

- [7] Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics [J]. Sex Transm Infect, 2002, 78(6): 413-415.
- [8] Sherrard J, Dongers G, White D, et al. European guideline for the management of vaginal discharge [J]. Int J STD AIDS, 2001, 12 Suppl 3: S73-77.
- [9] Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, et al. The normal vaginal flora,  $H_2O_2$ -producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women [J]. Clin Infect Dis, 1993, 16 Suppl 4(Suppl 4): S273-281.
- [10] Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. An adherent Gardnerella vaginalis biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole [J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 198(1): 97.e1-97.e6.
- [11] Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques [J]. BJOG, 2011, 118(5): 533-549.
- [12] Reid G, Bruce AW, Fraser N, et al. Oral probiotics can resolve urogenital infections [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2001, 30 (1): 49-52.
- [13] Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, et al. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women [J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2009, 22(1): 11-18.
- [14] Rajendran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond [J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 99-110.
- [15] Spear GT, Sikaroodi M, Zariffard MR, et al. Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV-infected and HIV-uninfected women with or without bacterial vaginosis [J]. J Infect Dis, 2008, 198(8): 1131-1140.
- [16] Myzik L, Romanowski B, Johnson SC. BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis [J]. Int J STD AIDS, 2005, 16(1): 52-55.
- [17] Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, et al. Evaluation of a point-of-care test, BVBlue, and clinical and laboratory criteria for diagnosis of bacterial vaginosis [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3): 1304-1308.
- [18] Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis [J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 169(2 Pt 2): 455-459.
- [19] Briselden AM, Moncla BJ, Stevens CE, et al. Sialidases(neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(3): 663-666.
- [20] McGregor JA, French JI, Jones W, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamycin cream [J]. Am J Obstet Gynecol, 1994, 170(4): 1048-1059.
- [21] Alexander CJ, Citron DM, Hunt Gerardo S, et al. Characterization of saccharolytic Bacteroides and Prevotella isolates from infected dog and cat bite wounds in humans [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35 (2): 406-411.
- [22] 罗招凡, 王惠英, 丁红, 等. 改良胺试验诊断细菌性阴道病的临床应用评价 [J]. 国际医药卫生导报, 2007, 13(3): 73-74.
- [23] West B, Morison L, Schim van der Loeff M, et al. Evaluation of a new rapid diagnostic kit (FemExam) for bacterial vaginosis in patients with vaginal discharge syndrome in The Gambia [J]. Sex Transm Dis, 2003, 30(6): 483-489.
- [24] Posner SF, Kerimova J, Aliyeva F, et al. Strategies for diagnosis of bacterial vaginosis in a resource-poor setting [J]. Int J STD AIDS, 2005, 16(1): 52-55.

(收稿日期: 2013-07-14)

## · 综述 ·

# 循环 DNA 在肺癌早期诊断中的研究进展

金萍<sup>1</sup>综述, 韩崇旭<sup>2△</sup>审校

(1. 扬州大学医学院; 2. 扬州大学临床医学院, 江苏扬州 225001)

**关键词:** 肺肿瘤; 早期诊断; 循环 DNA; 循环 RNA**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.043**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2013)23-3197-03

肺癌是目前世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,在人类癌症发病率和病死率排行中居首位。据统计,2008年,全世界约有160万人被确诊为肺癌,占所有肿瘤发生的13%,同时约有140万人死于肺癌,占所有肿瘤死亡人数的18%<sup>[1]</sup>。由于缺乏有效的肺癌早期检测手段,3/4的患者在确诊时已发生远处转移,造成当今世界范围内肺癌的低存活率。目前,肺癌患者的5年存活率仅约15%,若能在早期检测到肺癌病变,患者5年存活率可超过60%<sup>[2]</sup>。因此,需要发展新的经济有效的早期诊断方法,提高肺癌患者的生存率。

循环 DNA 主要是由单链或双链 DNA 以及单链与双链 DNA 的混合物组成的一种无细胞状态的胞外 DNA, 存在于血液(血清或血浆)、滑膜液等体液中, 主要以 DNA-蛋白质复合物的形式存在, 但也存在着部分游离的 DNA<sup>[3]</sup>。目前研究人员对循环 DNA 的检测主要分为定量和定性两种: 前者检测血

清或血浆中的 DNA 含量, 后者着重于血清或血浆中肿瘤特异性基因的改变。本文就上述两种检测方法在肺癌早期诊断中的研究进展综述如下。

### 1 循环 DNA 定量检测对肺癌早期诊断的意义

正常情况下, 衰老细胞死亡后释放的 DNA 是循环 DNA 的主要来源, 它的生成和清除处于低水平的动态平衡。机体的异常(如肿瘤的发生、感染性疾病、严重外伤等)将导致外周血循环 DNA 量的改变。有研究显示, 肿瘤患者循环 DNA 的含量是健康人的10倍以上<sup>[4]</sup>。所以, 有效的循环 DNA 定量检测对疾病的发生、发展有着重要的临床意义。目前, 实时定量 PCR 技术相对于传统方法有着高精确度、高灵敏性等优点, 已成为循环 DNA 定量的主流技术。Szpechcinski 等<sup>[5]</sup>报道用逆转录聚合酶链反应( RT-PCR )所研究的 30 例未经治疗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者和 16 例健康成人中, 健康成人的循环

DNA 范围为 0.9~7.0 ng/mL, 而 NSCLC 患者的范围为 1.5~50 ng/mL, 提示 NSCLC 导致患者循环 DNA 的增加。有人通过巧妙的设计, 构建人工质粒作为内参, 与目的基因一起经过样本的保存、核酸的提取纯化、再利用双重实时定量 PCR 进行扩增等一系列反应, 使之达到相同的扩增效率, 再通过内参的量计算出循环 DNA 的量<sup>[6]</sup>。王俊宏等<sup>[7]</sup>利用该定量方法对肺癌、肝癌患者及健康成人进行循环 DNA 检测, 研究表明, 肿瘤患者的量显著高于健康成人, 但是肺癌、肝癌患者循环 DNA 水平无明显差异, 说明循环 DNA 的定量对肺癌的诊断无特异性, 表明循环 DNA 定量作为一种肿瘤标记物, 可提示肿瘤的发生, 对肿瘤类型的鉴别诊断意义不大。另外有不少报道指出, 循环 DNA 的定量对于肺癌的分期、化疗后监测等方面有着重要的意义, 将为临床治疗提供依据。

## 2 循环 DNA 定性分析对肺癌早期诊断的价值

肺癌是一个多基因参与、多阶段发生的复杂病变过程。大量研究表明, 循环 DNA 与肿瘤组织 DNA 的基因改变具有高度一致性, 因此, 早期发现循环 DNA 的分子异常对于肿瘤的早期诊断有着重大意义。多年来, 国内、外学者试图通过对肺癌患者循环 DNA 的定性分析发现肺癌特异性肿瘤标记物, 其研究主要包括 3 个方面: 基因突变、甲基化异常、微卫星改变。

**2.1 基因突变** 目前, 与肺癌发生、发展相关的基因突变也是学者们研究的热点之一, 但国内、外对于从外周血中检测突变基因的报道较少。抑癌基因 *p53* 是肺癌最常见的突变基因之一。70% 以上的小细胞肺癌和 50% 以上的 NSCLC 均存在不同程度的 *p53* 突变<sup>[8]</sup>。李琪等<sup>[9]</sup>报道在 32 例 NSCLC 患者血标本中, *p53* 基因突变检出率 37.15%。但是, *p53* 基因突变作为一种肿瘤标记物, 也出现在其他肿瘤患者循环血中, 缺乏特异性。

表皮生长因子受体(EGFR)基因突变与肺癌关系重大, 何臣等<sup>[10]</sup>在 170 例 NSCLC 患者血浆标本中检出外周血 EGFR 基因突变 77 例, 突变率 45.3%。惠福海等<sup>[11]</sup>报道在研究的 23 例 NSCLC 患者肺癌组织和相应血浆中, EGFR 外显子 21 的突变率分别为 38.1% (8/21), 33.3% (7/21)。作为一种单基因诊断肺癌的标记物, EGFR 基因尚缺乏特异性, 且敏感度不高。由于 Kimura 等<sup>[12]</sup>国外学者报道肿瘤组织及外周血 EGFR 检测的一致性分别为 93% 和 94%, 而国内有学者也报告了极好的一致性, 近来人们着重于把 EGFR 基因突变与肺癌的临床治疗相结合, 取得了一定的成绩。

原癌基因 *K-ras* 又称 P21 蛋白, 其突变后的 Ras 蛋白不具有鸟苷三磷酸酶(GTPase)活性, 结合 GTP 后处于持续活化状态, 导致细胞持续增值。有研究表明, 在肺癌患者的外周血中, *K-ras* 突变的阳性率达 20%~24%<sup>[13]</sup>。值得注意的是, *K-ras* 突变主要存在于肺腺癌中, 肺鳞癌较为罕见, 腺鳞癌的突变率也仅为 3.8%<sup>[14]</sup>。所以, *K-ras* 突变对于肺腺癌的诊断治疗意义重大。

**2.2 甲基化异常** DNA 甲基化是指在甲基转移酶的催化作用下, DNA 中 C、G 两个核苷酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基基团, 形成 5-甲基胞嘧啶的化学修饰现象<sup>[15]</sup>。近年来已有大量循环 DNA 甲基化应用到肺癌早期诊断的报道。Usadel 等<sup>[16]</sup>在所研究的肺癌患者血清中发现结肠腺瘤性息肉病(APC)基因甲基化阳性检出率为 47%。Wang 等<sup>[17]</sup>在 80 例肺癌患者血清标本中发现 27 例 RAS 相关区域家族 1A (RASSF1A) 基因甲基化阳性, 检出率为 33.8%。

但是目前尚未发现只在肺癌中出现甲基化的特异性标志

物, 这些甲基化基因也在其他肿瘤中也频繁出现, 且单基因甲基化的检测敏感度和特异性较低, 因此, 人们不断探究多基因甲基化的联合检测来提高早期肺癌诊断的可行性。Tan 等<sup>[18]</sup>检测了 20 例肺癌患者血浆中 *RUNX3*、*p16*、*RASSF1A*、*CDH1* 基因甲基化, 阳性检出率分别为 55%、50%、30%、20%, 联合检测这 4 个基因得到肺癌阳性率为 90%。亢春彦等<sup>[19]</sup>报道在检测的 53 例肺癌患者血清中, *FHIT*、*p16*、*MGMT*、*RASSF1A* 这 4 个基因甲基化检出率分别为 35.8%、49.1%、35.8%、18.99%, 4 项指标联合检测肺癌的敏感度为 73.6%, 特异度为 95.8%。

**2.3 微卫星改变** 微卫星 DNA 异常改变, 包括微卫星不稳定性(MSI)和杂合性丢失(LOH)是在肿瘤发生早期, 由于基因复制错误造成简单重复序列的增加或丢失, 或者是同其连锁基因一同缺失的现象。大量研究显示, 微卫星 DNA 异常出现在肺癌发生早期, 且它的阳性检出率较高, 有望成为早期肺癌诊断的肿瘤基因指标之一。易斌等<sup>[20]</sup>发现血浆与组织中 DNA 的 MSI、LOH 检测一致性分别为 75%、86.7%, 联合 3 个位点进行微卫星改变的阳性检出率均在 70% 以上, 提高了诊断的敏感性, 提示循环 DNA 的微卫星改变可作为肺癌早期诊断的基因指标, 并有非常广阔的研究前景。Wang 等<sup>[21]</sup>对 69 例 NSCLC 患者血浆和组织中 *FHT1* 基因发生 LOH 检测发现, 其共同检出率为 74.10%, 说明血浆与 NSCLC 原发灶的 LOH 具有较高的一致性; 而实验中作为对照的 5 例正常健康人外周血中未检测到 LOH, 表明血浆 LOH 的检测具有较强的特异性。

## 3 循环 RNA

近几年来, 外周血 microRNA 成为全球肺癌早期诊断研究中的又一热点。microRNA 是一类长度约 22 nt 的内源性高度保守的小分子非编码 RNA, 几乎参与所有重要的生命过程, 与多种肿瘤密切相关。研究表明, 血清中 microRNA 可不受核糖核酸酶 A(RNaseA)作用而稳定存在<sup>[22]</sup>, 提示可以通过血清中一种或几种对肺癌有高特异性和高敏感性的 microRNA 检测来完成对肺癌患者的早期诊断。Buger 等<sup>[23]</sup>在对 152 例 NSCLC 患者和 75 例健康捐赠者血清的独立实验中提出 miR-25 和 miR-223 可作为 NSCLC 的诊断标识物。Sima 等<sup>[24]</sup>报道 miR-1254 和 miR-574-5P 作为肺癌早期诊断指标的敏感性和特异性分别达 82%、77%。Lebanony 等<sup>[25]</sup>报道 miR-205 在肺鳞癌诊断中有很高的敏感性和特异性。Uliivi 等<sup>[26]</sup>报道 miR-328 在 NSCLC 的诊断中灵敏度和特异性分别为 70%、83%, 作为潜在的生物标记物, miR-328 尤其适用于早期肿瘤的鉴别。国内、外类似报道还有很多, 但是利用 mi-RNA 进行肺癌诊断还存在许多问题, 如肺癌特异性 microRNA 的寻找; 肺癌不同分期特定性 microRNA 表达谱的确定; 作为肺癌诊断指标, microRNA 灵敏度和特异性的探究等。笔者相信, 随着分子技术的日益成熟, 对 microRNA 研究的不断深入, 这些问题会一一得到解决。在不久的将来, 它将对肺癌诊断、临床治疗、预后监测有着划时代的意义。

## 4 小结

综上所述, 检测循环 DNA 对于肺癌早期诊断有着广阔的前景, 但是目前的研究中, 尚未发现针对肺癌的肿瘤特异性基因指标。研究者从循环 DNA 的定量到定性, 从单基因的检测到多基因联合检测, 正不断完善循环 DNA 作为肺癌早期诊断指标的研究。笔者认为, 通过定量检测循环 DNA, 可以确定机体的异常, 提示肿瘤发生可能性增高, 再通过单基因检测, 或多

基因联合检测,或特异性较强的 microRNA 检测,提示肺癌发生概率的增高,便于早期防治,提高生存率。当然,对于肺癌特异性肿瘤基因的寻找仍是我们今后研究的重点。随着肿瘤分子生物学分子机制的不断研究和循环 DNA 检测方法的不断进步,有望早日将循环 DNA 的检测应用到临床,开创对肿瘤患者进行早期微创检测的新时代。

## 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Mulshine, James L, Sullivan, et al. Lung cancer screening[J]. N Engl J Med, 2005, 352(26):2714-2720.
- [3] 潘世扬,王俊宏.循环 DNA 的临床应用研究进展[J].齐鲁医学检验,2004,15(3):1-2.
- [4] Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(2):142-165.
- [5] Szpechcinski A, Dancewicz M, Kopinski P, et al. Real-time PCR quantification of plasma DNA in non-small cell lung cancer patients and healthy controls[J]. Eur J Med Res, 2009, 14 Suppl 4 (4):S237-240.
- [6] 蒋叶.中国人血浆 DNA 定量多中心合作研究进展报道[J].临床检验杂志,2008,26(3):240.
- [7] 王俊宏,潘世扬,黄珮琨,等.荧光定量聚合酶链反应检测肺癌患者血清循环 DNA 的临床应用[J].中华检验医学杂志,2003,26(12):791-792.
- [8] Lee JH, Hong YS, Ryu JS, et al. *p53* and FHIT mutations and microsatellite alterations in malignancy-associated pleural effusion[J]. Lung Cancer, 2004, 44(1):33-42.
- [9] 李琪,王以炳,陈建荣,等.非小细胞肺癌患者外周血细胞中 *p53* 基因突变的研究[J].临床肺科杂志,2009,14(3):337-339.
- [10] 何臣,刘明,周承志,等.非小细胞肺癌患者外周血表皮生长因子受体基因突变的检测及临床意义[J].中国呼吸与危重监护杂志,2011,10(3):273-277.
- [11] 惠福海,童向东,孙玉坤,等.23 例非小细胞肺癌患者肺癌组织和血浆中 EGFR 外显子 21 的基因突变检测[J].沈阳药科大学学报,2010,27(11):928-932.
- [12] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA)[J]. Br J Cancer, 2007, 97 (6):778-784.
- [13] Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, et al. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool[J]. Clin Chem, 2006, 52(10):1833-1842.
- [14] Sasaki H, Endo K, Yukie H, et al. Mutation of epidermal growth factor receptor gene in adenosquamous carcinoma of the lung[J]. Lung Cancer, 2007, 55(1):129-130.
- [15] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. Genes Dev, 2002, 16(1):6-21.
- [16] Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(2):371-375.
- [17] Wang Y, Yu Z, Wang T, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation of RASSF1A in serum DNA and its clinicopathological significance in lung cancer[J]. Lung Cancer, 2007, 56(2):289-294.
- [18] Tan SH, Ida H, Lau QC, et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3[J]. Oncol Rep, 2007, 18(5):1225-1230.
- [19] 亢春彦,周慧聪,肖红,等.血浆中检测 FHIT、*p16*、MGMT 和 RASSF1A 基因甲基化在肺癌诊断中的价值[J].肿瘤,2011,31(8):729-734.
- [20] 易斌,杨和平,阮志华.肺癌患者血浆游离 DNA 微卫星检测的意义[J].第三军医大学学报,2003,25(5):434-436.
- [21] Wang M, Xu CM, Huang L, et al. Loss of heterozygosity on FHIT gene in plasma of patients with non-small cell lung cancer[J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2010, 39(2):249-253.
- [22] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30):10513-10518.
- [23] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment[J]. Blood, 2006, 107(5):1761-1767.
- [24] Foss KM, Sima C, Ugolini D, et al. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(3):482-488.
- [25] Lebony D, Benjamin H, Gilad S, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(12):2030-2037.
- [26] Ulivi P, Foschi G, Mengozzi M, et al. Peripheral blood miR-328 expression as a potential biomarker for the early diagnosis of NSCLC[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(5):10332-10342.

(收稿日期:2013-09-16)

## • 综 述 •

# 免疫性病变与肠道菌群相关性研究进展

乔维洲 综述,孙福伯<sup>△</sup> 审校

(1. 大连市中心医院检验科,辽宁大连 116033;2. 大连医科大学医学影像学院,辽宁大连 116044)

关键词:肠道菌群; 过敏性疾病; 特应性皮炎; 益生菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3199-03

肠道是机体与外界环境接触最为密切的部位,是部分肠免疫细胞发育分化的微环境,肠上皮细胞不仅主宰人体的消化及

吸收,而且在机体免疫防御、免疫耐受中起了重要作用。肠道有大量的淋巴组织,肠道内壁是机体最大的免疫器官,肠淋巴