

• 论 著 •

Sanger 测序技术在检测肺癌吉西他滨化疗耐药敏感基因 CDA 中的应用

孙 怡¹, 张庆义², 魏宽霞³, 马将军^{4△}

(1. 中山大学附属孙逸仙纪念医院儿科, 广州 510120; 2. 吉林省白山市社会福利院内科 134300; 3. 吉林省白山市中心医院检验科 134300; 4. 中山大学肿瘤防治中心分子诊断科, 广州 510060)

摘要:目的 分析吉西他滨耐药敏感基因胞苷脱氨酶(CDA)多态性位点突变,以实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法为参照,探讨 Sanger 测序技术应用于临床样本检测的适用性。方法 随机选取 255 例ⅢB 和Ⅳ期晚期非小细胞肺癌(NSCLC)外周血样本,提取 DNA,分别采用 qPCR 法和 Sanger 测序法检测 CDA 基因 G208A 和 A79C 突变情况,评价 Sanger 测序法检测的敏感度和特异度。结果 255 例ⅢB 和Ⅳ期晚期 NSCLC 外周血样本 Sanger 测序法和 qPCR 法检测 CDA 基因突变的成功率分别为 98.04%(250/255)和 97.25%(248/255)。以 qPCR 法为参照,Sanger 测序法检测的敏感度和特异度分别为 92.50% 和 99.52%,两种方法检测出的突变分型完全吻合。结论 采用 Sanger 测序法可有效检测耐药基因 CDA 突变,实现了突变分型,可准确、高通量、高效检测 CDA 突变位点,为临床 NSCLC 对吉西他滨用药敏感提供一种有效检测手段。

关键词:吉西他滨; 胞苷脱氨酶; Sanger 测序

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0355-03

Application of Sanger sequencing technology in detection of gemcitabine resistance sensitive gene CDASUN Yi¹, ZHANG Qingyi², WEI Kuanxia³, MA Jiangjun^{4△}

(1. Department of Pediatrics, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Internal Medicine, Baishan Municipal Social Welfare Institute, Baishan, Jilin 134300, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Baishan Municipal Central Hospital, Baishan, Jilin 134300, China; 4. Department of Molecular Diagnosis, Tumor Prevention and Treatment Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510060, China)

Abstract: Objective To analyze the polymorphic site mutation of gemcitabine resistant sensitive gene cytidine deaminase (CDA), and to investigate the applicability of the Sanger detection technology in clinical sample detection with the real-time fluorescence quantitative PCR as the reference. **Methods** The peripheral blood samples from 255 cases of stage ⅢB to Ⅳ non small-cell lung cancer(NSCLC) were randomly selected for extracting DNA. The G208A and A79C mutation situation of CDA gene was respectively detected by qPCR and Sanger sequencing technology. **Results** The success rate for detecting the CDA gene mutation in peripheral blood sample in 255 cases of stage ⅢB and Ⅳ NSCLC were 98.04%(250/255) by the Sanger sequencing method and 97.25% (248/255) by qPCR. With the qPCR as the reference, the sensitivity and specificity of Sanger sequencing method was 92.50% and 99.52% respectively. All mutation types detected by two methods were fully consistent. **Conclusion** Adopting the Sanger sequencing method can effectively detect drug resistance gene CDA mutation, realizes the mutation typing, can accurately, high throughput and efficiently detect CDA mutation site, which provides an effective detection method for gemcitabine sensitive medication of NSCLC.

Key words: gemcitabine; cytidine deaminase; Sanger sequencing

非小细胞肺癌(NSCLC)是全球发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一,吉西他滨作为治疗晚期 NSCLC 标准一线化疗药物被广泛应用^[1-2]。目前,在吉西他滨不良反应的遗传药理学研究中,胞苷脱氨酶(CDA)发挥的作用尤为重要,但临幊上并没有建立对 CDA 基因多态性进行检测的实验方法,也无相关的临床检测报道。本研究分别采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法、Sanger 测序法对 255 例确诊为 NSCLC 患者外周血样本的 CDA 不同突变类型进行检测,以 qPCR 法为参照,分析 Sanger 法检测的敏感度和特异度,旨在探讨 Sanger 测序法应用于肺癌 CDA 检测的临床适用性,建立一种可靠的 CDA 基因突变及区分不同突变类型的检测技术,从而指导临幊合理用药,使患者能够更好地接受靶向药物治疗,实现肺癌个体化的临幊治疗。

1 资料与方法**1.1 一般资料** 收集 2013 年 3 月至 2015 年 11 月在吉林省

白山市第一人民医院进行化疗的不可手术切除的ⅢB 和Ⅳ期晚期 NSCLC 病例 255 例,其中男性 174 例、女性 81 例,年龄 29~71 岁,平均年龄 (54.35±1.73) 岁,所有病例均经病理学/细胞学确诊为 NSCLC 患者,所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪及电泳仪为美国 Bio-Rad 公司生产,ABI-7500 实时荧光定量 PCR 系统购自美国应用生物系统公司,台式高速离心机及多功能漩涡振荡器购自 Eppendorf 公司,微量移液枪购自 Gilson 公司。外周血样本 DNA 提取试剂盒购于德国 QIAGEN 公司,PCR 扩增试剂及 DNA 胶回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的制备 对不同组织病理学类型(腺癌和鳞癌)、临幊分期(ⅢB 和Ⅳ)的患者在化疗前无菌取外周血 3 mL,肝素抗凝,经平衡盐溶液-Hank's 液与全血等体积稀释后,用人淋巴细胞分离液 Ficoll 进行密度梯度离心,从而获得

外周血单个核细胞。接下来,严格按照DNA提取试剂盒说明书提取基因组DNA,并经分光光度仪检测DNA浓度及纯度后,再用去离子水将样品稀释至5 ng/μL,保存于4℃冰箱,备用。

1.3.2 实时荧光定量PCR法检测CDA基因G208A和A79C突变 G208A突变基因扩增引物上游序列:5'-CTA ATC TGC CTG TTG TGC T-3';下游引物序列:5'-GAA AGC CAG GTT GCA ACA AT-3'。A79C突变基因扩增引物上游序列:5'-TGT TTC CCG CTG CTC TGC T-3';下游引物序列:5'-GAC TGG GAT GAG GAA GGA AG-3'。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物上游序列:5'- GTG GTG AAT ACC ATG TAC AAA G-3';下游引物序列:5'- CAA CAC CCC CAG TCA TAC G-3'。G208A突变基因扩增的探针为羟基荧光素(FAM)荧光标记,其序列为:5'-GCT GGG CAT CTG TGC TGA ACG-3'。A79C突变基因扩增的探针为FAM荧光标记,其序列为:5'-TCA GCC TAC TGC CCC TAC AGT-3'。GAPDH探针为绿色荧光蛋白(VIC)荧光标记,其序列为:5'-AGT GCC CCA CAT GGC CGC TTC-3'。由宝生物工程(大连)有限公司(TAKARA)合成的G208A与A79C突变基因质粒作为阳性对照品,健康者外周血单个核细胞提取的DNA作为阴性对照品。PCR扩增反应体系总体系为25 μL,含2×PCR缓冲液12.5 μL,氯化镁(MgCl₂)2 μL,G208A(或A79C)突变基因扩增上游和下游引物各1.0 μL,G208A(或A79C)突变基因荧光探针0.25 μL,Taq酶2 μL,模板DNA2 μL。PCR反应条件:将反应体系置ABI-7500扩增仪中,95℃预变性,95℃15 s,62℃20 s,10个循环,95℃15 s,58℃35 s,40个循环,在58℃采集FAM、VIC荧光通道的信号。

1.3.3 Sanger测序法检测CDA基因G208A和A79C突变 G208A和A79C突变基因扩增的引物序列同qPCR法,PCR反应体系25 μL,模板10 ng、引物各2 pmol、2×PCR混合液10 U。反应条件:95℃预变性;95℃30 s,58℃30 s,72℃1 min,35个循环;72℃延伸5 min,扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,并由胶回收试剂盒(天根生物科技有限公司)纯化所扩增的产物。

1.3.4 测序 将PCR扩增产物纯化后,交由深圳华大基因公司进行检测。对检测后获得的结果,应用Chromas软件分析测序峰图同时进行序列比对,判断是否存在CDA基因突变及其具体的突变类型。

1.4 统计学处理 以qPCR法为标准对照,采用Cohen Kappa检验,对qPCR及Sanger测序两种检测方法的结果进行一致性分析,并计算出准确率、敏感度、特异度、Kappa值等指标及其95%可信区间。所有的检验均为采用双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。所有数据均采用SPSS17.0软件进行统计学分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CDA基因突变分析 在255例患者晚期非小细胞肺癌样本中,Sanger测序法成功检测出248例患者基因发生突变,qPCR法成功检测出250例患者基因发生突变,两种试验方法的检测成功率分别为97.25%和98.04%。Sanger测序法有7例患者检测失败,其中4例患者由于PCR扩增产物电泳无条带,无法回收DNA而终止测序,3例患者由于测序峰图无法判读而检测失败;qPCR法检测失败的5例患者,均为无扩增信号。

2.2 qPCR法检测结果 208例为CDA基因野生型,40例为CDA基因突变型,其中26例为G208A基因突变型,14例为A79C基因突变型见图1。

2.3 Sanger测序法检测结果 210例为CDA基因野生型,38例为CDA基因突变型,其中24例为G208A基因突变型,14例为A79C基因突变型电泳结果见图2,测序结果见图3~6(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

2.4 Sanger测序法与qPCR法比较 对两种试验方法各自检测成功的248例患者结果进行分析,Sanger测序法与qPCR法的检测结果基本一致,见表1。两种试验方法各自检出207例患者为CDA基因野生型,各自检出37例患者为CDA基因突变型,3例患者Sanger测序阴性但qPCR法检测为阳性,1例患者Sanger测序阳性但qPCR法检测为阴性。与qPCR法相比,Sanger法检测结果的符合率为98.39%(95%CI为0.9682~0.9996),敏感度为92.50%(95%CI为0.8922~0.9578),特异度为99.52%(95%CI为0.9865~1.0038),阳性预测值为97.37%(95%CI为0.9537~0.9936),阴性预测值为99.52%(95%CI为0.9865~1.0038),Kappa值为0.939(0.873~0.986),差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表1 两种检测方法检测CDA突变的结果(n)

检测方法	G208A 突变	A79C 突变	CDA 突变	CDA 野生
qPCR法	26	14	40	208
Sanger测序法	24	14	38	210

表2 两种检测方法检测结果的对比分析(n)

Sanger测序法	n	qPCR法	
		阳性	阴性
阳性	38	37	1
阴性	210	3	207
合计	248	40	208

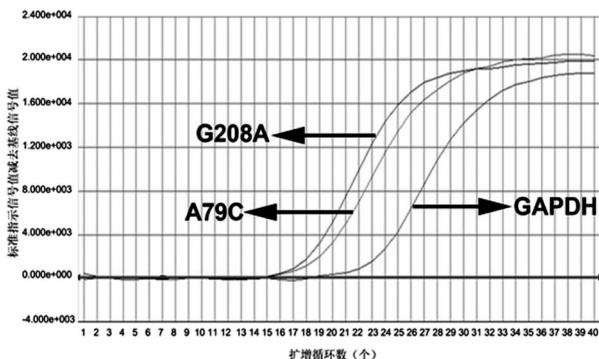


图1 G208A与A79C突变基因qPCR扩增曲线图

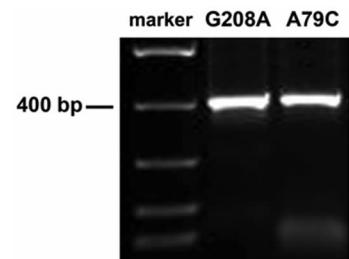


图2 G208A与A79C突变基因PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

3 讨 论

吉西他滨已在临幊上广泛用于NSCLC患者的治疗,CDA基因突变对吉西他滨药物疗效的预测作用已被广泛认识。目

前,研究已发现 CDA 基因编码区域有 3 个多态性位点,分别是 A79C(rs2072671)、G208A(rs60369023)和 C435T(rs1048977)。其中,多态性位点 G208A 仅仅存在于亚洲人群中,该位点发生突变后,可降低 CDA 酶活性,改变癌症患者的药代动力学,导致患者使用吉西他滨时,其清除减少而体内药物暴露增多,尤其在联合使用铂类药物时,患者机体极易发生中性粒细胞减少^[3]。此外,多态性位点 A79C 也可使癌症患者 CDA 酶的活性降低。有研究证实,在非小细胞肺癌患者中,A79C 位点发生突变能降低用药后的患者对药物的敏感度,降低患者总体生存率^[4-5]。而携带多态性位点 C435T 突变型基因的癌症患者,虽然总体生存率比较低,但并未在相关研究中发现 CDA 酶活性与此突变位点间存在作用关系^[6]。

虽然有关 CDA 基因突变位点的检测方法有多种,并且各有优劣,但临幊上并没有明确的检测标准,也没有相关的临幊检测报道。因此,建立一种可靠的 CDA 基因突变位点的检测技术,将有助于遴选出适合接受吉西他滨化疗的患者,使患者能够更好地接受靶向药物治疗,从而实现 NSCLC 的个体化治疗。在本研究中,虽然 qPCR 法敏感度高,重复性好,但实验成本高,荧光素种类及检验光源的局限性,限制了它的应用能力;内源控制物的选择也是实验结果可靠与否的关键;扩增产物及实验室环境的污染也会导致结果的不确定性。Sanger 测序法被认为是最基本、最直接的检测方法,它既能检测出已知的突变,又能检测出未知的突变,虽然其检测的敏感度不如 qPCR 法,但其操作简便、准确性高、通量高且费用低,使其更具有临幊应用价值。

尽管不同的试验检测方法优势各不相同,但是目前测序法仍是普遍公认的一种可靠的检测突变标准方法。本试验比较了 qPCR 法和 Sanger 测序法两种方法对基因突变检测的敏感度、特异度等指标,探讨 Sanger 测序法是否适用于临幊检测晚期非小细胞肺癌患者 CDA 基因突变。结果显示,这两种试验方法检测出结果的符合率为 98.39%,敏感度为 92.50%,特异度为 99.52%,一致性检验 Kappa 值为 0.939,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示两种检测方法的一致性较好;两种试验方法共同检测出的所有样本突变类型完全吻合,确定了 Sanger 测序法检测的准确性。

对 4 例 Sanger 测序法和 qPCR 法检测结果不一致的样本进行分析后发现,3 例患者 Sanger 测序法阴性,而 qPCR 法检测为阳性,其原因可能是 qPCR 法检测敏感度较 Sanger 测序法高,而使该 3 例患者突变未被 Sanger 测序法检出,但也不能排除 qPCR 法检测结果为假阳性的可能性;1 例患者 qPCR 法检测为阴性,而 Sanger 测序法检测为阳性,其原因可能是 qPCR 法检测结果为假阴性,但也不排除 Sanger 测序法在检测过程中出现交叉污染而致假阳性的可能性。此外,由于体细胞

(上接第 354 页)

- [J]. 国际检验医学杂志,2013,34(21):2875-2875.
- [4] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2004:621.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查规范[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2010.
- [6] 华静,李明,陶小梅,等. 175 例儿童地中海贫血基因诊断分析[J]. 国际医药卫生导报,2005,22(2):121-123.
- [7] 边旭明. 实用产前诊断学[M]. 北京:人民军医出版社,2008:419.

突变肿瘤组织的异质性,导致不同患者 CDA 基因突变型 DNA 水平存在不同,这也可能是造成这两种不同检测方法敏感度差异的主要原因。

综上所述,Sanger 测序法的敏感度和特异度与 qPCR 法相比,分别为 92.50% 和 99.52%,并且 Sanger 测序法根据其测序峰图可对基因突变型别进行直观的判定,操作也相对简便易行,能同时检测多个位点,可应用于晚期非小细胞肺癌患者的临幊分子诊断,从而指导和监控临幊吉西他滨耐药的治疗,可促进合理用药,实现个体化治疗,减轻患者社会与家庭经济负担。

参考文献

- [1] Azzoli CG, Baker S Jr, Temin S, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(36):6251-6266.
- [2] Yue L, Saikawa Y, Ota K, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity[J]. Pharmacogenetics, 2003, 13(1):29-38.
- [3] Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients; the impact of a cytidine deaminase polymorphism[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(1):32-42.
- [4] Gilbert J, Salava O, Yuan J, et al. Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6):1794-1803.
- [5] Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(6):1797-1803.
- [6] Soo R, Wang L. Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2009, 63(1):121-127.

(收稿日期:2016-08-04 修回日期:2016-10-24)



- [8] 康熙雄. 临床电泳[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:296-297.
- [9] 陈鸣鸣. 新生儿出生缺陷影响因素及近五年变化趋势分析[D]. 长春:吉林大学,2007.
- [10] 罗家有. 我国出生缺陷干预的现状与发展趋势[J]. 实用预防医学,2005,12(2):458-460.
- [11] 黄丽华. 广西柳州地区新生儿 α-地中海贫血筛查分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,32(10):70.

(收稿日期:2016-09-04 修回日期:2016-10-24)