

肿瘤诊断的新希望—循环游离 DNA 检测

黎四维 韩露 马培 周新

作者单位:430071 武汉市,武汉大学中南医院基因诊断中心

通讯作者:周新, E-mail:zhouxjyk@163.com

【摘要】 游离 DNA 是指游离于细胞之外的一类 DNA, 又称为循环核酸, 1947 年由 Mandel 和 Métais 发现。肿瘤患者外周血 DNA 水平高于正常人, 且血液中游离 DNA 具有肿瘤细胞 DNA 的特征。随着肿瘤分子生物学的深入研究, 血液中游离 DNA 定量分析已开始应用于肿瘤的早期诊断、个体化治疗和预后判断等。本文从游离 DNA 的来源、特点、提取、检测及临床应用方面对游离 DNA 及其在肿瘤中的重要作用做一综述。

【关键词】 游离 DNA; 基因检测; 肿瘤

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.02.014

游离 DNA 是一种游离于血液或体液中的 DNA。1947 年, Mandel 和 Métais^[1]首次报道了外周血中存在游离 DNA, 但这一发现并没引起足够的重视。在随后 30 多年的时间中, 人们先后在自身免疫性疾病和肿瘤中发现了游离 DNA 的存在。1994 年, Vasioukhin^[2]和 Sorenson^[3]等在急性髓性淋巴瘤、骨髓增生异常综合征和胰腺癌患者外周血游离 DNA 中发现了 RAS 基因的突变, 这一发现才引起人们足够的重视。1996 年, Nawroz 等^[4]又在肿瘤患者血浆游离 DNA 中发现了微卫星改变。随着新的研究结果的不断出现, 医学界对于肿瘤患者游离 DNA 的关注越来越多。

检测血浆或血清中游离 DNA 可视为一种“液体活检”, 有益于开展各种相关诊断, 并能避免对肿瘤组织活检的需要。以血液为检测标本, 使重复采集检测样本成为了可能, 从而有利于对疾病的发展及肿瘤的治疗过程进行跟踪监测。虽然游离 DNA 同时反映了生理和病理过程, 并非肿瘤特异性, 但自从发现血液游离 DNA 含有肿瘤细胞 DNA 相同基因突变后, 其在肿瘤的早期诊断、预后评估、疗效监测等方面的潜在价值越来越受到关注。本文就游离 DNA 的来源、生物学特性、检测方法及其在肿瘤诊断中的临床应用做一综述。

1 游离 DNA 的来源及其特点

在健康人体内, 血浆中可以发现少量的游离 DNA, 片段主要在 185~200 bp 或其整数倍。健康人血浆中的游离 DNA 主要来源于凋亡细胞。除此之外, 所有的活细胞都自发性的向血液中释放 DNA 片段, 这些 DNA 片段又称为代谢性 DNA 片段。对于肿瘤患者外周血中游离 DNA 的来源, 人们提出了几种假设。肿瘤微环境中癌细胞凋亡和坏死后释放是其主

来源。肿瘤细胞主动分泌可能是其另一个潜在的来源。坏死和凋亡细胞主要被巨噬细胞或其他清道夫细胞吞噬。巨噬细胞吞噬坏死细胞后可以释放消化的 DNA 到组织环境。体外的细胞培养实验^[5]结果表明, 巨噬细胞在释放 DNA 的过程中可被激活或死亡, 但细胞核酸的片段仍可以释放到外周血中。血液中循环的肿瘤细胞以及转移到骨髓或肝脏等处的肿瘤细胞也可以释放出游离 DNA, 其大小主要分布在 70~200 bp, 大的片段则可达到 10 000 bp 以上。

血浆中肿瘤细胞释放出游离 DNA 的多少, 取决于肿瘤的性质、大小等。此外, 血液中游离 DNA 的含量也受到血液及淋巴循环对其清除、降解等的影响。血液中的游离 DNA 由肝脏和肾脏清除, 其半衰期从 15 min 到几个小时不等。有研究^[6]显示, 某些形式的 DNA 较其他形式的半衰期更长。把纯化的 DNA 注入小鼠血液中, 结果显示双链 DNA 较单链 DNA 在血液中存在的时间更长, 环状的病毒 DNA 较线性 DNA 存活时间更长。然而, 不论片段大小及形态, 游离 DNA 都能被快速有效的从血液中清除。

2 游离 DNA 的提取及其检测方法

不同的实验室提取游离 DNA 的方法各有不同, 也有许多商品化的试剂盒可供使用, 但目前并没有公认的标准提取方法和纯化步骤。许多试剂盒也没有对样本的分离、处理、分析进行明确的说明。目前, 主要的提取方法有离子交换树脂法、盐析法和磁珠分离法等。

目前, 对于采用血浆还是血清作为游离 DNA 提取的最佳样本仍然存在争议。由于不同实验室采用不同的试剂和提取方法, 因而无法对各实验室间的提取结果进行比较。从血

浆中分离得到游离 DNA 较血清中少, 这可能是因为凝血可以促使白细胞释放游离 DNA。这种由白细胞释放的 DNA 对游离 DNA 的定量或突变等的检测均有影响。

游离 DNA 的定量检测目前尚无统一的操作标准, 不同实验室间的检测方法也很难达到一致。各种分析前因素, 如血液的处理延迟、凝固、冻融、储存温度、患者的基本情况等均会对游离 DNA 的含量及完整性有很大的影响。长时间的储存, 也会影响游离 DNA 的含量, Sozzi 等^[7]的实验结果显示, 血浆或 DNA 储存在 -80℃ 一年后, 其 DNA 含量可下降约 30%。但无论采用何种方法, 如荧光为基础的方法 (如 PicoGreen 染色和紫外光谱法) 或定量 PCR 法 (如 SYBR Green 和 TaqMan 探针), 均可检测到肿瘤患者游离 DNA 较正常对照者升高^[8]。

游离 DNA 的定性检测按研究对象和目的不同可采用不同的方法, 主要有单链构象多态性分析聚合酶链反应法、限制性片段长度多态性聚合酶链反应法、测序分析和特异性引物延伸法, 上述方法主要用于游离 DNA 未知突变的筛查、基因的遗传多态性分析、分析有无对应的已知突变等。如果采用游离 DNA 作为肿瘤诊断、预后评估及疗效监测的生物标志物, 进行更多大样本、多中心的临床研究并建立标准化的检测方法是很有必要的。

3 游离 DNA 的临床应用

3.1 游离 DNA 突变检测 检测游离 DNA 中肿瘤特异性的基因突变具有较好的临床价值, 如 KRAS 和 TP53 等这些在多种类型肿瘤中具有高突变频率的基因, 其检测对肿瘤的早期诊断具有重要的临床意义。最近的一项研究^[9]通过大规模的芯片筛查显示, PIK3CA、TP53 和 GATA3 三个基因突变占到全部乳腺癌基因突变的 10% 以上, 其中 Luminal A 型乳腺癌最常见的突变为 PIK3CA 基因 (45%), 其次是 MAP3K1, GATA3、TP53、CDH1 和 MAP2K4。Luminal B 型乳腺癌中 TP53 和 PIK3CA 基因突变均占总突变的 29%; HER2E 亚型乳腺癌中 HER2 基因扩增达 80%, 此外 TP53 和 PIK3CA 的突变分别为 72% 和 39%; basal-like 型乳腺癌中 TP53 突变则达到 80% 以上。

针对游离 DNA 突变的检测, 需要突变位点在肿瘤具有以下特点: 发生频率高并具有肿瘤特异性。但是, 突变往往发生频率较低。此外, 还应考虑到正常细胞所释放的 DNA 造成的干扰。通过血液游离 DNA 相对高发的基因突变的检测, 可以对相应疾病进行预警, 并有利于进一步对疾病进行分型。

3.2 肿瘤特异性的微卫星改变 游离 DNA 中发现的基因改变包括以 PCR 检测为基础的杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH)。由于 LOH 只在肿瘤患者中出现, 健康人体内不存在, 因此其检测对肿瘤的诊断具有重要的临床意义。针对血清或血浆的游离 DNA 的 LOH 检测方法均有报道, 但结果之

间存在很大的差异。这种差异一部分来自于游离 DNA 与肿瘤组织间的差异, 主要是游离 DNA 中 LOH 发生率较低, 另一部分则是方法本身的原因, 包括技术原因和背景 DNA (由正常细胞释放的 DNA) 对肿瘤 DNA 的稀释作用。此外, 在炎症或组织修复过程中, 良性细胞的异常增殖导致细胞凋亡增加, 血液中小片段的 DNA 增加, 也影响 LOH 的检测^[10]。

Schwarzenbach 等^[11]报道在 388 例乳腺癌患者的术前血浆标本中, 检测了 8 个微卫星位点, 其中对短片段游离 DNA 的 LOH 检出率为 38%, 而长片段检出率为 28%, 二者与肿瘤组织的一致性均为 32.85%。这些 LOH 改变与肿瘤分期、大小、淋巴结转移、孕激素受体阳性及 HER2 受体具有相关性。此外, 携带有 D12S1725 位点 (与细胞周期蛋白 D2 相关) LOH 的患者总生存期较不携带患者更短。同样, Shaw 等^[12]也报道, 尽管 LOH 在血浆与配对组织中的检出率在不同患者差异很大, 但 LOH 与患者淋巴结转移及生存期间存在显著相关。

目前 LOH 检测存在的主要问题是检出率较低, 且与组织标本的符合率差异性较大。从技术上对其进行改进有利于其在肿瘤诊断中的应用。此外, 多个 LOH 位点进行联合检测也可提高肿瘤检出率及检测效率。

3.3 表观遗传学改变 表观遗传学是指在不改变 DNA 序列的前提下, 通过某些机制引起可遗传的基因表达或细胞表现型的变化。表观遗传学的改变在肿瘤的发生、发展过程中起到了重要的作用。通过评估游离 DNA 甲基化的水平来预测肿瘤的患病风险已成为一个重要的研究内容。

为了提高分析的效能, 从众多已知的甲基化的基因中筛选出肿瘤相关基因至关重要。此外, 表观遗传学改变与肿瘤并不是一一对应的, 有些特定的肿瘤抑制基因, 经常在某些肿瘤中甲基化并且表达下调。Chimonidou 等^[13]用甲基化特异性 PCR 法检测了 123 例乳腺癌患者 CST6 基因启动子甲基化情况, 结果显示 49 例 (39.8%) 乳腺癌患者游离 DNA 高甲基化, 而健康个体均低甲基化。随后, 该团队还检测了 SOX17 基因启动子在原发性乳腺癌患者中的甲基化情况, 发现 55 例早期乳腺癌患者中有 19 例高甲基化, 59 例转移性乳腺癌患者中有 24 例高甲基化, 23 例健康人中有 1 例甲基化^[14]。同时, 他们还检测了循环肿瘤细胞中甲基化的情况, 结果表明循环肿瘤细胞甲基化的情况与游离 DNA 之间存在相关性, 从而也间接证明了游离 DNA 的来源。

3.4 游离 DNA 完整性检测 近年来, 游离 DNA 的完整性检测逐渐成为研究的热点。研究最多的是 ALU 和 LINE1 序列, 他们最初被称为 “junk DNA”。近来的研究^[15]表明, 他们在 DNA 修复、转录、表观遗传学和转座子等生理过程中可能起到了重要的作用。完整性检测主要是基于肿瘤坏死过程所释放的 DNA 片段一般较长, 也就是 DNA 完整性较好, 片段主要是 200~400 bp 大小之间, 而正常人群游离 DNA 以凋亡为

主,其 DNA 完整性较差。另一方面,由于 ALU 和 LINE1 序列分布在基因组的所有染色体上,因此在检测时具有较高的灵敏度,但同时也相应地降低了对肿瘤检测的特异性。研究^[16]表明,采用 PCR 技术检测血浆游离 DNA 的完整性可作为预测早期乳腺癌的发展及微转移(直径 ≤ 1 mm 的微小转移灶,通常须经病理组织学检查方能诊断)的一项重要指标。此外,游离 DNA 的完整性分析也被用于膀胱癌、大肠癌、肝癌、胰腺癌和卵巢癌等肿瘤的诊断中。

目前,对于游离 DNA 完整性的研究仍然较少,其是否可以作为多种肿瘤诊断的一个通用的生物学标志物在临床应用仍有待进一步深入研究。

3.5 病毒 DNA 检测 有些肿瘤中可发现病毒的游离 DNA。例如,EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV),分别是鼻咽癌、肝癌、子宫颈癌的发病原因之一。

这些特定的病毒 DNA 可以用来作为肿瘤诊断的分子标志物。已报道的游离 DNA 与肿瘤间存在相关性的有:EBV 与霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和鼻咽癌相关;HBV 与某些类型的肝细胞癌相关;HPV 与子宫颈癌相关等。多个大样本的研究^[17,18]已证明,EBV 游离 DNA 在鼻咽癌的诊断和预后判断中具有重要的临床价值。检测 EBV 的游离 DNA 作为评估鼻咽癌恶性程度的一项指标已在鼻咽癌的高发区

广泛开展。病毒游离 DNA 检测的一个主要局限性是良性的病毒感染患者游离病毒 DNA 水平也可升高,这对于临床的诊断筛查具有一定的干扰。因此建立具有临床诊断意义的 cut-off 值是很有必要的。

4 展望

检测技术的改进使得我们可以对游离 DNA 进行分析。通过分析肿瘤患者和健康个体游离 DNA 的差异,为非侵入性肿瘤诊断方法提供了一种新的可能性。同时,我们应该认识到,目前大量的病例对照研究显示结果存在较大差异,因此将这一技术成功应用于临床仍需做更大量的研究及验证。特别是对于程序的标准化及标准的控制需要作出努力,从而为实验室成果转化为临床应用做好准备。

5 参考文献

- Mandel P, M'etais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. Acad Sci Paris, 1948, 142: 241-243.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. Br J Haematol, 1994, 86: 774-779.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994, 3: 67-71.

- Nawroz H, Koch W, Anker P, et al. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. Nat Med, 1996, 2: 1035-1037.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. Clin Chem, 2010, 56: 1279-1286.
- Bendich a, Wilczok t, Borenfreund e. Circulating dna as a possible factor in oncogenesis. Science, 1965, 148: 374-376.
- Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. J Natl Cancer Inst, 2005, 97: 1848-1850.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. Cancer, 1983, 51: 2116-2120.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2012, 490: 61-70.
- Schwarzenbach H, Pantel K, Kemper B, et al. Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer. Breast Cancer Res, 2009, 11: R71.
- Schwarzenbach H, Eichelsner C, Kropidlowski J, et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. Clin Cancer Res, 2012, 18: 5719-5730.
- Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. Genome Res, 2012, 22: 220-231.
- Chimonidou M, Tzitzira A, Strati A, et al. CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. Clin Biochem, 2013, 46: 235-240.
- Chimonidou M, Strati A, Malamos N, et al. SOX17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. Clin Chem, 2013, 59: 270-279.
- Oler AJ, Traina-Dorge S, Derbes RS, et al. Alu expression in human cell lines and their retrotranspositional potential. Mobile DNA, 2012, 3: 11.
- Lehner J, Stotzer OJ, Fersching DM, et al. Plasma DNA integrity indicates response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally confined breast cancer. Int J Clin Pharmacol Ther, 2013, 51: 59-62.
- Chan KC, Hung EC, Woo JK, et al. Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA analysis in a surveillance program. Cancer, 2013, 119: 1838-1844.
- Wang WY, Twu CW, Chen HH, et al. Long -

效应分子)表达。然而,IL-27 在肝癌中可能起到促进肿瘤生长的作用。有研究^[6]发现,IL-27 在肝癌患者血清中的水平显著高于对照组,这也是国内首次报道 IL-27 在肝癌早期诊断中的临床意义。

本文研究对 100 例原发性肝癌患者的 6 种常见的细胞因子进行检测,结果显示,52 例肝转移组患者中只有 IL-17 和 IL-27 水平均显著高于 48 例无转移组患者,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。说明 IL-17 和 IL-27 均参与了肝癌的发生发展及癌细胞的转移,起到了促进肿瘤发展的作用。肝转移组患者的 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平也均高于无转移组患者,但差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。说明上述细胞因子虽然也对肝癌的发生发展起到促进作用,但在肝癌转移后升高幅度不大,因此不能作为肝癌早期转移的检测指标。

对肝转移患者中 6 种细胞因子的相关性分析结果显示,只有 IL-1 β 与 IL-17 呈正相关,其余细胞因子间均无相关性。IL-1 β 为促炎型细胞因子,与 IL-17 共同作用起到促进肝癌细胞生长的作用。IL-27 虽然也起到了促进肝癌细胞生长的作用,但与其他细胞因子均无相关性,说明 IL-27 在促进肝癌发生发展的过程中独立发挥作用。

采用 ROC 曲线评价 IL-17 和 IL-27 对肝癌转移的诊断效能,结果显示,IL-17 的 $AUC^{ROC}=0.664$, IL-27 的 $AUC^{ROC}=0.818$, 最佳诊断 cutoff 值分别为 2.005 pg/mL 和 238.95 pg/mL,敏感性分别为 83.3% 和 98.5%,特异性分别为 35.7% 和 64.3%,PPV 分别为 58.1% 和 62.1%,NPV 分别为 43.4% 和 44.4%,约登指数分别为 35.7 和 62.8。IL-27 的 AUC^{ROC} 及其他临床诊断性能评价指标水平均高于 IL-17,说明虽然 IL-17 和 IL-27 都可作为评价肝癌是否出现转移的指标,但 IL-27 的预测效果应更好。

综上,IL-17 和 IL-27 均为促进肝癌细胞生长的细胞因子,可作为预测肝癌转移及预后的有效指标。其中 IL-27 对检测肝癌细胞转移的灵敏度、特异性均高于 IL-17,可作为肝癌转移早期诊断及治疗的监测指标。

4 参考文献

1 孙义长. 调节性 T 细胞和 Th17 细胞在肝癌中的研究进展. 医学信

息, 2012, 25: 608-610.

2 李宝华, 何蓓晖, 潘高辉. 白细胞介素 17 在原发性肝癌中的表达及意义. 中国卫生检验杂志, 2012, 11: 2405-2409.

3 党倩丽, 陈超, 杜篷, 等. 人乳头瘤病毒基因分型液态芯片的构建. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24: 461-464.

4 侍阳, 宋庆伟, 于生才, 等. 肝癌模型大鼠肝硬化期 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平变化及作用机制. 中国老年学杂志, 2013, 33: 5663-5665.

5 张志强, 贺杰峰, 张瑜, 等. 大鼠实验性肺癌组织中 Treg 细胞与 TGF- β 1、IL-10 水平的相关性分析. 中华普通外科杂志, 2014, 29: 382-384.

6 范莎莎, 李爱民, 李荣, 等. IL-17 在肺癌患者血清中表达增高对肺癌诊断的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 2014, 37: 19-23.

7 范莎莎, 李荣, 陈逢生, 等. IL-27 在肺癌患者血清中表达增高对肺癌诊断的研究. 中国医师杂志, 2014, 16: 904-906.

8 Koel-Simmelink MJ, Vennegoor A, Killestein J, et al. The impact of pre-analytical variables on the stability of neurofilament proteins in CSF, determined by a novel validated SinglePlex Luminex assay and ELISA. J Immunol Methods, 2014, 402: 43-49.

9 McDonald LT, Russell DL, Kelly RR, et al. Hematopoietic stem cell-derived cancer-associated fibroblasts are novel contributors to the pro-tumorigenic microenvironment. Neoplasia, 2015, 17: 434-448.

10 Markowitz GJ, Michelotti GA, Diehl AM, et al. Inflammatory models drastically alter tumor growth and the immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. Sci Bull (Beijing), 2015, 60: 762-772.

11 Grenzi PC, de Marco R, Silva RZ, et al. Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. Hum Immunol, 2013, 74: 1300-1303.

12 刘立国. 术前血清中细胞因子含量与肝癌切除术后预后相关性探讨. 北京协和医学院, 2012.

13 Duan Y, Jia Y, Wang T, et al. Potent therapeutic target of inflammation, virus and tumor: focus on interleukin-27. Int Immunopharmacol, 2015, 26: 139-146.

14 Mengelle C, Mansuy JM, Prere MF, et al. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. Clin Microbiol Infect, 2013, 19: E458-E465.

(收稿日期: 2015-04-06)

(本文编辑: 李霖)

(上接第 121 页)

term survival analysis of nasopharyngeal carcinoma by plasma Ep-

stein-Barr virus DNA levels. Cancer, 2013, 119: 963-970.

(收稿日期: 2015-04-21)

(本文编辑: 李霖)