

· 综 述 ·

外周血游离 DNA 作为肿瘤标志物的临床展望和生物学意义*

瞿国英 综述, 郁爱平[△] 审校

(上海潍坊社区卫生服务中心检验科, 上海 200122)

关键词: CFDNA; 肿瘤标志物; 基因改变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)09-1234-03

早在 1977 年, 即有科学家发现在癌症患者血浆和血清中循环游离 DNA (CFDNA) 异常增高^[1]。然而直到近期, 人们才意识到癌症患者外周血 CFDNA 可以作为癌症早期诊断和预后标志物, 并加以研究。至今, 已发现在多种类型肿瘤患者中, 包括结直肠癌、胰腺癌、肺癌等, CFDNA 出现特征性基因改变, 包括点突变、微卫星不稳定、DNA 超甲基化、杂合子缺失等^[2-5]。多项研究表明, CFDNA 的变化与肿瘤原发部位基因改变完全相同。虽然, CFDNA 的基因改变与数量上升不能鉴别特定肿瘤, 但是处于肿瘤晚期且发生转移的患者往往伴有 CFDNA 的显著升高。因此, 利用 CFDNA 传递的遗传信息, 对肿瘤患者进行早期分子诊断和预后评估, 具有潜在临床价值。

1 CFDNA 的特征与起源

CFDNA 在健康人外周血浓度平均值为 30 ng/mL。推定每个细胞 DNA 水平为 6.6 pg, 则 1 mL 血中平均含有 5 000 个 DNA 基因组。在系统红斑狼疮、关节炎、肝炎、癌症患者外周血中, CFDNA 常表现为高水平。癌症患者外周血 CFDNA 平均值为 180 ng/mL^[4-6]。CFDNA 为双链, 常与蛋白结合成为核蛋白复合物, 但是目前复合物的具体成分还不清楚^[7]。对 CFDNA 实行低百分率琼脂糖凝胶电泳分析, 显示 0.18~21.00 kbp 的 DNA 片段在标本间差异最大。CFDNA 在血液中清除速率极快, 它对 DNase. 1 等血浆核酸酶极为敏感。但是肝脏和肾对 CFDNA 的生理清除作用还未彻底阐明。胎儿分娩后, 对母体中胎儿 CFDNA 的清除研究表明, CFDNA 的半衰期为 16.3 min^[8]。如果肿瘤患者 CFDNA 的半衰期类似母体中胎儿 CFDNA 的清除率, 那么每小时必须有数百万个 DNA 基因组释放入血才能维持血中 CFDNA 浓度达到 180 ng/mL。这个数目看似巨大, 但与同时机体内新陈代谢更新的细胞相比, 只占很小一部分。

CFDNA 的肿瘤起源说的产生是因为在肿瘤患者的肿瘤位点和 CFDNA 发现了原癌基因和抑癌基因发生相同突变。与此结果相符的是, 肿瘤患者 CFDNA 的生物物理特性与肿瘤细胞极为相似。肿瘤患者的 CFDNA 经体外致癌物处理后, 相比正常 DNA 双链稳定性下降, 健康志愿者的 CFDNA 同样处理后却与正常 DNA 一样保持双链稳定。

源自肿瘤的 CFDNA 占全部 CFDNA 比例在个体间差异极大。Jahr 等^[9]通过定量 PCR 发现外周血中肿瘤 CFDNA 占全体 CFDNA 的比例维持在 10%~90%, 肿瘤比例最高者总体 CFDNA 较低。但是, Hibi 等^[10]的研究却表明肿瘤 CFDNA

所占比例相当低(为 0.2%~10.0%)。这些差异有可能反映肿瘤状态(组织学、肿瘤起源、分级、大小)也可能是技术问题(外周血标本处理、CFDNA 分离、突变检测)。肿瘤的位点、组织学、分级分期对于 CFDNA 有很大影响, 然而目前还缺乏合适的数据系统比较不同类型肿瘤之间 CFDNA 的差异。高水平的 CFDNA 并不能特异反映肿瘤, 因为其他炎症病理状况, 如肝硬化、肝炎、系统性红斑狼疮都会出现 CFDNA 的升高。所以, 确定肿瘤特异的遗传改变是评估 CFDNA 肿瘤起源的最好办法。

2 CFDNA 释放入血的机制

游离 DNA 释放入血的生物机制目前仍不明晰。目前研究人员主要提出了 2 种主要机制: 一是凋亡和坏死; 二是完整细胞释放入血并发生裂解。

肿瘤位点发生凋亡和坏死都较为频繁。凋亡细胞具有特征化的 DNA 片断典型模式(“凋亡阶梯”)。在某些情况下, CFDNA 表现出凋亡细胞才有的阶梯模式。但是, 大片段甚至接近全基因组大小的 DNA 片段也常能检测到。对 DNA 特定大小片段进行定量 PCR 发现, 血浆中完整 DNA 的量相比正常人有升高。近期, Diehl 等^[11]发现, 发生 DNA 突变的大多为小片段, 而大片段大多为野生型。据此, 他们提出突变 DNA 来自坏死细胞经巨噬细胞消化后的产物。按照这个理论, 突变 CFDNA 的水平应该与肿瘤坏死的程度相一致。但是也有报道发现在前列腺癌、乳腺癌、肝癌患者中有完整细胞释放入血。值得注意的是, 这些细胞并非转移细胞, 它们仅仅能够进入血液而不能侵袭其他器官, 它们在血液中的降解产物构成了 CFDNA 的大片段。Anker 等^[12]提出细胞会主动分泌 DNA, 以核蛋白复合物的形式入血。该假说基于培养细胞基质中出现新合成的双链 DNA。许多附加实验表明 DNA 释放进入基质并不受到细胞周期的影响。然而, 目前仍然缺乏数据阐明 DNA 主动分泌的机制。

目前对于 CFDNA 在机体内发挥何种生物学功能还不确定。有人提出释放入血、发生基因突变的 CFDNA 可能会重新进入细胞发挥功能。它会整合进入细胞并改变接受细胞的遗传信息。这种学说甚至导致了“基因组转移”概念的提出。认为肿瘤 DNA 具有改变远端器官中干细胞基因组的潜在能力。

3 外周血 CFDNA 的检测方法

CFDNA 可由酚/氯仿或者商业化离子交换试剂盒抽提获得。已有多种高灵敏度方法检测血浆或血清中的 CFDNA。其中包括竞争性放射免疫测定, 灵敏度可达 25~1 000 ng/

* 基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题计划项目(201440470)。 作者简介: 瞿国英, 女, 副主任检验技师, 主要从事临床检验方向的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: 172327959@qq.com。

mL,以及对经切口翻译纯化的 DNA 进行直接放射标记(灵敏度可达 1.6 ng/mL)。DNA 嵌入染料,如 SYBR Green, Hochst 等,灵敏度还无法达到检测微量 DNA 的水平。利用免疫测定检测组蛋白和双/单链 DNA 已有商业化试剂盒(Cell Death Detection plus-EILSA, Roche, Mannheim, Germany),但是试验结果无法与其他方法比较确定敏感性。现在,最简单、最适宜进行 CFDNA 浓度测定的方法还是应用特异结合于 DNA 双链的染料(PicoGreen, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR),能够检测到 25 pg/mL 的双链 DNA^[13]。

早期,人们采用微卫星分析检测 CFDNA 中等位基因变化,发现与肿瘤 DNA 具有较高一致性。然而,必须考虑到源自肿瘤的 CFDNA 只占了全部 CFDNA 中很小一部分,肿瘤 DNA 等位基因改变在野生型的大背景下难以检测得到。通过附加 PCR 测定微卫星不稳定可检测到 CFDNA 中 0.1%~0.2% 的不稳定 DNA。CFDNA 基因点突变的检测,如 TP53、KRAS2,相比肿瘤组织需要更加精密的方法。在很多情况下,直接基因测序的灵敏度并不能保证,因为它无法检测到野生型基因背景下小于 25% 的突变信号。后来出现了 2 种改进方法,一种是限制性位点突变(RSM),对 DNA 先进行限制性酶消化后再行 PCR。另一种是限制性片段长度多态性(RFLP),即 PCR 完成后再进行限制性内切酶消化。但是这两种方法只能检测到限制性酶切位点特异的点突变,无法大量应用^[14-16]。最近,人们应用 2 种较高灵敏度的方法定量检测特定位点的突变,分别是短片断寡核苷酸质谱分析(SOMA)和乳胶颗粒扩增磁性(BEAMing)。在 SOMA 方法中,通过 PCR 和酶消化产生突变点周围的小 DNA 片段,然后根据 HPLC-电喷雾离子质谱确定特征。一项在非洲冈比亚的病例对照研究采用 SOMA 检测突变 CFDNA,TP53 基因在 249 位丝氨酸突变在肝细胞癌患者中位数水平较高(2 800 copy/mL,范围 500~11 000 copy/mL),肝硬化和健康者中位数水平均为 500 copy/mL。249 位丝氨酸突变对于鉴别诊断肝细胞癌具有统计学意义^[17]。在 BEAMing 方法中,第一轮 PCR 的产物经标记转移到颗粒上,然后对于突变位点进行单碱基延伸,使得野生型与突变型和不同的荧光染料结合,最后进行流式细胞术分析。该方法对晚期结肠癌患者定量分析发现,血浆中 APC 突变平均值为 5 300 copy/mL^[18]。

对于非特定位点突变的检测,大部分研究倾向于从采用预先筛选法。比如变性高压液相色谱(DHPLC)、时间温度梯度电泳(TTGE)、单链构相多态性(SSCP)。这些方法的灵敏度范围为 3%~50%(根据突变的位置和类型),因此只适合在肿瘤 CFDNA 所占比例较大时检测突变^[19]。

4 CFDNA 与临床研究

肿瘤患者体内 CFDNA 相比健康人有升高使得 CFDNA 成为肿瘤早期诊断和预后评估的有用工具。然而,目前还无法确定 CFDNA 应用于筛选的临床决定浓度。而且 CFDNA 浓度与患者实际的临床、生物学、组织学特征之间的联系还未建立起来。比较有希望的是检测基因改变的 CFDNA 应用于早期诊断或预后评估。突变 CFDNA 检测早于传统肿瘤诊断的例子还不多。对 49 例支气管镜检查疑似肺癌患者的 CFDNA 测定中,Allan 等^[20]发现有 13 例可检测到杂合子缺失,其中有 2 例,遗传改变的 CFDNA 检测早于肿瘤诊断几个月。所以,对于一些传统方法难以检测的肿瘤,遗传改变的 CFDNA 可能

是有用工具。CFDNA 的浓度变化和遗传改变也可作为疾病治疗后监测复发的有用标志。研究发现临床症状的改善往往伴有 CFDNA 浓度下降。有多项研究表明,肿瘤治疗后患者 CFDNA 的基因改变,如 KRAS2 突变、多位点微卫星不稳定、CDKN2A 的超甲基化,可反映疾病的复发程度。在一项大规模的结肠癌患者回访研究中,Ryan 等^[21]发现血清中 KRAS2 突变对于疾病复发具有 91.0% 的灵敏度、88.0% 的特异性、62.5% 的阳性预测值。

在过去的 10 年中,对 CFDNA 的多项研究使得它成为认识肿瘤的有用工具。然而,进一步的临床应用和群体研究还需要更深入地了解 DNA 释放入血的机制,CFDNA 与疾病进展的联系基本问题。目前而言,CFDNA 作为肿瘤标志物的优势在于它可以经非侵入性方法获得,患者痛苦较少,操作性好,结构稳定,易于保存。缺点在于特异性较差(遗传改变的 CFDNA 无法反应肿瘤类型和部位),而且在非肿瘤患者中也会出现 CFDNA 的改变。进一步研究工作应该是寻找并确定具有最大预后和诊断价值的遗传改变,以发挥优点克服不足。

参考文献

- [1] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of Cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3): 646-650.
- [2] Xia S, Huang CC, Le M, et al. Genomic variations in plasma cell free DNA differentiate early stage lung cancers from normal controls[J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(1): 78-84.
- [3] Taberero J, Lenz HJ, Siena S, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal Cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(8): 937-948.
- [4] Pinzani P, Salvianti F, Orlando C, et al. Circulating cell-free DNA in Cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1160: 133-145.
- [5] Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA[J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 430-435.
- [6] Wong BC, Lo YM. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2003, 3(6): 785-797.
- [7] Stroun M, Anker P, Lyautey J, et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of Cancer patients[J]. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1987, 23(6): 707-712.
- [8] Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(1): 218-224.
- [9] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of Cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1659-1665.
- [10] Hibi K, Robinson CR, Booker S, et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal Cancer patients[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(7): 1405-1407.
- [11] Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(45): 16368-16373.
- [12] Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by

human blood lymphocytes as shown in an in vitro system[J]. Cancer Res, 1975, 35(9):2375-2382.

[13] Xue X, Teare MD, Hoken I, et al. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum[J]. Clin Chim Acta, 2009, 404(2):100-104.

[14] Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(26):6499-6512.

[15] Keshavarz Z, Moezzi L, Ranjbaran R, et al. Evaluation of a modified DNA extraction method for isolation of Cell-Free fetal DNA from maternal serum[J]. Avicenna J Med Biotechnol, 2015, 7(2):85-88.

[16] Mauger F, Dulary C, Daviaud C, et al. Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma[J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(22):6873-6878.

[17] Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, et al. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma

from The Gambia[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(2):148-153.

[18] Barault L, Amatu A, Bleeker FE, et al. Digital PCR quantification of MGMT methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal Cancer[J]. Ann Oncol, 2015, 26(9):1994-1999.

[19] Wang Z, Chen R, Wang S, et al. Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC[J]. PLoS One, 2014, 9(11):110780.

[20] Allan JM, Hardie LJ, Briggs JA, et al. Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung Cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 91(3):359-365.

[21] Ryan BM, Lefort F, Mcmanus R, et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up[J]. Gut, 2003, 52(1):101-108.

(收稿日期:2015-12-20)

• 综 述 •

类风湿关节炎患者骨重建标志物的研究进展

常文静 综述, 蔡 辉 审核[△]

(南京军区南京总医院中西医结合科, 江苏南京 210002)

关键词:骨重建标志物; 类风湿关节炎; 炎症; 关节破坏; 生物制剂

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1236-03

类风湿关节炎(RA)是以慢性进行性软骨和骨破坏及滑膜改变为特征的炎性自身免疫性疾病。全身和关节滑膜合成的促炎细胞因子介导 RA 患者骨丢失,并可能导致骨质疏松症和骨折。骨形成标志物有血清 I 型前胶原氨基端前肽(P1NP)、血清 I 型胶原羧基末端前肽(I-CTP)、骨碱性磷酸酶(BAP)、骨钙素(OC),骨吸收标志物有 I 型胶原羧基末端肽(I-CTX)、I 型胶原氨基末端肽(I-NTX)、吡啶诺林(DPD)和PYD)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)。促炎细胞因子通过促进骨保护素(OPG)和和核因子- κ B 受体激活子配体(RANKL)比值下降,增加破骨细胞的生成和骨吸收,进而导致关节周围和全身性骨丢失。近年研究发现,骨重建标志物与 RA 病情活动和关节破坏相关,并可预测放射学进展及评估药物疗效。本文重点探讨骨重建标志物评估生物制剂的疗效。

1 炎症、关节破坏和骨质量

RA 是以关节破坏、关节周围骨丢失为特征的慢性疾病,慢性炎症增加骨质疏松的风险。RA 导致全身性骨丢失是多因素的:糖皮质激素、体力活动减少和疾病本身(尤其是疾病未得到控制)。无论是关节周围骨丢失,还是全身性骨丢失,其机制都是促炎细胞因子通过促进核因子- κ B 受体激活子配体,间接或直接地增加破骨细胞的生成,并促进其功能。在 RA 早期阶段,骨丢失与炎症参数相关。用 Larsen 评分评估关节破坏,关节破坏与骨密度(BMD)和脊椎畸形相关。

2 细胞因子和信号通路

RA 关节骨破坏和骨丢失的严重程度取决于破骨细胞的

数量及功能。促炎细胞因子在破骨细胞活化中起着重要作用。核因子- κ B 受体激活子(RANK)信号通路参与炎症过程基因表达的调节。成骨细胞分泌 RANKL, RANKL 与破骨前体细胞表面受体 RANK 结合,从而刺激破骨细胞的生成。成骨细胞和基质细胞产生 OPG, OPG 通过结合 RANKL 而阻断 RANKL 与 RANK 的结合,从而负性调节破骨细胞的生成。因此,OPG 与 RANKL 的相对比例决定了单位时间里破骨细胞的数量及骨丢失的程度。许多促进或抑制骨吸收的因素通过调节 RANKL 和 OPG 的表达而起作用。肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素-1(IL-1)等促炎细胞因子调节 RANKL 的表达^[1-4]。RANKL 值可以评估 RA 患者对 TNF 抑制剂治疗的疗效^[5],而不是 OPG^[6]。但使用英夫利昔单抗和依那西普治疗的 RA 患者滑膜 OPG 表达增加, RANKL 却不受治疗的影响。这说明 RANKL/OPG 比值比每个单独指标评估骨吸收更具有重要性^[7]。因此, RANKL 对骨密度有不利作用,而 RANKL 单克隆抗体狄诺塞麦可增加 RA 患者骨密度和减少骨转换^[8]。炎症过程骨形成也下降, DKK-1 是 dickkopf 家族的一种蛋白质, TNF- α 能增加其表达,并对 Wnt 信号通路发挥负调控作用,阻止成骨细胞分化和诱导硬化蛋白的表达,导致骨细胞死亡^[9]。DKK-1 水平升高与关节侵蚀风险增加相关,且独立于年龄、性别、基线放射学损伤、C 反应蛋白和疾病活动^[10]。IL-6 通过调节 Janus 激酶/STAT、STAT3 和 ERK1/2 磷酸化信号通路直接诱导 RA 患者滑膜细胞 RANKL 分泌^[11-12]。

作者简介:常文静,女,医师,主要从事中西医结合风湿免疫病的研究。

[△] 通讯作者, E-mail:caihuidh@163.com.