

• 论 著 •

不同核酸提取试剂盒对血浆游离 DNA 提取效果的比较*

方仲表¹, 沈伟锋², 饶焕新², 章余旋¹, 潘志文³, 吴 欧^{1△}

1. 浙江树人大学树兰国际医学院, 浙江杭州 310015; 2. 中翰盛泰生物技术股份有限公司, 浙江杭州 311100; 3. 浙江省肿瘤医院, 浙江杭州 310022

摘 要:目的 比较北京天根生化科技有限公司生产的大体积游离核酸提取试剂盒(磁珠法, 货号: DP-710, 以下简称天根)与德国 Qiagen 公司生产的 Circulating Nucleic Acid kit(硅胶膜吸附柱法, 货号: 55114, 以下简称 Qiagen)对血浆当中游离 DNA(cfDNA)的提取效果。方法 收集 Qiagen 和天根试剂盒的基本情况, 采用浙江省肿瘤医院提供的临床血浆样本, 用 Qiagen 和天根分别提取血浆样本中的 cfDNA。用超微紫外分光光度仪分析两种试剂盒提取得到 cfDNA 的浓度和纯度。采用人表皮生长因子受体(EGFR)突变基因检测试剂盒(多重荧光 PCR 法)评价两种试剂盒提取血浆中 cfDNA 的提取效果, 通过扩增结果的 Ct 值分析两种不同试剂盒对人 EGFR 基因突变的检出率和重复性的影响。结果 在 cfDNA 提取浓度、纯度方面, Qiagen 的 cfDNA 提取浓度明显高于天根, 且 Qiagen 提取得到的 cfDNA 纯度更优; 在人 EGFR 突变基因阳性检出率方面, Qiagen 阳性检出率为 100%, 天根阳性检出率为 85%; 在重复性方面, Qiagen 试剂盒提取的 cfDNA 的检出结果 Ct 值的变异系数(CV)均小于 5%, 而天根试剂盒有部分 CV 超过 5%。结论 Qiagen 试剂盒在 cfDNA 提取浓度、纯度, 人 EGFR 突变基因的阳性检出率、重复性方面的表现均要优于天根试剂盒。

关键词:天根; Qiagen; 核酸提取; 游离 DNA; EGFR 突变基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.08.017

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2022)08-0979-06

文献标志码:A

Comparison of the effects of different nucleic acid extraction kits on the extraction of plasma cell-free DNA*

FANG Zhongbiao¹, SHEN Weifeng², RAO Huanxin², ZHANG Yuxuan¹, PAN Zhiwen³, WU Ou^{1△}

1. Shulan International Medical College of Zhejiang Shuren University, Hangzhou, Zhejiang 310015, China; 2. Joinstar Biomedical Technology Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 311100, China; 3. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310022, China

Abstract: Objective To compare the extraction effect of the large volume free nucleic acid extraction kit (Method of magnetic beads, Cat: 55114, Hereinafter referred to as Qiagen) produced by Beijing Tiangen Biochemical Technology Co., Ltd. with that of Circulating Nucleic Acid kit produced by Qiagen, Germany (Silica gel membrane adsorption column method, Cat: 55114, Hereinafter referred to as Qiagen) on the extraction of cell-free DNA from plasma. **Methods** Collecting the basic information of Qiagen and Tiagen kits. Clinical plasma samples provided by Zhejiang Cancer Hospital were collected, and cfDNA was extracted from the plasma samples by Qiagen and Tiagen, respectively. The Concentration and Purity of cfDNA extracted by the two kits were analyzed by ultraviolet spectrophotometry. Human epidermal growth factor receptor (EGFR) mutant gene detection kit (multiplex fluorescent PCR method) was used to analyze the effects of the two kits on the extraction of cfDNA in plasma. The effect of two different kits on the detection rate and repeatability of EGFR gene mutation was analyzed by the Ct value of amplification results. **Results** In terms of the Concentration and Purity of cfDNA, the cfDNA extracted by Qiagen was significantly higher than that extracted by Tiagen, and the Purity of cfDNA extracted by Qiagen was better; The positive coincidence rate of EGFR mutation gene was 100% for Qiagen and 85% for Tiagen; In terms of repeatability results, the coefficient of var-

* 基金项目: 浙江省“十三五”省级产学研合作协同育人项目(096); 浙江省产教融合“五个一批”项目(096)。

作者简介: 方仲表, 男, 在读本科生, 主要从事临床医学专业研究。△ 通信作者, E-mail: wuou1@163.com。

本文引用格式: 方仲表, 沈伟锋, 饶焕新, 等. 不同核酸提取试剂盒对血浆游离 DNA 提取效果的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(8):

iation(CV) of cfDNA detected by the Qiagen kit were all less than 5%, while the CV of the Tiangen kit was over 5% in some cases. **Conclusion** Qiagen kit was superior to Tiangen kit in terms of cfDNA concentration, Purity, positive coincidence rate and repeatability of EGFR mutations.

Key words: Tiangen; Qiagen; nucleic acid extraction; cell-free DNA; epidermal growth factor receptor mutant gene

游离 DNA(cfDNA)是一种片段化的胞外核苷酸片段,主要以游离形式存在于血液之中或以蛋白质结合形式附着于细胞表面。在 1948 年研究者首次发现了血液 cfDNA 的存在^[1-2]。目前肿瘤组织样本是检测肿瘤基因突变位点的主要材料,但其在临床上存在取材困难、患者依从性差、检测周期长等诸多不足。而外周血因其具有无创伤性和实时检测的绝对优势,且与组织检测结果的一致性可达 80%以上^[5]。因此,近年来,血浆中的 cfDNA 在肿瘤的液体活检领域被广泛应用^[3-5]。由于血浆中游离 DNA 片段较短,含量极低,且易于降解^[6],如何高效提取 cfDNA 成为亟待解决的难题。目前市面上血浆 cfDNA 提取试剂盒较多,但是不同试剂盒的提取方法和提取效率上存在差异。硅胶膜吸附柱法和磁珠法是目前主流的 cfDNA 提取手段^[7-8]。本研究选取了市场上较有代表性的 Qiagen 公司的 Circulating Nucleic Acid kit(硅胶膜吸附柱法,以下简称 Qiagen)和北京天根生化科技有限公司生产的大体积游离核酸提取试剂盒(磁珠法,以下简称天根),从 cfDNA 提取浓度、纯度,人表皮生长因子受体(EGFR)基因突变阳性检出率、重复性等方面评估两种提取试剂盒的性能表现,以期为临床上对人 EGFR 突变基因的检测提供更经济、有效的商品化试剂盒的选择提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集浙江省肿瘤医院肺癌晚期患者的血浆样本 100 例,且院方已使用厦门艾德生物医药科技股份有限公司生产的人 EGFR 突变基因检测试剂盒检测出血浆样本的突变位点。

1.2 仪器与试剂 磁珠法大体积游离核酸提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,货号:DP-710);硅胶膜吸附柱法 Circulating Nucleic Acid kit(德国 Qiagen 公司,货号:55114);人 EGFR 突变基因检测试剂盒(多重荧光 PCR 法)由杭州中翰盛泰生物技术股份有限公司提供(批号:EGF2011002);NanoDrop 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司);ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);高速离心机(美国 Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 cfDNA 提取 医院收集到肺癌晚期患者外周血样本后,立即离心分离血浆。用 Qiagen 和天根试

剂盒分别进行提取。(1)Qiagen 提取步骤:取 1.5 mL 离心管依次加入蛋白酶 K、2 mL 血浆样本、裂解 ACL 缓冲液,振荡混匀后在 60 °C 下裂解孵育 30 min,添加缓冲液,ACB 振荡混匀并在冰上孵育 5 min,将混合物放入 QIAamp Mini 色谱柱的试管延长器中使裂解物完全通过色谱柱,在色谱柱依次上样缓冲液 ACW1、ACW2、无水乙醇,取下色谱柱置于心得采集管中在 56 °C 下孵育 10 min,丢弃采集管并将色谱柱置于 1.5 mL 洗脱管中,加入 50 μ L 洗脱缓冲液 AVE,室温孵育 3 min,离心 1 min 洗脱核酸并将溶液转移保存。(2)天根提取步骤:取 1.5 mL 离心管依次加入 2 mL 血浆、裂解液、蛋白酶 K、磁珠,涡旋振荡混匀后室温孵育 20 min,将离心管置于磁力架上去除液体,加入 750 μ L 缓冲液 GDF 混匀并置于磁力架去除液体,加入 750 μ L 漂洗液 PWG 振荡混匀并置于磁力架去除液体,加入 50 μ L 洗脱缓冲液 TBC,56 °C 孵育 5 min,将核酸溶液转移并保存。

1.3.2 提取后 cfDNA 浓度、纯度检测 取 12 例血浆样本用 Qiagen 和天根提取 cfDNA,使用超微量紫外分光光度计对 cfDNA 进行浓度、纯度检测,每例样本重复测 3 次,具体操作步骤按照超微量紫外分光光度计标准操作规程进行。对测得提取后 cfDNA 的浓度、纯度进行统计学分析,评价两试剂盒在提取 cfDNA 浓度、纯度方面的优劣。

1.3.3 荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)分析 EGFR 基因突变检出情况 采用人 EGFR 突变基因检测试剂盒(多重荧光 PCR 法),通过 ABI 7500 定时荧光定量 PCR 仪,检测两种试剂盒提取后的 cfDNA 的 EGFR 基因突变检测情况。具体步骤按照人 EGFR 突变基因检测试剂盒(多重荧光 PCR 法)说明书进行。扩增条件:95 °C 5 min;95 °C 1 s,70 °C 20 s,65 °C 20 s,共 15 个循环;95 °C 1 s,70 °C 20 s,60 °C 收集荧光信号 30 s,共 30 个循环。用 ABI 7500 software(v2.3)分析结果。

1.3.4 阳性检出率的评价和重复性评价 (1)阳性检出率的评价:选取 20 例 EGFR 突变阳性样本,对两种试剂盒提取 cfDNA 的 qRT-PCR 检测结果进行分析。将扩增结果的 Ct 值与人 EGFR 突变基因检测试剂盒说明书中对结果判定的阳性判断值(Cut-off 值)对比,判断阴阳性。再结合已知突变信息进行分析,

分别统计两种试剂盒提取后 EGFR 基因突变阳性检出率。阳性检出率的计算方法：阳性检出率 = 样本突变位点检出总个数 / 已知样本突变位点总个数。(2)重复性评价：选取 2 例血浆样品，分别用 Qiagen、天根试剂盒进行提取，每个样品重复提取 6 次。分析扩增后的指标(突变位点 19del、L858R 和内控基因)的 Ct 值并计算出相应的变异系数(CV 值)进而分析两试剂盒对 EGFR 突变基因重复性的影响。内控(IC)基因，采用人类基因中的保守片段。CV 值是概率分布离散程度的一个归一化

量度，其定义为标准差与平均值之比。已知两种血浆样品均发生突变 19del 突变和 L858R 突变。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间数据比较采用单因素方差分析，行 t 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Qiagen、天根两种游离核酸提取试剂盒的基本情况 见表 1。

表 1 游离核酸提取试剂盒基本情况

试剂盒	核酸提取方法	提取样本体积 (μL)	提取中是否 高温裂解	洗脱体积 (μL)	手提时长 (min)	参考价格 (元/人次)	产地
Qiagen	膜吸附柱法	2 000	是(60 $^{\circ}\text{C}$ 30 min)	50	≤ 30	200	德国
天根	磁珠法	2 000	否	50	≤ 45	50	中国

2.2 核酸浓度及纯度的比较 由表 2 可知，与 Qiagen 相比，天根试剂盒提取后样本 NO. 2 的核酸浓度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)，其余样本的核酸浓度显著降低，差异有统计学意义($P < 0.05$)。两种试剂盒所提取的 cfDNA 纯度数据见表 3。Qiagen 试剂盒提取出的 cfDNA 的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.2，而天根试剂盒提取得到的 cfDNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均明显低于 1.7，蛋白质污染严重。

表 2 两种试剂盒提取的 cfDNA 的浓度($\bar{x} \pm s, \text{ng}/\mu\text{L}$)

样本	Qiagen	天根
NO. 1	14.306 $\pm$ 0.710	8.674 $\pm$ 0.807 *
NO. 2	8.569 $\pm$ 0.633	8.599 $\pm$ 0.297
NO. 3	14.569 $\pm$ 0.826	4.847 $\pm$ 0.589 *
NO. 4	14.424 $\pm$ 0.398	4.487 $\pm$ 0.081 *
NO. 5	18.646 $\pm$ 0.487	9.312 $\pm$ 0.264 *
NO. 6	21.782 $\pm$ 0.364	4.786 $\pm$ 0.941 *
NO. 7	18.925 $\pm$ 0.965	6.259 $\pm$ 0.423 *
NO. 8	24.043 $\pm$ 0.717	13.043 $\pm$ 0.101 *
NO. 9	17.031 $\pm$ 0.291	3.761 $\pm$ 0.725 *
NO. 10	18.435 $\pm$ 0.930	13.428 $\pm$ 0.494 *
NO. 11	21.634 $\pm$ 0.227	10.756 $\pm$ 0.409 *
NO. 12	19.759 $\pm$ 0.842	8.046 $\pm$ 0.738 *

注：与 Qiagen 相比，* $P < 0.05$ 。

2.3 扩增结果分析

2.3.1 阳性检出率结果对比 表 4 结果显示，Qiagen 试剂盒提取的血浆 cfDNA 突变位点检出结果与已知突变位点信息一致，突变位点阳性检出率为 100%。天根试剂盒提取的血浆 cfDNA 中，样本 NO.

2 的突变位点 19del，样本 NO. 5 的突变位点 T790M，样本 NO. 9 的突变位点 G719X 出现漏检，突变位点阳性检出率为 85%。所有样本的 IC 基因均被检出。从结果中可以表明 Qiagen 试剂盒在阳性检出率方面要优于天根试剂盒。

表 3 两种试剂盒提取的 cfDNA 纯度($\bar{x} \pm s, A_{260}/A_{280}$)

样本	Qiagen	天根
NO. 1	1.99 $\pm$ 0.074	1.367 $\pm$ 0.034
NO. 2	1.98 $\pm$ 0.032	1.517 $\pm$ 0.009
NO. 3	2.05 $\pm$ 0.008	1.265 $\pm$ 0.066
NO. 4	1.81 $\pm$ 0.057	0.996 $\pm$ 0.044
NO. 5	1.97 $\pm$ 0.014	0.974 $\pm$ 0.028
NO. 6	2.004 $\pm$ 0.065	1.013 $\pm$ 0.031
NO. 7	2.062 $\pm$ 0.005	0.892 $\pm$ 0.011
NO. 8	2.066 $\pm$ 0.052	0.905 $\pm$ 0.022
NO. 9	2.054 $\pm$ 0.063	1.474 $\pm$ 0.042
NO. 10	2.054 $\pm$ 0.033	0.827 $\pm$ 0.034
NO. 11	2.032 $\pm$ 0.056	0.944 $\pm$ 0.048
NO. 12	2.028 $\pm$ 0.093	1.584 $\pm$ 0.057

表 4 两种试剂盒提取 cfDNA 突变位点的阳性检出率

样本	Qiagen	天根	已知突变 位点信息
NO. 1	19del	19del	19del
NO. 2	19del/20ins	20ins	19del/20ins
NO. 3	19del/T790M	19del/T790M	19del/T790M
NO. 4	L858R	L858R	L858R
NO. 4	L858R	L858R	L858R

续表 4 两种试剂盒提取 cfDNA 突变位点的阳性检出率

样本	Qiagen	天根	已知突变位点信息
NO. 5	T790M	—	T790M
NO. 6	20ins	20ins	20ins
NO. 7	19del	19del	19del
NO. 8	19del/20ins	19del/20ins	19del/20ins
NO. 9	19del/G719X	19del	19del/G719X
NO. 10	19del	19del	19del
NO. 11	19del/20ins	19del/20ins	19del/20ins
NO. 12	19del/20ins	19del/20ins	19del/20ins
NO. 13	19del/20ins	19del/20ins	19del/20ins
NO. 14	19del/T790M	19del/T790M	19del/T790M
NO. 15	L858R	L858R	L858R
NO. 16	19del	19del	19del
NO. 17	19del/T790M	19del/T790M	19del/T790M
NO. 18	19del/20ins	19del/20ins	19del/20ins
NO. 19	T790M	T790M	T790M
NO. 20	19del	19del	19del
阳性检出率(%)	100	85	—

注：—表示无数据。

2.3.2 重复性结果对比与分析 通过两试剂盒提取的 cfDNA 检出指标 Ct 值的 CV 值来分析两种不同试剂盒对 EGFR 基因突变的重复性的影响。见表 5。结果表明, Qiagen 试剂盒提取的 cfDNA 的检出结果 Ct 值的 CV 值均小于 5%, 而天根试剂盒的样本 NO. 1 中 19del 检测结果的 Ct 值的 CV 值大于 5%。

表 5 cfDNA 检出指标 Ct 值的重复性结果			
试剂盒	样本	指标	CV 值(%)
Qiagen	NO. 1	19del	2. 77
		L858R	2. 59
		IC	2. 14
	NO. 2	19del	2. 69
		L858R	1. 70
		IC	3. 14
天根	NO. 1	19del	3. 73
		L858R	1. 46
		IC	4. 62
	NO. 2	19del	7. 60
		L858R	3. 21
		IC	5. 26

3 讨 论

液体活检,特别是对 cfDNA 的分析,已经成为肿瘤学中一种很有前景的非侵入性诊断方法^[9]。因其无创

性的特点, cfDNA 作为“液体组织”已显示出了非常重要的临床应用前景^[10-11]。非小细胞肺癌(NSCLC)是最常见的肺癌亚型^[12]。EGFR 基因是 NSCLC 患者的肿瘤发生发展过程中的驱动基因, NSCLC 患者中常见的 EGFR 突变类型是 19 号外显子缺失突变(19del)和 21 号外显子 L858R 点突变,除此以外,还有 T790M 点突变和 20 号外显子插入突变(20ins)等类型^[13]。研究表明, 25% 的 NSCLC 患者就诊时已是晚期,此时进行手术诊断或连续活检可能无法完成^[15],因此,通过液体活检的方法,从血液中提取 cfDNA 可作为检测体基因突变的可行替代方法。通过获取血液(血浆)样本中 cfDNA 并检测其 EGFR 基因突变状态来评估 NSCLC 患者的情况,对 NSCLC 患者的诊断和检测具有预后价值^[14-15]。

然而,目前对 cfDNA 的定量检测仍然面临问题及争议,缺乏规范和标准化的流程^[16], cfDNA 的提取方法和定量方法也是决定实验误差的主要因素^[17]。有研究表明,不同的提取方法及使用不同提取试剂盒在提取 cfDNA 的效率上存在很大差异^[18-19]。因此,本研究采集了多例肺癌晚期患者的血浆样本,且医院已提供的了该血浆样本中 EGFR 突变基因的突变位点信息。采用 Qiagen 和天根分别提取血浆样本中的 cfDNA,再通过人 EGFR 突变基因检测试剂盒(多重荧光定量 PCR 法)分析两种试剂盒提取血浆中 cfDNA 的提取效果。通过比较目前市场上具有代表以上两种提取试剂盒(分别代表硅胶膜吸附柱法和磁珠法)的提取性能,建立评价 cfDNA 提取优劣的方法,为 cfDNA 在临床 EGFR 突变基因检测选取更经济、有效的 cfDNA 提取试剂盒提供依据。

本研究首先对试剂盒基本情况进行了评价。在成本方面, Qiagen 试剂盒单人次的价格虽要高于天根试剂盒,但在提取时间方面, Qiagen 试剂盒在手提时长方面耗时要少于天根试剂盒。且相关资料表明,在需要提取大量样本 cfDNA 且均为人工提取的情况下, Qiagen 试剂盒的 QIAamp Mini 色谱柱可以通过真空泵抽取液体显著节省提取时间。

cfDNA 提取优劣可以通过多种方面进行评价^[18-19]。本研究则在 cfDNA 提取浓度、纯度, EGFR 突变基因阳性检出率、重复性方面对两种试剂盒所提取的 DNA 质量进行评价分析。在 cfDNA 浓度、纯度检测方面,采用超微量紫外分光光度仪对多例血浆样本中提取得到的 DNA 进行检测分析。提取浓度方面的结果表明, Qiagen 提取的大部分样本中 cfDNA 浓度要显著高于天根。A₂₆₀/A₂₈₀ 比值可以用于表示 DNA 的纯度,质量较好的 DNA 纯度 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应为 1.8~2.0,比值小于 1.8 时,则可能存在蛋白质

或酚类的污染;大于 2.0 时,则可能存在 RNA 或异硫氰酸胍残留^[20]。提取纯度方面的结果表明, Qiagen 提取的 cfDNA 纯度有部分结果达到了 1.8~2.0, 其余结果均在 2.0 左右,且不超过 2.1,表明提取中虽存在轻微的 RNA 污染,但提取的 cfDNA 纯度较好;天根提取的 cfDNA 纯度均低于 1.7,表明其提取过程中均存在严重的蛋白质或多糖污染。由于 cfDNA 本身提取难度较大,而 Qiagen 在提取过程中仍有部分结果达到了理想区间,因此, Qiagen 在提取纯度方面要优于天根。总体而言, Qiagen 试剂盒提取出的 cfDNA 品质更好。

人 EGFR 突变基因检测试剂盒(多重荧光 PCR 法)用于体外定性检测人非小细胞肺癌患者经福尔马林固定的石蜡包埋组织样本或血浆样本中的人类 EGFR 突变基因。qRT-PCR 因其具有灵敏度高、特异性强、操作简单且耗时短等优势,广泛应用于临床疾病的诊断和评估^[21-22]。本研究根据 qRT-PCR 对 cfDNA 扩增结果的 Ct 值进行分析。Ct 值即循环阈值,表示每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数,它与起始模板的浓度负相关^[21]。因此,若 Ct 值越小,则表明提取效率越高。Cut-off 值表示阳性和阴性结果的临界值,是判断检测结果的标准。在本研究中, cfDNA 的 EGFR 突变位点扩增结果的 Ct 值小于 Cut-off 值则表示该突变位点检出结果呈阳性。本研究用 Qiagen 和天根对 20 例血浆样本分别进行 cfDNA 提取,共提取 40 次,用 RT-qPCR 进行扩增。结果显示, Qiagen 和天根提取的血浆 cfDNA 突变位点阳性检出率分别为 100% 和 85%,表明 Qiagen 提取的 cfDNA 阳性检出率要优于天根。

良好的重复性是检测系统在进行其他方法学验证实验的前提^[23]。因此,除提取浓度、纯度和 EGFR 突变基因阳性检出率之外,重复性也是判断试剂盒性能的重要指标。本研究结果显示, Qiagen 提取的血浆 cfDNA 中, EGFR 突变位点 19del 和 L858R 及 IC 通道的 Ct 值的 CV 值均小于 5%,表明 Qiagen 试剂盒提取重复性和稳定性高,随机误差小;天根提取的血浆 cfDNA 中,有部分 CV 值超过 5%,表明天根的提取重复性和稳定性要劣于 Qiagen。

综上所述,本研究在 cfDNA 提取浓度、纯度, EGFR 突变基因的阳性检出率、重复性方面综合评估了两种试剂盒的 cfDNA 提取效果,研究结果表明, Qiagen 试剂盒在以上几项性能的表现上均要优于天根试剂盒。

参考文献

[1] YING H, HONG N. Advance in human free circulating

DNA[J]. Hereditas, 2008, 30(7): 815.

- [2] MANDEL P, METAIS P. Nuclear acids in human blood plasma[J]. C R Seances Soc Biol Fil, 1948, 142(3/4): 241-243.
- [3] MCEWEN A E, LEARY S, LOCKWOOD C M. Beyond the blood: CSF-derived cfDNA for diagnosis and characterization of CNS tumors[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 18(8): 45.
- [4] 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.
- [5] XIE F, ZHANG Y, MAO X, et al. Comparison of genetic profiles among primary lung tumor, metastatic lymph nodes and circulating tumor DNA in treatment-naïve advanced non-squamous non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2018, 121(1): 54-60.
- [6] 徐鹏, 段小瑜, 张海梅, 等. 专用采血管对血浆中循环游离 DNA 保存效果的影响[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(8): 1035-1037.
- [7] JAIN M, BALATSKY A V, REVINA D B et al. Direct comparison of QIAamp DSP virus kit and QIAamp circulating nucleic acid kit regarding cell-free fetal DNA isolation from maternal peripheral blood[J]. Mol Cell Probes, 2019, 43(1): 13-19.
- [8] KRINITSINA A A, SIZOVA T V, ZAIKA M A, et al. A rapid and cost-effective method for DNA extraction from archival herbarium specimens[J]. Biochemistry (Mosc), 2015, 80(11): 1478-1484.
- [9] LUO H, WEI W, YE Z, et al. Liquid biopsy of methylation biomarkers in cell-free DNA[J]. Trends Mol Med, 2021, 27(5): 482-500.
- [10] PAGE K, HAVA N, WARD B, et al. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 104(8): 1342-1348.
- [11] BENN P, CUCKLE H, PERGAMENT E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013, 42(1): 15-33.
- [12] MOLINA J R, YANG P, CASSIVI S D, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(5): 584-594.
- [13] SHI Y, AU S K, THONGPRASERT S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER) [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(2): 154-162.
- [14] 官绍年, 陈迎珠, 卓明磊, 等. 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变检测的临床应用进展[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(2): 130-136.

(下转第 989 页)

H₂S 升高可促进骨组织的再生及修复,有利于骨折愈合。绝经后女性发生骨质疏松性脊柱骨折后 7 d 血清 H₂S 的低水平可能是增加患者发生骨折愈合受损风险的重要因素。建议对血清 H₂S 水平进行深入研究,为改善绝经后女性骨折愈合提供更佳治疗方案。

参考文献

[1] 夏梦嘉,顾巧萍,赵晓燕. 绝经后女性骨密度调查及骨质疏松危险因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(10): 2331-2333.

[2] SCHLICKWEI C W, KLEINERTZ H, THIESEN D M, et al. Current and Future Concepts for the Treatment of Impaired Fracture Healing[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22):5805.

[3] 吴钰坤,韩杰,温帅波. 骨折愈合过程中 Runx2 基因的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(14): 2274-2279.

[4] LIAO F, ZHU Z, XIAO C, et al. Hydrogen sulfide inhibits calcium and phosphorus loss after fracture by negatively regulating glucocorticoid/glucocorticoid receptor α [J]. Life Sci, 2021, 274(1): 119363.

[5] MA J, SHI C, LIU Z, et al. Hydrogen sulfide is a novel regulator implicated in glucocorticoids-inhibited bone formation[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(18): 7537-7552.

[6] 夏海娥,陈鸿颜,陈洪娇. 血清 Asprosin 水平与绝经后女性骨密度、平衡能力和骨折发生率的相关性[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(2): 208-211.

[7] STANGHELLE B, BENTZEN H, GIANREGORIO L, et al. Effect of a resistance and balance exercise programme for women with osteoporosis and vertebral fracture: study protocol for a randomized controlled trial[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2018, 19(1): 100.

[8] 姚颖,刘玮. 骨代谢生化指标与绝经后骨质疏松性腰椎骨折的关系[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(7): 112-115.

[9] 方兵,程翰林,虞红林,等. 血清 E2、P1NP 水平对绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 956-959.

[10] RAEHTZ S, BIERHALTER H, SCHOENHERR D, et al. Estrogen deficiency exacerbates type 1 diabetes-induced bone TNF- α expression and osteoporosis in female mice[J]. Endocrinol, 2017, 158(7): 2086-2101.

[11] SHARMA D, LARRIERA A I, PALACIO-MANCHEÑO P E, et al. The effects of estrogen deficiency on cortical bone microporosity and mineralization [J]. Bone, 2018, 110(1): 1-10.

[12] 王彦英,王淑,王丽萍,等. 骨代谢指标与围绝经期骨质疏松病人发生相关性骨折的多因素研究[J]. 安徽医药, 2021, 25(9): 1749-1752.

[13] 王湛,王毅,冯凯强,等. 骨转换标志物 CTX-1 和 P1NP 预测骨质疏松骨折的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(7): 1084-1087.

[14] BEHERA J, TYAGI S C, TYAGI N. Role of hydrogen sulfide in the musculoskeletal system[J]. Bone, 2019, 124(1): 33-39.

[15] GAMBARI L, GRIGOLO B, GRASSI F. Hydrogen sulfide in bone tissue regeneration and repair: state of the art and new perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5231.

[16] ZHENG Y, LIAO F, LIN X, et al. Cystathionine γ -lyase-hydrogen sulfide induces runt-related transcription factor 2 sulfhydration, thereby increasing osteoblast activity to promote bone fracture healing[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 27(11): 742-753.

(收稿日期: 2021-09-29 修回日期: 2022-03-20)

(上接第 983 页)

[15] MAYO-DE-LAS-CASAS C, IBÁÑEZ M G, JORDANA-ARIZA N, et al. An update on liquid biopsy analysis for diagnostic and monitoring applications in non-small cell lung cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18(1): 35-45.

[16] 李铁军,张孝卫. 循环游离 DNA 的定量检测及面临的问题[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(3): 215-219.

[17] FLEISCHHACKER M, SCHMIDT B, WEICKMANN S, et al. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(23/24): 2085-2088.

[18] 方艳,刘争,高颖,等. 游离 DNA 研究进展及标准化的必要性[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(9): 1042-1051.

[19] 潘杰,吴玉梅,赵琪,等. 国产血浆游离 DNA 提取试剂盒的性能评价[J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(2):

163-168.

[20] MANCHESTER K L. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids [J]. Biotechniques, 1995, 19(2): 208-210.

[21] 蒋玲丽,王雪亮,王华梁,等. 实时荧光定量 PCR 检测病毒核酸方法学性能验证程序的探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(5): 321-325.

[22] ZHU N, ZHANG D Y, WANG W L, et al. A novel coronavirus from patients with Pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.

[23] CURA C I, RAMÍREZ J C, RODRÍGUEZ M, et al. Comparative study and analytical verification of PCR methods for the diagnosis of congenital chagas disease[J]. J Mol Diagn, 2017, 19(5): 673-681.

(收稿日期: 2021-08-17 修回日期: 2022-03-19)