

# 血清游离 DNA 在肿瘤诊断中的研究进展

拜红霞<sup>1</sup>综述,戴 洋<sup>2</sup>审校(江苏省无锡锡山人民医院检验科 214011;2. 江西省血吸虫病防治研究所 214064)

【关键词】 游离 DNA; 肿瘤标志物; 肿瘤诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.09.051 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)09-1110-03

血清游离 DNA 又名循环 DNA,是血液循环中游离于细胞外的 DNA。研究发现,游离 DNA 在健康人的血液中含量甚微,而当机体在一些特殊状态时(如患有肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病、中风、心肌梗死及妊娠等),其含量明显上升<sup>[1-3]</sup>。因此,通过检测血液中游离 DNA 来反映某些疾病的状态成为一种可能的手段。

肿瘤是严重危害人类健康和生命的一种疾病,目前还缺乏有效的治疗药物,及时发现肿瘤并进行手术是治疗肿瘤的有效手段。因此寻找具有高度敏感性和特异性的肿瘤标志物具有十分重要的意义。血液游离 DNA 在肿瘤发生的早期就可出现含量上升,且在肿瘤患者中游离 DNA 还存在 DNA 完整性、微卫星变化、癌基因/抑癌基因突变、超甲基化以及染色体质量组等遗传学及表观遗传学的改变,同时由于血液样本较肿瘤活组织检查相对容易获取、无创伤、操作简便易行且可用于人群大规模筛查等优点,使游离 DNA 作为一种新颖的肿瘤标志物越来越受到研究人员的重视。本文将就近年来对血清游离 DNA 的一些特性、来源以及其作为肿瘤标志物研究的最新进展作一综述。

## 1 血清游离 DNA 的特性和来源

游离 DNA 是存在于血液中游离于细胞外的 DNA,血清和血浆中均含有,在健康人血清中的含量为 0~100 ng/mL,平均为 30 ng/mL,而在肿瘤患者血清中,血清游离 DNA 的含量个体之间的差异比较大,含量在 0~1 000 ng/mL 之间,平均约为 180 ng/mL。游离 DNA 在血清中以双链形式存在,多数可与核蛋白形成复合物,通过琼脂糖电泳观察 DNA 呈“梯形”分布,片段大小约在 180~21 000 碱基对(bp)之间。游离 DNA 在血循环中可被血浆核酸酶(如 DNase I)快速清除,通过对妊娠母体中胎儿游离 DNA 的检测显示,母体内的胎儿游离 DNA 的半衰期仅为 16.3 min。在肿瘤研究中,Diehl 等研究显示一个有体质量为 100 g 肿瘤的患者,每天约有 3.3% 以上的肿瘤 DNA 释放入循环中,而对游离 DNA 的稳定性研究未见报道<sup>[4]</sup>。

关于血清游离 DNA 来源的确切机制还不清楚,目前认为,主要存在以下两种机制。细胞发生凋亡/坏死后 DNA 释放入血循环和完整的细胞直接释放入血循环随后发生裂解释放出 DNA,由此形成了以下几种假说:(1)“凋亡假说”。在肿瘤发生过程中,基于游离 DNA 与凋亡细胞 DNA 电泳图谱类似,均显示 DNA 片段化,因此认为凋亡是血清游离 DNA 的主要来源。(2)“微小转移假说”。游离 DNA 来源于肿瘤发生微小转移过程中,少数细胞脱落随后裂解 DNA 释放入血,也就是说游离 DNA 的含量与循环中肿瘤细胞的数目是相关的,但研究发现循环中细胞的数目与游离 DNA 的含量并不相关,细胞数目要远低于理论上的估计,故该假说并不能自圆其说。

(3)“细胞坏死假说”。该假说认为,细胞坏死后释放的 DNA 是游离 DNA 的来源,包括肿瘤细胞的坏死和癌旁正常细胞的坏死,在肿瘤患者接受放射治疗后细胞会发生大量坏死按照该假说游离 DNA 水平会升高,但研究发现 90% 的肿瘤患者接受放射治疗后游离 DNA 的水平发生下降,因此该假说也存在争论。(4)“核酸酶失活假说”。健康人的血循环中存在核酸酶(DNase I 和 II)可有效降解游离 DNA,而维持游离 DNA 在较低的水平,而在肿瘤患者血循环中存在一些 DNase 的抑制因子使 DNase I 和 II 活性降低,降解游离 DNA 的活性下降导致了游离 DNA 的升高。(5)“细胞分泌假说”。该假说认为细胞可以 DNA-核蛋白复合物的形式主动向血循环中释放 DNA<sup>[1]</sup>。肿瘤的发生、发展是一个复杂的过程,不同类型的肿瘤也存在各自不同的特点,因此对肿瘤患者血清中游离 DNA 来源机制不可能用一种假说就可以完全阐释,应综合分析。

## 2 血清游离 DNA 在肿瘤诊断中的研究进展

血清中游离 DNA 在含量和质量上均可反映肿瘤存在的特征性变化,为肿瘤的诊断提供很好的检测靶标,研究内容主要包括游离 DNA 定量检测、DNA 完整性分析、肿瘤特异性改变(包括癌基因/抑癌基因突变、超甲基化、微卫星变化以及染色体重排等)的检测,分述如下。

### 2.1 血清游离 DNA 的定量检测

血清游离 DNA 含量的检测已有大量报道。早在 1977 年 Leon 等就用放免法检测了 173 例各种肿瘤患者和 55 例健康人血清中游离 DNA 的水平,发现肿瘤患者血清中游离 DNA 含量均值(180±38)ng/mL 远远高于健康人均值(13±3)ng/mL,伴有转移患者 DNA 水平均值(209±39)ng/mL 高于局部病灶者均值(100±30)ng/mL,放射治疗后, DNA 水平下降,如治疗后 DNA 水平仍维持在较高水平,提示治疗无效<sup>[5]</sup>。随后进行的一系列研究包括对上皮性卵巢癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌、睾丸癌等患者的游离 DNA 水平测定,结果显示肿瘤患者血清中游离 DNA 水平与健康人及其他非肿瘤的良好疾病相比均有显著升高,提示血清游离 DNA 含量是一个可用于肿瘤的早期诊断、评价疗效及判断预后的有效指标<sup>[6-7]</sup>。用于血清中游离 DNA 定量检测的方法主要有放射免疫法、荧光染料法(SYBR Green I、Pico Green、Hoechst 33258 等)、核酸凝胶染色法、荧光定量聚合酶链反应(PCR)等。由于血清游离 DNA 水平在多种恶性肿瘤患者中均有不同程度的升高,该指标无法对肿瘤的类型作出特异性的诊断,如将游离 DNA 水平与一些肿瘤标志物进行联合检测可大大提高肿瘤诊断的敏感性和特异性。在上皮性卵巢癌诊断的研究显示,游离 DNA 联合糖类抗原 125 检测可使诊断敏感性和特异性显著提高,结果提示,游离 DNA 定量可辅助现有的一些肿瘤标志物更好地应用于肿瘤的诊断<sup>[8]</sup>。

**2.2 血清游离 DNA 完整性分析** DNA 完整性又称 DNA 片段化模式,是反映游离 DNA 片段大小分布的指标。由于肿瘤患者的游离 DNA 可能来源于肿瘤细胞的坏死,可释放大片较长的游离 DNA,而健康人群游离 DNA 主要来源于细胞的凋亡,其释放的游离 DNA 片段较短,一般为 185~200 bp,因此通过分析游离 DNA 完整性可反映肿瘤的发生、发展过程,并可作为游离 DNA 定量检测的补充,更好地指导肿瘤的临床诊治和病情监测。用于游离 DNA 完整性分析的方法有琼脂糖凝胶电泳法和 PCR 定量检测法,前者是将游离 DNA 直接行琼脂糖凝胶电泳,染色后于紫外灯下直接观察游离 DNA 的片段大小分布,直观地反映游离 DNA 的完整性;而后者使用定量 PCR 方法对选定基因的较长片段与较短片段进行定量,用游离 DNA 完整性指数来反映游离 DNA 的完整性,其中游离 DNA 完整性指数等于较长 DNA 片段的量/较短 DNA 片段的量,通常选定的基因有  $\beta$ -肌动蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、人端粒酶逆转录酶等管家基因。高玉洁等应用电泳和定量 PCR 方法对白血病患者循环 DNA 完整性进行了分析,发现白血病患者循环 DNA 电泳显示大小不一的片段, DNA 完整性指数显著高于健康人,对白血病的诊断及预后判断具有重要价值<sup>[9]</sup>。同样对前列腺癌、睾丸癌、肺癌、肾细胞癌等患者的游离 DNA 完整性检测显示,游离 DNA 完整性指数较健康人均有显著升高<sup>[10-11]</sup>。

**2.3 血清游离 DNA 中肿瘤特异性改变的检测** 肿瘤患者血清游离 DNA 除了含量改变外,还存在一些肿瘤特异性变化,包括微卫星改变、癌基因或抑癌基因突变、DNA 超甲基化以及染色体重排等,这些改变可直接反映肿瘤的发生、发展,因此对这些变化的检测可以使对肿瘤的诊断更具特异性,具有更好的诊断及判断预后的价值。

微卫星(MS)是一种由 2~6 个核苷酸组成的具有高度多态性的简单串联排列的 DNA 序列,是一类高度多态性的遗传标记。微卫星序列定位于基因的启动子、基因编码区、内含子及其与外显子交界区,通过改变 DNA 结构或与特异性蛋白结合而发挥其基因调控作用。微卫星异常是基因组不稳定的重要分子标志,主要表现为:(1)微卫星不稳定性(MSI);(2)杂合性丢失(LOH)。MSI 是指肿瘤组织与其相应非肿瘤组织相比,其结构性等位基因的大小发生改变,即微卫星重复单元的增加和丢失。在扩增片段长度多态性分析中,表现为肿瘤组织 DNA 出现而非肿瘤组织中不出现的额外的带,或肿瘤的一个等位基因与非肿瘤组织相应等位基因相同,而另一等位基因的位置发生改变。肿瘤中微卫星的 LOH 比 MSI 更常见,是指一个位点上 2 个多态性等位基因中的一个出现突变或缺失。研究表明,这两种微卫星异常可在肿瘤患者血清游离 DNA 中检测到,且可作为肿瘤早期诊断、转移及预后的有效判断指标。检测微卫星改变的方法主要有毛细管电泳和荧光标记多重 PCR 等。在肺癌研究中,应用微卫星不稳定性(D21S1245)和杂合性缺失(FHIT 位点)2 个标志物检测 87 例 I~III 期非小细胞肺癌(NSCLC)和 14 例健康人,发现 56% NSCLC 组织和 40% 的血浆中存在至少一种微卫星改变,肿瘤组织阳性的患者中有 61% 血浆中存在 LOH,健康对照组无相应改变<sup>[12]</sup>。

肿瘤在发生过程中可出现癌基因或抑癌基因的突变,且可通过血清游离 DNA 对这些突变进行检测,检测最普遍的基因有 ras 基因和 p53 基因,目前用于检测的方法主要是基于 PCR

的方法(如限制性位点突变 PCR 分析、限制性片段长度多态性 PCR 及多流电子 PCR 分析等)和 DNA 的测序。ras 基因突变的检测不仅可作为一种肿瘤标志物还可评估机体荷瘤程度、预后及复发的监测。Wang 等对非小细胞肺癌研究发现,在血浆游离 DNA 中 ras 基因的突变与相应癌组织具有很好的相关性,并可作为一个很好的预测指标<sup>[13]</sup>。p53 基因可在多个外显子上的位点发生突变,使对该基因突变的检测较 ras 基因更为繁琐,尽管如此研究人员仍发现在不同肿瘤患者中,游离 DNA 存在该基因的突变。在 24% 小细胞性肺癌和乳腺癌组织中发现 p53 基因突变,其中 50% 在血浆中存在相同的改变,游离 DNA 中 p53 基因的突变与肺癌的复发密切相关<sup>[14]</sup>。

DNA 的超甲基化可使一些编码细胞生长调控和凋亡的基因表达发生和改变,因此在肿瘤的发生和发展过程中起到十分重要的作用<sup>[15]</sup>。近年来出现的甲基化特异性 PCR 使检测游离 DNA 中的 DNA 甲基化更加简便。研究人员检测了 22 例 NSCLC 患者,发现其中的 15 例(68%)肿瘤组织中存在以下一种基因的启动子高甲基化:p16、死亡相关蛋白激酶、谷胱甘肽-S 转移酶 Pi 和 O6 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶,其中的 11 例(73%)患者的血清中有相同的甲基化改变,健康人对照组无此改变; Liggett 等应用基于微点阵的检测方法分析了卵巢癌患者、良性卵巢疾病患者及健康人游离 DNA 的甲基化模式,发现不同启动子的甲基化模式对卵巢癌、良性卵巢疾病及健康人的鉴别诊断具有很高的敏感性和特异性,是一个有效的、可用于肿瘤诊断的靶点<sup>[16]</sup>。

染色体重排是游离 DNA 中可检测到的另一种肿瘤特异性变化。Frickhofen 等对非霍奇金氏淋巴瘤或急性 B 淋巴细胞白血病研究发现,患者血清/血浆游离 DNA 可检测到免疫球蛋白重链 DNA 重排,且该基因重排阳性可辅助诊断 B 淋巴细胞白血病,对该指标的动态观测可反映化疗的效果,同时是重要的预后指标,并能用于指导实施个体化治疗和骨髓移植治疗<sup>[17]</sup>。

### 3 结 语

综上所述,游离 DNA 检测具有样本采集无创伤性、简便易行、稳定性好(游离 DNA 可长时间保存)等优点,使其成为了肿瘤诊断的一个良好的靶点,尤其对一些无症状的肿瘤可以早期诊断,为及时有效的治疗创造了可能,通过检测其改变还可诊断微小转移肿瘤和早期复发,为药物疗效、制定治疗方案及判断预后提供了证据,从而提高了治愈率,具有重要的临床意义,显示了很好的应用和发展前景<sup>[18]</sup>。但其作为一个有效的肿瘤标志物也存在一些不足,比如特异性不是很理想(游离 DNA 一些遗传学变化不能很好地指示肿瘤的类型和发展的程度)、血清中的游离 DNA 的水平可受到其他一些非肿瘤疾病的影响、检测方法(如 PCR)的高度敏感性极易产生假阳性等。因此,游离 DNA 发展成为一个有效的可用于临床常规检测肿瘤标志物还需进一步的研究。

### 参考文献

- [1] Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine[J]. Cancer Treat Rev, 2002, 28(5): 255-271.
- [2] Tsai NW, Lin TK, Chen SD, et al. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients

- with acute ischemic stroke[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412 (5-6): 476-479.
- [3] Tsui DW, Chiu RW, Lo YD. Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma[J]. Chimerism, 2010, 1(1): 30-35.
- [4] Gormally E, Caboux E, Vineis P, et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance [J]. Mutat Res, 2007, 635(2-3): 105-117.
- [5] 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.
- [6] Hauser S, Zahalka T, Ellinger J, et al. Cell free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer [J]. Anticancer Res, 2010, 30(7): 2785-2789.
- [7] Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6 (2): 286-290.
- [8] 傅士龙, 屠红, 张国玲, 等. 卵巢上皮性癌患者循环 DNA 的定量研究 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21 (11): 659-662.
- [9] 高玉洁, 杨再林, 钟晓明, 等. 白血病患者循环 DNA 定量和完整性分析及其临床意义 [J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(1): 24-27.
- [10] Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, et al. Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer [J]. J Urol, 2009, 181(1): 363-371.
- [11] Schmidt B, Weickmann S, Witt C, et al. Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and non malignant lung disease [J]. Ann NY Acad Sci, 2008, 1137: 207-213.
- [12] Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients [J]. Int J Cancer, 2003, 105(3): 361-370.
- [13] Wang S, An T, Wang J, et al. Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(4): 1324-1330.
- [14] Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, et al. Plasma DNA, microsatellite alterations, and p53 tumor mutations are associated with disease-free survival in radically resected non-small cell lung cancer patients: a study of the perugia multidisciplinary team for thoracic oncology [J]. J Thorac Oncol, 2008, 3(4): 365-373.
- [15] Wang Z, Chen Z, Gao Y, et al. DNA hypermethylation of micro RNA - 34b/c has prognostic value for stage I non-small cell lung cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(5): 490-496.
- [16] Liggett T, Melnikov A, Yi QL, et al. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis [J]. Cancer, 2010, 116(7): 1674-1680.
- [17] Frickhofen N, Muller E, Sandherr M, et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia [J]. Blood, 1997, 90(12): 4953-4960.
- [18] 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.

(收稿日期: 2010-12-04)

## 肿瘤基因治疗的研究进展

王 浩 综述, 张 铀 审校(昆明医学院第二附属医院血液科 650101)

**【关键词】** 肿瘤基因; 基因治疗; 遗传物质

**DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 09. 052 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)09-1112-05**

基因治疗是以改变遗传物质为基础的 DNA 重组技术, 需要将目的基因传递到细胞内, 这一过程必须要有载体的协助才能达到目的, 因此载体在基因的转移中担任重要角色。随着免疫学的发展和基因技术, 研究的不断加深, 结合病毒载体、免疫基因和转基因等方法在肿瘤的基因治疗中取得了许多成就, 为肿瘤的治疗展现了广阔的应用前景。

### 1 基因沉默疗法

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在生物体细胞内, 与靶基因同源的外源性或内源性双链 RNA (dsRNA) 诱导转录后引起特异性基因沉默 (PTGS)。Shin 等<sup>[1]</sup> 和 Pang 等<sup>[2]</sup> 利用 RNAi 技术先后在胃癌、大肠癌和肝细胞癌治疗的实验研究中取得了明显的效果。国内也有许多 RNAi 研究的相关报道<sup>[3]</sup>。

RNAi 发生机制的大致模型。(1) 小干扰 RNA (siRNA) 的形成阶段: 此阶段需要 Rde-1、Rde-4 和 dsRNA 特异性的核酸内切酶 Dicer 等共同参与。Rde-1, 4 编码的蛋白识别外源 dsRNA, 引导 dsRNA 与 Dicer 结合, 然后 Dicer 将 dsRNA 解旋, 再将其裂解为 21~25 nt 大小的 siRNA。Dicer 定位于胞浆中, 但核内 mRNA 剪切修饰后在向核外运输过程中也存在 RNAi 现象, 可能有其他类似功能的酶发挥作用。现认为 21~25 nt 大小并在 3' 端带有 2~3 个碱基悬端且 5' 端磷酸化的 siRNA 诱导的 RNAi 效应最强。Dicer 家族在进化上非常保守, 有 5 个组成部分: N-端 RNA 解旋酶结构域、1 个 PAZ 结构域 (PAZ)、2 个 RNaseIII 结构域和 C 端 dsRNA 结合基序。Dicer 在体内一般是以二聚体的形式发挥作用的, 由于不同种族 Dicer 分子大小不一样, 所以 dsRNA 被切割成的 siRNA 大小具有