

- ria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground[J]. J Biomed Sci, 2008, 15(1):5-14.
- [18] 韩丽娟,邵海枫,王卫萍,等.鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物的耐药机制研究[J].医学研究生学报,2010,23(10):1038-1041.
- [19] 蒋守刚,黄利华,裴豪,等.鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药机制研究[J].检验医学,2012,27(8):619-623.
- [20] 刘家玉.关于抗生素使用情况的调查[J].现代医药卫生,2001,17(9):725.
- [21] 顾丽芳.鲍曼不动杆菌的菌种分布和耐药性分析[J].现代医药卫生,2009,25(23):3657-3658.
- [22] 王凌伟,陈升汶.不动杆菌微生物学耐药研究进展[J].国外医药抗生素分册,2004,25(3):135-136.
- [23] 王艳丽,黄茂,梅亚宁,等.鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制研究[J].中国感染与化疗杂志,2008,8(4):266-270.

## • 综述 •

# 循环 DNA 的研究进展\*

彭亮 综述, 娄晓丽, 侯彦强<sup>△</sup> 审校

(上海交通大学附属第一人民医院松江分院检验科, 上海 201600)

**关键词:**循环 DNA; 分子标志物; 综述

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.034

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)18-2424-03

循环 DNA 又称游离 DNA(cf-DNA)是一种存在于动、植物和人的体液中的无细胞状态的胞外 DNA。1977 年 Leon 等<sup>[1]</sup>首先发现肿瘤患者血浆 DNA 含量明显增高,提出了监测外周血游离 DNA 水平在观察疗效、预测复发方面的作用。有研究表明<sup>[2]</sup>健康人循环 DNA 含量极微,约在 5 μg/L 左右。当机体处于肿瘤、自身免疫性疾病和炎性反应等情况下,体内循环 DNA 的含量会相应的增加,但其产生的机制至今仍不十分明确。目前循环 DNA 的血清学检测还不能直接用于疾病的早期诊断和疗效判断,但它与一些疾病的产生与发展有着密切的联系,因此,检测循环 DNA 并对某些已知病种的特异性基因进行确定具有重要的临床意义,循环 DNA 将有可能成为颇具前景的疾病早期诊断和疗效判断的新型分子标志物。本文就循环 DNA 最新研究进展作一综述。

## 1 新型分子标志物循环 DNA

**1.1 循环 DNA 检测在肿瘤诊断中的应用** 研究显示肿瘤患者血浆中游离 DNA 具有与肿瘤组织中 DNA 相一致的分子遗传学改变(如基因突变、抑癌基因启动子高甲基化、微卫星不稳定和杂合性丢失等)<sup>[2-3]</sup>,因此对肿瘤患者血浆游离 DNA 的研究一直是热点。通过一系列研究,研究人员认为肿瘤患者循环 DNA 主要来源于以下途径<sup>[4-5]</sup>:(1)循环血或微转移灶中肿瘤细胞溶解;(2)肿瘤细胞的坏死或凋亡;(3)肿瘤细胞不断释放 DNA 进入血液循环;(4)肿瘤侵袭致周围细胞、组织变性而释放 DNA 入血;(5)淋巴细胞与肿瘤细胞的相互作用。(6)肿瘤患者血中存在 DNA 酶抑制剂,抑制血浆 DNA 降解,从而使 DNA 在血中富集。由此可见,肿瘤患者循环 DNA 的升高很可能可能是多种途径共同作用的结果。

1989 年 Stroun 等<sup>[6]</sup>首先对肿瘤患者体内的游离循环

- [24] Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, et al. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals[J]. Res Microbiol, 2005, 156(3):348-355.
- [25] Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5):1001-1004.
- [26] Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(9):3628-3634.

(收稿日期:2013-04-11)

DNA 的序列进行了检测,随后在肿瘤患者体内的游离循环 DNA 上相继检测到了 K-ras、N-ras、P53、APC 等基因的突变。Mulcahy 等<sup>[7]</sup>应用 RFLP-PCR 法检测了 21 例胰腺癌患者的循环 DNA,结果有 17 例患者的循环 DNA 中有 K-ras 基因突变,其中有 4 例循环 DNA 中有 K-ras 基因突变的患者最初诊断为胰腺炎,在此后的 5~14 个月中相继被诊断为胰腺癌。肿瘤抑制基因 p53 是迄今为止在人类癌症中最常突变的基因,研究显示在结直肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌和头颈部癌患者血浆/血清 DNA 中检测到 p53 的点突变<sup>[8]</sup>。

循环 DNA 的分子遗传学改变中基因高甲基化在肿瘤发生、发展中属于普遍现象,提示癌基因的甲基化可作为诊断肿瘤的特异性基因标志<sup>[9]</sup>。Göbel 等<sup>[10]</sup>研究乳腺癌患者血浆/血清中总循环 DNA 的量明显高于正常人,在 428 例乳腺癌患者外周血 cf-DNA 存在 PITX2 和 RASSF1A 基因异常甲基化情况。McNally 等<sup>[11]</sup>选择 42 例病理确诊且经介入治疗的肝细胞性癌患者,监测其血清 DNA 中 RASSF1A 甲基化基线水平以及在第 1 周期治疗后第 8 周的水平,结果显示 RASSF1A 甲基化基线水平与病灶直径大小呈正相关( $P < 0.01$ )。研究表明,循环 DNA 的甲基化现象与肿瘤细胞 DNA 的甲基化现象呈现高度的一致性,并且甲基化异常现象先于肿瘤蛋白标志物的出现,对于恶性肿瘤的早期检测更有优势,有望成为评价肿瘤状态的特异性标志物。

有报道显示大于 50% 肿瘤患者存在循环 DNA 的改变,这使其成为一种普遍的、有意义的临床和流行病学研究的分子标记物<sup>[12]</sup>。由于循环 DNA 可在疾病诊断之前就被检测出来,大大增加了其作为诊断肿瘤并用来监测癌症复发工具的可能性。

**1.2 循环 DNA 检测在胚胎医学方面的应用** Lo 等<sup>[13]</sup>在孕

\* 基金项目:上海市松江区科技攻关项目(QK2012)。作者简介:彭亮,男,主管检验师,主要从事病毒、肿瘤实验室诊断研究。<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail:houyanqiang@yahoo.com.cn。

妇母体血浆中发现了胎儿 DNA 的存在,这一发现被认为是循环核酸领域中的一个重大突破。研究还发现使用母体血浆中的游离循环胎儿 DNA 可以对胎儿的血型进行鉴定,这种方法应用在 Rh 型检测中准确率超过 99%。此外,母体血浆中游离胎儿 DNA 检测还可为产前性别连锁疾病的诊断提供了一种非侵入性的评价途径,但这种检测策略的缺陷在于,胎儿基因必须可与母亲 DNA 序列显著区分,而母体血浆中胎儿母源性等位基因很难被检测。利用 DNA 甲基化差异检测母体血浆中游离胎儿 DNA 的策略推论,突破母体血浆中检测胎儿 DNA 的局限性,拓宽了通过母体血浆中胎儿 DNA 进行胎儿疾病诊断的应用范围,使更多的 DNA 甲基化检测方法也可用于无创性产前诊断,包括 MS-PCR 和数字化 PCR。同时,寻找可提高游离胎儿 DNA 分离率的表观遗传学新标志物,可用于直接诊断某些由甲基化异常直接导致的疾病<sup>[14]</sup>。目前关于母体血浆中胎儿 DNA 应用到产前诊断等许多研究中都存在缺少统一的实验标准,在样品收集和准备上的不同以及缺乏合适的保证实验准确性的标准的一些问题。

**1.3 循环 DNA 检测在其他疾病中的应用** 除了肿瘤学和胚胎医学,循环 DNA 的检测也被应用在对其他疾病的研究中。对于外伤的患者的研究发现其体内的血浆游离循环 DNA 的浓度在受伤一小时内会上升,同时循环 DNA 浓度与受伤的程度有关<sup>[15]</sup>。血浆中循环 DNA 水平的高低还与创伤的程度和感染性疾病的严重程度相关,高水平的循环 DNA 预示着临床的高病死率<sup>[16]</sup>,对于治疗中的患者的循环 DNA 的检测可以预测其在器官衰竭、急性肺损伤、急性呼吸综合征以及死亡方面的情况。Wagner<sup>[17]</sup>研究发现血浆中循环 DNA 浓度的显著升高还见于各种老年性疾病如心肌梗死、中风等。Akirav 等<sup>[18]</sup>采用 PCR 的方法扩增糖尿病患者体内  $\beta$ -细胞甲基化基因和胰岛素基因,发现与正常人相比,糖尿病患者血清中的循环 DNA 明显升高。对循环 DNA 的检测也有效地应用在对器官移植排斥的检测中,对捐献者特异循环 DNA 的检测可以有效地预测肾移植排斥情况<sup>[19]</sup>。由此可见,许多疾病的发生可造成体内循环 DNA 浓度的升高,其产生机制及与肿瘤的发生是否有一定相关性还有待进一步研究。另外如果将检测外周血 DNA 水平应用于诊断恶性肿瘤,也应该首先排除各类急慢性炎症和自身免疫性疾病的可能。

## 2 循环 DNA 的检测方法

Ding 等<sup>[20-21]</sup>首先采用了单等位基因引物延伸反应(SA-BER)来检测单个碱基,研究人员将 SABER 法和 MALDI-TOF 质谱法结合起来应用到对  $\beta$ -地中海贫血的产前诊断中,极大地提高了循环 DNA 检测的灵敏度。目前,国内外应用较多的定量检测方法可分为两大类:一是以聚合酶链反应(PCR)为基础的扩增方法,如甲基化特异性 PCR 法(MSP)和实时荧光定量 PCR 法(RTQ-PCR);二是信号放大技术检测方法,如支链 DNA(bDNA)检测技术。过去几年中研究循环 DNA 浓度的研究者多采用基于定量 PCR 的分析方法<sup>[22-23]</sup>,高灵敏性的实时 PCR 方法为仅测量可被特异性扩增的 DNA 信号提供了条件,可以检测皮克(pg)级的 DNA。当然也有一些改进技术或联合应用技术可以更加精确地测定循环 DNA 的含量,但尚无统一的标准。

## 3 小结与展望

循环 DNA 作为一种临床应用前景很好的分子标志物,目前还存在一些问题有待解决:(1)循环 DNA 的确切来源还有待阐明。(2)循环 DNA 水平是在一个宽量程、无序的范围内

波动,如何控制检测的时效性。(3)由于对血样标本的处理不同、对照人群选择的差异和定量分析技术的差异,大量的同类研究之间存在显著性差异。显然,循环 DNA 的分子检测应用于临床,还有待于认真评估循环 DNA 标记物的结果与大量纵向的临床资料之间的吻合程度。今后重要的任务是发现和选择针对不同疾病以及不同群体的合适的循环 DNA 标记物及其精确的定量分析,以期达到建立清晰的临界值水平而验证这些分子模式。展望未来,循环 DNA 这一领域的基础实验及临床研究必将成为人们倍受瞩目的研究热点,很可能成为诊断和评估多种疾病的更为敏感和特异的标志物。

## 参考文献

- [1] Leon SA, Shapino B, Skaaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646.
- [2] Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, et al. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma[J]. Clin Chim Acta, 2008, 387(1/2): 55-58.
- [3] Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 892.
- [4] Goebel G, Zitt M, Zitt M, et al. Circulating nucleic acids in plasma or serum as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias[J]. Dis Markers, 2005, 21(3): 105-120.
- [5] 张忠,袁媛.循环 DNA、循环肿瘤细胞端粒酶与肿瘤早期诊断[J].癌症,2004,23(2):227.
- [6] Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients[J]. Oncology, 1989, 46(5): 318-322.
- [7] Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al. A prospective study of K-ras gene mutation in the plasma of pancreatic cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(2): 271.
- [8] Huang XH, Sun LH, Lu DD, et al. Codon 249 mutation in exon of p53 gene in plasma DNA: maybe a new early diagnostic marker of hepatocellular carcinoma in Qidong risk area, China[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 692.
- [9] Ponomaryova AA, Rykova EY, Cherdynseva NV, et al. RAR $\beta$ 2 gene methylation level in the circulating DNA from blood of patients with lung cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 2011, 20(6): 453-455.
- [10] Göbel G, Auer D, Gaugg I, et al. Prognostic significance of methylated RASSF1A and PITX2 genes in blood- and bone marrow plasma of breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(1): 109-117.
- [11] McNally ME, Martinez A, Khabiri H, et al. Inflammatory markers are associated with outcome in patients with unresectable hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization [J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(3): 923-928.
- [12] 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.
- [13] Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, et al. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood[J]. Lancet, 1989, 2(8676): 1363-1365.
- [14] Gao T, Nie Y, Hu H, et al. Hypermethylation of IGSF4 gene for noninvasive prenatal diagnosis of thalassemia[J]. Med Sci Monit, 2013, 19(10): e20210.

2012,18(1):BR33-40.

- [15] Lam NY, Rainer TH, Chan LY, et al. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients[J]. Clin Chem, 2003, 49(8):1286-1291.
- [16] Campello Yurgel V, Ikuta N, Brondani da Rocha A, et al. Role of plasma DNA as a predictive marker of fatal outcome following severe head injury in males[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(7):1172-1181.
- [17] Wagner J. Free DNA--new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? [J]. Biochem Med (Zagreb), 2012, 22(1):24-38.
- [18] Akirav EM, Lebastchi J, Galvan EM, et al. Detection of  $\beta$  cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(47):19018-19023.
- [19] Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection[J]. Transplantation, 2004, 77(12):1866-1875.

## · 综述 ·

# 微阵列比较基因组杂交技术及其在肿瘤拷贝数变化研究中的应用进展\*

徐秋月 综述, 张艳亮, 段 勇<sup>△</sup> 审校

(昆明医科大学第一附属医院检验科, 云南昆明 650000)

**关键词:** 微阵列比较基因组杂交技术; 肿瘤; 拷贝数变化

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.035

**文献标识码:**A

**文章编号:** 1673-4130(2013)18-2426-03

肿瘤是一种严重威胁健康和生命的疾病,据统计约有50%的男性和30%的女性可能患病<sup>[1]</sup>,并且超过半数的肿瘤患者分布在医疗条件欠缺的发展中国家<sup>[2]</sup>。肺癌的发生发展是一个多基因参与、多阶段发展的病理过程,而基因组DNA拷贝数变化(CNVs)是引起肿瘤基因异常的重要机制之一,识别特征性CNVs及所含基因对认识肿瘤的将起到重要作用。微阵列比较基因组杂交(aCGH)技术作为一种新型细胞-分子遗传学技术,具有高分辨率、高通量和自动化的特点,使用少量DNA就能检测出不同类型肿瘤在发生发展的不同时期中CNVs变化水平。因此aCGH技术特别适用于研究肿瘤及遗传<sup>[3]</sup>等复杂基因组改变的疾病,对于判断患者预后,选择个体化治疗方案具有重要的意义。本文就aCGH的原理、特点和在肿瘤研究中的应用和进展阐述如下。

## 1 aCGH的原理、分类、方法与技术进展

**1.1 aCGH的基本原理和分类** aCGH与比较基因组杂交技术(CGH)的原理相似,使用不同颜色荧光染料如cy5(红色)和cy3(绿色)标记的实验和对照样品的片段化DNA在人类全基因组DNA微阵列芯片上进行竞争性杂交,通过比较两种荧光信号的颜色和相对强弱,便可判断各染色体的CNVs:红绿色均等的区域为肿瘤细胞与正常细胞均具有的正常部分,红色较强的部分是肿瘤细胞染色体区域产生扩增的区域,以绿色为主的部分则是肿瘤细胞染色体缺失的区域。根据微阵列上所固化的核苷酸的性质,可将aCGH芯片分为cDNA aCGH、大插入aCGH、寡核苷酸aCGH这3种类型:cDNA aCGH芯片广泛分布着表达序列标签(EST);大插入aCGH敏感性和信噪比

较高;寡核苷酸aCGH易于标准化,重复性高,在实际操作中可根据不同的研究标准或是肿瘤类型来选择合适的芯片。

**1.2 分析方法** aCGH的分析步骤为:(1)数据的预处理:用阴性对照或综合全部非杂交点的平均信号来校正背景噪音,然后使用归一化因子调整数据。目前常用于调整aCGH数据的方法有:看家基因法、总光密度法、回归技术和比率统计归一化。(2)CNVs筛选:使用统计方法筛选肿瘤及对照组存在显著差异的区域;aCGH能鉴定出相似病例的共同断裂点及大小,一般认为共同变异大于10%即有意义;最后结合相关研究结果确定CNVs的最小关键区域,通过生物信息学找出其中包含的基因,筛选出与本研究相关的候选基因。查阅CNVs常用的数据仓库有:database of genomic variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)与Human Structural Variation Database (<http://humanparalogy.gs.washington.edu/structuralvariantion/>);(3)验证:CNVs对表型的调控作用是通过改变候选基因的转录(及推测随后的翻译)水平,因此使用较精确的FISH、RT-PCR或对相关基因的mRNA、蛋白做进一步检测,验证aCGH分析结果也是不可或缺的步骤。

**1.3 aCGH的技术进展** 经典的CGH技术,不能提供CNVs的精确定量与定位,并且需人工校正核型分析软件的结果。为突破传统CGH的局限性,1997年Solinas-Toldo等<sup>[4]</sup>率先在自己的研究中使用了Matrix-CGH,1998年这项技术又得到Pinkel等<sup>[5]</sup>研究组的进一步优化,aCGH技术用探针代替中期染色体做为微阵列杂交靶,避开复杂的染色体结构,从而提高分辨率。为了适应不同研究的需要,科学家开发出许多不同种

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160292)。 作者简介:徐秋月,女,在读硕士研究生,主要从事临床检验诊断专业研究。

△ 通讯作者,E-mail:duanyong7@139.com。

(收稿日期:2013-04-17)

- [20] Ding C, Cantor CR. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6):3059-3064.
- [21] Ding C, Chiu RW, Lau TK, et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(29):10762-10767.
- [22] Ellinger J, Müller DC, Müller SC, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies[J]. Urol Oncol, 2012, 30(4):509-515.
- [23] Huang Z, Hua D, Hu Y, et al. Quantitation of plasma circulating DNA using quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(2):271-276.