

循环游离DNA在临床疾病中的研究进展

周 钦¹, 王海久^{2*}

¹青海大学, 青海 西宁

²青海大学附属医院肝胆胰外科, 青海 西宁

收稿日期: 2022年1月23日; 录用日期: 2022年2月14日; 发布日期: 2022年2月25日

摘 要

循环游离DNA (cfDNA)作为一种非侵入性疾病生物标记物, 已成为一个有吸引力的研究课题。cfDNA目前可以在人体不同体液中(血液、尿液、唾液等)检测到。目前通过“下一代”测序(NGS)方法以及聚合酶链式反应(PCR)和NGS的组合, 靶向深度测序已被用于同时识别多个基因中的特定基因组区域或新的体细胞变体。新分子技术的快速发展促进了cfDNA的研究和鉴定, 为临床相关疾病的检测、临床决策和疾病的预后提供新的方法。目前, cfDNA可以应用于恶性肿瘤、产前筛查、心血管疾病、移植医学、自身免疫性疾病、寄生虫病等多种疾病领域的早期筛查和病情评估、监测等临床应用。本文就cfDNA的生物学特性及其在临床疾病中的应用作一综述, 以期为临床疾病的诊治提供新的视角。

关键词

循环游离DNA, 液体活检, 疾病, 临床应用

Research Progress of Circulation Cell-Free DNA in Clinical Diseases

Qin Zhou¹, Haijiu Wang^{2*}

¹Qinghai University, Xining Qinghai

²Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, The Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining Qinghai

Received: Jan. 23rd, 2022; accepted: Feb. 14th, 2022; published: Feb. 25th, 2022

Abstract

Circulating free DNA (cfDNA), as a non-invasive disease biomarker, has become an attractive research topic. cfDNA can be detected in different body fluids (blood, urine, saliva, etc.). Currently,

*通讯作者。

targeted deep sequencing has been used to simultaneously identify specific genomic regions or novel somatic variants in multiple genes through “next generation” sequencing (NGS) methods and a combination of polymerase chain reaction (PCR) and NGS. The rapid development of new molecular technologies has promoted the study and identification of cfDNA, providing new methods for the detection, clinical decision-making and prognosis of clinically relevant diseases. At present, cfDNA can be applied to clinical applications such as early screening, disease evaluation and monitoring in the fields of malignant tumors, prenatal screening, cardiovascular diseases, transplantation medicine, autoimmune diseases, parasitic diseases and other diseases. This paper reviews the biological characteristics of cfDNA and its application in clinical diseases, in order to provide a new perspective for the diagnosis and treatment of clinical diseases.

Keywords

Circulating Free DNA, liquid Biopsy, Disease, Clinical Application

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1948年, 自Mandel和Metais [1]首次报告了人类血浆中cfDNA的存在以来, 它作为一种非侵入性疾病生物标记物, 已成为一个有吸引力的研究课题。循环血中游离于细胞外的部分降解了的机体内源性DNA被称为cfDNA, 其可以存在于血清、血浆和其他体液(如尿液或唾液)中[2], 但其释放到血液中的机制还不清楚, 目前关于“液体活检”的研究内容包括以下几个方面: ① 肿瘤标志物; ② 外泌体; ③ 循环肿瘤细胞(CTC); ④ 循环肿瘤DNA(ctDNA)/循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA); ⑤ 循环肿瘤RNA; ⑥ 肿瘤内皮细胞。目前蛋白组学、外泌体、非编码单链RNA(miRNA)等手段尚处于研究阶段, 临床应用有限。cfDNA是一种血液或体液中游离于细胞之外的DNA, 这种cfDNA包含双链脱氧核苷酸片段, 其特征是长度大约低于200 bp, 分子量低, 浓度低[3] [4]。这种循环游离DNA存在于全血的无细胞成分中, 如血浆和血清, 以及其他人体液体[5] [6] [7]; 它与细胞无关[8], 但与蛋白质或膜结合结构形成复合物[9]。比如血浆中循环cfDNA最常见的假说: 可能来源于正常造血谱系细胞[10] [11]或其他有核细胞[12]的凋亡, 事实上, 健康受试者的cfDNA水平相对较低[13] [14]。cfDNA的几个特征支持这一假设: 其快速更新[15]及其在循环中的短半衰期[16]表明凋亡细胞持续释放的模型, 随后快速降解或过滤[14] [17] [18] [19] [20], 到目前为止, 凋亡和坏死并不是循环cfDNA存在的唯一机制。在某些疾病和特殊状态下, 比如肿瘤[21] [22]、系统性红斑狼疮(SLE) [23]、寄生虫病等, 其他细胞也会释放循环游离DNA入血。1994年, Vasioukhin等和Sorenson等[24] [25]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ctDNA中发现了RAS基因的突变, 表明可以利用ctDNA发现肿瘤的特异性基因突变。

然而在不同的生理和病理条件下, cfDNA的来源和功能可能不同。cfDNA主要通过病理机制释放到循环中: 对cfDNA的研究仅在其发现几年后才开始, 当时首先报道了SLE [23]和癌症患者[21] [22]中高水平的循环cfDNA, 肿瘤来源的循环cfDNA(称为循环肿瘤DNA(ctDNA))的检测启发了研究人员寻找其他DNA分子, 1997年在母体血浆中发现了胎儿来源的cfDNA [26]。据报道, 患有多种疾病的患者血浆或血清中cfDNA浓度升高, 如中风[27]、创伤、心肌梗死[28]和各种类型的癌症, 这表明cfDNA可能与炎症存在反馈关系, 其释放似乎激活了促炎性细胞因子反应[29]。

2. cfDNA 在临床疾病中的应用

2.1. cfDNA 在肿瘤疾病中的应用

2.1.1. cfDNA 在膀胱肿瘤诊断中的应用

肿瘤患者血浆内循环肿瘤细胞释放或原位肿瘤细胞释放入循环的 cfDNA 也称 ctDNA, ctDNA 在肿瘤诊断中的研究方向主要包括: ctDNA 突变的检测、肿瘤特异性微卫星改变、表观遗传学改变、ctDNA 完整性检测以及病毒 DNA 检测。尿液中同样也发现 ctDNA, 因此可能对部分膀胱癌诊断有效。膀胱癌患者尿液中主要的 ctDNA 主要来源于肿瘤细胞释放, 并且比血浆中浓度高, 因而更容易检测[30]。尿 ctDNA 也用于膀胱癌预后的评估, BIRKEN-KAMP-DEMTRODER [31]回顾性检测了 12 个非肌层浸润性患者的血清和尿液(6 个复发, 6 个进展)。通过 NGS 检测基因突变, 将高肿瘤特异性的基因突变制成个体化适用于数字 PCR (dPCR)的序列检测其余患者的血浆及尿液, 12 个患者中有 10 个患者检测到 ctDNA (83%), 4/6 (67%) ctDNA 检查阳性的患者在几个月后检查临床进展。因而证实这个手段可以用于早期检测及疾病预后预测。随后, 该实验室针对膀胱癌患者体液活检进行 FG-FR3 和 PIK3CA 突变检测。这些患者术前(膀胱切除术)术后的样本均被保留。8/9 (89%)可以检测到 ctDNA 的患者出现复发, 证实患者血浆中高水平 ctDNA 与高复发相关。同时, 该研究组通过 dPCR 检测膀胱癌尿液样本肿瘤特异性热点 FG-FR3 和 PIK3CA 突变, 发现非肌层浸润性尿液 ctDNA 水平很高, 因而能早期检测疾病进展到非肌层浸润性膀胱癌。尽管通过 CTC、ctDNA、外泌体和 miRNA 等“液体活检”技术进行膀胱癌分子诊断在临床以及检测手段发展迅速, 但仍需要多中心大样本临床随机试验(RCT)来验证其临床应用价值。随着新技术的不断开发以及检测手段的不断规范化, 分子诊断技术会广泛应用于临床实践中, 并且成为膀胱癌监测、预后评估、治疗效果评判的有力工具。

2.1.2. cfDNA 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤诊断中的应用

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是非霍奇金淋巴瘤(NHL)中最常见的亚型, 占 NHL 的 30%~40%, 是一种具有高度异质性的侵袭性淋巴瘤[32]。既往采用 Qubit3.0 荧光定量对血浆循环游离 DNA 精确定量研究发现[33] DLBCL 患者诊断时血浆循环游离 DNA 水平显著升高, 动态监测其水平可反映患者的疗效, 并可提示病情复发。cfDNA 在 DLBCL 的检测中具有取样方便、相对无创的优点, 便于连续检测和随访追踪, 具有广阔的临床应用前景, 该研究为单中心研究, 随访时间较短, 可获得的随访样本量较少。另有研究表明从 6 个治疗中心获得了 217 例诊断为 DLBCL 或原发性纵隔大 B 细胞淋巴瘤的患者的样本, 98% 的患者在治疗前可检测到 ctDNA。初步调查表明, 在开始治疗后的 1 周内, 应答者的 ctDNA 水平显著降低, 因此在第一个治疗周期结束时, 应答者和无应答者可以被完全区分, 表明 ctDNA 水平的动态改变可以提供临床结果的早期迹象, 该研究为多中心回顾性研究, 但样本量较小。目前 cfDNA 在 DLBCL 领域相关文献资料报道较少, 仍需进一步随访患者的长期疗效及扩大样本量以判断循环游离 DLBCL 的预后价值。

2.1.3. cfDNA 在肝细胞癌诊断中的应用

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 早期临床表现大多无特异性, 大多数患者被诊断为 HCC 时已经是晚期, 错失手术治疗的时机, 且发病率及死亡率较高, 故肝癌的早期诊断是其治疗的关键。有研究表明 cfDNA 作为一种单独的诊断指标对 HCC 诊断敏感性不足, 但可作为补充指标, 尤其当其和 AFP 联合后有较好诊断准确性, 并且定量检测的诊断准确性更高, 将来有望成为新的肝癌鉴别诊断指标。随着对血液中 cfDNA 的检测技术的不断发展[34], 肝癌患者 cfDNA 水平较健康人群升高, 并随肿瘤负荷动态变化[35]。Jiang 等[36]开展了大规模平行测序, 结果显示, cfDNA

对 HCC 的诊断敏感度为 80%，特异度为 94%，cfDNA 联合 AFP 检测在未来将作为一项常规早期诊断 HCC 的指标被应用于临床，进而提高 HCC 患者的早期诊断率。肝癌患者外周血 CTCs、cfDNA 明显升高，与 AFP、 γ -GT、CEA、ALT、AST、ALP 水平呈正相关，外周血 CTCs、cfDNA 水平检测对肝癌的早期筛查具有一定的临床价值，但此二者联合检测时的价值更高，可推广应用于临床中[37]。与组织活检相比，无细胞 DNA (cfDNA)测序具有一些明显的优势。首先，收集外周血以获得 cfDNA 与肿瘤活检相比是微创的，无论部位如何。其次，可以在治疗期间的任何时候采血，允许实时和动态监测肿瘤的分子变化，而不是依赖于侵入性活检甚至成像的挑战。此外，在癌症检测中，体细胞突变分析有几个优势，包括更高的临床灵敏度和动态范围，目前上述针对 cfDNA 在肝细胞癌的研究主要为 Meta 分析以及单中心回顾性研究，采用文献主要为英文及中文语种，相对受限，且样本量普遍较小，cfDNA 检测过程中质量控制(包括标本选择，采血管，离心方案等都是不可忽略的因素)，故在今后的研究中有待进一步解决。

2.1.4. cfDNA 肾细胞癌中的应用

肾癌是一类来源于肾小管上皮系统的恶性肿瘤，其中肾细胞癌(RCC)占肾脏所有原发性恶性肿瘤的 80%~90%，目前还没有临床验证的非侵入性生物标记物用于 RCC 的检测。健康人群中含量为 1~10 ng/ml，有研究表明[38] RCC 患者的外周血 cfDNA 表达量高于健康对照人群，并且随着 RCC 血管侵犯程度增加，另外，cfDNA 表达量与 RCC 预后效果呈负相关，肾切除术后出现复发的 RCC 患者的血 cfDNA 水平高于未复发者，这表明 cfDNA 在 RCC 血行转移方面具有潜在的预测价值。除了细胞核来源的 cfDNA 外，外周血中线粒体来源的 cfDNA (mt-cfDNA)在健康人群和 RCC 患者中也存在显著差异。在肾细胞癌中，基于基因和表观遗传学的 cfDNA 检测的表现可能反映了复发性改变特征的普遍性。鉴于常规临床采样的简便性，尿 cfDNA 是非侵入性癌症检测的有吸引力的来源。目前尚无针对尿液 cfDNA 进行全基因组分析以检测 RCC 的相关研究。虽然基于尿液的分类不如基于血浆的分类准确，但可以通过技术和计算优化来提高性能，例如选择 cfDNA 的大小以富集肿瘤来源的 DNA，并利用肿瘤甲基化数据来告知 cfDNA 甲基化分析。尽管如此，这些结果强调了尿液 cfDNA 对早期检测局部 RCC 的潜在价值。需进一步调查和优化尿液 cfDNA 准确性。

2.1.5. cfDNA 在头颈鳞状细胞癌(HNSCC)中的应用

头颈鳞状细胞癌(HNSCC)指原发于口腔、咽喉等部位的鳞状上皮细胞恶性肿瘤的总称。在世界范围内，HNSCC 占有新诊断癌症的 4%，5 年生存率低于 50%。HNSCC 的 5 年生存率较低，原因包括早期诊断不明、治疗效果欠佳及缺乏治疗后监测。近 50%的 HNSCC 患者在初次诊断时出现淋巴结受累，预后不良[39] [40]。cfDNA 检测具有微创以及可重复性，可能成为辅助组织活检的一种早期检测手段。大量研究表明，cfDNA 水平的增高可能提示肿瘤的发生[36]。Mazurek 等[41]通过实时荧光定量 PCR(qPCR)分析了 200 例 HNSCC 患者的 cfDNA 水平，与对照组相比，HNSCC 患者的平均总 DNA 水平较高，但差异无统计学意义。与其他 HNSCC 患者相比，口咽鳞状细胞癌患者的总 cfDNA 含量更高。研究人员还证明了 cfDNA 浓度与 HNSCC 淋巴结转移、分期和年龄之间存在显著相关性，有 14%的患者呈 HPV 阳性，其中大多数为 HPV16 阳性(96.4%)，而未检测到 EGFR 和 KRAS 突变。然而这些结果表明，cfDNA 检测可用于 HPV 阳性 HNSCC 的诊断[42]，是否对 HPV 阳性的 HNSCC 诊断有意义目前尚无大样本多中心的相关文献报道，同时，cfDNA 还可用于 HNSCC 治疗后监测以及 HNSCC 耐药性检测。

2.1.6. cfDNA 在胃肠道间质瘤中的应用

胃肠道间质瘤(GIST)是胃肠道最常见的间质瘤，约占所有肉瘤的 20% [43] [44]。肉瘤是一种罕见的癌症，可发生在骨骼、肌肉、神经、血管、结缔组织、脂肪和软骨中。肿瘤性 GIST 细胞似乎起源于一个共同的前体细胞，该前体细胞产生到正常肌间神经丛的 Cajal 间质细胞[45]。GIST 的特征是与肥大细

胞生长因子受体相关的受体酪氨酸蛋白或编码血小板衍生生长因子受体 α 的基因突变。这些遗传变异导致这些生长因子受体的持续激活, 并伴随异常细胞增殖, 从而导致 GIST 的发生, 早期检测这些基因改变对于诊断和治疗以及监测 GIST 的进展非常重要。在 GIST 患者外周血循环中循环的无细胞肿瘤 DNA (cfDNA) 中存在的突变肿瘤 DNA 衍生的“驱动”和“耐药”等位基因的情况下尤其如此。cfDNA 是一种使用微创取样的治疗过程中动态监测患者的肿瘤状态的新方法, 例如使用异种核酸的技术阻断野生型模板 PCR 扩增的夹持探针, 使组织活检样本和 cfDNA 中这些低频等位基因的分子检测得到改进。这些新方法可广泛应用于 GIST 治疗管理中的微创分子检测。

2.2. cfDNA 在心血管疾病检验中的应用

cfDNA 主要来源于凋亡或坏死的细胞, 在这种情况下会因 cfDNA 的释放入血而出现血浆内水平升高。冠心病往往会出现心肌长时间严重缺血导致的心肌细胞的坏死和凋亡。比如在心肌梗死(myocardial infarction, MI)发生时, 心肌缺血造成的心肌细胞坏死和凋亡引起 cfDNA 的升高[46]。冠心病患者血浆 cfDNA 升高可以用以补充心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)和肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)的诊断结果。研究显示[47], MI 患者血浆 cfDNA 浓度较健康对照升高 10 倍以上, 此外, cfDNA 的水平也是一个独立的检测指标, 其浓度水平和 CK-MB、cTnI 以及 C 反应蛋白无相关性, cfDNA 浓度在心肌损伤早期即可升高(远早于肌钙蛋白), 而达峰时间要晚于 CK-MB, 可以用于早期检测判断心肌损伤情况。另外, cfDNA 水平还是一个潜在的监测疾病进程和患者预后的指标[47]。随访结果显示, 出现心脏不利结果的 MI 患者血浆中 cfDNA 的水平升高达 3.5 倍以上[47]。由于心力衰竭也存在心肌细胞的凋亡和坏死, 故也会出现血浆 cfDNA 的升高。cfDNA 可以作为一种心肌功能提高的潜在诊断指标。

2.3. cfDNA 在移植医学中的应用

在移植医学中, 监测器官健康, 检测移植排斥反应, 对于器官移植受者的长期生存至关重要。Snyder 等人[48]已经证明供体衍生的 cfDNA 作为遗传特征存在于接受者的血浆中, 同种异体移植排斥事件可以与异常高水平的自身相关。由于排斥反应与移植衍生的某些细胞的凋亡有关, 测量受体血浆中 cfDNA 中的遗传特征, 因此可以随着时间的推移监测器官健康, 目前由于我国移植医学开展的中心相对较少, 相关研究文献缺乏, 且对于 cfDNA 检测及质控以及时机的把握尚无统一的标准, 期待今后能进一步完善。

2.4. cfDNA 在系统性红斑狼疮中的应用

内源性 DNA 主要存在于细胞核和线粒体中。然而, 在包括自身免疫性疾病在内的多种病理条件下, 已观察到细胞外的无细胞脱氧核糖核酸(cfDNA), 考虑到 cfDNA 对患者进行分层、监测治疗反应和预测疾病进展, 从而评估 cfDNA 对自身免疫性疾病的预后潜力的研究出现了高潮。在 20 世纪 70 年代 SLE 患者中发现高水平的 cfDNA 后, 对系统性自身免疫性疾病的研究一直在进行, 在认识到血浆是病理性 cfDNA 的更好来源后, 在该领域取得了重大突破, 健康志愿者中检测不到这种水平[49] [50] [51], 数据显示, cfDNA 浓度增加似乎与抗体滴度和活动性狼疮肾炎相关, 但与疾病活动性无关。无论如何, cfDNA 检测对 SLE 的诊断和预后仍有疑问[52]。cfDNA 在自身免疫性疾病中的临床相关性通过对自身免疫性和炎性疾病中导致 DNA 释放增强的生物过程的机械认识而得到加强。在这些早期观察之后, cfDNA 在其他自身免疫性疾病(包括类风湿性关节炎(RA))中得到证实[53]。然而, 随着更敏感方法的出现, 健康人血浆中也检测到 cfDNA, 尽管检测水平很低。这一观察结果, 加上 SLE 和 RA 患者 cfDNA 水平升高与疾病活动的时间相关性, 导致 cfDNA 可能成为自身免疫性疾病的潜在生物标志物。cfDNA 允许一种快速、简单、无创和重复的取样方法。结合这些生物学特征和取样的技术可行性, 将 cfDNA 定位为自身免疫性风湿性疾病的潜在生物标志物。然而, 为了实现这一目标, 有许多问题需要解决。应该承认的是, 自身

免疫疾病的潜在异质性本身可能导致 cfDNA 水平的大量变化, 因此必须采取适当措施, 尽量减少 cfDNA 取样水平的变化。值得注意的是, 样本类型(血浆/血清/滑液)、样本采集/处理方法、游离或细胞表面结合 DNA、cfDNA 提取和 cfDNA 定量以及定量 cfDNA 结果的呈现和解释缺乏一致性。此外, cfDNA 定性研究的出现带来了复杂性, 这也需要标准化。鉴于缺乏同质性, 健康个体的 cfDNA 水平尚未达成共识。此外, 大多数研究都是横断面的, 并且受到样本量的限制。然而, 为了充分了解 cfDNA 在自身免疫性风湿病中的生物标志物潜力, 今后需要一个系统的科学框架和协作效应来进行大规模、多中心的前瞻性分析试验。

2.6. cfDNA 在泡型棘球蚴疾病中的应用

多房棘球病(alveolar echinococcosis, AE)又称泡型包虫病, 属于感染棘球绦虫的幼虫所致的一类人兽共患寄生虫病, 以肝脏感染为最常见, 具有恶性化程度高、预后较差等特点。全球约有超过 90% 的肝泡型包虫病集中在我国经济 and 医疗水平相对落后的西部地区, 比如青海、四川、新疆和甘肃等省份(自治区), AE 在青海省的发病率为 0.63%, 人均伤残损失寿命为 2.434 年, 疾病负担为 32.24 万人/年。泡型包虫病一旦感染后还会通过血液循环等途径转移到其他器官, 类似癌症转移, 治疗困难, 病死率很高, 因此泡型包虫病也有“虫癌”之称。研究表明[54], 在 100% 的术 AE 患者的血浆中可检测到不同的虫源性循环游离 DNA (Em-cfDNA)。Em-cfDNA 对 AE 的诊断具有良好的敏感性和特异性。此外 Em-cfDNA 水平对于评价手术干预治疗 AE 病变的疗效明显具有参考价值。最后, 我们的分析显示, Em-cfDNA 水平可以反映术前 AE 患者病变大小的有意义的信息。基于测序的 Em-cfDNA 监测可作为临床中 AE 的有力诊断指标。我们还注意到, 这种液体活检方法在监测干预后 AE 患者中的持续疾病状态方面有很强的潜力。有报道称 cfDNA 可在许多种寄生虫病中被检测到, 如疟原虫、锥虫和细粒棘球菌, 并被认为是人类寄生虫感染的诊断工具[55] [56] [57] [58]。在这里, 我们确定了 AE 患者血浆中存在的棘球蚴病 cfDNA (Em-cfDNA) 是否对诊断和/或治疗评估具有临床价值, 并检测了 Em-cfDNA 水平与 AE 临床特征之间的潜在关联。

2.7. cfDNA 在其他临床疾病中的应用

cfDNA 除了在肿瘤、自身免疫性疾病、寄生虫、移植医学等的应用外, 尚有报道[59]认为 cfDNA 的检测可以应用在感染性疾病、创伤、急性胰腺炎、卒中和急性肠系膜缺血等方面。特别是在移植排斥的监测上有很好应用。通过检测尿液中游离 DNA 特异性可以很好地连续监测肾移植患者发生早期急性移植排斥反应[60]。

由于基因组领域的不断进步, cfDNA 应用的技术障碍已经逐渐被克服, 现在 cfDNA 分析在一些医学领域是一种可行的方法。人们对 cfDNA 分析越来越感兴趣, 并且独立于不同的临床领域, 但因为每种疾病的发生发展及其演变、治疗、预后不尽相同, 血液中的浓度也不尽相同, 比如肿瘤及肿瘤的不同分期、寄生虫病、心血管系统疾病、产前诊断等, 能否早期诊断, 早期发现才是关键所在, 目前, 就 cfDNA 的质量、数量和污染而言, 它们的性能比较差异很大。迄今为止, 无法获得一致且可重复的结果通常是由于缺乏标准化程序, 而不是由于分析变量。因此, 任何用于诊断目的的 cfDNA 的未来应用都应基于定义的协议, 以确保结果的再现性。由于将 cfDNA 分析转化为临床实践的不同障碍, 还没有预分析和分析共识。cfDNA 样品操作和分析的各种方案之间的异质性是主要障碍之一, 到目前为止, 操作程序的标准化还不存在, 且不同中心患者实验室采用的检测手段不尽相同, 易受实验技术、实验人员的操作影响, 未行成统一的规范操作, 潜在影响 cfDNA 浓度和片段的分析前参数包括从采血管选择到血浆处理、提取和纯化模式、发现解释和样品储存条件的步骤[61]。标准技术和方案的发展将为 cfDNA 在临床实践中的

有效使用铺平道路,而不仅仅是在研究领域。毫无疑问,未来 cfDNA 将在心血管疾病、癌症、糖尿病和其他疾病的筛查、诊断、预后、随访和治疗中发挥巨大作用。

参考文献

- [1] Mandel, P. and Metais, P. (1948) Comptesrendus des seances de la Societe de biologie etde sesfiliales. *Comptesrendus des séances de la Société de biologie et de sesfiliales*, **142**, 241-243.
- [2] Haber, D.A. and Velculescu, V.E. (2014) Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discovery*, **4**, 650-661. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1014>
- [3] Cicchillitti, L., Corrado, G., De Angeli, M., et al. (2017) Circulating Cell-Free DNA Content as Blood Based Biomarker in Endometrial Cancer. *Oncotarget*, **8**, 115230-115243. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23247>
- [4] Fleischhacker, M. and Schimdt, B. (2007) Circulating Nucleic Acids (CNAs) and Cancer—A Survey. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1775**, 181-232. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.10.001>
- [5] Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., et al. (2001) DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Research*, **61**, 1659-1665.
- [6] Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., et al. (2000) The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **906**, 161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06608.x>
- [7] Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., et al. (2001) About the Possible Origin and Mechanism of Circulating DNA Apoptosis and Active DNA Release. *Clinica Chimica Acta*, **313**, 139-142. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00665-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00665-9)
- [8] Canzoniero, J.V. and Park, B.H. (2016) Use of Cell Free DNA in Breast Oncology. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1865**, 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.006>
- [9] Stotzer, O.J., Lehner, J., Fersching-Gierlich, D., et al. (2014) Diagnostic Relevance of Plasma DNA and DNA Integrity for Breast Cancer. *Tumor Biology*, **35**, 1183-1191. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1158-4>
- [10] Lui, Y.Y., Chik, K.W., Chiu, R.W., et al. (2002) Predominant Hematopoietic Origin of Cell-Free DNA in Plasma and Serum after Sex-Mismatched Bone Marrow Transplantation. *Clinical Chemistry*, **48**, 421-427. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.3.421>
- [11] Elshimali, Y.I., Khaddour, H., Sarkissyan, M., et al. (2013) The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 18925-18958. <https://doi.org/10.3390/ijms140918925>
- [12] Swarup, V. and Rajeswari, M.R. (2007) Circulating (Cell-Free) Nucleic Acids—A Promising, Non-Invasive Tool for Early Detection of Several Human Diseases. *FEBS Letters*, **581**, 795-799. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.051>
- [13] Diaz, L.A. and Bardelli, A. (2014) Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*, **32**, 579-586. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>
- [14] Giacona, M.B., et al. (1998) Cell-Free DNA in Human Blood Plasma: Length Measurements in Patients with Pancreatic Cancer and Healthy Controls. *Pancreas*, **17**, 89-97. <https://doi.org/10.1097/00006676-199807000-00012>
- [15] Tsumita, T. and Iwanaga, M. (1963) Fate of Injected Deoxyribonucleic Acid in Mice. *Nature*, **198**, 1088-1089. <https://doi.org/10.1038/1981088a0>
- [16] Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., et al. (1999) Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *The American Journal of Human Genetics*, **64**, 218-224. <https://doi.org/10.1086/302205>
- [17] Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., et al. (2016) Cell-Free DNA Comprises an *in Vivo* Nucleosome Footprint That Informs Its Tissues-of-Origin. *Cell*, **164**, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050>
- [18] Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., et al. (2003) Degradation of Chromosomal DNA during Apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, **10**, 108-116. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401161>
- [19] Holdenrieder, S. and Stieber, P. (2004) Apoptotic Markers in Cancer. *Clinical Biochemistry*, **37**, 605-617. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.003>
- [20] Nagata, S. (2005) DNA Degradation in Development and Programmed Cell Death. *Annual Review of Immunology*, **23**, 853-875. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811>
- [21] Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., et al. (1977) Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research*, **37**, 646-650.
- [22] Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E.M., et al. (1983) Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Benign or Malignant Gastrointestinal Disease. *Cancer*, **51**, 2116-2120.

- [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19830601\)51:11<2116::AID-CNCR2820511127>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19830601)51:11<2116::AID-CNCR2820511127>3.0.CO;2-S)
- [23] Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I., *et al.* (1966) Deoxybonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, **45**, 1732-1740. <https://doi.org/10.1172/JCI105479>
- [24] Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., *et al.* (1994) Point Mutations of the N-Ras Gene in the Blood Plasma DNA of Patients with Myelodysplastic Syndrome or Acute Myelogenous Leukaemia. *British Journal of Haematology*, **86**, 774-779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x>
- [25] Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, F.H., *et al.* (1994) Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **3**, 67-71.
- [26] Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., *et al.* (1997) Presence of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum. *The Lancet*, **350**, 485-487. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)
- [27] Rainer, T.H., Wong, L.K., Lam, W., *et al.* (2003) Prognostic Use of Circulating Plasma Nucleic Acid Concentrations in Patients with Acute Stroke. *Clinical Chemistry*, **49**, 562-569. <https://doi.org/10.1373/49.4.562>
- [28] Chang, Y., Chia, R.H., Wu, T.L., *et al.* (2003) Elevated Cell-Free DNA Detected in Patients with Myocardial Infarction. *Clinica Chimica Acta*, **327**, 95-101. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00337-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00337-6)
- [29] Frank, O.M. (2016) Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation. *Biological Research for Nursing*, **18**, 477-488. <https://doi.org/10.1177/1099800416642571>
- [30] Togneri, F.S., Ward, D.G., Foster, J.M., Devall, A.J., *et al.* (2016) Genomic Complexity of Urothelial Bladder Cancer Revealed in Urinary cfDNA. *European Journal of Human Genetics*, **24**, 1167-1174. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.281>
- [31] Birkenkamp-Demtröder, K., Nordentoft, I., Christensen, E., *et al.* (2016) Genomic Alterations in Liquid Biopsies from Patients with Bladder Cancer. *European Urology*, **70**, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.01.007>
- [32] Menon, M.P., Pittaluga, S. and Jaffe, E.S. (2012) The Histological and Biological Spectrum of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the World Health Organization Classification. *The Cancer Journal*, **18**, 411-420. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31826aee97>
- [33] 李茂, 徐娟, 曹迪, 蒋昱, 徐才刚. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤血浆循环游离 DNA 水平的动态监测及临床意义[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(1): 113-115+139. <https://doi.org/10.13464/j.scuxbyxb.2018.01.023>
- [34] 王念跃, 马超, 李传燕, 等. 磁性纳米颗粒的制备及在全血 DNA 提取中的应用[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(3): 169-172.
- [35] Cai, Z., Chen, G., Zeng, Y., Dong, X., *et al.* (2019) Comprehensive Liquid Profiling of Circulating Tumor DNA and Protein Biomarkers in Long-Term Follow-Up Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **25**, 5284-5294. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3477>
- [36] Jiang, P., Chan, C.W., Chan, K.C., *et al.* (2015) Lengthening and Shortening of Plasma DNA in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **112**, E1317-E1325. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500076112>
- [37] 阎其均, 翁羽, 朱付英. 外周血 CTCs、cfDNA 联合检测在肝癌早期筛查中的应用价值分析[J]. 临床输血与检验, 2020, 22(4): 429-433.
- [38] 黄帅帅, 岑东. 循环游离核酸分子标志物在肾细胞癌诊治中的研究进展[J]. 现代实用医学, 2021, 33(8): 986-989+992.
- [39] Marur, S. and Forastiere, A.A. (2016) Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, **91**, 386-396. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.017>
- [40] Mermod, M., Tolstonog, G., Simon, C., *et al.* (2016) Extracapsular Spread in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oral Oncology*, **62**, 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.10.003>
- [41] Mazurek, A.M., Rutkowski, T., Fiszer-Kierzkowska, A., *et al.* (2016) Assessment of the Total cfDNA and HPV16/18 Detection in Plasma Samples of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *Oral Oncology*, **54**, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.12.002>
- [42] Wang, Y., Springer, S., Mulvey, C.L., *et al.* (2015) Detection of Somatic Mutations and HPV in the Saliva and Plasma of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Science Translational Medicine*, **7**, 293ra104.
- [43] Zhang, W. (2014) TCGA Divides Gastric Cancer into Four Molecular Subtypes: Implications for Individualized Therapeutics. *The Chinese Journal of Cancer*, **33**, 469-470.
- [44] Chen, W., Zheng, R., Zeng, H. and Zhang, S. (2015) The Updated Incidences and Mortalities of Major Cancers in China, 2011. *Chinese Journal of Cancer*, **34**, 502-507. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0042-6>

- [45] Nishida, X. and Hirota, S. (2000) Biological and Clinical Review of Stromal Tumors in the Gastrointestinal Tract. *Histology and Histopathology*, **15**, 1293-1301.
- [46] Jing, R., Cui, M., Wang, H., *et al.* (2013) Cell-Free DNA: Characteristics, Detection and Its Applications in Myocardial Infarction. *Current Pharmaceutical Design*, **19**, 5135-5145. <https://doi.org/10.2174/1381612811319280012>
- [47] Antonatos, D., Patsilina, S., Spanodimos, S., *et al.* (2006) Cell-Free DNA Levels as a Prognostic Marker in Acute Myocardial Infarction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1075**, 278-281. <https://doi.org/10.1196/annals.1368.037>
- [48] Snyder, T.M., Khush, K.K., Valantine, H.A., *et al.* (2011) Universal Noninvasive Detection of Solid Organ Transplant Rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 6229-6234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013924108>
- [49] Barnett, E.V. (1968) Detection of Nuclear Antigens (DNA) in Normal and Pathologic Human fluids by Quantitative Complement Fixation. *Arthritis & Rheumatology*, **11**, 407-417. <https://doi.org/10.1002/art.1780110306>
- [50] Koffler, D., Agnello, V., Winchester, R. and Kunkel, H.G. (1973) The Occurrence of Single-Stranded DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Other Diseases. *Journal of Clinical Investigation*, **52**, 198-204. <https://doi.org/10.1172/JCI107165>
- [51] Chen, J.A., Meister, S., Urbonaviciute, V., *et al.* (2007) Sensitive Detection of Plasma/Serum DNA in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmunity*, **40**, 307-310.
- [52] Truszczyńska, A., Foronczewicz, B. and Paczek, L. (2017) The Role and Diagnostic Value of Cell-Free DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology*, **35**, 330-336.
- [53] Dunaeva, M., Buddingh, B.C., Toes, R.E., Luime, J.J., Lubberts, E. and Pruijn, G.J. (2015) Decreased Serum Cell-Free DNA Levels in Rheumatoid Arthritis. *Autoimmunity Highlights*, **6**, 23-30. <https://doi.org/10.1007/s13317-015-0066-6>
- [54] Fan, H., Gai, W., Zhang, L., Ma, Y., Wang, H., *et al.* (2021) Parasite Circulating Cell-Free DNA in the Blood of Alveolar Echinococcosis Patients as a Diagnostic and Treatment-Status Indicator. *Clinical Infectious Diseases*, **73**, e246-e251. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1679>
- [55] Weerakoon, K.G. and McManus, D.P. (2016) Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections. *Trends in Parasitology*, **32**, 378-391. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.01.006>
- [56] Gal, S., Fidler, C., Turner, S., Lo, Y.M., Roberts, D.J. and Wainscoat, J.S. (2001) Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in Plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **945**, 234-238. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03891.x>
- [57] Ngotho, M., Kagira, J.M., Gachie, B.M., *et al.* (2015) Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Trypanosoma brucei* Gambiense in Urine and Saliva Samples in Nonhuman Primate Model. *BioMed Research International*, **2015**, Article ID: 867846. <https://doi.org/10.1155/2015/867846>
- [58] Chaya, D. and Parija, S.C. (2014) Performance of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cystic Echinococcosis Using Serum, Urine, and Cyst Fluid Samples. *Tropical Parasitology*, **4**, 43-46. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.129164>
- [59] Wagner, J. (2012) Free DNA—New Potential Analyte in Clinical Laboratory Diagnostics. *Biochemia Medica (Zagreb)*, **22**, 24-38. <https://doi.org/10.11613/BM.2012.004>
- [60] Kotsch, K., Mashreghi, M.F., Bold, G., *et al.* (2004) Enhanced Granulysin mRNA Expression in Urinary Sediment in Early and Delayed Acute Renal Allograft Rejection. *Transplantation*, **77**, 1866-1875. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000131157.19937.3F>
- [61] El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F., *et al.* (2013) Circulating Cell Free DNA: Preanalytical Considerations. *Clinica Chimica Acta*, **424**, 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.022>