

综述

胞外DNA的研究进展

刘景辉 王 昊 徐立红*

(浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058)

摘要 胞外DNA(extracellular occurring DNA, eoDNA)是一种独立于细胞外的DNA,广泛存在于体液中。研究发现, eoDNA的浓度水平及其特异基因的改变能很好地反映疾病的发生和发展。随着生物技术的发展, eoDNA易获得、微创伤、预测早等优点引起了许多学者的关注,使得eoDNA成为非入侵疾病检测生物标记中的一颗新星。相对于健康人,肿瘤患者体内eoDNA浓度明显升高,这一特征已被研究者广泛验证,同时,研究还发现肿瘤患者eoDNA部分起源于肿瘤组织细胞,且这些DNA与肿瘤组织基因组有着相似的分子特征。这些研究成果为eoDNA取代肿瘤组织早期微创诊断肿瘤发生提供了理论基础。此外,在产检方面,从母体血浆中获取胎儿eoDNA并用以观察胎儿健康情况也日益得到学者关注。该文从eoDNA研究背景出发就其作为肿瘤诊断、预后以及产检生物标记的可能性及应用作一简单综述,并展望了eoDNA在临床疾病诊断的应用前景。

关键词 胞外DNA(eoDNA); 起源; 肿瘤诊断; 产前诊断

The Current Development in Extracellular Occurring DNA Study

Liu Jinghui, Wang Hao, Xu Lihong*

(Department of Biochemistry, Medical School of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Extracellular occurring DNA (eoDNA) refers to the DNA presents in the extracellular environment and is found in various extracellular media widely. The studies so far have suggested that quantitative and qualitative changes of eoDNA might be used as markers for diagnosis and prognostic in clinical purpose. With the development of biotechnology, the advantages in easy access, minimally invasive and early diagnostic value have led to eoDNA becoming an attractive exploring area for developing a type of new less-invasive diagnostic and prognostic biomarkers. The higher concentration of eoDNA in patients with malignancy than that in healthy individuals has been proved widely. And it also seems that eoDNA in cancer patients has similar features with the DNA from their tumor tissues, which provides the theory basis for eoDNA as a new marker for early detection of malignant tumors. Besides, scientists have been developing non-invasive prenatal diagnostic tests based on cell-free fetal DNA analysis from maternal plasma. In the present paper, the research obtained hitherto about eoDNA have been reviewed and the perspective of eoDNA in the diagnosis of diseases are also discussed.

Key words extracellular occurring DNA(eoDNA); origin; cancer diagnosis; prenatal diagnosis

收稿日期: 2012-08-02 接受日期: 2012-09-10

国家自然科学基金(批准号: 81172703)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88208265, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

Received: August 2, 2012 Accepted: September 10, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172703)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88208265, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

胞外DNA泛指一切存在于胞外环境中的DNA,即出现在胞外的DNA(extracellular occurring DNA, eoDNA),也多被描述为cell free DNA、circulating DNA、circulating-free DNA和extracellular DNA。Peters等^[1]对胞外DNA的定义做了详细论述,他将cell free DNA和free DNA定义为不与任何其他结构结合的游离态DNA,用Particle-derived DNA来描述与其他结构结合的复合体态的DNA, circulating DNA指存在于循环系统特别是血液中的DNA,并且为区别circulating free DNA和cell free DNA的缩写cfDNA,而建议将circulating free DNA称为free circulating DNA。为叙述方便,本文中概述的胞外DNA,简称为eoDNA。eoDNA以多种形式存在于人和其他脊椎动物的血液、脑脊液、滑膜液、唾液等体液中,甚至在尿液和植物的胞外循环中也有发现^[1]。血液循环中的eoDNA是其中重要的一种,且容易获取,目前研究较为广泛,本文将作主要介绍。研究表明, eoDNA浓度水平和基因的改变与疾病的发生、发展有很好的相关性。

1 eoDNA的研究回顾

早在1948年, Mandel等^[2]就发现了外周血中有游离核酸,但在当时因核酸是否是遗传物质还没有被定论而没有引起人们的关注。1965年, Bendich等^[3]研究推测, eoDNA可能作为一种致癌基因的功能因子发挥作用。随后的1966年, Tan等^[4]在系统性红斑狼疮患者体内发现高水平的eoDNA。此后几年,科学家陆续在风湿性关节炎、白血病以及系统性免疫疾病中发现了类似现象^[5],推测eoDNA是病生理的一种特征表现,可作为病生理研究的一种指标^[6]。直到1972年Kamm等^[7]提出, eoDNA的存在是机体的一种正常表征,并对健康人血浆中eoDNA浓度进行了测定,这一结论此后得到了学者的广泛认可。几年后, Leon等^[8]首先报道了肿瘤患者外周血中eoDNA浓度水平高于正常人,这一发现揭开了eoDNA与肿瘤相关性研究的序幕。1989年, Stroun等^[9]研究表明, eoDNA中部分基因具有肿瘤组织基因类似特征;几年后, Vasioukhin等^[10]于血浆DNA中发现了突变的N-ras,进一步为两者相关性提供了依据。至此,学者们意识到, eoDNA作为一种新型生物标记对肿瘤发生预测具有重大意义。近几年,除肿瘤外的其他疾病(如心脑血管疾病等)也出现了eoDNA的报道, eoDNA

的研究也取得了巨大的进展^[11]。2003年, Chiu等^[12]报道了循环系统中线粒体DNA的收集和检测;2005年, Mori等^[13]描述了eoDNA的高甲基化对于肿瘤诊断和预后的重要作用;2006年, Leung等^[14]报道了EBV DNA浓度水平可独立作为NPC(nasopharyngeal carcinoma)预后检测因子;2008年, Lawrie等^[15]报道了血清中有miRNA的存在;2009年, Schwarzenbach等^[16]描述了血液中循环肿瘤细胞的存在与游离肿瘤特异DNA的关系;特别是在2010年, Garcia-Olmo等^[17]报道了肿瘤患者的血样(不含癌细胞)可使培养的细胞癌化,证明eoDNA可能具有信使的功能。

另一方面,随着肿瘤与eoDNA相关性研究的深入, Lo等^[18]认为,在免疫学上胚胎对于母体类似于肿瘤对于机体,可能在母体血浆中存在游离的胎儿DNA。1997年,他们通过实时PCR从一孕男胎妇女血液游离DNA扩增出胎儿Y染色体特异序列,首次证明孕妇外周血中存在胎儿游离DNA,为非创伤产前诊断开辟了一条新途径。随后在1998年,他们发现胎儿游离DNA在妊娠早期便存在于孕妇血液中,且胎儿游离DNA浓度随孕周的延长而增加^[19]。同年,他们建立方法,检测孕中期RhD阴性孕妇外周血中是否存在RhD基因,揭开了利用母体血浆中游离胎儿DNA进行产前诊断研究的序幕^[20]。

目前, eoDNA研究主要集中在临床应用方面,特别是肿瘤预测和产前诊断。此外, eoDNA的产生机制、存在形式、提取和检测方法等也有涉及。

2 eoDNA的起源

要认识和研究eoDNA,首先需清楚eoDNA的产生机制或起源。人类基因组DNA含量大约为6.6 pg,正常人平均每毫升血液中含5 000个游离基因组^[21],而且还要时常更新,如此多的eoDNA来自哪里,又是怎样产生的?还有,胎儿的游离DNA又是怎样出现在母体循环系统中的?

目前, eoDNA的来源机制尚不明确,科学家们普遍认为的可能机制有:凋亡机制、坏死机制和自分泌机制。

2.1 凋亡机制

细胞在信号的诱发下程序性死亡,在这一过程中DNA发生片段化以凋亡小体的形式释放到胞外或体液中。该机制最大的证据是多位研究者于实验中发现eoDNA有类似“凋亡梯”的现象,其次是每

天都有大量DNA(1~10 g)通过凋亡被降解的事实^[22]。凋亡机制能很好地解释正常机体存在低浓度循环DNA的现象,多位学者已报道eoDNA的产生与凋亡相关。Hara等^[23]研究发现,游离DNA以凋亡网泡的形式运输,这一过程受长春新碱的影响,由此推测游离DNA的运输与微管蛋白活性相关,并受凋亡机制调控。Jiang等^[24]研究表明, eoDNA与蛋白或脂结合形成的类核小体结构具有凋亡泡的特性,且受细胞周期和凋亡的调控。Choi等^[25]向大鼠体内注射凋亡细胞后观察到eoDNA以凋亡小体的形式增长,并且,他们还证明,体外培养的凋亡细胞在缺少巨噬细胞的情况下可以检测到eoDNA的产生。Roth等^[26]证明,血样中游离DNA的浓度与循环系统中的核小体紧密相关,而核小体的浓度与细胞凋亡相关,他们的观点也得到了其他学者的认可^[27-28]。Roth等^[29]研究还发现,肺癌患者血样中细胞凋亡蛋白酶活性明显升高,从而导致eoDNA浓度升高。另外,研究还表明,肿瘤细胞使周围的正常细胞缺氧而凋亡^[30],从而导致eoDNA浓度升高。

但是,凋亡机制不能解释肿瘤患者体内大量突变基因存在的原因,因为正常凋亡的细胞不会存在大量突变基因,而肿瘤细胞又不存在凋亡。另外,对于肿瘤患者机体出现eoDNA水平在短时间内迅速升高的现象也不能很好解释,凋亡机制似乎不会在短时间内造成DNA剧增。还有,大片段eoDNA(1 Kb以上)的出现也不能通过凋亡来解释,因为凋亡产生的DNA都是小片段的,多集中在180 bp以下,一般不超过200 bp^[31]。

2.2 坏死机制

eoDNA产生的另一种可能的机制是坏死细胞经过巨噬细胞酶解消化后进入体液或循环系统中,该机制有两种假说:(1)吞噬细胞吞食死亡或凋亡细胞,并将消化的DNA碎片等释放到体液中。当吞噬细胞损伤、死亡或坏死细胞超过吞噬能力时,坏死细胞会通过自溶缓慢地将DNA释放到胞外,这时eoDNA的浓度也会较低;(2)吞噬细胞吞食坏死细胞后正常情况下不会有eoDNA的释放,当坏死的细胞超过吞噬细胞的消化限度时会出现以下三种情况:部分坏死细胞不被吞食就自动降解并释放DNA;吞噬细胞吞食坏死细胞后还来不及消化就溢出到胞外;吞噬细胞吞食大量坏死细胞后导致自身凋亡,释放自身及吞食的细胞DNA到胞外^[24]。

Choi等^[25]在体外实验中证实,巨噬细胞缺失的情况下坏死细胞不产生游离DNA,只有巨噬细胞存在时才能检测到eoDNA,且可观察到类似“凋亡梯”的现象,在小白鼠体内实验中坏死细胞借助吞噬细胞可产生eoDNA。Sozzi等^[32]研究表明,血浆DNA浓度与血液中白细胞(中性粒细胞)数量紧密相关。坏死机制认为肿瘤患者体内eoDNA剧增来自于肿瘤发展或转移过程中对组织细胞的致死作用^[33],循环系统中游离肿瘤细胞与eoDNA总浓度关系不大^[21],但巨噬细胞消化肿瘤细胞并释放游离DNA到循环系统中已被证实。

坏死机制可以很好地解释像肿瘤这样恶性疾病带来eoDNA剧增的现象和突变DNA的出现,Choi等^[25]的研究也对eoDNA“凋亡梯”现象做出了解释。另外,大片段DNA的出现也得到了解释,坏死细胞对DNA的消化不完全也不规则,恶性疾病使大量细胞同时坏死,超出了巨噬细胞的消化限度,从而产生一些未消化或半消化的DNA片段。但是,对于正常机体为什么会存在一定量的循环DNA无法很好解释,另外有报道称,肿瘤患者放疗后血浆DNA不仅没有增加,反而有所减少^[8],这似乎与坏死机制相违背。此外,肿瘤的发展和转移导致细胞坏死,通常应该在肿瘤中后期eoDNA升高,但有文献报道称初期eoDNA高于中后期^[32],坏死机制也不能对此作出合理解释。

2.3 主动释放机制

有研究者推测, eoDNA来自淋巴细胞的释放,Anker等^[34]在体外实验中证明活化的淋巴细胞可以主动释放DNA,且这些DNA很可能是新合成的DNA,并推测肿瘤细胞也可以自主释放DNA,从而在eoDNA中有肿瘤特异基因。Stroun等^[35]认为,新合成的核酸会被细胞自发释放到胞外。Madine等^[36]也认为,细胞从快速增殖阶段向静止阶段转化过程中会有多余DNA的释放。肿瘤诊断方面也有文献报道一些常见的DNA可以由肿瘤细胞释放到循环系统中,片段集中在200-400 bp^[11]。还有文献报道,一个100 g的肿瘤组织(大约包含 3×10^{10} 肿瘤细胞),每天有超过3.3%的肿瘤DNA释放到血液中^[37]。Gahan等^[38]认为, eoDNA片段要比一般的基因组基因片段小,其来源机制可能是机体为了快速获得大量mRNA而产生的剩余基因拷贝(代谢DNA)被降解排出细胞造成的。另外, Peters等^[39]也认为,代谢DNA是eoDNA的

前体形式,按类凋亡片段大小被切断,而后细胞以脂蛋白复合物的形式释放。

主动释放机制可以解释正常个体内低浓度的eoDNA,对于部分肿瘤患者体内异常低的eoDNA浓度和放射治疗后浓度变低的情况也可做出解释。然而,主动释放同样不能解释恶性疾病患者体内的eoDNA剧增现象。另外,Jahr等^[40]的研究对淋巴细胞可释放DNA到胞外提出了质疑。

此外,还有观点认为eoDNA特别是血液中的eoDNA,源于造血过程中的造血器官和血细胞^[41]。

综上所述,各种机制都有其相关研究依据,同时又存在各自的问题,每种机制都不能全面解释eoDNA的来源。基于eoDNA具有类似凋亡梯的现象和大量的DNA每天都要通过凋亡被降解这两点,凋亡可能是正常机体eoDNA的主要来源。当机体发生轻微病变时会因清除机制紊乱而出现eoDNA水平略微升高。坏死可能是机体发生急性或恶性病变(对机体组织细胞带来高致死率)时,eoDNA的重要来源机制。由此产生的eoDNA是随意打断的,不像凋亡那么规则有序,这些DNA部分来自病变细胞本身,多数是由于病变组织的发展,使得病变组织周围的微环境内正常组织细胞坏死而产生的,此时坏死取代凋亡成为eoDNA的主要来源,占主导地位。另外,少量经细胞主动释放的DNA可能是一种基因转移或信号传递因子,对于eoDNA浓度的变化不起主导作用。

2.4 母体血浆中胎儿游离DNA的产生机制

前面提到Lo等^[18]根据猜想,在母体血浆中发现了胎儿游离DNA(cell-free fetal DNA,cffDNA)的存在,并广泛地应用在产前诊断的研究上。cffDNA的出现与eoDNA产生是什么关系,与母体又有什么关系?由于cffDNA的研究起步比较晚,目前的研究对这些问题的答案尚不明确,普遍认可cffDNA有四种机制产生^[42]:(1)主体源于胎盘滋养细胞,小部分源于胎儿造血细胞;(2)胎儿组织在发育过程中自然凋亡,释放出的DNA经母-胎界面进入母体血浆循环中;(3)胎儿DNA直接从胎儿组织中释放,经母-胎界面进入母体血浆中;(4)母体血浆中胎儿细胞通过胎盘屏障渗透到母体,被母体的免疫系统识别为异物,受到免疫攻击,致使细胞核膜溶解,DNA释放入母体血液中。

3 eoDNA的相关特性

eoDNA与胞内DNA一样,也是由四种脱氧核苷

酸组成的,有单链和双链形式。目前,关于eoDNA的研究主要集中在其与疾病相关的特性上:eoDNA存在状态、eoDNA片段完整性以及eoDNA的浓度水平。

3.1 eoDNA的存在状态

eoDNA可以单链或双链形式存在,多数是以微囊泡、微粒体、凋亡小体、外来体、组蛋白复合物以及病毒体形式存在的双链DNA^[1],具有双螺旋结构,可被DNA酶I消化,不能被RNA酶和链霉蛋白酶切割,游离DNA在循环系统或液体中存在的时间从15分钟到几个小时不等,多经肾脏或肝脏被降解^[43],单链相对双链更容易被降解,链状分子比环状更易降解^[3],其平均半衰期为16.3 min^[44]。

3.2 eoDNA的片段完整性

大量研究表明,正常个体游离DNA的分子大小在200 bp以下,一般会在180 bp以下,而肿瘤等恶性疾病患者体内eoDNA片段长度普遍偏大^[31,45-46],多数在200 bp以上甚至达到1 Kb以上(系统性红斑狼疮体内33 Kb左右的DNA含量相对丰富)。非常奇怪的是,肿瘤相关突变基因总是出现在小片段上,研究表明这部分片段多小于100 Kb^[37,47]。另外,母体血浆中胎儿eoDNA多集中在200 bp以下^[48],推测其多来源于发育中的细胞凋亡。

3.3 eoDNA的浓度水平

正常个体eoDNA含量通常较低,且常常受体内循环系统中酶降解速率和吞噬细胞的清除速率以及生理排泄等活动的影响^[49]。正常人血浆游离DNA平均含量仅为30 ng/mL(0~100 ng/mL),肿瘤、急性病、机械损伤、毒素等都可使血浆中eoDNA的水平升高,平均为180 ng/mL(0~>1 000 ng/mL)^[11]。研究表明恶性肿瘤患者体内eoDNA的浓度水平与肿瘤大小无关,仅与肿瘤恶化程度相关^[50],并且序列中甲基化等修饰不影响其在血浆中出现^[51]。虽然血浆中eoDNA的浓度因为研究者各自的样品获得方法和检测手段的不同而有所差异,但肿瘤等恶性疾病患者血样中eoDNA的水平偏高的趋势是被多数学者所验证和认可的^[21,29,45-46,50,52-66]。研究表明,恶性疾病血样中DNase I和II减少,并且DNase活性降低^[67-69],减少了对DNA的消化,从而相对保持了高浓度的DNA。另外,肿瘤患者体内血样中发现存在DNase抑制剂^[70],可能也是血液中保持高浓度eoDNA的因素。

此外,年龄也可能影响eoDNA浓度的变化。Jylhava等^[71]研究表明,高龄人群(90岁以上)体内eoDNA

的浓度较青年人(20岁左右)偏高,而且完整性低,也有文献报道,游离线粒体DNA浓度水平与年龄相关^[72],表明eoDNA的浓度等特性似乎与年龄有一定关系。

循环系统或体液中不仅可以检测到编码DNA,而且可以检测到非编码区(比如重复序列)和修饰后的DNA(如甲基化修饰),不仅有核DNA还有线粒体DNA^[63,72-73]及各种RNA^[74],甚至是miRNA^[15,75-77],这些都为科学家们研究和临床应用提供了多样化的选择。

3.4 胎儿游离DNA的特性

与eoDNA一样,母体血浆中的胎儿游离DNA的一些特性能很好地反映胎儿的健康状况,对这些特性的研究不仅能更深入地了解cffDNA,而且为cffDNA在产前诊断方面的应用提供了理论依据。

3.4.1 cffDNA片段完整性 母体血浆中胎儿DNA的片段长度往往短于母源性DNA,99%胎儿DNA的片段长度在313 bp以下,Chan等^[78]的研究表明,胎儿游离DNA的大小多集中在200 bp以下。Li等^[79]也报道和证实了胎儿DNA主要为小于300 bp的短片段分子。这一特性可以作为分离母体血浆游离DNA与胎儿游离DNA的依据。

3.4.2 cffDNA浓度 正常生理条件下的妊娠,孕妇血浆中胎儿游离DNA的含量相对丰富,胎儿游离DNA的浓度与孕周相关,同时存在个体差异。Lo等^[19]证明,孕中期和孕晚期的孕妇血浆DNA浓度高于孕早期。妊娠期间,孕妇血浆总DNA浓度较正常健康个体(非孕妇)显著升高。另外,研究表明女性生理周期不会影响体内eoDNA的改变^[58]。

病理性妊娠或妊娠相关性疾病可能改变胎盘结构而使母体血浆中游离胎儿DNA浓度显著升高,这一异常情况对病理性妊娠的诊断、预后及治疗具有重要意义。

4 eoDNA的提取

一个好的提取方法不仅是eoDNA研究的基础,高质量的eoDNA更是探究结果准确性的保证。目前,对于eoDNA的获取,使用的方法主要有:苯酚-氯仿抽提法、微柱吸附法、磁珠吸附法。

Fleischhacker等^[55]比较了三种试剂盒(QIAamp DNA Blood Midi Kit from Qiagen, NucleoSpin Kit from Macherey-Nagel, MagNA Pure isolation system from Roche Diagnostics)获取eoDNA的效率,认为DNA富

集方法在定量检测中起到很重要的作用。Yuan等^[80]用改良苯酚-氯仿法富集eoDNA,高效地检测到eoDNA中的EGFR(epidermal growth factor receptor),且其检出率要高于微柱吸附法试剂盒。Chen等^[81]研究表明,传统苯酚-氯仿法虽收集的DNA纯度不是很高,但是DNA的含量相对高纯度PCR模板制备试剂盒和单细胞PCR要高得多,是相对最有效率的提纯方法。

严子禾等^[82]比较了传统苯酚-氯仿法、微柱吸附法试剂盒和磁珠吸附法试剂盒对血浆游离结核分枝杆菌DNA和质粒DNA的提取效率,得出磁珠吸附法对血浆游离DNA的提取效率最高,尤其适合于小片段DNA的提取。宋小燕等^[83]通过对国产试剂盒提取血浆DNA的方法进行改良,提取的血浆DNA的质量不仅能达到相关分子生物学实验的要求,而且操作简单、耗时短、成本低。Yin等^[84]将盐析与苯酚-氯仿法相结合并进行改进提取血浆DNA,得到的总DNA是微柱吸附法试剂盒提取方法的两倍。通过此法得到总DNA后,又根据胎儿DNA分子片段长度小于孕妇自身DNA的原理,利用纯化PCR产物的过滤膜装置过滤提取的血浆DNA,得到的胎儿DNA是微柱吸附法试剂盒提取方法的8倍。

从妊娠妇女外周血中得到胎儿DNA主要有两种途径,一种是从妊娠妇女外周血中富集纯化胎儿细胞,另一种是从孕妇血中直接获取cffDNA。目前,主要的提取方法是提取出母体血浆总DNA,然后再用特异的引物扩增来判断胎儿特异性DNA序列,也有依据分子大小分离得到cffDNA,还有用肽核酸来富集得到cffDNA序列。

综上所述,传统苯酚-氯仿抽提法,虽操作复杂、特异性差,但提纯效率较好,改良后是一种高效、廉价的富集方法;微柱吸附法,操作简便、DNA纯度相对较高、重复性好,但成本相对较高,而且对小片段DNA丢失较严重;磁珠法采用磁珠吸附,磁场分离的原理,操作简便、快速、DNA纯度高,特别适合小片段eoDNA的富集。

eoDNA被认为是检测肿瘤组织的一种替代标记,然而由于eoDNA含量低、片段小,在提取过程中极易丢失,特别是肿瘤特异DNA片段,因多出现在小片段上而在提取过程中更易丢失,一些肿瘤的特异基因可以在组织中检测到却不能在eoDNA中检测到^[80,85]。此外,在肿瘤患者体内,肿瘤的恶化使肿瘤微环境中正常细胞产生大量eoDNA,而造成肿瘤

相关DNA相对含量下降,检测背景升高。还有一些检测手段要求样品中DNA浓度必须达到一定的浓度,如甲基化特异性多连接依赖性探针扩增(methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification, MS-MLPA)要求检测DNA必须达到50 ng/L^[86]。而对于临床检测具有实用性的廉价分光光度法,现在所获取的eoDNA的浓度还远不能达到其检测线^[87]。

5 eoDNA分子学检测

循环系统或体液中游离核酸不仅有DNA,还有RNA甚至miRNA,但目前研究多集中在DNA,主要由于DNA作为生物标记的优点在于:(1)结构稳定;(2)分布广泛,获得方法相对简单;(3)检测方法成熟、灵敏,一般借助于PCR可快速检测;(4)作为遗传物质,DNA是最早改变的位点和发源。

eoDNA的分子学检测分为定量和定性。前者主要针对eoDNA的浓度,后者包含突变基因、DNA甲基化、微卫星不稳定、片段完整性、杂合性缺失等。

5.1 定量检测

目前,广泛使用的eoDNA定量手段是实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, QPCR),其检测限为微微克。QPCR法检测体液中总eoDNA采用较普遍的扩增序列有 β -actin^[46,50,55]、 β -globin^[55,57,63,66,71]、Alu序列^[45,62]等普遍的持家基因。另外,很多学者用QPCR对eoDNA中许多疾病相关特异基因进行了定量:线粒体特异DNA^[63,72-73]、特异甲基化基因^[61,88]、人类表皮生长因子受体(EGFR)^[80,85,89-90]、端粒酶反转录酶基因(hTERT)^[53,60,65]、特异mRNA^[27,91]、miRNA^[29]。此外,还有用QPCR定量核小体数量的报道^[28]。eoDNA可来源于所有的染色体,但并不是对所有染色体上DNA的均匀覆盖^[1],因此QPCR定量总eoDNA时,选取合适的基因是关键。

除了QPCR,近些年还发展了许多DNA定量的手段:BEAMing(beads, emulsion, amplification and magnetics)是一种灵敏度高、特异性好的突变基因定量方法,已被许多学者认可和采用^[37,92-93],是目前较精确的基因定量的方法之一;MS-MLPA是一种高灵敏,迅速检测DNA浓度的新方法,可一次分析多个血浆或体液中eoDNA中基因的表达量和甲基化位点,具有很好的发展前景^[86];分支DNA测定技术有着独特的信号放大系统,根据固相杂交原理,采用一

种放大标记探针,目的探针不被放大,但检测信号被放大,是目前灵敏度较高的检测方法^[94]。此外,不少研究者使用PicoGreen来定量eoDNA^[26,29,56,61,69],也有用ELISA检测eoDNA、核小体浓度的报道^[27-28];还有许多研究者使用试剂盒来进行eoDNA定量^[29,80,95]。

eoDNA浓度的测定不仅受提取方法的影响,副反应、补体结合、血细胞凝集素抑制剂的存在等都会影响定量的结果^[21]。最近研究表明,样本的保存也会对终浓度有影响,研究表明,相对总eoDNA胎儿游离DNA的浓度变化对保存温度更敏感^[96]。

针对eoDNA片段小、含量低、在提取过程中有各种丢失和损耗的特点,我们迫切需要发展一种不需要提取和纯化的检测手段^[11]。

5.2 定性检测

目前,定性检测主要集中在eoDNA中抑癌基因启动子的甲基化、原癌基因、抑癌基因及相关蛋白调节因子的基因突变、微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)、杂合性缺失(loss of hetero-zygosity, LOH)、DNA完整性(integrity)、RNA检测(包括miRNA)、线粒体DNA以及相关致病病毒核酸的检测。

5.2.1 甲基化的检测 甲基化是核酸的一种重要修饰方法,调节基因的表达和关闭,与癌症、衰老、老年痴呆等许多疾病密切相关,是表观遗传学的重要研究内容之一。启动子甲基化使基因表达失活,在肿瘤检测中有重要作用,在肿瘤组织中常能检测到抑癌基因启动子高度甲基化,而致癌基因往往失去甲基化,研究表明, eoDNA中基因甲基化的检测可以预测多种肿瘤的发生^[27,86,88,97-104]。

相对MSI、LOH和突变基因等定性检测,甲基化检测不仅具有稳定性高和等位基因宽泛化的特性,而且具有在大量正常DNA的背景下高灵敏度的优点。因此,甲基化检测是目前定性检测eoDNA的研究热点之一。

5.2.2 突变基因的检测 eoDNA中突变基因是对组织病变最好的标记,特别是组织癌变,研究已表明肿瘤的特异突变基因可以在肿瘤患者体内eoDNA中检测到^[105]。但因肿瘤相关的特异突变DNA含量本来就很低(不到0.01%),且这些DNA提取中易丢失^[37],使突变基因的检测受到一定限制,在实验中容易产生假阴性。目前,检测到较为普遍的有:KRAS^[47,106-108]、APC^[37,92,101,108]、P53^[108]、EGFR^[80,85,89-90]、Bax、Bad、Bcl-2^[91]等。另外,有文献报道器官移植中可以在受

体eoDNA中检测到供体基因^[109], 这类似于突变基因的检测, 选取特异供体基因来观察移植器官的生存情况, 为临床移植手术提供了一种新型的监视方法。

5.2.3 病毒基因的检测 一些致病病毒的核酸往往进入血液或体液而出现在循环系统中, 对这部分核酸的检测, 可以预防病毒性疾病的传染。Hohaus等^[110]报道了在霍奇金淋巴瘤患者血样中可以检测到高浓度EB病毒DNA, Odeh等^[111]也报道GB Virus-C的核酸可在病患血浆中检测到。

5.2.4 eoDNA多态性的检测 MSI、LOH还有新兴的SNP(single nucleotide polymorphisms)序列^[105]等多态性改变是肿瘤组织的重要特征, 由于上述突变基因检测的一些限制, 目前大多数肿瘤患者eoDNA中很难检测到高突变的DNA, 促使人们努力在肿瘤患者eoDNA中寻找MSI等多态性改变。研究表明, 发生在肿瘤组织细胞的MSI或LOH在eoDNA中同样可以检测到^[112], 选择适当的引物可以扩增出多态性DNA片段, 然后通过这些标记的图谱分析得到结果。

5.2.5 eoDNA片段完整性检测 当体内eoDNA浓度剧增时, DNA由于消化不及时或随意切割而表现出完整性高或片段较大。基于这一特征, 研究eoDNA片段完整性对恶性疾病特别是肿瘤发生的诊断和预测具有重要价值, 文献中已广泛报道^[31,45-46,105]。

5.2.6 游离胎儿DNA的检测 胎儿游离DNA相对eoDNA含量更低, 片段也较小, 富集更困难, 而且往往受母体血浆eoDNA高背景的影响, 检测需要更高的灵敏度, 除了eoDNA的常规检测法外, 还有一些特殊的方法: 多重PCR, 在同一反应管中加入多对引物, 扩增同一模板的几个区域; 荧光PCR, 通过荧光PCR扩增多个STR位点, 据此可区分不同的个体; 质谱分析, 文献报道质谱可检测母体和胎儿单核苷酸多态性(SNP)来检测血浆中特异胎儿DNA序列。特别是, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱, 灵敏、准确的高分辨技术, 应用于检测cfDNA单碱基变异。

6 临床应用方面的研究进展

eoDNA简便、微创的样本取材方式及与疾病的高度相关性使得其具有广泛的临床应用价值。eoDNA的临床使用价值在肿瘤中研究最多, 主要分

三大类: 肿瘤的诊断和预后, 产前诊断和其他疾病方面的应用。

6.1 肿瘤诊断

肿瘤组织是作为癌症诊断的首选可靠样本来源, 然而一些组织获得困难(如非小细胞肺癌), 必须依靠一些外在生物标记, eoDNA无疑是很好的选择。eoDNA是对个体基因组的很好反映: 第一, eoDNA的基因序列与基因组的基因长度相关; 第二, 来自某一个特定染色体的核苷酸的数量与该染色体的大小相关, 即染色体越大, eoDNA中该染色体DNA数目就越多^[1]; 第三, eoDNA与肿瘤组织DNA特异变化有一定的一致性。Goto等^[85]研究表明, 用eoDNA诊断肿瘤发生, 虽阳性检出率低一些(23.7%, 组织中为61.5%), 但没有假阴性结果出现。Hazelton等^[113]也认为, 肿瘤在其直径生长到0.85 cm以前不会释放任何生物标记到循环系统中。

目前, eoDNA在肿瘤方面的研究已深入到肿瘤发生的各个时期, 包括预防期、早期、晚期, 还有很多在治疗阶段和治疗后观察阶段^[63,99,103], 已涉及到的肿瘤有: 肺癌^[28,50,60,73,85,88,97,100,103-104,112]、乳腺癌^[26,58,89-90,99,101,105]、肠癌^[37,45,54,68,92]、前列腺癌^[27,69,86]、肝癌^[65-66,92]、胃癌^[68]、子宫内膜癌^[62]、霍奇金淋巴瘤^[28,110]、黑素瘤^[31]、白血病^[46], 这些研究成果为eoDNA作为临床诊断和愈后监视的指标提供了重要的理论依据。

6.2 产前诊断

6.2.1 RhD血型的产前诊断 Lo等^[20]研究表明, 妊娠中晚期母体血浆中胎儿RhD基因PCR分析结果与血清学结果完全一致。Akolekar等^[114]用一种高通量机器人技术在孕后11~13周可准确检测到胎儿的RhD基因型, 为早期诊断胎儿RhD血型提供了依据。

6.2.2 21三体综合症的产前诊断 21三体综合征是一种最常见的染色体病, 产前对胎儿的筛检意义重大。Lee等^[115]发现妊娠21三体胎儿妇女血浆中胎儿DNA的含量高于正常妊娠妇女血浆中胎儿DNA含量, 这一现象被多位研究者证实^[116-118]。另外, 从母体血浆中分离出的胎儿有核细胞进行荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)分析也是一种诊断21三体综合征的有效方法^[119]。

6.2.3 地中海贫血症的产前诊断 地中海贫血是世界上最常见的单基因遗传病之一, 通过产前诊断淘汰重型患儿是目前世界上公认的地中海贫血首选预防措施。母体血浆胎儿游离核酸的发现为地中海

贫血的无创性产前诊断提供了新的途径。近些年来,针对地中海贫血遗传缺陷的母体血浆中胎儿游离DNA检测技术的发展使开展地中海贫血的无创性产前诊断成为现实^[120]。

6.2.4 性连锁遗传性疾病的产前诊断 胎儿性别的诊断对于一些性连锁遗传性疾病诊断具有重要意义。目前,采用PCR技术通过母体血浆中cffDNA对胎儿性别进行鉴定,已报道的符合率95%以上^[121]。Akolekar等^[114]使用的高通量机器人技术也报道了Y染色体特异性基因的检测。

6.2.5 早产的产前诊断 研究表明,在妊娠初期即能检测得到胎儿的游离DNA。Leung等^[122]通过实验证实母体血浆中胎儿游离DNA随着妊娠周数的增加而增加,而且早产的妊娠妇女这种增加发生得更早且更加明显,采取保胎措施以后胎儿游离DNA浓度有下降。最近,Illanes等^[123]和Jakobsen等^[124]也分别证实了这一结论。

6.3 其他疾病

其他疾病一般是急性(心脑血管疾病)或恶性疾病(系统性免疫疾病),这类疾病往往伴随机体细胞的大量损伤,从而导致eoDNA浓度水平变化。报道过的有:需机械通气危重症^[52,57]、中风^[63]、脊髓小脑性共济失调^[61]、心肌梗塞^[59,94]、急性登革热病^[56]。另外,有研究者在体育保健方面开展eoDNA的研究,研究高强度体育锻炼对机体损伤带来eoDNA的影响^[91,125]。还有学者将eoDNA研究应用在环境与人的健康方面,以eoDNA为指标检测辐射对机体的影响^[126]。

目前,对于eoDNA的研究已不仅仅停留在它的特征、检测等的探索上,开始以一种常规手段和指示标记出现在各个研究领域。有研究组通过观察eoDNA来比较不同治疗方法对机体的影响^[127];有研究者通过分离eoDNA得到与特异基因结合的蛋白质,这保证了提纯过程中蛋白质结构的完整性和功能,为胞外检测蛋白提供了新的提纯方法^[128];还有研究者用eoDNA来研究机体对化学药物的抗性^[129],开辟了一种快捷、方便、可靠的药物抗性研究新方法。

7 问题与展望

eoDNA自发现以来就不断引起学者的关注,特别是在认识到其与疾病的密切关系后更是给学者们带来了巨大的兴趣,进而推动了eoDNA研究的发

展。其获得简易、微创伤、预测早、结果准确等优点,使其在疾病防治方面得到了广泛的研究和应用,特别是在肿瘤和产检方面,有望或已成为临床检测、诊断和疗效监视的新型生物标记。

但是,随着研究的深入,学者们逐步揭开eoDNA神秘面纱的同时,也伴随出现了新的谜团——eoDNA的生物学功能。正常人每毫升血浆中大约含0~15 000个基因组,而这些DNA每隔一段时间(半衰期为16.3 min)要更新一次,如此多的DNA每时每刻投入到循环系统或体液中去,对于一个发达的生命体来说,我们完全有理由相信这不是核酸分子简单逃逸,而是带着一定的生物学使命的。早在1965年,Bendich等^[3]就推测肿瘤的传播可能通过血液中的eoDNA作为媒介。最近,Garcia-Olmo等^[17]的研究证明了这一可能性,他们在实验中发现肿瘤患者的血样(不含癌细胞)可使培养的细胞癌化。另外, eoDNA作为一种遗传信息传递的信使而实现基因转移已早有学者报道^[130-131];最近Peters等^[39]研究表明, eoDNA以不同于新达尔文主义规则的次基因组形式传递信息。还有, Atamaniuk等^[132]最近的研究表明, eoDNA对人类单核细胞具有选择性免疫效应。此外, Gahan等^[38]则认为,如果代谢DNA片段合适的话,理应也能够转录成RNA发挥功能。然而, eoDNA的生物学功能的研究目前还刚刚起步,现有的多数研究还处于猜想和假设阶段,除了上述的几种可能外是否还存在其他功能尚需进一步探讨。

除了eoDNA产生的具体机制尚不明确和生物学功能需要进一步探讨外,在研究过程中还有一些其他问题:(1)游离DNA提纯产率有待提高,目前很多提取方法获得的eoDNA达不到检测底线;(2)检测方面尚缺乏统一的国际标准,各研究者结果参照性差,学术交流、探讨困难,使得正常人体内eoDNA的浓度尚未达成共识,此外监测灵敏度也有待提高;(3)对于eoDNA作为临床诊断生物标记的使用,有学者提出了质疑^[90,113,133]。这些都是未来亟待解决的问题,而且其中有些不单需要生物学家(比如提取和检测手段的改进),还需要有其他专业的加入,诸如检测和富集标准的统一则需要全世界从事这一领域的团队联合才能解决。

尽管eoDNA的探究和应用还有很长的路要走,但是作为一种微创、及时、可靠的疾病诊断方法在

未来的疾病检测方面必会显出其巨大的价值。

参考文献 (References)

- 1 Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA—a new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta* 2011; 412(11/12): 806-11.
- 2 Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142(3/4): 241-3.
- 3 Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science* 1965; 148(3668): 374-6.
- 4 Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus [*In Vitro*]. *J Clin Invest* 1966; 45(11): 1732-40.
- 5 Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 2010; 411(21/22): 1611-24.
- 6 Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest* 1975; 56(2): 512-5.
- 7 Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 1972; 18(6): 519-22.
- 8 Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3): 646-50.
- 9 Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46(5): 318-22.
- 10 Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 86(4): 774-9.
- 11 Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(6): 426-37.
- 12 Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Rainer TH, *et al*. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem* 2003; 49(5): 719-26.
- 13 Mori T, O'Day SJ, Umetani N, Martinez SR, Kitago M, Koyanagi K, *et al*. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23(36): 9351-8.
- 14 Leung SF, Zee B, Ma BB, Hui EP, Mo F, Lai M, *et al*. Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(34): 5414-8.
- 15 Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, *et al*. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141(5): 672-5.
- 16 Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, *et al*. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(3): 1032-8.
- 17 Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, Anker P, Stroun M, Garcia-Verdugo JM, *et al*. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 2010; 70(2): 560-7.
- 18 Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, *et al*. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350(9076): 485-7.
- 19 Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, *et al*. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62(4): 768-75.
- 20 Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, *et al*. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 339(24): 1734-8.
- 21 Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem* 2006; 52(10): 1833-42.
- 22 Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: Kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005; 11(1): 59-67.
- 23 Hara A, Niwa M, Kumada M, Kitaori N, Yamamoto T, Kozawa O, *et al*. Fragmented DNA transport in dendrites of retinal neurons during apoptotic cell death. *Brain Res* 2004; 1007(1/2): 183-7.
- 24 Jiang N, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells. *Blood* 2003; 102(6): 2243-50.
- 25 Choi JJ, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The role of macrophages in the *in vitro* generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* 2005; 115(1): 55-62.
- 26 Roth C, Pantel K, Muller V, Rack B, Kasimir-Bauer S, Janni W, *et al*. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer* 2011; 11: 4.
- 27 Deligezer U, Yaman F, Darendeliler E, Dizdar Y, Holdenrieder S, Kovancilar M, *et al*. Post-treatment circulating plasma BMP6 mRNA and H3K27 methylation levels discriminate metastatic prostate cancer from localized disease. *Clin Chim Acta* 2010; 411(19/20): 1452-6.
- 28 Greystoke A, O'Connor JP, Linton K, Taylor MB, Cummings J, Ward T, *et al*. Assessment of circulating biomarkers for potential pharmacodynamic utility in patients with lymphoma. *Br J Cancer* 2011; 104(4): 719-25.
- 29 Roth C, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Schwarzenbach H. Screening for circulating nucleic acids and caspase activity in the peripheral blood as potential diagnostic tools in lung cancer. *Mol Oncol* 2011; 5(3): 281-91.
- 30 Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356(6368): 397-400.
- 31 Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, *et al*. Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clin Chim Acta* 2011; 412(23/24): 2141-5.
- 32 Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, *et al*. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(21): 3902-8.
- 33 Roz L, Verri C, Conte D, Miceli R, Mariani L, Calabro E, *et al*. Plasma DNA levels in spiral CT-detected and clinically detected lung cancer patients: A validation analysis. *Lung Cancer* 2009; 66(2): 270-1.
- 34 Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an *in vitro* system. *Cancer Res* 1975; 35(9): 2375-82.

- 35 Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int Rev Cytol* 1977; 51: 1-48.
- 36 Madine MA, Swietlik M, Pelizon C, Romanowski P, Mills AD, Laskey RA. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol* 2000; 129(2/3): 198-210.
- 37 Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(45): 16368-73.
- 38 Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1137: 7-17.
- 39 Peters DL, Pretorius PJ. Continuous adaptation through genetic communication—a putative role for cell-free DNA. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12 Suppl 1: S127-32.
- 40 Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4): 1659-65.
- 41 Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: A new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 2002; 28(5): 255-71.
- 42 Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1): 139-51.
- 43 Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775(1): 181-232.
- 44 Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64(1): 218-24.
- 45 Agostini M, Pucciarelli S, Enzo MV, Del Bianco P, Briarava M, Bedin C, *et al.* Circulating cell-free DNA: A promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(9): 2461-8.
- 46 Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, *et al.* Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(11): 1651-6.
- 47 Moliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12 Suppl 1: S209-15.
- 48 Hall A, Bostanci A, Wright CF. Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal DNA technology: Applications and implications. *Public Health Genomics* 2010; 13(4): 246-55.
- 49 Jylhava J, Lyytikainen LP, Kahonen M, Hutri-Kahonen N, Ketunen J, Viikari J, *et al.* A genome-wide association study identifies UGT1A1 as a regulator of serum cell-free DNA in young adults: the cardiovascular risk in young finns study. *PLoS One* 2012; 7(4): e35426.
- 50 Lee YJ, Yoon KA, Han JY, Kim HT, Yun T, Lee GK, *et al.* Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(15): 5179-87.
- 51 Puszyk WM, Chatha K, Elsenheimer S, Crea F, Old RW. Methylation of the imprinted GNAS1 gene in cell-free plasma DNA: Equal steady-state quantities of methylated and unmethylated DNA in plasma. *Clin Chim Acta* 2009; 400(1/2): 107-10.
- 52 Arnalich F, Lopez-Collazo E, Montiel C. Diagnostic potential of circulating cell-free DNA in patients needing mechanical ventilation: Promises and challenges. *Crit Care* 2011; 15(5): 187.
- 53 Bartoloni E, Ludovini V, Alunno A, Pistola L, Bistoni O, Crino L, *et al.* Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjogren's syndrome. *Lupus* 2011; 20(9): 928-35.
- 54 Danese E, Montagnana M, Minicozzi AM, de Matteis G, Scudo G, Salvagno GL, *et al.* Real-time polymerase chain reaction quantification of free DNA in serum of patients with polyps and colorectal cancers. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(11): 1665-8.
- 55 Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DM, Leszinski GS, Siegele B, *et al.* Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta* 2011; 412(23/24): 2085-8.
- 56 Ha TT, Huy NT, Murao LA, Lan NT, Thuy TT, Tuan HM, *et al.* Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One* 2011; 6(10): e25969.
- 57 Okkonen M, Lakkisto P, Korhonen AM, Parviai-nen I, Reinikainen M, Varpula T, *et al.* Plasma cell-free DNA in patients needing mechanical ventilation. *Crit Care* 2011; 15(4): R196.
- 58 Polcher M, Ellinger J, Willems S, El-Maarri O, Holler T, Amann C, *et al.* Impact of the menstrual cycle on circulating cell-free DNA. *Anticancer Res* 2010; 30(6): 2235-40.
- 59 Shimony A, Zahger D, Gilutz H, Goldstein H, Orlov G, Merkin M, *et al.* Cell free DNA detected by a novel method in acute STElevation myocardial infarction patients. *Acute Card Care* 2010; 12(3): 109-11.
- 60 Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, Sanmartin E, Blasco A, *et al.* Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(2): 286-90.
- 61 Swarup V, Srivastava AK, Padma MV, Rajeswari MR. Quantification of circulating plasma DNA in Friedreich's ataxia and spinocerebellar ataxia types 2 and 12. *DNA Cell Biol* 2011; 30(6): 389-94.
- 62 Tanaka H, Tsuda H, Nishimura S, Nomura H, Kataoka F, Chiyoda T, *et al.* Role of circulating free alu DNA in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22(1): 82-6.
- 63 Tsai NW, Lin TK, Chen SD, Chang WN, Wang HC, Yang TM, *et al.* The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta* 2011; 412(5/6): 476-9.
- 64 Wang HC, Lin YJ, Lin WC, Ho JT, Chen WF, Chang WN, *et al.* The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute spontaneous intra-cerebral hemorrhage. *Eur J Neurol* 2012; 19(12): 1532-8.
- 65 Yang YJ, Chen H, Huang P, Li CH, Dong ZH, Hou YL. Quantification of plasma hTERT DNA in hepatocellular carcinoma patients by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Clin Invest Med* 2011; 34 (4): E238.
- 66 Huang Z, Hua D, Hu Y, Cheng Z, Zhou X, Xie Q, *et al.* Quantitation of plasma circulating DNA using quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2012; 18(2): 271-6.
- 67 Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM. Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1981; 1(2): 55-60.

- 68 Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, *et al.* Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 191-6.
- 69 Cherepanova AV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1137: 218-21.
- 70 Cooper E, Trautmann M, Laskowski M. Occurrence and distribution of an inhibitor for deoxyribonuclease in animal tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 73: 219-22
- 71 Jylhava J, Kotipelto T, Raitala A, Jylha M, Hervonen A, Hurme M. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the vitality 90+ study. *Mech Ageing Dev* 2011; 132(1/2): 20-6.
- 72 Ellinger J, Muller DC, Muller SC, Hauser S, Heukamp LC, von Ruecker A, *et al.* Circulating mitochondrial DNA in serum: A universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol Oncol* 2012; 30(4): 509-15.
- 73 Strelkova I, Abdullaev SA, Snigireva GP, Bezlepkin VG, Gaziev AI. Share of extracellular mutated mitochondrial DNA increases in plasma of lung cancer patients following radiotherapy. *Biomed Khim* 2010; 56(4): 517-25.
- 74 Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46(11): 1832-4.
- 75 Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One* 2011; 6(6): e20769.
- 76 Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, *et al.* Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(10): 1721-6.
- 77 Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, *et al.* Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: A potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58(10): 1375-81.
- 78 Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, *et al.* Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50(1): 88-92.
- 79 Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004; 50(6): 1002-11.
- 80 Yuan H, Zhu ZZ, Lu Y, Liu F, Zhang W, Huang G, *et al.* A modified extraction method of circulating free DNA for epidermal growth factor receptor mutation analysis. *Yonsei Med J* 2012; 53(1): 132-7.
- 81 Chen W, Cai F, Zhang B, Zhong XY. Strategies of reducing input sample volume for extracting circulating cell-free nuclear DNA and mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(2): 261-5.
- 82 严子禾, 潘世扬, 陈丹, 魏源华, 高丽, 谢而付, 等. 4种血浆游离DNA提取方法的比较. *临床检验杂志*(Yan Zihe, Pan Shiyang, Chen Dan, Wei Yuanhua, Gao Li, Xie Erfu, *et al.* Comparison of four plasma cell-free DNA isolation methods. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*) 2006; 24(5): 363-5.
- 83 宋小燕, 徐兵, 李洁. 改良国产试剂盒提取血浆DNA的方法. *广东医学*(Song Xiaoyan, Xu Bing, Li Jie. A modified domestic diagnostic blood DNA kit for extraction of plasma DNA. *Guangdong Medical Journal*) 2008; 29(6): 906-7.
- 84 Yin A, Ng EH, Zhang X, He Y, Wu J, Leung KY. Correlation of maternal plasma total cell-free DNA and fetal DNA levels with short term outcome of first-trimester vaginal bleeding. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1736-43.
- 85 Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, Yamamoto N, Negoro S, Nishio K, *et al.* Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: From IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7(1): 115-21.
- 86 Schwarzenbach H, Chun FK, Isbarn H, Hulan H, Pantel K. Genomic profiling of cell-free DNA in blood and bone marrow of prostate cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(5): 811-9.
- 87 Garcia-Olmo DC, Samos J, Picazo MG, Asensio AI, Toboso I, Garcia-Olmo D. Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats. *Cancer Lett* 2008; 272(1): 133-40.
- 88 Shivapurkar N, Gazdar AF. DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Curr Mol Med* 2010; 10(2): 123-32.
- 89 Page K, Hava N, Ward B, Brown J, Guttery DS, Ruangpratheep C, *et al.* Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(8): 1342-8.
- 90 Shaw JA, Brown J, Coombes RC, Jacob J, Payne R, Lee B, *et al.* Circulating tumor cells and plasma DNA analysis in patients with indeterminate early or metastatic breast cancer. *Biomark Med* 2011; 5(1): 87-91.
- 91 Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol* 2008; 104(4): 711-7.
- 92 Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14(9): 985-90.
- 93 Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(15): 8817-22.
- 94 Jing RR, Wang HM, Cui M, Fang MK, Qiu XJ, Wu XH, *et al.* A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood: Relevance to myocardial infarction screening. *Clin Biochem* 2011; 44(13): 1074-9.
- 95 Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, *et al.* Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4675-8.
- 96 Hidestrand M, Stokowski R, Song K, Oliphant A, Deavers J, Goetsch M, *et al.* Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther* 2012; 31(2): 122-8.
- 97 Cabral RE, Caldeira-de-Araujo A, Cabral-Neto JB, Costa Carvalho Mda G. Analysis of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in circulating plasma DNA of lung cancer patients. *Mol Cell Biochem* 2010; 338(1/2): 263-9.
- 98 Goessl C, Muller M, Straub B, Miller K. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol* 2002; 41(6): 668-76.
- 99 Liggett TE, Melnikov AA, Marks JR, Levenson VV. Methylation patterns in cell-free plasma DNA reflect removal of the primary tumor and drug treatment of breast cancer patients. *Int J Cancer*

- 2011; 128(2): 492-9.
- 100 Ponomaryova AA, Rykova EY, Cherdyntseva NV, Skvortsova TE, Dobrodeev AY, Zav'yalov AA, *et al.* RARbeta2 gene methylation level in the circulating DNA from blood of patients with lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 2011; 20(6): 453-5.
- 101 Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lü Q, Burki N, Diesch C, *et al.* Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One* 2011; 6(1): e16080.
- 102 Sui X, Wang D, Geng S, Zhou G, He C, Hu X. Methylated promoters of genes encoding protocadherins as a new cancer biomarker family. *Mol Biol Rep* 2012; 39(2): 1105-11.
- 103 Vinayanuwattikun C, Sriuranpong V, Tanasanvimon S, Chantranuwat P, Mutirangura A. Epithelial-specific methylation marker: A potential plasma biomarker in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(11): 1818-25.
- 104 Zhang Y, Miao Y, Yi J, Wang R, Chen L. Frequent epigenetic inactivation of deleted in lung and esophageal cancer 1 gene by promoter methylation in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2010; 11(4): 264-70.
- 105 Shaw JA, Page K, Blighe K, Hava N, Guttery D, Ward B, *et al.* Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2012; 22(2): 220-31.
- 106 Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(6): 2129-37.
- 107 Trevisiol C, Di Fabio F, Nascimbeni R, Peloso L, Salbe C, Ferruzzi E, *et al.* Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases. *Int J Biol Markers* 2006; 21(4): 223-8.
- 108 Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, *et al.* Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg* 2004; 28(7): 721-6.
- 109 Snyder TM, Khush KK, Valantine HA, Quake SR. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(15): 6229-34.
- 110 Hohaus S, Santangelo R, Giachelia M, Vannata B, Massini G, Cuccaro A, *et al.* The viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in peripheral blood predicts for biological and clinical characteristics in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17(9): 2885-92.
- 111 Odeh RA, Yasin S, Nasrallah G, Babi Y. Rates of infection and phylogenetic analysis of GB virus-C among Kuwaiti and Jordanian blood donors. *Intervirology* 2010; 53(6): 402-7.
- 112 Bruhn N, Beinert T, Oehm C, Jandrig B, Petersen I, Chen XQ, *et al.* Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906: 72-82.
- 113 Hazelton WD, Luebeck EG. Biomarker-based early cancer detection: Is it achievable? *Sci Transl Med* 2011; 3(109): 109fs9.
- 114 Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29(4): 301-6.
- 115 Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, Canick JA, Farina A, Heber WW, *et al.* Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(5): 1217-21.
- 116 Chen EZ, Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Chan KC, Leung TY, *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011; 6(7): e21791.
- 117 Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, *et al.* Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: A study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 20(3): 205 e1-11.
- 118 Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, *et al.* DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genet Med* 2011; 13(11): 913-20.
- 119 Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, Nicolaides KH. Investigation of maternal blood enriched for fetal cells: Role in screening and diagnosis of fetal trisomies. *Am J Med Genet* 1999; 85(1): 66-75.
- 120 Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011; 16(2): 88-93.
- 121 Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007; 83(9): 563-6.
- 122 Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352(9144): 1904-5.
- 123 Illanes S, Gomez R, Fornes R, Figueroa-Diesel H, Schepeler M, Searovic P, *et al.* Free fetal DNA levels in patients at risk of preterm labour. *Prenat Diagn* 2011; 31(11): 1082-5.
- 124 Jakobsen TR, Clausen FB, Rode L, Dziegiel MH, Tabor A. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery. *Prenat Diagn* 2012; 32(9): 840-5.
- 125 Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, Bachl N, Tiran B, Tschan H. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2010; 110(4): 695-701.
- 126 Zhang H, Zhang SB, Sun W, Yang S, Zhang M, Wang W, *et al.* B1 sequence-based real-time quantitative PCR: A sensitive method for direct measurement of mouse plasma DNA levels after gamma irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74(5): 1592-9.
- 127 Opatrna S, Wirth J, Korabecna M, Sefrna F. Cell-free plasma DNA during Hemodialysis. *Ren Fail* 2009; 31(6): 475-80.
- 128 Wielscher M, Pulverer W, Peham J, Hofner M, Rappaport CF, Singer C, *et al.* Methyl-binding domain protein-based DNA isolation from human blood serum combines DNA analyses and serum-autoantibody testing. *BMC Clin Pathol* 2011; 11: 11.
- 129 Rosell R, Sanchez JM, Taron M, O'Brate A, Gutierrez JL, Monzo M, *et al.* Novel approaches in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 2001; 15(3 Suppl 6): 52-60.
- 130 Gahan PB. Circulating DNA: Intracellular and intraorgan messenger? *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 21-33.
- 131 Gahan PB, Stroun M. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct* 2010; 28(7): 529-38.
- 132 Atamaniuk J, Kopecky C, Skoupy S, Saemann MD, Weichhart T. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27(3): 902-5.
- 133 Atamaniuk J, Hsiao YY, Mustak M, Bernhard D, Erlacher L, Fodinger M, *et al.* Analysing cell-free plasma DNA and SLE disease activity. *Eur J Clin Invest* 2011; 41(6): 579-83.