

- in 2012[J]. Eur J Cancer, 2013,49(6):1374-1403
- 2 Zhang X, Han C, He J. Recent advances in the diagnosis and management of bladder cancer[J]. Cell Biochem Biophys, 2015,73(1):11-15
 - 3 张林超, 孙继建, 潘世杰, 等. 复方苦参注射液对膀胱癌细胞增殖、侵袭的影响及相关机制分析[J]. 中药材, 2017,5:1210-1213
 - 4 历春, 付天悦, 杨宝学, 等. 尿素通道蛋白 B 在人膀胱癌组织中的表达及其临床意义[J]. 吉林大学学报:医学版, 2017,4:705-708
 - 5 申耀元. SLC39A6 蛋白在食管鳞癌中的表达及临床意义[D]. 石河子:石河子大学, 2014
 - 6 赵磊. 锌离子转运体 SLC39A6/ZIP6 在斑马鱼造血中的作用[D]. 武汉:华中科技大学, 2015
 - 7 Lian J, Jing Y, Dong Q, *et al.* miR-192, a prognostic indicator, targets the SLC39A6/SNAIL pathway to reduce tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(3):2672-2683
 - 8 Leow JJ, Martin-Doyle W, Rajagopal PS, *et al.* Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials[J]. Eur Urol, 2014,66(1):42-54
 - 9 何龙, 毕晓军, 李健, 等. miRNA-218 在膀胱癌中表达及意义[J]. 临床军医杂志, 2017,7:661-663
 - 10 路娜, 王雅棣. 放射治疗在肌层浸润性膀胱癌治疗中的应用[J]. 癌症进展, 2016,2:98-101
 - 11 Kamat A M, Bagcioglu M, Huri E. What is new in non-muscle-invasive bladder cancer in 2016? [J]. Turk J Urol, 2017,43(1):9-13
 - 12 Taylor KM. LIV-1 breast cancer protein belongs to new family of histidine-rich membrane proteins with potential to control intracellular Zn^{2+} homeostasis[J]. IUBMB Life, 2000,49(4):249-253
 - 13 Taylor KM. A distinct role in breast cancer for two LIV-1 family zinc transporters[J]. Biochem Soc Trans, 2008,36(Pt 6):1247-1251
 - 14 Lue HW, Yang X, Wang R, *et al.* LIV-1 promotes prostate cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling[J]. PLoS One, 2011,6(11):e27720
 - 15 Shen R, Xie F, Shen H, *et al.* Negative correlation of LIV-1 and E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma cells[J]. PLoS One, 2013,8(2):e56542
 - 16 Lian J, Jing Y, Dong Q, *et al.* miR-192, a prognostic indicator, targets the SLC39A6/SNAIL pathway to reduce tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(3):2672-2683
 - 17 Cui XB, Shen YY, Jin TT, *et al.* SLC39A6: a potential target for diagnosis and therapy of esophageal carcinoma [J]. J Transl Med, 2015,13:321
 - 18 Lue HW, Yang X, Wang R, *et al.* LIV-1 promotes prostate cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling[J]. PLoS One, 2011,6(11):e27720
 - 19 Unno J, Satoh K, Hirota M, *et al.* LIV-1 enhances the aggressive phenotype through the induction of epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2009,35(4):813-821

(收稿日期:2017-08-16)

(修回日期:2017-09-01)

数字 PCR 检测血浆游离 DNA 方法的建立及在结直肠癌中的初步应用

刘 平 余玲玲 王金丹 蔡 锚 吴兆明 郑晓群

摘 要 **目的** 建立基于微滴式数字 PCR (ddPCR) 技术定量检测血浆游离 DNA (cf-DNA) 含量的方法, 并探讨其在结直肠癌诊疗中的应用价值。**方法** 设计 β -actin 特异性引物和探针, 建立 ddPCR 检测 cf-DNA 绝对定量方法, 根据不同浓度标准品验证该检测方法的敏感度、线性以及重复性。该法检测 68 例结直肠癌患者、33 例结直肠良性肿瘤患者及 60 例健康对照者血浆 cf-DNA 水平, 化学发光法检测其血清 CEA、CA19-9 水平, 分析血浆 cf-DNA 水平与临床病理参数及血清 CEA、CA19-9 水平的关系, 并用 ROC 曲线评估其诊断效能。**结果** 本实验所建立的 ddPCR 方法能够检测低至 $10\text{pg}/\mu\text{l}$ 的微量 DNA 模板, 检测敏感度为 $0.29\text{copies}/\mu\text{l}$; 且在模板浓度为 $10\text{pg}/\mu\text{l} \sim 10\text{ng}/\mu\text{l}$ 的范围内线性良好 ($Y = -2.34 + 33.17X, R^2 = 0.999$); 批内 CV 为

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201610343003); 浙江省科技厅分析测试科技计划项目 (2016C37073); 浙江省温州市科技局公益性科技计划项目 (Y201407320)

作者单位: 325027 温州医科大学附属第二医院 (刘平、余玲玲、蔡锚、郑晓群); 325035 温州医科大学检验医学院、检验医学教育部重点实验室 (刘平、王金丹、吴兆明、郑晓群)

通讯作者: 郑晓群, 电子信箱: jszhengxq@163.com

9.85%,批间 CV 为 11.04%。该法检测结直肠癌组、结直肠良性肿瘤组和健康对照组血浆 cf-DNA 水平分别为 6700(3800~9925)、3100(2300~4000)、2500(1775~4000)copies/ml,结直肠癌组血浆 cf-DNA 水平显著高于结直肠良性肿瘤组($P=0.000$)和健康对照组($P=0.000$),而结直肠良性肿瘤组与健康对照组比较,差异无统计学意义($P=0.167$)。结直肠癌患者血浆 cf-DNA 水平在不同年龄、性别、肿瘤部位、分化程度、淋巴结转移以及肿瘤浸润程度间比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05),在 TNM 分期间差异有统计学意义($P<0.01$)。结直肠癌患者血浆 cf-DNA 水平与 CEA($r=0.210, P=0.099$)和 CA19-9($r=0.125, P=0.233$)无相关性。ROC 曲线结果显示,以 5300copies/ml 为 cut off 值,cf-DNA 诊断结直肠癌 ROC 曲线下面积(AUC)、敏感度、特异性分别为 0.931、73.3%和 98.3%,高于 CEA(0.762、51.7%、95.6%)和 CA19-9(0.548、45.0%、82.0%)。

结论 建立了一种敏感、特异的 ddPCR 定量检测血浆 cf-DNA 的方法,有助于结直肠癌的辅助诊断及预后判断。

关键词 ddPCR cf-DNA 结直肠癌 CEA CA19-9

中图分类号 R446

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.011

Establishment of Digital PCR for Detecting Plasma Cell-free DNA and Its Application Value in Colorectal Cancer. Liu Ping, Yu Lingling, Wang Jindan, et al. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To establish a method for detecting concentrations of plasma cell-free DNA (cf-DNA) based on the droplet digital PCR (ddPCR), and to explore its diagnosis and treatment value in colorectal cancer. **Methods** ddPCR specific primers and probes for β -actin were designed to establish an absolute quantitative method for the detection of cf-DNA. The sensitivity, linearity and reproducibility of the method were validated by the detection of standards with different concentrations. The plasma cf-DNA levels were detected by this method in 68 patients with colorectal cancer, 33 patients with colorectal benign tumor and 60 healthy controls, and the concentrations of carcinoembryonic antigen (CEA), carcinoembryonic antigen 19-9 (CA19-9) were assayed by chemiluminescence, the correlation between plasma cf-DNA levels and clinicopathological parameters and serum CEA, CA19-9 was analyzed, and Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were established to illustrate the diagnostic performance. **Results** The ddPCR method established in this experiment can detect as low as 10pg/ μ l DNA template, which is approximate to 0.29copies/ μ l, and ddPCR was evaluated as linear in the range of 10pg/ μ l-10ng/ μ l ($Y=-2.34+33.17X, R^2=0.999$); Coefficient of Variance (CV) of intra-assay was 9.85%, CV of inter-assay was 11.04%. The levels of cf-DNA detected by ddPCR among the plasma samples of patients with colorectal cancer, colorectal benign tumor and healthy controls were 6700(3800-9925), 3100(2300-4000), 2500(1775-4000)copies/ml, respectively. There were significant differences between colorectal cancer and colorectal benign tumor patients ($P=0.000$), colorectal cancer patients and healthy individuals ($P=0.000$), and there was no significant difference between colorectal benign tumor patients and healthy individuals ($P=0.167$). No statistically significant difference of cf-DNA in age, gender, tumor sites, tumor differentiation, lymph node metastasis and the degree of tumor invasion was found. But there was significant difference in the stage TNM ($P<0.01$). There was no correlation between cf-DNA and CEA ($r=0.210, P=0.099$) and CA19-9 ($r=0.125, P=0.233$). The ROC curve showed that when cut off value was 5300copies/ml, the area under the ROC curve (AUC), sensitivity and specificity of plasma cf-DNA in colorectal cancer patients were 0.931, 73.3% and 98.3%, respectively, which were significantly higher than those of CEA(0.762, 51.7%, 95.6%) and CA19-9(0.548, 45.0%, 82.0%). **Conclusion** A sensitive, specific ddPCR for detecting plasma cf-DNA has been established, which is helpful for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

Key words ddPCR; cf-DNA; Colorectal cancer; CEA; CA19-9

结直肠癌是世界上严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,据国家肿瘤登记中心(NCCR)调查报告显示,在2015年我国结直肠癌的发生率和病死率均位于国内恶性肿瘤发生率和病死率的第5位,且呈逐年递增趋势^[1,2]。目前,诊断结直肠癌的金标准为肠镜下组织活检,但肠镜是一种有创的侵入性检查,使得部分患者不易耐受,且无法实现肿瘤进程的实时监控和随访监测。常见的诊断结直肠癌的血清学肿瘤标志物如CEA、CA19-9、CA125等,在结直肠癌的辅助诊断和预后判断中具有一定的意义。但这些肿瘤标

志物的敏感度和特异性均不高^[3,4]。因此,寻找敏感、特异的肿瘤标志物对结直肠癌的辅助诊断和治疗监测具有重要意义。

近年来,随着肿瘤标志物的深入研究,血浆游离DNA(cell-free DNA, cf-DNA)被认为是与肿瘤进展预后密切相关的新型标志物^[5]。通过对cf-DNA的检测,不仅可以实时反映肿瘤患者病情的动态变化,而且可以为肿瘤的早期诊断、疗效评估、复发监测提供重要的临床参考价值。但由于血浆cf-DNA含量较低,目前临床常用的检测技术很难实现其定量检

出,因此临床上迫切需要一种能高效富集靶标,且特异性好、敏感度高的血浆 cf-DNA 定量检测方法。微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 技术是近年来发展起来的一种全新的核酸分子检测技术。本方法无需建立标准曲线,不受扩增效率的影响,即可实现低至单拷贝的待检靶分子的检测^[6,7]。因此,基于 ddPCR 的上述优势,本研究拟采用该技术建立血浆 cf-DNA 定量检测方法,并结合 CEA、CA19-9 及相关临床资料进行分析,探讨其在结直肠癌诊断中的应用价值。

对象与方法

1. 研究对象:收集 2016 年 5 月~2017 年 6 月温州医科大学附属第二医院肛肠外科就诊的结直肠癌术前患者 68 例,男性 45 例,女性 23 例,患者年龄 41~84 岁,中位年龄 67 岁,所有患者均有组织病理学证据确诊。按 2010 年美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)癌症分期手册(第 7 版)进行肿瘤分期分级。收集 2017 年 2~6 月温州医科大学附属第二医院住院的结直肠良性肿瘤患者 33 例,其中,结肠息肉 11 例、直肠息肉 17 例、结肠高级别上皮内瘤变 2 例、结肠绒毛状管状腺瘤 3 例,男性 23 例,女性 10 例,患者年龄 42~78 岁,中位年龄 60 岁。另筛选同期体检健康者 60 例作为对照组,男性 39 例,女性 21 例,年龄 35~81 岁,中位年龄 63 岁。所有研究对象均排除炎症性疾病、组织损伤及免疫系统损伤等疾病。本研究经医院医学伦理委员会审核,所有患者均签署知情同意书。

2. 试剂与仪器:基因组 DNA 标准品(本实验提取)、血浆游离 DNA 提取试剂盒(杭州麦伯生物科技有限公司),QX200 微滴式数字 PCR 系统及配套试剂(美国 Bio-Rad 公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),罗氏 Cobas 8000 全自动生化免疫分析仪及配套试剂(美国罗氏公司)。

3. 标本采集:分别抽取检测对象外周静脉血 2ml 置于 EDTA 抗凝采血管中,2h 内分离血浆;在 4℃ 离心机中以 1600r/min 低速离心 10min 取上清液;所得上清再以 16000r/min 高速离心 10min 取上清液;获完全无血细胞成分的血浆约 1ml,置于 -80℃ 冰箱保存备用。

4. cf-DNA 提取:采用血浆游离 DNA 提取试剂盒(杭州麦伯生物科技有限公司)提取,严格按照说明书操作步骤进行。所有血浆标本均采用同一批号的试剂盒提取,以减少批间误差,提取的血浆游离

DNA 置于 -20℃ 冰箱保存备用。

5. ddPCR 检测方法建立:(1)以人 β -肌动蛋白基因(β -actin)为检测靶基因,设计引物和探针序列。上游引物序列:5'-CATTGCCGACAGGATGCA-3',下游引物序列:5'-CGCTCAGGAGGAGCAATGAT-3',探针序列:5'-FAM-CACTGCCCTGGCACCCAGCA-BHQ1-3'。引物扩增片段长度为 81bp,引物探针均由上海奕跃生物科技有限公司设计合成。(2)ddPCR 检测在 Bio-Rad QX200™ 微滴式数字 PCR 仪上进行。PCR 总反应体系为 20 μ l,包括 2 $\times$ ddPCR™ supermix for probe 10 μ l,正、反向引物各 1.8 μ l(终浓度为 900nmol/L),探针 0.5 μ l(终浓度为 250nmol/L),模板 DNA 4 μ l,ddH₂O 补足至 20 μ l。随后将 20 μ l 反应体系混合物加入到微滴生成卡中,进行微滴生成。将生成的微滴全部转移到 96 孔板上进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95℃/10min;94℃/30s,60℃/1min,40 个循环;98℃/10min。最后采用 QuantaSoft 1.6 软件(美国 Bio-Rad 公司)对结果进行分析。

6. ddPCR 检测方法评估:(1)敏感度和线性范围:将 10ng/ μ l 的基因组 DNA 连续梯度稀释制得浓度为 10ng/ μ l、1ng/ μ l、100pg/ μ l、50pg/ μ l、10pg/ μ l、1pg/ μ l 的标准品,分别标记为 S6-S1,然后应用稀释液 DNA 为模板,进行 ddPCR 反应,以检测 ddPCR 的敏感度和线性范围。(2)重复性:由于本实验旨在评估 ddPCR 方法在检测低拷贝时的检测性能,为确保其重复性,选取 50pg/ μ l 基因组 DNA 标准品,使用数字 PCR 平行重复检测 5 次,测定批内 CV。然后将同一份标准品 DNA 等分为 5 份,保存于 -20℃ 冰箱,每两天检测 1 次,连续检测 5 次,测定批间 CV。

7. 临床样本检测:应用所建的 ddPCR 方法分别对 68 例结直肠癌患者、33 例结直肠癌良性肿瘤患者和 60 例健康体检者血浆 cf-DNA 拷贝数进行检测,分析 cf-DNA 水平在结直肠癌中可能具有的诊断及预后判断价值。

8. CEA、CA19-9 的检测:采用罗氏 Cobas 8000 全自动生化免疫分析仪进行检测,配套试剂皆由罗氏公司提供,检测均由医院检验科检验人员严格按照试剂盒说明书进行测定。参考范围:CEA < 5ng/ml, CA19-9 < 34U/ml。

9. 统计学方法:应用 GraphPad Prism5.0 软件进行绘图,应用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析。血浆 cfDNA 经正态性检验,提示数据呈偏态分布,故采用中位数(四分位数间距)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示。两

独立样本间比较采用 *Mann - Whitney U* 秩和检验,多个独立样本间比较采用 *Kruskal - Wallis H* 非参数检验,检验肿瘤标志物与 cf - DNA 水平相关性采用 *Spearman* 等级相关分析。采用 ROC 曲线确定 cut - off 值并计算敏感度和特异性,以评价各指标对结直肠癌的诊断价值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ddPCR 检测方法评估:(1)敏感度和线性范围:通过 ddPCR 体系检测系列稀释的标准品,从一维散点图(图 1A)上可以看出阳性微滴数目随着浓度的升高而逐渐增多,此外,阴性对照中没有检测到阳

性微滴,可见该体系中没有污染或非特异性扩增,方法的特异性较好。图 1B 显示所建立的 ddPCR 方法具有较高的检测敏感度,对低至 $10\text{pg}/\mu\text{l}$ 的基因组 DNA 模板仍可检测,测得的拷贝数为 $0.29\text{copies}/\mu\text{l}$,并在 $10\text{pg}/\mu\text{l} \sim 10\text{ng}/\mu\text{l}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系 $R^2 = 0.999$, ($Y = -2.34 + 33.17X, n = 5, P = 0.000$)。(2)重复性分析:ddPCR 检测浓度为 $50\text{pg}/\mu\text{l}$ 基因组 DNA 标准品的拷贝数批内和批间 CV 结果分别为 9.85% 和 11.04%,表明本实验具有很好的稳定性。

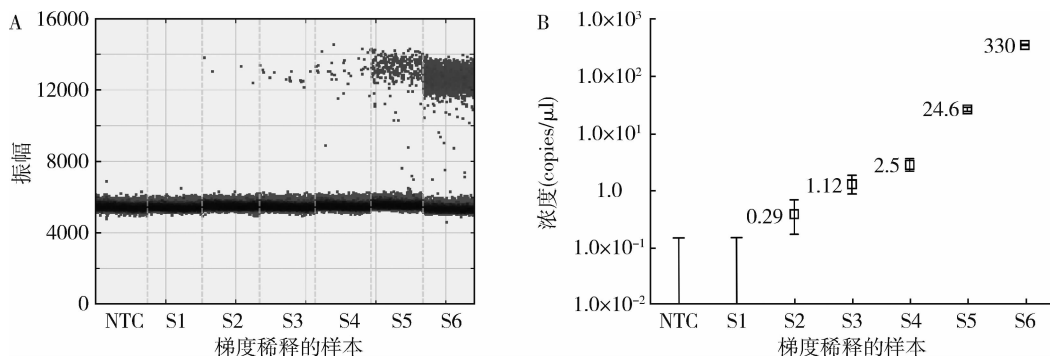


图 1 ddPCR 检测敏感度图

A. ddPCR 一维散点图;B. 目标基因浓度图

2. ddPCR 检测临床样本:图 2A 是 ddPCR 对临床样本血浆中 cf - DNA 扩增的一维原始散点图和微滴数图。所有反应生成的微滴数均达到 10000 以上,符合泊松分布的统计学原理。表明所有反应微滴生成正常,保证了后续定量分析的准确性。用 ddPCR 检测结直肠癌组、结直肠良性肿瘤组和健康对照组血浆 cf - DNA 水平分别为 6700(3800 ~ 9925)、3100(2300 ~ 4000)、2500(1775 ~ 4000) copies/ml,结直肠癌组血浆 cf - DNA 水平显著高于结直肠良性肿瘤组和健康对照组,差异有统计学意义(P 均 = 0.000),而结直肠良性肿瘤组与健康对照组差异无统计学意义($P = 0.167$),见图 2B。

3. 血浆 cf - DNA 水平与结直肠癌患者临床病理参数之间的关系:血浆 cf - DNA 水平与结直肠癌患者不同年龄、性别、肿瘤部位、分化程度、淋巴结转移以及肿瘤浸润程度间的差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),但与 TNM 分期间差异有统计学意义($P < 0.01$),结果见表 1。

4. 血浆 cf - DNA 水平与 CEA 和 CA19 - 9 相关性分析:采用化学发光法检测结直肠癌患者组血清

CEA 和 CA19 - 9 水平分别为 $4.15(2.17 \sim 11.34)\text{ng}/\text{ml}$ 、 $9.36(5.34 \sim 19.65)\text{U}/\text{ml}$,健康对照组分别为 $1.94(1.46 \sim 3.04)\text{ng}/\text{ml}$ 、 $7.10(5.29 \sim 9.01)\text{U}/\text{ml}$ 。结直肠癌组 CEA 和 CA19 - 9 的测定值均高于健康对照组,其中 CEA 的测定值明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P = 0.000$)。经 *Spearman* 等级相关分析结果表明,结直肠癌患者血浆 cf - DNA 水平与 CEA ($r = 0.210, P = 0.099$) 和 CA19 - 9 ($r = 0.125, P = 0.233$) 水平间无相关性。

5. 血浆 cf - DNA、CEA 和 CA19 - 9 对结直肠癌的诊断效能比较:经 ROC 曲线分析,选择最佳诊断结直肠癌的 cf - DNA、CEA、CA19 - 9 临界值分别为 $5300\text{copies}/\text{ml}$ 、 $4.02\text{ng}/\text{ml}$ 、 $9.24\text{U}/\text{ml}$ 时,血浆 cf - DNA 的 ROC 曲线下面积(AUC)、敏感度及特异性均高于 CEA 和 CA19 - 9。详见表 2、图 3。

讨 论

循环游离 DNA 是一种无细胞状态的胞外 DNA,早在 60 多年前就有研究报道人类血浆中存在着游离形式的核酸。然而由于受到提取方法、定量技术等诸多因素的限制,直到最近 10 年 cf - DNA 的研究

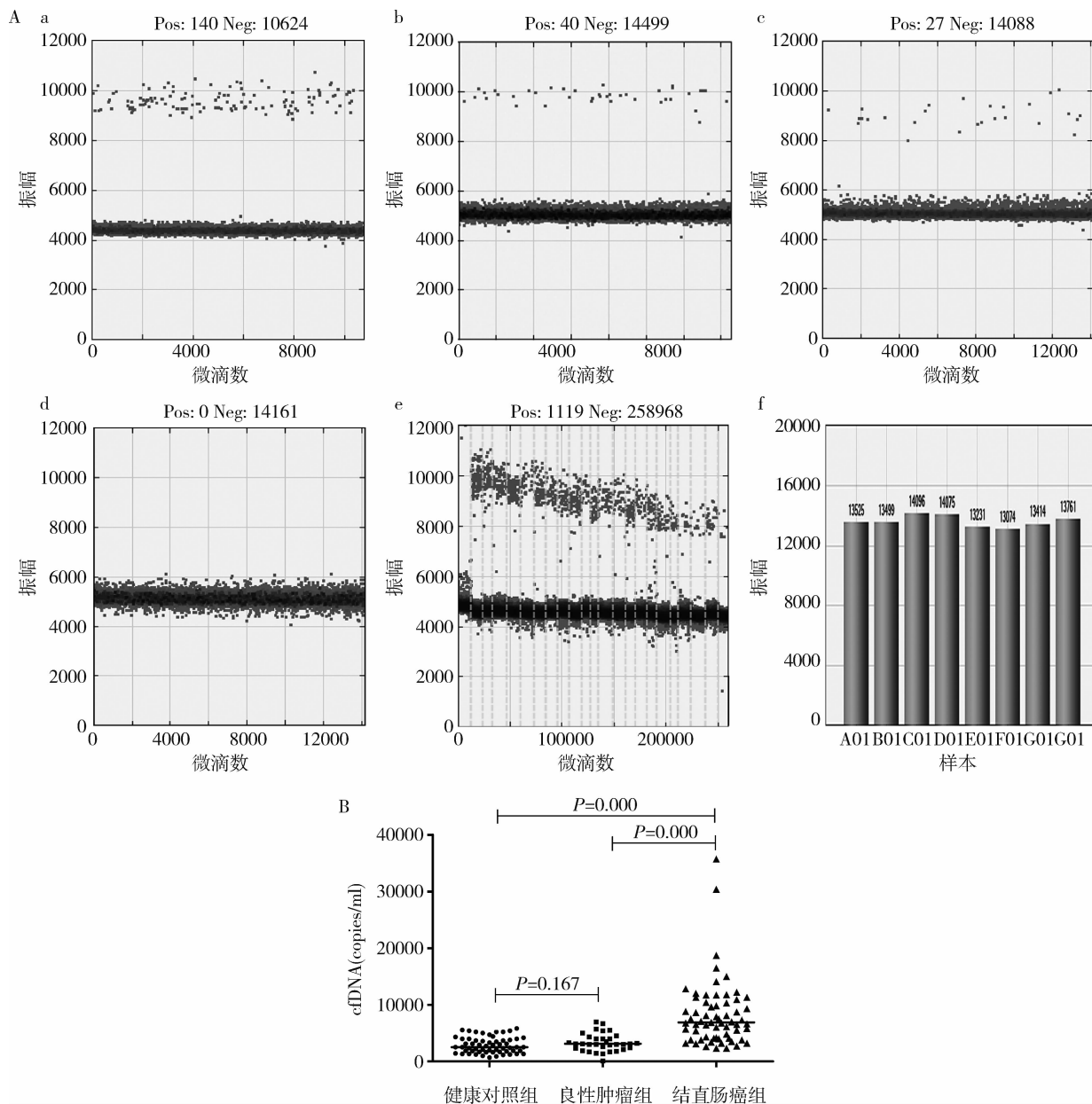


图 2 ddPCR 法对临床样本血浆 cfDNA 拷贝数的检测

A. 不同临床样本的原始微滴图片:a. 结直肠癌样本;b. 结直肠良性肿瘤样本;c. 健康对照样本;d. 阴性对照;e. 各样本及对照综合;f. 微滴柱状图;B. ddPCR 法对结直肠癌组、结直肠良性肿瘤组及健康对照组血浆 cfDNA 拷贝数检测

才受到广泛关注。越来越多的研究证实,在恶性肿瘤、炎性疾病、组织损伤和自身免疫病等多种疾病中,cf-DNA 水平均有不同程度的增高。游离核酸作为新兴的液体活检分子标志物,也被越来越多地应用于疾病诊断、治疗监测和预后判断等多个方面,本实验主要对 cf-DNA 在肿瘤液体活检领域中的临床应用及其意义进行研究。近年来研究发现,多种肿瘤患者中的 cf-DNA 含量均明显高于正常健康人^[8,9]。肿瘤患者 cf-DNA 水平不仅可以发生量的变化,而且

还可以出现与原发肿瘤 DNA 相同的特异性基因改变,包括点突变、DNA 甲基化、染色体微卫星不稳定性、杂合性缺失 (LOH) 等^[10~12]。这些事实进一步证明 cf-DNA 的肿瘤源性。

目前常用于 cf-DNA 检测分析的是 qPCR, 但该技术的敏感度不高, 当检测靶基因含量很低时, 采用 qPCR 检测技术往往无法获得准确的结果; 因此, 为了确保得到较高质量的 DNA 定量, 本研究采用特异性和敏感度都较高的 ddPCR 检测技术。ddPCR 是近年

表 1 结直肠癌患者血浆 cfDNA 水平与临床病理参数的相关性

临床病例参数	<i>n</i>	cf - DNA 水平 (copies/ml)	<i>Z</i> / χ^2	<i>P</i>
性别				
男性	45	7000 (4100 ~ 11300)	- 1.296	0.195
女性	23	6100 (3500 ~ 8350)		
年龄 (岁)				
≤ 67	35	6550 (4650 ~ 11000)	- 0.433	0.665
> 67	33	7000 (3950 ~ 9550)		
肿瘤部位				
结肠	21	7100 (3500 ~ 10800)	- 0.187	0.851
直肠	47	6700 (4275 ~ 9807)		
组织学病理类型				
高分化腺癌	7	6600 (5000 ~ 9515)	0.439	0.803
中分化腺癌	51	7050 (4150 ~ 9750)		
低分化腺癌	10	7150 (6175 ~ 10222)		
淋巴结转移				
N ₀ (无淋巴结转移)	39	6900 (5450 ~ 11100)	1.109	0.574
N ₁ (1 ~ 3 个淋巴结转移)	16	6000 (3900 ~ 9200)		
N ₂ (≥ 4 个淋巴结转移)	13	7500 (4800 ~ 10300)		
肿瘤浸润程度				
局限于肠壁	36	6800 (4275 ~ 8475)	- 0.310	0.757
穿透肠壁	32	7000 (4100 ~ 10397)		
TNM 分期				
I	12	5500 (4250 ~ 7450)	14.271	0.003
II	18	7100 (5700 ~ 9600)		
III	28	6200 (3850 ~ 8750)		
IV	10	11780 (10430 ~ 18700)		

表 2 血浆 cf - DNA、CEA、CA19 - 9 对结直肠癌的诊断效能比较

检测项目	AUC	cut - off	敏感度	特异性	95% CI	<i>P</i>
cf - DNA	0.931	5300copies/ml	73.3% (50/68)	98.3% (59/60)	0.887 ~ 0.974	0.000
CEA	0.762	4.02ng/ml	51.7% (35/68)	95.6% (57/60)	0.672 ~ 0.851	0.000
CA19 - 9	0.548	9.24U/ml	45.0% (31/68)	82.0% (49/60)	0.436 ~ 0.660	0.400

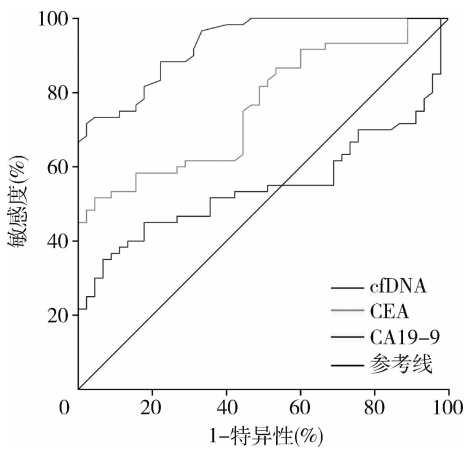


图 3 血浆 cf - DNA、CEA、CA19 - 9 诊断结直肠癌的 ROC 曲线图

来新推出的一种检测手段,其原理是将反应体系进行微滴化处理,使每个微滴独立地进行 PCR 反应,然后

在微滴分析仪上对每个微滴进行逐个分析,含有靶分子的微滴荧光信号为阳性,不含靶分子的微滴荧光信号为阴性,通过泊松分布原理和阳性微滴的比例计算出核酸数量^[13,14]。因此,与传统技术相比,ddPCR 技术直接分析目标基因,能够实现精确定量分析。目前,ddPCR 在痕量样本检测、低频突变检测等方面已广泛应用,但对血浆 cf - DNA 的定量检测还未见报道^[15,16]。在本研究中,笔者首先建立了 ddPCR 检测血浆 cf - DNA 的技术平台,评估了该方法的敏感度和重复性,并初步应用于结直肠癌诊断中,验证了 ddPCR 检测 cf - DNA 的可行性。研究显示,所建立的 ddPCR 方法扩增结果良好,对低至 10pg/ μ l 的基因组 DNA 模板仍可检测,测得的拷贝数为 0.29 copies/ μ l,说明其具有很高的敏感度。采用 ddPCR 对低浓度的标准品进行重复性检测,结果显示,批内 CV = 9.85%,批间 CV = 11.04%,表明本实验具有很好的

稳定性。由此可见, ddPCR 有望成为肿瘤诊断的新方法。

本研究用建立的 ddPCR 方法对结直肠癌患者血浆 cf-DNA 水平进行分析, 发现结直肠癌患者血浆 cf-DNA 水平明显高于良性肿瘤组和健康对照组, 差异有统计学意义 (P 均 = 0.000), 而结直肠良性肿瘤组和健康对照组比较差异无统计学意义 (P = 0.167), 此研究结果与 Qi 等^[17]的研究一致。笔者还发现, 各期结直肠癌患者血浆 cf-DNA 水平均明显高于健康对照组, IV 期出现肝脏、肺等远处转移的患者, cf-DNA 水平又较其他各期 (I、II、III 期) 明显升高, 这与闫巍等^[18]研究结果一致。表明血浆 cf-DNA 含量在结直肠癌患者中具有较高的区分度, 而且对于结直肠癌的早期诊断、预后判断和复发监测有一定的指向性。以上结果提示, ddPCR 可对 cf-DNA 进行准确定量, 其结合 cf-DNA 的微创、取样方便, 可连续检测, 可随访跟踪等优点, 可以真正使分子标志物的液体活检策略在临床诊疗中发挥巨大作用。

ROC 曲线分析发现, 当以血浆 cf-DNA 表达量 5300copies/ml 作为临界值时, 其对结直肠癌诊断的敏感度为 73.3%, 特异性为 98.3%。而临床作为诊断结直肠癌的常规血清肿瘤标志物 CEA 和 CA19-9, 本研究中其敏感度和特异性均低于 cf-DNA, 提示与血清 CEA (AUC = 0.762) 和 CA19-9 (AUC = 0.548) 相比, cf-DNA (AUC = 0.931) 对结直肠癌的诊断效能更好。且经 Spearman 相关分析发现血浆 cf-DNA 与 CEA 和 CA19-9 无相关性, 以上结果表明血浆 cf-DNA 可作为结直肠癌辅助诊断的一个独立的新型分子标志物。因此当组织标本不易获取或者需要反复取材时, 采用高敏感度的 ddPCR 技术对血浆 cf-DNA 进行检测, 可以作为诊断结直肠癌的辅助方法。

综上所述, 本研究建立的 ddPCR 检测血浆 cf-DNA 的方法特异性强、敏感度高、重复性好, 可为结直肠癌患者的辅助诊断、病程监控提供一种无创的、连续监测手段, 并为其他疾病血浆 cf-DNA 的监测提供一个通用的技术平台。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, *et al.* Colorectal cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 177-193
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132
- 3 Hao TB, Shi W, Shen XJ, *et al.* Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*. 2014, 111(8): 1482-1489
- 4 赵先文, 江波, 韩存芝, 荆洁线. 大肠癌患者血清肿瘤标志物含量测定与临床研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(5): 286-288
- 5 Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6): 426-437
- 6 Herring E, Kanaoka S, Tremblay é, Beaulieu JF. Droplet digital PCR for quantification of ITGA6 in a stool mRNA assay for the detection of colorectal cancers [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(16): 2891-2898
- 7 冯兆民, 舒跃龙. 数字 PCR 技术及其应用进展 [J]. *病毒学报*, 2017, 33(1): 103-107
- 8 Xia S, Huang CC, Le M, *et al.* Genomic variations in plasma cell free DNA differentiate early stage lung cancers from normal controls [J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(1): 78-84
- 9 杨益梅, 邵雪峰, 张玉泉等. 血清游离 DNA 定量检测对宫颈癌临床诊断的价值 [J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(11): 992-996
- 10 Thierry AR, Mouliere F, El MS, *et al.* Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA [J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 430-435
- 11 Barault L, Amatu A, Bleeker FE, *et al.* Digital PCR quantification of MGMT methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(9): 1994-1999
- 12 Allan JM, Hardie LJ, Briggs JA, *et al.* Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(3): 359-365
- 13 李春勇. 数字 PCR 技术原理及应用 [J]. *生物技术世界*, 2014, (11): 10-13
- 14 Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, *et al.* Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(17): 6474-6484
- 15 Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, *et al.* Droplet digital PCR is a reliable tool for monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(3): 437-444
- 16 Janku F, Huang HJ, Fujii T, *et al.* Multiplex KRASG12/G13 mutation testing of unamplified cell-free DNA from the plasma of patients with advanced cancers using droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(3): 642-650
- 17 Qi J, Qian C, Shi W, *et al.* Alu-based cell-free DNA: a potential complementary biomarker for diagnosis of colorectal cancer [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(1-2): 64-69
- 18 闫巍, 徐智. 结直肠癌 TNM 分期与循环 DNA 水平关系的临床研究 [J]. *中国微创外科杂志*, 2012, 12(6): 512-514

(收稿日期: 2017-10-06)

(修回日期: 2017-10-24)