

# 细胞游离DNA在器官移植中的应用

郎吉萍 苗芸

**【摘要】** 细胞游离DNA (cfDNA) 是存在于体液中、游离于细胞外的DNA片段,其主要来源于血细胞、组织细胞、脂肪细胞等,在特定条件下还可能来源于肿瘤、移植物或胎儿等。随着精准医疗时代的到来,基于cfDNA检测的液体活组织检查技术在产前诊断、恶性肿瘤以及器官移植等领域中具有明显优势,其无创诊断、治疗监测以及预后评估等方面受到广泛关注。本文就cfDNA的生物学基础、cfDNA在器官移植中的应用做一综述。

**【关键词】** 细胞游离DNA; 器官移植; 移植排斥; 移植物损伤; 免疫抑制剂; 生物标志物

**【中图分类号】** R617 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2018) 06-0012-03

细胞游离DNA (cell-free DNA, cfDNA) 是指存在于血液等各种体液中、游离于细胞外的DNA片段。随着精准医疗时代的到来,基于cfDNA检测的液体活组织检查(活检)技术在产前诊断、恶性肿瘤、器官移植等领域中具有明显优势,其无创诊断、治疗监测以及预后评估等方面受到广泛关注。本文就cfDNA的生物学基础及其作为生物标志物在器官移植中的应用进行综述。

## 1 细胞游离DNA的生物学基础

### 1.1 细胞游离DNA的来源及产生机制

cfDNA是游离于细胞外的微量内源性及异源性DNA片段,包括游离基因组DNA和游离线粒体DNA等。cfDNA以DNA-蛋白质复合物或者游离片段的形式存在于血液、尿液、胸腔积液、腹腔积液等各种体液及支气管肺泡灌洗液中,主要来源于血细胞、组织细胞、脂肪细胞等,在特定条件下还可能来源于肿瘤、移植物或胎儿等<sup>[1-2]</sup>。

目前cfDNA产生的具体机制尚不明确,其通常由细胞凋亡、坏死以及网捕死亡(NETosis)产生<sup>[3]</sup>。NETosis是一种新发现的介于凋亡和坏死的细胞程序性死亡方式,即中性粒细胞释放其DNA-组蛋白复合物,产生细胞外捕网,杀死病原体。

### 1.2 细胞游离DNA的含量及长度

人体内cfDNA含量多在100 μg/L之下,平均为30 μg/L, cfDNA含量在感染、炎症、恶性肿瘤、血液透析、器官移

植等病理状态下会相应增加。普通人群血浆中cfDNA的长度为185~200 bp,而孕妇、肿瘤患者、器官移植受体血浆内cfDNA的长度比普通人群更短<sup>[4]</sup>。

### 1.3 细胞游离DNA的半衰期及清除机制

cfDNA的半衰期为1~13 h,因此可以作为监测患者快速变化的有效的生物标志物<sup>[5]</sup>。cfDNA的清除机制尚不明确。实验显示肝脏在血浆cfDNA的清除中起重要作用,而DNA酶对人体血浆cfDNA的降解、母体血浆中胎儿cfDNA的清除或注射到小鼠体内的DNA仅起一部分作用<sup>[6]</sup>。该理论在全基因组关联研究中得到了进一步支持,其认为cfDNA的水平与DNA酶的基因多态性无关,但与尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT),特别是UGT1A1的基因多态性相关。由UGT1A1基因座位编码的酶是异源性物质以及一些内源性物质解毒的主要途径<sup>[7]</sup>。由于尿液中含有血浆来源的cfDNA,所以肾脏代谢也是cfDNA清除的可能机制之一<sup>[5]</sup>。

## 2 细胞游离DNA在器官移植中的应用

器官移植是治疗终末期器官衰竭患者的有效方法。移植排斥反应是影响实体移植器官存活的主要因素。此外,免疫抑制剂产生的不良反应也是导致移植物功能损伤的重要原因之一<sup>[8]</sup>。目前,移植排斥反应的监测指标灵敏度较低。例如,在发现血清肌酐异常之前,约有50%的移植肾功能可能已经受损<sup>[9]</sup>;传统的肝功能检测对评估移植肝排

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.06.012

基金项目: 国家自然科学基金(81500573); 广东省高等教育学会高等教育科学研究“十三五”规划重点调研课题(16GZD009); 广州市科技计划项目(201803010109); 南方医科大学大学生创新创业训练项目基金(201712121307、201812121251)

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学第一临床医学院

作者简介: 郎吉萍, 女, 1995年生, 南方医科大学临床医学八年制, 研究方向为细胞游离DNA的应用, Email: 893273759@qq.com

通讯作者: 苗芸, 女, 1978年生, 博士后, 副主任医师, 研究方向为器官移植的供体保存, Email: miaoyunecho@126.com

斥反应价值有限; 心肌酶谱对心脏移植后急性排斥反应的诊断灵敏度并不是很理想。目前, 病理学活检是排斥反应诊断的“金标准”, 但其具有侵入性和潜在并发症。因此, 建立更有效、无创的方法来监测移植状态显得尤其重要。

1998年, Lo等<sup>[10]</sup>检测到肝、肾移植术后女性受体的血浆中含有来自男性供体的Y染色体的cfDNA, 从而发现受体内含有供体特异性DNA。此后的研究进一步证实移植受体体液中存在供体来源的细胞游离DNA (donor-derived cell-free DNA, dd-cfDNA)<sup>[11]</sup>。随着分子诊断技术的不断发展, dd-cfDNA、受体内总cfDNA等不同cfDNA生物标志物的临床意义逐渐成为器官移植领域关注的热点。目前, 器官移植中cfDNA的常用检测方法包括荧光定量聚合酶链反应(PCR)、多重PCR、数字PCR、目标区域捕获测序和全基因组测序等。近年的研究表明, 器官移植后受体内的dd-cfDNA水平与移植排斥反应相关<sup>[12]</sup>, 其作为移植损伤和排斥的无创生物标志物, 有望补充或替代病理学活检, 从而更频繁、更安全地定量评估移植损伤和排斥状态, 并且在免疫抑制治疗监测等方面也展现了可观的前景。

### 2.1 用于监测移植损伤和排斥状态

dd-cfDNA作为诊断移植排斥反应的无创标志物的理论基础是: 移植排斥反应是移植器官组织细胞死亡的重要原因, 产生并释放较多的dd-cfDNA。研究表明, dd-cfDNA水平(即dd-cfDNA占受体总cfDNA的百分比)可以反映心脏移植、肺移植、肝移植或肾移植后的排斥反应<sup>[11-13]</sup>。

dd-cfDNA作为急性排斥反应生物标志物的研究多在心脏移植领域中进行。De Vlaminck等<sup>[14]</sup>研究发现, 发生排斥反应的心脏移植受体中dd-cfDNA水平显著高于功能稳定的心脏移植受体的dd-cfDNA水平。

相比于功能稳定的心脏移植受体, 功能稳定的肺移植和肝移植受体中的dd-cfDNA水平更高, 并且其中度至重度排斥反应中也会进一步增加, 这可能与器官大小和细胞再生率有关<sup>[15]</sup>。Schütz等<sup>[16]</sup>研究表明, 肝移植受体术后1d的dd-cfDNA水平可升高至50%以上, 随后在功能稳定的肝移植受体中dd-cfDNA水平迅速下降, 术后7~10d的dd-cfDNA水平为10%以下, 并在之后1年的随访中维持该水平。研究认为功能稳定的肝移植受体中dd-cfDNA水平的阈值上限为10%, 并可在活检证实的排斥反应前1~2周监测出排斥反应<sup>[16]</sup>。Sun等<sup>[17]</sup>研究发现cfDNA主要来源于白细胞, 约10%来源于肝脏, 这与研究所确定的功能稳定的肝移植受体中dd-cfDNA的正常阈值上限相符。

功能稳定的肾移植受体与心脏移植受体中dd-cfDNA水平相似。近期一项监测肾移植术后受体中dd-cfDNA的多中心研究将排斥组与对照组受体血浆中的dd-cfDNA水平进行比较, 结果表明两组的dd-cfDNA水平具有显著性差异, dd-cfDNA水平高于1%时提示可能发生移植肾排斥反应<sup>[18]</sup>。Bromberg等<sup>[19]</sup>进一步证实了该结论并首次明确了在功能稳定的肾移植受体中dd-cfDNA的生物学变异和临床参考区间, 其指出dd-cfDNA的参考变化幅度为61%。

如果肾移植受体第1次测量的dd-cfDNA水平为0.7%, 如果下一次测量的dd-cfDNA水平高于第1次测量结果的61%(即dd-cfDNA水平大约为1.1%), 则可认为连续两次测量结果之间的差异有统计学意义。

dd-cfDNA可以作为一种通用标志物, 用于监测实体移植器官的状态, 特异性地反映移植发生的细胞损伤, 并且其增加的幅度与损伤的严重程度成正比<sup>[11]</sup>。尽管确定dd-cfDNA水平后可能仍需通过病理学活检以确认组织病理学变化, 但dd-cfDNA水平可以更及时地反映移植损伤, 实现移植排斥反应的早期诊断, 更有效地改善受体的预后<sup>[20]</sup>。

### 2.2 用于指导个体化免疫抑制治疗

免疫抑制剂的治疗窗较窄, 药物使用不当容易出现不良反应或治疗效果不佳甚至导致排斥反应的发生。尽管临床医师可以对免疫抑制剂进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM), 但受体仍然会发生药物使用过量或不足的情况。监测亚临床排斥反应的生物标志物对于早期调整免疫抑制剂的剂量具有重要的指导作用。

目前认为dd-cfDNA水平监测与TDM结合使用时, 可提供更有效和更低毒性的个体化免疫抑制治疗。Oellerich等<sup>[21]</sup>通过监测肝移植受体的dd-cfDNA水平, 评估术后5~30d他克莫司(FK506)的治疗效果。当FK506的血药浓度未达到治疗剂量时, 约45%的肝移植受体中dd-cfDNA水平显著升高(>10%), 提示移植损伤, 结果表明监测dd-cfDNA水平可有助于确定单个肝移植受体FK506的最低有效浓度, 这对调整免疫抑制剂的剂量有指导作用。

在一些停用免疫抑制剂的受体中会发生自发耐受现象, 称之为可操作性耐受(operational tolerance, OT)。肝移植受体中OT的发生率≤20%, 这些受体将受益于免疫抑制剂最小化。非OT受体中的dd-cfDNA水平则会随着免疫排斥反应的出现而升高, 监测dd-cfDNA水平可有助于指导钙神经蛋白抑制剂(CNI)的使用。因此, dd-cfDNA可作为生物标志物指导个体化免疫抑制治疗。

### 2.3 细胞游离DNA临床转化的挑战

近年的研究使得人们对cfDNA在器官移植领域的潜在价值有了更多的认识, 然而将cfDNA应用于临床仍存在一定的挑战性。

首先是标准化问题, 包括分析前、分析中和分析后三方面因素。分析前因素如患者的基本情况、样本的收集时间、收集过程、存储条件、处理方法等都可能对检测结果产生影响。例如在采血、储存或离心过程中, cfDNA的总量可能受到溶血的影响。分析中因素如cfDNA的提取、分析平台和技术差异等也会产生不同的检测结果。分析后因素如结果的处理、判定、解读等也在不同程度上影响检测结果的准确性。目前, 由于实验平台、分析平台和技术等缺乏统一标准, 且由于cfDNA的总量较低, 仅以非常小的片段存在, 分离具有一定困难, 不同实验室给出的检

测结果通常存在差异,造成检测结果互认和比较具有一定难度。

其次是影响因素问题。dd-cfDNA 水平可受到移植物和受体 cfDNA 的双重影响,来自受体组织细胞的更新/死亡的扰动可能导致 dd-cfDNA 水平的变化。在基于 cfDNA 的无创产前诊断的研究中发现,体质量指数 (body mass index, BMI) 也是影响 dd-cfDNA 水平的因素之一。BMI 很低时,dd-cfDNA 水平升高。吸烟会使 cfDNA 水平几乎升高 3 倍。高强度运动也可以暂时性升高 cfDNA 的水平,至少持续几个小时。

目前 dd-cfDNA 是反映移植物病理状态的通用标志物,数据表明 dd-cfDNA 水平在急性排斥反应和移植物感染过程中都会明显升高,但仍需结合其他参数,如免疫抑制剂监测、免疫监测和微生物筛查,以提高其诊断价值。同时 cfDNA 的来源尚未完全阐明,在体内的产生及清除机制也未完全明确,这些均使其临床应用受到一定限制。

### 3 小 结

cfDNA 作为新兴的生物标志物已逐渐被人们所关注。在器官移植领域,cfDNA 作为移植物损伤和排斥的无创生物标志物可用于早期监测、评估移植物损伤和排斥状态,并且在指导免疫抑制治疗方面也展现出优势。但由于检测技术未标准化、受体 cfDNA 的干扰以及 cfDNA 的产生和清除等机制仍未完全明确,其广泛应用于临床仍存在一定的挑战性,需更多大规模的前瞻性多中心研究提供足够的循证医学数据。相信在大量基础与临床研究支撑下、在检测技术与设备的不断发展中,基于 cfDNA 的液体活检技术会发挥越来越重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] SNYDER MW, KIRCHER M, HILL AJ, et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 57-68. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.050.
- [2] CELEC P, VLKOVÁ B, LAUKOVÁ L, et al. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2018, 20: e1. DOI: 10.1017/erm.2017.12.
- [3] ALLAM R, KUMAR SV, DARISIPUDI MN, et al. Extracellular histones in tissue injury and inflammation[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(5): 465-472. DOI: 10.1007/s00109-014-1148-z.
- [4] ULZ P, HEITZER E, GEIGL JB, et al. Patient monitoring through liquid biopsies using circulating tumor DNA[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(5): 887-896. DOI: 10.1002/ijc.30759.
- [5] YU SC, LEE SW, JIANG P, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(8): 1228-1237. DOI: 10.1373/clinchem.2013.203679.
- [6] KHIER S, LOHAN L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature[J]. *Future Sci OA*, 2018, 4(4): FSO295. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0140.
- [7] TOSEVSKA A, FRANZKE B, HOFMANN M, et al. Circulating cell-free DNA, telomere length and bilirubin in the vienna active ageing study: exploratory analysis of a randomized, controlled trial[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38084. DOI: 10.1038/srep38084.
- [8] LUCEY MR, TERRAULT N, OJO L, et al. Long-term management of the successful adult liver transplant: 2012 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2013, 19(1): 3-26. DOI: 10.1002/lt.23566.
- [9] MEEUSEN JW, LIESKE JC. Looking for a better creatinine[J]. *Clin Chem*, 2014, 60(8):1036-1039. DOI: 10.1373/clinchem.2013.220764.
- [10] LO YM, TEIN MS, PANG CC, et al. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients[J]. *Lancet*, 1998, 351(9112): 1329-1330.
- [11] BECK J, OELLERICH M, SCHULZ U, et al. Donor-derived cell-free DNA is a novel universal biomarker for allograft rejection in solid organ transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2015, 47(8): 2400-2403. DOI: 10.1016/j.transproceed.2015.08.035.
- [12] GIELIS EM, LEDEGANCK KJ, DE WINTER BY, et al. Cell-free DNA: an upcoming biomarker in transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2015, 15(10): 2541-2551. DOI: 10.1111/ajt.13387.
- [13] DE VLAMINCK I, MARTIN L, KERTESZ M, et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(43): 13336-13341. DOI: 10.1073/pnas.1517494112.
- [14] DE VLAMINCK I, VALANTINE HA, SNYDER TM, et al. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(241): 241ra77. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007803.
- [15] BECK J, BIERAU S, BALZER S, et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(12): 1732-1741. DOI: 10.1373/clinchem.2013.210328.
- [16] SCHÜTZ E, FISCHER A, BECK J, et al. Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: a prospective, observational, multicenter cohort study[J]. *PLoS Med*, 2017, 14(4): e1002286. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002286.
- [17] SUN K, JIANG P, CHAN KC, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(40): E5503-E5512. DOI: 10.1073/pnas.1508736112.
- [18] BLOOM RD, BROMBERG JS, POGGIO ED, et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2221-2232. DOI: 10.1681/ASN.2016091034.
- [19] BROMBERG JS, BRENNAN DC, POGGIO E, et al. Biological variation of donor-derived cell-free DNA in renal transplant recipients: clinical implications[J]. *J Appl Lab Med*, 2017, 2(3): 309-321. DOI: 10.1373/jalm.2016.022731.
- [20] OELLERICH M, SCHÜTZ E, KANZOW P, et al. Use of graft-derived cell-free DNA as an organ integrity biomarker to reexamine effective tacrolimus trough concentrations after liver transplantation[J]. *Ther Drug Monit*, 2014, 36(2): 136-140. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000044.
- [21] OELLERICH M, WALSON PD, BECK J, et al. Graft-derived cell-free DNA as a marker of transplant graft injury[J]. *Ther Drug Monit*, 2016, 38( Suppl 1): S75-S79. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000239.

(收稿日期: 2018-08-16)

(本文编辑: 石梦辰 吴秋玲)