

人体循环 DNA 在心脏危急症方面的研究进展

王 敏¹, 郭延松²

(1. 福建中医药大学, 2. 福建省立医院心血管内科, 福建省福州市 350001)

[关键词] 血浆 DNA; 血浆线粒体 DNA; 心肌梗死; 心脏骤停

[摘要] 血浆 DNA 和线粒体 DNA 是血液循环系统中游离状态的 DNA。健康人的血液中含有极微量的循环 DNA 并维持相对恒定, 当机体在病理状态时常有不同程度的升高。通过血浆 DNA 和线粒体 DNA 的实时监测, 可以实现心肌梗死、心脏骤停等心脏危急症的早期诊断及预后评估。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Advance in Human Circulating DNA at Critical Heart Attack

WANG Min¹, and GUO Yan-Song²

(1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2. Department of Cardiovascular, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China)

[KEY WORDS] Plasma DNA; Plasma Mitochondrial DNA; Myocardial Infarction; Cardiac Arrest

[ABSTRACT] Plasma DNA and mitochondrial DNA are circulating DNA in the blood. The healthy has extremely small amounts of them, but in pathological state, the body often has a different increase in amount. Through real-time monitoring of plasma DNA and mitochondrial DNA, myocardial infarction and cardiac arrest can achieve early diagnosis and prognosis.

循环 DNA 是人体内环境中游离状态的 DNA, 血浆、血清、脑脊液及滑膜液等体液中广泛存在。血液中的游离 DNA 可与蛋白质结合以 DNA-蛋白质复合物的形式存在, 也可以单纯的游离 DNA 片段存在。健康人的血液中存在极低量且相对恒定的游离 DNA。血浆游离 DNA 能实时反映机体新陈代谢, 与机体生理和病理状态密切相关, 可作为机体状态评价的新生标志物。近年研究发现, 当机体处于心肌梗死、心脏骤停危急状态或其它特殊状态(如肿瘤、复合型严重创伤性损伤、高龄、脓毒血症及妊娠等), 血浆 DNA 含量会明显上升。我们就近年来循环 DNA 的生物特性、可能来源及其作为心肌梗死及心脏骤停标志物的最新进展作一综述。

1 血浆 DNA 的分子生物特性及其形成机制

血浆 DNA 表现为双螺旋结构或单链结构, 一部分以单纯的游离片段存在, 一部分与蛋白质结合成

复合体存在或直接粘附在血细胞表面^[1]。人血浆 DNA 主要来源于细胞核和线粒体 DNA 的释放, 健康成人中血浆 DNA 含量极低, 通过目前主流检测技术即实时荧光定量 PCR 和支链 DNA Alu 技术定量, 仅每毫升纳克级。生理情况下, 循环 DNA 主要来源于衰老细胞凋亡后 DNA 的释放, 且通过肝肾快速清除使其处于低水平动态平衡。Szpechcinski 等^[2]应用逆转录聚合酶链反应对 16 例健康成人血浆 DNA 进行检测, 含量仅 0.9 ~ 7.0 ng/mL; 另有研究应用支链 DNA Alu 技术检测 60 名健康自愿者血浆 DNA, 其浓度中位数高达 117.8 ng/mL^[3]。而在一项中国人血浆 DNA 定量多中心合作研究中, 运用双重实时荧光定量 PCR 对 100 名健康成人血浆 DNA 进行检测, 血浆 DNA 的中值水平为 37 ng/mL, 并初步确立正常参考值区间为 0 ~ 99 ng/mL^[4]。这种含量的明显差异有可能是样本及检测技术不同所导致的。

循环 DNA 在 1948 年第一次被 Mandel 和 Metais

[收稿日期] 2014-07-09

[修改日期] 2014-09-01

[作者简介] 王敏, 硕士研究生, 研究方向为冠心病基础与临床诊治, E-mail 为 wmhbyc@163.com。郭延松, 博士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病基础与临床诊治。

所描述,但目前其来源并不完全清楚,细胞裂解、坏死、凋亡和主动释放都可能是 DNA 进入血液的机制。近年来,对多种肿瘤细胞外 DNA 及肿瘤 DNA 遗传变异鉴定的研究中,部分研究表明肿瘤患者血浆循环 DNA 可来自肿瘤细胞凋亡、坏死或裂解^[5]。血浆 DNA 的长度与机体生理和病理状态密切相关,短的可小于 200 bp,较长的可大于 1000 bp^[6]。细胞凋亡时染色体 DNA 被蛋白酶在核小体处切断,产生特征性的低聚糖 DNA 梯度条带,可释放长度 180 ~ 200 bp 的 DNA^[7]。正常组织主要通过细胞凋亡产生长度 185 ~ 200 bp 的循环 DNA 短片段;而肿瘤坏死细胞 DNA 不完全消化呈现长度多样性,产生以长链为主的循环 DNA 片段^[8]。因此,有学者认为健康人血浆 DNA 主要来源于细胞凋亡而不是坏死^[9]。

Jing 等^[3]通过检测健康自愿者血清和血浆 DNA 发现,血清浓度比血浆更高,表明血液凝固过程可能促使循环 DNA 释放。该研究同时还发现血清 DNA 有着明显性别差异,男性血清游离 DNA 浓度中位数比女性低 100 ng/mL,但血浆 DNA 的这种性别差异无统计学意义。另有研究还表明血浆 DNA 可能存在着人群种族差异和年龄差异^[10,11]。

2 循环 DNA 在心血管方面的临床研究

2.1 在急性冠状动脉综合征中的诊断意义

重度心肌缺血常伴随严重并发症和猝死高风险,急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)必须及时与其它原因引起的胸痛鉴别。根据心电图 ST 段变化,ACS 常被分为 ST 段抬高型和非 ST 段抬高型心肌梗死。心肌梗死后普遍心肌细胞凋亡不单发生在早期梗死的心肌组织,还可发生于缺血再灌注的心肌。研究表明,在心肌梗死患者中,血浆 DNA 显著升高,具有独立性,与肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白 I 和肌红蛋白不相关^[3];更重要的是在对心肌梗死患者血浆 DNA 连续监测中发现,血浆 DNA 比肌钙蛋白 I 更灵敏,达峰值的时间更短,且对轻度心肌损伤的敏感性高于肌钙蛋白 I 和肌红蛋白。另有研究同样发现,相对于健康个体和稳定型心绞痛患者,ACS(特别是 ST 段抬高型心肌梗死)患者血浆 DNA 含量明显升高,且与 ACS 相关的 Gensini 评分和 GRACE 评分呈正相关^[12]。

在另一项研究中,正常对照组血浆 DNA 表现为相对恒定的极低量,而 ST 段抬高型心肌梗死患者会出现与肌钙蛋白 I 峰值相关的水浆 DNA 峰值,并

且该血浆 DNA 峰值还可能与实时心脏射血分数相关^[13]。

急性心肌梗死患者不单血浆 DNA 会升高,血浆线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)也会升高。Bliksøen 等^[14]首次证实局灶性心肌坏死会导致血浆 mtDNA 升高,并且透壁型心肌梗死者高于非透壁型心肌梗死者,血浆 mtDNA 还可能促进心肌梗死后无菌性炎症的发展。更重要的是在 ST 段抬高型心肌梗死患者中,血浆 mtDNA 3 h 即可达峰值,而肌钙蛋白 I 需 12 h,表明血浆 mtDNA 在心肌梗死早期峰值时间可能优于肌钙蛋白 I^[15]。

2.2 在心血管疾病预后评估中的意义

心肌梗死所有患者血浆 DNA 含量均表现异常,且平均血浆 DNA 水平高于正常人 10 倍,若发生心肌梗死相关并发症还会进一步升高^[16]。Antonatos 等^[17]研究证实 9 个单纯急性心肌梗死患者的血浆 DNA 低于 4 个伴有心肌梗死后并发症(心绞痛或病死)患者。另一项队列研究^[18]表明,相对于正常对照组,非 ST 段抬高型轻微心绞痛患者血浆 DNA 升高约 1.5 倍,ST 段抬高型心绞痛或心肌梗死患者则升高更多,且高于非 ST 段抬高型心绞痛或心肌梗死患者 1.3 倍;伴有心力衰竭或再梗死患者高于正常对照组 2 倍;发生早期心脏骤停患者高于正常对照组 3 倍,两年内发生心源性病死患者升高最多。该数据表明血浆 DNA 与 ACS 并发症(早期心脏骤停、心力衰竭、两年内死亡)相关,并且 ROC 曲线还表明血浆 DNA 是预测 ACS 患者两年内病死率的敏感特异性因子。

心脏骤停是心脏有效机械性收缩突然停止,全身有效循环血流及血氧运输中断的危急症。心脏骤停引起的广泛组织损伤不同于急性心肌梗死或脑卒中引起的特殊组织损伤。心脏骤停后自主循环恢复相关的缺血再灌注损伤及全身炎症反应综合征常致多器官功能障碍或衰竭,致广泛细胞凋亡和坏死^[19]。心脏骤停相关院前心肺事件与预后及结局终点密切相关,曾有研究^[20]报道心脏骤停早期阶段的高水平血浆 DNA 与入院后死亡率相关,早期损伤标志物对尽早做出心脏骤停预后评估有着重要的意义。

Huang 等^[19]发现在心脏骤停自主循环恢复早期阶段,血浆 DNA 变化呈时间相关性,即在 2 h 内达峰值后随时间逐渐下降,院内死亡患者在心脏骤停复苏成功后的 2 h 有着更高的血浆 DNA 水平;幸存出院患者在心脏骤停后第一个 24 h 血浆 DNA 水平显著低于住院期间死亡患者,但幸存出院患者与

生存期大于 72 h(院内死亡患者在心脏骤停发生后 72 h)的血浆 DNA 差异无统计学意义。另 ROC 曲线分析确立预测心脏骤停幸存出院的最佳血浆 DNA 临界值为 1170 g. e/mL(敏感性为 77.3%,特异性为 60%,准确性为 69%);多因素线性回归分析同时表明 1170 g. e/mL 的血浆 DNA 峰值可独立作为心脏骤停院内死亡的预测因子;Kaplan-Meier 生存曲线表明血浆 DNA 峰值低于 1170 g. e/mL 的心脏骤停患者生存期更有可能超过 90 天且幸存出院患者有着更好脑功能分级评分。Arnalich 等^[20]得出类似结果,心脏骤停生存期大于 24 h 的院内死亡患者第 24 h 游离血浆 DNA 中位数明显高于幸存患者,心肺复苏成功时间大于 30 min 患者的血浆 DNA 水平明显高于 30 min 内患者,并且血浆 DNA 与白细胞、肌钙蛋白、尿素氮、肌酐和血糖无关;心脏骤停相关迟发双向型二次打击继发性多器官功能衰竭死亡患者的血浆 DNA 浓度明显高于幸存患者。

血浆 DNA 浓度不仅与细胞坏死和凋亡等主动释放相关,还与血浆清除率相关。虽然血浆 DNA 主要通过肝肾代谢快速清除,但与肌酐、肌酐清除率并无明显关联^[21]。具有快速代谢特征的血浆 DNA 可用来实时评价组织损伤和疾病进展,但心脏骤停时血流动力学的变化对肝肾清除血浆 DNA 的影响还有待进一步研究。

在连续入选的 85 例院外心脏骤停患者的研究中发现,3 天内死亡患者的血浆 mtDNA 为 6982 ± 2102 g. e/mL,而幸存患者 3 天内的浓度为 3504 ± 1484 g. e/mL,表明 3 天内死亡患者血浆 mtDNA 浓度比幸存患者更高;ROC 曲线表明预测 3 天幸存期的血浆 mtDNA 最佳临界值为 3495 g. e/mL(敏感度为 92%,特异性为 75%),而血浆 DNA 为 3105 (g · e/mL)(敏感性为 86%,特异性为 71%)^[22]。虽血浆 DNA 和血浆 mtDNA 均有助于预测心脏骤停结局事件,但多因素线性回归分析表明血浆 mtDNA 可能是更优的独立预测因子,因其可能直接反映低氧对线粒体凋亡途径的激活。

3 小结与展望

循环 DNA 为急性心肌梗死的诊断提供了从 DNA 水平诊断的新思路。血浆 DNA 在心肌梗死患者中的升高具有独立性,比肌钙蛋白更灵敏且达峰的时间更短,并对轻度心肌损伤更敏感;其快速代谢动力学优于肌钙蛋白,对疾病的实时监测更具优势。关于 ACS 的不同类型,血浆 DNA 升高程度

不同,与冠状动脉病变程度及 ACS 危险分级相关,对预后评估具有重要意义,并且循环 DNA 中的血浆 mtDNA 比血浆 DNA 有更多优点。

循环 DNA 作为一种新生标志物,给临床心脏危急重症诊断和预后评估带来更多客观证据,同时目前也广泛应用于诊治肿瘤、结缔组织疾病,产前筛查及诊断等,具有标本易采集、创伤小及安全性高等优点。但其作为一种标志物也存在不足,特异性低,有年龄、种族差异是目前需要迫切解决的问题,关键是寻求与某种疾病相关联的特异性高的血浆 DNA;再加上目前缺乏定量检测统一标准,使血浆 DNA 统一量化标准的确立困难重重。但相信随着进一步深入研究和科学技术发展,这些问题会逐一解决,特征性循环 DNA 将会成为一个具有疾病相关高敏感性和特异性的理想标志物。

[参考文献]

- [1] Zeerleder S. The struggle to detect circulating DNA[J]. Crit Care, 2006, 10 (3): 142.
- [2] Szpechcinski A, Dancewicz M, Kopinski P, et al. Real-time PCR quantification of plasma DNA in non-small cell lung cancer patients and healthy controls[J]. Eur J Med Res, 2009, 14 (Suppl 4): 237-240.
- [3] Jing RR, Wang HM, Cui M, et al. A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood relevance to myocardial infarction screening[J]. Clin Biochem, 2011, 44 (13): 1 074-079.
- [4] 蒋叶. 中国人血浆 DNA 定量多中心合作研究进展[J]. 南京医科大学学报, 2008, 26 (3): 240.
- [5] Catarino R, Coelho A, Medeiros R. 循环 DNA 与非小细胞肺癌: 过往发现与新视角[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33 (6): 471-472.
- [6] Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumor-derived circulating DNA[J]. PLoS One, 2011, 6 (9): e23418.
- [7] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. Cancer Res, 2001, 61 (4): 1 659-665.
- [8] Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, et al. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool[J]. Clin Chem, 2006, 52 (10): 1 833-842.
- [9] Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, et al. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma[J]. Clin Chim Acta, 2008, 387 (1): 55-58.
- [10] Gerovassili A, Nicolaidis KH, Thein SL, et al. Cell-free

- DNA levels in pregnancies at risk of sickle-cell disease and significant ethnic variation [J]. *Br J Haematol*, 2006, 135 (5): 738-741.
- [11] Jylhävä J, Kotipelto T, Raitala A, et al. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90 + study [J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132 (1-2): 20-26.
- [12] Cui M, Fan M, Jing R, et al. Cell-free circulating DNA: a new biomarker for the acute coronary syndrome [J]. *Cardiology*, 2013, 124 (2): 76-84.
- [13] Shimony A, Zahger D, Gilutz H, et al. Cell free DNA detected by a novel method in acute ST-elevation myocardial infarction patients [J]. *Acute Card Care*, 2010, 12 (3): 109-111.
- [14] Bliksøen M, Mariero LH, Ohm IK, et al. Increased circulating mitochondrial DNA after myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 158 (1): 132-134.
- [15] Chen C, Xu J, Huang F. Recent players in the field of acute myocardial infarction biomarkers circulating cell-free DNA or microRNAs [J]? *Int J Cardiol*, 2013, 168 (3): 2 956-957.
- [16] Destouni A, Vrettou C, Antonatos D, et al. Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization [J]. *Acta Cardiol*, 2009, 64 (1): 51-57.
- [17] Antonatos D, Patsilinos S, Spanodimos S, et al. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1075: 278-281.
- [18] Rainer TH, Lam NY, Man CY, et al. Plasma beta-globin DNA as a prognostic marker in chest pain patients [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 368 (1-2): 110-113.
- [19] Huang CH, Tsai MS, Hsu CY, et al. Circulating cell-free DNA levels correlate with postresuscitation survival rates in out-of-hospital cardiac arrest patients [J]. *Resuscitation*, 2012, 83 (2): 213-218.
- [20] Arnalich F, Menéndez M, Lagos V, et al. Prognostic value of cell-free plasma DNA in patients with cardiac arrest outside the hospital: an observational cohort study [J]. *Crit Care*, 2010, 14 (2): R47.
- [21] Saukkonen K, Lakkisto P, Pettilä V, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock [J]. *Clin Chem*, 2008, 54 (6): 1 000-007.
- [22] Arnalich F, Codoceo R, López-Collazo E, et al. Circulating cell-free mitochondrial DNA: a better early prognostic marker in patients with out-of-hospital cardiac arrest [J]. *Resuscitation*, 2012, 83 (7): e162-e163.
- (此文编辑 文玉珊)