

# 肿瘤相关循环游离核酸的研究进展

邢星<sup>1</sup> 刘勇<sup>2</sup> 孙勇<sup>2</sup> 周鑫<sup>1</sup> 胡超苏<sup>1</sup>

1. 复旦大学附属肿瘤医院放疗科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
2. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

**[摘要]** 循环游离核酸是指存在于人体血液循环中, 游离于细胞外的微量内源性或外源性核酸片段。肿瘤患者的血液游离核酸的含量明显高于健康人群, 并具有与肿瘤的发生、发展相关的特征性改变, 如基因突变、甲基化、杂合性丢失、片段完整性改变、microRNA的异常表达等。对血液中游离核酸的定性定量检测, 在肿瘤的筛查、诊断、个体化治疗方案的制定、病情的监测以及预后评价中均有潜在的价值。

**[关键词]** 肿瘤; 循环游离核酸; 肿瘤标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.06.012

中图分类号: R730.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)06-0469-07

**Recent advances in cancer-associated circulating cell-free nucleic acids** XING Xing<sup>1</sup>, LIU Yong<sup>2</sup>, SUN Yong<sup>2</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup>, HU Chao-su<sup>1</sup> (1.Department of Radiation Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2.Cancer Research Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: HU Chao-su E-mail: hucsu62@yahoo.com

**[Abstract]** Circulating cell-free nucleic acids are defined as extracellular DNAs or RNAs in blood with physiological or pathological origins. Previous studies showed that the concentration of cell-free nucleic acids in the blood of cancer patients is significantly higher than in healthy people. Further studies showed that the genetic and epigenetic alterations of circulating cell-free nucleic acids are relevant to cancer development and progression, including mutation, hypermethylation, loss of heterozygosity, change of integrity, and abnormal expression of microRNAs. Detection of circulating cell-free nucleic acids shows promising potential in cancer screening, diagnosis, personalized treatment, and prognosis.

**[Key words]** Cancer; Circulating cell-free nucleic acids; Cancer biomarker

循环游离核酸(circulating cell-free nucleic acids)是指存在于人体循环系统中, 游离于细胞外的微量内源性或外源性核酸片段, 包括核DNA、线粒体DNA(mitochondrial DNA, mitDNA)、病毒DNA、信使RNA(messenger RNA, mRNA)及微小RNA(microRNA, miRNA)等。1948年, Mandel等<sup>[1]</sup>首次发现了血液循环中游离DNA的存在。随后, 循环游离核酸在病理状态下的特异性变化引起了广泛关注。1977年, Leon等<sup>[2]</sup>发现肿瘤患者血清中的游离DNA水平较健康人群明显升高, 并与肿瘤的进展与预后相关; 1989年, Stroun等<sup>[3]</sup>发现肿瘤患者血液中

的游离核酸含有与肿瘤细胞相同的基因突变。近年来, 随着研究的深入, 循环游离核酸所包含的与肿瘤的发生、发展相关的特征性改变逐渐被揭示。越来越多的证据表明, 游离核酸的检测在肿瘤的诊断、个体化治疗方案的制定及预后评估中有重要价值。本文针对这一领域近年来的研究进展进行综述。

## 1 循环游离DNA

### 1.1 生物学来源

血液循环中游离DNA产生的具体机制尚未明确, 但目前认为主要来源于细胞的凋亡和坏死。肿瘤患者血液中游离DNA来自肿瘤细胞或非肿瘤细胞。肿瘤细胞以被动和主动两种方式释放游离DNA片段入血。循环游离DNA的肿瘤相关突

变多发生在较短的片段中, 长片段很少含有此类突变, 由于短片断游离DNA多为巨噬细胞吞噬坏死细胞消化后的产物, 因此血液中肿瘤来源的游离DNA片断可能主要由坏死的肿瘤细胞经吞噬后释放<sup>[4]</sup>。同时, 增生活跃的肿瘤细胞也可能向血液中主动释放DNA片断<sup>[5]</sup>。但非肿瘤来源的游离DNA可能是肿瘤患者血液中游离DNA的更主要来源<sup>[6]</sup>, 皮下种植结肠癌细胞的小鼠血浆中, 非肿瘤来源的游离DNA浓度是肿瘤来源的游离DNA浓度的10倍以上, 且其浓度变化与肿瘤的直径变化正相关, 提示在肿瘤生长的过程中, 肿瘤细胞与正常组织细胞之间存在着一定相互作用, 促进了肿瘤周围组织细胞或其他正常组织细胞的凋亡和坏死<sup>[6]</sup>。琼脂糖凝胶电泳结果显示肝癌患者血液中的游离DNA呈现出典型的“凋亡梯”, 因此肿瘤患者血液中游离DNA的来源可能以细胞凋亡为主<sup>[7]</sup>。通常情况下, 游离DNA会被存在于血液中的DNA酶迅速降解, 从而维持在较低水平。而肿瘤患者血液中的DNA酶活性降低, 减缓了DNA的降解; 此外, 来源于肿瘤细胞的游离DNA多以脂蛋白复合体形式存在, 提高了对DNA酶的抵抗力<sup>[8]</sup>, 这可能是肿瘤患者循环游离DNA水平升高的另一潜在原因。

## 1.2 循环游离DNA与肿瘤

### 1.2.1 循环游离DNA浓度

自1977年Leon等<sup>[2]</sup>首次发现肿瘤患者血液中的游离DNA水平明显升高以来, 在多种肿瘤患者的血液中都相继检测到了游离DNA水平的升高。因此许多学者提出, 循环游离DNA的水平可用于肿瘤的筛查<sup>[9-10]</sup>。此外, 游离DNA的定量在肿瘤预后的评估中也体现出一定价值, Hashad等<sup>[9]</sup>发现乳腺癌患者血液中的游离DNA水平与肿瘤的大小、分期、淋巴结转移情况相关; 在卵巢癌、肺癌等患者中, 治疗后循环游离DNA持续在较高水平, 则提示更高的复发风险<sup>[11-12]</sup>。虽然循环游离DNA定量检测在肿瘤的诊断和疗效评估中体现出了一定价值, 但由于在炎症反应、外伤、败血症等病理状态下循环游离DNA的水平也明显升高, 导致这一指标在

肿瘤筛查中的特异性明显不足; 在定量检测的技术方面, 不同的研究间也存在较大差异, 使得目前难以取得统一的临床诊断标准。

### 1.2.2 基因突变

血浆中与肿瘤相关的突变基因的检出与肿瘤密切相关。*Kras*基因突变可见于结直肠癌、胰腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞中。Gall等<sup>[13]</sup>的研究发现, 血液中*kras*基因突变的检出率在胰腺癌患者和正常对照组间存在显著差异。外周血中检测突变的*p53*基因也具有较高的诊断价值, Chen等<sup>[14]</sup>的研究显示, 乳腺癌患者在治疗后外周血中不能检出*p53*基因突变则提示病情缓解, 而持续可检出的*p53*基因突变可能与治疗后的持续进展相关。

突变基因的检出还可评估患者对治疗的敏感性。既往研究已揭示, 在肺癌患者肿瘤细胞中, 存在表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, *EGFR*)基因突变型的患者对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epithelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)的敏感性更高。而血浆中可检出*EGFR*基因突变型的患者, 其对EGFR-TKI的应答率也同样高于检出结果为野生型的患者<sup>[15]</sup>, 因此循环游离DNA中该基因的检测可用于个体化治疗方案的选择。Murtaza等<sup>[16]</sup>在多个晚期肿瘤患者的外周血游离DNA中找到了与各自所使用的化疗药物相关的获得性药物抵抗突变基因, 如在使用紫杉醇的患者血浆中检测到了*PIK3CA*基因突变, 在使用他莫昔芬的患者血浆中检测到了*MED1*基因突变等, 提示对于以上突变的检测在化疗过程中可指导用药。

游离DNA突变的检测还可用于长期预后的判断。Levy等<sup>[17]</sup>报道, 结直肠癌患者血液中肿瘤特异性的基因突变与疾病的进展存在明显相关性。在非小细胞肺癌患者中, 外周血可检测到*kras*基因突变的患者总体生存率和无进展生存率明显低于仅检测到野生型的患者, 因此*kras*突变型在游离DNA中的检出可能提示预后不良<sup>[18]</sup>。

但由于突变基因在血液中的浓度较低, 增

加了游离DNA中突变检出的难度。在血样送检的过程中,血液细胞溶解会释放出大量正常细胞来源的DNA,会造成血液中突变基因的稀释;此外,肿瘤细胞的异质性导致并非所有肿瘤细胞均含有肿瘤特异性的突变,即使来源于肿瘤细胞的游离DNA也可能不含有这些突变,以上因素均增加了游离DNA突变检出的难度。有文献报道突变基因在肿瘤组织中的检出率高于在外周血中的检出率<sup>[15]</sup>,或为了提高突变检出率,对同一患者采集多个血样<sup>[16]</sup>。

### 1.2.3 微卫星不稳定性与杂合性丢失

微卫星指的是在基因组中由6个碱基对以内的短单元组成的DNA串联重复序列。微卫星片段的突变率高,称为微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)。MSI的改变可能造成等位基因中的一个基因丧失部分或全部序列,这种现象称为杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)。MSI和LOH可造成基因组的不稳定性增高,使抑癌基因丢失,进而造成肿瘤的发生和发展。将MSI与其他肿瘤标志物检测结果相结合,可明显提高肿瘤检测的敏感性<sup>[19]</sup>。对LOH的检测可以通过对微卫星不稳定性的检测来实现。Schwarzenbach等<sup>[20]</sup>研究发现,乳腺癌患者血浆游离DNA中,与抑癌基因相关的多个LOH位点突变的检出,提示更强的侵袭性、更高的淋巴结转移倾向以及更低的生存率。

### 1.2.4 非编码序列的完整性

近年来的研究表明,非编码DNA序列可能参与DNA修复、转录等生理过程。非编码序列通常包含大量重复序列。ALU序列是一种较短的重复序列,在整个人类基因组中占10%左右;LINE1则属于长散在重复元件(long interspersed elements, LINE)中的一种。正常细胞凋亡释放出的含有ALU和LINE1的片段较短,通常在200 bp以下。而肿瘤细胞的坏死可释放出较长的ALU片段<sup>[7]</sup>,同时肿瘤细胞也可以通过主动分泌的方式释放此类片段,长度多在200~400 bp之间<sup>[21]</sup>。许多研究通过游离DNA长

片段和短片段浓度比作为完整性指数,来表示血液中游离DNA片段的完整性。Chen等<sup>[22]</sup>的研究发现,乙肝病毒相关性肝细胞性肝癌患者游离DNA片段的完整性较乙肝患者明显升高,并与肿瘤大小、分期、淋巴结转移与远处转移明显相关,而两类患者血液中总的游离DNA水平差异无统计学意义。Chan等<sup>[23]</sup>发现,鼻咽癌患者血浆游离DNA片段完整性指数在放疗后有明显的下降,持续高水平的DNA完整性指数则提示预后不良。

### 1.2.5 DNA甲基化

DNA异常甲基化是与恶性肿瘤的发生密切相关的一种表观遗传学修饰,包括全基因组的低甲基化与多个肿瘤相关基因启动子CpG岛的高甲基化。启动子高甲基化在肿瘤形成中的发生率较高,并稳定存在,因此是一种极具优势的潜在的肿瘤标志物。在肿瘤的诊断方面,在卵巢癌、乳腺癌和胃癌患者的血液游离DNA中可检测到抑癌基因*RASSF1A*等的甲基化<sup>[24-26]</sup>;细胞周期相关基因*p15*、*p16*、修复相关基因*GSTP1*等的甲基化可以在包括前列腺癌、肺癌、结直肠癌等多种肿瘤患者的外周血DNA中检出<sup>[27-29]</sup>。这些均有望作为肿瘤标志物,用于肿瘤的早期诊断。此外,游离DNA甲基化的检测在肿瘤患者预后的判断中也有潜在的价值。乳腺癌、肝癌、结直肠癌、肺癌等肿瘤患者,其循环游离DNA所包含的特定位置的甲基化与不良预后有明显相关性<sup>[29-31]</sup>。Zhang等<sup>[26]</sup>进一步研究发现,对于早期卵巢癌的患者,血清游离DNA多个甲基化位点的检测相结合,具有比CA125的检测更高的敏感性。

### 1.2.6 肿瘤相关病毒DNA

病毒与某些肿瘤的发生密切相关。如鼻咽癌与Epstein-Barr病毒(EBV)感染、宫颈癌与人乳头瘤状病毒感染、肝癌与肝炎病毒的感染等均存在明显相关性。既往研究显示,EBV DNA在鼻咽癌患者的血清中的阳性率达96%,而在正常对照组中仅为7%<sup>[32]</sup>。在1项针对大样本人群的筛查中发现,与现行的筛查指标EBV IgA-

VCA相比, EBV DNA在鼻咽癌筛查中具有更高的敏感性<sup>[33]</sup>。鼻咽癌患者血液中的EBV DNA水平可以反映患者体内肿瘤负荷, 在治疗结束后鼻咽癌患者血液中EBV DNA水平的降低程度则可反映疾病的缓解程度, 与短期预后明显相关<sup>[34]</sup>; 此外, 血浆EBV的水平降低与较高的远期总体生存率也明显相关<sup>[34-35]</sup>。因此有望通过循环游离EBV DNA的检测来辅助鼻咽癌的诊断及预后评估。但非肿瘤患者在感染此类病毒时, 血浆中的病毒DNA水平也会明显升高, 单独将这一指标用于肿瘤诊断特异性不足, 若将该指标与其他指标相结合, 则可明显提高诊断的准确性。此外, 在统一检测技术手段的基础上, 选取一个恰当的游离病毒DNA拷贝数的诊断参考范围, 有助于进一步提高这一诊断方式的效力。

### 1.2.7 MitDNA

MitDNA长度较短, 与核基因组相比结构较为简单, 循环中的拷贝数较多, 用于临床检测和筛查更加经济便捷, 敏感性也更高, 这些优点使循环mitDNA的检测在临床应用中更具优势<sup>[36]</sup>。现已发现, 在多种肿瘤患者血液中可发现游离mitDNA水平的升高或降低, 但导致这一改变发生的机制尚不明确。Yu等<sup>[37]</sup>的研究显示, 在尤文氏肉瘤患者的血清中, mitDNA的水平明显低于健康对照组, 且与淋巴结转移情况相关。Zachariah等<sup>[38]</sup>发现卵巢癌患者血浆游离mitDNA的水平明显升高, 对游离mitDNA的定量检测可以有效区分出卵巢癌患者与子宫内膜异位症患者, 这一结论有望用于临床诊断。近年来, 在肝癌、乳腺癌、结直肠癌等肿瘤细胞中都发现与肿瘤发生、发展存在相关性的mitDNA突变<sup>[36]</sup>。此外, 完整性改变也是肿瘤患者游离mitDNA的特征性改变之一。Ellinger等<sup>[39]</sup>将220 bp的mitDNA和79 bp的mitDNA片段拷贝数比值作为泌尿系肿瘤的mitDNA完整性指数, 发现与前列腺癌患者和健康对照组相比, 在肾癌和膀胱癌患者中该指数明显升高, 这一指数也与肾癌的病理分期和膀胱癌的分级相关。

## 2 循环游离RNA与肿瘤

### 2.1 mRNA

mRNA本身的稳定性较低, 同时肿瘤患者血液中的RNA酶水平升高, 因此既往认为循环游离mRNA降解速度较快, 临床应用价值有限。1987年, Wiczorek等<sup>[40]</sup>的研究揭示了在肿瘤患者的血清中, RNA以脂蛋白复合体的形式存在。另有研究发现, 游离mRNA多来源于细胞凋亡, 存在于凋亡小体中, 因此肿瘤患者血液中的游离mRNA稳定性较高<sup>[41]</sup>。这些特征都使游离mRNA检测应用于临床成为了可能。

多种mRNA的定量检测均体现出了一定的价值。人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是维持端粒酶活性的主要组分之一, 端粒酶的激活在细胞的永生化和恶性肿瘤的增殖中起到了至关重要的作用。Terrin等<sup>[42]</sup>的研究显示, 以血浆中hTERT的水平来作为结直肠癌的检测方法, 其敏感性和特异性分别达到92%和100%; March-Villalba等<sup>[43]</sup>的研究表明, 以血浆hTERT mRNA的水平来区分局限性和局部侵袭性的前列腺癌, 敏感性和特异性分别达到83%和73%, 且特异性明显高于PSA。Miura等<sup>[44]</sup>发现肺癌患者血清里的hTERT mRNA的水平与肿瘤的大小、转移情况与复发情况相关。Pucciarelli等<sup>[45]</sup>进一步研究发现, 结直肠癌患者接受术前辅助放化疗前后的hTERT mRNA水平的差异可能与患者对放化疗的应答存在相关性。

其他游离mRNA在肿瘤的临床评估中也体现出了一定价值。*Cyclin D1*基因所编码的蛋白可促进细胞周期从G<sub>1</sub>向S的转化, 该基因的突变可使这一蛋白过度表达, 使细胞的增殖失调, 进而导致肿瘤的发生。Garcia等<sup>[46]</sup>研究发现, 在乳腺癌患者的血浆中可以检测到cyclin D1 mRNA的患者的总体生存率明显低于血浆cyclin D1 mRNA阴性的患者; 在临床病理特征提示预后较好的患者中, 血浆中检出cyclin D1 mRNA的患者预后较差; 在他默昔芬治疗的患者中, 血浆cyclin D1 mRNA阳性的患者的总体生存率明显低于cyclin D1 mRNA阴性的患者。

此外, Wong等<sup>[47]</sup>的研究发现鼻咽癌患者血浆mRNA完整性降低, 放疗后血浆游离mRNA完整性明显上升, 上升的游离mRNA水平可作为病情缓解的指标。

## 2.2 miRNA

miRNA在基因表达、转录后调控中具有重要作用, 并可能发挥原癌基因或抑癌基因的作用。它们在血浆或血清中有极高的稳定性, 与肿瘤的发生、发展密切相关, 这些特质使得miRNA成为一种潜在的肿瘤标志物。目前已在多种肿瘤患者血液发现了miRNA水平的异常改变。miR-155、miR-202、miR-425、miR-302b和miR-125b等是近年来报道的在健康人群和乳腺癌患者血浆或血清中表达有明显差异的miRNA, 在乳腺癌的早期筛查中有潜在价值<sup>[48-49]</sup>; 此外, miR-115在激素敏感与激素不敏感的乳腺癌患者血清中的水平有差异<sup>[50]</sup>, miR-10b在雌激素受体阴性的患者血清中水平升高<sup>[51]</sup>。对于结肠癌患者, miR-92a在早期检测中体现出了较高的敏感性<sup>[52]</sup>; miR-21的升高、miR34a的降低也具有较高的诊断效力<sup>[53-54]</sup>; miR-141和miR-221则被认为与不良预后相关<sup>[55-56]</sup>。

## 3 小 结

现有研究显示, 通过对循环游离核酸的定性定量检测, 可以获取肿瘤特异性的生物信息及患者个体化的遗传信息, 在肿瘤的早期诊断、病情评估、个体化治疗方案的确定以及预后判断中有着重要价值。同时, 循环游离核酸的检测也具有取样方便、创伤小、可多次重复操作等优势, 在临床应用中易于开展。在部分研究中, 游离核酸的定性定量检测, 已体现出比现行肿瘤标志物如肿瘤抗体(cancer antigen, CA)等指标更高的可靠性。由于循环游离核酸的水平随疾病的进展和治疗处于动态变化中, 在肿瘤诊断与治疗中, 对于循环游离核酸的持续检测可能更有意义。

但将循环游离核酸的检测用于临床实践尚存在一些待解决的问题。在血样的获取方式、保存方式、血浆或血清的选择、定量与定性检

测技术的标准化等方面, 各项研究间存在差异, 造成了结果和结论的不同。因此, 根据现有研究难以取得统一的参考标准, 游离核酸检测的临床应用仍处于探索阶段。有鉴于此, 相关研究机构应在研究设计和检测技术等方面取得共识, 并通过多中心、更大样本的临床试验进一步证实其效用。

## [参 考 文 献]

- [1] MANDEL P, MÉTAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l' homme [J]. C R Acad Sci Paris, 1948, 142: 241-243.
- [2] LEON S A, SHAPIRO B, SKLAROFF D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-750.
- [3] STROUN M, ANKER P, MAURICE P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer-patients [J]. Oncology, 1989, 46(5): 318-322.
- [4] DIEHL F, LI M, DRESSMAN D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(45): 16368-16373.
- [5] GAHAN P B, ANKER P, STROUN M. Metabolic DNA as the Origin of Spontaneously Released DNA? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137(1): 7-17.
- [6] GARCIA-OLMO D C, SAMOS J, PICAZO M G, et al. Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats [J]. Cancer Lett, 2008, 272(1): 133-140.
- [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): 1659-1665.
- [8] SUZUKI N, KAMATAKI A, YAMAKI J, et al. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma [J]. Clin Chim Acta, 2008, 387(1-2): 55-58.
- [9] HASHAD D, SOROUR A, GHAZAL A, et al. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer [J]. J Clin Lab Anal, 2012, 26(6): 467-472.
- [10] CHEN K, ZHANG H, ZHANG L N, et al. Value of circulating cell-free DNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(20): 3143-3149.
- [11] WIMBERGER P, ROTH C, PANTEL K, et al. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients [J]. Int J Cancer, 2011, 128(11): 2572-2580.
- [12] SZPECHCINSKI A, CHOROSTOWSKA-WYNIMKO J, KUPIS W, et al. Quantitative analysis of free-circulating DNA

- in plasma of patients with resectable NSCLC [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12 Suppl 1: 3-9.
- [ 13 ] GALL T M H, FRAMPTON A E, KRELL J, et al. Circulating molecular markers in pancreatic cancer: ready for clinical use? [J]. *Future Oncol*, 2013, 9(2): 141-144.
- [ 14 ] CHEN Z, FENG J, BUZIN C H, et al. Analysis of cancer mutation signatures in blood by a novel ultra-sensitive assay: monitoring of therapy or recurrence in non-metastatic breast cancer [J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7220.
- [ 15 ] HUANG Z, WANG Z J, BAI H, et al. The detection of EGFR mutation status in plasma is reproducible and can dynamically predict the efficacy of EGFR-TKI [J]. *Thoracic Cancer*, 2012, 3(4): 334-340.
- [ 16 ] MURTAZA M, DAWSON S J, TSUI D W, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA [J]. *Nature*, 2013, 497(7447): 108-112.
- [ 17 ] LEVY M, BENESOVA L, LIPSKA L, et al. Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(5): 1621-1626.
- [ 18 ] NYGAARD A D, GARM SPINDLER K L, PALLISGAARD N, et al. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(3): 312-317.
- [ 19 ] SUNAMI E, SHINOZAKI M, HIGANO C S, et al. Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(3): 559-567.
- [ 20 ] SCHWARZENBACH H, EICHELSER C, KROPIDLOWSKI J, et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5719-5730.
- [ 21 ] SCHWARZENBACH H, HOON D S, PANTEL K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6): 426-437.
- [ 22 ] CHEN H, SUN L Y, ZHENG H Q, et al. Total serum DNA and DNA integrity: diagnostic value in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Pathology*, 2012, 44(4): 318-324.
- [ 23 ] CHAN K C, LEUNG S F, YEUNG S W, et al. Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13): 4141-4145.
- [ 24 ] VAN DER AUWERA I, ELST H J, VAN LAERE S J, et al. The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(8): 1277-1286.
- [ 25 ] WANG Y C, YU Z H, LIU C, et al. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in serum from gastric and colorectal adenocarcinoma patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(19): 3074-3080.
- [ 26 ] ZHANG Q, HU G H, YANG Q F, et al. A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 130(1): 132-139.
- [ 27 ] REIBENWEIN J, PILS D, HORAK P, et al. Promoter hypermethylation of GSTP1, AR, and 14-3-3sigma in serum of prostate cancer patients and its clinical relevance [J]. *Prostate*, 2007, 67(4): 427-432.
- [ 28 ] LOFTON-DAY C, MODEL F, DEVOS T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(2): 414-423.
- [ 29 ] LOKK K, VOODER T, KOLDE R, et al. Methylation Markers of Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39813.
- [ 30 ] ZHANG Y J, WU H C, SHEN J, et al. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(8): 2378-2384.
- [ 31 ] GOBEL G, AUER D, GAUGG I, et al. Prognostic significance of methylated RASSF1A and PITX2 genes in blood- and bone marrow plasma of breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(1): 109-117.
- [ 32 ] LO Y M, CHAN L Y, LO K W, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(6): 1188-1191.
- [ 33 ] CHAN K C, HUNG E C, WOO J K, et al. Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA analysis in a surveillance program [J]. *Cancer*, 2013, 119(10): 1838-1844.
- [ 34 ] HOU X, ZHAO C, GUO Y, et al. Different clinical significance of pre- and post-treatment plasma Epstein-Barr virus DNA load in nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2011, 23(2): 128-133.
- [ 35 ] WANG W Y, TWU C W, CHEN H H, et al. Long-term survival analysis of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA levels [J]. *Cancer*, 2013, 119(5): 963-970.
- [ 36 ] YU M. Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers [J]. *Adv Clin Chem*, 2012, 57: 99-138.
- [ 37 ] YU M, WAN Y F, ZOU Q H. Cell-free circulating mitochondrial DNA in the serum: a potential non-invasive biomarker for Ewing's sarcoma [J]. *Arch Med Res*, 2012, 43(5): 389-394.
- [ 38 ] ZACHARIAH R R, SCHMID S, BUERKI N, et al. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors [J]. *Obstet Gynecol*, 2008, 112(4): 843-850.
- [ 39 ] ELLINGER J, MULLER D C, MULLER S C, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: A universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies [J]. *Urol Oncol*, 2012, 30(4): 509-515.
- [ 40 ] WIECZOREK A J, SITARAMAM V, MACHLEIDT W, et al.

- Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(23): 6407-6412.
- [ 41 ] HASSELMANN D O, RAPPL G, TILGEN W, et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(8): 1488-1489.
- [ 42 ] TERRIN L, RAMPAZZO E, PUCCIARELLI S, et al. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(22): 7444-7451.
- [ 43 ] MARCH-VILLALBA J A, MARTINEZ-JABALOYAS J M, HERRERO M J, et al. Plasma hTERT mRNA discriminates between clinically localized and locally advanced disease and is a predictor of recurrence in prostate cancer patients [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12 Suppl 1: 69-77.
- [ 44 ] MIURA N, NAKAMURA H, SATO R, et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(12): 1366-1373.
- [ 45 ] PUCCIARELLI S, RAMPAZZO E, BRIARAVA M, et al. Telomere-specific reverse transcriptase (hTERT) and cell-free RNA in plasma as predictors of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(9): 3089-3096.
- [ 46 ] GARCIA V, GARCIA J M, PENA C, et al. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome [J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(2): 312-320.
- [ 47 ] WONG B C, CHAN K C, CHAN A T, et al. Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(8): 2512-2516.
- [ 48 ] ROTH C, RACK B, MULLER V, et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(6): R90.
- [ 49 ] SCHRAUDER M G, STRICK R, SCHULZ-WENDTLAND R, et al. Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29770.
- [ 50 ] ZHU W, QIN W, ATASOY U, et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects [J]. *BMC Res Notes*, 2009, 2: 89.
- [ 51 ] HENEGHAN H M, MILLER N, LOWERY A J, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer [J]. *Ann Surg*, 2010, 251(3): 499-505.
- [ 52 ] NG E K, CHONG W W, JIN H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening [J]. *Gut*, 2009, 58(10): 1375-1381.
- [ 53 ] KANAAN Z, RAI S N, EICHENBERGER M R, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer [J]. *Ann Surg*, 2012, 256(3): 544-551.
- [ 54 ] NUGENT M, MILLER N, KERIN M J. Circulating miR-34a levels are reduced in colorectal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2012, 106(8): 947-952.
- [ 55 ] CHENG H, ZHANG L, COGDELL D E, et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17745.
- [ 56 ] PU X X, HUANG G L, GUO H Q, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(10): 1674-1680.

(收稿日期: 2013-10-10 修回日期: 2013-12-13)