

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.011

符合大肠癌早期无创分子诊断要求的粪便 DNA 样本贮存条件考察 *

王韵淞¹ 陈 杉¹ 沈燧昀¹ 刘琳琳¹ 邹秉杰² 宋沁馨^{1Δ} 周国华²

(1 中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室 江苏 南京 210009;

2 南京军区南京总医院药理科 江苏 南京 210002)

摘要 目的:考察在不同温度下储存时间和反复冻融对粪便中人基因组 DNA 含量的影响。**方法:**1.将粪便样本在室温、4℃、-40℃和 -70℃条件下分别放置不同时间和 -40℃条件下保存并反复冻融后,使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒提取得到粪便 DNA,通过实时荧光定量 PCR 体系对人 KRAS 基因定量确定人基因组 DNA 含量,评价粪便样本不同冻存条件对其中人基因组 DNA 含量的影响。2. 将粪便 DNA 样本在 4℃和 -40℃条件下分别放置不同时间和 -40℃条件下保存并反复冻融后,评价粪便 DNA 样本不同冻存条件下对其中人基因组 DNA 含量的影响。**结果:**1).粪便样本常温放置 2 小时,其中人基因组 DNA 即发生明显降解($P<0.01$),4℃可保存 3 天左右,-40℃可保存 4 周,-70℃可保存 3 个月以上,粪便反复冻融第 3 次,其中人基因组 DNA 降解具有统计学意义($P<0.05$)。2).粪便 DNA 4℃可保存 3 天,-40℃可保存 4 周,粪便 DNA 反复冻融第 4 次,其中人基因组 DNA 降解具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**符合大肠癌早期无创分子诊断要求的粪便 DNA 贮存条件:粪便样本室温收集后尽快保存;短期可处理的粪便样本存放在 4℃条件下(3 天内);暂无法处理则存于 -40℃(1 个月内);粪便样本长期保存在 -70℃条件下,可保存 3 个月。

关键词:大肠癌;无创分子诊断;粪便 DNA;保存条件

中图分类号:R-33;R735.34 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)05-852-06

A Study on the Storage Conditions of Stool DNA Samples in the Early Stage of Non-invasive Molecular Diagnosis of Colorectal Cancer*

WANG Yun-song¹, CHEN Shan¹, SHEN Yi-yun¹, LIU Lin-lin¹, ZOU Bing-jie², SONG Qin-xin^{1Δ}, ZHOU Guo-hua²

(1 Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China; 2 Department of pharmacology, Jinling Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of storage time at different temperatures and repeated freezing and thawing on the content of human genomic DNA in stool. **Methods:** 1. Fecal samples were stored at room temperature, 4℃, -40℃ and -70℃ for different times and stored at -40℃ repeatedly freeze-thawed. Then the fecal DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. Quantitative determination of human genomic DNA in human KRAS gene by fluorescence quantitative PCR system was conducted to evaluate the effect of different cryopreservation conditions on human genomic DNA content. 2. The effects of fecal DNA samples on the content of human genomic DNA under different cryopreservation conditions were evaluated after the fecal DNA samples were stored at 4℃ and -40℃ for different times and at -40℃ freeze-thawed. **Results:** 1. The stool samples stand at room temperature for 2 hours, the human genomic DNA occurred significantly degraded ($P<0.01$). The stool samples can be stored at 4℃ for 3 days or so, at -40℃ for 4 weeks, at -70℃ for more than 3 months. When the stool samples thawing was repeated for the third time, the human genomic DNA occurred significantly degraded ($P<0.05$). 2. Fecal DNA can be stored at 4℃ for 3 days, at -40℃ for 4 weeks, and fecal DNA was frozen and frozen for the fourth time, human genomic DNA occurred significantly degraded ($P<0.05$). **Conclusion:** The storage conditions of stool DNA samples in the early stage of non-invasive molecular diagnosis of colorectal cancer. Stool samples are stored as soon as possible after collection at room temperature. Short-term disposable stool samples are stored at 4℃ (within 3 days); temporary disposal is stored at -40℃ (within 1 month). Stool samples are stored for a long period of time at -70℃ for 3 months.

Key words: Colorectal cancer; Noninvasive molecular diagnostics; Stool DNA; Storage condition

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)05-852-06

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81673390);江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2016745);

江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(BK20151445);药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目(DQCP2015MS02);

中国药科大学药学基地科研训练及科研能力提高项目(J1310032);江苏省青蓝工程资助

作者简介:王韵淞(1992-),硕士研究生,研究方向:临床药物分析,电话:15150687078,E-mail: 825753693@qq.com

Δ 通讯作者:宋沁馨,副教授,E-mail: songqinxin@cpu.edu.cn

(收稿日期:2017-05-24 接受日期:2017-06-17)

前言

大肠癌是当前最常见的恶性肿瘤之一^[1,2],其发病率现已居全球第3位^[3]。有资料显示早期大肠癌(I期、II期)术后5年存活率高达90%、80%,而晚期大肠癌(III期、IV期)术后5年存活率只有30%和10%。结直肠从上皮增生到癌变的过程需要经历相对漫长的时间,这就给结直肠癌的筛查和治疗提供了机会,越早筛查越可以有效降低该疾病的发病率和死亡率^[4-6]。目前,临床上大肠癌早期筛查有两种方式,一种是非侵入性方法,即粪便隐血试验,另一种是侵入性方法,即结肠镜检查^[9]。其中,粪便隐血实验简单易行^[10-12],但是由于灵敏度和特异性较差,且易受多种因素的影响,误诊漏诊可能性大。结肠镜检查虽然是目前临床检测的金标准,但其易受到操作者经验和肿瘤部位的影响,而且患者依从性差。

大肠癌患者肠道中的肿瘤细胞持续大量的扩增和脱落会导致大量细胞和游离DNA脱落到肠腔随粪便排出,研究显示脱落细胞DNA和肠道肿瘤细胞DNA信息保持一致^[13],因此可以通过检测粪便中人基因组DNA的异常变化肠道肿瘤进行诊断。粪便DNA检测作为大肠癌筛查最理想的方法之一,通过对粪便所含人基因组DNA进行多靶点分析^[14-18],确证癌细胞的存在,具有高灵敏、高特异、无创等优点,其对大肠癌患者敏感度达到92.3%,远高于粪便隐血实验的73.8%,而对癌前息肉和高风险损伤的敏感度均在40%以上^[19]。2014年8月EXACT Science公司的Cologuard检测试剂盒作为全球首个非侵入型、粪便DNA结直肠癌筛查试剂盒已被美国FDA批准用于临床,并得到美国癌症联合委员会的推荐用于早期大肠癌及癌前病变筛查。

然而,国内对于基于粪便DNA检测的大肠癌筛查仍处于研究阶段,并未得到临床应用,限制粪便DNA检测应用的原因之一是粪便样本收集保存步骤的不合理性导致粪便样本中人基因组DNA(gDNA)降解严重,提取的DNA质量不能满足粪便DNA检测的要求。因此,寻找合适的粪便样本以及粪便DNA的冻存条件,从而得到高质量、大量的人基因组DNA,满足微量突变和稀有突变的检测需要,对提高大肠癌早期诊断水平具有重要意义。为解决这一问题,本研究对人粪便样本和粪便DNA溶液的冻存条件进行了一个系统性的探究,统计不同条件下粪便中人基因组DNA含量的变化,寻找最适冻存条件,防止DNA分子的降解,以期为大肠癌早期无创诊断提供稳定的检测样本。

1 材料与方法

1.1 粪便样本的收集和储存

临床粪便样本来源于南京总医院检验科,以粪便取样盒采集,并在采集后立即送至实验室,进行常温、4℃和-40℃粪便温度保存实验。样本采集经过受试者同意。

1.2 粪便DNA的提取和储存

使用QIAamp DNA Stool Mini Kit按照流程提取粪便DNA,其主要流程如下:将0.2g粪便样本和InhibitEX Buffer混合离心,去除不溶杂质,之后加入Proteinase K和Buffer AL,70℃水浴10 min,去除杂蛋白,然后加入乙醇(96%-100%),将混

匀溶液加入硅胶吸附柱,使溶液中DNA结合在柱上,加入Buffer AW1和Buffer AW2洗涤,最后通过ATE Buffer将结合在吸附柱上的DNA洗下,得到比较纯的DNA溶液。将提取得到的DNA溶液分别在4℃、-40℃和-70℃条件下进行DNA温度保存实验。

1.3 仪器和试剂

Eppendorf Research 移液器(德国Eppendorf公司),Allegra-X-30R 冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司),cubeTM 高速迷你离心机(厦门金瑞鸿捷生物科技有限公司),vortex-ge-nie2 涡旋振荡器(美国Scientific Industries公司),循环恒温水浴(美国PolyScience公司),BS110S 电子天平(中国赛多利斯电子天平),StepOne™ Real-Time PCR System(美国ABI公司)。Takara Premix Ex Taq(大连宝生物公司),无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司),QIAamp DNA Stool Mini Kit(德国QIAGEN公司)。

1.4 引物的设计与合成

KRAS基因定位于12p12.1(12号染色体短臂1区2带1亚带),是表皮生长因子受体功能信号的下游分子。进行KRAS基因检测,不但可以对结直肠癌患者进行早期诊断,还可以帮助医生选择对结直肠癌病人最有效的靶向治疗药物,大幅减少过度治疗所引起的治疗费用增加和无需要的毒副作用,实现真正意义上的个体化治疗。因此本研究选取KRAS基因作为检测靶标,使用实时荧光定量PCR方法对DNA提取产物中KRAS基因进行定量。

KRAS基因实时荧光定量TaqMan探针和引物使用Primer Premier 5.0软件和在线软件设计,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。上游引物:5'-GAC CTG AGT CTC CTT TGG AAC TCT-3',下游引物:5'-TTG TCA CAC GAG CCA GTG TTA GT-3',TaqMan探针序列:5'-FAM-CGT AGG CAA GAG TGC CTT GAC GAT A-ECLIPSE-3',扩增片段长度为72 bp。

1.5 KRAS基因的定量检测条件

为了对粪便中人基因组DNA定量,本研究针对KRAS基因片段建立了实时荧光定量PCR体系。使用提取自血液中的人基因组DNA(溶解于1×TE缓冲液)作为绘制标准曲线的标准品,紫外定量后按照每拷贝人基因组3.3 pg计算其拷贝数。使用基因组DNA拷贝数分别为20、100、500、2500、12500拷贝数/5 μL五个浓度梯度绘制标准曲线^[20],扩增反应加入阴性对照。

实时荧光PCR反应体系为25 μL,包括粪便DNA提取产物5 μL(阴性对照以5 μL双蒸水代替),2×Premix Ex Taq(Probe qPCR)12.5 μL,10 μmol/L上游引物0.5 μL,10 μmol/L下游引物0.5 μL,10 μmol/L TaqMan探针0.5 μL,50×Rox Reference Dye 0.5 μL,双蒸水5.5 μL。扩增条件:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 31 s,共40个循环。

1.6 统计学分析

使用IBM SPSS Statistics 19软件对粪便DNA含量进行进行One-way ANOVA单因素方差分析,方差齐性时,两两比较使用LSD、Sidak和Tukey进行多重比较检验分析;方差非齐性时,两两比较使用Games-Howell检验法进行分析。以P<0.05作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 用于粪便中 gDNA 片段定量的实时荧光定量 PCR 体系的建立

本研究针对 KRAS 基因片段建立了粪便中 gDNA 定量的实时荧光定量 PCR 体系, 使用 StepOne™ 实时荧光定量 PCR 仪进行 KRAS 基因片段定量, 结果如图 1 所示。图 1A 是 KRAS 基因的实时荧光定量 PCR 的扩增曲线, 在扩增的对数

增长期, 各曲线从高浓度至低浓度依次出现, 空白 40 个循环后出现扩增信号, 或出现低于定量拷贝数下限的信号, 表明实验过程无污染。图 1B 显示: KRAS 基因的实时荧光定量 PCR 体系定量准确性好, 最低可定量 20 拷贝的 DNA 模板, 且阴性对照无阳性扩增信号, 标准曲线的线性相关系数 $R^2=0.999$ 。因此, 可认为该实时荧光定量 PCR 体系可用于 KRAS 基因特定片段的准确定量。

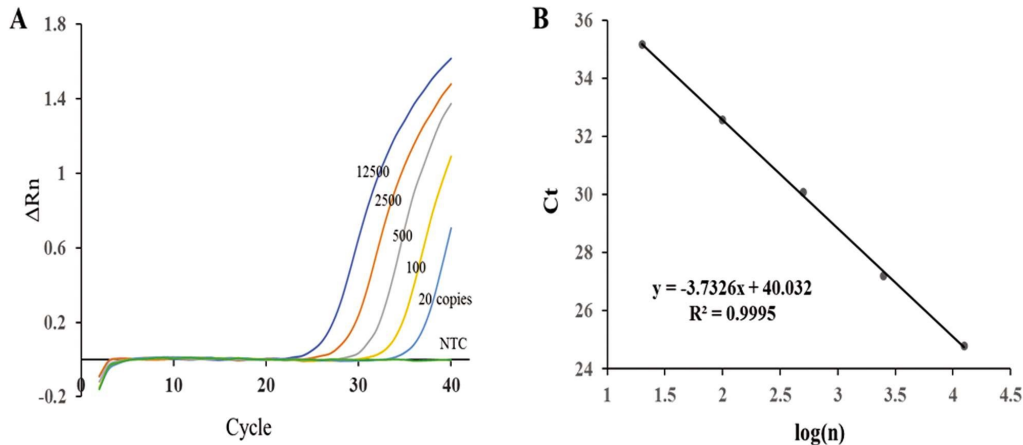


图 1 KRAS 基因实时荧光定量体系建立

(A)不同拷贝数 KRAS 基因(20、100、500、2500 和 12500 拷贝)实时荧光定量 PCR 扩增曲线。(B)KRAS 基因定量标准曲线。

Fig.1 Establishment of Real - time Fluorescence Quantification System of KRAS Gene

(A) Different copies of the KRAS genes (20, 100, 500, 2500 and 12500 copies) of real - time fluorescence quantitative PCR amplification curve.

(B) KRAS gene quantitative standard curve.

2.2 粪便样本保存条件考察

2.2.1 室温存放不同时间对粪便中 gDNA 的影响 临床上, 从患者排便至样本存放保存, 通常需要在常温下放置一段时间, 因此需要探究粪便在常温放置时的降解情况。将刚收集的新鲜粪便样本于常温后, 对不同储存时间的样本进行提取、定量, 以评估粪便中人基因 DNA 在室温存放下的降解情况。结果如图 2A, 粪便样本常温放置 2 小时与新鲜样本相比, 人基因组 DNA 含量下降 50%, 降解具有统计学意义($P<0.01$), 放置时间达到 4 小时时, 人基因组 DNA 降解 70%($P<0.01$), 因此粪便样本收集后应减少在室温下存放时间, 以保证粪便中 DNA 的质量。

2.2.2 4℃存放不同时间对粪便中 gDNA 的影响 本研究首先对 4℃条件下粪便样本中人基因组 DNA 的降解情况进行了探究。将刚收集的新鲜粪便样本于 4℃条件下保存不同时间后进行提取、定量。结果如图 2B 所示: 粪便样本在 4℃条件下随着保存时间延长, 人基因组 DNA 含量逐渐下降, 在放置第 3 天即时出现降解($P<0.05$)。如图 2B 所示: 相比常温存放, 粪便样本中人基因组 DNA 降解速度明显降低, 在第 6 天时样本中人基因组 DNA 含量仍保持在 50%以上, 说明温度降低确实可以延缓 DNA 的降解。

2.2.3 -40℃存放不同时间对粪便中 gDNA 的影响 由图 2B 可知, 粪便样本在 4℃时只能保存数天, 因此, 暂时不能提取的粪便样本, 需保存在更低的温度条件下, 本研究探究了粪便样本 -40℃条件下降解情况^[20]。将新鲜样本放置 1、2、3 和 4 周后

进行提取定量后得到的人基因组 DNA 情况进行比较, 探索人基因组 DNA 的降解情况。如图 2C 所示, 粪便样本在 -40℃条件下保存 4 周, 虽然每次提取结果之间存在波动, 但粪便中人基因组 DNA 含量基本保持稳定 ($P>0.05$), 说明粪便样本在 -40℃条件下保存 4 周, 其中的人基因组 DNA 不会发生明显降解。

2.2.4 -70℃存放不同时间对粪便中 gDNA 的影响 当粪便样本提取后, 一些重要样本剩余部分可能因为留样、备用等原因, 需要在 -70℃条件下长期保存。为探究粪便样本长期保存时间, 将刚收集的新鲜粪便样本放于 -70℃条件下保存不同时间后提取、定量。结果显示: 新鲜粪便样本提取得到的 gDNA 含量为 1.81×10^7 拷贝, 粪便放于 -70℃储存, 之后每月分别提取并进行定量分析, 结果分别为 1×10^7 拷贝、 1.47×10^7 拷贝和 2.12×10^7 拷贝, 提取结果有一定波动, 这主要由于该粪便提取得到的 gDNA 含量过大造成, 但差异均无统计学意义($P>0.05$), 说明粪便在 -70℃条件下保存 3 个月, 未发生明显降解。

2.2.5 反复冻融次数对粪便中 gDNA 的影响 上述结果表明当粪便样本在短时间内无法提取时, 需要放置 -40℃或 -70℃条件下冻存, 因此当粪便样本取用时会发生冻融, 所以需要考虑冻融对粪便样本的影响。为探究反复冻融对粪便样本的影响, 将新鲜粪便样本反复冻融后测定。结果如图 2D 所示, 粪便样本反复冻融第 3 次时, 其中的 gDNA 含量下降 40% ($P<0.05$), 当冻融第 4 次时, 其中的 gDNA 含量下降 85% ($P<0.01$)。因此, 粪便样本在进行粪便 DNA 检测时, 冻融次数不能超过 2 次。

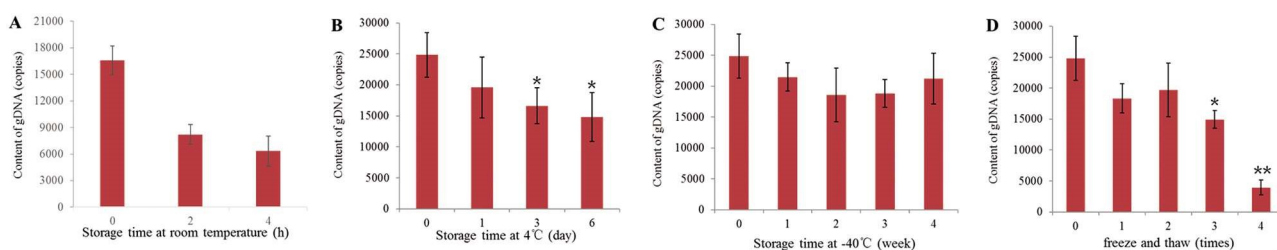


图2 粪便样本冻存条件考察结果图。(A)粪便样本室温条件下保存不同时间提取得到人基因组 DNA 含量。(B)粪便样本 4℃条件下保存不同时间提取得到人基因组 DNA 含量(* $P<0.05$)。(C)粪便样本 -40℃条件下保存不同时间提取得到人基因组 DNA 含量。(D)粪便样本反复冻融不同次数提取得到人基因组 DNA 含量(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

Fig.2 The results of frozen storage of stool samples. (A) Fecal samples were extracted at room temperature for different time to obtain human genomic DNA content. (B) Fecal samples were extracted at 4℃ for different time to obtain human genomic DNA content (* $P<0.05$). (C) Fecal samples at 40℃ under different conditions of storage to obtain human genomic DNA content. (D) Fecal samples were repeatedly frozen and thawed to extract human genomic DNA content (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

2.3 粪便 DNA 样本保存条件考察

2.3.1 4℃存放不同时间对粪便 DNA 溶液中 gDNA 的影响

粪便 DNA 样本是粪便样本提取后得到的 DNA 溶液。将粪便 DNA 样本于 4℃条件下保存,探究 gDNA(人基因组 DNA)在不同保存温度下的降解情况。图 3A 显示,gDNA 储存于 4℃条件下,在放置第 3 天时就出现降解,下降 30%左右,但进行单方差分析尚不具备统计学意义($P>0.05$),在放置第 6 天 gDNA 含量下降 50%,降解具有统计学意义($P<0.05$)。但与粪便样本 4℃保存(图 2A)相比,降解稍缓。因此,粪便 DNA 在 4℃条件下保存时间最好在 3 天以内。

2.3.2 -40℃存放不同时间对粪便 DNA 溶液中 gDNA 的影响

粪便 DNA 样本在 -40℃条件下分别保存 0,1,2,3,4 周后使用实时荧光定量 PCR 对其中 gDNA 含量进行定量。定量结果如

图 3B 所示,-40℃冻存 4 周,粪便 DNA 样本中 gDNA 含量基本保持稳定,降解无统计学差异($P>0.05$)。冻存前 3 周,粪便 DNA 样本中的人基因组 DNA 含量基本保持一致。冻存第 4 周,gDNA 含量略有下降,说明其中的人基因组 DNA 已经开始降解,但降解程度很低($P>0.05$)。因此,当粪便 DNA 样本短时间内无法检测,需要保存一段时间时,-40℃冻存条件可以满足要求,但保存时间不能超过 1 个月。

2.3.3 反复冻融次数对粪便 DNA 溶液中 gDNA 的影响

为探究反复冻融对粪便 DNA 中 gDNA 含量影响,将粪便 DNA 样本 -40℃保存并反复冻融 1,2,3,4 次。结果如图 3C 所示,粪便 DNA 随着冻融次数增加,gDNA 含量逐渐降低,在第 4 次冻融时降解具有统计学意义($P<0.05$)。因此,粪便 DNA 溶液在进行粪便 DNA 检测时,冻融次数不能超过 3 次。

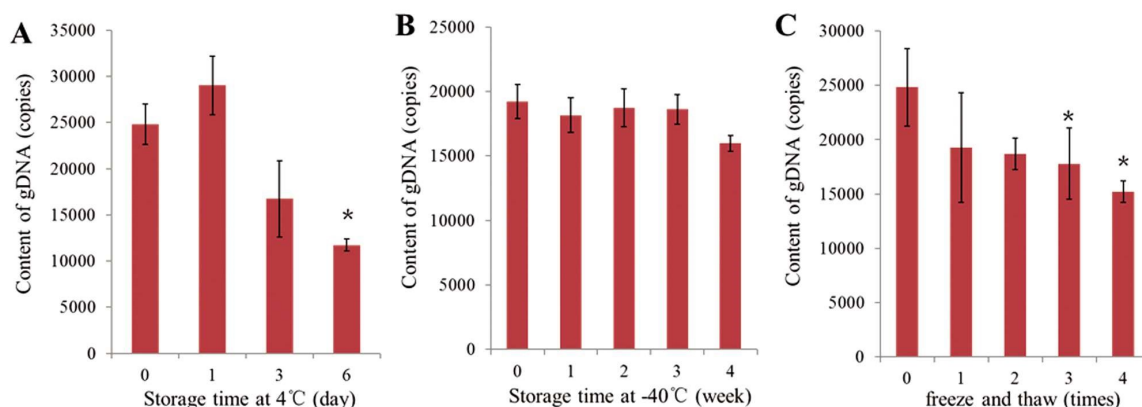


图3 粪便 DNA 样本冻存条件考察结果图。(A)粪便 DNA 样本4℃条件下保存不同时间提取得到人基因组 DNA 含量(* $P<0.05$)。(B)粪便 DNA 样本 -40℃条件下保存不同时间提取得到人基因组 DNA 含量。(* $P<0.05$)。(C)粪便 DNA 样本反复冻融不同次数提取得到人基因组 DNA 含量(* $P<0.05$)。

Fig.3 The results of frozen storage of stool DNA samples. (A) Fecal DNA samples were extracted at 4℃ for different time to obtain human genomic DNA content (* $P<0.05$). (B) Fecal DNA samples were extracted at -40℃ for different times to obtain human genomic DNA content. (C) The content of human genomic DNA was extracted by repeated freezing and thawing of DNA samples (* $P<0.05$).

2.4 临床实际样本检测结果

粪便 DNA 检测通过检测脱落进粪便中人基因组 DNA 的异常变化进行诊断。无肠道疾病的健康人的结直肠黏膜细胞通过程序性细胞死亡和细胞增殖平衡维持完整的上皮结构,导致部分肠道脱落细胞和脱落 DNA 存留在粪便中。当肿瘤发生时,肿瘤细胞持续大量的扩增和脱落,会使更多的细胞和游离 DNA 脱落到肠腔随粪便排出,因此相比于正常人脱落的肠道

DNA,大肠癌患者粪便样本中应该含有更多人基因组 DNA。为验证该结论的正确性,本研究对实际样本进行粪便 DNA 提取并对其中人基因组 DNA 含量进行定量,统计比较健康人与大肠癌患者粪便中人源 DNA 含量。相关实时荧光 PCR 扩增图谱(图 4)显示:肿瘤患者和腺瘤患者的扩增曲线相近,而与正常人扩增曲线相比,可以明显区分。具体结果如表 1 所示,腺瘤患者和肠癌患者粪便中人基因组 DNA 含量均值分别为 15.61×10^4

拷贝和 14.83×10^4 拷贝,二者差别不大,说明腺瘤患者和大肠癌患者均有大量人源 DNA 脱落进粪便;而健康人粪便中人基因组 DNA 含量均值为 3.88×10^4 拷贝,是腺瘤和肠癌患者的五分之一。由此可见,大肠癌患者粪便样本相比于健康人,含更多的人基因组 DNA。

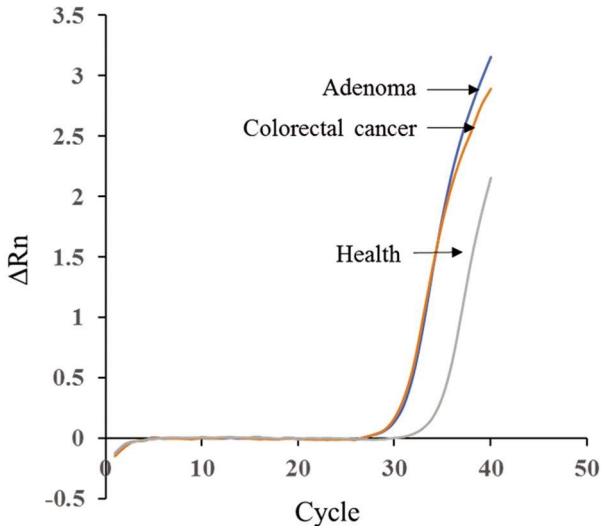


图 4 代表性临床粪便 DNA 样本实时荧光 PCR 扩增图

Fig.4 Real-time PCR amplification of representative clinical fecal DNA

表 1 健康人与大肠癌患者粪便样本中人基因组 DNA 含量统计表

Table 1 Human genomic DNA in stool samples from healthy and colorectal cancer patients

Sample type	Number	The mean content of gDNA in stool ($\times 10^4$ copies)
Health	66	3.88
Adenoma	18	15.61
Colorectal cancer	32	14.83

3 讨论

随着我国经济的发展,人民生活水平不断提高,大肠癌发病率也在逐年升高,已经成为我国女性第三位、男性第四位的恶性肿瘤^[22]。根据《中国肿瘤登记年报》数据显示,2015 年全国新增大肠癌病例约 40 万,死亡病例超过 15 万。我国大肠癌的发病率以每年 3.9% 的速度递增,递增速度是世界平均数的两倍,且大多数患者发现时已属于中晚期。有研究表明我国的大肠癌患者从 40 岁之后发病开始加快,50 岁后发病率则直线上升^[23]。因此,我国 50 岁以上人群需进行定期的大肠癌筛查,尤其是大肠癌易发高危人群。

大肠癌疾病发展一般分为下面几个阶段:①一般开始于生长在肠道内壁的赘生物,称为肠道息肉,息肉分为增生性息肉和腺瘤性息肉。②腺瘤性息肉很容易发生恶性癌变,成为生长在肠道内壁的肿瘤,此时已经可以确诊为大肠癌。③随着时间的变化,逐渐由内壁表面向内部生长。④癌细胞可能渗透蔓延至附近的血管或淋巴结,进而通过这些血管或淋巴结转移至其他器官。研究表明^[3-8]在大肠癌发病早期及时的发现和治疗可以

有效的延长患者的生存期。粪便 DNA 检测作为最适合大肠癌早期筛查的检测方法之一,随着研究的不断深入,其检测的灵敏度和特异性进一步提高,新一代的粪便 DNA 检测方法对大肠癌患者敏感度达到 92.3%,远高于 FIT 的 73.8%,而对癌前息肉和高风险损伤的敏感度均在 40% 以上^[24]。近来,随着“精准医疗”口号的提出,研究人员希望可以根据地域、人种等的差异找到各自专属的基因谱^[25,26],进一步提高粪便 DNA 检测的灵敏度和特异性,降低假阳性率和检测成本,从而可以大规模应用于临床,成为大肠癌早期筛查的一种常规检测方法。

一个健康人每天大约会脱落 1010 个肠道上皮细胞进入粪便^[27],而癌症患者生长旺盛的肿瘤上皮细胞更新速度更快,这些脱落的人肠道细胞和脱落 DNA 是粪便 DNA 检测的基础。但粪便中存在的多糖、胆酸、胆盐等成分会对下游检测产生抑制^[7],粪便中存在的核酸酶会对 DNA 产生降解,造成粪便中人基因组 DNA 含量的降低。临床上,考虑到样本数量较多,可能无法做到实时的检测,因此从患者排便至样本存放保存,再到样本提取检测需要几天甚至一个月的时间,而对于一些典型或稀少病例样本的留样保存,需要保存的时间则更长。如果保存不当,造成粪便 DNA 质量下降,会严重影响最终实验结果的好坏及可信度。因此,对粪便中 DNA 进行检测之前,首先要解决的问题即找到合适的粪便保存方法,满足其短期和长期保存的要求,这对提高大肠癌早期诊断水平具有重要意义。

目前,常见的粪便样本保存方法包括干燥保存、乙醇保存和直接低温保存。其中,干燥保存主要通过烘干、冻干等方式去除粪便中水分子,减少水解作用对 DNA 降解的影响,延长粪便中 DNA 保存时间。但干燥过程本身就会对 DNA 结构造成损伤^[28],使提取 DNA 的质量较差。乙醇保存主要通过乙醇渗透作用进入粪便内部,使粪便中含有的核酸酶失活,而不损伤 DNA,达到保存的目的^[29],但乙醇保存在提取时无法保证完全去除乙醇残留,而残留的乙醇会对下游 PCR 产生抑制作用,从而影响了 DNA 的检测。低温保存则是收集后直接低温条件下密封保存,降低了 DNA 分子的流动性和核酸酶活性,同时降低了氧化作用对 DNA 的损伤,适用于粪便样本的长期保存,而且保存时无需添加任何物质,减少了粪便样本保存时其他的干扰因素^[30],是最常见的粪便样本保存方法。目前,关于人类粪便样本低温保存的文献较少,王勇等^[31]只研究了 1 例粪便样本在 -70℃ 条件下保存一个月的情况,发现其对粪便中人基因组 DNA 提取产量无影响。因此,为了对粪便样本的冻存条件进行一个系统全面的探究,本研究系统考察了不同温度、不同时间下粪便中人基因组 DNA 含量的变化及反复冻融对粪便中人基因组 DNA 含量的影响。

本研究主要从粪便冻存条件及 DNA 冻存条件两方面影响进行考察,结果显示随着温度的降低,粪便样本的保存时间明显延长。粪便样本室温放置,短时间内即发生大量降解,因此应尽快选择合适方式保存;粪便样本在 4℃ 条件下保存时间在 3 天以内,可满足短时间提取的存放要求,同时避免样本反复冻融对其中的基因组 DNA 带来的影响;粪便样本 -40℃ 条件下保存,保存 4 周,其中的人基因组 DNA 含量基本保持一致,因此一般采集到的新鲜样本最好储存在 -40℃ 条件下。粪便样本在 -70℃ 条件下保存,可保存 3 个月,粪便样本中人基因组

DNA 含量变化无统计学差异,适用于粪便样本的长期储存;粪便冻融次数不要超过 2 次,否则会影响实验结果的准确性。

粪便 DNA 是使用 DNA 提取试剂盒等方法从粪便样本中提取得到的比较纯的 DNA,其中大部分为细菌 DNA^[32],是进行粪便 DNA 检测的前提。与粪便样本相比,粪便 DNA 去除了核酸酶等粪便中影响 DNA 降解的诸多成分,是比较纯的 DNA 溶液,具有体积小、无臭、方便保存和运输等优点。因此,粪便 DNA 冻存为相关大肠癌患者样本信息保存提供了一个新的途径。本研究考察了 4℃ 和 -40℃ 条件下粪便 DNA 的保存情况,结果显示 4℃ 条件下可保存 3 天,-40℃ 条件下可保存 4 周,DNA 含量变化均无统计学差异,粪便 DNA 样本反复冻融不能超过 3 次,否则会影响实验结果的准确性。以此为基础,本研究对 116 例粪便样本进行了粪便 DNA 的提取,其中健康对照 66 例,腺瘤患者 18 例,大肠癌患者 32 例。对提取结果进行比较分析,发现大肠癌患者粪便样本相比于健康人,含更多的人基因组 DNA。

综上所述,本研究最终确定了符合大肠癌早期无创分子诊断要求的粪便 DNA 贮存条件:1. 粪便样本室温收集后尽快保存。2. 短期可处理的粪便样本存放在 4℃ 条件下(3 天内);暂无法处理则存于 -40℃(1 个月内)。3. 粪便样本长期保存在 -70℃ 条件下,可保存 3 个月。

参考文献(References)

- [1] 侯国伟,刘晓菲,姜南阳,等. 大肠癌筛查新策略及研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(9): 1772-1774
Hou Guo-wei, Liu Xiao-fei, Jiang Nan-yang, et al. New strategies and research progress of colorectal cancer screening[J]. Advances in Modern Biomedicine, 2015, 15(9): 1772-1774
- [2] 花庶庆,刘斌. 大肠癌筛查方法的进展 [J]. 实用医药杂志, 2016, 33(7): 650-652
Hua Shu-qing, Liu Bin. Progress of Screening Methods for Colorectal Cancer[J]. Journal of Practical Medicine, 2016, 33(7): 650-652
- [3] Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal cancer [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2015, 1(1): 15065-15116
- [4] Robertson DJ, Imperiale TF. Stool Testing for Colorectal Cancer[J]. Gastroenterology, 2015, 149(5): 1286-1293
- [5] Singh H, Nugent Z, Demers AA, et al. The reduction in colorectal cancer mortality after colonoscopy varies by site of the cancer [J]. Gastroenterology, 2010, 139(4): 1128-1137
- [6] Tsang HF, Cheng KH, Wong SP, et al. Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(14): 3847-3857
- [7] 王勇,邹秉杰,周国华. 粪便中人基因组 DNA 提取技术及其应用[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(1): 72-75
Wang Yong, Zou Bing-jie, Zhou Guo-hua. Human genomic DNA extraction technology and its application in feces[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2014, 37(1): 72-75
- [8] Aghagolzadeh P, Radpour R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer [J]. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(25): 5678-5693
- [9] Schreuders EH, Grobbee EJ, Spaander MCW, et al. Advances in Fecal Tests for Colorectal Cancer Screening [J]. Current Treatment Options in Gastroenterology, 2016, 14(1): 1-11
- [10] Brenner H, Tao S. Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy[J]. European Journal of Cancer, 2013, 49(14): 3049-3054
- [11] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2012, 62(1): 10-29
- [12] Shaikat A, Mongin SJ, Geisser MS, et al. Long-term mortality after screening for colorectal cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2013, 369(12): 1106-1114
- [13] 曹琦珍,牛刚,高立永,等. 应用 PCR 和单克隆抗体方法从人粪便及肿瘤组织中检测大肠癌基因突变的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(7): 734-738
Cao Qi-zhen, Niu Gang, Gao Li-yong, et al. Application of PCR and monoclonal antibody method in the detection of colorectal cancer gene mutations from human feces and tumor tissue [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2004, 9(7): 734-738
- [14] Barry, Berger, Bernard, et al. Multitarget stool DNA for colorectal cancer screening: A review and commentary on the United States Preventive Services Draft Guidelines [J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2016, 8(5): 450-458
- [15] Ahlquist DA. Next-generation stool DNA testing: expanding the scope[J]. Gastroenterology, 2009, 136(7): 2068-2073
- [16] Dickinson BT, Kisiel J, Ahlquist DA, et al. Molecular markers for colorectal cancer screening[J]. Oncotarget, 2015, 6(9): 1485-1494
- [17] Ahlquist DA. Multi-Target Stool DNA Test: A New High Bar for Noninvasive Screening[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2015, 60(3): 623-633
- [18] Kim MS. DNA methylation markers in colorectal cancer [J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2010, 29(1): 181-206
- [19] Lee JK, Terdiman JP, Corley DA. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening [J]. New England Journal of Medicine, 2014, 371(2): 187-188
- [20] Whitney D, Skoletsky J, Moore K, et al. Enhanced Retrieval of DNA from Human Fecal Samples Results in Improved Performance of Colorectal Cancer Screening Test [J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2004, 6(4): 386-395
- [21] 王敏强,王斌,刘晓玲. 保存温度与时间对动物组织 DNA 提取质量的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16407-16409
Wang Min-qiang, Wang Bin, Liu Xiao-ling. Effect of storage temperature and time on DNA extraction quality of animal tissue[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(33): 16407-16409
- [22] 冯冰,代文琼,尹素凤. 慢性肾脏病继发性甲状旁腺亢的治疗[J]. 中国卫生标准管理, 2014, 5(5): 12-13
Feng Bing, Dai Wen-qiong, Yin Su-feng. Treatment of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease [J]. China Health Standards Management, 2014, 5(5): 12-13
- [23] 汪建平. 重视结肠直肠癌流行病学研究[J]. 中国实用外科杂志, 2013, 33(8): 622-624
Wang Jian-ping. Attention to epidemiology of colorectal cancer [J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2013, 33(8): 622-624
- [24] Souverijn JH. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening [J]. New England Journal of Medicine, 2014, 371(2): 187-188

- vival in Resectable Pancreatic Cancer: A Single-Institution Experience and Review of the Literature [J]. PLOS ONE, 2016,11 (3): e0151632
- [19] Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2010, 3(9): 1077-1083
- [20] Richardson AE, Hamilton N, Davis W, Brito C, et al. Insulin-like growth factor-2 (IGF-2) activates estrogen receptor-alpha and -beta via the IGF-1 and the insulin receptors in breast cancer cells [J]. Growth Factors, 2011, 29(2-3): 82-93
- [21] Shi P, Liu W, Tala, et al. Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation [J]. Cell Discov, 2017, 3: 17010
- [22] Pulito C, Mori F, Sacconi A, et al. Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities [J]. Cell Discov, 2017, 3: 17022
- [23] Arunachalam G, Lakshmanan AP, Samuel SM, et al. Molecular Interplay between microRNA-34a and Sirtuin1 in Hyperglycemia-Mediated Impaired Angiogenesis in Endothelial Cells: Effects of Metformin [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2016, 356(2): 314-323
- [24] Noren HN, Martin-Montalvo A, Dluzen DF, et al. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence[J]. Aging Cell, 2016, 15(3): 572-581
- [25] Wang F, Xu J, Liu H, et al. Metformin induces apoptosis by microRNA-26a-mediated downregulation of myeloid cell leukaemia-1 in human oral cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4671-4676
- [26] Kabel AM, Omar MS, Balaha MF, et al. Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model [J]. Tissue Cell, 2015, 47 (5): 498-505
- [27] Storozhuk Y, Hopmans SN, Sanli T, et al. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK [J]. Br J Cancer, 2013, 108(10): 2021-2032
- [28] Li H, Chen X, Yu Y, et al. Metformin inhibits the growth of nasopharyngeal carcinoma cells and sensitizes the cells to radiation via inhibition of the DNA damage repair pathway [J]. Oncol Rep, 2014, 32(6): 2596-2604
- [29] Skinner HD, Giri U, Yang LP, et al. Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(11): 2713-2722
- [30] Wang M, Han J, Marcar L, et al. Radiation Resistance in KRAS-Mutated Lung Cancer Is Enabled by Stem-like Properties Mediated by an Osteopontin-EGFR Pathway[J]. Cancer Res, 2017, 77(8): 2018-2028

(上接第 857 页)

- [25] Redwood D, Asay ED, Sacco P, et al. Stool DNA Testing for Screen-Detection of Colorectal Neoplasia in Alaska Native People[J]. Mayo Clinic Proceedings, 2016, 91(1): 61-70
- [26] Berger BM, Levin B, Hilsden RJ. Multitarget stool DNA for colorectal cancer screening: A review and commentary on the United States Preventive Services Draft Guidelines [J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2016, 8(5): 450-458
- [27] Abbaszadegan MR, Velayati A, Tavasoli A, et al. Rapid DNA extraction protocol from stool, suitable for molecular genetic diagnosis of colon cancer[J]. Iranian Biomedical Journal, 2007, 11(3): 203-208
- [28] 刘雅文. 浅析 DNA 保存的研究进展[J]. 轻工科技, 2016(7): 12-13
Liu Ya-wen. Research Progress of DNA Preservation[J]. Light Industry Technology, 2016(7): 12-13
- [29] 李娜, 李迪强, 王秀磊, 等. 粪便不同保存方法对动物基因组 DNA 提取效果的影响[J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29(5): 341-345
Li Na, Li Di-qiang, Wang Xiu-lei, et al. Effects of Different Preservation Methods on Extraction of Genomic DNA from Animals[J]. International Journal of Genetics, 2006, 29(5): 341-345
- [30] 刘艳华, 张明海. 马鹿粪便样品保存方法对 DNA 提取质量的影响[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(2): 67-69
Liu Yan-hua, Zhang Ming-hai. Effects of Preservation Methods on the Quality of DNA Extraction [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2006, 34(2): 67-69
- [31] 王勇, 邹秉杰, 刘云龙, 等. 不同粪便 DNA 提取试剂盒及样本储存时间对粪便人基因组 DNA 提取率的影响[J]. 临床误诊误治, 2014, 27 (4): 77-80
Wang Yong, Zou Bing-jie, Liu Yun-long, et al. Effects of different fecal DNA extraction kits and sample storage time on genomic DNA extraction rate of feces [J]. Clinical misdiagnosis and mistreatment, 2014, 27(4): 77-80
- [32] Kisiel JB, Ahlquist DA. Stool DNA screening for colorectal cancer: opportunities to improve value with next generation tests [J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2011, 45(4): 301-308