

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01042

• 论 著 •

孕妇血样采集后体外存放对血浆中胎儿游离 DNA 水平的影响

李 勤¹, 张 毅², 丁宇烽², 胡振林², 孙树汉², 惠 宁^{1*}

1. 第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433

2. 第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的: 探讨孕妇血样采集后体外存放过程中血浆游离 DNA 水平的影响因素。方法: 采集孕妇血样, 体外 4℃ 存放 6、36 h 后, 实时定量 PCR 检测孕妇外周游离 DNA 水平, Annexin V/PI 双染色法流式分析血样白细胞死亡情况, 速率法检测血浆乳酸脱氢酶(LDH)活性, 单相酶扩散法测定血浆 DNA 酶活性。结果: 血样体外存放 36 h 后, 血浆中 β -globin 基因的拷贝数较存放 6 h 的样品显著增加, 而 SRY 基因拷贝数明显减少; 4℃ 存放条件下, 妊娠晚期孕妇外周血中胎儿 DNA 占总 DNA 百分比从 6 h 的 $(10.3 \pm 5.6)\%$ 下降到 36 h 的 $(3.0 \pm 2.1)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。体外存放 6 h 的血样中基本未检出死亡细胞, 而存放 36 h 的血样中分别检出了坏死和凋亡的白细胞; 36 h 样品血浆中 LDH 活性较 6 h 样品显著升高 ($P < 0.05$)。单相酶扩散法结果表明, 血浆 DNA 酶在 4℃ 时虽然活性显著减弱, 但仍然保持降解 DNA 的能力。结论: 血样采集后体外存放时间过长会导致血浆总游离 DNA 增多, 而胎儿 DNA 减少, 这种变化可能与血样体外存放过程中白细胞死亡和血浆 DNA 酶对胎儿 DNA 的降解作用有关; 胎儿 DNA 抽提应在血样采集后尽早 (6 h 内) 进行。

[关键词] 孕妇; 血浆; 胎儿游离 DNA; Dnase; 乳酸脱氢酶**[中图分类号]** R 714.55**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1042-04

Influence of delay in blood-processing on the level of cell-free fetal DNA in maternal plasma sample

LI Qin¹, ZHANG Yi², DING Yu-feng², HU Zhen-lin², SUN Shu-han², HUI Ning^{1*}

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influencing factors of cell-free fetal DNA level in the maternal plasma during blood-processing. **Methods:** Aliquots of blood samples from pregnant women with male fetus were processed at 6 h and 36 h after sampling. The SRY and β -globin genes and the total DNA level were quantified by real-time quantitative PCR. Death of white blood cells was assayed by flow cytometry after stained with Annexin V/PI. The plasma DNase activity was assayed by radial enzyme-diffusion method and plasma lactate dehydrogenases (LDH) by rate method. **Results:** A 36 hour delay in blood-processing led to a significant increase in the total DNA and decrease in the fetal DNA (SRY gene) in the maternal plasma. The ratio of fetal DNA decreased from $(10.3 \pm 5.6)\%$ at 6 h after sampling to $(3.0 \pm 2.1)\%$ at 36 h after sampling under 4℃ ($P < 0.05$). No dead cells were identified in the blood sample 6 h after sampling; however, apoptosis and necrosis of white blood cells were identified 36 h after sampling. The activity of LDH at 36 h was significantly higher than that at 6 h ($P < 0.05$). Radial enzyme-diffusion result showed that, though greatly decreased at 4℃, the DNase was still able to degrade DNA. **Conclusion:** Delay in blood-processing can lead to increase of the total free DNA in maternal plasma but decrease of fetal DNA, which might be related to the death of white blood cells and degradation of fetal DNA by plasma DNase, so the extraction of fetal DNA should be done as early as possible after sampling (within 6 h).

[KEY WORDS] pregnant women; plasma; cell-free fetal DNA; Dnase; lactate dehydrogenases

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1042-1045]

孕妇血浆中的胎儿游离 DNA 在遗传病的无创性产前诊断中发挥重要作用^[1]。但是, 孕妇血浆中

胎儿游离 DNA 含量甚微, 而且仅占总游离 DNA 的很少部分, 约 5%~7%, 大量母源 DNA 的存在会影

[收稿日期] 2008-03-03 **[接受日期]** 2008-04-10**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(“973”计划, 2006CB504100). Supported by National Program on Key Basic Research Project of China (“973” Program, 2006CB504100).**[作者简介]** 李 勤, 硕士生. E-mail: pekingli@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070640, E-mail: huin1956@yahoo.com.cn

响相对微量的胎儿 DNA 的检出,尤其会增加那些与母亲 DNA 序列差异不大的胎儿 DNA 序列如点突变检测的难度^[2]。因此,建立合理的孕妇血样处理规范,以保证从血浆中获得稳定的高比例胎儿游离 DNA,对该无创性产前诊断的发展无疑是很重要的。不少研究对血样处理过程中的诸多可能影响因素进行了分析,发现分离血浆的离心力过大,可能导致血液白细胞受损释出 DNA,降低胎儿 DNA 的比例^[3-4];使用不同的抗凝剂^[5]、游离 DNA 的抽提方法^[6]等都能影响所得游离 DNA 中胎儿 DNA 的比例。除上述因素之外,孕妇血样采集后体外存放时间的不同亦有可能影响血浆中游离 DNA 水平,因为血样采集后血细胞可能在体外不断死亡和裂解,释放更多的母源 DNA。另一方面,血浆中 DNA 酶亦有可能不断降解游离 DNA,使胎儿 DNA 不断减少。

前期研究^[7]虽已证明血浆 DNA 酶的存在,但对其体外活性和是否能影响血浆胎儿 DNA 的水平也没有进行过分析。因此进一步研究孕妇血样采集后在体外存放过程中血细胞的死亡和裂解的情况、血浆 DNA 酶的活性、以及它们对血浆中游离 DNA 水平的影响对于建立优化和标准的临床血样处理规范具有重要的参考价值。本研究比较了取样后分别在体外 4℃ 存放了 6、36 h 再进行处理的孕妇血液样品血浆胎儿 DNA 和总游离 DNA 的水平,同时分析了血细胞的死亡情况和血浆 DNA 酶的活性,以探讨孕妇血样采集后体外存放对血浆中游离 DNA 水平的影响和作用机制。

1 材料和方法

1.1 一般资料 本院产科孕晚期住院健康待产孕妇 12 例,无妊娠并发症和妊娠合并症,无贫血(Hb>110 g/L)及严重心、肝、肾疾病。年龄 21~39 岁,孕周 36~42 周,B 超诊断为男性单胎同时出生后获得确诊。本研究经医院伦理委员会批准。入选的受检者均被告知并签署知情同意书。

1.2 血样采集和处理 参照文献^[8]取孕妇空腹静脉血 4 ml,EDTA 抗凝,立即分成 2 等份,每份 1 ml,随机分成两组,两组分别在 4℃ 放置 6 h、36 h 后离心,首先 200×g 离心 10 min,然后 1 600×g 再离心 10 min,小心转移上清液于新离心管中,再次 1 600×g 离心 10 min,小心转移上清液(不吸取到任何颗粒物),再次 1 600×g 离心 10 min,收集上清液血浆,等待立即抽提 DNA(取血过程中均注意避免机械损伤,以免细胞破碎),离心后剩余的血细胞沉淀保留备用。

1.3 血浆游离 DNA 的提取、纯化 取 400 μl 血浆样品使用 QIAamp DNA mini Kit(Qiagen)按照血浆 DNA 提取方案的操作步骤进行。

1.4 实时荧光定量 PCR 参照文献^[9]的方法,采用 Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Life Science, USA)实时荧光定量 PCR 仪,定量检测 SRY 和 β-globin 基因分别代表胎儿游离 DNA 和总游离 DNA 的量,引物及探针的序列如下,SRY 上游引物:5'-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3',下游引物:5'-CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3';Taqman 探针:5'-(FAM) AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA(TAMRA)-3';β-globin 上游引物:5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3',下游引物:5'-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3',Taqman 探针:5'-(FAM) AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG(TAMRA)-3'。PCR 条件为:预热 54℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,64℃ 1 min 40 个循环。每份样本设 3 复孔,取均值作为靶定量值。为了确定血浆中 DNA 的拷贝量,以已知浓度的男性基因组 DNA 作为标准稀释曲线。根据标准曲线的 C_T 值确定待测样品的 DNA 含量,最后以每个细胞含 6.6 pg DNA 换算出每毫升血清中所含拷贝数,以 GE/ml(基因当量/ml)表示。为了实验的准确性,减少污染,在实时定量 PCR 扩增系统中同时做阳性(男性外周血)对照及空白(三蒸水)对照。

1.5 血液样品白细胞的流式分析 采用 Annexin V/PI 双染色法:待测血细胞沉淀加入 1:10 稀释的溶血剂 FACS lysing solution(美国 BD 公司)0.5 ml,室温下避光 10 min,1 000×g 离心 5 min,弃上清。以 PBS 洗 1 次,用 Binding Buffer 洗 1 次,重悬于 200 μl Binding Buffer,加 AnnexinV-FITC 和 PI 各 5 μl,室温避光 15 min。1 h 内用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)收获细胞。每例标本收获 10 000 个细胞,收获的数据用 CellQuest 软件分析。

1.6 血浆乳酸脱氢酶(LDH)检测 采用 L→P 法试剂盒(上海复旦张江生物医药有限公司),以速率法按厂商试剂盒的说明书进行。

1.7 血浆 DNA 酶活性检测 参照文献^[10],采用单相酶扩散法将 A 液[牛胸腺 DNA(6 g/L)1 000 μl;EB(10 g/L)50 μl;pH 7.2,0.05 mol Tris-HCl 缓冲液(含 0.05 mol MgCl₂)8 910 μl;1 mol CaCl₂ 40 μl]和 B 液(2%的琼脂糖 10 ml,用去离子水配制,加热 100℃,溶解)混匀,灌注琼脂板,冷至凝固;用直径为 1.5 mm 的打孔器打孔;取 4 μl 样品加入琼脂板孔

中;于 37℃或 4℃湿盒孵育 16 h;于紫外透射仪下观察并测量 DNA 水解环的大小。以梯度稀释的牛胰 DNase(Sigma 公司)为标准品,检测不同浓度的标准品所形成的 DNA 水解环直径,DNA 水解环大小反映样品 DNase 活性的高低。

1.8 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件处理,两两样本均数间比较采用 *t* 检验。

表 1 母体外周血体外 4℃存放 6 h、36 h DNA 浓度、白细胞状态、LDH 值的变化
Tab 1 Plasma DNA concentration(fetal DNA and total DNA),apoptosis and necrosis of white blood cells and LDH activity at 6 h,36 h after sampling at 4℃

Group	DNA			WBC		LDH
	SRY GE/ml	β-globin GE/ml	Fetal DNA(%)	Apoptosis(%)	Necrosis(%)	
6 h	124.9±18.5	1 214.1±220.2	10.3±5.6	3.0±1.5	2.8±1.1	172±23.5
36 h	59.2±12.4*	2 004.7±382.7*	3.0±2.1*	37.8±7.6*	14.8±5.2*	475±62.4*

* *P*<0.05 vs 6 h group. LDH:Lactate dehydrogenases

2.2 孕妇血样体外存放后血细胞死亡情况的观察 将上述血样离心后的血细胞以 Annexin V/PI 双染后进行了流式细胞仪分析,仅被 Annexin V 染色为早期凋亡细胞,被 Annexin V 和 PI 双染色的为晚期凋亡细胞,仅被 PI 染色的为死亡细胞。结果(表 1)发现,在体外存放 6 h 的血样中,基本未检出死亡细胞,而在存放了 36 h 的血样中分别检出了坏死和凋亡的白细胞(*P*<0.05)。进一步检测 6 h 和 36 h 样品血浆中的 LDH 活性,发现 36 h 样品血浆中 LDH 活性较 6 h 样品显著升高(表 1,*P*<0.05),表明细胞内容物从死亡细胞释放至血浆。以上结果说明,血样采集后 4℃体外存放 6 h 后白细胞尚未发生死亡,但存放 36 h 后白细胞发生死亡并释放细胞内容物。

2.3 孕妇血样体外存放后 DNA 酶活性的变化 以单向酶扩散法检测血浆 DNA 酶的活性,其原理是不同浓度的 DNA 酶标准品在 37℃孵育时在含牛胸腺 DNA 和溴化乙啶的琼脂糖凝胶板上形成 DNA 水解环,DNA 酶浓度越高,DNA 水解环面积越大,结果(图 1A)表明该方法可用于 DNA 酶活性的定量检测;0 h 和 36 h 血浆样品在 37℃孵育时在琼脂糖凝胶板上形成的 DNA 水解环(图 1B),证明孕妇血浆中存在 DNA 酶活性;0 h 和 36 h 血浆样品在 4℃孵育时在琼脂糖凝胶板上形成的 DNA 水解环,表明血浆 DNA 酶在 4℃时虽然活性显著减弱,但仍然保持降解 DNA 的能力(图 1C)。

3 讨 论

Angert 等^[11] 研究分析了孕妇血样采集后室温

2 结 果

2.1 孕妇血样体外存放后 DNA 含量的变化 血样体外存放 36 h 后,血浆中 β-globin 基因的拷贝数较存放 6 h 的样品显著增加,而 SRY 基因拷贝数明显减少(*P*<0.05,表 1),表明血样采集后体外存放时间过长(36 h 以上),将导致血浆总游离 DNA 增多和胎儿游离 DNA 减少。

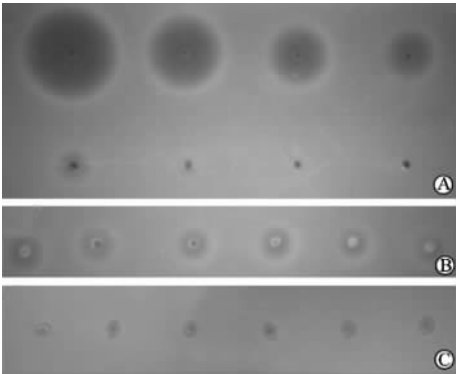


图 1 单相酶扩散法测定 DNase 活性
Fig 1 Measurement of DNase activity by radial enzyme-diffusion assay

A;DNA hydrolysis circles produced by serial diluted bovine DNase I standard in DNA agarose plate incubated at 37℃;B;DNA hydrolysis circles produced at 37℃ by plasma obtained from blood samples after storage *in vitro* for 6 h (left 3 wells) and 36 h (right 3 wells);C;DNA hydrolysis circles produced at 4℃ by plasma obtained from blood samples after storage *in vitro* for 6h (left 3 wells)and 36 h (right 3 wells)

体外存放 24 h 内,血浆游离 DNA 水平随时间变化的情况,其结果表明血浆总游离 DNA 在存放 4 h 后开始升高,6 h 时开始急剧升高,至 24 h 增高至初始水平的 10 倍以上。在实际工作中,血样采集后通常可以置于冰上以保持血样的稳定,预计可以减缓游离 DNA 水平的变化。因此本研究着重分析孕妇血样采集后在 4℃体外存放对血浆游离 DNA 的影响,并将观测时间延长至 36 h。结果表明:血样在 4℃体外存放 36 h 后,血浆总游离 DNA 明显升高,比存放 6 h 的样品增加了 1 倍左右。显然,血样 4℃存放

条件下,游离DNA变化的幅度比室温存放要小得多,这提示孕妇血样采集后如不能及时离心分离血浆,置于4℃存放是有益的。本研究通过Annexin V/PI双染后流式分析,发现存放36 h后血样中有坏死和凋亡的白细胞,而存放6 h的血样中未能检出死亡细胞;而且36 h样品的血浆中LDH活性显著高于6 h的样品,表明血样4℃体外存放6 h后,血液白细胞开始死亡并不断释放细胞内容物,基因组DNA也可能不断降解后释放,使血浆中总游离DNA水平升高。此结果表明,总游离DNA的升高可能是由于血液白细胞在体外存放过程中不断死亡而释放基因组DNA所致。

胎儿游离DNA的变化趋势与总游离DNA明显不同,前期研究^[11]已经发现血样室温体外存放时,虽然总游离DNA水平急剧升高,胎儿游离DNA水平在24 h内却基本保持稳定。本研究进一步发现,即便是4℃保存,血样体外存放时间延长至36 h,胎儿游离DNA水平会明显降低,与总游离DNA的变化趋势相反。本项研究还进一步确证了孕妇血浆中DNA酶的存在,分娩后2 h迅即在母体外周血中消失^[9],可能就是由DNA酶降解所致,因为DNA酶在37℃表现出极强降解DNA的活性,并且在4℃条件下,尽管其活性已明显降低,但仍然保持降解DNA的活性。血浆中低水平DNA酶活性的存在可以解释为什么随血样体外存放时间延长胎儿DNA水平会降低。当然,血浆中的DNA酶不仅降解胎儿游离DNA,同时也会降解母源DNA,似乎总游离DNA水平也应随血样体外存放时间延长而降低。但是事实上,血液白细胞在血样体外存放过程中有相当比例发生死亡,基因组DNA不断释出,这样补充的游离DNA量超过DNA酶降解的量,最终导致总游离DNA水平不断升高。与此相反,血浆的胎儿游离DNA已被证明主要来源于凋亡的胎盘滋养层细胞,因此,血样采集后,其主要来源即被切断。尽管孕妇外周血中也已被发现含有少量胎儿细胞,它们的体外死亡,也可能释放胎儿游离DNA,但是,孕妇外周血中的胎儿细胞数量极微,每毫升全血仅有1~6个胎儿细胞^[12]。因此以这种方式补充的胎儿游离DNA不能弥补血浆DNA酶对其的降解,所以最终的效应是胎儿游离DNA的水平随存放时间延长而降低。

本研究表明血样采集后体外存放时间过长,可以导致总游离DNA水平升高,而胎儿游离DNA减少,使胎儿DNA的比例显著降低,不利于胎儿DNA的进一步分析。因此,血样采集后应尽快处理,采集后4℃存放条件下,应于6 h内处理,此时尚无血液白细胞死

亡,可保持游离DNA水平的基本稳定。特定情况下不能及时处理,如血样须从采集点长途转运至检测中心,此时应采取低温保存,减缓游离DNA水平的变化。本项研究还提示血样存放过程中游离DNA水平的变化与血液白细胞死亡和血浆DNA酶的降解作用有关,因此,血样中加入细胞膜的稳定剂,阻止白细胞的裂解,或加入DNA酶的抑制剂,阻断其对DNA的降解,可望保持血浆游离DNA水平的稳定,延长血样的体外可存放时间。综上所述,本研究为建立合理的孕妇血样处理规范以进行无创性产前诊断奠定了基础。

[参考文献]

[1] Bischoff F Z, Lewis D E, Simpson J L. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure[J]. Hum Reprod Update, 2005, 11: 59-67.

[2] Bischoff F Z, Sinacori M K, Dang D D, Marquez-Do D, Horne C, Lewis D E, et al. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis[J]. Hum Reprod Update, 2002, 8: 493-500.

[3] Chiu R W, Poon L L, Lau T K, Leung T N, Wong E M, Lo Y M. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2001, 47: 1607-1613.

[4] Lui Y Y, Chik K W, Lo Y M. Does centrifugation cause the *ex vivo* release of DNA from blood cells[J]? Clin Chem, 2002, 48: 2074-2076.

[5] Lam N Y, Rainer T H, Chiu R W, Lo Y M. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis[J]. Clin Chem, 2004, 50: 256-257.

[6] Legler T J, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2007, 27: 824-829.

[7] Lo Y M, Zhang J, Leung T N, Lau T K, Chang A M, Hjelm N M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. Am J Hum Genet, 1999, 64: 218-224.

[8] Dhallan R, Au W C, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation[J]. JAMA, 2004, 291: 1114-1119.

[9] Lo Y M, Tein M S, Lau T K, Haines C J, Leung T N, Poon P M, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62: 768-775.

[10] Macanovic M, Lachmann P J. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 108: 220-226.

[11] Angert R M, LeShane E S, Lo Y M, Chan L Y, Delli-Bovi L C, Bianchi D W. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples[J]. Clin Chem, 2003, 49: 195-198.

[12] Poon L L, Leung T N, Lau T K, Lo Y M. Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma[J]. Lancet, 2000, 356: 1819-1820.