

基于滚环扩增技术的外周血 G-四链体检测方法的建立及其在 *ATRX* 突变型胶质瘤诊断中的应用研究

杨 华¹ 陈姝雨¹ 刘秀萍^{1,2} 王宇翔^{1Δ}

(¹复旦大学基础医学院病理学系 上海 200032; ²上海市第五人民医院病理科 上海 200240)

【摘要】 目的 开发一种基于滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)技术的高灵敏度外周血 G-四链体(guanine quadruplex, G4)检测方法,建立 *ATRX* 突变型脑胶质瘤的无创分子诊断体系,为临床早期筛查提供新型液体活检策略。方法 采用 shRNA 慢病毒感染技术建立 *ATRX* 稳定敲低的原代脑胶质瘤细胞株(*ATRX* KD),通过硫黄素 T(thioflavin T, ThT)荧光光谱法检测细胞上清液中 G4 的形成水平。构建 *ATRX* 敲低的原位脑胶质瘤小鼠模型,采用 RCA 变温扩增技术检测模型组与对照组外周血循环游离 DNA(cfDNA)中 G4 的丰度,并对 RCA 变温扩增技术的程序进行优化。收集临床确诊的 *ATRX* 突变型和野生型胶质瘤患者,以及健康志愿者的血清样本,提取 cfDNA 后采用优化的 RCA 方案进行 G4 定量检测,并再次对检测程序进行优化。结果 体外实验显示,*ATRX* 敲低可显著促进 G4 结构的形成,*ATRX* KD 组细胞上清液中 ThT 荧光强度较野生型显著增加。建立 RCA 变温扩增方案检测 *ATRX* 突变型胶质瘤小鼠模型外周血 cfDNA 中 G4 结构的实验条件:以 50 ng cfDNA 为起始模板,进行 10 个循环扩增。临床样本验证显示,优化后的 RCA 变温扩增方案较传统恒温扩增效率提升,能够有效区分 *ATRX* 突变型与野生型胶质瘤患者及健康人群。结论 成功建立了基于 RCA 变温扩增的外周血 G4 高灵敏度检测方案,该技术首次实现 *ATRX* 突变状态的液体活检分子分型,为胶质瘤早期筛查提供具有临床应用前景的无创诊断方法。

【关键词】 *ATRX* 基因突变; 胶质瘤; 循环游离 DNA(cfDNA); G-四链体(G4); 滚环扩增(RCA); 液体活检

【中图分类号】 R36 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2026.02.008

Establishment of a G-quadruplex detection method based on rolling circle amplification technology in peripheral blood and its clinical application in diagnosis of *ATRX*-mutant gliomas

YANG Hua¹, CHEN Shu-yu¹, LIU Xiu-ping^{1,2}, WANG Yu-xiang^{1Δ}

(¹Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²Department of Pathology, Shanghai Fifth People's Hospital, Shanghai 200240, China)

【Abstract】 **Objective** To develop a highly sensitive method for detecting peripheral blood G-quadruplex (G4) based on rolling circle amplification (RCA) technology, establish a non-invasive molecular diagnostic system for *ATRX*-mutant gliomas, and provide a novel liquid biopsy strategy for clinical early screening. **Methods** *ATRX* knockdown glioma cell lines (*ATRX* KD) were constructed via shRNA lentiviral infection. Thioflavin T (ThT) fluorescence spectroscopy was employed to detect G4 levels in the supernatant. An orthotopic *ATRX* knockdown glioma mouse model was established. RCA was applied to compare G4 abundance in peripheral blood circulating cell-free DNA (cfDNA) between

^ΔCorresponding author E-mail: yuxiang_wang@fudan.edu.cn

网络首发时间:2025-11-06 10:10:31 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20251105.1533.012

model and control groups, with optimization of RCA amplification protocols. Serum samples from clinically confirmed *ATRX*-mutant gliomas, wild-type gliomas, and healthy volunteers were collected. After cfDNA extraction, G4 quantification was performed using optimized RCA protocols with further procedural refinement. **Results** *In vitro* experiments demonstrated that *ATRX* knockdown significantly promoted the formation of G4 structures, with the ThT fluorescence intensity in the supernatant of *ATRX* KD cells being significantly higher than that in wild-type cells. The experimental conditions for detecting G4 structures in cfDNA from the peripheral blood of *ATRX*-mutant glioma mouse models using RCA temperature-variable amplification were established: starting with 50 ng of cfDNA as the template and performing 10 amplification cycles. Clinical sample validation showed that the optimized RCA temperature-variable amplification protocol improved efficiency compared to traditional isothermal amplification and effectively distinguished *ATRX*-mutant glioma patients from wild-type patients and healthy individuals. **Conclusion** This study successfully developed a highly sensitive peripheral blood G4 detection system based on RCA. This technology pioneers liquid biopsy-based molecular subtyping of *ATRX* mutation status, offering a clinically promising non-invasive diagnostic approach for early glioma screening.

【Key words】 *ATRX* gene mutation; glioma; circulating cell-free DNA (cfDNA); G-quadruplex (G4); rolling circle amplification (RCA); liquid biopsy

脑胶质瘤年发病率约为 6.4/10 万人,是成人中枢神经系统发病率最高的原发性恶性肿瘤;分为 I~IV 级,等级越高,恶性程度越高,总生存率越低,早诊断早治疗是赢得生存机会的关键^[1-2]。目前临床诊断金标准是 MRI 及 CT 影像学评估联合立体定向活检;MRI 为诊断和评估治疗的首选,但其准确性只有 80%~90%;病理学诊断虽可作为诊断依据,但组织活检存在并发症风险,尤其脑肿瘤生长位置特殊,更加难以实现治疗反应的动态监测^[3-5]。因此,开发新型无创诊断技术成为改善胶质瘤临床诊断及治疗的迫切需求。

ATRX 基因位于 X 染色体 q21.1 区域,在中枢神经系统发育等方面发挥关键作用^[6-7]。*ATRX* 突变在星形细胞瘤中高频发生,且与 1p/19q 共缺失存在互斥现象;*ATRX* 突变与患者预后显著相关,可作为独立的预后评估指标^[8],*ATRX* 缺失还与微卫星不稳定性密切相关^[9-10]。目前临床上脑胶质瘤 *ATRX* 突变的检测主要有免疫组化、Sanger 测序、下一代 DNA 测序技术 (Next-Generation Sequencing, NGS), Sanger 测序是金标准,但通量低,且与 NGS 一样成本高;免疫组化操作简单、成本较低、但需要足量组织。

脑胶质瘤由于其生长部位特殊性,非手术活检/早筛取材难度远高于其他组织;且组织活检具有侵入性,有产生并发症的风险,组织活检受肿瘤

异质性影响较大,难以重复取样以及定期检测。液体活检通过检测血液、脑脊液中的循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤 RNA (circulating tumor RNA, ctRNA)、循环肿瘤细胞或外泌体等标志物进行诊断,弥补了以上不足。其主要技术包括:(1)微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR),灵敏度高、可以绝对定量,但通量低、成本昂贵;(2)NGS,高通量、可检测未知突变,但试验操作复杂、成本高、分析复杂;(3)BEAMing 技术,具有灵敏度高、绝对定量、特异性高的特点,但成本较高、操作复杂;(4)滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA),以环状寡核苷酸为模板,灵敏度高、特异性高,并且操作简便、经济高效,因而临床适用性强。

尽管液体活检技术在近些年有所发展,但 *ATRX* 突变型胶质瘤的无创分子诊断体系仍面临多重挑战。首先,血脑屏障严重阻碍脑肿瘤源性分子生物标志物的释放,导致血液中循环生物标志物浓度极低,这成为无创检测的主要障碍之一;其次,与其他肿瘤相比,胶质瘤患者的 ctDNA 比例显著较小,血浆中 ctDNA 检测率低于 10%,远低于其他实体瘤 (75% 以上);另外 *ATRX* 突变不同于点突变,常表现为大片段缺失或移码突变,这使得难以通过常规的 ddPCR 或 NGS 进行有效捕捉。综上所述,目前在 *ATRX* 突变型胶质瘤中,尚缺乏标准化、高

灵敏度的无创分子诊断方案。

*ATRX*失活突变导致G4全局性累积,引发复制叉停滞及DNA损伤,游离DNA通过胞吐进入外周血。G4是Hoogsteen氢键形成G-四分体平面,经 π - π 堆积组装的特殊核酸二级结构,与肿瘤发生及细胞衰老等密切相关^[11-13]。RCA是一种基于phi29 DNA聚合酶的高效核酸扩增技术,通过环状DNA模板引导dNTP沿互补链延伸,生成大量串联重复的单链DNA产物,具有高保真性、高灵敏性及操作便捷性^[14-16]。

本研究旨在基于胶质瘤中*ATRX*基因突变与血液中G4含量的相关性,结合RCA技术,并利用G4与硫胺素T(thioflavin T, ThT)之间的特异性结合特性,建立一种无创检测*ATRX*突变型胶质瘤患者的新方法,以期为该类型胶质瘤的无创分子诊断与早期筛查提供新的策略。

资料和方法

研究对象 本研究符合人体试验伦理标准,经复旦大学附属华山医院伦理审查委员会批准[批件号:(2015)临审第(256)号],研究对象知情且同意,本研究样本使用已获授权。入组标准:(1)经复旦大学附属华山医院神经肿瘤外科手术确诊为脑胶质瘤患者;(2)患者年龄、性别以及既往史以病历系统实际记载的为依据;(3)实施了规范的颅内肿瘤切除手术;(4)有完整术前术后评估资料;(5)有完整术前MRI图像。排除标准:术前影像资料考虑为脑胶质瘤但术后经病理证实为非脑胶质瘤的患者。研究共纳入24例样本,包括20例脑胶质瘤患者[其中高级别胶质瘤(high grade glioma, HGG) 10例,低级别胶质瘤(low-grade glioma, LGG) 10例];*ATRX*突变型11例,野生型9例]及4例健康志愿者为对照组。

研究方法

人脑胶质瘤原代细胞分离培养 取新鲜肿瘤标本,置于无菌培养皿中;去除血凝块及电灼损伤组织;用预冷的HA培养液(H+GPSA medium)漂洗,剪碎,加入2 mL 0.1%胶原酶D及50 μ L DNase I (100 U/mL),混匀,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下消化30 min;300 \times g离心5 min,弃上清后加入2 mL Tryple Express,37 $^{\circ}$ C孵育15 min;轻柔吹打至单细

胞悬液,300 \times g离心5 min弃上清;加入5 mL红细胞裂解液,37 $^{\circ}$ C孵育15 min后,加入等体积HA培养液终止反应;用100 μ m细胞筛过滤去除未消化完全的组织块;收集细胞悬液,接种于T25培养瓶,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。细胞培养基为Neurobasal Medium+10% FBS+1%青霉素/链霉素。

构建*ATRX* KD人脑胶质瘤稳转株 将*ATRX*野生型人脑胶质瘤细胞,提前12 h铺板;加入*ATRX* shRNA/对照shRNA(shCon: 5'-ATCTCGCTTGGGCGAGAGTAAG-3'; 5'-sh*ATRX*: GGAACTAGCTCTTCAGAAA-3')慢病毒液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵育24 h;重复1次;弃上清,加入完全培养基,抗生素筛选5~7天,至对照组全部死亡;分离单克隆细胞株,通过Western blot验证基因表型。

细胞上清ThT荧光检测 将ThT与Tris-HCl-KCl溶液配成3 μ mol/L的ThT工作液;将细胞上清与ThT工作液1:1体积比混匀,室温避光孵育20 min;激发波长425 nm,发射波长490 nm,检测荧光值。

构建胶质瘤动物模型 提前48 h备皮;收集GL261细胞,调整细胞悬液密度至5 \times 10⁵个/ μ L,置于冰上备用;将C57BL/6小鼠用异氟烷麻醉,并固定于瑞沃德脑立体定位仪上;用70%酒精消毒小鼠头部后,持手术刀切开小鼠头部皮肤,以前囟为坐标原点,在左2 mm、下3 mm处钻孔4 mm,等待2 min后上提1 mm,缓慢注射3 μ L细胞悬液,注射完毕后静置5 min,缓慢向上旋出并用过氧化氢棉签擦拭消毒;用组织粘合胶粘合小鼠皮肤伤口,然后将其置于红外取暖灯下至苏醒后,放回原笼。

提取血清中的循环游离DNA(cfDNA) 使用QIAGEN循环游离DNA(circulating cell-free DNA, cfDNA)提取试剂盒,依据说明书取适量血清加入磁珠悬液,孵育后,加入微球洗脱液孵育,后经QIAmp UCP MiniElute柱吸附,EB缓冲液洗脱,得cfDNA并测浓度。

cfDNA环化连接反应 反应体系:50 ng/5 ng cfDNA, 2 μ L 10 \times T4连接酶缓冲液, 1 μ L T4 DNA连接酶(400 U/ μ L),无核酸酶水补足至20 μ L。室温避光孵育2 h,65 $^{\circ}$ C 10 min灭活。

RCA恒温扩增 配置36.5 μ L反应体系:20 μ L T4连接酶产物,3 μ L 10 \times phi29缓冲液,2 μ L 10 mmol/L

dNTP, 10 μ L Random Hexamer (50 μ mol/L), 1.5 μ L Equi-phi29 DNA 聚合酶(10 U/ μ L); 30 $^{\circ}$ C 恒温水浴 12 h, 随后立即将反应管 65 $^{\circ}$ C 加热 10 min 以灭活 phi29 DNA 聚合酶, 终止反应。

RCA 变温扩增 配制 35 μ L 预混体系: 20 μ L T4 DNA 连接酶产物, 3 μ L 10 \times phi29 缓冲液, 2 μ L 10 mmol/L dNTP, 10 μ L Random Hexamer (50 μ mol/L); 95 $^{\circ}$ C 3 min, 25 $^{\circ}$ C 3 min; 向退火产物中加入 1.5 μ L Equi-phi29 DNA 聚合酶(10 U/ μ L), 混匀后 10 000 $\times g$ 离心 10 s; 然后将反应管置于 PCR 仪中运行循环扩增程序: 30 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 15 s, 循环 10 次; 取产物 1/10 体积重复进行 T4 连接酶连接成环, 进行前四步实验步骤; 将前五步实验步骤重复 4 次; 扩增循环 5 次, 得到第五次 PCR 终产物, 并采用乙醇沉淀法回收并纯化。

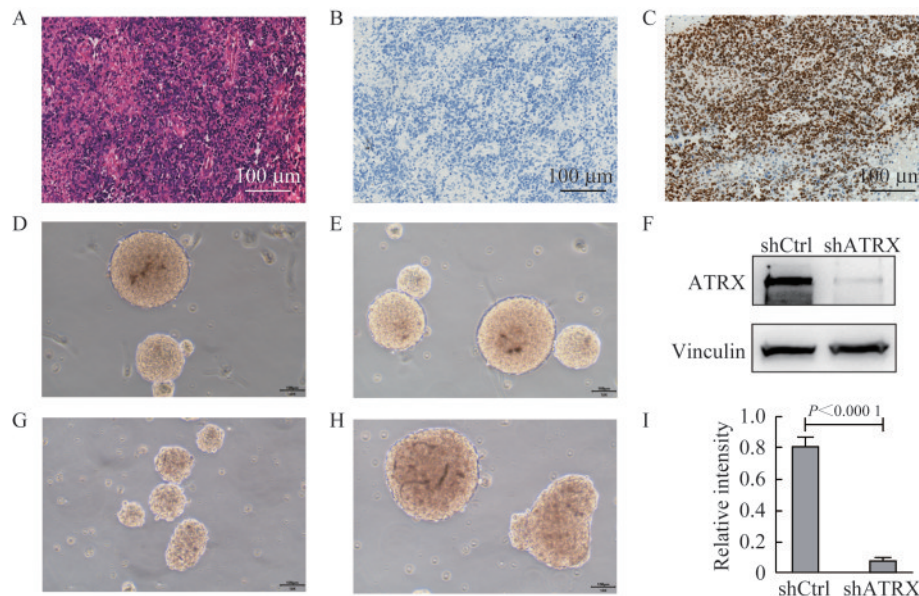
统计学分析 使用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析, 采用了独立样本 *t* 检验和单因素方差分析不同组之间的显著差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

体内外 *ATRX* 突变型/野生型中 G4 含量的差异

分析 为了验证胶质瘤中 *ATRX* 的基因状态对 G4 表达水平的影响, 我们采用手术切除的新鲜胶质母细胞瘤标本(病例 1)分离原代细胞培养, 该标本经病理鉴定为 WHO IV 级、IDH 野生型(-)且 *ATRX* 野生型(+)(图 1A~C)。成功分离的脑胶质瘤原代细胞在体外培养中表现出良好的增殖活性, 呈现典型的肿瘤干细胞生长特性: 细胞呈立体球形及圆形, 以悬浮方式生长(图 1D)。培养约 72 h 后即可观察到特征性神经球结构的形成(图 1E)。

利用慢病毒转染技术在 *ATRX* 野生型人脑胶质瘤细胞中构建 *ATRX* 敲低稳转株(图 1F、1I)。该稳转株在体外培养中保持良好的增殖活性, 呈现典型的肿瘤干细胞生长特征: 细胞呈立体圆形或球形, 以悬浮方式生长, 并能形成特征性的三维神经球结构(图 1G、1H)。



A: Glioblastoma HE staining; B: Immunohistochemical staining, IDH (-); C: Immunohistochemical staining, *ATRX* wild type (+); D: Primary culture of *ATRX* wild-type glioma cells (48 h); E: Primary culture of *ATRX* wild-type glioma cells (72 h); F and I: Western blot validation of *ATRX* knockdown in glioma cell lines. shCtrl: Empty vector control plasmid; shATRX: *ATRX* knockdown plasmid; G: Primary culture of *ATRX* knockdown glioma cells (48 h); H: Primary culture of *ATRX* knockdown glioma cells (72 h). Scale bar=100 μ m.

图 1 人原代脑胶质瘤细胞培养

Fig 1 Human glioma primary cell culture

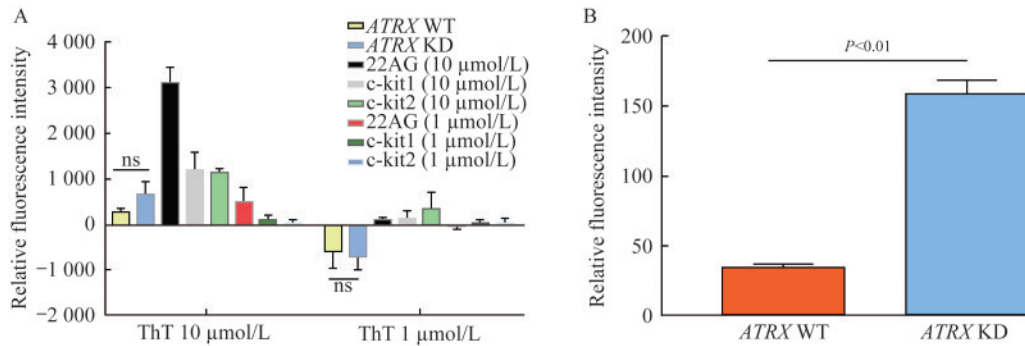
分别收集 *ATRX* 野生型 (*ATRX* WT) 和 *ATRX* 敲低 (*ATRX* KD) 的人脑胶质瘤细胞培养上清液。RCA 恒温扩增后, 与 ThT 在室温下孵育结

合, 通过检测荧光强度比较两组细胞上清中 G4 含量的差异。此外, 我们还对比分析了富含鸟嘌呤序列的 DNA 与 ThT 的结合情况。

低细胞密度(5×10^5)培养上清与 ThT 孵育检测结果显示, *ATRX* 敲低组与野生型组的荧光强度无显著差异(图 2A)。当细胞密度增加至 1×10^6 时, *ATRX* 敲低组上清与 ThT 结合后的荧光强度显著

高于野生型组(图 2B, $P=0.007$)。

这一结果提示, *ATRX* KD 组与 *ATRX* WT 组细胞上清中 G4 含量差异显著, 证实了 *ATRX* 基因表达对 G4 形成的影响。



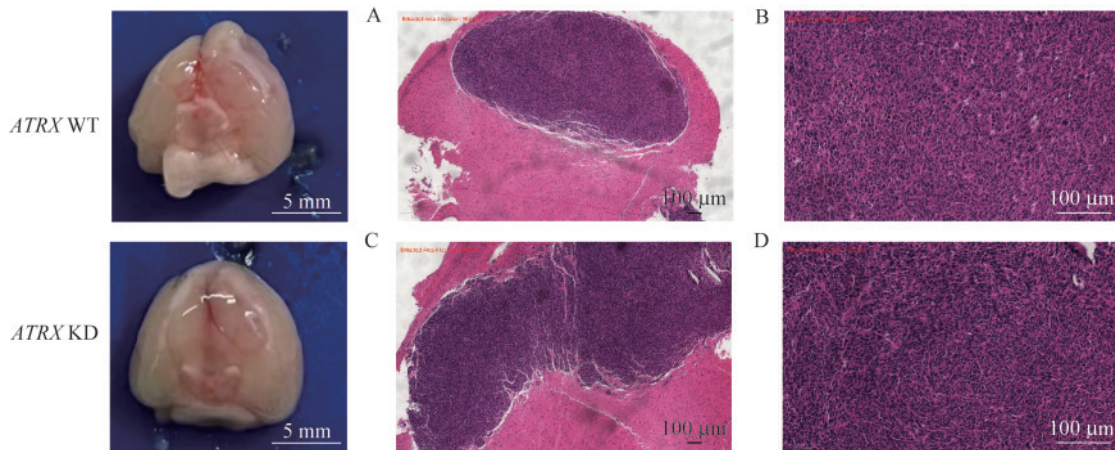
A: *ATRX* WT, *ATRX* wild-type human glioma cells; *ATRX* KD, *ATRX* knockdown human glioma cells; 22AG, c-kit1, and c-kit2 represent guanine-rich DNA sequences. Cell density: 5×10^5 . B: Cell density: 1×10^6 . ns: Not significant.

图 2 体外验证 *ATRX* 敲低和 *ATRX* 野生型人脑胶质瘤细胞上清与 G4 特异性结合荧光强度

Fig 2 *In vitro* validation of fluorescence intensity in G4-specific binding between supernatants of *ATRX* knockdown and *ATRX* wild-type human glioma cells

除了体外实验, 我们亦采用 RCA 变温扩增技术动态监测了小鼠成瘤过程中 1 周内的 G4 丰度变化。结果证实了 *ATRX* 基因突变的脑胶质瘤小鼠在体内确实会产生更多的 G4 结构, 为利用外周血 G4 水平作为无创性肿瘤标志物提供了重要依据。

基于 *ATRX* 突变脑胶质瘤动物模型的 RCA 扩增条件的优化 通过建立 *ATRX* 敲低 (KD) 的 GL261 小鼠胶质瘤稳转株 (GL261-sh*ATRX*), 构建 *ATRX* KD 和 *ATRX* WT 脑胶质瘤小鼠模型。结合组织解剖及 HE 染色验证肿瘤形成(图 3)。



A: *ATRX* mutant mice glioma HE staining; B: *ATRX* mutant mice glioma HE staining; C: *ATRX* wild-type mice glioma HE staining; D: *ATRX* wild-type mice glioma HE staining.

图 3 小鼠脑肿瘤大体照片与 HE 染色

Fig 3 Images of mice brain tumor and HE staining

为优化 RCA 技术对 G4 四链体结构的检测效率, 本研究首先建立了基于温度梯度优化的变温扩增体系。以 50 ng 血浆 cfDNA 为模板 (样本来源包括 *ATRX* KD、*ATRX* WT 胶质瘤小鼠模型及健康对照小鼠), 所有样本经 T4 DNA 连接酶环化处理

后, 在 phi29 DNA 聚合酶催化下, 分别进行 5、10、20 个循环的 RCA 扩增。扩增产物与 ThT 孵育后, 使用酶标仪检测 G4 信号强度。

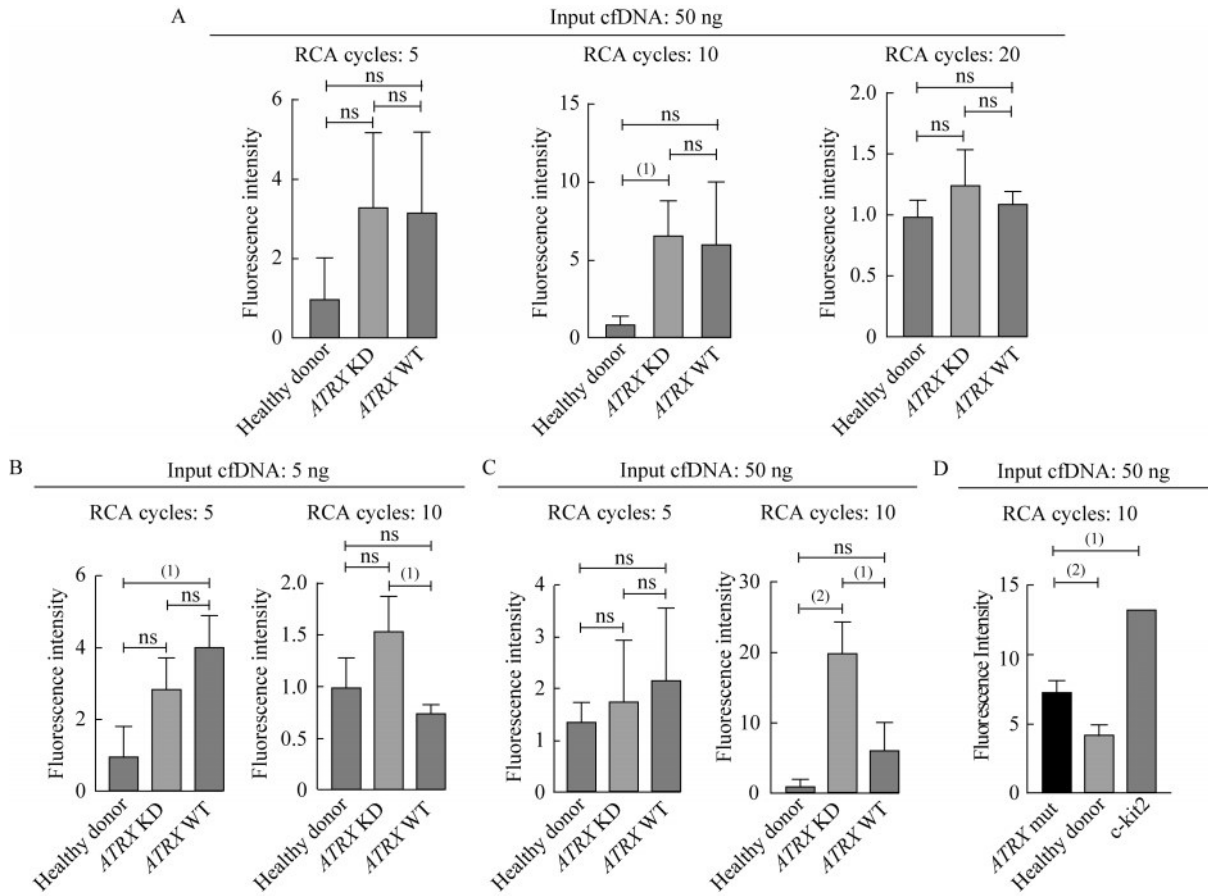
结果显示, 5 个循环组与 20 个循环组的 G4 信号强度组间差异无统计学意义(图 4A), 推测是在

20个循环组中,扩增反应已经到达平台期,因此健康小鼠对照组和 *ATRX* WT 组中检测所得信号过高,各组之间差异无统计学意义。值得注意的是,在10个循环条件下,*ATRX* KD 组的 G4 信号强度较健康小鼠对照组显著升高($P=0.035$),而与 *ATRX* WT 组相比无显著差异($P=0.065$);同时,*ATRX* WT 组与健康小鼠对照组的 G4 水平基本一致。这些数据表明,10个 RCA 循环可在 50 ng cfDNA 起始量的条件下实现最佳的 G4 扩增效率,并有效区分 *ATRX* 基因的突变状态(图 4A)。

为进一步优化 RCA 变温扩增 G4 的检测灵敏度,我们分别以 5 ng 和 50 ng cfDNA 为起始量,比较 5 个和 10 个循环的 RCA 扩增效果。结果显示,以 5 ng cfDNA 为起始量时,经过 5 个和 10 个循环,

ATRX KD 与健康小鼠对照组之间均未观察到显著差异(图 4B)。以 50 ng cfDNA 为起始量时,5 个循环条件下,*ATRX* KD 组与 WT 组和健康小鼠对照组均无显著差异($P=0.059, P=0.062$);而 10 个循环条件下,*ATRX* KD 组的 G4 信号强度显著高于 WT 组及健康小鼠对照组($P=0.013, P=0.008$)(图 4C)。

优化 RCA 条件后,我们以健康人外周血、*ATRX* 突变的胶质瘤患者外周血为样本进行检测,以验证 RCA 检测灵敏度,结果显示,以 50 ng cfDNA 为起始量,在 10 个循环条件下,*ATRX* 突变组与健康志愿者对照组、阳性对照组均有显著性差异(图 4D),一定程度上证明了 RCA 扩增的高灵敏度。



A: RCA amplification with 50 ng cfDNA as template (5, 10, 20 cycles) ($n=3$). cfDNA: Circulating free DNA. B-C: RCA amplification with 5 ng or 50 ng cfDNA as template (5 and 10 cycles). A-C: *ATRX* KD: Peripheral blood serum samples from *ATRX* knockdown glioma-bearing mice; *ATRX* WT: Peripheral blood serum samples from *ATRX* wild-type glioma-bearing mice; Healthy donor: Peripheral blood serum samples from healthy mice ($n=3$). D: *ATRX* mut: cfDNA of *ATRX* mutation glioma-bearing patients; Healthy donor: cfDNA in peripheral blood serum samples from healthy individuals with normal physiological levels who have not been diagnosed with any disease; c-kit2: Positive control rich in guanine DNA sequences ($n=3$). ns: Not significant, ⁽¹⁾ $P<0.05$, ⁽²⁾ $P<0.01$.

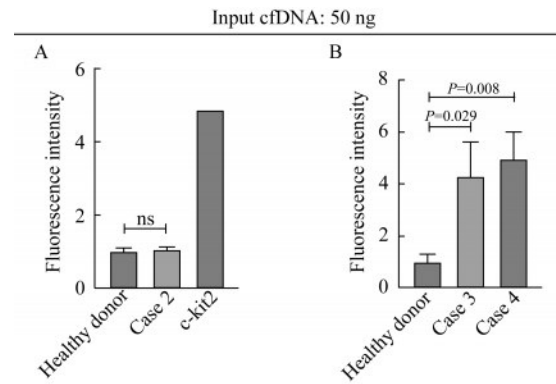
图 4 优化 RCA 技术对 G4 四链体结构的扩增效率的影响

Fig 4 Optimization of RCA amplification efficiency for G4-quadruplex structures

胶质瘤患者血清中 G4 四链体结构的检测分析 为评估 RCA 变温扩增技术在临床诊断中的应用价值,并优化 G4 四链体结构的检测方法,采用临床脑胶质瘤患者外周血血清标本进行验证。

首先从血清标本中提取 cfDNA,通过 PCR 初步扩增 G4 结构。然而,琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增条带信号较弱。为提升检测灵敏度,我们分别采用 RCA 恒温扩增和变温扩增技术进行对比分析。结果显示,RCA 恒温扩增后,ATRX 突变型胶质瘤患者较健康志愿者对照组 cfDNA 的荧光信号无显著差异($P=0.076$,图 5A)。RCA 变温扩增后,ATRX 突变型患者的 G4 结构丰度明显高于健康志愿者对照组,两组间荧光强度差异具有统计学意义($P=0.029$, $P=0.008$,图 5B)。这一发现提示,RCA 变温扩增技术可显著提升 G4 四链体结构的检测灵敏度。值得注意的是,ATRX 突变可能与 G4 结构的形成存在潜在关联,为胶质瘤的分子诊断提供了新的研究方向。

随后,我们对 RCA 的变温扩增条件进行了系统优化,具体实验流程如图 6 所示。在优化后的反应体系中,RCA 变温扩增流程中进行了 10 个 PCR 循环。结果显示,所有 ATRX 突变型脑胶质瘤患者的血清标本与健康志愿者对照组的血清标本的差异均有统计学意义($P<0.05$),而 ATRX 野生型脑胶质瘤患者血清标本与健康志愿者对照组之间则未



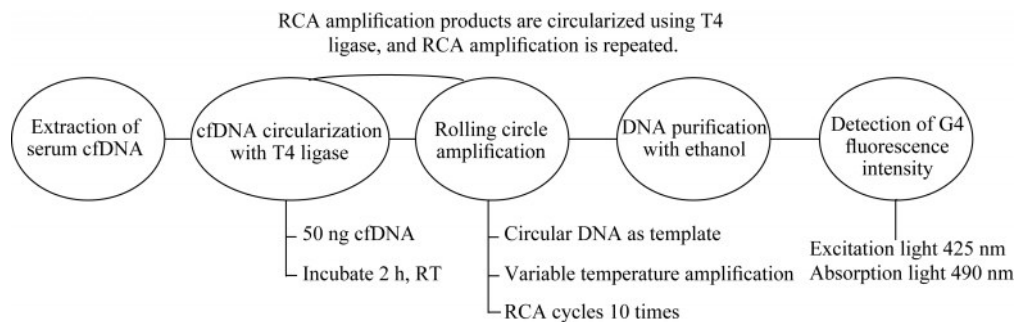
A: Isothermal RCA amplification. Case 2: cfDNA from ATRX mutant glioma patients; c-kit2: Positive control for guanine-rich DNA sequences. B: Thermocyclic RCA amplification. Case 3, and Case 4: cfDNA from ATRX mutant glioma patients; c-kit2: Positive control for guanine-rich DNA sequences. Healthy donor: Peripheral blood serum samples from healthy volunteers, ns: Not significant.

图 5 人血清标本进行 RCA 扩增

Fig 5 RCA amplification of human serum samples

观察到统计学差异(图 7)。这一发现与动物实验结果完成一致。

通过本研究,我们成功建立并优化了扩增 G4 结构的扩增实验体系,其最佳反应条件为:以 50 ng cfDNA 起始模板,经 T4 DNA 连接酶环化后,进行 RCA 变温扩增。PCR 条件:95 °C 预变性 3 min, 25 °C 退火 3 min;随后加入 Equi-phi29 DNA 聚合酶(10 U/ μ L)进行扩增反应:30 °C 延伸 5 min, 42 °C 变性 15 s,共循环 10 次。



The specific method and steps for optimizing the amplification of G4 are as follows: cfDNA is cyclized, and the connected products are used as templates for RCA variable-temperature amplification. RCA cycles are performed 10 times, and the final products are detected by binding with ThT to measure their fluorescence intensity. RT: Room temperature. cfDNA: Circulating free DNA.

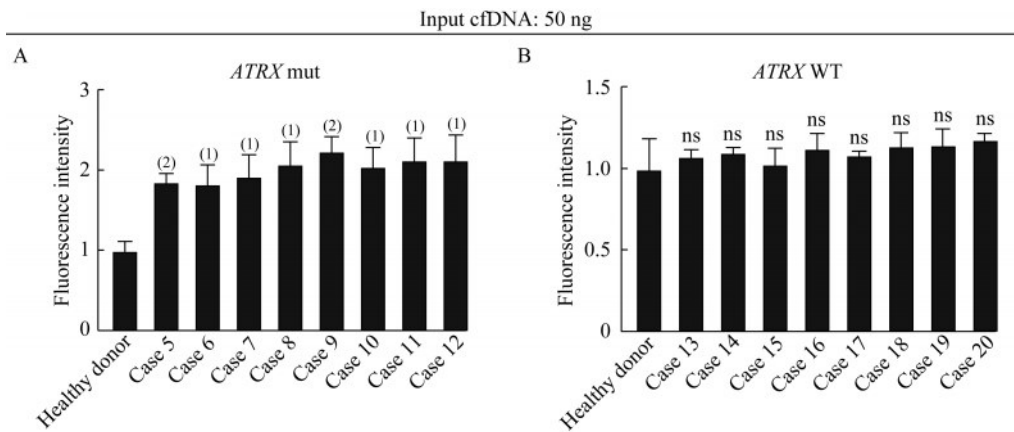
图 6 cfDNA 扩增具体实验路线图

Fig 6 Experimental workflow for cfDNA amplification

讨 论

本研究通过多维度实验体系系统性地阐明了

ATRX 基因表达对脑胶质瘤中 G4 含量的影响,并建立了一套 RCA 检测方法。研究首先在体外细胞实验中,采用慢病毒感染构建 ATRX 基因敲低稳转株,Western blot 验证敲除效率后,创新性地采用



A: cfDNA from glioma patients with *ATRX* mutation. B: cfDNA from glioma patients with *ATRX* wild-type. Healthy donor: cfDNA negative control from peripheral blood of healthy volunteers. All samples underwent 10 cycles of RCA amplification; *t*-tests were performed against the Healthy donor. ns: Not significant, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$.

图7 不同血清标本进行 RCA 扩增

Fig 7 RCA amplification of different serum samples

RCA 变温扩增技术,与恒温扩增方法相比,其 G4 扩增效率显著提高。RCA 恒温扩增无法检出 *ATRX* 基因敲低引起的 G4 丰度变化,而 RCA 变温扩增技术发现 *ATRX* 基因敲低可显著提升细胞上清液 G4 的丰度。在体内实验中,通过系统优化实验条件,确定以 50 ng cfDNA 作为起始模板,10 个循环为最佳扩增条件。该优化方案在 *ATRX* 突变型、野生型胶质瘤及健康对照小鼠样本中展现出最佳的 G4 分辨能力,显著优于传统恒温扩增方法。此优化方法不仅提高检测效率,还更准确呈现 *ATRX* 突变、*ATRX* 野生型脑胶质瘤患者及健康志愿者血清标本中 G4 含量的差异,为脑胶质瘤的早期诊断、治疗方案制定及病情监测提供有力技术支持。

分子机制研究表明,*ATRX* 作为染色质重塑蛋白,通过其 ADD 结构域和解旋酶结构域特异性识别 G4 结构^[6,17]。最新 WHO 中枢神经系统肿瘤分类(2021 版)强调,包括 *ATRX* 基因突变在内的分子标志物对胶质瘤分型具有重要临床价值^[18-20]。我们的研究发现,*ATRX* 突变导致肿瘤细胞有丝分裂过程中 G4 结构异常累积,并通过细胞外分泌途径进入外周循环系统。我们在胶质瘤原代细胞中观察到,胶质瘤 *ATRX* 敲低后,细胞上清液中 G4 的表达增加(图 2)。这一发现为理解 *ATRX* 突变在胶质瘤发生发展中的作用提供了新的分子机制解释。

1948 年,cfDNA 首次在癌症患者血清中发现,为一种新型的生物标志物,是细胞外部分降解的 DNA 小片段。cfDNA 分子检测现已广泛用于肿瘤

检测^[21]、器官移植、产检等部分领域。cfDNA 主要来源于基因组 DNA 以及线粒体 DNA,以裸露核酸的形式存在于外周血循环中^[22-23]。本研究通过提取血清中的 cfDNA,并进行 G4 检测,为胶质瘤的早期液体活检提供了可能。

本研究对 RCA 技术进行了全面的优化。RCA 技术利用 phi29 DNA 聚合酶的高效链置换活性,可实现短片段 DNA/RNA 的指数级扩增,其产物为包含数百个重复单元的单链 DNA 长链^[24-26]。通过对多种检测方法(包括胶体金法、电化学法、量子点法等)的系统比较,单链特异性荧光标记法具有最优的信噪比和检测灵敏度,被选定为检测方案。特别值得关注的是 ThT 荧光标记技术的应用,该分子通过苯胺环和苯硫醚环的自由旋转维持低背景荧光,当其与 G4 特异性结合后,分子构象固定导致荧光强度显著增强^[27-29]。本研究通过系统优化 RCA 变温扩增的起始模板和 PCR 循环次数,建立了优化的 G4 检测流程。实验数据表明,优化后的 RCA 技术在 *ATRX* 突变型胶质瘤患者血清检测中的准确率达 100% ($n=8$),且 *ATRX* 突变型胶质瘤患者血清 cfDNA 中 G4 的表达量显著高于健康志愿者。

从临床转化和应用前景来看,本研究具有重要的实践价值。cfDNA 中的 G4 作为新型液体活检标志物,其检测避免了传统组织活检的创伤性,且能反映肿瘤异质性。本研究证实,在动物模型动态监测中发现,*ATRX* 突变型胶质瘤小鼠外周血 G4 水平从接种后第 3 天即呈现持续升高趋势,而野生型

组在整个观察期内未表现显著变化,这一特征为疾病早期诊断提供了潜在的时间窗口。

综上所述,本研究揭示了 *ATRX* 突变脑胶质瘤患者癌细胞中 G4 可能通过多种机制释放至细胞外并进入外周血进而使血清中可检测到的 G4 增多。基于这一发现,我们最终成功建立并优化了滚环扩增技术,提高了 G4 的扩增效率。我们进一步利用可与 G4 特异性结合的荧光物质 ThT,实现了对 G4 的精准标记与检测。临床上对 *ATRX* 突变脑胶质瘤的鉴定主要依赖于患者的主诉及影像学检查,而基因型鉴定的步骤相对繁琐。因此,本研究建立的优化 RCA 检测外周血 G4 方法,为脑胶质瘤的早期诊断和精准分型提供了可靠的技术方法,有望成为一种快速、有效的脑胶质瘤早期筛查及 *ATRX* 突变脑胶质瘤鉴别的手段。

致谢 复旦大学附属华山医院毛颖教授课题组在实验样本等方面为我们提供了宝贵支持。

作者贡献声明 杨华 文献调研和梳理,论文撰写和修订,数据采集。陈姝雨 数据采集,实施实验,论文修订。王宇翔 论文构思和修订,监督指导。刘秀萍 论文修订,监督指导。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] SCHAFF LR, MELLINGHOFF IK. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults [J]. *JAMA*, 2023, 330(2):188-189.
- [2] KARSCHNIA P, GERRITSEN JKW, TESKE N, *et al.* The oncological role of resection in newly diagnosed diffuse adult-type glioma defined by the who 2021 classification: a review by the rano resect group [J]. *Lancet Oncol*, 2024, 25(9):e404-e419.
- [3] PAPADIMITRAKIS D, PERDIKAKIS M, GARGALIONIS AN, *et al.* Biomarkers in cerebrospinal fluid for the diagnosis and monitoring of gliomas [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(7):801.
- [4] LU Y, WANG Z, ZHANG D, *et al.* Application of circulating tumor DNA in the auxiliary diagnosis and prognosis prediction of glioma [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2024, 45(1):6.
- [5] LEI J, HUANG Y, ZHAO Y, *et al.* Nanotechnology as a new strategy for the diagnosis and treatment of gliomas [J]. *J Cancer*, 2024, 15(14):4643-4655.
- [6] AGUILERA P, LÓPEZ-CONTRERAS AJ. Atrx, a guardian of chromatin [J]. *Trends Genet*, 2023, 39(6):505-519.
- [7] YUAN K, TANG Y, DING Z, *et al.* Mutant atrx: pathogenesis of atrx syndrome and cancer [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11:1434398.
- [8] SHAO LW, PAN Y, QI XL, *et al.* ATRX loss in adult supratentorial diffuse astrocytomas correlates with p53 over expression and IDH1 mutation and predicts better outcome in p53 accumulated patients [J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31:103-114.
- [9] KOSIOL N, JURANEK S, BROSSART P, *et al.* G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):40.
- [10] CAVE JW, WILLIS DE. G⁻ quadruplex regulation of neural gene expression [J]. *FEBS J*, 2021, 289(12):3284-3303.
- [11] LANSDORP P. Telomere length regulation [J]. *Front Oncol*, 2022, 12:943622.
- [12] ESCAJA N, MIR B, GARAVÍS M, *et al.* Non-g base tetrads [J]. *Molecules*, 2022, 27(16):5287.
- [13] VARSHNEY D, SPIEGEL J, ZYNER K, *et al.* The regulation and functions of DNA and rna g-quadruplexes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8):459-474.
- [14] SOARES RRG, MADABOOSI N, NILSSON M. Rolling circle amplification in integrated microsystems: an uncut gem toward massively multiplexed pathogen diagnostics and genotyping [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(21):3979-3990.
- [15] MOHSEN MG, KOOL ET. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription [J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49(11):2540-2550.
- [16] QU H, FAN C, CHEN M, *et al.* Recent advances of fluorescent biosensors based on cyclic signal amplification technology in biomedical detection [J]. *J. Nanobiotechnol*, 2021, 19(1):403.
- [17] HAASE S, NUÑEZ FM, GAUSS JC, *et al.* Hemispherical pediatric high-grade glioma: Molecular basis and therapeutic opportunities [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24):9654.
- [18] LOUIS DN, PERRY A, WESSELING P, *et al.* The 2021 who classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8):1231-1251.
- [19] WAITKUS MS, ERMAN EN, REITMAN ZJ, *et al.* Mechanisms of telomere maintenance and associated therapeutic vulnerabilities in malignant gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2024, 26(6):1012-1024.