

· 综述 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.25.022

## ctDNA 应用于非小细胞肺癌的研究进展\*

曾力综述,吴永忠,翁克贵<sup>△</sup>审校

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院 400030)

**[摘要]** 检测血液中的循环肿瘤细胞(CTC)、循环肿瘤 DNA(ctDNA)及外泌体被称为液体活检,其中 ctDNA 是来源于肿瘤细胞的游离 DNA。目前,国内外大量研究显示 ctDNA 检测技术在肿瘤的辅助诊断、靶向耐药监测、预后评估、术后微小残留灶的追踪、肿瘤复发监测等方面具有广泛的应用价值。在非小细胞肺癌诊疗走向个体化精准的时代,ctDNA 检测可为患者提供更精准的诊断,指导临床治疗。本文综述了 ctDNA 检测在非小细胞肺癌中的应用及局限性。

**[关键词]** 循环肿瘤 DNA;癌,非小细胞肺;肿瘤标志物;肿瘤诊断;预后

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)25-3330-03

目前,肺癌的主要治疗手段包括手术、靶向治疗、免疫治疗、化疗、放疗等<sup>[1]</sup>,在治疗前通常需要有明确的组织学或细胞学诊断才能更好地实现精准治疗。近年来,随着肿瘤分子生物学研究的快速发展,新一代“液体活检”成为目前关注的焦点,其中检测血液中的 ctDNA 在肿瘤的诊断、治疗及预后评估监测等方面开始发挥重要作用<sup>[2]</sup>。其标本采用外周血,具有微创、方便、经济、快速、可重复性高等优势,适合临床应用。

### 1 ctDNA 的生物学特征

循环游离 DNA(circulating free DNA, cfDNA)是血液的组成部分之一,可以从血浆中分离出来<sup>[3]</sup>。cfDNA 不仅可在恶性肿瘤的患者外周血中检测到,同时也可以健康人、非恶性疾病患者中发现,如红斑狼疮、类风湿性关节炎、肺栓塞、侵入性治疗措施、孕妇等<sup>[4]</sup>,ctDNA 是由肿瘤细胞坏死、凋亡后分泌释放的一种游离 DNA,其基因组信息与肿瘤组织一致,代表来自原发性肿瘤和转移灶的组合遗传物质,其片段的大小约为 166 bp<sup>[5]</sup>。当癌细胞大量播散和坏死时,释放出来的核酸超过机体的清除力,所以恶性肿瘤患者体内 cfDNA 的含量高于健康人。有研究表明,健康人体内的 cfDNA 含量非常少,1~100 μg/L,平均约 30 μg/L。而肿瘤患者体内的 cfDNA 含量可达到 1 000 μg/L,平均约 180 μg/L。除此以外,外伤、锻炼、心肌梗死、终末期肾衰等也会使血液中 cfDNA 含量增加<sup>[4,6-8]</sup>。

### 2 ctDNA 的检测

一般认为,ctDNA 与健康人 cfDNA 的区别就在于 ctDNA 有体细胞基因突变,而这些突变仅存在于癌前细胞或者癌细胞基因组中,在同一机体内,它不会出现在其他正常细胞的 DNA,因此用于检测体细胞变异体 DNA 的方法也能用于 ctDNA 的检测<sup>[6]</sup>。

随着 DNA 测序技术的快速发展,通过现有检测手段如突变扩增阻滞系统(ARMS)、数字 PCR(dPCR)、新一代测序(NGS)等可以实现对 ctDNA 进行直接定性定量分析,通过 DNA 扩增对 ctDNA 进行精确检测<sup>[3]</sup>。ARMS、dPCR 灵敏度高,据研究显示,其检测 ctDNA 部分突变基因与通过组织活检发现的突变基因相一致,而 NGS 可以对多基因核酸片段进行高通量平行深度测序,检测出极其罕见的突变基因,但该技术却不能直接检测天然 DNA 中的碱基修饰<sup>[9-11]</sup>。目前尚在研发中的一种新兴测序技术,即因态纳米孔测序技术,又被称为第四代 DNA 测序技术,该技术借助纯物理学方法,不需要利用光信号及生化预处理材料,而是利用不同的碱基通过纳米孔时产生的电信号变化直接进行测序,具有高读长、易集成、省时间等优势<sup>[12-13]</sup>。

### 3 检测 ctDNA 的优势

目前,肿瘤组织活检是临床研究测序的主要方法,但肿瘤组织的获取过程为有创性操作,部分患者在操作后可能出现严重并发症,患者接受度低,此外,获得的组织标本是通过福尔马林固定石蜡包埋的方式进行保存,可能出现 DNA 被降解的情况。另外,由于肿瘤的异质性,即便是在同一个体中,其体内转移灶与原发灶的肿瘤细胞共有的突变可能仅占三分之一<sup>[14]</sup>。由此可见,组织活检用于诊断肿瘤不仅不能达到百分之百的准确率,还有可能对机体造成损伤。而检测血液中的 ctDNA 即“液体活检”,比组织活检更快,更容易重复,可以获取关于癌症的实时信息,指导临床治疗方案的选择,它提供的信息更全面,具有经济、快捷、方便、微创等特点,更能实现对肿瘤进展的实时跟踪。组织活检获得的癌症信息是静态的,而液体活检技术更能及时、有效的反映治疗过程中肿瘤的

\* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划项目(2016MSXM090)。 作者简介:曾力(1986—),硕士,主要从事肿瘤学研究。

<sup>△</sup> 通信作者,E-mail:676490673@qq.com。

动态变化情况。采用外周血作为标本,操作容易实现,可重复多次采血,从而实时监测治疗反应的动态变化<sup>[7,15]</sup>。

#### 4 ctDNA 在非小细胞肺癌中的应用

鉴于临床病理特征在非小细胞肺癌中应用的局限及肿瘤固有分子生物学特征的巨大差异,从分子生物学角度寻找用于非小细胞肺癌耐药监测、预后评估、微小残留灶追踪、复发监测等的新生生物学指标成为了目前关注的焦点<sup>[16]</sup>。尽管液体活检应用于临床还未获得批准,但相关研究已显示出其巨大的应用价值。

**4.1 靶向药物用药指导及耐药监测** 单个基因改变可指导临床靶向治疗,如结肠肿瘤患者存在 KRAS 基因突变将对 EGFR-TKI 产生耐药<sup>[17]</sup>,非小细胞肺癌患者有 ALK 重排会对克里唑替尼产生耐药<sup>[18]</sup>,黑色素瘤患者存在 BRAF 突变可能对维罗非尼产生耐药<sup>[19]</sup>。研究显示,高水平 KRAS 基因突变对结直肠癌患者进行西妥昔单抗、伊立替康治疗起到很好的指示作用<sup>[20]</sup>。

根据 NCCN 指南推荐,靶向治疗是目前非小细胞肺癌治疗方案的首选,但很多患者在服药过程中相继出现耐药。近年来,大量研究表明液体活检可以有效地监测到治疗过程中出现的耐药基因,如 EGFR-T790M,携带有该基因的患者超过半数会对靶向药物产生继发性耐药<sup>[21]</sup>。利用 ctDNA 检测技术,有学者<sup>[22]</sup>对接受 EGFR 抑制剂类药物治疗的癌症患者进行耐药性靶点的检测发现,KRAS 基因出现了 40 余种与耐药相关的基因突变。ZHENG 等<sup>[23]</sup>对 318 例进行 EGFR-TKI 靶向治疗的非小细胞肺癌患者进行观察,通过检测 ctDNA 发现约 36%(117 例)患者存在耐药,约 47%(55 例)患者发生 T790M 突变。

**4.2 预后评估** 预后评估主要根据影像学资料、参考其他辅助检查,再结合临床表现、疾病分期、组织病理学及分子生物学特征等因素进行综合判断,而这些信息多从影像资料及活检标本中得到。影像学检查价格昂贵、对人体有辐射;组织切片通常不易获得且为有创检查,患者接受度相对较低。而“液体活检”用于预后评估,微创、方便、经济、快速,进行 DNA 分析是监测肿瘤基因组实时变化的一种有效手段,是对组织活检分子领域的重要补充<sup>[15]</sup>。

在一项对 246 例接受一线靶向治疗的晚期非小细胞肺癌患者进行多变量分析中发现,检测到 KRAS 突变的患者预后相对较差<sup>[24]</sup>。有研究显示,ctDNA 也可用于乳腺癌的预后评估,它采用的方法是全基因组测序,选取了 30 例携带有 Tp53 基因、PIK3CA 基因突变的患者进行观察并监测其治疗过程中 ctDNA 的动态变化,他们发现,该变化与术后效果一致,疗效越好,ctDNA 含量越低<sup>[14]</sup>。另一项在胰腺癌中的研究发现,存在 KRAS 基因突变与不存在 KRAS 基因

突变的患者相比生存率更低,半年生存率比为 17% : 41%,1 年生存率比为 0% : 24%<sup>[25]</sup>。

**4.3 追踪微小残留病灶** ctDNA 可用于探测经手术或药物治疗后疾病的复发。目前监测疾病复发的主要手段是放射影像学检查,其价格昂贵对人体有辐射,对于微小转移灶不易检测出。HABER 等<sup>[9]</sup>在监测结直肠癌患者术后血液中肿瘤的特定基因如 APC、TP53、KRAS 的研究中发现,ctDNA 预测复发的灵敏度和特异度接近 100%。另一项研究对 55 例乳腺癌早期患者经手术、化疗等治疗后血液中 ctDNA 的变化进行监测发现,治疗后血液中 ctDNA 阳性患者较 ctDNA 阴性患者复发率高,可达 12 倍左右,而且在复发前 8 个月已经可以在血液中检测到 ctDNA<sup>[26]</sup>。此外,在慢性淋巴细胞白血病的治疗中,检测 ctDNA 对微小残留病进行评估,可以大致预测无进展生存期和总生存率<sup>[27]</sup>。

**4.4 评估肿瘤负荷,实时监测治疗反应及肿瘤演变** MURTAZA 等<sup>[28]</sup>研究指出,ctDNA 可用于追踪肿瘤负荷,监测癌症基因组,在这项研究中,他们追踪了 1 例 3 年内接受两线靶向治疗(他莫昔芬和曲妥珠单抗)的 ER、HER2 均为阳性的转移性乳腺癌患者,应用深度扩增子测序的方法分析了 8 例肿瘤活检标本和 9 例血浆标本,结果表明,血浆标本中的突变水平反映了由肿瘤活组织检查测序所推断的克隆层级,此外,在治疗期间,体细胞突变的连续变化与肿瘤疾病进展、转移部位之间的不同治疗反应均有相关性,这些结果来自单个转移性乳腺癌患者,表明 ctDNA 反映了克隆性肿瘤分级,并实时捕获亚克隆的动态变化。

**4.5 观察疾病治疗抗性及复发** FIALA 等<sup>[29]</sup>研究队列由被诊断患有早期非小细胞肺癌的 100 例患者组成,并进行手术切除肿瘤,使用手术切除的肿瘤标本与健康组织来进行基因蛋白质编码区域测序,随后比较二者的序列,鉴定遗传差异,特别是单核苷酸变体(SNV),每人测试 10~32 个 SNV,结果发现,SNV 在肿瘤发展早期发现,与肿瘤异质性无关,在肿瘤前平均 70 d 从 ctDNA 测试结果中就可以观察到治疗抗性及复发,且 ctDNA SNV 突变频率与肿瘤大小相关。

#### 5 小 结

尽管 ctDNA 作为一种应用前景广阔的无创性“液体活检”手段,对癌症特异性分子改变的研究有着重大潜力,但仍处于起步阶段,要真正应用于临床仍需克服诸多困难。(1)检测灵敏度,目前没有足够的灵敏度来对无症状个体的肺癌进行检测;(2)成本和时间,从单个基因组区域测序到创建特定的肿瘤特征,再进行“液体活检”测试,最后由专业人士对大量数据进行分析,过程费用昂贵,等待时间较长;(3)即使检测出 ctDNA,也不能区分它是来源于原发灶还是转移灶,其代表转移异质性的程度未知;(4)即使检测到肿瘤基因出现耐药突变或者出现了新的突变基因,

但如果没有研究出相应药物,依然束手无策。因此, ctDNA 广泛应用于临床除了需要检测流程的标准化外,还需要大量相关临床试验的进一步验证。

## 参考文献

- [1] 石远凯,孙燕,于金明,等.中国晚期原发性肺癌诊治专家共识(2016年版)[J].中国肺癌杂志,2016,19(1):1-15.
- [2] GOLD B,CANKOVIC M,FURTADO L V, et al. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility; a report of the association for molecular pathology[J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 209-224.
- [3] PARK B H. Circulating tumor DNA: measurement and clinical utility[J]. *Annu Rev Med*, 2018, 69: 223-234.
- [4] CATARINO R, COELHO A, ARAÚJO A, et al. Circulating DNA: diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38559.
- [5] MOULIERE F, ROSENFELD N. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(11): 3178-3189.
- [6] GEDVILAITE V, SCHVEIGERT D, CICENAS S. Cell-free DNA in non-small cell lung cancer[J]. *Acta Med Litua*, 2017, 24(2): 138-144.
- [7] ESPOSITO A, CRISCITIELLO C, TRAPANI D, et al. The emerging role of "liquid biopsies", circulating tumor cells, and circulating cell-free tumor DNA in lung cancer diagnosis and identification of resistance mutations[J]. *Curr Oncol Rep*, 2017, 19(1): 1.
- [8] BEITER T, FRAGASSO A, HUDEMANN J, et al. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(4): 633.
- [9] HABER D A, VELCULESCU V E. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(6): 650.
- [10] HIGGINS M J, JELOVAC D, BARNATHAN E, et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(12): 3462-3469.
- [11] 徐婷,徐国宾,贾淑芹,等.循环肿瘤 DNA 检测在恶性肿瘤诊治中的应用进展与问题思考[J].临床检验杂志,2017,35(2):81-88.
- [12] 姚亭秀. 四代 DNA 测序技术简述[J]. 生物学通报, 2017, 52(2): 5-8.
- [13] JAIN M, OLSEN H E, PATEN B, et al. Erratum to: The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 256.
- [14] GERLINGER M, ROWAN A J, HORSWELL S, et al. Intra-tumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(10): 883-892.
- [15] XU B, KRIE A, DE P, et al. Utilizing tumor and plasma liquid biopsy in treatment decision making for an estrogen receptor-positive advanced breast cancer patient[J]. *Cureus*, 2017, 9(6): e1408.
- [16] FRANCIS G, STEIN S. Circulating cell-free tumour DNA in the management of cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(6): 14122-14142.
- [17] HECHT J R, DOUILLARD J Y, SCHWARTZBERG L, et al. Extended RAS analysis for anti-epidermal growth factor therapy in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(8): 653-659.
- [18] SHAW A T, ENGELMAN J A. ALK in lung cancer: past, present, and future[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(8): 1105-1111.
- [19] GONZALEZ D, FEARFIELD L, NATHAN P, et al. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel[J]. *Br J Dermatol*, 2013, 168(4): 700.
- [20] SPINDLER K L, PALLISGAARD N, VOGELIUS I, et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4): 1177.
- [21] JR D L, BARDELLI A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(6): 579.
- [22] JR L A D, WILLIAMS R. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 537-540.
- [23] ZHENG D, YE X, ZHANG M Z, et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20913.
- [24] 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.
- [25] AKO S, NOUSO K, KINUGASA H, et al. Utility of serum DNA as a marker for KRAS mutations in pancreatic cancer tissue[J]. *Pancreatol*, 2017, 17(2): 285-290.
- [26] GARCIA-MURILLAS I, SCHIAVON G, WEIGELT B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(302): ra133.
- [27] GARCIA V J A, GARCIA M J A. Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Med Clin (Barc)*, 2018, 150(4): 144-149.
- [28] MURTAZA M, DAWSON S J, POGREBNIAK K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8760.
- [29] FIALA C, DIAMANDIS E P. Circulating tumor DNA for personalized lung cancer monitoring[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 157.