

液体活检技术及其在肿瘤早筛中的应用进展

陈晓霞¹, 陈伟², 林灿祥³, 刘奕龙¹, 曹素梅¹(1.中山大学肿瘤防治中心肿瘤预防研究室, 广东广州 510060; 2.中山大学附属第一医院胃肠外科, 广东广州 510080; 3.中山大学附属孙逸仙纪念医院心胸外科, 广东广州 510120)

【摘要】 肿瘤早期诊断是有效提高肿瘤预后的最重要手段之一。目前临床上主要采用影像、内镜、肿瘤标志物等对肿瘤进行早期筛查, 然而其发现早期肿瘤的敏感性仍不够理想。液体活检(Liquid biopsy)是通过采集能代表患者发病部位的体液(如血液、唾液、汗液、粪便、尿液及分泌物等), 对体内的肿瘤或其他生理状态进行监测的一种新兴体外诊断技术。目前常见的检测项目包括循环肿瘤细胞(Circulating tumor cell, CTCs)、循环肿瘤DNA(Circulating tumor DNA, ctDNA)及肿瘤细胞来源的外泌体(tumor cell-derived exo-somes, TEXs)等。液体活检采用高通量测序、PCR等手段, 对检出极微量的肿瘤来源核酸等标志物具有很高的敏感性, 因此可以用于肿瘤的早期乃至超早期筛查。大多数液体活检的对象是血液样品, 容易实现对多种肿瘤的同时覆盖, 从而大大提高早筛效率并降低成本。同时, 液体活检具有无创、可重复性强、样本获取方便等优点。因此, 液体活检有望提高无症状高危人群的肿瘤早期检出率, 帮助临床医生把握肿瘤的最佳治疗时机, 有效地提高患者的生存率。

【关键词】 液体活检; 肿瘤标志物; 早期筛查; CTCs; ctDNA; 外泌体; 高通量测序; PCR

Liquid biopsy and the advancement of its applications in early cancer screening CHEN Xiao-xia¹, CHEN Wei², LIN Can-xiang³, LIU Yi-long¹, WU Ying-ying⁴, Cao Su-mei¹. 1.Department of Epidemiology, Cancer Prevention Center, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, Guangdong Province; 2.Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province; 3.Department of Cardiothoracic Surgery in Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province; 4.Research of Center for Translational Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province
Grant sponsor: Guangdong Science and Technology Project; Grant number: 2017A020215033.

Correspondence to: Sumei Cao, MD, PhD, Sun Yat-sen University Cancer Center, 651 Dongfeng Road, East, Guangzhou 510060, Fax:+86-20-87343535, E-mail: caosumei@mail.sysu.edu.cn.

【Abstract】 Early diagnosis for tumor is one of the most important methods to improve the prognosis of cancer. At present, imaging, endoscopy and tumor markers are mainly used for early screening of tumors. However, the sensitivity of early detection of tumors is still not optimal. Liquid biopsies is a new technique for tumor in vitro diagnosis or other physiological status by collected humours (such as blood, saliva, sweat, feces, urine and secretions), which can represent the location of the disease. At present, the common detection items include circulating tumor cell (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA) and tumor cell-derived exocrine (TEXs). Liquid biopsy is highly sensitive to the detection of very small amounts of tumor-derived nucleic acids and other markers by high-throughput sequencing and polymerase chain reaction (PCR), therefore, it can be used for early and ultra-early screening of tumors. Most liquid biopsies are blood samples, which are easy to achieve simultaneous coverage of multiple tumors, thus greatly improving the efficiency of early screening and being cost effective. At the same time, liquid biopsy has the advantages of non-invasive, reproducible and easy to obtain samples. Therefore, liquid biopsy is expected to improve the early detection rate of tumors in asymptomatic high-risk population, help clinicians to grasp the optimal time for treatment of tumors, and effectively improve the survival rate of patients in tumor treatment.

【Key words】 Liquid biopsy; Tumor markers; Early screening; CTCs; ctDNA; Exosome; High-throughput sequencing; PCR

基金项目:广东省科技计划项目(2017A020215033)

通讯作者:曹素梅,教授,博士生导师, E-mail:caosm@sysucc.org.cn

前言

恶性肿瘤是严重危害人类健康的疾病,据最新癌症统计资料显示,我国2015年恶性肿瘤发病约392.9万,死亡约233.8万,占居民全部死因的23.91%,恶性肿瘤已经成为严重威胁中国人群健康的主要公共卫生问题之一^[1]。研究数据显示,大多数病人到医院就诊时,肿瘤已经发展到中晚期,因而错过最佳治疗时期,导致肿瘤无法手术切除或者出现术后复发转移。根据临床专家权威共识,如果能在肿瘤癌前病变时筛查出肿瘤,肿瘤临床治疗5年生存率将可提高至90%,可以从根本上降低肿瘤发病率和死亡率^[2]。由此可见,早期筛查对临床肿瘤防治具有重要意义。

肿瘤现有的筛查和诊断方法主要有影像学、组织活检和新兴的液体活检,除了乳腺癌早期筛查利用乳腺钼靶和超声联检的影像学检测,以一种无创筛查方式在临床取得高达85.1%敏感性和83.3%特异性外^[3],影像学和组织活检做为肿瘤主流的筛查方法都存在一定局限性,如影像学检查费用昂贵、早期筛查率低、有些可作为诊断金标准(如结肠直肠癌镜),但却具有一定的有创、侵入性而导致患者依从性低等特点,而同样组织活在癌症的检测诊断中具有相当重要的地位,但因有创,且存在很大的局限性,如取样较困难、取样窗口期有限,并可能增加转移风险,所以对肿瘤早期筛查也很有限。为解决此缺陷,液体活检技术应运而生。液体活检是通过检测人体体液以或取相关原发灶疾病信息的技术,此类技术具有实时检测、微创、可重复取样和便于连续取样等优点,在精准诊断方面具有极大的潜在价值。可辅助临床肿瘤的早期筛查与诊断。本文就该领域在常见恶性肿瘤(如鼻咽癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌等)早期筛查取得重要突破的研究进行综述。

1 液体活检技术

1.1 理论背景 1940年Mandel和Metais首次提出了细胞外游离核酸的概念^[4]。1977年,卢煜明等在国际著名医学期刊《柳叶刀》(Lancet)上发表孕妇的血浆内存有较高浓度的胎儿DNA,他和其团队后来研发了唐氏综合症的无创检验方法,迅速被超过90个国家所采用,成功将以DNA分析为本的无创性产前诊断技术,从科学研究层面应用至临床诊断,是医学界的重大突破。此外,卢煜明的团队透过大型平行测序技术及创新的生物信息科技,分析母体血浆中的微量DNA,成功破解了胎儿的全基因组图谱,可从而及早预测多种遗传病,是无创产前诊断技术发展的重要基础,这技术并可以应用到多种癌症的检测^[5]。

1.2 技术平台 液体活检的核心在于检测微量核酸变异,包括点突变、染色体结构变异及表观遗传学如甲基化水平分析等。高通量测序具有通量高、敏感度高及能够直接读取序列等优点,成为液体活检的核心技术。定量PCR(qPCR)及数字PCR具有敏感性高、对实验室软硬件要求低、成本可控等优点,在通量需求不高的情况下,也是很好

的选择。其它如Sanger测序、基因芯片、蛋白质芯片、质谱等,在部分领域也具有一席之地。

1.2.1 定量PCR 定量PCR(qPCR)目前被广泛应用于临床分子诊断,具有高敏感性的特点。研究表明,定量PCR同样可以应用于液体活检。其中,由传统定量PCR衍生出的ARMS PCR(等位基因特异性PCR)可以检查已知基因突变,在检测少量高频突变方面具有优势。研究者结合ARMS PCR与real-time PCR对ABO进行基因分型^[6];Pettersson等^[7]认为ARMS PCR结合焦磷酸测序技术,可以很好地应用于单体型分型,如 β_2 肾上腺素受体基因单体型及HLA单体型等;此外ARMS PCR还可用于种属鉴定,如Hiroshige等^[8]设计了针对FOXP2基因(控制语言和发声)外显子7区的等位基因特异性引物,包括人类、黑猩猩、牛、狗等10个物种的DNA进行扩增、电泳,结果显示该方法能够很好地区分出人类,灵敏度可达0.01 ng。

1.2.2 数字PCR 数字PCR(digital PCR, dPCR),同样由传统PCR技术衍生而来。数字PCR把待检测DNA模板分散到成千上万个微反应体系中,同步进行PCR反应并读取结果。通过计数阳性微反应体系的数量,数字PCR能够实现对目的DNA的绝对定量。与传统定量PCR相比,数字PCR不再需要标准品就能实现绝对定量分析。同时,数字PCR对模板的起始量要求较低,可以检测更低丰度的基因变异,在DNA拷贝数变异、突变检测、基因表达研究、二代测序结果验证、单细胞基因表达分析等领域具有明显优势。

研究者使用多重皮升微滴dPCR技术检测转移性结肠癌患者血浆游离DNA中的KRAS突变。该研究显示总的原癌组织和血浆样本分析一致性达92%^[9];Sanmaned等^[10]通过dPCR对使用BRAF抑制剂治疗的皮肤黑色素瘤患者ctDNA中BRAF V600E突变型进行检测,发现血浆检测与肿瘤组织检测结果一致性为84.3%;此外dPCR也以成为常规方法来验证NGS(二代测序)结果,包括确认来源少量DNA的低频突变。Alakus等^[11]使用皮升微滴dPCR来验证全外显子测序结果,检测阑尾来源的黏液性腹膜癌患者突变基因表达和拷贝数变异情况。

1.2.3 Sanger测序 Sanger测序采用双脱氧链终止法(Chain Termination Method),又称为一代测序。优点是测序片段较长,最长可达800 bp;同时Sanger测序准确率较高。其缺点是一次测序反应仅能检测一个目的区域,故属于低通量测序;同时Sanger测序敏感性较低,难以在混合样品中发现微量的变异。由于这些原因,Sanger测序一般不直接应用于液体活检,主要应用于验证二代测序或其它技术的检测结果。

1.2.4 高通量测序 高通量测序又称“下一代”测序技术(Next generation sequencing),能同步对高达数百万条DNA分子进行同步序列测定。高通量测序读长较短(最长约150-200 bp)。相对于Sanger测序而言,高通量测序对DNA模板的浓度和纯度要求更低,对基因片段完整性要求更低。高通量测序具有很高测序通量,可实现高测序深度,以

及对多位点、多标本的同步分析。因此,高通量测序特别适于样本浓度低、高度片段化的 ctDNA 检测,是目前液体活检的核心技术。

与二代测序相对应的三代测序技术,目前也在快速发展之中。三代测序具有更长读长、不需要对模板进行捕获扩增等优点,因而测序结果更接近样本真实情况。其缺点是对样本纯度要求较高,测序深度不足。因此,三代测序技术目前并不适于液体活检。

1.3 检测样品及指标 肿瘤液体活检对检测样品没有特殊要求,凡是能够充分反映肿瘤情况的体液均可以用于液体活检。外周血是最常用的检测样品,其它例如粪便、尿液、唾液、脑脊液等,使用也较多。液体活检的检测指标也多种多样,其中核酸变异,包括点突变、插入或缺失突变、融合基因、基因拷贝数变化、DNA 甲基化水平等,是与肿瘤最为相关的指标。其它常见的指标还包括:病毒的基因组、RNA、循环肿瘤细胞等。

1.3.1 循环肿瘤细胞 循环肿瘤细胞(CTC)是一种由肿瘤原发灶或转移灶产生,经血管或淋巴管等释放到外周血的肿瘤细胞^[12]。研究表明,肿瘤组织释放大量的 CTC 到血液中。例如一项研究发现,复发性前列腺癌患者外周血中 CTC 平均检出率高达 50 个/毫升^[13]。尽管 CTC 数量较多,其中仅有小部分 CTC 能够定植并形成转移灶。通过检测血液中 CTC,研究者可以了解患者的肿瘤负荷、基因变异,甚至可以培养 CTC 用于个体化药敏筛查。现有比较成熟的 CTC 捕获方法主要有 CellSearch 系统(Veridex),已被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于乳腺癌、前列腺癌或结直肠癌患者^[14]。该系统采用抗体识别肿瘤表面的上皮细胞粘附分子(EpCAM)和细胞角蛋白来捕获 CTC。为了进一步提高捕获成功率,研究者开始测试其它标志物,包括唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)、Hepar 1 和氨酰磷酸合成酶 1 等^[15]。此外,另外根据 CTC 的物理特性,包括 CTC 的大小、密度、变形性和电荷量等,可采用离心、过滤或微流控装置捕获 CTC,如 ISET 膜过滤何 Onco-Quick 分离体系等^[16]。这些依赖于物理特性的方法对 CTC 实现的捕获和分离特异性没有根据肿瘤抗原决定簇强,故依然会存在一定的偏好性,遗漏掉很多较小的 CTC。目前 CTC 的应用主要限于中晚期肿瘤,一般不认为 CTC 会在肿瘤发生早期出现。因此,目前 CTC 不作为肿瘤早期诊断的指标,主要应用于肿瘤患者的预后、评估治疗反应准确性和有效性^[17]。

1.3.2 循环游离 DNA 循环游离 DNA (circulating cell-free DNA) 是一种存在于血液、脑脊液等体液中的胞外 DNA,以单链或双链 DNA、DNA-蛋白复合物等形式存在,分子长度为 150—210000 bp^[18]。cfDNA 来源于体内凋亡细胞释放入血的 DNA;来源于肿瘤细胞的 cfDNA 被称为 ctDNA。ctDNA 片段长度约 170 bp,半衰期约为 2 h^[19]。ctDNA 与肿瘤突变负荷成正比^[20]。但也有研究表明在某种情况下,可同时发现存在较长或较短的 ctDNA 聚集现象^[21-22],研究表明血液里的 ctDNA 含量越高,可提示肿瘤进展。其

他的一些情况也会增加血液里 ctDNA 的含量,如自身免疫病等。故现在很多学者都开始趋向 ctDNA 的表观遗传学方向的研究,如甲基化水平。由于 ctDNA 具有半衰期短、高度片段化、样本中浓度较低等特点,故比较适合高通量测序平台。

1.3.3 排泄物及其它体液 人类肠道上皮大约一周更新一次,大量的正常上皮细胞、癌前病变期上皮细胞、肿瘤上皮细胞等都会随之脱落;同时粪便中还混有大量的细菌、食物残渣等。通过采集粪便,便能够方便的分离含有癌前病变、早癌的核酸。通过设计合适的引物、探针等,能够特异性俘获人体 DNA;结合高灵敏的深度测序或 PCR 技术,能够检出肿瘤相关的基因变异,从而对肿瘤存在与否进行预测。

与消化道类似,尿液中也含有泌尿系统脱落的细胞、核酸等。通过检测尿液中的标志物,可以发现肾癌、膀胱癌等常见肿瘤。其它与潜在癌变组织直接接触的体液,如脑脊液、唾液、胃液、分泌物等,理论上都可以被采集用于肿瘤的早期诊断。尽管这些领域目前成果不多,但正处于活跃的研究中,相信未来几年中会有许多重大发现产生。

1.3.4 外泌体 外泌体是细胞向胞外分泌的大小均一的囊泡类小体,直径为 30-100 nm,具有典型的脂质双分子膜结构,存在于细胞培养上清液、血清、唾液、尿液及其他体液中。外泌体携带有母细胞的多种成分,如蛋白质、脂质类、DNA、RNA 等。功能研究表明外泌体可能在细胞间的物质交流和信息传递中发挥一定作用^[23-25]。不仅如此,由于外泌体含有与肿瘤相关的蛋白、DNA 和 RNA 等潜在肿瘤标志物,因而外泌体也可作为液体活检的靶标。

与正常细胞相比,肿瘤细胞会分泌更多的外泌体,并且含有肿瘤相关的遗传信息。研究者^[26]用电镜拍摄到了神经胶质瘤细胞的外泌体(EVs)从分泌到脱落的图像,证实了肿瘤细胞可以分泌 Evs;在非小细胞肺癌的研究中,研究者发现,肺癌患者与未患病对照组之间的总体 miRNAs 水平存在显著差异,且患者循环系统中的外泌体与肿瘤细胞释放的外泌体之间,其 miRNAs 组分有很强的相似性,表明循环系统中外泌体包含的 miRNAs 有望成为肺癌筛查的分子靶标^[27];胰腺导管腺癌由于难以早期诊断,具有预后差、高转移的特点,而最近研究者发现,外泌体 miR-10b 和 miR-30c 可作为胰腺癌标志物,这一发现为胰腺癌的前期诊断提供十分重要的依据^[28]。

2 液体活检在肿瘤早筛中的应用

肿瘤是一种基因病,肿瘤的发生和发展是一个多步骤、多阶段基因变异的过程。随着基因组变异的积累,细胞生长逐渐失控,对各种环境因素的:原发灶肿瘤细胞无限扩增后个别细胞脱落进入基质,同时释放多种水解酶,侵袭基底膜,进入脉管系统,此时侵袭进入循环系统的大部分癌细胞死亡(失巢凋亡)而转移能力高的细胞在循环系统中相互聚集形成小的癌栓,以抵抗易损因素,然后肿瘤

细胞—血小板簇粘附锚定在内皮细胞表面,诱导脉管基底膜降解,逸出循环系统,最后在细胞外基质中移行,待条件适宜,重新进入细胞周期,开始恶性增殖,形成转移灶。这个过程一般需要较长时间,如果能在肿瘤原发灶转移前,即肿瘤癌前病变期,筛查出肿瘤,然后进行适宜的临床干预与治疗,将肿瘤彻底遏制在原发灶期,以实现从本质上防治肿瘤。

2.1 液体活检与结直肠癌的早筛 结直肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤,年发病人数占所有肿瘤 9.88%,位居恶性肿瘤发病率第 3 位,仅次于肺癌和胃癌。由于国民饮食习惯的改变,肠癌发病率逐年增高,在城市中肠癌发病率已经超过胃癌^[1]。由于早期症状不明显,多数结直肠癌确诊时已届中晚期,疗效不佳,故结直肠癌的早期发现和尽早预防至关重要。

肠上皮脱落细胞经粪便排出,其中携带有结直肠癌标志物,为结直肠癌早期筛查提供了便利,因此粪便 DNA 检查成为目前肠癌早期筛查研究的热点。目前临床主要通过粪便潜血试验或免疫化学法检测粪便中的红细胞,从而对肠癌进行预测。但该方法敏感性约 25%–40%,不能令人满意^[29]。2014 年 Thomas F 等研究者在 10000 例以上的前瞻性队列中,利用液体活检技术检测粪便 DNA 中 KRAS 突变、NDRG4 和 BMP3 甲基化异常。结果表明该试验对结直肠癌和癌前病变检出率分别达到 92.3%和 42.2%,较现有的潜血试验有了显著提高^[30]。目前该试验已经研制成结直肠癌早期筛查试剂盒,并获得美国 FDA 批准上市。

除了上述研究外,多内外多个科研机构和公司也开展了类似研究。一项荟萃分析对这些研究进行了总结^[31]。该研究纳入了 38 项研究共计 4867 例受试者,结果显示粪便 DNA 甲基化检测对不同分期的肠癌诊断敏感性为 0%–100%,特异性达到 73%–100%。常用的诊断标志物包括 SFRP1、SFRP2、NDRG4、VIM 等^[31]。我国在粪便 DNA 检测方面开展了较多研究,2018 年中国国家药品监督管理局同样批准一款粪便 DNA 检测产品上市,该试剂盒基于 SDC2 基因甲基化对肠癌进行早筛。据悉,该试剂盒经过 1213 例有效病例的临床验证,敏感性高达 84.22%,特异性为 97.85%;对 I/II 期肠癌的检出率达到 86.71%^[32]。此外,国内还有多家从事粪便基因检测的公司,产品处于测试、申报等不同阶段,预计未来会有更多的产品上市。

除了粪便 DNA 甲基化检测试剂盒外,中国国家药品监督管理局还批准了多个肠癌早期筛查试剂盒,包括粪便“miR-92a 检测试剂盒(荧光 RT-PCR 法)”^[33]、血液“Septin9 基因甲基化检测试剂盒”^[34]等。目前,这些试剂盒的临床应用仍然有限,我们期待将来有更多的实际应用数据呈现,来进一步证实这些早筛项目的可行性和有效性。

2.2 液体活检与鼻咽癌的早筛 鼻咽癌是指发生于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性肿瘤。是我国高发恶性肿瘤之一,发病率为耳鼻咽喉恶性肿瘤之首。在我国南方,鼻咽癌发病率高且稳定,特别是广东、广西、湖南、福建、海南为鼻咽癌

高发区^[35]。鼻咽癌中几乎均能检测到 EBV 感染,2017 年发表在《新英格兰医学杂志》上的一篇研究中尝试通过检测外周血 EBV 来诊断鼻咽癌。该研究对香港地区 20174 名受试者进行血浆 EBV DNA 载量连续监测,最终发现 34 例鼻咽癌患者,其中 71%患者属于早期(I、II 期);该试验诊断鼻咽癌敏感性为 97.1%,特异性为 98.6%。该研究表明外周血 EBV DNA 是可靠的鼻咽癌早诊指标,有望应用于鼻咽癌高发地区的人群筛查^[36]。与上述研究不同,笔者采用 ELISA 法联合检测 EBV VCA/IgA 和 EBNA1/IgA 抗体来筛查鼻咽癌。由于鼻咽癌发病率相对较低,该试验在人群筛查研究中阳性预测值仍不理想(<5%)。由于鼻咽部较为表浅,其它研究者尝试直接对鼻咽脱落细胞进行采样。例如,Octavia Rama-yanti 等采集受试者的鼻咽拭子、外周血和病理组织标本,对三种样品的 EBV DNA 拷贝数、全基因组甲基化状态及 RNA 表达谱进行检测,结果显示鼻咽脱落细胞更能真实反映原发癌的状态,是一种潜在可用于鼻咽癌早期筛查的微创取样方法^[37]。

2.3 液体活检与泛肿瘤早筛 泛肿瘤早筛(pan-cancer screening)是指通过一种检测实现多种肿瘤的早期筛查目的。对于大部分非肿瘤患者来说,针对多种肿瘤的液体活检显然比只针对某种肿瘤的检测更加高效。多瘤种早筛需要同时检测更多的指标,因此具有更高通量、更高敏感性的高通量测序技术是实现多瘤种早筛的主要技术。目前多个机构正在研究如何利用高通量测序技术检测 cfDNA 来早期诊断肿瘤,已经取得较大进展。

美国 Grail 公司最早专注于用于癌症早筛的液体活检技术开发,该公司启动了一项大规模肿瘤早筛研究计划:CCGA(The Circulating Cell-free Genome Atlas)。该项目计划对 15000 名受试者进行 cfDNA 液体活检以筛查肿瘤风险,检测内容包括 507 个基因的靶向深度测序、全基因组测序及全基因组甲基化测序等。在 2018 年美国癌症研究协会(ASCO)年度大会上,Grail 公司发布了该研究的初步结果^[38]。研究纳入了 1785 名受试者(984 例肿瘤,749 例正常),然后随机划分到训练集(training set)或验证集(testing set)。研究结果显示,该试验诊断肿瘤的特异性达到 99%。对于 cfDNA 较少的早期癌症(I、II 期),三种检测的敏感性均超过 60%;而在晚期癌症中检测敏感性超过 80%。另一家来自美国的基因检测公司 Guardant Health 也在研发液体活检肿瘤早筛技术。该公司结合其晚期肿瘤 cfDNA 靶向深度测序数据及 cfDNA 全基因组测序数据,开发了“LUNAR”试验,检测指标包括基因突变和 DNA 甲基化^[39]。

除了高通量测序以外,研究人员还尝试加入其它非基因指标,以增强液体活检诊断早期肿瘤的准确性。例如在 2018 年发表的一篇研究中,研究者把基于 16 个基因 64 个扩增子的靶向高通量测序与 8 个血清蛋白检测联合起来,命名为“CancerSEEK”试验,用于对 1000 名来自 8 种不同肿瘤类型的患者进行检测。该试验对肿瘤的总体检出率达到 70%,其中对卵巢癌和肝癌检出率高达 98%,而肺癌、胃

癌、胰腺癌和食管癌的检出率也达到60%~70%。

受到上述积极结果的影响,国内测序公司也纷纷开始自己的肿瘤早筛计划。例如,“先知”计划预期入组来自14种肿瘤类型的12000例患者,包括10000例早期肿瘤患者。其计划对500个基因进行深度测序^[40]。另外一家公司开发了cfDNA无创甲基化检测系统(MERMAID),用于肺部占位病变(如肺癌)的早筛。初步结果显示,利用该液体活检技术诊断早期肿瘤,可实现99.6%的敏感性和100%的特异性;用于肺部结节良恶性判定可实现84.8%的敏感性和87.5%的特异性^[41]。

早期诊断不仅限于早期肿瘤的初次诊断,也可以是对肿瘤残留或复发的早期诊断。微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)液体活检可以应用于微小残留病灶和肿瘤复发监测^[42]。例如,一项研究取肠癌患者根治性切除肿瘤组织进行高通量测序,筛选出体细胞染色体结构变异(SSV),进而对每个SSV设计数字PCR试验。研究者对患者长期随访并连续采集外周血标本,采用数字PCR试验进行检测。结果发现,该试验比常规肿瘤复发监测手段(CEA和CT)更早发现肿瘤复发或残留,提前时间为2~15个月^[43]。上述研究表明,肿瘤液体活检在微小残留病灶和肿瘤复发监测领域同样具有明显优势,有望帮助早期发现和治理肿瘤,提高患者预后。

展望

液体活检技术目前正处于高速发展之中,大量的研究成果不断发表出来。液体活检在样本来源、检测靶标、检测技术等方面具有多种选择。从样本来源看,基于血液的早筛指标具有广谱性,理论上可以同时绝大部分肿瘤进行筛查,因此最有希望成为泛肿瘤早筛的主流技术。从检测靶标看,多基因cfDNA甲基化检测和突变检测走在了前列,是未来最有可能取得突破的方向。从检测技术看,基于高通量测序的液体活检技术拥有更高的敏感性和通量,已经成为目前肿瘤早筛研究的主流技术。

然而我们也要注意,尽管已经有大量的肿瘤早筛文章发表,但绝大部分研究质量并不高。这些研究并非按照完整的诊断实验设计,没有在大样本非肿瘤人群中进行前瞻性验证,也没有经历较长时间的随访来明确其较现有早筛手段的优势。因此结论可靠性有限。从另一个角度看,即使是晚期肿瘤的液体活检,现阶段尚处于产品研发、临床验证阶段。用于早筛的液体活检,由于肿瘤负荷更低,产品和技术开发难度更大。因此,我们应该客观看待液体活性的优势及潜在的不足,加大研发相关技术手段,使液体活检技术得到不断完善,从而更好地服务精准医学和肿瘤早筛。

参考文献

[1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,曾红梅,邹小农,陈茹,顾秀瑛,魏文强,赫捷,等.2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J].中华肿瘤杂志,2019,41(1):19-28.

- [2] R.L.Siegel, K.D.Miller, A. Jemal, Cancer Statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67: 7-30.
- [3] 于亚南,孙学峰.乳腺钼靶与超声联合检查在早期乳腺癌筛查中的应用[J].Bao Jian Wen Hui, 2016,(10):1-30.
- [4] Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme[J]. CR Soc Biol Fil, 1948, 142(3-4):241-243.
- [5] Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J].Lancet 1997,350:485 - 87.
- [6] Muro T, Fujihara J, Imamura S, et al.Determination of ABO genotypes by real-time PCR using allele-specific primers[J]. Leg Med, 2012, 14(1):47-50.
- [7] Pettersson M, Bylund M, Alderborn A. Molecular haplotype determination using allele-specific PCR and pyrosequencing technology[J]. Genomics, 2003, 82(3):390-396.
- [8] Hiroshige K, Soejima M, Nishioka T, et al. Simple and Sensitive Method for identification of Human DNA by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction of FOXP2 [J]. J Forensic Sci, 2009,54(4):857-861.
- [9] Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients [J]. Clin Chem, 2013, 59(12):1722-1731.
- [10] Sanmamed MF, Fernández landázuri S, Rodríguez C, et al. Quantitative cell-free circulating BRAF V600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors [J]. Clin Chem, 2015, 61(1):297-304.
- [11] Alakus H, Babicky ML, Ghosh P, et al.Genome-wide mutational landscape of mucinous carcinomas of peritoneal appendiceal origin[J]. Genome Med, 2014, 6(5):43.
- [12] Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C.Cell-free circulating tumor DNA in cancer[J]. Chin J Cancer, 2016, 35(1):36.
- [13] Sequist L V, Louis D N, Morgan B P, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and independent sorting of rare circulating tumor cells [J]. Science Translational Medicine, 2013, 5(179):179.
- [14] Negin BP, Cohen SJ. Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges[J]. Curr Treat Options Oncol, 2010, 11(1-2):1-13.
- [15] Li J, Chen L, Zhang X, et al. Detection of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma using antibodies against asialoglycoprotein receptor, carbamoyl phosphate synthetase 1 and pan-cytokeratin[J]. PLoS One, 2014, 9:e96185.
- [16] Henry K. Lin1, Siyang Zheng, Anthony J. Williams, Marija Balic, Susan Groshen, Howard I. Scher, Martin Fleisher, Walter Stadler, Ram H. Datar, Yu-Chong Tai, and Richard J. Cote. Portable Filter-Based Microdevice for Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(20):5011-5018.

- [17] Fehm T, Solomayer EF, Meng S, et al. Methods for isolating epithelial cell and criteria for their classification as carcinoma cells[J]. *Cytotherapy*, 2005, 7:171.
- [18] Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: An upcoming molecular marker in exercise physiology [J]. *Sports Med*, 2012, 42(7):565-586.
- [19] 李君, 李泰伯. 循环肿瘤 DNA 及其癌症液体活检中的应用[J]. *转化医学杂志*, 2017, 4(3):1-6.
- [20] Yi X, Ma J, Guan Y. The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumordynamics [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(12):2642-2647.
- [21] 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, 61:1659-65.
- [22] Jiang P, Chan CW, Chan KC, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepato-cellular carcinoma patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112:E1317-E1325.
- [23] Terrasini N, Lionetti V. Exosomes in critical illness [J]. *Crit Care Med*, 2017, 45(6): 1054-1060.
- [24] Santangelo L, Battistelli C, Montaldo C. Functional roles and therapeutic applications of exosomes in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:2931813.
- [25] Hyenne V, Lefebvre O, Goetz JG. Going live with tumor exosomes and microvesicles [J]. *Cell Adh Migr*, 2017, 11(2):173-186.
- [26] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells [J]. *Nature cell biology*, 2008, 10(5):619.
- [27] Rabinowitz G, Gercel-Taylor C, Day J M, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer [J]. *Clinical lung cancer*, 2009, 10(1):42-46.
- [28] Lai X, Wang M, McElyea S D, et al. microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer [J]. *Cancer letters*, 2017, 393: 86-89.
- [29] Iannone A, Losurdo G, Prizzi M, et al. Stool Investigations for Colorectal Cancer Screening: From Occult Blood Test to DNA Analysis [J]. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 2016, 47(2): 143-151.
- [30] Thomas F. Imperiale, M.D., David F. Ransohoff, M.D., Steven H. Itzkowitz, M.D., Theodore R. Levin, M.D., Philip Lavin, Ph.D., Graham P. Lidgard, Ph.D. David A. Ahlquist, M.D. and Barry M. Berger, M.D. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 370:14.
- [31] Afsaneh M S, Maryam Y, Mehdi N, et al. The importance of stool DNA methylation in colorectal cancer diagnosis: A meta-analysis [J]. *PLOS ONE*, 2018, 13(7):e0200735.
- [32] 广州市康立明生物科技有限责任公司. 长安心肠癌检测试剂盒. <http://news.bioon.com/article/6730269.html>
- [33] 晋百慧生物. 睿肠太 TM 肠癌检测试剂盒. <https://genebio-health.com/col.jsp?id=154>
- [34] 博尔诚(北京)科技有限公司. Septin9 基因甲基化检测试剂盒. http://www.biochainbj.com/columns_detail/columnsId=82.html
- [35] 魏矿荣, 余元龙, 杨有业, 等. 中国鼻咽癌流行概况 [J]. *实用预防医学*, 2016, 25(11):835-840.
- [36] K.C. Allen Chan, F.R.C.P.A, John K.S. Woo, F.R.C.S, Ann King, F.R.C.R, Benny C.Y. Zee, Ph.D, W.K. Jacky Lam, F.R.C.S, Stephen L. Chan, F.R.C.P, Sam W.I. Chu, B.Sc, Constance Mak, B.S.N, Irene O.L. Tse, B.N, Samantha Y.M. Leung, B.N, Gloria Chan, R.N, Edwin P. Hui, F. R. C.P, Brigitte B.Y. Ma, M.D., Rossa W.K. Chiu, F.R.C.P.A, Sing-Fai Leung, F.R.C.R, Andrew C. van Hasselt, F.R.C.S, Anthony T.C. Chan, F.R.C.P and Y.M. Dennis Lo, F.R.S. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2017, 377; 6.
- [37] Octavia Ramayanti, Hedy Juwana, Sandra A.M.W. Verkuijlen, Marlinda Adham, Michiel D. Pegtel, Astrid E. Greijer and Jaap M. Middeldorp. Epstein-Barr virus mRNA profiles and viral DNA methylation status in nasopharyngeal brushings from nasopharyngeal carcinoma patients reflect tumor origin [J]. *International Journal of Cancer*, 2017, 140, 149-162.
- [38] Klein E, Hubbell E, Maddala T, et al. Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: The Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) study. *ASCO*, 2018, Abstract, 12021, #134.
- [39] Guardant Health: <https://guardanthhealth.gcs-web.com/news-releases/>
- [40] 因合生物. “先知”计划, 开展 1 万例肿瘤早筛样本研究. <http://www.bio4p.com/depth/14535.html>
- [41] 燃石医学. 肺癌个体化液体活检. <http://www.brbiotech.com/?list=934.html>
- [42] Siravegna G, Bardelli A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(8):449.
- [43] Reinert T, Scholer L V, Thomsen R, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery [J]. *Gut*, 2016, 65(4):625-343.