

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.003

· 专家论坛(专题) ·

## 循环肿瘤 DNA 的研究进展

郭巧梅, 姜加陶 (上海交通大学附属上海胸科医院 检验科, 上海 200030)

[摘要] 循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是由肿瘤细胞释放到循环系统中的基因组小片段,其来源于机体所有荷瘤部位,具有含量极低、个体间差异大、半衰期短、匀质性、携带有肿瘤特异性遗传学/表观遗传学变异等特点,与肿瘤的发展进化、休眠耐药、转移复发等密切相关,正逐渐成为肿瘤学分子研究领域的热点。目前针对 ctDNA 的检测方法和平台种类繁多,主要分为基于 PCR 和二代测序(next-generation sequence, NGS)的方法,二者各有利弊,需要根据研究目的灵活选择并建立统一标准。随着相关技术的发展和法规的不断完善,ctDNA 可作为癌症筛查、早期诊断、个体化治疗及预后评估理想的血源性生物标志物,在肿瘤的精准医疗中必将大放异彩。

[关键词] 循环肿瘤 DNA;肿瘤;表观遗传学变异;二代测序

[中图分类号] R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2016)05-0601-08

## Research progress of circulating tumor DNA

GUO Qiaomei, LOU Jiatao(Laboratory Medicine, Shanghai Chest Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] Circulating tumor DNAs(ctDNAs) are small genomic fragments released by tumor cells into circulatory system, which come from all of tumor bearing parts of the patients, have characters of extremely low content, great difference among the patients, a short half-time, homogeneous and carrying tumor-specific genetics and epigenetic mutations, and so on, are closely related to development, evolution, dormancy, drug resistance, metastasis and recurrence of the tumor and are gradually becoming key approach in molecular research field of oncology. At present, there is a wide variety of detection methods and platforms for ctDNA, which are mainly divided into PCR-based assay and next-generation sequencing(NGS), each of both them has their own advantages and disadvantages, and need to be flexibly selected according to research objective, and uniform standards should be established. ctDNA could become as an ideal hematogenous biomarker for tumor screening, early diagnosis, individually therapy and prognostic assessment with development of related techniques and continuous improvement of laws and regulations. This paper reviewed research progresses of ctDNA in the field of oncology.

[Key words] circulating tumor DNA(ctDNA);tumor; genetic and epigenetic mutations;next-generation sequence

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 601-608. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.003]



**姜加陶** 医学博士、副主任技师、硕士生导师,现任上海交通大学附属胸科医院检验科主任。主要从事胸部肿瘤早期诊断和个体化诊断以及肺癌发生发展机制的研究,在 *EMBO J*、*PLoS One* 和 *Cancer Res* 等杂志上发表多篇论文,作为第一承担人负责国家自然科学基金面上项目和上海市科委重点项目、自然科学基金项目及

科技攻关项目等多项研究课题。

近年来,液体活检在精准医疗领域备受青睐,而作为液体活检的明星分子之一,循环肿瘤 DNA(cir-

[基金项目] 国家国际科技合作专项资助项目(No. 2014DFA33010);上海申康医院发展中心市级医院临床辅助科室能力建设项目(No. SHDC22014011)。Project supported by the International Science & Technology Cooperation Program of China(No. 2014DFA33010),and the Clinical Ancillary Departments Capacity Building Project of Hospital Development Center of Shanghai(No. SHDC22014011)

[作者简介] 郭巧梅(1989-),女,河南鲁山人,硕士,主要从事胸部肿瘤早期诊断和个体化诊断的研究以及肺癌发生发展机制的研究, E-mail: guoqm2013@163.com

[通信作者] 姜加陶(LOU Jiatao, corresponding author), E-mail: loujiatao@126.com

[优先发表]

culating tumor DNA, ctDNA)检测正成为肿瘤学分子研究领域的重要手段。ctDNA是体液中全部游离循环DNA(cell-free nucleic acid, cfDNA)的一种,是仅由肿瘤细胞释放的携带有肿瘤特异性遗传学改变的自由基因组片段<sup>[1]</sup>,这些遗传学改变与肿瘤发生发展、抵抗性耐药及复发转移等密切相关<sup>[2,4]</sup>,是癌症散落在血液中的信息密码,对于肿瘤的诊断、治疗及预后评估具有重要价值。本文将从ctDNA的发现、检测方法尤其是数字PCR(digital PCR, dPCR)及二代测序(next-generation sequence, NGS)技术的研究进展以及ctDNA在肿瘤精准医疗中的应用作一阐述。

## 1 ctDNA的发现及其检测技术的发展

早在1948年, Mandel和Métais<sup>[5]</sup>即通过高氯酸沉淀的方法首次发现了人类血液中cfDNA的存在,当时人类还未意识到DNA是遗传物质,这一报道也未引起免疫学界的足够重视。1977年,人类第一次发现肿瘤和血清中cfDNA的含量存在一定关系<sup>[6]</sup>,但当时无法知道这些cfDNA是来自于正常组织还是肿瘤细胞。直到1989年, Stroun等<sup>[7]</sup>通过DNA链的热力学稳定性比较,才首次确认肿瘤患者血浆中cfDNA有一部分来自于肿瘤细胞。自此,游离核酸检测开始受到研究者的关注并逐渐发展起来。1994年, Sorenson等<sup>[8]</sup>和Vasioukhin等<sup>[9]</sup>采用PCR技术分别在胰腺癌和白血病患者血浆/清中检测到了突变的Ras原癌基因片段,至此,人们才认识到cfDNA的重要性。随后,不同类型癌症血中ctDNA的肿瘤相关遗传学改变先后得到证实<sup>[10]</sup>。近年来,随着高灵敏和高特异检测技术的发展,ctDNA作为血源性生物标志物的研究在相关领域得到了飞速发展。

## 2 ctDNA的生物学特性

ctDNA的来源和释放机制至今仍不清楚。目前认为,ctDNA来源于肿瘤原发灶、转移灶和循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)等。ctDNA的释放机制包括凋亡、坏死及分泌等方式,其中以凋亡释放为主<sup>[11]</sup>,但释放的速率和水平尚无定论。据估计,一个质量100g的实体肿瘤约有 $3 \times 10^{10}$ 个癌细胞,每天可释放3.3%肿瘤细胞的DNA入血<sup>[12]</sup>。人的单个体细胞约含有6.6pg的基因组DNA<sup>[13]</sup>,而晚期癌症患者每毫升血浆中约含有17ng的游离DNA<sup>[14]</sup>,相当于大约5000个单倍体细胞的基因组当量。

### 2.1 ctDNA的含量极低,在不同类型癌症及个体间

基线波动较大

ctDNA在血循环中的含量很低,且极易被丰度较高的非ctDNA污染和稀释,尤其是早期癌症患者;而且原发性脑瘤患者的ctDNA可能由于血脑屏障的阻隔作用难以在外周血中被检测到,这给ctDNA的检测带来了极大挑战。另外,ctDNA含量在不同癌症间差异明显,即使同一癌症类型的不同个体间ctDNA的含量差异也很大<sup>[15]</sup>。在同一患者体内,ctDNA水平随“肿瘤负荷”及疾病严重程度而变化<sup>[4, 15-16]</sup>,因此高浓度ctDNA的存在往往预示着癌症晚期及不良预后。

### 2.2 ctDNA具有显著的片段化特征和很短的半衰期

ctDNA的释放是以核小体作为载体的,核小体以单个、二联或三联的形式进入血液,并逐步分解,因此大部分的ctDNA都表现出显著的片段化特征,缠绕在每个核小体及其连接区域的DNA长度为166~180bp<sup>[11, 17]</sup>,因此ctDNA长度为150~200bp或它的倍数<sup>[11, 18]</sup>。另外其血循环中的半衰期不足2h<sup>[1]</sup>,血中浓度能实时反映肿瘤的最新动态变化。

### 2.3 ctDNA能够更全面地反映肿瘤的整体特征

ctDNA来源于机体所有荷瘤部位,包括肿瘤原发灶、转移灶,甚至微小残留病灶<sup>[19]</sup>。肿瘤异质性包括空间和时间上的,一方面局部穿刺标本难以准确反映肿瘤的整体特征,而且随着治疗选择压力导致的肿瘤演变以及耐药基因的出现,仅仅依靠治疗前组织标本去指导后续临床决策可能会造成治疗的偏倚;另一方面,对于无法进行或不耐受组织活检的患者,液体活检可以作为一个良好的补充检查手段。由于不同部位的肿瘤都会持续释放ctDNA进入循环系统,因此,血液中匀质性的ctDNA检测比局限性的组织活检具有更好的代表性。Muhammed等<sup>[20]</sup>对一个ER<sup>+</sup>HER2<sup>+</sup>的转移性乳腺癌患者进行了长达1193d的随访,收集不同时间点对应的肿瘤组织(包括原位和转移灶)和血样本进行外显子及靶向扩增子测序,证实ctDNA确实来自于所有的肿瘤组织,并能真实反映肿瘤的克隆异质性。

### 2.4 ctDNA携带有肿瘤特异性的遗传学信息

ctDNA最显著的特征是体细胞变异(somatic variation)的存在,包括单核苷变异(single nucleotide variants, SNV)、短的插入缺失(insertion-deletion, IN-DELS)、拷贝数变异(copy number variations, CNV)以及结构变异(structural variation, SV)等<sup>[14]</sup>,其中最常见变异模式是点突变。由于肿瘤细胞的克隆性质,ctDNA中的核酸序列与组织样本来源的肿瘤特异性核酸序列保持着高度的一致性。因此,通过分

析 ctDNA 的遗传学变异类型与数量, 可以确定对该变异类型敏感的治疗手段和靶向药物, 对肿瘤治疗进行预后监测, 最终形成针对性的个体化诊疗方案。

### 3 ctDNA 的检测方法

由于 ctDNA 仅占 cfDNA 的 1%, 甚至 0.01%<sup>[1]</sup>, 其检出率高度依赖于肿瘤发展阶段、肿瘤类型和检测方法。近年来, 高敏感性和高特异性的检测技术在肿瘤学领域层出不穷, 主要分为两个方面: 一是 ctDNA 的浓度或含量检测, 二是 ctDNA 的遗传学变异检测。根据所依赖的技术平台, ctDNA 检测方法大致可以分为两类: 一类是针对少量已知突变的基于 PCR 的检测方法, 主要以扩增阻滞突变系统 PCR (amplification refractory mutation system-PCR, ARMS-PCR)、数字 PCR、磁珠乳液扩增方法 (beads、emulsion、amplification、magnetics, BEAMing) 为代表; 另一

种是靶向多基因的基于 NGS 技术的方法, 主要是选定十几到几十个肿瘤相关基因进行测序, 技术关键在于如何富集这些相关基因。根据富集策略的不同, 基于 NGS 的技术目前又可分为靶向扩增子测序 (targeted amplicon Seq, TAS) 及目标序列捕获测序 (targeted capture sequencing, TCS): 前者是针对目的基因设计几十对甚至上百对 PCR 引物, 利用多重 PCR 扩增富集, 代表性方法有标记扩增深度测序 (tagged-amplicon deep sequencing, TAM-Seq)<sup>[21]</sup>、环化单分子扩增与重测序技术 (circulating single-molecule amplification and resequencing technology, cSMART)<sup>[22]</sup> 等; 而后者是针对目的基因设计探针, 通过捕获杂交的方法富集, 该方法较为经典的是深度测序肿瘤个体化建档法 (cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-Seq)<sup>[23]</sup>。各种 ctDNA 检测方法的比较见表 1。

表 1 各种 ctDNA 检测方法的比较

方法	原理	体外灵敏度 (%)	优点	缺点
PCR 平台			简便快捷、特异性好、灵敏度高	通量低, 不能发现新的突变
ARMS <sup>[24]</sup>	3'端错配原则	0.5 ~ 1	除上述 PCR 平台优点外, 是法规支持的肿瘤基因检测的主流方法, 技术普及度高	随检测的突变位点或类型的增多而增加非特异性结合概率和模板用量
BEAMing <sup>[2,25]</sup>	数字 PCR 结合流式细胞术	0.01 <sup>[25]</sup>	灵敏度高于 q-PCR	操作复杂, 通量低; 单分子扩增在非均一的微滴中实现, 且需要 PCR 预扩增, 会增加实验误差
dPCR	单分子水平 PCR 结合荧光信号检测	0.005 ~ 0.01	除上述 PCR 平台优点外, 可绝对定量, 是目前灵敏度最高的检测技术	生成微滴须服从泊松分布, 不适合高浓度 DNA 样本检测
NGS 技术			可检测未知突变, 检测基因数量不受限制	技术复杂不易普及标准化, 建库过程原始信息丢失严重, 限制了敏感度潜力发挥, 数据解读困难, 仪器与试剂成本高
TAM-Seq	标记扩增深度测序	2	单分子检测, 应用前景良好	同 NGS 技术缺点
Safe-Seqs <sup>[26]</sup>	将每个模板分子分别标记后进行扩增的安全测序系统	0.02 ~ 0.001	将每个模板分子标记独特的标志物 (或者条形码), 提高了 NGS 的敏感度	同 NGS 技术缺点
CAPP-Seq	靶向区域捕获测序	0.02	针对非小细胞肺癌具有高效的靶向捕获能力, 应用前景良好	除 NGS 技术缺点外, 针对不同的肿瘤需定制不同的筛选器, 可能会增加成本
cSMART	环化单分子扩增与重测序	0.03	能确保血浆游离 DNA 的高效富集, 并对其进行精确的绝对定量	目前针对非小细胞肺癌检测只有 10 对基因组合

在基于 PCR 平台的技术中, dPCR 作为一种全新的核酸检测和定量方法, 以操作快速、敏感性高及简捷的突变率计算见长, 是核酸绝对定量和罕见等位基因检测的理想选择, 尤其适用于 ctDNA 定量及分析。但是 dPCR 只能针对明确已知的突变位点, 且可同时检测位点的通量较低, 随着越来越多的驱动基因的发现, 仅检测几个基因变异是不够的, 需要建立多基因检测平台。NGS 技术以通量大、时间短、精度高和信息量丰富等特点见长, 极大地拓宽了基因测序的应用范围, 促进了分子诊断方法的革新, 已成为测序市场的主流。基于 NGS 技术的 ctDNA 检测可以对多个基因同时分析, 对各种肿瘤相关基因的覆盖更加全面, 而多基因组合又大大提高了对肿瘤诊断的敏感性和特异性。由于 NGS 技术在建库及测序过程中会产生较高的错误率, 不能用于检测频率低于 1% 的稀有变异<sup>[27]</sup>, 而 ctDNA 在 cfDNA 中比例较少 (0.01% ~ 1%), 该技术直接用于 ctDNA 检测显然不能满足要求。因此, 基于 NGS 技术的 ctDNA 检测方法首先需要保证肿瘤相关基因富集的过程高效均一, 甚至需要采用突变特异的富集方法, 从而最大可能地检测到来自肿瘤的突变 DNA。其次, ctDNA 的检测需要大大增加测序深度 (1 万倍以上), 使突变检出率达到 0.02%<sup>[23]</sup>; 近年来, 很多研究者将每个模板分子标记独特的标志物 (或者条形码), 提高了 NGS 的敏感度<sup>[26, 28]</sup>。

### 3.1 数字 PCR

数字 PCR 的概念早在 1999 年就由美国约翰·霍普金斯大学 Ludwig 中心联合主任 Vogelstein 与 Kinzler<sup>[29]</sup> 首次提出, 其定义为一种能够实现复杂来源样品中极低含量核酸分子 (DNA 或 RNA) 稳定检出的一种基于 PCR 的绝对定量技术。基本原理是将样品处理分割成多个单独的实时荧光定量 PCR 反应, 每个反应包含或不包含一个或多个拷贝的目标分子 (DNA 模板), 实现“单分子模板 PCR 扩增”, 反应结束后, 对每个反应单元进行检测, 以“扩增终点信号的有或无”作为结果判定的标准, 其中一部分反应含有靶标分子 (阳性), 而其余反应则不含靶标分子 (阴性)。在经过 PCR 扩增和信号分析后, 根据阴性反应的比例对样品中的靶标分子数目进行绝对计数, 而不必参照标准品或内源性对照<sup>[30]</sup>。

数字 PCR 的敏感性极高, 其实验中标准反应体系分配的过程可以极大程度地降低与目标序列有竞争性作用的背景序列浓度, 本质是把弱信号从噪音信号中“拎”出来, 因此特别适合在复杂背景中检测稀有突变。实验表明, 微滴式数字 PCR 可以实现

1:10 万的突变频率筛查<sup>[31]</sup>。而数字 PCR 的敏感性, 除了与检测器的敏感性和 PCR 扩增效率等因素有关外, 很大程度上取决于反应单元的数目。反应单元的数目越多, 数字 PCR 的敏感性越高, 准确性也越高。根据反应单元形成的不同方式, 主要有微反应室/孔板、微流控芯片和微滴式三种数字 PCR 系统, 目前市场主流是微流控芯片和微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)。其中, 前者主要以 Fluidigm 公司的 Bio-Mark 基因分析系统以及 Life Technologies 公司的 QuantStudio 3D 数字 PCR 系统为代表; 而 ddPCR 系统的代表有 Rain Dance 公司的 Rain Drop 数字 PCR 系统, Bio-Rad 公司的 QX100 系统以及 QX200 系统等<sup>[30]</sup>。

### 3.2 标记扩增深度测序<sup>[21]</sup>

TAM-Seq 的原理是首先针对目标区域设计引物进行 15 个循环的预扩增, 产生大小 200 bp 以下末端重叠覆盖整个区域的扩增子, 此时突变型 DNA 片段和野生型片段同时得到扩增; 然后, 通过单重 PCR 选择性扩增带突变的扩增子区, 从而排除非特异性产物; 最后, 在扩增产物两端加上测序接头及特异性的标签序列 (barcodes) 进行单端测序。据报道此种方法突变频率检出率可达 2%, 特异性高于 97%, 可以发现肿瘤中新型的未知突变。

### 3.3 深度测序肿瘤个体化建档法<sup>[23]</sup>

CAPP-Seq 属于一种捕获测序技术, 主要是利用现有的肿瘤基因突变数据库 (COSMIC) 等来源寻找与非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 驱动基因复发突变相关的外显子, 对来自癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库的 407 位 NSCLC 患者的全外显子测序结果进行筛选, 并包含了 NSCLC 中涉及到的 ALK, ROS1 等相关重排基因中复发突变的外显子或者内含子, 然后应用迭代算法使每个 NSCLC 患者样本的错义突变最大化来简化筛选器 (selector) 的大小, 利用定制化的 NimbleGen EZ Choice Library 设计筛选器, 包含 139 个相关基因的 521 个外显子和 13 个内含子, 共 125 kb, 平均能识别 4 个单核苷酸突变 (SNV), 经方法学优化后可以覆盖 96% 的肺腺癌及鳞癌患者。利用该探针构建 ctDNA 测序文库并进行高达 10 000 × 的超深度测序, 发现对 NSCLC 的检测敏感性在 I 期和 II ~ IV 期分别达到 50% 和 100%, 在各期 NSCLC 特异性均在 96%。在 II ~ IV 期和所有分期的 NSCLC 中, 根据 ROC 曲线计算出的曲线下面积 (area under curve, AUC) 分别为 0.99 和 0.95, 说明 CAPP-Seq 具有十分强大的靶向捕获能力。但

是,针对不同癌症类型需要定制不同的筛选器,对其临床推广应用具有一定的限制。

### 3.4 环化单分子扩增与重测序技术<sup>[22]</sup>

cSMART 首先在全长 cfDNA 片段两端添加带有标签序列的特制接头,然后将添加接头的 cfDNA 片段环化,在突变位点附近设计背靠背式引物进行反向 PCR 扩增,富集目标 DNA 片段,获得线性化的 PCR 扩增引物,对扩增后产物进行高通量测序,测序后的序列有 3 种:(1)起止位点和标签序列均相同的序列,识别为原始血浆中同一条游离 DNA 片段经 PCR 扩增获得的产物,只进行一次计数;(2)起止位点相同但标签序列不同的序列,识别为原始血浆中不同的游离 DNA 片段,进行分别计数;(3)起止位点不同的序列,识别为原始血浆中不同的游离 DNA 片段,进行分别计数。采用这样的计数方法即可准确识别携带有基因突变的 ctDNA 序列,并将测序结果还原回血浆原始 cfDNA 片段数量。临床验证证明,cSMART 技术的准确性高于 99%,对 ctDNA 的检测敏感性达 0.03%,并可对 ctDNA 进行绝对定量,也可以应用于甲醛溶液固定、石蜡包埋组织样品的检测,敏感性可达 0.01%。

## 4 ctDNA 检测在肿瘤精准医疗的应用

目前 ctDNA 被认为是肿瘤应用领域最具发展潜力的分子标志物,主要用于监测肿瘤负荷及病情发展,检测微小残留病变、评估疾病预后,并制定个体化用药方案、评估治疗反应、追踪耐药及复发、休眠性克隆等。

### 4.1 辅助诊断早期癌症及评估预后

癌症的发生发展是多个基因多种变异积累的复杂病变过程,早期检测是癌症研究和治疗的关键,通过对人体血液中痕量的 ctDNA 进行捕捉检测,可以在影像学还未发现病灶时指示肿瘤的存在,目前正成为肿瘤早期诊断领域努力的新方向之一。但是,癌症早期患者血液中 ctDNA 的含量往往更低,而且被大量的正常细胞基因组 DNA 污染和稀释,对检测技术的要求更为严格。截止目前,针对 ctDNA 的不同检测平台均存在较低信号背景噪声比的问题,对原发灶肿瘤早期诊断的敏感性均不够,影响分析的敏感性,Bettegowda 等<sup>[15]</sup>仅在约 50% 的实体肿瘤患者体内检测到了 ctDNA。此外,有研究<sup>[32]</sup>证实,基线 ctDNA 的浓度是一个独立的预后因素,基线具有较高浓度的患者比基线具有较低浓度的患者具有更差的无病生存期和总生存期。另外,相对于 ctDNA 的体细胞突变,ctDNA 甲基化可以作为更早的肿瘤

标志物被检测到<sup>[33]</sup>。甲基化改变是不同类型癌症的共同特征,CpG 岛的局部甲基化甚至早于肿瘤细胞的恶性增生,因此甲基化的诊断可用于肿瘤发生的早期预测,而且全基因组的低甲基化也随着肿瘤的发生而出现,并随着肿瘤恶性程度的增加而显著增加,因此甲基化的检测也可用于肿瘤分级。

### 4.2 制定调整个体化用药方案并监测病情进展

肿瘤治疗正在逐渐从宏观的对“症”用药转向更微观的对“基因”用药,也就是“同病异治”或“异病同治”。个体化治疗已经成为肿瘤治疗的公认趋向,基因检测是肿瘤个体化治疗的必要环节,其应用覆盖肿瘤的易感基因检测、早期筛查、致病基因确定、个性化用药指导和预后评价。近年来研究最多且已经用于临床实践的是 EGFR 基因突变检测。我国 NSCLC 患者 EGFR 基因突变检测专家指出:所有 NSCLC 患者,不限组织学类型,只要条件许可,均应尝试进行基于肿瘤组织的 EGFR 基因突变检测<sup>[23-34]</sup>。而当肿瘤组织难以获取时,cf/ctDNA 检测是突变分析合适的替代选择<sup>[35]</sup>。研究<sup>[16,36]</sup>表明,相对于传统的蛋白质类肿瘤标志物,ctDNA 检测更能实时反应疾病负荷的动态改变。Siravegna 等<sup>[36]</sup>发现 CRC 化疗患者撤销 EGFR 抗体后 KRAS 突变会随之下降,肿瘤会重新恢复 EGFR 抗体的敏感性,此时再次尝试 EGFR 抗体可能仍然有效,即所谓的 EGFR 阻断的间歇用药方案。

### 4.3 发现微小残留病灶并追踪耐药突变以预测肿瘤复发

传统的影像学检查对疾病复发转移的诊断在时间上要滞后于 ctDNA 检测。Newman 等<sup>[23]</sup>采用 ctDNA 和影像学检查对早晚期 NSCLC 患者治疗反应进行随访监测发现,影像学观察到的肿瘤体积减小而 ctDNA 浓度上升可能预示着微小残留病变的存在与发展;Oxnard 等<sup>[37]</sup>对 9 例接受厄洛替尼一线治疗的患者进行血浆 ctDNA 的监测后发现,6 例患者的血浆中都能检测到耐药的 T790M 突变且随治疗周期延长其浓度增加;与传统的随访相比,对早期或局限性癌症术后外周血的 ctDNA 进行监测可以准确地提供转移复发的线索和证据,即所谓的临床相关复发前导时间。Reinert 等<sup>[38]</sup>采用 dPCR 对结肠癌患者术后 ctDNA 中的 SSVs 进行追踪发现,其可 100% 的预测术后复发。Roschewski 等<sup>[4]</sup>发现,对 ctDNA 的动态监测可以早于影像学 3.5 个月检测到弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的复发;而 Garcia-Murillas 等<sup>[39]</sup>对早期乳腺癌患者的 NGS 和 dPCR 联合分析发现术后 2~4 周单一或连续血浆样本中的 ctDNA 检测能

够准确判断肿瘤的转移复发;连续血浆样本中的 ctDNA 的突变跟踪能够提高肿瘤复发预测的灵敏度,较临床诊断提前 7.9 个月。

#### 4.4 ctDNA 溯源肿瘤位置

DNA 甲基化具有时空特异性,不同类型的组织和细胞间存在特殊的差异甲基化模式,通过对比已知的甲基化图谱,可以辨别 ctDNA 的组成成分,提供血浆的全景图,从而指出 ctDNA 的来源。近来,国内学者<sup>[40]</sup>研发了一种甲基化 CpG 串联序列扩增及测序方法(methylated CpG tandems amplification and sequencing, MCTA-Seq),该方法对富含 CGCGCGG 的位点进行扩增,因此可以检测出 cfDNA 中成千上万超甲基化的 CpG 岛,并进一步鉴别出了血液中有潜力检测出早期阶段肝癌的一些高性能标志物。Snyder 等<sup>[41]</sup>经过寻找分裂模式而非依赖于寻求 DNA 突变以确定游离 DNA 的组织来源。人体内每个细胞中都含有大量的经过反复折叠的 DNA,而每个细胞的 DNA 折叠方式都有差异,这些差异可使游离 DNA 带上标志。通过对血浆中的游离 DNA 进行深度测序,科学家制成了有机体内核小体的全基因组图谱,同时发现游离 DNA 碎片蕴藏了转录因子的印迹。游离 DNA 核小体包含率(nucleosome occupancies)与细胞中核体结构、基因结构与表达密切相关,并可揭示细胞类型的起源。不仅不同癌症有不同的核小体 DNA 指纹,通过这些指纹还能鉴别出肿瘤的解剖学起源。

## 5 展 望

近年来,随着分子生物学技术的发展,基于病理形态学的肿瘤诊疗模式正在逐渐向分子分型方向转变,分子分型基础上的靶向治疗已成为癌症治疗的重要手段之一。而 ctDNA 作为一类最重要的分子标志物正在从科研领域快速向临床转化发展,但将其正式应用于临床实践前需要大量的前瞻性临床研究进行验证,且应对其分离检测及分析过程的每个环节进行标准化。由于实验室间检测方法和检测平台的不同,ctDNA 检测的差异从样本核酸提取的步骤就已开始形成。不同实验室的检测平台间最低检测限、方法灵敏度等性能相差甚远,给检测结果的对比分析造成困难。另外,现有的分子检测技术本身的可重复性和准确性方面仍不能令人满意,例如 NGS 技术产生的读值错误,难以通过后续的片段拼接和数据分析消除,这使得分子标志物检测的质量控制尤为重要。要解决这些问题,需要做到:(1)分析前的样本处理过程需要标准化。首先,收集的标

本类型采用血清还是血浆、采血到分离血浆的时间间隔、离心过程及 cfDNA 的提取、纯化、保存均需建立严格的 SOP 文件,确保临床检测结果的可重复性。有研究<sup>[42]</sup>显示,虽然血清中 ctDNA 的量比血浆中高 2~24 倍,但血浆更适用于用来分析 ctDNA,其原因可能是凝血过程中细胞产生的某些物质影响分析<sup>[18]</sup>。(2) ctDNA 片段化严重,不利于 PCR 扩增,如何改进 PCR 扩增效率和最小化等位基因丢失(allele dropout)是实验优化过程中的一个难点;其次,ctDNA 不到 cfDNA 总量的 1%,导致灵敏度的下降和假阳性率的升高,如何在成本允许的范围内尽可能开发高灵敏度、高特异性的检测方法,包括技术平台建设、实验方法创新、分析算法优化等以提高方法性能,并能在降低样本用量的同时尽可能并行检测多种变异类型;另外,数据分析和解读需要制定行业金标准,避免同一样本不同公司出现不同解读结果的现象。(3)政府政策和监管机制也需要尽快建立起来。值得注意的是,ctDNA 释放的动力学机制尚未完全阐明,需要在治疗过程中检测同一癌症患者不同时期 ctDNA 的浓度以便动态了解疾病情况。

值得注意的是,除了研究血液中的 ctDNA,科学家也在积极探索脑脊液 ctDNA 作为脑肿瘤液体活检标志物,从而克服血脑屏障的影响<sup>[43]</sup>。另有最新报道肺癌患者唾液中 ctDNA 呈现与血液 ctDNA 相近的检测效果<sup>[44]</sup>。随着技术的发展及相关法规的建立健全,ctDNA 在肿瘤精准医疗中必将大放异彩。

## [参 考 文 献]

- [1] YONG E. Cancer biomarkers: written in blood [J]. Nature, 2014, 511(7511): 524-526. DOI:10.1038/511524a.
- [2] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. Nat Med, 2008, 14(9): 985-990. DOI:10.1038/nm.1789.
- [3] THRESS K S, PAWELETZ C P, FELIP E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M [J]. Nat Med, 2015, 21(6): 560-562. DOI:10.1038/nm.3854.
- [4] ROSCHEWSKI M, DUNLEAVY K, PITTALUGA S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study [J]. Lancet Oncol, 2015, 16(5): 541-549. DOI:10.1016/S1473-2045(15)70106-3.
- [5] MANDEL P, METAIS P. Lesacides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [J]. C R Seances Soc Biol Fil, 1948, 142(3-4): 241-243.
- [6] LEON S A, SHAPIRO B, SKLAROFF D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-650.

- [ 7 ] STROUN M, ANKER P, MAURICE P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients [ J ]. *Oncology*, 1989, 46( 5 ): 318-322.
- [ 8 ] SORENSON G D, PRIBISH D M, VALONE F H, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood [ J ]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994, 3( 1 ): 67-71.
- [ 9 ] VASIOUKHIN V, ANKER P, MAURICE P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia [ J ]. *Br J Haematol*, 1994, 86( 4 ): 774-779.
- [ 10 ] SILVA J M, DOMINGUEZ G, VILLANUEVA M J, et al. Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients [ J ]. *Br J Cancer*, 1999, 80( 8 ): 1262-1264. DOI:10.1038/sj.bjc.6690495.
- [ 11 ] LO Y M, CHAN K C, SUN H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus [ J ]. *Sci Transl Med*, 2010, 2( 61 ): 61ra91. DOI:10.1126/scitranslmed.3001720.
- [ 12 ] DIEHL F, LI M, DRESSMAN D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102( 45 ): 16368-16373. DOI:10.1073/pnas.0507904102.
- [ 13 ] MORTON N E. Parameters of the human genome [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88( 17 ): 7474-7476.
- [ 14 ] CROWLEY E, DI NICOLANTONIO F, LOUPAKIS F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood [ J ]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10( 8 ): 472-484. DOI:10.1038/nrclinonc.2013.110.
- [ 15 ] BETTEGOWDA C, SAUSEN M, LEARY R J, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies [ J ]. *Sci Transl Med*, 2014, 6( 224 ): 224ra224. DOI:10.1126/scitranslmed.3007094.
- [ 16 ] DAWSON S J, TSUI D W, MURTAZA M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer [ J ]. *N Engl J Med*, 2013, 368( 13 ): 1199-1209. DOI:10.1056/NEJMoa1213261.
- [ 17 ] 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 ): 3178-3179. DOI: 10.1073/pnas.1501321112.
- [ 18 ] HEITZER E, ULZ P, GEIGL J B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer [ J ]. *Clin Chem*, 2015, 61( 1 ): 112-123. DOI:10.1373/clinchem.2014.222679.
- [ 19 ] BIDARD F C, WEIGELT B, REIS-FILHO J S. Going with the flow: from circulating tumor cells to DNA [ J ]. *Sci Transl Med*, 2013, 5( 207 ): 207ps214. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006305.
- [ 20 ] MURTAZA M, DAWSON S J, POGREBNIK K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer [ J/OL ]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8760 [ 2016-08-24 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659935/>. DOI:10.1038/ncomms9760.
- [ 21 ] FORSHEW T, MURTAZA M, PARKINSON C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA [ J ]. *Sci Transl Med*, 2012, 4( 136 ): 136ra168. DOI:10.1126/scitranslmed.3003726.
- [ 22 ] LV W, WEI X, GUO R, et al. Noninvasive prenatal testing for Wilson disease by use of circulating single-molecule amplification and resequencing technology ( cSMART ) [ J ]. *Clin Chem*, 2015, 61( 1 ): 172-181. DOI:10.1373/clinchem.2014.229328.
- [ 23 ] NEWMAN A M, BRATMAN S V, TO J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [ J ]. *Nat Med*, 2014, 20( 5 ): 548-554. DOI:10.1038/nm.3519.
- [ 24 ] HUANG T, ZHUGE J, ZHANG W W. Sensitive detection of BRAF V600E mutation by amplification refractory mutation system ( ARMS )-PCR [ J ]. *Biomark Res*, 2013, 1( 1 ): 3. DOI:10.1186/2050-7771-1-3.
- [ 25 ] LI M, DIEHL F, DRESSMAN D, et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants [ J ]. *Nat Methods*, 2006, 3( 2 ): 95-97. DOI:10.1038/nmeth850.
- [ 26 ] KINDE I, WU J, PAPADOPOULOS N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108( 23 ): 9530-9535. DOI: 10.1073/pnas.1105422108.
- [ 27 ] FOX E J, REID-BAYLISS K S, EMOND M J, et al. Accuracy of next generation sequencing platforms [ J/OL ]. *Next Gener Seq Appl*, 2014, 1:1000106 [ 2016-08-24 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4331009/>. DOI: 10.4172/jngsa.1000106.
- [ 28 ] STAHLBERG A, KRZYZANOWSKI P M, JACKSON J B, et al. Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing [ J/OL ]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44( 11 ): e105 [ 2016-08-24 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4914102/>. DOI:10.1093/nar/gkw224.
- [ 29 ] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96( 16 ): 9236-9241.
- [ 30 ] BAKER M. Digital PCR hits its stride [ J ]. *Nature Methods*, 2012, 9( 6 ): 541-544. DOI:10.1038/nmeth.2027.
- [ 31 ] JENNINGS L J, GEORGE D, CZECH J, et al. Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR [ J ]. *J Mol Diagn*, 2014, 16( 2 ): 174-179. DOI:10.1016/j.jmoldx.2013.10.007.
- [ 32 ] TISSOT C, TOFFART A C, VILLAR S, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer [ J ]. *Eur Respir J*, 2015, 46( 6 ): 1773-1780. DOI:10.1183/13993003.00676-2015.
- [ 33 ] WARTON K, SAMIMI G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer [ J/OL ]. *Front Mol Biosci*, 2015, 2: 13 [ 2016-08-24 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4428375/>. DOI:10.3389/fmolb.2015.00013.
- [ 34 ] 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家共识 [ J ]. *中华病理学杂志*, 2011, 40( 10 ): 700-702.

- DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2011.10.014.
- [ 35 ] 《非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识》制订专家组. 非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识 [ J ]. 中华医学杂志, 2015, 95( 46 ): 3721-3726. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.46.001.
- [ 36 ] SIRAVEGNA G, MUSSOLIN B, BUSCARINO M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients [ J ]. Nat Med, 2015, 21( 7 ): 795-801. DOI:10.1038/nm.3870.
- [ 37 ] OXNARD G R, PAWELETZ C P, KUANG Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA [ J ]. Clin Cancer Res, 2014, 20( 6 ): 1698-1705. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-2482.
- [ 38 ] REINERT T, SCHOLER L V, THOMSEN R, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery [ J ]. Gut, 2016, 65( 4 ): 625-634. DOI:10.1136/gutjnl-2014-308859.
- [ 39 ] 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 ): 302ra133. DOI:10.1126/scitranslmed.aab0021.
- [ 40 ] HU L, HE C. Detecting hepatocellular carcinoma in blood [ J ]. Cell Res, 2015, 25( 12 ): 1279-1280. DOI:10.1038/cr.2015.136.
- [ 41 ] SNYDER M W, KIRCHER M, HILL A J, et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin [ J ]. Cell, 2016, 164( 1-2 ): 57-68. DOI:10.1016/j.cell.2015.11.050.
- [ 42 ] JUNG M, KLOTZEK S, LEWANDOWSKI M, et al. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples [ J ]. Clin Chem, 2003, 49( 6 Pt 1 ): 1028-1029. DOI:10.1373/49.6.1028.
- [ 43 ] DE MATTOS-ARRUDA L, MAYOR R, NG C K, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma [ J/OL ]. Nat Commun, 2015, 6: 8839 [ 2016-08-24 ]. <http://www.nature.com/ncomms/2015/151110/ncomms9839/full/ncomms9839.html>. DOI:10.1038/ncomms9839.
- [ 44 ] IZUMCHENKO E, CHANG X, BRAIT M, et al. Targeted sequencing reveals clonal genetic changes in the progression of early lung neoplasms and paired circulating DNA [ J/OL ]. Nat Commun, 2015, 6: 8258 [ 2016-08-24 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4595648/>. DOI:10.1038/ncomms9258.

[ 收稿日期 ] 2016 - 08 - 16

[ 修回日期 ] 2016 - 09 - 01

[ 本文编辑 ] 党瑞山