

循环肿瘤 DNA 在妇科恶性肿瘤中的应用

陈霜, 马蓉, 马彩玲*

基金项目: 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室开放课题重点项目(项目编号: SKL-HIDCA-2019-5); 新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项科研项目(项目编号: WJWY-202012)

作者单位: 830054 新疆 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院妇科中心; 新疆维吾尔自治区省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室

作者简介: 陈霜, 新疆医科大学研究生在读, 主要研究方向为妇科恶性肿瘤

* 通信作者, E-mail: Hymcl@sina.com

【关键词】 循环肿瘤 DNA; 循环游离 DNA; 液体活检; 妇科肿瘤; 卵巢癌; 子宫内膜癌; 宫颈癌

【中图分类号】R 737.3 【文献标志码】A 【文章编号】1674-4020(2021)06-028-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-4020.2021.06.07

循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 是指肿瘤细胞 DNA 脱落或者当肿瘤细胞凋亡后释放进入循环系统的 DNA, 是一种无细胞状态的胞外 DNA, 广泛存在于血液、滑膜液和脑脊液等体液中, 其主要是由单链或双链 DNA 以及单链与双链 DNA 的混合物组成, 以 DNA 蛋白质复合物或游离 DNA 两种形式存在, 是一种特征性的肿瘤生物标志, 通过 ctDNA 检测, 能够检出血液中的肿瘤踪迹。ctDNA 作为液体活检的一种, 有时也被直接称为液体活检。

1 循环肿瘤 DNA 的生物学特征

在 1948 年, Mandel 和 Metais 发现了健康个体血液中存在游离的双链 DNA 片段 (cell free DNA, cfDNA)^[1]。在 1977 年, 有研究表明不同类型癌症患者血液中 cfDNA 的水平不同^[2]。由于在癌症患者血液检测到突变的 RAS 基因片段, cfDNA 的临床潜力得到了承认^[3-4]。cfDNA 可以在健康人群中检测到, 通常小于 100 ng/mL, 而肿瘤患者通常是 10 ~ 40 倍^[5-6]。ctDNA 是 cfDNA 的一部分, 来源于肿瘤细胞, 且仅见于肿瘤患者体内。从非癌细胞向外周血和其他体液中释放 cfDNA 的确切机制以及其生物学特性尚不清楚, ctDNA 可能通过多种机制起源于肿瘤细胞, 包括凋亡、坏死和细胞外囊泡和循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 的活性分泌^[7-9]。ctDNA 具有原发肿瘤或转移肿瘤相同的遗传物质和表观遗传改变, 具有无创评估癌症的潜能。几乎所有存在于癌细胞中的分子改变都可以在 ctDNA 中检测到, 包括编码区和非编码区、微卫星位点、杂合子丢失 (LOH)、突

变、pol 多态性、甲基化和拷贝数变化等^[10-11]。ctDNA 水平也受疾病严重程度和许多其他因素的影响, 如肿瘤位置、血管和细胞周期等^[8, 12-13]。大多数的肝癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌、食道癌、胰腺癌和转移性癌症患者以及头颈部神经母细胞瘤和黑色素瘤患者, 都可以检测到相当水平的 ctDNA, 而肿瘤定位于中枢神经系统或有黏液特征的肿瘤 (如前列腺和甲状腺) 通常只能检测到较低水平的 ctDNA 或不可检测到 ctDNA^[8, 14]。由于通过肾脏、肝脏和脾脏的淋巴循环迅速清除, ctDNA 在循环中有一个可变的半衰期, 据报道平均在 15 min 左右^[5]。而且, 对于一个肿瘤患者来说, ctDNA 来源于个别癌症病变的比例还取决于肿瘤的解剖位置和大小。此外, CTCs 和转移性病变的存在也有助于 ctDNA 的产生^[15]。

2 循环肿瘤 DNA 检测的相关技术

cfDNA 是高度片段化的 DNA, ctDNA 的总量约仅占 cfDNA 总量的 0.01%, 其极低的浓度给 ctDNA 的检测带来了挑战, 特别是在肿瘤发展的早期阶段^[16-18]。目前主要有两大类检测 ctDNA 的方法, 第一类是采用靶向测序的方法, 利用原发肿瘤中已知的单个或几个肿瘤特异性突变来监测外周血中的特异性改变, 这些技术包括高通量测序技术 (NGS)、数字 PCR 技术、实时 PCR 技术等, 该方法需要有关肿瘤基因组的详细信息, 而该方法敏感性较高, 可以快速检测到等位基因频率低至 0.01% 的突变, 且具有较高特异性^[19-21]。第二种方法是非靶向测序, 旨在进行全基因组范围内的拷贝数畸变分析

(CNAs)^[22]或通过全基因组测序(WGS)或全外显子组测序(WES)点突变分析^[23]。非靶向筛查方法既能够识别在肿瘤治疗期间发生的新变化,又不需要有关原发肿瘤基因组的信息,但是为了可靠地重建肿瘤特异性全基因组变化需要高浓度的 ctDNA。非靶向测序方法由于成本高、检测周期长、数据分析难度较大,而且总体灵敏度较低(5%~10%)^[23],难以应用于临床。

3 循环肿瘤 DNA 在妇科恶性肿瘤中的应用

3.1 循环肿瘤 DNA 与卵巢癌

在卵巢癌的诊断方面,ctDNA 有重要的临床意义,Phallen 等^[24]发现在 42 例入组的卵巢癌患者中,有 71% 的患者能检测出相当水平的 ctDNA;Zhang 等^[25]发现在 I 期卵巢癌中,ctDNA 的敏感性和特异性(分别为 85.3% 和 90.5%)比 CA125(分别为 56.1% 和 64.15%)更高。而 Parkinson 等^[26]发现在一组高级别浆液性卵巢癌患者中,ctDNA 水平与肿瘤体积之间也有很强的关系,说明 ctDNA 在评估肿瘤负担中具有潜在价值。Kamat 等^[27]在一项小鼠研究中证实 ctDNA 水平升高表明肿瘤负担增加。特定 ctDNA 突变的存在甚至被确定为卵巢癌患者总生存时间的独立预测因子^[28],Siravegna 等^[29]发现卵巢癌患者 ctDNA 水平与术后残余肿瘤负荷 > 1 cm ($P=0.0001$) 和复发风险较高 ($P=0.002$) 显著相关。在卵巢癌的复发预测方面,ctDNA 可能提供无法通过影像学检查发现的复发性病变。一项研究表明,ctDNA 可以比 CT 扫描提早 7 个月诊断出复发的卵巢癌病例^[30]。Martignetti 等^[31]采用一种高敏感性和高特异性的生物标记物,即成纤维细胞生长因子受体 2 (FGFR2) 融合 ctDNA 的生物标记物,在对特定卵巢癌患者进行为期 4 年的随访期间进行的 28 项测量中,FGFR2 融合比 CA125 更好地反映了疾病的演变,特别是肿瘤复发。

综上所述,ctDNA 对于卵巢癌的早期发现、治疗和预后及复发检测有十分重要的临床意义,也是基础和临床科研工作者研究的热点,对于卵巢癌这种起病隐匿、病死率高的疾病,希望能通过探索 ctDNA 与卵巢癌的临床意义,对卵巢癌的筛查、诊断及治疗预后提供重要依据,取得突破性进展。

3.2 循环肿瘤 DNA 与子宫内膜癌

ctDNA 在子宫内膜癌方面研究虽然相对较少,但仍有研究表明 ctDNA 具有作为识别不同组织学亚型和等级的子宫内膜癌复发的高度敏感的生物标志物的潜力。Moss 等^[32]报道 ctDNA 可以监测正在接受治疗的子宫内膜癌患者。Margolin 等^[33]开展了一项研究,以检测包括 42 例子宫内膜癌患者在内的 5 种类型肿瘤中 ZNF154CpG 岛的甲基化程度,除组织样本外,他们的研究还使用了 ctDNA 的计算模拟(1% 的肿瘤 DNA,99% 的正常 DNA),结果以 0.79 的 AUC 表明其在子宫内膜肿瘤中表现出很好的性能。有相关研究表明 ctDNA 可

在较早的时间点识别非有效疗法,而无需等待对疾病反应的影像学评估。目前关于子宫内膜癌的相关研究很少,可能是由于子宫内膜癌早期症状较明显,且通过较简单的活检方法就可以获得病理学标本,但并不代表生物学标志物对于子宫内膜癌的临床意义较小,因此探索 ctDNA 对于子宫内膜癌的临床意义仍是基础和临床工作者研究的重要方向。

3.3 循环肿瘤 DNA 与宫颈癌

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是宫颈癌发生发展的关键一步,已有研究表明,几乎所有宫颈癌组织都能发现 HPV 遗传物质^[34]。两种特殊的 HPV 亚型,HPV16 和 HPV18 导致 70% 以上的宫颈癌,包括宫颈鳞状细胞癌和腺癌^[34]。有研究表明宫颈癌患者血浆或血清中的 HPV ctDNA 在宫颈癌的诊断中具有极好的准确性^[35]。最近的研究表明,大多数超过 I 期的宫颈癌患者都可检测到 ctDNA,而且 ctDNA 的浓度反映了肿瘤的严重程度^[36]。由于将 HPV 整合到人类基因组中是肿瘤发生的关键部分^[37],而且病毒基因序列与人类基因不同,所以血液中 HPV DNA 的检测可能反映治疗前的肿瘤负担和治疗后观察期间的复发信号。由于 HPV 的 DNA 序列与人类基因组有很大的不同,因此在 ctDNA 中可以更容易地检测到 HPV DNA,遗憾的是,通过常规 PCR 只能发现 12%~45% 的宫颈癌患者^[38-39]。由于目前宫颈癌筛查项目和疫苗接种技术已经较成熟,所以关于宫颈癌 ctDNA 的相关研究较少,但是探索宫颈癌生物学标志物,通过液体活检比传统病理学活检有独到的优势,如无创、更早发现等优点,因此探索 ctDNA 对于宫颈癌的临床意义也十分重要。

4 结论与展望

基于液体活检的 ctDNA 分析已迅速成为在患者监测的许多阶段进行无创癌症评估的有效策略,液体活检可以通过释放到血液循环中的不同生物标志物提供有关肿瘤的生物学和临床特征等有价值的信息。可以通过定量检测血液样本中的 ctDNA 或通过检测突变来分析整个肿瘤基因组。过去几年中,有研究表明了 ctDNA 检测和分析技术的显著进步,例如,基于 NGS 的方法在克服许多降低 ctDNA 检测的错误率和提高灵敏度的挑战方面取得了重大进展。尽管如此,基于 NGS 的方法仍然相对昂贵并且消耗大量时间。而基于实时 PCR 的技术进行的分析具有成本效益、快速且对于有限数量的生物标记物在常规临床实践中是可行的。这些技术标准化的进一步发展将使 ctDNA 在癌症诊断领域发挥重要作用。因此探索更经济、灵敏度和特异度更高的 ctDNA 检测方法具有十分重要的临床意义。妇科恶性肿瘤目前仍然困扰着临床工作者,ctDNA 因具有无创、精准、比传统检查更早出现改变等优点,已成为目前科研工作者的重要研究方向,广大基础和临床科研工作者正在努力

探索更好的检测方法,改进液体活检的技术,提高检测的灵敏度和特异度。虽然目前 ctDNA 检测尚处于临床前阶段,但是相信在不久的将来,液体活检成为临床辅助检查,结合其他临床检查更好地指导临床。

【参考文献】

- [1] Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil [J]. Comptes Rendus des Seances de La Societe de Biologie et de ses Filiales, 1948, 142 (3/4): 241-243.
- [2] 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 Research, 1977, 37(3): 646-650.
- [3] Volik S, Alcaide M, Morin R D, et al. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies [J]. Molecular Cancer Research: MCR, 2016, 14(10): 898-908.
- [4] Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, et al. A comparison of cell-free DNA isolation kits; isolation and quantification of cell-free DNA in plasma [J]. The Journal of Molecular Diagnostics: JMD, 2017, 19(1): 162-168.
- [5] Das J, Ivanov I, Safaei T S, et al. Combinatorial probes for high-throughput electrochemical analysis of circulating nucleic acids in clinical samples [J]. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2018, 57(14): 3711-3716.
- [6] Bernard V, Kim D U, San L A, et al. Circulating nucleic acids are associated with outcomes of patients with pancreatic cancer [J]. Gastroenterology, 2019, 156(1): 108-118. e4.
- [7] Song Y, Zhu Z, An Y, et al. Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(8): 4141-4149.
- [8] Yoon H J, Kozminsky M, Nagrath S. Emerging role of nanomaterials in circulating tumor cell isolation and analysis [J]. ACS Nano, 2014, 8(3): 1995-2017.
- [9] Marchetti A, Del Grammastio M, Felicioni L, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next Generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment [J]. PLOS One, 2014, 9(8): e103883.
- [10] Nawroz H, Koch W, Anker P, et al. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients [J]. Nature medicine, 1996, 2(9): 1035-1037.
- [11] Siravegna G, Sartore-Bianchi A, Nagy R J, et al. Plasma HER2 (ERBB2) copy number predicts response to HER2-targeted therapy in metastatic colorectal cancer [J]. Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2019, 25(10): 3046-3053.
- [12] Bettgowda C, Sausen M, Leary R J, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies [J]. Science Translational Medicine, 2014, 6(224): 224ra24.
- [13] Yang N, Li Y, Liu Z, et al. The characteristics of ctDNA reveal the high complexity in matching the corresponding tumor tissues [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 319.
- [14] Siravegna G, Geuna E, Mussolin B, et al. Genotyping tumour DNA in cerebrospinal fluid and plasma of a HER2-positive breast cancer patient with brain metastases [J]. ESMO Open, 2017, 2(4): e000253.
- [15] Neumann M H, Bender S, Krahn T, et al. ctDNA and CTCs in liquid biopsy-current status and where we need to progress [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2018, 16: 190-195.
- [16] Openshaw M R, Page K, Fernandez-Garcia D, et al. The role of ctDNA detection and the potential of the liquid biopsy for breast cancer monitoring [J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2016, 16(7): 751-755.
- [17] Forsheew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA [J]. Science Translational Medicine, 2012, 4(136): 136ra68.
- [18] Kennedy S R, Schmitt M W, Fox E J, et al. Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing [J]. Nature Protocols, 2014, 9(11): 2586-2606.
- [19] 戴谦, 黄斐, 王宇鹏, 等. ICC 患者血浆 ctDNA 突变检测数字 PCR 平台的建立及临床应用价值 [J]. 检验医学, 2020, 35(4): 354-362.
- [20] Wang H, Jiang J, Mostert B, et al. Allele-specific, non-extendable primer blocker PCR (AS-NEPB-PCR) for DNA mutation detection in cancer [J]. The Journal of Molecular Diagnostics: JMD, 2013, 15(1): 62-69.
- [21] Freidin M B, Freydina D V, Leung M, et al. Circulating tumor DNA outperforms circulating tumor cells for KRAS mutation detection in thoracic malignancies [J]. Clinical Chemistry, 2015, 61(10): 1299-1304.
- [22] Beaver J A, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer [J]. Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2014, 20(10): 2643-2650.
- [23] Imperial R, Nazer M, Ahmed Z, et al. Matched whole-genome sequencing (WGS) and whole-exome sequencing (WES) of tumor tissue with circulating tumor DNA (ctDNA) analysis: complementary modalities in clinical practice [J]. Cancers, 2019, 11(9): 1399.
- [24] Phallen J, Sausen M, Adleff V, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA [J]. Science Translational Medicine, 2017, 9(43): ean2415.
- [25] Zhang Qing, Hu Guohong, Yang Qifeng, et al. A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA [J]. Gynecologic Oncology, 2013, 130(1): 132-139.
- [26] Parkinson C A, Gale D, Piskorz A M, et al. Exploratory analysis of TP53 mutations in circulating tumour DNA as biomarkers of treatment response for patients with relapsed High-Grade serous ovarian carcinoma: a retrospective study [J]. PLOS Medicine, 2016, 13(12): e1002198.
- [27] Kamat Aa, Bischoff F Z, Dang D, et al. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma [J]. Cancer Biology & Therapy, 2006, 5(10): 1369-1374.
- [28] Perkins G, Yap T A, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers [J]. PLOS One, 2012, 7(11): e47020. (下转第 34 页)

European Journal of Immunology,2013,43(3):679-692.

- [16] Willems H, Bruner W S, Barker K S, et al. Overexpression of candida albicans secreted aspartyl proteinase 2 or 5 is not sufficient for exacerbation of immunopathology in a murine model of vaginitis [J]. Infection and Immunity, 2017, 85 (10): e00217-e00248.
- [17] Barrientos-Durán A, Fuentes-López A, De Salazar A, et al. Reviewing the composition of vaginal microbiota; inclusion of nutrition and probiotic factors in the maintenance of eubiosis [J]. Nutrients,2020,12(2):419.
- [18] Zangl I, Pap I J, Aspöck C, et al. The role of Lactobacillus species in the control of Candida via biotrophic interactions [J]. Microbial Cell (Graz, Austria), 2019, 7(1):1-14.
- [19] Wang S, Wang Q, Yang E, et al. Antimicrobial compounds produced by vaginal lactobacillus crispatus are able to strongly inhibit candida albicans growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:564.

- [20] Jang S J, Lee K, Kwon B, et al. Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of Candida albicans [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1):8121.
- [21] Abisado R G, Benomar S, Klaus J R, et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions [J]. mBio, 2018, 9(3):e02317-e02331.
- [22] Wang F-j, Liu Z-h. Systematic analysis of protein expression in Candida albicans exposed to farnesol [J]. Chinese Medical Journal, 2019, 132(19):2348-2353.
- [23] Wang Fengjuan, Liu Zhaohui, Zhang Dai, et al. In vitro activity of farnesol against vaginal Lactobacillus spp [J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2017, 212: 25-29.
- [24] Swidsinski A, Guschin A, Tang Q, et al. Vulvovaginal candidiasis: histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2019, 220(1):91. e1-91. e8.

(收稿日期:2020-10-11 编辑:向晓莉)

(上接第30页)

- [29] Siravegna G, Bardelli A. Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients [J]. Molecular Oncology, 2016, 10(3):475-480.
- [30] Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, et al. Personalized circulating tumor DNA biomarkers dynamically predict treatment response and survival in gynecologic cancers [J]. PLOS One, 2015, 10(12):e0145754.
- [31] Martignetti J A, Camacho-Vanegas O, Friedigkeit N, et al. Personalized ovarian cancer disease surveillance and detection of candidate therapeutic drug target in circulating tumor DNA [J]. Neoplasia (New York, N. Y.), 2014, 16(1):97-103.
- [32] Moss E L, Gorsia D N, Collins A, et al. Utility of circulating tumor DNA for detection and monitoring of endometrial cancer recurrence and progression [J]. Cancers, 2020, 12(8):2231.
- [33] Margolin G, Petrykowska H M, Jameel N, et al. Robust detection of DNA hypermethylation of ZNF154 as a pan-cancer locus with in silico modeling for Blood-Based diagnostic development [J]. The Journal of Molecular Diagnostics:JMD, 2016, 18(2):283-298.
- [34] Walboomers J M, Jacobs M V, Manos M M, et al. Human

papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. The Journal of Pathology, 1999, 189(1):12-19.

- [35] Gu Y, Wan C, Qiu J, et al. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis [J]. PLOS One, 2020, 15(2):e0224001.
- [36] Campitelli M, Jeannot E, Peter M, et al. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients [J]. PLOS One, 2012, 7(8):e43393.
- [37] Tranberg M, Bech B H, Blaakær J, et al. Preventing cervical cancer using HPV self-sampling: direct mailing of test-kits increases screening participation more than timely opt-in procedures-a randomized controlled trial [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):273.
- [38] Sankaranarayanan R, Nene B M, Shastri S S, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India [J]. The New England Journal of Medicine, 2009, 360(14):1385-1394.
- [39] Georg G, Marion Z, Matthias Z, et al. Circulating nucleic acids in plasma or serum(CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias [J]. Disease Markers, 2014, 21(3): 105-120.

(收稿日期:2020-07-22 编辑:舒砚)