

非小细胞肺癌液体活检技术研究进展

吴亮¹, 山顺林²

作者单位:¹蚌埠医学院临床医学系, 安徽 蚌埠 233000;

²解放军 82 医院肿瘤中心, 江苏 淮安 223001

通信作者: 山顺林, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤内科, E-mail: 1187288527@qq.com

基金项目: 南京军区医学科技创新重点课题(15ZD011)

摘要: 随着精准医学和个体化治疗在肿瘤领域的发展, 采用肿瘤分子生物学特性进行监测的要求越来越高, 液体活检技术以其独有的无创性、便捷性、高重复性等特点在临床上得到了广泛关注, 在未来有着巨大的发展潜力。非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌病人 85%~90%, 针对 NSCLC, 该文以液体活检循环肿瘤细胞、循环肿瘤 DNA 和外泌体, 对 NSCLC 病人的临床应用做如下综述。

关键词: 液体活检; 癌, 非小细胞肺

Research progress in the liquid biopsy in patients with non-small cell lung cancer

WU Liang¹, SHAN Shunlin²

Author Affiliations: ¹Department of Clinical Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China;

²Department of Oncology Center, The 82 Hospital of PLA, Huaian, Jiangsu 223001, China

Abstract: With the development of precision medicine and individualized treatment in the field of cancer therapy, the demand of monitoring tumor molecular biology characteristics is elevated. Liquid biopsy technology has attracted extensive attention in clinical practice due to its unique features of noninvasive, convenient and high repeatability and has the huge development potential in the future. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts from 85% to 90% in patients with lung cancer. The clinical application of liquid biopsy of circulating tumor cells, circulating tumor DNA and exosomes in patients with NSCLC were reviewed as follows.

Key words: The liquid biopsy; Carcinoma, non-small cell lung

原发性肺癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 其发病率逐年上升, 其中 80%~85% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1]。我国恶性肿瘤发病率及病死率占第 1 位的均是肺癌^[2]。具有发病率高、发病机制复杂、早期难以发现, 治疗效果不佳等特点。肿瘤标志物有助于早期诊断肺癌, 对早发现、早诊断、早治疗有重要作用。根据数据显示, 在初诊时, 57% 的病人已出现远处转移, 因此发现新的有价值的生物学标志物检测方法对于早期诊断肺癌, 预测疾病发展, 快速评估疗效显得十分重要^[3]。

穿刺活检标本虽然能明确有无肿瘤及其类型, 但是有创伤性, 而且由于肺癌的位置和大小、肿瘤组织的异质性、活检组织的滞后性, 有不易反映肿瘤整体状态, 不易随时监测, 多次活检依从性差等缺点。正是存在这些缺点, 液体活检技术在肿瘤的

早期监测显示出明显的技术优势, 被 MIT Technology Review(麻省理工科技评论)杂志公布为 2015 年度十大突破技术的榜单, 液体活检位列其中, 成为当下研究热门领域^[4]。液体活检是一种非侵入性的新型诊断技术, 具有无创性, 标本容易获得, 可以反映肿瘤整体状态, 实现实时监测的优点, 有助于肿瘤微转移的早期发现和预后评估, 在治疗监测, 个体化治疗发挥重要价值。基于精准医疗已经成为肿瘤诊疗过程的热点, 液体活检是指从体液中获得来源组织的生物标志物, 并通过对所得标志物分析来反映其来源组织相关信息^[5]。液体活检项目包括循环肿瘤细胞(CTCs)、循环肿瘤 DNA(ctDNA)、外泌体(Exosomes)、小核糖核酸 miRNA 等, 其中 CTCs 与 ctDNA 发展最为迅猛。目前液体活检主要应用领域是肿瘤的血清检测, 即利用血清提示肿瘤发展进程及抗药性等信息, 指导个体化精准治疗。

目前,CTCs、ctDNA 和外泌体是现在最主流的液体活检技术,表 1 对这三种技术做了简单的归纳。

表 1 液体活检的分类

项目	CTCs	ctDNA	外泌体
血液丰度	0~1 000 个/毫升	-0.8 ng/mL	-10 ⁴ 个/毫升
内容物	整个细胞	无	RNA 蛋白质
FDA 认证	乳腺癌、大肠癌、前列腺癌	NGS、突变检测	miRNA, miRNA 表达 蛋白质表达
分离/检测 难度	中等	中等	困难
早期检测 可能	有一定临床证据,但技术要求很高	要求很高测序深度,区分假阳性难度较大	新兴领域 值得关注
实体瘤	是	是	是
液体瘤	是	有些是	—

从技术角度上,随着新一代的测序技术,ctDNA 的检测变得最为容易,也是液体活检领域发展最快的分支,外泌体是本身理化性质的原因,分离难度最大,CTCs 因为包含整个细胞的基因组、转录组、蛋白质组是液体活检领域临床研究最为深入。

1 CTCs

1.1 CTCs 作为潜在标志物的研究进展 CTC 在 1869 年被澳大利亚病理学家 John Ashworth 发现,是指在实体肿瘤发生过程中,有少量的细胞从原生肿瘤脱离进入血液,随血液循环到达新的定植器官,继而形成新的转移灶^[6]。1960 年科学家发现多个 CTC 聚集在一起的 CTC 簇。而随着 1994 年 Cellsearch 系统的研发成功,大量的临床实验展现了 CTC 在癌症预后复发效用上的应用^[7]。

目前 CTCs 是罕见的可以预测多种肿瘤预后的细胞,这些循环细胞通过不同技术进行检测,其分析被称为对病人的实时“液体活检”。CTCs 具有广阔前景,在技术上仍然具有很大的挑战性,尤其是关于 CTC 富集和分析技术,已先后出现膜过滤法、免疫荧光染色、RT-PCR 等,这些技术的不断革新提高了从海量血细胞中获取 CTC 的准确度和对后续分析提供支持,也是这项技术的临床应用成为可能。Dorsey 等^[8]研究中指出在成功检测 CTCs 数量的 NSCLC 病人中,放疗后病人血清 CTCs 数量减少和肿块的大小减小相一致,表明 CTCs 可以作为放疗疗效的评测指标。很多研究表明,很多肿瘤直径即使在 2~4 mm 的情况下已经有肿瘤细胞发生转移进入血液循环,从这个角度,CTCs 检测技术对于肿瘤的早期诊断具有重要意义。研究通过 Cellsearch 技术检测早期未发生转移的肿瘤病人(根据肿瘤的类型)CTC 细胞的比率非常低,利用同样

的技术,Ilie 等^[9]对长期吸烟的慢性阻塞性肺疾病病人进行 CTC 细胞测定,定期复查最终诊断为肺癌的病人发现 CTCs。CTCs 对于肿瘤的早期诊断方面有至关重要的作用,在 Fiorelli 等^[10]的研究中,CTCs 计数 >25 可以帮助从良性病变病人中区分肺癌的异常肺部成像。

1.2 CTCs 临床应用进展 临床分期是病人制定相关治疗方案的依据。目前基于影像学检测结果和通过肿瘤的病灶侵犯深度及淋巴结转移情况来判断病人的临床分期,不能准确判断肿瘤病灶血液微转移情况对病人治疗及预后的影响。液体活检技术检测 CTCs 可以很好地弥补这一缺陷,对病人的临床分期做出有效的评估。Krebs 等^[11]研究 101 例未经任何治疗 IV 期 NSCLC 病人,发现治疗前 CTC 计数水平与肿瘤分期具有显著相关。Nicolazzo 等^[12]对 24 例 IV 期 NSCLC 参与 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗的病人,发现 CTCs 及其 PD-L1 的表达与病人的不良反应结果相关。说明 PD-L1 阳性 CTCs 可能成为抗 PD-1 定向治疗的预测性肿瘤标志物。

1.3 CTCs 的临床局限性 虽然 CTCs 技术已经表现出很强的诊断和预测肿瘤治疗有效性的作用,CTCs 同时具有局限性,CellSearch 和其他的技术使用上皮组织标志物并不能发现所有的 CTCs,因此依赖单细胞测序技术的发展,同时肿瘤细胞具有异质性,CTCs 细胞并不能完全代表实体肿瘤,这些问题都需要在临床上亟待解决^[13]。

2 ctDNA

2.1 ctDNA 作为潜在标志物的研究进展 ctDNA 是指肿瘤细胞 DNA 经脱落或者当细胞凋亡后释放进入循环系统,源于肿瘤细胞的双链 DNA,主要存在血液,滑膜腔积液,脑脊液等体液中,外周血游离 DNA 的大小约为 160~190 bp,其长度大约为 50 nm。循环 DNA 的表现应该更具有特异性,随着基因测序的飞速发展,目前,已能在血液中进行检测并计数。它的发现追溯到循环游离 DNA (cfDNA),cfDNA 是由体细胞释放入外周血循环后发生降解的内源性 DNA。ctDNA 可以通过多种方式进入血液中,比如:分泌、吞噬作用以及凋亡坏死^[14]。Qiu 等^[15]研究发现 ctDNA 提供了一种微创和可行的方法检测 EGFR 突变的 NSCLC (NSCLC)。ctDNA 的分析将是 NSCLC 个体化治疗一个重要组成部分。Nie 等^[16]指出,基因突变、基因甲基化等均可在 NSCLC 病人 ctDNA 中发现,ctDNA 可以用来检测 NSCLC,同时对于肿瘤的异质性,ctDNA 检测肿瘤变异比 CTCs 有更高的敏感性和特异性。Marchetti

等^[17]从 37 例非小细胞癌病人中抽取血液样本利用 CellSearch 系统结合二代测序技术(NGS)进行研究,检测到 ctDNA 中 EGFR 基因突变和对应肿瘤组织检测结果 31 例,提示液体活检结果为病人 EGFR 基因突变产生并为病人提供个体化治疗提供重要的参考依据。

2.2 ctDNA 临床应用进展 很多科学研究表明 ctDNA 可以准确预测病人的预后,美国约翰霍普金斯大学发明 BEAMing 扩增法,大大提高 ctDNA 的检测敏感性。通过将循环 DNA 与磁珠结合进行计数,可以实现万分之一的检测灵敏度。此外数字化 PCR 技术也逐渐应用于 ctDNA 基因检测。数字 PCR 技术是一种新型的高灵敏性的核酸片段分析技术。Chen 等^[18]收集了 58 例早期 NSCLC 病人的配对血液和组织标本,采用靶向测序技术检测配对的肿瘤血浆 ctDNA 标本的基因突变状态,结果发现血浆检测 ctDNA 突变状态,与组织标本具有较高的一致性,且比不同肿瘤标志物具有更高的敏感性。表明 ctDNA 可以作为判断肿瘤的预测因子。Rosell 等^[19]通过 ctDNA 分析 180 例晚期 NSCLC 病人的 EGFR 和 KRAS 的突变状态,其中 120 例病人诊断时时分析 ctDNA,而 60 例病人在出现对 EGFR-TKIs 耐药性时分析了 ctDNA。结果显示对于发生转移的病人而言,ctDNA 分析是检测 EGFR 和 KRAS 突变的有效方式。最新研究表明,ctDNA 中肿瘤特异性突变和 CTC 计数相比,在判断预后 ctDNA 方面展现非常明显的优越性。

2.3 ctDNA 的临床局限性 不同病人不同时间测定外周血中 ctDNA 水平差异很大,受清除速度、血容量、肿瘤的分期分级等因素影响较大。此外基于现代的检测技术 digital PCR,标记扩增深度测序技术、分光光度法提高灵敏性,血液标本中 ctDNA 量少,与肿瘤组织相比,可靠性稳定性尚需进一步验证。

3 Exosomes

3.1 Exosomes 作为潜在标志物的研究进展 Exosomes 来源广泛,淋巴细胞、树突状细胞、肥大细胞及上皮样细胞、肿瘤细胞等都可以分泌外泌体。这些细胞向胞外分泌的囊泡类小体,直径约为 40 ~ 100 nm,具有典型的脂质双分子层膜结构,其携带有母细胞多种蛋白质、脂类、DNA 和 RNA 等重要信息,在细胞和细胞间的物质交换和信息传递起到重要作用^[20]。外泌体含有大量的蛋白质,主要分为两类:一类是外泌体固定蛋白,另一类是与细胞来源和组织类型相关性的特异性蛋白^[21]。此外,外泌体

含有大量的遗传信息 mRNA 和 miRNA,对外泌体研究最多的是具有功能活性的 miRNA 成分。最近的研究表明,这些外泌体可以作为标志物,来检测疾病的进展,甚至在病人出现临床症状前做出肿瘤诊断、预后判断、疗效评估。肿瘤来源的 Exosomes 促进肿瘤的生长,转移和耐药^[22]。目前对于外泌体的分离提纯方法包括高速离心法,密度梯度离心法,色谱法,超滤膜过滤离心法等^[23]。NSCLC 病人的 Exosomes 中包含的肿瘤相关蛋白有 EGFR、KARS、claudins、RAB 家族蛋白等。Alos 等^[24]对 8 例化疗前的 NSCLC 病人的外泌体进行电泳分析,发现 NSCLC,发现出现特异性高表达的蛋白条带,还发现 NSCLC 肿瘤组织中也存在该蛋白高表达,提示高表达的特异性蛋白条带可能来源原发肿瘤组织,可作为 NSCLC 潜在的肿瘤标志物。

3.2 Exosomes 的生物学功能 肺癌发生和发展是一个多步骤的过程,涉及分子基因水平的变化,肺癌的发病过程仍有很多未解之处。NSCLC 通过与肿瘤微环境相互作用介导肿瘤的增殖和侵袭。Al-Nedawi 等^[25]发现 NSCLC 外泌体可将突变的 EGFR 转移到肿瘤相关的血管内皮细胞,促进血管内皮生长因子的表达分泌,从而促进内皮细胞增殖。Wang 等^[26]研究表明,NSCLC 外泌体中的 TGF- β 和 IF-10 也参与调控细胞的增殖转移,其高水平表达可促进肿瘤生长和转移。Rahman 等^[27]通过将具有侵袭性和不具有侵袭性的肺癌细胞外泌体分别作用于受体细胞进行对比研究,发现高度侵袭性肺癌外泌体可诱导受体细胞表达与肿瘤发生转移密切相关的波形蛋白,并可能通过波形蛋白来驱动受体细胞发生上皮间质转化,从而获得侵袭和迁移能力。另外,NSCLC 外泌体中的 miRNA 也广泛参与 NSCLC 侵袭-转移过程中的调控^[28]。

3.3 Exosomes 的临床局限性 NSCLC 外泌体的研究有重要的临床意义,但是很多问题需要解决,外泌体的 miRNA 的表达受到很多因素影响,特异性和灵敏性不高,目前尚无标准的提纯外泌体的方法,在分离和纯化外泌体的过程还有很多问题需要进一步解决,肿瘤组织和外泌体的 miRNA 存在一定差异性^[29]。在临床上不能广泛的应用。

4 展望

早期检测是癌症研究和治疗的关键,液体活检是一项富有挑战的新技术,在肿瘤的精准医学中扮演越来越重要的角色,随着检测标准化的日益发展,检测灵敏度的提高,以及新的生物标志物的问世,液体活检将成为最具发展潜力的肿瘤无创诊断

和实时疗效检测手段,临床应用价值极其显著。大量研究进一步证实,液体活检技术检测在肿瘤细胞中数量与肿瘤发生、疗效、转移和预后有着密切的关系,通过外周血对肿瘤细胞的检测,有助于肿瘤的早期诊断,疗效的快速评估,个体化治疗,预后判断和肿瘤复发的监测。

随着肿瘤基因组分型系统和精准治疗的临床应用和推广,本文侧重描写了当前热门的 CTCs, ctDNA, miRNA, 外泌体技术在 NSCLC 中的研究进展,目前液体活检行业仍处于早期阶段,真正进入临床但仍有很多问题亟待解决,着力开发高特异性和灵敏性的检测技术是进一步临床的前提,建立检测标准,还需得到临床实践的认可,在检测技术不断创新的同时,相信液体活检技术会成为未来精准医学趋势。

参考文献

- [1] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [2] CHEN WQ, ZHANG SW, ZENG HM, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. *China Cancer*, 2014, 23(1):1-10.
- [3] EDWARDS BK, NOONE AM, MARIOTTO AB, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975—2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer [J]. *Cancer*, 2014, 120(9):1290-1314.
- [4] NAKATANI K, ISHIKAWA T. Breakthrough technologies 2015, MIT technologies review [J]. *Nature*, 2015, 120(9):69-72.
- [5] ROLFO C, CASTIGLIA M, HONG D, et al. Liquid biopsies in lung cancer; the new ambrosia of researchers [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846(2):539-546.
- [6] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility [J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 120(9):1105-1112.
- [7] RACK B, SCHINDLBECK C, JUCKSTOCK J, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(5):dju066.
- [8] DORSEY JF, KAO GD, MACARTHUR KM, et al. Tracking viable circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing definitive radiation therapy: pilot study results [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(12):1556-1563.
- [9] ILIE M, HOFMAN V, LONG-MIRA E, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e111597. DOI:10.1371/journal.pone.0111597.
- [10] FIORELLI A, ACCARDO M, CARELLI E, et al. Circulating tumor cells in diagnosing lung cancer; clinical and morphologic analysis [J]. *Ann Thorac Surg*, 2015, 99:1899-1905.
- [11] KREBS MG, SLOANE R, PRIEST L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(12):1556-1563.
- [12] NICOLAZZO C, RAIMONDI C, MANCINI M, et al. 2016. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:31726.
- [13] YU M, BARDIA A, WITTNER BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. *Science*, 2013, 339:580-584.
- [14] JAHR S, HENTZE H, ENGLISH 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(4):1659-1665.
- [15] QIU M, WANG J, XU Y, et al. Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24(1):206-212.
- [16] NIE K, JIA Y, ZHANG X, et al. Cell-free circulating tumor DNA in plasma/serum of non-small cell lung cancer [J]. *Nat Med*, 2014, 20(4):430-435.
- [17] MARCHETTI A, DEL GRAMMASTRO 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. DOI:10.1371/journal.pone.0103883.
- [18] CHEN KZ, LOU F, YANG F, et al. Circulating Tumor DNA Detection in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:31985.
- [19] ROSELL R, KARACHALIOU N. Lung cancer: Using ctDNA to track EGFR and KRAS mutations in advanced-stage disease [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(7):401-402.
- [20] LOTVALL J, VALADI H. Cell to cell signaling via exosomes through esRNA [J]. *Cell Adh Migr*, 2009, 1(3):156-158.
- [21] TAVERNA S, GIALLOMBARDO M, GIL-BAZO I, et al. Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patient critical analysis of evidence and potential role in clinical practice [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19):28748-28760.
- [22] MATHIVANAN S, FAHNER CJ, REID GE, et al. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(1):1241-1244.
- [23] ZERINGER E, BARTA T, LI M, et al. Strategies for isolation of exosomes [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015, 2015(4):319-323.
- [24] ALOS L, MOYANO S, NADAL A, et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of anoinasal squamous cell carcinomas with favorable outcome [J]. *Cancer*, 2009, 115(12):2701-2709.
- [25] AL-NEDAWI K, MEEHAN B, KERBEL RS, et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(10):3794-3799.