

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.03.14

液体活检在肿瘤转移早期诊断中的应用*

王梦妍, 娄加陶(上海胸科医院, 上海交通大学附属胸科医院检验科, 上海 200030)

摘要:液体活检作为一种新技术,具有方便、快捷、非侵入性、可重复性强等优点,其可以对体液中肿瘤相关 DNA、RNA、外泌体及细胞进行检测,对早期检测肿瘤转移、复发具有重要意义。尽管各种肿瘤分子相关标志物的研究不断深入,近年来对于液体活检技术的探索不断取得新的突破,然而,目前临床医生判断肿瘤患者是否发生转移依然停留在通过原位肿瘤大小和区域淋巴结状态等标准大体估测肿瘤发生转移的风险。限制液体活检应用于临床的主要因素包括:液体活检的研究进展和临床数据的结合应用非常有限;各种分子标志物的检测和参考区间尚未建立统一标准;缺乏足够状态良好、数据完整、长期随访的样品进行原发和转移肿瘤的比较等。近年来,随着检测技术的不断更新,对液体活检的研究逐渐深入,对其各项指标的生物学特征及临床意义的研究均取得了较大进展。

关键词:液体活检;肿瘤转移;循环肿瘤细胞;循环肿瘤 DNA;微小 RNA

中图分类号:R446

文献标志码:A

肿瘤转移是影响患者预后最直接的危险因素^[1]。传统的肿瘤转移检测金标准——组织活检作为一种侵入性的检查手段,对于年龄较大、病情较重的患者适用性差。而目前临床应用的许多影像学方法也存在不同程度的缺陷,如¹⁸F-NaF(一种带有药代动力学性能的 PET 成像的示踪剂)结合正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography PET)/电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)对监测肿瘤骨转移非常敏感,但¹⁸F-NaF 会极大地影响患者的治疗效果^[2]。PET 试剂——氟化葡萄糖也常用于转移性前列腺癌,且具有较高的预后价值,但其主要用于晚期且很难评估其是否具有足够的敏感性。近年来,液体活检作为一种新型的诊断手段逐渐受到关注,其可以通过多种液体对肿瘤的转移进行非侵入性实时监测^[3]。本文着重介绍不同液体活检指标在肿瘤转移中的应用进展及检测方法。

1 液体活检技术

“液体活检”的概念最早于 2010 年提出,由循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)作为乳腺癌活检的替代疗法,用于乳腺癌预后和治疗反应评估。肿瘤的液体活检是指以最小侵入性或非侵入性的方法取得患者的血液或其他液体样本(尿液、腹水、唾液、胸腔积液等),对其中的肿瘤细胞或核酸等生物学标志物,如 CTCs、循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤微小 RNA(miRNA)、外泌体(exosome)、血小板(platelets)等^[4]进行检测并获取相关疾病信息的技术。相比于组织活检这一肿瘤诊断传统金标准,液体活检具有很多优势,如非侵入性采样、均质化肿瘤异质性、操作方便、耗时短、重复性高、可实时监测肿瘤进展等。随着

精准医学在肿瘤领域中的不断发展,液体活检的无创诊疗优势越来越受医疗业界关注,其临床应用扩展到肿瘤的诊断、治疗、转移判断等各个领域。

2 与肿瘤转移相关的液体活检标志物

2.1 CTCs

2.1.1 CTCs 简介 在活检易引起高转移性风险的肿瘤患者中,CTCs 检测有其优势,可用于判断肿瘤对靶向治疗的反应,如监测肿瘤表面的抗 PD-1 配体 1(PD-L1)蛋白^[5]。另外,通过对 CTCs 进行基因分析,尤其是转录组学分析,对于转移过程的研究非常重要。如采用 RNA 测序可检测胰腺癌鼠模型中非经典 Wnt 通路(尤其是 Wnt2)中的肿瘤转移关键信号^[6]。在 CTCs 的 DNA 甲基化分析中,目前已经发现 CTCs 具备一些与肿瘤-间质转化(EMT)相似的甲基化改变,如转移性去势性前列腺癌的 CTCs 中出现了 EMT 相关基因 miR-200c/141 和 miR-200b/a/429 CpG 岛甲基化水平显著升高(分别为 33.7% 和 37.1%),而转移性乳腺癌患者 CTCs 中,EMT 相关基因 miR-200c/141、miR-200b/a/429 和 CDH1 CpG 岛甲基化水平分别升高了 7.2%、20.8% 和 1.1%^[7]。目前,CTCs 多用于跟踪监测不同的突变型,特定的 CTCs 亚群还能决定肿瘤转移的器官倾向性^[8]。同时,CTCs 还能用于功能性研究,包括 CTCs 的产生、存活、与血液组分的相互作用以及 CTCs 进入血流后产生的远处损伤。因此,CTCs 可为转移性肿瘤细胞的溯源提供有价值的信息。

2.1.2 CTCs 检测技术 目前已经有 40 多种方法用于分离 CTCs,主要包括基于 CTC 生物学特性和基于其物理特性的分离方法两大类。基于生物学特性的方法包括生物标志物

* 基金项目:上海市胸科医院多学科协同临床研究创新项目(XJXT20190201);上海市胸科医院基础研究院内培育项目(2019YNJCM12)。

作者简介:王梦妍,1996 年生,女,硕士研究生,临床检验诊断学专业。

通信作者:娄加陶,主任技师,博士,E-mail:loujiatao@shchest.org。

检测[如 CELLSEARCH[®] circulating tumor cell (CTC) test]和生物标志物与微流控技术相结合(如 Isoflux[®] FICOLL and EpCAM-based microfluidic device)。基于物理特性的方法包括根据 CTC 的大小、密度、离心力、导电性、变形性和光流控特性对 CTC 进行分离。其中强生公司的 CELLSEARCH[®] circulating tumor cell (CTC) test (7900001) 检测试剂盒是目前唯一被美国食品药品监督管理局(FDA)授权的 CTC 检测技术,已经应用于转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌的临床诊断,该项技术通过抗体包被的磁珠识别肿瘤细胞表面的特异性蛋白,然后通过磁铁吸附磁珠达到分离 CTCs 的目的。此外,还有 CTCs 芯片以及用纳米毛刷上的抗体捕获等新型 CTCs 分离技术^[9]。但富集 CTCs 的过程中很难保持其完整性,如流式细胞技术会破坏细胞团等,尽管已有分离 CTCs 细胞团的相关研究^[10],但在技术层面还不够完善。由于分离难度大,CTCs 技术的临床应用仍然会受到许多限制,如尚未形成标准化的单个和成团的细胞富集技术,目前用于分离分析 CTCs 中 DNA 的技术不够灵敏,有的 CTCs 不表达上皮细胞黏附分子(EpCAM),所以不能被以 EpCAM 为基础的方法捕获等^[11]。综上,检测 CTCs 的技术仍处于发展阶段,这也是限制其应用的主要制约因素。

2.2 ctDNA

2.2.1 ctDNA 简介 研究表明,肿瘤发生时,其 DNA 片段会持续汇入血流^[12]。肿瘤细胞的转移能力主要来源于其形成早期,初级肿瘤细胞获得的突变等位基因不仅使细胞有了选择性复制的优势,还包括是否存在转移倾向。相比于后期肿瘤的遗传学改变,转移能力受最初肿瘤发生突变的等位基因的特性影响更大。

血流中多种与癌症相关的 DNA 片段长度均低于正常组织来源的 DNA 片段,且血液中可检出的高浓度短链 DNA 片段与肿瘤转移具有一定相关性,如黑色素瘤患者出现脑转移时,83%的患者血液中 ctDNA 浓度升高^[13]。

2.2.2 ctDNA 检测技术 ctDNA 检测是目前非侵入性肿瘤基因分型最简便的方法,它使更方便快捷的肿瘤基因分型技术的研发成为可能^[14]。目前基于扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)的 PCR 技术在临床上的应用较为广泛,其操作简便,成本较低,常用于检测复发的热点突变和单核苷酸多态性。例如通过 ARMS PCR 检测 BRAF 突变基因,可监测甲状腺癌淋巴结转移^[15]。但 ARMS PCR 技术每次仅能检测 1 个基因位点,且敏感性不高,仅约为 0.1%~1%,限制了 ARMS PCR 的广泛应用。相比于 ARMS PCR,数字 PCR(ddPCR)技术敏感性较高,能使血液中 DNA 检测的灵敏度精确至 0.1%。Chang 等^[13]证实,使用微滴式数字 PCR(ddPCR)技术检测 ctDNA,可实现监测转移性黑色素细胞瘤的治疗效果。此外,另有研究证实,几种高度敏感的 PCR 技术,如 BEAMing 技术(数字 PCR-流式技术)或 PAP(焦磷酸激活的聚合作用)等均可检出单个 ctDNA 分子^[16]。随着操作简化和费用降低,ddPCR 技术,尤其是 ddPCR,有望得到更广泛的应用^[17]。但 ddPCR 的缺点是,所要寻找的异常基因的序列必须是已知的,而且是能同时检测的突变。更为精准的全基因组测序(whole genome sequenc-

ing, WGS)技术的应用使 ctDNA 相关的液体活检得到发展,ctDNA 得以从正常 DNA 中分离出来^[18]。因此,无需提前假设突变基因的测序技术在临床应用中更受青睐^[19]。ctDNA 的等位基因突变比例较低,故而非常适用于靶向 NGS(Targeted NGS),如基于杂交捕获的 NGS 和基于 PCR 的 NGS 等,目前已有通过 NGS 检测骨肉瘤进展和转移的研究^[20]。但由于 WGS 费用较高,耗时较长,目前还不适用于常规的临床检测。

尽管以 ctDNA 为基础的液体活检在临床上已经得到了一定程度的应用,然而目前可用于肿瘤转移诊断的方法仍然十分有限。因此,ctDNA 检测的推广仍需要进一步降低成本、简化实验操作并提高检测灵敏度。

2.3 循环肿瘤 miRNA

2.3.1 miRNA 简介 miRNA 在肿瘤转移的多个过程中起到调节作用,如 EMT、侵袭、血管生成和远处器官转移等^[21]。研究表明,分泌型 miRNA,尤其是外泌体中的 miRNA,与肿瘤转移高度相关。如脑星形胶质细胞可以释放富含 miR-19a 的外泌体,使乳腺癌细胞中的抑癌基因 PTEEN 沉默,从而促进其迁移^[22]。

2.3.2 miRNA 检测技术 目前 miRNA 检测方法主要包括高通量基因芯片、RNA 测序、PCR 检测等,PCR 检测又包括茎环法、poly(A)尾法和 ddPCR 法。由于 miRNA 的序列较短而且含量低,扩增困难,因此,用基因芯片检测 miRNA 的敏感性和特异性相对较低,一些 miRNA 序列仅有几个碱基有差异,这就容易导致假阳性升高。目前主要通过核苷酸类似物的引入解决这类问题。如用寡核苷酸提高捕获探针的溶解温度进而提高其检测灵敏度等。相比之下,RNA 测序准确性较高,可以发现新的 miRNA,即使检测样本中仅有小部分存在突变,也可以通过超深测序检测出来。但是 miRNA 测序的数据解释和分析较为复杂,费用较高,不同平台的检测结果也有较大差异。因此,可以参考基因组测序的方法,开发用于 miRNA 结果判读的软件,如 miRDeep2 等。PCR 法中的茎环法和加尾法都是通过增加 miRNA 片段的长度提高检测灵敏度,这也是目前应用最广泛的检测方法。但由于这两种方法依然是相对定量的方法,目前又缺乏公认的内参基因,因此这些缺陷不利于其普及。dPCR 是绝对定量的方法,不需要参考基因,即使检测低丰度样本也有较高的灵敏性,而且对 PCR 抑制剂的耐受性高。但这种方法成本较高,操作繁琐,机械化水平尚有待提高。

2.4 外泌体

2.4.1 外泌体简介 外泌体是含有功能性生物分子(蛋白质、脂质、DNA/RNA)的囊泡,可转运入受体细胞。研究表明,外泌体的某些成分,如蛋白质和 miRNA,与肿瘤转移存在高度相关性。例如在胰腺癌患者中,含有磷脂酰肌醇聚糖-1(GPC-1)的外泌体浓度与肿瘤转移高度相关,预示着外泌体可以作为肿瘤转移早期检测的生物学标志物^[23]。外泌体蛋白质组学研究发现,肿瘤发生时的整合素谱具有独特的表达特点。如外泌体蛋白组的变化能判断黑色素瘤患者发生非特异性远处转移的风险^[24];外泌体整合素 $\alpha 6\beta 4$ 与 $\alpha 6\beta 1$ 与肺转移有关,而 $\alpha v\beta 5$ 与肝转移有关。分别以 $\alpha 6\beta 4$

和 $\alpha v\beta 5$ 为靶点,能降低外泌体的摄取,并分别降低肺转移和肝转移发生率^[25]。

2.4.2 外泌体检测技术 目前已经有可以通过外泌体检测肿瘤的商品化试剂,主要包括离心柱法和超速离心法两大类。离心柱法操作简单,但很多商品化试剂盒中的外泌体吸附材料的特异性不高,因此,收集的外泌体常包含直径更大的细胞外囊泡。而超速离心法分离的外泌体具有更高的纯度,因此,其应用更为广泛,但它需要能实现超高转速的离心设备。目前已有基于以上 2 种方法的改进技术,如府伟灵教授团队研发了基于捕获外泌体标志物 CD63 的抽提方法,其通过对临床样本进行检测,具有较好的应用潜能^[26]。但由于外泌体之间 CD63 的表达水平存在差异,这种方法仍具有一定局限性。

2.5 肿瘤血小板(TEP)

2.5.1 TEP 简介 1877 年,Kanikarla-Marie 等^[27]发现了“富含特异性肿瘤成分的血栓”参与肿瘤细胞转移,随后其对巨核细胞、血小板、癌症之间相互作用的研究引出了 TEP 的概念。同时,血小板也有一定的吞噬摄取功能,例如,血小板能够摄取肿瘤来源的细胞因子和 RNA,促进原位肿瘤的血管形成。

在肿瘤发生转移的过程中,CTCs 普遍被血小板包被,血小板能与 CTCs 相互作用,使 CTCs 定植于血管壁,同时,黏附在 CTCs 上的血小板能抑制免疫系统对 CTCs 的识别,从而引起 CTCs 转移潜能增加^[28]。另外,血小板引起的转移风险升高还可能与 TGF- β 和组织特异性有关^[29]。

2.5.2 TEP 检测技术 目前对于 TEP 的检测,主要集中于计数、大小、相关标志物和 RNA。研究表明,血小板计数和大小与癌症具有高度相关性,如血小板体积增大的胰腺癌患者生存率降低($P=0.0005$)^[30];同时,在多种癌症中,高血小板计数均与高死亡率相关,如恶性间皮瘤、妇产科肿瘤、肺癌、肾癌、胃癌、结直肠癌和乳腺癌等。有学者指出,TEP 中的 lncRNAs 和 EGFRvIII 有助于转移性非小细胞肺癌的诊断^[31]。TEP 相关的标志物和 RNA 检测主要通过基因芯片和 RNA 测序。但目前的技术很难发现某种亚群的血小板对肿瘤更为敏感,因此,仍需要更深入的探索。

3 小结与展望

近年来,微转移细胞的研究和新一代测序技术发展迅猛,人们对于 CTCs、miRNA、ctDNA 等肿瘤相关生物学标志物的理解也日益加深。各种检测方法为检测肿瘤的生物特性以及发生、发展过程提供了新的研究角度。液体活检的优势是方便、快捷、减少患者痛苦并能使临床医师密切监测患者对治疗的反应和及早发现肿瘤转移。从长远来看,液体活检可在患者出现症状之前,或在肿瘤转移早期发现播散的肿瘤细胞,在血流中循环的肿瘤 DNA 所包含的遗传信息可即时反映肿瘤发展的状况,甚至可以以此探索肿瘤来源。近年来,对液体活检的研究日益增多。为使液体活检在检测肿瘤转移和复发中发挥充分的作用,在临床应用中真正取代手术活检,还需要进一步探索提高其敏感性和精密度、降低成本的方法。

4 参考文献

- [1] Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, *et al.* Systems biology of cancer metastasis[J]. Cell Syst, 2019, 9(2):109-127.
- [2] Sheikhabaehi S, Jones KM, Werner RA, *et al.* ¹⁸F-NaF-PET/CT for the detection of bone metastasis in prostate cancer: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies[J]. Ann Nucl Med, 2019, 33(5):351-361.
- [3] 林慧娟, 陈静. 液体活检分析技术研究进展[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(8):588-592.
- [4] Liu L, Lin F, Ma XT, *et al.* Tumor-educated platelet as liquid biopsy in lung cancer patients[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2020, 146:102863.
- [5] Janning M, Kobus F, Babayan A, *et al.* Determination of PD-L1 expression in circulating tumor cells of NSCLC patients and correlation with response to PD-1/PD-L1 inhibitors [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(6):E835.
- [6] VanderVorst K, Dreyer CA, Konopelski SE, *et al.* Wnt/PCP signaling contribution to carcinoma collective cell migration and metastasis [J]. Cancer Res, 2019, 79(8):1719-1729.
- [7] Lin XY, Chai GS, Wu YM, *et al.* RNA m6A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):2065.
- [8] Lu YS, Lian S, Cheng YL, *et al.* Circulation patterns and seed-soil compatibility factors cooperate to cause cancer organ-specific metastasis[J]. Exp Cell Res, 2019, 375(1):62-72.
- [9] Loeian MS, Mehdi Aghaei S, Farhadi F, *et al.* Liquid biopsy using the nanotube-CTC-chip: capture of invasive CTCs with high purity using preferential adherence in breast cancer patients[J]. Lab Chip, 2019, 19(11):1899-1915.
- [10] Zeinali M, Lee M, Nadhan A, *et al.* High-throughput label-free isolation of heterogeneous circulating tumor cells and CTC clusters from non-small-cell lung cancer patients [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(1):E127.
- [11] Zavridou M, Mastoraki S, Strati A, *et al.* Direct comparison of size-dependent versus EpCAM-dependent CTC enrichment at the gene expression and DNA methylation level in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):6551.
- [12] Pessoa LS, Heringer M, Ferrer VP. ctDNA as a cancer biomarker: a broad overview[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2020, 155:103109.
- [13] Chang GA, Tadepalli JS, Shao YZ, *et al.* Sensitivity of plasma BRAFmutant and NRASmutant cell-free DNA assays to detect metastatic melanoma in patients with low RECIST scores and non-RECIST disease progression[J]. Mol Oncol, 2016, 10(1):157-165.
- [14] Osumi H, Shinozaki E, Yamaguchi K, *et al.* Clinical utility of circulating tumor DNA for colorectal cancer[J]. Cancer Sci, 2019, 110(4):1148-1155.
- [15] Zhang J, Yang YY, Zhao J, *et al.* Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis with ARMS PCR[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(4):761-765.
- [16] Higgins MJ, 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.
- [17] 叶庆, 张标, 杨军, 等. 用于液体活检的新技术: 数字 PCR 检测

- 技术[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(8):564-567.
- [18] Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, *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.
- [19] Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC - challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(9):577-586.
- [20] Zhao J, Dean DC, Hornicek FJ, *et al.* Emerging next-generation sequencing-based discoveries for targeted osteosarcoma therapy[J]. *Cancer Lett*, 2020, 474: 158-167.
- [21] Kulkarni B, Kirave P, Gondaliya P, *et al.* Exosomal miRNA in chemoresistance, immune evasion, metastasis and progression of cancer[J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(10):2058-2067.
- [22] Zhang L, Zhang S, Yao J, *et al.* Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth[J]. *Nature*, 2015, 527(7576):100-104.
- [23] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 523(7559):177-182.
- [24] Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET[J]. *Nat Med*, 2012, 18(6):883-891.
- [25] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis [J]. *Nature*, 2015, 527(7578):329-335.
- [26] Zhao XX, Zhang WQ, Qiu XP, *et al.* Rapid and sensitive exosome detection with CRISPR/Cas12a [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(3):601-609.
- [27] Kanikarla-Marie P, Lam M, Menter DG, *et al.* Platelets, circulating tumor cells, and the circulome [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(2):235-248.
- [28] Jiang XC, Wong KHK, Khankhel AH, *et al.* Microfluidic isolation of platelet-covered circulating tumor cells[J]. *Lab Chip*, 2017, 17(20):3498-3503.
- [29] Takemoto A, Okitaka M, Takagi S, *et al.* A critical role of platelet TGF- β release in podoplanin-mediated tumour invasion and metastasis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:42186.
- [30] Lembeck AL, Posch F, Klocker EV, *et al.* Large platelet size is associated with poor outcome in patients with metastatic pancreatic cancer[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(5):740-744.
- [31] Luo CL, Xu ZG, Chen H, *et al.* LncRNAs and EGFRvIII sequestered in TEPs enable blood-based NSCLC diagnosis [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10:1449-1459.

(收稿日期:2020-06-06)

(本文编辑:许晓蒙)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

对一稿两投和一稿两用问题处理的声明

为维护本刊声誉和广大读者的利益,对于一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1.本声明中所说的“一稿两投”或“一稿两用”,均指同一原始研究的报告“两投”或“两用”或虽然2篇文章在文字的表达和讨论的叙述上有某些不同,但其主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿,即:如果1篇文章已以全文方式在某刊物发表,除非文种不同,否则不可再将该文投寄给他刊。

2.读者举报文稿涉嫌一稿两投时,编辑部将认真收集有关资料并仔细核实。确认属于一稿两投时,将立即进行退稿处理。

3.一稿两投或两用一经证实,本刊将择期在杂志中发布撤销该论文的声明;两年内拒绝刊登该文作者作为第一作者所撰写的一切文稿,并向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

《临床检验杂志》编辑部