

循环肿瘤 DNA 在胃癌发生发展中的作用

王晓楠,程民,胡世莲

(安徽医科大学附属安徽省立医院、安徽省立医院,安徽省老年医学研究所,肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室,安徽省循证医学中心,合肥 230001)

[摘要] 近年来,胃癌的发病率和死亡率居高不下,早期发现、早期诊断、早期治疗是防治胃癌的关键。随着现代医学发展,肿瘤标志物已应用于临床诊断,但由于肿瘤标志物灵敏度和特异度较低,临床应用局限,难以满足"精准医疗"要求。研究表明,循环肿瘤 DNA(ctDNA)检测技术是一种快速、高效、相对无创性的新型"液体活检"技术,能够实时监测机体肿瘤状态、转移、复发及预后评估。本文阐述 ctDNA 与胃癌的关系,介绍目前常用的 ctDNA 检测技术,探讨 ctDNA 在胃癌临床诊疗中的应用价值。

[关键词] 胃肿瘤;肿瘤细胞,循环;基因检测;分子靶向治疗

中图分类号:R735.2 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2017.01.035

The role of tumor circulating DNA in the development of gastric cancer and research progress Wang Xiaonan, Cheng Min, Hu Shilian (Anhui Provincial Hospital, Anhui Institute of Gerontology, Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy, Anhui Evidence-based Medicine Center, Hefei 230001, China)

Corresponding author: Hu Shilian, Email: hushilian@126.com

[Abstract] With increasing morbidity and mortality of gastric cancer in recent years, the early detection, diagnosis and treatment are critical to the prophylaxis and therapy of gastric cancer nowadays. Tumor markers have gain growing concern to its clinical applications but still confined to the sensitivity and specificity which make it hard to fit for "precision medicine". Some research have shown that circulating tumor DNA (ctDNA) detection is a kind of "liquid biopsy" technology which is rapid, effective and noninvasive. The state of tumor, including metastasis, recurrence and prognosis can be monitored by detecting ctDNA. This review focuses on the relationship between ctDNA and gastric cancer, as well as the detection technology commonly used to explore the application of ctDNA in clinical diagnosis and treatment of gastric cancer.

[Key words] Stomach neoplasms; Neoplastic cells, circulating; Genetic testing; Molecular targeted therapy

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一^[1],严重威胁人们的生命健康。近年来,肿瘤的个体化诊疗已经取得很好的效果,改善了患者的预后,但由于缺乏早期诊断的特异性标志物和有效的治疗手段,胃癌患者的复发和转移率仍居高不下。因此,胃癌的早诊、早治是临床亟待解决的问题。研究显示,在肿瘤形成的早期阶段,肿瘤组织可释放肿瘤细胞和 DNA

至外周血,形成循环肿瘤细胞(CTC)及循环肿瘤 DNA(ctDNA)。ctDNA 的水平与肿瘤发生发展具有相关性,检测肿瘤患者血液中 ctDNA 可以提供快速、高效、相对无创性的"液体活检"^[2],这为肿瘤的早期诊断和治疗提供新的研究方向。

1 循环肿瘤 DNA 与胃癌发生发展的关系

ctDNA 与胃癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤的发生发展关系密切^[3-5],其与胃癌的关系倍受关注,Sai 等^[6]采用实时荧光定量 PCR(RTQ-PCR)对 53 例胃癌患者血浆 ctDNA 浓度检测发现胃癌组血浆 DNA 浓度明显高于健康组,晚期胃癌患者的血浆 DNA 浓度高于早期胃癌患者,说明 ctDNA 浓度与胃癌的进展有关,与临床病理类型无关。胃癌的发生与基因改变有关,对胃癌患者的肿瘤组织和相应血浆中的

基金项目:国家自然科学基金(81071808);安徽省自然科学基金面上项目(1408085MH167);安徽省国际科技合作项目(1303063017)

作者简介:王晓楠,硕士在读,Email:1006445947@qq.com

通信作者:胡世莲,主任医师,教授,博士生导师,Email:hushilian@126.com

ctDNA 进行基因启动子区的甲基化检测,发现多数胃癌患者都存在一些基因启动子区高甲基化的现象。有研究^[7]检测 73 例胃癌患者血浆中肿瘤细胞 TFPI2 甲基化,采用实时荧光定量甲基化特异 PCR (RTQ-MSP) 检出 7 例 TFPI2 甲基化,提示 TFPI2 甲基化在胃癌患者中存在,在健康对照组中并未检出。再对样本进行 RTQ-MSP 法分析,发现淋巴结转移和远处转移的患者中 TFPI2 甲基化程度更高,提示其与胃癌的转移有关。RUNX3 是一种肿瘤抑制因子, RUNX3 启动子异常甲基化与包括胃癌在内的很多肿瘤的发生有关。Sakakura 等^[8]采用 RTQ-MSP 法检测胃癌患者血浆 ctDNA 的 RUNX3 甲基化,发现 29% (19/65) 的患者外周血中检测到 RUNX3 高甲基化,经手术治疗后患者血浆的 RUNX3 甲基化水平比术前降低 12 倍。对所有的术前和术后胃癌患者血浆 RUNX3 甲基化水平进行前瞻性研究发现,术后的胃癌患者 RUNX3 甲基化水平比术前下降 83%,并且 RUNX3 甲基化程度与肿瘤的分期、淋巴结转移、血管侵袭有关,敏感性高于 CEA。Kolesnikova^[9]和 Tani^[10]采用甲基化特异性聚合酶链式反应法 (MSP) 检测 MGMT, p15, 和 Hm-LH1 的甲基化程度,发现 20 例胃癌患者 MGMT, p15, 和 Hm-LH1 的甲基化程度分别为 50%、70%、25%,而晚期胃癌患者中 MGMT, p15, 和 Hm-LH1 甲基化程度分别为 90%、90%、60%,在健康对照组中并未检测到异常甲基化。核苷酸切除修复交叉互补基因 1 (ERCC1) 是一种 DNA 损伤修复基因,王红兵等^[11]采用甲基化特异性 PCR 技术 (MSP 法) 检测 30 例胃癌患者外周血、胃癌组织中 ERCC1 基因启动子 CpG 岛甲基化状态。结果显示胃癌组织中 ERCC1 基因启动子 CpG 岛甲基化率为 76.7%,外周血 ctDNA 的 ERCC1 基因启动子 CpG 岛甲基化率为 63.3%,提示胃癌患者外周血中的 ERCC1 基因启动子 CpG 岛甲基化率与胃癌组织中相似,同时发现 ctDNA 与原发肿瘤基因组 DNA 具有相同的遗传变异。检测外周血 ctDNA 可发现肿瘤相关基因的变异,从而反映肿瘤组织的特征性改变。

1999 年, García-Olmo 在结肠癌肿瘤小鼠模型中发现肿瘤小鼠的血浆可改变人工培养的细胞,因此提出:原发肿瘤病灶的致癌基因通过转染使易感细胞经过血液循环转移到远处的靶器官,这个假设称

为“基因转移”^[12]。Holmgren 用实验证明凋亡小体基因中的 DNA 能够转移到吞噬细胞内,这种转移 DNA 可以一直在巨噬细胞内存在。由此推论,位于血液循环中的肿瘤细胞的凋亡小体被吞噬细胞摄取后,释放发生变异的 ctDNA 重新进入其他细胞转染基因,并修改受体细胞的基因组成,即具有转化潜能的肿瘤 DNA 发生迁移,造成远处组织器官转移的机制称为“基因转移”^[13]。这种机制与肿瘤的扩散有关,机体内此类转化细胞应该具有干细胞潜能,因为他们同癌细胞相类似,都具有自我更新能力、分化及转移到不同组织内等特点。ctDNA 可能通过“基因转移”机制参与了结肠癌、胃癌等的肿瘤复发与转移^[14]。

2 循环肿瘤 DNA 检测技术

血清中 ctDNA 的量比血浆中高 3~24 倍,但血浆更适合用来分析 ctDNA,可能是血清受溶解细胞 DNA 的污染而影响 ctDNA 的相对水平^[15]。目前常用检测 ctDNA 方法有荧光染料法、实时荧光定量 PCR (RTQ-PCR)、液滴式数字 PCR (ddPCR) 和新一代靶向测序 (NGS) 等。由于所检测 DNA 靶标的不同,造成检测结果亦存在一定的差异,每种方法都有优缺点^[16]。荧光染料检测法敏感性高、重复性好,适合于大规模人群筛查和临床诊断,但是特异性不强^[17-18]。RTQ-PCR 可以定量研究,应用范围广,但是不同的 DNA 片段,检测条件也不相同,需要反复实验,而且依赖于荧光信号和标准曲线,只能分析较少且已经确定的突变点^[19]。ddPCR 是将样本通过微滴发生器进行微滴化处理后进行 PCR 反应,再用微滴检测器对每个微滴逐个检测,最终经分析软件计算出目标 DNA 分子的浓度,有以下优点:第一, ddPCR 采用终点检测,直接计算目的序列的拷贝数,无需依赖于 Ct 值和标准曲线就可以进行精确的定量检测。第二, ddPCR 敏感度和特异度更高,可以筛查 0.001% 的突变频率,较 qPCR 的敏感性增加了 1000 倍,广泛地应用于稀有突变检测、拷贝数变异分析和复杂样本基因表达检测等方面^[20-21]。NGS 可在全基因组进行高通量的检测,速度快、检测范围更广,并且提高了检测的准确性,但存在一定的假阳性比率,需进一步验证。NGS 主要用于复发或病情恶化前进行早期预测,以 ctDNA-NGS 为基础的分析方法可通过获取新兴突变片段或克隆选择从而制定

一个新的治疗方案^[22]。

3 循环肿瘤 DNA 在胃癌临床诊疗中的应用

3.1 早期诊断 肿瘤早期诊断是提高肿瘤治愈率,降低肿瘤患者病死率的重要途径。有些恶性肿瘤没有可靠的蛋白质生物标志物,有些缺乏特异性,而且大多数的蛋白质生物标志物在循环中持续存在数周,难以准确评估病情。ctDNA 的半衰期短(约2h),特异性强,可动态评估癌症情况^[23]。Kim等^[24]研究30例胃癌患者和34例健康对照组血浆ctDNA的水平,观察胃癌患者术前和手术24h后的ctDNA,发现晚期胃癌患者ctDNA浓度高于早期胃癌组,早期胃癌组高于健康对照组;相比于术前,胃癌术后患者的ctDNA的含量明显下降。Park等^[25]对54例胃癌患者和59例健康对照组研究发现,胃癌组的ctDNA浓度是对照组的2.4倍,提示血浆ctDNA可作为胃癌早期诊断的肿瘤标志物。肿瘤形成的早期,在外周血中检测到脱落的ctDNA,有助于肿瘤的早期发现、早期诊断,并针对性治疗。

3.2 疗效评估 随着治疗手段的多样化,选择安全可靠的疗效评估手段以验证新疗法的有效性。目前临床常用疗效监测方法有血清学指标(如肿瘤标志物)和影像学检查(如B超、CT、MRI)均存在很多不足。Bai等^[26]检测非小细胞肺癌患者化疗前ctDNA的EGFR突变比例为34.5%。但经化疗治疗后,下降为23.1%。而这些由EGFR突变阳性转变为阴性的患者对化疗药物表现出较好的反应性和敏感性。研究对比ctDNA、CTC、CA153和影像学检查监测转移性乳腺癌疾病进展,发现ctDNA比其他指标能更早的反映疾病进展和药物治疗反应^[27]。用血浆标本追踪肿瘤特异性的突变基因的动力学变化,ctDNA能够反映疾病的临床进程^[28]。

3.3 预后判断 肿瘤的分期及细胞的分化程度是胃癌生存期预测的主要依据,其中TNM临床分期与疾病诊断、治疗方案、患者预后息息相关。观察结直肠癌患者术后2~5年ctDNA的水平,结果显示术后检测到ctDNA的患者病情复发,而阴性的患者没有复发^[29]。将ctDNA与TNM分期结合,在治疗前后动态监测ctDNA水平,便于临床医师评估疗效及更改治疗方案。

3.4 靶向治疗 ctDNA最重要的临床应用之一就是根据肿瘤特定基因改变采用特定相应的分子靶向

治疗,靶向治疗不仅对患者身心的伤害小而且对肿瘤的治疗效果将远比传统方法明显^[30]。甲基化的基因治疗可以预防肿瘤的发生,Qu等^[31]研究发现5-氮-2'-脱氧胞苷可以逆转人乳腺癌细胞PDLIM2启动子的甲基化状态,恢复PDLIM2表达,并能抑制乳腺癌细胞的致瘤作用。未来几年以基因治疗为基础的分子靶向治疗将会是临床研究应用的热点^[32]。

4 总结

ctDNA携带的肿瘤基因组信息与肿瘤组织具有良好的一致性,能克服常规肿瘤组织活检所无法突破的肿瘤异质性问题。ctDNA检测简单无创,被称为“液体活检”。但是目前仍存在以下问题:在对同一类ctDNA定量研究发现各项研究数据之间有较大差异,这可能与ctDNA提取和定量方法不同或者肿瘤患者纳入和排除标准不同有关^[33]。研发具有特异性和敏感性的技术仍是应用于临床检测的关键。简便、花费小的方法将有助于ctDNA的检测技术尽快进入临床。ctDNA在胃癌转移的早期诊断、治疗、疗效评估和预后分析等方面具有重要意义,有利于针对肿瘤患者实施个体化综合治疗。

参考文献

- [1] CORREIA M, MACHADO JC, RISTIMIKI A. Basic aspects of gastric cancer[J]. *Helicobacter*, 2009, 14(S1):36-40.
- [2] LGNATIADIS M, LEE M, JEFFREY SS. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA: challenges and opportunities on the path to clinical utility[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(21):4786-4800.
- [3] HAMAKAWA T, KUKITA Y, KUROKAWA Y, et al. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(2):352-356.
- [4] OPENSHAW MR, 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 Rev Mol Diagn*, 2016, 16(7):751-755.
- [5] SANTARPIA M, KARACHALIOU N, GONZÁLEZ-CAO M, et al. Feasibility of cell-free circulating tumor DNA testing for lung cancer[J]. *Biomark Med*, 2016, 10(4):417-430.
- [6] SAI S, ICHIKAWA D, TOMITA H, et al. Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(4C):2747-2751.
- [7] HIBI K, GOTO T, SHIRAHATA A, et al. Detection of TFPI2 methylation in the serum of gastric cancer patients[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(11):3835-3838.
- [8] SAKAKURA C, HAMADA T, MIYAGAWA K, et al. Quantitative analysis of tumor-derived methylated RUNX3 sequences in the serum of gastric cancer patients[J]. *Anti-*

- cancer Res, 2009, 29(7):2619-2625.
- [9] KOLESNIKOVA EV, TAMKOVICH SN, BRYZGUNOVA OE, et al. Circulating DNA in the blood of gastric cancer patients[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137(1):226-231.
- [10] TANI N, ICHIKAWA D, IKOMA D, et al. An early detection of recurrence using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) from peripheral blood in patients after gastrectomy[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2006, 33(12):1720-1722.
- [11] 王红兵, 陈卫昌. 胃癌患者外周血与胃癌组织中 ER-CC1 基因甲基化的关系及其意义[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(11):900-903.
- [12] GARCÍA-OLMO D, GARCÍA-OLMO DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 945(1):265-275.
- [13] GARCÍA-OLMO DC, RUIZ-PIQUERAS R, GARCÍA-OLMO D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue[J]. Histol Histopathol, 2004, 19(2):575-583.
- [14] GOESSL C. Diagnostic potential of circulating nucleic acids for oncology[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(4):431-442.
- [15] 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.
- [16] DEVONSHIRE AS, WHALE AS, GUTTERIDGE A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(26):6499-6512.
- [17] 博士龙, 屠红, 张国玲, 等. 卵巢上皮性癌患者循环 DNA 的定量研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 21(11):659-662.
- [18] BJÖRKMAN L, REICH CF, PISETSKY DS. The use of fluorometric assays to assess the immune response to DNA in murine systemic lupus erythematosus[J]. Scand J Immunol, 2003, 57(6):525-533.
- [19] OPENSHAW MR, 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 Rev Mol Diagn, 2016, 16(7):751-755.
- [20] 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.
- [21] OXNARD GR, PAWELETZ CP, 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.
- [22] LIANOS GD, MANGANO A, KOURAKLIS G, et al. Dynamic sequencing of circulating tumor DNA: novel noninvasive cancer biomarker[J]. Biomark Med, 2014, 8(5):629-632.
- [23] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. Nat Med, 2008, 14(9):985-990.
- [24] KIM K, SHIN DG, PARK MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection[J]. Ann Surg Treat Res, 2014, 86(3):136-142.
- [25] PARK JL, KIM HJ, CHOI BY, et al. Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients[J]. Oncol Lett, 2012, 3(4):921-926.
- [26] BAI H, WANG ZJ, CHEN KN, et al. Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Chn Oncol, 2012, 30(25):3077-3083.
- [27] DAWSON SJ, TSUI DW, MURTAZA M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2013, 368(13):1199-1209.
- [28] 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):2805.
- [29] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. Nat Med, 2008, 14(9):985-990.
- [30] ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. Cancer Discov, 2016, 6(5):479-491.
- [31] QU Z, FU J, YAN P, et al. Epigenetic repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2: Implications for the biology and treatment of breast cancer[J]. J Biol Chem, 2010, 285(16):11786-11792.
- [32] CAI FF, KOHLER C, ZHANG B, et al. Epigenetic therapy for breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(7):4465-4487.
- [33] DEVONSHIRE AS, WHALE AS, GUTTERIDGE A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(26):6499-6512.