

# 液体活检在癌症中的临床研究新进展

李梦雨<sup>1</sup> 金红<sup>2</sup> 徐明鑫<sup>2\*</sup>

1. 牡丹江医学院第一临床医学院, 黑龙江牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院附属红旗医院检验科, 黑龙江牡丹江 157011

**[摘要]** 癌症严重威胁着人类的健康, 全球癌症负担日益加重, 随着科技的进步, 人们开始从基因组层面对癌症进行新的剖析, 在精准医疗的大背景下, 基因检测的蓝海——液体活检也迅速崛起。该技术相对于传统穿刺活检具有成本低、方便快捷等优点, 解决了临床取样的难题, 未来有望应用于肿瘤患者的早期筛查、动态监测及个性化用药等领域, 医疗前景广阔。本文首先介绍基于不同体液的液体活检类型, 随后根据近期国内外研究与实践情况, 整合并分析液体活检最新的技术和方法, 探讨液体活检在癌症中的临床研究新进展。

**[关键词]** 液体活检; 循环肿瘤细胞; 细胞外囊泡; 循环肿瘤 DNA; 精准医疗

**[中图分类号]** R743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-9701(2021)27-0189-04

## Progress in clinical research of liquid biopsy in cancer

LI Mengyu<sup>1</sup> JIN Hong<sup>2</sup> XU Mingxin<sup>2</sup>

1. The First Clinical Medical School, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China

**[Abstract]** Cancer is a serious threat to human health, and the global cancer burden is increasing. With the advancement of science and technology, people have begun to analyze cancer from the genome level. Under the background of precision medicine, liquid biopsy, the blue ocean of genetic testing, has also risen rapidly. Compared with traditional biopsy, this technology has the advantages of low cost, convenience and speed, and solves the problem of clinical sampling. In the future, it is expected to be applied to the fields of early screening, dynamic monitoring, and personalized medicine for cancer patients, and has a broad medical prospect. This article first introduces the types of liquid biopsy based on different body fluids, and then integrates and analyzes the latest technology and methods of liquid biopsy based on recent research and practice at home and abroad, and discusses the new clinical research progress of liquid biopsy in cancer.

**[Key words]** Liquid biopsy; Circulating tumor cells; Extracellular vesicles; Circulating tumor DNA; Precision medicine

由于人口增长老龄化等因素, 全球近一半的癌症病例和超过一半的癌症死亡病例将发生在亚洲, 中国作为人口大国更是深受癌症的荼毒<sup>[1]</sup>。随着人们在基因组层面对疾病认识的刷新, 精准医疗孕育而生, 其基础就是对肿瘤进行精确的病理诊断。组织活检虽是诊断肿瘤的金标准, 但其有着很大的局限性: ①创伤性大, 不宜重复获取; ②肿瘤具有异质性, 使组织活检所得基因信息片面。相比之下, 液体活检无创且易管理, 依赖于肿瘤细胞等可能释放到体液中的物质来获取肿瘤的全面信息, 完美克服了肿瘤异质性的问题, 不仅有利于癌症的早期诊断, 还有助于医生制订更精准有效的疗方<sup>[2]</sup>。本文就液体活检在癌症中的研究新进展进行综述。

**[基金项目]** 牡丹江医学院附属红旗医院“红旗科研基金”科技项目(2018HQ-03); 牡丹江医学院研究生创新科研项目(2019YJSCX-33MY)

\*通讯作者

### 1 血液类型的液体活检

液体活检常依附于血液检查。肿瘤或转移灶融入血液中的循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells, CTCs)、细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)、循环肿瘤DNA(Circulating tumor DNA, ctDNA)和循环RNA[主要是微小RNA(miRNA)]是目前已知的检测肿瘤和癌症辅疗的关键标志物。

#### 1.1 CTCs

CTCs指从原发性肿瘤或转移灶脱落并释放入血的肿瘤细胞, 少数CTCs可逃逸机体的免疫作用在血液循环中存活并播种新的转移灶<sup>[3]</sup>。中性粒细胞和CTCs相互联合可促进血液细胞周期的发展, 扩大CTCs的转移潜能, 但CTCs的生物学特征和脆性及如何定义白细胞与CTCs之间相互作用的分子特征尚未可知, 故研究人员可从此角度出发探讨其机制, 可能对癌症的治疗有重要意义。此外, CTCs可作为癌症的预后标志物, 如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等, CTCs水平

越高,预后越差<sup>[4]</sup>。监测 CTCs 类型和数量变化将有助于患者的早期检测、预后判断、疗效评估、耐药筛查及转移预警,实现个体化精准治疗。目前暂无有效公式去计算癌症患者 CTCs 的真实数量<sup>[5]</sup>,若能破解相关公式密码,将是医疗界的一项重大突破。

### 1.2 EVs

EVs 种类繁多,是指由细胞主动释放的纳米级膜囊。起初,EVs 被低估为“细胞尘埃”和一种处理细胞代谢废物的方式,通过后续研究,现已成为丰富和稳定的循环标志物来源。EVs 主要由微囊泡和外泌体构成,在促进肿瘤微环境中细胞间通讯中起重要作用<sup>[6]</sup>,如多形性胶质母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌等。EVs 可携带蛋白质、信使 RNA、miRNA 和 DNA 等物质,通过分析其携带的被动和主动物质的多样性,可调节癌症的发生、发展和治疗。Cheung 等<sup>[7]</sup>发现,乳腺癌患者血清衍生的 EVs 中存在人乳头瘤病毒 DNA(HPV DNA),对本标进行 EVs 检测能起到扩大诊断阳性病变领域的作用;Julich-Haertel 等<sup>[8]</sup>发现将膜联蛋白 V、上皮细胞黏附分子、去唾液酸糖蛋白受体 1 与 EVs 中的肿瘤相关微粒联合可将肝癌和胆管癌与其他慢性疾病区分开来,ROC 值、敏感度/特异度评分和阳性/阴性预测值>78%。EVs 不仅存在于血液中,还广泛存在于各种体液中,可作为癌症的微创检测工具。研究发现,检测血清和脑脊液中的 EVs 可提高最恶性脑癌成胶质细胞瘤患者的生存率<sup>[9]</sup>。尽管 EVs 具有巨大的临床应用潜能,目前仍缺乏敏感的 EVs 准备和分析技术来配合临床检测工作,因此,新的分析平台需要被开发以应对这些挑战。

### 1.3 ctDNA

ctDNA 属于循环游离 DNA(Circulating free DNA, cfDNA)的一员,是来自肿瘤基因组的 DNA 片段,现已成为液体活检和个体化用药的潜力先驱。研究提示,检测 ctDNA 的最佳标本类型是血浆(6 h 内收集的 EDTA 管)<sup>[10]</sup>。ctDNA 检测可用于识别肿瘤特异性基因突变,如乳腺癌中的人表皮生长因子受体 2(HER2)突变、肺癌和黑色素瘤中的基因突变<sup>[11-13]</sup>。相对于标准放射学,ctDNA 检测能尽早地发现耐药突变,可用于对患者肿瘤动态及治疗效果的评估。大量数据表明,ctDNA 检测对部分晚期癌症具有临床有效性和实用性,如肺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌及胰腺癌等。因相关研究大多为回顾性研究,ctDNA 检测在早期癌症、治疗监测或残留疾病检测中的证据不足,故需要进行大规模的前瞻性研究来确定临床有效性。一项重要的前瞻性研究显示,检测无细胞 EB 病毒(EBV)DNA 中的 ctDNA 可预测鼻咽癌的发生,阳性预

测值为 11%<sup>[14]</sup>。这表明 ctDNA 有筛查癌症的潜力。作为新兴的肿瘤生物标志物,ctDNA 有望在未来的癌症治疗中发挥更大的作用。

### 1.4 循环 RNA

1996 年,研究人员在黑色素瘤患者的血液中首次检测出循环肿瘤相关 RNA,随后在实体瘤患者中检测出其他形式的 RNA,一些 miRNA 可作为预后预测的标志物或新型癌症治疗的潜在靶点<sup>[15]</sup>。目前,对 miRNA 机制的研究还很模糊,研究人员正在积极探索 miRNA 与癌症之间的关系。Zhang 等<sup>[16]</sup>发现 miR-126 可控制慢性白血病干细胞的自我更新;Bhandari 等<sup>[17]</sup>研究证实 miR-133a-3p 可调节肿瘤缺氧进而驱动肿瘤的侵袭性分子特征。由此可见,未来解除对 miRNA 功能的管制对癌症的治疗有重要意义。

## 2 其他类型的液体活检

### 2.1 尿液活检

尿液活检是泌尿系统疾病无创性诊断和预后判断的最佳方法。将尿液离心后,其沉渣可进行尿脱落细胞学检查,上清液可进行游离物质检测,如 ctDNA 或 RNA。Yu 等<sup>[18]</sup>发现在大肠癌患者中检测尿液的 ctDNA 基因突变情况可作为大肠癌早期临床干预指标,Christensen 等<sup>[19]</sup>对尿液进行 ctDNA 检测发现成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR 3)可作为预测膀胱切除术后疾病复发的指标,而检测 RNA 中的 miR-193a 和 miR-448 可用于评估尿液样本的诊断和预后。尿液虽取样便捷,但其所受干扰因素较多,需要进行大量的临床研究才能将其运用到临床工作中。

### 2.2 唾液活检

唾液样本可用于头颈部癌症的检测。近期研究发现,唾液生物标志物可用于口腔癌的诊断和早期检测,如 Zhao 等<sup>[20]</sup>对口腔鳞癌患者唾液中的环状 RNA 进行检测,发现术后其表达水平与术前相比明显降低( $P<0.001$ )。

### 2.3 脑脊液活检

由于血脑屏障的存在,大脑和中枢神经系统成为肿瘤细胞的避难所,因此脑脊液腔室中含有一张独特的、高度信息化的“分子蓝图”。研究提示,脑脊液在中枢神经系统肿瘤患者中存在临床相关的基因组改变,可用液体活检监测肿瘤的进展<sup>[21]</sup>。

### 2.4 粪便活检

利用粪便样本对肿瘤进行分子检测是早期诊断癌症的有效手段,特别是大肠癌。研究提示,利用粪便中的生物标志物可以更早期地检测结肠直肠癌和晚期腺瘤,其较血液标志物相比在大肠癌不同的临床病理分期方面有更好的诊断性能<sup>[22-23]</sup>。

## 2.5 其他

除以上类型外,淋巴液、精液、乳汁、胸膜液和腹水也是肿瘤衍生物质的潜在来源,甚至还能利用呼吸活检测量相关有机化合物。

## 3 液体活检的技术和方法

### 3.1 CTCs 的检测技术

CTCs 发现时间较早,临床产品相对成熟,体外检测系统 Cellsearch 是 CTCs 检测的金标准。除基于电化学技术的 CTCs 检测外,即时 CTCs 检测技术测试仪器体积小,无需专门实验室和检验人员,更为临床提供了一种快速、廉价、易于操作的可能性<sup>[24]</sup>。此外,捕获 CTCs 时可利用 CTCs 与材料(如磁珠、微流控芯片)之间特异性的相互作用将 CTCs 与正常血细胞区分开来<sup>[25]</sup>,富集 CTCs 后可用荧光法(如荧光显微镜、荧光分光光度计、流式细胞仪)、表面增强拉曼光谱(SERS)或电阻抗检测,也可不经富集利用 SERS 或线共聚焦显微镜直接检测。2017 年,Myung 等<sup>[26]</sup>将生物模拟技术和纳米技术相结合,基于 CTCs 黏附蛋白的表面表达,最大限度提高了 CTCs 的检测水平,捕获率高达 82%,纯度高达 90%。CTCs 相关芯片的研发,有望为癌症的早期诊断和预后便捷评估提供新的选择。

### 3.2 EVs 的检测技术

EVs 的检测技术与 CTCs 相似。随着科技的进步,一些纳米材料也将用于 EVs 的检测。在最近的一篇文章中,描述了一种新型微芯片平台,该平台利用抗体条形码可对不同细胞类型和来源的 EVs 进行检测,可同时获取两种不同细胞间通讯物质(蛋白分泌物和 EVs)的信息,能更全面地监控细胞通信<sup>[27]</sup>。EVs 的临床潜力毋庸置疑,但敏感度和特异度差强人意,各种传感机制也存在差异,需要协同多平台表征,因此,研究人员需积极开发新的分析平台以应对这些挑战。

### 3.3 ctDNA 的检测技术

与 CTCs 相比,ctDNA 更稳定,更易分离,但 ctDNA 只占 cfDNA 的一小部分,片段在 170~200 碱基对之间,如何高效地将 ctDNA 提取纯化是研究的关键。市面上有很多提取纯化 ctDNA 的试剂盒,手工法可利用微柱吸附法和磁珠吸附法将其分离,随着技术的更新,也可用机器对其进行提取实现自动化。荧光法可以检测 ctDNA 的浓度<sup>[28]</sup>,其中的癌症基因组信息可通过多种技术被检测出来。基于液滴的数字 PCR(ddPCR)或二代测序(NGS)等新技术的发展,极大地提高了检测稀有序列的敏感度、特异度和精密度,这些技术敏感度在 0.001%~0.010%之间<sup>[29]</sup>。ctDNA 分析方法的最新进展推动了液体活检工具的开发,将用于癌症的诊断、预后、治疗反应监测和跟踪癌症患者中新的突变亚克隆的增加。

## 4 结语

液体活检弥补了传统基因检测不足,利用液体活检技术可实现肿瘤早期筛查、动态监测肿瘤治疗、耐药突变检测及个性化用药、评估肿瘤异质性和复发转移风险。在样本类型选择上,国内外研究以血液为主,其次为尿液,其他样本类型涉及较少。在活检物质选择上,因 CTCs 和 ctDNA 在肿瘤中含量较多,故热点主要集中于两者身上,不同的是,CTCs 捕获肿瘤细胞,ctDNA 则捕获肿瘤 DNA 片段。从临床角度,同时检测两者所得的诊断信息可互补。从技术角度,CTCs 和 ctDNA 可在同一样本中同时获得,两种技术并不冲突,共存可能是其未来的发展方向。液体活检热潮,如火如荼,生物技术公司纷纷切入液体活检领域,部分优秀研发产品已获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认证批准,显示出实验室监管机构对液体活检技术临床应用价值的认可,再加上医保的全面覆盖,液体活检有望在 5~10 年内大规模推广。

液体活检前景广阔,但其仍面临诸多问题和挑战。现有的液体活检技术大多检测复杂,成本昂贵,敏感度和特异度也不尽人意,国内技术与国外相比还属于较为空白区域,缺乏有效的试剂盒和仪器来应对挑战,高效的新兴技术有待研发。再者,关于液体活检的研究大多是回顾性研究,缺乏大规模的前瞻性研究,这是液体活检实际运用到临床工作中的最大障碍。液体活检技术的成熟需要各方面的努力,研究人员应不断扩充相关数据库,国民也应提高自身健康意识,定期去做体检,使液体活检这种癌症早期诊断检测技术实现应有的价值,同时相关部门应给予支持和推广,如此一来既提升了国家整体的医疗水平,又能给相关研究人员提供数据参考,形成一个良性循环。在这样一个精准医疗时代,液体活检技术的发展“道阻且长”,前途也不可限量。

## [参考文献]

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Geoff W. Liquid biopsy: Still early days for early detection[J]. The Lancet, 2018, 391(10140):2593-2594.
- [3] Follain G, Herrmann D, Harlepp S, et al. Fluids and their mechanics in tumour transit: Shaping metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(2):107-124.
- [4] Friedrich MJ. Going with the flow: The promise and challenge of liquid biopsies[J]. JAMA, 2017, 318(12):1095-1097.

- [5] Lorente D, Olmos D, Mateo J, et al. Circulating tumour cell increase as a biomarker of disease progression in metastatic castration-resistant prostate cancer patients with low baseline CTC counts[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(7): 1554-1560.
- [6] Pucci F, Garris C, Lai CP, et al. SCS macrophages suppress melanoma by restricting tumor-derived vesicle-B cell interactions[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 242-246.
- [7] Cheung TH, Yim SF, Yu MY, et al. Liquid biopsy of HPV DNA in cervical cancer[J]. *J Clin Virol*, 2019, 114(5): 32-36.
- [8] Julich-Haertel H, Urban SK, Krawczyk M, et al. Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 282-292.
- [9] Jafari D, Tiyuri A, Rezaei E, et al. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid and serum-isolated extracellular vesicles for glioblastoma: A systematic review and meta-analysis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2020, 20(11): 1075-1085.
- [10] Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(16): 1631-1641.
- [11] Yi Z, Rong G, Guan Y, et al. Molecular landscape and efficacy of HER2-targeted therapy in patients with HER2-mutated metastatic breast cancer[J]. *NPJ Breast Cancer*, 2020, 6: 59.
- [12] Dietz S, Christopoulos P, Yuan Z, et al. Longitudinal therapy monitoring of ALK-positive lung cancer by combined copy number and targeted mutation profiling of cell-free DNA[J]. *EBioMedicine*, 2020, 62: 103-103.
- [13] Marczyński GT, Laus AC, Dos Reis MB, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) detection is associated with shorter progression-free survival in advanced melanoma patients[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18 682.
- [14] Suchorska WM, Lach MS. The role of exosomes in tumor progression and metastasis (review)[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1237-1244.
- [15] Lfr G, Macrae IJ. Regulation of microRNA function in animals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 21-37.
- [16] Zhang B, Nguyen LXT, Li L, et al. Bone marrow niche trafficking of miR-126 controls the self-renewal of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia[J]. *Nat Med*, 2018, 24(4): 450-462.
- [17] Bhandari V, Hoey C, Liu LY, et al. Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 308-318.
- [18] Yu H, Han L, Yuan J, et al. Circulating tumor cell free DNA from plasma and urine in the clinical management of colorectal cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(1): 29-37.
- [19] Christensen E, Demtröder K, Nordentoft I, et al. Liquid biopsy analysis of FGFR3 and PIK3CA hotspot mutations for disease surveillance in bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2017, 71(6): 961-969.
- [20] Zhao SY, Wang J, Ouyang SB, et al. Salivary circular RNAs hsa\_circ\_0001874 and hsa\_circ\_0001971 as novel biomarkers for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(6): 2511-2521.
- [21] Liu X, Yu H, Qiao Y, et al. Salivary glycoproteins as potential biomarkers for screening of early-stage breast cancer[J]. *EBioMedicine*, 2018, 28(6): 70-79.
- [22] Bosch S, Berkhout DJ, Ben Larbi I, et al. Fecal volatile organic compounds for early detection of colorectal cancer: Where are we now? [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(1): 223-234.
- [23] Li L, Wang A, Cai M, et al. Identification of stool miR-135b-5p as a non-invasive diagnostic biomarker in later tumor stage of colorectal cancer[J]. *Life Sci*, 2020, 260: 118-117.
- [24] Chen LC, Wang E, Tai CS, et al. Improving the reproducibility, accuracy, and stability of an electrochemical biosensor platform for point-of-care use[J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 155: 112-111.
- [25] Armbricht L, Rutschmann O, Szczerba BM, et al. Quantification of protein secretion from circulating tumor cells in microfluidic chambers[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(11): 1903-237.
- [26] Myung JH, Park SJ, Wang AZ, et al. Integration of biomimicry and nanotechnology for significantly improved detection of circulating tumor cells (CTCs)[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 125: 36-47.
- [27] Ji Y, Qi D, Li L, et al. Multiplexed profiling of single-cell extracellular vesicles secretion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(13): 5979-5984.
- [28] Fontanilles M, Marguet F, Beaussire L, et al. Cell-free DNA and circulating TERT promoter mutation for disease monitoring in newly-diagnosed glioblastoma[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 179.
- [29] Zonta E, Garlan F, Pécuchet N, et al. Multiplex detection of rare mutations by picoliter droplet based digital PCR: Sensitivity and specificity considerations[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159 094.

(收稿日期: 2020-11-11)