



循环肿瘤DNA的检测技术及在癌症诊疗中的应用价值*

张洁洁^{1,2)} 牛春艳^{2)**} 董莲华²⁾ 杨 怡²⁾ 李会杰²⁾ 杨靖亚^{1)**}

(¹⁾ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ²⁾ 中国计量科学研究院前沿中心, 北京 100029)

摘要 循环肿瘤DNA (ctDNA) 来源于肿瘤, 能很好地反映肿瘤的基因信息, 并且会随着肿瘤的进展发生相应的改变。近年来, ctDNA独特的能力备受人们关注并被广泛研究, 本文在总结ctDNA的来源、性质和样品处理的基础上, 对ctDNA的检测技术及在癌症诊疗中的应用进行综述, 阐述了ctDNA标准物质在二代测序中的作用及重要性, 并指出ctDNA样品的收集、存储、定量检测以及数据分析等各个流程中建立统一标准及规范的迫切性。

关键词 循环肿瘤DNA, 液体活检, 检测技术, 应用, 生物标志物

中图分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0062

肿瘤是目前全球卫生保健问题日益严重的因素之一, 每年有超过百万的新确诊患者。它是由相关基因功能紊乱引起的遗传变化导致的多基因疾病, 有较高的发病率和死亡率^[1]。目前, 组织活检是临床上最常用的诊断癌症手段, 被广泛用于表征肿瘤类型。然而, 组织活检是一种侵入式取样方式, 在取样过程中很有可能因为组织本身的异质性或没有在病变位置采样而引起癌症错判^[2-4]。除此之外, 还会由于活检本身不能反复取样的特性而不能对肿瘤进行实时监控。所以组织活检技术在操作成本、诊断精确性, 以及癌症的高效治疗方面仍然面临更多的挑战。为了克服以上问题, 有研究人员开发一种新型的非侵入式检测方式, 称其为液体活检^[5-7]。该检测是基于对循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA^[8])、循环肿瘤细胞^[9]和血浆中其他肿瘤衍生物^[10]的分析。它们来源于肿瘤组织, 存在于血液中, 可以反映肿瘤发展进程以及耐药性等信息, 指导个体化精准治疗。液体活检中对ctDNA的检测可以发现单核苷酸变异、拷贝数变异^[11-12]、甲基化^[13]等多种表观遗传学改变。它携带肿瘤组织的信息密码, 是一种很好的肿瘤检测生物标志物, 在肿瘤检测方面有较高的准确性和安全性, 所以备受关注并被广泛研究。

1 ctDNA来源及性质

ctDNA是来源于肿瘤组织的一种循环游离DNA (circulating free DNA, cfDNA), 通过肿瘤细胞的凋亡、坏死和分泌外泌体释放到血液中。Mandel等^[14]在1948年首次发现cfDNA存在于健康人的血液中。研究显示, 在健康个体血浆中cfDNA浓度约为1~10 $\mu\text{g/L}$ ^[15]。但是在运动、急性创伤、移植、感染后cfDNA的浓度会升高, 这一特征为其成为潜在的生物标志物奠定了基础。1989年Stroun等^[16]发现, 在肿瘤患者血浆中的部分cfDNA来自于肿瘤细胞, 因为它具有肿瘤DNA特有的双链不稳定性。1994年Sorenson等^[17]首次报道用等位基因特异性聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法在胰腺癌患者血浆中发现的KRAS突变与在肿瘤中发现的KRAS突变相同, 从而证实了血浆中突变的DNA片段是肿瘤起源, 于是就产生了ctDNA这个术语。患者血液中ctDNA的存在及其水平的变化与肿瘤负荷和肿瘤进

* 中国计量科学研究院 (AKYZD202202) 资助项目。

** 通讯联系人。

牛春艳 Tel: 15811087482, E-mail: niuchy@nim.ac.cn

杨靖亚 Tel: 17701673205, E-mail: jy yang@shou.edu.cn

收稿日期: 2023-02-27, 接受日期: 2023-05-24

展有关, 并且 ctDNA 已被证实存在于多种实体恶性肿瘤患者中 (如肺癌^[18]、结直肠癌^[19]、乳腺癌^[20]、黑色素瘤^[21]、前列腺癌^[22]、胃癌^[23]等)。

基于细胞不同的死亡机制, ctDNA 的长度具有可变性, 来自坏死细胞的 ctDNA 片段长度可能超过 10 000 bp, 而来自凋亡细胞的 ctDNA 片段长度一般为 180 bp 左右 (以及 180 bp 的倍数)^[15, 24], 这可能与核小体有关。近年来基于测序的方法检测 cfDNA 时通常在 166 bp^[25-26] 处识别出一个显著的峰, 这是包裹在核小体周围的 DNA 长度 (147 bp) 加上与组蛋白相关的连接子 DNA 的长度。但是, 有研究表明, ctDNA 的片段长度比非癌症突变的 cfDNA 要短 20~40 bp, 在大鼠移植模型中, ctDNA 片段长度在 134~144 bp, 造成这种截短的原因尚不明确^[27]。An 等^[28]发现, cfDNA 片段化过程受到 DNA 甲基化的调控, DNA 甲基化可影响核酸酶的结合以及切割位点, 从而决定 cfDNA 片段化的模式。低水平的 DNA 甲基化可以增加核小体的可及性, 并改变 DNA 片段化过程中核酸酶的切割活性, 从而进一步导致 cfDNA 切割位点和大小分布的变化。

ctDNA 的半衰期较短, 约 15 min~2 h^[29-31], 被核酸酶水解进入循环系统, 并由肾脏排泄到尿液中。因此, ctDNA 可以作为肿瘤动态的高度特异性标志物, 对肿瘤的进程和术后反应进行实时监测, ctDNA 的分析与检测开启了肿瘤进展过程中无创检测特定癌症突变的可能性。

2 ctDNA 样品处理

由于片段小、容易丢失和降解, 所以从血液中分离 ctDNA 进行定量是具有挑战性的。虽然 ctDNA 的浓度会随着分期和肿瘤大小的增加而提高, 但是 ctDNA 在血液中的总百分比极低, 这对样品处理过程提出了更高要求^[32]。

首先在样品采集方面, 为了避免由于细胞裂解和血液凝固过程中 DNA 的释放造成 ctDNA 的稀释, 最好用血浆来提取 ctDNA^[33-34]。血浆样品也不能储存过长时间, 研究显示-80℃保存的血浆中的 DNA 水平每年下降 30%^[35]。另外抗凝剂管的选择也很关键, Wong 等^[36]通过对孕妇血浆中循环游离胎儿 DNA 分子分析, 调查和验证了进行无创产前检查的血液运输和储存条件。结果显示, 相比于 EDTA 抗凝管, Streck BCT 抗凝管能够最大限度地减少细胞降解。

其次在样品提取方面, Fong 等^[37]比较了不同的 cfDNA 提取方法 (苯酚-氯仿法、碘化钠法、QIAamp DNA 试剂盒等), 发现碘化钠方法的得率最高。为了排除由于 DNA 提取物中存在各种 PCR 抑制剂而导致扩增结果错误, 可以用亚硫酸盐转化去除 PCR 抑制成分 (蛋白质、EDTA 和乙醇等)^[38], 从而提高检测效率。

3 ctDNA 检测技术

近年来, 分子生物学技术正在迅速发展, 促进了 ctDNA 的研究与检测^[39]。目前 ctDNA 的主要检测方法一类是基于 PCR 的方法, 包括实时荧光定量 PCR (real-time fluorogenic quantitative PCR)、数字 PCR (digital PCR, dPCR)、BEAMing (beads, emulsion, amplification, and magnetics)、ARMS-PCR (amplification-refractory mutation system PCR), 另一类是基于下一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 方法。除此之外, 一些新技术, 特别是基于纳米技术的生物传感器在检测 ctDNA 方面具有巨大潜力, 为低成本临床应用提供了一种简单而高性能的通用策略。主要有电化学生物传感器、荧光生物传感器、表面增强拉曼散射生物传感器、比色/共振光散射生物传感器等 (图 1, 表 1)。

3.1 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 是检测 ctDNA 最常用的技术之一, 可以对其进行相对定量, 具有操作简单、灵敏度高、特异性好等特点。然而, 实时荧光定量 PCR 对反应中目标序列的“绝对”量是相对于从已知数量或拷贝数的样品生成的标准曲线进行校准^[40-41]。Fleischhacker 等^[42]使用 3 种不同的参考基因 (GAPDH、 β -globin、ERV) 通过实时荧光定量 PCR 对血浆中的 ctDNA 进行检测, 结果 β -globin 与另外两种参考基因的检测结果有很大差异。对于用实时荧光定量 PCR 技术进行 ctDNA 定量分析, 拥有统一且稳定的参考基因和已知拷贝数的 ctDNA 标准物质是问题的关键。

3.2 dPCR

dPCR 是被称为能够对样品中存在的目标核酸进行绝对定量的第三代 PCR 技术^[43]。在 dPCR 中, 首先将样品分为许多独立的 PCR 反应单元, 使得每个微小单元中包一个目标序列或不包含目标序列。众多的微小单元在相同的条件下进行 PCR 扩增, 扩增结束以后, 可以统计发出荧光信号的单元

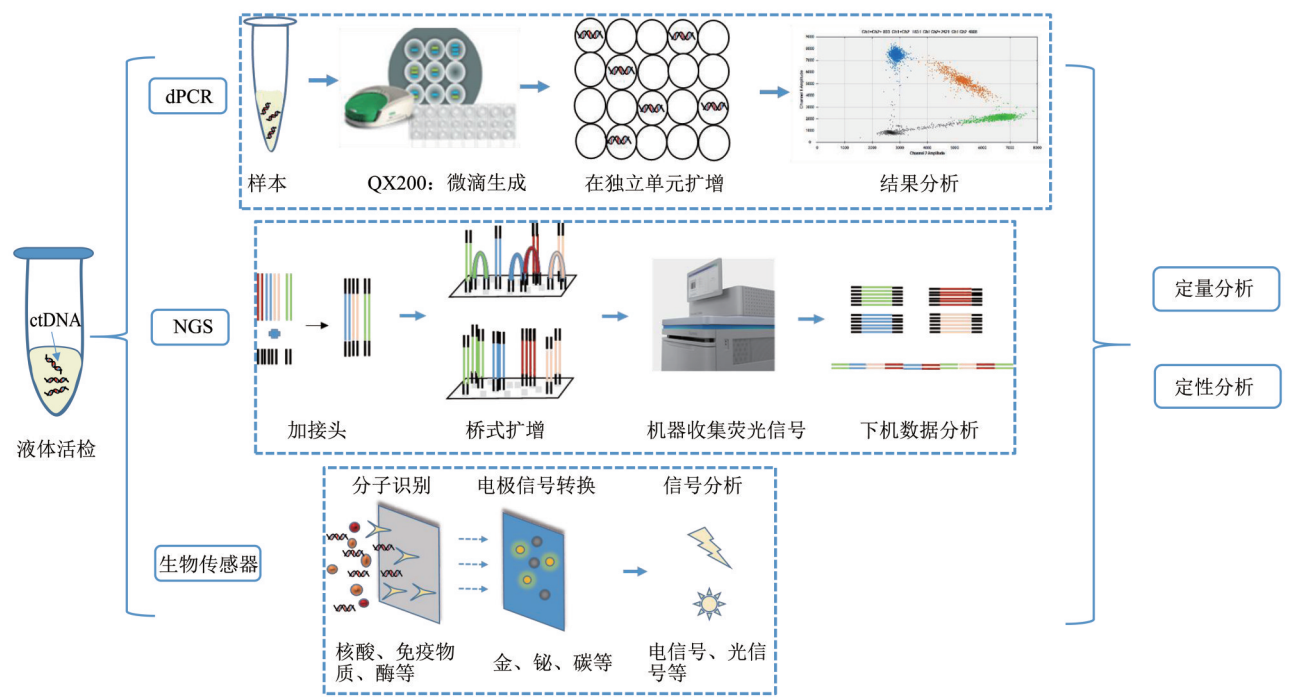


Fig. 1 Flowchart of the principle of the main detection methods for ctDNA
图1 循环肿瘤DNA主要检测方法的原理流程图

个数占总微滴个数的比例,通过泊松分布计算目标序列的浓度和绝对数目。并且目标序列集中在分离的微小单元里,这种浓度效应减少了模板竞争,从而能够在野生型序列的背景下检测罕见的突变。根据形成微小单元的不同原理,数字PCR又可以分为芯片式数字PCR和微滴式数字PCR。

液滴式数字PCR能产生体积达20 000 nl的油包水液滴,这些液滴同时进行PCR扩增,然后用荧光探测器对这些液滴进行分析,可以实现对相对较低浓度的样本进行绝对定量,比如对ctDNA基因突变检出限可以低至0.01%^[44-45],并且能够同时检测多种靶标。Guo等^[46]评估了dPCR对ctDNA样本EGFR基因3种突变类型(E746-A750del、L858R和T790M)的检测性能,检测特异性为100%,检出限分别为0.05%、0.05%和0.1%。De kock等^[45]同时检测了EGFR突变中的19DEL、L858R、L861Q、G719S、S768I等常见突变,当ctDNA的输入量为10 ng时,这些基因的检出限分别为5%、1%、0.25%、0.1%和0.01%。dPCR由于可以对目标基因进行绝对定量并且检测限极低已被广泛应用,但是其通量低且只能检测已知点突变。

3.3 BEAMing

BEAMing是指集合微珠、乳液、扩增、磁性,可以来测量突变型基因和野生型基因的技术^[47]。该技术制造出几百万个油包水乳液小泡,每个乳液小泡中,有一个小的磁珠,通过磁珠上包被基因特异的引物来扩增目的序列,每个磁珠包含原始DNA分子序列的数千个拷贝。然后可以利用荧光探针与磁珠上的DNA片段进行杂交,并使用流式细胞术计数来评估群体中变异DNA分子的数量。Janku等^[48]证明了使用BEAMing技术检测癌症晚期患者血浆ctDNA中BRAF、EGFR、KRAS和PIK3CA基因的21个致癌突变是可行的,其结果与组织活检有较高的一致性(BRAF, 91%; EGFR, 99%; KRAS, 83%; PIK3CA, 91%)。Higgins等^[49]使用BEAMing评估了同时获得的晚期乳腺癌患者的血浆和肿瘤组织样本,二者之间PIK3CA突变有100%的一致性。BEAMing技术的优点一是能够分析ctDNA分子中的微小变异,其突变等位基因频率的检出限约为0.02%,二是代表突变等位基因的稀有磁珠不仅可以定量,还可以纯化以供后续分析。

3.4 ARMS-PCR

ARMS-PCR^[50]指扩增受阻突变体系,又称为等位基因特异性扩增法,是一种简单而经济的SNP基因分型方法,包括PCR反应及凝胶电泳。使用特殊的两组引物在PCR反应中分别扩增已知点突变的模板和正常的模板,然后与微孔板阵列对角线凝胶电泳技术相结合,可以将点突变的模板与正常模板区分开。Xu等^[51]评估了ARMS-PCR检测非小细胞肺癌患者(non-small cell lung cancer, NSCLC)的*EGFR* T790M突变的敏感性和特异性。结果显示该方法敏感特异性强、成本低、操作简单。但是这种方法的引物设计部分关键且耗时,而且需要借助专门的引物设计计算机程序。

3.5 NGS

NGS被称为二代测序技术,是将DNA随机片段化、加接头、制备测序文库,通过对文库中数以万计的克隆进行延伸反应,然后通过检测信号,而得到序列信息的技术^[52]。因其具有据有高通量的优势,可以检测多个已知或未知的点突变,被广泛应用于ctDNA的检测^[53-54]。

由NGS衍生出了不同的测序类型,包括全基因组测序(WGS)、全外显子测序(WES)、标记扩增子深度测序(Tam-Seq)、肿瘤个性化深度测序(CAPP-Seq)等。WGS能提供完整的罕见肿瘤基因组信息,在协助罕见基因突变的临床决策和治疗方案的选择方面显示出巨大的潜力^[55],但由于昂贵且耗时以及一些伦理问题限制了它在临床中的应用。WES测序可用于对人类基因组编码区进行测序,以检测常见或罕见疾病的相关突变。与传统测序技术相比,有成本低、速度快的优势^[56]。Tam-Seq能够同时对数百万个DNA分子进行测序,从而能够对一个物种的转录本和基因组进行详细分析,其通量高、成本低、测序时间短^[47]。CAPP-Seq可以识别同类型癌症患者的多重突变,改善肿瘤异质性的评估,从而提供更全面的诊断信息^[55, 57]。

3.6 生物传感器

PCR和测序的方法使ctDNA检测取得了重大进展,使用少量的起始材料并提供高灵敏度和特异性。然而一些关键点限制了它们的应用,以及在临床环境中的开发:测序的方法操作复杂且过于昂贵,PCR法容易受到序列特异性扩增的影响,并且需要样品预处理,从而增加了分析成本和时间成本。因此,研究者开发了适合临床常规使用的低成本和便携式平台^[58],通过简单的操作过程,能够准确检测未经处理的血清或血浆中的特定ctDNA突变。

3.6.1 电化学生物传感器

Cai等^[59]报道了一种基于肽核酸探针-金纳米颗粒和磷酸铅载铁蛋白的双生物标志物检测平台,用于检测ctDNA中*PIK3CA*基因甲基化和肿瘤特异性突变。肽核酸探针和抗5甲基胞嘧啶抗体用于识别ctDNA的不同部分,在电极表面上形成三明治结构。通过方波伏安法检测电极上的载铁蛋白释放的铅离子电化学信号,从而实现对ctDNA高度特异性和灵敏性检测。该传感器可以对ctDNA浓度产生50~10 000 fmol/L的线性电流响应,检出限为10 fmol/L,并成功检测出从癌症患者血清中收集的ctDNA。

3.6.2 荧光生物传感器

Li等^[60]开发了一种基于杂交链式反应和邻位连接调控CRISPR-Cas12a系统的ctDNA灵敏检测双信号扩增策略。CRISPR-Cas系统除了非凡的基因编辑能力外,还具有等温信号放大的作用,开启了生物传感应用的新时代。ctDNA通过两个发夹探针的连续杂交启动杂交链式反应,产生许多带切口的双链DNA纳米片段,这些片段继续连接来激活CRISPR-Cas12a的反式切割活性。在这种情况下,可以切割双标记的单链DNA荧光基团以产生强烈的荧光信号。由于杂交链式反应和CRISPR-Cas12a的双重扩增,该方法对ctDNA表现出高灵敏度,检出限低至5.43 fmol/L。

Table 1 Comparison of ctDNA detection techniques

表1 循环肿瘤DNA检测技术对比

检测技术	原理	检测类型	优缺点	参考文献
实时荧光定量PCR	实时定量聚合酶链式反应	已知点突变	操作简单、灵敏度高;需要外标进行定量	[40-42]
dPCR	泊松分布	已知点突变	绝对定量、检测灵敏;只能检测已知点突变	[43-46]
BEAMing	磁珠与PCR相结合	已知点突变	检测灵敏、成本高;不易操作	[47-49]
ARMS-PCR	PCR与凝胶电泳结合	已知点突变	简单经济、高通量、灵敏度高;引物设计较难	[50-51]

续表1

检测技术	原理	检测类型	优缺点	参考文献
NGS	高通量测序	已知或未知点突变	检测灵敏、通量高; 成本高	[52-54]
WGS	全基因组测序	已知或未知点突变	能检测罕见肿瘤基因组信息; 昂贵耗时	[55]
WES	全外显子测序	已知或未知点突变	可用于对人类基因组编码区进行测序、成本低速度快	[56]
Tam-Seq	等位基因特异性测定法	已知点突变	灵敏度高、特异性好、成本低	[47]
CAPP-Seq	肿瘤个性化深度测序	已知或未知点突变	可检测单核苷酸变异、插入缺失、重排和拷贝数变异; 目的序列的选择和测序数据的解读是难点	[55, 57]
生物传感器	电化学	已知或未知点突变	操作简单、成本低、灵敏度高、特异性好	[59]
生物传感器	荧光	已知点突变	灵敏度高、特异性好	[60]

dPCR: 数字PCR; BEAMing: 微珠、乳液、扩增、磁性; ARMS-PCR: 扩增受阻突变体系; NGS: 二代测序技术; WGS: 全基因组测序; WES: 全外显子测序; Tam-Seq: 标记扩增子深度测序; CAPP-Seq: 肿瘤个性化深度测序。

4 ctDNA标准物质在NGS中的重要性

NGS 的应用越来越广泛, 有望成为实现人类癌症基因组医学的有用工具。然而, 其临床应用的前提是需要确保数据的可靠性和准确性。应用 NGS 进行基因突变检测包括样品制备、核酸提取、文库制备以及序列测定、数据分析等多个步骤, 因此确保所有步骤的有效性面临极大挑战^[61]。已知浓度和突变丰度的 ctDNA 标准物质可用于校准 NGS 测量和评估诊断性能, 通过 ctDNA 标准物质产生的标准数据集可对二代测序各个过程进行质量控制。因此, 提倡使用标准物质验证整个诊断系统^[62]。

ctDNA 标准物质对 ctDNA 分析性能全面评估起着关键作用。已知序列的合成 DNA 可用作验证 DNA 测序的标准^[63], 但理想情况是使用更接近真实临床样本的病理标本, 以验证包括样本制备在内的整个诊断过程^[64]。当待测基因数量较少时, 可以保存一部分临床标本并作为特定基因的标准物质, 但为多基因检测的测序方法中所有基因制备此类标准物质仍存在一定困难。此外, 对于某些遗传疾病, 由于突变的罕见性, 很难获得真实的临床样本。用已突变细胞系作为原料制备 ctDNA 标准物质比合成 DNA 更接近临床样品, 更易获得且可以保持稳定供应, 因此可以用于制备均匀稳定的标准物质, 对 NGS 检测过程进行验证和评估^[65-66]。

目前国内外利用标准物质开展对 ctDNA 分析方法进行性能评估的研究还较少。2021 年由美国食品药品监督管理局 (FDA) 牵头的一项研究^[52]报告了对业界领先的 5 种 ctDNA 测序分析方法的多位点、跨平台分析性能评估结果。该研究使用标准化的来源于细胞系的标准物质对 ctDNA 测序工作

流程的每个阶段进行了评估及验证。研究结果表明, 样本突变频率、覆盖深度和异质性、DNA 样本量、外显子边缘效应等因素是测序流程中重要的影响因素, 当等位基因突变频率高于 0.5% 时, 5 种测序检测方法均能以较高的灵敏度、准确性和重复性检测到 ctDNA 突变, 但低于这一范围时, 检测就变得不可靠, 不同检测方法之间的差异很大。这种对 ctDNA 分析性能的全面评估有助于为最佳实践指南提供参考。

5 ctDNA在癌症诊疗中的应用

5.1 疾病的早期筛查

在癌症早期, 通过液体活检去检测特定基因的常见突变位点, 可以对癌症进行早期筛查^[67]。Beaver 等^[68]用 dPCR 检测了 30 名乳腺癌患者术前的血液样本, 同时做了肿瘤组织分析, 结果显示血液样本和肿瘤组织中的 PIK3CA 突变率有很高的一致性。说明检测血浆中 ctDNA 基因热点突变位点可以作为肿瘤组织检测的补充。在早期筛查中发现的原发性肿瘤患者, 仅通过手术治愈癌症的可能性很高^[69]。因此, 这种早期筛查是未来降低癌症发病率和死亡率的最有希望的方法之一。但是, 血液中 ctDNA 浓度在癌症早期普遍较低, 所以通过该手段进行癌症早筛仍具有一定挑战性。

5.2 靶向药物的用药指导

在进展期 NSCLC 液体活检声明中^[70], ctDNA 已被明确推荐用于指导 NSCLC 患者靶向药物选择。欧洲药品管理局 (EMA) 和 FDA 已批准使用罗氏诊断的 EGFR 突变检测试剂盒作为伴随诊断^[71], 以帮助从无法进行肿瘤活检的患者中选择 EGFR 突变阳性的 NSCLC 患者进行吉非替尼、厄洛替尼和奥西替尼治疗。FDA 已批准 Guardant Health 基于

NGS 的液体活检测定法用于识别 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者进行奥西替尼的治疗^[71]。这些测试的临床实用性展示了 ctDNA 作为生物标志物的潜力。

表 2 列举了一些已经批准用于 ctDNA 液体活检相关标志物检测试剂盒或检测试剂。

Table 2 ctDNA related marker detection kit or detection reagent
表2 循环肿瘤DNA相关标志物检测试剂盒或检测试剂

技术	检测试剂盒或检测试剂	批准	生物标志物	用途/肿瘤类型	参考文献
PCR	Cobas EGFR Mutations Test V2	FDA、EMA	EGFR 19 del/L858R	伴随诊断/非小细胞肺癌	[71]
PCR	Therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit version 2	CE	EGFR 19 del/L858R	伴随诊断/非小细胞肺癌	[71]
PCR	血浆Septin9基因甲基化检测试剂 Epi proColon	FDA	Septin9基因	高危人群筛查/结直肠癌	[72]
PCR	PIK3CA基因突变检测试剂	FDA	PIK3CA C420R、E542K、E545A、E545D、E545K、Q546E、Q546R、H1047L、H1047R	伴随诊断/乳腺癌	[73]
PCR	SHOX2/PTGER4基因甲基化检测试剂	CE	SHOX2/PTGER4基因	辅助诊断/肺癌	[73]
NGS	Guardant 360 CDx	FDA	EGFR 19 del/L858R	伴随诊断/非小细胞肺癌	[71]
NGS	FoundationOne Liquid CDx	FDA	BRCA1/BRCA2	伴随诊断/前列腺癌	[71]

5.3 治疗效果的实时监控

Dawson 等^[74]评估了利用 ctDNA 来监测转移性乳腺癌治疗效果。将 30 名接受全身治疗的转移性乳腺癌患者的 ctDNA、循环肿瘤细胞和癌症抗原 (CA15-3) 的测定进行了比较。用 WGS 来鉴定体细胞基因组改变，并设计了特殊的方法来量化连续收集的血浆样品中 ctDNA。与此同时测量癌症抗原水平和循环肿瘤细胞的数量。结果发现，在体细胞基因组改变的女性中，分别以 97%、78%、87% 的比例检测到 ctDNA、循环肿瘤细胞和癌症抗原。ctDNA 水平显示出更广泛的动态范围，并且与肿瘤负荷变化的相关性更大。表明 ctDNA 能够为转移性乳腺癌患者提供丰富的信息，是具有高特异性和高灵敏性的生物标志物。

5.4 微小残留病灶以及复发风险的预后评估

微小残留病灶用于描述治疗后体内存在少量肿瘤细胞^[75]。在患者实施切除肿瘤手术后，一般会有较高的复发风险，因此，更好地评估微小残留病灶是癌症管理的关键。ctDNA 分析可以作为复发监测工具。在术后的不同时间点采集一系列的血浆样本，检测已知存在的原发性肿瘤细胞突变，数据显示 ctDNA 的检出与转移性复发风险的增加密切相关^[76]。在该领域早期的一项研究报道^[77]，对 20 名长期随访的原发性乳腺癌的患者进行 ctDNA 动态监测，通过微滴式 dPCR 对血浆中 ctDNA 肿瘤特异性染色体重排进行检测，首次发现 ctDNA 监测能准确区分病人是否出现临床检测到的术后复发。基

于 ctDNA 的检测，在 86% 的患者中提前 11 个月预测到复发风险。另外，基于 NGS 的 ctDNA 检测也可以评估患者的微小残留病灶水平，在预测疾病复发风险方面具有较高的敏感性和特异性^[78]。能够使医生动态监测和确认疾病的缓解，发现复发的早期迹象，并尽早开始治疗以有效管理癌症。该领域正在进行大量研究，尽管许多研究已经表明 ctDNA 检测微小残留病灶的临床效用^[79]，但仍然有许多局限性问题待研究者解决。

5.5 疾病进展检测

血浆中 ctDNA 浓度的增加与疾病进展之间存在相关性。Janssen 等^[80]成功开发了一个非线性混合效应模型，描述了接受厄洛替尼或吉非替尼治疗的 NSCLC 患者血浆中 L858R、19Del 和 T790M 浓度的动力学。此外，通过使用参数时间事件模型，L858R 和 19Del 浓度的相对变化被确定为该患者群体疾病进展的重要预测因素。先前已经表明，在患者血浆中测量的 ctDNA 浓度趋势与患者肿瘤组织中检测到的突变以及通过 CT 扫描测量的肿瘤体积变化相关。在这项研究中，与可检测到 ctDNA 浓度的患者相比，ctDNA 浓度低于检出限的患者表现出更长的无进展生存期和总生存期。与标准 CT 扫描诊断相比，ctDNA 的检测可以更早地发现非小细胞肺癌复发。

6 总结与展望

ctDNA 检测具有微创、可实时取样、反映的信

息全面等特点, 可以应用于癌症的早期筛查、靶向药物选择、疗效实时监控, 以及复发风险的预后评估等方面。此外, ctDNA 检测可与其他多组生物标志物协同使用, 如早期检测抗原、表观遗传标记物、循环肿瘤 RNA、外泌体相关免疫标记物等, 以增强早期检测。尽管 ctDNA 释放到血液中的确切途径尚不完全清楚, 但其存在以及数量与肿瘤负荷或转移有关, 对癌症患者的诊断及治疗有重要价值。

随着 NGS 和 dPCR 等技术的不断发展, 越来越多基于此类技术开发的液体活检方法已经可用于临床环境, 但仍存在实验室间检测结果重复性和再现性较差的难题^[81-82]。因此, ctDNA 的临床检测全过程, 包括可靠的血浆和血清收集和存储方法、DNA 分离和富集技术、可信可比的检测方法和数据分析等, 需要建立统一的标准及规范, 从而进一步提高 ctDNA 的临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] International Agency for Research on Cancer. Cancer Today[M/OL]. Geneva: World Health Organization, 2020 [2023-05-24]. <http://gco.iarc.fr/today/home>
- [2] Mäbert K, Cojoc M, Peitzsch C, *et al.* Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol*, 2014, **90**(8): 659-677
- [3] Mannelli C. Tissue vs liquid biopsies for cancer detection: ethical issues. *J Bioeth Inq*, 2019, **16**(4): 551-557
- [4] Dziejulska D, Kierdaszuk B, Gogol P. Technical aspects and current clinical applications of the skin and skeletal muscle biopsy in neurological diagnostics: an overview. *Folia Neuropathol*, 2022, **60**(3): 277-283
- [5] Sorrells R B. Synovioanalysis ("liquid biopsy"). *J Ark Med Soc*, 1974, **71**(1): 59-62
- [6] Alix-Panabieres C, Pantel K. Liquid biopsy: from discovery to clinical application. *Cancer Discov*, 2021, **11**(4): 858-873
- [7] Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid biopsy: general concepts. *Acta Cytol*, 2019, **63**(6): 449-455
- [8] Pessoa L S, Heringer M, Ferrer V P. ctDNA as a cancer biomarker: a broad overview. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020, **155**: 103109
- [9] Shimada Y, Sudo T, Akamatsu S, *et al.* Cell lines of circulating tumor cells: what is known and what needs to be resolved. *J Pers Med*, 2022, **12**(5): 666
- [10] Anfossi S, Babayan A, Pantel K, *et al.* Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, **15**(9): 541-563
- [11] Chan K C, Jiang P, Zheng Y W, *et al.* Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chem*, 2013, **59**(1): 211-224
- [12] Tsyganov M M, Ibragimova M K, Gaptulbarova K A, *et al.* DNA copy number aberrations and expression of ABC transporter genes in breast tumour: correlation with the effect of neoadjuvant chemotherapy and prognosis of the disease. *Pharmaceutics*, 2022, **14**(5): 948
- [13] Mattei A L, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet*, 2022, **38**(7): 676-707
- [14] Mandel P, Metais P. Nuclear acids in human blood plasma. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1948, **142**(3-4): 241-243
- [15] Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, *et al.* High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*, 2011, **6**(9): e23418
- [16] Stroun M, Anker P, Maurice P, *et al.* Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 1989, **46**(5): 318-322
- [17] Sorenson G D, Pribish D M, Valone F H, *et al.* Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994, **3**(1): 67-71
- [18] Shields M D, Chen K, Dutcher G, *et al.* Making the rounds: exploring the role of circulating tumor DNA (ctDNA) in non-small cell lung cancer. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(16): 9006
- [19] Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, *et al.* Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*, 2015, **21**(7): 795-801
- [20] Sant M, Bernat-Peguera A, Felip E, *et al.* Role of ctDNA in breast cancer. *Cancers (Basel)*, 2022, **14**(2): 310
- [21] Seremet T, Planken S, Schreuer M, *et al.* Illustrative cases for monitoring by quantitative analysis of BRAF/NRAS ctDNA mutations in liquid biopsies of metastatic melanoma patients who gained clinical benefits from anti-PD1 antibody therapy. *Melanoma Res*, 2018, **28**(1): 65-70
- [22] Annala M, Taavitsainen S, Khalaf D J, *et al.* Evolution of castration-resistant prostate cancer in ctDNA during sequential androgen receptor pathway inhibition. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(16): 4610-4623
- [23] Mencil J, Slater S, Cartwright E, *et al.* The role of ctDNA in gastric cancer. *Cancers (Basel)*, 2022, **14**(20): 5105
- [24] Jahr S, Hentze H, Englisch S, *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 2001, **61**(4): 1659-1665
- [25] Lo Y M, Chan K C, Sun H, *et al.* Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*, 2010, **2**(61): 61ra91
- [26] Thierry A R, Mouliere F, Gongora C, *et al.* Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(18): 6159-6175
- [27] Underhill H R, Kitzman J O, Hellwig S, *et al.* Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet*, 2016, **12**(7): e1006162
- [28] An Y, Zhao X, Zhang Z, *et al.* DNA methylation analysis explores the molecular basis of plasma cell-free DNA fragmentation. *Nat*

- Commun, 2023, **14**(1): 287
- [29] Lo Y M, Zhang J, Leung T N, *et al.* Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*, 1999, **64**(1): 218-224
- [30] Yao W, Mei C, Nan X, *et al.* Evaluation and comparison of *in vitro* degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: a qualitative study. *Gene*, 2016, **590**(1): 142-148
- [31] Waldeck S, Mitschke J, Wiesemann S, *et al.* Early assessment of circulating tumor DNA after curative-intent resection predicts tumor recurrence in early-stage and locally advanced non-small-cell lung cancer. *Mol Oncol*, 2022, **16**(2): 527-537
- [32] Ren S, Chen J, Xu X, *et al.* Camrelizumab plus carboplatin and paclitaxel as first-line treatment for advanced squamous NSCLC (cameL-sq): a phase 3 trial. *J Thorac Oncol*, 2022, **17**(4): 544-557
- [33] Jen J, Wu L, Sidransky D. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **906**: 8-12
- [34] Vandekerckhove G, Lavoie J M, Annala M, *et al.* Plasma ctDNA is a tumor tissue surrogate and enables clinical-genomic stratification of metastatic bladder cancer. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 184
- [35] Sozzi G, Roz L, Conte D, *et al.* Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst*, 2005, **97**(24): 1848-1850
- [36] Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, *et al.* Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem*, 2013, **46**(12): 1099-1104
- [37] Fong S L, Zhang J T, Lim C K, *et al.* Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 2009, **55**(3): 587-589
- [38] Nesic M, Bødker J S, Terp S K, *et al.* Optimization of preanalytical variables for cfDNA processing and detection of ctDNA in archival plasma samples. *BioMed Res Int*, 2021, **2021**:5585148
- [39] Gilson P. Enrichment and Analysis of ctDNA. *Recent Results Cancer Res*, 2020, **215**: 181-211
- [40] Green M R, Sambrook J. Constructing a standard curve for real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018. doi:10.1101/pdb.prot095026
- [41] Domnich A, De Pace V, Pennati B M, *et al.* Evaluation of extraction-free RT-qPCR methods for SARS-CoV-2 diagnostics. *Arch Virol*, 2021, **166**(10): 2825-2828
- [42] Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, *et al.* Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta*, 2011, **412**(23-24): 2085-2088
- [43] Moreno-Manuel A, Calabuig-Fariñas S, Obrador-Hevia A, *et al.* dPCR application in liquid biopsies: divide and conquer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2021, **21**(1): 3-15
- [44] Dong L, Wang X, Wang S, *et al.* Interlaboratory assessment of droplet digital PCR for quantification of BRAF V600E mutation using a novel DNA reference material. *Talanta*, 2020, **207**: 120293
- [45] De Kock R, Van Den Borne B, Youssef-el Soud M, *et al.* Therapy monitoring of EGFR-positive non-small-cell lung cancer patients using ddPCR multiplex assays. *J Mol Diagn*, 2021, **23**(4): 495-505
- [46] Guo Q M, Wang L, Yu W J, *et al.* Detection of plasma EGFR mutations in NSCLC patients with a validated ddPCR lung cfDNA assay. *J Cancer*, 2019, **10**(18): 4341-4349
- [47] Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*, 2022, **15**(1): 131
- [48] Janku F, Angenendt P, Tsimberidou A M, *et al.* Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget* 2015, **6**(14): 12809-12821
- [49] Higgins M J, Jelovac D, Barnathan E, *et al.* Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(12): 3462-3469
- [50] Chen J, Xu X, Dalhaimer P, *et al.* Tetra-primer amplification-refractory mutation system (ARMS)-PCR for genotyping mouse leptin gene mutation. *Animals (Basel)*, 2022, **12**(19): 2680
- [51] Xu J, Wu W, Wu C, *et al.* A large-scale, multicentered trial evaluating the sensitivity and specificity of digital PCR versus ARMS-PCR for detecting ctDNA-based EGFR p.T790M in non-small-cell lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, **10**(10): 3888-3901
- [52] Deveson I W, Gong B, Lai K, *et al.* Evaluating the analytical validity of circulating tumor DNA sequencing assays for precision oncology. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(9): 1115-1128
- [53] Frank M J, Hossain N M, Bukhari A, *et al.* Monitoring of circulating tumor DNA improves early relapse detection after axicabtagene ciloleucel infusion in large B-Cell lymphoma: results of a prospective multi-institutional trial. *J Clin Oncol*, 2021, **39**(27): 3034-3043
- [54] Muzzey D, Evans E A, Lieber C. Understanding the basics of NGS: from mechanism to variant calling. *Curr Genet Med Rep*, 2015, **3**(4): 158-165
- [55] Li H, Jing C, Wu J, *et al.* Circulating tumor DNA detection: a potential tool for colorectal cancer management (review). *Oncol Lett*, 2019, **17**(2): 1409-1416
- [56] 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. *Cancers (Basel)*, 2019, **11**(9): 1399
- [57] Bratman S V, Newman A M, Alizadeh A A, *et al.* Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, **15**(6): 715-719
- [58] Wang K, Peng Z, Lin X, *et al.* Electrochemical biosensors for circulating tumor DNA detection. *Biosensors (Basel)*, 2022, **12**(8): 649
- [59] Cai C, Guo Z, Cao Y, *et al.* A dual biomarker detection platform for quantitating circulating tumor DNA (ctDNA). *Nanotheranostics*, 2018, **2**(1): 12-20
- [60] Li M, Luo N, Liao X, *et al.* Proximity hybridization-regulated CRISPR/Cas12a-based dual signal amplification strategy for

- sensitive detection of circulating tumor DNA. *Talanta*, 2023, **257**: 124395
- [61] Ma X, Shao Y, Tian L, *et al.* Analysis of error profiles in deep next-generation sequencing data. *Genome Biol*, 2019, **20**(1): 50
- [62] Hardwick S A, Deveson I W, Mercer T R. Reference standards for next-generation sequencing. *Nat Rev Genet*, 2017, **18**(8): 473-484
- [63] Blackburn J, Wong T, Madala B S, *et al.* Use of synthetic DNA spike-in controls (sequins) for human genome sequencing. *Nat Protoc*, 2019, **14**(7): 2119-2151
- [64] Suzuki T, Tsukumo Y, Furihata C, *et al.* Preparation of the standard cell lines for reference mutations in cancer gene-panels by genome editing in HEK 293 T/17 cells. *Genes Environ*, 2020, **42**: 8
- [65] Craig D W, Nasser S, Corbett R, *et al.* A somatic reference standard for cancer genome sequencing. *Sci Rep*, 2016, **6**: 24607
- [66] Xu J, Qu S, Sun N, *et al.* Construction of a reference material panel for detecting KRAS/NRAS/EGFR/BRAF/MET mutations in plasma ctDNA. *J Clin Pathol*, 2021, **74**(5): 314-320
- [67] Tzanikou E, Lianidou E. The potential of ctDNA analysis in breast cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2020, **57**(1): 54-72
- [68] Beaver J A, Jelovac D, Balukrishna S, *et al.* Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2014, **20**(10): 2643-2650
- [69] Liang N, Li B, Jia Z, *et al.* Ultrasensitive detection of circulating tumour DNA *via* deep methylation sequencing aided by machine learning. *Nat Biomed Eng*, 2021, **5**(6): 586-599
- [70] Rolfo C, Mack P C, Scagliotti G V, *et al.* Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC. *J Thorac Oncol*, 2018, **13**(9): 1248-1268
- [71] Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, *et al.* Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, 2017, **17**(4): 223-238
- [72] Church T R, Wandell M, Lofton-Day C, *et al.* Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*, 2014, **63**(2): 317-325
- [73] 韩彦熙, 李金明, 张瑞. 循环肿瘤DNA检测的临床应用和挑战. *中华检验医学杂志*, 2021, **44**(3): 181-185
- Han Y X, Li J M, Zhang R. *Chin J Lab Med*, March 2021, **44**(3): 181-185
- [74] Dawson S J, Tsui D W, Murtaza M, *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2013, **368**(13): 1199-1209
- [75] Pierce E, Mautner B, Mort J, *et al.* Mrd in all: optimization and innovations. *Curr Hematol Malig Rep*, 2022, **17**(4): 69-81
- [76] Herreros-Villanueva I M, Bujanda L, Ruiz-Rebollo L, *et al.* Circulating tumor DNA tracking in patients with pancreatic cancer using next-generation sequencing. *Gastroenterol Hepatol*, 2022, **45**(8): 637-644
- [77] Olsson E, Winter C, George A, *et al.* Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med*, 2015, **7**(8): 1034-1047
- [78] Lin C, Liu X, Zheng B, *et al.* Liquid Biopsy, ctDNA diagnosis through NGS. *Life (Basel)*, 2021, **11**(9): 890
- [79] Caputo V, Ciardiello F, Corte C M D, *et al.* Diagnostic value of liquid biopsy in the era of precision medicine: 10 years of clinical evidence in cancer. *Explor Target Antitumor Ther*, 2023, **4**(1): 102-138
- [80] Janssen J M, Verheijen R B, Van Duijl T T, *et al.* Longitudinal nonlinear mixed effects modeling of EGFR mutations in ctDNA as predictor of disease progression in treatment of EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Clin Transl Sci*, 2022, **15**(8): 1916-1925
- [81] Kuderer N M, Burton K A, Blau S, *et al.* Comparison of 2 commercially available next-generation sequencing platforms in oncology. *JAMA Oncol*, 2017, **3**(7): 996-998
- [82] Torga G, Pienta K J. Patient-paired sample congruence between 2 commercial liquid biopsy tests. *JAMA Oncol*, 2018, **4**(6): 868-870

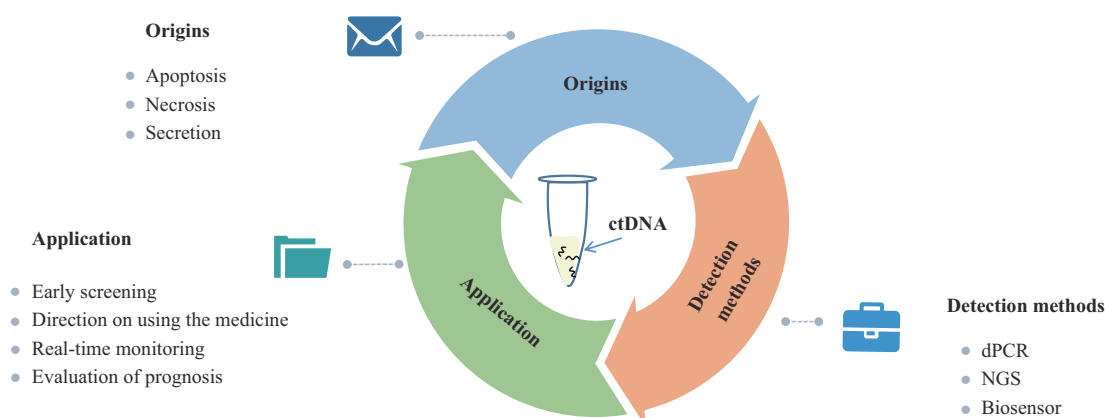
Circulating Tumor DNA Detection Technology and Its Application Value in Cancer Diagnosis and Treatment*

ZHANG Jie-Jie^{1,2)}, NIU Chun-Yan^{2)**}, DONG Lian-Hua²⁾, YANG Yi²⁾, LI Hui-Jie²⁾, YANG Jing-Ya^{1)**}

⁽¹⁾College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

⁽²⁾Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

Graphical abstract



Abstract Circulating tumor DNA (ctDNA) comes from tumor, reflecting the genetic information of the tumor well, and will change with the progress of tumor. In recent years, the unique capabilities of ctDNA have attracted much attention and been widely studied. In this paper, based on the summary of the source, properties and sample processing of ctDNA, its detection technology and application in cancer diagnosis and treatment are reviewed. The roles and importance of ctDNA reference material in second-generation sequencing are described. The urgency of establishing uniform standards and specifications of ctDNA in various processes, such as samples collection, storage, quantitative testing and data analysis, has been pointed out.

Key words circulating tumor DNA, liquid biopsy, detection technique, application, biomarker

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0062

* This work was supported by a grant from National Institute of Metrology, China (AKYZD202202).

** Corresponding author.

NIU Chun-Yan. Tel: 86-15811087482, E-mail: niuchy@nim.ac.cn

YANG Jing-Ya. Tel: 86-17701673205, E-mail: jyyang@shou.edu.cn

Received: February 27, 2023 Accepted: May 24, 2023