

· 论 著 ·

循环游离 DNA 在晚期恶性肿瘤中的应用价值

万莉¹, 王金焱², 徐瀚峰¹, 张启佳¹, 张全安²

1. 南京中医药大学附属南京医院 南京市第二医院肿瘤科, 江苏 南京 210003;

2. 南京医科大学附属江宁医院肿瘤科, 江苏 南京 211100

摘要: **目的** 对比循环游离 DNA (cfDNA)、常用肿瘤标记物在晚期恶性肿瘤中的变化, 探讨 cfDNA 的临床应用价值。**方法** 以南京市第二医院肿瘤科 2020 年 1 月至 2020 年 12 月收治的 30 例可进行影像学评估的晚期恶性肿瘤患者为对象进行回顾性研究, 观察患者治疗过程中 cfDNA、肿瘤标记物以及影像学变化。通过对治疗前患者空腹静脉血 cfDNA 和肿瘤标记物 (CEA、CA199、AFP、NSE) 的检测以及影像学 (CT 或 MRI) 评估, 对比观察 cfDNA 与肿瘤标记物水平变化与影像学疗效评估的一致性。**结果** 30 例晚期恶性肿瘤患者中有 25 例在基线水平检测到 cfDNA 增高, 检出率 83.33%; 体内肿瘤病灶的大小及数目与 cfDNA 水平呈正相关 ($r=0.084, P<0.01$; $r=0.580, P<0.01$)。体内肿瘤负荷越大, cfDNA 水平越高 ($P<0.05$)。cfDNA 与肿瘤标记物同向性变化者 20 例, 异向性变化者 8 例, 两周期抗肿瘤治疗后影像学检查评估显示: CR 0 例, PR 3 例, SD 22 例, PD 5 例。Spearman 相关性分析结果表明, cfDNA 持续增高与影像学检查评估的疾病控制率呈负相关 ($r=-0.553, P<0.01$)。**结论** cfDNA 对晚期恶性肿瘤的病情评估和疗效监测具有一定的预测作用, 或可作为动态观察晚期恶性肿瘤病情变化的一个血清学肿瘤标记物。

关键词: 循环游离 DNA; 恶性肿瘤; 血清肿瘤标记物; 影像学

中图分类号: R730.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)12-1610-04

Circulating cell-free DNA in advanced malignant tumor

WAN Li*, WANG Jin-yan, XU Han-feng, ZHANG Qi-jia, ZHANG Quan-an

* Department of Oncology, Nanjing Second Hospital, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210003, China

Corresponding author: ZHANG Quan-an, E-mail: quananzhang_doctor@163.com

Abstract: Objective To compare the changes of circulating free DNA (cfDNA), common tumor markers in advanced malignant tumors, and to explore the clinical value of cfDNA. **Methods** A retrospective study was conducted on 30 patients with advanced malignant tumors who could be evaluated by imaging in the oncology department of Nanjing Second Hospital from January 2020 to December 2020, to observe the changes of cfDNA, tumor markers and imaging features during the treatment. Through the detection of serum cfDNA and tumor markers [carcinoembryonic antigen (CEA), cancer antigen (CA) 199, alpha-fetoprotein (AFP), neuron specific enolase (NSE)] and the imaging evaluation (CT or MRI) before treatment, the consistency was observed between the changes of cfDNA and the levels of tumor markers and imaging evaluation in monitoring treatment efficacy. **Results** The cfDNA levels were increased in 25 of 30 patients with advanced malignant tumor at baseline (detectable rate 83.33%) and positively correlated with the size ($r=0.804, P<0.01$) and number of tumor lesions ($r=0.580, P<0.01$). The higher the tumor load in vivo, the higher the cfDNA level ($P<0.05$). The levels of cfDNA and the levels of tumor markers changed in the same direction in 20 cases and changed in the opposite direction in 8 cases. After two cycles of anti-tumor therapy, imaging evaluation showed no case of complete response (CR), 3 cases of partial response (PR), 22 cases of stable disease (SD) and 5 cases of progressive disease (PD). Spearman correlation analysis showed that the continuous increase of cfDNA was negatively correlated with the disease control rate by imaging evaluation ($r=-0.553, P<0.01$). **Conclusion** The

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2021.12.003

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK20161110)

通信作者: 张全安, E-mail: quananzhang_doctor@163.com

cfDNA has a certain predictive effect on the disease assessment and curative effect evaluation, and can be used as a serological biomarker to dynamically observe the changes of advanced malignant tumors.

Keywords: Circulating cell-free deoxyribonucleic acid; Malignant tumor; Serum tumor markers; Imaging

Fund program: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20161110)

液体活体检查,简称液体活检,是通过在体液中进行肿瘤相关分子检测的一种技术方法,具有非侵入性、简便、易操作、可反复多次取材的优点,在协助判定良恶性肿瘤、指导临床分期、监测治疗效果、评估病情、药物筛选、判定疾病转归和预后等方面具有一定的参考价值。液体活检^[1-2]作为一种非侵入式的血液学检测手段,其技术范畴包括循环肿瘤 DNA (circulating tumor deoxyribonucleic acid, ctDNA)、循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)以及外泌体检测等。ctDNA,是指肿瘤细胞坏死、凋亡或分泌的外排体释放进入循环系统、具有携带原始肿瘤突变特性的一类 DNA 片段,它从分子水平展现出肿瘤的遗传学特征^[3]。CTC,是指在循环体液中检测到的脱离肿瘤病灶(包括原发灶和转移灶)的肿瘤细胞。研究表明,其与肿瘤转移有着密切的相关性,是恶性肿瘤血行播散的重要机制^[4]。

但不论是 ctDNA 检测,还是 CTC 检测,均存在检测成本昂贵以及技术要求高的缺点,进而限制了其在临床应用的普及性。而血浆中 ctDNA 含量与循环游离 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 含量正相关^[5]。所谓 cfDNA,是指肿瘤细胞坏死后通过巨噬细胞消化进而释放入血的 DNA 片段或者正常细胞发生凋亡后释放入血液的游离 DNA 的统称,此外,细胞炎性坏死或活细胞的释放也是机体产生 cfDNA 的来源,包括机体在感染、衰老或运动状态下均可产生^[6-7]。本研究旨在通过对比 cfDNA 与肿瘤标记物水平的变化、cfDNA 与影像学检查(CT 或 MRI)的变化,分析 cfDNA 在晚期恶性肿瘤中的应用价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2020 年 1 月至 2020 年 12 月南京市第二医院肿瘤科收治的 30 例晚期恶性肿瘤患者的临床资料,进行回顾性研究。其中男性 21 例,女性 9 例;年龄 51~78(63.47±6.86)岁;肺癌 11 例,结肠癌 6 例,乳腺癌 3 例,肝癌 3 例,胃癌 1 例,食管癌 1 例,卵巢癌 1 例,十二指肠癌 1 例,阑尾癌 1 例,舌癌 1 例,纤维肉瘤 1 例。病例收集入选标准:(1)年龄 18~80 岁;(2)经病理学检查确诊为恶

性肿瘤;(3)具有可进行影像学检查评估的病灶;(4)患者依从性好,能够定时配合相关检查及治疗;(5)对本研究知情同意。排除标准:(1)合并有感染性病变;(2)缺乏影像学检查可测量的病灶。本研究经医院伦理委员会审查通过。

1.2 方法 外周血检测 cfDNA 和肿瘤标记物 [CEA、CA199、AFP、神经特异性烯醇化酶(NSE)]:采集患者抗肿瘤治疗前空腹静脉血,每 1 个治疗周期检测 1 次,观察 cfDNA 和肿瘤标记物水平的变化情况。影像学(CT 或 MRI)检查:每两个治疗周期进行 1 次检查。病情评估参照实体肿瘤疗效评价标准(RECIST)1.1,分为完全缓解(CR),部分缓解(PR),疾病稳定(SD)和疾病进展(PD)。

1.3 观察指标 观察治疗过程中 cfDNA 水平变化与肿瘤标记物测定值变化的关系。对治疗前后 cfDNA 水平变化与影像学检查疗效评估结果进行一致性分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行分析。计数资料采用例表示,相关性采用 Spearman 秩相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 cfDNA 检测结果(表 1) 30 例晚期恶性肿瘤患者中,检测到 25 例 cfDNA 水平增高,检出率 83.33%。进一步对其 cfDNA 水平进行分层分析,观察 cfDNA 分别在参考值范围内、 <2 倍水平增高、 $2\sim 5$ 倍水平增高、 ~ 10 倍水平增高以及 >10 倍水平增高时,与体内肿瘤病灶大小和肿瘤病灶数目之间的关系。结果表明,体内肿瘤病灶的大小及数目与 cfDNA 水平等级呈正相关($r=0.804, P<0.01$; $r=0.580, P<0.01$)。随着体内肿瘤病灶范围的增大,数目的增多,cfDNA 水平等级呈现明显增高趋势($P<0.05$)。

2.2 cfDNA 在治疗过程中变化情况与肿瘤标记物水平变化情况比较(表 2) cfDNA 与肿瘤标记物水平同向性变化(同时表现为增高,或同时表现为降低,或同时表现为平稳波动) 20 例,异向性变化(cfDNA 表现为增高而肿瘤标记物表现为降低,或者 cfDNA 表现为降低而肿瘤标记物表现为增高)

8例。

2.3 cfDNA变化情况与影像学疗效评估的关系(表3)

cfDNA持续增高9例,持续降低14例,基本不变7例。RECIST1.1疗效评估结果显示,抗肿瘤治疗后病情评估,CR 0例,PR 3例,SD 22例,PD 5例。cfDNA持续增高的9例中,经影像学检查评估为4例PD,5例SD;影像学评价为SD的5例中,有2例为联合放射治疗后;此外,针对评估为SD的病例,追加跟踪2周期后的影像学评估表现为PD。cfDNA持续降低的14例中,1例经影像学检查评估为PD,3例评估为PR,10例评估为SD,cfDNA持续降低,疾病控制率可高达92.86%。7例cfDNA基本不变,影像学检查评估均为SD,吻合度100%。Spearman相关性分析结果表明,cfDNA持续增高与影像学检查评估的疾病控制率呈负相关($r=-0.553, P<0.01$)。

表1 cfDNA与体内肿瘤负荷的关系 (n=30,例)

肿瘤负荷	cfDNA水平				
	正常范围内	<2倍	2~5倍	~10倍	>10倍
病灶大小(cm)					
<2	5	2	0	0	0
2~5	0	7	2	1	0
>5	0	0	7	2	4
病灶数目(个)					
1~2	5	3	2	0	0
3~5	0	6	6	1	0
>5	0	0	1	2	4

表2 cfDNA与肿瘤标记物动态变化对比 (n=30,例)

组别	例数	肿瘤标记物		
		增高	下降	平稳
cfDNA持续增高	9	6	3	0
cfDNA持续下降	14	5	7	2
cfDNA平稳波动	7	0	0	7

表3 cfDNA动态变化与影像学评估的关系 (n=30,例)

组别	影像学评估(RECIST 1.1)				合计
	CR	PR	SD	PD	
cfDNA持续增高	0	0	5	4	9
cfDNA持续下降	0	3	10	1	14
cfDNA平稳波动	0	0	7	0	7
合计	0	3(10.00)	22(73.33)	5(16.76)	30(100.00)

3 讨论

现有研究表明,cfDNA在健康人血浆中可以检出,但滴度低下;在某些良性疾病^[8-9]中可有增高表现,比如感染性疾病、组织创伤;但在晚期恶性肿瘤^[10]患者的血浆中,cfDNA表现为浓度明显增高。cfDNA异常增高原因考虑与肿瘤细胞和肿瘤临近组织的坏死或凋亡从而释放出大量cfDNA相关。Zwin-

mer等^[11]通过观察头颈部肿瘤放化疗过程中cfDNA水平情况变化发现,抗肿瘤治疗相关的炎症反应与并发感染性疾病所测得的cfDNA阈值不同,两者之间差异具有统计学意义,cfDNA可作为治疗决策的一个生物学参考指标。Szpehcinski等^[12]对65例非小细胞肺癌、28例良性肺结节和16例健康对照者的cfDNA水平及完整性进行分析,结果发现,非小细胞肺癌患者组的cfDNA水平显著高于良性肺结节和健康对照组,ROC曲线分析显示,血浆cfDNA水平>2.8 ng/ml时,其肺癌诊断敏感性达86.4%,特异性达61.4%;cfDNA完整性具有更好的鉴别能力,敏感性91.0%,特异性68.2%。通过cfDNA量化水平分析,可协助判定肺部病变性质,区分肺部良性结节和肺癌,具有与目前临床普遍采用的影像学形态评估的一致性。cfDNA在多个肿瘤的诊断和预后判断中具有重要的参考意义。Yamamoto等^[13]对92例肾细胞癌患者和41例健康人采用实时定量PCR法进行cfDNA检测,结果发现,与健康对照组相比,肾细胞癌患者体内cfDNA水平显著增高(3 803 copies/ml vs 2 242 copies/ml, $P<0.001$),cfDNA中位片段的长度更短(170 bp vs 171 bp, $P=0.052$);ROC曲线分析表明,cfDNA水平作为肾细胞癌诊断依据的敏感性和特异性分别为63.0%和78.1%;多因素分析显示,年龄、性别以及cfDNA水平与肾细胞癌的发生密切相关;此外,cfDNA片段的长度与肾细胞癌的无进展生存期(PFS)密切相关,更短的cfDNA片段与PFS呈负相关($P=0.006$)。总而言之,血浆cfDNA水平可作为诊断肾细胞癌的一个潜在生物学标记物,血浆cfDNA片段长度可作为肾细胞癌的一个预后指标。

本研究对晚期恶性肿瘤动态监测cfDNA水平变化情况发现,体内肿瘤负荷越大,测得的cfDNA水平越高;cfDNA动态水平变化与肿瘤病情相关,当病情得到有效控制后(部分缓解或稳定),cfDNA持续下降或趋于平稳波动,当病情恶化进展时,cfDNA持续异常增高,即cfDNA动态水平变化表现出与影像学检查的评估具有一致性。此外,通过对比cfDNA动态水平变化与临床常用肿瘤标记物水平变化情况发现,cfDNA动态水平变化相较于肿瘤标记物水平变化能更灵敏的反映疾病变化情况。

本研究中,cfDNA持续增高9例,有4例经影像学检查评价为PD,针对另5例影像学检查评价为SD的病例,综合病史及相关诊疗措施考虑,其可能与放射治疗后恶性肿瘤退缩坏死造成cfDNA假性增高相关;而追加跟踪2周期后影像学评估表现为PD,则提

示 cfDNA 持续异常增高与疾病进展相关,且早于影像学检查表现。换言之,动态监测 cfDNA 的变化具有重要意义,一方面对 cfDNA 在治疗后短期内呈现增高表现者,通过追踪动态监测 cfDNA 变化,可协助判定是否为治疗相关的假阳性表现;另一方面,追加跟踪监测 2 周期可发现,cfDNA 持续增高的患者,在初始 2 周期影像学评价为 SD 后,再行 2 周期检查则表现为 PD,提示 cfDNA 变化早于影像学检查表现。

本研究中观察到,cfDNA 持续下降与疾病控制率有一定的相关性,在 14 例 cfDNA 水平持续降低的患者中,最终经影像学检查评估 10 例为 SD,3 例达 PR,疾病控制率高达 92.86%,提示动态监测 cfDNA 可作为肿瘤疗效监测的一项指标。

但与此同时,本研究中也观察到,有 1 例肝癌患者,AFP 呈现进行性增高,影像学检查评估为 PD,但 cfDNA 却表现为与 AFP 异向性变化的降低趋势,是否预示在肝癌中 cfDNA 诊断的灵敏性和特异性可能仍不及 AFP。为此,笔者查阅了前期部分发表的文献,有研究表明,与非丙型肝炎病毒导致的肝癌相比,丙肝相关性肝癌的 cfDNA 水平明显增高 ($P < 0.0001$)^[14];同时,对 87 例行根治性肝切除术患者的 cfDNA 水平变化进行分析,体内高水平 cfDNA 患者的生存期(OS)显著低于体内 cfDNA 水平不高的患者;Cox 回归模型显示,cfDNA 水平是 OS 和肿瘤远处器官转移的独立预后因素;cfDNA 水平可作为根治性肝切除术后会否出现远处转移的一个潜在的生物学预测指标。因此,针对原发性肝癌需进行深入分层分析,包括诱发肿瘤发生的不同病因、肿瘤的不同病理类型等,在后续的临床工作中,笔者一方面将增加肝癌病例数的收集,扩大样本量,另一方面在明确肝癌具体病理类型的同时,关注引发肝癌发生的具体病因,进而对照影像学检查评判标准,着重观察 cfDNA 与 AFP 变化在肝癌诊断中的灵敏度和特异性,以期寻找不同类型肝癌更合适的生物学指标。

综合以上研究和分析表明,从临床实用性、技术可行性以及客观有效性方面,cfDNA 在晚期恶性肿瘤病情评估和疗效监测方面有一定预测作用,或可作为晚期恶性肿瘤病情变化动态观察的一个血清学标记物。

参考文献

- [1] Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells and cell-free DNA in gastrointestinal cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(2):73-74.
- [2] Lee JS, Park SS, Lee YK, et al. Liquid biopsy in pancreatic ductal adenocarcinoma; current status of circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(8):1623-1650.
- [3] Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30):48832-48841.
- [4] Micalizzi DS, Maheswaran S, Haber DA. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology [J]. *Genes Dev*, 2017, 31(18):1827-1840.
- [5] Forte VA, Barrak DK, Elhodaky M, et al. The potential for liquid biopsies in the precision medical treatment of breast cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2016, 13(1):19-40.
- [6] Yan W, Zhang A, Powell MJ. Genetic alteration and mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA (cfDNA) for diagnosis and targeted therapy of gastrointestinal stromal tumors[J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35(1):68.
- [7] Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(3):347-376.
- [8] Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775(1):181-232.
- [9] Hou YQ, Liang DY, Lou XL, et al. Branched DNA-based Alu quantitative assay for cell-free plasma DNA levels in patients with Sepsis or systemic inflammatory response syndrome[J]. *J Crit Care*, 2016, 31(1):90-95.
- [10] 杨俊,徐祖敏.循环肿瘤 DNA 在头颈部肿瘤中的研究进展[J]. *广东医学*, 2018, 39(11):1593-1596.
- [11] Zwirner K, Hilke FJ, Demidov G, et al. Circulating cell-free DNA: a potential biomarker to differentiate inflammation and infection during radiochemotherapy[J]. *Radiother Oncol*, 2018, 129(3):575-581.
- [12] Szepechinski A, Rudzinski P, Kupis W, et al. Plasma cell-free DNA levels and integrity in patients with chest radiological findings: NSCLC versus benign lung nodules[J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(2):202-207.
- [13] Yamamoto Y, Uemura M, Nakano K, et al. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(29):20467-20475.
- [14] Tokuhisa Y, Iizuka N, Sakaida I, et al. Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(10):1399-1403.

收稿日期:2021-07-13 编辑:王国品