

循环肿瘤 DNA 监测早期肺癌术后微小残留病灶的研究进展

姚舒洋, 张 毅

(首都医科大学宣武医院, 北京 100053)

摘 要: 循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA) 已经应用于监测转移性非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 的治疗。近来研究者开始关注 ctDNA 预测早期 NSCLC 患者根治术后微小残留病灶(minimal residual disease, MRD) 的价值。全文总结目前常用的 ctDNA 检测方法, 并介绍了其在早期肺癌术后评估 MRD 和复发预警方面的应用进展。

主题词: 非小细胞肺癌; 微小残留病灶; 循环肿瘤 DNA; 液体活检

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2023)01-0066-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2023.01.B012

Circulating Tumor DNA in Predicting Minimal Residual Disease of Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer

YAO Shu-yang, ZHANG Yi

(Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract: Circulating tumor DNA(ctDNA) has been widely used in monitoring efficacy of targeted therapy for metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC). Recent researches are focusing on the value of ctDNA in predicting minimal residual disease (MRD) of patients with early-stage cancer after treatment. This article reviews the techniques for detecting ctDNA and its application in monitoring MRD and recurrence in patients with early-stage NSCLC after radical resection.

Subject words: non-small cell lung cancer; minimal residual disease; circulating tumor DNA; liquid biopsy

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 占有所有肺癌的 85%, 约 30% 可以通过手术达到根治的目的。但由于微小残留病灶(minimal residual disease, MRD) 的存在^[1], 也就是局部或者远处存在的少量肿瘤细胞, 随着时间的延长 MRD 慢慢增长, 最终导致肿瘤复发转移。

大部分 II ~ III A 期以及有高危因素的 I B 期 NSCLC 患者在根治性手术切除后接受辅助治疗, 然而, 化疗的作用非常有限, 5 年总生存率(overall survival, OS) 仅提高 5%^[2]。多项研究^[3-4] 已证实表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪

氨酸抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI) 能明显改善 EGFR 敏感突变术后 NSCLC 患者的无病生存时间(disease free survival, DFS), 在辅助治疗阶段使用其他的靶向药物或免疫治疗药物的研究也在进行中。

近 5 年来, 关于血浆中定性和定量循环肿瘤 DNA(circulating-tumor DNA, ctDNA) 的研究越来越多, 且应用非常广泛, 从早期发现肿瘤到判断治疗反应和明确耐药机制。包括结直肠癌或乳腺癌在内的多种肿瘤中, ctDNA 已被作为预测 MRD 的生物标志物。近年来, 通过检测 ctDNA 来预测早期可切除 NSCLC 患者 MRD 的研究逐渐增多^[5-7]。在本篇综述中, 我们总结了 ctDNA 相关的技术进展, 并对使用 ctDNA 检测评估肺癌 MRD 进行了汇总和讨论, 还特别指出目前 ctDNA 检测 MRD 存在的问题。

基金项目: 2021 年吴阶平医学基金会资助(320.6750.2021-23-4)

通信作者: 张 毅, E-mail: steven9130@sina.com

收稿日期: 2022-05-20; **修回日期:** 2022-08-12

1 ctDNA 检测方法

1.1 数字聚合酶链式反应技术

数字聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术始于 1999 年,把样本 DNA 稀释至单分子水平进行扩增并逐一测序,能够检测出少见突变并进行定量。其缺点在于,每次只能进行某个目的基因突变位点的检测,对于不同的位点需要单独设计引物和探针,不能进行大规模的检测。因此,该技术只适用于特定的基因突变检测,而不适用于筛查和寻找突变。这一技术进一步改进成 BEAMing 技术[基于小珠(bead)、乳浊液(emulsion)、扩增(amplification)、磁性(magnetic),这四个主要组分来构建的],它把数字 PCR 与流式技术相结合。每一类 DNA 分子都与专一的磁性珠相连接,DNA 分子之间的差异可以通过流式细胞仪检测荧光标记作出评估。该方法可以单次进行多个突变的同时检测。

1.2 二代测序技术

二代测序技术(next generation sequencing,NGS)是基于大规模平行测序的技术,相比较于其他测序技术,能捕捉到所有循环肿瘤 DNA 的基因变化情况,进一步提高检测 ctDNA 样品突变的能力。通常可检测到的等位基因变异率(variant allele fraction, VAF)低至 2%^[8],当把小目标突变热点进行深度测序时,能达到 0.02%^[9]。NGS 的出现变革了基因组测序领域的发展,极大地降低了测序成本,使基因组测序技术不再受限于昂贵的价格。

肿瘤个体化深度测序分析(cancer personalized profiling by deep sequencing,CAPP-Seq)是微量 DNA 处理技术和多阶段生物信息学方法的结合体^[10]。该方法集合了当前 ctDNA 检测技术对早期诊断所存在的问题并加以改进,强调先将 ctDNA 富集化,再进行深度测序。这种方法增加了检测的灵敏度,对检测早期肺癌患者外周血中的 ctDNA 有非常重要的作用。

全外显子组测序(whole exome sequencing,WES)技术步骤主要有文库构建、平行测序、序列比对以及数据分析等步骤,该技术并不需要先验的肿瘤分子特征。研究者采用全外显子测序技术对 88 例 NSCLC 患者的 363 个标本进行了检测,中位 VAF 为 0.042%,63%的标本<0.1%,36%的标本<0.01%^[11]。

全基因组测序因为成本较高,限制了该方法在肿瘤 ctDNA 检测中的实用性。

2 早期肺癌术后 MRD 应用现状

2.1 肺癌围手术期 ctDNA 变化预测 MRD

在临床上可检测到复发转移病灶之前,肿瘤的基因物质可能已经释放入血。ctDNA 就是一种检测潜在肿瘤的方法,但因为早期肿瘤产生的 ctDNA 量低,其应用受到限制。有研究发现 82% IV 期肺癌患者能检测到 ctDNA,而只有 47% I 期患者能检测到^[12]。

一些早期研究发现术前和术后 ctDNA 水平的显著变化可以预测肺癌 MRD。一项研究纳入了 41 例 NSCLC 患者,检测术前 10 d 和术后的 6 种肿瘤驱动基因(*EGFR*,*KRAS*,*TP53*,*BRAF*,*PIK3CA*,*ERBB2*)的 ctDNA 突变频率,中位突变频率从 8.88% 下降到 0.28%,而且 I 期患者下降更明显,甚至有 1 例患者 ctDNA 完全消失^[13]。研究说明 ctDNA 水平反映现存的肿瘤组织量级, I 期肿瘤术后的残存病灶更少。之后的一项研究^[14]结果与之相似,76 例均接受根治性手术的早期 NSCLC 患者,ctDNA 突变频率明显降低,从术前的 4.78%~7.94%下降到切除术后的 0.28%~0.32%($P<0.001$)。

Chen 等^[15]开展的一项前瞻性研究,采用 cSMAERT 技术动态监测围手术期 ctDNA 的变化来明确适合肺癌患者 ctDNA 监测时间点。研究选取了 7 个时间点,分别是手术前(时间 A),手术肿瘤切除后 5 min(时间 B)、肿瘤切除后 30 min(时间 C)和肿瘤切除后 2 h(时间 D),术后 1 d(时间 P1)、术后 3 d(时间 P2)和术后 30 d(时间 P3)。共有 36 例患者在时间 A 点为 ctDNA 阳性;根治术后 ctDNA 浓度迅速降低,在时间 A、B、C 和 D 点的平均 VAF 分别为 2.72%、2.11%、1.14%和 0.17%。中位 ctDNA 半衰期为 35 min。MRD 阳性患者的 ctDNA 半衰期要比阴性者明显长(103.2 min vs 29.7 min, $P=0.001$)。在时间 P2,MRD 阳性者的中位无疾病复发时间(recurrence-free survival,RFS)为 278 d,明显短于 MRD 阴性者的 637 d($P=0.002$)。该研究认为肺癌 R0 切除术后第 3 d ctDNA 可以作为术后肺癌 ctDNA 监测的基线值。

Gale 等^[11]分析了 88 例早期(I~III 期)NSCLC 患者的 363 例血样,其中,78.4%接受了根治性手术

切除。I、II和III期患者治疗前 ctDNA 阳性率分别为 24%、77%和 87%, ctDNA 的临床特异度为 98.5%, 提前发现肿瘤复发的中位时间为 212.5 d。治疗后 2 周至 4 个月发现, ctDNA 阳性的患者有更短的 RFS (HR=14.8, $P<0.001$) 和 OS (HR=5.48, $P<0.001$)。25% 患者在术后 1~3 d 检测到 ctDNA, 与疾病复发无关。治疗前阳性患者有更短的 OS (HR=2.97, $P=0.01$) 和 RFS (HR=3.14, $P=0.003$)。

Waldeck 等^[16]前瞻性地对 33 例 I A~III B 期接受根治性切除的 NSCLC 患者在术前、术中、术后 1~2 周进行随访。57% 患者术前就存在 ctDNA 阳性。术中 ctDNA 阳性率和 ctDNA 浓度明显高于术前 (分别为 57% vs 19%; 12.47 ng/mL vs 6.64 ng/mL)。4 例 (19%) 术后 1~2 周 ctDNA 阳性者之后均出现疾病进展; 而 12 例 ctDNA 阴性者中, 只有 4 例出现复发; 同样发现术后早期 ctDNA 阳性者的 DFS ($P=0.013$) 和 OS 更短 ($P=0.004$)。

2.2 肺癌术后长期 ctDNA 监测预测 MRD

在 CAPP-Seq 的认证试验^[17]中, 有 2 例 I b 期 NSCLC 患者在术后和辅助放疗后 3~4 个月时检测不到 ctDNA, DFS 分别为 32 个月和 21 个月。另 1 例 II b 期 NSCLC 患者放疗后有一个残存肿物, 然而治疗后 ctDNA 检测为阴性, 该例患者一直进行 ctDNA 监测, 其 DFS 为治疗后 22 个月, 之后发现这一肿块为放疗诱导的炎症反应。由此可见早期肺癌根治性治疗后液体活检的预测价值。

TRACERx 试验^[7]对每例患者原发肿瘤进行了外显子测序, 制定个性化的单核苷酸变异谱, 纵向地通过 ctDNA 来进行监测, 血浆中发现 2 个及以上预定义的变异点即视为阳性。结果发现, ctDNA 状态与根治性手术后的疾病复发密切相关。24 例患者术前、术后 ctDNA 标本进行复发监测, 14 例患者出现复发, 其中 13 例在临床检查出病灶之前已经检测到 ctDNA。相比于影像学诊断, ctDNA 检测超前预判中位时间为 70 d。相反, 随访期间 (中位随访时间 775 d) 未出现复发的 10 例患者中, 只有 1 例检测到 ctDNA。尽管这一方法有很高的预测价值, 考虑到个体化 ctDNA 检测的经济费用, 作者持保留意见。此外, 值得注意的是, 该研究中肺腺癌 ctDNA 检测阳性率只有 19%, 而鳞癌为 97%, 这可能与肺鳞癌更常发生坏死相关。

Chaudhuri 等^[18]采用 CAPP-Seq 技术来评估 I~III 期 NSCLC 术后患者的 MRD。该方法采用了非个性化的 128-基因谱。37 例患者在肺癌根治术后进行了 ctDNA 检测且均出现了疾病复发, ctDNA 阳性率为 72%, 在影像学确认进展之前检测到 ctDNA 的中位时间为 5.2 个月, 这一检测可以较好地预测临床疗效, 尚未进展的患者无一例检测到 ctDNA, 93% ctDNA 阴性患者尚未发生进展。此外, 1 例复发的患者在诊断复发时, ctDNA 水平升高。与 TRACERx 试验不同的是, 这一研究中肺腺癌患者的 ctDNA 检出率为 89%, 部分原因是该研究纳入的 I 期患者比例更低 (18% vs 61%)。这两个研究结果说明可以通过检测 ctDNA 来评估 MRD, 并据此进行肺癌治疗决策。

Kuang 等^[19]研究发现, 与化疗后 ctDNA 清零者相比, 化疗后 ctDNA 持续阳性者的 RFS 更差 (HR=8.68, $P=0.022$)。化疗后 ctDNA 阴性与化疗后 ctDNA 阳性患者相比有更好的远期疗效 (HR=4.76, $P=0.047$)。该研究表明, 化疗后 ctDNA 状态与 RFS 密切相关, ctDNA 监测有可能用作术后强化治疗指导。

3 ctDNA 检测 MRD 的机遇

评估使用 ctDNA 预测 MRD 的优势, 很重要的一点, 要考虑目前的医疗现状。目前临床各指南推荐 I B~III A 期根治术后的 NSCLC 患者接受辅助化疗或辅助靶向治疗。虽然有些早期 NSCLC 根治术后的患者出现了复发, 但也有患者获得治愈, 未出现肿瘤复发, ctDNA 检测有助于甄别这部分患者, 从而避免接受不良反应大的全身化疗, 比如术后 ctDNA 检测为阴性者可能不需要接受全身治疗。考虑到 ctDNA 的高特异度, 通过未来的前瞻性试验研究, 希望证明根治术后 ctDNA 阴性患者无法从全身化疗中获益。未来的治疗策略可能依据术后 ctDNA 检测结果来制定, 术后 ctDNA 阳性者预示着存在 MRD, 建议进行术后辅助治疗; 而术后 ctDNA 阴性者预示着治愈, 术后常规复查即可。

ctDNA 长期监测有助于判断初始辅助化疗耐药患者是否接受后续强化治疗。TRACERx 试验中, ctDNA 水平在辅助化疗后升高, 说明出现了治疗耐药的情况。因此, 如果 ctDNA 检测发现 VAF 升高, 提示疾病进展, 建议调整治疗方案以及延长辅助治

疗的时间来改善患者预后。需要未来开展前瞻性研究来回答针对辅助化疗过程中 ctDNA 升高患者的最佳临床策略。

当影像学评估为稳定(甚至是好转),可 ctDNA 分析结果不佳,临床上应该采取什么措施?当 ctDNA 提示复发,是否需要等到影像学进展后再开始治疗?一旦出现 ctDNA 水平提高,需要制定合适的临床检查计划。放疗后或手术切除后原发病灶的影像学成像通常提示治疗后变化,而这可能与局部复发产生混淆。因此,ctDNA 可能有助于辨别早期局部复发。远处转移需要进行更特异度的检查,比如 PET/CT。一定要明确到底是局部复发还是远处转移,因为直接影响后续治疗策略的制定。未来的前瞻性临床试验研究也应该回答如何更准确地寻找和甄别复发转移病灶。

4 ctDNA 检测 MRD 的挑战

4.1 肿瘤组织和液体活检的一致性

ctDNA 用于检测 MRD,很重要的是确定血浆标本和肿瘤组织检测的一致性。一项纳入了 32 项研究的荟萃分析^[20],包括 4 527 例 NSCLC 患者,血浆标本和肿瘤组织中 ctDNA *EGFR* 突变状态检测的灵敏度和特异度分别是 0.70 和 0.98。肿瘤组织和血浆 DNA 检测不一致性会影响 ctDNA 的监测效能。

4.2 检测技术的局限性

TRACERx 试验研究数据说明肿瘤体积与 ctDNA 阳性 NSCLC 患者的平均血浆 VAF 水平相关。10 cm³ 大小的原发肿瘤预示着 ctDNA 血浆 VAF 为 0.1%。肿瘤大小可能限制单核苷酸变异 (single nucleotide variations, SNVs) ctDNA 的灵敏度,因此其并不能辨别很早期的复发。CT 检查尚无法检查出来的肺结节可能已经释放 ctDNA, VAF 低达 0.000 18%,即使是非常敏感的 ctDNA 技术(在适宜条件下,已报道的检测阈值为 0.000 25%)也难以达到^[21]。因此需要 ctDNA 技术不断改进以提高其检出病灶的灵敏度,以避免遗漏非常微小的 MRD。

4.3 ctDNA 检测的假阳性

ctDNA 的特异度也是一个问题,并非所有检测到的基因突变都与肿瘤发展相关。血浆游离 DNA (cell free DNA, cfDNA) 可能来自于血细胞(cfDNA

见于正常衰老过程,70 岁以上健康成年人的发生率为 10%),而不一定预示着肿瘤进展。Hu 等^[22]报道,cfDNA 监测到的大部分 *JAK2* 突变,一部分 *TP53* 突变和少量 *KRAS* 突变来自血细胞,而非肿瘤细胞。因此他们建议使用配对的外周血细胞基因型鉴定以避免误诊为肿瘤。Li 等^[23]报道一种检测 cfDNA 的新方法,把白细胞与一种杂交捕获谱(包括 37 种肺癌相关的基因,测试深度达到 50 000x)进行配对,可以筛除克隆性造血相关的体细胞突变。NGS 检测已知驱动基因的灵敏度率为 75% (68/91), 特异度达 100% (19/19)。

4.4 术后 ctDNA 检测的最佳时间

ctDNA 检测的最佳时间也需要在前瞻性研究中进行评估。Chen 等^[15]建议把 R0 切除术后第 3 d ctDNA 作为研究的基线值。Chae 等^[12]报道手术创伤可能导致肿瘤切除术后 1 周血浆 DNA 水平明显升高。在晚期 NSCLC 患者中发现,治疗早期 ctDNA 升高达峰,可能源于治疗诱导了肿瘤细胞死亡,肿瘤 DNA 快速释放^[21]。需要进一步的研究来区分上述 ctDNA 水平的变化与真正的 MRD。

5 结 语

近年来,从评估肿瘤负荷角度出发,MRD 监测在血液恶性肿瘤中早已不陌生,但在包括肺癌在内的实体肿瘤中的价值及应用前景仍在开发中。早期 NSCLC 根治术后的辅助治疗还存在诸多亟待解决的问题,即使近几年已经批准了 *EGFR* TKI 可用于 *EGFR* 敏感突变的 NSCLC 术后辅助治疗,目前辅助治疗选择仍非常有限。越来越多的研究证实 ctDNA 是一种高特异度和高灵敏度的生物标志物,能预测根治术后患者的 MRD,但仍需要更多的大型前瞻性研究结果来进一步明确和优化其在早期 NSCLC 领域中的应用。

参考文献:

- [1] Pantel K, Alix-Panabieres C. Tumour microenvironment: informing on minimal residual disease in solid tumours[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(6):325-326.
- [2] Burdett S, Pignon JP, Tierney J, et al. Adjuvant chemotherapy for resected early-stage non-small cell lung cancer [J].

- Cochrane Database Syst Rev,2015,(3):CD011430.
- [3] He J,Su C,Liang W,et al. Icotinib versus chemotherapy as adjuvant treatment for stage II ~ III A EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (EVIDENCE): a randomised, open-label,phase 3 trial[J]. Lancet Respir Med,2021,9(9): 1021–1029.
- [4] Wu YL,Tsuboi M,He J,et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. N Engl J Med,2020,383(18):1711–1723.
- [5] Cheng ML,Pectasides E,Hanna GJ,et al. Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: clinical relevance and future directions[J]. CA Cancer J Clin,2021,71(2): 176–190.
- [6] Vessies DCL,Schuurbiers MMF,van der Noort V,et al. Combining variant detection and fragment length analysis improves detection of minimal residual disease in post-surgery circulating tumour DNA of stage II ~ III A NSCLC patients[J]. Mol Oncol,2022,16(14):2719–2732.
- [7] Abbosh C,Birbak NJ,Wilson GA,et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution [J]. Nature,2017,545(7655):446–451.
- [8] 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):136ra168.
- [9] Narayan A,Carriero NJ,Gettlinger SN,et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing [J]. Cancer Res,2012,72(14):3492–3498.
- [10] Thompson JC,Yee SS,Troxel AB,et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next-generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA[J]. Clin Cancer Res,2016, 22(23):5772–5782.
- [11] Gale D,Heider K,Ruiz-Valdepenas A,et al. Residual ctDNA after treatment predicts early relapse in patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2022,33(5):500–510.
- [12] Chae YK,Oh MS. Detection of minimal residual disease using ctDNA in lung cancer: current evidence and future directions[J]. J Thorac Oncol,2019,14(1):16–24.
- [13] Guo N,Lou F,Ma Y,et al. Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery [J]. Sci Rep,2016,6:33519.
- [14] Chen K,Zhang J,Guan T,et al. Comparison of plasma to tissue DNA mutations in surgical patients with non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2017,154 (3):1123–1131,e1122.
- [15] Chen K,Zhao H,Shi Y,et al. Perioperative dynamic changes in circulating tumor DNA in patients with lung cancer(DY-NAMIC) [J]. Clin Cancer Res,2019,25(23):7058–7067.
- [16] 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[J]. Mol Oncol,2022, 16(2):527–537.
- [17] Newman AM,Bratman SV,To J,et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage[J]. Nat Med,2014,20(5):548–554.
- [18] Chaudhuri AA,Chabon JJ,Lovejoy AF,et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling[J]. Cancer Discov,2017, 7(12):1394–1403.
- [19] Kuang PP,Li N,Liu Z,et al. Circulating tumor DNA analyses as a potential marker of recurrence and effectiveness of adjuvant chemotherapy for resected non-small-cell lung cancer[J]. Front Oncol,2020,10:595650.
- [20] Zhou S,Huang R,Cao Y. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in peripheral blood circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer: a PRISMA-compliant meta-analysis and systematic review[J]. Medicine(Baltimore),2020,99(40):e21965.
- [21] Nagasaka M,Uddin MH,Al-Hallak MN,et al. Liquid biopsy for therapy monitoring in early-stage non-small cell lung cancer[J]. Mol Cancer,2021,20(1):82.
- [22] Hu Y,Ulrich BC,Supplee J,et al. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis[J]. Clin Cancer Res,2018,24(18):4437–4443.
- [23] Li BT,Janku F,Jung B,et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium[J]. Ann Oncol,2019,30(4):597–603.