

## 循环肿瘤 DNA 在非小细胞肺癌疗效评估中的意义

孙云凤, 杨欣, 方成, 赵伟庆, 季枚

(苏州大学第三附属医院 肿瘤内科, 江苏 常州, 213000)

**摘要:**目的 以影像学为标准,比较循环肿瘤 DNA(ctDNA)与癌胚抗原(CEA)、糖链抗原 19-9(CA 19-9)在局部晚期和晚期非小细胞肺癌(NSCLC)疗效评估中的敏感性。方法 所有患者经过2次化疗或者靶向治疗后,分别于治疗前后检测CT以及肿瘤标志物 CEA、CA 19-9,并收集外周血标本。采用荧光 PCR 法检测外周血总 DNA 量、完整 DNA 量及甲基化 DNA 拷贝数。影像学 RESIST1.1 标准作为疗效评估标准。结果 以 CT 为参考标准,CEA 评估治疗疗效的敏感性为 54.17%,CA 19-9 评估治疗疗效的敏感性为 64.58%,差异无统计学意义( $P=0.299$ );ctDNA 评估疗效的敏感性为 47.92%,与 CEA 相比差异无统计学意义( $P=0.540$ )。ctDNA 与 CA 19-9 的敏感性相比无显著差异( $P=0.100$ )。结论 CEA、CA 19-9、ctDNA 对评估疗效的敏感性为 CA 19-9 最强,ctDNA 最弱。

**关键词:**非小细胞肺癌;循环肿瘤 DNA;肿瘤指标;敏感性

中图分类号:R 734.2 文献标志码:A 文章编号:1672-2353(2018)13-049-04 DOI:10.7619/jcmp.201813014

## Significance of circulating tumor DNA in evaluating efficiency of non-small cell lung cancer

SUN Yunfeng, YANG Xin, FANG Cheng, ZHAO Weiqing, JI Mei

(Department of Oncology, The Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou, Jiangsu, 213000)

**ABSTRACT: Objective** To compare the sensitivity of ctDNA, CEA and CA19-9 in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) according to imaging manifestation. **Methods** After two times of chemotherapy or targeted therapy, all patients were detected by CT, CEA and CA19-9 before and after treatment, and peripheral blood samples were collected. Fluorescence PCR was used to detect the total DNA amount of peripheral blood, the total amount of DNA and the number of copies of methylated DNA. Imaging RESIST1.1 standard was used as the standard for efficacy evaluation. **Results** Taking CT as the reference standard, the sensitivity of CEA in evaluating therapeutic efficacy was 54.17%, and the sensitivity of CA 19-9 was 64.58%, and there were no statistical differences ( $P=0.299$ ). The sensitivity of ctDNA was 47.92%, which showed no significant difference when compared with CEA ( $P=0.540$ ). There was no significant difference in sensitivity between ctDNA and CA 19-9 ( $P=0.100$ ). **Conclusion** The sensitivity of CEA, CA19-9 and ctDNA in evaluating efficacy shows that CA 19-9 is the best and ctDNA is the worst.

**KEY WORDS:** non-small cell lung cancer; circulating tumor DNA; tumor markers; sensitivity

由于人口的增长和老龄化,癌症的发生量也在不断增加。其中肺癌的发病率及死亡率逐年上升<sup>[1-2]</sup>。目前居中国癌症死亡原因首位的肺癌,已经占到全部恶性肿瘤死亡总数的 22.7%。目前,肺癌的治疗的疗效评估主要参照影像学 RESIST 1.1 标准。此外,肿瘤指标 CEA、CA 9-9 等传统肿瘤指标也作为一个参考指标,但其敏感性不高。

循环肿瘤 DNA 是指肿瘤细胞体细胞 DNA 通过脱落或者细胞凋亡释放入循环系统,携带一定特征的 DNA 片段。ctDNA 用于预后评估及疗效评估在乳腺癌<sup>[3]</sup>、结直肠癌<sup>[4]</sup>、淋巴瘤<sup>[5]</sup>等肿瘤中均有研究。本研究采用荧光 PCR 法检测样本总 DNA 量、完整 DNA 量及甲基化 DNA 拷贝数;收集患者的影像学资料及临床资料,探讨 ctDNA 是

收稿日期:2018-01-09 录用日期:2018-03-26

通信作者:季枚

否较传统肿瘤指标 CEA、CA 9-9 在非小细胞肺癌疗效评估具有更高的敏感性,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 7 月—2018 年 1 月在苏州大学第三附属医院住院治疗(包括化疗、靶向治疗)的局部晚期及晚期非小细胞肺癌患者。纳入标准:①原发性非小细胞肺癌;②系经组织病理确诊;③PS 评分为 0 或者 1;④实验室检查:肝、肾功能正常;⑤具有完善的治疗前后的各临床指标。排除标准:①患者患有严重的系统性疾病和/或急、慢性感染性疾病;②严重的心、肝、肾等脏器疾病;③有精神系统疾病患者。分组情况:按照影像学 RECIST 1.1 标准评估疗效,分为进展组和有效组(CR + PR + SD)。

### 1.2 主要试剂及仪器设备

QIAamp DNA Blood Mini kit 试剂盒[凯杰企业管理(上海)有限公司(Qiagen)];EZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒(北京天漠科技开发有限公司);基因引物(金唯智生物科技有限公司);mastermix 聚合酶(近岸蛋白质科技有限公司);恒温水箱(常州朗越仪器制造有限公司);恒温金属浴(朗越仪器制造有限公司);4℃冰箱(青岛海尔股份有限公司);-20℃冰箱(青岛海尔股份有限公司);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);台式常温离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);振荡器(金坛市白塔新宝仪器厂);ABI 荧光定量 PCR 仪-7500 型[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];生物安全柜(上海鼎科科学仪器有限公司);超净工作台(上海鼎科科学仪器有限公司);循环变温器(浙江新丰医疗器械有限公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 血液样本 DNA 提取:采用 QIAamp DNA Blood Mini kit 法。取 2 mL 的离心管,加入 20  $\mu\text{L}$  的蛋白酶 K;再加入 200  $\mu\text{L}$  血浆后混匀;再加 200  $\mu\text{L}$  Buffer AL 于上述离心管底,混匀,振荡 15 s;随后在 56℃水箱中放置 10 min;取出离心管,短暂离心 5 s;加 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇于上述混合液中,振荡 15 s 混匀,短暂离心;完成后,在 QIAamp 柱子中加入上述混合液,然后将柱子放在 2 mL 收集管中,盖上盖子,将之放入离心机中以 8 000 转/min 离心 1 min;离心后,丢去原先的收

集管,放入一个干净的收集管中,打开 QIAamp 柱子,加入 500  $\mu\text{L}$  Buffer AW1 于柱子中,盖上盖子,将之放入离心机中,以 8 000 转/min 离心 1 min;然后丢去用过的收集管,放入一个新的干净的收集管中,打开 QIAamp 柱子,加 500  $\mu\text{L}$  Buffer AW2 于柱子中,盖上盖子,将之放入离心机中,以 14 000 转/min 离心 3 min;丢去离心后的收集管,将柱子套在一个新的收集柱中,以 14 000 转/min 离心 3 min 后,将柱子取出,打开盖子,室温干燥;待乙醇完全蒸发后,将柱子套在一个 1.5 mL 的干净的离心管中,加入 40  $\mu\text{L}$  Buffer AE 于柱子底部,静置 5 min 后放入离心机中,以 10 000 转/min 离心 3 min。提取出的 DNA 备用。

1.3.2 DNA 甲基化处理:采用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒法。在 500  $\mu\text{L}$  PCR 管中添加 130  $\mu\text{L}$  的 CT conversion Reagent,然后再加入提取备用的 20  $\mu\text{L}$  DNA 样品,通过轻弹试管或移液器操作来混合样品;将样品管放到循环变温器中,98℃放置 10 min,64℃放置 2.5 h,在 Zymo-Spin IC Column 中加 600  $\mu\text{L}$  M-binding Buffer,并将柱子放入试剂盒提供的收集管中;添加 PCR 管中的混合液到上述加有 M-binding Buffer 的 Zymo-Spin IC Column 中,盖上盖子,反复颠倒柱子以充分混匀样品,然后将柱子放入离心机中,以 10 000 转/min 离心 1 min;弃除掉柱中的废液,添加 100  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer 于柱子底部,以 10 000 转/min 全速离心 1 min;弃除掉柱中的废液,在柱子底部添加 200  $\mu\text{L}$  M-Desulphonation Buffer,在室温(20~30℃)下放置 15~20 min,随后以 10 000 转/min 全速离心 1 min;弃掉柱中的废液,添加 200  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer 于柱子底部,以 10 000 转/min 全速离心 1 min;弃掉柱中的废液,再加 200  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer 于柱子底部,以 10 000 转/min 全速离心 1 min;将柱子套在 1.5 mL 离心管中,添加 30  $\mu\text{L}$  M-Elution Buffer 于柱子中,以 10 000 转/min 全速离心 1 min 来洗脱 DNA,随后进行 DNA 分析。

1.3.3 总 DNA 及完整 DNA 计算(PCR):使用已知拷贝数为  $N_1$  的 DNA 样本,经过  $Ct_1$  个 PCR 扩增循环,到达设定阈值,然后使用同样的方法,处理需检测样本中的拷贝数  $N_2$ ,经过  $Ct_2$  个循环达到同样的阈值,根据下述公式,计算得出样本的总 DNA 及完整 DNA 的拷贝数。 $N_2 = N_1 \times 2^{Ct_1 - Ct_2}$ 。

1.3.4 甲基化 DNA 拷贝数计算(PCR):计算方

法及原理同总 DNA、完整 DNA。

1.4 统计学处理

统计学处理采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 计量资料采用均数 ± 标准差表示, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。GraphPad Prism 5.0 软件作图。

2 结果

2.1 一般资料

48 例非小细胞肺癌患者中女 14 例(29.17%), 男 34 例(70.83%), 年龄 42 ~ 79 岁, 中位年龄 63 岁; 48 例 NSCLC 患者中包含腺癌 40 例(83.33%), 鳞癌 6 例(12.50%), 细支气管肺泡癌 1 例(2.08%), 腺鳞癌 1 例(2.08%); IV 期患者 42 例, III 期 6 例; CT 评估 OR 30 例, PD 18 例; CEA 降低 32 例, 升高 16 例; CA 19-9 降低 35 例, 升高 13 例; ctDNA 评估治疗获益 25 例, 评估为有进展可能 23 例。见表 1。

表 1 患者一般资料

一般资料		n	CT	
			PD	SD + CR + PR
性别	男	34	12	6
	女	14	6	24
分期	IV	42	18	24
	III	6	0	6
CEA	升高	16	6	10
	降低	32	12	20
CA199	升高	13	7	6
	降低	35	11	24
ctDNA	进展	23	8	15
	获益	25	10	15

2.2 ctDNA、CEA 与 CA 19-9 评估疗效的敏感性比较

分别使用 CT、ctDNA、CEA、CA 19-9 评估疗效, 若 CEA 数值较前降低, 且 CT 评估为 OR, 表示 CEA 与 CT 评估一致。若 ctDNA 评估进展, CT 评估 PD 表示两者评估结果一致。

ctDNA 与 CT 评估一致的患者 23 例(47.92%), CEA 与 CT 评估一致的患者 26 例(54.17%), CEA 与 CT 的一致率较 ctDNA 高, 但二者无显著差异( $P = 0.540$ )。见图 1。ctDNA 与 CT 评估一致的患者 23 例(47.92%), CA 19-9 与 CT 评估一致的患者 31 例(64.58%), CA 19-9 与 CT 的一致率较 ctDNA 高, 但二者无显著差异( $P = 0.100$ )。见图 2。CEA 与 CT 评估一致的患

者 26 例(54.17%), CA 19-9 与 CT 评估一致的患者 31 例(64.58%), CA 19-9 与 CT 的一致率较 CEA 高, 但二者无显著差异( $P = 0.299$ )。见图 3。

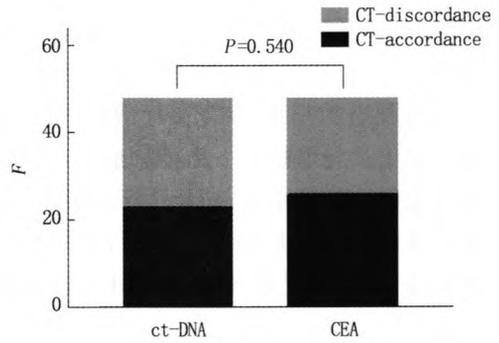


图 1 ctDNA、CEA 与 CT 评估的一致性

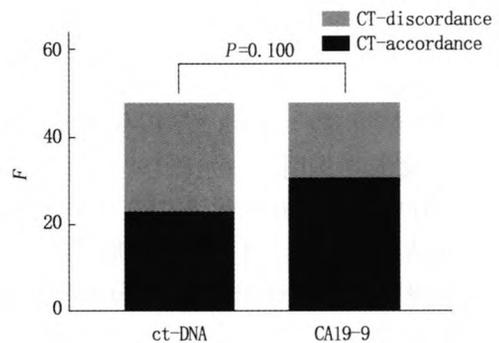


图 2 ctDNA 与 CA19-9 与 CT 评估的一致性

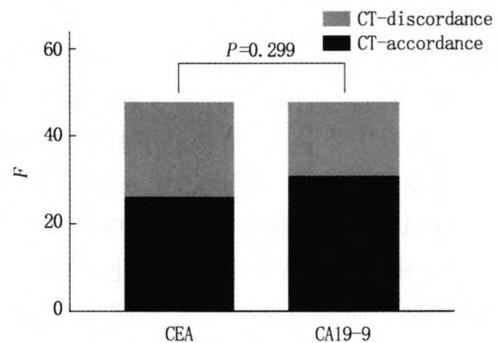


图 3 CEA、CA19-9 与 CT 评估的一致性

3 讨论

肺癌的高发病率与高致死率已经严重威胁到人类的健康。由于早期肺癌患者临床症状特异性不强, 大部分肺癌患者确诊时癌细胞已发生了转移, 导致患者的总体生存期短。肺癌的转移过程相当复杂, 其主要转移途径有种植性转移、直接浸润、淋巴道转移及血行转移。血行转移是肺癌转

移的首要路径,然而其转移效率较低,在经过一系列转移过程后,最终只有约 0.01% 的肿瘤细胞在血液循环得以存活,最后形成转移灶。

随着对肺癌的不断研究,针对肺癌的治疗方法不断增多,抗血管生成药物、分子靶向药物、免疫治疗等方法的临床应用,使得肺癌患者无疾病进展期明显延长,但是患者的 5 年生存率仍然较低<sup>[6]</sup>。目前肿瘤的早期诊断及疗效评估主要依据影像学变化及肿瘤指标。血清肿瘤标志物是诊断肿瘤的无创性检测手段,广泛用于肿瘤的筛查、治疗效果及患者的预后评估。然而,其特异性及敏感性欠佳,不能满足临床要求。CEA 诊断肺癌的敏感性仅有 40%<sup>[7]</sup>,其在肺癌中的预测、预后价值仍有争议<sup>[8]</sup>。本研究通过荧光定量 PCR 法对 NSCLC 患者治疗前及治疗后的血浆中的 ctDNA 进行检测,以 CT 为参考标准,进一步与传统肺癌血清肿瘤标志物 CEA、CA 19-9 对 NSCLC 治疗疗效价值进行比较。

本研究结果显示,CEA、CA19-9、ctDNA 均有一定的疗效预测作用,但敏感性不高,且 ctDNA 在评估治疗疗效上其并不优于 CEA、CA 19-9,与预期研究结果不一致。可能与下述原因有关:①在癌细胞侵袭入血的过程中,大部分的癌细胞被 NK 细胞吞噬,血液中残留的循环细胞及循环 DNA 含量均较低,因此对检测技术要求较高。循环中的肿瘤 DNA 在体内间断释放,且在体内不断的代谢,检测结果会因采血时间、饮食因素、个体差异及潜在的其他系统疾病影响。②肺癌容易发生转移,如脑转移、骨转移、肾上腺转移、淋巴结转移等。研究<sup>[9-11]</sup>认为,肺癌的甲基化与肺癌的恶性程度及预后有关,本研究中,ctDNA 的评估依据总 DNA、DNA 完整性、甲基化 DNA 三者综合评价疗效,其中检测结果中的甲基化 DNA,仅仅检测了 WT1、CDKN2A、CDH 13、SLIT 2、HOXA 9、SFRP 2、SNCA、CST 6 这 8 个常见的基因位点,以这 8 个位点的甲基化数量为甲基化 DNA 总量,而没有检测其他少见甲基化突变位点。③目前肺癌的治疗,仍然参考影像学评估,但是抗血管治疗及分子靶向治疗使得肿瘤发生空泡化、坏死、液化等变化,而在 CT 上表现为肿瘤病灶增大,依据影像学 RECIST 1.1 标准,疾病评估为进展(PD),

但实际上治疗是获益的。因此,单纯的以肿瘤直径变化来评估疗效的可靠性仍有待进一步考察。

④ ctDNA 检测过程复杂,步骤繁琐,一系列操作流程稍微的误差对最终的结果均可能有一定的影响。此外,本实验的纳入研究对象仅有 48 例,考虑样本量不足,需进一步扩大样本量。

#### 参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2017, 67(1): 5 - 12.
- [2] 王灵, 郁冬梅, 王硕, 等. 1993 年至 2012 年江苏省启东市社区人群肺癌发病和死亡趋势分析 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017(24): 31 - 35.
- [3] Takahashi H, Kagara N, Tanei T, et al. Correlation of Methylated Circulating Tumor DNA With Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients [J]. *Clinical Breast Cancer*, 2016, 17(1): 61 - 68.
- [4] Tie J, Kinde I, Wang Y, et al. Circulating Tumor DNA as an Early Marker of Therapeutic Response in Patients with Metastatic Colorectal Cancer [J]. *Annals of Oncology*, 2015, 26(8): 1715 - 1722.
- [5] Kwok M, Wu S P, Mo C, et al. Circulating Tumor DNA to Monitor Therapy for Aggressive B-Cell Lymphomas [J]. *Current Treatment Options in Oncology*, 2016, 17(9): 47 - 54.
- [6] Allemani C, Weir H K, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25, 676, 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. *Lancet*, 2015, 385(9972): 977 - 1010.
- [7] Tufman A, Huber R M. Biological markers in lung cancer: A clinician's perspective [J]. *Cancer Biomark*, 2010, 6(3): 123 - 135.
- [8] Grunnet M, Sorensen J B. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(2): 138 - 143.
- [9] Khan S, Hilliker A. DNA Methylation and Cancer [M]. New York: Springer, 2014: 1.
- [10] Chen C C, Lee K D, Pai M Y, et al. Changes in DNA methylation are associated with the development of drug resistance in cervical cancer cells [J]. *Cancer Cell International*, 2015, 15(1): 98 - 105.
- [11] Delpu Y, Cordelier P, Cho W, et al. DNA Methylation and Cancer Diagnosis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7): 15029 - 15058.