

液体活检在胃癌诊疗中的研究进展

蒋 婷 王 平 黄新恩

摘 要 胃癌是一种全球常见的恶性肿瘤,目前迫切需要具有高特异性和敏感度的生物学标志物以协助诊断,预判疗效和预后。液体活检的特点是从外周血或其他体液中分离癌症来源成分,如循环肿瘤细胞、循环肿瘤 DNA、microRNA、外泌体、长链非编码 RNA 等,并对其基因组或蛋白质组学进行评估。液体活检是一种微创、可重复的技术,可以用于早期胃癌的筛查和诊断、指导治疗、评估治疗效果和预测预后。在此,本文将对液体活检在胃癌诊疗中的临床应用及常规实施液体活检仍需克服的问题予以综述。

关键词 液体活检 胃癌 循环肿瘤细胞 循环肿瘤 DNA

中图分类号 R735.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.05.006

2020 年全球有超过 108 万新发胃癌病例,约 77 万死亡病例,且胃癌发生率还在不断上升^[1]。由于胃癌症状的非特异性和筛查条件限制等原因,多数患者确诊时已发展至晚期,错过了最佳治疗时机。因此,选择并开发合适的早期胃癌的筛查方法成为当前刻不容缓的问题。目前胃癌应用于临床的筛查方法包括幽门螺杆菌血清学、血清胃蛋白酶原检测、间接上消化道系列和内镜检查,但这些方法都有其局限性^[2]。例如,作为诊断胃癌的金标准,上消化道内镜结合病理活组织检查较易发生穿孔、出血等风险。现在临床上胃癌早期检测最常用的肿瘤标志物包括癌胚抗原(CEA)、糖类抗原(CA)199、CA724、CA125、CA242、CA50,以及胃蛋白酶原和甲胎蛋白(AFP)。然而,这些传统的肿瘤标志物的特异性和敏感度欠佳,到目前为止,没有一种是胃癌诊断所特有的。

近年来,由于液体活检较传统组织活检具有操作简便、非侵入性、可以动态观察等优势而日益受到关注。液体活检的对象原则上是任何可能含有肿瘤遗传物质的体液样本,例如血液、尿液、唾液或脑脊液等,其中以血液样本的研究最为广泛。液体活检主要检测循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、微小 RNA(microRNA, miRNA)、外泌体、长链非编码 RNA

(lncRNA)及微囊泡等。本文概述了液体活检在胃癌早期诊断、治疗、预后中的潜在临床应用,以及临床常规实施液体活检前仍需克服的障碍。

一、液体活检技术

液体活检是指对循环肿瘤细胞、细胞外囊泡、核酸等生物液体进行取样,并对其基因组或蛋白质组学进行评估。随着微流控芯片的细胞分离技术及分子检测技术的发展创新,如下一代测序(next generation sequencing, NGS)和液滴数字聚合酶链反应(droplet digital PCR, ddPCR),基于液体活检的个性化医疗有望逐步成为现实。对于临床医生来说,液体活检可用于筛查并诊断癌症、评估预后、确定治疗靶点、预测治疗的有效性、监测肿瘤负荷和治疗耐药性等多个方面^[3]。通过非侵入性技术在不同的生物体液中测定和鉴定生物学标志物,液体活检已被证明可有效应用于不同类型的肿瘤,包括肝癌、肺癌、结肠直肠癌、黑色素瘤和胰腺癌等,但是在胃癌中的研究较少^[4]。

二、液体活检常用生物学标志物

1. CTCs: CTCs 起源于原发性和转移的癌性病变,和形成新的远处转移相关,因此在疾病进展中发挥着关键的作用。CTCs 最常用的细胞病理学定义是:这是一种具有圆形或卵形形态的细胞,胞质内可见圆形或卵形核,与其他血细胞的区别在于其上皮标志物包括上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecules, EpCAM)和细胞角蛋白(cytokeratin, CK)的阳性表达以及白细胞特异性标志物 CD45 的阴性表达^[5]。CTCs 在形态学上分为两类,即单一 CTCs 和簇状 CTCs。癌症转移通常是通过簇类 CTCs 发生的,因此临床生物学标志物如肿瘤标志物和放射诊断特

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81972822);吴阶平医学基金会科研专项项目(320.6750.2021-2-73)

作者单位:210009 南京医科大学附属肿瘤医院、江苏省肿瘤医院、江苏省肿瘤防治研究所

通信作者:黄新恩,主任医师,硕士生导师,电子信箱:huangxinen06@163.com

征是为检测簇类 CTCs 的替代标志物^[6]。CTCs 通常在每毫升外周血中少于一个单位,因此血液中 CTCs 的检测需要敏感度、特异性和可重复性高的方法。免疫细胞化学、RT-PCR、流式细胞术和半自动化免疫磁分离系统(CellSearch)均已用于检测 CTCs。CellSearch 是目前唯一获得美国 FDA 批准的 CTCs 分离设备。CTCs 检测对癌症患者预后的试验表明,大量的 CTCs 与治疗反应差、总体生存期缩短、疾病侵袭性、转移增加、复发时间减少相关^[7]。

2. ctDNA:在肿瘤的发生和进展过程中,细胞凋亡或坏死以及外泌体可能会释放细胞游离 DNA (cfDNA)到血液中,而来源于肿瘤的 cfDNA,又称循环肿瘤 DNA (ctDNA)。ctDNA 是存在于血浆或血清中的单链或双链 DNA。早期研究表明,ctDNA 具有许多与肿瘤相关的分子特征,如单核苷酸突变、甲基化变化和肿瘤衍生序列等^[8]。推测 ctDNA 是通过易感细胞的致瘤转化而分泌的信号分子,驱动肿瘤转移。已有研究发现,通过结合 ctDNA 与蛋白质生物标记,单一检测可以筛查多种癌症类型。一般来说,ctDNA 的使用提供了一种成本效益高、敏感度高的工具,是一种具有潜在临床应用价值的微创方法,包括以下几种:①早期癌症筛查;②检测治疗效果;③识别治疗靶点;④评估预后和肿瘤复发情况;⑤实时评价耐药^[9]。

3. miRNA: microRNAs 是一类长度为 18~24 个核苷酸的小分子非编码 RNA (ncRNA),通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-utr)结合,在转录后调控基因表达,导致其翻译抑制或降解。miRNAs 是信号通路的调节因子,因此参与了肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭和迁移等多种过程。目前,有许多与胃癌发展相关的 microRNA 已被鉴定,其中一些与 Wnt/ β -catenin、PI₃K/Akt/mTOR、RAS/RAF/EKK/MAPK、NF- κ B、TGF- β 和 JAK/STAT 信号通路的关系被追踪。一些 miRNA 在细胞过程中具有多向作用。根据已发表的数据分析,发现与转移相关的 miRNA 最常与 Wnt/ β -catenin 通路相互作用,或在与其他通路相互作用时影响激活 EMT 的基因。在大多数情况下,与化疗耐药性相关的 miRNA 作用于凋亡调节因子,并与 PI₃K/Akt/mTOR 通路相关^[10]。与蛋白质或 lncRNA 比较,miRNA 具有耐核糖核酸酶降解和在生物样品中稳定性高的特点,是生物学标志物研究领域具有吸引力的靶点。

4. 外泌体:外泌体是一种直径为 30~140nm 的

膜结合颗粒,起源于大型多泡体(MVBs)。外泌体可通过 MVBs 与质膜融合释放到细胞外环境中,也可以大量释放在各种生物液体中,如血浆、尿液、唾液、腹腔积液和支气管肺泡灌洗液。目前外泌体的提取方法分为微分超离心法、密度梯度/缓冲离心法、尺寸排斥层析法、沉淀法、免疫亲和捕获法、微流控法等,其中微分超离心法因其提取纯度较高为研究者最常用的方法^[11]。与其他液体活检来源比较,外泌体具有显著的优势,如稳定性高、易于鉴别、获取方便、诊断准确性高等。最初人们认为外泌体只参与去除不必要的分子,但此后许多研究阐明了外泌体在肿瘤进展和转移中的复杂功能。外泌体可以呈现亲本细胞甚至靶细胞的特异性表面蛋白,从而实现起源特异性外泌体的分离,并预测器官特异性转移^[12]。与 CTCs 和 ctDNA 比较,肿瘤外泌体作为预后和治疗指导生物学标志物主要取决于其蛋白和 miRNA 表达谱。因此,鉴于外泌体在细胞-细胞通信和肿瘤特异性内容方面的关键作用,外泌体是一种很有前途的生物学标志物,可用于早期肿瘤检测、监测和药物治疗计划。

三、液体活检在胃癌诊疗中的临床应用

1. 早期筛查及诊断:Kang 等^[13]纳入了 116 例接受胃切除手术的胃癌患者和 31 例健康志愿者,在胃切除术前采集外周血,采用离心微流控系统检测 CTCs,结果发现当 CTCs 水平为 2 个单位/7.5ml 时,区分胃癌与健康对照组的敏感度和特异性分别为 85.3% 和 90.3%,且超过 80% 的早期(T₁ 或 N₀)胃癌患者可检测到 CTCs。在另一项研究中,使用一种新型楔形微流控芯片检测到胃癌患者 2ml 外周血中 CTCs 的阳性率为 75%。在此项研究中,CTCs 被证实与肿瘤分化、淋巴管浸润和分期有关^[14]。因此,CTCs 检测作为胃癌早期诊断的生物学标志物具有潜在的价值。有研究确定了 3 种特异性的 miRNAs: hsa-miR-320a、hsa-miR-1260b 和 hsa-miR-6515-5p,它们在胃癌患者的血清样本中显著高表达,具有高敏感度,为胃癌的诊断提供了一种新的简单而有效的方法^[15]。Chen 等^[16]研究发现,循环 miRNA-196a 可以区分癌前病变、低级别瘤变、高级别瘤变和早期胃癌患者与健康对照组,特别是健康参与者与胃发育不良和早期癌症患者。目前还没有针对胃神经内分泌肿瘤(gastric neuroendocrine neoplasms, g-NENS)的循环诊断生物学标志物,Dou 等^[17]研究发现,miRNA-202-3p 在 1 型 g-NENS 肿瘤组织中过表达,用实时荧光定量 PCR 检测受试者血清中的 miRNA-202-

3p 水平,发现患者组表达水平明显高于对照组,敏感度和特异性分别为 88.9% 和 77.8%,提示 miRNA-202-3p 对诊断 1 型 g-NENS 具有潜在价值。但是 miRNA-202-3p 是神经内分泌细胞增生的生物学标志物还是神经内分泌肿瘤的特异性生物学标志物还需要进一步的研究^[17]。此外,血浆外泌体 lncUEGC1 在区分 I 期胃癌患者与健康人群或癌前病变方面的诊断价值高于血清 CEA,提示外泌体可能是一种高敏感、无侵袭性的胃癌诊断生物学标志物^[18]。

2. 指导治疗:Wang 等^[19]研究证明了纵向 ctDNA 测序有望预测曲妥珠单抗治疗下 HER-2 阳性转移性胃癌患者的肿瘤收缩和进展,从而为耐药的基因改变提供新的思路。Zhang 等^[20]报道了胃癌患者中 miR-939 水平与局部复发、远处转移和化疗耐药呈负相关,同时进一步的功能研究表明,miR-939 的表达抑制胃癌细胞生长,并通过抑制细胞生长和诱导细胞凋亡来增强 5-氟尿嘧啶诱导的化疗敏感度。Fan 等^[21]研究发现,Cbl 原癌基因 B (Cbl-b) 作为 miR-940 相互作用的泛素化信号转换器和转录激活因子 5a (STAT5a) 的靶基因,下调 STAT5a 和抗程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的表达,而 miR-940/Cbl-b/STAT5a/PD-L1 轴促进胃癌细胞的增殖和迁移,所以类似的研究可能为胃癌基于 miRNA 的免疫治疗提供一些新思路。外泌体被认为是基于 RNA 的治疗策略的高效运载工具,因此外泌体已被用于运送生物分子和用于癌症治疗。体外实验表明,外泌体中装载的 anti-miR-214 能与细胞融合,调控潜在靶点,降低细胞活力,抑制迁移,促进细胞凋亡。由于肿瘤中 miR-214 的下调和对靶蛋白的过表达,尾注射 anti-miR-214 可在体内逆转胃癌对 DDP 的化疗耐药并抑制肿瘤生长,提示这可能是治疗顺铂难治性 GC 的一种替代方法^[22]。抗癌蛋白也可以通过外泌体传递并发挥肿瘤抑制作用。有研究证实,胃上皮分泌并内化了携带抑癌 GKN1 蛋白的外泌体,可抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡,从而抑制胃肿瘤的发生,这表明其在胃癌治疗中的临床应用^[23]。

3. 评价治疗效果:研究表明,ctDNA 可能是一个有用的术后标志物,并可以指导辅助治疗,且化疗后的 ctDNA 状态与手术后的疾病状态有更强的相关性,并有可能为进一步的治疗提供信息^[24]。在 Liu 等^[25]开展的研究中,基线 CTC 数量少或化疗第 1 个周期后 CTC 计数下降的晚期胃癌患者可能从姑息性化疗中获益显著,同时低 CTC 计数(≤ 2 个单位/5ml

外周血)的患者与高 CTC 计数(> 2 个单位/5ml 外周血)的患者比较,中位无进展生存期和中位总生存期 (median overall survival, mOS) 明显更长^[25]。因此,CTCs 计数可作为一个良好的化疗监测指标和理想的预后指标。一项回顾性研究纳入了 116 例新确诊的胃腺癌患者,发现 CTCs 阳性组与 CTCs 阴性组治疗前后差异有统计学意义 (12.6 个月 vs 31.6 个月, $P < 0.01$; 12.4 个月 vs 24.2 个月, $P = 0.002$)。两个化疗疗程后,病情进展组 CTCs 数量明显增加 ($P = 0.002$),而非病情进展组 CTCs 数量减少 ($P = 0.02$)。因此,CTCs 的变化与治疗反应密切相关 ($P = 0.004$),可作为评估化疗效果的辅助手段,引导后续方案的早期调整^[26]。

4. 预测胃癌预后:液体活检在预测胃癌患者不良预后方面具有重要作用。一项前瞻性研究通过检测分子残留疾病 (MRD),发现所有在术后立即检测到 ctDNA 的患者最终都经历了复发且术后纵向随访中任何时间的 ctDNA 阳性均与较差的术后无病期和总生存期相关。在以治疗为目的的局部胃癌患者中,这些结果表明,ctDNA 检测的 MRD 可以识别患者的复发高风险,并有助于在辅助治疗环境中加强治疗以提高生存率^[27]。近期一项研究采用 ddPCR 定量 68 例胃癌和食管癌患者血浆中的 miRNA 表达,结果发现 miR-21-5p、miR-148a-3p、miR-146a-5p、miR-141-3p 和 miR-218-5p 在接受一线治疗药物顺铂和吉西他滨的晚期胃癌患者中没有预后和(或)预测价值,但高水平的 miR-200c-3p 显示出 OS 恶化的趋势,提示循环 miRNAs 可能对改善患者姑息治疗选择有预后和预测价值^[28]。Zhao 等^[29]研究发现,与正常对照组比较,GC 组的外泌体 HOTTIP 表达水平通常上调,其表达水平与侵袭深度、TNM 分期显著相关。另外,外泌体 HOTTIP 水平升高与总生存期较差显著相关 ($P < 0.001$),使外泌体 HOTTIP 成为胃癌患者的独立预后因素 ($P = 0.027$)。

综上所述,液体活检作为组织活检的一种替代方法,是一种微创、廉价、可重复的技术,可以促进胃癌的筛查和早期诊断,为胃癌患者的临床分期提供更多信息。此外,基于血液的液体活检有助于监测胃癌的疾病进展、治疗疗效、预后和获得性化疗耐药。在未来,医生可以通过液体活检,根据实时的基因信息,以个性化医疗的方式为患者选择最合适的治疗方案。然而,液体活检在临床广泛应用前仍有一些实际问题需要解决。潜在的挑战可能包括样本中生物学标志

物数量少、缺乏分析共识、临床验证和监管机构认同等。在此背景下,进行大量的前瞻性临床试验是至关重要的。然而,液体活检从实验室转移到床边需要更大规模和多中心的试验来证实它的优势。此外,液体活检的方法很难统一,每种方法都有其特定的检测限制、敏感度和特异性。不同液体活检平台的结果很难进行比较,在应用于常规诊断之前,需要进行室内质量评价(external quality asseement,EQA)研究。目前液体活检在临床中应用有限,但随着基因检测技术的发展和新型生物学标志物的出现,液体活检将拥有更广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209 - 249
- 2 Huang ZB, Zhang HT, Yu B, et al. Cell-free DNA as a liquid biopsy for early detection of gastric cancer[J]. Oncol Lett, 2021, 21(1): 3 - 16
- 3 Lengyel CG, Hussain S, Trapani D, et al. The emerging role of liquid biopsy in gastric cancer [J]. J Clin Med, 2021, 10(10): 2108 - 2124
- 4 宋桂锋, 杨海莹. 液体活检技术在肿瘤诊断领域的应用[J]. 医学信息, 2021, 34(14): 36 - 39
- 5 Maltoni R, Gallerani G, Fici P, et al. CTCs in early breast cancer: a path worth taking[J]. Cancer Lett, 2016, 376(2): 205 - 210
- 6 Sawabata N, Susaki Y, Nakamura T, et al. Cluster circulating tumor cells in surgical cases of lung cancer[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2020, 68(9): 975 - 983
- 7 周鑫亚, 燕书明, 张萌萌, 等. 消化系统肿瘤液体活检研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2021, 30(9): 1060 - 1067
- 8 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
- 9 李诗哲, 商冠宁. 循环肿瘤 DNA 的临床应用现状和挑战[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(4): 72 - 78
- 10 Kipkeeva F, Muzaffarova T, Korotaeva A, et al. MicroRNA in gastric cancer development: mechanisms and biomarkers[J]. Diagnostics (Basel), 2020, 10(11): 891 - 916
- 11 Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1039 - 1051
- 12 Tannetta D, Masliukaite I, Vatish M, et al. Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia[J]. J Reprod Immunol, 2017, 119: 98 - 106
- 13 Kang HM, Kim GH, Jeon HK, et al. Circulating tumor cells detected by lab-on-a-disc: role in early diagnosis of gastric cancer [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0180251
- 14 Yang C, Zhang N, Wang S, et al. Wedge-shaped microfluidic

chip for circulating tumor cells isolation and its clinical significance in gastric cancer[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 139 - 150

- 15 Yao Y, Ding Y, Bai Y, et al. Identification of serum circulating microRNAs as novel diagnostic biomarkers of gastric cancer[J]. Front Genet, 2020, 11: 591515
- 16 Chen TH, Lee C, Chiu CT, et al. Circulating microRNA - 196a is an early gastric cancer biomarker[J]. Oncotarget, 2018, 9(12): 10317 - 10323
- 17 Dou D, Li XK, Xia QS, et al. Circulating miRNA - 202 - 3p is a potential novel biomarker for diagnosis of type 1 gastric neuroendocrine neoplasms[J]. BMC Gastroenterol, 2021, 21(1): 188 - 194
- 18 Lin LY, Yang L, Zeng Q, et al. Tumor-originated exosomal lncUEGC1 as a circulating biomarker for early-stage gastric cancer [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 84 - 89
- 19 Wang DS, Liu ZX, Lu YX, et al. Liquid biopsies to track trastuzumab resistance in metastatic HER2-positive gastric cancer[J]. Gut, 2019, 68(7): 1152 - 1161
- 20 Zhang JX, Xu Y, Gao Y, et al. Decreased expression of miR - 939 contributes to chemoresistance and metastasis of gastric cancer via dysregulation of SLC34A2 and Raf/MEK/ERK pathway[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 18 - 32
- 21 Fan Y, Che X, Hou K, et al. MiR - 940 promotes the proliferation and migration of gastric cancer cells through up-regulation of programmed death ligand - 1 expression[J]. Exp Cell Res, 2018, 373(1 - 2): 180 - 187
- 22 Wang X, Zhang H, Bai M, et al. Exosomes serve as nanoparticles to deliver anti-miR - 214 to reverse chemoresistance to cisplatin in gastric cancer[J]. Mol Ther, 2018, 26(3): 774 - 783
- 23 Yoon JH, Ham IH, Kim O, et al. Gastrokine 1 protein is a potential thernagnostic target for gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2018, 21(6): 956 - 967
- 24 Tie J, Cohen JD, Wang Y, et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer[J]. JAMA Oncol, 2019, 5(12): 1710 - 1717
- 25 Liu Y, Ling Y, Qi Q, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in advanced gastric cancer patients receiving chemotherapy[J]. Mol Clin Oncol, 2017, 6(2): 235 - 242
- 26 Zhu Y, Chen N, Chen M, et al. Circulating tumor cells: a surrogate to predict the effect of treatment and overall survival in gastric adenocarcinoma[J]. Int J Biol Markers, 2021, 36(1): 28 - 35
- 27 Yang J, Gong Y, Lam VK, et al. Deep sequencing of circulating tumor DNA detects molecular residual disease and predicts recurrence in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 346 - 354
- 28 van Zweeden AA, Opperman RCM, Honeywell RJ, et al. The prognostic impact of circulating miRNAs in patients with advanced esophagogastric cancer during palliative chemotherapy[J]. Cancer Treatment Res Commun, 2021, 27: 100371
- 29 Zhao R, Zhang Y, Zhang X, et al. Exosomal long noncoding RNA HOTTIP as potential novel diagnostic and prognostic biomarker test for gastric cancer[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 68 - 72

(收稿日期: 2021 - 11 - 16)

(修回日期: 2021 - 11 - 20)