

外周血循环肿瘤 DNA 基因突变检测在非小细胞肺癌中的应用价值

徐敏 何婉 李岚 朱美琴 陈亦欣 许瑞莲

【摘要】 目的 探讨高通量基因测序技术检测外周血循环肿瘤 DNA (ctDNA) 基因突变在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的应用价值。**方法** 用高通量测序技术同时检测 32 例晚期 NSCLC 患者的外周血 ctDNA 和组织石蜡切片 DNA (tDNA) 的基因突变情况, 并以 tDNA 为金标准, 评价 ctDNA 诊断 NSCLC 基因突变的效能。**结果** 32 例 NSCLC 患者中, ctDNA 检出基因突变 9 种 42 例次, tDNA 检出基因突变 11 种 40 例次。以 tDNA 检出的基因突变结果为金标准, 外周血 ctDNA 诊断 NSCLC 基因突变的敏感度为 75%~100%, 特异度达 95%~100%, 与 tDNA 结果的总体符合率为 91%~100%。**结论** 高通量基因测序技术检测 NSCLC 患者外周血 ctDNA, 可代替肿瘤组织切片了解基因突变情况。

【关键词】 非小细胞肺癌; 高通量测序; 循环肿瘤脱氧核糖核酸

The value of detection of gene mutations in peripheral circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer

Xu Min, He Wan, Li Lan, Zhu Meiqin, Chen Yixin, Xu Ruilian. Department of Medical Oncology, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen Cancer Institute, Shenzhen 518020, China

Corresponding author, Xu Ruilian, E-mail: xuruilian@126.com

【Abstract】 Objectives To investigate the value of gene mutations in peripheral circulating tumor DNA (ctDNA) in non-small cell lung cancer (NSCLC) by next-generation sequencing. **Methods** The gene mutations in peripheral ctDNA and tDNA of tissue paraffin sections in 32 advanced patients with NSCLC were simultaneously detected by next-generation sequencing, and regarded the tissue tumor DNA as the correct standard to evaluate the efficiency of ctDNA diagnosing the gene mutations in NSCLC. **Results** Among 32 patients with NSCLC, 42 samples of gene mutations in 9 types were detected in terms of ctDNA and 40 samples of gene mutations in 11 types were detected in tDNA. The result of tDNA gene mutations was regarded as the correct standard. Sensitivity of detection of gene mutations in peripheral circulating tumor DNA was 75%~100%, and specificity was 95%~100%. The concordance rate between result of tDNA and ctDNA was 91%~100%.

Conclusion To test mutations in NSCLC patients, detection of ctDNA is possible to replace tumor tissue paraffin sections by NGS.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; Next-generation sequencing; Circulating tumor DNA

全球肺癌的发病率和病死率高居各类恶性肿瘤之首, 严重威胁人类健康。肺癌患者中约 80%~85% 为非小细胞肺癌 (NSCLC), 约 50% 的患者确诊时已为晚期, 预后差。准确获知肿瘤的生物信息, 从而在基因分型指导下进行个体化治疗对于指导临床用药至关重要。目前临床常规采用组织 DNA (tDNA) 检测基因分型, 但此检测有创且对标本获取有较高的要求。循环肿瘤 DNA (ctDNA)

是特指肿瘤细胞体细胞 DNA 经脱落或者当细胞凋亡后释放进入循环系统的小片段 DNA, ctDNA 来自肿瘤细胞的体细胞突变, 可以出现与原发肿瘤 DNA 相同的特征或基因改变^[1]。外周血 ctDNA 可以被定性、定量和追踪, 将有可能为临床肿瘤的早期诊断、预后判定及跟踪随访等提供一系列方便、快捷、特异、无创或微创的分子生物学检测手段^[2-5]。但外周血 ctDNA 是否可以替代 tDNA 成为

常规基因检测手段应用于临床尚未可知。为此,笔者通过高通量基因测序技术检测 32 例晚期 NSCLC 患者的外周血 ctDNA 中的基因突变情况,并以组织 tDNA 作金标准,评价其诊断效能,现报告如下。

对象与方法

一、研究对象

2014 年 10 月至 2015 年 12 月我院收治的晚期(ⅢB 期以上)无法手术的 NSCLC 患者 32 例,所有患者均有原发组织的石蜡切片及血液样本。其中男 18 例、女 14 例,年龄 37~72 岁、中位年龄 55 岁,腺癌 23 例、鳞癌 9 例。血浆样本 DNA 提取后与组织切片送南京世和基因技术有限公司行基因检测。

二、方 法

1. 标本采集、血浆分离

入院次日清晨采集患者肘静脉血 5 ml,立即在室温下以 $2\,000 \times g$ 离心 10 min,分离血浆和血细胞,小心收集上层血浆,避免触及白细胞或血小板及红细胞下层。

2. 血浆样本 DNA 提取

采用 Qiagen DNA 提取试剂盒,取血浆样本,室温下 $3\,500 \times g$ 离心 15 min,弃上清,沉淀中加入 1 ml 试剂 1 裂解缓冲液;匀浆液 37°C 水浴静置 60 min 后,加入 10 μl 试剂 2, 50°C 水浴消化 3 h;按步骤分次吸取水相,加入 1 ml 试剂 3~5,轻柔颠倒混匀约 50 次,室温 $5\,000 \times g$ 离心 15 min;弃上清,向沉淀中加入 1 ml 70% 乙醇,重悬沉淀后,室温 $5\,000 \times g$ 离心 10 min;弃上清,吸干乙醇并晾干,加入试剂 6 溶解 DNA, 37°C 溶解 12~14 h,直至 DNA 完全溶解;测量 DNA 浓度后备用。

3. ctDNA 分离

采用薄膜柱吸附试剂盒从血浆中分离 ctDNA:DNA 定量后按照试剂盒说明取 20 ng 以上进行 DNA 文库构建,具体步骤包括 ctDNA 大片段分离、ctDNA 小片段回收、DNA 末端修复和 A 接头连接、将 DNA 两端加上 Illumina 测序试剂盒的专用接头、根据所需 DNA 片段大小进行磁珠筛选、使用 PCR 法扩增文库用于后续的探针杂交捕获和测序实验。

4. 生物素标记探针捕获基因

使用 Geneseeq 杂交富集探针对已建好的 DNA 文库进行目标基因靶标富集及扩增,包括:DNA 捕获探针与文库杂交;捕获文库产物的清洗和回收;捕获文库与链霉亲和素磁珠结合;磁珠捕获文

库清洗,去除非特异结合的文库。

5. 高通量测序

捕获后的文库按照 Illumina 试剂盒说明书的操作步骤,在 Illumina HiSeq 4000 高通量测序平台上样,DNA 在试剂盒 Flow cell 上形成 DNA 簇,测序平台通过单个碱基合成后暂停、荧光检测、合成恢复的循环完成 DNA 高通量测序。

6. 数据分析

将高通量测序结果与中国人群 hg19 基因组数据对比,完成基因 Mapping 工作;同步分析多种基因突变类型;分析生成肿瘤特有突变和种系突变。

7. tDNA 提取与检测

肿瘤组织采用 Qiagen DNA 提取试剂盒提取后应用超声破碎成 300~350 bp,采用 96 rxn xGen® Exome Research Panel v1.0 试剂盒富集后建立高通量测序文库,通过 Illumina Hiseq 4000 高通量测序平台进行 600 倍深度测序,下机数据通过生物信息学平台整理成样本突变信息。

三、统计学处理

以 tDNA 结果为金标准,分析各病例外周血 ctDNA 对 NSCLC 基因突变的诊断效能,计算外周血 ctDNA 诊断 NSCLC 基因突变的敏感度、特异度及总体符合率。

结 果

一、总体结果

32 例 NSCLC 患者中,ctDNA 检出基因突变 9 种 42 例次,tDNA 检出基因突变 11 种 40 例次。

二、外周血 ctDNA 基因对 NSCLC 基因突变的诊断效能评价

以组织石蜡切片 tDNA 检出的基因突变结果为金标准,外周血 ctDNA 对 NSCLC 基因突变的敏感度为 75%~100%,特异度达 95%~100%,与 tDNA 结果的总体符合率为 91%~100%,见表 1。其中,有 2 例患者 tDNA 中未检出突变,但相应外周血 ctDNA 中分别检测出 EGFR exon 19 缺失和 ERBB2 突变。

讨 论

目前临床上用于 NSCLC 患者基因突变检测的主要是经纤维支气管镜或肺穿刺活组织检查获取的 tDNA,但是 NSCLC 在确诊时超过 70% 的患者已为ⅢB 期、Ⅳ期,大部分不能手术,难以获取肿瘤组织,而且肿瘤的生物学特性在经过一系列治疗后可

表 1 外周血 ctDNA 对 NSCLC 基因突变的诊断效能评价

突变基因	ctDNA + (例)		ctDNA - (例)		敏感度 (%)	特异度 (%)	总体符合率 (%)
	tDNA +	tDNA -	tDNA +	tDNA -			
EGFR exon 18	2			30	100	100	100
EGFR exon 19	8	1	2	21	80	95	91
EGFR exon 20			2	30	-	100	94
EGFR exon 21	4		1	27	80	100	97
TP53	10			22	100	100	100
KRAS	4		1	27	80	100	97
ERBB2	3	1		28	100	97	97
PIK3CA	2		1	29	75	100	97
FGFR4	2			30	100	100	100
DPYD	4		1	27	80	100	97
BRAF			2	30	-	100	94

注：EGFR 为表皮生长因子受体，exon 为外显子，TP53 为肿瘤抑制蛋白 P53，KRAS 为鼠肉瘤病毒原癌同源体，ERBB2 为表皮生长因子受体 2，PIK3CA 为磷脂酰肌醇-3-激酶，FGFR4 为成纤维生长因子受体 4，DPYD 为二氢嘧啶脱氢酶编码基因，BRAF 为鼠肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1

能已经发生改变，故每次治疗前实时获得肿瘤信息才能较准确地反映肿瘤细胞特性，疾病进展后再次获取组织标本可谓难上加难。因此，仅仅通过 tDNA 进行 NSCLC 基因检测为临床治疗、研究带来很多不便，人们希望通过一些无创手段来获取患者的基因信息。

血液 ctDNA 的释放被认为与肿瘤细胞的自行分泌或凋亡、坏死有关^[6]。同时由于检测的无创性，可以作为“液体活检”，成为良好的预后和预测分子指标。早在 1948 年，法国学者 Mandel 等便发现了人类血液中存在循环 DNA。而直到 30 年后，Leon 等首次报道肿瘤患者 ctDNA 水平高于正常人，且与患者的预后及疗效有关。随后人们发现血清 ctDNA 水平升高与肿瘤转移、临床分期和患者生存有关，根据血清 ctDNA 水平可判断患者的预后^[7-8]。

2013 年 Dawson 等^[9]研究了 30 例接受了系统治疗的转移性乳腺癌女性患者，连续采集血浆标本，采用定向或全基因组测序分析识别体内基因改变，对 ctDNA 进行个体化定量分析。与同期检测的 CA15-3 及 CTC 相比，ctDNA 水平呈现更广的动态范围及与肿瘤负荷变化更强的相关性。在检测中，ctDNA 为 19 例中的 10 例女性提供较早的治疗反应检测信息。他们认为 ctDNA 是一种具有提示性、遗传特性和高敏感度的转移性乳腺癌生物标

记。

然而，由于循环中存在的 ctDNA 极其微量，对其替代 tDNA 成为肿瘤分子检测的“金标准”造成障碍。2014 年 Newman 等^[10]将高通量测序技术应用于 NSCLC 患者血浆 ctDNA 检测，发现对 II ~ IV 期的 NSCLC 患者检测敏感度达 100%，I 期的 NSCLC 呈中敏感度（50%）；对各期肺癌的特异度均为 96%。研究还表明，当 ctDNA 比例低至 0.019% 的时候仍能够被检测到。有学者分别对 10 例样本进行活组织检查和癌症个体化深度测序（CAPP-Seq）检测 EGFR 和 KRAS，结果显示 CAPP-Seq 并不比金标准肿瘤活组织检查的诊断效能差，其也能准确测定肺癌的基因型。高通量测序技术能一次对几十万至几百万条 DNA 分子进行序列测定，可以检测到低于 0.5% 的基因突变，是对传统测序革命性的改变，且其所需的 DNA 样本量较少，适用于 ctDNA 这种微量 DNA 的检测^[11]。

本研究通过高通量测序技术，分离外周血 ctDNA 并进行多基因联合检测。结果显示，以组织石蜡切片检测出的 tDNA 作金标准，血浆 ctDNA 的敏感度为 75% ~ 100%，特异度为 95% ~ 100%，与 tDNA 结果的总体符合率为 91% ~ 100%。其中，有 2 例患者组织切片中未检出突变，但相应的血液中却分别检测出 EGFR exon 19 缺失和 ERBB2 突变，提示治疗过程中肿瘤的基因突变可能发生了变化，

组织切片无法反映治疗前的实际基因突变情况。或者由于肿瘤具有异质性,组织标本因为取材受限无法反映真实的基因表达情况。

外周血 ctDNA 是一种特征性的肿瘤生物标记物,可实时反映肿瘤发生、发展或治疗过程中的信息,且与传统的组织活检标本相比具有取材方便、无创、患者依从性好等优点。通过本研究,我们发现用高通量测序技术能够检出极微量的外周血 ctDNA 基因突变,且与 tDNA 有较高的符合率。因而通过外周血检测 NSCLC 基因突变代替肿瘤组织是切实可行的,有望替代受到标本采集以及无法连续监测和随访追踪等诸多限制的组织切片。希望将来经过更多临床验证后,高通量测序技术能够得到临床推广,并将肺癌分子诊断和个体化治疗提高到一个新的水平。

参 考 文 献

- [1] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 2014, 32 (6): 579-586.
- [2] Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G, Zwaenepoel K, Gil-Bazo I, Passiglia F, Carreca AP, Taverna S, Vento R, Santini D, Peeters M, Russo A, Pauwels P. Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846 (2): 539-546.
- [3] Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, Kamal M, Blin A, Leroy Q, Rio Frio T, Pierron G, Callens C, Bieche I, Saliou A, Madic J, Rouleau E, Bidard FC, Lantz O, Stern MH, Le Tourneau C, Pierga JY. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol*, 2015, 9 (4): 783-790.
- [4] Madic J, Kiialainen A, Bidard FC, Birzele F, Ramey G, Leroy Q, Rio Frio T, Vaucher I, Raynal V, Bernard V, Lermine A, Clausen I, Giroud N, Schmucki R, Milder M, Horn C, Spleiss O, Lantz O, Stern MH, Pierga JY, Weisser M, Lebofsky R. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int J Cancer*, 2015, 136 (9): 2158-2165.
- [5] Bidard FC, Madic J, Mariani P, Piperno-Neumann S, Rampanou A, Servois V, Cassoux N, Desjardins L, Milder M, Vaucher I, Pierga JY, Lebofsky R, Stern MH, Lantz O. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int J Cancer*, 2014, 134 (5): 1207-1213.
- [6] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11 (6): 426-437.
- [7] Avraham A, Uhlmann R, Shperber A, Birnbaum M, Sandbank J, Sella A, Sukumar S, Evron E. Serum DNA methylation for monitoring response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Int J Cancer*, 2012, 131 (7): E1166-E1172.
- [8] Perrone F, Lampis A, Bertan C, Verderio P, Ciniselli CM, Pizzamiglio S, Frattini M, Nucifora M, Molinari F, Gallino G, Gariboldi M, Meroni E, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori*, 2014, 100 (2): 115-121.
- [9] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2013, 368 (13): 1199-1209.
- [10] Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW Jr, Alizadeh AA, Diehn M. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 2014, 20 (5): 548-554.
- [11] Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, Girard N, Trédaniel J, Guilleminault L, Gervais R, Prim N, Vincent M, Margery J, Larivé S, Foucher P, Duvert B, Vallee M, Le Calvez-Kelm F, McKay J, Missy P, Morin F, Zalcmann G, Olivier M, Souquet PJ; BioCAST/IFCT-1002 investigators. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res*, 2014, 20 (17): 4613-4624.

(收稿日期: 2016-02-24)

(本文编辑: 林燕薇)