

循环肿瘤 DNA 在卵巢癌中的研究进展

袁秋月¹ 乔慧敏² 张盛苗¹ 夏宝国¹ 毕淑娜¹ 陈龙¹

¹青岛大学医学院附属青岛市市立医院妇科 266071; ²大连医科大学临床医学系 116000

通信作者:陈龙,Email: chenlong6517@vip. sina. com

【摘要】 随着分子生物学技术的不断发展,循环肿瘤 DNA (ctDNA) 在恶性肿瘤的诊治方面显示出一定的价值,二代测序技术的出现使血浆 ctDNA 检测更为精准、快速。ctDNA 凭借其安全、非侵入性等优点在卵巢癌的早期诊断、病情监测、疗效评估、指导用药等方面发挥了一定作用。尽管目前血浆 ctDNA 检测的应用仍存在不足,但随着测序技术的不断发展,血浆 ctDNA 在卵巢癌的诊断、个性化治疗及预后评估等方面将发挥越来越重要的作用。

【关键词】 卵巢肿瘤; 循环肿瘤 DNA

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-422X. 2019. 01. 013

Research progress of circulating tumor DNA in ovarian cancer

Yuan Qiuyue¹, Qiao Huimin², Zhang Shengmiao¹, Xia Baoguo¹, Bi Shuna¹, Chen Long¹

¹Department of Gynecology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China; ²Faculty of Clinical Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116000, China

Corresponding author: Chen Long, Email: chenlong6517@vip. sina. com

【Abstract】 With the continued development of molecular biology technologies, circulating tumor DNA (ctDNA) has shown certain value in the diagnosis and treatment of malignant tumors. The emergence of next generation sequencing technology makes ctDNA detection more accurate and rapid. ctDNA plays a certain role in the early diagnosis, disease monitoring, therapeutic evaluation and medication guide of ovarian cancer by virtue of its safety and non-invasiveness. The application of ctDNA detection is insufficient at present, but with the continuous development of sequencing technology, ctDNA will play increasingly important roles in the diagnosis, personalized treatment and prognosis evaluation of ovarian cancer.

【Key words】 Ovarian neoplasms; Circulating tumor DNA

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-422X. 2019. 01. 013

循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 是释放入血的 DNA 片段,来源于肿瘤原发灶及其转移灶中肿瘤细胞的坏死、凋亡及溶解 ctDNA,也可来源于肿瘤细胞分泌的外泌体。近年来,随着“精准医疗”概念的提出、分子生物学研究的深入及测序技术的不断发展,血浆 ctDNA 在恶性肿瘤中的应用开始受到重视^[1],使其逐渐被认为是具有发展潜力的分子标志物。血浆 ctDNA 检测内容主要包括 DNA 拷贝数变异、基因突变、DNA 甲基化检测等^[2]。如今,血浆 ctDNA 在乳腺癌、结直肠癌、肺癌、肝癌等恶性肿瘤的早期诊断、病情监测、疗效评估、指导用药方面的研究取得一定的进展^[3-11]。近年来,随着测序技术的发展,尤其是第二代测序技术的出现,血浆 ctDNA 检测在卵巢癌诊治方面显示出了一定的临床价值^[12]。

1 血浆 ctDNA 在卵巢癌早期诊断中的价值

对于大多数肿瘤来说,早期诊断是治疗的关键。由于卵巢癌起病隐匿,早期常无明显的临床表现,其确诊时分期较晚。卵巢癌的诊断主要凭借影像学检查及组织活检,其存在有创性、滞后性等缺点,而血浆 ctDNA 检测具有安全、非侵入性等优点,并且可以在早期肿瘤患者血浆中检测到,在卵巢癌的早期诊断中发挥积极的作用。

Diamandis 和 Fiala^[13] 研究显示,血浆 ctDNA 在早期癌症患者中的检出率约为 60% ~ 70%,因此,血浆 ctDNA 有望为早期癌症诊断提供依据。Han 等^[4] 的研究结果显示,G 蛋白偶联胆汁酸受体 Gpbar1 启动子甲基化在原发性肝癌中的发生率为 48.18%,而在非肝癌患者中的发生率仅为 18.04%,这为肝癌的早期诊断提供了依据。

同样的,随着分子生物学技术的不断发展,血浆 ctDNA 检测的研究也逐渐应用于卵巢癌的早期诊断。Fader 等^[14]抽取 88 例未经治疗的卵巢癌患者及 97 例健康对照组人员的外周静脉血,利用一代测序技术检测了两组人员外周血中肿瘤来源的驱动基因突变,研究显示 I ~ II 期卵巢癌患者驱动基因突变的总体检出率为 63.6%,在健康对照组中基因突变检出率为 1.5%。Wu 等^[15]利用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术对 47 例卵巢癌患者、14 例良性卵巢肿瘤患者及 10 例健康对照组人员进行血浆 ctDNA 的 RASSF2A 甲基化检测,结果显示卵巢癌患者血浆中 RASSF2A 甲基化发生率为 36.2%,而在良性卵巢肿瘤患者和健康对照组人员血浆中未检测 RASSF2A 甲基化。Cohen 等^[16]收集 32 例高级别浆液性卵巢癌患者及 32 例健康对照者的术前血浆进行 ctDNA 测序,预先指定基因组获得或缺失 ≥ 15 Mb 为“筛查阳性”,对应其基因组图谱中拷贝数变异。结果显示,40.6% 的卵巢癌患者检测到基因组拷贝数变异,其中,38% 为早期卵巢癌患者,而 32 例健康对照者血浆 ctDNA 的拷贝数变异仅为 6.25%。以上研究结果显示,通过对血浆 ctDNA 进行驱动基因突变、RASSF2A 甲基化、拷贝数变异等检测,可能对卵巢癌的早期诊断提供一定的帮助。目前,在卵巢癌中,血浆 ctDNA 检测在早期诊断方面的相关研究甚少,仍需进一步探讨。

2 血浆 ctDNA 在卵巢癌复发监测中的价值

CA125 是卵巢癌病情监测最常用的肿瘤标志物,但在许多卵巢良性肿瘤中 CA125 也有表达,特异性不高。人附睾蛋白 4 可以更好地区分卵巢良恶性肿瘤,但敏感性较低。随着测序技术的发展,血浆 ctDNA 在恶性肿瘤患者病情监测、预测复发方面显示出一定的优势。血浆 ctDNA 能够连续监测恶性肿瘤患者血浆中肿瘤负荷的变化,提供肿瘤早期复发的信号。

在结肠癌中,Tie 等^[7]研究表明 II 期结肠癌术后未接受辅助化疗的患者,血浆 ctDNA 阳性者复发风险更高,在接受化疗的患者中,化疗完成后血浆 ctDNA 阳性者具有更短的无复发生存期。

同样的,血浆 ctDNA 检测在卵巢癌患者病情监测及预测复发方面的研究也取得了一定的成果。Lee 等^[17]利用微滴式数字 PCR 技术监测 51 例卵巢癌患者在接受手术和化疗过程中血浆 ctDNA 的 p53 突变情况,结果显示 10 例卵巢癌患者化疗期间或化疗后血浆 ctDNA 的 p53 突变水平升高,但 CA125 仍保持在正常范围,且其中 3 例卵巢癌患者在血浆 ctDNA 水平升高几个月后监测到卵巢癌复发。中间丝家族

孤啡肽 1 蛋白的启动子甲基化在卵巢肿瘤中经常被检测到,但在健康者血液中很少检测到。Campan 等^[3]对 9 例减瘤术后的卵巢癌患者进行随访,在 8 例卵巢癌复发患者中检测到中间丝家族孤啡肽 1 蛋白的启动子甲基化升高。Morikawa 等^[18]在卵巢透明细胞癌患者的血浆 ctDNA 中检测 PIK3CA 和 KRAS 基因在治疗过程中的反应变化,结果显示卵巢癌患者减瘤术及辅助化疗后两者拷贝数均减少,其后增加提示卵巢癌复发,以上研究为血浆 ctDNA 检测在卵巢癌复发监测中的临床应用提供了依据。

目前,血浆 ctDNA 在卵巢癌监测病情、预测复发方面的相关研究较少,且研究的样本量少,尚缺乏大样本的随机对照研究进一步验证其价值。

3 血浆 ctDNA 在卵巢癌预后评估中的价值

目前,临床上评估卵巢癌患者预后主要是根据肿瘤临床病理分期、年龄、肿瘤病理学分级、组织学类型、是否行满意的肿瘤细胞减灭术等。预后评估是卵巢癌个体化治疗的关键,可改善患者生命质量,最终延长卵巢癌患者的无进展生存期及总生存期。

随着分子生物学研究的不断深入,已有研究显示血浆 ctDNA 在肺癌及乳腺癌预后评估方面有一定的价值。有研究发现,转移性乳腺癌患者治疗结束后血浆 ctDNA 拷贝数水平与总生存率有关^[8]。同样的,Pécuchet 等^[9]的研究发现,晚期非小细胞肺癌初诊时血浆 ctDNA 阳性是患者预后不良的独立指标。

在卵巢癌患者预后评估方面,Pereira 等^[19]利用第二代测序技术对 8 例卵巢癌患者进行治疗前后血浆 ctDNA 拷贝数变化的检测,结果显示在治疗结束后,2 例血浆 ctDNA 水平 ≥ 10 拷贝/ml 的卵巢癌患者分别于 15 个月和 28 个月后因该病死亡,2 例未检测到血浆 ctDNA 拷贝数的卵巢癌患者存活超过 5 年。Parkinson 等^[20]检测 40 例复发性高级别浆液性卵巢癌患者血浆 ctDNA 中 TP53 基因突变情况,结果显示,在化疗 1 个疗程后,与 TP53 突变等位基因分数下降 $\leq 60\%$ 的患者相比,TP53 突变等位基因分数下降 $> 60\%$ 的患者有更长的无复发生存期。Morikawa 等^[18]对卵巢透明细胞癌患者细胞游离 DNA 中的 PIK3CA 和 KRAS 基因进行检测,结果显示细胞游离 DNA 中高水平 PIK3CA-H1047R 或 KRAS-G12D 的患者有更短的无进展生存期。因此,血浆 ctDNA 检测评估卵巢癌患者的预后具有一定的研究前景,为今后提高卵巢癌患者的生命质量、改善患者预后提供了临床参考依据。

4 血浆 ctDNA 在卵巢癌指导用药中的价值

如今,在卵巢癌治疗中,复发、耐药现象不可避免

地出现。随着分子生物学技术的不断发展,靶向治疗也逐渐受到医学界专家的重视。寻找耐药突变基因、发现卵巢癌的新靶向药物成为基础及临床研究的新课题。

目前,卵巢癌患者耐药机制的研究主要集中于活体组织基因检测,但大多数情况下,卵巢癌患者活体组织取材困难,存在一定的滞后性。而血浆 ctDNA 检测具有快速、安全、非侵入性等优点,且相关研究表明,血浆 ctDNA 与组织 DNA 检测具有高度一致性^[21]。在转移性结直肠癌中,Tie 等^[22]研究表明血浆 ctDNA 与肿瘤组织之间基因突变一致性为 92.3%。同样的,在卵巢癌方面,Giannopoulou 等^[23]利用 PCR 技术比较了 48 例卵巢癌患者肿瘤组织与血浆 ctDNA 中雌激素受体 1 的甲基化状态,结果显示卵巢癌患者肿瘤组织与血浆 ctDNA 中雌激素受体 1 的甲基化一致率为 75.0%。这些研究为 ctDNA 检测指导卵巢癌用药提供了一定的依据。

Ma 等^[11]的一项前瞻性研究收集了 18 例接受口服抗表皮生长因子受体 1 或 2 酪氨酸激酶抑制剂治疗的表皮生长因子受体 2 阳性的转移性乳腺癌患者,利用第二代测序技术对其血浆 ctDNA 进行定期检测,研究结果显示,在 14 例进展性乳腺癌患者中,6 例患者对抗表皮生长因子受体 1 或 2 酪氨酸激酶抑制剂发生耐药,且研究表明发生耐药原因与表皮生长因子受体 2 扩增、TP53 和磷脂酰肌醇 3-激酶/雷帕霉素靶蛋白信号通路中涉及的基因突变有关。

目前,血浆 ctDNA 在卵巢癌耐药机制方面的研究主要集中在 BRCA 基因突变的复发性卵巢癌患者。Ledermann 等^[24]研究显示,在对铂类敏感的复发性浆液性卵巢癌患者血浆 ctDNA 中可检测到 BRCA 突变,接受奥拉帕尼单药治疗会有更长的总生存期。Christie 等^[25]研究显示,在对铂类药物敏感的卵巢癌患者血浆 ctDNA 中检测到 BRCA1/2 逆转突变,这部分卵巢癌患者会对铂类药物或多聚 ADP-核糖聚合酶抑制剂奥拉帕尼产生耐药,但对吉西他滨和贝伐珠单抗治疗有反应。由此可见,血浆 ctDNA 检测对卵巢癌患者靶向药物选择及药物耐药的预测可能起到临床指导作用。

尽管已有研究显示血浆 ctDNA 与肿瘤组织 DNA 有高度一致性,但目前研究的数量及样本数量均较少,因此,在复发性卵巢癌患者中,血浆 ctDNA 能否取代肿瘤组织基因检测从而进一步指导用药仍需大量临床研究证实。

目前,血浆 ctDNA 检测的应用仍存在许多不足:

①血浆 ctDNA 检测有多种实验技术及检测指标的观

察研究,但各种技术及指标如何更好地应用于疾病发生发展的各个阶段,仍需大规模的临床研究予以验证。②缺少标准化的技术,血浆 ctDNA 中基因突变、拷贝数变异等检测内容缺乏统一定量的国际化标准。③血浆 ctDNA 的敏感性有待进一步提高。在细胞游离 DNA 总量中血浆 ctDNA 仅占不到 1%,在提高血浆 ctDNA 的敏感性方面还需进行大量相关研究。④许多研究证实了血浆 ctDNA 在卵巢癌诊治中的临床价值,但大多数研究样本较少,且缺乏血浆 ctDNA 与肿瘤组织 DNA 一致性的相关临床验证,仍需大样本的研究进一步证实。尽管如此,随着测序技术的不断发展,尤其是第二代测序技术的出现,血浆 ctDNA 检测在卵巢癌中的临床研究逐渐增多,有望在卵巢癌的早期诊断、复发监测、判断预后、指导用药等方面发挥越来越多的作用。

5 结语

血浆 ctDNA 具有无创、精准、可重复性等优势,在卵巢癌的早期诊断、复发监测、疗效评估及指导用药上显示出了一定的价值,使其有潜力成为卵巢癌诊治方面的特异性分子标志物。目前,血浆 ctDNA 检测技术及方法仍存在局限性,并且在卵巢癌领域,大样本量的临床研究相对较少,仍需要大量的基础及临床试验证实其应用价值。然而,随着 DNA 测序技术的不断进步,血浆 ctDNA 在卵巢癌方面的研究将会不断深入,从而为实现卵巢癌的个体化、精准化治疗提供一定的临床指导。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Gold B, Cankovic M, Furtado LV, et al. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology [J]. J Mol Diagn, 2015, 17(3): 209-224. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.02.001.
- [2] Giannopoulou L, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(2): 186-197. DOI: 10.1515/ccml-2017-0019.
- [3] Campan M, Moffitt M, Houshdaran S, et al. Genome-scale screen for DNA methylation-based detection markers for ovarian cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28141. DOI: 10.1371/journal.pone.0028141.
- [4] Han LY, Fan YC, Mu NN, et al. Aberrant DNA methylation of G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) is a potential biomarker for hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma [J]. Int J Med Sci, 2014, 11(2): 164-171. DOI: 10.7150/ijms.6745.
- [5] Schrock AB, Welsh A, Chung JH, et al. Hybrid capture-based genomic profiling of circulating tumor DNA from patients with advanced

- non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2018, pii: S1556-0864(18)33205-2. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.10.008.
- [6] Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(302): 302ra133. DOI: 10.1126/scitranslmed.aab0021.
- [7] Tie J, Wang Y, Tomasetti C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer[J]. 2016, 8(346): 346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
- [8] Stover DG, Wagle N. Precision medicine in breast cancer: genes, genomes, and the future of genomically driven treatments[J]. *Curr Oncol Rep*, 2015, 17(4): 15. DOI: 10.1007/s11912-015-0438-0.
- [9] Pécuchet N, Zonta E, Didelot A, et al. Base-position error rate analysis of next-generation sequencing applied to circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: a prospective study[J]. *PLoS Med*, 2016, 13(12): e1002199. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002199.
- [10] Hou H, Yang X, Zhang J, et al. Discovery of targetable genetic alterations in advanced non-small cell lung cancer using a next-generation sequencing-based circulating tumor DNA assay[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14605. DOI: 10.1038/s41598-017-14962-0.
- [11] Ma F, Zhu W, Guan Y, et al. ctDNA dynamics: a novel indicator to track resistance in metastatic breast cancer treated with anti-HER2 therapy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 66020-66031. DOI: 10.18632/oncotarget.11791.
- [12] Giannopoulou L, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(2): 186-197. DOI: 10.1515/cclm-2017-0019.
- [13] Diamandis EP, Fiala C. Can circulating tumor DNA be used for direct and early stage cancer detection? [J]. *F1000Res*, 2017, 6: 2129. DOI: 10.12688/f1000research.13440.1.
- [14] Fader AN, Wang Y, Papadopoulos N, et al. Detection of tumor-derived DNA with combination Pap smear and plasma testing in women with primary ovarian cancer: a potential screening test on the horizon? [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145 Suppl 1: 24-25. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.03.071.
- [15] Wu Y, Zhang X, Lin L, et al. Aberrant methylation of RASSF2A in tumors and plasma of patients with epithelial ovarian cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(3): 1171-1176.
- [16] Cohen PA, Flowers N, Tong S, et al. Abnormal plasma DNA profiles in early ovarian cancer using a non-invasive prenatal testing platform: implications for cancer screening[J]. *BMC Med*, 2016, 14(1): 126. DOI: 10.1186/s12916-016-0667-6.
- [17] Lee HY, Lee SW, Na GH, et al. Abstract B04: early detection of ovarian cancer recurrence using p53-mutated circulating tumor DNA as non-invasive biomarkers[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 Suppl 2: Abstract nr B04. DOI: 10.1158/1557-3265.OVCA15-B04.
- [18] Morikawa A, Hayashi T, Shimizu N, et al. PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(20): 15266-15274. DOI: 10.18632/oncotarget.24555.
- [19] Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, et al. Personalized circulating tumor DNA biomarkers dynamically predict treatment response and survival in gynecologic cancers[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e145754. DOI: 10.1371/journal.pone.0145754.
- [20] Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, et al. Exploratory analysis of TP53 mutations in circulating tumour DNA as biomarkers of treatment response for patients with relapsed high-grade serous ovarian carcinoma: a retrospective study[J]. *PLoS Med*, 2016, 13(12): e1002198. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002198.
- [21] Madic J, Kiiäläinen A, Bidard FC, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(9): 2158-2165. DOI: 10.1002/ijc.29265.
- [22] 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]. *Ann Oncol*, 2015, 26(8): 1715-1722. DOI: 10.1093/annonc/mdv177.
- [23] Giannopoulou L, Mastoraki S, Buderath P, et al. ESR1 methylation in primary tumors and paired circulating tumor DNA of patients with high-grade serous ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2018, 150(2): 355-360. DOI: 10.1016/j.ygyno.2018.05.026.
- [24] Ledermann JA, Harter P, Gourley C, et al. Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(11): 1579-1589. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30376-X.
- [25] Christie EL, Fereday S, Doig K, et al. Reversion of BRCA1/2 germline mutations detected in circulating tumor DNA from patients with high-grade serous ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(12): 1274-1280. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.4627.

(收稿日期:2018-11-26 修回日期:2018-12-12)
(本文编辑:张晶晶)