

肿瘤循环 DNA 在肝细胞癌临床诊治中的应用研究

徐滨, 杜飞*

中山大学附属第八医院 广东深圳

【摘要】肝癌是一类严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 恶性程度较高, 起病隐匿, 早期症状不典型, 确诊时大部分患者已属于中晚期, 丧失手术机会。尽管部分患者可进行手术治疗, 但术后复发和转移仍严重影响患者的生存期。早期发现和诊断是肝癌临床治疗成功和改善患者预后的关键。肿瘤复发是不可避免的, 如何及早发现早期复发和转移, 并采取及时干预, 显得尤为重要。目前临床上缺乏特异的检查手段进行早期筛查和预后判断。近年来, 基于循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA ctDNA) 的液体活检技术迅速并广受关注。因此, 本文探讨循环肿瘤 DNA 在肝癌诊断和治疗中的应用研究。

【关键词】肝细胞癌; 循环肿瘤 DNA

Application of tumor circulating DNA in clinical diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma

Bin Xu, Fei Du*

The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong

【Abstract】Hepatocellular carcinoma (HCC) is a kind of malignant tumor which is a serious threat to human health. It has a high degree of malignancy, insidious onset and atypical early symptoms. Most patients already belong to the middle or late stage and lose the opportunity of surgery when diagnosed. Although some patients can be treated with surgery, postoperative recurrence and metastasis still seriously affect the survival of patients. Early detection and diagnosis is the key to successful clinical treatment and improved prognosis of patients with liver cancer. If tumor recurrence is inevitable, how to detect early recurrence and metastasis, and take timely intervention, is particularly important. At present, there is a lack of specific examination methods for early screening and prognosis. Liquid biopsy techniques based on circulating tumor DNA(ctDNA) have gained rapid and widespread interest in recent years. Therefore, this paper discusses the application of circulating tumor DNA in the diagnosis and treatment of liver cancer.

【Keywords】hepatocellular carcinoma; circulating tumor DNA

前言

原发性肝癌是目前我国第 4 位常见恶性肿瘤及第 2 位肿瘤致死病因, 严重威胁我国人民的生命和健康^{[1][2]}。2020 年中国肝癌新发病例数 41 万例, 肝癌死亡病例数 39 万例^[2]。原发性肝癌的病理学分型中, 肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma HCC) 占 75%~85%, 胆管细胞癌 (Intrahepatic cholangiocarcinoma ICC) 占 10%~15%, 另有少部分为混合型肝癌^[2]。

在全球范围内, 慢性乙肝病毒感染是肝细胞癌

的主要病因。尽管乙肝疫苗的广泛接种降低了肝细胞癌的发病率, 但仍有许多未接种疫苗的人感染慢性乙肝病毒, 有罹患肝细胞癌的风险。在西方国家和日本, 肝细胞癌的主要病因是慢性丙肝病毒感染。全世界范围内, 非酒精性脂肪性肝病相关肝细胞癌的发病率呈上升趋势^[3]。有文献报道, 非肝硬化慢性乙肝病毒感染者的肝细胞癌年发生率为 0.5%~1.0%^[4], 而肝硬化患者肝细胞癌年发生率为 3%~6%^[5,6]。

肝癌的复发和转移严重影响患者的总体生存

*通讯作者: 杜飞

期, 如何做好早期诊断, 及早发现早期复发并及时干预, 显得尤为重要, 高敏感性和特异性的生物标志物则是早期诊断和监测复发的关键因素。

1 ctDNA 的简介

循环肿瘤 DNA 属于游离 DNA (circulating free DNA cfDNA), 存在于体液循环中, 来源为肿瘤细胞的分泌或者肿瘤细胞内凋亡。虽然正常人与肿瘤患者的外周循环系统均会有 cfDNA 的存在, 但是肿瘤患者外周血中的 cfDNA 显著高于正常人^[7,8]。这些肿瘤来源的 ctDNA 会携带大量的肿瘤变异。除了基因组突变, ctDNA 分子的片段长度也是肿瘤早筛的指标之一。研究表明, 肿瘤患者外周血样本中的 cfDNA 的长度短于正常样本中的 cfDNA 的长度^[9]。由于肝细胞癌患者体内循环肿瘤 DNA 含量浓度、表观遗传学等方面存在差异, 可以将 ctDNA 用于监测治疗效果, 转移复发等情况, 能为肿瘤的早期诊断、临床治疗效果及预后判断提供重要支持。

基于新一代测序技术的发展与应用, 循环肿瘤 DNA 的检测由只能检测外周循环中全部 cfDNA 的浓度发展成为特定突变基因的靶向检测, 弥补之前运用定量 PCR 技术无法从 cfDNA 分离肿瘤来源的 ctDNA 的缺点, 为基于血浆 ctDNA 检测提供了重要的依据^[7]。

ctDNA 的靶向测序检测的应用已经被多项研究证实^{[10][11]}, 并且根据不同的肿瘤突变基因的靶向测序开发出不同的适用基因 panel 来满足临床的需求。

2 ctDNA 与肝细胞癌的早期诊断

我国约 80% 的肝细胞癌患者初诊时已经发生肝内扩散或远处转移, 丧失手术切除机会。早期诊断率低及术后复发率高是肝癌患者预后不佳的重要因素。为了提高肝癌患者的诊疗效果, 延长其生存期, 可以采取对具有肝癌高危因素的人群尽早地进行筛查与监测相关指标来进行干预^[12]。目前, 尽管抗病毒治疗可以显著降低肝癌的发生风险, 但是仍然无法完全避免肝癌的发生^[13]。

目前临床上最常用的血清肿瘤标志物是甲胎蛋白 (alphafetoprotein, AFP), 但是其单独应用时的灵敏度为 50%, 即使与肝脏超声联合检测的灵敏度也仅为 63%^[14]。理想的监测模式需要具有较高的灵敏度和特异度, 高度的可重复性, 且不依赖于操作者技能。液体活检是一种合适的方法。随着精准医

学的大力发展, ctDNA 的检测不仅可以弥补传统肝组织活检的局限性, 其无创的优点可以实时全面监测肿瘤动态变化, 在肿瘤的诊治方面具有较高的临床价值。

ctDNA 的甲基化模式在 HCC 患者的早期诊断中具有巨大的潜力。Kotoh 等人^[15]开发了一种敏感的甲基化 SEPT9 检测方法, 其纳入包括 80 名健康志愿者、45 名无 HCC 的慢性肝病 (CLD) 患者和 136 名 HCC 患者, 对 HCC 患者进行巴塞罗那分期, 其中 0 期 12 例, A 期 50 人, B 期 31 人, C 期 41 人, D 期 2 人。在健康对照组、CLD 组和 HCC 组中, SEPT9 甲基化的中位数拷贝数分别为 0.0、2.0 和 6.4, 组间差异有统计学意义 (HCC vs 健康对照组, $P < 0.001$; HCC vs. CLD, $P = 0.002$; CLD vs 健康对照组, $P=0.008$)。与健康受试者相比, 检测 HCC 的灵敏度和特异度分别为 63.2% 和 90.0% (截止值 4.6 个拷贝)。甲基化 SEPT9 的阳性率随着 HCC 进展而增加 (0 期, 41.7%; A 期, 58.0%; B 期, 61.3%; C 期 75.6%; D 期 100%)。Kisiel 等人^[16]确定了 HCC 中 6 种最佳甲基化 DNA 标记物 (MDM), 包括 ECE1、HOXA1、CLEC11A、AK0559 57、PFKP 和 EMX1, 并结合了 I 期试验和 II 期临床验证。在诊断 HCC 时, 该 6 标记 MDM 组的受试者操作曲线下面积 (AUC) 为 0.96, 敏感度为 95%, 特异度为 92%。

Cai J 等人^[17]从 2554 名中国受试者 (1204 名 HCC 患者、392 名慢性乙型肝炎病毒感染 (CHB) 或肝硬化患者和 958 名健康个体和良性肝脏病变患者) 的 cfDNA 样本中获得全基因组 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC), 开发了一个基于巴塞罗那临床肝癌分期系统的 32 基因诊断模型, 准确区分早期 HCC (0/A 期) 和非 HCC (AU=88.4%; (95%CI:85.8%~91.1%)), 表现出优于甲胎蛋白 (AFP) 的性能。5hmC 模型除了能从非 HCC 中检出早期或小肿瘤 (如 $\leq 2.0\text{cm}$) 患者外, 还能从有 CHB 或肝硬化病史的高危受试者中鉴别早期 HCC (AUC=84.6%; (95%CI: 80.6%~88.7%)), 也显著优于 AFP。Cai Z 等人^[18]的研究中为捕获肿瘤体细胞单核苷酸变异 (SNV) 及拷贝数变异 (CNV), 通过对长期随访的 34 名 HCC 患者血浆进行靶向测序及低覆盖全基因组测序并结合患者临床资料, 以评估 ctDNA 与常见肝癌血

清标记物的对预后的预测。随访期间, SNVs 和 CNVs 动态变化与患者的肿瘤负担相关。我们整合了综合的 ctDNA 突变谱, 以提供一种可靠的策略, 该方法可以准确评估患者的肿瘤负荷, 并与患者的影像学结果保持高度一致性, 并可在影像学表现前平均 4.6 个月发现肿瘤的发生。该方法优于血清生物标志物甲胎蛋白 (AFP) 和异常凝血酶原 (DCP) 对于肿瘤的评估及预测。

一项荟萃分析纳入 33 篇文献^[19], 共计 4113 名受试者, 调查了四个主要亚组: 定量或 ctDNA 的定性分析、ctDNA 中 Ras 关联结构域家族 1 同种 A 型 RASSF1A 甲基化亚组以及联合甲胎蛋白 (AFP) 和 ctDNA 分析亚组。定量研究中灵敏度为 0.722 (95%CI:0.686-0.756), 特异度为 0.823 (95%CI: 0.789-0.854)。对于定性研究, 相应值为 0.568 (95%CI: 0.548-0.587)、0.882 (95%CI: 0.867-0.897)。侦查 RASSF1A 甲基化的灵敏度为 0.644 (95%CI:0.608-0.678), 特异度为 0.875 (95%CI:0.847-0.900)。AFP 结合 ctDNA 测定的灵敏度为 0.760 (95%CI:0.728-0.790) 特异度为 0.920 (95%CI:0.893-0.942)。循环肿瘤 DNA 在肝癌的诊断中具有很好的应用前景。然而, 它不是独立的, 可以作为辅助工具联合 AFP 用于 HCC 筛查和检测。

3 ctDNA 和肝细胞癌的术后监测、预后判断

ctDNA 甲基化除了在诊断方面的作用外, 也可以作为预后指标。Kotoh 等人^[15]的研究表明甲基化 S EPT9 的拷贝数与 BCLC 分期、大血管浸润、肿瘤数量和大小有关。Li 等人^[20]纳入了 155 例接受手术切除的 HCC 患者。检测 IGFBP7 甲基化状态、DNMT s mRNA 水平及丙二醛 (MDA)、黄嘌呤氧化酶 (X OD)、还原型谷胱甘肽激素 (GSH) 和谷胱甘肽 s-转移酶 (GST) 水平。IGFBP7 甲基化组 MDA、X OD 水平显著高于未甲基化组, GSH 水平显著低于未甲基化组。IGFBP7 甲基化组 DNMT1 和 DNMT3 a mRNA 水平高于未甲基化组。Kaplan-Meier 曲线分析显示, IGFBP7 启动子甲基化与总生存率 (OS) 显著相关 ($p<0.001$)。此外, IGFBP7 甲基化是 HCC 肝切除术后 OS ($p=0.000$) 和早期肿瘤复发 ($p=0.008$) 的独立预后预测因子。IGFBP7 启动子甲基化与 OS 相关, 提示 IGFBP7 启动子甲基化可能是肝切除术后 HCC 患者潜在的独立预后因素。

Ren N 等人^[21]证明循环血浆 DNA 水平和 D8S258 等位基因失衡 (AI) 的组合可能是 HCC 预后的独立预测因子。在 79 例 HCC 患者中检测到循环血浆 DNA 水平, D8S258 等位基因失衡与肿瘤分化、TNM 分期和血管浸润显著相关, 与 3 年无病生存率 (DFS) 和 OS 呈负相关。

Howell J 等人^[22]研究表明血浆 ctDNA 中 CSM D3 突变的检测与 HCC 患者总生存率降低相关。在单变量分析中, CSMD3 基因突变的存在与较短的总生存期相关 (Logrank HR 3.18, 95%CI:1.14-8.86, $P=0.027$)。CSMD3 突变患者的中位生存期为 15.5 个月 (IQR 7.77-16.5 个月), 而无 CSMD3 基因突变患者的平均生存期为 26.5 个月 (IQ 16.93-46.07 个月)。与总生存率相关的其他因素包括晚期 BCLC 分期 (HR 16.52, 95%CI:2.22-122.94, $P=0.006$) 和 Child-Pugh 分级 (CPC HR 7.98, 95%CI:2.31-27.61, $P=0.001$)。重要的是, Cox 比例风险模型显示, 当调整年龄、BCLC 分期和 Child-Pugh 分级时, CSMD3 突变仍然是 HCC 总生存期较短的显著独立风险 (HR 4.91, 95%CI:1.60-15.02, $P=0.005$; 比例风险假设检验 0.748)。

Ye K 等人^[23]建议 ctDNA 阳性患者应接受更密集的疾病监测和更积极的治疗策略, 以提高生存时间。该团队纳入 96 名肝癌患者, 术后采集所有患者的外周血样本, 并使用基于杂交捕获的下一代测序进行分析。外周血中至少一种体细胞突变的鉴定被定义为 ctDNA+。使用 Lasso Cox 模型, 肿瘤组织中的五个遗传特征与无病生存率 (DFS) 相关。在训练和验证队列中, 受试者操作特征曲线下的面积分别为 0.813 和 0.882。ctDNA+组和 ctDNA-组的复发率分别为 60.9%和 27.8%。多变量 Cox 回归分析显示, 术后 ctDNA 是 DFS (HR[危险比]:6.074, 95%CI:2.648-13.929, $P<0.001$) 和总生存率 (OS) 的独立预后预测因子 (HR:4.829, 95%CI:1.508-15.466, $P=0.008$)。ctDNA 与 AFP 的结合提高了预测性能。ctDNA+/AFP-H 组和 ctDNA+/AFP-L 组的中位 DFS 分别为 2.0 和 8.0 个月; 而 ctDNA-/AFP-H 和 ctDNA-/AFP-L 组在统计学上未达到中位时间 (对数秩检验, $P<0.0001$)。此外, 无论肿瘤分期如何, ctDNA-患者的预后都优于 ctDNA+患者。术后 ctDNA 测序对肝癌患者有很大的预后价值。

4 总结

随着下一代测序技术的发展, 基于循环肿瘤 DNA 的液体活检技术在肝细胞癌的诊断具有较高的灵敏度和特异度, 尤其是对于 AFP 阴性的肝细胞癌患者, 可以作为重要补充。另外 ctDNA 在监测复发和预后判断方面具有独特优势, 能比影像学、AFP 更早发现复发和转移。总之, ctDNA 在肝癌的诊断治疗中具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *The Lancet*, 2019(10204):394.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018 GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2018, 68: 394-424.
- [3] Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma[J]. *N Engl J Med*. 2019, 380(15):1450-1462.
- [4] Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors - ScienceDirect[J]. *Journal of Hepatology*, 2008, 48(2):335-352.
- [5] Chu C M, Liaw Y F. Hepatitis B virus-related cirrhosis: natural history and treatment.[J]. *Seminars in liver disease*, 2006(2):26.
- [6] Chen Y C, Chu C M, Yeh C T, et al. Natural course following the onset of cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: a long-term follow-up study[J]. *Hepatology International*, 2007, 1(1):267-273.
- [7] Aarthi R, Mani S, Velusami S, et al. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers[J]. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2015, 19(6):339-350.
- [8] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*. 2013;368(13):1199-1209.
- [9] 刘斌亮, 马飞, 曾益新. 循环肿瘤 DNA 在乳腺癌内分泌治疗耐药中的应用[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2017, (10):779-782.
- [10] Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients[J]. *Nat Med*. 2015;21(7):827.
- [11] Xu S, Lou F, Wu Y, et al. Circulating tumor DNA identified by targeted sequencing in advanced-stage non-small cell lung cancer patients[J]. *Cancer Lett*. 2016;370(2):324-331.
- [12] Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(7):417-422.
- [13] Hou JL, Zhao W, Lee C, et al. Outcomes of Long-term Treatment of Chronic HBV Infection With Entecavir or Other Agents From a Randomized Trial in 24 Countries[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(2):457-467.
- [14] Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, et al. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis[J]. *Gastroenterology*. 2018;154(6):1706-1718.
- [15] Kotoh Y, Suehiro Y, Saeki I, et al. Novel Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive Methylated *SEPT9* Assay for Diagnosing Hepatocellular Carcinoma[J]. *Hepatol Commun*. 2020;4(3):461-470.
- [16] Kisiel JB, Dukek BA, V S R Kanipakam R, et al. Hepatocellular Carcinoma Detection by Plasma Methylated DNA: Discovery, Phase I Pilot, and Phase II Clinical Validation[J]. *Hepatology*. 2019;69(3):1180-1192.
- [17] Cai J, Chen L, Zhang Z, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA as a non-invasive approach for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*. 2019;68(12):2195-2205.
- [18] Cai Z, Chen G, Zeng Y, et al. Comprehensive Liquid Profiling of Circulating Tumor DNA and Protein Biomarkers in Long-Term Follow-Up Patients with Hepatocellular Carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*. 2019;25(17):5284-5294.
- [19] Zhang Z, Chen P, Xie H, Cao P. Using circulating tumor DNA as a novel biomarker to screen and diagnose hepatocellular carcinoma: A systematic review and

- meta-analysis[J]. *Cancer Med.* 2020;9(4):1349-1364.
- [20] Li F, Qiao CY, Gao S, et al. Circulating Cell-Free DNA of Methylated Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 Predicts a Poor Prognosis in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma After Hepatectomy [J]. *Free Radic Res* (2018) 52:455-64.
- [21] Ren N, Qin LX, Tu H, et al. The prognostic value of circulating plasma DNA level and its allelic imbalance on chromosome 8p in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(6):399-407.
- [22] Howell J , Atkinson S R , Pinato D J , et al. Mutations in circulating cell-free tumour DNA: Predictors of survival in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Cancer International*, 2021, 2(2):54-62.
- [23] Ye K, Fan Q, Yuan M, et al. Prognostic Value of Post

operative Circulating Tumor DNA in Patients With Early- and Intermediate-Stage Hepatocellular Carcinoma[J]. *Front Oncol.* 2022;12:834992.

收稿日期: 2022 年 10 月 17 日

出刊日期: 2022 年 11 月 21 日

引用本文: 冯尚, 血塞通注射液治疗老年性心脑血管疾病的临床观察[J], 国际医学与数据杂志 2022, 6(6): 188-192.

DOI: 10.12208/j.ijmd.20220274

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS