液态活检

肺癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，靶向治疗和免疫治疗显著提高了晚期肺癌患者的无进展生存期和总生存期。靶向治疗的前提是明确患者的分子分型，常规的分子检测以肿瘤组织为"金标准"[1]，采用原发灶或单一转移灶的肿瘤组织获取DNA或RNA来检测基因突变。然而，肿瘤在各种内源性和外源性选择压力的作用下不断进化，肿瘤基因组分子图谱也在动态变化，特别是经靶向药物治疗后，细胞亚克隆增加，异质性增强[2]。此外，获取肿瘤组织为有创操作，无法多时间点重复采样，且肿瘤组织存在时间和空间异质性，活检或穿刺样本不能代表肿瘤病灶的全貌。因此，以外周血循环肿瘤 DNA（circulating tumor DNA，ctDNA）为代表的"液态活检"受到了越来越多的关注。

液态活检是基于体液（如血液、尿液、唾液等）样本的一类非侵入性的检测方法，能够快捷、无创地进行疾病诊断或治疗监测。其概念最早由Sorrells[3]于1974年提出，研究采用关节腔内的滑液诊断滑膜炎。目前，液态活检技术已被用于肿瘤诊断、指导靶向用药、监测疗效和耐药等方面。本文将从液态活检的样本类型、检测方法、临床应用等方面加以论述。

1　液态活检的样本类型及其生物学特征

1.1　以外周血为基础的液态活检样本

肿瘤细胞在体内不断更新、坏死、脱落，将 DNA、RNA、蛋白质等细胞成分乃至肿瘤细胞释放至血液循环。因此，肿瘤患者的外周血中可含有ctDNA、循环肿瘤RNA（circulating tumor RNA，ctRNA）、循环肿瘤细胞（circulating tumor cell，CTC）等，更关键的是这些介质携带肿瘤基因组信息，能够反映肿瘤负荷及进展等情况。

（1）ctDNA ：是指存在于外周血中且来源于肿瘤细胞的游离DNA。循环游离 DNA（circulating free DNA，cfDNA）即非细胞结合的DNA，Mandel等[4]于1948年首次发现在癌症患者的血液中存在非细胞结合核酸，即 cfDNA。1977年，Leon等[5]发现肿瘤患者外周血 cfDNA 的含量明显高于非肿瘤患者，这一重大发现促进了后续一系列研究。Stroun等 [6] 首先发现肿瘤患者的 cfDNA 携带肿瘤相关的基因变异，并相继被其他研究团队证实，cfDNA 包含了癌基因 / 抑癌基因的突变、微卫星不稳定、后生遗传学变异等基因变异信息 [7-9]。因此，肿瘤患者外周血 cfDNA 一部分来自于肿瘤细胞，称之为 ctDNA。

cfDNA 进入体液循环的机制尚不清楚，一般认为可通过细胞凋亡、坏死或主动分泌等方式将cfDNA 释放至血液循环或其他体液系统 [10-15]。通过测序发现 cfDNA 片段大小集中在 166 bp 左右，为环绕核小体（147 bp）及组蛋白 H1 接头 DNA的长度之和 [16,17]。而相对于非突变的 cfDNA 而言，ctDNA 的长度短于 cfDNA[18-21]，通过大鼠移植瘤模型分析发现 ctDNA 的长度为 134 ～ 144 bp[20]，这种缩短的机制仍不清楚。而长度大于 1000 bp的 cfDNA 更可能来自于正常细胞，通过外泌体释放至血液循环，或者来自坏死肿瘤细胞所释放的DNA 片段。研究发现 cfDNA 的半衰期为 16 分钟至 2.5 小时 [22-25]。因此，ctDNA 的定量分析能够实时反映肿瘤的负荷大小。但受到半衰期短以及背景复杂的影响，使得 ctDNA 在外周血中的占比波动较大，在临床实践中需要灵敏度高的方法才能满足ctDNA 的检测需求。

（2）CTC ：是指肿瘤在生长过程中释放至血液循环的肿瘤细胞。一般认为 CTC 进入血液循环的机制，一方面是通过对血管的内渗作用，发生上皮向间质细胞的转化；另一方面是肿瘤相关的脉管系统软化导致肿瘤细胞被动脱落至血液循环 [26]。1869 年，澳大利亚内科医生 Thomas Ashworth[27]首次报道了 CTC 的存在，CTCs 与肿瘤组织有相同的生物学信息，具备完整的基因组、转录组及蛋白质组信息。从肿瘤患者外周血中可分离出单个或成团的 CTCs，且 CTCs 的数量与预后及生存相关 [28]。外周血中 CTC 含量极低，1 ml 血液中大约含有 10个 CTCs，同时含有数百万个白细胞和 10 亿个红细胞，因此背景较为复杂 [26]。

（3）外泌体：Pan 等 [29] 和 Johnstone 等 [30] 首次定义了外泌体，其通过内吞途径产生，通过多泡体（multivesicular body，MVBs）从细胞膜释放至细胞外环境中 [31,32]，四分子交联体家族成员 CD9、CD63、CD81 及 CD82 是识别外泌体的特异性生物标志物 [32,33]。外泌体直径为 40 ～ 100 nm，密度为1.13 ～ 1.19 g/ml[34]。在生理或病理条件下，多种细胞均可分泌外泌体，包括免疫细胞、肿瘤细胞、干细胞等 [35-37]。由于外泌体携带亲代细胞的生物学和遗传学信息，如 RNAs、微小 RNAs（microRNAs，miRNAs）、DNA、蛋白质等，因此能够反映亲代细胞的生物学特性。同时，由于外泌体是脂质双分子层结构，其携带的生物学和遗传学信息不易被降解。外泌体的主要功能是进行细胞间物质和信息的交换，其具体功能取决于亲代细胞的类型及其所携带的信息成分，如肿瘤细胞来源的外泌体主要参与肿瘤进展、耐药信息传递等，正常细胞来源的外泌体主要发挥维持细胞稳态的作用 [38]。

（4）ctRNA ：1996 年，在黑色素瘤患者的血液中首次检出循环肿瘤相关信使 RNA（messenger RNA，mRNA）[39]。此后，相继在实体瘤的外周血中发现其他类型的 RNA，如 miRNAs、lncRNAs[40]。受多种原因影响，肿瘤相关 mRNA 的存在具有临床相关性，包括肿瘤特异性基因表达谱的鉴定。DNA 的体细胞突变仅代表癌症相关分子变异的一个子集，未完全概括可能由表观遗传改变、miRNA 的作用或其他机制引起的基因表达谱的变化。因此，基于血液的癌症 RNA 分析或可提供更有价值的信息。

miRNA 是外周血中含量最丰富的一类 RNA，血液中的外泌体、凋亡小体、蛋白 -miRNA 复合物及肿瘤驯化的血小板（tumor-educated platelets，TEP）均可携带 miRNA[40-42]。对血液中 mRNA 和miRNA 的分析仍处于探索阶段，临床应用价值也在研究中。

1.2　其他体液的液态活检样本

（1）尿液：尿液上清含有 DNA 片段，1999 年Zhang 等 [43] 首次于尿液上清中检出 Y- 染色体 SRY基因片段，10 年后证实尿液中的 cfDNA 即 transrenal DNA（tr-DNA），是肾脏清除血液中 cfDNA 的结果（图 1）[44,45]。理论上，尿液是一种有效的肿瘤DNA 的来源，收集简便，无任何侵袭性。

（2）脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）：CSF由脑室的脉络膜丛分泌，如果 CSF 与中枢神经系统的所有细胞直接接触（包括肿瘤细胞），理论上CSF 也是 ctDNA 的有效来源之一。对于肺癌患者而言，通过 CSF-ctDNA 检测可以分析脑转移病灶的基因变异特征。定位于中枢神经系统的肿瘤病灶，CSF 中 ctDNA 含量明显大于血浆中的含量，并可以通过检测 CSF-ctDNA 体细胞突变信息监测脑部病灶的变化 [46]。

2　液态活检的相关技术

2.1　液态活检的捕获技术

（1）分离游离核酸：从血液中分离 ctDNA 与RNA 的常用方法是通过商品化试剂盒来提取，提取 ctDNA 应用较为成熟的试剂盒为 Qiagen 公司的产品，提取 RNA 常用试剂盒为 SPLIT RNA Extr action Kit[47]。

（2）富集和捕获 CTC ：CTC 的富集主要基于CTC 的物理学（大小、密度、电极、可变形性等）和生物学（细胞表面蛋白、生存能力及侵袭性）特征，基于物理学特征的富集方法包括滤膜法、密度梯度离心法或二维电泳法；基于生物学特征的方法主要是免疫磁珠法，即通过 CTC 表面的上皮细胞抗原 EpCAM 进行正向富集，或者基于白细胞表面的 CD45 抗原进行负向富集 [48,49]。目前 CTC 富集捕获技术见表 1。

（3）分离外泌体：分离外泌体常用的方法是密度梯度超速离心法，或根据外泌体表面特异性标志物 CD9、CD63、CD81 等进行富集 [50,51]。

2.2　液态活检的检测技术

液态活检常用的检测技术包括以聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）为基础的检测技术，如突变扩增阻滞系统（amplification refractory mutation system PCR，ARMS-PCR）、Cobas-PCR、数字 PCR（digital PCR，dPCR）及二代测序（next generation sequencing，NGS）技术等。检测技术的发展进一步推动了液态活检在临床上的应用，本文将简要介绍国内常用的检测技术。

（1）ARMS-PCR ：Newton 等 [52] 最早建立了ARMS-PCR 方法检测已知的突变位点。其原理是根据特异的突变位点设计引物，仅目的片段存在突变才可进行 PCR 扩增，产生荧光信号，同时阻滞野生型基因的 PCR 扩增反应。与其他基于 PCR 的检测技术相比，ARMS-PCR 在检测单个已知突变位点时灵敏度更高（1%），更便捷。ARMS-PCR 的升级技术 super ARMS-PCR，其灵敏度进一步提升，可达 0.2%，更适用于血液表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）突变的检测 [53,54]。目前，ARMS-PCR 和 super ARMS-PCR 均已获得国家食品药品监督管理总局（China Food and Drug Administration，CFDA）批准用于晚期非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）检测 EGFR突变，指导临床靶向用药。

（2）Cobas-PCR ：是另一种基于等位基因特异性扩增的实时荧光 PCR，其对引物做了进一步修饰，导致引物与野生型片段结合时极不稳定，从而降低假阳性率，其第二代技术 Cobas V2.0 可同时检测组织和血液样本，并增加 EGFR 突变检测位点至 42 个 [55]。

（3）dPCR ：用于血液 EGFR 突变检测的数字PCR 技术主要包括微滴数字 PCR（droplet digital PCR，ddPCR）和 QuantStudio 3D dPCR，灵敏度约为 0.01%。ddPCR 基于乳液微滴技术，将 PCR 所需的反应体系分馏为 2 万个微滴，每个含有靶片段的微滴将发生扩增反应，通过阳性微滴数进行靶基因突变拷贝数的定量分析 [56]。QuantStudio 3D dPCR以封闭的芯片为基础，相较于其他 dPCR 平台，其成本低廉 [57]。目前，dPCR 技术仅作为单基因突变检测的一项重要补充，需在临床试验中进一步验证技术准确性与稳定性，以便在临床上普及推广。

（4）NGS ：即高通量测序技术，其原理是将待测 DNA 分子打断成若干个小片段，并于两端加上接头，单个片段进行扩增，复制碱基的同时检测信号。根据检测的基因数量和类型可以分为靶向 panel 测序、全外显子测序（whole exome sequencing，WES）、全基因组测序（whole genome sequencing，WGS）及转录组测序等。NGS 的流程一般为：样本制备、建库、靶向富集、高通量测序以及生物信息学分析 [58]。NGS 可对数以百万计的 DNA 分子同时进行测序，允许检测多个已知或未知的基因变异，具有对样本含量要求低、灵敏度高等优点 [59]。

3　临床应用

3.1　早期诊断

对 cfDNA 进行定量分析可用于评估肿瘤负荷。肿瘤患者血浆中 cfDNA 含量明显高于健康人或良性疾病患者，且随着肿瘤分期的增加而增加 [60,61]。此外，cfDNA 的检测可用于确定患者术后是否为无病生存，监测术后复发 [60-62]。虽然 cfDNA 提供的信息有限，但将 cfDNA 水平与ctDNA 体细胞突变相结合，则可提供宝贵的诊断信息。体细胞突变是肿瘤特异性的，相比常规肿瘤标志物如癌胚抗原，评估 ctDNA 体细胞突变对肿瘤的诊断将更加准确。另外，研究证实肿瘤候选基因突变谱在肿瘤组织和配对的血浆 DNA 样本之间是高度一致的，包括 NSCLC、乳腺癌、结肠癌等 [63-65]。因此，cfDNA/ctDNA 具有诊断和评估肿瘤预后的价值。

3.2　评估疾病对治疗的反应及监测耐药

ctDNA的分析可用于监测 NSCLC 对靶向治疗的反应。EGFR 敏感突变的晚期 NSCLC 接受 EGFR- 酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitors，TKIs）治疗1 个周期后，96% 的患者含有 EGFR 突变的 ctDNA水平降低，这反映了对 EGFR-TKIs 的敏感性，也提供了治疗反应的早期指征；通过 ctDNA 监测，在临床疾病进展前即检出 EGFR-TKIs 获得性耐药突变 T790M[66]。Wang 等 [67] 在 2017 年世界肺癌大会公布的 Benefit 研究结果再次证实了上述结论：EGFR-TKIs 治疗 8 周后，如 ctDNA 中 EGFR 突变未被清除则表明患者对 TKIs 效果不佳；而通过液态活检进行动态监测，可早于影像学进展 2 个月发现 T790M 耐药突变。通过 ctDNA 测序可以发现第三代 EGFR-TKI 的耐药机制，如 C797S 突变等 [66]。

化疗一直缺乏疗效预测的有效标志物，Jiang等 [68] 通过 cfDNA 测序发现 cfDNA 的突变谱对于预测一线含铂双药化疗的疗效具有潜在的临床价值，且对于基线水平即存在 TP53 突变的患者而言，监测 TP53 分子突变负荷对于监测化疗疗效有一定价值。

4　结语和展望

随着肿瘤发生发展机制、耐药机制及肿瘤微环境调控机制等的不断阐明，液态活检在临床领域的应用也将越来越广泛，可以为早期诊断筛查、疗效监测、预后评估及指导用药等方面提供重要依据。靶向治疗的全程管理与液态活检的动态监测密不可分，免疫治疗作为肺癌领域最具前景的研究方向，通过液态活检评估肿瘤突变负荷、肿瘤新生抗原等也可能为免疫治疗提供有效的生物标志物。因此，液态活检技术的不断发展和应用，将成为肿瘤精准治疗的重要组成部分。