

- Oncol, 2015, 22(3):552-558.
- [24] SMITH B L. Neoadjuvant versus adjuvant systemic therapy for operable breast cancer: equivalent outcomes? [J]. Ann Surg, 2013, 257(2):180-181.
- [25] YAN W T, CUI X, CHEN Q, et al. Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis[J]. Sci Rep, 2017, 7:43464.

- [26] SLADE M J, PAYNE R, RIETHDORF S, et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumor cells and blood-circulating tumor cells in breast cancer patients after primary treatment [J]. Br J Cancer, 2009, 100(1):160-166.

(收稿日期:2017-12-29 修回日期:2018-03-06)

• 综述 •

液体标本在非小细胞肺癌 EGFR 突变检测中的应用

沈才路 综述, 白静慧[△] 审校

(中国医科大学肿瘤医院/辽宁省肿瘤医院综合内科, 辽宁沈阳 110042)

摘要: 驱动基因检测基础上的靶向治疗是晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的一种重要治疗手段。目前肿瘤组织标本仍是基因检测的金标准, 但大多数患者往往无法耐受创伤性的检查。探索组织标本的替代品——液体标本活检是当前临床研究的热点。液体活检是指通过检测体液(包括血液、唾液、尿液、痰液、胸腹腔积液等)中的循环肿瘤细胞(CTCs)和循环肿瘤 DNA(ctDNA)等来源于肿瘤的生物标志物, 获取相关驱动基因的信息。该文对几种热点液体标本的表皮生长因子受体(EGFR)突变的检测进行综述, 并探讨其对指导 NSCLC 精准治疗的应用价值。

关键词: 液体标本; 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 精准治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.004

文章编号: 1673-4130(2018)16-1947-04

中图法分类号: R734.2

文献标识码: A

肺癌的发病率和病死率均在所有恶性肿瘤中居于首位^[1], 其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌总数的 80%~85%。多数 NSCLC 患者初次就诊时已属于不可手术的局部晚期或发生远处转移, 失去了根治性手术的机会。化疗是这类患者最常用的治疗方式, 但如今传统细胞毒性化学药物的疗效已经处于平台期^[2]。随着驱动基因的发现和相应靶向药物的使用, NSCLC 的治疗走上了以基因为靶点的精准治疗之路^[3]。目前检测肺癌驱动基因的金标准是肿瘤组织, 常见的获取病理组织的方式包括支气管镜下活检、纵隔镜或胸腔镜活检、淋巴结活检等^[4]。然而这些取材方法均属于有创操作, 不宜多次获取用于追踪病情和观察肿瘤基因状态的变化。近年来新的基因检测技术——液体活检的问世, 给肺癌的精准治疗带来了新的希望。液体活检是通过检测体液(如血液、唾液、尿液、痰液、胸腹腔积液等)中的循环肿瘤细胞(CTCs)和循环肿瘤 DNA(ctDNA)等来源于肿瘤的生物标志物^[5], 获取相关驱动基因的信息。这些体液标本不仅通过相对无创的方式便可获取, 而且能够动态反馈疾病的进展, 为 NSCLC 的临床诊断、病情评估、精准治疗、疗效评价、预后预测提供了一种简便有效的手段。

1 NSCLC 中表皮生长因子受体(EGFR)突变检测的意义及研究现状

目前, 越来越多的肺癌驱动基因正逐步被发现, 众多驱动基因中, 对 EGFR 基因检测技术的应用较为

成熟^[6]。位于细胞膜上的 EGFR 是原癌基因的表达产物, 信号通过 EGFR 传递至细胞核, 核内基因发生转录, 促使细胞增殖、分化, 若 EGFR 发生突变则可导致肿瘤的发生^[7]。NSCLC 中最常见, 且有针对性靶向药物的基因突变就是 EGFR 突变(mEGFR)。肿瘤组织证实, 存在 mEGFR 的患者接受表皮生长因子受体酪氨酸抑制剂(EGFR-TKIs)靶向治疗, 客观有效率可提高到 70% 左右, 无进展生存期(PFS)能提高到 8 个月左右^[8], 总生存期长达 2 年^[9]。这类患者生存时间的延长, 生存质量的提高, 得益于 mEGFR 的检出。因此, 针对 NSCLC 进行的 mEGFR 检测受到了越来越多的重视。应用商品化的 Cobas EGFR PCR 试剂盒对肿瘤组织进行 mEGFR 检测是目前的“金标准”^[10]。然而即使是前瞻性试验, 也有超过 50% 的患者无法取到满意的肿瘤组织^[11], 而获取的病理组织由于存在肿瘤异质性也会受到选择偏倚。且 EGFR 敏感基因突变不可避免地发展成耐药基因突变, 此时肿瘤组织取材率较初诊时能获取的比例更低, 这对 mEGFR 的初步检测和连续监测而言是一个巨大的挑战。针对组织活检的种种局限性, 液体活检应运而生。

2 液体标本活检

2.1 外周血标本 目前国内外学者研究最多的是利用 NSCLC 外周血进行 mEGFR 的检测^[12]。BAI 等^[13]采用变性高效液相色谱法(DHPLC)对 230 例晚

[△] 通信作者, E-mail: baijinghui559@163.com。

本文引用格式: 沈才路, 白静慧. 液体标本在非小细胞肺癌 EGFR 突变检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(16):1947-1950.

期 NSCLC 患者的外周血和配对的肿瘤组织 mEGFR 的检测结果进行分析,发现 2 种标本结果的一致性为 78%。研究表明外周血代替肿瘤组织用于 mEGFR 的检测具有一定的预测作用。

2.1.1 CTCs 是指从实体肿瘤组织中脱落进入外周血循环的肿瘤细胞,可随血液循环定植于新的器官,继而形成远处转移灶。在肿瘤早期阶段便可有 CTCs 进入外周血循环,通过检测技术证实 CTCs 中存在 mEGFR,可筛选 EGFR-TKIs 治疗的适合人群。MAHESWARAN 等^[14]运用等位基因特异性 PCR 法对 27 例 NSCLC 患者的外周血 CTCs 进行基因学分析,并与配对的肿瘤组织的结果对比,结果发现 20 例病理组织标本测出 mEGFR(20/27, 74.1%),而外周血 CTCs 检测出 mEGFR 有 19 例(19/27, 70.3%),两者检测结果有较高的一致性。虽然 CTCs 是有价值的生物标志物,但目前隔离方法和提取到的基因数量限制了它在临床实践中的广泛应用^[15]。

2.1.2 ctDNA 是指肿瘤细胞凋亡或坏死后释放到外周血中的游离 DNA 片段。ctDNA 理论上可来源于所有转移部位的肿瘤细胞,所以通过检测 ctDNA,可以克服组织活检由于肿瘤异质性原因而导致的检测缺陷。通过对获取的 ctDNA 进行驱动基因的检测,显示出与肿瘤组织有较高的一致性,文献[16]报道高达 70% 左右。MOK 等^[17]在 FASTACT-2 研究中发现,144 例外周血 ctDNA 检测到 EGFR 突变阳性的 NSCLC 患者,接受厄洛替尼和安慰剂治疗的 PFS 分别为 13.1 个月和 6.0 个月。该研究结果提示,使用外周血 ctDNA 检测出 mEGFR 可用于指导精准治疗。由于肺癌组织的血供很丰富,许多患者的外周血标本可检测到 CTCs 及 ctDNA^[18]。研究表明,CTCs 和 ctDNA 基因特征与肺癌组织有较高的一致性^[19]。因此,通过 CTCs 或 ctDNA 进行 mEGFR 的检测是当前研究的一个热点。

2.2 胸腔积液标本 胸腔积液是晚期 NSCLC 患者的一种常见并发症,通过胸腔穿刺术获取胸腔积液标本是一种简单、安全的操作,容易被患者接受,部分患者会反复出现胸腔积液,这对动态监测肿瘤细胞的分子特征起到重要的作用。

2.2.1 胸腔积液上清液 送检的胸腔积液标本经过常规细胞学诊断为 NSCLC,若肿瘤细胞含量>40%,可将胸腔积液离心后取上清液,提取上清液中的 DNA,直接用于 mEGFR 的检测^[20-21]。LIN 等^[22]采用高分辨率融合分析 36 例离心后提取上清液的 NSCLC 胸腔积液标本和 22 例匹配的肿瘤组织的 EGFR 突变情况,结果在胸腔积液上清液中检测到约 18 例(18/36, 50%)突变,22 例组织标本检测到 13 例(13/22, 59%)存在突变,其中配对的上清液有 12 例(12/22, 54%)检测出存在 mEGFR。该结果显示,上清液的 EGFR 突变率与其配对的肿瘤组织突变检出率接近。

2.2.2 胸腔积液细胞学 肿瘤细胞学检查为阳性的

胸腔积液标本,经离心后获取细胞沉淀并制成细胞块,提取其中 DNA,并分析 mEGFR 状况。禹乐等^[23]研究 60 例具有肿瘤组织作为对照的胸腔积液阳性的 NSCLC 患者,胸腔积液离心后制成细胞块,提取 DNA,运用 RT-PCR 同时对细胞学和病理组织的 EGFR 基因进行检测,并分析 2 种标本 EGFR 突变率的差异,结果 60 例细胞学标本中检测到 21 例(21/60, 35%)存在 mEGFR,而对应的组织标本有 22 例(22/60, 36.7%)发生突变,2 种标本的 EGFR 突变率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。魏冰等^[24]入选 109 例合并胸腔积液的晚期 NSCLC 患者,采用 RT-PCR 法对获取的病理组织和配对的胸腔积液的细胞学进行 mEGFR 检测,研究发现 2 种标本的 mEGFR 检出率很接近,说明胸腔积液细胞学与肿瘤组织在 mEGFR 上有较高的一致性。

胸腔积液是一种可行的检测 mEGFR 的液体标本,可替代肿瘤组织^[25]。随着分子检测技术的不断进步,通过胸腔积液将会成为了解 NSCLC 患者 mEGFR 状况的又一可靠途径。

2.3 痰液标本 痰液与其他标本相比具有无创、简单易得、便宜的优势,通过痰液细胞学查找肿瘤细胞,灵敏度约为 66%^[26]。肿瘤特异度分子的改变,如 KRAS 和 p53 的突变已能在痰液中通过分子检测技术检出^[27]。HUBERS 等^[28]进行了探讨 NSCLC 痰液检测 mEGFR 可行性的多中心国际研究。该研究收集 10 例已证实肿瘤组织存在 mEGFR 的 NSCLC 患者痰液,10 例无证据证实存在 mEGFR 的 NSCLC 患者和 10 例慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者的痰液,分别采用靶向再测序技术、PCR 法、PST 技术分析 EGFR 基因突变状况。结果发现,在肿瘤组织标本证实 EGFR 突变患者的痰液中,有 30% 的痰液标本可以检测出 mEGFR;无 mEGFR 的 NSCLC 患者和 COPD 对照组在其痰液标本中均检出 EGFR 基因突变,这表明痰液用于 mEGFR 的检测的临床特异度很高。该研究证实,痰液可作为一种非侵入性的方法来检测 mEGFR。一些被认为不宜做支气管镜或肺穿刺活检的 NSCLC 患者,如果单用痰液就可以分析 EGFR 基因突变,就可避免进行组织活检,但是否可以用这种方法监测患者使用 EGFR-TKIs 药物后的疗效,仍有待确定。

2.4 唾液标本 血液中存在的分子如 DNA、RNA、蛋白质、代谢物等均可在唾液中检测出^[29]。唾液标本的收集和处理简单,可精确诊断疾病,成本效益高,不会引起患者的不适,这使得唾液诊断引起了人们的重视。基于唾液对驱动基因的无创、实时、低成本检测和监测很有意义,如何在唾液中检测 mEGFR 是当前研究的一个热点。加利福尼亚大学洛杉矶分校近期的研究成果,证实了电场诱导释放和测量(EFIRM)的核心技术进行唾液 EGFR 突变(SABER)检测的可行性^[30]。1 项针对 NSCLC 患者的随机、盲法研究表明,使用 SABER 与组织标本在肿瘤组织的基因分型上的

检测具有很高的一致性。DAN 等^[31]从 3 个癌症中心收集了 17 例 NSCLC 患者的唾液标本，并采用 EFIRM 法分析 mEGFR，同时采用金标准法检测配对的肿瘤组织的 mEGFR 的情况，将 2 种方法检测结果进行比较，发现二者完全吻合。该研究显示唾液标本和其他液体标本一样，是一种有效的检测 EGFR 突变状态的组织活检替代品。

2.5 尿液标本 肿瘤细胞凋亡、坏死释放的 ctDNA，可随血液循环通过肾脏代谢，最终随尿排出体外。目前，科学家能够通过癌症患者的尿液标本检测到 ctDNA^[32]。若提取 NSCLC 尿液标本中的 ctDNA，通过分子检测技术分析 EGFR 基因突变状态，可用于精准靶向治疗及疗效的动态监测。由于尿液能够无创性地大量获得，相比于其他体液标本而言性质稳定，因此，尿液是一种理想的临床诊断液体标本。CHEN 等^[33]入组 150 例组织活检证实存在 mEGFR 并接受 EGFR-TKIs 药物治疗的 NSCLC 患者，并参与了疗效的连续监测，采用 PCR 法同时对原发肿瘤组织和配对的接受 EGFR-TKIs 治疗患者的尿液进行检测，尿液标本以 1 个月的间隔提取，持续 9 个月，连续时间点内监测 EGFR 基因突变状态，结果 2 种标本的 mEGFR 一致性达 88%，不同时间点的尿液 mEGFR 分析显示出与 EGFR-TKIs 治疗效果密切相关。在监测期间，有 53% 的患者尿液检测到继发性 EGFR-T790M 突变。该研究结果表明，尿液可能是常规肿瘤组织 mEGFR 检测的潜在替代品，并具有监测 EGFR-TKIs 疗效的临床价值。此外，尿液检测出 EGFR-T790M 耐药突变可早于影像学提示疾病进展数个月，这可让临床医生更好地调整治疗方案，指导下一步的精准治疗。

3 总结与展望

目前，液体活检作为基因检测的辅助手段，主要用于无创性诊断和耐药基因监测。从手术切除、支气管镜活检，到外周血、胸腔积液引流的细胞学，再到唾液、痰液、尿液等检测 EGFR 基因突变状态，如何找到肿瘤组织标本的有效替代品是 mEGFR 检测的研究热点。各种生物液体标本可能是较好的替代品，不仅获取简便，而且检测结果可靠，具有较高的临床实用性。然而，临床实践中各体液标本之间有着各自的优缺点，在整个诊疗过程中选择患者合适的体液标本需要有优化的策略。同时，耐药是靶向治疗不可回避的问题，也是临床诊疗的热点和难点问题。未来随着检测技术的不断进步，通过液体标本监测耐药基因突变，可实现从静态到动态、从定性到定量、从单基因到多基因的转变，为晚期 NSCLC 提供更为精准的治疗。

参考文献

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013[J]. Ca A Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11.
- [2] RECK M, HEIGENER D F, MOK T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. [J]. Lancet, 2013, 382(9893): 709-719.
- [3] 韩晓红, 张宁宁, 石远凯. 非小细胞肺癌基因检测的临床意义[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(17): 2021-2026.
- [4] 孙燕, 宋正波. 非小细胞肺癌驱动基因检测组织标本替代品的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(6): 387-390.
- [5] 张梦颖, 李敏, 胡成平. 液体活检在肺癌精准医疗中的应用[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(42): 3430-3433.
- [6] WENG X H, XU X W, WANG C L, et al. Genotyping of common EGFR mutations in lung cancer patients by electrochemical biosensor[J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 150: 176-182.
- [7] 张莹, 王哲, 杨向红. 辽宁沈阳地区非小细胞肺癌 EGFR 基因突变分析[J]. 现代肿瘤医学, 2018(1): 35-39.
- [8] MAEMONDO M, INOUE A, KOBAYASHI K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [9] ZHOU C, WU Y L, CHEN G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8): 735.
- [10] DAN P, HAO L, FANG W, et al. Evaluation of a novel saliva-based epidermal growth factor receptor mutation detection for lung cancer: A pilot study[J]. Thoracic Cancer, 2016, 7(4): 428-436.
- [11] PAEZ J G, JANNE P A, LEE J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-500.
- [12] 冉然, 李龙芸. 外周血检测非小细胞肺癌 EGFR 基因突变[J]. 癌症进展, 2012, 10(3): 221-232.
- [13] BAI H, MAO L, WANG H S, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(16): 2653-2659.
- [14] MAHESWARAN S, SEQUIST L V, NAGRATH S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 366-377.
- [15] HAN Y, LI J. Sample types applied for molecular diagnosis of therapeutic management of advanced non-small cell lung cancer in the precision medicine[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(12): 1817-1833.
- [16] KIM K S, JEONG J Y, KIM Y C, et al. Predictors of the response to gefitinib in refractory non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(6): 2244-2251.
- [17] MOK T S, WU Y L, SOO L J, et al. Detection and dynamic changes of EGFR mutations from circulating tumor DNA as a predictor of survival outcomes in NSCLC patients treated with first-line intercalated erlotinib and chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(2): 3196-3203.
- [18] SUN W, YUAN X, TIAN Y, et al. Non-invasive approaches to monitor EGFR-TKI treatment in non-small-cell

- lung cancer[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8(1): 95.
- [19] HE J, TAN W, MA J. Circulating tumor cells and DNA for real-time EGFR detection and monitoring of non-small-cell lung cancer[J]. Future Oncol, 2017, 13(9): 787-797.
- [20] 潘羨心, 孟加榕, 郭以河, 等. HRM 方法检测肺腺癌患者癌性胸水上清液 EGFR 基因突变的临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(10): 2332-2335.
- [21] 郭以河, 孟加榕, 张闽峰, 等. 一种快速提取恶性胸水中肿瘤细胞 DNA 的方法[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(12): 2833-2834.
- [22] LIN J, GU Y, DU R, et al. Detection of EGFR mutation in supernatant, cell pellets of pleural effusion and tumor tissues from non-small cell lung cancer patients by high resolution melting analysis and sequencing[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(12): 8813-8822.
- [23] 禹乐, 朱启淦, 杨立民, 等. 胸水细胞块 EGFR 基因突变检测在非小细胞肺癌中的临床意义[J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(5): 462-466.
- [24] 魏冰, 马杰, 马智勇, 等. 肺腺癌患者恶性胸腔积液中 EGFR 突变状况分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(3): 323-326.
- [25] 曾茄, 石平, 马兵, 等. EGFR 突变与肺癌伴恶性胸腔积液患者生物学行为的相关性研究[J]. 癌症进展, 2017, 15(5): 544-546.
- [26] 朱刚. 肺癌细胞学检查与病理学检查对比分析[J]. 临床医药实践, 2010(1x): 22-23.
- [27] 黄晓珠, 包勇. 痕分子标志物在肺癌早期诊断中的研究进展

· 综述 ·

循环 microRNA 在常见肿瘤中的应用研究进展

刘雯, 沙银中, 李亚东 综述, 彭红梅 审校

(喀什地区第一人民医院检验科, 新疆喀什 844000)

摘要: 微小 RNA(miRNA)是一组小的非编码 RNA(18~25个核苷酸), 是基因表达的主要调节因子, 通过调节特定靶 mRNA 活性从而在生理和病理过程中发挥重要作用。循环 miRNA 作为细胞外通讯 RNA, 在细胞增殖和分化中发挥重要作用, 是肿瘤学最有前途的生物标志物之一。新的证据表明, miRNA 参与肿瘤的发生和发展。癌症中 miRNA 表达谱的改变及循环 miRNA 的稳定性使其成为癌症诊断、分类、治疗决策和预后的新的潜在临床生物标志物。

关键词: 循环微小 RNA; 血清; 肿瘤; 标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.005

文章编号: 1673-4130(2018)16-1950-05

微小 RNA(miRNA)是在植物和动物细胞中发现的 18~25 个核苷酸的短链 RNA, 通过与其靶 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)区域的互补, 可诱导表观遗传修饰和调控转录、翻译, 实现基因层面的调控, 在 DNA、mRNA 和蛋白质三者之间发挥桥梁作用^[1-3]。迄今为止, 人类基因组中已发现超过 3000 种 miRNA。miRNA 可调控多达 30% 的人类基因^[4], 越来越多的证据表明 miRNA 在生命过程中起着至关重要的作用过程, 如增殖、分化、细胞凋亡、细胞信号传导和

展[J]. 中华肺部疾病杂志, 2015, 8(1): 90-93.

- [28] HUBERS A J, HEIDEMAN D A M, YATABE Y, et al. EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: A multitechnique study[J]. Lung Cancer, 2013, 82(1): 38-43.
- [29] 程兴群, 邓盟, 徐欣, 等. 唾液和唾液组学与疾病早期诊断[J]. 国际口腔医学杂志, 2014(2): 213-219.
- [30] WEI F, LIN C C, JOON A, et al. Noninvasive Saliva-based EGFR Gene Mutation Detection in Patients with Lung Cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(10): 1117-1126.
- [31] DAN P, HAO L, FANG W, et al. Evaluation of a novel saliva-based epidermal growth factor receptor mutation detection for lung cancer: A pilot study[J]. Thoracic Cancer, 2016, 7(4): 428-436.
- [32] SANDS J, LI Q, HORNBERGER J. Urine circulating-tumor DNA (ctDNA) detection of acquired EGFR T790M mutation in non-small-cell lung cancer: An outcomes and total cost-of-care analysis[J]. Lung Cancer, 2017, 110: 19-25.
- [33] CHEN S, ZHAO J, CUI L, et al. Urinary circulating DNA detection for dynamic tracking of EGFR mutations for NSCLC patients treated with EGFR-TKIs[J]. Clin Transl Oncol, 2016, 19(3): 1-9.

(收稿日期: 2017-12-26 修回日期: 2018-02-21)

中图法分类号: R730.2

文献标识码: A

免疫反应, 它们的功能与多种人类疾病有关, 包括癌症。癌症常常在晚期被诊断且常常伴随着预后不良, 用于检测和监测常见肿瘤的微创检测技术的发展可以大大降低全球范围内癌症的负担。基于血液生物标记物常规项目(如循环蛋白质、DNA)临床应用仍受一定限制^[5]。在多种癌症中已经报道了循环 miRNA 表达谱的改变, 且其表达模式似乎是组织特异性的, 由于它们的大小、丰度、组织特异性和循环中的相对稳定性, 循环 miRNA 显示出巨大的潜力^[6]。本文对