

论著 · 临床研究

中国地区 ctDNA 对乳腺癌诊断价值的 Meta 分析

孙 浩¹, 张红艳², 蒋紫欣³

(1. 福州金域医学检验所有限公司, 福建福州 350000; 2. 四川省医学科学院/四川省人民医院东院检验科, 四川成都 610000; 3. 成都市武侯区第三人民医院检验科, 四川成都 610000)

摘 要:目的 系统评价国内循环肿瘤 DNA 诊断乳腺癌的价值。方法 查找清华同方数据库、万方数据库、维普数据库、中国生物医学文献数据库、PubMed、EMBASE、Cochrane library 数据库中有关国内循环肿瘤 DNA 诊断乳腺癌的诊断性试验, 检索时限均为从建库至 2017 年 12 月 21 日。由 2 位研究者独立筛选文献、提取数据和评价纳入研究的方法学质量后, 使用 Meta-Discl. 4 软件对纳入研究进行综合定量评价, 并绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线), 对循环肿瘤 DNA 诊断中国人群乳腺癌的准确性进行评估, 使用 STATA13.0 软件进行发表偏倚检验。**结果** 共纳入 7 篇文献, 合并灵敏度为 0.85(95%CI: 0.82~0.87)、特异度为 0.86(95%CI: 0.84~0.89)、阳性似然比为 6.477(95%CI: 3.496~12.000)、阴性似然比为 0.173(95%CI: 0.102~0.296)、合并诊断比值比为 39.94(95%CI: 14.07~113.37), ROC 曲线下面积为 0.928 5。纳入文献存在异质性, 异质性来源于研究地区和目标基因。对纳入的研究作 Deeks 图, 提示不存在明显的发表偏移。**结论** 循环肿瘤 DNA 对中国人群乳腺癌诊断价值较高, 在临床实践过程中可以通过联合其他项目检测以提高对乳腺癌的诊断准确性。

关键词: 循环肿瘤 DNA; 乳腺癌; 中国; 荟萃分析

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.14.019 **中图法分类号:** R737.9

文章编号: 1673-4130(2019)14-1741-05 **文献标识码:** A

Diagnostic value of ctDNA for breast cancer in China: a Meta analysis

SUN Hao¹, ZHANG Hongyan², JIANG Zixin³

(1. Fuzhou KingMed Diagnostics Limited Company, Fuzhou, Fujian 350000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences/East Branch Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Wuhou, Chengdu, Sichuan 610000, China)

Abstract: **Objective** To systematically review the diagnostic value of circulating tumor DNA for breast cancer in China. **Methods** CNKI, Wanfang Data, VIP, CBM, EMBASE, Cochrane library were searched from inception to December 21, 2017, to collect diagnostic studies about circulating tumor DNA for breast cancer in China. Two reviewers independently screened literature, extracted data and assessed the methodological quality of included studies. Statistic analyses were performed by software Meta-Discl. 4 vision, and summary receive operating characteristic curve (ROC curve) was performed. The publication bias test was performed using STATA 13 software. **Results** A total of 7 studies were finally included. The pooled sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, and diagnostic odds ratio were 0.85 (95%CI: 0.82—0.87), 0.86 (95%CI: 0.84—0.89), 6.477 (95%CI: 3.496—12.000), 0.173 (95%CI: 0.102—0.296), respectively. The pool diagnostic odds ratio was 39.94 (95%CI: 14.07—113.37) and area under the ROC curve was 0.928 5. There was heterogeneity in the included studies, and subgroup analysis suggested that heterogeneity was derived from the study area and target genes. The deeks suggested the publication bias was not significant. **Conclusion** Current evidence indicates that circulating tumor DNA has high diagnostic value for breast cancer in Chinese population, and the accuracy of breast cancer diagnosis can be improved by joining the other project detection in clinical practice.

Key words: circulating tumor DNA; breast cancer; China; Meta analysis

目前, 乳腺癌已经成为全世界最为常见的女性恶性肿瘤^[1], 研究表明 2018 年全球新增乳腺癌病例约

作者简介: 孙浩, 男, 技师, 主要从事肿瘤标志物研究。
本文引用格式: 孙浩, 张红艳, 蒋紫欣. 中国地区 ctDNA 对乳腺癌诊断价值的 Meta 分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(14): 1741-1745.

210 万,约占女性癌症病例的 1/4,已跃居女性癌症死因首位^[2]。由于中国老龄化持续加深、环境污染及个人不良的生活方式等原因,我国乳腺癌发病率呈逐年上升,成为了我国女性发病率最高的恶性肿瘤疾病,预计到 2021 年,我国乳腺癌患者将高达 250 万^[3]。1977 年,LEON 等^[4]学者在乳腺癌患者血浆中检测出含有约 0~2 μg/mL 的循环肿瘤 DNA(ctDNA),并且发现 ctDNA 水平的改变与肿瘤状态有关,提示 ctDNA 可以成为诊断乳腺癌的生物学标志物之一。WANG 等^[5]学者通过 Meta 分析证实了 ctDNA 对乳腺癌的诊断具有较高价值,但其所纳入的研究存在一定的异质性,且纳入中国地区的研究仅为 2 篇,为探索中国地区 ctDNA 水平对乳腺癌的诊断价值,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为中国人且均经临床确诊,包含乳腺癌患者和容易误诊为乳腺癌的其他疾病患者、健康人。纳入标准:(1)文献均为近年国内外公开发表的关于中国人群的 ctDNA 对乳腺癌的诊断性研究;(2)均能直接或间接得到完整的 4 格表数据。排除标准:(1)数据资料欠缺;(2)老旧或重复发表的文献;(3)ctDNA 对乳腺癌的非诊断性研究;(4)文献综述、个案报道、动物实验等。

1.2 方法

1.2.1 文献检索 检索数据库包括清华同方(CNKI)数据库、万方数据库、维普数据库、中国生物医学文献数据库、PubMed、EMBASE、Cochrane library。检索年限为建库至 2017 年 12 月 21 日。语种限定为中文和英文。中文检索关键词(或缩写)包括循环肿瘤 DNA、ctDNA、游离 DNA、cfDNA、乳腺癌、乳腺肿瘤、乳房肿瘤。英文检索关键词(或缩写)包括 circulating tumor DNA、ctDNA、cell free DNA、cfDNA、breast cancer、plasma circulating DNA、breast neoplasm、mammary neoplasm、breast carcinoma、cancer of breast、China、Chinese 等。

1.2.2 数据提取 每篇文献由 2 名专业人员就文献标题、摘要、全文进行独立数据处理,意见不一致时商讨解决。提取的信息包括第一作者、发表时间、研究地区、研究类型、研究组和对照组例数、肿瘤分期、临界值、样品材料、样本采集时间、试剂来源、检测方法、完整 4 格表数据。

1.2.3 质量评价标准 由 2 名专业人员根据诊断准确性研究的质量评价工具 QUADAS-2^[6]中的 14 个条目对纳入文献进行质量评估。

1.3 统计学处理 采用 Meta-Disc 1.4 软件、STATA13.0 软件进行数据分析。使用 Meta-Disc 1.4 软件进行 Meta 分析,通过 Q 检验判断是否存在异质

性,若 $P<0.05$ 拒绝同质性假设,说明纳入研究间具有异质性,选择随机效应模型进行 Meta 分析,若 $P>0.05$,说明纳入研究间具有同质性,选择固定效应模型进行 Meta 分析;计算纳入研究的合并灵敏度、特异度、阳性似然比、阴性似然比及合并诊断比值比等指标,描绘受试者工作特征曲线(ROC 曲线)和曲线下面积(AUC),AUC 越接近 1,表示其准确价值越高。将纳入研究逐一排除后,对剩余的研究进行 Meta 分析,评价汇总诊断比值比、灵敏度和特异度。采用 STATA13.0 软件进行发表偏倚检验,采用 Deeks 图进行评估,若检验结果 $P<0.01$,说明存在显著发表偏移。

2 结果

2.1 文献检索结果 初步检索到文献 197 篇,按照设定的纳入和排除标准筛选后,最终纳入 7 个研究,共 1 521 例研究对象。文献筛选流程及结果见图 1。

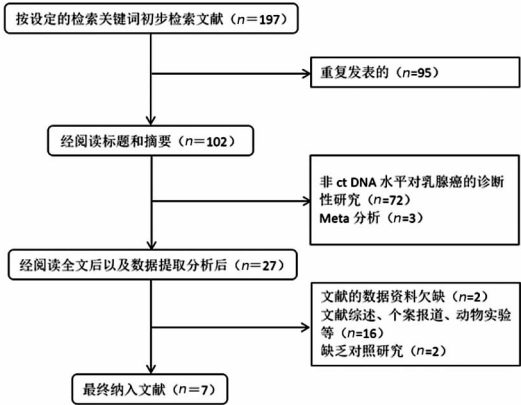


图 1 文献筛选流程

2.2 纳入研究的基本特征与质量评价 纳入研究的检测方法除叶坤等^[10]为 Qubit2.0 荧光定量,其余均为实时荧光定量 PCR,纳入研究的其他基本特征见表 1。纳入研究的方法学质量评价见表 2。其中 1 为是否纳入了连续或随机的病例;2 为是否避免了病例对照类研究设计;3 为研究是否避免了不恰当的排除;4 为待评价试验的结果判读是否在不知晓金标准试验的结果下进行的;5 为若使用了阈值,那么它是否是事先确定的;6 为金标准是否可以正确地区分目标疾病状态;7 为金标准结果判读是否使用了盲法;8 为待评价试验和金标准之间是否有恰当的时间间隔;9 为是否所有的患者接受了金标准;10 为所有的患者是否只接受了一个相同的金标准;11 为是否所有病例都纳入了分析,每一条目都以“是”“否”“不清楚”评价,“是”即达到这个标准,“否”是不符合这个标准,“不清楚”为不完全符合或者从文章中无法得到足够的信息。

2.3 Meta 分析结果

2.3.1 阈值效应 ROC 曲线不呈“肩臂”状分布,提示不存在阈值效应。进一步计算灵敏度对数与(1-特异度)对数的 Spearman 相关系数 = -0.536, $P=$

0.215,表明不存在阈值效应。ROC 曲线见图 2。

表 1 纳入研究的基本特征

纳入文献	乳腺癌	乳腺良性	健康者	真阳性	假阳性	假阴性	真阴性	地区	试剂来源	目的基因	肿瘤分期	临界值	样本材料	样本采集时间
	(n)	疾病(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)							
HUANG 等 ^[7]	61	33	27	58	3	3	24	江苏	德国 Qiagen 公司	β-globin	I~Ⅳ	19 ng/mL	血浆	手术/治疗前
薛建祥等 ^[8]	200	100	100	169	12	31	188	上海	上海市肿瘤研究所	GAPDH	I~Ⅳ	1×10 ³ copy	血清	手术/化疗前
GONG 等 ^[9]	200	100	100	190	18	10	182	上海	日本 Takara Bio Inc	GAPDH	I~Ⅳ	471 ng/mL	血清	手术/化疗前
叶坤等 ^[10]	62	46	52	50	15	12	83	湖北	德国 Qiagen 公司	—	I~Ⅳ	15.66 μg/L	血浆	手术前
ZHANG 等 ^[11]	100	—	104	80	33	20	71	北京	美国 Invitrogen 公司	HOTAIR	I~Ⅲ	0.30 相对浓度	血清	手术/治疗前
顾益凤等 ^[12]	106	72	30	72	20	34	82	江苏	德国 Qiagen 公司、TaKaRa 公司	hTERT	未报道	未报道	血浆	手术/治疗前
俞菁等 ^[13]	36	—	31	29	2	7	29	上海	上海市肿瘤研究所	GAPDH	未报道	1×10 ³ copy	血浆	手术/化疗前

注：—表示无数据

表 2 纳入研究的方法学质量评价

纳入研究	QUADAS 2 条目										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HUANG 等 ^[7]	是	否	否	不清楚	否	是	不清楚	不清楚	是	是	否
薛建祥等 ^[8]	是	否	否	不清楚	是	是	不清楚	不清楚	是	否	是
GONG 等 ^[9]	是	否	否	不清楚	否	是	不清楚	不清楚	是	否	是
叶坤等 ^[10]	是	否	否	不清楚	否	是	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	是
ZHANG 等 ^[11]	否	否	否	不清楚	否	是	不清楚	不清楚	是	是	是
顾益凤等 ^[12]	是	否	否	不清楚	不清楚	是	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	是
俞菁等 ^[13]	否	否	否	不清楚	不清楚	是	不清楚	不清楚	是	是	是

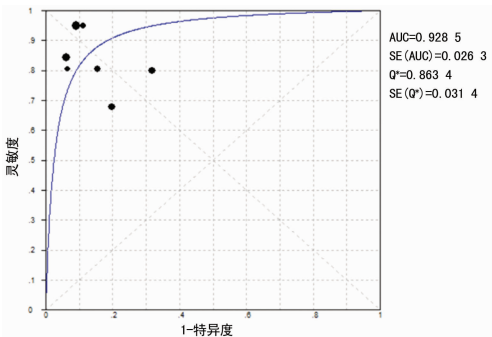


图 2 ROC 曲线

2.3.2 异质性检验 以合并诊断比值比为效应量，分析异质性，Q 检验显示 Cochran-Q = 63.24, P < 0.05,表明存在非阈值效应引起的异质性，见图 3。

2.3.3 系统评价 ctDNA 水平诊断乳腺癌的准确性 由于纳入的研究间存在异质性，故采用随机效应模型对数据进行分析，拟合 ROC 曲线得到 AUC = 0.928 5, Q 指数 = 0.863 4, 见图 2; 合并诊断比值比为 39.94(95%CI:14.07~113.37), 绘制 ctDNA 水平诊断乳腺癌的灵敏度和特异度森林图，得到合并灵敏度和特异度分别为 0.85(95%CI:0.82~0.87)、0.86(95%CI:0.84~0.89), 阳性似然比和阴性似然比分别为 6.477(95%CI:3.496~12.000)、0.173(95%CI:0.102~0.296)。见图 4~5。

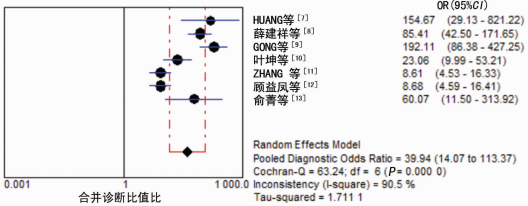


图 3 合并诊断比值比

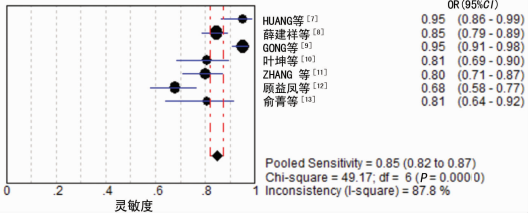


图 4 灵敏度森林图

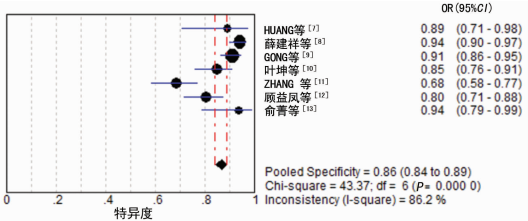


图 5 特异度森林图

2.3.4 亚组分析 由于受研究数量限制，只对研究地区、样本类型、目标基因进行亚组分析。按研究地

区进行分析,来自上海地区 3 个研究间的同质性较好 (Cochran- $Q=2.87, P=0.237\ 6$),其他地区的 4 个研究间存在异质性 (Cochran- $Q=13.35, P=0.003\ 9$);按样本类型进行分析,血浆 4 个研究间存在异质性 (Cochran- $Q=13.76, P=0.003\ 3$),血清 3 个研究间也存在异质性 (Cochran- $Q=41.38, P<0.000\ 1$);按目的基因进行分析, GAPDH 3 个研究间的同质性较好 (Cochran- $Q=2.87, P=0.237\ 6$),其他目的基因 3 个研究存在异质性 (Cochran- $Q=10.71, P=0.004\ 7$)。见表 3。

表 3 合并各效应量分析					
亚组	灵敏度	特异度	阳性似然比	阴性似然比	诊断比值比
研究地区					
上海	0.890	0.926	12.001	0.118	112.30
其他	0.790	0.785	3.895	0.240	17.453
样本类型					
血浆	0.789	0.845	5.252	0.209	30.114
血清	0.878	0.875	7.119	0.143	51.518
目的基因					
GAPDH	0.890	0.926	12.001	0.118	112.30
其他	0.787	0.760	3.459	0.233	16.608

2.3.5 灵敏度分析 每次排除 1 个研究,对剩余研究重新进行 Meta 分析,汇总结果见表 4,合并的诊断比值比、灵敏度与特异度未见明显变化,提示 Meta 分析结果较稳定。

表 4 各研究对 Meta 分析结果的灵敏度分析			
排除文献	诊断比值比	灵敏度	特异度
HUANG 等 ^[7]	33.412	0.838	0.864
薛建祥等 ^[8]	34.914	0.848	0.838
GONG 等 ^[9]	29.315	0.811	0.849
叶坤等 ^[10]	44.501	0.851	0.867
ZHANG 等 ^[11]	52.954	0.854	0.894
顾益凤等 ^[12]	52.887	0.874	0.874
俞菁等 ^[13]	37.935	0.849	0.862

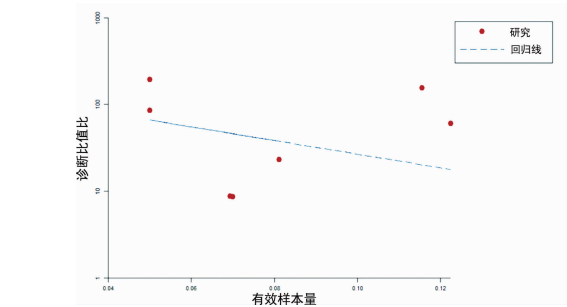


图 6 Deeks 图

2.3.6 发表偏移 对纳入的研究制作 Deeks 图,结

果显示斜率(Bias)=-18.103 1, $P=0.510$,提示不存在明显的发表偏移。见图 6。

3 讨论

纳入的 7 个研究进行 Meta 分析,通过合并诊断效应量、拟合 ROC 曲线来评价 ctDNA 检测在乳腺癌上对中国人群的诊断效能,通过分析研究间异质性及亚组分析来判断可能影响研究结果的因素,并且通过灵敏度分析和检测发表偏倚来评估本次 Meta 分析的可信度。

本次评价结果显示, $AUC=0.928\ 5$,合并诊断比值比为 39.94,表明 ctDNA 检测对中国人群乳腺癌的诊断有较高的准确率。合并灵敏度和特异度分别为 0.85 和 0.86,说明其漏诊率及误诊率均较低。有研究表明糖类抗原 153(CA153)对乳腺癌的灵敏度仅为 0.63^[14]。因此,可以考虑将 ctDNA 检测推广运用于临床,以期降低对乳腺癌患者的漏诊率。此外阳性似然比和阴性似然比分别为 6.477 和 0.173,这与 WANG 等^[5]学者的研究结果相近,也说明了其诊断准确率较高。统计学认为,阳性似然比大于 10 或阴性似然比小于 0.1,则该项目基本可以应用于确定或排除诊断,上述 2 个指标未达到临界值,提示在临床实践过程中可以通过联合其他检测项目来提高对乳腺癌的临床诊断效能。此外,有研究显示 ctDNA 甲基化和完整性对乳腺癌有一定的诊断价值^[12,15-16],在进一步研究可以对它们进行分析。

Meta 分析纳入的研究结果间存在较大的非阈值效应引起的异质性,通过亚组分析,提示研究地区和目标基因是导致异质性的主要原因。由于纳入研究有限,未对检测方法、临界值、肿瘤分期、采样时间等进行亚组分析,但不排除它们也是导致异质性的原因。根据 Cochrane 协作网有关诊断性 Meta 分析的要求,谨慎、客观地设置了研究纳入和排除标准,又根据 QUADAS-2 标准对纳入文献进行方法学质量评价,以确保本研究的质量。灵敏度分析结果显示,每次减少 1 个研究后,合并诊断比值比、灵敏度与特异度未出现明显变化,提示本研究受单个纳入研究的影响较小,分析结果稳定可信。Deeks 图显示斜率(Bias)=-18.103 1, $P=0.510$,提示本研究不存在有明显的发表偏移。

本次研究的局限性一方面在本次 Meta 分析纳入研究中并非所有研究的研究对象都包含疑似患者,这有可能导致高估 ctDNA 检测的诊断效能;纳入研究未报道是否采用盲法检测和盲法判断,存在测量偏倚的可能性;部分研究的病例组和对照组诊断标准不一致或未报道,可能会造成结果的偏差。另一方面检索范围局限于已发表的研究,对于未公开发表的研究和会议论文等,存在漏检的风险;检索语种局限于中文

和英文,可能会漏检其他语种的相关研究。

4 结 论

本次 Meta 分析显示,ctDNA 检测在乳腺癌上对中国人有较高的诊断效能,但纳入的研究存在异质性和一定风险,希望在下一轮的研究中提升研究纳入研究数目和方法学质量,以减少偏移与风险。

参考文献

[1] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer [J]. Lancet, 2017, 389(1):1134-1150.

[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 Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.

[3] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast cancer in China [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7):279-289.

[4] LEON S A, SHAPIRO B, SKLAROFF D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1977, 37(3):646-650.

[5] WANG H, LIU Z, XIE J, et al. Quantitation of cell-free DNA in blood is a potential screening and diagnostic marker of breast cancer: a Meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 60(8):102336-102345.

[6] WHITING P F, RUTJES A W, WESTWOOD M E, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies [J]. Annals Internal Med, 2011, 155(8):529-536.

[7] HUANG Z H, LI L H, HUA D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients [J]. Cancer Lett, 2006, 243(1):64-70.

[8] 薛建祥, 龚波, 俞菁, 等. 乳腺癌患者血清游离 DNA 的定量检测 [J]. 肿瘤, 2011, 31(12):1099-1102.

[9] GONG B, XUE J, YU J, et al. Cell-free DNA in blood is a potential diagnostic biomarker of breast cancer [J]. Oncology Letters, 2012, 3(4):897-900.

[10] 叶坤, 张连生, 刘冲. 血浆游离 DNA 含量在乳腺癌诊断中的临床意义 [J]. 今日健康, 2015, 20(12):433.

[11] ZHANG L, SONG X, WANG X, et al. Circulating DNA of HOTAIR in serum is a novel biomarker for breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 152(1):199-208.

[12] 顾益凤, 朱自力, 张金业, 等. 乳腺癌中血浆游离 DNA 含量和完整性的临床应用 [J]. 检验医学, 2017, 32(8):671-676.

[13] 俞菁, 龚波, 李海川, 等. 乳腺癌患者血清游离 DNA 与相关 miRNA 的表达水平 [J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(19):4651-4653.

[14] TANG S, WEI L, SUN Y, et al. CA153 in breast secretions as a potential molecular marker for diagnosing breast cancer: a Meta analysis [J]. PLoS One, 2016, 11(9):e0163030.

[15] WONG E M, SOUTHEY M C, FOX S B, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer [J]. Cancer Prevention Res, 2011, 4(1):23-33.

[16] 李甫梧. 基于 DNA 甲基化特异性位点区分癌症种类以及同种癌症分型并定量检测血液中的循环肿瘤细胞 [D]. 上海: 中国科学院研究生院, 2016.

(收稿日期: 2019-01-20 修回日期: 2019-03-27)

(上接第 1740 页)

REIRA B P, et al. MicroRNA expression signatures in lungs of mice infected with mycobacterium tuberculosis [J]. Tuberculosis, 2016, 101(12):151-159.

[19] ZHOU M, YU G, YANG X, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of childhood tuberculosis infection [J]. Mole Med Rep, 2016, 13(6):4620-4626.

[20] BHELA S, ROUSE B T. miR-31: A key player in CD8 T-cell exhaustion [J]. Cell Mole Immunol, 2017, 14(12):954-956.

[21] BORSKA L, ANDRYS C, CHMELAROVA M, et al. Roles of miR-31 and endothelin-1 in psoriasis vulgaris: Pathophysiological functions and potential biomarkers [J]. Physiol Res, 2017, 66(6):987-992.

[22] 范薇, 唐元家, 曲波, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血细胞 miR-31 的表达 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2011, 31

(1):39-42.

[23] 赵静, 陈光辉, 刘德军, 等. 原发性肺癌患者外周血中 miRNA-31 的表达及意义 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(5):684-686.

[24] VAN DER HEIDE V, MOHNLE P, RINK J, et al. Down-regulation of microRNA-31 in CD4⁺ T cells contributes to immunosuppression in human sepsis by promoting TH2 skewing [J]. Anesthesiol, 2016, 124(4):908-922.

[25] LUAN L, SHI J, YU Z, et al. The major miR-31 target genes STK40 and LATS2 and their implications in the regulation of keratinocyte growth and hair differentiation [J]. Exper Dermatol, 2017, 26(6):497-504.

[26] WU D, WANG B, SHANG J, et al. miR-31 reduces cell growth of papillary thyroid carcinoma by RNA-binding protein HUR [J]. Clin Labor, 2015, 61(11):1625-1634.

(收稿日期: 2018-12-24 修回日期: 2019-03-21)