

讲者介绍

- 应建明，博士，中国医学科学院肿瘤医院病理科副主任，硕士研究生导师。1998年和2000年分别获得北京医科大学医学学士和硕士学位，2007年获得香港中文大学医学博士学位。

2000年起在中国医学科学院肿瘤医院病理科从事肿瘤病理诊断，并负责肿瘤分子病理检测。2012年获北京市优秀中青年医师，现为中华医学会病理学分会及中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会青委会副主任委员，中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会青年委员。《中华病理学杂志》编委。已发表专业论文60余篇。

液态活检技术及其临床应用

应建明

中国医学科学院肿瘤医院

jmying@cicams.ac.cn

传统的肿瘤诊断技术



传统的肿瘤诊断存在的问题

早期筛查：

标记物不统一，方法不够灵敏或是特异性不足。

临床诊断：

- 影像学：较灵敏，特异性不足，对病灶大小有要求。
- 病理学：金标准，但是需要组织样本，取样会带来创伤和扩散风险，很多晚期患者无法取样或取样不足。

治疗/复发转移监测：

- 影像学：结果普遍存在滞后性。
- 血清标志物：较灵敏，但是特异性不足；有些类型癌症没有合适的血清标志物。

2015年十大突破技术—液态活检技术



10 Breakthrough Technologies 2015

Introduction

Magic Leap >

Nano-Architecture >

Car-to-Car Communication >

Project Loon >

Liquid Biopsy >

MIT Technology Review杂志发布了2015年度十大突破技术(10 Breakthrough Technologies 2015)的榜单。液态活检技术光荣上榜。



液态活检：快速、简便、无痛苦、无创伤的癌症血液检测方法

传统而又崭新的检测技术 ——“液态活检”

- “液态活检”的定义：

A liquid biopsy is a liquid biomarker that can be easily isolated from many body fluids (blood, saliva, urine, ascites, pleural effusion, etc.) and, as well as a tissue biopsy, a representative of the tissue from which it is spread.

-- Christian Rolfo, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013.

“液态活检” 的标记物

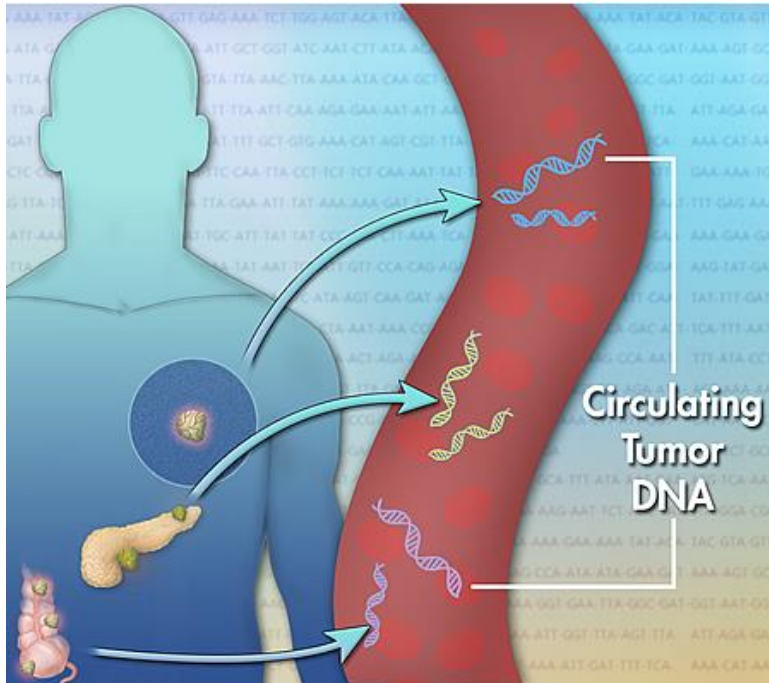
CTCs	ctDNA (cfDNA)
主要指来自于抗凝的外周血全血，完整的肿瘤细胞	主要指来自于抗凝血外周血的血浆，片段化的DNA片段
一般认为来源于肿瘤原发灶/转移灶	肿瘤细胞凋亡/坏死释放的DNA片段
活细胞，一般不宜长期保存	提取纯化后的核酸，可以保存
可以用于细胞学形态、结构分析；也可以分析细胞DNA、RNA、蛋白质等各类标志物	一般用于DNA突变监测、甲基化等DNA修饰相关分析
用于病情评价、预后判断，肿瘤早期诊断潜力不明确	用于个体化治疗，肿瘤早期诊断潜力相对明确

还有miRNAs, Peptides, Exosomes（外泌体），Secretomes（分泌物质组）等。

什么是ctDNA ？

ctDNA（circulating tumor DNA），即循环肿瘤DNA，从字面意思来讲，指的是由肿瘤细胞释放到血液循环系统中的DNA。但是在了解ctDNA之前，我们要知道另一个与之相关的概念——cfDNA。

cfDNA（cell-free DNA），或者叫血浆游离DNA，是血浆中游离存在的DNA，它们有的来自于正常细胞，有的来自于异常细胞（如肿瘤细胞），还有部分来自于我们外部（如病毒DNA）。

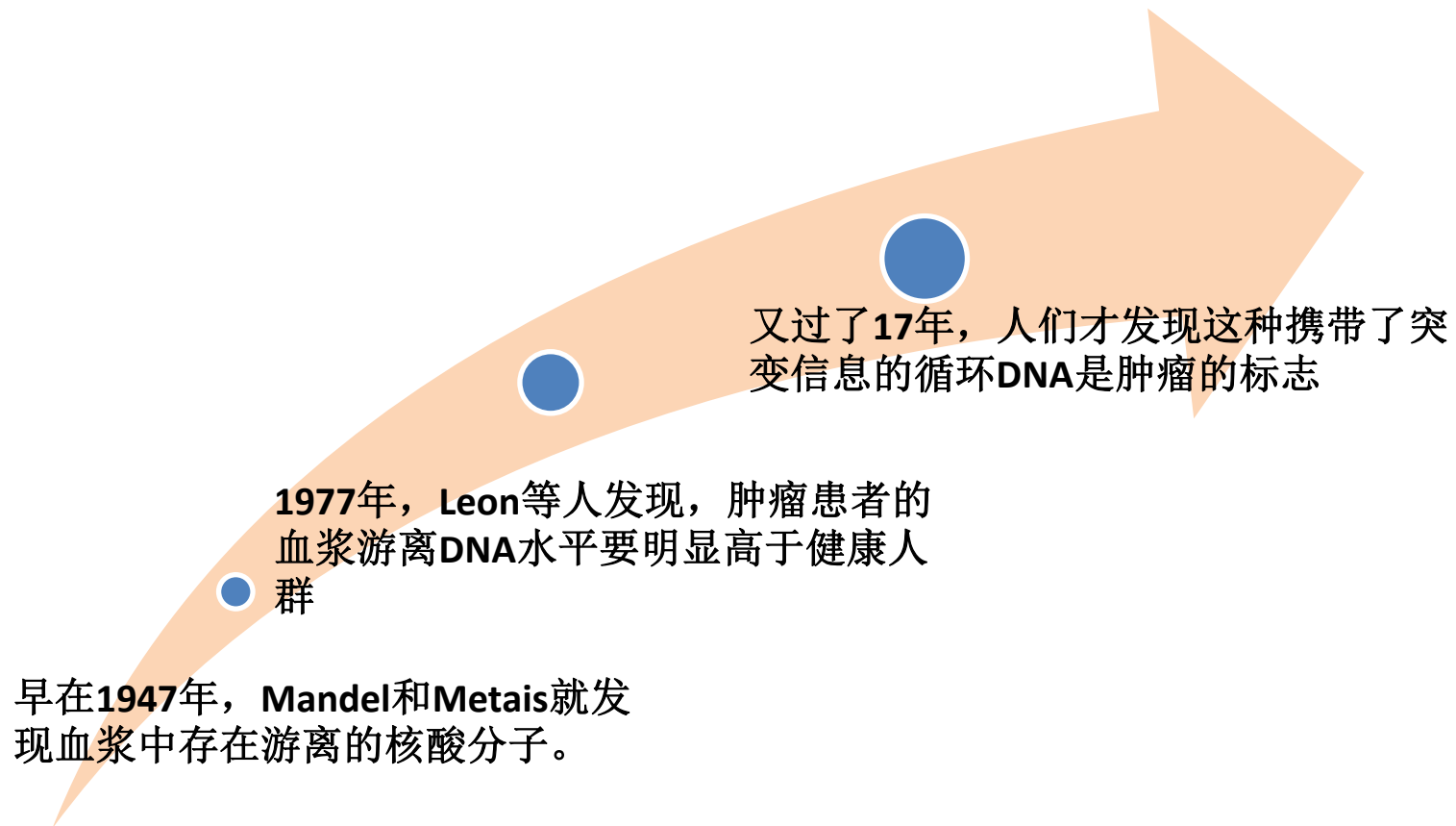


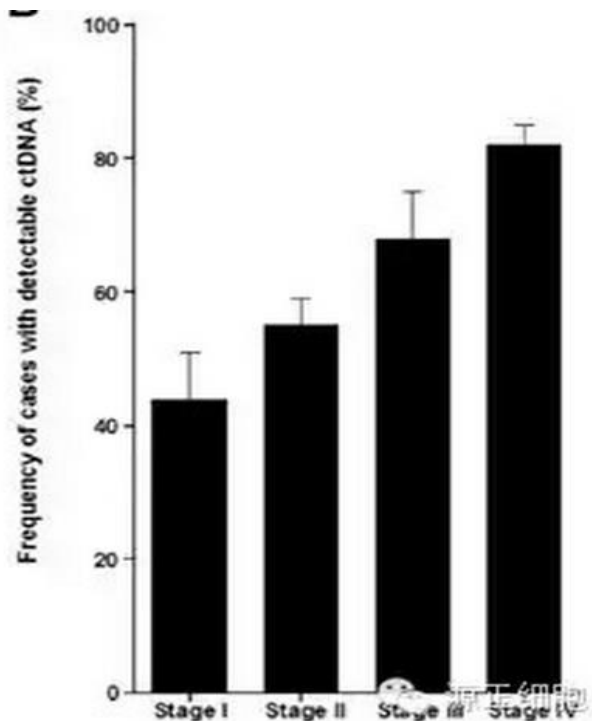
来源：

- 1、来自于坏死的肿瘤细胞
- 2、来自于凋亡的肿瘤细胞
- 3、来自于肿瘤细胞分泌的外排物

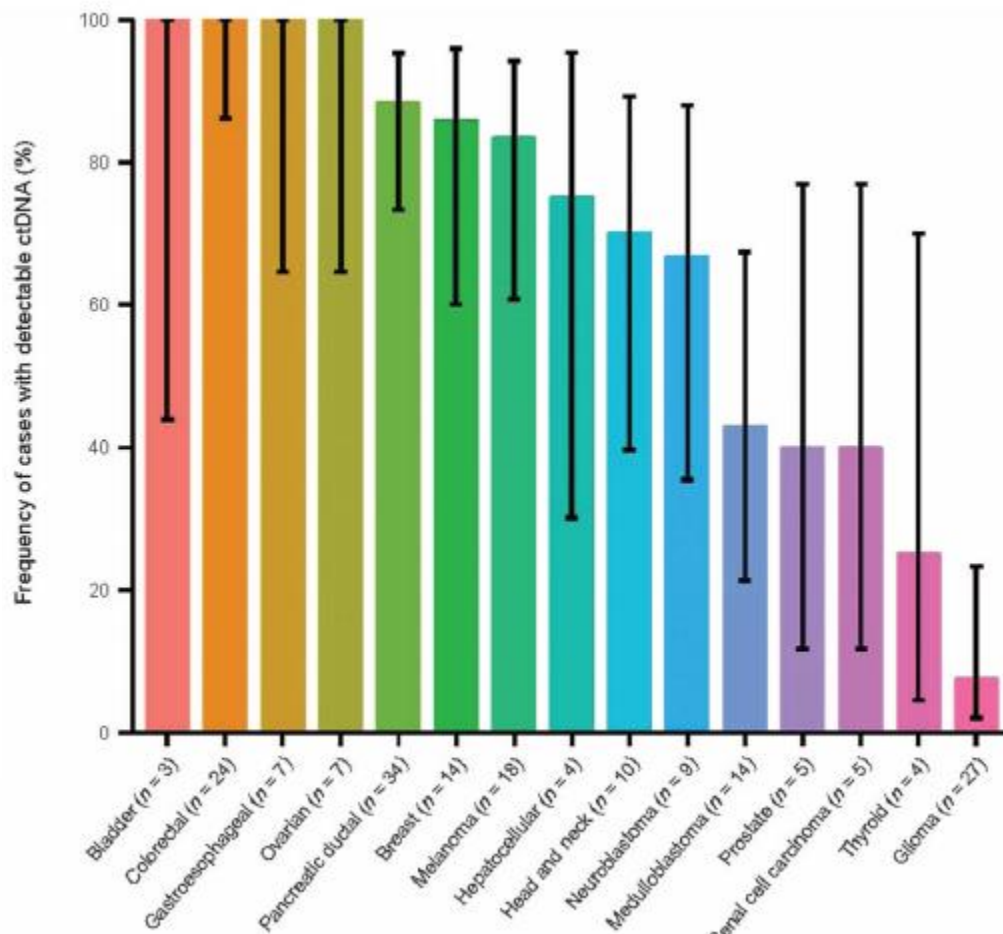
ctDNA的发现

人们逐渐明白，cfDNA中携带肿瘤特有突变的那一小部分DNA，确实确实是由肿瘤细胞释放出来的，ctDNA的研究终于与肿瘤关联起来。





不同分期癌症的ctDNA检出情况



不同癌症种类的ctDNA检出情况

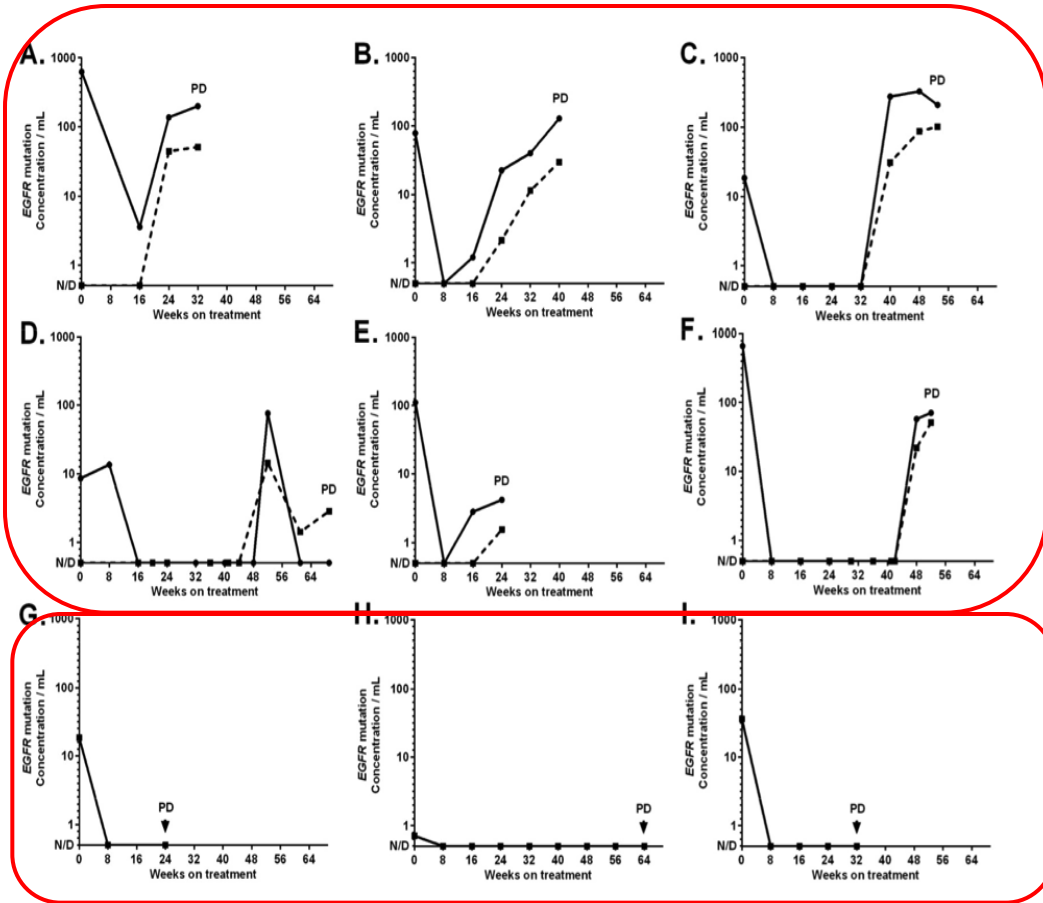
在几乎所有种类的癌症中，都检测到了ctDNA所带有的标志性突变，并且肿瘤越晚期，病情越严重，肿瘤的恶性程度越高，ctDNA特有突变的频率就越高。一项针对15种癌症进行的ctDNA测序研究显示，分别有47%，55%，69%，82%的I-IV期癌症病人中能检测到高于一定频率的ctDNA突变；而另一项使用更高灵敏度测序技术的研究则表示，对于II期以上的病人，均能100%检测到突变。

CtDNA临床应用领域



CtDNA作为一种新的肿瘤标志物，将在肿瘤的诊断、治疗及预后检测等方面发挥重要的作用，尤其是对于一些不具有典型临床症状、检查无特异性和诊断困难的肿瘤可避免复杂的、具有创伤性的活检。ctDNA来自肿瘤细胞的体细胞突变，不同于遗传突变的是，遗传突变存在于体内每个细胞。因此，ctDNA是一种特征性的肿瘤生物标记物，并且还可以被定性、定量和追踪。

利用NSCLC癌患者血浆中的ctDNA检测EGFR突变



检测9名接受特罗凯一线治疗的NSCLC患者血浆中ctDNA的EGFR突变情况，一直到患者进展至PD。

- 在接受治疗后，所有患者血浆中的含有EGFR突变的ctDNA浓度出现下降，其中8人的EGFR突变完全消失。
- 有6名患者的血浆中重新检测到EGFR突变的时间要比进展至PD的时间早4个月以上！随着治疗，所有9名患者的血浆中均检出一定量T790M突变。
- 血浆中没有检测到EGFR的3名患者，进展至PD期时，其肿瘤仅在胸腔内有缓慢进展。

现有技术用石蜡组织切片样本只能检测60copies以上的突变含量，但是用液态活检通过数字PCR平台却可以检测0-60copies之间的突变含量，更早的发现病情及耐药性，对于癌症患者如果能提前4个月发现病情的变化，生存率会大大提高。

An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage

Aaron M Newman^{1,2,7}, Scott V Bratman^{1,3,7}, Jacqueline To³, Jacob F Wynne³, Neville C W Eclov³, Leslie A Modlin³, Chih Long Liu^{1,2}, Joel W Neal², Heather A Wakelee², Robert E Merritt⁴, Joseph B Shrager⁴, Billy W Loo Jr³, Ash A Alizadeh^{1,2,5} & Maximilian Diehn^{1,3,6}

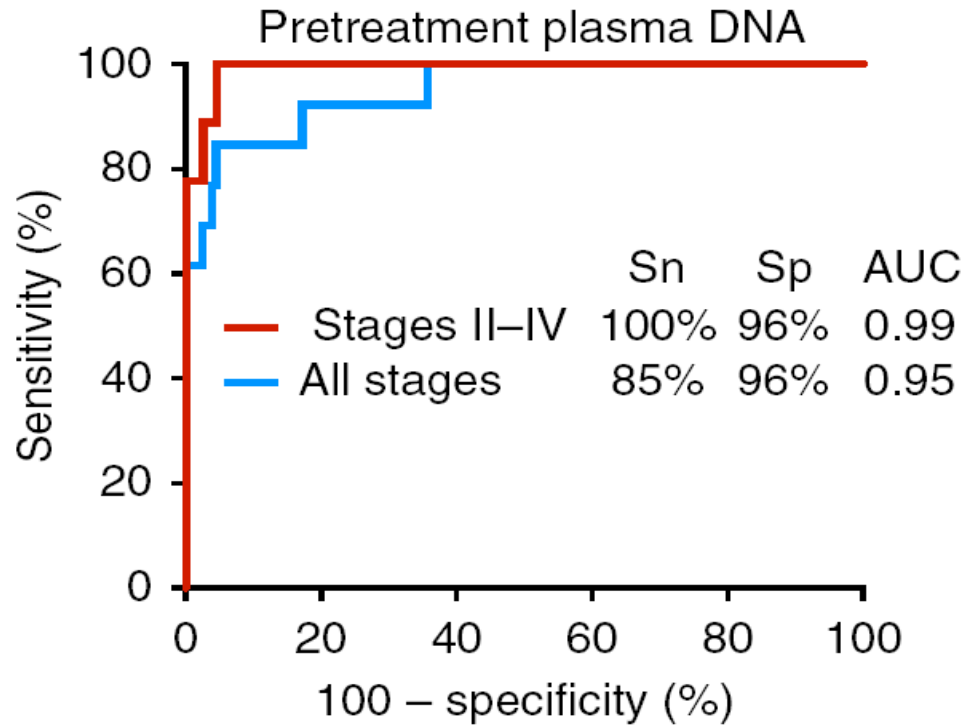
Circulating tumor DNA (ctDNA) is a promising biomarker for noninvasive assessment of cancer burden, but existing ctDNA detection methods have insufficient sensitivity or patient coverage for broad clinical applicability. Here we introduce cancer personalized profiling by deep sequencing (CAPP-Seq), an economical and ultrasensitive method for quantifying ctDNA. We implemented CAPP-Seq for non-small-cell lung cancer (NSCLC) with a design covering multiple classes of somatic alterations that identified mutations in >95% of tumors. We detected ctDNA in 100% of patients with stage II–IV NSCLC and in 50% of patients with stage I, with 96%

library preparation methods for low DNA input masses with a multiphase bioinformatics approach to design a ‘selector’ consisting of biotinylated DNA oligonucleotides that target recurrently mutated regions in the cancer of interest. To monitor ctDNA, the selector is applied to tumor DNA to identify a patient’s cancer-specific genetic aberrations and then directly to circulating DNA to quantify them (Fig. 1a). Here we demonstrate the technical performance and explore the clinical utility of CAPP-Seq in patients with early- and advanced-stage NSCLC.

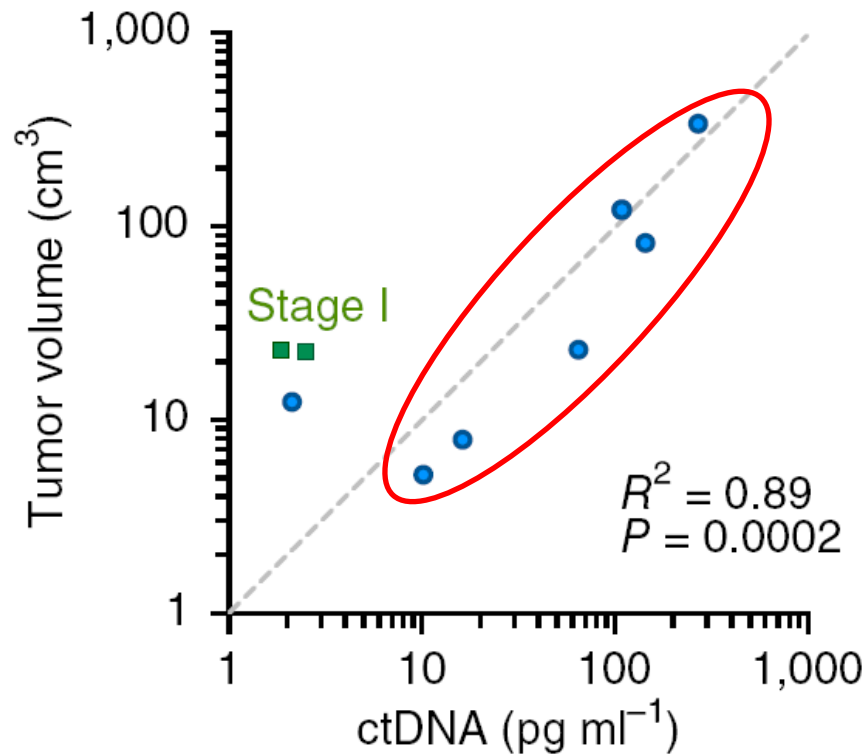
RESULTS

著名的JohnsHopkins大学最近的一项研究揭示了ctDNA的真面目，它其实是一种具备广泛应用前景、高敏感性、高特异性的肿瘤标志物，

-- *Nature Medicine*, 2014, May

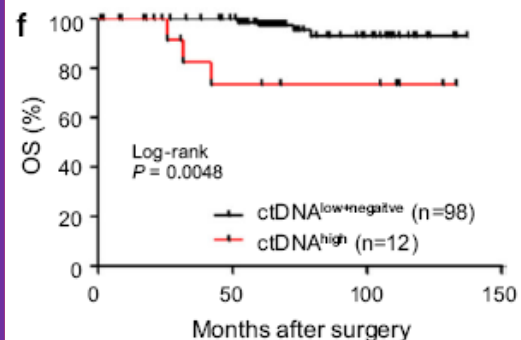
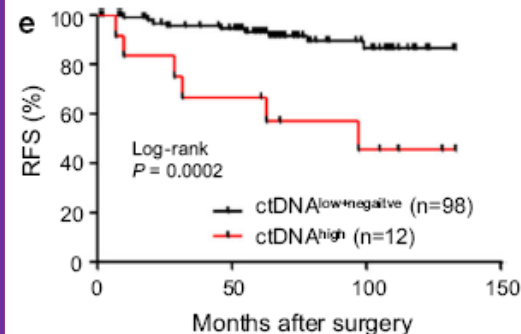
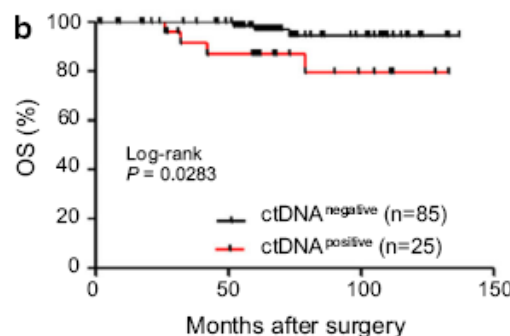
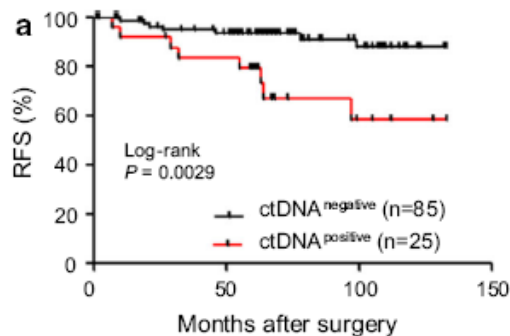
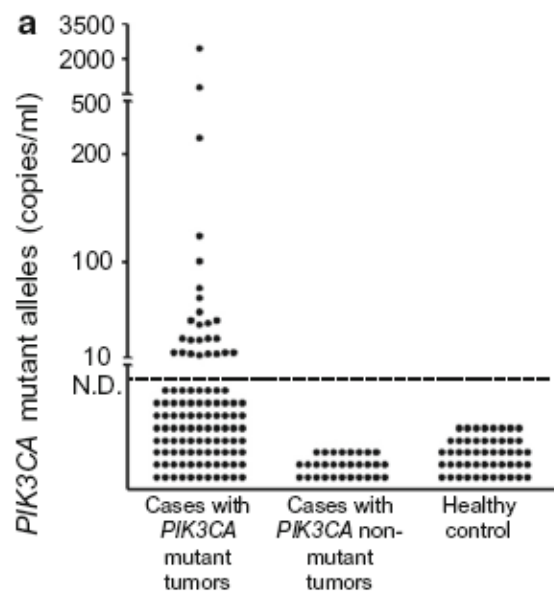


研究者还在不同级别的肺癌患者中对CAPP-Seq进行了验证，发现II-IV期的NSCLC中检测敏感性100%，I期的NSCLC中敏感性为50%，而且在各期的肺癌中的特异性均在96%。在II-IV期和所有分期的肺癌中，根据ROC曲线计算出的AUC分别为0.99和0.95，所以CAPP-Seq具有强大的检测能力。临床资料表明，ctDNA比例低至0.019%的时候也还能够被CAPP-Seq检测到。



研究者用CAPP-Seq测定的ctDNA的水平和肿瘤体积（肿瘤体积用CT和PET评估测定）之间存在显著相关性（ $p=0.0002$ ， $R^2=0.89$ ），除了几例I期肺癌患者的肿瘤体积明显高于其ctDNA相对应的大小。随访研究发现ctDNA水平随着疾病进展和相应的治疗，也在不断变化。对10例样本（7例阳性和3例阴性）进行了肿瘤标本（侵入性的活检）和血液标本（非侵入性的CAPP-Seq检测）在筛查和基因型（EGFR和KRAS）检测中的对比，结果发现CAPP-Seq并不比金标准肿瘤活检的检测效能差，能够准确测定肺癌的基因型。

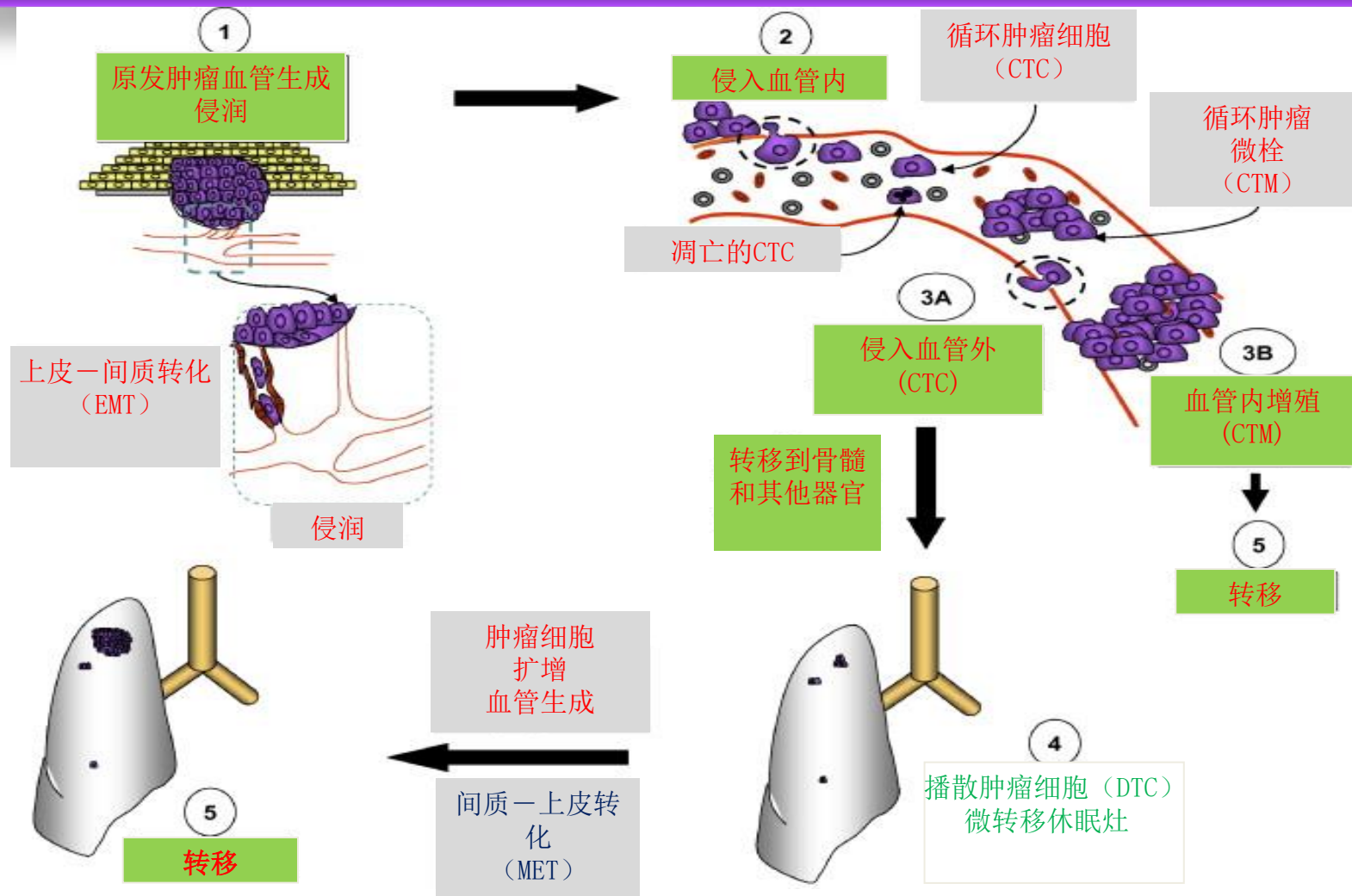
ctDNA中PI3KCA的检测可用于预测原发性乳腺癌患者的预后



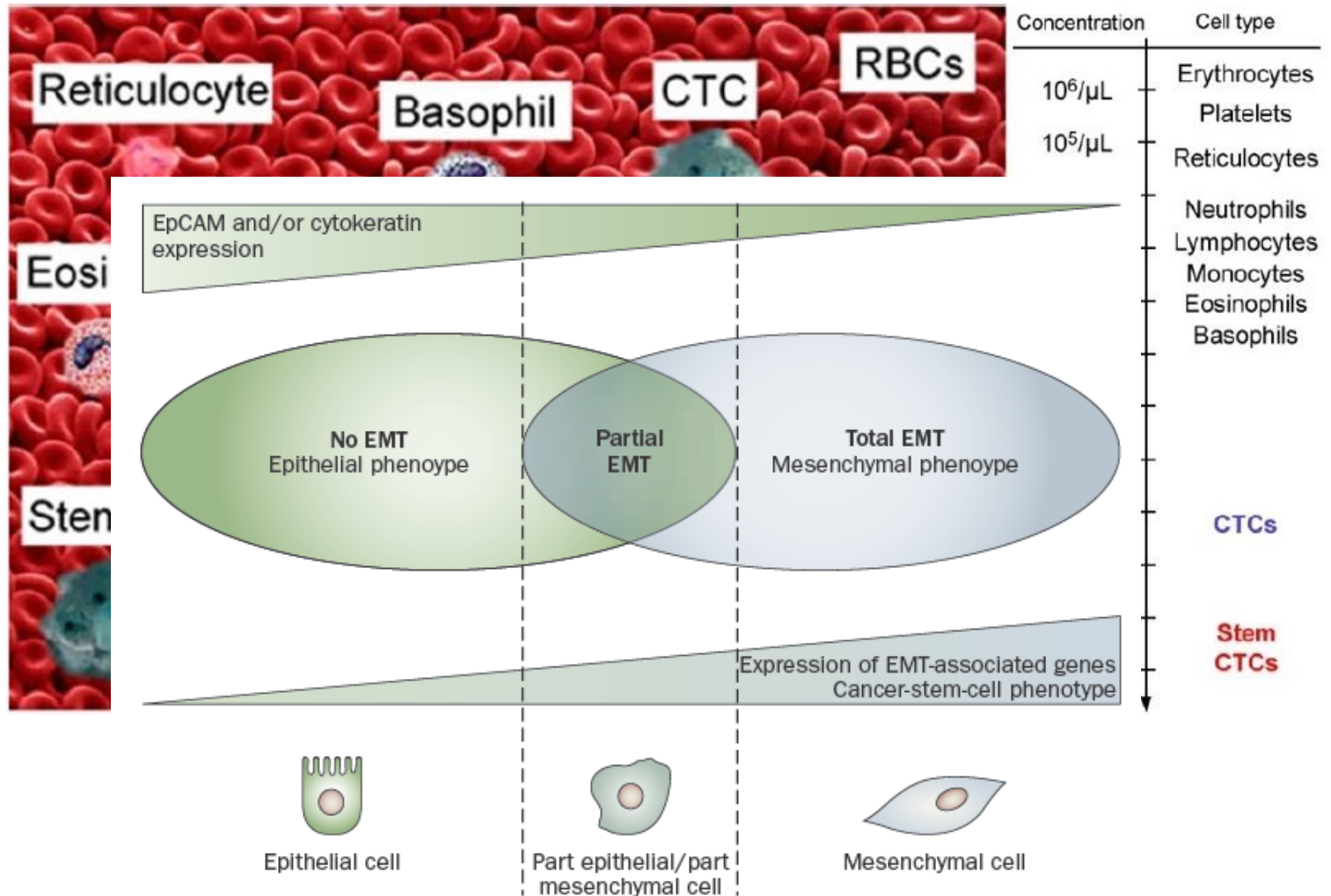
1. ctDNA有PI3KCA检出的乳腺癌患者，其预后要比没有检出的患者差。
2. ctDNA中PI3KCA拷贝数高的乳腺癌患者，其预后要比拷贝数低的患者差。

CTC形成、播散及转移的模式图

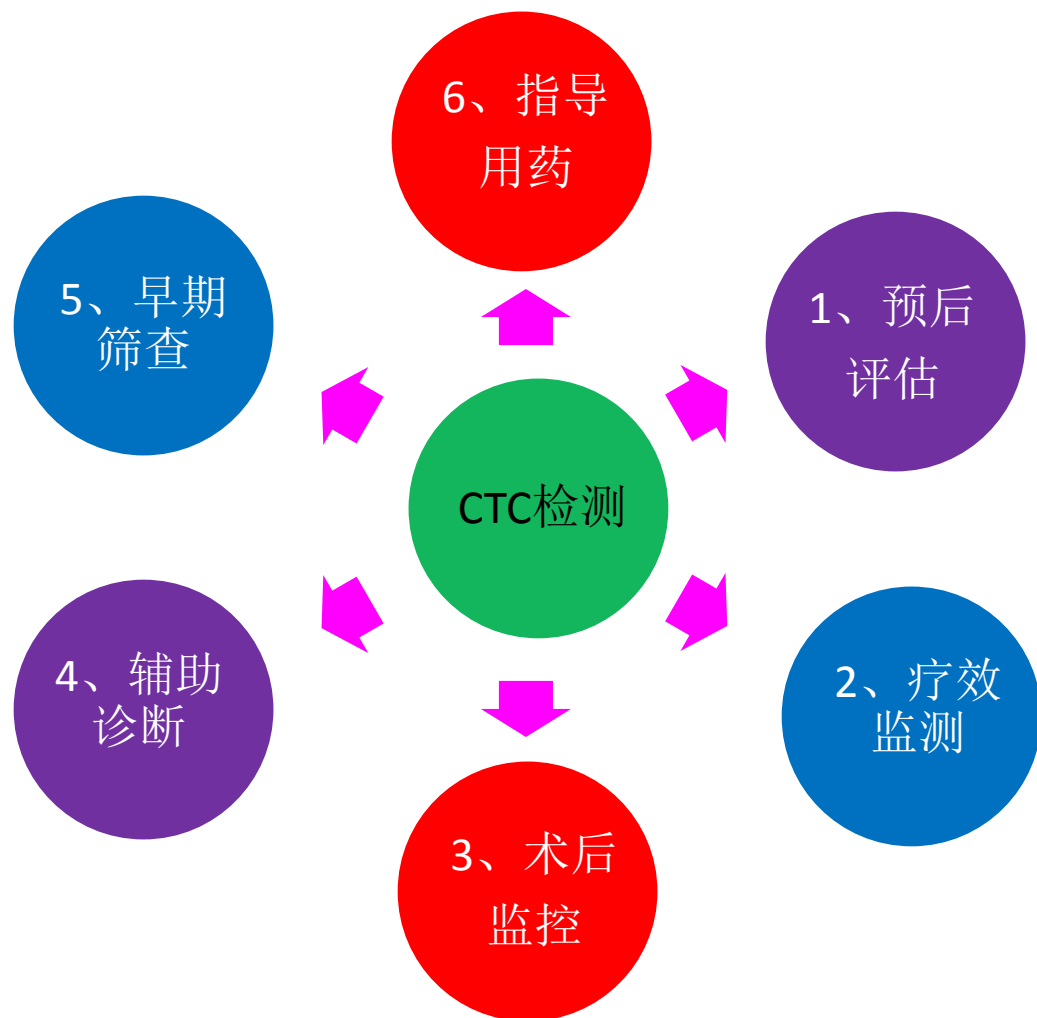
循环肿瘤细胞指从实体瘤中脱离出来并进入外周血液循环的肿瘤细胞。



CTC的稀有性和异质性



CTC的临床应用方向



用两种不同的方法检测CTC以评估 非小细胞肺癌患者的预后

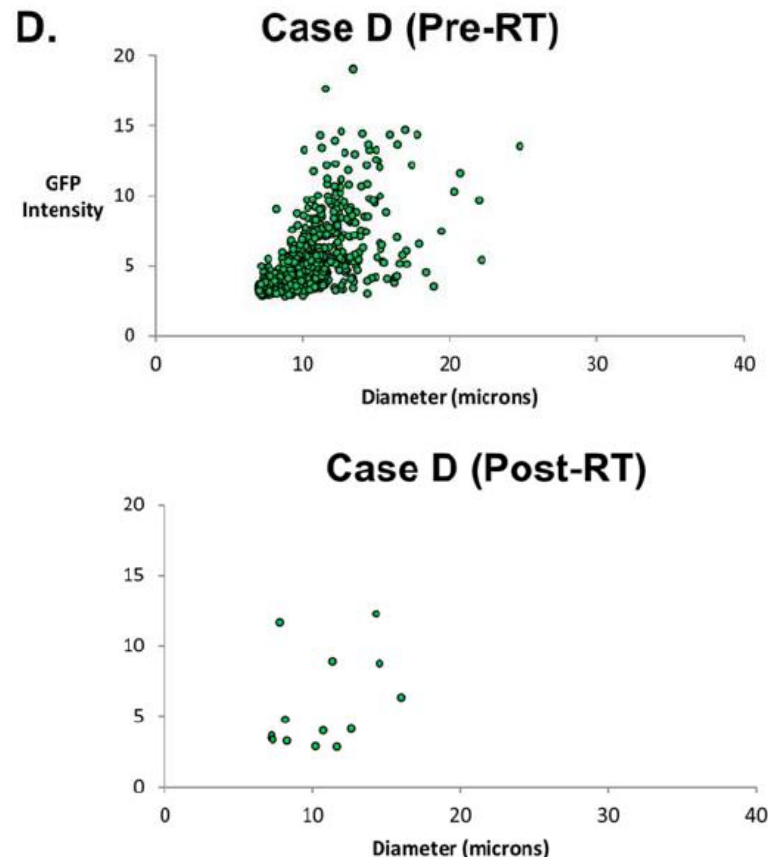
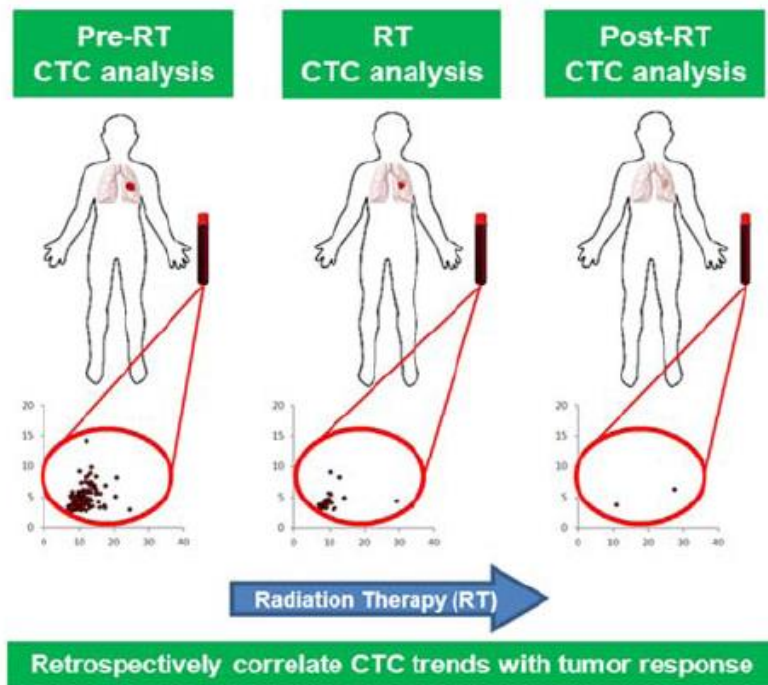
Variables	ISET+	<i>p</i> value*	Cell Search +	<i>p</i> value*	ISET+ and Cell Search+	<i>p</i> value*	ISET+ or Cell Search+	<i>p</i> value*
Histologic cell type								
Adenocarcinoma	64 (53%)	0.74	51 (43%)	0.3	27 (23%)	0.23	88 (73%)	0.066
Squamous cell carcinoma	23 (40%)		18 (32%)		7 (12%)		34 (60%)	
Neuroendocrine carcinoma	4 (57%)		2 (29%)		1 (14%)		5 (71%)	
Large cell carcinoma	5 (56%)		4 (44%)		2 (22%)		7 (78%)	
Adenosquamous carcinoma	1 (50%)		0 (0%)		0 (0%)		1 (50%)	
Sarcomatoid carcinoma	4 (40%)		3 (30%)		2 (20%)		5 (50%)	
NSCLC (NOS)	3 (60%)		4 (80%)		3 (60%)		4 (80%)	
pTNM stage								
I	44 (48%)	0.50	33 (36%)	0.8	13 (14%)	0.07	64 (70%)	0.59
II	24 (60%)		18 (45%)		12 (30%)		30 (75%)	
III	27 (45%)		24 (40%)		13 (22%)		38 (63%)	
IV	9 (47%)		7 (37%)		4 (21%)		12 (63%)	

1. ISET法检出率为 104/210(50%)，CellSearch法检出率为82/210(39%)，两种方法检出CTC的患者的DFS均明显劣于无CTC检出的患者。
2. ISET法检出 23/210（11%）的患者外周血中含有间质化的CTC细胞，这种细胞通常意味着更强的侵袭性。

ISET法和CellSearch法可以作为CTC检测的互补的方法，两种方法单独或者联合使用都可以用于检测CTC，以评估肺癌手术的预后。

通过检测非小细胞肺癌患者的外周血中循环肿瘤细胞评价放疗疗效

CTC Pilot study of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) patients receiving definitive RT



放疗前，65%患者检出CTC，平均检出率9.1CTCs/ml，明显高于放疗后的CTC平均数（0.6个）。有1名在放疗后CTC明显未降低的患者，出现远端转移。

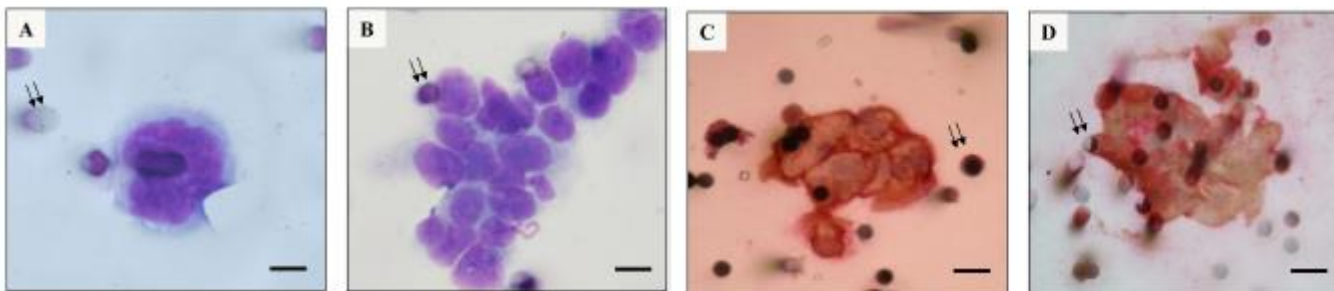
-- *Cancer J*, 2015, 121(1)

CTC可作为慢性阻塞性肺炎（COPD）患者 肺癌早期诊断的新的标志物

分类	COPD患者		吸烟者	健康人
检测结果	CTC+	CTC-	CTC-	CTC-
人数	5	163	42	35
当时是否检测出癌症	No	No	No	No
5年内检测出癌症	Yes (5/5)	No	No	No

Table 2. Clinical and pathological characteristics of CTC-positive COPD patients.

Patients	Sex	Age (years)	Smoking status (PY)	Year of COPD diagnosis	GOLD score	Year of CTC Detection (Study entry)	CTCs/CTM		Year of Lung cancer diagnosis	Lung Cancer size (cm)	Histology	Stage	Mutation tumor status	One-year follow-up after surgery
							CTCs	CTM						
P1	M	54	60	1998	3	2009	43	1	2012	1.9	Invasive papillary adenocarcinoma	IA	KRAS p.Gly12Cys	No recurrence
P2	F	48	45	1995	2	2009	67	3	2010	1.5	Invasive papillary adenocarcinoma	IA	KRAS p.Gly12Val	No recurrence
P3	M	47	35	1999	2	2008	32	1	2012	1.4	Invasive acinar adenocarcinoma	IA	KRAS p.Gly12Cys	No recurrence
P4	M	52	45	1994	3	2009	19	1	2013	2	Squamous cell carcinoma	IA	STK11 (missense mutation)	No recurrence
P5	M	63	55	2001	3	2009	28	1	2013	1.5	Invasive acinar adenocarcinoma	IA	No mutation	No recurrence



CTC v.s. ctDNA

—互相排斥还是互为补充？

CTCs

1. 细胞形态结合分子标记，特异性高；
2. 血液中数量稀少，检测难度大；
3. 只能代表肿瘤细胞的部分亚群，但是是最有侵袭性的一部分细胞；
4. 反向选择的CTCs检测适用于大多数癌症种类，但有些癌症检出率太低。
5. 完整的有活性的肿瘤细胞个体，能检测对药物的反应；可以提供新的肿瘤治疗靶点，可以帮助理解肿瘤转移的机制。

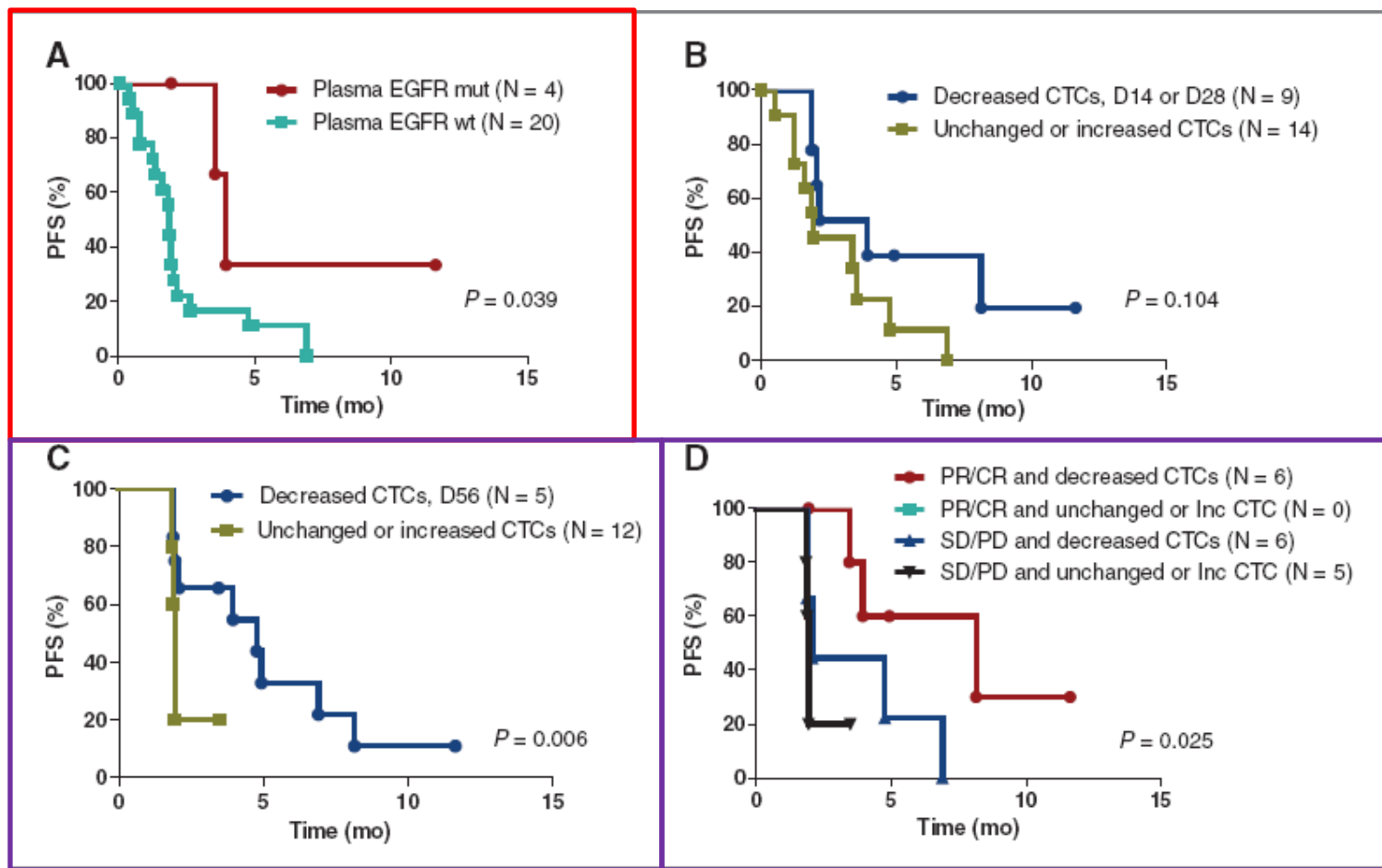
V.S.

CtDNA

1. 可能来源于非肿瘤组织，特异性低；
2. 血浆中含量较丰富，检测方法简便；
3. 来自多个细胞的更全面的遗传信息，但一般来自于凋亡的肿瘤细胞；
4. ctDNA用于实时监测乳腺癌等疾病的进展和疗效时，灵敏度更高；
5. 因为不含特异性突变，ctDNA不适用于某些癌症的检测，比如肾癌。

CTCs与ctDNA检测的有机结合才是未来的方向！

ctDNA及CTC检测与NSCLC的靶向治疗疗效的相关性



1. 检测EGFR突变时，ctDNA比CTCs更为灵敏，而且与原位肿瘤的一致性更高。
2. CTC数量的减少更适宜用于作为快速评价疗效反应的标记物。

Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer

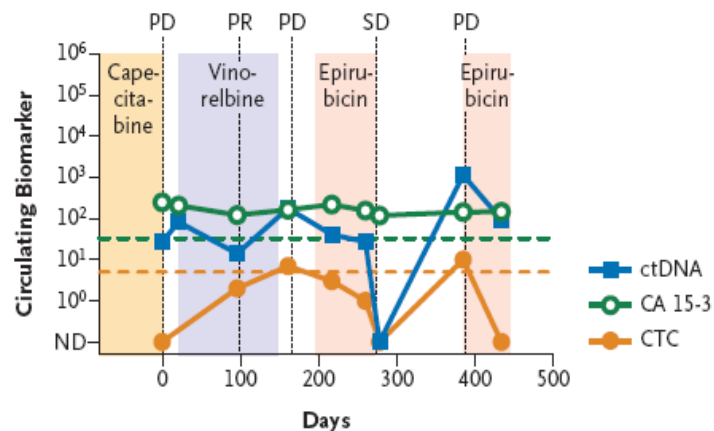
RESULTS

Circulating tumor DNA was successfully detected in 29 of the 30 women (97%) in whom somatic genomic alterations were identified; CA 15-3 and circulating tumor cells were detected in 21 of 27 women (78%) and 26 of 30 women (87%), respectively. Circulating tumor DNA levels showed a greater dynamic range, and greater correlation with changes in tumor burden, than did CA 15-3 or circulating tumor cells. Among the measures tested, circulating tumor DNA provided the earliest measure of treatment response in 10 of 19 women (53%).

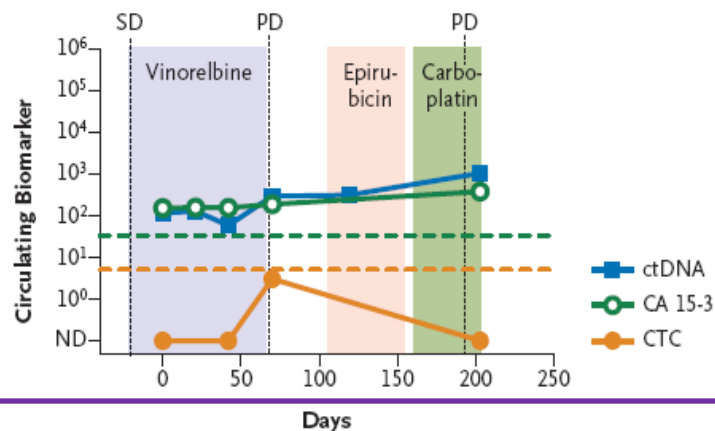
文章主要通过数字PCR比较CtDNA、肿瘤标记物及循环肿瘤细胞三个方法的比较，其中CtDNA灵敏度为97%，循环肿瘤细胞87%，肿瘤标记物灵敏度为78%，。

通过ctDNA及CTC检测监测转移性乳腺癌病情进展

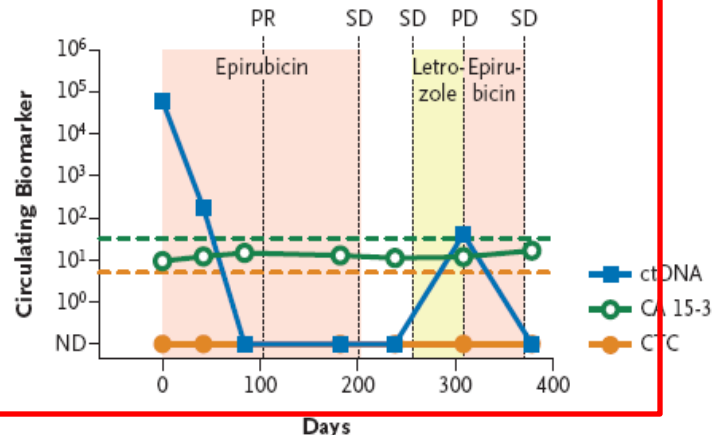
A Patient 17



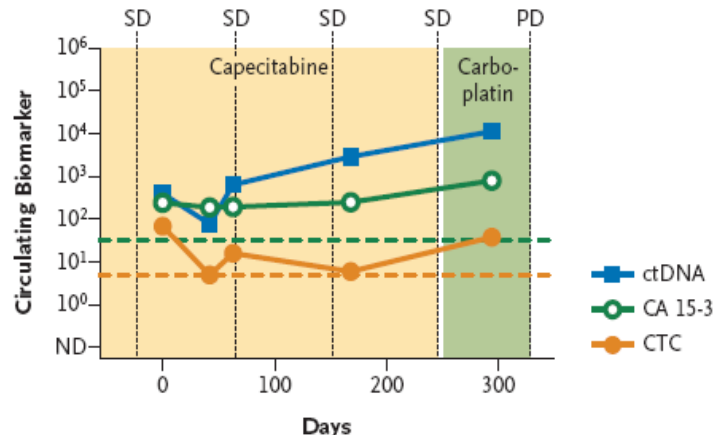
B Patient 8



C Patient 20



D Patient 6



与肿瘤标志物检测相比，CTC及ctDNA检测更能反映病情的进展。
某些病例里，ctDNA检测与病情更一致；某些病例里，CTC检测与病情进展更一致；

总结与展望

- “液态活检” 的检测技术越来越丰富，“液态活检” 研究将会给临床诊断带来革命性的突破；
- “液态活检” 是现有病理检测技术的必要和有效的补充；
- “液态活检” 的准确性有待更多的临床数据进一步确认；
- 病理科室理应成为“液态活检” 的领军科室。