

· 专家论坛 ·

2014 年圣安东尼奥乳腺癌研讨会报道: 乳腺癌循环核酸检测最新进展

庞达^{1,2} 张金锋¹ 张显玉¹ 张国强¹

循环核酸(circulating nucleic acid),是指循环血中游离于细胞外的机体内源性 DNA。循环核酸最早由 Mandel 和 Métais^[1]于 1947 年发现,由于缺乏高灵敏性和高特异性的检测方法,有关血中游离 DNA 与疾病相关性的研究在较长时期内进展缓慢。直到有效分离游离 DNA 技术、高通量测序和数字 PCR 的出现,使这一领域的研究在近些年得到了较为迅速的发展。尤其在发现循环核酸可真实反映肿瘤基因突变后,应用分子生物学手段对循环核酸的研究逐渐成为了国内外肿瘤学研究的热点。在 2014 年 12 月召开的第 37 届圣安东尼奥乳腺癌研讨会(SABCS)上,有关循环核酸的研究也是会议报道的热点之一。笔者选择其最新研究进展与大家分享。

1 循环肿瘤核酸(circulating tumor DNA, ctDNA) 深度测序评估早期乳腺癌的复发情况

早期乳腺癌系统治疗后,应该采取适当的辅助治疗以减少复发。Ng 等^[2]对接受新辅助治疗的患者进行研究,探索是否能够应用 ctDNA 深度测序预测疾病复发。该研究选取 31 例被证实无转移的患者接受新辅助化疗,收集其原发肿瘤组织和血浆样本。如果发生转移,收集转移的组织以及术后的血浆样本,每 6 个月进行 1 次随访。收集的血浆样本应用数字 PCR 检测 ctDNA 的变异情况。其中 4 例患者在临床复发前被检测到 ctDNA。研究者对这 4 例患者的原发灶组织、血浆样本和其中 2 例发生转移者的转移灶组织及转移后血浆 DNA 进行了 273 个基因的外显子测序。

该研究通过靶向测序揭示了 1~20 个早期乳

腺癌的体细胞变异,包括 3 个 PIK3CA H1047L/R 基因和 2 个 TP53 基因的致病性变异。所有 ctDNA 都是在复发之前被检测到的。然而,有 1 例患者的 ESR1 E380Q 基因变异在后续的 3 次随访血浆样本中并未被检测到,即使用数字 PCR 也未在转移组织中发现该基因变异。在 2 例患者中,未发现循环核酸测序与肿瘤组织测序存在明显差异,但在另外 2 例患者中发现了循环核酸测序与肿瘤组织测序存在明显差异。后两例患者的循环核酸中被检测到 1~5 个体细胞突变,但是在原发灶中并未被检出。特殊的是,对乳腺癌原发灶进行深度测序时未检测到 FGFR1 K656E 基因变异,但在术后 12 个月行血浆检测时发现了频率为 2.6% 的等位基因变异,并且,在检测远处转移灶时,应用数字 PCR 和靶向测序发现了 43.4% 的 FGFR1 K656E 基因变异。

因此,针对乳腺癌新辅助治疗,这些结果提供了克隆变化的证据。此外,该研究还证明了测序分析血浆 DNA 能够预测临床易复发的基因型。

2 ctDNA 为炎性乳腺癌提供了分子检测手段

炎性乳腺癌是一种进展迅速的乳腺癌类型,预后较差。它具有复杂的分子特点,包括体细胞的变异。这些体细胞的变异会导致基因不稳定,从而导致疾病难以治疗。通过活组织检查来监测该疾病是不可行的,但通过检测 ctDNA 突变能够提供一种非侵入性的分子监测手段。

Austin 等^[3]对炎性乳腺癌的 ctDNA 进行了研究。该研究选取 35 例接受标准化治疗失败的炎性乳腺癌患者,对其血浆 ctDNA 进行测序,旨在了解循环中是否存在实体瘤基因数据库中曾报道的 54 个基因。入组标准为:在标准化治疗之后,需要选择新的异常分子治疗靶点或确定组织中异常基因的疾病进展期患者。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2015.01.003

作者单位:150040 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院乳腺外科¹;
150081 哈尔滨,黑龙江省医学科学院²

通信作者:庞达,Email:pangdasir@163.com

该组患者中,80%有转移,且 37% ER(+)/HER-2(-),14% ER(+)/HER-2(+),23% ER(-)/HER-2(+),26% ER(-)/HER-2(-)。94%的Ⅲ、Ⅳ期肿瘤检测到基因变异。最常见的变异基因为 TP53 (49%)、PIK3CA (20%)、ERBB2 (17%)、Notch1 (17%) 和 ALK (11%)。利用新一代测序技术对其中 12 例患者进行组织水平的测序分析发现,有 9 例患者至少存在一个与上述基因相一致的变异。在通过 ctDNA 检测确定为 HER-2 扩增的患者中,有 4 例继续应用靶向治疗,其中 1 例正在进行靶向治疗的 ER(+)、HER-2(+)患者,经 ctDNA 检测发现其 ERBB2 和 PIK3CA 基因变异,当改用依西美坦/依维莫司治疗后,在治疗过程中继续监测 ctDNA,却发现只剩下 ERBB2 基因变异,之后改用曲妥珠单抗克隆抗体/依维莫司/长春瑞滨治疗,后续的 ctDNA 检测正在进行中。但是,应用拉帕替尼/卡培他滨治疗的三阴性乳腺癌患者,ctDNA 测序显示有 EGFR 和 ERBB2 基因变异,治疗 5 个月后 EGFR 和 ERBB2 均未被检出,患者也无疾病进展迹象。

由上述检测结果可知,通过 ctDNA 检测能够辨别炎性乳腺癌异常基因。这些基因异常的患者,具有相对较差的预后,而 ctDNA 为炎性乳腺癌提供了分子监督手段,对疾病的治疗有一定的指导意义。

3 ctDNA 基因 RUNX3(runt-related transcription factor 3) 甲基化是乳腺癌远处转移的分子标志物

乳腺癌发生转移是疾病难治和预后较差的原因。通过血液检测来预测乳腺癌转移高风险人群,可能会改变当前的治疗策略或改善患者的预后。由于缺乏表观遗传学的数据,找到可预测乳腺癌转移的分子标志物受到阻碍。近期,ctDNA 作为癌症风险预测和预后的评估指标,引起了众多研究者的关注。

Salhia 等^[4]进行了该项研究,目的是在乳腺癌高风险远处转移的患者中,鉴别并确定血液 DNA 甲基化的分子标志物。研究者应用 DNA 甲基化检测技术检测到了甲基化的 RUNX3,并通过对比 32 例乳腺癌脑转移的肿瘤组织和不配对的 50 例早期乳腺癌样本的 RUNX3 甲基化情况,发现曲线下面积(area under the curve, AUC)超过了 0.8,且在 HER-2 阳性患者中 AUC 更高。研究者也进行了血浆样本 ctDNA 的全基因组甲基化混

合测序(重亚硫酸盐法)。这些样本包括 40 例乳腺癌远处转移者,40 例未发生乳腺癌转移者,以及 40 例非乳腺癌患者(对照组)。将该种方法与 CpG 甲基化探针检测相比较,通过数据分析证明了转移性乳腺癌患者血浆中存在 ctDNA RUNX3 甲基化,并且两种方法检测到的 RUNX3 甲基化位点均在相同的区域。

研究者目前正在对每个患者的肿瘤组织和配对血浆样本进行重亚硫酸盐焦磷酸测序,对比脑转移和其他脏器转移的患者其 RUNX3 甲基化情况。综合目前研究的数据,证明了 RUNX3 特殊区域的甲基化可作为潜在的转移性乳腺癌分子标志物。这种分子标志物将有利于临床上建立监测方法和预测方案,从而改善高复发风险乳腺癌患者的预后,并延长其无病生存期。

4 ctDNA 变异分析作为转移灶活组织检查(简称活检)的替代物

随着肿瘤靶向治疗的不断扩大和发展,肿瘤遗传学在靶向治疗患者的选择上起到了重要的作用。然而肿瘤存在异质性,如果肿瘤组织活检不能反映患者肿瘤的全部遗传学信息,那么,选择性的靶向治疗就可能无效。应用非侵入性手段辨别针对某种靶向药物引起的遗传学改变,成为药学专家面临的严峻挑战。要克服这一难题,可以通过检测 ctDNA 来辨别肿瘤基因的变异。

Ignatiadis 等^[5]应用新一代测序技术进行血浆 ctDNA 检测,评估其是否能够代替转移性组织的活检。研究者选取了 17 例转移性乳腺癌患者的 61 个原发/转移灶和 29 个血浆样本。原发/转移灶的检测结果显示:17 例患者中有 12 例至少有 1 个下列基因变异(中位数为 1,区间 0~2),包括 TP53、PIK3CA、PTEN、AKT1 或 IDH2 基因。当分析血浆标本时,发现 17 例患者中有 11 例至少检测出 1 个下列基因变异(中位数为 1,区间 0~2),包括 p53、PIK3CA、PTEN、AKT1、IDH2 和 SMAD4 基因。对癌转移组织和血浆样本进行综合分析时发现,有 4 例患者的癌转移组织和血浆均未检测到基因变异,9 例患者具有相同基因的变异,2 例患者的血浆检测到一种基因变异,但在癌转移组织中并未检测到,还有 2 例患者的癌转移组织被检测到一种基因变异,但在血浆中却未被检出。尽管有 4 例患者的癌转移组织与血浆中的基因变异不一致,但 76% (13/17) 的患者是一致的。因此,该研究

得出这样的结论:在分子筛选中,血浆 ctDNA 检测在一定程度上能够代替转移性组织的检测。

Chamberlin 等^[6]也进行了类似的研究。该团队在患者的选择和检测方面的要求更为细化:纳入的病例应为新发现或恶性程度高的转移性乳腺癌患者;要求用粗针抽取血液并提取血浆 DNA;如果可以,肿瘤原发灶也应进行活检;活检组织应大于 3 条,且应来自>2 个不同的器官;肿瘤的组织学及 ER、PR、HER-2 状态都应被检测;肿瘤组织和血浆 DNA 都应进行 DNA 测序;还应对转移性乳腺癌进行 CT、骨扫描和 PET-CT 检查;允许治疗患者,但治疗前必须获得所有组织。研究的最终目标是确定血浆中的遗传变异是否能够反映所有肿瘤组织的遗传变异,确定原发灶和转移灶遗传异质性的程度。该研究正在进行,未来给出的结论将进一步证实 Ignatiadis 等的研究是否具有普遍性。

5 三阴性乳腺癌患者中 ctDNA 和循环肿瘤细胞的检测

在转移性乳腺癌中,ctDNA 作为一种预后分子标志物,在某种程度上类似于循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)。Bidard 等^[7]对转移性三阴性乳腺癌患者进行了 ctDNA 中 TP53 基因变异和 CTC 的检测。研究者在法国居里研究所招募了 40 例尚未进行新一轮治疗的三阴性转移性乳腺癌患者,应用 CellSearch 系统进行 CTC 的检测,并应用了目标深度测序(Illumina HiSeq 2500 和 Roche 454)进行 ctDNA 检测。然后,结合 CTC、ctDNA 检测结果和患者的临床病理特点,进行了疾病进展时间(time to progression, TTP)和 OS 分析。研究者对其中 31 例患者进行了成功测序,发现 27 例患者发生了 TP53 基因变异,其中 21 例检测出了 ctDNA 变异,每毫升血浆中检测出 48 ~ 648 000 个拷贝数(中位值为 1620 个拷贝数)。在 ctDNA 中,变异的等位基因频率为 2%~70% (中位值为 5%)。19 例(70%, 19/27)检测到了 CTC。虽然高水平的 ctDNA 对 OS 和 TTP 都没有显著影响,但 CTC 与 OS 相关($P=0.04$)。其他一些已知的常见因素,如临床表现、乳酸脱氢酶升高以及之前治疗的情况与预后也有很大的关系。在治疗过程中,有 12 例患者的 CTC 和 ctDNA 早期变化能被检测到,并且这种改变基本相似。在 TP53 基因变异的 27 例转移性三阴性乳腺癌患者中,ctDNA 水平与其他预后因素相比,并未对预后

产生更大的影响,表明三阴性乳腺癌中 ctDNA 的释放取决于某种生物学特征,而这种生物学特征没有影响到患者的预后。然而,应用 TAm-Seq 技术检测 ctDNA 的检出率胜过 CTC。

6 循环核酸中有 TP53 基因变异的 BRCA1 突变携带者的随访: CirCA01 研究

在癌症患者中,ctDNA 分析得出的遗传信息可能作为诊断、预后、治疗反应监测以及耐药机制评估的标志。

CirCA01 项目由 Bidard 等^[8]发起并实施,是法国几个癌症研究中心共同进行的前瞻性研究,已经在 BRCA1 变异的人群中启动,目的是检测血浆中 TP53 基因的变异。该项目将根据临床因素、TP53 失活和 BRCA1 变异情况,分析各因素与患者预后的相关性,并验证 ctDNA 中 TP53 变异检测是否能用于 BRCA1 变异携带者的肿瘤筛选,以及携带 BRCA1 变异基因且有影像学表现者的诊断检测。目前,该项目正在进行中。

7 结语

目前,对乳腺癌的防治依然依赖早期诊断、手术治疗、辅助治疗及监测病情变化。尽管乳腺癌的治疗有一定程度的改进,但同样有很多患者因为发生远处转移而死亡。肿瘤组织活检是肿瘤诊断的金标准,但因其为有创操作,且必须有准确定位的病灶,因此对疾病的监测有一定局限性。随着人类对乳腺癌研究的不断深入,越来越多的分子标志物将被应用于临床。确定有效的肿瘤标志物并将其在患者血清或血浆中检出,是未来非侵入性肿瘤诊断试验的发展方向。

随着高灵敏度、高特异性检测方法的应用以及测序技术的不断优化,循环核酸的检测变得更为精确。通过对循环核酸的定量检测,可以获取肿瘤特异性的生物学信息及患者个体化的遗传学信息,在肿瘤的早期诊断、病情评估、个体化治疗方案的确立以及预后判断中有着重要的价值。现阶段,国际上多个研究机构对循环核酸的研究设计和检测技术已取得共识,但尚未取得统一的参考标准,因此,循环核酸检测的临床应用仍处于探索阶段,更大样本的临床试验仍在进行中。

【关键词】 核酸类; 遗传学; 乳腺肿瘤; 肿瘤标志物

【中图法分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

参 考 文 献

- [1] Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme[J]. CR Acad Sci Paris, 1948, 142: 241-243.
- [2] Ng CKY, Weigelt B, Garcia-Murillas I, et al. High-depth sequencing of circulating tumor DNA to interrogate the genetics of residual micro-metastatic disease prior to relapse in early breast cancer [EB/OL]. [2014-12-12]. http://www.abstracts2view.com/sabcs14/view.php?nu=SABCS13L_1778&terms=.
- [3] Austin L, Fortina P, Sebisanoovic D, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) provides molecular monitoring for inflammatory breast cancer (IBC) [EB/OL]. [2014-12-11]. http://www.abstracts2view.com/sabcs14/view.php?nu=SABCS13L_1049&terms=.
- [4] Salhia B, Gooden GC, Johnson KN, et al. RUNX3 hypermethylation in circulating tumor DNA is a biomarker of breast cancer distant metastasis [EB/OL]. [2014-12-12]. http://www.abstracts2view.com/sabcs14/view.php?nu=SABCS13L_1809&terms=.
- [5] Ignatiadis M, Rothe F, Laes JF, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analyses in breast cancer [EB/OL]. [2014-12-11]. http://www.abstracts2view.com/sabcs14/view.php?nu=SABCS13L_801&terms=.
- [6] Chamberlin MD, Miller TW, Bean JR, et al. Circulating tumor DNA in plasma as a surrogate for tumor biopsy to identify tumor genetic alterations in patients with multi-focal metastatic breast cancer [EB/OL]. [2014-12-10]. http://www.abstracts2view.com/sabcs14/view.php?nu=SABCS13L_22&terms=.
- [7] Bidard FC, Madić J, Kiialainen A, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients [EB/OL]. [2014-12-11]. http://www.abstracts2view.com/sabcs14/view.php?nu=SABCS13L_1445&terms=.
- [8] Bidard FC, Stoppa-Lyonnet D, Nogues C, et al. TP53 mutants in circulating tumor DNA and follow-up of BRCA1 mutation carriers; The CirCA01 study [EB/OL]. [2014-12-10]. http://www.abstracts2view.com/sabcs14/view.php?nu=SABCS13L_1449&terms=.

(收稿日期: 2015-01-25)

(本文编辑: 罗承丽)

庞达, 张金锋, 张显玉, 等. 2014 年圣安东尼奥乳腺癌研讨会报道: 乳腺癌循环核酸检测最新进展 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2015, 9(1): 8-11.