

· 前沿述评 ·

【编者按】肺癌因致死率高、术后易复发等诸多特点，发病率及死亡率均占恶性肿瘤的前2位，威胁着患者的生命健康。临床对肺癌的认知在经历数十年发展后渐趋完善，但肺癌患者的疾病监测及预防仍是诊疗过程中的重点与难点。液体活检提供了一种检测肺癌的非侵入性方法，并能补充组织活检的检测结果，因而越发受到重视。本文汇总了既往不同体液标本活检在肺癌微小残留病灶（MRD）监测中应用的研究成果，通过介绍外周血、尿液、唾液、痰液、胸腔积液标本在肺癌MRD检测中的进展，为评估肿瘤活动情况提供更多可行方法。编者期望，未来临床能将肿瘤组织活检、临床检查和医学影像与液体活检的基因组学和MRD信息结合起来，为更多癌症患者提供更精确的治疗。

不同体液标本活检在肺癌微小残留疾病监测中的应用最新进展



扫描二维码
查看原文

闫星¹，刘山梅²，刘长宏^{1*}

【摘要】肺癌是世界上致死率最高的恶性肿瘤之一，治疗后复发是其难以攻克的主要原因。微小残留疾病（MRD）作为实体瘤复发的“桥头堡”，被描述为治疗原发肿瘤后，在没有任何癌症临床症状的情况下，患者的生物液体中仍然存在游离的循环肿瘤细胞或其他肿瘤细胞衍生物。2021年中国达成了首个“肺癌MRD的检测和临床应用共识”，旨在通过液体活检监测以评估肺癌患者MRD状态，进而完善其术后个体化治疗。本文综述了几种热点液体（外周血、尿液、唾液、痰液、胸腔积液）标本在肺癌MRD检测中的进展，并探讨其指导肺癌MRD精准治疗的应用价值。

【关键词】肺肿瘤；液体活组织检查；肿瘤，残留；循环肿瘤DNA；综述

【中图分类号】R 734.2 【文献标识码】A DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0641

闫星，刘山梅，刘长宏. 不同体液标本活检在肺癌微小残留疾病监测中的应用最新进展 [J]. 中国全科医学, 2023, 26(3): 280-286. [www.chinagp.net]

YAN X, LIU S M, LIU C H. Different body fluid biopsies for detecting minimal residual disease in lung cancer: a review of the latest advances [J]. Chinese General Practice, 2023, 26(3): 280-286.

Different Body Fluid Biopsies for Detecting Minimal Residual Disease in Lung Cancer: a Review of the Latest Advances

YAN Xing¹, LIU Shanmei², LIU Changhong^{1*}

1. Department of Thoracic Surgery, the Second Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000, China

2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 015000, China

*Corresponding author: LIU Changhong, Professor, Master supervisor; E-mail: 17709870870@163.com

YAN Xing and LIU Shanmei are co-first authors

【Abstract】 Post-treatment recurrence is a major difficulty in the treatment of lung cancer, one of the deadliest cancers worldwide. Minimal residual disease (MRD) as a “bridgehead” for the recurrence of solid tumors, is described as the presence of free circulating tumor cells or other tumor cell derivatives in the biological fluid of patients without any clinical cancer symptoms after the primary tumor treatment. China recently issued its first Consensus on the Detection and Clinical Application of MRD in Lung Cancer, aiming at improving the postoperative individualized treatment for lung cancer patients in accordance with the MRD status detected by the liquid biopsy. We reviewed the latest advances in the use of several most widely used body fluids (peripheral blood, urine, saliva, sputum and pleural effusion) in the detection of MRD in lung cancer, and discussed their values in guiding the precise treatment of MRD in lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms; Liquid biopsy; Neoplasm, residual; Circulating tumor DNA; Review

基金项目：辽宁省自然科学基金资助项目（20180550364）

1. 116000 辽宁省大连市，大连医科大学第二附属医院胸外科 2. 015000 内蒙古自治区呼和浩特市，内蒙古医科大学

*通信作者：刘长宏，教授，硕士生导师；E-mail: 17709870870@163.com

闫星与刘山梅为共同第一作者

本文数字出版日期：2022-10-17

经过几十年的相关探索,肺癌患者的管理方法发生了深刻变革。可以明确的是,疾病监测是治疗成功的基础,目前在肺癌的临床诊疗过程中因复发导致术后患者死亡的百分比仍然很高(2年内I B期患者复发率为45%、III A期患者复发率高达76%)^[1]。因此作为肿瘤复发的“罪魁祸首”——微小残留疾病(MRD)越来越受到临床重视。MRD是指经过治疗后,传统影像学或实验室检查不能发现,通过液体活检发现的癌来源分子异常,代表恶性肿瘤的持续存在和临床进展可能^[2]。在TRACERx研究中^[3],经液体活检分析证实99%以上没有复发的非小细胞肺癌患者MRD阴性,并且发现在通过标准成像检测到疾病之前复发的患者中可以检测到MRD。目前检测MRD的新兴手段之一便是液体活检,通过分析血液及其他体液中的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、外泌体等来源于实体瘤的生物标志物监测肿瘤进展,可为后续治疗提供临床决策。液体活检不同于组织活检的是可以多次、连续进行识别肿瘤驱动突变、跟踪肿瘤演变和监测疾病复发的无创操作,且操作方式更加便捷,能够动态反馈疾病的进展,相关报道称液体活检可使患者避免约5%与CT引导肺组织活检相关的主要并发症^[4]。同时液体活检可以完全反映肿瘤的异质性,为患者术后进行个体化靶向治疗、改善预后提供更多机会。本文综述了几种热点液体(外周血、尿液、唾液、痰液、胸腔积液)标本在肺癌MRD检测中的进展,并探讨多元化液体活检标本分析指导肺癌MRD精准治疗的应用价值,期待其成为未来指导临床决策并改善患者预后的一条崭新道路。

1 肺癌MRD液体活检的优势及挑战

传统检查(包括组织活检、影像学、生化指标等常规检查)一直在肺癌的发生、发展监测及治疗过程中起着重要作用,在液体活检应用于临床之前其是包括原发性肺癌在内的恶性肿瘤病理诊断、分期和治疗决策的“金标准”。然而,传统检查受限于操作与时效性而难以真正推动肺癌MRD监测的发展。液体活检的优势在于,首先相对于组织活检其是一种非侵入性操作,患者的体液可以很容易地重复取样,这使得在治疗过程中可以通过连续取样来监测肿瘤特征(“实时活检”),同时打破了其肿瘤异质性的取样局限。ROTHWELL等^[5]的一项研究发现,39例晚期实体瘤患者的循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA)和患者相应肿瘤组织DNA的高通量测序(NGS)显示,在肿瘤组织中未检测到的突变是来自血浆样本的30%;其次,液体活检相对于常规检测具有时间优越性及较高的特异度。TRACERx研究发现^[3],术后ctDNA预测肺癌患者36个月复发的灵敏度为48%,特异度为100%;且ctDNA

检测和影像学复发之间的中位时间为167 d,而癌胚抗原(CEA)升高和影像学复发之间的中位时间为61 d,相比较液体活检缩短了临床诊断复发间隔时间,争取了复发前治疗优势。有趣的是一份报告描述了1例II B期非小细胞肺癌患者接受了放射治疗且影像学检查显示有残留肿块,尽管该患者在治疗后没有检测到ctDNA,但根据ctDNA连续监测,该患者在治疗22个月后被视为无病状态^[6],事后来看,该肿块代表辐射诱导的炎症变化,这也引起了业界对影像学筛查导致假阳性率过高以及辐射风险的关注。然而,液体活检要想进一步在临床应用中大有作为仍存在一些挑战,例如克隆性造血(cloning of hematopoietic, CH),在没有已知驱动突变的情况下,随着非小细胞肺癌患者年龄增长,通过cfDNA检测到造血干细胞在造血的随机过程中可能获得突变,而大多数JAK2突变和部分TP53突变可能是由于CH,这就使得样本中CH相关突变的检测可能被错误地解释为肿瘤切除后MRD的指示。研究者目前正在采用各种方法从真正的肿瘤DNA衍生突变中筛选出CH相关突变。最直接的方法是对有核白细胞进行深度测序(CAPP-Seq)以识别克隆性造血突变,并将其从样本中排除^[7]。虽然该方法在技术上可行且操作简单,但其却将成本翻了一番。其他如基因片段太小、 $t_{1/2}$ 短以及随着治疗效果显现,肿瘤DNA比例会大幅度下降等。鉴于检测成本较高及缺乏分析方法共识,目前液体活检仍不能完全替代传统检查,但作为后者的辅助检测手段,未来的研究必定需要将两者更好地结合起来,监测与评估MRD状态,进而完善肺癌患者术后个体化治疗。不同液体活检的比较见表1。

2 体液标本活检

2.1 外周血 从早期至晚期肺癌,随着实体瘤的进展、转移、复发等,大量的肿瘤细胞及其衍生物会进入外周血液循环中,在影像学检查和血清学检查发现之前其是准确、可靠地识别MRD并指导后续治疗决策的标本。采集血液检查比活组织检查具有更小的侵入性,这使其易于获取,并允许对癌症进行近实时监测。外周血样本中主要活检对象包括CTC、ctDNA以及外泌体等,特征比较见表2。目前国内外大量临床试验以及分析处理的方法已基本达成共识,使得上述对象在以血液为载体的基础上进行活检成为目前最常用的方法。而某些特定体液中的肿瘤细胞及其衍生物因无法如同全身循环的血液那样反映癌症转移的具体情况,在临床实际应用中尚处于探索阶段。此外,相比于血液,其他体液有着更加复杂的微生物环境,微生物自身及其代谢物会对检测结果造成难以预测的影响。目前血液活检技术可根据其基因组覆盖范围进行分类,从靶向等位基因特异性聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)到NGS技术,

表 1 不同液体活检比较
Table 1 Comparison of five types of body fluid biopsies

体液类型	主要活检成分	优势	挑战
血液	CTC, ctDNA, 外泌体	成熟的分析方法, 可实时监测肿瘤进展, 适用于最多的患者, 应用更为普遍、广泛	高假阴性率, 生物标志物质量和数量低, 生物标志物半衰期较短, 不能连续采集
尿液	CTC, ctDNA, mRNA, 外泌体	样本量大, 无创、可以连续采集, 适合纵向随访, 对肿瘤转移有较高的反应	收集过程易受污染, 肾脏滤过后数量下降
唾液	唾液 mRNA, miRNA	无创操作, 交叉污染风险低, 可实时监测肺癌进展	样本量较少, 生物标志物质量和数量低, 复杂的成分, 包括酶、抗体、激素等
痰液	痰液 mRNA, miRNA, lncRNA, 外泌体	无创操作, 早期中央型肺癌灵敏度、特异度较高, 肿瘤内异质性	样本量较少, 缺乏成熟采样手段
胸腔积液 (包括上清液)	CTC, ctDNA, 积液 mRNA	生物标志物质量和数量高, 与临床特征高度相关	有创操作, 不能实时监测肺癌进展, 早期患者不适用

注: CTC=循环肿瘤细胞, ctDNA=循环肿瘤 DNA

表 2 外周血中三种常见活检对象比较
Table 2 Comparison of three common liquid biopsy biomarkers in peripheral blood

活检对象	组成	优势	挑战
CTC	上皮起源的有核细胞	肿瘤细胞的高特异性, 直接定量分析分离, 肿瘤细胞的形态学、分子和进一步生物学分析	分离肿瘤细胞的灵敏度和特异度相对较低 (技术挑战)
ctDNA	单链或双链 DNA	检测 DNA 改变 (体细胞突变、插入和删除、拷贝数改变、基因融合) 的高灵敏度	很难区分 ctDNA 和来自正常细胞的循环 DNA, 没有功能分析
外泌体	蛋白质, 非编码 RNA, mRNA, 以及单链或双链 DNA	RNA 分析 (miRNA、mRNA、长编码 RNA、RNA 特异性变体、RNA 表达), 作为载体用于药物递送	难以区分肿瘤来源的外泌体和正常细胞来源的外泌体, 提取困难

注: miRNA=microRNA

如杂交捕获 NGS、全外显子组测序和全基因组测序。所有检测方法共同面临的问题包括血浆 ctDNA 含量低、正常 (非肿瘤) 细胞产生的 cfDNA 背景丰富以及发现的基因变异来源不确定, 但随着技术的进步, 使用个性化的基因测序跟踪更多的突变可以提高这些平台在检测低容量 MRD 时的灵敏度。

2.1.1 CTC 是指从原发肿瘤或转移灶脱落、发生上皮-间质转化进入患者外周血血液循环的恶性肿瘤细胞^[8]。肿瘤复发需要许多病理生理级联反应, 在这些癌症扩展、生长和转移的基本过程中, CTC 可能参与了转移这一重要阶段。CTC 是血管中一种极其罕见的细胞, 外周血液中的数量非常少 (1 ml 全血中仅含有 1~10 个 CTC)^[9], 从文献回顾来看, 绝大部分肺癌患者中均可发现 CTC^[10]。对于早期肺癌, 可从外周血中检测到甲状腺转录因子-1 (TTF-1) 阳性 CTC, 并与不良预后和更短的进展期相关^[11]。对于经证实有远处转移或复发的肺癌患者, CTC 数量越多, 预后越差, 并且 LINDSAY 等^[12]的报告指出 CTC 将是晚期非小细胞肺癌无进展生存率 (PFS) 和总生存率 (OS) 的独立预后指标。因此, CTC 可作为肺癌患者的一种动态监测工具来观察治疗前后肿瘤动力学的变化。在上述文献回顾的研究中, 26 例患者早期肺癌术前和术后第 0 天、第 1 天和第 3 天进行 CTC 检测, 发现复发肺癌患者 CTC 计数的下降斜率较低, 而无复发患者的 CTC 下降斜率较高。对于有肺转移的肺外恶性肿瘤, 肿瘤切除后 CTC 下降,

术后第 3 天 CTC 反弹至更高水平, 即使在影像学上可见病变已完全切除。表示 CTC 可以作为 MRD 检测的一种工具, 并且可以预测治愈性术后几个月的复发情况。

2.1.2 ctDNA 定义为肿瘤细胞脱落到体循环中的短 DNA 序列, 来源于死亡 CTC 的分解产物或肿瘤细胞的活性分泌, 是 cfDNA 片段中的一小部分, 尽管比例不到 1% 但测序技术的进步已经可以满足检测与肿瘤生物学相关的突变和染色体改变^[13], 且 ctDNA 的 $t_{1/2}$ 约为 2 h, 比其他肿瘤标记物的 $t_{1/2}$ 更短^[14]。在肺癌发展过程中, 肺肿瘤组织可能获得一系列体细胞突变。某些突变如 EGFR T790M 会产生耐药性, 并影响患者的总体生存率。2016 年美国食品和药物管理局 (FDA) 批准 cobas EGFR 突变试验 V2^[15] 作为在肺癌中使用 ctDNA 检测 MRD 的第 1 次液体活检试验。因 ctDNA 检测隐匿性癌症和动态追踪肿瘤特异性突变的潜在能力, 连续血浆样本中跟踪检测肿瘤基因突变已经用于晚期非小细胞肺癌患者的临床决策^[16]。另一方面术后 ctDNA 与患者后期复发率呈正相关, 在一项包含 230 例肺癌患者术后的研究中^[17], 研究者通过血浆样本中相对于健康对照组中最高突变等位基因分数 (MAF) 量化的 ctDNA 确定了 ctDNA 阳性和阴性患者术后无复发生存率 (RFS) 的显著差异, 且认为术后 ctDNA 状态对 RFS 的影响大于任何单个临床病理风险因素或任何因素组合, 术后灵敏度、特异度皆高于其他检测手段。目前克隆性造血和组织活检之间的基因组差异性仍是 ctDNA 检测存在的

明显局限性，但随着 NGS 及数字 PCR (dPCR) 等技术的进步，ctDNA 检测的灵敏度也在逐渐提高。

2.1.3 外泌体 JOHNSTONE 等^[18]在研究网织红细胞的成熟过程时首次发现并命名外泌体。外泌体是一种球形囊泡，直径为 40~100 nm，密度为 1.13~1.19 g/ml，其内主要核酸包含 microRNA (miRNA)、tRNA 和长非编码 RNA (lncRNA)，以及大量片段化的信使 RNA (mRNA)。外泌体的分离方法主要有基于物理（如大小、密度和分子量）特性、沉淀、微流体、免疫亲和捕获的技术，目前超速离心和商用试剂盒提取法是分离外泌体最广泛使用的常规方法^[19]。尽管所有类型的细胞会释放出外泌体，但肿瘤细胞中的外泌体非常丰富。研究表明肿瘤细胞源性外泌体在肿瘤生物学过程中起着重要作用，其负责促进受体细胞的血管生成、侵袭和增殖，通过将其内容物转移到肺癌微环境中的靶细胞参与肺癌的形成和进展^[20]。癌细胞外泌体包含多种与癌症相关的蛋白质，例如表皮生长因子受体 (EGFR) 是肺癌外泌体中的主要膜结合蛋白，从肺癌细胞中提取的外泌体中约有 80% 呈 EGFR 阳性^[21]，而肿瘤源性外泌体衍生的 miRNA 也可能是影响非小细胞肺癌患者生存率的独立预测因子^[22]。RABINOWITS 等^[23]评估了血浆样本循环肿瘤外泌体水平对 27 例肺癌患者和 9 例健康对照的诊断和预后潜力，发现腺癌患者的外泌体水平（平均 2.85 mg/ml）、外泌体 miRNA 浓度 (158.6 ng/ml) 均高于健康对照（平均 0.77 mg/ml、68.1 ng/ml）。

2.2 唾液 唾液由唾液腺中的腺泡细胞产生，腺泡细胞具有很高的渗透性，且周围有丰富的毛细血管，使血液中的分子能够与相邻唾液细胞中的分子自由交换^[24]，目前血液中大约 40% 的肿瘤标志物也可以在唾液中找到^[25]。加之唾液的收集速度快、简单、便宜、无创，表明唾液可以被视作一种理想的液体活检标本。GU 等^[26]首次将血浆 CTC 和唾液 mRNA 生物标志物联合应用于非小细胞肺癌的无创检测，在区分早期肺癌患者和健康对照组的研究中其灵敏度和特异度分别高达 92.1% 和 92.9%。非小细胞肺癌患者和健康人群之间唾液 cfDNA 的定量或浓度无显著差异^[27]。然而，血浆 cfDNA 和唾液 cfDNA 之间 EGFR 突变的一致性为 83.78%，scfDNA 能够作为基因突变的补充^[28]。EGFR 是一种在 NSCLC 中频繁表达的膜受体，其影响 NSCLC 细胞的增殖、血管生成和 MRD 复发及化疗耐药性，并促进 NSCLC 细胞的转移^[29]。频繁对术后肺癌患者进行血液活检监测 EGFR 突变是不切实际的，而唾液活检恰可以为肺癌 MRD 提供另一个有希望的诊断补充。加州大学洛杉矶分校 (UCLA) 牙科学院开发的电场诱导释放和测量 (EFIRM) 技术可以检测肺癌患者体液中表皮生长因子受体 (EGFR) 突变。LI 等^[30]在 13 例非小

细胞肺癌患者唾液样本中利用上述技术检测到循环肿瘤 DNA (ctDNA) EGFR 突变，灵敏度为 100%。另一些肿瘤生物化学指标与肺癌患者的生存率显著相关^[31]，例如咪唑化合物 (ICs) 浓度和唾液乳酸脱氢酶 (LDH) 活性，这两个参数的组合被用作评估肺癌预后及存活率更为有效。对于预后良好 (ICs<0.311 mmol/L 和 LDH>1 133 U/L) 的患者，1 年、3 年和 5 年生存率比预后不良的患者均高 2 倍。而 C 反应蛋白 (CRP) 水平可能也会随着肿瘤大小和区域转移而升高。

2.3 尿液 经治疗后 MRD 血浆中 ctDNA 和 CTC 的含量较低，在连续监测病灶进展过程中需要提取相对大容量的血液，尽管是微创但患者仍然会感觉到不适。研究表明外周血中的 cfDNA 能够通过肾屏障并经过尿液排泄^[32]，CHEN 等^[33]对非小细胞肺癌患者匹配的 3 ml 外周血和 8 ml 尿液样本共计 150 份进行分析，从中获得的 cfDNA 数量没有统计学差异。且尿液易于储存和运输，更易于提取大容量样本，从尿液样本中获取关键疾病信息的可能性为补充传统的肿瘤取样方法提供了更多选择。MRD 阳性意味着癌症治疗后血液中可检测到来自肿瘤的 DNA，那么尿液中检测到的 DNA 水平也可以类似地指示肿瘤负担相关性。在先前的报道中利用尿液 DNA 追踪肿瘤特异性突变并针对耐药性给予个体化治疗，临床应用被证明适用于晚期非小细胞肺癌患者^[34]。LI 等^[35]发现治疗后可检测到尿 ctDNA 的存在与肺癌患者的疾病复发明显相关，尿 ctDNA 检测不到的患者有较好的无病生存率，可检测到 ctDNA 的患者 3、6 和 9 个月复发概率对应为 15.6%、6.6% 和 5.1%。表明尿 ctDNA 对疾病复发风险有一定的前瞻性，尤其是对突变 DNA 检测不到的患者进行甄别具有良好的临床实用性。LEE 等^[36]指出在治疗后阶段 EGFR 突变持续阳性的 NSCLC 患者可能存在残余病灶，需要进一步治疗或加强疾病复发监测。特别是 T790M 突变与疾病进展时间缩短和总体生存率降低密切相关。CHEN 等^[33]对 150 例非小细胞肺癌患者分组后发现，尿液 DNAT790M 阳性组患者的总体生存结果明显最差，中位生存率为 30 个月，T790M 阴性组的中位生存率为 34 个月，进一步验证了尿液 DNA 在治疗后患者风险分层和疾病监测中的临床实用性。

2.4 痰液 美国国家癌症研究所 (NCI)^[37]进行了一项肺癌的低剂量螺旋计算机断层扫描和痰细胞学双重筛查研究，双重筛查诊断的 90 例患者中有 18 例 (20%) 痰标本呈癌症阳性，但影像学检查呈阴性，表明痰液在诊断临床上处于缓解期或隐匿期的癌症相比较影像学具有时间优越性，但因为大多数肺癌患者痰液样本量较少，致使其包含的肿瘤细胞数量有限，加之痰液中的黏性黏液成分使得肿瘤源性的 DNA 提取更加困难。

这也是液体活检相对较少使用痰液的原因之一。WANG 等^[38]制备了一种无甲醇黏液溶解溶液 (MS2) 改进从痰中分离肿瘤源性 cfDNA, 实验证明经治疗后患者的痰标本中利用 MS2 提取的 cfDNA 检测 EGFR 突变的灵敏度显著高于经 MS1 (传统的含甲醇的黏液溶解溶液) 分离的同一队列痰标本, 并在一项包括 102 例肺腺癌患者的研究中, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对痰 cfDNA 检测后发现, 30 例患者 (29.4%) 的 EGFR 突变状态呈阳性, 总体灵敏度和特异度分别为 46.2% 和 100.0%。MAO 等^[39]在肺癌患者临床诊断之前发现 10 例原发肿瘤中有 8 例患者的痰液样本中检测到 K-ras 突变和 p53 突变, 这对提高肿瘤基因分型和肿瘤靶向精准治疗、发展围术期个体化治疗具有重要意义。研究证明 miRNAs、mir-21 和 mir-155 的过度表达是肿瘤切除后患者复发、预后及总体生存率的负面因素^[40]。而痰液含有来自肺部和下呼吸道的支气管上皮细胞, 痰液环境下 miRNA 对 RNase 活性具有抗性, 能显著地以稳定形式存在, 并且在储存长达 7 d 的痰液样本中也可检测到^[41]。LIAO 等^[42]发现痰样本中 miRNA 组可以检测 NSCLC, 具有显著的灵敏度和特异度。来自较小气道的腺癌很难通过支气管镜或痰细胞学检查发现, 痰中 miRNA 的表达将为肺癌的 MRD 监测提供一种高准确率的特异性标志物。并在无创的基础上对患者起到早诊断、早治疗的作用。

2.5 胸腔积液 恶性胸腔积液 (MPE) 是中晚期肺癌的一种常见并发症, 是淋巴腺被肿瘤阻塞, 组织液渗出积聚于胸膜腔内, 与患者肿瘤复发、转移显著相关。与组织活检等其他侵入性技术相比, MPE 非常容易收集。此外, 与手术切除标本相比, 肺癌相关 MPE 患者的突变率要高得多^[43]。胸腔积液活检标本的生物标志物可能来自多个肿瘤克隆, 因此其可以同时反映肿瘤以及播散性病变的异质性。同时足够来源的 MPE 为获得评估肿瘤基因组学提供了一个丰富的机会^[44]。MPE 的分子分析代表了一种检测肿瘤驱动基因突变的微创方法, 尤其是当肿瘤组织不可用时, 其可用于临床决策。MPE 可能是提供 EGFR 等基因突变状态有用信息的替代来源。如果 EGFR 基因突变检测可以通过更多可获得的胸腔积液样本实现, 将有利于探索 MRD 在驱动基因阳性和驱动基因阴性两种类型患者中的作用, 并进一步探讨耐药机制, 以及评估能否在影像学之前识别耐药的优越样本。晚期非小细胞肺癌患者的靶向药物治疗也将成为可能, 这将具有重要的临床和实用价值。

2.6 胸腔积液上清液 (MPEs) 晚期非小细胞肺癌患者胸腔积液上清液中的 cfDNA 的肿瘤基因突变丰度显著高于积液肿瘤细胞和血浆游离 DNA 样本, 已成为在检测治疗靶点和肿瘤突变负荷 (TMB) 中优异的替代

品^[45]。在晚期肺癌 MRD 中, 检测驱动基因 EGFR 的突变被用作靶向治疗的指导, TMB 可用于评估免疫治疗的疗效。WANG 等^[46]对肿瘤组织、血浆和 MPEs 的 EGFR 突变状态进行比较, 并将结果与 EGFR-TKI 疗法进行关联, 结果证明在基于 cfDNA 的 EGFR 突变检测方法下肿瘤组织和 MPEs 之间 EGFR 突变灵敏度和特异度的高度一致, 而血浆中的 EGFR 突变率最低。MPEs 中的 EGFR 突变可以预测第一代 EGFR-TKI 治疗的疗效。经 TKI 治疗的 EGFR 突变患者的中位总生存期长于野生型 EGFR 患者, 接受一线或二线 EGFR-TKI 治疗的 MPEs 中 EGFR 突变患者的 ORR 和 DCR 分别为 56% 和 94%, 与基于组织的检测结果一致。因此当两种样本均可用时, 从 MPEs 中提取的游离 DNA 可能是比血浆更好的作为预测肿瘤对 TKIs 反应的生物标志物。同时 YANG 等^[47]观察发现 MPEs 中 EGFR 突变患者的中位 PFS 显著长于野生型 EGFR 患者 (7.33 个月与 2.07 个月)。而 SONG 等^[48]研究了使用肺腺癌患者 MPEs 外泌体 DNA 进行基因检测的可行性, 发现在 MPEs 外泌体 DNA 中发现的 78% 的突变与 MPEs cfDNA 中发现的突变相匹配, 支持其用于基因检测的可靠性。多渠道确定肿瘤基因原始突变状态和监测突变的变化对于肺癌的治疗至关重要。

3 总结与展望

将液体样本衍生的生物标志物应用于监测 MRD、预测肿瘤反应和探索治疗耐药性等临床工作无疑是迫切需要的。液体活检作为一种分析变异的替代方法, 不仅提供了一种非侵入性的方法来提前检测肺癌的改变, 而且还补充了组织活检检测的结果, 使更多的癌症患者能够接受精准治疗。在这个个体化精准医疗时代, MRD 本身仍有很多问题有待进一步解决, 未来的研究有必要确定如何最好地将肿瘤组织活检、临床检查和医学影像与液体活检的基因组学和 MRD 信息结合起来, 从而使多元化液体活检标本分析应用于临床肿瘤工作成为指导临床决策并改善患者预后的一条崭新道路。

作者贡献: 闫星提出研究选题方向, 负责相关内容的文献收集和整理, 并撰写论文初稿; 刘山梅参与文献的收集和整理, 负责论文的修订, 与闫星在文章中所做同等贡献; 刘长宏负责文章的质量控制及审校, 对文章整体负责; 所有作者确认了论文的最终稿。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] KRIS M G, GASPAR L E, CHAFT J E, et al. Adjuvant systemic therapy and adjuvant radiation therapy for stage I to IIIA completely resected non-small-cell lung cancers: American society of clinical oncology/cancer care Ontario clinical practice guideline update [J]. J Clin Oncol, 2017, 35 (25): 2960-2974. DOI: 10.1200/JCO.2017.72.4401.

- [2] 吴一龙, 陆舜, 程颖, 等. 非小细胞肺癌分子残留病灶专家共识 [J]. 循证医学, 2021, 21 (3): 129-135. DOI: 10.12019/j.issn.1671-5144.2021.03.001.
WU Y L, LU S, CHENG Y, et al. Expert consensus of molecular residual disease for non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2021, 21 (3): 129-135. DOI: 10.12019/j.issn.1671-5144.2021.03.001.
- [3] LIANG W H, ZHAO Y, HUANG W Z, et al. Liquid biopsy for early stage lung cancer [J]. J Thorac Dis, 2018, 10 (Suppl 7): S876-881. DOI: 10.21037/jtd.2018.04.26.
- [4] ROLFO C, MACK P C, SCAGLIOTTI G V, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC [J]. J Thorac Oncol, 2018, 13 (9): 1248-1268. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.05.030.
- [5] ROTHWELL D G, AYUB M, COOK N, et al. Utility of ctDNA to support patient selection for early phase clinical trials: the TARGET study [J]. Nat Med, 2019, 25 (5): 738-743. DOI: 10.1038/s41591-019-0380-z.
- [6] NEWMAN A M, BRATMAN S V, TO J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. Nat Med, 2014, 20 (5): 548-554. DOI: 10.1038/nm.3519.
- [7] CHAN H T, NAGAYAMA S, CHIN Y M, et al. Clinical significance of clonal hematopoiesis in the interpretation of blood liquid biopsy [J]. Mol Oncol, 2020, 14 (8): 1719-1730. DOI: 10.1002/1878-0261.12727.
- [8] JIE X X, ZHANG X Y, XU C J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: mechanisms and clinical applications [J]. Oncotarget, 2017, 8 (46): 81558-81571. DOI: 10.18632/oncotarget.18277.
- [9] 何雨笑, 鲁继斌. 循环肿瘤细胞在非小细胞肺癌诊疗中的应用 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29 (3): 535-539. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.03.040.
HE Y X, LU J B. Application of circulating tumor cells in diagnosis and treatment of NSCLC [J]. Journal of Modern Oncology, 2021, 29 (3): 535-539. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.03.040.
- [10] POGGIANA C, ROSSI E, ZAMARCHI R. Possible role of circulating tumor cells in early detection of lung cancer [J]. J Thorac Dis, 2020, 12 (7): 3821-3835. DOI: 10.21037/jtd.2020.02.24.
- [11] O'FLAHERTY J D, GRAY S, RICHARD D, et al. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012, 76 (1): 19-25. DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.10.018.
- [12] LINDSAY C R, BLACKHALL F H, CARMEL A, et al. EPAC-lung: pooled analysis of circulating tumour cells in advanced non-small cell lung cancer [J]. Eur J Cancer, 2019, 117: 60-68. DOI: 10.1016/j.ejca.2019.04.019.
- [13] WU C Y, LEE C L, WU C F, et al. Circulating tumor cells as a tool of minimal residual disease can predict lung cancer recurrence: a longitudinal, prospective trial [J]. Diagnostics (Basel), 2020, 10 (3): E144. DOI: 10.3390/diagnostics10030144.
- [14] CHEN K Z, ZHAO H, SHI Y B, et al. Perioperative dynamic changes in circulating tumor DNA in patients with lung cancer (DYNAMIC) [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25 (23): 7058-7067. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1213.
- [15] TORRES S, GONZÁLEZ Á, CUNQUERO TOMAS A J, et al. A profile on cobas® EGFR Mutation Test v2 as companion diagnostic for first-line treatment of patients with non-small cell lung cancer [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2020, 20 (6): 575-582. DOI: 10.1080/14737159.2020.1724094.
- [16] ZUGAZAGOITIA J, GÓMEZ-RUEDA A, JANTUS-LEWINTRE E, et al. Clinical utility of plasma-based digital next-generation sequencing in oncogene-driven non-small-cell lung cancer patients with tyrosine kinase inhibitor resistance [J]. Lung Cancer, 2019, 134: 72-78. DOI: 10.1016/j.lungcan.2019.05.032.
- [17] TIE J, WANG Y X, TOMASETTI C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer [J]. Sci Transl Med, 2016, 8 (346): 346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
- [18] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. J Biol Chem, 1987, 262 (19): 9412-9420.
- [19] BI H H, REN D Q, ZHANG J, et al. Advances in exosomes in the pathogenesis and diagnosis of lung cancer [J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2020, 23 (7): 589-596. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.104.18.
- [20] MAHGOUB E O, RAZMARA E, BITARAF A, et al. Advances of exosome isolation techniques in lung cancer [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47 (9): 7229-7251. DOI: 10.1007/s11033-020-05715-w.
- [21] HUANG S H, LI Y, ZHANG J, et al. Epidermal growth factor receptor-containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells [J]. Cancer Invest, 2013, 31 (5): 330-335. DOI: 10.3109/07357907.2013.789905.
- [22] HU Z B, CHEN X, ZHAO Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28 (10): 1721-1726. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.9342.
- [23] RABINOWITS G, GERÇEL-TAYLOR C, DAY J M, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10 (1): 42-46. DOI: 10.3816/CLC.2009.n.006.
- [24] YOSHIZAWA J M, SCHAFER C A, SCHAFER J J, et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26 (4): 781-791. DOI: 10.1128/CMR.00021-13.
- [25] LOO J A, YAN W, RAMACHANDRAN P, et al. Comparative human salivary and plasma proteomes [J]. J Dent Res, 2010, 89

- (10) : 1016–1023. DOI: 10.1177/0022034510380414.
- [26] GU X W, HE J F, JI G L. Combined use of circulating tumor cells and salivary mRNA to detect non-small-cell lung cancer [J]. *Medicine*, 2020, 99 (8) : e19097. DOI: 10.1097/MD.00000000000019097.
- [27] SKALLEVOLD H E, VALLENARI E M, SAPKOTA D. Salivary biomarkers in lung cancer [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 6019791. DOI: 10.1155/2021/6019791.
- [28] MACÍAS M, ALEGRE E, ALKORTA-ARANBURU G, et al. The dynamic use of EGFR mutation analysis in cell-free DNA as a follow-up biomarker during different treatment lines in non-small-cell lung cancer patients [J]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 7954921. DOI: 10.1155/2019/7954921.
- [29] DA CUNHA SANTOS G, SHEPHERD F A, TSAO M S. EGFR mutations and lung cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 49–69. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130206.
- [30] LI F, WEI F, HUANG W L, et al. Ultra-short circulating tumor DNA (uscDNA) in plasma and saliva of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (8) : E2041. DOI: 10.3390/cancers12082041.
- [31] SU Y H, WANG M J, BRENNER D E, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer [J]. *J Mol Diagn*, 2004, 6 (2) : 101–107. DOI: 10.1016/S1525-1578 (10) 60497-7.
- [32] BEL'SKAYA L V, SARF E A, KOSENOK V K. Survival rates of patients with non-small cell lung cancer depending on lymph node metastasis: a focus on saliva [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11 (5) : 912. DOI: 10.3390/diagnostics11050912.
- [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*, 2017, 19 (3) : 332–340. DOI: 10.1007/s12094-016-1534-9.
- [34] FRANOVIC A, RAYMOND V M, ERLANDER M G, et al. Urine test for EGFR analysis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9 (Suppl 13) : S1323–1331. DOI: 10.21037/jtd.2017.06.144.
- [35] LI F J, HUANG J, JI D Y, et al. Utility of urinary circulating tumor DNA for EGFR mutation detection in different stages of non-small cell lung cancer patients [J]. *Clin Transl Oncol*, 2017, 19 (10) : 1283–1291. DOI: 10.1007/s12094-017-1669-3.
- [36] LEE Y, LEE G K, LEE Y S, et al. Clinical outcome according to the level of preexisting epidermal growth factor receptor T790M mutation in patients with lung cancer harboring sensitive epidermal growth factor receptor mutations [J]. *Cancer*, 2014, 120 (14) : 2090–2098. DOI: 10.1002/encr.28711.
- [37] FONTANA R S, SANDERSON D R, TAYLOR W F, et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1984, 130 (4) : 561–565. DOI: 10.1164/arrd.1984.130.4.561.
- [38] WANG Z, ZHANG L, LI L, et al. Sputum cell-free DNA: valued surrogate sample for detection of EGFR mutation in patients with advanced lung adenocarcinoma [J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22 (7) : 934–942. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.04.208.
- [39] MAO L, HRUBAN R H, BOYLE J O, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer [J]. *Cancer Res*, 1994, 54 (7) : 1634–1637.
- [40] YANG M M, SHEN H C, QIU C, et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49 (3) : 604–615. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.09.031.
- [41] XIE Y, TODD N W, LIU Z Q, et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2010, 67 (2) : 170–176. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.04.004.
- [42] LIAO J, SHEN J, LENG Q, et al. MicroRNA-based biomarkers for diagnosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11 (3) : 762–768. DOI: 10.1111/1759-7714.13337.
- [43] WU S G, GOW C H, YU C J, et al. Frequent epidermal growth factor receptor gene mutations in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma [J]. *Eur Respir J*, 2008, 32 (4) : 924–930. DOI: 10.1183/09031936.00167407.
- [44] PORCEL J M. Malignant pleural effusions because of lung cancer [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2016, 22 (4) : 356–361. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000264.
- [45] SOROLLA M A, SOROLLA A, PARISI E, et al. Diving into the pleural fluid: liquid biopsy for metastatic malignant pleural effusions [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (11) : 2798. DOI: 10.3390/cancers13112798.
- [46] WANG S H, CHEN H X, ZHONG J, et al. Comparative study of EGFR mutations detected in malignant pleural effusion, plasma and tumor tissue in patients with adenocarcinoma of the lung [J]. *Lung Cancer*, 2019, 135: 116–122. DOI: 10.1016/j.lungcan.2019.05.018.
- [47] YANG J, LEE O J, SON S M, et al. EGFR mutation status in lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion and efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50 (3) : 908–916. DOI: 10.4143/crt.2017.378.
- [48] SONG Z, WANG W, LI M, et al. Cytological-negative pleural effusion can be an alternative liquid biopsy media for detection of EGFR mutation in NSCLC patients [J]. *Lung Cancer*, 2019, 136: 23–29. DOI: 10.1016/j.lungcan.2019.08.004.

(收稿日期: 2022-07-11; 修回日期: 2022-10-11)

(本文编辑: 崔莎)