

循环肿瘤 DNA 在早期结肠癌诊疗中的临床应用

林健梅^{1,3}, 韦丽丽^{1,3}, 王豪华^{2,3*}

1. 中山大学附属第六医院 临床检验科, 广东 广州 510655

2. 中山大学附属第六医院 放射肿瘤科, 广东 广州 510655

3. 广东省结直肠盆底疾病研究重点实验室, 广东 广州 510655

【摘要】 早期结肠癌患者接受根治性手术治疗后仍有较高复发风险,一方面缺乏理想的术后监测手段,另一方面是治疗方式的局限性。随着液体活检技术的不断进步,通过检测患者血浆循环肿瘤 DNA,可用于监测早期结肠癌的术后复发及指导术后辅助治疗。本文围绕血浆循环肿瘤 DNA 检测在早期结肠癌诊疗中的临床应用展开综述。

【关键词】 循环肿瘤 DNA; 结肠癌; 辅助化疗

Clinical application of circulating tumor DNA in the diagnosis and treatment of early colon cancer

Lin Jianmei^{1,3}, Wei Lili^{1,3}, Wang Haohua^{2,3*}

1. Department of Clinical Laboratory, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, China

2. Department of Radiation Oncology, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Colorectal and Pelvic Floor Diseases, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, China

*Corresponding author: Wang Haohua, E-mail: wanghaohua0818@163.com

【Abstract】 Patients with early-stage colon cancer still have a high chance of recurrence after radical surgery. It is due to the lack of ideal postoperative monitoring methods, and the limitations of treatment methods. With the continuous advancement of liquid biopsy technology, the detection of circulating tumor DNA (ctDNA) in patients' plasma can be used to monitor postoperative recurrence of early colon cancer and guide postoperative adjuvant therapy. This article reviews the clinical application of plasma ctDNA detection in the diagnosis and treatment of early colon cancer.

【Key words】 Circulating tumor DNA; Colon cancer; Adjuvant chemotherapy

结肠癌作为全球常见的癌症之一,每年有超过 109 万新诊断病例,有超过 55 万的新死亡病例^[1]。它的 5 年总生存率为 64.4%^[2]。目前对早期结肠癌患者的标准治疗包括手术切除肿瘤,然后对有高复发风险的患者进行辅助化疗(adjuvant chemotherapy, ACT)^[3-5]。尽管如此,接受根治性手术治疗的结肠癌患者仍有 20%~35%的复发风险,其中 80%的肿瘤复发发生在原发肿瘤手术根治性切除术后的前 3 年内,95%的复发发生在术后前 5 年内^[6-7]。肿瘤复发包括腔内、局部和远处转移复发。早期发现肿瘤复发,特别是孤

立性局部或远处复发,能与与癌症相关的死亡率降低 9%~13%^[8-9]。

早期结肠癌接受根治性手术治疗后的随访包括癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)监测和计算机断层扫描(computed tomography, CT)。CEA 是目前指南推荐的唯一用于结肠癌术后监测的血液生物标志物,能比 CT 更早地发现肿瘤复发。尽管 CEA 被推荐使用,但对检测肿瘤复发的敏感度不足。当截断值为 10 μg/L 时,CEA 的敏感度和特异度分别为 68%(95%CI:53%~79%)和 97%(95%CI:90%~99%)。已知一些常见的因素会降低它的特异度(例如吸烟、感染、慢性阻塞性肺病、炎症肠病、肝病等)^[10]。此外,

* 通信作者:王豪华,电子邮箱:wanghaohua0818@163.com

CEA 半衰期较长,变化趋势较慢,无法在早期提示肿瘤复发。早期发现肿瘤无症状复发,能增加复发时再次行治愈性手术的可能性,是提高总生存率的关键策略。

近年来受到广泛关注的一种有前途的生物标志物是循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)。ctDNA 是死亡的癌细胞释放到血液中的 DNA 片段,理论上应该包含与它们起源的癌细胞相同的遗传和表观遗传变化。越来越多的证据表明,ctDNA 可用于评估术后肿瘤的复发^[11-12]。对于接受辅助治疗的患者,该标志物的无创性和动态性也可以实时反映辅助治疗的疗效。本文主要对 ctDNA 在早期结肠癌中的临床应用进行阐述。

1 ctDNA 概述

外周血中循环的游离 DNA(cell-free DNA, cfDNA)是在健康个体的非细胞血液成分中发现的片段化 DNA,它主要通过细胞坏死和凋亡释放,但也可能通过外泌体分泌^[13]。它长度约 166 bp,这与包裹在核小体周围的 DNA 片段的长度一致^[14]。在癌症患者中,只有一小部分 cfDNA(通常为 0.01%~5.00%)是由肿瘤细胞释放到血液中的 ctDNA^[15]。ctDNA 片段大小不等,近期研究表明它较非肿瘤性 cfDNA 短^[16]。ctDNA 来源于肿瘤细胞,它是由肿瘤细胞坏死时释放进入血液循环中^[17]。一旦进入循环,ctDNA 会迅速从血液中被清除,这导致其半衰期较短,可从 15 min 至几个小时不等^[18-19];这些特性使其在临床的诊疗和预后评估等方面都具有重要意义。

2 ctDNA 在早期结肠癌中的临床应用

2.1 监测早期结肠癌术后复发 在结肠肿瘤组织中 KRAS 的突变状态与 ctDNA 之间高度一致^[20-21],ctDNA 有时可能包含在原发灶中未检测到的 KRAS 突变。来源于肿瘤细胞中的 ctDNA,因其半衰期较短,从而能实时反映体内的肿瘤负荷情况,并且特异度非常高,与 CEA 等随访检测项目相比,ctDNA 预测结肠癌术后复发的价值更高。它能更早地提示肿瘤复发,为医生进行临床干预提供充足的时间,以便获得更好的临床结局。

Tie 等^[22]收集了来自 230 例行根治性切除术后 II 期结肠癌患者的 1046 份血浆样本,并使用基于大规模并行测序的方法来检测 ctDNA,在其中 34 例结肠癌复发患者中,有 27 例患者可获得连续 3 个月的 ctDNA 和 CEA 直至影像学复发;在影像学复发时,ctDNA 阳性率(85%,23/27)比 CEA 升高(41%,11/27)更频繁($P=0.002$)。ctDNA 升高至影像学复发之间的中位时间为 167 d,显著长于 CEA 的 61 d。该研究表明,ctDNA 比 CEA 平均提前了 106 d 提示肿瘤复发。Thomas 等^[23]对 130 例 I~III 期结肠癌患者的进一步研究表明,术后 30 d 时,ctDNA 阳性患者的复发可能性是 ctDNA 阴性患者的 7 倍($HR=7.2;P<0.001$)。在连续监测期间,ctDNA 阳性患者出现疾病复发的可能性是 ctDNA 阴性

患者的 43 倍($HR=43.5;95\%CI 9.8\sim 193.5;P<0.00$)。新辅助化疗后 ctDNA 阳性的 7 例患者均出现复发。与标准影像学监测相比,连续 ctDNA 检测显示疾病复发时间提前了 16.5 个月(平均 8.7 个月;范围 0.8~16.5 个月)。Tarazona 等^[24]对 132 例局限期结肠癌患者手术及辅助治疗后,每 4 个月监测 1 次 ctDNA,持续长达 5 年。辅助治疗后 ctDNA 阳性率是较差的无病生存($HR=10.02;95\%CI: 9.202\sim 307.3;P<0.0001$)的影响因素,并且在放射学复发之前检测到 ctDNA 的中位数为 11.5 个月。

以上研究表明,术后和辅助治疗后 ctDNA 评估在非转移性结肠癌的各个阶段的预后价值。值得注意的是,由于研究中包括的疾病阶段、ctDNA 检测和分析前变量(例如评估的血浆量和采血时间)的不同,ctDNA 检测率和预后影响因研究而异。尽管如此,这些研究表明,通过将纵向 ctDNA 检测纳入监测计划,可以更早地检测到复发。然而,提出复发的诊断是否会影响生存结果是未来研究需要回答的关键问题。

2.2 指导早期结肠癌术后辅助治疗 目前早期结肠癌的标准治疗是手术,如果有辅助化疗的指征,则随后进行 6 个月的辅助化疗。虽然辅助化疗在 III 期结肠癌中的益处明确,但辅助化疗在 II 期结肠癌中的作用仍然存在很多争议,并不推荐用于所有患者。临床指南目前推荐对 II 期结肠癌的辅助化疗需要考虑其他临床病理学参数来决定是否手术。主要预后因素包括 pT₄ 分期、穿孔和淋巴结取样 < 12 枚,次要预后参数包括高组织学分级、淋巴、血管或神经周围浸润、肿瘤表现为阻塞或术前 CEA 水平高^[25,26]。指南推荐的理由是有不良预后因素的患者可能受益于辅助化疗。然而,这种选择性治疗预后不良的 II 期患者的方法尚未最终证明可以提高总生存率^[27-30]。为此,临床上需要更好的预后和/或预测性生物标志物,以帮助确定最终能从辅助治疗中受益的患者。

法国的 IDEA-FRANCE III 期临床试验招募 2010 例患者,其中有 1345 个可用的血液样本用于 ctDNA 测试,在这些患者中,有 805 例患者在开始化疗前采集血液样本并通过数字液滴 PCR 检测 2 种甲基化标志物(WIF1 和 NPY)来检测 ctDNA。结果发现其中有 109 例患者的 ctDNA 呈阳性,占比 13.5%。这些术后 ctDNA 阳性的患者,进行 6 个月的基于奥沙利铂的辅助治疗比 3 个月的治疗效果更佳($HR=0.50,95\%CI:0.27\sim 0.95,P=0.033$)^[31]。

ctDNA 在局部晚期结肠癌中的临床应用需要前瞻性随机临床试验,以显示使用 ctDNA 指导辅助治疗对临床结果的有意义影响。ctDNA 指导 ctDNA 阳性和阴性患者的治疗选择将取决于正在研究的疾病阶段和当前的标准治疗,通常包括对 ctDNA 阳性患者的升级治疗和 ctDNA 阴性患者的降级方案。

例如,澳大利亚 DYNAMIC 研究将行根治性切除的 II 期结肠癌患者随机分配到标准治疗组,其中辅助化疗的使

用与否由临床医生根据常规临床病理特征决定;或 ctDNA 指导治疗组,即术后 ctDNA 结果为阳性的患者将接受辅助化疗(FOLFOX/CAPOX 或单药氟尿嘧啶),而术后 ctDNA 结果为阴性的患者将仅通过观察进行治疗。DYNAMIC-III 研究是一项类似的策略试验,旨在探索 ctDNA 引导的降级(缩短持续时间或减少药物数量)或升级(延长持续时间或增加药物数量)辅助化疗方法在 III 期结肠癌中的价值。

英国的 TRACC 研究^[32]是一项类似的基于 ctDNA 的随机策略试验,该研究招募了高危 II 期或 III 期结肠癌患者。随机分为标准治疗组和 ctDNA 指导治疗组,不同点在于本研究将在术后 ctDNA 初始阴性的患者中经过初始降级治疗(无化疗或卡培他滨)3 个月后,重复 ctDNA 分析,如 ctDNA 转为阳性,将升级为 3 个月的 CAPOX。

此外,还有基于 ctDNA 的分组策略,包括 NRGGI-005 (COBRA)^[33]、CIRCULATE-AIO^[34]和 CIRCULATE-PRODIGE70 研究^[35],即将术后 ctDNA 阳性的 II 期结肠癌患者,随机分为标准治疗组(观察)和试验组(辅助化疗),三项试验的主要目的是证明与单独观察相比,接受辅助化疗(FOLFOX 方案/CAPOX 方案或卡培他滨)的术后 ctDNA 阳性患者的无复发生存获益。另外,日本的 VEGA 研究是将术后 ctDNA 阴性的高危 II 期和低危 III 期结肠癌患者随机分配到对照组(3 个月的 CAPOX 方案)或试验组(观察),来证明在术后 ctDNA 阴性患者中,观察组的疗效不劣于 3 个月的 CAPOX 方案辅助化疗^[36]。

科学家们基于 ctDNA 的二线辅助治疗试验也进行了探索,如美国的 ACT-3 研究和日本的 ALTAIR 试验^[36]。在 ACT-3 试验中,完成 3~6 个月的 FOLFOX 方案或 CAPOX 方案辅助治疗后 ctDNA 阳性的患者被随机分配接受监测(对照组)或几种分子分层的“二线”辅助治疗(试验组),包括 FOLFIRI(用于微卫星稳定和 BRAF 野生型肿瘤)、encorafenib/binimetinib/西妥昔单抗(用于 BRAFV600E 突变肿瘤)和纳武利尤单抗(用于微卫星不稳定肿瘤)。ALTAIR 研究将评估二线辅助三氟尿苷/替吡嘧啶对接受 3 个月辅助 CAPOX 方案后 ctDNA 仍呈阳性的患者的疗效。

3 总结和展望

ctDNA 分析提供了一种实时、微创方法,用于检测临床相关的基因组改变,有助于确定准确的治疗方法,这有可能从根本上改变非转移性结肠癌的辅助治疗模式。除了病理分期外,术后 ctDNA 分析不仅可以提供更精确的复发风险分层,还可以根据 ctDNA 结果定制辅助治疗的强度和持续时间,而且连续 ctDNA 分析还可以提供早期实时读数用以判断辅助治疗疗效,提高辅助试验和新药开发的效率。虽然临床医生和科学家正在进行努力,以证明 ctDNA 的临床效用并提高 ctDNA 检测的敏感度,研究人员还应寻求标准化 ctDNA 检测特征和分析前变量,以确保检测结果的可重复性。

可以预见,随着液体活检技术的不断进步及对其临床价值的进一步探索,ctDNA 终将会在实践中广泛应用,成为结肠癌精准医疗的重要组成部分。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] SIEGEL RL, MILLER KD, FEDEWA SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
- [3] ANDRE T, BONI C, MOUNEDJI-BOUDIAF L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer [J]. N Engl J Med, 2004, 350(23): 2343-2351.
- [4] HALLER D G, TABERNERO J, MAROUN J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(11): 1465-1471.
- [5] ANDRE T, MEYERHARDT J, IVESON T, et al. Effect of duration of adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer (IDEA collaboration): final results from a prospective, pooled analysis of six randomised, phase 3 trials [J]. Lancet Oncol, 2020, 21(12): 1620-1629.
- [6] SEO SI, LIM SB, YOON YS, et al. Comparison of recurrence patterns between ≤ 5 years and > 5 years after curative operations in colorectal cancer patients [J]. J Surg Oncol, 2013, 108(1): 9-13.
- [7] SARGENT D, SOBRERO A, GROTHEY A, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(6): 872-877.
- [8] RENEHAN AG, EGGER M, SAUNDERS MP, et al. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials [J]. BMJ, 2002, 324(7341): 813.
- [9] PITA - FERNANDEZ S, ALHAYEK - AI M, GONZALEZ - MARTIN C, et al. Intensive follow-up strategies improve outcomes in nonmetastatic colorectal cancer patients after curative surgery: a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Oncol, 2015, 26(4): 644-656.
- [10] RUIBAL MORELL A. CEA serum levels in non-neoplastic disease [J]. Int J Biol Markers, 1992, 7(3): 160-166.
- [11] TIE J, COHEN J D, WANG Y, et al. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer [J]. JAMA Oncol, 2019, 5(12): 1710-1717.
- [12] TIE J, COHEN J D, WANG Y, et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally

- advanced rectal cancer: a prospective biomarker study [J]. *Gut*, 2019, 68(4): 663–671.
- [13] THIERRY AR, EL MESSAOUDI S, GAHAN PB, et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(3): 347–376.
- [14] BRONKHORST AJ, UNGERER V, HOLDENRIEDER S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management [J]. *Biomol Detect Quantif*, 2019, 17: 100087.
- [15] BARDELLI A, PANTEL K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet) [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 172–179.
- [16] MOULIERE F, ROSENFELD N. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(11): 3178–3179.
- [17] JAHR S, HENTZE H, ENGLISCH S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1659–1665.
- [18] SUMBAL S, JAVED A, AFROZE B, et al. Circulating tumor DNA in blood: Future genomic biomarkers for cancer detection [J]. *Exp Hematol*, 2018, 65: 17–28.
- [19] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985–990.
- [20] LIEBS S, KEILHOLZ U, KEHLER I, et al. Detection of mutations in circulating cell-free DNA in relation to disease stage in colorectal cancer [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(8): 3761–3769.
- [21] HAUPTS A, ROTH W, HARTMANN N. Liquid biopsy in colorectal cancer: An overview of ctDNA analysis in tumour diagnostics [J]. *Pathologie*, 2019, 40(Suppl 3): 244–251.
- [22] TIE J, WANG Y, 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.
- [23] REINERT T, HENRIKSEN T V, CHRISTENSEN E, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(8): 1124–1131.
- [24] TARAZONA N, GIMENO-VALIENTE F, GAMBARDELLA V, et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(11): 1804–1812.
- [25] ARGILES G, TABERNERO J, LABIANCA R, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(10): 1291–1305.
- [26] YOSHINO T, ARGILES G, OKI E, et al. Pan-Asian adapted ESMO Clinical Practice Guidelines for the diagnosis treatment and follow-up of patients with localised colon cancer [J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(12): 1496–1510.
- [27] YOTHERS G, O'CONNELL MJ, ALLEGRA CJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(28): 3768–3774.
- [28] TOURNIGAND C, ANDRE T, BONNETAIN F, et al. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the multicenter international study of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin in the adjuvant treatment of Colon Cancer trial [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(27): 3353–3360.
- [29] O'CONNOR ES, GREENBLATT DY, LOCONTE NK, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(25): 3381–3388.
- [30] FIGUEREDO A, CHARETTE ML, MAROUN J, et al. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(16): 3395–3407.
- [31] TAIEB J, TALY V, VERNEREY D, et al. Analysis of circulating tumour DNA (ctDNA) from patients enrolled in the IDEA-FRANCE phase III trial: Prognostic and predictive value for adjuvant treatment duration [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30: v867.
- [32] ANANDAPPA G, STARLING N, PECKITT C, et al. TRACC: Tracking mutations in cell-free DNA to predict relapse in early colorectal cancer—A randomized study of circulating tumour DNA (ctDNA) guided adjuvant chemotherapy versus standard of care chemotherapy after curative surgery in patients with high risk stage II or stage III colorectal cancer (CRC) [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38: TPS4120–TPS4120.
- [33] VAN K M, GREG Y, SCOTT K, et al. NRG-GI005 (COBRA): Phase II/III study of circulating tumor DNA as a predictive biomarker in adjuvant chemotherapy in patients with stage II colon cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(4_suppl): TPS261–TPS261.
- [34] GUNNAR F, ANKE R-S, ANDREA T, et al. Circulating tumor DNA-based decision for adjuvant treatment in colon cancer stage II evaluation: (CIRCULATE-trial) AIO-KRK-0217 [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(4_suppl): TPS273–TPS273.
- [35] TAÏEB J, BENHAIM L, LAURENT PUIG P, et al. Decision for adjuvant treatment in stage II colon cancer based on circulating tumor DNA: The CIRCULATE-PRODIGE 70 trial [J]. *Dig Liver Dis*, 2020, 52(7): 730–733.
- [36] TANIGUCHI H, NAKAMURA Y, KOTANI D, et al. CIRCULATE-Japan: Circulating tumor DNA-guided adaptive platform trials to refine adjuvant therapy for colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(7): 2915–2920.