

液体活检技术在肿瘤诊断中的最新研究进展

夏艳艳, 沈 瀚, 许红攀, 李智洋 (南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京 210008)

摘要: 肿瘤的死亡率居高不下。早期诊断对提高肿瘤患者的生存率, 改善预后至关重要。液体活检技术作为一种新型的生物标志物检测技术已成为近年来临床关注的热点。液体活检的研究内容包括循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤 DNA (circulating tumour DNA, ctDNA) 和外泌体, 具有操作方便快捷、能反复获取、易于实时监控等优点。全文就以上标志物在肿瘤早期诊断中的应用价值以及存在的优势和局限性进行综述, 以期肿瘤患者早期诊断提供新方法。

关键词: 肿瘤; 液体活检; 循环肿瘤细胞; 循环肿瘤 DNA; 外泌体

中图分类号: R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 03-157-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.03.037

Latest Research Progress of Liquid Biopsy in Tumor Diagnosis

XIA Yan-yan, SHEN Han, XU Hong-pan, LI Zhi-yang

(Gulou Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: The mortality rate of tumors remains high. Early diagnosis is essential to improve the survival and the prognosis rate of tumor. Liquid biopsy as a new type of biomarker has become a hot spot of clinical concern in recent years. The research content of liquid biopsy includes circulating tumor cells (CTC), circulating tumor DNA (ctDNA) and exosomes. It has the advantages of convenient and quick operation, repeated acquisition, and easy real-time monitoring. This article reviews the application value of the above markers in the early diagnosis of tumor, as well as their advantages and limitations, with a view to providing new methods for early diagnosis of tumor.

Keywords: tumor; liquid biopsy; CTC; ctDNA; exosomes

恶性肿瘤是严重危害人类健康的重大疾病, 其发病率和死亡率居高不下^[1]。由于肿瘤早期症状隐匿且多样化, 很多患者在首次诊断时已属肿瘤晚期^[2]。癌症的预后与病程有着密切关联, 临床研究表明, 原位癌治愈率达 90% 以上, I 期癌症患者的 5 年生存率达 60%~90%, II 期患者的 5 年生存率约 50%, 而 III b 和 IV 期患者的 5 年生存率仅 5%~20%, 提示早期发现、诊断是改善肿瘤预后的关键^[3]。因此, 如何提高肿瘤早期诊断水平已成为肿瘤防治工作中面临的紧迫任务。

目前肿瘤的诊断技术主要包括肿瘤标志物、计算机断层摄影 (computed tomography, CT)、组织活检。肿瘤标志物检测虽然操作简单, 但是其诊断的特异度和敏感度很低, 只有 30% 和 18%~70%^[4]。虽然 CT 针对早期肿瘤检出率能达到 40%~60%, 但其假阳性率较高 (达到 50% 以上), 常导致患者过多的辐射暴露和沉重的心理负担, 甚至不必要的手术带来的身体及经济负担^[5]。组织活检是确认的金标准, 但是有创的侵入性操作会对患者造成生理负担和心理影响, 同时由于其只能针对少数部分进

行取材, 穿刺活检也未必能获得准确性信息^[6]。因此发展敏感度及特异度更高, 更加精准、无创、简便地肿瘤早期筛查技术是临床亟待解决的重大科学问题。

液体活检是对患者外周血液进行检测分析, 获得患者肿瘤相关信息的一项新兴技术, 主要包括循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤 DNA (circulating tumour DNA, ctDNA) 和外泌体。液体活检具有操作方便快捷、能反复获取、易于实时监控等优点, 为肿瘤的早期诊断提供了新方法。以下就液体活检技术在肿瘤早期诊断中的应用价值以及存在的优势和局限性进行综述, 以期肿瘤患者早期诊断提供新方法。

1 液体活检中 CTC 在肿瘤诊断中的应用

CTC 是肿瘤细胞从原发部位分离, 进入血液循环, 并可以通过血液循环播散并进行远处转移。研究表明, CTC 在肿瘤直径 < 0.1 cm 时就已经表现出异常, 在时间上比传统影像学早 6~9 周^[7]。YU 等^[8]通过磁珠富集 CTC, 再标记肿瘤特异度配体叶酸进行 PCR 检测, 结果显示该方法诊断非小细胞肺癌

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81700790)。

作者简介: 夏艳艳 (1989-), 女, 硕士研究生, 检验技师, 研究方向: 生化指标影响因素, E-mail:xiayanyansy@qq.com。

通讯作者: 李智洋 (1979-), 男, 博士研究生, 研究员, 研究方向: 肿瘤标志物检测技术的研究。E-mail:843731079@qq.com。

(non small cell lung cancer, NSCLC) 的敏感度为 73.2%，特异度为 84.1%，但是对 I 期 NSCLC 患者的诊断敏感度只有 67.2%，仍旧有 1/3 的漏诊率。这主要是由于 CTC 在血液中的含量极低（一般患者 10 ml 血液中只有 1~10 个 CTC）、半衰期短所致，此外目前缺乏可用的特异度标志物来识别 CTC，容易出现假阳性和假阴性的情况^[9]。

2 液体活检中 ctDNA 在肿瘤诊断中的应用

ctDNA 也是肿瘤诊断中研究的热点。深度测序检测 ctDNA 显示^[10]，在 72% 的患者中，ctDNA 可早于影像学 5.2 个月检测到肿瘤，并且在首次治疗后检测复发率的准确度达到 94%。早期肿瘤患者 ctDNA 等位基因移位和杂合性丢失频繁发生，因此检测 ctDNA 能够发现肿瘤早期基因的改变^[11]。但是 ctDNA 代表的是死细胞的信息^[12]，半衰期仅有 2 h^[13]；而且含量低，约占整个循环 DNA 的 1%，甚至只有 0.01%^[14]，分离不当还会造成背景值过高，而影响检测的灵敏度。

3 液体活检中外泌体在肿瘤诊断中的应用

3.1 外泌体作为肿瘤标志物的优势 外泌体可以在细胞间转运癌基因和蛋白质，在肿瘤形成、生长、转移和耐药中起到关键作用^[15]。作为肿瘤标志物的优势体现在：①数量多，在血清中外泌体浓度可达到 3×10^6 个/ μl ^[16]，平均每个肿瘤细胞可释放 530 个外泌体/24 h^[17]；②信息丰富，非常类似于肿瘤细胞。外泌体膜表面也有着和细胞膜同样的蛋白，可以代表其亲本细胞的特征和状态^[18]；③易于长期保存和去除干扰。半衰期长，有磷脂双分子层的保护而不被蛋白酶和核酸酶降解，并且只要分离外泌体就可以去除干扰^[19]；④无创检测。外泌体可以穿过内皮进入循环系统，因此在几乎所有的体液中可以检测到^[20]，与组织活检相比，外泌体是个性化医疗的有效生物标志物。

外泌体相关蛋白、miRNA 等都可以作为肿瘤检测的标志物。采用表面增强拉曼光谱对肺癌患者外泌体进行分析，结果显示该方法区分肺癌和正常人外泌体的敏感度为 95.3%，特异度为 97.3%^[21]，但表面增强拉曼光谱需要特定的设备，而且仪器环境轻微震动会导致光学检测结果出现较大偏差。VANNI 等^[22]研究发现肺癌患者血液外泌体来源的 miR-25 和 miR-223 的表达水平较正常人升高，而 let-7f, miR-20b 和 miR-30e-3p 的表达水平前者较后者明显降低，这种差异性表达为肺癌的诊断带来潜在应用价值。因此，对肺癌患者的外泌体进行检测，将为肺癌患者的诊断提供更加科学的工具。然而目前针对外泌体 miRNA 肿瘤标志物的检测都是连同正常外泌体 miRNA 一起分析的，导致少量的肿瘤

外泌体中过表达 miRNA 信号常被噪声淹没^[23]。而外泌体膜表面蛋白反映其来源细胞的特征和状态，可借助亲和结合直接特异检测，因此发展以肿瘤外泌体表面特异蛋白为靶标的检测方法具有重要意义。3.2 以外泌体表面蛋白为靶标的检测方法进展 传统检测方法如蛋白印迹和酶联免疫法，操作复杂，敏感度极低，不适合临床推广^[24]。为了解决这些问题，ZONG 等^[25]采用磁珠捕获外泌体，再与结合在纳米棒上的探针相结合，利用表面增强拉曼散射检测肿瘤来源外泌体；ZHAO 等^[26]利用微流控芯片实现了外泌体表面多个蛋白的同时检测；JEONG 等^[27]采用磁珠直接捕获血清中的外泌体，利用电化学法分析了多种蛋白质；DOLDAN 等^[28]报道了一种基于电化学“三明治”免疫夹心的方法，用来定量检测外泌体。

核酸适配体 (aptamer) 具有与抗体相似的高亲和性，特异度高，识别能力强，可以特异地将肿瘤外泌体与正常外泌体区分开^[29]。XIA 等^[30]将针对 CD63 蛋白的 Aptamer 整合到单壁碳纳米管上，利用可视化的比色反应来检测乳腺癌来源外泌体；ZHOU 等^[31]将外泌体 CD63 蛋白特异性 Aptamer 固定在金电极表面并整合到微流体装置上，利用电化学生物传感器定量检测肝癌外泌体；JIANG 等^[32]利用金纳米粒子和外泌体竞争性的与 Aptamer 结合，导致金纳米粒子的聚合或者解聚，从而形成可视化的比色反应来检测外泌体；CHEN 等^[33]基于荧光共振能量转移 Aptamer 传感，将外泌体固定在上转换纳米粒子和金纳米棒之间进行检测；WANG 等^[34]报道了一种增强电化学 Aptamer 传感器，它利用 DNA 纳米四面体结构捕获 Aptamer，并固定在金电极上，在加入外泌体后发生氧化还原反应，并通过 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{KCl}$ 覆盖住整个电极来产生信号放大，纳米四面体结构有效地阻止了 Aptamer 在电极上容易聚集、缠结的现象，因此在检测外泌体时可产生更强、更稳定的检测信号。表 1 总结了外泌体的检测方法。

4 总结和展望

肿瘤的早期诊断对肿瘤的预后和 5 年生存率有着重要作用，然而目前的早期诊断技术难以满足临床需求。液体活检技术作为无创的新兴的肿瘤检测方法，在肿瘤的早期诊断、预后监测中都有重大的临床价值。外泌体与 CTC、ctDNA 都属于液体活检的重要组成部分，但是外泌体具有分布广泛、来源于活细胞、分离鉴定相对简单等优点，受到越来越多的关注。虽然外泌体在肿瘤诊断中有巨大应用价值，但仍存在很大的探索空间。目前外泌体诊断研究的标本量较少，仍需大样本、多中心的临床研究。而且外泌体表面蛋白的检测方法大都是利用亲和分

子特异性结合后进行检测,因此在应用该类方法进行临床检测时,比肿瘤来源外泌体多很多的正常外泌体会竞争性地占据捕获分子,导致无法结合肿瘤来源外泌体,而使检测灵敏度降低,因此如何保证

所有肿瘤来源外泌体均能与特异的识别分子结合,对肿瘤的早期筛查具有非常重要的意义。同时将外泌体与肿瘤相关的其他检测指标联合检测,或许能取得更好的诊断效能。

表 1 外泌体表面蛋白检测方法

方法	检测靶标	捕获基质	检测原理	信号检测方法	检测限 (个/ml)	缺点
微流控法 ^[26]	EpCAM	免疫磁珠包被 CD9 抗体	免疫夹心	荧光染料	7.5×10^5	连同正常外泌体一起捕获,导致竞争性抑制了肿瘤来源外泌体与捕获抗体结合
磁-电化学传感器 ^[27]	EpCAM, CD24, EGFR, MUC18, HER2, CA125	免疫磁珠包被 CD63 抗体	免疫夹心	辣根过氧化物酶 (HRP)	3×10^7	同上
单粒子干涉反射成像传感器 ^[35]	TSG101	SiO ₂ 芯片包被 CD81 抗体	免疫夹心	荧光标记	3.94×10^9	无信号放大,导致灵敏度不高
侧流免疫层析法 ^[36]	CD9, CD81, CD63	硝酸纤维素膜上包被 CD9, CD81, CD63	免疫夹心	HRP	8.54×10^8	连同正常外泌体一起捕获,导致竞争性抑制了肿瘤来源外泌体与捕获抗体结合
比色反应 ^[30]	CD63	单壁碳纳米管捕获 CD63 特异性适配体	单壁碳纳米管和外泌体竞争性结合适配体	过氧化酶比色法 (H ₂ O ₂ -TMB)	5.2×10^8	无信号放大,导致灵敏度不高
电化学 ^[31]	CD63	微流控表面的金电极上包被 CD63 特异性适配体	外泌体与适配体竞争性结合 CD63 蛋白	亚甲蓝电化学发光	1.0×10^6	无信号放大,导致灵敏度不高
增强电化学反应 ^[34]	LZH8 特异性外泌体表面蛋白	DNA 纳米四面体结构捕获 LZH8 适配体	外泌体结合适配体后氧化还原信号发生变化	K ₃ [Fe(CN) ₆]/KCl 覆盖住整个电极产生放大信号	2.09×10^4	无信号放大,导致灵敏度不高
荧光共振能量转移 ^[33]	CD63	上转换纳米粒子和金纳米棒	上转换纳米粒子和金纳米棒之间距离的改变引起共振能量转移	荧光猝灭	1.1×10^6	无信号放大,导致灵敏度不高

参考文献:

- ZHANG Bing, JIA Yejing, WANG Jing, et al. Colorimetric and photothermal dual-mode immunoassay for tumour marker detection based on a Ag₂CO₃@Ag nanocomposite[J]. Process Biochemistry, 2019, 87: 66-72.
- ZHANG Hai, TAVAKOLIAN P, SIVAGURUNATHAN K, et al. Truncated-correlation photothermal coherence tomography derivative imaging modality for small animal in vivo early tumor detection[J]. Optics Letters, 2019, 44(3): 675-682.
- OVERGAAUW A J C, SPEIJERS - VAN DER PLAS L M, HENDRIKS M P, et al. Outcome and feasibility of palliative chemotherapy in very elderly patients with metastatic breast cancer[J]. The Breast Journal, 2020, 26(3): 433-439.
- ALBERS A E, KAUFMANN A M. EGFR im Speichel: neuer Tumormarker für Plattenepithelkarzinom im Mund [J]. Laryngo- Rhino- Otologie, 2018, 97(5): 302-303.
- RENARD A S, NEDELCO C, PAISANT A, et al. Is multidetector CT-scan able to detect T3a renal tumor before surgery?[J]. Scandinavian Journal of Urology, 2019, 53(5): 350-355.
- SHIOGA T, KONDO R, OGASAWARA S, et al. Usefulness of tumor tissue biopsy for predicting the biological behavior of hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Research, 2020, 40(7): 4105-4113.
- TAKAKURA M, MATSUMOTO T, NAKAMURA M, et al. Detection of circulating tumor cells in cervical cancer using a conditionally replicative adenovirus targeting telomerase-positive cells[J]. Cancer Science, 2018, 109(1): 231-240.
- YU Yue, CHEN Zhaoli, DONG Jingsi, et al. Folate Receptor-Positive circulating tumor cells as a novel diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. Translational Oncology, 2013, 6(6): 697-702.
- ZHANG Xiaofen, JU Shaoqing, WANG Xudong, et al. Advances in liquid biopsy using circulating tumor cells and circulating cell-free tumor DNA for detection and monitoring of breast cancer[J]. Clinical and Experimental Medicine, 2019, 19(3): 271-279.
- FENIZIA F. Oncogenomics// Circulating Tumor Cells and ctDNA in NSCLC[M]. Italy Naples: Academic

- Press, 2019:465-475.
- [11] UDAYAN G, MARSELLA A, VALENTINI P. An ultra-sensitive colorimetric test for the detection of somatic rare mutations in DNA[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(5): 2973-2979.
- [12] LENAERTS L, TUVERI S, JATSENKO T, et al. Detection of incipient tumours by screening of circulating plasma DNA: hype or hope?[J]. *Acta Clinica Belgica*, 2020, 75(1): 9-18.
- [13] OLIVEIRA M, RUIZ-PACE F, MATITO J, et al. Determinants of concordance in clinically relevant genes(CRG)from synchronously acquired tumor biopsies(tBx)and ctDNA in metastatic breast cancer(MBC) [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2019, 37(15 suppl): 1075.
- [14] MACGREGOR-DAS A, YU Jun, TAMURA K, et al. Detection of circulating tumor DNA in Patients with pancreatic cancer using digital next-generation sequencing(article)[J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2020, 22(6): 748-756.
- [15] GAO Fangyuan, JIAO Fenglong, XIA Chaoshuang, et al. A novel strategy for facile serum exosome isolation based on specific interactions between phospholipid bilayers and TiO₂[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(6): 1579-1588.
- [16] LIANG Jinying, ZHANG Xinxin, HE Shufang, et al. Sphk2 RNAi nanoparticles suppress tumor growth via downregulating cancer cell derived exosomal microRNA [J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 286: 348-357.
- [17] LOGOZZI M, MIZZONI D, CAPASSO C, et al. Plasmatic exosomes from prostate cancer patients show increased carbonic anhydrase IX expression and activity and low pH[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35(1): 280-288.
- [18] BIJNSDORP I, EROZENCI L A, KOETSIER J, et al. The prostate cancer urinary exosome protein biomarker landscape[J]. *European Urology Open Science*, 2020, 19(S2):e517-e518.
- [19] JUBAIR S, ALKHATEEB A, TABL A A, et al. A novel approach to identify subtype-specific network biomarkers of breast cancer survivability[J]. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 2020, 9(1): 256-i319.
- [20] ALI A H. Current knowledge of buttermilk: Composition, applications in the food industry, nutritional and beneficial health characteristics[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2019, 72(2): 169-182.
- [21] PARK J, HWANG M, CHOI B, et al. Exosome classification by pattern analysis of Surface-Enhanced Raman spectroscopy data for lung cancer diagnosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(12): 6695-6701.
- [22] VANNI I, ALAMA A, GROSSI F, et al. Exosomes: a new horizon in lung cancer[J]. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(6): 927-936.
- [23] GAO Chao, FAN Fan, LIU Xin, et al. Exosomal miRNA analysis of aqueous humour of diabetes and cataract patients[J]. *Current Eye Research*, <https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1797107>.
- [24] WANG Jianjun, LIU Yuanyuan, SUN Wangwei, et al. Plasma exosomes as novel biomarker for the early diagnosis of gastric cancer [J]. *Cancer Biomarkers*, 2018, 21(4): 805-812.
- [25] ZONG Shenfei, WANG Le, CHEN Chen, et al. Facile detection of tumor-derived exosomes using magnetic nanobeads and SERS nanoprobe[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(25): 5001-5008.
- [26] ZHAO Zheng, YANG Yang, ZENG Yong, et al. A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(3): 489-496.
- [27] JEONG S, PARK J, PATHANIA D, et al. Integrated magneto-electrochemical sensor for exosome analysis[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(2): 1802-1809.
- [28] DOLDÁN X, FAGÚNDEZ P, CAYOTA A, et al. Electrochemical sandwich immunosensor for determination of exosomes based on surface Marker-Mediated signal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(21): 10466-10473.
- [29] WAN Shuo, ZHANG Liqin, WANG Sai, et al. Molecular Recognition-Based DNA nanoassemblies on the surfaces of nanosized exosomes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(15): 5289-5292.
- [30] XIA Yaokun, LIU Mengmeng, WANG Liangliang, et al. A visible and colorimetric aptasensor based on DNA-capped single-walled Carbon nanotubes for detection of exosomes[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 92: 8-15.
- [31] ZHOU Qing, RAHIMIAN A, SON K, et al. Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes[J]. *Methods*, 2016, 97: 88-93.
- [32] JIANG Ying, SHI Muling, LIU Yuan, et al. Aptamer/AuNP biosensor for colorimetric profiling of exosomal proteins[J]. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2017, 56(39): 11916-11920.
- [33] CHEN Xiaosong, LAN Jianming, LIU Yingxin, et al. A paper-supported aptasensor based on upconversion luminescence resonance energy transfer for the accessible determination of exosomes [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 102: 582-588.
- [34] WANG Sai, ZHANG Liqin, WAN Shuo, et al. Aptasensor with expanded nucleotide using DNA nanotetrahedra for electrochemical detection of cancerous exosomes [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(4): 3943-3949.
- [35] DAABOUL G G, GAGNI P, BENUSSI L, et al. Digital detection of exosomes by interferometric imaging[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 203-219.
- [36] OLIVEIRA-RODRÍGUEZ M, LÓPEZ-COBO S, REY-BURN H T, et al. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2016, 5(1): 31803.

收稿日期: 2020-10-11

修回日期: 2020-11-25