

· 综述 ·

循环肿瘤DNA检测在胃肠间质瘤诊疗中的价值

王盛锦,王峰,孙锋*

昆明医科大学第二附属医院胃肠外科,云南 昆明 650101

[摘要] 胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)起源于胃肠道间叶组织,多数继发于KIT及血小板源性生长因子受体 α (platelet derived growth factor receptor alpha, PDGFRA)基因突变,这一发现对GIST的基础研究和临床诊疗具有里程碑意义。基因检测被广泛运用于明确GIST的病理诊断、判断预后及指导靶向药物治疗等诸多领域。近年来众多研究表明包括循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)检测在内的液体活检技术对GIST的诊疗有极其重要的临床价值和广阔的应用前景,本文主要论述ctDNA检测用于GIST诊疗的价值。

[关键词] 胃肠间质瘤;液体活检;循环肿瘤DNA;诊断治疗

[中图分类号] R735

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)11-1596-09

doi:10.7655/NYDXBNS20231119

The value of circulating tumor DNA detection in the diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumors

WANG Shengjin, WANG Feng, SUN Feng*

Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China

[Abstract] Gastrointestinal stromal tumors (GIST) originate from gastrointestinal mesenchymal tissues, and most of them are secondary to KIT and platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene mutations. This discovery has a landmark significance for the basic research, clinical diagnosis and treatment of GIST. Genetic testing is widely used in many fields, such as identifying pathological diagnosis of GIST, judging prognosis and guiding targeted drug therapy. In recent years, numerous studies have shown that liquid biopsy techniques, including circulating tumor DNA (ctDNA) detection, have shown extremely important clinical values and broad application prospects for the diagnosis and treatment of GIST. This article reviews the value of ctDNA detection in the diagnosis and treatment of GIST.

[Key words] gastrointestinal stromal tumor; liquid biopsy; circulating tumor DNA; diagnoses and treatment

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(11):1596-1604]

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是消化道最常见的间叶源性肿瘤,不同国家和地区的发病率不同,全世界每10万人中6~22人患有GIST^[1],我国GIST的发病率为每10万人口42例,老年人多见,男性发病率略高于女性^[2]。其发病机制主要为KIT、血小板源性生长因子受体 α (platelet

derived growth factor receptor alpha, PDGFRA)基因获得性突变^[3]。GIST基因检测技术包括一代基因测序、二代基因测序和液体活检^[4-5]。液体活检是利用人体血液或体液作为标本来源获取肿瘤相关信息的技术,其检测标志物主要包括循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA)、循环RNA(circulating RNA, cRNA)和细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)等不同分子^[5-8]。细胞外的DNA片段主要吸附在血液中的红

[基金项目] 院士专家工作站(202205AF150011);国家自然科学基金(81960508)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:1346180395@qq.com

细胞和白细胞表面^[9-10]。cfDNA是指能在血浆中被识别出来的细胞外DNA片段^[7]。1948年Mandel等^[11]通过高氯酸沉淀的方法在健康人血液发现了cfDNA,受限于当时的科学水平,人们对于遗传物质DNA的认识不足,这个发现没有引起过多的关注。1977年Leon等^[12]在癌症患者中发现了游离DNA,但是无法确定它们来源于正常人体组织细胞还是肿瘤细胞。直到1989年有研究通过比较DNA链的热力学稳定性后发现癌症患者外周血中有一部分cfDNA拥有肿瘤细胞DNA才具备的双链不稳定性,证实了这部分cfDNA来源于肿瘤细胞^[13]。1994年Sorenson等^[14]利用PCR技术在胰腺癌患者血浆DNA中检测到的K-RAS2基因点突变与肿瘤组织基因检测结果一致,证实了血浆中突变的DNA片段源自肿瘤细胞,术语ctDNA就此诞生。cfDNA包括ctDNA以及其他正常细胞释放的DNA片段,ctDNA则特指肿瘤来源的DNA^[9,15-16]。ctDNA包括肿瘤细胞进入外周血中被免疫细胞吞噬发生裂解、释放出的DNA以及肿瘤细胞发生凋亡和坏死后释放到胞外的DNA片段^[17]。ctDNA既有一般体细胞所拥有的遗传信息,也包含肿瘤细胞特有的体细胞突变信息,且癌症患者血浆中的ctDNA浓度比正常人高^[18]。由于肿瘤异质性和活检相关并发症而导致克隆性缺失等技术和临床问题,通常无法收集足够的活检组织^[19-20]。常规组织活检是侵入式检查,ctDNA检测与之相比属于非侵入式或“微创”操作;且提供了肿瘤异质性(空间和时间)的信息,采集简单便捷可以反复获取,患者依从性高,尤其适用于临床工作中传统检测方法不易获取组织标本的GIST患者^[7]。其次ctDNA会随着肿瘤的进展发生相应变化,可以对ctDNA进行定性、定量分析和追踪,监测和了解病情的动态变化过程^[21]。ctDNA检测的灵敏度和特异度在很大程度上接近病理学诊断^[22],晚期GIST患者血液ctDNA检测与组织DNA检测结果具有较高的一致性^[23]。随着基因测序技术的发展进步,ctDNA突变检测阳性率增加^[24]。研究ctDNA检测可能会促进早期发现肿瘤,提供肿瘤发展动态图像^[25]。一系列研究表明ctDNA可作为一种潜在的肿瘤生物标志物,在GIST诊疗中发挥重要作用。本文对ctDNA检测在GIST诊疗中的价值做一综述,旨在为GIST的诊疗及疗效评估等提供新的检测方法。

1 ctDNA检测用于诊断GIST

目前,GIST的诊断依靠病理学检查和基因检

测,但这些方法均存在局限性。获取标本的过程往往是有创操作导致不能反复取样,其次用于诊断的肿瘤组织标本有限,存在一定的假阴性率。获取标本过程中还可能因人为操作不当造成肿瘤转移,具有一定风险性。且通过上述方法只能获得疾病的静态分子特征,对于同一病变部位内部以及不同病变部位之间存在的分子异质性,缺少一系列标本进行对比分析^[26]。ctDNA检测标本从血液获取,创伤小,可在疾病治疗过程中反复多次获取,理论上可以实现疾病的动态监测。Demetri等^[27]分析了伊马替尼和舒尼替尼治疗失败后晚期GIST患者的血浆和组织DNA后发现,两种方法检测到的原发性KIT基因外显子11突变的一致性为79%,外显子9突变的一致性为100%,外显子9和11突变的总体一致性为84%。这是首次报道在GIST患者外周血中发现含KIT突变的ctDNA^[25]。Maier等^[28]评估了38例KIT/PDGFRA突变GIST患者的291份血浆样本后得出结论:在这38例肿瘤组织检测证实存在基因突变的患者中,15例患者血浆样本可检测到突变的cfDNA。患者的cfDNA数量与病程相关,与完全缓解的患者相比,疾病活动期患者cfDNA数量显著增加。Kang等^[29]分析了25例GIST患者样本,其中包含18例存在KIT基因外显子11突变以及7例野生型GIST,研究发现在这18例KIT基因11号外显子突变的患者中,有13例患者通过ctDNA检测到了相同突变(检测一致率为72%)。在7例野生型GIST患者的血浆样本中未检测到突变。关于ctDNA检测的可靠性,一项纳入了32例进展期GIST患者的研究证实ctDNA检测与肿瘤组织DNA检测一致率高达71.9%,尤其是当GIST长径>10cm、Ki-67指数>5%时,ctDNA检测与组织活检的结果高度一致,并且ctDNA阳性率也更高^[23]。此外也有病例报道了在野生型GIST患者中发现含突变TP53的ctDNA^[30],使ctDNA用于野生型GIST的诊断成为可能,尤其是为基因检测假阴性和野生型GIST的鉴别诊断提供了一种新思路^[31]。

2 ctDNA检测用于识别继发突变

75%~80%GIST患者中可检测出KIT基因突变,10%~15%的患者可检测出PDGFRA基因突变,缺乏KIT或PDGFRA基因突变的GIST占5%~10%,被称为野生型GIST^[32]。Sharma等^[33]的研究发现不同部位的GIST突变类型各不相同,不同突变类型对酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor,TKI)反应不

同而预后不同^[34]。伊马替尼作为治疗GIST的一线药物,能显著提高患者的生存率和改善预后^[35-36]。但伊马替尼治疗过程中会发生耐药,近半数患者在2年内出现疾病进展。继发性耐药最主要的机制是KIT、PDGFRA基因的二次突变^[37-39],继发性突变位点主要在KIT基因外显子13、14、17、18上^[40]。这类耐药的间质瘤细胞在长期接受伊马替尼治疗后不断扩增,最终形成耐药型间质瘤^[41]。针对伊马替尼耐药的患者相继开发了二线治疗药物舒尼替尼、三线治疗药物瑞戈非尼。新一代TKI瑞普替尼的安全性及有效性在已完成的Ⅲ期临床实验中得到证实^[42-43],帕纳替尼在KIT基因多重继发性耐药突变情况下展现出了广阔的应用前景^[44]。

不同突变类型对不同药物治疗敏感性不同,因此早期识别继发性突变无论是对靶向药物的选择还是治疗方案的及时调整都具有重要临床意义。运用ctDNA检测技术鉴定继发性突变可以解决继发性突变的肿瘤标本通常难以获取的问题,以此来指导个体化的治疗。值得注意的是,与肿瘤组织相比,在血浆中能更频繁地检测到KIT基因继发性突变^[27]。Kang等^[45]分析了3例KIT基因突变并且接受TKI治疗的GIST患者,在他们的肿瘤组织和血浆ctDNA中可以检测到相同突变。通过ctDNA检测,其中2例患者检测到了其他突变,分别是KIT基因17外显子S821F突变和PDGFRA基因18外显子D842V突变,在后续随访中出现了TKI耐药。并且运用ctDNA检测可在临床影像学检查发现肿瘤耐药前即可发现继发突变基因。Wada等^[46]通过分析4例接受手术切除的伊马替尼耐药GIST患者,研究KIT基因继发性突变在组织和血液中的一致性。4例患者ctDNA中均可检测到继发性耐药突变,其中3例耐药前接受伊马替尼治疗后ctDNA含量下降,1例在换用舒尼替尼治疗后ctDNA片段减少。结果表明血浆中检测到的继发性耐药突变与伊马替尼耐药肿瘤组织相同,且ctDNA的突变比例随着肿瘤状态的变化而变化。此外Serrano等^[47]报道在12例TKI耐药的GIST患者中,11例可通过ctDNA检测到KIT基因继发性突变。George等^[44]在后续研究中也证实ctDNA可检测继发性耐药突变,突变ctDNA的基线水平和临床活动一致。上述相关研究表明ctDNA检测可用于识别继发性突变,提前预警继发性耐药问题,优化治疗策略,也可为使用伊马替尼治疗后出现疾病进展的患者在病因分析、药物治疗的选择上提供参考。

3 ctDNA检测用于监测疾病进展、复发和转移

Namløs等^[48]分析了50例GIST患者样本的ctDNA,44例未接受过TKI治疗的患者中有16例(36%)、接受TKI治疗的6例患者中有3例(50%)都检测到了肿瘤相关的特异性突变。此外,与中低风险GIST患者相比,高风险患者或出现病灶转移的患者血浆更容易检测到ctDNA突变。作者还对另外接受TKI治疗的6例GIST样本进行了研究,在疾病进展患者中检测到ctDNA突变,在病情稳定的患者中未检测到突变。此外肿瘤负荷是最重要的检测决定因素,中位肿瘤大小为13.4 cm的GIST患者血浆中可检测到突变,没有检测到突变的患者肿瘤大小为4.4 cm。研究证实了ctDNA含量与肿瘤危险度显著相关并可用于疾病进展监测。另有研究通过对38例GIST受试者的291份血浆样本进行分析发现,5例疾病进展或复发患者的ctDNA检测反复呈阳性结果或ctDNA数量增加,2例复发患者和1例疾病进展患者ctDNA检测由阴性转为阳性,5例对治疗有反应患者的突变ctDNA数量下降或ctDNA检测结果从阳性转为阴性^[28]。该研究表明可以在GIST患者的血浆中进行ctDNA的检测和定量,且ctDNA的量和疾病状态具有相关性,疾病活动期患者的ctDNA检测呈阳性且数量增加,ctDNA检测阴性转阳性的患者通常提示伴有疾病复发或进展。对治疗有反应的疾病缓解患者的ctDNA数量降低。Ko等^[49]也证实无转移病例或没有发生疾病进展的转移性病例的ctDNA未检测到任何基因突变,疾病进展GIST患者ctDNA中检测到继发性基因突变。病灶转移疾病进展的KIT突变型GIST患者ctDNA检测到KIT基因突变的肿瘤负荷高于没有突变的患者。以上研究表明可以把血液中的ctDNA作为一种生物标志物,通过对其进行定性和定量分析来监测GIST的进展、复发和转移。

4 ctDNA检测用于GIST疗效评估

4.1 治疗前评估

GIST患者KIT或PDGFRA基因特定区域的突变和TKI药物反应相关,因此TKI治疗前应进行基因突变分析^[50],对基因检测取材困难或样本量太小不适合标准突变分析时,通过ctDNA检测了解基因突变情况可为患者提供合适的TKI方案。另外,对临床上部分选择保守和手术治疗均可但都存在风险的患者,治疗方案选择往往存在争议。许多研究

表明高风险者、有病灶转移及疾病进展患者血浆中 ctDNA 含量增加,ctDNA 水平与肿瘤负荷及疾病活动度显著相关(表1),因此 ctDNA 定量分析可了解患者身体状况和疾病风险,评估后续不同治疗方案的价值。此外,GIST 相关临床试验中选择临床试验对象时,传统检测方法在大规模人群中进行初筛有多方面的困难。而 ctDNA 检测作为一种无创操作更容易被受试者接受,ctDNA 检测可对拟定人群进行初筛,根据患者的检测结果选择特定的临床试验对象在后续接受不同处理,有利于相关临床试验开展。

4.2 治疗后疗效评估

对于接受 TKI 药物治疗的 GIST 患者,肿瘤反应评价(疗效评估)主要基于 RECIST 标准(通过影像学图像中病灶数量和肿瘤大小变化的评价方法)和 Choi 标准(通过增强 CT/MRI 定期评估治疗效果)^[51]。但影像学检查价格昂贵、操作复杂、放射性强,且最大的缺点是时效性差,与血液指标相比变化具有滞后性,不易发现病灶的早期转移,导致许多患者错过最佳治疗干预时机,无法实现对疾病的动态检测。ctDNA 检测作为非侵入性检查更容易被患者所接受,其最大的优点是创伤小、允许连续采样和分析,通过对比展现疾病的动态变化,持续 ctDNA 监测可以评估肿瘤状态、了解治疗效果^[52]。Boonstra 等^[53]认为单一 ddPCR 检测用于测定 ctDNA 中多个外显子 11 突变是可行的,并且检测了 11 例转移性 GIST 患者的血浆样本后发现,在治疗期间检测到 ctDNA 突变减少,提出可通过血浆中的 ctDNA 分析来监测转移性 GIST 患者的治疗反应。此外通过 ctDNA 检测识别基因突变的类型可以了解原发肿瘤的预后情况,还可以预测 TKI 治疗效果^[54]。Huang 等^[55]指出 ctDNA 动态监测治疗效果与影像学结果高度吻合,却更早显示出有效的治疗反应。通过对 ctDNA 进行监测可以获取肿瘤对 TKI 治疗敏感性等相关信息,能更早了解药物疗效及识别继发性耐药,从而优化治疗策略。Johansson 等^[52]发现 ctDNA 水平能反映全身肿瘤负荷,ctDNA 水平变化和手术切除病灶的程度相关。术前 ctDNA 检测阳性的患者,在接受根治性手术切除后转阴。非根治性切除患者在切口闭合时采集的血浆样本中检测到 ctDNA,该研究说明 ctDNA 还可以用于评估手术治疗效果。Jilg 等^[56]通过 ddPCR 测量的肿瘤特异性 ctDNA 的量与疾病活动性和肿瘤大小呈正相关,ctDNA 突变量反映肿瘤负荷和疾病活动度,因此认为 ctDNA 可作为生物标志物用于监测治疗反应和术

后随访。

5 ctDNA 检测用于评估 GIST 的预后

GIST 患者预后受到肿瘤部位、肿瘤大小、手术方式、危险度分级、核分裂象、肿瘤破裂、细胞类型、伊马替尼治疗等多因素的影响^[57]。肿瘤异质性是恶性肿瘤的特征之一,对以此为特征的晚期癌症而言,液体活检具有独特的临床优势^[24],柳长明等^[58]研究发现 ctDNA 与 GIST 的原发部位、肿瘤大小(直径)、Fletcher 分级和核分裂象等病理特征具有显著相关性;发生在十二指肠的肿瘤 ctDNA 阳性率要比发生在胃、小肠和结直肠高;其次肿瘤直径大、Fletcher 分级定义为高危的患者以及核分裂象高的患者,相比肿瘤直径小、危险度低、核分裂象低的患者,ctDNA 阳性率更高。此外,ctDNA 阳性患者无进展生存期低于阴性患者。ctDNA 在 GIST 诊治中可作为动态监测指标为患者预后提供参考。另有研究指出进行 KIT 基因突变检测有助于评价 GIST 的预后^[59]。ctDNA 突变是进展期 GIST 患者的独立预后因子,DNA 异倍体是 GIST 预后的负性影响因素^[26]。Yoo 等^[60]发现血清来源的 ctDNA 中存在继发性 KIT 基因突变与总生存期降低显著相关。这些研究均表明 ctDNA 检测可用于评估 GIST 预后。

6 ctDNA 检测的其他应用

尽管有学者认为 ctDNA 到达体液可能与巨噬细胞的活跃分泌以及肿瘤细胞的凋亡或坏死有关^[17],但目前 ctDNA 到达体液的确切机制尚不清楚^[61]。ctDNA 检测识别染色体重排、易位等新变化,有助于对 GIST 进行更详细的分子分型。此外 ctDNA 检测可以追踪肿瘤变异情况,了解肿瘤获得性耐药基因的变化、演进过程,并最终发现新的治疗靶点。传统基因检测一般是从福尔马林和石蜡包埋切片中提取 DNA,而 ctDNA 中可检测到 GIST 患者基因原发性和继发性特异突变并可进行定量分析,对肿瘤而言突变基因组片段是高度特异的,ctDNA 水平又能反映肿瘤负荷,因此可将 GIST 患者肿瘤特异的 ctDNA 作为高度特异的生物标志物应用于 GIST 患者的基因分型。在疾病诊断方面,ctDNA 可以检测到 GIST 患者 KIT 基因 9 号、11 号外显子突变^[31],也可以检测到与继发性耐药相关的 KIT 基因 17 外显子 S821F 突变和 PGDFRA 基因 18 外显子 D842V 突变^[48],甚至是野生型 GIST 患者中少见的 TP53 突变基因^[34],这些类似基因突变可作为特异的生物标志

表1 2013—2022年ctDNA检测应用于GIST的研究汇总

Table 1 Summary of studies on the application of ctDNA testing in GIST from 2013 to 2022

作者	年份	主要研究结论及成果
Demetri等 ^[27]	2013	证明了基于血浆的ctDNA分析的实用性。在伊马替尼和舒尼替尼耐药的GIST患者中,ctDNA检测和传统肿瘤组织检测两种方法KIT基因第9外显子突变的一致性为100%,第11外显子突变的一致性为79%,外显子9和11突变的总体一致性为84%
Maier等 ^[28]	2013	38例经组织检测存在基因突变的GIST患者,有15例血浆中检测到突变的cfDNA,cfDNA的量和疾病状态具有相关性。肿瘤进展期患者cfDNA量增加,治疗缓解后cfDNA量降低。cfDNA检测阴性转阳性通常提示疾病复发
Yoo等 ^[60]	2014	证明血清ctDNA可用于鉴定TKI耐药突变。ctDNA中存在继发性KIT基因突变与总生存期降低显著相关
Kang等 ^[45]	2015	3例KIT基因突变并且接受TKI治疗的GIST患者在其肿瘤组织和血浆ctDNA中可以检测到相同突变,通过ctDNA检测在其中2例患者上检测到了其他突变,分别是KIT基因17外显子S821F突变和PGDFRA基因18外显子D842V突变,并且在后续随访中出现了TKI耐药
Kang等 ^[29]	2016	在18例KIT基因11号外显子突变的GIST患者中,有13例患者通过ctDNA检测到了相同突变(检测一致率为72%)。在7例野生型GIST患者的血浆样本中未检测到突变
Wada等 ^[46]	2016	4例伊马替尼耐药GIST患者ctDNA检测到的继发性突变与在伊马替尼耐药肿瘤组织中检测的相同,并且ctDNA的比例随肿瘤状态而变化,接受药物治疗后ctDNA含量降低
Xu等 ^[23]	2018	ctDNA检测与肿瘤组织DNA检测一致率达71.9%,尤其是当GIST肿瘤长径>10 cm、Ki-67>5%时,ctDNA阳性率高,与组织检测一致性强。ctDNA检测发现了组织DNA检测中未检测到的罕见突变
Boonstra等 ^[53]	2018	单一ddPCR检测用于测定ctDNA中多个外显子11突变是一种可行的方法,可通过血浆中ctDNA分析来监测治疗反应
Namløs等 ^[48]	2018	ctDNA含量和肿瘤危险度显著相关,高风险患者或出现转移病灶的患者血浆中更容易检测到ctDNA突变。在接受TKI治疗的患者中检测到ctDNA可能与疾病进展有关
Jilg等 ^[56]	2019	通过ddPCR测量的肿瘤特异性ctDNA的量与疾病活动性和肿瘤大小呈正相关。ctDNA突变量反映肿瘤负荷和疾病活动度,ctDNA可作为生物标志物用于监测治疗反应和术后随访
Serrano等 ^[47]	2019	在12例TKI耐药的GIST患者中,有11例可通过ctDNA检测到KIT基因继发性耐药突变
Dalle等 ^[30]	2020	报道了1例伊马替尼治疗无效的野生型GIST患者的ctDNA中检测到TP53基因突变
柳长明等 ^[58]	2020	ctDNA与GIST预后相关,ctDNA阳性患者无进展生存期低于ctDNA阴性患者
Serrano等 ^[64]	2020	GIST的ctDNA脱落相对较低,突变的等位基因频率也较低。在伊马替尼治疗失败后转移性GIST患者ctDNA中能检测到KIT基因原发及继发性突变
Johansson等 ^[52]	2021	ctDNA与肿瘤负荷相关,高风险患者ctDNA阳性率高。ctDNA阳性患者接受根治性手术后转阴。部分患者中检测到多重耐药突变。ctDNA可能是监测转移性GIST疾病进展的生物标志物
George等 ^[44]	2022	原发性KIT基因突变GIST患者通过ctDNA检测到的突变类型与肿瘤组织DNA检测结果具有很强的一致性,ctDNA可检测到继发性耐药突变。突变ctDNA的基线水平和临床活动一致
Ko等 ^[49]	2022	无转移或有转移但无疾病进展、对TKI治疗有反应的患者血浆中未检测到ctDNA突变。在疾病进展的GIST患者ctDNA中检测到继发性突变。有转移且疾病进展的KIT基因突变型GIST患者中,检测到ctDNA突变的肿瘤负荷高于没有突变的患者
Huang等 ^[55]	2022	持续监测ctDNA可反映肿瘤的动态变化、预测疗效和预后,ctDNA动态监测治疗效果与影像学结果高度吻合,却更早显示出有效的治疗反应

物用于GIST的诊断。血液中ctDNA丰度的变化反映疾病进程,是一种潜在的GIST生物标志物,但与结直肠癌、食管癌等不同,GIST目前还没有被证实的可用于独立预测疾病复发或生存的ctDNA标志物^[62]。ctDNA相关检测技术很多,各种技术在原理、适用范围等方面存在差别,在检测实践中也各

有优缺点(表2)。ctDNA在外周血中含量低、半衰期短,对检测方法也提出了更高的要求。

7 总结与展望

综上所述,在GIST临床诊疗过程中,ctDNA检测与传统标准活检相比,操作简便、可从血液中获

表2 ctDNA检测技术对比
Table 2 Comparisons of ctDNA detection techniques

技术	步骤原理	优点	缺点	参考文献
dRCR	样品分割	绝对定量、高灵敏度	仪器设备成本高	[65-68]
	PCR扩增	高精确性和准确性	只能检测已知点突变	
	信号检测	定量结果无需标准曲线	通量相对较低,耗时较长	
	数据分析	能检测低浓度的突变	需要较多的样本处理步骤	
ddPCR	样品分割	独立扩增	成本较高	[69-70]
	PCR扩增	不依赖标准曲线	通量相对较低	
	信号检测	高灵敏度和高精确性	分析时间较长	
	数据分析	能检测低浓度的突变		
qPCR	DNA扩增	操作简单、高灵敏度	成本高	[66, 71]
	荧光信号检测	能检测低浓度突变	受限于引物设计	
	Ct值计算	特异度高、速度快	潜在的污染风险	
	标准曲线			
BEAMing	DNA扩增	高灵敏度、高精确性	成本较高	[65, 72]
	珠子分离包埋	高通量、可定量分析	需要专业的技术设备	
	PCR扩增		对全基因组分析不适用	
	突变检测			
ARMS-PCR	引物设计	快速高效	引物难设计	[73-74]
	PCR扩增	高灵敏度和特异度	依赖于先验信息	
	电泳分析	不需要对目标序列测序	无法同时检测多个位点	
CAPP-Seq	样品准备	灵敏度及特异度高	成本较高	[66, 75]
	引物设计	高通量、个体化分析	数据分析复杂	
	文库捕获	能检测单个核苷酸的变异	依赖于先验信息	
	深度测序			
NGS	文库制备	高通量、高灵敏度	数据处理复杂	[76-77]
	测序	已知或未知点突变均可检测	比对困难、成本高	
	数据分析	可进行多样性分析,应用广泛	测序存在一定误差率	

取样本,因其微创和可重复性,可能会促进早期发现肿瘤。ctDNA检测具有提供肿瘤动态变化的优势,可实时掌握疾病最新进展,了解其复发转移情况以判断预后。此外,ctDNA检测可以发现新耐药突变,有助于监测治疗反应,并在影像学评估治疗反应之前即可了解治疗效果以便及时调整治疗决策从而实现GIST患者的最佳管理,更为临床工作中发现GIST新的潜在靶点提供了技术支持。肿瘤特异ctDNA作为高度特异的生物标志物应用于GIST患者的基因分型是一种新的诊疗思路。同时ctDNA检测也面临着一些挑战:ctDNA在外周血含量低,目前尚缺乏灵敏检测方法;ctDNA结构稳定性差、半衰期短(16 min~2.5 h)、易被降解,其检出率取决于肿瘤的位置、大小和血管分布^[17],这也给检测增加了难度;ctDNA检测的灵敏度会受到KIT/PDGFR α 基因突变异质性的影响,有研究指出PDGFR α 基因突

变者ctDNA检测的灵敏度显著低于KIT基因突变患者^[48];对于野生型GIST,目前尚无研究表明ctDNA中可检测到K/N-RAS、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)等突变基因^[63]。虽然迄今为止ctDNA检测运用于GIST诊疗的相关研究有限,但当前ctDNA检测作为穿刺活检技术的有效补充手段,对GIST的临床和生物学认识、基于风险的肿瘤患者分层、个体化治疗、临床结果评估等方面都展现出巨大的价值和广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] BLAY J Y, KANG Y K, NISHIDA T, et al. Gastrointestinal stromal tumours[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7:22
- [2] YANG Z X, ZHENG R S, ZHANG S W, et al. Incidence, distribution of histological subtypes and primary sites of soft tissue sarcoma in China[J]. Cancer Biol Med, 2019, 16(3):565-574

- [3] HEMMING M L, HEINRICH M C, BAUER S, et al. Translational insights into gastrointestinal stromal tumor and current clinical advances[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(10): 2037–2045
- [4] SHENDURE J, BALASUBRAMANIAN S, CHURCH G M, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future[J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 345–353
- [5] ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(5): 479–491
- [6] 中国临床肿瘤学会胃肠间质瘤专业委员会, 中国抗癌协会胃肠间质瘤专业委员会, 中国医师协会外科医师分会胃肠道间质瘤诊疗专业委员会. 胃肠间质瘤基因检测与临床应用的中国专家共识(2021版)[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2021, 26(10): 920–927
- [7] HEITZER E, HAQUE I S, ROBERTS C E S, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2): 71–88
- [8] BAROELLI A, PANTEL K. Liquid biopsies, what we do not know(yet)[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 172–179
- [9] STEWART C M, TSUI D W Y. Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management[J]. *Cancer Genet*, 2018, 228/229: 169–179
- [10] STEWART C M, KOTHARI P D, MOULIERE F, et al. The value of cell-free DNA for molecular pathology[J]. *J Pathol*, 2018, 244(5): 616–627
- [11] MANDEL P, METAIS P. Nuclear acids in human blood plasma[J]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1948, 142(3/4): 241–243
- [12] LEON S A, SHAPIRO B, SKLAROFF D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3): 646–650
- [13] STROUN M, ANKER P, MAURICE P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients[J]. *Oncology*, 1989, 46(5): 318–322
- [14] SORENSON G D, PRIBISH D M, VALONE F H, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994, 3(1): 67–71
- [15] WAN J C M, MASSIE C, GARCIA-CORBACHO J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 223–238
- [16] CONTEDEUCA V, GURIOLI G, DE GIORGI U. Re: niven mehra, David dolling, semini sumanasuriya, et al. plasma cell-free DNA concentration and outcomes from taxane therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer from two phase III trials (FIRSTANA and PROSELICA)[J]. *Eur Urol*, 2018, 74(3): 67–68
- [17] ELAZEZY M, JOOSSE S A. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2018, 16: 370–378
- [18] MOULIERE F, THIERRY A R. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12: 209–215
- [19] ANDERSSON D, FAGMAN H, DALIN M G, et al. Circulating cell-free tumor DNA analysis in pediatric cancers[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 72: 100819
- [20] GÓMEZ - PEREGRINA D, GARCÍA - VALVERDE A, PILCO - JANETA D, et al. Liquid biopsy in gastrointestinal stromal tumors: ready for prime time?[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2021, 22(4): 1–19
- [21] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985–990
- [22] 楼文晖, 刘霄宇. 从液体活检谈进展期胰腺癌的合理治疗[J]. *中国实用外科杂志*, 2017, 37(7): 728–730
- [23] XU H, CHEN L, SHAO Y, et al. Clinical application of circulating tumor DNA in the genetic analysis of patients with advanced GIST[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(1): 290–296
- [24] KAMPS R, BRANDÃO R, BOSCH B, et al. Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 308
- [25] RAVEGNINI G, SAMMARINI G, SERRANO C, et al. Clinical relevance of circulating molecules in cancer: focus on gastrointestinal stromal tumors[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11: 175883591983190
- [26] 赵倩, 李健. 循环肿瘤DNA在胃肠间质瘤诊治中的应用及意义[J]. *中国实用外科杂志*, 2018, 38(5): 571–574
- [27] DEMETRI G D, JEFFERS M, REICHARDT P, et al. Mutational analysis of plasma DNA from patients (pts) in the phase III GRID study of regorafenib (REG) versus placebo (PL) in tyrosine kinase inhibitor (TKI)-refractory GIST: Correlating genotype with clinical outcomes[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(15 suppl): 10503
- [28] MAIER J, LANGE T, KERLE I, et al. Detection of mutant free circulating tumor DNA in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor harboring activating mutations of *CKIT* or *PDGFRA*[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(17): 4854–4867
- [29] KANG G, SOHN B S, PYO J S, et al. Detecting primary KIT mutations in presurgical plasma of patients with gas-

- trointestinal stromal tumor[J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(4):347-351
- [30] DALLE F C, GUARDASCIONE M, DE MATTIA E, et al. Clonal selection of a novel deleterious TP53 somatic mutation discovered in ctDNA of a KIT/PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumor resistant to imatinib [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:36
- [31] 中华医学会外科学分会胃肠外科学组,中国医师协会外科医师分会胃肠道间质病诊疗专业委员会,中国临床肿瘤学会胃肠间质瘤专家委员会,等.胃肠间质瘤全程化管理中国专家共识(2020版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40(10):1109-1119
- [32] 石维坤,张信华,何裕隆.酪氨酸激酶抑制剂与手术在进展期胃肠间质瘤中的作用[J]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2019, 11(1):10-15
- [33] SHARMA A K, DE LA TORRE J, IJZERMAN N S, et al. Location of gastrointestinal stromal tumor (GIST) in the stomach predicts tumor mutation profile and drug sensitivity[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(19):5334-5342
- [34] JAKHETIYA A, GARG P, PRAKASH G, et al. Targeted therapy of gastrointestinal stromal tumours [J]. *World J Gastrointest Surg*, 2016, 8(5):345-352
- [35] RAITIO A, SALIM A, MULLASSERY D, et al. Current treatment and outcomes of pediatric gastrointestinal stromal tumors (GIST): a systematic review of published studies[J]. *Pediatr Surg Int*, 2021, 37(9):1161-1165
- [36] 中国药学会医院药专业委员会,中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会,《胃肠间质瘤靶向药物的治疗药物监测中国专家共识》编写组.胃肠间质瘤靶向药物的治疗药物监测中国专家共识[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(20):2041-2049
- [37] 孙祥飞,高晓东,沈坤堂.胃肠间质瘤中伊马替尼继发性耐药机制的研究进展[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2019, 22(9):886-790
- [38] KALFUSOVA A, LINKE Z, KALINOVA M, et al. Gastrointestinal stromal tumors: summary of mutational status of the primary/secondary KIT/PDGFR α mutations, BRAF mutations and SDH defects [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(12):152708
- [39] SERRANO C, MARIÑO-ENRÍQUEZ A, TAO D L, et al. Complementary activity of tyrosine kinase inhibitors against secondary kit mutations in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumours [J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(6):612-620
- [40] 吴昀紫,魏 千,马亮亮,等.胃肠间质瘤分子发病机制及精准治疗研究进展[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2022, 14(11):59-66
- [41] DERMAWAN J K, RUBIN B P. Molecular pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor: a paradigm for personalized medicine [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2022, 17:323-344
- [42] JANKU F, ABDUL RAZAK A R, CHI P, et al. Switch control inhibition of KIT and PDGFRA in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor: a phase I study of ripretinib [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(28):3294-3303
- [43] BLAY J Y, SERRANO C, HEINRICH M C, et al. Ripretinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours (INVICTUS): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(7):923-934
- [44] GEORGE S, VON MEHREN M, FLETCHER J, et al. Phase II study of ponatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors: efficacy, safety, and impact of liquid biopsy and other biomarkers [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(7):1268-1276
- [45] KANG G, BAE B N, SOHN B S, et al. Detection of KIT and PDGFRA mutations in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor [J]. *Target Oncol*, 2015, 10(4):597-601
- [46] WADA N, KUROKAWA Y, TAKAHASHI T, et al. Detecting secondary *C-KIT* mutations in the peripheral blood of patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor [J]. *Oncology*, 2016, 90(2):112-117
- [47] SERRANO C, LEAL A, KUANG Y N, et al. Phase I study of rapid alternation of sunitinib and regorafenib for the treatment of tyrosine kinase inhibitor refractory gastrointestinal stromal tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(24):7287-7293
- [48] NAMLØS H M, BOYE K, MISHKIN S J, et al. Noninvasive detection of ctDNA reveals intratumor heterogeneity and is associated with tumor burden in gastrointestinal stromal tumor [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(11):2473-2480
- [49] KO T K, LEE E, NG C C Y, et al. Circulating tumor DNA mutations in progressive gastrointestinal stromal tumors identify biomarkers of treatment resistance and uncover potential therapeutic strategies [J]. *Front Oncol*, 2022, 12:840843
- [50] 赵 刚,汪 明. NCCN《软组织肉瘤临床实践指南(2018年第1版)》胃肠间质瘤内容更新介绍与解读 [J]. *中国实用外科杂志*, 2018, 38(5):515-519
- [51] 王 健,沈朝勇,张 波.胃肠间质瘤个体化治疗策略的探讨 [J]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2019, 8(3):217-220
- [52] JOHANSSON G, BERNDSEN M, LINDSKOG S, et al. Monitoring circulating tumor DNA during surgical treatment in patients with gastrointestinal stromal tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(12):2568-2576

- [53] BOONSTRA P A, TER ELST A, TIBBESMA M, et al. A single digital droplet PCR assay to detect multiple KIT exon 11 mutations in tumor and plasma from patients with gastrointestinal stromal tumors [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (17):13870-13883
- [54] 汪明,曹晖. NCCN《软组织肉瘤临床实践指南(2017年第2版)》胃肠间质瘤内容介绍与更新解读[J]. *中国实用外科杂志*, 2017, 37(6):644-648
- [55] HUANG S Q, GUO X D, XIA Y Z, et al. Genotyping guided ripretinib directly after the progression of first-line imatinib therapy in advanced gastrointestinal stromal tumor: a case report[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(2):118
- [56] JILG S, RASSNER M, MAIER J, et al. Circulating *cKIT* and *PDGFRA* DNA indicates disease activity in Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(8):2292-2303
- [57] 陈燕,张贵阳,郑照正,等. 胃肠间质瘤预后影响因素的Meta分析[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2018, 28(9):798-800
- [58] 柳长明,崔国利,潘宁,等. 循环肿瘤DNA在胃肠间质瘤诊治中的应用[J]. *上海医药*, 2020, 41(15):58-60
- [59] SAPONARA M, URBINI M, ASTOLFI A, et al. Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFR α genotype evaluated by next generation sequencing (NGS) [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39):42243-42257
- [60] YOO C, RYU M H, NA Y S, et al. Analysis of serum protein biomarkers, circulating tumor DNA, and dovitinib activity in patients with tyrosine kinase inhibitor-refractory gastrointestinal stromal tumors [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25 (11):2272-2277
- [61] SIRAVEGNA G, MARSONI S, SIENA S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9):531-548
- [62] SALUJA H, KARAPETIS C S, PEDERSEN S K, et al. The use of circulating tumor DNA for prognosis of gastrointestinal cancers[J]. *Front Oncol*, 2018, 8:275
- [63] 孙建益,高晓东,沈坤堂. 液体活检在胃肠间质瘤中的研究进展[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2020, 23(9):917-921
- [64] SERRANO C, VIVANCOS A, LÓPEZ-POUSA A, et al. Clinical value of next generation sequencing of plasma cell-free DNA in gastrointestinal stromal tumors[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):1-12
- [65] 范昭璇,赵亮,张学记. 循环肿瘤DNA的检测:从数字化到测序[J]. *化学进展*, 2019, 31(10):1384-1395
- [66] 张洁洁,牛春艳,董莲华,等. 循环肿瘤DNA检测技术及在癌症诊疗中的应用价值[J/OL]. *生物化学与生物物理进展*, 2023(2023-05-29)[2023-06-08]. doi:10.16476/j.pibb.2023.0062
- [67] MORENO-MANUEL A, CALABUIG-FARIÑAS S, OBRA-DOR-HEVIA A, et al. dPCR application in liquid biopsies: divide and conquer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2021, 21(1):3-15
- [68] DONG L, WANG X, WANG S, et al. Interlaboratory assessment of droplet digital PCR for quantification of *BRAF* V600E mutation using a novel DNA reference material[J]. *Talanta*, 2020, 207:120293
- [69] DE KOCK R, VAN DEN BORNE B, YOUSSEF-EL SOUD M, et al. Therapy monitoring of EGFR-positive non-small-cell lung cancer patients using ddPCR multiplex assays [J]. *J Mol Diagn*, 2021, 23(4):495-505
- [70] GUO Q M, WANG L, YU W J, et al. Detection of plasma EGFR mutations in NSCLC patients with a validated ddPCR lung cfDNA assay[J]. *J Cancer*, 2019, 10(18):4341-4349
- [71] DOMNICH A, DE PACE V, PENNATI B M, et al. Evaluation of extraction-free RT-qPCR methods for SARS-CoV-2 diagnostics[J]. *Arch Virol*, 2021, 166(10):2825-2828
- [72] NIKANJAM M, KATO S, KURZROCK R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1):1-14
- [73] CHEN J G, XU X Y, DALHAIMER P, et al. *Tetra*-primer amplification-refractory mutation system (ARMS)—PCR for genotyping mouse leptin gene mutation [J]. *Animals*, 2022, 12(19):2680
- [74] XU J C, WU W, WU C Y, et al. A large-scale, multi-centered trial evaluating the sensitivity and specificity of digital PCR versus ARMS-PCR for detecting ctDNA-based EGFR p.T790M in non-small-cell lung cancer patients [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, 10(10):3888-3901
- [75] LI H Z, JING C W, WU J Z, et al. Circulating tumor DNA detection: a potential tool for colorectal cancer management [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2):1409-1416
- [76] DEVESON I W, GONG B S, LAI K, et al. Evaluating the analytical validity of circulating tumor DNA sequencing assays for precision oncology [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(9):1115-1128
- [77] FRANK M J, HOSSAIN N M, BUKHARI A, et al. Monitoring of circulating tumor DNA improves early relapse detection after axicabtagene ciloleucel infusion in large B-cell lymphoma: results of a prospective multi-institutional trial [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(27):3034-3043

[收稿日期] 2023-05-27

(本文编辑:陈汐敏)