



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.017
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.017
Chinese Journal of General Surgery, 2019, 28(9):1143-1149.

· 文献综述 ·

结直肠癌液体活检的临床应用进展

刘鹏, 刘合利

(中南大学湘雅医院 胃肠外科, 湖南 长沙 410008)

摘要

结直肠癌(CRC)是严重危害公众健康的一类疾病。早诊断早治疗已经成为改善CRC患者预后的关键。近年来,液体活检以其无创性、实时性及可重复性等优势在临床工作中发挥越来越重要的作用。笔者对各种液体活检技术在CRC中的临床应用进行综述。

关键词

结直肠肿瘤; 液体活检; 肿瘤细胞, 循环; 循环肿瘤DNA; 综述文献
中图分类号: R735.3

Advances in clinical applications of liquid biopsies for colorectal cancer

LIU Peng, LIU Heli

(Department of Gastrointestinal Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a kind of diseases causing serious threats to public health. Early diagnosis and timely treatment are crucial for improvement of the prognosis of CRC patients. In recent years, liquid biopsy plays an increasingly important role in clinical work because of its advantages of being non-invasive, real-time and repeatable. Here, the authors review various liquid biopsies techniques in clinical applications for CRC.

Key words

Colorectal Neoplasms; Liquid Biopsy; Neoplastic Cells, Circulating; Circulating Tumor DNA; Review
CLC number: R735.3

结直肠癌(CRC)以其高发病率及高病死率严重危害公众健康。根据2018年全球癌症数据统计,在所有肿瘤中,CRC的发病率和病死率分别位第三位和第二位^[1]。CRC早期阶段的5年生存率为90%,但是只有39%的患者诊断时处于该阶段,肿瘤累及区域淋巴结和邻近脏器的患者下降至70.4%,远处转移的患者5年生存率更低,仅为12.5%^[2]。并且,Zheng等^[3]分析大量数据发现超过

80%的转移性CRC(mCRC)患者在临床上未发现远处转移的证据时就已经发生了远处转移。因此对CRC进行早期诊治成为提高CRC患者生存率的关键。目前临床上对于CRC的确诊及其分子特征鉴定主要依靠组织活检,通常是从原发性肿瘤或单个转移病灶中获得组织来进行确诊,再鉴定其分子特征,随后根据分子特征制定相关治疗措施^[4]。但是该方法也存在局限性,比如:(1)组织活检反映的是肿瘤某一时间位点的情况,没有考虑肿瘤及其转移灶的空间异质性及时间异质性,很难准确反映肿瘤完整基因图谱;(2)组织活检属于侵入性检查,有相关的并发症及活检禁忌证,患者安全性难以得到保障;(3)对于保存时间较长的组织样本进行检测无法动态监测二次耐药的产生及其

基金项目: 湖南省科技创新引导计划资助项目(2018SK52604)。

收稿日期: 2019-06-28; **修订日期:** 2019-08-18。

作者简介: 刘鹏,中南大学湘雅医院住院医师,主要从事胃肠道肿瘤的临床及基础方面的研究。

通信作者: 刘合利, Email: heliliu@csu.edu.cn

机制, 因为肿瘤在治疗过程中, 特别是进行靶向治疗时其分子特征可以继发突变^[5-10]。

液体活检是指通过对患者外周血中的循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTC)、循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, CtDNA)、外泌体 (exosomes) 及肿瘤血小板 (tumor-educated platelets, TEPs) 等进行提取检测, 使临床医生能够反复多次及非侵入性地对患者肿瘤情况进行动态了解, 达到精准医疗的目的^[11]。除血液外, 尿液、唾液、胸腔积液以及粪便中已被证明含有肿瘤组织的遗传物质^[4]。许多临床研究已经证实对肿瘤患者进行液体活检能够确定患者肿瘤分子特征、监测治疗反应和微小残留病灶以及评估对治疗的耐药性。本文将对目前应用较为广泛的液体活检方法进行叙述, 以加深临床医生对液体活检的理解, 提高临床诊治能力。

1 CTC

CRC患者的预后主要取决于肿瘤的复发与转移。CTC是指从原发肿瘤和/或转移灶主动或被动脱落进入血管内的一种肿瘤细胞^[4]。目前在临床上可以从肿瘤患者的血液中分离出CTC, 包括单个细胞或者细胞团, 具有很强的异质性, 并且相关研究已经证明从患者血液检测到的CTC的数量与患者的预后及生存率具有明显相关性^[10-11]。但是, 血液中CTC的数量很少, 在转移性肿瘤患者中, 每 10^9 个血细胞中约有1个CTC, 而且在不同的肿瘤类型之间存在差异^[12]。由于血液中CTC的数量较少, 不能直接用于检测, 因此必须对CTC进行富集提取再进行相关分析。

提取血液中的CTC可以通过基于细胞直径大小和其它生物物理特性的负性富集来进行分离, 也可以通过使用CTC表面的细胞标志物如上皮细胞黏附分子 (EpCAM) 进行正性富集来进行分离^[13]。但是目前仍旧缺乏能够区分CTC与非恶性上皮细胞的标记, 并且, 由于肿瘤细胞直径大小相差较大, 基于细胞直径的提取方法会导致大量CTC的丢失^[4]。目前, 唯一一个经FDA批准的在转移性CRC患者中分离和计数CTC的平台是CellSearch, 是目前国际上最为稳定和可靠的CTC检测系统。该平台根据上皮细胞标志物EpCAM的表达和白细胞特异分子CD45的缺乏表达对CTC进行阳性选择^[14]。在转移性乳腺癌和前列腺癌患者中, 每7.5 mL血液中CTC ≥ 5 个是无进展生存期 (progression-

free survival, PFS) 降低的一个强有力的预测因素, 而 < 5 个CTC是总生存期 (overall survival, OS) 提高的预测因素^[15-16], 但是对于转移性CRC患者来说, 预测阈值为 ≥ 3 CTC/7.5 mL (PFS) 和 < 3 CTC/7.5 mL (OS) ^[17]。

1.1 CTC 的临床应用

1.1.1 肿瘤早期诊断与筛查 由于CRC患者早期症状不典型, 早期筛查主要依靠粪便隐血试验及肿瘤标志物等相关检查, 但其敏感性和特异性均有限。杨平等^[18]通过检测60例不同分期的CRC患者以及30例直肠良性疾病患者外周血CTC的表达情况发现, CRC患者外周血CTC的阳性率明显高于良性疾病对照组, 并且发现IV期CRC患者CTC的阳性率显著高于II~III期患者, 提示外周血CTC的数量与患者疾病的临床进展和临床分期有关。因此可以通过早期检测CTC水平筛选出CRC高危人群以提高CRC的早期诊断率。

1.1.2 监测肿瘤复发和转移 近年来, CTC与肿瘤复发转移的关系成为肿瘤研究的热点。Tien等^[19]的研究发现13例门静脉CTC计数较高的患者中有11例患者在术后6个月内发生了肝转移, 相反, 47例门静脉CTC计数较低的患者中只有6例发生了肝转移, 因此可以认为门静脉血中CTC数量可以作为术后6个月内肝转移的重要预测因素。Huang等^[20]的一项Meta分析统计分析了11项研究包含1847例CRC患者外周血CTC的相关数据, 也发现mCRC患者的外周血CTC的数量较未发生远处转移的患者显著升高。因此检测肿瘤患者外周血CTC的数量可以帮助监测患者是否出现复发及转移。

1.1.3 评估肿瘤患者预后 通过检测CRC患者术前以及术后外周血CTC数量及其两者之间的变化情况可以有效地判断患者的手术预后情况。一项Meta分析结果发现, 根据CRC患者术前外周血CTC的数量将其分为2组, 分别为CTC高数量组和CTC低数量组, 相较于CTC高数量组, 低数量组患者疾病控制率更好 ($P=0.048$), OS和PFS更长 ($P<0.001$); 进一步分析可以发现, 术后CTC由低数量组转变为高数量组和由高数量组转变为低数量组相比, OS ($P<0.001$) 和PFS ($P=0.023$) 更短^[21]。Tsai等^[22]也发现, 若术后患者血清中CTC计数 ≥ 5 个, 其发生远处转移的概率是CTC < 5 个的患者的8倍, 并且无复发生存期 (recurrence-free survival, RFS) 也更短。此外, Bork等^[23]的研究也显示手术前CTC数量是患者独立的预后预测因子。

1.1.4 评估化疗效果 临床上判断晚期肿瘤患者治疗疗效主要是根据基于测量病灶大小的 RECIST 疗效评价标准,但不是所有经过治疗好转的患者病灶都会缩小,部分患者病灶会出现形态学的变化比如囊性变,因此仅仅依靠 RECIST 标准评价患者情况有局限性。而 CTC 联合传统标准则可以更准确的评价患者的疗效及预后。Huang 等^[21]的 Meta 分析比较了化疗对 CTC 高数量组和低数量组的影响差异,CTC 低数量组化疗后中位无疾病进展期和中位疾病进展期分别为 21.7 个月和 7.9 个月,而 CTC 高数量组中位无疾病进展期和中位疾病进展期分别为 9.6 个月和 3.3 个月,两组疗效的差异提示 CRC 患者 CTC 的数量与化疗疗效之间有显著相关性。因此,除传统的影像学检查 CT、MRI 之外,外周血 CTC 计数可以作为判断化疗效果的补充性指标,帮助临床医生根据化疗过程中 CTC 数量的动态变化判断化疗效果,及时调整化疗方案^[24]。Abdallah 等^[25]研究发现连续动态监测 mCRC 患者外周血 CTC 中胸苷酸合成酶的变化可以作为预测 5-氟尿嘧啶耐药生物标志物的辅助工具。Khoo 等^[26]通过体外培养 CTC 观察到 CTC 形成簇集的可能性与药物浓度增加呈负相关,簇集形成所需药物浓度的增加可能预示着耐药性的产生,为临床医师早期对患者进行干预或及时调整干预措施提供了希望。

除此之外,提取肿瘤患者血液中的 CTC 还可用来检测药物靶点。研究发现可以检测乳腺癌患者 CTC 表面的 PD-L1 表达情况明确患者全身情况,将液体活检与免疫治疗联系起来,为免疫治疗在肿瘤中的应用提供了一种新途径^[4]。与 CtDNA 仅检测游离的肿瘤 DNA 碎片相比较,CTC 可利用完整的肿瘤细胞信息,更好的反映肿瘤在机体内的发生、发展、转移及复发情况^[27]。并且,对分离出来的 CTC 还可以进行核酸水平、蛋白质水平及分子水平的后续检测,进一步指导后续临床工作。

2 CtDNA

循环无细胞 DNA (cell-free DNA, CfDNA) 是由正常细胞、肿瘤细胞以及循环肿瘤细胞等凋亡坏死后释放到血管中的游离 DNA 片段,通常与蛋白质结合形成核小体游离于全身血液循环中^[28]。CfDNA 一旦进入外周循环,半衰期很短,很快就会通过肾脏、肝脏和脾脏等迅速从体内清除^[4]。因此,CfDNA 可以实时反映机体全身情况。肿瘤患者血液中的 CfDNA 包括非肿瘤来源的 DNA 和肿瘤

来源的 DNA,后者又被称为 CtDNA,可能来源于原发性肿瘤、转移灶或 CTC,其基因图谱与相应肿瘤的基因图谱非常匹配,能够真实可靠的反映患者的肿瘤信息^[4, 12]。CfDNA 中绝大部分为非肿瘤来源 DNA,而 CtDNA 的浓度很低^[4]。通过以往的研究发现,只有当 CtDNA 在 CfDNA 中的占比在 10% 或以上时,才能得到准确的肿瘤信息^[29]。可以通过加大测序深度来提高 CtDNA 检测的灵敏度和准确率,但是有研究已经证实许多良性病变与恶性肿瘤有着相似甚至相同的突变,因此提高检测的灵敏度可能会带来假阳性的结果,从而导致过度诊疗^[30]。CtDNA 反映的是从同个肿瘤病灶多个区域或不同肿瘤病灶释放的 DNA,可以评估肿瘤内的异质性及检测到亚克隆突变,以提供对肿瘤基因组的全面观察^[31]。CtDNA 的定量分析可以用于评估肿瘤负荷,因为肿瘤患者血浆中 CtDNA 含量明显高于健康人或良性疾病患者,并且随着肿瘤的分期的增加,CtDNA 含量上升^[32]。

2.1 CtDNA 的临床应用

2.1.1 CRC 的筛查与诊断 Bettogowda 等^[33]通过 PCR 技术和二代测序 (next generation sequencing, NGS) 技术对 640 例不同类型的肿瘤患者包括 CRC 进行了分析;在晚期肿瘤患者中有 75% 的患者外周血检测到了突变的 CtDNA,而早期肿瘤中不到 50% 的患者检测到突变 CtDNA,提示 ctDNA 的检出率与肿瘤负荷相关;该试验也证实了 CtDNA 检出率与分期也有关:47% 的 I 期肿瘤患者能够检测出 ctDNA,而 II、III 和 IV 期肿瘤患者的 CtDNA 检出率分别为 55%、69% 和 82%。Yang 等^[34]研究也证实 IV 期 CRC 患者外周血的 CtDNA 浓度显著高于 I 期患者并且 CtDNA 浓度增加与肿瘤大小增加相关,提示高浓度的 CtDNA 与患者的不良预后显著相关,并且该研究也显示了与临床上常用的生物标记物如 CEA、CA19-9 相比,CtDNA 的检出率比较高,提示 CtDNA 对 CRC 的筛查比肿瘤标志物效果要好。Boni 等^[35]的研究表明 CtDNA 在肠癌患者中的水平明显高于正常人群,且肿瘤分期越晚,CtDNA 血清浓度越高。将癌胚抗原与 CtDNA 联合作为早期筛查的肿瘤标志物,单个指标阳性的敏感性增加至 88%,特异性为 70.7%,两者均阳性时疾病诊断特异性可达 100%^[36]。

2.1.2 疗效判断 已经有相关研究证明 CtDNA 具有预后评估价值,在非转移性结肠癌患者经过手术治疗或化疗后,外周血仍检测得到 CtDNA 对患者来说是复发和不良预后相关的一个强有力的预

测指标^[37]。并且通过检测血液中 CtDNA 的肿瘤特异性变化,还可以检测出微小残留病灶,并预测结肠癌患者的复发情况^[38]。Symonds 等^[39]在对 91 例 CRC 患者手术前后血液样本的分析中发现,47 例患者在诊断时具有 CtDNA 阳性,35 例(74.5%)在肿瘤切除后转为阴性。Diehl 等^[40]的研究发现 CtDNA 在所有患者术前均能检测到,而连续血液取样显示 CtDNA 水平与手术切除程度有关。Cheng 等^[41]的研究也显示 CtDNA 既可以用来判断肿瘤是否切除彻底,又可以判断药物治疗是否有效。在许多肿瘤中,与抑癌基因相关的特定区域 CpG 岛启动子高度甲基化与肿瘤的发生发展有关,因此,CtDNA 的甲基化是一种很有前途的生物标志物^[4]。有相关研究比较了肿瘤组织中的异常的甲基化和血液样本中匹配的 CtDNA,相关性较好^[42]。Murray 等^[43]在 CRC 患者手术 12 个月内测定 CtDNA 的 BCAT1 和 IKZF1 甲基化状态,发现甲基化阳性的患者残留微小病灶和术后复发的风险大大增加。除此之外,David 等^[44]的一项研究将液体活检与免疫治疗联系起来。研究人员将液体活检测得的 bTMB 和通过组织样本测得的 TMB 进行比较,发现两者在整体上呈现正相关关系,后又发现 bTMB 的大小能够独立预测免疫治疗的疗效。

2.1.3 对治疗耐药的预测 液体活检也被成功应用于确定 mCRC 患者对 EGFR 抑制剂的耐药机制。在接受西妥昔单抗或帕尼单抗治疗 6 个月后,将近 40% 的患者血浆中可检测到高水平的 KRAS 突变,而在开始治疗前获得的组织活检标本中未发现该基因任何突变,并且,可以比影像学检查提前 10 个月证实疾病进展^[6, 45]。在转移性 CRC 和对 EGFR 抑制剂继发性耐药患者的血浆 CtDNA 中也检测到 met 扩增^[46]。因此,对患者血液 CtDNA 进行连续动态监测可以明确机体耐药情况,根据检测结果及时调整治疗措施,使患者获得最大的临床效益。

2.1.4 预后评估 Thomsen 等^[47]在对 138 例接受标准一线治疗的 mCRC 患者的研究中发现,第一轮化疗后低水平的 CtDNA 与疾病进展低风险有关,在治疗过程中任何时间 CtDNA 的显著增加都预示着疾病进展的高风险。Yao 等^[48]报道了 RAS/BRAF 突变的 CtDNA 检测可预测 mCRC 一线化疗患者 PFS 的恶化,为 RAS/BRAF CtDNA 突变检测在 mCRC 患者中的预后价值提供依据。原则上,液体活检方法可能非常适合测量微小残留病灶(Minimal residual disease, MRD)。在一项研究中,Diehl 等^[40]使用 BEAMing(珠乳扩磁技术)

方法测定 CRC 患者 CfDNA 中低至 0.01% 的突变频率,检测结果呈阳性的患者通常在局部手术后 1 年内复发。最近,Tie 等^[37]报道了一项前瞻性试验的结果,该试验评估了 II 期 CRC 患者术后 CtDNA 水平与肿瘤复发的关系,术后 CtDNA 检测到的患者的复发率是检测不到的患者的 10 倍以上。

由于 CtDNA 的假阳性率低、半衰期短、灵敏度高、数量较 CTC 等诸多优点,使其更适合成为肿瘤生物学指标。因此,也有越来越多有关于 CtDNA 的研究正在进行。最近有一项里程碑式的研究证明了 CtDNA 具有一定的长度特征。该研究通过将 344 份肿瘤患者血浆样本与 65 例健康人的血浆样本进行对比分析发现,健康人与肿瘤患者的 CfDNA 在 90~150 bp、180~220 bp 和 250~320 bp 之间的分布都有所不同,当他们将这些 CfDNA 测序后还发现带有肿瘤突变的 CtDNA 片段普遍比核小体 DNA 片段(167 bp)短 20~40 bp,在 90~150 bp 区间富集,说明可以通过富集短片段的方法提高 CtDNA 的浓度,进而能提高检测的灵敏度和准确度^[49]。研究者继续用片段选择性测序法检测肿瘤患者的疾病进展,发现能够比影像学检查提前 60 d 检测到肿瘤进展,而能够比未经片段选择的液体活检提前 89 d^[49]。不仅如此,研究者重新用两种液体活检方法对另一队列的 48 份肿瘤患者的血浆样品进行检测,与已知结果相比,两者的准确率分别为 82% 和 50%^[49]。可见,通过片段选择性液体活检能够大大提高液体活检的准确性,更适用于临床应用。

尽管 CtDNA 对临床的应用优势越发明显,但也有许多问题需要进一步解决^[4],比如:1) 患者血液采集程序的标准化问题;2) 如何提高样本在室温下的稳定性,从而有效降低分析前 ctDNA 的变异;3) 明确 CtDNA 定量方法的标准,以提高灵敏度及准确性。

3 循环肿瘤 RNA 及外泌体检测

miRNA 是血液中含有最丰富的 cfRNA 分子,可以被外泌体、凋亡小体、蛋白质-miRNA 复合物和肿瘤血小板(TEPs)所携带。外泌体是一种 30~150 nm 的双层膜囊泡,血细胞、内皮细胞、免疫细胞、血小板和平滑肌细胞都能释放外泌体^[50-51]。外泌体中包含蛋白质以及 DNA、mRNA 和 miRNA 等核酸,在细胞间进行信息交换和调节受体细胞活动^[52-53]。肿瘤来源的外泌体可以调节宿主

微环境、增强肿瘤侵袭能力,最终导致疾病进展及远处转移^[54]。目前可以通过常规密度梯度离心法从体液中提取外泌体,也可以通过超速离心、透射显微镜观察或根据特定蛋白标记物来分离外泌体^[55]。从生物体液中收集到的外泌体可以分离和随后分析mRNA,从而检测突变、剪接变异和基因融合,以及基因表达谱分析^[56]。因与肿瘤相关的外泌体包含有肿瘤相关信息,因此外泌体是一种潜在的肿瘤生物标志物。

检测外泌体中的mRNA与检测来自肿瘤细胞的CtDNA片段相比,mRNA可能来自一个高表达基因并且含有大量拷贝,并且可以以较高的浓度进入血液循环,因此,对于血液中CtDNA片段较少甚至无法检测到的患者来说,对外泌体中的mRNA进行分析比较有优势^[4]。多项试验已经证实外泌体包含的miRNA及蛋白质组分的敏感性及其特异性明显高于目前临床上应用的肿瘤标志物CEA、CA19-9。Ogata等^[57]分析对比了CRC患者与健康人群血清中16种外泌体来源的miRNA,结果发现其中7种mRNA(miR-21、let-7a、miR-23a、miR-1229、miR-150、miR-1246、miR-223)的含量在CRC患者血清中显著升高,并且在经过手术治疗后这些miRNA在机体内的表达水平明显下降,不仅如此,通过miR-23a和miR-1246筛查早期CRC患者的敏感性分别为95%、90%。另一项研究表明,外泌体来源的miR-200家族表达缺失,将导致肿瘤细胞更容易侵入血管及淋巴管,并且在5-FU耐药的细胞系中同样观察到外泌体分泌的miR-200家族表达水平下降,提示外泌体miR-200家族的缺失,将导致肿瘤侵袭性增加,更易耐药^[58]。

4 TEPs

TEPs作为一种新兴的液体活检,可用于泛肿瘤分析、区分肿瘤类型以及肿瘤基因突变的诊断。Best等^[59]通过对283份血小板样本的mRNA序列进行测定,能够区分228例局限性或者转移性肿瘤及健康体检者,准确率高达96%,不仅如此,TEPs还能区分及定位6种不同的肿瘤类型,其判断原发肿瘤位置的准确率达71%。

5 小结与展望

综上所述,液体活检技术在CRC及其它肿瘤种得到了广泛研究及应用,能够为肿瘤患者提

供更精准的治疗措施,使患者获得最佳的临床受益。尽管如此,但液体活检仍面临着许多挑战,尚处于临床试验阶段,需进行大规模的前瞻性临床试验来进一步验证。相信液体活检能够更加精准地为患者带来希望。

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. doi: 10.3322/caac.21492.
- [2] Favoriti P, Carbone G, Greco M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review[J]. *Updates Surg*, 2016, 68(1):7-11. doi: 10.1007/s13304-016-0359-y.
- [3] Hu Z, Ding J, Ma Z, et al. Quantitative evidence for early metastatic seeding in colorectal cancer[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(7):1113-1122. doi: 10.1038/s41588-019-0423-x.
- [4] 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. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14.
- [5] Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients[J]. *Nat Med*, 2015, 21(7):795-801. doi: 10.1038/nm.3870.
- [6] Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):537-540. doi:10.1038/nature11219.
- [7] Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS, et al. Tumor Heterogeneity and Lesion-Specific Response to Targeted Therapy in Colorectal Cancer[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(2):147-153. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1283.
- [8] Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8760. doi:10.1038/ncomms9760.
- [9] Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(4):731-736. doi:10.1093/annonc/mdv005.
- [10] Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3):129-144. doi:10.1038/nrclinonc.2013.253.
- [11] Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Annu Rev Med*, 2012, 63:199-215. doi: 10.1146/annurev-med-062310-094219.
- [12] Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Cancer*

- Discov, 2014, 4(6):650–661. doi: 10.1158/2159–8290.CD–13–1014.
- [13] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9):623–631. doi: 10.1038/nrc3820.
- [14] Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(19):3213–3221. doi: 10.1200/JCO.2007.15.8923.
- [15] Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(5):329–340. doi: 10.1038/nrc2375.
- [16] Bidard FC, Michiels S, Riethdorf S, et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(6):560–567. doi: 10.1093/jnci/djy018.
- [17] Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(4):406–414. doi: 10.1016/S1470–2045(14)70069–5.
- [18] 杨平, 魏建昌, 张通, 等. 外周血循环肿瘤细胞检测在结直肠癌转移早期诊断中的应用[J]. *中国医师进修杂志*, 2017, 40(8):735–737. doi:10.3760/cma.j.issn.1673–4904.2017.08.017.
- Yang P, Wei JC, Zhang T, et al. The application of circulating tumor cells in early diagnosis of colorectal cancer metastasis[J]. *Chinese Journal of Postgraduates of Medicine*, 2017, 40(8):735–737. doi:10.3760/cma.j.issn.1673–4904.2017.08.017.
- [19] Tien YW, Kuo HC, Ho BI, et al. A High Circulating Tumor Cell Count in Portal Vein Predicts Liver Metastasis From Periampullary or Pancreatic Cancer: A High Portal Venous CTC Count Predicts Liver Metastases[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(16):e3407. doi:10.1097/MD.0000000000003407.
- [20] Huang X, Gao P, Song Y, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:202. doi: 10.1186/s12885–015–1218–9.
- [21] Huang X, Gao P, Song Y, et al. Relationship between circulating tumor cells and tumor response in colorectal cancer patients treated with chemotherapy: a meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:976. doi: 10.1186/1471–2407–14–976.
- [22] Tsai WS, Chen JS, Shao HJ, et al. Circulating Tumor Cell Count Correlates with Colorectal Neoplasm Progression and Is a Prognostic Marker for Distant Metastasis in Non-Metastatic Patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:24517. doi:10.1038/srep24517.
- [23] Bork U, Rahbari NN, Schölch S, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(8):1306–1313. doi:10.1038/bjc.2015.88.
- [24] Huang MY, Tsai HL, Huang JJ, et al. Clinical Implications and Future Perspectives of Circulating Tumor Cells and Biomarkers in Clinical Outcomes of Colorectal Cancer[J]. *Transl Oncol*, 2016, 9(4):340–347. doi:10.1016/j.tranon.2016.06.006.
- [25] Abdallah EA, Fanelli MF, Buim ME, et al. Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: a new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(6):1397–1405. doi: 10.1002/ijc.29495.
- [26] Khoo BL, Greci G, Jing T, et al. Liquid biopsy and therapeutic response: Circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment[J]. *Sci Adv*, 2016, 2(7):e1600274. doi: 10.1126/sciadv.1600274.
- [27] Chi KR. The tumour trail left in blood[J]. *Nature*, 2016, 532(7598):269–271. doi:10.1038/532269a.
- [28] Roth C, Pantel K, Müller V, et al. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11:4. doi:10.1186/1471–2407–11–4.
- [29] Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA[J]. *Nature*, 2013, 497(7447):108–112. doi:10.1038/nature12065.
- [30] Haque IS, Elemento O. Challenges in Using ctDNA to Achieve Early Detection of Cancer. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/237578v1>.
- [31] Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2):71–88. doi: 10.1038/s41576–018–0071–5.
- [32] Kim K, Shin DG, Park MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection[J]. *Ann Surg Treat Res*, 2014, 86(3):136–142. doi:10.4174/astr.2014.86.3.136.
- [33] Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
- [34] Yang YC, Wang D, Jin L, et al. Circulating tumor DNA detectable in early- and late-stage colorectal cancer patients[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4). pii: BSR20180322. doi: 10.1042/BSR20180322.
- [35] Cassinotti E, Boni L, Marzorati A, et al. Circulating cell-free DNA as a possible tumor marker and prognostic factor in colorectal cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2012, 38(10):979–980. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejso.2012.07.020.
- [36] Flamini E, Mercatali L, Nanni O, et al. Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(23):6985–6988. doi: 10.1158/1078–0432.CCR–06–1931.
- [37] Tie J, Kinde I, Wang Y, et al. Circulating tumor DNA as an early

- marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(8):1715–1722. doi: 10.1093/annonc/mdv177.
- [38] 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):346–392. doi:10.1126/scitranslmed.aaf6219.
- [39] Symonds EL, Pedersen SK, Murray DH, et al. Circulating tumour DNA for monitoring colorectal cancer—a prospective cohort study to assess relationship to tissue methylation, cancer characteristics and surgical resection[J]. *Clin Epigenetics*, 2018, 10:63. doi:10.1186/s13148-018-0500-5.
- [40] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):985–990. doi: 10.1038/nm.1789.
- [41] Cheng C, Omura-Minamisawa M, Kang Y, et al. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(2):303–309. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.01021.x.
- [42] Liggett T, Melnikov A, Yi QL, et al. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis[J]. *Cancer*, 2010, 116(7):1674–1680. doi: 10.1002/cncr.24893.
- [43] Murray DH, Symonds EL, Young GP, et al. Relationship between post-surgery detection of methylated circulating tumor DNA with risk of residual disease and recurrence-free survival[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(9):1741–1750. doi: 10.1007/s00432-018-2701-x.
- [44] Gandara DR, Paul SM, Kowanzet M, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab[J]. *Nat Med*, 2018, 24(9):1441–1448. doi:10.1038/s41591-018-0134-3.
- [45] Misale S, Arena S, Lamba S, et al. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224ra26. doi: 10.1126/scitranslmed.3007947.
- [46] Bardelli A, Corso S, Bertotti A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(6):658–673. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0558.
- [47] Thomsen CB, Hansen TF, Andersen RF, et al. Monitoring the effect of first line treatment in RAS/RAF mutated metastatic colorectal cancer by serial analysis of tumor specific DNA in plasma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):55. doi:10.1186/s13046-018-0723-5.
- [48] Yao J, Zang W, Ge Y, et al. RAS/BRAF Circulating Tumor DNA Mutations as a Predictor of Response to First-Line Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 2018:4248971. doi:10.1155/2018/4248971.
- [49] Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(466). pii: eaat4921. doi: 10.1126/scitranslmed.aat4921.
- [50] Liao J, Liu R, Yin L, et al. Expression profiling of exosomal miRNAs derived from human esophageal cancer cells by Solexa high-throughput sequencing[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9):15530–15551. doi:10.3390/ijms150915530.
- [51] Wieckowski E, Whiteside TL. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles[J]. *Immunol Res*, 2006, 36(1/3):247–254. doi:10.1385/IR:36:1:247.
- [52] Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4):575–581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007.
- [53] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication[J]. *J Proteomics*, 2010, 73(10):1907–1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- [54] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4):431–437. doi: 10.1007/s00109-013-1020-6.
- [55] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4:27031. doi:10.3402/jev.v4.27031.
- [56] Rani S, O'Brien K, Kelleher FC, et al. Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 784:181–195. doi: 10.1007/978-1-61779-289-2_13.
- [57] Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e92921. doi: 10.1371/journal.pone.0092921.
- [58] Senfter D, Holzner S, Kalipcian M, et al. Loss of miR-200 family in 5-fluorouracil resistant colon cancer drives lymphendothelial invasiveness in vitro[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(13):3689–3698. doi: 10.1093/hmg/ddv113.
- [59] Best MG, Sol N, Kooi I, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(5):666–676. doi:10.1016/j.ccell.2015.09.018.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 刘鹏, 刘合利. 结直肠癌液体活检的临床应用进展[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(9):1143–1149. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.017

Cite this article as: Liu P, Liu HL. Advances in clinical applications of liquid biopsies for colorectal cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2019, 28(9):1143–1149. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.017