



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.01.010

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.01.010

· 论著 ·

循环肿瘤 DNA 与原发性肝癌的临床相关性分析

杨忠霞 丁方回 张伟 蒋妮 毛小荣

【摘要】 目的 分析循环肿瘤 DNA (ctDNA) 与原发性肝癌 (PLC) 的临床相关性, 评估 ctDNA 对 PLC 的诊断和病情监测价值。**方法** 检测 PLC 组 (80 例)、肝硬化组 (30 例)、慢性肝炎组 (30 例) 患者及正常人群 (正常组, 30 例) 的外周血磷脂酰肌醇蛋白多糖 3 (GPC3)-ctDNA 水平, 比较各组 ctDNA 水平; 采用受试者工作特征 (ROC) 曲线评估 ctDNA 对 PLC 的诊断效能; 分析 ctDNA 浓度与 PLC 临床特征的相关性。**结果** PLC 组患者的 ctDNA 水平明显高于其余 3 组 ($P < 0.05$)。ctDNA 联合甲胎蛋白 (AFP) 诊断 PLC 的特异性 (94%) 和敏感性 (80%) 明显高于 ctDNA 单独诊断 PLC 的特异性 (84%) 和敏感性 (63%) 或 AFP 单独诊断 PLC 的特异性 (73%) 和敏感性 (82%)。肿瘤最大直径 > 3 cm 且伴门静脉癌栓者的 ctDNA 水平明显高于肿瘤直径 ≤ 3 cm 且无门静脉癌栓者 ($P < 0.05$)。PLC 巴塞罗那 (BCLC) 分期为进展期及终末期的患者 ctDNA 水平较早中期患者高 ($P < 0.05$)。**结论** ctDNA 水平与 PLC 的发生发展具有临床相关性, 联合 AFP 能够提高对 PLC 的诊断效能。

【关键词】 循环肿瘤 DNA; 原发性肝癌; 肝硬化

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A

Clinical correlation between circulating tumor DNA and hepatocellular carcinoma

Yang Zhongxia, Ding Fanghui, Zhang Wei, Jiang Ni, Mao Xiaorong. Department of Infectious Disease, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 Objective To analyze the clinical correlation between circulating tumor DNA (ctDNA) and hepatocellular carcinoma (PLC), and the value of ctDNA in the diagnosis and monitoring of PLC. **Methods** The levels of glypican-3 (GPC3)-ctDNA in peripheral blood of patients in PLC group ($n = 80$), liver cirrhosis group ($n = 30$), chronic hepatitis group ($n = 30$) and normal people ($n = 30$) were detected and compared. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic effect of ctDNA on PLC. The correlation between ctDNA and clinical characteristics of PLC was analyzed. **Results** The ctDNA level in PLC group was significantly higher than those in other three groups ($P < 0.05$). The specificity (94%) and sensitivity (80%) of ctDNA combined alpha fetoprotein (AFP) in the diagnosis of PLC were significantly higher than those of ctDNA alone (specificity 84%, sensitivity 63%) and AFP alone (specificity 73%, sensitivity 82%). The ctDNA of patients with tumor diameter > 3 cm and tumor thrombus was higher than that of patients with tumor diameter ≤ 3 cm and without tumor thrombus ($P < 0.05$). The ctDNA level of patients with advanced and end-stage of BCLC was higher in the early and middle stage ($P < 0.05$). **Conclusion** ctDNA level is clinically correlated with the occurrence of PLC. Combined with AFP can improve the diagnosis of PLC.

【Key words】 Circulating tumor DNA; Hepatocellular carcinoma; Liver cirrhosis

原发性肝癌 (PLC) 是目前我国第 4 位常见恶性肿瘤及第 2 位肿瘤致死病因^[1-2], 早期不易诊断, 大部分患者发现时已处于中晚期, 失去手术治疗机会。由于 PLC 存在较高的复发转移风险, 患者 5 年生存率不到 12%^[3]。研究发现, 磷脂酰肌醇蛋白多糖 3 (GPC3) 蛋

白、信使 RNA (mRNA) 与 PLC 的诊断及预后具有相关性, 但收集更为方便、经济的 GPC3-循环肿瘤 DNA (ctDNA) 是否对 PLC 诊断及病情评价具有价值尚不明确, 本研究旨在探讨 GPC3-ctDNA 对 PLC 诊断及病情评价的作用。

对象与方法

1. 对象: 选取 2017 年 9 月 ~ 2018 年 9 月于我院感染科住院治疗的 PLC 患者 80 例 (PLC 组), PLC 诊断

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (17JR5RA265)

作者单位: 730000 兰州, 兰州大学第一医院感染科 (杨忠霞、蒋妮、毛小荣), 普外科 (丁方回), 中心实验室 (张伟)

通讯作者: 毛小荣, E-mail: jenny80aa@126.com

符合《原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)》中的诊断标准,其中男 59 例,女 21 例,年龄 26~68 岁,平均年龄(56.6 ± 11.2)岁。68 例(85%)患者有肝硬化病史。选择同期就诊于我院的肝硬化患者 30 例(肝硬化组),肝硬化诊断符合 2019 年我国《肝硬化诊治指南》中的诊断标准并排除合并肝癌者,其中男 18 例,女 12 例,年龄 18~65 岁,平均年龄(51.3 ± 11.2)岁;慢性肝炎患者 30 例(慢性肝炎组),慢性肝炎诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》诊断标准并排除合并肝癌者,其中男 16 例,女 14 例;年龄 25~58 岁,平均年龄(31.5 ± 6.8)岁。选取健康体检者(否认既往慢性肝炎等其他疾病史)30 例作为正常组,其中男 17 例,女 13 例,年龄 23~67 岁,平均年龄(52.6 ± 12.0)岁。4 组患者在年龄、性别构成及 3 组肝脏疾病患者的病因构成比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。本研究经兰州大学第一医院伦理委员会审核批准[LDYYLL2020-04 号],受试者均知情同意。

表 1 PLC 组、肝硬化组和慢性肝炎组患者病因分布[例, (%)]

组别	例数	HBV	HCV	酒精	其他
PLC 组	80	66(82.5)	5(6.3)	4(5.0)	5(6.3)
肝硬化组	30	23(76.7)	1(3.3)	3(10.0)	3(10.0)
慢性肝炎组	30	27(90.0)	2(6.7)	1(3.3)	0(0)

2. 方法

(1)临床资料收集:观察 PLC 组患者入组时的体力、神志情况。经上腹部 CT 或 MRI 检查后,收集 PLC 患者的癌结节数目、肿瘤最大直径、门静脉癌栓情况及腹腔积液状况。

(2)实验室检查:所有入组者采集空腹静脉血 3 ml 置于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝采血管中,4℃下以 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液置于 -80℃冰箱保存。所有 PLC 患者入组时均留取空腹静脉血(留取血标本前均未行手术、介入及靶向治疗等抗肿瘤治疗),检测 ALT、AST、总胆红素(TBil)、白蛋白、凝血酶原时间(PT)、甲胎蛋白(AFP)等。

(3)循环游离 DNA(cfDNA)分离和提纯:采用血液微量基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取血浆 cfDNA,为减少误差,所有标本用同一批号试剂盒,操作按照说明书进行,将提取的溶液储存于 -20℃备用。

(4)实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 ctDNA 含量:通过生物合成 GPC3 DNA 序列作为标准品(上海吉玛制药技术有限公司),然后将该序列片段克隆到质粒 pUC57 中,经过验证后纯化并提取 DNA 作为本研究标准品。血浆 GPC3-ctDNA 含量通过实时荧光定

量 PCR 检测(上海吉玛制药技术有限公司)。GPC3 基因上游引物:5'-GGAGCAAGACGTGACCTGAA-3';下游引物:5'-CGGCCACAGTCCTTACTGAA-3'。

3. 统计学处理:应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。计数资料以例和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 ctDNA 单独或与 AFP 联合诊断 PLC 的特异性和敏感性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PLC 组患者的临床特征:55% 的 PLC 患者 AFP $< 400 \mu\text{g/L}$,体力活动状态(ECOG PS 评分)为 0~2 分;肿瘤结节为多发(数目 ≥ 2 个),肿瘤直径 $> 3 \text{ cm}$,肝功能 Child-Pugh 分级为 A/B 级。9 例患者发生肝外转移,其中 8 例腹腔淋巴结转移,1 例骨骼转移。见表 2。

表 2 80 例 PLC 组患者临床特征

	例数	比例(%)
AFP		
$\geq 400 \mu\text{g/L}$	36	45.0
$< 400 \mu\text{g/L}$	44	55.0
ECOG PS 评分		
0~2 分	68	85.0
3~4 分	12	15.0
肿瘤结节数目		
≥ 2 个	48	60.0
< 2 个	32	40.0
肿瘤最大直径		
$> 3 \text{ cm}$	49	61.2
$\leq 3 \text{ cm}$	31	38.8
Child-Pugh 分级		
A 级	35	43.8
B 级	30	37.5
C 级	15	18.8
门静脉癌栓	22	27.5
肝外转移	9	11.3
BCLC 分期		
0-A(极早期-早期)	34	42.5
B(中期)	16	20.0
C(进展期)	22	27.5
D(终末期)	8	10.0

2. GPC3-ctDNA 定量分析结果:PLC 组、肝硬化组、慢性肝炎组、正常组 ctDNA 含量分别为(100.95 ± 85.16) copies/ μl 、(34.12 ± 14.01) copies/ μl 、(28.60 ± 5.55) copies/ μl 、(25.40 ± 8.53) copies/ μl 。PLC 组明显高于肝硬化组、慢性肝炎组和正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);肝硬化组、慢性肝炎组与正常组两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3. GPC3-ctDNA 用于 PLC 诊断的敏感性和特异性

分析:ROC 曲线分析结果显示,ctDNA 单独诊断 PLC 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.737(95% CI 0.561 ~ 0.913),约登指数最大为 0.63,对应的特异性是 84%,敏感性是 63%。AFP 单独诊断 PLC 的 AUC 为 0.725(95% CI 0.613 ~ 0.958),约登指数最大为 0.58,对应的特异性是 73%,敏感性是 82%。ctDNA 联合 AFP 诊断 PLC 的 AUC 为 0.861(95% CI 0.718 ~ 1.000),约登指数最大为 0.65,对应的特异性是 94%,敏感性 80%。

4. 不同临床特征 PLC 患者 GPC3-ctDNA 水平比较:PLC 组中肿瘤直径 > 3 cm 且发生门静脉癌栓的患者 ctDNA 水平较肿瘤直径 ≤ 3 cm 且无门静脉癌栓的患者高 ($P < 0.05$)。BCLC 进展期及终末期患者 ctDNA 水平较早中期患者高 ($P < 0.05$)。不同年龄、性别、Child-pugh 分级的 PLC 患者 ctDNA 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 不同临床特征 PLC 患者 GPC3-ctDNA 水平比较

临床参数	例数	GPC3-ctDNA 水平 (copies/ μ l)	P 值
肿瘤状态			
肿瘤直径 > 3 cm 且发生门静脉癌栓	18	156.33 ± 89.80	0.003
肿瘤直径 ≤ 3 cm 且无门静脉癌栓	26	45.25 ± 36.04	
性别			
男	59	111.51 ± 89.94	0.656
女	21	90.03 ± 89.23	
年龄			
≥ 60 岁	32	110.14 ± 88.47	0.612
< 60 岁	48	91.39 ± 91.02	
Child-pugh 评分			
A 级	35	106.91 ± 95.63	0.521
B 级	30	101.47 ± 73.72	
C 级	15	106.84 ± 93.92	
BCLC 分期			
0 + A + B(极早期 + 早期 + 中期)	50	86.54 ± 53.65	0.036
C + D(进展期 + 终末期)	30	135.26 ± 76.38	

讨 论

PLC 恶性程度高,预后差,早期诊断、早期治疗、密切监测病情变化对改善预后具有重要价值。AFP 是目前 PLC 临床诊断及病情评价常用的血液标志物,但敏感性和特异性仍较低^[4-5]。肝脏穿刺活组织检查由于其有创性及受到基础肝病的限制,不易在临床常规、反复应用^[6]。目前,AFP 与其他指标联合检测被认为有望提高 PLC 的早期诊断率^[7]。

ctDNA 是存在于肿瘤患者外周血液中的 DNA 片段,携带有肿瘤遗传信息。研究表明,多种肿瘤患者的血浆中可检测到 ctDNA^[8-9]。GPC3 表达与 PLC 的发生、发展和预后密切相关,研究表明 PLC 癌组织中 GPC3 蛋白高表达,而在正常肝组织中不表达或低表达^[10-11],

因此,本研究以 GPC3 基因作为检测 ctDNA 的靶基因。而 GPC3-ctDNA 是否能够帮助诊断疾病尚不明确,本研究分别对 PLC、肝硬化、慢性肝炎及正常人群外周血中 GPC3-ctDNA 水平进行检测发现,PLC 患者外周血中 GPC3-ctDNA 水平显著升高,提示 GPC3-ctDNA 具有成为诊断 PLC 生物标志物的潜力。本研究中 ROC 曲线分析结果显示,相较于单一 ctDNA 定量或单一 AFP 检测,GPC3-ctDNA 联合 AFP 可以提高对 PLC 的诊断效能。

PLC 易发生门静脉侵犯、腹腔淋巴结转移及远处转移,预后差。其中门静脉侵犯是临床中最多见的 PLC 进展形式。除了在诊断方面的价值外,ctDNA 在病情严重程度和疾病进展方面也有重要意义。Ren 等^[12]对 79 例 PLC 患者、20 例肝硬化但无 PLC 患者和 20 例正常对照者进行研究发现,ctDNA 水平与肿瘤大小及 TNM 分期相关,且与 3 年无病生存率和总生存率呈负相关。本研究得到了相似的结果,发现当肿瘤发生门静脉侵犯时,GPC3-ctDNA 水平明显升高;且 BCLC 分期为进展期和终末期的患者 GPC3-ctDNA 水平明显高于早中期患者。因此 ctDNA 有望用于 PLC 病情及疾病进展的评估。

综上所述,PLC 患者外周血液中可检测到 ctDNA,联合 AFP 在诊断 PLC 中具有较高的敏感性及特异性,且 ctDNA 水平与肿瘤进展具有相关性,能够帮助优化 PLC 的临床管理。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Dhir M, Melin AA, Douaiher J, et al. A Review and Update of Treatment Options and Controversies in the Management of Hepatocellular Carcinoma [J]. Ann Surg, 2016, 263(6): 1112-1125.
- [4] Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, et al. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2016, 63(1): 261-283.
- [5] Biselli M, Conti F, Gramenzi A, et al. A new approach to the use of alpha-fetoprotein as surveillance test for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis [J]. Br J Cancer, 2015, 112(1): 69-76.
- [6] Yin CQ, Yuan CH, Qu Z, et al. Liquid Biopsy of Hepatocellular Carcinoma: Circulating Tumor-Derived Biomarkers [J]. Dis Markers, 2016, 2016: 1427849.
- [7] 付萍, 周慧明, 沈磊. 联合检测肿瘤 M-2 型丙酮酸激酶和甲胎蛋白对肝癌的诊断价值 [J]. 临床内科杂志, 2014, 31(5): 338-339.
- [8] Cao Z, Peng L, He K, et al. Value of quantitative and qualitative analyses of serum and urine cell-free DNA as diagnostic tools for bladder cancer: a meta-analysis [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2019, 19(7): 645-653.
- [9] Thierry AR, Mouliere F, Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA [J]. Nat Med, 2014, 20(4): 430-435.
- [10] 王延峰, 李南阳, 任雅玲, 等. GPC3 和 AFP 联合检测对原发性肝癌的诊断价值 [J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(3): 366-368.
- [11] Haruyama Y, Kataoka H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1): 275-283.
- [12] Ren N, Ye QH, Qin LX, et al. Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(24): 3911-3914.

(收稿日期: 2019-11-22)

(本文编辑: 张一冰)