

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.15.026

脑脊液 ctDNA 活检在髓母细胞瘤的研究进展*

陈欣彤 综述, 盛汉松[△] 审校

温州医科大学附属第二医院神经外科, 浙江温州 325000

摘 要: 髓母细胞瘤(MB)是儿童常见的中枢神经系统恶性肿瘤之一,分析肿瘤分子特征有助于 MB 的临床诊断、治疗及预后。脑脊液循环肿瘤 DNA(ctDNA)分析能弥补临床组织活检进行分子分析的不足,为 MB 的诊断与监测提供更加精确、动态的分子信息。该文就脑脊液 ctDNA 活检在 MB 中的研究进展进行系统性综述。

关键词: 髓母细胞瘤; 脑脊液活检; 循环肿瘤 DNA

中图分类号: R739.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)15-2256-04

Research progress of ctDNA liquid biopsy of cerebrospinal fluid in medulloblastoma

CHEN Xintong, SHENG Hansong[△]

Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University,
Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Abstract: Medulloblastoma (MB) is a common malignant tumor of the central nervous system in children. Molecular characteristics analysis is helpful to the diagnosis, treatment and prognosis of MB. Analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) in cerebrospinal fluid can compensate for drawbacks of tissue biopsy, providing more accurate and dynamic molecular information for the diagnosis and monitoring of MB. This article summarizes the recent studies of ctDNA liquid biopsy of cerebrospinal fluid in MB.

Key words: medulloblastoma; liquid biopsy of cerebrospinal fluid; circulating tumor DNA

髓母细胞瘤(MB)是一种常见于儿童小脑或后颅窝的高侵袭性恶性肿瘤, 占所有儿童颅内肿瘤的 10%~20%。随着分子生物学的发展, MB 根据基因表达谱至少可以分为 4 种分子亚型: WNT、SHH、Group3 和 Group4^[1-2], 近年来也有不少研究表明可将这些亚型分为更详细的亚组^[3-4]。儿童 MB 主要根据分子亚型确定危险度分层及预后^[2,5]。因此, MB 的诊断、预后和治疗靶点的确定依赖于肿瘤的分子特征^[2]。目前临床上主要通过组织活检来表征, 但这种方式存在一定的局限性: 由于其具有侵入性, 组织活检的使用会受限于肿瘤的位置、大小等; 通过随机和局部的组织活检获得的样本可能会遗漏肿瘤异质性; 肿瘤基因组特征可能随着肿瘤发展而动态演变, 在肿瘤治疗过程中或复发时, 无法随时进行组织活检获取肿瘤信息, 使临床诊疗的精确性受到限制^[6-8]。循环肿瘤 DNA(ctDNA)的脑脊液活检有可能克服上述局限, 它能以一种侵入性较小的形式, 通过识别和验证肿瘤生物标志物, 提供实时信息以帮助诊断和监测中枢神经系统(CNS)恶性肿瘤^[9]。在本综述中, 笔者将概述脑脊液 ctDNA 活检在 MB 中的研究进展, 讨论其潜在的临床应用价值及转化为临床实践工具需要

克服的挑战。

1 脑脊液 ctDNA

细胞游离 DNA(cfDNA)是指由细胞脱落到生物体液中的 DNA 片段, 其中由肿瘤细胞脱落的 cfDNA 即为 ctDNA。ctDNA 主要来自凋亡和坏死的肿瘤细胞, 也可以由原发肿瘤中的任何细胞及其转移性病变释放^[6]。多项研究表明脑脊液是 ctDNA 的可靠来源, 在诊断 CNS 肿瘤方面比血浆或血清更有优势^[10-11]。ctDNA 可以根据健康细胞 DNA 中未发现的肿瘤特异性突变与 cfDNA 进行区分, 提供高特异性的生物标志物。随着肿瘤的生长, 细胞更新速率加快, 释放出更多的 ctDNA, 因此 ctDNA 丰度的纵向监测为评估肿瘤负荷提供了可追溯的生物标志物, 并且鉴于 ctDNA 的半衰期相对较短(约 2 h), 通过 ctDNA 分析实时监测肿瘤反应具有可行性^[6,12]。

脑脊液 ctDNA 的检测过程主要为脑脊液样本收集, 离心处理后通过核酸试剂盒提取与纯化 DNA, 继而采用 ctDNA 的检测和分析技术, 如新一代测序(NGS)技术、数字聚合酶链反应(PCR)技术、BEAMing 技术进行 DNA 测序, 对肿瘤特异性遗传和表观遗传学改变(如基因突变、扩增、重排、甲基化等)进行定

* 基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2021KY794, 2023KY147); 浙江省温州市儿童血液肿瘤疾病研究重点实验室。

[△] 通信作者, E-mail: shs951052@163.com。

量分析^[8,13-15]。目前,ctDNA 常用检测方法主要分为靶向和非靶向两大类。靶向方法检测特定的、已知分子变化的靶向 ctDNA,常使用基于 PCR 的技术或采用靶向基因测序,如数字 PCR 技术、BEAMing 技术,能检测到极低水平 ctDNA 中的突变,灵敏度高,适用于初始诊断和分子肿瘤分类,但受到检测突变数量的限制;非靶向方法一般采用全基因组或全外显子组测序,如 NGS 技术,能同时检测多个基因的多种变异,也包括肿瘤分子谱未知的 ctDNA 突变,适用于分析播散和转移性肿瘤随时间变化的基因组表现^[6,16-18]。

2 ctDNA 脑脊液活检用于诊断 MB 的临床价值

2.1 辅助 MB 诊断、分类及预后预测

脑脊液 ctDNA 的突变能高度体现肿瘤组织的基因型,可用于肿瘤的病理分型,协助诊断 MB,并通过分子分型结合患者年龄、手术切除程度、有无转移、组织病理类型辅助对 MB 的危险度进行分层^[2],进而预测 MB 患者的预后。MB 亚组主要通过分析与其相关的突变基因(BCOR、CTDNEP1、CTNNB1、DDX3X、GFI1、GFI1 act、GFI1B act、KBTBD4、KDM6A、KMT2C、KMT2D、PRDM6 act、PTCH1、SMARCA4、SMO、SUFU、TERT、TERT 启动子、TP53、ZMYM3 等)、染色体拷贝数变异(CNV,包括 GLI2、MYC、MYCN、OTX2 扩增,PTEN、SUFU 缺失等)及细胞遗传学特征(如 1q+,2+,4-,5+,6-,7+,8-,8+,9p+,9q-,10-,10q-,11-,13-,13+,14+,14q-,15-,16-,16q-,17p-,17p+,18+,21-)进行分类^[10,19]。ESCUDERO 等^[10]研究表明脑脊液 ctDNA 概括了原发性肿瘤中存在的肿瘤内异质性及肿瘤突变负荷,对于脑脊液细胞学结果阴性的患者,脑脊液中的 ctDNA 水平比血浆中的更高,并且脑脊液 ctDNA 的外显子组测序发现在原发性肿瘤样本中检测到的突变也可以在匹配的脑脊液 ctDNA 中检测出,二者的变异等位基因频率具有显著相关性。研究中检测到的基因组改变包括 MB 常见突变(PTCH1、TP53)、CNV(MYC 和 GLI2 扩增)和臂级染色体畸变(染色体 17p 丢失),表明 ctDNA 分析能为 MB 分子诊断与危险度分层提供充足的信息。LIU 等^[20]利用 MB 染色体不稳定性的优势将脑脊液 ctDNA 中 CNVs 作为可测量残留病灶(MRD)标志物,在 67 例基线样本[63.81%(67/105)]中检测到 MRD,且与相应的原发性肿瘤 CNV 谱呈高度相关。此外,有研究发现基线样本中 MRD 的可检测性与年龄、性别、切除范围、细胞学表现及从切除到脑脊液取样的持续时间无关,但与 MB 风险分组、转移状态、分子亚组和肿瘤位置显著相关,这些因素又具体表现在 MB 的危险度分层中^[20-21]。脑脊液 ctDNA 辅助 MB 诊断与危险度分层,继而为 MB 的预后提供预测信息,有研究表明虽然基线 MRD 的可检测性无显著预后价值,但放疗

后、化疗中期或治疗结束时的连续 MRD 评估与患者的无进展生存时间显著相关,无论初始风险分组如何,在辅助治疗期间或结束时持续的 MRD 阳性能高度预测疾病进展情况,反之,早期(例如在放疗后的时间点)MRD 阴性则可以作为治疗降级的附加标准^[20]。因此,相较于传统的组织活检分析分子特征的方法,脑脊液 ctDNA 能较全面、动态地反映肿瘤的基因组特征,从而辅助 MB 的诊断、分类与预后预测。

2.2 监测治疗反应、肿瘤进展与复发

在患者随访期间,通过监测 ctDNA 水平和 MRD,有助于评估治疗反应与肿瘤进展。ESCUDERO 等^[10]通过纵向分析脑脊液 ctDNA、检测 MRD,确定了肿瘤内和病灶间的异质性,揭示了肿瘤在复发时的基因组转化;通过对 MB 患者术前、术后及随访时的脑脊液 ctDNA 分析发现,在治疗结束时脑脊液样本中仍然观察到少量 ctDNA,表明脑脊液 ctDNA 分析可以检测到患者体内残留的小结节,并且在部分通过磁共振成像未观察到的样本中也能检测到。LIU 等^[20]研究发现,50%的患者通过 MRD 检测到的病情进展比放射学检测到的早 3 个月以上,即 MB 中 ctDNA 的增加先于放射学进展,表明脑脊液 ctDNA 可以弥补影像技术检测的滞后性,促进 MB 患者中 MRD 的鉴定。

MB 复发或转移的患者,脑脊液 ctDNA 中检测到的 MB 相关改变比来自肿瘤组织的基因组 DNA 更丰富,具有与原发肿瘤不共有的分子谱^[10,20-21]。ESCUDERO 等^[10]分析脑脊液 ctDNA 发现,除检测到肿瘤特异性突变(常见的 4 个预测驱动因素包括 PTCH1: p. L1024Pfs, TP53: p. N239Tfs, CDKN2B: p. G124D, KMT2A: p. W1199S)外,还检测到其他突变,揭示了复发时肿瘤的基因组转化。LIU 等^[20]对有疾病进展及在早期时间点与疾病进展时 MRD 均阳性的患者进行脑脊液与肿瘤样本匹配的 CNV 谱分析发现,80.00%患者(12/15)的染色体非整倍性存在,提示染色体克隆选择或进化,其中 2 例患者在原发肿瘤与基线 ctDNA 比较的亚群中检测到不同 CNV 谱,并且 ctDNA 的 CNV 谱与复发肿瘤更一致,提示患者基线时的脑脊液样本包括驱动疾病进展的侵袭性亚克隆。因此,ctDNA 分析可能更真实地代表最终驱动疾病进展的恶性细胞基因组信息,对肿瘤进展与复发的诊断有补充作用,有助于在复发时调整治疗策略。

MB 还呈现异常 DNA 甲基化改变的表现遗传学特征^[7],脑脊液 ctDNA 分析可以检测到具有诊断和预后价值的 DNA 甲基化标志物。LI 等^[22]分析了 MB 患者脑脊液 ctDNA 基因组中的表现遗传标志,包括 DNA 甲基化和羟甲基化,表明脑脊液 ctDNA 还可以进行表现遗传学分析,在 ctDNA 中鉴定的 DNA 甲基化标志具有潜在的诊断和预后价值,并且脑脊液样品中的 DNA 甲基化的变化可用于监测治疗反应和肿

瘤复发。

3 ctDNA 脑脊液活检用于诊断 MB 面临的挑战

首先是脑脊液获取方面的挑战。脑积液抽取在患有后颅窝肿瘤(如 MB)的儿童中较为常见,需在手术治疗前进行脑脊液外引流以减轻颅内压,并在 MB 临床诊疗过程中,常规收集脑脊液样品用于细胞学分析,因此脑脊液样本的获取对 MB 患儿一般不会造成额外伤害,且获取脑脊液的侵入性明显低于手术。但通过腰椎穿刺的方式获取脑脊液也存在一定限制,其禁忌证包括颅内压异常、脑疝风险和凝血异常等^[9]。

其次,收集和处理脑脊液 ctDNA 的方法尚需标准化和优化^[23],如样本采集的日期,尤其是术后采集日期,因为创伤诱导的 cfDNA 在手术后长达 4 周内丰度可能会稀释 ctDNA 的比例,进而影响检测结果^[24];样本量也会影响 ctDNA 的检测结果^[6];温度、储存条件等因素会影响 ctDNA 的完整性^[25]。

此外,ctDNA 并未在所有 CNS 恶性肿瘤患者的脑脊液中检测到,其检测结果可能受肿瘤负荷、肿瘤进展和解剖位置的影响^[20-21],尚需进一步扩大研究范围、确定检测涉及的影响因素以及提高检测技术的敏感性^[9]。影像学检查技术有时反映出的“肿瘤进展”可能是治疗引起的炎症反应过程,即假性进展^[26],尚需进一步的研究来调查脑脊液 ctDNA 分析是否有助于区分真实进展和假性进展。

4 总结与展望

目前肿瘤分子特征的分析已成为确定 MB 类型、预后以及治疗靶点的重要组成部分。脑脊液 ctDNA 分析从降低侵入性、更全面反映肿瘤异质性、样本获取的方便性等方面弥补了组织活检的不足,对 MB 的临床管理有潜在价值。脑脊液 ctDNA 分析可以反映 MB 的基因组特征,辅助 MB 早期、准确的分子诊断(包括亚型和危险度分层)与预后预测,脑脊液 ctDNA 分析还可以动态监测患者的疾病进展,提供有关 MRD、肿瘤演变和复发时的基因组信息。但 ctDNA 脑脊液活检尚面临处理方法标准化、检测技术优化等方面的挑战,因此有必要进行更大队列的研究,从优化检测技术、确立活检的纳入、处理与分析标准等方面解决脑脊液 ctDNA 分析向临床转化的困难,最终为 MB 患者提供更便捷、精准的临床管理等医疗服务。

参考文献

- [1] ORR B A. Pathology, diagnostics, and classification of medulloblastoma[J]. Brain Pathol, 2020, 30(3): 664-678.
- [2] 高鑫义,邹有瑞,黄灵,等. 儿童髓母细胞瘤分子病理学分型与诊断及预后的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(1): 108-112.
- [3] SHARMA T, SCHWALBE E C, WILLIAMSON D, et al. Second-generation molecular subgrouping of medulloblas-

toma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes[J]. Acta Neuropathol, 2019, 138(2): 309-326.

- [4] WU K S, SUNG S Y, HUANG M H, et al. Clinical and molecular features in medulloblastomas subtypes in children in a cohort in Taiwan [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(21): 5419.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 儿童髓母细胞瘤诊疗规范(2021 年版)[J]. 全科医学临床与教育, 2021, 19(7): 581-584.
- [6] BONNER E R, BORNHORST M, PACKER R J, et al. Liquid biopsy for pediatric central nervous system tumors [J]. NPJ Precis Oncol, 2018, 2: 29.
- [7] NORTHCOTT P A, BUCHHALTER I, MORRISY A S, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes[J]. Nature, 2017, 547(7663): 311-317.
- [8] 禹金良, 闫兆月, 盛致远, 等. 脑脊液 ctDNA 液体活检在脑恶性肿瘤中的临床研究[J]. 医药论坛杂志, 2020, 41(6): 75-79.
- [9] ESCUDERO L, MARTINEZ-RICARTE F, SEOANE J. ctDNA-based liquid biopsy of cerebrospinal fluid in brain cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(9): 1989.
- [10] ESCUDERO L, LLORT A, ARIAS A, et al. Circulating tumour DNA from the cerebrospinal fluid allows the characterisation and monitoring of medulloblastoma[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5376.
- [11] STANKUNAITE R, MARSHALL L V, CARCELLER F, et al. Liquid biopsy for children with central nervous system tumours: clinical integration and technical considerations[J]. Front Pediatr, 2022, 10: 957944.
- [12] SEOANE J, DE MATTOS-ARRUDA L, LE RHUN E, et al. Cerebrospinal fluid cell-free tumour DNA as a liquid biopsy for primary brain tumours and central nervous system metastases[J]. Ann Oncol, 2019, 30(2): 211-218.
- [13] 蔡一丹, 易帆, 谢小兵. 循环肿瘤 DNA 在恶性肿瘤早期诊断和预后的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(13): 1649-1653.
- [14] 蔡伟奇, 于津浦, 袁响林, 等. ctDNA 高通量测序临床实践专家共识(2022 年版)[J]. 中国癌症防治杂志, 2022, 14(3): 240-252.
- [15] 孙艳玲, 刘晶晶, 李苗, 等. 儿童髓母细胞瘤脑脊液循环肿瘤 DNA 检测可行性分析[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(3): 390-394.
- [16] MILLER A M, KARAJANNIS M A. Current role and future potential of csf ctDNA for the diagnosis and clinical management of pediatric central nervous system tumors [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(12): 1363-1369.
- [17] 董柳, 关明. 脑脊液 ctDNA 检测在中枢神经系统肿瘤的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 4(11): 1128-1133.
- [18] 李诗哲, 商冠宁. 循环肿瘤 DNA 的临床应用现状和挑战[J/CD]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(4): 72-78.
- [19] HOVESTADT V, AYRAULT O, SWARTLING F J, et

- al. Medulloblastomics revisited; biological and clinical insights from thousands of patients[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(1): 42-56.
- [20] LIU A P Y, SMITH K S, KUMAR R, et al. Serial assessment of measurable residual disease in medulloblastoma liquid biopsies[J]. Cancer Cell, 2021, 39(11): 1519-1530.
- [21] SUN Y, LI M, REN S, et al. Exploring genetic alterations in circulating tumor DNA from cerebrospinal fluid of pediatric medulloblastoma[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 5638.
- [22] LI J, ZHAO S, LEE M, et al. Reliable tumor detection by whole-genome methylation sequencing of cell-free DNA in cerebrospinal fluid of pediatric medulloblastoma[J]. Sci Adv, 2020, 6(42): eabb5427.
- [23] TIVEY A, CHURCH M, ROTHWELL D, et al. Circulating tumour DNA -looking beyond the blood[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(9): 600-612.
- [24] HENRIKSEN T V, REINERT T, CHRISTENSEN E, et al. The effect of surgical trauma on circulating free DNA levels in cancer patients-implications for studies of circulating tumor DNA [J]. Mol Oncol, 2020, 14 (8): 1670-1679.
- [25] RISBERG B, TSUI D W Y, BIGGS H, et al. Effects of collection and processing procedures on plasma circulating cell-free dna from cancer patients[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(6): 883-892.
- [26] THUST S C, VAN DEN BENT M J, SMITS M. Pseudo-progression of brain tumors[J]. J Magn Reson Imaging, 2018, 48(3): 571-589.
- (收稿日期: 2022-12-03 修回日期: 2023-04-05)

• 综 述 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 15. 027

lncRNA 作为鼻咽癌诊断、治疗、预后标志物的研究进展*

戴婷婷¹, 贾保昌², 孙洁璇¹ 综述, 高 卓^{1△} 审校

1. 哈尔滨医科大学附属第四医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 广州医科大学
附属肿瘤医院放疗科, 广东广州 510095

摘 要:鼻咽癌是一种具有特征性区域分布的头颈部肿瘤, 发病部位特殊, 早期不易察觉, 易复发和发生淋巴结转移, 预后差。长链非编码 RNA 作为参与整个生命过程的关键因子, 具有高特异性、高稳定性, 它可通过作为竞争性内源性 RNA、干扰信号通路转导等方式参与鼻咽癌的恶性行为和化疗耐药性, 有潜力作为鼻咽癌诊断、治疗、预后的生物标志物。

关键词:长链非编码 RNA; 鼻咽癌; 诊断; 治疗; 预后

中图分类号: R739. 63

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)15-2259-05

Research progress of lncRNA as markers for diagnosis, treatment and prognosis of nasopharyngeal carcinoma *

DAI Tingting¹, JIA Baochang², SUN Jiexuan¹, GAO Zhuo^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China; 2. Department of Radiotherapy, Affiliated Cancer Hospital and Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510095, China

Abstract: Nasopharyngeal carcinoma is a head and neck tumor with characteristic regional distribution, which has a special site of development, is not easy to detect in the early stage and prone to recurrence and lymph node metastasis, with poor prognosis. As a key factor participating in the whole life process, long-chain non-coding RNA, with high specificity and stability, can participate in the malignant behavior and chemoresistance of nasopharyngeal carcinoma by acting as competitive endogenous RNA and interfering with signal transduction, and it has potential as a marker for diagnosis, treatment and prognosis of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: long-chain non-coding RNA; nasopharyngeal carcinoma; diagnosis; treatment; prognosis

鼻咽癌是一种起源于鼻咽黏膜的恶性上皮性肿瘤, 77.0% 以上新发病例主要集中于东亚和东南亚地

* 基金项目: 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目 (UNPYSCT-2020175)。

△ 通信作者, E-mail: zgao018@163.com。