

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220217

· 综 述 ·

循环肿瘤 DNA 在食管癌患者全程管理中的应用研究进展

刘 涛¹, 金 海^{2*}

1. 北京大学第一医院胸外科, 北京 100034

2. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院胸外科, 上海 200433

〔摘要〕 食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 我国是食管癌的高发国家。由于食管癌预防难、发现晚, 有效防控是研究的热点和临床难点。以循环肿瘤 DNA (ctDNA) 为代表的液态活检技术的发展为食管癌早期诊断、治疗评估及预后监控提供了一种新的思路。ctDNA 检测方法具有高特异度及高灵敏度, 可以应用于肿瘤的筛查及诊断, 并且在判断预后、指导治疗方面也具有很高的应用价值。本文就 ctDNA 检测技术及其在食管癌诊疗中的研究进展进行阐述。

〔关键词〕 食管肿瘤; 循环肿瘤 DNA; 筛查; 诊断; 临床决策; 预后

〔引用本文〕 刘涛, 金海. 循环肿瘤 DNA 在食管癌患者全程管理中的应用研究进展[J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(2): 244-252. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220217.

Application of circulating tumor DNA in whole process management of patients with esophageal cancer: research progress

LIU Tao¹, JIN Hai^{2*}

1. Department of Thoracic Surgery, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

2. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

〔Abstract〕 Esophageal cancer is one of the common malignant tumors, and its incidence in China is high. Effective prevention and control is a focus and challenge due to difficult prevention and late diagnosis. The development of liquid biopsy technology represented by circulating tumor DNA (ctDNA) provides new insights for early diagnosis, treatment evaluation and prognosis monitoring of esophageal cancer. ctDNA detection method has high specificity and sensitivity, which can be used in tumor screening and diagnosis, and has high application value in judging prognosis and guiding treatment. This article reviews the detection technology of ctDNA and the research progress in the diagnosis and treatment of esophageal cancer.

〔Key words〕 esophageal neoplasms; circulating tumor DNA; screening; diagnosis; clinical decision; prognosis

〔Citation〕 LIU T, JIN H. Application of circulating tumor DNA in whole process management of patients with esophageal cancer: research progress[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(2): 244-252. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220217.

食管癌是世界上常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率分别排第 7 和第 6 位, 其病理类型主要为腺癌和鳞状细胞癌^[1-2]。食管癌不同的病理类型流行病学分布区域有明显的差异, 欧洲及北美地区主要以腺癌为主; 在东亚、非洲则以鳞状细胞癌为主^[2]。中国是食管癌的高发国家, 随着经济水平提升和饮食改善及公众健康意识的增强, 我国食管癌的发病率呈下降趋势, 但病例数仍占全球总病例数的近 50%, 其中食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)占比

高达 90%, 成为我国食管癌的主要病理类型^[2]。研究表明, 吸烟、热饮、食用腌制蔬菜是导致罹患 ESCC 的危险因素, 而肥胖、胃食管反流病及幽门螺旋杆菌感染是导致食管腺癌发病的危险因素^[2-3]。随着治疗方案的不断优化, 食管癌患者生存期得到有效延长^[4-5]。由于食管癌患者早期无明显症状, 肿瘤早期筛查效果欠佳, 多数患者在出现进食哽噎症状后就诊, 诊断时肿瘤已明显进展, 高达 40% 的患者在确诊时已是晚期, 晚期患者 5 年生存率仅为 5%; 局部晚期患者在接受根治性手术

〔收稿日期〕 2022-03-14

〔接受日期〕 2022-11-14

〔基金项目〕 上海市科学技术委员会课题(15411951700)。Supported by Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (15411951700)。

〔作者简介〕 刘 涛, 硕士, 住院医师。E-mail: liu-ta0@outlook.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161774, E-mail: projinhai@163.com

以及辅助治疗后仍有 20% 的患者在 2 年内发生复发或者转移,复发后中位生存期仅为 8 个月^[6-7]。目前食管癌筛查、诊断以及监测疾病进展的方法具有明显的局限性。食管镜加活检技术是公认的食管癌诊断的“金标准”,但该方法具有侵入性,且无法实时监测患者病程变化,限制了其大规模的应用^[8];血清学标志物检测对食管癌诊断和监测治疗的反应灵敏度均较差^[9];CT 等影像学监测手段不仅存在辐射暴露的风险,且肿瘤进展与炎性坏死区域区分困难^[10],因此,临床上迫切需要新的技术来提高食管癌诊断效率和指导临床决策。

目前主流观点认为,癌症的发生、发展、转移与肿瘤驱动基因的变异有直接关系^[11]。由于传统的肿瘤活检技术具有侵入性,并且无法实时监控,如何即时高效地检测肿瘤相关基因,成为当代诊疗工作中迫切需要解决的关键问题。随着医学研究的深入,业内专家提出了“液态活检”概念^[12]。1948 年 Mandel 和 Metais 首次发现人体血浆内存在细胞游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA),其中来自肿瘤细胞及外泌体的 cfDNA 被称为循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)^[13]。研究表明,ctDNA 源自肿瘤细胞凋亡、坏死、溶解过程中细胞核及线粒体 DNA 的释放及肿瘤细胞和外泌体的活性分泌^[14],这些 ctDNA 携带同原发肿瘤一致的基因突变、缺失、插入、重排、拷贝数异常及甲基化等分子遗传学改变,可有效解决肿瘤异质性的难题^[15]。鉴于其半衰期短、可实时检测和检测技术具有较高的灵敏度,ctDNA 检测在肿瘤早期筛查及指导临床治疗策略方面具有很高的应用价值^[16]。目前 ctDNA 已广泛应用于大肠癌、胰腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 等多种癌症的早期筛查、预后评价、指导临床治疗等方面^[17-18]。当前 ctDNA 应用于食管癌的研究还处于发展阶段,本文按其在临床中的应用场景进行了分类综述。

1 ctDNA 在食管癌筛查和诊断中的应用

在临床肿瘤学领域,液态活检已应用于部分肿瘤的早期检测,然而,ctDNA 在恶性肿瘤筛查中的应用仍面临诸多挑战。无症状个体的 ctDNA 浓度通常较低,因此检测 ctDNA 需要大量的血浆或灵敏度较高的方法。研究显示,在早期肿瘤患者中

ctDNA 检出率为 47%~69%,而在晚期肿瘤患者中其检出率为 85%~100%^[19]。食管鳞状异型增生被认为是 ESCC 的前体病变,患者通常无自觉症状,由于内镜筛查的侵入性特点,在筛查方面的依从性不佳。ctDNA 检测技术的进步提高了食管癌早期筛查的依从性和准确性。对 70 例食管癌患者的非肿瘤组织、上皮内瘤变和 ESCC 肿瘤样本的突变和基因拷贝数进行分析发现,上皮内瘤变和肿瘤样本具有相似的突变谱及基因组不稳定性特征,说明癌前病变中观察到的基因组变化可能成为识别 ESCC 的潜在生物标志物^[20]。ctDNA 检测应用于食管癌筛查具有很好的应用前景,但目前仍然需要进行大量相关研究来证明。

肿瘤患者中存在抑癌基因和修复基因启动子区域的异常甲基化,从而导致机体丧失对肿瘤的抑制作用。研究表明,同其他基因变异相比,早期肿瘤患者血浆中 ctDNA 甲基化是可以被检测的基因表观修饰,并且在不同肿瘤类型中甲基化表现具有高度特异性^[21],ctDNA 甲基化检测可以用于食管癌早期筛查^[22]。一项研究提示食管癌肿瘤组织中红细胞膜蛋白带 4.1 样 3、谷胱甘肽过氧化物酶 3 和 XIV 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的甲基化频率高于正常周围组织,并且这 3 个基因的甲基化仅在 ESCC 患者的血浆中检出^[23]。Qiao 等^[24]比较分析了肿瘤组织与癌旁组织中的异常甲基化区域,并开发了用于食管癌早期筛查的预测模型。该模型在训练集和验证集中区分肿瘤患者与健康对照的总体灵敏度 (训练集: 76.2%, 验证集: 74.7%) 和特异度 (训练集: 94.1%, 验证集: 95.9%) 均表现良好,且其在早期食管癌患者 (0~II 期) 中的灵敏度为 58.8%^[24]。我国的一项前瞻性研究证明,通过基于血浆中 ctDNA 甲基化检测可以较常规诊断提前 4 年检测出包括食管癌在内的 5 种常见肿瘤,总体灵敏度为 88%,特异度为 96%^[21]。

更多的液态活检尤其是 ctDNA 方法与技术 在食管癌中的研究进展见表 1。目前尚缺乏基于 ctDNA 专门针对食管癌的大样本量的筛查或早期诊断研究^[24-26],含食管癌在内的多癌种研究已有一定数量的报道^[21,27-30]。基于 ctDNA 的方法具有较好的特异度,但灵敏度在不同的研究、不同癌种间存在较大的差异。其检测维度多元化发展,不同维度指标相结合可以提高检测性能。目前大多数是

基于回顾性研究的结果, 需要前瞻性研究的进一步验证。并且目前的研究队列主要在癌症患者和健康人群对照之间展开, 缺乏与良性肿瘤患者、有近似临床症状患者的对比研究。同时, 早期食管癌的 ctDNA 检出灵敏度仍然不足, 容易被炎症和免疫性

疾病干扰; 检测成本也较高, 应用于临床筛查普及率较低。随着肿瘤发生与发展机制研究的不断深入, 检测基因面板 (panel) 的进一步完善, 以及检测费用的降低, ctDNA 应用于健康体检及针对高危人群的肿瘤筛查在将来有很好的应用前景。

表 1 以 ctDNA 为代表的液态活检技术在食管癌筛查和诊断中的应用

方法	样本量 <i>n</i>		肿瘤类型	肿瘤分期	检测技术与基因面板	检测指标	主要结果	文献
	健康	癌症						
单癌种								
	63	40	ESCC	0~Ⅰ	CCND1	ctDNA 拷贝数	特异度 80%, 早期灵敏度 69.8%	[25]
	60	66	ESCC	Ⅰ~Ⅳ	RNA 测序	miRNA 异构体	特异度 93.8%, 灵敏度 81%	[26]
	125	85	食管癌	0~Ⅳ	161 984 个CpG 位点	ctDNA 甲基化	特异度 95.9%, 灵敏度 74.7% (总体)、58.8% (早期)	[24]
多癌种								
CancerSEEK	812	1 005	肺癌、肠癌、胃癌、肝癌、食管癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌	Ⅰ~Ⅲ	16 个基因+8 个蛋白	ctDNA 突变+蛋白	特异度>99%, 不同癌种的灵敏度 33%~98%, 食管癌灵敏度 68.9%	[27]
PanSeer	605	223	胃癌、食道癌、肠癌、肺癌、肝癌	Ⅰ~Ⅳ	11 787 个CpG 位点	ctDNA 甲基化	特异度 96%, 总体灵敏度 88%, 食管癌灵敏度 91%	[21]
RealSeqS	812	883	肺癌、肠癌、胃癌、肝癌、食管癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌	Ⅰ~Ⅲ	16 个基因+8 个蛋白+全基因组浅测序	ctDNA 突变+蛋白+ctDNA 拷贝数	特异度 99%, 不同癌种的灵敏度 38%~97%, 食管癌灵敏度 80.5%	[28]
Grail	1 254	2 823	肺癌、肠癌、胃癌、肝癌、食管癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌等(>50 种)	Ⅰ~Ⅳ	1 166 720 个CpG 位点	ctDNA 甲基化	特异度 99.5%, 总体灵敏度 51.5%, 食管癌灵敏度 85%	[29]

ctDNA: 循环肿瘤 DNA; ESCC: 食管鳞状细胞癌; CCND1: 细胞周期蛋白 D1; miRNA: 微 RNA; RealSeqs: 重复元素非整倍体测序系统。

2 ctDNA 在预测食管癌患者预后及微小残留病中的应用

食管癌是一种致命性癌症, 当前主要通过肿瘤 TNM 分期来预测患者生存率。ctDNA 作为肿瘤遗传信息的载体, 其检出率和变异等位基因频率 (variant allele frequency, VAF) 与肿瘤负荷有关^[31]。由于食管壁内富含淋巴管网络, 随着肿瘤体积的增大和浸润深度的加深, 淋巴结转移 (lymph node metastasis, LNM) 的概率显著增加。肿瘤体积以及浸润深度是影响食管癌患者生存率的重要因素。ctDNA 可以预测肿瘤体积以及浸润深度, 其 VAF 越高多提示肿瘤体积越大、浸润深度越深^[32]。LNM 数量是食管癌分期的重要标准之一, 也是影响患者生存率的独立因素。术前 ctDNA 检测有助于预测肿瘤 LNM 情况, 一项关于 NSCLC 的研究表明, 术前 ctDNA 的高 VAF 与 LNM 显著相关^[33]。晚期食管癌患者的 ctDNA 检出率和含量均显著高

于早期患者, 发生肿瘤转移患者的 ctDNA 含量明显高于局限性肿瘤患者^[34]。另外, 某些特定基因突变可能是影响患者预后的独立因素, ctDNA 中某些特定基因的检出可以帮助判断患者预后^[35]。研究表明, 肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A 基因的改变与食管癌的发展和预后有关, 治疗后 TP53 基因突变阳性的患者预后更差^[36-37], 其可以作为辅助判断食管癌预后的靶点。

食管癌 TNM 分期对患者进行了很好的分层, 但不能对患者进行个体化预测^[38]。在临床事件中, 经常会出现某些早期肿瘤患者接受治疗后生存时间较短, 然而某些中晚期食管癌患者却可以获得更长的生存时间。多项研究表明, 在接受包括手术以及放化疗等抗肿瘤治疗的患者, 治疗后 ctDNA 检出率、VAF 均有大幅下降, 而治疗后仍然有 ctDNA 检出的患者其预后相对较差^[12,31-32]。出现此类现象可能与同肿瘤微小残留病相关。微小残

留病是指癌症患者在进行根治性手术、化疗、放疗、靶向或免疫治疗后用常规手段不能观察到残留的肿瘤病灶。微小残留病的检出代表患者体内肿瘤的持续存在,可能是肿瘤局部或远处转移的起点^[39]。当前微小残留病检测的分子标记物包括循环肿瘤细胞、ctDNA、非编码 RNA (微小 RNA、长链非编码 RNA、Piwi 互作 RNA)、外泌体和循环蛋白 (鳞状上皮细胞癌抗原、糖类抗原 125、癌胚抗原、前列腺特异性抗原) 等,多种证据表明通过 ctDNA 可以检测食管癌患者微小残留病状态,评估患者预后^[40]。检出 ctDNA 微小残留病阳性的食管癌患者,其复发率高,预后差^[37]。并且,由于 ctDNA 半衰期短,可以较影像学监测更早的检测出肿瘤残余,预测患者复发^[41-42]。基于这种特点,应用 ctDNA 在手术后 (或明确放疗后) 和辅助治疗期间,通过对肿瘤微小残留病的连续检测可以确认治疗方案。ctDNA 能够判断微小残留病清除的能力,并将其与临床检查相关联可以有效地判断肿瘤进展。研究发现食管癌晚期患者化疗后其 TP53 基因变异清除,证实可以通过 TP53 基因 VAF 变化预测治疗效果^[43]。另外,量化 ctDNA 变化可能提示肿瘤活性以及预后。一项针对肠癌的研究首次将治疗后 ctDNA 倍增时间作为患者预后影响因素,发现倍增时间较短提示肿瘤具有较强的转移风险以及更差的预后^[44]。量化 ctDNA 连续性监测可以为肿瘤患者个体化管理提供新的证据。

3 ctDNA 指导临床决策

目前手术仍是食管癌治疗的核心,围手术期辅助放化疗可以明确提高患者生存率^[45]。单纯手术对于局部晚期患者治疗效果并不理想,术后并发症发生率以及死亡率偏高^[46]。研究认为,对于可切除中晚期食管癌患者,新辅助治疗 (neoadjuvant therapy, NAT) 可能实现肿瘤降期,提高手术 R0 切除率,减少局部复发率,提高患者生存率^[4,45]。但以上诸多优势仅存在于对 NAT 有效的患者,研究表明,近 70% 的食管癌患者对目前的 NAT 反应有限或无反应,30%~40% 的患者在接受新辅助放化疗后仍未达到满意的效果,对于未达到病理缓解的患者 NAT 效果并不理想^[47]。另外,对于 NAT 后获得病理完全反应的患者是否仍需手术治疗,目前

仍有争议^[48]。有效监控患者病情变化、及时手术可以提高患者生存率,因此及时、有效地判断患者 NAT 抵抗是食管癌患者管理的关键。文献表明,内镜活检、超声内镜和 PET-CT 检查作为检测食管癌 NAT 以及术后微小残留病的单一方法准确性不足^[49]。ctDNA 检测对于食管癌 NAT 以及术后微小残留病的监测被证实是有效的,用于监测食管癌治疗后存在的残余病变具有很大的潜力^[37]。研究表明,食管癌患者在接受 NAT 联合手术的标准治疗后 ctDNA 检测呈阳性患者较阴性患者复发风险更高,预后更差,通过 ctDNA 检测发现肿瘤复发较放射学证据显示进展时间早 2.8 个月^[50]。

肿瘤个体化的治疗方案需要对患者进行完整的肿瘤学跟踪,当前肿瘤的治疗方案从传统基于病理特征的经验性决策转向基因型生物标记物治疗策略^[51]。肿瘤的异质性表现为基因组特征克隆进化,导致了某些肿瘤易于发生远处转移,转移部位基因组特征同原发灶基因组信号不一致^[52]。这种现象解释了恶性肿瘤治疗中应用靶向药物不能完全缓解以及耐药性的发生原因。而由于病理取材的“滞后性”,无法反映肿瘤的异质性,需要通过随访跟踪患者 ctDNA 相关突变才可以实现^[53]。ctDNA 水平可能会在疾病进展的极少数几个月内提供早期诊断,甚至在得到影像学证据或血液蛋白标记物水平变化之前提供早期诊断^[36,50,54-55] (表 2)。及时监测患者治疗反应,尽早判断肿瘤耐药性并且更改治疗方案可以有效改善患者预后^[56]。一项来自日本的研究认为,食管癌患者在接受化疗后,早期 ctDNA 变化可以辅助预测肿瘤消退程度和治疗效果^[43]。ctDNA 也是 ESCC 患者放疗的预后标志物,放疗后 ctDNA 阳性患者的无疾病生存和总生存均较阴性患者显著降低^[57]。然而,利用 ctDNA 检测预测食管癌预后的灵敏度在不同研究中差异较大^[50,55,58]。关于 NSCLC 的临床研究发现,表皮生长因子受体 -T790M 突变会导致患者对于吉非替尼的继发性耐药^[59]。肿瘤患者治疗过程中辅助应用 ctDNA 分析结合影像学监测,可以对肿瘤进展进行更加全面的评估。另外,ctDNA 分析可以提示医师何时使用成像诊断程序,减少患者的辐射暴露。当前 ctDNA 应用于食管癌治疗报道较少,随着食管癌治疗策略以及 ctDNA 检测技术的发展,ctDNA 将为食管癌的精准治疗带来新的灵感。

表 2 近年来 ctDNA 在食管癌预后监测中的应用

肿瘤类型	监测策略	监测方法	样本量 <i>n</i>	肿瘤分期	基因检测面板	主要结果	文献
ESCC	基于肿瘤信息	NGS	13	I ~ IV	53 个基因 (非特异性)	ctDNA 预测复发比临床提前 6 个月	[36]
食管癌	基于肿瘤信息	NGS	45	I ~ III	607 个基因	放化疗后 ctDNA 预测肿瘤进展比影像学证 据平均提前 2.8 个月	[50]
ESCC	基于肿瘤信息	数字 PCR	36	I ~ IV	31 个基因 (特异性)	ctDNA 预测复发的中位提前期为 112 d, 临 床有效性为 91%	[54]
ESCC	血浆	NGS	25	I ~ III	180 个基因	放疗后 ctDNA 阳性的患者无进展生存期、 总生存期显著降低	[57]
食管腺癌	血浆	NGS	97	I ~ III	77 个基因 (非特异性)	术后 ctDNA 预测复发的灵敏度为 50%、特 异度为 97%、阳性预测值为 90%、阴性预测 值为 68%	[58]
食管腺癌	基于肿瘤信息	NGS	20	I ~ IV	全基因组测序	术前、术后 ctDNA 预测复发的灵敏度分别 为 100%、80%, 较临床或影像学预测复发 的中位提前期约 1 年	[55]
ESCC	基于肿瘤信息	数字 PCR	42	I ~ IV	31 个基因 (特异性)	初始化疗周期的早期 ctDNA 变化可预测化 疗疗效, AUC 为 0.88	[43]

ctDNA: 循环肿瘤 DNA; ESCC: 食管鳞状细胞癌; NGS: 下一代测序; PCR: 聚合酶链反应; AUC: 曲线下面积。

4 挑战与展望

综上所述, 应用 ctDNA 测序诊断和监测癌症的能力有望给临床肿瘤学带来革命性的变化。然而, 可靠地检测微量的 ctDNA 片段仍然是一个主要的技术挑战。当前 ctDNA 检测成本较高, 关于 ctDNA 产生的代谢机制仍然不明确。ctDNA 来自死亡的肿瘤细胞碎片, 坏死和自噬是肿瘤细胞死亡的常见原因, 过程中会产生不均匀的 DNA 碎片。因此 ctDNA 片段化程度高、片段大小差异大、分离困难, 影响了其定量的准确性。由于高度片段化, 携带某些遗传标记的 DNA 分子可能会丢失, 从而影响了 ctDNA 分析的准确性。ctDNA 的释放、降解和清除涉及多种机制, 目前还没有得到充分的研究。ctDNA 以外泌体伴生、核小体 DNA 不同形式存在, 不同形式 ctDNA 表现出不同程度的稳定性; 另外核酸酶活性以及脾脏、肝脏等功能的变化水平也会影响 ctDNA 检测结果的稳定性^[60]。健康人的 ctDNA 含量通常为 5~10 ng/mL, 尽管肿瘤患者 ctDNA 水平是正常水平的 50 倍, 但早期肿瘤患者血液中 ctDNA 含量仍然很低, 一般仅占 cfDNA 的 0.01%, 因此 ctDNA 检测需要通过基因组扩增提高样本产量, 在基因扩增的过程中可能会发生偏倚误差。另外, ctDNA 多分布在低频区, 如何高效地从血液中分离出 ctDNA 用于临床评估具有挑战性^[61]。当前 ctDNA 检测方法以及基因面板的选择方面尚无统一的标准, 再加上其较高的成本, 都限制了其在临床上的应用。理想情况下, ctDNA 检测

分析方法应该能够以高灵敏度和低成本覆盖整个基因组, 如何精确有效的检测并且控制检测成本是当前研究的热点。

4.1 测序方法 目前应用于 ctDNA 检测的方法大致分为靶向和非靶向两种。靶向测序是将感兴趣的已知肿瘤致癌基因组合形成一个基因面板 (可包含数十至上千个基因), 通过测序找到已知基因中的致癌突变, 该方法可以克服 ctDNA 片段长度短、血液含量低、VAF 低等问题, 因此受到越来越多的关注^[62]。非靶向方法不需要事先了解原发肿瘤的遗传变化, 通常是对人体全部基因采用全基因组或全外显子组测序以及重排末端的个性化分析。非靶向方法在破译肿瘤异质性以及发现新的药物靶点方面发挥了重要作用, 由于其对于罕见突变检出率低、样本需要量大以及成本昂贵, 临床应用进展缓慢。同非靶向技术相比, 靶向测序通常更适用于临床。

目前用于检测 ctDNA 的技术包括基于定量 PCR 技术的扩增阻滞突变系统 PCR、实时荧光定量 PCR 等^[63], 具有简单易用, 成本低的优点, 然而, 这些方法大多灵敏度低, 只能分析有限数量的基因组位点。以微流体阵列式芯片、BEAMing、微滴数字 PCR^[64] 为代表的基于数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术, 是将稀释后的样品分配到大量的微小反应单元进行单分子模板 PCR 扩增, 直接通过阳性反应物的数量代表检测目标序列的拷贝数, 不需要依赖于扩增曲线和扩增效率, 也不需要参考样本。可以实现绝对定量分析, 突变检测相对

更灵敏,但是,产生的液滴必须服从泊松分布,不适合高浓度DNA样本的检测,而且一次只能检测到一个已知突变,检测效率并不理想。下一代测序(next-generation sequencing, NGS),也称为大规模并行测序,允许在不具备先前序列信息的情况下同时测序数百万个DNA片段^[17]。在可靠性、测序便捷性、数据解释和成本方面有了显著提高。标签扩增序列测序和肿瘤个性化深度测序是基于NGS技术的一些重要测序方法。NGS技术的出现对人类基因组学研究产生了革命性的影响,但是其读取长度较小、高GC区读取困难。一项研究通过对比5种业界成熟ctDNA分析方法运用模拟、合成DNA掺入实验和标准化的细胞系衍生参考样本的测试来评估ctDNA测序工作流程,研究证明当VAF高于0.5%时5种ctDNA检测方法均具有较高的灵敏度、特异度和重复性,而低于这一水平时检测的准确度无法得到保证^[53]。牛津纳米孔技术公司引入了纳米孔测序,被称为第三代测序(TGS)^[65],可以对单分子进行测序,不需要PCR扩增,因此产生的偏倚较少,基因组覆盖率较高。然而,第三代测序技术错误率较高,在ctDNA检测方面应用较少^[65]。

4.2 检测panel的选择 目前ctDNA检测技术策略包括肿瘤先验分析(tumor-informed assays)^[55]和肿瘤未知分析(tumor-agnostic assays)^[66]。肿瘤先验分析运用较早也较广泛,其在使用ctDNA进行预测分析前,必须先进行配对对肿瘤组织样本的检测获得变异信息,通过对比分析获得ctDNA中肿瘤特异性的变异分子,将其作为特定生物标志物进行后续的追踪分析,这种方法可使用固定化panel,其检测成本和检测周期适中,但对于不同癌种的灵敏度差异较大;也可以在组织样本全外显子测序后筛选个性化分子标签,从而定制个性化panel,后续使用多重PCR进行监测^[66],这种策略前期需要较长的周期,成本较高,但具有灵敏度较高的优点,后期跟踪的检测周期和检测成本大大降低。肿瘤未知分析策略不需要预先进行肿瘤组织检测,直接对cfDNA进行检测分析即可,因此这种策略又被称为tumor-naïve或plasma-only,这种方法可适当缩短检测周期,降低检测成本,但需要注意假阳性干扰。由于2种技术策略在食管癌中的应用均在发展中,目前尚无统一的标准,孰优孰劣还需

要更多的临床应用证据来评判。

鉴于目前ctDNA检测的局限性,未来还需要更多的临床和分子研究以及详细的功能实验。随着测序技术的进展,ctDNA潜在益处正不断被发掘,将对改善食管癌患者预后提供重要参考。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34. DOI: 10.3322/caac.21551.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [3] HUANG F L, YU S J. Esophageal cancer: risk factors, genetic association, and treatment[J]. *Asian J Surg*, 2018, 41(3): 210-215. DOI: 10.1016/j.asjsur.2016.10.005.
- [4] LIU S, WEN J, YANG H, et al. Recurrence patterns after neoadjuvant chemoradiotherapy compared with surgery alone in oesophageal squamous cell carcinoma: results from the multicenter phase III trial NEOCRTEC5010[J]. *Eur J Cancer*, 2020, 138: 113-121. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.08.002.
- [5] KELLY R J, AJANI J A, KUZDZAL J, et al. Adjuvant nivolumab in resected esophageal or gastroesophageal junction cancer[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(13): 1191-1203. DOI: 10.1056/nejmoa2032125.
- [6] HE H, CHEN N, HOU Y, et al. Trends in the incidence and survival of patients with esophageal cancer: a SEER database analysis[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(5): 1121-1128. DOI: 10.1111/1759-7714.13311.
- [7] DING T, LIU C, HUANG B, et al. A survival prediction nomogram for esophageal squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 7771-7782. DOI: 10.2147/CMAR.S329687.
- [8] CODIPILLY D C, QIN Y, DAWSEY S M, et al. Screening for esophageal squamous cell carcinoma: recent advances[J]. *Gastrointest Endosc*, 2018, 88(3): 413-426. DOI: 10.1016/j.gie.2018.04.2352.
- [9] HAYANO K, OHIRA G, HIRATA A, et al. Imaging biomarkers for the treatment of esophageal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(24): 3021-3029. DOI: 10.3748/wjg.v25.i24.3021.
- [10] WANG Y, LI L, COHEN J D, et al. Prognostic potential of circulating tumor DNA measurement in postoperative surveillance of nonmetastatic colorectal cancer[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(8): 1118-1123. DOI: 10.1001/

- jamaoncol.2019.0512.
- [11] MILLER K N, VICTORELLI S G, SALMONOWICZ H, et al. Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease[J]. *Cell*, 2021, 184(22): 5506-5526. DOI: 10.1016/j.cell.2021.09.034.
 - [12] KOSOVEC J E, ZAIDI A H, POUNARDJIAN T S, et al. The potential clinical utility of circulating tumor DNA in esophageal adenocarcinoma: from early detection to therapy[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 610. DOI: 10.3389/fonc.2018.00610.
 - [13] HABER D A, VELCULESCU V E. 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.
 - [14] SCHWARZENBACH H, HOON D S B, PANTEL K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6): 426-437. DOI: 10.1038/nrc3066.
 - [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. DOI: 10.1038/nrc.2017.7.
 - [16] EGYUD M, TEJANI M, PENNATHUR A, et al. Detection of circulating tumor DNA in plasma: a potential biomarker for esophageal adenocarcinoma[J]. *Ann Thorac Surg*, 2019, 108(2): 343-349. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2019.04.004.
 - [17] CHEN M, ZHAO H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection[J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1): 34. DOI: 10.1186/s40246-019-0220-8.
 - [18] GARCIA-PARDO M, MAKAREM M, LI J, et al. Integrating circulating-free DNA (cfDNA) analysis into clinical practice: opportunities and challenges[J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(4): 592-602. DOI: 10.1038/s41416-022-01776-9.
 - [19] BETTEGOWDA C, SAUSEN M, LEARY R J, 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.
 - [20] LIU X, ZHANG M, YING S, et al. Genetic alterations in esophageal tissues from squamous dysplasia to carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(1): 166-177. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.033.
 - [21] CHEN X, GOLE J, GORE A, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3475. DOI: 10.1038/s41467-020-17316-z.
 - [22] TALUKDAR F R, PIETRO M D, SECRIER M, et al. Molecular landscape of esophageal cancer: implications for early detection and personalized therapy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1434(1): 342-359. DOI: 10.1111/nyas.13876.
 - [23] LI X, ZHOU F, JIANG C, et al. Identification of a DNA methylome profile of esophageal squamous cell carcinoma and potential plasma epigenetic biomarkers for early diagnosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103162. DOI: 10.1371/journal.pone.0103162.
 - [24] QIAO G, ZHUANG W, DONG B, et al. Discovery and validation of methylation signatures in circulating cell-free DNA for early detection of esophageal cancer: a case-control study[J]. *BMC Med*, 2021, 19(1): 243. DOI: 10.1186/s12916-021-02109-y.
 - [25] KOMATSU S, ICHIKAWA D, HIRAJIMA S, et al. Clinical impact of predicting CCND1 amplification using plasma DNA in superficial esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(6): 1152-1159. DOI: 10.1007/s10620-013-3005-2.
 - [26] IBUKI Y, NISHIYAMA Y, TSUTANI Y, et al. Circulating microRNA/isomiRs as novel biomarkers of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0231116. DOI: 10.1371/journal.pone.0231116.
 - [27] COHEN J D, LI L, WANG Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test[J]. *Science*, 2018, 359(6378): 926-930. DOI: 10.1126/science.aar3247.
 - [28] DOUVILLE C, COHEN J D, PTAK J, et al. Assessing aneuploidy with repetitive element sequencing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(9): 4858-4863. DOI: 10.1073/pnas.1910041117.
 - [29] KLEIN E A, RICHARDS D, COHN A, et al. Clinical validation of a targeted methylation-based multi-cancer early detection test using an independent validation set[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(9): 1167-1177. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.05.806.
 - [30] CRISTIANO S, LEAL A, PHALLEN J, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer[J]. *Nature*, 2019, 570(7761): 385-389. DOI: 10.1038/s41586-019-1272-6.
 - [31] ABBOSH C, BIRKBAK N J, WILSON G A, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution[J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 446-451. DOI: 10.1038/nature22364.
 - [32] BONIFACE C, DEIG C, HALSEY C, et al. The feasibility of patient-specific circulating tumor DNA monitoring throughout multi-modality therapy for locally advanced esophageal and rectal cancer: a potential biomarker for early detection of subclinical disease[J]. *Diagnostics(Basel)*, 2021, 11(1): 73. DOI: 10.3390/diagnostics11010073.
 - [33] ZHANG R, ZHANG X, HUANG Z, et al. Development and validation of a preoperative noninvasive predictive

- model based on circular tumor DNA for lymph node metastasis in resectable non-small cell lung cancer[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2020, 9(3): 722-730. DOI: 10.21037/tlcr-20-593.
- [34] TOMOCHIKA S, IIZUKA N, WATANABE Y, et al. Increased serum cell-free DNA levels in relation to inflammation are predictive of distant metastasis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2010, 1(1): 89-92. DOI: 10.3892/etm_00000016.
- [35] TESTA U, CASTELLI G, PELOSI E. Esophageal cancer: genomic and molecular characterization, stem cell compartment and clonal evolution[J]. *Medicines (Basel)*, 2017, 4(3): 67. DOI: 10.3390/medicines4030067.
- [36] UEDA M, IGUCHI T, MASUDA T, et al. Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma recurrence[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(38): 62280-62291. DOI: 10.18632/oncotarget.11409.
- [37] LIU T, YAO Q, JIN H. Plasma circulating tumor DNA sequencing predicts minimal residual disease in resectable esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 616209. DOI: 10.3389/fonc.2021.616209.
- [38] WEN J, CHEN J, CHEN D, et al. Comprehensive analysis of prognostic value of lymph node classifications in esophageal squamous cell carcinoma: a large real-world multicenter study[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2021, 13: 17588359211054895. DOI: 10.1177/17588359211054895.
- [39] SPROLL C, FLUEGEN G, STOECKLEIN N H. Minimal residual disease in head and neck cancer and esophageal cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1100: 55-82. DOI: 10.1007/978-3-319-97746-1_4.
- [40] MODING E J, NABET B Y, ALIZADEH A A, et al. Detecting liquid remnants of solid tumors: circulating tumor DNA minimal residual disease[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(12): 2968-2986. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0634.
- [41] 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): 346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
- [42] CHIN R I, CHEN K, USMANI A, et al. Detection of solid tumor molecular residual disease (MRD) using circulating tumor DNA (ctDNA)[J]. *Mol Diagn Ther*, 2019, 23(3): 311-331. DOI: 10.1007/s40291-019-00390-5.
- [43] FUJISAWA R, IWAYA T, ENDO F, et al. Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(10): 1239-1249. DOI: 10.1093/carcin/bgab088.
- [44] HENRIKSEN T V, TARAZONA N, FRYDENDAHL A, et al. Circulating tumor DNA in stage III colorectal cancer, beyond minimal residual disease detection, toward assessment of adjuvant therapy efficacy and clinical behavior of recurrences[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(3): 507-517. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-21-2404.
- [45] WATANABE M, OTAKE R, KOZUKI R, et al. Recent progress in multidisciplinary treatment for patients with esophageal cancer[J]. *Surg Today*, 2020, 50(1): 12-20. DOI: 10.1007/s00595-019-01878-7.
- [46] ZHAO Z, ZHANG Y, WANG X, et al. Clinical response to chemoradiotherapy in esophageal carcinoma is associated with survival and benefit of consolidation chemotherapy[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(16): 5881-5888. DOI: 10.1002/cam4.3273.
- [47] KLEVEBRO F, ALEXANDERSSON VON DÖBELN G, WANG N, et al. A randomized clinical trial of neoadjuvant chemotherapy versus neoadjuvant chemoradiotherapy for cancer of the oesophagus or gastro-oesophageal junction[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(4): 660-667. DOI: 10.1093/annonc/mdw010.
- [48] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, et al. Esophageal and esophagogastric junction cancers, version 2.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019, 17(7): 855-883. DOI: 10.6004/jnccn.2019.0033.
- [49] EYCK B M, ONSTENK B D, NOORDMAN B J, et al. Accuracy of detecting residual disease after neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Surg*, 2020, 271(2): 245-256. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003397.
- [50] AZAD T D, CHAUDHURI A A, FANG P, et al. Circulating tumor DNA analysis for detection of minimal residual disease after chemoradiotherapy for localized esophageal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(3): 494-505.e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.10.039.
- [51] TURSKI M L, VIDWANS S J, JANKU F, et al. Genomically driven tumors and actionability across histologies: BRAF-mutant cancers as a paradigm[J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(4): 533-547. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0643.
- [52] ZOU S M, LI W H, WANG W M, et al. The gene mutational discrepancies between primary and paired metastatic colorectal carcinoma detected by next-generation sequencing[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(11): 2149-2159. DOI: 10.1007/s00432-018-2742-1.
- [53] DEVESON I W, GONG B, 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. DOI: 10.1038/s41587-021-00857-z.
- [54] IWAYA T, ENDO F, TAKAHASHI F, et al. Frequent tumor burden monitoring of esophageal squamous cell carcinoma with circulating tumor DNA using individually designed digital polymerase chain reaction[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(1): 463-465.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.09.035.
- [55] OCOCKS E, SHARMA S, NG A W T, et al. Serial circulating tumor DNA detection using a personalized, tumor-informed assay in esophageal adenocarcinoma patients following resection[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(5): 1705-1708.e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.07.011.
- [56] LUO H, LI H, HU Z, et al. Noninvasive diagnosis and monitoring of mutations by deep sequencing of circulating tumor DNA in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(4): 596-602. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.02.011.
- [57] JIA R, ZHAO C H, LI P S, et al. Post-radiation circulating tumor DNA as a prognostic factor in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 68. DOI: 10.3892/ol.2020.12329.
- [58] OCOCKS E, FRANKELL A M, MASQUE SOLER N, et al. Longitudinal tracking of 97 esophageal adenocarcinomas using liquid biopsy sampling[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(4): 522-532. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.12.010.
- [59] GRIDELLI C, DE MARINIS F, DI MAIO M, et al. Gefitinib as first-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation: review of the evidence[J]. *Lung Cancer*, 2011, 71(3): 249-257. DOI: 10.1016/j.lungcan.2010.12.008.
- [60] ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Liquid biopsy: from discovery to clinical application[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(4): 858-873. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1311.
- [61] LANMAN R B, MORTIMER S A, ZILL O A, et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140712. DOI: 10.1371/journal.pone.0140712.
- [62] CHEN Y, GEORGE A M, OLSSON E, et al. Identification and use of personalized genomic markers for monitoring circulating tumor DNA[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1768: 303-322. DOI: 10.1007/978-1-4939-7778-9_17.
- [63] WEE E J H, WANG Y, TSAO S C H, et al. Simple, sensitive and accurate multiplex detection of clinically important melanoma DNA mutations in circulating tumour DNA with SERS nanotags[J]. *Theranostics*, 2016, 6(10): 1506-1513. DOI: 10.7150/thno.15871.
- [64] ELLINGSON B M, SALAMON N, WOODWORTH D C, et al. Reproducibility, temporal stability, and functional correlation of diffusion MR measurements within the spinal cord in patients with asymptomatic cervical stenosis or cervical myelopathy[J]. *J Neurosurg Spine*, 2018, 28(5): 472-480. DOI: 10.3171/2017.7.SPINE176.
- [65] VAN DIJK E L, JASZCZYSZYN Y, NAQUIN D, et al. The third revolution in sequencing technology[J]. *Trends Genet*, 2018, 34(9): 666-681. DOI: 10.1016/j.tig.2018.05.008.
- [66] GONG J, HENDIFAR A, GANGI A, et al. Clinical applications of minimal residual disease assessments by tumor-informed and tumor-uninformed circulating tumor DNA in colorectal cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(18): 4547. DOI: 10.3390/cancers13184547.

[本文编辑] 魏学丽