

综述

腹腔灌洗液循环肿瘤 DNA 在预测胃肠道恶性肿瘤腹膜转移中应用的研究进展

白 龙, 夏 翔, 曹 晖, 张子臻

上海交通大学医学院附属仁济医院胃肠外科, 上海 200127

[摘要] 腹膜转移是胃肠道恶性肿瘤患者死亡的重要原因之一, 也是临床诊治的难点。如何在具有高危因素的患者中预测腹膜转移的发生, 将诊治关口前移至腹膜转移发生之前, 提高患者的生存获益, 是目前临床工作中尚未解决的问题。在细胞学检查阳性率较低、隐匿型腹膜转移诊断困难的情况下, 能够早期诊断腹膜转移的分子标志物与检测技术亟待验证。腹腔灌洗液具有较少的白细胞来源的无细胞 DNA 干扰, 相对循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 浓度更高; 并且, 与原发病灶或潜在腹膜转移灶的直接接触, 使其在胃肠道肿瘤的预测中有独特的优势。目前, 腹腔灌洗液中 ctDNA 的检测方式有数字 PCR、基于表观遗传的分析方式以及二代测序等。随着技术的迭代, 应用二代测序及个性化定制面板进行 ctDNA 检测, 不仅在预测术后腹膜转移方面展现出了极大潜力, 更是对腹膜转移进行预防性升阶治疗设想的推动力量。该文对腹腔灌洗液 ctDNA 在预测胃肠道恶性肿瘤腹膜转移中的应用进行综述。

[关键词] 胃肠道恶性肿瘤; 腹膜转移; 腹腔灌洗液; 循环肿瘤 DNA

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.12.011 **[中图分类号]** R735; R730.4 **[文献标志码]** A

Progress in application of peritoneal lavage fluid circulating tumor DNA to predicting peritoneal metastasis of gastrointestinal cancer

BAI Long, XIA Xiang, CAO Hui, ZHANG Zizhen

Department of Gastrointestinal Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

[Abstract] Peritoneal metastasis is one of the important causes of death in patients with gastrointestinal cancer and is also a difficult point in clinical diagnosis and treatment. How to predict the occurrence of peritoneal metastasis in patients with high-risk factors, advance the threshold of diagnosis and treatment before the occurrence of peritoneal metastasis, and improve the survival benefit of patients is an unsolved problem in clinical work. In the case of low positive rate of cytology and difficulty in diagnosing occult peritoneal metastasis, new molecular markers and detection techniques for early diagnosis of peritoneal metastasis need to be verified. Peritoneal lavage fluid has the characteristics of less leukocyte-derived cell-free DNA interference, higher concentration of circulating tumor DNA (ctDNA), and direct contact with the primary lesion or potential peritoneal metastasis at physical distance, making it a unique advantage in gastrointestinal cancer. At present, the detection methods of ctDNA in peritoneal lavage fluid include digital PCR, epigenetic-based analysis, and next-generation sequencing. With the iteration of technology, the application of next-generation sequencing and personalized panels to ctDNA detection has not only shown great potential in predicting postoperative peritoneal metastasis, but also promoted the idea of preventive escalation treatment of peritoneal metastasis. This article reviews the current application of ctDNA to peritoneal lavage fluid in predicting peritoneal metastasis of gastrointestinal cancer.

[Key words] gastrointestinal cancer; peritoneal metastasis; peritoneal lavage fluid; circulating tumor DNA

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81972206, 82173215); 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划 (2022-65); 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项 (202140458); 上海市自然科学基金项目 (22ZR1438800); 上海交通大学医学院附属仁济医院培育基金 (RJTJ22-MS-025)。

[作者简介] 白 龙 (2000—), 女, 硕士生; 电子信箱: bailong001001@163.com。

[通信作者] 张子臻, 电子信箱: zhangzizhen@renji.com。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81972206, 82173215); Shanghai "Medical Garden Rising Star" Young Medical Talent Training Grant Program (2022-65); Health Industry Clinical Research Project of Shanghai Municipal Health Commission (202140458); Shanghai Natural Science Foundation (22ZR1438800); Cultivation Fund of Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (RJTJ22-MS-025).

[Corresponding Author] ZHANG Zizhen, E-mail: zhangzizhen@renji.com.

在世界卫生组织国际癌症研究机构发布的2020年全球癌症数据中,胃癌的新发病例数为108万,发病率位居第五位,病死率位居第四位^[1]。而胃癌根治术后出现转移,尤其是腹膜转移,是胃癌患者死亡的重要原因之一。10%~30%的胃癌患者在初始诊断时已发现存在腹膜转移,超过一半的Ⅱ~Ⅲ期胃癌患者在根治性手术后的5年内发生腹膜转移^[2]。并且,随着腹膜转移病灶分布范围的扩大,患者生存率下降。一项针对胃癌腹膜转移患者预后的研究结果显示,腹膜散播病灶仅局限在横结肠上方以及在横结肠下方远端腹膜有数个结节的患者2年生存率分别为21%和8%,而在远端腹膜发现大量转移灶的患者2年生存率仅为4%^[3]。

结直肠癌是发病率与死亡率分别位居全球第三位与第二位的肿瘤^[1]。腹膜是结直肠癌病例中仅次于肝、肺的常见转移部位;腹膜转移也是结直肠癌患者死亡的主要原因之一,死亡率仅次于肝转移。据报道,4%~19%的患者会在根治术后随访期发生腹膜转移;相比于没有腹膜播散的结直肠癌患者,存在腹膜播散者往往预后较差^[4]。未经有效治疗的结直肠癌腹膜转移患者,中位生存期甚至仅有5~7个月^[5]。

胃肠道恶性肿瘤(gastrointestinal cancer, GIC)出现腹膜转移是临床诊治的难点。当前对于GIC腹膜转移的治疗体系以全身系统化学治疗(化疗)为主要手段,联合肿瘤细胞减灭术、腹腔热灌注化疗(hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, HIPEC)和新辅助腹腔内联合全身化疗等治疗手段,可以改善部分患者预后^[6]。一项共纳入3 773例胃癌腹膜转移患者的研究结果显示,接受全身治疗的患者中位生存期仅为9.4个月^[7]。另一项研究中,对胃癌腹膜转移患者进行HIPEC联合放射治疗或化疗,单次HIPEC治疗后的中位生存期接近20个月^[8]。而对于初诊时无腹膜转移但存在腹膜转移高风险因素的患者,如T3/T4期、淋巴结转移阳性及淋巴结外浸润、Borrmann分型Ⅲ或Ⅳ型等^[9],目前认为术中广泛腹腔灌洗对腹膜转移的预防无明确意义^[10]。预防性HIPEC对于降低腹膜转移发生风险的效果仍不明确。虽然有部分研究显示出预防性HIPEC可延长未发生腹膜转移患者的生存期^[11],但其安全性及生存获益仍需要进一步的评估^[12]。因此,如何筛选出具有腹膜转移高危因素的GIC患者,将诊治关口前移至腹膜转移发生之前,避免过度治疗,是目前临床胃肠肿瘤医师亟待解决的问题。

根据“种子-土壤”假说,腹膜转移是一个多步骤的过程,包括癌细胞从原发肿瘤中分离、生存于腹腔微环境、黏附于腹膜间皮细胞并浸润生长等^[13]。而胃癌原发灶穿透浆膜层进入腹腔形成腹腔游离癌细胞——“种子”,是腹膜转移发生的病理学基础。因此,如何在进展期GIC患者中识别出脱落、游离的腹腔癌细胞,已经成为临床腹膜转移防治决策中的核心问题。日本胃癌协会认为,在腹水或腹腔灌洗液细胞学检查中发现癌细胞,可认定为Ⅳ期胃癌^[14]。美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)对胃癌的第8版TNM分类中,将存在腹水且腹腔穿刺后细胞学检查中检测到癌细胞归类为M1期。在AJCC结直肠癌第8版TNM分类中,新增了结直肠癌转移至腹膜表面伴或不伴其他转移的M1c分类,因为其预后远差于有实质器官转移但无腹膜转移的M1a期与M1b期^[15]。事实上,腹腔灌洗液的细胞学检查作为诊断腹腔内游离肿瘤细胞的金标准,其阳性率与诸多因素有关,包括术中是否留取足够腹腔灌洗液量、样本送检是否及时、脱落细胞形态是否典型等,最终导致检出阳性率较低。一项纳入19项研究的meta分析显示,胃癌患者腹腔灌洗液中检出游离癌细胞的频率为6.25%~54.4%,且受到肿瘤浸润深度、分化程度和化疗多方面的影响^[16]。一项纳入3 135例结直肠癌病例的回顾性分析显示,在结直肠癌腹腔灌洗液细胞学检测中,Ⅲ期和Ⅳ期病例中游离癌细胞检出阳性者仅为19例(2.0%)和86例(16.9%),并且该阳性结果是Ⅲ期和Ⅳ期结直肠癌患者的独立预后影响因素^[17]。

在细胞学检查阳性率较低、隐匿型腹膜转移诊断困难的情况下,能够早期诊断腹膜转移的分子标志物与检测技术亟待验证。通过检测循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)评估癌症分子残留病灶(molecular residual disease, MRD)的方式已被证明可以预测多种癌症的术后复发。2022年5月,美国食品药品监督管理局(FDA)发布了《ctDNA用于早期实体瘤药物开发指南草案》,鼓励通过ctDNA进行MRD检测和评估,支持使用ctDNA作为手术及新辅助化疗后检测MRD的标志物,以丰富对疾病风险较高及疾病复发或死亡风险较高患者的评估检测方式。中国抗癌协会肿瘤标志分会发布的《ctDNA高通量测序临床实践专家共识(2022版)》认为基于二代测序检测的ctDNA水平定量和动态变化分析,有

望成为新兴的疗效评估途径。虽然大多数研究聚焦于血液样本中的 ctDNA, 但包括尿液、胸水、腹水、脑脊液甚至唾液在内的非血液来源的 ctDNA 在预测转移方面也存在着独特的优势。

1 基于 ctDNA 检测的 MRD 评估

1.1 ctDNA 与 MRD

MRD 最初用于血液系统恶性肿瘤, 用于描述无法用传统细胞形态学检测出的残留白血病细胞^[18]。目前, 经过在乳腺癌、肺癌、胃癌和结直肠癌等实体瘤中的探索, MRD 可定义为治疗后患者体内持续存在的少量肿瘤细胞或者肿瘤来源的分子异常, 其无法用目前的医学影像技术检测, 是癌症进展的一个隐匿阶段, 最终可能导致疾病复发^[19]。通过体液中的循环肿瘤细胞、循环外细胞囊泡以及 ctDNA 等, 可以检测特定的肿瘤基因组改变, 反映机体内 MRD 的水平。

ctDNA 是肿瘤坏死、凋亡或被巨噬细胞吞噬后分泌产生的存在于细胞外环境中的 DNA 片段, 通常由长度 <145 bp 的链组成, 可以在血液、尿液、腹水、胸水和唾液等体液中检测到^[20]。ctDNA 的突变可用于识别一些潜在的可改变的驱动基因, 以及提供个性化的生物标志物用于检测残留疾病或监测治疗期间的肿瘤水平^[21]。基于 ctDNA 检测的 MRD 评估是指通过 ctDNA 并使用某些算法推算出体内 MRD 状况的技术, 用于在肿瘤患者中确定机体内 MRD 的存在^[22]。MRD 的评估有助于肿瘤患者各个阶段的管理, 包括筛查、指导辅助治疗、监测治疗效果、早期预测复发以及耐药基因分型等^[23]。

1.2 ctDNA 检测的主要技术

ctDNA 在细胞外环境中的水平通常较低, 特别是在病灶限制在局部的患者中^[24]。在血浆 37 °C 条件下, 蛋白结合 DNA 与裸 DNA 的半衰期为 26.8~161.2 min^[25]。这种短半衰期的特征, 使其可以实时动态监测患者的肿瘤负荷, 但也要求 ctDNA 的检出需要高度复杂的检测和定量技术。目前, ctDNA 检测常用数字 PCR (digital PCR, dPCR)、基于 DNA 甲基化^[26]或其他表观遗传特征的分析方法, 以及基于二代测序 (next generation sequencing, NGS) 的靶向检测等^[27]。

在癌细胞中, 甲基化模式的改变是基于 DNA 甲基化的分析方法的理论基础。甲基化 ctDNA 是一种潜在的生物标志物, 但其检测灵敏度有一定欠缺^[28], 无法实现临床应用。但增加目标甲基化 ctDNA 数量或与其他生物标志物联合时, 其可能会发挥更大的效能。一项在结直肠癌患者血浆中检测 ctDNA 的研究结果显示, 与检测单独的基因组改变相比, 整合表观遗传特征可使检测敏感度增加 25%~36%^[29]。

微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 作为 dPCR 中的一种, 可以检测血浆中约 0.1% 的 DNA。ddPCR 甚至可以对样本中的 DNA 进行绝对定量^[30], 即使在污染源引起的高野生型背景中也能保持较高的特异度和灵敏度^[31]。但也因其将单个血浆样本中的单个 DNA 分子分析至最大化, ddPCR 较适用于少量突变或较流行的热点突变鉴定, 对复杂性的多点突变 MRD 敏感性低于 NGS^[27], 在临床上也并非 ctDNA 检测的首选方法。

基于 NGS 的靶向测序包括固定面板与个性化定制面板两类^[32]。固定面板作为一项既定工具, 可以检测一种或多种既往已知的癌症频发突变基因, 但对一些低频变异呈现低检出率, 需要使用其他补充方法来提高其敏感性。个性化定制面板则通过对不同患者分别进行肿瘤 DNA 测序, 识别不同患者肿瘤细胞中特异性突变, 排除非肿瘤来源的潜在假阳性, 以此增加 ctDNA 检测的特异度与灵敏度。该项技术因需要肿瘤样本而存在一些应用限制, 如因肿瘤样本的取材位置不同而产生的异质性, 肿瘤样本取材给患者带来的出血风险, 以及肿瘤的基因组可能随着治疗或疾病进展而改变等^[33]。由 KURTZ 等^[34]开发的一种用于疾病特征与 MRD 检测混合捕获的检测技术 PHasED-Seq, 能检测出 1/1 000 000 的 ctDNA。基于 NGS 的靶向测序具有高敏感性, 成为目前检测 ctDNA 的推荐方法, 个性化定制面板也是具有临床应用前景的检测方式。

2 GIC 腹腔灌洗液检测 ctDNA 相较于血液检测的优势

在血液中对胃肠道肿瘤 ctDNA 进行检测的研究已经开展得十分广泛, 包括在筛查早期癌症、检测 MRD 以及在晚期疾病治疗指导和检测中的应用^[35-36]。然而, ctDNA 也可以从非血液来源获得,

包括胸水、腹水、尿液以及脑脊液等^[37]。在血液中,大量来自于白细胞的长度140~170 bp的无细胞DNA (cell-free DNA, cfDNA)^[38]会成为检测ctDNA时的背景噪声,而非血液样本中克隆造血的相对缺乏使ctDNA有相对更高的浓度和变异等位基因频率^[39-40],因而可以成为血液ctDNA检测结果的补充条件。腹腔灌洗液作为非血液样本的一种,本身具有少白细胞来源cfDNA干扰、相对ctDNA浓度更高的优势,更重要的是其与原发病灶或潜在腹膜转移灶的直接接触,使其在胃肠道肿瘤中相较于其他体液样本有独特的优势。

腹腔灌洗液中的生物标志物与腹膜转移的关系可能较血液来说更为密切。VAN'T ERVE等^[41]使用ddPCR评估了20例结肠直肠癌伴腹膜转移患者血浆以及腹腔灌洗液中的肿瘤cfDNA,结果显示腹腔灌洗液中的cfDNA水平高于血浆($P<0.0001$),因而血浆cfDNA可能并不是检测结肠直肠癌伴腹膜转移的敏感标志物。从腹膜转移的发生机制上看,其特点是通过原发肿瘤直接向腹膜方向进行渗透或是手术造成的医

源性散播;另一方面,腹膜-血浆屏障可能会限制cfDNA从腹膜释放到体循环中^[42],这可能可以解释腹腔灌洗液中的更高水平cfDNA。

3 腹腔灌洗液中检测ctDNA预测GIC术后腹膜转移

3.1 胃癌腹腔灌洗液ctDNA检测

在胃癌腹腔灌洗液用于ctDNA检测的早期探索中,大多数研究使用了甲基化特异性PCR。其作为一种评估基因启动子甲基化状态的技术,可以使用亚硫酸氢盐转化DNA对特定点位的DNA甲基化进行高度敏感且全特异性的检测^[43],对给定的CpG岛位点的0.1%甲基化等位基因敏感^[44]。在该技术的支持下,针对胃癌的多项研究进行了腹腔灌洗液中特定基因甲基化的检测,以此发现腹腔灌洗液中的MRD,并揭示其与患者生存时间以及腹膜转移的相关性(表1)。

表1 胃癌患者腹腔灌洗液中基因甲基化检测相关研究

Tab 1 Detection of gene methylation in peritoneal lavage fluid in gastric cancer patients

Literature	No. of patients	Detecting technique	Target site of DNA	Positive result in PLF/(n)	Prediction of peritoneal recurrence
HIRAKI ^[45]	80	Real-time methylation-specific PCR	CHFR, E-cadherin, BNIP3	19% (6/31) ^①	2 of 5 patients with multigene methylation showed peritoneal recurrence after surgery
HIRAKI ^[46]	107	Real-time methylation-specific PCR	BNIP3,CHFR,CYP1B1, MINT25,RASSF2,SFRP2	20% (9/45) ^②	3 of 9 patients carrying positive methylation experienced peritoneal recurrence
YU ^[47]	92	Real-time methylation-specific PCR	CDH1 methylation	48.9% (45/92)	CDH1 methylation correlated significantly with distant metastasis ($P<0.005$)
HAN ^[48]	92	Real-time methylation-specific PCR	Methylated MINT2	90.2% (37/41)	Levels of methylated MINT2 DNA in PLF was significantly different between patients with and without peritoneal metastasis ($P<0.0001$)
YU ^[49]	92	Real-time methylation-specific PCR	TIMP-3 methylation	53.3% (49/92)	TIMP-3 hypermethylation in PLF ($\gamma=0.804, P<0.001$) was closely correlated with positive PLF cytology
HU ^[50]	92	Quantitative methylation-specific PCR	Methylated THBS1	58.7% (54/92)	Accuracy 63.0% (34/54), Sensitivity 87.2% (34/39), Specificity 100% (34/34)

Note: PLF—peritoneal lavage fluid. ^①Two or more genes; ^②Any of 6 genes.

HU等^[50]采用甲基化特异性定量PCR技术检测了92例胃癌患者样本,证实血栓反应蛋白1(thrombospondin 1, THBS1)的异常DNA甲基化与胃癌的腹膜散播、肿瘤进展和不良预后密切相关。该项研究在92例胃癌患者的肿瘤组织、腹腔灌洗液和血清中检测THBS1甲基化状态,结果显示肿瘤组织

中THBS1甲基化异常明显高于癌旁正常组织,在40例健康对照者中未发现THBS1甲基化。以CT及肿瘤标志物联合判断腹膜转移,最终腹腔灌洗液中甲基化THBS1 DNA诊断胃癌腹膜转移的准确率为63.0% (34/54),敏感度为87.2% (34/39),特异度为100% (34/34)。该结果表明,腹腔灌洗液和血清中THBS1

甲基化对腹膜播散具有较高的诊断价值,提示液体活检样本中 *THBS1* 甲基化可作为胃癌患者腹膜播散的新标志物。除此之外,该中心进一步检测了同一组 92 例患者腹腔灌洗液中甲基化 *MINT2* DNA^[48]、甲基化 *TIMP-3* DNA^[49] 和甲基化 *CDHI* DNA^[47],结果显示其与胃癌腹膜微转移以及患者无病生存期具有显著相关性,说明在腹腔灌洗液中检测甲基化 *MINT2* DNA、甲基化 *TIMP-3* DNA 和甲基化 *CDHI* DNA 可以作为胃癌的独立预后因素。基因甲基化并不是在所有癌细胞中普遍发生的,且上述研究皆仅涉及单基因甲基化检测。因此,增加癌细胞中特异性甲基化的基因数量,可能可以提高使用腹腔灌洗液进行基因甲基化分析以预测患者预后的敏感性。

同样应用定量甲基化特异性 PCR 技术,HIRAKI 等^[45]将 80 例胃癌患者根据肿瘤的分期依次升高分为 A、B、C 3 组(C 组已明确存在腹膜转移),并对其腹腔灌洗液标本进行了 *CHFR*、*p16*、*RUNX3*、*E-cadherin*、*hMLH1*、*ABCG2* 和 *BNIP3* 基因甲基化检测。最终筛选出腹腔灌洗液中 *CHFR*、*E-cadherin*、*BNIP3* 基因的甲基化阳性率在 A、B、C 3 组间的差异具有统计学意义并依次增高,且甲基化模式与原发肿瘤一致。A 组和 B 组患者术后随访至少 8 个月。A 组 35 例患者均无癌症复发;B 组 28 例患者中,5 例多基因甲基化患者中有 2 例(40%)出现术后腹膜转移,无或单基因甲基化患者术后未出现癌症复发。B 组腹膜复发与多基因甲基化有显著相关性。同时,C 组 14 例患者中有 8 例(57%)存在多基因甲基化,而 A 组 35 例患者中只有 3 例(9%)存在多基因甲基化。该结果进一步说明了多基因甲基化检测腹膜中隐匿性肿瘤细胞的临床可行性。该作者于另一项研究中^[46],使用同样的方法在腹腔灌洗液中进行 *BNIP3*、*CHFR*、*CYP1B1*、*MINT25*、*RASSF2* 和 *SFRP2* 基因的甲基化检测,结果显示携带癌细胞的腹腔灌洗液甲基化阳性率最高可达 75%,说明了多基因特异性甲基化 DNA 分析可以提高 MRD 的检出率。该研究为较早的在腹腔灌洗液中进行的基因甲基化检测的研究,揭示了腹腔灌洗液中基因甲基化检出与腹膜转移的相关性;但检测位点筛选过程烦琐,多位点检测叠加后的阳性率依然差强人意,不宜作为 ctDNA 的主要检测方式。

ZHAO 等^[51]在 104 例胃癌患者的前瞻性队列中,对每个病例进行了肿瘤组织的全外显子测序,并选择 20 个肿瘤特异性突变,开发了 Mutation Capsule 这项

基于突变分析技术的个性化检测方法检测腹腔灌洗液中的基因突变。经过 41 个月的随访,以磁共振成像(MRI)、CT、PET-CT 或腹水/腹膜病变活检作为判断腹膜转移的标准,该技术检测出了所有发生腹膜转移的病例,灵敏度为 100%,特异度为 85%,阳性预测值为 71%。该研究结果显示腹腔灌洗液中 MRD 阳性与腹膜转移风险显著增加相关,MRD 阳性与无复发生存期和总生存期缩短相关。基于 Cox 比例风险模型,这种 MRD 分析方式表现出了最佳效果,被认为是对腹膜转移患者无复发生存期的最强预测因子。因此,这种敏感性与特异性皆较高的个性化检测方式,对于改善可能存在胃癌腹膜转移患者的生存预后具有重要的意义,也让早期发现和早期干预胃癌根治术后腹膜转移成为可能。

3.2 结直肠癌腹腔灌洗液 ctDNA 检测

相比于胃癌,结直肠癌不常发生腹膜转移,这可能与胃癌细胞与结直肠癌细胞本身的异质性有关。但结直肠癌患者的腹腔灌洗液 ctDNA 的检出仍可预测患者的预后,并与腹膜转移存在一定相关性。

KAMIYAMA 等^[52]在 33 例结直肠癌患者中,通过定量甲基化特异性 PCR 技术,检测原发肿瘤与腹腔灌洗液中 *CDHI*、*p16*、*MGMT* 和 *APC* 基因的甲基化模式。结果显示 88% 的患者原发肿瘤至少存在 1 个异常基因甲基化,而在匹配的腹腔灌洗液中检测到 1 种以上甲基化的患者无复发生存期明显缩短,在腹腔灌洗液检测到甲基化的 4 例复发患者中有 2 例为腹膜转移。该标志物检测术后复发和肿瘤异时性事件的灵敏度和特异度分别为 66.6% 和 92.3%。另一项单独检测腹腔灌洗液 *CDHI* 基因甲基化的研究呈现了相似的结果^[53]。

YUAN 等^[54]在 40 例结直肠癌患者训练队列中(包括 17 例腹膜转移与 23 例非腹膜转移患者),使用超深度 NGS 技术检测肿瘤组织中的 DNA 突变与腹腔灌洗液中的 ctDNA。在最佳阳性阈值为 6.29% 时,曲线下面积为 0.951,腹腔灌洗液 ctDNA 检测腹膜转移的灵敏度为 100%,特异度为 78.3%。准确率为 87.5%;在非腹膜转移的病例中,60% (3/5) 的腹膜 ctDNA 阳性病例出现复发,提示存在假阳性或 MRD。而在后续的 11 例随机结直肠癌患者验证队列中,以影像学证实腹膜转移为诊断标准,腹腔灌洗液 ctDNA 检测腹膜转移的临床灵敏度为 83.3%,特异度为 100%,

准确率为90.9%，这表明腹膜ctDNA在诊断腹膜转移方面有很高的效能。不仅如此，腹腔灌洗液中的ctDNA检测在结直肠癌患者的腹膜转移程度，以及细胞减灭术-腹腔内高温化疗联合治疗后肿瘤负荷评估中的作用也得到了证实^[55-56]。

4 总结与展望

综上所述，在GIC患者中应用NGS或个性化定制面板检测腹腔灌洗液中的ctDNA，检测时间短，能够反映瘤内和转移灶异质性，在预测腹膜转移上展现出了极大的潜力。目前在GIC的相关研究中，应用NGS或个性化面板在腹腔灌洗液中检测ctDNA的研究及纳入的样本量皆较少，亟待未来更多前瞻性临床研究的开展，进一步验证其对腹膜转移的预测效力。另一方面，基于ctDNA的NGS技术在样本收集与处理、实验室技术方面有较高要求，结果解读良莠不齐，目前检测费用较为昂贵，因此在临床应用方面暂时未得到推广。随着相关研究的开展、指南与专家共识的发布，ctDNA NGS检测有望规范发展^[57]。

应用合理的技术进行腹腔灌洗液ctDNA检测，结合血液ctDNA，可能在细胞学检查阳性率较低、隐

匿型腹膜转移诊断困难的情况下，成为早期诊断GIC患者腹膜转移的基础。另一方面，应用腹腔灌洗液ctDNA检测筛选出具有腹膜转移高危因素的GIC患者，将诊治关口前移至腹膜转移发生之前，对避免过度治疗或进行预防性升阶治疗有重要价值，期待进一步的前瞻性临床研究的开展。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

张子臻及曹晖负责文章的选题和设计，指导论文写作并提出修改意见；夏翔负责文献审核及论文修改；白龙负责文献查阅和分析，并撰写论文。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

ZHANG Zizhen and CAO Hui proposed the topic selection and design of the article, guided the writing of the paper and proposed revisions. XIA Xiang participated in the examination of references and revised the paper. BAI Long completed literature review and analysis, and wrote the thesis. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-07-23
- Accepted: 2023-10-27
- Published online: 2023-12-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] 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.
- [2] LEI Z, WANG J, LI Z, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis: a multicenter propensity score-matched cohort study[J]. *Chin J Cancer Res*, 2020, 32(6): 794-803.
- [3] YONEMURA Y, BANDO E, KAWAMURA T, et al. Quantitative prognostic indicators of peritoneal dissemination of gastric cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2006, 32(6): 602-606.
- [4] FRANKO J, SHI Q, GOLDMAN C D, et al. Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: a pooled analysis of north central cancer treatment group phase III trials N₉₇₄₁ and N₉₈₄₁[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(3): 263-267.
- [5] MO S, CAI G. Multidisciplinary treatment for colorectal peritoneal metastases: review of the literature[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2016: 1516259.
- [6] SÁNCHEZ-HIDALGO J M, RODRÍGUEZ-ORTIZ L, ARJONA-SÁNCHEZ Á, et al. Colorectal peritoneal metastases: optimal management review[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(27): 3484-3502.
- [7] KOEMANS W J, LURVINK R J, GROOTSCHOLTEN C, et al. Synchronous peritoneal metastases of gastric cancer origin: incidence, treatment and survival of a nationwide Dutch cohort[J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24(4): 800-809.
- [8] BADGWELL B, BLUM M, DAS P, et al. Phase II trial of laparoscopic hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion for peritoneal carcinomatosis or positive peritoneal cytology in patients with gastric adenocarcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(11): 3338-3344.
- [9] 中国抗癌协会胃癌专业委员会. 胃癌腹膜转移防治中国专家共识[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2017, 20(5): 481-490.
Gastric Cancer Professional Committee. Chinese expert consensus on prevention and treatment of gastric cancer peritoneal metastasis[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2017, 20(5): 481-490.
- [10] YANG H K, JI J, HAN S U, et al. Extensive peritoneal lavage with saline after curative gastrectomy for gastric cancer (EXPEL): a multicentre randomised controlled trial[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021, 6(2): 120-127.
- [11] DESIDERIO J, CHAO J, MELSTROM L, et al. The 30-year experience—a meta-analysis of randomised and high-quality non-randomised studies of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the treatment of gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 79: 1-14.
- [12] 徐岩, 王振宁. 胃癌腹膜转移的临床治疗进展与未来展望[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2023, 26(5): 414-418.
XU Y, WANG Z N. Recent progress and future prospects of treatment for peritoneal metastasis in gastric cancer[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2023, 26(5): 414-418.
- [13] KANDA M, KODERA Y. Molecular mechanisms of peritoneal dissemination in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(30): 6829-6840.

- [14] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2018 (5th edition) [J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24(1): 1-21.
- [15] AMIN M B, EDGE S B, GREENE F L, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*[M]. 8th ed. New York: Springer, 2017.
- [16] KOŁOMAŃSKA M M, GŁUSZEK S. Free cancer cells in gastric cancer: methods of detection, clinical and prognostic importance (meta-analysis)[J]. *Contemp Oncol(Pozn)*, 2020, 24(1):67-74.
- [17] MATSUI S, FUKUNAGA Y, SUGIYAMA Y, et al. Incidence and prognostic value of lavage cytology in colorectal cancer[J]. *Dis Colon Rectum*, 2022, 65(7): 894-900.
- [18] GOMEZ-ARTEAGA A, GUZMAN M L. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1100: 111-125.
- [19] PANTEL K, ALIX-PANABIÈRES C. Liquid biopsy and minimal residual disease: latest advances and implications for cure[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(7): 409-424.
- [20] THIERRY A R, EL MESSAOUDI S, GAHAN P B, et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(3): 347-376.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] PENG Y, MEI W, MA K, et al. Circulating tumor DNA and minimal residual disease (MRD) in solid tumors: current horizons and future perspectives[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 763790.
- [24] 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.
- [25] YAO W, MEI C, NAN X, et al. Evaluation and comparison of *in vitro* degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: a qualitative study[J]. *Gene*, 2016, 590(1): 142-148.
- [26] LIU M C, OXNARD G R, KLEIN E A, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(6): 745-759.
- [27] 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.
- [28] TAIEB J, TALY V, VERNEREY D, et al. Analysis of circulating tumour DNA (ctDNA) from patients enrolled in the IDEA-FRANCE phase III trial: prognostic and predictive value for adjuvant treatment duration[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30: v867.
- [29] PARIKH A R, VAN SEVENTER E E, SIRAVEGNA G, et al. Minimal residual disease detection using a plasma-only circulating tumor DNA assay in patients with colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(20): 5586-5594.
- [30] KOJABAD A A, FARZANEHPUR M, GALEH H E G, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(7): 4182-4197.
- [31] COCHRAN R L, CRAVERO K, CHU D, et al. Analysis of BRCA2 loss of heterozygosity in tumor tissue using droplet digital polymerase chain reaction[J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(7): 1546-1550.
- [32] 王童博, 李峥, 赵东兵. 胃癌腹腔分子残留病灶的诊断方法[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2023, 26(5): 419-422.
WANG T B, LI Z, ZHAO D B. Diagnostic methods for peritoneal molecular residual disease in gastric cancer[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2023, 26(5): 419-422.
- [33] HONORÉ N, GALOT R, VAN MARCKE C, et al. Liquid biopsy to detect minimal residual disease: methodology and impact[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(21): 5364.
- [34] KURTZ D M, SOO J, CO TING KEH L, et al. Enhanced detection of minimal residual disease by targeted sequencing of phased variants in circulating tumor DNA[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(12): 1537-1547.
- [35] MENCEL J, SLATER S, CARTWRIGHT E, et al. The role of ctDNA in gastric cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(20): 5105.
- [36] ZHOU H, ZHU L, SONG J, et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 86.
- [37] 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.
- [38] LO Y M, CHAN K C, SUN H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(61): 61ra91.
- [39] TONG L, DING N, TONG X, et al. Tumor-derived DNA from pleural effusion supernatant as a promising alternative to tumor tissue in genomic profiling of advanced lung cancer[J]. *Theranostics*, 2019, 9(19): 5532-5541.
- [40] TU H Y, LI Y S, BAI X Y, et al. Genetic profiling of cell-free DNA from pleural effusion in advanced lung cancer as a surrogate for tumor tissue and revealed additional clinical actionable targets[J]. *Clin Lung Cancer*, 2022, 23(2): 135-142.
- [41] VAN'T ERVE I, ROVERS K P, CONSTANTINIDES A, et al. Detection of tumor-derived cell-free DNA from colorectal cancer peritoneal metastases in plasma and peritoneal fluid[J]. *J Pathol Clin Res*, 2021, 7(3): 203-208.
- [42] HASOVITS C, CLARKE S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intraperitoneal cancer chemotherapeutics[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2012, 51(4): 203-224.
- [43] RAMALHO-CARVALHO J, HENRIQUE R, JERÓNIMO C. Methylation-specific PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1708: 447-472.
- [44] ZENG T, HUANG Z, YU X, et al. Combining methylated SDC2 test in stool DNA, fecal immunochemical test, and tumor markers improves early detection of colorectal neoplasms[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1166796.
- [45] HIRAKI M, KITAJIMA Y, SATO S, et al. Aberrant gene methylation in the peritoneal fluid is a risk factor predicting peritoneal recurrence in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(3): 330-338.
- [46] HIRAKI M, KITAJIMA Y, KOGA Y, et al. Aberrant gene methylation is a biomarker for the detection of cancer cells in peritoneal wash samples from advanced gastric cancer patients[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(10): 3013-3019.
- [47] YU Q M, WANG X B, LUO J, et al. CDH1 methylation in preoperative peritoneal washes is an independent prognostic factor for gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2012, 106(6): 765-771.
- [48] HAN J, LV P, YU J L, et al. Circulating methylated MINT2 promoter DNA is a potential poor prognostic factor in gastric cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(6): 1160-1168.
- [49] YU J L, LV P, HAN J, et al. Methylated TIMP-3 DNA in body fluids is an independent prognostic factor for gastric cancer[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138(11): 1466-1473.
- [50] HU X Y, LING Z N, HONG L L, et al. Circulating methylated THBS1 DNAs as a novel marker for predicting peritoneal dissemination in gastric cancer[J]. *J Clin Lab Anal*, 2021, 35(9): e23936.
- [51] ZHAO D, YUE P, WANG T, et al. Personalized analysis of minimal residual cancer cells in peritoneal lavage fluid predicts peritoneal dissemination of gastric cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 164.
- [52] KAMIYAMA H, NODA H, TAKATA O, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in peritoneal lavage and the prognosis of patients with colorectal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2009, 100(1): 69-74.
- [53] LU F, DU G, ZHENG S, et al. Detection of CDH1 gene methylation of suspension cells in abdominal lavage fluid from colorectal cancer patients and its clinical significance[J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2014, 17(11): 1133-1136.
- [54] YUAN Z, CHEN W, LIU D, et al. Peritoneal cell-free DNA as a

- sensitive biomarker for detection of peritoneal metastasis in colorectal cancer: a prospective diagnostic study: a prospective diagnostic study[J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1): 65.
- [55] LEICK K M, KAZARIAN A G, RAJPUT M, et al. Peritoneal cell-free tumor DNA as biomarker for peritoneal surface malignancies[J]. *Ann Surg Oncol*, 2020, 27(13): 5065-5071.
- [56] LÓPEZ-ROJO I, OLMEDILLAS-LÓPEZ S, VILLAREJO CAMPOS P, et al. Liquid biopsy in peritoneal fluid and plasma as a prognostic factor in advanced colorectal and appendiceal tumors after complete cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920981351.
- [57] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会. 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.
- Tumor Marker Committee of Chinese Anti-Cancer Association. Expert consensus on clinical practice of ctDNA next generation sequencing (2022 edition) [J]. *Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment*, 2022, 14(3): 240-252.

[本文编辑] 吴 洋

学术快讯

上海交通大学医学院附属第九人民医院介入团队成功利用无水乙醇治疗疑难囊性病例

2023年9月21日,上海交通大学医学院附属第九人民医院介入团队杨西涛医师在《英国医学杂志》(*The British Medical Journal*)发表题目为 *An unusual abdominal distension* 的临床病例报道。该文章介绍了1例常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 女性病例。该患者因严重腹胀,活动后即胸闷气促,严重影响日常生活,多处就医均未获得可行的药物治疗或外科手术方案。针对该疑难病例,上海交通大学医学院附属第九人民医院介入团队定制个性化方案,最终确认采用靶向动脉栓塞联合局部抽吸无水乙醇硬化双途径治疗,以达到快速去血管化、缩小囊性病灶的治疗效果。该方法具有创伤小、无瘢痕、恢复快等优点。术后即刻患者腹胀症状显著改善,日常生活逐渐恢复到正常,重返工作岗位。