

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.031

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.031>

## 肿瘤相关血小板 RNA 用于恶性肿瘤液体活检的研究进展

范怡畅 综述 俞静 审校

(首都医科大学附属北京友谊医院肿瘤中心, 北京 100050)

**[摘要]** 随着精准医疗概念的提出, 恶性肿瘤的早期筛检及基于肿瘤基因检测的靶向治疗成为一个重要的研究方向。对肿瘤组织进行病理诊断并进行相关基因检测是目前进行肿瘤诊断和制定治疗策略的重要基石。组织活检因其有创性、高风险性、难以重复性及异质性, 在临床应用中受到一定的限制。而液体活检则是组织活检有效的补充, 它是一种新型的微创检测方法, 可通过分析个体化的基因表达谱, 提高检测的准确性, 降低检测成本。目前液体活检方法如循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、血小板RNA等用于肿瘤检测的研究已取得一定的进展。

**[关键词]** 肿瘤相关血小板RNA; 非小细胞肺癌; 液体活检

## Research progress of tumor-educated platelets RNA in liquid biopsy of non-small cell lung cancer

FAN Yichang, YU Jing

(Center of Oncology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**Abstract** With proposing the concept of precision medicine, early diagnosis of malignant tumor and targeted therapy based on tumor gene detection have become an important development trend. Pathological analysis and related genetic analysis of the tumor tissue are important criteria for tumor diagnosis and treatment. Tissue biopsy is restricted in clinical application because of invasive, high risk, difficult repeat-ability and heterogeneity. And liquid biopsy is a kind of new minimally invasive detect method to analyze individualized gene expression profiles, supplying for tissue biopsy. Moreover, it could improve the accuracy of detection and reduce the testing cost. Currently, circulating tumor DNA (ctDNA), circulating tumor cells (CTC), platelet RNA has been used for liquid biopsy and made some progress.

**Keywords** tumor-educated platelets RNA; non-small cell lung cancer; liquid biopsy

收稿日期 (Date of reception): 2018-09-12

通信作者 (Corresponding author): 俞静, Email: yujing026@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81774221); 首都卫生发展科研专项项目 (2018-2-1113); 首都医科大学基础-临床科研合作基金 (17JL14); 首都医科大学附属北京友谊医院科研启动基金 (yyqdk2016-4)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (81774221), Capital Health Research and Development of Special Project (2018-2-1113), Basic-Clinical Cooperation Program from Capital Medical University (17JL14), and Research Foundation of Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University (yyqdk2016-4), China.

近几年,恶性肿瘤的早期筛检及基于肿瘤基因检测的靶向治疗成为重要的研究热点。对肿瘤组织进行病理分析及相关基因学分析是目前进行肿瘤诊断和指导治疗的重要前提,但仅仅从组织活检中获得的肿瘤信息还不尽完善,有时并不能准确、全面地反映组织的异质性<sup>[1-2]</sup>。另外,肿瘤组织活检属于侵入性检查,这不仅限制了二次活检的可行性,并且临床上有一部分患者确诊时已为晚期,患者身体虚弱,不能耐受有创操作以获取足够的肿瘤组织进行分子检测。液体活检是一种新型的微创检测方法,可根据个体化的表达谱来提高检测的准确性,降低检测成本,另外也可以进行基因学分析,作为组织活检的补充。血液富含信息来源,通过它可以检测、识别和分类实体肿瘤及其亚型,辅助指导治疗。每毫升血液中含有2~5亿个血小板,在保证高质量RNA和主要肿瘤RNA特征的同时,整个血液还可以在室温下储存48 h<sup>[3]</sup>。这些特点使得血小板具有很高的诊断价值。研究<sup>[4]</sup>证实这种微创检验方法可以用来辅助诊断、监测肿瘤的发生发展、分析基因状态并指导治疗等。目前循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、血小板RNA等液体活检方法用于肿瘤诊断方面的研究已取得很大进展。其中血小板RNA用于肿瘤的检测已经在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤、胆管癌等恶性肿瘤中开展了相关临床研究<sup>[4]</sup>。本文就血小板RNA用于液体活检的研究进展作一综述,现报告如下。

## 1 血小板的功能

血小板是人体重要的无核血细胞,含有丰富的RNA,包括信使RNA(messenger RNA, mRNA)、转运RNA(transfer ribonucleic acid RNA, tRNA)、核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)、核仁小分子RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)、微小核糖核酸(micro RNA, miRNA)等。在生理情况下,研究<sup>[5-6]</sup>证实血小板参与机体促凝血、抗炎等多种生理功能。此外,血小板还可以分泌促进细胞生长和血管生成的生长因子。其还能吸引其他血细胞,如单核细胞和粒细胞,这可能有助于营造转移前微环境<sup>[7]</sup>。而在肿瘤微环境相关研究领域,研究<sup>[3]</sup>揭示血小板能促进肿瘤的增殖、侵袭、

血管生成等恶性生物学行为。

## 2 血小板与肿瘤的相互关系及肿瘤相关血小板的形成

在肿瘤发生发展过程中,肿瘤细胞可以通过直接或间接的方式通过不同的信号分子或受体影响血小板,整合改变血小板RNA信息及蛋白质含量,形成肿瘤相关血小板(tumor-educated platelets, TEPs),通过多种途径参与肿瘤细胞的增殖和转移。

一方面,肿瘤细胞主要通过释放血小板活化受体选择素P,刺激血小板,使其释放多种生长因子和促血管生成因子,如促血管生成素(ANGPT1),血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, BFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子(insulin like growth factor-1, IGF1)、转化生长因子(transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ),血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)和血管内皮生长因子-C(VEGF-C)。TEPs可释放这些因子到肿瘤微环境中,参与肿瘤的生长及转移<sup>[6]</sup>。此外,血小板还可以向肿瘤细胞转移MHC I类蛋白,从而参与肿瘤细胞的免疫逃逸,使之免受自然杀伤(NK)细胞的识别及破坏。血小板也可以在CTC周围形成肿瘤细胞-纤维-血小板的聚集体,同样具有保护肿瘤细胞免受NK细胞识别、破坏的作用<sup>[3]</sup>。

另一方面,血小板可以通过囊泡的方式摄取肿瘤细胞特有的mRNA,如点突变的驱动基因、新的融合基因,还有一些非编码RNA,这些RNA能够进一步调控血小板mRNA的表达、剪接。如肿瘤来源的血小板因子4(PF4, CXCL4)能够促进NSCLC患者骨髓巨核细胞介导的血小板生成<sup>[8]</sup>。另外,通过RT-PCR技术和深度扩增测序法,研究人员在NSCLC患者的TEPs RNA中,可以检测到具有肿瘤特异性的棘皮动物微管相关蛋白4和间变淋巴瘤激酶的融合基因(echinoderm microtubule associated protein like 4-Anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK)、Kirsten鼠肉瘤基因(Kirsten rat sarcoma, KRAS)和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的点突变<sup>[1]</sup>,这一技

术使得血小板RNA在基因检测方面的应用具有可行性。

### 3 液体活检的优势

目前的肿瘤诊断依赖于将肿瘤进行切除并进行病理学检查以及相关基因学分析, 最常用的是新鲜肿瘤组织或4%中性甲醛固定的石蜡组织<sup>[9]</sup>。但仅从组织活检中获得信息还不完善, 有时候限制了对肿瘤进行快速定性, 甚至有时候并不能准确反映组织的异质性<sup>[2]</sup>。另外, 肿瘤组织活检属于侵入性检查, 这限制了重复性应用(肿瘤治疗需要追踪疗效以及动态监测对治疗的耐药性)。而液体活检是一种新型的无创检测方法, 可根据个体化的表达谱来提高检测的准确性, 降低检测成本, 作为组织活检的补充, 可以提供精确的、综合性的分子诊断信息, 也可以在多个维度上反映肿瘤微环境的相关信息, 并且还可以达到: 1) 早期筛查肿瘤; 2) 预测患者的肿瘤分期和转移; 3) 为个体化治疗寻找新靶点; 4) 肿瘤治疗前分类/预测疗效; 5) 早期治疗监测, 实时性分析疗效; 6) 动态观察疾病的复发和转移<sup>[3,9]</sup>。

## 4 TEPs RNA 在液体活检中的应用

### 4.1 TEPs RNA 基因测序用于肿瘤诊断

血小板可以通过简单的离心步骤从血液中分离出来, 其RNA易于纯化, 利于检测基因融合和剪接体等<sup>[10]</sup>。通过对TEPs中RNA测序, 可以识别多种与趋化因子、细胞黏附、聚集和细胞相互作用相关的蛋白编码基因, 从而诊断出不同种类的肿瘤<sup>[11]</sup>。Best等<sup>[1]</sup>对283个血小板样本进行了RNA测序, 包括健康人( $n=55$ )和肿瘤患者( $n=228$ ), 癌症类型: 胶质母细胞瘤、NSCLC、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌和胆管癌。利用癌症患者和健康人的不同TEPs RNA谱, 开发一种新型的预测算法, 可以用于确诊恶性肿瘤(准确率约96%)、判断肿瘤类型(准确率约71%)以及肿瘤的分子突变亚型(准确率85%~95%)<sup>[1]</sup>。此后, 2017年Best等<sup>[12]</sup>将临床样本从2015年的283例扩展到了779例, 其中包括402例诊断为早期或晚期NSCLC的病例组, 以及277例包括了多发性硬化症、慢性胰腺炎等疾病的对照组。研究人员采集全血样本之后, 首先分离出富含血小板的血浆, 再利用OptiPrep密度梯度离心方法分离出血

小板, 将分离出的血小板利用Clontech和Illumina的文库制备试剂盒进行建库, 并在HiSeq 2500平台上测序。通过ThromboSeq技术对TEPs RNA分析, 早期肺癌诊断准确率可达81%、曲线下面积(AUC)为0.89, 晚期转移性肺癌诊断准确率为88%, AUC为0.94; 在年龄、吸烟状况和血液储存时间短的实验组中, 该算法的准确度高达91%<sup>[12]</sup>。2018年Wurdinger团队<sup>[9]</sup>通过ThromboSeq技术, 发现分析TEPs RNA还可识别前列腺癌PCA3, KLK3, FOLH1, NPY, 乳腺癌PIK3CA $\Delta$ , HER2+, 胶质瘤EGFRvIII, NSCLCKRAS, EGFR, PIK3CA, HER2突变等生物标志物。

### 4.2 TEPs RNA 用于基因测序及指导靶向治疗用药

#### 4.2.1 EGFR 基因及相关通路蛋白

EGFR基因是NSCLC的驱动基因之一, 可以刺激肿瘤细胞异常增殖、分化, 是肿瘤发生、发展的重要因素之一。目前30%~40%的NSCLC患者在确诊时携带EGFR基因突变<sup>[13]</sup>。表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)已广泛应用于EGFR基因敏感突变的晚期NSCLC患者的治疗, 更有ARCHER 1050研究<sup>[14]</sup>发现第二代EGFR-TKI达可替尼可使中位无进展生存期达到14.7个月, 总生存期更是可达34.1个月。这些EGFR基因敏感突变的突变率约为37.3%, 主要包括L858R, 19-Del, 18和20外显子突变等, 其中前2种突变约90%<sup>[15]</sup>。

然而, 在应用EGFR-TKI的过程中, 一些初始治疗有效的患者在1~2年内会出现获得性耐药。既往研究<sup>[16]</sup>表明: EGFR-TKI获得性耐药机制中约50%归因于T790M突变(突变率约7%), 另外还包括KRAS基因突变(突变率约32.2%)、磷酸肌醇3激酶(phosphotylinosital 3 kinase, PIK3CA)突变(突变率约2%)、c-Met原癌基因突变(突变率约4.2%)、HER-2突变(突变率约2%)<sup>[17]</sup>。为明确耐药原因, 临床常规推荐组织二次活检。但组织活检因其具有创伤性、风险大及异质等特点, 使其应用受限。而液体活检则可以作为组织活检的一种替代或补充方法。有研究者<sup>[18]</sup>取局限性或转移的NSCLC患者血小板标本进行检测, 利用SVM/LOOCV算法分析, 并与组织基因检测结果相比, 发现TEPs RNA谱与组织mRNA谱有较高的一致性( $\kappa$ 值=0.795~0.895,  $P<0.05$ ), EGFR突变准确度达87%, KRAS突变准确度达90%, MET检测

准确度达91%。因此,通过对TEPs RNA谱进行分析,可用于基因测速并指导靶向治疗用药。

#### 4.2.2 EML4-ALK 融合基因

肺癌患者中EML4-ALK基因融合,促使肺癌发生和进展。克唑替尼(Crizotinib)是治疗ALK阳性NSCLC有效的靶向药物。有研究<sup>[19]</sup>利用患者血小板,采用RT-PCR方法,检测到晚期肺癌患者EML4-ALK融合基因的表达率约5%,其中血小板RNA检测的灵敏度为65%,特异性为100%,而血浆RNA检测的灵敏度为21%,特异性为100%<sup>[20]</sup>。此外,ALK阳性NSCLC患者接受克唑替尼治疗后,不可避免地在1~2年内相继发生耐药。在使用克唑替尼治疗的患者血小板中的EML4-ALK重组的持久性与肿瘤的进展和预后不良有关,可以用来预测和监测克唑替尼的治疗效果<sup>[21]</sup>。

## 5 结语

目前ctDNA和CTC用于肿瘤诊断的检测方法已取得了很大进展,但存在含量少以及不稳定等不足。而基于血小板的液体活检在检测个体化治疗的相关分子靶点方面有很大的潜力,通过对TEPs中RNA测序,不仅可以辅助诊断肿瘤类型及亚型,也可以检测基因突变,用于指导靶向治疗用药。但目前TEPs RNA用于液体活检的大多临床研究还处于探索阶段,还需要进一步大规模研究和临床验证。

## 参考文献

- 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.
- Clancy L, Freedman JE. The role of circulating platelet transcripts[J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(Suppl 1): S33-S39.
- Sol N, Wurdinger T. Platelet RNA signatures for the detection of cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(2): 263-272.
- Kanikarla-Marie P, Lam M, Menter DG, et al. Platelets, circulating tumor cells, and the circulome[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(2): 235-248.
- Bardelli A, Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet)[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 172-179.
- Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation and cancer[J]. *Blood*, 2015, 126(5): 582-588.
- Stegner D, Dütting S, Nieswandt B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis[J]. *Thromb Res*, 2014, 133 Suppl 2: S149-S157.
- Feller SM, Lewitzky M. Hunting for the ultimate liquid cancer biopsy—let the TEP dance begin[J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 4(1): 24.
- Best MG, Wesseling P, Wurdinger T. Tumor-educated platelets as a noninvasive biomarker source for cancer detection and progression monitoring[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13): 3407-3412.
- 范军振, 石怀银. 晚期非小细胞肺癌EGFR-TKIs耐药机制及外周血ctDNA基因检测的研究进展[J]. *诊断病理学杂志*, 2018, 25(2): 152-155.  
FAN Junzhen, SHI Huaiyin. Research progress on the mechanism of EGFR-TKIs resistance non-small lung cancer and gene detection of ctDNA in peripheral blood[J]. *Chinese Journal of Diagnostic Pathology*, 2018, 25(2): 152-155.
- Molina-Vila MA, Mayo-de-Las-Casas C, Giménez-Capitán A, et al. Liquid biopsy in non-small cell lung cancer[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2016, 3: 69.
- Best MG, Sol N, In 't Veld SGJG, et al. Swarm intelligence-enhanced detection of non-small-cell lung cancer using tumor-educated platelets[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(2): 238-252. e239.
- Bello M. Binding mechanism of kinase inhibitors to EGFR and T790M, L858R and L858R/T790M mutants through structural and energetic analysis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118(Pt B): 1948-1962.
- Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al. Improvement in overall survival in a randomized study that compared dacomitinib with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer and EGFR-activating mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(22): 2244-2250.
- 杨耀湘. 非小细胞肺癌患者ALK、EGFR、KRAS基因的检测及临床病理特征[J]. *中国现代药物应用*, 2018, 12(8): 219-220.  
YANG Yaoxiang. Gene detection of ALK, EGFR, KRAS and clinicopathologic features in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Chinese Journal of Modern Drug Application*, 2018, 12(8): 219-220.
- Otsuka K, Hata A, Takeshita J, et al. EGFR-TKI rechallenge with bevacizumab in EGFR-mutant non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76(4): 835-841.
- Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2017, 107: 100-107.
- Joose SA, Pantel K. Tumor-educated platelets as liquid biopsy in cancer patients[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(5): 552-554.

19. Hofman P. ALK status assessment with liquid biopsies of lung cancer patients[J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(8): E106.
20. Nilsson RJ, Karachaliou N, Berenguer J, et al. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1): 1066-1075.
21. Santarpia M, Liguori A, D'Aveni A, et al. Liquid biopsy for lung cancer early detection[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(Suppl 7): S882-S897.

**本文引用:** 范怡畅, 俞静. 肿瘤相关血小板RNA用于恶性肿瘤液体活检的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(1): 193-197. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.031

**Cite this article as:** FAN Yichang, YU Jing. Research progress of tumor-educated platelets RNA in liquid biopsy of non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(1): 193-197. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.031