

• 综述 •

尿液循环肿瘤 DNA 在膀胱癌早期诊断及
治疗监控中的研究进展*孙之冰¹ 徐维章²

[摘要] 膀胱癌(bladder cancer, BC)是最常见的癌症类型之一,也是最致命的泌尿系统恶性肿瘤。目前,BC 的诊断和随访依赖于膀胱镜检查 and 细胞学方法,具有侵入性且往往受到肿瘤异质性的影响。因此,发现新的预测性生物标志物对 BC 的诊断、进展和预后至关重要。已有研究显示,尿液循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)与肿瘤细胞具有同源性,相比于血浆 ctDNA 具有更高的浓度,可能对泌尿系统肿瘤的早期检出发挥作用。但样本量较小且分离难度较高,检测方法的标准化的仍需进一步统一。本文总结了尿液 ctDNA 作为液体生物标志物在 BC 早期诊断、疗效监控及复发预测方面的价值,以为临床提供参考。

[关键词] 尿液循环肿瘤 DNA; 循环肿瘤 DNA; 膀胱癌

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2023.11.015

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

**Progress of urinary circulating tumor DNA in the early diagnosis
and therapeutic monitoring of bladder cancer**SUN Zhibing¹ XU Weizhang²

(¹School of Pediatrics, Nanjing Medical University, Nanjing, 211166, China; ²Department of Urology, Jiangsu Cancer Hospital, Jiangsu Institute of Cancer Research, Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University)

Corresponding author: XU Weizhang, E-mail: 493572284@qq.com

Abstract Bladder cancer(BC) is one of the most common types of cancer in the world and the most lethal urological malignancy. Currently, the diagnosis and follow-up of BC rely on cystoscopy and cytological methods, which are invasive and often affected by tumor heterogeneity. Therefore, the discovery of new predictive biomarkers is crucial for the diagnosis, progression and prognosis of BC. It has been shown that urinary circulating tumor DNA(ctDNA) is homologous to tumor cells, with higher concentrations compared to plasma ctDNA, so it may be useful for early detection of urological tumors. However, the sample size is small and difficult to isolate, and the standardization of detection methods still needs further harmonization. This paper summarizes the value of urinary ctDNA as a liquid biomarker for early diagnosis, efficacy monitoring and recurrence prediction in BC so as to provide clinical reference.

Key words urinary circulating tumor DNA; circulating tumor DNA; bladder cancer

膀胱癌(bladder cancer, BC)是最常见的癌症类型之一,也是最致命的泌尿系统恶性肿瘤。绝大多数来自上皮组织,其中 90% 以上为尿路上皮癌,鳞癌和腺癌各占 2%~3%;1%~5% 来自间叶组织,多数为肉瘤,如横纹肌肉瘤。BC 的预后和管理在很大程度上取决于膀胱镜活检或肿瘤

切除术病理活检的分期和浸润程度^[1]。BC 采用 TNM 系统进行分期,其有 2 个亚类:70% 的患者存在非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC),可分期为 Tis、T_a、T₁ 期,其余患者存在肌层浸润性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer, MIBC),范围 T₂~T₄ 期。在 NMI-BC 患者中,70% 存在 T_a 病变,20% 存在 T₁ 病变,10% 存在 Tis^[2]。大多数 BC 是在患者经历肉眼血尿后诊断的,因此长期以来人们一直在寻找基于尿液的生物标志物来改善诊断、疾病监测和治疗分层的方法。尽管取得了一定进展,但尿液的细胞学评

*基金项目:江苏省肿瘤医院科技发展基金项目(No: ZL202119)

¹南京医科大学儿科学院(南京,211166)

²江苏省肿瘤医院 南京医科大学附属肿瘤医院 江苏省肿瘤防治研究所

通信作者:徐维章, E-mail:493572284@qq.com

估以及尿道的膀胱镜和输尿管镜评估仍然是诊断的金标准。然而,膀胱镜检查的准确度依赖操作者的技术且具有高度侵袭性,会给患者造成痛苦及产生如排尿困难、尿频、血尿和感染等并发症,且往往受到肿瘤异质性的影响。此外,膀胱镜检查难以识别小或扁平的肿瘤,例如原位癌(CIS)。而尿细胞学检查尽管无创,具有高特异度,但灵敏度较低(20%~53%),可重复性也较低^[3]。基于蛋白质和非整倍体的可溶性尿蛋白生物标志物和脱落细胞检测虽已获得美国食品和药物管理局(FDA)批准;然而,由于灵敏度和(或)特异度有限,这些策略并未被广泛采用。NMIBC 复发率高达 34%,其中低于 15%的患者进展为 MIBC,因此需要基于此检查进行长期随访,故 BC 的管理费用比任何其他癌症都要高。因此,迫切需要开发用于 BC 无创诊断的准确生物标志物。循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)作为诊断时疾病分期、治疗方案选择、转移复发早期检测、治疗监控和复发预测的液体生物标志物^[4],由于具有微创、信息全、可重复性等优势,近年来受到肿瘤临床医学工作者的重视,成为多种癌症类型中的一个新兴领域。本文就近年来关于尿液 ctDNA 的生物学特征、检测技术以及在 BC 诊断及治疗监控中的研究进展进行综述。

1 ctDNA 的特性

ctDNA 是血液、尿液中游离于细胞外的肿瘤 DNA 片段,最早由 Mandel 和 Metals 于 1947 年在细胞游离 DNA(cell-free DNA, cfDNA)中发现。cfDNA 广泛存在于各种体液中,尿液中平均长度为 81 bp,这种片段 DNA 在细胞凋亡及坏死后释放,常呈双链片段^[5]。研究发现,各种类型原发肿瘤形成和生长的各个阶段均会释放胞内 DNA 入血,故称来源于肿瘤细胞的 cfDNA 为 ctDNA。在健康个体中,血浆 cfDNA 常维持在较低水平(1~100 $\mu\text{g/L}$),而肿瘤患者体内 cfDNA 常明显升高,可达 1 000 $\mu\text{g/L}$ ^[6]。这也为以 DNA 浓度为主的定量检测方法提供依据,并为肿瘤分期和预后提供指导。ctDNA 具有独特的表观遗传学模式,与肿瘤细胞 DNA 具有同源性,包含肿瘤特异性基因突变体,因此能够准确反映出肿瘤的特征性改变^[7]。此外,肿瘤患者的 ctDNA 片段中有凋亡细胞的遗传物质中未发现的 hTERT 和 hTr 序列^[8],这保证了 ctDNA 能凭借其特异性成为肿瘤诊断的液体生物标志物。

ctDNA 释放入血的机制是随机或经生物学程序目前尚有争议,主要考虑为以下几点:cfDNA 的片段大小与特定的肿瘤生理状态有关。正常细胞释放的 cfDNA 内化于大分子复合物或囊泡中,这种结构保护它免受循环系统中核酸酶的影响,并防

止免疫系统对其进行攻击,通过主动凋亡形成约 185~200 bp 的规则片段。而肿瘤组织细胞缺乏此类囊泡保护,故坏死过程中核酸酶随机进行消化,形成不规则片段。基于 Q-PCR 的方法或 AFM 显示,肿瘤患者的 ctDNA 大小主要低于 145 bp^[9]。在健康个体中发现的 cfDNA 的基础量表明其他非肿瘤细胞的凋亡也参与其构成。构成肿瘤微环境的细胞,如基质细胞、内皮细胞、淋巴细胞和其他免疫细胞同样构成了与肿瘤进展相关的 ctDNA 的潜在来源^[10]。肿瘤患者血中 DNA 酶浓度低且存在 DNA 酶抑制剂,可能抑制血浆 DNA 降解。

ctDNA 相比于肿瘤组织活检有很多优势,不但具有微创甚至无创、取材方便、可重复采样等特点,而且能实时提供肿瘤进展过程中肿瘤基因组的动态进化能力信息,用于连续监测,允许评估肿瘤进展。而传统的膀胱镜检查,不仅价格昂贵,且具有侵入性,不适用于对治疗效果进行连续性动态监测。少量组织的病理活检可能不能代表肿瘤中侵袭性最强的亚群,ctDNA 可以弥补病理活检因肿瘤异质性而导致的不可靠结果,提供肿瘤全面的基因图谱。与其他的液体活检生物标志物相比,ctDNA 的灵敏度较高,72%的患者可早于影像学 5.2 个月检测到,且半衰期短,仅为 15 min 至数小时^[11]。诊断的主要挑战是 ctDNA 含量较低,当等位基因突变频率较低时,易出现假阴性与假阳性的结果^[12]。若需确定肿瘤生长或复发部位,则仍需依靠影像学手段确定。

2 尿液 ctDNA 的提取及检测技术

2.1 尿液 ctDNA 的来源及提取

尿液 ctDNA 由泌尿生殖道细胞直接排入尿液组成或来源于通过肾小球滤过的 cfDNA。血浆 ctDNA 中的部分片段可穿过肾屏障,以 150~200 bp 片段的形式出现在尿液中^[13]。因此,尿 ctDNA 相比于血浆 DNA 具有更高的浓度,更容易检测。目前,不存在从尿液中提取出 ctDNA 的标准化方法,一些公司已经开发了能够从尿液中分离 ctDNA 的试剂盒。其中最常用的是 QIAamp 循环核酸试剂盒(QIAGEN)。此外,其他技术如离子标记的寡核苷酸-磁性离子液体(ITO-MIL)技术正在开发中,仍需进一步的研究来确定从尿液中分离 ctDNA 的最佳方法。

2.2 尿液 ctDNA 的检测技术

对 ctDNA 的定量分析为肿瘤早期诊断和个性化治疗提供新方法,最初集中在使用基于 PCR 的方法进行检测,这些方法可以在存在大量野生型 DNA 的情况下优先扩增低水平的突变等位基因,但缺乏灵敏度,在疾病早期 ctDNA 丰度低时不适用。数字 PCR(dPCR)与上述基于 PCR 的技术相比,允许对次要突变等位基因部分进行更精确的定量,具有高灵

敏度、特异度和相对较低的成本等优势。

如今尿液 ctDNA 的检测技术主要分为以磁珠捕获法(BEAMING 技术)为主的靶向测序与非靶向二代测序。BEAMING 技术结合了 dPCR 和流式细胞术,将不同类别的磁珠分布在对应的 DNA 中,利用磁珠吸附 DNA,然后用流式细胞仪检测标记以计算出 ctDNA,具有较高的灵敏度。第二代高通量测序法(NGS)为常见的非靶向二代测序法,允许对单个样本中的数亿个 DNA 片段进行大规模并行测序,广泛应用于各种液体分析上。

在 NGS 的基础上萌生了很多用以检测 ctDNA 的方法。例如,癌症个体化深度测序分析方法(CAPP-Seq),通过深度测序来研究 ctDNA 特性的 CAPP-Seq 是第一个基于 NGS 技术的 ctDNA 检

测技术,虽然检测价格较高,但其高灵敏度和准确性还是获得了广泛关注和临床应用。数字微滴 PCR(ddPCR)可针对性检测尿液 DNA 中的特定突变,不依赖 Ct 值,对低丰度突变具有高灵敏度,有助于早期和高度敏感地检测疾病复发,为一小部分缺乏基于 NGS 面板检测基因突变的患者提供一种替代的监测方法,但受限于捕获的突变数量少,并且不适应肿瘤异质性和随时间的分子进化。此外,还有全外显子测序(WES)、ARMS、甲基化-BEAMING、cold-PCR 等新兴 ctDNA 检测手段。

检测方法各有优势与不足(表 1),适用于不同的研究设计。目前,尚不存在检测尿液 ctDNA 的标准化方法。

表 1 尿液 ctDNA 检测技术的方法及优缺点

技术名称	方法	优点	限制性
磁珠捕获法 (BEAMING 技术)	结合了 dPCR 和流式细胞术,将不同类别的磁珠分布在对应的 DNA 中,利用磁珠吸附 DNA,然后用流式细胞仪检测标记以计算出 ctDNA	允许极其精确地计数携带感兴趣的突变的总模板分子的数目,并且可以实现低至 0.01% 的检测限度 具有较高的灵敏度与精确性	低通量 不能检测未知突变
NGS	第二代高通量测序法,对单个样本中的数亿个 DNA 片段进行大规模并行测序	高灵敏度(某些方法) 比其他 NGS 方法便宜	不如其他 NGS 方法全面 无法检测体细胞拷贝数改变 (SCNAs)
癌症个体化深度测序分析方法 (CAPP-Seq)	基于 NGS 技术通过深度测序来研究 ctDNA 特性	可以同时覆盖数千个不同的基因组区域 不需要事先了解肿瘤的突变 具有非常高的分析灵敏度	比基于扩增子的方法更耗时 只能检测所覆盖的基因组区域中的改变。
数字微滴式聚合酶链反应 (ddPCR)	通过对目标基因进行筛选,检测特定基因突变,从而发现微小残留病灶	可针对性检测尿液 DNA 中的特定突变 不依赖 CT 值,对低丰度突变具有高灵敏度 有助于早期和高度敏感地检测疾病复发	受限于捕获的突变数量少 并且不适应肿瘤异质性和随时间的分子进化

3 尿液 ctDNA 在 BC 诊断及治疗监控中的应用

尽管 cfDNA 含量在肿瘤患者体内高于健康人,但由于血浆中 ctDNA 脱落量低及免疫系统的清除作用,循环系统中的 ctDNA 含量仍较低,因此很难在早期癌症患者中找到肿瘤相同的突变。已有研究表明,ctDNA 的丰度从肿瘤病灶的近端到远端被逐渐稀释^[14],尿液与膀胱组织密切接触,可以直接反映出膀胱肿瘤的特异性改变。

3.1 预测肿瘤早期发病率及术前分期

Ge 等^[15]通过浅层全基因组测序(sWGS)检测尿路上皮癌,内部交叉验证显示,中位临床灵敏度为 86%,特异度为 95%,表明尿 ctDNA 可以作为无创性尿路上皮癌检测的基础。

Dudley 等^[16]开发了一种基于高通量测序(HTS)的杂交捕获方法,用于检测尿液 ctDNA,称为尿液癌症个体化深度测序分析方法(uCAPP-

Seq),并将其应用于尿液上清液样本。该方法将 54 例 BC 患者(CIS, pT_a~T₂)的尿液预处理样本与 34 例健康志愿者的样本进行比较,有 83% 的癌症患者中检测到尿液 ctDNA,特异度为 97%。当结合肿瘤病理活检测序进行评估时,uCAPP-Seq 的灵敏度提高到 93%。与细胞学相比,对尿液 ctDNA 的评估在检测早期 BC 和微小残留病灶(MRD)方面具有优越的性能特征。

Hirotsu 等^[17]观察到,与细胞 DNA 相比,cfDNA 在检测临床可操作的基因组畸变方面具有更高的灵敏度。在液体活检中,尿液上清液中发现 53% (89/168) 的肿瘤突变,尿液沉淀中发现 48% (81/168) 的肿瘤突变,血浆中发现 2% (3/168) 的肿瘤突变。尿液中的高变异等位基因分数(VAF)与更负面的临床指标(如肿瘤浸润)显著相关。尽管常规细胞学检验仅在 22% 的非侵袭性肿瘤中能

检测到肿瘤细胞,但使用尿液上清液和沉淀进行检测,肿瘤诊断灵敏度分别增加到 67%和 78%。

Togneri 等^[18]在 ctDNA 中观察到比细胞 DNA 更大的异常负载,提示在使用 ctDNA 时检测临床可操作基因组异常的分析灵敏度更高。因此,从 UBC 患者尿液中提取的 ctDNA 比细胞 DNA (61%)具有更高的肿瘤基因组负荷,为稳健的全基因组肿瘤分析提供了有前景的资源。

Russo 等^[19]通过液滴数字 PCR(ddPCR)比较了尿液 ctDNA 和肿瘤病理活检标本中 TERT 228 G>A/T 突变的存在,在组织样本中存在突变的 BC 患者中,尿液 ctDNA 的鉴定灵敏度达到 92%。Hayashi 等^[20]通过 ddPCR 分析了尿液 ctDNA 中的热点基因突变 TERT 启动子和 FGFR3(TERT 228C>T、TERT 250C>T 和 FGFR3 249S>C)。结合细胞学进行评估后,这些突变在尿路上皮癌的诊断和分期中实现了 78.6%的灵敏度和 96.0%的特异度。

Ou 等^[21]使用基因面板本研究比较了尿液上清液、尿液沉淀物、血浆与来自同一受试者的肿瘤组织样本在血尿患者恶性肿瘤鉴别中的诊断潜力。他们得出结论,尿液样本相比于血浆样本显示出相对于癌组织更高的突变重叠(生物信息学分析产生了 5 个目标基因 TERT、FGFR3、TP53、PIK3CA 和 KRAS),尿液中的基因突变(ctDNA 和细胞 DNA)与癌症组织的一致性也优于血浆 ctDNA。

淋巴转移是 BC 转移扩散的常见途径,恶性淋巴结对患者分型,指导临床早期诊断等发挥了重要作用。而影像学检测 BC 恶性淋巴结的灵敏度相对较低(31%~45%),常导致淋巴结转移患者分期错误,耽误治疗^[22];研究表明,ctDNA 的丰度与肿瘤负荷呈正相关,淋巴结受累越多,肿瘤体积越大的 BC 患者中,ctDNA 丰度更高。因此,对 ctDNA 的丰度大小进行检测,可用于术前淋巴结分期,辅助 BC 的早期诊断。同时,ctDNA 的检测可弥补穿刺不准导致的偏倚,拥有更短的周转时间。

所有上述研究都表明,对 ctDNA 基因组变化进行分析以对 BC 患者进行早期诊断可行,标准化后有望减少有创诊断技术的使用。

3.2 监测治疗期间肿瘤基因突变,全身系统性治疗疗效预测

合适的治疗管理方案对于 BC 患者十分重要,免疫治疗、靶向治疗均有赖于肿瘤基因信息的支持。

Christensen 等^[23]对 ctDNA 基因组变异进行分析,在疾病进展患者尿液样本中可检测到高水平的 ctDNA,而未进展或有所缓解的患者尿液中含有突变序列的 ctDNA 浓度下降,从而个性化监测 BC 患者的治疗效果。随后该实验室筛选 ctDNA 中的 FGFR3 和 PIK3CA 热点突变并得出结论,尿

液和血浆 ctDNA 中 FGFR3 和 PIK3CA 突变的增加表明 BC 的晚期进展和转移。

通过对比原发肿瘤与转移肿瘤的 ctDNA 基因差异,寻找到与转移能力相关的突变基因。Christensen 等^[24]观察到原发性肿瘤治疗有疗效患者三核苷酸突变信号 5($P=0.024$)的贡献显著增加,且与 ERCC2 突变状态相关,表明 ctDNA 监测仍然是高危患者预后和治疗反应的最强预测因子。在另一项实验中,为了评估原发肿瘤和转移瘤之间异质性对连续 ctDNA 测序的影响,该团队将血浆 WES 数据中鉴定的所有突变与来自原发肿瘤的相关数据进行比较,以评估在转移进化过程中获得的突变变化。结果表明,原发性肿瘤的突变图谱与 ctDNA 之间存在高度相似性,且突变表达的增加可解释治疗的耐药性。

Kinde 等^[25]通过评估 14 例经早期膀胱肿瘤切除术(TURB)的 BC 患者尿液 ctDNA 中 TERT 启动子突变,以帮助确定是否存在残留的肿瘤细胞。在 11 例存在 TERT 突变患者中,7 例复发,且突变等位基因的比例通常很大(0.17%~23.00%,中位数为 4.40%)。在 3 例无 TERT 突变患者中,均未复发。

ctDNA 检测分析可以指导靶向药物治疗方案及寻找耐药发生机制。FGFR3 热点基因突变与尿路上皮细胞癌发病机制相关^[26],是 NMIBC 患者最常见的突变基因之一,诊断 BC 的灵敏度达 39%,且与 BC 的转移和复发显著相关,因此 FGFR3 可能是非侵袭性和侵袭性 BC 的重要治疗靶点。研究表明,FGFR3 突变可能通过调节通过免疫细胞破坏肿瘤细胞的急性炎症反应来促进肿瘤发生^[27]。因此,基于 FGFR3 和免疫调节剂的同步抑制,对于 FGFR3 突变或过表达 BC 的早期阶段可能存在潜在的治疗策略。对于 ctDNA 阳性并接受 atezolizumab 治疗的患者,ctDNA 可指导尿路上皮癌的辅助免疫治疗,有望改变术后癌症护理的方法,并对患者药物选择及耐药性预测提供临床用药指导^[28]。尽管需要更多的研究来验证上述方法,但在不久的将来,评估 BC 患者的尿液 ctDNA 以监测 BC 治疗可能成为一种合适的方法。

3.3 预后风险分层及局部治疗后复发预测

目前,影像学是放射治疗后反应评估的主要方法。然而,对于经常进行影像学长期随访的患者,可能会有致癌风险,并导致在确定治疗反应或疾病状态方面产生重大主观性。而 ctDNA 可精确定量肿瘤负担,如前所述,ctDNA 的浓度增加与疾病进展密切相关。因此,ctDNA 分析有望为疾病晚期患者提供辅助随访监测,且比影像学检测更具有预见性。

Patel 等^[29]结合使用标记扩增子测序(TAm-

Seq)和 sWGS 来无创评估 12 例 BC 患者肿瘤组织中的单核苷酸变异和拷贝数改变。结果表明,在 6 例疾病复发的患者中,有 5 例生物体液样本(尿沉渣、尿上清液或血浆)中检测到突变 DNA,而在 6 例无疾病复发的患者中均未检测到突变 DNA,因此总体灵敏度和特异度分别为 100%和 83%。

Dudley 等^[16]通过 uCAPP-Seq 方法发现 PLE-KHS1 启动子突变是 BC 中最常见的体细胞改变之一,并且对于接受局部治疗后复发 BC 监测的患者的细胞学灵敏度达到约 2 倍的改善,在临床复发前 2.7 个月的中位数时间检测到 92%的复发。

Christensen 等^[24]发现化疗前诊断时 ctDNA 的存在具有高度预后意义(风险比:29.1; $P = 0.001$),ctDNA 分析在膀胱切除术术后监测期间可正确识别出所有转移复发的患者(灵敏度 100%,特异度 98%),并观察到长达 245 d 的影像学领先时间(中位时间 96 d, $P = 0.023$)。此外,对于治疗前或治疗期间 ctDNA 阳性的高危患者,化疗期间 ctDNA 的动态变化与疾病复发相关($P = 0.023$),且相关性高于其他方法。

Birkenkamp-Demtröder 等^[30]发现膀胱切除术后液体活检中检测到的 ctDNA 表明有转移性疾病,并与新辅助治疗反应、转移性疾病反应和疾病进展的影像学数据相关。ctDNA 比 CT 扫描阳性中位前置时间为 101 d,表明 ctDNA 分析可能比 CT 扫描对其他癌症类型更敏感。因此,ctDNA 分析可以在早期确认患者治疗方案改变的准确性及检测 MRD 并揭示治疗效果。同时该团队使用肿瘤测序来识别肿瘤特异性变异,生成个性化的 ddPCR 分析 101 个尿液样本中的 ctDNA。50%的复发性 NMIBC 患者样本和 96%的 MIBC 或转移性 UCB 患者的样本中检测到 ctDNA,平均为 1 282 拷贝/mL,而在发生局部复发的患者中为 31 拷贝/mL,这表明 ctDNA 水平可能反映了侵袭潜力。

Raja 等^[31]测试 ctDNA 的改变是否可以预测接受抗 PD-L1(Durvalumab)治疗的 BC 患者的生存率,发现早期出现 ctDNA 含量下降的患者较晚期出现 ctDNA 下降的患者拥有更大的肿瘤体积缩小比例以及更长的无进展生存和总生存时间,并且可能是 BC 免疫治疗长期受益的预测因子。

4 总结与展望

BC 复发或进展时预后较差,尽早发现进行明确的治疗、辅助化疗时的评估监测以及早期发现复发对于实现长期无病生存从而提高生活质量至关重要。尽管膀胱镜检查 and 细胞学检查仍是诊断和检测 BC 的金标准,但仍需要更敏感、侵入性更小、成本更低、可重复获取的方法。ctDNA 分析作为一种非侵入性方法,不仅具有诊断和监测能力,且比细胞学检测具有更高的灵敏度和特异度,通常能

在常规方法之前提示 BC,这为诊断 MRD 提供可能。而尿液 ctDNA 相比血液 ctDNA 又有十分显著的优越性,尿液中 ctDNA 主要来源于肿瘤释放,且与膀胱组织直接接触,相比血液 ctDNA 浓度更高,更易测出,诊断 BC 也更敏感。同时,具有取样方便、无创、可多次采样进行连续监测等优势。在样本保存方面,尿液样本相比全血更易保存,从而能确保样本中 ctDNA 的原始比例与完整性,最大程度地排除背景无关因素。尽管大多数研究是在小型患者队列中进行的,样本量有限,观察指标不稳定,仍需进行大型前瞻性临床试验进行验证,但 ctDNA 分析在肿瘤精准医学和个性化治疗上展现出巨大潜力。与此同时,由于早期肿瘤体积较小或治疗初期 MRD 极小,入血的 ctDNA 有限,检出率低,分离不当可能造成背景值过高,检测方法需进一步完善以提高灵敏度和特异度。还需统一研究方法和技术,以建立一种标准化的方法来收集、预处理样本,并选择有效技术准确分离 ctDNA。

总之,随着检测技术的不断进步,ctDNA 在不久的将来会广泛应用于临床实践中,并且成为 BC 早期诊断的重要工具。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Spiess PE, Agarwal N, Bangs R, et al. Bladder Cancer, Version 5. 2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15 (10):1240-1267.
- [2] Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis [J]. Urology, 2005, 66(6 Suppl 1):4-34.
- [3] Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses [J]. Urology, 2003, 61(1):109-118.
- [4] Avritscher EB, Cooksley CD, Grossman HB, et al. Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications [J]. Urology, 2006, 68(3):549-553.
- [5] Markus H, Zhao J, Contente-Cuomo T, et al. Analysis of recurrently protected genomic regions in cell-free DNA found in urine [J]. Sci Transl Med, 2021, 13 (581):eaaz3088.
- [6] Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. Cancer Discov, 2014, 4(6):650-661.
- [7] 邹文超, 陈南辉. 晚期膀胱癌免疫治疗潜在的生物标志物研究进展 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2023 38(1):72-77.
- [8] Nassar AH, Umeton R, Kim J, et al. Mutational analysis of 472 urothelial carcinoma across grades and anatomic sites [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25:2458-2470.
- [9] Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High

- fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23418.
- [10] Moulriere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12 Suppl 1: S209-S215.
- [11] Udayan G, Marsella A, Valentini P. An ultrasensitive colorimetric test for the detection of somatic rare mutations in DNA[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(5): 2973-2979.
- [12] Liao H, Li H. Advances in the Detection Technologies and Clinical Applications of Circulating Tumor DNA in Metastatic Breast Cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 3547-3560.
- [13] Garcia Moreira V, Prieto Garcia B, de la Cera Martinez T, et al. Elevated transrenal DNA (cell-free urine DNA) in patients with urinary tract infection compared to healthy controls[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(7-8): 729-731.
- [14] Goto T, Hirotsu Y, Amemiya K, et al. Distribution of circulating tumor DNA in lung cancer: analysis of the primary lung and bone marrow along with the pulmonary venous and peripheral blood [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 59268-59281.
- [15] Ge G, Peng D, Guan B, et al. Urothelial Carcinoma Detection Based on Copy Number Profiles of Urinary Cell-Free DNA by Shallow Whole-Genome Sequencing[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(1): 188-198.
- [16] Dudley JC, Schroers-Martin J, Lazzareschi DV, et al. Detection and Surveillance of Bladder Cancer Using Urine Tumor DNA [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(4): 500-509.
- [17] Hirotsu Y, Yokoyama H, Amemiya K, et al. Genomic profile of urine has high diagnostic sensitivity compared to cytology in non-invasive urothelial bladder cancer[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(10): 3235-3243.
- [18] Togneri FS, Ward DG, Foster JM, et al. Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA[J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24(8): 1167-1174.
- [19] Russo IJ, Ju Y, Gordon NS, et al. Toward Personalised Liquid Biopsies for Urothelial Carcinoma: Characterisation of ddPCR and Urinary cfDNA for the Detection of the TERT 228G > A/T Mutation [J]. *Bladder Cancer*, 2018, 4(1): 41-48.
- [20] Hayashi Y, Fujita K, Matsuzaki K, et al. Clinical Significance of Hotspot Mutation Analysis of Urinary Cell-Free DNA in Urothelial Bladder Cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 755.
- [21] Ou Z, Li K, Yang T, et al. Detection of bladder cancer using urinary cell-free DNA and cellular DNA [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 9(1): 4.
- [22] Wu S, Zheng J, Li Y, et al. Development and Validation of an MRI-Based Radiomics Signature for the Preoperative Prediction of Lymph Node Metastasis in Bladder Cancer[J]. *EBio Medicine*, 2018, 34: 76-84.
- [23] Christensen E, Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, et al. Liquid Biopsy Analysis of FGFR3 and PIK3CA Hotspot Mutations for Disease Surveillance in Bladder Cancer [J]. *Eur Urol*, 2017, 71(6): 961-969.
- [24] Christensen E, Birkenkamp-Demtröder K, Sethi H, et al. Early Detection of Metastatic Relapse and Monitoring of Therapeutic Efficacy by Ultra-Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA in Patients With Urothelial Bladder Carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(18): 1547-1557.
- [25] Kinde I, Munari E, Faraj SF, et al. TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(24): 7162-7167.
- [26] Sung JY, Sun JM, Chang Jeong B, et al. FGFR3 overexpression is prognostic of adverse outcome for muscle-invasive bladder carcinoma treated with adjuvant chemotherapy[J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(1): 49. e23-e31.
- [27] Foth M, Ismail NFB, Kung JSC, et al. FGFR3 mutation increases bladder tumorigenesis by suppressing acute inflammation [J]. *J Pathol*, 2018, 246(3): 331-343.
- [28] Chauhan PS, Chen K, Babbra RK, et al. Urine tumor DNA detection of minimal residual disease in muscle-invasive bladder cancer treated with curative-intent radical cystectomy: A cohort study[J]. *PLoS Med*, 2021, 18(8): e1003732.
- [29] Patel KM, van der Vos KE, Smith CG, et al. Association of plasma and urinary mutant DNA with clinical outcomes in muscle invasive bladder cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 5554.
- [30] Birkenkamp-Demtröder K, Christensen E, Nordentoft I, et al. Monitoring Treatment Response and Metastatic Relapse in Advanced Bladder Cancer by Liquid Biopsy Analysis[J]. *Eur Urol*, 2018, 73(4): 535-540.
- [31] Raja R, Kuziora M, Brohawn PZ, et al. Early Reduction in ctDNA Predicts Survival in Patients with Lung and Bladder Cancer Treated with Durvalumab[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(24): 6212-6222.

(收稿日期: 2022-03-05)