

• 临床研究 •

非小细胞肺癌循环肿瘤 DNA 突变特征与放疗敏感相关性研究*

罗成, 吴川, 方曾怡, 高明权, 吴自飞, 王卫东[△]

646000 四川 泸州, 西南医科大学附属医院 肿瘤科(罗成、吴川、方曾怡、王卫东); 610054 成都, 电子科技大学 医学院(高明权、吴自飞); 610041 成都, 四川省肿瘤医院·研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学医学院, 放射肿瘤学四川省重点实验室 放射治疗中心(王卫东)

[摘要] 目的: 通过高通量测序技术检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA) 的突变特征, 并分析其与肿瘤等效退缩率之间的相关性, 探讨 ctDNA 对放射治疗敏感性的评估价值。方法: 纳入四川省肿瘤医院初治的非小细胞肺癌患者 35 例, 采集静脉血分离血浆 ctDNA, 进行 Illumina HiSeq PE150 测序, 获取突变特征谱; 按肿瘤等效退缩率将入组患者分为敏感组和抵抗组。采用 *t* 检验或秩和检验进行统计学分析。结果: 非小细胞肺癌 ctDNA 突变特征主要表现为单核苷酸突变, 其中以外显子编码区域错义突变为主, 另有部分同义突变, 非编码 RNA 突变及非翻译区突变等, 但它们的发生率在敏感组和抵抗组之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 基因拷贝数变异是非小细胞肺癌 ctDNA 突变的另一主要表现, 它包括有变异类型的重复和缺失, 变异数目的多少及区域的大小, 其中变异类型及数目在敏感组和抵抗组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但基因拷贝数变异区域的大小, 在敏感组和抵抗组之间差异具有统计学意义 ($P = 0.014$), 秩相关分析显示相关系数 $r_s = 0.554$, 进一步分析其变异重复类型区域的大小, 在敏感组和抵抗组之间差异也具有统计学意义 ($P = 0.008$), 秩相关系数 $r_s = 0.591$ 。结论: 非小细胞肺癌 ctDNA 突变中非同义突变、非翻译区突变、非编码 RNA 突变均与放射敏感无相关性, 基因拷贝数变异类型及数目均与放射敏感性无关, 但变异区域的大小, 尤其是重复区域的大小与肿瘤放射敏感呈现出负相关性。

[关键词] 循环肿瘤 DNA; 非小细胞肺癌; 突变特征; 放疗敏感性

[中图分类号] R734.2; R730.55 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.08.005

引文格式: Luo C, Wu C, Fang ZY, et al. Correlation between circulating tumor DNA mutation and radiation sensitivity in non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(8): 658-664. [罗成, 吴川, 方曾怡, 等. 非小细胞肺癌循环肿瘤 DNA 突变特征与放疗敏感相关性研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(8): 658-664.]

Correlation between Circulating Tumor DNA Mutation and Radiation Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer

Luo Cheng, Wu Chuan, Fang Zengyi, Gao Mingquan, Wu Zifei, Wang Weidong

Department of Oncology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China (Luo Cheng, Wu Chuan, Fang Zengyi); School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, Sichuan, China (Wu Zifei, Gao Mingquan); Radiotherapy Center, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, Sichuan, China (Wang Weidong)

Corresponding author: Wang Weidong, E-mail: wwdwyl@sina.com

This study was supported grants from Ministry of Science and Technology of the People's Republic China (NO. 2017YFC0113904) and Science & Technology Department of Sichuan Province (NO. JH2017009).

[收稿日期] 2020-03-19 **[修回日期]** 2020-07-01

[基金项目] * 国家科技部重点研发项目(编号:2017YFC0113904); 四川省科技厅重点研发项目(编号:JH2017009)

[通讯作者] [△]王卫东, E-mail: wwdwyl@sina.com

[Abstract] **Objective:** To detect the mutational characteristics of circulating tumor DNA (ctDNA) in peripheral blood in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) by using high-throughput sequencing technology, and analyze the corre-

lation between it and the therapeutic effect of radiotherapy, so as to evaluate the sensitivity of ctDNA to radiotherapy. **Methods:** Thirty-five NSCLC patients in Sichuan Cancer Hospital were included. Plasma ctDNA was extracted and sequenced by IlluminaHiSeqPE150. The enrolled patients were assigned to the sensitive group and the resistant group according to the equivalent regression rate of the tumor. t-test or rank sum test were used for statistical analysis. **Results:** Mutations in ctDNA from NSCLC patient plasma were characterized by single nucleotide mutations; and missense mutations in exons were predominant; besides, some synonymous mutations, mutations in non-coding RNA and mutations in untranslated regions; but differences were not statistically significant between the sensitive group and the resistant group ($P > 0.05$). Gene copy number variation (CNV) was another major manifestation of ctDNA mutation in NSCLC. It included two types, duplication and deletion, focusing on the number of variation and the size of regions. There were no significant differences between the sensitive group and the resistant group in type and number of variation ($P > 0.05$). However, the CNV total region size was significantly different between the two groups ($P = 0.014$), and the Spearman rank correlation analysis showed that the correlation coefficient was 0.554. Further analysis demonstrated that the CNV duplication region size was also significantly different between the two groups ($P = 0.008$), and the rank correlation coefficient was 0.591. **Conclusion:** Neither non-synonymous mutation, untranslated region mutation and non-coding RNA mutation among mutations in ctDNA from NSCLC patient plasma nor the type or number of gene copy number variation are correlated to radiosensitivity, but the CNV total region size, especially the CNV duplication region size, is negatively correlated to radiosensitivity.

[**Key words**] Circulating tumor DNA; NSCLC; Mutation characteristics; Radiation sensitivity

探索一种能准确及时反映肺癌放疗敏感性的特异性标志物,将会对肺癌个体化治疗策略的制定及修正具有重要的临床意义^[1]。肿瘤基因变异及多态性差异与放射敏感性密切相关。基因不仅可以预测肿瘤放射敏感性,还可成为改善肿瘤放射敏感性的靶点,为肿瘤放射增敏提供新思路^[2],对肿瘤基因突变及差异表达的研究是放射敏感性研究的重要方向。外周血循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 是液体活检的重要手段,它包含肿瘤细胞的全部基因突变信息,在肺癌的早期诊断、疗效评估、用药指导、预后预测及复发监控方面具有独特的优势^[3]。ctDNA 突变特征类型包括单核苷酸突变 (single nucleotide variant, SNV), 小片段插入/缺失 (insertion and deletion, Iad), 拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 3 种^[4-6]。目前国内尚未报道过非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) ctDNA 突变特征与放射敏感性之间的关联性。因此,本研究通过高通量测序技术检测 NSCLC 患者外周血 ctDNA 的基因突变特征,并与肿瘤等效退缩率 (equivalent tumor regression rate, ETRR) 进行相关性分析,初步研究外周血 ctDNA 在 NSCLC 中的突变特征谱及其与放射敏感的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

前瞻性纳入 2017 ~ 2019 年在四川省肿瘤医院

初治的 NSCLC 患者,入组标准:1) 病理提示为 NSCLC;2) 有影像学可评估的肺部病灶;3) 卡氏评分 ≥ 70 分,预计生存期 > 6 月;4) 全程采用调强放疗技术;5) 完成全部放疗计划。排除标准:1) 合并严重肺部疾病,一氧化碳弥散功能占预计值的百分比 $< 60\%$;2) 合并严重心、脑血管及肝肾疾病;3) 严重贫血,血红蛋白 < 80 g/L;4) 年龄 < 18 岁或 > 80 岁;5) 有放射治疗其他禁忌症。

所有患者统一使用医科达或瓦里安系统医用直线加速器,采用 6MV X 线能量,剂量率 400 ~ 600 cGy/min,全程采用调强放疗技术,处方剂量:(45 ~ 75) Gy/(15 ~ 33)f,单次分割剂量 2.0 ~ 3.55 Gy/f,w。所有入组患者根据 ICRU-62 指南在胸部定位增强 CT 肺窗上勾画肿瘤原发病灶体积 (gross tumor volume tumour, GTV-T),预先设定窗宽、窗位分别为 1 600 Hu 和 -600 Hu,有毛刺时仅勾画毛刺根部,胸膜凹陷处包入靶区内,粘液栓不包入靶区内。纵隔病变在纵隔窗勾画,设定窗宽、窗位分别为 400 Hu 和 20 Hu,阳性淋巴结定义短径 > 1 cm/短径 ≤ 1 cm,但有 > 5 个的小淋巴结成团或成簇出现。临床靶区为根据病理类型由 GTV 外扩 0.6 (鳞癌) ~ 0.8 cm (腺癌) 区域。同时勾画正常肺组织、食管、脊髓及心脏等危及器官,并根据 RTOG 0225 实验协议要求设定危及器官限制剂量。

1.2 ETRR 计算及分组

在肺窗上勾画 GTV-T 后,由 MIMO 计算机系统

计算肿瘤体积值,作为放疗前肿瘤基线体积,并定义为 V_0 ,放疗结束后 1 月复查定位增强 CT,再次按上述靶区勾画原则,勾画放疗后的原发肿瘤残留体积,并定义为 V_1 。按照肿瘤退缩率 (tumor regression rate, TRR) 公式 $[TRR = (V_0 - V_1)/V_0 \times 100\%]$ [7], 计算样本的 TRR,其数值可以间接反映肿瘤对放射治疗的敏感性(胸部增强 CT 显示 NSCLC 样本放射治疗前后肿瘤体积变化情况如图 1 所示)。考虑到临床中患者接受放疗剂量的差异,我们将 TRR 与生物效应剂量 (biological effective dose, BED) 的比值,其中 $BED = n \times d \times [1 + d/(\alpha/\beta)]$, n 为分次数, d 为分次剂量, α/β 取值 $10^{[8]}$,来对放疗剂量进行标准化处理,我们定义这个值为 ETRR,即 $ETRR = TRR/BED$,得到 20 例肿瘤样本的等效退缩率分布图,这样避免了放疗剂量差异对疗效观察的影响,使结果更加准确可靠(图 2)。

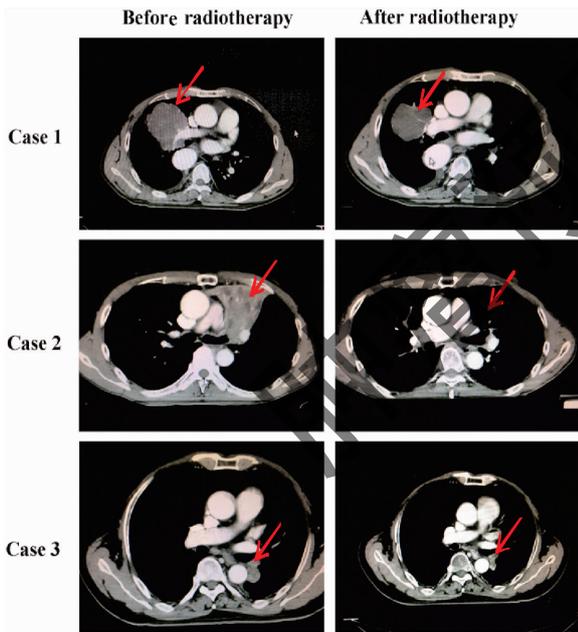


图 1 3 例代表性 NSCLC 患者放疗前后胸部 CT 图像
Figure 1. CT Images of Three Typical NSCLC Patients before and after Radiotherapy

Tumor size as indicated by the red arrow.

NSCLC: Non-small cell lung cancer.

肿瘤临床评效标准参照 RECIST 1.1 的标准进行,治疗后肿瘤体积退缩 30% 及以上定义为敏感组,退缩不足 30% 定义为抵抗组。

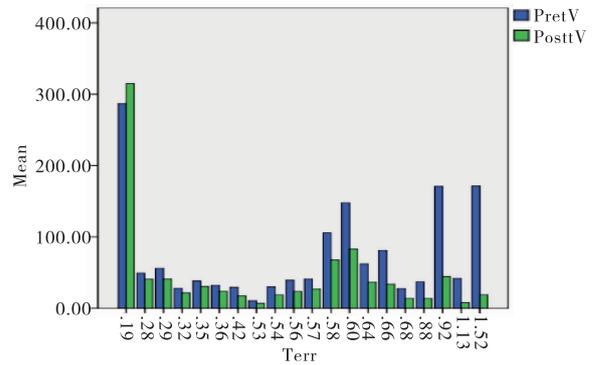


图 2 等效退缩率直条图

Figure 2. Equivalent Regression Rate of the Tumor

The regression of tumor volume and the corresponding distribution of equivalent regression rate in 20 samples before and after radiotherapy. The X axis represents the equivalent regression rate of the tumor (%), and the Y axis represents the tumor volume (cm^3). Pret V: Volume before radiotherapy; Postt V: Tumor volume after radiotherapy.

1.3 ctDNA 样本提取及检测方法

统一采用 EDTA 抗凝管采集空腹外周静脉血液,时间节点分别选择患者放射治疗前 1 周内及治疗结束后 4 周。将采集的血液于 2 h 内进行处理,在 $4^\circ C$ 环境下静置,进行血浆及白细胞分离,采用循环核酸提取试剂盒提取血浆 ctDNA,将样本中 DNA 浓度 $\geq 20 \text{ ng}/\mu L$,总量 $0.6 \mu g$ 以上的 DNA 样品用来建库,将基因组 DNA 经 Covaris 破碎仪随机打断成长度为 180 ~ 280 bp 的片段,捕获实验采用 Agilent SureSelect Human All Exon V6 试剂盒,末端修复、磷酸化以及加 A 尾后,片段两端分别连接上接头制备 DNA 文库。带有特异标签序列 index 的文库与生物素标记的探针进行液相杂交,再使用带链霉素的磁珠将 20 965 个基因的 334 378 个外显子捕获下来,经 PCR 线性扩增后进行文库质检[链霉素磁珠杂交捕获原理(北京诺禾致源公司)见图 3],合格后进行 Illumina HiSeq PE150 高通量双端测序。具体建库测序流程见图 4。同时通过基因测序技术准确获得肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB),即外显子编码区每兆碱基中发生基因突变的总数。

1.4 统计学分析

相关数据处理采用 SPSS 17.0 软件,两组间计量资料符合正态分布者采用 t 检验,不符合正态分布者采用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,进一步对有统计学意义的数据行 Spearman 秩相关分析。

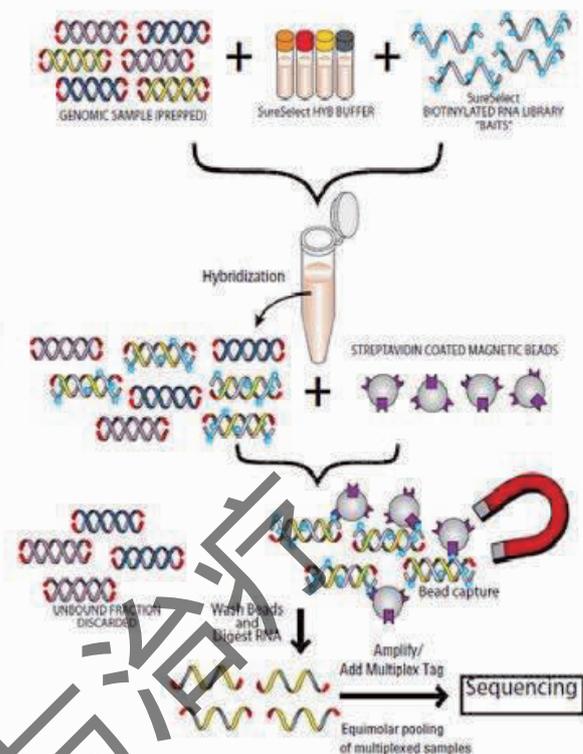
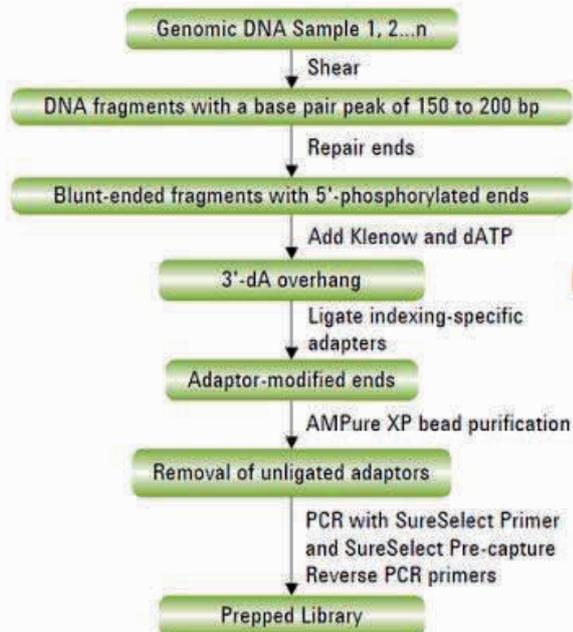


图 3 杂交捕获原理
Figure 3. Principle of Hybrid Capture

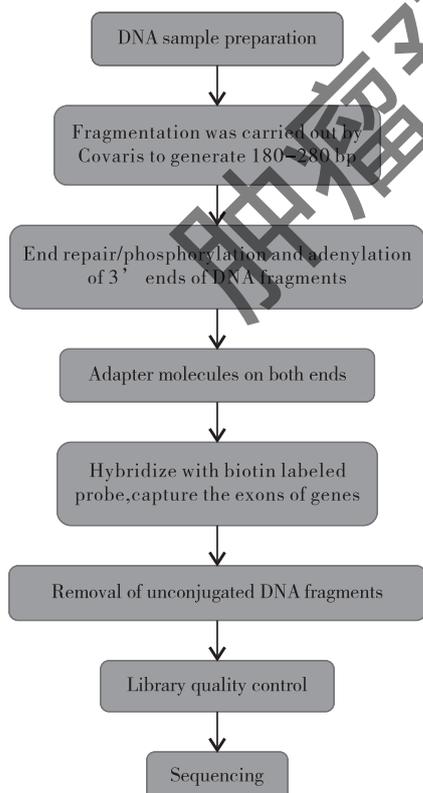


图 4 建库测序流程
Figure 4. Process of Library Sequencing

2 结果

2.1 患者临床特点及分组

总入组 35 例患者,7 例于放疗前放弃治疗,5 例在治疗中放弃治疗,最后完成全部放疗计划的患者总计 23 例。年龄最大的 77 岁,最小的 48 岁;男性 18 例,女性 5 例;腺癌 8 例,鳞癌 15 例;II 期 1 例,III 期 11 例,IV 期 11 例。其中 1 例在治疗过程中出现肺部严重感染,胸腔积液,放疗被迫中断,待感染控制后断续完成放射治疗,总放疗持续时间 > 8 周;2 例在放疗开始前 1 周内完成了铂类为基础的双药联合化疗。

为了避免铂类化疗药物对 TMB、基因编码和潜在驱动突变的影响^[9],以及放疗中断时间过长,肿瘤增殖对肿瘤退缩的影响,我们在进行疗效分析时,排除 2 例接受化疗的样本和 1 例放疗中断时间过长的样本,对剩下的 20 例样本进行分析。

将整体受照物理剂量按公式换算成 BED,所得数据服从正态分布。利用统计学分析得到平均 BED 为 70.47 ± 11.35 ,按照 30% 比上平均 BED 转换成 ETRR 的敏感临界值为 0.43%,小于 0.43% 为抵抗组,大于或等于 0.43% 为敏感组。最后,20 例

样本分成敏感组 13 例,抵抗组 7 例。

2.2 SNV 与 ETRR 的相关性分析

SNV 主要包括外显子编码区域突变,内含子区域突变,3' UTR 和 5' UTR 区域突变,剪切位点 4bp 区域突变,非编码 RNA 区域突变,基因间隔区突变等,其中以外显子编码区域错义突变为主,约占 70%,另有部分同义突变,约占 25%,而由于插入、删除或连续碱基替换导致变异位点产生一个新的终止密码子或终止密码子丢失的非同义突变类型和未知突变仅占约 5%,本文中我们将此类型与错义突

变一起统称为非同义突变。分别将 SNV 总数(SNV total, SNVT)、SNV 中非同义突变总数(SNV nonsynonymous total, SNVNT)、SNV 中非编码 RNA 突变总数(SNV non-coding RNA total, SNVNRT)、3' UTR 和 5' UTR 区域突变数(UTR total, UTRT)、剪切位点 4bp 区域突变数(splicing total, ST)进行 *t* 检验,结果显示两组样本之间差异无统计学意义($P > 0.05$),可以认为 SNV 中的上述观察指标在放射治疗敏感组和抵抗组之间无差异(表 1)。

表 1 SNV *t* 检验结果

Table 1. Types of SNV in ctDNA from Sensitive Group and Resistance Group

Type of SNV	Sensitive group	Resistant group	<i>t</i>	<i>P</i>
SNVT	2659.46 ± 1002.20	2283.14 ± 591.46	0.905	0.377
SNVNT	1035.00 ± 445.01	969.00 ± 267.46	0.357	0.726
SNVNRT	123.54 ± 69.42	98.00 ± 16.55	0.948	0.356
UTRT	91.92 ± 50.08	74.71 ± 20.64	0.862	0.400
ST	34.15 ± 10.96	30.86 ± 8.17	0.695	0.496

SNV: Single nucleotide variant; ctDNA: Circulating tumor DNA; SNVT: SNV total; SNVNT: SNV nonsynonymous total; SNVNRT: SNV non-coding RNA total; UTRT: UTR total; ST: Splicing total.

2.3 基因 Iad 突变与 ETRR 的相关性分析

20 例样本测序结果显示基因小片段的插入/缺失突变非常少,这可能与 DNA 经破碎仪处理后 50 bp 以内的小片段太短,采用二代测序方法时,能检测出的数量太少有关。本文不再进一步对此类突变进行分析。

2.4 基因 CNV 与 ETRR 的相关性分析

CNV 可分为缺失和重复两种类型,每种类型又有变异数目的多少和区域的大小之分。测序结果显示基因 CNV 两种类型均存在,并且重复和缺失可以在同一样本的不同位点上发生。在 CNV 数目方面,主要表现为拷贝数重复的数目多于缺失的数目,但变异数目的多少与区域的大小无绝对正相关性。分析拷贝数变异类型、总数目、总区域大小、重复数和

缺失数及其区域大小,进行正态性检验后服从正态分布者采用 *t* 检验,不服从正态分布数据采用秩和检验,结果显示,敏感组和抵抗组基因拷贝数变异的总数(CNV total count)、类型、变异重复数(CNV duplication count)、变异缺失数(CNV deletion count)及变异缺失区域大小(CNV deletion region size)无统计学差异($P > 0.05$),但两组样本拷贝数变异总区域大小(CNV total region size)及重复区域大小(CNV duplication region size)有统计学差异($P = 0.014, P = 0.008$)。进一步进行 Spearman 秩相关分析显示秩相关系数 $r_s > 0$ ($r_s = 0.554, 0.591$),为正相关,即变异重复区域越大,对放射治疗敏感性越低(表 2 ~ 4)。

表 2 CNV 和 TMB *t* 检验结果

Table 2. CNV and TMB in ctDNA from Sensitive Group and Resistance Group by *t* Test

Variable	Sensitive group	Resistant group	<i>t</i>	<i>P</i>
CNV total count	26.08 ± 15.72	24.57 ± 11.66	0.222	0.827
CNV duplication total	19.54 ± 16.82	17.86 ± 9.14	0.244	0.810
CNV deletion total	6.54 ± 6.25	6.71 ± 8.20	-0.054	0.958
TMB	36.63 ± 14.42	33.92 ± 9.78	0.442	0.664

CNV: Copy number variation; TMB: Tumor mutation burden.

表 3 CNV 秩和检验结果

Table 3. CNV in ctDNA from Sensitive Group and Resistance Group by Wilcoxon Signed-Rank Test

Type of CNV	Sensitive group	Resistant group	Z	P
CNV total region size	2,190,016 (1,151,023 - 3,599,793)	27,150,025 (11,550,019 - 43,303,580)	-2.417	0.014
CNV duplication region size	1,740,013 (265,009 - 2,515,039.5)	26,820,021 (11,310,035 - 36,240,019)	-2.575	0.008
CNV deletion region size	400,007 (40,001.5 - 1,000,166)	25,567 (180,003 - 340,006)	-0.555	0.588

表 4 CNV 秩相关分析结果

Table 4. CNV by Spearman Rank Correlation Analysis

Type of CNV	r_s	P
CNV total region size	0.554	0.011
CNV duplication region size	0.591	0.006

2.5 TMB 与 ETRR 的相关性分析

TMB 在敏感组为 (36.63 ± 14.42) mutations/mb, 抵抗组为 (33.92 ± 9.78) mutations/mb, 将敏感组和抵抗组 TMB 行 *t* 检验, 结果显示两组样本的均数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 认为 TMB 与放射治疗敏感无相关性 (表 2)。

3 讨论

本研究测序结果显示, NSCLC 患者的 ctDNA 突变特征主要表现为以下几方面: 体细胞突变几乎均存在 SNV、Iad 及 CNV 三种类型, 其中 Iad 类型较少见, 这可能与 DNA 经破碎仪处理后的片段中低于 50 bp 的小片段较少有关, 而 SNV 及 CNV 相对常见, SNV 是基因组中种类最丰富的变异, 其中以外显子编码区域错义突变为主, 另外还有部分内含子区域, 非翻译区域, 剪切位点 4bp 区域, 非编码 RNA 区域及间隔区域突变。

本研究重点观察 SNV 总数、非同义突变数、非编码 RNA 突变数、非翻译区突变数、剪切位点 4bp 区突变数在放射敏感组与抵抗组的差异表达情况, 结果显示其在两组中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。李健强等^[10] 采用病例对照方法分析 NSCLC 患者 *p53* 基因 BstU I 位点的多态性与放疗疗效的相关性, 发现 *p53* 基因 BstU I 单核苷酸多态性可能与放射敏感性有关。而本研究重点研究体细胞突变, 未对单核苷酸多态性进行深层次基因分析, 但这给今后的研究提供了思路。Lin 等^[11] 的研究已经证实了 3' UTR 区域的突变影响 miRNA 与基因的结合, 导致基因的调控产生异常, 影响 NSCLC 患者的总体生存。非编码 RNA 尽管也不编码蛋白质, 但它们不仅参与了肿瘤细胞的增殖、凋亡、调控细胞周

期、黏附、诱导血管生成等多种生物学行为, 而且在染色质重塑、转录调控和转录后加工等多层面调控基因表达, 在肿瘤的诊断及治疗方面有着重要的作用^[12]。Wolfort 等^[13] 发现, 真核细胞翻译起始因子 4E 在乳腺癌中高表达可能与放疗抵抗有关。孙献涛等^[14] 发现非编码 RNA 的强制表达通过促进细胞凋亡提高结直肠癌对放射治疗的敏感性。剪切位点 4bp 突变也可以通过影响 RNA 的剪接, 从而影响蛋白的表达^[15]。但关于 SNV 中非同义突变、非编码区 RNA 突变及剪切位点 4bp 区域突变与肺癌放射敏感性的研究目前尚未有相关报道, 本研究也只是初步从整体突变数量方面进行探讨, 仍有待后续深入研究。另外, 尽管 Lin 等^[11] 的研究证实 3' UTR 区突变与 NSCLC 的总体生存相关, 但影响总体生存的因素较多, 非翻译区突变与放射敏感性的关系仍需进一步证实。

本研究对 CNV 的分析发现, 拷贝数多以重复为主, 但大多同时伴有拷贝数的缺失, 且变异数目的多少与区域的大小并无绝对相关性, 进一步分析变异总数目、重复或缺失的数目与放射治疗敏感无相关性 ($P > 0.05$), 但变异总区域的大小, 尤其是重复区域的大小与肿瘤对放射治疗的敏感具有相关性 ($P < 0.05$), 且肿瘤变异区域越大, 越容易对放射治疗产生抵抗。根据肿瘤分子生物学特点, 癌基因多位于拷贝数重复的区域中, 抑癌基因可能更多位于缺失的区域中。拷贝数重复区域癌基因的激活, 使得 DNA 的修复能力增强, 使机体对治疗的耐受性增加; 反之, 拷贝数减少, DNA 修复能力下降, 更有利于对预后产生好的影响^[16]。而汪弋汀等^[17] 通过大数据分析后发现放疗抵抗与 CNV 缺失有关, 放疗敏感与 CNV 扩增具有一定相关性。这与本研究的结论差异可能与数据分析时样本的选择偏倚有关。汪弋汀等是从 TCGA 数据库中提取的标本, 最后纳入 38 例进行研究, 其中 36 例为术后患者, 23 例进行瘤床照射, 13 例行区域淋巴结照射, 而本研究全部进行的肺部可见病灶的照射。

理论上, TMB 表达水平高者可以通过 T 细胞介

导的抗肿瘤效应增强肿瘤对放射治疗的敏感性,但我们的结果与这一结论不一致,本研究发现敏感组和非敏感组之间 TMB 并无明显差别。这可能与两方面原因有关:1) TMB 表达水平受年龄影响较大,使结果产生偏差;2) 实际上只有能够产生激发免疫反应的免疫性抗原的基因突变的数量越多,即非同义突变越多,才能产生更多的新抗原,以被 T 细胞识别,激发更强抗肿瘤效应^[18]。所以尽管部分 TMB 表达水平很高,但能激发免疫性抗原的基因突变的数量较少,表现对放射治疗仍然是不敏感。

本研究采集外周血进行二代高通量测序检测 ctDNA 突变频率及图谱,筛选疗效评估及预后监测的重要指标。同时,也引入了一个 ETRR 的概念,用来间接评估肿瘤对放射治疗的敏感性,这种处理使研究结果更加准确可靠。但本研究也有如下缺陷:1) 血液采集的时间节点及 CT 评估肿瘤基线体积和残留体积的时间节点有待进一步精准和细化;2) 样本接受放射治疗的剂量有待更标准化;3) 纳入研究的样本仅 20 例,可能缺乏足够的统计学效力。下一步我们将筛查出 CNV 重复的区域,寻找重复区域的具体位点和基因;从 ctDNA 突变特征中寻找肿瘤驱动基因及高频突变基因,进一步分析与放疗敏感性相关的突变基因及其代谢通路。

作者声明: 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端: 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议: 经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权: 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Edwards BK, Noone AM, Mariotto AB, *et al.* Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975 - 2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer[J]. *Cancer*, 2014, 120(9):1290-1314.
- [2] 李涛,郎锦义. 放射肿瘤学的进展与未来[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019,32(1):1-6.
- [3] Ledergerber C, Dessimoz C. Base-calling for next-generation sequencing platforms[J]. *Brief Bioinform*, 2011, 12(5):489-497.
- [4] Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, *et al.* Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3):213-219.
- [5] Saunders CT, Wong WS, Swamy S, *et al.* Accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(14):1811-1817.
- [6] Boeva V, Zinovyev A, Bleakley K, *et al.* Control-free calling of copy number alterations in deep-sequencing data using GC-content normalization[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(2):268-269.
- [7] 高立伟,李宁宁,王继英,等. 局部晚期非小细胞肺癌同步放疗过程中肿瘤退缩的相关因素分析[J]. *中国医刊*, 2018, 53(2):224-227.
- [8] 韩俊庆,翟利民. 线性二次方程的演变及其临床生物学意义[J]. *齐鲁肿瘤杂志*, 1996,3(4):250-252.
- [9] Pich O, Muinos F, Lolkema MP, *et al.* The mutational footprints of cancer therapies[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2):1732-1740.
- [10] 李健强,邵国光,刘琳琳,等. p53 基因 BstI 位点多态性与非小细胞肺癌易感性及放射敏感性的相关研究[J]. *中华肺癌杂志*, 2006,9(2):173-176.
- [11] Lin J, Zandi R, Shao R, *et al.* A miR-SNP biomarker linked to an increased lung cancer survival by miRNA-mediated down-regulation of FZD4 expression and Wnt signaling[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):9029.
- [12] 曾益新. 肿瘤学[M]. 第4版. 北京:人民卫生出版社,2017:70-76.
- [13] Wolford R, de Benedetti A, Nuthalapaty S, *et al.* Up-regulation of TLK1 B by eIF4E overexpression predicts cancer recurrence in irradiated patients with breast cancer[J]. *Surgery*, 2006,140(2):161-169.
- [14] 孙献涛,练延帮,白杨,等. LncRNA CRNDE 靶向 miR-384 影响结直肠癌细胞放射敏感性的研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2019,39(12):893-898.
- [15] Bergert SM. Exon recognition in vertebrate splicing[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(6):2411-2414.
- [16] Vanhecke E, Valent A, Tang X, *et al.* 19q13-ERCC1 gene copy number increase in non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(5):549-557.
- [17] 汪弋汀. 基于 TCGA 数据和体外实验探索 NSCLC 放疗敏感性机制[D]. 上海:上海交通大学,2018.
- [18] 马杰,曾瑄,张波. 非小细胞肺癌免疫治疗新兴生物标志物:肿瘤突变负荷及相关研究进展[J]. *中华病理学杂志*, 2019, 48(12):987-992.