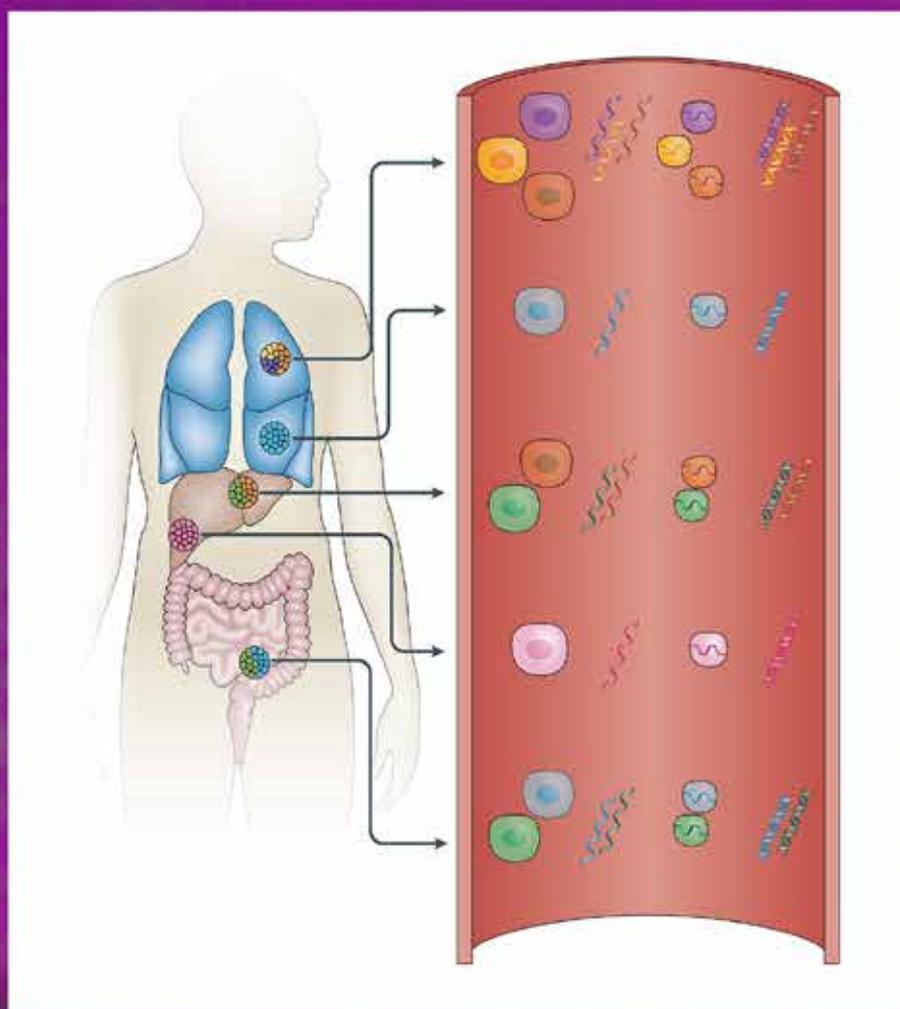


# 生命奥秘

LifeOmics

2017年 12月刊 总第101期

## 液态 活检



23ANDME公司沉浮录

白蚁的“肺丘”利用太阳能运转

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

# 目录 : CONTENTS

## 专 题 — 液态活检

前言 .....	01
一、基于血液的液态活检 .....	02
二、ctDNA和CTC的检测方法 .....	11
三、液态活检的临床应用 .....	13
四、前景和展望 .....	23

下一期（2018年1月刊）预告：炎性肠病

下一期《生命奥秘》将以炎性肠病（Inflammatory Bowel Disease, IBD）为专题。炎性肠病是一种典型的终身慢性疾病。美国IBD患者超过100万，我国IBD患者超过150万，且近10年我国IBD总病例数增长超过24倍。尽管如此，IBD的发病原因仍不明确，治疗手段也相对缺乏，且无法治愈。一些感染性肠道疾病可以用粪便移植治疗，并且疗效显著。那么粪便移植是否也对IBD有效？同时，近几年IBD在东亚地区的发病率暴涨，这又是为什么呢？请关注《生命奥秘》。

## 热点

23ANDME公司沉浮录 .....	27
--------------------	----

## 百态

白蚁的“肺丘”利用太阳能运转 .....	34
自由不羁的泳者——大口黑鲈鱼 .....	36

# 专题

## 液态活检

特约编辑：马辰凯, 男, 博士在读, 研究方向：肿瘤

### 前言

在肿瘤进展和治疗期间，肿瘤细胞的多个亚克隆群体的相互竞争和选择压力最终诱导了主要亚克隆的出现。这种肿瘤主要亚克隆的复制能力和传播能力最强，并且对治疗的敏感度最低。目前，实体肿瘤分子形态是通过手术或活检组织样本建立起来的。然而，因为基于组织的肿瘤特征受到取样偏倚的限制，所以对它的分析仅能提供肿瘤异质性的大致情况，而且无法重复获取。已有研究证实循环无细胞肿瘤DNA（circulating cell-free tumour DNA, ctDNA）的基因表达谱与其相应的肿瘤紧密匹配，这对分子病理学和临床肿瘤学都有重要意义。通常情况下，被称为“液态活检（liquid biopsy）”的循环核酸分析可用于监测患者对治疗的响应，以评估耐药性的出现以及量化最小的残留疾病。除了血液之外，其它几种体液，如尿液、唾液、胸腔积液和脑脊液可能都含有肿瘤来源的遗传信息。对循环肿瘤细胞（circulating tumour cell, CTC）、RNA、蛋白质和包含在囊泡内的脂质，例如外泌体（exosome）的深入分析可以进一步补充通过ctDNA获取的分子谱。本专题主要介绍如何利用不同形式的液态活检来指导患者的诊疗工作，从而最终将其纳入临床实践，并重点关注目前临床上最先进的方法——ctDNA液态活检技术。

# 一、基于血液的液态活检

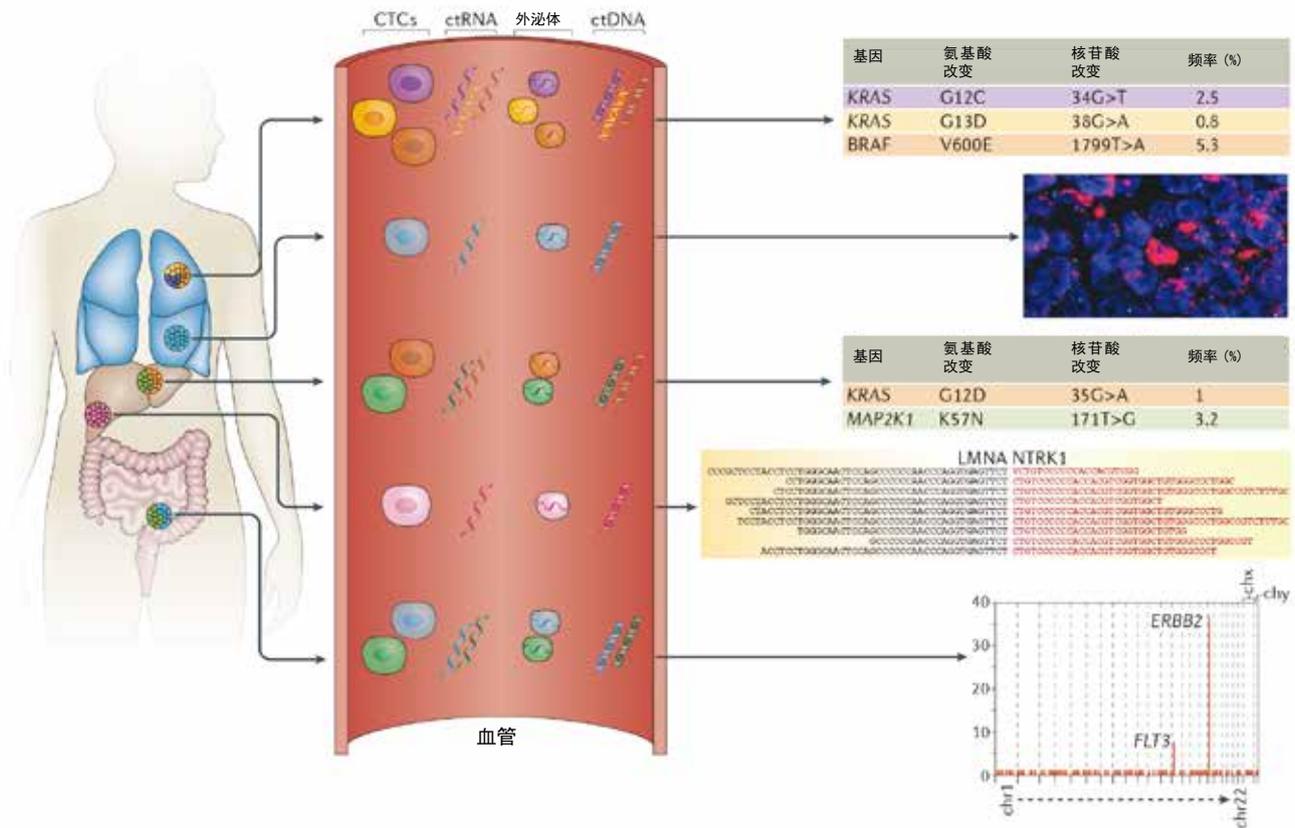


图 1 液态活检能反映肿瘤的异质性。研究人员可以利用血液中的肿瘤组分来进行液态活检，以捕获携带不同遗传物质的不同肿瘤之间的分子异质性。表格显示通过候选基因或血浆中 ctDNA 的下一代测序分析来检测癌基因的点突变 (*KRAS* 中的 G12D、G12C 和 G13D 突变; *BRAF* 的 V600E 突变和 *MAP2K1* (MEK1) 的 K57N 突变); 序列比对图显示 *LMNA-NTRK1* 基因融合; 右上荧光显微图显示采用荧光原位杂交分析技术在 CTC (从血液中分离获得) 中检测出基因拷贝数变异。 *FLT3* 和 *ERBB2* (*HER2*) 扩增图则显示通过下一代测序技术对血源性肿瘤 DNA 进行全外显子分析。

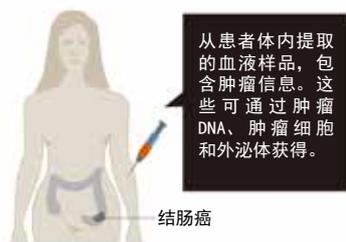
图片来源: Giulia Siravegna. *et al.* (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14 (9) : 531-548.

新生肿瘤中控制细胞存活、生长、增殖和分化的基因中分子改变的积累诱发了肿瘤。目前, 研究人员通常从原发肿瘤片段DNA和/

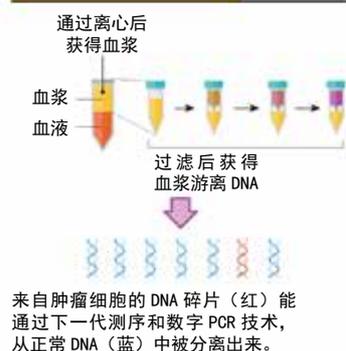
或RNA, 或单次转移的病灶中获得肿瘤的分分子谱。随后, 他们根据组织的分子表达谱来确定治疗策略。然而, 肿瘤的分分子表达谱会

## 不依赖手术刀的活检

目前有三种通过血液检测的、非侵袭的方法可以检测肿瘤。

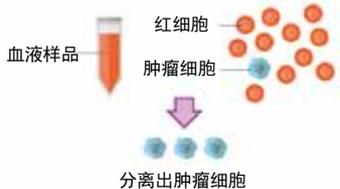


### 循环肿瘤DNA



### 循环肿瘤细胞

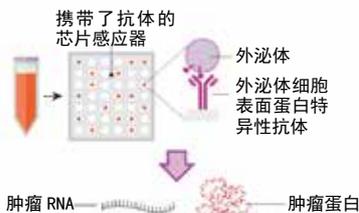
循环肿瘤细胞可以通过细胞分离系统而从血液中被分离出来。



将肿瘤细胞破碎后，通过全基因组测序技术分析其所含的肿瘤DNA。

### 外泌体

通过不同方法从血液中分离出肿瘤外泌体。



捕获外泌体后，我们可以对外泌体里的RNA和或蛋白进行深入的分析。

图2 不依赖手术刀的活检。  
图片来源：KR Chi. (2016) The tumour trail left in blood. *Nature*, 532(7598): 269-271.

动态变化。在多种内源性和外源性选择压力下，肿瘤的进化能力有以下几个含义：首先，单个肿瘤的遗传构成是高度异质性的；其次，在单个患者中，不同转移性病变的分子表达谱是有差异的；第三，施加在肿瘤细胞上的治疗应激，尤其是通过靶向药物对肿瘤细胞施加的治疗应激可以动态地改变肿瘤的基因组。值得指出的是，人体血液样品含有的各种物质，包括无细胞DNA (cfDNA) 和RNA (cfRNA)、蛋白质、细胞和囊泡 (如外泌体) 都可以来自不同组织，包括肿瘤。实际上，癌细胞的快速更替导致肿瘤衍生的核酸和囊泡被不断释放到循环中，并且活肿瘤细胞也可以从肿瘤中分离而进入血流。因此，检测循环无细胞肿瘤DNA (ctDNA) 和/或肿瘤衍生的RNA (主要是miRNA) 和循环肿瘤细胞 (CTC) 的能力，可以让临床医生反复、非侵入性地监测人类肿瘤的动态演变 (图1)。通过抽血来探查实体肿瘤的分子表达情况可能会对研究和患者护理产生重大影响，所以这一做法目前已经引起了肿瘤学领域很多研究人员的极大兴趣。术语“液态活检”，通常被用于描述这种方法。

通过这种方法，肿瘤的遗传特征能绕过手术通过分析检测血液中的肿瘤DNA的成分而获知。现在，赖于基因组检测技术的快速发展，研究人员得以把这些最新的发明应用到临床当中。液态活检的优点在于快速、方便和基本无痛，并且它允许临床医师紧密监测肿瘤对治疗的反应、和预测复发情况。在临床实践中，研究人员可以通过液态活检在患者出现症状前发现肿瘤。

许多研究已经表明液态活检方法能够确定肿瘤患者的基因组图谱、监测治疗响应和定量最小残留疾病，并评估抗药性出现的潜力。除了血液外，研究人员还指出其它几种体液，如尿液、唾液、胸腔积液和脑脊髓液 (CSF)，还有粪便都含有肿瘤衍生的遗传物质，鉴于此，我们利用液态活检进行诊断的能力将进一步扩大。然而，液态活检标本的分析工作极具挑战性，这是因为与细菌系cfDNA相比，ctDNA是片段化的和极为低丰度表达的，并且我们只能从血液样品中分离有限数量的CTC。因此，对通过液体活检获取的肿瘤材料的分析需要配备高度敏感的测定法。

基于血液的液态活检是指我们可从血液中分离出一系列的肿瘤成分。这些不同组分的分子分析可以提供临

床相关的信息（表1）。目前液态活检主要包括以下三种非侵入性的技术：循环肿瘤DNA（circulating tumour DNA）、在血液中的循环肿瘤细胞，以及肿瘤分泌出来的小囊泡——外泌体（exosome）（图2）。

另外一个值得注意的研究是，人们发现血小板也能通过吸附作用而携带具有肿瘤RNA的囊泡。如果血小板能携带肿瘤的转录组信息，那么将大大提升其诊断疾病的能力，因为

我们可以很方便地从每天的血液检测中获取血小板。欧洲thromboDx公司开发了可以检测肿瘤患者血小板中RNA的技术。他们发现，患有早期肿瘤的39名患者的血小板RNA表达谱显著不同于肿瘤中的表达情况。该研究还在其他患有10种不同肿瘤的1000例患者中进行了检测，这提示我们不能忽视血小板的存在，它可能和其它循环标志物一起构建了完善的液态活检技术。

表1 ctDNA、CTC和外泌体在应用方面的比较

	ctDNA/RNA	CTC	外泌体
反映时间和空间上的肿瘤异质性	是	否	否
评估分析前和后的变异性	是	是	是
检测体细胞突变、插入缺失、拷贝数变化和基因融合	是	是	是
评估甲基化表达模式	是	是	是
分析mRNA/miRNA/lncRNA/RNA可变剪切体	是	是	是
分析RNA表达谱	否	是	是
离体细胞的形态和功能研究	否	是	否
检测信号通路的共定位	否	是	否
分析蛋白组学	否	是	是

“是”表明该方法是可行的，和/或已发表相关研究。

“否”表明该应用不可行，和/或没有发表相关研究。

表格来源：Giulia Siravegna. *et al.* (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14 (9) : 531-548.

CTC是侵及血管壁的肿瘤细胞，或从原发肿瘤和/或转移性病变上被动脱落后进入血液的肿瘤细胞（图3）。1869年，澳大利亚医师Thomas Ashworth首次报道了CTC的存在，但直到20世纪90年代后期，人们才了解到它们的临床疗效。CTC可以作为单细胞或细胞簇从肿瘤患者的血液中被分离出来，而可检测的CTC数量与治疗结果和总生存率相关。血液中CTC的丰度较低（在转移癌患者中，丰度为1个细胞/ $1 \times 10^9$ 血细胞），而且肿瘤类型不同，丰度不同。

目前，研究人员采用了多种技术来分离CTC，并进行了广泛的研究。我们可以基于其大小和其它生物物理性质，或通过使用通常在这些细胞表面表达的标记（例如上皮细胞粘附分子（EpCAM））的阳性富集来分离CTC。尽管研究人员已经通过将成像技术与功能测定技术联合使用来鉴定CTC，但他们仍然缺乏区分CTC与正常上皮细胞的标记。由于CTC通常大于正常的血细胞，所以我们可以采用基于尺寸的选择方法来分离CTC。

有趣的是，有几个科研小组指出，一旦离体分离，CTC便可以鉴定，并可被用于体外和体内的功能测定研究，从而为我们提供更深入的肿瘤生物学信息。尤其需要指出的是，Yu等人已经从6名转移性管状乳腺癌（metastatic luminal breast cancer）患者中分离出了CTC，并在体外培养了6个月以上。然而，建立来自其它肿瘤类型的CTC细胞系仍是一件具有挑战性的事。例如，通过从结直肠癌（colorectal cancer）患者身上分离出来的CTC来创建CTC永久性细胞系的成功率就非常低——迄今仅有一个成功的案例。相反，在体外培养从免疫功能低下的小鼠体内分离出来的CTC的成功率就非常高。目前研究人员已经

从转移性管状乳腺癌患者身上获取了CTC，并用其构建出异种移植模型（CTC-derived xenograft, CDX）。此外，Hodgkinson等人证实，化疗敏感性或化疗性小细胞肺癌（small-cell lung cancer, SCLC）患者的CTC在免疫功能低下的小鼠中能形成肿瘤，并且这些CTC衍生的CDX模型对化学疗法的响应反映了供体患者的情况。更重要的是，全基因组测序（whole-genome sequencing, WGS）分析显示，分离的CTC和相应的CDX具有类似的基因组图谱。使用这种方法，在耐药性疾病复发前和后，从患者身上收集的血液样本可能可以被用于构建CDX模型，并对其进行鉴定和比较，从而寻找新的药物靶标；同样，相应的靶向治疗的常规体内测试也是可行的，它们都可以促进个性化药物策略的研发。除了CDX模型，从前列腺癌（prostate cancer）患者身上分离的CTC已经成功地被培养成3D类器官，这些类器官可能可以模拟不同前列腺癌亚型的分子复杂性。

值得注意的是，Khoo等人研发了一种有效的方法，即在与微流体平台相结合的微加工锥形微孔中培养患者来源的CTC，然后用其评估治疗的敏感性。而无需进行CTC预富集的药物筛选技术就能够提供快速的反馈结果（两周后），因此研究人员能在检测耐药性或耐受性的过程中给予及时的干预。在使用来自55例早期或转移性乳腺癌患者的73例血液样品，以及24个用于药物筛选的样品对CTC培养程序进行临床验证后，研究人员发现CTC簇形成的潜力与不断增加的药物浓度成反比。据此，他们提出，在治疗过程中，预防CTC簇生成所需的药物浓度的增加可能可以预测耐药性或耐受性的发生。

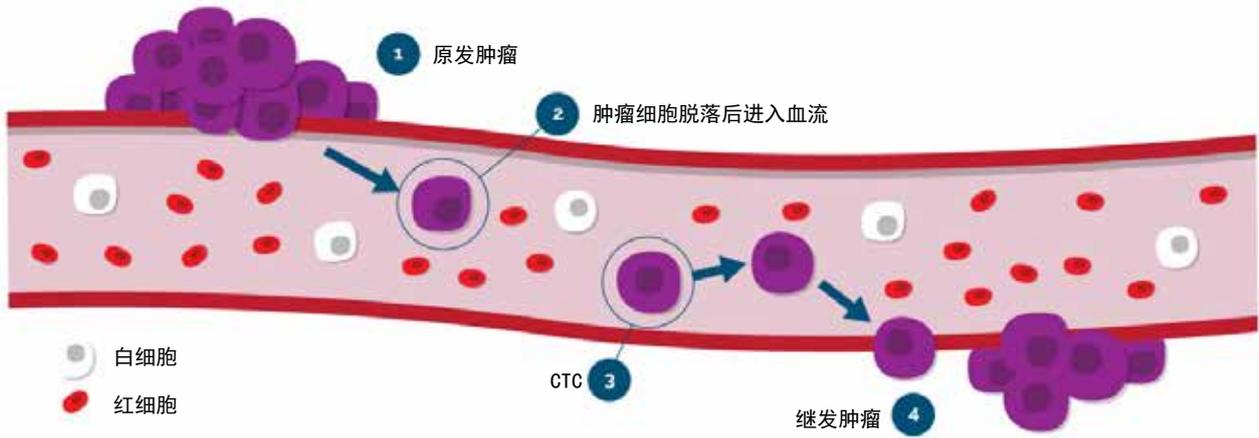


图3 CTC的产生和肿瘤转移机制。原发肿瘤分泌或从其脱落的肿瘤细胞进入血管。这些进入血管的肿瘤细胞就是CTC，它们可在肿瘤患者的血样中被检测到。CTC通过血液定植到远处，从而发生肿瘤转移。  
图片来源：<http://vortexbiosciences.com/technology/>



# 资讯 · 频道

[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)

## 2 外泌体

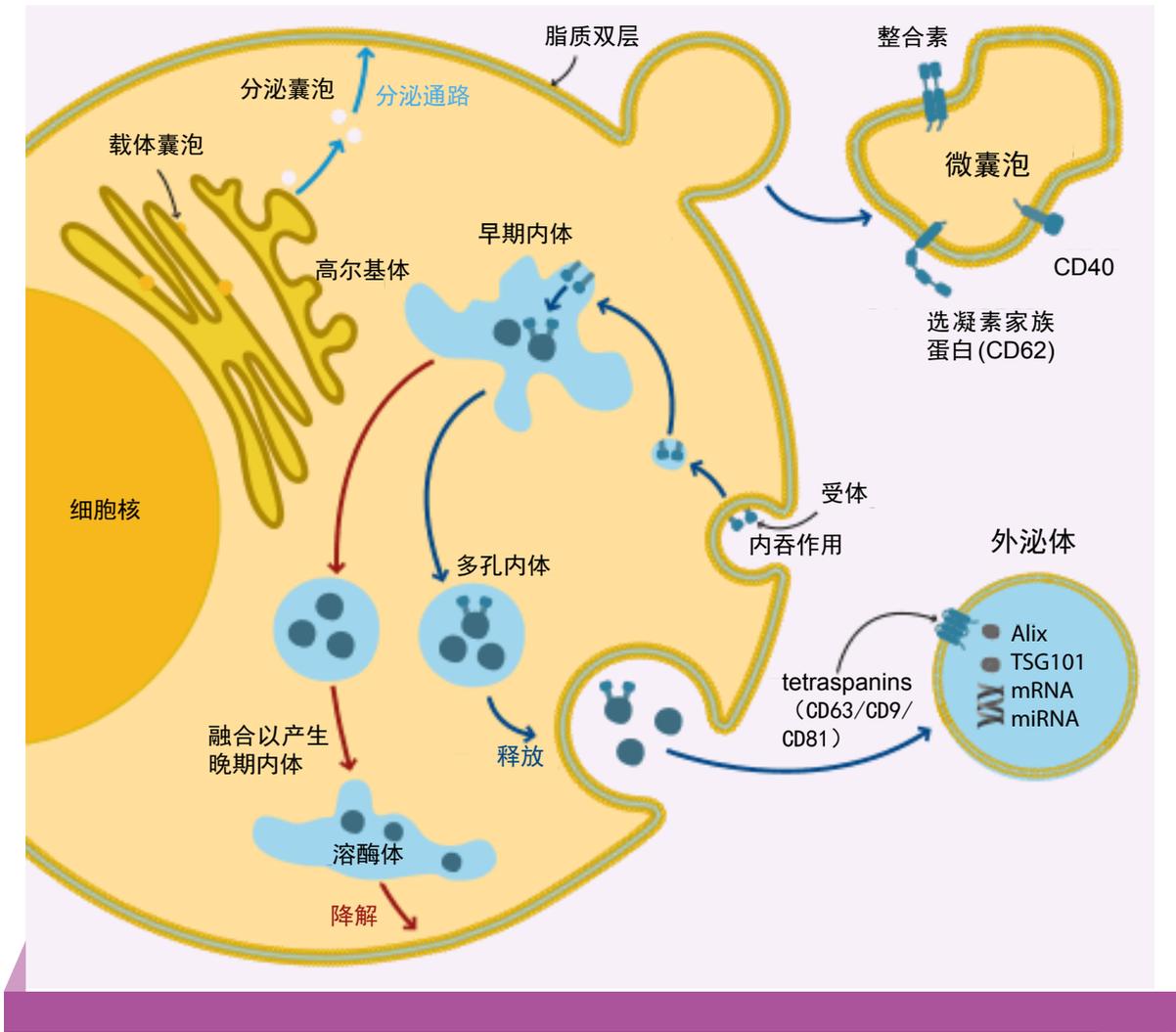


图4 外泌体的形成。胞外囊泡可以通过两种方式形成：一种通过细胞膜出芽形成，为微小囊泡(microvesicles)；另一种因为细胞膜凹陷，形成内质网的，为外泌体(exosome)。

图片来源：<http://www.abcam.com/primary-antibodies/extracellular-vesicles-an-introduction>

细胞外囊泡（**extracellular vesicles, EV**）主要有两类，第一类包括通过发芽从细胞膜直接脱落的微囊泡（**microvesicle**）；第二类是当多囊泡体（**multivesicular body, MVB**）与质膜融合时，因胞吐作用而渗出的外泌体（图4）。1983年，Pan和Johnstone首次发现了外泌体，并指出它是大小为40-100 nm的EV。外泌体可以被几种细胞释放到细胞外间隙和各种体液中。目前已知血细胞、内皮细胞、免疫细胞、血小板和平滑肌细胞都能释放外泌体。我们可以通过常规的密度梯度离心法（**density-gradient centrifugation**）从体液中提取外泌体。此外，我们可以通过超速离心（**ultracentrifugation**）来分离外泌体，然后通过透射显微镜来确认外泌体，或通过特异性蛋白标记，如tetraspanin蛋白CD63、CD9和CD81的表达来鉴定外泌体。

外泌体在细胞间交换分子信息方面具有重要作用：外泌体含有蛋白质以及一系列核酸，包括DNA、mRNA和miRNA，这表明它们可以调节受体细胞的活性。鉴于其内含物的特性，外泌体和其它EV也许能够被开发成肿瘤生物标志物。此外，外泌体miRNA似乎参与了疾病的进展过程，例如，它们可以刺激血管生成，并促进肿瘤转移。从生物液体中提取外泌体可以分离并分析外泌体中的mRNA，从而检测突变、剪接变体、基因融合物，以及基因表达谱。与基本上存在于肿瘤细胞中，同时仅携带两个拷贝的ctDNA片段相比，每个细胞中源自高表达基因的mRNA可以有数千个拷贝，并且在浓度较高时还会被释放进入循环（在EV内或成为cfRNA）。因此，仔细分析外泌体mRNA，特别是对可检测的ctDNA数量有限的患者进行外泌体mRNA分析意义重大。

# 3 ctRNA

1996年，研究人员首次在黑色素瘤（melanoma）患者的血液中检测出与循环肿瘤相关的mRNA（图5）。此后不久，研究人员在实体肿瘤患者的血液循环中鉴定出了其它形式的RNA。这些RNA主要是miRNA和长非编码RNA（lncRNA）。血液中存在肿瘤衍生的mRNA具有临床意义，其中一个原因是它们可以鉴定肿瘤特异性基因表达谱。DNA中的体细胞突变仅代表与肿瘤相关分子改变的一个子集，而且不能完全显示由表观遗传改变、miRNA的作用或其它机制引起的基因表达谱的变化。如果后者能实现，那么基于血液的肿瘤RNA分析就可以提供非常有价值的信息了。

miRNA是血液中最丰富的cfRNA分子，外泌体、凋亡小体、蛋白质-miRNA复合物和肿瘤血小板（tumour-educated platelet, TEP）都可以携带这些miRNA。在肿瘤患者和没有该疾病的个体之间，外泌体miRNA的数量和组成不同，这提示miRNA可能是非常有潜力的非侵入性诊断生物标志物。目前对血液中的mRNA和miRNA开展的大部分分析工作仍然在进行中，并且我们需要通过标准化的方案对临床研究进行相关验证，以证实临床中cfRNA的价值。NETest提供了临床应用的一个范例，即可以通过使用从外周血样品分离出的mRNA的51个基因的靶向表达谱来揭示关于神经内分泌肿瘤的活性信息。

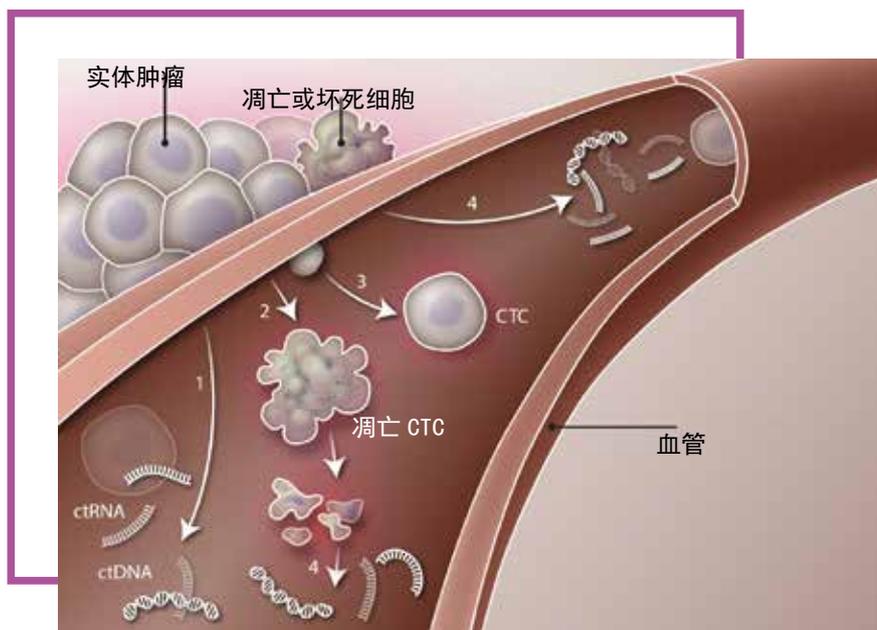


图5 ctRNA 及其形成。ctRNA 可以通过多种方式进入血液，这些方式包括肿瘤细胞直接分泌 ctRNA 入血、通过 CTC 获取 ctRNA，或者通过凋亡的肿瘤细胞裂解后得到 ctRNA。  
图片来源：<https://medicalxpress.com/news/2016-06-liquid-biopsy-techniques-edge-cancer.html>

# 4 ctDNA

早在1948年，Mandel和Metais就在肿瘤患者的血液中检测到非细胞结合的核酸，首次描述了cfDNA的存在。尽管炎症、自身免疫、吸烟、怀孕、运动和心脏功能障碍已被证明有助于产生cfDNA，但我们对于这些cfDNA的起源和释放机制的了解仍然十分有限。

1977年，Leon等人报告指出，肿瘤患者cfDNA的数量高于健康个体。这一开创性的发现促进了进一步的研究：Stroun等人发现肿瘤患者的cfDNA中存在肿瘤相关的基因改变；其它研究也证实了可以在ctDNA中检测到各种类型的肿瘤基因组改变（即癌基因和/或肿瘤抑制基因、微卫星不稳定性和表观遗传学变化）。目前ctDNA被释放进入血液的确切机制尚待研究。除了凋亡之外，DNA片段还可以通过其它机制，比如坏死，被癌细胞释放出来。此外，通过吞噬坏死的肿瘤细胞，巨噬细胞似

乎也在肿瘤DNA片段被释放进入循环的过程中发挥了作用。研究人员对孕妇身上分离出来的血浆cfDNA进行WGS，结果发现了一个与核酸酶被切割的核小体相似的DNA断裂片段（142bp），这表明cfDNA是由细胞DNA凋亡降解而产生的。在其它研究中，研究人员比较了健康个体和肿瘤患者的cfDNA的大小分布，结果同样显示单个或多个核蛋白复合物大小的片段富集，这进一步提示细胞凋亡是总cfDNA和ctDNA的主要来源（图6）。

对ctDNA分析来说，血浆样品优于血清样品：血清中cfDNA的总量为血浆中的2-24倍，这可能与凝血过程中裂解的免疫细胞释放的DNA被大量污染有关。此外，由于野生型DNA的背景水平较低，所以血浆是ctDNA的更优来源。

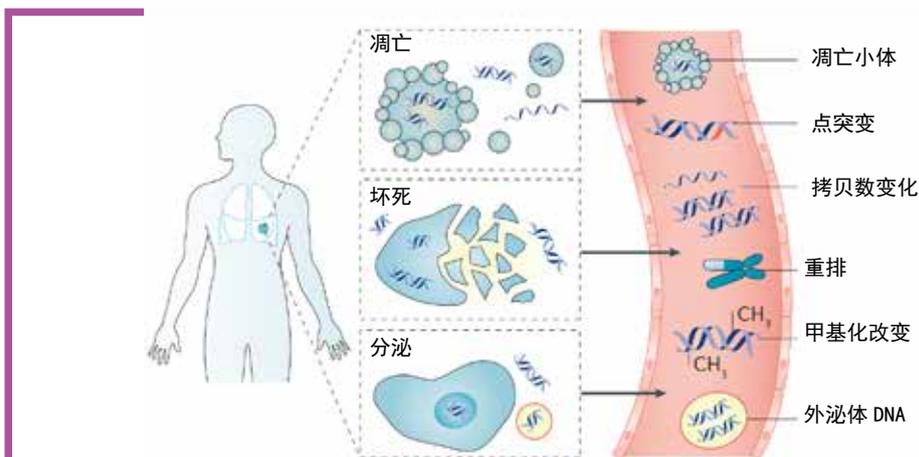


图 6 ctDNA 的来源。循环中的 ctDNA 主要可以通过三种方法进入血液，这三种方法分别是凋亡、坏死和分泌。在血液中，ctDNA 可以单独存在，也可以和外泌体共存。各种遗传学和表观遗传学上的变化都可以在 ctDNA 中检测到。

图片来源: Jonathan C. M. Wan. *et al.* (2017) Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews cancer*, 17 (4) :223-238.

## 三、ctDNA和CTC的检测方法

循环cfDNA主要由源自正常细胞的种系DNA组成。由于肿瘤患者中存在相对较小，且高度可变的ctDNA，所以传统方法在对DNA分析（如Sanger测序）中的灵敏度并不足以检测肿瘤患者血浆ctDNA中的体细胞突变。为了克服这些限制，研究人员开发了具有高分析灵敏度和特异性的数字PCR（digital PCR, dPCR）技术，这使我们能够在丰富的野生型等位基因背景下，高通量、有针对性地扩增感兴趣的突变基因，而且检测极限低于0.0001%——这是检测ctDNA罕见畸变的必要条件。

dPCR技术，特别是液滴的数字PCR技术虽然操作简单、价格便宜，还能让液态活检快速地进入临床，但缺点是需要临床医师明确自己是在寻找哪些异常突变。

非靶向的全基因组分析能够在不确定是否存在突变的情况下，鉴定肿瘤的特异性改变。因此，这种方法可以被用于从头发现引起治疗抵抗的基因突变，并鉴定肿瘤患者的新的可用药靶点。借助NGS，我们可以在单个反应中产生数百万个ctDNA序列，随后将它们与参照基因组或与从同一患者获得的种系DNA（即来自非恶性组织，通常为外周血单核细胞）进行比对，从而鉴定相对于参照序列的核苷酸突变。现在研究人员已经设计了几种基于NGS的方法，这些方法不仅可以检测点突变和插入突变、缺失突变或基因重排，还能检测拷贝数变异和基因融合。

在不久的将来，dPCR技术和NGS技术可能可以在液体活检分析过程中互补。前者可以对单个突变进行动态分析，但需要研究人员提前了解突变体等位基因的情况；后者可以发现

新的突变，但具有较高的成本，并且现在还不能对患者进行纵向监测。

对ctDNA的鉴别分析可以覆盖从单个突变到全基因组的分析。自21世纪中期以来，研究人员便采用等位基因特异性PCR来鉴别血清和血浆中的热点突变（hot-spot mutation）。基于微流控平台的dPCR技术也能提供很好的定量分析和极高的敏感度。多重PCR受限于对突变位点不同的结合程度，需要对于位点极为敏感的引物或探针。如果需要对大量位点进行检测，则需要使用PCR扩增技术或杂交捕获技术来测定靶向序列。此时测序范围可以从单个目标外显子（千碱基对）扩大到整个外显子组（大约50 Mb）。

近几年，业界出现了一系列新颖的CTC检测技术。原则上，这些方法大致可分为基于核酸的技术和基于细胞计数的技术。在PCR发展起来后，整个20世纪90年代，人们主要都使用基于核酸的技术来检测CTC。不得不说，这种技术确实是非常敏感的技术，因为它依赖于肿瘤细胞差异表达的特异性DNA或RNA序列的分析。然而，近年来，让细胞保持完整的细胞计数测定却有了独特的优势：细胞形态变化可视化——可以显示细胞，并可以通过诸如荧光原位杂交（FISH）或DNA / RNA提取技术进一步分析实际上或理论上可能的情况。与使用基于核酸方法的有限能力相反，细胞计数测定技术具有无限的可能性。

细胞计数方法使用免疫染色分析。如果要在临床中发挥作用，并且用于制定辅助患者治疗的决策，就需要其具备高灵敏性、高特异性和高重复性。大多数方法采用初始浓缩步骤来优化罕见细胞的检测技术，这可以通过免疫

磁性分离、离心或过滤实现。然后通过基于细胞的技术，研究人员可以使用荧光显微镜或免疫组织化学方法寻找细胞。目前临床测试中使用最广泛的细胞计数CTC技术是CellSearch™平台（Veridex LLC, Huntingdon Valley, PA, USA）。它是唯一获得FDA批准可在特定癌症群体中全面检测CTC的一种技术。该系统

的主要优点是半自动化，并且在验证方面具有重复性、可靠性、高灵敏性和准确性。这几点是任何生物标志物检测技术都应该具备的至关重要的性能。有了这些性能，这些技术才能确保实验结果在多个中心的临床试验上有效。CellSearch™平台采用基于免疫磁珠的分离技术来富集CTC。



# 百态·频道

[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)

## 三、液态活检的临床应用

液态活检测定的潜力是无限的，而其广泛的临床应用才刚开始呈现。液体活组织检查可用于诊断疾病，以及在疾病过程中识别和追踪肿瘤的特异性改变，进而指导治疗。然而，只有制定了标准化的程序，并进行了大量的验证研究，该技术才能真正适用于临床。目前而言，较为成熟、已经进入临床决策考量的只有ctDNA，其次是CTC。外泌体等目前仍然处于实验研发阶段，若要进入临床，则还需要开展更多的研究。

在肿瘤学领域，液态活检作为新型的检测手段，将可以在以下几个方面发挥作用。(1) 肿瘤诊断：肿瘤的早期诊断能让治疗时间提前，而且如果诊断时，肿瘤处于进展的早期阶段，那么便可实施根治性手术。对于系统性症状的患者而言，敏感性和特异性的肿瘤检测手段可能可以加速诊断和治疗的速度。而从人群角度来说，疾病标志物的筛查工作将可以在症状出现前对患者进行相关干预。(2) 预后、残余病灶和复发风险：对疾病进展进行风险评估在决定治疗程度或是否有必要增加治疗强度方面具有重要作用。在初始治疗之后，鉴定有高复发风险的残存病灶患者，将有助于进行疾病分层和辅助治疗。合理有效的疾病分层治疗将

有助于防止对低危患者进行过度治疗。(3) 治疗方案的选择：我们需要更好的分子表达谱检测工具来筛选大量的分子靶向药物和免疫治疗药物，以便对患者进行分层次治疗。目前，组织活检是获取肿瘤DNA的标准方法，但是，并非任何情况都能获得。何况，肿瘤的异质性的也会混淆其解读，最终导致假阴性结果和只能选择不太理想的治疗方案。(4) 监测肿瘤负荷：目前主要由成像技术或者分子检测技术来开展的肿瘤治疗监测方案可以判断治疗响应和进展情况，从而让医生和患者选择合适的治疗方案。然而现有的方法准确性不高、操作繁琐，并且有辐射问题。理想的监测方法应当具备可重复性、对患者风险较小，并且能准确反映肿瘤的进展情况。

传统的活检方法往往很难获得充足的组织，以进行基因组学检测，并且取材也会受到肿瘤异质性的偏倚限制，因此目前的肿瘤分子检测缺少特异性。现在出现的液态活检能对每一期的患者受益。液态活检的好处主要体现在两个维度上：定量分析肿瘤负荷（包括在特定时间点上的肿瘤分期、预后）和基因组学分析（包括突变情况、治疗选择和监测肿瘤进化等）。

# 1 CTC作为生物标志物及其临床应用

目前，虽然有证据表明肿瘤患者血液中的肿瘤细胞的丰度具有预后价值，但是关于CTC分析的临床价值仍有争议。一开始，人们以为治疗后的CTC数量可以预测治疗反应以及治疗结果。然而，我们在对待这些研究成果时必须非常谨慎，因为CTC数量在不同肿瘤类型之间是高度可变的，并且它与所使用的CTC检测方法的种类有关。2014年，研究人员试图通过捕获转移性乳腺癌患者血液中的肿瘤细胞来发现更为恶性的肿瘤患者。但是，尽管给予了额外的化疗，这些患者仍然没有取得最佳的生存获益。此外，检测到的CTC数量和患者生存率之间的相关性远没有被完全研究清楚。因此，CTC不能完全成为预后的一个判断指标。美国临床肿瘤学会（American Society of Clinical Oncology, ASCO）也不推荐将CTC的数量作为治疗的标准。目前有超过40种不同的循环肿瘤细胞的分离方法，但在转移性乳腺癌、结肠直肠癌或前列腺癌患者中，唯一通过FDA批准的CTC分离和计数平台是CellSearch。这是一种半自动化系统，它可以根据上皮标志物EpCAM的表达和白细胞特异性分子CD45的表达呈阴性来进行CTC选择。CellSearch显示CTC存在于大多数类型的肿瘤（包括前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌或肺癌）患者的外周血中，但不存在于没有肿瘤的人群血液中。在一项独立研究中，研究人员发现CTC的数量是转移性乳腺癌患者的无进展生存期（progression-free survival, PFS）和总生存期的良好预测因子。

随着更全面的分子特征和功能分析的不

断发展，人们将能更好地了解CTC的生物学和临床意义。更为重要的是，我们还可以从CTC中提取RNA，并测定其序列；另外，在前列腺癌患者中，RNA原位杂交技术让我们能够鉴定特异性基因融合体（如*TMPRSS2-ERG*融合体）。在另一项研究中，基于微流体的单细胞mRNA表达谱分析能够对来自乳腺癌患者CTC中87个肿瘤相关基因和参考基因的转录谱进行分析，显示与转移相关的基因表达升高，以及加深对肿瘤异质性的了解。

另外一种较好的方法是，通过对CTC的DNA或者RNA进行测序，以提供更多的患者肿瘤信息。随着分离技术水平的提高，我们应该可以对从血液中获得肿瘤细胞的数量进行更深入的研究，例如进行体外培养、移植到小鼠体内等。

此外，我们还可以将CTC当作肿瘤活检组织的替代品，来研究药物靶标。在这方面，程序性细胞死亡配体1（programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1）的肿瘤内表达已被认为是阻止免疫系统破坏癌细胞的关键因素；因此，PD-L1表达的肿瘤细胞可能是这种免疫治疗方法成功的基础。Mazet等人提供的证据表明PD-L1经常在激素受体阳性的HER2阴性乳腺癌患者的血液CTC中表达。在16例（68.8%）可在血液中检测到肿瘤细胞的患者中，有11例存在PD-L1表达的CTC。这种基于CTC的PD-L1测定方法可能可以用于未来临床试验，以用于患者分层，并监测免疫检查点抑制剂的反应。

## 2 ctDNA在肿瘤诊断中的应用

我们可以使用cfDNA的定量分析来评估肿瘤负荷，这具有诊断意义。例如，与健康个体或患有良性疾病的患者相比，肿瘤患者血浆中存在的cfDNA的量明显更高，并且似乎随着肿瘤进展而增加（也可能是随着肿瘤体积增大而增加）。此外，cfDNA监测还可以用于确认患者在治愈手术后是否还有疾病。在诊断肿瘤时，虽然循环系统中的cfDNA数量能提示的信息非常有限，但是，如果同时鉴定体细胞突变（主要关注的是ctDNA），那么我们就能够获得非常有价值的诊断信息。体细胞突变具有肿瘤特异性，因此，与标准蛋白生物标志物（如癌胚抗原CEA）相比，其对ctDNA中突变情况的评估诊断准确率更高。许多研究已经证明液态活检测定在肿瘤早期诊断中具有较大潜力。例如，爱泼斯坦-巴尔病毒（Epstein-Barr virus, EBV）的ctDNA分析已被用于检测早期鼻咽癌（nasopharyngeal carcinoma）。Chan等人筛选了1318名无症状的志愿者，并在69名志愿者中检测到EBV DNA。而且进一步的调查则在3名EBV阳性患者中发现了鼻咽癌，这证实了基于ctDNA的筛查是可行的。虽然该检测非常便宜，每个测试仅需25美元，但前提是临床医师需要明确检测的是哪种突变。

在另外一项独立研究中，1098名健康志愿者中有13人被检测出KRAS突变。25个月内，这13人中有6人患上了膀胱癌或呼吸系统肿瘤。目前，以液态活检为基础的肿瘤早期检测方法如何影响患者的预后，还有待进一步研究。值得一提的是，鉴于许多癌前病变已经显

示出携带与恶性肿瘤共有的常见突变，因此高度敏感的ctDNA分析可能导致高比例的假阳性，从而导致过度诊断和过度治疗。

有几项研究结果均表明，肿瘤中的候选基因与乳腺癌、结肠直肠癌或非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）患者血浆DNA样本的突变之间存在很高的一致性。在一项胰腺导管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma）研究中，近30%的患者被确认发生了体细胞突变和基因扩增，血浆cfDNA中KRAS突变的等位基因频率为0 ~ 87.7%。在加拿大一项仍在开展的研究中，研究人员正在评估死亡前和死后血浆ctDNA中的BRAF突变，以及该名黑色素瘤患者的肿瘤DNA样品中的BRAF突变，以了解ctDNA和总肿瘤负荷之间的定量关系。除了非侵入性地评估肿瘤负荷的潜力之外，ctDNA和肿瘤组织样本中存在的突变之间的相关性在诊断特异性分子肿瘤亚型中也越发具有重要意义。

为了寻找血液中DNA片段的来源，科学家们开始考虑DNA的长度问题。正常DNA大约为100-200碱基对，并缠绕在组蛋白上。有多种肿瘤的DNA片段比正常DNA要短，并且，高浓度的DNA短片段可提示肿瘤转移，然而在此之前，医师是很难判断肿瘤是否会发生转移，而且发现肿瘤的时候，往往已是晚期。2015年，在对20位乳腺癌患者开展的一项血液检测中，相比肿瘤临床常规诊断，研究人员发现ctDNA技术可以提前3年就检测出染色体重排等异常变化。

## 2.1 ctDNA在肿瘤分期中的作用

血液中ctDNA的浓度与肿瘤的大小和分期都有关。在一项囊括640名患有不同类型的肿瘤和肿瘤分期的研究中，研究人员发现在IV期患者的中位ctDNA浓度要比I期的患者高出100倍。对每位患者的肿瘤突变情况进行定量分析后显示，I期患者每5ml血中要少10个突变拷贝。而处于进展期的前列腺癌、卵巢癌和结直肠癌肿瘤患者中，中位浓度为100-1000个突变拷贝/每5ml血。即使是患有同种肿瘤，并且处于同一肿瘤分期，患者间的ctDNA水平也会具有很大的差别。这种差别可以部分归结为转移潜力以及疾病负荷的不同。

## 2.2 ctDNA在分析肿瘤异质性方面的作用

近年来，研究人员确认了不同肿瘤间的异质性差异。多区域测序研究发现同一位患者不

同位置的肿瘤，以及原发和转移的肿瘤之间都有着明显不同的突变谱。虽然人们已意识到异质性很可能具有各种复杂的效应，但是对病人进行多重肿瘤活检，以更好地理解异质性的机制既不可行，也不可取。单次活检不仅不能完整地反映患者肿瘤的基因表达谱，还会给个性化治疗研究中的药物筛选和药物疗效鉴定带来偏倚。最近一项采用EGFR抑制剂治疗肺癌的研究显示，EGFR<sup>T790M</sup>位点片段与肿瘤的缩小程度相关，这提示目前基于单个突变存在或缺失的疗法筛选模式并不是最好的选择。

鉴于液态活检中的样品ctDNA是由多个肿瘤区域释放而来的，因此它们可能会反映肿瘤异质性以及不同空间位置上的病灶。尽管肿瘤的异质性导致不同区域的肿瘤活检得出的突变谱各不相同，但是ctDNA能检测到相应组织中无法检测到的突变。

# 3 ctDNA中的甲基化谱

## ——预测化疗反应

多种肿瘤中都会出现与肿瘤抑制基因相关的特异性CpG位点的启动子甲基化，鉴于此，甲基化ctDNA是比较有潜力的生物标志物。有几项研究对肺癌、胃肠道癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌和头颈癌等肿瘤组织，及其对应血液样本中的ctDNA的异常甲基化情况进行了比较分析，结果发现在大多数情况下两者具有良好的相关性。

研究人员在多形性胶质母细胞瘤（glioblastoma multiforme, GBM）患者的ctDNA中首次发现了MGMT基因的甲基化（MGMT基因编码6-O-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶，该酶参与DNA烷基化鸟嘌呤修复）。Balaña等人指出组织与其对应的血清中的MGMT启动子甲基化高度相似，而且MGMT启动子甲基化与临床对治疗反应之间存在潜在相关性。需要指出的是，研究人员证明血

清MGMT启动子甲基化程度的增加能预示患者接受细胞毒性烷化剂治疗后，能有更好、更快的响应。另外，目前启动子甲基化诱导的MGMT沉默已被应用于最有可能对烷基化剂——达卡巴嗪（dacarbazine）或替莫唑胺（temozolomide）作出响应的GBM或转移性结肠直肠癌患者。研究人员采用名为“methyl-BEAMing”的技术分别检测血浆ctDNA和肿瘤组织样品中的MGMT启动子甲基化，随后对该技术进行了预后和预测评估，结果显示该方法比其它技术，例如甲基化特异性PCR和亚硫酸氢盐焦磷酸测序更具特异性。在转移性结肠直肠癌患者中，methyl-BEAMing定量检测技术和亚硫酸氢盐焦磷酸测序技术均优于甲基化特异性PCR，它们都可以更好地预测治疗反应和PFS。

## 4 ctDNA可作为MRD监测

### 和早期复发诊断的标志物

原则上，液态活检方法可能非常适合于测量微小残留病（minimal residual disease, MRD），因为它非常灵敏，可以检测出残留的肿瘤成分。同时概念验证研究（proof-of-concept study）得出的数据显示，ctDNA水平可用于检测手术或其它治愈性疗法后续的MRD。Beaver等人在93%的罹患局部乳腺癌，并且肿瘤负荷较低的患者术前血浆样品DNA中，检测出PIK3CA突变。外科手术后，研究人员收集了其中10名患者的血样（术后14天内收集5名患者的血样，这些都是遵循研究设计方案的受试者，然后术后15天到72天之间收集其他5名患者的血样），结果在其中5名患者的血样中检测出ctDNA，这表明单凭手术并不能完全治愈疾病，而该检测技术还预测1名患者的疾病会复发。同样，在接受新型辅助化疗的55例早期乳腺癌患者的前瞻性队列研究中，对接受治疗后的患者的血浆ctDNA的检测成功预测了疾病的转移性复发现象；进一步的纵向突变跟踪增加了预测复发的敏感性，并预估临床复发中位数为7.9个月。

事实上，临床试验中液体活检的一个关

键应用是ctDNA监测，即旨在确认患者接受初次治疗且无疾病迹象后，是否仍然会出现疾病复发。目前研究人员通过对107例接受EPOCH方案（包括依托泊苷、泼尼松、长春新碱环磷酰胺和多柔比星）的治疗，且疾病完全缓解的弥漫性大B细胞淋巴瘤（diffuse large-B-cell lymphoma, DLBCL）患者，进行了回顾性分析，从而评估疾病监测过程中的ctDNA的NGS分析。中位随访11年后，研究人员发现，携带可检测的克隆型ctDNA患者的疾病复发率是没有被检测出ctDNA的患者的228倍。液态活检方法的阳性和阴性预测值（PPV和NPV）分别为88%和98%，而疾病复发到疾病确诊的中位时间是3.5个月，这表明液态活检是一个能鉴别治疗失败高风险患者的生物标志物。

最近，Tie等人报道了2期结直肠癌患者术后ctDNA水平与肿瘤复发存在关系的前瞻性试验结果。术后可检测出ctDNA的患者的复发率是无法检测出ctDNA的患者的10倍以上，这表明ctDNA可以作为预测型生物标志物。MRD监测也提高了减少MRD阴性患者治疗的可能性。

## 5 评估反应和预测抗性

除了在确切治疗后监测MRD，确认复发风险之外，液态活检还可用于监测患者对全身治疗的反应和/或抗性。例如，Dawson等人通过对转移性乳腺癌患者的ctDNA进行WGS分析和目标基因分析，来检测PIK3CA和TP53突变（这些突变之前已在肿瘤组织中被鉴定出来了）。此外，与血清CA15-3水平或CTC计数相比，突变ctDNA的总量能更好地预测患者对标准治疗的反应。高ctDNA水平也与较低的总体生存率相关。Schiavon等人分析了ctDNA中的ESR1突变，以探究171例晚期乳腺癌患者治疗期间抗药性的变化。研究人员仅在曾接受芳香酶抑制剂治疗的雌激素受体（ER）阳性疾病患者中检测到ESR1突变。在随后的治疗中，该突变与非常短的PFS相关。

研究人员还研究了ctDNA分析在监测NSCLC患者对治疗的响应时的效用。结果显示，第一个治疗周期后，96%的患者EGFR突变的ctDNA水平降低了，这是治疗反应的早期指征。然而，在临床疾病进展之前，研究人员在ctDNA中检测到EGFR<sup>T790M</sup>突变，该突变是与第一代EGFR TKI的抗性相关的看门突变。

与之类似，目前液态活检已成功应用于鉴定转移性结直肠癌患者体内的、由抗体介导的对EGFR阻断疗法产生抗性的机制。接受西妥昔单抗或帕尼单抗治疗6个月后，几乎40%的患者的血清中都有高水平的KRAS突变，而在治疗开始前获取的组织活检样本中，则没有该基因的任何突变。有趣的是，研究人员可以在放射学影像确认疾病进展情况前长达10个月内，持续检测出抗性KRAS突变克隆。事实上，Diaz等人发现，曾接受帕尼单抗治疗的转移性结直肠癌患者的血液循环中存在多种KRAS突变。重要的是，由这些患者的ctDNA

分析数据构建而成的数学模型表明，结肠直肠癌患者的肿瘤可能在治疗前就已携带抗性KRAS突变细胞，随后以达尔文进化方式在治疗压力下选择了这些抗性细胞。

研究人员已经在那些对抗EGFR抗体治疗产生部分反应或病情得到稳定的结肠直肠癌患者中，检测出抑制西妥昔单抗和帕尼单抗的EGFR胞外结构域（ECD）里的突变。随后，这些患者接受MM-151（这是具有亲和性、不会受到ECD突变影响的寡克隆抗EGFR抗体的一种新型混合物）治疗，结果却导致含有EGFR ECD突变的ctDNA水平下降。值得注意的是，一名患者的EGFR<sup>G465E</sup>突变等位基因频率下降，预示着肿瘤体积将显著缩小，5周后的CT检测证实了这个预测，这表明EGFR ECD突变体克隆对MM-151敏感。这些研究成果说明ctDNA分析在监测疾病进展，以指导治疗决策方面具有很大的潜力。

对ctDNA致癌基因重排现象的检测研究是另一个非常有趣的研究领域。例如，Russo等人纵向监测血浆ctDNA，以评估在用TRK酪氨酸激酶受体抑制剂entrectinib治疗期间，具有转移性结直肠癌患者的LMNA-NTRK1基因的融合状态。除了监测治疗反应和药物抵抗之外，这种液态活检方法还能够发现以前未知的、对entrectinib有抗性的突变：治疗前在ctDNA中无法检测出抗性的两个新型NTRK1激酶结构域突变（G595R和G667C），在治疗后被检测出具有药物抗性。

事实上，液态活检可用于监测响应治疗所施加的选择压力的克隆动态演化（图7）。例如，研究人员已经对ctDNA进行了深入分析，以便确认结直肠癌的基因型，并在患者接受抗EGFR抗体治疗之前、期间和之后的多个位点

跟踪克隆演化。研究表明，停止抗EGFR抗体治疗后，通常伴随EGFR阻断而出现的KRAS突变克隆的丰度会降低。从抗EGFR抗体多重攻击中受益的患病的ctDNA图谱显示KRAS突变体的水平波动较大，这为基于EGFR阻断机制的再激活疗法的功效提供了分子层面的解释。

对组织和液态活检样本的评估应与放射成像结合使用，以监测个体致癌性改变对病变特异性治疗响应的影响。Murtaza等人报道指出他们对患有ER + / HER2 + 转移性乳腺癌患者的肿瘤活检标本和血浆样本进行了广泛的分

析。该患者首先接受他莫昔芬和曲妥单抗治疗，接着接受拉帕替尼治疗，并且肿瘤进展历时3年以上。血浆ctDNA突变分析结果反映出通过多区域肿瘤组织的测序而确定的克隆层级，并且能够跟踪不同病变的不同治疗响应。这些研究结果进一步表明，在肿瘤发展早期发生的突变是使用ctDNA监测肿瘤负荷的理想对象，因为它们基本上存在于患者的所有癌细胞中。同时，在肿瘤系统发育后期产生的亚克隆或“分支”突变可能有助于告知患者分层情况，并最终指导靶向治疗的选择。

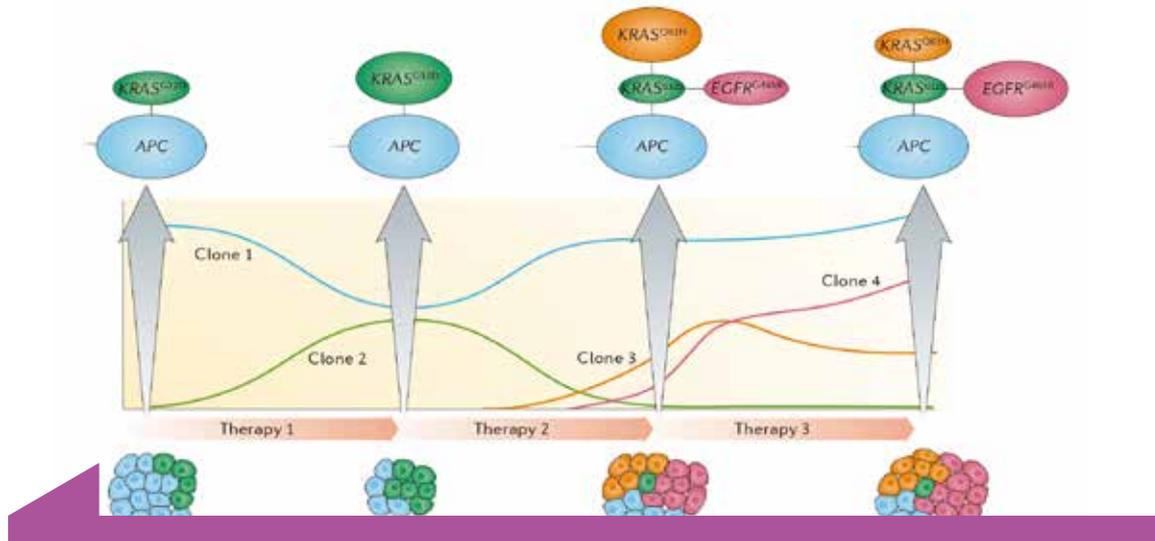


图7 使用液态活检监测克隆进化。靶向疗法使肿瘤细胞处于选择性压力之下，从而诱发了克隆进化，该克隆进化现象可以通过液体活检方法检出。由此获取的数据有助于研究人员深入了解耐药机制，并指导治疗决策的制定工作。该示意图描绘了用抗EGFR抗体治疗的转移性结直肠癌患者中携带不同突变的肿瘤细胞亚克隆的丰度的动态变化。对基本上所有肿瘤细胞（克隆1，蓝色线）中都存在的APC克隆突变的监测，可以跟踪肿瘤负荷，而亚克隆突变（分别为克隆2, 3和4中的KRAS<sup>G12D</sup>、KRAS<sup>Q61H</sup>和EGFR<sup>G465R</sup>）则可以用于测量治疗期间的克隆进化。亚克隆突变是病变特异性的，从而导致不同疾病部位对治疗产生不同的响应。在这个模拟患者的模型中，虽然采用抗EGFR抗体开展的初步治疗通过靶向大多数肿瘤细胞，来导致肿瘤负荷的显著下降，但是抗性KRAS<sup>G12D</sup>突变亚克隆的生长最终诱发了肿瘤再生。治疗方式的改变减少了KRAS<sup>G12D</sup>细胞群体的细胞数量，但具有其它突变的抗性亚克隆（克隆3和4）获得扩增，并促进了肿瘤的生长。第三阶段的治疗限制了克隆3的生长，但是克隆4仍能继续增殖。图片来源：Giulia Siravegna. *et al.* (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14 (9) : 531-548.

## 6 外泌体的应用

第三类液态活检方法靶向的是外泌体。这类小囊泡由多种活细胞（包括肿瘤细胞）分泌而成。正如其亲代细胞一样，外泌体包含DNA、RNA和蛋白质。尽管人们对外泌体还了解不多，但目前以外泌体为基础开发的肿瘤测试技术已被商业化。2016年1月，美国Exosome Diagnostics公司开发的一项血液测试技术——通过肿瘤-外泌体RNA分析技术检测肺癌——获得了美国临床实验室改进法案修正案（Clinical Laboratory Improvement Act

ndments, CLIA）授予的在实验室范围内使用该技术的认证。这些研究人员可以从患者的血样中收集外泌体，此外也可以通过尿液收集外泌体，后者更为简单、方便。然而，与提取游离DNA或肿瘤细胞相比，提取肿瘤来源的外泌体，并将它们与正常外泌体区分开来是一件非常困难的事情。因此，我们仍然需要继续对该技术进行更深入的研究，以使其能够应用于其它肿瘤检测工作。

## 7 参考基因组

对于在临床中使用ctDNA，有必要使用专业人员和特定仪器（NGS, ddPCR），因为不同的仪器和人员操作会造成一定的差异（批间差）。如有条件，外部质量控制程序也必须建立。质量管理和标准化的实验室软件和生物信息学是使用ctDNA的必要条件。最近的研究结果表明，对于基于SNP的分析，不同的检测方法下，基因检测的结果可能会有显著差异。这种差异在组织学检测中也同样明显。有研究表明，不同的商业化检测平台下，其检测出来的突变位点一致性较差，仅有22%的一

致性。在此基础上，仅有25%的推荐药物一致性。除此之外，即使使用同一平台，也会因存在扩增的不均一性、DNA降解、操作误差等原因，造成解读的困难。因此，有必要在建立文库时，同时引入合适的参考基因组。Horizon Discovery最近建立能在抽提DNA时就可引入的高质量cfDNA混合品。这能大大减少错误步骤造成的假阴性/假阳性结果的出现此外，为了正确解释基因组结果及其用于指导临床决策，多学科的专家合作是至关重要的。

## 特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

### 岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

### 要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 [editor@lifeomics.com](mailto:editor@lifeomics.com)

## 四、前景和展望

过去5年，液态活检被应用于肿瘤学，而且发展速度非常惊人。目前，虽然许多对实体肿瘤患者开展的临床试验都纳入了纵向研究，但是大多数研究仅招募了小部分患者。我们只有在进行了广泛的对照研究后，才能在临床实践中实施液态活检。目前，超过60项试验（预计招募20000名患者，涉及11种癌症）在应用液态活检技术时，面临重重困难。要解决这些问题，我们需要做到以下几点：制定收集血液的标准程序，以提高样品在室温下的稳定性，从而减少实验分析前出现的偏差；明确ctDNA的定量方法；制定提取ctDNA的标准程序，以提高产量；提高ctDNA对稀有分子改变情况检测的敏感性，以判断耐药性。

在患者筛查工作中利用液态活检方法可以更全面地了解肿瘤特征（包括肿瘤侵袭性和整体分子图谱）。临床环境的综合措施包括使用PCR技术对已知热点突变的部分候选基因进行初步分析，并将其作为基准测试，以确认是否存在足够量和高质量的ctDNA，然后进行更广泛的ctDNA测序，从而发现可行的治疗靶点。

液态活检中ctDNA的相关研究已经提示其可以作为药物筛选、研究肿瘤异质性和克隆进化的有效工具。在不久的将来，随机对照试验将会比较ctDNA指导的医疗决策是否优于传统的标准治疗方法。目前，人们已启动了将ctDNA检测作为治疗监测方法的相关临床研究。其中一项研究是对接受了厄洛替尼治疗的非小细胞肺癌患者进行药物监测。后续如果在血浆中发现了抗性突变，则进行额外筛选程序，以查看是否有新的疾病进展。另一项研究的目的在于明确靶向进展期乳腺癌患者血浆中的突变疗效。这项研究的结果或许能支持，将

来仅通过血浆检测出的突变就能有效地进行治疗分层。这些研究共同表明，ctDNA具有决定临床决策的潜力。

此外，更深入地了解ctDNA的生物学机制将有助于将其更好地应用于液态活检。目前我们仍然不清楚，是否所有的肿瘤亚克隆都释放相等量的ctDNA，也不知道血液中的ctDNA是否会受到其它生物学因素，例如肿瘤的血管丰富程度和代谢活性等的影响。通过细胞标记的活体实验以及自噬研究将会更好地阐释亚克隆的分布情况。ctDNA大小尺寸的不同则提示我们需要进行样本处理和提取的优化，来减少选择偏倚对结果造成的影响。

多层次的液态活检标志物的组合，或许能对患者的疾病带来更好的解读。表观遗传分析ctDNA能得到患者DNA甲基化的情况，其它循环标志物，如mRNA和miRNA则能提供其它维度的信息。此外，尽管我们能通过ctDNA推测基因表达情况，但是不如直接对外泌体内的RNA、CTC和血小板进行测序。分析血液中的ctDNA还能和分析尿液、脑脊液中的ctDNA进行互补。

组织活检还会继续成为肿瘤管理的关键点，特别是在组织学诊断和肿瘤分类上。虽然将来医院内的实验室都能进行CTC和ctDNA的分析，但目前仍然需要依靠专业的实验室。下一代“液态活检”研究将成为基于血液的基因组分析的关键方法。毫无疑问，液态活检将取代外科手术，唯一的问题是在什么时候以及以什么方式替代外科手术。

投资者也对这个内容非常感兴趣，许多资金逐渐涌入液态活检的初创公司。测序巨头公司illumina于2016年1月建立了Grail公司，旨

在发展基于血浆的多种肿瘤的早期筛查。但在其正式取代外科手术前，我们仍然需要进行大量的研究和测试工作，以提高液态活检的敏感性和精确度。目前，液态活检仍然停留在研发阶段。2015年，Pathway Genomics推出了面向消费者的血液检测系统。FDA等监管部门表示，这个花费699美元的检测只针对肿瘤高危人群，还不能直接面向普通消费者。

FDA和EMA已初步批准将在血浆内检测

突变作为伴随诊断，并且，基于ctDNA的临床试验提示了液态活检能完全加入个体化治疗的项目。日新月异的技术能提供更多无创检测肿瘤的方法，从而为基因组研究和临床决策提供更多信息。为了能更好地发挥液态活检的临床价值，我们需要更深入地研究其生物学机理。至此，液态活检已经显示出许多应用的可能性，并且已经为患者提供了帮助。

#### 原文检索

Galatea Kallergi. *et al.* (2016) Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs). *Cell Physiol Biochem*, 40 (3-4): 411-419.

Giulia Siravegna. *et al.* (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14 (9): 531-548.

Jonathan C. M. Wan. *et al.* (2017) Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews cancer*, 17 (4) :223-238.

Olsson E. *et al.* (2015) Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med*, 7(8): 1034-47.

KR Chi. (2016) The tumour trail left in blood. *Nature*, 532(7598): 269-271.

M Oellerich. *et al.* (2017) Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54 (3): 205-218.

NM Kuderer. *et al.* (2016) Comparison of 2 Commercially Available Next-Generation Sequencing Platforms in Oncology. *Jama Oncology*, 3(7):996-998.

# GeneCopoeia 预制稳定细胞系

## • CRISPR-Cas9 预制稳转株

稳定插入人源 AAVS1 或小鼠 ROSA26 的 "Safe Harbor" 安全位点, CRISPR-Cas9 在表达过程中不影响细胞的其它正常生物功能。涵括 13 种人源、鼠源细胞系的 Cas9 稳转株现货。提供单克隆细胞现货。

## • Luciferase+GFP 双标签肿瘤细胞稳转株

持续表达高水平荧光素酶及荧光蛋白。进行活体注射后, 短时间即可检测荧光及荧光素报告基因, 涵括 19 种常用的人源癌细胞系的稳转株现货。提供混合细胞株。

## • GFP 荧光标记肿瘤细胞稳转株

持续表达高水平荧光蛋白。涵括 18 种常用的人源癌细胞系的稳转株现货。提供混合细胞株。

## • 细胞结构相关预制稳转株

可持续表达与细胞骨架构成相关的蛋白, 可与 RFP 融合表达。提供混合细胞株。

## • TRE 预制稳转株

可持续表达转录应答因子 (Transcriptional Response Element)。提供单克隆细胞现货。

### 选择 GeneCopoeia 预制稳定细胞系:

- 出货前, 细胞的存活率达到 95% 以上, 活细胞比例高;
- 保证无支原体、细菌、真菌或其它影响细胞生长的毒素、污染;
- 报告基因表达稳定、均匀;
- Cas9 预制稳转株利用 Safe Harbor 整合位点, 保持 Cas9 稳定表达的同时无细胞毒副作用;
- Cas9 预制稳转株为单克隆, 保证稳定整合, 在单一基因背景下持续高水平表达。

## CRISPR-Cas9 预制稳转株

另有: 40+ 种人源、鼠源 Cas9 稳定细胞系

细胞系	启动子 / 筛选标记	Cas9 整合位点	新货号	规格	目录价
HEK293T	CBh/Puro	AAVS1	SL502	2 x 10 <sup>6</sup> cells/vial x 1 vial	¥ 10,000
HEK293 (with loxP)	CBh/Hygro		SL554		
NCI-H1299	CMV/Puro		SL501		
A549	CBh/Hygro		SL504		
HeLa	CBh/Hygro		SL503		
MCF-7	CBh/Hygro		SL514		
T47D	EF1a/Hygro		SL517		
HepG2	CBh/Hygro		SL518		
Neuro2a	CBh/Hygro		SL509		
Neuro2a (with loxP)	CHh/Hygro		SL559		
Neuro2a	CBh/Puro	ROSA26	SL510		
Neuro2a	CBh/Neo		SL511		
C2C12	EF1a/Hygro		SL564		

## Luciferase+GFP 双标签肿瘤细胞稳转株

## GFP 荧光标记肿瘤细胞稳转株

细胞系	启动子 / 筛选标记	货号	规格	目录价
NCI-H1299	CMV+SV40/Puro	SL001	2 x 10 <sup>6</sup> cells/vial x 1 vial	¥ 7,000
NCI-H861		SL002		
NCI-H1975		SL003		
LoVo		SL004		
COLO 205		SL005		
HT-29		SL006		
SNU-475		SL007		
C3A		SL008		
PLC/PRF/5		SL009		
Panc 10.05		SL010		
CFPAC-1		SL011		
BxPC-3		SL012		
KATOIII		SL013		
NCI-N87		SL014		
AGS		SL015		
HCC70		SL016		
MCF7		SL017		
MDA-MB-231		SL018		
K562		SL019		

细胞系	启动子 / 筛选标记	货号	产品规格	目录价
NCI-H1299	SV40/Puro	SL101	2 x 10 <sup>6</sup> cells/vial x 1 vial	¥ 6,000
NCI-H861		SL102		
NCI-H1975		SL103		
LoVo		SL104		
COLO 205		SL105		
HT-29		SL106		
SNU-475		SL107		
C3A		SL108		
PLC/PRF/5		SL109		
Panc 10.05		SL110		
CFPAC-1		SL111		
BxPC-3		SL112		
KATOIII		SL113		
NCI-N87		SL114		
AGS		SL115		
HCC70		SL116		
MCF7		SL117		
MDA-MB-231		SL118		

## 细胞结构相关预制稳转株

细胞系	启动子 / 筛选标记	产品描述	货号	规格	目录价
H1299	CMV/Puro	稳定表达细胞结构相关蛋白 RFP-ACTC1	SL201	2 x 10 <sup>6</sup> cells/Vial x 1 vial	¥ 7,000
		稳定表达细胞结构相关蛋白 RFP- $\alpha$ -tubulin	SL202		

## TRE 预制稳转株

细胞系	筛选标记	产品描述	货号	规格	目录价
HEK293T	Puro	稳定表达转录应答因子 PKC-Luc (单克隆)	SL401	2 x 10 <sup>6</sup> cells/vial x 1 vial	¥ 7,600
		稳定表达转录应答因子 NFAT-Luc (单克隆)	SL402		
		稳定表达转录应答因子 TCF/LEF-Luc (单克隆)	SL403		
		稳定表达转录应答因子 NEG-Luc (阴性对照)	SL404		



扫一扫, 关注官方微信



# 热点

## 23ANDME公司沉浮录

ANNE WOJCICKI是如何将23ANDME这家新兴公司带出低谷的呢？

在Anne Wojcicki的办公室里有一张海报，海报上有一个玩具独角兽，在这个独角兽的后面有一个木质名牌，上面写着：“我是CEO，一个坏女人。”这张海报很好地呈现了Wojcicki的管理哲学。

2006年，Wojcicki就是带着这股无礼劲闯入了医疗保健行业。她的目标是给消费者提供更加精确的DNA分析报告以及与消费者健康、疾病和家系相关的信息，同时也积累遗传数据，为科学研究提供数据服务。可是到了2013年，公司的发展遇到了问题。Wojcicki不了解她需要获得监管机构的同意，才可以向客户提供健康及患病风险方面的评估报告。因此FDA要求她们立即停止相关的业务。

FDA的禁令让Wojcicki等人花了好几个月去思考应该如何调整方向，以满足FDA的要求。Wojcicki指出，这种情况下，他们只能接受，他们是被监管的对象，而且那里不是硅谷，不可能在24小时之内就给出一个解决方案。

多年的努力终于换来了今年（2017年）4月的回报——FDA同意23andme给客户提供患病风险报告，涉及的疾病包括帕金森氏病（Parkinson's disease）和迟发型阿尔茨海默病（late-onset Alzheimer's disease）。经过了一轮积极的、正面的宣传，以及公司开展的一系列广告攻势，客户量终于奇迹般地突破了1000万人。



2006年，ANNE WOJCICKI创办了直接向消费者提供基因检测服务的23ANDME，她计划将客户数增长到1000万。

23andme自成立以来，一直都是最著名的、直接面对消费者个人的遗传检测公司。现在，她们变得比以前更强大了。今年9月，该公司宣布刚刚募得2.5亿美元的资金，这比她们自成立以来筹集到的所有资金都要多。投资人估计，该公司目前市值已经超过了10亿美元，用硅谷流行的说法就是——她们已然是一只独角兽了。但是对于科研人员而言，23andme最大的价值并不是值多少钱，而是她们拥有的数据。23andme已经积累了200多万人的基因数据，而且还都是与他们每个人的身体健康数据相关的基因数据，这已经成为了世界上同类型的数据库中最大的一个数据库。此外，她们还发表了80多篇论文，在制药界有20多个合作伙伴，而且她们开了一家自己的治疗分公司。

美国斯坦福大学（Stanford University, California）的心血管专家Euan Ashley认为，23andme已经悄悄地变成了世界上最大的遗传研究机构了。

不过23andme在发展的道路上也遭遇了不少挫折。首先，她们需要取得消费者的信任，还要面对同行的竞争，并且最终要能够证明这些遗传数据是可以帮助我们开发出有价值的新药的，但这个目标太难实现了。除此之外，23andme还需要获得FDA的支持，FDA可不会同意你直接将与普通消费者健康相关的遗传信息告诉他们的，比如告诉某一个客户，她体内的BRCA基因（该基因与乳腺癌密切相关）属于什么类型。

不过Wojcicki并没有被这些困难吓住，她如此评价自己：“我是非常固执的一个人。”

## 回顾历史

23andme总部位于美国加利福尼亚州的山景镇（Mountain View, California），该公司成立至今已有11年了。办公室里挂满了绿色和粉红色的铝膜气球，以庆祝员工的工作纪念日，小厨房里放满了各种健康小食，茶水间也填满了所有员工的照片（照片按照每位员工的入职顺序排列），每张照片上都写着个性化的员工自我介绍，比如有人写“我最爱喝绿茶”，还有人写“曾经在一个模仿New Kids on the Block乐队的假唱比赛中得奖”等。

第一张照片当然是Wojcicki本人的了。Wojcicki从小在斯坦福大学的校园里长大，她的父母分别是物理教授和老师。Wojcicki在耶鲁大学主修生物学，同时也打冰球。她现在还非常热爱运动，在公司里经常可以看到她骑自行车来上班。

1996年，Wojcicki毕业后进入一家投资公司工作，主要负责医疗健康领域的投资。不过她很快就厌倦了当时医疗行业致力于开发新产品，以及如何从保险公司那里获取最大补偿的昂贵运作方式。她开始关注如何开发消费者们都负担得起的医疗保健产品和服务。

终于在2006年，Wojcicki与Linda Avey和Paul Cusenza一起创办了23andme，她们的目标是彻底颠覆传统的医疗保健模式。2007年，该公司从多个非常有实力的投资人那里获得了895万美元的投资（投资方包括大名鼎鼎的Genentech公司和谷歌公司），而且Wojcicki还在那一年嫁给了Google的创始人之一Sergey Brin，不过两人于2015年分手。

Wojcicki的计划是通过销售便宜的基因检测产品来吸引数百万的用户，客户可以通过这些基因检测了解几十种遗传易感性（genetic predispositions）。这些基因检测还可以提示一些患病风险，还客户是否容易出现秃头、肥胖，以及耳屎多不多等其它无关紧要的信息。Wojcicki希望她们的努力可以让基因组变得更

有趣、更亲民，同时还能够吸引更多的客户。她为此邀请了许多名人，开了多场聚会，给那些引领时尚潮流的明星们免费提供遗传检测，来吸引公众和媒体的眼球。比如Ivanka Trump在做了检测之后就非常高兴地宣布，她变胖的几率非常低。2007年底，在23andme正式向市场推出她们的基因检测服务时，Wojcicki和Avey都被大家称作是有远见的人。不过当时Cusenza已经离开了公司，Avey也在两年后离开公司。

当时科学家们对这项业务持半信半疑态度。直到现在，从预测患病风险的角度来看，家族史（family history）还是比基因检测更加准确。斯坦福大学的伦理学家、律师Hank Greely一直都是坚定地站在批判23andme的立场上的，因为Greely认为，越来越多的证据显示，这种直接针对每个人的遗传检测几乎没有任何的益处和价值。

对于23andme打算出售消费者个体基因检测数据，并开发新药的打算，也存在颇多的质疑。因为十几年来，已经有很多公司都在做类似的基因数据发掘工作了，可是收效甚微。以1996年成立的deCODE基因公司为例，该公司招募了一半的冰岛人来做研究，虽然他们发现了某种疾病的遗传机制，但还是没能开发出哪怕一款药物。

科研界的质疑并没有阻挡23andme的业务发展，已经有数十万人成为了该公司的客户，而且也没有吓退投资人。就在23andme成立的头五年里，他们一共获得了1.18亿美元的投资，但是随后，问题出现了。2009年，FDA要求23andme提供证据，以证明他们的广告不存在虚假宣传以及检测业务对消费者是没有害处的。FDA担心，消费者在拿到23andme的基因检测报告之后会采取某些医疗措施：比如在没有咨询医生的情况下擅自改变服药量，或者做一些没有必要的手术，比如乳腺切除术等；

抑或因为假阳性的检测结果而采取了某些医疗手段。FDA还要求23andme提供证据来证明他们的检测结果是准确的，并且给消费者提供的检测报告也是准确的、合适的。

接下来几年，23andme的日子变得非常难过。他们和FDA做了沟通，承诺在2013年1月前会提交相关的证据。可是据FDA介绍，2013年5月，23andme在完全没有和FDA沟通的情况下，开展了新的广告宣传。于是2013年11月22日，FDA给23andme发了一封警告信，

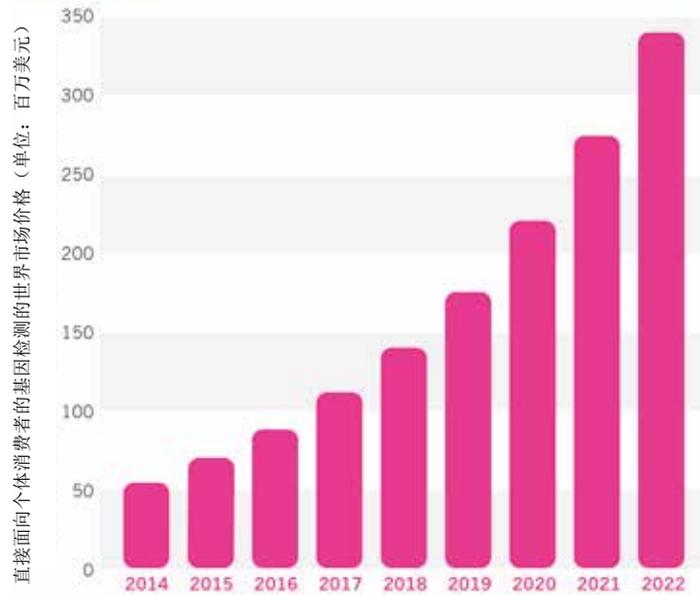
要求他们停止所有的市场销售行为。

这完全是23andme自找的。时任Genentech公司CEO的Richard Scheller认为，23andme太傲慢了。对此，23andme不得不大规模消减订单量，这严重威胁到了公司的生存。

当时Wojcicki不知所措，随后她开始明白，她们彻底激怒了FDA。Wojcicki不知道当时自己为什么要那样做。

### 基因的力量

据估计，未来五年内，直接面向个体消费者的基因检测市场的规模将增长3.4亿美元。这在整个DNA检测市场中只占很小的比例。整个DNA检测市场的规模同期预计将增长100亿美元。



## 走上正轨

在收到FDA的警告信之后，Wojcicki马上给当时在另外一家位于美国加利福尼亚州红树市的基因检测公司Genomic Health的律师Kathy Hibbs打了一个电话，Wojcicki想咨询的是，她能否在一年内让公司恢复正常运作。Hibbs指出，她可以让公司恢复正常运作，但一年肯定不够，得好几年，而且前提是好好配合FDA的要求。

这对Wojcicki来说是一个非常大的挑战，因为她根本不认同FDA阻止消费者了解自己的遗传背景信息。但是Hibbs等人最终说服了她，使她下定决心尽快配合FDA，满足FDA的要求，好让公司赶紧正常运转起来。

Wojcicki后来聘请Hibbs帮助她们收集证据，一一回答FDA的各种问题，这是一项非常艰巨的任务，因为FDA和她们公司已经在很多问题上纠缠了很多年了。到2014年底，Hibbs觉得他们已经做好了充足的准备，于是向FDA提出申请，要求同意23andme销售的一款基因检测产品。这款基因检测产品可以告诉消费者，他们的孩子是否会患上一种名为Bloom综合症（Bloom syndrome）的遗传性疾病。

## 发现新药之路

尽管23andme在面向消费者个人提供基因检测方面受到了FDA的抵制，但他们并没有停止在药物开发方面的工作，能够让Scheller加入到公司中来是其中的关键。2014年12月，Scheller宣布正式从Genentech公司退休，就在同一天，Wojcicki给他发了一封邮件。4个月后，Scheller来到了山景镇，接掌了23andme的新药研发部门。2015年7月，Wojcicki获得了1.15亿美元的投资。

Scheller最感兴趣的并不仅仅是23andme积累的个体遗传数据的规模，更主要的原因是，他看重这些数据资料在内容方面的丰富

2015年2月，FDA给出了同意的答复。不过这个消息并没有引起媒体的关注，因为Bloom综合症是一种非常罕见的疾病，仅见于德系犹太人（Ashkenazi Jewish），发病率只有1/50000。但无论如何，这也让23andme成为了第一个能够在美国直接面向消费者个人提供与某种疾病相关基因检测服务的公司，虽然他们早就已经在其他国家开展了这样的业务。

尽管获得了FDA的这纸批文，23andme还是不能向消费者提供更多的信息，比如他们是否携带某种肿瘤高危突变基因，或者他们更适合使用哪些药物等。在FDA发出警告信之前，23andme的检测报告里可是有多达数百条与健康相关的信息的。

Greely认为，FDA的禁令是非常有必要的，因为有非常强有力的证据证明，某些遗传变异可能与十种疾病有关，而这些疾病都是FDA批准可以进行基因检测的。可是大部分遗传变异（与常见疾病相关的遗传变异）在预测疾病发病风险方面的能力比较差，但这些遗传变异的检测结果之前全都出现在23andme的检测报告里。

性。每一名23andme的客户都会填写一份非常详细的问卷，其中有300个调查题，涉及各个方面，比如他的既往医疗史等。这就能够让Scheller等人尝试一种全新的新药开发模式，即以基因数据为指导的新药开发模式。

通常的工作流程是这样的，首先我们需要开展全基因组关联分析（genome-wide association study, GWAS）。科研人员们会收集一大群患有某一种疾病，或者具有某种性状的人的基因组数据，然后找出与该疾病或者性状相关的遗传变异。可是Scheller等人却反其道而行之。他们先挑出一个已经存在相应靶

向药物的基因，然后寻找与该基因不同突变体最为相关的疾病或者性状。Scheller指出，他们其实是在基因数据库里寻找这些药物的适应症。这种“新药”开发模式也被称做全表型组关联研究（phenome-wide association study, PheWAS）。23andme新药研发部门的主任Erik Karrer将其称作他们的“秘密武器”。23andme认为，他们将加快新药的开发速度，科研人员们可以在他们的数据库中选出对人体最重要的药物作用靶点，这样既可以让药效达到最强，也可以让副作用尽可能地降低。

为了验证这种工作模式的可行性，计算生物学家Fah Sathirapongsasuti用近十年来的药物开发数据做了测试，以查看23andme的数据是否能够成功地预测这些新药的诞生。Sathirapongsasuti调查了数千种药物，其中有一些药物已经上市销售了。

他首先做了一份表格，其中收录了这数千种药物中所有基因的作用位点，然后与23andme的数据库进行比对，以查看这些基因都与哪些疾病相关。结果发现，虽然有一些药物对人体有作用，但是在小鼠实验，或者其它临床前实验中都没有发现相应的作用。Sathirapongsasuti还发现，利用23andme的数据库可以预测一些药物的副作用。

此外，这些数据还可以预测某些药物其实更适合用于治疗其它的某些疾病。比如Isofagomine tartrate这种药物，最开始是用于治疗戈谢氏病（Gaucher's disease）的，但是2009年，因临床实验失败，研究人员停止了研发工作。可是Sathirapongsasuti分析后发现，这种药可能对帕金森氏病有作用。现在研究人员正在开展相关的验证工作。

Sathirapongsasuti的工作表明，PheWAS方法的确可以用来开发新药，这更加坚定了23andme的信心。Scheller等人现在已经锁定了四个目标，那就是肿瘤、心血管疾

病、皮肤病和哮喘等免疫疾病。

现在，大部分科研人员都不再认为23andme是一个没有价值的公司了。他们能够拥有200万名客户，而且未来还会更多，这已经是一个很大的吸引力了，科研人员们全都排着队等着和23andme合作呢。要知道那几大生物银行也不过存有50万人左右的数据。美国加利福尼亚州Scripps转化科学研究所（Scripps Translational Science Institute in La Jolla, California）的所长、心血管专家Eric Topol评价道：“23andme有权说‘不’了。”

今年10月，NIH又给了23andme 170万美元，让他们为公司的数十万非洲裔美国人客户进行基因组测序。这些客户之前购买的只是标准服务，只能提供大概的基因组检测报告，而不是深度分析报告。这也是23andme启动的项目之一，他们的目的是解决美国少数民族基因数据不足的问题。

23andme要求他们的合作者遵守一些不寻常的规定，甚至科研人员也得有一定的调整。按照23andme与客户签订的协议，客户无权向其他合作者分享数据，所以别的合作者只能看到分析结果，而得不到原始数据。

有一些科研人员对23andme这种由客户自己填写问卷而获得的数据也有一点意见。比如与Pfizer公司开展过非常著名的合作，并发现了与抑郁症（depression）有关的遗传标志物（genetic markers）的神经遗传学家Ashley Winslow指出，审稿人对23andme的客户数据的真实性持怀疑态度。他们指出，有些人在问卷里说自己被确诊为抑郁症，其实不过是有几天情绪不太好而已。Winslow等人也会对数据的真实性做一些内部调查，比如会看看有多少人声称自己服用了选择性5羟色胺再摄取抑制剂类药物（selective serotonin re-uptake inhibitors）等。这些分析的确可以让论文得以发表，但是并不能打消人们的疑虑。

目前就职于美国费城大学（University of Pennsylvania in Philadelphia）的Winslow表示，很多人还是对基因检测持怀疑态度的，他们要求有更多的数据来证明基因与疾病的相关性。不过她同时也表示，包括她们自己的研究（该研究的结果已经被其他的大型研究所证实）在内的很多大型研究的结果让越来越多的科研人员希望与23andme开展合作。Winslow也认为，大家现在对23andme的态度要比过去好多了。

不过这并不意味着23andme就一定会开发出新药。很多著名的以人类遗传学为基础的新药开发研究最终都失败了。比如今年5月，著名的Amgen公司就宣布，在有4000人参与的临床实验中发现，他们开发的用于治疗骨质疏松症（osteoporosis）的新药romosozumab会增加患者的心脏病风险，而且其增加幅度达到了30%。Topol表示，有了遗传学数据就能开发出新药，这个设想其实并没有那么容易实现。早在23andme初创时期，直接面向消费者的基因检测市场就已经发生了改变。虽然这个市场在整个基因检测市场中只占很小的比例，但是据估计，5年内，该市场的规模将达到3.4亿美元。

现在，市场上出现了更多的遗传检测公司和23andme竞争。比如Color Genomics等提供廉价的、特定基因检测服务的公司；Ancestry DNA等提供家系检测服务的公司；Veritas等提供全基因组测序服务的公司，以及Human Longevity等结合了医疗检测项目的公司，或者Helix等提供app服务，用于解读基因

组数据的公司。

这些竞争者让Wojcicki更加充满信心，她相信未来的基因数据市场会更大。Veritas公司的CEO Mirza Cifric表示，他自己就是23andme的超级粉丝。23andme是这个行业的开创者，不论是在开发消费市场，还是完善监管体系方面都做出了重要的贡献。目前，23andme还是美国市场上唯一一个可以向消费者提供健康检测服务（health tests）的公司，而且没有任何其他竞争者有意进入这个领域。

Wojcicki当然非常愿意充当领军者的角色。她表示，关于她们的业务，她们有很多想法。比如，23andme正在密切关注Google和Apple公司在传感器和移动健康应用方面的新技术的进展，他们也在寻找在这方面有潜力的项目，计划未来持续地获取客户的数据。而且Wojcicki相信她们的客户数一定会超过1000万，哪怕按照目前的增长速度，这也是一个不难实现的目标。

在23andme的茶水间里，Wojcicki的照片上写着这样一句话：“我曾经因为吃了太多的胡萝卜，所以全身都变成黄色的了。结果我一年都不能再吃胡萝卜了。”

Wojcicki的确接受了建议，肤色恢复正常了。但是关于她的决心和回归正确方向的能力，能否带领23andme开发出新的药品，我们还不得而知。如果Wojcicki能成功，那么情况最终就会变成她的质疑者们全都变成了真正的硅谷独角兽——这些人太罕见，又不善言词，我们几乎无法感觉到这些人的存在。

原文检索：

Erika Check Hayden. (2017) THE RISE, FALL AND RISE AGAIN OF 23ANDME. *Nature*, 550: 174-177.

Eason/编译

# 百态

## 白蚁的“肺丘”利用太阳能运转

乍一看去，白蚁那露出地面的高塔般的蚁丘像是它们无比繁华的摩天大楼，但实际上，数十万只白蚁所生活的大型都市埋藏在地下。几十年来，人们都认为蚁丘能够调控其所在栖居地的气候条件。美国雪城纽约州立大学（State University of New York, SUNY）的Scott Turner就曾提出，蚁丘的作用类似于肺部，并由风力驱动。由此，美国哈佛大学（Harvard University）的Hunter King、L. Mahadevan和麻省理工学院（Massachusetts Institute of Technology）的Samuel Ocko得到启发，着手研究印度根土白蚁（*Odontotermes obesus*）蚁丘中的气流情况。结果发现，其建筑结构的功能确实类似于动物的肺，而且通过蚁丘的气流由照射在其表

面的太阳能所驱动。也就是说，太阳能形成温度梯度，促使建筑内部产生气流，而气流在蚁丘壁间的流转，促使了空气中二氧化碳的排出和氧气的流入。那么，生活在其它环境中的白蚁是否也有类似的通风机制，并从中受益呢？

Mahadevan、King和Ocko与其合作者Turner、Paul Bardunias（来自SUNY）、Rupert Soar（来自英国诺丁汉特伦特大学，Nottingham Trent University）与David Andreen（来自瑞典隆德大学，Lund University）一同来到了纳米比亚的奥奇瓦龙戈（Otjiwarongo），测量肯坦大白蚁（*Macrotermes michaelseni*）蚁丘的温度梯度和通过的气流情况。忆及此事，Ocko表示，气流传感器放进去不久，就被那些兵蚁和

工蚁攻击了，探针上很快就沾满了湿泥。于是，这项田野工作就华丽丽地变成了人与白蚁族群的游击实战游戏。但研究小组还是找到了大约30个

蚁丘，并收集到了一天之内不同时点的120多个内部气流的测量结果；同时，研究人员还测量了外部的风速和方向，从蚁丘的外围植入纽扣式温度记录仪，试图了解

这所“建筑”内部的热度梯度在一天之内的变化情况。

通过对纳米比亚蚁丘气流情况的重建，研究小组意识到，气流的流通循环在一天之内有两次转换，先是中间的空气上升到蚁丘顶部，然后在夜间通过侧面通道下沉；而在近中午时分，气流有时又会转为相反方向。研究小组分析了整个蚁丘的温度梯度，发现了一些问题：太阳对蚁丘的照射在一天之内会发生变化，导致蚁丘表面的温暖带区产生相应的变化，由此产生了不断变化的温度梯度，驱使气流流动。因此，肯坦大白蚁蚁丘内部的气流并非由外部环境的风力驱动，而是由太阳能驱动的，这一

点与印度蚁丘是相似的。

此外，研究小组还测量了其中一个蚁丘上的两个不同高度点和地下蚁穴的二氧化碳

水平。结果发现，纳米比亚蚁巢和蚁丘内的二氧化碳浓度相一致，高达5%；而印度蚁丘的相应水平则较低，且有流动情况。对于这个不同点，King表示，如果像人们所想的那



样，在一天之中的某些时点有大气流的减速，那么蚁巢内就会产生气体滞留，结果就会是此处的二氧化碳水平高于蚁丘的水平。而研究小组测量了蚁丘壁的多孔性，发现其结构的气孔足以保持整个蚁巢的良好通风。

King表示，白蚁的蚁丘就像一个倒转的肺，他希望人们能向白蚁学习如何通过利用太阳能来保持住所内良好的通风能力。毕竟，这种被动式散热的解决方案极有希望能够启发人类在工程学和建筑学方面的应用，特别是在解决节能问题上，说不定还能够取代传统的供暖、通风和空调系统。

原文检索：

Ocko, S. A., King, H., Andreen, D., Bardunias, P., Turner, J. S., Soar, R. and Mahadevan, L. (2017). Solar-powered ventilation of African termite mounds. *J. Exp. Biol.* 220, 3260-3269.

文佳/编译

# 自由不羁的泳者 ——大口黑鲈鱼

谁都知道，在健身房中玩跑步机并不等同实战。现在，鱼儿恐怕也遇到类似的问题了。目前，美国韦尔斯利学院（Wellesley College）的David Ellerby正在关注在水道中进行的一些实验（等同于将鱼儿置于跑步机上），并提出，人们此前认为，鱼儿的天性是选择消耗最少体能的游速，这恐怕并非真相。

他表示，几乎所有对鱼儿游动消耗的测量都被研究者以各种条件限制在某个恒定速度上，而不是听从鱼儿的选择。尽管这也是有价值的信息，但关于实验室数据是否确实与野外鱼儿的游泳行为

相关，大家都知之甚少。于是，他意识到应该走出实验室，与自由的大口黑鲈鱼一同在慰冰湖（Lake Waban）游泳，以观察基于实验室的研究与真实情况到底有何区别。Ellerby与两名本科生——Angela Han和Caroline Berlin——共同设计出一套实时立体摄像系统，他们把一架运动相机绑在摄像头上，随后

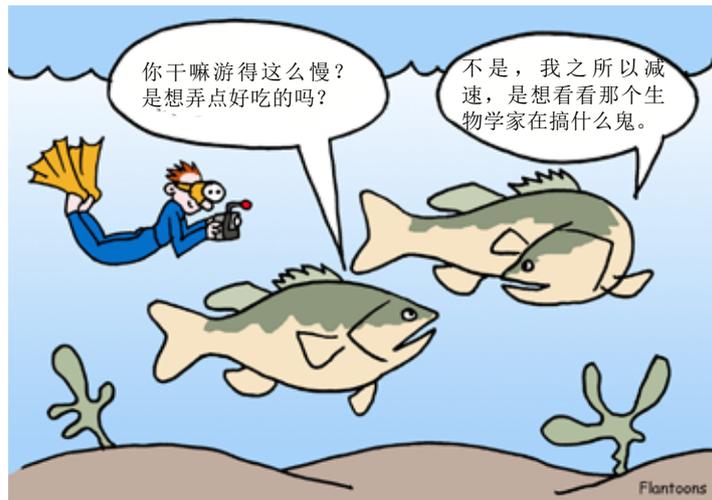
戴上潜水通气管，潜入水中游行。

回到实验室之后，三位研究者通过视频估计每条鱼的长度，再测出每条鱼的速度、取道的方向以及摆动尾巴的速度。当他们将鱼儿在水中游动的速度与在实验室的水道中记录的最“经济”的速度进行比较时，惊奇地发现，相对于实验室水道中记录的最佳速度（0.4-0.5

$\text{ms}^{-1}$ ），大部分自由的鱼儿是以较慢、较不省体力的速度（约0.3-0.4  $\text{ms}^{-1}$ ）游动的。

那么，为何野外自由的鱼儿会选择如此不羁的游速呢？Ellerby认为，它们之所以选择这种又

慢又不省力的速度，可能是为了提高吃到不幸经过的美味的几率。又或者，人们在测试实验室水道中游鱼的代谢率时，它们无法像自由游动的湖鱼一样行动自如。不管是哪一种可能的原因，Ellerby提醒，鱼儿在真实世界的行为很可能会与“健身房”中的鱼儿有细微的差异。



原文检索：

Han, A. X., Berlin, C. and Ellerby, D. J. (2017). Field swimming behavior in largemouth bass deviates from predictions based on economy and propulsive efficiency. *J. Exp. Biol.* 220, 3204-3208.

文佳/编译

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of four people standing on the ground, two people standing on their shoulders, and one person standing on the shoulders of the two people in the middle. The text is overlaid on the image in a bold, red font with a white outline.

**合办专题专刊**  
**网站广告合作**  
**邮件群发推广**

请致电 (020) 32051255



[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)  
[WWW.LIFEOMICS.COM](http://WWW.LIFEOMICS.COM)