

MRD在NSCLC患者术后对于预后及辅助治疗的预测价值

华大智造DNBSEQ测序平台赋能肺癌实体肿瘤MRD的检测与研究

广东省人民医院、广东省肺癌研究所吴一龙教授团队基于华大智造DNBSEQ测序平台探索了MRD检测在NSCLC患者手术后的预后和辅助治疗价值。

该研究成果于2022年以封面文章的形式发表于在国际顶级期刊 *Cancer Discovery* (IF: 39.397) 上, 题为 “Longitudinal Undetectable Molecular Residual Disease Defines Potentially Cured Population in Localized Non-Small Cell Lung Cancer”¹。

推荐应用：肿瘤组学（肺癌）

推荐机型：DNBSEQ-T7RS, MGISEQ-2000RS

• 实现肺癌肿瘤MRD检测

DNBSEQ-T7能够为ctDNA的高灵敏性MRD检测提供支撑, 助力早中期可手术的非小细胞肺癌领域前瞻性研究。

• 第三方靶向富集方案可完美适配DNBSEQ测序平台

华大智造通用文库转换方案可使该靶向捕获方案完美适配DNBSEQ测序平台。

• 高效准确的测序

独有的DNBSEQ技术具有高准确性、低数据冗余、低标签跳跃等特性。

• 提供全套产品组合

借助独有的自动化建库技术和生信分析软件可实现从样本输入到报告输出的全套产品组合。



背景介绍

MRD (Minimal Residual Disease) 即微小残留病灶又名分子残留病灶, 相关的检测技术可用于肿瘤患者的诊疗中。当肿瘤治疗后, 许多患者体内仍存在残留肿瘤细胞或微小病灶, 但此时残留的癌细胞数量或许很少, 不会引起任何体征或症状, 此时仅仅通过影像学手段无法检出残留病灶。倘若不进行医疗手段的干预, 则极有可能会引起肿瘤进展或复发转移²。

最近开发出来的几种检测非小细胞肺癌 (NSCLC) 分子残留病灶 (MRD) 的技术主要是通过追踪游离DNA (cfDNA) 中的超低频体细胞肿瘤变异的方法来实现的³⁻⁶。MRD 检测对非小细胞肺癌患者确定性手术后的预后具有重要价值。越来越多的证据表明, 实体瘤患者在根治性治疗后体内若残存有分子水平的肿瘤残留病灶, 即可能会导致肿瘤复发, 从而产生不良预后⁷。图1全景展示了肿瘤负荷与疾病发展的全过程⁸。

这项研究证实了基于 ctDNA 的 MRD 检测对非小细胞肺癌患者根治性切除术后的预后价值。强调了未检测到MRD 的价值, 它可用于定义局部非小细胞肺癌中潜在治愈的人群。此外, 亚组分析表明, 对于未检测到MRD 的患者, 可能不需要辅助治疗。

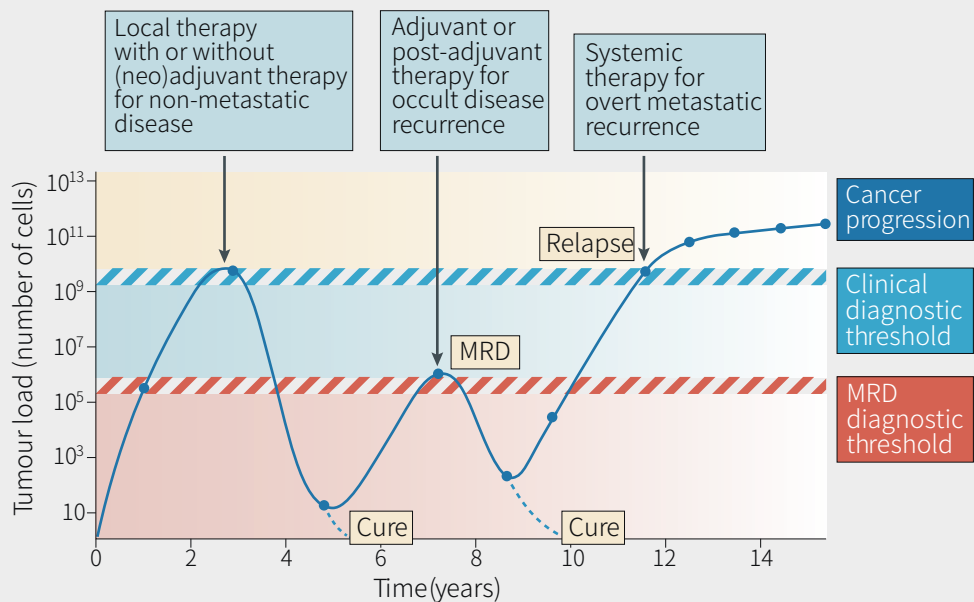


图1. 基于癌症患者体内肿瘤负荷的动态变化开展治疗策略的制定⁸

实验方法

样本收集和DNA提取

该前瞻性观察研究所涉及到的样本来源于2019年3月至2021年1月期间在广东省人民医院和广东省肺癌研究所共收集到的处在一期到三期间的非小细胞肺癌（肿瘤直径 ≥ 2 厘米）的261位病患。具体实验设计流程可查阅原文。

对于未接受辅助治疗的患者、接受辅助化疗的患者与接受长期EGFR抑制剂或ICI辅助治疗的患者分别在术前和术后的预定时间点收集两管10毫升的外周血于 Streck管中并进行相应的样本处理。之后，提取血浆循环cfDNA、用外周血淋巴细胞提取种系基因组DNA；相应的肿瘤DNA则从新鲜的肿瘤组织或FFPE肿瘤组织样本中提取。其中，增设了11名I期非小细胞肺癌患者，收集切除的肺叶的肺静脉残端血液5至10毫升以进一步确认手术前肺部肿瘤未脱落。

文库制备与测序

a. cfDNA Panel设计

本研究基于与CAPP-seq³类似的设计理念设计了一个338基因Panel。该Panel综合考虑了肺癌、结直肠癌以及肝细胞癌，可覆盖550Kbp的基因组区域。在Panel设计过程中：1.首先选择了包括这三种癌症类型中最常见的驱动突变；2.增加可操作的敏感和抗性突变、与免疫疗法效果有关的基因改变；3.基于吉因加测序的48,353位癌症患者、其他开放的数据库选择的高频突变区域。

b. 文库构建、目标区域捕获和测序

对于种系基因组DNA和配对的肿瘤DNA，使用超

声仪将400~800 ng DNA超声打断使DNA片段的峰值为200 ~ 250 bp，并使用NEBNext Ultra DNA文库制备试剂盒(NEB)将其制备成测序文库备用。而cfDNA也用于文库构建，并在每个双链DNA上标记唯一标识符(UID)以区分真实的体细胞突变和伪体突变，提高了精确跟踪单个血浆分子的能力。

对于肿瘤基因组和相应的种系DNA文库，使用某已报道的，可覆盖约1.5 Mbp基因组并靶向1021个癌症相关基因的定制设计Panel用于杂交富集。对于血浆DNA及其配对的基因组种系DNA文库则使用本文设计的cfDNA Panel进行杂交富集。

构建好的DNA文库在华大智造产的DNBSEQ-T7RS测序仪或吉因加产的Gene+ seq -2000测序仪上完成双端100bp(PE100)的测序。针对外周血淋巴细胞、血浆和新鲜/FFPE标本分别产生5、40和5Gb的数据。

数据分析

使用BWA 0.6.2版的默认参数，在去除适配体和低质量读数后，将测序数据比对到人类参考基因组(GRCh37)上。使用Picard中的MarkDuplicates工具对肿瘤和种系基因组DNA的重复读数进行标记和删除。对于cfDNA，通过UID和模板片段的位置来识别重复Reads以消除PCR或使用realSeq测序引入的错误。使用GATK对SNVs和indels周围的局部进行重排，以及进行质量控制评估。

使用realDcaller和TNscope对肿瘤体细胞的SNVs和小Indels进行分析；使用CNVKit检测拷贝数变异；结构变异则使用算法NCsv进行分析。在这之后进行ctDNA-MRD检测并进行统计分析。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
261位处在一期到三期间的非小细胞肺癌（肿瘤直径≥2厘米）的病患的相关样本。	 <p>第三方建库试剂盒 +靶向杂交Panel捕获</p> <p>MGIEasy 通用文库转换试剂盒 (App-A)</p> <p>DNBSEQ-T7RS基因测序仪</p>	<p>BWA Picard GATK realDcaller TNscope CNVkit NCsv</p>	<p>基于 ctDNA 的 MRD 检测探讨非小细胞肺癌患者根治性切除术后的预后价值</p>

结果

阴性预测值在MRD检测中具有重要价值,持续阴性可定义为潜在治愈

该研究对术后的患者进行单节点 (Landmark) MRD检测,发现在预后效果方面,检测结果为阴性的患者明显优于阳性患者 (图2)。为提高预测

准确性对患者进行动态MRD检测,在检测结果中NPV (阴性预测值) 达到96.8%,该数据表明96.8%的持续阴性人群没有出现肿瘤复发,这一结论可以将持续阴性人群定义为潜在治愈人群的指标 (图2)。

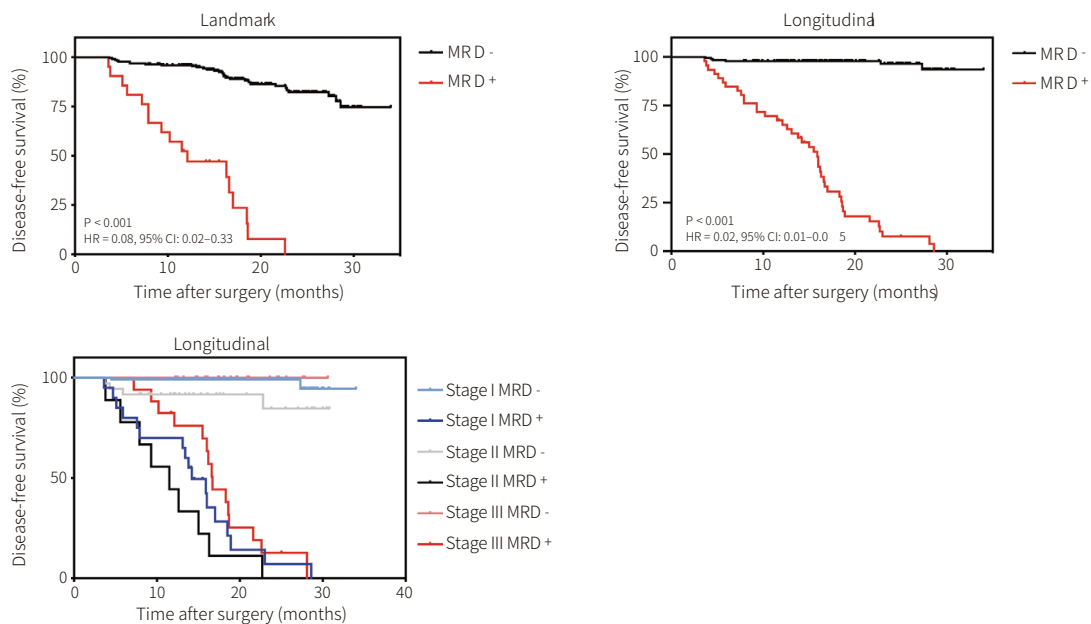


图2. 术后MRD持续阴性定义潜在治愈人群

仅供研究使用, 不适用于临床诊断

MRD检测能够为预测辅助治疗提供获益价值

相关结果表明，术后MRD检测阳性的患者，这部分人群接受辅助治疗对于改善DFS具有明显作用；反之，MRD结果为阴性的患者，不能从辅助治疗

中进行获益（图3）。这提示MRD阴性人群的肿瘤负荷极低（接近治愈），辅助治疗有可能是非必需的（图3）。MRD持续阴性的人群可以确定为潜在治愈人群，这部分人群的肿瘤负荷极低，很可能不需要辅助治疗（图3）。

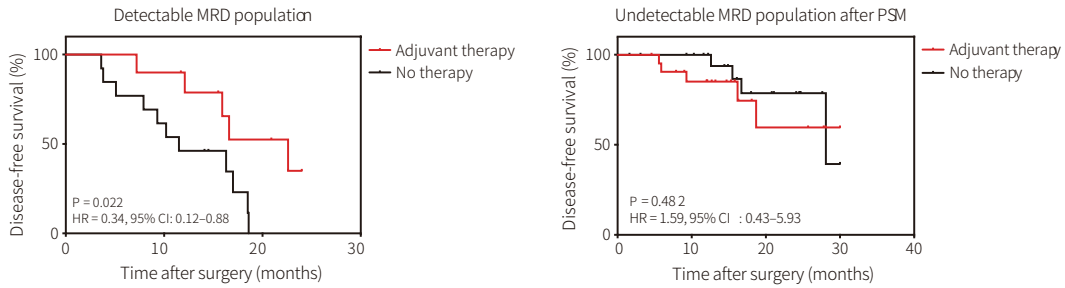


图3. 术后MRD阴性患者不能从辅助治疗中获益

肺癌MRD检测受Nonshedding肿瘤的影响

Nonshedding肿瘤指手术前ctDNA-MRD检测为阴性的情况，术前并未发现微小残留病灶，研究选取11例切除肺叶的1期患者，对其静脉残端血和外

周血的进行ctDNA检测，其中有6例患者样本，检测不到其静脉残端血和外周血中的ctDNA，结果表明Nonshedding肿瘤的必然存在性，存在多种因素影响ctDNA释放（图4）。

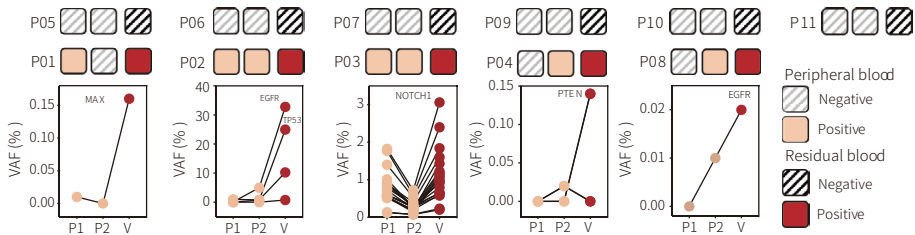


图4. 增加的11例I期患者两次外周血和静脉残端血的ctDNA检测结果比较

除此之外，对14例术前ctDNA阴性、术后复发的患者患者进行术后MRD检测，14例患者都能准确检测到MRD，因此得出结论术前ctDNA能否检测到不

影响术后MRD监测结果（图5）。同时该研究发现，影响MRD监测的重要原因是单纯脑转移的解剖学因素。

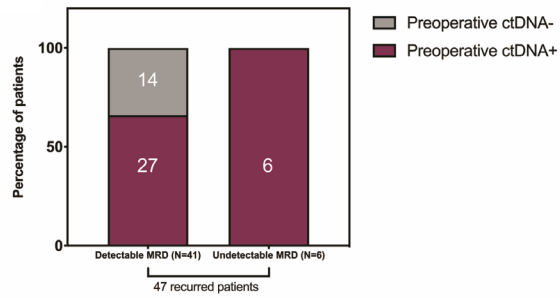


图5. 复发患者术后MRD监测与术前ctDNA检出的关系

总结

这项前瞻性研究基于华大智造DNBSEQ测序技术表明了ctDNA-MRD检测与肺癌患者临床结果之间具有显著的相关性。

华大智造的DNBSEQ测序平台持续助力癌症医学领域前沿研究。该研究将MRD检测持续阴性的人群定义为潜在治愈人群，探讨了MRD对辅助治疗的预测价值，表明辅助治疗对MRD检测持续阴性的患者是没有价值的，同时阐明术前Nonshedding肿瘤的存在不影响术后MRD监测。



DNBSEQ-T7RS基因测序仪

参考文献

1. Zhang, J. T. *et al.* Longitudinal Undetectable Molecular Residual Disease Defines Potentially Cured Population in Localized Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov* 12, 1690-1701, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1486 (2022).
2. Wang, B. *et al.* Prognostic potential of circulating tumor DNA detection at different time periods in resectable non-small cell lung cancer: Evidence from a meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 177, 103771, doi:10.1016/j.critrevonc.2022.103771 (2022).
3. Newman, A. M. *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20, 548-554, doi:10.1038/nm.3519 (2014).
4. Zviran, A. *et al.* Genome-wide cell-free DNA mutational integration enables ultra-sensitive cancer monitoring. *Nat Med* 26, 1114-1124, doi:10.1038/s41591-020-0915-3 (2020).
5. Newman, A. M. *et al.* Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* 34, 547-555, doi:10.1038/nbt.3520 (2016).
6. Chae, Y. K. & Oh, M. S. Detection of Minimal Residual Disease Using ctDNA in Lung Cancer: Current Evidence and Future Directions. *J Thorac Oncol* 14, 16-24, doi:10.1016/j.jtho.2018.09.022 (2019).
7. Xia, L. *et al.* Perioperative ctDNA-Based Molecular Residual Disease Detection for Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Multicenter Cohort Study (LUNGCA-1). *Clin Cancer Res* 28, 3308-3317, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-3044 (2022).
8. Pantel, K. & Alix-Panabieres, C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 409-424, doi:10.1038/s41571-019-0187-3 (2019).

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	基因测序仪DNBSEQ-T7RS	900-000236-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT生信分析加速器（工作站式服务器）	970-000085-00
	ZTRON Pro 一体机（T500）	900-000444-00
建库试剂	MGIEasy 通用文库转换试剂盒（App-A）（16RXN）	1000004155
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL PE100）	1000012554
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装(FCL PE100) V2.0	1000028455

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2023年5月版

撰稿：蓝英阁 刘芹秀

责任编辑：王其伟

审稿：江遥