

1079.

[23] ROGACKA D, AUDZEYENKA I, RYCHLOWSKI M, et al. Metformin overcomes high glucose-induced insulin resistance of podocytes by pleiotropic effects on SIRT1 and AMPK[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018,1864(1):115-125.

[24] HOU S, ZHANG T, LI Y, et al. Glycyrrhizic acid prevents diabetic nephropathy by activating AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling in db/db mice[J]. J Diabetes Res, 2017,2017:2865912.

[25] AZUSHIMA K, UNEDA K, WAKUI H, et al. Effects of rikkunshito on renal fibrosis and inflammation in angiotensin II-infused mice[J]. Sci Rep, 2019,9(1):6201.

[26] 李蕾芳,李芳华. 慢性肾脏病患者血清 Klotho 水平、微炎症状态、氧化应激指标与肾功能的关系[J]. 山东医药,

2018,58(34):68-70.

[27] GAO D, ZUO Z, TIAN J, et al. Activation of SIRT1 attenuates klotho deficiency-induced arterial stiffness and hypertension by enhancing AMP-activated protein kinase activity[J]. Hypertension, 2016,68(5):1191-1199.

[28] LIU X, YANG R, BAI W, et al. Exploring the role of orexin B-sirtuin 1-HIF-1 $\alpha$  in diabetes-mellitus induced vascular endothelial dysfunction and associated myocardial injury in rats[J]. Life Sci, 2020,254:117041.

[29] LIU S, ZHAO M, ZHOU Y, et al. Resveratrol exerts dose-dependent anti-fibrotic or pro-fibrotic effects in kidneys: a potential risk to individuals with impaired kidney function[J]. Phytomedicine, 2019,57:223-235.

(收稿日期:2020-09-02 修回日期:2021-05-17)

• 综 述 •

## 循环肿瘤 DNA 在恶性肿瘤早期诊断和预后的研究进展\*

蔡一丹<sup>1</sup>, 易帆<sup>2</sup>综述, 谢小兵<sup>3 $\Delta$</sup>  审核

1. 湖南中医药大学医学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南航天医院检验科, 湖南长沙 410205;

3. 湖南中医药大学第一附属医院检验与病理中心, 湖南长沙 410007

**摘要:**癌症是威胁人类健康的主要疾病之一。肿瘤的早发现和精准治疗是人类面临的世界性医学难题, 基于痕量、无创、实时快速检测技术, 检测患者循环肿瘤 DNA(ctDNA), 分析患者表观遗传学特点, 在分子水平为临床医生提供精细的分类及诊断, 可实现对患者提供个性化精准治疗的解决方案。近年来, 日益发展的各种基于血浆 ctDNA 的分子诊断技术可为恶性肿瘤的早期诊断、预后评估和用药指导提供有重要价值的生物标志, 为恶性肿瘤的临床精准治疗提供新的途径。

**关键词:**循环肿瘤 DNA; 恶性肿瘤; 第二代高通量测序; 磁珠捕获技术; 微滴式数字 PCR 技术

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.028 **中图法分类号:**R730.4

**文章编号:**1673-4130(2021)13-1649-05 **文献标志码:**A

### Progress of circulating-tumor DNA in early diagnosis and prognosis for the malignancy\*

CAI Yidan<sup>1</sup>, YI Fan<sup>2</sup>, XIE Xiaobing<sup>3 $\Delta$</sup>

1. Medical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Hunan Aerospace Hospital, Changsha, Hunan 410205,

China; 3. Department of Medical Laboratory and Pathology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

**Abstract:** Cancer is one of the main diseases threatening human health. Early detection and accurate treatment of tumor is a worldwide medical problem. Based on trace, non-invasive, real-time and rapid detection technology, we can detect the circulating tumor DNA (ctDNA) in the plasma of patients, analyze the epigenetics and clinical characteristics of patients, provide precise classification and diagnosis for clinicians at the molecular level, and realize the solution of personalized precise treatment for patients. In recent years, various molecular diagnostic techniques based on plasma ctDNA have provided important biomarkers for the early diagnosis, prognosis evaluation and medication guidance of malignant tumors, and provided a new approach for clinical precision treatment of malignant tumors.

\* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(2020JJ4481)。

$\Delta$  通信作者, E-mail: xxiaobing888@163.com。

本文引用格式:蔡一丹,易帆,谢小兵. 循环肿瘤 DNA 在恶性肿瘤早期诊断和预后的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(13):1649-

**Key words:** circulating tumor DNA; malignant tumor; next generation sequencing; BEAMing; droplet digital PCR

随着人们生活水平提高和寿命的延长,癌症成为威胁人类健康的主要疾病之一,肿瘤的检测和治疗也成为人类面临的世界性医学难题。已有的检测方法有的检出率较低,有的存在侵入性伤害,具有一定的局限性<sup>[1]</sup>。寻求一种非侵入性检测方法,对恶性肿瘤进行早期筛查、诊断以便早发现、早治疗,是研究人员一直不断努力的方向。循环肿瘤 DNA(ctDNA)分子检测作为新一代体液活检技术,由于具有微创、信息全、可重复性等优势,近年来受到肿瘤生物学和肿瘤临床医学工作者的重视。本文就近年来关于 ctDNA 的生物学特征、检测方法及在常见恶性肿瘤临床中的早期诊断、预后评估及用药指导方面的研究进展进行综述。

## 1 ctDNA 的发现和生物学特征

ctDNA 是肿瘤患者血液中游离的来自肿瘤细胞的 DNA。健康人体中均存在一类细胞游离 DNA(cfDNA),它们是可以存在于血液或其他体液中并游离于细胞之外。通常血液中的 cfDNA 主要由坏死和凋亡后的白细胞释放入血液中,在某些疾病(如心肌梗死、冠心病)及特殊状态下(如急性剧烈运动、妊娠),其他细胞也会释放 cfDNA 入血液。MANDEL 等<sup>[2]</sup>于 1948 年首次报道了健康个体外周血中存在 cfDNA。LEON 等<sup>[3]</sup>1977 年发现肿瘤患者血清中 cfDNA 的水平显著升高。10 多年后,VASIOUKHIN 等<sup>[4]</sup>和 SORENSON 等<sup>[5]</sup>相继在急性髓性淋巴瘤、骨髓增生异常综合征和胰腺癌患者外周血 cfDNA 中发现了 ras 基因的突变,科学工作者将从肿瘤细胞脱落释放入体液中的一类 cfDNA 称为 ctDNA。有研究发现,肿瘤患者无论其处于肿瘤进展的哪个阶段、何种类型的实体瘤均存在 ctDNA 水平的显著升高,并证实随着肿瘤的进展,ctDNA 的水平不断升高<sup>[6-7]</sup>。然而,ctDNA 释放到血液中是随机过程还是经过某种特定生物学程序加工后再释放,仍是肿瘤生物学中一个有争论的课题<sup>[8]</sup>。

ctDNA 中常包含有突变、缺失、插入、重排、拷贝数异常及甲基化等相关 DNA 突变信息<sup>[9]</sup>。ctDNA 片段一般为 166 bp 的核酸序列,其半衰期为 16 min 至 2 h 不等。由于血浆中存在核酸酶,单独以 DNA 形式存在的 ctDNA 片段大多易被降解,ctDNA 大多以 DNA 和蛋白质结合形成 DNA-蛋白质复合体的形式存在。健康人体在免疫系统特别是巨噬细胞的吞噬和溶酶体的清除作用下,血液中的 ctDNA 水平较低。肿瘤患者 ctDNA 水平显著升高,一方面机体肿瘤细胞在以指数方式倍增,肿瘤细胞的代谢、凋亡和坏死的量及释放进入血液的循环肿瘤细胞也以同样的方式倍增,循环肿瘤细胞播散及坏死释放的 DNA

超出了机体正常的清除能力;另一方面,肿瘤患者机体免疫系统的功能大多异常,导致肿瘤患者血液 ctDNA 显著升高。有研究表明,健康人血液中 cfDNA 水平多为 1~100  $\mu\text{g/L}$ ,而肿瘤患者血液中 ctDNA 浓度可达 1 000  $\mu\text{g/L}$ ,平均为 180  $\mu\text{g/L}$ <sup>[10]</sup>。

## 2 ctDNA 的检测方法

肿瘤是一种由于体细胞的基因异常产生的病变,这些突变的体细胞 DNA,只存在于癌前细胞或癌细胞基因组中,同一机体的其他正常细胞基因组则不会出现,这保证了 ctDNA 能以特有的生物特异性成为肿瘤诊断的生物标志物。因此,理论上所有用于鉴定体细胞 DNA 变异的分子生物学技术都可以用于 ctDNA 的检测。然而,由于体液中 ctDNA 水平非常低,通常 ctDNA 只有 cfDNA 的 0.01%~1.00%,常规基因测序技术如 Sanger 法、焦磷酸测序只能用于高负荷肿瘤检测或是高丰度 ctDNA 突变片段分析,使其推广和临床应用受到了极大限制。近年来,随着 DNA 测序技术和分子诊断技术的快速发展,对痕量 DNA 分子进行定量分析已经有了多种选择。当前常用的可用于 ctDNA 检测和分析技术有第二代的高通量测序法(NGS)、磁珠捕获法(BEAMing)<sup>[11]</sup>、微滴式数字 PCR 技术<sup>[12]</sup>(ddPCR)、低温变性下复合 PCR 技术(cold-PCR)<sup>[13]</sup>。

**2.1 NGS** NGS 技术具有通量高、检测速度快、成本较低等优点,被广泛应用于各种体液标本 DNA 的分析。NGS 主要包括 DNA 连接,DNA 文库构建,克隆模板扩增和大规模平行测序。NGS 平台可执行大规模的 DNA 并行测序,以实现来自样品的数百万个 DNA 片段进行统一测序和对未知突变的筛查,并分析基因的遗传多态性。NGS 技术的应用主要有两个:一是进行基因组靶序列捕获测序,设计合适的芯片探针,可实现对一个或多个已知致病基因进行测序;二是进行全外显子组测序或全基因组测序,前者可用于研究基因组的蛋白编码区域,从而揭示对疾病和群体健康的遗传影响,后者可对不同个体或者是群体进行全基因组序列分析和生物信息学分析,可全面挖掘基因组的各类变异<sup>[14]</sup>。

**2.2 BEAMing** BEAMing 技术是利用磁珠来吸附游离 DNA,其探针是一条序列已知的单链固定在固相(芯片、微珠)表面,另一条样品中的单链来与其杂交配对。它可以从数万个正常细胞 DNA 中检测出有基因突变的 ctDNA 分子。GARCIA 等<sup>[15]</sup>对 183 例已知 EGFR 突变的非小细胞肺癌患者,分别采用 BEAMing 和 NGS 方法检测患者 ctDNA 中 T790M EGFR 基因突变,检测阳性率分别为 21.8% 和 10.9%。

**2.3 ddPCR** ddPCR 技术是先将 DNA 链模板稀释到单个模板分子并分配到大量独立的反应单元中,即先对标本微滴化处理,再进行 PCR 扩增,扩增结束后对每个独立反应室荧光信号进行统计学分析,最后定量 DNA 拷贝数。ddPCR 不依赖扩增的循环阈值(Ct),不需内参和标准曲线,具有准确度高、重现性好和绝对定量分析等优点<sup>[16]</sup>。ddPCR 和优化的 NGS 在 ctDNA 分析中也各有优缺点。与 NGS 相比,ddPCR 实验更容易建立,速度更快,敏感度更高,分析不需要复杂的信息学支持。BETTEGOWDA 等<sup>[17]</sup>报道,采用 ddPCR 技术,超过 80% 的晚期结直肠癌、黑色素瘤和胰腺癌患者中可以检测到血浆 ctDNA 中与癌症相关的热点基因突变。与此类似,VESSIES 等<sup>[18]</sup>也在黑色素瘤、结直肠癌、肺癌和胰腺癌中检测到血浆 ctDNA 中相关基因的突变。

**2.4 cold-PCR** cold-PCR 技术是在高丰度野生型 DNA 片段背景下选择性变性并扩增低丰度突变型 DNA 片段序列的方法,cold-PCR 技术可将突变型序列富集 10~100 倍。基于突变片段 T<sub>m</sub> 值的改变和异源双链 DNA 分子的形成,cold-PCR 可富集扩增片段中所有类型和位置的突变,也可富集未知突变,具有敏感高、特异性强、精确度高、低成本和易操作等优点<sup>[19-20]</sup>。SEFRIQUI 等<sup>[21]</sup>采用 ddPCR 技术和 cold-PCR 技术定量分析了 29 例结直肠癌患者血清 ctDNA 中 Kras 基因突变,发现 cold-PCR 可以准确地检测和量化 ctDNA 的低丰度基因突变,在保证定量分析准确性的前提下可快速得出分析结果。

### 3 ctDNA 在恶性肿瘤临床应用中的进展

由于 ctDNA 中包含患者肿瘤的全部遗传学信息,利用 ctDNA 做为肿瘤标志物,分析其突变、缺失、插入、倒位及甲基化等表观遗传学改变,在肿瘤的早期筛查、预后以及用药指导等各方面可以发挥重要作用。

**3.1 ctDNA 作为恶性肿瘤早期诊断的生物标志** 近年来,关于疾病生物标志物的研究一直是临床医学研究的热点、重点和难点。特别是精准医疗的概念提出后,肿瘤生物标志物相关研究计划被列入了国家“973”计划、国家重点研发计划、科技部重大专项计划等<sup>[22]</sup>。这些生物标志物是疾病复发、进展或预后评估中的指示因子。来自肿瘤的 ctDNA 能在一定程度上代表肿瘤的整体基因组格局,并且可以用作液体活检来分析肿瘤特异性遗传和表观遗传学改变,包括癌基因或抑癌基因的突变、甲基化及基因扩增等。在过去的几年中,ctDNA 作为有效且可靠的生物标志,在对特定患者进行分型,指导临床早期诊断和治疗及预后的评估中发挥了关键作用。利用 ctDNA 生物标志,早期检测特定类型癌症的表观遗传学异常,如癌基因或者抑癌基因中启动子的低甲基化,可以为肿瘤生物学研究和临床治疗提供重要信息。多项研究表明,在

肝癌患者外周血 ctDNA 中,常见 TP53<sup>[23]</sup>、ITH<sup>[24]</sup>、HCK<sup>[25]</sup> 和 TNNB1<sup>[26]</sup> 存在特异性突变,提示可以检测患者外周血 ctDNA 来早期诊断肝细胞癌变。GORMALLY 等<sup>[27]</sup>报道了检测血浆 ctDNA,最早可以提前 2 年发现健康受试者的 Kras 基因突变,提前在癌症诊断之前的 20.8 个月发现健康患者 TP53 的突变。早期肿瘤或肿瘤微转移的晚期患者虽然血浆中只含有较低丰度的 ctDNA 片段,但是随着 DNA 检测技术的不断进步,对痕量 DNA 定量定性分析也成为可能<sup>[28]</sup>。

**3.2 ctDNA 在恶性肿瘤预后评估中的作用** 临床医生根据影像和组织标本检测中得到的信息,结合临床观察、肿瘤进展分期、组织病理学改变和生物分子特征等可以对不同癌症患者的预后进行评估。当组织切片不易获得(如非实体瘤),或者保存的组织切片基因分析遇到困难,利用患者血液检测 ctDNA 的重要性就得到显现。BETTEGOWDA 等<sup>[17]</sup>的研究表明,ctDNA 可在超过 75% 的非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌、肝癌及头颈癌中检测到。已有研究证明,ctDNA 具有一系列与肿瘤相关的分子生物学特征:ras 基因及 TP53 基因的突变,p14、p16、APC 基因过甲基化,等位基因杂合性缺失(LOH)及 mtDNA 改变等现象<sup>[29]</sup>。非小细胞肺癌(NSCLC)患者中,大约 1/3 都有 Kras 基因突变,GAUTSCHI 等<sup>[30]</sup>研究了 180 例肺癌患者 ctDNA 发现 Kras 突变与患者预后不良有关。PARKINSON 等<sup>[31]</sup>对 40 例恶性复发性高级别浆液性卵巢癌患者 TP53 基因 ctDNA 突变情况分析,显示在化疗 1 个疗程后,TP53 突变等位基因分数下降 >60% 的患者有更长的无复发生存期。MORIKAWA 等<sup>[32]</sup>对卵巢透明细胞癌患者血浆 PIK3CA 和 Kras 基因 ctDNA 检测结果显示,细胞高水平 PIK3CA-H1047R 或 KRAS-G12D 的 ctDNA 患者有更短的生存期。一系列的研究表明,胰腺癌患者血浆 ctDNA 含有 Kras 基因突变并且 Kras 基因的突变可以用来监测胰腺癌的发展<sup>[33-34]</sup>。DABRITZ 等<sup>[35]</sup>检测了 56 例胰导管腺癌患者及 13 例胰腺炎患者血浆 ctDNA 中 Kras 基因突变,胰导管腺癌中检测到 20 例患者的 Kras 基因有突变,而在胰腺炎患者中均无 Kras 基因的突变。在结肠直肠癌的研究方面,TROJAN 等<sup>[36]</sup>比较了 37 例结直肠癌患者血液 ctDNA 中 Kras 基因突变及 CDKN2A 启动子的超甲基化情况,发现 Kras 基因有突变和(或)CDKN2A 启动子有超甲基化的患者,其 2 年生存率为 48%,而二者没有发生改变的患者,其 2 年生存率为 100%。

**3.3 ctDNA 在恶性肿瘤治疗中用药指导作用** 近年来,肿瘤药物在传统的放疗、化疗的药物基础上呈现多样化、个性化和精准化的趋势,选择安全、疗效可靠的药物是肿瘤临床治疗面临的重要挑战。作为一种生物标志,患者外周血中 ctDNA 水平及不同类型肿

瘤相关基因的变异特征都能有效反映肿瘤的变化, ctDNA 检测在肿瘤手术治疗或者药物治疗后疗效评估中显示出了其诱人的应用潜力。

有研究表明,晚期结直肠癌患者 ctDNA 检测分析能反映肿瘤进展状况及术后预后评估,也能指导靶向药物的治疗方案及寻找耐药发生机制,通过检测 Kras 基因野生型和突变型来研究晚期结肠癌 EGFR 阻断剂耐药突变的出现<sup>[37]</sup>,对可能产生的耐药位点基因突变进行检测,并追踪耐药突变基因。BETTE-GOWDA 等<sup>[17]</sup>对晚期结肠癌患者 Kras、BRAF、NRAS、EGFR 和 PIK3CA 的所有外显子进行分析,发现 96% 的晚期结肠癌患者的 Kras 或 NRAS 基因至少一个有突变。可见血浆 ctDNA 检测对卵巢癌患者药物选择及药物耐药的预测能起到临床用药指导作用。

#### 4 基于 ctDNA 检测的肿瘤精准医疗在临床应用中存在的问题和未来发展趋势

##### 4.1 ctDNA 检测在肿瘤临床应用中存在的问题

**4.1.1** 研究的样本量有限,限制了 ctDNA 在临床的广泛应用 尽管已有研究显示,血浆 ctDNA 与恶性肿瘤组织基因突变有高度一致性,但目前的研究大多处于实验室研究阶段,研究的样本量较少,因此在恶性肿瘤患者中,血浆 ctDNA 检测能否完全取代肿瘤组织的基因检测从而进一步指导临床诊断、治疗和用药仍需进一步的、前瞻性的临床研究证实。

**4.1.2** 检测方法和观察指标的稳定性、标准化还需要进一步提高 目前血浆 ctDNA 检测方法有多种实验技术,各种恶性肿瘤血浆 ctDNA 检测观察指标不一,各种监测技术及观察指标如何更加敏感、稳定、标准化地应用于评估肿瘤发生、发展的进程,仍需大规模、大样本的临床研究验证。

##### 4.2 ctDNA 检测技术在肿瘤临床应用中的发展趋势

随着肿瘤生物学、分子生物学及基因工程技术研究的不断深入,以及转化医学的迅速发展,ctDNA 在恶性肿瘤诊疗过程中的作用将不断受到重视。ctDNA 检测的快速、简便、经济、侵害性小、实时动态佳等优势受到越来越多的科研工作者和临床医学工作者的关注。基于肿瘤患者血液 ctDNA 的监测策略将更全面、动态地反映肿瘤进展的演变过程,显示肿瘤在早期诊断、预后、临床用药指导的价值。人类基因检测技术的发展为肿瘤精准医疗提供了技术支撑。目前,基于 NGS、BEAMing、ddPCR 及 cold-PCR 技术等基因测量技术的发展,对基因的表达分析和检测更加精准,为肿瘤的分型和精准治疗提供了技术援助,随着这些检测技术的进步和更新,检测成本的不断降低,对肿瘤精准治疗的实施将成为现实。

#### 参考文献

[1] LEVY I, GRALNEK I M. Complications of diagnostic

colonoscopy, upper endoscopy, and enteroscopy[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2016, 30(5): 705-718.

- [2] MANDEL P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme[J]. *CR Seances Soc Biol Fil*, 1948, 142: 241-243.
- [3] LEON S A, SHAPIRO B, SKLAROFF D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res*, 1977, 37: 646-650.
- [4] VASIOUKHIN V, ANKER P, MAURICE P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 1994, 86(4): 774-779.
- [5] SORENSON G D, PRIBISH D M, VALONE F H, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single copy genes in human blood[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994, 3(1): 67-71.
- [6] MADHAVAN D, WALLWIENER M, BENTS K, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 146: 163-174.
- [7] FRACKLER MJ, LOPEZ BUJANDA Z, UMBRICH C, et al. Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74: 2160-2170.
- [8] ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(5): 479-491.
- [9] AMATU A, SCHIRRIPA M, TOSI F, et al. High circulating methylated DNA is a negative predictive and prognostic marker in metastatic colorectal cancer Patients treated with regorafenib[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 622.
- [10] HABER D A, VELCULESCU V E. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(6): 650-661.
- [11] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-990.
- [12] KOŠIR A B, DIVIETO C, PAVŠIĆ J, et al. Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(28): 6689-6697.
- [13] LIU P, LIANG H, XUE L, et al. Potential clinical significance of plasma-based KRAS mutation analysis using the COLD-PCR/TaqMan(R)-MGB probe genotyping method[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(1): 109-112.
- [14] MORGANTI S, TARANTINO P, FERRARO E, et al. Next generation sequencing (NGS): a revolutionary technology in pharmacogenomics and personalized medicine in cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1168: 9-30.
- [15] GARCIA J, WOZNY A S, GEIGUER F, et al. Profiling of circulating tumor DNA in plasma of non-small cell lung cancer patients, monitoring of epidermal growth factor re-

- ceptor p. T790M mutated allelic fraction using beads, emulsion, amplification, and magnetics companion assay and evaluation in future application in mimicking circulating tumor cells[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(8):3685-3697.
- [16] 李春勇. 数字 PCR 技术原理及应用[J]. *生物技术世界*, 2014(11):10-13.
- [17] BETTEGOWDA C, SAUSEN M, LEARY R J, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224ra24.
- [18] VESSIES D C L, GREUTER M J E, VAN ROOIJEN K L, et al. Performance of four platforms for KRAS mutation detection in plasma cell-free DNA: ddPCR, Idylla, COBAS z480 and BEAMing[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):8122.
- [19] 梁卉, 陈国杰, 于燕, 等. 低温变性下复合 PCR 技术及其应用[J]. *遗传*, 2018, 40(3):227-236.
- [20] MAUGER F, HOW-KIT A, TOST J. COLD-PCR technologies in the area of personalized medicine: methodology and applications[J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21(3):269-283.
- [21] SEFRIQUI D, MAUGER F, LECLERE L, et al. Comparison of the quantification of KRAS mutations by digital PCR and E-ice-COLD-PCR in circulating-cell-free DNA from metastatic colorectal cancer patients[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 465:1-4.
- [22] 王红阳. 精准医疗时代的肿瘤生物标志物发展[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2018, 56(10):1-2.
- [23] YU L, LIU X, HAN C, et al. XRCC1 rs25487 genetic variant and TP53 mutation at codon 249 predict clinical outcomes of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a cohort study for 10 years' follow up[J]. *Hepatol Res*, 2016, 46(8):765-774.
- [24] HUANG A, ZHAO X, YANG X R, et al. Circumventing intratumoral heterogeneity to identify potential therapeutic targets in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2):293-301.
- [25] CAI Z X, CHEN G, ZENG Y Y, et al. Circulating tumor DNA profiling reveals clonal evolution and real-time disease progression in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(5):977-985.
- [26] HUANG A, ZHANG X, ZHOU S L, et al. Detecting circulating tumor DNA in hepatocellular carcinoma patients using droplet digital PCR is feasible and reflects intratumoral heterogeneity[J]. *J Cancer*, 2016, 7(13):1907-1914.
- [27] GORMALLY E, VINEIS P, MATULLO G, et al. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13):6871-6876.
- [28] LIM M, KIM C J, SUNKARA V, et al. Liquid biopsy in lung cancer: clinical applications of circulating biomarkers (CTCs and ctDNA)[J]. *Micromachines (Basel)*, 2018, 9(3):100.
- [29] PANAGOPOULOU M, KARAGLANI M, BALGKOURANIDOU I, et al. Circulating cell-free DNA in breast cancer: size profiling, levels, and methylation patterns lead to prognostic and predictive classifiers[J]. *Oncogene*, 2019, 38(18):3387-3401.
- [30] GAUTSCHI O, HUEGLI B, ZIEGLER A, et al. Origin and prognostic value of circulation KRAS mutations in lung cancer patients[J]. *Cancer Lett*, 2007, 254:265-273.
- [31] PARKINSON C A, GALE D, PISKORZ A M, et al. Exploratory analysis of TP53 mutations in circulating tumour DNA as biomarkers of treatment response for patients with relapsed high-grade serous ovarian carcinoma: a retrospective study[J]. *PLoS Med*, 2016, 13(12):e1002198.
- [32] MORIKAWA A, HAYASHI T, SHIMIZU N, et al. PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(20):15266-15274.
- [33] LOFT M, LEE B, TIE J, et al. Clinical applications of circulating tumor DNA in pancreatic adenocarcinoma[J]. *J Pers Med*, 2019, 9(3):37.
- [34] CHEN H, TU H, MENG Z Q, et al. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36(7):657-662.
- [35] DÄBRITZ J, PRESTON R, HÄNFLER J, et al. Follow-up study of K-ras mutations in the plasma of patients with pancreatic cancer: correlation with clinical features and carbohydrate antigen 19-9[J]. *Pancreas*, 2009, 38(5):534-541.
- [36] TROJAN J, KLEIN-SCORY S, KOCH C, et al. Clinical application of liquid biopsy in targeted therapy of metastatic colorectal cancer[J]. *Case Rep Oncol Med*, 2017, 2017:6139634.
- [37] PIETRANTONIO F, VERNIERI C, SIRAVEGNA G, et al. Heterogeneity of acquired resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(10):2414-2422.