

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-01-035

· 综述 ·
· REVIEW ·

数字 PCR 技术在体液中检测恶性肿瘤的研究进展^①

高聪聪^②, 曾思恩^③

(桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001)

摘要 恶性肿瘤的诊断与治疗已经日渐趋向个体化医疗阶段, 要求临床工作者对恶性肿瘤多变的生长进化过程和复杂的内部分子结构以及耐药的产生要有综合全面的把握。基于体液检测的数字 PCR 技术, 因为其取材方便, 可有效规避组织活检带来的有创损伤以及较高的检测灵敏度和特异性, 所以能够在体液样本中检测到恶性肿瘤的相关基因, 有望成为恶性肿瘤分子检测的可靠工具之一。本文就数字 PCR 技术在体液中检测恶性肿瘤的研究进行综述。

关键词: 体液检测; 数字 PCR; 肺癌; 结直肠癌; 乳腺癌

中图分类号: R730.43

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)01-0171-07

Research progress of digital PCR technology in the detection of malignant tumors in body fluids^①

GAO Congcong^②, ZENG Si'en^③

(The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

Abstract The diagnosis and treatment of malignant tumors have been moving towards the stage of individualized medicine, which requires clinical workers to have a comprehensive grasp of the variable growth and evolution process of malignant tumors, the complex internal molecular structure and the generation of drug resistance. Digital PCR technology based on body fluids detection is expected to become one of the reliable tools for molecular detection of malignant tumors because of its convenient sampling, effective avoidance of invasive damage caused by tissue biopsy and high detection sensitivity and specificity. Therefore, it can detect malignant tumor related genes in body fluid samples. This article mainly reviews the researches on the detection of malignant tumors in body fluids by digital PCR technology.

Keywords: body fluids detection; digital PCR; lung cancer; colorectal cancer; breast cancer

① 基金项目: 桂林医学院硕士研究生科研项目(GYYK2022018)。

② 第一作者简介: 高聪聪, 硕士研究生在读, 研究方向为数字 PCR。

③ 通信作者: 曾思恩, E-mail: zse@glmc.edu.cn。

恶性肿瘤目前仍是人类死亡的主要病因之一,多种癌由于起病隐匿、病程发展较快,在诊疗过程中存在诸多困难,给患者及社会带来了沉重负担,所以对于恶性肿瘤患者,早期发现并选择有效的治疗方法显得尤为重要。靶向治疗是目前恶性肿瘤的主要治疗手段之一,对于延长患者生命,减轻患者痛苦具有重要作用。但由于恶性肿瘤异质性的存在,所以靶向药物的临床适用性有所差别,选择一种合适的检测方式来识别恶性肿瘤特异性对于靶向用药具有重要作用。但恶性肿瘤的形成过程多变,随着时间的推移,恶性肿瘤自身的基因状态也可能出现变化,因此恶性肿瘤的诊断、治疗也需要相应做出调整。恶性肿瘤克隆进化的纵向检测对于精准医疗具有重要作用。但目前临床普遍应用的组织活检方式属有创取材,存在异质性问题无法实现对恶性肿瘤的动态监测,作为替代补充方法的体液检测,因其样本无创(微创)、方便快捷,逐步在恶性肿瘤的诊断、疗效监测等领域获得认可。基于体液检测逐步兴起的数字 PCR 技术因拥有高度的灵敏性和特异度,并且区别于第一、第二代 PCR 技术,能够实现绝对定量,在体液的基因检测中凸显优势,能准确检出外周血及其他体液样本(尿液、脑脊液、肺泡灌洗液等)中微量基因的突变及甲基化,为恶性肿瘤的筛查、病程监测和确诊后的靶向用药指导提供了强有力的技术支持。

1 体液检测的数字 PCR 技术

目前,组织活检切片检查依旧是恶性肿瘤检测的金标准,但由于组织取样存在较多局限性,例如恶性肿瘤内的异质性、因解剖位置难以取样、取样过程存在污染、患者自身状况不能承受取样等^[1],因而选取组织外的样本进行恶性肿瘤的动态监测显得尤为重要。利用血液中恶性肿瘤 DNA 片段作为恶性肿瘤基因的替代来源,产生了一种称为“液体活检法”^[2],研究表明^[3],液体活组织检测在确定患者的基因特征、监测治疗反应、量化最小残留疾病以及评估耐药性等方面具有很大潜力,其中对细胞游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 的定量分析对恶性肿瘤的诊断具有重要意义。所有的恶性肿瘤细胞都释放

自身 DNA 到外周体液当中,由此可检测恶性肿瘤内的异质性状态^[4]。恶性肿瘤患者中的 cfDNA 含量明显高于正常人和良性病变患者,并且随恶性肿瘤分期的增高而增加,其含量可能与恶性肿瘤体积有着密切关联^[5]。进行胃癌患者术前术后 cfDNA 定量分析,结果显示术后 24 h 的 cfDNA 含量显著降低,提示 cfDNA 可作为胃癌术后评估的一项重要指标。

体液检测的标本来源丰富,并不局限于血液样本,尿液、脑脊液、唾液、肺泡灌洗液等均可作为体液检测的可靠标本。不同的体液中检测出的 cfDNA 丰度存在明显差别,这对不同恶性肿瘤的定位信息具有一定的作用^[6-7]。所以对于早期恶性肿瘤的检测,评估治疗效率与确定恶性肿瘤复发增加的风险,体液检测具有重要意义。然而,体液检测对 cfDNA 进行定量分析过程却存在较多困难,因为 cfDNA 水平也与怀孕、非恶性肿瘤病理过程(糖尿病、炎症、感染等)或组织损伤(剧烈运动或损伤)有关^[8-9],并且 cfDNA 在体内排出物中呈现高度碎片化,这致使它在血液中的半衰期较短(约 114 min),或循环过程中存在稀释,使浓度偏低,影响了其检测效果。因此,选择一种高灵敏度的检测方法,对体液中的微量 cfDNA 实现准确检测显得尤为重要。

目前,体液检测应用最为广泛的为定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 技术和下一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术,但两种技术都存在不足,qPCR 技术虽然具有相对简单的操作流程,但是由于其结果的判读需要依赖标准曲线,易受环境以及反应抑制剂的影响,且对于目的片段突变频率普遍偏低的体液检测,无法实现准确检出。NGS 技术虽然其灵敏度达到 0.1%^[10],基本满足应用的要求,但是由于其成本高昂,操作复杂,对样本纯度以及技术要求较高,难以实现推广普及。在此两者基础上优化发展起来的数字 PCR 技术作为一种新的检测技术,同时具备高灵敏性和特异度,且相对经济高效,成为临床基因检测的一项新选择。

数字 PCR 技术在 20 世纪 90 年代就通过限制稀释 PCR 的方式被提及^[11],由于经济和技术的限制,阻碍了其发展,数字 PCR 概念直到 1999 年才被提出^[12]。但其发展过程也遇到了众多瓶颈,最主要的

是对样本进行分散的技术要求高。近年随着微纳制造技术及微流控技术的发展,使得数字 PCR 技术在生物技术与医学领域得以快速发展与普及,多重数字 PCR 不仅可检测多个靶点,而且还可降低检测成本,满足经济高效检测的临床需求,因而获得广泛关注^[13]。

数字 PCR 技术是在传统 PCR 技术上的一次革新,最大的突破在于数字 PCR 技术不再依赖标准曲线,而是通过检测终点荧光信号实现绝对定量。在传统的 qPCR 反应体系中,DNA 分子混合物中若目的片段浓度偏低,野生型信号太过于强大,会导致稀有突变难以检出,结果不准确。数字 PCR 技术的创新就巧妙地规避了这一弊端,由于其内部存在数以万计的独立单元格,在扩增之前把样本充分分散到独立的单元格中,确保每个单元格中有一个或有限数量的 DNA 分子进行独立反应^[14]。由于每个单元格中的荧光信号有限,野生型与突变型信号的竞争就会大幅下降,可以更加准确地收集到稀有突变信号,最后再对所有单元格中的荧光信号进行富集,利用单元格中阳性信号与总单元格信号之间的比例,应用泊松校正来估计目标浓度,在不依赖标准曲线的基础上实现对目标分子的绝对定量^[15]。数字 PCR 技术是检测稀有突变的一种强有力工具,也可用于检测核酸绝对定量、拷贝数变异分析、DNA 甲基化和不同类型临床样本中的基因重排^[16],也广泛应用于恶性肿瘤学、传染病、环境监测、产前诊断、器官移植等领域。

2 数字 PCR 技术在体液中检测恶性肿瘤

2.1 数字 PCR 技术在体液中检测肺部恶性肿瘤

肺癌是我国发病率位居首位的恶性肿瘤^[17],在众多的肺癌病例中,半数以上为非小细胞型肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)^[18],多因其发病隐匿,确诊时已为晚期,预后较差,早发现早治疗是最有效的处理方式。在精准化个体医疗的时代背景下,对非小细胞型肺癌患者进行基因检测有助于更准确地诊断和后期指导用药,数字 PCR 技术在其中有重要作用,在早期肺癌的筛查过程中,数字 PCR 技术检测稀有突变的优势得以体现。有研究^[19]发

现,微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)和扩增阻滞突变系统多聚链酶式扩增(amplification refractory mutation system PCR, ARMS-PCR)对晚期肺癌患者 cfDNA 中 EGFR 突变的检测具有较高的特异性和敏感性,但根据恶性肿瘤分期的分层分析,ddPCR 的敏感性在早期可能比 ARMS-PCR 高,可能是由于两种方法检测限不同的原因,在血浆中检测到 ARMS-PCR 的敏感性为 0.1%,而 ddPCR 的敏感性为 0.01%^[3,20-22]。体现了数字 PCR 技术灵敏度高的特点,优于其他技术手段在早期实施非侵入性动态监测,判断恶性肿瘤的状况。

靶向用药是目前非小细胞型肺癌的有效治疗方式之一,对于非小细胞型肺癌的主要靶向用药策略是应用表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI),但研究表明 EGFR 突变严重影响靶向用药的效果,因为当 EGFR 活性域发生 2 次点突变时,会使患者产生获得性耐药,其中 T790M 突变会引起对第一代和第二代 TKIs 的 50%~60% 的耐药性^[23-24]。因此,有必要在晚期非小细胞型肺癌患者的治疗和监测过程中关注 EGFR 突变。为了解 EGFR 突变的临床意义,分析了 122 例接受 EGFR TKIs 治疗的新诊断的无进展患者的生存率(progression-free survival, PFS)^[25],结果表明,应用数字 PCR 技术检测组织和 cfDNA 中的 EGFR 突变状态与 TKIs 的临床反应有关。对于那些无法获得足够恶性肿瘤组织样本的患者,通过 ddPCR 进行基于血浆 cfDNA 的 EGFR 突变分析是一种潜在的替代方法。随着数字 PCR 技术对非小细胞型肺癌外周血 EGFR 研究的不断深入,对其灵敏度与特异性也逐渐了解,Wei 等^[26]研究结果显示,T790M 的检测敏感性达到了 0.005%,这与 Oxnard 等^[22]研究基本吻合。对于影响因素较多的临床样本,数字 PCR 技术也显示出较好的一致性。有研究^[25]发现,以组织 ARMS-PCR 为对照标准运用 ddPCR 对 EGFR 突变位点进行检测,结果显示 E746-A750del 的临床敏感性和特异性分别为 62.5% 和 100%,对 L858R 的临床敏感性和特异性分别为 75.0% 和 94.2%。说明 ddPCR 在检测肺癌 EGFR 突变方面的优势,表明数字 PCR 技

术在检测肺癌患者外周血 EGFR 突变中具有较大的临床应用前景。

2.2 数字 PCR 技术在体液中检测结直肠恶性肿瘤

结直肠癌由于其发病部位特殊,易与其他常见病混淆,不易察觉,发现时多为晚期或已转移。最新研究显示,结直肠癌已成为继肺癌、乳腺癌后第 3 位高死亡率癌^[27],引起临床及社会高度关注。运用数字 PCR 技术进行基因检测是临床个体化医疗下的精准检测手段,但由于结直肠癌是多种突变累积引起的,这促使数字 PCR 技术检测位点越来越多元化,可从同一样本中筛选出多个突变,是目前多种分子检测难以实现的。Taly 等^[28]利用多重数字 PCR 技术从转移性结直肠癌患者的血浆样本中筛选出鼠类肉瘤病毒癌基因(kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS)致癌基因密码子 12 和 13 中的 7 个最常见突变。对 50 例已经进行恶性肿瘤组织活检患者的血浆再进行检测,结果显示恶性肿瘤患者有 KRAS 突变。从这些样本中提取血浆 DNA 进行多重 ddPCR 分析,发现 14 个样本与恶性肿瘤组织中发现的突变相匹配,1 个样本包含不同的 KRAS 突变,4 个样本未检测到突变。并且在组织中未检测到突变的野生型基因,用于数字 PCR 技术检测的血浆样本却意外发现了 2 个 KRAS 突变。说明多重 dPCR 在同时筛查多个突变方面的临床应用,其敏感性足以检测通过无创外周血获得的循环 DNA 中的突变,使结直肠癌患者能够早期接受精确的个体化诊疗。Sato 等^[29]应用多重数字 dPCR 技术检测结直肠癌的 KRAS 突变,发现具有良好的敏感性和特异性,并且与档案标本常规临床突变检测结果也有较好的一致性。最近的一项研究展示了数字 PCR 技术在结直肠癌中的另一项应用^[30],进行甲基化的量化监测,采用液滴数字 PCR 技术分析不同基因在结直肠癌患者不同阶段的高甲基化情况,以确定后期对患者的随访标记物,结果显示 80% 的转移性结直肠癌和 45% 局限性结直肠癌患者中均检测到 cfDNA 的甲基化表象,表明可用数字 PCR 技术进行无创检测 cfDNA 中的甲基化替代结直肠癌患者的随访代替物。

随着对结直肠癌检测技术的发展,临床对数字

PCR 技术的了解不断加深,不久的将来数字 PCR 技术有望在结直肠癌的诊断中发挥重要作用。

2.3 数字 PCR 技术在体液中检测乳腺恶性肿瘤

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,呈逐年上升的趋势,死亡率已超过肺癌位居首位^[27,31-32]。近几年,随着医疗事业的发展,以及对乳腺癌的关注,其预后有所改善,但依旧无法避免乳腺癌易发生复发和转移造成的严重后果。乳腺癌患者的自身存在较大异质性,同一组织学类型的恶性肿瘤表现出不同的形态学和生物学特征,因此会产生不同的临床行为和治疗反应^[33]。但仅仅依赖病理诊断和标记物的检测难以实现对乳腺癌的诊断。目前新兴的数字 PCR 技术有助于从基因层面检测乳腺癌的风险,为患者提供新的诊疗策略。

雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) 基因的突变激活在 70% 的欧美国家乳腺癌患者中可检测出阳性,并驱动常规内分泌治疗产生耐药性。所以 ESR1 的突变水平与治疗效果和生存期长短密切相关。选择一种低侵入性、高灵敏性的检测方法,早期筛选出乳腺癌的耐药突变意义重大。在一项研究中,进行两种检测方法的比较,结果显示 ddPCR 分析比 NGS 分析更敏感,在同样一批样本中,NGS 在基线 cfDNA 中检测到 ESR1 中 3 个激活突变,ddPCR 检测到 6 个 cfDNA 样本带有 ESR1 p.D538G 突变,频率为 1%,且在持续治疗阴性患者的连续血浆样本中发现了 ESR1 突变。说明通过 ddPCR 体液检测早期发现 ESR1 突变在无需活检的基础上可允许早期停止无效的内分泌治疗,并切换到其他有效治疗^[34]。另外,通过 ddPCR 确定的磷脂酰肌醇(PIK3CA)突变是三阴性乳腺癌患者的良好预后因素^[35]。在早期乳腺癌患者术前血液样本中检测到 PIK3CA 突变,与组织检测结果相比,其敏感性为 93.3%,特异性为 100%。其中一些患者的恶性肿瘤直径小于 2 cm,组织活检可能存在误差与异质性,但数字 PCR 技术可避免组织活检的弊端,在早期可使用体液检测突变,判定患者的预后诊疗效果^[36]。此外,利用数字 PCR 技术进行突变跟踪,也有助于检测患者发生复发的风险^[37]。可依据检测结果提前预知,判定是否需要为乳腺癌中的微小残留病灶(minimal

residual disease, MRD) 的治疗进行调整。

3 数字 PCR 技术在体液中检测其他恶性肿瘤

数字 PCR 技术对液体样本的选择来源多样,除血液样本外,对于尿液、脑脊液、痰液、肺泡灌洗液的检测也同样适用,多样本选择,拓宽了数字 PCR 技术在临床中的应用。相比较血液样本可能具有更强针对性,有研究显示,脑脊液比血浆更易检测到源于脑恶性肿瘤中的突变^[6],其差异可能由于血脑屏障的存在^[38]。中枢神经系统(central nervous system, CNS)患者脑脊液中恶性肿瘤源性 cfDNA 水平的变化可作为恶性肿瘤负荷和治疗反应的指标,由此通过数字 PCR 技术在脑脊液中进行恶性肿瘤来源的 cfDNA 定量,既可提高检查的敏感性,又可以避免组织活检带来的有创伤害,实现病程长期动态监测。

尿液样本获取方便,也为数字 PCR 技术在恶性肿瘤中的应用提供便利。一项研究显示^[39],用数字 PCR 技术与下一代测序相结合检测非肌肉浸润性膀胱癌(non muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)患者特异性突变,值得注意的是,即使血浆还未检测到恶性肿瘤 DNA 的疾病早期阶段,也可在尿液中检测到恶性肿瘤 DNA 水平的升高。此外,这些检测还能够区分转移患者和浅表性膀胱恶性肿瘤患者,显示出与恶性肿瘤侵袭性的密切关系。同样利用数字 PCR 技术进行尿源性微小核糖核酸(micro RNA, miRNA)的检测,也可检测到血浆中无法检测到的变化,用于膀胱癌的诊断治疗^[40]。不仅如此,数字 PCR 技术也可以在痰液中定量检测 miRNA,作为肺癌的临床生物标志物,且具有一定潜在的应用价值^[41]。对于多种体液样本进行检测的研究因为数字 PCR 技术的引入,使其敏感性提高,意义增加。

4 小结

随着体液检测技术的不断成熟,对数字 PCR 技术的应用研究也越发深入,由于其样本来源广泛且相对无创,灵敏度高,特异度好,使其成为恶性肿瘤个体化诊断、监测、治疗的有力工具,但其在临床应用方面尚未普及,可能是由于其自身某些方面仍不

够完善,例如对于检测对象的选择有一定的局限性,不同于 NGS 可以检测多种恶性肿瘤特异性基因改变的能力^[22,42],可大规模同时对数百万个基因进行平行测序。数字 PCR 技术只能进行已知位点突变的检测,在现实应用过程中,数字 PCR 技术灵敏度、特异性还不能满足稳定性的要求,有一部分原因取决于核酸的种类以及数量^[43]。一项研究结果显示^[44],在同一恶性肿瘤病理组织基因检测与利用数字 PCR 技术监测非小细胞型肺癌患者外周血 EGFR 突变状态,随着 cfDNA 输入量的减少,其灵敏度从原来的 82% 下降至 46.7%。并且由于恶性肿瘤异质性,早期时 cfDNA 中恶性肿瘤 DNA 含量过少,使其检测灵敏度受影响,所以若要稳定其灵敏度,样本数量及质量也至关重要。在检测过程中,当样本条件符合要求的情况下,由于操作过程还未实现自动一体标准化,试剂、探针的非特异性结合、引物二聚体形成或样品之间的交叉污染等原因的存在,仍难以消除假阳性假阴性结果的困扰,所以数字 PCR 技术仍需大量临床数据验证和更大规模的前瞻性研究,使其不断优化。另外,为满足临床检测要求,避免有限的样本多次检测,降低检测成本,数字 PCR 技术的发展有望向多重检测方向发展,相比于多重 qPCR 技术多重数字 PCR 技术是通过终点反应来进行信号收集,使其在结果显示上具备荧光信号的颜色对比、荧光信号强弱对比、信号定位等多方面的信号收集,使结果更加全面。但对于数字 PCR 技术在临床中的应用,需要与其他检测技术互补应用,实现对恶性肿瘤从早筛诊断至后期靶向用药指导提供最精准的把握。

参考文献:

- [1] MORELLI M P, OVERMAN M J, DASARI A, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(4): 731-736.
- [2] DIAZ L A J R, BARDELLI A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(6): 579-586.
- [3] SIRAVEGNA G, MARSONI S, SIENA S, et al. Integrating

- liquid biopsies into the management of cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9):531-548.
- [4] WANG Y X, SPRINGER S, MULVEY C L, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas[J]. *SciTransl Med*, 2015, 7(293):104r-293r.
- [5] KIM K, SHIN D G, PARK M K, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection[J]. *Ann Surg Treat Res*, 2014, 86(3):136-142.
- [6] PAN W, GU W, NAGPAL S, et al. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(3):514-522.
- [7] DE MATTOS-ARRUDA L, WEIGELT B, CORTES J, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by *de novo* mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(9):1729-1735.
- [8] POSTEL M, ROOSEN A, LAURENT-PUIG P, et al. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(1):7-17.
- [9] SIRAVEGNA G, MARSONI S, SIENA S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9):531-548.
- [10] SINGH R R. Next-Generation sequencing in high-sensitive detection of mutations in tumors: challenges, advances, and applications[J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(8):994-1007.
- [11] JEFFREYS A J, NEUMANN R, WILSON V. Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis[J]. *Cell*, 1990, 60(3):473-485.
- [12] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(16):9236-9241.
- [13] 尹居鑫, 夏丽萍, 邹哲宇, 等. 多重数字聚合酶链式反应技术及其应用[J]. *分析化学*, 2022, 50(1):25-38.
- [14] DRANDI D, KUBICZKOVA-BESSE L, FERRERO S, et al. Minima residual disease detection by droplet digital PCR in multiple myeloma, mantle cell lymphoma, and follicular lymphoma: a comparison with real-time PCR[J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(6):652-660.
- [15] HUGGETT J F. The digital MIQE guidelines update: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(8):1012-1029.
- [16] OLMEDILLAS-LÓPEZ S, GARCÍA-ARRANZ M, GARCÍA-OLMO D. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology[J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21(5):493-510.
- [17] 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(8):1982-1986.
- [18] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [19] LI C C, HE Q H, LIANG H R, et al. Diagnostic accuracy of droplet digital PCR and amplification refractory mutation system PCR for detecting EGFR mutation in cell-free DNA of lung cancer: a meta-analysis[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:290.
- [20] VENDRELL J A, MAU-THEM F T, BÉGANTON B, et al. Circulating cell free tumor DNA detection as a routine tool for lung cancer patient management[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2):264.
- [21] CABEL L, PROUDHON C, ROMANO E, et al. Clinical potential of circulating tumour DNA in patients receiving anticancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(10):639-650.
- [22] OXNARD G R, PAWELETZ C P, KUANG Y N, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(6):1698-1705.
- [23] SEQUIST L V, WALTMAN B A, DIAS-SANTAGATA D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(75):26r-75r.
- [24] NORIKAZU M, KOICHI A, KAZUKO S, et al. Association of EGFR Exon 19 deletion and EGFR-TKI treatment duration with frequency of T790M mutation in EGFR-Mutant lung cancer patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36458.
- [25] GUO Q M, WANG L, YU W J, et al. Detection of plasma EGFR mutations in NSCLC patients with a validated ddPCR Lung cfDNA assay[J]. *J Cancer*, 2019, 10(18):4341-4349.
- [26] WEI Z J, SHAH N, DENG C, et al. Circulating DNA

- addresses cancer monitoring in non small cell lung cancer patients for detection and capturing the dynamic changes of the disease[J]. Springerplus, 2016, 5: 531.
- [27] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249.
- [28] TALY V, PEKIN D, BENHAIM L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients [J]. Clin Chem, 2013, 59(12): 1722–1731.
- [29] SATO K A, HACHIYA T, IWAYA T, et al. Individualized mutation detection in circulating tumor DNA for monitoring colorectal tumor burden using a cancer-associated gene sequencing panel [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e146275.
- [30] GARRIGOU S, PERKINS G, GARLAN F, et al. A study of hypermethylated circulating tumor DNA as a universal colorectal cancer biomarker[J]. Clin Chem, 2016, 62(8): 1129–1139.
- [31] DESANTIS C, MA J M, BRYAN L, et al. Breast cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 52–62.
- [32] LOWERY A J, KELL M R, GLYNN R W, et al. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 133(3): 831–841.
- [33] TSANG J Y S, TSE G M. Molecular classification of breast cancer[J]. Adv Anat Pathol, 2020, 27(1): 27–35.
- [34] GUTTERY D S, PAGE K, HILLS A, et al. Noninvasive detection of activating estrogen receptor 1 (ESR1) mutations in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer[J]. Clin Chem, 2015, 61(7): 974–982.
- [35] TAKESHITA T, YAMAMOTO Y, YAMAMOTO-IBUSUKI M, et al. Prognostic role of PIK3CA mutations of cell-free DNA in early-stage triple negative breast cancer [J]. Cancer Sci, 2015, 106(11): 1582–1589.
- [36] BEAVER J A, JELOVAC D, BALUKRISHNA S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(10): 2643–2650.
- [37] GARCIA-MURILLAS I, SCHIAVON G, WEIGELT B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(302): 133r–302r.
- [38] ZHAO J, YE X, XU Y, et al. EGFR mutation status of paired cerebrospinal fluid and plasma samples in EGFR mutant non-small cell lung cancer with leptomeningeal metastases[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 78(6): 1305–1310.
- [39] BIRKENKAMPDEMTRÖDER K, NORDENTOFT I, CHRISTENSEN E, et al. Genomic alterations in liquid biopsies from patients with bladder cancer [J]. Eur Urol, 2016, 70(1): 75–82.
- [40] ARMSTRONG D A, GREEN B B, SEIGNE J D, et al. MicroRNA molecular profiling from matched tumor and biofluids in bladder cancer[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 194.
- [41] LI N, MA J, GUARNERA M A, et al. Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(1): 145–150.
- [42] UCHIDA J, KATO K, KUKITA Y, et al. Diagnostic accuracy of noninvasive genotyping of EGFR in lung cancer patients by deep sequencing of plasma cell-free DNA[J]. Clin Chem, 2015, 61(9): 1191–1196.
- [43] 隋亚鑫, 蒋涛, 杨林林, 等. 数字 PCR 在液体活检中的研究进展[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(5): 905–909.
- [44] ZHANG Y, XU Y, ZHONG W, et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 5861–5873.

[收稿日期: 2022-09-09]

[责任编辑: 涂剑, 向秋 英文编辑: 阳雨君]