

循环肿瘤DNA在非小细胞肺癌诊疗中的应用

任大虎¹, 韩朝辉¹, 郭昊欣¹, 段国辰^{2*}

(¹河北省人民医院胸外科, 石家庄 050051; ²河北省儿童医院胸外科, 石家庄 050031)

摘要: 肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是其最常见的类型。近年来, 随着肺癌个体化诊疗的发展, 循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)检测逐渐成为人们关注的焦点。ctDNA是血液中游离的肿瘤细胞DNA, 是临床肿瘤诊治过程中一种很有前景的生物标志物, 为非小细胞肺癌的个体化诊疗开辟了新的途径。本文围绕ctDNA检测在NSCLC的辅助诊断、术后微小残留病灶的追踪、个体化治疗及预后的预测等方面的研究进展进行综述, 讨论ctDNA检测的临床应用前景。

关键词: 非小细胞肺癌; 循环肿瘤DNA; 靶向治疗; 免疫治疗

Application of circulating tumor DNA in the diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer

REN Dahu¹, HAN Zhaohui¹, GUO Haoxin¹, DUAN Guochen^{2*}

(¹Department of Thoracic Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China;

²Department of Thoracic Surgery, Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: Lung cancer is one of the most common malignancies worldwide. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common pathological type of lung cancer. With the development of individualized diagnosis and treatment of lung cancer, the detection of circulating tumor DNA (ctDNA) has become the focus of attention. As a part of cell-free DNA in blood, ctDNA has become a promising non-invasive biomarker for clinical tumor diagnosis and treatment, opening up a new way for individualized diagnosis and treatment of NSCLC. In this paper, we reviewed the progress of ctDNA detection in not only auxiliary diagnosis of NSCLC, but also minimal residual disease tracking after surgery, individualized treatment and prognosis prediction, and further discussed the clinical application prospects of ctDNA detection.

Key Words: non-small cell lung cancer; circulating tumor DNA; targeted therapy; immunotherapy

肺癌是全世界最常见及死亡率最高的恶性肿瘤之一, 对人类健康构成严重的威胁^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数的85%, 肺腺癌和肺鳞癌是最常见的NSCLC类型^[2]。在肺癌的诊治过程中, 胸部CT和组织活检是目前肺癌早期筛查、监测病情进展、评估治

疗效果的主要临床方法。但是胸部CT和组织活检不仅不能反映治疗期间肿瘤发生的动态变化, 反复性侵入性活检还可能导致程序性风险及诊治决策的延迟^[3,4]。相较于传统方法, 循环肿瘤DNA检测的标本采用的是外周血, 具有无创、快速、可重复性等优势。近年来, 随着检测技术的迅速发

收稿日期: 2022-03-10

第一作者: E-mail: rendahu2021@163.com

*通信作者: E-mail: duanguoc@126.com

展,为NSCLC患者提供了更加精准的诊疗依据。本文分析探讨了循环肿瘤DNA检测在NSCLC的临床应用进展。

1 循环肿瘤DNA

细胞游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)是血液的组成成分之一,起源于所有细胞,大部分起源于正常的白细胞。循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是cfDNA的一部分,是指从原发肿瘤或转移细胞释放到血液中的DNA片段,凋亡和坏死是肿瘤细胞释放DNA的主要机制^[5,6]。ctDNA含有与其来源肿瘤同样的遗传信息,如特异性点突变、DNA甲基化、染色体重排等;通常只占cfDNA的一小部分,甚至小于0.01%,其数量还受肿瘤类型、分期、位置以及癌细胞转移潜能等因素的影响;在血液中的半衰期也非常短,从16 min到2.5 h不等^[7,8]。因此,血液中ctDNA的检测要求检测技术具备很高的灵敏性。除此之外,克隆造血(clonal hematopoiesis, CH)即造血细胞的克隆性增长,也会影响检测的灵敏性^[9]。

2 ctDNA检测技术

过去的几年中,随着科学技术的快速发展,ctDNA检测技术得到很大进展,主要包括基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的方法和覆盖范围更广的下一代测序(next-generation sequencing, NGS)方法。表1总结了各种ctDNA检测的优缺点。

基于PCR的方法,如突变阻滞扩增技术、数字微滴PCR(digital droplet PCR, ddPCR)等,通常用来检测部分靶点的已知突变,有较高的敏感

性、较低的成本以及较短的周转时间。但是,其只能检测已知的突变,临床应用受到一定的限制。与基于PCR的方法相比,NGS是一种高通量测序,采集静脉血后即对全身的肿瘤进行基因信息进行测序,如癌症个体化深度测序、全基因组测序、全外显子测序等,可以识别同一目标基因位点内的多个不同的基因改变,在识别未知基因突变上也更具优势,可以对未知序列进行测序^[17-20]。然而,由于ctDNA检测需要花费大量的费用,所以这些检测方法的应用目前比较有限。目前,结合PCR和NGS两种平台优势的分析方法已被开发出来。

近年来,ctDNA甲基化测序逐渐成为第三种检测方法。DNA甲基化是一种表观调控修饰,可以在不改变碱基序列的情况下参与调控蛋白质的合成。与正常的组织相比,肿瘤DNA在早期就可以表现出异常的甲基化,异常的甲基化DNA具有细胞类型特异性,并且能够在血液中检测到^[21,22]。所以ctDNA甲基化检测可以用于辨别肿瘤的组织起源,早期识别肿瘤。

3 早期诊断与筛查

癌症的早诊、早治至关重要。早期肺癌患者的5年平均生存率为91%,晚期5年平均生存率仅为26%^[23]。ctDNA检测已经被证明可以用于肺癌的早期诊断,在NSCLC患者和健康个体中,ctDNA检测的敏感性和特异性分别为90%和80.5%^[24]。Chen等^[25]的研究结果也表明,ctDNA检测的结果比常规诊断早了4年,可以安全地用于无症状癌症患者的早期诊断。然而对于早期患者,ctDNA检测的敏感性较低。Phallen等^[26]研究显示,I期和II期肺癌

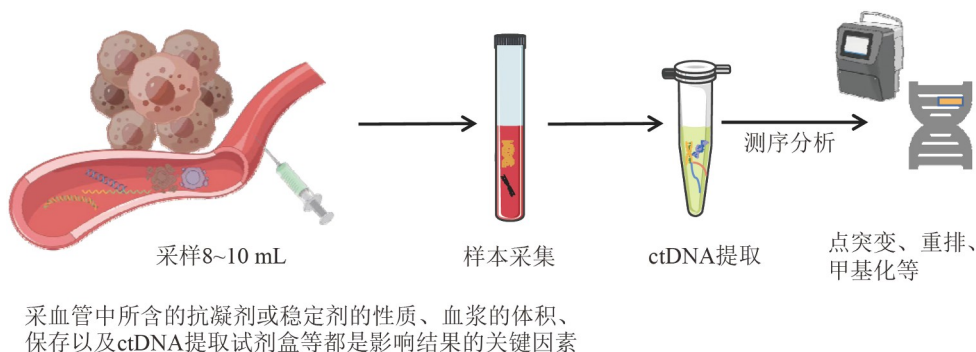


图1 ctDNA提取的主要步骤

表1 不同ctDNA检测方法比较

检测方法	原理	优势	劣势	文献
ARMs	利用3'端碱基分别与突变和正常的模板碱基互补	高灵敏度, 周转时间短, 准确率高, 成本低	低通量, 无法检测未知突变	[10]
ddPCR	将样本“分割”为数万个微滴, 每个微滴含有不同目标分子, 进行独立的PCR扩增, 结束后对每个单元进行采集	高灵敏度, 周转时间短, 成本较低	低通量, 无法检测未知突变	[11,12]
BEAMing	结合dPCR与流式技术, 通过磁珠克隆DNA, 利用特异性PCR引物扩增目标突变区, 与磁珠混合进行油包水单分子扩增反应。反乳化作用后, 利用荧光探针结合磁珠上的PCR产物, 使用流式细胞仪分析磁珠颜色来确定突变情况	高灵敏度和特异性	低通量, 无法检测未知突变操作复杂, 成本较高	[13]
TAM-Seq	首先, 进行初始靶向预扩增, 选择扩增感兴趣的区域。然后, 在进一步的PCR中将测序接头和样本特异性条形码连接到扩增子上	高灵敏度, 测序通量高, 测序时间和成本显著降低	低通量, 无法检测未知突变, 存在一定的假阳性	[14]
WES/WGS	WES: 是指利用序列捕获技术将捕获富集后进行高通量测序, 能够直接发现与蛋白质功能变异相关的遗传变异。WGS: 是指对基因组整体进行高通量测序, 分析不同个体间的差异, 同时完成基因组结构注释	检测整个基因组和外显子组, 发现未知序列	价格昂贵, 周转时间长	[15]
CAPP-Seq	首先, 查询癌症数据库以识别特定癌症类型的已知复发突变。然后, 设计寡核苷酸探针用于靶向相关区域的大片段	高灵敏度和特异性, 与WES/WGS相比, 经济可行	检测范围较WES/WGS窄	[16]

ARMS: 突变扩增系统(amplification refractory mutation system); ddPCR: 数字微滴PCR(droplet digital PCR); BEAMing: 小珠、乳浊液、扩增、磁性技术(bead, emulsion, amplification and magnetics); TAM-Seq: 标记扩增深度测序(tagged amplicon deep sequencing); WGS: 全基因组测序(whole-genome sequencing); WES: 全外显组测序(whole-exome sequencing); CAPP-Seq: 癌症个体化深度测序(cancer personalized profiling by deep sequencing)

患者的敏感性仅为59%。为了提高敏感性, Cohen等^[27]开发了名为CancerSEEK的检测方法, 通过测定血液中的蛋白标志物和ctDNA突变来检测8种类型的癌症, 其中肺癌的检出率达75%。一项前瞻性的研究将这种方法与PET-CT成像结合, 发现特异性由98.9%提高到99.6%, 阳性预测值由19.4%提高到40.6%, 但对敏感性几乎没有影响^[28]。ctDNA的低敏感性, 特别是对早期肺癌的检测, 是该方法作为一种筛查方法的局限性。因此, 通过ctDNA进行肿瘤的早期筛查依然很困难, 需要不断改进技术, 来增加ctDNA检测对早期肿瘤检测的敏感性。

4 ctDNA可用于指导治疗

4.1 ctDNA与靶向治疗

靶向药物的使用使NSCLC患者受益匪浅, 降低了NSCLC患者的死亡率, 改善了晚期NSCLC患者的生存结局^[29]。ctDNA作为一种循环生物标志物, 可用于肺部肿瘤的初始基因分型, 监测靶向治疗的后续影响, 识别耐药机制; 增加靶向突变

的识别机会, 如上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)突变、间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)融合、原癌基因鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体B1(*BRAF*)突变及间质表皮转化因子(cellular-mesenchymal to epithelial transition factor, *MET*)扩增^[30,31]。

靶向致癌驱动约占肺腺癌的25%, 其中*EGFR*突变是最常见的类型。Guardant360 CDx是一种新型的ctDNA测序方法, 已被批准作为一种伴随诊断, 用于检测非小细胞肺癌中的*EGFR*突变^[30]。两项基于Guardant360 ctDNA检测技术的研究, 报告了ctDNA检测与基于组织的临床基因分型之间的高度一致性^[31,32]。除了检查*EGFR*突变外, ctDNA检测可用于识别*BRAF*突变和*ALK*重排、*ALK*突变和融合等^[33]。此外, Pérez-Barrios等^[34]研究表明, 在非小细胞肺癌的临床治疗过程中, 还可以从患者身上其他体液如胸膜液、心包液和腹水等样本中检测出可行的突变。以上多种证据表明, ctDNA检测突变可以作为组织活检检测突变的理想替代方法。因此, 当无法进行手术、活检或获得的组织

不足时,使用ctDNA检测是一种很有吸引力的替代方法。

靶向治疗的效果极佳,但很多患者在治疗过程中不可避免地出现耐药性。在接受第一代和第二代药物治疗的患者中,超过一半的患者通过继发性T790M突变产生耐药性。Zhang等^[35]和Nagano等^[36]利用多平台ctDNA检测显示了类似的结果,EGFR T790M的总检出率为62.16%。然而接受第三代靶向药物奥西替尼治疗的患者,复发后可能出现新的基因改变。研究显示,携带EGFR T700M突变的患者接受奥西替尼治疗后,通过ctDNA检测出新的获得性C797S突变^[37,38]。另一项研究发现,患者在对EGFR抑制剂耐药后,通过ctDNA检测发现了MET扩增,表明MET也是该药的耐药机制之一^[39]。此外,一部分患者的病理形态通过转化为小细胞肺癌表型而产生耐药性^[40]。目前还没有可用的工具来检测小细胞表型转化。为了更好地理解耐药机制,人们正在开发更多的工具来对多个基因进行测序。

4.2 ctDNA与免疫治疗

以免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICI)为主的免疫治疗在NSCLC患者中显示出显著的优势,然而只有小部分人通过免疫治疗获益。因此,必须正确识别哪些患者可以通过ICI治疗获益。临床上,肿瘤组织程序性死亡受体配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)与肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)是预测NSCLC患者接受免疫治疗临床效果的两种重要的生物标记物^[41]。TMB是指在肿瘤的基因组中发现的体细胞编码突变的数量,较高的TMB预示着更好的免疫治疗反应^[42]。TMB除了通过组织检测进行评估外,还可以通过血液样本进行评估^[43]。研究表明,外周血ctDNA的TMB(blood TMB, bTMB)与组织TMB(tissue TMB, tTMB)具有一致性^[44]。Gandara等^[45]发现,阿特珠单抗在转移性NSCLC患者中的效益与bTMB呈正相关。这些研究证实了通过外周血ctDNA评估TMB的可行性,为ctDNA取代组织活检检测肿瘤TMB提供了有力的证据。

通过监测免疫检查点抑制剂治疗期间ctDNA水平的变化,可以观察免疫治疗的疗效。一项关

于ctDNA在晚期非小细胞肺癌免疫治疗的META表明,ctDNA的早期减少与无进展生存期(progress free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)等的改善有关,ctDNA动态减少的患者明显从ICIs治疗中获得了更多的临床益处,反映了肿瘤对有效治疗的早期反应^[46]。并且从治疗开始到观察到ctDNA应答的时间要明显早于观察到影像学变化的时间,具有更好的预测能力,有利于指导临床决策^[47]。

但是,不同实验之间TMB的截断值不同,不同的检测方法也有不同的测序标准;而且,不同方法对ctDNA检测时的最低限值也不同。这些都限制了ctDNA检测在NSCLC患者免疫治疗过程中的应用,其在免疫治疗疗效预后的预测作用仍需要进一步的证实,以确定ctDNA是否可以作为监测ICIs临床治疗效果的标志物。

5 ctDNA与预后

目前,临床上仍以组织活检和影像学检查相结合来评估患者预后。但Xia等^[48]分析了330例I-III期NSCLC患者围手术期的血浆样本,发现基于ctDNA的微小残留病灶检测可在围手术期预测NSCLC的复发,术后1个月微小残留病灶阳性是NSCLC复发的一个强有力的预测因素。微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)是指癌症根治性治疗后残留在体内的少量癌细胞或来源于癌细胞的分子标志物,随着MRD的临床应用价值逐渐受到关注,涌现出越来越多商业化平台,用于癌症患者的预后评估、复发风险分层等^[49]。

越来越多的证据表明,ctDNA可以作为手术或者放化疗治疗后MRD的替代检测方法,能够帮助制定治疗方案,正在逐渐成为癌症诊断和治疗不可或缺的一部分^[22,50]。对于不可切除的NSCLC患者,Moding等^[51]进行了一项回顾性研究,放化疗或免疫治疗期间检测到MRD的患者,中位生存期低于未检测到MRD的患者。对于可手术切除的患者,前瞻性的DYNAMIC研究显示,手术切除肿瘤后,通过围手术期对患者进行连续采样,分析得出患者术后3 d的ctDNA状态可以预测复发风险,R0切除术后第3天是合理进行术后MRD监测的时间点^[47]。这些研究结果综合表明,非小细胞肺

癌个体化肿瘤的ctDNA监测具有良好的应用前景。

虽然使用ctDNA进行MRD检测看起来很有前途,但是缺乏统一的MRD检测标准,ctDNA检测的敏感性有待进一步提高,ctDNA的临床有效性也有待进一步验证。最近开发出了一种新的方法,阶段性富集和检测测序(phased variant enrichment and detection sequencing, PhasED-Seq),在接受放化疗的Ⅲ期NSCLC患者中,使用阶段性富集和检测测序,在3份使用标准单核苷酸变异(single-nucleotide variant, SNV)方法未检测到的样本中观察到MRD^[52]。与传统的基于单核苷酸变异的ctDNA分析相比,PhasED-Seq提高了NSCLC患者ctDNA检测的敏感性。

6 小结

ctDNA是非小细胞肺癌诊疗的一个非常有潜力的生物标志物。作为一种无创的检测方法,具有采样简单、创伤小、可重复等优点,能够真实地反映肿瘤组织的基因突变图谱及肿瘤的动态变化,是非小细胞肺癌筛查诊断、监测MRD、个体化治疗和预后监测的重要指标。随着ctDNA检测技术在通量、检测范围、灵敏度和特异性等方面的不断提升,在实体肿瘤检测领域展现出广阔的应用前景,越来越多的检测方法被批准应用于临床。

然而,由于ctDNA在血液中的含量极少,对突变的检测是一个巨大的挑战,降低了检测的准确性。除此之外,对于早期肺癌诊断筛查的低灵敏性、较高的检测成本以及如何确定肿瘤的组织来源等问题亟待解决。迄今为止,已发表的大多数报告都是使用先前诊断过该疾病的患者进行的,ctDNA检测从研究到临床还需要更加充足的证据,需要大量的前瞻性研究进行验证。ctDNA检测要广泛应用于临床,还需要更先进的生物学检测方法来提高其敏感度和特异性。提高检测的准确性,还有很长的一段路要走。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries. *CA Cancer*

J Clin, 2021, 71(3): 209-249

[2] Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(8): 535-546

[3] Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor dna as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 112-123

[4] Phallen J, Leal A, Woodward BD, et al. Early noninvasive detection of response to targeted therapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1204-1213

[5] Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9): 531-548

[6] Elzanowska J, Semira C, Costa-Silva B. DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects. *Mol Oncol*, 2021, 15(6): 1701-1714

[7] Sumbal S, Javed A, Afroze B, et al. Circulating tumor dna in blood: future genomic biomarkers for cancer detection. *Exp Hematol*, 2018, 65: 17-28

[8] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant dna to assess tumor dynamics. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-990

[9] Chan HT, Chin YM, Nakamura Y, et al. Clonal hematopoiesis in liquid biopsy: from biological noise to valuable clinical implications. *Cancers*, 2020, 12(8): 2277

[10] 张孝欢, 周玉. 循环肿瘤DNA检测及相关研究进展. 实用医院临床杂志, 2017, 14(1): 148-152

[11] 王琦, 范颖. 微滴式数字PCR技术进展. 中国医学前沿杂志(电子版), 2016, 8(11): 15-19

[12] Valpione S, Campana L. Detection of circulating tumor DNA (ctDNA) by digital droplet polymerase chain reaction (dd-PCR) in liquid biopsies. *Methods Enzymol*, 2019, 629: 1-15

[13] O'Leary B, Hrebien S, Beaney M, et al. Comparison of BEAMing and droplet digital PCR for circulating tumor DNA analysis. *Clin Chem*, 2019, 65(11): 1405-1413

[14] Forsheo T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*, 2012, 4(136): 136-168

[15] Imperial R, Nazer M, Ahmed Z, et al. Matched whole-genome sequencing (WGS) and whole-exome sequencing (WES) of tumor tissue with circulating tumor DNA (ctDNA) analysis: complementary modalities in clinical practice. *Cancers*, 2019, 11(9): 1399

[16] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 2014, 20(5): 548-554

[17] Esposito Abate R, Frezzetti D, Maiello MR, et al. Next generation sequencing-based profiling of cell free DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer:

- advantages and pitfalls. *Cancers*, 2020, 12(12): 3804
- [18] Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC. *J Thoracic Oncol*, 2018, 13(9): 1248-1268
- [19] Di Capua D, Bracken-Clarke D, Ronan K, et al. The liquid biopsy for lung cancer: state of the art, limitations and future developments. *Cancers*, 2021, 13(16): 3923
- [20] Peng Y, Mei W, Ma K, et al. Circulating tumor dna and minimal residual disease (MRD) in solid tumors: current horizons and future perspectives. *Front Oncol*, 2021, 11: 763790
- [21] Leal A, Sidransky D, Brait M. Tissue and cell-free DNA-based epigenomic approaches for cancer detection. *Clin Chem*, 2020, 66(1): 105-116
- [22] Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(9): a019505
- [23] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30
- [24] Nicolazzo C, Barault L, Caponnetto S, et al. True conversions from RAS mutant to RAS wild-type in circulating tumor DNA from metastatic colorectal cancer patients as assessed by methylation and mutational signature. *Cancer Lett*, 2021, 507: 89-96
- [25] Chen X, Gole J, Gore A, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3475
- [26] Phallen J, Sausen M, Adleff V, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*, 2017, 9(403): ean2415
- [27] Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*, 2018, 359(6378): 926-930
- [28] Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I, et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science*, 2020, 369(6499): eabb9601
- [29] Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, et al. The effect of advances in lung-cancer treatment on population mortality. *N Engl J Med*, 2020, 383(7): 640-649
- [30] Aggarwal C, Rolfo CD, Oxnard GR, et al. Strategies for the successful implementation of plasma-based NSCLC genotyping in clinical practice. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(1): 56-62
- [31] Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical utility of comprehensive cell-free DNA analysis to identify genomic biomarkers in patients with newly diagnosed metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4691-4700
- [32] Zhao Q, Yuan Z, Wang H, et al. Role of circulating tumor cells in diagnosis of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res*, 2021, 49(3): 030006052199492
- [33] Bordi P, Tiseo M, Rofi E, et al. Detection of ALK and KRAS mutations in circulating tumor DNA of patients with advanced ALK-positive NSCLC with disease progression during crizotinib treatment. *Clin Lung Cancer*, 2017, 18(6): 692-697
- [34] Pérez-Barrios C, Sánchez-Herrero E, García-Simón N, et al. ctDNA from body fluids is an adequate source for *EGFR* biomarker testing in advanced lung adenocarcinoma. *Clin Chem Laboratory Med*, 2021, 59(7): 1221-1229
- [35] Zhang Y, Xiong L, Xie F, et al. Next-generation sequencing of tissue and circulating tumor DNA: resistance mechanisms to *EGFR* targeted therapy in a cohort of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Med*, 2021, 10(14): 4697-4709
- [36] Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy. *Cells*, 2018, 7(11): 212
- [37] Starrett JH, Guernet AA, Cuomo ME, et al. Drug sensitivity and allele specificity of first-line osimertinib resistance *EGFR* mutations. *Cancer Res*, 2020, 80(10): 2017-2030
- [38] Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al. Acquired *EGFR* C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring *EGFR* T790M. *Nat Med*, 2015, 21(6): 560-562
- [39] Deng L, Kiedrowski LA, Ravera E, et al. Response to dual crizotinib and osimertinib treatment in a lung cancer patient with *MET* amplification detected by liquid biopsy who acquired secondary resistance to *EGFR* tyrosine kinase inhibition. *J Thoracic Oncol*, 2018, 13(9): e169-e172
- [40] Marcoux N, Gettinger SN, O'Kane G, et al. *EGFR*-mutant adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer and other neuroendocrine carcinomas: clinical outcomes. *J Clin Oncol*, 2019, 37(4): 278-285
- [41] 王鹏, 汤传昊, 梁军. 非小细胞肺癌免疫检查点抑制剂治疗相关外周血生物标志物研究进展. *中国肺癌杂志*, 2021, 24(07): 503-512
- [42] Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, et al. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 183
- [43] Filipiska M, Rosell R. Mutated circulating tumor dna as a liquid biopsy in lung cancer detection and treatment. *Mol Oncol*, 2021, 15(6): 1667-1682
- [44] Fridland S, Choi J, Nam M, et al. Assessing tumor

- heterogeneity: integrating tissue and circulating tumor dna (ctDNA) analysis in the era of immuno-oncology-blood TMB is not the same as tissue TMB. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(8): e002551
- [45] Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med*, 2018, 24(9): 1441-1448
- [46] Wang H, Zhou F, Qiao M, et al. The role of circulating tumor dna in advanced non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*, 2021, 11: 671874
- [47] Anagnostou V, Forde PM, White JR, et al. Dynamics of tumor and immune responses during immune checkpoint blockade in non small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1214-1225
- [48] Xia L, Mei J, Kang R, 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*, 2021. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3044
- [49] 吴一龙, 陆舜, 程颖, 等. 非小细胞肺癌分子残留病灶专家共识. *循证医学*, 2021, 21(3): 129-135
- [50] Yang Y, Zhang T, Wang J, et al. The clinical utility of dynamic ctDNA monitoring in inoperable localized NSCLC patients. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 117
- [51] Moding EJ, Liu Y, Nabet BY, et al. Circulating tumor DNA dynamics predict benefit from consolidation immunotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *Nat Cancer*, 2020, 1(2): 176-183
- [52] Kurtz DM, Soo J, Co Ting Keh L, et al. Enhanced detection of minimal residual disease by targeted sequencing of phased variants in circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(12): 1537-1547