

血液生物标志物检测对晚期非小细胞肺癌EGFR-TKI治疗疗效的评估价值

范瑞, 吴勇汇*, 顾瞻, 彭艳斌, 王丽新

Evaluation Value of Blood Biomarker Tests for Efficacy of EGFR-TKI in Advanced NSCLC Treatment

FAN Rui, WU Yonghui*, GU Zhan, PENG Yanbin, WANG Lixin (*: Contributed Equally as the First Author)

Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai Pulmonary Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200433, China

Corresponding Author: WANG Lixin, E-mail: 1701005@tongji.edu.cn

Abstract: Objective To analyze the levels of serum CTCs and ctDNA in NSCLC patients receiving first-line EGFR-TKI treatment, and to explore the clinical value of CTCs and ctDNA detection in assessing the efficacy of treatment for advanced lung cancer. **Methods** A total of 109 NSCLC patients receiving first-line EGFR-TKI treatment were enrolled. Serum tumor markers CEA, CTCs, and ctDNA were detected at baseline and after one month of treatment. Chest CT scans were performed, and treatment efficacy was evaluated based on RECIST1.1 criteria. CTCs were counted by enrichment-staining-computational algorithm to analyze malignant features, while ctDNA was assessed using digital PCR. **Results** Survival rate was low in patients with abnormal CEA and ctDNA tests at baseline and in patients with reduced serum CTCs after treatment. In the SD subgroup of patients with brain metastases and advanced stage, the PFS benefit was low. **Conclusion** Patients in the SD subgroup have significantly higher recurrence risks than those in the PR or CR subgroups. Therefore, CTC and ctDNA testing should be applied to patients in the SD subgroup to identify high-risk patients with poor response to EGFR-TKI treatment, intervene with additional treatment promptly, and obtain long progression-free survival.

Key words: Advanced NSCLC; EGFR-TKI; Efficacy; Circulating tumor cells; Circulating tumor DNA

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 82004115); Key Specialty Cultivation Project of Traditional Chinese Medicine Clinical Practice by the Shanghai Municipal Administration of Traditional Chinese Medicine (No. ZY2021-2023-0302); Special Project for Integrating Traditional Chinese and Western Medicine by the Shanghai Municipal Administration of Traditional Chinese Medicine (No. ZHYY-ZXYJHZX-202107); Shanghai Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine Oncology, Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 21MC1930500); Shanghai Municipal Health Commission Project (No. 2022QN094); National Administration of Traditional Chinese Medicine Integration of Traditional Chinese and Western Medicine Flagship Department Construction Project; Shanghai Key Discipline of Traditional Chinese Medicine (No. shzyydzxk-2024106)

收稿日期: 2024-10-17; 修回日期: 2024-11-29

基金项目: 国家自然科学基金 (82004115); 上海市中医药管理局中医临床重点专科培育项目 (ZY2021-2023-0302); 上海市中医药管理局中西医结合专项 (ZHYY-ZXYJHZX-202107); 上海市中医肿瘤临床医学研究中心, 上海市科学技术委员会项目 (21MC1930500); 上海市卫生健康委员会项目 (2022QN094); 国家中医药管理局中西医协同旗舰科室建设项目; 上海市中医药临床重点学科 (shzyydzxk-2024106)

作者单位: 200433 上海, 同济大学医学院, 同济大学附属上海市肺科医院中西医结合科

通信作者: 王丽新, 女, 博士, 主任医师, 主要从事中医药防治肺部疾病临床与基础研究, E-mail: 1701005@tongji.edu.cn, ORCID: 0000-0003-4748-3225

作者简介: 范瑞, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事中医药防治肺部肿瘤研究, ORCID: 0009-0007-2997-1045; 吴勇汇, 男, 博士在读, 主要从事中医药防治肺部肿瘤研究, ORCID: 0000-0001-6588-3180 (*: 并列第一作者)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 分析接受一线EGFR-TKI治疗的非小细胞肺癌患者的外周血CTCs和ctDNA水平, 探究CTCs和ctDNA检测对晚期肺癌疗效评估的临床价值。方法 纳入109例接受一线EGFR-TKI治疗的非小细胞肺癌患者, 在基线和治疗1月后检测血清肿瘤指标CEA、CTCs和ctDNA水平, 并行胸部CT检查, 依据RECIST1.1标准评估疗效, CTCs通过富集-染色-计算算法分析恶性特征进行计数, ctDNA通过

数字PCR进行。结果 基线时CEA、ctDNA检测异常和治疗后外周血CTCs降低的患者生存率更低。在SD亚组患者中, 脑转移、晚期的患者PFS获益更低。结论 SD亚组患者的复发风险显著高于PR或CR组患者, 因此, 建议将CTCs和ctDNA检测应用于SD亚组患者中, 以识别对EGFR-TKI治疗疗效不佳的高危患者, 及时介入额外治疗干预以期获得更长的无进展生存期。

关键词: 晚期非小细胞肺癌; EGFR-TKI; 疗效; 循环肿瘤细胞; 循环肿瘤DNA
中图分类号: R73; R4
开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

肺癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 占癌症死亡总数的18.7%^[1]。靶向治疗以其有效率高、不良反应小的优势成为临床研究热点, 有关表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 突变阳性晚期NSCLC患者一线治疗的多个随机对照研究显示, 靶向治疗对比化疗均可显著改善患者的PFS, 但接受EGFR-TKI治疗的患者PFS差异较大, 大部分患者在15个月左右出现耐药^[2-3]。因此, 在非小细胞肺癌EGFR突变患者中, 选择新型的生物标志物筛选出优势人群成为研究的焦点。

液体活检是指从体液中获得来源于组织的生物标志物, 通过分析得到其来源组织的相关信息^[4]。目前已知的关键标志物有循环肿瘤细胞 (Circulating tumor cells, CTCs)、循环肿瘤DNA (Circulating tumor DNA, ctDNA)、细胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EVs) 和循环RNA (miRNA)。CTCs指从原发性肿瘤或转移灶脱落并释放入血液的肿瘤细胞, 少数CTCs可逃逸机体的免疫作用在血液循环中存活并播种新的转移灶^[5]。ctDNA是指由肿瘤细胞分泌和肿瘤细胞凋亡或坏死后释放入血液中的特异性DNA片段, 大小为120~160 bp, 通常携带有与原发肿瘤相同的遗传特征, 如基因突变、拷贝数变异、甲基化等, 在晚期癌症患者中, 肿瘤可能是血液中大部分ctDNA的来源^[6]。不同于组织活检的大创伤性、难以解决肿瘤异质性问题, 液体活检可以在治疗期间的不同时间采集血样, 因此可以实时监测EGFR-TKI的治疗反应。

目前国内外开展了较多外周血CTCs和ctDNA等作为NSCLC生物标志物与肺癌筛查、治疗、预后相关性的研究^[7-10]。但针对不同种类的液体活检方式检验效能评估的研究较少, 本研究以RECIST1.1疗效评估标准为金标准, 通过相关性分析、无进展生存时间影响因素等分析, 比较接受一线EGFR-TKI治疗的非小细胞肺癌患者血清CEA、CTCs

和ctDNA对预后效果的影响, 从而评价血液CEA、CTCs和ctDNA检测对晚期肺癌EGFR-TKI预后的指导意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2019年1月至2020年11月109例接受一线EGFR-TKI治疗的ⅢB期或Ⅳ期非小细胞肺癌并明确有EGFR敏感突变的患者 (治疗药物主要是1代EGFR-TKI, 少部分患者使用3代药物, 脑转移患者在治疗1月内未接受脑部放疗)。纳入标准: (1) 经组织学或细胞学证实携带EGFR突变的NSCLC; (2) 分期为ⅢB期或Ⅳ期; (3) 年龄≥18岁; (4) 预计生存期≥3个月; (5) 无心脏、肝脏、肾脏、血液系统等严重疾病。入组前实验室检查必须符合以下条件: 白细胞WBC≥ $3.5 \times 10^9/L$, 血红蛋白Hgb≥90 g/L, 血小板≥ $100 \times 10^9/L$, 胆红素≤1.5 ULN, 碱性磷酸酶 (ALP)、天门冬氨酸转氨酶 (AST) 和丙氨酸转氨酶 (ALT) 均≤2.5 ULN, INR≤1.5, 肌酐≤1.5 ULN; (6) 根据RECIST1.1标准, 有可测量病灶; (7) 患者自愿参加本研究, 并在入组前签署知情同意书。排除标准: (1) 已接受相关化疗药物治疗的患者; (2) 合并其他恶性肿瘤患者; (3) 心电图检查异常者; (4) 不配合研究或中途退出者。本研究经同济大学附属上海市肺科医院伦理委员会批准 (批准号: K20-050Y)。患者在基线检查时和治疗1月后进行胸部CT检查和血清CEA、CTCs及ctDNA检测。本研究数据随访PFS至2021年12月31日, 中位随访时间为14.6个月。现场就诊随访或电话随访。

1.2 检测方法

1.2.1 血清CEA检测 从外周静脉抽取1管8 ml血液, $3\ 500\text{ r/min}$ 离心15 min分离血清, 置于 -80°C 冰箱冷冻保存, 检测血清CEA水平, 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司, 严格按照试剂说明书进行操作。采用全自动电化学发光仪 [罗氏诊断产品 (上海) 有限公司, e-601型] 进行检测。CEA的截断值在各研究中有所不同, 大多数研究结果显示CEA的截断值为10 ng/ml或更低^[11], 本研究参照说明书的诊断标准确定最终的截断值。

1.2.2 ctDNA检测方法 从外周静脉抽取1管10 ml血液, 分离出4 ml血浆, 利用循环游离DNA提取试剂盒 (Qiagen公司, 中国) 提取样本DNA。基于数字PCR检测系统 (南京科维思) 检测血浆ctDNA水平, 根据入组患者初始基因状态分别检测EGFR 19 Del、EGFR L858R基因。简要步骤如下: 配置14.5 μL 反

应液，包括数字PCR反应液7.25 μl、检测反应液0.72 μl和样本DNA 6.53 μl；将配好的反应液上样至数字PCR通用芯片（分割液滴），记录芯片编号，并检查密封的数字PCR通用芯片是否有泄漏、气泡，以及盖子方向是否正确；将制备好的数字PCR通用芯片加载至PCR仪中，设定扩增条件，运行程序如下：96℃ 10 min，预变性；60℃ 2 min退火和延伸，98℃ 30 s变性，共39个循环数；60℃ 2 min终延伸；10℃保温。将数据导入分析软件，进行结果分析，得到EGFR 19Del、EGFR L858R基因的信号比值，我们参考使用同样试剂盒检测的临床研究方法^[7,12]，用免疫组织化学检测（IHC）结果作为参考，在一系列可能的阈值范围内比较真阳性、真阴性、假阳性、假阴性的数量，研究发现当阈值为0.021时，真阳性和真阴性加起来占比100%，没有假阳性和假阴性，则以信号比值0.021为界将该结果判定为阳性和阴性。

1.2.3 CTCs检测方法 从外周静脉抽取两管7.5 ml血样，收集到10 ml BD Vacutainer® EDTA管中（美国新泽西州贝克顿迪金森公司）。采集后，将试管倒置几次，使样本与抗凝剂充分混合。离心血液样本（1 000 g，5 min），丢弃血浆层。其余进行红细胞溶解术。离心后，将有核细胞重新悬浮在含有1% BSA的PBS plus中，并放置在FlowCell® CTCs富集系统（Polaris Biology，中国上海）上，以清除大部分残余红细胞（RBC）和白细胞（WBC）。将富集的细胞与Cy5结合的抗CD45抗体在37℃、不含葡萄糖的RPMI1640培养基中培养40 min。将所有细胞暴露于浓度为0.5 g/ml的0.4 mmol/L 2-脱氧-2-[（7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-基）氨基]d-葡萄糖（2-NBDG）和Hoechst3342中20 min。冷PBS广泛冲洗，用高含量筛选系统扫描并成像离心（1 000 g，5 min）到玻璃上的所有细胞，EVOS FL Auto 2（美国马萨诸塞州Invitrogen）有三种荧光颜色（DAPI: Nucleus，2-NBDG: CTCs，CY5: CD45）。利用计算算法分析图像，并确定了具有活力和高糖摄取的候选肿瘤细胞，然后由经验丰富的技术人员进行审查。

1.3 统计学方法

定量资料符合正态分布采用均值±标准差表述，不符合正态分布采用中位数（四分位间距）描述；定性资料采用中位数（百分比）描述。两两比较，满足*t*检验条件采用两独立样本*t*检验，不满足*t*检验采用符号秩和检验。针对频数或率的比较采用卡方检验，两两比较采用分割卡方检验，借助R软件的rcompanion包。采用Spearman相关分析，检

验不同变量之间的关联性。采用R软件的survival包进行疾病复发无进展生存分析绘制Kaplan-Meier生存曲线。采用多因素Cox回归分析，探究影响疾病复发的联合暴露风险因素。所有统计分析均采用R软件进行，*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床特征

共纳入109例ⅢB期或Ⅳ期非小细胞肺癌并明确有EGFR敏感突变的患者，基线特征见表1。基线期平均年龄为61岁，大多数（58.7%）患者为女性，腺癌占比为81.7%，EGFR-19Del突变占比为65.1%，Ⅳ期患者占比85.3%，其中脑转移患者占比72.5%。

表 1 接受一线EGFR-TKI治疗的ⅢB期或Ⅳ期非小细胞肺癌并明确有EGFR敏感突变的患者临床基线特征

Table 1 Clinical baseline characteristics of stage ⅢB or Ⅳ NSCLC patients with EGFR mutations receiving first-line EGFR-TKI treatment

Clinical characteristics	Number (n=109)
Gender (n(%))	
Male	45(41.3)
Female	64(58.7)
Age (mean±s, years)	61±10
Smoking history (n(%))	
Never	70(64.2)
Current/former	39(35.8)
Histology type (n(%))	
Adenocarcinoma	89(81.7)
Non-Adenocarcinoma	20(18.3)
Brain metastases (n(%))	
Yes	79(72.5)
No	30(27.5)
Type of mutation	
EGFR19	71(65.1)
EGFR21	38(34.9)
Disease stage (n(%))	
Ⅲ	16(14.7)
Ⅳ	93(85.3)

截至随访结束，根据RECIST标准，79例患者（72.5%）部分缓解（PR），26例患者（23.9%）稳定（SD），4例患者（3.6%）完全缓解（CR）。

2.2 血清CEA、CTCs和ctDNA对患者生存获益的评估

通过Kaplan-Meier生存分析探究治疗前后患者血清CEA、CTCs和ctDNA差值对患者生存获益的评估价值。血清CEA、CTCs和ctDNA分别以10 μg/L、60个/7.5 ml（低风险）、信号比值定性结果^[12]作为截断值，将患者分为不同的亚组。在基线检查时，血清CEA值正常范围内的患者在14.6个月时的生存概率为55%，而检查指标异常增高的患者为33%

($P=0.044$), 见图1A。血清ctDNA值正常范围内的患者在14.6个月时的生存概率为50%, 而检查指标异常增高的患者为27% ($P=0.044$), 见图1B。CTCs患者基线检查指标无显著差异, 但外周血CTCs治疗前后差值分析显示, 治疗后CTCs计数增高的患者14.6个月的生存率为65%, 而降低的患者为23% ($P=0.0271$), 见图1C。

多因素Cox回归分析结果显示, ctDNA异常患者的复发风险高于正常患者 ($HR=1.93$, 95%CI: 1.01~3.68, $P=0.0459$); CEA检测获得类似的结果 ($HR=1.52$, 95%CI: 1.01~2.31, $P=0.0456$), 但复发风险在两组之间差异无统计学意义, 可能归因于研究人群样本量限制, 存在混杂因素。治疗前后CTCs计数上升患者的复发风险低于正常患者 ($HR=0.369$, 95%CI: 0.148~0.918, $P=0.0321$); 在接受EGFR-TKI一线治疗的非小细胞肺癌患者中, SD亚组患者复发风险高于PR或CR的患者 ($HR=15.8$, 95%CI: 2.12~117, $P=0.0071$), 见图2。

2.3 血清标志物评估SD亚组患者的生存获益

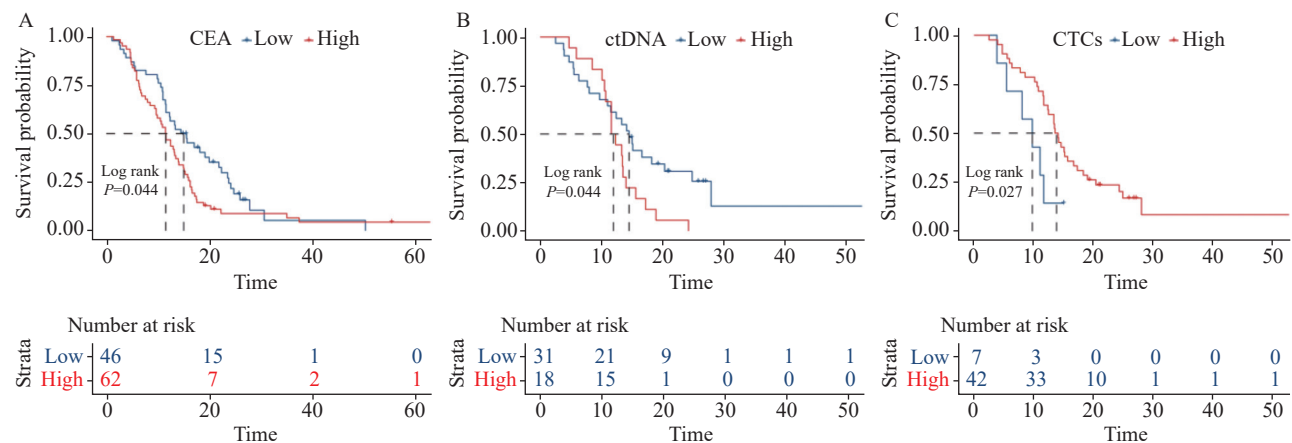
在SD亚组中, 诊断时没有脑转移的患者中位PFS为11个月, 而发生脑转移患者中位PFS只有4个月 ($P=0.037$), 见图3A; 与Ⅲ期患者相比, Ⅳ期患者中位无进展生存期显著缩短 ($P=0.031$), 见图3B。上述结果表明, 在SD亚组患者中, 脑转移、分期较晚是患者病情进展的危险因素。

3 讨论

随着基础研究和国内外临床试验的开展, 晚期肺癌的治疗方式得到不断优化, 5年生存率显著提高, 目前临床上晚期非小细胞肺癌EGFR-TKI治疗PFS为15.8个月, 疾病进展风险显著降低了32%^[13]。

为进一步提高治疗有效率, 延长PFS, 需要依据患者自身情况采取个体化的治疗方案, 筛选出进展风险较高的患者群体采取联合治疗模式。基因突变患者的联合治疗模式, 即在靶向治疗的基础上加入抗血管生成药物治疗、化疗、放疗等治疗手段能否延长无病进展生存期, 是临床上研究的热点。JO25567研究中A+T治疗模式(联合抗血管生成药物)延长中位PFS达6.3个月^[14]。一项EGFR-TKI联合化疗一线治疗晚期非小细胞肺癌临床研究NEJ009结果显示, 吉非替尼联合化疗组和吉非替尼单药组的ORR分别为84%和67%, 联合治疗组的PFS明显长于吉非替尼单药组(20.9月 vs. 11.2月), 但联合用药组3级及以上不良反应发生率对比吉非替尼单药组较高(65.1% vs. 31.4%)^[15]。因此, 联合治疗不能盲目地应用在所有基因突变患者中, 对EGFR-TKI的治疗反应明显的患者应采用单纯的靶向治疗, 而加入其他治疗手段会增加不良反应, 降低生活质量, 加重患者的负担。但对EGFR-TKI的治疗反应欠佳的患者, 如果早期应用联合治疗模式, 会带来更长的生存期。因此, 临床工作中寻找新的预后指标和预测因素对基因突变患者进行分层, 筛选出对EGFR-TKI的治疗反应欠佳的患者具有重要意义。

液体活检是一种非侵入性检测, 已有临床研究验证了液体活检在肺癌诊断、预测疗效及预后中的意义。深度测序检测ctDNA在肺癌筛查和预后中的研究显示, ctDNA诊断肿瘤早于影像学5.2个月, 检测复发率的准确度达到94%^[16]。但ctDNA含量低, 约占整个循环DNA的1%, 分离不当导致背景值过高会影响检测的敏感度^[17]。CTCs检测在肺癌诊断中具有较好的敏感度, 可以检测直径<0.1 cm的肿瘤, 且较传统影像学早6~9周检测到肿瘤^[18]。



A: baseline serum CEA: 10 μ g/L; B: baseline serum ctDNA: signal ratio qualitative results; C: baseline serum CTCs: 60 (low risk).

图1 血清标志物CEA、ctDNA和CTCs对患者生存获益的评估

Figure 1 Assessment of survival benefit of patients by serum markers CEA、ctDNA and CTCs

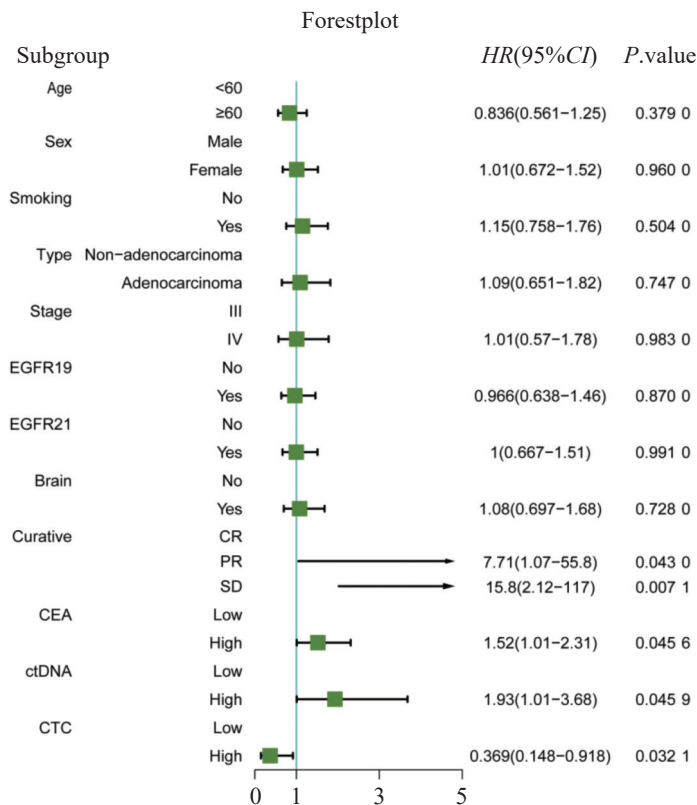


图2 Cox多元回归模型估计三种血清标志物对患者无进展生存期的影响
Figure 2 Effect of three serum markers on progression-free survival of patients estimated by Cox multiple regression model

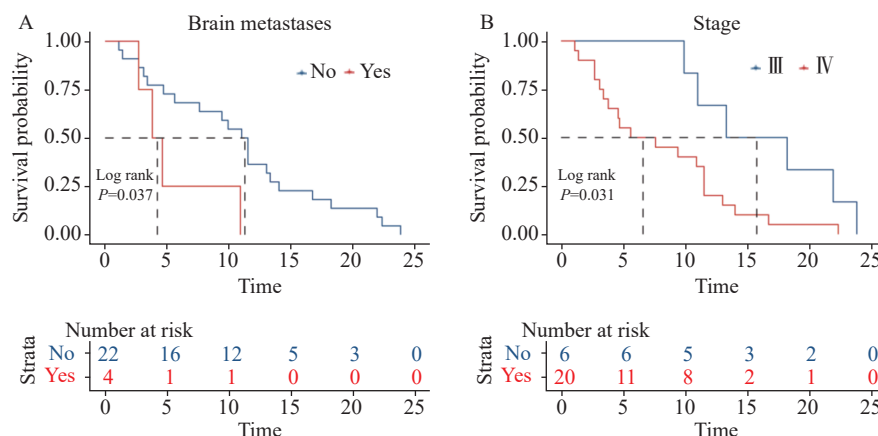


图3 单变量Kaplan-Meier生存分析探究SD亚组PFS获益的影响因素
Figure 3 Factors influencing PFS benefit in the SD subgroup explored by univariate Kaplan-Meier survival analysis

因此多项血清检测指标的联合应用成为研究热点。

卡方分析中,基线期三项联合指标诊断有效率高于任何单一检测手段,这与多项临床研究的结果相一致^[7,19]。但由于检测成本高昂在临床应用中存在局限性,在所有患者中开展联合检测成本较高。在单因素分析中,基线期CEA、ctDNA检测异常的患者具有更高的复发率,治疗后外周血CTCs降低提示更高的复发率。治疗1月后,ctDNA计数降低,PFS越长,而CTCs计数升高,PFS越长。在靶向治疗期间,ctDNA计数降低的患者PFS越长,尽管这在统计学上并不显著,但具有临床意义,很多临床研究也证明了这一趋势^[20]。而研究观察到治疗后CTCs计数的下降预示更高的复发风险,多因素Cox回归分析进一步证实了这一结论,与之前的一

项关于ctDNA和CTCs在接受一线化疗的NSCLC患者预后的预测作用研究结果一致,该研究观察到基线CTCs中位数与OS之间呈正比关系^[21]。这可能与它们从肿瘤释放到循环血液中的不同机制有关,ctDNA主要通过被动机制(肿瘤细胞死亡)释放,而CTCs通过主动过程(肿瘤侵袭性)传播。另一方面,需要通过加大样本量、增加检测手段等方式验证这一结论。通过Cox多元回归模型评估各临床特征与预后(PFS)之间的关系,在接受靶向治疗的NSCLC患者中,疗效评估为SD的患者复发风险高于PR或CR的患者,疗效分类具有独立的预后作用。因此,建议将CTCs和ctDNA检测应用到SD亚组患者中。

临床上单纯依据RECIST1.1疗效评估标准,筛

选出的SD患者异质性高，无法精准地区分复发风险。有研究试图将液体活检与RECIST疗效评估标准相结合，以期更加精准地反映治疗效果，但结论尚未统一^[22-23]。本研究SD亚组分析显示，诊断时没有脑转移的患者中位PFS为11个月，而发生脑转移患者只有4个月；分期越晚，中位无进展生存期越短；在SD患者亚群中，脑转移、分期较晚、较高的ctDNA和较低的CTCs计数可能使一线EGFR-TKI治疗患者具有较高的复发风险。

本研究存在一定的局限性：首先，患者血液指标个体差异较大，受生活习惯、素体差异等多重因素的影响，存在液体活检不同检测指标的同质化问题；其次，需要通过加大样本量、增加检测手段等方式，更大规模的前瞻性研究验证本临床试验的结论。

综上所述，在基线和治疗期间对ctDNA和CTCs的纵向分析可以指导治疗并帮助预测患者预后，血清标志物CTCs和ctDNA可以作为CEA的补充用于评估临床非小细胞肺癌患者的预后；将CTCs和ctDNA检测应用到SD亚组患者中，更好的筛选出对EGFR-TKI的治疗反应欠佳的患者，及早采取联合治疗模式，同时可能避免不必要的治疗以及相关成本和不良反应，为患者带来更长的生存获益。

利益冲突声明：

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献：

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Shi YK, Wang L, Han BH, *et al.* First-line icotinib versus cisplatin/pemetrexed plus pemetrexed maintenance therapy for patients with advanced EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (CONVINCE): a phase 3, open-label, randomized study[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): 2443-2450.
- [3] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.
- [4] 张敏, 陈骏. 液体活检在非小细胞肺癌中的临床应用进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2021, 24(10): 723-728. [Zhang M, Chen J. Advances in Clinical Application of Liquid Biopsy in Non-small Cell Lung Cancer[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2021, 24(10): 723-728.]
- [5] Follain G, Herrmann D, Harlepp S, *et al.* Fluids and their mechanics in tumour transit: shaping metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(2): 107-124.
- [6] Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(7): 409-424.
- [7] 李娜, 姚丽. CTC检测在预测肺癌复发转移及患者预后中的意义[J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(5): 490-493. [Li N, Yao L. Implication of CTC detecting in the predicting recurrence and metastasis of lung cancer and prognosis of patients[J]. *Zhong Nan Yi Xue Ke Xue Za Zhi*, 2020, 48(5): 490-493.]
- [8] 刘俊, 卢绪菁, 刘永萍, 等. 晚期非小细胞肺癌大分割调强放疗

- 前后CTC变化临床意义研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(18): 1367-1372. [Liu J, Lu XJ, Liu YP, *et al.* Dynamic changes of the circulating tumor cells in the patients with advanced non-small cell lung cancer before and after fractionated intensity modulated radiation therapy and its clinical significance[J]. *Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi*, 2019, 26(18): 1367-1372.]
- [9] Wei T, Zhu D, Yang Y, *et al.* The application of nano-enrichment in CTC detection and the clinical significance of CTCs in non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment[J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0219129.
- [10] Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, *et al.* Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution[J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 446-451.
- [11] Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(2): 138-143.
- [12] Zhou R, Cai Y, Shen S, *et al.* A digital PCR based assay to detect all ALK fusion species[J]. *Front Lab Med*, 2018, 2(2): 49-54.
- [13] Cheng Y, Murakami H, Yang PC, *et al.* Randomized Phase II Trial of Gefitinib With and Without Pemetrexed as First-Line Therapy in Patients With Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer With Activating Epidermal Growth Factor Receptor Mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(27): 3258-3266.
- [14] Kato T, Seto T, Nishio M, *et al.* Erlotinib Plus Bevacizumab Phase II Study in Patients with Advanced Non-small-Cell Lung Cancer (JO25567): Updated Safety Results[J]. *Drug Saf*, 2018, 41(2): 229-237.
- [15] Hosomi Y, Morita S, Sugawara S, *et al.* Gefitinib Alone Versus Gefitinib Plus Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer With Mutated Epidermal Growth Factor Receptor: NEJ009 Study[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(2): 115-123.
- [16] Fenizia F, Rachiglio AM, Iannaccone A, *et al.* Circulating Tumor Cells and ctDNA in NSCLC[J]. *Oncogenomics*, 2019: 465-475.
- [17] Macgregor-Das A, Yu J, Tamura K, *et al.* Detection of Circulating Tumor DNA in Patients with Pancreatic Cancer Using Digital Next-Generation Sequencing[J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(6): 748-756.
- [18] Takakura M, Matsumoto T, Nakamura M, *et al.* Detection of circulating tumor cells in cervical cancer using a conditionally replicative adenovirus targeting telomerase-positive cells[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(1): 231-240.
- [19] 李芳颖, 鄂颖, 井明晰, 等. 基于cSMART技术检测ctDNA驱动基因突变指导非小细胞肺癌精准治疗的疗效研究[J]. *中国癌症防治杂志*, 2019, 11(2): 110-115. [Li FY, E Y, Jing MX, *et al.* The preliminary study on ctDNA-driven gene mutation detected by cSMART and its effect on precise treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Zhongguo Ai Zheng Fang Zhi Za Zhi*, 2019, 11(2): 110-115.]
- [20] Kumar S, Guleria R, Singh V, *et al.* Plasma DNA level in predicting therapeutic efficacy in advanced nonsmall cell lung cancer[J]. *Eur Respir J*, 2010, 36(4): 885-892.
- [21] Castello A, Carbone FG, Rossi S, *et al.* Circulating Tumor Cells and Metabolic Parameters in NSCLC Patients Treated with Checkpoint Inhibitors[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2): 487.
- [22] Lee YJ, Yoon KA, Han JY, *et al.* Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(15): 5179-5187.
- [23] Li BT, Drilon A, Johnson ML, *et al.* A prospective study of total plasma cell-free DNA as a predictive biomarker for response to systemic therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancers[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(1): 154-159.

[编辑：尤婷婷；校对：刘红武]

作者贡献：

范瑞、吴勇汇：研究设计、论文撰写

顾瞻、王丽新：审阅、指导和修改论文

彭艳斌：数据整理、可视化分析