doi:10.11659/jjssx.11E023028

·临床研究·

循环肿瘤DNA与EGFR、KRAS、NRAS突变型可切除非小细胞肺癌的病理关系

王 磊,刘 先,吴清辉,高 珂 (成都市第二人民医院胸心外科,四川 成都 610017)

[摘 要] **目的** 探讨循环肿瘤DNA(ctDNA)与表皮生长因子受体基因(EGFR)、Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因(KRAS)、神经母细胞瘤RAS病毒致癌基因(NRAS)突变型可切除非小细胞肺癌(NSCLC)患者临床病理特征的关系。**方法** 纳入在我院接受手术切除并且在生物库中有匹配血浆样本的36例NSCLC患者进行突变分析。使用肽核酸钳制PCR法分析血浆ctDNA和活检组织EGFR、KRAS、NRAS突变,探讨血浆ctDNA脱落与患者临床病理特征的关系。**结果** 36例患者活检组织和血浆样本中EGFR、KRAS、NRAS的一致性分别为63.89%(23/36)、88.89%(32/36)、86.11%(31/36)。在突变型肿瘤中,血浆ctDNA中EGFR、KRAS、NRAS突变检测的敏感度分别为23.53%(4/17)、33.33%(2/6)、40.00%(2/5)。在腺癌患者中,血浆ctDNA脱落与较高的肿瘤分期、N分期、TNM分期、肿瘤坏死率、10HPFs核分裂象及较大的肿瘤最大直径、肿瘤体积有关(P<0.05)。在肺腺癌患者亚组分析中,ctDNA脱落与较高的N分期、血管浸润率、肿瘤坏死率、10HPFs核分裂象及更大的肿瘤最大直径、肿瘤体积显著相关(P<0.05)。**结论** 肺腺癌ctDNA脱落与原发性肿瘤的直径、体积以及侵袭性组织学特征(如坏死和高核分裂象)有关。

[关键词] 非小细胞肺癌;循环肿瘤DNA;基因突变;肽核酸钳制PCR法

[中图分类号] R734.1 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-11-07

Pathological relationship between circulating tumor DNA and EGFR, KRAS and NRAS mutant resectable non-small cell lung cancer

WANG Lei, LIU Xian, WU Qing-hui, GAO Ke (Department of Cardiothoracic Surgery, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu Sichuan 610017, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the circulating tumor DNA (ctDNA) and the clinicopathological features of epidermal growth factor receptor gene (EGFR), Kirsten rat sarcoma viral oncogene (KRAS), and neuroblastoma RAS viral oncogene (NRAS) in patients with mutant resectable non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Thirty-six patients with NSCLC who underwent surgical resection in our hospital and had matched plasma samples in the biobank were included for mutation analysis. The EGFR, KRAS and NRAS mutations of plasma ctDNA and biopsy tissue were analyzed by peptide nucleic acid clamp PCR to explore the relationship between plasma ctDNA shedding and clinicopathological features of patients. **Results** The consistency of EGFR, KRAS and NRAS in biopsy tissue and plasma samples of 36 patients was 63.89% (23/36), 88.89% (32/36) and 86.11% (31/36), respectively. In mutant tumors, the sensitivity of EGFR, KRAS and NRAS mutation detection in plasma ctDNA was 23.53% (4/17), 33.33% (2/6) and 40.00% (2/5), respectively. In patients with adenocarcinoma, plasma ctDNA shedding was associated with higher tumor stage, N stage, TNM stage, tumor necrosis rate, mitotic count 10HPFs, larger maximum tumor diameter and tumor volume (P<0.05). In subgroup analysis of lung adenocarcinoma patients, ctDNA shedding was significantly associated with higher N stage, vascular invasion rate, tumor necrosis rate, and mitotic count 10HPFs, as well as larger maximum tumor diameter and tumor volume (P<0.05). **Conclusion** The shedding of ctDNA in lung adenocarcinoma is associated with primary tumor diameter, volume, and aggressive histological features (such as necrosis and high mitotic count).

Keywords: non-small cell lung cancer; circulating tumor DNA; gene mutation; peptide nucleic acid clamp PCR

致癌驱动因素的识别和靶向治疗的发展改变了晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)的治疗方案[1]。但并非所有NSCLC患者的肿瘤组织均可进行突变分析。血浆中含有肿瘤衍生的循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA,ctDNA),当肿瘤组织不可用时,血浆基因分型可能是突变分析的合适替代品[2]。血浆检测的敏感度不仅取决于分析因素,还取决于ctDNA从肿瘤中释放的速率,即所谓的ctDNA脱落[3]。不脱落ctDNA的肿瘤很可能在血浆检测中出现假阴性结果。因此,了解导致ctDNA脱落的条件和因素对于提高液体活检技术的准确性很有必要。曾有研究发现,ctDNA脱落与癌症病变类型、病灶大小及分子特

[基金项目] 四川省科技创新人才项目(2021JDRC0017)

[通信作者] 高 珂,E-mail:gaoke19752003@163.com

征有关[4-6]。NSCLC发病机制中有几种常见的突变癌基因，如表皮生长因子受体基因（epidermal growth factor receptor gene，EGFR）、Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因（Kirsten rat sarcoma viral oncogene，KRAS）、神经母细胞瘤RAS病毒致癌基因（neuroblastoma RAS viral oncogene，NRAS）。但目前缺乏相关研究评估NSCLC肿瘤的ctDNA脱落与不同肿瘤突变类型临床病理特征之间的关联，故本研究就原发性NSCLC患者ctDNA脱落与临床病理特征的关系展开探讨，并针对血浆和肿瘤组织中EGFR、KRAS、NRAS的突变状态进行深入分析。

1 资料与方法

1.1 临床资料

回顾性分析2019年5月至2021年10月在我院接受治疗性肺部手术的NSCLC患者的临床资料，对其肿瘤组织及血浆样本进行分析。纳入标准：①经组织病理学确诊为原发性NSCLC[7]；②间变性淋巴瘤激酶基因重排阴性。排除标准：①采集血浆及肿瘤组织前进行了放化疗、手术治疗或酪氨酸激酶抑制剂靶向治疗；②合并其他原发性肿瘤、自身免疫性疾病、其他肺部疾病。最终共纳入了36例NSCLC患者，男25例，女11例，中位年龄66岁（33～81岁），其中33例接受肺叶切除术，3例接受肺楔形切除术。根据Ⅰ～Ⅳ期肺腺癌组织样本和血浆ctDNA中EGFR突变是否一致，得到肿瘤组织EGFR突变的肺腺癌患者数量。根据血浆ctDNA脱落是否检测到EGFR突变对肺腺癌患者进行分组，从而开展肺腺癌患者亚组分析。收集患者临床资料，包括年龄、性别、肿瘤分期、N分期、TNM分期、胸膜浸润、血管浸润、淋巴浸润、肿瘤坏死、细胞异型性、肿瘤大体病理类型、肿瘤最大直径、肿瘤体积。N分期、TNM分期根据美国癌症联合委员会第8版分期系统[8]确定。本研究方案获得我院伦理审查委员会的批准（伦理批号：伦审2021第0221号）。本研究为回顾性研究，利用以往临床诊疗中获得的病历及组织标本进行研究，已申请免除患者知情同意的要求。

1.2 样本采集及处理

所有外周血样本均在术前24 h内获得，并立即处理以分离血浆。对于手术标本，在冷冻切片时进行肺血管穿刺和采血，并在2 h内分离血浆。采集的全血置于BD Vacutainer TM K2 EDTA管，并于4 ℃下以1 500 r/min离心10 min，在不干扰血沉棕黄层和红细胞的情况下，吸出血浆上清液并转移到新试管中，然后于4 ℃下以3 000 r/min进一步离心10 min，在不干扰沉淀的情况下，将上清液转移到新试管中。上清液在-80 ℃下冷冻保存待用。

1.3 组织病理学观察

细胞异型性分为以下3类[9]：轻度（相对均匀的细胞核，在100倍镜下核仁不明显）；中度（相对均匀的细胞核，在100倍镜下核仁明显）；重度（在100倍镜下可观察到畸形、大小不一的增大核仁）。使用Olympus BX41显微镜在400倍镜下（可见面积2.37 mm^2）观察高倍视野（high power-field，HPF）下的核分裂细胞数，计数每10个HPFs（10HPFs）的核分裂象。

1.4 肿瘤体积计算

在术前胸部CT图像上测量肿瘤体积（中位CT扫描至手术时间间隔为21 d，范围1~67 d）。使用Brilliance 64 CT扫描仪自肺尖扫描至肋膈角以获得CT图像。在肺窗设置中的每个轴向CT图像上手动绘制每个肿瘤边缘，通过整合所有轴向图像来确定肿瘤三维区域，利用分割出来的肿瘤区域的所有像素点数表示肿瘤体积。

1.5 组织突变分析

肿瘤组织经10%中性福尔马林固定、石蜡包埋，然后使用Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA纯化试剂盒提取基因组DNA。使用荧光分析法对DNA进行定量，并使用10~25 ng DNA进行突变分析。使用PANAMutyper™ R EGFR、KRAS、NRAS基因突变检测试剂盒和QuantStudio™ 5实时荧光定量PCR系统以肽核酸钳制PCR法进行EGFR、KRAS、NRAS突变检测。

1.6 血浆突变分析

使用QIAamp循环核酸试剂盒从2 mL血浆中提取ctDNA。采用PANAMutyper™ R EGFR、KRAS、NRAS检测试剂盒进行突变检测，并使用高灵敏度Quant-iT PicoGreen双链DNA检测试剂盒进行定量。由于血浆ctDNA含量极低，应使用足够体积的含有ctDNA的血浆（2 mL），如果血浆样本中ctDNA的质量或数量不足，则无法进行实时PCR。在本研究中，所有血浆样本均成功扩增。

1.7 观察指标

患者组织和血浆样本均完成EGFR、KRAS、NRAS基因检测，检测出丰度>0.2%定义为检出阳性，两者同时具有相同基因突变则认为具有一致性。血浆ctDNA基因突变型例数占组织EGFR、KRAS、NRAS基因突变型例数的百分比即为血浆突变检测的敏感度；血浆ctDNA基因野生型例数占组织EGFR、KRAS、NRAS基因野生型例数的百分比即为血浆突变检测的特异度。

1.8 统计分析

所有数据统计学分析均使用SPSS 25.0软件进行。分类变量以频数或率(%)表示,连续变量以中位数(四分位间距)表示,分别进行*Fisher*精确检验和*Mann-Whitney U*检验。采用*Logistic*回归分析基因突变与临床病理特征之间的关系。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织和血浆ctDNA中EGFR、KRAS、NRAS突变情况

36例患者活检组织和血浆样本中EGFR、KRAS、NRAS的一致性分别为63.89%(23/36)、88.89%(32/36)、86.11%(31/36),见表1。1例Ⅰ期腺癌患者肿瘤组织中同时出现EGFR T790M和EGFR L858R突变,而在所有患者中均未检测到EGFR C797S突变。在突变肿瘤中,血浆ctDNA中EGFR、KRAS、NRAS突变检测的敏感度分别为23.53%(4/17)、33.33%(2/6)、40.00%(2/5)。血浆中EGFR(19/19)、KRAS(30/30)、NRAS(31/31)突变检测的特异度均为100%(表2)。

2.2 血浆ctDNA中EGFR、KRAS、NRAS突变检测与临床病理特征的相关性

根据肿瘤组织突变分析,共21例患者发生EGFR、KRAS或NRAS基因突变,其中5例患者也检测到血浆ctDNA中EGFR、KRAS或NRAS基因突变,纳入脱落组,其他16例纳入未脱落组。血浆中ctDNA脱落与较高的肿瘤分期、N分期、TNM分期、肿瘤坏死率、10HPFs核分裂象及较大的肿瘤最大直径、肿瘤体积显著相关($P<0.05$),见表3。

表1 匹配的组织样本和血浆ctDNA中EGFR、KRAS、NRAS突变的结果(n=36,例)

组织学亚型	分期	EGFR突变			KRAS突变			NRAS突变		
		一致	不一致	总计	一致	不一致	总计	一致	不一致	总计
腺癌	Ⅰ期	6	12	18	16	2	18	13	5	18
	Ⅱ期	3	0	3	3	0	3	3	0	3
	Ⅲ期	5	1	6	5	1	6	6	0	6
	Ⅳ期	1	0	1	0	1	1	1	0	1
鳞状细胞癌	Ⅰ期	4	0	4	4	0	4	4	0	4
	Ⅱ期	2	0	2	2	0	2	2	0	2
黏液表皮样癌	Ⅰ期	1	0	1	1	0	1	1	0	1
大细胞神经内分泌癌	Ⅱ期	1	0	1	1	0	1	1	0	1

表2 组织样本和血浆ctDNA中EGFR、KRAS、NRAS突变状态比较(n=36,例)

血浆ctDNA基因突变	组织EGFR突变		总计	组织KRAS突变		总计	组织NRAS突变		总计
	突变型	野生型		突变型	野生型		突变型	野生型	
突变型	4	0	4	2	0	2	2	0	2
野生型	13	19	32	4	30	34	3	31	34
总计	17	19	36	6	30	36	5	31	36

2.3 肺腺癌患者亚组分析

如表1所示,共15例肺腺癌患者检测到肿瘤组织EGFR突变。其中4例患者能够检测到血浆ctDNA脱落,其他11例患者血浆ctDNA突变分析中未检测到EGFR突变;ctDNA脱落与较高的N分期、血管浸润率、肿瘤坏死率、10HPFs核分裂象及更大的肿瘤最大直径、肿瘤体积显著相关($P<0.05$),见表4。

3 讨论

目前,组织基因分型被认为是检测肿瘤遗传改变的金标准[10],然而在实际临床诊断时,20%~30%的NSCLC组织是不足以进行分子检测的[11]。血浆中含有肿瘤衍生的细胞外DNA(如ctDNA),当肿瘤组织不可用时,血浆基因分型可能是突变分析的合适替代品[12-13]。ctDNA来自肿瘤细胞,携带有肿瘤基因组的DNA信息。当巨噬细胞清除凋亡/坏死肿瘤细胞时会产生ctDNA片段,并通过外泌体脱落至循环血液中,与远处组织进行交流,血液中循环的肿瘤细胞也有助于释放ctDNA[14]。肿瘤DNA含有独特的体细胞突变,因此血浆中存在的突变DNA具有高度的肿瘤特异性,可以用作肿瘤生物标志物。本研究中,术前获得的血浆与切除组织中EGFR、KRAS、NRAS突变的一致性分别为63.89%、88.89%、86.11%;血浆ctDNA中EGFR、KRAS、NRAS突变检测的敏感度分别为23.53%、33.33%、40.00%,说明血浆与组织样本基因突变的检出率相差不大。

与Han等[15]的研究结果相比,本研究的一致性和敏感度较低,这可能与患者处于早期肿瘤阶段或血浆检测平台不同有关。在既往研究中,肿瘤组织基因分型结果显示,血浆EGFR和KRAS突变检测的敏感度

表3 EGFR、KRAS、NRAS突变肺腺癌中ctDNA突变的临床病理特征(*n*=21)

临床病理特征		脱落组(*n*=5)	未脱落组(*n*=16)	*P*	*OR*	95%*CI*
性别[例(%)]	男	3(60.00)	8(50.00)	0.697	0.667	0.087~5.127
	女	2(40.00)	8(50.00)			
肿瘤分期[例(%)]	T1、T2期	1(20.00)	14(87.50)	0.014	28.000	1.988~394.405
	T3、T4期	4(80.00)	2(12.50)			
N分期[例(%)]	N0期	1(20.00)	15(93.75)	0.007	60.000	3.038~1 185.035
	N1、N2期	4(80.00)	1(6.25)			
TNM分期[例(%)]	Ⅰ、Ⅱ期	1(20.00)	14(87.50)	0.014	28.000	1.988~394.405
	Ⅲ、Ⅳ期	4(80.00)	2(12.50)			
胸膜浸润[例(%)]	无	3(60.00)	12(75.00)	0.521	2.000	0.214~16.612
	有	2(40.00)	4(25.00)			
血管浸润[例(%)]	无	2(40.00)	13(81.25)	0.093	6.500	0.731~57.829
	有	3(60.00)	3(18.75)			
淋巴浸润[例(%)]	无	3(60.00)	13(81.25)	0.341	2.889	0.325~25.702
	有	2(40.00)	3(18.75)			
肿瘤坏死[例(%)]	无	1(20.00)	15(93.75)	0.007	60.000	3.038~1 185.035
	有	4(80.00)	1(6.25)			
细胞异型性[例(%)]	轻度至中度	1(20.00)	11(75.00)	0.080	8.800	0.772~100.275
	重度	4(80.00)	5(25.00)			
肿瘤大体病理类型[例(%)]	实性	4(80.00)	12(75.00)	0.819	0.750	0.064~8.834
	亚实性	1(20.00)	4(25.00)			
肿瘤最大直径(cm)		6.80(5.20,8.50)	2.35(1.90,3.20)	0.002	1.038	1.002~1.095
肿瘤体积(cm^3)		81.73(62.32,142.27)	5.51(2.23,8.67)	0.002	1.031	1.002~1.087
10HPFs核分裂象(个)		12.50(2.80,17.00)	0(0,1.00)	0.018	11.925	1.006~39.951

表4 血浆ctDNA-EGFR突变临床病理特征亚组分析(*n*=15)

临床病理特征		脱落(*n*=4)	未脱落(*n*=11)	*P*	*OR*	95%*CI*
性别[例(%)]	男	3(75.00)	6(54.55)	0.622	1.333	0.624~9.789
	女	1(25.00)	5(45.45)			
肿瘤分期[例(%)]	T1、T2期	1(25.00)	9(81.82)	0.062	13.500	0.878~207.624
	T3、T4期	3(75.00)	2(18.18)			
N分期[例(%)]	N0期	1(25.00)	10(90.91)	0.029	30.000	1.410~638.150
	N1、N2期	3(75.00)	1(9.09)			
TNM分期[例(%)]	Ⅰ、Ⅱ期	1(25.00)	9(81.82)	0.062	13.500	0.878~207.624
	Ⅲ、Ⅳ期	3(75.00)	2(18.18)			
胸膜浸润[例(%)]	无	2(50.00)	10(90.91)	0.112	10.000	0.584~171.202
	有	2(50.00)	1(9.09)			
血管浸润[例(%)]	无	1(25.00)	10(90.91)	0.029	30.000	1.410~638.150
	有	3(75.00)	1(9.09)			
淋巴浸润[例(%)]	无	2(50.00)	9(81.82)	0.236	4.500	0.374~54.155
	有	2(50.00)	2(18.18)			
肿瘤坏死[例(%)]	无	1(25.00)	11(100)	0.001		
	有	3(75.00)	0(0)			
细胞异型性[例(%)]	轻度至中度	1(25.00)	9(81.82)	0.236	4.500	0.374~54.155
	重度	3(75.00)	2(18.18)			
肿瘤大体病理类型[例(%)]	实性	3(75.00)	8(72.73)	0.930	0.889	0.064~12.252
	亚实性	1(25.00)	3(27.27)			
肿瘤最大直径(cm)		5.45(4.90,6.00)	2.00(0.80,3.55)	0.027	1.019	1.001~1.385
肿瘤体积(cm^3)		64.00(44.57,83.42)	5.45(0.48,21.80)	0.027	1.011	1.002~1.377
10HPFs核分裂象(个)		16.50(14.00,18.20)	0(0,5.00)	0.009	6.260	1.003~44.082

分别为56.50%~63.20%和50.00%~60.00%;特异度分别为72.70%~75.00%和95.00%~96.00%[16-17],其敏感度均优于本研究结果,但特异度低于本研究结果,推测与假阳性血浆结果及肿瘤内异质性有关。此外,除了EGFR T790M和EGFR C797S突变外,NSCLC中KRAS和NRAS突变多发生在癌变早期,两种基因的肿瘤内异质性较为罕见,故本研究未单独针对二者进行分析[18-19]。

在既往研究中,ctDNA的作用各不相同。一项关于研究ctDNA浓度预测NSCLC患者预后价值的荟萃

分析表明,基线ctDNA与肿瘤负荷相关,高水平的ctDNA通常提示较短的无进展生存期和总生存期[20]。而Abbosh等[21]研究发现,早期NSCLC中淋巴血管浸润和高Ki-67增殖指数是ctDNA检测的独立预测因子。在本研究中,ctDNA脱落与较高的肿瘤分期、N分期、TNM分期、肿瘤坏死率、10HPFs核分裂象及更大的肿瘤最大直径、肿瘤体积有关;在肺腺癌患者亚组分析中,ctDNA脱落与较高的N分期、血管浸润率、肿瘤坏死率、10HPFs核分裂象及更大的肿瘤最大直径、肿瘤体积显著相关。

本研究存在一定局限性:首先,本研究的样本量较小,获取信息有限,无法进行深入分析,主要是在单个机构很难从每个NSCLC患者身上收集足够的术前血液样本,后期还需要扩大样本量进一步研究,以确定ctDNA脱落的病理生理学机制;其次,本研究的ctDNA检测方法与基于二代测序技术的方法相比,虽然敏感度较低且信息量较少,但是考虑到血浆二代测序技术在日常检测中成本高,因此本研究使用PANAMutyper™ R EGFR、KRAS、NRAS基因突变检测试剂盒进行肽核酸钳制PCR,在临床中应该更具推广价值。

综上,本研究证实在可实施NSCLC切除的患者中,ctDNA从肿瘤组织到血浆中的脱落率较低;肺腺癌ctDNA脱落与原发性肿瘤的直径、体积以及侵袭性组织学特征(如坏死和高核分裂象)有关。

[参考文献]

[1] Tivey A, Church M, Rothwell D, et al. Circulating tumour DNA: looking beyond the blood[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(9): 600-612. doi: 10.1038/s41571-022-00660-y.

[2] Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC: challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(9): 577-586. doi: 10.1038/s41571-018-0058-3.

[3] Li N, Wang BX, Li J, et al. Perioperative circulating tumor DNA as a potential prognostic marker for operable stage Ⅰ to ⅢA non-small cell lung cancer[J]. Cancer, 2022, 128(4): 708-718. doi: 10.1002/cncr.33985.

[4] Avanzini S, Kurtz DM, Chabon JJ, et al. A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size[J]. Sci Adv, 2020, 6(50): eabc4308-eabc4316. doi: 10.1126/sciadv.abc4308.

[5] Duffy MJ. Circulating tumour DNA as a cancer biomarker[J]. Ann Clin Biochem, 2019, 56(1): 42-48. doi: 10.1177/0004563218798401.

[6] Maron SB, Chase LM, Lomnicki S, et al. Circulating tumor DNA sequencing analysis of gastroesophageal adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(23): 7098-7112. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1704.

[7] 中华医学会,中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社. 中华医学会肺癌临床诊疗指南(2018版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(12): 935-964. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.12.012.

[8] 李兴睿,徐 滔. 美国癌症联合委员会第8版分化型甲状腺癌TNM分期更新解读[J]. 临床外科杂志, 2019, 27(1): 33-35. doi: 10.3969/j.issn.1005-6483.2019.01.009.

[9] Wepy C, Nucci MR, Parra-Herran C. A typical endometriosis: comprehensive characterization of clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features[J]. Int J Gynecol Pathol, 2024, 43(1): 70-77. doi: 10.1097/PGP.0000000000000952.

[10] Judd J, Abdel Karim N, Khan H, et al. Characterization of KRAS mutation subtypes in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20(12): 2577-2584. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0201.

[11] Loft M, To YH, Gibbs P, et al. Clinical application of circulating tumour DNA in colorectal cancer[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(9): 837-852. doi: 10.1016/S2468-1253(23)00146-2.

[12] Sant M, Bernat-Peguera A, Felip E, et al. Role of ctDNA in breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(2): 310-323. doi: 10.3390/cancers14020310.

[13] Labiano I, Huerta AE, Arrazubi V, et al. State of the art: ctDNA in upper gastrointestinal malignancies[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(5): 1379-1404. doi: 10.3390/cancers15051379.

[14] Ou SI, Hong JL, Christopoulos P, et al. Distribution and detectability of EGFR exon 20 insertion variants in NSCLC[J]. J Thorac Oncol, 2023, 18(6): 744-754. doi: 10.1016/j.jtho.2023.01.086.

[15] Han JY, Choi JJ, Kim JY, et al. PNA clamping-assisted fluorescence melting curve analysis for detecting EGFR and KRAS mutations in the circulating tumor DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 627-636. doi: 10.1186/s12885-016-2678-2.

[16] 窦世华,谢鸿生,杨 林. 基于ctDNA的MRD检测在早期非小细胞肺癌根治术后的应用价值[J]. 中国肺癌杂志, 2021, 24(12): 862-866. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2021.102.44.

[17] 杨会珍,赵幸汝,张晓菊,等. 表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂治疗后耐药的肺腺癌患者二次组织活检与外周血基因特征一致性分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2021, 35(3): 272-275. doi: 10.13507/j.issn.1674-3474.2021.03.015.

[18] Le NQK, Kha QH, Nguyen VH, et al. Machine learning-based radiomics signatures for EGFR and KRAS mutations prediction in non-small-cell lung cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9254-9267. doi: 10.3390/ijms22179254.

[19] Li D, Ding L, Ran W, et al. Status of 10 targeted genes of non-small cell lung cancer in eastern China: a study of 884 patients based on NGS in a single institution[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(9): 2580-2589. doi: 10.1111/1759-7714.13577.

[20] Li Y, Xu Z, Wang S, et al. Disease monitoring of epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated non-small-cell lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors via EGFR status in circulating tumor DNA[J]. Thorac Cancer, 2022, 13(15): 2201-2209. doi: 10.1111/1759-7714.14545.

[21] Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution[J]. Nature, 2017, 545(7655): 446-451. doi: 10.1038/nature22364.

(编辑:魏 源)