

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.08.018

循环肿瘤 DNA 在结直肠癌临床诊疗中的应用及价值

Application and value of circulating tumor DNA in clinical diagnosis and treatment of colorectal cancer

王蕾 综述, 王梅 审阅 (第二军医大学 长海医院 肿瘤科, 上海 200433)

[摘要] 循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是由实体肿瘤细胞释放到循环系统中的基因组小片段,来源于机体内所有肿瘤部位,其携带的基因组信息与肿瘤组织具有良好的一致性,能克服常规肿瘤组织活检所无法突破的肿瘤异质性问题。通过外周血 ctDNA 检测可以进行肿瘤相关基因的遗传学和表观遗传学研究,如基因突变、异常扩增、杂合性缺失等,还可以进行定量,追踪机体内特异性基因的状态变化。ctDNA 检测是一种新兴技术,相对于传统的肿瘤组织活检具有简单、易行、高重复性等优点,更易被患者接受。目前主要的技术及平台包括 PCR 技术和二代测序法,两者各有所长,根据不同时期不同需求可以进行调整。ctDNA 检测在结直肠癌的早期诊断、疗效评估、动态监测、耐药评估以及个体化精准治疗中具有深远意义及临床价值。

[关键词] 结直肠癌; 循环肿瘤 DNA(ctDNA); PCR 技术; 二代测序法; 临床应用

[中图分类号] R730.4; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0918-05

结直肠癌是我国常见的肿瘤之一,也是近二三十年来发病率上升最快的肿瘤之一^[1]。在我国,其发病率居所有恶性肿瘤中第 3 位,居恶性肿瘤致死原因第 5 位^[1]。而随着经济的发展、生活水平的提高和生活方式的改变,其发病率还将呈不断上升的趋势。近年来,随着多学科治疗引入,个体化治疗完善,靶向药物广泛应用,晚期患者的生存期得到明显延长,中位生存期可达 30 个月^[2]。目前发现的与结直肠癌相关的特异性基因主要有: *RAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 等^[3-4]。这些肿瘤特异的生物信息主要是从手术或活检组织标本中取得。但是,组织活检标本不能反映其异质性,且由于获取标本时采用侵入性手段,会给患者带来一定痛苦。因此,寻找可以替代肿瘤组织活检标本并具有高度敏感性和特异性的肿瘤标志物具有十分重要的意义。

目前的诊断方法难以发现肿瘤负荷的微小变化,随着高通量技术的发展,循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)的基因状态可代表原发肿瘤的表型和遗传学基因组成,为患者早期诊断提供了可能。作为一种潜在的实时监测肿瘤的标志物,ctDNA 检测不仅可以在早期对结直肠癌患者进行无创性诊断,还可以为个体化治疗提供新的治疗靶点及思路,用来监测患者的治疗效果。本文就 ctDNA 在结直肠癌临床诊疗中的应用及价值作一综述。

1 ctDNA 的生物学特性

ctDNA 是实体肿瘤细胞凋亡或破裂而释放进入外周血液循环系统的游离基因片段,大小在 0.18~21 kb,主要存在于血液、滑膜液和脑脊液等液体中,可

经尿液和粪便排出^[5]。目前关于 ctDNA 的来源及释放机制尚无统一论,但大部分学者认为来源于肿瘤原发灶、转移灶和循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)等^[6],释放机制包括凋亡、坏死及分泌等方式,其中以凋亡释放为主,但释放的速率和水平尚不清楚。

同时,在生物体内,ctDNA 还具有一些特有的生物学特性^[7-9]需要研究者关注。(1)含量极低。在不同类型癌症及个体间基线波动较大。ctDNA 含量在不同癌症间差异明显,即使同一癌症类型的不同个体间 ctDNA 的含量差异也很大。在同一患者体内,ctDNA 水平随“肿瘤负荷”及疾病严重程度而变化。因此高浓度 ctDNA 的存在往往预示着癌症晚期及不良预后。(2)具有较短的半衰期。ctDNA 在血液循环中的半衰期不足 2 h,血中浓度能实时反映肿瘤状态。(3)能全面地反映肿瘤的整体特征。ctDNA 来源于机体所有肿瘤部位,包括肿瘤原发灶、转移灶,甚至微小残留病灶。(4)携带有肿瘤特异性的遗传学信息。由于肿瘤细胞的克隆性质,ctDNA 中的核酸序列与肿瘤组织样本来源的肿瘤特异性核酸序列保持着高度的一致性。因此,通过分析 ctDNA 的遗传学基因变异类型与数量,可以确定对该基因变异类型敏感的治疗手段和靶向药物。

[作者简介] 王蕾(1978-),女,硕士,主治医师,主要从事结直肠癌的治疗,E-mail:13921263829@163.com

[通信作者] 王梅(WANG Mei, corresponding author),博士,副教授,研究生导师,主要从事结直肠癌的靶向治疗,E-mail:13601810867@163.com

2 ctDNA 的检测

2.1 检测样本的制备

通过富集 1 ml 血清或 3 ml 血浆都可以检测 ctDNA。但有文献^[10-12]指出,虽然血清中 DNA 含量较多、质较纯,但是由于其易降解,导致异常基因检测的阳性率降低。并且当血液凝固时,血细胞裂解可向血清中释放正常 DNA,可能会对检测结果进行干扰。因此,临床上使用血浆作为检测 ctDNA 的最佳取样标本。处理血浆时,血液需放于含有 EDTA 的抗凝血剂中,细胞通过离心与上清液或血浆分离。血清在血液凝结后被收集,离心去细胞后与血清分离。收集的血浆或血清用专用试剂盒提取 ctDNA。同时,为了更加准确地测量 ctDNA 的含量、分析 ctDNA 中肿瘤特异性基因的改变,对其检测样本的采集与提

取也有严格要求:采新鲜外周血 8~10 ml,放入专用的含 EDTA-K3 抗凝血剂和细胞防腐剂的 ctDNA BCT 管中,轻轻倒转 8~10 次,保证其充分混合,因为混合不充分或不及时均可能影响检测结果的准确性。在 4~37 °C 常温保存和运输,禁止冷藏或冷冻保存^[13]。

2.2 检测方法

目前针对结直肠癌患者外周血 ctDNA 检测可分为定性和定量两种,分别用以反映肿瘤的存在及其恶性程度。常见的 ctDNA 检测技术主要基于两大平台,一种是以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)为基础扩增,另一种以二代测序(next generation sequencing, NGS)为基础检测。前者主要用于特定单个基因或数个基因的 ctDNA 检测,保证特异性的基础上有更高的敏感性;后者用于批量基因、外显子和基因组的 ctDNA 检测,效率更高。常见检测方法优劣见表 1。

表 1 常见 ctDNA 检测技术的优劣对照

检测平台	检测方法	灵敏度	智能化	定性	定量	优点	缺点
PCR	PCR/ Sanger Sequencing ^[10]	>10%	慢	可以		直观且相对成本低,可检测已知和未知突变	工作量大且灵敏度低
	ARMS-PCR ^[14]	0.10%	较快	可以		敏感度高且污染几率小,只扩增并检测突变的序列	只能检测已知突变,相邻密码子之间存在交叉反应,成本较高
	BEAMing ^[13]	0.01%	快		可以	灵敏度高,使拷贝数量化,可检测特定组织或人群中罕见的基因突变	实验操作步骤较多
	Digital PCR ^[15]	0.01%	快		可以	可绝对定量,灵敏度可达单个核酸分子	只能检测已知突变位点,通量低
NGS	NGS ^[16]	1%~5%	较慢	可以	可以	可实现大规模平行测序,灵敏度高,特异性强,可进行相对定量	耗时较长
	TAM-Seq ^[17]	0.01%	快		可以	测序通量高,敏感性和特异度较高,相对成本较低,利于临床应用	基于新一代测序技术,检测时间相对较长
	CAPP-Seq ^[18]	0.01%	快		可以	灵敏度及特异性高,与全外显子测序等相比相对经济可行	耗时较长

3 ctDNA 在结直肠癌治疗中的应用

3.1 早期诊断

ctDNA 水平的升高对肿瘤高危人群的早期筛查和肿瘤早期诊断具有重要意义。Tie 等^[19]通过检测结肠癌和健康人中的血清 DNA 水平和 CEA 水平,证实结肠癌患者 ctDNA 水平比健康人明显升高,并提示可将血清游离 DNA 和 CEA 进行联合检测,并将其作

为早期结肠癌筛查指标。有研究者^[20]将 229 例化疗抵抗的转移性结直肠癌患者和 100 例健康人进行对比研究,结果显示,结直肠癌患者中的 ctDNA 水平明显高于健康人组($P<0.01$)。Garrigou 等^[21]进一步将 ctDNA 甲基化指标应用于结直肠癌的早期筛查。然而,对于早期患者,检测血液 ctDNA 做诊断目前仍处于科研探索阶段,可以作为一些热点突变的初筛和肿瘤组织检测的补充。

3.2 疗效的判断

近年来,伴随着结直肠癌治疗的进展,肿瘤药物呈现多样化的趋势,如何选择安全可靠的疗效评价方法并及时反馈治疗方法的有效性,是肿瘤治疗过程中所面临的重要挑战。鉴于患者外周血中 ctDNA 浓度及其本身变异特征都能及时反映肿瘤的变化,已有研究^[22]证实,ctDNA 在手术及治疗后疗效评估方面作用显著。既可以通过检测 ctDNA 水平评估手术效果,判断肿瘤是否已经切除干净,又可以判断患者针对某一药物治疗后的有效性。闫巍等^[23]研究结直肠癌患者手术前后 ctDNA 水平的变化时发现,结直肠癌患者通过手术切除肿瘤后 3 d ctDNA 水平与术前相比有一过性升高,术后 14~30 d ctDNA 水平下降,明显低于术前水平。Frattini 等^[24]不仅研究了结直肠癌患者手术前后的 ctDNA 水平,还研究了 ctDNA 中 *KRAS* 和 *p16* 的变化。研究发现术后 ctDNA 水平逐渐下降,肿瘤复发时快速升高,并且仅在肿瘤患者的 ctDNA 中能发现突变的 *KRAS* 和甲基化的 *p16* 基因。Cheng 等^[22]报道结直肠癌患者经过有效治疗后,体内 ctDNA 水平明显下降,并且随着病情复发,ctDNA 水平随之升高。以上研究均表明 ctDNA 的水平及突变情况与肿瘤发展状况相关,肿瘤特异性 ctDNA 的变化能够反映肿瘤负荷大小。

3.3 动态监测

以 ctDNA 作为肿瘤标志物,多次取样定性定量检测肿瘤负荷,监控疾病复发;同时还可以追踪药物对患者肿瘤的响应程度,通过药物疗效信息及时采取调整或治疗措施。众所周知,肿瘤异质性包括空间和时间上的,一方面局部穿刺标本难以准确反映肿瘤的整体特征,而且随着治疗选择压力导致的肿瘤演变以及耐药基因的出现,仅仅依靠治疗前组织标本去指导后续临床决策可能会造成治疗的偏倚。另一方面,对于无法进行或不耐受组织活检的患者,ctDNA 监测可以作为一个良好的补充检查手段。当治疗药物有效时,ctDNA 中药物敏感的肿瘤特异基因突变减少,一旦产生耐药,ctDNA 中耐药基因突变增加。Misale 等^[25]研究发现野生型 *KRAS* 的 mCRC 患者在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂治疗进展后检测血浆中能到 *KRAS* 突变,*KRAS* 水平呈进行性增加,中断后 EGFR 抑制剂 *KRAS* 突变基因呈进行性下降。由于不同部位的肿瘤都会持续释放 ctDNA 进入循环系统,因此,血液中匀质性的 ctDNA 检测比局限性的组织活检具有更好的代表性,对临床的指导意义更大。

3.4 用药指导

通过对 ctDNA 中肿瘤特异的突变检测,能够有

效反映患者对治疗的响应。在结直肠癌领域,出现 *KRAS* 和 *BRAF* 基因突变是三线治疗原发耐药的主要原因。Diaz 等^[26]检测了 28 例接受帕尼单抗治疗的结直肠癌患者的 ctDNA,发现只有 40% 的 *KRAS* 野生型患者对 EGFR 阻断治疗敏感,在原发性及治疗过程中获得性 *KRAS* 突变是出现 EGFR 阻断治疗不敏感的原因,与其他靶向药物联合治疗可能是更长期缓解病情的有效办法。因此,对于晚期结直肠癌依据血液 ctDNA 基因检测结果可以有效指导临床用药。

3.5 追踪耐药产生

在晚期结直肠癌患者治疗过程中,ctDNA 检测分析不但能反映肿瘤生长状况及术后效果,还能指导靶向药物治疗及寻找耐药机制,对产生耐药的患者给予早期警告。ctDNA 检测联合影像学检查能够筛选对抗肿瘤治疗有反应的患者,并且,与 CT 扫描相比能较早预测肿瘤进展。另外,可以通过可能出现的耐药基因突变的监控,来检测到耐药的产生。比如 EGFR 阻断剂,Diaz 等^[26]通过检测 *KRAS* 野生型和突变型的情况来监控患者 EGFR 阻断剂耐药突变的出现。对可能产生的耐药位点进行检测,可以追踪耐药突变的产生,从而定性并定量。如 Bettegowda 等^[27]对 *KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 和 *EGFR* 所有的外显子进行检测,发现 96% 的样本的 *KRAS* 或 *NRAS* 基因有至少一个突变。

3.6 预后评估

目前,结直肠癌患者经治疗后,虽然大部分肿瘤细胞被免疫系统吞噬,但是在适当的条件下能进一步发展成新的肿瘤灶。因此,可以通过对 ctDNA 分子水平的监测,判断复发及预后疗效。Barbazán 等^[28]对 37 例结直肠癌患者进行观察,分析 ctDNA 中 *KRAS* 基因突变及 *CDKN2A* 启动子超甲基化在结直肠癌患者预后判断中的作用。结果显示,发生 *KRAS* 基因突变或 *CDKN2A* 启动子超甲基化的患者 2 年整体生存率低至 48%,而以上两种基因没有发生改变的患者 2 年整体生存率为 100%。通过这组数据可明显发现,以上 ctDNA 中 2 种基因的变化直接影响患者生存率,表明其在结直肠癌预后判断中具有非常重要的价值,可能在今后的研发中成为结直肠癌预后的重要标志物。

2012 年,Spindler 等^[29]对 108 例接受西妥昔单抗和伊立替康联合治疗的晚期结直肠癌患者进行 ctDNA 中 *KRAS* 和 *BRAF* 基因突变的研究,研究通过 qPCR 检测对患者 ctDNA 中 *KRAS* 和 *BRAF* 基因突变进行治疗前检测。发现 *KRAS* 基因突变率 75% 以上患者的疾病控制率低于突变率较低的患者。Cox 回归分析显示 DNA 中 *KRAS* 基因突变率与晚期结直肠癌

预后具有相关性, *KRAS* 基因突变率与 mCRC 患者预后呈负相关, 由此可见, ctDNA 中 *KRAS* 基因突变率分析有可能成为组织活检后结直肠癌患者预后评估新手段。

由上述内容可知, ctDNA 在“量”与“质”两个方面对 CRC 患者的治疗及预后评估均有非常巨大的作用与价值, 通过不断地研究和探索, 将 ctDNA 的监测分析形成一套标准的临床评估方法, 使其在临床 CRC 治疗过程中指导治疗方案的调整及患者预后评估, 使得临床医务人员可通过 ctDNA 的监测分析来充分掌握结直肠癌患者的病情。

4 结 语

本文主要叙述了 ctDNA 在结直肠癌临床治疗过程中的实用性, 近年来, 众多科研人员对 ctDNA 进行了多方面的研究, 初步形成了对 ctDNA 的认识和了解, 发现其在结直肠癌患者的诊断、治疗、病情监测及预后评估方面有其独特的优势, 这些优势使得 ctDNA 的检测具有巨大的临床应用价值, 例如取样简便易行, 可重复使用, 在临床应用时可更加准确的判断患者的病情, 提高患者的依从性; 早期诊断、高特异性、高灵敏度使的及早并准确的发现病情, 为患者赢得宝贵的治疗时间; 动态监测和预后判断更是为结直肠癌患者的治疗提供了准确的指导信息, 以便及时调整治疗方案, 减少不必要的毒副作用及降低治疗费用。

但是, 笔者意识到, 在 ctDNA 的研究过程中同样存在困难, 例如由于 ctDNA 均为片段状, 在外周血中浓度较低、容易降解, 这使其检测难度加大, 检测方法不稳定、不统一、没有固定的标准, 其质量不能保证等。但近年来, 随着基因技术和生物学技术的快速发展, 基因测序技术迅速发展, 新方法不断产生, ctDNA 检测的灵敏度不断提高, 可靠性大大增强, 并在临床上得到了广泛的应用, 使血液样本 ctDNA 检测替代组织活检成为现实, 逐渐在肿瘤临床领域显现出更高的应用价值, 相信在不久的将来, 血液样本 ctDNA 检测将逐步发展成熟并形成标准, 为结直肠癌患者临床诊疗服务。

[参 考 文 献]

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.

[2] MODEST D P, STINTZING S, FISCHER VON WEIKERSTHAL L, et al. Relation of early tumor shrinkage (ETS) observed in first-line treatment to efficacy parameters of subsequent treatment in FIRE-3 (AIOKRK0306)[J]. Int J Cancer, 2017, 140(8): 1918-1925.

DOI: 10.1002/ijc.30592.

- [3] SORICH M J, WIESE M D, ROWLAND A, et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials[J]. Ann Oncol, 2015, 26(1): 13-21. DOI: 10.1093/annonc/mdl378.
- [4] THERKILDSEN C, BERGMANN T K, HENRICHSEN-SCHNACK T, et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Acta Oncol, 2014, 53(7): 852-864. DOI: 10.3109/0284186X.2014.895036.
- [5] 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. DOI: 10.1373/clinchem.
- [6] OXNARD G R, PAWELETZ C P, KUANG Y, 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. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2482.
- [7] YORUKER E E, OZGUR E, KESKIN M, et al. Assessment of circulating serum DNA integrity in colorectal cancer patients[J]. Anticancer Res, 2015, 35(4): 2435-2440. DOI:10.1016/bs.acc.2015.03.002.
- [8] EL-GAYAR D, EL-ABD N, HASSAN N, et al. Increased free circulating DNA integrity index as a serum biomarker in patients with colorectal carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(3):939-944. DOI: 10.7314/apjcp.2016.17.3.939.
- [9] SCHWAEDERLE M, HUSAIN H, FANTA P T, et al. Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9707-9717. DOI: 10.18632/oncotarget.7110.
- [10] WANG J Y, HSIEH J S, CHANG M Y, et al. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers[J]. World J Surg, 2004, 28(7): 721-726. DOI: 10.1007/s00268-004-7366-8.
- [11] 蒋蓓琦, 张一楚. 血游离DNA检测及肿瘤的基因诊断[J]. 国外医学外科学分册, 2001, 28(2): 65-67. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4203.2001.02.001
- [12] JAHR S, HENTZE H, ENGLISCH S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(4):1659-1665.
- [13] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. Nat Med, 2008 14(9): 985-990. DOI: 10.1038/nm.1789.
- [14] NYGAARD A D, GARM SPINDLER K L, PALLISGAARD N, et al. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2013, 79(3): 312-317. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.11.016
- [15] FORSHEW T, MURTAZA M, PARKINSON C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(136): 136-168. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003726.
- [16] SCHWAEDERLE M, HUSAIN H, FANTA PT, et al. Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free

(blood) circulating tumor cell DNA assay[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 9707-9717. DOI: 10.18632/oncotarget.7110.

[17] DAWSON S J, TSUI D W, MURTAZA M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13): 1199-1209. DOI: 10.1056/NEJMoa1213261.

[18] NEWMAN A M, BRATMAN S V, TO J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage[J]. *Nat Med*, 2014, 20(5): 548- 554. DOI: 10.1038/nm.3519.

[19] TIE J, KINDE I, WANG Y, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(8): 1715-1722. DOI: 10.1093/annonc/mdv177.

[20] SPINDLER K L, PALLISGAARD N, ANDERSEN R F, et al. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0108247[2017- 02- 05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4395277>. DOI: 10.1371/journal.pone.0108247.

[21] 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. DOI: 10.1373/clinchem.2015.253609.

[22] CHENG C, OMURA-MINAMISAWA M, KANG Y, et al. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(2): 303- 309. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.01021.x.

[23] 闫巍, 张能维, 徐智, 等. 结直肠癌患者手术前后循环DNA水平的变化及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(12):1627-1630. DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.12.021.

[24] FRATTINI M, CALLINO G, SIGNORONI S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(2): 170-181. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.021.

[25] MISALE S1, YAEGER R, HOBOR S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer[J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 532-536. DOI: 10.1038/nature11156.

[26] DIAZ LA J R, WILLIAMS R T, WU J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 537- 540. DOI: 10.1038/nature11219.

[27] 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. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094.

[28] BARBAZÁN J, ALONSO- ALCONADA L, MUINELO-ROMAY L, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in human metastatic colorectal cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40476 [2017- 02- 05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3397799>. DOI: 10.1371/journal.pone.0040476.

[29] SPINDLER K L, PALLISGAARD N, VOGELIUS I, et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4):1177- 1185. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0564.

[收稿日期] 2017-02-09 [修回日期] 2017-05-22
[本文编辑] 黄静怡

· 读者·作者·编者·

参考文献题名后应标注文献类型和文献载体标识代码

本刊参考文献按照国家标准GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都应标上[文献类型标识代码]或[文献类型标识代码/文献载体标识代码]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子资源类文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。现把常用文献类型标识和电子文献载体标识代码列于表1作一介绍。

表1 文献类型和文献载体标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码	载体类型	标识代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会议录	C	数据库	DB	联机网络	OL
学位论文	D	计算机程序	CP		
报 告	R	电子公告	EB		