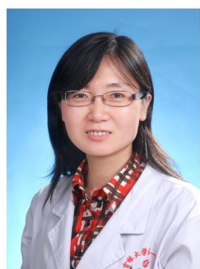


DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.02.001

· 专家论坛 ·

## 肿瘤精准医学时代下精准检测技术的发展现状与临床应用

白日兰, 郭寒菲, 崔久崑(吉林大学第一医院 肿瘤中心, 吉林 长春 130021)



**崔久崑** 教授、主任医师、博士生导师, 现任吉林大学第一医院肿瘤中心肿瘤科主任; 兼任中国研究型医院生物治疗学专业委员会副主任委员、肺癌生物治疗学组组长, 中国医药质量管理协会细胞治疗质量控制与研究专业委员会常委, 中华医学免疫学会常务委员, 中国抗癌协会营养与支持委员会肿瘤免疫营养学组组长, 中国临床肿瘤学会(CSCO)理事, 中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会委员, 中国医药生物技术协会医药生物技术临床应用专业委员会委员等。主持和参加国家科技部重大慢性疾病项目1项, 国家自然科学基金重点项目1项, 国家自然科学基金4项, 国家卫生部临床重点项目3项, 教育部科学技术研究重大项目1项。在*Blood*、*Leukemia*、*Mol Cell Proteomics*、*Clin Cancer Res*等国际期刊上发表SCI收录文章80余篇, 主编学术著作4部, 主译学术著作2部。

**[摘要]** 精准检测技术推动了精准医学时代个体化肿瘤诊治的发展, 同时, 临床精准诊治的需求进一步驱动精准检测技术的改良与应用。近年来, 精准医学检测实现了从基因低通量测序到高通量测序、组织活检到液体活检及多细胞混杂检测到单细胞精准检测的变革, 推动了肿瘤精准医学时代新技术、新靶点、新药物的产生与发展。未来, 多维度联合检测有助于提高精准医学的精准度, ctDNA甲基化检测分析则有助于拓宽精准医学研究领域, 临床试验设计的变革也有助于推动精准医学深入发展。

**[关键词]** 肿瘤; 精准医学; 液体活检; 第二代测序; 单细胞测序

**[中图分类号]** R730.43; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)02-0103-06

## Development status and clinical applications of precision detection technology in the times of precision oncology

BAI Rilan, GUO Hanfei, CUI Jiwei (Cancer Center, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China)

**[Abstract]** Precision detection techniques have promoted the development of individualized diagnosis and treatment of tumors in the era of precision medicine. At the same time, clinical demands of precision treatments have further driven the development and application of precision detection techniques. In recent years, precision medical detection techniques realized rapid transformations from low-throughput to high-throughput genomic sequencing, from tissue biopsies to liquid biopsies, and from multi-cell promiscuous detection to single cell precision sequencing. All these changes have promoted the emergence and development of new technologies, new targets, and new drugs in the era of precision oncology medicine. In the future, multi-dimensional combined detection could help to improve the accuracy of precision medicine; ctDNA methylation detection analysis could broaden the research field of precision medicine; and the transformation of clinical trial design could also contribute to promote the in-depth development of precision medicine.

**[Key words]** oncology; precision medicine; liquid biopsies; next-generation sequencing (NGS); single cell sequencing (SCS)

[Chin J Cancer Biother, 2019, 27(2): 103-108. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.001]

**[基金项目]** 国家重点研发项目(No. 2016YFC1303804); 吉林省科技厅科技发展计划项目(No. 20190303146SF); 吉林省发展和改革委员会省级产业创新专项资金项目(No. 2017C022); 吉林省科技厅重点实验室建设项目(No. 20170622011JC)。Project supported by the National Key Research and Development Program of China (No.2016YFC1303804), the Science and Technology Development Project of Department of Science and Technology of Jilin Province (No.20190303146SF), the Special Project of Development and Reform Commission in Jilin Province (No.2017C022), and the Key Laboratory Construction Project of Department of Science and Technology of Jilin Province (No.20170622011JC)

**[作者简介]** 白日兰(1993-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤综合治疗的基础和临床研究工作, E-mail: bairilan@foxmail.com

**[通信作者]** 崔久崑(CUI Jiwei, corresponding author), E-mail: cuijw@jlu.edu.cn

精准医学的发展应以精准检测为基础,综合考虑包括基因、环境因素、生活习惯差异等多方面因素,精确寻找疾病病因与治疗靶点,对不同疾病及其发展过程进行精确分类,最终实现对疾病的最优化、个性化精准治疗,提高疾病诊治与预防效益<sup>[1]</sup>。2015年3月,我国科技部首次召开精准医学战略专家会议,计划启动精准医学计划,并将其列为国家“十三五”健康保障发展问题研究的重大专项之一。精准医学时代的开启为肿瘤诊治带来巨大变革,肿瘤驱动基因的发现和相应靶向治疗药物不断出现<sup>[2]</sup>,推动了个体化精准治疗,也为精准医学检测带来挑战。近年来,临床需求逐步驱动精准检测技术的发展及应用,精准医学检测经历了基因低通量测序到高通量测序、组织活检测到液体活检、多细胞混杂检测到单细胞精准检测的变革,推动了肿瘤精准医学时代新技术、新靶点、新药物的研发与进步。

## 1 临床需求驱动精准检测技术的发展及应用

### 1.1 精准检测技术经历了基因低通量测序到高通量测序的变革

鉴于同一病理类型肿瘤可有不同的驱动基因异常,精准医学检测技术经历了从单一位点检测到多位点同时检测的变革,基因测序从第一代低通量测序(Sanger法)发展为第二代或第三代高通量测序阶段,逐步实现了对基因的同步、多靶点检测。

第一代测序技术因费用昂贵、耗时长而难以普及。随着技术的不断发展与改进,第二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术应运而生。其主要用于检测DNA序列中的单碱基变异、插入缺失、结构变异和拷贝数变化等<sup>[3]</sup>,通过结合聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增和荧光标记成像技术获取基因全部遗传信息,提供肿瘤遗传景观快照。应用于整个基因组的NGS技术称为全基因组测序<sup>[3]</sup>(whole genome sequencing, WGS),可对整个基因组进行测序,提供最全面的基因组特征和最高水平的基因组测序。而全外显子组测序<sup>[3]</sup>(whole exome sequencing, WES)仅对占基因组2%的编码DNA进行测序,为发现活化的体细胞突变提供了一种有效方法。WES可充分读取单个区域,以更经济而快速的过程确保100倍的覆盖范围,因而更合适分析肿瘤基因组。目前,许多基于NGS的肿瘤基因组合(gene panel)已应用于临床实践,如美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的可检测324种基因突变的Foundation One CDx技术体系和可检测468基因突变的MSK-IMPACT癌症基因检测分析平台。基因panel数影响肿瘤突变负

荷(tumor mutational burden, TMB)检测的精准度,基因数目大者与WES的相关性及临床预测效果更佳<sup>[4]</sup>。如研究<sup>[5]</sup>显示,通过对约1 Mb基因组panel测序可准确评估TMB水平。与第一代相比,第二代测序技术极大地降低了测序成本,节约了测序时间;但由于其在建库过程中需扩增和分段环节,使得读取和序列组装时可能会引入大量偏差和错误,且读长较短,可能造成基因组高复杂度的区域组装错误、测序间隙区增多及低丰度难以检出等分析缺点<sup>[6]</sup>。

针对以上问题,第三代单分子测序技术逐渐发展。它弥补了第二代测序读取序列较短的劣势,且无需PCR扩增便可快速对全基因组序列进行测序拼接,避免产生上述测序偏差,并在测序成本和时间上更有优势<sup>[7]</sup>。该技术可从DNA上同时获得基因组序列信息和单核苷酸水平的表观遗传信息,为深入解析生物体不同代谢过程的表观遗传调控机制提供重要的技术支撑。在肿瘤检测方面,单分子测序技术不仅可检测基因遗传突变,还可通过检测表观遗传修饰位点和长链非编码RNA丰度等对肿瘤进行分级和分型<sup>[8-9]</sup>。

RNA测序(RNA-seq)是NGS的一种相对较新的应用,逐渐取代微阵列作为转录物分析的最佳技术。它可量化基因表达,检测新转录物、基因融合和插入缺失等,并分析未翻译成蛋白质的小型非编码RNA<sup>[10-11]</sup>。由于测序深度的优势,RNA-seq可更全面地揭示生物个体在特定时刻和特定组织的全部基因表达情况,在鉴别罕见病候选基因异常表达、剪接和选择性剪接事件方面具有实用价值<sup>[12]</sup>。

综上,精准医学检测历经了单一位点检测到多位点同时检测、低通量测序到高通量测序的变革。目前各项检测方法虽仍有技术上的瓶颈,但预示着未来测序的发展方向。

### 1.2 精准检测技术实现了组织活检测到液体活检的变革

由于时空进化和动态演进的连续性,肿瘤细胞和基因/基因组变异存在高度异质性,广义上可分为肿瘤间异质性和肿瘤内异质性<sup>[13]</sup>,表现为不同肿瘤、同一肿瘤不同个体、肿瘤瘤灶内、瘤灶间的异质性等<sup>[14]</sup>,而肿瘤的高度异质性和快速演进是实现肿瘤精准检测和诊治的最大障碍<sup>[15-16]</sup>。组织活检时可能会出现取样区域偏差,且原发性和转移性病变的连续广泛组织取样难以实现;另外,组织活检局限于其侵入性和静态检测的特点。因此,亟待寻找更全面反映肿瘤特征及肿瘤动态变化的检测手段。

近几年,液体活检技术的出现推动精准检测实现了从静态检测到动态监测的变革。液体活检通过简单的非侵入性血液采样及分析,可重复、动态监测

肿瘤随时间的演变过程,并成为研究肿瘤内异质性最有力的工具<sup>[17-18]</sup>。它可通过PCR或高通量测序技术<sup>[19]</sup>,检测从原发肿瘤和转移部位释放到血流中的循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)和ctRNA<sup>[20]</sup>。

1.2.1 ctDNA 定量分析ctDNA突变的等位基因可反映肿瘤负荷,监测微小残留或隐匿性转移,是药物疗效、肿瘤复发的高灵敏度和特异性预测因子;定性分析ctDNA的突变、扩增、缺失等可识别与药物治疗反应相关的遗传改变,从而有针对性地进行个体化治疗<sup>[19]</sup>。近年来,已开发多种ctDNA中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变检测方法,包括突变阻滞扩增系统(amplification refractory mutation system, ARMS)、微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)及NGS等<sup>[21]</sup>。SuperARMS法<sup>[22]</sup>是最近提出的一种改良ARMS技术,在保留原技术优势的同时进一步提高了检测灵敏度。2018年,中国国家食品药品监督管理总局(China Food and Drug Administration, CFDA)已批准其用于检测晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)血液EGFR突变状态,筛选适合靶向药物的患者。除对单基因的检测外,基于ctDNA的多基因分析技术,如血液TMB(blood TMB, bTMB)、微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)检测显示出较组织学检测更为简便、快速、动态的特点<sup>[23]</sup>。近期POPLAR及OAK临床研究<sup>[24-25]</sup>结果显示,bTMB水平可预测免疫治疗疗效,且随着bTMB临界值的升高,患者更倾向于从免疫治疗中获益。

1.2.2 CTC 临床实践中可利用CTC的物理特性如大小、密度、电荷等,或基于抗原抗体反应识别CTC表面特有分子等两类技术分离富集CTC,再通过细胞化学染色、荧光原位杂交技术、PCR、测序等技术对其进行鉴定及核酸分析。目前,唯一经FDA批准广泛应用于临床的CTC检测技术是细胞搜索系统(Cell Search System)<sup>[26]</sup>,它将CTC定义为血液中检测到上皮细胞黏附分子<sup>+</sup>/细胞角蛋白<sup>+</sup>/4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>的细胞。CTC检测可通过细胞计数为临床提供肿瘤定量信息,也可获取基于单细胞基因组、转录组学和/或蛋白质组学分析的定性信息。它能反映肿瘤组织情况,通过无创动态监测方式对肿瘤进行病理诊断、分子测序、疾病监测,并为临床提供治疗决策、预后信息等<sup>[27]</sup>。

1.2.3 EV EV是细胞分泌的携带各种蛋白质和核酸的一种脂质囊泡,可通过其获取肿瘤相关信息<sup>[28-29]</sup>。肿瘤细胞分泌的富含PD-L1的外泌体可进

入机体外周血并对肿瘤微环境以外的T细胞发挥抑制作用<sup>[30]</sup>,对它的检测有助于深入探究肿瘤免疫逃逸机制,并研发靶向解除免疫抑制的疗法。诊断前列腺癌的外泌体液体活检技术ExoDx Prostate IntelliScore(EPI)已获美国FDA突破性医疗器械认定,可用于前列腺癌的相关检测及预后评估。研究<sup>[31-32]</sup>还显示,佛氏白血病毒整合蛋白1(friend leukemia virus integration 1, FLI1)外显子环状RNA是一种新的致癌驱动因子,可通过miR584-ROCK1途径促进肿瘤转移,而血清外泌体中FECR1(FLI1外显子4-2-3组成的环状RNA)的含量与小细胞肺癌患者的疗效及预后相关,可作为疗效监测及预后评估的新型标志物。

1.2.4 液体活检技术临床应用与不足 临床上,液体活检可实现对肿瘤标志物的全面、动态监测,在肿瘤筛查、早期诊断、肿瘤治疗实时监测、治疗靶点和耐药机制研究、转移复发的风险/预后的预测等方面具有广阔的临床应用前景<sup>[33]</sup>。目前,其技术方面的局限性主要有以下几点:首先,检测技术灵敏度低是早期肿瘤筛查的重要问题;其次,临床实践中ctDNA的分析缺乏用于分析前样品制备和纯化的标准化方案,目前的分析检测程序较复杂,可能导致ctDNA降解和血细胞溶解,将其从血液中快速纯化的分析平台是未来需解决的难题;再者,CTC的异质性和脆性,以及对CTC基因表达的认识不足等也是液体活检的重要挑战;最后,早期检测中单个或组合基因突变的预测价值有限,联合检测方法,如基因组学与转录组学、蛋白质组学检测的联合,可能是提高肿瘤特异性检测的新型技术。尽管目前一些研究已证实液体活检在改变肿瘤治疗模式方面的潜力,但未来仍需大量实践明确其在肿瘤诊断、监测和预后中的作用。

1.3 精准检测技术实现了多细胞混杂检测到单细胞精准检测的变革

传统基因检测基于细胞混杂的DNA样本,检测结果为组织内多数细胞的特征或整体样本的平均值,因而无法表征细胞间差异性,亦无法解读生物的生长发育机制和少量特殊细胞的特征。近几年发展的单细胞测序(single cell sequencing, SCS)<sup>[34]</sup>技术基于单个细胞的基因组、转录组、表观组进行高通量测序分析,可分析肿瘤异质性及克隆演化,并揭示肿瘤化疗耐药的分子机制<sup>[35]</sup>。SCS技术可检测微量基因表达和罕见非编码型RNA,揭示细胞个体在特定时间的演化情况,有助于在个体水平认识组织或机体的发生和演化<sup>[34,36]</sup>。

SCS已逐步应用于基础和临床实践研究。首先,SCS可构建免疫细胞图谱,促进了对肿瘤免疫微环境

研究的发展。LI 团队<sup>[37]</sup>使用单细胞转录组测序和 T 细胞受体测序(T cell receptor repertoire sequencing, TCR-Seq)分析并绘制了黑色素瘤详尽的免疫细胞图谱,发现不同患者的免疫细胞相对丰度差异大,揭示了微环境浸润 T 细胞转录组的异质性和分化途径,为免疫治疗效果的差异提供理论支撑。AZIZI 团队<sup>[38]</sup>通过分析正常乳腺组织、乳腺癌、外周血及淋巴结来源的共 4 万多免疫细胞的基因表达特征,揭示了肿瘤免疫微环境内淋巴细胞和髓系细胞的异质性和表型扩增,绘制了目前规模最大的免疫细胞图谱。GUO 等<sup>[39]</sup>利用 SCS 技术研究了肿瘤浸润淋巴细胞的组成、谱系和功能状态的基线情况,设计了 NSCLC T 淋巴细胞图谱,其内包含单细胞数据获取流程、T 细胞亚群分类、亚群间的状态转换关系及调节性 T 细胞的异质性等免疫特征。其次,SCS 还可揭示细胞空间定位。KEREN 等<sup>[40]</sup>使用核素标记 36 个蛋白,获得了其单细胞水平信息,即多重离子束飞行时间成像(multiplexed ion beam imaging by time of flight, MIBI-TOF)技术。通过此技术可系统地了解乳腺癌肿瘤细胞和不同种免疫细胞的空间分布特征,精确地认识不同患者的细胞分布特征,进而评估免疫治疗疗效及预后。

## 2 精准检测技术的未来趋势

### 2.1 多维度联合检测有助于提高精准医学的精准度

基因组学联合转录组学、蛋白组学检测可扩展精准医学的应用,提供最佳和尽可能多的肿瘤治疗方案。WINTHER 试验<sup>[41]</sup>通过整合 DNA 和 RNA 基因表达谱数据,为难治性肿瘤推荐精准治疗方案,转录组学显著提高了患者接受匹配治疗的比例,且 22.4% 的患者接受推荐治疗与先前治疗的 PFS 比值 > 1.5。有专家团队<sup>[42]</sup>将 8 种血液生物标志物与 16 种肿瘤相关基因 ctDNA 突变谱分析相结合,用于早期常见肿瘤筛查,其特异性超过 99%,中位敏感性在 I 期肿瘤为 43%、II 期肿瘤为 73%、III 期肿瘤为 78%<sup>[42]</sup>。外泌体 RNA 联合 ctDNA 也显示出潜在优势。KRUG 等<sup>[43]</sup>人收集了参加 TIGER-X 试验(NCT01526928)的 84 名患者的肿瘤组织和血液样本,分别使用 exoNA 法[基于 NGS 的胞外囊泡外泌体 RNA(exoRNA)联合 ctDNA 检测]和 BEAMing(ddPCR)法检测 ctDNA EGFR,结果显示,exoNA 法检测 EGFR 激活突变的灵敏度为 98%、检测 EGFR T790M 灵敏度为 90%,而 BEAMing 法检测 EGFR 灵敏度为 82%、T790M 为 84%,显示出血液学生物标志物多维度联合检测的优势。

### 2.2 ctDNA 甲基化检测分析有助于拓宽精准医学研究领域

DNA 甲基化是肿瘤发生发展中最早发现的主要表观遗传改变之一,其异常化模式在不同肿瘤组织中具有高度特异性。先前对表观基因组学的研究基本依靠微阵列技术,NGS 的出现很大程度上促进了在单核苷酸分辨率下以高通量数据输出检测全基因组范围内表观遗传改变的研究。基因甲基化的检测技术有 PCR、全基因组甲基化测序、450K 甲基化芯片等。临床上,ctDNA 甲基化可反映基因启动子区高甲基化特征,利用肿瘤标志物和组织特异性甲基化模式的双重信号可检测和定位肿瘤;另外,ctDNA 甲基化可反映肿瘤负荷变化,用于肿瘤诊断、评估预后等<sup>[44]</sup>。一项基于大规模临床数据分析和深度学习的研究<sup>[45]</sup>提出了用于肝癌早期筛查、风险评估和预后监测的甲基化模型,包括综合诊断模型(cd-score)和综合预后模型(cp-score),并验证了其在肿瘤监测方面的潜在作用。

### 2.3 临床试验设计的变革有助于推动精准医学深入发展

基于基因组学的临床研究的最佳试验设计对于推动精准医学发展至关重要。近年来,针对精准肿瘤医学的创新性临床试验可分成两大类,一类称为篮式试验(basket trial),即将相同靶基因突变的不同肿瘤纳入同一研究<sup>[46-47]</sup>;另一类称为伞式试验(umbrella trial),即将不同驱动基因突变,如 KRAS、EGFR、ALK 突变的同种肿瘤纳入同一研究,根据不同靶基因应用不同精准靶药物进行治疗(MASTER 试验,NCT02154490),其最大优势在于将罕见突变事件集中,对加速少见疾病的临床试验研究及实现个体化精准治疗具有显著临床意义。MyPathway 研究(2015 ASCO 摘要号:LBA11511)利用伞篮式相结合的新型混合实验模式(hybrid trial)评估了 4 种靶向治疗方案在无可获益方案晚期肿瘤患者中的疗效,展现出初步成果。优化的试验设计可帮助临床前期工作的推进,对加速精准治疗药物的开发、批准及临床肿瘤学的发展均是有意义的起步和探索,但未来仍需进一步细化和设计。

## 3 总结与展望

精准检测技术推动了精准医学时代个体化肿瘤诊治的发展,同时,临床精准诊治的需求可进一步驱动精准检测技术的改良与应用。精准医学依赖于对肿瘤生物学的了解,新技术使研究者能够绘制肿瘤分子图谱、识别关键致癌驱动因素、并设计专门针对细胞靶标的治疗方法,以获得临床效益。近年来,精准医学检测的变革推动了肿瘤精准医学时代新技术、新靶点、新药物的产生与发展,加快了科研进步,

提升了对疾病风险机制的把握和对多种疾病最佳治疗方案的预测。

目前,精准检测技术应用和平台建设仍存在诸多挑战,如不同NGS平台间检出结果不一致问题,可能与样本预处理、NGS平台和算法差异有关;液体活检的敏感度和准确性仍需足够证据验证,且尚不能广泛用于肿瘤的早期筛查与诊断等<sup>[48]</sup>;SCS技术的成本较高、需新鲜分离的细胞、对实验室的等级要求较高等,均限制了其在临床上的广泛应用。此外,研究<sup>[49]</sup>显示针对同一基因突变的靶向治疗在不同肿瘤类型中可产生不同效果,可能与信号转导的差异、肿瘤间异质性等有关,而精准检测技术的发展有助于充分探究其内在机制,更准确地预测单个患者对治疗的反应,以实现个体化精准医学治疗。

未来,应广泛探究液体活检技术的联合检测及精准检测在表观遗传学、罕见基因检测、个体化靶向治疗和多基因靶向药物联合治疗方面<sup>[50]</sup>的作用;通过大样本和大数据的积累,借助云计算和人工智能技术的发展,有望加快科研进步、推动医学科技前沿发展,并带动大健康产业的发展;通过精准医学检测,可了解每一患者的分子谱与突变信息特征而制定个性化精准诊疗方案,更早地判断疾病预后、更敏感地监测疾病发展、更科学地评价治疗疗效,最终实现精准医学时代的要求。

## [参考文献]

- [1] SCHMIDT K T, CHAU C H, PRICE D K, et al. Precision oncology medicine: the clinical relevance of patient-specific biomarkers used to optimize cancer treatment[J]. *J Clin Pharmacol*, 2016, 56(12): 1484-1499. DOI:10.1002/jcph.765.
- [2] HERBST R S, MORGENZSTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454. DOI:10.1038/nature25183.
- [3] PAOLILLO C, LONDIN E, FORTINA P. Next generation sequencing in cancer: opportunities and challenges for precision cancer medicine[J/OL]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2016, 245: S84-S91 [2019-09-16]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365513.2016.1210331>. DOI:10.1080/00365513.2016.1210331.
- [4] GAROFALO A, SHOLL L, REARDON B, et al. The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine[J/OL]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 79[2019-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4962446/>. DOI:10.1186/s13073-016-0333-9.
- [5] CHALMERS Z R, CONNELLY C F, FABRIZIO D, et al. Analysis of 100, 000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden[J/OL]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 34[2019-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395719/>. DOI:10.1186/s13073-017-0424-2.
- [6] BUERMANS H P, DEN DUNNEN J T. Next generation sequencing technology: Advances and applications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(10): 1932-1941. DOI:10.1016/j.bbdis.2014.06.015.
- [7] ARBOLEDA V A, XIAN R R. An overview of DNA analytical methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1897: 385-402. DOI:10.1007/978-1-4939-8935-5\_31.
- [8] AMEUR A, KLOOSTERMAN W P, HESTAND M S. Single-molecule sequencing: towards clinical applications[J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(1): 72-85. DOI:10.1016/j.tibtech.2018.07.013.
- [9] JENJAROENPUN P, WONGSURAWAT T, PEREIRA R, et al. Complete genomic and transcriptional landscape analysis using third-generation sequencing: a case study of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(7): e38[2019-09-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5909453/>. DOI:10.1093/nar/gky014.
- [10] GOLDSTEIN L D, CAO Y, PAU G, et al. Prediction and quantification of splice events from RNA-seq data[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156132[2019-09-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4878813/>. DOI:10.1371/journal.pone.0156132.
- [11] STEIJGER T, ABRIL J F, ENGSTRÖM P G, et al. Assessment of transcript reconstruction methods for RNA-seq[J/OL]. *Nat Methods*, 2013, 10(12): 1177-1184[2019-09-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3851240/>. DOI:10.1038/nmeth.2714.
- [12] FRÉSARD L, SMAIL C, FERRARO N M, et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts[J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 911-919. DOI:10.1038/s41591-019-0457-8.
- [13] TURAJLIC S, SOTTORIVA A, GRAHAM T, et al. Resolving genetic heterogeneity in cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(7): 404-416. DOI:10.1038/s41576-019-0114-6.
- [14] VOGELSTEIN B, PAPADOPOULOS N, VELCULESCU V E, et al. Cancer genome landscapes[J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1546-1558. DOI:10.1126/science.1235122.
- [15] JAMAL-HANJANI M, WILSON G A, MCGRANAHAN N, et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(22): 2109-2121. DOI:10.1056/NEJMoa1616288.
- [16] GERLINGER M, ROWAN A J, HORSWELL S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(10): 883-892. DOI:10.1056/NEJMoa1113205.
- [17] DE RUBIS G, RAJEEV KRISHNAN S, BEBAWY M. Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(3): 172-186. DOI:10.1016/j.tips.2019.01.006.
- [18] MADER S, PANTEL K. Liquid biopsy: current status and future perspectives[J]. *Oncol Res Treat*, 2017, 40(7/8): 404-408. DOI:10.1159/000478018.
- [19] 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. DOI:10.1038/s41571-018-0074-3.
- [20] DE RUBIS G, KRISHNAN S R, BEBAWY M. Circulating tumor DNA - Current state of play and future perspectives[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 136: 35-44. DOI:10.1016/j.phrs.2018.08.017.
- [21] 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. DOI:10.1080/14737159.2018.1400384.
- [22] LI Y P, XU H Y, SU S S, et al. Clinical validation of a highly sensi-

- tive assay to detect EGFR mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced lung adenocarcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183331[2019-09-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5568724/>. DOI:10.1371/journal.pone.0183331.
- [23] 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. DOI:10.1038/s41571-018-0074-3.
- [24] TANAKA M, KATO K, GOMI K, et al. Perivascular epithelioid cell tumor with SFPQ/PSF-TFE3 gene fusion in a patient with advanced neuroblastoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2009, 33(9): 1416-1420. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181a9cd6c.
- [25] BYRNE K, ZANOTTI G, HALLWORTH P, et al. Real-world treatment patterns and outcomes of patients with stage IV squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Future Oncol*, 2019, 15(6): 611-623. DOI:10.2217/fo-2018-0484.
- [26] ANDREE K C, VAN DALUM G, TERSTAPPEN L W. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system[J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(3): 395-407. DOI:10.1016/j.molonc.2015.12.002.
- [27] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 22(3): 421-430. DOI:10.1007/s10147-017-1105-2.
- [28] SHAO H L, IM H, CASTRO C M, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(4): 1917-1950. DOI:10.1021/acs.chemrev.7b00534.
- [29] GHOLIZADEH S, SHEHATA DRAZ M, ZARGHOONI M, et al. Microfluidic approaches for isolation, detection, and characterization of extracellular vesicles: Current status and future directions[J/OL]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 588-605[2019-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5323331/>. DOI:10.1016/j.bios.2016.12.062.
- [30] CHEN G, HUANG A C, ZHANG W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 382-386. DOI:10.1038/s41586-018-0392-8.
- [31] LI L Y, LI W, CHEN N F, et al. FLI1 exonic circular RNAs as a novel oncogenic driver to promote tumor metastasis in small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(4): 1302-1317. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-1447.
- [32] CHEN N F, ZHAO G, YAN X, et al. A novel FLI1 exonic circular RNA promotes metastasis in breast cancer by coordinately regulating TET1 and DNMT1[J/OL]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 218[2019-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6290540/>. DOI:10.1186/s13059-018-1594-y.
- [33] WANG J Y, CHANG S, LI G C, et al. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges[J]. *Front Med*, 2017, 11(4): 522-527. DOI:10.1007/s11684-017-0526-7.
- [34] WIEDMEIER J E, NOEL P, LIN W, et al. Single-cell sequencing in precision medicine[J/OL]. *Cancer Treat Res*, 2019, 178: 237-252 [2019-09-19]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-030-16391-4\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-030-16391-4_9). DOI:10.1007/978-3-030-16391-4\_9.
- [35] ZHU W J, ZHANG X Y, MARJANI S L, et al. Next-generation molecular diagnosis: single-cell sequencing from bench to bedside[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(5): 869-880. DOI:10.1007/s00018-016-2368-x.
- [36] ZHANG X Y, MARJANI S L, HU Z Y, et al. Single-cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6): 1305-1312. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1907.
- [37] LI H J, VAN DER LEUN A M, YOFE I, et al. Dysfunctional CD8 T cells form a proliferative, dynamically regulated compartment within human melanoma[J]. *Cell*, 2019, 176(4): 775-789.e18. DOI:10.1016/j.cell.2018.11.043.
- [38] AZIZI E, CARR A J, PLITAS G, et al. Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment[J/OL]. *Cell*, 2018, 174(5): 1293-1308.e36[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348010/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.05.060.
- [39] GUO X Y, ZHANG Y Y, ZHENG L T, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 978-985. DOI:10.1038/s41591-018-0045-3.
- [40] KEREN L, BOSSE M, MARQUEZ D, et al. A structured tumor-immune microenvironment in triple negative breast cancer revealed by multiplexed Ion beam imaging[J/OL]. *Cell*, 2018, 174(6): 1373-1387.e19[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6132072/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.08.039.
- [41] RODON J, SORIA J C, BERGER R, et al. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial[J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 751-758. DOI:10.1038/s41591-019-0424-4.
- [42] COHEN J D, LI L, WANG Y X, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test[J]. *Science*, 2018, 359(6378): 926-930. DOI:10.1126/science.aar3247.
- [43] KRUG A K, ENDERLE D, KARLOVICH C, et al. Improved EGFR mutation detection using combined exosomal RNA and circulating tumor DNA in NSCLC patient plasma[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(3): 700-706. DOI: 10.1093/annonc/mdx765.
- [44] GUO S C, DIEP D, PLONGTHONGKUM N, et al. Identification of methylation haplotype blocks aids in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(4): 635-642. DOI:10.1038/ng.3805.
- [45] XU R H, WEI W, KRAWCZYK M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Mater*, 2017, 16(11): 1155-1161. DOI: 10.1038/nmat4997.
- [46] REDIG A J, JÄNNE P A. Basket trials and the evolution of clinical trial design in an era of genomic medicine[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(9): 975-977. DOI:10.1200/JCO.2014.59.8433.
- [47] HYMAN D M, PUZANOV I, SUBBIAH V, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(8): 726-736. DOI:10.1056/NEJMoa1502309.
- [48] MERKER J D, OXNARD G R, COMPTON C, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American society of clinical oncology and college of American pathologists joint review[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(16): 1631-1641. DOI:10.1200/JCO.2017.76.8671.
- [49] STEWART A, COKER E A, PÖLSTERL S, et al. Differences in signaling patterns on PI3K inhibition reveal context specificity in KRAS-mutant cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(8): 1396-1404. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-18-0727.
- [50] SICKLICK J K, KATO S, OKAMURA R, et al. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study[J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 744-750.

[收稿日期] 2019-12-08

[修回日期] 2020-01-15

[本文编辑] 黄静怡