

综 述

循环肿瘤 DNA 的临床应用及展望
Clinical application and prospect
of circulating tumor DNA

顾建建, 陈大可, 钱滨滨, 顾小林

(江苏省南通市通州区人民医院 肿瘤科, 江苏 南通, 226300)

关键词: 液体活检; 循环肿瘤 DNA; 循环肿瘤细胞; 外泌体

中图分类号: R 730.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2019)16-124-05 DOI: 10.7619/jcmp.201916034

癌症严重威胁着人类的生命健康。中国人口众多, 医疗设备及医护人员配置暂时无法与发达国家相比, 大部分癌症患者在确诊时病情已经进展到中晚期, 错过了最佳的治疗时机。随着医学水平的发展和提高, 人们已经意识到有同样病症的患者对于同样的治疗手段的获益各异。导致患者获益效果不同的原因有多种, 解决问题的关键在于以更精细的手段对癌症进行分类, 针对每个患者制定专属的治疗方案。“精准肿瘤学”的提出正是为了改善癌症的诊断和治疗现状^[1]。对基因组和其他分子进行分析, 以获知肿瘤的分子亚型, 选择对应的治疗方法, 并对预后进行预判。临床上通常采用穿刺或者手术获取肿瘤组织进行分子性能分析, 但有时患者身体情况不允许采用此类方法获得肿瘤组织, 且此类方法也不适用于肿瘤的连续监测。因此, 非侵袭方式的液体活检更能满足研究人员和精准医学的需求。

液体活检可以多次重复取样, 监测整个疾病进程, 以及时发现耐药、肿瘤转移和复发, 迅速调整治疗方案。除此之外, 也有多项研究项目利用液体活检技术进行癌症早期筛查。液体活检最初是描述从血液样本中获取与组织活检一样诊断结果的检测方法, 后来扩展到以更多类型体液为检测对象的技术, 如尿液、腹水和胸腔积液^[2-4]。外周血的分析对象主要包含循环肿瘤细胞 (CTCs)、循环肿瘤 DNA (ctDNA)、外泌体及循环 RNA^[5-8]。CTCs 虽能提供完整的肿瘤细胞信息, 但是不易捕获; 外泌体的提取及循环 RNA 的提取和保存具有一定的技术难度; ctDNA 的捕获和检测是目前市场应用较多、流程较为成熟的液体

活检技术。本研究对 ctDNA 的特点、检测技术、临床应用以及技术发展前景等方面做简要阐述与前瞻性探讨。

1 ctDNA 概要及优势

1994 年, 研究^[9]报道在胰腺癌患者的血液游离 DNA 中检测到 KRAS 基因突变, 这与在患者肿瘤中的 KRAS 突变相同, 从而证实了血浆中的 DNA 突变片段是来源于肿瘤, 也就形成了“循环肿瘤 DNA (ctDNA)”这一术语, 是癌症的高度特异性标志物。最新研究^[10-12]表明, ctDNA 片段在 90 ~ 150 bp 的丰度有明显提高, 根据 ctDNA 在各长度区间分布而建立模型可有效区分肿瘤血液样本和健康血液样本, 有目的地富集 ctDNA 能使液体活检在更早期就检测到癌症。

坏死的肿瘤细胞、凋亡的肿瘤细胞、循环肿瘤细胞和肿瘤细胞外泌体都可能产生 ctDNA, 因此 ctDNA 来源于多个不同肿瘤区域或者多个病灶处, ctDNA 分析结果可以提供肿瘤基因组的综合描述, 克服组织活检的异质性, 补充组织样本中遗漏的突变^[13-14]。ctDNA 深度测序能发现只在部分细胞中出现的亚克隆突变, 揭示具有独特基因组特征的特定分子亚型^[15-18]。CTCs 或组织样本想要获得同类水平信息则需要多个样本。ctDNA 样本易采集, 且不局限于血液, 尿液、胸腹水、脑脊液等体液都可以纳入检测范围^[19-22], 其保存和运输的研究成果也较为成熟, 市面上已经有多个品牌的商业 ctDNA 保存管用于血液的采集保存, 可长途运输, 操作手法简单易行^[23-25]。相较于 RNA 和外泌体, ctDNA 的提取与保存操作难度

低,很多实验室和医院都可以开展。

2 ctDNA 检测技术平台

从单碱基突变到多基因突变检测,有很多检测方法可以灵活选择。目前适用于 ctDNA 临床检测常用的技术平台有 ARMS-PCR 平台、数字 PCR (dPCR)平台和二代测序 (NGS)技术平台。

突变扩增系统 (ARMS)是由 Newton 等^[26]首先建立并用于检测已知基因突变的方法。ARMS 法可分为实时荧光定量 PCR (qPCR)和巢式 ARMS 法电泳检测^[27-28]。根据 PCR 引物 3'端碱基必须与模板 DNA 互补才能进行有效扩增的基本原理,依据已知突变位点设计引物,使 3'端碱基分别与突变和野生型模板碱基进行互补、扩增,以区分突变模板和野生模板。ARMS 法具有高特异性、高灵敏度以及耗时短、成本低、操作简单等特点,其特异性的关键在于引物设计和 PCR 反应体系优化。

数字 PCR 概念诞生于 1999 年,包含 PCR 扩增和荧光信号分析两个部分。样品稀释后分配到大量微小的反应单元中,每个单元包含 1 个或多个拷贝的目标分子,通过 PCR 反应体系对目标分子进行扩增,然后对每个反应单元的荧光信号进行采集。考虑到有些反应单元可能会包含 2 个或 2 个以上的目标分子,分析软件会应用泊松概率分布公式进行计算。不同于实时荧光定量 PCR,数字 PCR 无需参照,可以同时实现相对定量和绝对定量,检测灵敏度达到 0.001% ~ 0.01%^[29-31]。根据反应单元类型不同,数字 PCR 可分为 3 类:微反应室数字 PCR,借助高通量自动上样设备实现快速精确取样;微流控芯片数字 PCR,含有数千个超高密度亲疏水微孔芯片;微滴式数字 PCR,将含有目标分子的样品分成上千万个纳升级的油包水微滴,再对每个微滴进行扩增和荧光信号采集。由于数字 PCR 生成微滴内的模板数必须服从泊松分布,所以样本浓度需要控制在一定范围内。

ARMS 和数字 PCR 只能针对已知突变位点设计引物进行检测,且一次检测的位点数有限。若需一次性地对多基因区域或未知突变进行检测,则要借助下一代测序技术 (NGS)。ctDNA 丰富较高时可选择全面的非特异性检测,如全基因组测序 (WGS)、全甲基化测序、血浆全基因组测序和全外显子测序等。但大部分样本获得的

ctDNA 丰度较低,需要特异性富集。NGS 的富集技术又分为靶向扩增子测序和目标序列捕获测序^[32-33]。靶向扩增子技术是针对目的基因设计数对 PCR 引物,利用多重 PCR 扩增富集。目标序列捕获测序技术是针对目的基因设计探针,通过杂交捕获的方法富集再进行 PCR 扩增。NGS 通量高,一次运行可对多个样本、多个基因区域、多种变异进行深度测序,检测灵敏度能达到 0.01% ~ 0.5%,对于肿瘤诊断、治疗和监测具有重大意义^[34-36]。相比于 PCR,NGS 技术和数据处理较为复杂,实验室水平间差异较大,其检测流程暂未标准化。

3 ctDNA 在肿瘤临床方面的应用

ctDNA 样本可多次重复获得决定了它可以贯穿疾病管理全周期,在肿瘤早筛、肿瘤诊断、用药指导、耐药监测、肿瘤转移和复发监测等各个领域发挥不同的作用。

疾病的发生、发展需要一个过程,肿瘤亦是如此。中国医疗资源本就不均衡,没有针对性的体检往往无法在早期发现肿瘤,而目前常用的早筛技术(如肠镜、胃镜),因体验感不佳而导致受检者依从性差。若能在癌症早期或癌症转移之前确诊,可以提高肿瘤治愈率,改善患者生存状态。有研究^[37-38]表明,能在患者癌症确诊 2 年前的唾液和血浆样本中检测到突变,华大基因也报道在 NIPT 检测中有发现一些孕妇的血浆样本含有异常变异并最后确诊为癌症,说明 ctDNA 在无创肿瘤早期诊断中的发展潜力。市面上现有的比较成熟的商业 ctDNA 肿瘤早筛试剂盒为 Epigenomics 公司的 Septin9 基因甲基化检测试剂盒、北京博尔诚的 Septin9 基因甲基化检测试剂盒和苏州为真的人 Septin9 基因甲基化检测试剂盒,就是基于临床筛查实验证明 Septin9 基因甲基化是结肠直肠癌早期发生、发展中的特异性分子标志物,主要用于大肠癌筛查。《中国早期结直肠癌筛查及内镜诊治指南》^[39]也指出,中国一项大规模临床试验发现血浆 Septin9 基因甲基化检测诊断结直肠癌的敏感度和特异性分为 74.8% 和 87.4%,高于同期进行的免疫化学粪便潜血试验检测。联合 ctDNA 液体活检和甲基化检测技术还可以用于确定肿瘤原发病灶,以 ctDNA 甲基化的 CpG 岛作为特定的检测标签,通过与各器官组织细胞 DNA 甲基化进行比对,快速检测肿瘤细胞并确定肿瘤在

体内的生长位置,为早期干预提供参考信息。

组织活检是肿瘤诊断的金标准,但并不是所有患者的情况都允许进行组织活检。如果无法进行组织活检采集,医生可通过 ctDNA 检测对肿瘤进行分子分型诊断,依据结果分析而确定治疗方案。对于晚期肺癌患者来说,表皮生长因子受体 (EGFR) 突变可能意味着患者能从酪氨酸激酶抑制剂中获益,如吉非替尼、埃罗替尼等。ctDNA 还可以用于选择免疫治疗方案,2018 年一项研究^[40]显示,血液肿瘤突变负荷高 (bTMB-H) 的患者使用免疫治疗比其他患者有更长的无进展生存时间 (PFS) 和总生存期 (OS), 该研究还发现同一个患者的组织 TMB (tTMB) 与 bTMB 呈显著正相关。2019 年肺癌 NCCN 指南将 TMB 检测列为 2A 类推荐,以此指导免疫治疗方案。另外,液体活检可多次重复取样的特点代表它在疾病监测、用药监测及预后预测领域的广阔发展空间。已有研究^[41-42]发现在非小细胞肺癌和高级别浆液性卵巢癌中肿瘤体积和 ctDNA 突变等位基因频率呈线性关系,通过 ctDNA 突变频率获知肿瘤大小信息,从而反映出疾病的发展状态和对治疗方案的反应。在一项肺癌研究项目^[43]中,等体积血浆提取出的 ctDNA 浓度与肺癌患者的代谢肿瘤体积

有很高的相关性。ctDNA 丰度还可以评估免疫治疗疗效,对接受免疫治疗的 28 例晚期非小细胞肺癌患者进行检测,结果显示出现 ctDNA 缓解 (将 ctDNA 突变丰度自基线下降 50% 定义为 ctDNA 缓解) 的患者更容易临床获益^[44]。此外,还可利用 ctDNA 检测结果建立分析模型,预测患者体内有无肿瘤残留、复发,对不同风险的患者进行更为个体化的治疗^[45]。

4 ctDNA 检测试剂盒获批现状

凯杰与阿斯利康合作开发的 Therascreen EGFR Plasma RGQ PCR 试剂盒是全球首个以“液体活检”进行登记的伴随诊断试剂盒,于 2015 年 1 月在欧洲推出。目前全球仅有 6 款 ctDNA 检测试剂盒获批,中国国家食品药品监督管理总局批准的 3 款 ctDNA 检测试剂都仅用于大肠癌早筛,暂时没有伴随诊断试剂。6 款试剂所用的检测方法都是基于 PCR,暂无 NGS 技术平台和 dPCR 技术平台。FDA 和 CFDA 现批准的基于 NGS 技术平台的多基因检测试剂盒针对的样本类型都是 FFPE。这预示体外诊断试剂的市场对液体活检技术的需求,以及研究机构应加强液体活检技术的临床验证。6 款 ctDNA 检测试剂盒详情见表 1。

表 1 ctDNA 检测试剂获批详情

试剂名称	厂家	样本类型	批准机构	批准时间
Septin9 基因甲基化检测试剂盒	Epigenomics	血浆	FDA	2016 年 4 月
cobas EGFR 突变测试 V2	Roche	FFPE 和血浆	FDA	2016 年 6 月
Therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit	Qiagen	血浆	CE-IVD	—
Septin9 基因甲基化检测试剂盒	北京博尔诚	血浆	CFDA	2014 年 11 月
人 septin9 基因甲基化检测试剂盒	苏州为真	血浆	CFDA	2018 年 3 月
Super-ARMS® EGFR 基因突变检测试剂盒	艾德生物	血浆	CFDA	2018 年 1 月

5 ctDNA 临床应用展望

ctDNA 在临床应用中显示出巨大潜力。健康人群的血浆游离 DNA 浓度为 1 ~ 10 ng/mL, 理论上晚期癌症患者的血浆游离 DNA 浓度会增大,但个体差异会导致有些患者的游离 DNA 浓度很低,血浆中 ctDNA 的检出与肿瘤负荷相关联^[41, 46]。采用分子条形码标记被测序的 DNA 片段可以提高测序的准确性;或是在提取时富集特定大小片段的 cfDNA,以提高 ctDNA 初始比例;或是检测多种基因突变,联合确定阳性样本的 cut-off 值^[32, 36, 41, 47]。目前商业检测机构都侧重于开发基于 NGS 对肿瘤基因组测序的方法,但更精准的

肿瘤类型判读应该基于多个检测方法结果综合分析的基础上,例如从 DNA、RNA、蛋白和表观遗传学对肿瘤进行基因组学、转录组学、表观基因组学、蛋白质组学和代谢组学等多方面的综合分析^[48-52]。这些多参数结果分析可以更深入地了解分子突变在肿瘤分型中扮演的角色和功能,有助于发现新的肿瘤亚型和研发靶标新药。面对海量的测序数据库,可引入机器学习,探索数据中隐藏的信息宝藏^[53]。

目前 ctDNA 临床应用最大的挑战之一就是检测结果的一致性和临床的有效性还未得到完全确认。有研究^[54]使用不同的 ctDNA 检测方法对同一批样本进行检测,34 个受检样本中仅有 9 个样

本结果完全一致。另有研究人员比对了 Guardant 360 和 PlasmsSELECT 对 40 例胰腺癌患者的 cfDNA 检测结果, 25 例检出有基因变化的仅 3 例结果完全一致。商业检测机构和研究人员需要联合起来进行多中心研究, 使用足够大的患者群和样本数据来确认 ctDNA 检测的分析效度和临床有效性。

参考文献

- [1] Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A M. Precision oncology in the age of integrative genomics[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(1): 46–60.
- [2] Cohen J D, Javed A A, Thoburn C, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(38): 10202–10207.
- [3] 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.
- [4] Chan K C A, Woo J K S, King A, et al. Analysis of plasma Epstein-Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 513–522.
- [5] Wan J C M, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 223–238.
- [6] Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(5): 479–491.
- [7] Solé C, Tramonti D, Schramm M, et al. The circulating transcriptome as a source of biomarkers for melanoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(1): E70–E79.
- [8] Fu Q, Jiang H M, Wang Z B, et al. Injury factors alter miRNAs profiles of exosomes derived from islets and circulation[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(12): 3986–3999.
- [9] Sorenson G D, Pribish D M, Valone F H, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994, 3(1): 67–71.
- [10] Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz A M, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(466): 4921–4929.
- [11] De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng C K Y, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8839–8844.
- [12] Murtaza M, Dawson S J, Pogrebnik K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8760–8768.
- [13] Kuo Y B, Chen J S, Fan C W, et al. Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 433: 284–289.
- [14] Jamal-Hanjani M, Wilson G A, Horswell S, et al. Detection of ubiquitous and heterogeneous mutations in cell-free DNA from patients with early-stage non-small-cell lung cancer[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(5): 862–867.
- [15] Carreira S, Romanel A, Goodall J, et al. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(254): 254125–254134.
- [16] 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): 22424–22434.
- [17] Scherer F, Kurtz D M, Newman A M, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(364): 364155–364163.
- [18] Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility[J]. *Science*, 2014, 345(6193): 216–220.
- [19] Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(8 Pt 1): 1078–1084.
- [20] Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Christensen E, et al. Genomic alterations in liquid biopsies from patients with bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2016, 70(1): 75–82.
- [21] Wang Y X, Springer S, Zhang M, et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(31): 9704–9709.
- [22] Pan W Y, Gu W, Nagpal S, et al. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(3): 514–522.
- [23] Fernando M R, Chen K, Norton S, et al. A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage[J]. *Prenat Diagn*, 2010, 30(5): 418–424.
- [24] Norton S E, Lechner J M, Williams T, et al. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(15): 1561–1565.
- [25] Norton S E, Luna K K, Lechner J M, et al. A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device[J]. *J Clin Lab Anal*, 2013, 27(4): 305–311.
- [26] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)[J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(7): 2503–2516.
- [27] Ryan S E, Ryan F, O'Dwyer V, et al. A real-time ARMS

- PCR/high-resolution melt curve assay for the detection of the three primary mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy[J]. *Mol Vis*, 2016, 22: 1169–1175.
- [28] Medrano R F, de Oliveira C A. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development[J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(7): 599–608.
- [29] Thierry A R, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA[J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 430–435.
- [30] Zonta E, Garlan F, Pécuchet N, et al. Multiplex detection of rare mutations by picoliter droplet based digital PCR: sensitivity and specificity considerations[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159094–e0159104.
- [31] Kidess E, Heirich K, Wiggin M, et al. Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 2549–2561.
- [32] 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.
- [33] Gale D, Lawson A R J, Howarth K, et al. Development of a highly sensitive liquid biopsy platform to detect clinically-relevant cancer mutations at low allele fractions in cell-free DNA[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194630–e0194638.
- [34] 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): 13668–13673.
- [35] Lanman R B, Mortimer S A, Zill O A, et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140712–e0140719.
- [36] Newman A M, Lovejoy A F, Klass D M, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(5): 547–555.
- [37] Mao L, Hruban R H, Boyle J O, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(7): 1634–1637.
- [38] Gormally E, Vineis P, Matullo G, et al. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13): 6871–6876.
- [39] 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.
- [40] Gandara D R, Paul S M, Kowanz M, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab[J]. *Nat Med*, 2018, 24(9): 1441–1448.
- [41] Abbosh C, Birkbak N J, Wilson G A, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution[J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 446–451.
- [42] Parkinson C A, Gale D, Piskorz A M, et al. Exploratory analysis of TP53 mutations in circulating tumour DNA as biomarkers of treatment response for patients with relapsed high-grade serous ovarian carcinoma: A retrospective study[J]. *PLoS Med*, 2016, 13(12): e1002198–e1002205.
- [43] Chaudhuri A A, Chabon J J, Lovejoy A F, et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(12): 1394–1403.
- [44] Li L, Zhang J, Jiang X Y, et al. Promising clinical application of ctDNA in evaluating immunotherapy efficacy[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(10): 1947–1956.
- [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.
- [46] 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): 22424–22431.
- [47] Schmitt M W, Kennedy S R, Salk J J, et al. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(36): 14508–14513.
- [48] Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein J N, Collisson E A, et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(10): 1113–1120.
- [49] Amorim M G, Valieris R, Drummond R D, et al. A total transcriptome profiling method for plasma-derived extracellular vesicles: applications for liquid biopsies[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14395–14403.
- [50] Chan K C, Jiang P Y, Chan C W, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(47): 18761–18768.
- [51] Kim Y, Jeon J, Mejia S, et al. Targeted proteomics identifies liquid-biopsy signatures for extracapsular prostate cancer[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11906–11911.
- [52] Mayers J R, Wu C, Clish C B, et al. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development[J]. *Nat Med*, 2014, 20(10): 1193–1198.
- [53] Yuan Y C, Shi Y, Li C Y, et al. DeepGene: an advanced cancer type classifier based on deep learning and somatic point mutations[J]. *BMC Bioinformatics*, 2016, 17(Suppl 17): 476–479.
- [54] Torga G, Pienta K J. Patient-paired sample congruence between 2 commercial liquid biopsy tests[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(6): 868–870.