

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.22.024

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190920.1703.017.html>(2019-09-23)

## 数字 PCR 在肺癌诊疗中的应用研究\*

王萍<sup>1</sup>, 韩苗苗<sup>1</sup>, 朱雁凤<sup>2</sup>综述, 席守民<sup>1</sup>审校

(河南科技大学:1. 医学院;2. 材料科学与工程学院, 河南洛阳 471000)

**[摘要]** 数字 PCR(dPCR)是一种全新的核酸分子绝对定量分析技术,它的原理是将模板稀释后随机分配到大量反应单元中,实现单个模板分子的 PCR 扩增,最后根据阳性反应单元数比例和泊松分布来计算核酸分子数目,可实现不依赖于标准曲线的直接和绝对定量。与实时荧光定量 PCR(qPCR)技术相比,它具有更高的灵敏度和准确性,尤其适用于微量或痕量 DNA 的检测与定量。由于 dPCR 具有独特的技术优势,它在众多研究领域显示出巨大的优势和应用前景。该文主要从 dPCR 的技术原理、分类、优势及其在肺癌诊断、肺癌靶向治疗方案制定、耐药监测及预后预测方面的应用进行综述。

**[关键词]** 数字 PCR;绝对定量;肺肿瘤

**[中图分类号]** R734

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)22-3879-04

### Applications of digital PCR in diagnosis and treatment of lung cancer\*

WANG Ping<sup>1</sup>, HAN Miaomiao<sup>1</sup>, ZHU Yanfeng<sup>2</sup>, XI Shoumin<sup>1</sup>

(1. Medical College; 2. School of Materials Science and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China)

**[Abstract]** Digital PCR (dPCR) is a novel technique for absolute quantitative analysis of nucleic acid molecules. The principle is that the template is diluted and randomly distributed into a large number of reaction units to realize PCR amplification of a single template molecule, and finally the number of nucleic acid molecules is calculated according to the proportion of positive reaction units and the poisson distribution. So it can realize direct and absolute quantification of target genes without depending a standard curve. Compared with real-time quantitative PCR (qPCR) technology, it has higher sensitivity and accuracy, especially suitable for the detection and quantification of trace or trace amounts of DNA. Due to its unique technical advantages, dPCR has shown the great advantages and application prospects in many research fields. This paper mainly reviewed the technical principle, classification and advantages of dPCR and its applications in the aspects of the diagnosis of lung cancer, the targeted therapy formulation for lung cancer, drug resistance monitoring and prognosis prediction.

**[Key words]** digital PCR; absolute quantitation; lung neoplasm

1985 年由 MULLIS 发明的聚合酶链式反应 (PCR) 技术是生命科学领域的一项重大成就。第一代传统的 PCR 技术需要根据琼脂糖凝胶电泳结果对扩增产物进行定性和半定量分析,并且容易产生假阳性。第二代的实时荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 利用荧光探针或染料实现对靶标基因的定量分析,但其定量过程需依赖于内参基因或标准曲线,所以用于检测核酸分子只是相对定量,并且其灵敏度也不能完全满足分子生物学研究的需求。数字 PCR

(digital PCR, dPCR) 是第三代 PCR 技术,可实现对核酸拷贝数的绝对定量,不受扩增曲线的循环阈值 (cycle threshold, Ct)、内参基因和标准曲线的影响,并且灵敏度和准确度更高,这些优点使得它在众多领域迅速得到应用。

#### 1 dPCR 技术的原理

1992 年, SYKES 等<sup>[1]</sup> 使用有限稀释、PCR 和泊松分布检测了低丰度的 IgH 重链基因突变,这一研究奠定了 dPCR 的雏形。1999 年, VOGELSTEIN 等<sup>[2]</sup>

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(61701171); 河南省高等学校重点科研项目计划资助项目(18A180012)。 作者简介: 王萍(1987-), 副教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

在检测结肠癌患者粪便中 Kras 基因突变时,通过将样本 DNA 稀释并等分到 384 孔板中进行微升级的 PCR 反应,从而实现样品中的 Kras 突变进行定量的目的,并首次正式提出了 dPCR 的概念。从广义上讲,经典的 PCR 技术可以用于定性或定量分析,即研究目标分子的性质或确定目标分子的数量。dPCR 与经典的 PCR 在这方面类似,不同之处在于 dPCR 技术在 PCR 扩增前将模板 DNA 稀释到单分子水平并分散至许多微反应单元,这导致在每个反应单元中的模板数为 0 或 1 个。在 PCR 扩增后,含有靶 DNA 序列的反应单元会显示荧光阳性信号(定义为“1”),而没有靶序列的单元中只能观察到背景荧光(定义为“0”)。然而,通常每个反应单元中可含有至少两个 DNA 模板分子,因此必须使用泊松分布公式进行校正,以减少反应单元中由多个目标模板的出现产生的误差<sup>[3-4]</sup>。最后,根据泊松分布和荧光信号阳性反应单元与所有反应单元的比例,实现量化靶 DNA 的初始拷贝数或分析靶分子性质的目的。

## 2 dPCR 技术的分类

根据反应单元形成的方式,dPCR 技术主要分为三类:微反应室/孔板、微流控芯片和液滴 dPCR。

**2.1 微反应室/孔板 dPCR** 微孔板式 dPCR 是最早出现的 dPCR 技术。dPCR 技术初期就是通过手工逐级稀释并将样品分配至 96 或 384 微孔板中进行 PCR 反应。这种操作方式不仅繁琐、试剂消耗量大、检测通量小,其灵敏度也不能满足实验需求。除了 PCR 的扩增效率外,dPCR 技术的检测灵敏度主要取决于样品分解的反应单元数目  $n$ 。理论上,反应单元数目越多,dPCR 的灵敏度越高,其检测的准确度也越高。MORRISON 等<sup>[5]</sup>通过使用不锈钢芯片,将反应单元数达到了 3 072 个,每个反应单元体积只有 33 nL。该芯片用于 dPCR 技术中,与 384 孔板 dPCR 相比,其反应体积降低了 64 倍,分析通量提高了 24 倍。但是这种方法需借助高通量自动点样仪或机械手等设备,从而增加了操作的复杂性,提高了系统的成本<sup>[6]</sup>。

**2.2 微流控芯片 dPCR** 由于微流控技术可以实现液体样品纳升甚至皮升级的分解,因此待测样品可以获得更大分解数目,使得 dPCR 技术的检测灵敏度、可信度和动态范围度得到极大改善。同时,通过使用微流控芯片可以进行多个平行反应,它具有体积小、成本低和通量高的优点,是理想的 dPCR 平台。目前,国内外许多研究课题组和公司已开发出以微流控芯片为核心组件的 dPCR 系统<sup>[7-10]</sup>,如 Fluidigm 公司的 BioMark™ 基因分析系统和 Life Technologies 公司的 QuantStudio™ 3D 系统。

**2.3 液滴 dPCR** 液滴 dPCR 源于乳液 PCR 技术<sup>[11-12]</sup>。其核心是在 PCR 扩增前将反应体系进行微滴化处理,利用油包水技术将反应液分割成纳升甚至皮升级的微滴,每个液滴含有 1 个或 0 个靶分子,并且每个液滴都是一个独立的 PCR 反应单元,在 PCR 反应结束后可检测每个油包水乳滴的荧光信号以达到定量的目的。Bio-Rad 公司的 QX100™ 和 QX200™ 均为使用液滴技术的 dPCR 系统。

## 3 dPCR 技术的优势

**3.1 绝对定量** 目前,qPCR 仍然是核酸定量分析中更受欢迎的方法,主要是因为成本较低。标准品或内参基因的使用是 qPCR 数据分析的核心,并可能因实验室而异。相比之下,dPCR 采用终点荧光检测和阳性反应单元比例进行定量分析,不依赖于标准曲线和内参基因,实现真正意义上的绝对定量。

**3.2 抑制剂耐受性强** 与 qPCR 相比,dPCR 对酶抑制剂的耐受性很强<sup>[13]</sup>,原因是 dPCR 在反应液平均分配到每个反应单元的过程中,一些 PCR 抑制剂也被均匀分配到反应单元中,从而降低了抑制剂对反应的干扰。而 qPCR 由于受到抑制剂的影响,会降低扩增效率。

**3.3 高灵敏度和精确度** 尽管 qPCR 和 dPCR 两种技术在核酸检测方面的荧光化学本质是相同的,但 dPCR 体系采用成千上万的反应分区,可以精确地检测出变化很小的目的序列。相对于 qPCR,dPCR 定量分析的变异系数(精确度的度量指标)明显较低<sup>[14]</sup>。此外,在模板分配的过程中降低了背景 DNA 和其他污染物水平,从而提高了反应单元中的信噪比,提高了检测灵敏度<sup>[15]</sup>。这一优势使得 dPCR 可以用于分析复杂临床标本如血液、脑脊液中游离 DNA 的突变,为临床用药和治疗提供更多信息。

**3.4 高通量单细胞基因组测序** 单细胞基因组测序是通过在单个细胞水平上对全基因组进行扩增和测序的一项新技术,可为研究单个细胞的行为、机制等提供新方向。大细胞群的单细胞基因组测序应用一直受限于基因组制备过程中隔离单个细胞的技术挑战。而数字 PCR 可将一个传统的 PCR 反应分割成数百万的独立皮升级反应,基于此,LAN 等<sup>[16]</sup>利用液滴微流体技术来分离细胞,将细胞基因组碎片化并将独特的条形码加到所有基因组片段上,这种方法可以在几小时内处理 50 000 多个细胞。然后,所有细胞的条形码可以被汇集和测序,并通过条形码分组,提供了单细胞基因组的库。研究者利用这种方法分析了环境样品微生物群落中抗菌药物抗性基因、毒性因子和噬菌体序列的分布情况。

## 4 dPCR 技术在肺癌诊疗中的应用

**4.1 肺癌诊断** 微 RNA(miR)-21-5p 和 miR-335-3p 在肺癌患者血浆中呈现异常表达<sup>[17]</sup>。MA 等<sup>[18]</sup>利用 dPCR 分析了 36 例肺癌患者和 38 例健康对照血浆中的 miR-21-5p 和 miR-335-3p 的拷贝数。研究结果表明,qPCR 只能检测到血浆中 miR-21-5p 的拷贝数,而 dPCR 可同时检测到血浆中的 miR-21-5p 和 miR-335-3p 的拷贝数,说明 dPCR 对低丰度核酸的检测更敏感。根据 dPCR 定量分析结果,血浆 miRNA 区分肺癌患者和健康对照的灵敏度和特异度分别为 71.8%和 80.6%。MiR-31 和 MiR-210 的联合检测可用于肺癌的诊断<sup>[19]</sup>。LI 等<sup>[20]</sup>利用 dPCR 对 35 例肺癌患者和 40 例健康对照的痰液中 miR-31 和 miR-210 进行检测,结果显示两个 miRNAs 联合用于肺癌诊断的灵敏度和特异度分别为 65.71%和 85.00%。作者的研究小组发现 miR-126 在肺癌患者血清中异常表达,并构建了一种基于微流控芯片的乳滴 dPCR 技术检测了 20 例早期肺癌患者和配对正常肺组织中 miR-126 的表达,通过分析受试者工作特征(ROC)曲线显示,相对于 qPCR,dPCR 可以更准确地区分正常组织和肺癌组织<sup>[21-22]</sup>。

**4.2 靶向治疗方案制订** 表皮生长因子受体(EGFR)是一种肿瘤靶向治疗分子,并在国内外得到认可。EGFR 突变是对小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor,TKI)敏感的一个强预测因子。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)患者 EGFR 基因 19 号外显子的缺失和 21 号外显子 L858R 错义突变可以大大提高其对 TKI 的敏感性<sup>[23]</sup>。YUNG 等<sup>[24]</sup>利用微流控 dPCR 检测了 35 例 NSCLC 患者治疗前的血浆标本中 EGFR 基因突变,并用测序方法检测患者组织中该基因突变。结果显示,dPCR 检测到血浆中 19 号外显子缺失突变和 21 号外显子 L858R 错义突变的比例分别为 17%和 26%,与组织检测相比,血浆 EGFR 基因突变分析的灵敏度和特异度分别为 92%和 100%。这表明 dPCR 可用于分析血浆中低丰度 EGFR 基因突变,并为临床用药提供依据。

**4.3 耐药监测** EGFR-TKIs 已被证明可有效治疗 EGFR 激活突变的 NSCLC 患者。然而,大多数接受 EGFR-TKIs 治疗的患者最终会产生耐药性,其中约 50%的患者都具有 EGFR T790M 突变。WATANABE 等<sup>[25]</sup>利用乳滴 dPCR 检测了 373 例具有 EGFR 激活突变的 NSCLC 患者组织中 EGFR T790M 突变的情况。结果显示,治疗前 T790M 突变的总发生率为 79.9%,频率为 0.009%~26.9%,由于大多数治

疗前 T790M 突变频率低于 0.1%,临床上常规检测方法无法检测到。因此,dPCR 更适合于微量样品的 T790M 突变检测,有潜力作为高灵敏度的诊断工具用于个体化治疗的选择。

虽然组织标本对于研究 EGFR-TKIs 的耐药机制十分重要,但是对于有些 NSCLC 患者来说,获取组织标本十分困难,并且组织标本的连续获取对患者来说创伤性也很大。据报道,肺癌患者血浆标本中循环游离 DNA(circulating cell-free DNA,cfDNA)的水平高于健康人<sup>[26]</sup>,循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA,ctDNA)是 cfDNA 的一部分,并且肿瘤患者的 ctDNA 可反映肿瘤突变信息,与肿瘤组织具有良好的-一致性,并且 ctDNA 的检测具有连续、方便和微创的优势,但其在血浆中的含量很低<sup>[27-29]</sup>。基于此,ISHII 等<sup>[30]</sup>利用 dPCR 检测了 NSCLC 患者血浆中 T790M 突变,检测的灵敏度和特异性分别为 81.8%和 85.7%,并且血浆和组织标本中突变的一致性高达 83.3%。这表明 dPCR 可以作为高灵敏的检测方法用于血浆标本中 T790M 突变的检测,为耐药监测提供依据。OXNARD 等<sup>[31]</sup>利用乳滴 dPCR 在 NSCLC 患者的血浆标本中通过对 EGFR 和 KRAS 基因突变定量检测,可以提前几周预测临床耐药性的发生,从而指导治疗。

**4.4 预后预测** WANG 等<sup>[32]</sup>利用 dPCR 和突变阻滞扩增系统(amplification refractory mutation system,ARMS)监测了 135 例晚期 NSCLC 患者用 EGFR-TKI 治疗 6 个月后的生存情况。结果显示,dPCR 对于 ctDNA 中 EGFR T790M 突变的检测限为 0.03%。在 TKI 治疗前后的血浆标本中,dPCR 检测到的 T790M 突变频率均高于 ARMS,并且与 TKI 治疗前不具有 T790M 突变患者相比,具有 T790M 突变的患者的无进展生存时间和总生存时间要差。研究表明,通过 dPCR 检测 ctDNA 中 T790M 突变可以为 EGFR-TKI 预后提供一种非侵入性和灵敏的检测方法。Kras 是一种致癌驱动基因,30%的 NSCLC 患者都有 Kras 基因突变,并且该基因突变与预后不良相关。GUIBERT 等<sup>[33]</sup>利用 dPCR 检测了 32 例肺腺癌患者中的血浆和循环肿瘤细胞中的游离 DNA。研究结果显示,循环游离 DNA 中 Kras 基因突变的检测可以作为治疗反应差的预测因子。

## 5 小 结

常规的 PCR 技术对稀有分子遗传变化的定量分析能力有限,由于 dPCR 具有高灵敏度和准确性,有助于检测复杂背景下的罕见突变,因此在许多领域已得到应用。这将有助于促进癌症的个体化治疗,耐药

性研究及肿瘤的预后监测。尽管 dPCR 的第一个商业化平台已于 2006 年上市,并在众多领域已有应用,但与成熟的 qPCR 技术相比,由于 dPCR 技术上有一些局限性,使得它在临床上的应用仍处于初级阶段。

(1)dPCR 分析过程需要高度特异性的等位探针来降低反应的交叉性和假阳性。(2)需要大量的样本量来覆盖研究的突变类型。(3)样品分离过程中 DNA 的变性会将两条单链 DNA 分配到不同的反应单元中,从而导致反应结束后靶标分子的拷贝数高于实际值。相反,样品的不均匀性及分液体积的变化会导致靶标分子的拷贝数低于实际值<sup>[32,34]</sup>。虽然存在一些局限性,但随着对实验方法的不断研究,dPCR 技术也会进一步完善和发展,相信 dPCR 技术具有广阔的应用前景,有望成为基因研究的前沿技术,并可在不久的将来作为常规技术用于临床试验。

## 参考文献

- [1] SYKES P J,NEOH S H,BRISCO M J,et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution[J]. *Biotechniques*,1992,13(3):444-449.
- [2] VOGELSTEIN B,KINZLER K W. Digital PCR[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1999,96(16):9236-9241.
- [3] HUGGETT J F,FOY C A,VLADIMIR B,et al. The digital MIQE guidelines; minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments [J]. *Clin Chem*,2013,59(6):892-902.
- [4] 田星,张春玉. 数字 PCR 技术概述[J]. *国际遗传学杂志*,2017,40(3):141-144.
- [5] MORRISON T,HURLEY J,GARCIA J,et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR[J]. *Nucleic Acids Res*,2006,34(18):e123.
- [6] 林彩琴,姚波. 数字 PCR 技术进展[J]. *化学进展*,2012,24(12):2415-2423.
- [7] OTTESEN E A,HONG J W,QUAKE S R,et al. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria [J]. *Science*,2006,314(5804):1464-1467.
- [8] SHEN F,DU W,KREUTZ J E,et al. Digital PCR on a SlipChip[J]. *Lab Chip*,2010,10(20):2666-2672.
- [9] MEN Y,FU Y,CHEN Z,et al. Digital polymerase chain reaction in an array of femtoliter polydimethylsiloxane microreactors[J]. *Anal Chem*,2012,84(10):4262-4266.
- [10] ZHU Q,QIU L,YU B,et al. Digital PCR on an integrated self-priming compartmentalization chip [J]. *Lab Chip*,2014,14(6):1176-1185.
- [11] DIEHL F,LI M,HE Y,et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions[J]. *Nat Methods*,2006,3(7):551-559.
- [12] DRESSMAN D,YAN H,TRAVERSO G,et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2003,100(15):8817-8822.
- [13] DINGLE T C,SEDLAK R H,COOK L,et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances[J]. *Clin Chem*,2013,59(11):1670-1672.
- [14] WHITE R A,BLAINEY P C,FAN H C,et al. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing[J]. *BMC Genomics*,2009,10(1):116.
- [15] HUDECOVA I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids[J]. *Clin Biochem*,2015,48(15):948-956.
- [16] LAN F,DEMAREE B,AHMED N,et al. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding [J]. *Nat Biotechnol*,2017,35(7):640-647.
- [17] SHEN J,TODD N W,ZHANG H,et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer[J]. *Lab Invest*,2011,91(4):579-587.
- [18] MA J,LI N,GUARNERA M,et al. Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis[J]. *Biomark Insights*,2013,8(1):127-136.
- [19] SHEN J,LIAO J,GUARNERA M A,et al. Analysis of microRNAs in sputum to improve computed tomography for lung cancer diagnosis[J]. *J Thorac Oncol*,2014,9(1):33-40.
- [20] LI N,MA J,GUARNERA M A,et al. Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2014,140(1):145-150.
- [21] WANG P,JING F,LI G,et al. Absolute quantification of lung cancer related microRNA by droplet digital PCR[J]. *Biosens Bioelectron*,2015,74:836-842.
- [22] WANG P,YANG D,ZHANG H,et al. Early detection of lung cancer in serum by a panel of microRNA biomarkers [J]. *Clin Lung Cancer*,2015,16(4):313-319.
- [23] SHARMA S V,BELL D W,SETTLEMAN J,et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. *Nat Rev Cancer*,2007,7(3):169-181.
- [24] YUNG T K,CHAN K C,MOK T S,et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*,2009,15(6):2076-2084.
- [25] WATANABE M,KAWAGUCHI T,ISA S,et al. Ultra-sensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in Non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using droplet digital PCR[J]. *Clin Cancer Res*,2015,21(15):3552-3560.

- [23] PASSARO D, DI TULLIO A, ABARRATEGI A, et al. Increased vascular permeability in the bone marrow microenvironment contributes to disease progression and drug response in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(3):324-341.
- [24] MUNCH V, TRENTIN L, HERZIG J, et al. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia is mediated by vascular endothelial growth factor [J]. *Blood*, 2017, 130(5):643-654.
- [25] PATON-HOUGH J, CHANTRY A D, LAWSON M A. A review of current murine models of multiple myeloma used to assess the efficacy of therapeutic agents on tumour growth and bone disease[J]. *Bone*, 2015, 77(1):57-68.
- [26] SOLIMANDO A G, BRANDL A, MATTENHEIMER K, et al. JAMA as a prognostic factor and new therapeutic target in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2018, 32(3):736-743.
- [27] PILARSKI L M, HIPPERSON G, SEEBERGER K, et al. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease; engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice [J]. *Blood*, 2000, 95(3):1056-1065.
- [28] ZHANG L, NOMIE K, ZHANG H, et al. B-cell lymphoma patient-derived xenograft models enable drug discovery and are a platform for personalized therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(15):4212-4223.
- [29] ARMITAGE J O, WEISENBURGER D D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-hodgkin's lymphoma classification project [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(8):2780-2795.
- [30] CORSO S, CARGNELUTTI M, DURANDO S, et al. Rituximab treatment prevents lymphoma onset in gastric cancer patient-derived xenografts [J]. *Neoplasia*, 2018, 20(5):443-455.
- [31] CORSO S, GIORDANO S. How can gastric cancer molecular profiling guide future therapies? [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(7):534-544.
- [32] TOWNSEND E C, MURAKAMI M A, CHRISTODOULOU A, et al. The public repository of xenografts enables discovery and randomized phase II-like trials in mice [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(1):183.
- [33] KHAW S L, SURYANI S, EVANS K, et al. Venetoclax responses of pediatric ALL xenografts reveal sensitivity of MLL-rearranged leukemia [J]. *Blood*, 2016, 128(10):1382-1395.

(收稿日期:2019-03-10 修回日期:2019-08-02)

(上接第 3882 页)

- [26] SOZZI G, CONTE D, LEON M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(21):3902-3908.
- [27] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):985-990.
- [28] PUNNOOSE E A, ATWAL S, LIU W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer; association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8):2391-2401.
- [29] DIEHL F, LI M, DRESSMAN D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45):16368-16373.
- [30] ISHII H, AZUMA K, SAKAI K, et al. Digital PCR analysis of plasma cell-free DNA for non-invasive detection of drug resistance mechanisms in EGFR mutant NSCLC: correlation with paired tumor samples [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31):30850-30858.
- [31] 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.
- [32] WANG Z, CHEN R, WANG S, et al. Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e110780.
- [33] GUIBERT N, PRADINES A, FARELLA M, et al. Monitoring KRAS mutations in circulating DNA and tumor cells using digital droplet PCR during treatment of KRAS-mutated lung adenocarcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2016, 100:1-4.
- [34] TONG Y, SHEN S, JIANG H, et al. Application of digital PCR in detecting human diseases associated gene mutation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(4):1718-1730.

(收稿日期:2019-03-14 修回日期:2019-06-06)