

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.22.025

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190726.1738.006.html>(2019-07-29)

血液肿瘤 PDX 模型的构建及应用进展*

张华青¹ 综述,何远桥²,李 菲^{1△} 审校

(1. 南昌大学第一附属医院血液科,南昌 330006;2. 南昌大学实验动物科学中心,南昌 330006)

[摘要] 人源肿瘤异种移植(PDX)模型通过动物提供的环境生长,这不仅能够保留原始肿瘤异质性及遗传信息分子多样性,而且能保留人原代肿瘤生长的肿瘤微环境。PDX 模型能更准确地预测新型药物的临床疗效,为血液肿瘤患者包括白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤等,特别是为临床治疗后耐药复发及难治性肿瘤患者带来了新的希望。这在临床肿瘤治疗转化医学的研究中具有不可替代的作用,对实现血液肿瘤精准医疗奠定了基础。该文就 PDX 模型在血液肿瘤中的构建及应用进展予以综述。

[关键词] 人源肿瘤异种移植模型;临床前模型;血液肿瘤;精准医疗

[中图法分类号] R551.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)22-3883-05

Progress in construction and application of PDX model in hematological tumor*

ZHANG Huaqing¹, HE Yuanqiao², LI Fei^{1△}

(1. Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Experimental Animal Scientific Center, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] The patient-derived tumor xenograft(PDX) model grows through the environment provided by animals, which not only preserves the heterogeneity of the original tumor and molecular diversity of genetic information. Moreover, it can preserve the growth microenvironment of human primary tumor. The PDX model can more accurately predict the clinical efficacy of new drugs for hematological tumor patients including leukemia, multiple myeloma and lymphoma, etc. Especially, it brings new hope to the patients with drug-resistant relapse and refractory tumor after clinical treatment. It plays an irreplaceable role in the research of clinical oncology transformation medicine, and lays a foundation for precision medical treatment of hematological tumors. This article reviews the progress in the construction and application of PDX model in hematological tumors.

[Key words] patient-derived tumor xenograft model; preclinical model; hematological tumor; precision medical

人源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型是将患者来源的原发性肿瘤直接移植到免疫缺陷小鼠的体内而形成的移植瘤模型,依靠动物提供的环境保留人原代肿瘤的关键特征,如组织病理学、生物学、遗传学等;这些特征可以通过小鼠之间的连续传代保留^[1],因此 PDX 模型为癌症患者提供了开发抗癌疗法和研究个性化药物的工具^[2]。研究表明 PDX 模型在移植和传代扩增过程中不会改变肿瘤特性,传代到第三、四代的肿瘤组织和原代肿瘤

能够保持高度一致性并具有一定的稳定性,且大多提倡使用低传代数(<10)的 PDX 模型来保持亲代肿瘤的遗传完整性^[2-3]。PDX 模型采用一个模型对应一个患者的模式,更直观地反映个体间肿瘤的差异性;同时与传统模型相比,能更好地反映临床患者的实际病情变化,而且药物筛查结果与临床结果具有较高的匹配度^[4]。PDX 模型的这些特征为肿瘤患者患病机制的研究和药物筛选提供了良好的基础条件,利用 PDX 模型库及其医疗数据库可以更加准确地预测新型药

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81560036;81560034;81360353);江西省卫生和计划生育委员会科技计划项目(20171044);江西省科技厅对外科技合作计划(20141BDH80010)。作者简介:张华青(1994-),在读研究生,主要从事恶性血液疾病发病机制研究。△ 通信作者, E-mail:yx021021@sina.com。

物的临床前疗效和药物毒性,也为药企提供更贴近临床的新药转化研究途径。

近年来 PDX 模型逐渐运用于血液肿瘤的治疗,为肿瘤个性化用药提供指导^[5],为实现血液肿瘤精准医疗奠定基础。本文将就 PDX 模型在血液肿瘤中的构建及应用进展进行综述。

1 血液肿瘤 PDX 模型的构建

1.1 小鼠品系的选择 (1) Nude 小鼠又称裸鼠,无毛、胸腺,缺乏成熟 T 细胞,但是 B 细胞和自然杀伤细胞(NK)功能正常。血液肿瘤 PDX 模型较难在此类小鼠构建成功,但是也有少数恶性程度高的血液肿瘤可在皮下成瘤。(2) 重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠^[6] T、B 细胞缺失,但巨噬细胞和 NK 细胞功能处于正常水平。(3) 非糖尿病性肥胖/严重联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠不仅具有 T、B 细胞功能缺陷,而且 NK 细胞和结合补体的能力弱,具有更高的免疫缺陷程度^[7-8]。(4) 缺乏白细胞介素 2 受体 γ 链(IL-2R γ)基因的 NOD/SCID 小鼠称为 NSG 小鼠^[9],缺乏成熟 T、B 细胞,NK 细胞的活性几乎丧失,机体免疫功能严重降低,是目前国际公认的免疫缺陷程度最高的小鼠,对来源组织、细胞几乎没有排斥。小鼠免疫功能缺陷使移植入体内的肿瘤组织、细胞不产生免疫排斥作用,建模更易成功。一般来说,小鼠的免疫缺陷程度越高,移植瘤成活率越高。NSG 小鼠虽然是免疫缺陷程度最高的小鼠,但价格昂贵,饲养条件要求更严格,一般不作为首选实验对象。研究表明 NOD/SCID 小鼠体内虽然保留较弱的 NK 细胞功能,但是成瘤率相对较高,是目前血液肿瘤移植的较理想模型^[8]。

1.2 小鼠年龄及性别的选择 构建血液肿瘤模型一般多选用 4~12 周龄的小鼠,也会用 1~3 d 的新生鼠^[10]。动物性别的选择取决于实验的研究目的和性激素对于实验药物、检测指标等是否存在明显的影响。为避免处理因素对单一性别的影响,一般采用雌雄各半的原则。另外因为雌激素有一定的免疫保护作用,在免疫学实验时多选雌鼠^[7,11]。

1.3 小鼠的预处理 在移植前对小鼠进行免疫抑制预处理来提高模型成瘤率,处理的方式包括全身辐照(成年鼠 1~1.5 Gy、新生鼠 2~4 Gy)、注射用细胞毒药物如环磷酰胺等。由于 NSG 小鼠 NK 细胞功能几乎丧失,无预处理的情况下 NSG 小鼠中肿瘤的移植成功率也很高^[9]。

1.4 肿瘤移植方式及部位 (1) 异位移植:皮下接种是最常见的异位移植部位,将肿瘤切成 1~4 mm³ 的小碎片植入小鼠背侧皮下。具有操作简单、局部成瘤

快、成瘤率高、易观察肿瘤生长位置的优点,也能更简单直观地观察和测量肿瘤大小,但此类模型与临床患者实际情况存在较大差异^[2,12-14]。肝内注射及肾包膜下移植也是血液肿瘤常用的异位移植部位,此处血管丰富,不仅能显著提高模型的成瘤率,还可以缩短成瘤周期^[10,15-16]。但是手术技术要求高,对小鼠的损伤大,增加了小鼠感染的概率。(2) 原位移植:通过 ficoll 密度梯度离心法将患者骨髓或外周血分离的单个核细胞、肿瘤细胞经尾静脉或骨内注射至小鼠体内,接种细胞数量 10⁶~10⁸ 个^[9-10,17],肿瘤可通过小鼠提供的生长微环境经血液循环扩散至全身并局部浸润靶器官,更准确地模拟临床患者体内肿瘤生长特点^[18-19]。因此原位移植被认为比异位移植更具有移植优势^[2],但是原位移植模型观察肿瘤生长情况不易,需要更高要求的监测手段,给小鼠做成像技术来验证肿瘤是否成功移植入体内,如外周血涂片、骨髓涂片、流式细胞分析等^[12]。另外,原位模型的移植成功率相对较低且耗时长、成本高。

1.5 其他影响因素 一般来说移植的肿瘤细胞恶性程度越高,建模成功率也越高。在将肿瘤移植到小鼠体内之前,可与基质胶混合,为肿瘤生长提供更高的生长效率,提高移植成功率^[18]。

2 PDX 在血液肿瘤中的应用进展

常见的血液肿瘤包括白血病、多发性骨髓瘤(MM)和淋巴瘤等,可以为耐药复发及难治性临床患者建立对应的小鼠模型,为患者筛选出最适合的治疗方案,为临床治疗提供参考意见。

2.1 PDX 模型在白血病患者中的应用 化疗方案的不断优化极大地提高了白血病患者的治愈率,然而部分具有遗传异常或难治复发的患者在进行常规药物化疗后仍预后不良^[18,20]。WANG 等^[21]将来自急性白血病(acute leukemia, AL)患者的 160 个标本经尾静脉途径移植到 NSG 小鼠中,成功建立 119 个 AL PDX 模型,对 374 个基因和 265 个易重排的 RNA 进行靶向测序,强调了 PDX 模型和患者基因组图谱的重要性。MIN 等^[22]通过建立皮下荷瘤鼠模型,验证了组蛋白去乙酰化酶 1 和 2(HDAC1/2)选择性抑制剂与阿扎胞苷(azacitidine)在急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)治疗中具有协同作用。PASSARO 等^[23]通过将 AML 患者的肿瘤细胞经尾静脉成功移植到免疫缺陷小鼠体内,发现一氧化氮(NO)抑制剂不仅可以降低 AML PDX 模型中的血管通透性提高化疗效率,还可以维持正常造血干细胞功能(HSC),保护正常的残余 HSC。MUNCH 等^[24]通过建立儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic

leukemia, ALL) 动物模型发现中枢神经系统(CNS)白血病血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)高表达并介导 ALL 肿瘤细胞进入 CNS, 同时发现贝伐珠单抗可捕获 VEGF。这不仅强调 VEGF 在介导 CNS 疾病中的作用, 而且为控制 CNS 白血病提供了新的治疗策略。

2.2 PDX 模型在多发骨髓瘤患者中的应用 MM 是一种恶性浆细胞病, 特点在于恶性浆细胞的克隆性增殖并分泌单克隆免疫球蛋白或其片段(M 蛋白), 使造血功能受损, 并导致以骨质疏松、局灶溶解性病变、病理性骨折和高钙血症为特征的溶骨破坏^[25]。近年来临床治疗方案不断优化, 但 MM 仍然无法治愈^[26], 仍需要探索新的治疗手段。骨髓微环境对 MM 细胞的生存、生长起着至关重要的作用, PDX 模型为其保留了生长的微环境。但是 MM 细胞属于终末阶段的细胞, 肿瘤细胞生长缓慢, 成为 MM 建模的主要影响因素。PILARSKI 等^[27]通过将患者的外周血或胸腔积液分离肿瘤细胞后经心内(IC)或骨内(IO)途径注射到 NOD/SCID 小鼠中, 小鼠最终出现骨质破坏和红骨髓的损失, 在脾内及骨髓中检测到肿瘤细胞的生长, 成功建立了 MM PDX 模型。PDX 模型准确地反映了 MM 的大部分临床特征, 且被证实可以用于检测抗肿瘤和抗骨质破坏药物的疗效^[25]。

2.3 PDX 模型在淋巴瘤中的应用 PDX 模型在淋巴瘤中也有很大的应用前景, 通过模型进行药物筛选为患者带来希望。最近的研究表明, PDX 是评估新药反应最稳定的模型, 可用于预测治疗方案的临床疗效。淋巴瘤是最常见的血液恶性肿瘤, 由于淋巴系统的分布特点使得淋巴瘤属于全身性疾病, 几乎可以侵犯全身任何组织和器官^[28-29]。ZHANG 等^[28]通过建立 16 例 B 细胞淋巴瘤 PDX 模型对 BTK 抑制剂依鲁替尼的原发性和获得性耐药进行了研究, 同时还建立了对依鲁替尼耐药的模型, 阐明依鲁替尼耐药的机制并确定克服耐药性的药物治疗方法, 为个性化治疗 B 细胞淋巴瘤患者提供基础条件。CORSO 等^[30]通过建立淋巴瘤 PDX 模型, 提出利妥昔单抗可以减缓疾病的进展。这些数据均表明 PDX 模型为患者提供了更准确地治疗方案和更坚实的临床前基础^[31]。另外, 在建立淋巴瘤 PDX 模型过程中发现尾静脉注射的移植成功率较低。因此 TOWNSEND 等^[32]在肾包膜下移植淋巴瘤组织, 成功率达 30.2%, 在一些恶性程度较低的淋巴瘤建模中起到了积极作用。

3 PDX 模型与免疫治疗

免疫疗法的兴起如: 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(CAR-T)给患者带来治愈疾病的新希望, 抗 B 细胞

抗原的单克隆抗体包括 CD 22 和 CD 19 在临床试验中表现出了很好的实验疗效, 同时针对 CD19 的 CAR-T 细胞在经过大量预处理的 ALL 或 CLL 患者中也显示出明显的临床疗效^[33]。然而肿瘤通过靶抗原的下调产生逃逸作用, 靶细胞发生脱靶效应, 使患者治疗效果差、预后不良。ZAH 等^[11]为了解决 CD19 CAR-T 细胞抗原逃逸的问题, 通过体外和体内验证了当 CD19 表达丧失时, CD19-OR-CD20 CAR 可以通过 CD20 靶向恶性 B 细胞来防止抗原逃逸的问题。另外, CAR-T 疗法在肿瘤细胞清除的过程中伴随着大量的细胞因子释放, 细胞因子水平显著提高造成细胞因子风暴(CRS), 症状可以从轻微的流感样症状到休克甚至多系统器官衰竭, 这无论对患者还是对医生来说都是一个巨大的挑战。利用 PDX 模型贴近临床患者情况的优势与 CAR-T 疗法相结合, 检验 CAR-T 的疗效并找到解决不良反应的方法。另外为缺乏这些抗原的白血病如: 急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)^[27]探索新的治疗方案。

4 PDX 模型的局限和挑战

PDX 模型保留了人原代肿瘤的异质性并为肿瘤提供生长微环境, 在肿瘤研究领域是较理想的模型, 但仍存在局限性和挑战性。首先, PDX 建模耗时较长, 用于临床前研究的 PDX 模型通常需要 2~8 个月, 模型不能完全与患者病情进展同步, 难以针对患者个性化治疗的实时情况进行观察比较。第二, 血液肿瘤的 PDX 模型相对于其他大部分实体肿瘤而言, 建模成功率相对较低, 应努力提高建模成功率。第三, PDX 模型缺乏人体的正常免疫环境及相应的免疫靶点, 所以对免疫抑制药物实验有一定限制, 这也是该模型的一大缺陷。第四, 建模是一项成本较高的实验技术, 特别是在血液肿瘤方面, 要求建模的鼠种免疫缺陷程度高, 一般选用 NOD/SCID 小鼠; 若是经费充足的情况下建议使用免疫缺陷程度更高的 NSG 小鼠, 以保证更高的建模成功率。第五, 人体基质和免疫细胞在模型传代过程中会不断损耗, 植入的肿瘤中包含的人体基质很快会被鼠基质取代。因此在经过 3~5 次传代后, 肿瘤基质本质上是鼠基质。这种新的鼠基质可能导致肿瘤旁分泌调节及间质等物理性质的改变, 可能会限制针对该肿瘤区室的药物研究, 也将会限制肿瘤微环境和转移等相关性研究^[1]。

5 结 语

综上所述, PDX 模型已经成为血液肿瘤研究的有利工具, 理想的 PDX 模型不仅可以保留原始肿瘤的生长微环境, 而且其疾病进展和对药物的反应与患者的结果具有高度一致性。目前血液肿瘤 PDX 模型成

瘤率较低,且原位移植检测成瘤手段较复杂。PDX 模型所需的免疫缺陷小鼠价格昂贵,也限制了 PDX 模型的大规模应用。其次,随着免疫治疗的推广流行,可以将 CAR-T 治疗与 PDX 模型结合,检测免疫治疗的临床前疗效及不良反应。这对血液肿瘤新药研发和作用机制研究具有重要意义,促进其研究结果向临床转化,推进血液肿瘤向个性化治疗转变。

参考文献

- [1] HIDALGO M, AMANT F, BIANKIN A V, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research[J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(9): 998-1013.
- [2] SIOLAS D, HANNON G J. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(17): 5315-5319.
- [3] RUBIO-VIQUEIRA B, JIMENO A, CUSATIS G, et al. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(15): 4652-4661.
- [4] IZUMCHENKO E, PAZ K, CIZNADIJA D, et al. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): 2595-2605.
- [5] SAMUELS A L, BEESLEY A H, YADAV B D, et al. A pre-clinical model of resistance to induction therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood Cancer J*, 2014, 4(8): e232.
- [6] BOSMA G C, CUSTER R P, BOSMA M J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse[J]. *Nature*, 1983, 301(5900): 527-530.
- [7] LOCK R B, LIEM N, FARNSWORTH M L, et al. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse[J]. *Blood*, 2002, 99(11): 4100-4108.
- [8] MACOR P, SECCO E, ZORZET S, et al. An update on the xenograft and mouse models suitable for investigating new therapeutic compounds for the treatment of B-cell malignancies[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(21): 2023-2039.
- [9] GOPALAKRISHNAPILLAI A, KOLB E A, DHANAN P, et al. Generation of pediatric leukemia xenograft models in NSG-B2m mice: Comparison with NOD/SCID mice[J]. *Front Oncol*, 2016, 6(1): 162.
- [10] HER Z, YONG K, PARAMASIVAM K, et al. An improved pre-clinical patient-derived liquid xenograft mouse model for acute myeloid leukemia[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 162.
- [11] ZAH E, LIN M Y, SILVA-BENEDICT A, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(6): 498-508.
- [12] KIM M P, EVANS D B, WANG H, et al. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(11): 1670-1680.
- [13] IGARASHI K, KAWAGUCHI K, KIYUNA T, et al. Patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model of adult rhabdomyosarcoma invades and recurs after resection in contrast to the subcutaneous ectopic model[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(1): 91-94.
- [14] GOETZ M P, KALARI K R, SUMAN V J, et al. Tumor sequencing and patient-derived xenografts in the neoadjuvant treatment of breast cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(7): 306.
- [15] WANG Y, REVELO M P, SUDILOVSKY D, et al. Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue[J]. *Prostate*, 2005, 64(2): 149-159.
- [16] CHAPUY B, CHENG H, WATAHIKI A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease[J]. *Blood*, 2016, 127(18): 2203-2213.
- [17] YOSHIMI A, BALASIS M E, VEDDER A, et al. Robust patient-derived xenografts of MDS/MPN overlap syndromes capture the unique characteristics of CMML and JMML[J]. *Blood*, 2017, 130(4): 397-407.
- [18] JUNG J, SEOL H S, CHANG S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research[J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(1): 1-10.
- [19] SZADVARI I, KRIZANOVA O, BABULA P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment[J]. *Physiol Res*, 2016, 65(Suppl 4): S441-S453.
- [20] FRISMANTAS V, DOBAY M P, RINALDI A, et al. Ex vivo drug response profiling detects recurrent sensitivity patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2017, 129(11): e26-e37.
- [21] WANG K, SANCHEZ-MARTIN M, WANG X, et al. Patient-derived xenotransplants can recapitulate the genetic driver landscape of acute leukemias[J]. *Leukemia*, 2017, 31(1): 151-158.
- [22] MIN C, MOORE N, SHEARSTONE J R, et al. Selective inhibitors of histone deacetylases 1 and 2 synergize with azacitidine in acute myeloid leukemia[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e169128.

- [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)