

下一代测序技术在癌症诊疗中的应用及研究进展

赵熙萌, 张燕香, 马同辉, 胡云富*

(北京泛生子基因科技有限公司, 北京 102206)

[摘要] 下一代测序 (NGS) 在癌症诊疗中扮演着日益重要的角色, 继在临床中广泛普及的伴随诊断应用之后, 基于循环肿瘤 DNA (ctDNA) 的液体活检技术近年来发展迅速, 并有望在高危人群癌症早筛和患者术后微小残留病灶 (MRD) 检测方面发挥重要作用。综述 NGS 与癌症临床相关的最新应用和研究进展, 并探讨其现有临床价值和发展前景。

[关键词] 下一代测序; 癌症; 遗传; 液体活检; 伴随诊断

[中图分类号] R730.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2023) 06-0404-13

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2023.06.002

Advances in Cancer Diagnosis and Treatment Based on NGS Technology

ZHAO Ximeng, ZHANG Yanxiang, MA Tonghui, HU Yunfu

(Genetron Health Beijing Co., Ltd., Beijing 102206, China)

[Abstract] Next-generation sequencing (NGS) is becoming increasingly important in cancer diagnosis and treatment. Following the widespread application of NGS in companion diagnostics, liquid biopsy based on circulating tumor DNA (ctDNA) is now rapidly advancing, and it has been proven to be a promising method in early screening of cancer and post-surgery minimal residual disease (MRD) detection. This review introduces the latest NGS applications and advances relating to cancer clinical intervention and research, and discusses its current clinical value and future prospects.

[Key words] next-generation sequencing; cancer; genetics; liquid biopsy; companion diagnostic

癌症是一类可发生于多种组织器官的, 以细胞生长、增殖失控为主要特征的, 由遗传物质改变所引起的疾病。癌症发病的根本机制是多种因素共同作用导致的基因组 DNA 损伤和基因变异的积累^[1]。导致遗传物质改变的因素十分复杂, 包括接触环境致癌物 (如吸烟、饮酒、过度加工食物、大气污染、电离辐射、紫外线等)^[2-5], 免疫因素 (如炎症反应)^[6], 内分泌因素 (如高雌激素水平)^[7] 和遗传因素 (如胚系易感基因突变和表观遗传学改变)^[8-9]。

对癌症遗传学基础的认识水平很大程度上依托近几十年来各类 DNA 突变分析技术的高速发展, 高通量测序或称下一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术的出现是此过程中的里程碑事件之一。相较于 Sanger 测序, NGS 具有通量高、以 DNA 文库代替细菌克隆的 DNA 片段、测序过程

无需电泳 3 项重要优势^[10], 极大地降低了测序所需的时间及人力成本, 故在其发明后的近 20 年中获得了大量推广应用, 鉴定出大量疾病相关基因突变和染色体变异。NGS 推动癌症研究及临床诊疗进入了基因组时代, 也使得基于肿瘤突变特征的个性化医疗成为现实。

NGS 在癌症临床中的应用方式包括全基因组测序 (whole-genome sequencing, WGS)、全外显子组测序 (whole-exome sequencing, WES)、靶向基因测序 (targeted gene panel sequencing, TS)、转录组测序、表观遗传测序和单细胞测序^[11]。WGS、WES 和 TS 在应用层面上的主要区别为覆盖范围。WGS 的覆盖范围是全基因组, 覆盖率约为 95%~98%^[12]。WES 和 TS 则分别需要在测序前针对全外显子或依据具体需求选择性地纳入的目的基因, 进行 DNA 片段捕获测序。由于人类基因组仅有约 2% 为编码序列, 采用 WES 和 TS 有利于在节约成本的前提下增加测序深度, 以保持测序的精准和高效。在癌症相关的商业化 NGS 应用中, 绝大多数产品均

接受日期: 2023-05-28

* 通信作者: 胡云富, 博士, 首席医疗官;

研究方向: 癌症分子诊断;

Tel: 13910955915; E-mail: yunfu.hu@genetronhealth.com

基于 TS 方法获取癌症相关基因序列或表观遗传信息。随着近年来癌症相关 NGS 检测理论和技术的持续发展和快速推广, 其实际应用场景已覆盖癌症早筛、术后微小残留病灶 (minimal residual disease, MRD) 检测、晚期癌症患者的伴随诊断等多个临床阶段 (见图 1)。

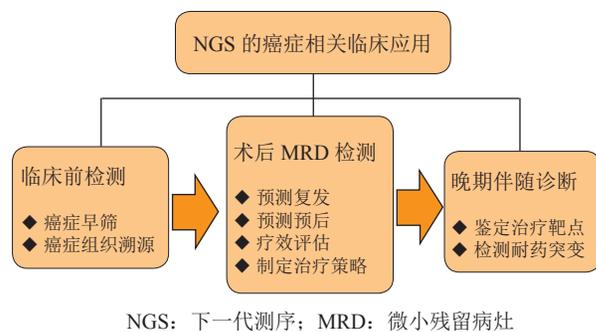


图 1 NGS 在癌症各临床阶段中的相关应用

Figure 1 Related applications of NGS in each clinical stage of cancer

液体活检是近年来开始发展的新型癌症检测技术, 即通过采集患者血液、尿液、胸腔积液、脑脊液、唾液或胆汁等体液, 检测其中包含的癌症生物标志物。液体活检相比传统组织活检的优势主要为: 1) 取材的无创性或低创性, 使其有利于在多个时间点进行重复检测。2) 减少了传统组织活检中由肿瘤内异质性导致的取样偏差, 故能更好地反映肿瘤整体特征。液体活检在血液中的分析目标包括循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤 RNA (circulating tumor RNA, ctRNA)、循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs)、蛋白质、外泌体以及代谢物。其中, 外周血 ctDNA 检测是目前较多采用的液体活检方法。近期发表的一系列研究结果显示, 依据不同癌种独特的液体分布特征进行液态样本活检是有前景的癌症诊断发展方向之一。例如针对脑脊液 ctDNA 的胶质瘤分子检测^[13]; 针对尿液细胞 DNA 突变和 CpG 甲基化尿路上皮细胞癌检测^[14]; 针对腹膜灌洗液中的肿瘤细胞, 采用个性化定制基因 panel 预测胃癌腹膜转移和预后^[15]; 针对胆汁中的 DNA 突变和甲基化进行胆管癌诊断等^[16]。

ctDNA 是循环游离 DNA (circulating free DNA,

cfDNA) 的一部分, 一般长度为 132~145 bp, 半衰期一般小于 2 h。ctDNA 主要由肿瘤细胞坏死、凋亡和外分泌过程进入细胞外环境, 其携带包括单碱基变异 (single nucleotide variation, SNV)、甲基化、拷贝数变异 (copy number variation, CNV)、结构变异 (structural variation, SV) 等肿瘤细胞遗传学特征。在不同肿瘤类型、肿瘤体积、肿瘤分期和多种其他因素的影响下, ctDNA 含量在个体间或同一个体的不同疾病阶段均存在巨大变化, 其含量范围可低于 0.1% 或大于 90%^[17]。在某些极端情况下, 例如在携带有低于计算机断层扫描术 (computer tomography, CT) 分辨率的微小肺癌病灶患者血浆中, ctDNA 在 cfDNA 中的等位基因频率 (allele frequency, AF) 可低至 0.000 18%^[18]。大量源于正常细胞和白细胞的 cfDNA 会对检测结果产生干扰, 因此在检测 ctDNA 时还需采用外周血白细胞作为对照以减少背景信号。即便如此, 高度可变的 ctDNA 含量仍对 NGS 检测的灵敏度提出了严重挑战。虽然面临以上困难, 但依赖于 NGS 检测技术的进步和液体活检的固有优势, 近年来基于 NGS 的 ctDNA 检测方法发展迅速。通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 多重扩增或杂交捕获等高深度测序方法, NGS 的 ctDNA 检测极限 (limit of detection, LOD) 已可低至 0.000 1%^[19], 具备了相对于数字 PCR (LOD 约为 0.1%) 更高的灵敏度。

本综述分别针对 3 个主要临床阶段的癌症诊疗, 即高危人群的临床前早筛, 术后复发和预后预测, 以及晚期癌症伴随诊断, 重点介绍近年来 NGS 在癌症诊疗中的研究及应用进展, 并讨论其临床价值和前景。

1 基于 ctDNA 的高危人群早期筛查

依据 2020 年世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 发布的统计数据, 在中国和全球发达国家中, 癌症已超过心血管疾病, 成为导致过早死亡的最主要因素^[20]。据最新研究估计, 2022 年中国的癌症发病和死亡人数分别可达 4 820 000 人和 3 210 000 人^[21]。癌症的早期诊断是提高患者 5

年生存期的最重要因素, 目前美国国立综合癌症网络 (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) 或美国癌症学会 (American Cancer Society, ACS) 指南推荐的癌症易患人群早期筛查方法包括针对肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的超声结合甲胎蛋白 (AFP) 检测; 针对肺癌的低剂量螺旋 CT (low-dose helical computed tomography, LDCT); 针对结肠直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的结肠镜检查; 针对乳腺癌的乳腺 X 线摄影术; 针对宫颈癌的宫颈细胞学检查和人类乳头瘤病毒 (HPV) 检测; 针对前列腺癌的前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA) 检测; 针对子宫内膜癌的组织学检查^[22]。以上传统检查方式的共同缺陷是覆盖的癌种单一, 灵敏度和特异性较低, 且多为有创检查, 以致其难以广泛应用于目标人群。ctDNA 检测仅需抽取少量外周血即可完成, 目前在多个单一癌症类型检测中已获得相比传统筛查方法更高的灵敏度和特异性^[23-24], 且具有同时对多个癌种进行筛查的能力。ctDNA 检测的主要生物标记包括以下 3 类: 1) 针对 ctDNA 序列突变的测序和分析; 2) 针对以甲基化为主的 ctDNA 表观遗传特征的测序和分析; 3) 针对 ctDNA 片段长度特征的分析。目前, 血浆或血清 ctDNA 含量与早期癌症的准确对应关系尚不清楚, 主流的分析方法通常依赖机器学习建模, 并通过算法优化和同时纳入分析多种类型的 ctDNA 特征以提高结果准确性。下文选取了 HCC、肺癌、CRC 这 3 个在液体活检早筛应用领域进展较快的癌种, 结合与传统筛查方法的对比, 介绍此 ctDNA 检测技术的最新进展。

1.1 肝细胞癌

HCC 是全球致死人数排第 3 位的癌症^[25]。目前针对 HCC 的传统检测方法为影像学检查, 包括 CT、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、超声造影 (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 结合血清 AFP 水平测定, 但以上方法具有明显局限性。AFP 水平作为诊断标志物的灵敏度仅为 62.4%, 易造成假阴性诊断^[26]。影像学检查的灵敏度和特异性分别约为 82% 和 90%, 但仅能检出直径大于 1cm 的病灶^[27]。肝脏是人体产生 cfDNA 最多的器官之一, 相应地, HCC 也是所有癌症中产生

ctDNA 最多的癌种^[28], 这十分有利于采用 ctDNA 进行 HCC 筛查。基于 ctDNA 的表观遗传学特征分析是目前 HCC 主要早筛方法, 其灵敏度普遍高于基于突变特征的分析^[29], 并可有效区分 HCC 与肝炎、慢性乙型肝炎病毒感染 (chronic hepatitis B virus infection, CHB)、肝硬化 (liver cirrhosis, LC) 等 HCC 相关早期病变, 以减少过度诊断。

较早的一项以 CpG 甲基化作为标记的研究采用 715 例 HCC 患者与 560 例健康受试者对照 (healthy controls, HC), 通过靶向重亚硫酸盐测序获取甲基化标记信息, 并以随机森林和 LASSO 算法共同筛选出 10 个标记并以此构建预测模型, 最终在鉴定 383 例 HCC 患者与 275 例 HC 的模型性能验证中达到了灵敏度 83.3% 和特异性 90.5%^[30]。另一研究采用全基因组 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosines, 5hmC) 水平作为标记, 在训练集中纳入具有 CHB 和 LC 病史的 HCC 患者 335 人, CHB 或 LC 患者 263 人, 以及 HC 522 人, 分别针对 HCC 与 HC 和 HCC 与 CHB/LC 两组间进行多项逻辑回归建模分析, 鉴定出两组间共有的 32 个 HCC 的标记基因。该研究团队开发了 wd-score (weighted diagnostic score) 算法, 依据 32 个标记基因的回归系数和 5hmC 值进行 HCC 诊断。该算法在验证集中的灵敏度和特异性分别为 82.7% 和 76.4%^[31]。另一项于 2021 年发表的研究则同时采用了全基因组 5hmC、核小体足迹 (nucleosome footprint)、5' 末端模体 (5' end motif) 和 cfDNA 片段化特征这 4 类特征, 并结合以上特征达到了目前基于 NGS 进行 HCC 诊断的较高灵敏度和特异性, 分别为 95.8% 和 95.0%^[32]。此外, Qu 等^[33]发表的 HCCscreenTM 技术是准确性较高的 HCC 早筛方法, 其通过检测 ctDNA 中的一系列肝癌特征性突变, 结合血清 AFP 和异常凝血酶原 (DCP) 及被测者性别和年龄, 在针对 HBsAg 阳性且 AFP 和超声检测阴性的无 HCC 症状人群前瞻性筛查中, 灵敏度和特异性分别达到 100% 和 94%。该团队最近发表的研究则采用了新技术 MCP (mutation capsule plus), 此项技术的主要优势为在一次反应中同时获取全基因组序列突变和甲基化信息, 同时保持两种检测的高灵敏度。通过机器学习构建基于突变结

合甲基化的预测模型后, 在验证集中区分 HCC 组与 HC 组的灵敏度和特异性分别达到 90% 和 94%^[34]。

1.2 肺癌

肺癌是全球造成死亡人数最多的癌症^[25], 主要分为小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)。多数肺癌在出现症状并确诊时已发生转移, 是造成其高死亡率的主要原因。目前针对高危人群的肺癌早筛常规方法为低剂量螺旋 CT (low-dose spiral CT, LDCT), 可有效降低高风险人群死亡率, 但其缺陷包括高达 90% 的假阳性率^[35]、具有一定的放射性危害和较低的普及程度。

2020 年有研究者采用了基于杂交捕获和 NGS 的癌症个体化高深度测序方法 (personalized profiling by deep sequencing, CAPP-seq), 整合了 ctDNA 的突变频率、突变基因、片段长度和 CNV 等信息, 通过机器学习方法构建了 lung-CLiP score 预测模型; 在 98% 特异性下, 此方法在验证集中检验 I、II、III 期 NSCLC 的灵敏度分别为 41%、54% 和 67%^[36]。然而相较 ctDNA 突变, 更多的肺癌早筛研究基于血浆或血清的 ctDNA 甲基化特征。早期相关研究多集中于单一或少量基因的 CpG 甲基化区域, 利用定量甲基化特异性 PCR (quantitative methylation specific PCR, qMSP) 鉴定患者和 HC 之间的基因甲基化水平差异, 但灵敏度和特异性通常较低^[37-38]。在最近发表的研究中, Chemi 等^[39]采用一种高灵敏度的 NGS 甲基化测序方法 T7-BMD-seq, 通过对 SCLC 患者来源异种移植体 (patient-derived xenografts, PDX) 和循环肿瘤细胞来源外植体 (circulating tumor cell-derived explant, CDX) 与 HC 肺组织或 ctDNA 进行甲基化差异对比, 鉴定出 4 061 个差异化甲基化区域 (differentially methylated regions, DMRs)。随后该研究团队采用机器学习方法构建分类模型, 并在由 41 例 HC、29 例局限期 SCLC (LS-SCLC) 和 49 例广泛期 SCLC (ES-SCLC) 患者 cfDNA 组成的验证集中进行检验; 此模型成功鉴定了 93% 的 LS-SCLC 和 100% 的 ES-SCLC, 在 100% 特异性时灵敏度达到了 80% 以上^[39]。另一项研究则采用基于 WGS 的 cfDNA 片段分析, 通过机器学习构建了算

法模型 DELFI, 并在 I~II 期和 III~IV 期肺癌检测中分别达到 91%、94% 的灵敏度和 80% 的特异性^[40]。

1.3 结直肠癌

CRC 是全球死亡人数排第 2 位的癌症^[25]。针对 CRC 的非侵入性检查主要为粪便隐血检测 (fecal occult blood test, FOBT) 和粪便免疫组化检测 (fecal immunohistochemical test, FIT), 但因其较低的灵敏度易发生漏诊。

针对 CRC 早筛的 ctDNA 标记主要为基因甲基化。2013 年 Church 等^[41]针对单一的 *SEPT9* 甲基化标记, 采用定量聚合酶链反应 (quantitative PCR, qPCR) 方法对 CRC 进行前瞻性检测, 在 I、II、III 和 IV 期 CRC 中的灵敏度分别为 35%、63%、46% 和 77.4%, 特异性为 91.5%。近期发表的 2 项研究采用了多个 CRC 相关的甲基化标记, 结合机器学习大幅提升了检测性能。其中 ColonAiQ 算法纳入了 6 个甲基化标记, 通过 qPCR 获取各位点甲基化数据, 在鉴定 173 例 CRC 患者与 136 例 HC 的模型性能验证中达到 86% 灵敏度和 92% 特异性^[42]。另一项研究采用了 LASSO 算法, 从 667 个候选的组织甲基化标记中筛选出 11 个 ctDNA 甲基化标记, 并构建预测模型; 此模型在鉴定 123 例 CRC 患者与 67 例 HC 的性能验证中的灵敏度和特异性分别为 84.6% 和 86.6%, 并可较准确地筛查 I 期 CRC^[43]。

1.4 多癌种

基于 cfDNA 的多癌种早筛 (multi-cancer early detection, MCED) 可在一次检测中同时筛查多个器官肿瘤, 因此具有极广泛的应用前景。近期的一项研究预测, 如将 MCED 纳入常规诊疗, 将有效提高癌症早期诊断率, 并使诊断后 5 年内死亡的患者人数减少 39%^[44]。MCED 并非单一癌种筛查方法的累加, 因其会同时累加整体检出的假阳性率和假阴性率, 且增加取样难度和检测成本。同时, MCED 需具有进行肿瘤组织来源 (tissue of origin, TOO) 鉴定的能力。

CCGA (Circulating Cell-free Genome Atlas, NCT02889978) 是由加拿大和美国多个医学中心推进的一项大规模前瞻性双臂 cfDNA 研究, 也是目前全球规模最大的相关研究。该研究目的为寻找适合的 cfDNA 癌症标记, 并构建机器学习模型以在

人群中进行多癌种筛查。第 1 个 CCGA 子项目研究发现, 相比针对 SNV、插入/缺失 (indel)、CNV 的 WGS 和靶向测序, 针对全基因组甲基化模式的全基因组重亚硫酸盐测序 (whole genome bisulfite sequencing, WGBS) 具有更好的预测性能, 且在 TOO 分析方面具有显著优势^[29]。随后该研究团队使用超过 50 个癌种的 2 482 名患者和 4 207 名对照, 进行了基于全基因组甲基化模式的机器学习建模, 所构建的 2 个模型分别用于癌症筛查和预测肿瘤 TOO。其中, 癌症筛查模型在高于 99% 的特异性下, 对验证集中 I~III 期全癌种筛查的灵敏度达到 43.9%, 其灵敏度随癌症分期而升高。TOO 预测模型则在 I~IV 期癌症中达到了 93% (321/344) 的准确性^[45]。

2 基于 ctDNA 的术后微小残留病灶检测

微小残留病灶或称分子残留病灶 (molecular residual disease, MRD) 是指非转移性癌症患者接受手术、放疗等治疗并达到完全缓解后, 仍有相当一部分患者的血液中可检出残留的肿瘤细胞或肿瘤分子标志物。目前已有大量证据表明, MRD 可用于早期预测肿瘤的转移和复发。MRD 检测主要依赖循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 和 ctDNA, 对两者进行检测分析均可在多种癌症中有效评估复发风险^[46], 但目前基于 NGS 的 ctDNA MRD 检测研究相对更加广泛。依据不同的检测时间和目的, ctDNA MRD 检测主要分为 2 种: 1) 地标检测 (landmark analysis), 通常在手术或放疗后的某个时间点进行检测, 可在术后快速制定进行辅助治疗方案的依据; 2) 纵向监测 (longitudinal surveillance), 指在术后随访过程中的多个间隔时间点进行检测, 以尽早发现可能出现的 MRD, 以便在出现影像学指征前提早开展新一轮辅助治疗^[26]。

目前已有大量研究显示, ctDNA MRD 可有效预测多种癌症的复发和预后。2017 年一项肺癌相关研究采用 CAPP-seq, 对 40 名 I~III 期 NSCLC 患者接受根治性治疗前的 ctDNA 进行突变基因检测, 并在 93% ($n=37$) 患者中检出 ctDNA; 于术后进行的 ctDNA MRD 纵向监测则在 54% ($n=20$) 的

术前阳性患者中再次检出 ctDNA。进一步随访发现, 术后 ctDNA 阳性患者最终全部复发, 且多数患者检出 ctDNA 的时间点比影像学更早。相较于术后 ctDNA 阴性患者, 阳性患者的无进展期和生存期均显著缩短。此外, 该研究中有 53% 患者在 ctDNA 检测中发现了与酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 或免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 用药相关的突变^[47]。Xia 等^[48]最近发表的前瞻性、多中心、队列研究纳入了 330 名 I~III 期肺癌患者, 于术前、术后 3 天和术后 1 个月分别采集患者血浆样本, 并使用覆盖 769 基因的 panel 进行 ctDNA 测序。结果显示, 术后 ctDNA 阳性是复发的有效指标 [风险比 (hazard ratio, HR) = 11.1, $P < 0.001$], 其预测准确性高于 TNM 分期。该研究还发现, 术后 ctDNA 阴性患者接受辅助治疗可显著增加其无复发生存期 (relapse free survival, RFS) ($HR=0.3$, $P=0.008$)。在接受新辅助治疗后的早期三阴乳腺癌患者中, ctDNA MRD 检测成功预测了 79% 患者的复发, ctDNA 阴性和阳性患者达到 24 个月无远端疾病生存期 (distant disease-free survival, DDFS) 的比例分别为 56% 和 81%, 且阴性患者具有显著较低的无病生存期 (disease-free survival, DFS) 和总生存期 (overall survival, OS)^[49]。Li 等^[50]在接受过一线治疗的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 患者中, 采用 Onco-LymScan panel 进行 ctDNA 检测, 证明基于 ctDNA 的 MRD 检测可有效实现 DLBCL 的预后预测、复发预测和疗效评估。

为了在保持 ctDNA MRD 检出准确性的同时提高检测率, 可在患者术后对其肿瘤组织和正常白细胞进行平行测序, 识别肿瘤组织特异突变, 并针对每位患者的肿瘤突变谱订制个性化 panel 用于后续的一系列 ctDNA 检测。Gale 等^[51]近期发表的研究入组了 88 名 I~III 期 NSCLC 患者, 于患者术后采用 WES 对其原发肿瘤和血液白细胞进行测序, 并针对突变基因频率排位前 47~48 的突变设计引物, 在 ctDNA 检测中进行多重 PCR 和 NGS; 在该 panel 中还包含部分正常人群携带的 SNP, 以便对测序结果进行质控。结果显示, 术后 2 周至 4 个月期间,

17% 患者中检出 ctDNA, 此部分患者的 RFS (HR = 14.8, $P < 0.000 01$) 和 OS (HR = 5.48, $P < 0.000 3$) 均显著较短。在复发的患者中, 有 64.3% 提前检出了 ctDNA, 相比传统临床检测方法的检出时间中位数提前 212.5 天。Liu 等^[52] 发表的局部进展期直肠癌 (LARC) 相关研究入组了 60 名 LARC 患者, 在其接受新辅助治疗 (neoadjuvant therapy, NAT) 的前、中、后期和全直肠系膜切除术 (TME) 前 4 个阶段进行血样采集, 对其肿瘤组织和血液白细胞进行 WES 或包含 509 基因的通用 panel 测序, 并采用多至 22 个体细胞突变设计个性化 panel 用于 cfDNA 测序。结果显示, NAT 后的 ctDNA 水平预测复发的灵敏度和特异性分别达到 76.47% 和 97.67%, 其预测性能高于所有经典的风险指标, 包括癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 水平、癌抗原 19-9 (carcinoma antigen 19-9, CA19-9) 水平和依据欧洲肿瘤学会 (European Society for Medical Oncology, ESMO) 指南评估的临床风险。NAT 后 MRD 阳性患者的复发风险显著高于 MRD 阴性患者 (HR = 27.38, $P < 0.000 1$), 且在 3 年随访中显示了更短的 OS (HR = 17.78, $P = 0.000 54$) 以及 RFS。该研究还显示, 通过全基因组低深度测序获得的基线 (即 NAT 治疗前) CNV 也可预测复发, 其灵敏度和特异性分别为 66.67% 和 100%。如结合个性化 panel 结果, 则可将灵敏度和特异性提升至 82.35% 和 97.67% (HR = 35.89, $P < 0.000 1$)。

3 晚期癌症患者的伴随诊断

近年来, NGS 因其不断提高通量、降低成本, 在癌症的伴随诊断 (companion diagnostics, CDx) 中已广泛应用于鉴定驱动基因突变、可靶突变和耐药位点, 并持续取得进展。NGS 鉴定的突变类型主要包括 SNV、插入/缺失、染色质重排、CNV、微卫星不稳定性、肿瘤突变负荷等。目前已有一系列基于 NGS 的 CDx 产品获得美国食品和药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准, 包括用于检测实体瘤组织样本的 FoundationOne CDx (F1CDx)、FoundationFocus CDx BRCA、Oncomine Dx Target Test、Praxis Extended RAS panel、

Myriad myChoice CDx、ONCO/Reveal Dx Lung & Colon Cancer Assay (O/RDx-LCCA) 和检测血液样本的 FoundationOne Liquid CDx、Guardant360 CDx、Agilent Resolution ctDx FIRST assay 等^[53]。2020 年, ESMO 发布了关于转移性癌症相关的 NGS 应用指南, 指出多基因 panel 可应用于肺腺癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胆管癌、卵巢癌的体细胞突变检测, 大 panel 可应用于未知原发灶肿瘤的检测, 以及宫颈癌、唾液腺癌、甲状腺癌、中等分化至高度分化的神经内分泌肿瘤和会阴癌的肿瘤突变负荷 (tumor mutation burden, TMB) 检测^[54]。ESMO 同时发布了依据其分子靶点临床可操作性量表 (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets, ESCAT)^[55] 分级的多个晚期癌种可靶突变, 为临床实践提供了进一步详细指导。近期研究显示, 全基因组-转录组测序和分析 (whole-genome and transcriptome sequencing and analysis, WGTA) 可在 83% 的晚期转移性泛癌种患者中检出可临床干预靶点, 而在接受靶向治疗的患者中有 46% 取得了临床获益^[56], 这进一步肯定了 NGS 在晚期肿瘤临床干预中的重要地位。近期的相关研究主要集中在进一步补充潜在治疗靶点, 并在临床试验中明确靶药的治疗效果。随着未来更多靶向药物的获批上市, NGS 用于 CDx 的价值将得到进一步提升。

3.1 肺癌

NGS 技术使肺癌的精准治疗获得极大发展, 目前经过广泛验证的肺癌可靶向突变多存在于 NSCLC 的肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LADC) 分型中, LADC 约占全部 NSCLC 的 60%, 是占比最高的肺癌分型^[57]。EGFR、ALK、ROS1、BRAF、KRAS、MET、RET、HER2 和 NTRK 突变是 NSCLC 主要治疗靶点^[58]。2023 年第 2 版 NCCN 指南推荐使用 NGS panel 对所有 NSCLC 进行检测, 并指出应在未检出驱动基因突变时考虑采用 RNA 测序以最大化检出融合基因。美国 FDA 于 2021 年批准 EGFR/MET 双特异性抗体 amivantamab 用于治疗携带 EGFR 20 号外显子插入突变的 NSCLC, 同时批准 Guardant360 CDx 作为其伴随诊断方法。2022 年, 美国 FDA 批准 cemiplimab 结合化疗用于治疗

无 *EGFR*、*ALK*、*ROS1* 突变的晚期成人 NSCLC。近期的研究和临床试验仍在不断完善针对以上靶点用药的治疗效果。Yu 等^[59]发表的一项真实世界研究纳入了 2 864 名携带 *EGFR* 体细胞突变的进展期中国 NSCLC 患者, 以验证 *EGFR*-酪氨酸激酶抑制剂 (*EGFR* tyrosine kinase inhibitor, *EGFR*-TKI) 的治疗效果。结果显示, 接受 *EGFR*-TKI 治疗的患者 OS 显著高于其他治疗方式患者, 其 OS 中位数增加 6.8 个月。此外, 接受第 1 代或第 2 代 *EGFR*-TKI 一线治疗后疾病进展并转用第 3 代 *EGFR*-TKI 治疗的患者, 其 OS 显著高于接受第 3 代 *EGFR*-TKI 一线治疗和进展后未接受第 3 代 *EGFR*-TKI 治疗的患者, 进一步明确了 *EGFR*-TKI 对中国 NSCLC 患者的临床价值。*ALK* 融合是临床指南中推荐的重要 NSCLC 生物标志物和治疗靶点, 针对 *ALK* 激酶区的靶向抑制剂, 包括克唑替尼 (*crizotinib*) 和第 2 代抑制剂色瑞替尼 (*ceritinib*)、阿莱替尼 (*alectinib*)、布加替尼 (*brigatinib*), 以及第 3 代抑制剂劳拉替尼 (*lorlatinib*) 均已应用于治疗 *ALK* 融合阳性 NSCLC 患者。最近一项多中心、随机、III 期临床研究结果显示, 第 2 代 *ALK* 抑制剂恩莎替尼 (*ensartinib*) 相比克唑替尼对全身病灶, 尤其针对颅内转移病灶有更高的反应率 (63.6% vs 21.1%), 提示 *ensartinib* 有潜力成为新的一线治疗药物^[60]。Shi 等^[61]针对多癌种的回顾性 *RET* 融合研究同时采用 DNA 和 RNA NGS 测序, 在肺癌中鉴定出 *GLI3-RET* 和 *MALRDI-RET* 2 个新的功能性融合, 进一步完善了潜在的靶向 *RET* 融合突变谱。

KRAS 是另一常见的 NSCLC 驱动突变基因, 其在 LADC 中的发生率约为 35%^[62]。然而由于 *KRAS* 具有非常强的三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 亲和性, 加之较小的催化结构域使其难以结合小分子, 导致直接针对 *KRAS* 靶向药物研发十分困难。与此同时, 较早的针对 *KRAS* 协同通路^[63]或下游通路^[64]进行的靶向治疗临床试验同样未取得良好效果。最近, 针对 *KRAS* p.G12C 新靶点开发的药物索托拉西布 (*sotorasib*) 在临床试验中被证明有效^[65], 并获得 FDA 快速通道批准, 用于已接受过至少一次系统治疗的 *KRAS*^{G12C} 突变携带者^[66]。

同时获批的伴随诊断试剂为 QIAGEN therascreen® *KRAS* RGQ PCR kit 与 Guardant360® CDx, 分别用于检测组织和血浆样本。此外, 针对 *KRAS* 突变热点表达的肿瘤新抗原 (tumor neo-antigen, TNA) 开发 mRNA 疫苗是具有良好前景的新型治疗方法, 但其有效性尚待临床试验的进一步研究支持^[67]。

3.2 结直肠癌

近年来, 随着中国的经济发展和民众饮食习惯改变, CRC 的发病率和死亡率不断升高。2020 年, 中国新增 CRC 患者 555 477 人, 相关死亡人数为 286 162 人, 分别占全球 CRC 的 28.8% 和 30.6%^[68]。

2021 年第 2 版 NCCN 指南推荐采用 NGS 或其他方法检测转移性 CRC (mCRC) 生物标志物, 包括 *KRAS/NRAS* 突变, *BRAF*^{V600E} 突变, *HER2* 扩增或过表达, 缺陷错配修复 (deficient mismatch repair, dMMR) / 高频率微卫星不稳定性 (high microsatellite instability, MSI-H) 状态和 *NTRK* 融合。该指南建议所有 mCRC 患者均应进行分子检测, 以识别林奇综合征 (Lynch syndrome, LS) 相关的 dMMR/MSI-H, 约有 5% 的 mCRC 携带此标志物。除与 LS 相关外, dMMR/MSI-H 还可提示免疫治疗有效性^[69]。Zhao 等^[70]最近发表的研究对罕见的同步多原发结直肠癌 (synchronous multiple primary colorectal cancer, sMPCC) 和单原发结直肠癌 (single primary CRC, SPCRC) 的分子特征进行了分析, 对 78 名 sMPCC 的 158 个病灶和 111 名 SPCRC 患者的肿瘤组织进行 NGS panel 测序, 证实 sMPCC 具有更高的 dMMR/MSI-H 与高肿瘤突变负荷 (high tumor mutation burden, TMB-H) 发生率, 提示 sMPCC 患者更可能获益于免疫治疗。

另外, NCCN 发布的遗传/家族性高风险评估: 结直肠 (Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal) 指南 2022 年第 2 版^[71]则推荐对高风险 CRC 遗传风险的人群进行基于多基因 panel 的遗传突变检测, 其中应至少包含以下风险相关基因: *APC*, *MUTYH*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *PECAM*, *BMPR*, *SMAD4*, *PTEN* 和 *STK11*。目前, NCCN 指南中推荐的遗传性突变筛查年龄为小于 50

岁的 CRC 患者, 而 Jiang 等^[72]最近发表的 CRC 胚系突变筛查研究则显示, 年龄至 70 岁及以下的 CRC 患者均可能携带癌症发病风险相关基因胚系突变。

与 NSCLC 类似, *KRAS* 在 mCRC 中具有高达 44% 的突变率, 但针对 *KRAS*^{G12C} 的靶向抑制剂在 mCRC 临床试验中未取得与 NSCLC 相近的反应率^[73]。Amodio 等^[74]针对 NSCLC 和 CRC 细胞系的研究发现, CRC 细胞系具有更高的受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 基线活性水平, 并可被上游生长因子激活。该研究还发现, EGFR 信号通路激活是 CRC 对 *KRAS*^{G12C} 抑制剂耐药的重要机制, 同时应用 EGFR 和 *KRAS*^{G12C} 抑制剂 AMG150 在 CRC 细胞系、CRC 肿瘤类器官和异种移植体中均取得显著治疗效果, 使其成为有前景的 *KRAS*^{G12C} 突变靶向治疗方法。基于此结论, 2023 年 1 月 Jänne 等^[75]报告的 I~II 期临床试验对 *KRAS*^{G12C} 抑制剂 adagrasib (MRTX849) 单一用药和 adagrasib 联合 EGFR 抑制剂 cetuximab 治疗 *KRAS*^{G12C} 突变型 mCRC 进行对比。该研究结果显示, 联合用药获得了更高的反应率 (46% vs 19%)、更长的无进展生存期 (progression-free survival, PFS) (6.9 个月 vs 5.6 个月) 和更低的 3/4 级不良反应发生率 (16% vs 34%), 验证了 *KRAS*^{G12C} 抑制剂和 EGFR 抑制剂联合用药的临床价值。

3.3 乳腺癌

女性乳腺癌 (breast cancer, BC) 是目前所有癌症中发病率最高的种类, 约占所有癌症发病人数的 11.7%, 而在女性癌症中可达 24.5%^[25]。通过雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和 HER2 等分子分型可将乳腺癌分为 4 类: 管腔 A 型 (luminal A: ER⁺, PR⁺, HER2⁻, Ki67 低表达), 管腔 B 型 (luminal B: ER⁺, PR⁺, HER2⁻, Ki67 高表达), HER2 过表达型和三阴乳腺癌 (TNBC: ER⁻, PR⁻, HER2⁻)。其中管腔 A/B 型亦可称为激素受体阳性、HER2 阴性 (HR⁺, HER2⁻) 型^[76]。针对 HR⁺ 乳腺癌目前主要应用内分泌疗法, 针对 HER2⁺ 乳腺癌主要采用 HER2 靶向治疗结合化疗, 而 TNBC 缺少以上治疗靶点, 故主要采用化疗且预后不佳^[77]。2020 年,

美国临床肿瘤学会 (American Society of Clinical Oncology, ASCO) / 美国病理学家协会 (college of american pathologists, CAP) 更新了乳腺癌 HR 表达检测的相关指南, 由于采用激素疗法治疗 ER 细胞表达率为 1%~10% 的乳腺癌的疗效证据有限, 故将此部分 ER⁺ 乳腺癌定义为低 ER 表达乳腺癌^[78]。临床中通常采用免疫组化 (IHC) 进行上述分型。

目前, NGS 主要应用于 BC 的遗传易感基因检测。全部 BC 中约有 10% 具有家族史或遗传易感突变, 其中最常见易感突变基因为 *BRCA1* 和 *BRCA2*, 其易感突变基因携带者至 80 岁时 BC 累积患病风险高达 70%^[79]。依据 2023 年更新的 NCCN 遗传性癌症检测指南^[80], 发病年龄为 50 岁及以下或经评估具有家族史的 BC 患者应进行遗传易感基因突变检测, 包括 *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *PALB2*, *PTEN* 和 *TP53*。

由于 BC 筛查方法的进步, 依据监测, 流行病学和最终结果 (Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER) 项目公布的数据显示, 2019 年美国仅有 7.5% BC 患者诊断时发生远端转移。然而, 远端转移是导致 BC 患者死亡的主要原因^[81]。针对转移性乳腺癌 (mBC) 的部分患者, 目前已有部分治疗方法经 FDA 批准应用于临床, 如 PI3K 抑制剂 alpelisib 可用于治疗携带 *PIK3CA* 热点突变的 HR⁺/HER2⁻ mBC^[82]。mBC 中还可检测到部分罕见体细胞突变, 如 *MSI-H*, *NTRK* 融合, 分别可采用相应的泛实体瘤靶向药物进行治疗^[83-84]。近期发表的部分相关研究旨在进一步探索 mBC 治疗靶点, 并验证 NGS 在 mBC 临床干预中的作用。Kawaji 等^[85]采用 F1CDx 对 109 名 mBC 患者肿瘤进行测序, 发现有 76% 患者携带可临床干预的突变, 但未对患者实施干预并分析预后。另一项研究中, Andre 等^[86]入组了 1 462 名 HER2⁻ mBC 患者, 采用多基因 panel 结合比较基因组杂交 (CGH) 对肿瘤进行突变分析; 研究者将总计 238 名携带可临床干预突变且希望接受治疗的患者, 其中 115 名携带 ESCAT I/II 级突变的患者, 随机分为 2 组, 在组内分别进行维持性化疗和与突变匹配的多种靶向治疗。结果显示, 两组内接受靶向治疗的患者 PFS 均显著长于接受化疗的患

者。此结果在 ESCAT I/II 级突变携带者中尤为显著, 携带此类突变并接受靶向治疗的患者 ($n=75$) 相比接受维持性化疗的患者 ($n=40$), 其 PFS 中位数延长了 6.3 个月 (9.1 个月 vs 2.8 个月, $P < 0.001$); 而在携带非 ESCAT I/II 级突变的患者中, 2 种治疗方法的 PFS 无显著差异。提示, 在严谨的突变分级指导下, 以 NGS 为基础的靶点检测和靶向治疗对 mBC 的预后改善具有重要意义。

3.4 脑胶质瘤

成人弥漫性胶质瘤 (diffuse glioma) 是最常见的成人脑实质肿瘤, 其占比大于 70%^[87]。在 2021 年发布的第 5 版 WHO 中枢神经系统肿瘤分类 (WHO CNS 5) 中, 分子诊断的重要性得到了大幅提升^[88]。依据突变类型, 成人弥漫性胶质瘤可分为以下 3 类: 1) 星形胶质细胞瘤, IDH 突变型; 2) 少突胶质细胞瘤, IDH 突变和染色体 1p/19q 共缺失型; 3) 胶质母细胞瘤, IDH 野生型。可见, IDH 突变仍为最重要的分型依据。欧洲神经肿瘤协会 (European Association for Neuro Oncology, EANO) 建议, 对于小于 55 岁且 IHC 检测 IDH1 R132H 阴性的 WHO 2/3 级弥漫性星形胶质瘤、少突胶质瘤和全部胶质母细胞瘤患者, 应采用测序进行 IDH 突变检测^[89]。另有研究显示, 依据现行诊断标准, 采用 NGS 检测 IDH1、IDH2 突变的可靠性优于 IHC^[90], 结合目前大幅增加的分子分型标记种类, 提示 NGS 有潜力成为胶质瘤分型的首选检测方法, 从而提升分子诊断的准确性并指导临床干预。

目前的胶质瘤治疗方法主要为手术切除和术后放疗, 但一系列研究和临床试验为针对胶质瘤突变的靶向治疗提供了新的可能性。Ivosidenib 是一种 IDH1 靶向抑制剂, 目前已由 FDA 批准用于治疗复发性或难治性 IDH1 突变型急性髓系白血病和 IDH1 突变型局部晚期或转移性胆管癌。近期的一项多中心 I 期临床试验纳入了 66 名进展期胶质瘤患者, 其中 46 例纳入剂量扩展阶段 (dose expansion phase), 接受 500 mg、1 次/日用药, 最佳响应为 1 名患者的部分缓解和 44 名患者的病情稳定。该研究还依据对比增强 MRI T1 加权像将患者分为增强组和非增强组, 并发现非增强组经治疗后的 PFS

中位数长于增强组 (13.6 个月 vs 1.4 个月)^[91]。Vorasidenib 是一种 IDH1/2 双抑制剂, 针对其开展的 I 期临床试验显示, vorasidenib 治疗非增强胶质瘤的客观缓解率为 18%, 非增强组与增强组的 PFS 中位数分别为 36.8 个月和 3.6 个月^[92]。然而, IDH1 抑制剂的治疗效果仍需进一步临床试验评估。

MET 14 号外显子跳跃 (MET^{ex14}) 较常见于继发性胶质母细胞瘤, 其发生率约为 14%。 MET^{ex14} 和功能性 MET 融合均可导致 MET 和 STAT3 通路异常激活^[92], 从而促进肿瘤细胞增殖和转移。MET 抑制剂已在 I 期临床试验中被证明对携带 MET^{ex14} 突变或 PTPRZI-MET 融合的患者有效^[93]。Yang 等^[94] 的近期研究显示, MET 融合在脑癌中的携带率为 1.1%, 除相对常见的 PTPRZI-MET 和 CAPZA2-MET 外, 在脑癌中还发现了 ST7-MET, BMT2-MET, DNAJB6-MET 和 CHRM2-MET 罕见融合, 进一步为 MET 抑制剂应用于脑癌治疗提供了基础, 并明确了 NGS 在 MET 融合鉴定中的价值。

4 结语

NGS 技术的发展极大地提高了人们对于肿瘤基因组学、表观遗传学和转录组学方面的认识, 以及对肿瘤的个体间异质性、肿瘤内时空异质性和肿瘤耐药性形成机制的理解。对各癌种体细胞突变谱和驱动基因突变致癌、促癌机制的深入研究, 为靶向药物的研发提供了坚实基础。目前, 已有上百种癌症靶向药获批上市, 并在 NSCLC、CRC、BC 等癌症的辅助治疗中取得了突出成效。NGS 又可广泛应用于伴随诊断, 其高灵敏度、高通量、高覆盖率地检测序列突变、CNV 以及基因融合, 相较其他方法具有许多不可替代的优势。在伴随诊断应用中, ctDNA 检测已被纳入多个国内外癌症诊疗指南或专家共识, 可在适当前提下替代组织活检样本。同样, 基于 ctDNA 的 MRD 检测则依靠 CAPP-seq 方法获得极高灵敏度, 可更早地预测肿瘤复发和患者预后, 同时获取复发病灶突变信息以指导临床干预。

近年来, 基于液体活检的早筛方法依托其采样简单、低创伤性、高灵敏度和多癌种同时检测溯源等内在优势, 获得了较快发展。然而, 由于癌症早

筛的目标人群基数庞大, 即使筛查方法具有较高的特异性, 仍将产生相当数量的假阳性结果, 导致过度诊断。其次, 较高的检测成本同样限制了此项技术在易感人群中的普及。未来随着 NGS 技术可靠性

的进一步提升和成本的降低, 结合癌症特异性生物标志物的优化选择和机器学习算法的快速发展, 加之相关政策法规的进一步完善, 液体活检早筛的优势将进一步体现, 并有望广泛地投入临床应用。

【参考文献】

- [1] Stratton M R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise[J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1553–1558.
- [2] Lagoa R, Marques-da-Silva D, Diniz M, et al. Molecular mechanisms linking environmental toxicants to cancer development: significance for protective interventions with polyphenols[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80: 118–144. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.02.002.
- [3] Deng W, Jin L, Zhuo H, et al. Alcohol consumption and risk of stomach cancer: a meta-analysis[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 336: 109365. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109365.
- [4] Xue Y, Wang L, Zhang Y, et al. Air pollution: a culprit of lung cancer[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 434: 128937. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128937.
- [5] Kliemann N, Al Nahas A, Vamos E P, et al. Ultra-processed foods and cancer risk: from global food systems to individual exposures and mechanisms[J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(1): 14–20.
- [6] Kay J, Thadhani E, Samson L, et al. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 83: 102673. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.102673.
- [7] Revilla G, Cedó L, Tondo M, et al. LDL, HDL and endocrine-related cancer: from pathogenic mechanisms to therapies[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 73: 134–157. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.11.012.
- [8] Huang K L, Mashl R J, Wu Y, et al. Pathogenic germline variants in 10,389 adult cancers[J]. *Cell*, 2018, 173(2): 355–370.e314. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.039.
- [9] Lee J E, Kim M Y. Cancer epigenetics: past, present and future[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 83: 4–14. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.03.025.
- [10] van Dijk E L, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology[J]. *Trends Genet*, 2014, 30(9): 418–426.
- [11] Hussen B M, Abdullah S T, Salihi A, et al. The emerging roles of NGS in clinical oncology and personalized medicine[J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 230: 153760. DOI: 10.1016/j.prp.2022.153760.
- [12] Gorcenco S, Ilinca A, Almasoudi W, et al. New generation genetic testing entering the clinic[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2020, 73: 72–84. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.02.015.
- [13] Pan C, Diplas B H, Chen X, et al. Molecular profiling of tumors of the brainstem by sequencing of CSF-derived circulating tumor DNA[J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137(2): 297–306.
- [14] Xu Y, Ma X, Ai X, et al. A urine-based liquid biopsy method for detection of upper tract urinary carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 597486. DOI: 10.3389/fonc.2020.597486.
- [15] Zhao D, Yue P, Wang T, et al. Personalized analysis of minimal residual cancer cells in peritoneal lavage fluid predicts peritoneal dissemination of gastric cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 164. DOI: 10.1186/s13045-021-01175-2.
- [16] He S, Zeng F, Yin H, et al. Molecular diagnosis of pancreatobiliary tract cancer by detecting mutations and methylation changes in bile samples[J]. *EclinicalMedicine*, 2023, 55: 101736. DOI: 10.1016/j.eclinm.2022.101736.
- [17] Palmisani F, Kovar H, Kager L, et al. Systematic review of the immunological landscape of Wilms tumors[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 22: 454–467. DOI: 10.1016/j.omto.2021.06.016.
- [18] 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.
- [19] Kurtz D M, Soo J, Co Ting Keh L, et al. Enhanced detection of minimal residual disease by targeted sequencing of phased variants in circulating tumor DNA[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(12): 1537–1547.
- [20] Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide[J]. *Cancer*, 2021, 127(16): 3029–3030.
- [21] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584–590.
- [22] Smith R A, Andrews K S, Brooks D, et al. Cancer screening in the United States, 2019: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(3): 184–210.
- [23] Donaldson J, Park B H. Circulating tumor DNA: measurement and clinical utility[J]. *Annu Rev Med*, 2018, 69: 223–234. DOI: 10.1146/annurev-med-041316-085721.

- [24] Phallen J, Sausen M, Adleff V, *et al.* Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(403): eaan2415. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan2415.
- [25] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–249.
- [26] Wu X, Li J, Gassa A, *et al.* Circulating tumor DNA as an emerging liquid biopsy biomarker for early diagnosis and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(9): 1551–1562.
- [27] Anon. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 7. DOI: 10.1038/s41572-021-00245-6.
- [28] van der Pol Y, Mouliere F. Toward the early detection of cancer by decoding the epigenetic and environmental fingerprints of cell-free DNA[J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(4): 350–368.
- [29] Jamshidi A, Liu M C, Klein E A, *et al.* Evaluation of cell-free DNA approaches for multi-cancer early detection[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(12): 1537–1549.e1512. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.10.022.
- [30] 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.
- [31] Cai J, Chen L, Zhang Z, *et al.* Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA as a non-invasive approach for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2019, 68(12): 2195–2205.
- [32] Chen L, Abou-Alfa G K, Zheng B, *et al.* Genome-scale profiling of circulating cell-free DNA signatures for early detection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients[J]. *Cell Res*, 2021, 31(5): 589–592.
- [33] Qu C, Wang Y, Wang P, *et al.* Detection of early-stage hepatocellular carcinoma in asymptomatic HBsAg-seropositive individuals by liquid biopsy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(13): 6308–6312.
- [34] Wang P, Song Q, Ren J, *et al.* Simultaneous analysis of mutations and methylations in circulating cell-free DNA for hepatocellular carcinoma detection[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(672): eabp8704. DOI: 10.1126/scitranslmed.abp8704.
- [35] Li P, Liu S, Du L, *et al.* Liquid biopsies based on DNA methylation as biomarkers for the detection and prognosis of lung cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2022, 14(1): 118. DOI: 10.1186/s13148-022-01337-0.
- [36] Chabon J J, Hamilton E G, Kurtz D M, *et al.* Integrating genomic features for non-invasive early lung cancer detection[J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 245–251.
- [37] Ooki A, Maleki Z, Tsay J J, *et al.* A panel of novel detection and prognostic methylated DNA markers in primary non-small cell lung cancer and serum DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22): 7141–7152.
- [38] Powrózek T, Krawczyk P, Nicoś M, *et al.* Methylation of the DCLK1 promoter region in circulating free DNA and its prognostic value in lung cancer patients[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(4): 398–404.
- [39] Chemi F, Pearce S P, Clipson A, *et al.* cfDNA methylome profiling for detection and subtyping of small cell lung cancers[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(10): 1260–1270.
- [40] Mathios D, Johansen J S, Cristiano S, *et al.* Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5060. DOI: 10.1038/s41467-021-24994-w.
- [41] Church T R, Wandell M, Lofton-Day C, *et al.* Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer[J]. *Gut*, 2014, 63(2): 317–325.
- [42] Cai G, Cai M, Feng Z, *et al.* A multilocus blood-based assay targeting circulating tumor DNA methylation enables early detection and early relapse prediction of colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(6): 2053–2056.e2052. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.08.054.
- [43] Wu X, Zhang Y, Hu T, *et al.* A novel cell-free DNA methylation-based model improves the early detection of colorectal cancer[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(10): 2702–2714.
- [44] Hubbell E, Clarke C A, Aravanis A M, *et al.* Modeled reductions in late-stage cancer with a multi-cancer early detection test[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2021, 30(3): 460–468.
- [45] Liu M C, Oxnard G R, Klein E A, *et al.* Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(6): 745–759.
- [46] Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 131. DOI: 10.1186/s13045-022-01351-y.
- [47] 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.
- [48] Xia L, Mei J, Kang R, *et al.* Perioperative ctDNA-based molecular residual disease detection for non-small cell lung cancer: a prospective multicenter cohort study (LUNGCA-1)[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(15): 3308–3317.
- [49] Radovich M, Jiang G, Hancock B A, *et al.* Association of circulating tumor DNA and circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy with disease recurrence in patients with triple-negative breast cancer: preplanned secondary analysis of the BRE12-158 randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(9): 1410–1415.
- [50] Li M, Mi L, Wang C, *et al.* Clinical implications of circulating tumor DNA in predicting the outcome of diffuse large B cell lymphoma

- patients receiving first-line therapy[J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 369. DOI: 10.1186/s12916-022-02562-3.
- [51] Gale D, Heider K, Ruiz-Valdepenas A, *et al.* Residual ctDNA after treatment predicts early relapse in patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Ann Oncol*, 2022, 33(5): 500–510.
- [52] Liu W, Li Y, Tang Y, *et al.* Response prediction and risk stratification of patients with rectal cancer after neoadjuvant therapy through an analysis of circulating tumour DNA[J]. *EBioMedicine*, 2022, 78: 103945. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103945.
- [53] U.S.FDA. List of cleared or approved companion diagnostic devices (*in vitro* and imaging tools)[EB/OL]. (2023-05-23)[2023-05-25]. <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-in-vitro-and-imaging-tools>.
- [54] Mosele F, Remon J, Mateo J, *et al.* Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(11): 1491–1505.
- [55] Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, *et al.* A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(9): 1895–1902.
- [56] Pleasance E, Bohm A, Williamson L M, *et al.* Whole-genome and transcriptome analysis enhances precision cancer treatment options[J]. *Ann Oncol*, 2022, 33(9): 939–949.
- [57] Friedlaender A, Banna G, Malapelle U, *et al.* Next generation sequencing and genetic alterations in squamous cell lung carcinoma: where are we today?[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 166. DOI: 10.3389/fonc.2019.00166.
- [58] Imyanitov E N, Iyevleva A G, Levchenko E V. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: current status and perspectives[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 157: 103194. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.103194.
- [59] Yu X, Si J, Wei J, *et al.* The effect of EGFR-TKIs on survival in advanced non-small-cell lung cancer with *EGFR* mutations: a real-world study[J]. *Cancer Med*, 2022, 12(5): 5630–5638.
- [60] Horn L, Wang Z, Wu G, *et al.* Ensartinib vs crizotinib for patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7(11): 1617–1625.
- [61] Shi M, Wang W, Zhang J, *et al.* Identification of RET fusions in a Chinese multicancer retrospective analysis by next-generation sequencing[J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(1): 308–318.
- [62] Prior I A, Hood F E, Hartley J L. The frequency of *Ras* mutations in cancer[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(14): 2969–2974.
- [63] Goldman J W, Mazieres J, Barlesi F, *et al.* A randomized phase III study of abemaciclib versus erlotinib in patients with stage IV non-small cell lung cancer with a detectable *KRAS* mutation who failed prior platinum-based therapy: JUNIPER[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 578756. DOI: 10.3389/fonc.2020.578756.
- [64] Jänne P A, van den Heuvel M M, Barlesi F, *et al.* Selumetinib plus docetaxel compared with docetaxel alone and progression-free survival in patients with *KRAS*-mutant advanced non-small cell lung cancer: the SELECT-1 randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2017, 317(18): 1844–1853.
- [65] Skoulidis F, Li B T, Dy G K, *et al.* Sotorasib for lung cancers with *KRAS* p.G12C mutation[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(25): 2371–2381.
- [66] Nakajima E C, Drezner N, Li X, *et al.* FDA approval summary: sotorasib for *KRAS*^{G12C}-mutated metastatic NSCLC[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(8): 1482–1486.
- [67] Reck M, Carbone D P, Garassino M, *et al.* Targeting *KRAS* in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(9): 1101–1110.
- [68] Li N, Lu B, Luo C, *et al.* Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, Europe, and northern America[J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 255–268. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.09.034.
- [69] Biller L H, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review[J]. *JAMA*, 2021, 325(7): 669–685.
- [70] Zhao Y, Wu J, Pei F, *et al.* Molecular typing and clinical characteristics of synchronous multiple primary colorectal cancer[J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(11): e2243457. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.43457.
- [71] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/familial high-risk assessment: colorectal[EB/OL]. (2022-12-07)[2023-05-15]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf.
- [72] Jiang W, Li L, Ke C F, *et al.* Universal germline testing among patients with colorectal cancer: clinical actionability and optimised panel[J]. *J Med Genet*, 2022, 59(4): 370–376.
- [73] Canon J, Rex K, Saiki A Y, *et al.* The clinical *KRAS*(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 217–223.
- [74] Amodio V, Yaeger R, Arcella P, *et al.* EGFR blockade reverts resistance to *KRAS*(G12C) inhibition in colorectal cancer[J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(8): 1129–1139.
- [75] Jänne P A, Riely G J, Gadgeel S M, *et al.* Adagrasib in non-small-cell lung cancer harboring a *KRAS*^{G12C} mutation[J]. *N Engl J Med*, 2022,

- 387(2): 120–131.
- [76] Waks A G, Winer E P. Breast cancer treatment[J]. *JAMA*, 2019, 321(3): 316. DOI: 10.1001/jama.2018.20751.
- [77] Garrido-Castro A C, Lin N U, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 176–198.
- [78] Allison K H, Hammond M E H, Dowsett M, et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(12): 1346–1366.
- [79] Kuchenbaecker K B, Hopper J L, Barnes D R, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers[J]. *JAMA*, 2017, 317(23): 2402–2416.
- [80] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/familial high-risk assessment: breast, ovarian, and pancreatic[EB/OL]. (2023-02-13)[2023-05-16]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf.
- [81] Abotaleb M, Kubatka P, Caprnda M, et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: an update[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 458–477. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.108.
- [82] Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G, et al. Alpelisib for *PIK3CA*-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(20): 1929–1940.
- [83] Doebele R C, Drilon A, Paz-Ares L, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials[J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(2): 271–282.
- [84] Marcus L, Lemery S J, Keegan P, et al. FDA approval summary: pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(13): 3753–3758.
- [85] Kawaji H, Kubo M, Yamashita N, et al. Comprehensive molecular profiling broadens treatment options for breast cancer patients[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(2): 529–539.
- [86] Andre F, Filleron T, Kamal M, et al. Genomics to select treatment for patients with metastatic breast cancer[J]. *Nature*, 2022, 610(7931): 343–348.
- [87] Ostrom Q T, Patil N, Cioffi G, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(12 Suppl 2): iv1–iv96. DOI: 10.1093/neuonc/noaa200.
- [88] Louis D N, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231–1251.
- [89] Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(3): 170–186.
- [90] Śledzińska P, Bebyn M, Szczerba E, et al. Glioma 2021 WHO classification: the superiority of NGS over IHC in routine diagnostics[J]. *Mol Diagn Ther*, 2022, 26(6): 699–713.
- [91] Mellinghoff I K, Ellingson B M, Touat M, et al. Ivosidenib in isocitrate dehydrogenase 1-mutated advanced glioma[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(29): 3398–3406.
- [92] Mellinghoff I K, Penas-Prado M, Peters K B, et al. Vorasidenib, a dual inhibitor of mutant *IDH1/2*, in recurrent or progressive glioma; results of a first-in-human phase I trial[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(16): 4491–4499.
- [93] Hu H, Mu Q, Bao Z, et al. Mutational landscape of secondary glioblastoma guides MET-targeted trial in brain tumor[J]. *Cell*, 2018, 175(6): 1665–1678.e1618. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.038.
- [94] Yang W, Zhao X, Zheng A, et al. Identification of MET fusions in solid tumors: a multicenter, large scale study in China[J]. *Int J Cancer*, 2023, 152(6): 1259–1268.



[专家介绍] 胡云富: 博士, 北京泛生子基因科技有限公司首席医疗官。胡云富博士在医疗器械、医药研发领域, 拥有 20 余年企业管理及政府监管经验: 在 BD、葛兰素史克、Metabolon 公司先后共有 10 年工作经验, 随后 11 年就职于美国 FDA。作为首席医疗官加入泛生子前, 担任美国 FDA 医疗器械和放射健康中心 (CDRH) / 体外诊断和放射健康办公室 (OIR) 分子遗传学与病理学部副主任, 其领导的团队负责监管癌症分子诊断 (液体活检、癌症早筛、病程监测、微小残留病等)、伴随诊断、基因检测、人工智能解剖学和细胞学病理设备。曾获得 FDA 局级奖励 10 次, 获得医疗器械和放射健康中心级集体成就奖 8 次。

胡云富博士在 FDA 任职期间, 带领团队完成多项里程碑式的癌症相关创新检测产品审批, 如: 首例基于 LDT 的伴随诊断服务 (Myriad Genetics 的 BRACAnalysis CDx)、首例基于 NGS 的 LDT 伴随诊断服务 (Foundation Medicine 的 FoundationFocus CDx BRCA)、首例基于 NGS 的伴随诊断试剂盒 (ThermoFisher Oncomine Dx Target Test)、首例基于 NGS 的肿瘤大 panel LDT 检测服务 (纪念斯隆-凯特琳癌症中心的 MSK-IMPACT 和 Foundation Medicine 的 FoundationOne CDx)、首例液体活检伴随诊断试剂盒 (非小细胞肺癌) (罗氏 Cobas EGFR Mutation Test v2)、2 款癌症早筛产品 (Exact Sciences 的 Cologuard 和 EpiGenomics 的 Epi ProColon) 等。