

循环肿瘤 DNA 在消化道肿瘤早期筛查中的研究进展

聂宇魁, 余超, 郭勤平, 何若冲*

山西医科大学第三医院(山西白求恩医院/山西医学科学院/同济山西医院) 胃肠外科, 山西 太原 030032

【摘要】 消化道肿瘤发病率高,起病隐匿,且预后较差。传统的筛查方法存在创伤性、滞后性、敏感度及特异度低等不足,导致其在消化道肿瘤早期筛查中的推广应用受到限制。循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)是由肿瘤细胞坏死或凋亡后释放到体液中的游离 DNA 片段,携带有突变、重排和甲基化等肿瘤特异性改变的遗传信息,与传统组织活检相比,ctDNA 检测具有敏感度和特异度高、无创、易获得以及可重复性好的优势,在消化道肿瘤早期筛查中有很大潜力。本文通过对 ctDNA 在消化道肿瘤早期筛查中的研究现状作一综述,旨在评估 ctDNA 在消化道肿瘤诊断中的潜在价值,为探索消化道肿瘤的早期诊断手段提供理论依据。

【关键词】 循环肿瘤 DNA; 消化道肿瘤; 检测技术; 早期筛查

Research progress of circulating tumor DNA in early screening of digestive tract tumors

Nie Yukui, Yu Chao, Guo Qiping, He Ruochong*

Department of Gastrointestinal Surgery, Third Hospital of Shanxi Medical University (Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Tongji Shanxi Hospital), Taiyuan 030032, Shanxi, China

*Corresponding author; He Ruochong, E-mail: bill0415@sohu.com

【Abstract】 The digestive tract tumors have a high incidence, insidious onset and poor prognosis. The traditional screening methods have the disadvantages of trauma, lag, low sensitivity and specificity, which limit their application in the early screening of digestive tract tumors. Circulating tumor DNA (ctDNA) is a free DNA fragment released into the body fluid after tumor cell necrosis or apoptosis, carrying genetic information of tumor-specific changes such as mutation, rearrangement and methylation. Compared with traditional tissue biopsy, ctDNA detection has the advantages of high sensitivity and specificity, non-invasiveness, easy availability and repeatability, and has great potential in early screening of digestive tract tumors. This article reviews the research status of ctDNA in the early screening of digestive tract tumors, aiming to evaluate the potential value of ctDNA in the diagnosis of digestive tract tumors and provide a theoretical basis for exploring the early diagnosis of digestive tract tumors.

【Key words】 Circulating tumor DNA; Digestive tract tumors; Detecting technique; Early screening

消化道肿瘤是常见的恶性肿瘤,也是全世界肿瘤相关死亡的主要原因之一。据国际癌症研究机构统计,2020年全球的癌症新增病例有1930万,癌症死亡病例约1000万,消化道肿瘤发病率

约占其中的23.4%,死亡率约占35.6%,并且中国消化道肿瘤发病率位居世界前五^[1]。早期筛查可以避免因延误诊断而导致的不良后果,理想的筛查应是微创、低成本且高参与的,并提供最小的假阴性或假阳性。现有筛查手段包括血清标志物、影像学、内镜检查及组织病理学检查等,这些筛查方法虽降低了癌症相关死亡率,但诊断效能低、价格高、侵入性强,仍需可靠的生物标志物用于辅助癌症早期诊断。

基金项目:山西科技厅自然科学研究面上项目(202203021221239);山西省“136”兴医工程基金项目(2021YZ11)

*通信作者:何若冲, E-mail: bill0415@sohu.com

循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 作为一种有前景的非侵入性生物标志物, 在肿瘤早期诊断、术后肿瘤微小残留病灶动态检测以及疗效应答监测中的作用已被证实^[2]。ctDNA 有检测便捷、无创伤、依从性好等优势, 还可以克服基于组织测序所看到的肿瘤异质性现象, 在癌症临床应用中前景广阔。本文就 ctDNA 在消化道肿瘤筛查中的最新研究进展进行综述, 以期为临床实践和研究提供参考。

1 ctDNA 生物学特征

循环游离 DNA (circulating free DNA or cell free DNA, cfDNA) 为正常细胞和循环肿瘤细胞通过凋亡、坏死和分泌外泌体释放到血液中的 DNA 片段, 通常与蛋白质结合形成核小体游离存在于血液、尿液、脑脊液等体液中, 由肿瘤细胞释放的这部分 cfDNA, 称为 ctDNA。不同形式产生的 ctDNA 片段大小不一, 细胞凋亡产生的 ctDNA 大小一般在 70~200 bp, 细胞坏死产生的 ctDNA 通常在 200~21 000 bp。ctDNA 浓度与肿瘤的类型、大小和生长状态有关。早期肿瘤患者血浆中的 ctDNA 浓度占比通常在 0.01%到 1%之间, 在晚期肿瘤患者中, ctDNA 的浓度占比可高达 90%^[3]。ctDNA 半衰期很短, 为 1~2 h。

ctDNA 片段在血液循环中被单核细胞系统和巨噬细胞摄取, 在核酸内切酶和外切酶催化作用下被逐渐降解。此外, 免疫系统中的清道夫细胞也可能参与了 ctDNA 的降解过程^[4]。

2 ctDNA 检测方法

目前 ctDNA 检测方法主要包括三类, 不同方法各具优势(表 1)。第一类是基于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的方法, 包括: 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)、扩增受阻突变体系 PCR (amplification refractory mutation system-PCR, ARMS-PCR)、低温变性共扩增 PCR 技术 (co-amplification at lower denaturation temperature-PCR, COLD-PCR)、数字 PCR-流式技术 (bead, emulsion, amplification, magnetic, BEAMing)、微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 检测等, 具有操作简单、敏感度及特异度高、成本低等特点^[5-9]。第二类是基于测序检测, 包括 Sanger 测序和二代测序技术(next-

generation sequencing, NGS)^[10]。NGS 是将 DNA 随机片段化、加接头、制备测序文库, 通过对文库中数以万计的克隆进行延伸反应, 然后通过检测信号得到序列信息的技术。包括全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS)、全外显子测序 (whole exome sequencing, WES)、标记扩增子深度测序 (tagged-amplicon deep sequencing, Tam-Seq)、肿瘤个性化深度测序 (cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-Seq) 等^[11]。NGS 在检测未知序列、未知突变、高通量多位点等方面独具优势, 被广泛应用于 ctDNA 的检测^[12]。第三类是基于酶的 ctDNA 突变检测方法, 可以成功检测 ctDNA 中靶基因的突变, 如 CRISPR-Cas12a 被应用于检测 *BRAF V600E* 突变^[13]。除此之外, 基于纳米技术的生物传感器等一些新技术也在开发中, Mei 等^[14]基于 CRISPR-Cas9 靶向偶合熵驱动链置换反应 (entropy-driven strand displacement reaction, ESDR) 系统构建了 3D 石墨烯/Au-Pt-Pd 纳米花生物传感器, 用于检测患者 ctDNA 含量和 ctDNA 中的 *EGFR* 突变。

基于 PCR 和测序的检测方法可以在不同深度上对 ctDNA 进行全面、多维度的分子学特征分析。两种检测方法在 ctDNA 相关研究中相辅相成, 我们可以根据具体的实验目的和所需信息的深度与广度选择特定的检测方法(表 2)。然而基于酶和纳米技术生物传感器的 ctDNA 检测方法目前大多都只用于检测突变。

3 ctDNA 在消化道肿瘤早期筛查中的应用

3.1 cfDNA 定量分析及片段组学特征

基于 cfDNA 浓度及片段化特征的液体活检技术独立于肿瘤突变特征, 理论上代表所有肿瘤, 不受肿瘤异质性的影响, 通过定量检测 cfDNA 在血液中的浓度可以用于消化道肿瘤的早期诊断、监测疾病负荷以及评估预后。Kim 等^[15]比较了健康人群、早期胃癌患者和晚期胃癌患者的 cfDNA 水平, 当 cfDNA 浓度截断值为 90 ng/ml 时, 胃癌患者检出的敏感度为 96.67%, 特异度为 94.11%。该研究跟踪分析了胃癌手术患者的 cfDNA 浓度变化, 与术前的 cfDNA 水平相比, 术后 24 h 的 cfDNA 水平显著下降 [(112.17±13.42) ng/ml 比 (77.93±5.94) ng/ml, $P<0.001$]。Wu 等^[16]比较了 120 例结肠癌患者和 90 例健康人群血清中的 cfDNA 浓

表1 ctDNA 检测方法的类型及优缺点

检测方法	优点	缺点	参考文献
基于 PCR 检测			
qPCR	操作简单、敏感度高	只能检测已知点突变; 需要外标进行定量	[8]
ARMS-PCR	简单经济、高通量、敏感度高	引物设计较难; 不能实现高通量检测	[9]
COLD-PCR	解决了传统 PCR 中敏感度低、特异度低的缺点, 在检测罕见和低水平未知突变方面具有很强的优势	需要与其他检测方法相结合, 如 ddPCR 和二代测序	[5]
BEAMing	敏感度高	操作步骤相对复杂, 只能检测已知点突变	[6]
ddPCR	绝对定量、检测敏感度高	只能检测已知点突变; 需要较大容量的外周血标本	[7]
基于测序检测			
Sanger 测序	高分辨率、长测序片段、详细的过程、可视化结果和低误检率	低通量	[10]
Tam-Seq	敏感度高、特异度高、成本低	只能检测已知点突变	[6]
CAPP-Seq	可检测单核苷酸变异; 插入缺失、重排和拷贝数变异、目的序列的选择	测序数据的解读困难	[11]
NGS	检测敏感、通量高; WGS 能检测罕见肿瘤基因组信息; WES 可用于对人类基因组编码区进行测序; 成本低、速度快	WGS 耗时、成本高	[12]
基于酶的 ctDNA 检测	该方法摒弃了传统的 PCR 富集过程, 节省了检测时间和流程, 敏感度高	操作复杂, 在 PCR 过程中酶很容易失活	[13]
基于纳米技术生物传感器的 ctDNA 检测	具有特异度高、敏感度高、低成本、高性能等优点, 可有效检测单个碱基变化序列, 有望用于 ctDNA 中多个靶点的检测和富集	操作过程更加复杂, 需要专业化的技术人员操作	[14]

注: PCR, 聚合酶链反应; qPCR, 实时荧光定量聚合酶链反应; ARMS-PCR, 扩增受阻突变体系聚合酶链反应; COLD-PCR, 低温变性共扩增聚合酶链反应技术; BEAMing, 数字聚合酶链反应-流式技术; ddPCR, 微滴式数字聚合酶链反应; Tam-Seq, 标记扩增子深度测序; CAPP-Seq, 肿瘤个性化深度测序; NGS, 二代测序技术; WGS, 全基因组测序; WES, 全外显子测序; ctDNA, 循环肿瘤 DNA。

表2 基于 PCR 的检测和基于测序的检测方法的应用

方法	cfDNA 定量分析及片段组学特征	ctDNA 突变检测	拷贝数变异检测	甲基化检测
基于 PCR 的检测	可以用于定量测定 cfDNA 的含量, 通过扩增特定 DNA 片段并进行定量分析, 估计 cfDNA 的丰度	可以针对已知突变设计特异性引物, 对特定突变进行快速而敏感的检测	可以针对特定基因的拷贝数变异进行定性或定量检测, 适用于已知的重要靶基因	可以设计特异性引物用于甲基化位点的定性检测, 对已知的甲基化位点具有较高的敏感度
基于测序的检测	可以揭示 cfDNA 的片段组学特征, 包括片段长度分布、鸟嘌呤和胞嘧啶含量等, 从而为后续的突变检测和其他分子分析提供基础信息	可以进行全基因组或全外显子的突变筛查, 对未知的突变提供检测机会	可以全面检测基因组的拷贝数变异, 揭示整个基因组的变异情况	可以进行全基因组的甲基化检测, 揭示整个基因组的甲基化模式

注: cfDNA, 循环游离 DNA; ctDNA, 循环肿瘤 DNA; PCR, 聚合酶链反应。

度, 结直肠癌患者血清 cfDNA 浓度水平 (35.51 ± 4.55) ng/ml 明显高于健康人群 (6.18 ± 2.77) ng/ml, cfDNA 区分结直肠癌患者与健康人群的曲线下面积为 0.79 (95% CI: 0.73~0.85)。这些结果均表明

cfDNA 浓度及完整性有作为消化道肿瘤早期诊断和鉴别诊断候选标志物的潜能。然而, cfDNA 浓度并不是一个特异性标志物, 它受到多种因素影响, 包括炎症状态、寄生虫病、心血管疾病、手术创伤

等,因此,需要更多研究来验证其准确性和临床应用的可行性。

cfDNA完整性及片段组学模型在消化道恶性肿瘤与一些良性疾病的鉴别诊断上也有一定的潜力。cfDNA片段组学包括cfDNA片段大小、末端基序、首选末端、单链锯齿状末端和核小体足迹等。cfDNA完整性是衡量cfDNA片段化程度的指标。cfDNA完整性是指血浆或血清中较长的DNA片段与较短片段的浓度之比。在细胞凋亡过程中,正常细胞会在血液中释放180~200 bp短且均匀的DNA片段,而肿瘤细胞会释放出较长且不均匀的DNA片段,从而具有更高的完整性。Peng等^[17]通过机器学习模型筛选出cfDNA片段5个特征并进一步开发了一个检测模型,该模型可区分健康人群与结直肠癌患者或腺瘤患者,其区分早期结直肠癌患者的特异度为94.8%,敏感度为98.0%(95% CI:0.942~0.996),区分腺瘤患者的敏感度为95.7%(95% CI:0.852~0.995)。即使在1×覆盖率下,敏感度也可达到94.4%(95% CI:0.901~0.972),特异度为94.8%。基于cfDNA片段组学的肿瘤研究大多集中在肝癌、结直肠癌、肺癌和乳腺癌等血液cfDNA含量较高的癌症类型,而对于食管癌、胃癌则鲜有报道。

3.2 突变检测

基因突变参与癌症的发生发展,通过检测ctDNA中的癌症相关突变基因,可以在内镜检查之前提前数月甚至数年发现癌症。Sun等^[18]研究显示,通过检测APC、KRAS、BRAF和CTNNB1基因中19个常见突变位点,在结直肠癌患者中,ctDNA突变检出率为100%(n=137),高于石蜡切片组织样本突变检出率,对癌前病变检测的敏感度可达62.5%(95% CI:0.358~0.837),特异度高达95.2%(95% CI:0.825~0.991),曲线下面积为0.79。Maron等^[19]研究发现,TP53(53.0%)、HER2(17.0%)、EGFR(17.0%)、KRAS(15.0%)、MYC(13.0%)、PIK3CA(13.0%)和MET(11.0%)等关键基因突变与胃癌的发生发展密切相关,相较于组织样本,基于ctDNA检测更容易发现MET、FGFR2和EGFR基因靶向变异。ctDNA检测可以作为肿瘤组织检测的补充,在早期阶段检测到消化道肿瘤相关的突变,从而提高早期癌症的检出率。

3.3 拷贝数变异

染色体拷贝数变异(copy number variations,

CNV)是指染色体上的一段DNA序列拷贝数目的差异。CNV可以以多种形式存在,包括增加、缺失、重排。CNV在不同个体间存在很大的变异,包括大小和位置上的差异。

CNV与消化道肿瘤的发生和发展密切相关。研究发现,7p(EGFR)、8q(MYC)、13q(CDX2和PDX1)的增加,以及1p、8p、15q、17p(TP53)和18q(DCC、SMAD2和SMAD4)的缺失与结肠腺瘤癌变的进展有关^[20]。ctDNA的CNV检测可作为癌症预后潜在的临床生物标志物,尤其是晚期癌症。Grenda等^[21]研究显示在胃癌患者中HER2基因的拷贝数明显高于健康人群,基于HER2基因的CNV改变对胃癌进行筛查,敏感度为58%,特异度为98%,曲线下面积为0.707。此外,研究还发现,在食管癌、胃癌、结直肠癌等消化道肿瘤患者中,食管癌患者的cfDNA拷贝数的中位数最高,其次是结直肠癌。尽管需要更多的临床试验来验证ctDNA中CNV检测的实用性,但ctDNA中的CNV检测仍可作为消化道肿瘤筛查的重要手段。

3.4 甲基化检测

DNA甲基化会导致原癌基因的过表达或抑癌基因的表达受到抑制,促进癌症的发生和发展。基于血液的DNA甲基化检测被广泛应用于癌症的早期诊断。Lima等^[22]研究显示,SEPT9基因甲基化与结直肠癌相关,SEPT9甲基化区分结直肠癌患者和健康人群的敏感度为50%,特异度为90.0%。以粪便为样本进行ctDNA甲基化检测也有很高的敏感度及特异度。Han等^[23]对粪便DNA中的黏结蛋白聚糖2(syndecan-2, SDC2)异常甲基化进行检测,在早期结直肠癌(I~II期)的检出中,敏感度为89.1%,特异度为90.2%。ctDNA甲基化不仅可以用于消化道肿瘤的检出,在定位癌症起源方面也有一定潜力。Stackpole等^[24]对包括胃癌、结直肠癌、肺癌等5种癌症在内的408例患者进行ctDNA全基因组甲基化分析,在检测全期和早期癌症方面的敏感度分别达到80.7%和74.5%,在定位全期和早期癌症的起源组织方面准确率分别达到89.1%和85.0%。继续深入研究消化道肿瘤ctDNA甲基化机制,并开发更便捷、准确的诊断方法,仍然是未来研究的热点。

4 多组学联合检测

整合不同维度和数量的肿瘤生物学信息,如

甲基化、突变、片段化特征等,进行多组学联合检测在消化道肿瘤早期筛查中有独特优势。Nguyen等^[25]使用靶向和低深度WGS($\sim 0.55\times$),联合分析了ctDNA甲基化、片段组学、拷贝数和末端基序特征,开发了一种被称为SPOT-MAS的多模式测定法。SPOT-MAS多模式测定法在包括乳腺癌、结直肠癌、胃癌、肺癌和肝癌在内的738例非转移性患者以及1550例健康对照者的队列研究中,癌症整体检出的敏感度为72.4%,特异度为97.0%,I期和II期早期癌症检出的敏感度分别为73.9%和62.3%,肿瘤起源定位检测的准确率为70%。SPOT-MAS与其他ctDNA的检测方法性能相当,但测序深度明显降低,成本更低,更适用于全人群筛查。本文对近期开展的消化道肿瘤临床试验进行了总结(表3)。

5 小结与展望

5.1 不同ctDNA检测方法的选择

基于cfDNA浓度及片段化特征、ctDNA拷贝数变异、基因突变以及甲基化检测在消化道肿瘤的早期筛查中各有优劣。基于cfDNA浓度及片段化特征检测在区分III~IV期肿瘤方面有较高的敏感度和特异度,但对I~II期肿瘤不敏感。同时,cfDNA水平易受炎症、怀孕等因素影响,在早期筛查中容易出现假阳性。基于基因突变检测在消化道肿瘤筛查中的应用广泛,敏感度及特异度均较高,但是该方法需要预先获取肿瘤组织突变信息,而且不同个体和不同癌种基因突变的位点、数量和类型都有差别,使得构建基因突变人群筛查模板极为困难。所以目前基于基因突变的ctDNA检测更多用于化疗后肿瘤转移复发检测、靶向药物的筛选以及个体化治疗方案的制定^[26]。基于拷贝数变异及甲基化检测,具有测序深度低,成本低的优势,并且ctDNA甲基化检测可以定位肿瘤组织的起源,在肿瘤筛查中独具优势。但不同研究对拷贝数及甲基化的算法不一,导致不同研究的实验结果差异较大。虽然ctDNA不同检测方法在消化系统肿瘤的早期筛查中得到了广泛应用,但各个检测平台的敏感度和特异度均有所不同,不同实验室对于ctDNA检测结果的可比性较差,亟需统一的判断标准、制定统一的行业规则以保证结果的可靠性、可重复性及准确性。

5.2 ctDNA在消化道肿瘤早期筛查应用中的优势与不足

ctDNA在消化道肿瘤早期筛查应用中的优势包括以下几个方面:①高敏感度和特异度。ctDNA在消化道肿瘤早期就能够检测到微小的肿瘤变化,比传统的肿瘤标志物(癌胚抗原、糖类抗原19-9等)及大便隐血实验等更加敏感,容易发现早期肿瘤及癌前病变,降低消化道肿瘤的发病率及死亡率,提高患者生存质量^[27]。②非侵入性。通过血液样品即可获取,不需要进行内镜下组织活检,减少了对患者的伤害,减轻了患者的痛苦,更适用于大规模人群筛查。③多样性。ctDNA可以同时检测多种消化道肿瘤(如胃癌、食管癌、结直肠癌等),不局限于某种特定肿瘤。然而,目前ctDNA在消化道肿瘤早期筛查的应用中仍面临巨大困难。首先,ctDNA半衰期短,对血液标本的取材方式、运输及保存方式要求高。血液样本保存不当容易干扰结果判定。而且各阶段的血液标本处理,包括采血至分离血浆的时间间隔、离心和纯化方案等均会影响最终的测定结果。其次,ctDNA提取流程复杂、技术要求高以及测序费用昂贵,是目前制约ctDNA应用到消化道肿瘤早期筛查中的关键因素。最后,目前尚缺乏多中心、大规模的临床试验验证ctDNA在临床实践应用中的可行性。

5.3 ctDNA应用前景

ctDNA在消化道肿瘤的早期筛查中具有巨大潜力。在未来,WGS检测成本的下降将推动ctDNA广泛应用于临床。WGS分析获得的复杂数据阵列包括拷贝数变异、突变、甲基化等多维数据,通过特征提取和各种机器学习,并与其他多组生物标志物协同使用,最终有可能开发出一种能够用来筛查消化道肿瘤的模式。此外,通过ctDNA检测肿瘤特异性基因特征和表观遗传学特征的变化,还可应用于治疗及判断预后,也将推动个体化治疗及精准治疗的进展。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, 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.
- [2] 林健梅,韦丽丽,王豪华. 循环肿瘤DNA在早期结肠

表 3 ctDNA 检测与消化道肿瘤早期筛查的临床试验

癌种	临床试验编号	试验地点	样本量(例)	研究类型	研究对象	实验目的	检测技术	观察指标
胃癌	NCT04947995	中国	n=450	前瞻性病例对照研究	年龄 ≥ 40 岁、接受食管胃镜检查的癌症、癌前病变患者或健康人群	开发和验证基于血液的多组学测定和计算模型,用于胃癌的早期检测	NGS	与食管胃镜检查发现和/或组织学诊断相比,基于血浆 ctDNA 的多组学测定用于胃癌早期检测的敏感度和特异度
消化系统癌症(包括食管癌、胃癌、结直肠癌、肝癌)	NCT05431621	中国	n=2340	单盲、病例对照、多中心研究	癌症、癌前病变患者和健康人群	通过 ctDNA 甲基化和突变,描述胃癌中 ctDNA 甲基化的分子检测方法,建立消化系统癌症的早期诊断模型	NGS 及 DNA 甲基化	建立消化系统癌症早期诊断分子分类模型并评估模型在癌症早期检测中的敏感度和特异度
胃癌	NCT04511559	中国	n=540	队列研究	慢性胃炎、中度至重度萎缩/化生或胃癌患者	证明 ctDNA 甲基化状态与预后之间的相关性	DNA 甲基化	ctDNA 甲基化状态及其与早期诊断和预后评估的相关性
胃癌	NCT04665687	韩国	n=1730	前瞻性队列研究	早期胃癌和癌前胃腺瘤患者	确定基于组织或血液的肿瘤分子分析是否可用于预测早期胃癌、胃腺瘤诊断	NGS	确定早期胃癌和癌前腺瘤鉴别诊断的生物标志物
胃癌	NCT05027347	越南	n=200	前瞻性队列研究	早期和局部晚期(I、II 和 IIIA 期)患者	制定检测早期胃癌患者血浆中 ctDNA 的方案	NGS	基于突变的检测方法检测早期胃癌患者的敏感度和特异度
结直肠癌	NCT05587452	中国	n=950	前瞻性队列多中心研究	结直肠癌、结直肠腺瘤患者和健康人群	建立基于血浆多组学结合人工智能的新型筛查模型	NGS 和 ctDNA 甲基化测试	评估基于血浆多组学结合人工智能的新型筛查方法在大型前瞻性队列中检测结直肠癌和晚期腺瘤的准确性和有效性
结直肠癌	NCT05234177	美国	n=160	多中心前瞻性队列研究	I~IV 期结直肠癌患者	对结直肠癌患者进行 ctDNA 生物标志物纵向分析研究	NGS	评估 ctDNA 用于结直肠癌筛查和预测肿瘤复发的敏感度和特异度
结直肠癌	NCT05558436	中国	n=712	前瞻性队列研究	结直肠癌、良性结直肠疾病患者	建立基于肿瘤特异性血浆 ctDNA 甲基化标志物的诊断模型	ctDNA 甲基化	ctDNA 甲基化与癌胚抗原检测结直肠癌的诊断敏感度、特异度、准确度、阳性预测值和阴性预测值的比较
结直肠癌	NCT05485077	中国	n=18 000	前瞻性研究	社区人群	评价多基因甲基化检测作为结直肠癌辅助诊断的价值	ctDNA 甲基化	结直肠癌中多基因甲基化检测的敏感度和特异度
肝癌	NCT05541601	英国	n=3000	多中心、前瞻性研究	肝硬化患者	构建肝细胞癌早期诊断模型	ctDNA 甲基化	评估基于 ctDNA 构建的诊断模型对肝细胞癌早期诊断的敏感度和特异度

注:ctDNA,循环肿瘤 DNA;NGS,二代测序技术。

- 癌诊疗中的临床应用 [J/CD]. 消化肿瘤杂志 (电子版), 2022, 14(3): 258–261.
- [3] YAGHOUBI NAEI V, BORDHAN P, MIRAKHORLI F, et al. Advances in novel strategies for isolation, characterization, and analysis of CTCs and ctDNA [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2023, 15: 17588359231192401.
- [4] YUAN S, NIE R, HUANG Y, et al. Residual circulating tumor DNA after adjuvant chemotherapy effectively predicts recurrence of stage II–III gastric cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2023, 43(12): 1312–1325.
- [5] PU D, CHEN H, FU W, et al. Combining E-ice-COLD-PCR and Pyrosequencing with Di-Base Addition (PDBA) Enables Sensitive Detection of Low-Abundance Mutations [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2023.
- [6] NIKANJAM M, KATO S, KURZROCK R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 131.
- [7] MORENO-MANUEL A, CALABUIG-FARIÑAS S, OBRADOR-HEVIA A, et al. dPCR application in liquid biopsies: divide and conquer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2021, 21(1): 3–15.
- [8] DOMNICH A, DE PACE V, PENNATI BM, et al. Evaluation of extraction-free RT-qPCR methods for SARS-CoV-2 diagnostics [J]. *Arch Virol*, 2021, 166(10): 2825–2828.
- [9] CHEN J, XU X, DALHAIMER P, et al. Tetra-Primer Amplification-Refractory Mutation System (ARMS)-PCR for Genotyping Mouse Leptin Gene Mutation [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(19): 2680.
- [10] SCHMID K, DOHMEN H, RITSCHEL N, et al. Sanger: the high-throughput Sanger sequencing analysis pipeline [J]. *Bioinform Adv*, 2022, 2(1): vbac009.
- [11] ANITHA K, POSINASETTY B, NAVEEN KUMARI K, et al. Liquid biopsy for precision diagnostics and therapeutics [J]. *Clin Chim Acta*, 2024, 554: 117746.
- [12] DEVESON IW, GONG B, LAI K, et al. Evaluating the analytical validity of circulating tumor DNA sequencing assays for precision oncology [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(9): 1115–1128.
- [13] ZHANG W, ZHAO S, XIE Z, et al. The fluorescence amplification strategy based on 3D DNA walker and CRISPR/Cas12a for the rapid detection of BRAF V600E [J]. *Anal. Sci*, 2022, 38(8): 1057–1066.
- [14] CHEN M, WU D, TU S, et al. CRISPR/Cas9 cleavage triggered ESDR for circulating tumor DNA detection based on a 3D graphene/AuPtPd nanoflower biosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 173: 112821.
- [15] KOLDBY KM, MORTENSEN MB, DETLEFSEN S, et al. Tumor-specific genetic aberrations in cell-free DNA of gastroesophageal cancer patients [J]. *J Gastroenterol*, 2019, 54(2): 108–121.
- [16] WU Z, YU L, HOU J, et al. Plasma cfDNA for the Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 9538384.
- [17] MA X, CHEN Y, TANG W, et al. Multi-dimensional fragmentomic assay for ultrasensitive early detection of colorectal advanced adenoma and adenocarcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 175.
- [18] SUN Q, PASTOR L, DU J, et al. A novel xenonucleic acid-mediated molecular clamping technology for early colorectal cancer screening [J]. *PloS one*, 2021, 16(10): e0244332.
- [19] MARON SB, CHASE LM, LOMNICKI S, et al. Circulating Tumor DNA Sequencing Analysis of Gastroesophageal Adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(23): 7098–7112.
- [20] DEBATTISTA J, GRECH L, SCERRI C, et al. Copy Number Variations as Determinants of Colorectal Tumor Progression in Liquid Biopsies [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1738.
- [21] GREYND A, WOJAS-KRAWCZYK K, SKOCZYLAS T, et al. HER2 gene assessment in liquid biopsy of gastric and esophagogastric junction cancer patients qualified for surgery [J]. *BMC gastroenterol*, 2020, 20(1): 382.
- [22] LIMA AB, DOS REIS MB, MATSUSHITA M, et al. Combined SEPT9 and BMP3 methylation in plasma for colorectal cancer early detection and screening in a Brazilian population [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(15): 15854–15867.
- [23] HAN Y, OH T, CHUNG T, et al. Early detection of colorectal cancer based on presence of methylated syndecan-2 (SDC2) in stool DNA [J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1): 51.
- [24] STACKPOLE ML, ZENG W, LI S, et al. Cost-effective methylome sequencing of cell-free DNA for accurately detecting and locating cancer [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5566.
- [25] NGUYEN V, NGUYEN TH, DOAN N, et al. Multimodal analysis of methylomics and fragmentomics in plasma cell-free DNA for multi-cancer early detection and localization [J]. *Elife*, 2023, 12: RP89083.
- [26] 王童博, 李峥, 赵东兵. 胃癌腹腔分子残留病灶的诊断方法 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2023, 26(5): 419–422.
- [27] 李扬, 年媛媛, 孟宪梅. 胃癌前病变的诊断和治疗现状 [J/CD]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2022, 14(2): 113–118.