

· 综述 · DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 03. 031

## 数字 PCR 在肿瘤无创诊疗中的应用进展\*

林金端, 刘红伟, 冯子人, 张慧贤 综述, 尹卫国<sup>△</sup>审校

广州医科大学附属第六医院分子诊断中心, 广东清远 511500

关键词: 数字 PCR; 液体活检; 循环肿瘤 DNA; 靶向治疗

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)03-0410-06

1999 年, VOGELSTEIN 创造了“数字 PCR”一词, 文章正式报道于美国科学院院报, 并表明该技术可用于发现罕见的癌症突变<sup>[1]</sup>。数字 PCR (dPCR) 是一种核酸分子绝对定量技术, 通过将样本分配到几十至几十万个反应单元, 在每个反应单元中分别对目标分子进行 PCR 扩增, 并收集荧光信号进行统计学分析。相较于传统 PCR, dPCR 的优势主要在于: (1) 绝对定量, 该技术结果判定不依赖于扩增曲线的循环阈值 (Ct), 不受扩增效率的影响, 具有很好的准确度和重现性。(2) 样品需求量低, 在检测珍贵样品和样品核酸存在降解时具有明显的优势。(3) 高灵敏度, dPCR 本质上是将一个传统的 PCR 反应分成了数万个独立的 PCR 反应, 在这些反应中可以精确地检测到很小的目的片段的差异、单拷贝甚至是低浓度混杂样品, 且能避免非同源异质双链的形成。(4) 高耐受性, 由于目的序列被分配到多个微滴中, 显著降低了体系间的影响及背景序列和抑制物对反应的干扰, 扩增基质效应大大减小。因此 dPCR 适用于不能依靠 Ct 值很好分辨的应用领域, 如拷贝数变异、突变检测、基因相对表达研究 (如等位基因不平衡表达)、二代测序结果验证、miRNA 表达分析、单细胞基因表达分析等。在丰度低、样本珍贵、背景复杂的肿瘤样本检测中具有良好的应用前景。

尽管近年来肿瘤诊疗已取得了许多进展, 但肿瘤仍然是全世界死亡的主要原因之一。基因分子分型检测促进肿瘤个体化治疗, 显著改善了治疗效果。目前分子分型主要依赖于手术或活检组织进行 PCR、免疫组织化学 (IHC) 和荧光原位杂交检测 (FISH) 等方法。然而, 对于早期或部分晚期肿瘤患者, 难以获得足够组织样本进行检测或因各种原因无法实施活检, 此时进行血液检测具有重要意义。在肿瘤晚期, 凋亡和坏死的肿瘤细胞进入血液时会释放产生外周血游离 DNA (cfDNA), cfDNA 在血浆中水平较低, 片段很短, 因此, 使用血浆样本进行突变基因检测时如何提高检测方法灵敏度至关重要。当前灵敏度较高的检测方法主要包括突变扩增系统 PCR (ARMS-

PCR)、dPCR 和二代测序 (NGS) 等。

dPCR 作为第三代 PCR 技术, 与 ARMS-PCR 和 NGS 比较, 具有灵敏度高、操作流程简单、受背景信号干扰小等优点。近年来, dPCR 技术在肿瘤无创诊疗领域已开始展现出独特的优势。本文将通过分析 dPCR 在常见肿瘤中的应用情况探索 dPCR 液体活检技术在大多数肿瘤诊疗中的实际临床应用效果。

### 1 dPCR 技术与非小细胞肺癌 (NSCLC) 的无创诊疗

NSCLC 是最常见的肺癌类型, 占有肺癌的 80%~85%。目前可用于指导临床靶向药物选择的驱动基因包括表皮生长因子 (EGFR)、V-raf 鼠肉瘤病毒癌基因同源物 B1 (BRAF)、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、克氏大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (KRAS) 和间质表皮转化因子, 以及间变性淋巴瘤激酶 (ALK)、v-ros UR2 肉瘤病毒癌基因同源物 1、原癌基因酪氨酸蛋白激酶受体和神经营养受体酪氨酸激酶 1/2 重排等。

**1.1 dPCR 技术在 EGFR 突变 NSCLC 患者无创诊疗中的应用** EGFR 是 NSCLC 中最常见的突变基因, 占 10%~35%。其突变类型以 21 号外显子 L858R 和 L861Q 及 19 号外显子缺失最为常见, 约占所有 EGFR 突变的 85%。EGFR 突变患者对酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 敏感。多重 dPCR 进行血浆 EGFR 突变检测可显著提高其检出率, 使更多患者有机会使用 TKI, 改善预后<sup>[2]</sup>。近期 LEE 等<sup>[3]</sup>基于 75 例早期和晚期 NSCLC 患者的 86 份血浆样本进行血浆与组织 EGFR 突变的检测, 并将检出率进行比较, 利用 dPCR 检测血浆 EGFR 突变, 其检出率接近组织 EGFR 突变率 (43.2% vs. 52.3%)。

除用于驱动基因检测外, dPCR 在 NSCLC 诊疗中的另一个重要应用方向是耐药监测。通过 dPCR 检测 T790M 突变已经成为 EGFR 突变 NSCLC 患者使用 TKI 药物后耐药监测的重要手段。SPENCE 等<sup>[4]</sup>利用 dPCR 技术检测 343 例 NSCLC 患者血浆中的 EGFR 突变, 发现 24% 的患者中存在 EGFR T790M 突变, 血浆 EGFR T790M 突变可有效预测奥

\* 基金项目: 广东省清远市人民医院医学科研基金项目 (20190213)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: hyinweigu@hotmai.com。

希替尼疗效,避免患者接受侵入性组织活检。LI 等<sup>[5]</sup>通过回顾性分析 dPCR 技术检测奥希替尼二线治疗后部分反应、疾病稳定和疾病进展期的患者血浆 cfDNA 中的 T790M 突变频率,发现奥希替尼二线治疗部分反应、疾病稳定患者血浆中 T790M 突变水平高于疾病进展期的患者,且血浆中 T790M 突变水平与患者无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)相关,但 BUDER 等<sup>[6]</sup>却提出 NSCLC 患者血浆中 T790M 水平与患者预后未存在明显关系。因此,目前仍需更多的研究和标准来评估 dPCR 技术用于血浆 T790M 突变的定量是否可用于预测患者 TKI 治疗反应。

除 T790M 突变外,EGFR 基因的 C797S 突变也是 NSCLC 患者奥希替尼耐药的主要原因。有 20%~40% 的奥希替尼耐药是由 C797S 突变引起的,通过 dPCR,纵向评估治疗前后血浆 EGFR T790M 和 C797S 水平,显示血浆 cfDNA 不同 EGFR 突变类型可作为评价奥希替尼治疗期间疾病进展的预后因素,这可能有助于临床决策的制订<sup>[7]</sup>。目前,dPCR 技术还用于检测晚期 NSCLC 患者中 EGFR 基因不太常见的突变,例如 G719S 和 L851Q<sup>[8]</sup>。此外 dPCR 检测 EGFR 突变已开始于在支气管冲洗液、细针抽吸上清液、痰液和尿液等其他体液样本中进行探索。有研究表明,对于发生中枢神经系统转移的肺癌患者,也可通过检测脑脊液中的 EGFR 突变来评估患者预后,其预测效果优于血浆样本<sup>[9]</sup>。

**1.2 dPCR 技术在 KRAS 突变 NSCLC 患者无创诊疗中的应用** KRAS 是一种致癌驱动基因,25%~30% 的 NSCLC 患者中存在 KRAS 突变<sup>[10]</sup>。尽管针对其突变的多种靶向药物对患者临床结果的影响已得到证实,但目前只有索托拉西布获得美国食品和药物管理局批准用于 KRAS G12C NSCLC 患者<sup>[11]</sup>。目前已有多重 dPCR 技术可用于检测 KRAS 基因最常见的 G12/G13 突变的,实现对血浆 cfDNA 进行灵敏、快速、准确的基因分型,其检出限至少可达 0.2%,帮助临床医生快速判断患者是否适合使用索托拉西布<sup>[11-12]</sup>。另外,dPCR 技术也用于 NSCLC KRAS 突变患者预后判断,目前已观察到 NSCLC 患者血浆 KRAS 突变水平随着疾病进展而增加,I 期 8%,II 期 30%,III 期 71%,IV 期 73%<sup>[12]</sup>。此外,一项基于 dPCR 技术的研究已发现血浆 ctDNA KRAS 突变水平与 NSCLC 患者的生存时间、化疗疗效等相关<sup>[10]</sup>。

**1.3 dPCR 技术在 ALK 基因重排 NSCLC 患者无创诊疗中的应用** 约 5% 的 NSCLC 患者存在 ALK 基因重排,其中以与棘皮动物微管相关蛋白样 4 (EMLA4)发生融合为多见,重排的 ALK 基因常导致持续信号激活,从而诱导细胞增殖。出现 ALK-EMLA4 重排的患者对克唑替尼、色瑞替尼等 ALK-TKI 敏感<sup>[13]</sup>,因此,高灵敏的检测技术可使更多患者获得靶向治疗机会。目前,FISH 或 IHC 是 ALK 基因重

排检测的“金标准”,但其灵敏度较低,检出限约为 15%<sup>[14]</sup>。作为一种高灵敏度技术,dPCR 检测已被设计用于检测石蜡样品中的 ALK-EMLA4 基因易位,其检出限达 0.25%<sup>[14]</sup>。

在耐药监测方面,约有 20% ALK 基因重排患者在接受第 1 代 ALK-TKI 克唑替尼治疗后,由于激酶结构域的突变而产生耐药性。因此,如何快速、高通量检测 ALK 突变并及时更改用药,对提高患者预后具有重要作用。目前已报道超过 10 个突变与第 1 代 ALK-TKI 耐药相关,包括 G1202R、F1174C/L、L1196M、G1269A、C1156Y、I1151Tins、L1152R、S1206Y、I1171T、D1203N 和 V1180L 等。已有多重 dPCR 用于检测多种 ALK 突变,在一个由 7 例 ALK 阳性 NSCLC 患者组成的小型队列中,多重 dPCR 成功地监测了疾病过程中不同的 ALK 耐药突变状态<sup>[15]</sup>。由于该队列入组人数较少,仍需更多的数据和研究来进一步评估 dPCR 检测 ALK 继发性突变的临床意义及其对 NSCLC 患者预后的影响。即便如此,该队列利用 dPCR 方法快速而灵敏的技术特点,通过微创的方法监测 ALK 耐药性突变,为临床制订用药决策提供新思路。

## 2 dPCR 技术与乳腺癌(BC)的无创诊疗

BC 是女性头号杀手,其发病率最近已超过肺癌,位居癌症之首。临床实践中,BC 根据组织学和 5 种分子特征分为 3 种亚型:激素受体(HR)阳性 BC,HER2 阳性 BC,不表达 HR 和 HER2 的 BC(三阴性乳腺癌)。这些标志物可用于预测 BC 患者对内分泌治疗药物和免疫治疗药物的反应。其他靶点包括 PIK3CA、雄激素受体、v-akt 鼠科胸腺瘤病毒癌基因同源物 1、雌激素受体 1(ESR1)和程序性死亡受体配体 1 等也是目前新药研发关注的靶点。dPCR 技术已开始用于 BC 患者的无创诊疗过程。研究表明 dPCR 等比 Sanger 测序更灵敏的技术证实了早期 BC 患者手术前后可在患者血浆中检测到 ctDNA,甚至比传统方法提前 11 个月预测肿瘤复发,可作为指导临床诊疗的高灵敏度的检测方法<sup>[16]</sup>。

**2.1 dPCR 技术在 BRCA 基因突变 BC 患者无创诊疗中的应用** 10% 的 BC 患者具有遗传性,与家族病史有关。BRCA 家族基因是 BC 中最常发生突变的基因,其畸变会使发生 BC 的风险增加 70%。携带 BRCA 基因突变患者可能会受益于 ADP-核糖聚合酶抑制剂,从而改善预后。BRCA 基因改变多样,包括点突变、大基因组重排或拷贝数变异(CNV)。Sanger 测序和多重连接依赖探针扩增(MLPA)被认为是最可靠的方法<sup>[17]</sup>。有研究表明,dPCR 在检测 BRCA1 基因组重排方面与 MLPA 具有良好的一致性<sup>[18]</sup>,但其成本约为 MLPA 的 1/6。另外,MLPA 检测每个基因外显子至少需要一个单独的反应,操作烦琐,目前已经开发出一种基于多通道的更具成本效益的多重

dPCR, 涵盖所有编码和非编码外显子, 以及 2 个参考基因(RPP30 和 ALB), 可克服 MLPA 这个缺点<sup>[17]</sup>。

尽管 dPCR 可用于对液体活检中的 BRCA 基因分型, 但目前仍处于起步阶段, 仍需要更多的队列研究数据, 进一步优化和标准化, 以阐明其临床应用和意义。

**2.2 dPCR 技术在 PIK3CA 突变 BC 患者无创诊疗中的应用** 激素疗法极大地改善了 HR 阳性转移性 BC(mBC) 患者预后。然而, PIK3CA 9 号外显子 E545K 和 E542K, 以及 20 号外显子 H1047R 和 H1047L 突变常导致激素疗法耐药。采用 dPCR 技术检测血浆 ctDNA 中这些生物标志物可用于预测 BC 疗效。已有大量的临床试验如 PALOMA-3、MIRHO 和 BOLERO-2, 采用 dPCR 技术用于分析 BC 患者血浆 PIK3CA 突变与临床疗效的关系。尽管 PALOMA-3 和 MIRHO 试验未发现 PIK3CA 基线水平与 PFS 之间存在关联, 但该研究发现了血浆 PIK3CA 突变患者接受氟维司群联合治疗可延长其 PFS<sup>[18]</sup>。相比之下, BOLERO-2 试验发现, PIK3CA 突变对其不能从哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂依维莫司二线治疗中获益, 不能作为该药的疗效预测指标<sup>[19]</sup>。可见, 应用 dPCR 技术早期鉴定 mBC 患者血浆 PIK3CA 突变状态, 可用于更好地指导临床治疗, 避免患者重复接受组织活检的痛苦。

**2.3 dPCR 技术在 ESR1 突变 BC 患者无创诊疗中的应用** 在雌激素受体阳性 mBC 患者中, 有 30%~40% 患者发生 ESR1 突变<sup>[20]</sup>。研究表明, 多数接受一线芳香化酶抑制剂(AI)治疗的 mBC 患者在内分泌治疗期间会获得 ESR1 突变, 导致耐药<sup>[21]</sup>。通过 dPCR, 一些研究人员分析了外周血中的 ESR1 突变状态, 结果发现与仅接受辅助 AI 治疗的患者相比, 已接受一线 AI 治疗患者的突变发生率显著增加。进一步的分析表明 ESR1 基因 Y537S 和 D538G 突变与较短的 OS 相关。通过 dPCR 技术连续监测 BC 患者治疗过程中 ESR1 Y537S、Y537N、Y537C 和 D538G 位点突变水平, 结果显示 AI 治疗可导致血浆 ESR1 突变水平波动, 治疗后 ESR1 突变水平的增加是导致预后不良的原因<sup>[22]</sup>。目前采用 dPCR 技术能在 2.5%~7.0% 的原发性 BC 中检测到 ESR1 突变<sup>[23]</sup>。此外, 有研究显示, 血浆 ESR1 突变检出率甚至高于组织检出率<sup>[24]</sup>。

**2.4 应用 dPCR 技术检测血浆 HER2 水平在 BC 患者无创诊疗中的应用** 在 20%~30% 的侵袭性 BC 患者中存在 HER2 扩增。HER2 过表达导致肿瘤细胞增殖、侵袭和随后的不良预后。目前, 曲妥珠单抗联合帕妥珠单抗可改善 HER2(+) 的早期 BC 和 mBC 患者的 PFS 和 OS<sup>[25]</sup>。目前评估 HER2 扩增的“金标准”是组织 IHC 或 FISH。尽管对液体活检中的 HER2 扩增检测知之甚少, 但已有团队通过优化

dPCR 检测技术, 用于检测血浆中的 HER2 CNV。为了确保检测结果的准确性, 该团队使用 EFTUD2 基因作为内参, 设计了 HER2 dPCR 检测方案, 该技术对 76 例 BC 患者的检测过程中, 发现以肿瘤活检结果作为标准, 该方法的检测灵敏度达 100%, 特异度达 98%<sup>[26]</sup>。尽管该方法主要是为检测血浆衍生的 cfDNA 而开发的, 但它也可以适用于甲醛固定石蜡包埋(FFPE)或新鲜冷冻组织样本。这些研究提示 HER2 扩增的微创测试将是一个临床转机。此外, 可以进一步优化这种方法用于检测其他扩增基因。

### 3 dPCR 技术与结直肠癌(CRC)的无创诊疗

众所周知, CRC 是由参与细胞复制、增殖和侵袭性密切相关调节途径的关键基因, 如腺瘤性大肠息肉、KRAS、BRAF、PIK3CA 和 SMAD4 集中的几个突变的积累引发的。研究发现 CRC 组织可释放大量 DNA 到血液中, dPCR 技术检测血浆 cfDNA 在肿瘤诊断、耐药监测和预后判断等患者全程管理方面有良好的应用前景<sup>[27]</sup>。

**3.1 dPCR 技术与血浆 KRAS 和 BRAF 检测及其临床意义** 研究表明, 5%~80% CRC 患者中可发现 EGFR 信号过度激活<sup>[28]</sup>。过去十余年, 大多数疗法主要是针对 MAPK 通路的激活或异常信号传导。然而, KRAS 或 BRAF 突变会导致抗 EGFR 单克隆抗体治疗失败。一项基于 Bio-Rad dPCR、BioCartis Idylla、Roche COBAS z480 和 Sysmex BEAMing 4 个检测平台用于检测血浆 ctDNA KRAS 突变的检测效能的比对研究表明, 在 4 个平台中, dPCR 和 BEAMing 灵敏度最高, 此外, dPCR 和 COBAS 可以在单个反应中分析多个样本<sup>[29]</sup>。另一项回顾性研究表明, 无论在与组织检测结果的一致性还是检测通量、重复性、检测速度方面, dPCR 检测血浆 KRAS 突变的能力优于 COLD-PCR<sup>[30]</sup>。有研究表明 cfDNA 水平与转移性结直肠癌(mCRC)中的肿瘤突变负荷之间存在良好的相关性<sup>[30]</sup>, 也可通过 dPCR 技术进行 CRC 的早期筛查, 实现精准防治。在预后判断方面, mCRC 患者血浆 KRAS 突变水平具有预测患者预后和治疗监测的能力。在来自前瞻性多中心 AIO KRK0207 试验结果显示, 利用 dPCR 技术对患者血浆中的 KRAS 突变进行量化, 可通过检测基线和治疗过程中的 KRAS 突变情况, 预测其 OS 和 PFS<sup>[31]</sup>。dPCR 检测血浆 KRAS 突变影像学可提早 10 个月预测疾病进展<sup>[32]</sup>。可见, dPCR 技术检测血浆 KRAS 突变波动和最终消失可作为预测 CRC 患者抗 EGFR 疗效的手段<sup>[33]</sup>。

**3.2 dPCR 技术与微卫星不稳定性(MSI)及其临床意义** DNA 错配修复缺陷(dMMR)导致 DNA 微卫星中大量 DNA 复制错误的积累, 这种现象被称为 MSI。早期阶段 CRC 患者 dMMR/高度微卫星不稳定性(MSI-H) 的频率为 15%, 在 mCRC 中占 2%~

4%<sup>[33]</sup>。dMMR/MSI-H 是免疫治疗疗效的预测性泛肿瘤生物标志物。ctDNA 微创检测 MSI-H 是一种很有前途的诊断和治疗监测工具。目前已经开发了一种 dPCR 测定方法来评估微卫星标志物 BAT-26、ACVR2A 和 DEFB105A/B。MSI-dPCR 测定在组织和血液样本中得到验证,实现了<0.1%的检测灵敏度,其检测结果与最常用的商业试剂盒 pentaplex-PCR 的测定结果 100%一致<sup>[34]</sup>。新的 MSI-dPCR 检测有望成为一种经济、高效、简单、快速的诊断工具,用于检测具有高临床敏感性的 MSI。此外,该测定同样适用于固体和液体活检,还包括具有低 MSI 频率的肿瘤组织样本。

#### 4 dPCR 技术与胰腺癌(PC)的无创诊疗

虽然 PC 并不常见,但其预后极差,病死率极高,已成为全球第 7 大癌症。已有研究通过多重 dPCR 检测到的 KRAS 热点突变发现,PC 晚期患者 KRAS 突变水平更高,且与远处器官转移的存在显著相关性<sup>[35]</sup>,血浆 KRAS 突变发生率与预后不良有关<sup>[36]</sup>。在一个局部晚期不可切除的 PC 队列中,治疗后血浆 KRAS 突变水平显著降低<sup>[37]</sup>。在一项类似的研究中,研究人员观察到在治疗后 6 个月内无法在血浆中检测到 KRAS 突变的患者,其预后更好<sup>[38]</sup>。这些结果与另一项使用多重 dPCR 测定法检测 16 个 KRAS 突变的研究结果一致<sup>[35]</sup>。

#### 5 其 他

周围肿瘤区域中的液体(例如腹膜液)已被证明是有用的 cfDNA 液体活检来源<sup>[39]</sup>。在腹膜转移 CRC 患者中,在腹膜液中检测到的 KRAS 或 BRAF ctDNA 水平明显高于血浆中的水平<sup>[40]</sup>。由于尿液收集方便,且具有可重复多次采集等优点,尿液也被列为肿瘤生物标志物液体活检样本,用于疾病进展和药物反应监测。在 KRAS 阳性 mCRC 队列验证研究中,从尿液和匹配的血浆样本中筛选出 KRAS 或 BRAF 突变。尽管二者的一致性很低,但它们表明了使用尿液样本进行非泌尿生殖道肿瘤突变筛查的可行性<sup>[41]</sup>。

已有研究证明,肿瘤组织周围区域中的其他 DNA 来源(例如外泌体、循环肿瘤细胞和其他体液等)可提供有关疾病演变的信息<sup>[39,42]</sup>。dPCR 技术除了检测血浆中 ctDNA 外,还可用于血浆外泌体检测。外泌体是细胞主动分泌的囊性结构,可提供有关疾病演变的信息。有研究表明,dPCR 用于评估来自外泌体衍生 DNA 中的 KRAS 热点突变,灵敏度和特异度分别为 75.4%和 92.6%,外泌体中的 KRAS 突变检测在所有阶段都优于血浆 cfDNA。此外,局部切除前和切除后突变率分别从 66%急剧下降至 5%<sup>[43]</sup>。

#### 6 展 望

液体活检被认为是癌症管理的良好替代和补充工具。通过灵敏度检测技术对特定生物标志物的研

究可以指导临床医生在靶向治疗期间监测疾病进展。尽管 dPCR 已被证明其在检测罕见的可操作突变方面具有很高的灵敏度和特异度,但仍需要进一步的研究以在所有临床实验室实施精准医学。另一方面,相较于数字酶联免疫吸附试验能够提高将免疫检测的灵敏度提高到 fg/mL 级别,实现了高敏蛋白的检测,dPCR 尽管发展更早,却在临床应用方面一直难以取得突破,主要是由于 dPCR 过程有很多技术难点。因此如何制作成本低廉的芯片,如何集成液滴生成和 PCR 扩增,如何进行灵敏的信号检测和分析,如何提高自动化程度是实现所谓的第 3 代 PCR 临床应用推广的重要突破。

#### 参考文献

- [1] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR[J]. J Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [2] DE KOCK R, DEIMAN B, KRAAIJVANGER R, et al. Optimized (Pre) analytical conditions and workflow for droplet digital PCR analysis of cell-free DNA from patients with suspected lung carcinoma[J]. J Mol Diagn, 2019, 21(5): 895-902.
- [3] LEE K, LIM S, LEE Y G, et al. Evaluation of molecular methods for plasma detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2022, 18(6): 595-604.
- [4] SPENCE T, PERERA S, WEISS J, et al. Clinical implementation of circulating tumour DNA testing for EGFR T790M for detection of treatment resistance in non-small cell lung cancer[J]. J Clin Pathol, 2021, 74(2): 91-97.
- [5] LI J Y, HO J C, WONG K H. T790M mutant copy number quantified via ddPCR predicts outcome after osimertinib treatment in lung cancer[J]. Oncotarget, 2018, 9(46): 27929-27939.
- [6] BUDER A, HOCHMAIR M J, SCHWAB S, et al. Cell-free plasma dna-guided treatment with osimertinib in patients with advanced EGFR-mutated NSCLC[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(6): 821-830.
- [7] ROMERO A, SERNA-BLASCO R, ALFARO C, et al. ctDNA analysis reveals different molecular patterns upon disease progression in patients treated with osimertinib[J]. Transl Lung Cancer Res, 2020, 9(3): 532-540.
- [8] ESTEVA-SOCIAS M, ENVER-SUMAYA M, GOMEZ-BELLVERT C, et al. Detection of the EGFR G719S mutation in non-small cell lung cancer using droplet digital PCR[J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7: 594900.
- [9] LIU Y, YANG S, ZHAO J, et al. Cell-free DNA from cerebrospinal fluid can be used to detect the EGFR mutation status of lung adenocarcinoma patients with central nervous system metastasis[J]. Transl Lung Cancer Res, 2021, 10(2): 914-925.
- [10] WAHL S, DAI H Y, EMDAL E F, et al. Prognostic value of absolute quantification of mutated KRAS in circulating

- tumour DNA in lung adenocarcinoma patients prior to therapy[J]. *J Pathol Clin Res*, 2021, 7(3):209-219.
- [11] 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.
- [12] SACHER A G, PAWELETZ C, DAHLBERG S E, et al. Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer[J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(8):1014-1022.
- [13] SHARMA G G, MOTA I, MOLOGNI L, et al. Tumor resistance against ALK targeted therapy—where it comes from and where it goes [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(3):62.
- [14] LUND H L, HUGHESMAN C B, FAKHFAKH K, et al. Initial diagnosis of ALK-positive non-small-cell lung cancer based on analysis of ALK status utilizing droplet digital PCR[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(9):4879-4885.
- [15] YOSHIDA R, SASAKI T, UMEKAGE Y, et al. Highly sensitive detection of ALK resistance mutations in plasma using droplet digital PCR[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):1136.
- [16] OLSSON E, WINTER C, GEORGE A, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease [J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(8):1034-1047.
- [17] OSCORBIN I, KECHIN A, BOYARSKIKH U, et al. Multiplex ddPCR assay for screening copy number variations in BRCA1 gene[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 178(3):545-555.
- [18] CRISTOFANILLI M, TURNER N C, BONDARENKO I, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(4):425-439.
- [19] PREOBRAZHENSAYA E V, BIZIN I V, KULIGINA E S, et al. Detection of BRCA1 gross rearrangements by droplet digital PCR[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 165(3):765-770.
- [20] MOYNAHAN M E, CHEN D, HE W, et al. Correlation between PIK3CA mutations in cell-free DNA and everolimus efficacy in HR(+), HER2(-) advanced breast cancer; results from BOLERO-2[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(6):726-730.
- [21] TOY W, WEIR H, RAZAVI P, et al. Activating ESR1 mutations differentially affect the efficacy of ER antagonists[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(3):277-287.
- [22] TAKESHITA T, YAMAMOTO Y, YAMAMOTO-IB USUKI M, et al. Analysis of ESR1 and PIK3CA mutations in plasma cell-free DNA from ER-positive breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32):52142-52155.
- [23] TAKESHITA T, YAMAMOTO Y, YAMAMOTO-IB USUKI M, et al. Clinical significance of monitoring ESR1 mutations in circulating cell-free DNA in estrogen receptor positive breast cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22):32504-32518.
- [24] NAJIM O, HUIZING M, PAPADIMITRIOU K, et al. The prevalence of estrogen receptor-1 mutation in advanced breast cancer; the estrogen receptor one study (EROS1)[J]. *Cancer Treat Res Commun*, 2019, 19:100123.
- [25] RAN R, HUANG W, LIU Y, et al. Prognostic value of plasma HER2 gene copy number in HER2-positive metastatic breast cancer treated with first-line trastuzumab [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:4385-4395.
- [26] GARCIA-MURILLAS I, LAMBROS M, TURNER N C. Determination of HER2 amplification status on tumour DNA by digital PCR[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e83409.
- [27] ZMRZLJAK U P, KOSIR R, KRIVOKAPIC Z, et al. Detection of somatic mutations with ddPCR from liquid biopsy of colorectal cancer patients [J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(2):289.
- [28] SEPULVEDA A R, HAMILTON S R, ALLEGRA C J, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer; guideline from the american society for clinical pathology, college of american pathologists, association for molecular pathology, and the American society of clinical oncology[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(13):1453-1486.
- [29] VESSIES D, GREUTER M, VAN ROOIJEN K L, et al. Performance of four platforms for KRAS mutation detection in plasma cell-free DNA: ddPCR, Idylla, COBAS z480 and BEAMing[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):8122.
- [30] GALBIATI S, DAMIN F, BURGIO V, et al. Evaluation of three advanced methodologies, COLD-PCR, microarray and ddPCR, for identifying the mutational status by liquid biopsies in metastatic colorectal cancer patients[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 489:136-143.
- [31] LUEONG S S, HERBST A, LIFFERS S T, et al. Serial circulating tumor DNA mutational status in patients with KRAS-mutant metastatic colorectal cancer from the phase 3 AIO KRK0207 trial [J]. *Clin Chem*, 2020, 66(12):1510-1520.
- [32] MISALE S, ARENA S, LAMBA S, et al. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224-226.
- [33] KLEIN-SCORY S, WAHNER I, MASLOVA M, et al. Evolution of RAS mutational status in liquid biopsies during first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:1115.
- [34] GEORGIADIS A, DURHAM J N, KEEFER L A, et al. Noninvasive detection of microsatellite instability and high tumor mutation burden in cancer patients treated with PD-1 blockade[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(23):7024-7034.
- [35] SUGIMORI M, SUGIMORI K, TSUCHIYA H, et al.

- Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(1): 266-278.
- [36] KIM M K, WOO S M, PARK B, et al. Prognostic implications of multiplex detection of KRAS mutations in cell-free DNA from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Clin Chem*, 2018, 64(4): 726-734.
- [37] WOO S M, KIM M K, JOO J, et al. Induction chemotherapy with gemcitabine and cisplatin followed by simultaneous integrated boost-intensity modulated radiotherapy with concurrent gemcitabine for locally advanced unresectable pancreatic cancer: results from a feasibility study [J]. *Cancer Res Treat*, 2017, 49(4): 1022-1032.
- [38] WATANABE F, SUZUKI K, TAMAKI S, et al. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer [J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e227366.
- [39] LEICK K M, KAZARIAN A G, RAJPUT M, et al. Peritoneal cell-free tumor dna as biomarker for peritoneal surface malignancies[J]. *Ann Surg Oncol*, 2020, 27(13): 5065-5071.
- [40] VAN'T E I, ROVERS K P, CONSTANTINIDES A, et al. Detection of tumor-derived cell-free DNA from colorectal cancer peritoneal metastases in plasma and peritoneal fluid[J]. *J Pathol Clin Res*, 2021, 7(3): 203-208.
- [41] CRISAFULLI G, MUSSOLIN B, CASSINGENA A, et al. Whole exome sequencing analysis of urine trans-renal tumour DNA in metastatic colorectal cancer patients[J]. *ESMO Open*, 2019, 4(6): e000572.
- [42] YAP S A, MUNSTER-WANDOWSKI A, NONNENMA CHER A, et al. Analysis of cancer-related mutations in extracellular vesicles RNA by Droplet Digital PCR[J]. *Biotechniques*, 2020, 69(2): 99-107.
- [43] ALLENSON K, CASTILLO J, SAN L F, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(4): 741-747.

(收稿日期: 2022-03-20 修回日期: 2022-12-06)

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.03.032

## HIV 感染/AIDS 患者血小板减少和贫血发病机制及临床研究进展\*

薛成军<sup>1</sup>, 罗效梅<sup>2</sup>, 杨 坤<sup>2</sup>, 李小凤<sup>2</sup>综述, 王 静<sup>2△</sup>审校

1. 重庆市两江新区第二人民医院检验科, 重庆 401123; 2. 重庆市公共卫生  
医疗救治中心医学检验科, 重庆 400036

关键词: 艾滋病; 血小板减少; 贫血; 中性粒细胞减少

中图分类号: R512.91

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)03-0415-04

艾滋病(AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的一类免疫缺陷病。HIV 属于病毒科慢病毒属中的人类慢病毒组, 是一种引起人体多系统疾病的反转录病毒, 主要通过攻击人体免疫系统最重要的 CD4<sup>+</sup> 辅助性 T 淋巴细胞, 破坏人体免疫系统来发挥其致病作用。2019 年, 世界卫生组织统计报告显示, 全世界约有 3 800 万 HIV 感染者或 AIDS 患者(简称 HIV 感染/AIDS)。国内 HIV 感染/AIDS 患者的数量也呈逐年上升的趋势, 截至 2018 年 7 月 31 日, 全国报告现存活 HIV 感染/AIDS 患者 831 225 例, 死亡 255 995 例<sup>[1]</sup>。AIDS 已成为全球最严峻的公共卫生挑战, 并且 HIV 的高致病性和 HIV 感染/AIDS 患者多种并发症所导致的高病死率也给临床诊疗带来了极大的挑战。

血液学的改变是 HIV 感染/AIDS 患者最常见并发症。目前已有研究证实, HIV 可以通过主要受体 CD4 和辅助受体(CCR5、CXCR4)直接进入辅助性 T

淋巴细胞、单核巨噬细胞和树突状细胞, 导致其被感染并最终引发细胞的破坏。同时, 骨髓作为人体的造血器官, 也是 HIV 感染和药物作用的靶器官, 并且 HIV 感染/AIDS 患者体内释放的炎症因子也会对骨髓造血功能产生直接的影响。因此, HIV 感染/AIDS 患者常常会出现血小板减少、贫血和中性粒细胞减少等血液系统并发症, 并且成为患者死亡的风险之一。本文就 HIV 感染/AIDS 患者的血小板减少、贫血和中性粒细胞减少的发病机制及相关临床研究进行综述。

### 1 HIV 对骨髓系统的影响

骨髓是人体的造血组织, 位于身体的许多骨骼内。造血组织主要由基质细胞和造血干细胞组成。基质细胞又包括成纤维细胞、内皮细胞、脂肪细胞、巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞、网状细胞和间充质干细胞等。基质细胞及其分泌的多种细胞因子[干细胞因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、白细胞介素(IL)-

\* 基金项目: 重庆市 2020 年科卫联合医学科研项目(2020FYXX161); 重庆市卫生健康委员会医学科研项目(2022WSJK037)。

△ 通信作者, E-mail: wj13883977403@163.com。