

# 循环肿瘤 DNA 与转移性结直肠癌靶向治疗及耐药机制的相关研究

李建英<sup>1</sup>, 毛玉环<sup>1</sup>, 张晓<sup>2</sup>, 周琼<sup>2</sup>, 谭黎明<sup>2</sup>

1. 长沙市第一医院, 湖南 长沙 410005; 2. 湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院), 湖南 长沙 410001

**摘要:** **目的** 探讨转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer, mCRC)耐药相关的点突变,明确循环肿瘤 DNA(circulating tumour DNA, ctDNA)能否作为 mCRC 检测和耐药相关的突变分子标志物以及 mCRC 可能的耐药机制。 **方法** 通过对连续抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)单抗药物治疗的 mCRC 患者多阶段 ctDNA 进行 KRAS、BRAF 和 PIK3CA 基因点突变动态监测,构建药物作用下的肿瘤基因突变谱变化,筛选耐药相关点突变;培养相应点突变细胞系后,通过体外细胞增殖试验(MTS 法)分析细胞系的耐药程度,实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测药物作用对突变丰度的影响。 **结果** 通过临床数据分析,筛选出可能与 mCRC 耐药相关的点突变 KRAS(G12D)、PIK3CA(H1047R)和 BRAF(V600E),并纳入后续研究。选择 NCI-H747、SW948 和 SW1417 细胞系分别作为 KRAS(G12D)、PIK3CA(H1047R)和 BRAF(V600E)点突变的细胞系,并选用 C2BBel 野生型细胞系作为本底细胞。MTS 半数抑制浓度即 IC<sub>50</sub>测定发现,野生型细胞系对西妥昔单抗和帕尼单抗敏感性均较突变细胞高;经与本底细胞稀释后,西妥昔单抗组和帕尼单抗组在培养 3 d 后突变基因相对水平平均比不加药组高,不加药组均比基线组高。 **结论** ctDNA 检测能够发现与耐药相关的点突变;KRAS(G12D)、PIK3CA(H1047R)和 BRAF(V600E)点突变可提高转移性结直肠癌细胞生长速度,并与西妥昔单抗和帕尼单抗耐药相关。

**关键词:** 转移性结直肠癌;循环肿瘤 DNA;靶向治疗;耐药机制

中图分类号:R735.3<sup>+</sup>5 文献标识码:A 文章编号:1006-3110(2021)12-1450-05 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2021.12.010

## Correlation of circulating tumor DNA with targeted therapy and drug resistance mechanism of metastatic colorectal cancer

LI Jian-ying<sup>1</sup>, MAO Yu-huan<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>2</sup>, ZHOU Qiong<sup>2</sup>, TAN Li-ming<sup>2</sup>

**基金项目:**湖南省卫生计生委科研课题(B2017079);湖南省科技创新计划项目(2017SK50509)

**作者简介:**李建英(1989-),女,硕士,检验医师,研究方向:基因分子生物学。

**通信作者:**谭黎明,E-mail:tanliming838@163.com。

**志谢** 感谢参与湖南省新冠肺炎疫情防控的各级医疗机构和疾病预防控制中心对流行病学调查、标本采集、运送和检测工作做出的支持和贡献

### 参考文献

- [1] World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [EB/OL]. (2020-03-11) [2020-05-12]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (2020).
- [2] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.
- [3] 周涛,刘权辉,杨紫陌,等. 新型冠状病毒肺炎基本再生数的初步预测[J]. 中国循证医学杂志, 2020, 20(3): 359-364.
- [4] Nishiura H, Linton NM, Akhmetzhanov AR. Serial interval of novel coronavirus (COVID-19) infections [J]. Int J Infect Dis, 2020, 93(2020): 284-286.
- [5] 詹思延,叶冬青,谭红专. 流行病学[M]. 第7版.北京:人民卫生出版社, 2012: 208.
- [6] Backer JA, Klinkenberg D, Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from

Wuhan, China, 20-28 January 2020 [J]. Euro Surveill, 2020, 25(5): 2000062.

- [7] Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China[J]. N Engl J Med, 2020, 382(18): 1708-1720.
- [8] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎防控方案(第四版)[Z]. 2020-01-27.
- [9] Li Q, Guan X, Peng Wu, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J]. N Engl J Med, 2020, 382(13): 1199-1207.
- [10] 国家卫生健康委员会. 中国-世界卫生组织新型冠状病毒肺炎(COVID-19)联合考察报告[R]. 北京:国家卫生健康委员会, 2020: 18.
- [11] 叶莹,范威,王文华,等. 新型冠状病毒肺炎潜伏期分析[J]. 实用预防医学, 2021, 28(2): 129-131.
- [12] Chan JF, Yuan S, Kok KH, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission; a study of a family cluster[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 514-523.

收稿日期:2021-03-07

1. The First Hospital of Changsha City, Changsha, Hunan 410005, China;

2. The People's Hospital of Hunan Province (The First Hospital Affiliated to Hunan Normal University), Changsha, Hunan 410001, China

Corresponding author: TAN Li-ming, E-mail: tanliming838@163.com

**Abstract:** **Objective** To explore the possible mutations associated with drug resistance in metastatic colorectal cancer (mCRC), to verify whether circulating tumor DNA (ctDNA) can be used as a molecular marker of mutations associated with mCRC detection and drug resistance as well as the possible drug resistance mechanisms of mCRC. **Methods** Through the dynamic monitoring of KRAS, BRAF and PIK3CA gene point mutations in ctDNA in multi-stages in mCRC patients with continuous anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy, the changes in tumor gene mutation spectrum under drug treatment were constructed and drug-resistance-related point mutations were screened. The multiplexed cell lines were selected according to the point mutation, and multidrug resistance of multiple groups of cell lines was analyzed by MTS assay. The drug pressure was analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** KRAS (G12D), PIK3CA (H1047R) and BRAF (V600E) mutations related to drug resistance of mCRC were screened by clinical data analysis, and enrolled in the follow-up study. NCI-H747, SW948 and SW1417 cell lines were selected as KRAS (G12D), PIK3CA (H1047R) and BRAF (V600E) point mutation cell lines, respectively, and the wild-type cell line of C2BBel1 was used as the background. IC<sub>50</sub> was performed by MTS experiments. It was found that the wild-type cells were significantly higher than mutation cells for the incidence of cetuximab and panitumumab. The cells were diluted by basal cells. After 3-day cultivation, the relative levels of the mutant genes were higher in the cetuximab group and the panitumumab group than in the non-drug group as well as higher in the non-drug group than in the baseline group. **Conclusion** Drug-resistance-related point mutations can be determined by ctDNA detection. The growth rate of metastatic colorectal cancer cells can be increased by KRAS (G12D), PIK3CA (H1047R) and BRAF (V600E) mutations, and they are associated with the drug resistance of cetuximab and panitumumab.

**Keywords:** metastatic colorectal cancer; circulating tumor DNA; targeted therapy; drug resistance mechanism

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是人类最常见的恶性肿瘤之一, 尽管诊疗方式不断更新, 但预后情况仍不乐观, 尤其是转移性结直肠癌 (metastatic colorectal cancer, mCRC) 其 5 年生存率仅为 13%<sup>[1]</sup>。近年来抗表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 单克隆抗体分子靶向治疗 mCRC 取得了较好疗效。然而, 研究发现 KRAS、BRAF 和 PIK3CA 等基因突变的 mCRC 患者对靶向治疗有效率仅约 10%<sup>[2-3]</sup>。因此, 早期靶向突变基因检测是判断 mCRC 疗效的关键。研究显示, 循环肿瘤 DNA (circulating tumour DNA, ctDNA) 是肿瘤细胞主动释放或被动脱落进入血液循环的 DNA 片段, 携带有完整的肿瘤特异性遗传学改变基因组信息, 通过检测 ctDNA 可以明确相关肿瘤的遗传学改变<sup>[4]</sup>。为寻求 mCRC 有效的靶向治疗分子标记物, 本研究通过对 mCRC 患者多阶段 ctDNA 进行 KRAS、BRAF 和 PIK3CA 基因点突变检测和生物信息学分析, 构建药物压力下的肿瘤基因突变谱变化, 筛选耐药相关点突变, 并在体外验证这些突变是否与耐药相关, 从而明确 ctDNA 能否作为 mCRC 耐药相关的突变分子标志物, 探讨 mCRC 患者可能存在的耐药机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 人类 KRAS、BRAF 和 PIK3CA 基因突变检测试剂盒: 购自厦门艾德有限公司; MTS 试剂: 购自美国 Promega 公司; 基因提取试剂盒: 购自天根生化科技有限公司。

1.1.2 细胞株 NCI-H747: 结直肠癌细胞株, RPMI-1640 培养基; SW948: 结直肠癌细胞株, Leibovitz's L-15 培养基; SW1417: 结直肠癌细胞株, Leibovitz's L-15 培养基; C2BBel1: 结直肠癌细胞株, DMEM 高糖培养基; 培养液: 10% 胎牛血清, 加入青霉素和链霉素各 100 U/ml; 培养条件: 置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养。

1.1.3 药品 西妥昔单抗: 购自 selleckchem 公司; 帕尼单抗: 购自 selleckchem 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 临床样本 ctDNA 数据收集 选取经抗 EGFR 单抗连续治疗的 mCRC 患者 30 例, 在连续给药期间的第 0 d、第 (56±2) d、第 (112±2) d、第 (168±2) d…… (以 28 d 为 1 周期, 每 2 个周期采血一次) 抽取静脉血 5 ml, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 冷冻保存。提取患者多个阶段的外周血 ctDNA, RT-qPCR 检测 ctDNA 中 KRAS、PIK3CA 和 BRAF 基因突变, 明确药物压力下肿瘤基因突变谱变化, 筛选耐药相关点突变。

1.2.2 选定相关细胞系 在 CCLE 数据库选取对应点突变的肿瘤细胞系。

1.2.3 药物 IC<sub>50</sub> 浓度的测定 将选取的细胞系在 96 孔板内培养 24 h, 帕尼单抗和西妥昔单抗分别等比稀释成 8 个不同浓度, 每孔加入已配制好含有不同浓度药物的培养基, 培养 72 h 弃去含药物培养基后加入含有 MTS 溶液的培养基, 进行吸光度值的检测, 计算药物 IC<sub>50</sub> 的浓度。

1.2.4 药物处理选定的细胞系 分别将点突变细胞与本底细胞混合成一定浓度后分为 4 份, 1 份在未加药物时提取 DNA, 其余 3 份分别加帕尼单抗、西妥昔单抗以及不加药培养基, 培养 72 h 后提取 DNA, 其中加入药物的浓度为 IC<sub>50</sub> 值的浓度。

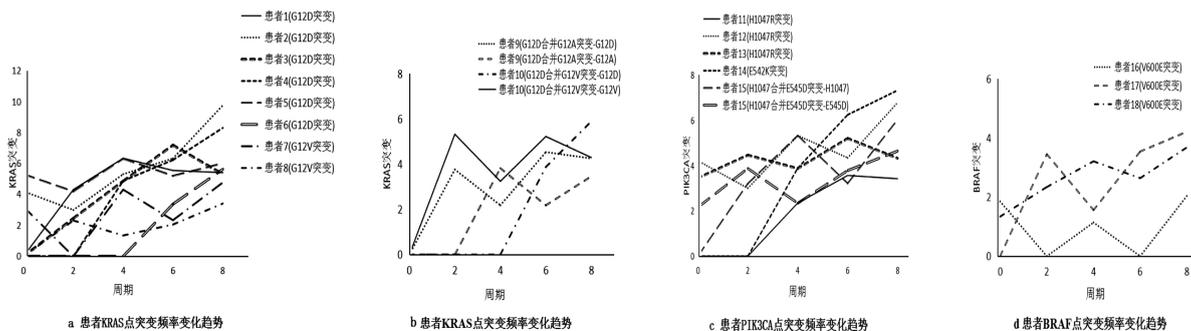
1.2.5 细胞经药物处理前后突变基因相对变化 RT-qPCR 检测 4 份 DNA 中 KRAS (G12D)、PIK3CA (H1047R) 和 BRAF (V600E) 基因突变丰度, 验证该突变基因与肿瘤细胞对帕尼单抗和西妥昔单抗耐药的相关性。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 首先进行数据的正态性检验, 若为正态分布, 数据统计量用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 并采用 *t* 检验分析组间差异; 若为非正态分布, 数据统计量用中位数和范

围来表示, 并用 Mann-Whitney 检验分析组间差异, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 可能与耐药相关的点突变 30 例连续抗 EGFR 药物治疗的 mCRC 患者不同阶段外周血 ctDNA 突变频率变化如图 1 所示。其中有 10 例出现了 KRAS 基因 12 密码子突变, 共检出 3 种突变类型: 6 例突变类型为 G12D (Gly12Asp), 碱基变化为 GGT>GAT; 2 例突变类型为 G12V (Gly12Val), 碱基变化为 GGT>GTT; 1 例 G12D 合并 G12A (Gly12Ala) 突变, 1 例 G12D 合并 G12V (Gly12Val) 突变。其中 5 例出现了 PIK3CA 基因 9 号和 20 号外显子突变, 共检出 3 种突变类型: 3 例突变类型为 H1047R (3140A>G), 1 例 E542K (1624G>A), 1 例 H1047R 合并 E545D (1633G>T); 其中 3 例出现了 BRAF 突变, 突变类型均为 V600E; 3 例出现 KRAS 合并 PIK3CA 基因突变。检测的三种基因点突变频率最高的是 KRAS (G12D)、PIK3CA (H1047R) 和 BRAF (V600E) 类型, 故将该点纳入下一步研究。



注: a 和 b 表示 KRAS 突变患者突变频率变化; c 和 d 分别表示 PIK3CA 和 BRAF 突变患者突变频率变化。

图 1 患者 ctDNA 中点突变频率变化趋势图

2.2 细胞系的选定及基本信息采集 根据筛选出的结直肠癌耐药频率最高的点突变类型及细胞系的状态采集, KRAS (G12D) 突变类型选用 NCI-H747 细胞系, PIK3CA (H1047R) 选用 SW948 细胞系, BRAF (V600E) 选用 SW1417 细胞系。同时选用 C2BBel 野生型细胞系作为本底细胞和对照。突变细胞和野生型细胞均为结直肠癌细胞, 并经测序验证突变类型的正确性。

表 1 不同细胞系对不同药物的 IC<sub>50</sub> 值 (umol/L)

细胞系	西妥昔单抗	帕尼单抗
C2BBel	3.45±1.02	3.98±1.13
NCI-H747	10.24±1.63	9.46±1.61
SW948	7.78±1.27	8.35±0.89
SW1417	6.65±0.96	6.42±1.44

2.3 野生型和点突变型细胞系对药物的 IC<sub>50</sub> 值测定 表 1 显示, 4 种细胞系对西妥昔单抗和帕尼单抗的 IC<sub>50</sub> 值。如图 2 所示, 3 种点突变的细胞对两种药物的 IC<sub>50</sub> 值均比野生型细胞高 ( $P < 0.05$ ), 表明经点突变后的细胞对两种抗 EGFR 单抗药物的敏感性降低。

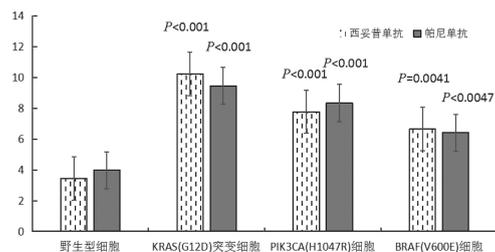


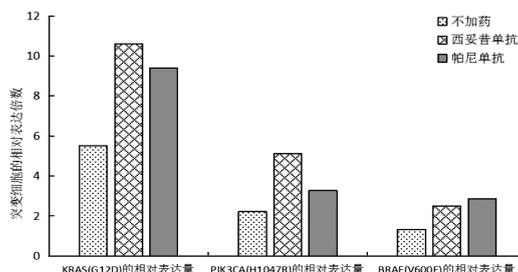
图 2 不同细胞系对不同药物的 IC<sub>50</sub> 值 (umol/L)

2.4 各细胞系经药物处理前后突变基因水平相对变化 采用 RT-qPCR 分析了各点突变细胞系经药物处理前后 KRAS (G12D)、PIK3CA (H1047R) 和 BRAF (V600E) 变化情况。从表 2 可知, 不管加或不加药, 3 d 之后基因突变相对水平均高于基线水平, 而加药后三种基因突变相对水平均高于不加药组, 见图 3。

表 2 突变基因的相对表达量

细胞系		Ct 突变	Ct 内参	$\alpha$ Ct	$\beta$ Ct	$\gamma$ Ct
NCI-H747	D0	36.654	22.327	14.327	0.000	1.000
	西妥昔单抗	33.456	22.536	10.920	-3.407	10.607
	帕尼单抗	33.489	22.395	11.094	-3.233	9.402
	不加药处理	34.142	22.278	11.864	-2.463	5.514
SW948	D0	33.421	22.431	10.990	0.000	1.000
	西妥昔单抗	31.153	22.517	8.636	-2.354	5.112
	帕尼单抗	31.869	22.686	9.283	-1.707	3.265
	不加药处理	32.476	22.632	9.844	-1.146	2.213
SW1417	D0	35.978	22.731	13.247	0.000	1.000
	西妥昔单抗	34.275	22.354	11.921	-1.326	2.507
	帕尼单抗	34.189	22.462	11.727	-1.520	2.868
	不加药处理	35.014	22.179	12.835	-0.412	1.331

注: D0 指用药前; Ct 突变和 Ct 内参分别指突变和内参基因扩增数;  $\alpha$ Ct 指突变基因减内参基因的循环差异数;  $\beta$ Ct 指突变基因相对 D0 d 的相对循环差异数,  $\gamma$ Ct 指突变基因相对 D0 d 的相对倍数差异。



注: 细胞经不同处理 3 d 后, 突变细胞系突变基因相对 D0 d 的表达量。

图 3 突变基因相对表达量

### 3 讨论

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是 HER/ErbB 家族的一员, 可于结直肠癌在内的多种恶性肿瘤中过度表达<sup>[5]</sup>。西妥昔单抗和帕尼单抗是两种常见的抗 EGFR 单克隆抗体 (MoAbs), 两者联合化疗药物作用于 mCRC 患者, 可使其中位总生存期从 6 个月提高至近 30 个月, 显著改善 mCRC 患者的生存质量及预后<sup>[6-7]</sup>。

然而大型临床研究证实 48% 的 mCRC 癌患者至少携带一种耐药基因突变, 对此类药物治疗无效。同时, 临床研究表明大多数癌症患者并非死于原发性癌症而是癌症的转移, 导致癌症转移的信号众多, 其关键

作用靶点及具体作用机制尚不完全清楚, 因此癌症转移是癌症治疗中的难题<sup>[8-9]</sup>。抗 EGFR 治疗的原发、继发性耐药机制极大地限制了抗 EGFR 单抗药物的应用, 耐药肿瘤细胞的早发现是克服 EGFR 耐药的关键之一。已有研究发现 KRAS、BRAF 和 PIK3CA 等基因突变可导致肿瘤对抗 EGFR 单抗耐药<sup>[10-11]</sup>。因此, 抗 EGFR 治疗耐药后, 可通过耐药基因突变检测, 对突变激活通路靶向干预, 为制定个体化的逆转耐药方案争取时间<sup>[12]</sup>。随着人们对肿瘤发展机制及其分子特征的不断探索, “液态活检” ctDNA 已成为有效检测抗 EGFR 治疗继发性耐药突变的重要检测手段<sup>[13-14]</sup>。ctDNA 是由机体细胞释放入外周血循环后发生部分降解的内源性 DNA, 与肿瘤细胞基因组信息相一致, 并能克服组织活检有创性、组织异质性等特点。

另外, 有文献报道与耐药相关的肿瘤突变细胞会随着药物压力作用逐渐富集<sup>[15]</sup>。因此, 本文通过对患者 ctDNA 的动态监测, 可以观察到耐药细胞亚群会占据优势, 并且可从中筛选与耐药相关的点突变, 进行耐药机制的探索。本试验研究得到 mCRC 患者中突变频率最高的基因是 KRAS (10/30, 33.3%), 突变频率最高的点突变是 G12D。这与我国学者潘洋洋等<sup>[16]</sup>研究 114 例 mCRC 患者 KRAS 和 BRAF 基因突变, 其中以 G12D 突变最多, 占 49.06%, 结果较一致。KRAS 是 RAS 基因家族的一员, 当 KRAS 基因突变后, 表达的 RAS 蛋白为 GAP 敏感型即抑制 RAS 与 GAP 反应, 引起 RAS 的持续活化不断地与 GTP 结合, 使下游的 RAF-MEK-ERK 通路持续激活, 引发肿瘤<sup>[17]</sup>。此外本研究对 PIK3CA 和 BRAF 突变基因也进行了检测, 突变频率分别为 16.7% 和 10.0%。其中 PIK3CA 突变主要是 H1047R 突变, 表明 PIK3CA (H1047R) 在转移性结直肠癌细胞耐药中可能起着重要的作用; 而 BRAF 基因突变类型仅为 V600E, 与文献<sup>[16]</sup>报道的 BRAF 基因突变类型相符。提示在临床实践中 BRAF 突变型 mCRC 患者在治疗前也需谨慎。

筛选出 KRAS、PIK3CA 和 BRAF 基因最高突变类型后, 本试验培养出相应点突变细胞系和野生型细胞系, 并行测序验证。同时, 利用 CRC 治疗疗效较好的西妥昔单抗和帕尼单抗两种药物处理野生型细胞系和各点突变细胞系, 并进行药物 IC<sub>50</sub> 测定, 考察各细胞对药物敏感性的变化。研究发现, 野生型细胞的西妥昔单抗和帕尼单抗 IC<sub>50</sub> 值均比各点突变细胞要低, 也就是说, 细胞经 KRAS、PIK3CA 和 BRAF 点突变后, 对两种抗 EGFR 单抗药物的敏感性都显著降低。

虽然上述药物 IC<sub>50</sub> 值结果显示各点突变细胞系对

药物的敏感性降低,但是也无法说明这是由该试验研究的三个目标点突变造成的影响。因此,为进一步探索目标点突变是否与耐药相关,本试验将野生型细胞和各目标点突变细胞混合,其中均使野生型细胞占主体。同时将每份混合细胞群体分为 4 份,第 1 份作为基线组,在第 0 d 提取 DNA,其余 3 份分别为西妥昔单抗组、帕尼单抗组和不加药组,即用西妥昔单抗、帕尼单抗和不加药培养基培养 3 d 后提取 DNA,观察各点突变基因相对水平的变化。本试验得出,即使不加药,3 d 后突变 KRAS、PIK3CA 和 BRAF 的水平也是升高的,考虑是 KRAS(G12D)、PIK3CA(H1047R)和 BRAF(V600E)引起细胞生长速度加快所导致,其中以 KRAS 突变引起细胞生长加速最为显著。既往文献<sup>[18-20]</sup>报道,携带有 KRAS(G12D)和 PIK3CA(H1047R)点突变细胞的生长速度、迁移能力、转移能力均升高,和本文得出到的结果一致。研究还发现,加用西妥昔单抗、帕尼单抗之后,三种点突变细胞水平比不加药明显升高,也就是说,加用这两种抗 EGFR 单抗药物后,携带有 KRAS(G12D)、PIK3CA(H1047R)和 BRAF(V600E)点突变的细胞比例变得更高,说明这三个点突变与西妥昔单抗和帕尼单抗耐药相关。

本试验通过对临床 ctDNA 数据动态研究,发现可能与抗 EGFR 药物耐药相关的点突变,经选定相应点突变细胞系、野生型细胞稀释、药物处理,最后通过 RT-qPCR 检测,发现用药前后突变基因相对水平的变化,明确了 ctDNA 检测能够发现与耐药相关的点突变,验证了 KRAS(G12D)、PIK3CA(H1047R)和 BRAF(V600E)点突变确实与结直肠癌细胞对西妥昔单抗和帕尼单抗的耐药相关。这些发现使得在含有此突变患者身上使用靶向治疗成为可能,为受益患者的精准诊疗提供依据。

#### 参考文献

[1] 王锡山. 从中美结直肠癌流行病学特征看结直肠癌早诊早治的重要性[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2021, 10(1):26-33.

[2] Chiu RWK. Fastidious detection of circulating tumor DNA mutations in residual breast cancer disease for ultimate analytical sensitivity and specificity[J]. Clin Chem, 2020, 66(7):866-867.

[3] Parseghian C, Loree J, Morris V, et al. Anti EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge[J]. Ann Oncol, 2019, 30(2):243-249.

[4] Mesquita A, Costa JL, Schmitt F. Utility of circulating tumor DNA in different clinical scenarios of breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(12):3797.

[5] Takai E, Totoki Y, Nakamura H, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment and precision medicine in pancreatic cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 924(14):13-17.

[6] Sato Y, Matoba R, Kato K. Recent advances in liquid biopsy in precision oncology research[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(3):337-342.

[7] Mittendorf E, Bartlett J, Lichtensztajn D, et al. Incorporating biology into breast cancer staging: American Joint Committee on Cancer, eighth edition, revisions and beyond[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2018, 38:38-46.

[8] Hsu HC, Tan KT, Lu YJ, et al. Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients[J]. Oncotarget, 2016, 7(16):22257-22270.

[9] 蔡讯, 李琦. 结直肠癌少见和罕见靶点治疗药物进展[J]. 医药专论, 2020, 41(11):839-843.

[10] Ma G, Zhang J, Jiang H, et al. Epidermal growth factor receptor T790M mutation as a prognostic factor in EGFR-mutant non-small cell lung cancer patients that acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. Oncotarget, 2017, 9(21):334-350.

[11] Llovet P, Sastre J, Ortega JS, et al. Prognostic value of BRAF, PI3K, PTEN, EGFR copy number, amphiregulin and epi-regulin status in patients with KRAS codon 12 wild-type metastatic colorectal cancer receiving first-line chemotherapy with anti-EGFR therapy[J]. Mol Diagn Ther, 2015, 19(6):397-408.

[12] Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA[J]. Nature, 2013, 497(7447):108-112.

[13] Che L, Bode AM, Dong Z. Circulating tumor cells: moving biological insights into detection[J]. Theranostics, 2017, 7(10):2606-2619.

[14] Takai E, Totoki Y, Nakamura H, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment and precision medicine in pancreatic cancer[J]. Sci Rep, 2016, 924:13-17.

[15] Thierry AR, Pastor B, Jiang ZQ, et al. Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(16):4578-4591.

[16] 潘洋滔, 黄学锋. 转移性结直肠癌中发生 KRAS 与 BRAF 基因同时突变的病例探究[J]. 全科医学临床与教育, 2020, 18(8):678-681.

[17] Holm M, Andersson E, Osterlund E, et al. Detection of KRAS mutations in liquid biopsies from metastatic colorectal cancer patients using droplet digital PCR, Idylla, and next generation sequencing[J]. PLoS One, 2020, 15(11):e0239819.

[18] Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. Nature, 2012, 486(7404):537-540.

[19] Hecht JR, Douillard JY, Schwartzberg L, et al. Extended RAS analysis for anti-epidermal growth factor therapy in patients with metastatic colorectal cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2015, 7372(15):103-106.

[20] 陈馨宁, 黄斐, 沈敏娜, 等. 转移性结直肠癌患者 ctDNA 基因突变检测方法的比较及影响因素分析[J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(3):192-197.