

ddPCR 检测 NSCLC 患者血液 *EGFR* 基因突变准确性的 Meta 分析

袁世洋^{1,2}, 彭赖水¹, 谢军平¹, 邹叶青²

(1. 南昌大学第二附属医院, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学第二附属医院, 江西省分子医学重点实验室, 江西 南昌 330006)

摘要: [目的] 系统评价 ddPCR 法检测 NSCLC 患者血液 *EGFR* 基因突变的准确性。[方法] 检索 PubMed、Embase、Web of Science、the Cochrane Library、CNKI、万方、维普等数据库, 搜集国内外公开发表的有关 ddPCR 检测 NSCLC 血液 *EGFR* 基因突变的诊断性研究, 检索时限从建库到 2018 年 9 月。由 2 名评价员按纳入、排除标准独立进行文献筛选、提取资料, 并评价纳入文献的偏倚风险, 采用 Review Manager 5.3 软件和 Meta-disc 14 软件进行 Meta 分析。[结果] 最终纳入 10 项诊断性研究, 共计 915 例 NSCLC 患者。Meta 分析结果显示, ddPCR 对 NSCLC 血液 *EGFR* T790M、19-del+L858R、19-del、L858R 检测的平均灵敏度分别为 0.71(0.59~0.81)、0.67(0.61~0.73)、0.71(0.64~0.77) 和 0.71(0.63~0.78); 此外, 平均特异性分别为 0.79(0.66~0.89)、0.95(0.92~0.97)、0.99(0.98~1.00) 和 0.99(0.97~1.00)。[结论] ddPCR 法检测 NSCLC 患者血液 *EGFR* 基因突变具有较高的灵敏度和特异性, 可作为肿瘤组织缺失时的替代检测方法。

关键词: 肺肿瘤; 微滴数字 PCR; 表皮生长因子受体; Meta 分析

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2019)06-0461-09

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.06.A012

Accuracy of ddPCR in Detection of Blood *EGFR* Gene Mutations in Patients with NSCLC: A Meta-analysis

YUAN Shi-yang^{1,2}, PENG Lai-shui¹, XIE Jun-ping¹, ZOU Ye-qing²

(1. The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: [Purpose] To systematical evaluate the accuracy of ddPCR method for detection of *EGFR* gene mutations in blood samples of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). [Methods] Database including Pubmed, Web of Science, EMBASE, the Cochrane Library, CNKI, Wanfang were searched from inception to September 2018 to collect the diagnostic studies of detection of blood *EGFR* gene mutations in NSCLC patients by ddPCR. Two reviewers independently screened literature according to the inclusion and exclusion criteria, extracted data and assessed the risk of bias of included studies. Review Manager 5.3 and Meta-disc 14 software were used for the Meta-analysis. [Results] A total of 10 studies involving 915 patients with NSCLC were finally included. Meta-analysis showed that the average sensitivity of ddPCR for detection of *EGFR* T790M, 19-del+L858R, 19-del and L858R mutations in blood samples of NSCLC patients were 0.71(0.59~0.81), 0.67(0.61~0.73), 0.71(0.64~0.77) and 0.71(0.63~0.78), respectively. The average specificity were 0.79(0.66~0.89), 0.95(0.92~0.97), 0.99(0.98~1.00) and 0.99(0.97~1.00), respectively. [Conclusion] The ddPCR method has high sensitivity and specificity for detection of blood *EGFR* gene mutations in NSCLC patients, which can be used as an alternative detection method instead of using tumor tissue samples.

Key words: lung neoplasms; droplet digital PCR(ddPCR); epidermal growth factor receptor(EGFR); Meta-analysis

基因突变是肿瘤发生发展的重要因素之一, 几

乎所有癌症患者都携带有 DNA 突变, 如非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中的 *EGFR* 基因突变。既往, DNA 直接测序法作为 *EGFR* 基因检测的金标准, 但其对所检测的肿瘤组织样本要求

收稿日期: 2018-06-21; 修回日期: 2018-09-30

基金项目: 江西省科技厅重点研发项目(20171BBG70123); 江西省科技厅对外合作项目(20161BBH80077)

通信作者: 邹叶青, E-mail: zouyeqing3366@163.com

较高且灵敏度低。而临床上获取肿瘤组织标本更倾向于创伤相对较小的 CT 引导下经皮肺穿刺活检术以及超声引导下的肺穿刺活检术,但这类方法获取的组织样本小,有时难以满足 *EGFR* 基因检测的基本要求,且肿瘤组织本身存在异质性可能带来假阴性结果。近年来,液体活检的诞生可满足临床无创、安全获取检测样本要求的同时,也可满足 *EGFR* 基因突变精准检测的需要,尤其适用于动态监测 *EGFR* 基因突变状态,指导靶向药物的使用及早期耐药的判断^[1,2]。循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 作为液体活检技术的一员,已有多个检测 NSCLC 患者血液 ctDNA *EGFR* 突变的方法被报道,包括突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)^[3]、变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography, DH-PLC)^[4]、以及下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)^[5]等,但检测灵敏度、特异性在不同研究中大不相同。微滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 是一种新兴的诊断技术,是在传统的 PCR 扩增前对样品进行微滴化处理,可以将每份样本分成 20 000 个微滴,然后进行 PCR 扩增,根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例,可得出靶向分子的起始拷贝数或浓度,是一种核酸分子的绝对定量技术,其检测灵敏度高达 0.001%。本文通过诊断性实验 Meta 分析法评价 ddPCR 法检测 NSCLC 患者血液 *EGFR* 突变的准确性。

1 资料与方法

1.1 检索策略

计算机检索 PubMed、Embase、Web of Science、the Cochrance Library、CNKI、万方、维普等数据库,检索截止至 2018 年 9 月。收集国内外公开发表的关于“微滴数字 PCR 检测 NSCLC 患者血液 *EGFR* 突变”的相关文献。采取主题词和自由词相结合的方式检索。中文检索词:微滴数字 PCR、表皮生长因子受体、非小细胞肺癌等。英文检索词:droplet digital PCR、epidermal growth factor receptor、non-small cell lung cancer 等。

1.2 纳入标准

①研究类型:诊断性研究;②研究对象:年龄>

18 岁的 NSCLC 患者;③待评价试验:采用 ddPCR 检测患者血液 *EGFR* 基因型,金标准为肿瘤组织基因型(肿瘤组织和血液标本间隔时长≤2周);④结局指标:以肿瘤组织基因型为参考标准,可计算出 ddPCR 法在各病例组的真阳性 (ture positive, TP)、假阳性 (flase positive, FP)、假阴性 (flase negative, FN) 以及真阴性 (ture negative, TN) 的具体例数。

1.3 排除标准

①非诊断性研究,如系统综述等;②重复发表,则选择信息全面的文献;③无法提取数据的文献;④未报告本次系统评价所关注的结局指标的文献。

1.4 文献筛选、数据提取及质量评价

由 2 位评价员独立进行文献筛选和资料提取,若遇分歧,则讨论或咨询第三方协助裁定。按设计好的资料提取表提取相关资料,主要提取内容包括:①纳入研究的基本信息:研究文题、第一作者、发表年份及文献来源等;②研究对象的基本特征:研究的样本量;③偏倚风险评价的关键要素;④所关注的结局指标。参照诊断性实验研究质量评价标准 (QUADAS-2 标准)^[6]进行质量评价。

1.5 数据处理和统计学分析

提取各个研究的 TP、FP、FN、TN 值,采用 Review Manager 5.3 软件和 Meta-disc 1.4 软件进行异质性检验和合并效应量。采用 Q 检验分析纳入研究之间是否存在异质性,以 *P* 估算分析异质性的 大小,然后根据异质性分析的结果选择合适的统计分析模型进行后续的 Meta 分析。以 *P*<0.1 且 *I*²>50% 为异质性明显,反之则为不明显。当异质性明显时,采用随机效应模型,无明显异质性时使用固定效应模型。合并效应量:按照相应的效应模型,合并灵敏度、特异性、阳性似然比 (positive likelihood ratio, PLR)、阴性似然比 (negative likelihood ratio, NLR)、诊断优势比 (diagnostic odd ratio, DOR) 和 SROC 曲线下面积,并绘制相应的森林图和 SROC 曲线。

2 结果

2.1 检索结果及纳入研究文献

通过设定的检索词进行初步检索,共获得中英文文献到 443 篇文献, PubMed 数据库 78 篇, Embase 数据库 188 篇, Cochrance Library 11 篇, Web

of Science 128 篇,CNKI 数据库 34 篇、万方数据库 3 篇、维普数据库 1 篇。经初筛剔除重复文献71 篇, 阅读文献标题和摘要排除会议摘要、个案报道、文献综述及与问题无相关性文献 327 篇。进一步阅读全文, 仔细分析比较, 剔除无主要结局指标及 Meta 分析等文献 35 篇。最终纳入 10 个诊断性研究进行 Meta 分析^[7-16](Figure 1)。

2.2 纳入研究的基本特征

纳入 10 项诊断性研究, 均为英文文献, NSCLC 病例共 915 例。其中样本量最大为 215 例, 最小为 35 例。其中有 3 篇分析了 T790M^[9-11], 5 篇分析了 19-del 和 L858R 敏感突变, 6 篇单独分析了 19-del 突变, 7 篇单独分析了 L858R 突变 (Table 1)。

2.3 纳入研究的质量评价

10 项研究采用诊断性实验研究质量评价标准 (QUADAS-2 标准) 进行质量评价, 结果显示纳入的研究偏倚风险较

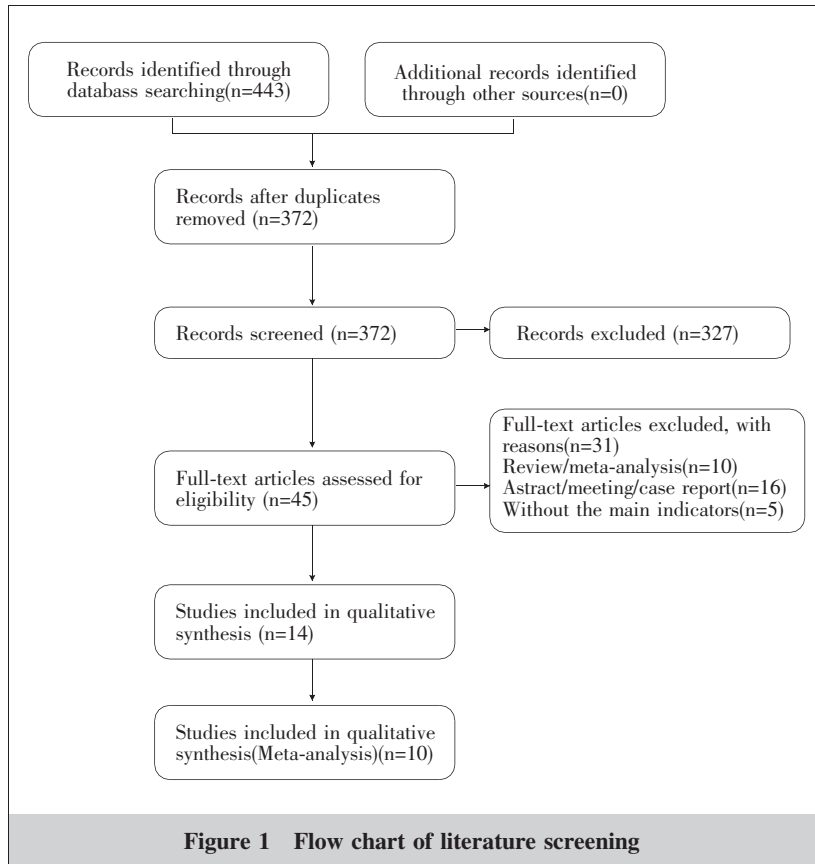


Table 1 Characteristics of included studies

First author	Country	Patients included	EGFR mutation site	Standard	Sample size	TP	FP	FN	TN
Feng 2018 ^[7]	China	Newly diagnosed	19-del/L858R	ARMS	79	41	3	10	25
Lee 2016 ^[8]	Korea	Newly diagnosed	19-del	Direct sequencing or PNA-clamp	58	26	0	8	24
			L858R		58	17	0	7	34
Sacher 2016 ^[9]	Boston	Newly diagnosed or acquired resistance	19-del	Direct sequencing or PCR or NGS	174	41	0	9	124
			L858R		174	23	0	8	143
			T790M		54	27	7	8	12
Seki 2016 ^[10]	Japan	Acquired resistance	T790M	ARMS	35	5	2	2	26
Takahama 2016 ^[11]	Japan	Newly diagnosed or acquired resistance	19-del/L858R	ARMS or COBAS	41	25	1	8	7
			T790M		41	20	3	11	7
Thress 2015 ^[12]	USA	Acquired resistance	L858R	COBAS	38	9	0	1	28
Wang 2017 ^[13]	China	Newly diagnosed	19-del/L858R	AMRS	68	14	4	14	36
			19-del		68	7	0	7	54
			L858R		68	7	1	7	53
Zhang 2017 ^[14]	China	Newly diagnosed	19-del/L858R	AMRS	77	18	0	7	52
			19-del		77	10	0	6	61
			L858R		77	8	0	1	68
Zhang 2017 ^[15]	China	Newly diagnosed	19-del/L858R	ARMS	215	57	4	36	118
			19-del		215	26	2	19	168
			L858R		215	31	3	17	164
Zhu 2015 ^[16]	China	Newly diagnosed	19-del	ARMS	86	18	1	4	63
			L858R		86	12	3	3	68

Note: TP: true positive; FP: false positive; FN: false negative; TN: true negative.

低,质量较高(Figure 2)。

2.4 Meta 分析结果

2.4.1 异质性检验

以 DOR 作为效应量, 分别分析 ddPCR 检测 *EGFR* T790M、*EGFR* 19-del+L858R、*EGFR* 19-del 和 *EGFR* L858R 的异质性。检验结果显示, ddPCR 检测 T790M、*EGFR* 19-del +L858R、19-del 和 L858R 的 Cochran-Q 为 2.41、6.41、2.18、4.04 (P 均 >0.05), 表示异质性不明显, 故采用固定效应模型对纳入的文献进行分析。

2.4.2 合并效应量

ddPCR 对 NSCLC 血液 *EGFR* T790M、19-del+L858R、19-del、L858R 检测的平均灵敏度分别为 0.71 (0.59~0.81)、0.67 (0.61~0.73)、0.71 (0.64~0.77)、0.71 (0.63~0.78); 平均特异性分别为 0.79 (0.66~0.89)、0.95 (0.92~0.97)、0.99 (0.98~1.00)、0.99 (0.97~1.00)

(Figure 3)。

ddPCR 对 NSCLC 血液 *EGFR* T790M、19-del+L858R、19-del、L858R 检测的平均 PLR 分别为 2.55 (1.58~4.11)、11.52 (6.77~19.61)、66.83 (26.70~167.32)、43.86 (22.25~86.46); 平均 NLR 分别为 0.39 (0.24~0.62)、0.37 (0.31~0.45)、0.31 (0.25~0.39)、0.30 (0.24~0.38) (Figure 4)。

ddPCR 对 NSCLC 血液 *EGFR* T790M、19-del+L858R、19-del、L858R 检测的平均 DOR 分别为 6.71 (2.94~15.33)、32.25 (17.43~59.69)、210.91 (82.57~538.71)、146.42 (66.98~320.12); SROC 曲线下面积分别为 0.783、0.917、0.979、0.972 (Figure 5)。

2.4.3 发表偏倚

以 DOR 对数的标准误 (SELog RR) 为纵坐标, OR 值为横坐标绘制漏斗图, 各点较为对称, 未发现发表偏倚 (Figure 6)。

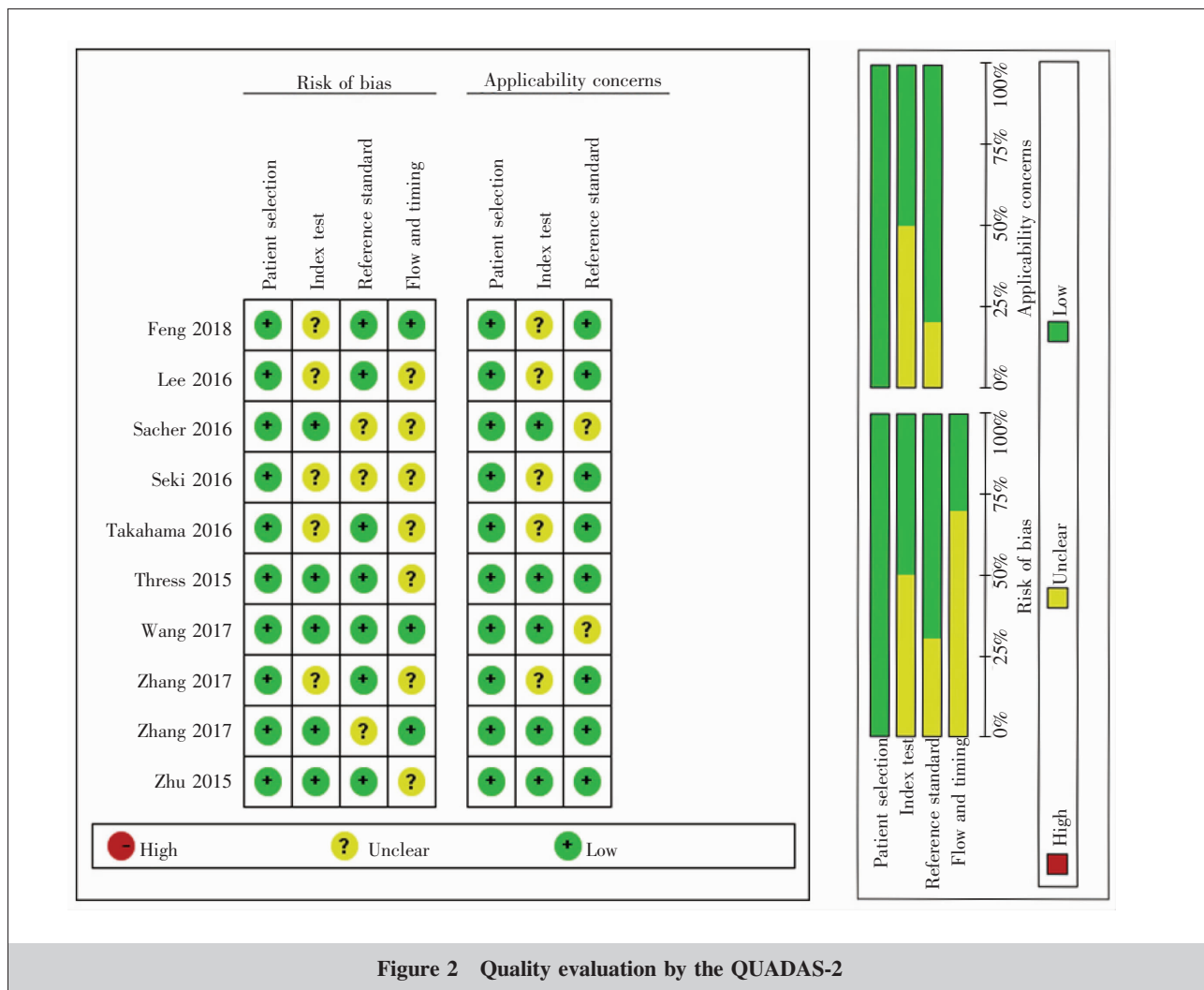
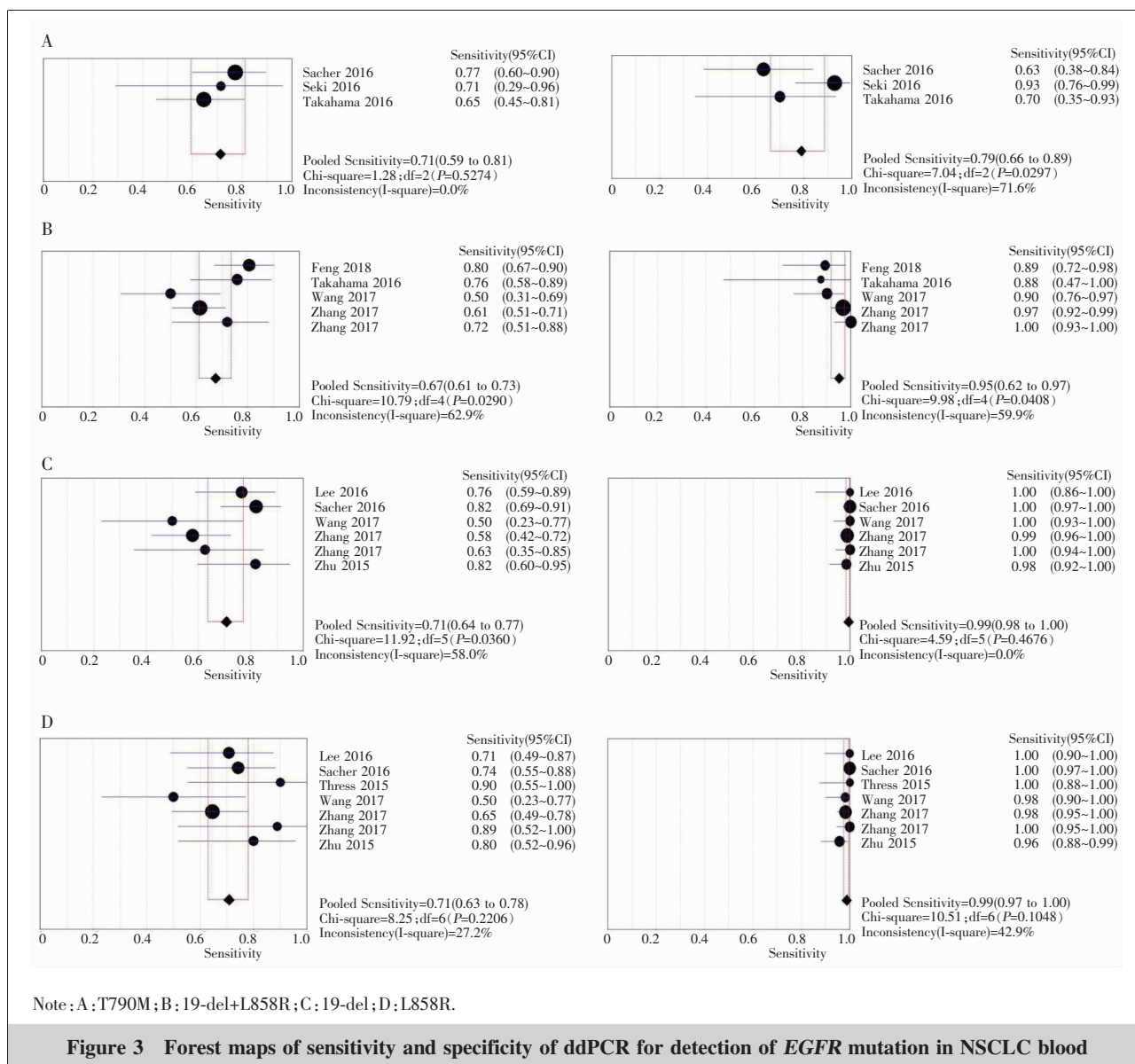


Figure 2 Quality evaluation by the QUADAS-2

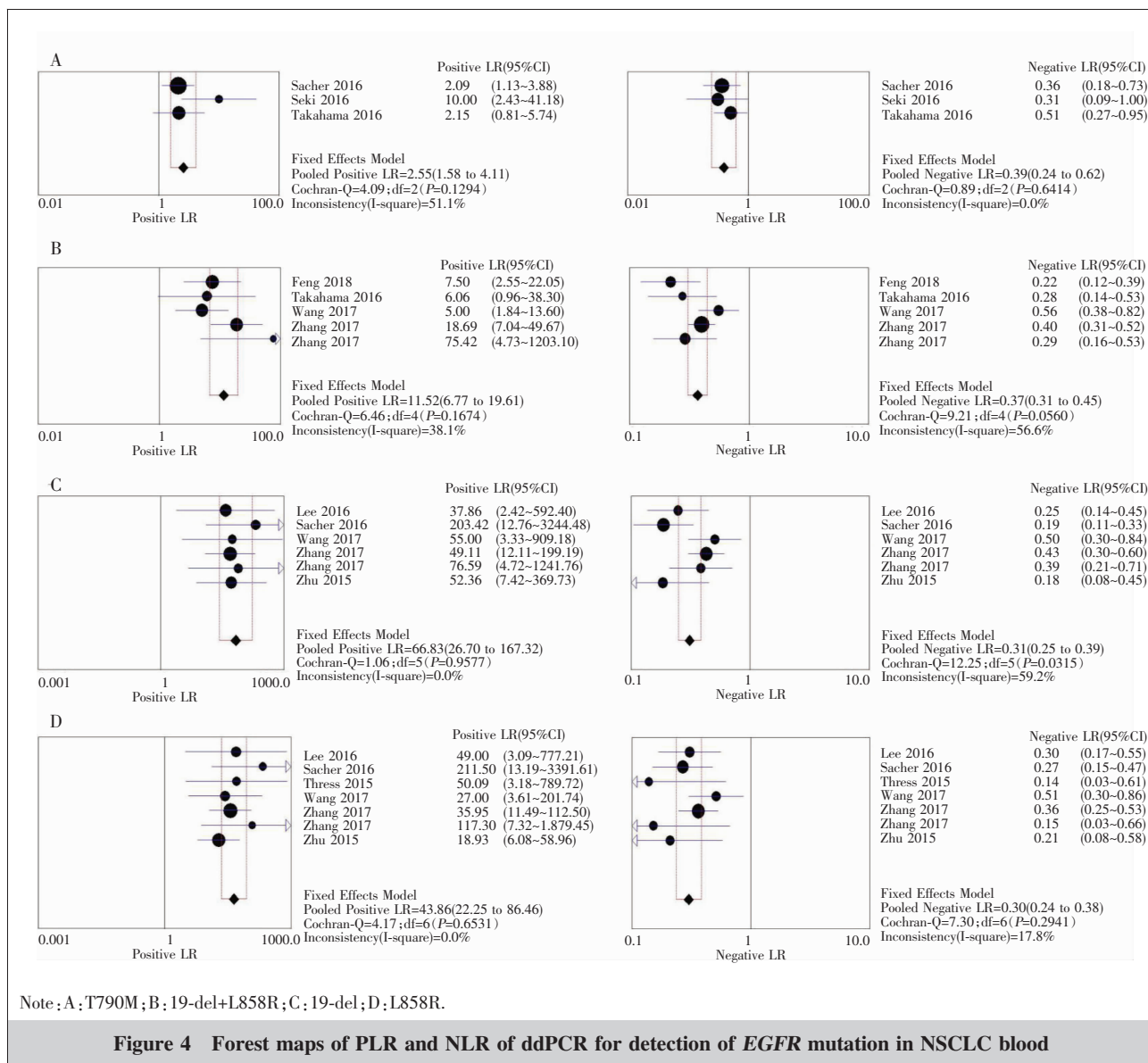


3 讨论

全球范围内,肺癌已成为癌症致死和健康问题最主要的因素之一。NSCLC 是肺癌中最常见的病理类型,包含鳞癌、腺癌以及大细胞肺癌等,约占所有肺癌的 80%^[17]。EGFR 基因是 NSCLC 极为重要的驱动基因之一,和化疗相比,对有 EGFR 突变的 NSCLC 患者接受 EGFR-TKI 靶向治疗可获得显著提高的治疗反应及无进展生存期(progress free survival, PFS)^[18]。EGFR-TKI 靶向治疗已被多项指南推荐成为 EGFR 基因敏感突变的 NSCLC 患者的一线治疗方案,而患者是否受益于 EGFR-TKI,由是否

EGFR 基因突变类型决定。因此,如何高精准的检测 EGFR 基因突变成为目前亟待解决的问题。

肿瘤组织或肿瘤细胞的基因检测仍然是 EGFR 基因检测的金标准,但绝大多数 NSCLC 患者初次确诊时已属晚期,已失去手术根治的时机。目前大部分肿瘤组织标本是通过 CT-PALB、EBUS-TBNA 等小风险的穿刺术获取的,这类样本通常体积很小,并且部分晚期肺癌患者难以获取标本。最终约有 10%~50% 以上的患者不能进行有效的肿瘤组织基因检测^[19]。另外肿瘤组织本身存在异质性,小标本的组织基因检测可能遗漏某个突变型甚至产生假阴性。目前认为,ctDNA 可能来源于肿瘤细胞的坏死及循环肿瘤

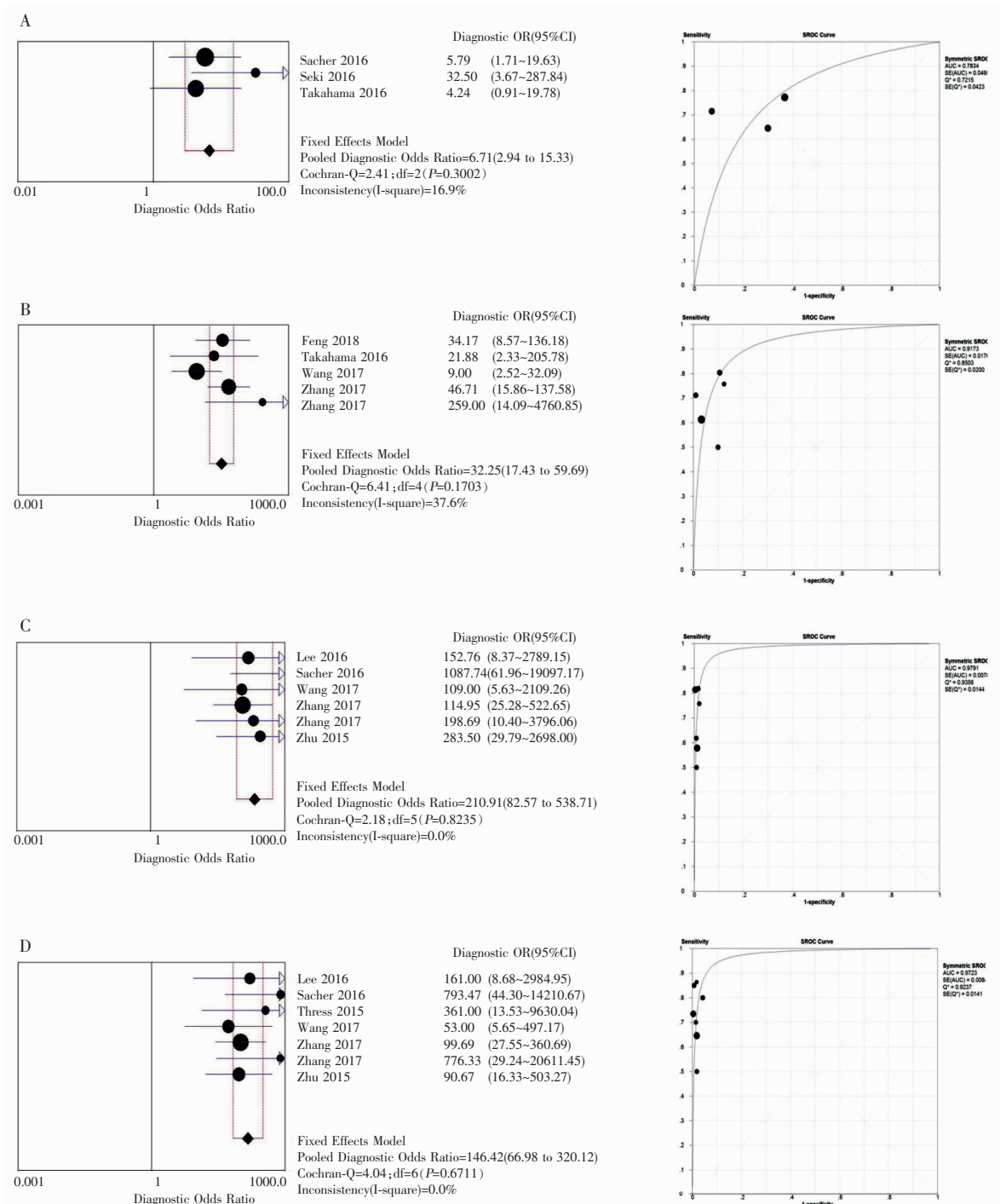


细胞(circulation tumor cell, CTCs)裂解释放等,并且血液中的 ctDNA 与肿瘤组织 DNA 具有相同的遗传变异特性^[20,21]。此外,在整个疾病过程中,因受治疗的影响,EGFR 突变的水平及类型是呈动态变化的。因此,基于血液检测 ctDNA EGFR 基因突变用于指导 EGFR-TKI 靶向药物的使用,在理论上是可行且极具有优势的。血液中含有大量不同的细胞,非肿瘤细胞同样产生 DNA 片段,如此导致 ctDNA 中突变的拷贝数低,研究证实有 50%以上的患者突变的 ctDNA 比例低于 1%~4%^[22]。所以,在血液中检测 EGFR 突变,需要更高灵敏度的检测方法。

最初,直接测序法是 EGFR 突变分析中应用最

广泛的方法。然而,该方法的灵敏度仅约 20%,并且当样本中突变的 DNA 含量低于 20%时,就会产生假阴性结果。相比之下,ARMS 法的灵敏度为 1%,可适用于肿瘤组织标本 EGFR 基因检测。此外,这种方法更加简便,目前大多数医院也是采用这种方法检测肿瘤组织 EGFR 基因突变。尽管,大多数患者突变的 ctDNA 比例低于 1%~4%,但 ddPCR 完全可以达到检测要求,故可减少假阴性的发生。因此,本研究通过诊断性 Meta 分析法探讨 ddPCR 在检测 ctDNA EGFR 基因突变的准确性。

本研究共纳入 10 项研究,通过应用 Meta-Disc 1.4 合并 DOR、拟合 SROC 曲线探讨 ddPCR 法检测



Note: A: T790M; B: 19-del+L858R; C: 19-del; D: L858R.

Figure 5 Forest maps of DOR and SROC curve of ddPCR for detection of *EGFR* mutation in NSCLC blood

NSCLC 患者血液 *EGFR* 突变热点突变位点(19-del、L858R、T790M) 的诊断效能。结果显示, ddPCR 对 NSCLC 血液 *EGFR* T790M、19-del+L858R、19-del、L858R 检测的平均灵敏度分别为 0.71 (0.59~0.81)、

0.67(0.61~0.73)、0.71(0.64~0.77)、0.71(0.63~0.78); 平均特异性分别为 0.79 (0.66~0.89)、0.95 (0.92~0.97)、0.99(0.98~1.00)、0.99(0.97~1.00)。对 *EGFR* 19-del、L858R 敏感突变, ddPCR 显示了极高的特异

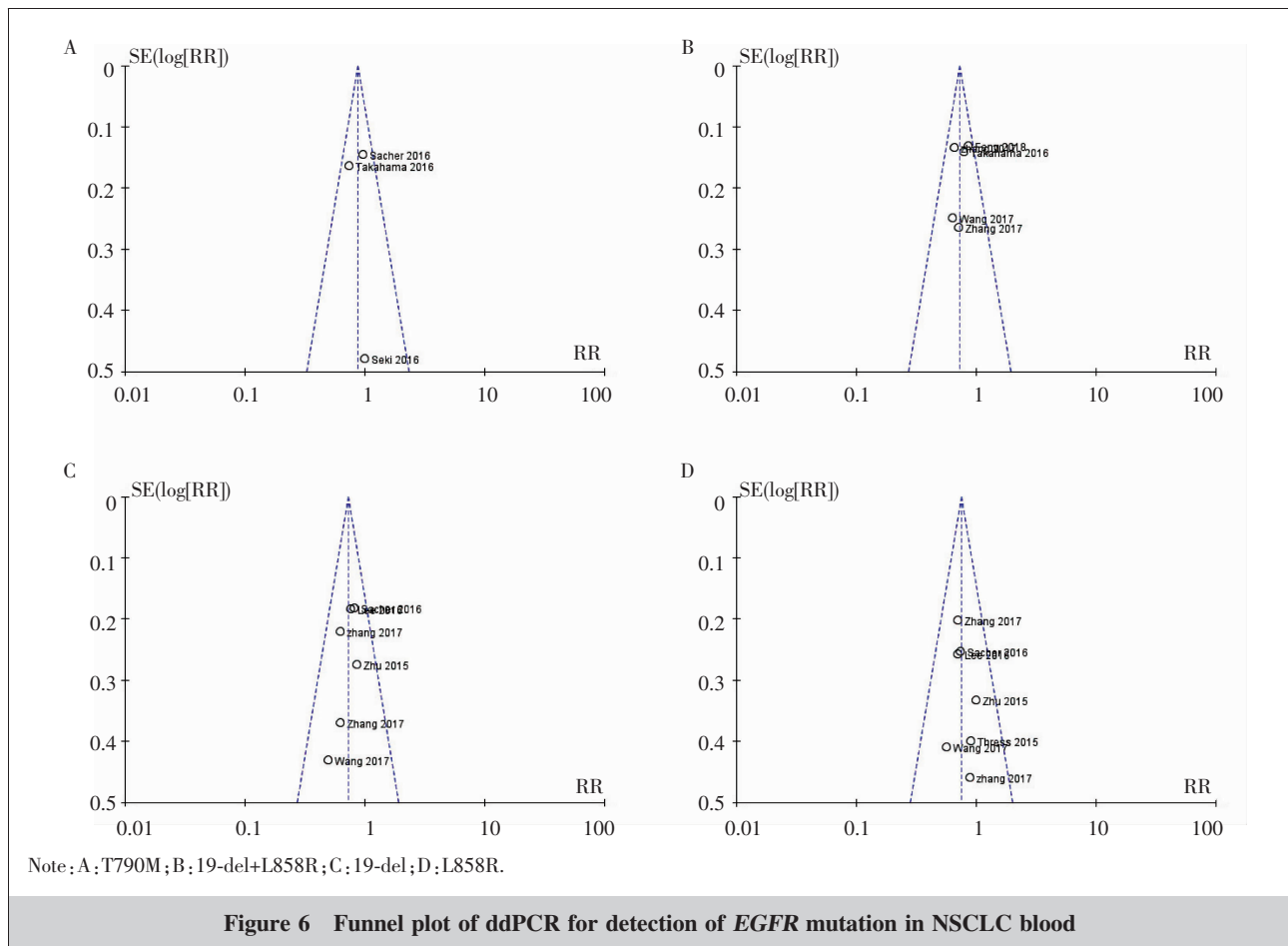


Figure 6 Funnel plot of ddPCR for detection of *EGFR* mutation in NSCLC blood

性,但对于 T790M 突变,ddPCR 诊断的特异性和灵敏度相似。对于各 *EGFR* 突变位点,ddPCR 检测血液 ctDNA 的平均灵敏度约 70%,表明在缺乏肿瘤组织标本时,可以采用 ddPCR 对血液样本进行 *EGFR* 检测,但可能漏检部分患者。

PLR 意味着诊断实验正确判断为阳性的概率是错误判断为阳性概率的倍数,即该值越大,代表该阳性为真阳性的概率越大。类似的是,NLR 值越小,说明该试验判断阴性为真阴性可能性越大。DdPCR 对 NSCLC 血液 *EGFR* T790M、19-del +L858R、19-del、L858R 检测的平均 PLR 分别为 2.55 (1.58~4.11)、11.52 (6.77~19.61)、66.83 (26.70~167.32)、43.86 (22.25~86.46),认为可以辅助临床医师做出诊断;平均 NLR 分别为 0.39 (0.24~0.62)、0.37 (0.31~0.45)、0.31 (0.25~0.39)、0.30 (0.24~0.38),表明该试验阴性时不能排除 *EGFR* 突变的可能,如有 *EGFR* 其他点突变或 ctDNA 浓度过低。如检测阴性,仍需要采取肿瘤组织标本进一步验证。

DOR 反应诊断试验结果与疾病的联系程度。取值>1 时,其值越大,说明该诊断试验的判别效果越好;取值<1 时,正常人比患者更有可能被试验判断为阳性;取值=1 时,表示该试验无法判别正常人与患者。我们统计的结果显示,ddPCR 对 NSCLC 血液 *EGFR* T790M、19-del+L858R、19-del、L858R 检测的平均 DOR 分别为 6.71 (2.94~15.33)、32.25 (17.43~59.69)、210.91 (82.57~538.71)、146.42 (66.98~320.12),提示诊断试验的判断效果良好。

诊断试验 Meta 分析法通过计算合并灵敏度、特异性、PLR、NLR 以及 DOR,异质性分析后绘制 SROC 曲线,该曲线可综合灵敏度、特异性等信息,综合评价诊断实验的准确性并获得评价诊断试验准确度的统计量。DdPCR 对血液 *EGFR* 各位点 SROC 曲线下面积分别为 0.783、0.917、0.979、0.972,曲线靠近左上角,曲线下面积大,说明 ddPCR 法鉴别 ctDNA *EGFR* 基因 19-Del 和 L858R 准确度高,尤其对于 *EGFR* 19-del 和 L858R 两个位点的突变。

本次 Meta 分析存在的不足：①Meta 分析局限性：检索得到的文献不够全面，检索范围局限在已经发表的研究，对于未公开发表的，如会议论文等。②纳入研究的局限性：ddPCR 作为诊断性试验，采用盲法检测和盲法判断可尽量减少诊断的倾向性，而多数研究未报告是否采用盲法检测，存在测量偏倚的可能性。

综上所述，ddPCR 可以检测 ctDNA 中的 *EGFR* 基因 19-Del 和 L858R 突变状态，具有较高的灵敏度和特异性，有临床应用价值。在缺乏肿瘤组织标本时，血液标本可以替代做 ctDNA *EGFR* 基因检测，今后需纳入更多的研究进行验证。

参考文献：

- [1] Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9):531–548.
- [2] Jenkins S, Yang JC, Ramalingam SS, et al. Plasma ctDNA-analysis for detection of the *EGFR* T790M mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(7):1061–1070.
- [3] Li W, Qiu T, Guo L, et al. Primary and acquired *EGFR* T790M-mutant NSCLC patients identified by routine mutation testing show different characteristics but may both respond to osimertinib treatment[J]. *Cancer Lett*, 2018, 423: 9–15.
- [4] Yu JY, Yu SF, Wang SH, et al. Clinical outcomes of *EGFR*-TKI treatment and genetic heterogeneity in lung adenocarcinoma patients with *EGFR* mutations on exons 19 and 21[J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35:30.
- [5] Legras A, Barritault M, Tallet A, et al. Validity of targeted next-generation sequencing in routine care for identifying clinically relevant molecular profiles in non-small-cell lung cancer: results of a 2-year experience on 1343 samples[J]. *J Mol Diagn*, 2018, 20(4):550–564.
- [6] Higgins J. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The cochrane collaboration [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 2011, 5(2):S38.
- [7] Feng WN, Gu WQ, Zhao N, et al. Comparison of the superarms and droplet digital PCR for detecting *EGFR* mutation in ctDNA from NSCLC patients [J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(2):542–545.
- [8] Lee JY, Qing X, Xiumin W, et al. Longitudinal monitoring of *EGFR* mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with *EGFR* TKIs; Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02)[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6):6984–6993.
- [9] Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, 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.
- [10] Seki Y, Fujiwara Y, Kohno T, et al. picoliter-droplet digital polymerase chain reaction-based analysis of cell-free plasma DNA to assess *EGFR* mutations in lung adenocarcinoma that confer resistance to tyrosine-kinase inhibitors [J]. *Oncologist*, 2016, 21(2):156–164.
- [11] Takahama T, Sakai K, Takeda M, et al. Detection of the T790M mutation of *EGFR* in plasma of advanced non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (West Japan oncology group 8014LTR study)[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36):58492–58499.
- [12] Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. *EGFR* mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma; a cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291[J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(3):509–515.
- [13] Wang L, Guo Q, Yu W, et al. Quantification of plasma *EGFR* mutations in patients with lung cancers: comparison of the performance of ARMS-Plus and droplet digital PCR [J]. *Lung Cancer*, 2017, 114:31–37.
- [14] Zhang X, Chang N, Yang G, et al. A comparison of ARMS-Plus and droplet digital PCR for detecting *EGFR* activating mutations in plasma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(67):112014–112023.
- [15] Zhang Y, Xu Y, Zhong W, et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA *EGFR* mutation detection using droplet digital PCR [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4):5861–5873.
- [16] Zhu G, Ye X, Dong Z, et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of *EGFR*-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 265–272.
- [17] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. global cancer Statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394–424.
- [18] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Final overall survival results from a randomised, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of *EGFR* mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802)[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(9):1877–1883.
- [19] Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next-generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(23):5772–5782.
- [20] Weber B, Meldgaard P, Hager H, et al. Detection of *EGFR* mutations in plasma and biopsies from non-small cell lung cancer patients by allele-specific PCR assays [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:294.
- [21] Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity; implications for targeted therapeutics[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(3):479–485.
- [22] Perez-Callejo D, Romero A, Provencio M, et al. Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(5):455–465.