

液体活检技术应用于肿瘤筛检的研究现状

贾思侬, 谢 丽, 李 磊, 钱碧云

(上海交通大学医学院公共卫生学院, 上海交通大学医学院虹桥国际医学研究院, 上海交通大学医学院临床研究中心, 上海 200025)

摘 要:随着社会经济发展、城市化及人口老龄化进程加速、生活方式改变等,恶性肿瘤已成为严重威胁人们健康的重大慢性疾病,而高水准的肿瘤筛检技术可早期发现肿瘤的存在,通过肿瘤早诊早治,改善预后。液体活检技术是新兴的极具潜力的血液检测技术,凭借便捷、无创、经济等特点成为近年来关注的热点,其有望取代传统的肿瘤筛检技术,成为未来主流的筛检方式。全文将液体活检技术在肿瘤筛检中的应用现状进行汇总,并进一步检索在美国临床试验注册平台和中国临床试验注册中心注册的相关研究,深入探讨液体活检技术应用于肿瘤筛检的应用价值、可行性和未来发展方向。

关键词:液体活检;肿瘤;筛检

中图分类号:R73 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2019)10-0774-06

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.10.A010

Liquid Biopsy in Early Screening of Cancer: Current Status and Perspectives

JIA Si-nong, XIE Li, LI Lei, QIAN Bi-yun

(School of Public Health, Hongqiao International Institute of Medicine, Clinical Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: With the rapid development of social economy, urbanization, population aging and the lifestyle changes, cancer has become a major chronic disease that seriously threatens people's health. Cancer screening can detect the presence of tumor early, and cancer can be diagnosed and treated in time, the prognosis of patient can be improved. Liquid biopsy, an emerging technique with great potential, has become a focus of attention recently because of its convenience, non-invasiveness and less costs. It is expected to replace the traditional technique and become the mainstream cancer screening method in the future. In this article, the related studies in Clinicaltrials.gov registration platform and Chinese Clinical Trial Registry are searched, and the recent progress of liquid biopsy in cancer screening are summarized to focus on its application value, feasibility and future development direction.

Key words: liquid biopsy; tumor; screening

当前,恶性肿瘤已成为严重威胁人们健康的重大慢性疾病。世界卫生组织下属的国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IRAC)公布了全球癌症状况的最新数据,预计2018年全球新发肿瘤患者达1810万例,另有960万人死于癌症^[1],较前有所提高。由于全球人口的增长和老

龄化,预计到2025年,每年将新增癌症病例1930万。值得注意的是,发达国家和地区与欠发达国家和地区之间的癌症发病情况存在巨大差异,前者虽有较高的发病率,但因肿瘤早期筛检技术的普遍应用和治理措施不断提高,其死亡率相对低^[2]。

在肿瘤的早期防治措施中,筛检具有关键的作用,世界发达国家均已开展相关研究,并逐步将肿瘤早期筛检纳入基本公共卫生服务中。美国最新的癌症统计数据显示,在过去几十年里,女性的癌症发病率总体上保持稳定,男性的癌症发病率每年下降约

收稿日期:2019-07-25;修回日期:2019-08-10

基金项目:上海市加强公共卫生体系建设三年行动计划重点学科项目(15GWZK0802);上海市卫生和计划生育委员会卫生行业临床研究专项课题(20184Y0331)

通信作者:钱碧云, E-mail: qianbiyun@sjtu.edu.cn

2%^[3]。虽然美国癌症的发病率较之前未出现明显波动,但死亡率却在持续下降,肿瘤筛检对于改善初次诊断时肿瘤分期分布,进而降低患者病死率,延长总生存期具有重要作用。快速、方便、无创的液态活检已经成为肿瘤领域受到高度关注的新技术,但是其早期应用于肿瘤筛检的应用价值尚不明确。本文拟将液体活检技术在肿瘤筛检中的应用现状进行汇总,并进一步检索在美国临床试验注册平台(Clinicaltrials.gov)和中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Registry, ChiCTR)注册的相关研究,针对液体活检技术应用于肿瘤筛检的研究进展进行系统总结与综述,深入探讨液体活检技术应用于肿瘤筛检的应用价值、可行性和未来发展方向。

1 液体活检技术及主要肿瘤标志物

以血液或其他体液样本为基础的非侵入性技术(液体活检)进行肿瘤早期检测的想法并不新颖。几十年来,肿瘤蛋白质生物标志物如癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原 19-9 (carcinoembryonic antigen 19-9, CA19-9)、甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)等已广泛用于各癌种的早期诊断、疗效评估、术后检测、预后判断等方面^[4-6],然而由于这些生物标志物特异性较低,在无肿瘤存在的情况下仍可出现异常升高,因此长期以来在临床实践中受到限制。

液体活检技术,实际上是体外诊断中的分子技术,是精准医疗代表性的诊断技术。近几年,液体活检技术在肿瘤早期诊断和预后管理方面的应用取得了突破性进展,而在肿瘤筛检方面,传统的侵入性筛检方式已难以满足人们的要求。液体活检作为一种非侵入性的检测方法,可为受试者免除手术活检和穿刺活检等有创性检查的痛苦。该技术主要通过监测肿瘤或转移灶释放的物质来检测肿瘤,其检测物质来源可分为血基生物标志物和其他体液生物标志物两大类。其中血基生物标志物主要包括循环游离 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA)、循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)、外泌体 (exosomes)、肿瘤血小板 (tumor educated platelets, TEPs) 等。除外周血外,其

他体液来源物质也可作为生物标志物应用于液体活检,如尿液、唾液、脑脊液、胸腔积液、腹水等^[7]。液体活检技术凭借其无创、全面、实时、准确等优势成为近年来肿瘤监测领域的研究热点。

2 循环游离 DNA (cfDNA)

2.1 循环游离 DNA 及其检测技术

循环游离 DNA (cfDNA) 是指在血液的非细胞成分中发现的 DNA 碎片,通过细胞坏死或凋亡入血,由 Mandel 和 Metais 于 1948 年首次报道。研究表明,肿瘤来源的体细胞改变,其 DNA 可以在肿瘤患者血浆中以细胞游离 DNA 的形式检测到。健康人血浆中由正常细胞释放出的 cfDNA 的水平极低,肿瘤患者血液中 cfDNA 的含量较健康人有所改变。由于游离 DNA 的长度短、半衰期短(通常小于 1 小时),分离和分析均需要特殊的方法。通常使用基于聚合酶链反应的突变特异性技术(PCR)分析突变特异性识别个体点突变,可以在 cfDNA 中识别并量化出低于 0.01% 的等位基因突变。二代基因测序方法对检测 cfDNA 尤为适用,从全基因组或全外显子组测序到有限基因组的靶向测序^[8-9]。

2.2 cfDNA 应用于肿瘤筛查的研究

卢煜明及其团队前瞻性运用血浆游离 EB 病毒 DNA 作为生物标志物,在大规模健康人群中进行鼻咽癌筛检,是液体活检应用于肿瘤筛检的里程碑。该研究纳入 20 174 名受试者,灵敏度及特异性高达 97.1% 和 98.6%。显示了循环 DNA 分析在筛检早期鼻咽癌方面的潜力,同时证明即使是较小的肿瘤也可以向循环中释放足量 DNA。与历史队列相比,通过筛检发现的鼻咽癌患者,临床分期显著较早,且无进展生存期显著延长^[10]。该研究证实了血浆游离 EB 病毒 DNA 是鼻咽癌筛检的有效手段。有研究使用 cfDNA 进行肺癌筛检,结果表明,非小细胞肺癌患者血浆中 cfDNA 水平明显高于慢性呼吸道炎症患者和健康人,在区分肺癌患者和健康人时,灵敏度为 90%,特异性为 80.5%,AUC 为 0.90^[11]。

然而在大多数情况下,仅检测单个指标远远不够。2018 年 CancerSEEK 的早期癌症检测策略首次披露。Cohen 等^[12]通过评估循环蛋白水平和游离 DNA 突变来检测 8 种常见癌症类型。该研究共纳入 1005

例癌症患者,灵敏度为Ⅰ期43%、Ⅱ期73%、Ⅲ期78%。在8种癌症中的阳性率中值为70%,特异性大于99%。83%的患者可将肿瘤定位到具体解剖部位。有研究者开发了一种名为肝细胞癌筛查(HCC-screen)的方法,通过联合检测cfDNA和蛋白质,在无症状且肝细胞癌状态未知的人群中早期检测肿瘤,在验证队列中具有较高的灵敏度(100%)和特异性(94%),有望应用于无症状社区人群的筛检中^[13]。

在涉及多个指标的研究中,还需要考虑参数整合问题。综合考量多种指标需要较高的计算能力,而机器学习算法则有望自动发现和检测癌症特异的指标,助力液体活检,目前机器学习技术与液体活检技术联合应用也有初步探索。有研究将检测cfDNA和人工智能技术相结合,其区分肿瘤患者和健康人的准确度较高(AUC=0.94),该技术还可用于定位肿瘤来源^[12]。Wang等^[14]比较基于单个肿瘤标志物、联合检测和机器学习方法检测肿瘤的能力。结果表明机器学习方法优于单个肿瘤标志物的检测。但在数据量不足的前提下,机器学习算法可能会出现过度拟合,尽管它能很好地解释训练数据,但应用于新人群时往往表现前欠佳。

2.3 cfDNA 应用于肿瘤筛检的优势与局限性

从常规采血中分析肿瘤源性DNA的技术是一项具有潜在革命性临床应用的重要进展。cfDNA分析具有的微创特性为活检困难的肿瘤提供了一种分子谱分析方法,并使重复检测肿瘤DNA成为可能,避免了传统肿瘤组织活检的风险和潜在并发症,为无明显临床症状的患者提供了肿瘤检测的可能^[15]。然而,利用cfDNA筛检肿瘤尚处于探索阶段,同一癌种的患者之间,ctDNA的水平存在较大差异,这可能与生物学差异或单个肿瘤细胞死亡率的差异有关,一定程度上限制了筛检肿瘤的准确性。

3 循环肿瘤 DNA(ctDNA)

3.1 循环肿瘤 DNA 及其检测技术

循环肿瘤DNA(ctDNA),由肿瘤细胞释放入血,是一种在人外周血等体液中存在的携带肿瘤特异性突变的DNA片段,是循环游离DNA(cfDNA)的一部分,也是液体活检中主要的肿瘤生物标志物之一。ctDNA主要的检测技术为数字聚合酶链反应(digital

polymerase chain reaction,dPCR)、二代测序技术(next-generation sequencing,NGS)。然而,在癌症早期,血液中ctDNA水平较低,检测相对困难,增加测序深度固然可以提高灵敏度和准确性,但可能会造成假阳性结果。Mouliere等^[16]研发了一种新的检测方法,其在体外富集特定长度的cfDNA并进行测序和分析,而后结合已知的突变位点,使用机器学习方法建立模型,在检测肿瘤血样和健康血样时,准确度较高(AUC>0.99)。

3.2 ctDNA 应用于肿瘤筛检的研究

ctDNA在肿瘤领域的研究大量集中在肿瘤诊断、监测治疗反应、预测肿瘤预后、侵袭和复发,筛检中的应用研究相对较少。有研究在局限性肿瘤患者中发现,分别有73%、57%、48%和50%的结直肠癌、胃食管接合部癌、胰腺癌和乳腺癌患者可以检测到ctDNA。Kammesheidt等^[17]对无症状个体进行筛查,其中5%(58/1059)受试者的基因存在突变,在1年的随访时间内只有4例确诊为癌症,在随后的随访中,有2例检测到突变的比例没有随肿瘤负荷的变化而变化,因此,其临床意义尚不清楚。近期有研究同时对脑脊液中的ctDNA和血浆中的cfDNA进行基因测序,结果表明脑脊液中的ctDNA具有较高的敏感性,有助于胶质瘤的早期诊断^[18]。

3.3 ctDNA 应用于肿瘤筛检的优势与局限性

ctDNA对不同的肿瘤组织具有较高的代表性,有助于明确肿瘤基因分型^[19],还可评估位于难以活检位置肿瘤的情况^[20]。然而早期无症状个体中,ctDNA含量较低,特定的突变更加微乎其微,可能有敏感性和特异性较低的问题,筛检效果表现欠佳,可能将限制ctDNA在肿瘤筛检中应用^[21]。

4 循环肿瘤细胞(CTC)

4.1 循环肿瘤细胞及其检测技术

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)来源于原发肿瘤部位,在健康人群中较为罕见。是扩散的先导细胞,也是转移过程中的关键因素,可在各种转移性癌中检测到。由于数量少,以及具有某些分子和细胞特性,其难以被发现和研究,这是循环肿瘤细胞尚未成为临床常规检测手段的因素之一^[22]。当前,循环肿瘤细胞的分离方法分为两类,基于细胞表面标

记和基于物理性质。主要的分离方法分为物理学方法:过滤法、电泳法,即依据细胞物理特性,如大小、密度等进行分离。免疫学方法,即利用抗原抗体反应的原理对细胞表面蛋白标志物进行分离,分为阳性捕获法和阴性富集法。有研究小组开发了一种新型 CTC 检测方法,分离效率(>99%)和分离纯度(>87%)均高,有望提高 CTC 的检测效率^[23]。美国密歇根大学的科学家以超高的纯度研究每个循环肿瘤细胞,全面分析基因信息,超越当前技术,未来也许能进一步提高早期发现肿瘤能力^[24]。

4.2 CTC 应用于肿瘤筛检的研究

Kohn EC 等研究表明乳腺癌诊断前的 5~10 年肿瘤细胞已经开始侵袭,基于此观点,Paterlini-Bréchet^[25]提出如果使用对血液中“前哨”癌细胞非常敏感的检测技术,应该有可能在诊断前阶段检测出癌症。Tanaka 等^[26]研究者发现,肺癌患者的 CTC 计数明显高于患肺部良性疾病的患者,同时,肺癌患者血液中 CTC 计数随疾病进展而增加。Fiorelli 等^[27]研究表明,CTC 计数超过 25 个时,在区分良恶性肺部疾患时具有较高的灵敏度和特异性,分别为 89% 和 100%。Ilie 等^[28]使用上皮肿瘤细胞大小分离(ISET)技术在 245 名受试者的血液中寻找 CTCs,5 例 COPD 患者(3%)在研究过程中检测到 CTCs,每年对 CTC 阳性的 COPD 患者进行 CT 扫描,在诊断为 COPD 的 14 年后检测出肺结节,于肿瘤早期进行手术切除。术后 12 个月随访 5 例癌症患者(CT 扫描和 ISET)均无肿瘤复发,对照者均未检出 CTCs。

4.3 CTC 应用于筛检的优势与局限性

现阶段,在各常见癌种中,CTC 计数及分析主要用于指导治疗方法、跟踪随访治疗效果、预测肿瘤转移和预测预后情况等,目前已有少量研究进行了用于肿瘤筛检试验的初步探索。CTC 来源于原发肿瘤,有助于早期发现肿瘤和了解肿瘤的生物特征。然而,高质量的富集方法限制了 CTC 在肿瘤筛检的应用,评估 CTC 分子特征的技术和标准化方法也处于发展阶段。

5 其他血基生物标志物

除 ctDNA、cfDNA 和 CTC 外,还有研究者使用

其他血基生物标志物进行肿瘤筛检,如:SEPT9 基因检测是国家食品药品监督管理局批准的第一个用于结直肠癌筛检的血液检测方法,近期一项 Meta 分析显示,SEPT9 检测更适用于有症状的人群^[29];有研究团队尝试分析肺癌、脑癌及乳腺癌患者及健康正常人的肿瘤血小板,结果表明其在肿瘤患者和健康人群中存在差异,肿瘤血小板具有作为生物标志物用于肿瘤筛检的潜力^[30];有研究者使用新一代测序技术检测肿瘤来源的 miRNA,结果显示其区分肺癌患者和健康对照组的能力较好,灵敏度为 80.3%,特异性为 92.3%,AUC 可达 0.90。此类 miRNA 可能是早期识别非小细胞肺癌的潜在生物标志物^[31]。由于样本量相对不足及缺乏前瞻性的试验设计,此类血基生物标志物的有效性尚需进一步探讨。

6 液体活检应用于筛检研究进展

截止到 2019 年 3 月,已有 194 项液体活检技术及相关应用的研究在美国临床试验注册平台(<https://clinicaltrials.gov>) 登记注册,其中 14 项分别由美国、加拿大、法国、中国、德国和日本等国家发起的研究是将该技术应用于肿瘤筛检,且大多为病例对照研究,主要用于筛检结直肠癌、肝细胞癌、肺癌、宫颈癌、乳腺癌和前列腺癌等常见癌种,所使用的血基生物标志物分别为 CTC、cfDNA 和 ctDNA,各研究的预计入组人数为 100~30 000 不等。已完成入组的研究中,最大样本量为 18 471 例,最小为 39 例。主要的终点指标为 CTC 计数、肿瘤诊断、灵敏度和特异性、ctDNA 阳性率等。另有 5 项关于液体活检技术相关研究在中国临床试验注册中心(<http://www.chictr.org.cn>) 登记注册,将该技术应用于肿瘤筛检的有 3 项,分别应用于前列腺癌、结直肠癌及肺癌。所使用的血基生物标志物均为 ctDNA,主要终点指标为灵敏度、特异性、准确率及 cfDNA 突变等。其中两项研究处于受试者招募阶段,一项尚未开始招募受试者,此三项研究均未汇报预计入组的受试者数量。

国内外均有针对液体活检技术在肿瘤筛检中应用的研究,检测的癌种较为广泛,基本涵盖各常见癌种,大部分仍处于受试者招募阶段且多为病例对照研究,尚缺乏规范设计的大规模人群前瞻性研究。

7 总结与展望

在世界范围内,液体活检技术仍然处于探索阶段。寻找合适的生物标志物,研发新的分离、富集和分析技术及尝试将已掌握的技术和已知的生物标志物应用于诊断、监测用药反应、预测复发和生存期等是当前研究的主流方向^[32-33]。由于多数肿瘤在早期阶段仅需手术切除即可痊愈,近年来,人们尝试将液体活检技术应用于肿瘤筛检,以实现肿瘤的早诊早治。

当前疾病负担较重的主要癌种有现行的筛检方法与策略,肺癌的筛检方法是痰液细胞学筛查和低剂量螺旋CT^[34];结直肠癌的筛检方法是粪便隐血和结肠镜检查;乳腺癌主要的筛检方法是乳腺超声、X线摄影和CT等^[35];胃癌主要以内镜检查为筛检方法^[36];宫颈癌的筛检方法主要为巴氏涂片法和人乳头瘤病毒(HPV)检测;前列腺癌主要的筛检方法为直肠指检和前列腺特异性抗原检查^[37]。

然而传统筛检技术仍存在一些局限,有待进一步完善。肺癌的痰液细胞学筛检的敏感度低(最低为2%),低剂量螺旋CT过度诊断的发生率高且难以与肺部结节进行区分^[38-39]。结直肠癌的粪便隐血检查难以发现早期的结直肠癌,结肠镜检查需肠道准备且花费较高。乳腺超声难以筛检出早期的乳腺癌,MRI检查费用高、时间长,缺乏相应的诊断标准,只建议高危女性作为补充检查。胃癌的筛检方法中,内窥镜检查成本较高且灵敏度低,幽门螺杆菌筛查效果欠佳^[40]。宫颈癌的筛检方法中,巴氏涂片法的假阴性率高达15%~40%。同时,人乳头瘤病毒的感染具有一过性,并非所有感染者均患宫颈癌。前列腺癌的直肠指检检测到的通常为晚期,前列腺特异性抗原检查的假阳性率可达80%,许多受试者因被误诊而进行了前列腺切除术,易造成性功能障碍、排尿困难等其他不良后果^[41-42]。

液体活检技术通过采集外周血或尿液等体液,获取体内肿瘤细胞的信息,革新了肿瘤筛检的技术方法,免除受试者的痛苦,可以重复采样,且取样全面、精准,避免了因肿瘤异质性带来的取样不全等。但是仍存在某些亟待解决的问题限制液体活检技术在临床中大规模应用,如:某些生物标志物在多个癌种中都可以表现出含量升高,故无法明确癌种;肿瘤晚期阶段出现的某些生物标志物不宜在筛检中使

用;肿瘤早期的血液标志物可能被其他疾病所掩盖,如慢性炎症及健康个体随着年龄增长而积累的癌症相关突变等^[43]。由于当前已发表的液体活检技术应用于肿瘤筛检方面的文献数量相对较少,且大多仍处于实验室阶段,存在研究对象数量较少、研究过程欠规范等问题,但已有研究团队证实了液体活检技术应用于肿瘤早筛的可行性,并有公司为研发此技术投入大量人力物力,使该技术应用于肿瘤筛查成为可能^[44]。

未来将继续寻找可行的生物标志物,提高分离、富集和检测技术,研发新型试剂盒,提高肿瘤筛检的准确性和有效性,对已发现的部分生物标志物和研制出的试剂盒进行前瞻性研究证实其可行性。随着对各生物标志物了解的不断深入,可以想象未来有可能仅需要几毫升的外周血、尿液或唾液等就可以同时筛检多种常见肿瘤,有效提高早期癌症检出率,或将传统的生化标志物和/或成像技术与基于液体活检的方法相结合,可能会进一步提高肿瘤筛检的灵敏度,但高度敏感技术的研发及其伴随的高成本是大规模临床使用的阻碍。

未来的液体活检研发将横跨多个学科,包括基础生物学和生理学、分子生物学、检测技术、统计学和机器学习等。关键问题是,只有当液体活检应用于肿瘤筛检的有效性和实用性得到证明之后,这项技术才能发挥它在肿瘤筛检领域的全部潜力,为肿瘤筛检带来革命性的影响。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [4] Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2018, 67(1): 358-380.
- [5] Yang D, Zhang X, Powell CA, et al. Probability of cancer in high-risk patients predicted by the protein-based lung cancer biomarker panel in China: LCBP study[J]. Cancer, 2018, 124(2): 262-270.
- [6] Xu HX, Liu L, Xiang JF, et al. Postoperative serum CEA and CA125 levels are supplementary to perioperative CA19-9 levels in predicting operative outcomes of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Surgery, 2017, 161(2): 373-384.
- [7] Zhang W, Xia W, Lyu Z, et al. Liquid biopsy for cancer:

- circulating tumor cells, circulating free DNA or exosomes? [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(2): 755–768.
- [8] 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.
- [9] Adalsteinsson VA, Ha G, Freeman SS, et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1324–1324.
- [10] Chan KCA, Woo JKS, King A, et al. Analysis of plasma Epstein-Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 513–522.
- [11] Szpechcinski A, Chorostowska-wynimko J, Struniawski R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(3): 476–483.
- [12] Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test[J]. *Science*, 2018, 359(6378): 926–930.
- [13] 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.
- [14] Wang HY, Hsieh CH, Wen CN, et al. Cancers screening in an asymptomatic population by using multiple tumour markers[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): 1–16.
- [15] Corcoran RB, Chabner BA. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(18): 1754–1765.
- [16] Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(466): 1–13.
- [17] Kammesheidt A, Tonozi TR, Lim SW, et al. Mutation detection using plasma circulating tumor DNA (ctDNA) in a cohort of asymptomatic adults at increased risk for cancer [J]. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2018, 9(1): 1–12.
- [18] Miller AM, Shah RH, Pentsova EI, et al. Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid[J]. *Nature*, 2019, 565(7741): 654–658.
- [19] Odegaard JJ, Vincent JJ, Mortimer S, et al. Validation of a plasma-based comprehensive cancer genotyping assay utilizing orthogonal tissue- and plasma-based methodologies [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(15): 3539–3549.
- [20] Hiemcke-jiwa LS, Ten Dam-van Loon NH, Leguit RJ, et al. Potential diagnosis of vitreoretinal lymphoma by detection of myd88 mutation in aqueous humor with ultrasensitive droplet digital polymerase chain reaction [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2018, 136(10): 1098–1104.
- [21] Fiala C, Diamandis EP. Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection[J]. *BMC Med*, 2018, 16(1): 166–175.
- [22] Allard WJ, Terstappen LW. CCR 20th Anniversary Commentary: paving the way for circulating tumor cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(13): 2883–2885.
- [23] Zhou J, Kulasinghe A, Bogseth A, et al. Isolation of circulating tumor cells in non-small-cell-lung-cancer patients using a multi-flow microfluidic channel[J]. *Microsystems & Nanoengineering*, 2019, 5(1): 8–19.
- [24] Cheng YH, Chen YC, Lin E, et al. Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA-sequencing for circulating tumor cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2163–2173.
- [25] Paterlini-Brechot P. Circulating tumor cells: who is the killer? [J]. *Cancer Microenviron*, 2014, 7(3): 161–176.
- [26] Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cells as a diagnostic marker in primary lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(2): 6980–6986.
- [27] Fiorelli A, Accardo M, Carelli E, et al. Circulating tumor cells in diagnosing lung cancer: clinical and morphologic analysis [J]. *Ann Thorac Surg*, 2015, 99(6): 1899–1905.
- [28] Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, et al. “Sentinal” circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): 1–7.
- [29] Song L, Jia J, Peng X, et al. The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: a meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3032–3043.
- [30] Best MG, Wesseling P, Wurdinger T. Tumor-educated platelets as a noninvasive biomarker source for cancer detection and progression monitoring [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13): 3407–3411.
- [31] Jin X, Chen Y, Chen H, et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17): 5311–5318.
- [32] Tsao SC, Wang J, Wang Y, et al. Characterising the phenotypic evolution of circulating tumour cells during treatment [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1482–1491.
- [33] Babayan A, Pantel K. Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer [J]. *Genome Med*, 2018, 10(1): 21–23.
- [34] De Koning HJ. Lung cancer screening and its continuous risk assessment [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(11): 1434–1436.
- [35] Smith RA, Andrews KS, Brooks D, et al. Cancer screening in the United States, 2017: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(2): 100–121.
- [36] Libanio D, Dinis-Ribeiro M. Gastroscopy and gastric cancer-related mortality: time to change recommendations regarding screening? [J]. *Gastrointest Endosc*, 2018, 87(1): 128–130.
- [37] Hayes JH, Barry MJ. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence [J]. *JAMA*, 2014, 311(11): 1143–1149.
- [38] Zhang ZL, Shi MY. Research progress of early screening of lung cancer [J]. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science*, 2018, 10(7): 32–36. [张增利, 施敏骅. 肺癌早期筛查的研究进展 [J]. *中国医学前沿杂志 (电子版)*, 2018, 10(7): 32–36.]
- [39] Kong WJ, An T, Lyn B, et al. Current status: low dose spiral CT lung screening and pulmonary nodules [J]. *Practical Oncology Journal*, 2018, 32(1): 68–72. [孔维嘉, 安甜, 吕博, 等. 低剂量螺旋 CT 肺癌筛查及肺结节的研究现状 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(1): 68–72.]
- [40] Griffin-sobel JP. Gastrointestinal cancers: screening and early detection [J]. *Semin Oncol Nurs*, 2017, 33(2): 165–171.
- [41] Stewart RW, Lizama S, Peairs K, et al. Screening for prostate cancer [J]. *Semin Oncol*, 2017, 44(1): 47–56.
- [42] Jung M. Breast, prostate, and thyroid cancer screening tests and overdiagnosis [J]. *Curr Probl Cancer*, 2017, 41(1): 71–79.
- [43] Bardelli A, Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet) [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 172–179.
- [44] Kaiser J. ‘Liquid biopsy’ for cancer promises early detection [J]. *Science*, 2018, 359(6373): 259–260.