

肿瘤内科学专题

• 综述 •

cfDNA 在非小细胞肺癌中的研究进展*

曹轲, 陈正庭 综述, 常莉, 李文辉[△] 审校

650118 昆明, 昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院 放射治疗中心(曹轲、陈正庭、常莉、李文辉), 云南省肺癌研究重点实验室(曹轲、陈正庭)

[摘要] 肺癌发病率及死亡率居全球癌症之首, 尽管近年来肺癌的分子靶向治疗和免疫治疗技术不断发展, 但患者的总生存时间并未显著延长。尽早确定肺癌患者的临床分期和分子分型, 提升早期临床诊断效率, 以及监测患者耐药性和探究其耐药机制, 对提高肺癌患者生存率具有重要意义。对于晚期患者而言, 由于取材等问题, 作为金标准的病理诊断并不一定可用, 且在非小细胞肺癌的发展过程中, 连续手术组织活检仍然是一大难题, 而 cfDNA (cell-free DNA, cfDNA) 的液体活检技术, 正迅速成为标准肿瘤活检的重要微创辅助手段。肿瘤细胞可以通过凋亡或坏死释放 DNA 片段进入血液循环, 形成细胞游离 DNA, 非小细胞肺癌患者的血浆 cfDNA 水平较高, 分析患者血浆中 cfDNA 对非小细胞肺癌患者的早期临床诊断、基因突变检测以及预后的预测、耐药性监测等方面均有着重要价值, 并有望成为重要的液体生物标志物和指导非小细胞肺癌精准治疗模式中的新方法。本文就 cfDNA 在非小细胞肺癌研究中的最新进展情况作一综述。

[关键词] 细胞游离 DNA; 非小细胞肺癌; 基因突变; 耐药性监测

[中图分类号] R34; R734.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.09.015

引文格式: Cao K, Chen ZT, Chang L, et al. Progress of research on cell-free DNA in non-small cell lung cancer [J]. J Cancer Control Treat, 2019, 32(9): 849-857. [曹轲, 陈正庭, 常莉, 等. cfDNA 在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(9): 849-857.]

Progress of Research on Cell-Free DNA in Non-Small Cell Lung Cancer

Cao Ke, Chen Zhengting, Chang Li, Li Wenhui

Radiotherapy center, Yunnan Cancer Hospital & The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University & Yunnan Cancer Center, Kunming 650118, Yunnan, China (Cao Ke, Chen Zhengting, Chang Li, Li Wenhui); Key Laboratory of Lung Cancer Research in Yunnan Province, Yunnan Cancer Hospital & The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University & Yunnan Cancer Center, Kunming 650118, Yunnan, China (Cao Ke, Chen Zhengting)

Corresponding author: Li Wenhui, E-mail: liwenhui0325@163.com

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (NO. 8160504), Yunnan Health Science and Technology Plan Project (NO. 2018NS0064), Yunnan Provincial Department of Education Scientific Research Fund Project (NO. 2018Y057) and Graduate Innovation Fund Project of Kunming Medical University (NO. 2019S048, NO. 2019D015).

[Abstract] The incidence and mortality of lung cancer ranks first in the world. Although molecular targeted therapy and immunotherapy technology for lung cancer have been

[收稿日期] 2019-06-12 **[修回日期]** 2019-08-19

[基金项目] * 国家自然科学基金(编号:81660504); 云南省卫生科技计划项目(编号:2018NS0064); 云南省教育厅科学研究基金项目(编号:2018Y057); 昆明医科大学研究生创新基金项目(编号:2019S048, 2019D015)

[通讯作者] [△] 李文辉, E-mail: liwenhui0325@163.com

developed in recent years, the overall survival of patients has not been significantly prolonged. It is of great significance to improve the survival rate of lung cancer patients by identifying the clinical stage and molecular type for lung cancer patients as early as possible, improving the efficiency of early clinical diagnosis, monitoring drug resistance in patient and exploring

the mechanism of drug resistance. For advanced patients, pathological diagnosis as a gold standard is not necessarily available due to factors such as material extraction. In the development of non-small cell lung cancer, continuous surgical tissue biopsy is still a major problem, and cell-free DNA (cfDNA) liquid biopsy is rapidly becoming an important minimally invasive tool for standard tumor biopsy. Tumor cells can release DNA fragments into the blood circulation through apoptosis or necrosis to form cfDNA. Patients with non-small cell lung cancer have higher plasma cfDNA levels. Analyzing cfDNA in plasma is of great value in early clinical diagnosis, gene mutation detection, prognosis prediction and drug resistance monitoring in patients with non-small cell lung cancer, and it is expected to become an important liquid biomarker and a new method to guide the precise treatment of non-small cell lung cancer. This article reviews the recent advances in research on cfDNA in non-small cell lung cancer.

[Key words] Cell-free DNA; Non-small cell lung cancer; Gene mutation; Drug resistance monitoring

细胞游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 于 1948 年被首次报道^[1], 是血液中双链 DNA 的组成部分之一, 并可从血浆中分离出来^[2]。肺癌作为最常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率居癌症之首, 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占所有肺癌分型的 85%。研究表明, 与健康对照组或良性疾病组相比, NSCLC 患者血浆中的 cfDNA 水平较高^[3], 且 cfDNA 高水平患者具有更短的无进展生存期 (progress free survival, PFS) 和总生存期 (overall survival, OS)^[4]。所以, 分析患者血浆中 cfDNA 或许对 NSCLC 患者的早期临床诊断、基因突变检测以及预后的预测、耐药性监测等方面有着重要价值, 并有望成为重要的液体生物标志物和指导 NSCLC 精准治疗模式中的新方法。为此, 本文就 cfDNA 在非小细胞肺癌研究中的最新进展情况作一综述。

1 cfDNA

目前认为, cfDNA 通过细胞凋亡或坏死释放到血液中, 通常是长度为 150 ~ 200 个碱基对的双链片段^[1]。研究发现, 在健康人血浆中, 正常细胞 cfDNA 浓度约为 30 μg/L, 而肿瘤患者则为 180 μg/L, 且血浆中 cfDNA 分子会被迅速清除, 其半衰期为 30 分钟至 2 小时^[5]。早在 1977 年, Leon 等^[6]就发现癌症患者 cfDNA 总体水平高于未患癌人群, 而在癌症患者中, 从肿瘤细胞释放的 cfDNA 通常被称为循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), 但其仅构成整个 cfDNA 的一部分, 且癌症患者整个 cfDNA 中 ctDNA 所占比例差异巨大, 根据肿瘤大小、定位和血管分布, 从少于 0.1% 至多于 90% 之间变化^[7-8]。虽然个体患者的 ctDNA 所占比例往往与肿瘤负荷平行, 但在患相同类型癌症的不同患者之间, 已观察到显著的变异, 这可能反映了个体肿瘤的生物学差异或细胞死亡率差异。此外, 不同类型癌症的患者在可检出的 ctDNA 频率方面也有显著变异。故如何

在正常种系 cfDNA 背景中检测和分析 ctDNA 仍是一大难题。

2 cfDNA 的检测和分析

由于来自肿瘤的 cfDNA 含量低、半衰期短, 且不同癌症患者之间个体差异大, 故需要超灵敏的方法来检测血浆 cfDNA 中以极低频率存在的变异体—等位基因突变、拷贝数变化以及其他改变。如今已有多种方法可以检测血浆 cfDNA 中的基因突变情况, 包括测序法、荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、扩增阻滞突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS)、突变富集 PCR、变性高效液相色谱法以及数字 PCR。近年来, 在数字 PCR 基础之上又衍生出如微滴数字 PCR 技术 (droplet digital PCR, ddPCR) 和微乳滴磁珠 PCR 以及微数字 PCR^[9], ddPCR 技术甚至可以识别和定量 cfDNA 中以 ≤0.001% 的等位基因频率存在的变化^[10]。然而, 这些方法的灵敏度和特异度受到 DNA 聚合酶错误率和测序反应的限制。新一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 方法针对 cfDNA 进行了定制, 多项研究表明, NGS 结合了深度测序覆盖、分子条形码方法和错误抑制算法的改良方法改进了检测限, 其范围包括从全基因组或全外显子组测序到有限基因组的靶向测序, 大大提高了检测的准确性和敏感性^[11-15]。

3 cfDNA 在 NSCLC 中的应用

肿瘤组织的病理诊断及相关分子检测一直是临床医师诊断和治疗的金标准。在未接受活检的 NSCLC 患者中, 涉及血浆 cfDNA 的液体活检技术是分析临床相关遗传改变的重要材料来源之一。虽然诸如循环肿瘤细胞、外泌体以及 RNA 亦可作为液体活检的检测对象, 但对于携带基因突变的许多 NSCLC 患者而言, 血浆 cfDNA 的液体活检技术才是

最合适的选择,甚至优于标准肿瘤标志物,例如 CEA 和 CA12-5、CA15-3、CA19-9^[13,16-18]。因此,笔者将从以下几个方面对 cfDNA 在 NSCLC 中的应用进行相关阐述。

3.1 cfDNA 用于 NSCLC 患者早期临床诊断

早期发现和早期治疗是提高癌症患者生存率的关键,与晚期癌症患者相比,没有影像学转移性病变的患者预后更佳。Szpechcinski 等^[19]利用 PCR 方法检测 NSCLC 患者(I 期 44%, II 期 40%, IIIA 期 16%)、慢性呼吸系统疾病患者以及健康志愿者,发现 NSCLC 患者的血浆 cfDNA 浓度水平显著高于慢性呼吸系统疾病患者和健康个体,同时在区分 NSCLC 患者与健康个体时,其灵敏度和特异度分别为 90% 和 80.5%。Newman 等^[12]利用一种超灵敏的量化 ctDNA 方法(CAPP-Seq)检测发现,即使当 cfDNA 含量达到 0.02% 的检测限时,仍然在 100% 的 II~IV 期 NSCLC 患者和 50% 的 I 期患者中检测到 cfDNA,且突变基因部分的特异性为 96%。国内的一项研究结论也得出血浆 cfDNA 可作为 NSCLC 早期诊断和临床分期的有效工具^[20]。虽然目前已有多项研究表明血浆 cfDNA 在 NSCLC 患者早期临床诊断中的作用,但大部分为小样本研究,仍缺乏关于早期 NSCLC 患者血浆 cfDNA 检测的大规模研究,这可能与确诊的早期 NSCLC 患者较少从而收集相关数据困难有关。同时有研究也提出了质疑,例如一项前瞻性研究显示血浆 cfDNA 对早期 NSCLC 患者检测的特异性高但敏感性低,该研究招募了 288 名 NSCLC 患者,并使用 NGS 作为 I~IV 期 NSCLC 患者 ctDNA 中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变的检测方法,结果显示外显子 19 缺失的诊断敏感性和特异性分别为 50.9% 和 98%,并且对于 L858R 突变为 51.9% 和 94.1%,所有病例的整体敏感度为 54.4%,IIIB~IV 期为 72.7%,但 IA~IIIA 期为 22.2%^[21]。以上研究显示出血浆 cfDNA 在 NSCLC 早期临床诊断领域仍存在一定争议,需要进一步的研究来确立其效用,但不可否认的是血浆 cfDNA 检测为早期肿瘤的微创检测提供了广泛适用的方法,并为 NSCLC 患者的早期筛查和临床诊断提供了一定的依据。

3.2 cfDNA 用于 NSCLC 基因检测及预后预测

3.2.1 EGFR

EGFR 是一种属于酪氨酸激酶 ErbB 家族的跨膜蛋白受体,编码基因位于第 7 号染色体短臂,由酪氨酸激酶结构域的突变导致信号转导途径的激活,从而引发细胞增殖和抗凋亡^[22-23]。

在 NSCLC 中最主要的驱动基因就是 EGFR,既往数据表明,EGFR 基因突变率在白种人患者中约 10%~15%,而在亚洲人患者中却高达 40%^[24],其主要发生在 18 号-21 号外显子内,最常见的是 19 号外显子缺失和 21 号外显子 L858R 碱基替换^[25]。以上这些外显子的突变赋予酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKIs)的敏感性,并显示出其与药物高反应率(>70%)和 PFS 相关^[26-28]。一项研究报道了血浆 cfDNA 中 EGFR 基因突变的存在与 EGFR-TKIs 的反应之间有显著相关性,并且在血浆和肿瘤组织同时发现 L858R 突变的患者与仅在组织中发现 L858R 突变的患者相比,前者的 OS 较短^[29]。

迄今为止,已经开发出了三代 EGFR-TKIs,虽然其显示出较好的早期临床获益,然而患者由于耐药性的产生导致最终复发。国内最近的一项研究利用 ARMS 法检测血液 cfDNA 中 EGFR 基因突变并监测耐药基因 T790M 的变化,同时评估 TKI 在靶向治疗患者中的预后价值,其结果显示血液 cfDNA 和肿瘤组织样本活检在 EGFR 突变检测上的总体一致率为 68.2%,结论提示应用 ARMS 法检测血液 cfDNA 的 EGFR 基因突变是一种特异性高、敏感好的检测方法,适用于晚期 NSCLC 患者治疗前的 EGFR 基因突变状态检测,同时适用于监测靶向治疗后 T790M 耐药突变状态和预测患者预后^[30]。由此可见,血浆 cfDNA 检测与组织活检在确定 EGFR 基因突变方面存在具有高度一致性,虽然肿瘤组织的活检传统上对于组织学鉴别原发性和转移性肺肿瘤,以及确定相关 EGFR 基因突变的存在是必不可少的,且肿瘤组织中的基因检测仍是这些应用的金标准。然而,约 25% 的 NSCLC 患者为晚期疾病,由于取材困难等问题,肿瘤活检不足以实现全面的基因检测,为了能使 EGFR-TKIs 更好地应用于 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者,血浆 cfDNA 液体活检技术的发展已经能够在血浆中进行检测,这样对于晚期 NSCLC 患者来说,其可作为组织活检的替代检测方式。

一些研究利用血浆 cfDNA 评估了 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者接受 EGFR-TKIs 治疗后的临床效用,发现血浆 cfDNA 中的突变状态与 PFS 或 OS 之间存在显著相关性,其结果都显示出 NSCLC 患者在接受靶向治疗后 OS 或 PFS 呈上升趋势^[31-33]。这些研究都提示血浆中 cfDNA 浓度水平在评估 NSCLC 患者在接受靶向治疗后的预后上具有极大价值,并能够反映 NSCLC 患者潜在的肿瘤负荷情

况,因为肿瘤负荷较高的 NSCLC 患者可能有更密集的 cfDNA 释放到血液中,所以其浓度水平可以通过治疗引起的肿瘤细胞死亡来调节,在 NSCLC 患者接受靶向治疗后出现短暂性上升,而随着肿瘤的退缩迅速下降。因此,cfDNA 可以作为监测肿瘤负荷的替代指标,并使其成为评估 NSCLC 患者的宝贵预后因素。

3.2.2 Kristen 鼠肉瘤病毒原癌基因同源体(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS) KRAS 基因是 RAS 家族的一个原癌基因。在 NSCLC 的不同组织病理学类型中,尤其是肺腺癌中,KRAS 基因突变率在东西方人种中差异较大;该基因突变是西方人种最常见的突变基因,突变率接近 30%,但在亚洲人群中突变率仅为 5%^[34]。研究发现,KRAS 基因编码的蛋白主要位于 EGFR 信号途径的下游,该突变可导致 MAPK 信号通路持续激活,从而加速肿瘤细胞的增殖。KRAS 基因突变最常发生在 2 号外显子的第 12 位和第 13 位密码子^[35]。迄今为止,针对 KRAS 突变的靶向药物研发工作仍在艰难进行中,尚无临床广泛应用的靶向药物。尽管有报道针对 TP53 和 KRAS 突变的免疫疗法已显示出一定的前景^[36],但目前对于携带 KRAS 基因突变的 NSCLC 患者,化疗才是一线选择。

传统上,在 NSCLC 患者的活组织检查中检测到 KRAS 基因突变与预后不良有关。然而,血浆 cfDNA 作为预后标志物在评估 KRAS 基因突变的 NSCLC 患者的价值仍值得进一步探讨。Nygaard 等^[37]利用血浆 cfDNA 对可接受化疗的 246 例晚期 NSCLC 患者进行至少 1 个周期(最多 6 个周期)的最小剂量化疗后评价预后,发现 17.5% 血浆 KRAS 基因突变患者(治疗前检测),其 OS 和 PFS 较野生型 KRAS 基因突变的患者明显缩短,化疗对于血浆 KRAS 基因突变组的有效率也明显低于野生型 KRAS 基因突变组;并且,同一研究组的另一项前瞻性研究纳入了 69 例晚期 NSCLC 患者,并分析这些患者在治疗期间血浆 cfDNA 与 KRAS 基因突变的动态变化,发现当患者血浆 cfDNA 浓度高于基线水平时提示预后不良,同时,在治疗过程中若血浆 cfDNA 水平发生变化,疾病进展显著增加^[38]。这些研究都表明血浆 cfDNA 中检测到 KRAS 基因突变的存在可能是预后不良的标志。可另一项 Meta 分析结果却提示血浆 cfDNA 中检测到 KRAS 基因突变可能不是 NSCLC 患者生存的预后因素^[39]。一种原因可能是,在发生 KRAS 基因突变的 NSCLC 患者中,血浆 cfDNA 作为

预后和预测生物标志物的真正价值被高估了,另一个原因可能是利用血浆 cfDNA 检测 KRAS 基因突变用于预测 NSCLC 患者预后的研究较少。虽然作为生物标志物的 cfDNA 在血浆中检测到 KRAS 基因突变的预后和预测价值仍存在争议,但其体现的作用却不可忽视,所以仍需要样本数更多的前瞻性研究得出明确的结论。

3.2.3 间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK) ALK 是一种跨膜受体酪氨酸激酶,在正常情况下,ALK 受体可与配体结合引起 ALK 二聚化和下游激酶信号转导,影响下游信号通路,包括 RAS/MEK/ERK 通路和 PI3K/Akt/mTOR 通路,从而促进细胞生长和增殖^[40-41]。据统计,大约 3%~5% NSCLC 中会出现 ALK 基因重排^[42]。Soda 等^[43]于 2007 年通过蛋白组学技术在肺腺癌肿瘤组织中首次发现 ALK 融合基因,即 ALK 与棘皮动物微管蛋白 4(echinoderm microtubule-associated protein like 4, EML4) 形成 EML4-ALK 融合基因,其产生的融合蛋白可引起 ALK 的胞内激酶结构域发生二聚化,激活经典的 ALK 下游信号通路导致细胞增殖与凋亡失控。

虽然传统的化疗方案对 ALK 阳性 NSCLC 患者疗效并不理想,但针对 ALK 阳性的靶向药物间变性淋巴瘤激酶酪氨酸激酶抑制剂(ALK-tyrosine kinase inhibitor, ALK-TKIs)不仅提升了临床疗效,同时极大程度修改了对于 ALK 阳性 NSCLC 患者的临床用药指南,成为世界范围内公认的一线治疗手段。在当前的临床实践中,有 4 种不同方法来检测 ALK 融合基因的表达,分别是荧光原位杂交、免疫组织化学、逆转录聚合酶链式反应以及 NGS。虽然肿瘤组织仍然是首选材料,但有部分研究也证明血浆 cfDNA NGS 检测提供了一种非侵入性的方法来检测 ALK 基因重排和 ALK 融合基因,同时其具有良好的灵敏度和优异的特异性,不仅可以检测新诊断的 ALK 阳性 NSCLC 患者的靶向改变,对于已远处转移的 NSCLC 患者也具有意义^[44-46]。如上所述,多项研究都表明血浆 cfDNA 可作为检测 ALK 基因重排以及 ALK 融合基因的实用性方法,为获取肿瘤组织困难的患者提供可靠和连续的检测方式,这也间接地说明了当 NSCLC 患者检测出 ALK 基因重排或 ALK 融合基因时,能够尽早选择并使用 ALK-TKIs 来延缓疾病的进展,而当 ALK 阳性的 NSCLC 患者出现 ALK 耐药突变体时,cfDNA 也具备及时检测出新发耐药机制的能力,特别是对于疾病进展迅速或

出现 ALK 耐药突变体的 NSCLC 患者,每一代 ALK-TKIs 针对的耐药突变体不同,选择合适及正确的 ALK-TKIs 不仅可以减轻患者的经济负担,还可以精确有效治疗这类患者。

ALK 阳性的 NSCLC 患者在接受 ALK-TKIs 治疗后,不仅疗效显著,并且患者预后和生存率也得到大幅度改善^[47]。国内最近的一项回顾性分析纳入了 174 例克唑替尼治疗的携带 ALK 基因重排并已有脑转移的 NSCLC 患者,结果显示即使这类患者也可以从克唑替尼中获得生存方面的益处^[48]。如前所述,血浆 cfDNA 新一代测序(next-generation sequencing, NGS)检测存在远处转移的 NSCLC 患者,并且具有高敏感性和高特异性的特点,这也提示血浆 cfDNA 在检测远处转移伴 ALK 基因重排或 ALK 融合基因的 NSCLC 患者方面具有独特的作用,因为脑转移或肝转移的 NSCLC 患者预后较差且远期生存率较低,所以尽早发现远处转移的 NSCLC 患者是否存在 ALK 基因重排或 ALK 融合基因,并及时选择正确的 ALK-TKIs 具有十分重要的意义。虽然关于血浆 cfDNA 检测在评估 EGFR 或 KRAS 基因突变的 NSCLC 患者预后的研究很多,可目前对于 ALK 基因重排或 ALK 融合基因的 NSCLC 患者,利用血浆 cfDNA 评估其接受 ALK-TKIs 治疗后临床效用的研究却十分缺乏。这也提示,对于 ALK 阳性的 NSCLC 患者,虽然血浆 cfDNA 在评估其预后方面具有一定的前景,但仍需要大量研究来证明其效用才可以得出明确的结论。

3.3 cfDNA 用于 NSCLC 中耐药性监测

3.3.1 EGFR-TKIs 获得性耐药监测 如前所述,EGFR-TKIs 对于 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者来说占据重要地位。与单纯接受化疗或放疗联合的患者相比,放疗联合标准一线 EGFR-TKIs(如吉非替尼,厄洛替尼或阿法替尼)治疗的 EGFR 基因突变患者客观缓解率(objective response rate, ORR)、PFS 和生活质量均明显更好^[27,49-51]。然而不幸的是,大多数患者都存在不可避免的获得性耐药,而 T790M 次级突变是最常见的耐药机制,占近 60% 的病例^[52-53]。在这种情况下,相比于手术活检,使用血浆 cfDNA 的液体活检优势在于可以进行频繁采样,当使用 EGFR-TKIs 治疗 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者时,cfDNA 在血浆中减少甚至消失,且这种情况与 T790M 次级突变一起再次出现。因此,对于发生 T790M 次级突变的 NSCLC 患者来说,组织活检往往可行性差,而血浆 cfDNA 的液体活检技

术在 EGFR-TKIs 的治疗背景下显得十分重要,目前正用作手术活检的替代方法,一些研究也已经证明,血浆 cfDNA 中检测到 T790M 次级突变的 NSCLC 患者,可选择第三代 EGFR-TKIs 进行治疗^[54-56]。

第三代 EGFR-TKIs(奥希替尼)可以与 T790M 受体结合,目前已被批准用于治疗进展为 EGFR-TKIs 耐药并携带 T790M 次级突变的 NSCLC 患者^[57],是针对 T790M 次级突变的高选择性且不可逆性的药物。临床研究结果显示,该药对发生 T790M 次级突变的 NSCLC 患者疗效显著,反应率为 55%,PFS 中位数为 9.6~13.1 个月^[58-59]。但使用第三代 EGFR-TKIs 仍然导致了新的抵抗机制,Thress 等^[60]研究报道,EGFR 基因突变的 NSCLC 患者通过 C797S 突变的机制从而发生了奥西替尼抗性,其对来自 7 名发生奥西替尼抗性的 NSCLC 患者,利用 ctDNA 进行 NGS 检测,其中一例患者表现出 C797S 突变,而连续收集的 15 例携带 T790M 次级突变并接受 AZD9291 处理的 NSCLC 患者,利用 ctDNA 进行 ddPCR 检测,发现奥西替尼抗性的 3 种分子亚型,其中 6 例携带 C797S 突变,5 例有 T790M 次级突变而没有 C797S 突变,4 例仅发现 EGFR 基因突变。c-MET 扩增或过表达是另一种可导致 EGFR-TKIs 治疗失败的获得性耐药机制,约占病例的 5%~20%,其可以激化下游信号通路,促进肿瘤细胞增殖、生长、迁移和血管生成^[61]。目前关于抗 MET 单克隆抗体和 MET-TKIs 的疗效正在非 T790M 患者的临床试验中进行^[62]。其他耐药机制还包括 ERBB2 扩增(12%~13% 的病例),PIK3CA 突变(约 5%),BRAF 突变(1%)和组织学转化^[63]。因此,对于发生获得性耐药性机制的 NSCLC 患者,血浆 cfDNA 的液体活检技术可以利用频繁采样的优势使其成为个体化医疗中最重要的应用,并能让临床医生采用更有效的替代治疗策略。

3.3.2 ALK-TKIs 获得性耐药监测

虽然 ALK-TKIs 的疗效取得了瞩目进展,ALK 阳性患者最初对 ALK-TKIs 反应良好,但获得性耐药依旧不可避免,绝大多数患者会在几年内出现继发性耐药,而其耐药机制主要包括:1) ALK 继发性耐药突变(激酶域的点突变和 ALK 融合基因拷贝数目的扩增);2) 旁路信号通路活化;3) 继发性自噬;4) 上皮间质转化。在 ALK-TKIs 获得性耐药中最常见的为 L1196M,其次为 G1269A、C1156Y、G1202R、I1171T、S1206Y、E1210K 等^[64]。第一代 ALK-TKIs 克唑替尼对于 ALK 阳性的晚期 NSCLC 亚裔患者,

在 PFS 和客观缓解率 ORR 方面都具有显著疗效^[65]。第二代 ALK-TKIs(色瑞替尼和阿雷替尼)虽然对克唑替尼耐药性敏感,但耐药谱却各不相同,例如色瑞替尼对存在 L1196M、G1269A、I1171T 和 S1206Y 耐药突变的细胞有明显抑制作用,但对 G1202R 和 F1174C 耐药性突变无效,而阿雷替尼能够克服 L1196M、C1156Y 和 F1174L 等耐药相关的突变从而产生疗效^[66]。第三代 ALK-TKIs 劳拉替尼则克服了目前已知的多种 ALK 耐药突变体,是唯一强效抑制包括 G1202R 在内的所有 ALK 二次突变 ALK-TKIs,对于使用过多线 ALK-TKIs 治疗后仍复发的患者而言,其对复合型突变也有效,且具有较好的 PFS 和 ORR^[67-68]。但目前也有研究表明在接受劳拉替尼治疗后复发的患者中检测到了 L1198F 突变^[69]。如上所述,尽管获得了最初的临床益处,但大部分患者最终仍因不同的耐药机制而复发。Bordi 等^[70]分析了 20 例 ALK 阳性的晚期 NSCLC 患者,在 4/20(25%)患者的血浆 cfDNA 中检测到 ALK 耐药性突变,在 1 例中观察到伴随的 L1196M 和 G1269A,表明获得性抗性机制的异质性;此外,在 10/20(50%)病例中检测到 KRAS 突变,其中 3 例中出现了 ALK 基因突变。由此可表明,血浆 cfDNA 在检测 ALK 基因突变的新发耐药机制以及可能的旁路途径方面有着高灵敏度和高特异性的特点,其对 ALK 阳性 NSCLC 患者具有重要指导意义。

在 NSCLC 的众多治疗手段中,特别对于发生基因突变的 NSCLC 患者,靶向治疗起着十分重要的作用,而血浆 cfDNA 的液体活检技术不仅可以检测 NSCLC 患者的基因突变,还能识别获得性耐药的新发遗传改变,进而采用适合的 TKI 进行治疗,更好地指导临床用药,这极大程度上提高了临床治疗效率,并且其在患者的早期诊断、预测患者预后方面也展现出极高的价值,为 NSCLC 靶向治疗计划提供了新的依据和参考。

4 总结与展望

在 NSCLC 的发展过程中,特别是晚期 NSCLC,相比于组织活检或标准肿瘤标志物,血浆 cfDNA 的液体活检技术能够便捷并有效地监测患者的疾病进展情况,从而选择更有针对性的治疗方案。尽早确定 NSCLC 患者的分子分型是选择并接受靶向制剂的必要条件,然而目前的基因突变分析往往基于肿瘤组织,并有许多局限性,因为大多数 NSCLC 患者确诊时已为晚期,由于取材等问题,不适合通过侵入

性手术或活检提供组织,而血浆 cfDNA 的液体活检技术由于其微创性的性质,是十分有前途的来源并作为基因突变分析的检测工具。同时,随着免疫治疗在 NSCLC 中发挥作用的研究被证实,多项研究也显示出血浆 cfDNA 监测可作为免疫治疗反应的早期指标,并可用于监测癌症患者对免疫疗法的反应^[71-72],最新的一项研究利用血浆 cfDNA 实时监测晚期 NSCLC 患者服用纳武单抗有效性,其结果表明血浆 cfDNA 在免疫治疗抗性的实时监测中可能具有潜在作用^[73]。综上所述,血浆 cfDNA 的液体活检技术在 NSCLC 的早期临床诊断、基因突变检测以及预后的预测、耐药性监测等方面均有着重要的应用价值,且在免疫治疗中的早期反应监测以及药物抗性监测等方面也逐渐发挥出相应作用,有望成为指导非小细胞肺癌精准治疗模式中的新方法。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

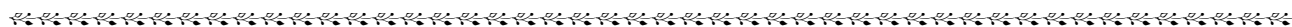
[参考文献]

- [1] Corcoran RB, Chabner BA. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment[J]. N Engl J Med, 2018, 379(18):1754-1765.
- [2] Donaldson J, Park BH. Circulating tumor DNA: measurement and clinical utility[J]. Annu Rev Med, 2018, 69:223-234.
- [3] Paci M, Maramotti S, Bellesia E, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2009, 64(1):92-97.
- [4] Wei Z, Shah N, Deng C, et al. Circulating DNA addresses cancer monitoring in non small cell lung cancer patients for detection and capturing the dynamic changes of the disease[J]. Springerplus, 2016, 5:531.
- [5] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6):426-437.
- [6] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Res,

- 1977, 37(3):646-650.
- [7] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):985-990.
- [8] Bettgeowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224ra224.
- [9] 张雨, 徐燕, 王孟昭. 非小细胞肺癌外周血游离 DNA 及肿瘤细胞 EGFR 基因突变检测方法的研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(11):766-772.
- [10] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22):8604-8610.
- [11] 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.
- [12] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage[J]. *Nat Med*, 2014, 20(5):548-554.
- [13] Liu L, Liu H, Shao D, et al. Development and clinical validation of a circulating tumor DNA test for the identification of clinically actionable mutations in nonsmall cell lung cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2018, 57(4):211-220.
- [14] Li BT, Janku F, Jung B, et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(4):597-603.
- [15] Wu Z, Yang Z, Li CS, et al. Differences in the genomic profiles of cell-free DNA between plasma, sputum, urine, and tumor tissue in advanced NSCLC[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(3):910-919.
- [16] Santarpia M, Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, et al. Feasibility of cell-free circulating tumor DNA testing for lung cancer[J]. *Biomark Med*, 2016, 10(4):417-430.
- [17] Husain H, Melnikova VO, Kosco K, et al. Monitoring daily dynamics of early tumor response to targeted therapy by detecting circulating tumor DNA in urine[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(16):4716-4723.
- [18] Corcoran RB, Andrieu T, Atreya CE, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK inhibition in patients with BRAFV600E-mutant colorectal cancer[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(4):428-443.
- [19] Szepechinski 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.
- [20] 杜洁, 隋永杰, 李红艳, 等. 血浆游离 DNA 在非小细胞肺癌诊断中的价值[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2017, 10(6):686-689.
- [21] Uchida J, Kato K, Kukita Y, et al. Diagnostic accuracy of noninvasive genotyping of EGFR in lung cancer patients by deep sequencing of plasma cell-free DNA[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(9):1191-1196.
- [22] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995, 19(3):183-232.
- [23] Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor[J]. *Cell*, 2006, 125(6):1137-1149.
- [24] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676):1497-1500.
- [25] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(5):339-346.
- [26] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10):947-957.
- [27] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(3):239-246.
- [28] Yang JC, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(2):141-151.
- [29] Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EORTAC Trial[J]. *JAMA Oncol*, 2015, 1(2):149-157.
- [30] 苏飞, 郑可, 付祎云, 等. 不同治疗对肺癌患者血液循环游离 DNA 检测 EGFR 基因突变的影响及预后分析[J]. *中国肺癌杂志*, 2018, 21(5):389-396.
- [31] Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum; from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(1):115-121.
- [32] 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.
- [33] Alegre E, Fusco JP, Restituto P, et al. Total and mutated EGFR quantification in cell-free DNA from non-small cell lung cancer patients detects tumor heterogeneity and presents prognostic value[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10):13687-13694.
- [34] Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, et al. Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(10):1819-1828.
- [35] Garzón M, Villatoro S, Teixidó C, et al. KRAS mutations in the circulating free DNA (cfDNA) of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(5):511-516.
- [36] Dong ZY, Zhong WZ, Zhang XC, et al. Potential predictive value of TP53 and KRAS mutation status for response to PD-1 blockade

- immunotherapy in lung adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12):3012-3024.
- [37] Nygaard AD, Garm Spindler KL, Pallisgaard N, et al. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(3):312-317.
- [38] Dowler Nygaard A, Spindler KL, Pallisgaard N, et al. Levels of cell-free DNA and plasma KRAS during treatment of advanced NSCLC [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(2):969-974.
- [39] Ai B, Liu H, Huang Y, et al. Circulating cell-free DNA as a prognostic and predictive biomarker in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):44583-44595.
- [40] Childress MA, Himmelberg SM, Chen H, et al. ALK fusion partners impact response to ALK inhibition; differential effects on sensitivity, cellular phenotypes, and biochemical properties [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(11):1724-1736.
- [41] Golding B, Luu A, Jones R, et al. The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):52.
- [42] Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus Crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(9):829-838.
- [43] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer [J]. *Nature*, 2007, 448(7153):561-566.
- [44] Wang Y, Fian PW, Wang WY, et al. Noninvasive genotyping and monitoring of anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearranged non-small cell lung cancer by capture-based next-generation sequencing [J]. 2016, 7(40):65208-65217.
- [45] Cui S, Zhang W, Xiong L, et al. Use of capture-based next-generation sequencing to detect ALK fusion in plasma cell-free DNA of patients with non-small-cell lung cancer [J]. 2017, 8(2):2771-2780.
- [46] McCoach CE, Blakely CM, Banks KC, et al. Clinical utility of cell-free DNA for the detection of ALK fusions and genomic mechanisms of ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(12):2758-2770.
- [47] Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement; a retrospective analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(11):1004-1012.
- [48] Xing P, Wang S, Wang Q, et al. Efficacy of crizotinib for advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer patients with brain metastasis: A multicenter, retrospective study in China [J]. *Target Oncol*, 2019, 14(3):325-333.
- [49] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25):2380-2388.
- [50] Wu YL, Zhou C, Hu CP, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(2):213-222.
- [51] 饶明月, 文庆莲, 林盛, 等. EGFR 突变阳性的晚期非小细胞肺癌交替使用 EGFR-TKI 及放化疗的回顾性研究 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(1):30-37.
- [52] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(75):75ra26.
- [53] Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8):2240-2247.
- [54] Leary RJ, Kinde I, Diehl F, et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(20):20ra14.
- [55] Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(6):1698-1705.
- [56] Sorensen BS, Wu L, Wei W, et al. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib [J]. *Cancer*, 2014, 120(24):3896-3901.
- [57] Lovly CM, Iyengar P, Gainor JF. Managing resistance to EGFR- and ALK-targeted therapies [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2017, 37:607-618.
- [58] Jänne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(18):1689-1699.
- [59] Sequist LV, Rolfe L, Allen AR. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(6):578-579.
- [60] Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M [J]. *Nat Med*, 2015, 21(6):560-562.
- [61] Engelman JA, Zejnullahu K, Gale CM, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB 2 mutations that are resistant to gefitinib [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24):11924-11932.
- [62] Fan W, Tang Z, Yin L, et al. MET-independent lung cancer cells evading EGFR kinase inhibitors are therapeutically susceptible to BH3 mimetic agents [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13):4494-4505.
- [63] Morgillo F, Della Corte CM, Fasano M, et al. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer [J]. *ESMO Open*, 2016, 1(3):e000060.
- [64] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(S3):iii42-iii50.
- [65] 姚文秀, 李秀娟, 黄欢. EML4-ALK 融合基因重排对晚期非小细胞肺癌诊断及治疗价值 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2017, 30(5):390-395.
- [66] Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-

- rearranged lung cancer[J]. Cancer Discov, 2016, 6(10):1118-1133.
- [67] Shaw AT, Felip E, Bauer TM, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial [J]. Lancet Oncol, 2017, 18(12):1590-1599.
- [68] Waqar SN, Morgensztern D. Lorlatinib: a new-generation drug for ALK-positive NSCLC[J]. Lancet Oncol, 2018, 19(12):1555-1557.
- [69] Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, et al. Resensitization to crizotinib by the lorlatinib ALK resistance mutation L1198F[J]. N Engl J Med, 2016, 374(1):54-61.
- [70] Bordi P, Tiseo M, Rofi E, et al. Detection of ALK and KRAS mutations in circulating tumor DNA of patients with advanced ALK-positive NSCLC with disease progression during crizotinib treatment[J]. Clin Lung Cancer, 2017, 18(6):692-697.
- [71] Weiss GJ, Beck J, Braun DP, et al. Tumor cell-free DNA copy number instability predicts therapeutic response to immunotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(17):5074-5081.
- [72] Jensen TJ, Goodman AM, Kato S, et al. Genome-wide sequencing of cell-free DNA identifies copy-number alterations that can be used for monitoring response to immunotherapy in cancer patients[J]. Mol Cancer Ther, 2019, 18(2):448-458.
- [73] Passiglia F, Galvano A, Castiglia M, et al. Monitoring blood biomarkers to predict nivolumab effectiveness in NSCLC patients[J]. Ther Adv Med Oncol, 2019, 11:1758835919839928.



· 读者 · 作者 · 编者 ·

《肿瘤预防与治疗》2020 年征订启事

《肿瘤预防与治疗》是《中国科技论文统计源期刊》(即《中国科技核心期刊》), CN51 - 1703/R, ISSN1674 - 0904, 大 16 开, 月刊, 每月 25 日出版。

本刊主要报道国内外肿瘤防治研究领域的新成果、新进展。开设栏目有专家述评、国际交流、应用基础研究、临床研究、临床经验与技术交流、肿瘤流行病学、综述与讲座、短篇与个案报道等。所征稿件内容: 肿瘤流行病学、基础研究、肿瘤病理、临床研究、临床诊治经验、病例报告、国外研究动态等。

敬请读者及作者踊跃投稿, 欢迎订阅, 每期定价 15.00 元, 全年订价 180.00 元。需订阅者请到当地邮局订阅, 邮发代号 62 - 142, 错过订阅时间可直接向编辑部订阅, 款汇至成都市武侯区人民南路四段 55 号《肿瘤预防与治疗》编辑部。

邮编: 610041; 电话: 028 - 85420233

E - mail: zlyfyzl@163.com; 网址: www.zlyfyzl.cn

欢迎订阅, 欢迎使用网上投稿。

本刊编辑部