

循环肿瘤细胞的检测及其在肺癌诊疗中的应用

王晓楠,程民,胡世莲

(安徽医科大学附属省立医院、安徽省立医院老年医学科,安徽省老年医学研究所,肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室,安徽省循证医学中心,合肥 230001)

[摘要] 肺癌的高转移率和高复发率是导致肺癌患者病死率居高不下的主要原因。循环肿瘤细胞(CTCs)是存在于肿瘤患者外周血中的一类特殊细胞,可以作为肿瘤标志物用于监测肿瘤状态。CTCs 检测可应用于肿瘤患者早期诊断、疗效评价、预后评估以及个体化治疗等方面。该文阐述 CTCs 的生物学特性,同时比较不同 CTCs 检测技术的原理及优缺点,探讨 CTCs 在肺癌临床诊疗中的应用价值。随着科学研究的不断深入,CTCs 将为肺癌的诊断治疗提供新的方向。

[关键词] 肺肿瘤;肿瘤细胞,循环;分子诊断技术

中图分类号:R734.2 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2018.02.038

The circulating tumor cells and its advance in the of diagnosis and treatment of lung cancer Wang Xiaonan, Cheng Min, Hu Shilian (Department of Geriatrics, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

Corresponding author: Hu Shilian, Email: hushilian@126.com

[Abstract] The high mortality rate in patients with lung cancer is largely due to the high recurrence and metastasis rate. Circulating tumor cells, a special kind of peripheral blood cells, exist in peripheral blood of patients, and it can be used as a biomarker for monitoring tumor. Recently, we have seen dramatic advancement in exploring the role of CTCs in terms of diagnosis, treatment response, prognosis prediction and, finally, personalized medicine. The aims of this review are to understand the biological feature of CTCs and to compare methods of detecting CTCs that apply to the various types of solid tumor. Furthermore, we explore the clinical applications of CTCs, including diagnosis and treatment, in the context of lung cancer. With further research, CTCs will provide a new direction for the diagnosis and treatment of lung cancer.

[Key words] Lung neoplasms; Neoplastic cells, circulating; Molecular diagnostic techniques

在恶性肿瘤中,肺癌的发病率和病死率居于首位^[1]。据统计,肺癌初诊患者中约 40% 存在远处转移,根治性手术治疗后亦有 30% ~ 60% 的患者发生远处转移^[2]。目前肺癌的临床诊断与治疗技术已经达到了相当完备的水平,但肺癌的复发和转移仍是阻碍患者生存期提高的主要原因。近些年,新的检测手段和治疗方法使肺癌患者的预后得到改善,但仍难以达到早期确诊,早期治疗。肿瘤的转移和复发是一个多阶段、多步骤的复杂过程,其中肿瘤细胞进入外周血是肿瘤发生远处转移和复发的重要一步。循环肿瘤细胞(CTCs)来自原发灶或转移灶肿瘤脱落进入外周血液循环的肿瘤细胞^[3]。临床研究表明,CTCs 参与肿瘤血行转移过程,进入外周血

后绝大部分 CTCs 在短期内死亡,只有极少部分 CTCs 可以在血液中存活,它们具有高度活性、高度转移潜能、自我增殖能力,并且可以通过聚集形成微小癌栓,在适宜的条件下发展成微小转移灶。因此,在血液中检测到 CTCs 提示肿瘤形成或已经发生了扩散或远处转移^[4]。

早在 1896 年,澳大利亚学者 Ashworth 在一个转移性肿瘤患者的尸检报告中首次提出了循环肿瘤细胞的概念,他发现肿瘤患者的血液中存在肿瘤细胞,并定义为循环肿瘤细胞。这些细胞存在于外周血、淋巴、骨髓中,在一定的条件下增殖、浸润、转移^[5]。许多患者在术中并未发现淋巴结和远处转移,但不久之后肿瘤复发,可能与血液中或淋巴组织

基金项目:安徽省科技攻关项目(1501041142)

作者简介:王晓楠,硕士在读,Email:1006445947@qq.com

通信作者:胡世莲,主任医师,教授,博士生导师,Email:hushilian@126.com

中的微小转移灶有关。有研究表明 CTCs 可作为肿瘤标志物应用于临床诊断^[6]。通过检测外周血中 CTCs, 可以对肿瘤转移和复发进行早期诊断, 并采取积极的治疗措施, 有助于延长患者生存期、提高患者生存质量。

1 循环肿瘤细胞的生物学特性

1.1 CTCs 具有上皮间质转化(EMT)与间质上皮转换(MET)能力 EMT 是指上皮细胞转化具有间质细胞特性的过程, 而间质细胞具有如运动能力强、侵袭性高、抗凋亡能力等特性。当肿瘤细胞由原发灶转移至继发灶时, CTCs 经历了 EMT 转变, 导致细胞的侵袭性增强, 血管增多以及细胞存活能力增强^[7]。

EMT 参与肿瘤细胞浸润和转移可通过以下三种方式: 减弱细胞间的联系, 降解细胞基质以及修饰细胞骨架。上皮细胞之间及上皮细胞与细胞外基质之间分别通过整合蛋白和钙连接蛋白紧密相连, 然后再通过细胞角蛋白和胶原蛋白加强这种联系。当肿瘤发生浸润或转移时, 肿瘤细胞失去了正常上皮细胞间的相互作用, 表现出间质细胞的特征, 即 EMT, 肿瘤细胞更容易侵入血管内皮进入循环系统, 发生远处转移^[8]。在 EMT 过程中, 上皮细胞表达的上皮细胞粘附分子(EpCAM)、E-cadherin 和细胞角蛋白(CK)下调, 而表达间质细胞的标志物如波形蛋白和 N-神经钙黏素上调^[9]。通过 EMT, 参与细胞间的紧密连接和黏附的分子表达降低, 同时以波形蛋白为主的细胞骨架发生转化, 使细胞间黏附作用下降, 运动能力增加, 从而促使单个肿瘤细胞从肿瘤组织中脱落游走迁移至血管。此外, EMT 还可产生促进基质金属蛋白酶(MMP)^[10], 通过 MMP 的作用对细胞基质进行降解, 促进 CTCs 从肿瘤组织上皮表面释放, 便于 CTCs 渗透入血管^[11]。

CTCs 也可出现上皮细胞标志物和间质细胞标志物共表达, 提示 EMT 和 MET 间可以发生相互转化^[12], 作为与 EMT 相反的生理过程, MET 可增强细胞间的黏附性, 减弱细胞的运动能力从而增强细胞的定植能力, 还能促进细胞向上皮细胞转变, 因此 CTCs 在进行 EMT 的同时还可能发生 MET, MET 为 CTCs 的远处定植及建立转移提供便利条件。

1.2 CTCs 聚集形成循环肿瘤微栓 进入到外周血液中的 CTCs 具有不同细胞类型, 有上皮细胞表型、上皮细胞与间质细胞混合表型、间质细胞表型等^[13], 其中以间质细胞表型 CTCs 转移潜能最高。

也可根据存在形式分为单个细胞(CTC)及聚集成团的循环肿瘤微栓(CTM), 其中以 CTM 的转移潜能最强。

CTM 又称为循环肿瘤细胞集群(CTC clusters)。CTCs 通常以单个细胞游走于血液循环中, 侵入循环系统的 CTCs 受到血液物理作用的破坏以及机体自身免疫系统的吞噬杀伤作用, 极少数可以在血液中共存活, 通过相互聚集成 CTM 发挥抗吞噬作用, 从而提高存活能力^[14]。研究表明, CTM 肿瘤播散能力是 CTCs 的 50 倍以上, 这可能与 CTM 具有抗凋亡能力, CTM 中异质性细胞的相互作用, 以及免疫耐受等作用有关^[15]。

CTM 是由一些 CTC 和非肿瘤细胞(辅助细胞)构成, 其中辅助细胞包括上皮细胞, 间质细胞, 免疫细胞, 血小板和一些纤维母细胞等。辅助细胞可以为肿瘤细胞生存提供支持, 如纤维母细胞等, 可以增加 CTCs 集群的稳定性, 便于形成转移灶, 当去除 CTM 中部分纤维母细胞后, CTCs 转移播散能力明显下降^[16]。与单个 CTCs 相比, 尽管 CTM 含量更少, 但是 CTM 是肿瘤细胞的“集体迁移”结果, 其抗凋亡能力更高、增殖能力更强以及具有逃避免疫杀伤能力从而具备更高的转移潜能^[17]。有研究显示: CTM 的转移能力和耐药性远远大于单个 CTC^[18]。

1.3 CTCs 具有肿瘤干细胞(CSC)特性 肿瘤干细胞理论是在干细胞理论假说的基础上提出来的。根据肿瘤干细胞理论: 肿瘤细胞来源于基因突变的干细胞, 具有无限分化增殖能力, 并且能侵入到其他组织并扩散到全身各处^[19-21]。

CSC 是一类具干细胞特性的肿瘤细胞, 可以长期存活, 同时具有很强的运动和迁移能力。CTCs 存在于肿瘤患者血液循环中, 可能是作为 CSC 的一种特殊类型, 具有一定的干细胞特性, 在肿瘤发生和转移过程中起重要作用^[22]。但并不是所有的 CTCs 都能发生转移, 只有极少部分类似于干细胞特性的 CTCs 才能存活并转移到远处形成继发病灶, 这些细胞称为循环肿瘤干细胞, 具有自我更新、增殖的潜能, 导致肿瘤发生和转移。

2 CTCs 的检测技术

Steinert 等^[23]研究发现, 肿瘤病人每天每克原发灶或转移灶约有 10^6 个 CTCs 脱落进入外周血液中, 而 90% 的 CTCs 通过血液物理作用、免疫损伤和凋亡而失去活力。CTCs 在血液中含量极少, CTCs 与正常血细胞的比值为 $(1/10^7) \sim (1/10^8)$ ^[24], 因此

难以用常规的方法提取足够量的 CTCs,这限制了 CTCs 在临床中的应用。

CTCs 检测分为富集及鉴定两个步骤。富集是指利用细胞形态学或免疫学方法分选出肿瘤细胞。一种方法是利用血细胞与肿瘤细胞之间的形态学差异来分离 CTCs,优点是细胞结构不被破坏,分离后的肿瘤细胞可接着进行免疫组织化学等方面的研究,此方法缺点是特异性较差,易出现假阳性,较少用;还有一种方法是采用免疫学方法进行分离:大部分来源于上皮的肿瘤细胞都表达上皮细胞黏附分子(EpCAM)以及细胞角蛋白(CK)等抗原,而血液来源于骨髓的细胞则表达 CD45 等分子^[25]。利用磁珠特异性结合抗原分选的方法,可从外周血中将 CTCs 分离富集出来。鉴定是指利用肿瘤表面或细胞核内特异性标志物对肿瘤细胞进行计数和特征分析。目前 CTCs 的鉴定有三种方法:一是于核酸检测技术,即反转录 PCR(RT-PCR);二是荧光显微技术;三是细胞免疫标记技术。核酸检测技术是通过聚合酶链式反应扩增出肿瘤细胞相关的特异性标志物来证实肿瘤细胞的存在,该方法敏感度及特异度均较高,但是不足之处是假阳性率高,取血时容易受到上皮细胞的污染^[26]。荧光显微技术是指抗体经过荧光标记处理与特异性抗原结合,在显微荧光镜下可以直接观察细胞形态。细胞免疫标记采用抗原抗体结合的方法鉴定 CTCs,利用肿瘤细胞表达的一些特异性分子抗原,相比核酸检测技术,细胞免疫标记是基于细胞内部特异性抗原的表达,敏感性低于 RT-PCR。

因此为了提高敏感度和特异性,更加准确地分离并检测分析 CTCs,集富集、检测和分析于一体的综合系统逐渐应用于临床,如 CellSearch 系统、CTCs 芯片(CTCs-chip)。Cellsearch™ 系统已通过美国食品和药物监督管理局(FDA)认证,可从 7.5 mL 的外周血中检测到单一的肿瘤细胞^[27]。此系统采用 EpCAM 抗体磁珠进行富集后,在外加强力磁场的作用下从血液中提取 CTCs,并对分离出来的 CTCs 进行通透、固定,然后用 DAPI 荧光核染料、CD45 荧光抗体和 CK8/CK18/CK19 荧光抗体标记细胞,最后采用半自动四色荧光显微镜 Cell-Spotter Analyzer 检测分析筛选出 CK8⁺/18⁺/19⁺、DAPI⁺、CD45⁻的细胞为 CTCs。该方法可从 400 多亿个血细胞中检测到稀少的 CTCs,目前已应用于肺癌、乳腺癌、前列腺癌等外周血的 CTCs 检测,敏感性和特异性较高,但

是检测费昂贵,尚不能大规模推广。

3 CTCs 在肺癌诊疗中的研究进展

3.1 肺癌的早期诊断 近些年,在影像学检查不能明确的情况下,肿瘤标志物对疾病严重程度的诊断评估起到重要作用,如 PSA、AFP 和 CEA。然而仍有许多恶性肿瘤不具有可靠的蛋白质生物标志物,缺乏肿瘤诊断特异性标志物,加上目前技术的限制,导致其敏感性和特异性不高。此外,许多蛋白质生物标志物在血液循环中持续存在数周,因此需数周或数月后才能得到准确评估^[28]。外周血中 CTCs 的含量水平与肿瘤分化程度和肿瘤大小密切相关,水平越高,患者预后相对越差。在肺癌形成和转移的早期,如果在外周循环中检测到脱落的 CTCs,可以达到早发现,早诊断,并针对性治疗。CTCs 检测相对于病理活检达到了相对无创,被称为“液态活检”。Tanaka 等^[29]利用 CellSearch 系统比较 125 例肺癌和 25 例良性肿瘤的 CTCs 阳性率,发现肺癌(30.6%)的阳性率明显高于良性肿瘤的阳性率(12%),同时发现晚期以及发生肺癌转移患者的 CTCs 含量明显增高。接着研究人员通过检测患者外周血 CTCs 的数量来鉴别原发肺肿瘤和肺部良性疾病,采用受试者工作特征(ROC)曲线将癌胚抗原(CEA)和 CTCs 的诊断价值进行比较,研究结果显示:在鉴别肺癌和肺良性疾病方面,CTCs 的诊断价值尚不如 CEA(CTCs 检测 ROC 曲线面积为 0.598、CEA 检测 ROC 曲线面积为 0.747),但是 CTCs 在预测远处转移方面有一定优势,其特异度和阳性预测值分别为 83.0%、89.7%,可见 CTCs 预测价值高于 CEA。因此,监测 CTCs 特异性的改变可作为检测早期肺癌和有效治疗后残留灶复发的指标,有利于治疗决策^[30]。

3.2 病情监测指导个体化治疗 目前对肺癌患者病情监测的主要手段有影像学检查,肿瘤标志物等血清学检查以及临床表现,然而目前的手段难以实时监测肿瘤的变化。相比穿刺或者手术获取肿瘤标本,CTCs 的检测具有实时性、相对无创性。可通过 CTCs 对肺癌患者病情进行监测并且指导治疗方案的制定及更换,甚至对手术效果以及化疗进行评价。在 NSCLC(非小细胞肺癌)中,原发灶标本检测 EGFR 呈阴性,在病情恶化后,有些患者外周血 CTCs 可以检测到 EGFR 发生突变,而使用靶向药物吉非替尼治疗后,可以有效延长患者生存期,提高生活质量^[31]。Carter 等^[32]研究显示,外周血 CTCs 的检测

可以预测小细胞肺癌 (SCLC) 患者对治疗的应答情况。研究人员在对 31 名小细胞肺癌患者的血液分离 CTCs 进行研究发现, 在外周血检测到 CTCs 的基因改变与患者的化疗耐药有关, 对外周血 CTCs 的检测可以作为化疗前预测小细胞肺癌患者对化疗药物是否敏感的生物标志物。因此, 实时监测 CTCs 的数目和分子特性可以有效反映患者病情变化, 及时调整治疗方案, 达到个体化治疗。

3.3 疗效评估和预后判断 肿瘤的组织学类型、TNM 分期、以及临床特征目前是对肿瘤患者进行预后判断的主要依据, 然而 CTCs 的含量水平与肿瘤生存期具有明显相关性, 可以利用 CTCs 这一优势对肺癌等肿瘤患者进行预后评估。Hofman 等^[33]进行的一项大样本前瞻性研究显示, 术前检测 CTCs 数目可用来预测行根治性肺癌手术切除的 I ~ II 期 NSCLC 患者的无疾病进展期 (DFS) 与总体生存时间 (OS), 对于术前 CTCs > 50 个的患者其无疾病进展期 (DFS) 要更短一些, 具有更高的复发风险。Muinelo-Romay 等^[34]纳入 43 例 NSCLC 患者研究发现治疗前、化疗 2 周后、化疗 5 周后的 CTCs 水平进行检测, 发现治疗前 CTCs 计数为 $(18.9 \pm 14.8) / 7.5 \text{ mL}$, 化疗后明显降低, 分别为 $(0.87 \pm 0.22) / 7.5 \text{ mL}$ 、 $(0.77 \pm 0.42) / 7.5 \text{ mL}$ 。此外, 治疗前 CTCs $\geq 5 / 7.5 \text{ mL}$ 的患者较 CTCs $< 5 / 7.5 \text{ mL}$ 患者无进展生存期 (PFS) (4.1 个月, 95% CI 2.2 ~ 6; 7.6 个月, 95% CI 5.7 ~ 9.5) 及总生存率 (OS) 更短 (4.6 个月, 95% CI 2.5 ~ 6.8; 10.7 个月, 95% CI 8.6 ~ 12.8)。因此, 通过监测肺癌患者外周血 CTCs 含量水平变化对病情疗效判断以及预后评估。

4 总结

CTCs 通过肿瘤原发灶中脱落经历 EMT 过程进入脉管系统, 通过血管进入循环系统, 克服循环系统中物理作用和免疫杀伤作用形成新的微小转移灶并转移到远处器官的微血管, 再从血液中渗出, 经过 MET 转变, 在新的组织环境中存活, 扩散最终形成远处转移灶。EMT-MET 理论解释肿瘤转移和复发的过程, EMT 及其相关分子参与到 CTCs 的许多生理步骤, 深入研究 CTCs 以及 CTM 生理过程及其机制对于寻找新治疗靶点, 优化临床治疗方案, 预后评估等方面均有重要意义。

肿瘤防治的关键是“三早”, 即早发现、早诊断、早治疗。早期治疗不仅可以节约医疗费用, 减少病人创伤, 延长病人寿命, 提高生活质量。因此, 探寻

可以早期诊断并能预测转移、复发的检测方法对于提高肿瘤患者生存率、改善预后至关重要。CTCs 的浓度能实时、动态反映疾病的进程, 可用于肺癌的早期诊断、病情监测、评估预后。CTCs 的检测易获取、可重复、相对无创, 被称为“液体活检”。通过对外周血液中 CTCs 数量及类型检测, 监测肿瘤动态进展, 进行疗效评估, 甚至可以对 CTCs 进行基因检测, 指导肺癌个体化治疗。虽然 CTCs 检测具有很好的临床应用前景, 但目前仍存在问题: 虽已证实检测出 CTCs 与肿瘤预后具有一定的相关性, 但是检测出 CTCs 并不代表肿瘤一定会复发或转移, 因此需要寻找高转移潜能的 CTCs 亚群; 研发出更高敏感性和特异性的检测技术仍是应用于临床的关键; 采用简便、价格低廉的方法, 将有助于 CTCs 的检测尽快进入临床。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] TSUBOI M, OHIRA T, SAJI H, et al. The present status of postoperative adjuvant chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 13(2): 73-77.
- [3] MAVROUDIS D. Circulating cancer cells[J]. ESMO, 2010, 21 Suppl 7: VII95-VII100.
- [4] JOOSSE SA, GORGES TM, PANTEL K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells[J]. EMBO Mol Med, 2014, 7(1): 1-11.
- [5] ALAMA A, TRUINI A, COCO S, et al. Prognostic and predictive relevance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(10): 1671-1676.
- [6] 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.
- [7] SUN YF, YANG XR, ZHOU J, et al. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(8): 1151-1173.
- [8] BARRIERE G, TARTARY M, RIGAUD M. Epithelial mesenchymal transition: a new insight into the detection of circulating tumor cells[J]. ISRN Oncol, 2012: 382010.
- [9] MULLER V, ALIX-PANABIERES C, PANTEL K. Insights into minimal residual disease in cancer patients: implications for anti-cancer therapies[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(7): 1189-1197.

- [10] RADISKY ES, RADISKY DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 201-212.
- [11] FANTOZZI A, GRUBER DC, PISARSKY L, et al. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation[J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1566-1575.
- [12] NIETO MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells[J]. Science, 2013, 342(6159): 1234850.
- [13] CHO YY, SUH S, JOUNG JY, et al. Clinical characteristics and follow-up of Korean patients with adrenal incidentalomas[J]. Korean J Intern Med, 2013, 28(5): 557-564.
- [14] WILLIAMS SC. Circulating tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(13): 4861.
- [15] ACETO N, BARDIA A, MIYAMOTO DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis[J]. Cell, 2014, 158(5): 1110-1122.
- [16] HONG Y, FANG F, ZHANG Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review) [J]. Int J Oncol, 2016, 49(6): 2206-2216.
- [17] MASCALCHI M, FALCHINI M, MADDAU C, et al. Prevalence and number of circulating tumour cells and microemboli at diagnosis of advanced NSCLC[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(1): 195-200.
- [18] YU M, BARDIA A, WITTNER BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. Science, 2013, 339(6119): 580-584.
- [19] DESHMUKH A, DESHPANDE K, ARFUSO F, et al. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 69.
- [20] VERMEULEN L, SPRICK MR, KEMPER K, et al. Cancer stem cells-old concepts, new insights[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(6): 947-958.
- [21] FABIAN A, VEREB G, SZOLLOSI J. The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy[J]. Cytometry A, 2013, 83(1): 62-71.
- [22] TINHOFFER I, SAKI M, NIEHR F, et al. Cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells[J]. Int J Radiat Biol, 2014, 90(8): 622-627.
- [23] STEINERT G, SCHOLCH S, KOCH M, et al. Biology and significance of circulating and disseminated tumour cells in colorectal cancer[J]. Langenbecks Arch Surg, 2012, 397(4): 535-542.
- [24] HONG B, ZU Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends[J]. Theranostics, 2013, 3(6): 377-394.
- [25] ZHANG J, CHEN K, FAN ZH. Circulating tumor cell isolation and Analysis[J]. Adv Clin Chem, 2016, 75(1): 1-31.
- [26] YIE SM, LOU B, YE SR, et al. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(11): 3073-3082.
- [27] ANDREE KC, VAN DALUM G, TERSTAPPEN LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system [J]. Mol Oncol, 2016, 10(3): 395-407.
- [28] FORSHEW T, MURTAZA M, PARKINSON C, et al. Non-invasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(136): 13668.
- [29] TANAKA F, YONEDA K, KONDO N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22): 6980-6986.
- [30] TOGNELA A, SPRING KJ, BECKER T, et al. Predictive and prognostic value of circulating tumor cell detection in lung cancer: a clinician's perspective[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2015, 93(2): 90-102.
- [31] 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.
- [32] CARTER L, ROTHWELL DG, MESQUITA B, et al. Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer[J]. Nat Med, 2017, 23(1): 114-119.
- [33] HOFMAN V, ILIE MI, LONG E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the Cell Search Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method[J]. Int J Cancer, 2011, 129(7): 1651-1660.
- [34] MUINELO-ROMAY L, VIEITO M, ABALO A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced NSCLC patients receiving first-line systemic treatment [J]. Cancers, 2014, 6(1): 153-165.