

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.021

· 综述 ·

结直肠癌循环肿瘤细胞及 DNA 的研究进展

Research progress of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in colorectal cancer

吴康 综述; 邓安梅, 颜宏利 审阅(第二军医大学附属长海医院 实验诊断科, 上海 200433)

[摘要] 结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 尽管联合应用手术、化疗、放疗可提高患者的生存率, 但仍有大量患者因术后转移和复发死亡。循环肿瘤细胞及循环肿瘤 DNA 对结直肠癌的早期诊断、疗效监测、预后评估以及个体化治疗方案制定均有重要意义, 已成为近年来研究的热点。本文对近年来结直肠癌循环肿瘤细胞及循环肿瘤 DNA 的检测技术及其在早期诊断、疗效监测和预后判断中的应用进展作一综述。

[关键词] 结直肠癌; 循环肿瘤细胞; 循环肿瘤 DNA

[中图分类号] R735.2; R730.4; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)03-0393-06

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在我国发病率仅次于肺癌和乳腺癌, 是排名第三的恶性肿瘤^[1]。因其低至 11% 的早期诊断率和高达 20% ~ 45% 的术后复发或远处转移率, 病死率居我国肿瘤死亡的第四位^[2]。然而目前影像学、肿瘤标志物和病理学在预测复发和转移方面并不尽如人意, 影像学检查昂贵费时且发现时较晚, 肿瘤标志物则具有滞后性且灵敏度和特异性都较低, 而病理学侵入性取样受病灶位置所限。因此, 结直肠癌研究的一个重要目标就是找到可以方便准确预测复发和转移的生物标记物。随着对 CRC 研究的不断深入, 人们发现在 CRC 原发肿瘤发生发展中, 可以在外周血中出现循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)和循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)。CTCs 是一种可通过外周血检测的从实体瘤脱落入血液循环可引起肿瘤转移的具有肿瘤特异性抗原或基因特征的肿瘤细胞^[3]。ctDNA 是一种无细胞状态的胞外 DNA, 属于游离 DNA 的一部分, 由单链 DNA 或双链 DNA 以及单双链 DNA 混合组成, 以 DNA 蛋白质复合物或游离 DNA 两种形式存在; 主要来源于肿瘤细胞的坏死或凋亡、微转移灶或 CTCs 的裂解和增殖旺盛肿瘤细胞的释放^[4]。CTCs 可以辅助早期诊断及良恶性判断、指导分期及分子分型、筛选药物及监测疗效、提示微转移及预后等, 且非侵入性, 可以多次便捷取样实现实时监测, 被称为“液体活检”^[5]。ctDNA 可为肿瘤的早期诊断、疗效评估、复发监测及预后判断提供重要的信息, 被认为是一个潜在的肿瘤早期诊断和预后判断手段^[6]。本文将介绍结直肠癌 CTCs 及 ctDNA 的检测技术和应用进展。

1 CTCs 和 ctDNA 的检测

结直肠癌 CTCs 具有非常强的异质性, 可以根据其物理和生物学性质采用不同技术在 DNA、RNA(mRNA or microRNA) 和蛋白水平进行富集和鉴定, 常用标志有 CK8、CK18、CK19、CK20、EPCAM、hTERT、CEA、CA199 等。近来还出现了越来越多针对基因、CD 及 mRNA 的新标志。循环肿瘤干细胞(circulating tumor stem cells, CTSCs)和表皮间叶转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)等新理论有望提高结直肠癌 CTCs 检测的敏感性和特异性^[7]。

1.1 CTCs 的富集与检测

1.1.1 CTCs 的富集 血液中的 CTCs 非常稀少, 每 10 ml 血液中可能仅含有几个到几十个循环肿瘤细胞, 所以 CTCs 检测的关键和挑战是如何从血液细胞的海洋中“大海捞针”对 CTCs 进行富集。目前主要的富集方法有: (1) 基于物理特性法, 如密度梯度离心^[8], 膜滤过分离法^[9]; (2) 免疫磁珠法: 此方法提高了检测灵敏度和外周血样本中 CTCs 浓度, 是目前富集率和特异性相对最高的^[10]; (3) 微流控芯片法: 微流控芯片具有快速、高效、高灵敏度等诸多

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81472770, 81272280)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81472770, 81272280)

[作者简介] 吴康(1984-), 男, 湖南省醴陵市人, 硕士生, 主要从事临床检验方面的研究工作, E-mail: 759051596@qq.com

[通信作者] 颜宏利(Yan Hongli, corresponding author), E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn

优点,为 CTCs 检测技术的发展提供了新的方法和思路。Chen 等^[11]研发了一种微流控捕获芯片 (CTC-Chip),当血液流经包被 EPCAM 抗体显微位点的 CTC-Chip 时,CTCs 被捕获。Sun 等^[12]发明了一个更先进的双螺旋微通道芯片,可以快速分离富集和计数 CTCs。

1.1.2 CTCs 的鉴定 (1)传统检测方法:早期 CTCs 的检测主要是检测肿瘤细胞异常的基因突变、表达或修饰,如 DNA 甲基化、微卫星改变等,也可以利用免疫组化检测 CTCs 表面的特定蛋白——角蛋白(cytokeratin,CK),或者利用荧光原位杂交技术检测染色体数目或畸变(如 8 号染色体扩增)。另外,Fusi 等^[13]采用 FCM 探讨了实体瘤 CTCs 中趋化因子受体的表达,发现 CTCs 的检测效率大大提高。常用 CTCs 检测技术的原理及优缺点见表 1。(2)CTCs 检测新技术:目前实际应用中常常需要把富集和鉴定方法有效结合,如经美国 FDA 批准的 Cell Search 系统,该系统结合上皮细胞黏附分子(epithe-

lial cell adhesion molecule,EPCAM)抗体的阳性选择和 CD45 抗体的阴性选择,定义 CK⁺、DAPI⁺ 和 CD45⁻且符合肿瘤细胞形态的细胞为 CTCs。该系统速度快、重复性好,但只能检测出 EPCAM 抗体阳性的 CTCs,且此方法可能由于检测之前标本耽搁而存在假阳性^[14]。此外,在酶联免疫斑点法的基础上设计的 EPI-SPOT 技术不仅可以检测 CTCs 的活性,还能检测到肿瘤转移过程中细胞表达分泌的重要蛋白,对于验证 CTCs 与肿瘤转移复发的关系具有重要意义^[15]。Xu 等^[16]结合微流控装置和端粒酶技术能捕获和鉴定有活性的 CTCs,具有快速、简便且准确定量的优势,有望成为一种新的 CTCs 定量检测和表征方法。Hughes 等^[17]设计的检测 CTCs 的微量流动装置是利用 E-选择素和针对上皮细胞的抗体分子,该装置 CTCs 捕获率高于 Cell Search 系统。Heitzer 等^[18]通过全息阵列和下一代测序技术检测 CTCs 来推断复杂的肿瘤基因组,取得良好效果。

表 1 常用 CTCs 检测技术的原理及优缺点

技 术	基本原理	优 点	缺 点
分离富集			
密度梯度离心法	细胞密度更小	简单易行	敏感性及特异性较低
膜滤过法	细胞体积更大	简单易行	敏感性及纯度较低
免疫磁珠法	抗原抗体反应 + 磁场作用	可直接观察 CTCs	主观性较强,有假性结果
生物芯片法	分子生物学基因探针	可光学确认 CTCs	主观性强,有假性结果
鉴定分析			
核酸技术	检测异常基因状况	敏感性高,客观	特异性差,无法分析形态
免疫 FISH 技术	标记免疫 + 染色体分析	简便直观,特异性高	主观性较强
流式细胞技术	标记免疫 + 单细胞多参数分析	多参数定量测定	昂贵耗时,特异性欠佳
激光扫描细胞技术	流式技术 + 细胞图像仪	不必富集 CTCs	主观性强

1.2 ctDNA 的提取和检测

细胞循环肿瘤 DNA(cell circulating tumor DNA, ctDNA)是指凋亡或坏死的细胞进入血管中所释放的肿瘤 DNA 片段,主要存在于细胞外的血浆中,呈游离状态。肿瘤患者的血浆游离 DNA 的来源机制尚无定论,普遍认为存在两种模式:(1)肿瘤组织的细胞坏死、凋亡,释放 DNA 进入血液循环;(2)增殖活跃的肿瘤细胞分离进入血液后被溶解,持续释放 DNA^[19]。ctDNA 在含量和质量上均可反映肿瘤存在的特征性变化,为肿瘤的诊断提供很好的检测靶

标,其检测在方法学方面具有采样容易、操作安全、可同时检测多个基因改变、可连续检查以及费用较低等很多优点^[20]。

ctDNA 随肿瘤发生发展而升高,因肿瘤得到控制而降低,因此,检测肿瘤患者 ctDNA 含量是一个可用于疾病早期诊断、疗效评价及预后监测的有效指标^[21]。其方法主要有放射免疫法、荧光染料法 (SYBR Green 1、PicoGreen、Hoechst 等)、核酸凝胶染色法、荧光定量 PCR、斑点杂交法及分支 DNA (bDNA)法等^[22]。

ctDNA 主要来源于凋亡和坏死的肿瘤细胞,其遗传学和表观遗传学异常改变如基因突变、微卫星改变(微卫星不稳定性及微卫星杂合性缺失)及 DNA 甲基化异常等与原发肿瘤组织相同可对其进行直接分析:如丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(BRAF)、腺苷酰磷酸胞苷(APC)、癌基因 *erB-2*、表皮生长因子受体(EGFR)和原癌基因 *Myc* 等基因的变异。这些突变基因也被用作肿瘤疗效监测和预后评估的指标^[21]。ctDNA 中也有微卫星改变,许多研究探讨了微卫星改变作为生物标志预测疾病预后的潜能。微卫星改变也用作监测治疗反应的指标和治疗后随访指标,在患者分类和监测肿瘤复发研究中已体现出潜在价值^[23]。检测方法主要有毛细管电泳和荧光标记多重 PCR 等。除此之外,DNA 甲基化异常可使一些编码细胞生长调控和凋亡的基因发生改变多种基因,如 APC、死亡相关蛋白激酶基因(DAPK)、谷胱甘肽转移酶 P1(GSTP1)、甲基鸟嘌呤一甲基转移酶(MGMT)、P16、Ras 相关区域家族 1A(RASSF1A)和视黄酸受体 G2(RAR α)已在不同肿瘤的 ctDNA 分析中被鉴定为甲基化标志物^[21]。异常 DNA 甲基化常发生在特定的 CpG 岛,可以通过甲基化特异性 PCR(MSP)法或 DNA 测序检测。

外周血中的 ctDNA 含量通常较低,提取和纯化的方法也千差万别,使用不同的方法将会得到不同的数量和类型,这种不稳定性可能遗漏一些重要的 ctDNA,影响检测准确性。近年来有相对较高特异性及敏感性的实时荧光定量 PCR 被越来越多的用于 ctDNA 的研究中。Newman 等^[24]开发了一种高灵敏度和高特异性的 ctDNA 定量检测方法(cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-Seq)。目前多采用第三代 PCR 即微滴式数字 PCR 和新一代测序检测 ctDNA^[25-26]。

2 CTCs 和 ctDNA 在 CRC 早期诊断中的应用

结直肠癌起病隐匿,80% 以上的患者发现时已经处于中晚期。有数据表明,Duke A 期的患者 5 年生存率达 95%,Duke B 期的患者 5 年生存率为 75% 左右,但 Duke C 期或 D 期的 5 年生存率只有 30%~40%,因此,CRC 的早期诊断具有非常重要的价值。Sastre 等^[27]发现 60% 的 Duke B 期患者能检测到 CTCs 的存在,而 85% 的 Duke C 期或 D 期 CRC 能够检测到 1~5 个 CTCs/7.5 ml 血,远比目前常用的大便隐血实验和肿瘤标志物检查灵敏度和特异性高,提示 CTCs 检测对 CRC 早期诊断具有潜在的应用价值。Bettegowda 等^[28]利用数字 PCR 的方

法检测了 640 例肿瘤的 ctDNA 和 CTCs,发现在 75% 的肿瘤中能够检测到肿瘤特异性的 ctDNA,但 CTCs 的检出率低于 50%。通过对 CTCs 和 ctDNA 的灵敏度和特异性的比较,认为 ctDNA 比 CTCs 具有更大的诊断价值。随着高敏感度 PCR 方法的发展,通过检测 CTCs 基因突变和表观遗传变异如 DNA 甲基化将成为检测 CRC 的下一代方法^[29]。但是,也应该看到,CTCs 具有较高的异质性,早期结直肠癌和中晚期结直肠癌检出的 CTCs 在恶性程度、转移潜能等方面具有较大差异,因此单纯检测 CTCs 数量尚不足以反映患者肿瘤的恶性程度;另外,由于正常细胞也会释放游离 DNA,尤其是在慢性炎症患者同样会释放大量的游离 DNA 进入血液,导致 ctDNA 的量在不同 CRC 患者间差异较大(最高和最低相差 50 倍),因此,CTCs 和 ctDNA 在 CRC 早期诊断中的价值尚需要进一步的深入研究和大规模样本的数据支持^[30]。

3 CTCs 和 ctDNA 在 CRC 疗效评估中的应用

手术治疗和化疗是 CRC 患者的主要治疗手段,评估其疗效也相当重要,而这正是 CTCs 和 ctDNA 的一个突出应用。通过研究 CTCs 治疗靶标的突变或靶标下游蛋白质的突变可以评估针对这些靶标药物的功效。在 CRC 治疗中,一种 EGFR 下游蛋白质 K-Ras 的突变可以阻断针对 EGFR 的药物的功效^[31]。最近针对从 CRC 患者中获得的数以百计的 CTCs 的两个单独的单细胞分析揭示了在患者内在和患者之间存在高的 K-Ras 突变的异质性^[32-33]。因此早期检测 CTCs 的 K-Ras 基因突变可能会有助于指导个体化治疗。Yakabe 等^[34]研究表明,以 CA199 为标志的 CTCs 检测已成为 IV 期 CRC 患者围手术期独立的预后因素。Tol 等^[35]评估 372 个 CRC 患者 CTCs 对联合化疗的反应,结果发现高 CTCs 组化疗开始时 29% 的反应率,经 2 周化疗后降为 11%,而低 CTCs 组的基本不变,且这一结果与影像学检测结果相符。Matsusaka 等^[36]分析 64 名患者以奥沙利铂为主的化疗表明,CTCs < 3 的患者的无进展生存时间(progression-free survival, PFS)及总生存时间(overall survival, OS)明显长于 CTCs > 3 的患者。Iinuma 等^[37]分析 735 名(CEA、CK、CD133)mRNA 检测阳性患者发现,PFS 明显短于检测阴性的患者。研究同时表明循环(CEA、CK、CD133)mRNA 检测阳性的患者 Dukes C 期普遍出现化疗抗拒。因此,CTCs 检测可视作疗效评估的指标之一,且外周血中 CTCs 数目及分子特性可实时

监测疗效,更好的为临床医生及时调整治疗方案提供帮助,从而达到个体化治疗目的。多项研究也证实了 ctDNA 在疗效监测方面作用显著。治疗过程中,动态监测 ctDNA 变化,一方面可以监测肿瘤负荷;另一方面可以监测获得性耐药,能够更早更准确预测疗效和患者的总体生存状况。对于晚期或非手术患者难以获得足够组织样本、无法实时监测而制约了靶向治疗药物使用的现状,ctDNA 可使实时监测肿瘤基因表达或突变成为可能。Pu 等^[38]研究了 CRC 患者在无肿瘤组织检测条件下,可以采用多肽核酸钳制 PCR(PNAPCR)法检测 ctDNA 中 K-Ras 基因的状态以指导靶向药物治疗。Misale 等^[39]发现在给予肿瘤组织 K-Ras 野生型的 mCRC 患者靶向 EGFR 的治疗药物,部分耐药患者的 ctDNA 中检出 K-Ras 的突变。出现以上结果的可能解释为:药物的选择性筛选作用,即在原发肿瘤组织中存在极低频的 PIK3CA 或 K-Ras 突变,靶向药物治疗过程中选择性地杀死了敏感肿瘤细胞,而残存了含有 PIK3CA 或 K-Ras 突变的肿瘤细胞并生长,进而在血液中被检出;获得性突变,即在靶向药物治疗过程中,肿瘤细胞为了适应或抵抗药物所致的生存环境的恶劣变化,获得新的突变。这些解释在其他研究工作中得到了证实^[40-41]。因此,ctDNA 检测以一种新型的“液体活检”方式,弥补了现有临床诊断方法的不足,并且提供了从肿瘤细胞水平到分子水平的分析平台,为个体化治疗提供了参考。在不久的将来 ctDNA 可能取代 CTCs 用于肿瘤治疗进展的监测^[42]。

4 CTCs 和 ctDNA 在 CRC 预后判断中的应用

CTCs 和 ctDNA 相比 PET-CT 及血清肿瘤标志物等方法能更便捷准确的预测患者的复发和转移。CTCs 作为独立的预后因素,不只反映了肿瘤负荷,同时还可反映出肿瘤的生物学特性,包括肿瘤的血供情况和侵袭性,这在肿瘤的预后方面有着显著的作用。Aggarwal 等^[43]研究发现 CTCs 数目与患者的 CEA 水平和 OS 密切相关,且患者预后随着 CTCs 数目越多而越差,CTCs 数目可独立或者与 CEA 共同为 mCRC 患者提供预后信息。Wong 等^[44]研究发现 CK20 阳性或 CDX2 阳性的 CTCs 能够准确预测肿瘤的复发及转移,并明显影响 OS。Yokobori 等^[45]发现以 Platin3 为新型标志的 CTCs 对 mCRC 患者具有显著的预后价值。Albuquerque 等^[46]用 RTqPCR 分析 CTCs 的肿瘤相关基因 KRT19、MUC1、EPCAM、EACAM5 和 BIRC5D 的分子特性,从而指导 CRC 患

者的预后及个体化治疗。Barbazan 等^[47]用 qRT-PCR 方法分析 CTCs 的基因表达发现其与 CRC 患者的转移有关,其与临床表现的高度相关表明其在诊断及预后中有重要作用。Rahbari 等^[48]对 36 个研究进行 Meta 分析表明 CRC 患者的 PFS 和 OS 可通过外周血中 CTCs 进行独立预测。Dolores 等^[49]使用 CRC 患者的血浆培养肿瘤易感细胞,得到与 ctDNA 一致的突变型基因的细胞,将含有该基因突变型的细胞植入小鼠体内,一段时间后小鼠体内形成了肿瘤。这一实验有力证实了 ctDNA 与肿瘤的转移有密切的联系。Diehl 等^[50]监测 CRC 患者血浆肿瘤特异性基因突变(APC, P53 和 K-Ras)可以识别肿瘤复发,敏感性和特异性几乎为 100%,证实 ctDNA 可以实时评估肿瘤动态并准确判断肿瘤预后。Frattini 等^[51]研究表明,ctDNA 定量、定性及定点的联合检测将提高肿瘤的临床诊断率。研究观察了 CRC 患者手术前后的 ctDNA 水平和 ctDNA 中 K-Ras 和 P16 的变化。发现 K-Ras 的突变和 P16 基因的甲基化只见于肿瘤患者,术后 ctDNA 水平逐渐下降,当肿瘤复发时快速升高。McBride 等^[52]研究证实,ctDNA 是一个很好的肿瘤负荷实时监控指标。肿瘤患者 ctDNA 水平和基因改变的检测是识别肿瘤复发或进展及更加科学可靠实行肿瘤负荷实时监控的有效手段。

5 CTCs 和 ctDNA 在 CRC 中应用的前景

CTCs 和 ctDNA 都是 CRC 很好的生物标志物,各有特点,CTCs 量少但其生物特性分析能提供深入的肿瘤转移生物学见解,ctDNA 含量比较大,检测也更加方便。二者也存在关联,首先从生物学特性上,ctDNA 部分来源于 CTCs;其次二者临床意义相似,尤其在疗效的动态监测方面。CTCs 和 ctDNA 的研究在不断深入,但问题依然存在^[53]:(1)ctDNA 的来源、发生机制及生物学意义尚待进一步研究;(2)缺乏理想的分子标志及标准且理想的检测流程和统一准确的相关阈值;(3)如何分析异质性,其能否揭示起源和识别远处器官转移和复发的潜在位点;(4)CTCs 存活及其基因型和表观遗传特性发挥作用的机制如何。目前研究也出现很多新趋势^[54]:(1)出现了端粒酶和新一代测序等新检测技术;(2)发展了检测循环肿瘤微栓子、CTCs 簇^[55]和循环肿瘤物质等的新研究途径;(3)开始培养 CTCs 并建立相应的模型。随着高通量测序平台以及单细胞基因组扩增技术的进步,CTCs 的未来朝着单细胞组学发展;ctDNA 的发展方向则是在组学的基础上明确分子标

记物。综上所述,CTCs 和 ctDNA 检测技术越来越先进,为 CRC 研究提供了良好的直接靶点,摆脱了肿瘤组织标本的限制,使非创伤性诊断、监测成为了可能,为 CRC 的诊断、治疗监测、预后评估等提供了简便途径。可以预见,随着科技的迅猛发展,CTCs 和 ctDNA 必将在 CRC 的诊治中发挥更大作用,从而造福更多患者。

[参 考 文 献]

- [1] 王强,郑海涛,丁德祥. 结直肠癌的流行病学和筛查进展 [J]. 中国现代卫生, 2008, 46(18): 103-104.
- [2] 李明,顾晋. 中国结直肠癌 20 年来发病模式的变化趋势 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7(3): 214-217.
- [3] Morris-Hardeman D. Circulating cancer cells [J]. Ann Oncol, 2010, 21(7): 95-100.
- [4] Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(1): 209-215.
- [5] Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer [J]. Clin Chem, 2013, 59(1): 110-118.
- [6] Alix-Panabieres C, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. Ann Rev Med, 2012, 63: 199-215.
- [7] Tam WL, Weinberg RA. The epigenetic of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer [J]. Nature Med, 2013, 19(11): 1438-1449.
- [8] Hou HW. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1259.
- [9] Sollier E. Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex Technology [J]. Lab Chip, 2014, 14(1): 63-77.
- [10] Hoepfener AE, Swennenhuis JF, Terstappen LW. Immunomagnetic separation technologies [J]. Recent Results Cancer Res, 2012, 195(12): 43-48.
- [11] Chen J, Li J, Sun Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization and separation [J]. Lab Chip, 2012, 12(10): 1753-1767.
- [12] Sun J, Li M, Liu C, et al. Double spiral micro channel for label-free tumor cell separation and enrichment [J]. Lab Chip, 2012, 12(20): 3952-3960.
- [13] Fusi A, Liu Z, Kummerlen V, et al. Expression of chemokine receptors on circulating tumor cells in patients with solid tumors [J]. J Trans Med, 2012, 10: 52-58.
- [14] Coumans FA, Van DG, Beck M, et al. Filter characteristics influencing circulating tumor cells enrichment from whole blood [J]. PLoS ONE, 2013, 8: e61770.
- [15] Alix-Panabieres C. EPISPOT assay: Detection of viable CTCs/CTCs in solid tumor patients [J]. Recent Results Cancer Res, 2012, 195: 69-76.
- [16] Xu T, Lu B, Tai YC, et al. Cancer detection platform which measures telomerase activity from live circulating tumor cells captured on micro fiber [J]. Cancer Res, 2010, 70(16): 6420-6426.
- [17] Hughes AD, Mattison J, Western LT, et al. Micro tube device for selecting-mediated capture of viable circulating tumor cells from blood [J]. Clin Chem, 2012, 58(5): 846-853.
- [18] Heitzer E. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing [J]. Cancer Res, 2013, 73(10): 2965-2975.
- [19] Gormally E. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance [J]. Mutat Res, 2007, 635(2/3): 105-117.
- [20] Christoph K, Sabine W. An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids [J]. Ann NY Acad Sci, 2008, 1137(1): 135-139.
- [21] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6): 426-437.
- [22] Fong SL, Zhang JT, Lim CK, et al. Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients [J]. Clin Chem, 2009, 55(3): 587-589.
- [23] Rawnaq T, Schwarzenbach H, Schur PG, et al. Monitoring of loss of heterozygosity in scam microsatellite DNA among patients with gastrointestinal stromal tumors indicates tumor recurrence [J]. Surg Res, 2011, 169(1): 31-35.
- [24] Newman AM. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. Nature Med, 2014, 4(6): 23-37.
- [25] Forshe T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA [J]. Sci Trans Med, 2012, 4(136): 136-168.
- [26] Leary RJ, Sausen M, Kinde I, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(162): 154-162.
- [27] Sastre J, Maestro ML, Puente J. Circulating tumor cells in colorectal cancer: Correlation with clinical and pathological variables [J]. Ann Oncol, 2008, 19(5): 935-938.
- [28] Bettgowda. Detection of circulating tumor DNA in early-and late-stage human malignancies [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(224): 3007094.
- [29] Jin HC, Ma YN, Shen Q, et al. Circulating methylated DNA as biomarkers for cancer detection [J]. Licensee Tech, 2013, 4(6): 137-152.
- [30] Ignatiadis M, Dawson SJ. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: Dream or reality? [J]. Ann Oncol, 2014, 25(12): 2304-2313.
- [31] Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: Moving new biological insights into the clinic [J]. Nature Med, 2013, 19(11): 1450-1464.
- [32] Gasch C. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer [J]. Clin Chem, 2013, 59(1): 252-260.
- [33] Mostert B. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic

- tumor tissue [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(1): 130-141.
- [34] Yakabe T, Nakafusa Y, Sumi K. Clinical significance of CEA and CA199 in postoperative follow-up of colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(9): 2349-2356.
- [35] Tol J, Koopman M, Miller MC. Circulating tumor cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(5): 1006-1012.
- [36] Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(6): 1188-1192.
- [37] Inuma H, Watanabe T, Mimori K. Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes stage B and C colorectal cancer [J]. *Clin Oncol*, 2011, 29(12): 1547-1555.
- [38] Pu X, Pan Z, Huang Y, et al. Comparison KRAS/BRAF mutations between primary tumors and serum in colorectal cancer: biological and clinical implications [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 249-254.
- [39] Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 532-536.
- [40] Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer [J]. *Nat Med*, 2012, 18(2): 221-223.
- [41] 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.
- [42] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA [J]. *Clin Oncol*, 2014, 32(6): 579-586.
- [43] Aggarwal C, Meropol NJ, Punt CJ. Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(2): 420-428.
- [44] Wong SC, Ng SS, Cheung MT. Clinical significance of CDX2-positive circulating tumor cells in colorectal cancer patients [J]. *Bri J Cancer*, 2011, 104(6): 1000-1006.
- [45] Yokobori T, Inuma H, Shimamura T. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7): 2059-2069.
- [46] Albuquerque A, Kubisch I, Stölzel U. Prognostic and predictive value of circulating tumor cell analysis in colorectal cancer patients [J]. *Trans Med*, 2012, 10(1): 222-227.
- [47] Barbazan J, Alonso AL, Muñelo RL. Molecular characterization of circulating tumor cells in human metastatic colorectal cancer [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e40476.
- [48] Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 1714-1726.
- [49] Dolores C, Garcia O, Carolina D, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic information of susceptible cultured cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 560-567.
- [50] Diehl Schmidt K, Choti MA. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-990.
- [51] Frattini M, Callino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(2): 170-181.
- [52] McBride DJ, Orpana AK, Sotiriou C, et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49(11): 1062-1069.
- [53] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumor cell research [J]. *Cancer*, 2014, 14(9): 623-631.
- [54] Bin H, Youli Z. Detecting circulating tumor cells: Current challenges and new trends [J]. *Theranostics*, 2013, 3(6): 377-394.
- [55] Krebs MG. Molecular analysis of circulating tumor cells--biology and biomarkers [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3): 129-144.
- [收稿日期] 2015 -01 -21 [修回日期] 2015 -04 -07
[本文编辑] 阮芳铭

· 简 讯 ·

2015 年“布里斯班 Immunotherapy 大会”征文通知

2015 年“布里斯班 Immunotherapy 大会”将于 2015 年 11 月 24 - 26 日在澳大利亚布里斯班召开,大会将邀请诺贝尔奖获得者 Rolf Zinkernagel 教授、Peter Doherty 教授和多位国际知名科学家做大会特邀报告,中国医学科学院院长、中国免疫学会秘书长曹雪涛院士受邀参会并做特邀报告。

2015 年“布里斯班 Immunotherapy 大会”征文投稿截止时间为 2015 年 9 月 15 日,欢迎有意参会的免疫学界和生物治疗学界的同仁积极投稿,具体注册投稿方式请登陆大会官方网站:<http://conference.qimrberghofer.edu.au/page/immunotherapy>。

(中国免疫学会秘书处)