

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.018

循环肿瘤微栓的生物学特性和临床意义

The biological characteristics and clinical significance of circulating tumor microemboli

李圣杰², 综述; 杨之斌¹, 殷正丰² 审阅(1. 昆明医科大学第三附属医院 大肠癌科, 云南 昆明 650118; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 分子肿瘤实验室, 上海 200438)

[摘要] 恶性肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的重要原因。现有资料表明, 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是肿瘤通过血道转移的根源, 其中由两个或两个以上的 CTCs 聚集成团的循环肿瘤微栓(circulating tumor microemboli, CTM)作为一种特殊类型的 CTCs 更容易在血循环中生存, 比 CTCs 具有更强的远处转移倾向, 是不良预后和化疗抵抗的一个重要因素。本文从 CTM 的分离方法、构成成分、形成机制、生物学特性及其临床意义等方面综述 CTM 相关的研究进展, 并指出有待解决的科学问题和今后的研究方向。

[关键词] 循环肿瘤细胞; 循环肿瘤微栓; 转移; 临床意义

[中图分类号] R730.2; R730.4; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2016)04-0560-06

转移是恶性肿瘤的主要特征, 也是恶性肿瘤致死的主要原因。肿瘤细胞从原发部位侵入血管、淋巴管或体腔, 迁移到其他部位而继续生长, 形成与原发瘤同一类型的肿瘤, 这个过程称为转移, 其中血道是肿瘤转移的主要途径之一。肿瘤细胞从原发灶脱落, 通过侵袭、迁移和入侵血管等一系列复杂过程进入外周血循环, 被称为循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)。现有资料表明, CTCs 检测对于预后预测、复发风险评估和疗效监测具有重要临床意义。近年来, 由两个或两个以上的 CTCs 聚集成团的循环肿瘤微栓(circulating tumor microemboli, CTM)作为一种特殊类型的 CTCs 受到特别重视。越来越多研究认为, CTM 中的癌细胞容易在血循环中生存, 比 CTCs 具有更强的远处转移倾向, 是不良预后和化疗抵抗的一个重要因素。

1 CTM 分离方法和构成成分

1.1 CTM 分离方法

尽管已有一些实验方法能可靠地分离 CTM, 由于其含量非常少且缺乏有效的特异性标志物, 现有的分离和检测方法各有利弊, 并且敏感性差异较大。在这些方法中, 基于上皮性肿瘤细胞大小的过滤法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET)被认为较容易分离到 CTM, 该方法利用 8 μm 孔径的聚碳酸酯膜过滤, 直径较小的血细胞可通过滤孔被滤去, 而 CTCs 和 CTM 因体积较大被阻滞留在膜上^[1]。除了 ISET, 目前已报道^[2]采用免疫磁性分离(immunomagnetic separation)、CellSearch 系统和血平

板联合免疫荧光(blood plate and immunofluorescence)等方法在肺癌、大肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌等患者外周血中均分离到 CTM。有研究者用免疫磁性分选方法分别在前列腺癌^[3]和 大肠癌^[4]患者外周血分离到 CTM。也有研究者用免疫磁性分选法的专业产品 CellSearch 系统在肺癌^[5]患者外周血分离到 CTM。Cho 等^[6]采用血平板联合免疫荧光方法在乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌和前列腺癌等多种恶性肿瘤患者外周血分离到 CTM。此外 Stott 等^[7]利用 CTC 芯片(CTC-Chip)技术分离到前列腺癌患者外周血 CTM。最近 Sarioglu 等^[8]基于微流体原理独创了能专门捕获 CTM 的芯片(Cluster-Chip)技术, 并用于分离乳腺癌、前列腺癌和恶性黑色素瘤患者外周血 CTM。

1.2 CTM 构成成分

现有研究证实 CTM 构成成分较为复杂, 其组分间具有一定的异质性, 体现出较高的转移潜能。CTM 至少由两个肿瘤细胞聚集而成, 偶有正常细胞参与构成。已经有研究^[9]证明 CTM 可以仅由肿瘤细胞组成, 其他细胞如成纤维细胞、白细胞、内皮细胞、壁细胞和血小板也可以与肿瘤细胞一起参与构

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81272669, No. 81560472)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81272669, No. 81560472)

[作者简介] 李圣杰(1989-), 男, 湖北省宜昌市人, 硕士生, 主要从事肝癌临床与基础研究。E-mail: leeshengjie@126.com

[通信作者] 殷正丰(YIN Zhengfeng, corresponding author), E-mail: yinzfk@aliyun.com; 杨之斌(YANG Zhibing, corresponding author), E-mail: yzblbab@vip.sina.com

成,并且发挥类似微环境的作用。Duda 等^[10]巧妙地构建了一个体内模型,证明肿瘤间质(特别是成纤维细胞)可增加 CTM 中肿瘤细胞的生存能力,为转移灶提供早期生长优势;而部分肿瘤相关成纤维细胞的损耗则能降低肿瘤转移能力。Upreti 等^[11]构建了乳腺癌裸鼠 CTM 模型,发现其中的内皮细胞可以导致乳腺癌细胞对紫杉醇化疗及放疗产生抵抗,而且上调血管生成相关因子白介素 1 α 及基质金属酶 8、基质金属酶 9 表达,促进肿瘤新生血管形成,加快移植瘤生长速度,更容易出现肺转移。之前也有研究者镜下观察到 CTM 被内皮细胞和壁细胞包被^[12],以及白细胞^[13]、血小板^[14]参与形成 CTM,是促进肿瘤转移的相关因素。CTM 形态不一,呈现不规则形状,包括团状、圆圈状和索状等^[15]。总之,CTM 构成成分较复杂、形态不一,组分之间具有异质性,不同组分在 CTM 形成过程中可能发挥不同作用,甚至决定 CTM 的生物学特性。因此,深入研究这些组成成分将有助于理解 CTM 在肿瘤发展过程中的重要作用。

2 CTM 形成机制

肿瘤细胞从原发灶脱落后播散进入外周血形成 CTCs 是一个复杂的过程。在血液循环中,CTCs 大多以单个细胞形式游走,少数以聚集成簇的 CTM 存在^[16]。目前关于 CTM 形成机制主要有两种理论:一是从原发灶脱落的单个肿瘤细胞侵袭间质,通过血管间隙内渗侵入血管,进入血循环后聚集成团形成 CTM,即 CTM 是 CTCs 黏附能力增加的产物。有研究者^[15]认为死亡细胞释放的 DNA 分子具有黏性,在血流剪切力较低情况下 CTCs 发生互相碰撞,聚集形成 CTM。二是肿瘤细胞在原发灶中直接簇集成团,脱落后侵入血管^[17]。例如,Aceto 等^[18]研究发现,CTM 的形成并非归因于血管内 CTCs 聚集,而是由黏附相关基因 JUP 编码的盘状球蛋白(plakoglobin)介导细胞间黏附而形成,随后脱离原发灶侵入血管。他们发现,从乳腺癌患者体内分离出的 CTM 中盘状球蛋白的表达量约是单个 CTCs 的 219 倍,而在敲除 plakoglobin 的小鼠模型中,经尾静脉注射的细胞团块均解离成为单个细胞。此前已有研究^[19-20]认为 plakoglobin 不仅能与 E 钙黏蛋白(E-cadherin)胞内 C 端结合,经 α 连环蛋白(α -catenin)介导与细胞骨架蛋白即肌动蛋白(actin)结合,参与介导细胞连接,而且能与桥粒核心蛋白(desmoglein)及桥粒核心蛋白黏着蛋白(desmocolin)结合参与介导桥粒连接。因此认为 plakoglobin 是 CTM

形成的一个决定性因素。由于少部分 CTM 体积相对较大,可由几十个细胞构成,那么它们如何侵入并通过微血管进入血循环?对于这个疑问,一个似乎合理的解释是:CTM 中的细胞具有一定的可塑性变形能力,加上血管旁路的存在,即使体积较大的 CTM 也能进入血循环^[18]。

曾经有人认为,不能完全排除因血液样本处理过程操作不当可能导致肿瘤细胞成“团”的可能性。然而后来的研究发现,并不是每一个肿瘤患者都能检测到 CTM^[21];在血液中掺入肿瘤细胞也并未聚集成团^[2,22];受检的 CTM 呈现出与对应的肿瘤活检标本高度相似的形态学特征^[23];并且在多种肿瘤切除标本中,原发肿瘤周围脉管结构中易检测到 CTM^[24-26]。这些证据提示 CTM 确实是在体内形成,并非处理血液样本过程中操作因素的产物。

3 CTM 生物学特性

CTM 是肿瘤细胞的“集体迁移”行为,因其能抵抗失巢凋亡、保持增殖能力和逃避免疫杀伤而具有更高的转移潜能。已有不少 CTM 相关研究阐明 CTM 具有较高的转移潜能,相关临床研究证实 CTM 与恶性肿瘤的不良预后相关,而关于 CTM 中不同肿瘤细胞异质性的研究则能提供更准确的肿瘤信息。

3.1 CTM 具有高转移潜能

与单个 CTCs 相比,尽管 CTM 含量更少,然而越来越多的证据表明 CTM 可能具有更高的转移潜能,与不良预后关系密切^[27]。一些研究者在小鼠实验中发现,皮下接种肿瘤细胞团块比接种单个肿瘤细胞能产生更多的转移灶;而体积较大的肿瘤细胞团块比体积较小的肿瘤细胞团块能产生更多的转移灶^[17,28]。最近,Aceto 等^[18]建立的小鼠实验模型也得到了类似的结果,给予免疫缺陷小鼠尾静脉接种两种不同荧光标记的乳腺癌细胞系,5 周后小鼠肺部形成了转移灶,在检测到的 323 个微小转移灶中,有 53% (171/323)来源于 CTM,加上在小鼠末梢血检测到的 CTCs 数目远远多于 CTM(2 421 个 *vs* 65 个),因此估算 CTM 转移潜能约为 CTCs 的 50 倍。Hou 等^[29]的另外一项研究发现,与 CTCs 不同,CTM 中所有细胞核形态学均未呈现凋亡特征;同时 CTM 中抗凋亡指标 BCL-2 高表达,提示 CTM 的抗凋亡能力为转移灶形成提供了决定性优势。Krebs 等^[23]用 ISET 从非小细胞肺癌患者血液中分离 CTCs 和 CTM,并检测细胞增殖指标 Ki67 表达情况,发现在不同患者中,Ki67 阳性表达 CTCs 的比例从 0 到 62% 不等,而 CTM 中所有细胞均不表达 Ki67,提示

CTM 中的细胞处于非增殖状态, 这或许更有利于其从原发肿瘤脱落, 侵袭间质和内渗进入血管的集体迁徙行为。另一方面, CTM 中细胞的这种“静息”状态或许是导致化疗抵抗的重要原因。研究者应用上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和间质上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET) 的可塑性对此提出了一个似乎合理的解释: CTM 在迁徙过程中表现出更多的间质特征, 帮助上皮性细胞侵袭, 而在转移至新的“栖息地”之后表现出更多的上皮特征, 启动增殖程序, 形成转移灶。在此过程中 EMT 和 MET 之间的相互转化发挥了重要作用。

CTM 具有更高转移潜能可能归因于两点: 一是 CTM 体积大, 在通过狭窄的脉管系统容易被截留^[18,28], 截留后便“定居”于此。在随后的增殖过程中, CTM 增长到一定体积后能“撑破”毛细血管网, 继续向组织实质侵袭, 进而在局部形成转移灶。与单个 CTCs 相比, 血管外渗这一环节对于 CTM 便不是不可或缺^[30]。另一个原因是 CTM 不仅表现为肿瘤细胞“集体迁移”, 而且能提供更有利于肿瘤细胞存活的微环境, 由细胞外基质、实质细胞与间质细胞相互作用以及多肽类生长因子等构成的微环境能促进肿瘤细胞增殖并抵抗凋亡^[31], 而外周血中的绝大多数单个 CTCs 因失巢凋亡则无法存活^[32]。CTM 中的非肿瘤细胞组分在促进 CTM 发生转移过程中起重要作用, 例如, 血小板能介导 CTM 黏附于血管内皮, 促进其发生血管外渗, 且能释放转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 诱导 EMT 的发生^[33]; 其中白细胞能够分泌血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGFA), 增加血管内皮细胞通透性, 有利于 CTM 的外渗血管过程^[34]。此外, CTM 能保护被包裹的肿瘤细胞免受淋巴细胞和自然杀伤细胞的免疫攻击^[15]。

3.2 CTM 中肿瘤细胞具有异质性

肿瘤异质性是指肿瘤在生长分化过程中, 经过多次分裂增殖, 其子细胞呈现出分子生物学或基因方面的改变, 从而使肿瘤生长速度、侵袭转移能力、对药物敏感性、预后等各方面产生差异^[35]。已有一些证据佐证 CTM 中不同肿瘤细胞之间存在异质性, 但尚不确定这些肿瘤细胞转移潜能是否相同。Fidler 等^[36]的较早研究将两种具有不同转移潜能的细胞系混合, 接种于裸鼠侧腹壁皮下, 发现在原始接种部位形成了多克隆肿瘤。而血液中检测到的 CTM 以及 90% 的肺转移肿瘤也是多克隆组成。当把两种细胞系分别接种于对侧腹壁皮下时, 和较高

转移潜能的细胞系相比, 仅有不到 10% 的微小转移灶是由较低转移潜能的细胞系形成。随后 Kusters 等^[37]给两组同源小鼠尾静脉注射两种转移潜力相似的细胞系形成细胞团块, 有趣的是, 在肺毛细血管内形成的微小转移灶仅有一种核型的细胞系, 这可以用克隆进化的理论来解释。原发肿瘤细胞一般较少同时表达上皮指标和间质指标, 然而在 CTCs 或 CTM 中却经常出现这种情况。

Hou 等^[15]用 ISET 从同一非小细胞肺癌患者血液中分离到两种不同上皮黏附分子表型的 CTM。在另一例小细胞肺癌患者血液中分离到表达 E 钙黏蛋白的 CTM, 而且 E 钙黏蛋白在核内表达, 但其中部分肿瘤细胞并不表达 E 钙黏蛋白。此外还在一例小细胞肺癌患者血液中同时分离到细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 阳性和 CK 阴性的 CTCs/CTM。值得注意的是, 部分 CTM 高表达 EMT 间质指标波形蛋白 (vimentin), 而这些细胞紧密相连。这似乎有悖于发生 EMT 的细胞通常黏附降低的观点。

Yu 等^[38]另一项研究在受检的 41 例患者中, 17 例患者检测出 CTCs, 并呈现上皮表型、间质表型及混合表型。其中雌激素、孕激素受体阳性乳腺癌患者的 CTCs 主要呈上皮表型, HER2 阳性及三阴性乳腺癌 (triplenegative breast cancer, TNBC) 患者 CTCs 大多呈现间质表型。在接受 MET 诱导治疗的 10 例患者中, 5 例患者接受诱导治疗后 CTCs 数目降低, 并且大多数 CTCs 表现出上皮表型, 而另外 5 例患者 CTCs 数目增多, 更多表现为间质表型, 但疾病出现进展。这些结果提示 CTCs 可发生 EMT, 并且呈现出上皮指标与间质指标的动态表达差异。研究者在不同时间点对一例雌激素、孕激素受体阳性乳腺癌患者的 CTCs 表型进行了多次检测, 最初大部分 CTCs 表达间质指标, 接受诱导治疗后 CTCs 数目减少并转变为上皮表型。7 个月后大多数 CTCs 重新发生间质转变, 患者出现疾病进展。此时该患者表现出短暂的化疗敏感反应, 经过常规化疗后 CTCs 向上皮表型转变, 但在 3 个月后再发生 CTCs 表型反转及疾病进展。同时还检测到一些 CTM, 大多为间质表型, 并且存在着大量血小板组分。鉴于血小板在介导肿瘤发生转移过程扮演重要角色, 研究者认为血小板不仅能与肿瘤细胞紧密结合, 而且能释放 TGF- β 促进 EMT 进程。这或许可以解释 CTM 中间质指标高表达却能够紧密结合成团的现象。

4 CTM 的临床意义

4.1 CTM 与肿瘤转移相关

目前研究结果认为,CTCs 可能是肿瘤转移的根源,CTM 作为 CTCs 的特例也跟肿瘤转移息息相关,一方面 CTCs 或者 CTM 的出现更易导致肿瘤转移,另一方面相比于检出 CTCs 的肿瘤患者,检测到 CTM 的患者具有更高的转移倾向。Vona 等^[39]发现,检测到肝癌 CTM 的患者比仅检出单个 CTCs 的患者具有更高的转移风险。Aceto 等^[18]研究表明,尽管 CTM 仅占 CTCs 的 2%~5%,但是 CTM 引起肿瘤转移的风险却是 CTCs 的 23~50 倍。因此估计大约 50% 的乳腺癌转移来源于 CTM。

4.2 CTM 与不良预后相关

一些临床研究结果提示 CTM 往往与不良预后相关。Aceto 等^[18]发现,与仅检测到 CTCs 或只在 1~3 个时间点检测到 CTM 的乳腺癌患者相比,在超过 3 个时间点检测到 CTM 的患者具有明显较短的无进展生存期(progression-free survival, PFS)时间(32.6 vs 160.5, 134.8 d, $P=0.0002$)。与仅检测到 CTCs 的前列腺癌患者相比,检出 CTM 的患者有着更短的总生存(overall survival, OS)时间(115.8 vs 930.1 d, $P=0.00001$)。Vona 等^[39]发现,检测到 CTM 或者 4 个以上 CTCs 的肝癌患者的预后显著差于未检出 CTM 或检出少于 4 个 CTCs 的患者。Mu 等^[40]发现,在纳入的 115 例未接受一线治疗的晚期(III 期、IV 期)乳腺癌患者中,有 20 例患者检测到至少 1 个 CTM,其中检出 CTM 组的中位无进展生存期明显低于未检出 CTM 组(8.3 vs 18.5 周)。同样,在 TNBC 患者中也得到类似的结论,即 CTM 是不良预后的一个独立危险因素^[41]。

4.3 CTM 与肿瘤分期相关

CTM 的数目可能与肿瘤分期相关。Mu 等^[40]采用 CellSearch 系统检测晚期乳腺癌患者 7.5 ml 外周血中 CTM 数目。检出 3 个以上 CTM 的患者绝大多数为炎性乳腺癌(inflammatory breast cancer, IBC),提示恶性肿瘤侵袭性越强,越容易形成 CTM。Carlsson 等^[42]发现,在 1.5 ml 血液中,晚期肺癌患者外周血 CTM 数目远远多于早期肺癌患者(0~184 vs 0~2 个)。然而, Mascalchi 等^[43]发现,非小细胞肺癌患者外周血 CTM 数目与临床分期并没有相关性。这种差异可能是检测及鉴定方法不同所致,因此仍需进一步研究。

最近一些研究揭示 CTM 的异质性与临床肿瘤病理分级相关。Wu 等^[44]运用 RNA 免疫荧光原位

杂交技术,检测 164 例肝癌、鼻咽癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌和非小细胞肺癌患者 CTM 的 EMT 相关标记物表达情况,并将 CTM 分为上皮表型、上皮-间质复合表型、间质表型三组。相比于早期肿瘤患者,晚期肿瘤患者的 CTM 更多表现为间质表型,预示检测到 EMT 的 CTM 患者可能属于晚期肿瘤。

因此,鉴于 CTM 往往提示不良预后,不同分期肿瘤患者 CTM 数目差异明显,而且不同表型的 CTM 可能代表不同分期肿瘤信息,CTM 检测可能为临床治疗提供更准确的病情信息,成为辅助诊断或评估疗效的标志物。

4.4 CTM 与化疗效应相关

Jiang 等^[45]也采用 RNA 免疫荧光原位杂交技术检测小鼠模型中 CTCs/CTM 的 CK18 表达情况,检测到 CK 阴性二倍体、CK 阳性二倍体和 CK 阳性多倍体等三种表型/核型的 CTCs。药物敏感试验发现,所有的 CK 阴性二倍体和 75% 的 CK 阳性二倍体 CTCs 对顺铂化疗敏感性较好,而高达 63% 的 CK 阳性多倍体 CTCs 则表现出对顺铂化疗抵抗。CTM 中不同细胞除了以上表型/核型,还有 CK 阴性单倍体、CK 阴性多倍体的表型/核型。这些不同表型/核型的肿瘤细胞表现出对顺铂化疗不同的反应,因此可以预测,由不同表型/核型肿瘤细胞构成的 CTM 对顺铂化疗会产生不一样的效应。CTM 中不同肿瘤细胞确实存在异质性,CTM 分子表型及核型鉴定能够让我们更清楚地辨识 CTM 中不同肿瘤细胞的精确信息,而这些不同表型或核型或许决定着肿瘤细胞不同的生物学特性,可能成为肿瘤分子靶向治疗的靶标。

5 结 语

已有的研究已证实,CTM 由肿瘤细胞及其他不同细胞组构成,然而其具体形成机制仍有待进一步阐明。CTM 抗凋亡、逃避免疫杀伤能力以及微环境因素均为其带来生存优势,而且由于体积大,更易形成肿瘤转移,以及引起化疗抵抗,从而导致不良预后。CTM 甚至 CTM 内 CTCs 存在的异质性可能为筛选更合适的分子靶标,指导肿瘤个体化精准治疗提供依据。尽管随着 CTCs 分离检测技术的不断优化,CTM 开阔了抗肿瘤研究的视野。然而,事实上检测到的 CTM 数量非常少,或者因为现有分离检测技术的局限而漏检,这无疑阻碍了对 CTM 的进一步研究和认识。因此,需要加强研究,优化分选策略和技术,筛选更好的分子标志物,提高检出率及准确率,深入探索肿瘤转移相关分子表型。此外,优化

CTM 体外培养技术便于研究者用更多的技术手段研究 CTM, 获得有关 CTM 的精确信息, 也许可以将 CTM 纳入肿瘤疾病的分层, 指导肿瘤靶向化、个体化治疗。

[参 考 文 献]

- [1] MA Y C, WANG L, YU F L. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2013, 12(4): 295-309. DOI: 10. 7785/tert. 2012. 500328.
- [2] KREBS M G, METCALF R L, CARTER L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3): 129-144. DOI: 10. 1038/nrclinonc. 2013. 253.
- [3] BRANDT B, JUNKER R, GRIWATZ C, et al. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(20): 4556-4561.
- [4] MOLNAR B, LADANYI A, TANKO L, et al. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12): 4080-4085. DOI: 10. 1016/s0016-5085(00)83194-7.
- [5] KREBS M G, SLOANE R, PRIEST L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(12): 1556-1563. DOI : 10. 1200/jco. 2010. 28. 7045.
- [6] CHO E H, WENDEL M, LUTTGEN M, et al. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors [J/OL]. *Phys Biol*, 2012, 9(1): 016001 [2016-02-21]. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1478-3975/9/1/016001/meta>; jsessionid = 3082D79D088D42C13248448D29E7B0F2. c4. iopscience. cld. iop. org. DOI: 10. 1088/1478-3975/ 9/1/ 016001.
- [7] STOTT S L, HSU C H, TSUKROW D I, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip [J]. *Proc Natl AcadSci U S A*, 2010, 107(43): 18392-18397. DOI:10. 1073/pnas. 1012539107.
- [8] SARIOGLU A F, ACETO N, KOJIC N, et al. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(7): 685-691. DOI:10. 1038/nmeth. 3404.
- [9] HONG B, ZU Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends [J]. *Theranostics*, 2013, 3(6): 377-394. DOI:10. 7150/thno. 5195.
- [10] DUDA D G, DUYVERMAN A M, KOHNO M, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(50): 21677-21682. DOI:10. 1073/pnas. 1016234107.
- [11] UPRETI M, JAMSHIDI-PARSIAN A, KOONCE N A, et al. Tumor-endothelial cell three-dimensional spheroids; new aspects to enhance radiation and drug therapeutics [J]. *Transl Oncol*, 2011, 4(6): 365-376. DOI:10. 1593/tlo. 11187.
- [12] KATUS-UGURLU G, ROODINK I, DE WEIJERT M, et al. Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma [J]. *J Pathol*, 2009, 219(3): 287-293. DOI:10. 1002/path. 2613.
- [13] BORSIG L, WONG R, HYNES R O, et al. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(4): 2193-2198. DOI: 10. 1073/pnas. 261704098.
- [14] LAUBLI H, STEVENSON J L, VARKI A, et al. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1536-1542. DOI:10. 1158/0008-5472. can-05-3121.
- [15] HOU J M, KREBS M, WARD T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(3): 989-996. DOI:10. 1016/j. ajpath. 2010. 12. 003.
- [16] WILLIAMS S C. Circulating tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(13): 4861. DOI: 10. 1073/pnas. 1304186110.
- [17] OZKUMUR E, SHAH A M, CICILIANO J C, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells [J/OL]. *SciTransl Med*, 2013, 5(179): 179ra47 [2016-02-21]. <http://stm.sciencemag.org/content/5/179/179ra47>. long. DOI:10. 1126/scitranslmed. 3005616.
- [18] ACETO N, BARDIA A, MIYAMOTO D T, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis [J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1110-1122. DOI:10. 1016/j. cell. 2014. 07. 013.
- [19] AKTARY Z, PASDAR M. Plakoglobin represses SATB1 expression and decreases in vitro proliferation, migration and invasion [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78388 [2016-02-21]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0078388>. DOI:10. 1371/journal.pone. 0078388.
- [20] HATZFELD M, WOLF A, KEIL R. Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling [J]. *Cell Commun Adhes*, 2014, 21(1): 25-42. DOI:10. 3109/15419061. 2013. 876017.
- [21] HOU J M, GREYSTOKE A, LANCASHIRE L, et al. Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(2): 808-816. DOI:10. 2353/ajpath. 2009. 090078.
- [22] HOU J M, KREBS M, WARD T, et al. Circulating tumor cells, enumeration and beyond [J]. *Cancers (Basel)*, 2010, 2(2): 1236-1250. DOI:10. 3390/cancers. 2021236.
- [23] KREBS M G, HOU J M, SLOANE R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(2): 306-315. DOI: 10. 1097/jto. 0b013e31823c5c16.
- [24] TOMLINSON J S, ALPAUGH M L, BARSKY S H. An intact

- overexpressed E-cadherin/alpha, beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 5231-5241.
- [25] SUGINO T, YAMAGUCHI T, OGURA G, et al. Morphological evidence for an invasion-independent metastasis pathway exists in multiple human cancers [J/OL]. *BMC Med*, 2004, 2: 9 [2016-02-21]. <http://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-2-9>. DOI: 10.1186/1741-7015-2-9.
- [26] KLEER C G, VAN GOLEN K L, BRAUN T, et al. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer [J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(5): 458-464. DOI: 10.1038/modpathol.3880334.
- [27] BOTTOS A, HYNES N E. Cancer: staying together on the road to metastasis [J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 309-310. DOI:10.1038/514309a.
- [28] LIOTTA L A, SAIDEL M G, KLEINERMAN J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process [J]. *Cancer Res*, 1976, 36(3): 889-894.
- [29] HOU J M, KREBS M G, LANCASHIRE L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(5): 525-532. DOI:10.1200/jco.2010.33.3716.
- [30] PATERLINI-BRECHOT P, BENALI N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions [J]. *Cancer Lett*, 2007, 253(2): 180-204. DOI:10.1016/j.canlet.2006.12.014.
- [31] ZHANG X, NIE D, CHAKRABARTY S. Growth factors in tumor microenvironment [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2010, 15: 151-165. DOI:10.2741/3612.
- [32] FRIEDL P, GILMOUR D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(7): 445-457. DOI:10.1038/nrm2720.
- [33] LABELLE M, BEGUM S, HYNES R O. Platelets guide the formation of early metastatic niches [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(30): E3053-E3061 [2016-02-21]. <http://www.pnas.org/content/111/30/E3053.long>. DOI: 10.1073/pnas.1411082111.
- [34] RIABOV V, GUDIMA A, WANG N, et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis [J/OL]. *Front Physiol*, 2014, 5: 75 [2016-02-21]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00075/full>. DOI: 10.3389/fphys.2014.00075.
- [35] KOREN S, BENTIRES-ALJ M. Breast tumor heterogeneity: source of fitness, hurdle for therapy [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 537-546. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.031.
- [36] FIDLER I J, TALMADGE J E. Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell [J]. *Cancer Res*, 1986, 46(10): 5167-5171.
- [37] KUSTERS B, KATS G, ROODINK I, et al. Micronodular transformation as a novel mechanism of VEGF-A-induced metastasis [J]. *Oncogene*, 2007, 26(39): 5808-5815. DOI:10.1038/sj.onc.1210360.
- [38] YU M, BARDIA A, WITTNER B S, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. *Science*, 2013, 339(6119): 580-584. DOI: 10.1016/j.breastdis.2013.07.021.
- [39] VONA G, ESTEPA L, BEROUD C, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer [J]. *Hepatology*, 2004, 39(3): 792-797. DOI:10.1002/hep.20091.
- [40] MU Z, WANG C, YE Z, et al. Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 154(3): 563-571. DOI: 10.1007/s10549-015-3636-4.
- [41] PAOLETTI C, LI Y, MUNIZ M C, et al. Significance of circulating tumor cells in metastatic triple-negative breast cancer patients within a randomized, phase II trial: TBCRC 019 [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(12): 2771-2779. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-14-2781.
- [42] CARLSSON A, NAIR V S, LUTTGEN M S, et al. Circulating tumor microemboli diagnostics for patients with non-small-cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(8): 1111-1119. DOI:10.1097/jto.0000000000000235.
- [43] 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. DOI:10.1007/s00432-015-2021-3.
- [44] WU S, LIU S, LIU Z, et al. Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123976. DOI:10.1371/journal.pone.0123976.
- [45] JIANG J, WANG DD, YANG M, et al. Comprehensive characterization of chemotherapeutic efficacy on metastases in the established gastric neuroendocrine cancer patient derived xenograft model [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(17): 15639-15651. DOI:10.18632/oncotarget.3712.
- [收稿日期] 2016 - 02 - 23 [修回日期] 2016 - 05 - 24
- [本文编辑] 宋关鸿