

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.001

· 专家论坛(专题) ·

液体活检和肿瘤精准医疗

许扬梅, 郑秋红(福建医科大学附属肿瘤医院, 福建省肿瘤医院国家临床重点肿瘤专科 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] 精准医疗新技术——液体活检,既有极高的科研价值,又具备助力推进精准医疗临床实践的巨大潜能。它可用于癌症早期筛查、诊断、监控、治疗方案指导和疗效评估等众多领域,液体活检的优势使其成为最具发展潜力的肿瘤诊疗手段。本文围绕液体活检在临床肿瘤精准医疗的应用前景,从概念、特点、研究方法和个体化肿瘤治疗、临床应用及研究现状等方面进行阐述,展示了液体活检巨大的临床应用价值和市场前景。

[关键词] 液体活检;精准医疗;循环肿瘤细胞;循环肿瘤DNA;循环肿瘤干细胞

[中图分类号] R730.231; R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2016)05-0589-06

Liquid biopsy in precision medicine for oncology

XU Yangmei, ZHENG QiuHong (Affiliated Cancer Hospital of Fujian Medical University, Tumor Hospital of Fujian Province, National Clinical Key Specialty of Cancer, Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] As a new technique in precision medicine, liquid biopsy has tremendous scientific value as well as great potential to put forward the clinical application. It can be applied in early detection, diagnosis, monitoring, therapy selection and efficacy evaluation of cancer. The advantages of liquid biopsy enable its promising role as a noninvasive technique. This article elucidates the application prospect of liquid biopsy from the views of definition, characteristics, methodology and clinical research of personalized oncology treatment, showing its great importance and potential.

[Key words] liquid biopsy; precision medicine; circulating tumor cells; circulating tumor DNA; circulating tumor stem cells

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 589-594. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.001]



郑秋红 福建医科大学附属肿瘤医院、福建省肿瘤医院肿瘤分子生物学研究室主任,福建省肿瘤生物治疗重点实验室副主任,教授、主任医师、硕士生导师。长期从事肿瘤生物治疗临床及基础研究工作。2012年赴美国康涅狄格大学生命科学院访问研修。主持多项国家、省级科研课题,在SCI刊物上发表学术论文20余篇。

抗肿瘤治疗中,转移瘤克隆进化持续发生,抗肿瘤治疗失败继而重演。美国和中国于2015年初陆续推出了“精准医疗计划(precision medicine initiative)”^[2]。精准医疗具有精准性和便捷性,一方面通过基因测序可以找出癌症的突变基因,迅速确定对症药物,提升

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目资助;福建省临床重点专科建设项目资助;福建省医学创新项目(No. 2015-CXB4)。Project supported by the National Clinical Key Specialty Construction Program; Key Clinical Specialty Discipline Construction Program of Fujian and Fujian medical innovation project (No. 2015-CXB4)

[作者简介] 许扬梅(1981-),女,湖北新洲人,硕士,主管技师,主要从事肿瘤免疫治疗、消化道肿瘤干细胞和循环肿瘤细胞的基础研究, E-mail: yymvictoria810@hotmail.com

[通信作者] 郑秋红(ZHENG QiuHong, corresponding author), E-mail: zqh2858@foxmail.com

[优先发表]

恶性肿瘤的高度异质性使不同个体之间存在药效的差异,肿瘤不断进化,在不同阶段表现出不一样的生物学特征,给临床诊治造成了很大困扰^[1]。侵袭与转移能力高的肿瘤细胞扩散至循环血后,在特定的阶段及环境中种植于身体某些部位,不断增殖形成转移瘤,且表现出与原发肿瘤不一样的生物学特征。在

治疗效果;另一方面,基因测序只需患者的血液甚至唾液,无需传统病理切片,可以减少诊疗过程中对患者身体的损伤而对疾病做出诊断和治疗与预后评估。作为精准医疗新技术的“液体活检”,被国际学术界评为“2015年度十大突破技术”^[3]。2016年6月1日美国食品药品监督管理局(FDA)批准了第一个基于血液样本的基因检测技术^[4],该技术能够从非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者血液中直接检测 *EGFR* 基因突变。液体活检的正式商用化对于肿瘤的个体化医疗具有重要意义,将为肿瘤精准医疗提供强有力的资金与技术支持。目前液体活检的主要包括检测血液中游离的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)和外泌体等,本文重点论述 ctDNA 和 CTC。

1 ctDNA 与肿瘤精准治疗

1.1 ctDNA 的检测

人的血浆中游离存在高度片段化的游离DNA (cell-free DNA, cfDNA), 它们有的来自于正常细

胞,有的来自于异常细胞(如肿瘤细胞),还有部分来自于人体外部(如病毒DNA)。ctDNA 是人体血液循环系统中不断流动的携带一定特征(包括突变、缺少、插入、重排、拷贝数异常和甲基化等)的来自肿瘤基因的DNA片段。ctDNA 是属于 cfDNA 的一种类型,是一种特征性的肿瘤生物标志物,可以被定性、定量和追踪。ctDNA 在肿瘤疾病(甚至进展期)的含量非常稀少,新的技术革新可以从 cfDNA 中区别目标 ctDNA 并加以检测。目前 ctDNA 的主要检测方法是 PCR 和二代测序(next-generation sequence, NGS)技术(表1)。

2016年哈佛医学院 Sacher 等^[5]利用微滴式数字 PCR 技术(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)从血浆中检测导致 NSCLC 的两种关键基因 *EGFR* 和大鼠肉瘤致癌因子基因(kirsten rat sarcoma viral oncogene, *KRAS*)致病突变,进而帮助临床医生为患者制定针对上述两种突变的化疗药单。血浆基因分型在临床测试中具有不可估量的应用潜力,这种癌症常规基因标志的快速与无创筛查可以避免传统侵入性的活组织检查。

表1 常用的 ctDNA 检测方法

原理	方法	检测变异类型	优点	缺点
基于 PCR	(1) Nested real-time PCR; (2) ARMS/Scorpion PCR; (3) PCR-SSCP; (4) Mutant allele-specific PCR; (5) Mass spectrometry; (6) Bi-PAP-A amplification; (7) DdPCR; (8) BEAMing	(1~6)检测如 <i>EGFR</i> 等已知点突变; (7~8)检测已知点突变和基因组重排	(1~6)操作简单易行,成本低;(7~8)敏感性高	(1~6)敏感性低,只能检测有限的基因位点;(7~8)只能检测有限的基因位点
目标深度测序	(1) SafeSeq; (2) TamSeq; (3) Ion-AmpliSeq; (4) CAPP-Seq; (5) OnTarget	在目标区域 SNVs、CNVs 和重排	敏感性高	较昂贵
全基因组测序	(1) Digital karyotyping; (2) PARE	基因组范围 SNVs、CNVs 和重排	应用范围广泛	很昂贵

NGS 技术的发展使 ctDNA 中肿瘤特异性的基因突变或者拷贝数异常(copy number variations, CNV)通过 ctDNA 检测成为可能,这种高通量基因检测方式具有非常高的敏感性,并能精确地捕捉到临床治疗过程中患者体内微量 ctDNA 的变化,是目前公认最有效的分析方法。Newman 等^[6]利用数字错误抑制(integrated digital error suppression, IDES)的方法和癌症个体化深度测序分析方法(cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-seq)相结合,检测到低至 0.004% 的突变等位基因,通过对首次和以后多次 ctDNA 检测的对比,能及时发现肿瘤基因突变。据报道^[7],采用 cfDNA 片段谱系分

析,可以替代直接寻找 DNA 特殊突变的方法,其原理是通过游离 DNA 深度测序得出一个基因组范围内核小体占位图谱,根据该图谱可以鉴定细胞种类来源(例如淋巴类、髓样细胞、骨髓和癌样组织),该技术还能在更广阔临床病症中起非侵袭性监测作用。然而,NGS 也存在一些不足之处,由这些技术带来的昂贵费用、庞大数据处理以及高质量 DNA 样本的依赖是目前需要克服的问题。

1.2 ctDNA 检测在肿瘤诊疗中的应用

研究^[6,8]证实,肿瘤患者 ctDNA 所携带的肿瘤基因组信息与肿瘤组织具有良好的一致性,能克服常规肿瘤组织活检所无法突破的肿瘤异质性问题。

通过 ctDNA 检测,能帮助实时动态监测肿瘤原发灶及转移复发灶基因组信息,协助早期诊断、疗效监测和预后判断,也有助于靶向治疗适应证的评估,从而推进精准医疗的实施。例如,Dawson 等^[9]利用 ctDNA 成功诊断了 29/30 例乳腺癌患者,敏感性可达 97%。Spindler 等^[10]在相应肿瘤患者的 ctDNA 中进行药物敏感的突变位点 *KRAS* 和鼠类肉瘤滤过性病毒致瘤同源体(*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, BRAF*)检测,为临床药物的筛选提供指导意见。Steffensen 等^[11]对 144 例具有多重耐药性的上皮卵巢癌患者进行研究,量化化疗过程中所收集的患者 ctDNA,结果提示 ctDNA 水平与无进展生存期和总生存期呈显著负相关。

作为液体活检的新手段,ctDNA 检测优点在于:对疾病负荷量的检测更加敏感;可以预测特定耐药位点;可以和 CTC 互补共同监测手术及放化疗后微小残余灶。ctDNA 不足之处在于:无法观察细胞表型;无法进行细胞功能实验;检测结果有假阳性(老年人或频发良性病变时正常组织发生的肿瘤相关基因变异)和假阴性(只能检测特定突变)。总之,ctDNA 检测在肿瘤诊疗领域具有广阔的应用前景,也是推动肿瘤基础研究进展的重要助力。

2 CTC 与肿瘤精准治疗

2.1 CTC 的富集、检测和分析

CTC 富集方法主要分为两类:一是利用其物理学特征,比如大小、密度、电荷及可塑性等,采用密度梯度离心法、膜过滤法、介电泳等方法加以分选;二是利用其生物学特性,比如抗原表达、蛋白分泌及侵袭性等,根据其表面标志物如 EpCAM、CK、CD45 等,通过免疫磁珠、流式细胞仪和 CTC 检测系统来检测和捕获细胞^[12]。美国麻省总医院^[13]研制了一种融合了微流控分离芯片、磁电泳与白细胞去除技术的非抗原依赖的 CTC 分离装置,消除了上皮-间质转化(epithelial-mesothelium transformation, EMT)表型变化的干扰,提高了分离效率,而且能保持细胞的形态与性质,便于后续的分型分析。体外培养 CTC 也是一种富集方式^[14]。磁性纳米颗粒作为纳米材料的一种,也越来越多地用于 CTC 的鉴定和捕获^[16-17]。国家纳米科学中心的胡志远教授研究组^[16]利用纳米加工和微流控技术构建的 CTC 捕获微孔阵列,可以准确获取单个细胞。Pramanik 等^[18]利用多色荧光磁性纳米探针可以分析 CTC 中异质性细胞并选择性捕获。

对分离出来的 CTC 需要进行表型、基因型分析

与功能鉴定。CTC 的表型主要通过免疫荧光方法分析其表面标志物。免疫斑点法通过检测细胞在短时间培养中分泌、脱落或释放的蛋白质,对有功能活性的 CTC 进行评估。原位杂交技术可用于检测 CTC 的基因扩增与基因重排的情况。RT-PCR 和芯片方法用于检测 CTC 中高表达的 mRNA 或突变性质的基因。单细胞全基因组测序技术是在单细胞水平对全基因组进行扩增与测序的一项新技术,用于分析 CTC 的基因突变与基因组异常等^[19]。

2.2 CTC 检测在肿瘤诊疗中的应用

2.2.1 疗效评估

(1) 手术疗效评估 Lu 等^[20]采用 qPCR 技术发现术后 CTC 持续出现,提示结直肠癌患者术后预后不良。Nesteruk 等^[21]运用 qPCR 技术发现,对于术前接受过短期放疗的结直肠癌患者,术前 CTC 水平不能评价预后,而术后 7 d 的 CTC 水平是局部转移的独立预后因子。Galizia 等^[22]发现,术后高 CTC 数目提示结直肠癌患者预后不良。Peach 等^[23]对 14 篇文献中 1 841 例根治性结直肠癌手术患者的 Meta 分析显示,中位随访时间 36~38 个月,平均 CTC 检出率为 (33.4±3.6)%;术后 24 h 后检测到 CTC 是预测肿瘤早期复发的独立因素;但是未发现围手术期 CTC 与结直肠癌预后相关。

(2) 化疗疗效评估 Bian 等^[24]报道乳腺癌患者在接受化疗(白蛋白结合型紫杉醇+卡培他滨+曲妥珠单抗)前后 CTC 的变化,治疗前 CTC 数目 3 个(其中 2 个 CTC 为 HER-2⁺);治疗 1 周期后 CTC 迅速下降至 0 个。6 个周期治疗后病理学完全缓解,证实 CTC 值在乳腺癌治疗早期发生显著变化,能够准确地预示疗效。Goldkorn 等^[25]报道,接受多西他赛联合阿曲生坦治疗的转移性去势抵抗性前列腺癌患者,基线 CTC 数量可预测预后,3 周时 CTC 升高提示总生存较差,有望作为指导优化治疗的良好指标。转移性乳腺癌和前列腺癌等患者经抗癌治疗有效后,CTC 计数常由高变低。如 CTC 计数在治疗后从低升高,常预示肿瘤患者疗效欠佳、病情恶化、生存期缩短。比较肿瘤患者治疗前后的 CTC 计数变化,能反馈患者的疗效情况,从而可指导制定更有效的化疗方案。Smerage 等^[26]在 595 例可评价的转移性乳腺癌患者外周血中检测 CTC,将这些患者分成 A 组(从初始治疗直到进展 CTC 没有升高)、B 组(CTC 最初增加,在初始治疗 21 d 后减少)和 C 组(初始治疗 21 d 后持续升高),发现 3 组患者 OS 分别为 35、23 和 13 个月($P < 0.01$),从而得出结论:CTC 可以作为化疗疗效的预后因子。

(3) 放疗疗效评估 研究^[27]发现, 头颈部鳞状细胞癌局部放疗可以增加血中 CTC 数目, 可能会引发肿瘤扩散。通过对 30 例 NSCLC 患者放疗前后 CTC 数目检测, 发现 CTC 数目可以反映患者放疗的疗效^[28]。

(4) 免疫治疗疗效评估 近年来, 随着对机体免疫系统认识的不断深入以及生物技术的迅速发展, 免疫治疗已成为肿瘤治疗的重要手段, 成为继手术、放疗、化疗外的另一种肿瘤治疗模式。当前精准肿瘤免疫治疗更是肿瘤精准医疗的重要突破口。但是对于肿瘤免疫治疗疗效的评价众说纷纭, 尚没有理想评价标准, 传统的 WHO 或 RECIST 标准不能适应肿瘤免疫治疗的评价。2009 年 WHO 推荐使用免疫相关反应评价体系 (immune-related response criteria, IrRC)^[29], 该标准将可测量的新发病灶计入总肿瘤负荷, 并将其与基线肿瘤负荷进行比较, 按照 irCR、irPR、irSD 和 irPD 来评价治疗效果。IrRC 为评价免疫治疗临床效应提供了一个相对好的工具, 但是对微小转移无法监测。而液体活检能有效反映患者的药效动态信息及疾病状况, 可以有效地指导患者的个体化治疗。2016 年美国临床肿瘤学会 (ASCO) 第 52 届学术年会上, 有学者提到液体活检技术也可作为监测肿瘤高危人群免疫细胞治疗疗效的指标。2015 年, 笔者研究团队开展对 20 例结直肠癌患者各个时间点的全程动态 CTC 分析, 同期收集相同分期的、没有接受细胞治疗的 20 例结直肠癌患者为对照组, 以 PFS 为观察终点的前瞻性研究, 在已完成根治术的 8 例患者 (因受国家政策影响于 2016 年 5 月份暂停) 全程 CTC 分析结果中发现: 患者术前 CTC 的表达水平与肿瘤的大小、T 分期 (浸润深度) 显著相关 (均 $P < 0.05$); 术后 CTC 与肿瘤的 T 分期、N 分期、M 分期均具有显著相关性 (均 $P < 0.05$)。CTC 与免疫细胞治疗相关性的初步数据显示, 细胞治疗疗效好的患者, 其 CTC 在细胞免疫治疗 3 个周期后呈下降趋势 ($P < 0.05$), 并维持在较低水平, CTC 变化可以用作为细胞治疗疗效评价的参考指标。肿瘤免疫治疗的临床疗效评价对于肿瘤免疫治疗的发展和临床应用具有十分重要的意义, 而液体活检可以成为肿瘤免疫治疗疗效评价体系中的重要指标。

(5) 个体化治疗药物选择 CTC 具有与肿瘤原发灶相似的基因型和表型, 研究 CTC 的分子分型对靶向药物治疗有指导价值。大部分乳腺癌 CTC 的 HER-2 表达与原发肿瘤组织一致, 这意味着可依据 CTC 来指导乳腺癌靶向药物曲妥珠单抗的治疗; 而

小部分原发性乳腺癌组织为 HER-2 阴性的患者, 在治疗过程中检测到 CTC 的 HER-2 转为阳性, 在使用曲妥珠单抗治疗后, 也取得了较好的疗效^[30]。在个体化治疗中, 直接检测 CTC 药物靶标的表达来指导药物治疗方案制定甚至优于检测原发肿瘤组织, 更能反映具有转移潜质的肿瘤细胞特征。

2.2.2 预后评估 CTC 检测系统是目前唯一已被 FDA、SFDA 批准用于乳腺癌、结直肠癌及前列腺癌的临床检测系统。从肿瘤患者抽取 7.5 ml 外周血, 检测 CTC 数目, 如果转移性乳腺癌 CTCs ≥ 5 个细胞、前列腺癌 CTCs ≥ 5 个细胞、结肠癌 CTCs ≥ 3 个细胞, 则提示患者预后不良。流式细胞仪也被大量用于 CTC 研究, 并发现 CTC 数目与多种肿瘤预后预测都相关^[31-32]。笔者研究团队采用流式细胞仪进行 CTC 检测, 不仅具有良好的敏感性 (可达到 1×10^{-6}) 与专一性, 并可同时使用不同荧光通道检测多个 CTC 相关表面标志物; 通过分选系统收集的 CTC 还可进行后续培养或分子基因水平的研究。未来 CTC 检测技术在患者预后评估的临床应用, 仍依赖于检测方法的完善及评估标准的建立。

CTC 检测优点在于对完整肿瘤细胞的形态鉴定并展开细胞功能研究 (体内和体外实验), 在单细胞水平研究可以分析肿瘤细胞群体异质性, 以及 CTC 与转移过程和疾病进展的相关性; CTC 分析方法多样, 可以在细胞和亚细胞层次作分子功能研究, 可以和 ctDNA 互补 (化疗后出现 CTC, 预示着治疗失败)。CTC 检测缺点: 肿瘤细胞数量少、脆弱; 检测有假阳性 (EMT 导致上皮表面标志物表达弱或缺失) 和假阴性 (死细胞非特异性染色); 不同方法得出的结果缺乏比较标准。

总之, ctDNA 与 CTC 在临床应用方面均十分广泛, 各有长短。Freidin 等^[33]对胸部肿瘤 KRAS 突变进行检测, 发现 ctDNA 的灵敏度高于 CTC。Madic 等^[34]对 30 位转移性乳腺癌患者的研究发现: (1) 以能否检测到突变为评判标准, ctDNA 的灵敏度高于 CTC; (2) CTC 的数量和预后密切相关, 而 ctDNA 的数量则与预后的关联不大。因此, 对于液体活检而言, 问题并不在于选择 CTC 还是 ctDNA, 关键两者能提供互补的信息, 作为检测指标均有临床价值。

2.3 循环肿瘤干细胞 (circulating tumor stem cell, CTSC) 检测的临床应用

2.3.1 CTC 和 CTSC 的关系 CTC 是远处转移发生的必要前提。然而, 并非所有的 CTC 都能形成远处转移。有研究者^[35]提出将 CTC 分为 3 种类型: 非致病性 CTC、激活性 CTC 及转移性 CTC (即或

CTSC),并指出只有正在进行EMT的激活性CTC或已完成EMT且具有干细胞特性的CTSC,才在肿瘤转移中发挥重要作用,而CTSC仅占CTC总量的0.01%。由于CTSC与肿瘤转移之间的密切关系,目前这一领域已引起越来越多研究者的关注^[36]。通过流式分析或RT-PCR检测可在肿瘤患者外周血中发现CTSC,并证实转移性肿瘤患者CTC中高表达EMT和干细胞等相关基因(如*Akt2*, *PI3K*; *Twist1*, β -catenin, Vimentin, Fibronectin; *MUC*, *CK19*, *CD44*, *CD133*, *ABCG2*, *CD90*, *ALDH1* 和 *ICAM-1* 等)^[37-39]。

2.3.2 CTSC检测应用于肿瘤个体化治疗 有学者^[37]利用流式细胞仪进行乳腺癌患者CTC/CTSC的检测,证实流式细胞仪具有高敏感性及专一性,且CTSC的数目与患者的临床分期具有相关性。Yu等^[40]报道,侵袭性强的乳腺癌类型以间质性表型CTC(具有EMT干细胞特性)为主;在接受治疗后,产生疗效的患者的间质型CTC数量下降,而病情恶化的患者的间质型CTC数目明显增多。在患者治疗过程中对CTC动态监测,肿瘤患者初始对相应靶向药物治疗疗效较好,CTC数量明显降低并以上皮型为主;经7个月治疗后出现了耐药性及病情进展,间质型CTC数目升高,这说明患者CTC、CTSC与药物疗效或耐药情况密切相关。因此,肿瘤治疗过程中实时监测CTC/CTSCs的数量和相关分子标志物、EMT表型等分子特征,能有效反映患者的药效动态信息及疾病状况,从而有效地指导患者的个体化治疗。

3 结 语

人类基因组学、药物基因组学与肿瘤生物学研究成果的涌现,推动了肿瘤个体化医疗模式的兴起与快速发展,精准医疗的时代已经到来。液体活检作为精准医疗新技术,使得癌症早期阶段的筛查成为可能,在肿瘤诊断、治疗方案指导、疗效评估及预后测评领域,都具有极高的临床应用价值和市场前景。尤其在以预防复发和转移为主旨的肿瘤免疫治疗临床疗效评价体系方面,液体活检将有助于肿瘤免疫治疗的科学发展和精准指导临床实践。期待通过临床医师、技术专家和政府部门三方深入探讨该技术在医疗临床实践中的应用科学,推动液体活检在肿瘤精准诊疗中应用的规范化和合法化。

[参 考 文 献]

[1] BROUWER A, DE LAERE B, PEETERS D, et al. Evaluation and consequences of heterogeneity in the circulating tumor cell compartment [J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 2016 [Epub ahead of

print] [2016-08-31]. <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget>. DOI: 10.18632/oncotarget.8015.

- [2] DONG L, WANG W H, LI A, et al. Clinical next generation sequencing for precision medicine in cancer [J]. *Curr Genomics*, 2015, 16 (4):253-263. DOI: 10.2174/1389202915666150511205313.
- [3] QIN Z, LJUBIMOV V A, ZHOU C, et al. Cell-free circulating tumor DNA in cancer [J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35 (7):36. DOI: 10.1186/s40880-016-0092-4.
- [4] MULCAHY N. FDA OKs first liquid biopsy for lung cancer mutation [EB/OL]. (2016-06-01) [2016-08-01]. <http://www.aiweibang.com/yuedu/121492087.html>.
- [5] SACHER A G, PAWELETZ C, DAHLBERG S E, et al. Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2 (8): 1014-1022. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.0173.
- [6] NEWMAN A M, LOVEJOY A F, KLASS D M, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34 (5): 547-555. DOI: 10.1038/nbt.3520.
- [7] SNYDER M W, KIRCHER M, HILL A J, et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin [J]. *Cell*, 2016, 164 (1/2): 57-68. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.050.
- [8] HEITZER E, ULZ P, GEIGL J B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer [J]. *Clin Chem*, 2015, 61 (1):112-123. DOI: 10.1373/clinchem.2014.222679.
- [9] DAWSON S J, TSUI D W, MURTAZA M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (13): 1199-1209. DOI: 10.1056/NEJMoa1213261.
- [10] SPINDLER K L, PALLISGAARD N, VOGELIUS I, et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (4):1177-1185. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0564.
- [11] STEFFENSEN K D, MADSEN C V, ANDERSEN R F, et al. Prognostic importance of cell-free DNA in chemotherapy resistant ovarian cancer treated with bevacizumab [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50 (15):2611-2618. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.06.022.
- [12] JOOSSE S A, GORGES T M, PANTEL K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells [J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7 (1): 1-11. DOI: 10.15252/emmm.201303698.
- [13] KARABACAK N M, SPUHLER P S, FACHIN F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9 (3):694-710. DOI: 10.1038/nprot.2014.044.
- [14] YU M, BARDIA A, ACETO N, et al. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility [J]. *Science*, 2014, 345 (6193): 216-220. DOI: 10.1126/science.1253533.
- [15] KIM S, HAN S, PARK M J, et al. Circulating tumor cell microseparator based on lateral magnetophoresis and immunomagnetic nanobeads [J]. *Anal Chem*, 2013, 85 (5):2779-2786. DOI: 10.1021/ac303284u.

- [16] WANG Z, WANG W, GENG L, et al. Distinguishing of tumor cell-targeting peptide ligands through a color-encoding microarray [J]. *Lab Chip*, 2015, 15(24): 4512-4516. DOI: 10.1039/c5lc01010a.
- [17] 王雷, 胡志远. 循环肿瘤细胞纳米检测技术用于肿瘤早期诊断的探索 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(5): 595-600. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.002.
- [18] PRAMANIK A, VANGARA A, VIRAKA NELLORE B P, et al. Development of multifunctional fluorescent-magnetic nanoprobes for selective capturing and multicolor imaging of heterogeneous circulating tumor cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(24): 15076-15085. DOI: 10.1021/acsami.6b03262.
- [19] NI X, ZHUO M, SU Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients [J]. *PNA*, 2013, 110(52): 21083-21088. DOI: 10.1073/pnas.1320659110.
- [20] LU C Y, UEN Y H, TSAI H L, et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(7): 1178-1184. DOI: 10.1038/bjc.2011.40.
- [21] NESTERUK D, RUTKOWSKI A, FABISIEWICZ S, et al. Evaluation of prognostic significance of circulating tumor cells detection in rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy: prospectively collected material data [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:712827[2016-08-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070579/>. DOI: 10.1155/2014/712827.
- [22] GALIZIA G, GEMEI M, ORDITURA M, et al. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients [J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(10): 1809-1818. DOI: 10.1007/s11605-013-2258-6.
- [23] PEACH G, KIM C, ZACHARAKIS K, et al. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: a systemic review [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(9): 1327-1334. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605651
- [24] BIAN L, WANG T, LIU Y, et al. Evaluation of treatment response for breast cancer: are we entering the era of "biological complete remission"? [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(4): 403-407. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2012.11.01.
- [25] GOLDKORN A, ELY B, QUINN D I, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration resistant prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(11): 1136-1142. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.7417.
- [26] SMERAGE J B, BARLOW W E, HORTOBAGYI G N, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500 [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(31): 3483-3489. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2561.
- [27] TINHOFER I, HRISTOZOVA T, STROMBERGER C, et al. Monitoring of circulating tumor cells and their expression of EGFR/phospho-EGFR during combined radiotherapy regimens in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(5): 685-690. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2012.02.009.
- [28] DORSEY J F, KAO G D, MACARTHUR K M, et al. Tracking viable circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing definitive radiation therapy: pilot study results [J]. *Cancer*, 2015, 121(1): 139-149. DOI: 10.1002/cncr.28975.
- [29] WOLCHOK J D, HOOS A, ODAY S, et al. Guidelines for the evaluation of Immunotherapy activity in solid tumors: immune-related response criteria [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(23): 7412-7420. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1624.
- [30] LIU Y, LIU Q, WANG T, et al. Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: a valuable prognostic and predictive biomarker [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 202. DOI: 10.1186/1471-2407-13-202.
- [31] WARKIANI M E, KHOO B L, TAN D S, et al. An ultra-high-throughput spiral microfluidic biochip for the enrichment of circulating tumor cells [J]. *Analyst*, 2014, 139(13): 3245-3255. DOI: 10.1039/c4an00355a.
- [32] WATANABE M, UEHARA Y, YAMASGHITA N, et al. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system [J]. *Cytometry A*, 2014, 85(3): 206-213. DOI: 10.1002/cyto.a.22422.
- [33] FREIDIN M B, FREYDINA D V, LEUNG M. Circulating tumor DNA outperforms circulating tumor cells for KRAS mutation detection in thoracic malignancies [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(10): 1299-1304. DOI: 10.1373/clinchem.2015.242453.
- [34] MADIC J, KIHALAINEN A, BIDARD F C, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(9): 2158-2165. DOI: 10.1002/ijc.29265.
- [35] SCATENA R, BOTTONI P, GIARDINA B. Circulating tumour cells and cancer stem cells: a role for proteomics in defining the interrelationships between function, phenotype and differentiation with potential clinical applications [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1835(2): 129-143. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.12.002.
- [36] YANG M H, IMRALI A, HEESCHEN C. Circulating cancer stem cells: the importance to select [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(5): 437-449. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.04.08.
- [37] WANG N, SHI L, LI H, et al. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation [J]. *Tumor Biol*, 2012, 33(2): 561-569. DOI: 10.1007/s13277-011-0303-1.
- [38] SUN Y F, XU Y, YANG X R, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1458-1468. DOI: 10.1002/hep.26151.
- [39] LIU S, LI N, YU X, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 by hepatocellular carcinoma stem cells and circulating tumor cells [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(5): 1031-1041. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.046.
- [40] 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: 10.1126/science.1228522.

[收稿日期] 2016-08-26

[修回日期] 2016-09-07

[本文编辑] 党瑞山