

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.003

· 专题报道(临床研究) ·

直肠癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤组织基因表达谱的差异分析

许扬梅, 龚福生, 陈路川, 应敏刚, 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] **目的:**通过直肠癌循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)与原发肿瘤组织基因表达谱的差异分析,筛选直肠癌 CTC 的特异性基因。**方法:**选取 2015 年 9 月至 2015 年 12 月福建省肿瘤医院收治的直肠癌患者 4 例,取肿瘤组织和相应的癌旁组织并采集外周血 20 ml。应用流式细胞术检测血液 CTC,抽提癌组织和 CTC 的总 RNA,采用人全转录组表达谱芯片检测 CTC 及相应肿瘤组织 mRNA 表达谱,经聚类分析筛选 CTC 特异性基因,并采用生物分子注释系统 MAS 软件对其进行基因功能及其相关的信号通路分析。**结果:**4 例直肠癌患者检测到 CTC 数目分别是 67、78、53 和 120 个。筛选出肿瘤与癌旁组织差异基因共 7 755 个、CTC 与白细胞差异基因共 567 个,肿瘤组织及 CTC 差异基因交集后共同上调或下调的特异性基因共 36 个,其中上调 16 个、下调 20 个($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。CTC 特异性基因与肿瘤转移和干细胞功能有关,涉及与细胞转移、干细胞功能和免疫功能相关的 22 条信号通路。**结论:**CTC 与原发肿瘤基因相比,具有独特的表达谱,是肿瘤复发和转移的重要基础。

[关键词] 直肠癌;循环肿瘤细胞;基因表达谱

[中图分类号] R730.231; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)04-0348-07

Analysis of differentially expressed profiles of circulating tumor cells and primary tumor tissues in rectal cancer

XU Yangmei, GONG Fusheng, CHEN Luchuan, YING Mingang, ZHENG QiuHong (Key Laboratory of Tumor Biotherapy of Fujian Province, National Clinical Key Specialty of Tumor, Tumor Hospital of Fujian Province, Tumor Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:**To screen specific gene of circulating tumor cells (CTCs) of rectal cancer according to the differentially expressed profile of rectal cancer CTCs and primary tumor tissues. **Methods:** Four cases of rectal cancer patients treated in Fujian Cancer Hospital from September 2015 to December 2016 were selected to collect tumor tissues and corresponding para-cancerous tissues, in addition, 20 ml of peripheral blood was collected. Moflo XDP cytometry was adopted to identify and sort CTCs; after purification and amplification of sample total RNA, human whole transcriptome microarray chip was used to detect the expression profiles of CTCs and tumor tissue mRNA of corresponding patients, and further to screen the CTCs specific genes. In addition, MAC3.0 bio-informatics software was used for the gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. **Results:** After sorting and testing, CTCs number sorted from each patient were 67, 78, 53 and 120. There were 7 755 differentially expressed gene between tumor tissues and normal para-cancerous tissues; there were 567 differentially expressed gene between CTCs and white cells; Combining the two dataset, there were 36 differentially co-expressed gene, including 16 up-regulated genes and 20 down-regulated genes ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). GO function of CTCs specific genes were correlated with tumor me-

[基金项目] 福建省医学创新基金资助项目(No. 2015-CXB-4);福建省自然科学基金资助项目(No. 2016J01436);国家临床重点专科建设基金资助项目(No. 2015-544)。Project supported by the Medical Innovation Project of Fujian Province(No. 2015-CXB-4), the Natural Science Foundation of Fujian Province(No. 2016J01436), and the National Clinical Key Specialty Construction Program(No. 2015-544)

[作者简介] 许扬梅(1981-),女,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工作, E-mail: yymvictoria810@hotmail.com

[通信作者] 郑秋红(ZHENG QiuHong, corresponding author),博士,主任医师,硕士生导师,主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: zqh2858@foxmail.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170413.1025.004.html>

tastasis and stem cell function, and those specific genes also participated in 22 signaling pathways related to cell migration, stem cell function and immune function. **Conclusion:** Compared with primary tumor gene, CTCs has a unique mRNA profile, which is the foundation of tumor recurrence and metastasis.

[**Key words**] rectal cancer; circulating tumor cells (CTCs); gene expression profile

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 348-354. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.003]

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是指从实体瘤中脱离出来并进入外周血液循环的肿瘤细胞,原发肿瘤和转移灶都会释放 CTC。CTC 是液体活检的主要内容之一,其数量检测和基因型分析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^[1-2]。通过免疫磁珠、流式细胞仪和 CTC 检测系统(CellSearch)来检测和捕获 CTC 的表面标志物(如 EpCAM、CK、CD45 等)是目前常用的方法^[3-5]。但是由于 CTC 数量极少,如何获取足量的 CTC 进行分子生物学特性研究是目前的技术难点。本研究通过流式细胞术鉴定和分选 CTC,并采用芯片方法检测直肠癌组织和其相应 CTC 中特异性基因表达谱,筛选 CTC 关键分子,以期对肿瘤转移早期诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取 2015 年 9 月至 2015 年 12 月福建省肿瘤医院收治的 4 例初治直肠癌患者作为研究对象,所有患者均经术后病理确诊为直肠腺癌。所有患者既往无恶性肿瘤病史,临床病理资料无偏倚,均知情同意。截至 2016 年 9 月,4 例患者均未出现复发情况。术前 1 d 采集外周血 20 ml,乙二胺四乙酸二钾抗凝,4 ℃ 冰箱保存,4 h 内分离外周血单个核细胞。肿瘤组织和相应癌旁正常组织标本均于手术离体 30 min 内采集,部分送病理科做诊断,部分液氮冷冻或 -80 ℃ 保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠抗人 EpCAM-APC 单克隆抗体和小鼠抗人 CD45-PE 单克隆抗体均购自美国 BD 公司,DAPI 购自美国 Life Tech 公司,Ficoll-Paque™ Premium 淋巴细胞分离液购自美国 GE Healthcare 公司,RPMI 1640 购自北京宝日医有限公司,胎牛血清购自 Gibco 公司。人全转录组表达谱芯片 Affymetrix HTA 2.0 Array 购自北京博奥生物有限公司,Hybridization Oven 640 和 GeneChipScanner 3000 购自美国 Affymetrix 公司,Moflo XDP 型流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。微量细胞提取试剂盒 REPLI-g Cell (WTA)

Kit 购自美国 Quagen 公司,DNA 纯化试剂盒微量紫外分光光度计 QIAamp® DNA Mini Kit 购自美国 Quagen 公司,NanoDrop 2000 购自美国 Thermo 公司,微流控芯片电泳分析系统 Agilent Bioanalyzer 2100 购自德国 Agilent 公司。

1.3 分离直肠癌患者外周血单个核细胞

将外周血经等量的 PBS 稀释后,用 Ficoll-Paque™ Premium 淋巴细胞分离液 2 000 × g 离心 15 min,吸取界面的单个核细胞,以 PBS 洗涤 2 次,1 500 × g 离心 5 min,收集细胞进行抗体标记。

1.4 流式细胞术检测和分选直肠癌患者 CTC

将收集的细胞用 100 μl PBS 重悬,依次加入 CD45-PE 40 μl 和 EpCAM-APC 10 μl,避光 4 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次,重悬至 800 μl 含 10% 胎牛血清的 PBS 中,应用 Moflo XDP 高速流式细胞仪检测和分选 CTC(DAPI⁺/CD45⁻/Epcam⁺)和白细胞对照(DAPI⁺/CD45⁻/Epcam⁻)。分选的 CTC 冻存于 -80 ℃ 冰箱,进行 RNA 提取与预扩增。

1.5 提取直肠癌患者 CTC 和肿瘤组织的总 RNA

血液 CTC RNA 提取与扩增:采用微量细胞提取试剂盒 REPLI-g Cell (WTA) Kit 抽提和扩增,选用 QIAamp® DNA Mini Kit 纯化方案,纯化后样本经 NanoDrop 2000 和 Agilent Bioanalyzer 2100 质检,合格样本进入芯片实验。直肠癌组织标本 RNA 提取:采用 TRIzol 法进行样品的总 RNA 抽提,抽提所得总 RNA 经 NanoDrop 2000 和 Agilent Bioanalyzer 2100 质检,合格样本进入芯片实验。

1.6 人全转录组表达芯片检测直肠癌组织和 CTC 的基因表达谱

采用人全转录组表达谱芯片 Affymetrix HTA2.0 Array 完成表达谱基因芯片的检测。芯片检测步骤主要包括双链 cDNA 的合成、标记和双链的片段化等,芯片的杂交和扫描分别在 Hybridization Oven 640 和 GeneChipScanner 3000 上进行。Agilent mRNA 表达谱芯片杂交扫描后的 TIFF 格式图片数据采用 Feature Extraction 提取软件进行预处理分析,然后采用 GeneSpring GX 软件分析基因表达差异。再根据样品表达模式的相关性进行 Cluster 3.0 软件聚类分析。数据筛选标准为 $P \leq 5\%$,同时差异倍数在

2.0 倍以上。将芯片检测结果用生物分子功能注释系统(MAS, <http://bioinfo.capitalbio.com/mas3/>) 软件进行 GO(Gene Ontology)分析,其中 MAS 系统包括 3 个公共数据库: Molecular Function、Biological Process 和 Cellular Component,从而探讨差异基因的功能以及可能涉及的相关信号通路。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件,两组数据比较采用非配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 成功检测出直肠癌 CTC

入选病例一般资料及检测 CTC 数见表 1。利用流式细胞术检测 CTC(DAPI⁺/CD45⁻/Epcam⁺)和白细胞对照(DAPI⁺/CD45⁻/Epcam⁻)见图 1,4 例患者检测出 CTC 数量为 53 ~ 120 个。

表 1 入选病例一般资料和分选 CTC 个数

Tab.1 Clinical features and sorted CTC number of the 4 patients with rectal cancer

No.	Sex	Age (t/a)	Pathological type	Grading and Staging (WHO 2010)	CTC number
1	Male	44	Moderately differentiated ulcerative adenocarcinoma of rectum	pT3N1M0, III B	67
2	Male	59	Same as above	pT3N0M0, II A	78
3	Female	60	Same as above	pT2N0M0, I	53
4	Female	66	Same as above	pT2N1cM0, III A	120

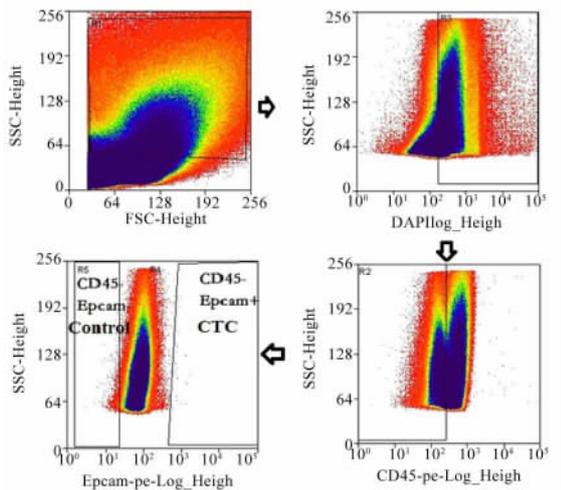


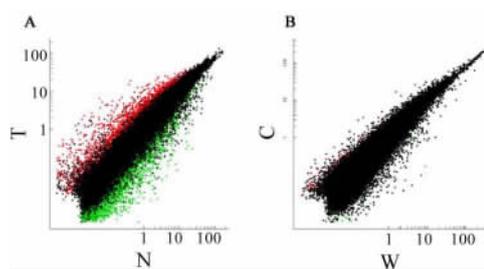
图 1 流式细胞仪检测和分选 CTC

Fig.1 Identification and sorting of CTCs by flow cytometry

2.2 直肠癌组织及血液 CTC 中部分基因表达明显上调或下调

2.2.1 肿瘤组织及血液 CTC 基因芯片散点分布散点图(图 2)中肿瘤组织用 T 表示,癌旁正常组织用 N 表示,CTC 用 C 表示,白细胞用 W 表示。散点图分别展示了 T/N 和 C/W 样品之间基因表达的差异情况。其中 X 轴和 Y 轴分别以荧光信号强度为

坐标,图中每个点代表芯片上一个探针集(基因)的荧光信号强度,其中标注为红色的分别是 T/N 和 C/W 发生上调的基因,标注为绿色的是 T/N 和 C/W 发生下调的基因,标注为黑色的是表达无差异基因。



A: Rectal carcinoma and normal intestinal tissues(T/N);
B: CTCs and white cells(C/W)

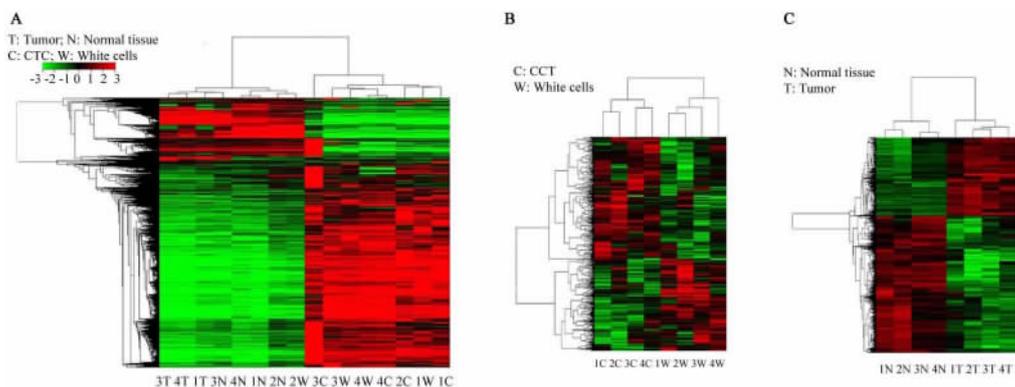
图 2 直肠癌组织与血液 CTC 细胞表达谱散点图
Fig.2 Scatter plot of both rectal cancer tissues and blood CTCs expression profile

2.2.2 聚类分析显示直肠癌组织与 CTC 的基因表达谱差异较大 根据 4 例样品表达模式的相关性用 Cluster 3.0 软件进行聚类分析,TreeView 绘制聚类图(图 3)。直肠癌组织与正常肠组织、CTC 与白细胞各组之间均聚类良好;组织(T 和 N)与细胞(C 和 W)这两大组的表达谱差异很大,大于单独 T/N 或

C/W 差异。

2.2.3 直肠癌组织与 CTC 差异基因交集后共同上调或下调的基因 特异性基因筛选:(1)肿瘤/正常组织差异基因(T/N)共 7 755 个,其中上调 2 830

个、下调 4 925 个; CTC/ 白细胞对照(C/W)差异基因共 567 个,其中上调 325 个、下调 142 个。特异性基因(上述两大组差异基因取交集)共 36 个,其中上调 16 个、下调 20 个($P < 0.05$ 或 < 0.01),见表 2、3。



A: Cluster data of tumor and normal tissues, CTCs and white cells microarray data;
 B: Cluster data of CTCs and white cells (C/W) microarray data;
 C: Cluster data of tumor and normal tissues(T/N) microarray data

图 3 直肠癌组织与血液 CTC 细胞表达谱芯片聚类图

Fig.3 Cluster data of microarray expression profiling of rectal cancer and blood CTCs

表 2 肿瘤/正常组织和 CTC/白细胞对照差异基因取交集后共同上调的基因

Tab.2 Up-regulated genes from the intersection result between the sets of T/N and C/W

Gene	T/N		C/W	
	Up-regulation level	P	Up-regulation level	P
<i>FANCA</i>	2.4265442	0.0051064	3.9408231	0.0197647
<i>DST</i>	2.0676714	0.0158062	2.3053244	0.0195608
<i>ZNF469</i>	3.7105461	0.0153363	2.5548924	0.0266696
<i>S100A3</i>	4.2944346	0.0151915	2.7417368	0.0112295
<i>MMP9</i>	3.1864032	0.0011982	2.5714867	0.0038834
<i>ODF2</i>	2.2472830	0.0087753	2.1423327	0.0158847
<i>ODC1</i>	3.0671490	0.0028717	4.4565782	0.0211096
<i>PEX10</i>	2.3222037	0.0270837	2.7092833	0.0477897
<i>ALG3</i>	2.5449418	0.0020069	3.0287012	0.0328646
<i>SORD</i>	3.4871562	0.0073913	2.4335637	0.0343812
<i>FAM72D</i>	6.3463021	0.0075492	5.1872470	0.0396666
<i>LOC101926941</i>	4.3519589	0.0215872	3.1494441	0.0067325
<i>SERPINB5</i>	11.0482150	0.0055938	3.9026998	0.0366444
<i>SOX30</i>	5.0096113	0.0198062	2.9647922	0.0138990
<i>SNRPG</i>	2.3169668	0.0421699	3.1589280	0.0245389
<i>ITGA11</i>	2.8215638	0.0252885	3.2205157	0.0278300

2.3 CTC 的特异性基因与肿瘤转移和干细胞功能有关

经 MAS 生物信息学软件分析,36 个交集差异基因 GO 功能按生物过程、细胞成分和分子功能分类,比例分别是 27.67%、45.28% 和 27.04%。在 GO 功能进一步亚分类中,最主要的两类是 GO:0007582 生理过程占 11.50%; GO:0009987 细胞过程占 14.25%,都属于生物过程(图 4)。比较显著性富集的是 GO:0007155 细胞黏附(*DST, ITGAI1, DDR2, MMP9*); GO:0007275 发育(*ODF2, MITF, ARHGAP24*); GO:0030154 细胞分化(*ODF2, ARHGAP24*); GO:0007165 信号转导(*DDR2, OR2A42, DPYSL5, ARHGAP2*); GO:0045104 中间纤维细胞骨架组织和生物发生(*DST*); GO:0007229

整联蛋白介导信号转导途径(*DST; ITGAI1; LAT*); GO:0008380 RNA 剪切(*SNRPG, SNRPG, YTHDC1*)。这些显著性富集的 GO 功能都与肿瘤转移和干细胞功能有关。

2.4 CTC 的特异性基因涉及 22 条相关信号通路

经 MAS 生物信息学软件分析,36 个交集差异基因进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路分析,发现共涉及 22 条信号通路(图 5)。其中 *ITGAI1* 参与黏着斑、肌动蛋白细胞骨架调节和细胞外基质受体相互作用的 3 条通路,与细胞转移功能相关。而 *NFATC4* 则参与包括 VEGF、Wnt、MAPK 信号通路(参与细胞增殖和分化)及 T、B、NK 免疫细胞信号通路,与干细胞功能和免疫功能相关。

表 3 肿瘤/正常组织和 CTC/白细胞对照差异基因取交集后共同下调的基因

Tab.3 Down-regulated genes from the intersection result between the sets of T/N and C/W

Gene	T/N		C/W	
	Down-regulation level	P	Down-regulation level	P
<i>CHFR</i>	3.3332321	0.0366488	2.1836060	0.0238603
<i>DDR2</i>	3.8718791	0.0045353	3.7032434	0.0242982
<i>LOC100131581</i>	4.5064907	0.0054180	2.5315999	0.0465955
<i>SDCBP2</i>	2.7416124	0.0388925	2.0094241	0.0230470
<i>OR2A42</i>	3.2674229	0.0024044	3.2188433	0.0106309
<i>MITF</i>	2.6688214	0.0251311	2.9275756	0.0301814
<i>XLOC_l2_011636</i>	3.7408227	0.0456427	2.1952807	0.0285885
<i>MKNK2</i>	2.1792578	0.0065416	3.0930021	0.0411723
<i>GOLGA8K</i>	3.8799528	0.0039127	3.5783740	0.0301008
<i>OR9H1P</i>	2.0921017	0.0128555	8.5755874	0.0477666
<i>TARP</i>	4.2700256	0.0056966	2.0203761	0.0077104
<i>LAT</i>	2.5848801	0.0396454	3.5466598	0.0167896
<i>MYO5B</i>	2.1935556	0.0102812	11.2504132	0.0359066
<i>LRRK2</i>	7.6166926	0.0111882	4.9810366	0.0344279
<i>NFATC4</i>	5.0002477	0.0142101	2.0172409	0.0157473
<i>CCDC162P</i>	2.4339435	0.0356909	3.3581893	0.0468129
<i>YTHDC1</i>	4.5186903	0.0029598	2.3058910	0.0240664
<i>LOC400958</i>	6.0792952	0.0044580	2.0744238	0.0078736
<i>DPYSL5</i>	7.4278550	0.0173224	3.6150902	0.0147252
<i>ARHGAP24</i>	2.8675507	0.0005237	4.4719011	0.0067527

3 讨论

恶性肿瘤的高度异质性使不同个体之间存在药效差异, 肿瘤在不断进化, 不同阶段表现出不一样的生物学特征, 给临床诊治造成极大困扰^[6]。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。因此, 分析 CTC 的基因表达谱具有重要的临床意义, 可能由此推断未来形成转移瘤的特征, 从而起到早期筛查和指导用药的作用^[7]。

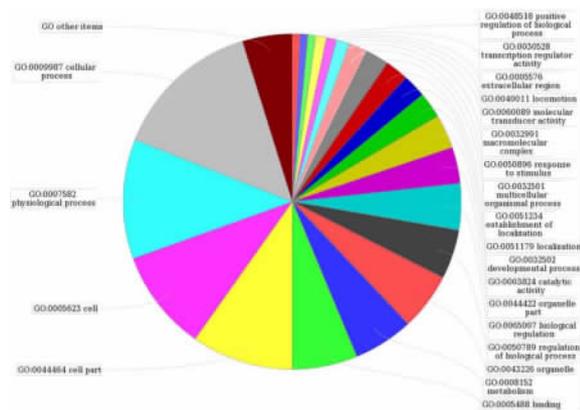


图 4 交集差异基因 GO 功能亚分类

Fig. 4 GO sub-category of differentially expressed genes after intersection results

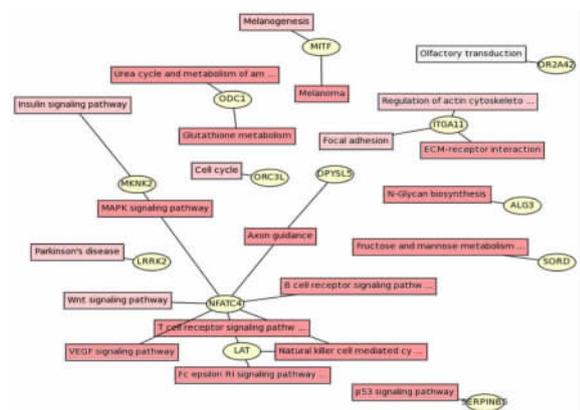


图 5 交集差异基因信号通路分析

Fig. 5 Signaling pathway analysis of differentially expressed genes after intersection results

循环肿瘤细胞检测系统是目前唯一已被美国食品药品监督管理局、中国国家食品药品监督管理局批准, 用于乳腺癌、结直肠癌及前列腺癌患者 CTC 的

临床检测系统, 其以 CD45⁻ EpCAM⁺ CK⁺ 确认为 CTC, 从 7.5 ml 外周血中检测 CTC 数目, 如果结肠癌 CTC ≥ 3 个细胞, 则提示患者预后不良。但在基础研究领域, 鉴于不同的实验目的和策略, 采用的标志物有所不同^[8]。Satelli 等^[9]发现细胞表面波形蛋白(cell-surface vimentin, CSV)和 EpCAM 结合可以作为 CTC 标志物, 鉴别乳腺癌患者治疗反应性和无反应性组。Onstenk 等^[10]发现 EpCAM 和 MCAM 两种标志物联用可以提高新辅助化疗乳腺癌患者的 CTC 检测水平。Magbanua 等^[11-12]利用 CD45⁻/Epcam⁺ 联合核酸染料作为 CTC 细胞鉴定和分选标志物, 从转移性乳腺癌患者血液中分 CTC 并研究了其基因组拷贝数变异。Neves 等^[13]发现较短的固定时间不会引起细胞 DNA 片段化, 利用 DAPI⁺/CK⁺/CD45⁻ 从转移性乳腺癌中分离出了 CTC, 且在单个 CTC 细胞水平上采用比较基因组杂交芯片研究基因拷贝数变异。本课题组采用 CTC 鉴定的标志物组合为: DAPI⁺/CD45⁻/Epcam⁺。CK 是胞内蛋白, 标记需要细胞固定和破膜, 该过程易破坏 RNA, 而且 CTC 数量太少且不易分选回收。考虑到本实验最终目的, 故分选时放弃 CK 标志, 采用 DAPI 染色以排除死细胞的影响。本研究利用流式细胞仪分选了 4 例直肠癌患者血液 CTC 细胞, 采用 Affymetrix 表达谱芯片检测 CTC 和相应患者肿瘤组织的 mRNA 表达谱, 筛选到 36 个 CTC 的特异性基因。通过 MAS 软件分析发现, 这些基因显著性富集的 GO 功能都与肿瘤转移及干细胞功能相关, 信号通路主要与干细胞功能和免疫功能有关。其中 *ITGA11* 在头颈部肿瘤间质^[16]、乳腺癌转移亚群^[17]中高表达, 均与肿瘤转移有关。在肺癌中, *ITGA11* 不仅与转移相关, 还可以用来预测肺癌预后^[18]。在直肠癌中未见 *ITGA11* 与转移相关的报道。本研究发现 *ITGA11* 在直肠癌组织和 CTC 中均高表达, 提示 *ITGA11* 可能参与直肠癌转移和复发。Kim 等^[19]发现 *SERPINB5* 与直肠癌的恶性程度相关; 本研究中 *SERPINB5* 在直肠癌组织和 CTC 细胞中均高表达, 两课题研究结果相符。*NFATc4* 参与调控胰腺癌的发生^[20], 在肠道系统中, 可通过调控 *PTEN* 来调节肠道细胞分化^[21]。本研究发现, *NFATc4* 在直肠癌组织和 CTC 中均低表达, 提示 *NFATc4* 可能抑制直肠癌转移和复发。MMP9 蛋白的已知功能就包括降解细胞外基质, 破坏血管完整性, 利于细胞转移。

本课题组下一步将继续对 *ITGA11*、*SERPINB5* 和 *NFATc4* 进行功能验证, 揭示 CTC 转移和形成转移灶的具体调控机制, 希望能为肿瘤转移早期诊断

和机制研究提供线索。本研究受技术方面的限制, 没有深入进行单细胞水平的研究。随着技术的发展和普及, CTC 的单细胞全基因组测序研究已成为当今研究的热点, 亦将是笔者后续研究的主要方向。

【参考文献】

- [1] 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.
- [2] SCHLANGE T, PANTEL K. Potential of circulating tumor cells as blood-based biomarkers in cancer liquid biopsy[J]. *Pharmacogenomics*, 2016, 17(3):183-186. DOI: 10.2217/pgs.15.163.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] WATANABE M, UEHARA Y, YAMASGHITA N, et al. Multi-color 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.
- [6] 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 [2017-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5217044/>. DOI: 10.18632/oncotarget.8015.
- [7] 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.
- [8] GABRIEL M T, CALLEJA L R, CHALOPIN A, et al. Circulating tumor cells: a review of non-EpCAM-based approaches for cell enrichment and isolation[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(4):571-581. DOI: 10.1373/clinchem.2015.249706.
- [9] SATELLI A, BROWNLEE Z, MITRA A, et al. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 259-266. DOI: 10.1373/clinchem.2014.228122.
- [10] ONSTEN W, KRAAN J, MOSTERT B, et al. Improved circulating tumor cell detection by a combined EpCAM and MCAM cell search enrichment approach in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(3):821-827. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0653.
- [11] MAGBANUA M J, SOSA E V, ROY R, et al. Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 30-40. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3017.
- [12] MAGBANUA M J, SOSA E V, SCOTT J H, et al. Isolation and genomic analysis of circulating tumor cells from castration resistant metastatic prostate cancer[J/OL]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 78 [2017-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395839/>. DOI:10.1186/1471-2407-12-78.
- [13] NEVES R P, RABA K, SCHMIDT O, et al. Genomic high-resolution profiling of single CKpos/CD45neg flow-sorting purified circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer[J]. *Clin Chem*, 2014, 60(10): 1290-1297. DOI: 10.1373/clinchem.2014.222331.
- [14] 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.
- [15] ALBERTER B, KLEIN C A, POLZER B. Single-cell analysis of CTCs with diagnostic precision: opportunities and challenges for personalized medicine[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(1): 25-38. DOI:10.1586/14737159.2016.1121099.
- [16] PARAJULI H, TEH M T, ABRAHAMSEN S, et al. Integrin $\alpha 11$ is overexpressed by tumour stroma of head and neck squamous cell carcinoma and correlates positively with alpha smooth muscle actin expression[J/OL]. *J Oral Pathol Med*, 2016, 2016: 4 [2017-02-15]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jop.12493/abstract>. DOI: 10.1111/jop.12493.
- [17] WESTCOTT J M, PRECHTL A M, MAINE E A, et al. An epigenetically distinct breast cancer cell subpopulation promotes collective invasion[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(5):1927-1943. DOI: 10.1172/JCI7767.
- [18] ZHENG W, JIANG C, LI R. Integrin and gene network analysis reveals that ITGA5 and ITGB1 are prognostic in non-small-cell lung cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(18):2317-2327. DOI: 10.2147/OTT.S91796.
- [19] KIM J H, CHO N Y, BAE J M, et al. Nuclear maspin expression correlates with the CpG island methylator phenotype and tumor aggressiveness in colorectal cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1920-1928. DOI: 10.1038/cddis.2015.127.
- [20] HESSMANN E, ZHANG J S, CHEN N M, et al. NFATc4 regulates Sox9 gene expression in acinar cell plasticity and pancreatic cancer initiation[J/OL]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 5272498 [2017-02-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4677249/>. DOI: 10.1155/2016/5272498.
- [21] WANG Q, ZHOU Y, JACKSON L N, et al. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling regulates PTEN expression and intestinal cell differentiation[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(3): 412-420. DOI: 10.1091/mbc.E10-07-0598.

【收稿日期】 2017-01-02

【修回日期】 2017-03-25

【本文编辑】 王映红