

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.004

· 专题报道(临床研究) ·

流式细胞术检测结直肠癌根治术前后循环肿瘤细胞和循环肿瘤干细胞及其临床预测价值

许扬梅,刘巧珍,刘沁颖,魏晟宏,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:**探讨流式细胞仪检测结直肠癌根治术前后循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)和循环肿瘤干细胞(circulating tumor stem cell, CTSC)作为患者临床预测指标的可行性和临床价值。**方法:**入组首诊初治50例结直肠癌患者,手术前后各抽取15 ml外周血。分离单个核细胞后分成两份,一份标记CTC标志物(CD45、EpCAM和CK),另一份标记CTSC标志物(CD45、EpCAM、CD44和CD133),Moflo XDP流式细胞仪对其进行检测,CD45⁻EpCAM⁺CK⁺细胞确定为CTC;CTSC确定为3群:CD44⁺CTSC、CD133⁺CTSC和CD44⁺CD133⁺CTSC。**结果:**结直肠癌根治术前患者CTC和CD44⁺CTSC阳性率分别为34%和44%,CD133⁺CTSC和CD44⁺CD133⁺CTSC是24%和0;术后患者CTC和CD44⁺CTSC阳性率分别为38%和54%,CD133⁺CTSC和CD44⁺CD133⁺CTSC分别为26%和0。根治术前后CTC阳性率都与肿瘤T分期有关联($P < 0.05$);术后CTC与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移和远处转移有关联($P < 0.05$);术前CD44⁺CTSC与肿瘤的浸润深度有关联。**结论:**根治术前后CTC及术前CD44⁺CTSC阳性率都具有临床预测指标的可行性和价值,术后CTC阳性率可能是更好的预测指标。

[关键词] 结直肠癌;循环肿瘤细胞;循环肿瘤干细胞;CD133;CD44;流式细胞术

[中图分类号] R735.3; R730.43; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)04-0355-08

Identification of circulating tumor cells and circulating tumor stem cells before and after radical resection of colorectal carcinoma by flow cytometry and its prognostic value

XU Yangmei, LIU Qiaozhen, LIU Qinying, WEI Shenghong, CHEN Luchuan, YING Mingang, ZHENG Qihong (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 explore the feasibility and clinical value of indentifying circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor stem cells (CTSCs) by Flow cytometry before and after the radical resection of colorectal carcinoma for the prognosis prediction of colorectal cancer (CRC) patients. **Methods:** Altogether 50 colorectal cancer patients without previous chemotherapeutic treatment were recruited. Approximately 15 ml peripheral blood was drawn from each patient before and one week after surgery. Mononuclear cells were isolated and divided into two groups: one was tagged with CTC surface markers (CD45, EpCAM and CK), and the other with CTSC markers (CD45, EpCAM, CD44 and CD133). After examination by Moflo XDP flow cytometry, CTC was defined as CD45⁻EpCAM⁺CK⁺; and CTSC was categorized into three groups: CD44⁺CTSC (CD45⁻EpCAM⁺CD44⁺), CD133⁺CTSC (CD45⁻EpCAM⁺CD133⁺), CD44⁺CD133⁺

[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);福建省卫教联合项目(No. WKJ-FJ-14);国家临床重点专科建设基金资助项目(No. 2013-544)。Project supported by Fujian Natural Science Foundation (No. 2015-CXB-4), Project supported by Fujian Natural Science Foundation(No. 2016J01436), Fujian Provincial Joint Project of Health and Education Bureau (No. WKJ-FJ-14), and the National Clinical Key Specialty Construction Program(No. 2013-544)

[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: yym-victoria810@hotmail.com

[通信作者] 郑秋红(ZHENG Qihong, 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.20170413.1025.006.html>

CTSC (CD45⁻EpCAM⁺CD44⁺CD133⁺). **Results:** Positive rates of pre-operative CTC and CD44⁺CTSC were 34% and 44% , respectively, while the positive rates of CD133⁺CTSC and CD44⁺CD133⁺CTSC were 24% and 0% , respectively. Positive rates of post-operative CTC and CD44⁺CTSC were 38% and 54% , respectively, while the positive rates of CD133⁺CTSC and CD44⁺CD133⁺CTSC were 26% and 0% , respectively. Both pre- and post-operative CTC levels were associated with the T stages of tumor ($P < 0.05$); Moreover, post-operative CTC level had significant correlation with infiltration depth, lymphnode metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$). Pre-operative CD44⁺CTSC level was associated with tumor infiltration depth ($P < 0.05$). **Conclusion:** Pre- and post-operative CTCs and preoperative CD44⁺CTSC all have the feasibility and practical value to be the prognostic biomarkers; Postoperative CTC positive rate may serve as a better predictive biomarker for colorectal cancer.

[**Key words**] colorectal cancer(CRC); circulating tumor cell(CTC); circulating tumor stem cell(CTSC); CD133; CD44; flow cytometry

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 355-361. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.004]

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是自发或因诊疗操作进入外周血循环的肿瘤细胞,作为液体活检的主要检测物之一,CTC 在肿瘤早期诊断,预后评估和个性化用药指导等方面具有广泛的应用前景。结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是人类常见的恶性肿瘤之一^[1]。一份包含 36 项研究和 3 094 位 CRC 患者资料的 Meta 分析显示,CTC 的检出与患者预后差相关^[2]。然而,对于 CRC 根治术前后 CTC 的预测能力,不同学者意见不一。循环肿瘤干细胞(circulating tumor stem cell, CTSC)是具有干细胞功能的 CTC^[3-6]。在 CRC 中,CD133 和 CD262 都被用作 CTSC 标志物^[5,7]。如何确定 CRC 的 CTSC 以及 CTSC 是否具有临床预测价值是当前研究的热点和难点。本研究利用 Moflo XDP 高速分选型流式细胞仪检测了 CRC 根治术前后 CTC/CTSC 水平,并探讨了它们作为患者预后预测指标的可行性和临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集福建省肿瘤医院 2013 年 9 月至 2014 年 12 月收治的首诊初治的 CRC 患者 50 例,年龄 < 75 岁, KPS 评分 > 70,预期生存期 > 3 个月;所有病例均经过病理确诊;晚期患者;血象正常、无心肺肾等基础疾病;估计能耐受放化疗。入选病例中位年龄 56.9 岁(27 ~ 75 岁)。根据美国癌症协会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)标准,患者分期如下: I 期 5 例, II 期 11 例, III 期 29 例, IV 期 5 例。同期对照组选择健康人 50 例,入组条件:血象正常;肝肾功能、心肺功能、电解质正常;免疫功能正常;无传染病。抽血均获本人或其家属同意并签署知情同意书,研究方案获福建省肿瘤医院伦理委员会批准

(科研[2013]29 号)。

1.2 主要试剂与仪器

荧光标记单克隆抗体 CK18-FITC、EpCAM-APC、CD45-PE(标记 CTC 细胞)、CD45-FITC、EpCAM-APC、CD133-PE, CD44-PerCP-CyTM5.5(标记 CTSC 细胞)均购自美国 BD 公司, Ficoll-PaqueTM 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, Triton X-100 购自厦门泰京公司, Optilyse 裂解液购自美国 Beckman 公司。Moflo XDP 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.3 分离并标记外周血单个核细胞

将外周血经等量的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释后,用 Ficoll-PaqueTM 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,经 PBS 洗涤 2 次,1 500 × g 离心 5 min,收集细胞。

1.4 流式细胞术检测抗体标记的 CTC/CTSC

加入 2 ml 裂解液于收集细胞中,混匀,裂解红细胞并固定其余细胞。然后离心洗涤,用 100 μl PBS 重悬,均分成 2 份。用以 CTC 检测的 1 份加入 2 ml 透化剂,室温作用 10 min,1500 × g 离心 5 min,收集细胞重悬于 50 μl PBS,而后依次加入荧光抗体 CD45-PE 20 μl、CK18-FITC 10 μl 和 EpCAM-APC 10 μl;用以 CTSC 检测的另一份依次加入 CD45-FITC 20 μl、CD133-PE 10 μl、CD44-PerCP-CyTM5.5 5 μl 和 EpCAM-APC 10 μl。避光 4 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次,重悬至 500 μl 含 10% 胎牛血清的 PBS 中,样本经 Moflo 流式细胞仪检测分析,CTC 细胞确认为 CD45⁻EpCAM⁺CK⁺;CTSC 确认为 3 群: CD44⁺CTSC (CD45⁻EpCAM⁺CD44⁺), CD133⁺CTSC (CD45⁻EpCAM⁺CD133⁺) 和 CD44⁺CD133⁺CTSC (CD45⁻EpCAM⁺CD44⁺CD133⁺)。记录外周

血分离的 CTC/CTSC 数量。≥3 CTC/7.5 ml 和 ≥1 CTSC/7.5 ml 分别确认为 CTC 和 CTSC 阳性。

1.5 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 计数资料以百分率表示, 进行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 根治术前后患者 CTC 阳性率及其与临床参数的关系

流式细胞术对 CTC 检测结果见图 1、表 1。CRC 患者被检出的 CTC 数量范围是 0 ~ 120 个/7.5 ml 血样。

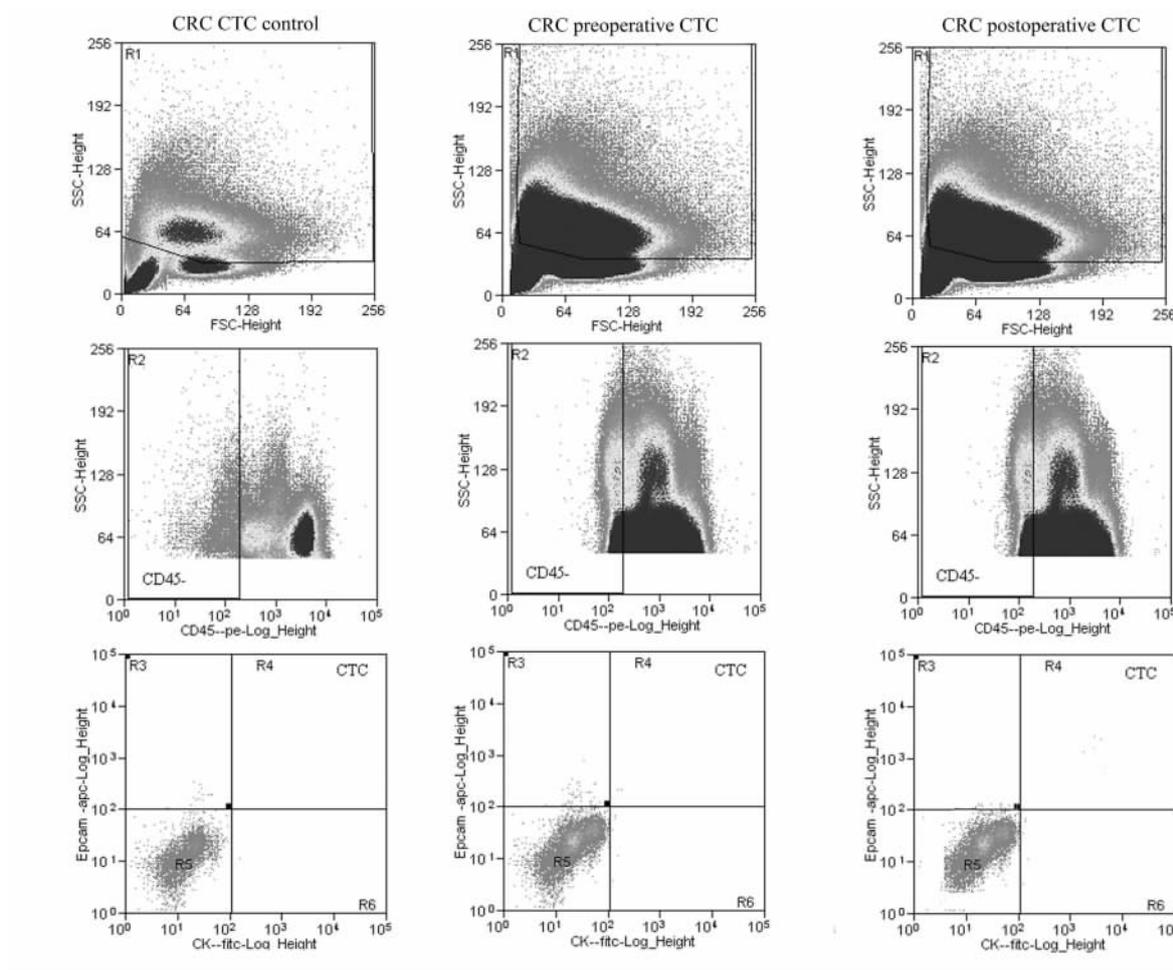


图 1 流式细胞仪检测 CRC 患者根治术前后 CTC 数量

Fig. 1 Preoperative and postoperative CTCs enumeration of CRC patients by flow cytometry

流式细胞术检测结果显示, 健康对照 ($n = 10$) CTC 阳性率为 0, 根治术前后 ($n = 50$) CTC 阳性率达到 34% 和 38%。

分析 CRC 根治术前后 CTC 阳性率与患者临床参数的关系, 结果(表 1)显示, 根治术前 CTC 的表达水平与肿瘤大小和 T 分期相关 ($P = 0.013$; $P = 0.029$); 术后 CTC 不仅与 T 分期相关, 还与淋巴结转移和远处转移密切相关 ($P = 0.012$; $P = 0.037$; $P = 0.041$)。

2.2 CRC 根治术前后患者 CTSC 阳性率与临床参数的关系

流式细胞术对 CTSC 检测结果见图 2。CRC 患者被检出的 CTSC 数量范围是 0 ~ 39 个细胞/7.5 ml 血样。

流式细胞术对 CRC 患者根治术前后 CTSC 的检测结果显示, $CD44^+$ CTSC (44%、54%) 检测率远高于 $CD133^+$ CTSC (4%、6%), 而 $CD44^+ CD133^+$ CTSC 检测率是 0。根治术前后 CTSC 数量与患者临床参数的关系分析结果(表 2)显示, 术前 $CD44^+$ CTSC 阳性率与年龄和肿瘤的 T 分期有关 ($P = 0.013$, $P = 0.015$)。T4 患者的 CTSC 阳性率比 T2 和 T3 期患者都高。术后 $CD44^+$ CTSC 阳性率与任

何临床参数都无关联。根治术前后 CD133⁺ CTSC 阳性率与任何临床参数都无关。

表 1 CRC 患者根治术前后 CTC 阳性率与临床参数的关系[n(%)]

Tab.1 Correlation between positive rates of pre- and post- operative CTCs and clinical characteristics of CRC patients [n(%)]

Characteristic	N	Preoperative CTCs	P	Postoperative CTCs	P
Age(t/a)			0.370		0.382
≤60	25	10(40.0)		8(32.0)	
>60	25	7(28.0)		11(44.0)	
Sex			0.903		0.341
Man	30	10(33.3)		13(43.3)	
Female	20	7(35.0)		6(30.0)	
Tumor size(d/cm)			0.013		0.944
<5	26	13(54.2)		10(41.7)	
≥5	24	4(16.7)		9(37.5)	
TNM stage			0.546		0.116
I	5	2(40.0)		3(60.0)	
II	11	2(18.2)		3(27.3)	
III	29	12(41.4)		9(31.0)	
IV	5	1(20.0)		4(80.0)	
T stage			0.029		0.012
T1	2	0(0)		0(0)	
T2	5	4(80.0)		3(60.0)	
T3	4	3(75.0)		4(100.0)	
T4	39	11(28.2)		12(30.8)	
RLNM			0.222		0.037
N0	17	3(17.6)		1(5.9)	
N1	21	9(42.9)		10(47.6)	
N2	12	5(41.7)		1(8.3)	
M(metastasis)			0.440		0.041
M0	45	16(35.6)		15(33.3)	
M1	5	1(20.0)		4(80.0)	

Statistically significant P values are given in bold

表 2 CRC 患者根治术前后 CD44⁺ CTSC 阳性率与临床参数的关系[n(%)]

Tab.2 Correlation between positive rates of pre-and post- operative CD44⁺ CTSCs and clinical characteristics of CRC patients [n(%)]

Characteristic	N	Preoperative CD44 ⁺ CTSCs	P	Postoperative CD44 ⁺ CTSCs	P
Age(t/a)			0.013		0.157
≤60	25	12(48.0)		15(60.0)	
>60	25	10(40.0)		12(48.0)	
Sex			0.313		0.205
Man	30	4(13.3)		17(56.7)	
Female	20	3(15.0)		10(50.0)	
Tumor size(d/cm)			0.138		0.189
<5	26	2(7.7)		13(50.0)	
≥5	24	5(20.8)		14(58.3)	
TNM stage			0.887		0.611
I	5	2(40.0)		3(60.0)	
II	11	5(45.5)		5(45.5)	
III	29	12(41.4)		15(51.7)	
IV	5	3(60.0)		4(80.0)	
T stage			0.015		0.675
T1	2	2(100.0)		1(50.0)	
T2	5	0(0.0)		3(60.0)	
T3	4	0(0.0)		1(25.0)	
T4	39	20(52.6)		22(56.4)	
RLNM			0.226		0.626
N0	17	7(41.2)		8(47.1)	
N1	21	13(61.9)		13(61.9)	
N2	12	4(33.3)		6(50.0)	
M(metastasis)			0.275		0.191
M0	45	19(42.2)		23(51.1)	
M1	5	3(60.0)		4(80.0)	

Statistically significant P values are given in bold

2.3 流式细胞术检测 CRC 患者根治术前后 CTC 和 CTSC 的临床预测价值

CTC/CTSC 临床预测价值综合分析结果如表 3 所示,根治术前后 CTC 的表达水平都与肿瘤 T 分期相关;术前 CTC 还与肿瘤大小相关;术后 CTC 还与

肿瘤淋巴结转移和远处转移密切相关。根治术前后的 CTC 都具有肿瘤预后预测价值, 术后 CTC 比术前 CTC 更能反映肿瘤转移情况。

对于 CTSC, 只有术前 CD44⁺ CTSC 与年龄和肿

瘤 T 分期有关。由此推断, CD44⁺ CTSC 具有肿瘤预后预测价值。CD133⁺ CTSC 虽有检出率, 但较低, 且与临床病理特征无关联。CD44⁺ CD133⁺ CTSC 无检出率, 因而无临床检测可行性和价值。

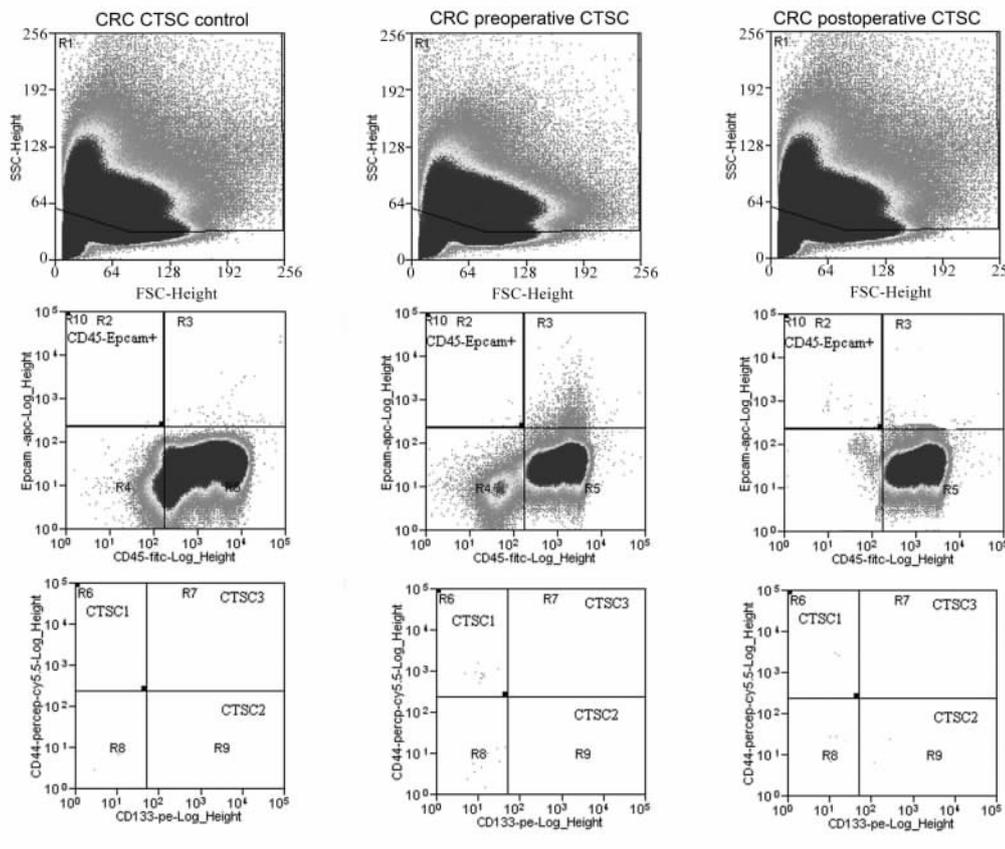


图 2 流式细胞仪检测 CRC 患者根治术前后 CTSC 数量

Fig. 2 Preoperative and postoperative CTSCs enumeration of CRC patients by flow cytometry

表 3 流式细胞术检测 CRC 患者根治术前后 CTC 和 CTSC 的临床预测意义

Tab. 3 Clinical significance of detecting pre-and post-operative CTCs and CTSCs of CRC patients by flow cytometry

Cell type	Detection rate(%)	Related clinical parameter				
		Age	Tumor size	T stage	M0	M1
CTC						
Preoperation	34	$P > 0.05$	$P = 0.013$	$P = 0.029$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
Postoperation	38	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P = 0.012$	$P = 0.037$	$P = 0.041$
CD44 ⁺ CTSC						
Preoperation	44	$P = 0.013$	$P > 0.05$	$P = 0.015$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
Postoperation	54					

3 讨论

液体活检, 就是通过血液或者尿液等对癌症等疾病做出诊断, 作为精准医学新技术, 被 MIT Tech-

nology Review 列为“2015 年度十大突破技术”。CTC 作为液体活检重要内容之一, 其分析和研究方法多样, 包括 CTC 临床检测系统、磁珠分选、流式细胞术、微液流芯片和荧光定量 PCR 等方法^[8-12]。

CRC 患者虽然 5 年生存率较高, 但约 20% ~ 40% 根治术后患者会复发或转移^[13], 是导致患者死亡的主要原因。因此, 研究 CTC 作为 CRC 临床预后评价指标的价值具有重大意义^[14-16]。然而, 对于 CRC 根治术前、后 CRC 的预测能力, 不同学者意见不一。Cohen 等^[17]认为治疗前 CTC 数量是患者预后有效标志物, 与患者治疗方案和自身特征无关, 而 Lu 等^[18]认为术后 CTC 才具有预后预测价值。Nesteruk 等^[19]运用 qPCR 发现术前经过了放疗的 CRC 患者, 术前 CTC 水平不能判断预后, 但是术后 7 d CTC 水平可以作为局部转移的独立预后指标。

对于围手术期 CTC 的研究国内外学者运用了各种各样的方法, 其研究结果也不尽相同^[20]。Galizia 等^[21]以 CD45⁻/CK⁺ 细胞判定为 CTC 并用流式细胞仪检测其数量, 发现术前 CTC 阴性的患者都没有出现转移, 术后 CTC 水平可以预测肿瘤转移。本研究结果与 Galizia 相似, 术后 CTC 水平与 T 分期 (N 和 M 期) 都相关。由于 CRC 患者 5 年存活率高, 本课题随访时间 (26 ~ 41 个月) 还太短, 以致没有发现 CTC 阴阳性组的 PFS 和 OS 有显著差异 (数据未显示)。

近年来判定 CTSC 的研究方兴未艾, 包括 CD133、EpCAM、CD44、CK、CD166、CEA 和 ALDH1 等标志物都被用来鉴定 CTSC^[3-6]。由于 CTSC 比 CTC 数量更少, 而且其表面标志物还不清楚, 如何定义 CTSC 以及 CTSC 是否具有临床预后预测价值是当前的研究难点。本课题组对于 CTCS 鉴定, 选取了 4 个标志物: CD45、EpCAM、CD133 和 CD44。CD45 用于排除淋巴细胞。EpCAM 虽然在 CTC 的鉴定中是一个上皮标志物, 但本身也是 CRC 干细胞的标志物。CD133 是一个被广泛研究的 CRC 干细胞标志物^[22]。Shimada 和 Pilati 两个研究组^[5-6]证明了 CD133 的表达与根治术后 CRC 患者的预后相关性。与他们的结果不同, 本研究发现患者外周血细胞 CD133 蛋白表达极少, 而且根治术前后 CD133 的表达水平与临床转移参数都无相关性。研究结果的不一致的原因或许与研究方法不同有关。CD44 是一个重要的 CRC 干细胞标志物, 而且 CD44 促进转移的能力强于 CD133^[23]。在 80 例石蜡 CRC 标本中, 用免疫组化法发现 EpCAM^{high}/CD44⁺ 细胞与肿瘤分化程度、侵袭程度、临床分期和转移情况等相关^[24]。本研究发现, 术前 CD45⁻EpCAM⁺CD44⁺ 与 T 分期相关, 与上述结果相一致, 提示 CD44 CTSC 作为预后标志物的可行性。目前, CD44 作为 CTSC 标志物的预后价值在包括胃癌和乳腺癌等肿瘤中都

有研究^[25-26], 但在 CRC 的研究还未见报道。

本研究采用的 CTC 阈值是根据 CellSearch 系统制定的。对于 CTSC 的检测, 由于其数量比 CTC 更少, 采用 ≥ 3 个/7.5 ml 的阈值对于研究临床参数相关性不适用。故采用 ≥ 1 个 CTSC/7.5 ml 作为阈值, 导致 CTSC1 检出率 (术前 44%、术后 54%) 高于 CTC (术前 34%、术后 38%)。当然, 检出率并不反映它们在血中的实际数量。

综上所述, 本研究利用流式细胞仪检测了 CRC 患者根治术前后 CTC/CTSC 水平, 发现 CRC 根治术前后 CTC 和 CD44⁺CTSC 都与 T 分期相关, 反映了它们具有一定的肿瘤预测价值。为了更准确地研究 CTC/CTSC 的预测价值, 计划增多入组病例, 加强随访工作, 为 CRC/CTSC 用于肿瘤临床的预测分析和判断奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R, DESANTIS C, JEMAL A. Colorectal cancer statistics: CA Cancer [J]. J Clin, 2014, 64(2): 104-117. DOI: 10.3322/caac.21220.
- [2] RAHBARI N N, AIGNER M, THORLUND K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. Gastroenterology, 2010, 138(101): 1714-1726. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.008.
- [3] 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.
- [4] 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]. Tumour Biol, 2012, 33(2): 561-569. DOI: 10.1002/jcla.21911.
- [5] PILATI P, MOCELLIN S, BERTAZZA L, et al. Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(2): 402-408. DOI: 10.1245/s10434-011-2132-2.
- [6] SHIMADA R, IINUMA H, AKAHANE T, et al. Prognostic significance of CTCs and CSCs of tumor drainage vein blood in Dukes' stage B and C colorectal cancer patients [J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 947-953. DOI: 10.3892/or.2012.1649.
- [7] MENG Q, WU W, PEI T, et al. Novel markers for circulating tumor stem cells in colorectal carcinoma [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(10): 4233-4241.
- [8] WINER-JONES J P, VAHIDI B, ARQUILEVICH N, et al. Circulating tumor cells: clinically relevant molecular access based on a novel CTC flow cell [J/OL]. PLoS One, 2014, 9: e86717 [2017-01-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0086717. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906064/.
- [9] 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.
- [10] WATANABE M, UEHARA Y, YAMASHITA N, et al. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system[J]. *Cytometry*, 2014, 85(3): 206-213. DOI: 10.1002/cyto.a.22422.
- [11] YABUSAKI M, SATO J, KOHYAMA A, et al. Detection and preliminary evaluation of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with eight types of cancer using a telomerase-specific adenovirus[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 1772-1778. DOI: 10.3892/or.2014.3436.
- [12] HARDINGHAM J E, GROVER P, WINTER M, et al. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer-20 years of progress[J]. *Mol Med*, 2015, 21(Suppl 1): S25-S31. DOI: 10.2119/molmed.2015.00149.
- [13] CHEN W, ZHENG R, ZUO T, et al. National cancer incidence and mortality in China, 2012[J]. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28(1): 1-11. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.08.
- [14] NAGRATH S, SEQUIST L V, MAHESWARAN S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-1239. DOI: 10.1038/nature06385.
- [15] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J/OL]. *Int J Clin Oncol*, 2017[2017-01-10]. DOI: 10.1007/s10147-017-1105-2. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10147-017-1105-2>.
- [16] BUNGER S, ZIMMERMANN M, HABERMANN J K. Diversity of assessing circulating tumor cells (CTCs) emphasizes need for standardization; a CTC Guide to design and report trials[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(3): 527-545. DOI: 10.1007/s10555-015-9582-0.
- [17] COHEN S J, PUNT C J, IANNOTI N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(7): 1223-1229. DOI: 10.1093/annonc/mdn786.
- [18] 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.
- [19] 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]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 712827[2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006584>. DOI: 10.1155/2014/712827.
- [20] TRALHAO J G, HOTI E, SERODIO M, et al. Perioperative tumor cell dissemination in patients with primary or metastatic colorectal cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2012, 36(2): 125-129. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2009.07.003>.
- [21] 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.
- [22] REN F, SHENG W Q, DU X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(17): 2603-2611. DOI: 10.3748/wjg.v19.i17.2603.
- [23] DU L, RSO G, WANG H, et al. CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8): 2682-2694. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3759.
- [24] LIU D, SUN J, ZHU J, et al. Expression and clinical significance of colorectal cancer stem cell marker EpCAM/CD44 in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(5): 1544-1548. DOI: 10.3892/ol.2014.1907.
- [25] LI M, ZHANG B, ZHANG Z, et al. Stem cell-like circulating tumor cells indicate poor prognosis in gastric cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 981261[2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stem+cell-like+circulating+tumor+cells+indicate+poor+prognosis+in+gastric+cancer>. DOI: 10.1155/2014/981261.
- [26] BACCELLI I, SCHNEEWEISS A, RIETHDORF S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(6): 539-544. DOI: 10.1038/nbt.2576.
- [收稿日期] 2017 - 03 - 12 [修回日期] 2017 - 03 - 25
[本文编辑] 韩丹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
上海厦泰生物科技有限公司	封三
索尼(中国)有限公司生命科学业务部	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心集团	后插页