

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.006

· 专题(综述) ·

循环肿瘤细胞在非小细胞肺癌个体化诊疗中的研究进展

Progresses of research on circulating tumor cell in the individualized diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer

夏雨婷 综述; 张志伟, 宋鑫 审阅(昆明医科大学第三附属医院暨云南省肿瘤医院生物治疗中心, 云南昆明 650118)

[摘要] 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是发病率及病死率最高的恶性肿瘤,确诊时大多数 NSCLC 患者已到疾病晚期,导致患者 5 年生存率低。随着肿瘤个体化治疗的进展,早期诊断以及对患者病情实时监测尤为重要。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)作为肿瘤血源性转移的生物学标志物之一,是“液体活检”的重要指标,可用于肿瘤患者实时动态监测。检测 CTC 有助于早期发现 NSCLC 微转移、重新确定临床分期、实时监测抗肿瘤治疗疗效、评估预后、制定个体化的治疗策略,不仅如此,对其进一步分子鉴定有助于阐明肿瘤的生物学进程及转移机制。然而,由于检测标准不统一、检测阳性率低等多种因素,现阶段 CTC 仍较难应用到临床工作中。本文对 CTC 的发展历程及其在 NSCLC 诊断、治疗及预后等方面的研究新近进展作一综述。

[关键词] 循环肿瘤细胞;非小细胞肺癌;诊断;疗效评估;预后

[中图分类号] R730. 2; R730. 43

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)04-0367-06

肺癌的发病率和病死率在恶性肿瘤中位居第一,尤其是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌的 75% ~ 85%^[1],严重威胁人类的健康与生存。令人关注的是,NSCLC 早期诊断率较低,大部分患者确诊时已属晚期,其 5 年生存率仅为 15%^[2],同时 NSCLC 经治疗达到完全缓解(CR)或部分缓解(PR)后,长期随访也缺乏针对性的实验检测方法,常病情出现进展后才被发现。针对 NSCLC 早期诊断和连续监测转移倾向的需要,检测患者外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)是一项高效可行的方法,明显优于传统的肿瘤标志物和影像学检查方法。更令人关注的是,基于 CTC 的分子生物学分析,有助于指导更好的个体化治疗方案和精准治疗^[3],被认为是目前最具研究前景的“液态活检”方法^[4-5]。本文就 CTC 的发展历程、检测方法及其在 NSCLC 个体化诊疗中应用的新近进展作如下综述。

1 CTC 的发展历程

1896 年, Ashworth 在 1 例转移性癌症患者的外周血中首次发现了 CTC^[6],为 CTC 的临床转化应用提供了可行性。随着细胞分离和荧光标记技术的进步,CTC 检测技术,尤其是上皮来源的 CTC 检测方法的逐步建立,奠定了 CTC 的临床转化应用基础^[7]。而检测技术的逐渐进步,推动了 CTC 在肿瘤早期诊断、疗效预测、预后评估等方面的临床应用,

为临床肿瘤监测提供了新选择,也为肿瘤三级预防提供了新思路。

目前,CTC 被定义为自发或由诊疗操作引起的,从原发灶或转移灶脱落后进入血液循环中的肿瘤细胞,它可通过主动脱落或被动的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程进入血液循环^[8-9]。众多研究已证实,CTC 普遍存在于恶性肿瘤患者外周血中,与肿瘤的大小、进展情况、治疗疗效等密切相关,这种特性使得 CTC 在肿瘤研究领域有着重要的地位。

然而,CTC 在血液中的含量相对较少,在肿瘤患者 1 ml 外周血中或 $10^6 \sim 10^7$ 个白细胞中才能发现 1 个 CTC^[10],极大地增加了富集和检测的难度;并且,部分 CTC 发生 EMT 过程中常发生细胞形态改变,表现间充质细胞属性^[11-12],这种异质性的 CTC

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. U1502222, No. 81470005);云南省应用基础研究(昆医联合专项基金)资助项目(No. 2015FB074, No. 2014FB065)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. U1502222, No. 81470005), and the Applied Basic Science Research Foundation of Yunnan Province(No. 2015FB074, No. 2014FB065)

[作者简介] 夏雨婷(1991 -),女,硕士生,主要从事肿瘤生物免疫治疗及 NSCLC 发生发展的机制研究, E-mail: summerrain68@126.com

[通信作者] 宋鑫(SONG Xin, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤生物免疫治疗研究, E-mail: songxin68@126.com

[优先发表]

检测技术的敏感性与特异性提出了更高的要求。因此, CTC 的检测方法不断革新, 突破一个又一个瓶颈, 逐步成为一种切实可行的检测方法, 并成为肿瘤研究中的一大热点。

进一步关于 CTC 的临床应用研究发现, 其在肿瘤早期诊断、连续监测、疗效预测、预后评估等方面具有较好的应用价值, 特别是对于监测乳腺癌^[13]、结直肠癌^[14]、前列腺癌^[15]、NSCLC^[16]等的转移倾向上独具优势。不仅如此, 通过检测 CTC 上致癌基因的突变, 还可以为分子靶向治疗提供依据^[17]。

2 CTC 检测方法

多年来, 研究者们普遍致力于分离各种肿瘤中的 CTC, 然而由于其在血液中的含量极其稀少, 又具有肿瘤异质性的细胞学特点, 导致 CTC 的检测具有极大困难。直到近年来, 能对其有效地分析并计数的可重复性检测方法才被开发出来^[18]。

目前, CTC 的检测方法众多, 各有利弊, 包括分离富集、检测鉴定两个步骤。分离富集方法通常基于 CTC 的形态学特性(密度和大小)或免疫学特征(分子特征), 包括密度梯度离心法、膜滤过上皮肿瘤细胞体积分离法、免疫磁性分选法等; 检测鉴定技术根据原理可分为细胞计数法和核酸检测法, 如免疫细胞化学技术、流式细胞计数、CTC 芯片、RT-PCR 检测技术等。虽然检测方法众多, 但这些方法均处于实验室研究阶段, 部分方法在操作中可重复性差, 受人为因素影响较大。在临床相关性研究, 尤其是 NSCLC 中应用最广泛的方法是基于免疫磁性富集并同时检测 CTC 的 CellSearch 系统。它是目前唯一被美国 FDA 批准进入临床, 用于转移性乳腺癌^[19]、结直肠癌^[20]、前列腺癌^[21]的 CTC 检测以及预后评估手段的新技术。

CellSearch 是一个半自动检验系统, 检测过程标准化, 可重复性强, 每次检测需 7.5 ml 患者外周血液样品。在检测过程中通过包被上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体的磁珠颗粒对肿瘤细胞进行富集, 肿瘤细胞属于上皮细胞来源, 具有上皮细胞特性, EpCAM 阳性表达, 血液细胞不具备此特性, 包被 EpCAM 抗体的磁珠与肿瘤细胞特异性结合, 从而将肿瘤细胞与血液细胞有效区分开来。磁珠捕获并富集 CTC 后, 固定细胞并用 DAPI 荧光核染料标记细胞核, 细胞内角蛋白荧光抗体 CK-PE 识别其是否为上皮细胞, 而后通过白细胞荧光抗体 CD45 检测并排除白细胞的存在。最终, 符合肿瘤细胞学形态特征并且 EpCAM⁺、DA-

PI⁺、CK-PE⁺和 CD45⁻的细胞被定义为 CTC。

早在 2007 年, Sawabata 等^[22]就利用 CellSearch 系统检测了 9 例 NSCLC 男性患者术前、术后的 CTC, 结果提示仅有 1 例和 3 例分别于术前和术后立即检测到 CTC, 术后 10 d 检测所有患者, 均未发现 CTC 的存在, 对以上患者平均随访 14 个月后, 均未出现肿瘤复发。随访结果与 CTC 的检测结果一致, 说明 CTC 与 NSCLC 的预后可能有相关性。此后, 研究者们使用 CellSearch 系统对其在 NSCLC 中的临床意义做了更多更为详细的研究, 如扩大样本量研究 CTC 在 NSCLC 诊断、分期、指导治疗、监测治疗疗效以及预测转移等作用。然而, CellSearch 系统也并非完美, 在肿瘤进展过程中部分肿瘤细胞可能发生 EMT, 出现 EpCAM 表达缺失, 此类细胞使用该系统检测时会出现假阴性结果。对于此难题, 有望通过使用更为特异及敏感的肿瘤标志物或多种肿瘤标志物联合应用加以解决。

3 CTC 与 NSCLC 的临床相关性研究

3.1 CTC 与 NSCLC 的早期诊断

影像学手段(包括 X 线、CT、B 超等)和常规病理组织学检查是 NSCLC 的传统诊断方式, 而 NSCLC 的早期诊断主要依赖于影像学检查, 然而影像学方法仅能检测直径 > 5 mm 的肿瘤, 肿瘤微转移灶的检测一直是临床检测的难点。多项研究表明, 早期 NSCLC 可以检测到 CTC, 同时 CTC 与肿瘤微转移灶存在直接关联, 因此, 外周血 CTC 可以为 NSCLC 的早期诊断提供新策略。

CTC 对于 NSCLC 的早期诊断具有重要的指导作用, 但是也存在一定的难度。Bevilacqua 等^[23]应用 CellSearch 系统在早期 NSCLC 患者(经针吸细胞学检查及影像学检查已证实)的外周血中检测到了 CTC 的存在, 这对 NSCLC 的早期诊断至关重要。Chen 等^[24]对此进一步研究, 在 169 例 NSCLC 患者中仅 23.7% 检出 CTC, 但在 I 期患者中并未检测到 CTC。Wan 等^[25]检测了 50 例 NSCLC 患者外周血中的 CTC, 在 I 期患者外周血中检测到了少量 CTC。结果的差异可能源于 CTC 在早期 NSCLC 外周血的浓度低, 且其分离检测技术水平的差异性, 使得各研究中得到的 CTC 阳性率及平均水平存在波动, 因此 CTC 的标化也是临床研究的重要方向。

令人感兴趣的是, 新近研究发现, 肺静脉血 CTC 检测在 NSCLC 早期诊断上优于外周静脉血 CTC 检测。Reddy 等^[26]的一项针对 NSCLC 早期患者的最新研究发现, 分别检测患者术前、术中、术后的肺静

脉血及外周静脉血中 CTC,结果表明,肺静脉血中 CTC 数目明显多于外周静脉血,更有利于检测早期 NSCLC 中 CTC,因此,针对早期 NSCLC 患者,可以检测其肺静脉血中 CTC。目前,将检测 CTC 应用于 NSCLC 的早期诊断任重而道远,不仅需要提高检测手段的敏感性及特异性,更需要符合规范统一的检测方法。

3.2 CTC 与 NSCLC 的分期

恶性肿瘤的 TNM 国际分期方法延续至今已有几十年的历史,长期的临床实践使其的不足逐渐凸显,早有研究证明,有些肿瘤早期就已发生转移,单纯肿瘤体积及浸润程度并不能完全反映肿瘤的实际情况及预后,这种侵袭的特质可能与肿瘤分化程度、病理类型以及分子标志物的特异性表达有关。单一地使用 TNM 分期来指导下一步诊疗计划极有可能延误患者的治疗,亟需实时、有效、可重复性强的标志物来明确病情的进展情况。

在一个单中心前瞻性研究中^[27],研究者检测了 101 例 III-IV 期的 NSCLC 患者,发现其中 IV 期患者血液中 CTC 的含量明显高于 III 期患者,提示 CTC 的计数结果可能与肿瘤分期相关。一项 Meta 分析^[28]也指出,不仅晚期 NSCLC 患者的 CTC 计数显著高于早期患者,而且 CTC 比例越高,疾病的进展越快、预后越差。Wan 等^[25]纳入了 50 例 NSCLC 患者、38 例肺良性肿瘤患者以及 28 例健康人作为对照组,分别检测其外周血中 CTC,结果提示,NSCLC 患者血液中的 CTC 计数远高于良性对照组及健康对照组,且在 I 期患者血液中检测到了少量 CTC,不仅如此,其 CTC 的计数与临床分期呈正相关,III、IV 期患者血液中的 CTC 含量显著高于 I、II 期患者。这不仅为 NSCLC 的鉴别诊断提供了依据,更说明了早在疾病初期肿瘤的微小转移业已出现。检测患者血液中的 CTC 可为 NSCLC 的早期诊断以及疾病进程提供参照,有益于临床医师制定更有效的治疗方案。

3.3 CTC 与 NSCLC 疗效评价

在肿瘤临床诊疗中,通常使用实体瘤疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST)评估患者病情,指导下一步治疗。然而,RECIST 并不能实时监测患者对治疗的反应,具有滞后性。通过检测 CTC 数目和分子特性则可实时反映病情变化。

对于早期 NSCLC 患者而言,主要的治疗方式是手术,为了抑制局部复发和改善生存,通常术后辅助化疗,监测术后患者血液中的 CTC 可以为术后治疗提供依据。Bayarri-Lara 等^[29]检测了 56 例 I-III A

期 NSCLC 患者术前、术后 1 月外周血中 CTC,结果提示,术后所有患者的平均 CTC 数(0.66/10 ml)显著少于术前(3.16/10 ml),同时术后检测到 CTC 的患者较阴性患者较早出现病情进展,预后不良。因此,检测患者术后的 CTC 有助于早期识别风险,指导临床医师制定进一步治疗方案。

对于晚期 NSCLC 患者而言,化疗应用广泛。然而在 NSCLC 治疗中常出现化疗耐药,为了减少临床治疗中患者的毒副反应,需要找到一种快速评估化疗效果的标志物。CTC 检测的实时性及动态性可以为此提供帮助。Muinelo-Romay 等^[30]对 43 例初诊为晚期 NSCLC 的患者进行标准化疗,使用 CellSearch 系统检测其化疗前 1 d、化疗 2 周期、化疗 5 周期后外周血中的 CTC,结果提示化疗 2 个周期和 5 个周期后的 7.5 ml 血中 CTC 数目显著低于化疗前 1 d 的数目[(0.87 ± 0.22)个、(0.77 ± 0.42)个 vs (18.9 ± 14.8)个],提示治疗有效。若化疗 2 周期和 5 周期后 CTC 仍 ≥ 5 个,说明患者对该治疗方案不敏感。因此,在 NSCLC 的综合治疗中,检测患者血液中 CTC 能实时监测疗效,指导个体化治疗。

3.4 CTC 与 NSCLC 分子靶向治疗

在晚期 NSCLC 中,患者主要通过活检进行定性诊断,而在肿瘤组织较少或无法进行活检的情况下,如何进行病理诊断和临床诊治方案决策就成为一个难题。CTC 的发展和进步,使得大部分活检困难肿瘤患者获得及时病理诊断,特别是 CTC 分离后的进一步分子生物学分析,更为临床 NSCLC 的分子靶向治疗提供了更好的分子基础。

针对 *EGFR* 的靶向治疗是晚期 NSCLC 的重要治疗方法之一,然而无法对同一肿瘤患者的 *EGFR* 突变情况进行连续监测,而 CTC 分离后再分析为 *EGFR* 突变连续监测提供了可行性。Breitenbuecher 等^[31]检测了 8 例发生 *EGFR* 基因突变的晚期 NSCLC 患者 CTC 的突变情况,将 *EGFR* 基因突变 CTC < 1 个/ml 定义为阴性,反之为阳性。研究结果提示:CTC 的 *EGFR* 基因突变阳性患者相较于阴性患者更早出现病情进展和治疗抵抗,阳性患者的治疗有效期显著短于阴性患者,通过检测 CTC 的 *EGFR* 基因突变情况,实时监测 *EGFR* 基因突变 NSCLC 患者的靶向治疗疗效,可以为患者的进一步治疗方案提供依据。在 Pender 等^[32]的研究中,NSCLC 患者 CTC 的 *KRAS* 基因突变情况与组织基因检测结果的一致性也同样得到了验证。

Tan 等^[33]最近研究了间变淋巴瘤激酶(anaplas-

tic lymphoma kinase, *ALK*)基因在 CTC 中的重组情况,研究纳入 27 例 NSCLC 患者,14 例经肿瘤组织基因检测已证实存在 *ALK* 基因重组(重组型);12 例未检出 *ALK* 基因重组(野生型);1 例由于未取到肿瘤组织,*ALK* 基因重组情况不明。研究同时纳入 5 例健康志愿者作为阴性对照。检测受试者外周血中 CTC 的 *ALK* 基因重组发现,重组型 CTC 在重组型患者血液中的数量(3~15 个/1.88 ml)显著高于野生型患者与健康志愿者(0~2 个/1.88 ml),后者随后被证实为“假阳性”结果。并且,在重组型患者中,CTC 的重组结果与肿瘤组织基因检测结果高度一致。而后,使用克唑替尼对 *ALK* 基因重组情况不明的患者进行治疗并同时检测 CTC 发现,治疗前、部分缓解、病情进展 3 个时间段的重组型 CTC 数量分别为 6 个/1.88 ml、3 个/1.88 ml、11 个/1.88 ml,随着病情不断进展,重组型 CTC 数量逐渐增多。研究提示,在肿瘤标本获取困难的情况下,检测 NSCLC 患者 CTC 的 *ALK* 基因重组情况,能够有效指导 *ALK* 基因的靶向治疗。与此同时,He 等^[34]研究了 NSCLC 患者外周血 CTC 中 *ALK* 基因重组的情况,得出了同样的结论。

在一项关于 NSCLC 患者发生 *ROS1* 基因重排的研究中^[35],研究者们发现发生 *ROS1* 基因重排的 NSCLC 患者 CTC 的 *ROS1* 基因结构异常,且发生高数值的染色体不稳定,与基因检测的结果高度一致性揭示了 *ROS1* 基因重排导致患者对 *ROS1* 抑制剂耐药的机制。在患者肿瘤组织基因检测困难的情况下,通过检测其 CTC 中基因突变情况来预测靶向治疗药物靶点切实可行,而且具有实时、无创、可重复等优点,有待进一步的研究将其应用于临床。

3.5 CTC 与 NSCLC 预后

肿瘤的预后是由多因素决定的,目前临床医生主要根据肿瘤组织类型、TNM 分期、临床特征等对患者预后进行判断。Krebs 等^[27]使用 CellSearch 系统检测了 101 例 III-IV 期的 NSCLC 患者化疗前后外周血中 CTC 计数的变化,结果提示化疗前 CTC ≥ 5 个的患者与 CTC < 5 个患者相比,其 PFS 以及 OS 明显缩短,说明 CTC 数量的变化与患者临床预后显著相关。根据 CTC 计数结果为患者制定个体化的治疗方案,可以有效防止不良预后的发生。已有研究证实,不仅 CTC 的数量与 NSCLC 的预后相关,通过检测 CTC 上的生物标志物也能判断患者预后。Du 等^[36]纳入 78 例晚期 NSCLC 患者,使用 RT-PCR 技术检测其化疗前、化疗 1 周期和 3 周期后血液中 CTC 的凋亡抑制基因 *Survivin*,发现化疗后血液中检

测到 *Survivin* 阳性 CTC 的患者 PFS 以及 OS 明显短于阴性患者,多变量分析后提示化疗后血液中出现 *Survivin* 阳性表达的 CTC 是患者预后不良的独立危险因素。

以上研究均提示,检测 CTC 可以做为判断 NSCLC 患者预后的可靠指标,然而由于目前 CTC 检测普遍灵敏度低、成本高,短期内还难以应用于临床,为了解决这一难题,有研究者将血清肿瘤标志物和外周血 CTC 进行联合评估,以期能减少误差。Chen 等^[24]在研究中同时检测了 NSCLC 患者外周血中的 CTC 以及血清 CEA 含量,进行综合分析后提示,CTC 的计数结果与 CEA 水平呈正比,两者检测结果均高的患者肿瘤侵袭能力更强,预后更差。结合患者 CEA 水平来分析 CTC 的检测结果,有可能避免检测过程中出现的部分误差,增强 CTC 的预后评估能力。

4 展 望

CTC 是肿瘤血源性转移的生物标志物,可监测抗肿瘤治疗疗效,预测疾病转移复发,具有广泛的应用前景。近年来,关于 CTC 的研究不断涌现,其中大部分是关于其分离富集、检测鉴定方面的研究,在临床上还局限于其计数有关临床意义的研究。而关于 CTC 分子表型鉴定的临床意义的研究尚处于起步阶段,对捕获的细胞行进一步的基因分析仍存在一定难度。在不同癌种、不同检测方法的研究中,CTC 临床应用的意义还存在着巨大争议。在 NSCLC 中,外周血 CTC 含量稀少难以检测,作为早期诊断的手段目前还难以应用于临床,有待检测的敏感性以及特异性进一步提高以及检测流程的标化。对于 NSCLC 的临床分期,也存在上述问题,由于检测手段不一、检出率不高,难以对分期进行严格界定,仅仅可以作为影像学及病理学检查的补足。为了克服这些难题,目前研究者们普遍致力于研发新的更有效的检测方法,如利用多肽纳米磁珠来捕获外周血中的 CTC^[37],开发新一代 CTC 芯片技术^[38]等,提高 CTC 的检测技术仍有赖于阐明肿瘤细胞发生 EMT 的分子机制,寻找更特异及敏感的标志物来区分 CTC 与其他细胞,将其应用于临床任重而道远。未来 CTC 的临床应用可能更集中于预测 NSCLC 的治疗疗效以及预后方面。而其是否可取代常规检查方法,还需要更多前瞻性临床试验来验证。而对 CTC 进行分子表型鉴定将是未来 CTC 研究的重点内容,如通过 CTC 发现的新的促癌基因或者抑癌基因相关研究,进一步从分子水平上深化

NSCLC 及其他肿瘤发生发展、转移复发机制,为肿瘤患者的个体化治疗提供有效策略。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 65(1): 5-29. DOI:10.3322/caac.21332.
- [2] POLANSKI J, JANKOWSKA-POLANSKA B, ROSINCZUK J. Quality of life of patients with lung cancer[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 1023-1028[2017-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4778772/>. DOI:10.2147/OTT.S100685.
- [3] MILLNER L M, STROTMAN L N. The future of precision medicine in oncology[J]. *Clin Lab Med*, 2016, 36(3): 557-573. DOI: 10.1016/j.cll.2016.05.003.
- [4] MOLINA-VILA M A, MAYO-DE-LAS-CASAS C, GIMÉNEZ-CAPITÁN A, et al. Liquid biopsy in non-small cell lung cancer [J/OL]. *Front Med (Lausanne)*, 2016, 3: 69[2017-02-20]. <http://europepmc.org/backend/ptmprender.fcgi?accid=PMC5179978&blobtype=pdf>. DOI: 10.3389/fmed.2016.00069.
- [5] CORTESI E, PALLESCHI M, MAGRI V, et al. The promise of liquid biopsy in cancer: a clinical perspective[J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(5): 488-490. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.10.01.
- [6] ASHWORTH T R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death[J]. *Aust Med J*, 1896, 14: 146-149.
- [7] ZITO MARINO F, RONCHI A, ACCARDO M, et al. Detection of folate receptor-positive circulating tumor cells by ligand-targeted polymerase chain reaction in non-small cell lung cancer patients [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(7): 1437-1439. DOI: 10.21037/jtd.2016.05.38.
- [8] GORGES T M, PENKALLA N, SCHALK T, et al. Enumeration and molecular characterization of tumor cells in lung cancer patients using a novel in vivo device for capturing circulating tumor cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(9): 2197-2206. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1416.
- [9] TOSS A, MU Z, FERNANDEZ S, et al. CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine[J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(11): 108-108. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.06.
- [10] ROSS A A, COOPER B W, LAZARUS H M, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques[J]. *Blood*, 1993, 82(9): 2605-2610.
- [11] PAIN M, BERMUDEZ O, LACOSTE P, et al. Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype[J]. *Eur Respir*, 2014, 23(131): 118-130. DOI:10.1183/09059180.00004413.
- [12] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196. DOI: 10.1038/nrm3758.
- [13] BULFONI M, TURETTA M, DEL BEN F, et al. Dissecting the heterogeneity of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: going far beyond the needle in the Haystack[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1775[2017-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5085799/>. DOI:10.3390/ijms17101775.
- [14] HUANG M Y, TSAI H L, HUANG J J, et al. Clinical implications and future perspectives of circulating tumor cells and biomarkers in clinical outcomes of colorectal cancer[J]. *Transl Oncol*, 2016, 9(4): 340-347. DOI: 10.1016/j.tranon.2016.06.006.
- [15] DANILA D C, SAMOILA A, PATEL C, et al. Clinical validity of detecting circulating tumor cells by adnatest assay compared with direct detection of tumor mRNA in stabilized whole blood, as a biomarker predicting overall survival for metastatic castration-resistant prostate cancer patients[J]. *Cancer J*, 2016, 22(5): 315-320. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000220.
- [16] NURWIDYA F, ZAINI J, PUTRA A C, et al. Circulating tumor cell and cell-free circulating tumor DNA in lung cancer[J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(3): 151-158. DOI: 10.4068/cmj.2016.52.3.151.
- [17] PAILLER E, AUGER N, LINDSAY C R, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(7): 1408-1415. DOI: 10.1093/annonc/mdv165.
- [18] ARYA S K, LIM B, RAHMAN A R. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells[J]. *Lab Chip*, 2013, 13(11): 1995-2027. DOI: 10.1039/c3lc00009e.
- [19] CRISTOFANILLI M, BUDD G T, ELLIS M J, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8): 781-791. DOI:10.1056/NEJMoa040766.
- [20] COHEN S J, ALPAUGH R K, GROSS S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2006, 6(2): 125-132. DOI:10.3816/CCC.2006.n.029.
- [21] OKEGAWA T, NUTAHARA K, HIGASHIHARA E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer[J]. *J Urol*, 2009, 181(3): 1091-1097. DOI: 10.1016/j.juro.2008.11.015.
- [22] SAWABATA N, OKUMURA M, UTSUMI T, et al. Circulating tumor cells in peripheral blood caused by surgical manipulation of non-small-cell lung cancer: pilot study using an immunocytology method[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 55(5): 189-192. DOI: 10.1007/s11748-007-01001-2.
- [23] BEVILACQUA S, GALLO M, FRANCO R, et al. A "live" biopsy in a small-cell lung cancer patient by detection of circulating tumor cells[J]. *Lung Cancer*, 2009, 65(1): 123-125. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.01.019.
- [24] CHEN X, WANG X, HE H, et al. Combination of circulating tumor cells with serum carcinoembryonic antigen enhances clinical prediction of non-small cell lung cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126276[2017-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440620/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0126276.
- [25] WAN J W, GAO M Z, HU R J, et al. A preliminary study on the

- relationship between circulating tumor cells count and clinical features in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(22): 352-352. DOI: 10.3978/j. issn. 2305-5839. 2015. 11. 18.
- [26] REDDY R M, MURLIDHAR V, ZHAO L, et al. Pulmonary venous blood sampling significantly increases the yield of circulating tumor cells in early-stage lung cancer[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 151(3): 852-858. DOI: 10.1016/j. jtcvs. 2015. 09. 126.
- [27] 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.
- [28] WANG J, WANG K, XU J, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78070[2017-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3817175/>. DOI: 10.1371/annotation/6633ed7f-a10c-4f6d-9d1d-9c1245822eb7.
- [29] BAYARRI-LARA C, ORTEGA F G, CUETO LADRON DE GUEVARA A, et al. Circulating tumor cells identify early recurrence in patients with non-small cell lung cancer undergoing radical resection[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148659[2017-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4767413/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0148659.
- [30] MUINELO-ROMAY L, VIEITO M, ABALO A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced NSCLC patients receiving first-line systemic treatment[J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(1): 153-165. DOI: 10.3390/cancers6010153.
- [31] BREITENBUECHER F, HOFFARTH S, WORM K, et al. Development of a highly sensitive and specific method for detection of circulating tumor cells harboring somatic mutations in non-small-cell lung cancer patients[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85350[2017-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3897440/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0085350.
- [32] PENDER A, GARCIA-MURILLAS I, RANA S, et al. Efficient genotyping of KRAS mutant non-small cell lung cancer using a multiplexed droplet digital PCR approach[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139074[2017-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586384/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0139074.
- [33] TAN C L, LIM T H, LIM T K, et al. Concordance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements between circulating tumor cells and tumor in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 23251-23262. DOI: 10.18632/oncotarget.8136.
- [34] HE W, XU D, WANG Z, et al. Detecting ALK-rearrangement of CTC enriched by nanovelcro chip in advanced NSCLC patients [J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 2016: Epub ahead of print[2017-02-20]. <http://www.impactjournals.com/oncotarget/>. DOI: 10.18632/oncotarget.8305.
- [35] PAILLER E, AUGER N, LINDSAY C R, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(7): 1408-1415. DOI: 10.1093/annonc/mdv165.
- [36] DU Y J, LI J, ZHU W F, et al. Survivin mRNA-circulating tumor cells predict treatment efficacy of chemotherapy and survival for advanced non-small cell lung cancer patients[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4499-4507. DOI: 10.1007/s13277-013-1592-3.
- [37] 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.
- [38] CHIKAIISHI Y, YONEDA K, OHNAGA T, et al. EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a universal CTC-chip[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 77-82. DOI: 10.3892/or.2016.5235.

[收稿日期] 2017-02-22 [修回日期] 2017-03-19

[本文编辑] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符, 它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法, 切不可混淆使用。现根据有关标准和规则, 把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体, 例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体), 例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体, 例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。(4) 各种统计学符号应斜体, 例如样本数 *n*、均数 \bar{x} 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外), 例如长度 *L* (*l*)、面积 *A* (或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体, 例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体, 例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)