

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.09.015

肝细胞癌循环肿瘤细胞研究的最新进展

The latest research progress of the circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma

张思宇^a综述; 查勇^a, 姚宏^b审阅(昆明医科大学 第三附属医院暨云南省肿瘤医院 a. 肝胆胰外科; b. 生物治疗中心, 云南 昆明 650118)

[摘要] 肝细胞癌具有高发病率和病死率的特点, 在治疗过程中易发生复发或转移, 目前缺乏高敏感度的生物标志物进行预测和评估。研究发现, 循环肿瘤细胞可作为肝细胞癌潜在的生物标志物, 能应用于肝细胞癌的早预测、早诊断、早治疗及治疗过程中的疾病监测, 有助于预防和控制相关治疗的不良反应。本文将对循环肿瘤细胞作为生物标志物在肝细胞癌临床诊疗中应用的最新研究进展进行综述。

[关键词] 肝细胞癌; 循环肿瘤细胞; 生物标志物

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)09-1056-06

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是消化系统中发病率及病死率较高的恶性肿瘤^[1-2]。目前, 虽然HCC在诊断和治疗方面的临床预测指标持续更新^[3], 但预后仍较差, 总生存率较低^[4], 主要原因是缺乏早期可确诊的肝癌评价指标和治疗后不可预测的复发及转移。因此, 迫切需要更精确、更有效的生物标志物应用于HCC患者的早期筛查、治疗评估或预后结果预测中, 这对提高HCC患者诊断率, 选择最佳治疗方案有重要意义。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC), 是指脱离肿瘤组织后在血液中循环并存活的一类肿瘤细胞^[5], 通过抽取患者外周血即可检出。有研究者^[6]认为, CTC不同于任何现有的肿瘤生物标志物, 因为它代表的是患者体内存活的肿瘤样本。近年来, CTC不仅在肿瘤的基础研究中具有重要价值, 而且在临床诊断和肿瘤治疗等多方面具有重指导意义^[7-8]。目前, 已有研究报道了CTC在乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肺癌等多种恶性肿瘤诊疗中的临床应用^[9-12]。本文对CTC在HCC的临床诊疗中应用的研究现状及发展前景作一综述。

1 CTC的生物学特性

1869年, 澳大利亚病理学家ASHWORTH首次提出“CTC”的概念。CTC被称为肿瘤的“种子”, 进入外周血循环后转移到身体的其他器官或组织, 继续生长, 最终形成转移瘤或肿瘤复发^[13]。然而, 大多数CTC在循环中会经历自身凋亡, 或在免疫细胞攻击及剪切力作用下死亡, 仅有不到0.01%的CTC幸存, 形成肿瘤转移病灶。此外, 为适应生存环境, 部分CTC在外周血中发生上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)这一病理过程^[14-15], 即

上皮细胞标志物表达缺失, 同时间质细胞标志物表达升高, 且生物学行为与间质细胞类似。经历EMT的CTC易于从肿瘤组织中分离出来, 侵入到毛细血管中, 明显提高了自身生存能力和转移潜力^[16]。所以CTC被分为3种亚型: 上皮型、间质型和上皮间质混合型CTC。另外, 研究^[17-18]表明, CTC可以不同形式存在, 由两个或多个CTC聚集在一起可形成聚合物, 称之为细胞团(circulating tumor cell clusters, CTC clusters), 细胞团的转移潜能和生存能力均比单个CTC更强。显然, CTC并不是肿瘤细胞彼此之间的克隆产物, 而是来自不同病灶的肿瘤细胞。因此, 通过分析CTC可揭示肿瘤细胞的分子特征, 这将有助于研究肝癌的复发、转移及耐药机制。CTC也可视为HCC患者的早期诊断、病情评估以及疗效预测潜在的临床生物标志物。

2 CTC的检测与分离

CTC在血液中含量较低, 这无疑对检测技术水

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81560497); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养计划项目(No. 2018HB058), 云南省卫生健康委员会医学学科带头人培养计划(No. D-2018001). Project by the National Natural Science Foundation of China (No. 81560497), the Young and Middle-aged Academic and Technical Leader Reserve Talent Program of Yunnan Province (No. 2018HB058), and the Academic Leaders Training Program of Yunnan Provincial Health Planning Commission (No. D-2018001).

[作者简介] 张思宇(1991-), 女, 硕士生, 主要从事消化道肿瘤治疗的基础及临床研究, E-mail: 1185135439@qq.com

[通信作者] 查勇(ZHA Yong, corresponding author), 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事消化道外科肿瘤的基础及临床研究, Email: zha-yong888@sina.com; 姚宏(YAO Hong, co-corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫学及基因与细胞治疗, E-mail: yaohong20055@hotmail.com

平要求极高^[19]。检测方法主要依据 CTC 的物理特性和分子特性,分为3类检测平台:免疫亲和性、物理学特性和两种特性相结合的分选平台。

免疫亲和性分选法:依据靶细胞是 CTC 或白细胞,划分为阳性分选、阴性分选。阳性分选是利用特异性抗体与 CTC 上的抗原特异性相结合,最终得到目的细胞。目前唯一通过美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认证的检测方法是 CellSearch™ 系统,即是利用上皮细胞黏附因子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 抗体分选出 CTC。KELLEY 等^[20]先用免疫磁珠包被的 EpCAM 抗体从血细胞中捕获到 CTC,再用免疫荧光标志的细胞角蛋白抗体、细胞核 DAPI 荧光染色试剂和去除白细胞的 CD45 抗体共同识别 CTC。结果显示,转移性 HCC 患者的 CTC 检出率(40%)明显高于非恶性肝病患者的 CTC 检出率(10%)。与这一原理相类似的技术,微流控芯片 (CTC-iChip) 是结合了免疫磁珠分选和微流控装置,且此方案比 CellSearch™ 系统检测 CTC 的灵敏度更高^[21]。此外,发生 EMT 的 CTC 主要以间质型表型存在,可以逃脱靶向上皮标志物(例如 EpCAM)的阳性富集系统,考虑到这一局限性,间充质标志物(例如波形蛋白)的阳性富集方法也被挖掘出来。但是,即使靶向多种抗原的抗体混合物也不能完全解释 CTC 抗原的异质性。负富集策略通过去除背景血细胞来解决这一问题,即通过用抗 CD45 代替抗 EpCAM 来用于负向富集,例如 RosetteSep™ 系统^[22]。尽管与正向富集技术相比,该系统具有更高的灵敏度,但单独负向富集技术明显降低富集的纯度。因此,为提高 CTC 富集的纯度,部分学者选择将两者结合。

物理学特性分选法:主要基于 CTC 的大小、密度、可塑变形性和电介质迁移能力对 CTC 进行分选,其中 ISET™ 就是通过微滤过装置利用 CTC 的大小,从众多血细胞中富集到 CTC。Canpatro™ 平台先裂解红细胞,再通过纳米过滤技术截留 CTC,最后利用上皮和间质型标志物对 CTC 进行鉴定,最终检测出不同表型 CTC^[23]。Labyrinth 微流控装置是结合 CTC 的密度和惯性效应,最终从白细胞中分离出^[24]。

虽然 CTC 的检测技术种类繁多,但每种技术个体敏感性和特异性是不一。有研究者认为,CTC 的计数主要取决于采用的技术和实验的血容量体积,但 CTC 计数的主要影响因素是所选取 CTC 的生物标志物的有效性。当前所面临的研究困境就是检测血液样本体积数不同、检测目标标志物不同,因此更需对单一原理的检测方案进行标准化,这将有助于对 CTC 进行检测分离。

3 CTC 的表型分子

CTC 的表面标志物是识别其是否存在的关键。当前,对于上皮型 HCC CTC 的富集,常用 EpCAM 作为捕获 CTC 的靶向抗原,主要原因是 EpCAM 在上皮型癌细胞上表达最强,且具有显著的敏感性和特异性;此外,EpCAM 的胞外结构域为捕获 CTC 的抗体提供了靶点,且不需要破膜,大多数 CTC 均可被分离出来^[25]。细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 常用于 CTC 富集后的鉴定工作,常用 CK8、CK19 作为标志物来鉴定 HCC CTC^[7-8]。如 CellSearch™ 系统、Canpatro™ 系统应用此原理,最终得到 EpCAM⁺CK8/18/19⁺DAPI⁺CD45⁻的有核 CTC^[26]。然而,部分肿瘤细胞发生 EMT,导致间质型表型波形蛋白、Twist 或 N-cadherin 表达上调和上皮表型 EpCAM、CK 和 E-cadherin^[27] 表达缺失或下调,需用间充质标志物富集 CTC^[28]。此外,若检测到 CTC 上存在间质型表型,能更准确地预测肿瘤的进展。有学者^[29-30]证实,小部分 CTC 具有干细胞特性,如自我更新及增殖能力,可表达干细胞表型如 CD90、CD44、CD133 或 EpCAM,并激活 WNT 通路。

4 CTC 在 HCC 诊疗中的应用

4.1 CTC 参与免疫促进 HCC 进展

Toll 样受体 (TLR) 表达于巨噬细胞和树突状细胞上,可激活 NK 细胞,分泌穿孔素和肿瘤坏死因子,攻击病毒感染细胞和肿瘤细胞。在发生转移癌患者的血液样本中,CTC 计数增加、TLR 表达下调,抑制 NK 细胞激活且减弱其抗肿瘤作用。主要组织相容复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 可帮助识别肿瘤抗原,激活 T 细胞,对启动特异性免疫应答至关重要。其中, MHC I 类分子相关基因家族 MICA/MICB 是 NK 细胞活化性受体 NKG2 的配体,若 MHC I 类分子下调,则 NK 细胞活性将被抑制。例如, HUAMAN 等^[31]进行的临床前研究表明,在发生肺转移的 HCC 同源小鼠模型的血液样本中检测到 CTC 上 MHC I 类分子表达下调、NK 细胞抗肿瘤作用降低,这可能与免疫逃逸机制有关。CD8⁺ T 细胞是启动细胞毒性 T 淋巴的细胞免疫应答的重要受体,CTC 可下调 CD8⁺ T 细胞上 MHC I 类分子,抑制 NK 细胞激活。PD-L1 蛋白广泛表达于癌细胞和巨噬细胞上,PD-L1 与 T 细胞上的受体 PD-1 相互作用,会抑制 T 细胞活化,实现免疫逃逸。已有研究者^[32]用流式细胞术从 HCC 的 CTC 中检测到 PD-L1 的存在,表明这些细胞可以逃避 T 细胞杀伤,实现免疫逃逸;该研究也表明,肿瘤大小、巴塞罗那分期 (Barcelona Clinic

Liver Cancer, BCLC)与PD-1/PD-L1的表达相关。这些发现表明,CTC具有独特而重要的分子机制,对促进HCC进展和转移的研究具有重要意义。

4.2 CTC与HCC早期诊断

目前,临床中对HCC患者的早期诊断方法较局限,导致部分HCC患者无法早期确诊,错失治疗的黄金时期。CTC的存在对HCC患者早期诊断有预测功能(表1)。GUO等^[29]采用qRT-PCR平台探究了CTC计数与HCC患者诊断的关系,结果表明HCC患者的CTC阳性率明显高于非恶性肿瘤患者;且CTC的存在对AFP阴性患者具有更好的诊断价值。此外,WANG等^[33]进一步研究了HCC患者和非恶性肝病患

者中不同表型的CTC(上皮表型、间质表型、上皮-间质混合型)计数的差异,表明只有间质型CTC与HCC患者术后早期复发密切相关。CHENG等^[34]收集了113例HCC患者和57例非恶性肝病患者的血样,检测到的CTC总数对HCC患者有诊断价值,如与AFP联合应用更可提升HCC诊断的有效性;其次,间质型CTC与HCC患者的疾病进展有关,可间接反映肿瘤的分期。然而,SUN等^[35]经Meta分析认为不应建议将CTC作为确诊HCC的独立指标。因为CTC检测方法无标准,对照组中候选者标准不固定,实验结果间的比较有待验证。

表1 CTC的不同表型对HCC诊治的意义

CTC表型	富集方法	检测方法	HCC(N)	阳性(n)	诊治意义	文献
CD45 ⁺ pERk ⁺ pAkt ⁺ ; CD45 ⁺ pERk ⁺ pAkt ⁺ ; CD45 ⁺ pERk ⁻ pAkt ⁺ ; CD45 ⁺ pERk ⁺ pAkt ⁻	密度梯度离心	免疫组化; 免疫荧光法	109	101	疗效预测	[38]
CD45 ⁺ EpCAM ^{mRNA+}	阴性富集法	qRT-PCR	49	NR	预后预测	[41]
EpCAM, CK8/18/19, DAPI, CD45 ⁻	Celltracks TM AutoPrep系统	CellSearch TM 系统	57	9	预后预测	[42]
NR	过滤	RNA原位杂交	42	术前33; 术后34	预后预测	[3]
EpCAM, CK8/18/19, DAPI, CD45 ⁻	Celltracks TM AutoPrep系统	CellSearch TM 系统	89	50	预后预测	[43]
EpCAM, CK19, CD133, CD90, CD44, ABCG2, ICAM1, CD24, Nestin	NR	qRT-PCR	395	NR	诊断; 预后预测; 疗效预测	[29]
EpCAM, CK8/18/19, CD45 ⁻ , Twist, Vimentin	CanPatrol TM	RNA原位杂交	165	117	预后预测	[8]
EpCAM, CK8/18/19, CD45 ⁻ , Twist, Vimentin	CanPatrol TM	RNA原位杂交	112	101	预后预测	[7]
EpCAM, CK8/18/19, CD45 ⁻ , Twist, Vimentin	CanPatrol TM	RNA原位杂交	136	125	治疗方案选择	[44]
EpCAM, CK8/18/19, CD45 ⁻ , Twist, Vimentin	CanPatrol TM	RNA原位杂交	113	NR	诊断	[34]
EpCAM ⁺ CD45 ⁻	PowerMag TM	免疫荧光法	104	NR	预后预测	[39]

NR: No report

4.3 CTC与疗效预测

索拉非尼是新型分子靶向抗肿瘤药,但患者对

该药的耐受力及耐药性存在个体差异,若在治疗过程中能实时评估患者病情,可辅助临床医师适时调

整治疗方案及用药剂量。相关研究^[36]表明,CTC的计数动态变化与疾病变化相关。YAN等^[37]采用流式细胞术检测经索拉非尼治疗后HCC的CTC数量变化,结果显示治疗后CTC计数低于治疗前,经统计学分析认为CTC是预测疾病进展和监测疗效的标志物。LI等^[38]进一步研究,HCC患者的CTC中pERK⁺/pAkt表达与病理组织中分型高度一致(90%),给予索拉非尼治疗2周后pERK⁺/pAkt表达降低,其对索拉非尼非常敏感,经多变量分析认为CTC中pERK⁺/pAkt是索拉非尼治疗HCC患者无进展生存期(progression-free survival, PFS)的独立预测因子。RAU等^[39]研究共入组了30位晚期HCC患者,依据患者的身体状况和耐受性,每天给索拉非尼400~800 mg,根据索拉非尼的不良反应调整剂量,最大剂量为每天800 mg。每2~3个月进行一次CTC计数,并测定血清AFP水平,以监测治疗反应。该实验组共收集了85份血液样本,利用PowerMag平台的分析结果显示:治疗期间连续的CTC计数与血清AFP联合监测患者预后,能对用药效果和病情评估提供实时反馈信息。通过大样本、多中心的临床研究,CTC的应用价值会进一步提高。综上,CTC检测可对晚期HCC患者索拉非尼治疗的物疗效及耐药现象有预测价值(表1),对晚期HCC患者的综合治疗具有重要指导意义。

4.4 CTC与患者预后测评

Meta分析^[40]中证实,CTC计数高于基线值是患者PFS和OS的独立预测因素(表1)。ZHOU等^[41]探究了CTC计数与HCC术后患者预后的关系,术后CTC计数增加的患者(术前CTC<2、术后CTC≥2)比术后未增加的患者(术前CTC<2、术后CTC<2)DFS和OS短;术前CTC>2、术后CTC>2的患者预后最差;术前CTC<2、术后CTC<2患者的DFS和OS相对较长。在另一项经肝切除术后HCC患者CTC的研究^[42]中得出相似结论,术后CTC阳性的患者比CTC阴性的患者复发的风险更高,OS和无复发生存期RFS相对较短。SHEN等^[43]进行了一项前瞻性研究,采用CellSearch™系统检测97例不能切除的HCC经肝动脉化疗栓塞治疗的患者的CTC,结果提示高比例的EpCAM⁺CTC患者治疗后生存期相对较短。以上相关研究表明,术前或药物治疗前CTC的存在与患者的不良预后明显相关。为进一步探讨不同表型CTC对预后生存的影响情况,QI等^[44]纳入136例HCC患者,依据手术方式分为两组:解剖性肝切除组($n=57$)和非解剖性肝切除组($n=79$),两组患者术前检测CTC结果表明:两种治疗方案对患者的TFS没有影响,而与CTC表型有关;表型共检测到CTC的3个表型:上皮细胞型CTC(E-CTC),间质型CTC(M-

CTC)和上皮/间质混合型CTC(E/M-CTC),统计学分析显示,CTC总数低、E-CTC⁽⁺⁾和混合型E/M-CTC⁽⁺⁾的患者中,TFS明显延长;而术前总CTC计数高、E-CTC⁽⁺⁾和混合型CTC⁽⁺⁾的患者提示该患者术前可能已经发生转移,且TFS明显缩短;该研究得出重要结论:CTC的计数及亚型均可作为预后独立预测因素;然而这项研究的样本量较少,且是回顾性分析,结论有局限性。研究^[4]发现,术后CTC计数与PFS和OS并无关联,而如术后CTC较术前升高或降低则与PFS和OS相关。

5 结 语

近年来,随着对CTC检测技术不断更新,CTC对肿瘤患者的临床应用价值受到高度重视。然而,CTC作为一种新的生物标志物,它的分离、检测方法未实现标准化,实验的对照组和检测组病例标准不统一,这些是当前亟需解决的问题。目前针对CTC与HCC治疗决策相关的研究较少,但具有广阔的临床研究前景。CTC表型分子可成为HCC免疫治疗的新靶点,从而指导抗癌药的研发,最终改善患者的预后。CTC的检测将会给临床医生对HCC患者的早期诊断、病情和疗效的监测评估及预后预测提供有价值的指标,然而在其应用于临床前,仍需要进行多中心、多变量、多领域的大型研究作为理论支撑。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics[J]. *CA: Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [3] YE X, LI G, HAN C, et al. Circulating tumor cells as a potential biomarker for postoperative clinical outcome in HBV-related hepatocellular carcinoma [J/OL]. *Cancer management and research*, 2018, 10: 5639-5647 [2020-05-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6245351/>. DOI:10.2147/cmar.S175489.
- [4] SARVEAZAD A, AGAH S, BABAHAJIAN A, et al. Predictors of 5 year survival rate in hepatocellular carcinoma patients [J/OL]. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 2019, 24: 86-93[2020-05-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6856560/>. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_1017_18.
- [5] KIM M Y, OSKARSSON T, ACHARYYA S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells[J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1315-1326. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.025.
- [6] MEGO M. Emerging role of circulating tumor cells in cancer management[J]. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 2014, 35(4): 237-238. DOI:10.4103/0971-5851.144962.
- [7] QI L N, XIANG B D, WU F X, et al. Circulating tumor cells under-

- going EMT provide a metric for diagnosis and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4731-4744. DOI:10.1158/0008-5472.Can-17-2459.
- [8] OU H, HUANG Y, XIANG L, et al. Circulating tumor cell phenotype indicates poor survival and recurrence after surgery for hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(9): 2373-2380. DOI: 10.1007/s10620-018-5124-2.
- [9] MOLLICA V, DI NUNNO V, SANTONI M, et al. An evaluation of current prostate cancer diagnostic approaches with emphasis on liquid biopsies and prostate cancer[J]. *Exp Rev Mol Diag*, 2020, 20(2): 207-217 DOI:10.1080/14737159.2019.1684265.
- [10] FABISIEWICZ A, SZOSTAKOWSKA-RODZOS M, ZACZEK A J, et al. Circulating tumor cells in early and advanced breast cancer; biology and prognostic value[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): DOI: 10.3390/ijms21051671.
- [11] MARCUELLO M, VYMETALKOVA V, NEVES R P L, et al. Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer [J/OL]. *Mol Aspects Med*, 2019, 69: 107-122 [2020-05-08]. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.002>. DOI: 10.1016/j.mam.2019.06.002.
- [12] CHEMI F, MOHAN S, BRADY G. Circulating tumour cells in lung cancer[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2020, 215: 105-125 DOI: 10.1007/978-3-030-26439-0_6.
- [13] YANG C, XIA B R, JIN W L, et al. Circulating tumor cells in precision oncology: clinical applications in liquid biopsy and 3D organoid model[J/OL]. *Cancer Cell Inter*, 2019, 19: 341 [2020-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6918690/>. DOI: 10.1186/s12935-019-1067-8.
- [14] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis [J/OL]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395-412[2020-05-08]. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043854>. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.
- [15] YEUNG KT, YANG J: Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Mo Oncol*, 2017, 11(1): 28-39. DOI: 10.1002/1878-0261.12017.
- [16] AIELLO N M, MADDIPATI R, NORGARD R J, et al. EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration[J]. *Dev Cell*, 2018, 45(6): 681-695. DOI:10.1016/j.devcel.2018.05.027.
- [17] GIULIANO M, SHAIKH A, LO H C, et al. Perspective on circulating tumor cell clusters: why it takes a village to metastasize[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4): 845-852 DOI:10.1158/0008-5472.Can-17-2748.
- [18] MICALIZZI DS, MAHESWARAN S, HABER DA: A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology[J]. *Genes Dev*, 2017, 31(18): 1827-1840. DOI:10.1101/gad.305805.117.
- [19] KULASINGHE A, KENNY L, PERRY C et al: Impact of label-free technologies in head and neck cancer circulating tumour cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 71223-71234. DOI: 10.18632/oncotarget.12086.
- [20] KELLEY R K, MAGBANUA M J, BUTLER T M, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls [J/OL]. *BMC cancer*, 2015, 15: 206-217[2020-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4399150/>. DOI: 10.1186/s12885-015-1195-z.
- [21] BHAN I, MOSESSO K, GOYAL L, et al. Detection and analysis of circulating epithelial cells in liquid biopsies from patients with liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(6): 2016-2018.e2011. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.09.020.
- [22] YAO Y, LI Y, LIU Q, et al. Rapid detection of hepatocellular carcinoma metastasis using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *Talanta*, 2020, 208: 120402 DOI:10.1016/j.talanta.2019.120402.
- [23] CHEN Y, LI S, LI W et al: Circulating tumor cells undergoing EMT are poorly correlated with clinical stages or predictive of recurrence in hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7084. DOI: 10.1038/s41598-019-43572-1.
- [24] WAN S, KIM T H, SMITH K J, et al. New labyrinth microfluidic device detects circulating tumor cells expressing cancer stem cell marker and circulating tumor microemboli in hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18575. DOI: 10.1038/s41598-019-54960-y.
- [25] GIRES O, STOECKLEIN N H. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(22): 4393-4402 DOI: 10.1007/s00018-014-1693-1.
- [26] CRISTOFANILLI M, BUDD GT, ELLIS MJ 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.
- [27] WONG S H M, FANG C M, CHUAH L H, et al. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications[J/OL]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 121: 11-22[2020-05-08]. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010>. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.
- [28] HYUN K A, KOO G B, HAN H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 24677-24687. DOI:10.18632/oncotarget.8250.
- [29] GUO W, SUN YF, SHEN MN et al: Circulating tumor cells with stem-like phenotypes for diagnosis, prognosis, and therapeutic response evaluation in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(9): 2203-2213. DOI:10.1158/1078-0432.Ccr-17-1753.
- [30] YANG ZF, HO DW, NG MN et al: Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166. DOI:10.1016/j.ccr.2008.01.013.
- [31] HUAMAN J, NAIDOO M, ZANG X, et al. Fibronectin regulation of integrin B1 and SLUG in circulating tumor cells[J]. *Cells*, 2019, 8(6): 618-636. DOI:10.3390/cells8060618.
- [32] ZENG Z, SHI F, ZHOU L, et al. Upregulation of circulating PD-L1/PD-1 is associated with poor post-cryoablation prognosis in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23621. DOI:10.1371/journal.pone.0023621.
- [33] WANG Z, LUO L, CHENG Y et al: Correlation between postoperative early recurrence of hepatocellular carcinoma and mesenchymal circulating tumor cells in peripheral blood[J]. *J Gastrointest Sur*, 2018, 22(4): 633-639. DOI:10.1007/s11605-017-3619-3.
- [34] CHENG Y, LUO L, ZHANG J, et al. Diagnostic value of different phenotype circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2019, 23(12): 2354-2361 DOI: 10.1007/s11605-

- 018-04067-y.
- [35] SUN C, LIAO W, DENG Z, et al. The diagnostic value of assays for circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J/OL]. *Medicine*, 2017, 96(29): e7513 [2020-05-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5521903/>. DOI: 10.1097/md.00000000000007513.
- [36] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. *Inter J Clin Oncol*, 2017, 22(3): 421-430. DOI:10.1007/s10147-017-1105-2.
- [37] YAN J, FAN Z, WU X et al. Circulating tumor cells are correlated with disease progression and treatment response in an orthotopic hepatocellular carcinoma model[J]. *Cytometry A*, 2015, 87(11): 1020-1028. DOI:10.1002/cyto.a.22782.
- [38] LI J, SHI L, ZHANG X, et al. pERK/pAkt phenotyping in circulating tumor cells as a biomarker for sorafenib efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2646-2659. DOI:10.18632/oncotarget.6104.
- [39] RAU K M, LIU C T, HSIAO Y C, et al. Sequential circulating tumor cell counts in patients with locally advanced or metastatic hepatocellular carcinoma: monitoring the treatment response [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(1): 188-206. DOI:10.3390/jcm9010188.
- [40] FAN JL, YANG YF, YUAN CH et al: Circulating tumor cells for predicting the prognostic of patients with hepatocellular carcinoma: a meta analysis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(2): 629-640. DOI:10.1159/000430382.
- [41] ZHOU Y, WANG B, WU J, et al. Association of preoperative Ep-CAM Circulating Tumor Cells and peripheral Treg cell levels with early recurrence of hepatocellular carcinoma following radical hepatic resection[J/OL]. *BMC cancer*, 2016, 16: 506[2020-05-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/27439521/>. DOI: 10.1186/s12885-016-2526-4.
- [42] VON FELDEN J, SCHULZE K, KRECH T, et al: Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(52): 89978-89987. DOI: 10.18632/oncotarget.21208.
- [43] SHEN J, WANG W S, ZHU X L, et al. High epithelial cell adhesion molecule-positive circulating tumor cell count predicts poor survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with transcatheter arterial chemoembolization[J]. *JVIR*, 2018, 29(12): 1678-1684 DOI:10.1016/j.jvir.2018.07.030.
- [44] QI L N, MA L, CHEN Y Y, et al. Outcomes of anatomical versus non-anatomical resection for hepatocellular carcinoma according to circulating tumour-cell status[J]. *Ann Med*, 2020, 52(1/2): 21-31. DOI:10.1080/07853890.2019.1709655.

[收稿日期] 2020-03-05

[修回日期] 2020-07-20

[本文编辑] 韩丹