

综述

循环肿瘤细胞检测在肺癌诊疗中的应用

张丽妍, 谭晓明

上海交通大学 医学院附属仁济医院南院呼吸科, 上海 201112

[摘要] 循环肿瘤细胞是从原发肿瘤脱落并进入血液循环系统的癌细胞。其检测将有助于肿瘤的早期发现、复发转移监测、预后评估等。该文就近年来循环肿瘤细胞检测方法的进展及其在肺癌诊疗中的应用作一综述。

[关键词] 循环肿瘤细胞; 肺癌; 检测方法

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.03.019 **[中图分类号]** R734.2 **[文献标志码]** A

Application in diagnosis and treatment of circulating tumor cell detection in lung cancer

ZHANG Li-yan, TAN Xiao-ming

Department of Respiratory Medicine, South Campus, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201112, China

[Abstract] Circulating tumor cells (CTCs) are cancer cells that fall off from the primary tumor and enter into the blood circulation system. CTCs detection will contribute to diagnosing tumor in its early stage, monitoring the relapse and metastasis, evaluating the prognosis. In this review, the recent progress and the application in diagnosis and treatment of CTCs detection methods in lung cancer were summarized.

[Key words] circulating tumor cells (CTCs); lung cancer; detection method

原发性肺癌是中国常见的恶性肿瘤之一。2015年, 国家癌症中心发布的数据显示, 中国2006—2011年肺癌患病率为130.2/10万, 男性84.6/10万, 居恶性肿瘤第2位; 女性45.6/10万, 居恶性肿瘤第4位^[1]。大多数肺癌在确诊时已属晚期, 故其病死率居高不下。低剂量CT筛查可有助于及早发现肺癌, 但确诊仍有赖于病理活检这一金标准。随着精准化医疗的推进, 通过病理活检标本检测肿瘤驱动基因表型可以进一步指导临床治疗^[2]。然而, 肿瘤在经过一段时间的治疗后, 无法避免会产生耐药性, 致使患者不得不再次接受活检以了解肿瘤细胞基因层面的最新改变^[3]。病理活检虽在肺癌诊断中扮演着重要的角色, 但由于其操作有创性且耗时, 在实际过程中进行反复活检仍然面临挑战^[4]。此外, 因原发灶与转移灶之间存在的异质性, 以及活检取材存在的主观抽样偏差, 活检获取的组织可能无法代表肿瘤真正的完整特征^[5]。因此, 肺癌的早期诊断及肿瘤分子水平变化的后期连续观察成为了迫切需要解决的问题。

1869年, Ashworth发现血液中存在一种与原发肿

瘤细胞相类似的细胞, 提出了循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的概念^[6]。CTCs是存在于原发瘤及转移瘤之外的肿瘤细胞, 这部分肿瘤细胞通过原发肿瘤的不断增殖、侵袭进入循环, 成为具备有侵袭及转移潜能的循环肿瘤细胞。而循环中出现CTCs对于远处转移而言, 将是一个早于常规影像学、组织学及细胞学的重要信号。CTCs检测是一种新兴的微创液体活检技术, 有助于疾病的早期诊断和治疗过程中的疾病监测。由于该技术捕获肿瘤细胞风险较小且获取途径较为便捷, 在特定人群中可应用于疾病的早期筛查。对于肺癌患者而言, 该技术不仅可获得多样的肿瘤分子, 同时还便于临床上连续观察且不增加额外的活检风险, 具有较广泛的应用前景。

1 CTCs的富集技术

1.1 基于形态学的富集技术

该技术利用单核细胞密度低于其他血液成分的特性, 通过密度梯度将CTCs进行分离。OncoQuick在此基础上加

[基金项目] 上海市闵行区自然科学研究课题(2016MHZ52)(Natural Science Foundation of Minhang District of Shanghai, 2016MHZ52)。

[作者简介] 张丽妍(1985—), 女, 住院医师, 硕士; 电子信箱: leeyan_516@163.com。

[通信作者] 谭晓明, 电子信箱: tanxiaomingfsh@163.com。

设多孔屏障进行改良,提高了 CTCs 的检出率^[7]。Vona 等^[8]提出了基于肿瘤细胞大小的分离法 (isolation by size of epithelial tumor cells, ISET),利用包含有不同孔径的滤膜对无法通过孔径的细胞进行收集,目前认为 8 μm 孔径的滤膜收集 CTCs 效果最佳。

1.2 基于免疫学的富集技术

免疫磁珠法是利用细胞表面的特异性抗原与连接有磁珠的特异性单克隆抗体相结合,使细胞具有磁性,继而可以被外加磁场所吸引而滞留,实现 CTCs 分离。其中,分选的磁珠可分为阳性磁珠和阴性磁珠,前者可通过标记肿瘤表面抗原 (如 EpCAM) 直接分选肿瘤细胞,而后者则可通过标记白细胞、巨核细胞及血小板表面抗原 (如 CD45、CD14、CD61) 后进行移除来达到收集肿瘤细胞的目的^[9]。

2 CTCs 检测技术

CTCs 的检测可以从细胞水平及基因水平 2 个方面进行。其中,前者包括免疫细胞化学法 (immunocytochemistry, ICC) 及流式细胞检测法 (flow cytometry, FCM) 等,后者则包括聚合酶链反应法 (polymerase chain reaction, PCR) 及反转录聚合酶链反应法 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 等。

2.1 ICC

通过带有抗体的显色剂显色含有相应抗原的细胞,进而对该部分细胞进行定位、定性及定量检测。该方法可以保持细胞完整性,从而进一步对肿瘤的形态学进行分析;但该方法灵敏性较低,缺乏特异性肿瘤抗体^[10]。近年来,研究人员又开发了光导纤维阵列扫描术、激光扫描细胞计数仪、自动细胞显像系统等技术,通过提高扫描速度、准确定位免疫标记的肿瘤细胞,以显著提高细胞检测灵敏性^[11]。

2.2 FCM

该技术采用荧光抗体标记具有相应抗原的 CTCs 进行检测。其优点为简便、快速、精确,但灵敏度仅为 10^5 。由于大部分外周血中 CTCs 浓度均低于该浓度,极易造成漏诊^[12]。

2.3 PCR

理论上,通过对 CTCs 中发生突变的原癌基因、抑癌基因及其他特定的肿瘤基因序列进行检测,可以确认 CTCs 的存在。然而,由于外周血中存在游离的循环肿

瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA),即使检测到 ctDNA 也并不能真实地反映 CTCs 的存在。故该方法虽灵敏性较高,但因无法克服假阳性而不适合在临床中应用。

2.4 RT-PCR

与 PCR 类似,RT-PCR 也具有较高的灵敏度。该方法以由肿瘤特异性的 mRNA 序列反转录的 DNA 片段为检测对象,可识别肿瘤 mRNA^[13]。由于该类 mRNA 不存在于正常的外周血细胞中,且在肿瘤细胞死亡后可迅速被 RNA 降解酶降解,一旦在外周血中被检测到,即可以很好地提示 CTCs 的存在。该方法是 PCR 法的一种很有效的替代。

3 CTCs 富集与检测相结合技术

外周血中 CTCs 的含量极低,且不同肿瘤或同种肿瘤不同患者甚至同一患者的不同阶段间的 CTCs 数量均存在明显差异,所以在检测前对外周血中的循环肿瘤细胞进行富集已成为主流共识。富集技术可以明显提高 CTCs 的浓度及检出率。

3.1 CellSearch 技术

该技术利用免疫磁珠富集原理,使用带有 EpCAM 抗体的磁珠对 CTCs 进行标记,经过正向收集 CTCs 后,通过 ICC 进行检测计数^[14-15]。

3.2 CTC-chip 技术

与 CellSearch 技术的基本原理相同,CTC-chip 技术在前者的基础之上,进一步利用微流体学原理,在硅片上设置了 78 000 个包含有 EpCAM 抗体的显微位点。当包含有 EpCAM 抗原的 CTCs 流经位点时,可以被位点捕获,继而再利用 ICC 对其进行检测计数^[16]。

3.3 ISET 联合激光扫描细胞计数仪技术

该方法利用 ISET 富集原理,采用孔径为 8 μm 的滤膜对肿瘤细胞进行分离,而后利用激光扫描细胞计数仪对进行过荧光标记的肿瘤细胞扫描计数。该方法可以有效捕获 EpCAM 阴性的肿瘤细胞,但也存在小于 8 μm 的肿瘤细胞被遗漏的缺点^[17]。其与 CellSearch 技术的原理不同,因此在计数同一患者的 CTCs 时,将得出不一致的结果^[18]。

3.4 免疫磁珠负向富集联合 FR 靶向 PCR 检测

该方法是针对肺癌设计的新一代 CTCs 检测技术,利

用负向富集的原理, 通过带有磁珠的白细胞特异性抗体 CD45 抗体、CD14 抗体分别标记白细胞和巨噬细胞, 进而去除该 2 种细胞以负向富集 CTCs。而后, 利用部分肿瘤细胞 (如卵巢癌、肺癌) 中叶酸受体 (folate receptor, FR) 高表达的特性, 将 FR 作为一个检测靶点, 在标本内加入肿瘤特异性叶酸配体-寡核苷酸偶合物探针标记液, 再对标本进行荧光定量 PCR 扩增分析。由于该方法利用的检测原理不同于 CellSearch 和 CTC-chip, 所以其对于缺乏 EpCAM 表达的肿瘤细胞依然有效, 同时也避免了利用 ISET 富集原理造成的漏诊和假阳性。目前, 该方法已在肺癌中开展并获得了较好的效果^[19-20]。

4 CTCs 检测在肺癌诊疗中的应用

4.1 CTCs 与肺癌诊断

目前, 肺癌的确诊依赖组织细胞学活检。但该操作的有创性及可能带来的并发症使患者难以接受, 且不利于对患者的病情进行长期监测。外周血 CTCs 检测因其创伤性小、重复性好, 已成为肺癌诊断的一种良好补充手段。CTCs 可以在肿瘤的早期阶段进入外周血液循环, 通过对 CTCs 的检测可以早期诊断肺癌, 避免患者被确诊时已属晚期继而错过最好的治疗期。Allard 等^[21]利用 CellSearch 技术对 99 例肺癌患者的样本进行检测, 发现分别有 20%、14%、10%、6% 的患者外周血中 CTCs 数目 (个) ≥ 2 、 ≥ 5 、 ≥ 10 、 ≥ 50 。Nagrath 等^[16]利用灵敏性更高的 CTCs-chip 进行检测, 发现所有肺癌患者外周血中均可检出 CTCs。之后有大量采用不同富集、检测方法的独立研究对 CTCs 在肺癌诊断中的价值进行验证, 所获得的 CTCs 诊断肺癌的灵敏性及特异性不尽相同。近年来, 通过对肺癌 CTCs 检测技术的研究和改进, 研究人员利用 FR 靶向 PCR 技术对肺癌患者进行检测发现, 该方法灵敏性及特异性均较高^[20]。在 I 期非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者中, 该方法灵敏度也达到了 67.2%^[19]。研究人员利用 ISET 方法在 5 例慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 患者的外周血中检测到 CTCs, 经过 1~4 年的 CT 随访发现有新发肺部结节影, 手术后证实为早期肺癌^[22]。该研究证实, CTCs 不但对诊断早期肺癌有帮助, 同时还可以帮助监测具有肺癌高危因素的人群, 及早发现癌前病变, 进而实现对癌症的早期干预以改善预后。

4.2 CTCs 与肺癌的复发转移

在肺癌中, 血行转移是造成患者转移、复发及死亡的

重要原因。多项研究^[23]证实, 外周血 CTCs 数量与肿瘤发生转移的可能性成正比。Tanaka 等^[24]也发现 CTCs 的数目与肿瘤发生远处转移具有相关性。Cheng 等^[25]的研究发现, 骨转移患者的外周血中 CTCs 的浓度明显高于无骨转移患者。接受手术治疗的患者中, 术前 CTCs 数目较高的患者术后发生复发和转移的可能性也更高^[17]。

4.3 CTCs 与肺癌治疗方案的选择及疗效评价

肺癌治疗方案的选择主要根据肿瘤的 TNM (tumor node metastasis) 分级及患者的综合情况。除少部分的早期患者外, 绝大部分的中、晚期患者无论是否接受手术治疗, 均需进行化学治疗、放射治疗、分子靶向治疗及免疫治疗, 且患者疾病的进一步发展趋势判断也并不能在原发灶发生进展或出现转移复发之前进行有效评价。而通过对 CTCs 数量的变化检测, 则可有效判断肺癌患者的病情及间接反映肿瘤对于治疗的敏感性, 帮助患者及早延续或调整治疗方案, 以实现个性化治疗。多项研究^[26-28]表明, 检测患者 CTCs 对于评价放射治疗、化学治疗等多种不同的肺癌治疗手段均有价值。此外, 从外周血中收集而来的 CTCs 还可用来进行后续的肿瘤基因分析^[29]。随着对肺癌个体化靶向治疗的研究深入, 肿瘤分子标志物的检测显得更为重要。Maheswaran 等^[30]检测了 12 例包含有表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 突变的 NSCLC 患者的 CTCs 中 EGFR 情况, 结果证实有 11 例存在与原发肿瘤相同的 EGFR 突变。而对 CTCs 的 EGFR 检测可有效指导酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 的应用。此外, 当肿瘤发生 EGFR 20 号外显子 (T790M) 突变时, 原先对 TKIs 治疗有效的患者即会发生耐药。CTCs 检测技术也可以很好地反映 T790M 突变, 及时指导调整用药^[31]。除此之外, 该技术还可被应用于 *ALK* 基因以及 *ROS1* 基因重排检测, 为靶向治疗提供依据^[32-33]。

另外, 有 2 项未来可能对指导患者治疗有益的研究在此也值得一提。一项研究是利用 CTCs 进行程序性死亡配体 (programmed death ligand-1, PD-L1) 的检测。新近上市的纳武单抗克隆抗体和帕姆单抗克隆抗体获批应用于肺癌, 进一步强调了肿瘤组织中对 PD-L1 表达检测的重要性。通过检测该配体, 可以更好地筛选出适合这类药物治疗的患者^[34]。有研究^[35]报道, 通过微流体系统捕获 NSCLC 患者的 CTCs, 可显示出 PD-L1 的表达及其异质性, 且该研究为不采用有创活检、实现对患者进行 PD-L1 检测提供了可能。另一项研究源自 CTC 衍生植入物 (CTC-derived explant, CDX), 未来可能代替患者衍生异种移植物, 用



于患者基因检测及临床前药物测试, 尤其适合于那些不适合进行活检的患者^[36]。

4.4 CTCs 与肺癌预后

在过去的十余年内, 数项研究证实外周循环血中的 CTCs 数量在肺癌中与患者预后具有明确相关性。利用 CellSearch 技术检测接受一线化疗的晚期 NSCLC 患者外周血发现, 当 CTCs 数目大于 5 个 / (7.5 mL 外周血) 时, 患者的无进展生存时间和总生存时间明显缩短^[14]。同时, CTCs 判断预后的作用在接受肿瘤根治术的病例中同样有效^[37-38]。Meta 分析显示, CTCs 的存在与患者无进展生存时间及总生存时间的减少相关, 虽然研究采用了包括 RT-PCR、CellSearch、ICC 在内的多种检测方法, CTCs 依然可以作为预测患者预后的一项独立指标^[39]。Hou 等^[40]利用 CellSearch 技术检测了 50 例小细胞肺癌患者, 结果显示 86% 的患者在接受化学治疗前可检测到 CTCs, 经化学治疗后其检出率下降至 60%; 且当患者 CTCs 数值持续走高时, 也意味着有更差的预后。

CTCs 检测在应用方面具有如下优点: ①可作为肿瘤检测的一项量化指标 (包括早期筛查、术前术后以及肿瘤进展评估)。②用于检测肿瘤基因突变 (包括点突变和重排)。③可进一步对 RNA 和蛋白质进行分析 (通过荧光原位杂交和免疫组化技术进一步检测, 如 ALK、PD-L1 等药物靶点)。④CDX 技术可应用于药敏等功能性化验。此外, 该类技术也存在一定的局限性: ①目前, 虽然可用于 CTCs

的富集检测技术众多, 但不同方法之间检出一致率较低, 缺乏统一的标准。②上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和循环肿瘤微栓 (circulating tumor microemboli, CTM) 现象可造成部分检测技术检出率降低。③富集和捕获将增加外周血 DNA 检测的步骤和成本。

因此, 在针对不同的检测目的时, 应选择最适合的应用技术。例如, CellSearch 技术通过免疫磁珠对 CTCs 进行检测, 易造成细胞团块离散, CTM 无法被检出^[18]。由于 CTM 较单个 CTC 更容易在外周血中生存, 且具有更强的远处转移倾向, 当检测的主要对象为 CTM 时, 则不适合应用 CellSearch 等利用免疫表型进行检测的技术。同时, 针对肺癌等存在 EMT 现象的肿瘤, 由于上皮免疫表型缺失, CTCs 假阴性率亦会明显增高^[41], 也应改用 ISET 等技术进行检测。另外, 在靶点检测方面 CTCs 技术更适用于对肿瘤 RNA 和蛋白质的分析, 而对于普通的 DNA 点突变和重排则可选用成本更低、灵敏性更高的 ctDNA 技术。

综上所述, 随着 CTCs 富集检测技术的革新, 尤其是通过针对肺癌的特异性标志 FR 的开发应用, CTCs 在肺癌的早期诊断、转移及复发监测、治疗方案选择、疗效评价以及预后判断等方面的应用均取得较大进展, 其应用方面也从单纯的细胞计数转向了对富集所得肿瘤细胞携带 DNA、RNA 及蛋白质信息的检测。相信通过 CTCs 技术在临床的进一步普及应用, 这种新颖的无创性液体活检技术将在临床诊断及治疗, 尤其是肺癌的精准化治疗方面扮演越来越重要的角色。

参·考·文·献

- [1] 石远凯, 孙燕, 于金明, 等. 中国晚期原发性肺癌诊治专家共识[J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(1): 1-15.
- [2] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma[J]. Nature, 2014, 511(7511): 543-550.
- [3] Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(5): 1169-1180.
- [4] Overman MJ, Modak J, Kopetz S, et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed?[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(1): 17-22.
- [5] de Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution[J]. Science, 2014, 346(6206): 251-256.
- [6] Donato BM, Burns L, Willey V, et al. Treatment patterns in patients with advanced breast cancer who were exposed to an anthracycline, a taxane, and capecitabine: a descriptive report[J]. Clin Ther, 2010, 32(3): 546-554.
- [7] Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood[J]. Cytometry, 2002, 49(4): 150-158.
- [8] Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(1): 57-63.
- [9] Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects[J]. Expert Rev Proteomics, 2014, 4(6): 741-756.
- [10] Deng G, Herrler M, Burgess D, et al. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(4): R69.
- [11] Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, et al. High speed detection of circulating tumor cells[J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21(10): 1893-1899.
- [12] Goodale D, Phay C, Postenka CO, et al. Characterization of tumor cell dissemination patterns in preclinical models of cancer metastasis using flow cytometry and laser scanning cytometry[J]. Cytometry A, 2009, 75(4): 344-355.
- [13] Ji XQ, Sato H, Tanaka H, et al. Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the Light Cycler System[J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(2): 355-360.
- [14] Krebs MG, 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.
- [15] Cristofanilli M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. Semin Oncol, 2006, 33(3 Suppl 9): S9-S14.
- [16] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. Nature, 2007, 450(7173): 1235-1239.
- [17] Farace F, Massard C, Vimond N, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour cell detection in patients with metastatic carcinomas[J]. Br J Cancer, 2011, 105(6): 847-853.
- [18] Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent

- and-independent approaches[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(2): 306-315.
- [19] Parker N, Turk MJ, Westrick E, et al. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay[J]. *Anal Biochem*, 2005, 338(2): 284-293.
- [20] Lou J, Zhou C, Wu J, et al. A multicenter clinical trial of lung cancer circulating tumor cell assay with the largest sample size (1210 cases) in China[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14 suppl): Abstract nr 2247.
- [21] Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6897-6904.
- [22] Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e111597.
- [23] Katoh M, Neumaier M, Nezam R, et al. Correlation of circulating tumor cells with tumor size and metastatic load in a spontaneous lung metastasis model[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(3a): 1421-1425.
- [24] Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(22): 6980-6986.
- [25] Cheng M, Liu L, Yang HS, et al. Circulating tumor cells are associated with bone metastasis of lung cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(15): 6369-6374.
- [26] 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)*, 2013, 6(1): 153-165.
- [27] Hirose T, Murata Y, Oki Y, et al. Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Res*, 2012, 20(2/3): 131-137.
- [28] Dorsey JF, Kao GD, Macarthur KM, 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.
- [29] Hviehia GE, Parveen Z, Wagner C, et al. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(12): 2894-2904.
- [30] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *N Engl Med*, 2008, 359(4): 366-377.
- [31] Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, et al. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(5): 587-595.
- [32] Ilie M, Long E, Butori C, et al. *ALK*-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(11): 2907-2913.
- [33] Pailler E, Auger N, Lindsay CR, 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.
- [34] Carbognin L, Pilotto S, Milella M, et al. Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death ligand-1 (PD-L1): sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130142.
- [35] Ahmad Z, Fraser-Fish J, Kumar R, et al. Characterization of PD-L1 expression on circulating tumor cells (CTCs) isolated with a label-free inertial microfluidic system from advanced non-small cell lung cancer patients (NSCLC pts)[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14 Suppl): Abstract nr 2243.
- [36] Morrow CJ, Trapani F, Metcalf RL, et al. Tumorigenic non-small cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: a clinical case study[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(6): 1155-1160.
- [37] Hofman V, Ilie MI, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch AssayTM and the isolation by size of epithelial tumor cell method[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(7): 1651-1660.
- [38] Bayarri-Lara C, Ortega FG, 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]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148659.
- [39] Wang J, Wang K, Xu J, et al. Correction: prognostic significance of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78070.
- [40] Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, et al. Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(2): 808-816.
- [41] Prudkin L, Liu DD, Ozburn NC, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(5): 668-678.

[收稿日期] 2017-04-06

[本文编辑] 邵碧云

