



章真，教授，博士生导师，1988年毕业于上海医科大学医学系，2007年获得复旦大学博士学位，2000—2001年曾在美国MD Anderson癌症中心放疗科进修。现任复旦大学附属肿瘤医院放疗中心主任，大肠癌综合治疗组副首席专家。Journal of Radiation Oncology杂志编委。NCI直肠癌工作小组成员，美国放射治疗协会会员，中国肿瘤治疗指南胃癌治疗规范专家组成员，中国肿瘤治疗指南癌性贫血治疗规范专家组成员，中国肿瘤治疗指南直肠癌治疗规范专家组成员，中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会委员，中国抗癌协会大肠癌专业委员会常务委员，放疗学组组长，中华医学会放射治疗专业委员会常务委员，中国抗癌协会放射治疗专

业委员会委员，中国老年学学会老年肿瘤专业委员会胃肠分委会常务委员。擅长胃肠道肿瘤、恶性淋巴瘤、乳腺癌及其他腹部和盆腔肿瘤的放射治疗和综合治疗。研究方向主要为消化道肿瘤的综合治疗、放疗新技术、图像引导放疗的应用及肿瘤的个体化治疗。

结直肠癌患者外周血循环肿瘤细胞的检测及临床研究进展

孙文洁，章 真

复旦大学附属肿瘤医院放疗科，复旦大学上海医学院肿瘤学系，上海 200032

【摘要】 结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一，虽然综合治疗的开展使其疗效有较大改善，但仍有较多患者死于术后的复发和转移。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)来源于肿瘤组织，与肿瘤转移及预后密切相关。对CTC检测方法及其在结直肠癌中的临床研究进行综述。

【关键词】 结直肠癌；循环肿瘤细胞；检测；治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.11.003

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-3639(2015)11-0854-07

Research progress on circulating tumor cells and their detection in colorectal cancer SUN Wenjie, ZHANG Zhen (Department of Radiation Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZHANG Zhen E-mail: zhenzhang6@gmail.com

【Abstract】 Colorectal cancer is one of the most common malignant tumors. Though the development of multidisciplinary therapy has largely improved the therapy effects, many patients still died of local recurrence and metastases after surgery. Circulating tumor cell (CTC) originates from primary tumor tissues and has a close relationship with cancer metastases and prognosis. This review summarizes the CTC detection methods and relevant clinical research on CTC in recent years.

【Key words】 Colorectal cancer; Circulating tumor cell; Detection; Therapy

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一，虽然手术及放化疗等治疗手段的不断改进使得其疗效有较

大改善，但仍有较多患者死于术后的局部复发和远处转移。癌细胞在腹腔、淋巴结及外周血中的微转移是导致结直肠癌术后复发和转移的主要

原因,因此及时发现微转移对于指导临床治疗及判断预后具有重要作用。

外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)的概念在1896年由Ghossein等^[1]首先提出。CTC来源于肿瘤组织,在各种细胞因子的作用下,肿瘤细胞进入血液循环即形成CTC,大多数CTC在人体免疫机制的对抗下短期内发生死亡,只有极少数具有高度活力和高度转移潜能的肿瘤细胞在循环系统中存活下来,相互聚集形成微小癌栓,并在一定条件下发展成为转移灶^[2]。近年来,检测技术的发展促进了CTC的进一步研究,CTC与肿瘤转移及预后密切相关,并且有望成为新的预测疾病进展及指导临床治疗的有效指标。本文对CTC的检测方法及其在结直肠癌中的临床研究进行综述。

1 CTC的富集方法

由于CTC在外周血中的数量极少,通常需要在1亿个白细胞和500亿个红细胞中寻找仅有的几个肿瘤细胞^[2],因此为了提高CTC的检出率,通常需要在检测前对CTC进行富集。富集技术主要是通过一些物理或化学原理将这些细胞特异性地收集,目前CTC的富集方法主要包括免疫磁珠分离技术、密度梯度离心技术及基于肿瘤细胞大小的分离法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET)。

1.1 免疫磁珠分离技术

免疫磁珠分离技术是富集CTC最常用的方法,这一方法的原理为表面包被抗体的磁珠直接与靶细胞表面的抗原进行抗原抗体反应,这些结合了磁珠的细胞一旦置于强大的磁场下,就会与其他未被结合的细胞分离。与反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)相比,免疫磁珠分离技术最大的优势是分离细胞的可视性和可定量性,具有高分离率和高特异性,且不影响细胞活性,避免了细胞裂解对实验结果的影响^[2]。免疫磁珠分离技术分为阳性筛选和阴性筛选。阳性筛选使用表面偶联抗体的磁珠,细胞与磁珠结合后,直接在磁场中被分离出来。阴性筛选通过去除无关细胞使目的细胞得以纯

化。在检测中阳性筛选的效率受到肿瘤细胞表面靶抗原表达强弱的影响,抗原表达弱的肿瘤细胞可能丢失。CellSearch系统是利用免疫磁珠分离技术的典范,已经被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)指定用于转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌患者的检测和治疗,但是由于一些CTC不表达上皮类抗原及非上皮性细胞的存在,CellSearch系统仍存在一定的缺陷^[3]。在使用阴性筛选检测CTC时,一般选择白细胞表面的CD45或巨噬细胞、血小板表达的CD61,通过阴性选择可以去除无关细胞以筛选出肿瘤靶细胞,但这种方法虽然富集效率较高,但特异性较差。

1.2 密度梯度离心技术

密度梯度离心技术是样品在一定惰性梯度介质溶液中进行离心沉淀或沉降平衡,在一定离心力下把颗粒分配到梯度中某些特定位置上,形成不同区带的分离技术。经过离心后,从底层到表面依次是红细胞层、中性粒细胞层、分离液层、单核细胞层(淋巴细胞、单核细胞、上皮细胞、肿瘤细胞)、血浆层。该方法分离肿瘤细胞对设备、技术要求不高,过程易于掌握,分离的肿瘤细胞形态保存完整,可再通过免疫染色等技术从形态或分子特征等方面鉴别肿瘤细胞。但是该方法仍有一定的局限性,如果全血与分离液混合后不立即进行离心,血细胞有可能渗入分离液而不利于分离,而且肿瘤细胞有时可迁移至血浆层,造成分离过程中丢失肿瘤细胞^[4]。Oncoquick就是基于密度梯度离心技术,在常规方法上增加了多孔的屏障,能使分离出的目的细胞纯度更高,从而提高了CTC的检出率^[5]。RosetteSep应用微量成像(RosetteSep-applied imaging rare event, RARE)是以阴性选择为基础的密度梯度离心技术,在阴性选择过程中,白细胞CD45阳性细胞与多种红细胞交联结合形成四聚体复合物,通过密度梯度离心技术去除这些复合物后分离出CTC^[6-7]。

1.3 ISET

由Vona等^[8]提出的ISET主要根据肿瘤细

胞与血细胞的大小不同来分离肿瘤细胞。该方法利用直径为8 μm 的滤膜过滤经过固定处理的外周血, 肿瘤细胞及较大的血细胞被截留在膜上。此方法敏感度高, 1 mL血中只掺入1个肿瘤细胞也可检出, 分离的肿瘤细胞形态保存完整, 表面的抗原或分子标记均未破坏, 可再通过光学染色或免疫染色从形态学特征或分子特征等识别肿瘤细胞。且该方法对设备、技术要求不高, 过程易于掌握。经过过滤后绝大多数的血细胞被去除, 只有包括肿瘤细胞在内的少数较大的细胞留在膜上。有学者用多种不同孔径的膜进行对比研究, 结果显示, 用8 μm 大小孔径的膜分离外周血肿瘤细胞效果最佳, 但这也意味着ISET只能分离直径大于8 μm 的肿瘤细胞, 而目前尚无报道证实所有的肿瘤细胞都大于8 μm , 使其分离的敏感度受到质疑^[9]。近年来还逐渐发展了微流控芯片技术, 该技术是把生物、化学及医学分析过程中的样品制备、反应、分离和检测等操作单元集成到一块微米尺度的芯片上, 自动或半自动完成分析全过程的新型技术, 具有检测率高、成本低的特点^[10-11]。Zheng等^[10]利用单层聚对二甲苯-C膜微过滤的方法获得了89.5% \pm 9.5%的前列腺癌细胞的捕获率。Bhagat等^[11]利用收缩膨胀阵列排布的矩形微管道获得了超过90%的乳腺癌细胞株MCF-7的捕获率。

2 CTC的检测方法

2.1 以形态学为基础的CTC检测方法

常用的方法包括免疫细胞化学法(immunocytochemistry, ICH)、激光扫描细胞计量技术(laser scanning cytometry, LSC)和光导纤维阵列扫描技术(fiber-optic array scanning technology, FAST)等。这类方法主要是通过使用不同上皮抗原的单克隆抗体来检测CTC, 最常用的抗体有CK抗体和EpCAM抗体。ICH是利用抗原与抗体特异性结合的原理, 使显色剂标记的抗体与特异的肿瘤标志物结合, 通过酶和底物反应显色或其他显色方法显色以判断肿瘤细胞的存在。但是单纯ICH方法敏感度较低, 目前较少单独应用。LSC是高通量细胞分析仪, 具

有流式细胞仪和图像细胞仪的功能, 通过连续扫描荧光显微镜下图像自动分析数据, 可在一定时间(30~60 min)内在显微镜下自动筛查 5×10^4 个细胞, 如与细胞富集技术相结合经过荧光染色后可达到在 10^7 个细胞中发现1~2个肿瘤细胞的敏感度^[12]。LSC能通过目镜直接观察细胞及细胞核形态, 可对细胞的微细结构进行定性、定量和定位分析。Pachmann等^[13]首次将LSC运用于外周血CTC的检测, 对细胞进行重新定位后直接观察、定量, 检测各期的乳腺癌和肺癌患者, 临床检测阳性率达92%, 特异度为97%。FAST也是近年来出现的高通量的检测技术, 1 s能扫描 3×10^5 个细胞^[14]。

CellSearch系统是目前唯一经FDA批准上市的检测CTC的方法。首先用包被EpCAM抗体的免疫磁珠富集CTC, 被富集的细胞再用细胞核染料DAPI标记, 并用荧光标记的CK抗体和CD45抗体分选上皮细胞和白细胞, 最终将CK阳性、CD45阴性的细胞用荧光显微镜自动分析系统进行鉴别分选^[15]。这种技术将细胞富集、荧光抗体染色和自动荧光显微镜分析技术相结合, 已被用于转移性乳腺癌、结直肠癌和前列腺癌的临床实践中^[16]。

近年出现的芯片技术CTC-Chip是一种比CellSearch系统更为先进的技术, 该系统由78 000个EpCAM抗体包被的微柱阵列组成^[17]。当血液流过微柱阵列时, 上皮来源的细胞几乎全被捕获, 再通过细胞形态和免疫特征等检测鉴别, 可用于几乎所有肿瘤的CTC检测^[18]。

2.2 以核酸为基础的CTC检测方法

PCR技术检测肿瘤患者外周血中CTC主要通过检测癌基因、抑癌基因的突变或染色体异位产生的异常DNA。虽然该方法灵敏度高, 但是由于其易出现假阳性限制了该技术的发展, 而且外周血中CTC和核酸的半衰期不稳定, 检测到的游离DNA可能并非真正的肿瘤细胞, 因此应用PCR技术检测CTC的特异度不高^[19]。RT-PCR是在PCR基础上扩增由肿瘤特异性mRNA序列反转录的DNA片段, 从而识别组织或肿瘤特异性mRNA的表达或某些基因改变后RNA水平

的异常。由于这些特异性mRNA通常不在正常外周血细胞中表达,且半衰期较短,在细胞死亡后会迅速降解,因此在外周血中检测到的这些特异性mRNA可以间接提示CTC的存在^[19]。与PCR技术相比,虽然RT-PCR可提高肿瘤细胞mRNA表达的鉴别能力,但仍存在一些因素导致假阳性结果,如取样时上皮细胞污染、肿瘤标志物在外周血的非正常表达或假基因干扰等原因,而且RT-PCR无法进行形态学观察及对肿瘤细胞定量是影响其广泛应用于CTC检测的最大障碍。有研究表明,恶性肿瘤患者伴随的炎性反应可能会增加RT-PCR检测CTC的假阳性率,从而影响检测的特异性^[20-21]。此外,游离的RNA和杂交DNA也可能导致假阳性结果的出现^[22]。

3 CTC检测在结直肠癌患者中的临床应用

3.1 CTC可评估患者临床特点

由于CTC来源于肿瘤组织,因此CTC数量一定程度上可反映患者体内的肿瘤负荷情况。目前已有多项研究指出CTC可反映结直肠癌患者的肿瘤浸润和淋巴结转移等临床特点。Sastre等^[23]纳入了97例结直肠癌患者,指出CTC数量与临床分期相关,进展期的患者具有较高的CTC数量。该研究采用CellSearch系统对CTC进行检测,在可评估的94例患者中有34例(36%)可检测到CTC ≥ 2 个,中位数量为3.4个。CTC阳性率(CTC ≥ 2 个)与原发性肿瘤部位、升高的CEA或LDH水平及肿瘤分化程度未呈现明显的相关性。仅有疾病分期与CTC阳性率相关(II期:20.7%,III期:24.1%,IV期:60.7%, $P=0.005$)。同样,当阈值定义为大于等于3个CTC为阳性时,也显示分期是唯一与CTC相关的因素(II期:12%,III期:16%,IV期:64%, $P=0.0001$)。Wong等^[24]检测了132例结直肠癌患者,其CTC检出率达到62%,而在120例结直肠良性疾病患者和40例健康人中未检测到CTC,同时发现CTC数量与淋巴结转移与否密切相关。Katsuno等^[25]进行的一项Meta分析评估了CTC与结直肠癌患者淋巴结阳性率和肝转移率的相关性,共纳入了646例结直肠癌患者,发

现淋巴结阳性的患者相比阴性的患者具有更高的CTC阳性率(50% vs 21%),同样CTC阳性的患者具有更高的肝转移率(21% vs 8%)。Hiraiwa等^[26]分析了130例胃肠道肿瘤的患者,发现转移性患者的CTC数量明显高于非转移性患者,CTC数量不仅与患者的临床分期密切相关,而且与患者是否有腹腔转移具有明显相关性。Iinuma等^[27]也得出类似的结果,通过对167例结直肠癌患者的分析发现,CTC可很好地反映患者的临床病理特点,与患者的肿瘤侵犯深度、血管侵犯、淋巴结转移及肝转移等均具有明显的相关性。以上研究均显示,CTC可很好地反映结直肠癌患者的临床病理特点,在临床应用中,可以通过CTC数量的信息了解肿瘤疾病的状态和严重程度,同时可对患者的临床分期进行补充和修正。

3.2 CTC在预测疾病复发及判断预后方面的价值

CTC除了可以及时了解肿瘤的状态,还可以对疾病的复发进行很好的预测。Uen等^[28]对438例I~III期结直肠癌患者,分别在手术前和手术后进行CTC检测,发现术前和术后CTC情况与术后的复发相关,术前和术后CTC均阴性组无复发生存明显高于术前和术后均阳性组($P<0.001$)。Allen-Mersh等^[29]同样对196例行根治性结直肠癌切除术的患者,在术后24 h进行CTC检测,发现术后CTC阳性患者之后出现复发的危险比高于术后病理淋巴结阳性的患者,而两者均阳性的患者发生复发的概率明显增加,说明术后进行CTC检测可预测复发。Yalcin等^[30]检测了93例结直肠癌患者的CTC,治疗后有8例患者CTC数量下降,14例患者CTC数量上升,而5例患者未发生明显变化。在CTC数量下降的8例患者中仅有2例患者在治疗后出现疾病进展,而在14例CTC数量上升的患者中则有13例患者出现疾病进展($P=0.001$)。同样地,在5例治疗后CTC数量未发生变化的患者中,有4例患者出现疾病进展。因此,该研究认为可以通过治疗前后CTC的检测对疾病复发进行很好的预测。

目前已有多项研究证实了CTC可以对结直肠癌患者的长期生存进行很好的预判。Cohen等^[31]通过对430例转移性结直肠癌CTC的检测发现, 无论治疗前还是治疗后CTC的浓度对预后均有预测作用, 治疗前后CTC均低浓度组的预后明显优于治疗前后CTC均高浓度组($P=0.0001$)。影像学和CTC的联合检测能更好地对患者的生存进行评估预测, 影像学评估为非疾病进展同时CTC低浓度组的中位生存时间为18.8个月, 而影像学评估为疾病进展同时CTC高浓度组的中位生存时间仅为3.1个月($P<0.0001$)。Van Dalum等^[32]前瞻性纳入了183例初治的非转移性结直肠癌患者, 中位随访5.1年, 结果发现手术前可检测到CTC的患者具有明显较低的无复发生存率(recurrence-free survival, RFS)和结肠癌相关生存率(colon cancer-related survival, CCRS), 相比于对照组术前CTC阳性患者5年RFS从75%降低至61%, 而CCRS从83%降低至69%。多因素分析也显示, CTC和淋巴结转移均是RFS的有效预测因素。Huang等^[33]进行的一项Meta分析共纳入13项研究, 指出CTC低浓度的结直肠癌患者的疾病控制率明显高于CTC高浓度组($P=0.048$), CTC高浓度的患者无进展生存率(progression-free survival, PFS)和总生存率($P<0.001$)(overall survival, OS)较差, CTC由低浓度转化为高浓度的患者以及CTC持续高浓度的患者PFS($P=0.023$)和OS($P<0.001$)较差。

3.3 CTC在预测和评估疗效方面的价值

在预测和评估疗效方面, CTC检测同样具有良好的应用价值, 可以根据CTC检测结果给予患者个体化治疗。Cohen等^[31]针对430例转移性结直肠癌患者, 在治疗后3~5周检测CTC, 发现在治疗后疾病进展的患者中CTC ≥ 3 个/7.5 mL组占73%, 而治疗后疾病稳定或好转的患者中仅7%的患者CTC ≥ 3 个/7.5 mL, CTC评价疗效的准确性达到78%。Barbazán等^[34]也得出类似的结论, 发现在治疗后通过常规影像学检查判定为治疗有效的患者中仍有部分CTC阳性, 而这部分患者具有较差的长期生存, 因此该研究指出通过CTC的检测可以鉴别出常规影像学

检查无法发现的对抗治疗抵抗的患者, 并且可以及时地给予针对性的治疗。随着对CTC研究的深入, 学者们开始针对CTC进行相应的基因检测, 以发现更多CTC蕴含的生物学信息。多项研究发现, 通过对CTC相应基因的检测, 可以对结直肠癌患者的疗效进行很好的预测, 包括化疗及靶向治疗等^[35-38]。Hendlisz等^[35]评估并对比了化疗对于CTC和原发肿瘤表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表达的影响, 纳入了未经过化疗的转移性结直肠癌患者, 分别在治疗前、第2疗程治疗前和第4疗程治疗后进行检测, 14例(64%)患者在治疗前CTC呈现EGFR表达阳性, 而原发肿瘤和CTC的EGFR表达无关, 14例基线CTC-EGFR阳性的患者, 经过4个疗程化疗后, 13例仍表达阳性, 其中位进展时间为6.6个月, 而8例基线CTC-EGFR表达阴性的患者, 在4个疗程化疗后, 7例患者EGFR呈现阳性, 中位进展时间为8.5个月。该研究表明化疗可诱导CTC中EGFR表达状态的改变, EGFR阴性的肿瘤在化疗后应该重新评估EGFR状态, 利用CTC-EGFR表达水平可以预测转移性结直肠癌化疗的疗效。在实际临床工作中, 在使用西妥昔单抗治疗结直肠癌前必须检测肿瘤组织的*K-ras*基因, *K-ras*基因野生型对西妥昔单抗的治疗有效, 而突变型则疗效不佳。Yen等^[36]收治76例转移性结直肠癌患者并给予化疗联合西妥昔单抗治疗, 同时检测其外周血CTC的*K-ras*基因, 发现CTC与肿瘤组织的*K-ras*基因突变率具有很好的一致性, 通过对CTC的*K-ras*基因检测可以很好地预测西妥昔单抗的疗效, 因此有望取代传统的对肿瘤组织的基因检测。Musella等^[37]也得出类似的结论, 指出通过CTC的检测可以较早期地预测出抗EGFR治疗的疗效, Abdallah等^[38]检测并分析了CTC中的胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TYMS), 用以评估5-FU在转移性结直肠癌患者中的疗效, 共分析了34例患者的外周血CTC, 发现9例TYMS表达阳性, 其中6例在5-FU治疗后出现肿瘤进展, CTC的TYMS表达与肿瘤进展具有明显的相关性, 该研究结果表明通过CTC的TYMS检

测可以预测出对5-FU抵抗的患者，从而可以给予患者个体化的治疗方案。

4 总结和展望

结直肠癌在切除术后复发和转移率仍然很高，严重影响患者的预后，寻找更为有效的方法检测CTC，不仅有利于术后复发和转移的预测，并且为判断疗效、实现个体化治疗提供依据。目前检测CTC的方法众多，每种方法都有其优点和缺点，而肿瘤细胞存在较大的异质性，不能靠单一的标志物或方法对CTC进行完整分析，因此今后应考虑进行联合多种标志物及联合多种方法进行检测。另外，外周血样本的采集时间一直未得到较大的关注，这牵涉到CTC在循环中释放的机制，是随机释放还是类似于激素分泌的周期性规律释放，目前还尚无定论。而对于某些学者提出的CTC细胞亚群鉴定和针对不同亚群细胞进行个体化治疗也是今后研究的新思路。

[参 考 文 献]

- [1] GHOSSEIN R A, CARUSONE L, BHATTACHARYA S. Review: polymerase chain reaction detection of micrometastase and circulating tumor cells: application to melanoma, prostate and thyroid carcinomas [J] . *Diagn Mol Pathol*, 1999, 8(4): 165-175.
- [2] PATERLINI-BRECHOT P, BENALI N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions [J] . *Cancer Lett*, 2007, 253(2): 180-204.
- [3] ALIX-PANABIÈRES C, RIETHDORF S, PANTEL K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis [J] . *Clin Cancer Res*, 2008, 14(16): 5013-5021.
- [4] GERTLER R, ROSENBERG R, FUEHRER K, et al. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation [J] . *Recent Results Cancer Res*, 2003, 162: 149-155.
- [5] 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.
- [6] HAYES G M, BUSCH R, VOOGT J, et al. Isolation of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) for analysis of cell proliferation: validation of a simplified method suitable for multi-center clinical studies [J] . *Leuk Res*, 2010, 34(6): 809-815.
- [7] NAUME B, BORGES E, TØSSVIK S, et al. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method [J] . *Cytotherapy*, 2004, 6(3): 244-252.
- [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] ZIGEUNER R E, RIESENBERG R, POHLA H, et al. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry in vitro [J] . *J Urol*, 2000, 164(5): 1834-1837.
- [10] ZHENG S, LIN H, LIU J Q, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells [J] . *J Chromatogr A*, 2007, 1162(2): 154-161.
- [11] BHAGAT A A, HOU H W, LI L D, et al. Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation [J] . *Lab Chip*, 2011, 11(11): 1870-1878.
- [12] SCHOLTENS T M, SCHREUDER F, LIGTHART S T, et al. CellTracks TDI: an image cytometer for cell characterization [J] . *Cytometry A*, 2011, 79(3): 203-213.
- [13] PACHMANN K, CLEMENT J H, SCHNEIDER C P, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer [J] . *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(6): 617-627.
- [14] SOMLO G, LAU S K, FRANKEL P, et al. Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology [J] . *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128(1): 155-163.
- [15] RIETHDORF S, FRITSCHE H, MÜLLER V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the Cell Search system [J] . *Clin Cancer Res*, 2007, 13(3): 920-928.
- [16] ALLARD W J, MATERA J, MILLER M C, 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): 6897-904.
- [17] UHR J W. Cancer diagnostics: one-stop shop [J] . *Nature*, 2007, 450(7173): 1168-1169.
- [18] 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.
- [19] JI X Q, 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.
- [20] KOWALEWSKA M, CHECHLINSKA M, MARKOWICZ S, et al. The relevance of RT-PCR detection of disseminated

- tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(16): 2671-2674.
- [21] JUNG R, KRÜGER W, HOSCH S, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro [J]. *Br J Cancer*, 1998, 78(9): 1194-1198.
- [22] IAKOVLEV V V, GOSWAMI R S, VECCHIARELLI J, et al. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107(1): 145-154.
- [23] SASTRE J, MAESTRO M L, PUENTE J, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(5): 935-938.
- [24] WONG S C, CHAN C M, MA B B, et al. Clinical significance of cytokeratin 20-positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 1005-1012.
- [25] KATSUNO H, ZACHARAKIS E, AZIZ O, et al. Does the presence of circulating tumor cells in the venous drainage of curative colorectal cancer resections determine prognosis? A meta-analysis [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(11): 3083-3091.
- [26] HIRAIWA K, TAKEUCHI H, HASEGAWA H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(11): 3092-3100.
- [27] IINUMA H, OKINAGA K, EGAMI H, et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(2): 297-306.
- [28] UEN Y H, LU C Y, TSAI H L, et al. Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(8): 2120-2128.
- [29] ALLEN-MERSH T G, MCCULLOUGH T K, PATEL H, et al. Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma [J]. *Br J Surg*, 2007, 94(1): 96-105.
- [30] YALCIN S, KILICKAP S, PORTAKAL O, et al. Determination of circulating tumor cells for detection of colorectal cancer progression or recurrence [J]. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(104): 1395-1398.
- [31] COHEN S J, PUNT C J, IANNOTTI N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(19): 3213-3221.
- [32] VAN DALUM G, STAM G J, SCHOLTEN L F, et al. Importance of circulating tumor cells in newly diagnosed colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3): 1361-1368.
- [33] HUANG X, GAO P, SONG Y, et al. Relationship between circulating tumor cells and tumor response in colorectal cancer patients treated with chemotherapy: a meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 976.
- [34] BARBAZÁN J, MUINELO-ROMAY L, VIEITO M, et al. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(11): 2633-2643.
- [35] HENDLISZ A, MARECHAL R, DURBECQ V, et al. Modulation and prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in circulating tumor cells (CTC) during chemotherapy (CT) in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(15): 431-436.
- [36] YEN L C, YEH Y S, CHEN C W, et al. Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(13): 4508-4513.
- [37] MUSELLA V, PIETRANTONIO F, DI BUDUO E, et al. Circulating tumor cells as a longitudinal biomarker in patients with advanced chemorefractory, RAS-BRAF wild-type colorectal cancer receiving cetuximab or panitumumab [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(6): 1467-1474.
- [38] ABDALLAH E A, FANELLI M F, BUIM M E, et al. Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: A new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(6): 1397-1405.

(收稿日期: 2015-04-25)