

循环肿瘤细胞的“旧语新说”

王砚春^{1,2}, 杨晓蓉¹, 郭林^{1,2}, 卢仁泉^{1,2△}

1. 复旦大学附属肿瘤医院检验科, 上海 200032; 2. 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

摘要: 循环肿瘤细胞(CTC)是指游离在循环体液中的肿瘤细胞; CTC 检测避免了侵入性组织活检的局限性, 取材便捷、无创, 在动态反映肿瘤状态、疗效监测与预后评估中有重要作用。目前, 应用于临床的 CTC 计数是评估乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌预后的有效指标; CTC 携带的肿瘤特异性抗原与核酸分析的转化研究, 将有助于提高 CTC 的捕获效率与诊断性能。虽然 CTC 检测技术的临床应用仍然面临着诸多挑战, 但是其在肿瘤诊疗上的潜力不容小觑, 具有广阔的应用前景。

关键词: 循环肿瘤细胞; 肿瘤诊疗; 临床应用

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.001

中图法分类号: R73

文章编号: 1673-4130(2021)07-0769-05

文献标志码: A

"Old words and new sayings" of circulating tumor cells

WANG Yanchun^{1,2}, YANG Xiaorong¹, GUO Lin^{1,2}, LU Renquan^{1,2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China;

2. Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Circulating tumor cells (CTC) refer to tumor exfoliated cells that are free in circulating body fluids. CTC detection avoids the limitations of invasive tissue biopsy, which is convenient and non-invasive, and plays an important role in dynamically reflecting tumor status, monitoring curative efficacy and evaluating prognosis. At present, the CTC count used in clinic practice is an effective prognostic indicator of breast cancer, prostate cancer and colorectal cancer. Additionally, the translational study of tumor specific antigen and nucleic acid analysis carried by CTC will help to improve the capture efficiency and diagnostic performance of CTC. Although the clinical application of CTC detection technology still faces many challenges, its potential in tumor diagnosis and treatment can not be underestimated and has broad application prospects in the future.

Key words: circulating tumor cells; tumor diagnosis and treatment; clinical application



传统的组织活检作为肿瘤诊断的“金标准”, 其侵入性取材的限制致使组织活检无法实时掌握肿瘤异质性的动态变化。液体活检技术的问世, 摆脱了传统组织活检的取材束缚, 受到临床的广泛关注。循环肿瘤细胞(CTC)作为液体活检技术的重要成员,

能动态反映肿瘤的实时状态, 在个体化治疗的疗效监测与预后评估中发挥重要作用, 具有广阔的应用前景。

1 CTC 概述

CTC 是指从原发肿瘤中游离出来, 进入血液或其他体液的肿瘤细胞^[1]。虽然 THIELE 等^[2] 较早就提出了 CTC 的概念, 但 CTC 在外周血中十分稀有, 仅少量上皮间质转化细胞或侵袭性肿瘤细胞能够侵入血液, 只占有肿瘤细胞的 0.000 000 1%^[3]、外周血有核细胞的 0.000 1%(1~10 个细胞/mL)^[2], 所以通过常规检测方法几乎无法识别。

2 CTC 的检测技术

随着检测技术的发展, 经过分离、富集、标记、鉴定等步骤, 捕获并检测体液中微量的 CTC 已得以实

专家简介: 卢仁泉, 博士、主任技师、哈佛大学博士后、检验科副主任、精准中心副主任、上海市浦江人才、上海市学科带头人、博士研究生导师。目前主要担任上海抗癌协会检验医学专业委员会副主任委员、中国中西医结合学会肿瘤免疫专委会副主委、中国中西医结合学会液体活检专委会副主委、中国抗癌协会肿瘤标志物委员会委员、上海医学会检验医学分会委员、国家自然科学基金项目评审专家等。目前主持国家自然科学基金项目(面上项目 3 项)、上海市科学技术委员会项目(3 项)、卫生健康委员会、教育委员会等课题近 10 项; 参与国家基础研究计划“973”子课题等; 近年在国内、外期刊发表论文 60 余篇, 其中 SCI 论文 40 余篇, 主要成果发表于《Nature Communication》《J Hemo Oncol》《Oncogene》等; 副主编专著 2 本; 申请国家发明专利 3 项; 获中国抗癌科技奖二等奖、上海抗癌科技奖一等奖、上海优秀发明奖银奖等; 担任《Oncology Communication》编委, 《检验医学》《检验医学与临床》《中国癌症杂志》编委; 《中华检验医学杂志》《BJC》《BMC Cancer》等审稿专家及多项基金项目的评审专家。

△ 通信作者, E-mail: lurenquan@126.com。

本文引用格式: 王砚春, 杨晓蓉, 郭林, 等. 循环肿瘤细胞的“旧语新说”[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(7): 769-773.

现。此外,CTC 未经富集的直接检测技术^[4]、体内置入的实时富集技术^[5],也已转化为临床应用。

2.1 CTC 的分离与富集 CTC 的分离与富集主要依据肿瘤细胞的物理性质和生物学特性进行,包括基于细胞大小、密度、电荷的细胞过滤法,密度梯度离心法,介电泳分离法,以及依赖细胞生物标志物的阳选与阴选策略等。

CellSearch 检测系统是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的首个 CTC 检测方法^[6]。这项技术采用上皮细胞黏附分子抗体,捕获具有上皮间质转化特征

的 CTC^[7]。无独有偶,我国 CFDA 也批准了Ⅲ类医疗器械 CTC 采样针 CellCollector,其随着全身血液循环不断捕获细胞,提高了 CTC 的检测灵敏度^[5]。近年来,与微流控技术相结合的 CTC 富集方法树立了 CTC 检测的新里程碑。微流控技术不仅可以保持 CTC 分离的效率和纯度,而且可以确保 CTC 的完整性和活性^[8]。同时,新近兴起的其他 CTC 分离方法也大大提高了检测效率、降低了检测成本;但是,每种分离富集与方法均存在一定的局限性,见表 1。

表 1 CTC 分离与富集方法比较

方法	优势	缺陷
细胞过滤法	使用方便、处理通量高、回收效果好	易受血流速度、孔径均匀性和膜硬度等因素干扰
密度梯度离心法	成本低、操作简单、不依赖特异性抗原表达	效率低、纯度低
介电泳分离法	回收效果好、能够区分异质性不同的肿瘤细胞	纯度低(损失与白细胞电性质相似的 CTC;处理时间长,容易引起污染,从而降低纯度)
免疫磁珠技术-阳性富集	FDA 批准的方法,操作较简单、能够实现自动化、较耐用、纯度较高、不依赖单个标志物的表达	易丢失表面标志物缺失的 CTC;需高分辨率的成像方法,并进行肿瘤特异性检测;设定统一标准难度大,需针对每种肿瘤类型设计抗体
免疫磁珠技术-阴性富集	易于批量分离、可实现高通量分选	需要裂解红细胞、纯度低、易导致假阳性结果
微流控技术	效率高、能够富集稀有 CTC 等几乎所有种类的 CTC	成本高、富集时间较长、未完全分离的 CTC 易受污染

2.2 CTC 的标记与鉴定 分离与富集后的 CTC 需要进一步进行染色标记与鉴定,经典的标记鉴定方法包括细胞免疫荧光技术、PCR 方法等;其中最常用的方法为细胞免疫荧光技术,通过荧光显微镜检测结果将角蛋白阳性,CD45 阴性和 4',6-二脒基-2 苯基吲哚阳性的细胞定义为 CTC^[9]。

美国 FDA 批准的 CellSearch 检测系统,就是以形态学与表面标志物为主要诊断依据,可用于监测转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌的预后^[10]。这项技术如何结合核酸分子等进行特异性鉴定,全面获取肿瘤细胞的携带信息,避免干细胞假阳性污染,提高捕获效率与诊断性能,是 CTC 检测重返市场需要攻克的难关^[10]。

近年来,采用叶酸受体免疫磁珠负向筛选联合靶向荧光定量 PCR 方法(国械注准 20163400061),从一定程度上弥补了上述 CellSearch 检测 CTC 的缺陷,能够靶向并定量检测人全血中叶酸受体阳性的肿瘤细胞,可用于早期肺癌患者的辅助诊断及非小细胞肺癌患者的疗效监测^[11]。

CTC 测序技术能够精准反映肿瘤体细胞变异和基因表达变化,使全面检测分析 CTC 成为可能^[12]。CHENG 等^[13]开发的 Hydro-Seq 平台,可以对 CTC 进行单细胞转录组分析,从分子层面分析 CTC 的基因表达图谱,不仅有助于 CTC 亚型分类、提供肿瘤异质性参数,而且通过雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体 2(HER2)等药物靶标的

分析还为激素和靶向药物的使用提供依据,突显了 CTC 测序在精准医学中的潜在价值。

3 CTC 的临床应用情况

在肿瘤诊断过程中,肿瘤异质性会带来检测对象的随机选择,肿瘤组织活检的细针抽吸对肿瘤肿块的部分取样,不能反映肿瘤组织的全貌。从原发肿瘤脱落的 CTC,携带有肿瘤的全面信息,在肿瘤相对早期阶段即可从体液中分离出来,比发现原发肿瘤肿块或转移灶的常规检测方法更为灵敏,因此在肿瘤的临床诊疗中发挥着重要作用。

3.1 CTC 与肿瘤早期辅助诊断 肿瘤的早期辅助诊断一般依赖于影像学与肿瘤标志物的检查,但对于最大径小于 5 mm 的肿块,影像学难以发现^[14];同时大部分肿瘤标志物的特异度不高,不能作为诊断的独立指标,目前肿瘤早期辅助诊断的方法仍具有一定的局限性。然而 CTC 的检测灵敏度相对较高,对肿瘤的早期发现有着重要价值。

ILIE 等^[15]发现,对慢性阻塞性肺疾病患者进行 CTC 检测并随访,检出 CTC 的患者在之后的随访期间均发现罹患肺癌,真正做到了肿瘤的早发现、早诊断。YIN 等^[16]使用叶酸受体富集 CTC,对肺癌诊断的灵敏度为 87.1%,相比常用的筛查方法——低剂量计算机断层扫描更加便捷、省时。CTC 与传统的血清肿瘤标志物相比,也展现出在早期诊断方面的巨大潜力。吴方等^[14]发现 CTC 诊断肺癌的灵敏度、特异度

分别为 77.1%、89.6%，均高于传统血清肿瘤标志物（神经元特异性烯醇化酶、糖类抗原 125、糖类抗原 153、细胞角蛋白 19 的可溶性片段、鳞状上皮细胞癌抗原等）。GUO 等^[17]使用带有阴性选择的定量 PCR 平台，对具有干细胞表型的 CTC 进行检测，发现对早期肝癌患者的诊断特异度为 94.2%，诊断性能比血清甲胎蛋白更好。

当然，由于 CTC 捕获效率的差强人意，CTC 检测仍面临着巨大挑战。CTC 分离鉴定方法的局限性，易造成 CTC 的丢失或者误判，从而出现假阴性或假阳性结果。在基于核酸检测的技术中，虽然具有较高的灵敏度，但仍需要解决 CTC 损耗、纯度低、检测谱窄等问题^[18]。近年来，不少新兴技术的出现为 CTC 检测具有更高的灵敏度和特异度提供了新方向，例如 Ephesia CTC 芯片将免疫磁珠技术与微流控技术相结合，可将 CTC 的捕获效率提高到 90%~94%，检测特异度达到 99.6%^[19]。

此外，使用 CTC 和循环肿瘤 DNA(ctDNA)相结合的检测方法，可以进一步提高液体活检的敏感性^[20]。在一项针对多发性骨髓瘤患者的研究中发现，ctDNA 与富集的 CTC 之间没有直接相关性，CTC 和 ctDNA 具有不同的遗传突变谱^[21]。因此，结合 CTC 和 ctDNA 的检测方法可以在不降低特异度的情况下相互补充，更灵敏地检测肿瘤特异性基因的改变，有助于肿瘤的精准检测。

3.2 CTC 与肿瘤疗效的关联 随着多种新辅助疗法的应用，以及肿瘤靶向治疗理念的革新，传统监测肿瘤疗效的方法已无法为临床提供及时准确的疗效信息^[22]，CTC 检测在肿瘤疗效监测方面赋予了重要作用。首先，通过检测 CTC 的组分蛋白，有助于临床治疗方案的选择。例如，在乳腺癌患者中，CTC 表面的 HER2 状态可以辅助指导靶向药物的使用，即使是原发肿瘤 HER2 阴性的患者，也可因为检测到 HER2 阳性的 CTC，从而采取有效的靶向治疗并从中获益^[23]。同样，FUJII 等^[24]在转移性乳腺癌患者中分析 ER 的表达，发现在原发肿瘤 ER 阳性的患者中，出现了 ER 阴性的 CTC，能够解释 ER 靶向治疗失败的原因，得出监测 CTC 的 ER 表达可以优化乳腺癌治疗的结论。

CTC 表面标志物也有助于免疫疗法的评估；CTC 检测可能成为一种可靠的方法，反映肿瘤整体的生物学特性，对免疫治疗策略的抉择至关重要^[25]。例如在胃肠道肿瘤中，CTC 表面的 PD-L1 表达水平可作为筛查 PD-1/PD-L1 阻断疗法的预测指标，关注 CTC 的动态变化可监测免疫治疗的有效性^[26]。此外，在晚期非小细胞肺癌患者的自然杀伤细胞治疗后，CTC 数量的减少与治疗疗效密切相关，CTC 也是评估自然杀伤细胞疗法疗效的标志物^[27]。

其次，CTC 计数和表面标志物是监测疾病进展、治

疗的有力工具，其内部的核酸组分也具有提供临床治疗信息的巨大潜力^[28]。一些研究表明，仅 CTC 计数不足以指导治疗决策，但对 CTC 进行核酸分析，可以辅助靶向治疗方案的确立^[29]。例如通过筛选 CTC 中的鼠类肉瘤病毒癌基因、表皮生长因子受体、HER2、ER 等基因突变，将 CTC 基因组与原发肿瘤基因组进行差异分析，能为靶向治疗动态监测提供新的见解^[30]。对 CTC 进行 RNA 分析可用于耐药相关分子的鉴定。MIY-AMOTO 等^[31]对前列腺癌患者外周血 CTC 进行单细胞 RNA 分析，发现 CTC 与原发肿瘤之间存在表达谱差异，相关信号通路的异质性是导致雄激素治疗无效的原因。在局部晚期直肠癌的 CTC 中，通过原位杂交检测胸苷酸合酶 mRNA 发现，胸苷酸合酶 mRNA 表达的患者不存在病理完全缓解的情况，对新辅助化疗不敏感，提示 CTC 的核酸分析可准确预测病理完全缓解情况，从而免除根治性手术的可能^[32]。

最后，CTC 可作为探索肿瘤新生细胞和治疗策略研究的新手段^[33]。从晚期肿瘤患者中分离出的 CTC 可制备异种移植瘤，进行功能表型和药理研究；制备离体培养物，进行药物筛选和全基因组、蛋白质组分析等^[34]。ZHANG 等^[35]从间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性肺癌患者中获得 CTC 进行离体培养，并用 2 种 ALK 抑制剂：赛可瑞和色瑞替尼进行药物敏感性测试，发现色瑞替尼是一种更有效的 ALK 抑制剂。这种通过分离 CTC 建立体外模型、进行个体化药物治疗的研究，为 CTC 在疗效监测方面的转化应用打开了新的思路。

3.3 CTC 与肿瘤患者预后 通常情况下，CTC 数量随着肿瘤远处转移的进展而增加，研究发现 CTC 计数与无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)密切相关，可作为评估临床预后和复发风险的重要依据^[36]。在早期前列腺癌、乳腺癌和结直肠癌中应用的 CellSearch 系统，每 7.5 mL 外周血中有 ≥5 个 CTC 是 PFS 减少的有效预测指标^[37]。

此外，CTC 表面特异性标志物的变化对判断肿瘤的预后情况有重要价值。SPARANO 等^[38]在乳腺癌复发患者中发现，ER 阳性 CTC 患者比 ER 阴性 CTC 患者的复发风险高 13.1 倍。WANG 等^[39]发现在放疗后的转移性肺癌患者中，CTC PD-L1 的表达增加与预后不良相关，PD-L1 阳性的 CTC 可作为恶性肿瘤预后的标志物。

在核酸水平上，一项 Meta 分析发现，在非转移性结直肠癌中，通过 PCR 方法检测 CTC 阳性患者的 OS 和无病生存期(DFS)较 CTC 阴性患者明显缩短；并且 CTC 与许多预后不良指标相关，如淋巴结转移、血管侵犯、肿瘤分化程度低、TNM 晚期等^[40]。通过数字 PCR 方法检测胰腺癌患者 CTC 的基因表达，发现未经治疗的胰腺癌患者其 CTC 中具有较高的 ALCAM、POU5F1B 和 SMO mRNA 表达水平，这些患者的 PFS

和 OS 明显缩短^[41]。HINZ 等^[42]使用 CK20 实时荧光定量 PCR 方法检测 CTC,发现其是结肠癌的独立预后标志物,CTC 阳性患者的复发风险明显升高。

早在 2010 年美国癌症联合委员会制订的《肿瘤分期指南》中,已把 CTC 列入 TNM 分期系统^[43]。cM0(i+)微转移的分期概念出现在传统检测方法认定肿瘤尚未达到 M1 水平,但循环体液中却能检出 CTC 的肿瘤转移早期阶段。虽然这种分期在临床实践中很少使用,CTC 能否作为可靠的分期标准还有待商榷,但是 CTC 作为肿瘤分期的重要工具,已受到广泛重视。例如在胃癌中,CTC ≥ 4 的患者比例随着肿瘤分期的增加而增加,胃癌患者处于肿瘤分期 IV 期时其比例可高达 95.24%^[44]。CRISTOFANILLI 等^[45]分析了 2 436 例复发转移性乳腺癌患者,将每 7.5 mL 5 个 CTC 设为临界值进行分层,CTC ≥ 5 被列为 IV_{aggressive} 期,CTC < 5 为 IV_{indolent} 期,并且使用 Kaplan-Meier 曲线和 Log-rank 检验分析发现前者的 OS 明显缩短(16.0 个月 *vs.* 36.3 个月, $P < 0.001$),从而证明 CTC 是转移性乳腺癌 IV 期分层的理想标志物。

4 结语及展望

CTC 检测作为液体活检技术的重要成员,在肿瘤诊疗方面发挥重要作用。CTC 携带了原发肿瘤的异质性信息,可作为一种有效的生物标志物和模型工具。通过非侵入性活检、分离并鉴定的 CTC,在肿瘤早期诊断、实时疗效监测和预后评估等方面得到广泛应用。但是,目前 CTC 检测在检测技术的优化、临床应用的完善上仍然有着较大的提升空间。一方面 CTC 检测技术仍在不断更新,新兴发展的检测技术需要充分验证,获得批准才能进入临床;另一方面,肿瘤异质性一直是肿瘤诊疗的一大难题,CTC 异质性能否反映肿瘤全貌,在临床应用上仍然面临着挑战。

随着科技不断进步,在单细胞水平上对 CTC 进行基因组、转录组、蛋白质组分析,以及 CTC 体外模型的不断完善^[46],可促进肿瘤研究的不断深入,为肿瘤诊断、治疗、预后、病因机制和药物开发等领域开拓新的视野。相信在不久的将来,随着技术的持续改进、标准化方案的制订、待解决难题的不断攻克,CTC 检测将会为肿瘤临床诊疗带来更多便利。

参考文献

- [1] PLAKS V, KOOPMAN C, WERB Z. Cancer. Circulating tumor cells[J]. Science, 2013, 341(6151): 1186-1188.
- [2] THIELE J, BETHEL K, KRÁLÍCKOVÁ M, et al. Circulating tumor cells: fluid surrogates of solid tumors[J]. Annu Rev Pathol, 2017, 12(1): 419-447.
- [3] FISCHER A. Circulating tumor cells: seeing is believing[J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(9): 1367-1369.
- [4] SHEN Z, WU A, CHEN X. Current detection technologies for circulating tumor cells[J]. Chem Soc Rev, 2017, 46(8): 2038-2056.

- [5] SAUCEDO-ZENI N, MEWES S, NIESTROJ R, et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire[J]. Int J Oncol, 2012, 41(4): 1241-1250.
- [6] ANDREE K, VAN-DALUM G, TERSTAPPEN L. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system[J]. Mol Oncol, 2016, 10(3): 395-407.
- [7] VAN-BUSSEL M T J, PLUIM D, BOL M, et al. EpCAM-based assays for epithelial tumor cell detection in cerebrospinal fluid[J]. J Neurooncol, 2018, 137(1): 1-10.
- [8] TIAN C, XU X, WANG Y, et al. Development and clinical prospects of techniques to separate circulating tumor cells from peripheral blood[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12(1): 7263-7275.
- [9] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. Int J Clin Oncol, 2017, 22(3): 421-430.
- [10] 王祝春, 卢仁泉, 郭林. 液体活检新技术在临床肿瘤诊疗中的应用新进展[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2): 124-129.
- [11] WANG L, WU C, QIAO L, et al. Clinical significance of folate receptor-positive circulating tumor cells detected by ligand-targeted polymerase chain reaction in lung cancer[J]. J Cancer, 2017, 8(1): 104-110.
- [12] CASTRO-GINER F, ACETO N. Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis[J]. Genome Med, 2020, 12(1): 31.
- [13] CHENG Y, CHEN Y, LIN E, et al. Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA-sequencing for circulating tumor cells[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2163.
- [14] 吴方, 赵京, 张侠, 等. 循环肿瘤细胞与肿瘤标志物在肺癌诊断中的价值比较[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(5): 527-531.
- [15] 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.
- [16] YIN W, ZHU J, MA B, et al. Overcoming obstacles in pathological diagnosis of pulmonary nodules through circulating tumor cell enrichment[J]. Small, 2020, 16(25): e2001695.
- [17] GUO W, SUN Y, SHEN M, 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.
- [18] MING Y, LI Y, XING H, et al. Circulating tumor cells: from theory to nanotechnology-based detection[J]. Front Pharmacol, 2017, 8(1): 35.
- [19] KARABACAK N M, SPUHLER P S, FACHIN F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples[J]. Nat Protoc, 2014, 9(3): 694-710.

- [20] AOKI M, SHOJI H, KASHIRO A, et al. Prospects for comprehensive analyses of circulating tumor cells in tumor biology[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(5): 1135.
- [21] MANIER S, PARK J, CAPELLETTI M, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1691.
- [22] 郭玮, 孙云帆, 潘柏申, 等. 循环肿瘤细胞检测及临床应用价值[J/CD]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2014, 2(3): 179-184.
- [23] MASUDA T, HAYASHI N, IGUCHI T, et al. Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer[J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(3): 408-417.
- [24] FUJII T, REUBEN J, HUO L, et al. Androgen receptor expression on circulating tumor cells in metastatic breast cancer[J]. *PloS One*, 2017, 12(9): e0185231.
- [25] ZHONG X, ZHANG H, ZHU Y, et al. Circulating tumor cells in cancer patients: developments and clinical applications for immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 15.
- [26] YUE C, JIANG Y, LI P, et al. Dynamic change of PD-L1 expression on circulating tumor cells in advanced solid tumor patients undergoing PD-1 blockade therapy[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(7): e1438111.
- [27] LIN M, LIANG S Z, SHI J, et al. Circulating tumor cell as a biomarker for evaluating allogeneic NK cell immunotherapy on stage IV non-small cell lung cancer[J]. *Immunol Lett*, 2017, 191(1): 10-15.
- [28] LIN E, CAO T, NAGRATH S, et al. Circulating tumor cells: diagnostic and therapeutic applications[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2018, 20(1): 329-352.
- [29] WAN L, PANTEL K, KANG Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1450-1464.
- [30] ALIX-PANABIERES C, PANTEL K. Challenges in circulating tumor cell research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 623-631.
- [31] MIYAMOTO D, ZHENG Y, WITTNER B, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance[J]. *Science*, 2015, 349(6254): 1351-1356.
- [32] TRONCARELLI-FLORES B C, SOUZA E S V, ALI-ABDALLAH E, et al. Molecular and kinetic analyses of circulating tumor cells as predictive markers of treatment response in locally advanced rectal cancer patients[J]. *Cells*, 2019, 8(7): 641.
- [33] TAYOUN T, FAUGEROUX V, OULHEN M, et al. CTC-derived models: a window into the seeding capacity of circulating tumor cells (CTCs)[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1145.
- [34] JORDAN N V, BARDIA A, WITTNER B S, et al. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells[J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 102-106.
- [35] ZHANG Z, SHIRATSUCHI H, PALANISAMY N, et al. Expanded circulating tumor cells from a patient with ALK-positive lung cancer present with EML4-ALK rearrangement along with resistance mutation and enable drug sensitivity testing: a case study[J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(2): 397-402.
- [36] PRAHARAJ P, BHUTIA S, NAGRATH S, et al. Circulating tumor cell-derived organoids: current challenges and promises in medical research and precision medicine[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1869(2): 117-127.
- [37] 徐训政, 张好刚, 乔鹏飞, 等. 循环肿瘤细胞检测的临床有效性和实用性分析[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(2): 169-173.
- [38] SPARANO J, O'NEILL A, ALPAUGH K, et al. Association of circulating tumor cells with late recurrence of estrogen receptor-positive breast cancer: a secondary analysis of a randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(12): 1700-1706.
- [39] WANG Y, KIM T, FOULADDEL S, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells increases during radio (chemo) therapy and indicates poor prognosis in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 566.
- [40] YANG C, ZOU K, ZHENG L, et al. Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells detected by RT-PCR in non-metastatic colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 725.
- [41] AMANTINI C, MORELLI M B, NABISSI M, et al. Expression profiling of circulating tumor cells in pancreatic ductal adenocarcinoma patients: biomarkers predicting overall survival[J]. *Front Oncol*, 2019, 9(1): 874.
- [42] HINZ S, HENDRICKS A, WITTIG A, et al. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients—a prospective study[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 53.
- [43] ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(5): 479-491.
- [44] HE W, HOU M, ZHANG H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in predicting disease progression and chemotherapy resistance in patients with gestational choriocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(6): 1421-1431.
- [45] CRISTOFANILLI M, PIERGA J, REUBEN J, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): international expert consensus paper[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 13(1): 439-445.
- [46] HEYMANN D, TÉLLEZ-GABRIEL M. Circulating tumor cells: the importance of single cell analysis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1068(1): 45-58.