

## · 讲座 ·

## 循环肿瘤细胞及循环肿瘤 DNA 检测在乳腺癌中的研究进展

戚丽娜 郑树

**【摘要】** 乳腺癌是中国女性最常见的癌症,其早期检测、个体化治疗及实时疾病监测一直是科研及临床工作者关注的重点。癌症患者血液中循环肿瘤细胞(CTC)和循环肿瘤 DNA(ctDNA)的检测微创、简便,易实时获取信息。目前,有关 CTC 富集鉴定方法多种多样,CTC 及 ctDNA 检测的敏感度和特异度较前有所提高,未来研究面临的最大挑战为肿瘤细胞特异性标志物的开发以及 ctDNA 临床意义的研究。CTC 及 ctDNA 在基础研究、检测方法、CTC 培养、早期肿瘤检测、个体化治疗及临床预后等方面的研究均有开展。笔者对乳腺癌 CTC 及 ctDNA 的研究进展作一总结。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 肿瘤循环细胞; DNA, 肿瘤; 精准医学

**【中图分类号】** R737.9;R730.4

**【文献标志码】** A

乳腺癌是女性发病率较高的癌症<sup>[1]</sup>,确诊的金标准为组织病理学检查,治疗方法根据肿瘤的分期及原发灶的病理结果选择手术、化疗、放射治疗、内分泌治疗及靶向治疗等。癌症患者血液中循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)和循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)及外泌体等的检测为“液态活组织检查(简称活检)”的主要内容与研究热点。自 1869 年 Ashworth<sup>[2]</sup>提出了 CTC 的概念,随即被肿瘤领域关注,截止到 2016 年 10 月,在 Pubmed 上关于 CTC 的文章已有 2 万余篇。1948 年, Mandel 和 Metais<sup>[3]</sup>发现了循环核酸,而 ctDNA 的研究在近年才兴起。目前有众多乳腺癌“液态活检”的研究,涉及 CTC 和 ctDNA 的来源、检测、与临床的相关性,以及 CTC 的亚群等方面。2016 年 1 月,美国政府出台了一项由政府主导的血液癌症研究计划,旨在联合不同企业、国立机构和大学,分享研究数据,建立云端数据库,科学地对这些数据进行整合分析,加速癌症血液检测的发展,意味着医学研究进入大数据时代<sup>[4]</sup>。2016 年 1 月,中国国家食品药品监督管理总局批准了首个 CTC 检测试剂盒<sup>[5]</sup>。2016 年 6 月,美国 FDA 批准了罗氏公司生产的 cobasEGFR Mutation Test v2“液态活检”试剂盒,用于检测非小细胞肺癌相关基因突变,“液态活检”技术开始应用于临床<sup>[6]</sup>。

### 一、CTC 及 ctDNA 简介

#### 1. CTC

目前认为 CTC 来源于原发灶及转移灶中的肿瘤细胞,上皮性肿瘤中这一过程可能与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)有关<sup>[7]</sup>。CTC 是否会在血液中进行自我增殖尚不知晓。CTC 有多种亚群,根据细胞类型可分为上皮性、间质性、上皮-间质中间型、干细胞型 CTC<sup>[8,9]</sup>,根据存在形式可分为单独、成团以及被血小板包裹的 CTC。其中,间质型、干细胞型以及成团的 CTC 更具侵袭性,可能

与肿瘤的复发转移关系更密切,并且,成团的 CTC 形成转移灶的能力为单个 CTC 的 23 ~ 50 倍<sup>[10]</sup>。CTC 形成转移灶是一个复杂的过程,目前已知的促进因素为激活的血小板及巨噬细胞的作用、CTC 成团聚集后黏附于血管内皮、化学因子等<sup>[11-13]</sup>。1 g 肿瘤组织每天大约可向周围血中释放  $1 \times 10^6$  个 CTC<sup>[14]</sup>,但 CTC 数量仍极少,约每  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个白细胞中可能仅有 1 个 CTC<sup>[15]</sup>,且存活时间较短,半衰期为 1.0 ~ 2.4 h<sup>[16]</sup>。小鼠模型的研究发现,肿瘤细胞能经过循环系统回到原发部位,称为“归巢现象”,这可能与肿瘤的原位复发有关<sup>[17]</sup>。

#### 2. ctDNA

ctDNA 存在于血液、滑膜液和脑脊液等体液中,由来自原发灶和转移灶的肿瘤细胞释放入血的单链或双链 DNA 混合物组成,以 DNA 蛋白质复合物或游离 DNA 2 种形式存在,携带有与原发肿瘤组织相一致的分子遗传学改变。大部分来源于已经衰老及死亡的肿瘤细胞<sup>[18]</sup>或肿瘤细胞碎片,部分 ctDNA 来源于活性肿瘤细胞通过释放外泌体的方式释放双链 DNA 入血<sup>[19]</sup>,这部分来源的 ctDNA 可能与肿瘤的转移、复发关系更密切,但此发现仍存在争议。ctDNA 半衰期为 0.5 ~ 2.0 h<sup>[20]</sup>,含量极低,占血液中总游离 DNA 的 1% 不到,因大部分的游离 DNA 均由正常组织释放<sup>[21-22]</sup>。ctDNA 会被正常宿主细胞摄取,并影响这些宿主细胞的功能,称为“基因转移”<sup>[23]</sup>。Trejo-Becerril 等<sup>[24]</sup>发现 ctDNA 可诱导 NIH3T3 小鼠细胞发生转化、癌变,提示 ctDNA 可能有促进肿瘤形成的作用。

#### 二、CTC 的检测

国内关于 CTC 的研究较 ctDNA 多,目前 CTC 的富集方法众多,利用物理、化学方法结合免疫学的原理,并利用微流控提升捕获效率为研究的热点。

##### 1. 富集

为开展进一步研究,CTC 的富集是关键。当前较有代表性的富集手段有密度梯度离心法、流式细胞学方法<sup>[25]</sup>、免疫磁珠法<sup>[26]</sup>、CellSearch 技术等<sup>[27]</sup>。根据原理不同大致分为

2类:基于肿瘤细胞表面标志物的方法和利用肿瘤细胞物理特性的方法。

基于细胞表面标志物的方法分为阳性选择法和阴性剔除法。阳性选择法通过癌细胞表面的特异性标志物,如上皮细胞黏附分子,将 CTC 从血细胞中挑出。但 EMT 的过程中肿瘤细胞表面的上皮标志物逐渐减少<sup>[28]</sup>,为捕获这部分 CTC,需要应用新的标志物,如 vimentin、EGFR、HER-2、mucin 1 阳性等。利用阳性选择法需排除假阳性,在血液中具有上皮细胞特性的细胞可能来源于肠道上皮等<sup>[29]</sup>。阴性剔除法为利用白细胞表面特异性抗原将白细胞剔除,以 CD45 为主<sup>[25]</sup>。用此方法获得的 CTC 较阳性选择法多,但纯度较前者低。可根据实验目的选取相应的分离方法。

利用 CTC 物理性质的方法是指利用 CTC 与血细胞具有不同物理性质如大小、密度、磁性等达到分离的目的。代表性的方法有密度梯度离心法、基于细胞大小的 CTC 微过滤法<sup>[30]</sup>、三维微过滤仪器法<sup>[31]</sup>、可变微旋转排列仪器法<sup>[32]</sup>、CTC-Chip<sup>[33]</sup>和微量流式仪器法<sup>[34]</sup>等。此类方法极大地保留了 CTC 表面的生物学信息。Mu 等<sup>[35]</sup>利用基于 CTC 大小的分离方法从转移性乳腺癌患者血液中分离到了单个和成团的 CTC,以及上皮性、EMT 性 CTC 和肿瘤相关性巨噬细胞样细胞。

## 2. 鉴定

CTC 富集后鉴定是否为肿瘤细胞是极其重要的一项工作。应用较多的是免疫荧光<sup>[25]</sup>、第 8 号染色体荧光原位杂交<sup>[36]</sup>、上皮细胞免疫斑点技术<sup>[37]</sup>和基因突变检测<sup>[25]</sup>等。

目前尚无统一、稳定、高效的 CTC 分离方法,未来 CTC 检测方法要求具有更高的敏感度、特异度,获得具有活性的细胞以及开展 CTC 亚群的检测。在鉴定中免疫荧光法和 CellSearch 系统在科研中应用最广,其中 CellSearch 系统集分离和富集功能为一体。

## 三、ctDNA 的检测

当前敏感度和特异度较高的 ctDNA 检测方法有数字 PCR、SafeSeqS、BEAMing 技术、实时荧光定量 PCR 及高通量测序、标记扩增深度测序 (tagged-amplicon deep sequencing, TAM-Seq) 等。由于血液中由正常组织释放的游离 DNA 数目庞大,探测到含量极低的 ctDNA 是最大的技术挑战。2014 年,Stanford 大学医学院的研究者们研究出了癌症个体化深度测序,具更高的敏感度和特异度<sup>[38]</sup>。为达到早期检测肿瘤的目的,更高敏感度的 ctDNA 探测技术有待研发。目前,药物的敏感性和耐药机制的研究以及复发监测为 ctDNA 应用前景较好的研究方向。

## 四、CTC 的培养及应用

探究 CTC 内部信息(如细胞内蛋白、RNA 和 DNA)的最大挑战为细胞数极少。以往单个 CTC 所含的 DNA 量远达不到测序的要求,如今针对单个细胞行 DNA 测序的技术已实现,原理为对单个细胞的全基因组做一个预扩增。Heitzer 等<sup>[39]</sup>用此技术率先对单个 CTC 进行二代测序,证实该方法的可行性。将 CTC 进行培养获取更多的细胞也为研究提供了可能性,可用于研究乳腺癌 CTC 的异质性等。为提高 CTC

体外培养的成功率,在提取过程中应注意保护细胞活性。

CTC 数目极少也为其培养带来巨大的困难,但近年来乳腺癌 CTC 培养的研究也有所进展。Jordan 等<sup>[40]</sup>从原发灶为 ER 阳性、HER-2 阴性的乳腺癌患者中获取 CTC,并用流式细胞仪分离得到 HER-2 阴性和 HER-2 阳性的 CTC 亚群。

## 五、CTC 和 ctDNA 与临床的相关性研究

目前,国内多利用 CellSearch 系统检测晚期乳腺癌 CTC 的阳性率(每 7.5 ml 外周血中阳性 CTC  $\geq 5$  个),并开展其与临床病理特征及预后的相关性研究<sup>[41-43]</sup>。CTC 计数可能随癌细胞脱落的速度产生波动,且不同的 CTC 功能差异大,仅通过计数得到的信息非常有限。“液态活检”携带的信息与原发灶信息的对比,对于药物敏感性的预测及耐药后的药物指导以及治疗的实时监测将会是研究的重点。

### 1. 肿瘤的检测

乳腺癌的检测方法主要有检测传统的血清标志物 CA153 及 CEA、影像学、目前作为诊断金标准的组织病理,以及新兴的“液态活检”CTC 及 ctDNA。不同检测指标的应用价值因自身的特异度及敏感度不同而各不相同。CTC 和 ctDNA 在肿瘤检测中的优势为微创、简便,劣势为早期敏感度不高,来源确定困难。

Dawson 等<sup>[44]</sup>通过 TAM-Seq 发现 ctDNA 的敏感度及与病情变化的相关性优于 CTC 及 CA153。研究发现 ctDNA 跟踪检测可以更早地发现已接受根治性治疗的早期乳腺癌患者的复发,与传统的影像学检测相比,追踪早期乳腺癌患者术后血液中的 ctDNA 可以提前 7.9 个月发现乳腺癌复发<sup>[45]</sup>。

### 2. 与临床病理特点的相关性

Liao 等<sup>[46]</sup>对乳腺癌 CTC 阳性率与临床病理特点的关系进行 Meta 分析,共 2 334 例患者纳入研究,CTC 阳性率与肿瘤大小 ( $P=0.002$ )、肿瘤分期 ( $P=0.006$ )、ER 水平 ( $P=0.007$ )、PR 水平 ( $P=0.04$ ) 相关,但与淋巴结是否转移无明显相关性 ( $P=0.10$ )。

### 3. 与预后的相关性

日本一项 3 期临床试验 JO21095 提示,在 HER-2 阴性的转移性乳腺癌患者中,基线评估每 7.5 ml 外周血中阳性 CTC  $\geq 2$  个的患者预后更差,提示 CTC 可作为乳腺癌患者的预后预测指标<sup>[47]</sup>。血液中 ctDNA 的检测也可为预后提供信息。在 ER 阳性的乳腺癌中,ctDNA 检测时发现 PIK3CA 突变基因为提示预后不良的关键独立预后因子<sup>[48]</sup>。

### 4. 药物敏感性和耐药机制

在乳腺癌的辅助治疗中,ER、PR 和 HER-2 的状态至关重要。在晚期乳腺癌患者中 ER 阳性所占比例高达 65%,但部分 ER 阳性患者对内分泌治疗耐药,而部分 ER 阴性的患者对内分泌治疗有反应。原发灶为 ER 阳性的患者存在 ER 阴性的 CTC,这可能与内分泌治疗耐药有关<sup>[49]</sup>。另一重要的靶点为 HER-2 基因,大约在 20% 的乳腺癌患者中过度表达,且随着乳腺癌的进展,HER-2 表达的阳性率逐渐增高。有关 HER-2 靶向治疗的耐药研究发现,由于 PIK3CA 基因突变导致的 PI3L 通路的激活在耐药机制中起了重要作

用<sup>[50-52]</sup>。乳腺癌免疫治疗研究发现程序性死亡配体-1 在 60% 的 ER 阳性、HER-2 阴性乳腺癌患者 CTC 中有表达<sup>[53]</sup>, 这给免疫治疗提供了靶点。

ctDNA 基因突变的检测也应用于乳腺癌耐药机制的研究。随着乳腺癌获得性耐药的出现, ctDNA 中测得的基因突变随之增加, 包括 PIK3CA 基因突变、ER 相关基因的缺失突变、GAS6 的拼接突变等, 但这些基因突变与耐药的关系还有待进一步证实<sup>[54]</sup>。

## 5. 治疗方式选择

乳腺癌中最重要的辅助治疗为内分泌治疗和靶向治疗。当 ER 阳性转移性乳腺癌患者 CTC 数量大时加用化疗是否获益, 当原发灶为 HER-2 阴性的乳腺癌患者出现 HER-2 阳性的 CTC 时采用靶向治疗是否获益, 这些问题需要大型的前瞻性临床试验来回答。一项临床试验 (NCT01710605) 纳入了 1 000 例 ER 阳性转移性乳腺癌患者, 当患者每 7.5 ml 外周血中阳性 CTC 数目  $\geq 5$  个时采用化疗,  $< 5$  个时仅使用内分泌治疗作为一线治疗, 对比这 2 种治疗的预后差异<sup>[55]</sup>。在另一项纳入 228 例 HER-2 阴性转移性乳腺癌患者的临床试验 (DETECT III) 中<sup>[56]</sup>, CTC 检测到 HER-2 阳性, 分别使用化疗+内分泌治疗与化疗+内分泌+靶向药物, 对比这 2 种方法的预后差异。以上 2 项试验均还在进行中。

## 六、结语

“液态活检”的研究结果初步展示了循环肿瘤标志物检测对于传统治疗理念的冲击, 通过开发更先进的 CTC 富集检测技术提高检测的敏感度、特异度及采用新一代测序技术进行 ctDNA 高通量多基因的检测, 并对检测水平进行标准化后有望替代传统的侵入性组织活检, 并可能为肿瘤的早期诊断、治疗、预后判定及跟踪随访等提供一系列简便、特异、微创的检测手段。ctDNA 在非小细胞肺癌的药敏及耐药机制的研究中已显示其优势, 但其多为非活性肿瘤细胞来源 DNA, 笔者认为活性 CTC 的研究前景较 ctDNA 更广阔, 其内蕴含的信息较 ctDNA 更丰富。笔者希望 CTC 及 ctDNA 的进一步研究能为乳腺癌的精准治疗提供依据。

## 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death [J]. Aust Med J, 1869, 14: 146-149.
- [3] Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [J]. C R Seances Soc Biol Fil, 1948, 142(3-4): 241-243.
- [4] U. S. Government. Blood profiling atlas pilot [EB/OL]. [2016-12-10]. [https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/docs/fact\\_sheet\\_final\\_moonshot.pdf](https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/docs/fact_sheet_final_moonshot.pdf).
- [5] 国家食品药品监督管理总局. 叶酸受体细胞检测试剂盒 [EB/OL]. [2016-12-10]. <http://app2.sfda.gov.cn/datasearchp/index1.do?tableId=26&tableName=TABLE26&tableView=国产器械&Id=111907>.
- [6] U. S. Food and Drug Administration. Cobas EGFR mutation test v2 [EB/OL]. [2016-12-10]. <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm504540.htm>.
- [7] Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(2): 449-455.
- [8] Grover PK, Cummins AG, Price TJ, et al. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research [J]. Ann Oncol, 2014, 25(8): 1506-1516.
- [9] Pantel K, Alix-Panabieres C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction [J]. Cancer Res, 2013, 73(21): 6384-6388.
- [10] Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis [J]. Cell, 2014, 158(5): 1110-1122.
- [11] Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(2): 123-134.
- [12] Smith HA, Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells [J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(4): 411-429.
- [13] Bonicchi R, Galliera E, Borroni EM, et al. Chemokines and chemokine receptors: an overview [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009, 14: 540-551.
- [14] Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions [J]. Cancer Lett, 2007, 253(2): 180-204.
- [15] Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, et al. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35(5): 463-474.
- [16] Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8152-8162.
- [17] Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells [J]. Cell, 2009, 139(7): 1315-1326.
- [18] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA [J]. J Clin Oncol, 2014, 32(6): 579-586.
- [19] Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection [J]. Cell Res, 2014, 24(6): 766-769.
- [20] Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma [J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(1): 218-224.
- [21] Yong E. Cancer biomarkers: written in blood [J]. Nature, 2014, 511(7511): 524-526.
- [22] Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(45): 16 368-16 373.
- [23] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6): 426-437.
- [24] Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52754.
- [25] Boral D, Vishnoi M, Liu HN, et al. Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 196.

- [26] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(179): 179ra147.
- [27] Bitting RL, Boominathan R, Rao C, et al. Development of a method to isolate circulating tumor cells using mesenchymal-based capture [J]. *Methods*, 2013, 64(2): 129-136.
- [28] Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 623-631.
- [29] Pantel K, Deneve E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(5): 936-940.
- [30] Zhou MD, Hao S, Williams AJ, et al. CORRIGENDUM: separable bilayer microfiltration device for viable label-free enrichment of circulating tumour cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7967.
- [31] Zheng S, Lin HK, Lu B, et al. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood [J]. *Biomed Microdevices*, 2011, 13(1): 203-213.
- [32] Harouaka RA, Zhou MD, Yeh YT, et al. Flexible micro spring array device for high-throughput enrichment of viable circulating tumor cells [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(2): 323-333.
- [33] Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility [J]. *Science*, 2014, 345(6193): 216-220.
- [34] Hughes AD, Mattison J, Western LT, et al. Microtube device for selectin-mediated capture of viable circulating tumor cells from blood [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(5): 846-853.
- [35] Mu Z, Benali-Furet N, Uzan G, et al. Detection and characterization of circulating tumor associated cells in metastatic breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): pii: E1665.
- [36] Li Y, Zhang X, Ge S, et al. Clinical significance of phenotyping and karyotyping of circulating tumor cells in patients with advanced gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6594-6602.
- [37] Alix-Panabieres C, Pantel K. Liquid biopsy in cancer patients: advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(11): 1411-1417.
- [38] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. *Nat Med*, 2014, 20(5): 548-554.
- [39] Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(10): 2965-2975.
- [40] Jordan NV, Bardia A, Wittner BS, et al. HER2 expression identifies functional states within circulating breast cancer cells [J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 102-106.
- [41] 李蕾, 刘毅, 张少华, 等. 循环肿瘤细胞检测在不同阶段不同类型乳腺癌中的应用及意义 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(36): 2812-2815.
- [42] 边莉, 刘毅, 王涛, 等. 循环肿瘤细胞动态变化对转移性乳腺癌患者治疗反应及预后的预测价值 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(4): 265-268.
- [43] 吕海通, 施宇梅, 安胜利, 等. 循环肿瘤细胞在可手术乳腺癌患者中的检出率及特征分析 [J]. *广东医学*, 2016, 37(12): 1819-1822.
- [44] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13): 1199-1209.
- [45] Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(302): 302ra133.
- [46] Liao Y, Wang SY, Meng XY, et al. Circulating tumor cells in breast cancer and its association with tumor clinicopathological characteristics: a meta-analysis [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(12): 343.
- [47] Iwata H, Masuda N, Yamamoto D, et al. Circulating tumor cells as a prognostic marker for efficacy in the randomized phase III JO21095 trial in Japanese patients with HER2-negative metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 162(3): 501-510.
- [48] Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, et al. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 150(2): 299-307.
- [49] Babayan A, Hannemann J, Spötter J, et al. Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75038.
- [50] Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(1): 1-8.
- [51] Ibrahim EM, Kazkaz GA, Al-Mansour MM, et al. The predictive and prognostic role of phosphatase phosphoinositol-3 (PI3) kinase (PIK3CA) mutation in HER2-positive breast cancer receiving HER2-targeted therapy: a meta-analysis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 152(3): 463-476.
- [52] Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications [J]. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2015, 7: 111-123.
- [53] Mazel M, Jacot W, Pantel K, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(9): 1773-1782.
- [54] Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA [J]. *Nature*, 2013, 497(7447): 108-112.
- [55] U. S. National Institutes of Health. Medico-economic interest of taking into account circulating tumor cells (CTC) to determine the kind of first line treatment for metastatic, hormone-receptors positive, breast cancers [EB/OL]. [2016-12-10]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01710605?term=NCT01710605&rank=1>.
- [56] U. S. National Institutes of Health. DETECT III - a multicenter, phase III study to compare standard therapy +/- lapatinib in HER2-ve MBC-patients with HER2+ve CTCs (DETECT III) [EB/OL]. [2016-12-10]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01619111?term=DETECT++III&rank=1>.

(收稿日期 2016-12-10)

(本文编辑: 刘军兰)

咸丽娜, 郑树等. 液态活组织检查在乳腺癌方面的研究进展 [J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2018, 12(3): 187-190.