

## · 论著 ·

# 可手术乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征的关系

崇梅红 肇毅 王水 查小明 刘晓安 凌立君

**【摘要】 目的** 探讨可手术乳腺癌患者外周血循环肿瘤细胞(CTCs)的阳性率及其与原发肿瘤临床病理特征的关系。**方法** 以2010年9月至2011年5月期间南京医科大学第一附属医院收治的94例可手术乳腺癌患者为实验组,20例健康志愿者及20例乳腺良性疾病患者为对照组,抽取实验组及对照组患者的外周静脉血10 ml,用密度梯度离心法富集分离单个核细胞,以多标志物(CK19、人乳腺珠蛋白、小黏蛋白)联合的实时荧光定量PCR法检测CTCs。采用皮尔逊 $\chi^2$ 检验分析可手术乳腺癌组与对照组外周血CTCs阳性率的差异,以及CTCs与原发肿瘤临床病理特征的关系。**结果** 可手术乳腺癌组外周血CTCs阳性率显著高于对照组[56% (53/94)比5% (2/40),  $\chi^2=30.62$ ,  $P=0.00$ ]。可手术乳腺癌患者外周血CTCs阳性率在不同的年龄、绝经状态、肿块大小、淋巴结转移、TNM分期、病理分级、病理类型、激素受体状态、HER-2表达、是否为三阴性乳腺癌、分子分型、P53表达、Ki67表达以及增殖细胞核抗原(PCNA)表达分组间差异无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。**结论** 可手术乳腺癌患者外周血CTCs的阳性率较高,但其与原发肿瘤临床病理学特征无关系。

**【关键词】** 乳腺肿瘤;循环肿瘤细胞;TNM分期;激素受体;人表皮生长因子受体2

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标志码】** A

**Relationship between circulating tumor cells and clinicopathologic characteristics of primary tumor in operable breast cancer patients** CHONG Mei-hong\*, ZHAO Yi, WANG Shui, ZHA Xiao-ming, LIU Xiao-an, LING Li-jun. \*Department of Thyroid and Breast Surgery, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225000, China

Corresponding author: ZHAO Yi, Email: doctorzhaoyi@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the positive rate of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood in patients with operable breast cancer and its relationship with clinicopathologic characteristics of primary tumor. **Methods** From September 2010 to May 2011, ninety-four operable breast cancer patients in the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University were involved as the experiment group, 20 healthy volunteers and 20 patients with benign breast diseases served as control group. Samples of peripheral blood (10 ml) from the experiment group and control group were enriched by density gradient centrifugation for mononuclear cells respectively, and then the cells were detected by a multimarker [CK19, human mammary globin (hMAM), small breast epithelial mucin (SBEM)] real time quantitative PCR method. Pearson's Chi-square test was used to analyze the difference on positive rates of CTCs in peripheral blood between the experiment group and control group, and the relationship between the positive rate of CTCs and clinicopathologic characteristics of primary tumors. **Results** The positive rate of CTCs in peripheral blood in the experiment group (56%, 53/94) was significantly higher than that in control group (5%, 2/40) ( $\chi^2=30.62$ ,  $P=0.00$ ). The positive rates of CTCs in operable breast cancer patients showed no significant difference among the different subgroups with regards to age, menopausal status, tumor size, lymph node metastasis, TNM stage, histological grade, histological type, hormone receptor status, human epithelial growth factor receptor 2 (HER-2) expression, triple negative status, molecular type, P53 expression, Ki67 expression, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2013.02.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071753);江苏省六大人才高峰项目(2010-ws-079)

作者单位:225000 江苏 扬州,江苏省苏北人民医院甲乳外科(崇梅红);210029 南京,南京医科大学第一附属医院乳腺外科(肇毅、王水、查小明、刘晓安、凌立君)

通信作者:肇毅,Email: doctorzhaoyi@sina.com

( $P>0.05$ ). **Conclusion** The patients with operable breast cancer show a high positive rate of CTCs in peripheral blood, but no significant correlation is found between the presence of CTCs and the clinicopathologic characteristics of primary tumor.

**【Key words】** breast neoplasms; circulating tumor cell; TNM stage; hormone receptor; human epithelial growth factor receptor 2

可手术乳腺癌患者发生远处转移的风险与原发肿块大小、腋窝淋巴结状态、原发肿块生物学特征等预后预测因子有关。但是,这些传统的乳腺癌预后预测因子并不能准确地鉴定出那些具有复发风险的患者。可手术乳腺癌患者外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)可能代表着体内存在的隐蔽的癌细胞负荷,有望成为新的独立的乳腺癌预后预测因子<sup>[1]</sup>。本研究运用多标志物联合的实时荧光定量 PCR 法检测可手术乳腺癌患者外周血 CTCs,研究可手术乳腺癌患者外周血 CTCs 阳性率,并且探讨 CTCs 与原发肿瘤临床病理学特征之间的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源及患者一般资料

外周血标本取自 2010 年 9 月至 2011 年 5 月南京医科大学第一附属医院乳腺外科经病理诊断为乳腺癌的 94 例患者。患者年龄为 28~85 岁,平均年龄为 54.5 岁,通过术前体检及辅助检查已排除远处转移及其他恶性肿瘤,并且术前未进行过辅助治疗,手术方式均为改良根治术,手术切除标本均经规范病理检查。按照美国癌症联合会 2010 年第 7 版乳腺癌分期标准对患者行 TNM 分期。为了定义检测 CTCs 的标志物 CK19、人乳腺珠蛋白(human mammaglobin, hMAM)、小黏蛋白(small breast epithelial mucin, SBEM)在正常人群外周血中的基线表达水平,选择同期在南京医科大学第一附属医院就诊的 20 例健康志愿者(年龄为 26~72 岁,平均年龄为 52.0 岁),以及 20 例乳腺良性疾病患者(年龄为 28~65 岁,平均年龄为 53.0 岁)作为对照组。对照组均没有恶性肿瘤病史及患恶性肿瘤的临床征象。病例组与对照组年龄和性别分布具有可比性( $P$  值均 $>0.05$ )。采集每名受试者清晨空腹外周血 10 ml。

1.2 主要试剂与仪器

人淋巴细胞分离液为天津灏洋生物公司产品。RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂 PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix、实时荧光定量 PCR 试剂 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 为大连宝生物工程有限公司产品(TaKaRa)。水平离心机 Centrifuge 5810R、

微量移液枪及 PCR 反应仪 Eppendorf realplex 均为德国 Eppendorf 公司产品。

1.3 循环肿瘤细胞检测方法

**1.3.1 密度梯度离心法富集:**将 PBS 及人淋巴细胞分离液从冰箱取出放置在室温预热,将 10 ml 抗凝全血离心弃除上清液后以等比例 PBS 稀释并混匀,缓慢加入到等比例人淋巴细胞分离液上面,在室温下置于水平离心机中,以 2000 r/min (离心机半径为 9.5 cm)离心 15 min,用毛细滴管吸取中间云雾状的单个核细胞层,PBS 洗涤后冻存备用。

**1.3.2 RNA 提取及 cDNA 反转:**所有标本按照氯仿/异丙醇法提取 RNA,核酸蛋白定量仪测定 RNA 浓度和纯度, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值为 1.8/2.0,1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示完整,进入下一步实验。cDNA 合成按照试剂盒说明书进行,取 2  $\mu\text{g}$  RNA 反转成 40  $\mu\text{l}$  cDNA 体系放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

**1.3.3 实时荧光定量 PCR 反应:**CK19 mRNA、SBEM mRNA 及内参照基因  $\beta$ -actin mRNA 的引物参考 GenBank,采用 Prime Primer 5.0 软件设计,hMAM mRNA 的引物参考文献[2]的设计,所有引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 引物

名称	序列
CK19-F	5'-TCCGAACCAAGTTTGAGACG-3'
CK19-R	5'-CCCTCAGCGTACTGATTTCTCT-3'
hMAM-F	5'-ATGAAGTTGCTGATGGTCCTCAT-3'
hMAM-R	5'-GTCTTAGACACTTGTGGATTGATTGTCT-3'
SBEM-F	5'-GTATCCAGCTACTGGTCCTGCT-3'
SBEM-R	5'-CAATTGCAGAAAGACTCAAGCTG-3'
$\beta$ -actin-F	5'-GCTGTGCTATCCCTGTACGC-3'
$\beta$ -actin-R	5'-TGCCTCAGGGCAGCGGAACC-3'

F:上游引物;R:下游引物

实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 法,PCR 反应在 Eppendorf realplex 上进行,检测荧光超过背景荧光时的循环数定义为 Ct 值。

使用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂进行实时

荧光定量 PCR 反应,反应体系共 20  $\mu\text{l}$ ,其中 2 $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 10  $\mu\text{l}$ ,50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4  $\mu\text{l}$ ,cDNA 2  $\mu\text{l}$ ,灭菌蒸馏水 6.8  $\mu\text{l}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  上游和下游引物各 0.4  $\mu\text{l}$ 。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,循环 40 次后,进行溶解曲线分析。

使用 96 孔板进行实时荧光定量 PCR 反应,每个体系行 3 复孔测试,取平均值为 Ct 值,按照  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因的相对定量表达<sup>[3]</sup>。选择一名健康志愿者作为参照,其外周血 CK19、hMAM、SBEM 相对基因表达 (relative gene expression, RGE) 设定为 1。

实时荧光定量 PCR 切点阈值设置为对照组相应标志物 (CK19、hMAM、SBEM) RGE 均值加上 3 倍标准差,高于该值即为阳性表达<sup>[4]</sup>。

检测标本外周血中 3 种标志物 CK19、hMAM 和 SBEM,只要有一个呈阳性表达即为 CTCs 阳性。

#### 1.4 统计学方法

应用 SPSS12.0 软件进行统计学处理。采用皮尔逊  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外周血 CTCs 阳性切点阈值的确定

对照组 CK19、hMAM、SBEM 的平均 RGE 分别为 0.88、1.38、1.04;为了增加检测的特异性,阳性切点阈值设定为均值加上 3 倍标准差,分别为 3.77、6.62、3.27。

### 2.2 对照组和可手术乳腺癌组外周血 CTCs 阳性率

40 例对照组中有 1 例 CK19 为阳性,其 RGE 为 5.89;有 1 例 hMAM 为阳性,其 RGE 为 6.88。40 例对照组中共有 2 例 CTCs 阳性 (健康志愿者和乳腺良性疾病患者各 1 例),阳性率为 5% (2/40)。94 例可手术乳腺癌组中,有 53 例外周血 CTCs 为阳性,阳性率为 56% (53/94)。可手术乳腺癌组外周血 CTCs 阳性率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ,表 2)。

表 2 对照组与可手术乳腺癌组外周血循环肿瘤细胞阳性率比较

组别	例数	循环肿瘤细胞 [例 (%)]		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性	阴性		
对照组	40	2 (5%)	38 (95%)	30.62	0.00
可手术乳腺癌组	94	53 (56%)	41 (44%)		

### 2.3 可手术乳腺癌组外周血 CTCs 与原发肿瘤临床病理特征的关系

可手术乳腺癌组外周血 CTCs 阳性率与年龄、

月经状态、肿块大小、淋巴结病理分期、TNM 分期、病理分级、病理类型、激素受体状态、HER-2 状态、是否为三阴性乳腺癌、分子分型、P53 表达、Ki67 表达以及增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达均无关联 ( $P$  值均  $> 0.05$ ,表 3)。

在肿块直径  $> 5 \text{ cm}$ 、 $\geq 10$  枚腋窝淋巴结转移、TNM 分期为 III 期、组织学分级为 3 级、HER-2 阳性、Luminal-B 型及 P53 阳性的亚组中,可手术乳腺癌组外周血 CTCs 阳性率分别为 4/4、9/12、65% (17/26)、70% (19/27)、68% (17/25)、12/15、65% (31/48),呈现更高的阳性率。

## 3 讨论

远处转移是乳腺癌导致死亡的主要原因。转移过程包括肿瘤细胞从原发病灶脱落、侵入血管、在循环系统中停留、游离出血管、定位于远处器官、增殖形成转移灶;肿瘤细胞必须顺利完成这一系列过程才能最终形成远处转移灶<sup>[5]</sup>。研究显示部分乳腺癌发生血行转移是独立于淋巴结转移途径的,并且血行转移可能发生于疾病进程的早期阶段<sup>[6-9]</sup>。运用现代生物学技术,在没有明显转移迹象的乳腺癌患者外周血中检测到肿瘤细胞,称为 CTCs,可能提示乳腺癌早期转移。本研究显示 94 例可手术乳腺癌患者中外周血 CTCs 检出率达 56%,证实了乳腺癌发生血行转移是在疾病的早期阶段。然而,早期乳腺癌患者外周血中检测到 CTCs 并不一定形成最终的转移灶,因为部分 CTCs 可能会凋亡或者休眠而终止转移的级联过程<sup>[10]</sup>。但是,对于外周血中检测出 CTCs 的早期乳腺癌患者,其后发生远处转移的危险相对增高,应该给予更为密切的随访检查。许多研究已经发现早期乳腺癌外周血 CTCs 检出与更差的预后相关<sup>[11-14]</sup>。

实时荧光定量 PCR 由于具有高度的敏感性 & 特异性的特点,被广泛应用于基因表达解析。由于在正常人外周血中,上皮特异性或者肿瘤特异性标志物会有微量的表达,而实时荧光定量 PCR 能够给予一个切点值鉴别正常细胞表达和肿瘤细胞表达,因而较 RT-PCR 法具有更好的特异性。为了在血液系统中鉴别肿瘤细胞,通常选择上皮特异性或者肿瘤特异性标志物,它们在血液系统中不表达或者表达极微;然而由于肿瘤细胞的异质性及基因表达的不稳定性,事实上并没有一个特定的标志物用于检测乳腺癌外周血 CTCs,



表 3 94 例可手术乳腺癌患者外周血循环肿瘤细胞与临床病理因素的关系

临床病理因素	例数	循环肿瘤细胞		$\chi^2$ 值	P 值	临床病理因素	例数	循环肿瘤细胞		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性(例)	阴性(例)					阳性(例)	阴性(例)		
年龄				0.77	0.38	HER-2 状态				1.87	0.17
≤45 岁	20	13	7			阴性	69	36	33		
>45 岁	74	40	34			阳性	25	17	8		
绝经状态				0.06	0.81	三阴性乳腺癌 <sup>b</sup>				0.37	0.54
绝经前	38	22	16			是	18	9	9		
绝经后	56	31	25			否	76	44	32		
原发肿瘤分期 <sup>a</sup>				3.26	0.19	分子分型 <sup>c</sup>				4.28	0.37
T1	28	14	14			Luminal A	51	27	24		
T2	62	35	27			Luminal B	15	12	3		
T3	4	4	0			Basal-like	8	4	4		
淋巴结病理分期 <sup>a</sup>				2.41	0.49	Normal-like	10	5	5		
pN <sub>0</sub>	49	25	24			HER-2 过表达	10	5	5		
pN <sub>1</sub>	20	12	8			P53				4.17	0.23
pN <sub>2</sub>	13	7	6			阴性	26	11	15		
pN <sub>3</sub>	12	9	3			弱阳性	16	8	8		
TNM 分期 <sup>a</sup>				1.18	0.55	阳性	48	31	17		
I 期	17	9	8			未知 <sup>d</sup>	4				
II 期	51	27	24			Ki67				4.91	0.43
III 期	26	17	9			阴性	2	0	2		
组织学分级				3.18	0.20	<10% 阳性	15	9	6		
1 级	26	14	12			10%~30% 阳性	24	12	12		
2 级	41	20	21			>30%~60% 阳性	17	10	7		
3 级	27	19	8			>60% 阳性	23	13	10		
病理类型				2.92	0.19	未知 <sup>d</sup>	13				
导管原位癌	2	0	2			PCNA				2.02	0.62
浸润性导管癌	91	52	39			阴性	2	1	1		
浸润性小叶癌	1	1	0			弱阳性	7	4	3		
激素受体状态				0.66	0.42	阳性	68	36	32		
阴性	28	14	14			未知 <sup>d</sup>	17				
阳性	66	39	27								

a: 按照美国癌症联合会 2010 年第 7 版乳腺癌分期标准进行分期; b: 三阴性乳腺癌是 ER、PR、HER-2 均为阴性; c: Luminal A 型指 ER 和(或)PR 阳性, HER-2 阴性; Luminal B 型指 ER 和(或)PR 阳性, HER-2 阳性; Basal-like 指 ER、PR、HER-2 均阴性, CK5/6 阳性; Normal-like 指 ER、PR、HER-2 均阴性, CK5/6 阴性; HER-2 过表达指 ER、PR 阴性, HER-2 阳性; d: 未知病例未参与统计学分析; PCNA: 增殖细胞核抗原

因而提倡多标志物联合使用<sup>[15]</sup>。本研究采用上皮特异性标志物 CK19 及肿瘤特异性标志物 hMAM、SBEM 联合的实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血 CTCs, 94 例可手术乳腺癌外周血 CTCs 的阳性率达 56%, 而其他相似研究中 CTCs 阳性率为 15%~50%<sup>[11,13,16-19]</sup>, 本研究显示了较高的 CTCs 阳性率。然而, 由于 CTCs 稀少且存在异质性, 目前并没有一个统一规范的方法用于检测, 不同的研究小组往往选择不同的检测方法, CTCs 检测如何实现标准化仍然需要进一步研究。

早期乳腺癌外周血 CTCs 的检出可能提示血行转移的发生, 分析患者原发肿瘤在何种状态下易于出现 CTCs, 即患者具有哪些特征易于发生血行转移一直是研究的热点。部分研究显示 CTCs 与传统预后预测因子有关联, 如 CTCs 与淋巴结转移、TNM 分期相关<sup>[20]</sup>, CTCs 与淋巴结转移相关<sup>[21]</sup>; 而部分研究显示 CTCs 与传统预后预测因子无统计学关联<sup>[4,14,19,22-23]</sup>。本研究显示 CTCs 与传统的预后预测因子无统计学关联, 与文献报道有差异, 可能是由于检测方法和样本量不同所致。

本研究结果显示可手术乳腺癌患者外周血 CTCs 与患者年龄、绝经状态、肿块大小、淋巴结转移、TNM 分期、病理类型、组织学分级、激素受体、HER-2 表达均无关系。同时,本研究也比较了 CTCs 阳性率与原发肿瘤的分子分型、P53 表达、Ki67 表达、PCNA 表达之间的关系,结果也显示差异无统计学意义。但是,笔者发现外周血 CTCs 阳性率在肿块直径>5 cm、腋窝淋巴结 $\geq 10$  枚转移、TNM 分期为Ⅲ期、组织学分级 3 级、HER-2 阳性、Luminal B 型、P53 阳性的可手术乳腺癌患者中更高。本研究结果可能归因于 CTCs 的发生是一个复杂的过程,不能仅仅单用传统的临床病理学指标对其进行预测。已有研究显示早期乳腺癌 15 年死亡风险是 5 年死亡风险的二倍<sup>[24]</sup>,表明体内可能存在隐藏的癌细胞负荷驱使后来的复发。而传统的预后预测因子并不能准确地鉴定出具有复发风险的患者,因此,研究者假设 CTCs 代表着体内存在的隐藏的癌细胞负荷,希望其能成为一个独立的预后预测指标<sup>[1]</sup>。本研究结果显示 CTCs 与传统预后预测因子无关,佐证了 CTCs 可能是独立的乳腺癌预后预测因子,然而,本研究结果需要长期的随访研究去验证。并且,本研究结果也有可能因为研究样本量不足而导致本来存在的差异未被发现,因而需谨慎对待。

本研究建立了多标志物联合的实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血 CTCs 的方法学平台,显示较高的检测阳性率。本研究检测了 94 例可手术乳腺癌患者外周血 CTCs,阳性率达 56%,提示部分可手术乳腺癌可能已发生血行转移;CTCs 与原发肿瘤的临床病理特征无统计学关联,提示 CTCs 可能是乳腺癌一个独立的预后预测因子。今后,有必要进行进一步的随访研究以便揭示可手术乳腺癌外周血 CTCs 与预后的关系。

### 参考文献

- [1] Lugo TG, Braun S, Cote RJ, et al. Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumours [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(13): 2605-2615.
- [2] Benoy IH, Elst H, Van der Auwera I, et al. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(10): 1813-1820.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, et al. Detection of mamaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 55.
- [5] Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 563-572.
- [6] Fisher B, Jeong JH, Anderson S, et al. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(8): 567-575.
- [7] Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, et al. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study [J]. *Lancet*, 1999, 354(9174): 197-202.
- [8] Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, et al. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years [J]. *Ann Surg*, 2002, 235(1): 10-26.
- [9] Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(6): 448-456.
- [10] Lankiewicz S, Rivero BG, Bócher O. Quantitative real-time RT-PCR of disseminated tumor cells in combination with immunomagnetic cell enrichment [J]. *Mol Biotechnol*, 2006, 34(1): 15-27.
- [11] Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(4): 589-597.
- [12] Apostolaki S, Perraki M, Kallergi G, et al. Detection of occult HER-2 mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic relevance [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 117(3): 525-534.
- [13] Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(13): 2177-2184.
- [14] Molloy TJ, Devriese LA, Helgason HH, et al. A multimarker QPCR-based platform for the detection of circulating tumour cells in patients with early-stage breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(12): 1913-1919.
- [15] Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(8): 793-802.
- [16] Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 7004-7010.
- [17] Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer [J]. *Cancer*, 2010, 116(14): 3330-3337.
- [18] 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 CellSearch

- system [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 920-928.
- [19] Chen Y, Zou TN, Wu ZP, et al. Detection of cytokeratin 19, human mamaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer [J]. Int J Biol Markers, 2010, 25(2): 59-68.
- [20] Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mamaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors [J]. Anticancer Res, 2010, 30(6): 2377-2382.
- [21] 齐晓伟, 姜军, 杨新华, 等. 乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征关系的初步研究 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 850-853.
- [22] Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(23): 3756-3762.
- [23] Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, et al. Circulating HER-2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance [J]. Ann Oncol, 2007, 18(5): 851-858.
- [24] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials [J]. Lancet, 2005, 365(9472): 1687-1717.
- (收稿日期: 2011-10-19)  
(本文编辑: 罗承丽)

崇梅红, 肇毅, 王水, 等. 可手术乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征的关系 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2013, 7(2): 80-85.

