

· 综述 ·

乳腺癌患者循环肿瘤细胞检测及其临床意义

闫继慈 郑新宇

乳腺癌已被证实是一种全身性的疾病,其发展早期即可出现远处播散和转移,血液中检测出肿瘤细胞即是重要证据。而肿瘤细胞进入外周血即是肿瘤远处转移的前提,是肿瘤转移的主要途径之一。在外周血中检测到肿瘤细胞提示存在肿瘤微转移并有可能进一步发展为远处转移。随着循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)检测技术的敏感性和特异性不断提高,其在外周血中的含量与乳腺癌的诊断、治疗和预后有密切的关系,这一点已被大多数研究者所证实。本文简要综述了目前对乳腺癌患者的 CTCs 检测方法以及其对临床的指导意义,并对其临床运用前景进行了展望。

1 CTCs 的概念与作用机制

早在 1896 年, Ashworth^[1] 在 1 例因癌症死亡的患者外周血中发现了类似肿瘤细胞,并提出了 CTCs 的概念。有研究发现,随着原发肿瘤细胞的不断增殖,部分细胞通过上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)过程发生了表型转化,导致 E2 钙黏素等下降,造成细胞间以及细胞与周围基质间相互附着能力的降低或消失,细胞从肿瘤母体脱离并降解,逐渐浸润周围组织,从而进入外周血液循环^[2]。CTCs 进入外周血液 24 h 后只有不到 0.1% 的 CTCs 仍然具有活性,而最终具有形成转移灶能力的 CTCs 却不足 0.01%,并非所有体内检测到 CTCs 的肿瘤患者均有复发或转移,这可能与机体的免疫防御机制相关,也可能与 CTCs 的休眠特性或异质性相关^[3]。CTCs 通常能到达多个组织和/或器官,然而其定居和播种形成微转移却不是随意的,在与其所处的微环境相互协调的过程中,CTCs 会选择特异的组织或器官

形成转移灶。有些无腋窝淋巴结转移的乳腺癌患者可能在治疗后几年内发生复发和转移,这提示了肿瘤细胞可绕过淋巴途径直接进入血液循环中,复发和转移很可能是由已经存在却未被检出的 CTCs 造成的。一些诊疗操作如手术,穿刺针活组织检查(简称活检)等也可以使肿瘤细胞进入外周血液循环。Mori 等^[4]检测了 13 例乳腺癌患者手术前后的外周血中 CTCs 癌胚抗原(carcino embryonic antigen, CEA)mRNA,发现 3 例术前阴性的患者术后转为阳性。Hu 等^[5]发现细针穿刺抽吸细胞性活组织检查也可以导致肿瘤细胞播散入外周血。目前将这些自发或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血液循环的肿瘤细胞定义为循环肿瘤细胞。

2 CTCs 的检测方法

与淋巴结、骨髓相比,外周血标本易获得、创伤性小、可反复采集、患者易于接受,因此外周血是临床上常规检测较为理想的标本^[6]。由于 CTCs 在外周血中存在数量极少,为了提高 CTCs 的检出率,目前采用的检测技术通常先富集分离 CTCs,然后再对其进行识别和确认。

2.1 富集和分离 CTCs

2.1.1 免疫磁性分离技术(immunomagnetic separation, IMS):该方法的基本原理是采用一种既能被磁铁所吸引,又能结合抗体载体的免疫磁珠。磁珠上的抗体与含有特异性抗原的细胞结合并形成细胞抗原-抗体-磁珠免疫复合物,在磁力的作用下发生移动,使复合物与其他物质分离,以此达到分离特异性细胞的目的^[7]。此方法是目前特异性和富集率相对最高的细胞富集方法,它不仅提高了检测的敏感度,还提高了外周血样本中肿瘤细胞的浓度。此方法反应结合时间很短,简单易行,可将免疫分离与富集的过程相结合,不仅不会影响细胞的生物活性,也不会改变细胞的基因表达。但是,目前仍未发现高特异性的肿瘤相

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2013.06.009

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院乳腺外科(闫继慈,郑新宇),中国医科大学肿瘤研究所乳腺癌研究室(郑新宇)

通信作者:郑新宇, Email:xyzheng@mail.cmu.edu.cn

关抗原,富集过程中仍然会造成 CTCs 的丢失,并出现假阴性或假阳性的结果。

2.1.2 密度梯度离心法:该方法是根据血液中不同细胞的密度不同予以分离。优点是细胞回收率高,且对设备要求不高,方法简单,经济实用^[8]。但该方法缺乏特异性,可能会丢失部分肿瘤细胞。其敏感度较低且依赖于肿瘤细胞的特性、离心时间、温度等多种因素。

2.1.3 滤过法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET):该方法是根据肿瘤细胞的体积普遍大于外周血中的粒细胞,通过膜滤过从而使肿瘤细胞与外周血中的粒细胞分离^[9]。该方法具有敏感性、表面的各种抗原或分子标记均无破坏、不影响细胞特性、细胞形态保存较完整、过程易于掌握、设备技术要求不高等优点。但由于同种细胞具有异质性,CTCs 大小并不完全一致,所以不能富集出所有的肿瘤细胞。

2.2 识别和确认 CTCs

2.2.1 免疫细胞化学方法(immunocytochemistry, ICC):乳腺癌是上皮来源性的恶性肿瘤,其细胞的生物学特征亦具上皮性。而外周血细胞不表达上皮源性的抗原。该检测方法的基本原理是抗原与抗体的结合反应。目前较常用的肿瘤标志物有:(1)上皮细胞膜特异性抗原,如人上皮细胞抗原(human epithelial antigen, HEA)-125;(2)HER-2;(3)肿瘤相关糖蛋白(tumor associated glycoprotein, TAG),如 TAG-12;(4)CK,如 CK19 等。其中 CK 被认为是特异性较高的指标并被广泛应用^[10]。但有文献报道,CTCs 会经历 EMT,其中 CK 表达就会下调,检测时有些 CTCs 甚至可能会呈现 CK 阴性^[11]。但由于 CTCs 并不表达白细胞的共同抗原 CD45,所以可采用 CD45(-)和 CK(+)双标记来提高 ICC 的特异性。目前,为了提高检测的敏感度和特异性,可采用多种标记物联合检测 CTCs。ICC 的优点是可以对 CTCs 进行形态学分析,直观简单;缺点是 CTCs 表面抗原表达不一致、部分淋巴细胞的交叉反应等会影响检测的敏感度和特异性,对结果的判定亦有较强的主观性。但目前 ICC 仍是评价 CTCs 检测方法的金标准^[10]。

2.2.2 上皮细胞免疫斑点法(epithelial immunospot, EPISPOT):该方法是通过检测细胞分泌或被激活所释放的特异性蛋白来鉴定蛋白分泌型细胞(protein-secreting cell, SC),即活性 CTCs。目前常采用黏蛋白 1(mucin 1, MUC1)和 CK19 共同作

为检测乳腺癌 CTCs 的标志物,用 EPISPOT 检测转移性乳腺癌(metastatic breast cancer, MBC)患者中 CTCs 分泌的 MUC1,结果发现所有被检者的结果均为阳性,而健康人群中却无法检测得到^[11]。EPISPOT 不但具有较高的检测敏感度和特异性,还可检测出活性 CTCs,为研究 CTCs 的生物学功能提供了技术基础。

2.2.3 生物芯片技术:该方法是利用每张芯片含有 78 000 个微位点,每个微位点均被上皮特异性黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体所包被,从而使 EpCAM 阳性的细胞结合到微位点上,最后在镜下根据细胞所表现的活力、形态学特征及表面肿瘤标记物来确认。该方法用 CK 和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)阳性且 CD45 阴性进行选择,从而使 CTCs 检测敏感度提高,在每例患者中至少可检测到 1 个 CTC^[12]。该方法具有极高的敏感度、特异性和可重复性,是一种非常高效的方法^[13]。

2.2.4 RT-PCR:该方法是利用组织或肿瘤表达特异性的 mRNA,或某些基因改变后 RNA 水平异常的原理。这些 mRNA 标志物通常不表达于外周血细胞,半衰期较短,RNA 酶会在细胞死亡后迅速地把它们降解。因此在外周血中检测到特异性的 mRNA 间接提示了 CTCs 存在。最常用于乳腺癌外周血 CTCs 检测的标志物为:CK19、CK20、人乳腺珠蛋白(human mamoglobin, Hmam)。该方法具有高灵敏度、高效率、高特异性、快捷、简便、稳定等优点。缺点是细胞已经被破坏,无法对其进行计数和形态学观察等。目前仍未找到乳腺癌细胞的特异性标志物。为提高 CTCs 检测方法的敏感度和特异性,通常联合采用不同的标志物^[14]。取样时上皮细胞受到污染,肿瘤标志物在外周血异常表达等原因可导致假阳性的结果,这是目前其临床应用的障碍。

2.2.5 流式细胞技术(flow cytometry, FCM):该方法是运用被荧光物标记的单克隆抗体与肿瘤细胞表面的特异性标志物相结合,肿瘤细胞染色后,用流式细胞仪对其进行测量分析。Wang 等^[15]用 EpCAM 和 CD44 共同标志物来检测 CTCs,证实 FCM 的特异性高于 PCR。

2.2.6 激光扫描细胞计量技术(laser scanning cytometry, LSC):LSC 兼备流式细胞仪和图像细胞仪的功能,能连续扫描荧光显微镜下图像并自动分析数据。由于背景等原因不适用于 FCM 的

样本可用 LSC 进行细胞的定量检测。LSC 能通过目镜直接地观察细胞及核形态,不仅具有高放大倍数、高分辨率、高敏感度的特性,还可对细胞内微细结构进行定量、定性和定位分析。

2.2.7 CellSearch 系统:是目前唯一被 FDA 批准应用于 CTCs 检测的系统,采用 EpCAM 抗体磁珠来富集 CTCs,再把具有肿瘤细胞学形态特征且 DAPI(+)、CK(+) 和 CD45(-) 的细胞定义为 CTC。该系统具有较高的仪器间吻合度、批内批间分析精确度、敏感度、特异性和可重复性等优点,且细胞回收率平均可达 80% 以上^[16]。该系统目前在对乳腺癌患者的临床研究中广泛应用^[17],但由于 normal-like 型乳腺癌细胞表面并不表达 EpCAM 抗原,所以该系统不能识别该型乳腺癌细胞^[18]。

目前,CTCs 的检测方法很多,但均采用不同的富集和识别方法相互结合,如 ISET 联合 LSC,IMS 联合 ICC,LSC 联合 IMS 等。Racila 等^[19]运用 IMS、FCM、ICC 相联合的方法检测乳腺癌患者的 CTCs,却发现部分已有转移灶的患者 CTCs 阳性率却很低。造成各种检查结果差异很大的原因有:(1)实验原理的不同而结果变化很大^[20-21];(2)检测方法本身的局限性,有出现假阴性和假阳性结果的可能;(3)CTCs 的释放规律尚不可知(其释放可能是间歇性的),CTCs 常常成群分布,单一时间点的检测可能产生偏倚^[20-22]。目前仍未发现乳腺癌绝对特异性的标志物,国内外学者正在探索并努力寻找灵敏度和特异性更高的检测手段。

3 CTCs 的临床意义

近年来发现 CTCs 检测在乳腺癌的诊断、治疗、疗效评估及提示预后等多方面具有重要的临床意义。对于乳腺癌 CTCs 的研究主要集中在以下几方面。

3.1 CTCs 与诊断

乳腺癌是全身性疾病,甚至在早期时肿瘤细胞即可扩散到全身^[23]。因此检测 CTCs 亦有助于乳腺癌的早期诊断。Biggers 等^[24]检测了 41 例早期乳腺癌患者,其中 10 例(24.4%) 在术前已可检测到 CTCs。乳腺 X 线、MRI 等影像学检查在发现病灶时大多数患者已处于疾病的进展期或晚期。Lobodasch 等^[25]研究显示定期监测 CTCs 的数量,可比临床提前 5 个月或更长时间诊断肿瘤的复发,这就提供了足够时间去追加治疗从而控制复

发。Budd 等^[26]在对 138 例转移性乳腺癌患者治疗前后影像学和外周血中 CTCs 变化的研究中发现,经过中位 10 周的随访,在影像学无进展的患者中,每 7.5 ml 血中有 5 个或以上 CTCs 的患者 3 例(9%),少于 5 个的 83 例(63%),其中位 OS 更低(15.3 个月比 26.9 个月, $P=0.0389$);在影像学存在进展的患者中,每 7.5 ml 血中有 5 个或以上 CTCs 的患者比 CTCs 少于 5 个的患者中位 OS 要低(6.6 个月比 19.9 个月, $P=0.0039$);CTCs 检测比影像学有更小的变异度。De Giorgi 等^[27]研究发现,在复发和进展期的转移性乳腺癌患者中,骨转移者出现较高的 CTCs,且多发骨转移比仅有 1~2 个病灶的患者外周血 CTCs 数目要多。

3.2 CTCs 与临床分期

虽然在乳腺癌的早期就可检测出 CTCs,但 CTCs 的存在并不意味着一定有转移。Mikhitarian 等^[28]对 215 例 T₁~T₃ 期乳腺癌患者外周血样本用联合多种标志物的方法检测 CTCs,发现 CTCs 的升高与肿瘤组织学分级具有相关性。蔡清清等^[29]也通过检测 52 名乳腺癌患者及 20 名健康女性外周血 CK8/18 阳性的肿瘤细胞,表明乳腺癌患者外周血中 CTCs 与临床分期及腋窝淋巴结状况呈正相关。这些研究表明,CTCs 的状态与肿瘤分期有一定的相关性。虽然 CTCs 水平检测目前尚未应用于 TNM 分期中,但其很有可能成为 TNM 分期系统的有益补充,从而对病情的评估更加准确,使患者得到适当的治疗。

3.3 CTCs 用于疗效评估

临床上大多数乳腺癌患者因为术后没有可测量病灶,所以无法对这部分患者进行辅助治疗效果的评估,然而 CTCs 检测的出现为评估这一部分患者的病情及疾病进展情况提供了新的方法和指标。Nole 等^[30]研究发现,与治疗前 CTCs 水平相比,在治疗后检测到每 7.5 ml 血中 CTCs ≥ 5 个的患者,其疾病进展率是治疗前后检测每 7.5 ml 血中 CTCs 均少于 5 个的患者的 5 倍,提示这部分患者的治疗效果不佳或无效。若能及时地更改治疗方案,可使患者及早接受有效的治疗,减少不良反应和经济负担。Hartkopf 等^[31]检测了 58 例转移性乳腺癌患者 3 个周期化疗前后的 CTCs 变化,结果显示 CTCs 的变化与血清 CA153 变化相关($P=0.017$),与影像学 RECIST 标准的改变一致($P<0.001$),治疗后 CTCs 下降的患者比升高者生存明显延长[(17.67 \pm 5.90) 月比 (4.53 \pm 0.54) 月,

$P < 0.001$],提示 CTCs 对评估患者治疗有一定的价值。Pachmann 等^[32]研究显示新辅助化疗前后 CTCs 数量的下降与患者肿块的缩小成正相关。Riethdorf 等^[17]研究显示,新辅助化疗前每 7.5 ml 血中有 1 个以上 CTCs 的患者为 46 例(46/216, 21.6%),新辅助化疗后下降为 22 例(22/207, 10.6%);20 例(15.0%)经新辅助治疗后由最初的 CTCs 阳性转为阴性,11 例(8.3%)之前检测为阴性新辅助治疗后转为阳性。Smerage 等^[33]研究显示,新辅助化疗后未检测到 CTCs 的患者均达到病理完全缓解;仍有 CTCs 存在的患者在术中可发现癌肿内有残余的病灶,提示了 CTCs 有助于准确评估新辅助化疗疗效。CTCs 在化疗前后有明显的变化,可通过监测化疗期间 CTCs 的变化来判断患者对化疗方案的敏感性。

3.4 CTCs 与靶向治疗

乳腺癌的内分泌及靶向治疗方案选择主要依据原发肿瘤组织的 ER、PR 和 HER-2 等状态,未曾考虑过 CTCs 的状况。Shaw 等^[34]已经证实了 CTCs 起源于原发肿瘤,但原发肿瘤细胞与 CTCs 的受体状态并非总是一致^[35],这也很可能是辅助治疗方案目前难以达到理想效果的原因。Fehm 等^[36]用血清 HER-2 水平和 CTCs 来测定原发肿瘤 HER-2 状态不详或阴性的 77 例复发的乳腺癌患者 HER-2 的状态,其中 23 例至少用一种方法检测出 HER-2 阳性,而对 23 例患者中 CTCs 阳性的患者使用曲妥珠单抗抗体仍可取得疗效,使本来无法应用 HER-2 靶向治疗的患者可以得到有效的治疗机会。研究还显示,可根据乳腺癌患者 CTCs 表面分子特征选择适当的靶向治疗,并通过 CTCs 数量的检测判断疗效,如根据 CTCs 是否表达 EGFR 选择是否应用抗 EGFR 的靶向治疗^[37];也可用于对以肿瘤疫苗为基础的免疫治疗的疗效监测^[38];根据 HER-2 阳性患者 CTCs 的数量变化判断 HER-2 疫苗的治疗效果等^[39]。Xenidis 等^[40]应用 RT-PCR 技术检测 119 例激素受体阳性且正服用他莫昔芬的患者外周血 CTCs。22 例(18.5%)患者在完成辅助化疗后检测到 CTCs,其中 15 例(68.2%)服用他莫昔芬治疗后不能清除 CTCs [119 例患者中 15 例(12.6%)持续阳性]。119 例患者中有 68 例(57.1%)患者在随访中 CTCs 持续阴性。持续检测到 CTCs 可以独立的预测 DFS 和 OS 变短。因此,在辅助他莫昔芬治疗中,如果持续检测到 CTCs,应该考虑调

整为芳香化酶抑制剂。目前乳腺癌治疗方案的制定主要依靠原发瘤的分子生物学特征,但在肿瘤疾病治疗的过程中可能会发生细胞基因型及表型的改变,从而出现治疗抵抗。所以 CTCs 的基因型及表型及计数可使临床医师制定更好的治疗方案。

3.5 CTCs 与预后评价

Lucci 等^[41]研究表明 CTCs 可提示早期乳腺癌的预后。术前随机抽取 302 例样本,其中 73 例(24%)患者每 7.5 ml 血中有 1 个或 1 个以上 CTCs,这些患者 DFS 和 OS 都相对较短。Xenidis 等^[42]用 RT-PCR 方法检测 437 例早期乳腺癌患者辅助化疗后 CTCs 的情况。辅助化疗后检测到 CTCs 阳性与 3 枚以上腋窝淋巴结阳性相关;辅助化疗后 CTCs 仍为阳性的患者其临床复发和疾病相关死亡明显增高,而 DFS 和 OS 则明显变短;因而可以认为检测到 CTCs 是 DFS 和 OS 降低的一个独立预测因素。Lobodasch 等^[25]应用激光扫描荧光纤维测定法检测 25 例早期无转移且进行化疗的乳腺癌患者的 CTCs 水平,其中 19 例 CTCs 下降或没有变化的患者没有复发,然而 6 例 CTCs 数目上升的患者中 1 例局部复发,5 例出现了远处转移;这表明了动态观察 CTCs 的变化可以预见疾病的结果。在一项对 76 例进展期乳腺癌患者的研究中,检测 HER-2 阳性细胞的患者比未检测到 CTCs 或 HER-2 阴性细胞的患者有更短的 PFS^[43]。Weissenstein 等^[21]在一项对 59 例转移性乳腺癌的研究中证实了 CTCs 对于预后的重要意义。每 7.5 ml 血中 CTCs < 5 个和 ≥ 5 个的患者的中位无进展生存时间分别为 > 100 周和 60 周($P = 0.0002$)。Pierga 等^[44]共检测 118 例乳腺癌患者新辅助化疗前后的 CTCs 状态,发现新辅助化疗前和/或后检出 CTCs 的患者比新辅助化疗前后均未检出 CTCs 的患者的无远处转移生存率显著降低(中位随访时间 18 个月)。

4 问题与展望

近年来,外周血 CTCs 检测已成为一种具有高度可行性和可重复性的信息含量高的非侵入性的新型诊断方法。但同时也存在一些问题:首先,目前多采用上皮特异性抗原来替代肿瘤细胞特异性抗原,为了提高检测手段的敏感性和特异性,需要寻找更合适的肿瘤细胞标志物;其次,尽管每个患者抽取的外周血容积相同,但却应用了不同的检测方法及不同的上皮肿瘤细胞标志物;再次,若肿

瘤细胞在静息休眠期,也无法在外周血中检测到转移细胞,所以无论哪一种检测方法,都会存在假阳性或假阴性的问题;最后,检测手段尚未形成国际标准,很难将这些研究结果进行横向比较。随着对 CTCs 研究的深入,CTCs 可以辅助肿瘤早期诊断,并提供影像学诊断无法明确的病例以更多的诊断信息,实时监测治疗效果,从而对患者的治疗方案做出准确评估,早期发现肿瘤复发转移,判断肿瘤预后。通过对 CTCs 的分子学和功能分析,可以提高对肿瘤的侵袭、转移部位、免疫逃避及化疗耐药等机制的了解;CTCs 同原发肿瘤具有明显差异表达的分子谱^[45],可以发现肿瘤治疗的新靶点,有效抑制肿瘤转移。CTCs 比原发癌在化疗药及生物靶向治疗药的敏感性上更方便得到验证;分析 CTCs 的受体状态可为辅助治疗的选择提供更多的依据;更有利于患者的个体化治疗。因此,在未来乳腺癌的综合治疗中将更多的考虑 CTCs 的存在及其自身特性。检测乳腺癌患者外周血 CTCs 有着良好的应用前景。随着这一研究领域的不断发展,必将催生新的诊疗手段,建立更加及时、完善、有效的个体化治疗方案,从而降低乳腺癌患者复发转移率,延长生存期,提高生活质量。

【关键词】 乳腺肿瘤; 肿瘤细胞,循环

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

参考文献

- [1] Asworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death[J]. Aust Med J, 1869, 14:146-149.
- [2] Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions[J]. Cancer Lett, 2007, 253(2):180-204.
- [3] 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.
- [4] Mori M, Mimori K, Ueo H, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease[J]. Int J Cancer, 1996, 68(6):739-743.
- [5] Hu XC, Chow LW. Fine needle aspiration may shed breast cells into peripheral blood as determined by RT-PCR[J]. Oncology, 2000, 59(3):217-222.
- [6] Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells; finding the needle in the haystack[J]. Am J Cancer Res, 2011, 1(6):740-751.
- [7] Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer[J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(6):617-627.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Lalle M, De Rosa L, Marzetti L, et al. Detection of breast cancer cells in the bone marrow or peripheral blood: methods and prognostic significance[J]. Tumori, 2000, 86(3):183-190.
- [11] Alix-Panabières C, Vendrell JP, Pellé O, et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients[J]. Clin Chem, 2007, 53(3):537-539.
- [12] 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.
- [13] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4):366-377.
- [14] 郑建,李丽. 循环肿瘤细胞在乳腺癌中的研究现状[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(6):1158-1162.
- [15] Wang N, Shi L, Li H, et al. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation[J]. Tumour Biol, 2012, 33(2):561-569.
- [16] 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.
- [17] Riethdorf S, Müller V, Zhang L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(9):2634-2645.
- [18] Chong MH, Zhao Y, Wang J, et al. The dynamic change of circulating tumour cells in patients with operable breast cancer before and after chemotherapy based on a multimarker QPCR platform[J]. Br J Cancer, 2012, 106(10):1605-1610.
- [19] Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(8):4589-4594.
- [20] Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells[J]. Anticancer Res, 2011, 31(2):427-441.
- [21] Weissenstein U, Schumann A, Reif M, et al. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies[J]. BMC Cancer, 2012, 12:206.
- [22] Xu W, Cao L, Chen L, et al. Isolation of circulating tumor

- cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy [J]. Clin Cancer Res, 2011, 7(11): 3783-3793.
- [23] Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(1): 58-68.
- [24] Biggers B, Knox S, Grant M, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for primary breast cancer: preliminary results of a pilot study[J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(4): 969-971.
- [25] Lobodasch K, Frohlich F, Rengsberger M, et al. Quantification of circulating tumour cells for the monitoring of adjuvant therapy in breast cancer: an increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse[J]. Breast, 2007, 16(2): 211-218.
- [26] Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6403-6409.
- [27] De Giorgi U, Valero V, Rohren E, et al. Circulating tumor cells and bone metastases as detected by FDG-PET/CT in patients with metastatic breast cancer[J]. Ann Oncol, 2010, 21(1): 33-39.
- [28] Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, et al. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 55.
- [29] 蔡清清, 黄慧强, 林天歆, 等. 乳腺癌患者外周血中循环癌细胞的检测及其临床意义[J]. 癌症, 2005, 24(7): 5.
- [30] Nole F, Munzone E, Zorzino L, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications[J]. Ann Oncol, 2008, 19(5): 891-897.
- [31] Hartkopf AD, Wagner P, Wallwiener D, et al. Changing levels of circulating tumor cells in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer[J]. Anticancer Res, 2011, 31(3): 979-984.
- [32] Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, et al. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring[J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(6): R975-R979.
- [33] Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer[J]. Br J Cancer, 2006, 94(1): 8-12.
- [34] Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy[J]. Genome Res, 2012, 22(2): 220-231.
- [35] Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(3): R71.
- [36] Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, et al. Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status[J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(5): R74.
- [37] Payne RE, Yague E, Slade MJ, et al. Measurements of EGFR expression on circulating tumor cells are reproducible over time in metastatic breast cancer patients[J]. Pharmacogenomics, 2009, 10(1): 51-57.
- [38] Stojadinovic A, Mittendorf EA, Holmes JP, et al. Quantification and phenotypic characterization of circulating tumor cells for monitoring response to a preventive HER2/neu vaccine-based immunotherapy for breast cancer: a pilot study[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(12): 3359-3368.
- [39] Gates JD, Benavides LC, Stojadinovic A, et al. Monitoring circulating tumor cells in cancer vaccine trials[J]. Hum Vaccin, 2008, 4(5): 389-392.
- [40] Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, et al. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer[J]. Ann Oncol, 2007, 18(10): 1623-1631.
- [41] Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(7): 688-695.
- [42] 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.
- [43] Munzone E, Nole F, Goldhirsch A, et al. Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2010, 10(5): 392-397.
- [44] 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.
- [45] Wang J, Cao MG, You CZ, et al. A preliminary investigation of the relationship between circulating tumor cells and cancer stem cells in patients with breast cancer[J]. Cell Mol Biol, 2012, 58 (Suppl): 1641-1645.

(收稿日期: 2012-12-19)

(本文编辑: 刘军兰)