

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00313

循环肿瘤细胞分离与检测

曹璐,徐文,殷正丰*

第二军医大学东方肝胆外科研究所分子肿瘤实验室,上海 200438

[摘要] 肿瘤播散是造成肿瘤相关死亡的主要原因,而肿瘤细胞自发循环导致肿瘤远处转移。因此,特异、敏感地检测循环肿瘤细胞非常重要,不仅能够更加准确地评估肿瘤患者的预后,还有利于制定个性化治疗方案。本文就循环肿瘤细胞的富集、分离、检测和分析方法作一综述。

[关键词] 肿瘤循环细胞;分离;检测

[中图分类号] R 73-37 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0313-04

Isolation and detection of circulating tumor cells: recent progress

CAO Lu, XU Wen, YIN Zheng-feng*

Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] Disseminated malignancy is the main cause of cancer-related death. The spontaneous circulation of tumor cells is responsible for distant metastasis; therefore it is of potential importance to specifically and sensitively detect the circulating tumor cells, which not only allows for more accurate prediction of cancer prognosis, but also helps to tailor individualized anticancer treatment. This paper reviews the enrichment, detection and analyzing methods of circulating tumor cells.

[Key words] neoplasms circulating cells; isolation; detection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3): 313-316]

根据肿瘤细胞转移的途径,在血液或淋巴管中循环的肿瘤细胞被定义为循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC),而其中若干细胞聚集形成的细胞团块被称为循环肿瘤微栓(circulating tumor microemboli, CTM)。CTM是肿瘤细胞的“集体迁移”行为,因其能够抵抗细胞凋亡、保持细胞增殖能力而具有更高的转移潜能^[1]。由于循环肿瘤细胞含量非常少以及缺乏有效的特异性标志物,有关CTC的研究进展比较缓慢。现有的分离、检测技术方法各有利弊,至今尚未有一个统一的实验方案和标准。

1 CTC富集方法

CTC在外周血中的含量极少,每10 ml血液中可能仅含少数几个CTC或CTM,而10 ml血液则含有大约1亿个白细胞和500亿个红细胞。因此,只有首先对临床血样中的CTC进行富集,然后才能进行检测和生物学性质与基因分析。现有的富集方法通常是基于CTC的物理性质(密度和大小)或免疫磁性。

1.1 梯度密度离心法 即依据不同类型细胞沉降系数不同

而进行分离。将全血直接平铺于Ficoll(瑞典Amersham公司)、Lymphoprep(挪威Nycomed公司)或其他密度梯度液上。离心后,各个成分被分层分离,由下至上依次是红细胞、中性粒细胞、密度梯度液和单个核细胞(包括淋巴细胞、单核细胞、上皮细胞和肿瘤细胞),最上层是血浆。由于肿瘤细胞可能会移入血浆组分,而且如果不能立即离心会影响各类细胞的分层效果,于是产生了新的改进技术——OncoQuick(德国Greiner公司),即一个内置一层多孔膜屏障的50 ml离心管,密度梯度液置于膜下。15~35 ml全血被平铺于多孔膜上,通过离心将肿瘤细胞、上皮细胞、血小板和小部分白细胞与其他细胞分离。肿瘤细胞掺杂实验显示,与Ficoll相比,OncoQuick能更好地富集肿瘤细胞,使后续实验(如细胞染色、免疫标记和分子生物学研究等)相对简单^[2]。虽然OncoQuick可避免离心前全血与密度梯度液混合,但是与其他梯度密度离心方法一样,其敏感性较低,不仅容易造成肿瘤细胞丢失^[2-3],而且如果血液抗凝不完全,微小凝块则可能使肿瘤细胞落至梯度密度液的底部。

1.2 过滤法 2000年Vona等^[4-5]报道了一种依据细胞大

[收稿日期] 2009-07-15 **[接受日期]** 2009-11-27

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(“863”计划,2007AA02Z461),国家科技重大专项(2008ZX10002-021),国家自然科学基金(30672002,30772513), Supported by National High-tech R&D Program (“863”Program, 2007AA02Z461), National Science & Technology Major Projects (2008ZX10002-021), and National Natural Science Foundation of China(30672002,30772513).

[作者简介] 曹璐,硕士生, E-mail: caolu0909@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875351, E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

小,通过过滤直接富集上皮性肿瘤细胞的方法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET)。8 μm 孔径的聚碳酸酯膜可使较小的淋巴细胞和中性粒细胞通过,而较大的肿瘤细胞则被阻滞在膜上。该方法不仅操作简单,而且比较敏感,可避免烦琐的多步骤分离造成的稀少细胞的破坏和丢失。重复性实验显示,ISET 可从 1 ml 血中将掺入的 1 个肿瘤细胞分离出来^[6]。具有高转移潜能的 CTM 也能被富集和计数。富集到的细胞可进行细胞学染色,或通过免疫标记、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、TUNEL 等方法分析其抗原、非整倍性和细胞凋亡等。在进行激光显微切割后,还可对 CTC 或 CTM 进行分子水平的分析^[4]。例如 Pinzani 等^[6]在 ISET 富集、显微切割之后,研究了肿瘤细胞中 HER-2 DNA 扩增产物。

1.3 免疫磁性分离法 这是目前最为常用的 CTC 富集方法,甚至已有 FDA 批准上市的专业产品 CellSearch™ System(Veridex)。针对上皮细胞抗原 EpCAM、BerEP4、CK 或器官特异性标志物(如 mammoglobin、PSA、CEA 和 HER-2)的抗体通常被用来分离 CTC,富集效率可达 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 倍^[7]。为了进一步降低血细胞含量,提高富集效率,可以将阴性分选与阳性分选相结合。阴性分选采用的标志物通常是白细胞表达的 CD45 或巨噬细胞、血小板表达的 CD61。另外,为了提高 CTC 富集的特异性,最近的研究倾向于将物理分离方法和免疫磁性分离方法相结合。例如, Morgan 等^[8]先用 Ficoll-Hypaque 离心分离,接着进行免疫磁性阳性、阴性分选,最后在荧光染色的基础上用显微操作技术收集高效富集的前列腺肿瘤细胞。免疫磁性分离法效率高,且在整个过程中可避免细胞溶解,使目的细胞的计数成为可能。但其费用较高;并且由于尚无针对 CTC 的特异性抗原,目前采用的抗体会造成假阳性或假阴性结果。上皮细胞特异性抗体不仅能特异性标记非肿瘤上皮细胞,还有可能非特异性标记非上皮性非肿瘤细胞(如白细胞),因此会产生假阳性结果。正常对照中 CK 阳性细胞的比例为 $0 \sim 20\%$ ^[3,9],其中大多是白细胞。在无恶性肿瘤的受试者外周血中可以检测到数量不等的上皮细胞^[3],这与受试者的良性上皮细胞增殖性疾病、炎症、组织创伤和手术干预以及采血操作有关^[9-10]。器官特异性抗体也有同样的弊端,因为并不是所有肿瘤细胞都表达这些抗原,所以会造成假阴性结果。实际上,现有抗体没有一个具有 100% 肿瘤或组织特异性^[9]。

造成 CTC 丢失还有另外一个重要原因,那就是上皮-间质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT),即恶性肿瘤细胞为了获得运动性和侵袭性丢失了某些上皮细胞的表型,获得了某些间充质细胞的形态学和基因型特征。多数恶性肿瘤细胞在脱离原发灶、侵袭远处器官过程中发生 EMT,丢失了上皮抗原。这意味着以上皮细胞为靶细胞的检测方法很容易漏掉那些最具有侵袭能力的肿瘤细胞。研究发现^[11],在不同组织类型的 134 例肿瘤中,仅 70% 表达 EpCAM。Fehm 等^[12]发现,乳腺癌患者血液中 CK 阴性的非整倍体细胞(缺少上皮抗原的肿瘤细胞)数量多于 CK 阳性细胞。进一步的研究发现,CK8、CK18 和 CK19 在来源于播散肿瘤细胞的细胞系中表达缺失^[13]。此外,免疫磁性分离法

无法用来检测 CTM,因为多步细胞标记和处理会使细胞团块离散。

2 CTC 检测方法

2.1 免疫学检测法 CellSearch 是一种基于免疫学的检测方法,已被 FDA 批准用于预测乳腺癌患者的生存期。基本流程是:用 EpCAM 抗体磁珠对上皮细胞进行富集后,将细胞通透、固定,用 DAPI 荧光核染料、CD45 荧光抗体和 CK8、CK18 以及 CK19 荧光抗体标记细胞,然后采用半自动四色荧光显微镜 Cell-Spotter® Analyzer 进行分析,检测 CK 阳性、CD45 阴性的上皮细胞。CellSearch 是一个半自动化检测过程,可以减少人为因素造成的误差,还可以对获得的超过一定数目的 CTC 进行分子生物学研究,因此具有大规模临床应用的潜能。2008 年,一项针对 1 500 例乳腺癌患者的临床试验发现,在化疗前 10% 患者每 7.5 ml 外周血中含有 1 个以上 CTC,在治疗后这部分患者仍有 10% CTC 阳性^[14]。与其他免疫磁性富集 CTC 所遇到的问题一样,免疫组织化学所选择的 CTC 标志物依然是争论的焦点。CellSearch 法涉及的 EpCAM、CK8、CK18 和 CK19 抗体都是上皮细胞特异性的。如前所述,由于外周血中存在一定数量的非肿瘤性上皮细胞(循环上皮细胞),加上大多数恶性 CTC 由于 EMT 丢失了上皮抗原而无法被检测到,当 CTC 计数用于评估肿瘤对治疗的反应、肿瘤复发风险以及肿瘤筛查时,这些问题就显得特别重要。

2.2 基于 RT-PCR 检测法 即通过分析上皮细胞或肿瘤细胞的正常起源组织特异的候选基因的表达来检测 CTC。其灵敏度非常高,一般可在 $10^6 \sim 10^7$ 个正常细胞中检出 1 个目标细胞,大约相当于在 0.1~1 ml 血液中检出 1 个细胞。但是该法的一个重要局限是 CTC 被破坏而无法计数,同时也不能对单个肿瘤细胞进行观察、分析。另一个局限是难以选择 RNA 标志物。鉴于其灵敏度很高,RNA 标志物的选择及阴性对照的设置就显得尤为重要。理想的标志 RNA 应有如下特点:在该类型肿瘤的所有肿瘤细胞中均表达,而在外周血白细胞和非肿瘤上皮细胞中完全不表达,也不发生非法转录(illegitimate transcription)^[15](低水平、非特异性转录,如白蛋白在淋巴细胞中表达^[16])。如果采用上皮细胞表达分子基因如 CK 基因作为目标基因,假如血液中存在非肿瘤循环上皮细胞,那么就可能出现假阳性。有研究发现,CK19 mRNA 存在于 3.7% 的健康人以及 14.3% 的恶性血液病患者血液中,健康人血液中 CK19 的检出归因于外周血白细胞非法转录 CK19 基因^[17],或可诱导组织特异性基因转录的细胞因子的分泌增加^[15]。CK20 也有相似情形。器官特异性标志基因如前列腺特异抗原 PSA/KLK3,在所有的前列腺细胞中表达。因此,如果因炎症、侵入性诊断操作(如活检)或手术导致非肿瘤前列腺细胞进入血液,就会出现假阳性结果。肿瘤特异性标志物也可能在非肿瘤细胞中表达。例如,甲胎蛋白在肝脏来源的非肿瘤细胞中表达,癌胚抗原转录产物在健康志愿者和炎性肠病患者血液中也检测到,而 HER-2 mRNA 则出现在 10% 健康女性和大多数健康志愿者血液样本中^[18]。部分解决的方案是将多个标志物联合起来

进行检测。Shen 等^[19]用 Survivin、hTERT 和 hMAM 3 个标志物检测乳腺癌患者 CTC,提高了平行测验的灵敏度和系列测验的特异性。由 CK20、CK19、CEA、GCC 4 个基因组成的分子谱可以识别 87.7% 肿瘤转移,假阳性率仅有 2.2%^[20]。

2.3 酶联免疫斑点技术 免疫细胞化学法和 RT-PCR 法存在一个共同的缺陷:不能区分活细胞和凋亡细胞。酶联免疫斑点(enzyme-linked immunospot, ELISPOT)是一种在单细胞水平检测细胞分泌蛋白的免疫学技术。而在此基础上特别设计的 EPISPOT(epithelial immunospot)则被用来研究循环上皮细胞。应用 EPISPOT 检测到的细胞均是有活力和有功能的 CTC,所得数据更加准确、可信,且有实际意义。以 MUC-1 和 CK19 作为标识蛋白检测乳腺癌 CTC,发现分泌 MUC-1 的 CTC 存在于所有受试乳腺癌转移患者中,但不存在于正常对照中^[21]。

2.4 CTC 芯片技术 近年报道了一种基于微流体学的 CTC 检测技术,称 CTC 芯片(CTC-Chip)。CTC 芯片是一张与标准载玻片尺寸相同的硅片,上面排列了 78 000 个蚀刻特殊几何图案的固相支持物,支持物上包被了 EpCAM 抗体。受检全血在空气的推力作用下与 CTC 芯片表面紧致排列的支持物最大化接触,其中被 EpCAM 抗体高效捕获的细胞被确认为 CTC(通过免疫染色区分是上皮性细胞还是非特异性结合的白细胞),然后可以计数,或用分子特征鉴定的方法进行分析。由于全血未经任何预处理,且 CTC 在通过芯片的过程中绝对压力极小,因此捕获到的 CTC 98% 具有活力^[22]。该方法大大提高了敏感性和从全血中捕获稀少细胞的得率,同时操作过程简单温和,从而使分离到的 CTC 保持活力。另外,CTC 芯片平台非常灵活,各种不同的抗体都可以包被在固相支持物上,从而分离到不同类型的 CTC。Nagrath 等^[22]对取自 68 例上皮性肿瘤患者的 116 份血样进行 CTC 芯片检测,在其中的 55 份来自早期非小细胞肺癌(NSCLC)患者的血样中全部分离到 CTC(2~1 281 个,155±236)。在包括结肠癌、食管癌、乳腺癌、前列腺癌在内的其他肿瘤中也发现了相似的结果。如此多数量的 CTC 与其他方法检测得到的结果有显著差异。用 CellSearch™ 法对来自 99 例早期肺癌患者的 168 份血样进行分析^[23],仅从 34 份(20%)血样中检测到 CTC,其中仅 10 份(6%)样品中 CTC 数目大于 6,其余更少。

3 CTC 分析

CTC 分析对于进一步获得其恶性特征相关数据及评价单个 CTC 的侵袭潜能非常重要。动物实验研究发现,10 000 个 CTC 中只有 1 个能形成转移灶^[24]。尽管这个数据在人体中可能会有所不同且与肿瘤的差异性有关,但有一点很明确,那就是有必要鉴定并研究最具转移潜能的 CTC。经细胞病理学确认的 CTC 被激光显微切割后,可用定量 PCR 技术分析其癌基因扩增产物和癌基因突变。Panayiotis 等^[25]应用免疫标记分析富集的乳腺癌 CTC,发现有 35.2% 的 CD44⁺/CD24^{-/low}、17.7% 的 ALDH1^{high}/CD24^{-/low} 恶性高致瘤细胞。FISH、比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)等方法也可被用来直接对 CTC 进行分

析。只要 CTC 的富集步骤未使细胞形态受到破坏,细胞病理学分析可常规进行。但是,由于技术及操作成本原因,基因组分析、突变分析目前尚未应用于 CTC 常规检测,而仅用于 CTC 实验研究。另外,用 CK 染色和 TUNEL 分析发现,在乳腺癌患者血液中检测到的上皮细胞中有相当数量的凋亡细胞^[26]。抗肿瘤治疗前后进行循环凋亡细胞的检测和计数可评价治疗措施的促凋亡作用,具有重要意义。然而必须考虑到,添加了防腐剂的血液储存会使细胞变得脆弱,而多步骤操作和与磁珠的接触则可能会诱导其凋亡^[27]。

4 CTC 检测的临床意义

目前,针对不同类型恶性肿瘤的研究都在试图阐述肿瘤患者 CTC 的检测在诊断及预后评估中的价值。一项大规模的 II 期临床研究表明,乳腺癌患者术后或化疗前 CTC 的检出是肿瘤早期复发的独立预测指标^[28]。治疗前后 CTC 数目的变化可以评估治疗的反应:CTC 数量下降则治疗有效,而 CTC 数量上升则提示治疗无效或肿瘤进一步发展^[29]。但是由于现有方法的各种缺陷和可能存在的假阳性、假阴性结果,使其得出的数据的准确性面临挑战。除此之外,CTC 临床研究还面临一个标准化的问题。由于不同肿瘤类型、疾病分期以及接受的治疗不同等因素,造成数据结果呈现不均一性。因此,应该进行多中心性研究,由相同疾病类型、阶段,接受相同治疗,具有相同风险的患者群体得到的研究数据,才能够较为准确地帮助我们分析 CTC 的生物学特征以及其作为预后评估因素的作用。另一个重要决定要素是确定一个标准化、统一并且特异、敏感的 CTC 细胞学检测方法。规范、完善的临床试验有望产生可靠的结果,并为 CTC 这一标志物应用于临床肿瘤学提供指南。针对稀少循环肿瘤细胞的常规分子生物学技术的进步,以及新的肿瘤标志物的发现,将为 CTC 研究提供新的更可靠的工具。这将有利于拓展人们对 CTC 的进一步了解,更重要的是,得到新的 CTC 相关数据可以指导临床医生采取更为合理的诊疗措施,提高患者生活质量和预期寿命。

[参考文献]

- [1] Mocellin S, Keilholz U, Rossi C R, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers[J]. Trends Mol Med, 2006, 12: 130-139.
- [2] Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood[J]. Cytometry, 2002, 49: 150-158.
- [3] Fehm T, Solomayer E F, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells[J]. Cytotherapy, 2005, 7: 171-185.
- [4] Vona G, Estepa L, Beroud C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer [J]. Hepatology, 2004, 39: 792-797.
- [5] Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K,

- 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, 156:57-63.
- [6] Pinzani P, Salvadori B, Simi L, Bianchi S, Distanti V, Cataliotti L, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection[J]. *Hum Pathol*, 2006, 37:711-718.
- [7] Paterlini-Brechot P, Benali N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions[J]. *Cancer Lett*, 2007, 253:180-204.
- [8] Morgan T M, Lange P H, Vessella R. Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells[J]. *Front Biosci*, 2007, 12:3000-3009.
- [9] Goeminne J C, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells[J]. *Ann Oncol*, 2000, 11:785-792.
- [10] Crisan D, Ruark D S, Decker D A, Drevon A M, Dicarlo R G. Detection of circulating epithelial cells after surgery for benign breast disease[J]. *Mol Diagn*, 2000, 5:33-38.
- [11] Went P T, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2004, 35:122-128.
- [12] Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8:2073-2084.
- [13] Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, et al. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11:8006-8014.
- [14] Rack B K, Schindlbeck C, Schneeweiss A, Hilfrich J, Lorenz R, Beckmann M W, et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy: the German SUCCESS-trial[J]. *J Clin Oncol* [2008 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)], 2008, 26(15S):503.
- [15] Chelly J, Concordet J P, Kaplan J C, Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:2617-2621.
- [16] Chou H C, Sheu J C, Huang G T, Wang J T, Chen D S. Albumin messenger RNA is not specific for circulating hepatoma cells[J]. *Gastroenterology*, 1994, 107:630-631.
- [17] Novaes M, Bendit I, Garicochea B, del Giglio A. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors[J]. *Mol Pathol*, 1997, 50:209-211.
- [18] Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2005, 42:155-196.
- [19] Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42:194-200.
- [20] Gervasoni A, Monasterio Muñoz R M, Wengler G S, Rizzi A, Zaniboni A, Parolini O. Molecular signature detection of circulating tumor cells using a panel of selected genes[J]. *Cancer Lett*, 2008, 263:267-279.
- [21] Alix-Panabières C, Vendrell J P, Pell O, Rebillard X, Riethdorf S, Müller V, et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients[J]. *Clin Chem*, 2007, 53:537-539.
- [22] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, Bell D W, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. *Nature*, 2007, 450:1235-1239.
- [23] Allard W J, Matera J, Miller M C, Repollet M, Connelly M C, Rao 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, 10:6897-6904.
- [24] Luzzi K J, MacDonald I C, Schmidt E E, Kerkvliet N, Morris V L, Chambers A F, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases[J]. *Am J Pathol*, 1998, 153:865-873.
- [25] Theodoropoulos P A, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridakis Z, Mavroudis D, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2010, 288:99-106.
- [26] Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros P F. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159:17-20.
- [27] Larson C J, Moreno J G, Pienta K J, Gross S, Repollet M, O'hara S M, et al. Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients[J]. *Cytometry*, 2004, 62:46-53.
- [28] Pierga J Y, Bidard F C, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giacchetti S, 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, 14:7004-7010.
- [29] Maheswaran S, Sequist L V, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura C V, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359:366-377.