

肺癌循环肿瘤细胞的临床意义

杜凤彩¹,李鹏²,陈剑²,迟铨²,李兆建²,胡宝红²

(1. 大连医科大学临床学院,辽宁 大连 116000;

2. 青岛大学附属医院毓璜顶医院,山东 烟台 264000)

摘要:循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)是指自发地或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放入血的恶性肿瘤细胞。目前,CTCs在恶性肿瘤诊断、分期、疗效、治疗、预后中的意义及其富集分离、检测技术已成为研究热点。

关键词:肺癌;循环肿瘤细胞;预后评估

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2016)10-0787-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.10.A009

Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer

DU Feng-cai¹, LI Peng², CHEN Jian², et al.

(1. Clinical Academy of Dalian Medical University, Dalian 116000, China;

2. Affiliated Hospital of Qingdao University, Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China)

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) refers to malignant tumor cells released into the blood from solid tumor or metastases spontaneously or because of operation for diagnosis and treatment. Recently, intimate connection between CTCs and the early diagnosis, clinical staging, curative efficiency evaluation, individualized treatment and prognosis evaluation of lung cancer and its separation, detection have become a hot topic. Now, issues mentioned above were summarized and generalized in this article.

Key words: lung cancer; circulating tumor cells; prognosis evaluation

据调查显示,肺癌发病率居恶性肿瘤第一位,约有18%的癌症相关死亡与肺癌有关^[1,2]。全球每年新发男性病例109.5万,死亡病例达95.1万。每年新发女性病例有51.4万,死亡病例有42.7万^[3]。在美国,每年新发肺癌病例超过225 000例^[4]。在我国,肺癌发病率明显上升。有专家估计,至2025年我国肺癌年死亡人数可达100万^[5]。由于肺癌早期症状不明显,患者确诊时多已晚期,已错失最佳手术机会。再加上有些患者无法耐受放化疗或化疗后产生耐药等原因导致肺癌5年生存率仅为15%。即使经根治性手术治疗的I期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)5年复发率仍有30%^[6]。因此,对于肺癌,找到能早期诊断、指导治疗、评价疗

效、评估预后的方法意义重大。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指自发地或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放入血的恶性肿瘤细胞。1869年, Ashworth在癌症死亡患者尸检血液中找到了与原发肿瘤细胞相似的恶性细胞,并首次提出了循环肿瘤细胞的概念^[7]。目前, CTCs富集、分离、检测技术以及其在恶性肿瘤诊断、分期、疗效、治疗、预后中的意义都倍受关注^[8-15]。现就CTCs富集、分离、检测技术以及在肺癌的早期诊断、临床分期、疗效评估、个性化治疗、预后评价中的作用进行综合论述。

1 CTC富集分离和检测技术

CTCs的富集分离技术根据其原理分为以细胞物理性质为基础的方法和以细胞生物特性为基础的

收稿日期:2015-12-07;修回日期:2016-04-09

通讯作者:陈剑, E-mail: cjdjc123@163.com

杜凤彩和李鹏为并列第一作者

分离方法。以细胞物理性质为基础的方法包括密度梯度离心法、滤过法、红细胞溶解法、细胞变形性富集法、细胞电学特征富集法和 ApoStream™ 技术等。其中,细胞变形性富集法、细胞电学特征富集法和 ApoStream™ 技术近几年已成为研究重点。它们分别根据肿瘤细胞变形性、电容、尺寸和表面电荷与正常细胞的差异进行物理分离^[16-18]。其中,ApoStream™ 技术是由美国 Apocell 公司开发的利用肿瘤细胞尺寸和表面电荷与正常细胞的差异并借助电场频率改变来捕捉 CTCs。其优点是抗体非依赖性,低成本、高效率,对绝大部分肿瘤细胞有效以及高捕捉率和高纯度,且该方法可以保证所得细胞的完整和存活状态,不影响后续检测分析。根据肿瘤细胞的生物特性而设计的分离方法即免疫磁性分离技术(immunomagnetic separation,IMS)。磁珠与特异性抗体结合组成芯片即可通过抗原-抗体原理加上磁力作用即能将 CTCs 与其他物质分离^[19]。磁珠筛选分为阳性筛选和阴性筛选,阳性筛选磁珠表面的抗体特异结合 CTCs 膜表面抗原进而将 CTCs 直接分离出来;但其受到抗原低表达或不表达影响部分 CTCs 会被遗漏。阴性筛选是筛掉 CTCs 以外的细胞而保留目的细胞。此方法特异性、敏感度高且简单易行,且不影响细胞的生物活性,不改变细胞的基因表达。但是,高特异性的肿瘤相关抗原很难检测。

CTCs 的检测分析方法有核酸分析法、免疫细胞化学法、流式细胞分析法、功能分析法。核酸分析法(nucleic acid analysis)包括 DNA 分析和 mRNA 分析两种。但目前基于 DNA 分析的只有荧光原位杂交法(FISH)^[20]。基于 RNA 分析的方法研究较多,其中逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和定量 RT-PCR 将 CTCs 中特异性 mRNA 序列逆转录为 DNA 片段并扩增。外周血细胞不表达这些 mRNA 序列,在外周血中检测到特异 mRNA 序列就提示 CTCs 的存在。免疫细胞化学法(immunocyto-chemistry,ICC)是指用标有显色剂的特异性抗体与肿瘤细胞抗原结合,再通过显色反应进行定性和定量测定。ICC 改进所得的光扫描细胞计量技术(laser scanning cytometry, LSC)^[21]具有流式细胞仪和图像细胞仪的功能,可通过连续扫描荧光显微镜下图像自动分析产生数据,敏感度高、分辨率高、放大倍数高并且可对细胞内部微细结构进行定性、定量和定位分析^[22]。流式细胞分

析法(flow cytometry)将荧光物质与肿瘤细胞单抗结合,使肿瘤细胞染色,然后流式细胞仪对其进行分析分选。流式细胞术的优点是可定量检测、细胞形态测定、做多参数分析且测量速度快;但要求目标细胞数目大、价格昂贵、耗时长。功能分析法包括上皮免疫斑点法(epithelial immunospot,EPISPOT)、胶原粘附基质(CAM)测定法。前者依靠酶联免疫吸附来检测特异性标记蛋白的分泌,进而计数 CTCs^[23];后者是根据 CTCs 具有侵袭性来分离 CTCs^[24]。功能分析法敏感度、特异性都比较高,研究前景开阔乐观,但肿瘤细胞特异性的标志物并不容易找到。

另外,为了提高敏感度和特异性,更加准确地分离并分析 CTCs,一些集富集分离与检测分析于一体的综合系统,例如 CellSearch 系统、CTCs 芯片(CTCs-chip)诞生。CellSearch 系统由 Cellsave 储存管、Autoprep 系统、Analyzer 系统以及配套的试剂盒等组成。Cellsave 储存管主要是储存和保护作用,能够提高分析的可重复性和可靠性,确保 CTCs 在室温条件下稳定保存 96 小时。Autoprep 系统是全程质量控制系统,能够实现复杂样本处理的自动化和标准化。Analyzer 系统是一种半自动荧光光学系统,主要功能是对分选的 CTCs 进行拍照分析和计数。CellSearch 系统试剂盒的组分主要是上皮黏附蛋白(EpCAM)、免疫磁珠细胞固定试剂、荧光标记试剂以及缓冲液等^[25]。该系统是目前惟一被 FDA 批准应用于 CTCs 检测的系统。Cellsearch 现已在包括肺癌在内的多种肿瘤的 CTCs 实验室检测中广泛应用^[26-29],但是试剂盒价格昂贵。另外,发生了上皮细胞间质转变 CTCs 可逃脱系统的检测,而且并非所有肿瘤细胞都表达上皮标志,比如黑色素瘤细胞,因而假阴性在所难免。加入新的抗原可以降低假阴性,但是新标志物与非肿瘤细胞的结合反应会增加假阳性率。CTCs 芯片(CTCs-chip)是由 78 000 个包被 EpCAM 抗体的微磁性柱构成。肿瘤患者的抗凝全血在压力装置的作用下与芯片充分接触使肿瘤细胞与磁性柱结合,再将非特异黏附细胞洗脱即可获得 CTCs。Alix-Panabières 等^[30]将非小细胞肺癌细胞系 NCI-H1650 掺入到健康人全血标本中,检测发现 CTCs 芯片的检出率>60%。由此可见,综合系统是 CTCs 富集分离、检测分析技术开发的正确方向。

2 CTCs 与肺癌的早期诊断

随着肿瘤细胞不断增殖,部分肿瘤细胞出现上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),即上皮表型标志 E-钙粘素表达下降,波形蛋白、成纤维细胞特异性蛋白-1 等间充质表型特征分子表达上调,使肿瘤细胞的极性、粘附能力下降,运动能力增强,获得侵袭性,侵入结缔组织间隙并穿过基底膜进入血液循环系统,或者随着肿瘤扩张生长,毛细血管破裂,直接进入血液系统,形成 CTCs^[31]。进入血液循环的 CTCs 存在异质性,会受到机体免疫系统的攻击,仅有不足 0.01% 的 CTCs 能够在外周血存活^[32]。这些逃过免疫反应和凋亡的 CTCs 再通过间充质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)重新获得上皮表型或者在毛细血管末端形成癌栓,突破血管屏障,从而形成转移灶。因此,若在患者外周血检测出 CTCs 便可以作为肺癌诊断及发生转移的证据。

Kurusu 等^[33]收集 125 例肺癌患者和 25 例肺良性肿瘤患者行对照研究。利用 CellSearch 技术富集分离实验组和对照组外周血中的 CTCs,以 1 个 CTC/7.5ml 作为分界点。发现实验组 CTCs 阳性率(30.6%)明显高于良性肿瘤患者阳性率(12.0%)($P < 0.05$)。李晶等^[34]收集原发 NSCLC 患者 30 例为肺癌组,同期入院治疗的肺良性疾病及健康志愿者各 10 例为对照组,经 CellSearch System 技术检测,结果对照组外周血中未检出 CTCs,肺癌组患者外周血中 18 例(60%)检出 CTCs 两组差异有统计学意义($P = 0.001$)。

然而,这些研究仅能证明 CTCs 可以诊断肺癌,和目前临床上应用的病理学检查相比,CTCs 除了检查方便、快捷、机体损伤小,并不能显示 CTCs 对肺癌早期诊断的优势。以往认为肺癌首先发生的是原发灶的浸润,然后是周围组织、器官的侵袭,最后才是经血液系统、淋巴系统的远处转移^[35]。但近期研究发现,在癌前病变极早期肿瘤细胞就可以通过上述的 EMP 改变入血,形成 CTCs,再经过 EMP 过程形成远处转移灶。此时,由于还未形成转移灶,或转移灶直径过小,常规的检测手段很难发现,这个过程被称为微转移(mirometastasis)。由此可见,恶性肿瘤的发生、增殖、局部浸润和远处转移是同时进行的^[36,37]。

Ross 等^[38]收集 49 例 NSCLC 患者和 20 名健康者利用免疫磁珠方法检测其外周血中的 CTCs。结果显示:健康者未检测出 CTCs,而病例组均检测出 CTCs。而且,在 5 例 I 期 NSCLC 患者中检测出了 CTCs,数量为 0.40 ± 0.55 ,14 例 III 期 NSCLC 患者检测出 CTCs 的数量为 16.86 ± 16.75 ,30 例 IV 期 NSCLC 中检测出 CTCs 的数量为 18.33 ± 21.32 。由此可见,CTCs 对 I 期肺癌诊断也有意义。Kurusu 等^[33]检测 NSCLC 患者(均接受根治性切除术)和肺纤维化患者、健康自愿者外周血中 CTCs,结果显示即使术后定为 I 期的 NSCLC 患者外周血也检测到 CTCs,而肺纤维化患者和健康者 CTCs 检测均为阴性。

随着关于 CTCs 用于肺癌早期诊断临床试验的开展^[39,40],越来越多的学者认为外周血 CTCs 检测可作为一种非侵入性的“液体病理”,可准确、快捷地早期诊断肺癌^[41-45]。而且,近期有研究发现,对于一些影像学诊断困难的病例,例如严重慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者罹患肺癌,CTCs 可以补充影像学的不足,帮助更加准确地诊断合并其他肺病的肺癌^[46]。

3 CTCs 与肺癌分期

目前临床上使用的肺癌分期标准是美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)提出的 TNM 分期系统。TNM 分期主要依靠手术中所见和影像学检查。然而,对于失去手术机会的肺癌患者,单凭影像学检查分期并不能准确反映患者的病情。而且,影像学检查只能反映病灶的物理性质并不能显示肿瘤细胞增殖过程中的变异。近期研究^[13,33,46]显示肺癌 CTCs 与肿瘤分期具有明显的相关性。Yie 等^[46]对 143 例 NSCLC 患者(均已接受手术治疗)和 177 名健康志愿者外周血行 CTCs 检测。结果显示:手术分期 pT₁/pT₂, pT₃, pT₄ 患者 CTCs 检测阳性率分别是 5.6%、11.3%、83%,差异具有统计学意义($P = 0.001$)。临床分期 I、II、III、IV 期患者 CTCs 阳性率分别是 15.4%、29.7%、47.9%、75.0%,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。另一项包含 35 例肺癌患者(腺癌 31 例,鳞癌 4 例,均经根治手术治疗)的临床研究结果显示,CTCs 阳性率为 28.6%(10/35);术后 TNM 分期 I 期 13 例,II 期 6 例,III 期 16

例,CTCs 检测阳性率分别为 7.7%(1/13)、33.3%(2/6)、43.8%(7/16),差异具有统计学意义($P<0.05$)^[47]。这些研究都充分显示了 CTCs 数目或阳性率与肺癌分期之间的密切关系。但是受 CTCs 检测技术不成熟等因素的影响,目前并不能制定准确的用于肺癌分期的 CTCs 阳性率标准^[38]。

近年来,不少学者提出分子分期的概念^[48],肺癌分子分期是指检测病人外周血、骨髓和纵隔淋巴结 CEA、CK19、Muc-1 等基因 mRNA 表达来诊断肺癌微转移,用于肺癌分期,指导选择外科手术适应证和术后辅助治疗。刘春花等^[49]收集 65 例肺癌(肺癌组)、10 例肺良性疾病患者和 10 名健康志愿者(对照组)外周血 7.5ml,应用免疫磁珠阴性富集联合免疫细胞化学染色检测 Pan-CK+/CD45-CTCs 在 65 例肺癌患者中表达,CTCs 阳性率为 69.23%(45/65),肺良性疾病患者及健康志愿者均未检出 CTCs。TNM 分期 I~II、III、IV 期患者 CTCs 阳性率分别为 23.08%(3/13)、50.00%(6/12)、90.0%(36/40),差异有统计学意义($P<0.001$);M₁期、M₀期肺癌患者 CTCs 阳性率分别为 83.33%(35/42)、43.48%(10/23)($P=0.002$)。随着转移部位个数的增多,CTCs 阳性率呈高趋势($P=0.024$)。由此可见,CTCs 阳性率与肺癌患者的临床分期、远处转移部位密切相关。Kurusu 等^[33]通过检测可手术的非小细胞肺癌患者外周血中的肿瘤组织特异性 CEA mRNA 阳性细胞,也发现其阳性率很大程度上与疾病分期有关。这说明多分子联合检测 CTCs 可提高检测的准确性,为制定准确的肺癌分期标准提供依据。Singletary 等^[50]也认为 CTCs 检测有可能应用于国际分期系统,作为肿瘤分期的有益补充。

4 CTCs 与肺癌的疗效及预后评估

目前,肺癌治疗效果的评估主要依靠影像学检查,分为完全缓解(complete remission)、部分缓解(partial remission)、稳定(stable disease)、病情进展(progressive disease)四个级别。影像学仅能根据病灶大小变化或有无新发病灶来判断,不能反映肿瘤细胞增殖分化过程中基因突变,也不能显示微转移。因此,需要一种更加方便、准确,能检测肿瘤分化程度、免疫组化改变的有效监测手段。

研究表明 CTCs 检测是肺癌患者治疗后疗效评价,指导治疗的重要手段^[33,51]。Hofman 等^[52]收集参加了厄罗替尼及 pertuzumab 二期临床试验的 41 例肺癌患者,并用 CellSearch 系统检测外周血的 CTCs 数量,利用 FDG-PET 和 CT 对其疗效进行评价。结果显示 78%的患者在基线水平上可检测到 CTCs ≥ 1 ,且 CTCs 数量检测结果与 FDG-PET 检查(依据实体瘤的疗效评价标准)结果一致。有研究利用 CellSearch 技术检测 50 例小细胞肺癌患者外周血 CTCs,结果显示:治疗前 CTCs 阳性率为 80%,第 1 个疗程一线化疗第 22 天检测 CTCs 阳性率只有 60%,说明 CTCs 可以评估化疗疗效^[10]。Zhang 等^[53]分别运用外周血 CTCs 数量检测和影像学检查(根据实体瘤的疗效评价标准)两种方法对 9 例 NSCLC 患者进行化疗后疗效评价,结果显示具有高度一致性。Wu 等^[54]应用 CellSearch System 对 12 例化疗 2 个疗程的肺癌患者跟踪随访,得到相似的结果。由此可见,肺癌患者外周血 CTCs 数量增减可反映治疗过程中病情改变,评价治疗方案的有效与否,进而在一定程度上指导治疗。

分子水平的检测可以反映原发肿瘤的变异,及其药物敏感性的改变。在单细胞层对 CTCs 的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因的 18、19、20、21 外显子进行测序,成功检测出 CTCs 为 EGFR 野生型,与原发灶病理组织检测结果相同^[55]。Jiang 等^[14]利用 CTCs 检测 EGFR 突变类型,结果表明与原发肿瘤符合率高达 92%。另外,在治疗过程中,肺癌肿瘤组织基因的表达可发生变化,从而使治疗方案失效,如耐药基因 T790M 可导致对吉非替尼敏感的 NSCLC 治疗失败。应用 CTC-chip 检测接受吉非替尼治疗的 NSCLC 患者的 CTCs,发现 CTC 检测显示 T790M 突变的患者确实失去对吉非替尼的敏感性。

这些研究都说明 CTCs 检测可作为实时动态检测肿瘤患者的基因突变类型,指导临床个体化治疗。

近几年,随着 CTCs 在早期诊断、疗效评价等方面的研究深入,CTCs 对肺癌预后评价的意义也越来越明朗。Tognola 等^[8]利用 CellSearch 系统检测 101 例 III~IV 期 NSCLC 患者的 CTCs,IV 期、IIIb 期的 CTCs 数目分别为 0~146、0~3,而 IIIa 期则未检测到 CTCs。CTCs <5 个/7.5ml 总生存期为 8.1 个月,CTCs $>$

5个/7.5ml患者的生存期仅为4.3个月。Zhang等^[56]用ISET法对208例NSCLC患者外周血CTCs进行检测,阳性率为36%;随访发现,阳性患者中超过50%预后不良。对于小细胞肺癌患者治疗前CTCs \geq 50个的总生存期为5.4个月,而CTCs $<$ 50个的总生存期为11.5个月^[10]。由此可见,CTCs检测可作为评价肺癌患者预后的方法之一。相比传统评价手段,CTCs检测具有方便、损伤小、可动态监测等优点^[38,57]。

5 问题与展望

肺癌CTCs的研究越来越受临床医生和科研人员的重视,其在肺癌早期诊断、疗效评价、个体化治疗和预后评估等方面的巨大潜力,但是仍存在亟待解决的问题:①富集、分离、检测方法不够成熟,不能准确检测CTCs数量、分子特点,且没有统一的标准;②临床试验规模不足,应该积极开展多中心合作的大规模临床试验,真正了解CTCs对肺癌患者诊断、治疗、预后评估等方面的重要意义及其分子机制;③缺乏统一的标准规范,各研究成果缺乏可比性。

相信随着检测技术的成熟,大型临床试验的开展,CTCs研究成果会给肺癌患者带来福音。

参考文献:

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-386.
- [2] Lagerwaard FJ, Aaronson NK, Gundy CM, et al. Patient-reported quality of life after stereotactic ablative radiotherapy for early-stage lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(7): 1148-1154.
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [5] Vinikoor-Imler LC, Davis JA, Luben TJ. An ecologic analysis of county-level PM2.5 concentrations and lung cancer incidence and mortality [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2011, 8(6): 1865-1871.
- [6] Siegel RL, Miller KD, Jemal A, et al. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [7] Hofman V, Ilie M, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells from lung cancer patients in the era of targeted therapy: promises, drawbacks and pitfalls [J]. *Curr Mol Med*, 2014, 14(4): 440-456.
- [8] Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Oncol*, 2011, 29(12): 1556-1563.
- [9] Hofman V, Ilie MI, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(7): 1651-1660.
- [10] Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(5): 525-532.
- [11] Naito T, Tanaka F, Ono A, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells in patients with small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7: 512-519.
- [12] Afify AM, Tate S, Durbin, et al. Expression of CD44s and CD44v6 in lung cancer and their correlation with prognostic factors [J]. *Int J Biol Markers*, 2011, 26(1): 50-57.
- [13] Chen X, Wang X, He H, et al. Combination of circulating tumor cells with serum carcinoembryonic antigen enhances clinical prediction of non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126276.
- [14] 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.
- [15] Nieva J, Wendel M, Lutgen MS, et al. High-definition imaging of circulating tumor cells and associated cellular events in non-small cell lung cancer patients: a longitudinal analysis [J]. *Phys Biol*, 2012, 9(1): 016004.
- [16] Zhang W, Kai K, Choi DS, et al. Microfluidics separation reveals the stem-cell-like deformability of tumor-initiating cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(46): 18707-18712.
- [17] Hur SC, Henderson-MacLennan NK, McCabe ER, et al. Deformability-based cell classification and enrichment using inertial microfluidics [J]. *Lab Chip*, 2011, 11(5): 912-920.
- [18] Shim S, Gascoyne P, Noshari J, et al. Dynamic physical properties of dissociated tumor cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation [J]. *Integr Biol*, 2011, 3(8): 850-862.
- [19] Guo M, Li X, Zhang S, et al. Real-time quantitative RT-PCR detection of circulating tumor cells from breast cancer patients [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1): 281-289.
- [20] Zhang Y, Li J, Cao L, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: detection techniques, clinical implications, and future perspectives [J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4): 449-460.
- [21] Doan HQ, Chinn GM, Jahan-Tigh RR. Flow Cytometry II: mass and imaging cytometry [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(9): e36.
- [22] Wylie PG, Onley DJ, Hammerstein AF, et al. Advances in

- laser scanning imaging cytometry for high-content screening[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2015, 13(2):66–78.
- [23] Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, et al. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(1):214–221.
- [24] Onstenk W, Kraan J, Mostert B, et al. Improved circulating tumor cell detection by a combined EpCAM and MCAM CellSearch enrichment approach in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(3):821–827.
- [25] Lu Y, Liang H, Yu T, et al. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry [J]. *Cancer*, 2015, 121(17):3036–3045.
- [26] Schölch S, García SA, Iwata N, et al. Circulating tumor cells exhibit stem cell characteristics in an orthotopic mouse model of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016. [Epub ahead of print].
- [27] Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(1):61–66.
- [28] Muller V, Riethdorf S, Rack B, et al. Prospective evaluation of serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and carbonic anhydrase IX in correlation to circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(4):R71.
- [29] Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of circulating tumor cells detected by the Cell Search System in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer[J]. *J Oncol*, 2010, 2010:617421.
- [30] Alix –Panabières C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2012, 195:69–76.
- [31] Songa W, Gobe GC. Understanding molecular pathways and targets of Brachyury in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human cancers [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016. [Epub ahead of print].
- [32] Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 527 (7579):525–530.
- [33] Kurusu Y, Yamashita J, Ogawa M. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in patients with resectable non-small-cell lung cancer[J]. *Surgery*, 1999, 126(5):820–826.
- [34] Li J, Jiang B, Wan P, et al. Clinical significance of circulating tumor cells detection in non-small cell lung cancer patients[J]. *Chinese General Practice*, 2013, 169(C):3202–3207.[李晶, 姜北, 万鹏, 等. 晚期非小细胞肺癌患者循环肿瘤细胞检测的临床意义 [J]. *中国全科医学*, 2013, 169(C):3202–3207.]
- [35] Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4):239–252.
- [36] Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5):573–581.
- [37] Dickey DD, Giangrande PH. Oligonucleotide aptamers: a next-generation technology for the capture and detection of circulating tumor cells[J]. *Cancer Methods*, 2016, 97:94–103.
- [38] Ross K, Pailler E, Faugeron V. The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15 (12):1605–1629.
- [39] Cheng M, Liu L, Yang HS, et al. Circulating tumor cells are associated with bone metastasis of lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(15):6369–6374.
- [40] Chen X, Wang X, He H, et al. Combination of circulating tumor cells with serum carcinoembryonic antigen enhances clinical prediction of non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0126276.
- [41] Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2014, 51(3):160–171.
- [42] Wang J, Lu W, Tang C, et al. Label-free isolation and mRNA detection of circulating tumor cells from patients with metastatic lung cancer for disease diagnosis and monitoring therapeutic efficacy [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(23):11893–11900.
- [43] Hanssen A, Loges S, Pantel K, et al. Detection of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer[J]. *Front Oncol*, 2015, 5:207.
- [44] Chen YY, Xu GB. Erratum to: effect of circulating tumor cells combined with negative enrichment and CD45-FISH identification in diagnosis, therapy monitoring and prognosis of primary lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(7):190.
- [45] Truini A, Alama A, Dal Bello MG, et al. Clinical applications of circulating tumor cells in lung cancer patients by Cell Search System[J]. *Front Oncol*, 2014, 4:242.
- [46] Yie SM, Lou B, Ye SR, et al. Clinical significance of detecting survivin-expressing circulating cancer cells in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2009, 63(2):284–290.
- [47] Zhao SW, Chu HL, Li YY, et al. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in patients with NSCLC[J]. *Prac J Med & Pharm*, 2015, 32(2):146–147. [赵士伟, 楚慧丽, 李艳云, 等. 非小细胞肺癌患者术后循环肿瘤细胞的检测及其意义[J]. *实用医药杂志*, 2015, 32(2):146–147.]
- [48] Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW. Lung cancer: Biology and treatment options [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1856(2):189–210.
- [49] Liu CH, Yang Z, Li N, et al. The relationship between cir-

- culating tumor cells and clinicopathologic characteristics of primary lung cancer patients[J]. Chongqing Yixue, 2014, 43(20):2565-2568. [刘春花, 杨政, 李娜, 等. 循环肿瘤细胞与肺癌临床病理特征的关系 [J]. 重庆医学, 2014, 43(20):2565-2568.]
- [50] Singletary SE, Greene FL, Sobin LH. Classification of isolated tumor cells; clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual [J]. Cancer, 2003, 98(12):2740-2741.
- [51] Yoon SO, Kim YT, Jung KC, et al. TIF-1 mRNA positive circulating tumor cells in the peripheral blood predict poor prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2011, 71(2):209-216.
- [52] Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(4):827-835.
- [53] Zhang W, Kai K, Choi DS, et al. Microfluidics separation reveals the stem-cell-like deformability of tumor-initiating cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(46):18707-18712.
- [54] Wu C, Hao H, Li L, et al. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients [J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(1):30-36.
- [55] Sun S, Deng YL. Single-cell detection of EGFR gene mutation in circulating tumor cells in lung cancer[J]. Hereditas, 2015, 37(12):1251-1257. [孙帅, 邓宇亮. 肺癌循环肿瘤细胞的单细胞 EGFR 基因突变检测(优先出版)[J]. 遗传, 2015, 37(12):1251-1257.]
- [56] Zhang Y, Li J, Cao L, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma; detection techniques, clinical implications, and future perspectives[J]. Semin Oncol, 2012, 39(4):449-460.
- [57] Mego M, Giordano A, De Giorgi U, et al. Circulating tumor cells in newly diagnosed inflammatory breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2015, 17:2.

坚决贯彻执行《发表学术论文“五不准”》规定

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技人员在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院和自然科学基金委共同研究制定并联合下发了《发表学术论文“五不准”》的通知。

(1)不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。

(2)不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。

(3)不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。

(4)不准提供虚假同行评议人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评议人,应确保所提供的评议人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评议环节的任何弄虚作假行为。

(5)不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

希望广大科技工作者、读者和作者,以及本刊编委、审稿专家和有关工作人员都应加强学术道德自律,共同努力,捍卫学术尊严,维护良好学风。