

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

肺癌循环肿瘤细胞的研究进展

于盼, 朱丽华, 阙祖俊, 田建辉

引用本文:

于盼, 朱丽华, 阙祖俊, 等. 肺癌循环肿瘤细胞的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(5): 519–523.

YU Pan, ZHU Lihua, QUE Zujun, et al. Research Advances of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2021, 48(5): 519–523.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2021.20.1073>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

胶质母细胞瘤循环肿瘤细胞的研究进展

Research Progress in Circulating Tumor Cells of Glioblastoma

肿瘤防治研究. 2018, 45(12): 1020–1022 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0603>

循环肿瘤细胞的体外培养与应用

In Vitro Culture and Application of Circulating Tumor Cells

肿瘤防治研究. 2018, 45(05): 343–346 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1436>

79例肺肉瘤样癌的临床特征及预后分析

Clinical Features and Prognosis of 79 Cases of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma

肿瘤防治研究. 2018, 45(05): 295–299 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1144>

PD1/PD-L1激活促进癌症发生、发展和转移的研究进展

Novel Findings on Activation of PD1/PD-L1 that Contributes to Cancer Development and Metastasis

肿瘤防治研究. 2017, 44(6): 423–427 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0087>

肺癌小鼠转移模型研究进展

Research Progress of Mice Metastasis Models for Lung Cancer

肿瘤防治研究. 2017, 44(11): 769–773 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0279>



杂志官网



微信公众号

肺癌循环肿瘤细胞的研究进展

于盼¹, 朱丽华^{1*}, 阙祖俊², 田建辉^{1,2}

Research Advances of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer

YU Pan¹, ZHU Lihua^{1*}, QUE Zujun², TIAN Jianhui^{1,2} (*: Contributed Equally as the First Author)

1. Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Oncology Institute of TCM Affiliated to Shanghai Research Institute of TCM, Shanghai 200032, China

Corresponding Author: TIAN Jianhui, E-mail: tjhhawk@shutcm.edu.cn

Abstract: Metastasis is the main factor leading to the death of patients with lung cancer, and active prevention is the key to improve the efficacy of treatment. Circulating tumor cells (CTCs) play an important role in initiating metastasis. They trigger a series of metastatic cascade reactions at the moment of shedding from the primary focus, and finally colonize and proliferate in the distant target organs. In recent years, the detection technology of lung cancer CTCs has been continuously optimized. It can not only count CTCs, but also identify different subsets. CTCs detection of lung cancer can be used for early screening, the prediction of prognosis after surgery and chemoradiotherapy and the evaluation of curative effect of targeted immunotherapy. Dynamic monitoring of tumor heterogeneity is helpful to adjust personalized treatment plan and achieve the accurate treatment of cancer. Tian Jianhui's research group established the world's first circulating tumor cell line of human lung adenocarcinoma, integrated it into the theory of "positive deficiency and toxin" in the subclinical core pathogenesis of lung cancer, and actively promoted the construction of a specific research platform for lung cancer, in order to improve the research, prevention and control efficiency of lung cancer metastasis.

Key words: Lung neoplasm; Circulating tumor cells; Metastasis; Detection; Clinic application

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 81973517, 81803777); Projects Within Budget of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (No. 2019LK005); Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Peiran Plan Talent Training Project

Competing interests: The authors declared that they have no competing interests.

摘 要: 转移是导致肺癌患者死亡的主要因素, 积极防治转移的发生是提高患者疗效的关键。循环肿瘤细胞 (CTCs) 是启动远处转移的重要环节, 自原发灶脱落开始即触发一系列转移级联反应, 最终在远处靶器官定植和增殖。近年来, 肺癌CTCs的检测技术手段不断优化, 不仅可以对CTCs进行计数, 还可鉴定不同亚群。肺癌CTCs检测可用于早期筛查、手术及放化疗后的预后预测、免疫靶向治疗的疗效评价等方面, 动态监测肿瘤异质性, 有助于调整个体化治疗方案, 达到精准治癌的目的。田建辉研究组建立世界首例人肺腺癌循环肿瘤细胞系, 将其融入肺癌亚临床核心病机“正虚伏毒”学说的探索, 并积极促进肺癌特异性研究平台的构建, 以期提高肺癌转移的研究和防控效率。

关键词: 肺肿瘤; 循环肿瘤细胞; 转移; 检测; 临床应用

中图分类号: R734.2; R273

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



收稿日期: 2020-09-10; 修回日期: 2020-12-15

基金项目: 国家自然科学基金 (81973517, 81803777); 上海中医药大学预算内项目 (2019LK005); 上海中医药大学沛然计划人才培养项目

作者单位: 1. 200032 上海, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科; 2. 200032 上海, 上海市中医药研究院中医肿瘤研究所

通信作者: 田建辉 (1973-), 男, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事中医药防治恶性肿瘤的临床与基础研究, E-mail: tjhhawk@shutcm.edu.cn

作者简介: 于盼 (1996-), 女, 硕士在读, 主要从事中医药防治肺癌的临床与基础研究; 朱丽华 (1986-), 女, 博士在读, 副主任医师, 主要从事中医药防治恶性肿瘤的研究 (*: 并列第一作者)

0 引言

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤。2017年死于肺癌的总人数超过乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌和脑瘤的总和, 预计2020年死于肺癌的人数将达到所有癌症死亡人数的22%以上^[1], 局部复发和远处转移是导致肺癌高病死率的主要原因。肿瘤的异质性是单次活检无法获取肿瘤全部分子信息的重要原因, 也是造成肿瘤耐药性的基础, 因此需要对肿瘤的分子分型进行动态评估。液体活检作为一种非侵入性的肿瘤检

测方法, 可持续、动态地评估肿瘤细胞的基因突变状态^[3]。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTCs)、循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)、外泌体、mi-RNA、cf-DNA等是肺癌液态活检的主要检测指标^[4], 其中CTCs可以提供包含DNA、RNA和蛋白质等多层次的分子信息, 而其他指标只能提供遗传层面的异常信息^[5]。可见CTCs在肺癌的诊断、疗效评价、预后预测等方面作用显著^[6]。本文讨论了CTCs的转移级联过程、检测方法, 以及肺癌CTCs在临床早期筛查、预测复发转移、疗效监测评价等方面的应用, 并融合入中医“正虚伏毒”理论, 以期对肺癌转移转化研究提供新的思路。

1 肺癌循环肿瘤细胞

1869年, Ashworth首次提出循环肿瘤细胞的概念, CTCs是从原发肿瘤脱落进入血液的肿瘤细胞, 从浸润至进入循环会发生一系列转移级联过程进而造成远处转移和定植^[7]。2019年, 田建辉等从一例Ⅱa期肺癌患者的血液中分离出CTCs, 成功建立了永久性的人肺腺癌循环肿瘤细胞系CTC-TJH-01。CTC-TJH-01处于上皮间质转化 (EMT) 的中间阶段, 具有干细胞表型、耐药性强和休眠的特性, 在NOD-SCID小鼠上具有致瘤性和肺转移能力^[8]。根据EMT的不同阶段可将CTCs亚群分为上皮-间充质型循环肿瘤细胞、上皮型循环肿瘤细胞和间充质型循环肿瘤细胞^[9], 不同表型的CTCs转移能力有所差异。

2 CTCs参与肿瘤转移级联过程

2.1 肿瘤细胞脱落

肿瘤细胞从原发灶脱落浸润基底膜主要有两种方式: (1) EMT介导途径。EMT是上皮细胞向间质细胞转化的关键过程, 通过分泌相关转录因子 (Snail、Twist、ZEB-1)、细胞外分子 (TGF- β 、HGF)、炎性细胞以及特定的信号转导途径 (Wnt、 β -catenin、NF- κ B、PI3K) 调节相关蛋白 (上皮标志物: EpCAM、E-cadherin、CK; 间质标志物: Vimentin、N-cadherin等) 表达, 使肿瘤细胞向间充质型转化, 从而获得更强的移动性并抵抗细胞凋亡^[10]; (2) 非EMT介导途径。肿瘤细胞通过外力和中心体增大的方式, 介导肿瘤细胞被动渗入血液, 以单细胞或细胞簇的形式离开原发肿瘤^[11]。通过以上两种方式进入循环的CTCs可能具有不同的细胞表型, 皆可引起肿瘤转移。

2.2 血液循环中的CTCs

实体肿瘤每天都有数以万计的肿瘤细胞进入血液循环, CTCs在血液循环中面临着免疫监视、血流剪切力、氧化应激等多方面的因素, 只有未被免疫系统清除的CTCs才能进一步播散定植^[12]。其中单个循环肿瘤细胞易被免疫细胞清除, 发生失巢凋亡。而由多个循环肿瘤细胞组成的循环肿瘤细胞簇或循环肿瘤微栓 (circulating tumor micro-emboli, CTM) 能更大程度上发生免疫逃逸, 具有更强的凋亡抵抗, 更易发生转移^[13]。血液循环中的CTCs可被血小板识别, 激活血小板并诱导相关细胞因子释放和聚集, 形成由血小板包被的细胞簇, 从而逃避NK细胞和T细胞的杀伤作用, 进而发生免疫逃逸^[14]。

2.3 CTCs远处转移和定植

进入血液循环的CTCs可以锚定在内皮细胞的表面, 通过受体-配体结合的方式使CTC发生外渗, 进而产生远处转移。不同的是, 单个CTCs通过毛细血管向外迁移, 而CTC簇可逆性地重组为单排链, 再横向穿过毛细血管^[15]。CTCs表面的整联蛋白通过与内皮细胞表面的黏附分子1 (ICAM1) 或血管细胞黏附分子1 (VCAM1) 结合, 为CTCs突破血管壁细胞外基质提供动力。CTCs产生的趋化因子配体取决于各自受体的表达, 进而决定远处的归巢器官^[16]。CTCs还可调节肿瘤微环境中相关抑制性免疫细胞以支持自身增殖和存活。

3 肺癌循环肿瘤细胞检测

CTCs的富集和分离主要有两种方式: 其一, 基于CTCs独特的物理特性, 通过过滤或密度梯度离心等方式获取, 被称为“非标记依赖法”; 其二, 基于CTCs经历的EMT过程, 表达特异性细胞表面蛋白, 可通过免疫磁珠分选、抗体特异性结合等方式获得, 被称为“标记依赖法”, 最常用的细胞表面标志物是上皮细胞黏附分子 (EpCAM)、细胞角蛋白 (CK) 等。目前常用的基于物理方法的CTCs检测系统主要有: ISET、MetaCell、CellSieve、Parsortix、OncoQuick、Vita-Assay等; 基于标记依赖的CTCs检测仪器主要有: CellSearch、MagSweeper、MACS、EPISPOT、CellCollector等^[17]。然而, 不同系统的CTCs检出效率有差异, 如Tamminga等比较了CellSearch和ISET对肺癌CTCs的检出率, 发现CellSearch的检出率为69%, 而ISET的检出率为88%, 表明ISET更适合

于肺癌患者的CTCs检测^[18]。

研究者正在对检测系统进行优化研究,研发出多种不同原理的CTCs检测方法和新型检测仪器,以提高肺癌CTCs的检出率:(1)微流控装置。Wang等设计的集成微流控装置对肺癌CTCs的平均回收率达到92.5%,纯度达到94%^[19];(2)芯片法。Yan等则使用集成多功能电化学芯片将CTCs的捕获效率控制在8%~100%^[20];(3)免疫磁珠分离法。通常采用上皮细胞黏附分子(EpCAM)作为主要标志物,将与磁性微粒结合的EpCAM抗体加入外周血中,通过免疫磁珠分离富集CTCs^[21];(4)纳米技术。核酸适配体修饰的PEG-PLGA-纳米纤维(PPN)微流控系统,可识别肺癌患者中罕见的CTC亚型并进行优化,显著提高对多克隆源性肿瘤细胞的捕获效率^[22];(5)新型肺癌CTCs检测仪器。光流式细胞仪(OFCM)集成了多级微流控芯片和四色荧光检测系统,可以完成自动肺癌CTCs分离,进行3D聚焦和单细胞表型分析^[23]。

4 肺癌循环肿瘤细胞的临床应用

4.1 早期筛查

肺癌患者在癌症发展早期基本处于无症状阶段,多数患者明确诊断时已至中晚期,已发生转移,错失治疗的最佳时机。肺癌的早期筛查主要通过低剂量计算机断层扫描(LDCT)实现,然而LDCT具有高假阳性,令患有非恶性结节的患者面临不必要的活检相关风险^[24]。Duan等使用CellCollector检测了44名肺结节患者和20例健康志愿者外周血中的CTCs,在志愿者外周血中未检测到CTCs。通过病理学诊断结果对比后发现,肺结节患者外周血中CTCs阳性率为52.94%,其诊断特异性为90%,CellCollector系统检测CTCs可有效区分良恶性结节,用于肺癌早期筛查^[25]。Li等采用阴性富集-荧光原位杂交(NE-FISH)方法检测肺癌患者及健康志愿者外周血中CTCs水平,发现肺癌患者的CTCs数量明显高于志愿者或患有良性肺疾病的患者,将CTCs与血清肿瘤标志物联合检测可提高早期肺癌患者的诊断敏感度^[26]。

4.2 预后及复发转移预测

肺癌的预后与分期密切相关。大量研究表明,检测肺癌患者手术、放化疗前后血液中的CTCs数量和亚群可预测预后,指导进一步的治疗。Wang等发现放射治疗后NSCLC患者外周血中PD-L1⁺CTC亚群比例升高,预示着治疗反应与预

后不良^[27]。Tamminga等研究发现晚期NSCLC患者体内CTCs的存在与酪氨酸激酶抑制剂(TKI)或化疗反应率低、无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)短相关^[28]。复发转移是导致肺癌患者死亡、生存期短和生活质量低的主要原因。患者术后伴有原发灶切除和淋巴结清扫,短期内无法评估和发现复发转移等情况。有研究发现,手术可以导致肺癌患者术后CTCs数目减少,但术后1天与3天的CTCs数目出现早期反弹现象,且与数月后的复发有关^[29]。Chinniah等对48例接受放化疗的局部晚期非小细胞肺癌(LA-NSCLC)患者的CTCs进行纵向监测发现,在患者外周血中检测到CTCs早于放射影像学证据显示疾病复发^[30]。

4.3 化疗及免疫靶向治疗的疗效监测与评价

由于肿瘤细胞的异质性,存在基因突变(如ALK重排、EGFR突变等)的患者易发生耐药突变,此时需要进行重复的基因检测。通过对捕获的CTCs进行单细胞测序可以检测到EGFR、MET、ALK和ROS1等基因的分子变化以及PD-L1的表达,鉴定肺癌患者免疫靶向治疗后的耐药性突变,其动态变化有助于实时疗效监测及个性化治疗方案的选择^[31]。Guibert等研究发现,NSCLC患者外周血中分离的CTCs表面PD-L1阳性率(83%)高于癌组织(41%),且在使用PD-L1抑制剂治疗的患者中,治疗前PD-L1⁺CTCs与预后不良相关^[32]。

5 创新肺癌亚临床研究思路,提出并验证“正虚伏毒”学说

早期肺癌术后患者影像学评估无可见病灶,临床评估为治愈,但是其外周循环和器官组织中还存在CTCs或休眠的肿瘤细胞,患者实际上处于肺癌转移的亚临床状态,这将成为日后复发转移发生的根源。针对该阶段病理特征,田建辉传承《道德经》“有生于无”和《黄帝内经》重视“正气”思想,融合现代肿瘤学和免疫学进展,提出“正虚伏毒”学说并系统验证,“正虚”主要免疫衰老和免疫逃逸为主的免疫抑制内环境,“伏毒”指高危人群或术后患者体内存在的肿瘤干细胞、循环肿瘤细胞和休眠肿瘤细胞等,“伏毒”具有“毒自内生,深伏血道,内藏脏腑,流注全身,伺机为患,正盛则伏而不出,正虚则出而为病”的特点。认为肺癌术后患者存在伏毒是绝对事件,而最终是否发生复发转移与机体的免疫状态密切相关,免疫功能紊乱可以表现为免疫监视和免疫清除能力下降(正虚),促使潜伏在

患者循环系统或者脏器内的CTCs（伏毒）、休眠肿瘤细胞和微小转移灶等发生免疫逃逸，最终导致复发与转移的发生^[33]。该学说为肺癌复发转移的研究提供了启发和探索。

课题组前期采用阴性富集和阳性富集（微流控芯片结合免疫磁珠分离技术）研究发现肺癌患者外周血中CTC计数与临床分期之间存在负相关性，早期患者外周血中具有较高数目的CTCs。同时研究发现免疫负调控细胞Tregs和MDSCs的比例与肺癌患者的临床分期呈正相关^[34]。提示在局部脏器中免疫抑制微环境的形成可能是促进CTCs定植后存活、增殖形成转移灶的原因之一，目前正在进一步研究。此外，田建辉课题组围绕前期建立的肺癌循环肿瘤细胞系（CTC-TJH-01），证实其具有干细胞表型、休眠、免疫逃逸特征，体内研究证实其致瘤性和肺转移特征，目前发现CTCs形成细胞簇后较单个CTCs具有更强的转移能力；而调控NK细胞功能可抑制CTCs肺转移的发生等现象，从而构建了肺癌转移的体内外研究平台，促进肺癌转移转化研究效率的提高^[35]。

6 小结与展望

复发转移是导致早期肺癌术后患者死亡的主要因素，也是制约肺癌整体防控效率提高的关键，但目前仍缺乏成熟的亚临床阶段发病学理论，而循环肿瘤细胞的研究丰富了对该阶段的认识。2018版CSCO《原发性肺癌诊疗指南》肯定了肺癌术后循环肿瘤细胞检测在预测复发中的价值，并逐渐进入临床研究。然而现阶段肺癌CTCs的研究仍局限于检测技术的开发与完善，由于CTCs检测技术具有多样性，而应用不同原理研发的检测系统灵敏度存在差异，导致临床上尚缺乏统一的检测方法和判定标准；另外由于不同CTCs亚群的转移能力也有所区别，仅以CTCs数目预测转移仍存在争议；CTCs最终是否转移与其所处环境因素密切相关，如CTCs与自然杀伤细胞、巨噬细胞等固有免疫细胞；T、B淋巴细胞等适应性免疫细胞以及血小板等存在复杂的作用机制，有待进一步研究探索^[36]。因此，通过精准鉴定转移潜能强的CTCs亚群，进而与免疫、凝血功能状态结合构建肺癌转移风险模型是促进临床推广的关键。充分发挥中医学认知疾病的系统性优势，融合现代科学精华不断创新肺癌转移理论和研究体系，将促进突破制约转移疗效提高的瓶颈，推动肺癌整体防控效率的提高。

参考文献：

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] 吴炳群, 魏慎海, 田进涛, 等. 不同转移部位的非小细胞肺癌患者的生存时间比较[J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(2): 105-110. [Wu B, Wei S, Tian J, *et al.* Comparison of the Survival Time in the Non-small Cell Lung Cancer Patients with Different Organ Metastasis[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2019, 22(2): 105-110.]
- [3] Pawlikowska P, Faugeron V, Oulhen M, *et al.* Circulating tumor cells (CTCs) for the noninvasive monitoring and personalization of non-small cell lung cancer (NSCLC) therapies[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(Suppl 1): S45-s56.
- [4] Russo A, De Miguel perez D, Gunasekaran M, *et al.* Liquid biopsy tracking of lung tumor evolutions over time[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2019, 19(12): 1099-1108.
- [5] Zhang Y, Zheng H, Zhan Y, *et al.* Detection and application of circulating tumor cell and circulating tumor DNA in the non-small cell lung cancer[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(12): 2377-2386.
- [6] Wang PP, Liu SH, Chen CT, *et al.* Circulating tumor cells as a new predictive and prognostic factor in patients with small cell lung cancer[J]. J Cancer, 2020, 11(8): 2113-2122.
- [7] Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies[J]. Mol Oncol, 2016, 10(3): 374-394.
- [8] Que Z, Luo B, Zhou Z, *et al.* Establishment and characterization of a patient-derived circulating lung tumor cell line *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 21.
- [9] Sun WW, Xu ZH, Lian P, *et al.* Characteristics of circulating tumor cells in organ metastases, prognosis, and T lymphocyte mediated immune response[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 2413-2424.
- [10] Jie XX, Zhang XY, Xu CJ. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 81558-81571.
- [11] Chen L, Bode AM, Dong Z. Circulating Tumor Cells: Moving Biological Insights into Detection[J]. Theranostics, 2017, 7(10): 2606-2619.
- [12] Hamilton G, Rath B. Mesenchymal-Epithelial Transition and Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 994: 229-245.
- [13] Nurwidya F, Zaini J, Putra AC, *et al.* Circulating Tumor Cell and Cell-free Circulating Tumor DNA in Lung Cancer[J]. Chonnam Med J, 2016, 52(3): 151-158.
- [14] Kanikarla-marie P, Lam M, Menter DG, *et al.* Platelets, circulating tumor cells, and the circulome[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017, 36(2): 235-248.
- [15] Kulasinghe A, Zhou J, Kenny L, *et al.* Capture of Circulating Tumour Cell Clusters Using Straight Microfluidic Chips[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(1): 89.
- [16] Yousefi M, Ghaffari P, Nosrati R, *et al.* Prognostic and therapeutic significance of circulating tumor cells in patients with lung cancer[J]. Cell Oncol (Dordr), 2020, 43(1): 31-49.

- [17] Maly V, Maly O, Kolostova K, *et al.* Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer[J]. *In Vivo*, 2019, 33(4): 1027-1037.
- [18] Tamminga M, Andree KC, Hiltermann TJN, *et al.* Detection of Circulating Tumor Cells in the Diagnostic Leukapheresis Product of Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Comparing CellSearch® and ISET[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 896.
- [19] Wang K, Zhou L, Zhao S, *et al.* A microfluidic platform for high-purity separating circulating tumor cells at the single-cell level[J]. *Talanta*, 2019, 200:169-176.
- [20] Yan S, Chen P, Zeng X, *et al.* Integrated Multifunctional Electrochemistry Microchip for Highly Efficient Capture, Release, Lysis, and Analysis of Circulating Tumor Cells[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(22): 12039-12044.
- [21] Gao W, Huang T, Yuan H, *et al.* Highly sensitive detection and mutational analysis of lung cancer circulating tumor cells using integrated combined immunomagnetic beads with a droplet digital PCR chip[J]. *Talanta*, 2018, 185: 229-236.
- [22] Zhu Y, Zou C, Zhang J, *et al.* Dynamically Monitoring the Clonal Evolution of Lung Cancer Based on the Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells Using Aptamer Cocktail-Modified Nanosubstrates[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(5): 5671-5679.
- [23] Li Q, Cui S, Xu Y, *et al.* Consecutive Sorting and Phenotypic Counting of CTCs by an Optofluidic Flow Cytometer[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(21): 14133-14140.
- [24] Zhu Y, Lowe AC. Multiplexed fluorescence in situ hybridization-based detection of circulating tumor cells: A novel liquid-based technology to facilitate accurate and early identification of non-small cell lung cancer patients[J]. *Cancer Cytopathol*, 2020, 128(8): 518-519.
- [25] Duan GC, Zhang XP, Wang HE, *et al.* Circulating Tumor Cells as a Screening and Diagnostic Marker for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 1931-1939.
- [26] Li Y, Tian X, Gao L, *et al.* Clinical significance of circulating tumor cells and tumor markers in the diagnosis of lung cancer[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(8): 3782-3792.
- [27] Wang Y, Kim TH, Fouladdel S, *et al.* PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells Increases during Radio(chemo)therapy and Indicates Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 566.
- [28] Tamminga M, De Wit S, Schuurin E, *et al.* Circulating tumor cells in lung cancer are prognostic and predictive for worse tumor response in both targeted- and chemotherapy[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(6): 854-861.
- [29] Wu CY, Lee CL, Wu CF, *et al.* Circulating Tumor Cells as a Tool of Minimal Residual Disease Can Predict Lung Cancer Recurrence: A longitudinal, Prospective Trial[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(3): 144.
- [30] Chinniah C, Aguarin L, Cheng P, *et al.* Early Detection of Recurrence in Patients With Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer via Circulating Tumor Cell Analysis[J]. *Clin Lung Cancer*, 2019, 20(5): 384-390. e2.
- [31] Pailler E, Faugeron V, Oulhen M, *et al.* Acquired Resistance Mutations to ALK Inhibitors Identified by Single Circulating Tumor Cell Sequencing in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(22): 6671-6682.
- [32] Guibert N, Delaunay M, Lusque A, *et al.* PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab[J]. *Lung Cancer*, 2018, 120:108-112.
- [33] 田建辉, 罗斌, 毕凌, 等. 非小细胞肺癌循环肿瘤细胞表达规律及其与“伏邪”致病关系的研究[J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50(1): 15-19, 33. [Tian JH, Luo B, Bi L, *et al.* Expression of circulating tumor cells in NSCLS and its relationship with 'Hidden Pathogen'[J]. *Shanghai Zhong Yi Yao Za Zhi*, 2016, 50(1): 15-19, 33.]
- [34] 董昌盛, 阙祖俊, 朱丽华, 等. 基于循环肿瘤细胞的非小细胞肺癌之“伏毒”本质临证探析[J]. *上海中医药大学学报*, 2018, 32(1): 18-22. [Dong CS, Que ZJ, Zhu LH, *et al.* Clinical study on essence of "hidden toxin" in non-small cell lung cancer based on circulating tumor cell expression[J]. *Shanghai Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao*, 2018, 32(1): 18-22.]
- [35] 阙祖俊, 罗斌, 董昌盛, 等. “正虚伏毒”肺癌研究平台的构建[J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(4): 11-16. [Que ZJ, Luo B, Dong CS, *et al.* Construction of lung cancer research platform under the theory of 'hidden toxicity due to vital qi deficiency'[J]. *Shanghai Zhong Yi Yao Za Zhi*, 2019, 53(4): 11-16.]
- [36] 朱丽华, 周蕾, 罗斌, 等. 284例非小细胞肺癌患者循环肿瘤细胞与临床特征及凝血功能的相关性[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2020, 33(9): 746-752. [Zhu LH, Zhou L, Luo B, *et al.* Correlation of circulating tumor cells with clinical characteristics and clotting function in 284 patients with non-small cell lung cancer[J]. *Zhong Liu Yu Fang Yu Zhi Liao*, 2020, 33(9): 746-752.]

[编辑: 安凤; 校对: 尤婷婷]

作者贡献:

于 盼、朱丽华: 文献搜集与分析、论文撰写与修改

阙祖俊: 论文修改

田建辉: 论文撰写指导与修改