·肿瘤专栏·

肺癌循环肿瘤细胞联合组织双模板测序方法的临床应用研究

张维雪[1]，贾利辉[1]，吕雅蕾[2]，冯 浩[1]，谭国梁[1]，李国雷[1*]
（1.河北省中医院普外科，河北 石家庄 050017；2.河北医科大学第一医院肿瘤内科，河北 石家庄 050031）

［摘要］ 目的 评估肺癌循环肿瘤细胞（circulating tumor cell，CTC）联合组织双模板测序方法在非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）患者治疗监测及用药指导中的潜在应用价值。**方法** 应用上皮细胞黏附分子（epithelial cell adhesion molecule，EpCAM，Ep）和波形蛋白（vimentin，Vi）修饰的脂质磁珠（lipid magnetic beads，LMB）依次分选富集系统（Ep-LMB/Vi-LMB），成功实现了 CTC 的高效捕获。基于该技术平台，将 CTC-Deoxyribonucleic acid（DNA）与组织 DNA 进行整合分析，构建了双模板测序体系。分别对入组的 26 例患者外周血样本进行 CTC 检测，其中 5 例患者额外获取福尔马林固定石蜡包埋的组织样本并用于高通量测序（Next-generation sequencing，NGS）。**结果** 肺癌患者的 CTC 计数较健康对照组显著升高［（34.6±5.2）*vs.*（3.8±1.4），$P<0.001$］，双模板测序技术每例可平均检出 2.44 个肿瘤特异度基因变异，较单样本测序可多识别 28.7％的低频突变，差异有统计学意义（$P<0.05$）。同时显示双模板测序不仅检测到了组织测序中预期的所有变异，而且还检测到了组织测序未检测到的其他变异。**结论** 基于多靶标 LMB 的捕获技术可突破传统 EpCAM 依赖方法的局限性，实现上皮－间质转化过程中 CTC 的有效富集。双源（组织＋CTC）测序工作流程不仅能覆盖组织活检检出的所有基因变异，还可额外识别具有临床意义的突变位点。

［关键词］ 肿瘤细胞，循环；脂质体磁珠；高通量测序 doi：10.3969/j.issn.1007-3205.2025.06.003
［中图分类号］ R730.21 **［文献标志码］** A **［文章编号］** 1007-3205（2025）06-0635-07

Clinical application of dual template sequencing method for lung cancer circulating tumor cells combined with tissue

ZHANG Wei-xue[1], JIA Li-hui[1], LYU Ya-lei[2], FENG Hao[1], TAN Guo-liang[1], LI Guo-lei[1*]
(1.*Department of General Surgery, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang* 050017, *China*; 2.*Department of Oncology, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang* 050031, *China*)

［Abstract］ Objective To evaluate the potential application value of circulating tumor cells (CTCs) combined with tissue dual template sequencing method in the treatment monitoring and medication guidance of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. **Methods** This study applied a sequential sorting and enrichment system (Ep LMB/Vi LMB) modified with epithelial cell adhesion molecule (EpCAM, Ep) and vimentin (Vi) to achieve efficient capture of CTCs. Based on this technology platform, CTC Deoxyribonucleic acid (DNA) was integrated with tissue DNA for analysis, and a dual template sequencing system was constructed. CTC testing was performed on peripheral blood samples of 26 enrolled patients, with tissue samples additionally obtained from 5 patients and fixed in formalin and embedded in paraffin for next-generation sequencing (NGS). **Results** The CTC count of lung cancer patients was significantly higher than

［收稿日期］2025－03－18
［基金项目］河北省省级科技计划资助项目（2137781D）
［作者简介］张维雪（1993－），女，河北邯郸人，河北省中医院主治医师，医学硕士，从事普外科疾病诊治研究。
＊通信作者。E-mail：liguolei0924@126.com

that of the healthy control group [(34.6±5.2) *vs*. (3.8±1.4), $P<0.001$]. The dual template sequencing technology was used to detect an average of 2.44 tumor specific gene variations per case, which could identify 28.7% more low-frequency mutations than single sample sequencing, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Simultaneously, dual template sequencing not only detected all expected variations in tissue sequencing, but also other variations that were not detected in tissue sequencing. **Conclusion** The capture technology based on multi-target LMB can overcome the limitations of traditional EpCAM dependent methods and achieve effective enrichment of CTCs during epithelial mesenchymal transition. The dual source (tissue+CTC) sequencing workflow not only covers all gene variations detected by tissue biopsy, but also identifies clinically significant mutation sites.

[**Key words**] neoplastic cells, circulating; liposome magnetic beads; high throughput sequencing

肺癌严重威胁全球人类健康,发病率和病死率位居首位,患者预后较差,5年生存率低[1]。目前,基因检测指导下的靶向治疗成为肺癌治疗的重要方式[2],组织活检虽作为确诊肺癌的金标准但存在诸多局限性,如对样本质量要求高、操作风险大等[3]。液体活检通过检测患者体液中的肿瘤成分进行分析,因微创、可动态监测等优势受到关注。血液中的循环肿瘤基因(circulating tumor deoxyribonucleic acid,ctDNA)来源于多种肿瘤细胞群,因此较单一组织来源的基因检测更具全面性[4]。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)是从原发或转移灶脱落进入血液循环的肿瘤细胞。由于其在血液中数量稀少且每个CTC周围存在大量白细胞,因此高效富集是CTC检测的前提[5]。本研究旨在将新开发的多靶标脂质磁珠(lipid magnetic beads,LMB)依次捕获策略富集CTC联合组织进行更全面的分析,构建双模板测序体系,评估其在肺癌诊疗中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 细胞培养 本研究使用的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)细胞系,包含人非小细胞肺癌细胞827(human non-small cell lung cancer cell 827, HCC827)、人肺腺癌细胞1975(human lung adenocarcinoma cell 1975,H1975)、人非小细胞肺癌细胞系A549(A549),均购自中国科学院细胞资源中心。各细胞系的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)基因型特征如下。HCC827存在19号外显子缺失(exon 19 deletion,exon 19 del),H1975携带EGFR基因中常见的突变类型,即发生在第20外显子中的亚位点790位置,胸氨酸(T)被甲硫氨酸(M)替代的突变p.Thr790Met(T790M)与发生在第21外显子中的亚位点858位置,即亮氨酸(L)被精氨酸(R)替代的突变(L858R)共存,A549为EGFR野生型。所有细胞系均于含10%胎牛血清和1%青霉素—链霉素溶液的培养基Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640)或Dulbecco′s Modified Eagle Medium(DMEM)中进行常规培养,培养条件为37 ℃、5% CO_2 恒温恒湿环境。

本研究经河北省重点研发计划项目(批准号:21377781D)伦理委员会审核通过。所有入组患者均在研究开始前签署书面知情同意书。

1.2 患者与血液样本采集 本研究纳入2022年1月—2023年5月于河北省中医院接受治疗的NSCLC患者26例(其中肺腺癌20例,肺鳞癌6例),所有患者均于术前1 d采集外周血样本并送至湖州猎源医学检验实验室进行CTC检测。其中5例患者额外获取福尔马林固定和石蜡包埋(formalin-fixed paraffin-embedding,FFPE)的组织样本并用于高通量测序(next-generation sequencing,NGS)。所有患者均进行根治性切除术,且符合以下标准:①可提供高质量组织样本;②外周血采集前已签署书面知情同意书。具体操作流程如下。使用10 mL抗凝管乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,EDTA)采集肺癌患者外周静脉血7.5 mL,采血后轻柔颠倒混匀10次。样本置于4 ℃冷藏并于48 h内完成检测。为实现组织与血液样本的双模板测序,相关样本处理严格遵循图1所示工作流程。上排为通过试剂盒从患者FFPE样本中提取DNA;下排为通过免疫磁珠法从患者外周血样本中分离CTC,随后进行免疫染色鉴定与定量分析,并对分离的CTC进行DNA提取;最后对CTC-DNA和对应组织样本DNA开展

突变分析。

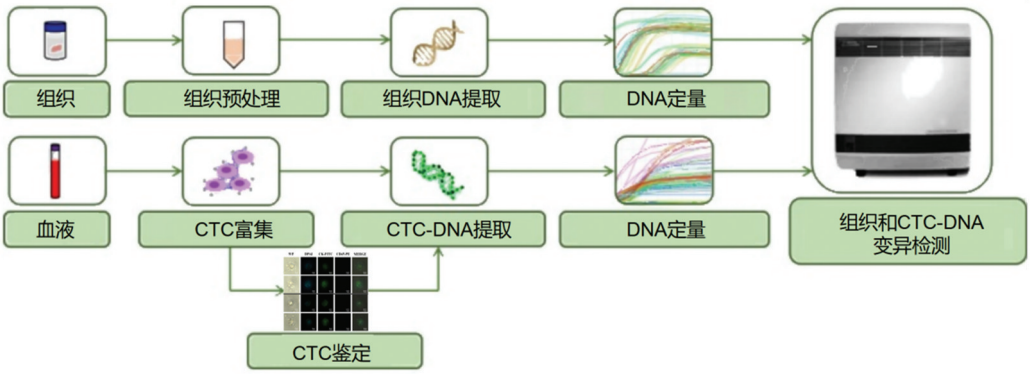


图1　同一患者组织样本和CTC高通量测序的整体工作流程

Figure 1　Overall workflow for next-generation sequencing of tissue samples and CTCs from the same patient

1.3　样本处理流程

1.3.1　样本固定　取7.5 mL外周血加入10 mL细胞固定液，充分混匀后室温静置24 h。离心分离：将固定后样本转移至15 mL离心管，700 g离心10 min，吸弃上清液。免疫磁珠富集：加入1 mL PBS重悬细胞沉淀，然后依次加入上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule，EpCAM)免疫磁珠(靶向上皮标志物)及波形蛋白(vimentin，Vi)免疫磁珠(靶向间质标志物)。37 ℃恒温孵育1 h，每15 min轻柔涡旋混匀。洗涤纯化：使用预冷磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline，PBS)洗涤3次(500 g，5 min/次)。细胞计数：血细胞计数板或自动细胞计数仪定量CTC。

1.3.2　CTC的鉴定标准　从患者外周血中富集的细胞若符合以下免疫表型特征，则定义为CTC。CTC判定标准如下。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer，FITC)标记的细胞角蛋白(cytokeratin，CK)(CK-FITC)表达可变(FITC绿色荧光阳性或弱阳性)；4′，6-二脒基-2-苯基吲哚(4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI)核染色阳性；白细胞共同抗原(leukocyte common antigen，CD45)阴性或阳性。白细胞排除：符合$DAPI^+/CK^+/CD45^+$标记的细胞判定为白细胞。CK阳性(可能源于上皮来源活化淋巴细胞)；核染色(DAPI)阳性；白细胞共同抗原(CD45)阳性。

1.3.3　文库制备与测序流程　首先进行DNA片段的处理。取DNA产物至0.5 mL离心管，加入超纯水进行体积校准，校准终体积至50 μL。其中超声破碎参数为工作时间30 s/间隔30 s，循环13次。然后进行DNA的末端修复与接头连接。其中酶反应体系的建立如下。在聚合酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)仪梯度控温下加入20 μL末端修复预混液，25 ℃孵育15 min → 12 ℃孵育5 min。磁珠纯化的过程如下。加入2倍体积贝克曼磁珠，涡旋10 s → 2 000 g离心2 min → 磁力架吸附弃上清，70%乙醇清洗2 min → 室温干燥5 min，20 μL Tris/Borate/EDTA(TBE)缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.5)重悬磁珠。随后进行文库扩增。其中PCR富集过程如下。转移20 μL纯化产物至96孔PCR板，加入20 μL指数接头预混液(Illumina TruSeq)，22 ℃延伸30 min(确保P5/P7接头有效连接)。再进行二次纯化，即2 000×g离心2 min → 磁力架吸附转移上清，最终洗脱体积20 μL(EBT缓冲液)。最后进行质检与测序。文库质控使用Agilent 2100分析仪检测片段分布(目标峰150～300 bp)及实时荧定量PCR方法进行定量(Kapa Biosystems标准曲线法)。使用桥式PCR扩增(HiSeq 3000/4000平台)进行簇生成。采用Illumina NovaSeq 6000进行双端测序，其中数据产出量≥30×深度(目标区域覆盖度≥95%)。

1.4　组织测序与双模板测序结果对比　本研究从入组的26例患者中选取5例进行FFPE组织测序，其DNA提取及建库方法与双模板测序流程完全一致，整个工作流程如图2所示。

1.5　统计学方法　应用SPSS 19.0统计软件分析数据。所有细胞实验均进行至少3次独立重复(生物学重复)。计量资料比较采用Mann-Whitney U秩和检验，突变等位基因频率一致性通过Pearson相关性分析验证。$P<0.05$为差异有统计学意义。

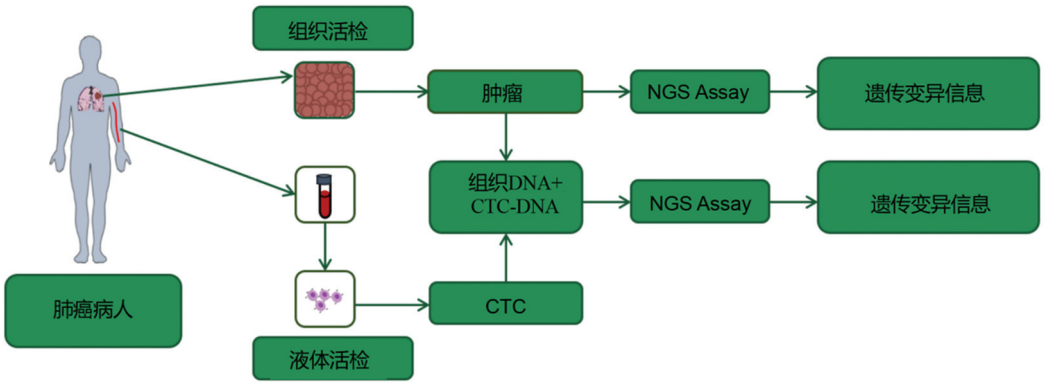


图2　组织样本测序与双模板测序对比的整体工作流程

Figure 2　Overall workflow for comparison of tissue sample sequencing and dual template sequencing

2　结　　果

2.1　肺癌患者CTC捕获分析结果　采用EpCAM免疫磁珠(Ep-LMB)与波形蛋白免疫磁珠(Vi-LMB)对肺癌患者7.5 mL外周血样本进行分步捕获,并通过荧光显微镜(Olympus IX83)鉴定CTC。如图3A所示,典型CTC表现为DAPI核染色(蓝色荧光)阳性、CD45阴性及CK19(绿色荧光)阳性。对健康受试者和肺癌患者的血液样本中的CTCs进行分析,结果表明当仅向样本中添加Ep-LMB或Vi-LMB时,捕获的CTC平均数量分别为3.42/(7.5 mL)和2.84/(7.5 mL)。当依次向样本中添加EP-LMB和Vi-LMB时,捕获的CTC总平均数量增加到7.35/(7.5 mL)。亚组分析的结果表明,Ep-LMB和Vi-LMB捕获的CTC数量差异无统计学意义($P>0.05$)。然而,肺癌患者的CTC数量显著高于健康志愿者的外周血中的数量,图3B～D。

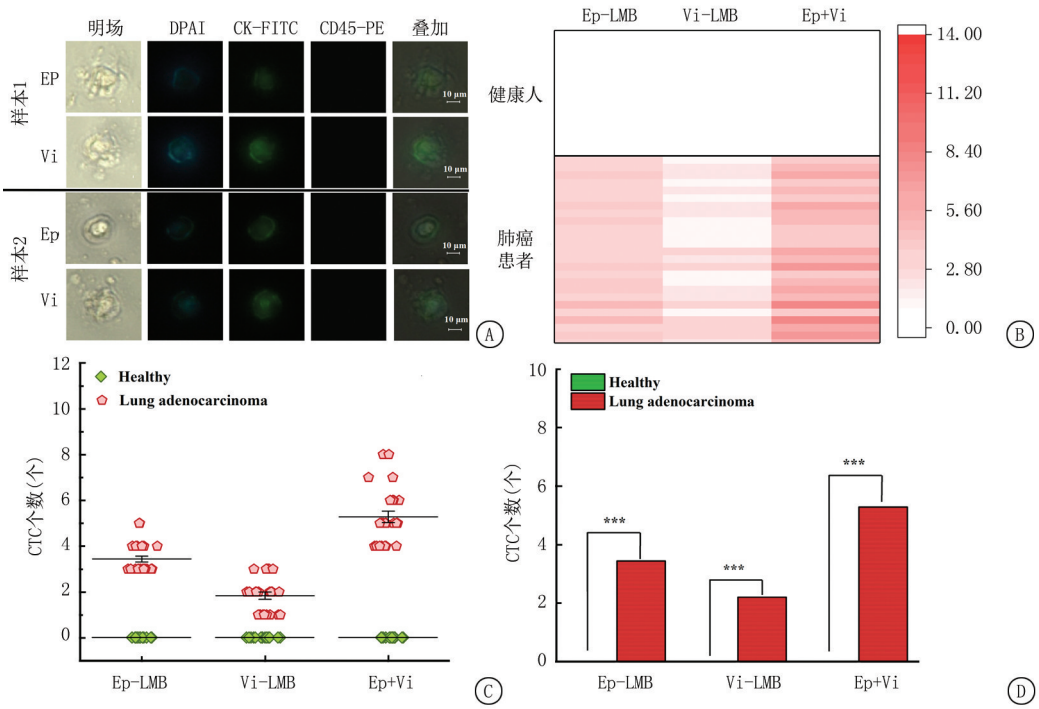


图3　肺癌患者CTC的统计分析

A.肺癌患者来源CTC的荧光显微成像图;B.不同磁珠富集CTC分布热图;C.CTC数量分布散点图;D.CTC平均数量分布柱状图

Figure 3　Statistical analysis of CTCs in patients with lung cancer

2.2　循环肿瘤细胞EGFR检测敏感度验证　为了评估该检测方法的敏感度,分别对携带EGFR特异度变异体的肺癌细胞系进行了计数,并将其与来自健康志愿者的白细胞以不同比例混合,以模拟富含外周血CTC后混合物的情况,涵盖0.1%～2%的纯度梯度,同时考察1～25 ng的DNA总量范围。起

始浓度设定为 25 ng，富集的 CTC 的纯度范围为 0.1%～10%。结果显示，在所有纯度为 0.1%以上的样本中都检测到了基因变异信息。见表 1。

表 1　采用肺癌细胞系评估检测敏感度

Table 1　Evaluation of detection sensitivity using lung cancer cell lines

纯度(%)	样本类别		HCC827 细胞			H1975 细胞		
	CTC	白细胞	Ex19del	T790M	L858R	Ex19del	T790M	L858R
NTC	N/A	N/A	−	−	−	−	−	−
LPC	N/A	N/A	+	+	+	+	+	+
1 ng								
10%	20	180	+	−	−	−	+	+
5%	10	190	+	−	−	−	+	+
2%	4	196	+	−	−	−	+	+
2 ng								
5%	20	380	+	−	−	−	+	+
2%	8	392	+	−	−	−	+	+
1%	4	396	+	−	−	−	+	+/−
25 ng								
0.50%	25	4 975	+	−	−	−	+	+
0.20%	10	4 990	+	−	−	−	+	+
0.10%	5	4 995	+	−	−	−	+	+

2.3　肺癌患者双模板高通量测序分析　本研究通过整合组织与 CTCs 双源样本进行高通量测序，系统解析肺癌基因变异特征。突变频率最高的基因依次为 EGFR、肿瘤蛋白 53(tumor protein 53，TP53)及 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog，KRAS)。双模板测序每例平均可检出 2.44 个肿瘤特异度基因变异，较单样本测序可多识别 28.7%的低频突变，二者相比差异有统计学意义($P=0.018$)，且次要等位基因频率(minor allele frequency，MAF)<0.5%。见图 4A、B。

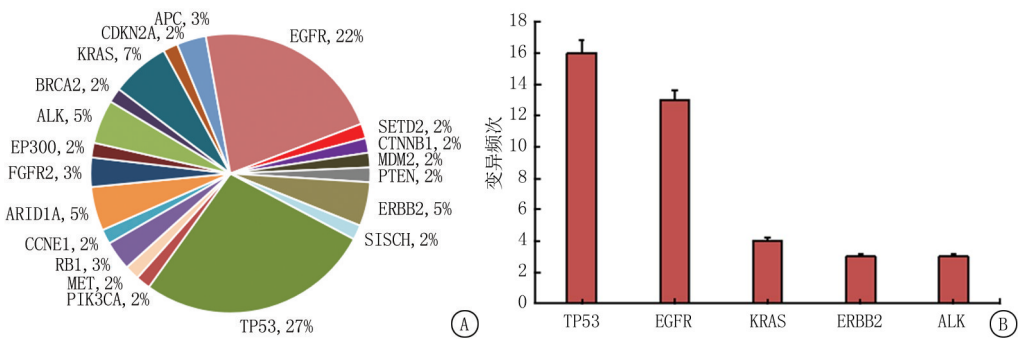


图 4　双模板测序技术整体工作流程的特征分析

A.双模板测序检出的突变位点；B.双模板测序突变频率最高的前 5 个基因

Figure 4　Characterization of the overall workflow with dual template sequencing

2.4　双模板测序与组织测序的对比验证　为验证 CTC 双模板测序的临床可行性，本研究对 5 例患者的福尔马林固定石蜡包埋组织样本进行高通量测序，并将其结果与双模板测序(组织＋CTC)进行系统性比对。结果显示，传统组织测序检出的所有突变(32 个)均能被双模板测序完整覆盖，且突变 MAF 高度一致($r=0.930$，$P<0.001$)。通过双模板测序，分别在患者 7 和 8 中检测到了 EGFR 基因扩增和双微体同源基因 2(murine double minute 2，MDM2)基因扩增。然而，在传统的基于组织的测序中并未显示这些拷贝数变异(copy number variations，CNV)。结果推测具有这些 CNV 的 CTC 可以通过双模板测序被识别出来。见表 2。

表2 组织样本高通量测序与双模板测序结果比较

Table 2 Comparison of next-generation sequencing and dual template sequencing results of tissue samples

入组编号	性别	年龄(岁)	变异基因(组织+CTC)	变异基因(组织)
2	女	64	ALK,EML4-ALK(E6:A20);ARID1(Ap.A345_A349del),EGFR(p.L858R;TP53p.R249S)	EGFR(p.L858R);TP53(p.R249S)
5	男	75	CCNEI CNV(扩增),CTNNB1(p.S33Y;EGFR p.L858R)	CTNNBI(p.S33Y),EGFR(p.L858R)
6	男	60	RB1(p.R7Pfs*24),TP53(p.L194R)	TP53(pL194R)
7	女	60	EGFR CNV(扩增),EGFR(p.E746_A750del),EGFR(p.T790M);ERBB2 CNV(扩增);FGFR2 CNV(扩增),TP53(p.Y220C)	EGFR(p.E746 A750del),EGFR(p.T790M),ERBB2 CNV(扩增)
8	男	68	EGFR(p.L747P),MDM2 CNV(扩增),PTEN(p.K183Rfs*16)	EGFR(p.L747P),PTEN(p.K183Rf*16)

3 讨 论

肺癌是全球人类健康的挑战,其发病率和病死率均居全球首位。每年约有200万新发病例,并导致100万～179万患者的死亡[6]。肺癌患者的预后仍不乐观,5年生存率仅为4%～17%[7]。预计至2035年肺癌年死亡例数将攀升至300万[8]。手术仍是早期肺癌治疗的金标准,Ⅰ～Ⅱ期患者术后5年生存率可达60%～80%[9]。然而约75%的肺癌患者在晚期才被确诊,此时治疗选择极为有限。近20年来,靶向治疗显著改善了晚期肺癌患者的生存[10],约69%的晚期患者携带潜在可干预分子靶点[11]。尽管组织基因组检测仍是分子分型的金标准,但其侵入性操作带来的并发症风险及肿瘤空间异质性导致的检测偏差,严重制约了临床应用[12]。

CTC从肿瘤组织脱落,并通过远端转移和血液循环生长,最终形成可检测的肿瘤[13]。越来越多的证据[14-15]表明,循环肿瘤细胞作为肿瘤进展的重要因素具有重要意义,与许多癌症的预后情况密切相关。目前,唯一同时获得美国和中国食品药品监督管理局批准用于检测CTC的平台是Cell Search,能够识别展示EpCAM蛋白表面表达的CTC[16]。然而,值得注意的是,相当一部分CTC或者缺乏或者表面表达EpCAM的水平较低,这妨碍了对肿瘤的全面检测,从而对临床操作产生了影响[17]。本研究中,鉴于上述情况,依次使用了Ep-LMB和Vi-LMB来富集肿瘤细胞,这些方法不仅能够富集大多数上皮来源的肿瘤细胞,还能富集处于上皮间质转化过程中的肿瘤细胞以及间质来源的肿瘤细胞。当仅向样本中添加Ep-LMB或Vi-LMB时,捕获的CTC平均数量分别为3.42/(7.5 mL)和2.84/(7.5 mL),研究结果表明,平均每个患者都能检测到一定数量的CTC;当依次向样本中添加Ep-LMB和Vi-LMB时,捕获的CTC总平均数量增加到7.35/(7.5 mL)。Ep-LMB和Vi-LMB的组合在CTC富集方面表现出更优越的能力,这与Liang等[18]研究结果一致。此外,为了评估该检测方法的敏感度,分别对携带EGFR特异性变异体的肺癌细胞系进行了计数,并将其与来自健康志愿者的白细胞以不同比例混合,以模拟富含外周血CTC产物的情况。结果显示,CTC富集检测平台显示出更高的敏感度和特异度。CTC的基因组分析作为一种强大的工具应运而生,能够全面描绘肿瘤细胞的表型和基因型。这种多功能性使得体外检测更全面。因此,越来越多的研究将注意力转向对循环肿瘤细胞的遗传分析[19]。

研究[20]显示,通过直接对循环肿瘤细胞进行二代测序,识别出与转移性疾病中生物学差异因素分析相关的单点变异磷脂酰肌醇3-激酶催化亚基p110alpha编码基因(phosphatidylinositol 3-kinasecatalytic subunit p110alpha,PIK3CA),并证实了利用CTC进行分子分析的可行性。此外,通过比较CTC-DNA模板与相应组织活检DNA突变谱的一致性,显示两者之间存在显著重叠[21],传统组织测序检出的所有突变(32个)均能被双模板测序完整覆盖,且突变MAF高度一致。在这种情况下,本研究显示双模板测序与单独组织测序之间DNA突变谱的变异性,并显示双模板测序不仅检测到了组织测序中预期的所有变异,而且还检测到了组织测序未检测到的其他变异。本研究分别在患者7和8中检测到了EGFR基因扩增和MDM2基因扩增。然而,在传统的基于组织的测序中并未显示这些CNV。研究结果表明,双模板测序能够提供比传统组织测序更全面的肿瘤分子变异信息。为了应对肿瘤组织的空间分子异质性,本研究通过使用定制的Ep-LMB、Vi-LMB来富集外周血中的CTC,并将其与组织DNA结合构建测序文库,从而优化了整个工作流程。本研究表明,CTC结合组织的双模板测序能够为疾病的晚期状态提供有价值的、详细的见解;同时也可在EGFR、KRAS等关键基因的检出方

面提示肺癌患者的预后情况。研究[22-23]表明 CTC 在预后预测方面优于传统的血清标记物，但在诊断敏感度方面可能存在不足，联合检测 CTC 和血清标记物可以提高诊断准确性，并提供更全面的预后信息。CTC 也可以作为影像学检查的补充，提供肿瘤的分子特征和动态变化信息。将 CTC 与影像学数据相结合，可以提高肺癌的诊断准确性和个性化治疗效果[24]。因此，CTC 结合组织或 ctDNA 的联合测序可能弥补以上 CTC 与血清标志物及影像学检测相比的不足，并代表了未来液体活检的发展方向。然而，还需要更多的标本及进一步的研究来验证这种方法的临床价值和意义。

尽管本研究受限于相对较小的患者样本量，但仍通过初步研究结果验证了 CTC 与组织样本双模板测序工作流程的可靠性。优化的实验方案证实了联合分析 CTC-DNA 与组织 DNA 的可行性，且双模板测序可为患者肿瘤相关变异提供更全面互补的分子信息。目前团队正筹备在更大规模患者队列中开展扩展性研究，以进一步评估其临床应用价值。

[参考文献]

[1] Que Z, Luo B, Yu P, et al. Polyphyllin Ⅶ induces CTC anoikis to inhibit lung cancer metastasis through EGFR pathway regulation[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(16): 5204-5217.

[2] Kemper M, Krekeler C, Menck K, et al. Liquid biopsies in lung cancer[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(5): 1430.

[3] Deng Z, Wu S, Wang Y, et al. Circulating tumor cell isolation for cancer diagnosis and prognosis[J]. EBioMedicine, 2022, 83: 104237.

[4] Que Z, Qi D, Yang Y, et al. Regulating chemoresistance and cancer stemness: the CDH17-YAP pathway in distinct cellular states of lung cancer CTC clusters[J]. Cell Mol Biol Lett, 2025, 30(1): 23.

[5] Kanayama M, Kuwata T, Mori M, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells detected with the microfluidic "universal CTC-chip" for primary lung cancer[J]. Cancer Sci, 2022, 113(3): 1028-1037.

[6] Huh HD, Sub Y, Oh J, et al. Reprogramming anchorage dependency by adherent-to-suspension transition promotes metastatic dissemination[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 63.

[7] Jin F, Zhu L, Shao J, et al. Circulating tumour cells in patients with lung cancer universally indicate poor prognosis[J]. Eur Respir Rev, 2022, 31(166): 220151.

[8] Chen X, Luo L, Lu Y, et al. Construction of IMMS containing multi-site liposomes for dynamic monitoring of blood CTC in patients with osimertinib-resistant non-small-cell lung cancer and its mechanism[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2023, 23(6): 676-686.

[9] Li C, Zhong S, Chen J, et al. TsRNA-49-73-Glu-CTC: A promising serum biomarker in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2025, 20(3): e0320187.

[10] Liu Y, Zhao W, Hodgson J, et al. CTC-Race: Single-cell motility assay of circulating tumor cells from metastatic lung cancer patients[J]. ACS Nano, 2024, 18(12): 8683-8693.

[11] Hamilton G, Hochmair MJ, Stickler S. Overcoming resistance in small-cell lung cancer[J]. Expert Rev Respir Med, 2024, 18(8): 569-580.

[12] Dashzeveg NK, Jia Y, Zhang Y, et al. Dynamic glycoprotein hyposialylation promotes chemotherapy evasion and metastatic seeding of quiescent circulating tumor cell clusters in breast cancer[J]. Cancer Discov, 2023, 13(9): 2050-2071.

[13] Andrikou K, Rossi T, Verlicchi A, et al. Circulating tumour cells: detection and application in advanced non-small cell lung cancer[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 16085.

[14] Balamurugan K, Poria DK, Sehareen SW, et al. Stabilization of E-cadherin adhesions by COX-2/GSK3beta signaling is a targetable pathway in metastatic breast cancer[J]. JCI Insight, 2023, 8(6): e156057.

[15] Tomasik B, Skrzypski M, Bieńkowski M, et al. Current and future applications of liquid biopsy in non-small-cell lung cancer-a narrative review[J]. Transl Lung Cancer Res, 2023, 12(3): 594-614.

[16] Austin RG, Huang TJ, Wu M, et al. Clinical utility of non-EpCAM based circulating tumor cell assays[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 125: 132-142.

[17] Bankó P, Lee SY, Nagygyörgy V, et al. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 48.

[18] Liang DH, Hall C, Lucci A. Circulating tumor cells in breast cancer[J]. Recent Results Cancer Res, 2020, 215: 127-145.

[19] Carlsson A, Nair VS, Luttgen MS, et al. Circulating tumor microemboli diagnostics for patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(8): 1111-1119.

[20] Herbst RS, Maddox AM, Rothenberg ML, et al. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase Ⅰ trial[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(18): 3815-3825.

[21] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. Lancet, 2017, 389(10066): 299-311.

[22] Guo S, Chen J, Hu P, et al. The value of circulating tumor cells and tumor markers detection in lung cancer diagnosis[J]. Technol Cancer Res Treat, 2023, 22: 15330338231166754.

[23] Wankhede D, Grover S, Hofman P. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in resectable lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(24): 6112.

[24] Wang X, Bai L, Kong L, et al. Advances in circulating tumor cells for early detection, prognosis and metastasis reduction in lung cancer[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1411731.

（本文编辑：何祯）