

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.29.007
文章编号: 1005-8982 (2017) 29-0032-07

晚期非小细胞肺癌外周血 CTC 与 肿瘤组织 EGFR 表达的相关性*

朱颖¹, 江波¹, 杨承纲², 金从国³, 涂长玲¹, 何文杰¹, 刘坤¹

(昆明医科大学第三附属医院 1. 干部医疗科, 2. 病理科, 3. 肿瘤研究所,
云南 昆明 650118)

摘要: 目的 探讨晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 外周血循环肿瘤细胞 (CTC) 与肿瘤组织表皮生长因子受体 (EGFR) 表达的一致性。**方法** 利用流式细胞术及免疫组织化学染色配对检测 66 例 NSCLC 患者外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 的表达水平。给予 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂治疗 1 个月后进行疗效评价。比较 CTC 与肿瘤组织 EGFR 表达的一致性, 并分析其与患者临床因素、疗效及预后的相关性。**结果** 外周血 CTC 与肿瘤组织 EGFR 表达一致率为 69.7%。CTC 与肿瘤组织 EGFR 的表达在不同组织学类型间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在不同性别、年龄、分期、体力活动状态评分方面比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。EGFR 高表达组疾病控制率高于低表达组 (CTC: 87.5% vs 35.3%; 肿瘤组织: 72.7% vs 36.4%) ($P < 0.05$)。生存分析结果显示, EGFR 高表达组有更长的无进展生存期 (CTC: 8 个月 vs 2 个月; 肿瘤组织: 6 个月 vs 2 个月) 和总生存期 (CTC: 20 个月 vs 13 个月; 肿瘤组织: 16 个月 vs 14 个月) ($P < 0.05$)。**结论** 晚期 NSCLC 患者外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达的一致性较好, 两者对酪氨酸激酶抑制剂治疗的疗效及预后具有一定的预测价值。外周血 CTC 作为肿瘤组织的替代检测标本是可行的。

关键词: 非小细胞肺癌, 循环肿瘤细胞, 肿瘤组织, 表皮生长因子受体

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Correlation between EGFR expression in circulating tumor cells and in tumor tissues of advanced non-small cell lung cancer*

Ying Zhu¹, Bo Jiang¹, Cheng-gang Yang², Cong-guo Jin³, Chang-ling Tu¹, Wen-jie He¹, Kun Liu¹

(1. Cadre's Medical Oncology; 2. Department of Pathology; 3. Tumor Research Institute, the Third
Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective To detect the expression level of epidermal growth factor receptor (EGFR) in circulating tumor cells (CTC) and matched tumor tissues from patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), and investigate the consistent rate of these two methods. **Methods** The EGFR expression was analyzed by flow cytometry and immunohistochemical staining in the peripheral blood CTC and tumor tissues from 66 advanced NSCLC patients. The therapeutic efficacy was evaluated after 1 month of treatment with EGFR-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI). The consistency of the EGFR expression in the CTC and the tumor tissues was compared. The relationships of EGFR expression with clinical characteristics, efficacy, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were analyzed. **Results** The consistent rate of the two methods was 69.7% (46/66, $P < 0.05$). The EGFR expression levels in the CTC and the tumor tissues were significantly different between the patients with

收稿日期: 2016-03-31

* 基金项目: 云南省科技厅应用基础研究面上项目 (No: 2012FB164); 云南省教育厅重点项目 (No: 2013Z113)

[通信作者] 江波, E-mail: jiangruonin1973@163.com

different pathological types ($P < 0.05$), but not statistically different between the patients with different gender, age, clinical stage or PS score ($P > 0.05$). The patients with high EGFR expression level had remarkably higher disease control rate than those with low EGFR expression level (CTC: 87.5% vs. 35.3%; tumor tissue: 72.7% vs. 36.4%; $P < 0.05$), longer PFS (CTC: 8 months vs. 2 months; tumor tissue: 6 months vs. 2 months; $P < 0.05$) and OS (CTC: 20 months vs. 13 months; tumor tissue: 16 months vs. 14 months; $P < 0.05$). **Conclusions** In the patients with advanced NSCLC, EGFR expression level in the CTC and the tumor tissues is highly consistent. Both of them can be used for predicting the efficacy of EGFR-TKI therapy and prognosis. CTC can be a substitute for tumor tissue.

Keywords: non-small cell lung cancer; circulating tumor cell; tumor tissue; epidermal growth factor receptor

肺癌是目前世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 严重威胁人类健康^[1]。所有肺癌中约 84% 为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 大部分患者就诊时已属晚期^[2], 失去了根治性手术治疗的机会, 只能进行姑息性放、化疗。近年来出现的生物靶向治疗为 NSCLC 患者提供新的治疗手段。表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 已成功应用于临床, 极大地改善 NSCLC 患者的生存质量, 延长生存时间^[3]。表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 敏感突变是 EGFR-TKI 对 NSCLC 患者疗效的预测指标, 而肿瘤组织是 EGFR 突变检测的金标准^[4]。对不能手术的晚期 NSCLC 患者, 仅能通过穿刺等手段获取极少量的肿瘤组织, 或者无法获取肿瘤组织标本。如何从该类患者中筛选出对 EGFR-TKI 敏感的人群, 成为目前亟待解决的问题。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 是指由原发灶或转移灶脱落下来, 进入外周血循环的肿瘤细胞, 是肿瘤播散转移的重要原因^[5], 相对于肿瘤组织, 可以多次、实时获取。为使 CTC 替代组织作为检测载体, 必须识别出 CTC, 并对其表型特征进行认识, 这将有助于提示潜在的治疗靶点, 为临床靶向治疗的选择提供一个可行的方法。本研究对晚期 NSCLC 患者外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平进行配对检测, 旨在探讨外周血 CTC 与肿瘤组织 EGFR 表达的一致性, 以及外周血 CTC 作为肿瘤组织替代检测标本的可行性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2012 年 9 月 -2014 年 5 月昆明医科大学第三附属医院收治且经病理组织学或细胞学确诊的晚期 NSCLC 患者 66 例。其中, 男性 40 例, 女性 26 例, 男、女比例为 1.54 : 1.00; 年龄 41 ~ 78 岁, 平均 61 岁;

病理类型: 腺癌 52 例, 鳞癌 14 例。TNM 分期: III B 期 4 例, IV 期 62 例, 体力活动状态 (performance status, PS) 评分 0 ~ 1 分 44 例, ≥ 2 分 22 例。治疗前后行胸腹部 CT、彩超、颅脑磁共振成像、心电图、血常规、血液生化及肿瘤标志物检查。

1.2 治疗方法

66 例患者中, 16 例为 EGFR 敏感突变阳性, 均给予 EGFR-TKI 治疗。其余 50 例患者不愿 / 不能耐受化疗, 在患者知情同意的前提下, 给予 EGFR-TKI 治疗。根据医生经验从以下 3 种 EGFR-TKI 类药物中任选 1 种: 吉非替尼片 (英国阿斯利康公司) 口服 250 mg/次, 1 次/d; 厄洛替尼片 (美国罗氏公司) 口服 150 mg/次, 1 次/d; 盐酸埃可替尼片 (浙江贝达药业公司) 口服 125 mg/次, 3 次/d。无论选择何种药物均服用 ≥ 1 个月。

1.3 流式细胞技术

1.3.1 标本采集 66 例患者在治疗前从肘正中静脉中采血 5 ml, 随机选取 10 例患者另采血 20 ml, 所有血液标本加入肝素抗凝混匀, 并在采集后 2 h 内进行检测。

1.3.2 抗体、试剂及仪器 CD45-PC5 荧光单克隆抗体、荧光标记细胞角蛋白 18 抗体、荧光标记 EGFR 抗体、氯化铵 NH_4Cl 溶血素均购于美国 Beckmancoulter 公司, 流式细胞仪 EPICS XL (美国 Beckmancoulter 公司), 水冷紫外激光器、离心机、恒温箱及摇床购自 Coherent 公司。

1.3.3 分选 $\text{CD}45^- \text{CK}18^+$ 细胞 将 10 例 20 ml 外周血每份分成 20 份, 加入 5 ml 无菌试管中, 每管 1 ml; 每管加入 CD45-PC5、CK18-FITC 各 200 μl , 避光保存 30 min; 加入 NH_4Cl 溶血素 4 ml, 反复溶血, 直到液体透亮, 离心后加入培养液待分选。消毒 ALTRA 流式室, 调节室内温度至 8℃ 左右, 开始收集细胞, 流速控制在 10 000 ~ 25 000 个/s, 收集过程中全程振荡, 观察 1 次/30 min。细胞数接近 1 000 个时结束分选。

1.3.4 确定 CD45⁻CK18⁺ 细胞为外周血 CTC 将分选的 CD45⁻CK18⁺ 细胞用玻片收集微球, 置于光学显微镜下观察有无恶性肿瘤细胞的特征。

1.3.5 检测 CTC 中 EGFR 的表达水平 将 66 例 5 ml 血液标本加入 20 μ l CD45-PC5、20 μ l EGFR-PE 和 20 μ l CK18-FITC, 加入肝素抗凝的全血 100 μ l, 摇匀后避光室温保存 30 min。加入 NH₄Cl 溶血素 2 ml, 溶血 15 min 后上机检测, 表达 CD45⁻CK18⁺ 的细胞为患者外周血残留的 CTC, 表达 CD45⁻CK18⁺EGFR 阳性的细胞为 CTC 的 EGFR 阳性细胞。

1.4 免疫组织化学法

1.4.1 标本采集 66 例患者均采集到组织学标本, 采集方法包括: 纤维支气管镜活检术、CT 引导下经皮肺穿刺活检术、胸腔镜取材活检术。

1.4.2 抗体、试剂及方法 鼠抗人 EGFR 抗体, 免疫组织化学 SP 法试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。

1.4.3 结果判断 在光学显微镜下对切片染色情况进行评估, EGFR 阳性表达主要定位于肿瘤细胞的细胞质或细胞膜上, 呈棕黄色颗粒。采用 Mattern 半定量分析方法, 综合染色强度和细胞数量进行分级, 按染色强度分为: 基本未着色、染色与背景相似计 0 分; 着色浅、略高于背景计 1 分; 中度着色、明显高于背景计 2 分; 强染、着深棕色计 3 分。阳性细胞数 <5% 为 0 分; 5% ~ 25% 为 1 分; 26% ~ 50% 为 2 分; 51% ~ 75% 为 3 分; >75% 为 4 分。2 项相加后分为低表达和高表达: 0 ~ 2 分为低表达, >2 分为高表达。

1.5 疗效评价

疗效按 WHO 实体瘤评价标准分为: 完全缓解 (complete response, CR)、部分缓解 (partial response, PR)、疾病稳定 (stable disease, SD)、疾病进展 (progression disease, PD), CR+PR 为有效, CR+PR+SD 为控制。无进展生存期 (progression free survival, PFS) 指自治疗首日至病变进展日; 总生存期 (overall survival, OS) 为自治疗首日至死亡日或失访日, 均以月计算。随访终止时间为 2015 年 6 月。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 一致性比较采用 Kappa 检验 (Kappa >0.75 为一致性高, 0.40 ~ 0.75 为一致性好, Kappa <0.40 为一致性差)、McNemar 检验、准确性检验 [受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 的曲线下面积

(area under curve, AUC) 0.5 ~ 0.7 表示诊断价值较低, 0.7 ~ 0.9 表示诊断价值中等, >0.9 表示诊断价值较高]; 计数资料以率表示, 用 χ^2 检验; 生存分析用 Kaplan-Meier 法、Log-rank 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 确定外周血 CTC

10 例标本中均分选出 CD45⁻CK18⁺ 细胞, 染色后置于光学显微镜下观察, 具备恶性肿瘤细胞的特征: 细胞核染色加深, 染色质变粗, 核浆比例增大。可确定 CD45⁻CK18⁺ 细胞为外周血 CTC。见图 1。

2.2 EGFR 在外周血 CTC 中的表达

66 例外周血 CTC 的 EGFR 表达值: 最小值 5.4, 最大值 50.0, 中位数 23.0, 均值 24.6, 以 24.6 分界, >24.6 为高表达, <24.6 为低表达。高表达数为 32 例, 低表达数为 34 例。

2.3 EGFR 在肿瘤组织的表达

66 例肿瘤组织免疫组织化学染色高表达 44 例, 低表达 22 例。见图 2、3。

2.4 外周血 CTC 与肿瘤组织 EGFR 表达水平的一致性

外周血 CTC 检测到 EGFR 高表达 32 例, 肿瘤组织检测到 EGFR 高表达 44 例, 在 CTC 和肿瘤组织中均为高表达 28 例。以肿瘤组织的 EGFR 表达

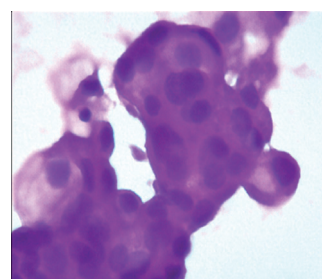


图 1 晚期 NSCLC 患者外周血 CTC (SP \times 400)

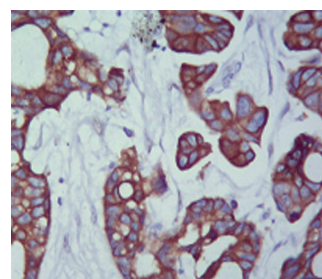


图 2 NSCLC 组织中 EGFR 高表达 (SP \times 200)

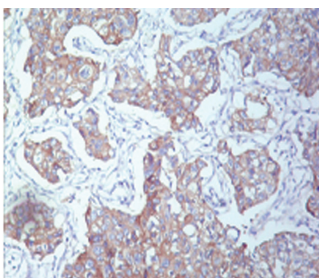


图 3 NSCLC 组织中 EGFR 低表达 (SP×200)

结果为参照, CTC 检测 EGFR 表达的敏感性和特异性分别为 63.6% (28/44) 和 81.8% (18/22), 阳性预测值和阴性预测值分别为 87.5% (28/32) 和 52.9% (18/34), 两者一致率为 69.7% (46/66)。说明外周血 CTC 的 EGFR 表达与肿瘤组织的 EGFR 表达一致性好 (Kappa =0.400, P =0.000), 两者检测结果无差别 (McNemar 检验 P =0.012), CTC 的 EGFR 表达检测有一定诊断价值 (AUC =0.770, P =0.001)。见表 1 和图 4。

2.5 外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平与临床因素的相关性

66 例标本中, 不同病理类型的 EGFR 表达水平比较, 差异有统计学意义 (P <0.05), 腺癌 EGFR 高表达率高于鳞癌。而在性别、年龄、TNM 分期、PS 评分方面,

外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平比较, 差异无统计学意义 (P >0.05)。见表 2。

表 1 晚期 NSCLC 患者外周血 CTC 与肿瘤组织 EGFR 表达的一致性 例

CTC	EGFR		合计
	高表达	低表达	
高表达	28	4	32
低表达	16	18	34
总数	44	22	66

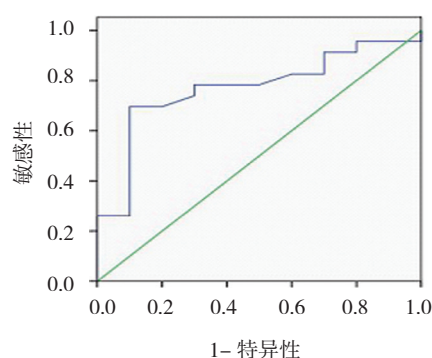


图 4 晚期 NSCLC 患者外周血 CTC 的 EGFR 表达的 ROC 曲线

表 2 晚期 NSCLC 患者临床特征与外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平的关系 例 (%)

临床特征	CTC				EGFR			
	高表达	低表达	χ^2 值	P 值	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
性别								
男	18 (45.00)	22 (55.00)	0.494	0.482	26 (65.00)	14 (35.00)	0.127	0.722
女	14 (53.84)	12 (46.15)			18 (69.20)	8 (30.80)		
年龄								
≥ 60 岁	14 (53.84)	12 (46.15)	0.494	0.482	18 (69.20)	8 (30.80)	0.127	0.722
< 60 岁	18 (45.00)	22 (55.00)			26 (65.00)	14 (35.00)		
病理类型								
腺癌	30 (57.69)	22 (42.31)	8.321	0.004	40 (76.92)	12 (23.08)	9.531	0.002
鳞癌	2 (14.29)	12 (85.71)			4 (28.57)	10 (71.43)		
TNM 分期								
III B	0 (0.00)	4 (100.00)	2.208	0.137	2 (50.00)	2 (50.00)	0.033	0.855
IV	32 (51.61)	30 (48.39)			42 (67.74)	20 (32.26)		
PS 评分								
0、1 分	24 (54.55)	20 (45.45)	1.941	0.164	28 (63.64)	16 (36.36)	0.545	0.460
≥ 2 分	8 (36.36)	14 (63.64)			16 (72.73)	6 (27.27)		

2.6 外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平与酪氨酸激酶抑制剂疗效的相关性

66 例晚期 NSCLC 患者中, 2 例 CR, 24 例 PR, 14 例 SD, 26 例 PD, 总有效率(CR+PR)为 39.4%(26/66), 疾病控制率(disease control rate, DCR)(CR+PR+SD)为 60.6%(40/66)。EGFR 高表达患者的疾病控制率高于低表达患者 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.7 外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平与生存期的相关性

本组患者中位 OS 为 15 个月(8~30 个月), 1 年生存率为 69.7%, 2 年生存率为 18.2%。CTC 的 EGFR 高表达组中位 PFS 和 OS 高于低表达组 ($P = 0.000$)。肿瘤组织的 EGFR 高表达组中位 PFS 和 OS 亦高于低表达组 ($P = 0.000$)。见图 5 ~ 8。

表 3 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平与酪氨酸激酶抑制剂疗效的相关性

组别	例数	CR/ 例	PR/ 例	SD/ 例	PD/ 例	DCR/%	χ^2 值	P 值
CTC								
高表达	32	2	14	12	4	87.5	18.818	0.000
低表达	34	0	10	2	22	35.3		
EGFR								
高表达	44	2	18	12	12	72.7	8.123	0.004
低表达	22	0	6	2	14	36.4		

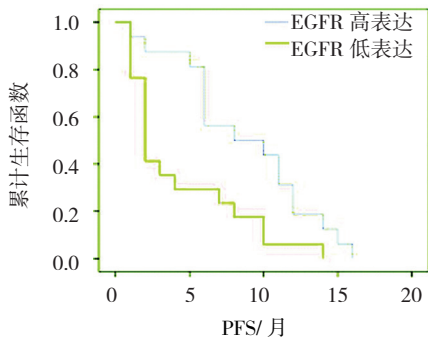


图 5 晚期 NSCLC 患者 CTC 的 EGFR 不同表达水平的 PFS 比较

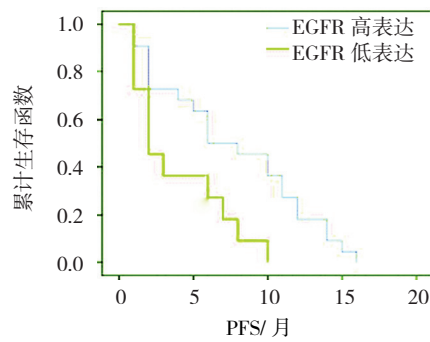


图 7 晚期 NSCLC 患者肿瘤组织 EGFR 不同表达水平的 PFS 比较

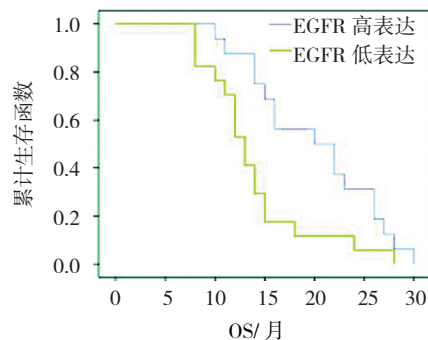


图 6 晚期 NSCLC 患者 CTC 的 EGFR 不同表达水平的 OS 比较

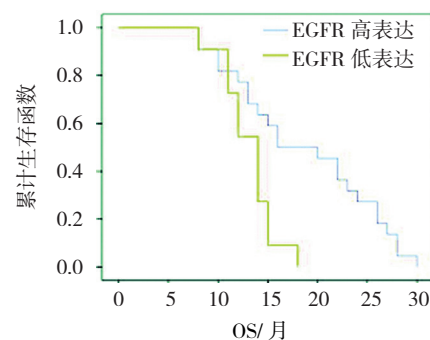


图 8 晚期 NSCLC 患者肿瘤组织 EGFR 不同表达水平的 OS 比较

3 讨论

EGFR 是一种具有酪氨酸激酶活性的细胞膜表面糖蛋白受体, 在细胞信号传导通路中起重要作用。针对该靶点的药物有大分子单克隆抗体和酪氨酸激酶抑

制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI), 其中 TKI 类药物在临床中使用最为广泛。大量研究显示, 对于存在 EGFR 敏感突变的患者, EGFR-TKI 治疗的客观缓解率 $>70%$, 无突变者 $<10%$ ^[3, 6]。肿瘤组织是进行 EGFR

突变检测的金标准, 突变扩增阻滞系统法是目前标准的检测方法, 对肿瘤组织的取材要求也较高。本研究中, 16 例患者进行肿瘤组织 EGFR 突变检测, 检测率仅为 24.2%。对于无法获得组织学标本, 或是标本过少无法进行检测的晚期 NSCLC 患者来说, 外周血的检测就显得尤为重要。

从理论上而言, 负载肿瘤细胞、基因或蛋白的标本均有可能成为组织的替代物, 如外周血、浆膜腔积液、分泌物及体液等, 其中以外周血检测较为方便, 成为近年研究的热点。有研究通过检测外周血游离 DNA 发现, 外周血和肿瘤组织中检测到的 EGFR 突变状态有一定相关性^[7-8]。2008 年 MAHESWARAN 等^[9]分析 12 例晚期 NSCLC 患者的外周血 CTC 和血浆标本, 结果显示, 两者 EGFR 突变的检出率分别为 92% 和 33%, 提示 CTC 可能是更好的组织替代标本。近年来, 针对外周血 CTC 检测 EGFR 突变的研究较多, 大部分研究证实其与肿瘤组织突变的一致性^[10-11]。然而, 关于检测 CTC 的 EGFR 蛋白表达水平的研究极少, 未见 CTC 与肿瘤组织 EGFR 蛋白表达水平相关性研究的报道。

国内外研究表明, 应用流式细胞技术检测细胞角蛋白 (Cytokeratin, CK) 可作为评估肿瘤血行微转移较敏感的指标, 但以 CK 单一指标作为判断存在癌细胞的标准, 会产生假阳性的结果。将白细胞共同抗原 CD45 与 CK 结合, 可以排除大部分 CD45⁺CK⁺ 的假阳性细胞, 获得比较特异的 CD45⁻CK⁺ 微转移癌细胞。本研究利用白细胞抗原 CD45, 负性分选出 CTC, 配对检测晚期 NSCLC 患者外周血 CTC 和肿瘤组织 EGFR 表达水平, 结果显示, CTC 的 EGFR 高表达率为 48%, 组织标本的 EGFR 高表达率为 67%, 两者一致率为 69.7% (46/66), 一致性好。可见, 外周血 CTC 有可能替代肿瘤组织, 作为液体活检标本。

本研究还显示, 无论 CTC 还是肿瘤组织, 腺癌中的 EGFR 表达水平均高于鳞癌, 这与目前大量 EGFR 突变概况研究结果一致, 腺癌 EGFR 突变率高于鳞癌^[12]。而性别、年龄、TNM 分期、PS 评分方面比较, CTC 与肿瘤组织的 EGFR 表达水平无差异。

有研究显示, 对于肿瘤组织未检测到表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 基因扩增的晚期乳腺癌患者, 病情进展后, 通过检测 CTC 的 HER2 蛋白表达水平, HER2 高表达者给予曲妥珠单抗靶向治疗, 获得较好的疗效^[13-14]。而

在 NSCLC 靶向治疗方面未见类似报道。目前在中国获批用于临床的 EGFR-TKI 包括吉非替尼、厄洛替尼及埃克替尼, 3 者具有相似的化学结构及作用机制, CTONG0901、WJOG5108L、ICOGEN 等大型临床研究也显示 3 者疗效相当^[15-17]。因此, 本研究对药物的选择未做强行规定。本研究 66 例晚期 NSCLC 患者中, CTC 的 EGFR 高表达组患者疾病控制率高于低表达组, 高表达组的中位 PFS 和 OS 高于低表达组。在肿瘤组织也得到相似的结果, EGFR 高表达组患者的疾病控制率、中位 PFS 和 OS 高于低表达组。本研究中, CTC 与肿瘤组织检测结论相似, 两者的 EGFR 表达水平对 TKI 治疗的疗效及预后有一定的指导意义。

对于晚期 NSCLC 患者, 靶向治疗相对于化疗有明显的优越性, 各国指南已将 TKI 类药物列为 EGFR 突变者的一线治疗。对于难以获取肿瘤组织的患者来说, 需要一种可以替代组织检测的方法来实现个体化治疗。相对于肿瘤组织而言, 外周血 CTC 采集方便, 可以反复、多次采集。因此, 对于获取肿瘤组织困难的患者, 用 CTC 代替肿瘤组织进行 EGFR 检测是可行的。

参 考 文 献:

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] DETTERBECK F C, BOFFA D J, TANOUÉ L T. The new lung cancer staging system[J]. CHEST Journal, 2009, 136(1): 260-271.
- [3] MOK T S, WU Y L, THONGPRASERT S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. New England Journal of Medicine, 2009, 361(10): 947-957.
- [4] CAGLE P T. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2013, 15(Issue): 415-453.
- [5] PLAKS V, KOOPMAN C D, WERB Z. Cancer circulating tumor cells[J]. Science, 2013, 341(341): 1186-1188.
- [6] TAMURA K, OKAMOTO I, KASHII T, et al. Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403)[J]. British Journal of Cancer, 2008, 98(5): 907-914.
- [7] MACK P C, HOLLAND W S, BURICH R A, et al. EGFR mutations detected in plasma are associated with patient outcomes in erlotinib plus docetaxel-treated non-small cell lung cancer[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2009, 4(12): 1466-1472.
- [8] KIMURA H, SUMINOE M, KASAHARA K, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA)[J]. British Journal of Cancer, 2007, 97(6): 778-784.

- [9] MAHESWARAN S, SEQUIST L V, NAGRATH S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359(4): 366-377.
- [10] MARCHETTI A, GRAMMASTRO M D, FELICIONI L, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): DOI: 10.1371/journal.pone.0103883.
- [11] FRANK B, SANDRA H, KARL W, et al. Development of a highly sensitive and specific method for detection of circulating tumor cells harboring somatic mutations in non-small-cell lung cancer patients[J]. *PLOS One*, 2014, 9(1): DOI: 10.1371/journal.pone.0085350.
- [12] WU Y L, ZHONG W Z, LI L Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and their correlation with gefitinib therapy in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis based on updated individual patient data from six medical centers in mainland China[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2007, 2(5): 430-439.
- [13] MENG S, TRIPATHY D, SHETE S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(25): 9393-9398.
- [14] 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 Research*, 2007, 9(5): 1-8.
- [15] 谭芬来, 张力, 赵琼, 等. 国家一类新药盐酸埃克替尼的药理与临床评价 [J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(18): 1691-1694.
- [16] SHI Y, ZHANG L, LIU X, et al. Icotinib versus gefitinib in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (ICOGEN): a randomised, double-blind phase 3 non-inferiority trial[J]. *Lancet Oncology*, 2013, 14(10):953-961.
- [17] NISHIYAMA A, KATAKAMI N, MORITA S, et al. Randomized phase III study comparing gefitinib (G) with erlotinib (E) in patients (PTS) with previously treated advanced lung adenocarcinoma (LA): WJOG 5108L[J]. *Annals of Oncology*, 2014, 25(supplement 4): DOI: 10.1093/annonc/mdu349.50.

(童颖丹 编辑)