

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.19.007

文章编号: 1005-8982(2017)19-0034-06

外周血捕获循环肿瘤细胞的有效方法研究*

周洲¹, 李良平¹, 高采平¹, 钟应佳², 翟祎星², 赖兵²

[1. 四川省医学科学院(四川省人民医院) 消化内科, 四川 成都 610072;

2. 地奥九泓制药厂前沿生物技术研究室, 四川 成都 610041]

摘要:目的 建立有效获取肿瘤患者外周血中单个循环肿瘤细胞(CTC)的方法。**方法** 预先将经 Dll 染色的 SW480 细胞混入健康成人的抗凝全血中, 分别单独采用密度梯度离心(OncoQuick)、淋巴细胞分离术(Ficoll)、“玫瑰花富集”(RosetteSep)、免疫磁珠(CELLlection)及淋巴细胞分离术联合免疫磁珠联用(Ficoll+CELLlection) 富集这些肿瘤细胞, 统计回收率并观察纯度以进行比较。再使用显微操作仪捕获单个 NCI-H460、HCT-116、DLD-1、SW480、TF-1 等探测细胞及从肝癌患者外周血中富集获得的 CTC, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)技术分析单细胞的 CD45 mRNA 表达水平。**结果** 5 组方法的肿瘤细胞回收率分别为(52.5±3.5)%、(46.6±1.9)%、(36.9±5.5)%、(14.1±3.1)%和(8.8±1.4)%; 单因素方差分析表明, 5 组方法回收率比较差异有统计学意义($P<0.05$); SNK-q 检验表明, 除 OncoQuick 组和 Ficoll 组($P>0.05$)、CELLlection 组和 Ficoll+CELLlection 组($P>0.05$)外, 其他各组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。在荧光显微镜下观察富集的肿瘤细胞, 发现 CELLlection 组及 Ficoll+CELLlection 组的纯度更高。qRT-PCR 结果显示, 总循环数 60, GAPDH Ct 均值为(29.94±0.59), 除了单个 TF-1 细胞的 CD45 Ct 均值为(34.21±0.22), 其他单个探测细胞及 CTC 的 CD45 均无表达。**结论** CELLlection 即免疫磁珠法配合显微操作能有效获取肝癌患者外周血中的单个 CTC 并保留其原始分子特性, 适用于后续单细胞分析与研究。该方法为 CTC 运用于剖析肿瘤分子的特征、评价靶向治疗药物的药效以及监控肿瘤的复发与转移等临床问题奠定了基础。

关键词: 循环肿瘤细胞; 免疫磁珠法; 显微操作

中图分类号: R730.4

文献标识码: A

Isolation of single circulating tumor cell from peripheral blood of liver cancer patients by immunomagnetic beads and micromanipulation*

Zhou Zhou¹, Liang-ping Li¹, Cai-ping Gao¹, Ying-jia Zhong², Yi-xing Zhai², Bing Lai²

[1. Department of Gastroenterology, Sichuan Academy of Medical Sciences (Sichuan Provincial People's Hospital), Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Laboratory of Advanced Biotechnology, Di'ao JiuHong Pharmaceutical Company, Chengdu, Sichuan 610041, China]

Abstract: Objective To isolate single circulating tumor cell (CTC) from peripheral blood of liver cancer patients. **Methods** Four commercial kits including OncoQuick, Ficoll-Paque PLUS (Ficoll), RosetteSep and CELLlection, as well as Ficoll-CELLlection-combination were used to enrich Dll-stained SW480 cells added to peripheral blood of healthy adults. In order to compare the above five methods, recovery and purity of enriched tumor cells were counted or observed. Then, detection cells including NCI-H460, HCT-116, DLD-1, SW480 and TF-1, and CTCs from the peripheral blood of liver cancer patients were isolated by micromanipulation individually. Subsequently, mRNA

收稿日期: 2016-11-13

* 基金项目: 四川省科技厅资助项目(No: 2014TD0028)

[通信作者] 赖兵, E-mail: laib76@139.com; Tel: 028-82855467

expression level of CD45 antigen, the leukocyte common antigen, was detected by qRT-PCR. **Results** Compared in pairs, the recovery of the five methods [OncoQuick (52.5 ± 3.5)%, Ficoll (46.6 ± 1.9)%, RosetteSep (36.9 ± 5.5)%, CELLection (14.1 ± 3.1)% and Ficoll-CELLection-combination (8.8 ± 1.4)%] revealed significant differences ($P < 0.05$) except for OncoQuick and Ficoll ($P > 0.05$), CELLection and Ficoll-CELLection-combination ($P > 0.05$) by one-way ANOVA test and SNK-q method. Moreover, CELLection and Ficoll-CELLection-combination enriched tumor cells with higher purity when they were observed under fluorescent microscope. In addition, CD45 mRNA expression of all single detection cells and CTC were negative except TF-1 (mean Ct within 60 cycles: TF-1 (34.21 ± 0.22), GAPDH (29.94 ± 0.59), others none; $n = 3$). **Conclusions** The combination of immunomagnetic beads and micromanipulation is an effective method to isolate single CTC from peripheral blood of liver cancer patients. The captured single CTC keeps its original molecular characteristics for subsequent single-cell analysis. Furthermore, our method lays a foundation for clinical application of CTC, for tumor molecular characteristic analysis, therapeutic effect evaluation and treatment monitoring.

Keywords: circulating tumor cell; immunomagnetic beads; micromanipulation

肿瘤转移是导致患者死亡的主要原因之一。它是一个多步骤、多因素相互作用的复杂过程。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是由肿瘤原发灶或转移灶脱落并释放到外周血中的肿瘤细胞。其中部分 CTC 随着血液循环分散、黏附并逐渐发展成新的转移灶^[1],可见其在肿瘤转移中发挥了重要作用。诸多实验结果表明,CTC 与肿瘤的发生发展、早期转移密切相关^[2-3]。由于它来源于肿瘤实体,检测血液中的 CTC 能获得更多个体化的肿瘤信息,以监控肿瘤的复发与转移、评价抗肿瘤药物的药效、分析患者的预后水平等。然而,患者外周血中的 CTC 数量极少^[4],目前主要依据细胞密度及形态^[5-6]或细胞表面免疫原性^[7]分离并富集这些 CTC,而后者的发展时间更长、技术相对更成熟、应用更多。

随着分子生物学的迅速发展,单细胞分析已成为研究疾病生物标志物、克隆多样性、致病分子机制等的重要手段,比如通过微芯片技术检测其临床标志物^[8];通过微流控获得其相关物理特征^[9];通过检测特定基因表达分析其转录特征或肿瘤突变情况^[9];通过扫描离子电导显微镜搭建的纳米级研究平台在不影响细胞状态的条件下取出其胞内物质如线粒体^[10]。由于血液中 CTC 的数量极少且难以分离,上述手段并不适用。然而,目前针对 CTC 的研究亟需分析其分子如 DNA、RNA、蛋白质等的特征^[11],以研究其与肿瘤发生发展及转移的关联。因此,本次实验试图建立一种能维持分子特性、快速准确的 CTC 单细胞化方法。

通过传统的富集方法获得的 CTC 往往存在正常血液细胞如红细胞、白细胞、血小板的污染,为后续单细胞化及分析带来干扰。本文比较了 5 种商品化的富集 CTC 的方法,即密度梯度离心(Onco-

Quick)、淋巴细胞分离术(Ficoll)、“玫瑰花富集”(RosetteSep)、免疫磁珠(CELLection)及淋巴细胞分离术联合免疫磁珠联用(Ficoll+CELLection)等,发现 CELLection 不仅能富集高纯度的 CTC,还具有可接受的回收率。随后,利用显微操作平台挑选出的单个探测细胞和 CTC,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测其生物标志物(白细胞分化抗原 CD45)的 mRNA 表达水平。结果表明,通过 CELLection 即免疫磁珠法配合显微操作获得的单个 CTC 较完整地维持了其分子特性,适用于后续单细胞分析。

1 材料与方法

1.1 材料

四川省医学科学院、四川省人民医院初治肝癌患者 1 例,对其穿刺检测、收集癌组织并由病理学确诊,同时抽取外周血 4 ml;健康成人的外周血取自输血全套检测合格的成人志愿者。实验所用细胞株(NCI-H460、HCT-116、DLD-1、SW480、TF-1)均购于美国模式培养物集存库(ATCC)。实验所用试剂:DiIC18(3)染料(Dil)(碧云天生物技术研究);Ficoll-Paque PLUS(GE);OncoQuick(Greiner Bio-One);RosetteSep CTC Enrichment Cocktail Containing Anti-CD36(Stemcell);CELLection Epithelial Enrich(In-vitrogen);Single Cell-to-CT qRT-PCR Kit(Ambion);SsoAdvanced SYBR Green Supermix(Bio-Rad)。实验所用仪器:PCR 仪型号:S1000,购自 Bio-Rad(美国);qRT-PCR 仪型号:CFX96,购自 Bio-Rad(美国);倒置荧光显微镜型号:DM IL LED,购自 Leica(德国);显微操作仪型号:TransferManNK2,购自 Eppendorf(德国)。

1.2 方法

1.2.1 血液样本 严格消毒之后,用真空采血针分别采集健康成人或肝癌患者肘正中静脉血 4 ml 入 EDTA 抗凝管,并于 4 h 内开展实验。

1.2.2 外周血中肿瘤细胞的富集 以 SW480 细胞作为阳性肿瘤细胞,预先用 DiI 将其染色,以 100 个 / 50 μ l 的浓度加入 4 ml 健康成人的抗凝全血中。再分别用 OncoQuick、Ficoll、RosetteSep、CELLection、Ficoll+CELLection 等方法富集这些肿瘤细胞,随后将肿瘤细胞悬液在光学显微镜下计数并观察,取直径 $\geq 10 \mu$ m 的细胞数比血液样本体积作为患者外周血中的 CTC 浓度。

1.2.3 肿瘤细胞的单细胞化 以 NCI-H460、HCT-116、DLD-1、SW480、TF-1 等作为探测细胞,收集其经正常培养、胰酶消化后的细胞悬液及肝癌患者外周血中富集的 CTC 悬液,在光学显微镜下依据肿瘤细胞形态学特征(细胞呈圆形、椭圆形或梭形,直径 $\geq 10 \mu$ m,细胞核完整而不规则,核浆比高等)利用显微操作平台(荧光显微镜搭配显微操作仪)挑取单个肿瘤细胞。

1.2.4 单细胞 qRT-PCR 检测生物标志物的 mRNA 表达水平 利用单细胞逆转录试剂盒提取上述单个肿瘤细胞的总 RNA 并逆转录为 cDNA。先对其进行 PCR 预扩增:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 4 min,扩增 14 个循环。再将产物稀释后使用 qRT-PCR 检测:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,扩增 60 个循环。所用引物见附表,其中 GAPDH 的引物序列源于文献^[12],CD45 的引物序列为自行设计。

附表 qRT-PCR 所用引物序列表

引物名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	正向: CCACTCCTCCACCTTTGAC
GAPDH	反向: ACCCTGTTGCTGTAGCCA
CD45	正向: ACCACAAGTTTACTAACGCAAGT
CD45	反向: TTTGAGGGGGATTCCAGGTAAT

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析,组间用 SNK-*q* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫磁珠法是富集 CTC 的较优方法

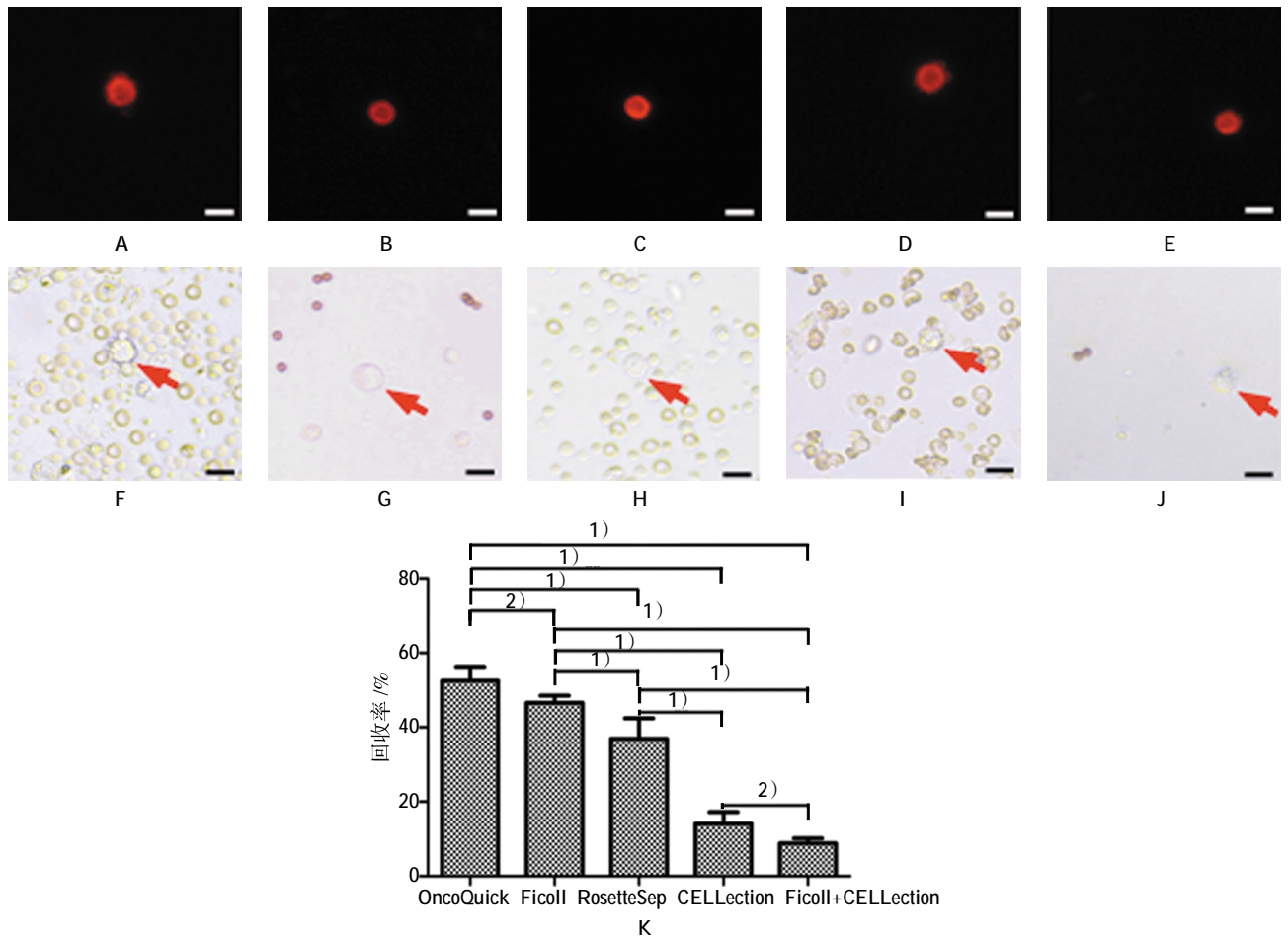
先用 OncoQuick、Ficoll、RosetteSep、CELLection 等 4 种方法提取正常人的抗凝全血中预先加入的 100 个 / 50 μ l 经 DiI 染色的 SW480 细胞,并将其移至荧光显微镜下的 96 孔板中计数。结果显示,4 种方法的肿瘤细胞回收率分别为:OncoQuick (52.5 \pm 3.5)%,Ficoll (46.6 \pm 1.9)%,RosetteSep (36.9 \pm 5.5)%,CELLection (14.1 \pm 3.1)%。在光镜下观察发现,虽然 OncoQuick 有最高的回收率,但富集的 CTC 纯度偏低(见图 1H),严重影响后续单细胞化操作;CELLection 则反之。于是,本实验试图将 Ficoll+CELLection 联用以期在 CTC 的回收率和纯度上均维持较高水平。该方案先用 Ficoll 大量分离并去除血液样本中的白细胞,再用 CELLection 富集 EpCAM 表达阳性的 CTC。结果显示,Ficoll+CELLection 组富集的 CTC 虽然纯度较 Ficoll 组或 CELLection 组更高(见图 1J),但其回收率降至(8.8 \pm 1.4)%,且繁琐的步骤不利于成功富集血液样本中原本数量就极少的 CTC。单因素方差分析表明,上述 5 组方法回收率的差异有统计学意义($F = 97.95, P < 0.05$);SNK-*q* 检验表明,除 OncoQuick 组和 Ficoll 组($P = 0.075$)、CELLection 组和 Ficoll+CELLection 组($P = 0.080$)外,其他各组之间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。综上所述,本实验最终选择单独采用 CELLection 富集用于后续单细胞化的 CTC。

2.2 CTC 的单细胞化

采集肝癌伴腹膜转移病人血液样本 4 ml,采用 CELLection 富集其中的 CTC,肿瘤细胞悬液计数为 58 个 / ml(见图 2A)。富集后的 CTC 存在正常血液细胞的污染,这直接影响 CTC 分子水平的检测与分析。因此,利用光学显微镜观察细胞形态,辅以显微操作平台挑取选定的单个 CTC 用于后续实验。为维持 CTC 原有的分子特性,本实验依据 CTC 体积大(直径大于 $\geq 10 \mu$ m)、细胞核完整而不规则、核浆比高等特征进行挑选,而未经 EpCAM 荧光抗体染色(见图 2B)。

2.3 单细胞化 CTC 的鉴定

收集经正常培养、胰酶消化后的 NCI-H460、HCT-116、DLD-1、SW480、TF-1 等探测细胞悬液,利用显微操作平台从中挑取单个肿瘤细胞作为对照,利用 qRT-PCR 技术检测其 CD45 的 mRNA 表

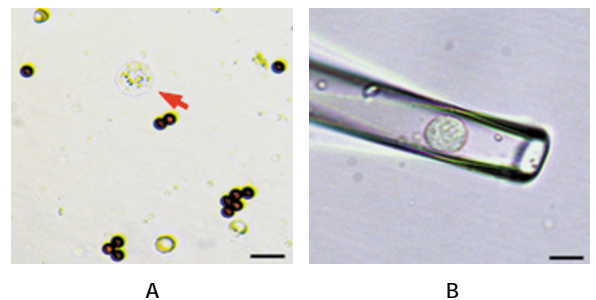


A-J: DiI 染色 SW480 细胞; A, F: Ficoll; B, G: CELlection; C, H: OncoQuick; D, I: RosetteSep; E, J: Ficoll+CELlection; 红箭头指单个 DiI 染色的细胞, bar=10 μm; K: 各组 CTC 回收率的比较, 1) $P < 0.05 (n = 3)$; 2) $P > 0.05$

图 1 CELlection 富集 CTC 有高纯度及可接受的回收率

达水平,其中 Ct 值(循环阈值)与模板中的目的基因 cDNA 分子数成正比。由于单个细胞中总 RNA 量本就偏少, 还需均分 cDNA 作为模板检测内参及目的基因的 mRNA 表达水平, 在 qRT-PCR 后加入了预扩增步骤, 并将循环数设为 60 次。结果显示, 探测细胞除红系白血病细胞 TF-1 外, 其余 4 种上皮来源的细胞株单个细胞均未检测到 CD45 mRNA 的表达 (Ct 值 >60); 单个 TF-1 的 CD45 Ct 均值为 $(34.21 \pm 0.22) (n = 3)$; 5 种单个细胞的 GAPDH Ct 值都 <35 且差异较小(见图 3A)。上述结果说明, 5 种探测细胞仅 TF-1 高表达 CD45, 而其余上皮来源的贴壁细胞无表达, 与预期相符; 制备的单细胞 cDNA 具有较好的浓度和质量; 该实验方案稳定可靠, 能进一步甄别 CTC 和白细胞。值得注意的是, 单个 TF-1 CD45 的扩增曲线和熔解曲线良好 (见图 3C、3D), 说明这次自行设计的引物能特异性扩增 CD45。随后, 采用上述的方法富集并单细胞化肝癌患者血液

样本中的 CTC, 检测其 CD45 的 mRNA 表达水平。结果显示, 挑取的 CTC①、②、③ CD45 均无表达(图 3B), 与上述 4 种单个上皮样探测细胞的结果一致。该结果说明 CELlection 配合显微操作单细胞化 CTC 的方案消除了正常血细胞的污染, 降低了假阳性率, 为后续检测与分析提供了高质控标准的实验对象。



A: 用 CELlection 富集的 CTC; 红箭头指成功富集到的 CTC, bar=10 μm; B: 显微操作仪挑取单个 CTC

图 2 CTC 的单细胞化

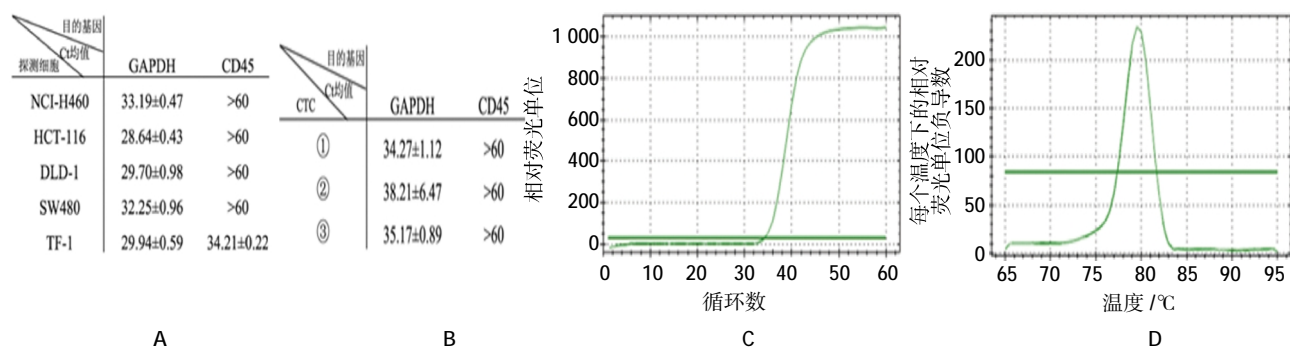


图 3 单细胞化 CTC 的鉴定

3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤重要的生物学特性。CTC 在肿瘤转移中发挥重要的作用,并对评价疗效、推测预后等具有重要意义^[13-15]。对于已确诊的肿瘤患者,分析其外周血中的 CTC 能提供更多的病理信息,进而准确获得维持原有分子特性的 CTC 是体现其应用价值的前提条件。迄今为止,CTC 的富集方法主要基于细胞大小及形态、细胞特性如细胞密度、细胞表面免疫原性等^[16]。本文首先比较了多种 CTC 富集方法的回收率及纯度,体现出免疫磁珠法的优势,随后利用显微操作仪实现了富集后 CTC 的单细胞化,并通过检测生物标志物的表达水平鉴定了单个 CTC 的分子特性。

本文中所用的多种 CTC 富集方法均存在一定的局限:①OncoQuick 依据细胞密度及直径大小分离并富集 CTC^[17],其步骤中初步分离的肿瘤细胞用 50 ml 洗液混匀再经离心后最终 CTC 悬液体积约 300 μ l。该方法虽然回收率高,但血小板、红细胞、白细胞等污染明显。②CELLlection 是以带 EpCAM 抗体的磁珠去捕获并富集血液样本中的上皮样 CTC。该方法富集的 CTC 纯度高,最终细胞液体积仅 100-200 μ l,但步骤繁多,如反复多次的清洗磁珠,易导致较低的回收率。③Ficoll 依据细胞密度有效分离血液中的 CTC 和红细胞,但无法除去白细胞和血小板。因此,尽管它的回收率高,一般仍需与其他方法联用来富集高纯度的 CTC。本研究尝试 Ficoll+CELLlection 联用富集最高纯度的 CTC,但繁琐的步骤不利于成功富集血液样本中原本数量就极少的 CTC。④RosetteSep 先用抗体集结红细胞成团,再以密度梯度离心分离 CTC 和血细胞团。通过该方法富

集的 CTC 中常含有凝集的红细胞团,且红细胞团常与 CTC 聚集到一起。综上所述,本实验最终选择了相对较优的 CELLlection 富集 EpCAM 阳性的 CTC。

显微操作能准确挑取单个细胞用于检测与分析,对细胞损伤小,可有效维持其原有的分子特性。本研究选择该方法将富集后的 CTC 单细胞化,挑取形态、体积与正常血细胞显著不同的细胞。随后,本文还鉴定出单个探测细胞及挑取的 CTC CD45 均无表达,进一步验证了上述联合方法的可行性和准确度。

相较于穿刺活检,检测分析单个 CTC 对患者的伤害小,实时性和可操作性高。单细胞化的 CTC 还可用于体外培养建系,建立人源肿瘤模型^[18],分析 CTC 之间以及病例之间的差异性^[19]等后续实验,进一步在化疗药物筛选的基础上找到更适合患者的个体化治疗方案。综上所述,本研究为 CTC 的单细胞分析提供了切实可行的前置方案,为实现 CTC 在肿瘤患者临床问题中的应用奠定了基础。

本文通过比较 OncoQuick、Ficoll、RosetteSep、CELLlection、Ficoll+CELLlectio 5 种方法富集外周血中肿瘤细胞的回收率及纯度,建立起 CELLlection 即免疫磁珠法配合显微操作成功分离并鉴定肝癌患者外周血中的单个 CTC 的方法,为其运用于剖析肿瘤分子的特征、评价靶向治疗药物的药效、监控肿瘤的复发与转移等临床问题奠定了基础。

参 考 文 献:

- [1] PACHMANN K, CLEMENT J H, SCHNEIDER C P, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer[J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(6): 617-627.

- [2] HUSEMANN Y, GEIGL J B, SCHUBERT F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(1): 58-68.
- [3] MULLER V, STAHMANN N, RIETHDORF S, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3678-3685.
- [4] MILLER M C, DOYLE G V, TERSTAPPEN L W. Significance of circulating tumor cells detected by the cellsearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer[J]. *J Oncol*, 2010, 2010: 617421-617429.
- [5] FRIEDERICHS J, GERTLER R, ROSENBERG R, et al. Correlation of CK-20-positive cells in peripheral venous blood with serum CEA levels in patients with colorectal carcinoma[J]. *World J Surg*, 2007, 31(12): 2329-2334.
- [6] BALIC M, DANDACHI N, HOFMANN G, et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005, 68(1): 25-30.
- [7] GLEGHORN J P, PRATT E D, DENNING D, et al. Capture of circulating tumor cells from whole blood of prostate cancer patients using geometrically enhanced differential immunocapture (GEDI) and a prostate-specific antibody[J]. *Lab Chip*, 2010, 10(1): 27-29.
- [8] PAGADUAN J V, SAHORE V, WOOLLEY A T. Applications of microfluidics and microchip electrophoresis for potential clinical biomarker analysis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(23): 6911-6922.
- [9] MOIGNARD V, GOTTGENS B. Transcriptional mechanisms of cell fate decisions revealed by single cell expression profiling[J]. *Bioessays*, 2014, 36(4): 419-426.
- [10] ACTIS P, MAALOUF M M, KIM H J, et al. Compartmental genomics in living cells revealed by single-cell nanobiopsy[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(1): 546-553.
- [11] STAHLBERG A, THOMSEN C, RUFF D, et al. Quantitative PCR analysis of DNA, RNAs, and proteins in the same single cell[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(12): 1682-1691.
- [12] ZHANG Y, BA Y, LIU C, et al. PGC-1alpha induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARgamma-dependent pathway[J]. *Cell Res*, 2007, 17(4): 363-373.
- [13] O'FIAHERTY J D, GRAY S, RICHARD D, et al. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(1): 19-25.
- [14] REUBEN J M, KRISHNAMURTHY S, WOODWARD W, et al. The role of circulating tumor cells in breast cancer diagnosis and prediction of therapy response[J]. *Expert Opin Med Diagn*, 2008, 2(4): 339-348.
- [15] JURATLI M A, SIEGEL E R, NEDOSEKIN D A, et al. In vivo long-term monitoring of circulating tumor cells fluctuation during medical interventions[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137613.
- [16] WU L J, PAN Y D, PEI X Y, et al. Capturing circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2012, 326(1): 17-22.
- [17] HUANG L, CHENG H C, LSOM R, et al. Protein kinase cepsilon mediates polymeric fibronectin assembly on the surface of blood-borne rat breast cancer cells to promote pulmonary metastasis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(12): 7616-7627.
- [18] YU M, BARDIA A, ACETO N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility[J]. *Science*, 2014, 345(6193): 216-220.
- [19] DENG G, KRISHNAKUMAR S, POWELL A A, et al. Single cell mutational analysis of PIK3CA in circulating tumor cells and metastases in breast cancer reveals heterogeneity, discordance, and mutation persistence in cultured disseminated tumor cells from bone marrow[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 456-468.

(张西倩 编辑)