

循环肿瘤细胞在肺癌中的临床研究进展

闵梦云¹, 尹宜发², 赵新程¹, 乔洪源²

(1. 三峡大学医学院 三峡大学第二人民医院, 湖北 宜昌 443000;

2. 宜昌市第二人民医院, 湖北 宜昌 443000)

摘要: 循环肿瘤细胞(CTCs)作为“液体活检”的方法之一, 在肺癌的早期检测、复发、预后评估和监测治疗反应有重要的指导作用。由于 CTCs 在数量上及异质性的限制, 其检测方法仍有待统一的标准技术。全文对 CTCs 在肺癌中的检测方法和临床应用进行综述。

关键词: 肺癌; 循环肿瘤细胞; 早期诊断; 预后评估

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)01-0006-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.01.B002

Clinical Research Progress on Circulating Tumor Cells in Lung Cancer

MIN Meng-yun¹, YIN Yi-fa², ZHAO Xin-cheng¹, et al.

(1. Medical School of The Three Gorges University, The Second People's Hospital of The Three Gorges University, Yichang 443000, China; 2. The Second People's Hospital of Yichang, Yichang 443000, China)

Abstract: With the incidence and mortality of cancer increasing, early diagnosis and treatment, timely access to biological information to guide individualized treatment of patients are the key methods to improve the prognosis of cancer. Circulating tumor cells (CTCs) have an important guiding role as “liquid biopsy” method for early detection of lung cancer recurrence, prognosis assessment and monitoring of therapeutic responses. Due to the quantitative and heterogeneity of CTCs, the detection method of CTCs has yet to be unified. In this paper, the detection method of CTCs and clinical application of CTCs in lung cancer are reviewed.

Subject words: lung cancer; circulating tumor cells; early diagnosis; prognosis evaluation

根据 2015 年全国肿瘤登记中心发布数据显示, 2012 年我国肺癌发病率为 70.5/10 万, 居恶性肿瘤首位; 同期死亡病例数无论男性还是女性, 城市还是农村, 均已成为我国恶性肿瘤死亡原因的第 1 位^[1]。据统计, 早期肺癌患者经手术切除后 5 年生存率约 50%~80%, I A 期术后可达 90% 以上^[2], 但由于缺乏有效的早期诊断手段, 绝大部分患者确诊时已属晚期, 失去了最佳手术时机。即使近年来基于分子水平个体化指导的靶向治疗在临床上广泛应用, 但晚期肺癌的 5 年生存率仍不足 20%^[3]。因此, 如何对肺癌患者进行早期筛查、获得患者的实时生物学信息以指导个体化治疗是改善肺癌预后的关键。

癌症患者的体液中含有多种肿瘤相关成分, 如

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、循环肿瘤 DNA(ctDNA)、RNAs、外泌体等^[4]。液体活检是一种非侵入性、动态和信息化的采样方法, 将自发的或因诊疗操作从实体瘤或转移灶释放到外周血循环的上述肿瘤成分进行检测^[5]。早在 1869 年, 澳大利亚学者 Ashworth 在转移性肿瘤患者血液中初次观察到从实体肿瘤中脱离进入血液循环的肿瘤细胞, 率先提出了 CTCs 的概念^[6]。CTCs 检测作为液体活检的重要分支, 对于肿瘤患者的疗效、预后以及个体化治疗等有重要的指导作用。本文将对 CTCs 在肺癌中的临床应用和常用检测方法进行综述。

1 循环肿瘤细胞与生物学信息

从分子细胞学水平上找到明确的驱动基因进行对应的靶向治疗是走向精准医疗的重大突破, 及时

通讯作者: 尹宜发, 主任医师, 学士; 宜昌市第二人民医院肿瘤放疗化疗科, 湖北省宜昌市西陵区体育场路 18 号(443000); E-mail: yinyifa858@163.com

收稿日期: 2017-02-26; **修回日期:** 2017-03-25

获得患者的生物学信息,从而指导晚期肺癌患者的个体化治疗可以显著改善患者的 PFS 和 OS。目前肺癌中已经明确的驱动基因包括:腺癌有:EGFR、EML4-ALK、Kras、Met、ROS1、Ret、BRAF、TP53;鳞状细胞癌:FGFR1、PIK3CA、DDR2、Met、SOX2、PTEN、CDKN2A 等^[7]。已有研究^[4,7,8]将组织活检与液体活检所获得的生物学信息进行对比,结果显示液态活检具有微创、重复性好、方便迅捷等优势,特别是在运用靶向药物后出现获得性耐药时,通过实时检测 CTCs 可及时发现肿瘤进展调整治疗方案,在分子层面上实现了肿瘤治疗疗效与耐药性的动态检测。

2 循环肿瘤细胞的检测方法

外周血循环中的 CTCs 数量十分有限,大约在 $10^6 \sim 10^7$ 个白细胞中才能检测到 1 个 CTC^[6];此外,由于 CTC 之间存在异质性、易聚合成微栓等原因对 CTC 检测技术的敏感度、特异性及效率提出了极高的挑战。CellSearch 是唯一被美国食品药品监督管理局(FDA)批准应用于检测 CTCs 的方法^[9],已经运用到前列腺癌、乳腺癌、结肠癌等的研究。

基于目前的技术原理,可将分选 CTCs 的技术分为两类:一是根据其物理学特性,通过 CTCs 大小、密度、带电性、变形性等将 CTCs 与血液中的其他细胞分开,包括密度梯度离心法、滤过膜分离法(ISET)、微流控芯片法、激光显微捕获切割(LCM)^[10]等。该法操作简单,成本相对低廉,不依赖细胞表面抗体的表达,细胞存活率高,但不能避免个体异质性的干扰;二是生物学特性,主要使用免疫磁珠分离^[11],包括阳性捕获和阴性富集法,前者采用抗 EpCAM 结合免疫磁珠捕获 EpCAM 阳性的 CTCs;后者利用 CD45 磁珠抗体吸附于血细胞并将血液中的白细胞剔除,使 CTCs 被富集沉淀,保证了较高的纯度和细胞活性。但由于部分 CTCs 并无相关表面抗原的表达,因此该法的敏感度在一定程度上受到 CTCs 表面抗原表达的限制。

经上述方法富集的 CTCs 需行进一步的鉴定,确认是否为循环肿瘤细胞。目前常用的检测技术有免疫细胞技术(immunocytochemistry, ICC)^[12]、CTCs 芯片技术(CTCs-Chip)^[13]、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)^[11]、荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ

Hybridization, FISH)^[14]、流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)^[15]等。

3 循环肿瘤细胞在肺癌中的临床应用

3.1 循环肿瘤细胞与肺癌的早期诊断

目前用于诊断肺癌的检查手段有肿瘤标志物(包括 CEA、CA199、NSE、Cyfra21-1、CA125、SCCAg 等)^[16]、影像学检查(X 线、CT、PET 等)^[17-19]、脱落细胞学^[20,21]以及组织活检。由于肿瘤标志物的特异性不高、影像学检查辐射暴露且价格昂贵、脱落细胞学检查敏感度低、病理活检标本难以获取且存在组织异质性,使得肺癌的早期筛查受到了多重限制。

近年来低剂量螺旋 CT(LDCT)^[22,23]因其低辐射、高分辨力、无创、快速等特点倍受关注,美国国家肺癌筛查试验(national lung screening trial, NLST)在 2002 年的随机对照研究中将来自 33 个中心的 53 454 名受试者分别进行了低剂量 CT 与胸片的筛查,结果显示,与 X 线胸片相比,采用 LDCT 对肺癌高危人群进行筛查可使肺癌病死率下降 20%^[24]。但随之带来的高假阳性率以及由此产生的焦虑和过度诊断(如更多的辐射暴露和诊断性穿刺)也成为阻碍 LDCT 广泛应用于临床的主要原因。

CTCs 作为液态活检的重要分支,是目前最有潜力满足上述要求的早期诊断手段。血液系统是实体肿瘤发生远处转移的必经途径之一,原发灶肿瘤细胞在合适的微环境下发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),导致细胞间黏附能力减弱、迁移和侵袭能力增强,随后脱离原发灶进入外周血循环形成循环肿瘤细胞。Ben 等于 2008 年发现 EMT 和肿瘤播散入血早于肿瘤转移病灶形成,因此在影像学可检测的实体病灶形成之前进行高危人群 CTCs 检测对早期肺癌的筛查具有重要的预测作用^[25]。

Fiorelli 等^[5]利用 ISET 方法对 77 例患者的 CTCs 进行测定,包括 60 例经病理学确诊的肺癌患者和 17 例良性病变患者,根据细胞学形态将收集的细胞分为具有恶性特征的细胞(即 CTCs)、不确定良恶性细胞以及良性特征细胞,结果发现肺癌组的 CTCs 阳性率(90%)明显高于良性病变组(5%)($P < 0.05$)。以 25 个 CTCs/7.5ml 为界限,该法测定 CTCs 的敏感

度为 89%, 特异性为 100%。Tanaka 等^[26]对 125 例有远处转移($n=31$)或无($n=94$)的原发性肺癌与 25 例非恶性疾病患者进行了对照试验, 利用 CellSearch 系统在 30.6% 肺癌患者和 12.0% 对照组中检测到 CTCs。Hofman 等将没有临床可检测肿瘤的肺癌高危人群 COPD 患者(168 例)与健康个体(77 名)进行对照, 用 ISET 法在 3% 的慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者(5/168)中检测到 CTC, 这些患者使用低剂量螺旋 CT 进行年度监测, 在平均随访 3.2 年后监测到了肺结节并进行及时的手术切除和组织病理学诊断, 其中 4 例为侵袭性腺癌、1 例鳞状细胞癌。5 例术后经 CT 及 CTCs 检测, 随访 12 个月无肿瘤复发^[27]。该试验在没有临床可检测肺癌的 COPD 患者中检测到 CTCs 并追踪发展为肺癌, 预示了 CTCs 在肺癌早期筛查的实用价值。

上述研究分别通过 CTCs 的物理学特性(ISET 方法)和生理学特性(CellSearch 系统)进行检测, 两种方法对 CTCs 进行富集的结果均提示初诊肺癌患者外周血 CTCs 水平显著性高于肺良性疾病和健康对照者, I~II 期患者中较高水平的 CTCs 提示不良的预后和复发风险。由于方法的不统一性、入组患者不同分期所占的比例不同、病理类型不同等, 可能造成所得的结果具有差异性。但随着近年 CTCs 检测技术的不断优化, 敏感度和特异性不断提高, 其有望成为肺癌和其他癌症早期筛查的“利器”并应用到癌症监测的常规检查中。

3.2 循环肿瘤细胞与肺癌的临床分期

目前肺癌采用的分期标准是 2015 年由国际肺癌研究学会(international association for the study of lung cancer, IASLC)制定的第八版国际肺癌 TNM 分期: 即根据原发病灶大小、区域淋巴结转移以及远处转移共同指导肺癌的分期。国内外大量研究证实 CTCs 水平与 TNM 分期呈正相关, 该分期是在影像学可测量病灶大小的基础上建立的, 对于“隐形病灶”的肺癌来说 TNM 分期具有一定的局限性, 因此 CTCs 水平可以成为 TNM 分期系统的有效补充, 从而获得更加准确的肿瘤分期。

Chen 等^[28]用肿瘤特异性叶酸受体标记结合 PCR 法对 473 例非小细胞肺癌(NSCLC)、227 例肺良性疾病患者和 56 名健康者进行 CTCs 定量分析, I/II 期 NSCLC 患者的 CTCs 水平($10.17 \pm 6.23/3\text{ml}$)显著

性低于 III 期($11.96 \pm 8.23/3\text{ml}$)($P=0.036$)和 IV 期($12.44 \pm 9.02/3\text{ml}$)($P=0.004$); 同时发现 CTCs 与年龄(≤ 60 岁或 >60 岁)、性别、吸烟和病理学类型无明显相关性。Chen 等^[29]用 CellSearch 系统对 169 例不同分期的肺癌患者进行 CTCs 的检测, 在 I 期(14 例) NSCLC 患者中均未检测到 CTCs, 在 15.8%(6/38)的 II~III A 期患者和 29.1%(34/117) III B~IV 期患者中检测到 ≥ 1 个 CTCs/7.5ml。临床分期 I、II、III、IV 期患者 CTCs 阳性率($\text{CTCs} \geq 1$)分别是 0%、12.5%、20.0%、30.9%, 提示临床 TNM 分期与 CTCs 呈正相关。由此可见, CTCs 在 NSCLC I、II 期患者中的水平有统计学差异, 但 III、IV 期患者的 CTCs 是否有差异还有待验证。目前需要进一步改善 CTCs 富集检测技术和更多大样本的试验来制定统一的 CTCs 阳性标准, 从而更加精确地进行肿瘤的分期诊断。

3.3 循环肿瘤细胞与肺癌的疗效、预后评估

许多研究^[30-32]回顾性证实了 CTCs 在局部晚期及转移性 NSCLC 中的预后意义, 进行疾病进展监测和治疗评估对于临床医生确定系统治疗方案是至关重要的。患者经过根治性手术切除或放化疗、靶向治疗后监测血液中的 CTCs 水平可以在一定程度上反映手术和药物治疗的疗效, 当 CTCs 计数减少时意味着患者对该治疗方案反应良好, 反之则可能出现了耐药性或肿瘤进展。

在一项经帕妥珠单抗和厄洛替尼治疗的复发性 NSCLC 的 II 期试验^[33]中, CTCs 计数的减少与通过 RECIST 标准评价的 CT 表现以及 PET 上的代谢反应呈相关性。值得注意的是, 当使用 CTCs 计数与 CT 表现共同评价疗效时, CT 显示无变化但其 CTCs 降低的患者有更长的 PFS, 这意味着 CTCs 可能比影像学检查更早地提示治疗反应, 进一步验证了使用 CTC 预测 PFS 的潜在价值。

另一项研究^[34]前瞻性地分析了 56 例 NSCLC 患者手术前和术后 1 个月的 CTCs 计数, 其中有 29 例(51.8%) 在术前检测出了 CTCs, 术后 1 个月检出率 32.1%(18 例)降低($P=0.034$); 术前 CTCs 平均数为 3.16(中位数 1, 范围 0~84), 术后降低至 0.66(中位数 0, 范围 0~3)($P=0.051$)。手术后持续存在的 CTCs 提示着肿瘤的早期复发($P=0.018$)和较短的无病生存期($P=0.008$)。Hofman 等^[35]用滤过膜分离法(ISET)法对 208 例经手术切除的肺癌患者进行 CTCs 计数

得到相似检出率(49%),平均随访 24 个月后,不同分期的肺癌患者中超过 50 个 CTCs 预示更短的 OS 和 PFS。

这些研究表明,CTCs 计数可能作为肺癌患者预后的有力预测因子,并且有助于治疗方案的选择,特别是用于拒绝或失去手术机会需要进行靶向治疗的患者,对治疗疗效的实时监测并及时发现耐药性将使肿瘤患者 PFS 和 OS 获益。

3.4 循环肿瘤细胞与肺癌的复发转移

CTCs 是恶性肿瘤患者复发和远处转移的重要因素^[36]。原位肿瘤细胞入血并在远处器官形成新的病灶是由多种因素共同作用的结果,其中 EMT 是肿瘤细胞转移的先决条件和核心步骤,因此肿瘤患者中 CTCs 的存在可以是转移性病灶的预测指标。

Maestro 等^[37]对 789 例血样本(包括 106 名健康志愿者、438 例乳腺癌、195 例直肠癌、50 例前列腺癌)进行了 CTCs 的计数,分别比较了不同癌症原位肿瘤和发生了转移性病变的 CTCs 的差异,结果显示健康志愿者均未检出 ≥ 2 个 CTCs/7.5ml,而在 62.3%的肿瘤(不考虑肿瘤类型)患者中检测出 CTCs 超过 2 个以上,无转移的病例仅有 14%检测出 CTCs ≥ 2 个,再一次证实了 CTCs 在肿瘤患者中的预测作用,且转移性患者 CTCs 计数明显高于原位癌患者。该研究分别统计 3 种不同癌症的 CTCs 检出率(CTCs ≥ 2 个/7.5ml),其中原位乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌分别为 13%、15.2%和 15.4%,相对应的已经明确有转移性病灶形成的检出率分别为 61.5%、61.3%和 70.8%,证实了 CTCs 在肿瘤转移中的预测作用。值得注意的是,研究还发现 CTCs 计数可能因肿瘤类型而不同,所以 CTCs 阈值的制定可能需要因肿瘤类型而异。

4 结 语

作为监测癌症进展和治疗反应的新工具,“液体活检”为不能获得组织活检时提供基本信息,在精准医学的大背景下提供可靠快速的诊断。循环肿瘤细胞具有完整的细胞结构和功能,相较于传统病理来源的肿瘤标志物其具有取样便捷、无创等特点,可通过形态学特征、分子生物学信息、单细胞转录组和基因组分析等技术较全面地反映肿瘤相关信息。近年

来美国癌症联合委员会(AJCC)已将 CTCs 列入国际 TNM 分期临床指南中,作为肿瘤分期、预后乃至指导治疗的重要标志物之一。然而,就目前的技术发展而言,由于 CTCs 数量稀少、个体异质性高,细胞的富集和检测成为当前面临的重大技术瓶颈,因此,如何提高 CTCs 检测敏感度及特异性,发展适合临床 CTCs 快速诊断需要的高通量自动化仪器,完善 CTCs 检测程序及标准化流程仍需进一步探索。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Vansteenkiste J,Crino L,Dooms C,et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer:early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis,treatment and follow-up[J]. Ann Oncol,2014,25(8):1462-1474.
- [3] Siegel RL,Miller KD,Jemal A. Cancer statistics,2016[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(1):7-30.
- [4] Hofman P,Popper HH. Pathologists and liquid biopsies:to be or not to be?[J]. Virchows Arch,2016,469(6):601-609.
- [5] Fiorelli A,Accardo M,Carelli E,et al. Circulating tumor cells in diagnosing lung cancer:clinical and morphologic analysis[J]. Ann Thorac Surg,2015,99(6):1899-1905.
- [6] Ferreira MM,Ramani VC,Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies[J]. Mol Oncol,2016,10(3):374-394.
- [7] Carper MB,Claudio PP. Clinical potential of gene mutations in lung cancer[J]. Clin Transl Med,2015,4(1):33.
- [8] Yeo T,Tan SJ,Lim CL,et al. Microfluidic enrichment for the single cell analysis of circulating tumor cells [J]. Sci Rep,2016,6:22076.
- [9] Tamminga M,Groen HH,Hiltermann TJ. Investigating CTCs in NSCLC-a reaction to the study of Jia-Wei Wan;a preliminary study on the relationship between circulating tumor cells count and clinical features in patients with non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Dis,2016,8(6):1032-1036.
- [10] Gross A,Schoendube J,Zimmermann S,et al. Technologies for single-cell isolation[J]. Int J Mol Sci,2015,16(8):16897-16919.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Chikaisi Y,Yoneda K,Ohnaga T,et al. EpCAM-indepen-

- dent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip' [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1):77-82.
- [14] Sato K. Microdevice in cellular pathology: microfluidic platforms for fluorescence in situ hybridization and analysis of circulating tumor cells [J]. *Anal Sci*, 2015, 31(9): 867-873.
- [15] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(2):163-176.
- [16] Hiraes CC, Flores FJ, Padilla CE, et al. Current status of circulating protein biomarkers to aid the early detection of lung cancer [J]. *Future Oncol*, 2014, 10(8): 1501-1513.
- [17] Kanodra NM, Silvestri GA, Tanner NT. Screening and early detection efforts in lung cancer [J]. *Cancer*, 2015, 121(9): 1347-1356.
- [18] Infante M, Cavuto S, Lutman FR, et al. Long-term follow-up results of the DANTE trial, a randomized study of lung cancer screening with spiral computed tomography [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(10):1166-1175.
- [19] Shlomi D, Ben-Avi R, Balmor GR, et al. Screening for lung cancer: time for large-scale screening by chest computed tomography [J]. *Eur Respir J*, 2014, 44(1):217-238.
- [20] Sagawa M, Kobayashi T, Uotani C, et al. A survey about further work-up for cases with positive sputum cytology during lung cancer mass screening in Ishikawa Prefecture, Japan: a retrospective analysis about quality assurance of lung cancer screening [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45(3):297-302.
- [21] Yu L, Shen J, Mannoor K, et al. Identification of ENO1 as a potential sputum biomarker for early-stage lung cancer by shot-gun proteomics [J]. *Clin Lung Cancer*, 2014, 15(5):372-378.
- [22] Silva M, Pastorino U, Sverzellati N. Lung cancer screening with low-dose CT in Europe: strength and weakness of diverse independent screening trials [J]. *Clin Radiol*, 2017, 72(5):389-400.
- [23] Infante M, Sestini S, Galeone C, et al. Lung cancer screening with low-dose spiral computed tomography: evidence from a pooled analysis of two Italian randomized trials [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2016. [Epub ahead of print]
- [24] Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(5):395-409.
- [25] Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation [J]. *Cell*, 2012, 148(1-2):349-361.
- [26] Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(22):6980-6986.
- [27] Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e111597.
- [28] Chen X, Zhou F, Li X, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cell detected by LT-PCR-based method as a diagnostic biomarker for non-small-cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(8):1163-1171.
- [29] 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):e126276.
- [30] Hall CS, Karhade MG, Bowman BJ, et al. Prognostic value of circulating tumor cells identified before surgical resection in nonmetastatic breast cancer patients [J]. *J Am Coll Surg*, 2016, 223(1):20-29.
- [31] Sawada T, Araki J, Yamashita T, et al. Prognostic impact of circulating tumor cell detected using a novel fluidic cell microarray chip system in patients with breast cancer [J]. *E Bio Medicine*, 2016, 11:173-182.
- [32] Salgia R, Weaver RW, Mc Cleod M, et al. Prognostic and predictive value of circulating tumor cells and CXCR4 expression as biomarkers for a CXCR4 peptide antagonist in combination with carboplatin-etoposide in small cell lung cancer: exploratory analysis of a phase II study [J]. *Invest New Drugs*, 2017. [Epub ahead of print]
- [33] Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8):2391-2401.
- [34] Bayarri-Lara C, Ortega FG, Cueto Ladrón de Guevara A, et al. Circulating tumor cells identify early recurrence in patients with non-small cell lung cancer undergoing radical resection [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e148659.
- [35] 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.
- [36] Song IH, Yeom SW, Heo S, et al. Prognostic factors for post-recurrence survival in patients with completely resected Stage I non-small-cell lung cancer [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 45(2):262-267.
- [37] Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, et al. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(11):4839-4843.