

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.007

胃癌循环肿瘤细胞动物模型的构建*

周 洲¹, 赖 兵², 高采平¹, 王 璞¹, 王 晗¹, 李良平¹

(1. 四川省医学科学院/四川省人民医院消化内科, 成都 610072;

2. 地奥九泓制药厂前沿生物技术研究室, 成都 610041)

[摘要] **目的** 构建胃癌循环肿瘤细胞(CTC)动物模型,为 CTC 运用于临床提供依据。**方法** 构建 4 种裸鼠胃癌肿瘤模型,分别为皮下移植瘤、原位移植瘤、腹腔移植瘤、尾静脉移植瘤,检测各组肿瘤生长、转移水平,比较各组循环血中 CTC 数目,并进一步行单细胞实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-QPCR)分析转移相关基因在 CTC 与原细胞中的表达变化,免疫组织化学法检测肿瘤组织中血管的生成情况。**结果** 胃癌细胞原位移植模型是研究胃癌 CTC 的理想模型,裸鼠死亡率低,肿瘤转移明显,CTC 数量较其他造模方法明显升高。**结论** 成功构建了 CTC 裸鼠模型,为 CTC 应用于临床奠定了基础。

[关键词] 胃肿瘤;循环肿瘤细胞;肿瘤复发;肿瘤转移**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4917-05

Construction of gastric cancer animal model for circulating tumor cells' research*

Zhou Zhou¹, Lai Bing², Gao Caiping¹, Wang Pu¹, Wang Han¹, Li Liangping¹

(1. Department of Gastroenterology, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital,

Chendu, Sichuan 610072, China; 2. Department of Frontier Biotechnology, Diao Jiu Hong

Pharmaceuticals, Chendu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To construct gastric cancer circulating tumor cell(CTC) animal models, in order to provide references for utilization of CTC in clinical practice. **Methods** Four kinds of gastric tumor models in nude mice were constructed, which were subcutaneously transplanted tumor, orthotopic xenograft, abdominal tumor and tail vein tumor. The tumor growth and metastatic capability were detected, and the number of CTCs in each group was compared. Furthermore, the metastasis-related gene expression changes in CTC and the original cells were detected at single cell level with RT-QPCR analysis. Immunohistochemical staining was used to determinate tumor angiogenesis. **Results** The orthotopic xenograft tumor model was the best model for CTC research. Nude mice death ratio, tumor metastasis and CTC number in orthotopic xenograft tumor model were all better than those of other models. **Conclusion** The gastric cancer CTC animal model is successfully constructed, which might lay foundation for clinical use of CTC.

[Key words] gastric neoplasms; circulating tumor cells; neoplasm recurrence; neoplasm metastasis

胃癌是最常见的严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,全世界范围内每年约有 100 万的新发病例及 50 万的死亡病例^[1]。在恶性肿瘤中,肿瘤转移是重要的预后因素,是导致病死的主要原因^[2]。目前,肿瘤发现和诊断临床上仍依赖于影像学检查及传统肿瘤标志的监测,难以早期发现肿瘤的转移或复发,也难以及时反映疗效。选择最佳的治疗策略,有效地限制转移复发依然是目前临床上的主要挑战。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是指因自发或诊疗操作由原发灶或转移灶进入外周血循环的肿瘤细胞。侵入循环系统的肿瘤细胞,大部分由于机体的免疫识别、机械杀伤及自身凋亡在短期内死亡,只有极少数存活下来,在适于自身存活和增殖的器官或组织形成转移灶。而有些早期播散的肿瘤细胞或微小转移灶在切除原发灶后可以保持休眠状态并在若干年后形成转移灶^[3]。因此,在外周血中检测到 CTC 对解决复发转移监测、肿瘤细胞分子特征等临床问题有重要的应用价值。动物模型能够模拟肿瘤在体内环境的生物学行为,在肿瘤的研究中有重要作用。

目前文献报道的胃癌造模方式主要有皮下移植瘤、原位移植瘤、腹腔移植瘤、尾静脉移植瘤 4 种^[4],但是这 4 种方式形成的 CTC 少见报道。本实验检测各组肿瘤生长、转移水平,比较各组 CTC 数目,并进一步行单细胞实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-QPCR)分析转移相关基因在 CTC 与原细胞中的表达变化,免疫组织化学法了解肿瘤组织中血管生成情况,为进一步临床监控胃癌转移提供良好的研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验所用的 BALB/c 裸鼠均为雌性,4~6 周龄,体质量 17~20 g,购自四川省医学科学院实验动物研究所,全程饲养于无特定病原体(SPF)级动物实验房空气层流架内(室温恒定于 20~22 ℃,空气湿度 30%~50%),予以动物的饲料为⁶⁰钴辐射灭菌过的小鼠专用颗粒饲料,约每 2~3 天更换清洁笼子。本实验动物的使用严格遵守实验动物管理条例,实验设计符合四川省实验动物伦理委员会要求。

1.2 仪器与试剂 分离 CTC 的免疫磁珠为 CELLlection Epi-

* 基金项目:四川省科技厅支持项目资助项目(2014TD0028)。 作者简介:周洲(1983—),主治医师,博士,主要从事消化系统肿瘤的基础临床研究。

thelial Enrich(美国 Invitrogen 公司);单细胞 mRNA 反转录试剂盒为 Single Cell-to-CT qRT-PCR Kit(美国 Ambion 公司);QPCR 试剂盒为 SsoAdvanced SYBR Green Supermix(美国 Bio-Rad 公司);RPMI1640 培养基,胰蛋白酶,磷酸盐缓冲液(PBS)及胎牛血清(美国 Life Technologies 公司);免疫组织化学试剂盒及兔抗人 CD34 单克隆抗体(北京中杉金桥公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验细胞的培养 SGC-7901 胃癌细胞购自中国科学院上海细胞库,培养于 RPMI1640+10%胎牛血清培养液中,置于 37℃,5%二氧化碳(CO₂)培养箱内通气培养,隔天换液。

1.3.2 动物模型的构建

1.3.2.1 裸鼠皮下移植瘤模型的构建 取处于对数生长期的细胞制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^8 /mL。用注射器在每只裸鼠右侧肩胛部皮下注射细胞悬液 0.1 mL,注射后轻压 5 s。每组 10 只裸鼠。将裸鼠重新放回笼中观察约 1 周,右侧肩胛部皮下出现米粒大小质硬结节为模型建立成功。

1.3.2.2 裸鼠原位瘤模型的构建 取处于对数生长期的细胞制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^8 /mL。用注射器在每只裸鼠右侧肩胛部皮下注射细胞悬液 0.1 mL,注射后轻压 5 s。将裸鼠重新放回笼中观察,右侧肩胛部皮下出现米粒大小质硬结节为模型建立成功。2 周后,以颈椎脱臼法处死,小心剥取移植瘤,在培养液中分割成 1 mm×1 mm 的组织碎块。接下来用裸鼠建立原位胃癌移植模型(10 只)。用浓度为 2.5%异氟烷诱导麻醉,待小鼠痛觉消失后,用手术剪在小鼠左上腹部做一约 1 cm 的横切口,暴露腹腔组织,小心分离将胃暴露出腹腔,用生物胶将 1 块胃癌组织粘在小鼠胃组织上。然后用 6.0 不可吸收外科缝线关闭腹腔。整个操作过程在超净工作台完成。之后每天观察小鼠状态,测量小鼠体质量。

1.3.2.3 小鼠腹腔注射肿瘤细胞模型组 待 SGC-7901 细胞进入对数生长期后,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,PBS 液洗涤后,调节成相应的细胞浓度为 5×10^7 /mL 的细胞悬液。于每只裸鼠左下腹进针,回抽无血腹腔注入 0.2 mL 细胞悬液。

1.3.2.4 小鼠尾静脉注射肿瘤细胞模型组 将处于对数生长期的 SGC-7901 细胞浓度调整至 5×10^7 /mL,取 0.1 mL 细胞尾静脉注射入裸鼠,观察小鼠生长活动状况。

1.3.3 血标本采集 严格消毒后,应用真空采血针采集眼眶静脉血 2 mL,加入乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,并在采集后的 2 h 内富集 CTC。

1.3.4 免疫磁珠法筛选 CTC 将 250 μ L 免疫磁珠加入 2 mL 全血中,在 2~8℃ 温度中轻柔旋转,孵育 30 min,然后将管子在磁场中放置 2 min 后轻柔地倒出上清液。将管子从磁场中移除,加入 5 mL 缓冲液 1(Buffer 1),混悬均匀 2~3 次后继续将试管放入磁场中 2 min。再次将试管置于磁场中,移除上清液,将管子从磁场中移除,加入 5 mL Buffer 1,混悬均匀 2~3 次后继续将试管放入磁场中 2 min。最后加入 200 μ L 缓冲液 3(Buffer 3),将细胞充分混悬均匀后复热至 37℃。加入 4 μ L Release Buffer,在室温中孵育 15 min,同时轻柔混匀液体,然后用 100~200 μ L 吸液管将液体充分混悬均匀 5~10 次。将试管放入磁场中 2 min,然后将上清液移入新的试管中进行单细胞挑选。

1.3.5 循环肿瘤细胞的判定标准及挑取 将富集的细胞液在

显微镜下再次进行形态学筛选。显微操作平台:Leica DM IL LED 荧光显微镜搭配 Eppendorf TransferMan NK 2 显微操作仪。筛选标准:(1)细胞呈圆形、椭圆形或长形,长径大于 10 μ m;(2)光镜下可见完整细胞形态及细胞核;(3)核质比失常。将选定的 CTC 在单细胞挑取台上细针挑取收集。

1.3.6 单细胞 RT-QPCR 将选取的细胞加入按说明配好的 10 μ L 单细胞溶解液 I,室温下孵育 5 min,然后加入 1 μ L 终止液(总体积约 11 μ L),室温孵育 2 min 后加入 4.5 μ L RT Mix(总体积约 15 μ L),25℃ 孵育 10 min,42℃ 孵育 60 min,85℃ 孵育 5 min。将得到的逆转录 cDNA 均分为每份 2 μ L,分别加入 0.6 μ L Single Cell PreAmp Mix,和 0.8 μ L 按说明稀释好的引物,95℃ 孵育 10 min 后 95℃ 15 s,60℃ 4 min,进行 14 个循环后取 1 μ L 预扩增产物稀释后用于 PCR 扩增。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 10 s,6℃ 退火 30 s,60 个循环。RT-PCR 结果以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照计算基因 mRNA 相对表达水平。每次反应均设立 3 个复孔。

1.3.7 小鼠胃癌组织免疫组织化学 采用免疫组织化学 SP 染色法,常规脱蜡、水化,以 0.01 mol/L 柠檬酸高压修复 5 min,3%过氧化氢(H₂O₂)室温孵育 5~10 min,正常山羊血清封闭 10 min 后,滴加一抗,孵育过夜,其余步骤严格遵照即用型 SP 免疫组织化学试剂盒说明书进行,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,中性树脂胶封片。阳性对照由试剂公司提供,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。以细胞膜/细胞质/细胞核中出现明显的黄色或黄褐色颗粒视为免疫组织化学染色阳性,综合染色强度及阳性细胞数量进行半定量分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本检验方差齐性后,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间的比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组 CTC 数目比较 4 组小鼠均接种成功,在观察期间,皮下组的死亡率为 0,原位组为 30%,腹腔组为 20%,尾静脉组为 50%。分别在接种成功后 2、3、4 周采集裸鼠眼眶静脉血(第 2 周处死 2 只,第 3 周处死 2 只,第 4 周处死 6 只),计数外周血中 CTC 数目。结果显示,皮下组在整个实验过程中未发生血中转移,原位组随着时间推移循环血中 CTC 数目逐渐增加,并且裸鼠死亡率低,是一种可行的构建 CTC 动物模型的方法,见图 1。腹腔组虽然发生转移,但实验过程中,CTC 数目较少。尾静脉组虽然 CTC 数目较腹腔组高,但裸鼠死亡率高,可能与操作技术复杂,裸鼠对尾静脉注射耐受力低有关。

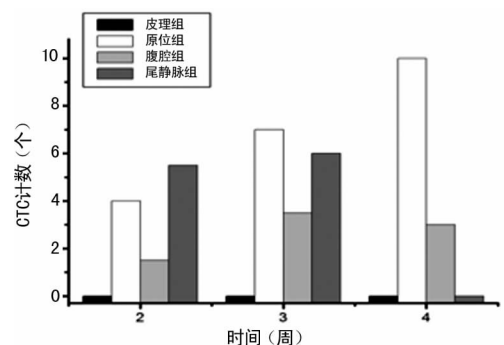


图 1 CTC 计数比较

2.2 4 种接种方法转移情况比较 为了进一步阐明 4 种造模方式转移情况的比较,对裸鼠转移部位进行分析。由于肿瘤的迅速增殖,小鼠出现明显的恶病质表现(消瘦、精神萎靡不振、食欲下降、腹水),小鼠处死后剖腹观察。4 组裸鼠移植瘤在体内的转移情况,见图 2。皮下组未发生任何转移,原位组发现了肝脏(80%)、肺脏(30%)、肠系膜(100%)转移,并且出现了腹水(40%),腹腔组肠系膜转移率高(100%),腹水(80%)出现率高,但肝脏(40%)、肺脏(10%)转移率低。尾静脉注射组发生转移率较原位组、腹腔组均低(肝脏转移 30%、肺脏转移 10%、肠系膜转移 50%、腹水 20%)。可能与裸鼠生存期短,在实验过程中死亡率高相关。

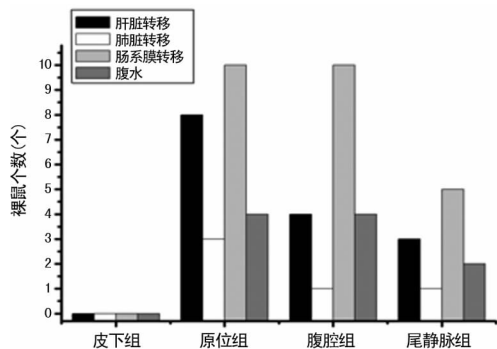
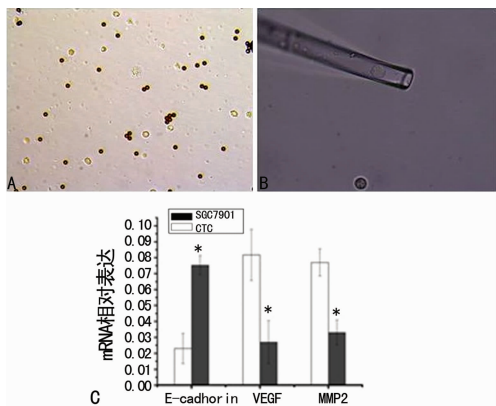


图 2 裸鼠模型转移部位的比较

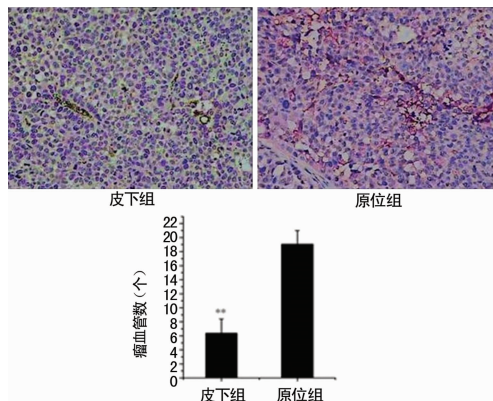
2.3 单细胞 RT-QPCR 检测原位组 CTC 及 SGC7901 细胞中转移相关基因表达差异 由于原位肿瘤移植裸鼠组动物死亡率低,转移率高,是一种较好的反映肿瘤转移的动物模型。采用免疫磁珠法提取原位组外周血中 CTC 行单细胞 RT-QPCR,与接种细胞 SGC7901 行转移相关基因表达变化比较。结果表明,基质金属蛋白酶 2(MMP2) mRNA 在 SGC7901 细胞表达水平为(0.038±0.007),在 CTC 表达水平为(0.077±0.009),差异有统计学意义($t=6.27, P<0.05$);血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 在 SGC7901 细胞的表达水平为(0.027±0.013),在 CTC 的表达水平为(0.082±0.002),差异有统计学意义($t=4.52, P<0.05$);钙粘素 E(E-cadherin) mRNA 在 SGC7901 细胞的表达水平为(0.075±0.005),在 CTC 的表达水平为(0.023±0.009),差异有统计学意义($t=8.10, P<0.05$),见图 3。



A: CELLlection™ 富集 CTC; B: 单细胞挑取 CTC; C: CTC 与 SGC 7901 细胞代谢相关基因比较; *: $P<0.05$,与 CTC 中表达水平比较。

图 3 单细胞 RT-QPCR

2.4 免疫组织化学检测原位瘤与皮下瘤中血管数目改变 采用内皮细胞特异性 CD34 染色和微血管计数检测皮下移植瘤与原位胃癌血管生长水平。皮下移植瘤组血管数量明显低于原位移植肿瘤[(2.17±1.47) vs. (28.33±3.93), $P<0.01$],见图 4。



*: $P<0.01$,与原位组比较。

图 4 皮下移植瘤及原位移植瘤血管数目比较 (SP 染色×200)

3 讨论

胃癌是全世界范围内常见的恶性肿瘤之一,胃癌的发病率及病死率均较高。胃癌早期诊断率低,缺乏特异性早期表现,多数患者确诊时已属中晚期,失去手术根治机会,预后极差,中位生存期仅为 6~10 个月^[1]。目前,大部分胃癌相关死亡事件是由肿瘤的转移行为所引起的^[5]。早期发现远处转移是提高胃癌治愈率、改善患者预后的有效及关键途径。

肿瘤转移浸润是一个复杂的过程,肿瘤细胞从原位癌中脱离,随血液分散至身体各部,形成新的癌灶。早在 19 世纪中叶,人们已经在肿瘤患者体内发现了一种“异质”细胞,并且认识到血液是传播它的主要途径,但由于条件所限,一直没有进行深入研究^[6]。直到最近,由于技术手段的发展,才有机会认识它,更重要的是,将 CTC 用于临床肿瘤的诊断、监测及治疗^[7]。因此,在外周血中检测到 CTC 对解决复发转移监测、肿瘤分子特征等临床问题有重要的应用价值。CTC 是肿瘤血行转移过程中的关键步骤,提供了原发性与转移性肿瘤之间的联系。如何利用 CTC 控制肿瘤转移侵袭,是一个迫切需要被深入发掘及研究的重要问题。

CTC 与其他有创手段获取肿瘤标本有不可比拟的优势,血液来源的 CTC,标本采集容易、创伤性小、患者依从性较好,是临床上较为理想的标本来源。目前 CTC 在临床中的应用主要包括以下几个方面。(1) 肿瘤的诊断:对于一些隐匿部位的肿瘤,虽然临床高度怀疑,但在没有病理诊断的情况下,临床的诊断及治疗相当棘手。所以,如果能在外周血获得 CTC,并进行相关的病理学、分子生物学分析,对临床肿瘤的诊断治疗有极大的帮助,故 CTC 作为无创的实时液体活检标本有重要的意义^[8]。(2) 指导个体化治疗:在肿瘤靶向治疗中,临床策略的决定主要根据患者原发肿瘤的基因表型,但在治疗过程中,肿瘤的基因表型很可能发生改变,CTC 为整个疗程中的肿瘤基因表型提供实时监测,为精准的个体化治疗提供了可能^[9]。(3) 治疗效果及预后的评估:外周血中 CTC 的数目是评估预后的良好指标,研究表明,在多种肿瘤中,CTC 的计数是肿瘤预

后的独立影响因素^[10]。

目前,CTC 在临床的运用越来越多。Sastre 等^[11]采用 CellSearch 系统监测结肠癌患者,证实 CTCs 阳性率与原发肿瘤部位、肿瘤分化程度及癌胚抗原(CEA)水平升高无关,但与结肠癌的临床分期相关,且 CTCs 在结肠癌的早期阶段即可检测到,表明 CTCs 检测有助于早期发现结肠癌及可能出现的微转移。Cristofanilli 等^[12]在一个多中心、前瞻性和双盲临床试验中,检测 177 例转移性乳腺癌患者 7.5 mL 外周血中 CTCs 的数量,发现治疗前外周血中 CTCs ≥ 5 的患者与 CTCs < 5 的患者相比,预后较差,因此 CTCs 可作为转移性乳腺癌患者预后评估的独立预测因素。有研究者运用荧光原位杂交(FISH)技术发现,38%的转移性乳腺癌患者原发肿瘤组织呈表皮生长因子受体-2(HER-2)阴性,而分离并富集的外周血 CTCs 能够扩增到 HER-2 基因,根据 CTCs 的 HER-2 扩增情况适时调整治疗方案,能够获得更好的治疗效果^[13]。监控 CTCs 的 HER-2 基因表达,进行有针对性的个体化治疗是对乳腺癌患者传统治疗观念的改进。Smerage 等^[14]在 595 例转移性乳腺癌患者外周血中检测 CTCs,结果表明,CTCs 是强烈的预后因子。因此,CTCs 检测对早期发现肿瘤微转移、评估预后及肿瘤的个体化治疗等具有重要意义,而且由于检测标本是外周血,侵袭性小,可重复进行,所以 CTCs 检测技术具有广阔的临床应用前景。

目前,CTCs 在胃癌领域的研究较少,尚需通过更多大规模、多中心的随访研究深入探讨其在评估患者疗效、预后和监测复发转移方面的应用价值,从而为肿瘤的合理化及个体化治疗奠定基础。动物模型是探讨 CTC 临床运用的前提,目前迫切需要找到一个经济、好用,能够反应 CTC 临床特征,但目前还缺乏这方面的研究。

在本研究中,作者采用了 4 种常用的胃癌造模手段,包括皮下移植瘤、原位移植瘤、腹腔移植瘤、尾静脉移植瘤 4 种。采用免疫磁珠法分离外周血中 CTC,它是目前比较常用的 CTC 分离和富集技术^[15]。其原理是基于 CTCs 主要表达上皮源性表面标志,利用抗原抗体方法分离和富集 CTCs,通过磁珠偶联上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EPCAM)和细胞角蛋白(cytokeratins, CKs)等标志直接富集外周血中上皮来源的细胞。对于富集的 CTC,作者采用单细胞 RT-QPCR 进一步分析原细胞与 CTC 基因表达差异。RT-QPCR 不仅高度敏感,而且具有高度特异性。它相比于 RT-PCR 的主要优势是通过 Cq 值的形式,设置截断水平,以减少基于错误转录的假阳性结果^[16]。目前,已有部分研究采用 RT-QPCR 技术分析 CTC 肿瘤预后标志物表达水平,包括 HER-2^[17]、TWIST1^[18]、CD133^[19]、表皮生长因子受体(EGFR)^[20]、间质表皮转化因子(MET)^[21]和血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)^[22]。但是,目前大部分研究采用全血细胞进行 RT-QPCR,其主要缺陷是不能排除白细胞的污染,假阳性概率增高,并且不能区分 1 份样品中多个循环肿瘤细胞基因表达差异。由于这个缺点,作者采用单细胞 RT-QPCR 技术进行 CTC 基因表达分析。将单细胞平台筛选出的 CTC 行 CD45 初筛,对于 CD45-的细胞进一步行转移相关基因表达检测。CD45 在白细胞中有高表达,而在其他各种来源的细胞中无表达,这样可以有效去除血液其他细胞的污染。

本研究结果表明,皮下移植瘤不能形成 CTC,尾静脉注射法虽然在前 2 周 CTC 数目多,在接种第 4 周,已有一半裸鼠死亡,可能与尾静脉注射法技术难度大,操作困难有关。而腹腔注射组 CTC 数目较少,转移部位较局限,不是构建 CTC 的理想方案。原位接种裸鼠死亡率低,CTC 数目多,且转移范围较广,是一种比较成功的构建 CTC 模型的方法。进一步单细胞 mRNA 研究表明,与 SGC7901 相比,体内单细胞 CTC MMP2、VEGF mRNA 表达明显增加,而 E-cadherin mRNA 表达明显减少。原位胃癌的血管数目明显多于皮下移植瘤,可见在体内环境下,CTC 转移相关基因表达增强,抑制转移相关基因表达减弱,肿瘤血管生成增多,导致肿瘤转移能力明显增强。

综上所述,肿瘤复发转移是造成肿瘤致死的主要原因,早期准确检测 CTC 对肿瘤患者的综合治疗至关重要,并且可能作为胃癌治疗监测、评估预后、复发转移风险预测的评估指标,有助于选择个体化治疗方案,从而降低肿瘤复发率,延长患者生存期。本实验探索性的采用了免疫磁珠法联合单细胞收集法收集 CTC,并采用单细胞 RT-QPCR 检测 CTC 相关基因表达,为 CTC 应用于临床奠定了基础。

参考文献

- [1] Fock KM. Review article; the epidemiology and prevention of gastric cancer[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 40(3):250-260.
- [2] Li S, Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6):1806-1812.
- [3] Chmielewska M, Łosiewicz K, Socha P, et al. The application of circulating tumor cells detecting methods in veterinary oncology[J]. *Pol J Vet Sci*, 2013, 16(1):141-151.
- [4] Zhang C, Awasthi N, Schwarz MA, et al. Establishing a peritoneal dissemination xenograft mouse model for survival outcome assessment of experimental gastric cancer[J]. *J Surg Res*, 2013, 182(2):227-234.
- [5] Zhao F, Chen X, Meng T, et al. Genetic polymorphisms in the osteopontin promoter increases the risk of distance metastasis and death in Chinese patients with gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012(12):477.
- [6] Balic M, Williams A, Lin H, et al. Circulating tumor cells: from bench to bedside[J]. *Annu Rev Med*, 2013(64):31-44.
- [7] Arya SK, Lim B, Rahman AR. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells[J]. *Lab Chip*, 2013, 13(11):1995-2027.
- [8] Möckelmann N, Laban S, Pantel K, et al. Circulating tumor cells in head and neck cancer: clinical impact in diagnosis and follow-up[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 271(1):15-21.
- [9] Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(5):931-939.
- [10] Broersen LH, Van Pelt GW, Tollenaar RA, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer[J].

- Cell Oncol (Dordr), 2014, 37(1):9-15.
- [11] Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab; a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study [J]. *Oncologist*, 2012, 17(7):947-955.
- [12] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8):781-791.
- [13] Cao S, Li Y, Li J, et al. Quantitative determination of HER2 expression by confocal microscopy assay in CTCs of breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(2):423-428.
- [14] Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500 [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(31):3483-3489.
- [15] Alonso-Alconada L, Muínelo-Romay L, Madisoo K, et al. Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1):223.
- [16] Roberts TC, Hart JR, Kaikkonen MU, et al. Quantification of nascent transcription by bromouridine immunocapture nuclear run-on RT-qPCR [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(8):1198-1211.
- [17] Wang HY, Ahn S, Kim S, et al. Detection of circulating tumor cell-specific markers in breast cancer patients using the quantitative RT-PCR assay [J]. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20(5):878-890.
- [18] Markou A, Strati A, Malamos N, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(3):421-430.
- [19] Mi DC. Circulating CD133: a promising biomarker, but what are we measuring? [J]. *Ann Surg Onco*, 2012, 19(2):351-352.
- [20] Lankiewicz S, Rother E, Zimmermann S, et al. Tumour-associated transcripts and EGFR deletion variants in colorectal cancer in primary tumour, metastases and circulating tumour cells [J]. *Cell Oncol*, 2008, 30(6):463-471.
- [21] Uen YH, Lin SR, Wu CH, et al. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 367(1/2):55-61.
- [22] Taylor M, Rössler J, Geoerger B, et al. High levels of circulating VEGFR2 + Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14):4561-4571.
- (收稿日期:2016-05-21 修回日期:2016-08-09)
- (上接第 4916 页)
- 对肿瘤细胞上皮-间质转化的诱导机制 [J]. 2015, 36(1):90-93.
- [9] Ali A, Zhang P, Liangfang Y, et al. KLF17 empowers TGF- β /Smad signaling by targeting Smad3-dependent pathway to suppress tumorgrowth and metastasis during cancer progression [J]. *Cell Death Dis*, 2015(6):e1681.
- [10] van Zijl F, Mair M, Csiszar A, et al. Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge [J]. *Oncogene*, 2009, 28(45):4022-4033.
- [11] Ishida T, Hijioka H, Kume K, et al. Notch signaling induces EMT in OSCC cell lines in a hypoxic environment [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(5):1201-1206.
- [12] Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(17):6392-6397.
- [13] Lee JH, Suk J, Park J, et al. Notch signal activates hypoxia pathway through HES1-dependent SRC/signal transducers and activators of transcription 3 pathway [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(10):1663-1671.
- [14] Lim JH, Chun YS, Park JW. Hypoxia-inducible factor-1 α obstructs a Wnt signaling pathway by inhibiting the hARD1-mediated activation of beta-catenin [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13):5177-5184.
- [15] Zhang Q, Bai X, Chen W, et al. Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(5):962-973.
- (收稿日期:2016-05-18 修回日期:2016-08-06)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。