

胃腺癌中循环肿瘤细胞检测及 HER2 表达情况的研究*

杜日昌¹,李宇芳²,杨莎莎¹,王林辉¹,李 静¹,邱俊勇¹,黄俊仙¹

(汕头大学医学院附属粤北人民医院;1.病理科;2.急诊内科,广东韶关 512009)

[摘要] **目的** 探讨胃腺癌(GAC)患者外周血中循环肿瘤细胞(CTC)和 CTC-人类表皮生长因子受体 2 (HER2)的表达及其临床意义。**方法** 选取该院行手术切除治疗并用免疫组织化学染色(IHC)检测 HER2 的患者 113 例,胃良性病变患者 10 例,通过 CTC 检测方法(微流控芯片分离技术)测定外周血 CTC 数目和 CTC-HER2 表达情况,并分析其与临床病理特征的关系。**结果** GAC 患者外周血 CTC 检出率明显高于良性病变患者(74.34% vs. 0, $P < 0.05$);CTC 检测阳性率与 GAC 的 T 分期、临床分期及脉管内癌栓相关($P < 0.05$),与患者的年龄、组织学分级、淋巴结转移无关($P > 0.05$);CTC-HER2 检测阳性率与组织学分级、T 分期及脉管内癌栓相关($P < 0.05$),与患者的年龄、临床分期、淋巴结转移无关($P > 0.05$)。GAC 患者 CTC-HER2 检测阳性率为 49.56%,组织学 HER2 检测阳性率为 38.05%,差异有统计学意义($P < 0.001$)。**结论** CTC 及 CTC-HER2 可反映 GAC 的转移及预后,并有助于实时监测 HER2 的状态。

[关键词] 胃肿瘤;肿瘤细胞,循环;人类表皮生长因子受体 2;预后;免疫组织化学**[中图法分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)10-1500-05Detection of circulating tumor cells and HER2 expression
in gastric adenocarcinoma*DU Richang¹, LI Yufang², YANG Shasha¹, WANG Linhui¹, LI Jing¹, QIU Junyong¹, HUANG Junxian¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Emergency Medicine, Yuebei People's Hospital

Affiliated to Medical College of Shantou University, Shaoguan, Guangdong 512009, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of circulating tumor cell (CTC) and CTC-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in peripheral blood of patients with gastric adenocarcinoma (GAC). **Methods** A total of 113 GAC patients who underwent surgical resection treatment and were tested for HER2 using immunohistochemical staining (IHC) and 10 patients with benign gastric lesions were selected from this hospital. The number of peripheral blood CTC and the expression of CTC-HER2 were detected using CTC detection method (microfluidic chip separation technology), and the relationships of the number of peripheral blood CTC and the expression of CTC-HER2 with clinicopathological features were analyzed. **Results** The detection rate of peripheral blood CTC in patients with GAC was significantly higher than that in patients with benign gastric lesions (74.34% vs. 0, $P < 0.05$). The positive rate of CTC detection was correlated with the T stage, clinical stage and lympho-vascular invasion ($P < 0.05$), while not with the age, histological grading and lymph node metastasis of patients with GAC ($P > 0.05$). The positive rate of CTC-HER2 expression was correlated with the histological grading, T stage and lympho-vascular invasion ($P < 0.05$), while not with the age, clinical stage and lymph node metastasis of patients with GAC ($P > 0.05$). The positive rate of CTC-HER2 detection in patients with GAC was 49.56%, and the positive rate of histological HER2 detection was 38.05%, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). **Conclusion** CTC and CTC-HER2 can indicate the metastasis and prognosis of GAC, and contribute to monitor the status of HER2 in real time.

[Key words] stomach neoplasms; neoplastic cells, circulating; human epidermal growth factor receptor 2; prognosis; immunohistochemistry

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,2020 年全球有超过 108 万新发胃癌病例,约 77 万死亡病例,且胃癌发病率还在不断上升^[1]。胃癌常规化疗方法有效率仅为

20%~30%。即使通过围手术期化疗或新辅助化疗,5 年生存率仍普遍低下。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)即外周血液循环中的肿瘤细胞,来

* 基金项目:韶关市科技计划项目(200812114531471);韶关市卫生健康科研计划项目(Y20136)。 作者简介:杜日昌(1971—),主任医师,学士,主要从事肿瘤病理学诊断研究。

源于恶性肿瘤的原发灶、转移灶,甚至是各种临床诊疗操作。研究表明,CTC 检测在肿瘤早期诊断、评估预后、确定治疗靶点、治疗监测及治疗耐药性监测等多个方面具有重要意义^[2]。李刚强等^[3]指出,乳腺癌患者 CTC-人类表皮生长因子受体 2(HER2)检测有助于了解其 HER2 表达的实时状态,为靶向治疗及疗效监测提供了依据。本研究通过测定胃腺癌(astrocytic adenocarcinoma,GAC)患者 CTC 数量及 CTC-HER2 表达情况,探讨二者与组织学及临床病理参数的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

在 2019 年 1 月至 2020 年 12 月于本院行手术切除治疗的 653 例 GAC 患者中,选取已行免疫组织化学染色(IHC)HER2 检测的 113 例 GAC 患者,其中 HER2 阴性 70 例,HER2 阳性 43 例;男 75 例,女 38 例;年龄 35~71 岁,中位年龄 46 岁。同时选取 10 例胃良性病变患者,男 6 例,女 4 例,年龄 32~70 岁,中位年龄 51 岁。

1.2 方法

1.2.1 CTC 检测

纳入的 113 例 GAC 患者及 10 例胃良性病变患者均行外周血 CTC 检测。采用江苏汇先医药公司 CytoBot2000 自动制片系统。CTC 检测方法原理:微流控芯片表面 anti-EpCAM 抗体与患者外周血中表达 EpCAM 抗原的稀有细胞发生特异性结合,通过微流控芯片分离技术实现稀有细胞的分离和富集,并添加荧光试剂以识别此类细胞。拟手术患者术前 1 周内行 CTC 及 CTC-HER2 检测,具体操作如下:(1)收集患者外周血 10 mL 于 ACD 抗凝管中,移液枪抽取 4 mL 样品密度分离液至 15 mL 离心管中离心。(2)观察离心管可分为血浆层、外周血单个核细胞(PBMC)层、分离液层及红细胞 4 层。(3)将离心管中间 PBMC 层抽取至另一离心管中,保证 PBMC 层抽取干净,可吸取少量分离液层。(4)按要求设置离心机参数,温度 25℃,离心力 500 g,9 档升降速,时间 5~6 min。去上清液,注意不能抽取到细胞沉淀物。用 5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬离心管中的沉淀物。离心后吸取上清液,留下层细胞沉淀物,300 μ L PBS 重悬离心管中的细胞沉淀物,完成血样预处理。接下来用移液枪抽取混合均匀的细胞,加入 TIP 头组件,进行 CTC 富集。(5)用 CytoBot2000 自动加样系统进行常规 CTC 及 CTC-HER2 检测。按产品说明书步骤进行免疫荧光检测(FISH):DAPI(+)/CK(+)/CD45(-)判读为 HER2(-)CTC;DAPI(+)/CK(+)/HER2(+)/CD45(-)判读为 HER2(+)CTC。由于检测方法不同,尚无统一的 CTC 阳性标准规范及指南,本研究参照江苏汇先医药公司产品说明书,监测到两个及以上 CTC 判读为阳性。

1.2.2 IHC 及判定

手术切除 GAC 组织标本,经 4% 中性甲醛固定,

脱水,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,行苏木素-伊红(HE)染色及 IHC(EnVision 法)。HER2 蛋白为 VENTANA 公司产品(克隆号:4B5,即用型)。用 GAC 患者已知 HER2 阳性的组织切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。评分参照胃癌 HER2 检测指南(2016 版)HER2 评分标准^[4]:(1)IHC(0),无反应或 <10% 的肿瘤细胞膜染色;(2)IHC(1+), $\geq$ 10% 的肿瘤细胞微弱或隐约可见膜染色,仅有部分细胞膜染色;(3)IHC(2+), $\geq$ 10% 的肿瘤细胞有弱至中度基底侧膜、侧膜或完全性膜染色;(4)IHC(3+), $\geq$ 10% 的肿瘤细胞基底侧膜、侧膜或完全性膜强染色。IHC(0)及 IHC(1+)定义为阴性;IHC(3+)为阳性;IHC(2+)为不确定性,需行荧光原位杂交(FISH)验证。

1.2.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行统计分析。计数资料以例数或百分比表示,比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

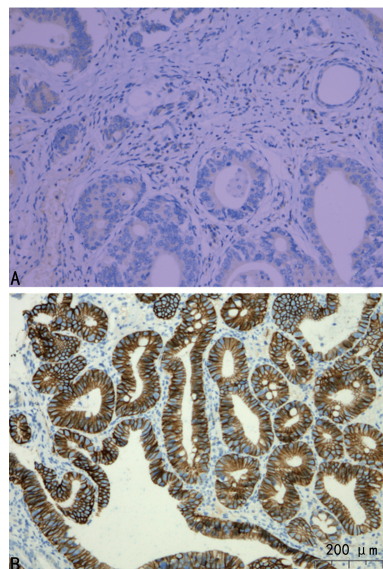
2 结果

2.1 GAC 与良性病变患者 CTC 表达状况

GAC 患者外周血中 CTC 的检出率为 74.34% (84/113),良性病变患者外周血中未检测到 CTC(检出率为 0),差异有统计学意义($\chi^2 = 23.445, P < 0.05$)。

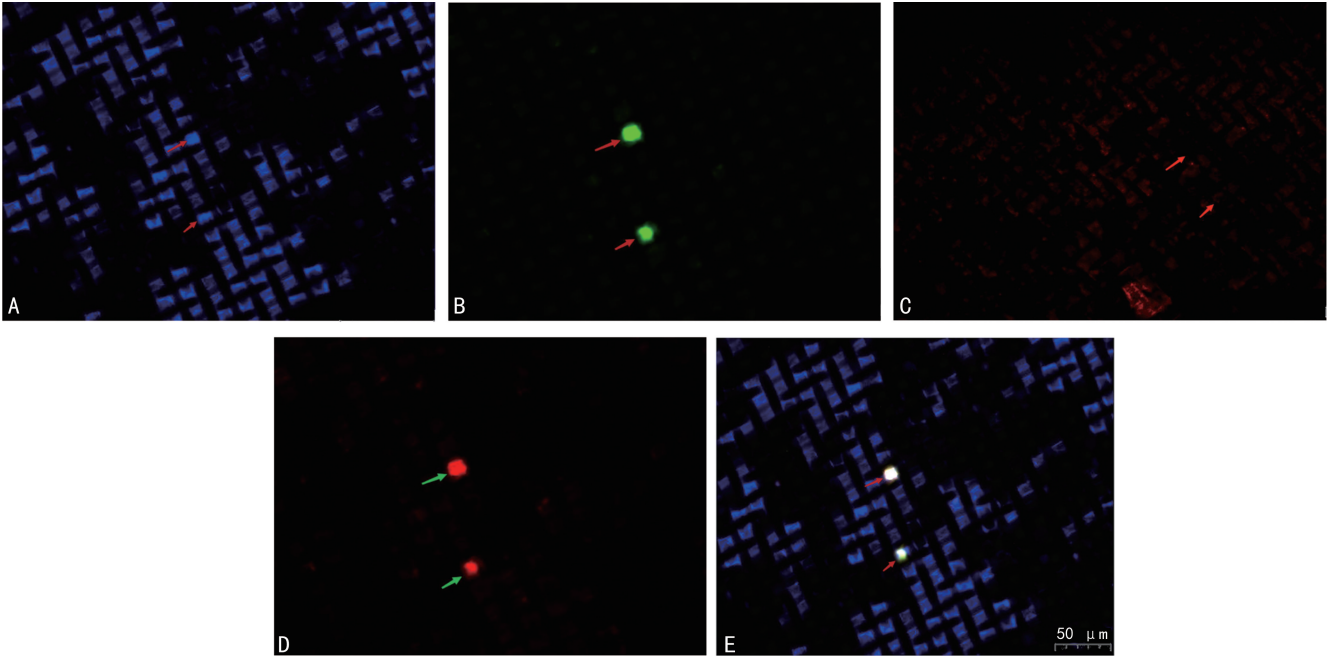
2.2 GAC 中 CTC 及 HER2 的表达与临床病理参数的关系

GAC 患者 CTC 检测阳性率与患者的 T 分期、临床分期、脉管内癌栓有关($P < 0.05$),与患者的年龄、组织学分级、淋巴结转移无明显相关性($P > 0.05$);CTC-HER2 检测阳性率与患者的 T 分期、组织学分级、脉管内癌栓有关($P < 0.05$),与年龄、临床分期及淋巴结转移无明显相关性($P > 0.05$),见表 1;GAC 组织学 HER2 表达见图 1,外周血 CTC-HER2 表达见图 2。



A:HER2(-);B:HER2(3+)。

图 1 GAC 组织 IHC 检测 HER2 表达(EnVision 法)



A:DAPI(+),箭头所示蓝色细胞为 CTC 细胞核着色;B:CK(+),箭头所示绿色细胞为 CTC;C:CD45(-),箭头所示为 CTC 而非白细胞;D:HER2(+),箭头所示红色细胞为 HER2 阳性 CTC;E:箭头所示为上述 4 种合成 CTC。

图 2 GAC 患者外周血 CTC-HER 表达情况

表 1 GAC 中 CTC 及 HER2 的表达及其与临床病理参数的关系[*n*=113,*n*(%)]

类别	<i>n</i>	CTC		χ^2	<i>P</i>	CTC-HER2		χ^2	<i>P</i>
		-	+			-	+		
年龄(岁)				0.469	0.494			0.012	0.914
≤60	49	11(22.45)	38(77.55)			25(51.02)	24(48.98)		
>60	64	18(28.12)	46(71.87)			32(50.00)	32(50.00)		
T 分期				17.700	0.001			10.390	0.016
T ₁	14	8(57.14)	6(42.86)			11(78.57)	3(21.42)		
T ₂	19	9(47.37)	10(52.63)			13(68.42)	6(31.58)		
T ₃	34	7(20.59)	27(79.41)			16(47.06)	18(52.94)		
T ₄	46	5(10.87)	41(89.13)			17(36.96)	29(63.04)		
组织学分级				0.159	0.924			28.369	<0.001
低分化	55	17(30.91)	38(69.09)			41(74.54)	14(25.45)		
中分化	43	12(27.91)	31(72.09)			13(30.23)	30(69.77)		
高分化	15	4(26.67)	11(73.33)			3(20.00)	12(80.00)		
临床分期				9.948	0.002			0.093	0.760
I+II	46	19(41.30)	27(58.69)			24(52.17)	22(47.83)		
III+IV	67	10(14.92)	57(85.07)			33(49.25)	34(50.75)		
淋巴结转移				0.012	0.912			0.115	0.734
是	77	20(25.97)	57(74.02)			38(49.35)	39(50.65)		
否	36	9(25.00)	27(75.00)			19(52.78)	17(47.22)		
脉管内癌栓				15.806	<0.001			11.059	0.001
是	63	7(11.11)	56(88.89)			23(36.51)	40(63.49)		
否	50	22(44.00)	28(56.00)			34(68.00)	16(32.00)		

2.3 GAC 患者 CTC-HER2 与组织 HER2 表达情况

在 43 例组织学 HER2 阳性的 GAC 患者中,CTC-HER2 表达阳性 38 例,二者一致率为 88.37%(38/43);在 70 例组织学 HER2 阴性的 GAC 患者中,检出 18 例 CTC-HER2 表达阳性,检出率为 25.71%(18/70);CTC-HER2 检测阳性率为 49.56%(56/113),组织学 HER2 检测阳性率为 38.05%(43/113),二者相比,差异有统计学意义(*P*<0.001),见表 2。

表 2 GAC 患者 CTC-HER2 与组织 HER2 表达情况(*n*)

组织 HER2 表达	CTC-HER2 表达		
	+	-	合计
+	38	5	43
-	18	52	70
合计	56	57	113

3 讨 论

GAC 是世界范围内致死率居第 3 位的恶性肿瘤,主要原因是疾病通常诊断较晚、化疗反应率低,以及目前对肿瘤生物学总体缺乏了解^[5]。CTC 来源于原发肿瘤或转移灶,指从实体瘤中脱离出来并进入外周血液循环的肿瘤细胞。研究显示,通过对进展期 GAC 患者术前进行外周血检测发现,CTC 数量与肿瘤分化、淋巴血管浸润及肿瘤分期有关^[6]。HUANG 等^[7]对多个研究进行 meta 分析结果表明,Ⅲ~Ⅳ期 GAC 患者 CTC 阳性率与 I~Ⅱ期相比有明显差异。本研究结果提示,GAC 患者外周血中 CTC 的检出率明显高于胃良性病变患者(74.34% vs. 0, $P < 0.05$);CTC 检测阳性率与 GAC 患者年龄、组织学分级、淋巴结转移无明显相关性($P > 0.05$),而与 T 分期、脉管内癌栓和临床分期相关($P < 0.05$)。与葛海燕等^[8]研究结果基本一致。但也有不同的观点,国外的学者检测了晚期 GAC 患者的 CTC,CTC 阳性率与 GAC 的组织学分型和是否发生远处转移有关,而与其他临床病理特征并无明显相关性^[9]。GAC 患者 CTC 的数目与临床病理特征相互关系如何,目前研究报道不一,作者认为可能与选择对象的临床特点、抽血量、细胞富集方法选择、阳性阈值范围等相关。各种研究都显示了 CTC 在胃癌诊断、复发监测及预后判断的价值,肿瘤细胞能够分泌促进小血管增生的血管生长因子,供给癌细胞快速生长所需的营养。进入血管的瘤细胞本身或与血液成分混合形成癌栓^[10-12]。本研究结果显示,CTC 检测阳性率与脉管内癌栓相关,说明肿瘤细胞进入脉管越多,检出的 CTC 也越多,并可提示肿瘤的进程。多项研究表明,CTC 可早于 CT 等影像学检查预警肿瘤复发。因此,对外周血进行 CTC 检测,能及时动态地监控胃癌患者病情变化,准确判断胃癌患者转移和复发的状况,及时调整治疗方案,并为精准化治疗提供分子理论参考依据。

HER2 是癌基因 *erbB2* 的编码产物,属于表皮生长因子受体家族的成员,与细胞增殖及转移等密切相关^[13]。TOGA 研究证实曲妥珠单抗对 HER2 过表达 GAC 患者有明显疗效。现阶段,GAC 组织学 HER2 的检测方法有 IHC、显色原位杂交(CISH)或 FISH^[4],但存在一些缺点:(1)标本的固定、IHC 的处理及判读等;(2)转移患者需再次活检;(3)脑及纵隔转移等穿刺困难者可能无法完成,不能实时检测 GAC 患者 HER2 状况。而 CTC-HER2 检测技术具有无创、能重复检查等优点,对 GAC 患者的预后、疗效等有较好的提示作用,有助于根据提示调整方案。

李刚强等^[3]指出,乳腺癌患者 CTC-HER2 检测有助于监测 HER2 实时状态,为靶向治疗及疗效监测提供依据。ABDALLAH 等^[5]评估了 55 例 GAC 患者的 45 份活检样品和 42 份 CTC 样品中 HER2 的表达,其中有 36 例 HER2 结果重叠。在 36 例原发肿瘤组织与 CTC 中 HER2 的表达有良好一致性($\kappa = 0.272$),CTC 中 HER2 的阳性率(43%)高于原发肿瘤

组织(11%);3/5 的原发肿瘤组织 HER2 阴性疾病进展患者有 HER2 阳性 CTC。本研究显示,在 43 例胃癌组织学 HER2 阳性患者中,CTC-HER2 阳性 38 例,有较高的一致性,一致率为 88.37%;而组织学 HER2 阴性患者 CTC-HER2 阳检出率为 25.71%。我国一项基于组织学的大样本量、多中心研究显示,HER2 阳性率为 8.8%,并且 HER2 阳性与标本类型、肿瘤部位、Lauren 分型和分化程度相关^[14]。本研究发现,组织学与 CTC 检测 HER2 存在不一致的情况,分析可能的原因:(1)肿瘤的异质性,因为 GAC 组织学阳性判读标准为 $\geq 10\%$ 的肿瘤细胞基底侧膜、侧膜或完全膜强染色;(2)组织学定义为阳性的病例中仍有部分细胞膜不染色的情况,进入血液里的 CTC 可能是组织学 HER2 不表达的肿瘤细胞,导致不一致的情况;(3)检测的时间不同,即组织学 HER2 检测与 CTC-HER2 检测时间不同导致 HER2 状态不一;(4)HER2 的状况会随着疾病或治疗的过程发生变化等^[15]。说明 CTC 表面的基因特征虽然可反映实体肿瘤细胞的基因特征,组织学 HER2 状态可能不能完全代表实体肿瘤 HER2 实际状态,从而导致组织学和 CTC 的 HER2 状态不一致。因此,作者认为同时评价组织学 HER2 及 CTC-HER2 至关重要。LI 等^[16]认为,相对于组织学一次检测 HER2 状态,CTC 上的 HER2 状态更具有动态性,连续检查 CTC-HER2 表型可有助于实时监测胃癌患者的治疗反应。因此,结合组织学和 CTC 的 HER2 表达,更有益于患者个体化治疗。通过检测 CTC 实时判断胃癌患者 HER2 状态,为靶向药物 Herceptin 治疗提供依据,从而弥补仅根据肿瘤组织 HER2 表达的一次性检测结果进行治疗的局限性。

目前,CTC-HER2 阳性数量没有标准阈值。WANG 等^[17]对 105 例晚期组织学 HER2 阳性乳腺肿瘤患者的 CTC-HER2 状态进行检测,定义 ≥ 2 个 CTC 有 HER2 表达确定为 CTC-HER2 阳性,并判为高危患者,其认为在组织学 HER2 阴性的晚期乳腺癌患者中,CTC-HER2 的状态可指导抗 HER2 靶向治疗。HUAI 等^[18]对 198 例组织学 HER2 阳性的乳腺癌患者进行 CTC-HER2 检测,检出率为 79.8%,只有 41.1% 的患者组织学和 CTC-HER2 状态一致,其应用的标准为:当 CTC 呈阳性时,根据 HER2 的荧光强度,将其表达定义为 0(无表达)、1+(弱表达)、2+(中表达)、3+(强表达), $> 30\%$ 的 CTC 过表达 HER2 (3+)才被定义为 CTC-HER2 阳性。DAISUKE 等^[19]采用 CellSearch 系统检测 105 例转移性或复发性胃癌患者 CTC 中 HER2 的表达,结果表明,曲妥珠单抗联合化疗对组织学 HER2 阴性而 CTC-HER2 阳性患者具有潜在的临床应用价值。通过对乳腺癌患者的 CTC 进行分析,对组织学 HER2 阴性但 CTC-HER2 阳性的患者进行 Herceptin 治疗,部分效果明显。结合肿瘤的异质性及前面所述 CTC 表面的基因特征,CTC 可以反映实体肿瘤细胞的基因特征。本研

究 HER2 阳性采用了与 WANG 等^[17]研究相似的标准,即 2 个以上 CTC 有 1 个 HER2 表达阳性判断为阳性,可为胃癌患者提供更大的 Herceptin 治疗机会。但是,CTC-HER2 阳性判读是否也与胃癌组织学 HER2 判读一样,需根据肿瘤细胞的数量及表达强度综合判读确定阈值,该阈值在乳腺癌与 GAC 是否相同,需更多研究证实。

总之,CTC 是胃癌患者预后及疗效评价指标之一,有助于临床快速、实时地了解 GAC 的进程及转移状况,同时检测 GAC 患者外周血中 CTC 的 HER2 表达实时状态,有利于靶向治疗及疗效监测,也为组织学 HER2 阴性的患者提供了进一步检测的依据。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3) : 209-249.

[2] LENGYEL C G, HUSSAIN S, TRAPANI D, et al. The emerging role of liquid biopsy in gastric cancer[J]. J Clin Med, 2021, 10(10): 2108.

[3] 李刚强, 许珺, 濮亚斌, 等. 乳腺癌患者外周血中循环肿瘤细胞的检测及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(12): 2114-2117.

[4] 《胃癌 HER2 检测指南(2016 版)》专家组. 胃癌 HER2 检测指南(2016 版)[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45(8): 528-532.

[5] ABDALLAH E A, BRAUN A C, FLORES B C T C P, et al. The potential clinical implications of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in gastric cancer[J]. Oncologist, 2019, 24(9): 854-863.

[6] YANG C, ZHANG N, WANG S, et al. Wedge-shaped microfluidic chip for circulating tumor cells isolation and its clinical significance in gastric cancer[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 139.

[7] HUANG X, GAO P, SUN J, et al. Clinicopathological and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with gastric cancer: a meta-analysis[J]. Int J Cancer, 2015, 136 (1) : 21-33.

[8] 葛海燕, 张振宇, 茅丽玲, 等. 胃癌患者围手术期循环肿瘤细胞变化及其与临床病理分期的相关性[J]. 同济大学学报(医学版), 2020, 41(1): 47-50.

[9] OKABE H, TSUNODA S, HOSOGI H, et al. Circulating tumor cells as an independent pre-

dictor of survival in advanced gastric cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22(12): 3954-3961.

[10] HAMILTON G, RATH B, HOLZER S, et al. Second-line therapy for small cell lung: exploring the potential role of circulating tumor cells[J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(1): 71-77.

[11] KULASINGHE A, PERRY C, JOVANOVIĆ L, et al. Circulating tumor cells in metastatic head and neck cancers[J]. Int J Cancer, 2015, 136 (11): 2515-2523.

[12] AI-AIAO B S, GATELY K, NICHOLSON S, et al. Prognostic impact of vascular and lymphovascular invasion in early lung cancer[J]. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2014, 22 (1) : 55-64.

[13] 孙旭凌, 申婧, 黄桂林, 等. 结直肠癌 HER2 及 Ki-67 表达的关系及预后因素分析[J]. 重庆医学, 2018, 47(12): 1610-1615.

[14] 黄丹, 李增山, 樊祥山, 等. 中国人 40 842 例胃腺癌 HER2 多中心检测结果分析[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(11): 822-826.

[15] NEVISI F, YAGHMAIE M, PASHAIEFAR H, et al. Correlation of HER2, MDM2, c-MYC, c-MET, and TP53 copy number alterations in circulating tumor cells with tissue in gastric cancer patients: a pilot study[J]. Iran Biomed J, 2020, 24(1): 47-53.

[16] LI Y L, ZHANG X T, LIU D, et al. Evolutionary expression of HER2 conferred by chromosome aneuploidy on circulating gastric cancer cells contributes to developing targeted and chemotherapeutic resistance [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(21): 5261-5271.

[17] WANG C, MU Z H, YE Z H, et al. Prognostic value of HER2 status on circulating tumor cells in advanced stage breast cancer patients with HER2-negative tumors [J]. Breast Cancer Res Treat, 2020, 181(3): 679-689.

[18] HUAI J G, CAO M, JIANG Y, et al. Evaluation of liquid biopsy in patients with HER2-positive breast cancer[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6388492.

[19] DAISUKE M, YOSHIKAZU U, TAKAAKI A, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in the response to trastuzumab for HER2 negative metastatic gastric cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2021, 87(6): 789-797.