

循环肿瘤细胞联合 CEA、CA19-9 检测在结直肠癌患者中的临床价值

欧阳航 吴一波 蒋燕成 陈紫萱 吴聪莲 张志珊(通讯作者)

福建医科大学附属泉州第一医院检验科, 福建 泉州 362000

摘要:目的 研究 CTC 联合癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 与 CA19-9 对结直肠癌患者的诊断价值及 CTC 与患者临床特征的关系。方法 收集结直肠癌病例组 115 例及健康对照组 20 例。CTC 的富集与鉴定采用差相-免疫荧光原位杂交法 (subtraction enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization, SE-iFISH), 血清中 CEA 与 CA19-9 采用化学发光法检测。统计学方法采用卡方检验、二项逻辑回归建立模型进行受试者工作曲线 (ROC) 分析。结果 结直肠癌组患者 CTC 阳性率为 87.8% (101/115), 显著高于健康对照组的 10% (2/20) ($\chi^2=52.837, P<0.001$)。CTC、CEA 与 CA19-9 三者的检测灵敏度分别为 87.8%、28.7% 和 26.0%。CTC 检测时的受试者工作特征 receiver operating characteristic (ROC) 曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.889, 高于单独检测 CEA 时的 0.643 ($Z=5.868, P<0.0001$) 以及 CA19-9 时的 0.605 ($Z=5.512, P<0.0001$)。CTC 联合 CA19-9 检测时, 灵敏度达到最高的 92.2%, AUC 面积达到 0.917, 比单独检测 CTC 时有更高的诊断效能 ($Z=2.550, P<0.05$)。CTC 与患者肿瘤分期和淋巴结转移有关 ($P<0.05$), 与性别、年龄、癌变部位以及分化程度无关。结论 CTC 联合 CA19-9 有助于进一步提高诊断效能, 在结直肠癌诊断中有较高的临床应用价值。CTC 的存在可能与淋巴结转移及 TNM 分期相关。

关键词: 结直肠癌; 循环肿瘤细胞; 癌胚抗原; 糖链抗原 19-9

The clinical value of circulating tumor cells combined with CEA and CA19-9 in patients with colorectal cancer
OU Yanghang, WU Yibo, JIANG Yancheng, CHEN Zixuan, WU Conglian, ZHANG Zhishan[△]. Affiliated Quanzhou
First Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

Abstract: Objective To investigate the clinical value of CTC combined with CA19-9 and carcinoembryonic antigen (CEA) in the diagnosis of colorectal cancer and the relationship between CTC and clinical characteristics of patients. Methods 115 cases of colorectal cancer and 20 cases of healthy control group were collected. CTC was enriched and identified by subtraction enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization (SE-iFISH), and serum CEA and CA19-9 were detected by chemiluminescence. Chi-square test and binomial logistic regression were used to establish a model for ROC analysis. Statistical methods The chi-square test and binomial logistic regression were used to establish a model for receiver operating characteristic curve (ROC). Results The positive rate of CTC in colorectal cancer group was 87.8% (101/115), which was significantly higher than that in healthy control group (10% (2/20) ($\chi^2 = 52.837, P < 0.001$). The sensitivity of CTC, CEA and CA19-9 were 87.8%, 28.7% and 26.0% respectively. The area under curve (AUC) of CTC was 0.889, higher than 0.643 ($Z = 5.868, P < 0.0001$) of CEA alone and 0.605 ($Z = 5.512, P < 0.0001$) of CA19-9. When CTC combined with CA19-9 detection, the highest sensitivity was 92.2%, and the AUC area was 0.917, which could further improve the diagnostic efficiency of CTC detection alone ($Z = 2.550, P < 0.05$). CTC was correlated with tumor stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not with sex, age, location of canceration and degree of differentiation. Conclusion CTC combined with CA19-9 is helpful to further improve the diagnostic efficiency and has high clinical value in the diagnosis of colorectal cancer. The presence of CTC may be related to lymph node metastasis and TNM staging.

Key words: Colorectal cancer Circulating tumor cells Cancerous embryo antigen carbohydrate antigen 19-9

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 已经是世界上发病率高居第三的恶性肿瘤^[1], 我国的结直肠癌发病率与患者死亡率也在逐年升高。目前, 临床上普遍使用 CEA 与 CA199 辅助诊断结直肠癌, 然而这两种肿瘤标志物敏感度和特异度均较低。直肠指诊、结肠镜以及结肠 CT 三维重建等检测方法虽有较高检出率, 但大部分无明确症状患者接受度较低, 导致错过了对疾病的正确诊断, 因此临床上急需寻找新的有效标志物来辅助疾病的诊断。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTC) 是指由原发灶或者转移灶突破基底膜, 进入外周血液循环系统的肿瘤细胞。有多项研究发现, CTC 存在于肿瘤患者各个时期, 且能早于影像学检测发现肿瘤患者。CTC 的发现对辅助判断患者是否患有结直肠癌具有重要提示作用。本实验方法采用较新的 CTC 阴性富集检测法 SE-iFISH, 相比早期的正向富集法, 更能有效避免对血液中罕见 CTC 的漏检, 提高 CTC 的检出率。本研究旨在发现 CTC 与结直肠癌患者临床特征的相关性。以及 CTC 单独检查与联合 CEA 和 CA19-9 在结直肠癌患者中的诊断价值, 为结直肠癌患者的诊断提供辅助指标。

1 对象与方法

1.1 研究对象

研究对象选择福建医科大学附属泉州第一医院 2018 年至 2019 年经病理确诊的结直肠癌患者 115 例。其中男性患者 69 例, 女性患者 46 例, 年龄 (58.2 ± 12.0) 岁。另外选择同期医院健康体检者 20 例, 其中男 15 例, 女 5 例, 年龄 (51.8 ± 6.7) 岁。结直肠癌患者诊断标准及 TNM 分期依据美国肿瘤联合会第八版癌症分期系统。本研究 115 例结直肠癌患者中, I~II 期 25 例, III~IV 期 90 例。

1.2 主要试剂与仪器

循环肿瘤细胞差相富集试剂盒 (10X 浓缩 hCTC Buffer, Cytelligen 细胞分离液, CD45 磁珠结合缓冲液和 Cytelligen 细胞固定液, 血细胞分析用染色液 A01, 血细胞分析用染色液 B01) 和荧光原位杂交试剂盒 (CD31 抗体结合液、FR1 细胞固定液, FR2 样本稀释液, FR3 缓冲液, CEP8 探针处理液, DAPI 染色液, 美国 Cytelligen 公司), 正置荧光显微镜 (日本尼康), ThermoBrite 原位杂交仪 (美国雅培)。血清 CEA 及 CA19-9 检测使用 I2000SR 雅培全自动化学发光免疫分析仪及相应配套检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 CTC 富集与鉴定

为防止上皮细胞污染, 弃掉前 2ml 血液后, 收集患者外周血 7.5ml 于枸橼酸钠抗凝管, 混匀, 4h 内处理。将去上清后的采血管头尾颠倒混匀, 剩余样本倒入 50ml 离心管 A 中, 每次 1ml 1×hCTC Buffer 洗涤采血管 2 次, 洗涤液转入 A 管; 取 3 ml 细胞分离液于离心管 B, 将管 A 中的血细胞叠加至分离介质上; 取 1ml 1×hCTC Buffer 1ml 洗涤 A 管, 沿壁缓慢并入 B 管; 配平, 450 g (1467 rpm) 离心 8min; 将白膜层及上清转移至离心管 C; 离心管 C 中, 分别加入清洗后的磁珠 200 μL, 混匀, 将离心管倾斜 (约 30 度) 置于摇床上, 130rpm, 摇动 20min; 取 3 ml 细胞分离液于离心管 D, 将管 C 中的磁珠混悬液叠加至分离介质上; 配平, 450g (1467 rpm) 离心 8min; 离心后, 将沉淀以上所有液体转移至 50 ml 离心管 E, 保留至磁珠上方 100 μL 处; 于离心管 E 中再加入 1×hCTC Buffer 至体积 45 ml 清洗至少两遍后弃上清至 100 μL 用移液枪轻打混匀; 加入血细胞分析用染色液 A01 和 B01 个 1ul 后等待 15 分钟, 之后将 100 μL 样本加入 Cytelligen 固定液, 涂片, 室温过夜晾干玻片。

将 20ul 组织固定液 FR1+180ul 样本稀释液 FR2 混匀后滴加于样本框上, 静置 10 分钟; 吸弃样本框上液体后, 使用 FR3 缓冲液以及乙醇至少清洗 3 遍; 滴加 10ul CEP8 探针处理液, 盖上盖玻片, 使用封片胶封住盖玻片四边边缘后, 直接放入杂交仪, 设置程序为变性 76℃, 10 分钟; 杂交 37℃, 4 小时; 杂交结束后取下盖玻片, 滴加 10ul DAPI 染色液, 盖上新盖玻片, 置于荧光显微镜下观察。

1.3.2 CEA、CA199 检测

使用促凝剂真空采血管, 采集研究对象静脉血 3ml, 2100 ×g 离心 10 分钟分离血清, 置于 I2000SR 雅培全自动化学发光免疫分析仪中进行检测。

1.3.3 结果判定

(1) CTC 鉴定标准: 将 DAPI+/CD45-/CD31-/CEP8 ≠ 2 鉴定为 CTC, 且 CTC ≥ 1 个/7.5ml 即为外周血 CTC 阳性。鉴定 CTC 需排除白细胞及 CEC 的干扰, 白细胞鉴定标准: DAPI+/CD45+/CD31-/CEP8 = 2; CEC 鉴定标准: DAPI+/CD45-/CD31+/CEP8 ≠ 2

(2) CEA 与 CA199 阳性标准: CEA > 10.9ng/ml 判断为阳性, CA19-9 > 37U/ml 判断为阳性。

1.4 统计学方法

实验所得数据使用 SPSS20.0 与 Medcalc18.2 软件进行统计分析。计数资料采用率 (%) 表示, 用卡方检验或 Fisher 精确检验进行比较。计量资料呈偏态分布时, 用中位数 (四分位数间距) 表示。使用受试者工作特征 (ROC) 曲线评价各指标对结直肠癌的诊断效能并采用二项逻辑回归建立诊断模型, 然后进行各 ROC 曲线下面积的比较。以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CTC、CEA 以及 CA19-9 的检测结果

利用 SE-iFISH 检测平台观测到的 CTC 图像如图 1 所示。结直肠癌组与健康对照组 CTC、CEA 与 CA19-9 的检测结果见表 1。其中 CTC 个数在结直肠癌组和健康对照组的中位数为 3.0 (10.0) 个与 0 个, CTC 阳性率分别为 87.8% 与 10.0%, 差异具有统计学意义 (x²=52.837, P<0.001)。CA19-9 在结直肠癌和健康对照组阳性率为 26.0% 与 5.0%, 差异无统计学意义 (x²=3.173, P>0.05)。其余各种联合检测的组合在结直肠癌和对照组的阳性率差异均有统计学意义 (P>0.05)。

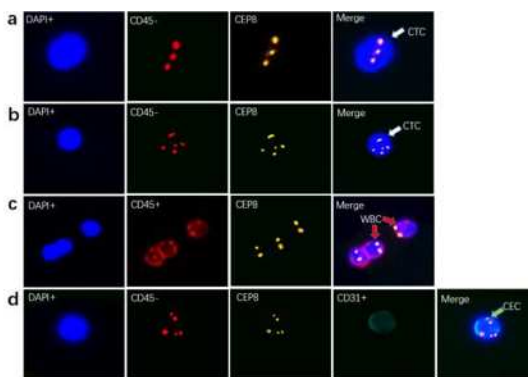


图 1 荧光显微镜下 CTCs 的图像 (x400)

Fig.1 Image of CTCs under fluorescence microscope (x400)

Identification of CTCs in colorectal cancer by SE-iFISH platform. DAPI:blue, CD45:red, CEP8:orange, CD31:green. a:DAPI+/ CD45-/CEP8=3 (white arrow); b: DAPI+/ CD45-/CEP8 > 5(white arrow); c: DAPI+/ CD45+/CEP8 =2 (red arrow); d: DAPI+/ CD45-/CD31+/CEP8 >5(green arrow)

表 1 CTC、CEA 与 CA19-9 的检测结果

Tab.1 Test results of CTC, CEA and CA19-9

Groups	N	Disease group (n=115)	Health group (n=20)	x ²	p value
CTC				52.837	0.000
Positive	103	101	2		
Negative	32	14	18		
CEA				6.122	0.013
Positive	33	33	0		
Negative	102	82	20		
CA19-9				3.173	0.075
Positive	31	30	1		
Negative	104	85	19		
CEA+CTC				55.279	0.000
Positive	104	102	2		
Negative	31	13	18		
CA199+CTC				60.385	0.000
Positive	109	106	3		
Negative	26	9	17		
CEA+CA19-9				8.835	0.003
Positive	46	45	1		
Negative	89	70	19		
CA19-9+CEA+CTC				60.385	0.000
Positive	109	106	3		
Negative	26	9	17		

2.2 CTC 联合 CEA、CA199 的诊断效能比较

单独及联合检测方法的灵敏度、特异度及准确度等评价指标见表 2。CTC 检测灵敏度为 88.7% 高于 CEA 的 27.8% 和 CA19-9 的 26.0% (P<0.05)。将 CTC、CEA 与 CA19-9 联合检测采用二项逻辑回归方程进行拟合, 获得新的联合诊断模型, 其 ROC 曲线分析结果见图 2)。ROC 曲线分析显示, CTC 诊断效能均高于 CEA、CA19-9。当 CTC 联合 CA19-9 检测时, 灵敏度提高到 92.2%, AUC 提升到 0.917, 高于单独使用 CTC 的诊断效能 (Z=2.550, P<0.05)。CTC 联合 CEA 与单独使用 CTC 的诊断效能相比较无明显差异 (P>0.05)。进一步联合 3 种检测方法, 其 AUC 为 0.908, 比单独使用 CTC 时提高, 但与 CTC 联合 CA19-9 的 AUC 差异无统计学意义 (Z=1.406, P>0.05)。

因此, CTC 联合 CA19-9 为最优组合方式, 可显著提高辅助诊断的效能。

的病死亡率, 早期术后患者 5 年生存率可以达到 90%~95%[2]。当患者在初诊时就已经发生局部或者远处转移时, 其 5 年生

表 2 CTC、CEA 与 CA19-9 之间的检验效能
Tab.2 Diagnostic efficacy of n CTC, CEA and CA19-9

Groups	SN	SP	PPV	NPV	accuracy	ROC curve		
						AUC	P value	95%CI
CTC	87.83%	90.00%	98.06%	56.25%	88.15%	0.889	0.037	0.824~0.937
CEA *	28.70%	100.00%	100.00%	19.61%	39.26%	0.643	0.021	0.557~0.724
CA19-9 *	26.01%	95.00%	96.77%	18.27%	36.30%	0.605	0.032	0.518~0.688
CTC+CEA	88.70%	90.00%	98.08%	58.06%	88.89%	0.908	0.029	0.846~0.951
CTC+CA19-9※	92.17%	85.00%	97.25%	65.38%	91.11%	0.917	0.032	0.856~0.957
CEA+CA19-9	39.13%	95.00%	97.83%	21.35%	47.41%	0.678	0.030	0.592~0.756
CTC+CEA+CA19-9	92.17%	85.00%	98.08%	58.06%	88.89%	0.908	0.027	0.866~0.963

*: P<0.05, compared with CTC and have lower AUC;
※: P<0.05, compared with CTC and have higher AUC

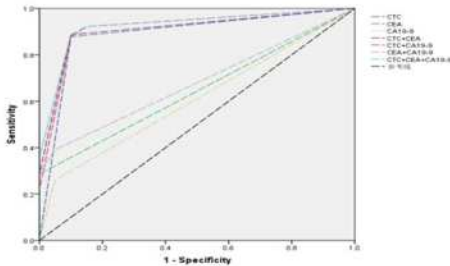


图 2 CTC、CEA 与 CA19-9 单独及联合检测的 ROC 曲线
Fig.2 The ROC curves of CTC, CEA and CA19-9 individual and combined

2.3 CTC 与结直肠癌患者临床病理特征的相关性

CTC 与淋巴结转移及 TNM 分期存在相关性 (P<0.05), 而与性别、年龄、癌变部位和分化程度之间的差异均无统计学意义 (P>0.05)。见表 3。

表 3 CTC 与结直肠癌患者临床病理学特征的关系

Tab.3 Relationship between CTC and clinicopathological features of CRC

Factor	Total (N=115)	CTC Positive (n=101)	CTC Negative (n=14)	P value
Gender				0.415
Male	69	62	7	
Female	46	39	7	
Age				0.754
≤60	62	55	7	
>60	53	46	7	
Location				0.368
colon	61	52	9	
rectum	54	49	5	
TNM				0.017
I~II	25	18	7	
III~IV	90	83	9	
Differentiation				0.298
Poor	13	10	3	
Moderate/well	98	89	9	
unknown	4	2	2	
Lymph node metastasis				0.021
Yes	78	73	5	
No	28	21	7	
Unknown	9	7	2	

3 讨论

结直肠癌发病率在逐年上升, 转移和复发是结直肠癌死亡的主要因素。早期诊断和干预治疗可以显著降低结直肠癌

存率下降仅为 12%, 且生存质量差^[3]。CTCs 的迁移似乎是人类癌变的早期事件, 可早于影像学发现肿瘤。当肿瘤直径小于 1 mm 时, 在模型动物的血液中就可以检测到 CTCs^[4]。且有研究发现约 80% 的转移瘤细胞来自于早期播散的癌细胞^[5]。目前对于结直肠癌的诊断主要依靠影像学或者病理检查, 这两种方法都存在较大的局限性。而依靠血清肿瘤标志物的检测, 虽然患者接受度较高, 但目前常用的肿瘤标志物 CEA、CA19-9 的单独检测灵敏度和特异性均较低, 本研究结果显示 CEA、CA19-9 诊断结直肠癌的敏感度仅为 27.8%, 26.0%。寻找新的标志物, 以及将多个标志物联合建立模型来达到更好的诊断效能是目前研究者的努力方向。

CTC 作为液体活检的一个部分, 已被证实在疾病的早期阶段, 肿瘤细胞会突破上皮基底膜进入血液循环, 这对于将 CTC 的检测应用于结直肠癌的辅助诊断提供了新的理论依据^[6]。目前 CTC 检测过程基本可以分为细胞富集和细胞检测, 细胞富集方法主要有阳性富集法和阴性富集法。近年来已证实肿瘤细胞在进入血液循环系统期间, 会经历上皮间质转化 (EMT), 引起上皮标志物如上皮细胞粘附分子 (EPCAM), 间质标志物如波形蛋白 (vimentin) 上调。因此依赖肿瘤细胞表面表达上皮标志物的阳性富集法常会造成漏检, 引起假阴性。本实验采用差相-免疫荧光原位杂交法 (SE-iFISH) 对 CTC 进行富集和检测, 不依赖于肿瘤细胞表面特定标志物的表达, 而是通过白细胞标志物 CD45 有效去除白细胞, 进而通过荧光原位杂交法选用染色体异倍体作为鉴定肿瘤细胞的标志性特征, 并且以抗 CD31 抗体鉴别区分异倍体循环血管内皮细胞 (circulating endothelial cells, CECs) 的干扰, 大大提高 CTC 识别特异性^[7]。染色体异倍体是肿瘤细胞的标志性特征^[8]。Ge^[9]等利用 SE-iFISH 技术对肺癌和食管癌患者外周血中的 CTC 进行检测, 检出率分别是 92% 和 87%。在胰腺癌患者检测 CTC 时得到的敏感性和特异性分别是 88% 和 90%^[10]。Sheng^[11]等对 45 例乳腺癌患者进行 CTC 检测, 阳性率为 91%。SE-iFISH 技术相比早期经过 FDA 获批的 cell search 系统检测 CTC 具有更高的检出率。本研究通过 SE-iFISH 技术检测 96 例结直肠癌患者 CTC, 检出率达到 90.7%, 即使对早期结直肠癌 (I、II 期) 依然有较高的检出率 72.0% (18/25), 晚期患者 (III、IV 期) 则有 92.2% (83/90) 的检出率, 对早期结直肠癌患者的辅助诊断具有重要意义。既往有研究表明 CTC 在结直肠癌患者的各个时期均可检测到, 且随着分期的增高, 其阳性 CTC 检出率也越来越高^[12]。这与本研究的结果相似, 晚期患者阳性率大于早期患者阳性率, 且差异具有统计学意义。另外还发现 CTC 可能与患者是否淋巴结转移相关, 淋巴结转移的患者中有更高的 CTC 检出率。此外, 一项关于 CTC 数量对结直肠癌患者预后价值的 meta 分析显示, 外周血中 CTC 的存在与结直肠癌患者的总生存期和无进展生存期具有明确的相关性^[13]。目前对 CTC 应用研究还包括 CTC 与抗癌药物疗效及耐药性的评估、术后检测以及基因组学等各个方面^[14]。

为了提高结直肠癌的辅助诊断效能,本研究除对患者进行 CTC 检测外,进一步联合 CEA、CA19-9 检测结果进行分析,结果表明 CTC 检测灵敏度高于 CEA 和 CA19-9 单独检测,差异有统计学意义。当 CTC 联合 CA19-9 时,检出率提升到 92.2%, AUC 提升到 0.917,且显著高于单独应用 CTC 时的 0.889 ($Z=2.550, P<0.05$)。蒋晓芬^[15]等人研究结果表明,CTC 与 CEA 联合检测在 I、II 期结直肠癌诊断中的敏感性、特异性均高于 CTC 及 CEA 单独检测。但本研究结果显示,CTC 联合 CEA 对结直肠癌的诊断效能,与单独使用 CTC 的诊断效能相比较无明显差异。可能与其采用的 CTC 检测方法和本研究采用的 SE-iFISH 方法不同有关。本研究中尚存在一些不足,由于 SE-iFISH 技术通过染色体异倍体来确定 CTC,可适用于多种上皮性肿瘤,如乳腺癌、食管癌和胃癌等,也因此无法单独应用此检测手段确定患者所患肿瘤类型,其检测结果只能用于肿瘤的辅助诊断,临床医师还需结合患者的临床症状对肿瘤做出诊断。另外本研究中样本量较小,特别是 I、II 期患者量不足,今后将扩大样本量,进一步验证 CTC 与患者临床特征的关联性,以及 CTC 与 CEA、CA19-9 的联合检测在不同分期结直肠癌辅助诊断中的作用。

综上所述,CTC 与患者 TNM 分期以及是否淋巴结转移存在相关性。相比临床常用的 CEA 及 CA19-9 两种肿瘤标志物,通过 SE-iFISH 检测 CTC 在结直肠癌患者中具有较高的检出率,当 CTC 联合 CA19-9 时,此时比单独及其他组合有着更高的辅助诊断结直肠癌的效能,阳性预测值达 97.3%,阴性预测值 65.4%,对结直肠癌的辅助诊断有较高的应用价值。

参考文献

[1] Segel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30.
 [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
 [3] 郭玮. 液体活检在结直肠癌诊疗中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(40):227-230.
 [4] Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation[J]. Cell, 2012, 148(1-2):349-361.
 [5] Hosseini H, Obradović MM, Hoffmann M, et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer[J]. Nature, 2016(10):1038.

[6] Chofield JW, Gaffney EA, Gatenby RA, et al. Tumour angiogenesis: the gap between Theory and experiments[J]. J Theor Biol, 2011, 274(1):97-102.

[7] Lin PP, Gires O, Wang DD, et al. Comprehensive in situ co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):9789.

[8] Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(3):189-203.

[9] Ge F, Zhang H, Wang DD, et al. Enhanced detection and comprehensive in situ phenotypic characterization of circulating and disseminated heteroploid epithelial and glioma tumor cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(29):27049-27064.

[10] Gao Y, Zhu Y, Zhang Z, et al. Clinical significance of pancreatic circulating tumor cells using combined negative enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35:66.

[11] Sheng Y, Wang T, Li H, et al. Comparison of analytic performances of Cellsearch and iFISH approach in detecting circulating tumor cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(5):8801-8806.

[12] Sastre J, Maestro ML, Puente J, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables[J]. Ann Oncol, 2008, 19(5):935-938.

[13] Huang X, Gao P2, Song Y, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the cell search system in colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2015, 30(15):202.

[14] Bielčíková Z, Jakabová A, Pinkas M, et al. Circulating tumor cells: what we know, what do we want to know about them and are they ready to be used in clinics?[J]. Am J Trans Res, 2017, 9(6):2807-2823.

[15] 蒋晓芬, 邵传锋, 张浩, 等. 循环肿瘤细胞联合癌胚抗原检测在 I、II 期结直肠癌诊断中的应用研究. 中华全科医学, 2018, 16(10):1653-1655.

作者简介: 通讯作者: 张志珊, E-mail: 554882707@qq.com.