论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1148-04

乳腺癌外周血循环肿瘤细胞变化与新辅助化疗效果的关系

王明浩,杨新华,张 毅,范林军,张 帆,齐晓伟,李世超,孙 鹏,姜 军 (400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心)

[摘要] **目的** 探讨乳腺癌患者外周血中循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTC)变化情况与新辅助化疗(neoadjuvant or primary chemotherapy,NCT)疗效的关系。**方法** 抽取70例乳腺癌患者NCT前后健侧上肢静脉血5 mL,利用密度梯度离心法富集血标本中单个核细胞,通过荧光定量RT-PCR技术检测所获得单个核细胞中细胞角蛋白-19(cytokeratin-19,CK-19)阳性的CTC数目。**结果** NCT前外周血CTC检出率为24.29%(17/70),与患者年龄($P=0.008$)及HER-2($P=0.022$)表达情况有关。根据NCT前后CTC检测情况,将患者分为阳性-阳性、阳性-阴性、阴性-阳性及阴性-阴性4组,以RECIST标准评估NCT疗效时,4组有效率依次为66.67%(2/3)、78.57%(11/14)、0(0/4)和71.43%(35/49),差异具有统计学意义($P=0.023$);以Miller-Payne标准评估NCT疗效时,4组有效率依次为66.67%(2/3)、71.43%(10/14)、0(0/4)和69.39%(34/49),差异具有统计学意义($P=0.043$)。**结论** NCT前后CTC的变化情况与疗效有一定关系,CTC可作为评估NCT疗效的潜在预测指标。

[关键词] 乳腺肿瘤;新辅助化疗;循环肿瘤细胞
[中图法分类号] R730.43; R730.53; R737.9 [文献标志码] A

Relationship of peripheral blood circulating tumor cells with therapeutic effect of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: report of 70 cases

Wang Minghao, Yang Xinhua, Zhang Yi, Fan Linjun, Zhang Fan, Qi Xiaowei, Li Shichao, Sun Peng, Jiang Jun (Center of Breast Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship between the alterations of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and the curative effect of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Methods** A total of 70 patients with confirmed lateral breast infiltrating ductal carcinoma without obvious metastasis hospitalized in our department from March 2010to September 2011 were enrolled in this study. Venous blood samples of 5 ml were collected from their upper limb of health side before and after 2 to 6 cycles of TE regimen as neoadjuvant chemotherapy (paclitaxel 175 mg/m^2, epirubicin 60 mg/m^2, d_1, 21 d/cycle). Density gradient centrifugation was used to enrich mononuclear cells in blood specimens. Fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect the mononuclear cells positive to cytokeratin-19 (CK-19). **Results** Before neoadjuvant chemotherapy, 24.29% patients (17/70) had CTC detected, which was related with age ($P=0.008$) and HER-2 expression ($P=0.022$). According to the result of having CTC detected or not before and after chemotherapy, the patients were divided into 4 groups, that is, positive to positive, positive to negative, negative to positive and negative to negative groups. When the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria was used to evaluate the efficiency of neoadjuvant chemotherapy, it was 66.67% (2/3), 78.57% (11/14), 0 (0/4) and 71.43% (35/49) respectively for the above 4 groups with significant difference($P=0.023$). When the efficiency was evaluated by the Miller-Payne grading system, it was 66.67% (2/3), 71.43% (10/14), 0(0/4) and 69.39% (34/49) respectively for the above 4 groups with significant difference($P=0.043$). **Conclusion** The alteration of CTC before and after chemotherapy has a certain relationship with efficiency of neoadjuvant chemotherapy. CTC can be regarded as a predictor for evaluating neoadjuvant chemotherapy.

[**Key words**] breast cancer; neoadjuvant chemotherapy; circulating tumor cells

Supported by the Foundation of Clinical Research of Third Military Medical University (2010XLC03, SWH2012LC03). Corresponding author: Jiang Jun, Tel: 86-23-68754160, E-mail: jbcd@medmail.com.cn

[基金项目] 第三军医大学临床科研基金(2010XLC03,SWH2012LC03)
[通信作者] 姜 军,电话:(023)68754160,E-mail:jbcd@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.1019.019.html(2013-03-25)

乳腺癌是女性发病率和病死率最高的恶性肿瘤，其复发和转移仍是导致乳腺癌患者死亡的首要因素[1-2]。利用现代免疫学和分子分析技术，能在血液中检测到1种微转移细胞，称为循环肿瘤细胞（circulating tumor cells，CTC）。CTC是乳腺癌远处转移的重要环节，研究表明，在乳腺癌早期即有CTC进入血液并发生全身播散[3-4]。我们前期的研究结果显示，乳腺癌患者外周血中不仅存在CTC，而且CTC阳性率与患者肿瘤分期、淋巴结转移状态、激素受体状态以及乳腺癌分子亚型等临床病理特征明显有关[5-7]。初步疗效研究结果显示，CTC阳性率变化与术后辅助治疗的疗效密切有关[8-9]。新辅助化疗（neoadjuvant or primary chemotherapy，NCT）是乳腺癌综合治疗中重要的环节之一。由于肿瘤的异质性，如何能在早期及时、有效的评估NCT疗效至关重要。对于CTC评估NCT的疗效目前研究较少，且存在争议。因此，有必要进一步研究CTC在NCT疗效评估中的作用和价值。我们采用队列研究，抽取70例乳腺癌患者外周静脉血，利用密度梯度离心法富集单个核细胞，通过荧光定量RT-PCR（quantitative real-time reverse transcription-PCR，qRT-PCR）技术检测所获单个核细胞中细胞角蛋白19（cytokeratin-19，CK-19）mRNA表达阳性的CTC，初步探讨外周血CTC与NCT疗效的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院乳腺中心2010年3月至2011年9月收治的女性乳腺浸润性导管癌患者。入组患者同时进行1项检测乳腺癌CTC在早期诊断乳腺癌复发、转移前瞻性队列研究（ChiCTR-OCH-10000859）。纳入标准：①经空心针穿刺活检确诊为ⅡⅠb～ⅢⅠc期乳腺癌；②年龄18～70岁；③肿瘤为单侧、单发；④所有患者就诊前未接受任何辅助性治疗；⑤患者无化疗禁忌证；⑥行2～6个周期TE方案（紫杉醇175 mg/m^2，表阿霉素60 mg/m^2，d_1，21 d/周期）NCT；⑦患者无其他部位恶性肿瘤病史。排除标准：①有较严重的心肺疾病；②炎性乳腺癌；③哺乳期乳腺癌；④患者入院前已行包块切除活检；⑤已发生远处转移；⑥不能按方案进行NCT、依从性差者。本实验研究终点：①NCT期间，以RECIST标准评估病情达到完全缓解或部分缓解；②NCT期间以RECIST标准评估患者病情进展或出现远处转移；③行NCT 6个周期，患者疾病稳定。

最终入组70例患者，年龄29～66岁，中位年龄47岁。空心针穿刺和手术切除标本均常规经规范病理检查。免疫组化S-P法检测患者雌激素受体（estrogen receptor，ER）、孕激素受体（progester-one receptor，PR）以及人表皮生长因子受体-2（human epiderm growth factor receptor 2，HER-2）的表达情况。根据美国临床肿瘤学会和美国病理学家学会公布的乳腺癌ER/PR免疫组化指南评估ER/PR状况[10]。根据HerecepTest评分系统评估HER-2表达情况[11]。按照美国癌症联合会（American joint commission on cancer，AJCC）和国际抗癌联盟（international union against cancer，UICC）2010年第7版乳腺癌TNM分期标准进行分期。签署知情同意书后，抽取患者首次住院和NCT结束后、手术前健侧上肢浅静脉血。本实验研究方案获得西南医院伦理委员会批准。

1.2 主要仪器及试剂

实时荧光qPCR仪（美国Applied Biosystems公司），PCR扩增仪（美国Applied Biosystems公司，GeneAmp PCR System 9700），电泳仪和数字凝胶成像分析系统（美国Bio-Rad公司），低温超速离心机（德国Eppendorf公司）。人淋巴细胞分离液（天津灏洋生物公司），Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒（日本TOYOBO公司），TRNzol全血RNA提取液（北京天根生化科技有限公司），2×*Taq* PCRMaster Mix（北京天根生化科技有限公司）。MCF-7乳腺癌细胞株由本中心唐鹏博士惠赠。

1.3 引物设计

目的基因CK-19引物根据Primer Premier 5.0软件设计，由上海生工公司合成。CK-19 mRNA上游引物5′-CCCGCGACTACAGCCACTACTA-3′，下游引物5′-ATGAGCGTGGAGGCCGAC-3′。内参β-actin基因引物为购买试剂盒中提供，β-actin上游引物5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′，下游引物5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′。

1.4 循环肿瘤细胞的检测方法

1.4.1 密度梯度离心法富集 取患者首次住院和NCT结束后、手术前健侧上肢浅静脉血5 mL（弃去最初抽取的1 mL血液，以防止上皮细胞污染），在试管中加入5 mL人淋巴细胞分离液，取5 mL肝素抗凝静脉血与等量Hanks液稀释混匀，并将稀释液缓慢加至人淋巴细胞分离液上层。水平离心机室温下4 000 r/min离心20 min。可见离心管自下而上出现5层，分别为红细胞层、粒细胞层、透明分离液层、环状乳白色单个核细胞层和血浆层。吸取环状乳白色单个核细胞层，加入5 mL Hanks液洗涤2次，室温水平离心2 000 r/min，每次10 min，吸取试管底部细胞沉积，置于液氮罐保存待统一检测。

1.4.2 qRT-PCR检测CK-19 mRNA表达阳性的CTC 在保证无RNA酶条件下，依据TRNzol试剂盒说明提取全血总RNA。并以RNA为模板，按cDNA合成试剂盒说明书合成cDNA。采用SYBR Green-1染料法的qRT-PCR技术定量检测CK-19 mRNA的表达情况。荧光定量总反应体系为20 μL，包括模板cDNA 2 μL，其中下游引物0.5 μL，2×SYBR Rremix *Ex Taq*™（包括SYBR Green Ⅰ、*Taq*酶、Mg^{2+}、dNTP）10 μL，ddH_2O 7.0 μL；上游引物0.5 μL。PCR反应条件为：95 ℃预变性3 min，95 ℃变性30 s，63 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，循环30次。反应结束后进行溶解曲线分析以检验扩增特异性及引物二聚体是否存在（60～95 ℃，0.1 ℃/s）。为了对PCR反应结果进行定量分析，提取人乳腺癌MCF-7细胞系1×10^4个细胞总RNA，并依据试剂盒说明书将2 μg RNA为模板逆转录cDNA，并以10倍稀释为5个浓度梯度（10^4、10^3、10^2、10^1、10^0），取每个梯度2 μg作为模板制作标准曲线。以每2微克总RNA对应的MCF-7细胞系数目代替每份标本中CK-19 mRNA阳性CTC数目：本实验中此方法检测下限为对应0.9个/2 μg为检测CTC的阳性判断标准[12]。

1.5 影像学RECIST标准和病理学Miller-Payne标准

影像学RECIST标准[13]是以NCT结束或者2～6个周期后，以超声或者CT等影像学手段为指导，测量实体肿瘤最大径

线。化疗效果分4类:疾病进展(progressive disease,PD):基线病灶长径总和增加≥20%或者出现新的病灶;疾病稳定(stable disease,SD):基线病灶长径总和有缩小但未达到部分反应(partial disease,PR)或者有增加但未达到PD;PR:基线病灶长径总和缩小≥30%;完全反应(complete disease,CR):所有目标病灶消失。以PR+CR定义为有效,PD+SD定义为无效。

病理学Miller-Payne标准[14]是以手术切除瘤体后立即10%福尔马林固定并于24 h内切开,对肉眼所见残余病变肿物区和瘤旁区多点取材,行常规石蜡固定切片,HE染色。化疗后细胞出现变形、坏死。与NCT前细针穿刺组织的病理标本进行比较,根据残留肿瘤细胞百分比数量分为5级:Ⅰ级,浸润癌组织细胞无变化;Ⅱ级,浸润癌组织的数量减少比例≤30%;Ⅲ级,浸润癌组织的数量减少30%~90%;Ⅳ级,浸润癌组织的数量减少>90%,仅少量残余的癌细胞散在分布;Ⅴ级,所有切片无浸润性癌残留,可见残留的导管内癌成分。定义Ⅰ~Ⅱ级为无效,Ⅲ~Ⅴ级为有效。

1.6 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件进行χ^2检验,当1/5以上格子的理论频率数<5时采用Fisher确切概率法。配对资料比较采用McNemar Test。

2 结果

2.1 NCT前CTC检出情况与患者临床病理特征关系

70例乳腺癌患者中,NCT前外周血CTC检出率为24.29%(17/70),CTC阳性与患者年龄($P=0.008$)及HER-2($P=0.022$)表达情况有关,但与患者绝经状态、肿瘤部位、TNM分期、ER及PR表达情况无关($P>0.05$)。见表1。

表1 NCT前CTC阳性与乳腺癌临床病理特征之间的关系

临床病理参数	例数(%)	CK19 mRNA			χ^2值	P值
		−	+	阳性率(%)		
年龄(岁)					7.000	0.008
>50	32(45.71)	19	13	40.62		
≤50	38(54.29)	34	4	10.53		
绝经状态					2.400	0.121
绝经前	44(62.86)	36	8	18.18		
绝经后	26(31.14)	17	9	34.62		
部位					0.070	0.791
左侧	39(55.71)	30	9	23.08		
右侧	31(44.29)	23	8	25.81		
TNM分期					0.102	0.750
Ⅱ期	43(61.43)	32	11	25.58		
Ⅲ期	27(38.57)	21	6	22.22		
ER					0.492	0.483
阳性	34(48.57)	27	7	20.59		
阴性	36(51.43)	26	10	27.78		
PR					0.021	0.886
阳性	36(51.43)	27	9	25.00		
阴性	34(48.57)	26	8	23.53		
HER-2					5.223	0.022
++~+++	25(35.71)	15	10	40.00		
−~+	45(64.29)	38	7	15.56		

2.2 NCT前后CTC的变化

70例乳腺癌患者总体有效率为68.57%(48/70)。NCT治疗前CTC阳性患者17例(24.29%),CTC阴性患者53例(75.71%)。NCT治疗后CTC阳性患者7例(10.00%),CTC阴性患者63例(90.00%)。NCT后CTC阳性率较NCT前显著降低($\chi^2=5.029$,$P=0.025$)。

2.3 NCT前后CTC变化与疗效的关系

2.3.1 以RECIST标准评估NCT疗效 NCT治疗结束后,以RECIST标准评估化疗疗效。NCT治疗前后CTC状态为阳性-阳性、阳性-阴性、阴性-阳性、阴性-阴性的病例数分别为3、14、4例和49例,有效率分别为66.67%(2/3)、78.57%(11/14)、0(0/4)和71.43%(35/49),差异有统计学意义($\chi^2=9.568$,$P=0.023$)。

2.3.2 以Miller-Payne标准评估疗效 NCT治疗结束后,以Miller-Payne病理标准评估化疗疗效。NCT前后CTC状态为阳性-阳性、阳性-阴性、阴性-阳性、阴性-阴性的病例数分别为3例、14例、4例和49例,有效率分别为66.67%(2/3)、71.43%(10/14)、0(0/4)和69.39%(34/49),差异有统计学意义($\chi^2=8.164$,$P=0.043$)。

3 讨论

乳腺癌是一种全身疾病,在发病早期便可发生肿瘤细胞的全身扩散[15]。有70%~80%的乳腺癌患者接受外科手术切除原发性肿瘤并给予术后辅助治疗可降低疾病复发风险。然而,仍然会有20%~30%患者会在5年内复发。其原因可能是虽然原发肿瘤灶得到充足的治疗,但在治疗的最佳时间内未发现在早期就进入循环系统中的肿瘤细胞,而CTC即血液中微转移的方式之一。研究表明,CTC在确立诊断、治疗决策和监控辅助治疗疗效,识别患者被掩蔽的微观转移方面有很重要的意义[16-17]。本研究结果显示,NCT治疗前后CTC阳性率由24.29%(17/70)下降到10.00%(7/70),差异具有统计学意义($P=0.025$),与Muller等[18]对245例乳腺癌患者行NCT前后CTC阳性率由22.0%(54/245)下降至14.3%(35/254)结果基本相似,说明NCT能有限抑制乳腺癌患者循环中的肿瘤细胞。进一步分析患者临床病理参数与疗效的关系发现,CTC阳性与患者年龄($P=0.008$)及HER-2($P=0.022$)表达情况有关,而与激素受体表达无关。HER-2(++~+++)患者CTC阳性率较HER-2(−~+)患者较高。这可能与HER-2高表达的肿瘤侵袭力强,恶性程度高有关,但尚需进一步验证。

随着现代生物技术的发展,CTC检测的特异性和敏感性明显提高,但CTC检测方法仍无法规范统一。PCR和免疫组织化学是目前检测CTC较常用方法之一[19]。qRT-PCR的应用解决了普通PCR特异性低,无法精确定量等问题,大幅提高了CTC的检测率。利用qRT-PCR技术检测循环血液中CK-19 mRNA表达状态是目前检测CTC的常用方法之一。

NCT在乳腺癌中的应用始于20世纪70年代,NCT可以减小原发肿瘤的大小,降低肿瘤分期,从而

有利于肿瘤切除,增加保留乳房的机会;能有效杀灭亚临床播散病灶,降低全身微转移及局部复发的机会;能有效评估肿瘤细胞对化疗药物的敏感程度,指导术后辅助化疗等。然而,乳腺癌NCT在临床应用方面依然存在许多亟待解决的问题[20],及时、准确地评估NCT的疗效最为关键。虽然病理完全缓解(pathologic complete response, pCR)被认为是评估NCT最有效的指标,但是由于肿瘤的异质性,使得我们在临床实践中发现有极少患者虽然NCT后获得pCR,但依然存在复发转移的风险;而在未获得pCR的患者中仍有大约一半的患者不会复发转移。这提示在评估NCT疗效中除了观察原发肿瘤的情况,还需要寻找更多能准确评估疗效、预测预后的相关指标。虽然初步临床研究显示,CTC可能与化疗疗效有关,但目前有关CTC与NCT疗效的研究主要集中在Ⅰ~Ⅲ期乳腺癌术后化疗和Ⅳ期乳腺癌患者的综合治疗上,而对CTC与NCT疗效关系研究较少且存在争议。为进一步明确CTC在NCT疗效评估中的价值,我们抽取70例乳腺癌患者外周静脉血,利用qRT-PCR检测CTC,初步探讨外周血CTC与NCT疗效的关系。在Xenidis等[21]对437例早期乳腺癌术后化疗前后CTC表达的研究中显示,随访53.5个月后,术后化疗前后CTC状态为阳性-阴性患者的无病生存率和总生存率均高于阴性-阳性患者,多因素分析显示术后化疗前后患者的CTC状态是无病生存率和总生存率的独立预测因素。本研究根据NCT前后患者CTC状态将患者分为阳性-阳性、阳性-阴性、阴性-阳性和阴性-阴性4组。通过检测NCT前后CTC阳性变化情况发现:以影像学RECIST和病理学Miller-Payne标准评估NCT疗效时,4组化疗有效率均存在统计学差异。说明NCT前后CTC阳性转阴性及均阴性患者临床有效率较高,而NCT前后CTC阴性转阳性患者临床有效率较差或对该化疗方案不敏感。提示在NCT期间CTC的降低可能是其化疗有效的评价指标之一。

总之,本研究结果初步显示CTC状态的变化与NCT疗效有一定的关系,提示实时检测CTC可有效指导个体化治疗,避免盲目用药而错失治疗的最佳时机。由于本实验样本量较少且为回顾性研究,因此CTC在NCT疗效评估中的作用价值还仍需前瞻性、大样本、多中心临床研究进一步验证。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
[2] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024): 1559-1564.
[3] 齐晓伟, 姜军. 乳腺癌循环肿瘤细胞临床应用研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(5): 394-398.
[4] Serrano M J, Rovira P S, Lorente J A, *et al*. Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy[J]. Exp Ther Med, 2012, 4(1): 43-48.
[5] 李世超, 姜军, 杨新华, 等. 乳腺癌分子分型与外周血循环肿瘤细胞相关性探讨[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(10): 1006-1010.
[6] Qi X, Yang X, Fan L, *et al*. Association between the spread of circulating tumor cells and breast cancer subtypes[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(3): 402.
[7] 齐晓伟, 姜军, 杨新华, 等. 乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 850-853.
[8] Qi X W, Zhang F, Yang X H, *et al*. Circulating tumor cells predict the clinical efficiency of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer patients[J]. Int J Gynecol Cancer, 2011, 21(12): S967.
[9] 张帆, 姜军, 杨新华, 等. 手术及术后化疗对乳腺癌血液微转移的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(23): 2083-2085.
[10] Hammond M E, Hayes D F, Dowsett M, *et al*. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer[J]. Arch Pathol Lab Med, 2010, 134(6): 907-922.
[11] 乳腺癌HER2检测指南编写组. 乳腺癌HER2检测指南[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(10): 631-633.
[12] Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, *et al*. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(14): 5145-5151.
[13] Therasse P, Arbuck S G, Eisenhauer E A, *et al*. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(3): 205-216.
[14] Ogston K N, Miller I D, Payne S, *et al*. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival[J]. Breast, 2003, 12(5): 320-327.
[15] 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.
[16] Mego M, De-Giorgi U, Hsu L, *et al*. Circulating tumor cells in metastatic inflammatory breast cancer[J]. Ann Oncol, 2009, 20(11): 1824-1828.
[17] Zhao S, Liu Y, Zhang Q, *et al*. The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR in breast cancer: a meta-analysis of published literature[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(3): 809-816.
[18] Muller V, Riethdorf S, Loibl S, *et al*. Prospective monitoring of circulating tumor cells in breast cancer patients treated with primary systemic therapy-A translational project of the German Breast Group study GeparQuattro[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(18 Suppl): 21085.
[19] Sanislo L, Vertakova-Krakovska B, Kuliffay P, *et al*. Detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients[J]. Endocr Regul, 2011, 45(3): 113-124.
[20] 孙强. 乳腺癌新辅助化疗的实践与思考[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2011, 5(3): 266-271.
[21] Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, *et al*. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(13): 2177-2184.

(**收稿**:2013-02-25;**修回**:2013-03-18)
(编辑 汪勤俭)