DOI:10.16016/j.1000-5404.201912123

骨与软组织肉瘤患者检测循环肿瘤细胞及 HOXB7 基因表达的临床意义

杨松巍,王 亮,李虎进,单东力,王 全,陈 飚 400030 重庆,重庆大学附属肿瘤医院骨与软组织肿瘤科

[**摘要**] **目的** 探讨骨与软组织肉瘤患者外周血中循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)的数量、类型以及循环肿瘤细胞上同源盒基因 B7(homeobox genes B7,HOXB7)表达的临床意义。**方法** 回顾性分析本院 2017 年 5 月至 2019 年 7 月经病理确诊的骨与软组织肉瘤患者 40 例,患者确诊后均采用 CanPatrol™ 富集技术检测循环肿瘤细胞,采用多重 mRNA 原位分析对循环肿瘤细胞进行分型鉴定,并使用 RNA 探针检测循环肿瘤细胞上 HOXB7 基因的表达情况。结合临床资料,分析 CTC 计数、类型及 HOXB7 基因表达与骨与软组织肿瘤的分期及转移之间的关系。**结果** 40 例患者中有 37 例在治疗前检测出 CTC 细胞,检测出的 CTC 分为上皮型、混合型和间质型。CTC 计数与骨与软组织肉瘤的分期密切相关($P=0.002$),Ennecking Ⅲ期患者外周血 CTC 计数明显多于 Ennecking Ⅱ期($P=0.040$);Ennecking Ⅲ期患者间质型 CTC 的计数也显著高于 Ennecking Ⅱ期($P=0.001$)。HOXB7 在 Ennecking Ⅲ期患者 CTC 中的阳性表达率为 56.9%,显著高于其他分期($P=0.003$)。对骨肉瘤进行亚组分析,Ennecking Ⅲ期患者 CTC 中 HOXB7 表达的阳性率显著高于 Ennecking Ⅱ期($P=0.025$)。**结论** 骨与软组织肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞细胞计数、分型及 HOXB7 基因的表达与肿瘤分期、转移密切相关。

[**关键词**] 骨与软组织肉瘤;循环肿瘤细胞;同源盒基因 B7;上皮间质转化;转移
[**中图法分类号**] R730.23; R730.43; R738.1 [**文献标志码**] A

Clinical significance of circulating tumor cells and their homeobox gene B7 expression in patients with bone and soft tissue sarcomas

YANG Songwei, WANG Liang, LI Hujin, SHAN Dongli, WANG Quan, CHEN Biao Department of Bone and Soft Tissue Oncology, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing, 400030, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the clinical significance of the count and type of circulating tumor cell (CTC) and the expression of homeobox gene B7 (HOXB7) gene in the CTC in patients with bone and soft tissue sarcomas. **Methods** We retrospectively analyzed the data of 40 patients with newly diagnosed bone and soft tissue sarcomas from May, 2017 to July, 2019 at Chongqing University Cancer Hospital. After the diagnosis, all the patients were examined for peripheral blood CTC using the CanPatrol™ System, and the isolated CTC was characterized using a multiple messenger RNA *in situ* analysis (MRIA). The expression of HOXB7 gene in the CTC was detected using a RNA probe. The correlations of CTC counts, cell type and the expression level of HOXB7 gene with clinical stages and metastasis of bone and soft tissue sarcomas were analyzed. **Results** of the 40 patients with sarcoma, CTC including epithelial CTC, mesenchymal CTC (M-CTC), and biophenotypic epithelial/mesenchymal CTC were detected in 37 patients before treatment. The CTC counts correlated significantly with Enneking stages ($P=0.002$). The number of CTC and the ratio of mesenchymal CTC were significantly greater in stage Ⅲ patients than in stage Ⅱ patients ($P=0.040$ and 0.001, respectively). Positive expression of HOXB7 in the CTC was detected in 56.9% of the stage Ⅲ patients, a rate significantly higher than that in patients in other stages ($P=0.003$). Subgroup analysis of osteosarcoma showed that the positivity rate of HOXB7 in the CDC was significantly higher in stage Ⅲ patients

[**基金项目**] 重庆市科卫联合医学项目(2018QNXM019)
[**通信作者**] 陈 飚,E-mail:chenbiao1179@sina.com

than in stage Ⅱ patients ($P=0.025$). **Conclusion** In patients with bone and soft tissue sarcomas, the counts and types of peripheral blood CTC and HOXB7 expression in the CDC are closely correlated with metastasis and clinical Enneking stages, and can serve as indicators for assessing tumor metastasis, therapeutic effect and prognosis of the patients.

[**Key words**] bone and soft tissue sarcomas; circulating tumor cell; homeobox gene B7; epithelial-mesenchymal transition; prognosis

Supported by the Joint Medical Research Project of Chongqing Municipal Science and Technology Commission and Health Commission (2018QNXM019).
Corresponding author: CHEN Biao, E-mail: chenbiao1179@sina.com

骨与软组织肉瘤是一种起源于间叶组织的原发性恶性肿瘤,占成人恶性肿瘤的5%,儿童肿瘤的20%[1]。尽管相对罕见,但其致死率高,根据美国国家卫生统计中心的最新估计,仅在美国每年有5 800多骨与软组织肉瘤患者死亡,占新发患者的40%[1]。对于无转移的骨与软组织肉瘤患者而言,70%的患者可获得较长的生存期,而一旦发生转移或复发,其5年生存率仅有20%左右[1]。有10%~20%的骨与软组织肉瘤患者在确诊时已发生远处转移或微转移,且多为肺内转移[2]。目前检测复发或转移的方法主要依赖于临床检查、影像学检查和正电子发射断层扫描(positron emission computed tomography,PET-CT),以确定肿瘤的生长区域或代谢活动的增加。检测复发和转移的新方法可能改变骨与软组织肉瘤的诊断、筛查和治疗方式。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)是来源于原发肿瘤或转移灶的肿瘤细胞,在特定条件下释放入外周循环血中。它们具有肿瘤的生物学特性,是肿瘤远处转移的种子。因此,CTC被认为是肿瘤复发和远处转移的重要原因之一[3]。研究表明,CTC计数与恶性肿瘤患者的分期、转移及预后密切相关[4-5]。通过检测外周血CTC,可为肿瘤转移、复发机制的研究、治疗方案的选择、疗效的评判及预后的预测等提供可靠依据。CTC的检测较影像学方法更能早期提示肿瘤细胞的复发和微转移,可用于监测肿瘤的发展状况,评估患者的预后。对CTC的检测已经在许多肿瘤类型中被研究,最常见的是在乳腺和结肠等上皮性肿瘤以及黑色素瘤中[6],但在间叶组织恶性肿瘤中CTC的研究相对较少。

同源盒基因(homeobox genes,HOX)是控制细胞增殖和分化的主要基因之一,其编码的转录因子通过作用于黏附分子、生长因子及膜蛋白受体等在肿瘤的进展、转移中发挥重要作用[7],同时参与调控肿瘤的自我更新、无限增殖等恶性生物学行为。目前在肺癌、胃癌、结肠癌及乳腺癌等多种肿瘤中均可检测到HOX基因的异常表达[8]。其中,位于第17号染色体的HOXB7已被证实属于癌基因的范畴[9]。HOXB7参与相关蛋白的DNA修复,其过度表达可能促使某些细胞的恶性转化[10-11]。因此,HOXB7在癌变过程中起着关键作用,与肿瘤的侵袭转移和疾病进展相关,并有望可作为治疗骨与软组织肉瘤的治疗靶点。

本研究检测骨与软组织肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞,分析循环肿瘤细胞的数量、类型以及HOXB7基因的表达和骨与软组织肉瘤患者转移及预后中的关系,为骨与软组织肉瘤的诊治提供新的策略和依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

纳入本院2017年5月至2019年7月有完整临床治疗及随访资料的新发骨与软组织肉瘤患者。纳入标准:①病理确诊为骨肉瘤或软组织肉瘤,ECOG评分0~2;②既往未接受过化疗、放疗、手术治疗及其他抗肿瘤治疗;③治疗前有CTC检测结果。排除标准:①合并其他恶性肿瘤病史者;②不接受治疗及依从性差者;③拒绝签署知情同意书者。

1.2 方法

1.2.1 收集资料 收集患者基线资料和临床病理参数信息,包括年龄、性别、Enneking分期、肿瘤位置、大小、肿瘤类型等相关资料。

1.2.2 外周血循环肿瘤细胞富集与鉴定 病理确诊后治疗开始前1周检测患者外周血CTC。所有样本检测采用CanPatrol™二代CTC检测技术(广州益善科技)[12-14]。使用EDTA抗凝采血管采集5 mL外周血,上下颠倒混匀10次。加入红细胞裂解液裂解外周血中的红细胞,离心后去除上清液,在沉淀物中加入含4%甲醛的PBS重新悬浮细胞,转移至过滤管中加压过滤,压力≥0.08 MPa,过滤后回收滤膜上的细胞进行进一步鉴定分型。分型鉴定采用多重mRNA原位分析(multiple mRNA *in situ* analysis,MRIA)方法,对分离的CTC进行核酸定位并分型[12]。使用蛋白酶处理细胞后用上皮标记探针、间质标记及白细胞标记探针进行杂交,依次加入预扩增液、预扩增探针进行孵育。

含有上皮型标志物 CK8、CK18、CK19 及 EpCAM 基因的 RNA 探针标记上皮型 CTC,含有间质型标志物 Vimentin 和 Twist 基因的 RNA 探针标记间质型 CTC,含有针对白细胞的 CD45 探针标记白细胞,同时还检测了 HOXB7 基因。孵育后加入 Alexa Fluor 594 红色荧光二抗检测上皮型探针,Alexa Fluor 488 绿色荧光二抗检测间质型探针,Alexa Fluor 750 白色荧光二抗检测白细胞,Alexa Fluor 647 紫色荧光二抗检测 CTC 中的 HOXB7 基因。

1.2.3 结果分析 红色荧光信号表示上皮型 CTC,绿色荧光信号表示间质型 CTC,同时显示红色及绿色信号的为混合型 CTC,白色信号为白细胞,紫色信号表示 CTC 内的 HOXB7 基因表达阳性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析。资料的正态性检验使用 Shapiro-Wilk 检验,不同患者 CTC 计数不满足正态性检验,CTC 数量与年龄、性别、肿瘤位置、大小等临床资料关系之间的比较使用 Mann-Whitney U 非参数检验,比较肿瘤类型、不同分期 CTC 数量之间的分布差异,采用 Kruskal-Wallis H 非参数检验,各分型 CTC 中 HOXB7 表达阳性的细胞数采用 χ^2 检验。双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 临床病理特征

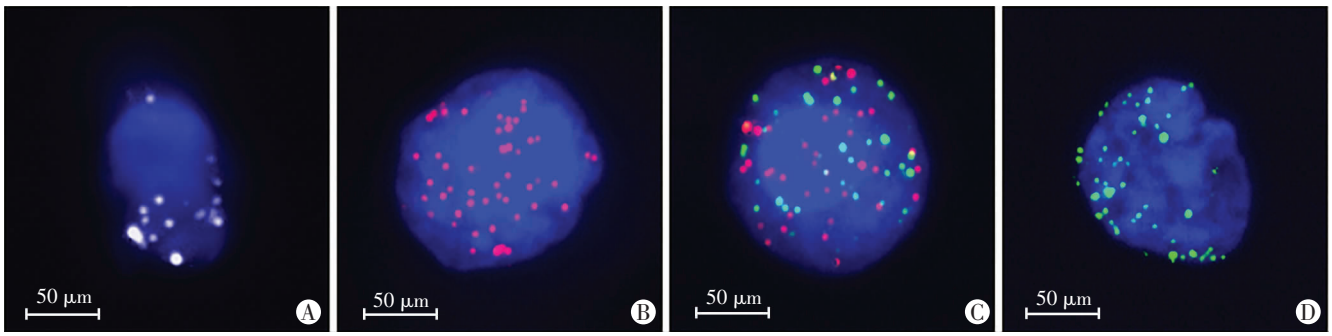
本研究共纳入 40 例患者,其中男性 19 例,女性 21 例;年龄 6~68(31.28±17.05)岁;发生在肢体的肿瘤 33 例,非肢体的肿瘤 7 例;Ennecking Ⅰ期 7 例,Ennecking Ⅱ期 27 例,Ennecking Ⅲ期 6 例;肿瘤直径≤5 cm 的 7 例,>5 cm 的 33 例;骨肉瘤患者 19 例(47.5%),尤文肉瘤或原始神经外胚层瘤 4 例(10%),软组织肉瘤 17 例(42.5%)。在 40 例患者中检测了外周血循环肿瘤细胞,其阳性率为 37/40(92.5%),分析循环肿瘤细胞与年龄、性别、肿瘤位置、大小以及肿瘤类型之间的关系,结果显示均无统计学意义(表 1)。

2.2 CTC 分型

通过对滤过膜上的循环肿瘤细胞进行多重 RNA 原位杂交标记,对循环肿瘤细胞进行分型。其中上皮型标志物 CK8、CK18、CK19 及 EpCAM 基因表达阳性的为上皮型,表现为红色荧光;间质型标志物 Vimentin 和 Twist 基因表达阳性的为间质型,表现为绿色荧光;上皮型和间质型均表达阳性的为混合型,表现为红绿相间荧光;白细胞标志物 CD45 表达阳性者为白细胞,表现为白色荧光(图 1);HOXB7 基因表达阳性的 CTC,表现为紫色荧光(图 2)。

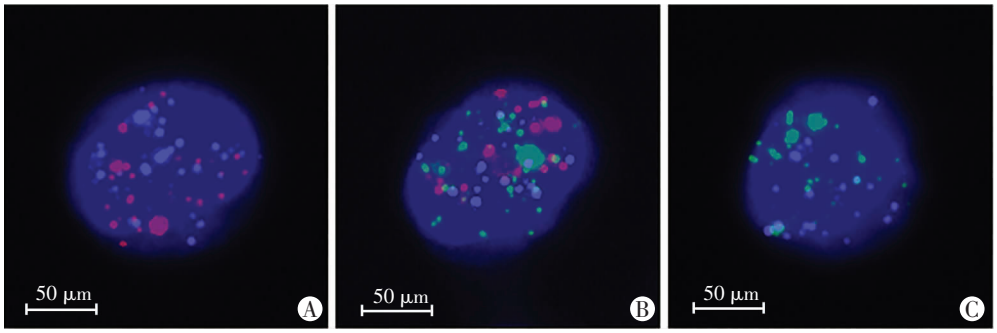
表 1 40 例骨与软组织肉瘤患者临床特征与 CTC 检测情况(例)

临床参数	*n*	CTC 阳性例数	*P*
年龄/岁			
<18	11	10	0.976
≥18	29	27	
性别			
女性	21	20	1.000
男性	19	17	
肿瘤部位			
肢体	33	30	0.626
非肢体	7	7	
Enneking 分期			
Ⅰ	7	6	
Ⅱ	27	25	0.002
Ⅲ	6	6	
肿瘤长径			
≤5 cm	7	7	0.972
>5 cm	33	30	
肿瘤类型			
骨肉瘤	19	18	
尤文肉瘤或原始神经外胚层瘤	4	3	0.066
软组织肉瘤	17	16	



A:白细胞;B:上皮型 CTC;C:混合型 CTC;D:间质型 CTC

图 1 白细胞及 3 种 CTC 免疫荧光图像



A: HOXB7 阳性上皮型 CTC;B:HOXB7 阳性混合型 CTC;C:HOXB7 阳性间质型 CTC

图 2 HOXB7 阳性的 3 种 CTC 免疫荧光图像

2.3 CTC 分型与肿瘤类型的关系

40 例患者中,19 例骨肉瘤患者共检测出 795 个 CTC,17 例软组织肉瘤患者共检测出 430 个 CTC,4 例尤文肉瘤或原始神经外胚层瘤患者共检测出 31 个 CTC,其不同 CTC 分型见表 2。各瘤种 CTC 总数量分布差异无统计学意义($P=0.065$),不同瘤种间上皮型、混合型及间质型 CTC 分布差异均无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 2 CTC 数量及分型与肿瘤类型的关系

CTC 分型	肿瘤类型			P
	骨肉瘤	尤文肉瘤或原始神经外胚层瘤	软组织肉瘤	
上皮型	162	11	63	0.523
混合型	525	17	340	0.070
间质型	108	3	27	0.365
合计	795	31	430	0.065

2.4 CTC 分型与肿瘤分期的关系

40 例患者中,37 例患者外周血 CTC 检测结果阳性(92.5%)。分析 CTC 计数与肿瘤分期的关系,结果显示,Ennecking Ⅰ期患者 7 例,其外周血 CTC 为 36 个,其中上皮型 8 个,混合型 27 个,间质型 1 个;均低于 Ennecking Ⅱ期和Ⅲ期患者(表 3)。各分期 CTC 平均数量分布不同,差异具有统计学意义($H=12.918$,$P=0.002$,表 3);Ennecking Ⅲ期患者 CTC 平均计数明显高于Ⅰ期(调整后的 $P=0.001$)和Ⅱ期(调整后的 $P=0.024$)患者。各分期上皮型 CTC 平均数量分布不同,差异具有统计学意义($H=12.454$,$P=0.002$,表 3);Ennecking Ⅲ期患者上皮型 CTC 平均数量明显高于Ⅰ期(调整后的 $P=0.004$)和Ⅱ期(调整后的 $P=0.004$)患者。各分期混合型 CTC 数量分布不同,差异具有统计学意义($H=6.367$,$P=0.041$,表 3),但校正显著性水平的事后两两比较无统计学意义。各分期间质型 CTC 数量分布不同,差异具有统计学意义($H=18.277$,$P<0.001$,表 3);Ennecking Ⅲ患者间质型 CTC 平均数量明显高于Ⅰ期(调整后的 $P<0.001$)和Ⅱ期(调整后的 $P=0.001$)患者。

表 3 CTC 数量及分型与肿瘤分期的关系

CTC 分型	Enneking 分期			P
	Ⅰ($n=7$)	Ⅱ($n=27$)	Ⅲ($n=6$)	
上皮型	8	112	116	0.002
混合型	27	701	154	0.041
间质型	1	45	92	<0.001
合计	36	858	362	0.002

2.5 CTC 中 HOXB7 的表达水平与肿瘤分期的关系

通过 RNA 原位杂交技术检测 40 例患者外周血 CTC 中 HOXB7 基因的表达,不同 Ennecking 分期间 HOXB7 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=11.672$,$P=0.003$,表 4)。同时检测 19 例骨肉瘤患者外周血 CTC 中 HOXB7 的表达水平,骨肉瘤 Ennecking Ⅱ期患者 HOXB7 阳性率显著低于Ⅲ期患者($\chi^2=4.992$,$P=0.025$,表 5)。

表 4 40 例骨与软组织肉瘤患者不同分期 CTC 中 HOXB7 的表达[例(%)]

Enneking 分期	n	HOXB7 阳性	HOXB7 阴性	合计
Ⅰ	7	15(41.7)	21(58.3)	36
Ⅱ	27	400(46.6)	458(53.4)	858
Ⅲ	6	206(56.9)	156(43.1)	362

$\chi^2=11.672$,$P=0.003$

表 5 19 例骨肉瘤患者不同分期 CTC 中 HOXB7 的表达

Enneking 分期	n	HOXB7 阳性	HOXB7 阴性	合计
Ⅱ	13	212(49.0)	221(51.0)	433
Ⅲ	6	206(56.9)	156(43.1)	362

$\chi^2=4.992$,$P=0.025$

3 讨论

CTC 是原发肿瘤脱落到血管系统并在血流中循环的细胞[15]。这些细胞因其在早期诊断和监测抗癌药物治疗反应中的潜在作用而受到关注。基于细胞表面抗原或 CTC 的物理性质,研究者们开发了不同的 CTC 分离和表征技术[16]。基于细胞表面抗原的方法,如上皮标志物,是应用最广泛的 CTC 检测策略[17]。因此,现有的 CTC 研究主要集中于上皮来源肿瘤如乳腺癌、肺癌、胃癌等,而肉瘤等间质来源肿瘤由于缺乏特异性标记物[18],限制了骨与软组织肉瘤 CTC 的相关研究[6]。然而,这些上皮抗原为基础的方法很可能忽略了 CTC 细胞亚群的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)。EMT 是一个多步骤的过程,在转移和癌症进展中起着重要的作用,具有 EMT 表型的 CTCs 被认为参与了肿瘤的传播和转移[19-20]。本研究采用 CanPatrol™ CTC 富集技术对骨肉瘤患者中无法表达上皮抗原的 CTC 进行分离和鉴定[12]。

通过对 40 例骨与软组织肿瘤患者外周血 CTC 的检测,37 例患者外周血中检测出 CTC 细胞,阳性率为 92.5%,如此高的阳性率反映了骨与软组织肉瘤是一类非常容易发生远处转移的肿瘤。对不同分期肉瘤患者进行 CTC 检测,结果表明,治疗前的 CTC 细胞计数与肿瘤的分期和转移显著相关,分期越晚,CTC 计数越多。同时对不同分期 CTC 的类型进行分析,结果显示,间质型 CTC 与肉瘤患者的分期显著相关,分期越晚,间质型 CTC 比例越大。这说明上皮间质转化与肉瘤的进展、转移有关。目前对肉瘤患者复发、转移的检测及疗效的评估主要依靠影像学检查,尽管传统的 TNM 分期及 Enneking 分期在肉瘤的预后评估中起到了重要作用,但也有其局限性。肉瘤患者的转移与其组织学分级密切相关,尽管有些肿瘤体积较小,但可发生转移,说明按照解剖学特征的分期系统不足以充分反映肉瘤的预后。因此 CTC 计数可以作为影像学检查的补充,辅助临床医师对肉瘤患者病情的评估及预后的判定。对于 CTC 计数较多,间质型 CTC 比例较大等预后不良因素的患者进行针对性的干预处理。

研究表明,HOXB7 可通过上调碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),激活 Ras/Rho 蛋白通路,从而促进乳腺细胞发生 EMT,促使肿瘤的转移[21]。最新研究发现骨肉瘤组织和细胞与相邻的非肿瘤骨组织和成骨细胞相比 HOXB7 的表达被上调[22]。HOXB7 敲除显著抑制细胞存活、增殖、迁移和上皮间充质转移。相反 HOXB7 的下调显著抑制了骨肉瘤细胞的体外增殖,同时抑制了体内异种移植瘤的生长,下调 HOXB7 也抑制了骨肉瘤细胞的迁移和侵袭[23]。因此为了检测 HOXB7 在肉瘤中的作用,本研究检测了不同分期 CTC 中 HOXB7 基因的表达情况。结果显示,肿瘤分期越晚,HOXB7 表达的阳性率越高,对骨肉瘤进行亚组分析,也可得出同样的结果。说明 HOXB7 可以通过增加 CTC 的侵袭和转移,进而增加肿瘤的转移,影响骨与软组织肉瘤患者的预后。因此,HOXB7 可以作为预测骨肉瘤预后的潜在靶点。

综上所述,本研究通过研究骨与软组织肉瘤患者外周血 CTC 计数、分型及 HOXB7 基因表达与骨与软组织肿瘤的分期及转移之间的关系,结果表明,CTC 计数、间质型 CTC 及 HOXB7 基因高表达与骨与软组织肉瘤的远处转移密切相关,可以作为常规影像学检查的补充,在预测肿瘤转移、疗效及预后中发挥辅助作用。未来需要多中心、大样本的临床试验进一步验证目前的结论。

参考文献:

[1] CHANG L, ASATRIAN G, DRY S M, *et al*. Circulating tumor cells in sarcomas: a brief review[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 430. DOI: 10.1007/s12032-014-0430-9.

[2] MEYERS P A, SCHWARTZ C L, KRAILO M D, *et al*. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children's Oncology Group[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(4): 633-638. DOI: 10.1200/JCO.2008.14.0095.

[3] KIM M Y, OSKARSSON T, ACHARYYA S, *et al*. Tumor self-seeding by circulating cancer cells[J]. Cell, 2009, 139(7): 1315-1326. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.025.

[4] ZHONG X, ZHANG H, ZHU Y, *et al*. Circulating tumor cells in cancer patients: developments and clinical applications for immunotherapy[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 15. DOI: 10.1186/s12943-020-1141-9.

[5] PAOLETTI C, HAYES D F. Circulating tumor cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 882: 235-258. DOI: 10.1007/978-3-319-22909-6_10.

[6] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, *et al*. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. Int J Clin Oncol, 2017, 22(3): 421-430. DOI: 10.1007/s10147-017-1105-2.

[7] WELLIK D M. Hox genes and vertebrate axial pattern[J]. Curr Top Dev Biol, 2009, 88: 257-278. DOI: 10.1016/S0070-2153(09)88009-5.

[8] LIAO W T, JIANG D, YUAN J, *et al*. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(11): 3569-3578. DOI: 10.

1158/1078-0432.CCR-10-2533.

[9] 原薇薇, 谭艳, 杜敏, 等. HOXB7 基因在肺腺癌中的表达及其临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(11): 987-991.
YUAN W W, TAN Y, DU M, *et al*. Expression of HOXB7 in human lung adenocarcinoma and its clinical significance[J]. Chin Clin Oncol, 2014, 19(11): 987-991.

[10] BITU C C, CARRERA M, LOPES M A, *et al*. HOXB7 expression is a prognostic factor for oral squamous cell carcinoma [J]. Histopathology, 2012, 60(4): 662-665. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.04102.x.

[11] RUBIN E, WU X, ZHU T, *et al*. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair [J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1527-1535. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4283.

[12] WU S, LIU S, LIU Z, *et al*. Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers [J]. PLoS ONE, 2015, 10(4): e0123976. DOI: 10.1371/journal.pone.0123976.

[13] LI M, LU Y, LONG Z, *et al*. Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells in osteosarcoma [J]. J Bone Oncol, 2019, 16: 100236. DOI: 10.1016/j.jbo.2019.100236.

[14] WU Z J, TAN J C, QIN X, *et al*. Significance of circulating tumor cells in osteosarcoma patients treated by neoadjuvant chemotherapy and surgery[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 3333-3339. DOI: 10.2147/CMAR.S176515.

[15] GUPTA G P, MASSAGUE J. Cancer metastasis: building a framework[J]. Cell, 2006, 127(4): 679-695. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.001.

[16] CHEN X X, BAI F. Single-cell analyses of circulating tumor cells[J]. Cancer Biol Med, 2015, 12(3): 184-192. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0056.

[17] YU M, BARDIA A, WITTNER B S, *et al*. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition[J]. Science, 2013, 339(6119): 580-584. DOI: 10.1126/science.1228522.

[18] 李明辉, 鲁亚杰, 张浩强,等. 骨肉瘤外周血循环肿瘤细胞检测的临床意义[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(6): 330-337. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2352.2018.06.002.
LI M H, LU Y J, ZHANG H Q, *et al*. Clinical significance of peripheral blood circulating tumor cells detection in osteosarcoma patients[J]. Chin J Orthop, 2018, 38(6): 330-337. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2352.2018.06.002.

[19] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007.

[20] KANG Y, PANTEL K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients [J]. Cancer Cell, 2013, 23(5): 573-581. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.017.

[21] WU X, CHEN H, PARKER B, *et al*. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition [J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9527-9534. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4470.

[22] YANG Y, CHEN J, CHEN Q. Upregulation of HOXB7 promotes proliferation and metastasis of osteosarcoma cells [J]. Mol Med Rep, 2017,16(3): 2773-2778. DOI: 10.3892/mmr.2017.6906.

[23] YANG L, XIE F, LI S. Downregulation of Homeobox B7 inhibits the tumorigenesis and progression of osteosarcoma [J]. Oncol Res, 2017, 25(7): 1089-1095. DOI: 10.3727/096504016X14784668796788.

(收稿:2019-12-12;修回:2020-03-12)

(编辑 汪勤俭)