

循环肿瘤细胞检测方法在食管癌中的应用及展望

张叶星, 李传飞, 吕琳, 梅浙川*

重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆

收稿日期: 2023年3月24日; 录用日期: 2023年4月18日; 发布日期: 2023年4月27日

摘要

食管癌作为世界上最常见的恶性肿瘤之一, 具有较高的发病率及死亡率。及时发现和诊断食管癌对患者的治疗和预后至关重要。现有诊断与长期监测食管癌的方法具有一定的局限性, 如影像学检测受限于肿瘤大小; 鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen, SCCA)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)等血清肿瘤标志物的特异性和准确性较低; 组织病理学作为肿瘤诊断的“金标准”, 但是侵入性检查, 且由于肿瘤的异质性, 病理活检有其局限性。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指从原发肿瘤病灶中脱落并随血液循环到达身体各处的肿瘤细胞, 针对CTCs的检测是新兴的液体活检方法之一, 被广泛应用于研究各种肿瘤。本文综述了循环肿瘤细胞的分离及富集方法, 并综述了CTCs与食管癌放化疗之间的研究, 并对其未来进行展望。

关键词

循环肿瘤细胞, 食管癌, 富集, 分离, 治疗

Application and Prospect of Detection Methods of Circulating Tumor Cells in Esophageal Cancer

Yexing Zhang, Chuanfei Li, Lin Lyu, Zhechuan Mei*

Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Mar. 24th, 2023; accepted: Apr. 18th, 2023; published: Apr. 27th, 2023

Abstract

As one of the most common malignant tumors in the world, esophageal cancer has high morbidity

*通讯作者。

and mortality. Timely detection and diagnosis of esophageal cancer is crucial to the treatment and prognosis of patients. The existing methods for diagnosis and long-term monitoring of esophageal cancer have certain limitations, for example, imaging detection is limited by tumor size. The specificity and accuracy of serum tumor markers such as squamous cell carcinoma (SCC) antigen and carcinoembryonic antigen (CEA) are low. Histopathology is the “gold standard” for tumor diagnosis, but it’s an invasive medical test, pathological biopsy has its limitations due to the heterogeneity of tumor. Circulating tumor cells (CTCs) are tumor cells that fall out of the primary tumor focus and reach all parts of the body with blood circulation. The detection of CTC is one of the emerging liquid biopsy methods, and is widely used to study various tumors. In this paper, the separation and enrichment methods of circulating tumor cells are reviewed, and the research between CTC and radiotherapy and chemotherapy of esophageal cancer is reviewed, and its future is prospected.

Keywords

Circulating Tumor Cell, Esophageal Cancer, Enrichment, Separation, Treatment

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

食管癌是一种起源于食管上皮的常见胃肠道癌症，是全球第十大最常见的肿瘤，食管癌也是 2020 年全球肿瘤相关死亡的第六大主要原因[1]。虽然在过去几十年中，食管癌的诊断、治疗有很多新进展，但总体来说，食管癌的五年生存率仍不乐观。目前，食管癌的临床诊断主要依赖于影像学筛查、血清学肿瘤标志物检测和组织病理学方法。然而，影像学检测的敏感性受限于肿瘤病变的直径；作为非侵入性手段，常用 SCCA, CEA 等血清肿瘤标志物的检测虽常被用于监测治疗效果，但由于特异性和准确性较低，这些标志物对食管癌的预测价值并不高；组织病理学是肿瘤诊断的“金标准”，但由于机体创伤，无法实现动态实时监测，且由于部分患者病情的特殊性 & 肿瘤的异质性，所以病理活检往往具有其局限性。因此，考虑到食管癌在中国的高发，迫切需要一种有效的辅助诊断方法早期发现食管癌，尤其是在无症状患者中[2] [3]。

肿瘤转移与包括食管癌在内的绝大多数恶性肿瘤的死亡有密不可分的关系[4]。恶性肿瘤具有时空异质性，单点活检往往存在漏诊误诊风险，而病理学活检作为有创操作，多点活检又难以实现。因此人们把研究重心转向了“液体活检”这一充满前景的领域。CTCs 在 150 年前首次被 Thomas Ashworth 报告[5]。自被发现起，各国专家学者就投入大量精力研究 CTCs 的检测与分离技术，并希望将 CTCs 用作“液体活检”以及作为一种早期的生物指标用于研究疾病进展[6]。近年来，CTC 因其在肿瘤转移中的重要作用而受到极大的关注。如今，CTCs 的检测和分子表征已经逐渐成为癌症研究中最热门的领域之一[7]。研究发现循环肿瘤细胞在预测与后方面具有重要价值，因此，美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)已批准循环肿瘤细胞在转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌中的临床应用[8]。

CTCs 既可以单个存在，也可以成簇存在，当超过两个或三个肿瘤细胞在血液中一起移动，即成为循环肿瘤微栓子[9]。与单个 CTCs 相比，循环肿瘤微栓子的尺寸更大，脏器的微血管可以保留较大的 CTCs，因此更容易保留循环肿瘤微栓子[10]。早在上个世纪 70 年代，就有研究表明，循环肿瘤微栓子比单个的 CTCs 更易形成远处转移[11]。在原发肿瘤形成的早期，肿瘤细胞从原发灶中脱落，然后到血液中循环。

恶性肿瘤患者的预后主要取决于从原发灶脱落的肿瘤细胞向远处器官组织的血源性播散以及其在新环境中的生长[12]。

外周血中寻找 CTCs 的优势在于外周血液容易获得, 且具有可反复操作性。但其实在具体操作中并非易事, 因为 CTCs 在外周血中的含量并不丰富, CTCs 的富集和检测往往需要在数以百万计的血细胞为背景中寻找检出。研究表明, 在食管癌等实体肿瘤患者的血液中, CTCs 的浓度为每 $5\sim 10 \times 10^6$ 个白细胞中有一个细胞, 因此检测 CTCs 就如同大海捞针[13]。因此, 如何高效地检测外周血中的 CTCs 具有很大的研究前景, 目前的研究一般是通过 CTCs 的物理学和生物学特性, 利用不同的技术进行富集和检测的, 需要极高灵敏度和特异性的检测技术。

在这篇综述中, 我们讨论了 CTCs 检测的关键技术, 强调了将 CTCs 分析应用于临床实践必须克服的挑战, 并综述了 CTCs 在食管癌的研究应用与未来展望。

2. CTCs 的分离与富集方法

要分离或富集 CTCs 的关键步骤在于区分 CTCs 与其周围的其他正常造血细胞, 现有的方法一般是基于 CTCs 的生物学特性, 如细胞表面蛋白表达、蛋白质的磁性颗粒的亲合性等, 或是基于 CTCs 的物理学性质, 如其大小、密度、电荷或可变形性等。

2.1. 基于 CTCs 生物学特性的富集方法

免疫磁珠法是一种基于抗体的检测方法, 是当前应用最广泛的富集 CTCs 的方法, 既可以针对 CTCs (阳性选择), 也可以针对白细胞(阴性选择)。与阳性选择相比, 阴性选择的好处是能够收集到所有的 CTCs。免疫磁珠法通过偶联到磁珠的抗体靶向抗原, 随后抗原-抗体复合物通过暴露于磁场中而被分离出来。该方法通常使用抗上皮细胞粘附分子(EpCAM)抗体进行。目前基于 EpCAM 的技术中, 通过阳性选择实现 CTCs 富集的 CellSearch[®] 是美国 FDA 批准的第一个也是唯一一个商业性 CTC 分离平台[14]。该系统使用涂有抗体的铁磁流体颗粒, 以 EpCAM 为目标, 从患者血液中富集 CTCs, 分离的细胞随后用荧光标记抗体进行免疫染色, 然后使用自动细胞图像捕获和分析进行计数。2004 年推出以来, CellSearch 系统已被用于多种肿瘤患者的诊断和预后工具。虽然该系统被认为是 CTCs 检测的“金标准”, 但它有几个缺点。这种检测方法的灵敏度高度依赖于上皮标记物, 这导致出现上皮间质转化的细胞回收率低。如有研究[15]表明 CellSearch 显示间充质乳腺癌细胞系的回收率仅为 2%。此外, 该系统富集的 CTCs 背景有高度污染的白细胞, 导致富集纯度低(0.01%~0.1%) [16]而限制了进一步的分析。并且在大多数实体瘤中, CellSearch[®] 很少分离出循环肿瘤微栓子, 原因可能在于, 与单个 CTCs 相比, 循环肿瘤微栓子具有较小的表面积与体积比, 这降低了抗体捕获的效率。这种情况在较大的 CTC 集群中更为明显。一般认为肿瘤细胞与血管内皮细胞的相互作用是肿瘤细胞外渗的前提。从物理生物学的角度来看, 有研究称循环肿瘤微栓子倾向于通过与 E-选择素相互作用而发生边缘化、旋转并粘附于内皮。循环肿瘤微栓子的滚动速度比单个 CTCs 更低, 更易于黏附于血管内皮而发生浸润或转移[17]。此外, 在有湍流流动的设备中, CTCs 簇的完整性容易受到损害, 这可能导致 CTCs 簇变形[18]。

另一个例子是 MagSweeper, 可提供高度纯化的 CTCs。它阳性选择表达 EpCAM 的 CTCs, 并可支持其后续分子分析。通过使用三维纳米结构衬底, 由涂有抗 EpCAM 抗体的硅纳米线阵列组成[19]。为了评估 MagSweeper 分离完整 CTCs 用于下游分析的能力, 国外有研究[20]从转移性前列腺癌患者血液中分离出的单个 CTCs, 并和添加到健康献血者血液中的单个前列腺癌细胞系 LNCaP 细胞进行了信使核糖核酸测序(Messenger RNA sequencing, mRNA-Seq)。研究发现 MagSweeper 有效地分离了 CTCs, 其捕获效率与 CellSearch 平台相匹配。然而, 与 CellSearch 不同的是, MagSweeper 有助于分离单个活 CTCs 而不污

染白细胞,且 mRNA-Seq 分析显示, MagSweeper 分离过程对从加标人类血液中分离的单个 LNCaP 的转录谱没有明显的影响,这表明 MagSweeper 过程对分离细胞的转录特征造成的影响极小。

而 RosetteSep™ 技术作为一种阴性富集方法,是基于双特异性抗体,可将红细胞和白细胞交联形成簇,即形成细胞玫瑰花结,随后可通过密度梯度离心去除[21]。该方法分离出的 CTCs 可通过核酸提取、细胞培养和流式细胞术等下游处理[21]。

2.2. 基于物理分离的技术

利用 CTCs 与血细胞在细胞密度、大小、介电性能和机械塑性方面的物理性质差异,可以用来分离 CTCs 和 CTCs 簇。目前有大量研究从形态学、力学、电学等方面,分析了 CTCs 区别于其他血细胞不同的物理和生物力学特性。与白细胞(7~20 μm)和红细胞(6~8 μm)相比,大多数 CTCs (17~52 μm)体积更大,且具有更高的核-胞质比以及更为复杂的折叠膜,并且它们的机械性能允许它们在通过血管时发生变形。因此,当前有很多分离富集 CTCs 的方法是基于其物理性质研发的。基于物理性质分离 CTCs 的优点在于可以做到无需标记即分离出 CTCs 分离[6]。

2.2.1. 微过滤技术分离方法

微过滤技术依赖于微流体的装置,这种分离方法依赖于细胞的大小属性以及大小和可变形性标准的组合。目前已研究出了几种微过滤分离技术应用于分离 CTCs: 微结构后置过滤器[22]、微孔膜[23]或微流控收缩[24]。

其中一种过滤方法是利用一组微米大小的柱型体作为过滤器来捕获 CTCs。一项研究[25]集成了微流体狭缝组成了微椭圆滤波器阵列,椭圆形过滤器可减少摩擦和剪切力,由此保留了肿瘤细胞的活力。该研究在 1 mL/h 的速度下实现了 90% 的癌细胞捕获率,并且肿瘤细胞的存活率可达 96%。然而,其缺点在于可因细胞堵塞过滤器而导致低样本容量,并且利用该技术开发的设备无法回收 CTCs 进行进一步的下游分析。Park 等人[26]开发了一种基于 CTCs 变形性的设备,该装置利用了微流体棘轮机制,它依赖于 CTCs 相对于血液细胞的独特变形性,但该设备尚不能处理 7.5 mL 的血液。另一种过滤方法利用微孔膜,可实现更高的通量(>3 mL/h)。另一项来自日本的研究[27]开发了一种配备了镍基微腔阵列(MCA)过滤器的微流控设备,以富集血液样本中的 CTCs。但 MCA 系统依赖于肿瘤细胞与正常血细胞之间的大小差异,这使体积较小肿瘤细胞有损失的风险。

Hvichia 等人[28]开发了一种半自动分离系统 Parsortix™,目前正在等待 FDA 批准其用于转移性乳腺癌患者。该系统在高通量(10 mL/h)下对 CTCs 的平均捕获效率为 64%,具有高纯度和高活力。该系统的主要优势是可以保证肿瘤细胞的存活状态,并将其用于下游分析[29]。

2.2.2. 流体动力分离法

与微滤技术相比,在流体动力学方法分离 CTCs 过程中,由于 CTCs 无需通过物理障碍,因此流体动力对 CTCs 施加的流体应力较小,并且实现高通量分选,也可以回收 CTCs 用于后续分析[30]。确定性侧向位移(Deterministic Lateral Displacement, DLD)、惯性聚焦、惯性迁移、微流体涡流都是较有研究前景的流体动力分离法。

2.2.3. 声电泳细胞分离技术

声电泳分离技术[31]依赖于悬浮在流体中的细胞和粒子在接触超声波时受到声辐射力,可以通过在微流体通道的横截面上产生驻波并利用这种力实现颗粒的分离[32]。这种方法依赖于细胞在声波影响下的迁移,与 CTCs 的大小、密度和可变形性相关。基于声学的方法提供了一种非接触式、简单、经济、多功能的分离方法。

3. CTCs 在食管癌全程管理中的研究和应用

截至目前,关于 CTCs 与食管癌之间的研究没有肺癌、直肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤多,但针对 CTCs 与食管癌手术操作、放化疗等治疗方法的研究仍在逐渐深入。从现有研究可以推论出手术操作可以刺激食管癌患者的 CTCs 从原发肿瘤灶脱落并进入外周血循环,针对患者术前 CTCs 的计数可以实现对食管癌患者预后的判断,而针对 CTCs 与食管癌放化疗之间关系的研究,还需要进一步深入探讨。

3.1. CTCs 与食管癌的手术治疗

血源性复发是胃肠道恶性肿瘤最常见的方式之一。早在 20 世纪 60 年代,就有研究在动物模型中观察到原发肿瘤手术操作过程中癌细胞脱落进入血液。既往有研究[33]对外周动脉和上腔静脉的血液样本进行了癌胚抗原特异性逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),通过检测 CEA mRNA 间接量化 CTCs,以研究 CTCs 的存在与手术的关系,结果表明手术操作可能导致循环肿瘤细胞从原发部位分离并流入血管。尽管该实验没有直接检测出循环肿瘤细胞,而是通过间接量化的方式,这使得结果可能具有一定局限性,但该发现仍有一定的启发意义。

研究表明,肺癌[34]、结直肠癌[35]、胃癌[36]、肝癌[37]患者进行手术操作均会影响其外周血中循环肿瘤细胞的数量,使其数目增加。研究[38]报道,结直肠癌切除术后 24 小时以上,外周血中 CTCs 的检出被认为是复发的独立预后标志。此外,手术方式的不同也会影响癌症手术患者的 CTCs 计数。微创手术可以减少 CTCs 数量,而开放手术则可能导致术后更高的 CTCs 计数[39]。这些结果表明,手术操作可对多种恶性肿瘤患者的外周血 CTCs 数目产生影响,其原因可能是针对原发肿瘤的手术操作促进了肿瘤细胞的体内循环。

3.2. CTC 与食管癌的放疗

关于食管癌与放疗之间关系的研究[40]发现 CTCs 改变可以反映放疗效率,放疗后 CTCs 状态可能是决定 ESCC 预后的关键因素。如果放射治疗有效地降低了肿瘤负荷,从而阻止癌细胞释放到外周血中,则外周血中的 CTCs 状态可能因凋亡增加而变为阴性,从而达到改善患者的预后的目标。反之,如果放疗不能有效控制肿瘤生长,CTCs 可能持续存在,甚至由阴性状态转为阳性状态,则患者预后不良。因此研究者分析,放疗后 CTCs 阳性状态可能是预测食管鳞状细胞癌患者放疗疗效及预后的良好工具。

除了循环肿瘤细胞外,而今液体活检的另一研究热门“循环肿瘤 DNA”(circulating tumor DNA, ctDNA) [41]检测也具有良好的前景。ctDNA 指的是由肿瘤细胞释放到血液循环系统中的 DNA,其中包含了来源于肿瘤的突变和基因变异信息。ctDNA 比循环肿瘤细胞更灵敏,更适合成为癌症的生物学指标。

有研究[42]发现,在放射治疗后,ctDNA 阳性和阴性患者的无进展生存时间(progression-free survival, PFS)有显著差异。此外,ctDNA 阳性患者的高复发率一定程度上证明了其阳性预测价值。ctDNA 阳性的患者在放疗后可能需要额外的治疗,包括化疗或手术等。以 CTC 及 ctDNA 为指标探究食管恶性肿瘤与放疗之间关系的研究目前仍较少,有待进一步的深入探索。

3.3. CTC 与食管癌的化疗

食管癌的特点是即使手术切除后局部和远处复发程度仍较高,5 年总生存期(overall survival, OS)较差[43]。术前化疗在食管鳞状细胞癌患者治疗中的作用现存在争议。在西方国家,术前放化疗(chemoradiotherapy, CRT)是局限性晚期食管癌的标准治疗方法[44]。在日本,临床试验 JCOG9204 [45]和 JCOG9907 [46]认为,局限性晚期食管癌的标准治疗方法是术前化疗。有研究[47]表明,对 II 期或 III 期的食管鳞癌患者,进行治疗前 CTCs 检测,若为 CTCs 阳性,术前化疗可改善其短期 PFS。因此 CTCs 检测可作为指导术前化疗个体化战略决策的指标,但还需要更多证据。

3.4. CTC 与食管癌的预后预测

手术仍然是根治性治疗食管癌的唯一方式。但近三分之二的食管癌患者在行根治性手术切除后出现局部复发或远处转移, 并有超过 90% 的患者死于肿瘤复发和远处转移。因此, 在手术治疗前, 准确的术前诊断和预后分期是非常必要的。近年来, 外周血循环中 CTCs 的检测已被证明是食管癌的一个预后因素, 并可能为治疗癌症提供新的策略[48]。

一项单中心前瞻性研究[49]中, 从 100 名被诊断为可切除食管癌的患者中提取外周血样本进行 CTCs 分析, 发现在 18% 的患者外周血中检测到 CTCs。且与 CTCs 阴性患者相比, CTCs 阳性患者无复发时间和总生存期显著缩短。在存在淋巴结浸润且无远处转移的患者中, CTCs 检测阳性患者无复发和总生存期显著缩短。进行多因素分析后发现, CTCs 是肿瘤复发的一个独立预后指标。

一项包含 43 名经 R0 切除术的食管癌患者的研究[50]中, 研究者对病例进行术前、术后外周血 CTCs 数检测, 并对其上皮/间质类型进行分类, 结果显示: 其 CTCs 检出率为 81% (35/43); 上皮型、间质型和混合型 CTCs 检出率分别为 53%、33% 和 63%。3 年总生存率为 67%。CTCs 大于 2 提示复发、转移和死亡风险增加(P 分别为 0.018、0.002)。由此考虑, 术前 CTCs 数, 尤其是间质 CTCs 数可作为食管癌患者预后的辅助指标。

另一项前瞻性的单中心研究[51]中纳入了 76 例无转移的未手术食管癌患者, 并使用 CellSearch 系统分离富集 CTCs, 同时分离弥散肿瘤细胞(Disseminated tumor cells, DTC), 结果显示, 有 15 例患者的外周血液中可检出 CTCs, 13 例患者可检测出 DTC。CTCs 和 DTCs 同时检测的仅 3 例, 而检测结果一致(DTCs/CTCs 均阴性和 DTCs/CTCs 均阳性)的有 54 例。但研究者发现, 只有 CTCs 阳性的患者的总生存期和无复发生存期显著缩短, 经多变量分析显示, 仍只有 CTCs 是总生存期和无复发生存期的独立预测因子, 适合用于食管癌患者的临床分期。

综上, CTCs 检测可以在食管癌中实现较为准确的术前分期, 从而可能为改善食管癌患者的治疗模式提供机会, 这有待于在未来通过大型多中心试验进行验证。

4. CTCs 在食管癌领域的研究前景及展望

近年来, 不断有新的 CTCs 检测技术被开发, 并在不断改进。这些新方法需要在多中心临床研究中得到验证才能被广泛应用。但比起所使用的技术方法, 我们要解决的关键问题是如何通过评估 CTCs 以指导治疗, 从而更有效地系统治疗恶性肿瘤。只有在更早的时间点检测和根除转移性肿瘤细胞, 才有可能降低癌症带来的死亡率。尽管食管癌现在可以通过内镜检查实现早期发现, 但针对某些无法完成内镜检查的病人, CTCs 的检测具有其可观的应用前景, 且 CTCs 可作为食管癌诊断的辅助诊断方法之一。但更加简便、经济适用的 CTCs 检测方法有待被开发。不仅仅是局限于食管癌的诊断, 在食管癌的治疗方面也有其研究价值, 其中针对食管癌的免疫和靶向治疗中, 鲜有研究, 仍是一个待探索领域。

在液体活检中, 除了 CTCs 以外, ctDNA 技术也是一种近年来被广为研究的诊断和监测方法, 具有中等灵敏度和高特异性, CTC 分析和 ctDNA 可能可以共同解释为什么实体肿瘤对靶向治疗产生耐药性。在针对 CTCs 的研究中, 结合单细胞分析技术, 也许会产生更多其他的发现[52]。总的来说, 越来越多的证据表明, CTCs 实时反映癌症进展, 这一信息可能在全身治疗的背景下显得十分重要。在未来, CTCs 表征有望有助于在特定的治疗窗口内指导特定的靶向治疗, 这是实现个性化医疗的标志。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249.

- <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Chen, Y., Yang, Z., Wang, Y., *et al.* (2019) Karyotyping of Circulating Tumor Cells for Predicting Chemotherapeutic Sensitivity and Efficacy in Patients with Esophageal Cancer. *BMC Cancer*, **19**, 651. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5850-7>
- [3] Gao, Q.Y. and Fang, J.Y. (2015) Early Esophageal Cancer Screening in China. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **29**, 885-893. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.09.018>
- [4] Krebs, M.G., Metcalf, R.L., Carter, L., *et al.* (2014) Molecular Analysis of Circulating Tumour Cells—Biology and Biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **11**, 129-144. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.253>
- [5] Lianidou, E.S. (2014) Circulating Tumor Cell Isolation: A Marathon Race Worth Running. *Clinical Chemistry*, **60**, 287-289. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.216010>
- [6] Alix-Panabières, C. and Pantel, K. (2013) Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clinical Chemistry*, **59**, 110-118. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194258>
- [7] Plaks, V., Koopman, C.D. and Werb, Z. (2013) Circulating Tumor Cells. *Science*, **341**, 1186-1188. <https://doi.org/10.1126/science.1235226>
- [8] Cristofanilli, M., Stopeck, A. and Reuben, J.M. (2004) Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **351**, 781-791. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040766>
- [9] Hou, J.M., Krebs, M.G., Lancashire, L., *et al.* (2012) Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **30**, 525-532. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3716>
- [10] Peeters, D.J.E., Brouwer, A., Van Den Eynden, G.G., *et al.* (2015) Circulating Tumour Cells and Lung Microvascular Tumour Cell Retention in Patients with Metastatic Breast and Cervical Cancer. *Cancer Letters*, **356**, 872-879. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.10.039>
- [11] Umer, M., Vaidyanathan, R., Nguyen, N.T., *et al.* (2018) Circulating Tumor Microemboli: Progress in Molecular Understanding and Enrichment Technologies. *Biotechnology Advances*, **36**, 1367-1389. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.002>
- [12] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [13] Allard, W.J., Matera, J. and Miller, M.C. (2004) Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but Not in Healthy Subjects or Patients with Nonmalignant Diseases. *Clinical Cancer Research*, **10**, 6897-6904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>
- [14] Riethdorf, S., O'Flaherty, L., Hille, C., *et al.* (2018) Clinical Applications of the Cell Search Platform in Cancer Patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **125**, 102-121. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.01.011>
- [15] Mostert, B., Kraan, J., Bolt-De Vries, J., *et al.* (2011) Detection of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer May Improve through Enrichment with Anti-CD146. *Breast Cancer Research and Treatment*, **127**, 33-41. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0879-y>
- [16] Smirnov, D.A., Zweitzig, D.R., Foulk, B.W., *et al.* (2005) Global Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells. *Cancer Research*, **65**, 4993-4997. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4330>
- [17] Hong, Y., Fang, F. and Zhang, Q. (2016) Circulating Tumor Cell Clusters: What We Know and What We Expect (Review). *International Journal of Oncology*, **49**, 2206-2216. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3747>
- [18] Sarioglu, A.F., Aceto, N., Kojic, N., *et al.* (2015) A Microfluidic Device for Label-Free, Physical Capture of Circulating Tumor Cell Clusters. *Nature Methods*, **12**, 685-691. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3404>
- [19] Alix-Panabières, C., Schwarzenbach, H. and Pantel, K. (2012) Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Annual Review of Medicine*, **63**, 199-215. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062310-094219>
- [20] Cann, G.M., Gulzar, Z.G., Cooper, S., *et al.* (2012) mRNA-Seq of Single Prostate Cancer Circulating Tumor Cells Reveals Recapitulation of Gene Expression and Pathways Found in Prostate Cancer. *PLOS ONE*, **7**, e49144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049144>
- [21] Drucker, A., Teh, E.M., Kostyleva, R., *et al.* (2020) Comparative Performance of Different Methods for Circulating Tumor Cell Enrichment in Metastatic Breast Cancer Patients. *PLOS ONE*, **15**, e0237308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237308>
- [22] Zhang, X., Lu, X., Gao, W., *et al.* (2021) A Label-Free Microfluidic Chip for the Highly Selective Isolation of Single and Cluster CTCs from Breast Cancer Patients. *Translational Oncology*, **14**, Article ID: 100959. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100959>
- [23] Yin, J., Mou, L., Yang, M., *et al.* (2019) Highly Efficient Capture of Circulating Tumor Cells with Low Background

- Signals by Using Pyramidal Microcavity Array. *Analytica Chimica Acta*, **1060**, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.054>
- [24] Armbrecht, L., Rutschmann, O., Szczerba, B.M., *et al.* (2020) Quantification of Protein Secretion from Circulating Tumor Cells in Microfluidic Chambers. *Advanced Science*, **7**, Article ID: 1903237. <https://doi.org/10.1002/adv.201903237>
- [25] Chen, H., Cao, B., Sun, B., *et al.* (2017) Highly-Sensitive Capture of Circulating Tumor Cells Using Micro-Ellipse Filters. *Scientific Reports*, **7**, 610. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00232-6>
- [26] Park, E.S., Jin, C., Guo, Q., *et al.* (2016) Continuous Flow Deformability-Based Separation of Circulating Tumor Cells Using Microfluidic Ratchets. *Small*, **12**, 1909-1919. <https://doi.org/10.1002/sml.201503639>
- [27] Hosokawa, M., Hayata, T., Fukuda, Y., *et al.* (2010) Size-Selective Microcavity Array for Rapid and Efficient Detection of Circulating Tumor Cells. *Analytical Chemistry*, **82**, 6629-6635. <https://doi.org/10.1021/ac101222x>
- [28] Hvichia, G.E., Parveen, Z., Wagner, C., *et al.* (2016) A Novel Microfluidic Platform for Size and Deformability Based Separation and the Subsequent Molecular Characterization of Viable Circulating Tumor Cells. *International Journal of Cancer*, **138**, 2894-2904. <https://doi.org/10.1002/ijc.30007>
- [29] Descamps, L., Le Roy, D. and Deman, A.L. (2022) Microfluidic-Based Technologies for CTC Isolation: A Review of 10 Years of Intense Efforts towards Liquid Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 1981. <https://doi.org/10.3390/ijms23041981>
- [30] Namli, I., Seyedmiraie, S.S., Sheibani, A.A., *et al.* (2022) Hydrodynamic Cavitation on a Chip: A Tool to Detect Circulating Tumor Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **14**, 40688-40697. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c12356>
- [31] Karthick, S., Pradeep, P.N., Kanchana, P., *et al.* (2018) Acoustic Impedance-Based Size-Independent Isolation of Circulating Tumor Cells from Blood Using Acoustophoresis. *Lab on a Chip*, **18**, 3802-3813. <https://doi.org/10.1039/C8LC00921J>
- [32] Magnusson, C., Augustsson, P., Lenshof, A., *et al.* (2017) Clinical-Scale Cell-Surface-Marker Independent Acoustic Microfluidic Enrichment of Tumor Cells from Blood. *Analytical Chemistry*, **89**, 11954-11961. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01458>
- [33] Nakashima, S., Natsugoe, S., Matsumoto, M., *et al.* (2003) Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Blood by Molecular Detection and Tumor Markers in Esophageal Cancer. *Surgery*, **133**, 162-169. <https://doi.org/10.1067/msy.2003.9>
- [34] Matsutani, N., Sawabata, N., Yamaguchi, M., *et al.* (2017) Does Lung Cancer Surgery Cause Circulating Tumor Cells?—A Multicenter, Prospective Study. *Journal of Thoracic Disease*, **9**, 2419-2426. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.07.33>
- [35] Guller, U., Zajac, P., Schnider, A., *et al.* (2002) Disseminated Single Tumor Cells as Detected by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Represent a Prognostic Factor in Patients Undergoing Surgery for Colorectal Cancer. *Annals of Surgery*, **236**, 768-776. <https://doi.org/10.1097/00000658-200212000-00009>
- [36] Ikeguchi, M. and Kaibara, N. (2005) Detection of Circulating Cancer Cells after a Gastrectomy for Gastric Cancer. *Surgery Today*, **35**, 436-441. <https://doi.org/10.1007/s00595-004-2978-z>
- [37] Yu, J., Xiao, W., Dong, S., *et al.* (2018) Effect of Surgical Liver Resection on Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer*, **18**, 835. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4744-4>
- [38] Peach, G., Kim, C., Zacharakis, E., *et al.* (2010) Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells Following Surgical Resection of Colorectal Cancers: A Systematic Review. *British Journal of Cancer*, **102**, 1327-1334. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605651>
- [39] Kauffman, E.C., Lee, M.J., Alarcon, S.V., *et al.* (2016) Lack of Impact of Robotic Assisted Laparoscopic Radical Prostatectomy on Intraoperative Levels of Prostate Cancer Circulating Tumor Cells. *Journal of Urology*, **195**, 1136-1142. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.11.013>
- [40] Yin, X.D., Yuan, X., Xue, J.J., *et al.* (2012) Clinical Significance of Carcinoembryonic Antigen-, Cytokeratin 19-, or Survivin-Positive Circulating Tumor Cells in the Peripheral Blood of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Radiotherapy: Circulating Tumor Cells in ESCC. *Diseases of the Esophagus*, **25**, 750-756. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2012.01326.x>
- [41] Ye, Q., Ling, S., Zheng, S., *et al.* (2019) Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Molecular Cancer*, **18**, 114. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1043-x>
- [42] Jia, R., Zhao, C.H., Li, P.S., *et al.* (2020) Post-Radiation Circulating Tumor DNA as a Prognostic Factor in Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology Letters*, **21**, 68. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12329>
- [43] Allum, W.H., Stenning, S.P., Banciewicz, J., *et al.* (2009) Long-Term Results of a Randomized Trial of Surgery with or without Preoperative Chemotherapy in Esophageal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 5062-5067.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.2083>

- [44] Van Hagen, P., Hulshof, M.C., Van Lanschot, J.J.B., *et al.* (2012) Preoperative Chemoradiotherapy for Esophageal or Junctional Cancer. *New England Journal of Medicine*, **366**, 2074-2084. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112088>
- [45] Ando, N., Iizuka, T., Ide, H., *et al.* (2003) Surgery plus Chemotherapy Compared with Surgery Alone for Localized Squamous Cell Carcinoma of the Thoracic Esophagus: A Japan Clinical Oncology Group Study—JCOG9204. *Journal of Clinical Oncology*, **21**, 4592-4596. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.12.095>
- [46] Ando, N., Kato, H., Igaki, H., *et al.* (2012) A Randomized Trial Comparing Postoperative Adjuvant Chemotherapy with Cisplatin and 5-Fluorouracil Versus Preoperative Chemotherapy for Localized Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Thoracic Esophagus (JCOG9907). *Annals of Surgical Oncology*, **19**, 68-74. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-2049-9>
- [47] Zhao, Y., Han, L., Zhang, W., *et al.* (2020) Preoperative Chemotherapy Compared with Postoperative Adjuvant Chemotherapy for Squamous Cell Carcinoma of the Thoracic Oesophagus with the Detection of Circulating Tumour Cells Randomized Controlled Trial. *International Journal of Surgery*, **73**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2019.11.005>
- [48] Han, L., Li, Y.J., Zhang, W.D., *et al.* (2019) Clinical Significance of Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Medicine*, **98**, e13921. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013921>
- [49] Reeh, M., Effenberger, K.E., Koenig, A.M., *et al.* (2015) Circulating Tumor Cells as a Biomarker for Preoperative Prognostic Staging in Patients with Esophageal Cancer. *Annals of Surgery*, **261**, 1124-1130. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001130>
- [50] Ren, Z., Hou, X., Xue, Z., *et al.* (2021) The Relationship between the Number of Circulating Tumor Cells and the Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, **12**, 1265-1276. <https://doi.org/10.21037/jgo-21-409>
- [51] Konczalla, L., Ghadban, T., Effenberger, K.E., *et al.* (2021) Prospective Comparison of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Blood and Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of a Single Patient's Cohort with Esophageal Cancer. *Annals of Surgery*, **273**, 299-305. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003406>
- [52] Court, C.M., Ankeny, J.S., Sho, S., *et al.* (2016) Circulating Tumor Cells in Gastrointestinal Cancer: Current Practices and Future Directions. In: Bentrem, D. and Benson, A.B., Eds., *Gastrointestinal Malignancies*, Springer International Publishing, Cham, 345-376. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-34244-3_17
https://doi.org/10.1007/978-3-319-34244-3_17