

· 综 述 ·

叶酸受体阳性循环肿瘤细胞检测的临床研究进展

李 倩¹, 郑 琪², 马婕群², 张彦兵², 廖子君²

(1. 西安医学院, 陕西 西安 710021; 2. 西安交通大学医学院附属陕西省肿瘤医院内一科, 陕西 西安 710061)

摘要: 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指从肿瘤原发灶脱落后进入外周血的肿瘤细胞, 数量稀少, 检测难度较大。叶酸受体(folate receptor, FR)被证实普遍高表达于大多数肿瘤细胞表面, 而在正常人血液中几乎不表达。因此, 叶酸受体已经成为检测外周血中 CTCs 的理想靶点, 被应用于多种实体肿瘤的早期诊断、疗效监测及预后判断。本文对 FR 阳性 CTCs 检测的临床研究进展进行阐述, 并探讨其在恶性胸腔积液诊断中的应用前景。

关键词: 循环肿瘤细胞; 叶酸受体; 叶酸受体阳性循环肿瘤细胞

中图分类号: R730 **文献标识码:** A

The Progress of Clinical Research on Folate Receptor-positive Circulating Tumor Cells Analysis

LI Qian¹, ZHENG Qi², MA Jiequn², ZHANG Yanbing², LIAO Zijun²

(1. Xi'an Medical College, Xi'an 710021, China; 2. First Department of Medical Oncology, Affiliated Shaanxi Provincial Cancer Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, China)

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) refers to tumor cells that break away from the primary site and enter the vascular system. CTCs are rare and difficult to detect. Studies have confirmed that folate receptor (FR) is generally highly expressed on the surface of most tumor cells, but hardly expressed in normal blood. Therefore, FR has become an ideal target for detecting the CTCs and has been used in the early diagnosis and efficacy monitoring of various solid tumors. This article reviews the progress of clinical research on folate receptor-positive circulating tumor cells analysis, and explores its potential application prospect in malignant pleural effusion (MPE).

Key words: Circulating tumor cells; Folate receptor; Folate receptor-positive circulating tumor cells

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指从肿瘤原发灶脱落后进入外周血液循环的肿瘤细胞^[1-2], 数量稀少, 大约 $10^6 \sim 10^7$ 白细胞中才能找到1个CTC^[3]。1869年, 澳大利亚医生ASHWORTH在转移性乳腺癌患者的尸检中, 首次发现了与肿瘤细胞形态相似的CTCs, 他认为这可能有助于揭示患者体内多处肿瘤的起源模式。由于当时技术条件落后, 无法将这些CTCs从患者体内分离鉴定出来。现代医学研究^[4-5]发现, 当上皮源性CTCs进入外周血时会发生上皮-间质转换(epithelial mesenchymal

transition, EMT), 一旦随着血流到达理想的组织或器官, CTCs就会通过间质-上皮转化(mesenchymal epithelial transition, MET)这一过程离开血液进入器官或组织中。故CTCs存在多种类型, 包括上皮细胞表型、间质细胞表型和上皮与间质细胞混合表型。理论上讲, 肿瘤大小超过2 mm左右时便可诱导新生血管形成, 从而为CTCs进入血液提供基础。有研究^[6]发现, 肿瘤发生发展的早期, CTCs即可通过内渗作用被释放入血。但是, 即便外周血中检测到CTCs也并不代表肿瘤已经发生转移, 只有极小一部

DOI:10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2020.02.036

收稿日期:2019-09-26; 修回日期:2019-11-10

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81602907)

通讯作者:廖子君, 男, 56岁, 教授, 主任医师, 在职博士。主要研究方向为肿瘤转移的综合治疗。

分能力强的 CTCs 逃避免疫系统识别后,侵入第二器官形成微转移灶,CTCs 才会发展成为肿瘤远处转移,这一系列转移机制常常是引起肿瘤细胞相关死亡的重要原因^[7-11]。目前研究已证实,CTCs 来自原发肿瘤克隆,验证了 ASHWORTH 的观点,同时亦为肿瘤学研究提供了新的方向。

1 CTCs 的临床意义

毋庸置疑,目前组织或细胞学病理诊断仍是恶性肿瘤诊疗诊断的金标准,然而在初始肿瘤病理学明确诊断(包括穿刺活检组织、手术切除组织、脱落细胞等)后的若干时间段内,再次或多次获取组织学标本以进行基因分析往往十分困难,且因有一定创伤性而致患者依从性差。因此,液体(最主要、最常用是血液)活检(包括循环肿瘤细胞,循环肿瘤 DNA,循环肿瘤微栓子等)尤其是 CTCs 被认为是最可靠的个体化标本来源。相比传统的活检方法,CTCs 的优势在于创伤小、易操作、可重复取样、动态监测及时方便。作为新兴技术,CTCs 的检测已经成为临床研究的热点。OKUMURA 等^[12]研究表明,可手术治疗的肺癌患者中,96.7% 患者的肺静脉血中可检测出 CTCs,29.4% 患者的外周血中可检测出 CTCs。相关文献^[8]报道,肺癌、乳腺癌、结肠癌以及前列腺癌患者外周血中的 CTCs 数量普遍高于健康人群,且 CTCs 的计数水平与转移程度、生存时间相关。已有大量研究报道,CTCs 是多种实体肿瘤的辅助诊断^[13-15]、疗效评价^[16]、基因突变分析^[15]、复发转移监测^[17-18]以及预后预测^[19-22]的重要潜在生物标志物,这就要求 CTCs 的检测方法必须具有较高的灵敏度和特异性。

叶酸(folic acid)是一种人体必需的小分子量维生素,但人体自身不能合成,需摄取来自外界的叶酸。其途径是叶酸通过与细胞表面叶酸受体(folate receptor,FR)结合后被内吞进入细胞。叶酸受体是一种表达于细胞膜表面的糖蛋白,具有很强的组织及肿瘤特异性,除表达于肾、脾和肺等少数正常组织中外^[23],绝大多数高表达于肿瘤细胞表面;而 FR 在健康人的血细胞、正常细胞(除了少量被激活的巨噬细胞)中几乎不表达^[24]。有研究发现,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)组织中 FR 的表达率高达 72%~83%^[25-26],肾癌组织中 FR 的表达率为 86%^[23],卵巢癌组织中 FR 的表达率在 36%~80% 之间^[23,27]。因此,FR 可作为检测 CTCs 的理想靶点。

2 CTCs 的检测方法

2.1 Cell Search 系统

近年来,各种 CTCs 的分离及检测方法层出不穷,但很少有被批准用于临床常规应用。Cell Search 系统(Veridex, Raritan, NJ)是唯一被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的检测平台^[28-31],已经在包括乳腺癌、前列腺癌和结肠癌在内的多种类型晚期癌症中显示出良好的临床应用前景^[17-19]。该试剂盒基于免疫学原理,依靠上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、细胞角蛋白(cytokeratin, CK)等上皮细胞特异性标志来分离识别 CTCs。该方法具有灵敏度高、结果稳定、可重复性好的优点^[32],但可能漏检一些不表达上皮特异性标志物的 CTCs^[33]。

2.2 微流式装置(CTC 芯片法)

CTC 芯片法是将受检者的血液标本与 CTCs 芯片表面的支持物最大化接触时,被排布在芯片表面的数个 EpCAM 抗体高效捕获的细胞被确认为 CTCs(通过免疫染色区分是上皮性细胞还是非特异性结合的白细胞)^[34-36]。该方法提高了血液中 CTCs 的阳性检出率,但是无法从健康受试者中分离鉴定出 CTCs。

2.3 膜过滤法(ISET 法)

ISET(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET)法是根据肿瘤细胞的体积大于白细胞这一物理特性,通过带有小于 8 μm 直径小孔的膜过滤分离和计数上皮源性肿瘤细胞。该方法不仅具有操作简便、检测灵敏度高的优点,还可完全分离出上皮型和间质型的 CTCs,维持细胞原有形态不被破坏,并能检测出循环肿瘤微栓子^[37]。尽管如此,ISET 法还是可能漏掉小于 8 μm 直径的 CTCs,保留一些体积大的白细胞,且特异性与可重复性较差,因此未能被 FDA 批准成为 CTCs 的标准检测方法。

2.4 FR 靶向 PCR 技术

YU 等^[25]于 2013 年发表的一项研究,提出了通过特异性识别细胞表面 FR 的新型 CTCs 检测方法,即 FR 靶向 PCR(ligand-targeted polymerase chain reaction,LT-PCR)技术。该方法利用细胞表面高表达的 FR 与其配体类似物结合形成“配体-寡核苷酸偶合物”检测探针,再实现探针与 CTCs 的共同孵育,最后通过对探针进行实时定量 PCR 检测来计算 CTCs 的数量。研究^[25]显示,入组的 153 例 NSCLC 患者外周血中 CTCs 计数显著高于肺良性疾病组和

健康受试组($P < 0.001$), I 期 NSCLC 的诊断灵敏度达到 67.2%, II、III、IV 期 NSCLC 患者 CTCs 阳性检出率分别为 69.4%、80.9%、100%。2016 年 1 月 11 日, 中国国家食品药品监督管理总局(CFDA)批准了叶酸受体阳性 CTCs 检测试剂盒(格诺思博生物科技有限公司, 注册证编号: 国械注准 20163400061)用于肺癌的辅助诊断及疗效监测。

3 叶酸受体阳性循环肿瘤细胞(folate receptor-positive circulating tumor cells, FR⁺-CTCs)检测的临床应用

3.1 肺癌

CHEN 等^[38]的研究中, 通过外周血中 FR⁺-CTCs 的检测, 诊断 NSCLC 的灵敏度为 76.37%, 特异度为 82.39%; 与癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇酶(NSE)常规生物标志物联合诊断时, 灵敏度和特异度可高达 88.78% 和 87.36%。此后亦有研究^[39]报道, FR⁺-CTCs 在肺癌患者组中的水平(11.97 cells/3mL 血液)显著高于肺良性疾病组(6.72 cells/3mL 血液, $P < 0.0001$)和健康对照组(5.82 cells/3mL 血液, $P < 0.0001$), FR⁺-CTCs 诊断肺癌的灵敏度为 77.7%, 特异性为 89.5%; 相比, FR⁺-CTCs 诊断效率最高, 且 FR⁺-CTCs、CEA、NSE、CYFRA21-1 联合应用可显著提高肺癌的诊断效能。

在一项探讨 FR⁺-CTCs 在小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)中的应用价值的研究^[40]中, 共纳入 80 例患者, 其中 67 例患者的基线 FR⁺-CTCs 计数阳性(≥ 8.7 cells/3mL 血液)。经过 2 周化疗后, 出现部分缓解(partial response, PR)患者的基线 CTCs 计数明显高于疾病进展(stable disease, PD)组患者($P < 0.05$)。此外, FR⁺-CTCs 计数阳性组中, CTCs 计数水平低(8.7 ~ 14.0 cells/3mL 血液)的患者无进展生存期(progression-free survival, PFS)明显长于 CTCs 计数高(≥ 14 cells/3mL 血液)的患者(PFS: 9.1 个月 vs 6.9 个月, $P < 0.05$; OS: 11.1 个月 vs 8.6 个月, $P < 0.05$)。该研究结果表明, FR⁺-CTCs 计数可能是 SCLC 患者疗效评价和预后预测的潜在生物标志物。

一项最新研究^[41]结果显示, 外周血 FR⁺-CTCs 的表达水平可用来鉴别肺部良恶性结节, 灵敏度为 78.6% ~ 82.7%, 特异性为 68.8% ~ 78.4%, 是一种可靠的鉴别方法。此外, FR⁺-CTCs 检测联合肿瘤最大直径(maximum tumour diameter, MTD)可在术前对

≤ 2 cm 的肺腺癌结节的浸润性进行有效评估, 指导术式选择, 避免过度治疗。

3.2 乳腺癌

HE 等^[24]设立的一项研究, 确立了 CTCs 计数在进展期乳腺癌中的预测价值, 即转移性乳腺癌患者在进行新一轮的抗肿瘤治疗(内分泌治疗、化疗或其他治疗)前检测其外周血中 CTCs 计数; 结果显示, 与 CTCs 计数低的患者相比, CTCs 计数 ≥ 5 cells/7.5mL 血液的患者 PFS(2.7 个月 vs 10 个月, $P < 0.001$)和 OS(10.1 个月 vs > 18 个月, $P < 0.001$)较差; 其中包含几项分子生物学和临床预后指标的多变量分析提示, CTCs 计数是较好的独立预后因子。另一项早期乳腺癌的研究^[26], 2 026 例乳腺癌手术后辅助治疗前的患者, 21.5% 患者的外周血中可检测出 CTCs, 且 CTCs 计数是该类人群 PFS 和 OS 独立预后因子。虽然癌症人群中 CTCs 计数总体水平偏低, 且结果分析也需要较高灵敏度的实验平台, 但在早期癌症中, CTCs 计数有望成为监测根治性治疗后是否存在残余肿瘤的指标。

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)不仅缺乏有效的治疗靶点和高度侵袭性, 且具有较高的转移风险。最近一项研究^[42]结果显示, FR α 在大部分侵袭性基底样 TNBC 中过表达, 且与新辅助化疗后疾病复发的高风险性相关($P < 0.05$)。另外, 还发现 FR α 参与了肿瘤细胞信号传导, 有望成为新的治疗靶点。

3.3 结肠癌

PILATI 等^[43]主持了一项有关结直肠癌的临床研究, 430 例患者在进行新一轮抗肿瘤治疗前检测其外周血中 CTCs 计数, 患者按血中 CTCs 计数被分为 ≥ 3 cells/7.5mL 血液的不良预后组和 < 3 cells/7.5mL 血液的良好预后组; 按此标准分类后, “不良预后组”患者较“良好预后组”患者有较短的 OS(9.4 个月 vs 18.5 个月, $P < 0.001$)和 PFS(4.5 个月 vs 7.9 个月, $P < 0.0002$); 另一项转移性结直肠癌的研究^[19]也证实了 CTCs 计数可作为独立的疗效评价指标。COHEN^[19]等的研究发现, 转移性结肠癌治疗后 CTCs 计数处于较低水平的患者 PFS 和 OS 得到延长, 且这种预测价值在整个治疗期间的不同时段始终存在; 该研究中, 衡量患者理想 CTCs 水平和不理想 CTCs 水平的标准是以 3 cells/7.5mL 血液为界值(cut off)。

3.4 前列腺癌

前列腺癌是最常见的泌尿系统恶性肿瘤, 也是

许多发达国家男性癌症相关死亡的第二大原因^[44]。大多数前列腺癌患者在首诊时就已经出现了远处转移,以骨转移最为常见。IMMC38 实验在转移性去势抵抗性前列腺癌 (metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC) 研究中,首先对基线 CTCs 计数的预测价值进行了评估。该项研究一共入组了 164 名患者,将接受一线化疗 (81% 接受多西他赛单药化疗,剩下的接受包含多西他赛的化疗方案) 的研究结果显示,相对于低 CTCs 计数的患者而言,基线 CTCs 计数高的患者 (定义为 ≥ 5 cells/7.5 mL 血液) 生存期明显缩短 (21.7 个月 vs 11.5 个月)^[45],进一步的临床研究也证实了这个结果^[46]。IMMC38 首次把 CTCs 计数变化与临床结局相联系起来,得出高水平 CTCs 计数的患者化疗后 CTCs 计数明显下降者,较治疗后仍保持高水平 CTCs 计数的患者具有较好的预后^[45]。

4 展望

近年来,液体活检特别是 CTCs 检测在临床上的应用愈来愈广泛,也取得许多可喜的成果。然而,CTCs 检测在日常临床实践中的真正地位仍未完全确立。一方面,CTCs 计数在细胞富集和计数程序方面的复杂性仍然较高 (包括试剂盒和操作时间);另一方面,CTCs 计数对肿瘤治疗、预后判断的参考价值仍然需要更多的研究来证实。目前,FR⁺-CTCs 检测技术已经得到了多项研究证实,本课题组设计将 CTCs 检测技术应用于恶性胸腔积液的研究中,通过新型的 FR⁺-CTCs 技术检测恶性胸腔积液中的 CTCs,动态监测 CTCs 计数的变化,评估其能否成为肿瘤患者辅助诊断及预后预测的潜在生物标记物。虽然目前 CTCs 检测费用昂贵、且在恶性胸腔积液中的检测尚且缺乏前瞻性临床研究,但因其标本获取简便、创伤小等优点,可能会被越来越多的肿瘤临床医生认可。

参考文献

[1] ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 623-631.

[2] MARTIN O A, ANDERSON R L, NARAYAN K, et al. Does the mobilization of circulating tumour cells during cancer therapy cause metastasis? [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(1): 32-44.

[3] ALLARD W J, MATERA J, MILLER M C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (20): 6897-6904.

[4] DANILA D C, PANTEL K, FLEISHER M, et al. Circulating tumors

cells as biomarkers: progress toward biomarker qualification [J]. *Cancer J*, 2011, 17(6): 438-450.

[5] JOOSSE S A, GORGES T M, PANTEL K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells [J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(1): 1-11.

[6] HUSEMANN Y, GEIGL J B, SCHUBERT F. Systemic spread is an early step in breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13 (1): 58-68.

[7] NI X, ZHUO M, SU Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (52): 21083-21088.

[8] LI P, STRATTON Z S, DAO M, et al. Probing circulating tumor cells in microfluidics [J]. *Lab Chip*, 2013, 13 (4): 602-609.

[9] PLAKS V, KOOPMAN C D, WERB Z. Cancer Circulating tumor cells [J]. *Science*, 2013, 341 (6151): 1186-1188.

[10] YOUNG R, PAILLER E, BILLIOT F, et al. Circulating tumor cells in lung cancer [J]. *Acta Cytol*, 2012, 56 (6): 655-660.

[11] JIATAO L, CAICHUN Z, JING W, et al. Abstract 2247: A multicenter clinical trial of lung cancer circulating tumor cell assay with the largest sample size (1210 cases) in China [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 2247-2247.

[12] OKUMURA Y, TANAKA F, YONEDA K, et al. Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients [J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87 (6): 1669-1675.

[13] TANAKA F, YONEDA K, KONDO N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(22): 6980-6986.

[14] ILIE M, HOFMAN V, LONG-MIRA E, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e111597.

[15] MAHESWARAN S, SEQUIST L V, NAGRATH S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 366-377.

[16] OKEGAWA T, ITAYA N, HARA H, et al. Circulating tumor cells as a biomarker predictive of sensitivity to docetaxel chemotherapy in patients with castration-resistant prostate cancer [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34: 6705-6710.

[17] BAYARRI-LARA C, ORTEGA F G, CUETO LADRÓN DE GUEVARA A, et al. Circulating tumor cells identify early recurrence in patients with non-small cell lung cancer undergoing radical resection [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e148659.

[18] HALL C S, KARHADE M, LAUBACHER B A, et al. Circulating tumor cells and recurrence after primary systemic therapy in stage III inflammatory breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107 (11): v250.

[19] COHEN S J, ALPAUGH R K, GROSS S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Clin Colorect Cancer*, 2006, 6 (2):

125-132.

- [20] CRISTOFANILLI M, BUDD G T, ELLIS M, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8): 781-791.
- [21] COCO S, ALAMA A, VANNI I, et al. Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells as prognostic and predictive biomarkers in advanced non-small cell lung cancer patients treated with first-line chemotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1035.
- [22] YUAN D, ZHANG Q, LV Y, et al. Predictive and prognostic significance of circulating endothelial cells in advanced non-small cell lung cancer patients [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(11): 9031-9037.
- [23] PARKER N, TURK M J, WESTRICK E, et al. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay [J]. *Anal Biochem*, 2005, 338(2): 284-293.
- [24] HE W, KULARATNE S A, KALLI K R, et al. Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123:1968-1973.
- [25] YU Y, CHEN Z, DONG J, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cells as a novel diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer [J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(6): 697-702.
- [26] NUNEZ M I, BEHRENS C, WOODS D M, et al. High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and EGFR [corrected] mutation [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(5): 833-840.
- [27] O SHANNESSY D J, SOMERS E B, SMALE R, et al. Expression of folate receptor- α (FRA) in gynecologic malignancies and its relationship to the tumor type [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2013, 32(3): 258-268.
- [28] LIN H K, ZHENG S, WILLIAMS A J, et al. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(20): 5011-5018.
- [29] ALUNNI-FABBRONI M, SANDRI M T. Circulating tumour cells in clinical practice; Methods of detection and possible characterization [J]. *Methods*, 2010, 50(4): 289-297.
- [30] ROSS J S, SLODKOWSKA E A. Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 132(2): 237-245.
- [31] AMADORI A, ROSSI E, ZAMARCHI R, et al. Circulating and disseminated tumor cells in the clinical management of breast cancer patients: unanswered questions [J]. *Oncology*, 2009, 76(6): 375-386.
- [32] PATERLINI-BRECHOT P, BENALI N L. Circulating tumor cells (CTC) detection; clinical impact and future directions [J]. *Cancer Lett*, 2007, 253(2): 180-204.
- [33] FEHM T, SAGALOWSKY A, CLIFFORD E, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2073-2084.
- [34] HUANG S B, WU M H, LIN Y H, et al. High-purity and label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) in a microfluidic platform by using optically-induced-dielectrophoretic (ODEP) force [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(7): 1371-1383.
- [35] DIAMOND E, LEE G Y, AKHTAR N H, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in prostate cancer [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 131.
- [36] DONG Y, SKELLEY A M, MERDEK K D, et al. Microfluidics and circulating tumor cells [J]. *J Mol Diagn*, 2013, 15(2): 149-157.
- [37] VONA G, SABILE A, LOUHA M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(1): 57-63.
- [38] CHEN X, ZHOU F, LI X, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cell detected by LT-PCR-based method as a diagnostic biomarker for non-small-cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(8): 1163-1171.
- [39] LOU J, BEN S, YANG G, et al. Quantification of rare circulating tumor cells in non-small cell lung cancer by ligand-targeted PCR [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80458.
- [40] SHEN J, ZHAO J, JIANG T, et al. Predictive and prognostic value of folate receptor-positive circulating tumor cells in small cell lung cancer patients treated with first-line chemotherapy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49044.
- [41] ZHOU Q, GENG Q, WANG L, et al. Value of folate receptor-positive circulating tumour cells in the clinical management of indeterminate lung nodules: A non-invasive biomarker for predicting malignancy and tumour invasiveness [J]. *EBioMedicine*, 2019, 41: 236-243.
- [42] CHEUNG A, OPZOOMER J, ILIEVA K M, et al. Anti-folate receptor alpha-directed antibody therapies restrict the growth of triple negative breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(20): 5098-5111.
- [43] PILATI P, MOCELLIN S, BERTAZZA L, et al. Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(2): 402-408.
- [44] SCHER H I, JIA X, de BONO J S, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer; a reanalysis of IMMC38 trial data [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(3): 233-239.
- [45] GOLDKORN A, ELY B, QUINN D I, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(11): 1136-1142.