

循环肿瘤细胞在外周血中的存活与转移机制

郭立煌^{1,2}, 徐克前^{1,2*}

(¹中南大学湘雅三医院医学检验系, 长沙 410013; ²中南大学湘雅医学院医学检验系, 长沙 410013)

摘要: 肿瘤转移是恶性肿瘤发展的一个重要阶段, 也是导致患者死亡的主要原因。实体恶性肿瘤病灶(原发或转移灶)的肿瘤细胞因自发性脱落或外部因素释放入血形成循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)。CTCs是肿瘤患者出现复发转移的最直接原因。外周血中的CTCs会因血流剪切力作用、失巢凋亡以及免疫细胞杀伤作用死亡, 但仍有小部分的CTCs可以存活下来并发生转移。因此, 研究CTCs在外周血中的存活转移机制对肿瘤患者的诊治具有重要意义, 本文对CTCs在外周血中存活转移机制的最新研究进展进行了综述, 并对其未来发展进行展望。

关键词: 循环肿瘤细胞; 肿瘤转移; 免疫逃逸

Mechanism of survival and metastasis of circulating tumor cells in peripheral blood

GUO Lihuang^{1,2}, XU Keqian^{1,2*}

(¹Faculty of Laboratory Medicine, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China;

²Faculty of Laboratory Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Metastasis is an important stage in the development of malignant tumors and is the leading cause of cancer-related deaths. Circulating tumor cells (CTCs) shed from primary tumor and/or metastatic lesions into the vasculature and CTCs are commonly described as source of recurrence and metastasis in cancer patients. CTCs disseminate within the bloodstream where most of them die due to the shear forces, anoikis or the attack of immune system. In fact, only a small fraction of CTCs are capable of surviving, seeding distant organs, and eventually giving rise to overt metastatic disease. Therefore, it has great significance to study the mechanism on how CTCs survive and metastasize in bloodstream for the diagnosis and treatment of tumor patients. In this review, we introduce the latest findings regarding CTCs survive and metastasize in blood stream and prospect its development in future.

Key Words: circulating tumor cells; metastasis; immune escape

一直以来, 全球恶性肿瘤发病率和死亡率居高不下。2018年全球癌症统计年报指出, 肿瘤导致全年死亡人数约960万例, 取代心血管疾病成为首位最常见的死亡原因^[1], 而在这些肿瘤患者的死

亡原因中, 大约90%是由于肿瘤转移复发^[2]。肿瘤转移是一个涵盖多方面、多步骤的复杂过程。1889年, Stephan Paget提出的“种子-土壤假说”, 认为某些肿瘤细胞(种子)会转移到合适的器

收稿日期: 2022-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(81471499); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ40347)

第一作者: E-mail: guolihuang@csu.edu.cn

*通信作者: E-mail: xukeqian@126.com

官(土壤)上定植生长导致转移。随后几十年的研究极大地促进了我们对肿瘤转移过程中细胞分子层面的理解^[3,4]。目前主流的观点认为,外周血中的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)扮演着“种子”的角色,直接参与肿瘤转移、复发等过程。临床实验也已证实,CTCs在肿瘤患者中具有重要的诊断和预后价值^[5-7]。尽管每天有数以百万计的原发性肿瘤细胞脱落入血,但只有极少数的CTCs(约0.01%)能够存活并形成转移灶。这是因为CTCs在进入外周血后会因血流剪切力的物理损伤、失巢凋亡的自发性损伤以及免疫细胞的杀伤作用而死亡^[8-10]。许多研究正在探索CTCs如何能够存活于外周血循环以及引起转移的机制。因此,本文将主要从CTCs的特性及其如何在外周血中存活转移这一角度出发,对有关研究进展作一综述(图1)。

1 CTCs的生物学特性

CTCs最早由澳大利亚病理学家Thomas Ashworth在一例因转移性癌症而死亡病人血液中发现^[11],而后被正式定义为自发性或因诊疗操作等造成原位癌或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞。研究表明,进入外周血循环的CTCs半衰期极短,仅有1~2.4 h^[12],且部分CTCs在进入血液循环后会进入一种长期休眠状态,遇到合适的条

件才会增殖。CTCs临床应用的难点在于其稀有性和异质性。相较于外周血中众多的血细胞,CTCs的数量很少,一般来说 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 个血细胞中可能存在有1~10个CTCs^[13],目前已有大量的研究注重于CTCs的分离和富集策略。而CTCs的异质性体现在基因和细胞表面分子等方面。Wang等^[14]研究了不同肿瘤类型中CTCs与原发肿瘤细胞的突变情况,发现肺癌中EGFR突变的一致性为75.27%,KRAS突变的一致性为73.77%;在结直肠癌中,KRAS突变的一致性为56.10%,BRAF突变的一致性为46.15%。同样,Pestrin等^[15]在转移性乳腺癌患者中发现,部分患者的CTCs具有PIK3CA突变,并且同一患者体内的CTCs也具有不同的PIK3CA突变状态。因此,目前有多项研究重点利用CTCs来跟踪和检测肿瘤细胞克隆亚群的发育和进化。除基因异质性外,CTCs进入外周血可能会经历一个上皮-间质转换(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)的动态过程^[16],导致细胞表面典型的上皮细胞标志物如上皮细胞黏附分子(EpCAM)、E-钙黏蛋白、细胞角蛋白等表达下调,而间充质细胞标志如波形蛋白等表达上调。因此,外周血中的CTCs可进一步细分为上皮型、间质型和混合型。混合型的CTCs在三种类型CTCs中占绝大多数,这些细胞同时表达上皮细胞特异性蛋白和间充质细胞特异性蛋白,可塑性较强。

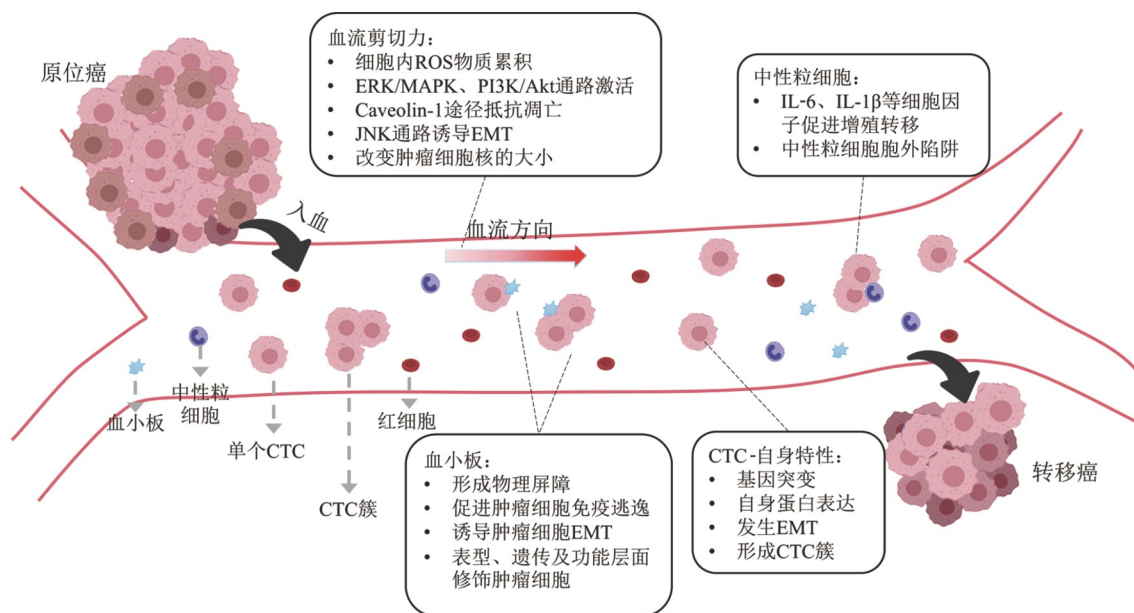


图1 循环肿瘤细胞在外周血中存活转移的机制

CTCs在经历EMT后, 细胞黏附能力下降, 转移性和侵袭性增强, 并且还表现出一定的肿瘤干细胞特性^[17], 即循环肿瘤干细胞。此外, 部分进入外周血中的CTCs可能会聚集形成CTC簇, 即含有两个或两个以上的肿瘤细胞组合。CTC簇在外周血中的数量更少, 仅占有CTCs的2%~5%, 但其转移侵袭能力更强, 据估计CTC簇的转移潜力比单个CTC高23~50倍^[18]。

2 CTCs在外周血中的存活转移机制

2.1 CTCs独特的自身特性使其存活于外周血循环中

目前测序研究表明, 肿瘤细胞的基因突变主要集中在DNA修复、细胞周期增殖、能量代谢、休眠及凋亡抵抗相关等方面^[19,20]。这些有助于CTCs在面临复杂的血流环境时存活转移。Wang等^[21]利用单细胞全基因组测序的方法解析了浸润性乳腺癌患者外周血中CTCs的单核苷酸变异, 发现除典型的基因突变外, 还鉴定出特殊的基因突变*SHC4*, 目前认为该基因可能与调控细胞凋亡、干细胞分化及细胞侵袭迁移等有关。Lawson等^[22]通过CRISPR技术, 在乳腺癌、结直肠癌、肾癌和黑色素瘤中进行筛选, 成功鉴定出182个肿瘤固有免疫逃逸基因, 这些基因的表达会使肿瘤细胞对T细胞的杀伤作用更具有抵抗力。

CTCs可通过改变其自身蛋白的表达逃避免疫监视使其存活于外周血中。最典型的便是肿瘤细胞表面程序性细胞死亡受体配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)的高表达, 可以介导T细胞发挥免疫抑制作用^[23,24], 帮助CTCs逃避免疫监视。值得注意的是, PD-L1一直被认为只是PD-1的膜结合配体。但Gao等^[25]研究发现, PD-L1可易位到细胞核内作为基因转录的调节因子, 促进肿瘤的发生和免疫逃逸, 然而其中的具体机制仍不明确。Steinert等^[26]在结肠癌患者血液中发现, CTCs通过上调CD47的表达和下调钙网蛋白的表达来进行免疫逃逸。CD47被认为是一种可抑制免疫细胞的细胞毒性和吞噬活性的蛋白质, 而钙网蛋白作为一种归巢信标, 可诱导自然杀伤细胞和其他免疫效应细胞强烈的细胞毒性和吞噬反应。Santos等^[27]检测了74例转移性癌症患者中CTC的数量与自

然杀伤细胞的活性, 发现CTCs的数量越多, 自然杀伤细胞的细胞毒性越小。进一步研究发现, 患者体内的抗原提呈细胞的表面Toll样受体表达下降。这提示CTCs可能通过抑制抗原提呈细胞表面Toll样受体的表达从而躲避自然杀伤细胞的杀伤作用。König等^[28]在乳腺癌患者中发现, 人白细胞抗原-G的血浆浓度与具有干性特征的CTCs有一定关联, 说明CTCs可能通过分泌人白细胞抗原-G促进其免疫逃逸。此外, 研究还发现, CTCs可增加死亡受体配体(Fas ligand, FasL)的表达, 保护细胞免受Fas介导的细胞毒性T淋巴细胞杀伤作用, 甚至有可能反过来诱导T细胞凋亡^[29,30]。

EMT是发育和疾病进展的基本过程, 可导致细胞失去分化的上皮特性并获得间充质表型。目前, 关于EMT在肿瘤细胞扩散和转移中的必要性仍有争议, 但一般认为EMT是CTCs形成和转移的关键因素。Yu等^[31]分析了乳腺癌患者CTCs中的EMT标记, 发现大部分的CTCs表达EMT标记, 并在乳腺癌的转移中发挥关键的作用。Liu等^[32]在小鼠模型中也发现EMT表型的CTCs是乳腺癌转移的重要来源, 并可能与肿瘤细胞的化疗耐药有关。而诱导内皮细胞DII4/Notch功能的缺失可以影响EMT的过程, 直接减少血液中CTCs的数量而抑制转移^[33]。这一结果提示, 抑制肿瘤细胞的EMT过程, 或许可以从源头阻断肿瘤转移的发生。此外, 研究表明, EMT可以激活CTCs与生存相关的信号通路, 如PI3K/Akt、EGFR途径或者增强抗凋亡蛋白Bcl-2的表达抵抗失巢凋亡^[34]。EMT相关的转录因子Snail和Twist也能增强CTCs抵抗凋亡的能力。Snail因子不仅可以下调细胞p53介导的细胞凋亡增强肿瘤细胞的抵抗性, 还可以上调基质金属蛋白酶-9的表达增加肿瘤细胞的侵袭性, 同时可激活Wnt信号通路促进肿瘤细胞的增殖生长能力^[35]。Twist因子则有助于抵抗癌基因诱导的细胞早期衰老、凋亡。而未经历EMT的肿瘤细胞获得血管浸润、侵袭转移的能力可能与细胞中心体增殖破坏细胞之间的黏附有关^[36]。目前, 尚不清楚CTCs保持EMT状态以及转移定植后重新恢复上皮表型的潜在机制。

CTC簇的存在也能促进肿瘤细胞的存活和转移。尽管与单个CTC相比, CTC簇在血液循环中的

半衰期更短(6~10 min)^[18],但形成转移的潜力更高,这提示CTCs可能通过相互作用增强其转移能力和保护其免受血流剪切力、失巢凋亡和免疫监视介导的破坏。Hou等^[37]检测了97例小细胞肺癌患者外周血中单个CTC和CTC簇的增殖和凋亡情况,发现单个CTC处于不同程度的增殖状态,少部分CTCs出现凋亡特征,而所有的CTC簇均未出现凋亡特征,细胞增殖标记Ki-67均阴性。这提示CTC簇在外周血中可能处于一种相对静止休眠状态从而保护自身在血液循环中的存活。另一项研究发现,与单个CTC相比,CTC簇除抗凋亡蛋白Bcl-2表达增加外,IL-6和ERCC1的表达也增加^[38]。目前认为IL-6可激活细胞中的促生长和抗凋亡途径,而ERCC1参与细胞的DNA损伤修复。Gkoutela等^[39]发现,CTC簇中细胞干性和增殖相关转录因子结合位点发生特异性的表观甲基化修饰,可促进CTCs的存活转移。目前,尚不清楚处于休眠状态的CTC簇重新获得增殖转移能力的分子机制,以及CTC簇中所有的肿瘤细胞是否具有相同的转移潜力或某些细胞具有更高的转移潜力。

此外,CTC簇还可与血小板、免疫细胞以及与癌症相关的成纤维细胞聚集形成循环肿瘤微栓(circulating tumor microemboli, CTM),从而为CTCs提供了一个局部微环境保护其存活于外周血循环中,并抵抗失巢凋亡的发生。Choi等^[40]通过在小鼠体内注射尿激酶(一种溶栓剂)解离CTM,可显著减少转移的发生。Gkoutela等^[39]同样发现s强心苷通过抑制钠钾泵功能可将CTC簇打散为单个细胞,并且在小鼠模型中转移灶数量减少了约80倍,这些为预防肿瘤转移提供了一种新的思路。

2.2 血流剪切力作为“双刃剑”可促进CTCs在外周血中的存活转移

血流剪切力的生理范围为1~30 dyn/cm²,具体取决于血管的解剖位置,如动脉、静脉或毛细血管^[41]。血流剪切力可破坏大部分进入循环中的肿瘤细胞,但仍有少部分肿瘤细胞可以存活。目前,大部分研究认为这可能与血流剪切力诱导CTCs产生ROS物质有关,其作用机制为适当水平的ROS可以调控细胞信号通路如ERK/MAPK、PI3K/Akt等来促进CTCs的增殖存活^[42]。Yang等^[43]将乳腺癌细胞暴露在1.8 dyn/cm²的流体剪切力下,

期间产生的ROS提高了PI3K调节亚基p85和Akt的磷酸化水平,使肿瘤细胞的I型膜基质金属蛋白酶蛋白水平增加,促进了细胞转移。Li等^[44]发现,血流剪切力可通过Caveolin-1途径调控CTCs抵抗细胞凋亡。血流剪切力还可通过JNK信号诱导CTCs的EMT,促进CTCs的存活^[45]。血流本身的环境也有助于肿瘤细胞ROS的产生。缺氧是已知参与癌症各种标志物调节的一个关键因素,肿瘤细胞可通过重新调整自身的基因表达来适应低氧条件^[46]。当进入富氧的血液中时,肿瘤细胞会促进ROS的产生,激活ERK和Akt的磷酸化^[47]。

此外,Xu等^[48]研究发现,血流剪切力还可直接改变CTCs的细胞核尺寸促进肿瘤细胞存活,具体的机制可能是因为血流剪切力提高了CTCs的组蛋白乙酰化水平进而使细胞核增大。这项研究进一步揭示了CTCs如何在血液剪切力作用下存活转移的机械转导机制,其靶向研究可能为CTCs的清除和转移预防提供新的治疗策略。

2.3 中性粒细胞可促进CTCs在血液中的存活转移

中性粒细胞作为先天性免疫系统的组成部分,是人体抵御感染的第一道防线。Szczerba等^[49]检测了70例乳腺癌患者血中的CTCs,发现患者外周血中有少部分的CTCs(约3.4%)是以CTCs-中性粒细胞簇的形式存在,并且其转移能力更强;进一步发现CTCs-中性粒细胞簇中的CTCs增殖能力比单个CTC或CTC簇更强,认为可能与中性粒细胞分泌的IL-6、IL-1 β 等细胞因子促进肿瘤细胞增殖有关。中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)是中性粒细胞杀灭细菌、病毒及寄生虫等的主要方式。然而研究发现,NETs可以促进肿瘤细胞的转移,其机制可能是NETs释放的高迁移率族蛋白B1激活了肿瘤细胞的TLR-9途径,从而促进其生长增殖和转移^[50,51]。Zhang等^[52]进一步研究发现,CTCs由于NETs的形成而表达高水平的低氧诱导因子-1 α ,进而促进CTCs的侵袭转移。此外,中性粒细胞还可通过产生ROS物质抑制T细胞活性、促进肿瘤细胞与内皮细胞的黏附、通过基质金属蛋白酶-9降解细胞外基质来促进血管生成等方式促进肿瘤细胞的存活、转移^[53]。

2.4 血小板黏附可促进CTCs在血液中的存活转移

血小板是机体参与止血、凝血功能的重要组

成部分。当CTCs从原位肿瘤脱落至外周血循环时,血小板可迅速识别CTCs表达的血小板组织因子Ⅲ/CD142,进而通过GPⅡb-Ⅲa-纤维蛋白原桥和P-选择蛋白附着在CTCs的表面^[54]。越来越多的研究表明,血小板对于CTCs在外周血中的存活和转移具有重要的作用。Gareau等^[55]在鼠乳腺癌模型中发现,使用血小板抑制剂可以显著减少转移灶的数量并延长小鼠生存期。另一项临床研究也证实,使用阿司匹林抑制血小板后可以显著减少结直肠癌患者血中的CTCs数量^[56]。目前认为血小板促进CTCs存活转移的机制主要涉及以下几方面。首先,血小板黏附在CTCs表面形成物理屏障,可保护CTCs免受血流剪切力的物理损伤。其次,血小板分泌的TGF- β 等因子可激活CTCs的Smad、NF- κ B等信号通路,诱导其发生EMT,增强CTCs的转移潜力^[57]。最重要的是,血小板还可以帮助CTCs实现免疫逃逸:(1)血小板黏附在CTCs表面形成的物理屏障可阻碍NK细胞的识别;(2)血小板释放的TGF- β 和PDGF可能会降低NK细胞表面免疫受体NKG2D的表达,抑制NK细胞活性^[58];(3)CTCs可将血小板表达的主要组织相容性复合Ⅰ(major histocompatibility complex I, MHC-I)整合至自身细胞膜,获得“正常”的血小板表型,从而阻止NK细胞的识别,实现免疫逃逸^[59]。Ward等^[60]研究发现,肿瘤细胞表面CD97的表达异常可刺激血小板分泌LPA、ATP等物质,进而促进CTCs的侵袭转移。另外,血小板释放的趋化因子CXCL12也可募集中性粒细胞,增强CTCs的存活和转移。

此外,Rodriguez-Martinez等^[61]发现,血小板可将自身的部分脂质、蛋白质甚至RNA高效转移到CTCs中,诱导肿瘤细胞的结构、遗传和功能发生改变,即血小板可在表型、遗传特性以及功能上修饰肿瘤细胞,从而促进CTCs的存活转移和免疫逃逸。Liu等^[62]同样发现,CTCs可以内吞血小板,并获得RGS18基因。血小板来源的RGS18通过Akt-GSK3 β -CREB信号通路轴促进CTCs中HLA-E的表达,并介导CTCs逃避NK细胞免疫监视。以上研究都表明,血小板在癌症转移过程中扮演着关键角色,阻断CTCs和血小板之间的相互作用是治疗肿瘤转移的重要步骤。但目前对于血小板黏附

的发生是否可存在于原位肿瘤微环境中及其在帮助CTCs最终定居于器官组织中的作用尚未得知。

2.5 其他因素

除中性粒细胞、血小板外,血液中的其他免疫细胞也可参与CTCs的存活转移。Wei等^[63]发现,肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)的存在与结直肠癌细胞的迁移侵袭能力相关。进一步的实验表明,TAM通过调节STAT3/miR-506-3p/FoxQ1轴诱导肿瘤细胞EMT,从而促进肿瘤的侵袭转移。另一项研究发现,CTCs可以募集和分化TAM,诱导TAM分泌OPN、MCP-1、IL-8和MMP-9等细胞因子,进而促进CTCs的增殖和转移^[64]。骨髓来源免疫抑制细胞是一群骨髓来源的未成熟异质性免疫抑制细胞,也被发现可以通过ROS/Notch/Nodal信号通路促进CTCs的增殖转移和免疫逃逸^[65,66]。

淋巴细胞是机体适应性免疫应答的重要组成部分,参与细胞免疫和体液免疫。然而,外周血T淋巴细胞在CTCs免疫监视中的作用尚不明确。在转移性乳腺癌患者中,T淋巴细胞的数量与CTCs的数量呈负相关^[67]。在晚期非小细胞肺癌患者中,调节性T淋巴细胞数量减少有利于CTCs的免疫逃逸^[68]。观察性研究也发现,联合CTC计数和中性粒细胞-淋巴细胞比值可以更好地评估肿瘤患者的预后^[69,70]。这都提示了CTCs与外周血中的T淋巴细胞存在一定关系,CTCs可能通过某种途径调节淋巴细胞,需要进一步的研究来探索CTCs与淋巴细胞相互作用的关系。

3 总结与展望

转移是导致癌症死亡的主要原因,是肿瘤治疗过程中面临的最大挑战。目前,作为引起癌症转移最直接的原因之一,CTCs正逐渐成为人们控制肿瘤转移、研究新疗法的关键靶标。外周血中的CTCs仅有极少部分可以逃避死亡,类似于自然选择,存活的CTCs势必有其独特之处。CTCs可通过产生基因突变、改变自身蛋白的表达等适应复杂的血流环境;加之能与血小板、中性粒细胞、巨噬细胞等相互作用避免自身被破坏,都体现出了CTCs“适者生存”的进化机制。但目前对于CTCs存活转移的确切分子机制、如何从原位癌脱

落入血和穿过血管屏障到达转移灶形成转移等方面仍待研究,比如何种机制在CTCs的存活转移中处于主导地位,以及不同类型肿瘤中CTCs的存活转移机制是否不同?同时,CTC簇的形成机制尚未完全阐明,目前认为细胞之间的黏附蛋白在CTC簇的形成中发挥了重要作用。深入了解这些问题,可以推动CTCs成为防止或者抑制肿瘤转移、开发新的治疗手段和促进肿瘤的精准治疗中的重要一环。此外,外周血中原本应该破坏CTCs的因素,却发挥着一定的保护作用,那么我们推测,外周血中存活的CTCs是否也可以发挥抗肿瘤作用,尤其是CTCs具有“自我播种”的现象,相信随着对CTCs的深入研究,其一定可以为我们所用。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424
- [2] Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 2017, 168(4): 670-691
- [3] Liu Q, Zhang H, Jiang X, et al. Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to “seed and soil” hypothesis. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 176-194
- [4] Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, et al. Systems biology of cancer metastasis. *Cell Syst*, 2019, 9(2): 109-127
- [5] 中华医学会检验医学分会分子诊断学组. 循环肿瘤细胞临床应用与实验室检测专家共识. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(11): 1008-1020
- [6] Tamminga M, de Wit S, Hiltermann TJN, et al. Circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients are associated with worse tumor response to checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 173-181
- [7] Pak S, Suh YS, Lee DE, et al. Association between postoperative detection of circulating tumor cells and recurrence in patients with prostate cancer. *J Urol*, 2020, 203(6): 1128-1134
- [8] Strlic B, Offermanns S. Intravascular survival and extravasation of tumor cells. *Cancer Cell*, 2017, 32(3): 282-293
- [9] Yang C, Xia BR, Jin WL, et al. Circulating tumor cells in precision oncology: clinical applications in liquid biopsy and 3D organoid model. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 341-353
- [10] Hamza B, Miller AB, Meier L, et al. Measuring kinetics and metastatic propensity of CTCs by blood exchange between mice. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5680
- [11] Sharma S, Zhuang R, Long M, et al. Circulating tumor cell isolation, culture, and downstream molecular analysis. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1063-1078
- [12] Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 573-581
- [13] Tibbe AGJ, Miller MC, Terstappen LWMM. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry*, 2007, 71A(3): 154-162
- [14] Wang Q, Zhao L, Han L, et al. The discordance of gene mutations between circulating tumor cells and primary/metastatic tumor. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, 15: 21-29
- [15] Pestrin M, Salvianti F, Galardi F, et al. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol*, 2015, 9(4): 749-757
- [16] Pal M, Chen H, Lee BH, et al. Epithelial-mesenchymal transition of cancer cells using bioengineered hybrid scaffold composed of hydrogel/3D-fibrous framework. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8997-9007
- [17] Lowes LE, Allan AL. Circulating tumor cells and implications of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Adv Clin Chem*, 2018, 83: 121-181
- [18] Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 2014, 158(5): 1110-1122
- [19] Vishnoi M, Liu NH, Yin W, et al. The identification of a TNBC liver metastasis gene signature by sequential CTC-xenograft modeling. *Mol Oncol*, 2019, 13(9): 1913-1926
- [20] Kanwar N, Hu P, Bedard P, et al. Identification of genomic signatures in circulating tumor cells from breast cancer. *Int J Cancer*, 2015, 137(2): 332-344
- [21] Wang Y, Guo L, Feng L, et al. Single nucleotide variant profiles of viable single circulating tumour cells reveal CTC behaviours in breast cancer. *Oncol Rep*, 2018, :
- [22] Lawson KA, Sousa CM, Zhang X, et al. Functional genomic landscape of cancer-intrinsic evasion of killing by T cells. *Nature*, 2020, 586(7827): 120-126
- [23] Kallergi G, Vetsika EK, Aggouraki D, et al. Evaluation of PD-L1/PD-1 on circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 2018, 10: 175883401775012
- [24] Guibert N, Delaunay M, Lusque A, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer*, 2018, 120: 108-112
- [25] Gao Y, Nihira NT, Bu X, et al. Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the

- efficacy of anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(9): 1064-1075
- [26] Steinert G, Schölch S, Niemietz T, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res*, 2014, 74(6): 1694-1704
- [27] Santos MF, Mannam VKR, Craft BS, et al. Comparative analysis of innate immune system function in metastatic breast, colorectal, and prostate cancer patients with circulating tumor cells. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(3): 367-374
- [28] König L, Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, et al. The prognostic impact of soluble and vesicular HLA-G and its relationship to circulating tumor cells in neoadjuvant treated breast cancer patients. *Hum Immunol*, 2016, 77(9): 791-799
- [29] 郭存丽, 毕玉美, 刘钊, 等. 肝细胞癌患者外周血死亡受体表达及其与CD8⁺T 淋巴细胞凋亡的相关性. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(2): 125-129
- [30] Modiano JF, Bellgrau D. Fas ligand based immunotherapy: a potent and effective neoadjuvant with checkpoint inhibitor properties, or a systemically toxic promoter of tumor growth. *Discov Med*, 2016, 21(114): 109-116
- [31] Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 2013, 339(6119): 580-584
- [32] Liu X, Li J, Cadilha BL, et al. Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Sci Adv*, 2019, 5(6): eaav4275
- [33] Mendonça L, Trindade A, Carvalho C, et al. Metastasis is impaired by endothelial-specific Dll4 loss-of-function through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and reduction of cancer stem cells and circulating tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, 2019, 36(4): 365-380
- [34] Cao Z, Livas T, Kyprianou N. Anoikis and EMT: lethal "Liaisons" during cancer progression. *Crit Rev Oncog*, 2016, 21(3-4): 155-168
- [35] Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 91-100
- [36] Godinho SA, Picone R, Burute M, et al. Oncogene-like induction of cellular invasion from centrosome amplification. *Nature*, 2014, 510(7503): 167-171
- [37] Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2012, 30(5): 525-532
- [38] Murlidhar V, Reddy RM, Fouladdel S, et al. Poor prognosis indicated by venous circulating tumor cell clusters in early-stage lung cancers. *Cancer Res*, 2017, 77(18): 5194-5206
- [39] Gkoutela S, Castro-Giner F, Szczerba BM, et al. Circulating tumor cell clustering shapes DNA methylation to enable metastasis seeding. *Cell*, 2019, 176(1-2): 98-112
- [40] Choi JW, Kim JK, Yang YJ, et al. Urokinase exerts antimetastatic effects by dissociating clusters of circulating tumor cells. *Cancer Res*, 2015, 75(21): 4474-4482
- [41] Papaioannou TG, Stefanadis C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol*, 2005, 46(1): 9-15
- [42] Ma S, Fu A, Chiew GGY, et al. Hemodynamic shear stress stimulates migration and extravasation of tumor cells by elevating cellular oxidative level. *Cancer Lett*, 2017, 388: 239-248
- [43] Yang H, Guan L, Li S, et al. Mechanosensitive caveolin-1 activation-induced PI3K/Akt/mTOR signaling pathway promotes breast cancer motility, invadopodia formation and metastasis *in vivo*. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16227-16247
- [44] Li S, Chen Y, Zhang Y, et al. Shear stress promotes anoikis resistance of cancer cells via caveolin-1-dependent extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3730-3743
- [45] Xin Y, Li K, Yang M, et al. Fluid shear stress induces EMT of circulating tumor cells via JNK signaling in favor of their survival during hematogenous dissemination. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8115-8131
- [46] Saxena K, Jolly MK, Balamurugan K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: emerging culprits in metastasis. *Transl Oncol*, 2020, 13(11): 100845-100858
- [47] Bartkowiak K, Koch C, Gärtner S, et al. *In vitro* modeling of reoxygenation effects on mRNA and protein levels in hypoxic tumor cells upon entry into the bloodstream. *Cells*, 2020, 9(5): 1316-1332
- [48] Xu Z, Li K, Xin Y, et al. Fluid shear stress regulates the survival of circulating tumor cells via nuclear expansion. *J Cell Sci*, 2022, 135(10): jcs259586
- [49] Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*, 2019, 566(7745): 553-557
- [50] Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*, 2013, 123(8): 3446-3458
- [51] Park J, Wsocki RW, Amoozgar Z, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular

- DNA traps. *Sci Transl Med*, 2016, 8(361): 361ra138
- [52] Zhang Y, Wang C, Li W, et al. Neutrophil cytopharmaceuticals suppressing tumor metastasis via inhibiting hypoxia-inducible factor-1 α in circulating breast cancer cells. *Adv Healthcare Mater*, 2022, 11(3): 2101761
- [53] Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res*, 2016, 76(6): 1367-1380
- [54] Lou XL, Sun J, Gong SQ, et al. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(5): 450-460.
- [55] Gareau AJ, Brien C, Gebremeskel S, et al. Ticagrelor inhibits platelet-tumor cell interactions and metastasis in human and murine breast cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2018, 35(1-2): 25-35
- [56] Yang L, Lv Z, Xia W, et al. The effect of aspirin on circulating tumor cells in metastatic colorectal and breast cancer patients: a phase II trial study. *Clin Transl Oncol*, 2018, 20(7): 912-921
- [57] Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 576-590
- [58] Labelle M, Hynes RO. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov*, 2012, 2(12): 1091-1099
- [59] Placke T, Örgel M, Schaller M, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res*, 2012, 72(2): 440-448
- [60] Ward Y, Lake R, Faraji F, et al. Platelets promote metastasis via binding tumor CD97 leading to bidirectional signaling that coordinates transendothelial migration. *Cell Rep*, 2018, 23(3): 808-822
- [61] Rodriguez-Martinez A, Simon-Saez I, Perales S, et al. Exchange of cellular components between platelets and tumor cells: impact on tumor cells behavior. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2150-2161
- [62] Liu X, Song J, Zhang H, et al. Immune checkpoint HLA-E:CD94-NKG2A mediates evasion of circulating tumor cells from NK cell surveillance. *Cancer Cell*, 2023, 41(2): 272-287
- [63] Wei C, Yang C, Wang S, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 64-86
- [64] Hamilton G, Rath B, Klameth L, et al. Small cell lung cancer: recruitment of macrophages by circulating tumor cells. *Oncoimmunology*, 2015, 5(3): e1093277
- [65] Sprouse ML, Welte T, Boral D, et al. PMN-MDSCs enhance CTC metastatic properties through reciprocal interactions via ROS/Notch/Nodal signaling. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1916-1936
- [66] Liu Q, Liao Q, Zhao Y. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) facilitate distant metastasis of malignancies by shielding circulating tumor cells (CTC) from immune surveillance. *Med Hypotheses*, 2016, 87: 34-39
- [67] De Giorgi U, Mego M, Scarpi E, et al. Relationship between lymphocytopenia and circulating tumor cells as prognostic factors for overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 2012, 12(4): 264-269
- [68] Ye L, Zhang F, Li H, et al. Circulating tumor cells were associated with the number of T lymphocyte subsets and NK cells in peripheral blood in advanced non-small-cell lung cancer. *Dis Markers*, 2017, 2017: 1-6
- [69] Chong W, Zhang Z, Luo R, et al. Integration of circulating tumor cell and neutrophil-lymphocyte ratio to identify high-risk metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 655-666
- [70] Ni HH, Yang XH, Yang CL, et al. Combination of preoperative circulating tumor cell count and neutrophil-lymphocyte ratio for prognostic prediction in hepatocellular carcinoma patients after curative hepatectomy. *Biomed Res Int*, 2022. doi: 10.1155/2022/7305953