

## 外周血循环肿瘤细胞检测在筛查卵巢上皮性癌中的应用

陈志强<sup>1</sup>, 米贤军<sup>1</sup>, 陈 昂<sup>1</sup>, 苏年华<sup>2</sup>, 黄华勇<sup>1</sup>, 段立锋<sup>1</sup>, 邓文同<sup>1</sup>, 代新珍<sup>1</sup>

(1. 南方医科大学附属中山博爱医院病理科, 广东 中山 528400; 2. 中山大学附属中山医院肿瘤研究所, 广东 中山 528403)

**摘要:**【目的】检测健康女性、卵巢良性上皮性肿瘤患者及卵巢恶性上皮性癌患者(含各分期)外周血循环肿瘤细胞(CTC)阳性率及数量差异,初步评估CTC检测在卵巢恶性上皮性癌筛查中的临床意义。【方法】选取中山市博爱医院、中山大学附属中山医院2016年1月至2017年12月期间,151例健康女性体检者(正常组)、138例卵巢上皮性良性肿瘤患者(良性组)、92例卵巢上皮性癌,含所有类型及临床分期的卵巢上皮性癌患者(恶性组)为研究对象,卵巢肿瘤患者以病理组织学结果为金标准,采集患者术前和正常组静脉血液样本,采用免疫磁珠微粒阴性富集法和免疫荧光原位杂交法检测研究对象的CTC,使用SPSS 20.0比较3组外周血CTC阳性率及数量差异;统计分析CTC检测诊断卵巢上皮性癌的灵敏度、特异度、符合率、阳性预测值和阴性预测值,综合评估CTC检测诊断卵巢上皮性癌的价值。【结果】①正常组、良性组与恶性组CTC阳性率分别为0、0和90.22%,总体差异具有统计学意义( $P < 0.001$ );恶性组与正常组、恶性组与良性组相比差异均具有统计学意义(均 $P < 0.001$ )。②恶性组I~IV期CTC阳性率分别为81.25%、89.47%、90.32%和96.15%,差异无统计学意义( $P = 0.47$ )。③正常组、良性组与恶性组CTC均数分别为0、(0.02 ± 0.15)和(8.27 ± 10.88)个,总体差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),良性组与正常组间无差异( $P = 0.97$ ),恶性组与良性组、恶性组与正常组差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$ )。④恶性组I~IV期CTC均数分别为(2.13 ± 1.31)个、(2.68 ± 1.53)个、(5.90 ± 2.95)个、(19.35 ± 15.19)个,总体差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),除III期与II期( $P = 0.19$ )、III期与I期( $P = 0.14$ )、II期与I期( $P = 0.84$ )差异无统计学意义外,其余各期之间均有统计学意义(均 $P < 0.001$ )。⑤CTC诊断卵巢上皮性癌的灵敏度、特异度、符合率分别为90.22%、100%、97.64%。【结论】卵巢上皮性癌患者CTC阳性率与均数均为最高;CTC均数与卵巢上皮性癌临床分期具有相关性,提示CTC在卵巢上皮性癌的早期诊断及临床分期预测中具有较高的临床价值。

**关键词:**循环肿瘤细胞;免疫磁珠阴性富集;免疫荧光原位杂交;卵巢上皮性癌

中图分类号:R361 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2018)06-0891-06

### Preliminary Study of Peripheral Blood Circulating Tumor Cell Detection in Screening of Ovarian Epithelial Cancer

CHEN Zhi-qiang<sup>1</sup>, MI Xian-jun<sup>1</sup>, CHEN Ang<sup>1</sup>, SU Nian-hua<sup>2</sup>, HUANG Hua-yong<sup>1</sup>, DUAN Li-feng<sup>1</sup>,  
DENG Wen-tong<sup>1</sup>, DAI Xin-zhen<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Zhongshan BOAI Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan 528400;  
2. Institute of Cancer Research, Zhongshan Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Zhongshan 528403, China)

Corresponding to: HUANG Hua-yong; Email: 340477619@qq.com

**Abstract:** 【Objective】 To detect the positive rate and number of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of healthy women, benign epithelial ovarian tumors and patients with ovarian malignant epithelial cancer (including all stag-

收稿日期:2017-11-27

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2017321);广东省中山市社会公益科技研究专项(2018B1035);广东省中山市卫生和计划生育局医学科研立项(2017J111);广东省中山市卫生和计划生育局医学科研立项(2014J128)

作者简介:陈志强,副主任技师,研究方向:病理学技术,E-mail:765228687@qq.com;黄华勇,通信作者,研究方向:妇产科病理,E-mail:340477619@qq.com

es), and to preliminarily evaluate the clinical significance of CTC detection in ovarian malignant epithelial cancer screening. 【Methods】 This project was achieved by collecting 151 female controls (normal group), 138 cases of benign ovarian epithelial tumor (benign group) and 92 cases of ovarian epithelial cancer (epithelial ovarian cancer including all types and clinical stages) patients (malignant group), sent from Zhongshan Boai Hospital and Zhongshan Hospital from January 2016 to December 2017. Patients with ovarian cancer were detected by gold pathological standard. Venous blood samples were collected before surgery in each group. Negative enrichment of immunomagnetic beads and immunofluorescence in situ hybridization were using. Then we compared positive rate of CTC in peripheral blood and the number of differences; statistical analysis CTC detection and diagnosis ovarian epithelial cancer, sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value, the value of comprehensive evaluation of CTC detection in the diagnosis of ovarian epithelial cancer. 【Results】 ① The positive rates of CTC in the normal group, the benign group and the malignant group were 0, 0 and 90.22%, respectively. The overall difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ); The difference between the malignant group and the normal group, the malignant group and the benign group was statistically significant ( $P < 0.001$ ). ② The positive rates of CTC in stage I-IV group were 81.25%, 89.47%, 90.32% and 96.15%. The difference was not statistically significant ( $P = 0.47$ ). ③ The average number of CTC in the normal group, the benign group and the malignant group were 0,  $(0.02 \pm 0.15)$ ,  $(8.27 \pm 10.88)$ . The total difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). There was no difference between the benign group and the normal group ( $P = 0.97$ ), but were significant differences between the malignant group and the benign group, the malignant group and the normal group (all  $P < 0.001$ ). ④ The mean CTC in stage I-IV of malignant group were  $(2.13 \pm 1.31)$ ,  $(2.68 \pm 1.53)$ ,  $(5.90 \pm 2.95)$ , and  $(19.35 \pm 15.19)$ , respectively. The difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). There was no significant difference between stage III and stage II ( $P = 0.19$ ), stage III and stage I ( $P = 0.14$ ), stage II and stage I ( $P = 0.84$ ), and the rest periods were statistically significant ( $P < 0.001$ ). ⑤ The sensitivity, specificity, and accuracy of CTC diagnosis in ovarian epithelial cancer, were 90.22%, 100%, and 97.64%. 【Conclusion】 The positive rate and the average number of CTC in ovarian epithelial cancer patients are the highest, and the mean number of CTC is correlated with the clinical stage of ovarian epithelial cancer. It indicates that CTC has high clinical value in the early diagnosis and clinical stage prediction of ovarian epithelial cancer.

**Key words:** circulating tumor cells; negative enrichment of immunomagnetic beads; immunofluorescence in situ hybridization; ovarian epithelial cancer

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(6): 891-896]

卵巢上皮性癌恶性程度极高,死亡率位于妇科癌症之首。其早期症状并不明显,70%的患者被发现时往往都已经进入中晚期,五年生存率仅为30%左右<sup>[1]</sup>。早期卵巢上皮性癌的五年生存率为80%~90%,若能及早诊治可有效提高五年生存率。目前尚无灵敏而特异的筛查方法,因此迫切需要寻找一种无创性、敏感性好、特异性高、便于临床应用的筛查方法。随着现代医学的快速发展,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)检测技术的出现为卵巢上皮性癌筛查方法带来了希望,CTC是指进入到血液循环中的肿瘤细胞。Cui等<sup>[2]</sup>研究证实CTC可用于实时监测卵巢上皮性癌的治疗反应及预后。Blassl等<sup>[3]</sup>研究认为CTC可用于预测卵巢上皮性癌远处转移和复发。Ning

等<sup>[4]</sup>研究发现CTC对上皮来源恶性肿瘤的早期诊断具有一定价值。因此,我们有理由猜测:在健康女性体检者、卵巢上皮性良性肿瘤患者、卵巢上皮性癌患者外周血中CTC检测的阳性率及数量应该是有差异的。本研究通过检测研究对象的CTC水平,初步探讨CTC在卵巢上皮性癌筛查中的作用,拟为临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本来源

使用随机数字表进行随机选取2016年1月至2017年12月期间于中山市博爱医院、中山大学附属中山医院的151例健康女性体检者(正常组)、

138例卵巢上皮性良性肿瘤患者(良性组)、92例卵巢上皮性癌患者(恶性组),所有研究对象均未合并其他肿瘤,组织学病理结果经2位病理医师确诊。健康女性体检者年龄22.9~67.8岁,平均年龄(42.9±7.2)岁。卵巢上皮性良性肿瘤患者年龄25.3~66.4岁,平均年龄(46.9±6.9)岁。卵巢上皮性癌患者年龄33.6~78.3岁,平均年龄(48.1±7.5)岁。三组患者年龄差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

卵巢上皮性肿瘤的入选依据世界卫生组织(WHO)2014年制定的分类执行,包括:浆液性肿瘤、黏液性肿瘤、子宫内膜样肿瘤、透明细胞肿瘤、Brenner肿瘤、浆-黏液性肿瘤、未分化癌<sup>[5]</sup>。卵巢上皮性癌肿瘤分期按照国际妇产科联盟(FIGO)的手术病理分期(2015年)<sup>[6]</sup>:I期16例、II期19例、III期31例、IV期26例。本研究经中山市博爱医院伦理委员会认可、征得患者同意及签署知情同意书。采集患者术前和正常组静脉血液样本4 mL放入ACD抗凝管内,于室温(15~30℃)保存,24 h内送检。

## 1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂及仪器 人外周血白细胞去除试剂盒、荧光原位杂交样品处理试剂盒均购自江苏莱尔生物医药科技有限公司。TDH-500杂交仪购自杭州奥盛仪器有限公司。尼康ECLIPSE 80i荧光显微镜购自日本奥林巴斯株式会社。

1.2.2 CTC分离富集 参照参考文献<sup>[3]</sup>采用阴性免疫磁微粒法:充分混匀全血标本,取4 mL全血至50 mL离心管中。用CS1缓冲液将全血的体积补充至45 mL。离心,去上清,留10 mL于离心管,混匀细胞。将上述10 mL血混匀后,加CS2工作液至45 mL。将离心管混匀、离心,弃上清至3 mL,补加CS1至45 mL。离心,弃上清至5 mL,用1 mL加样器轻柔吹打重悬沉淀( $\times 650 g$ ,室温,5 min)。洗涤免疫磁珠微粒,按每人份150  $\mu$ L加入前期处理好的样本中,并充分混匀。于新50 mL离心管中加入3 mL CS3,将所有液体轻轻叠加到CS3顶层,离心后吸取最上2层溶液移至新的15 mL离心管内,加CS1至14 mL,离心,弃上清至500  $\mu$ L,加CS1至1 mL,混匀后转移至新2 mL离心管中,置于磁力架上2 min,离心( $\times 200 g$ ,室温,3 min),弃上清至100  $\mu$ L,混匀,涂片,自然干燥。

1.2.3 免疫荧光原位杂交(imFISH)检测分析 ①

FISH操作:预固定、洗涤、脱水、盖片、封片、杂交、洗片、洗涤。② 免疫荧光染色操作:洗片、孵育、洗片。③ 复染:复染、盖片。实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 CTC阳性判定标准 参阅相关文献<sup>[7]</sup>:将CEP8(8号染色体探针) $>2$ 个信号点,DAPI阳性、CD45阴性的细胞定义为CTC。以CTC数量 $\geq 2$ 个的研究对象定义为CTC阳性患者。

## 1.3 统计学处理

使用SPSS 20.0统计软件进行数据处理。计数资料的统计学分析:CTC阳性率的比较采用 $\chi^2$ 检验,比较各组CTC阳性率的总体差异检验标准取 $\alpha=0.05$ 。恶性组不同分期的组间比较时检验标准取 $\alpha'=0.017(0.05/3)$ 。计量资料的统计学分析:CTC均数的比较采用单因素方差分析,多个样本均数的两两比较采用SNK法。以上检验的侧别均为双侧, $P<0.05$ 示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卵巢上皮性癌患者CTC在荧光显微镜下的特征

肿瘤细胞膜完整,DAPI阳性、CEP8阳性( $>2$ 个信号点,图1)且CD45阴性。图中蓝色部分为肿瘤细胞核DAPI染色阳性,红色部分为CEP8探针表达阳性图片。

### 2.2 三组研究对象外周血CTC阳性率的比较

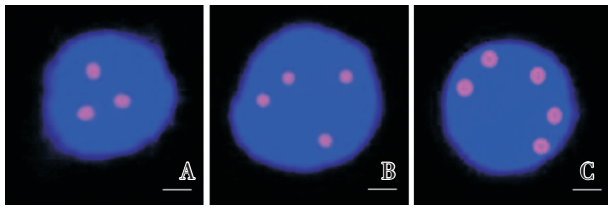
正常组、良性组与恶性组CTC阳性率(表1),总体差异具有统计学意义( $\chi^2=333.35$ , $P<0.001$ );正常组与良性组之间无差别;恶性组与正常组相比差异具有统计学意义( $\chi^2=206.90$ , $P<0.001$ );恶性组与良性组相比差异具有统计学意义( $\chi^2=206.90$ , $P<0.001$ )。提示CTC阳性患者仅存在于卵巢恶性组,在卵巢正常组和卵巢良性组中并不存在,CTC诊断卵巢上皮性癌的特异性强。

### 2.3 恶性组各临床分期外周血CTC阳性率比较

恶性组各临床分期外周血CTC阳性率(表2),总体差异不具有统计学意义( $\chi^2=2.51$ , $P=0.47$ )。说明CTC的阳性率跟卵巢上皮性癌临床分期无关。

### 2.4 三组研究对象外周血CTC均数的比较

正常组、良性组与恶性组CTC均数(表3),方



A: CTC in patients with ovarian epithelial cancer (triploid); B: CTC in patients with ovarian epithelial cancer (tetraploid); C: CTC in patients with ovarian epithelial cancer (five ploidy). bar = 50  $\mu\text{m}$

图1 卵巢上皮性癌患者外周血 CTC 在荧光显微镜下的共同特征

Fig.1 Common characteristics of peripheral blood CTC in patients with ovarian epithelial cancer under fluorescence microscopy

表1 三组研究对象外周血 CTC 阳性率比较

Table 1 Comparison of CTC positive rates in peripheral blood of three groups of subjects

	Negative( <i>n</i> )	Positive( <i>n</i> )	Positive rate(%)
Normal group	151	0	0 <sup>1)</sup>
Benign group	138	0	0 <sup>1)</sup>
Malignant group	9	83	90.22

1) Comparison with malignant group,  $P < 0.017$ .

表2 恶性组各临床分期外周血 CTC 阳性率比较

Table 2 Comparison of CTC positive rates of peripheral blood in each clinical stage of the malignant group

FIGO stage	Negative	Positive (positive rate)
I	3	13(81.25)
II	2	17(89.47)
III	3	28(90.32)
IV	1	25(96.15)

差分析结果显示:  $F = 83.54$ ,  $P < 0.001$ , 差异有统计学意义, 可认为各组外周血中 CTC 均数不全相同, 需进一步做多重比较。SNK 法检验结果显示: 正常组与良性组间无差异 ( $P = 0.97$ ), 恶性组与良性

组、恶性组与正常组外周血中 CTC 均数差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ), 以恶性组均数最高, 健康体检组均数最低。

表3 三组研究对象外周血 CTC 均数的比较

Table 3 Comparison of the average number of peripheral blood CTC in three groups

	Total ( <i>n</i> )	CTC number ( $\bar{x} \pm s$ )
Normal group	151	0
Benign group	138	$0.02 \pm 0.15$
Malignant group	92	$8.27 \pm 10.88$

## 2.5 卵巢上皮性癌患者各临床分期外周血 CTC 均数比较

卵巢上皮性癌患者各临床分期外周血 CTC 均数 (表4), 方差分析结果显示:  $F = 21.93$ ,  $P < 0.001$ , 差异有统计学意义, 可认为卵巢上皮性癌患者各临床分期周血中 CTC 均数不全相同, 需进一步做多重比较。SNK 法检验结果显示: 除 III 期与 II 期 ( $P = 0.19$ )、III 期与 I 期 ( $P = 0.14$ )、II 期与 I 期 ( $P = 0.84$ ) 无统计学差异外, 其余各期之间均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ), 以 IV 期均数最高, I 期均数最低。

表4 卵巢上皮性癌患者各临床分期外周血 CTC 均数比较

Table 4 Comparison of peripheral blood CTC in each clinical stage of ovarian epithelial cancer patients

FIGO stage	Total ( <i>n</i> )	CTC number ( $\bar{x} \pm s$ )
I	16	$2.13 \pm 1.31$
II	19	$2.68 \pm 1.53$
III	31	$5.90 \pm 2.95$
IV	26	$19.35 \pm 15.19$

## 2.6 CTC 发现卵巢上皮性癌的价值

以组织病理诊断结果为金标准, CTC 检测发现卵巢上皮性癌的灵敏度、特异度、符合率如表5, 可见在卵巢上皮性癌的诊断中, CTC 表现出了具有较高的价值。

表5 CTC 检出卵巢上皮性癌情况  
Table 5 Checking early cervical invasive by CTC

Test method/Index	CTC test	
	Positive	Negative
Gold standard	Positive	83
	Negative	0
Total	83	298
Sensitivity	90.22%	
Specificity	100%	
Coincidence rate	97.64%	

### 3 讨论

卵巢上皮性癌是妇科生殖系统的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率分别在妇科生殖系统疾病中占第三位和第一位<sup>[8]</sup>。研究证实卵巢上皮性癌筛查确实对女性有所获益,可有效降低卵巢上皮性癌的死亡率,挽救女性生命<sup>[9-10]</sup>。目前临床上采用卵巢上皮性癌肿瘤标志物及超声这两种方式,作为卵巢上皮性癌的早期筛查手段,CA125诊断的敏感性较高,但特异性较差。超声检查可早期发现卵巢病变但不能明确鉴别卵巢肿瘤的性质<sup>[11]</sup>。鉴于目前筛查方案的局限性,寻找一种敏感而特异、便于临床应用的卵巢上皮性癌筛查方法具有十分重要的意义。

作为液态活检的CTC是一种无创性的检测手段,CTC可以通过上皮-间质转换(EMT)进入患者外周血中进行扩散转移<sup>[12]</sup>,与外周血的血细胞比较,CTC具有体积大、密度小、刚性低和膜电容高等属性<sup>[13-14]</sup>,这类属性成为外周血中分离和富集CTC理论基础。

针对CTC本身具有稀有性(1个/( $10^5 \sim 10^9$ 个)、抗原异质性和非典型形态等特点,本研究使用采用阴性免疫磁微粒法分离和免疫荧光原位杂交(imFISH)检测分析相结合,前者不依赖肿瘤细胞标示物,通用于所有实体肿瘤,适用于所有非血源性循环稀有细胞的富集,富集后的细胞处于自然状态,便于进行一系列后续检测。后者避开上皮标志物,提高灵敏性、特异性,排除血源性异常细胞干扰。两者的结合建立了兼具细胞形态及核

遗传变异的精准CTC鉴别方法,以保证实验的严谨性和可信度。

从荧光显微镜下分析:肿瘤细胞膜完整,荧光信号是耀眼的,探针定位准确、背景干净,说明该技术方法检测出来的CTC可信且清晰易见。本研究入选标准:研究对象除具有卵巢原发性肿瘤外无合并身体其他肿瘤。结合表1、2,从定性角度分析:CTC阳性患者仅存在于卵巢恶性组,在卵巢正常组和卵巢良性组中并不存在,CTC诊断卵巢上皮性癌的特异性强,而且CTC的阳性率跟卵巢上皮性癌临床分期无关。说明CTC在卵巢上皮性癌的诊断,甚至是早期病例的预测中具有较好的价值。若今后的实验中能将收集到的CTC进行肿瘤细胞抗原分析就能从另外一个角度证实其特异性,以区别于血管内皮细胞、纤维细胞和其它上皮细胞。结合表3、4,从定量角度分析:CTC的均数在恶性组均数最高,正常组均数最低。CTC均数在卵巢上皮性癌临床分期中IV期最高,I期最低。说明,CTC在卵巢上皮性癌的诊断,尤其是卵巢上皮性癌临床分期预测中灵敏度高。综上所述,从定性、定量两个角度来分析,卵巢上皮性癌患者CTC阳性率与均数均为最高;CTC均数与卵巢上皮性癌临床分期具有相关性,提示CTC在卵巢上皮性癌的早期诊断及临床分期预测中具有较高的临床价值。

为验证CTC检测结果与金标准的差异,本研究的卵巢肿瘤患者以病理组织学结果为金标准,表5从灵敏度、特异度、符合率等,列举了CTC的诊断性能,笔者认为:CTC作为一种无创、高效的卵巢上皮性癌筛查方法,有利于卵巢上皮性癌的诊断,与Ilie等<sup>[15]</sup>研究报道CTC在早期非小细胞肺癌诊断中具有重要的临床价值的结论基本一致。

本研究在样本量偏小的情况下初步探讨了CTC在卵巢上皮性癌中筛查中的作用,提示CTC作为一种无创、新型、便捷的卵巢上皮性癌早期筛查方法,在临床应用是具有一定价值的。进入全身血液循环中的肿瘤细胞代表了全面的、现在的肿瘤生长状况和信息,更精准地反映了肿瘤发生和发展的即时信息,可作为伴随诊断方式,即时获取肿瘤最全面的分子信息,以便更客观的指导临床治疗。后续的研究中我们将在扩大样本量、进一步深入研究CTC与卵巢上皮性癌患者

年龄、绝经状态和临床病理特征的相关性,以期对卵巢上皮性癌重要生物学及物理特性进入更

深层次的了解,也许对于肿瘤的精准治疗具有更为深广的意义。

#### 参考文献

- [1] Bogani G, Matteucci L, Tamberi S, et al. The impact of number of cycles of neoadjuvant chemotherapy on survival of patients undergoing interval debulking surgery for stage iii-c-iv unresectable ovarian cancer: results from a multi-institutional study [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27(9): 1856-1862.
- [2] Cui L, Kwong J, Wang CC. Prognostic value of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Ovarian Res*, 2015, 8(1): 38-45.
- [3] Blassl C, Kuhlmann JD, Webers A, et al. Gene expression profiling of single circulating tumor cells in ovarian cancer—Establishment of a multi-marker gene panel [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(7): 1030-1042.
- [4] Ning N, Zhan T, Zhang Y, et al. Improvement of specific detection of circulating tumor cells using combined CD45 staining and fluorescence in situ hybridization [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 433(9): 69-75.
- [5] Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, et al. WHO classification of tumours of female reproductive organs [M]. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2014.
- [6] Prat J, Belhadj H, Berek J, et al. Abridged republication of FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2015, 36(4): 367-369.
- [7] 田晓坤, 李玉明, 胡宝光, 等. 胃癌患者外周血 Cytel 循环肿瘤细胞检测及临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(2): 208-210.  
Tian XK, Li YM, Hu BG, et al. Detection and clinical significance of Cytel circulating tumor cells in peripheral blood of patients with gastric cancer [J]. *Chin J Exp Surg*, 2017, 34(2): 208-210.
- [8] Wang K, Guan C, Yu J, et al. Prognostic value of HER-2/neu expression in epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 75528-75543.
- [9] 岳娟, 刘菲, 李艳红. 卵巢上皮性癌早期诊断的血清肿瘤标记物研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2015, 42(5): 560-563.  
Yue J, Liu F, Li YH. Research progress in serum tumor markers of early diagnosis of ovarian cancer [J]. *J Int Obstetr Gynecol*, 2015, 42(5): 560-563.
- [10] Menon U, Griffin M, Gentry-Maharaj A. Ovarian cancer screening—current status, future directions [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 132(2): 490-495.
- [11] Yang L, Zhang B, Xing G, et al. Neoadjuvant chemotherapy versus primary debulking surgery in advanced epithelial ovarian cancer: A meta-analysis of peri-operative outcome [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186725.
- [12] Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, et al. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(1): R15.
- [13] Sun D, Chen Z, Wu M, et al. Nanomaterial-based Microfluidic Chips for the Capture and Detection of Circulating Tumor Cells [J]. *Nanotheranostics*, 2017, 1(4): 389-402.
- [14] 王振丹, 赵文华, 李胜, 等. 循环肿瘤细胞检测方法研究现状 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(17): 1391-1394.  
Wang ZHD, Zhao WH, Li SH, et al. Research status of circulating tumor cell detection methods [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2014, 21(17): 1391-1394.
- [15] 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.

(编辑 余 菁)