

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.12.008

基于物理过滤与原位杂交技术的骨肉瘤循环肿瘤细胞检测及临床意义*

李明辉¹ 鲁亚杰¹ 张浩强² 高鹏¹ 杨迪¹ 陈国景¹ 王臻^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032; 2 兰州军区兰州总医院骨科中心 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的:探寻一种有效地从骨肉瘤患者外周血中富集并鉴定循环肿瘤细胞的方法。方法:利用基于物理过滤与原位杂交结合的技术对骨肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞分离并鉴定。采用直径 8 μm 纳米滤膜截留外周血中体积较大的白细胞及肿瘤细胞,利用多重 RNA 原位杂交技术检测 CD45、EpCAM、CK8、CK18、CK19、vimentin 及 twist 基因表达,并根据结果对滤膜截留下的细胞进行鉴定并分型。结果:本研究所使用的基于物理过滤与原位杂交技术的循环肿瘤细胞检测方法可以高效地从骨肉瘤患者外周血中富集骨肉瘤循环肿瘤细胞,该方法富集细胞的效率超过 90%。15 例健康志愿者中 1 例志愿者检测结果阳性。20 例纳入研究的骨肉瘤患者中 19 例患者外周血中检测出 CTC,CTC 计数范围为 0-20。肿瘤转移患者外周血 CTC 计数为 11.33±5.88,肿瘤未转移患者外周血 CTC 计数为 4.36±2.98,差异具有统计学意义(P=0.0022)。肿瘤转移患者外周血间质型 CTC 比例高于肿瘤未转移患者(P=0.0031)。结论:利用基于物理过滤与原位杂交结合的技术可以有效地检测骨肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞。CTC 检测结果可以作为辅助判断肿瘤转移情况的辅助指标。

关键词: 循环肿瘤细胞;骨肉瘤;液体活检;肿瘤转移

中图分类号: R-33; R738 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)12-2238-04

Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Osteosarcoma Patients using Physical Filtration combined with in Situ Hybridization*

LI Ming-hui¹, LU Ya-jie¹, ZHANG Hao-qiang², GAO Peng¹, YANG Di¹, CHEN Guo-jing¹, WANG Zhen^{1Δ}

(1 Department of orthopedic, Xi-Jing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Joint Surgery, General Hospital of Lanzhou Military Region, Gansu, Lanzhou, 730050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the detection and clinical significance of circulating tumor cells in osteosarcoma patients using physical filtration combined with in situ hybridization. **Methods:** In this study, the detection of circulating tumor cells in osteosarcoma is based on physical filtration combined with in situ hybridization. The cells are firstly enriched from peripheral blood by 8 μm diameter pores calibrated membrane. Then multiplex RNA-in situ hybridization assay was used to characterize the molecular markers including CD45, EpCAM, CK8, CK19, Vimentin and Twist in each cell. The cells are classified as leukocyte and circulating tumor cell base on the expression of different markers. 20 osteosarcoma patients and 15 healthy donors were enrolled to investigate the clinical significance of circulating tumor cells. **Results:** The cell recovery rate was higher than 90%. Among the enrolled 20 patients and 15 healthy donors, 19 patients and 14 healthy donors had been detected CTCs in peripheral blood. CTC count in metastatic and localized patients is 11.33±5.88 and 4.36±2.98, respectively. The result revealed that CTC count in metastatic patients is significantly higher than localized patients. The ratio of mesenchymal CTC in metastatic patients is significantly higher than localized patients. **Conclusions:** Circulating tumor cells in osteosarcoma can be detected efficiently by physical filtration combined with in situ hybridization. CTC count and phenotype are related with tumor metastasis in osteosarcoma.

Key words: Circulating tumor cell; Osteosarcoma; Liquid biopsy; Tumor metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)12-2238-04

前言

骨肉瘤是常见的骨原发性恶性肿瘤,发病率约为 3/100

万。骨肉瘤好发于 10-25 岁的青少年,男性略多于女性,发病部位多为长骨干骺端,中轴骨及骨盆次之^[1]。骨肉瘤侵袭性强,预后差,容易发生早期肺转移。研究表明,70%的未发生转移的患

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(31370944,31170914)

作者简介:李明辉(1991-),博士研究生,主要研究方向:恶性骨肿瘤液体活检, E-mail: liminghui0905@foxmail.com

Δ 通讯作者:王臻(1959-),博士生导师,主要研究方向:骨肿瘤的基础研究、临床治疗与人工骨移植材料,

电话:029-84775281, E-mail: wangzhen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2018-01-06 接受日期:2018-02-02)

者可获得长期生存,而肿瘤转移的患者,其五年生存率仅为20%左右^[2]。因此,早期判断骨肉瘤患者转移风险,加强预后因素研究对于提高骨肉瘤患者生存期至关重要。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC),是指自发或因诊疗操作从肿瘤组织脱落并进入外周血循环系统的肿瘤细胞。1896年,Ashworth首次提出了循环肿瘤细胞的概念。CTC存在于数目庞大的红细胞及白细胞中,少数具有高度活性及转移潜能的CTC可以定居在不同部位,导致肿瘤的转移及复发^[3]。液体活检作为体外诊断的一个分支,是指一种非侵入式的血液检测,液体活检可以监测肿瘤原发灶或转移灶释放到血液中的肿瘤成分,是肿瘤诊断及辅助治疗的突破性技术^[4]。CTC作为液体活检的主要手段之一,已经被证实来判断肿瘤状态,评价治疗效果及预测患者预后等方面发挥重要作用^[5]。目前,循环肿瘤细胞检测方法主要依赖于上皮细胞粘附分子和特异性的肿瘤标志物,因此这些检测方法多数只能检测上皮来源肿瘤的CTC^[6]。间叶组织来源肿瘤例如骨肉瘤缺乏特异性的肿瘤标志物,因此需要一种不依赖于特异性标志物的富集方式从患者外周血中富集CTC^[7-11]。本研究中,我们使用一种基于物理过滤与原位杂交技术结合的CanPatrol™系统检测骨肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞,并探索骨肉瘤循环肿瘤细胞特征的临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

使用人骨肉瘤细胞系HOS作为检测细胞富集效率的工具细胞,细胞购自上海复旦大学生命科学院;胎牛血清、 α -MEM培养基、透膜剂、PBS溶液、多聚甲醛及蛋白酶购自美国Gibco公司;EDTA、DAPI购自美国Invitrogen公司;纳米滤膜购自美国Millipore公司。多重RNA探针及bDNA信号放大探针由美国Invitrogen公司设计合成。真空管、过滤器及真空泵由中国益善生物公司提供。荧光显微镜购自日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 临床试验方案 本研究纳入健康志愿者及原发骨肉瘤患者作为研究对象。入组的骨肉瘤患者为2015年3月至2015年12月在第四军医大学西京医院骨肿瘤科治疗的骨肉瘤患者。为排除治疗过程对循环肿瘤细胞的影响,患者入组时均未接受任何化学治疗及手术治疗。本研究已通过第四军医大学西京医院伦理委员会审批,所有受试者均对本研究知情同意并签署知情同意书。本研究已于中国临床试验注册中心注册,注册号ChiCTR-OOC-15005925

1.2.2 外周血样本采集与处理 骨肉瘤患者与健康志愿者均空腹采血,采血方式为肘正中静脉穿刺采血。为避免穿刺过程中细胞污染,收集中段外周血5.0 mL并置于EDTA抗凝采血管中,颠倒混匀后加入红细胞裂解液裂解红细胞。低温离心后收集细胞沉淀并加入4%多聚甲醛溶液使细胞沉淀悬浮并固定60 min。利用CanPatrol™系统对细胞悬浊液进行物理过滤,该系统由直径8微米的纳米滤膜,过滤器及真空泵组成,通过物理过滤后,体积较大的细胞将被截留在滤膜表面等待进一步的鉴定。

1.2.3 多重RNA原位杂交技术鉴定截留细胞 对滤膜截留下的细胞利用多重RNA探针进行鉴定分型。首先使用透膜剂及

蛋白酶对细胞进行预处理并加入3组RNA探针进行孵育。A组探针含有上皮型标志物CK8,18,19及EpCAM基因探针;B组探针含有白细胞标志物CD45基因探针;C组探针含间质型标志物Vimentin, Twist基因探针。孵育后加入bDNA信号放大探针与RNA探针结合。最后利用DAPI对细胞核进行染色并于荧光显微镜下观察结果。

1.2.4 细胞培养 HOS细胞采用含有10%胎牛血清的 α -MEM培养基培养于T-25细胞培养瓶,置于37℃,5% CO₂饱和湿度的孵箱。培养瓶中细胞达90%汇合时,细胞处于对数生长期,将细胞以1:4比例进行传代。

1.2.5 细胞富集效率实验 使用HOS细胞对CanPatrol™系统的细胞富集效率进行检验。首先,使用含2 mM EDTA的PBS溶液将HOS细胞稀释为1个/ μ L。将0,10,30,50和100个HOS细胞分别加入至5 mL健康志愿者的外周血中。利用CanPatrol™系统对外周血中的HOS细胞进行富集回收,从而计算CanPatrol™系统的细胞富集效率。

1.3 统计学分析

应用GraphPad Prism 6.0统计学软件,计量资料用平均值 $\pm$ 标准差表示;使用线性回归分析数据包进行回归分析;采用Kolmogorov-Smirnov检验对数据进行正态分布的检验;采用独立t检验对CTC计数与肿瘤转移的关系进行检验;采用卡方检验对CTC分型与肿瘤转移之间的关系进行检验。

2 结果

2.1 HOS细胞回收效率检测

本研究中,我们分别在5 mL健康志愿者外周血中加入0,10,30,50和100个HOS细胞并通过CanPatrol™系统对细胞进行富集。为保证实验结果的准确性,不同细胞数量的实验均重复3次,实验结果如图1,结果显示CanPatrol™系统从外周血中富集骨肉瘤细胞的富集效率约为92.64%。

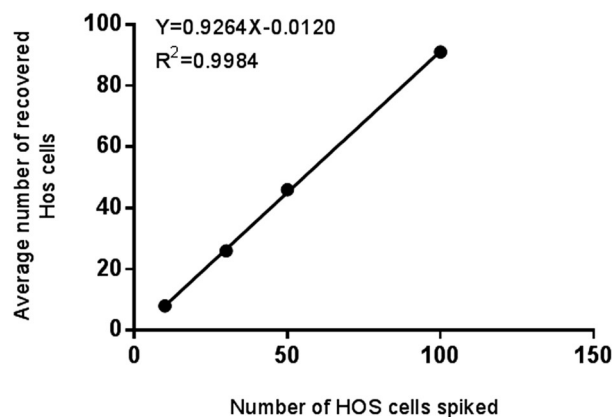


图1 CanPatrol™系统骨肉瘤细胞富集效率实验结果

Fig.1 Calibration curve obtained using Canpatrol™ system in the spiking experiment (n=3) with HOS cells at different dilutions

注:CanPatrol™系统的细胞富集效率约为92.64%。

Note: The result demonstrated that the enrichment process was linear ($R^2=0.9984$) and the average recovery at each dilution of cells was 92.64%.

2.2 循环肿瘤细胞的判定结果

根据多重RNA原位杂交结果对滤膜截留下的细胞进行鉴

定分型。如图 2 所示,CD45 表达阳性为白细胞;仅有上皮型标志物表达阳性的细胞为上皮型 CTC,仅有间质型标志物表达阳

性的细胞为间质型 CTC,既有上皮型又有间质型标志物表达阳性的细胞为混合型 CTC。

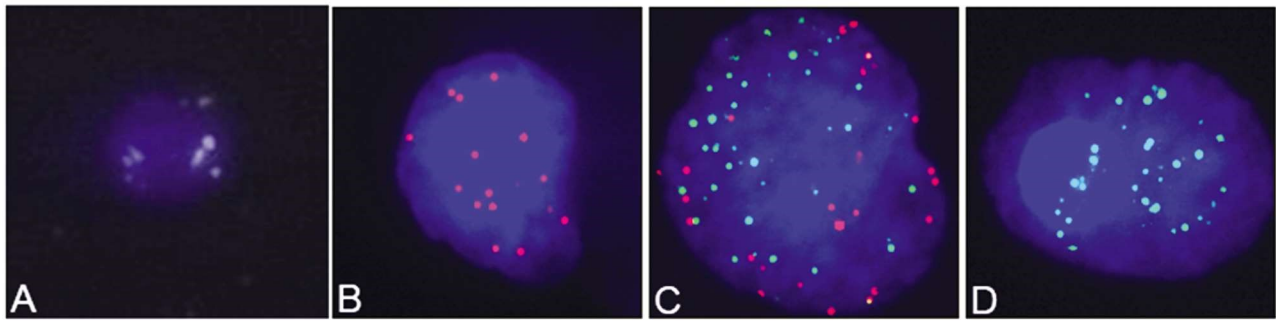


图 2 多重 RNA 原位杂交结果

Fig.2 The expression of different markers detected by RNA-ISH assay

注:多重 RNA 原位杂交结果。红色荧光点为上皮型标志物表达阳性,绿色荧光点为间质型标志物表达阳性,白色荧光点为 CD45 表达阳性。

A 白细胞;B 上皮型 CTC;C 混合型 CTC;D 间质型 CTC。(放大倍数:100×)

Note: CD45, EpCAM, CK8/18/19, vimentin and twist expression in circulating tumor cells from osteosarcoma patients. Red fluorescence: expression of epithelial biomarkers EpCAM and CK8/18/19; Green: expression of the mesenchymal biomarkers vimentin and twist; White blue fluorescence: expression of leukocytic biomarker CD45. A: leukocyte; B: epithelial CTC; C: biophenotypic epithelial/mesenchymal CTC; D: mesenchymal CTC. (Magnification: 100×)

2.3 入组患者临床特征与外周血检测结果

本研究共入组 15 例健康志愿者及 20 例原发性骨肉瘤患者。患者年龄为 13.75 ± 4.40 岁,其中男性 12 例,女性 8 例。发病部位,1 例位于肱骨,15 例位于股骨,4 例位于胫骨。20 例骨肉瘤患者中,19 例患者外周血中存在 CTC,CTC 计数范围为 0-23,15 例健康志愿者中,仅 1 例外周血中检测到 CTC。

2.4 外周血 CTC 计数与肿瘤转移之间的关系

20 例患者中,发生转移的患者 6 例,外周血均检测到 CTC,CTC 计数为 (11.33 ± 5.88) ,计数范围为 4-20。未发生转移的患者 14 例,其中 13 例患者检测到 CTC,CTC 计数为 (4.36 ± 2.98) ,计数范围为 0-11。转移患者与未转移患者外周血 CTC 计数比较结果显示,发生转移的患者外周血 CTC 数量明显更多(图 3)。

2.5 外周血 CTC 分型与肿瘤转移之间的关系

我们将患者按照肿瘤转移情况分为两组,并对各组患者外周血中各分型 CTC 的比例进行统计分析。统计学分析结果显示,确诊时已发生肿瘤转移的患者体内间质型 CTC 的比例明显高于未发生转移的患者 ($P=0.0031$)。这一结果提示间质型 CTC 在肿瘤转移过程中可能发挥重要作用。

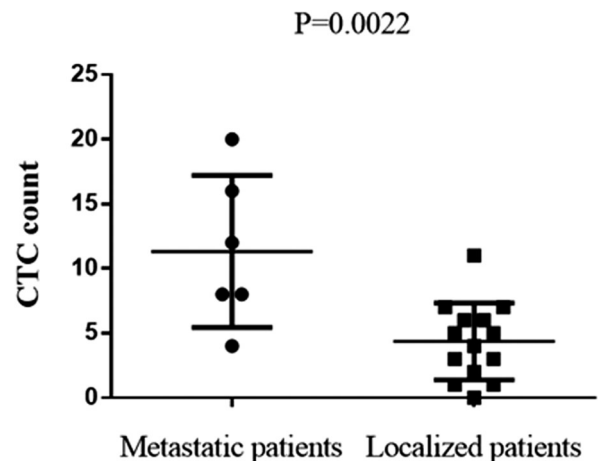


图 3 骨肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞计数与肿瘤转移之间的关系

Fig.3 The relation between CTC count and tumor metastasis

注:肿瘤转移患者外周血 CTC 计数明显高于未发生转移的患者 ($P=0.0022$)。

Note: The number of CTCs in the group of patients with metastasis vs. localized osteosarcoma ($n=6$ and 14 , respectively). A statistically significant difference was found between the groups ($P=0.0022$).

表 1 循环肿瘤细胞分型与肿瘤转移之间关系

Table 1 The ratios of different phenotypic CTCs in patients with metastasis vs. localized osteosarcoma at baseline

Tumor metastasis	Epithelial(n)	Mixed(n)	Mesenchymal(n)	P Value
Yes	10	23	35	0.0031
No	14	34	13	

Note: The ratios of mesenchymal CTCs in patients with metastasis is higher than localized osteosarcoma ($P=0.0031$). The result indicated that mesenchymal CTCs play a more important role in osteosarcoma metastasis than other phenotypic CTCs.

3 讨论

骨肉瘤是间叶组织来源的恶性骨肿瘤,易复发,易转移,预

后差。即使接受化学治疗及手术治疗等手段,仍有 30-60% 的患者发生远处转移^[12]。肺部是骨肉瘤最常见的转移部位,相较于未发生转移的患者,肿瘤转移患者的生存期明显缩短。目前评

价骨肉瘤患者病情,治疗效果及预后主要依赖于传统的影像学检查,然而影像学检查在检测微小转移病灶时缺乏灵敏度,容易忽视早期微小病灶^[13]。因此,液体活检的发展一定程度上解决了肿瘤转移病灶早期检测困难的问题。循环肿瘤细胞作为液体活检的主要手段可以预测病情转归,评价治疗效果。然而受限于 CTC 的检测技术,现有的 CTC 研究主要集中于上皮来源肿瘤如乳腺癌、肺癌及胃癌等^[5,10,14,15]。骨肉瘤循环肿瘤细胞相关的临床研究较少且多为回顾性研究^[16],这些研究大多忽视了治疗过程对 CTC 的特征影响,因而具有一定的局限性^[17]。为此,本研究利用基于物理过滤与原位杂交技术的 CanPatrol™ 系统对骨肉瘤患者外周血中的 CTC 进行先分离后鉴定的检测方法,该方法有效提高了 CTC 的富集效率^[18,19]。为研究 CTC 特征与病情之间的关系,我们前瞻性地纳入了骨肉瘤患者及健康志愿者作为临床研究对象。纳入研究的骨肉瘤患者未经任何治疗,这避免了治疗过程对 CTC 特征的影响,使得临床试验结果更具科学性。

本研究的结果显示,基于物理过滤与原位杂交技术的 CanPatrol™ 系统可用于骨肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞检测且具有大于 90% 的富集效率,具有良好的灵敏度。在入组的 20 例骨肉瘤患者中,19 例患者 CTC 检测结果为阳性。而 15 例健康志愿者中,仅 1 例检测结果为阳性,该结果说明 CanPatrol™ 系统富集 CTC 具有较高的特异性,可以排除外周血中其他细胞对检测结果的干扰。有研究显示,CTC 可以作为预测多种肿瘤患者病情及预后的独立危险因素^[5,8,20,21]。为探寻骨肉瘤 CTC 的临床意义,我们对 CTC 特征与患者临床特征进行了统计学分析。结果显示,相较于未发生转移的患者,已发生肿瘤转移的患者外周血 CTC 数量明显增加。因此,CTC 计数可以作为判断肿瘤早期转移的辅助手段,在临床诊疗过程中,可以对 CTC 计数较多的患者进行更为严密的检测,以便在肿瘤转移早期进行针对性的治疗。此外,我们对 CTC 的分型与肿瘤转移之间的关系进行分析。结果显示,肿瘤转移的患者外周血中,间质型 CTC 的比例明显高于未发生肿瘤转移的患者。该结果提示间质型 CTC 在骨肉瘤转移的过程中发挥重要作用,这可能与骨肉瘤细胞的上皮-间质转化有关,既往的研究也证实了发生上皮-间质转化的骨肉瘤细胞的侵袭及增殖能力增强,更易发生转移^[22,23]。

本研究中,我们利用基于物理过滤与原位杂交技术结合的 CanPatrol™ 系统检测骨肉瘤患者外周血循环肿瘤细胞。我们应用骨肉瘤细胞系 HOS 验证了该方法富集 CTC 的效率,并利用该方法成功检测到了骨肉瘤患者外周血中的 CTC。初步的临床试验中,我们发现患者外周血 CTC 计数、分型与肿瘤转移相关,这有助于在临床诊疗过程中确定骨肉瘤患者个体化治疗方案,为改善骨肉瘤患者不良预后提供帮助。在进一步的研究中,我们将完善临床试验方案,进行多中心大样本的前瞻性临床试验,增加每例入组患者的检测节点,进一步分析 CTC 计数,计数变化与骨肉瘤患者病情,治疗效果以及预后之间的关系。同时,我们将运用单细胞基因检测技术,对 CTC 的分子学特征进行进一步的研究,揭示 CTC 在肿瘤转移,肿瘤耐药过程中的作用。

参考文献(References)

- [1] Bielack S, Carrle D, Casali PG. Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2009, 20(Suppl 4): 137-139
- [2] Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, 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
- [3] Tseng JY, Yang CY, Liang SC, et al. Dynamic changes in numbers and properties of circulating tumor cells and their potential applications [J]. Cancers (Basel), 2014, 6(4): 2369-2386
- [4] Polasik A, Tzschaschel M, Schochter F, et al. Circulating Tumour Cells, Circulating Tumour DNA and Circulating MicroRNA in Metastatic Breast Carcinoma - What is the Role of Liquid Biopsy in Breast Cancer? [J]. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2017, 77 (12): 1291-1298
- [5] Li Y, Gong J, Zhang Q, et al. Dynamic monitoring of circulating tumour cells to evaluate therapeutic efficacy in advanced gastric cancer [J]. Br J Cancer, 2016, 114(2): 138-145
- [6] Poruk KE, Valero V 3rd, Saunders T, et al. Circulating Tumor Cell Phenotype Predicts Recurrence and Survival in Pancreatic Adenocarcinoma [J]. Ann Surg, 2016, 264(6): 1073-1081
- [7] Banys-Paluchowski M, Krawczyk N, Meier-Stiegen F, et al. Circulating tumor cells in breast cancer-current status and perspectives [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 97: 22-29
- [8] Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging—predicting overall survival in metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6403-6409
- [9] Beijer N, Jager A, Sleijfer S. Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: the clinician's guide to breast cancer treatment? [J]. Cancer Treat Rev, 2015, 41(2): 144-150
- [10] Shen Z, Wu A, Chen X. Current detection technologies for circulating tumor cells [J]. Chem Soc Rev, 2017, 46(8): 2038-2056
- [11] Chang L, Asatryan G, Dry SM, et al. Circulating tumor cells in sarcomas: a brief review [J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 430
- [12] Ogura K, Fujiwara T, Yasunaga H, et al. Development and external validation of nomograms predicting distant metastases and overall survival after neoadjuvant chemotherapy and surgery for patients with nonmetastatic osteosarcoma: A multi-institutional study [J]. Cancer, 2015, 121(21): 3844-3852
- [13] Haddox CL, Han G, Anijar L, et al. Osteosarcoma in pediatric patients and young adults: a single institution retrospective review of presentation, therapy, and outcome [J]. Sarcoma, 2014, 2014: 402509
- [14] Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(8): 997-1007
- [15] Jin XR, Zhu LY, Qian K, et al. Circulating tumor cells in early stage lung adenocarcinoma: a case series report and literature review [J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23130-23141
- [16] Zhang H, Gao P, Xiao X, et al. A liquid biopsy-based method for the detection and quantification of circulating tumor cells in surgical osteosarcoma patients [J]. Int J Oncol, 2017

- Physicians, 2017, 9(2): 145-147
- [15] 樊寻梅,周永涛.化脓性脑膜炎[M].诸福棠实用儿科学(第7版),人民卫生出版社,2003: 912-926
- Fan Xun-mei, Zhou Yong-tao. Purulent meningitis [M]. Zhu Futang Pediatrics (Seventh Edition), People's Medical Publishing House, 2003: 912-926
- [16] 陈爱华,徐之良.乳胶凝集试验对小儿新型隐球菌脑膜炎诊断及治疗的应用探讨[J].中国综合临床, 2014, 30(9): 995-997
- Chen Ai-hua, Xu Zhi-liang. Application of latex agglutination test in the diagnosis and treatment of *Cryptococcus neoformans* meningitis in children[J]. Clinical Medicine of China, 2014, 30(9): 995-997
- [17] Vita S, Ajassa C, Caraffa E, et al. Immunological diagnosis as an adjunctive tool for an early diagnosis of tuberculous meningitis of an immune competent child in a low tuberculosis endemic country: a case report[J]. BMC Res Notes, 2017, 10(1): 123
- [18] Camara-Lemarrroy CR, Delgado-Garcia G, et al. Mean platelet volume in the differential diagnosis of tuberculous and bacterial meningitis[J]. J Infect Dev Ctries, 2017, 11(2): 166-172
- [19] Chang CC, Kangethe R, Omarjee S, et al. Relationship of Human Immunodeficiency Virus Viral Load in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Patients Co-infected with Cryptococcal Meningitis [J]. Open Forum Infect Dis, 2017, 4(2): ofx032
- [20] 任伟,袁春雷,周涛,等.儿童脑脊液培养阳性43例临床分析[J].中国小儿急救医学, 2014, 21(2): 101-103
- Ren Wei, Yuan Chun-lei, Zhou Tao, et al. Clinical analysis of 43 cases of positive culture of cerebrospinal fluid in children[J]. Chinese Pediatric Emergency Medicine, 2014, 21(2): 101-103
- [21] Kumar K, Giribhattanavar P, Patil S. Nitric oxide in cerebrospinal fluid of central nervous system tuberculosis: correlations with culture, antibody response, and cell count [J]. Turk J Med Sci, 2017, 47(1): 109-114
- [22] Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR, et al. Dilemmas in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis [J]. Lancet, 2012, 380(9854): 1684-1692
- [23] Zhang X A, Li S, Ching J, et al. A sensitive and specific point-of-care detection assay for Zaire Ebola virus[J]. Emerging Microbes & Infections, 2017, 6(1): e5
- [24] Kaewmongkol G, Maneesaay P, Suwanna N, et al. First Detection of *Ehrlichia canis* in Cerebrospinal Fluid From a Nonthrombocytopenic Dog with Meningoencephalitis By Broad-Range PCR[J]. J Vet Intern Med, 2016, 30(1): 255-259
- [25] Wilson M R, Naccache S N, Samayoa E, et al. Actionable Diagnosis of Neuroleptospirosis by Next-Generation Sequencing [J]. New England Journal of Medicine, 2014, 370(25): 2408-2417
- [26] Akkaya O, Guvenc HI, Yuksekkaya S, et al. Real-time PCR Detection of the Most Common Bacteria and Viruses Causing Meningitis [J]. Clin Lab, 2017, 63(4): 827-832
- [27] Başpınar EÖ, Dayan S, Bekçibaşı M, et al. Comparison of culture and PCR methods in the diagnosis of bacterial meningitis [J]. Braz J Microbiol, 2017, 48(2): 232-236
- [28] Almeida SM, Raboni SM, Nogueira MB, et al. Red blood cells in cerebrospinal fluid as possible inhibitory factor for enterovirus RT-PCR[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2016, 74(10): 810-815
- [29] Rios-Sarabia N, Hernández-González O, González-Y-Merchand J, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis using nested PCR[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(4): 1289-1295
- [30] Farahani H, Ghaznavi-Rad E, Mondanizadeh M, et al. Specific detection of common pathogens of acute bacterial meningitis using an internally controlled tetraplex-PCR assay[J]. Mol Cell Probes, 2016, 30(4): 261-265

(上接第2241页)

- [17] Hong Y, Zhang Q. Phenotype of circulating tumor cell: face-off between epithelial and mesenchymal masks [J]. Tumour Biol, 2016, 37(5): 5663-5674
- [18] 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
- [19] Liu YK, Hu BS, Li ZL, et al. An improved strategy to detect the epithelial-mesenchymal transition process in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients [J]. Hepatol Int, 2016, 10(4): 640-646
- [20] Guan X, Ma F, Liu S, et al. Analysis of the hormone receptor status of circulating tumor cell subpopulations based on epithelial-mesenchymal transition: a proof-of-principle study on the heterogeneity of circulating tumor cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(40): 65993-66002
- [21] Sun YF, Xu Y, Yang XR, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1458-1468
- [22] Wang S, Zhang D, Han S, et al. Fibulin-3 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6215
- [23] Wang X, Liang X, Liang H, et al. SENP1/HIF-1alpha feedback loop modulates hypoxia-induced cell proliferation, invasion and EMT in human osteosarcoma cells [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(2): 1819-1826