

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201801004

循环肿瘤细胞识别技术研究现状

王 燕,徐秀林

(上海理工大学 医疗器械与食品学院,上海 200093)

摘要:循环肿瘤细胞(CTCs)对恶性肿瘤传播转移有重要影响,因此 CTCs 识别技术的出现与不断进步有着重要的临床意义,准确可靠的 CTCs 识别技术将为尽早确诊肿瘤、指导个性化治疗方案、诊断微小残留病变以及评估抗癌药物的敏感性提供强有力的工具。本文针对核酸检测法、免疫细胞化学术、流式细胞术和基于表征特性图像识别技术等 CTC 识别技术的发展情况进行了综述总结,比较各种技术的优缺点,对现阶段该领域存在的问题进行了讨论,并对 CTCs 识别的技术发展方向作了进一步的展望,为学者们提供更广的研究思路。

关键词:循环肿瘤细胞;恶性肿瘤;识别技术

中图分类号:Q354 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2018)03-137-06

Research status of identification for circulating tumor cells

WANG Yan, XU Xiulin

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) have an important effect on the process of malignant tumor metastasis. Therefore, the emergence and continuous progress of CTCs detection technology have important clinical significance. Accurate and reliable CTCs identification techniques provide a powerful tool for early diagnosis of cancer, guidance of personalized treatment options, diagnosis of minimal residual disease, and assessment of the sensitivity of anticancer drugs. This article reviews the development of CTC identification methods such as PCR, Immunocytochemistry, flow cytometry, and image recognition technology based on characterization, compares the advantages and disadvantages of each method, and makes further prospect on the development direction of CTCs identification, so as to provide a broader research direction for scholars.

Keywords: Circulating tumor cell; Malignant tumor; Identification technique

肿瘤细胞的自发循环是一部分癌细胞“侵入性行为”的标志,获得强侵袭能力的 CTCs 和随后的癌细胞转移导致了 90% 的癌症患者的死亡^[1]。由于入侵发生在肿瘤早期阶段^[2],此时血液中的 CTCs 数量非常稀少,这意味着准确有效的 CTCs 识别与分析对于尽早地确诊肿瘤并采取有效的治疗措施具有重要意义,同时有助于评估单个 CTCs 的侵袭能力以及预判可能发生的癌细胞转移。

多项研究表明,CTCs 在恶性肿瘤发生和发展过程中都可以被检测到,包括肿瘤的临床确诊之前^[3]。但外周循环血中 CTCs 的数量极少,每 $10^6 \sim 10^7$ 个单核细胞中才能发现一个 CTCs^[4],难以直接

从数量庞大的白细胞中检测出 CTCs。另外还面临着高灵敏度和特异度的挑战^[5],因此现有的 CTCs 检测技术大多数是在富集分离的基础上进行,常用的富集方法基本包含依据形态学原理的膜过滤法^[6-7]和密度梯度离心法^[8-10],以及依据抗原抗体原理的免疫磁性分离法^[11-13]和微芯片技术^[14-15]。

目前的富集技术还不能保证富集产物的纯度,分离出来的 CTCs 往往会跟数量庞大的白细胞混合在一起。如果不进一步识别确认,容易导致假阳性或假阴性结果,造成 CTCs 数目的不可靠性。因此具备高灵敏度和特异度的 CTCs 识别技术不仅能进一步验证富集效果,而且将为癌症早期诊断、指导个

收稿日期:2018-01-24;修回日期:2018-05-09.

作者简介:王燕,女,硕士研究生,研究方向:生物医学工程;E-mail: 18321882568@163.com.

* 通信作者:徐秀林,女,教授,研究方向:生物医学工程;E-mail: xxlin100@163.com.

性化医疗以及药物的疗效监测提供可靠参考。因此如何准确、灵敏的识别 CTCs 成为当前研究的新重点,本文对几种 CTCs 识别技术进行总结展望。

1 核酸检测法

核酸检测法主要是通过 PCR 技术或 RT-PCR 技术靶向扩增上皮源性肿瘤细胞特异性 DNA 或 mRNA 来完成对 CTCs 基因层面上的鉴定分析。此方法灵敏度高于免疫细胞化学术,可以从 $10^6 \sim 10^7$ 个正常细胞中识别出一个 CTCs^[16],但这需要以核酸全部来自于 CTCs 为前提;稳定性好,成本较低,因此已经成为当前 CTCs 鉴定分析领域最有效的方法^[17]。

传统的 PCR 技术,常用胶体电泳分离最终产物,并使用溴化乙锭(EB)等染料将其染色,无法监测反应过程和定量分析模板序列。

实时荧光定量 PCR 技术(fq-PCR)^[18]结合传统 PCR 与荧光共振能量传递技术^[19],通过加入与目标 DNA 特异性结合的荧光探针来表示 PCR 反应过程中产物的增长。过程中,通过探针信号的连续积累改变实现了实时监测每一轮循环后产物量的增加与否;由指数扩增期的产物数量推算出模板序列的拷贝数,最后利用 Ct 值或标准曲线对模板序列定量分析,实现了对特异性 DNA 序列的精准定量。由于荧光探针的引入,除了 DNA 引物序列的特异性之外,还有探针序列的特异性,从两个方面保证了所扩增序列的特异性。

实时荧光定量 PCR 能够准确可靠地测出特定癌基因的具体表达量。Schuster R 等^[20]使用该技术对 128 例结直肠癌病患外周血液样本中弥散性肿瘤细胞进行了三种不同 mRNA 标志物的检测实验,所有血液样本中都检测到了三种标志物(ProtM:17%; CEA:86%; CK20 :88%),并且检测到 13% 的患者血液中的标志物浓度有明显升高。

虽然目前实时荧光定量 PCR 已经进行过端粒酶 hTERT 基因、慢性淋巴细胞性白血病 BCL2 和 p53 基因、肿瘤 MDR1 基因等的准确检测^[21-24]。但是想要广泛应用于常规临床检测还面临以下问题:(1) 荧光素种类以及检测激发光源限制了其用于复合式检测;(2) 过高的成本限制了其应用于常规临床分析。

各项 PCR 或 RT-PCR 技术都需要有肿瘤细胞的 DNA 或 mRNA 才能进行鉴定,但是获得核酸需要裂解细胞,因而无法进行形态学分析,也无法对 CTCs 数量进行统计。而且坏死肿瘤细胞释放的核酸容易污染目的核酸,造成假阳性。

2 免疫细胞化学术

免疫细胞化学术(immunocytochemistry, ICH)^[25]基于细胞形态特性和表面特征标记物表达来识别鉴定 CTCs,是一种联合抗原抗体反应的高度特异性及荧光标记的直观可见性的生化染色技术。通过荧光标记的抗体与 CTCs 表面的抗原进行结合,针对肿瘤细胞的特异性蛋白或基因进行定量检测,从而实现 CTCs 的鉴定以及形态学分析。通常情况下借助于上皮细胞特异性 CK 抗体,白细胞特异性 CD45 抗体以及核荧光染料 DAPI 进行处理,若结果为 CK+/ CD45-/ DPAI+,则认为待检细胞为 CTCs。2014 年郭立民等^[26]以细胞角蛋白 CK 为标记,采用免疫细胞染色在肝癌患者外周血中检测到了完整的 CTCs,检出率为 63.15%。但是此项技术需要人工在显微镜下寻找已染色肿瘤细胞,检测效率及准确率太低,无法达到临床诊断上的要求。在此基础上发展起来的光纤阵列扫描术(FAST)彻底地摆脱了这一限制。

FAST^[27-28]是一种快速准确的 CTCs 定位计数系统,在不牺牲捕获效率的前提下具备由末端非对称光纤实现的超大观察视野(50 341 mm),不需要提前对 CTCs 进行富集分离,氩离子激光器直接以快于常规自动数字显微镜 500 倍的速率正交扫描载玻片,载玻片上经过免疫荧光染色的 CTCs 受激发后产生的发射荧光经准直透镜到达滤光片,收集后到达光电倍增管,得到的结果被输入到一个完全自动化的扫描数字显微镜系统(REIS)中进行处理,实现了快速且准确定位已荧光染色的 CTCs,自动对其进行数量统计,解决了传统免疫化学术准确率低以及检测效率低的问题。Marrinucci^[29]用 FAST 技术对于五例结直肠癌患者进行 CTCs 检测,所有的血液样本中均检测到 CTCs,平均每毫升血液中检测到的 CTCs 个数为 12~282 个。

免疫细胞化学术依赖于上皮细胞特异性抗体 CK,但是上皮源性肿瘤细胞在经历了上皮-间充质转化(EMT)^[30]过程之后,上皮源性标志物(如 EpCAM、CK)表达会下调,这就说明此项技术极易漏检发生 EMT 变化后具有了较强侵袭性的肿瘤细胞,有着不容忽视的假阴性。

3 流式细胞技术

流式细胞技术(Flow cytometry, FCM)^[31]是借助流式细胞仪作为检测手段的一种针对单个细胞的定量分析技术,基本包括血液样本液流技术、目的细胞识别和计数,以及数据采集和分析等技术。经特定染料标记

的细胞悬浮液进入检测室,在鞘液的限制下,通过喷嘴形成单细胞悬液。单细胞悬液通过激光照射区受到光源激发光照射,细胞上的荧光物质被激发,会产生不同波长,分别代表着细胞不同特征物质的荧光信号,由光电接收器接受转换,通过实时的测定库尔特电阻、荧光种类和强度、光散射和吸收来定量检测细胞内外标记物如 DNA 含量、细胞体积、细胞膜受体和表面抗原等诸多关键参数,完成 CTCs 识别和分选。

通过流式细胞仪来鉴别分析 CTCs,可以实现多个通道同时工作,检测速度较快。另外,该技术保留 CTCs 的形态学特征和抗原性,能够快速分析数以万计个细胞的多种参数,提高了 CTCs 鉴定结果的准确率。Takao M 等^[32]等曾经使用此技术在肺癌 PC-9 系和乳腺癌 MCF-7 系上做了 CTCs 的检测实验并取得了良好的效果。

近年来,PAFC 技术^[33]即活体流式细胞仪,结合了活体(近红外)实时高速影像方法和体外流式细胞仪。通过激光实时检测某段时间内通过血管某一处截面的被荧光标记的肿瘤细胞,实现实时监测活体 CTCs 并对其进行定量分析与检测。Galanzha 等^[34]研究得出在最佳的 NIR 范围内(例如 820 nm 或者 1 064 nm),PAFC 技术能够在 100 300 个红细胞中检测出单个恶性黑素瘤 CTCs。

2011 年,Merck Millipore 公司推出的 FlowSight 图像式流式细胞仪^[35-36],融合了流式细胞仪的检测功能与荧光显微成像功能,这种独特的组合提供了

所获得的单个 CTCs 的视觉验证,完成 CTCs 识别的同时观察细胞形态。由双色镜构成的滤光片堆栈(Dichroic Filter Stack)将细胞发射荧光信号的不同波段分别投射到时间延时积分 CCD 相应的检测通道上,产生一个 brightfield,一个 darkfield 以及至多个不同荧光检测通道的细胞图像。光路系统通过采用航空遥感 CDD、自动调整焦距以及实时测定细胞运动速度等方式保证采集到的 CTCs 图像的质量和荧光信号的灵敏度。

4 基于表征特性图像识别技术

意大利 Silicon Biosystems 公司开发的 DEPArray 系统^[37](见图 1),结合了介电电泳技术操控单细胞与基于图像的细胞识别技术,包括特殊晶片和 Cell Browser 分析软件,实现自动化地从异质血液样本中识别和回收单个目的细胞。晶片表面排列着 40 000 个可控制的电极矩阵,每一个电极都连有嵌入式传感器,使细胞周围形成介电电泳(DEP)环境。将细胞悬浮液注入晶片后,通过配置五个荧光通道、一个可见光和 CCD 影像传感器,扫描获取细胞影像,Cell Browser 根据细胞影像,确认其荧光强度和形态上的特征,通过表征特征图像识别技术识别到所需荧光标记和形态学特征的目的细胞。相邻电极之间通电之后形成电场,通过不断调整各电极间电场的方向,利用介电电泳力将目的细胞移动到指定位置,完成 CTCs 的精准识别捕获。

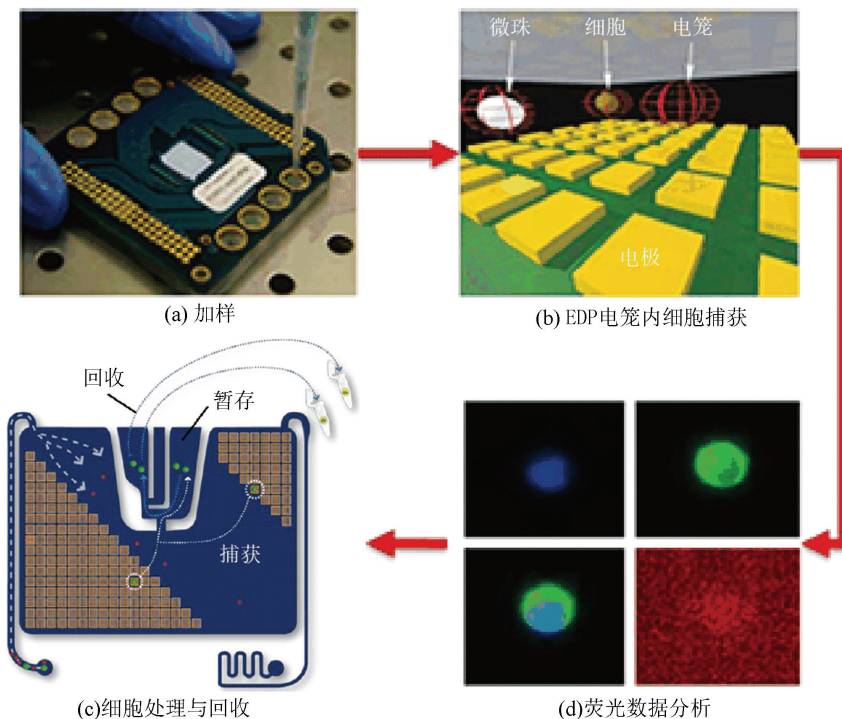


图 1 DEPArray 工作方式的示例图

Fig.1 DEPArray working method

Francesco Fabbri 等^[38]利用肺癌细胞系 A549 的癌细胞来测试 DEPArray 系统的检测率。设计 20 组实验,每组中将一定数量的该细胞加入到外周血液中(每毫升血液中加入 5~300 个癌细胞细胞)模拟 CTCs,经过实验每组样品中都检测到了癌细胞,检测率在 11.6%~86.0%范围内不等,但是识别分离出来的细胞里癌细胞纯度达到 100%,表明 DEPArray 系统检测结果具有一定的准确率。

DEPArray 系统利用介电泳技术对细胞施力,结合形态学的信息,完成单个完整 CTCs 的识别、捕获和回收。整个操作过程用力温和、无物理接触或摩擦,完整保留细胞活性,便于继续实验培养或者用于表达谱、基因测序、拷贝数变异等进一步分析。

5 总结与展望

本文所述的各种方法各有其优缺点。通过不同的富集和识别方法,对于同一肿瘤患者的血液样本分别进行检测所得结果的灵敏性和特异性也是不尽相同的,因此 CTCs 检测领域所面临的一个急需解决的问题是缺少统一的 CTCs 富集和检测标准。

在精准医疗的时代背景下,肿瘤疾病的精确诊断有着不可忽视的重要性,因此 CTCs 检测结果的准确性至关重要。核酸检测法和免疫细胞化学术可能存在假阳性和假阴性结果,无法确保其识别鉴定结果的准确可靠。流式细胞术通过测定细胞的存活状态、内外标记物等多个重要参数,从各方面保证了 CTCs 鉴定结果的准确率,可靠性高。DEPArray 系统除了多通道扫描细胞影像保证结果准确率之外,以温和的方式精准识别捕获单个目的细胞,有助于后续精确的分子分析验证,进一步保证了结果的可靠性。此外随着机器视觉、图像处理技术的往更深度和广度不断发展,图像式流式细胞仪和基于表征性图像识别技术将成为 CTCs 识别检测领域今后发展的新趋势。

参考文献(References)

- [1] WITTEKIND C, NEID M. Cancer invasion and metastasis [J]. *Oncology*, 2005, 69(Suppl.1):14-16. DOI: 10.1159/000086626.
- [2] PATERLINI-BRECHOT P, BENALI N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions [J]. *Cancer Letters*, 2007, 253(2):180. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.12.014.
- [3] TANAKA F, YONEDA K, KONDO N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer [J]. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2009, 15(22):6980. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1095.
- [4] 马清, 陈水平, 陈建魁. 肝癌患者循环肿瘤细胞的检测及其临床应用研究进展 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2014, 21(5):599-602. DOI: 10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2014.05.029.
- MA Qing, CHEN Shuiping, CHEN Jiankui. Progress of circulating tumor cell analysis and clinical application in patients with liver cancer [J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2014, 21(5):599-602. DOI: 10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2014.05.029.
- [5] BEDNARZKNOLL N, ALIXPANABIÈRES C, PANTEL K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells [J]. *Breast Cancer Research*, 2011, 13(6):228. DOI: 10.1186/ber2940.
- [6] VONA G, SABILE A, LOUHA M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells [J]. *American Journal of Pathology*, 2000, 156(1):57-63. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64706-2.
- [7] ZABAGLO L, ORMEROD M G, PARTON M, et al. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells [J]. *Cytometry Part A*, 2003, 55A(2):102-108. DOI: 10.1002/cyto.a.10071
- [8] GERTLER R, ROSENBERG R, FUEHRER K, et al. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation [J]. *Recent Results in Cancer Research. fortschritte Der Krebsforschung. progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 2003, 162(162):149. DOI: 10.1007/978-3-642-59349-9_13XIAO.
- [9] LAGOUDIANAKIS E E, KATAKI A, MANOURAS A, et al. Detection of epithelial cells by RT-PCR targeting CEA, CK20, and TEM-8 in colorectal carcinoma patients using OncoQuick density gradient centrifugation system [J]. *Journal of Surgical Research*, 2009, 155(2):183-190. DOI: 10.1007/s00381-007-0515-2.
- [10] 曹璐, 徐文, 殷正丰. 循环肿瘤细胞分离与检测 [J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(3):313-316. DOI: 10.3724/SP.J.1008.2010.00313.
- CAO Lu, XU Wen, YIN Zhengfeng. Isolation and detection of circulating tumor cells: recent progress [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2010, 31(3):313-316. DOI: 10.3724/SP.J.1008.2010.00313.
- [11] PATERLINI-BRECHOT P, BENALI N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions [J]. *Cancer Letters*, 2007, 253(2):180. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.12.014.
- [12] COHEN S J, PUNT C J A, IANNOTTI N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Journal of Clinical Oncology*

- Official Journal of the American Society, 2008, 26 (19) : 3213. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.8923.
- [13] 吴源娜. 基于 ISET 技术的晚期胃癌循环肿瘤细胞检测及其临床意义[D]. 南京: 南京大学, 2016.
WU Yuanna. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in advanced gastric cancer based on ISET technology[D]. Nanjing: Nanjing University, 2016.
- [14] NAGRATH S, SEQUIST L V, MAHESWARAN S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.[J]. Nature, 2007, 450(7173): 1235-9. DOI: 10.1038/nature06385.
- [15] STOTT S L, HSU C H, TSUKROV D I, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(43): 18392-7. DOI: 10.1073/pnas.1012539107.
- [16] PUNIA S L, BI L, TURKER M A, et al. Clearcell FX microfluidic system for the enrichment and genetic analysis of circulating tumor cells.[J]. Journal of Microfluidics, 2015, 34(6): 204-215.
- [17] 王振丹, 赵文华, 李胜. 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. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2014.17.023.
WANG Zhendan, ZHAO Wenhua, LI Sheng. Advance in the detection of circulating tumor cells[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2014, 21(17): 1391-1394. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2014.17.023.
- [18] 赵焕英, 包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(4): 492-497. DOI: 10.3870/j.issn.1004-1850.2007.04.023.
ZHAO Huanying, BAO Jinfeng. The principle and application of real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2007, 16(4): 492-497. DOI: 10.3870/j.issn.1004-1850.2007.04.023.
- [19] CLAPP A R, MEDINTZ I L, MAURO J M, et al. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors.[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(1): 301-310. DOI: 10.1021/ja037088b.
- [20] SCHUSTER R, MAX N, MANN B, et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. [J]. International Journal of Cancer, 2004, 108(2): 219 - 227. DOI: 10.1002/ijc.11547.
- [21] YANG Y J, CHEN H, HUANG P, et al. Quantification of plasma hTERT DNA in hepatocellular carcinoma patients by quantitative fluorescent polymerase chain reaction.[J]. Clinical & Investigative Medicine Médecine Clinique Et Experimentale, 2011, 34(4): E238.
- [22] 李承彬, 欧阳耀灵, 周家杰, 等. 不同样本中 DD3mRNA 和 hTERT mRNA 检测比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(11): 2856-2860.
LI Chengbin, OUYANG Yaoling, ZHOU Jiajie, et al. Comparison of detection for DD3 mRNA and hTERT mRNA in the different samples[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(11): 2856-2860.
- [23] SAAED H K, MAHMOOD M A, KHOSHNAW N. Quantitative real time PCR analysis of apoptotic gene expression in chronic lymphocytic leukemia patients and their relationships with chemosensitivity[J]. Applied Cancer Research, 2017, 37(1): 8. DOI: 10.1186/s41241-017-0014-z.
- [24] 曹建中, 鲍柏军. 晚期进展期胃癌患者外周血多药耐药基因 1 的表达[J]. 江苏医药, 2015, 41(1): 58-60. DOI: 10.19460/j.cnki.0253-3685.2015.01.021.
CAO Jianzhong, BAO Baijun. Expression of MDR1 in peripheral blood of patients with advanced gastric carcinoma [J]. Jiangsu Medical Journal, 2015, 41(1): 58-60. DOI: 10.19460/j.cnki.0253-3685.2015.01.021.
- [25] JULIA J, BRIGITTE R, FRIEDL T W P, et al. Detection of circulating tumor cells using manually performed immunocytochemistry (MICC) does not correlate with outcome in patients with early breast cancer-Results of the German SUCCESS-A- trial[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 1-11. DOI: 10.1186/s12885-016-2454-3.
- [26] 郭立民, 鲁岩, 彭吉润, 等. 应用免疫激活磁珠分选技术 CD45 去除方法富集——免疫细胞化学联合苏木素-伊红染色检测肝癌患者循环肿瘤细胞[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(9): 2019-2021. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.09.063.
GUO Limin, LU Yan, PENG Jirun, et al. Combined use of immunomagnetic activated cell sorting technique enrichment and immunocytochemistry with hematoxylin and eosin staining for identification of circulating tumor cells in peripheral blood mononuclear cells of hepatocellular carcinoma patients[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2014, 31(9): 2019-2021. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.09.063.
- [27] SUN Y F, YANG X R, ZHOU J, et al. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance[J]. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, 2011, 137(8): 1151. DOI: 10.1007/s00432-011-0988-y.
- [28] KRIVACIC R T, LADANYI A, CURRY D N, et al. A Rare-Cell Detector for Cancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(29): 10501. DOI: 10.1073/pnas.0404036101.
- [29] MARRINUCCI D, BETHEL K, LAZAR D, et al. Cytomorphology of circulating colorectal tumor cells: a small

- case series[J]. *Journal of Oncology*, 2010, 2010(1687–8450):861341. DOI: 10.1155/2010/861341.
- [30] LOWES L E, GOODALE D, YING X, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to disease-stage differences in circulating tumor cell detection and metastasis in pre-clinical models of prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(46):76125–76139. DOI: 10.18632/oncotarget.12682.
- [31] LÓPEZ-RIQUELME N, MINGUELA A, VILLAR-PERMUY F, et al. Imaging cytometry for counting circulating tumor cells; comparative analysis of the CellSearch vs ImageStream systems[J]. *Apmis*, 2013, 121(12):1139–1143. DOI: 10.1111/apm.12061.
- [32] TAKAO M, TAKEDA K. Enumeration, characterization, and collection of intact circulating tumor cells by cross contamination-free flow cytometry[J]. *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2011, 79A(2):107–117. DOI:10.1002/cyto.a.21014.
- [33] NEDOSEKIN D A, SARIMOLLAOGLU M, YE J H, et al. In Vivo Ultra-Fast photoacoustic flow cytometry of circulating human melanoma cells using near-infrared high-pulse rate lasers[J]. *Cytometry A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2011, 79A(10):825–833. DOI: 10.1002/cyto.a.21102.
- [34] GALANZHA E I, ZHAROV V P. Circulating tumor cell detection and capture by photoacoustic flow cytometry in vivo and ex vivo[J]. *Cancers*, 2013, 5(4):1691. DOI:10.3390/cancers5041691.
- [35] HENNING A L, SAMPSON J N, MCFARLIN B K. Measurement of low-abundance intracellular mRNA using amplified fish staining and image-based flow cytometry[J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2016, 76(1):7.46.1–7.46.8. DOI: 10.1002/0471142956.cy0746s76.
- [36] BASIJI D. The design and applications of the flowsight, an affordable, high-performance imaging flow cytometer[C]// *Bi International Practical Cytometry Workshop*, 2012.
- [37] MEDORO G. Introducing deparrayTM: individual manipulation and detection of more than 10 000 cells in a drop of sample[C]// *Sensors and Microsystems – Italian Conference*, 2014: 361–363. DOI: 10.1142/9789812702944_0056.
- [38] FABBRI F, CARLONI S, ZOLI W, et al. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device; KRAS mutation status in pure CTCs[J]. *Cancer Letters*, 2013, 335(1):225–231. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.02.015.