

循环肿瘤细胞与三阴性乳腺癌预后及肿瘤状态的关系分析

王浩¹, 李南林², 曹海玲³

(广东省广州市番禺区中心医院, 1. 病理科, 3. 甲状腺乳腺外科, 广东 广州, 510000;
2. 中国人民解放军空军军医大学西京医院 甲乳外科, 陕西 西安, 710032)

摘要:目的 分析循环肿瘤细胞(CTC)与三阴性乳腺癌(TNBC)预后及肿瘤状态的关系。方法 从32例Ⅲ~Ⅳ期TNBC患者和30名健康对照者的外周血中分离出CTC,进行分子特征分析。结果 与3.2 mL血样中CTC计数<5个的23例患者相比,CTC计数≥5个的8例患者无进展生存期、总生存期均更差,差异有统计学意义($P=0.033, 0.006$),表明CTC计数对TNBC患者预后具有评估价值;3.2 mL血样中CTC计数≥5个的患者中,CTC簇的存在与患者较差的总生存期有关($P=0.001$)。CTC的上皮、间充质和干性标志物基因表达显示出重要的细胞可塑性,表明上皮间充质转化的中间表型与肿瘤的有效转移有关,且CTC的分子特征可以有效预测患者预后。结论 CTC的分子特征能够反映晚期TNBC患者的肿瘤状态,或可作为高度特异的生物标志物用于无创预后监测。

关键词: 循环肿瘤细胞; 三阴性乳腺癌; 预后; 转移; 上皮间充质转化

中图分类号: R 737.9; R 730.43 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2023)18-039-05 DOI: 10.7619/jcmp.20230815

Relationships of circulating tumor cells with prognosis and tumor status of triple-negative breast cancer

WANG Hao¹, LI Nanlin², CAO Hailing³

(1. Department of Pathology, 3. Department of Thyroid Gland and Mammary Gland Surgery, Panyu District Central Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong, 510000;
2. Department of Thyroid Gland and Mammary Gland Surgery, Xijing Hospital of Air Force Military Medical University of Chinese People's Liberation Army, Xi'an, Shaanxi, 710032)

Abstract: Objective To analyze the relationships of circulating tumor cell (CTC) with prognosis and tumor status of triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods** CTC was isolated from the peripheral blood of 32 patients confirmed as TNBC and 30 healthy controls, and molecular characteristics were analyzed. **Results** Compared with 23 patients with CTC count < 5 in 3.2 mL blood samples, 8 patients with CTC count ≥ 5 had worse progression-free survival and overall survival, and the difference was statistically significant ($P=0.033, 0.006$), suggesting that the CTC count was valuable in evaluating the prognosis of TNBC patients; among patients with CTC count ≥ 5 in 3.2 mL blood samples, the presence of CTC clusters was associated with poorer overall survival ($P=0.001$). Epithelial, mesenchymal, and dry marker gene expression of CTC showed important cellular plasticity, suggesting that the intermediate phenotype of epithelial mesenchymal transformation was associated with effective tumor metastasis, and the molecular characteristics of CTC can effectively predict patients' prognosis. **Conclusion** The molecular features of CTC can reveal the tumor status of patients with advanced TNBC and can be used as highly specific biomarkers with the potential for noninvasive prognostic monitoring.

Key words: circulation tumor cells; triple-negative breast tumor; prognosis; metastasis; epithelial mesenchymal transformation

乳腺癌(BC)是女性最常见的一种恶性肿瘤,且发病率呈逐年升高趋势^[1]。BC包括不同的亚

型,通常根据雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)以及人表皮生长因子受体 2 (HER2) 的状态进行分类^[2]。ER、PR、HER2 均阴性表达的三阴性乳腺癌(TNBC),由于具有疾病侵袭性高等特点且缺乏特异性治疗靶点,目前治疗难度较大^[3]。原发性肿瘤样本可反映特定肿瘤类型的相关特征,也可明确最具侵袭性肿瘤细胞的分子复杂性。基于循环肿瘤细胞(CTC)的研究可提供疾病的全面信息及不同位置肿瘤的特征,帮助识别新的生物标志物和治疗靶点,进而改善癌症患者预后^[4]。不同阶段 TNBC 患者的外周血中均存在 CTC^[5],CTC 簇在 TNBC 患者中常见且与不良预后相关^[6]。除了 CTC 对 TNBC 患者的预后价值之外,CTC 的表型和分子特征还可以用于实时液体活检。AGELAKI S 等^[7]发现,早期 TNBC 患者 CTC 表型具有异质性,而 HER2 阳性(HER2+)在疾病演变过程中一直存在。CTC 在肿瘤细胞转移过程中发生变化,这些变化主要与上皮间充质转化(EMT)过程、上皮标记物表达减少和可塑性、侵袭性增加有关,可使肿瘤细胞更能抵抗细胞衰老和死亡,从而影响肿瘤的治疗和预后^[8]。本研究从 32 例 III ~ IV 期 TNBC 患者外周血中分离出 CTC,用与癌症侵袭性和细胞可塑性相关的基因进行表征,以期确定新的生物标志物和治疗靶点,为 TNBC 患者的治疗方案制订和预后监测提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取广州市番禺区中心医院 2014—2017 年收治的 32 例 TNBC 患者作为研究对象。纳入标准:① 病理诊断符合《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015 版)》中的 TNBC 诊断标准者;② 首次发病或复发者;③ 血细胞计数、肝肾功能和血脂指标等正常者;④ 同意参与研究并签署知情同意书者。排除标准:① 乳腺急性炎症期患者;② 存在精神疾病或认知功能障碍者;③ 合并其他恶性肿瘤者;④ 哺乳期或妊娠期妇女。另选取 30 名匹配的健康人员作为对照,年龄 42 ~ 78 岁,平均 56.1 岁。本研究经广州市番禺区中心医院伦理委员会批准,所有受试者签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CTC 检测和分析:分别采集所有患者和

健康人员的外周血各 2 管(3.2 mL/管)。第 1 管外周血样先于室温条件下以 1 900 转/min 离心 5 min 弃上层血浆,再用氯化铵裂解红细胞后以 1 900 转/min 离心 5 min 去除红细胞碎片,加入磁珠孵育后去除白细胞,将剩余细胞悬液浓缩涂片。干燥后,使用抗人 CD45 和针对 7 号染色体着丝粒、8 号染色体着丝粒的探针通过 CD45 免疫染色和荧光原位杂交(FISH)技术检测 CTC。CD45 阴性,7 号染色体着丝粒或 8 号染色体着丝粒中任意 1 个阳性,4',6-二脒基-2-苯基喹啉阳性,则该样品被判定为 CTC。第 2 管外周血样用于分离上皮细胞黏附分子(EpCAM)阳性 CTC,将全血样品于室温下以 $600 \times g$ 离心 10 min,去除血浆,将细胞部分与涂有抗 EpCAM 抗体(克隆 Ber-EP4)的动态珠孵育并分离,产生磁场。富集步骤后,将与磁珠偶联的 CTC 重悬于 100 μ L RNeasy 中,并储存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境直至 RNA 提取。本研究将每 3.2 mL 血液中含 5 个 CTC 作为 CTC 阳性阈值,使用 Cytel 方法识别和计数 CTC,该方法结合了阴性富集、CD45 免疫染色和 FISH 技术(预实验中已确认技术细节,包括方法的准确性、线性和重现性)。CTC 检测使用 Cytel CTC 检测试剂盒和 Cytel CTC 检测系统,均由莱尔生物医药科技有限公司(莱尔生物)生产。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测基因表达:① 使用 Qiagen QIAmp 病毒 RNA 提取试剂盒提取 CTC 样本的 RNA,使用 Takara SuperScript III 反转录试剂盒合成 cDNA,使用 TaqMan PreAmp Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR 检测。将 CD45 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。② 使用 miRNeasy FFPE 提取试剂盒和脱蜡溶液从所有福尔马林固定石蜡包埋组织(FFPE)切片样品(3 个 10 μ m 切片)中提取 RNA,使用 Takara SuperScript III 反转录试剂盒合成 cDNA,使用 TaqMan PreAmp Master Mix 试剂盒进行实时定量 PCR 检测。将 GAPDH 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验或方差分析,计数资料以[n(%)]表示,组间比较采用卡方检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制患者生存曲线并进行分析,采用 Log-rank 检验比较生存期差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNBC 患者一般资料和临床病理特征分析

32 例 TNBC 患者年龄 33 ~ 80 岁, 平均 58.5 岁; 肿瘤分期为 III 期 9 例, IV 期 23 例; 样本状态为初诊 24 例, 复诊 8 例; 肿瘤转移 21 例, 其中 17 例为内脏转移, 4 例同时有内脏转移和骨转移; 肿瘤病理类型为导管原位癌 29 例、浸润性小叶癌 1 例、化生性乳腺癌 2 例, 组织学分级为 3 级 22 例, 2 级 10 例; 有手术史者 23 例, 未接受过任何抗肿瘤治疗者 5 例; Ki67 表达水平低 4 例、高 27 例, 表达阴性 1 例; 疾病进展期 20 例, 无进展生存期 (PFS) 为 0.5 ~ 45.2 个月, 平均 12.4 个月; 生存状态为生存 15 例、死亡 17 例, 总生存期

(OS) 为 0.5 ~ 45.2 个月, 平均 18.4 个月。

2.2 TNBC 患者 CTC 计数及其与预后的关系

采用 CytteI 技术检测 31 例患者 (另 1 例患者因出现假阴性情况被剔除) 外周血中 CTC 水平, 其中 8 例检出 ≥ 5 个 CTC, 3 例检出 CTC 簇。本研究未发现 CTC 计数与其他临床病理特征存在相关性。与 3.2 mL 血样中 CTC 计数 < 5 个的 23 例患者相比, CTC 计数 ≥ 5 个的 8 例患者 PFS、OS 均更差, 差异有统计学意义 ($P = 0.033$ 、 0.006), 表明 CTC 计数对 TNBC 患者预后具有评估价值; 3.2 mL 血样中 CTC 计数 ≥ 5 个的患者中, CTC 簇的存在与患者较差的 OS 有关 ($P = 0.001$)。见表 1。

表 1 31 例 TNBC 患者 CTC 水平与预后情况

指标	分类	n	无进展生存期/月		总生存期/月	
			平均值(95% CI)	P	平均值(95% CI)	P
CTC 计数	<5 个	23	22.7(14.3~31.3)	0.033	32.3(23.7~40.8)	0.006
	≥ 5 个	8	6.5(1.6~11.4)		11.9(4.8~19.1)	
CTC 簇	无(0 个)	28	20.7(13.2~28.3)	0.071	29.4(21.7~37.1)	0.001
	有(≥ 1 个)	3	6.0(0~14.3)		6.04(0~14.3)	
CTC 总况	<5 个 CTC	23	22.7(14.3~31.2)	0.077	32.3(23.7~40.8)	0.001
	≥ 5 个 CTC 但无 CTC 簇	5	6.8(0.8~13.4)		15.5(5.8~25.0)	
	≥ 5 个 CTC 且有 ≥ 1 个 CTC 簇	3	6.0(0~14.3)		6.04(0~14.3)	

CTC 计数、CTCs 簇结果均基于 3.2 mL 血样进行检测。

高水平 VIM 不仅与高水平的 EMT 启动子 (如 *TIMP1* 或 *SNAIL1*) 和干细胞标记物 (如 *CD44*、*ALDH2* 和 *CD49F*) 相关, 还与 *EPCAM*、*CDH1* 基因相关。受试者工作特征 (ROC) 曲线分析结果显示, 这些基因的曲线下面积 (AUC) 均 > 0.66 , 且 $P < 0.05$, 可区分患者与健康对照者, 证实其对肿瘤细胞转移具有诊断价值, 见表 2。

表 2 CTC 标记物的诊断价值

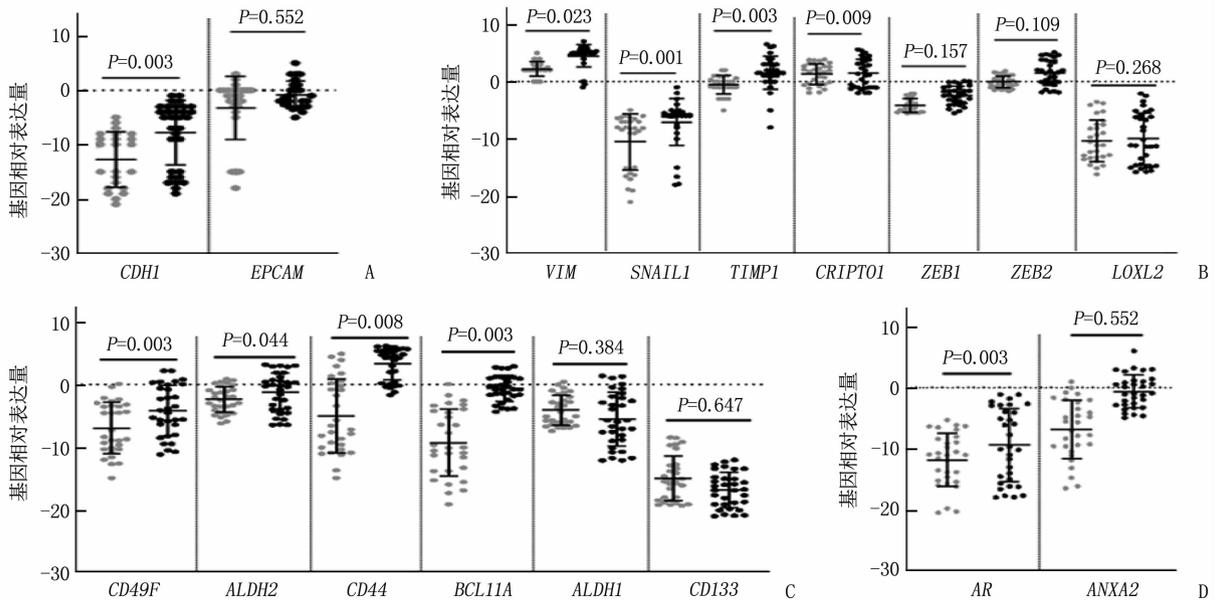
基因	AUC	P	95% CI
<i>EPCAM</i>	0.697	0.013	0.560~0.843
<i>AR</i>	0.758	0.001	0.633~0.884
<i>TIMP1</i>	0.764	0.001	0.636~0.891
<i>CRIP101</i>	0.727	0.004	0.595~0.858
<i>CDH1</i>	0.712	0.008	0.571~0.853
<i>VIM</i>	0.659	0.046	0.515~0.803
<i>CD49F</i>	0.755	0.001	0.624~0.887
<i>ALDH2</i>	0.648	0.063	0.502~0.795
<i>CD44</i>	0.696	0.014	0.554~0.837
<i>SNAIL1</i>	0.793	< 0.001	0.673~0.912
<i>BCL11A</i>	0.766	0.001	0.637~0.894
<i>GAPDH</i>	0.665	0.027	0.520~0.811

2.3 TNBC 患者 CTC 具有细胞高可塑性的特征

为了利用 CytteI 系统对 CTC 计数进行补充, 本研究于 EpCAM 阳性 CTC 免疫分离后通过 RT-qPCR 法对患者队列中的 CTC 群体进行表征, 将 30 名健康对照者的外周血样本作为所选基因的非 CTC 相关表达的参考对照。将 *GAPDH* 和 *CD45* 作为内参基因进行表达谱分析, 包括与 EMT、干性表型和 BC 侵袭性相关的基因。分析所有样本后, 本研究发现 CTC 群体的特点是表达上皮标志物 (*CDH1*、*EPCAM*), 与分离方法一致; 此外, 这些细胞还不同程度表达与间充质和更多恶性特征相关的基因 (如 *VIM*、*SNAIL1*、*TIMP1* 和 *CRIP101* 等) 以及干性标记物 (如 *CD49F*、*ALDH2*、*CD44* 和 *BCL11A* 等), 见图 1。

2.4 CTC 表达特征对患者预后的预测价值

以百分位数 70 作为临界值, 将基因表达水平分为高水平 and 低水平。高水平 *CD49F* 与转移肿瘤细胞存在相关性 ($P = 0.024$), 而非转移肿瘤细胞显示低水平 *AR* ($P = 0.035$) 和 *TIMP1* ($P = 0.014$)。为了确定 TNBC 患者 CTC 标志物的预



A: 上皮相关基因 (*CDH1*、*EPCAM*)；B: 间充质相关基因 (*VIM*、*SNAIL1*、*TIMP1*、*CRIP101*、*ZEB1*、*ZEB2*、*LOXL2*)；
C: 干细胞特征基因 (*CD49F*、*ALDH2*、*CD44*、*BCL11A*、*ALDH1* 和 *CD133*)；D: *AR*、*ANXA2* 基因。
灰色圆点代表健康对照者 ($n=30$) 基因表达水平,黑色圆点代表 TNBC 患者 ($n=32$) 基因表达水平。

图 1 TNBC 患者 CTC 和健康对照者 CTC 的基因表达谱比较

后价值,本研究进行 Kaplan-Meier 生存分析,结果显示,高水平的 *CD49F*、*ALDH2*、*CD44*、*GAPDH*、*TIMP1* 均与患者较短的 OS 显著相关 ($P < 0.05$),高水平的 *CD49F*、*GAPDH*、*TIMP1* 均与患者较短的 PFS 显著相关 ($P < 0.05$),见表 3。Cox 回归分析显示, *CD49F*、*TIMP1*、*GAPDH*、*ALDH2*、*CD44* 高水平患者的死亡风险显著增加,分别是低表达水平患者的 5.12、5.12、5.18、3.12、3.70 倍; *CD49F*、*TIMP1*、*GAPDH* 高水平患者的复发风险也显著增加,分别是低水平患者的 3.33、3.86、3.56 倍,见表 3。

表 3 CTC 标志物的单变量 Cox 回归分析

预后指标	基因	RR (95% CI)	P
总生存期	<i>CD49F</i>	5.12 (1.61 ~ 15.25)	0.006
	<i>ALDH2</i>	3.12 (1.16 ~ 8.41)	0.024
	<i>CD44</i>	3.70 (1.37 ~ 9.95)	0.010
	<i>TIMP1</i>	5.12 (1.87 ~ 14.02)	0.001
	<i>GAPDH</i>	5.18 (1.49 ~ 15.29)	0.004
无进展生存期	<i>CD49F</i>	3.33 (1.23 ~ 9.01)	0.018
	<i>TIMP1</i>	3.86 (1.39 ~ 10.70)	0.004
	<i>GAPDH</i>	3.56 (1.34 ~ 10.17)	0.014

本研究对所有差异表达的标记物进行二元 Logistic 回归和 ROC 曲线分析。分析结果显示, *TIMP1*、*SNAIL1*、*BCL11A* 三者联合是检测肿瘤细胞转移的最佳组合 (AUC 为 0.861, $P < 0.001$)。模型方程为 $\ln(\text{odds}) = 2.02 + 0.31 \times \textit{TIMP1}$ 表达 $+ 0.05 \times \textit{SNAIL}$ 表达 $+ 0.55 \times \textit{BCL11A}$ 表达。基于

这个模型,本研究能够以 0.756 的截断值和 100% 的特异度,识别出 60% 的患者存在转移性肿瘤细胞。

本研究进一步分析 CTC 标志物表达水平和 CTC 细胞计数后发现, CTC 计数 ≥ 5 个的患者具有更高水平的 *CDH1*、*EPCAM*、*TIMP1* ($P = 0.018$ 、 0.008 、 0.025),表明 CytteI 系统识别的 CTC 表达这 3 种标志物。为了确定标志物在肿瘤细胞转移过程中的作用,本研究分析了 19 例患者在诊断或手术时获得的原发肿瘤、转移组织和健康组织样本,并在原发肿瘤和非肿瘤组织的转移灶中发现 *EPCAM*、*SNAIL1*、*CD44*、*CDH1*、*TIMP1* 和 *BCL11A* 表达水平显著增高,说明其可能在肿瘤形成和转移过程中发挥重要作用。

3 讨论

近年来,研究^[9-10]证明 CTC 与不同类型肿瘤的预后有关。CTC 具有特殊的分子特征,是转移病灶形成的关键,而 TNBC 是最具侵袭性的 BC 亚型,具有高转移率和缺乏有效治疗靶点等特点^[11]。因此,对 TNBC 患者 CTC 进一步研究,或可为改善预后和明确诊断提供有用信息。

本研究基于 CytteI 系统发现患者 CTC 阳性检出率为 25.8% (8/31),这些患者均已出现转移。ZHANG Y W 等^[12]使用 CytteI 技术分析 286 例 I、II 和 III 期 TNBC 患者手术前后的 CTC 水平,发现各期的平均 CTC 含量分别为 23%、37% 和 56%。

MAGBANUA M J 等^[13] 基于 CytteI 系统发现 102 例 IV 期 TNBC 患者开始化疗前的 CTCs 检出率 (CTCs ≥ 5 个) 为 44%，而开始治疗后 15 d 时则降至 33%。由此表明，目前的技术还不能充分地检测 CTC。为了更好地探索 CTC 在 TNBC 中的潜在价值，本研究应用不同于既往研究^[14] 的方法深入探讨 CTC 的分子特征。

CDHI、EPCAM 在从 TNBC 患者样本中分离出的 CTC 中高表达，说明肿瘤细胞起源于上皮细胞。上皮蛋白的活性在肿瘤细胞定植的最后阶段尤为重要，此时肿瘤细胞必须增殖，以重建新的肿瘤病灶^[15]。TNBC 患者 CTC 中 VIM、SNAIL1、TIMP1、CRIPTO1、CD49F、ALDH2、CD44 和 BCL11A 等基因表达，表明存在间充质干细胞标记物，可能有助于肿瘤细胞在血液中的存活。研究^[16-17] 表明，从上皮到间充质特征的转变会诱导上皮起源的肿瘤细胞出现干细胞特性，这些中间表型与侵袭性有关。有研究^[18] 对 CTC 群体进行表征，发现这些中间表型的出现对肿瘤细胞的存活和定植有显著影响，与本研究结果一致。在渗入和迁移到血液的过程中，细胞可塑性使得 CTC 能够克服缺氧环境，避免凋亡和被免疫细胞识别，在极端恶劣的环境下生存^[19]。本研究发现，在转移性肿瘤患者 CTC 中，TIMP1、AR 和 CD49F 表达水平更高，这可能与 CTC 数量增加有关，且这些基因表达水平增高可能与疾病进展有关。本研究结果显示，表型可塑性更强的 EpCAM 阳性 CTC 与肿瘤恶性进展有关，这可为癌症患者提供有效的预后信息。

综上所述，CTC 计数及分子特征是获取疾病相关信息的有效途径，可为建立新的 TNBC 诊断、监测、预后评估方法提供参考依据，这种基于 CTC 液体活检的方法有可能成为探索 TNBC 扩散机制的重要工具。此外，本研究在 TNBC 患者 CTC 中发现了细胞可塑性，这可能与肿瘤的不良预后和高侵袭性有关。

参考文献

[1] 林小龙, 黄心瑜, 周一智. 乳腺癌组织环状 RNA ANKS1B 及上游转录因子 1 的表达及临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(5): 55-60.

[2] LUO J Y, LAI J G. Pyroptosis-related molecular classification and immune microenvironment infiltration in breast cancer: a novel therapeutic target[J]. J Cellular Molecular Medi, 2022, 26(8): 2259-2272.

[3] MANI S, HANDE A, BOICHUK S. Triple-negative breast cancer: the current aspects of pathogenesis and therapies[J]. BioNanoScience, 2022, 12(4): 1404-1435.

[4] RING A, NGUYEN-STRÄULI B D, WICKI A, et al. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(2): 95-111.

[5] ADDANKI S, MEAS S, SARLI V N, et al. Applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in precision oncology for breast cancers [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 7843.

[6] LISENCU L A, TRANCĂ S, BONCI E A, et al. The role of circulating tumor cells in the prognosis of metastatic triple-negative breast cancers: a systematic review of the literature[J]. Biomedicines, 2022, 10(4): 769.

[7] AGELAKI S, DRAGOLIA M, MARKONANOLAKI H, et al. Phenotypic characterization of circulating tumor cells in triple negative breast cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 5309-5322.

[8] ORRAPIN S, UDOMRUK S, LAPISATEPUN W, et al. Clinical implication of circulating tumor cells expressing epithelial mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell (CSC) markers and their perspective in HCC: a systematic review[J]. Cancers, 2022, 14(14): 3373.

[9] 王会珂, 罗茜, 魏千, 等. 基于炎症-免疫-营养评分和循环肿瘤细胞对食管癌根治术后患者构建预后列线图[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(4): 225-238.

[10] 马新寓, 郑亚赏, 周雪冰, 等. 循环肿瘤细胞在乳腺癌诊疗中的应用[J]. 生命科学, 2022, 34(4): 477-483.

[11] 俞毅麟, 肖艺, 赵娟娟, 等. 三阴性乳腺癌耐药细胞模型的构建及其生物学特性考察[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(22): 1901-1910.

[12] ZHANG Y W, LV Y D, NIU Y D, et al. Role of circulating tumor cell (CTC) monitoring in evaluating prognosis of triple-negative breast cancer patients in China[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 3071-3079.

[13] MAGBANUA M J, CAREY L A, DELUCA A, et al. Circulating tumor cell analysis in metastatic triple-negative breast cancers[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(5): 1098-1105.

[14] BARBAZÁN J, VIEITO M, ABALO A, et al. A logistic model for the detection of circulating tumour cells in human metastatic colorectal cancer[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(10): 2342-2349.

[15] YAMAMOTO A, DOAK A E, CHEUNG K J. Orchestration of collective migration and metastasis by tumor cell clusters[J]. Annu Rev Pathol Mech Dis, 2023, 18: 231-256.

[16] KUNDU P, SHANKAR B S. Macrophage induced ERK-TGF- β 1 signaling in MCF7 breast cancer cells result in reversible cancer stem cell plasticity and epithelial mesenchymal transition[J]. Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj, 2022, 1866(11): 130215.

[17] SANTOS M, FERREIRA M, OLIVEIRA P, et al. Epithelial-mesenchymal plasticity induced by discontinuous exposure to TGF β 1 promotes tumour growth[J]. Biology, 2022, 11(7): 1046.

[18] FINA E. Signatures of breast cancer progression in the blood: what could be learned from circulating tumor cell transcriptomes[J]. Cancers, 2022, 14(22): 5668.

[19] PANTEL K, ALIX-PANABIÈRES C. Crucial roles of circulating tumor cells in the metastatic cascade and tumor immune escape: biology and clinical translation[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(12): e005615.