

## 循环肿瘤细胞在结直肠癌免疫治疗中的应用前景

WAN Arabella H<sup>1,2</sup>, 李佳蕊<sup>3</sup>, 信文君<sup>1\*</sup>, 万国辉<sup>3\*</sup>

(1. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080;  
3. 中山大学药学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 液体活检的概念在十多年前被提出后, 很快就扩展到了循环肿瘤细胞 (CTC) 领域。CTC 作为一种新型的生物标志物, 具有无创、敏感、操作简易等传统影像学检测和活体检测无法比拟的优点, 正成为日渐重要的肿瘤诊疗技术。CTC 除了可以提供基因组层面的分析, 还可以由此得到转录组、蛋白组及表观遗传组等层面的信息。相比其他液体活检技术, CTC 检测能够提供更为完整的肿瘤遗传信息, 以及展示出更为详细的肿瘤发展轨迹。针对微卫星不稳定型 (MSI) 结直肠癌, 免疫疗法的预后最佳。CTC 的检测对结直肠癌预后评估、个性化用药与制定免疫治疗方案有着重要的临床应用价值。本综述系统总结了 CTC 分离方法和在肿瘤中的应用, 影响结直肠癌免疫疗效的预后因素, 以及对如何利用 CTC 检测表征来制定治疗方案, 动态检测疾病进展、判断预后、评价免疫疗效和精准治疗等展开了讨论和展望。

**关键词:** 循环肿瘤细胞; 液体活检; 免疫治疗; 结直肠癌; 精准治疗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2590-11

## Application and prospect of circulating tumor cell in colorectal cancer immunotherapy

WAN Arabella H<sup>1,2</sup>, LI Jia-rui<sup>3</sup>, XIN Wen-jun<sup>1\*</sup>, WAN Guo-hui<sup>3\*</sup>

(1. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** After the concept of liquid biopsy was proposed more than a decade ago, it has quickly expanded to the field of circulating tumor cell (CTC). As a novel biomarker, CTC has the advantages of non-invasiveness, sensitivity, and easy operation, which are incomparable with traditional imaging assay and *in vivo* detection, therefore it has been an increasingly important technology for tumor diagnosis and treatment. In addition to providing genomic analysis, CTC can provide information at the transcriptomic, proteomic, and epigenomic levels. Compared with other liquid biopsy methods, CTC detection can provide more complete tumor genetic information and show detailed traces of tumor development. Immunotherapy has the best prognosis for colorectal cancer with microsatellite instability (MSI). The detection of CTC has great clinical application value for the prognosis evaluation of colorectal cancer, personalized medicine and the formulation of immunotherapy plans. This review article systematically summarized the various methods of capturing CTC, the prognostic factors that affect the efficacy of colorectal cancer immunotherapy, and how to use CTC characterization to formulate treatment. Schemes, dynamic detection of disease progression, prognosis, evaluation of immunotherapy efficacy and precise treatment are also discussed and

收稿日期: 2022-04-09; 修回日期: 2022-05-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82122069, 82073869); 广东省基础与应用基础研究基金 (2021B1515020004, 2019A050510019); 广州市科技计划项目-基础与应用基础研究项目 (202002020051).

\*通讯作者 Tel: 86-20-39943495, E-mail: wanguoh@mail.sysu.edu.cn; xinwj@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0415

prospected.

**Key words:** circulating tumor cell; liquid biopsy; immunotherapy; colorectal cancer; precision therapy

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球范围内第三位高发恶性肿瘤,也是致死率第二的癌种<sup>[1]</sup>。大于 90% 结直肠癌是由结肠和直肠腺上皮细胞发展而来的腺癌,其他种类 CRC 还包括鳞状细胞癌、腺鳞癌、梭型细胞癌和未分化癌<sup>[2]</sup>。以往 CRC 多发病于 50 岁以上且以男性患者居多,但由于不健康的饮食生活习惯和沉重的生活压力等因素,近年来 CRC 发展呈现年轻化趋势。尽管肠镜筛查可以有效地降低死亡风险,但仍有大量患者初次诊断即为晚期转移性 CRC。目前, CRC 的治疗主要包括手术切除、化疗和生物免疫治疗。近十几年来,由于分子靶向技术的高速发展与新药研发上市, CRC 治疗方案有了很大的改善,虽然有效降低了发病率和死亡率<sup>[2]</sup>,但仍存在部分患者的治疗效果很差, CRC 的耐药性和易转移等特点仍是亟待解决的重要挑战。

CRC 具有显著的基因组不稳定性 (genomic instability), 其染色体畸变与基因序列突变的概率大幅度增加,导致 CRC 过度增殖与免疫逃逸。CRC 细胞基因组的不稳定性主要包括染色体不稳定性 (CIN)、微卫星不稳定性 (MSI) 和 CpG 岛甲基化表型 (CIMP), 这些特点增加了 CRC 的治疗难度<sup>[2]</sup>。除此之外, CRC 还存在明显的肿瘤内异质性。APC、TP53、KRAS、BRAF、PIK3CA 和 SMAD4 等是驱动 CRC 的关键基因<sup>[3]</sup>。精确检测 CRC 细胞中上述关键基因的变化有利于预后判断和改善靶向治疗、化疗方面的临床决策。

在过去,肿瘤学检测的标准做法是对切除的原发肿瘤进行活体组织检查分析,虽然这对肿瘤的生长、扩散情况等提供了必要的临床信息,但对原发肿瘤及其相关基质进行活体检测并不能提供实时的肿瘤进展信息,而且还有可能提供与转移特征有误的相关信息<sup>[4]</sup>。据报道,有相当一部分癌症患者在原发肿瘤切除后的随访过程中没有发现肿瘤转移病灶,但却在 5 年内发生了转移性复发,说明这些看似成功治愈的肿瘤患者其实具有隐匿不易检测的微转移或微小残留病灶 (MRD)<sup>[5]</sup>。由此,科学家们提出对血液或其他体液中的循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTC) 及循环肿瘤 DNA (ctDNA) 进行“液体活检”,用于早期检测原发肿瘤和肿瘤复发的监控、疗效的监控及研究耐药机制和寻找潜在的药物靶点。由于 CTC 是活的肿瘤细胞,较其他免疫治疗常用的生物标志物更能安全、实时、全面、动态地反映免疫治疗的效果,进而揭示发病

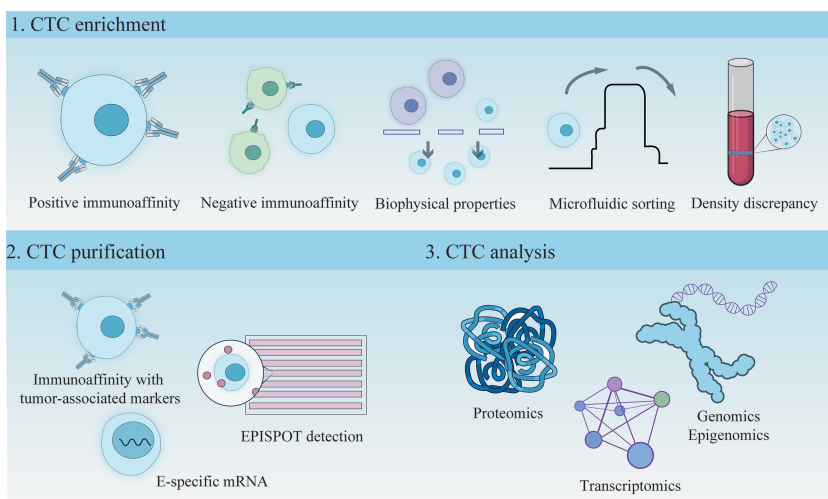
与转移机制。而且 CTC 保留着完整的肿瘤信息,可以支持单细胞测序、全转录组和表观遗传组分析,为预测免疫疗效提供更为精准的生物标志物和临床信息<sup>[5]</sup>。因此,近年来科学家们开发出了多种新的平台来高灵敏地检测不同亚型的 CTC,而 CTC 在 CRC 肿瘤研究中的应用价值也正逐步被发掘。

总而言之, CTC 的“液体检测”技术在未来 CRC 的诊断、治疗与随访中至关重要。这篇综述概述了当前热门的 CTC 分离和检测技术,并讨论 CTC 在 CRC 预防、治疗与预后中的临床价值,重点对 CTC 在评价免疫治疗疗效和精准治疗领域的作用进行了系统讨论和展望 (图 1)。

## 1 肿瘤循环细胞

1869 年,医生 Thomas Ashworth 首次在癌症转移的患者血液中发现了 CTC,并于 1955 年阐明了其与癌症进展和肿瘤转移的临床关系<sup>[6]</sup>。2007 年美国临床肿瘤协会首次将 CTC 列入肿瘤标志物行列<sup>[7]</sup>。CTC 指与原发肿瘤分离,进入循环系统或骨髓 (BM) 并在其中漂流或聚集的肿瘤细胞,其分子特征和表型与癌种、肿瘤进展程度、免疫微环境及癌症治疗手段有关。散布在骨髓中的 CTC 通常被称为散播性肿瘤细胞 (disseminating tumor cell, DTC)。大部分癌症患者或根治性治疗后有复发风险的患者血液循环中都存在 CTC,且高 CTC 评分往往意味着预后更差与转移能力更强<sup>[8,9]</sup>。2014 年一项研究表明,在 1 944 例转移性乳腺癌中 991 例患者 (46.9%) 检测出 CTC (每 7.5 mL 血液中分离出 5 个),且其存在与乳腺癌无进展生存期 (PFS) 和总生存期 (OS) 的降低相关<sup>[10]</sup>。同样,在一项包含胃肠道癌临床研究中, CTC 的高检出率也意味着患者的疾病进展加剧与化疗效果不佳有关<sup>[11]</sup>。因此, CTC 正成为癌症治疗领域中极具前途的一种新型生物标志物,对结直肠癌患者的预后监测、治疗实时观测、治疗后随访评估以及提升生存率具有重要的诊断意义。同时 CTC 的检测与分析也作为研究 CRC 发生发展与转移的重要医学手段。

过去几年中, CTC 在实时液体活检中的运用受到了广泛关注。一方面通过对 CTC 的分析,医生可以为结直肠癌患者提供早期诊断,确立最低疾病量,以及对早期患者的复发率做评估,也对患者的潜在转移提供了一种更方便的途径;另一方面,由于血液样本比较廉价,且容易获取,除了 CTC,血浆和血清也可以作为研



**Figure 1** Detection of circulating tumor cells (CTCs) in personalized medicine as liquid biopsy. CTC could be enriched by positive or negative immunoaffinity, and by biophysical properties *via* microfluidic sorting or density discrepancy. After purification, CTC could be verified by immunoaffinity with tumor-associated markers, E-specific mRNA or EPISPOT detection. Finally, CTC could be used for proteomic, genomic, epigenomic and transcriptomic analysis

研究对象,检测血液样本可以避免侵入性操作,而且可以重复获取<sup>[12]</sup>。但是如何用原理不同的方法和各种多样化实验来检测和验证 CTC,仍困扰着整个 CTC 研究领域。CTC 在肿瘤转移患者血液中浓度极低,数量极少(每毫升 6~10 个),而且它们的异质性也影响其细胞表面标志物的分离,因而给 CTC 检测分析工作带来了很大的挑战<sup>[13,14]</sup>。此外,离体后的 CTC 十分脆弱,容易发生表型变化甚至凋亡,使得针对 CTC 的功能研究备受局限<sup>[15]</sup>。最初的研究主要围绕着逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对 CTC 的上皮标志物,如 EpCAM 进行检测<sup>[16]</sup>。随着免疫治疗的发展,一些针对 CTC 的检测手段陆续被开发出来,其中以“液体活检”手段效果最为突出。“液体活检”具有高度的灵敏性可以实时分离出肿瘤患者隐藏在十几亿普通血液细胞中零星的肿瘤细胞。

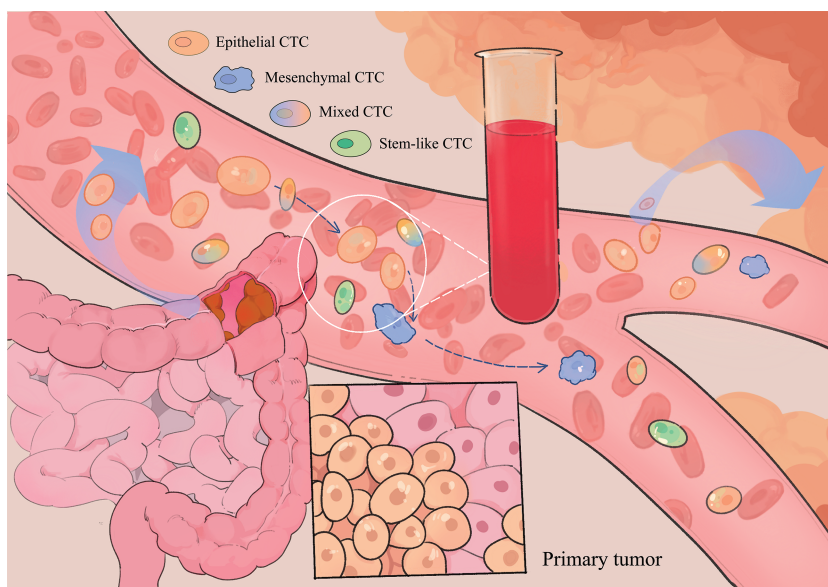
## 2 CTC 的分离方法

**2.1 生物分离方法** 生物分离法是使用特定的表面标志物,根据其免疫亲和力分选细胞的方法。原发肿瘤细胞在进入外周血循环的过程中通常会发生上皮-间质转变(EMT),按照细胞表型分类可以分为:① 上皮细胞表型:常见表面标志物为上皮细胞黏附分子(EpCAM)、细胞骨架蛋白成员(pan-CK、CK8、CK18、CK19 和 CK20)、黏蛋白 1(MUC1);② 间质细胞表型:常见表面标志物为波形蛋白(VIM);③ 上皮间质细胞混合表型;④ 干细胞表型[常见表面标志物为(CD44 和 CD133)<sup>[17]</sup>和醛脱氢酶 1(ALDH1)<sup>[18]</sup>。根据特定 CTC 表面标志物可以采用亲和性富集法进行分离(图 2)。

唯一经过 FDA 批准的杨森诊断公司的 CellSearch

系统是 CTC 检测的黄金标准,它可以捕捉到具有特定 EpCAM 高度表达的 CTC。随后, MagSweeper 系统则引入了 EpCAM 修饰的免疫磁珠,该磁珠适用于低至中度 EpCAM 表达的 CTC 分离<sup>[19]</sup>。随着 CTC 分离效率的提高, CTC 样本质量也逐渐提高。2010 年麻省总医院癌症研究中心的 Stott 教授等<sup>[20]</sup>设计研发出一种“人字形 CTC 芯片(HB-Chip)”,该芯片通过产生微涡流来促进 CTC 与 EpCAM 抗体包被的芯片表面之间的相互作用,从而能够灵敏并快速地分离 CTC。但该方法分离得到的 CTC 无法进行下一步的体外培养。因此,2013 年第三代 CTC 分离平台 CTC-iChip 系统被开发出来。该平台首先利用流体力学手段去除最小的血液组分,然后以正选法清除淋巴细胞,最后剩余细胞即为 CTC。该平台成功将生物分离和物理分离结合起来,并且能够以  $10^7$  个细胞/秒的速度从全血中分选出稀有的 CTC<sup>[21]</sup>。

**2.2 物理分离方法** 物理分离方法是基于 CTC 的物理特性,诸如尺寸(微滤器)、膜电荷(电泳)和密度(密度梯度离心)等对 CTC 进行分离。这些物理特性的组合与一些特定平台结合,如微流控技术,能够显示出捕捉 CTC 的巨大潜力。而这些方法分离 CTC 大多数都不需要特定的表面标记,虽然在原理上很简单,但这些技术必须依赖先进的材料或辅助性手段来取得良好的分离效果<sup>[19]</sup>。比如 AccuCyte 系统利用的是 CTC 特定密度,能将白细胞和血小板完全分离。分离后的 CTC 被 CyteFinder 系统识别和表征,其获得 CTC 计数的能力优于 CellSearch 系统,而 CTC 平均回收率也高达 90% 以上<sup>[22]</sup>。具体常见的分离 CTC 方法总结如



**Figure 2** CTC subtypes. CTCs can be characterized as epithelial subtype, mesenchymal subtype, mixed subtype (epithelial and mesenchymal) and stem-like subtype

下(表1)<sup>[21-29]</sup>。

### 3 CTC在肿瘤中的应用

越来越多的证据表明,炎症标志物如血细胞比率,包括白细胞计数和CTC检出率在CRC患者的预后和生存中发挥着重要作用<sup>[30]</sup>。这些细胞生物标志物可以在常规的血液检查中进行评估,并用于识别高风险患者或有可能从化疗、靶向治疗、免疫治疗中获益的患者。目前,CTC的分析可以为CRC的早期诊断提供有用信息,如识别最小残余疾病量和评估早期CRC患者的复发风险等,下面列举CTC在临床上的应用(图3)。

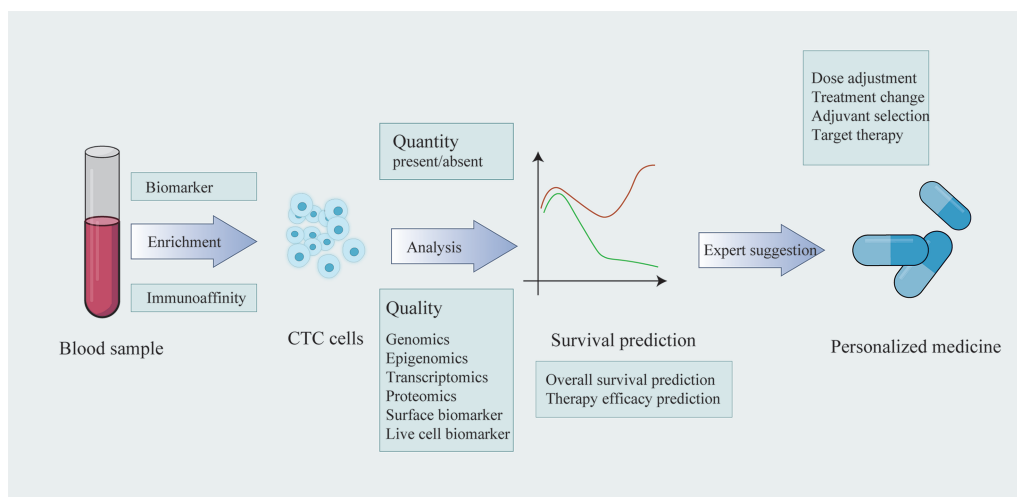
**3.1 新型血液生物标志物** CTC在外周血中的识别是基于上皮细胞表面标志物的表达水平或物理特征。CTC的出现表明了疾病的活跃度、肿瘤细胞增殖和转移能力。随后CTC可以提供基因组分析,提供肿瘤生

物学方面的信息及实时监测疗效<sup>[31]</sup>。常用于CTC分析的CRC表面标志物总结如下,其中CRC干细胞表面常用的细胞标志物包括有CD133、CD44、beta-catenin蛋白和EpCAM等(图4)。

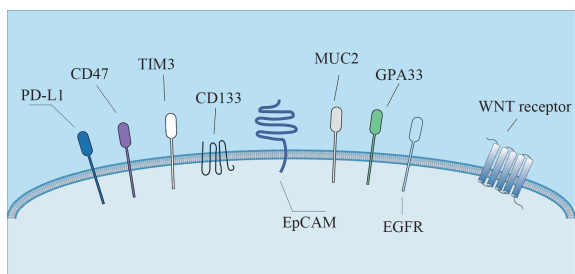
**3.2 临床预后的预测** 有大量的研究表明,CTC的数量和生物学特征具有重要的临床预后价值(图5)。如富含EpCAM的CTC可以作为多种癌症中一种可靠的预后工具。由于CTC具备RNA测序能力,其提供的转录组信息包括表观遗传组信息,对鉴定和预测该肿瘤的生物特性和发展状态具有重大的临床意义。目前,针对单个CTC细胞进行的RNA测序检测已被多个医疗机构用于分析预后的显著性、肿瘤的转移性及药品靶点和抗药性机制研究<sup>[32]</sup>。一项研究发现,转移性结直肠癌患者在切除肝转移肿瘤前后治疗的1个月内,其CTC计数(每7.5 mL中多于3个,即 $\geq 3/7.5$  mL)

**Table 1** Common platforms for CTC detection and validation. ICC: Immunocytochemistry; EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule; CK: Cytokeratins; CD45: Lymphocyte common antigen; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; HE: Hematoxylin and eosin; WG: Wright-Giemsa; qPCR: Real-time polymerase chain reaction

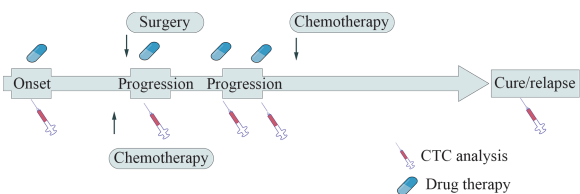
Platform	Separation	Validation method	Reference
CellSearch	Positive immunoaffinity by magnetic beads	ICC detection (CTC = EpCAM <sup>+</sup> /CK <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /DAPI <sup>+</sup> )	[23]
Parsortix	Microfluidic chips (relative larger sizes and smaller deformability)	ICC detection, cell-based detection, FISH detection, HE/WG staining, qPCR detection, RNA seq analysis	[24]
Cytophone	<i>In vivo</i> photoacoustic flow cytometry	Flow cytometry analysis	[25]
CellCollector	Positive enrichment of FSMW hydrogel-coupled immunoaffinity	ICC detection, qPCR detection, RNA seq analysis	[26]
EPISPORT	Microfluidic chips	ICC detection	[27]
EPIDROP	Microfluidic chips	Digital pathology detection, single-cell sequencing	[28]
LiquidBiopsy	Positive enrichment of biotin-ferromagnetic immunoaffinity	ICC detection, qPCR detection, RNA seq analysis	[29]
AccuCyte	Cell density gradient centrifugation	ICC detection, qPCR detection, RNA seq analysis	[22]
CTC-iChip	Positive enrichment by immunoaffinity chips	ICC detection, qPCR detection, RNA seq analysis	[21]



**Figure 3** Application of CTC analysis in clinic. CTC is enriched and purified for quantity analysis and quality analysis, which could serve as a biomarker for survival prediction and therapy efficacy prediction. CTC analysis is being used for personalized medicine



**Figure 4** Surface biomarkers of CTC in colorectal cancer (CRC). PD-L1: Programmed death ligand 1; CD47: Cluster of differentiation 47, known as integrin associated protein (IAP); TIM3: T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3; CD133: Cluster of differentiation 133, known as prominin-1; EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule; MUC2: Mucin 2; GPA33: Cell surface glycoprotein A33; EGFR: Epidermal growth factor receptor; WNT receptor: Frizzled G protein-coupled receptor



**Figure 5** CTC analysis in prognostic prediction. CTC detection could be monitored at various phases during treatments (surgery or chemotherapy), including onset, progression and cure/relapse

是该患者不良 OS 的独立预后因素<sup>[33]</sup>。手术前后高负荷 CTC 在预测复发和转移方面也有显著相关性<sup>[34]</sup>。针对切除肝转移的 CRC 患者中,发现术前 CTC 分析呈阳性 ( $\geq 2/7.5$  mL),即使是手术完全切除,患者的 PFS 和 OS 的指标呈现更差<sup>[35]</sup>。而在非转移性 CRC 患者中,术后 CTC 水平和术前肿瘤生物标志物 CA125 水平

与肿瘤复发呈现显著相关<sup>[36]</sup>。间质型 CTC 与总 CTC 的比率可以评估 CRC 患者的预后和转移<sup>[37]</sup>。有研究报告,CTC 的染色体变异与肿瘤组织染色体变异及相应的转移阶段存在一致性,CTC 的分子特征可以用来评估 CRC 复发和转移状态<sup>[38]</sup>。如间质型 CTC 常出现在转移性 CRC 患者中,CTC 上高表达 EMT 相关基因 Akt-2 的患者预后较差<sup>[39]</sup>。一项研究 73 例 CRC 患者不同表型 CTC 中环氧化酶-2 (COX-2) 的表达与间质型 CTC 和转移性密切相关,表明了间质型 CTC (COX-2 阳性) 具有早期检测转移和评估预后的潜力<sup>[40]</sup>。

**3.3 免疫检查点治疗** 免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICI) 是近年来抗肿瘤免疫治疗的重点之一。常用的免疫检查点包括细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白质 4 (CTLA-4) 及其抑制剂、程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) 及其抑制剂及 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3 (TIM3) 抑制剂<sup>[41]</sup>。其中以 PD-1/PD-L1 通路抑制剂研究最为深入,肿瘤细胞利用自身诱导 PD-L1 异常表达来保护自身免受机体免疫反应的影响。逻辑上说,通过阻断 CTC 上的免疫检查点,可以激活自身免疫系统来消除血液循环中的 CTC,这为减少恶性肿瘤的复发和转移提供了一个新的途径<sup>[42]</sup>。另外,肿瘤细胞也会上调 CD47,一个可以与调节蛋白  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 结合,从而向巨噬细胞传递抑制性信号并抑制吞噬作用的受体蛋白,可以作为 CTC 上一个“不要吃我”的信号逃避免疫杀伤<sup>[43]</sup>。因此,2019 年一项研究开展了同时抑制 PD-L1 和 CD47 双检查点,阻断“不要找到我”信号和“不要吃我”信号,结果发现阻断双检查点可以更高效地阻断 CTC 的转移<sup>[44]</sup>。

另外一个检查点 TIM3 在多种免疫细胞和白血病

干细胞表面均有表达,作为T细胞抑制受体并阻碍免疫治疗的进展。在癌症中,TIM3高表达标志着免疫失调与T细胞耗竭,阻断TIM3可以有效增强免疫治疗的效果<sup>[45]</sup>。CTLA-4是一种白细胞分化抗原,与CD28分子具有高度的同源性,与其受体结合后可向T细胞传递抑制信号<sup>[46]</sup>。有研究在分析了10名肺癌患者组织样本和血液中74种生物标志物与CTC的关系后发现,CTC数目与CTLA4、TIM3、PD-1之间存在强关联性<sup>[47]</sup>。但是CTLA4、TIM3等其他更多免疫检查点与CTC的关系及相互作用机制有待进一步的研究。

#### 4 基于MSI结直肠癌的免疫疗法

在过去治疗难治性实体瘤如黑色素瘤和肺癌中发现,高肿瘤突变负荷(TMB)已经成为多种癌症免疫治疗反应性一个重要的标志<sup>[48,49]</sup>。在结直肠癌中,根据突变模式,可分为MSI型(每 $10^6$ 个DNA碱基>12个突变)和MSS型(每 $10^6$ 个DNA碱基<8.24个突变)。DNA错配修复(MMR)功能则可以通过检测MMR蛋白MLH1(MutL homolog 1)、MSH2(MutS homolog 2)、MSH6(MutS homolog 6)或PMS2(PMS1 homolog 2)的表达量来判断。临床研究发现,MSI型CRC存在大量浸润的免疫细胞,包括CD8<sup>+</sup>肿瘤浸润淋巴T细胞(TILs)、T helper 1细胞和M1型巨噬细胞;与MSS型CRC相比,MSI型CRC的肿瘤微环境中还检测到丰富的干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )信号。从疾病进展程度分析,转移性结直肠癌(mCRC)患者的预后普遍较差,但由MSI型CRC发展而来的晚期mCRC患者(仅占有mCRC的2%~4%)体内的PD-1、PD-L1和CTLA-4蛋白表达量显著上调,这些现象预示这些患者可能对ICI疗法反应良好<sup>[50]</sup>。因此,在2017年美国FDA批准ICI用于治疗MSI型CRC患者。而与MSI型患者不同,单独的ICI治疗在占绝大多数MSS型mCRC患者中并没有显示出临床效益,这可能是由于低TMB和缺乏浸润的效应免疫细胞从而产生免疫抵抗,肿瘤微环境对免疫细胞的招募能力应该是免疫治疗效果的根本保证<sup>[51,52]</sup>。

PD-1抑制剂和其他免疫检查点分子(如CTLA-4)的抑制剂联合治疗可能对一小部分MSS型CRC患者有益,但大多数MSS型患者仍需要联合其他治疗方法进行治疗<sup>[53]</sup>。通常有几种联合治疗的思路,包括MEK(mitogen-activated protein kinase kinase)抑制剂和PD-1抑制剂联合疗法、双特异性抗体治疗、化疗和抗血管新生联合治疗、免疫治疗和放疗联合治疗<sup>[54]</sup>。研究发现,RAS-MAPK通路的激活不仅对肿瘤细胞有直接的促增殖作用,还与T细胞向肿瘤浸润程度的减少有关,相反,抑制MEK这条通路的下游效应,可以诱导依赖IFN- $\gamma$ 的HLA(human leukocyte antigen)和PD-L1表达

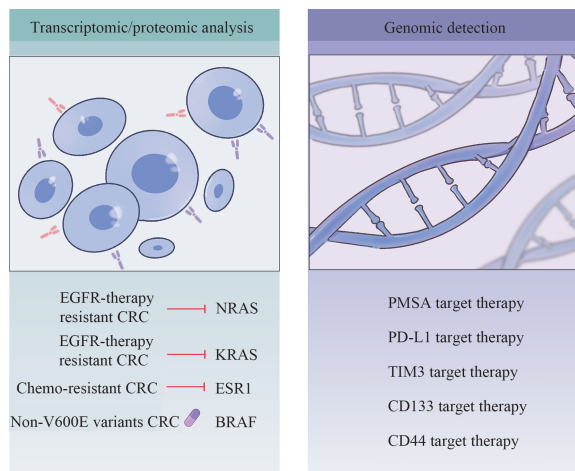
上调,从而增强PD-1/PD-L1抑制剂的抗肿瘤活性<sup>[55,56]</sup>。正在进行的针对MSS型CRC患者的免疫治疗和靶向治疗相结合的研究包括了联合cobimetinib、nivolumab和ipilimumab治疗的II期临床研究和另一项联合cobimetinib、atezolizumab和贝伐珠单抗治疗的Ib期临床研究,相信联合治疗这个思路在不久后将会在临床上得到大量应用。

双特异性抗体是一类新型的工程抗体,具有与两个不同靶点结合的能力。CEA-TCB是一个T细胞双特异性抗体,能同时结合癌胚抗原(CEA)和T细胞表面的CD3从而交联肿瘤细胞和T细胞,引导T细胞的参与和特异性识别肿瘤细胞,增强T细胞的浸润能力和肿瘤炎症反应<sup>[57,58]</sup>。CEA-TCB是第一种在实体瘤特别是MSS型CRC患者中显示出疗效的T细胞双特异性抗体,目前仍处于临床I期试验。有研究表明,肿瘤化疗后对检查点阻断疗法敏感,因此免疫治疗联合化疗也是一个思路<sup>[59]</sup>。在一项黑色素瘤患者治疗中发现,抗血管生成的药物(贝伐珠单抗)具有明显的免疫调节作用,和单独给药ipilimumab相比,联合贝伐珠单抗可以增加CD8<sup>+</sup>T细胞向肿瘤的浸润<sup>[60]</sup>。因此,阿特佐利单抗(atezolizumab)联合贝伐珠单抗和化疗正在难治性MSS型CRC患者中进行临床试验,结果发现,14例MSS型CRC患者在接受atezolizumab加贝伐珠单抗治疗后,1例(7%)有临床反应,9例(64%)病情稳定。随后的相关性分析显示,经过化疗后,无论是否给予atezolizumab和贝伐珠单抗治疗,肿瘤中CD8<sup>+</sup>T细胞浸润和PD-L1表达均增加<sup>[61]</sup>。另外,放疗辐射会对肿瘤细胞造成DNA损伤,产生新抗原库,从而增强对T细胞识别的免疫原性<sup>[62]</sup>。之前有报道,pembrolizumab联合射频消融术或体外照射治疗CRC患者的临床研究,22例接受体外照射的患者中,1例有反应,但接受射频消融的患者无反应。另外,CTLA-4和PD-L1的双重免疫检查点阻断疗法联合放疗或射频消融术目前正在研究中<sup>[30]</sup>。将来,针对增强MSS型CRC患者的免疫疗法还需深入研究。

#### 5 CTC为预测CRC免疫疗法提供依据

PD-1抑制剂在MSI型CRC患者中获得持久反应的结果,成功预示着治疗mCRC型患者新时代的到来。然而,除了MSI基因型作为临床验证过的mCRC免疫治疗的生物标志物,研究者迫切需要更多的生物标志物来预示mCRC免疫治疗反应。而CTC作为治愈性治疗后残留疾病的重要标志物,它的增加或新克隆的出现均与MSS型mCRC患者随后的疾病进展有关<sup>[63,64]</sup>。目前,已有多项研究在评估强化辅助治疗对根治性治疗后CTC阳性患者的作用、在早期治疗反应

评估中的作用及在指导全身治疗中的作用<sup>[30]</sup>。因此,结合 CTC 对于免疫治疗生物标志物的检测,一方面能够很好地解决活体检测遇到的难题;另一方面由于组织取样灵活而且能够多次无创取样,CTC 能够辅助免疫治疗伴随的诊断和作为生物标志物提供预后评估和免疫疗效监测(图6)。



**Figure 6** Application of CTC analysis in chemotherapy and immunotherapy in CRC. Detection of CTC could provide transcriptomic, proteomic and genomic information to assist in personalized therapy, including target-therapy, chemotherapy and immunotherapy

**5.1 PD-L1 表达** PD-L1 是 T 细胞表面的共抑制受体,也在多种 CTCs 上高表达。PD-L1 在肿瘤细胞(肿瘤比例评分, TPS)和 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润(肿瘤浸润免疫细胞, IC)或两者(组合阳性评分, CPS)上的表达已被确定作为对 ICI 反应的潜在预测因子。此外,已经开发了几种 PD-L1 抗体用于免疫组织化学染色,PD-L1 的表达模式可以根据所用抗体和病理医生的检测判断而变化<sup>[65]</sup>。在一项临床研究 KEYNOTE-016 中,膜表面 PD-L1 的表达仅发生在基因配对修复缺陷(dMMR)癌症患者中,并且在肿瘤浸润淋巴细胞和位于肿瘤侵袭前沿的肿瘤浸润巨噬细胞上表达显著<sup>[66]</sup>。但是,膜表面 PD-L1 的表达在结直肠癌患者中尚未确定为有效的生物标志物。2017 年一项研究开发了工程化释放 PD-L1 抗体的血小板,其能有效靶向和攻击小鼠体内的 CTC<sup>[67]</sup>。虽然目前 PD-L1 的表达作为预测免疫疗法最成熟的生物标志物,但仅分析 PD-L1 的表达并不足以对患者肿瘤进展进行精准分析与预测。为了评估肿瘤中的 PD-L1 表达,组织 PD-L1 活检是一种常见的方法<sup>[68]</sup>。然而,这使患者面临着并发症和检测延迟的风险。而有限的样本可能不足以代表整个肿瘤的异质性。在这种情况下,PD-L1 在 CTC 上的表达检测可以

克服肿瘤组织 PD-L1 活检的缺点。在胃肠道肿瘤中,高表达 PD-L1 的 CTC 可以认为是一个预测因素,因此 PD-L1 的表达量被临床上判断作为筛选患者进行 PD-1/PD-L1 阻断疗法的一个预测因素,而测量 CTC 上 PD-L1 动态的变化同时可以监测 ICI 治疗的响应效果<sup>[69,70]</sup>。CTC 的检测目前被应用于对免疫治疗进行指导,通过检测 CTC 表面的分子特征,科学家们可以进一步揭示个体有效的治疗靶点如 PD-L1,从而对患者进行个性化治疗<sup>[71]</sup>。

**5.2 TMB** TMB 可导致肿瘤产生许多新抗原,增加 T 细胞反应性和不同肿瘤类型对免疫检查点抑制剂的反应性<sup>[72,73]</sup>。基于预处理患者免疫治疗反应率的提高,FDA 最终批准了单药派姆单抗用于每一百万个碱基中 TMB 大于 10 个的所有实体瘤类型<sup>[74-77]</sup>。有研究表明,在 52 例结直肠癌患者中,CTC 与原发肿瘤存在 5.77% KRAS (KRAS proto-oncogene, GTPase)、3.85% BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) 的突变不一致,但其余肿瘤突变负荷 CTC 与原发肿瘤存在显著相关,因此,检测 CTC 可以有效地预测患者 TMB 状态<sup>[78]</sup>。在接受双重免疫检查点抑制剂治疗的早期结肠癌患者中,尽管治疗前肿瘤细胞 TMB 较低,但在基因配对修复完善型(pMMR)肿瘤中观察到了免疫反应,并且 TMB 在 pMMR 反应者和非反应者之间并没有差异<sup>[79]</sup>。虽然高 TMB 是许多实体瘤中免疫检查点抑制剂的重要指征,但它似乎并不能准确预测结直肠癌患者的反应<sup>[80]</sup>。最近针对中国结直肠癌患者全外显子测序的研究表明,TMB 可以作为一个有效的生物标志物来表征免疫治疗临床获益<sup>[81,82]</sup>。利用单细胞测序与基因组测序能有效地评估结直肠癌患者 CTC 的 TMB 状态<sup>[83,84]</sup>。目前,利用 CTC 评估免疫检查点抑制剂单独使用或与其他药物联合治疗 TMB 高的结直肠癌的研究正在进行中,相信不久会得到更多的临床数据证明。

**5.3 DNA 聚合酶 epsilon (POLE) 突变** POLE 是具有校对活性的外切核酸酶,其种系突变与结肠息肉病和结直肠癌的易感性有关<sup>[85]</sup>。有研究证明,在脑胶质瘤 CTC 簇中能检测出 POLE 的突变<sup>[86]</sup>。体细胞 POLE 上校对域突变导致基因组上插入缺失、错义突变和无义突变的积累,从而导致肿瘤 pMMR/MSS 具有高 TMB (范围为每 100 万碱基出现 50~200 个突变)<sup>[87]</sup>。POLE 的突变与结直肠癌免疫治疗响应性存在明显的相关性<sup>[88,89]</sup>,而对 mCRC 患者检测 CTC 中突变等位基因(包括 POLE)可以对药物治疗反应进行评估和预判<sup>[90]</sup>。导致校对缺陷的 POLE 突变主要是错义突变<sup>[91]</sup>,并且免疫治疗临床研究调查了在具有外切核酸

酶域 POLE 突变的肿瘤患者的 II 期单臂队列中 PD-1 的阻断与纳武单抗的疗效和耐受性相关。欧洲肿瘤医学学会 (ESMO) 2020 上公布的初步结果表明, 在具有致病性 edPOLE 突变 (P286R、N363K、V411L) 的患者中, ORR 为 50% ( $n = 3/6$ )。因此, 直接从 CTC 上检测 POLE 的突变可以作为结直肠癌对免疫检查点抑制剂反应的有效的生物标志物, 也提供了更为便捷的非侵入式检测方法。

## 6 CTC 研究的前景展望

CTC 研究在过去十几年为癌症检测打开了新的大门, 对肿瘤个性化治疗具有重要的临床意义。目前, CTC 作为一种药物引起癌症变异的生物标记, 其分子特性可以提供额外的信息。比如通过单细胞测序分析 CTC 能够提供患者之间的异质性, 能够进一步阐明患者耐药的分子机制。相对于其他液体活检而言, CTC 的转录分析能给对不同器官土壤下肿瘤克隆的侵袭性进行深入的探讨, 结合蛋白组学和转基因小鼠, 为建立 CTC 的后续研究提供了一个连接临床的平台。另外, 临床试验协会比如美国的 BLOODPAC 和欧洲的 CANCER-ID 对越来越多的 CTC 临床应用开展了预分析和建立了分析标准, 而且对标准操作的规范化进行广泛的校正, 也针对 CTC 质量控制和稳定性开发一些合适的材料。相信在不久的将来, CTC 可以作为连接临床和基础的桥梁, 为抗肿瘤药物开发提供一个标准化的平台。

**作者贡献:** WAN Arabella H. 负责执笔、构思作图; 李佳蕊负责作图和调研文献; 信文君、万国辉指导、修改和审校。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [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 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [2] Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16: 713-732.
- [3] Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer [J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10: 13-27.
- [4] Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10: 374-394.
- [5] Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377: 1836-1846.
- [6] Engell HC. Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation [J]. *Acta Chir Scand Suppl*, 1955, 201: 1-70.
- [7] Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 5287-5312.
- [8] Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 827-835.
- [9] Miyamoto DT, Lee RJ, Kalinich M, et al. An RNA-based digital circulating tumor cell signature is predictive of drug response and early dissemination in prostate cancer [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8: 288-303.
- [10] Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 406-414.
- [11] Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15: 3092-3100.
- [12] Galvis MM, Romero CS, Bueno TO, et al. Toward a new era for the management of circulating tumor cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1286: 125-134.
- [13] Yin W, Zhu J, Ma B, et al. Overcoming obstacles in pathological diagnosis of pulmonary nodules through circulating tumor cell enrichment [J]. *Small*, 2020, 16: e2001695.
- [14] Stoecklein NH, Fischer JC, Niederacher D, et al. Challenges for CTC-based liquid biopsies: low CTC frequency and diagnostic leukapheresis as a potential solution [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16: 147-164.
- [15] Francart ME, Lambert J, Vanwynsberghe AM, et al. Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: travel companions to metastases [J]. *Dev Dyn*, 2018, 247: 432-450.
- [16] Becker S, Becker-Pergola G, Banys M, et al. Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 117: 227-233.
- [17] Jiang M, Jin S, Han J, et al. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer [J]. *Biomark Res*, 2021, 9: 85.
- [18] Grillet F, Bayet E, Villeronce O, et al. Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in *ex vivo* culture [J]. *Gut*, 2017, 66: 1802-1810.
- [19] Zhong X, Zhang H, Zhu Y, et al. Circulating tumor cells in cancer patients: developments and clinical applications for immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19: 15.
- [20] Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 18392-18397.
- [21] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating

- tumor cells [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 179ra147.
- [22] Ramirez AB, U'Ren L, Campton DE, et al. RareCyte(R) CTC analysis step 1: AccuCyte(R) sample preparation for the comprehensive recovery of nucleated cells from whole blood [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1634: 163-172.
- [23] Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 4589-4594.
- [24] Miller MC, Robinson PS, Wagner C, et al. The Parsortix Cell Separation System—a versatile liquid biopsy platform [J]. *Cytometry A*, 2018, 93: 1234-1239.
- [25] Galanzha EI, Menyayev YA, Yadem AC, et al. *In vivo* liquid biopsy using Cytophone platform for photoacoustic detection of circulating tumor cells in patients with melanoma [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11: eaat5857.
- [26] Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, et al. A novel method for the *in vivo* isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41: 1241-1250.
- [27] Deneve E, Riethdorf S, Ramos J, et al. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients [J]. *Clin Chem*, 2013, 59: 1384-1392.
- [28] Lee J, Kwak B. Simultaneous on-chip isolation and characterization of circulating tumor cell sub-populations [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 168: 112564.
- [29] Winer-Jones JP, Vahidi B, Arquilevich N, et al. Circulating tumor cells: clinically relevant molecular access based on a novel CTC flow cell [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e86717.
- [30] Huyghe N, Baldin P, Van den Eynde M. Immunotherapy with immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer: what is the future beyond deficient mismatch-repair tumours? [J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2020, 8: 11-24.
- [31] Boussios S, Ozturk MA, Moschetta M, et al. The developing story of predictive biomarkers in colorectal cancer [J]. *J Pers Med*, 2019, 9: 12.
- [32] Gao Y, Ni X, Guo H, et al. Single-cell sequencing deciphers a convergent evolution of copy number alterations from primary to circulating tumor cells [J]. *Genome Res*, 2017, 27: 1312-1322.
- [33] Bidard FC, Kiavue N, Ychou M, et al. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA detection in potentially resectable metastatic colorectal cancer: a prospective ancillary study to the unicancer prodige-14 trial [J]. *Cells*, 2019, 8: 516.
- [34] Hinz S, Hendricks A, Wittig A, et al. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients—a prospective study [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17: 53.
- [35] Arrazubi V, Mata E, Antelo ML, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing resection of colorectal cancer liver metastases. Clinical utility for long-term outcome: a prospective trial [J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26: 2805-2811.
- [36] Wang D, Yang Y, Jin L, et al. Prognostic models based on post-operative circulating tumor cells can predict poor tumor recurrence-free survival in patients with stage II-III colorectal cancer [J]. *J Cancer*, 2019, 10: 4552-4563.
- [37] Wang W, Wan L, Wu S, et al. Mesenchymal marker and LGR5 expression levels in circulating tumor cells correlate with colorectal cancer prognosis [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2018, 41: 495-504.
- [38] Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 892-901.
- [39] Ning Y, Zhang W, Hanna DL, et al. Clinical relevance of EMT and stem-like gene expression in circulating tumor cells of metastatic colorectal cancer patients [J]. *Pharmacogenomics J*, 2018, 18: 29-34.
- [40] Cai J, Huang L, Huang J, et al. Associations between the cyclooxygenase-2 expression in circulating tumor cells and the clinicopathological features of patients with colorectal cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 4935-4941.
- [41] Morad G, Helmink BA, Sharma P, et al. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade [J]. *Cell*, 2021, 184: 5309-5337.
- [42] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 252-264.
- [43] Chen J, Zhong MC, Guo H, et al. SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells *via* Mac-1 integrin [J]. *Nature*, 2017, 544: 493-497.
- [44] Lian S, Xie R, Ye Y, et al. Dual blockage of both PD-L1 and CD47 enhances immunotherapy against circulating tumor cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 4532.
- [45] Acharya N, Sabatos-Peyton C, Anderson AC. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e000911.
- [46] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 336-347.
- [47] Wang X, Jaimes M, Gu H, et al. Cell by cell immuno- and cancer marker profiling of non-small cell lung cancer tissue: checkpoint marker expression on CD103<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T-cells predicts circulating tumor cells [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14: 100953.
- [48] Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types [J]. *Nat Genet*, 2019, 51: 202-206.
- [49] Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30: 44-56.
- [50] Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5: 43-51.
- [51] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict

- clinical outcome [J]. *Science*, 2006, 313: 1960-1964.
- [52] Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade [J]. *Science*, 2017, 357: 409-413.
- [53] Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 773-779.
- [54] Xu J, Geng M, Huang M. Mechanistic advancement in chemotherapeutic agents modulated antitumor immune response [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1741-1748.
- [55] Liu L, Mayes PA, Eastman S, et al. The BRAF and MEK inhibitors dabrafenib and trametinib: effects on immune function and in combination with immunomodulatory antibodies targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 1639-1651.
- [56] Ebert PJR, Cheung J, Yang Y, et al. MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade [J]. *Immunity*, 2016, 44: 609-621.
- [57] Bacac M, Fauti T, Sam J, et al. A novel carcinoembryonic antigen T-cell bispecific antibody (CEA TCB) for the treatment of solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 3286-3297.
- [58] Liu B, Luo J. Research and development of innovative antibody-based drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1811-1819.
- [59] Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, et al. Immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to checkpoint blockade therapy [J]. *Immunity*, 2016, 44: 343-354.
- [60] Hodi FS, Lawrence D, Lezcano C, et al. Bevacizumab plus ipilimumab in patients with metastatic melanoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2: 632-642.
- [61] Bendell J, Powderly J, Lieu C, et al. Safety and efficacy of MPDL3280A (anti-PDL1) in combination with bevacizumab (bev) and/or FOLFOX in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 704.
- [62] Park SS, Dong H, Liu X, et al. PD-1 restrains radiotherapy-induced abscopal effect [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3: 610-619.
- [63] McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade [J]. *Science*, 2016, 351: 1463-1469.
- [64] Anagnostou V, Smith KN, Forde PM, et al. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7: 264-276.
- [65] Kintsler S, Cassataro MA, Drosch M, et al. Expression of programmed death ligand (PD-L1) in different tumors. Comparison of several current available antibody clones and antibody profiling [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2019, 41: 24-37.
- [66] Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 2509-2520.
- [67] Wang C, Sun W, Ye Y, et al. *In situ* activation of platelets with checkpoint inhibitors for post-surgical cancer immunotherapy [J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 0011.
- [68] Tang J, Yu JX, Hubbard-Lucey VM, et al. Trial watch: the clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 854-855.
- [69] Yue C, Jiang Y, Li P, et al. Dynamic change of PD-L1 expression on circulating tumor cells in advanced solid tumor patients undergoing PD-1 blockade therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7: e1438111.
- [70] Yan S, Sun L, Wan G. The mechanism and research progress of drug resistance of PD-1/PD-L1 immunotherapy in tumors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1728-1734.
- [71] Papadaki MA, Koutsopoulos AV, Tsoulfas PG, et al. Clinical relevance of immune checkpoints on circulating tumor cells in breast cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 376.
- [72] Stenzinger A, Allen JD, Maas J, et al. Tumor mutational burden standardization initiatives: recommendations for consistent tumor mutational burden assessment in clinical samples to guide immunotherapy treatment decisions [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58: 578-588.
- [73] Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, et al. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 183.
- [74] Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378: 2093-2104.
- [75] Ott PA, Bang YJ, Piha-Paul SA, et al. T-cell-inflamed gene-expression profile, programmed death ligand 1 expression, and tumor mutational burden predict efficacy in patients treated with pembrolizumab across 20 cancers: KEYNOTE-028 [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37: 318-327.
- [76] Ready N, Hellmann MD, Awad MM, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 568): outcomes by programmed death ligand 1 and tumor mutational burden as biomarkers [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37: 992-1000.
- [77] Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer [J]. *Science*, 2015, 348: 124-128.
- [78] Lyberopoulou A, Aravantinos G, Efsthathopoulos EP, et al. Mutational analysis of circulating tumor cells from colorectal cancer patients and correlation with primary tumor tissue [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0123902.
- [79] Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21: 1353-1365.
- [80] Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers [J]. *Nat Med*, 2020, 26: 566-576.

- [81] Zhou C, Chen S, Xu F, et al. Estimating tumor mutational burden across multiple cancer types using whole-exome sequencing [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9: 1437.
- [82] Li Y, Ma Y, Wu Z, et al. Tumor mutational burden predicting the efficacy of immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 751407.
- [83] Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, et al. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 360.
- [84] Kojima M, Harada T, Fukazawa T, et al. Single-cell DNA and RNA sequencing of circulating tumor cells [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 22864.
- [85] Rayner E, van Gool IC, Palles C, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 71-81.
- [86] Krol I, Castro-Giner F, Maurer M, et al. Detection of circulating tumour cell clusters in human glioblastoma [J]. *Br J Cancer*, 2018, 119: 487-491.
- [87] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487: 330-337.
- [88] Hwang HS, Kim D, Choi J. Distinct mutational profile and immune microenvironment in microsatellite-unstable and POLE-mutated tumors [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9: e002797.
- [89] Ajayi OE, Yu W, Rong Q, et al. Exploration of the genomic landscape of a long-term surviving stage III colorectal cancer patient identifies recurrent and rare mutations: a case report [J]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9: 2992-2998.
- [90] Kalikaki A, Politaki H, Souglakos J, et al. KRAS genotypic changes of circulating tumor cells during treatment of patients with metastatic colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e104902.
- [91] Rousseau B, Vidal J, Diaz LA Jr. Evaluation of POLE/POLD1 variants as potential biomarkers for immune checkpoint inhibitor treatment outcomes [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6: 589-590.