

· 专家论坛 ·

内镜技术在胰腺癌肝脏转移灶方面的研究进展

叶童 赵海英 李鹏 张澍田

首都医科大学附属北京友谊医院消化内科 国家消化系统疾病临床医学研究中心,
北京 100050

通信作者:李鹏,Email: lipeng@ccmu.edu.cn;张澍田,Email: zhangst@ccmu.edu.cn



李鹏,教授、主任医师、博士生导师。中华医学会消化病学分会常务委员,中国医药教育协会消化内镜专业委员会副主任委员,欧美同学会医师协会中西医整合消化病学分会副主任委员。*Chronic Disease and Translational Medicine, Cancer Letter*,《中华消化内镜杂志》《中华医学杂志英文版》等杂志编委及审稿人。先后主持“十三五”国家重点研发计划重点专项1项、国家自然科学基金面上项目3项,作为核心骨干参与“十二五”863、973等国家级、省部级课题10余项。主编和(或)参编指南、论著9部,获批国家专利6项

【提要】 介绍以全氟丁烷为造影剂的谐波造影增强超声内镜、超声内镜引导下细针穿刺以及门静脉循环肿瘤细胞检测在诊断胰腺癌肝脏转移灶方面的原理、优势以及中心经验,提出临床实践中存在的问题,展望消化内镜在胰腺癌肝脏转移灶诊断领域未来的发展方向。

【关键词】 胰腺癌; 肝脏转移灶; 谐波造影增强超声内镜; 细针穿刺; 循环肿瘤细胞

Progress of endoscopy in liver metastases of pancreatic cancer

Ye Tong, Zhao Haiying, Li Peng, Zhang Shutian

Department of Gastroenterology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University; National Clinical Research Center for Digestive Diseases, Beijing 100050, China

Corresponding author: Li Peng, Email: lipeng@ccmu.edu.cn; Zhang Shutian, Email: zhangst@ccmu.edu.cn

据 WHO 2020 年数据统计,消化系统恶性肿瘤中,胰腺癌发病率位居第 5 位,病死率位居第 7 位,死亡人数(466 000)接近发病人数(496 000)^[1]。首诊时只有 15%~20% 的患者可行手术切除,另 40%~50% 则发生远处转移^[2-3]。肝脏是胰腺癌远处转移最好发部位,约占 70%^[4]。识别肝脏转移灶对胰腺癌的分期、临床决策、预后至关重要。螺旋增强 CT 是胰腺癌诊断和分期的首选影像学检查方法^[5]。

然而,24% 的患者术后仍发生肝脏转移^[6],提示增强 CT 在术前评估时遗漏了部分肝脏转移灶。因此,临床上急需诊断效能更优的新技术。

一、谐波造影增强超声内镜检查(contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasound, CH-EUS)

超声内镜检查(endoscopic ultrasonography, EUS)融合了超声技术与内镜技术,具有干扰小、探查距离近、分辨率高等优点。研究显示,在 730 例

DOI: 10.3760/cma.j.cn321463-20220307-00108

收稿日期 2022-03-07 本文编辑 唐涌进

引用本文:叶童,赵海英,李鹏,等. 内镜技术在胰腺癌肝脏转移灶方面的研究进展[J]. 中华消化内镜杂志, 2022, 39(8): 602-606. DOI: 10.3760/cma.j.cn321463-20220307-00108.



胰腺癌、胃癌、胸部恶性肿瘤患者中,EUS 发现了 118 例(16.2%)肝脏转移患者,而 CT 或 MRI 只发现了 82 例(11.2%)。由此可见,EUS 的诊断效能优于 CT 或 MRI。然而在探测胰腺癌小肝脏转移灶(直径<10 mm)时,EUS 灵敏度仅为 30.6%,CH-EUS 的灵敏度为 88.9%,提示 CH-EUS 诊断效能优于 EUS,且差异具有统计学意义^[7]。Oh 等^[8]也发现 CH-EUS 能检出 93.3% 的肝脏病灶,而 EUS 的检出率仅为 73.3%。

类比于 CT 与增强 CT,在 EUS 的基础上,由外周浅静脉注入造影剂,即可实现超声内镜造影。超声造影剂是一种含有直径为几微米气泡的液体,利用含气泡液体对超声波有强散射的特性,临床将超声造影剂注射到人体血管中,用以增强血流的超声多普勒信号和提高超声图像的清晰度和分辨率。注射用全氟丁烷微球为临床应用的新一代超声造影剂,具有高机械指数成像、高频成像佳、有血管期和枯否期(血管后成像期)双影像期等特点,尤其是其独特的枯否期成像持续时间可达 10 min 以上,让长时间造影条件下的病变扫描成为可能,在肝脏、胰腺等占位性疾病的良恶性疾病鉴别诊断方面应用越来越广泛,尤其在诊断微小病灶方面具有独特优势。文献报道,静脉推注造影剂后,微气泡能迅速通过肺循环进入左心室,然后进入体循环,注射后 5~10 min 在包括血液、肝脏、脾脏、脂肪、肺和脑等组织和器官中出现最大观测浓度,半衰期为 30~45 min^[9]。肝脏枯否细胞在吞噬全氟丁烷微球后显像,由于肝脏转移灶不是正常的肝脏组织,缺乏枯否细胞,因此在造影后枯否相(即血管后期影像)表现为充盈缺损。一项纳入了 116 例胰腺癌肝脏转移灶患者的研究中,以充盈缺损为肝脏转移灶指征,其灵敏度为 96.6%,特异度为 99.0%,诊断准确率为 98.4%。灵敏度、诊断准确率均显著优于 EUS (76.7%、93.4%)及增强 CT(69.8%、90.6%)。

本中心一项研究共纳入 35 例胰腺疾病患者,其中 13 例确诊为肝脏转移,以充盈缺损为肝脏转移灶的指征,CH-EUS 的灵敏度为 83.33%,特异度为 100.00%,阳性预测值为 100.00%,阴性预测值为 100.00%,诊断准确率为 92.31%,*Kappa* 值为 0.84。而增强 CT/MRI 诊断肝脏转移灶的灵敏度为 66.67%,特异度为 100.00%,阳性预测值为 100.00%,阴性预测值为 77.78%,诊断准确率为 84.62%,*Kappa* 值为 0.68。*Kappa* 值反映检查方法与金标准的一致程度,通过 *Kappa* 值的比较,提示

CH-EUS 诊断胰腺癌肝脏转移灶的能力优于增强 CT/MRI。

CH-EUS 具体操作流程如下:

1. 设备及参数:超声内镜(日本 Fujifilm EG-530UR,日本 Pentax EG-3270UK),处理器(日本 Fujifilm SU-9000),机械指数设置为 0.26,发射频率为 5 MHz。

2. 造影剂注射:肘前静脉置入 22 号套管针,2 mL 灭菌注射用水复配全氟丁烷,推荐注射剂量为 0.015 mL/kg,以 1 mL/s 的速度注入,10 mL 生理盐水冲管。造影剂于 10~15 s 产生信号,20 s 达峰值;造影剂分布到肝动脉时产生动脉相,分布到门静脉时产生门静脉相,8~10 min 后分布到肝脏组织中产生枯否相。目前尚无全氟丁烷过敏的相关报道,提示其具有良好的安全性。

3. 观察并穿刺肝脏病灶:首先在 EUS 下观察肝脏,调整至分屏显示模式,注射全氟丁烷,使 EUS 及 CH-EUS 的图像分别置于屏幕左侧及右侧。注射全氟丁烷后 8~10 min 进入枯否相,靶病灶表现为充盈缺损,尽可能将内镜换能器维持在最稳定且最贴近靶病灶的位置。由于全氟丁烷可以在肝脏中停留 10 min~2 h,因此有充足的时间进行穿刺。

二、超声内镜引导下细针抽吸术(endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration, EUS-FNA)

由于手术病理具有滞后性且仅有 15%~20% 的患者可行手术切除,因此 EUS-FNA 是目前获取肝脏转移灶组织的最有效方法。EUS-FNA 诊断肝转移的灵敏度为 82%~98%,而 CH-EUS 能够纠正 80%~100% 的 EUS-FNA 假阴性结果^[8,10],EUS-FNA 联合 CH-EUS 的技术成功率为 100%,诊断准确率为 86.7%^[8]。CH-EUS 枯否相可更加灵敏地呈现病灶,并可显示出病灶内部血管和坏死部位,这样既可协助避开血管提高穿刺的安全性,也可协助避开坏死区域提高样本的合格率^[11]。因此从一定程度上避免了二次穿刺,减轻了患者的经济及心理负担。

目前大量研究的焦点集中于应用 EUS-FNA 诊断胰腺病变,仅极少数研究关注于这项技术在肝脏转移灶诊断中的应用。为了提高 EUS-FNA 诊断的准确率,借鉴胰腺穿刺经验,推荐使用扇形穿刺、湿抽、负压、慢撤导丝;有条件的中心推荐使用细胞学快速现场评估(rapid on-site evaluation, ROSE)。扇形穿刺是指在靶病变内多方向进出穿刺针取样,相比于传统穿刺手法,第一针诊断准确率更高(85.7%

比 57.7%, $P=0.02$)^[12]。借鉴流体动力学原理,湿抽即穿刺前以生理盐水预充针道,以减少针道压力,利于传递负压^[13]。一项纳入了 6 个研究、418 例患者的 Meta 分析发现:湿抽队列的样本合格率优于干抽,血液污染率、组织学诊断准确率具有一定优势^[14]。传统湿抽技术多于 10 mL 负压注射器内注入 3 mL 生理盐水,目前则更推荐连接干燥的 10 mL 负压注射器,以整合湿抽和干抽优势^[13]。

关于是否使用负压,使用什么程度的负压一直存在争议。负压能提高细胞密度但也增加了血液污染的风险。慢撤导丝能提供一个低水平负压。一项随机对照实验在无负压、10 mL 负压、慢撤导丝的情况下分别往复 10 次、15 次、20 次穿刺胰腺组织,结果发现,在无负压情况下,往复次数越多,诊断准确率越高;有负压情况下,由于往复穿刺 20 次并未提高诊断准确率反而提高了出血风险,因此推荐往复穿刺 15 次;在使用 22 G 穿刺针往复穿刺 15 次的前提下,10 mL 负压和慢撤导丝的诊断准确率差异并无统计学意义^[15]。另一项研究也表明,使用 22 G 穿刺针时,10 mL 负压和慢撤导丝诊断灵敏度、特异度、准确率差异无统计学意义^[16]。使用 25 G 穿刺针时,慢撤导丝诊断准确率高 10 mL 或 20 mL 负压(90.0% 比 67.9%),血液污染率低于 10 mL 或 20 mL 负压(25.0% 比 66.7%)^[17]。因此,推荐在使用 25 G 穿刺针时慢撤导丝,使用 22 G 穿刺针时可根据实际需求进行选择。CH-EUS-FNA 穿刺肝脏不良反应率低(0.82%),包括出血、穿孔、感染、胆汁性腹膜炎、恶性细胞针道播散^[18]。

本中心共进行了 9 例肝脏转移灶 CH-EUS-FNA

(图 1~图 6)。选用 25 G(5 例)、22 G(5 例)穿刺针,扇形穿刺,以生理盐水预充穿刺针道,连接 10 mL 负压注射器或慢撤导丝,在没有 ROSE 的情况下,推荐穿刺肝脏病灶 2×20 次。

ROSE、宏观现场评估和超声内镜引导下细针活检有利于提高诊断准确率^[19-20],是 EUS-FNA 技术未来的发展方向。

三、循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)检测

液体活检技术可检测原发灶、转移灶在血液中释放的肿瘤相关物质,常用技术包括 CTC、核酸、外泌体和蛋白质等^[21]。门静脉 CTC 检测方法大致分为 5 类:生物学特性阳性或阴性分离(例如蛋白质标记物的表达),物理属性阳性或阴性分离(例如大小、密度、可变形性或电荷),免疫学分析(免疫细胞化学、CellSearch® 系统、流式细胞学、DEPArray®),分子学技术(RT-qPCR)和功能学分析^[22]。

尽管外周静脉采血侵入性小,但由于外周血每 10 亿个血细胞中只有 1 个肿瘤细胞^[23],癌症患者每 10 mL 外周静脉血中有 1~10 个肿瘤细胞^[22],因此对任何一种检测方法而言都是巨大的挑战。而门静脉 CTC 避免了肝脏的首过消除作用,负荷量高于外周静脉,大量研究结果也通过术中门静脉穿刺^[24-26]以及超声内镜引导下门静脉穿刺^[23, 27-28]证实了这一观点。一项纳入 9 项研究的 Meta 分析显示:门静脉血 CTC 负荷量是外周血的 7.7 倍(95%CI:1.35~43.9)^[29]。在这些研究中,门静脉血 CTC 的检出率为 75%,而外周血 CTC 的检出率仅为 50%^[21]。

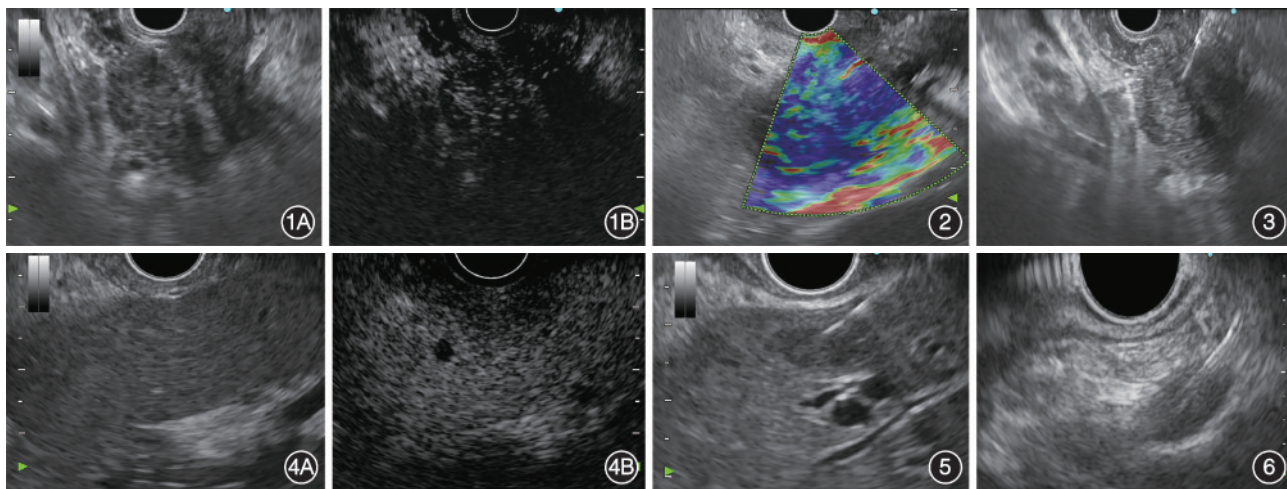


图 1 胰腺癌病灶行超声内镜造影 1A:胰腺癌病灶在超声内镜下表现为低密度;1B:胰腺癌病灶在谐波造影增强超声内镜下表现为异质性、低增强 图 2 胰腺癌病灶弹性成像显示病灶较硬 图 3 胰腺癌病灶穿刺 图 4 胰腺癌肝转移病灶行超声内镜造影 4A:超声内镜下未见肝脏转移灶;4B:谐波造影增强超声内镜下见肝脏转移灶 图 5 肝脏转移灶穿刺 图 6 门静脉穿刺

门静脉 CTC 阳性是肝脏转移的标志^[27]。即使在未发生肝脏转移时,门静脉 CTC 在 G3 期的负荷量高于 G1、G2 期,与肝转移危险分层相关,而中心静脉 CTC 则没有上述相关性^[30]。ROC 曲线分析发现,可切除胰腺癌患者 CTC 总数和间充质 CTC 百分比有助于鉴别早期(6 个月内)肝转移,其最佳临界值分别为 14 个/mL(AUROC=0.893,灵敏度 0.857,特异度 0.813, $P=0.001$)和 0.545(AUROC=0.795,灵敏度 0.714,特异度 0.545, $P=0.016$)^[26]。

CTC 阳性患者的总体生存率较差($HR=1.82$, 95%CI: 1.61~2.05)^[29]。未发生肝转移时,门静脉 CTC<185($HR=4.464$, $P=0.016$)是判断预后的独立危险因素^[30],中心静脉 CTC 则没有上述相关性。可切除胰腺癌中,门静脉 CTC 负荷量与预后相关^[21, 31],门静脉 CTC 计数与总生存期显著相关,而外周静脉 CTC 则无明显相关性^[25],CTC 总数和间充质 CTC 百分比是无复发生存期的独立危险因素($P=0.003$, $P=0.001$)。

文献报道中门静脉穿刺时使用的穿刺针规格包括 19 G、20 G 及 22 G。本中心使用 22 G($n=9$)及 25 G($n=1$)穿刺针,由经肝通路穿刺门静脉,取血 6 mL 注入 EDTA 抗凝管送检。选择经肝通路主要为了借助肝脏组织压迫止血。由于门静脉压力低,且穿刺针道长,极易凝血。为防止凝血影响 CTC 计数,可预先于负压注射器内注入 200~500 μ L EDTA 溶液。考虑到安全因素,并未用 EDTA 溶液预充整个穿刺管道。于门静脉穿刺术后 24 h、1 周随访,10 例患者均未出现明显术后并发症。此外,CTC 检测可以用于分子/基因分析,有助于放化疗患者分层,并根据肿瘤细胞分子特征个体化调整放化疗方案^[27, 32]。

综上所述,以全氟丁烷为造影剂行 CH-EUS 观察枯否相是否有充盈缺损、CH-EUS-FNA 获取肝脏病灶组织、门静脉血 CTC 检测在诊断胰腺癌肝脏转移灶方面具有优势,有望提高检出率,实现胰腺癌的精准分期,有助于临床决策及预后判断,本文分享了本中心的实践经验,以期推动消化内镜在胰腺癌肝脏转移诊断领域的深远发展。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

- [2] Martin-Perez E, Domínguez-Muñoz JE, Botella-Romero F, et al. Multidisciplinary consensus statement on the clinical management of patients with pancreatic cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2020, 22(11): 1963-1975. DOI: 10.1007/s12094-020-02350-6.
- [3] Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2016,22(44):9694-9705. DOI: 10.3748/wjg.v22.i44.9694.
- [4] Xu B, Zhou Y, Pei Q, et al. The survival impact of palliative radiotherapy on synchronous metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: metastatic site can serve for radiotherapy-decision[J]. J Cancer, 2022, 13(2): 385-392. DOI: 10.7150/jca.64800.
- [5] Tempero MA, Malafa MP, Al-Hawary M, et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 19(4):439-457. DOI: 10.6004/jnccn.2021.0017.
- [6] Sasaki T, Nishiwada S, Nakagawa K, et al. Integrative analysis identifies activated anti-tumor immune microenvironment in lung metastasis of pancreatic cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2022, DOI: 10.1007/s10147-022-02131-x.
- [7] Minaga K, Kitano M, Nakai A, et al. Improved detection of liver metastasis using Kupffer-phase imaging in contrast-enhanced harmonic EUS in patients with pancreatic cancer (with video) [J]. Gastrointest Endosc, 2021, 93(2): 433-441. DOI: 10.1016/j.gie.2020.06.051.
- [8] Oh D, Seo DW, Hong SM, et al. The usefulness of contrast-enhanced harmonic EUS-guided fine-needle aspiration for evaluation of hepatic lesions (with video) [J]. Gastrointest Endosc, 2018,88(3):495-501. DOI: 10.1016/j.gie.2018.05.019.
- [9] Kitano M, Yamashita Y. New imaging techniques for endoscopic ultrasonography: contrast-enhanced endoscopic ultrasonography[J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2017, 27(4):569-583. DOI: 10.1016/j.giec.2017.06.002.
- [10] Seicean A, Jinga M. Harmonic contrast-enhanced endoscopic ultrasound fine-needle aspiration: fact or fiction? [J]. Endosc Ultrasound, 2017, 6(1): 31-36. DOI: 10.4103/2303-9027.196917.
- [11] Kamata K, Takenaka M, Omoto S, et al. Impact of avascular areas, as measured by contrast-enhanced harmonic EUS, on the accuracy of FNA for pancreatic adenocarcinoma[J]. Gastrointest Endosc, 2018, 87(1): 158-163. DOI: 10.1016/j.gie.2017.05.052.
- [12] Bang JY, Magee SH, Ramesh J, et al. Randomized trial comparing fanning with standard technique for endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of solid pancreatic mass lesions[J]. Endoscopy, 2013, 45(6): 445-450. DOI: 10.1055/s-0032-1326268.
- [13] Wang Y, Wang RH, Ding Z, et al. Wet-versus dry-suction techniques for endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of solid lesions: a multicenter randomized controlled trial[J]. Endoscopy, 2020, 52(11): 995-1003. DOI: 10.1055/a-1167-2214.
- [14] Ramai D, Singh J, Kani T, et al. Wet-versus dry-suction techniques for EUS-FNA of solid lesions: a systematic review and meta-analysis[J]. Endosc Ultrasound, 2021, 10(5): 319-324. DOI: 10.4103/EUS-D-20-00198.
- [15] Paik WH, Choi JH, Park Y, et al. Optimal techniques for EUS-guided fine-needle aspiration of pancreatic solid masses

- at facilities without on-site cytopathology: results from two prospective randomised trials[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(20): 4662. DOI: 10.3390/jcm10204662.
- [16] Cheng S, Brunaldi VO, Minata MK, et al. Suction versus slow-pull for endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of pancreatic tumors: a prospective randomized trial[J]. *HPB (Oxford)*, 2020, 22(5): 779-786. DOI: 10.1016/j.hpb.2019.10.007.
- [17] Nakai Y, Isayama H, Chang KJ, et al. Slow pull versus suction in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of pancreatic solid masses[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(7): 1578-1585. DOI: 10.1007/s10620-013-3019-9.
- [18] Kudo M, Ueshima K, Osaki Y, et al. B-Mode ultrasonography versus contrast-enhanced ultrasonography for surveillance of hepatocellular carcinoma: a prospective multicenter randomized controlled trial[J]. *Liver Cancer*, 2019, 8(4): 271-280. DOI: 10.1159/000501082.
- [19] Chen YI, Chatterjee A, Berger R, et al. Endoscopic ultrasound (EUS)-guided fine needle biopsy alone vs. EUS-guided fine needle aspiration with rapid onsite evaluation in pancreatic lesions: a multicenter randomized trial[J]. *Endoscopy*, 2022, 54(1):4-12. DOI: 10.1055/a-1375-9775.
- [20] Chong C, Lakhtakia S, Nguyen N, et al. Endoscopic ultrasound-guided tissue acquisition with or without macroscopic on-site evaluation: randomized controlled trial[J]. *Endoscopy*, 2020, 52(10):856-863. DOI: 10.1055/a-1172-6027.
- [21] Buscail E, Chiche L, Laurent C, et al. Tumor-proximal liquid biopsy to improve diagnostic and prognostic performances of circulating tumor cells[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(9): 1811-1826. DOI: 10.1002/1878-0261.12534.
- [22] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 623-631. DOI: 10.1038/nrc3820.
- [23] Catenacci DV, Chapman CG, Xu P, et al. Acquisition of portal venous circulating tumor cells from patients with pancreaticobiliary cancers by endoscopic ultrasound[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(7): 1794-1803.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.08.050.
- [24] Bissolati M, Sandri MT, Burtulo G, et al. Portal vein-circulating tumor cells predict liver metastases in patients with resectable pancreatic cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2): 991-996. DOI: 10.1007/s13277-014-2716-0.
- [25] White MG, Lee A, Vicente D, et al. Measurement of portal vein blood circulating tumor cells is safe and may correlate with outcomes in resected pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2021, 28(8): 4615-4622. DOI: 10.1245/s10434-020-09518-y.
- [26] Dong X, Ma Y, Zhao X, et al. Spatial heterogeneity in epithelial to mesenchymal transition properties of circulating tumor cells associated with distant recurrence in pancreatic cancer patients[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(11): 676. DOI: 10.21037/atm-20-782.
- [27] Liu X, Li C, Li J, et al. Detection of CTCs in portal vein was associated with intrahepatic metastases and prognosis in patients with advanced pancreatic cancer[J]. *J Cancer*, 2018, 9(11):2038-2045. DOI: 10.7150/jca.23989.
- [28] Chapman CG, Ayoub F, Swei E, et al. Endoscopic ultrasound acquired portal venous circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with pancreaticobiliary cancers[J]. *Pancreatol*, 2020, 20(8): 1747-1754. DOI: 10.1016/j.pan.2020.10.039.
- [29] Pang T, Po JW, Becker TM, et al. Circulating tumour cells in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of clinicopathological implications[J]. *Pancreatol*, 2021, 21(1): 103-114. DOI: 10.1016/j.pan.2020.11.022.
- [30] Padillo-Ruiz J, Suarez G, Pereira S, et al. Circulating tumor cells enumeration from the portal vein for risk stratification in early pancreatic cancer patients[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(24): 6153. DOI: 10.3390/cancers13246153.
- [31] Song BG, Kwon W, Kim H, et al. Detection of circulating tumor cells in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: a prospective evaluation as a prognostic marker[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:616440. DOI: 10.3389/fonc.2020.616440.
- [32] Soler A, Cayrefourcq L, Mazel M, et al. EpCAM-independent enrichment and detection of viable circulating tumor cells using the EPISPOT assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1634: 263-276. DOI: 10.1007/978-1-4939-7144-2_22.