

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.034.html>

循环肿瘤细胞的研究进展

王宜文 综述, 胡孔旺 审校

摘要 循环肿瘤细胞(CTC)是指经过自发或因临床诊疗操作由原发灶或转移灶释放然后进入外周血循环的肿瘤细胞,研究表明其是恶性肿瘤患者术后复发和发生远处转移的一个重要原因。随着检测技术的不断提高,CTC检测逐渐成为一种新颖的无创性检测手段,在早期诊断恶性肿瘤、监测复发、治疗疗效与预后评估等方面的应用在临床上越来越普遍。同时由CTC衍生出来的循环肿瘤脱氧核糖核酸(ctDNA)检测也成为了临床研究热点。本研究收集国内外有关CTC及ctDNA文献进行综述。

关键词 循环肿瘤细胞;液态活检;循环肿瘤脱氧核糖核酸;肿瘤

中图分类号 R 730.45

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1897-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.034

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)一直以来是临床研究热点,CTC与肿瘤的早期微转移存在一定相关性,肿瘤外周血液中的CTC也是肿瘤发生转移的起源。随着研究的不断深入,CTC检测技术不断改进,CTC在肿瘤诊断、监测复发、治疗疗效及预后评估中都扮演着一些重要的角色。循环肿瘤脱氧核糖核酸(circulating tumor deoxyribonucleic acid, ctDNA)检测也随着基因测序技术的进步不断发展。该文就近几年国内外相关CTC文献作一综述。

1 CTC的概念及检测

1.1 CTC的概念 Ashworth于1896年提出CTC概念^[1]。当前CTC定义为自发或者因为诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞^[2-3]。进入外周血液循环而未被清除的肿瘤细胞经过一系列迁移黏附聚集过程而形成一个个微小癌

栓,在一定条件下就形成了转移灶^[4]。随着人们不断对肿瘤转移机制深入的研究,以及对检测技术的改进,CTC的检测已经取得了突破性的进展,CTC的临床研究也已取得了明显的进展。

1.2 CTC的检测 由于CTC在外周血中含量极低,因此对于CTC检测技术的灵敏度和特异度都有很高的要求。CTC与血液细胞相比,体积更大,液相流动更大以及细胞膜的电导和电容不同,这也是CTC检测技术的切入点。目前CTC的检测主要包括CTC的分离富集以及对CTC的检测过程^[5-6]。富集方法主要包括梯度离心法、过滤法和免疫磁性分选法。检测方法包括免疫学技术、反转录聚合酶连锁反应技术、酶联免疫斑点技术以及CTC芯片技术。其中免疫磁性分选法是当前最常用的一种CTC富集方法。而强生公司研发的专有技术CellSearch检测系统已经成为CTC检测的一个标准实验方案^[7]。其主要核心技术主要是流式正向富集及荧光标记技术,特异度达到80%。通过上皮细胞黏附因子标记的抗体磁珠来捕获CTC,然后细胞内角质蛋白荧光抗体(cell keratin fluorescent antibody, CK-PE)可以识别上皮细胞,白细胞荧光抗体(CD45-APC)能够识别白细胞以及4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide, DAPI)荧光核染料用于生成显微镜下可视细胞图像。其中符合肿瘤细胞学形态特征而同时CK-PE(+), DAPI(+)和CD45(-)的细胞被定义为CTC。该检测可以自动识别并筛选出从原发肿瘤脱落后进入外周循环血液中的肿瘤细胞。该方法只需要7.5 ml血液样本,即可从几百亿血液细胞中检测到一个CTC。CellSearch检测系统目前也已经被美国食品药品监督管理局批准进入临床应用。

2 CTC与肿瘤的诊断

传统的肿瘤诊断主要依据常规的影像学检查,如超声、计算机断层摄影、磁共振成像、正电子发射计算机断层显像等。传统的影像学检查就存在其本身的弊端,因为现在检测分辨率的局限性,除此之外

2017-07-07 接收

基金项目:安徽医科大学第一附属医院2014后备人才项目;安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号:KJ2016A323)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院胃肠外科,安徽医科大学实验教学中心,合肥 230022

作者简介:王宜文 男 硕士研究生;

胡孔旺 男 副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: hukw@sina.com

影像学的检查可能与实际有相对大的差别^[8]。传统的血清学肿瘤指标,如癌胚抗原、甲胎蛋白、癌抗原 19-9、前列腺特异性抗原等。这些肿瘤标志物的灵敏度和特异性并不高,存在假阳性的情况。每个人的循环血液中包含着肿瘤的遗传信息,这些遗传信息就包含在 CTC 当中,只需检测患者外周血中 CTC 即可实现对肿瘤的诊断。目前检测技术对肿瘤诊断的特异性不高。在胰腺癌当中,很多患者在被诊断时基本已进入晚期,预后很差。液态活检技术的出现,实现了对很多肿瘤早期诊断的革命性变化。“液态活检”^[9-10]的概念最早在 1974 年 Sorrells 提出来,当时主要是指关节腔中的滑液用于分析诊断相关滑膜疾病。目前这一技术不断发展,应用到当前临床实践中。液态活检的标本来源主要为以血液为主的体液,血液也是很容易获得的临床检验样本。而液态活检的一个主要研究对象就是 CTC。在 Court et al^[11]一项研究中,实验纳入了 10 例已确诊胰腺癌的患者,同时纳入了 10 例慢性胰腺炎及过往胰腺炎病史或胰腺癌家族史志愿者,分别抽取上述研究对象的外周血,用强生公司出品的 CellSearch 系统分别检测出患者循环血液中的 CTC 数目,最后显示确诊为胰腺癌患者外周血中 CTC ≥ 3 个/7.5 ml,其中部分症状严重的患者和影像学检查已证实远处转移的患者外周血中 CTC ≥ 5 个/7.5 ml,而对照组中 CTC 数目几乎为 0。经过对比分析显示胰腺癌患者外周血中存在 CTC,而已发生转移的样本血液中 CTC 数目更多,正常人循环血液中未检测到 CTC。同时经过一段时间的随访,上述研究对象在 1 个月后未接受手术治疗后,结果显示癌患者外周血中 CTC 数目在增加,而正常人血中仍然未检测到 CTC。本研究显示 CTC 检测可以在胰腺癌的诊断中扮演着一个重要的角色。CTC 检测也应用到胃癌^[12]、乳腺癌^[13]、结直肠癌^[14]等相关肿瘤的诊断当中。

3 CTC 与肿瘤分期的关系

CTC 不单单与肿瘤的诊断有关,CTC 在实体肿瘤的分期中也扮演着很重要的角色。临床肿瘤分期(tumor regional lymph node metastasis, TNM)系统首先是由法国人 Pierre Denoix 率先提出来,后来由美国癌症联合委员会和国际抗癌联盟逐步完善开始建立起统一的国际性分期标准,逐步形成目前的 TNM 分期系统^[15]。肿瘤的 TNM 分期反应肿瘤目前的生存状态,同时反应疾病程度为后期医师进一步评估

决策治疗方案提供宝贵的意见。肺癌在当前严重影响了人们健康,病死率较高同时发病率还在不断上升。大多数肺癌患者在最后都会发生脑、骨、肝脏等器官转移,这会危害患者的预后及生命健康。肺癌常常发生血行转移,同时 CTC 有原发肿瘤细胞类似的遗传学特性,根据这个肿瘤转移特点着手进行研究,陈倩^[16]选取北京天坛医院的 42 例肺癌患者作为研究对象,分别采取患者 7.5 ml 外周静脉血样标本,检测样本中 CTC 数目,影像学以及病理学检查的结果来对上述患者进行 TNM 分期。最后对 CTC 数目和 TNM 分期进行相关性的统计分析。结果显示在 T1 期患者当中 CTC 数目大多以 1~2 个为主(4/8, 50%),而在 T2~T4 期患者当中 CTC 数目以 ≥ 3 为主(T2:6/14, 42.86%; T3:5/8, 62.5%; T4:6/10, 60%)。M1 期的肺癌患者血液中的都可以检测出 CTC。I 期患者的 CTC 数目以 1~2 个为主,II~IV 期患者中 CTC ≥ 3 个为主。然而值得注意的是 IV 期患者血液样本均可检出 CTC,而且 CTC 数目都较高。这就解释 CTC 与肺癌的 TNM 分期有一定的相关性,在分期越晚的患者中 CTC 数目更多。同时在 Kaifi et al^[17]有关 CTC 在结直肠癌分期的研究中,研究纳入 40 例转移性结直肠癌患者,同时选择 20 例的健康志愿者及良性结直肠疾病患者作为对照。分别采集研究对象 7.5 ml 外周静脉血。同样以 CellSearch 系统方法来计数研究对象外周血 CTC 数目,同时收集上述对象原发灶肿瘤位置等情况来 TNM 分期,最后进行统计分析,评价 CTC 与肿瘤 TNM 分期的相关性。在总的 TNM 分期中显示 CTC 在 II~IV 期中会高于 I 期患者($P=0.074$),IV 期中则显示会明显高于 I 期患者($P<0.05$)。在上述两个研究也在某种程度上证实了 CTC 与肿瘤分期有一定相关性,且分期越晚,CTC 的数目越多。然而还是需要更多直接的证据去鉴别证实这种相关性。

4 CTC 在肿瘤治疗及预后中的价值

在临床实践中肿瘤治疗疗效及预后更能让医师及患者去关注。在患者接受某项手术后怎样评判患者肿瘤是否根治彻底以及预后相关情况,实体瘤的疗效评价标准^[18]被作为一个标准来判断肿瘤治疗疗效及预后相关情况。传统的术后评估手段在临床上很少实行或者缺少比较可靠的指标。某些肿瘤患者术后如需要接受化疗,在入院后一般接受常规的血液检测、相关的肿瘤指标及影像学的复查后评估患者无化疗禁忌后即给予患者行化学治疗。而临床

上术后复发更常见。肿瘤术后的复发监测也是一道难关,医师很难去准确判断患者的病情进展,除了常规的影像学诊断如CT、磁共振成像及复查血清学肿瘤指标外,除非患者有明显的症状时才能判断出来,然而这时疾病复发已经开始一段时间了。针对大多数已经发生转移而并未呈现明显临床症状的患者,医师也很难去评估患者的恢复情况及合理地给患者用药,这时患者可能还在遭受着过度的治疗。某些患者在一开始就出现远处转移,这时候患者可能需要接受其他方法治疗如靶向治疗而不是手术治疗。而现在显示很多患者在接受靶向治疗后出现了耐药反应,而导致了药物的治疗效果不佳,也就需要医师去及时发现耐药反应去避免治疗过度。Li et al^[19]一项胃癌研究中纳入44例胃癌患者,分别有手术前患者、手术后患者以及手术后接受6个月“卡培他滨+奥沙利铂”方案化疗的患者,分别检测患者血液中CTC数目,显示患者术前血液中都存在一定量的CTC,术后患者血液中CTC数目出现不同程度的减低,尤其在术后恢复良好的患者血液中CTC数目几乎检测不到。化疗过程中CTC也会变化,而当肿瘤复发时,CTC会随着复发程度加重呈现相对线性关系的生长。当影像学检测显示患者肿瘤复发时,CTC检测的量也早已经开始升高。上述的这些结果表明CTC可以评估胃癌手术疗效,同时可以提前显示术后肿瘤复发从而使得临床医师早期干预治疗以及避免过度治疗。在Tsai et al^[20]一项研究中共纳入了21例早期结直肠癌患者,27例正常人,21例早期结直肠癌患者,未发生转移的91例患者以及15例转移性结直肠癌患者。分别取得2 ml外周循环血液,通过CellSearch系统检测上述标本的CTC数目,结果显示CTC在上述阶段患者中分别是1、0、5、36个。而在未转移患者的两年随访中显示CTC $\geq$ 5个对应的患者比一年之内接受手术治疗后CTC $<$ 5的患者有更高8倍的几率发展成转移性结直肠癌。本研究对比显示CTC是一个结直肠癌良好的独立预后指标。乳腺癌是一项好发于年轻女性的癌症,预后不佳,尤其是三阴性乳腺癌的预后就更差。在Madic et al^[21]三阴性乳腺癌预后的研究中纳入了21例患者,同样取得治疗过程中不同阶段的7.5 ml血液,CellSearch系统检测上述标本的CTC数目,最后进行统计分析CTC与乳腺癌预后的相关性关系,显示当CTC $\geq$ 5个/7.5 ml与CTC $<$ 5个/7.5 ml比较,前者的总生存期会缩短($P=0.041$),同时疾病进展时间也会缩短($P=0.06$)。这就表明

CTC可能是反应三阴性乳腺癌治疗预后的一个有效指标。

5 CTC与ctDNA在肿瘤中的研究比较

CTC可以自发或者通过人为操作进入循环血液当中,而在这个过程中,正常组织细胞也会进入到外周血液循环当中。而本研究在获得外周血检测CTC时自然就会有正常细胞的干扰,因此是不是可以进一步提取有关CTC核酸遗传信息来实现对肿瘤的诊断、治疗疗效及预后评估。正常细胞和肿瘤细胞在某些外界或自身因素的影响下会发生破裂,这些细胞中的DNA随之就会被释放到体液当中去,其中进入外周循环血液当中的这部分DNA,就称为血浆游离DNA,来源于肿瘤细胞的DNA就称为ctDNA^[22]。随着基因测序技术的不断发展,如Illumina测序^[23]、454测序^[24]和数字微滴式PCR测序^[25]技术的出现,ctDNA检测在临床应用中也开始变得广泛了。Calabuig-Fariñas et al^[26]一项肺癌研究中,CTC和ctDNA都可以监测肺癌治疗反应及预后评估,但ctDNA比CTC更能有效诊断肺癌同时动态监测整个治疗反应。在Olsson et al^[27]利用高通量全基因组测序与数字微滴式PCR通过对ctDNA的检测分析找到乳腺癌中P53基因突变的类型,基因重组部位,可以精确找出乳腺癌靶向治疗过程出现的耐药突变遗传信息改变部位,去为靶向治疗提供治疗策略。ctDNA检测可能更优于CTC作为一个良好的肿瘤治疗疗效及预后评估的检测指标,也需要判断其是不是相辅相成的,在肿瘤诊断、治疗疗效及预后评估中可能各自侧重点不同。因为CTC的检测相对于ctDNA的检测应用更普遍,检测难度相对较小以及检测费用也相对更廉价。

6 结语及展望

在其他生物标志物特异性及灵敏度并不高效的情况下,CTC检测可以有效的在一些肿瘤的早期诊断提供相应的证据,同时对肿瘤治疗疗效反应提供良好的衡量标准,在患者出现耐药反应时及时反馈信息,有助于医师及时改变治疗策略同时避免患者过度治疗。ctDNA检测也可以用于个性化用药指导及耐药性分析。在未来,可以对患者实施无创血液检测来应用于临床诊断及治疗反应评估。当然上述的所有研究也都存在一定的瑕疵,如样本量的不足,实验中误差与偏倚,并不全方位的数据对比分析都需要进一步改善加以研究证明。CTC的检测技术也

需要不断改进以能够普遍应用于临床。随着新一代基因测序技术的蓬勃发展,液态活检技术的兴起, ctDNA 检测也慢慢可以在临床实践中开展起来,但 ctDNA 测序依然有难点,除了突变信号相对于背景信号来说信号强度较低外,其样本量极其有限,常常需要在极其微量的游离 DNA 中找到突变信息。除此之外基因测序仪器中存在的问题还有读取错误等,同时基因测序由于其昂贵的价格让其普及到临床实践中还有一段距离要走。相信如果上述的问题能够得到很好的解决,针对 ctDNA 进行精准高深度的靶向测序,将来会是一个很有潜力的临床肿瘤基因检测手段。同时如何有效联合 CTC 与 ctDNA 应用于临床检测也将是一个需要深入研究的问题。

参考文献

- [1] 李晶,姜北万,鹏等. 循环肿瘤细胞研究进展[J]. 现代肿瘤医学 2013 21(4):891-4.
- [2] Azevedo A S, Follain G, Patthabhiraman S, et al. Metastasis of circulating tumor cells: Favorable soil or suitable biomechanics, or both[J]. Cell Adh Migr, 2015 9(5):345-56.
- [3] Hong B, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends[J]. Theranostics 2013 3(6):377-94.
- [4] Spring B Q, Abu-Yousif A O, Palanisami A, et al. Selective treatment and monitoring of disseminated cancer micrometastases *in vivo* using dual-function, activatable immunoconjugates[J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2014 111(10):E933-42.
- [5] Strati A, Kasimir-Bauer S, Markou A, et al. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2013 15(2):R20.
- [6] 杜凤彩,陈剑. 循环肿瘤细胞的富集分离和检测[J]. 现代肿瘤医学 2016 24(21):3487-90.
- [7] Gorges T M, Stein A, Quidde J, et al. Improved detection of circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer by the combination of the cellsearch® system and the adnatest®[J]. PLoS One, 2016 11(5):e0155126.
- [8] Tachtsidis A, McInnes L M, Jacobsen N, et al. Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells[J]. Clin Exp Metastasis 2016 33(6):521-50.
- [9] Ilić M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? [J]. Transl Lung Cancer Res 2016 5(4):420-3.
- [10] Tu M, Chia D, Wei F, et al. Liquid biopsy for detection of actionable oncogenic mutations in human cancers and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB) [J]. Analyst 2016 141(2):393-402.
- [11] Court C M, Ankeny J S, Hou S, et al. Improving pancreatic cancer diagnosis using circulating tumor cells: prospects for staging and single-cell analysis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015 15(11):1491-504.
- [12] Tang L, Zhao S, Liu W, et al. Diagnostic accuracy of circulating tumor cells detection in gastric cancer: systematic review and meta-analysis[J]. BMC Cancer 2013 13:314.
- [13] Mego M, Giordano A, De Giorgi U, et al. Circulating tumor cells in newly diagnosed inflammatory breast cancer[J]. Breast Cancer Res 2015 17:2.
- [14] Hardingham J E, Grover P, Winter M, et al. detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer—20 years of progress[J]. Mol Med 2015 21(Suppl 1):S25-31.
- [15] Chan A C, Fan S T, Poon R T, et al. Evaluation of the seventh edition of the American joint committee on cancer tumour-node-metastasis (TNM) staging system for patients undergoing curative resection of hepatocellular carcinoma: implications for the development of a refined staging system[J]. HPB (Oxford) 2013 15(6):439-48.
- [16] 陈倩. 循环肿瘤细胞与肺癌 TNM 分期的相关性研究[D]. 北京:北京协和医学院 2011.
- [17] Kaifi J T, Kunkel M, Zhu J, et al. Circulating tumor cells are associated with diffuse spread in stage IV colorectal cancer patients[J]. Cancer Biol Ther, 2013 14(12):1174-81.
- [18] Jang G S, Kim M J, Ha H I, et al. Comparison of RECIST version 1.0 and 1.1 in assessment of tumor response by computed tomography in advanced gastric cancer[J]. Chin J Cancer Res, 2013 25(6):689-94.
- [19] Li T T, Liu H, Li F P, et al. Evaluation of epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells in patients with resectable gastric cancer: relevance to therapy response[J]. World J Gastroenterol 2015 21(47):13259-67.
- [20] Tsai W S, Chen J S, Shao H J, et al. Circulating tumor cell count correlates with colorectal neoplasm progression and is a prognostic marker for distant metastasis in non-metastatic patients [J]. Sci Rep 2016 6:24517.
- [21] Madic J, Kiialainen A, Bidard F C, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients[J]. Int J Cancer, 2015 136(9):2158-65.
- [22] Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer [J]. Oncotarget, 2016 7(30):48832-41.
- [23] Kanda K, Pflug J M, Sproul J S, et al. Successful recovery of nuclear protein-coding genes from small insects in museums using illumina sequencing[J]. PLoS One 2015 10(12):e0143929.
- [24] Li J Z, Chapman B, Charlebois P, et al. Comparison of illumina and 454 deep sequencing in participants failing raltegravir-based antiretroviral therapy[J]. PLoS One 2014 9(3):e90485.
- [25] Koepfli C, Nguitragool W, Hofmann N E, et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. Sci Rep 2016 6:39183.
- [26] Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Herreros-Pomares A, et al. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer—which one will win[J]. Transl Lung Cancer Res 2016 5(5):466-82.
- [27] Olsson E, Winter C, George A, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease[J]. EMBO Mol Med 2015 7(8):1034-47.