

(1):679-686.

[12] PRETORIUS L, THOMSON G J A, ADAMS R C M, et al. Platelet activity and hypercoagulation in type 2 diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1):141.

[13] 王志军, 张鹏宇, 周建芝, 等. 冠心病合并糖尿病患者联合抗血小板药物抵抗的相关研究[J]. 临床心血管杂志, 2016, 32(10):978-982.

[14] 俞海珍, 郭旭昌, 李立峰. 血小板平均体积在 2 型糖尿病患者初级预防保健中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(13):1851-1852.

[15] 许文亮, 丁华民, 杨璇, 等. 老年冠心病合并代谢综合征患者平均血小板体积的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(1):42-45.

[16] 范志佳, 徐黎明, 王力, 等. 糖尿病患者血小板高活性状态研究进展[J]. 检验医学, 2018, 33(12):1144-1147.

[17] ELHAOUARI M. Platelet oxidative stress and its relationship with cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus patients [J]. Curr Med Chem, 2019, 26 (22): 4145-4165.

[18] ROTTENBERG H, HOEK J B. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore[J]. Aging Cell, 2017, 16(5): 943-955.

[19] ODEGAARD A O, JACOBS D R, SANCHEZ O A, et al. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction

and incidence of type 2 diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2016, 15(1):51.

[20] KAUR R, KAUR M, SINGH J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1):121.

[21] 谭芳, 李代渝. NO 和维生素 B6 抑制血小板活化和聚集的研究进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(7):709-712.

[22] YANG S, ZHAO J, CHEN Y, et al. Biomarkers associated with ischemic stroke in diabetes mellitus patients[J]. Cardiovasc Toxicol, 2016, 16(3):213-222.

[23] HU L, CHANG L, ZHANG Y, et al. Platelets express activated p2y12 receptor in patients with diabetes mellitus [J]. Circulation, 2017, 136(9):817-833.

[24] PORDZIK J, JAKUBIK D, JAROSZ-POPEK J, et al. Significance of circulating microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review[J]. Cardiovasc Diabetol, 2019, 18(1):113.

[25] LI S, WEI J, ZHANG C, et al. Cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(6):2439-2450.

(收稿日期:2020-09-29 修回日期:2021-05-12)

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.12.042

循环肿瘤细胞的检测与临床应用

王 萍 综述, 井丰军 审校

芜湖市中医医院检验科, 安徽芜湖 241000

关键词: 循环肿瘤细胞; 检测; 富集
中图分类号: R730.4 **文献标志码:** A

文章编号: 1672-9455(2021)12-1802-04

循环肿瘤细胞(CTCs)是指由实体肿瘤原发病灶中脱落出来,进入血液循环和(或)淋巴系统的细胞,具有与原发肿瘤相似的特征,能够反映肿瘤发生发展情况并可能介导肿瘤转移。近年来,CTCs 的检测技术得到飞速发展。随着检测技术的提高,越来越多的研究发现,CTCs 在多种恶性肿瘤的诊断、治疗、疗效评估和预后方面有着重要作用。

1 CTCs 的富集和检测

1.1 CTCs 的富集 传统的肿瘤检测方法,是以组织活检获取病理标本,以查找到肿瘤细胞为“金标准”,标本获取困难,患者创伤较大,而 CTCs 存在于患者血液中,获取途径没有侵袭性,易于操作,是一种“液体活检”。CTCs 在外周血中数量极其稀少,因此,在检测之前需要先对 CTCs 进行富集。临床常用的富集技术,主要基于两方面:CTCs 的物理特性或 CTCs

表面生物特征。

1.1.1 基于 CTCs 的物理特性 根据大小、密度、电荷等方面差异将 CTCs 与正常的造血细胞区分开来。比如 MCA 系统根据 CTCs 与正常血液细胞在大小和变形能力上的差异,将 CTCs 特异性分离出来^[1]。物理富集过程相对简单,所需时间短,不依赖于 CTCs 特定表面标志物,但部分白细胞大小性质与 CTCs 相近,致使所获得 CTCs 特异性和纯度较低。

1.1.2 基于 CTCs 表面生物特性 主要根据抗原抗体特异性结合的原理。这种富集技术又分为正向富集:捕获 CTCs,洗脱健康血细胞;负向富集:捕获非目标细胞(即健康血细胞),洗脱目标细胞(即 CTCs)。正向富集通常根据 CTCs 表达的上皮细胞黏附分子(EpCAM)作为标记物,在免疫磁珠系统通过与磁珠结合的抗体来捕获抗原,然后,抗原-抗体复合物经由

磁场被分离出来。亦有依靠其他分子标志物如人类表皮生长因子受体 2 (HER2)。随着对肿瘤细胞表面叶酸受体 (FRs) 认识的增加, 利用 CTCs 表面 FRs 检测 CTCs 在肺癌中的应用也逐渐增多^[2]。目前唯一一个通过 FDA 认证的 CellSearch™ 系统就是基于 EpCAM 技术, 随后问世的其他新的检测方法多是与 CellSearch™ 进行比较。然而 CellSearch™ 系统有着难以克服的缺点: (1) 设备昂贵; (2) 每个样本的检测成本较高; (3) 检测过程需要复杂的富集步骤; (4) 每个样本检测时间长; (5) 捕获的 CTC 纯度很低; (6) 假阳性和假阴性率都较高。因此, CellSearch™ 系统很难被广泛应用。

负向富集 CTC 检测技术的优势包括: (1) 不依赖于 CTCs 的表面生物标志物, 可以有效避免 CTCs 表面抗原表达减弱或缺失导致的假阴性, 具有普遍适用性; (2) 可以完整的收集不同性质的 CTCs。缺点也很明显: (1) 所获得 CTCs 纯度较低; (2) 得到的低纯度 CTCs 的鉴定需要进一步复杂的分析程序; (3) 使用负向富集技术捕获血细胞需要大量抗体, 成本高。

上述富集技术都是在体外进行富集, SAUCEDO-ZENI 等^[3]发现一种体内富集技术, 通过插入患者肘部静脉的导丝, 在非小细胞肺癌和乳腺癌患者体内获得 CTCs。体内富集优点: (1) 相对于体外方法有限的血样容量, 体内富集能得到更多的 CTCs; (2) 灵敏度要求较低, 降低了技术门槛; (3) 假阴性率低。缺点: (1) 体内富集时间较长; (2) CTCs 捕获需要大量抗体、成本高; (3) 富集方法具有侵入性, 患者较难以接受。

以上所有富集方式得到的 CTCs 都需要后续实验进行检测鉴定, 富集方式即使不同检测方法可以相同。CTCs 检测方法很多, 在蛋白水平上有流式细胞技术 (FCM)、免疫荧光染色、上皮细胞免疫斑点技术 (EPISPOT) 等; 在基因水平上有荧光原位杂交、逆转录聚合酶链技术、基因测序等。

1.2 CTCs 的检测

1.2.1 FCM 可通过识别荧光抗体与 CTCs 结合后, 产生的荧光信号来收集 CTCs^[4]。优点是定量检测 CTCs, 而且可以对 CTCs 进行后续分析。缺点在于灵敏度较差, 可能会出现假阴性结果, 操作复杂, 价格昂贵。

1.2.2 免疫荧光染色 固定富集的细胞后, 用抗 CD45、角蛋白荧光抗体和 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 等荧光染料标记抗体, 染色细胞, 并用荧光显微镜进行分析, 这也是目前最常用的方法^[5]。其优点是在荧光显微镜下观察, 更加方便, 可观测细胞蛋白表型及形态。缺点是蛋白标志物的表达缺乏稳定性, 不能区分活细胞和死细胞。

1.2.3 EPISPOT 它检测单个上皮癌细胞分泌释放的蛋白质。该方法的原理是利用富集的 CTCs 在培

养基中分泌特定蛋白质, 再使用荧光标记的分泌蛋白抗体, 与 CTCs 进行孵育以使抗体与蛋白质特异性结合, 最后通过荧光显微镜观察, 定量检测具有生物活性的 CTCs^[6]。一个单一的免疫斑点代表着一个活细胞, 该方法具有高特异度和高稳定性的显著特点。但细胞培养需要有足够数量的分泌标记蛋白积累形成免疫斑点。

1.2.4 荧光原位杂交 (FISH) FISH 技术通过标记染色体能检测到染色体数目、结构异常的肿瘤细胞^[7]。优点是在基因水平鉴定 CTCs, 灵敏度和特异性更高; 缺点是有可能受到来自于患者血液细胞中异常染色体干扰, 且选择一种染色体探针只能检测对应的一个标志物。

1.2.5 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 将肿瘤特异性 mRNA 序列反转录为 cDNA 后, 通过 PCR 技术扩增后识别肿瘤特异性 mRNA 的表达^[8], 是目前检测 CTCs 最常用的方法之一。但是由于 PCR 只是从基因层面上鉴别 CTCs, 所以无活力的 CTCs 在此方法中同时被鉴定出来, 在细胞变形性分析和药物反应测定方面, 需要取活细胞, 使得应用受限。

1.2.6 基因测序 (NGS) 使用精确和高通量的下一代测序 (NGS) 技术, 对 CTCs 进行细胞测序, 能在单个细胞水平上鉴定基因结构和基因表达状态, 对 CTCs 进行基因分型, 用于肿瘤的突变分析, 有助于癌症精准医疗的建立^[9]。NGS 技术对上游分离技术要求很高, 要求 CTCs 纯度、丰度达到一定标准。

富集检测方法机制不同, 各有优缺点, 单纯一种方法很难分离出纯的和有代表性的 CTCs 亚群。现在开发的技术方法多是将物理和生物特性联合起来, 进行优化^[10]。

2 CTCs 的临床应用

2.1 CTCs 在肿瘤早期诊断中的价值 DING 等^[11]的一项研究表明 CTCs 可作为筛查孤立性肺结节和早期肺癌的标志物。联合应用 CTCs 和癌胚抗原 (CEA) 可显著提高肺腺癌的检出率。ZHOU 等^[2]也发现叶酸受体阳性的 CTCs (FR⁺-CTCs) 可以鉴别孤立肺结节的恶性程度, 灵敏度为 78.6%~82.7%, 特异度为 68.8%~78.4%。此外, FR⁺-CTC 计数联合最大肿瘤直径 (MTD) 可以区分非侵袭性癌症和侵袭性癌症, 这为医生的诊断提供了重要依据。而 CTCs DNA (ctDNA) 分析已被批准用于表皮生长因子受体 (EGFR) 突变检测转移性非小细胞肺癌^[12]。除肺癌外, CTCs 在胰腺导管腺癌 (PDAC) 的诊断和分期中有积极作用, 4 mL 血液中 ≥3 个 CTCs 值可用于区分局限性和转移性 PDAC, 灵敏度为 85.2%, 特异度为 86.7%^[13]。检测多发性骨髓瘤患者体内的循环骨髓瘤细胞, 可对骨髓瘤复发起到一定监测诊断作用^[14]。在一项为期两年的研究中, RIED 等^[15]对 542 人进行了 CTCs 检测, 其中一半人属于癌症高危人群, 观察

发现在所有癌症患者体内均检测到 CTCs, 比如多发性骨髓瘤, 非霍奇金淋巴瘤, 重要的是, 在检测到 CTCs 的男性中, 有多达一半的人前列腺特异性抗原 (PSA) 水平正常, 随后通过前列腺特异膜抗原正电子发射体层显像融合计算机体层显像技术 (PSMA-PET) 扫描显示阳性, 诊断为早期前列腺癌, 这表明 CTCs 在前列腺癌的筛查中, 与 PSA 相比更可靠。通过 CTCs 筛查和随后的扫描发现的其他类型的癌症包括早期乳腺癌、卵巢癌等。

2.2 CTCs 在肿瘤治疗中的应用 有研究数据表明, 帕唑帕尼治疗的小细胞肺癌患者的 CTCs 计数和表型特征具有临床相关性和预测价值。此外, 分析 CTCs 在抗血管生成治疗过程中的不同亚群可以作为监测治疗效果的动态生物标志物^[16]。在一组 27 例接受去势手术的转移性前列腺癌中, CTCs 评分的提高提示患者为高危人群, 总体生存率较差, 另一组 34 名局限性前列腺癌患者中, 术前 CTCs 评分升高预测镜下可能会出现精囊和(或)淋巴结播散, 这些观察结果提示 CTCs 分析有助于预测局限性前列腺癌接受手术切除的患者是否存在早期播散的可能性^[17]。另 153 例结肠直肠癌 (CRC) 肝转移患者中发现, CTCs DNA 可作为液体活检工具, 有助于判断患者是否需要接受肝切除手术^[18]。在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 治疗中, 术前化疗的作用仍存在争议。ZHAO 等^[19] 对所有入组患者进行 CTCs 检测, 发现对于 II 期或 III 期 ESCC 患者, 在任何治疗之前 CTCs 检测为阳性, 术前化疗可改善短期无进展生存期 (PFS)。在局部进展性胃癌中, 发现多西他赛/奥沙利铂/5-FU (DOF) 方案联合贝伐珠单抗总有效率明显高于 DOF 组, 贝伐珠单抗的加入显著提高了手术切除率和 R0 切除率 ($P < 0.05$)。用 FISH 法计数 CTCs, DOF + 贝伐珠单抗组新辅助治疗后 CTCs 计数下降明显大于 DOF 组 ($P = 0.0335$)。这些有益作用可能与 CTCs 计数的减少有关^[20]。

2.3 CTCs 在肿瘤预后判断中的应用 在小细胞肺癌中, 60% 的患者检测到 CTCs, 与 I ~ II 期患者相比, III 期患者的 CTCs 计数呈非显著增加趋势, 基线 ≥ 15 个 CTCs 预测 100% 的患者生存期 ≤ 2 年, 70% 的患者生存期 ≤ 1 年^[21]。一项对 156 例, 新近诊断为转移性乳腺癌患者 (MBC) 的研究中, 使用 CellSearch™ 系统检测基线 (BL) 和系统治疗 1、3、6 个月后的 CTCs 和 CTC 簇, 随访时间 25 (7 ~ 69) 个月, 发现基线时 ≥ 5 个 CTCs 组与生存受损显著相关, 后续测量结果显示, 治疗期间 ≥ 5 个 CTCs 和有 CTC 簇的患者预后危险性增加。CTCs 和 CTC 簇的纵向评估改善了开始一线系统治疗的 MBC 患者的预后监测。预后价值随时间增加, 提示 CTCs 计数的变化具有临床相关性^[22]。另一项对于乳腺癌的研究也显示, 无论原发肿瘤的大小、级别或淋巴结是否阳性, 在原

发肿瘤切除前确认的一个或多个 CTCs, 预测更差的无复发生存率和总体生存率^[23]。而在肝脏肿瘤中研究发现, 在影像学未显示肉眼可见的微小门静脉浸润 (mPVI) 和远处转移之前, 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3) 阳性的 CTCs ≥ 5 为危险因素, 可能是肝细胞癌 (HCC) 患者预后的一个有用的生物标志物^[24]。同时, 有学者也发现 CTCs 数量与多发性骨髓瘤 (MM) 治疗反应显著相关^[25]。

陈万青等^[26] 报道我国恶性肿瘤发病第一位是肺癌, 接下来依次为胃癌和肝癌, 而女性发病第一位的是乳腺癌, 在这些肿瘤中, 都发现 CTCs 的重要作用。

3 存在的问题

CTCs 检测对患者创伤较小, 可出现于病理学、影像学异常表现之前, 且能反复获取以便对肿瘤状况进行检测, 是近年来的热点研究领域, 但真正应用于临床还有诸多难点需要克服: (1) 缺乏健全和标准化的检测程序, CTCs 来源于不同设备不同的检测方法, 而且没有一个明确的参考范围, 使得结果解读比较困难; (2) 特异性较差, 现在选择的标志物通常是上皮细胞来源, 无法确定是哪个部位哪种肿瘤, 即使找到 CTCs, 临床医生也难以判断其来源, 限制了 CTCs 在肿瘤早期筛查早期诊断中的应用; (3) 缺乏特异性 CTCs 标志物, 非上皮细胞来源的 CTCs 标志物很少; (4) 价格昂贵, 无论哪种方法富集检测 CTCs, 对绝大多数病患来说, 都是个不小负担。CTCs 检测方法众多, 需要了解各自原理, 根据肿瘤类型和临床需要选择适宜方法。CTCs 在实体瘤的作用仍需大规模的临床实验来验证, 但其为人们提供了对于癌症研究的新思路。

参考文献

- [1] HOSOKAWA M, KENMOTSU H, KOH Y, et al. Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system[J]. PLoS One, 2013, 28(6): e67466.
- [2] ZHOU Q J, GENG Q, WANG L, et al. Value of folate receptor-positive circulating tumour cells in the clinical management of indeterminate lung nodules: a non-invasive biomarker for predicting malignancy and tumour invasiveness[J]. Ebio Medicine, 2019, 41(1): 236-243.
- [3] SAUCEDO-ZENI N, MEWES S, NIESTRO 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(4): 1241-50.
- [4] SU P J, WU M H, WANG H M, et al. Circulating tumour cells as an independent prognostic factor in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma undergoing Chemoradiotherapy[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 31423.
- [5] RAMIREZ A B, BHAT R, SAHAY D, et al. Circulating

- tumor cell investigation in breast cancer patient-derived xenograft models by automated immunofluorescence staining, image acquisition, and single cell retrieval and analysis[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 220.
- [6] CIESLIKOWSKI W A, BUDNA-TUKAN J, SWIERCZEWSKA M, et al. Circulating tumor cells as a marker of disseminated disease in patients with newly diagnosed high-risk prostate cancer[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(1): 160.
- [7] ZEINALI M, LEE M, NADHAN A, et al. High-throughput label-free isolation of heterogeneous circulating tumor cells and CTC clusters from non-small-cell lung cancer patients[J]. Mol Oncol, 2016, 10(8): 1330-1343.
- [8] 沙杰, 范理宏. miRNA-146b-3p 在早期非小细胞肺癌中的诊断价值[J]. 同济大学学报(医学版), 2018, 39(2): 73-78.
- [9] LUCA G D, CARDINALI B, MASTRO L D, et al. Optimization of a WGA-free molecular tagging-based NGS protocol for CTCs mutational profiling[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4364.
- [10] 张偲, 徐克前. 循环肿瘤细胞的分离与鉴定研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1129-1133.
- [11] DING C, ZHOUXF, XU C, et al. Circulating tumor cell levels and carcinoembryonic antigen: an improved diagnostic method for lung adenocarcinoma[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(11): 1413-1420.
- [12] DOUILLARD J Y, OSTOROS G, COBO M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(9): 1345-1353.
- [13] ANKENY J S, COURT C M, HOU S, et al. Circulating tumour cells as a biomarker for diagnosis and staging in pancreatic cancer[J]. Br J Cancer, 2016, 114(12): 1367-1375.
- [14] WANG N N, TESFALUUL N, LI J, et al. Enrichment of circulating myeloma cells by immunomagnetic beads combined with flow cytometry for monitoring minimal residual disease and relapse in patients with multiple myeloma[J]. Ann Hematol, 2019, 98(12): 2769-2780.
- [15] RIED K, ENG P, SALI A. Screening for circulating tumour cells allows early detection of cancer and monitoring of treatment effectiveness: an observational study[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(8): 2275-2285.
- [16] MESSARITAKIS I, POLITAKI E, KOINIS F, et al. Dynamic changes of phenotypically different circulating tumor cells sub-populations in patients with recurrent/refractory small cell lung cancer treated with pazopanib[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2238.
- [17] MIYAMOTO D T, LEE R J, 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(3): 288-303.
- [18] BIDARD F C, 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(6): 516.
- [19] ZHAO Y P, HAN L, ZHANG W H, et al. Preoperative chemotherapy compared with postoperative adjuvant chemotherapy for squamous cell carcinoma of the thoracic oesophagus with the detection of circulating tumour cells randomized controlled trial[J]. Int J Surg, 2020, 73(1): 1-8.
- [20] MA J X, YAO S, LI X S, et al. Neoadjuvant therapy of DOF regimen plus bevacizumab can increase surgical resection rate in locally advanced gastric cancer: a randomized, controlled study[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(42): 1489.
- [21] TAY R Y, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ F, FOY V, et al. Prognostic value of circulating tumour cells in limited-stage small-cell lung cancer: analysis of the concurrent once-daily versus twice-daily radiotherapy (CONVERT) randomised controlled trial[J]. Ann Oncol, 2019, 30(7): 1114-1120.
- [22] LARSSON A M, JANSSON S, BENDAHL P O, et al. Longitudinal enumeration and cluster evaluation of circulating tumor cells improve prognostication for patients with newly diagnosed metastatic breast cancer in a prospective observational trial[J]. Breast Cancer Res, 2018, 20(1): 48.
- [23] HALL C S, KARHADE M G, BAULDRY J B B, et al. Prognostic value of circulating tumor cells identified before surgical resection in nonmetastatic breast cancer patients[J]. J Am Coll Surg, 2016, 223(1): 20-29.
- [24] HAMAOKA M, KOBAYASHI T, TANAKA Y, et al. Clinical significance of glypican-3-positive circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma patients: a prospective study[J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0217586.
- [25] HUHN S, WEINHOLD N, NICKEL J, et al. Circulating tumor cells as a biomarker for response to therapy in multiple myeloma patients treated within the GMMG-MM5 trial[J]. Bone Marrow Transplant, 2017, 52(8): 1194-1198.
- [26] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.

(收稿日期: 2020-10-02 修回日期: 2021-05-02)