doi:10.16118/j.1008-0392.2018.03.024

·综 述·

循环肿瘤细胞检测技术的研究进展

黄子凌,宇小婷 综述,易祥华 审校

(同济大学附属同济医院病理科,上海 200065)

【摘要】 循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)检测是一种新型的"液体活检"技术,具有无创、便捷、实时、整体、精准和可重复操作等特点,为临床提供了从肿瘤细胞到分子水平的分析平台,弥补了现有临床肿瘤诊断方法的不足,有助于实现肿瘤患者的精准医疗。本文主要就 CTC 检测技术的临床应用价值和常用方法等最新进展作一综述。

【关键词】循环肿瘤细胞;病理技术;精准医学

【中图分类号】R730 【文献标志码】A 【文章编号】1008-0392(2018)03-0123-05

Current status and future of circulating tumor cell detection

HUANG Zi-ling, YU Xiao-ting, YI Xiang-hua

(Dept. of Pathology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China)

【**Abstract**】 The detection of circulating tumor cells is a new type of "liquid biopsy" technique. It has the advantages of non-invasiveness, convenience, real-time, integrity, precision and repeatability. The technique provides a clinical analysis platform from cellular to molecular levels, and makes up the deficiency of the existing methods of cancer diagnosis, to facilitate more accurate medical treatment for cancer patients. This article reviews the latest progress on the clinical application and common methods of circulating tumor cell detection.

【**Key words**】 circulating tumor cells; pathological technique; precision medicine

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是指进入到血液循环中的肿瘤细胞。部分 CTC 可以逃离机体免疫识别或药物治疗,在体内寻找合适的微环境,形成"种子"在远处器官或原发组织生长,造成肿瘤的转移或复发。CTC 检测是一种新型的"液体活检"技术,具有无创、便捷、实时、精准、可重复操作等特点,为临床提供了从肿瘤细胞到分子水平的分析平台,弥补了现有临床肿瘤诊断方法的不足,有助于实现肿瘤患者的精准医疗。本文主要就该技术产生的背景和临床应用价值、常用方法、特点、不足及未来的发展进行评述。

1 CTC 检测技术的产生和临床应用价值

恶性肿瘤的侵袭转移是患者复发转移的关键环节,常导致肿瘤治疗失败,危及患者生命。如何尽早发现肿瘤细胞入血,及时采取有效的治疗措施,是肿瘤治疗成功的关键。CTC 概念的最早出现于 1869 年,Ashworth[1] 在 1 例因癌症死亡的患者血液中发现一种类似于尸检发现的肿瘤细胞,首次提出 CTC 的概念。1889 年,Steven Paget 提出了"种子与土壤

收稿日期:2017-06-30

基金项目:国家自然科学基金(81600043、81401882);上海市科学技术委员会医学重点科技攻关专项基金(09411951600);上海市卫生局医学重点专项基金(20134034)

作者简介:黄子凌(1987—),女,博士研究生.E-mail:erin831024@163.com

通信作者:易祥华.E-mail:yixhxf@163.com

假说”,假说指出器官微环境可影响特定肿瘤细胞的种植、侵袭、存活和生长。肿瘤细胞可以随着血液在体内循环,在进入其他器官之后可以如同“种子”遇到“土壤”一样,在那里发展出新的病灶[2]。随着方法学技术的进步,2004年,美国强生公司子公司Veridex开发的CellSearch CTC检测技术获得美国FDA的认证,证实了CTC是转移性乳腺癌患者独立的预后因子[3]。CTC这一应用价值先后也在结直肠癌、前列腺癌中得到证实。2007年,美国临床肿瘤学会将CTC纳入了肿瘤标志物检测的方法。

大量研究[4-6]显示,CTC的检测有助于早期发现肿瘤的微转移、监测术后复发、评估疗效及预后,以及选择合适的个体化治疗。Budd等[7]对138例转移性乳腺癌患者在治疗前和治疗后10周进行影像学评估,在治疗后4周进行CTC检测,影像学无进展且CTC≥5的患者(13例,9%)中位总生存期明显短于CTC<5的患者(30例,60%),影像学有进展且CTC<5的患者(20例,14%)中位总生存期明显长于CTC≥5的患者(22例,16%),结果显示CTC评估比现有影像学方法可以更早、重复性更好地提示疾病的进展。Lu等[8]对90例根治手术后接受mFOLFOX化疗Ⅲ期结直肠癌的患者进行CTC检测,发现30例(33.3%)患者化疗后发生复发,单因素和多因素分析显示化疗后持续存在CTC是根治术后复发的独立预测因子,认为对于化疗后晚期肿瘤患者CTC预测复发准确率较CEA更高。

肿瘤细胞不仅可以从实体瘤原发灶或转移灶脱落入血,也可在形成可见实体瘤之前入血。CTC的检测可早于影像学或血清学检测。CTC已被证实存在于肺癌、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤患者的血液中[9-17]。CTC的检测和应用为肿瘤患者的精准诊断和治疗带来了福音。

2 CTC检测技术的方法及其特点

CTC的检测和临床应用是一门新的病理技术,一般包括肿瘤细胞的分离富集和鉴定识别两个主要的步骤。

2.1 肿瘤细胞的分离富集技术

主要是基于细胞物理特性原理的过滤法、电泳法及利用抗原抗体反应的免疫学方法。

2.1.1 *物理学技术* 依据细胞物理特性,如大小、密度等进行分离。(1)过滤法:通过滤过体积较小的血细胞的方式分离体积较大的CTC。优点是操作简便,成本低,可分离不同表型的CTC;缺点是无法获取体积较小及形状自发改变和受压改变的肿瘤细胞,灵敏性不高、稳定性差。(2)电泳法:利用细胞极性进行分离捕获的一种新型研究方法。但临床研究少,暂无分析数据,需进一步验证其性能。(3)直接分析法:采用光纤阵列扫描或者传感器技术,直接对血液中的CTC进行高通量分析。该法对细胞损伤最小,但缺乏对CTC高浓度的提取,这对进一步的下游分析造成影响。

2.1.2 *免疫学技术* 根据抗原抗体反应的原理对细胞表面蛋白标志物进行分离,分为阳性捕获法和阴性富集法。(1)阳性捕获法:通过CTC表面靶抗原进行分离,即通过特异性抗体与肿瘤细胞表面上皮细胞黏附分子(epithelial cellular adhension molecule, EpCAM)等抗原结合(如常用的CellSearch检测系统),分离CTC。优点是可获取较高纯度的肿瘤细胞,缺点是尚无具有普适性的肿瘤细胞表面抗原,受肿瘤细胞上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)的影响,蛋白水平标志物表达不稳定,灵敏性不高且可能存在假阳性。目前,较高特异性的肿瘤相关抗原的缺乏及肿瘤异质性的存在使得阳性分选会出现假阴性结果。(2)阴性富集法:借助免疫磁微粒技术,去除血浆和红细胞等,通过特异性抗体与白细胞表面共同抗原CD45结合去除血液中的白细胞,得到富集的CTC。优点是可获取任意大小、形状、表型变化的CTC,也适用于所有血液、体液中稀有细胞的富集,具有普适性;由于不依赖肿瘤相关特异性抗原,可以有效避免CTC表面抗原表达减弱或缺失导致的假阴性,更适合获得全面的CTC。缺点是纯度受白细胞去除效果的影响。

2.2 肿瘤细胞的鉴定识别技术

常用的鉴定识别技术包括对肿瘤细胞计数的免疫组织化学染色、免疫荧光染色、荧光原位杂交及对肿瘤细胞核酸分析的PCR等技术。

2.2.1 *免疫组织化学染色* 其优点是贴近组织病理概念,病理科易于接受,可观测细胞形态;缺点是CTC与来源于组织的肿瘤细胞存在差异,同时非典型形态的变化使形态判别易受影响,且同时有其他

背景细胞干扰，光镜下识别判断难度增加。

2.2.2　免疫荧光染色　其优点是利用荧光素标记抗体，通过在荧光显微镜下的观察对 CTC 进行识别，更具便利性，可观测细胞蛋白表型及形态；缺点是蛋白标志物表达不稳定，各肿瘤之间尚无统一的普适性蛋白标志物，容易存在漏检及假阳性。

2.2.3　荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization，FISH）　其优点是在核染色体水平鉴定 CTC，更具精准性和客观性，灵敏度和特异性更高；缺点是有可能受到血源性染色体异常细胞干扰，选择一种染色体探针只能针对其中一个标志物检测。

2.2.4　PCR、RT-PCR　其灵敏度高，假阳性也高，无法观测细胞形态。

2.2.5　测序、基因组分析　这些方法对上游分离技术要求高，对 CTC 纯度、丰度要求高，目前不易直接实现。

2.2.6　免疫荧光原位杂交技术（immunofluorescent in situ hybridization，imFISH）　一种基于免疫荧光染色技术和荧光原位杂交技术相结合的新型的 CTC 检测技术。正常细胞以染色体二倍体的形式出现，而肿瘤细胞的显著特点是 DNA 含量增高，基因拷贝数异常，染色体可以出现三倍体、四倍体，甚至多倍体；或者发生基因重组或缺失。FISH 技术通过标记染色体能检测到染色体和基因拷贝数异常、发生基因重组或缺失的肿瘤细胞。imFISH 将基因水平的 FISH 技术与蛋白水平的免疫荧光染色技术相结合，通过 FISH 检测肿瘤细胞的染色体和肿瘤靶基因改变，白细胞共同抗原（CD45）免疫荧光染色帮助鉴别排除血源性异常细胞。该技术能同时显示细胞形态和遗传变异，因而在鉴定 CTC 方面具有非常突出的优势[14]。将捕获的 CTC 进行激光切割，可进一步进行基因突变检测，药物敏感性和耐药性检测，实现从细胞鉴别、计数到分子分型和细胞表型分析的一步到位检测。根据不同实体瘤，可通过增加不同探针组合、抗体组合，进一步提高检测的特异性和灵敏性，满足不同的临床应用，从而更好地辅助肿瘤诊断，指导治疗。上述方法有待在临床实践中应用和提高。

阴性富集（negative enrichment）结合 imFISH 检测 CTC 在临床广泛应用。传统 CTC 富集方法多采用依赖于 EpCAM 抗原表达的阳性捕获法。而 CTC 具有抗原异质性，即不同实体瘤来源的 CTC 表面抗原表达不同，且 CTC 在入血过程中，会经历大小、形态及表面抗原表达的变化过程，因此，采用依赖于 CTC 表面抗原表达或 CTC 大小等分离富集方法具有局限性。阴性富集技术克服了阳性捕获法的不足，莱尔 Cyttel™-CTC（以下简称 Cyttel™-CTC）检测技术是目前具有高效、广泛适用性的富集技术。它通过去除血液中白细胞的方式使血液中的循环稀有细胞（含 CTC）最大程度剩余富集，不依赖于肿瘤细胞表面抗原表达，且不受限于大小及形状变化，具有广泛的适用性。另外，Cyttel™-CTC 阴性富集专利技术，通过核心单克隆抗体组合群包被免疫磁微粒的方式可去除血液中 99.99%以上的白细胞，且可基本保证无损肿瘤细胞的回收，较之其他阴性富集法具有更高的纯度和分离效率。

CTC 检测另外需要改进的是 CTC 鉴别、计数、分型和分析。染色体数目和结构的异常是癌症基因组学最明显和突出的特征。染色体结构改变和部分重排通过激活癌基因或使抑癌基因失活等方式，对肿瘤的发生发挥重要作用。大规模 DNA 拷贝数分析显示，人类癌症中染色体非整倍性普遍发生。在最大的人类癌症细胞遗传信息数据库 Mitelman（https：//cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman）中，6 万多病例的研究结果也证实了这一现象。有学者发现，来自于同一患者血液中的 CTC 具单碱基突变的异质性，即每个细胞都不一样；然而这些细胞却表现出高度一致的拷贝数变异模式，不同患者的同种癌的基因拷贝数图案也是一样的。这一发现先后在肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌和胃癌得到证实。这为通过分析 CTC 拷贝数图案来推测癌症类型展现了一个良好的前景。

Cyttel™-CTC 技术通过识别染色体异倍体来鉴定 CTC。从核酸水平鉴定 CTC 的方式打破了传统蛋白水平鉴定的模式，更具精准性、客观性、稳定性。同时也从本源上给出了究竟什么样的细胞才是肿瘤细胞的解释。此外，imFISH 技术通过引入蛋白质染色与 FISH 技术相结合，排除了血源性异常细胞的干扰，较之传统 FISH 技术具有更高的特异性。imFISH 平台的建立也同时实现了核酸水平、蛋白水平延展性多向科研平台的搭建，即 Cyttel™-CTC 技术提供了一个从上游细胞形态鉴别、计数到下游核型、表型分析的

一步到位模式,具有较高的科研应用价值。

3 CTC检测技术的不足

尽管CTC的应用价值已被多方面所证实,但由于其自身特点以及目前整体方法学的局限性,仍然存在着一些不足[18-19]。主要问题表现在:(1)缺乏标准化。不同检测方法在不同肿瘤中的检测敏感性和特异性不同,而用不同的方法研究不同肿瘤的不同临床应用方向,得出的更是海量数据和结果,无法得出准确结论,缺乏统一的标准。(2)缺乏指向性。肿瘤标志物器官和组织特异性通常较差,目前尚没有一种高度特异性的标志物指向某种肿瘤。CTC的检测也面临这样的问题,即检测到肿瘤细胞,无法说明是哪个器官组织来源的,不具有指向性。这也为在临床症状不明或其他检测手段显示无异常时,CTC检测阳性却无法具体指向带来了困惑。

4 展 望

综上所述,传统的病理组织学检测缺乏对转移灶等全身整体性的评价,另外存在病灶位置特殊使取样受阻和无法反复取样等局限性,CTC检测是一种新型的"液体活检"技术,具有无创、便捷、整体、精准、可重复操作等特点,弥补了现有肿瘤诊断方法的不足[16]。进入血液中的CTC更准确地反映了肿瘤发生和发展的即时信息,通过对CTC计数的分析,可以反映患者的肿瘤负荷,判断患者的疾病进展和预后情况。治疗过程中动态检测CTC数目变化可以反映化疗的治疗效果,判断患者是否有耐药发生。结合FISH、PCR、测序等实时检测CTC药物靶基因信息,实时检测耐药性,更好地指导个体化治疗。血液CTC检测在术后复发转移预测与检测、疗效评估及耐药性监测等方面显示广阔的临床应用前景[20]。

临床肿瘤学未来的发展方向是精准医学,精准医学中非常关键的是如何发现遗传学的改变,通过遗传学的改变指导临床诊断、治疗策略的选择。目前,有多少技术手段能够为精准医学所用是研究的热点。CTC的优势在于:(1)可用于肿瘤发展中的疾病过程监测;(2)可以通过检测预测治疗的有效性;(3)通过将治疗过程中基因组学改变同疗效相结合,为随时调整治疗策略打下良好的基础。

目前可以通过血液富集的方法将游离DNA浓集[21]、可以将单个CTC分离出来等,这些技术都为进一步基因组学研究奠定了基础。未来,就是利用CTC检测的优势,使基因组学更精准,利用精准的数据来指导检测和治疗。

【参考文献】

[1] ASHWORTH T R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death[J]. Aust Med J, 1869,14(3): 146-149.

[2] FIDLER I J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. Nat Rev Cancer, 2003,3(6): 453-458.

[3] CRISTOFANILLI M, BUDD G T, ELLIS M J, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2004,351(8): 781-791

[4] PLAKS V, KOOPMAN C D, WERB Z. Cancer. Circulating tumor cells[J]. Science, 2013, 341(6151): 1186-1188.

[5] PATERLINI-BRECHOT P, BENALI N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions[J]. Cancer Lett, 2007,253(2): 180-204.

[6] MAHESWARAN S, HAHER D A. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis[J]. Curt Opin Genet Dev, 2010,20(1): 96-99.

[7] BUDD G T, CRISTOFANILLI M, ELLIS M J, et al. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006,12(21): 6403-6409.

[8] LU C Y, TSAI H L, UEN Y H, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage Ⅲ colon cancer[J]. Br J Cancer, 2013,108(4): 791-797.

[9] XU Y H, ZHOU J, PAN X F. Detecting circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3): 10352-10358.

[10] JANNI W J, RACK B, TERSTAPPEN L W, et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in primary breast cancer[J]. Clin Canc-

er Res，2016，22(10)：2583－2593

[11] KAIFI J T，KUNKEL M，DICKER D T，et al. Circulating tumor cell levels are elevated in colorectal cancer patients with high tumor burden in the liver[J]. Clin Cancer Res，2015，16(5)：690－698.

[12] THALGOTT M，RACK B，EIBER M，et al. Categorical versus continuous circulating tumor cell enumeration as early surrogate marker for therapy response and prognosis during docetaxel therapy in metastatic prostate cancer patients[J]. BMC Cancer，2015，15：458.

[13] MSAOUEL P，KOUTSILIERIS M. Diagnostic value of circulating tumor cell detection in bladder and urothelial cancer：systematic review and meta-analysis[J]. BMC Cancer，2011，11(1)：1－14.

[14] BLUEMKE K，BILKENROTH U，MEYE A，et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev，2009，18(8)：2190－2194.

[15] ROMERO-LAORDEN N，OLMOS D，FEHM T，et al. Circulating and disseminated tumor cells in ovarian cancer：a systematic review[J]. Gynecol Oncol，2014，133(3)：632－639.

[16] 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)：1491－1504.

[17] PINZANI P，SALVADORI B，SIMI L，et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer：correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection[J]. Hum Pathol，2006，37(6)：711－718.

[18] HONG B，ZU Y. Detecting circulating tumor cells：current challenges and new trends[J]. Theranostics，2013，3(6)：377－394.

[19] WICHA M S，HAYES D F. Circulating tumor cells：not all detected cells are bad and not all bad cells are detected[J]. J Clim Omcol，2011，29(12)：1508－1511.

[20] COUMANS F A，LIGTHART S T，UHR J W，et al. Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC[J]. Clin Cancer Res，2012，18(20)：5711－5718.

[21] 王凯玲，任涛.NSCLC 患者血浆游离 DNA 检测的临床意义[J].同济大学学报(医学版)，2016，37(4)：46－50.

(上接第 113 页)

[14] AMENT J D，GREENAN K N，TERTULIEN P，et al. Medical necessity of routine admission of children with mild traumatic brain injury to the intensive care unit[J]. J Neurosurg Pediatr，2017，19(6)：1668－1674.

[15] SADEGH R，KARIMIALAVIJEH E，SHIRANI F，et al. Head CT scan in Iranian minor head injury patients：evaluating current decision rules[J]. Emerg Radiol，2016，23(1)：9－16.

[16] JOSEPH B，PANDIT V，AZIZ H，et al. Mild traumatic brain injury defined by Glasgow Coma Scale：is it really mild?[J]. Brain Inj，2015，29(1)：11－16.

[17] 梁鲲，刘勇.定量 CT 对骨质疏松症诊断价值的 meta 分析[J].同济大学学报(医学版)，2017，38(3)：70－75.

[18] 宋鑫，曹师锋，任东林，等.TLIF 手术对近端椎体关节突关节的影响及相关因素分析[J].同济大学学报(医学版)，2017，38(5)：69－73.