

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.044

## 肺癌循环肿瘤细胞检测及临床应用的研究进展\*

何文杰<sup>1</sup>, 王羽丰<sup>1</sup>, 李 佳<sup>1</sup>, 李继鹏<sup>2△</sup>综述, 江 波<sup>1</sup> 审校

(1. 昆明医科大学第三附属医院干部医疗科 650118; 2. 昆明医科大学第四附属医院急诊内科 650031)

[关键词] 肿瘤循环细胞; 肺肿瘤; 诊断技术和方法; 治疗应用

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)02-0273-03

每一年全球新发肺癌患者 160 万人, 因肺癌死亡患者 140 万人<sup>[1]</sup>。多数肺癌患者就诊时已为晚期, 常伴发有一个甚至多个器官的转移。90% 肺癌患者并非死于原发肿瘤, 而是因转移灶引起器官衰竭而死亡<sup>[2]</sup>。当前, 无论是影像学还是血清肿瘤标志物都难以及时而精准地预测肿瘤转移的发生、发展。因此, 建立一种精准、便捷、能动态监测肿瘤发生、发展的诊断方法, 成为全球肺癌研究领域关注的热点。

19 世纪末期, PAGET 提出了肿瘤转移的“种子与土壤”学说, 认为携带肿瘤细胞的种子能够从原发肿瘤脱落转移到远处器官的土壤中继续生存。依据这一学说, 提出了循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 的概念, 即由原发肿瘤或转移肿瘤脱落后进入到循环血液中, 具有肿瘤基因特征或肿瘤抗原特性的恶性肿瘤细胞<sup>[3]</sup>。当前的研究显示, 在发生转移之前, 恶性肿瘤细胞就可释放 CTCs 通过上皮细胞间充质化进入转移器官中<sup>[4]</sup>。CTCs 可作为肺癌早期诊断、评价疗效及预后、检测转移及复发的重要指标, 也可检测肺癌驱动基因的突变状态, 指导肺癌的靶向治疗。但 CTCs 检测的精确性、科学性在学术界仍存在争议, 仍需进一步的研究和探索。

本文主要总结了当前 CTCs 的检测方法及在肺癌中的应用的现状, 并总结了当前 CTCs 的特性与肺癌转移的相关性问题。同时也突显出了当前 CTCs 在肺癌诊断、治疗中得到广泛临床认可及推广需要解决的问题。

## 1 CTCs 的检测方法

当前 CTCs 检测技术主要分为富集技术和分析技术两大方面。

## 1.1 富集技术

1.1.1 基于形态学的分离法 基于肿瘤细胞与正常血细胞相比, 有更大的体积 ( $>8 \mu\text{m}$ )、不同的密度及形态的原理, 建立了基于 CTCs 形态学的分离法。包括基于肿瘤细胞大小的分离法 (isolation by size of epithelial tumor cells, ISET) 和密度梯度法。

首先建立的是 ISET 法, 其通过一定孔径的聚碳酸酯膜设计肿瘤分子屏障, 依据肿瘤细胞较正常血细胞直径大的原理分离 CTCs。通过物理特性的原理分离出的 CTCs 形态完整, 细胞的特性得以完整保存, 其表达的抗原未遭破坏, 提高了后续免疫标记、染色等的可行性和准确性。但外周血中的也存在着许多大分子的细胞, 同时部分 CTCs 体积较血细胞相似甚至更小, 从而降低了该检测方法的灵敏度和特异度。

密度梯度法依据肿瘤细胞与正常血细胞不同的密度差, 通

过离心的方式将血液分层为血清、白细胞、CTCs 和单核细胞、红细胞等。该方法操作简便、易行, 对设备、试剂要求较低, 但离心过程中容易使 CTCs 与单核细胞混入血浆层或积聚成团混入红细胞层。有鉴于此, 改进后的 Oncoquick 法, 通过放置多孔膜在分离液与血液之间, 防止交叉混合, 从而降低 CTCs 的损失率。而 RosetteSep<sup>TM</sup> 法, 通过抗体交联的方式与不需要的血细胞交联, 增加其密度, 离心后使其沉降到最底层, 从而容易被去除。该方法能够极大提高 CTCs 的富集率。

1.1.2 免疫磁性分离法 免疫磁性分离法是当前认可度最高的 CTCs 富集方法。其工作原理为上皮来源的肿瘤细胞一般都表达上皮黏附分子 (EpCAM) 和细胞角蛋白 (CK), 而这些分子在血细胞中是不表达的。同时, 一些肿瘤具有特异性的肿瘤标志物, 例如 Her2-neu、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原 (PSA)、甲胎蛋白 (AFP) 等。将这些特异性的分子抗体与免疫磁珠结合, 形成阳性免疫磁珠, 与肿瘤细胞特异性抗原相结合, 通过磁场的作用被吸附出来。另外, 将含有特异性白细胞表面抗体如 CD45 抗体与免疫磁珠结合, 形成阴性免疫磁珠, 消除血细胞中的白细胞, 有利于之后针对 CTCs 的免疫细胞化学和免疫荧光分析检测<sup>[5]</sup>。但在循环系统中, 上皮特异性抗体可标记非肿瘤性的上皮细胞, 从而增加了假阳性结果。同时, 免疫磁性检测方法, 对检测设备、实验条件要求较高, 检测步骤繁琐, 费用昂贵, 这也限制了其在临床工作中的推广和应用。

## 1.2 分析技术

1.2.1 基于免疫细胞化学的分析技术 免疫细胞化学法是将待检测的细胞固定后, 与带有荧光的上皮性肿瘤细胞特异性抗原如 EpCAM、CK 的抗体结合, 依据抗原抗体的反应, 检测 CTCs 的存在及数量。同时, 加入特殊的抗白细胞抗体来排除假阳性的发生。当前常用的检测方法有流式细胞技术、光纤阵列扫描技术 (fiber-optic array scanning technology, FAST)、酶联免疫斑点检测技术 (enzyme-linked epithelial immunospot assay, EPISPOT)。

流式细胞术是一种利用识别荧光染色的单克隆抗体标记的肿瘤细胞, 来分析和检测富集后分离的 CTCs 的技术。其具有高效、快速、精确的特性。此外, 流式细胞术还能够同期对 CTCs 进行细胞大小、形态、细胞内外标记物、DNA 特性等多参数分析<sup>[6]</sup>。

FAST 是一种更为高效、快速的流式细胞技术。通过配备一个 50 341 mm 的分析视野, 其扫描、分析荧光标记的 CTCs 的速率是常规检测方法的 500 倍。MARRINUCCI 等<sup>[7]</sup> 研究

\* 基金项目: 云南省教育厅一般项目 (2016ZDX059)。 作者简介: 何文杰 (1979—), 主治医师, 博士, 主要从事肺癌的内科治疗及研究。

△ 通信作者, E-mail: yisheng19791216@sohu.com。

显示,在晚期大肠癌患者中,FAST 与传统流式细胞术、反转录 PCR 比较,能够更为快速地发现更多数量的 CTCs。目前该方法多用于小样本量临床试验阶段。

EPISPO 首先利用免疫阳性磁珠分离出带有肿瘤特异性抗原的细胞,利用免疫阴性磁珠去除血液中的白细胞。之后与带有荧光标记的抗体结合,利用荧光检测方法分析分泌肿瘤特异性蛋白的 CTCs<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 基于核酸的分析技术** 反转录 PCR 是目前广泛用于肺癌 CTCs 分析的技术之一,其主要通过检测外周血中表达肿瘤相关标记物的 mRNA(CEA mRNA,CK19 mRNA,LUNX mRNA 等)碎片,通过反转录的方式转变为 cDNA,再利用 PCR 技术扩增后检测、分析 CTCs<sup>[9]</sup>。

CellSearch™ 系统目前在肺癌 CTCs 检测中得到广泛的认可和应用。该系统主要由自动化的免疫磁性分离系统和免疫荧光分析系统组成。检测标本首先通过阳性和阴性免疫磁珠,分离出 EpCAM<sup>+</sup>CK<sup>+</sup>的细胞,去除 CD45<sup>+</sup>的白细胞。再通过包含有备选检测图像的图库,对分离的细胞进行全自动的荧光分析,最终筛选出直径大、细胞变形、细胞核变异、染色异常的 CK<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>细胞为 CTCs<sup>[10]</sup>。该系统具有高效、快捷、操作简便、灵敏度及特异度高的特点。但该系统也存在部分不表达肿瘤特异性抗原的 CTCs 无法被检出的缺陷。

CTCs-chip 通过 7 800 个结合抗 EpCAM 抗体的微阵列组成微流体平台,严格控制血液流过芯片的速度和剪切力,每 1 个位点能够直接捕获 CK<sup>+</sup>、EpCAM<sup>+</sup>、DAPI<sup>+</sup> 的 CTCs,而 CD45<sup>+</sup>的血细胞则被消除。在肺癌、乳腺癌、肠癌、前列腺癌、胰腺癌中可达到 99.1% 的灵敏度和 100.0% 的特异度<sup>[11]</sup>。该方法仅需一步操作,不需要复杂的前期准备,能够最大化地避免 CTCs 的丢失、破坏及标本的污染。同时,该方法还能检测出既往检测方法没有发现过的罕见 CTCs 细胞群。

## 2 CTCs 在早期肺癌诊断中的预测价值

在肺癌早期阶段,CTCs 的存在并不直接意味远处转移的存在。只有极少的 CTCs 能够与血管内皮建立联系,通过上皮间质转化的形式侵入远处薄壁组织,形成转移瘤<sup>[12]</sup>。TANAKA 等<sup>[13]</sup>研究发现,30.6% 的早期肺癌患者能检测到 CTCs。而分期越晚,CTCs 检出率越高。KURUSU 等<sup>[14]</sup>研究显示在 II A、II B、III A 期肺癌患者中 CTCs 检出率为 50%、73%、100%,高于 I A、I B 期的 36%、41%。

## 3 CTCs 在肺癌手术中的预测价值

SAWABATA 等<sup>[15]</sup>发现术后每 7.5 mL 血液中 CTCs $\geq$ 5 个有更短的肿瘤复发时间。YAMASHITA 等<sup>[16]</sup>发现术后 CTCs 的数量与总生存率相关。提示 CTCs 可作为检测术中肿瘤播散、预测术后复发的有效指标。对术后 CTCs 高于分界点的患者,即使为 I A 或 I B 期,术后辅助化疗是否尽早使用仍值得进一步研究。

## 4 CTCs 在进展期肺癌诊断中的价值

KATSEL 等<sup>[17]</sup>研究发现,CK19 阳性的 CTCs 与淋巴结、骨、肾上腺、脑转移相关;PTHrP 阳性的 CTCs 与骨转移相关;LUNX 阳性的 CTCs 与淋巴结转移相关。IV 期肺癌患者的 CTCs 检出率明显增高。MUINELO 等<sup>[18]</sup>研究显示,CTCs 是影响进展期 NSCLC 患者化疗后无瘤生存率及总体生存率的独立预后因素。虽然多数研究都支持 CTCs 可作为进展期肺癌诊断、评价疗效及预后的指标,但仍存在检出率差异大,结果对立等问题。这可能与检测方法及治疗模式不统一,疗效评价标准不一致、敏感性不足、样本量偏小等因素有关。仍需高灵

敏度的检测系统的发展、统一,开展多中心、大样本量的研究来解决。

## 5 CTCs 在进展期肺癌化疗应用的价值

NAGRATH 等<sup>[19]</sup>研究发现,每一周期化疗后 CTCs 检出值的变化与肿瘤体积的变化一致,CTCs 检出率越低的患者,疗效越好。但 NAIR 等<sup>[20]</sup>研究发现,CTCs 的变化与化疗后肿瘤体积的变化没有相关性。这些研究结果的不一致性,可能与肿瘤的异质性、化疗方案的差异、耐药基因的表达不同等因素有关,值得我们进一步的探索和研究。

## 6 CTCs 在肺癌放疗应用的价值

CHEN 等<sup>[21]</sup>研究显示,接受同期放化疗后,未检出 CTCs 的肺癌患者其疗效及预后明显优于检出 CTCs 的患者。但 GE 等<sup>[22]</sup>研究显示,根治性放疗后的肺癌患者,虽然 CTCs 检出值有明显的降低,但与疗效没有相关性。

## 7 CTCs 在肺癌分子靶向治疗应用的价值

CTCs 由于具有原发肿瘤同源的基因及遗传特性,因此能微创、动态、实时的检测肺癌驱动基因,在临床上已开始得到广泛关注和应用。

当前研究显示,通过 CTCs 检测表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)突变与组织检测 EGFR 突变具有高度的一致性,同时通过 CTCs 检测 T790M 的突变能够预测耐药性的发生。MAHESWARAN 等<sup>[23]</sup>通过 CTCs 检测并经组织证实具有 EGFR 突变的患者,其一致性达 95%;而在 64% 耐药后的患者中,有 33% 检测到 T790M 的突变。SUNDARESAN 等<sup>[24]</sup>研究发现,组织中与 CTCs 中 T790M 突变检出率分别为 75% 和 70%。PAILLER 等<sup>[25]</sup>分别检测组织与 CTCs 中的间变淋巴瘤激酶(ALK)重排发现,检出 ALK 重排一致性 100%。

目前通过 CTCs 检测肺癌患者的驱动基因仍存在特异度高而灵敏度低的缺点。对 CTCs 检测基因阴性的患者仍需组织基因检测进一步证实。因此,提高检测技术的灵敏度仍是 CTCs 能否在基因检测领域得到进一步推广和应用的关键所在。

## 8 CTCs 的发展展望

近几年来,CTCs 在整个肿瘤医学领域获得了极大的关注。首先,CTCs 具有安全、方便、实时、可重复等优点,在肺癌的筛查、诊断、治疗、预后等方面具有较好的应用前景。其次,通过 CTCs 检测驱动基因的突变,可作为靶向药物选择的依据。再次,通过研究 CTCs 的分子和基因特征,能够深入了解肺癌的生物学特性及转移机制。

但目前存在的许多问题仍限制 CTCs 在临床中广泛应用,主要包括(1)由于肺癌缺乏特异度的肿瘤标志物,而循环系统中 CTCs 数量稀少,现有的检测技术均存在特异度高,而灵敏度不足的缺点;(2)当前与 CTCs 相关的临床研究,由于在试验设计、方法、对象、标准、质控等方面的不同,其结果存在较大的差异性和矛盾性。缺乏多中心、大样本量的试验研究来建立统一的标准和共识;(3)当前 CTCs 检测费用昂贵,无法作为临床常规检测项目进一步推广。

目前 CTCs 仍无法取代组织病理在肺癌中“金标准”的地位,但随着检测技术的不断更新和发展,其在肺癌研究、预防、诊断、治疗领域的优势将会突显,从而得到推广和应用。

## 参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statis-

- tics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1):7-30.
- [2] GOLDSTRAW P, CHANSKY K, CROWLEY J, et al. The IASLC lung cancer staging project; proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(1):39-51.
- [3] TOGNELA A, SPRING K J, BECKER T, et al. Predictive and prognostic value of circulating tumor cell detection in lung cancer: a clinician's perspective[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 93(2):90-102.
- [4] LIANIDOU E S, STRATI A, MARKOU A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2014, 51(3):160-171.
- [5] WARAWDEKAR U M, SIRAJUDDIN M M, PRAMESH C S, et al. An approach of selecting appropriate markers from the primary tumor to enable detection of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer [J]. *J BUON*, 2015, 20(3):782-790.
- [6] LU Y S, LIANG H Y, YU T, et al. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry[J]. *Cancer*, 2015, 121(17):3036-3045.
- [7] MARRINUCCI D, BETHEL K, LAZAR D, et al. Cytomorphology of circulating colorectal tumor cells; a small case series[J]. *J Oncol*, 2010(861341):1687-8450.
- [8] ALIX-PANABIÉRES C, PANTEL K. Technologies for detection of circulating tumor cells; facts and vision[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(1):57-62.
- [9] YU N, ZHOU J, CUI F, et al. Circulating tumor cells in lung cancer; detection methods and clinical applications [J]. *Lung*, 2015, 193(2):157-171.
- [10] ADAMS D L, STEFANSSON S, HAUDENSCHILD C, et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch™ CTC test [J]. *Cytometry A*, 2015, 87(2):137-144.
- [11] HYUN K A, LEE T Y, LEE S H, et al. Two-stage microfluidic chip for selective isolation of circulating tumor cells(CTCs) [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 15(67):86-92.
- [12] STANGER B Z, KAHN M L. Platelets and tumor cells; a new form of border control[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(1):9-11.
- [13] TANAKA F, YONEDA K, KONDO N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(22):6980-6986.
- [14] KURUSU Y, YAMASHITA J, OGAWA M. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in patients with resectable non-small-cell lung cancer[J]. *Surgery*, 1999, 126(5):820-826.
- [15] SAWABATA N, OKUMURA M, UTSUMI T, et al. Circulating tumor cells in peripheral blood caused by surgical manipulation of non-small-cell lung cancer; pilot study using an immunocytology method[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 55(5):189-192.
- [16] YAMASHITA J I, MATSUO A, KURUSU Y, et al. Pre-operative evidence of circulating tumor cells by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA is an independent predictor of survival in non-small cell lung cancer; a prospective study[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 124(2):299-305.
- [17] KATSELI A, MARAGOS H, NEZOS A, et al. Multiplex PCR-based detection of circulating tumor cells in lung cancer patients using CK19, PTHrP, and LUNX specific primers[J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(5):513-520.
- [18] MUINELO R L, VIEITO M, ABALO A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced NSCLC patients receiving First-Line systemic treatment [J]. *Cancers*, 2014, 6(1):153-165.
- [19] NAGRATH S, SEQUIST L V, MAHESWARAN S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology [J]. *Nature*, 2007, 450(7173):1235-1239.
- [20] NAIR V S, KEU K V, LUTTGEM M S, et al. An observational study of circulating tumor cells and (18)F-FDG PET uptake in patients with treatment-naive non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e67733.
- [21] CHEN T F, JIANG G L, FU X L, et al. CK19 mRNA expression measured by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer treated by chemotherapy; an independent prognostic factor [J]. *Lung Cancer*, 2007, 56(1):105-114.
- [22] GE M J, SHI D E, WU Q C, et al. Fluctuation of circulating tumor cells in patients with lung cancer by real-time fluorescent quantitative-PCR approach before and after radiotherapy [J]. *J Cancer Res Ther*, 2007, 1(4):221-226.
- [23] MAHESWARAN S, SEQUIST L V, NAGRATH S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4):366-377.
- [24] SUNDARESAN T K, SEQUIST L V, HEYMACH J V, et al. Detection of T790M, the acquired resistance EGFR mutation, by tumor biopsy versus noninvasive blood-based analyses [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(5):1103-1110.
- [25] PAILLER E, ADAM J, BARTHELEMY A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(18):2273.