

循环肿瘤细胞检测试剂的研究进展

田亚宾, 张春涛* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 循环肿瘤细胞是原发肿瘤脱落后进入外周血中的肿瘤细胞。大量研究证明: 其与肿瘤的进展有着密切的关系。通过检测和分析循环肿瘤细胞的特征、数量及变化, 可用于肿瘤的诊断、治疗监测和预后评估。由于其微创、非侵入的获得方式, 同时能够实时地评价肿瘤的动态, 作为液态活检的一种方法备受关注。目前, 市场上循环肿瘤细胞检测系统众多, 主要包括分离富集和检测鉴定两部分。基于不同的原理, 循环肿瘤细胞的检测结果差异较大。本文将简要介绍几种循环肿瘤细胞检测系统的原理和应用。

关键词: 肿瘤诊断; 治疗监测; 预后评估; 肿瘤细胞标志物; CTCs 检测试剂; Cell Search 系统; 微流控芯片

中图分类号: R730; 733 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)08-0877-05
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.08.007

Research Progress of Circulating Tumor Cell Detection Reagent

TianYabin, Zhang Chuntao* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) are the tumor cells that shed from the primary site into the peripheral blood. A large number of studies have shown that CTCs have a close relationship with tumor progression in patients. It can be applied to the diagnosis, treatment monitoring and prognosis assessment of tumors by detecting and analyzing the characteristics, quantity and changes of CTCs. Because of its minimally invasive and non-invasive manner, real-time information of tumors can be evaluated. CTCs are the hot spot of cancer research and diagnosis as a method of liquid biopsy. So far, there have been many CTCs detection systems on the market, including two parts: enrichment and detection. Based on different principles, the detection results of CTCs are greatly different. This paper will briefly introduce the principle and application of several CTCs detection system.

Keywords: tumor diagnosis; treatment monitoring; prognosis assessment; tumor cell markers; CTCs detection reagent; Cell Search system; micro-fluidchip

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 是指原发位点的肿瘤细胞脱落后通过循环系统进入外周血中的一类肿瘤细胞。1869年, 澳大利亚医生在转移性癌症病人血液中发现了一种与原发肿瘤相似的细胞, CTCs的概念第一次被提及^[1]。之后, Patel等^[2]提出在原发肿瘤形成之初, 肿瘤细胞就会脱落进入血液中。但是, 大多数的肿瘤细胞由于血液中基质的压力而破碎或凋亡。少数的细胞

滞留在血液中或者转移到远端器官, 在合适的条件下形成新的肿瘤^[3-4]。在乳腺癌病人和肺癌病人中, 发现CTCs具有转移的能力, 分离后植入免疫缺陷动物体内能够形成新的肿瘤^[4-6]。临床研究发现, CTCs的数量多少与乳腺癌病人的无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 和总进展生存期 (overall survival, OS) 有着密切的关系^[7]。在其他类型的癌症病人中, 如胰腺癌、肺癌等, CTCs也

与肿瘤灶的转移和恶性化相关^[8]。

目前,对于肿瘤的基因检测大多数仅体现了原发肿瘤基因的特点,而对于转移肿瘤的特性了解很少。在癌症患者中,多数病人死于肿瘤细胞的不同部位的转移,而且转移的时间跨度可能高达10年^[9]。原发肿瘤检测的信息不足以评价肿瘤转移和复发的程度。传统的肿瘤诊断需要肿瘤组织活检或者靶向位点的mRNA的基因分析或蛋白表达(EGFR、HER2)^[10]。然而,这些常规的肿瘤诊断存在一定的局限,比如对于放化疗或手术切除后的病人,原发肿瘤的残留很少,根本没有组织用来活检以监测后续由微转移引起的复发。由于活检的物质很难获得深部的组织,在一定程度上会无法监测到肿瘤的特异性突变。CTCs细胞被认为是肿瘤转移前体细胞,可能造成癌症细胞的转移,在一定程度上能够提供肿瘤的动态信息,这在临床上具有重要意义。对于外周血中CTCs的检测属于一种非侵入、微创的检测手段,不仅弥补了传统肿瘤组织活检的众多弊端,而且能够实时地监测肿瘤的进展。其作为液态活检的一种方法,迅速成为肿瘤诊断的热点。随着全基因组测序和二代测序的发展,分离出来的细胞可以用新技术检测转移肿瘤的相关突变基因。通过检测和分析CTCs的特征、数量及变化,与原发肿瘤进行比较,能够提供一些肿瘤特异性信息,从而指导不同个体的治疗。

在外周血中,CTCs数量极少,在每毫升血液中仅含有1~10个CTCs^[11]。CTCs处于含有数以百万计的红细胞和白细胞高背景下,这本身提高了分离的难度。目前,市场上研发了大量的CTCs分离和检测试剂。基于不同原理设计的CTCs检测平台,CTCs的结果也存在很大的差异。CTCs的检测试剂主要包括分离富集和检测鉴定。富集技术主要基于以下三种原理:免疫捕获、细胞大小、负向去除。富集后对其中的CTCs进行鉴定,主要通过免疫荧光、荧光定量PCR、FISH、EPISPOT等分子方法检测某个或某些生物标志物而实现。以下主要介绍几种CTCs检测试剂。

1 Cell Search系统

Cell Search系统是目前被美国FDA批准进入临床的CTCs检测试剂,用于预测转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌的CTCs检测技术^[12]。CellSearch被认为是CTCs检测试剂的金标准。这种技术集合

了免疫磁珠分选技术和免疫荧光标记的检测方法,主要利用包裹了上皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体颗粒的磁流体靶向捕获CTCs,再用荧光试剂鉴定角蛋白(Cytokeratin, CK)和CD45,并计数表型为EpCAM+, CK+, DAPI+和CD45-的CTCs^[13]。国外的临床数据表明,利用CellSearch系统对多种癌症类型的病人进行CTCs检测,结果表明CTCs的存在与病人的进展有着密切关系^[12-13]。但是,CellSearch系统也存在一定的局限。Pantel等^[14]在一些息肉、结肠炎等良性结肠疾病患者中,利用CellSearch系统检测发现11%患者中存在EpCAM阳性细胞。这表明在血液中,除了含有上皮细胞性质的肿瘤细胞,也可能存在循环的上皮细胞,从而导致假阳性的结果。

EpCAM作为一种上皮细胞的表面标志物,仅表达于具有上皮性质的肿瘤细胞中,而在外周血中的一些细胞中并不表达,因此,作为特异性标志物对CTCs进行靶向分离。但是,近年来,大量的数据表明CTCs不仅仅是上皮细胞类,还具有间质化特性^[15]。在乳腺癌患者中,发现循环肿瘤细胞过表达上皮细胞间质化(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)过程的相关基因,这类基因与肿瘤的转移密切相关^[16]。EMT是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程^[17]。在肿瘤转移的过程中,经历EMT过程的肿瘤细胞具有更高的转移风险^[18]。间质化的肿瘤细胞会引起上皮细胞特性改变,导致表面抗原的降低或丢失,从而使得单一抗体捕获CTCs的效率降低。因此会发生一些极端案例,比如已经全身多处肿瘤转移的病人,由于癌表面的抗原已经脱落,反而会出现假阴性的结果。Zhang等^[19]发现脑转移的乳腺癌病人,利用其他分子标志物检测其表型为HER2+/EGFR+/HPSE+/Notch1+,但是,由于其EpCAM阴性无法用CellSearch系统捕获。对于一些不是起源于上皮细胞或低表达EpCAM的癌细胞来说,CellSearch系统会造成漏检,需要采用其他表面标志物进行分离和检测。

2 微流控芯片

微流控芯片(Microfluidic chip)技术是一种自动化CTCs分离检测系统,发展较快。这种技术能捕获到存活的CTCs,有助于肿瘤表型的分析,从而对后续肿瘤治疗具有指导意义。随着全基因组

测序、数字PCR、二代测序的发展,也为分离后的CTCs分析提供了技术保障。目前,微流控芯片平台较多,主要根据细胞的生化特性和物理特性进行分离。微流控芯片系统较其他CTCs检测系统具有以下优势:1)操作简单,通量高,且样本制备系统无需预处理。通过微流控进行全血处理能够避免细胞损失,封闭的系统使CTCs捕获达到最大灵敏度;2)检测所需的血样量较少,回收率高;3)能够分离到活的CTCs,有利于后续的体外培养和基因分析^[20]。

基于EpCAM抗体的微流控芯片系统较多,目前主要有CTC-chip、CTC-HBchip、CTC-ichip和CMx (Cells captured in Maximum)等。CTC-chip是第一代基于EpCAM抗体的微流控芯片,它能直接将全血中的CTCs通过微流设备分离到包被EpCAM的芯片上,利用其他方法进行检测。芯片上含有78000个包被有EpCAM抗体的微孔,通过特定的层状液体流动,将全血中的CTCs吸附到芯片上^[21]。CTC-HBchip是在CTC-chip的基础上进行的改进,主要将非透明的芯片改为透明的芯片,这有利于利用光学仪器对后续分离的CTCs进行分析^[22]。CMx系统是一种基于脂质双层的微流芯片。通过在芯片上包被防污染、润滑的抗EpCAM抗体的脂质双层,这种防污、润滑的脂质双层在分离的过程中提供了一种缓冲,降低了剪切力,从而减少了CTCs的损失,提高了分离的效率。基于脂质双层的流动性和非共价结合的特性,结合在脂质双层表面的CTCs能够被疏水的空气泡沫分解,从而释放出完整的CTCs。分离到的细胞可用于进一步研究鉴定,如荧光染色、基因分析或者体外培养。利用这种系统对混有人结直肠癌细胞系HCT116的样品进行检测,获得95%的回收率,且85%的细胞具有活力^[23]。Wen-Sy Tsai等^[24]对158份临床样本利用CMx系统进行检测,结果发现其CTCs数量变化范围在0~36个/2mL,表明利用CTCs的数量与结直肠肿瘤具有相关性。这类微流控芯片与Cellsearch类似,仅捕获具有上皮细胞性质的CTCs。

以细胞大小和形变分离的试剂,在市場较多,如Celsee分析平台(Celsee PREP 400 system)^[25]、Vortex HT (High Throughput Vortex Chip)^[26]、ClearCell[®] FX1 (ClearBridge)。以Celsee分析平台(Celsee PREP 400 system)为例,Celsee

分析平台的微流控芯片由56320个捕获腔室组成,无需标签抗体,主要根据CTCs的细胞大小和形变能力与其他血细胞不同而从外周血中捕获并分离。捕获到每个腔室的CTCs,能在单细胞水平进行细胞培养或者进行蛋白或DNA/RNA探针的分析。这种根据细胞大小和形变能力捕获CTCs的平台,其优势在于富集效果不受癌细胞抗原脱落的影响,能够捕获到一些低表达或不表达EpCAM的CTCs。PriyaGogoi等^[25]比较了Celsee系统和Cellsearch系统,对18份来自胰腺癌患者的血样进行检测,Celsee系统显示了94%灵敏度(17/18)。但是这样的系统也存在一定的局限性。由于并非所有的肿瘤细胞在形态上均大于血液细胞,这在一定程度上无法捕获到较小的肿瘤细胞,从而造成假阴性结果,降低了这类试剂的灵敏度。

3 端粒酶法

端粒酶在大多数癌细胞中是激活状态的,而且与肿瘤的恶性化有关^[27]。基于肿瘤细胞的这一特性,目前一些试剂利用基因工程对腺病毒进行改造,加入人端粒酶逆转录基因启动子(hTERT-p)和GFP报告基因,从而能在表达端粒酶的肿瘤细胞中感染并成功表达GFP蛋白。主要包括三个步骤:红细胞的破碎,含有GFP报告基因的腺病毒的感染,GFP荧光蛋白的观察。日本的TelomeScan[™] (OncolysBioPharma Inc., Tokyo, Japan)试剂利用改造的Ad5 (OBP-401)感染CTCs。由于腺病毒的感染效率取决于易感细胞表达柯萨奇病毒-腺病毒受体(Coxsackie-adenovirus receptor, CAR)的程度,而在大多数血细胞中,不表达CAR,使Ad5仅感染表达CAR的CTCs。这在一定程度上,增加了试剂的特异性^[28-29]。在国内,北京锤特生物公司选取了腺病毒载体Ad11,通过将调节Ad5早期基因表达的增强子及在肿瘤细胞内高表达的人端粒酶逆转录酶基因的启动子(hTERT-p)替换控制Ad11腺病毒早期基因表达的相应元件,同时在Ad11E3区基因中插入绿色荧光蛋白(GFP)基因,构建成对肿瘤细胞具有靶向性、感染能力强,并表达GFP的重组腺病毒载体Ad11-5ETel-GFP。这些基于端粒酶的检测方法,弥补了由于EMT过程丢失表面抗原的检测试剂的局限。由于GFP报告基因的引入,后续可以利用流式分选获得CTCs。但是,由于这种方法目前尚未有大量的临床数据支持,其在实际的应用中

需要进一步的研究。

4 DNA/RNA为基础的CTCs检测方法

CTCs的某些基因或表达的mRNA不存在于正常外周血细胞中,可通过对这些DNA或RNA的检测来判断CTCs的存在。这种以PCR的方法特异性强,灵敏度高,可分析极微量基因,然而因为该技术是以信号放大为基础的,稍有污染就容易造成假阳性的结果出现。目前,在国内,格诺思博生物公司基于在血液中肺癌细胞高表达叶酸受体来研发CTCs检测试剂。这个试剂主要是利用免疫磁珠富集纯化系统负向去除红细胞和绝大多数的白细胞,得到剩余的稀有细胞包括叶酸受体阳性细胞。然后,利用靶向探针标记系统,使用特异性小分子探针叶酸受体阳性细胞进行标记。最后,采用荧光定量PCR技术,对叶酸受体结合的小分子探针中的寡聚核苷酸进行定量检测,评估叶酸受体阳性的CTCs水平。在临床试验中,对560例肺癌患者、350例肺部良性疾病患者和150例正常人(健康人)检测数据显示出了88.2%的特异性和79.6%的灵敏度。

近年来,CTCs检测试剂发展迅速,种类繁多,新技术新平台层出不穷。除了上述介绍的几种,还有其他各种试剂,如Adna Test^[30]、micro-hall director^[31]、ISTE等,这里不一一赘述。CTCs相关检测试剂作为一种无创的液态活检技术,每种检测系统均存在一定的局限,并不完善。目前,除了Cellsearch系统在大量的临床试验中进行了验证,而其他多数试剂仅局限于科研使用,仅在少量的临床样本中进行了检测。由于没有统一的标准去界定CTCs的定义,在不同平台的检测下,CTCs的检测试剂的灵敏度和特异性也存在很大的差异^[1]。对于CTCs的生物学特性了解不足也限制了CTCs试剂的发展和应用。由于肿瘤细胞具有极大的异质性,这决定了任何一种癌症细胞都无法用单一的靶点去鉴定和验证。不同类型或同一类型的CTCs特性也存在差异,这在一定程度上也降低了CTCs试剂的灵敏度。随着新技术的不断发展,找到明确的、稳定的肿瘤细胞特异性标志物,对于促进CTCs检测的特异性及准确性至关重要。

参考文献:

[1] 王涛. 循环肿瘤细胞研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2015, 27(11): 784-787.

- [2] Pantel K, Brakenhoff R H. Dissecting the Metastatic Cascade[J]. Nature Reviews Cancer, 2004, 4(6): 448-456.
- [3] 吕少刚, 姜加陶. 循环肿瘤细胞的生物学特性研究进展[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(5): 338-340.
- [4] Pantel K, Speicher M R. The Biology of Circulating Tumor Cells[J]. Oncogene, 2016, 35(10): 1216-1224.
- [5] Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a Population of Blood Circulating Tumor Cells from Breast Cancer Patients that initiates Metastasis in a Xenograft Assay[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(6): 539-544.
- [6] Hodgkinson C L, Morrow C J, Li Y, et al. Tumorigenicity and Genetic Profiling of Circulating Tumor Cells in Small-cell Lung Cancer[J]. Nature Medicine, 2014, 20(8): 897-903.
- [7] Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer[J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2012, 18(20): 5701-5710.
- [8] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in Circulating Tumor Cell Research[J]. Nature Reviews Cancer, 2014, 14(9): 623-631.
- [9] Uhr J W, Pantel K. Controversies in Clinical Cancer Dormancy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(30): 12396-400.
- [10] Schlange T, Pantel K. Potential of Circulating Tumor Cells as Blood-based Biomarkers in Cancer Liquid Biopsy[J]. Pharmacogenomics, 2016, 17(3): 183-186.
- [11] Craig M M, Doyle G V, Terstappen L W M M. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer[J]. Journal of Oncology, 2010, 2010: 617421.
- [12] Andree K C, Van D G, Terstappen L W. Challenges in Circulating Tumor Cell Detection by the CellSearch System[J]. Molecular Oncology, 2016, 10(3): 395-407.
- [13] Allard W J, Matera J, Miller M C, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of all Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients with Nonmalignant Diseases[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(20): 6897-6904.

- [14] Pantel K, Den è ve E, Nocca D, et al. Circulating Epithelial Cells in Patients with Benign Colon Diseases[J]. *Clinical Chemistry*, 2011, 58 (5) : 936–940.
- [15] 真德智, 周世杰, 刘志东, 等. 循环肿瘤细胞上皮间质转化的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22 (4) : 699–703.
- [16] Hensler M, Vančurová I, Becht E, et al. Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells from Breast Cancer Patients[J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5 (4) : e1102827.
- [17] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of Cancer: the Next Generation[J]. *Cell*, 2011, 144 (5) : 646–674.
- [18] 张慧君, 朱军, 刘鸿程, 等. 上皮间质转化在肿瘤侵袭转移中的研究进展[J]. *生命科学*, 2009, 21 (4) : 556–559.
- [19] Zhang L, Ridgway L D, Wetzel M A, et al. The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5 (180) : 180ra48.
- [20] 杜晶辉, 刘旭, 徐小平. 微流控芯片分选富集循环肿瘤细胞的研究进展[J]. *色谱*, 2014, 32 (1) : 7–12.
- [21] 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.
- [22] Stott S L, Hsu C H, Tsukrov D I, et al. Isolation of Circulating Tumor Cells Using a Microvortex–Generating Herringbone–Chip[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (43) : 18392–18397.
- [23] Chen J Y, Tsai W S, Shao H J, et al. Sensitive and Specific Biomimetic Lipid Coated Microfluidics to Isolate Viable Circulating Tumor Cells and Microemboli for Cancer Detection[J]. *Plos One*, 2016, 11 (3) : e0149633.
- [24] 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]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24517.
- [25] Gogoi P, Sepehri S, Zhou Y, et al. Development of an Automated and Sensitive Microfluidic Device for Capturing and Characterizing Circulating Tumor Cells (CTCs) from Clinical Blood Samples[J]. *Plos One*, 2016, 11 (1) : e0147400.
- [26] Che J, Yu V, Dhar M, et al. Classification of Large Circulating Tumor Cells Isolated with Ultra–High Throughput Microfluidic Vortex Technology[J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (11) : 12748–12760.
- [27] Blackburn E H. Telomere States and Cell Fates[J]. *Nature*, 2000, 408 (6808) : 53.
- [28] Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, et al. A Simple Biological Imaging System for Detecting Viable Human Circulating Tumor Cells[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119 (10) : 3172–3181.
- [29] Gerges N, Rak J, Jabado N. New Technologies for the Detection of Circulating Tumour Cells[J]. *British Medical Bulletin*, 2010, 94 (1) : 49–64.
- [30] 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.
- [31] Issadore D, Chung J, Shao H, et al. Ultrasensitive Clinical Enumeration of Rare Cells ex–vivo Using a Micro–hall Detector[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4 (141) : 141ra92.

(收稿日期 2016年11月8日 编辑 邹宇玲)