

- [8] 李勤广,赵霞.临床检验分析前的质量控制[J]. 检验医学与临床, 2007,2(4):148-149.
- [9] 朱强.临床生化检验的标本采集处理及质量控制[J]. 中外医疗, 2008,28(13):132.
- [10] 崔之础,冯仁丰.现代医学检验质量保证问答[M]. 西安:陕西人民教育出版社,1993:30.
- [11] Nathan PJ, Jayaselan AS, Burrows GP, et al. Modulation of plasma melatonin concentrations by changes in posture[J]. Pineal Res, 1998,24(4):219-223.
- [12] 韩靖云,张秀珍.不合格标本及送检导致生化指标波动原因的探讨[J]. 中华检验医学, 2001,24(2):120-121.
- [13] 徐志学,童巧霞.临床检验标本的采集与送检[M]. 武汉:湖北人民出版社,2000:38.
- [14] 何铭.临床标本采集与分析前质量管理的体会[J]. 工企医刊, 2012,25(1):94-95.
- [15] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[S]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006.
- [16] 班立芳,孔庆飞,王勇鸣.浅谈临床检验分析前的质量控制[J]. 中国实用医药, 2011,6(24):260-261.
- [17] 张俊凤,崔翠翠,肖琛.血液标本采集与处理的质量控制[J]. 临床输血与检验, 2005,7(2):145-146.
- [18] 章美霞.如何做好临床检验分析前的质量控制[J]. 中国社区医师, 2011,11(13):212-213.
- [19] 张治文,肖丽娜.临床生化检验的质量保证[J]. 临床合理用药, 2011,4(11):185.
- [20] 贾海菊.拒收不合格标本是分析前质量保证的重要因素[J]. 医学检验与临床, 2009,22(6):1980-1981.
- [21] 边红放.拒收不合格标本是分析前质量控制的关键[J]. 医疗装备, 2012,12(1):41.
- [22] 程真珍,乔文斌,王新.实验室信息系统在检验标本分析前质量控制的意义[J]. 中国医疗设备, 2012,27(1):48-50.
- [23] 赖国建.门诊血细胞分析的质量控制及应对办法[J]. 实用医技杂志, 2008,15(12):1617-1618.
- [24] 邵俊国,周振东,宋巧云,等. UF-1000i 全自动尿流式细胞分析仪的质量控制[J]. 河北医药, 2011,33(23):3651-3652.

(收稿日期:2012-01-11)

• 综 述 •

循环肿瘤细胞检测方法的研究进展

嵇金陵 综述,沈佐君[△]审校

(安徽医科大学附属省立医院/安徽省立医院/安徽省临检中心,合肥 230001)

关键词:肿瘤细胞; 血液循环; 肿瘤转移; 诊断技术和方法; 综述

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 15. 025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1847-03

随着科学技术的发展,对肿瘤患者采取了多种综合治疗方法,大大减低了肿瘤患者的死亡率,但一些判断预后良好的病例在治疗后仍会发生复发与远处转移。因此,寻找更加可靠的评价标准来检测早期微转移已成为当务之急,这不仅对肿瘤预后的判断有着积极的意义,而且对临床治疗也有很大的指导价值。而在原发恶性肿瘤早期阶段就脱落到循环系统的肿瘤细胞(CTC)引起了人们极大的重视,在早期发现肿瘤转移、指导治疗和判断预后等方面逐步成为临床研究的热点。

1 CTC 概述

1869 年,澳大利亚病理学家 Ashworth 在 1 例因癌症死亡的患者外周血中发现了类似肿瘤的细胞,并首次提出了 CTC 的概念^[1]。CTC 是指自发或因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。随着肿瘤细胞的不断增殖,部分肿瘤细胞可以通过分泌一种抑制粘附因子表达的物质,增加其自身运动能力并使之与肿瘤母体脱落,这些脱落的肿瘤细胞再分泌一种蛋白溶解酶,以破坏周边宿主结缔组织并进入循环系统^[2]。进入循环的大部分肿瘤细胞都会失去活性,只有不足 0.01% 的肿瘤细胞通过迁移、粘附、相互聚集形成微小癌栓,并在一定条件下发展为转移灶^[3]。因此,在外周血中检测到肿瘤细胞预示着有可能发生肿瘤转移。

2 CTC 检测方法

2.1 免疫细胞化学法 免疫细胞化学法(immunocytochemistry, ICC)是基于抗原抗体结合反应的原理,将特异性的肿瘤标志物与单克隆抗体相结合,通过酶与底物反应显色或其他显色

方法对肿瘤进行定位、定性和定量测定的技术。ICC 检测的优点是简便、直观并可进行细胞大小与形态学分析,缺点是敏感性低,只能从 10^5 个正常细胞中发现 1 个肿瘤细胞,而且肿瘤细胞表面抗原表达的不均一性,也在一定程度上降低了检测的敏感性^[4]。另外,许多分化差的肿瘤细胞不能表达目标抗原、部分淋巴细胞交叉反应等因素都会影响 CTC 检测的特异性。因此,临床上很少单独应用 ICC 对肿瘤患者 CTC 进行检测。为了提高 ICC 检测的敏感性和特异性,有学者提出用磁性细胞分选技术或密度梯度离心法对肿瘤细胞进行富集后再用 ICC 检测。Wulfing 等^[5]用磁性细胞分选技术对肿瘤细胞进行富集后,采用 ICC 法检测 42 例乳腺癌患者表皮生长因子受体(HIR2)阳性 CTC,无明显转移的患者阳性率为 48.6%,转移患者组为 100%,且 CTC 的出现与患者缓解期及总生存期显著相关。由此看出,磁性细胞分选技术与 ICC 相结合则弥补了技术上的不足,提高了 CTC 检测的敏感性和特异性。

2.2 流式细胞术 流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一项集计算机技术、激光、电子物理、流体动力学、细胞免疫学、单克隆抗体等方法为一体的新型细胞分析技术,该技术主要是运用标记荧光物质的单克隆抗体与肿瘤细胞特异性的标志物结合,使肿瘤细胞染色,然后用流式细胞仪进行测量分析^[6]。FCM 的优点主要是可在免疫放大检测 CTC 的同时对癌细胞的形态进行定量测定,可以提供 DNA 倍数性的关系,而且测量速度迅速,检测数据较精确。同时,FCM 还可进行多参数测量,并可对细胞进行分析与分选。Cohen 等^[7]人在研究结直肠癌患

[△] 通讯作者, E-mail: shenzuojun@163. com。

者时,利用 FCM 技术在每 7.5 mL 血液中检测出 2 个 CTC,而且结果显示 CTC 的检出率与病理分期有显著的相关性,这对结直肠癌微转移的诊断具有一定的临床意义,同时,Cohen 发现,CTC 在治疗前后数目的变化与影像学联合应用也可以作为判断结直肠癌转移的重要因素。

如今,随着 FCM 在 CTC 检测方面的广泛应用,其技术上的局限性也逐渐暴露出来了。例如缺乏规范的操作方法,价格昂贵且耗时较长,最主要的是其敏感性较低。由于 FCM 检测靶细胞的敏感度仅为 1×10^{-4} ,而外周血中肿瘤细胞数量常少于 1×10^{-6} ,因此受筛检细胞数目的限制,单纯依靠 FCM 检测微转移的方法受到一定的限制,而主要用于骨髓微转移的检测和有明显转移的进展期患者外周血的肿瘤细胞的检测^[8]。有文献指出,将 FCM 与其他细胞富集技术联用可对 CTC 进行特异性富集,提高方法的敏感性和鉴别力,可使 CTC 的阳性检出率更高^[9]。

2.3 逆转录聚合酶链反应 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)及其各种改进的技术目前在 CTC 的检测中应用非常广泛,且被认为是目前检测 CTC 最有效的方法之一。该方法是基于组织或肿瘤表达特异性 mRNA 或某些基因改变后造成 mRNA 水平的异常来检测 CTC 的,这些特异性 mRNA 在外周血中消退很快,一般不表达于正常外周血细胞,所以在外周血中一旦检测到特异性 mRNA 的表达就意味着有 CTC 的存在^[10],所以说 RT-PCR 具有高度特异性。此外,很多实验已证实 RT-PCR 检测 CTC 的敏感性远远高于 ICC^[11]。

在晚期癌症患者的外周血中,RT-PCR 技术可以从每毫升血液中检测到单个肿瘤细胞,因此具有高度的敏感性^[12]。但由于该方法都是以某个肿瘤标志物的 mRNA 为标志,因此易受到假基因的干扰,组织特异性基因在非特异性基因细胞内的非法转录易造成假阳性的结果,游离的 RNA 和杂交 DNA 也可能导致假阳性结果的出现^[13]。而循环肿瘤细胞间断释放入血以及 RNA 易被 RNA 酶降解的特点均可导致假阴性结果,这些都是 RT-PCR 技术的局限性。近年来,在 RT-PCR 的基础上出现了一些新的技术,如实时定量 RT-PCR、巢式 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR,这些新技术在一定程度上提高了 RT-PCR 检测的敏感性和特异性^[14]。Uen 等^[15]应用巢式 RT-PCR 检测胃癌患者外周血中 c-Met、MUC1 mRNA 的表达与临床病例特征、术后转移发生率、总生存率之间的关系,结果发现 c-Met、MUC1 mRNA 表达的阳性率与肿瘤侵犯程度、淋巴结转移、TNM 分期、术后转移等密切相关,由此可见,应用巢式 RT-PCR 检测胃癌患者外周血中 c-Met、MUC1 mRNA 的表达有利于检测出早期微转移的 CTC,有助于预后。如今,RT-PCR 及其各种改进技术被广泛的应用于检测多种实体肿瘤的 CTC,但技术上的不足,如假阳性、假阴性结果的出现,无法进行形态学观察等问题的存在使其临床诊断使用价值受到了限制。

2.4 免疫磁珠分离检测法 免疫磁珠分离技术(immunomagnetic separation, IMS)是近年来国内外研究的一种新的免疫学技术,它能够从大量外周血中筛选出带有特异性标记的肿瘤细胞,其基本原理主要是基于细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合,形成抗原-抗体-磁珠免疫复合物,该复合物在外加磁场的作用下发生力学移动,将含有靶抗原的目的细胞与其他细胞分离,从而达到特异性分离细胞的目的^[16]。该方

法的优点在于分选过程中避免了细胞溶解,降低了后续鉴定工作中的干扰因素,并可对细胞进行计数、染色、核酸分析以及药物敏感实验。

免疫磁珠分离技术包括阳性分选和阴性分选两种方法。阳性分选即与磁珠结合的细胞就是所要分离获得的靶细胞;阴性分选则利用免疫磁珠去除无关细胞,游离于上清液的细胞为所需细胞。在试验中,技术人员多将阳性分选与阴性分选相结合以进一步降低血细胞的含量,提高富集效率。有报道称该技术的富集效率与一般的分离方法相比可提高 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 倍^[17]。有研究人员将免疫磁珠与免疫细胞化学、RT-PCR、流式细胞术等方法相联合起来检测 CTC,大大弥补了这些检测技术所存在的缺陷,提高了这些检测技术的敏感性和特异性。如 Moreno 等^[18]将 EpCAM(上皮细胞粘附分子)抗体作为分子标志物,通过免疫磁珠法富集 37 例转移性前列腺癌患者 7.5 mL 外周血中的肿瘤细胞,然后对本标进行多指标流式细胞分析,结果每 7.5 mL 血中发现前列腺癌细胞的数量变化为 0~8 586 个。实验证明 IMS 与上述方法联合后提高了灵敏度和特异性,而且方便快捷,同时提高了癌细胞的检测率,将可能有助于早期肿瘤患者微转移的发现、术后患者肿瘤复发与转移的检测、预后评估、治疗策略的选择以及临床分期的重新确定^[19]。但该技术在富集 CTC 的有效率以及检测微转移的研究中仍存在一些问題:例如受试者的炎症性疾病、组织创伤、样本中非肿瘤标志物的表达,以及手术干预、采血时的操作都会造出假阳性的结果;而分离过程中 CTC 的丢失、循环中的肿瘤细胞的高度异质性等因素则会造出假阴性的结果。

2.5 CellSearch 系统 CellSearch 系统是惟一被美国 FDA(Food and Drug Administration)批准用于临床检测 CTC 的技术,该系统是一种半自动技术,是基于免疫学原理的检测方法。首先,CellSearch 系统利用 EpCAM 抗体磁珠富集 CTC,然后在外加磁场的作用下对血液中提取、分离出来的 CTC 进行通透、固定,再用 DAPI 荧光核染料、CD45 荧光抗体和 CK8、CK18 以及 CK19 荧光抗体标记细胞,最后采用半自动四色荧光显微镜 Cell-Spotter Analyzer 检测分析^[20]。系统的这种半自动特征使得样本的检测非常迅速,而且具有很好的重复性。CellSearch 系统所需的血液样本在含有一种特殊防腐剂的试管中存放 72 h 后,仍能检测到精确的 CTC 数目,表明该方法的敏感性很高,而且只需 7.5 mL 血液样本,即可从 400 多亿血细胞中检测到一个 CTC^[21]。但是,CellSearch 系统操作步骤繁琐,技术要求高,价格昂贵,并且只能检测出 EpCAM 抗体阳性的 CTC,因此,目前仍没有大规模的应用于临床。

3 CTC 检测的临床意义

研究人员发现,进入循环系统的 CTC 绝大多数在机体免疫识别及杀伤等作用下发生凋亡,只有极少数能存活下来,并在一定条件下发展为转移灶。但是,在外周血中检测到 CTC 并不意味着一定存在转移灶。尽管如此,大量临床研究结果证实,CTC 的检测在肿瘤的早期诊断、判断患者预后、评估抗肿瘤药物的疗效及制定个体化治疗方面有着巨大的潜在临床应用价值,且与其他组织学标本如骨髓等相比,外周血标本容易获得,且创伤小,是临床上常规检测较为理想的标本来源^[22]。

目前,CTC 检测的价值已经在转移性乳腺癌^[23]、转移性前列腺癌^[24]、转移性结直肠癌^[25]中被证实,除此之外,亦在肺癌^[26]、胃癌^[27]、肾癌^[28]、膀胱癌^[29]等肿瘤中开展。随着相关技术的发展和进步,CTC 的检测方法将发展为具有高度可行

性的、信息含量高的新型诊断手段,具有更高的敏感性和特异性,今后会在肿瘤诊治领域得到更为广泛的应用。

4 结 语

综上所述,CTC 的检测是一个多步骤联合的检测过程,多种检测方法的联合应用有助于提高外周血样本中 CTC 的检出率,从而更为准确地指导临床治疗。但目前众多的检测方法均缺乏公认的检测标志,标准的检测流程尚无统一规范,所以未来的研究有必要对现有的 CTC 检测方法进行改进,以形成规范化、标准化的 CTC 检测方法。总之,寻找特异性高的 CTC 标志物,提高检测手段的敏感性和特异性,在研究中采用标准统一的技术和统计学方法将有助于更好地理解 CTC 与肿瘤转移的关系,以指导临床医生采取更为合理地诊疗措施,提高患者的生活质量和预期寿命。

参考文献

- [1] Ashworth TR. 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(1):146-149.
- [2] Dittmar T, Heyder C, Gloria-Maercker E, et al. Adhesion molecules and chemokines; the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(1):11-32.
- [3] Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs[J]. Int J Cancer, 2011, 128(11):2527-2535.
- [4] 周晴接, 杨建民. 循环肿瘤细胞研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(11):1081-1087.
- [5] Wulfing P, Borchard J, Buerger H, et al. HER-2 positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6):1715-1720.
- [6] Jiang W, Zhang H. Enrichment and detection of circulating tumor cells in peripheral blood[J]. Chin-Ger J Clin Oncol, 2011, 10(4):240-244.
- [7] Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer[J]. Ann Oncol, 2009, 20(7):1223-1229.
- [8] Carcia JA, Rosenberg JE, Weinberg V, et al. Evaluation and significance of circulating epithelial cells in patients with hormone-refractory prostate cancer[J]. BJU Int, 2007, 99(3):519-524.
- [9] 张惠静, 毕颖楠, 郝敦玲. 循环肿瘤细胞检测技术的发展现状及展望[J]. 中国测试, 2010, 36(5):1-3.
- [10] Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells; finding the needle in the haystack[J]. Am J Cancer Res, 2011, 1(6):740-751.
- [11] Schmitt M, Foekens JA. Circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients assessed by a novel RT-PCR test kit and comparison with status of bone marrow-disseminated tumor cells[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(5):109.
- [12] Yu M, Stott S, Toner M, et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization[J]. J Cell Biol, 2011, 192(3):373-382.
- [13] Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, et al. Quantitative de-

tection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 107(1):145-154.

- [14] 李燕, 李大鹏, 马德亮, 等. 乳腺癌患者循环肿瘤细胞的检测及其临床应用[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2010, 2(1):34-36.
- [15] Uen YH, Lin SR, Wu CH, et al. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma[J]. Clin Chim Acta, 2006, 367(1/2):55-61.
- [16] Hoeppener AE, Swennenhuis JF, Terstappen LW. Immunomagnetic separation technologies[J]. Recent Results Cancer Res, 2012, 195(12):43-48.
- [17] Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer[J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(6):617-627.
- [18] Moreno JG, Miller MC, Gross S, et al. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer[J]. Oncology, 2005, 65(4):713-718.
- [19] 黄同海. 循环肿瘤细胞检测的研究新进展[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(8):476-479.
- [20] 平伟, 付向宁, 孙威. 循环肿瘤细胞的研究进展[J]. 医学与哲学, 2011, 32(6):37-49.
- [21] Riethdort S, Fritsche H, Muller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch System[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3):920-928.
- [22] 蒋蔚峰. 外周血循环肿瘤细胞检测的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(10):944-947.
- [23] Ross JS, Slodkowska EA. Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 132(2):237-245.
- [24] De Bono JS, Scher HI, Montgarnery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(19):6302-6309.
- [25] Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer[J]. Ann Oncol, 2009, 20(7):1223-1229.
- [26] Bevilacqua S, Gallo M, Franco R, et al. A "live" biopsy in a small-cell lung cancer patient by detection of circulating tumor cells[J]. Lung Cancer, 2009, 65(1):123-125.
- [27] Hoffmann AC, Vallbohmer D, Prenzel K, et al. Methylated DAPK and APC promoter DNA detection in peripheral blood is significantly associated with apparent residual tumor and outcome[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(9):1231-1237.
- [28] Bluemke K, Bilkenroth U, Meyer 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.
- [29] Gradilone A, Petracca A, Nicolazzo C, et al. Prognostic significance of survivin-expressing circulating tumor cells in T2G3 bladder cancer[J]. BJU Int, 2010, 106(5):710-715.

(收稿日期:2012-01-12)