

human blood lymphocytes as shown in an in vitro system[J]. Cancer Res, 1975, 35(9): 2375-2382.

[13] Xue X, Teare MD, Holen I, et al. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum[J]. Clin Chim Acta, 2009, 404(2): 100-104.

[14] Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(26): 6499-6512.

[15] Keshavarz Z, Moezzi L, Ranjbaran R, et al. Evaluation of a modified DNA extraction method for isolation of Cell-Free fetal DNA from maternal serum[J]. Avicenna J Med Biotechnol, 2015, 7(2): 85-88.

[16] Mauger F, Dulary C, Daviaud C, et al. Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma[J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(22): 6873-6878.

[17] Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, et al. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from The Gambia[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(2): 148-153.

[18] Barault L, Amatu A, Bleeker FE, et al. Digital PCR quantification of MGMT methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal Cancer[J]. Ann Oncol, 2015, 26(9): 1994-1999.

[19] Wang Z, Chen R, Wang S, et al. Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC[J]. PLoS One, 2014, 9(11): 110780.

[20] Allan JM, Hardie LJ, Briggs JA, et al. Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung Cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 91(3): 359-365.

[21] Ryan BM, Lefort F, Mcmanus R, et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up[J]. Gut, 2003, 52(1): 101-108.

(收稿日期: 2015-12-20)

• 综 述 •

类风湿关节炎患者骨重建标志物的研究进展

常文静 综述, 蔡 辉 审校[△]

(南京军区南京总医院中西医结合科, 江苏南京 210002)

关键词: 骨重建标志物; 类风湿关节炎; 炎症; 关节破坏; 生物制剂

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 09. 034 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2016)09-1236-03

类风湿关节炎(RA)是以慢性进行性软骨和骨破坏及滑膜改变为特征的炎性自身免疫性疾病。全身和关节滑膜合成的促炎细胞因子介导 RA 患者骨丢失,并可能导致骨质疏松症和骨折。骨形成标志物有血清 I 型前胶原氨基端前肽(P1NP)、血清 I 型胶原羧基末端前肽(I-CTP)、骨碱性磷酸酶(BAP)、骨钙素(OC),骨吸收标志物有 I 型胶原羧基末端肽(I-CTX)、I 型胶原氨基末端肽(I-NTX)、吡啶诺林(DPD 和 PYD)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)。促炎细胞因子通过促进骨保护素(OPG)和和核因子- κ B 受体激活子配体(RANKL)比值下降,增加破骨细胞的生成和骨吸收,进而导致关节周围和全身性骨丢失。近年研究发现,骨重建标志物与 RA 病情活动和关节破坏相关,并可预测放射学进展及评估药物疗效。本文重点探讨骨重建标志物评估生物制剂的疗效。

1 炎症、关节破坏和骨质量

RA 是以关节破坏、关节周围骨丢失为特征的慢性疾病,慢性炎症增加骨质疏松的风险。RA 导致全身性骨丢失是多因素的:糖皮质激素、体力活动减少和疾病本身(尤其是疾病未得到控制)。无论是关节周围骨丢失,还是全身性骨丢失,其机制都是促炎细胞因子通过促进核因子- κ B 受体激活子配体,间接或直接地增加破骨细胞的生成,并促进其功能。在 RA 早期阶段,骨丢失与炎症参数相关。用 Larsen 评分评估关节破坏,关节破坏与骨密度(BMD)和脊椎畸形相关。

2 细胞因子和信号通路

RA 关节骨破坏和骨丢失的严重程度取决于破骨细胞的

数量及功能。促炎细胞因子在破骨细胞活化中起着重要作用。核因子- κ B 受体激活子(RANK)信号通路参与炎症过程基因表达的调节。成骨细胞分泌 RANKL, RANKL 与破骨前体细胞表面受体 RANK 结合,从而刺激破骨细胞的生成。成骨细胞和基质细胞产生 OPG, OPG 通过结合 RANKL 而阻断 RANKL 与 RANK 的结合,从而负性调节破骨细胞的生成。因此, OPG 与 RANKL 的相对比例决定了单位时间里破骨细胞的数量及骨丢失的程度。许多促进或抑制骨吸收的因素通过调节 RANKL 和 OPG 的表达而起作用。肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素-1(IL-1)等促炎细胞因子调节 RANKL 的表达^[1-4]。RANKL 值可以评估 RA 患者对 TNF 抑制剂治疗的疗效^[5],而不是 OPG^[6]。但使用英夫利昔单抗和依那西普治疗的 RA 患者滑膜 OPG 表达增加, RANKL 却不受治疗的影响。这说明 RANKL/OPG 比值比每个单独指标评估骨吸收更具有重要性^[7]。因此, RANKL 对骨密度有不利作用,而 RANKL 单克隆抗体狄诺塞麦可增加 RA 患者骨密度和减少骨转换^[8]。炎症过程骨形成也下降, DKK-1 是 dickkopf 家族的一种蛋白质, TNF- α 能增加其表达,并对 Wnt 信号通路发挥负调控作用,阻止成骨细胞分化和诱导硬化蛋白的表达,导致骨细胞死亡^[9]。DKK-1 水平升高与关节侵蚀风险增加相关,且独立于年龄、性别、基线放射学损伤、C 反应蛋白和疾病活动^[10]。IL-6 通过调节 Janus 激酶/STAT、STAT3 和 ERK1/2 磷酸化信号通路直接诱导 RA 患者滑膜细胞 RANKL 分泌^[11-12]。

3 骨重建标志物

骨基质主要由 I 型胶原和 I 型胶原肽组成。I-CTX 和 I CTP 在血清和尿液中均能检测到,且是骨降解非常敏感性和特异性的指标。这两种肽是 I 型骨胶原被两种不同的酶水解释放的。(1) I CTP 是由基质金属蛋白酶酶解 I 型胶原产生,非常有效地反映 RA 相关的骨侵蚀。(2) I-CTX 是由组织蛋白酶 K 降解 I 型胶原羧基端产生并被分解及释放入血,可有效地反应全身性骨吸收。RA 患者 I CTP 滑液与血清比值增加,而 I-CTX 滑液与血清比值则无显著变化。表明 I CTP 是预测关节周围骨吸收更敏感的标志物。这可能与滑膜细胞基质金属蛋白酶活性增加相关。

骨重建和软骨降解与 RA 密切相关。虽然 II-CTX 不是骨重建的标志物,但是软骨降解的标志物之一。骨和软骨标志物是关节侵蚀的独立强预测因子。Straburzynska-Lupa 等^[18]研究表明,RA 早期患者 I-CTX 和 II-CTX 水平均显著升高,并能预测关节进一步破坏。

4 生物制剂对 RA 患者骨代谢的影响

4.1 TNF- α 抑制剂 RA 患者 BMD 与血清 TNF- α 水平呈负相关。TNF- α 对 RA 患者骨代谢的影响主要是通过促进破骨细胞的形成,而对骨细胞的影响较小。即 TNF- α 主要通过促进骨吸收来影响骨代谢,而对骨形成影响较小。TNF- α 抑制剂通过阻断 TNF- α 来发挥作用,这就决定了 TNF- α 抑制剂对骨吸收的抑制作用强,而对骨形成的作用弱。因此,骨吸收标志物较骨形成标志物更能反映 TNF- α 抑制剂对骨代谢的影响。Vis 等^[14]对 102 例 RA 患者进行了开放式队列研究,观察使用英夫利昔单抗治疗一年的 RA 患者腰椎、髌部和手的变化以及骨重建标志物的变化,结果显示,RA 患者腰椎和髌部 BMD 无显著变化,但手 BMD 下降 0.8%,提示 RA 患者掌骨皮质骨经英夫利昔单抗治疗一年后仍在持续丢失。且欧洲抗风湿病联盟评分改善明显的患者在髌部骨密度上的获益也是同步的,其血清 CTX 和 RANKL 在 0、14、30、46 周较基线水平明显下降,且血清 CTX 的下降与疾病活动评分和 C 反应蛋白的下降是同步的。Chopin 等^[15]进行了多中心前瞻性队列研究,48 例经其他改变病情抗风湿药治疗失败的病程超过 10 年的重度 RA 女性使用 1 年的英夫利昔单抗,这些患者没有使用双磷酸盐制剂,其中 77% 患者在使用糖皮质激素治疗,结果显示,RA 患者经治疗 1 年后 BMD 没有变化,但血清 I-CTX 水平在第 6 周、第 22 周分别下降 19%、22%,而 54 周时又回到基线水平。相反地,RA 患者血清 PINP 水平稳定,PINP/I-CTX 比值改善 30%~40%,有利于骨形成。另外,软骨降解标志物 II-CTX 在研究期间也没有变化。总之,骨形成/骨吸收标志物的改善提示英夫利昔对 RA 患者全身和局部骨有有利影响。在“BeST”研究中,研究者对 218 例早期 RA 患者应用四种不同的治疗方法:连续单药治疗、加强联合治疗、联合糖皮质激素治疗和联合英夫利昔单抗治疗。治疗 1、2 年后检测患者腰椎、髌部和手指(第 2~4 掌指关节)BMD。所有治疗组患者经 1、2 年治疗后腰椎、髌部和手指都存在骨丢失,但手指骨丢失较腰椎和髌部骨丢失严重,而联合糖皮质激素治疗患者或联合英夫利昔单抗治疗患者手指骨丢失较轻。关节侵蚀的进展与手指和髌部 BMD 降低有关。二磷酸盐只保护腰椎和髌部骨丢失^[16]。用 PubMed 数据库查询 TNF- α 抑制剂对 RA 患者 BMD 和骨重建标志物的影响,发现有四个研究表明 RA 患

者 BMD 稳定或腰椎 BMD 增加(高达 2.8%)和髌部 BMD 增加(高达 13.1%)^[17-20],而有一个研究表明结果是阴性的^[15]。骨重建标志物的变化是不同的,但是骨吸收略有减少而骨形成增加。

4.2 IL-6 抑制剂 在体外,IL-6 抑制剂能减少 RANKL 或 RANKL 加 TNF- α 刺激培养的单核细胞破骨细胞分化和骨吸收;在体内,IL-6 抑制剂能抑制转基因小鼠破骨细胞形成和骨吸收^[21]。一项试点研究比较 22 例活动性 RA 女性患者和 22 例非骨质减少的健康女性对照者注射 8 mg/kg 托珠单抗血清骨重塑标志物早期变化^[22]。在基线,RA 患者血清 OPG/RANKL 比值较对照者低 5 倍;RA 患者血清 Dkk-1、硬化蛋白、 β -CTX 和骨钙素水平升高与其高重塑状态和骨形成减慢相关;RA 患者血清 OPG 水平与其 DAS28 评分呈负相关,而 RA 患者血清 RANKL 水平与其 C 反应蛋白水平呈正相关。2 月后,RA 患者血清 OPG/RANKL 比值增加,而其血清 Dkk-1 水平下降。10 例患者疾病缓解或低活动的 10 例 RA 患者血清 OPG/RANKL 比值较疾病活动的 12 例 RA 患者增加尤为显著,而两者血清 Dkk-1 和硬化蛋白水平相似。因此,IL-6 抑制剂因迅速抑制炎症而纠正骨骼平衡。“OPTION”多中心随机对照研究评估托珠单抗对骨和软骨重塑的影响。623 例患者中的 416 例中重度 RA 患者纳入该研究,且这些患者对甲氨蝶呤疗效欠佳。患者随机给予托珠单抗(每 4 周 4 mg/kg 或每 4 周 8 mg/kg)联合甲氨蝶呤或安慰剂联合甲氨蝶呤。结果显示,托珠单抗在第 4、16、24 周后呈剂量依赖性降低 II 型前胶原氨基端肽、胶原螺旋肽和基质金属蛋白酶-3;在骨形成标志物中,托珠单抗者只有血清 PINP 较对照者显著升高,而骨吸收标志物 I-CTX 和 I CTP 显著降低^[23]。全膝关节置换术患者骨髓活检研究显示,托珠单抗通过增加 OPG 表达来增加骨形成,而非生物制剂甲氨蝶呤没有这一作用^[24]。另外,托珠单抗还降低 dickkopf 水平来增加 OPG/RANKL 比值^[22]。“RADIA”研究显示,托珠单抗通过降低 CTX-I 和 CTX-I/OC 比值来抑制组织蛋白酶 K 介导的骨吸收^[25]。此外,用尿 C-端交联端肽(uCTX-II)、尿吡啶啉/脱氧吡啶啉比值、体质量指数和关节间隙狭窄评分 4 个指标来预测关节破坏进展的程度。托珠单抗单药治疗 RA 患者 1 年。与低风险患者相比,托珠单抗能显著抑制高风险患者放射学进展^[26]。

5 利妥昔单抗

B 淋巴细胞通过分泌 RANKL 来增加 RA 骨吸收。B 淋巴细胞抑制剂利妥昔单抗能降低 RA 患者骨吸收标记物以及抑制 RA 患者破骨细胞生成。有研究显示,利妥昔单抗能减少 RA 患者滑膜破骨细胞前体数目,并能增加 RA 患者血清 OPG/RANKL 比值,从而保护了 RA 患者的 BMD^[27]。前瞻性研究^[28]表明,RA 患者应用利妥昔单抗 3~15 个月,骨形成标志物 BAP、I CTP 没有显著变化,而能轻微降低 RANKL (OPG 没有变化)以及显著降低骨降解标志物 I-CTX。因此,利妥昔单抗能降低破骨细胞活性。

6 阿巴西普

CTLA4-Ig 抑制 CTLA4 与单核细胞表面受体 CD80/CD86 结合,并能下调破骨细胞分化和成熟。在无 T 细胞存在的情况下,CTLA4 在体外呈剂量依赖性抑制 RANKL 和 TNF 介导的破骨细胞生成。另外,阿巴西普能抑制甲状腺素引起小鼠骨丢失,提示阿巴西普可能对 RA 骨丢失有保护作用^[29]。

7 结 论

RA 患者体内骨重建标志物水平的改变可以反映骨形成和骨吸收情况,并能进一步预测骨折的风险。因此,骨重建标志物与 RA 病情活动及骨丢失相关,并可预测放射学进展及评估药物疗效。而骨重建标志物不能用于诊断,它容易受到年龄、性别、饮食、绝经、肝肾功能等众多因素的影响,并且在某些疾病中如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌等疾病中也会升高^[30],在分析病情时应该考虑到。除了特定抗骨质疏松药物外,生物制剂通过减少炎症诱导的骨丢失来预防 RA 患者骨丢失和骨质疏松性骨折。

参考文献

- [1] Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells[J]. *Bone*, 1999, 25(3): 255-259.
- [2] Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss[J]. *Bra Med Bio Res*, 2005, 38(2): 161-170.
- [3] Barnabe C, Hanley DA. Effect of tumor necrosis factor alpha inhibition on bone density and turnover markers in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2009, 39(2): 116-122.
- [4] Sakthiswary R, Das S. The effects of TNF α antagonist therapy on bone metabolism in rheumatoid arthritis: a systematic review[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(13): 1552-1557.
- [5] Van Tuyl LH, Voskuyl AE, Boers M, et al. Baseline RANKL: OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(9): 1623-1628.
- [6] Gonzalez-Alvaro I, Tomero E. Baseline serum rankl levels May serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with tn timer antagonists[J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(12): 1675-1678.
- [7] Catrina AI, Af Klint E, Ernestam S, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1): 76-81.
- [8] Dore RK, Cohen SB, Lane NE, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis receiving concurrent glucocorticoids or bisphosphonates[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(5): 872-875.
- [9] Heiland GR, Zwerina K, Baum W, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(12): 2152-2159.
- [10] Garner P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N. Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(12): 2313-2315.
- [11] Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(11): 1635-1640.
- [12] Wong PK, Quinn JM, Sims NA, et al. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and

drives inflammation-induced osteoclastogenesis[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1): 158-168.

- [13] Straburzyńska-Lupa A, Nowak A, Romanowski W, et al. A study of the Link between bone turnover markers and bone mineral density with inflammation and body mass in postmenopausal women with active rheumatoid arthritis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2013, 31(2): 169-176.
- [14] Vis M, Havaardsholm EA, Haugeberg G, et al. Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NFkappaB ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(11): 1495-1499.
- [15] Chopin F, Garner P, Le Henanff A, et al. Long-term effects of infliximab on bone and cartilage turnover markers in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(3): 353-357.
- [16] Güler-Yüksel M, Allaart CF, Goekoop-Ruiterman YP, et al. Changes in hand and generalised bone mineral density in patients with recent-onset rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(3): 330-336.
- [17] Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, et al. A 1-year case-control study in patients with rheumatoid arthritis indicates prevention of loss of bone mineral density in both responders and nonresponders to infliximab[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(3): 61.
- [18] Seriole B, Paolino S, Sulli A, et al. Bone metabolism changes during anti-TNF-alpha therapy in patients with active rheumatoid arthritis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1069(1): 420-427.
- [19] Briot K, Garner P, Le Henanff A, et al. Body weight, body composition, and bone turnover changes in patients with spondyloarthritis receiving anti-tumour necrosis factor {alpha} treatment[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(8): 1137-1140.
- [20] Lange U, Teichmann J, Müller-Ladner U, et al. Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha antibody: a prospective open-label pilot study[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(12): 1546-1548.
- [21] Axmann R, Böhm C, Krönke G, et al. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(9): 2747-2756.
- [22] Terpos E, Fragiadaki K, Konsta M, et al. Early effects of IL-6 receptor inhibition on bone homeostasis: a pilot study in women with rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2011, 29(6): 921-925.
- [23] Garner P, Thompson E, Woodworth TA. Rapid and sustained improvement in bone and cartilage turnover markers with the Anti-Interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab plus methotrexate in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate results from a substudy of the multicenter Double-Blind, Placebo-Controlled trial of tocilizumab in inadequate responders to methotrexate alone[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(1): 33-43.
- [24] Kanbe K, Nakamura A, Inoue Y, et al. Osteoprotegerin expression in bone marrow by treatment with tocilizumab in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(9): 2669-2674.
- [25] Karsdal MA, Schett G, Emery P, et al. IL-6 receptor inhibition positively modulates bone balance in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-tumor necrosis factor therapy: biochemical marker analysis of bone metabolism in the tocili-

- zumab RADIATE study (NCT00106522) [J]. Semin Arthritis Rheum, 2012, 42(2):131-139.
- [26] Hashimoto J, Garnero P, Van Der Heijde D, et al. Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study[J]. Mod Rheumatol, 2011, 21(1):10-15.
- [27] De Hair MJ, Zijlstra IA, Boumans MJ, et al. Hunting for the pathogenesis of rheumatoid arthritis: core-needle biopsy of inguinal lymph nodes as a new research tool[J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(11):1911-1912.
- [28] Hein G, Eidner T, Oelzner P, et al. Influence of rituximab on markers of bone remodeling in patients with rheumatoid arthritis: a prospective open-label pilot study[J]. Rheumatol Int, 2011, 31(2):269-272.
- [29] Bedi B, Li JY, Grassi F, et al. Inhibition of antigen presentation and T cell costimulation blocks PTH-induced bone loss[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1192(1):215-221.
- [30] Jung K, Lein M. Bone turnover markers in serum and urine as diagnostic, prognostic and monitoring biomarkers of bone metastasis [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1846(2):425-438.

(收稿日期:2016-01-21)

• 综 述 •

循环肿瘤细胞富集检测的研究进展

周婧婷¹综述,戴启宇^{2△}审校

(1. 新乡医学院研究生院,河南新乡 453000;2. 中国人民解放军第三七一中心医院检验科,河南新乡 453000)

关键词:循环肿瘤细胞; 富集检测方法; 纳米技术

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 09. 035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1239-02

恶性肿瘤的复发和转移是导致肿瘤患者死亡的重要原因。目前临床上仍主要通过影像学检查及传统肿瘤标志物的检测来发现并诊断肿瘤,发现时患者常常已处于肿瘤进展晚期,影响患者预后^[1]。循环肿瘤细胞(CTCs)是从原发或转移肿瘤病灶脱落,进入外周血的肿瘤细胞,与肿瘤的转移密切相关,其检测具有重要的临床意义,不仅有助于实时监测肿瘤动态、早期发现肿瘤微转移,还能为评估预后和疗效以及肿瘤的个体化治疗提供可靠参考^[2]。近年来纳米技术在 CTCs 的富集检测中得到广泛应用,本文对常用的 CTCs 富集检测方法以及相关研究进展进行总结,并对纳米技术在 CTCs 检测中的应用进行探讨。

1 CTCs 的生物学特性及其检测的临床意义

CTCs 主要表达上皮源性表面标志,存在于大多数上皮来源的恶性肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、结直肠癌和膀胱癌等多种恶性肿瘤中^[3]。虽然 CTCs 在血液中水平极低,但是 CTCs 检测是评估临床预后及化疗疗效的重要指标。

2 现有 CTCs 富集和检测的方法学

外周血 CTCs 取材方便,重复性强,可实时监测癌细胞动态,相比较骨髓来说,是更为理想的检测标本来源。外周血中白细胞水平较高,而 CTCs 的浓度极低,这就对其检测分析技术提出了较高要求。现有的方法学主要分为 CTCs 分离富集方法和 CTCs 检测鉴定方法两大类^[4]。

2.1 CTCs 分离富集方法

2.1.1 物理富集方法 物理富集方法是基于 CTCs 和血细胞之间直径、密度、变形性、介电性质等物理学特性的不同而建立的方法。目前最常用的 CTCs 富集方法为膜滤过分析法和密度梯度离心法。这两种方法分别根据 CTCs 直径和密度与其他血细胞的差异,通过滤膜过滤法和离心法将 CTCs 分离出,并用于进一步的检测鉴定。基于 CTCs 物理学特性的富集方法操作简便,但特异性低,得到的 CTCs 纯度较低,且存在被漏

检的可能^[5]。细胞变形性富集法是利用肿瘤细胞的恶性程度增加,变形性增加这一特性而设计的一种微流体装置进行细胞分离富集的方法。目前该方法应用于临床仍有一定的困难。细胞电学特征富集法是根据细胞介电性质的不同而建立的分离富集方法。该方法具有活细胞分选、使用灵活、容易调控、便于自动化、可重复使用的优点。但是由于各种肿瘤细胞的介电性质不同,无法对所有肿瘤进行检测。肿瘤细胞的尺寸和表面电荷与正常细胞存在差异,ApoStreamTM技术利用这一点通过改变电场频率来捕获 CTCs^[6]。ApoStreamTM技术的 CTCs 检出率明显高于 CellSearch 系统,有报道称,ApoStreamTM技术检出的 CTCs 数超过 CellSearch 系统的 10 倍以上^[7]。

2.1.2 生物富集方法 生物富集方法是基于 CTCs 和普通血细胞之间某些生物标志物的表达差异而建立的方法。免疫磁性分离技术是目前最常用的 CTCs 分离富集方法^[8],其原理是形成抗原-抗体-磁珠免疫复合物,通过外加磁场作用使该复合物发生移动,达到分离细胞的目的,主要有阳性富集和阴性富集两种^[9]。CellSearch 系统是目前唯一获得美国 FDA 的批准应用于临床检测 CTCs 的新技术^[10]。该技术通过上皮细胞黏附分子 Ep-CAM 标记磁珠从而对上皮细胞进行富集,目前已用于检测结直肠癌、前列腺癌和转移性乳腺癌 CTCs^[11]。该方法与免疫细胞化学技术、RT-PCR、流式细胞术(FCM)等方法相结合检查 CTCs,可提高检测敏感度和特异度。CellSearch 系统具有很好的重复性^[12],可以很好地保存细胞形态结构。缺点则是操作较为复杂,技术要求和检测成本均较高。采用上皮细胞标志筛选将遗漏发生上皮间质转化(EMT)的肿瘤细胞,造成结果的假阴性^[13]。有研究者发现,增加的标记分子在提高 CTCs 检出率的同时,其与正常细胞的特异性反应和非特异性反应也会增加,所以要求增加的标记分子特异性好、具有一定代表性^[14-15]。

2.2 CTCs 检测鉴定方法