

- [19] DU F J, XIE L, ZHANG Y H, et al. Prospective comparison of QFT-GIT and T-SPOT. TB assays for diagnosis of active tuberculosis[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):5882.
- [20] MASAKI T, AKIKO N, AKIE A, et al. The direct comparison of two interferon-gamma release assays in the tuberculosis screening of Japanese healthcare workers[J]. *Intern Med*, 2017, 56(7):773-779.
- [21] DUC T, LARRY D, JULIE G, et al. Characteristics associated with negative interferon- γ release assay results in culture-confirmed tuberculosis patients, Texas, USA, 2013-2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(3):534-540.
- [22] ZHANG L, SHI X, ZHANG Y, et al. Analysis of factors influencing diagnostic accuracy of T-SPOT. TB for active tuberculosis in clinical practice[J]. *Sci Rep*, 2018, 7(1):7764.
- [23] KANG W L, WU M Y, YANG K Y, et al. Factors associated with negative T-SPOT. TB results among smear-negative tuberculosis patients in China[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):4236.
- [24] YANG C, ZHANG S J, YAO L, et al. Evaluation of risk factors for false-negative results with an antigen-specific peripheral blood-based quantitative T cell assay (T-SPOT.TB) in the diagnosis of active tuberculosis: a large-scale retrospective study in China[J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(5):1815-1825.
- [25] CHEN Y, JIANG H, ZHANG W, et al. Diagnostic value of T-SPOT. TB test in cutaneous mycobacterial infections [J]. *Acta Derm Venereol*, 2018, 98(10):989-990.
- [26] DI L, LI Y. The risk factor of false-negative and false-positive for T-SPOT. TB in active tuberculosis[J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 32(2):e22273.
- [27] PERRY S, CHANG A H, SANCHEZ L, et al. The immune response to tuberculosis infection in the setting of *Helicobacter pylori* and helminth infections[J]. *Epidemiol Infect*, 2013, 141(1):1232-1243.
- [28] DASARI S, NAHA K, PRABHU M. Brucellosis and tuberculosis: Clinical overlap and pitfalls [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(10):823-825.
- [29] CHEN Y, JIANG H, ZHANG W, et al. Diagnostic value of T-SPOT. TB test in cutaneous Mycobacterial infections [J]. *Acta Derm Venereol*, 2018, 98(10):989-990.
- [30] REGO K, PEREIRA K, MACDOUGALL J, et al. Utility of the T-SPOT. TB test's borderline category to increase test resolution for results around the cut-off point [J]. *Tuberculosis*, 2018, 108:178-185.
- [31] TAGMOUTI S, SLATER M, BENEDETTI A, et al. Reproducibility of interferon gamma (IFN- γ) release assays a systematic review [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2014, 11(8):1267-1276.

(收稿日期:2019-02-22 修回日期:2019-05-21)

• 综 述 •

循环肿瘤细胞检测在肺癌中的应用

毛 莉, 李金密, 任晓东, 陈 敏 综述, 黄 庆[△] 审校

(陆军军医大学大坪医院/野战外科研究所检验科, 重庆 400042)

摘 要:肺癌是目前全世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤,早期诊治是改善其预后的关键,随着循环肿瘤细胞(CTCs)检测技术的改进与发展,检测的灵敏度与特异度逐步提高,肺癌患者将在早期得到确诊,对肺癌的诊断、治疗及预后评估都具有重要意义。本文重点综述了近年来 CTCs 检测诊断技术的进展及其在肺癌诊断中的应用,并对其检测技术面临的挑战进行了探讨。

关键词:肺癌; 循环肿瘤细胞; 早期诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.17.024

文章编号:1673-4130(2019)17-2147-04

中图法分类号:R734.2,R446

文献标识码:A

The detection of circulating tumor cells and its application in lung cancer

MAO Li, LI Jinmi, REN Xiaodong, CHEN Min, HUANG Qing[△]

(Department of Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research/Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Lung cancer has the highest morbidity and mortality in the world. Early diagnosis and treatment is the key to improve its prognosis. With the improvement and development of circulating tumor cells (CTCs) detection technology, the sensitivity and specificity of detection are gradually improved. Lung cancer patients will be diagnosed at an early stage, which is of great significance for the diagnosis, treatment and prognosis e-

[△] 通信作者, E-mail: Dr. Q. Huang@gmail.com.

本文引用格式: 毛莉, 李金密, 任晓东, 等. 循环肿瘤细胞检测在肺癌中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(17): 2147-2150.

valuation of lung cancer. In this paper, the progress of CTCs detection and diagnosis technology in recent years and its application in lung cancer diagnosis are reviewed, and the challenges faced by CTCs detection technology are discussed.

Key words: lung cancer; circulating tumor cells; early diagnosis

肺癌在全世界的发病率和病死率居高不下,近年来更是一跃成为中国最常见的死亡原因^[1]。由于缺乏理想的早期诊断方法,且肺癌患者在发病早期的临床症状不明显,导致肺癌确诊时已发病至中晚期,使患者错过了最佳的治疗时期。因此,肺癌的早期诊断是降低肺癌患者病死率的关键。近年来,随着循环肿瘤细胞(CTCs)检测技术的发展,特别是 CellSearch 系统在临床实践中的广泛应用,CTCs 检测将成为对肿瘤早期诊断、治疗及预后评估的新型工具。本文综述近年来 CTCs 检测诊断技术的进展及其在肺癌诊断中的应用,并对其检测技术面临的挑战进行探讨。

1 CTCs 检测技术的进展

1869 年,ASHWORTH^[2]在肿瘤患者的血液中检测到 CTCs,并且发现在肿瘤发生早期即有 CTCs 通过血液循环发生全身扩散的现象,这一发现开启了国内外多个国家医学专家的研究热潮。CTCs 进入血液循环后通过迁移、黏附、相互聚集形成微小癌栓,并在一定条件下发展为转移灶,CTCs 在肿瘤的发生发展和转移扩散中均扮演着重要角色^[3]。

1.1 CTCs 的富集 CTCs 在外周血中的浓度极低,出现的概率约为每 10^9 个血细胞中出现 1 个 CTCs^[4],所以,CTCs 检测的关键在于能否在复杂环境中准确、高速有效地富集 CTCs。根据检测原理,CTCs 的富集方法可分为特异性富集方法和非特异性富集方法。特异性富集方法基于 CTCs 细胞表面的标志物如细胞角蛋白(CK)等进行富集,包括免疫磁性分离法(IMS)、芯片富集法、纳米粒富集法等。其中 IMS 是目前用于富集 CTCs 最常见的方法,它的原理是在外部磁场中,相应的抗原抗体复合物附着在磁珠上并保留在磁场中,而没有这种表面抗原的其他细胞由于不能与连接着磁珠的特异性单克隆抗体结合而不具有磁性,不在磁场中停留,从而使肿瘤细胞得以分离^[5-6]。非特异性富集方法是根据 CTCs 自身的物理特性,如大小、密度等进行富集,包括密度梯度离心法、细胞大小富集法等。密度梯度离心法是目前实验室常用的一种基于形态学特点富集肿瘤细胞的方法,该方法设备要求低,操作简便,但该方法血液需求量大,灵敏度低,重复性较差。

1.2 CTCs 的检测 根据检测原理,富集 CTCs 检测方法可分 2 大类:细胞计数法和核酸检测法。前者主要包括各种免疫细胞化学技术(ICC)、流式细胞术(FCM)等,后者主要包括 PCR、逆转录 PCR 等技术。

1.2.1 ICC ICC 指以显色剂标记的特异性抗体与 CTCs 特异性结合后,通过显色剂显色反应对相应抗

原进行定位、定性和定量测定的技术。ICC 检测能够对细胞大小和形态进行分析,但灵敏度低,只能从 $(1\sim 10)\times 10^5$ 个正常细胞中发现 1 个肿瘤细胞^[7],这无疑限制了其在临床上的应用。

1.2.2 FCM 该方法集激光、电子物理、光电测量、计算机、细胞荧光化学及单克隆抗体技术为一体,能够对细胞和亚细胞结构进行检测的方法。近年来有一种微创体内检测技术,通过将荧光标记的单克隆抗体注射入体内,通过放置于血管的激光检测流过的 CTCs,极大地弥补了检测灵敏度的不足。

1.2.3 PCR 该方法主要通过检测癌基因、抑癌基因的突变或染色体质量产生的异常 DNA 来检测肿瘤患者外周血中的 CTCs。

1.2.4 逆转录 PCR 该方法是在 PCR 的基础上扩增由肿瘤特异性 mRNA 序列逆转录的 DNA 片段,由于这些特异性的 mRNA 通常不表达于正常外周血细胞,因此,在某些基因改变后,可以基于组织或肿瘤特异性 mRNA 的表达或某些基因改变后 RNA 水平的异常可以间接检测到 CTCs 的存在^[8]。此法灵敏度较高,但是假阳性率高,无法检测 CTCs 细胞形态等问题局限了该方法在临床上的应用。随着近几年逆转录 PCR 技术的发展,实时定量逆转录 PCR、荧光定量逆转录 PCR 等新方法的出现,由于其高扩增效率和高特异度、灵敏度,逆转录 PCR 及其改进技术广泛应用于 CTCs 的检测中,被公认为目前最准确的检测方法^[9]。

1.2.5 富集与检测技术结合 为了加速 CTCs 检测在临床实践中的应用,近年来,结合富集和检测技术的自动化检测系统已被用于提高检测的灵敏度和特异度。目前,CellSearch 检测系统相对成熟并得到广泛应用。CellSearch 系统是一个使用灵活,功能强大的研究平台。

CellSearch 检测系统首先通过纳米磁珠特异性地富集血液中的 CTCs。再进一步将富集出来的 CTCs 进行化学或生物染色,最后通过检测系统完成对 CTCs 的准确检测。该系统具有特异度、灵敏度、重复性高的优点,可从 400 多亿的血细胞中检测到单一的一个 CTCs,并且检测结果准确可靠。值得注意的是,使用单一抗原富集 CTCs(如表面的 EpCAM)经常导致检测结果中的假阴性,因为并非每种肿瘤细胞都表达上皮标志。为了避免这一问题的出现,研究者开始加入新的表面分子。使用抗 EpCAM 和抗 CK(CK7/8)的免疫磁珠富集 CTCs,用酶学方法去检测 CTCs^[10]。OncoCEE 平台运用了多种混合抗体富集

转移性乳腺癌患者的 CTCs,与 CellSearch 相比,灵敏度提高了 21%^[11]。虽然使用新的检测标志物可以提高检出率,但同时会增加与正常有核细胞的特异和非特异性反应,因此,只有筛选出具有强特异度的标志物才可以提高 CTCs 的检出率。此外,具有高灵敏度的 CTCs-Chip 也是一项集富集与检测为一体的先进技术,即使只有极少量的肿瘤细胞,CTCs-Chip 技术也可以一步将它们于全血中捕获,捕获的肿瘤细胞存活率高达 98%^[12],并且检测结果不受肿瘤细胞间歇性释放的影响。鉴于肺癌影像学筛查的效用和成本争议,CTCs-Chip 的血液检测作为吸烟者等肺癌高危人群的筛查工具极具吸引力。

2 CTCs 在肺癌中的应用

肺癌是当今世界各国常见的恶性肿瘤,肺癌患者的 5 年生存率低于 15%^[13-14],其中非小细胞肺癌占肺癌患者总数的 80%~85%^[15]。近年来,基于血液中生物标志物的液体活检技术为肺癌的早期诊断与早期转移复发的检测提供了新思路,这些生物标志物包括循环肿瘤 DNA(ctDNA)^[16]和 CTCs。ctDNA 主要是指来自肿瘤细胞坏死凋亡后释放于人体血液循环中不断循环的肿瘤基因组游离 DNA 片段^[17]。CHAN 等^[18]通过对比肺癌患者与健康人的 ctDNA 含量的显著差异,证明通过检测 ctDNA 含量的变化,可以对肺癌高危人群进行早期筛查。相较于 ctDNA 检测,CTCs 检测具有独特优势,通过检测从实体肿瘤上脱落后进入血液循环的肿瘤细胞,对转移癌的诊断具有极高的特异度,能够鉴定所有类型的肿瘤细胞,并且能进一步进行肿瘤分子生物学和遗传学分析。

研究发现,进入人体循环系统的 CTCs 绝大多数被机体的免疫系统杀伤或在血液动力学的作用下破坏死亡,只有少数能存活下来,并在一定条件下发展为转移灶^[19],而外周血中 CTCs 的数量反映了肺癌发生血行转移的程度和能力,CTCs 计数会随着肿瘤远处转移的进展而显著增高。此外,CTCs 在肺癌的早期诊断、微转移、评估疗效与预后、选择合适的个体化治疗等方面的作用也得到了大量的研究证实。LV 等^[20]使用 CellSearch 系统检测 32 例非小细胞肺癌患者肺静脉血中的 CTCs,结果显示阳性率为 90.6% (29/32),且 CTCs 计数与肿瘤大小呈正相关($P=0.012$),后将来自 3 例患者的富集的 CTCs 注射到 3 只免疫缺陷的小鼠中,1 只小鼠产生异种移植肿瘤,表明 CTCs 检测有助于早期发现肺癌及可能出现的微转移。LOU 等^[21]使用定量 PCR 和免疫细胞化学法检测各阶段肺癌患者的外周血 CTCs,结果显示阳性率为 70%,研究结果同时表明,CTCs 阳性率与血清肿瘤标志物(包括血清癌胚抗原、细胞角蛋白片段 19 抗原 21-1)升高的水平无关,但与肺癌的临床分期有关,其中 I 期肺癌的阳性率为 67.2%,CTCs 对肺癌的早期诊断更为灵敏。FIORELLI 等^[22]应用细胞

大小富集法从 77 例患有恶性($n=60$)和良性($n=17$)肺病变的患者外周血中分析 CTCs,统计数据表明,60 例(90%)恶性肿瘤患者中有 54 例检测出 CTCs,17 例(5%)良性患者中有 1 例检测出 CTCs,在测试的 I 期肺癌患者(42%)中,CTCs 的数量与肿瘤大小相关($P=0.001$)。另一项研究数据表明,CTCs 在肺癌早期即可检测到,阳性率为 68%^[23],表明 CTCs 检测有助于早期发现肺癌及可能出现的微转移。PUN-NOOSE 等^[24]通过 CellSearch 法检测 41 例非小细胞肺癌患者的 CTCs,发现 CTCs 计数的降低与放射性治疗具有相关性,表明 CTCs 检测可作为肺癌患者放射性治疗后的检测手段。MAHESWARAN 等^[25]采用 CTCs-Chip 法检测 27 例非小细胞肺癌患者的 CTCs,结果显示,从接受酪氨酸激酶抑制剂治疗的 EGFR 突变患者中收集的 CTCs 中检测到 T790M 突变(该突变赋予药物抗性),表明 CTCs 检测可作为肺癌患者靶向药物治疗后检测治疗期间基因型变化的方法。BREITENBUECHER 等^[26]研究表明,携带 EGFR 突变的肺癌患者中有 84%的 CTCs 可检测到 EGFR 突变,在 94%的病例中,CTCs 中发现的突变与肿瘤组织中的突变不一致,这可能是由于原发病灶和转移部位之间的肿瘤异质性导致。TANIGUCHI 等^[27]采用逆转录 PCR 法检测 8 例肺癌患者的 CTCs,结果显示 EGFR 突变患者在 CTCs 中均表现出相同的突变。此外,CTCs 在其他肿瘤的临床应用方面也取得了一些进展,如胰腺癌、胃癌、膀胱癌。

3 CTCs 检测面临的挑战与展望

CTCs 检测是一种真正的无创、可以动态监测病情变化、对于肿瘤的早期诊断、复发与转移、靶向药物筛选等具有重要临床意义的检测方法,在恶性肿瘤精准医疗领域具有良好的临床应用前景和巨大的社会效益。但目前尚缺乏规范的检测流程与相应的质量标准,还需进一步的临床试验去完善检测的重复性。各种富集和检测新方法的联合使用也将极大地提高检测的灵敏度和特异度,随着技术的不断改进与发展,CTCs 检测必将在临床肿瘤诊治中得到推广应用。

参考文献

- [1] INAGE T, NAKAJIMA T, YOSHINO I, et al. Early lung cancer detection[J]. Clin Chest Med, 2018, 39(1): 45-55.
- [2] ASHWORTH T R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death [J]. Australian Med J, 1969, (14): 146-149.
- [3] KAIGORODOVA E, TARABANOVSKAYA N, SIMOLINA E, et al. T15: circulating tumor cells and bone marrow progenitor cells in the blood of breast cancer patients in the dynamics of neoadjuvant chemotherapy [J]. Ejc Supplements, 2015, 13(1): 22-24.
- [4] WILLIAMS A, HAROUAKA R, ZHENG S, et al. Perspectives on the functional characterization and in vitro

- maintenance of circulating tumor cells [J]. *Circulating Tumor Cell*, 2016, 4(1): 215-231.
- [5] LV S W, WANG J, XIE M, et al. Photoresponsive immunomagnetic nanocarrier for capture and release of rare circulating tumor cells [J]. *Chem Sci*, 2015, 6(11): 6432-6438.
- [6] LI P, MAO Z, PENG Z, et al. Acoustic separation of circulating tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(16): 4970-4975.
- [7] CASTLE J, MORRIS K, PRITCHARD S, et al. Challenges in enumeration of CTCs in breast cancer using techniques Independent of cytokeratin expression [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175647.
- [8] STERMANN A, HUEBENER N, SEIDEL D, et al. Targeting of MYCN by means of DNA vaccination is effective against neuroblastoma in mice [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(10): 1215-1227.
- [9] BANYS M J, KRAWCZYK N, BECKER S, et al. Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients [J]. *Onkologie*, 2008, 31(1): 140-141.
- [10] WEISSENSTEIN U, SCHUMANN A, REIF M, et al. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 206.
- [11] DESITTER I, GUERROUAHEN B S, BENALI-FURET N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(2): 427-441.
- [12] SEQUIST L V, NAGRATH S, TONER M, et al. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients [J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(3): 281-283.
- [13] HUANG S C, NG K F, LEE S E, et al. HER2 testing in paired biopsy and excision specimens of gastric cancer: the reliability of the scoring system and the clinicopathological factors relevant to discordance [J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(1): 176-182.
- [14] SIEGEL R, MA J M, ZOU Z H, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29.
- [15] CHERIYAN V T, ALSAAB H, SEKHAR S, et al. A CARP-1 functional mimetic compound is synergistic with BRAF-targeting in non-small cell lung cancers [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(51): 29680-29697.
- [16] FENG W N, GU W Q, ZHAO N, et al. Comparison of the Super ARMS and droplet digital PCR for detecting EGFR mutation in ctDNA from NSCLC patients [J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(2): 542-545.
- [17] DIAZ L A, BARDELLI A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(6): 579-586.
- [18] CHAN K, JIANG P Y, ZHENG Y W, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(1): 211-224.
- [19] LANGLEY R R, FIDLER I J. 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.
- [20] LV C, ZHAO B T, WANG L M, et al. Detection of circulating tumor cells in pulmonary venous blood for resectable non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 1103-1112.
- [21] LOU J T, WANG X Q, LIANG X H, et al. Quantitation of rare circulating tumor cells in non-small cell lung cancer by ligand-targeted PCR [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80458.
- [22] FIORELLI A, ACCARDO M, CARELLI E, et al. Circulating tumor cells in diagnosing lung cancer: clinical and morphologic analysis [J]. *Ann Thorac Surg*, 2015, 99(6): 1899-1905.
- [23] ZHANG Z, SHIRATSUCHI H, LIN J, et al. Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12383-12397.
- [24] PUNNOOSE E A, ATWAL S, LIU W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8): 2391-2401.
- [25] 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.
- [26] BREITENBUECHER F, HOFFARTH S, WORM K A, et al. Development of a highly sensitive and specific method for detection of circulating tumor cells harboring somatic mutations in non-small-cell lung cancer patients [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85350.
- [27] TANIGUCHI K, UCHIDA J, NISHINO K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24): 7808-7815.