

• 综 述 •

循环肿瘤细胞在肝癌精准诊疗中的研究进展^{*}

王 丹¹, 陈凤娇², 汤青霞¹, 张为国³ 综述, 李小松^{4△} 审校

(1. 重庆市荣昌区人民医院检验科, 重庆 402460; 2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016; 3. 中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 重庆 400714; 4. 重庆医科大学附属第一医院临床分子医学检测中心, 重庆 400016)

摘 要:精准医疗时代背景下的新型分子诊断技术和方法为肝癌的个体化诊疗提供了新的契机,通过检测原发或转移性肝癌自发脱落或外源因素诱导脱落进入外周血液循环系统中的肿瘤细胞,即循环肿瘤细胞(CTCs),可为肝癌的早期筛查、辅助诊断、预后判断、疗效评估和复发转移等提供重要的指导。与传统检测方法相比,CTC 检测具有无创、实时、方便、高效等显著特点,有望为肝癌患者开辟一条个性化的精准治疗之路。本文将对 CTC 在肝癌精准诊疗中的研究进展作一概述和展望,以期临床提供重要的参考。

关键词:肝细胞癌; 精准诊疗; 循环肿瘤细胞; 液体活检

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.09.023

中图法分类号:R735.7;R446.9

文章编号:1673-4130(2020)09-1116-07

文献标识码:A

Recent advances in precise diagnosis and treatment of liver cancer by CTCs^{*}

WANG Dan¹, CHEN Fengjiao², TANG Qingxia¹, ZHANG Weiguo³, LI Xiaosong^{4△}

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Rongchang District, Chongqing 402460, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing 400714, China; 4. Clinical Molecular Medicine Testing Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: The new molecular diagnostic techniques and methods in the context of precision medicine provide a new opportunity for the individualized diagnosis and treatment of liver cancer. The detection of tumor cells in the peripheral blood circulation system (circulating tumor cells, CTCs) which come from spontaneous or exogenous factors induces shedding in primary or metastatic liver cancer, could provide important guidance for early screening, adjuvant diagnosis, prognosis, efficacy evaluation, recurrence and metastasis of liver cancer. Compared with the traditional detection methods, CTCs detection has the characteristics of non-invasive, real-time, convenient and high-efficiency. It is expected to open a personalized and precise treatment for patients with liver cancer. This article will make a overview and prospect on the precise diagnosis and treatment of liver cancer by CTCs, with a view to provide an important reference for the clinic.

Key words: hepatocellular carcinoma; precise diagnosis and treatment; circulating tumor cells; liquid biopsy

2016 年,国家癌症中心赫捷院士团队在国际顶级期刊 *CA Cancer J Clin* 杂志在线发表了 2015 年中国癌症统计数据,数据显示,2015 年我国累计新发癌症病例 429.2 万,死亡病例 281.4 万^[1]。有研究发现,2018 年全球每年新发癌症患者近 2 000 万,其中肝癌患者近 100 万^[2]。ARZUMANYAN 等^[3]学者研究报道,全球累计 20 亿人曾感染过乙型肝炎病毒(HBV),

目前我国 HBV 携带者 9 000 余万,每年因 HBV 感染所引发的死亡病例近 50 万。

目前,人类最主要的死亡原因仍是恶性肿瘤。肝细胞癌(HCC)是临床上最常见的恶性肿瘤之一,肝癌的发生、发展与病毒感染、乙醇、糖尿病、遗传、马兜铃酸和黄曲霉素等饮食毒素具有一定的关系,其中肝炎的活动与肝硬化和肝癌的发生密切相关,我国约 80%

^{*} 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81871653);重庆市医学科研项目(2018MSXM065、2019QNXM002)。

[△] 通信作者, E-mail: aleex24@163.com。

本文引用格式:王丹,陈凤娇,汤青霞,等.循环肿瘤细胞在肝癌精准诊疗中的研究进展[J].国际检验医学杂志,2020,41(9):1116-1122.

的肝癌患者都与肝炎病毒的感染相关,其中和乙型肝炎病毒感染相关的达 50%。目前,肝癌最有效的治疗方法是手术切除和肝移植,但术后的复发和转移较高,严重影响了肝癌患者的治疗效果^[4-5]。HCC 的诊断主要依赖于血清标志物筛查、穿刺活检和影像学检查等,但针对小于 2 cm 的病变,影像学检查的灵敏度和特异度均较低;此外近 1/3 肝癌患者的血清标志物甲胎蛋白无明显改变^[6]。目前,常规检测方法所诊断的肝癌患者多处于中晚期,不利于肝癌的早期筛查和诊断。随着精准医疗时代的到来,精准检测技术和方法得到了迅猛的发展,特别是近年来“液体活检”技术的变革性发展^[7],为临床疾病的个体化诊疗开辟了新的天地。循环肿瘤细胞(CTCs)是当前液体活检的重要标志物之一。CTCs 是指原发或转移性肿瘤自发脱落或外源因素诱导脱落进入外周血液循环系统中的肿瘤细胞^[8]。其实早在 100 多年前澳大利亚著名科学家 ASHWORTH 教授就发现外周血液循环系统中存在与某特定原发肿瘤细胞相类似的细胞,并首次提出和阐释了 CTCs 的概念。研究发现,肿瘤患者外周血液循环系统中的 CTCs 常以成簇或单个游离的形式存在,而成簇的 CTCs 多为肿瘤转移的“种子”^[9]。随着分子诊断技术的日新月异和新型肿瘤标志物的发现,CTCs 的优势逐渐得以体现,由于 CTCs 具有完整的细胞形态和功能,不但可提供原发灶或转移灶肿瘤的生物信息(基因突变信息、蛋白质组学和代谢组学信息等),还可为下游的细胞实验和表征分析提供现实基础,因此,CTCs 具有广泛的应用前景。CTCs 的分选与培养可广泛应用于肿瘤患者的早期筛查、辅助诊断、预后判断、疗效评估、复发转移和耐药评估^[10]。CTCs 常存在于肿瘤患者的外周血液循环系统中,而在健康人群或其他非肿瘤疾病人群的外周血液循环系统中不能检测到。来源于肿瘤病灶的 CTCs 多与原发肿瘤具有相似甚至相同的病理特征,捕获到的 CTCs 可直接反映原发肿瘤的病理学特征^[11]。见图 1。

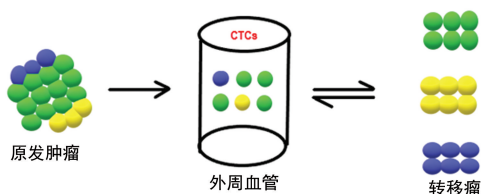


图 1 CTCs 产生与播散示意图

目前,肿瘤确诊的“金标准”仍是组织病理学和细胞病理学,但该方法存在创伤性大、取材困难、无法连续监测疾病进展等缺点。而液态活检技术(如外周血 CTCs、ctDNA 等)具有无创、实时、方便、快捷且能持续监测疾病进程、判断和评估患者预后和复发等优点,因而具有广泛的应用前景^[12-16]。CTCs 是肿瘤实现侵袭和转移的最初阶段,并为最终形成肿瘤转移灶

提供了“种子”,是患者无进展生存期和总生存期的独立预测因子,其计数常被应用于各肿瘤的预后判断和疗效评估。

近年来,在精准医疗概念的推动下,CTCs 逐渐被认为是一种新型的肿瘤标志物,关于 CTCs 的临床应用研究呈爆发式增长^[17]。研究表明,肿瘤患者外周血中 CTCs 数量稀少、半衰期短、容易降解,常规分选技术很难捕获到外周血液循环系统中全周期、完整的 CTCs;目前基于 CTCs 的研究多集中于探寻其特异性标志物以期提高检测的灵敏度和特异度^[18-19]。CTCs 广泛应用于实体瘤的微转移、术后复发监测、疗效评估、预后判断及个体化靶向治疗。CTCs 检测阳性患者的无进展生存期和总生存期显著低于 CTCs 阴性患者,在经过有效治疗后 CTCs 数量呈明显下降趋势,在实时监测肿瘤疗效和复发转移方面具有独特的优势。原发性肝癌形成的早期阶段,肿瘤细胞可从原发灶脱落并进入外周血液循环系统,促使肿瘤的肝内和肝外转移;如果能在脱落的早期阶段检测到外周血液循环系统中的肿瘤细胞,将对 HCC 的早期筛查、鉴别诊断、治疗方案选择、疗效评估及肿瘤转移等方面提供一种全新的非侵入性方法^[20]。

1 CTCs 的分离与富集

外周血液循环系统中的 CTCs 数量极其稀少,仅占外周血白细胞数量的 $1/10^7 \sim 1/10^8$,同时,由于肿瘤细胞异质性的存在,针对 CTCs 检测方法的特异度和灵敏度要求较高。如何分离和鉴定外周血液循环系统中的 CTCs 成为当前 CTCs 检测方法学中的研究热点。目前多采取高效的分离与富集方法来捕获外周血液循环系统中数量极其稀少的 CTCs,再将获取的 CTCs 进行分析和鉴定,以期为临床的精准诊疗提供重要的参考依据。

1.1 密度梯度离心技术 密度梯度离心技术是根据血液中各细胞密度的差异,在外周血中加入特定的分离液后进行离心,CTCs 悬浮于分离液上方,从而将血液中的 CTCs 分离出来。该方法在富集 CTCs 方面具有廉价、有效的显著特点,但方法学本身的局限性依然明显。由于分离液与血液相互掺杂,会导致部分 CTCs 的损失,从而影响 CTCs 的检出限和检出率,即影响 CTCs 检测的灵敏度。

1.2 过滤技术 过滤技术是指使用肿瘤上皮细胞与外周血液循环系统中的血细胞体积不同的原理,采用 $8 \mu\text{m}$ 孔径的过滤器将外周血中体积较小的淋巴细胞和中性粒细胞过滤掉,而肿瘤细胞因体积较大滞留在过滤器上。该方法的显著优点是操作非常简单,并且可以避免由多步分离引起的稀有细胞的破坏和丢失;通过该方法分离的 CTCs 的形态和结构均能够保持一定的完整性,有利于后续分析或临床应用研究。其缺点是一些体积较大的白细胞很容易与肿瘤细胞混合,不易分离导致假阳性或 CTCs 数量偏高;而一些

体积较小的 CTCs 很容易被过滤掉导致假阴性或 CTCs 数量偏低。因此,该方法的灵敏度和特异度均存在一定的问题^[21]。

1.3 免疫磁珠富集技术 免疫磁珠富集技术是唯一被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床检测 CTCs 的方法,该方法分为阳性分选和阴性分选。阳性分选方法是将上皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体包被在磁珠上,该磁珠可与表达 EpCAM 抗原的肿瘤细胞进行特异性结合,并在磁场引力作用下将血液中 EpCAM 表达呈阳性的肿瘤细胞与 EpCAM 表达呈阴性的非肿瘤细胞进行分离。阴性分选方法是首先采用离心的方法去除大部分血浆和所有红细胞,再将白细胞表面抗原 CD45 包被在分选磁珠上,该磁珠可与剩余血浆中的白细胞结合形成磁珠-白细胞复合物,在磁场引力作用下将白细胞去除,从而富集余下的肿瘤细胞^[22]。近年来我国学者在此理论基础上进行改良,通过 EpCAM 联合 CK8 免疫磁珠的方法可有效提高非小细胞肺癌 CTCs 的检出效率^[23]。

1.4 流体硅芯片技术 美国麻省总医院癌症中心与强生公司于 2007 年合作开发了一种高灵敏度的 CTCs 检测微流体硅芯片(CTC-Chip)。该芯片表面密集覆盖着近 8 万个含 EpCAM 抗体的微位点。此方法在理论上能在 10 亿个以上的血细胞中检出单个肿瘤细胞,但目前仅应用于科学研究,尚未临床实践。CTC-Chip 于 2010 年成功升级为 HB-Chip(herring-bone-chip)。作为第 2 代技术,HB-Chip 可捕获血液样本中 90% 以上的肿瘤细胞,其分离效率显著提高,较 CTC-Chip 提高了 25%;同时 HB-Chip 还可捕捉到 CTC-Chip 或其他 CTCs 分离技术从未发现过的循环肿瘤微栓子(CTM),对 CTM 的深入研究将有助于进一步解析肿瘤转移的分子病理机制。HB-Chip 兼容了传统的病理学检查方法,可直观地识别肿瘤细胞,一次检测的血液样本通量更大,可广泛运用于临床的

大规模应用研究。该团队于 2013 年又开发出了第 3 代技术,称为 iChip(inertial focusing-chip);该技术通过流体力学的作用将细胞与柱子对齐,通过流体动力学分选来去除最少的血液成分,然后再使用阳性选择方法去除淋巴细胞,最后收集剩下的目标细胞。该技术实际上完美结合了物理和免疫分离方法,大大提高了对 CTCs 的分离效果和效率,每小时可处理 20 mL 血液,通过该方法富集未标记的 CTCs,保持了肿瘤细胞的完整性和活性,为下游的细胞培养和表征分析提供了重要支撑。

1.5 纳米基板技术 纳米基板技术是指在 CTC 芯片中嵌入尺寸依赖性过滤和可降解的纳米结构基板,该技术可显著提高 CTCs 的分离效率。由于肿瘤细胞表面存在大量伪足和微绒毛,可大大增加肿瘤细胞的表面积;通过利用肿瘤细胞与纳米材料的强附着力来实现 CTCs 的高效捕获和分离^[24-25]。

1.6 微流控技术 微流控技术检测 CTCs 是指在微米级通道内进行流体控制以实现 CTCs 的分离富集和筛选,作为近年来发展起来的一种分子诊断新兴技术^[26],具有自动化、集成化、高通量和速度快等显著优点。微流控技术检测 CTCs 可显著提高其富集效率和纯度,目前微流控技术根据其分离原理分为两大类。一是基于 CTCs 物理属性的分离方法,该方法主要是根据 CTCs 的体积大小、密度和介电性等存在的差异进行分离和富集,通量高且免细胞标记;二是基于 CTCs 表面标志物的特征设计芯片基底表面的修饰分子和肿瘤细胞表面的靶标分子进行高效而特异的结合。

上述方法均可用于 CTCs 的分离和富集,但目前仍没有一种方法可以兼具高效、高特异度和高灵敏度的特点,筛选到不同肿瘤类型患者不同分期的 CTCs。CTCs 的分离富集技术具有各自的优缺点,见表 1。

表 1 CTCs 分离富集技术对比分析

分离富集技术	优点	缺点
微流控技术(基于物理特性)	高通量、高捕获效率、免细胞标记、低成本	孔道易堵塞、细胞易破裂
芯片技术	高灵敏度、高捕获效率、不改变细胞生物学特性	操作复杂、成本高
免疫磁珠富集技术	高特异度、高纯度	细胞活性受损、仅获得单一特征 CTCs、标本量大
纳米基板技术	高灵敏度、高捕获效率、不改变细胞生物学特性	操作复杂、成本高
密度梯度离心技术	操作简单、经济实惠、不改变细胞生物学特性	低灵敏度、低特异度
过滤技术	操作简单、经济实惠、不改变细胞生物学特性	低灵敏度、低特异度

2 CTCs 的分析与鉴定

从数以亿计的血细胞中分离富集到含量稀少的 CTCs 后,还需对其进行临床病理分析和鉴定,以期为肿瘤的精准诊断和治疗提供重要的依据。目前,主要采取 PCR 技术、免疫荧光技术、流体芯片技术和流式

细胞技术等 CTCs 的分析与鉴定。

2.1 基于 PCR 技术与鉴定 CTCs PCR 方法可以特异性扩增肿瘤患者肿瘤驱动基因的 DNA,并通过实时荧光定量 PCR 方法检测肿瘤细胞的 mRNA 表达情况。该方法具有高灵敏度和快捷方便的显著

特点,可检测鉴定出人体外周血液循环系统中含量稀少的肿瘤细胞,但对实验条件和实验操作要求较高,容易污染,同时由于 PCR 的高灵敏度可能产生非特异性扩增,导致假阳性结果产生^[27]。

2.2 基于流式细胞技术分析并鉴定 CTCs 流式细胞技术充分结合了激光、计算机、电物理、光电子测量、细胞荧光化学及单克隆抗体等技术,该方法将荧光标记的单克隆抗体与肿瘤细胞表面特异表达的抗原进行特异性结合,进而检测肿瘤患者外周血液循环系统中的肿瘤细胞。该方法具有较高的通量和灵敏度,其检测肿瘤细胞的灵敏度高达 $1/10^5 \sim 1/10^4$;但该技术对仪器和设备的要求较高,试剂成本较昂贵,对实验人员的操作要求较高^[28]。

2.3 基于流体芯片技术分析并鉴定 CTCs 流体芯片技术分析并鉴定 CTCs 是近年来得到迅猛发展的一项新型分子诊断技术,具有速度快、灵敏度高、显著特点,同时能更好地保持 CTCs 的体外生物活性。该方法可将大约 8 万个涂有 EpCAM 抗体的微阵列柱分布在标准载玻片上,经乙二胺四乙酸处理的肿瘤患者外周血样品通过摇动混匀装置混合后可通过气动泵输入芯片,以此提高捕获效率。使用抗 CK、4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)和 CD45 进行免疫荧光标记,并将 CK 阳性、DAPI 阳性和 CD45 阴性的细胞视为 CTCs,可实现 CTCs 的原位定性及定量检测。目前,该方法仍处于科学研究阶段,随着技术的改良与发展,将逐渐走向临床,为肿瘤的精准诊疗提供重要的技术支撑。

2.4 基于上皮细胞免疫斑点技术分析并鉴定 CTCs 上皮细胞免疫斑点技术是一种基于抗原抗体反应的方法,用于定量检测具有生物活性的 CTCs。该方法的原理是利用富集的 CTCs 在培养基中分泌特定蛋白质,再使用荧光标记的分泌蛋白抗体,与 CTCs

进行孵育以使抗体与蛋白质特异性结合,最后通过荧光显微镜观察,每个着色的斑点就代表一个 CTC,该方法具有高特异度和高稳定性的显著特点,但易受主观因素的影响^[29]。

2.5 基于免疫荧光染色技术分析并鉴定 CTCs 免疫荧光染色技术固定富集的细胞后,用抗 CD45、角蛋白荧光抗体和 DAPI 荧光染料染色细胞,并用荧光显微镜进行分析。这也是目前最常用的方法。CellSearch 是 2004 年第一批被美国 FDA 批准用于临床 CTCs 的检测方法。CellSearch 系统理论上适用于检测所有上皮来源的恶性肿瘤,但是实际上它并不适用于 HCC 的 CTCs 富集。HCC 是一种起源于肝细胞的上皮恶性肿瘤,但 EpCAM 表达水平较低(约 35%),而且,EpCAM 也被认为是癌症干细胞标志物,而不是 HCC 的通用标志物^[30]。

2.6 基于荧光原位杂交技术分析并鉴定 CTCs 荧光原位杂交技术是 20 世纪 80 年代在放射性原位杂交技术基础上发展起来的一种非放射性分子生物学和细胞遗传学结合的新技术,是以荧光标记取代同位素标记而形成的一种新的原位杂交方法。该方法不仅可以检测 CTCs 的表面和内部标志物,还可以检测到细胞的核型。将异倍体阳性、表面 EpCAM 阳性和 DAPI 阳性的细胞视为 CTCs。通过荧光原位杂交技术可检测到前列腺癌患者 CTCs 中 AR、PTEN 和 TMPRSS2-ERG 等基因表达的变化,揭示 CTC 表面标志物和组织活检之间的高度一致性。荧光原位杂交技术可用于 CellSearch 免疫磁珠富集和分离后的 CTCs 中 AR 和 MYC 状态的测定。

上述方法均可用于 CTCs 的分析和鉴定,但目前仍没有一种方法可以兼具高效、高特异度和高灵敏度的特点,鉴定出不同肿瘤类型患者不同分期的 CTCs。CTCs 的分析鉴定技术具有各自的优缺点,见表 2。

表 2 CTCs 分析鉴定技术对比分析

分析鉴定技术	优点	缺点
荧光原位杂交技术	高特异度、高灵敏度、高稳定性	效率低、易受其他因素干扰
流式细胞技术	速度快、高通量	低灵敏度、高成本
免疫荧光技术	速度快、高灵敏度、细胞形态完整	异质性强、易受主观因素影响
流体芯片技术	速度快、高灵敏度、细胞功能完整	高成本
PCR 技术	高灵敏度、方便快捷	实验条件要求高、易污染、易假阳性
上皮细胞免疫斑点技术	高特异度、高稳定性	效率低、易受主观因素影响

3 CTCs 在肝癌精准诊疗中的应用

随着液体活检技术特别是 CTCs 的分离富集和分析鉴定技术的日趋成熟,CTCs 的阳性率、数量与分子特征在肝癌的早筛早诊、预后判断、疗效评估及精准治疗等方面取得了一些进展。

3.1 早筛早诊 目前,用于肝癌早筛和早诊的方法

多为血清学肿瘤标志物[甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)或癌抗原 19-9(CA19-9)]或影像学检查(超声或 CT),其确诊的“金标准”仍是病理组织活检技术。但肿瘤标志物检测特异度较低,影像学检查也只能鉴定出大于 1 cm 的肿瘤病灶,同时,人体器官的蠕动及病变位置的隐蔽性等因素都会影响检测的准确性。

肝癌组织活检取材部位和时机及肿瘤的异质性等因素也会影响其早期诊断。CTCs 的数量和表型对肝癌的早期筛查和诊断具有重要的意义,CTCs 的数量与标准的巴塞罗那(BCLC)分期及血清肿瘤标志物 AFP 水平间存在显著的正相关性^[31]。有研究发现,即使血清肿瘤标志物 AFP 阴性的早期肝癌患者也会检测到 CTCs^[32]。近年来有学者利用 CTCs 结合数学建模的方法来提高肝癌的早期筛查和诊断^[33]。CTCs 的阳性率、数量与分子特征还可用于指导肝癌的 TNM 分期,肝癌患者的外周血液系统 CTCs 阳性率和数量与 TNM 的分期呈高度相关性^[34]。

3.2 预后判断 早在 2004 年就有研究发现,CTCs 的阳性率、数量与分子特征与肝癌的复发转移、预后判断呈显著相关性。XU 等^[35]学者研究发现,85 例肝癌患者中有 69 例(81%)患者每 5 毫升外周血中含 19~24 个 CTCs,其阳性率和数量与肝癌的大小、门静脉癌栓、分化状态和疾病进程呈高度相关性。近年来有研究显示,可利用干细胞表型(间充质表型)和 EpCAM 阳性的 CTCs 作为肝癌早期复发转移的判断依据和治疗靶点^[36-37]。OKAJIMA 等^[38]学者发现,通过检测 CTCs 的 GPC-3 基因 RNA 表达情况可作为肝癌是否发生早期复发转移的重要依据。肝癌患者外周血液系统 CTCs 的数量与患者预后具有显著的相关性,CTCs 数量越多,肝癌患者手术后肿瘤复发风险较高,预后越差,平均生存期越短,患者生产率较低^[39]。

3.3 疗效评估 CTCs 的阳性率、数量与分子特征可用于肝癌患者的疗效评估和判断。有研究显示,肝癌切除手术或移植患者,其手术后 CTCs 的数量与肝癌的手术疗效呈显著相关性^[40-41]。CTCs 的阳性率和数量还与肝癌患者手术后的总生存期、无病生存期具有显著的相关性,其数量越多,则生存期越短。因此,CTCs 的阳性率和数量可作为肝癌患者术后疗效评估和判断的重要参考指标。

3.4 精准治疗 研究显示,体外分离培养获得的肝癌 CTCs 可用于化疗药物灵敏度的检测,且具有肝癌干细胞特性的 CTCs 可表达 ABCG2 等耐药蛋白从而导致肝癌患者术后放化疗不灵敏^[42-43];CTCs 的亚型可以作为肝癌患者分子分型的重要补充,可为肝癌的精准治疗提供参考,上皮源性的肝癌患者一般预后较差,而携带 pERK⁺/pAkt⁻的 CTCs 的肝癌患者对索拉非尼比较灵敏,具有良好的预后;同时也可作为预后良好的独立因素。因此,肝癌患者 CTCs 可作为其精准检测、精准诊断和精准治疗的重要标志物,CTCs 的阳性率、数量与分子特征可为肝癌患者选择最佳的治疗方式提供重要的参考依据。

4 展 望

综上所述,作为近年来迅猛发展的“液态活检”技术之一,CTCs 的分离与鉴定技术具有快速、简便、无

创、实时的显著特征,同时还可克服肿瘤的异质性。最新研究发现,成簇 CTCs 的 DNA 甲基化可作为肿瘤转移播种的“种子”,该研究通过对肿瘤患者 CTCs 的全基因组甲基化分析发现,CTCs 的聚集可导致 NANOG、OCT4、SOX2 和 SIN3A 等调控细胞干性、增殖基因的低甲基化及 Polycomb 基因的高甲基化,成簇 CTCs 的甲基化常常预示预后不良^[44]。已获 FDA 批准用于成簇 CTCs 解离的化合物可显著减少肿瘤的扩散和转移,CTCs 可作为肝癌精准治疗的新靶点。LI 等^[45]学者研究发现,表达 Twist 和 Vimentin 的 CTCs 与门静脉癌栓的形成具有显著相关性,并且,通过检测 CTCs 中的 Twist 和 Vimentin 可以准确预测肝癌的复发与转移^[46]。

虽然国内外学者在肝癌“液态活检”技术领域开展了基于 CTCs 和 ctDNA 的大量临床研究,如美国国立卫生研究院资助的临床研究项目(NCT02973204),但目前在 CTCs 的临床推广和应用方面还存在一些瓶颈和困难,多处于科学研究阶段,原因如下。(1)由于肿瘤细胞的异质性,目前仍没有一种分离鉴定的方法可将所有肿瘤患者外周血液循环系统中的 CTCs 筛选出来。(2)由于肿瘤患者外周血液循环系统中的 CTCs 半衰期较短,对血液标本的采集时间和周期要求较高,会导致假阴性结果的产生,继而影响疾病的诊断和治疗。(3)由于肿瘤细胞易获得间充质干细胞特征发生上皮-间质转化,导致 EpCAM 丢失,产生更大的侵袭性和转移能力,促进肿瘤的复发和转移,将导致基于 EpCAM 的 CTCs 分离鉴定技术产生假阴性。

即使基于 CTCs 的“液态活检”技术还存在不少局限和瓶颈,但是随着新的肿瘤标志物的发现及分子诊断技术的变革,CTCs 的分离鉴定技术在肝癌的精准诊疗中将逐渐扮演重要的角色。CTCs 的分离鉴定一是需要进行多中心、大样本、大周期的临床基础与应用基础研究,获取 CTCs 相关的生物学特征和信息。二是需要整合多种分离鉴定技术和方法,基于肿瘤异质性的特点,单一分离鉴定方法不能作为肿瘤早期筛查或诊断的常规方法。三是需要对现有的分离鉴定技术和方法进行标准化,目前 CTCs 的分离鉴定技术和方法存在种类繁多、操作步骤繁简不一、实验干扰因素较多、结果解读标准不统一等缺点,急需制订相对统一的实验操作规范和结果解读标准;以期临床肝癌患者的个体化诊疗提供坚实可靠的保障。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAAD P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence

- and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(3):394-424.
- [3] ARZUMANYAN A, REIS H M, FEITELSON M A. Pathogenic mechanisms in HBV and HCV- associated hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Cancer* 2013, 13(2):123-135.
- [4] KULIK L, EL-SERAG H B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2018, 156(2):35165.
- [5] DAI W C, CHEUNG T T. Strategic overview on the best treatment option for intrahepatic hepatocellular carcinoma recurrence[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2016, 16(10):1063-1072.
- [6] SEO S I, KIM H S, KIM W J, et al. Diagnostic value of PIVKA-II and alpha-fetoprotein in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(13):3928-3935.
- [7] JOSÉ MARRUGO-R, MÓNICA M, JOSEP S. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: a promising non-invasive alternative to tissue biopsy [J]. *J Mol Sci*, 2018, 19(10):2877.
- [8] ZHANG J, CHEN K, FAN Z H. Circulating tumor cell Isolation and analysis[J]. *Adv Clin Chem*, 2016, 75(1):1-31.
- [9] ACETO N, BARDIA A, MIYAMOTO D T, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis [J]. *Cell*, 2014, 158(5):1110-1122.
- [10] KHOO B L, GRENCI G, JING T, et al. Liquid biopsy and therapeutic response: circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment [J]. *Sci Adv*, 2016, 2(7):e1600274.
- [11] MIYAMOTO D T, TING D T, TONER M, et al. Single-cell analysis of circulating tumor cells as a window into tumor heterogeneity [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2016, 81(2):269-274.
- [12] WANG Z, LUO L, CHENG Y, et al. Correlation between postoperative early recurrence of hepatocellular carcinoma and mesenchymal circulating tumor cells in peripheral blood [J]. *J Gastrointest Surg*, 2018, 22(4):633-639.
- [13] 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.
- [14] GUO W, SUN Y F, SHEN M N, et al. Circulating tumor cells with stem-like phenotypes for diagnosis, prognosis, and therapeutic response evaluation in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(9):2203-2213.
- [15] VON FELDEN J, SCHULZE K, KRECH T, et al. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(52):89978-89987.
- [16] KULASINGHE A, KAPELERIS J, KIMBERLEY R, et al. The prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck and non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(12):5910-5919.
- [17] SHEN Z, WU A, CHEN X. Current detection technologies for circulating tumor cells [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(8):2038-2056.
- [18] CHAUSOVSKY G, LUCHANSKY M, FIGER A, et al. Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach and lung [J]. *Cancer*, 2015, 86(11):2398-2405.
- [19] MATEO J, GERLINGER M, RODRIGUES D N, et al. The promise of circulating tumor cell analysis in cancer management [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(8):1-10.
- [20] CARR B I. Some new approaches to the management of hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4):369-373.
- [21] MORRIS K L, TUGWOOD J D, KHOJA L, et al. Circulating biomarkers in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(2):323-332.
- [22] OKABE M, TOH U, IWAKUMA N, et al. Pretreatment and posttreatment evaluations of circulating tumor cells (CTC) in patients with metastatic breast cancer [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2015, 42(10):1237-1239.
- [23] 任慧子, 陈健, 丁世凯. EpCAM 联合 CK8 免疫磁珠制备及循环肿瘤细胞检测 [J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(4):1698-1700.
- [24] LI S, GAO Y, CHEN X, et al. Highly efficient isolation and release of circulating tumor cells based on size-dependent filtration and degradable ZnO nanorods substrate in a wedge-shaped microfluidic chip [J]. *Biomed Microdevices*, 2017, 19(4):93.
- [25] COURT C M, ANKENY J S, SHO S, et al. Reality of single circulating tumor cell sequencing for molecular diagnostics in pancreatic cancer [J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18(5):688-696.
- [26] WARKIANI M E, GUAN G, LUAN K B, et al. Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells [J]. *Lab Chip*, 2014, 14(1):128-137.
- [27] YANG C, ZOU K, ZHENG L, et al. Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells detected by RT-PCR in non-metastatic colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):725.
- [28] WANG N, SHI L, LI H, et al. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(2):561-569.
- [29] RAMIREZ J M, FEHM T, ORSINI M, et al. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(1):214-221.
- [30] KIM M J, CHOI N Y, LEE E K, et al. Identification of novel markers that outperform EpCAM in quantifying

- circulating tumor cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2014, 37(4):235-243.
- [31] MANDAIR D, VESELY C, ENSELL L. A comparison of Cell Collector with Cell Search in patients with neuroendocrine tumours[J]. Endocr Relat Cancer, 2016, 23(1): 29-32.
- [32] LUSTBERG M B, BALASUBRAMANIAN P, MILLER B, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(2): R23.
- [33] MYUNG J H, PARK S J, WANG A Z. Integration of biomimicry and nanotechnology for significantly improved detection of circulating tumor cells (CTCs) [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018(1): 36-47.
- [34] WANG S, ZHANG C, WANG G, et al. Aptamer-mediated transparent-biocompatible nanostructured surfaces for hepatocellular circulating tumor cells enrichment[J]. Theranostics, 2016, 6(11): 1877-1886.
- [35] XU W, CAO L, CHEN L. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(11): 3783-3793.
- [36] KALINICH M, BHAN I, KWAN T T. An RNA-based signature enables high specificity detection of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(5): 1123-1128.
- [37] LIU Z, GUO W, ZHANG D. Circulating tumor cell detection in hepatocellular carcinoma based on karyoplasmic ratios using imaging flow cytometry[J]. Sci Rep, 2016, 6: 39808.
- [38] OKAJIMA W, KOMATSU S, ICHIKAWA D, et al. Liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and cell-free nucleic acids[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(31): 5650-5668.
- [39] STEBBING J, HARDING V, URCH C E. The prognostic role of circulating tumor cells in heavily pretreated individuals with a low life expectancy[J]. FUTURE ONCOLOGY, 2014, 10(16): 2555-2560.
- [40] SUN Y F, XU Y, YANG X R. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1458-1468.
- [41] SCHULZE K, GASCH C, STAUFER K, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2013, 133(9): 2165-2171.
- [42] LI J, SHI L, ZHANG X, et al. pERK/pAkt phenotyping in circulating tumor cells as a biomarker for sorafenib efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(3): 2646-2659.
- [43] ZHANG Y, ZHANG X, ZHANG J, et al. Microfluidic chip for isolation of viable circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma for their culture and drug sensitivity assay[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(11): 1177-1187.
- [44] GKOUNTELA S, CASTRO-GINER F, MARIA SZCZERBA B. Circulating tumor cell clustering shapes DNA methylation to enable metastasis seeding[J]. Cell, 2019, 176(1/2): 98-112.
- [45] LI Y M, XU S C, LI J, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease[J]. Cell Death & Disease, 2013, 4: e831.
- [46] CHEN J, CAO S, CAI Z. Epithelial-mesenchymal transition phenotypes of circulating tumor cells correlate with the clinical stages and cancer metastasis in hepatocellular carcinoma patients[J]. Cancer Biomarkers, 2017, 20(3): 487-498.

(收稿日期: 2019-10-19 修回日期: 2020-01-29)

甲状腺癌分子标志物研究进展*

罗莎¹, 唐万燕², 李伟², 刘虹², 刘一秀², 张娜², 易琳²综述, 林昌海^{2△}审校

(1. 陆军军医大学第一附属医院检验科, 重庆 400038; 2. 重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所, 重庆 400030)

摘要:近年来检出的甲状腺结节患者越来越多, 多数甲状腺结节是良性的, 可以采取保守治疗, 但有 5%~10% 的甲状腺结节是恶性的, 需要早期手术治疗, 才能获得良好的预后。但是一般良、恶性结节的症状和体征无明显区别, 极易误诊。目前甲状腺细针穿刺抽吸检查在一定程度上可以提高甲状腺癌诊断的准确性, 但仍有部分不能明确诊断, 存在一定的局限性。近年的研究发现大部分甲状腺癌存在一种或几种基因上的异常, 而这些基因异常可作为潜在的标志物应用于甲状腺的诊断, 也可以对患者的预后进行预测, 还可以当作治疗靶点, 对临床具有重要意义。本文主要对甲状腺癌新的潜在分子标志物研究进展展开综述。

* 基金项目: 重庆市科委科研院所绩效激励引导专项 (cstc2017jxjl130026、cstc2017jxjl130047); 重庆市教委科学技术研究项目 (KJQN201800111)。

△ 通信作者, E-mail: 303161477@qq.com。

本文引用格式: 罗莎, 唐万燕, 李伟, 等. 甲状腺癌分子标志物研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(9): 1122-1126.