

The Research Progress of Circulating Tumor Cell Detection and Clinical Application

Shiwi Xu¹, Dong Yin²

¹Bengbu Medical College, Bengbu Anhui

²Jiaying First Hospital, Jiangxi Anhui

Email: 616983656@qq.com

Received: Nov. 30th, 2018; accepted: Dec. 14th, 2018; published: Dec. 21st, 2018

Abstract

With more and more individualized and precise diagnosis and treatment of tumors, the detection technology of circulating tumor cells has great application value for prognosis assessment, guiding treatment and medication, and studying biological characteristics of tumors, due to its small trauma and high repeatability. However, due to the low content of circulating tumor cells in peripheral blood, low detection rate and high detection cost, the development of detection technology has been limited. This paper reviews the current methods of detecting circulating tumor cells, hoping to inspire us to explore more efficient methods.

Keywords

Circulating Tumor Cell, Colorectal Cancer, Detection Technology, Review

循环肿瘤细胞检测方法以及临床应用的研究进展

徐士伟, 尹 东

¹蚌埠医学院, 安徽 蚌埠

²嘉兴市第一医院, 安徽 嘉兴

Email: 616983656@qq.com

收稿日期: 2018年11月30日; 录用日期: 2018年12月14日; 发布日期: 2018年12月21日

摘 要

随着肿瘤诊疗越来越个体化、精准化, 循环肿瘤细胞检测技术由于其创伤小、可重复性高, 对肿瘤预后

评估、指导治疗用药、研究肿瘤生物学特性等方面存在着巨大的应用价值。然而, 由于循环肿瘤细胞在外周血中含量少、检出率低, 且检测成本高, 从而限制了检测技术的发展。本篇文章对现有多种循环肿瘤细胞检测方法进行综述, 希望能对探索更高效的检测方式有所启发。

关键词

循环肿瘤细胞, 结直肠癌, 检测技术, 综述

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1869年澳洲医生在外周血中发现一种血细胞与尸检得到的肿瘤细胞相似, 并命名为循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC) [1]。CTC是由肿瘤组织脱落并进入血液循环的肿瘤细胞。通过现有的生物学技术可以对血液中的CTC进行分离计数, 并指导肿瘤的临床诊疗工作。由于血液中的CTC可以实时、动态地反应出肿瘤发展进程以及治疗效果, 因此, 与单一部位的组织学病理检查相比, 检测CTC所获得的信息更及时、全面[2], 对完善当前临床肿瘤检查体系有着重大意义。然而, 由于CTC在外周血中稀少, 大约每107个白细胞中有一个[3]。同时, 肿瘤细胞具有异质性且常常在血液内簇集成团。这些因素都使CTC分离计数的难度增大, 成为CTC检测技术发展的阻碍。近年来, 随着生物学技术的飞速发展, 各种新型检测方法脱颖而出, 看似为CTC检测的发展带来曙光。但目前仅有cellsearch系统被美国FDA批准上市, 并成为一种标准检测方案[4]。该检测方案需7.5 ml外周血, 在57%前列腺癌、37%乳腺癌、30%结肠癌患者样本中检出 ≥ 2 个CTC, 而健康志愿者和非恶性肿瘤患者样本几乎没有这种现象[5]。

2. 富集策略概述

由于CTC在外周血中的含量低, 检测CTC时首先需要将其从血液中分离提纯, 便于进行下一步操作, 此步骤称为CTC的富集。尽管少数CTC检测技术可跳过血液样本的富集阶段直接对CTC进行识别, 但当前包括cellsearch等绝大多数检测方法均是基于各种不同的富集策略完成CTC检测的。

2.1. 物理富集法

根据CTC与血细胞的细胞密度、体积大小、细胞刚性以及电性能等物理性质方面的差异可以从外周血中进行CTC富集, 其中最常用的有根据CTC密度低于血细胞而使用的密度梯度离心法与根据CTC直径大于血细胞而使用的膜滤过分离法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET) [6]。此外, 由于CTC具有更大的细胞总表面积, 导致CTC的膜电容较高, 有学者通过双向电泳法分离CTC [7]。也有学者发现CTC具有更高的质核比, 通过筛选具有高质核比特征的细胞进行CTC富集[8]。基于物理性质的富集方法的优点是操作简便、价格低、对CTC活性影响小以及便于进行下游分析。同时, 由于物理富集法无需抗体标记细胞, 可以避免只分离带有特定免疫标识的CTC, 从而使得到的CTC种类更全面。但是, 对于一些物理特性与血细胞相似的CTC难以达到分离效果, 且由于没有特异的肿瘤学标志物, 虽然避免了遗漏, 却导致分离得到的CTC不纯, 计数难度大。

2.2. 免疫富集法

基于抗体-抗原特异性结合这一原理分离捕获 CTC, 是目前最常见也是最有效的富集方法。该方法依赖 CTC 表面的特异性抗原, 通过抗体包被的“介质”直接或者间接的捕获肿瘤细胞。根据分离方向的不同又可分为阳性分离和阴性分离。阳性分离也称正向分离, 是一种以直接捕获 CTC 为目标的分离方案。阴性分离也称为负向分离, 是一种通过优先去除血液中非 CTC 的血细胞, 从而间接获取 CTC 的分离方案。在实际操作中, 阳性分离和阴性分离可联合使用从而提高检出率。大多数 CTC 具有明显的上皮细胞特性并表达上皮细胞粘附蛋白(EpCAM), 利用 EpCAM 抗体可将 CTC 从细胞群中分离出来, 实现 CTC 的阳性分离。而利用白细胞表面标志抗原 CD45 可将白细胞从血液中分离并去除, 实现 CTC 的阴性分离 [9]。大多数免疫富集都是基于以上方法进行操作。但是, 由于肿瘤细胞缺少 100%特异性的抗体, 并不是所有肿瘤细胞都表达某种特异性抗原, 这就限制了该方法在实际样本中的应用。

3. 检测识别技术及临床应用

基于以上的富集策略发展出了许多检测方法和实验室技术。但到目前为止, 仍然没有一种完全成熟的 CTC 检测方案。此外, 富集捕获得到的 CTC 需要进行识别确认, 现阶段对 CTC 的识别定义为逻辑定义, EpCAM +/CK +/CD45-表型是用来识别 CTC 最常用的表型。

3.1. 抗体 - 抗原检测

免疫磁珠分离法(immunomagnetic beads separation, IMS)是将 EpCAM 抗体锚嵌在磁珠上 [10], 待磁珠与 CTC 充分结合后, 通过外加磁场牵拉磁珠并间接捕获 CTC, 这是应用最多的一种检测方法。Cell collector 装置通过将一根表面排满 EpCAM 抗体的医用导丝置入人体静脉, 在静脉血中直接采集 CTC, 在 24 例癌症患者中, 共有 22 例被导丝成功捕获到 CTC [11]。利用抗体-抗原结合得到的 CTC 具有较高的纯度, 但富集到的 CTC 大多数失去细胞活性, 难以进行下游分析。同时, 由于肿瘤细胞的上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)现象, 可导致肿瘤细胞原有的上皮特性消失 [12]。因此, 有学者通过其他特异标记(如生存蛋白, PSMA, HER2 等)以检测 CTC [13] [14] [15], 但目前均未达到理想效果。

3.2. CTC 芯片技术

通过在硅片上排列抗体或设置弯道凹槽可制成 CTC 芯片, 该芯片可同时利用肿瘤细胞的生物学特性和物理特性进行细胞捕获。一张芯片上最多可以微距排列 78,000 多个包被 EpCAM 抗体的位点, 当血液样本在流过硅片时捕获其中的 CTC [16]。同时, 通过在芯片内部添加弯道型的小室流动槽, 增加了样品与抗体的混合时间, 可将捕获率提高 26.3% [17]。近期发明的 CTC-ichip 根据细胞的体积大小洗脱血细胞, 再通过磁场作用筛选出被免疫磁珠标记的 CTC [18], 这种方法也是将两种富集策略联用来提高检出率。值得一提的是, Toner 发明 cluster-chip 可依靠芯片通道的尺寸检测出血液中的 CTC 细胞群 [19]。芯片技术操作方便、效率高, 芯片体积小, 但由于芯片造价高昂, 限制了临床推广。

3.3. 直接显像识别法

经富集捕获后的细胞需要验证和识别身份, 符合 DAPI+/CK+/CD45-表型方可定义为 CTC。尽管经过富集后需要观察的细胞总数大量减少, 但样本成像与辨析仍然是十分耗时的工作。Cell search 使用的微流细胞集中器(microfluidic, cell concentrator, MCC) [20]通过将样本集中在更小的观测区域, 从而缩短了识别时间。而 Imagestream 通过将传统的流式细胞技术与荧光显像结合进行细胞分析 [21], 在实验中得到的计数结果与 Cellsearch 系统并无统计学上的差异 [22]。尽管如此, 大多数的 CTC 识别仍是建立在样本富集的基础之上。然而, 由于一些具有高速、多参数特征的荧光显像方法有着更高的分辨率, 无需富集便

可直接对样本进行 CTC 识别。如 Epic Sciences 技术通过将样本细胞单层排布在玻璃片上, 使用电脑算法配合高分辨率显像来检测 CTC。有核细胞被上样到专门的显微镜玻片上。每块玻片大约含有 300 万个有核细胞, 相当于 0.5 mL 血液。利用 CTC 基础检测对玻片进行染色, 它包含细胞角蛋白和 CD45 的抗体, DAPI 以及一个或两个鉴定抗体。随后在荧光显微镜下扫描整块玻片。该方法在 66 例非小细胞肺癌患者中, 共检出了 45 例 CTC 阳性患者[23]。无需富集 CTC 的检测技术还有 Fastcell 和 CytoTrack。前者依靠光纤阵列扫描技术(fiber-optic array scanning technology, FAST), 通过紧密排布的光纤组合成观察范围更广的观察孔, 从而拥有更大的观察视野[24]。而后者则通过制作拥有更大观察区域的标本盘(Cytodisc), 使其最高可单层排布 1 亿个细胞, 在标本盘高速旋转状态下使用激光进行连续扫描鉴别[25]。但目前尚缺乏大型临床研究以明确以上两种技术的实用性。

4. 结语

尽管分子生物学及临床研究显示肿瘤的转移很可能在肿瘤发生的早期便已经开始[26]。然而直到今天, 包括影像学、血清肿瘤标志物在内的监测方法对于肿瘤的早期评估并不理想。因此, 通过 CTC 检测直接捕获到正在转移中的肿瘤细胞, 对及时发现肿瘤的早期转移并引导其个体化治疗有着重要的意义。然而, CTC 低含量和异质性仍限制当前 CTC 检测技术的发展。聚集成团的 CTC 转移潜能更高, 但检测难度更大。因此, 如何提高 CTC 集群的检出率也是当前 CTC 检测技术需要解决的问题。

芯片技术的发明使 CTC 的检出效率获得提升, 但目前尚未有相关大型临床研究的文献报道。此外, 包括芯片、Cellsearch 系统在内的检测装置均涉及到免疫识别, 其特异性标记通常为 EpCAM。虽然 CTC 的上皮特性使以 EpCAM 作为识别标识的检测方法达到捕获目的, 但这亦使一些上皮细胞被误检为 CTC。且由于肿瘤细胞的 EMT 现象, 上皮细胞表型的丢失可能让 CTC 检测结果出现假阴性, 因此, 未来寻找特异性更高的标志物也是 CTC 检测技术需要探索的一个方向。通过免疫方法得到的 CTC 是符合 EpCAM+、CD45-、CKs+表型模式的细胞, 并非完全是真正的循环肿瘤细胞, 其应用价值有待进一步的临床研究去证实。此外, 由于 CTC 检测费用高昂, 也成为其大规模临床应用的阻碍。通过革新技术降低检测成本, 对 CTC 检测在临床上的早日普及也将起到巨大的推动作用。目前, CTC 检测发展之路依然任重道远, 不过可以预见的是, CTC 检测作为可重复、非侵入性的检查手段, 在肿瘤的诊断、预后评估、个体化治疗中发挥了重要作用。随着检测技术的改进和新技术的研发, CTC 检测将会在临床肿瘤诊治工作中占据一席之地。

参考文献

- [1] Haber, D.A., Gray, N.S. and Baselga, J. (2011) The Evolving War on Cancer. *Cell*, **145**, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.026>
- [2] Krebs, M.G., Metcalf, R.L., Carter, L., Brady, G., Blackhall, F.H. and Dive, C. (2014) Molecular Analysis of Circulating Tumour Cells-Biology and Biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **11**, 129-144. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.253>
- [3] 郭玮, 孙云帆, 潘柏申, 等. 循环肿瘤细胞检测及临床应用价值[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2014, 82(3): 43-48.
- [4] Chen, F.F., Wang, S.Y., Fang, Y., et al. (2016) Feasibility of a Novel One-Stop ISET Device to Capture CTCs and Its Clinical Application. *Oncotarget*, **8**.
- [5] 余锋, 张好, 施乐华, 殷正丰. 循环肿瘤细胞检测的临床应用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(22): 2346-2349.
- [6] Gascoyne, P.R., Noshari, J., Anderson, T.J. and Becker, F.F. (2009) Isolation of Rare Cells from Cell Mixtures by Dielectrophoresis. *Electrophoresis*, **30**, 1388-1398. <https://doi.org/10.1002/elps.200800373>
- [7] Liu, Z.X., Guo, W.X., Zhang, D.D., et al. (2016) Circulating Tumor Cell Detection in Hepatocellular Carcinoma Based on Karyoplasmic Ratios Using Imaging Flow Cytometry. *Scientific Reports*, **6**, Article Number: 39808.

<https://doi.org/10.1038/srep39808>

- [8] Hyun, K.A., Lee, T.Y. and Jung, H.I. (2013) Negative Enrichment of Circulating Tumor Cells Using a Geometrically Activated Surface Interaction Chip. *Analytical Chemistry*, **85**, 4439-4445. <https://doi.org/10.1021/ac3037766>
- [9] 王东升, 张岩, 吕平, 朱晓辉, 张玲, 周芳, 高晓明. 抗体包被免疫磁珠的研制及其应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(3): 296-297.
- [10] Saucedo, Z.N., Mewes, S., Niestroj, R.A., *et al.* (2012) A Novel Method for the *in Vivo* Isolation of Circulating Tumor Cells from Peripheral Blood of Cancer Patients Using a Functionalized and Structured Medical Wire. *International Journal of Oacology*, **41**, 1241-1250.
- [11] Lowes Lori, E., Goodale, D., Xia, Y., *et al.* (2016) Epithelial-to-Mesenchymal Transition Leads to Disease-Stage Differences in Circulating Tumor Cell Detection and Metastasis in Pre-Clinical Models of Prostate Cancer. *Oncotarget*, **76**.
- [12] Ning, Y., Hanna Diana, L., Zhang, W., *et al.* (2015) Cytokeratin-20 and Survivin-Expressing Circulating Tumor Cells Predict Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients by a Combined Immunomagnetic qRT-PCR Approach. *Molecular Cancer Therapeutics*, **14**, 2401-2418. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0359>
- [13] Santana Steven, M., Liu, H., Bander Neil, H., *et al.* (2012) Immunocapture of Prostate Cancer Cells by Use of Anti-PSMA Antibodies in Microdevices. *Biomedical Microdevices*, **14**, 401-407. <https://doi.org/10.1007/s10544-011-9616-5>
- [14] Hyun Kyung, A., Lee, T.Y., Lee, S.H., *et al.* (2015) Two-Stage Microfluidic Chip for Selective Isolation of Circulating Tumor Cells (CTCs). *Biosensors and Bioelectronics*, **67**, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.019>
- [15] Nagrath, S., Sequist Lecia, V., Maheswaran, S., *et al.* (2007) Isolation of Rare Circulating Tumour Cells in Cancer Patients by Microchip Technology. *Nature*, **450**, 1235-1239. <https://doi.org/10.1038/nature06385>
- [16] Stott, S.L., *et al.* (2010) Isolation of Circulating Tumor Cells Using a Microvortex-Generating Herringbone-Chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **107**, 18392-18397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012539107>
- [17] Karabacak, N.M., Spuhler, P.S., Fachin, F., *et al.* (2014) Microfluidic, Marker-Free Isolation of Circulating Tumor Cells from Blood Samples. *Nature Protocols*, **9**, 694-710. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.044>
- [18] Fatih, S.A., Nicola, A., Nikola, K., *et al.* (2015) A Microfluidic Device for Label-Free, Physical Capture of Circulating Tumor Cell Clusters. *Nature Methods*, **12**, 685-691. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3404>
- [19] Casavant, B.P., Mosher, R., Warrick, J.W., *et al.* (2013) A Negative Selection Methodology Using a Microfluidic Platform for the Isolation and Enumeration of Circulating Tumor Cells. *Methods*, **64**, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.027>
- [20] Dent, B.M., Ogle, L.F., O'Donnell, R.L., *et al.* (2016) High-Resolution Imaging for the Detection and Characterisation of Circulating Tumour Cells from Patients with Oesophageal, Hepatocellular, Thyroid and Ovarian Cancers. *International Journal of Cancer*, **138**, 206-216. <https://doi.org/10.1002/ijc.29680>
- [21] López-Riquelme, N., Minguela, A., Villar-Permy, F., *et al.* (2013) Imaging Cytometry for Counting Circulating Tumor Cells: Comparative Analysis of the CellSearch vs. ImageStream Systems. *APMIS*, **121**, 1139-1143. <https://doi.org/10.1111/apm.12061>
- [22] Nieva, J., Wendel, M., Luttgren, M.S., *et al.* (2012) High-Definition Imaging of Circulating Tumor Cells and Associated Cellular Events in Non-Small Cell Lung Cancer Patients: A Longitudinal Analysis. *Physical Biology*, **9**, Article ID: 016004. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/9/1/016004>
- [23] Somlo, G., Lau, S.K., Frankel, P., *et al.* (2011) Multiple Biomarker Expression on Circulating Tumor Cells in Comparison to Tumor Tissues from Primary and Metastatic Sites in Patients with Locally Advanced/Inflammatory, and Stage IV Breast Cancer, Using a Novel Detection Technology. *Breast Cancer Research and Treatment*, **128**, 155-163. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1508-0>
- [24] Thore, H., Peer, H., Ann-Britt, N., *et al.* (2015) *In Vitro* Detection of Circulating Tumor Cells Compared by the CytoTrack and CellSearch Methods. *Tumor Biology*, **36**, 4597-4601. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3105-z>
- [25] Alix-Panabières, C. (2012) EPISPOT Assay: Detection of Viable DTCs/CTCs in Solid Tumor Patients. *Recent Results in Cancer Research*, **195**, 69-76. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28160-0_6
- [26] Nicola, A., Aditya, B., Miyamoto, D.T., *et al.* (2014) Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell*, **158**, 1110-1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8712，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org