

循环肿瘤细胞在结直肠癌中的应用

廖亮亮, 高永建, 宋德锋, 冯野*

吉林大学中日联谊医院, 吉林 长春

收稿日期: 2022年2月3日; 录用日期: 2022年2月26日; 发布日期: 2022年3月7日

摘要

具有高特异性和敏感性的新的诊断和预后生物标志物是目前管理结直肠癌患者的一个重要的需求。循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells, CTC)被认为是肿瘤复发的原因, 得益于分子生物学技术的发展, 其正在逐步应用于恶性肿瘤的临床诊疗中。它具有微创、可重复的优点, 可在结肠直肠癌患者的筛查和诊断、预测复发和转移、监测微小残留病和化疗耐药等方面发挥重要作用。尽管有这些优势, 但它并没有包括在临床指南中, 仍有一些实际问题需要解决。该文的目的是对已进行的临床试验进行总结, 进一步理解其在结直肠癌患者管理中的作用。

关键词

循环肿瘤细胞, 结直肠癌, 上皮细胞黏附分子

Application of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer

Liangliang Liao, Yongjian Gao, Defeng Song, Ye Feng*

China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun Jilin

Received: Feb. 3rd, 2022; accepted: Feb. 26th, 2022; published: Mar. 7th, 2022

Abstract

New diagnostic and prognostic biomarkers with high specificity and sensitivity are currently an important need in the management of patients with colorectal cancer. Circulating tumor cells (CTC) are considered to be the cause of tumor recurrence. Thanks to the development of molecular biology technology, CTC has been gradually applied in the clinical diagnosis and treatment of malignant tumors. It has the advantages of minimally invasive and repeatable, and can play an impor-

*通讯作者。

tant role in screening and diagnosis of colorectal cancer patients, predicting recurrence and metastasis, monitoring minimal residual disease and chemotherapy resistance. Despite these advantages, they are not included in clinical guidelines and there are practical issues that need to be addressed. The purpose of this article is to summarize the clinical trials that have been conducted and to further understand its role in the management of patients with colorectal cancer.

Keywords

Circulating Tumor Cells, Colorectal Cancer, Epithelial Adhesion Molecules

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 前言

尽管针对结直肠癌的各种治疗方法被不断地开发, 乃至今日其仍然是最致命的癌症之一。预后不良的主要原因是局部复发和转移。具有侵袭性的肿瘤细胞通过“努力”扩散进入外周血后称为循环肿瘤细胞(CTCs)。它的发生可能在出现任何临床症状之前就出现了, 但幸运地是可以通过血液样本中检测到它的存在。近年来, 众多团队试图寻找有效无创的生物标志物来提前预测直肠癌的复发和转移, 更好地判断预后, 以期实现提前进行加强干预或降级治疗来避免化疗毒性的损害。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)作为新兴的肿瘤特异性生物标志物, 在多种常见癌症的诊治及预后中已经显现出很好的潜力, 而 CTCs 在结直肠癌中的研究相对较少。因此, 为了更好地了解 CTCs 在 CRC 患者中的潜在的预后价值, 本文就 CTCs 在结直肠癌中的应用进行回顾和分析。

2. CTCs 的检测

CTC 的检测并非易事。首先其在外周血的浓度极低, 有研究显示在数百万到数十亿的血细胞中才有一个 CTC 存在[1]。其次, 一个理想的 CTC 检测方法必须能够在宏大的正常血细胞的背景下分离和检测出所有并不同质的 CTC 细胞。

正确的选择出 CTC 是进一步检测其特点的基础。早在 1998 年就有研究者报道了免疫亲和富集 CTC 的方法, 且其仍是迄今为止最广泛使用和唯一获得 FDA 批准的方法。该方法利用不同细胞表面表达不同的特定生物标志物(如 EpCAM 和 CD45)来捕获细胞。用于选择的抗体通常被锚定在设备表面或磁性物质上(即免疫磁捕获), 允许通过磁场捕获细胞。阳性选择意味着利用肿瘤细胞特异表达的抗原(如 EpCAM)直接选择出 CTCs; 相反, 阴性选择是指通过肿瘤细胞不表达的抗原(如 CD45)来去除背景细胞。然而, 到目前为止, CTCs 所表达的标记物的具有广泛的异质性, 使得我们无法确定一种通用的 CTCs 特异性抗原。

除了上述基于生物化学的选择方法外, 有些研究开发了基于生物物理学选择 CTC 的策略, 它是基于 CTC 和白细胞之间的大小、变形能力、生物电特征或密度存在差异。

CTC 被富集后, 鉴别所捕获细胞的方法通常基于高分辨率成像结合免疫细胞荧光染色。除此之外还有更为复杂的技术, 如下游高通量基因组、转录组或蛋白质组特征的分离细胞。例如 CellSearch 系统[2], 作为 FDA 唯一通过的 CTC 分离技术, 它通过抗体标记的磁性纳米颗粒来识别上皮细胞粘附分子(EpCAM)表达细胞, 并使用荧光显微镜检测细胞角蛋白, CK, DAPI, CD45, 将在血液中检测到的 EpCAM(+)/细

胞角蛋白(+)/CK(+)/DAPI(+)/CD45(-)的细胞定义为 CTCs。

一旦 CTC 被分离出来,它们就可以用于多种分析,如遗传、表观遗传、转录组、蛋白质组和表面细胞标记物或活细胞特性的鉴定。所有这些分析都有可能用于临床诊断,预后,复发预测或应用于治疗不同类型的实体癌症。

3. 生物标志物的种类

EpCAM 是细胞粘附分子(CAM)家族的一员,在 1979 年首次于结肠癌中发现。上皮细胞黏附分子(EpCAM)在正常上皮细胞中表达,在大多数(近 70%)原发性肿瘤中呈高表达。在结肠腺癌中,EpCAM 过表达率为超过 80%,EpCAM 可促进肿瘤增长且参与许多独立的通路[3]。它在 Wnt 信号通路的激活中发挥作用,而 Wnt 信号通路以其致癌作用而闻名。EpCAM 不仅通过与 Lrp6 的相互作用来激活 Wnt 信号通路。而且它下调了一些这种途径的抑制物的表达。EpCAM 也被认为通过与 β -catenin 相互作用[4],通过原癌基因如 c-Myc 或 Cyclin A 激活细胞增殖,从而促进肿瘤发生。

尽管有众多的研究将 CTC 作为结直肠癌定量的预后生物标志物(归功于 CellSearch 是一种基于 EpCAM 的 FDA 唯一批准的是 CTC 计数方法),然而,部分肿瘤细胞在转移扩散过程中会发生上皮-间充质转化(EMT),这会使其失去上皮性标记物(其中之一便是 EpCAM)。因此基于 EpCAM 的分离方法在发生 EMT 的肿瘤细胞的检测上具有明显的局限性[5]。

于是, Yokobori T 等人[6]选择了一种在 EMT 过程中不会丢失的标记物-Plastin3 (PLS3)来检测 CTC。他们发现 PLS3 阳性的 CTC 在 Dukes B、C 期结直肠癌患者中和预后之间的联系中尤为强烈。Sugimachi K 等[7]进一步发现 PLS3 实际上是 EMT 的促进因素,PLS3 通过转化生长因子(TGF)- β 信号通路诱导 EMT,导致 CRC 细胞获得侵袭能力。Armstrong A J 等[8]人发现 CTC 可同时表达上皮性和干细胞性标志物。他们认为在转移性患者中,高频率存在的上皮性、间充质性和干细胞性标记物共表达的 CTC,对 CTC 检测方法的应用和解释具有重要意义。Ning Y 等[9]将上皮性(CK20)和干细胞性(survivin)标志物联合应用发现,这一策略可以可靠地分离结直肠癌 CTC 且可以预测转移性 CRC 患者的临床结局。

新的标记物的发展集中在发现可能对预后有特殊影响的特异性 CTC 亚群。Zhao R 等[10]结合 CTC 计数和 EMT 状态预测疾病侵袭性。他们根据上皮细胞性和间充质细胞性标志物的表达鉴定出三种表型:上皮细胞 CTCs、双表型(上皮 + 间充质) CTCs 和间充质 CTCs。Spearman 秩相关分析发现 CTC 总数与临床分期($P < 0.001$)、淋巴结转移($P < 0.001$)及远处转移($P = 0.024$)均呈正相关。此外,双表型和间充质 CTCs 都与上述参数相关,而上皮细胞 CTCs 与之无关,表明间充质表型的 CTCs 更具有侵袭性和转移潜能。

4. CTC 对预后的影响

对于使用 CellSearch 系统的研究,在转移性 CRC 中,多个研究将每 7.5 mL 血液中大于或等于 3 个 CTC 作为阳性来确定“高 CTC”患者,“高 CTC”患者有较差的无进展生存期和总生存期。如 Matsusaka S 等[11]发现基线、2 周时和 8~12 周时 $CTC \geq 3$ 的患者的中位无进展生存期(分别为 8.5、7.3 和 1.9 个月)较 $CTC < 3$ 的患者(分别为 9.7、10.4 和 9.1 个月)短(log-rank 检验: $P = 0.047$, $P < 0.001$ 和 $P < 0.001$)。 $CTC \geq 3$ 的患者 2 周和 8~12 周的中位总生存期(分别为 10.2 和 4.1 个月)比 $CTC < 3$ 的患者(分别为 29.1 和 29.1 个月)短($P < 0.001$; $P = 0.001$)。Aggarwal C 等[12]及 Sastre J 等[13]的研究也发现了一致的结果。van Dalum G 等[14]发现术前有 CTC 的患者无复发生存期(RFS, log-rank 检验: $P = 0.014$)和结肠癌相关生存期(CCRS, $P = 0.002$)显著下降。术前有 CTC 的患者与无 CTC 的患者相比,5 年 RFS 从 75%下降到 61%,5 年 CCRS 从 83%下降到 69%。在多因素无复发生存分析中,CTC 存在和淋巴结转移阳性仍然是显著的影响因素。Coumans F A 等[15]报道 CTC 每增加 10 倍,转移性 CRC 患者的生存期减少 6.6 个月。Tsai W S 等[16]研

究发现外周血 CTC 计数与病情进展和 CRC 患者的不良预后有关: 分别采取健康人(27 例)、良性肿瘤(21 例)、非转移 CRC (95 例)和 mCRC (15 例)患者外周血 2 ml, 结果显示, CTC 计数平均分别为 0、1、5 到 36; 在对非转移性 CRC 患者进行 2 年随访后, CTCs ≥ 5 个的患者在根治性手术后一年内发生远处转移的可能性是 CTCs < 5 个的患者的 8 倍。

Krebs M G 等[17]的研究显示对于晚期 CRC 患者, 通过 CTC 计数分层确定了高 CTC 组可以从加强的 4 药化疗方案(奥沙利铂、伊立替康、替加氟尿嘧啶与亚叶酸钙和西妥昔单抗)中受益, 而低 CTC 组可选择 3 药化疗方案(与加强的 4 药化疗方案相比生存期无统计学差异), 避免其接受 4 药方案带来的高毒性损害。Aranda E 等[18]也进行了类似的临床研究发现, 一线使用 FOLFOXIRI (伊立替康、奥沙利铂、亚叶酸钙、氟尿嘧啶) + 贝伐单抗与 FOLFOX (奥沙利铂、亚叶酸钙、氟尿嘧啶) + 贝伐单抗相比显著改善了转移性结直肠癌和基线 CTCs ≥ 3 (表明预后较差)患者的 PFS, 认为 CTC 计数可能是一个有用的非侵入性生物标志物, 以协助选择患者进行强化一线治疗。

虽然 CTC 在 CRC 患者中的预后价值已被较多的报道, 但对于收集 CTC 的最佳采样时间尚无共识。正如 Fan T 等[19]建议的, 在基线时 CTC 的存在可作为肿瘤负荷的替代标志物, 似乎基线是最好的采样时间。而 Galizia G 等[20]则发现, 术后高 CTC 水平与肿瘤复发密切相关, 是预后不良的唯一独立预后因素。此外, Matsusaka S 等[11]发现, 在化疗开始后 2 周持续取得少于 3 个 CTC, 是当前治疗有效的有力指标, 特别是奥沙利铂, 似乎在化疗开始后 2 周收集 CTC 更好。

5. 局限性

目前, CTC 在常规诊断中的使用受到限制, 这主要是由于方法学上的限制, 例如 CTC 分离设备在检出率存在相当大的差异[21], 限制了它们作为监测工具的使用。CTC 用于检测早期结直肠癌相当困难且只有少数研究获得了并不满意的效果。因此, CTC 用于 CRC 筛查或早期检测中的临床可用性似乎很差[22]。

依赖于上皮细胞黏附分子(EpCAM)的 CellSearch 系统已于 2004 年获得美国食品和药物管理局(FDA)批准, 是包括 CRC 在内的不同癌症中 CTC 分离的“金标准”。然而, 只有维持上皮特征的 CTC 才能被 EpCAM 检测到, 其排除了具有间充质特征且侵袭性更强的那部分 CTC, 这意味着该检测方法可以检测到癌细胞, 但只能检测到可能没有侵袭、增殖和转移能力的细胞。

尽管在 CRC 中开展了大量的 CTC 的临床研究, 初步结果也很有希望, 但该方法在临床实践中的应用仍然非常有限。其原因主要为使用不同的检测方法进行 CTC 检测, 其结果不尽相同, 缺乏标准化的检测技术, 这阻碍了 CTC 检测在常规临床实践中的实施。研究者需要从 CTC 中找到覆盖任何阶段或癌症类型的通用特征, 从而提高检测方法的敏感性和特异性。

6. 总结

CTC 已成为人们研究的热点, 近年来出现了许多新的 CTC 检测技术, 使 CTC 从实验室到临床实践, 这些技术的发现是意义重大的。虽然只有少数系统可用于临床环境的常规使用, 但其众多的潜在价值定会促使研究者开发新的更加有利于标准化的检测系统。虽然 CTC 数量极少, 其检测具有挑战性, 但在转移性和非转移性癌症中都发现了 CTC, 它与疾病的分期、预后和生存密切相关。有必要开发更新、更便宜的 CTC 检测技术, 作为侵入性诊断和治疗监测的替代方法。

参考文献

- [1] Nelson, N.J. (2010) Circulating Tumor Cells: Will They Be Clinically Useful? *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **102**, 146-148. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq016>

- [2] Vasseur, A., Kiavue, N., Bidard, F.C., *et al.* (2021) Clinical Utility of Circulating Tumor Cells: An Update. *Molecular Oncology*, **15**, 1647-1666. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12869>
- [3] Huang, L., Yang, Y., Yang, F., *et al.* (2018) Functions of EpCAM in Physiological Processes and Diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, **42**, 1771-1785. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3764>
- [4] Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., *et al.* (2009) Nuclear Signalling by Tumour-Associated Antigen EpCAM. *Nature Cell Biology*, **11**, 162-171. <https://doi.org/10.1038/ncb1824>
- [5] Gorges, T.M., Tinhofer, I., Drosch, M., *et al.* (2012) Circulating Tumour Cells Escape from EpCAM-Based Detection Due to Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *BMC Cancer*, **12**, Article No. 178. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-178>
- [6] Yokobori, T., Iinuma, H., Shimamura, T., *et al.* (2013) Plastin3 Is a Novel Marker for Circulating Tumor Cells Undergoing the Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Associated with Colorectal Cancer Prognosis. *Cancer Research*, **73**, 2059-2069. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0326>
- [7] Sugimachi, K., Yokobori, T., Iinuma, H., *et al.* (2014) Aberrant Expression of Plastin-3 via Copy Number Gain Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in Circulating Colorectal Cancer Cells. *Annals of Surgical Oncology*, **21**, 3680-3690. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3366-y>
- [8] Armstrong, A.J., Marengo, M.S., Oltean, S., *et al.* (2011) Circulating Tumor Cells from Patients with Advanced Prostate and Breast Cancer Display Both Epithelial and Mesenchymal Markers. *Molecular Cancer Research*, **9**, 997-1007. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0490>
- [9] Ning, Y., Hanna, D.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**, 2401-2408. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0359>
- [10] Zhao, R., Cai, Z., Li, S., *et al.* (2017) Expression and Clinical Relevance of Epithelial and Mesenchymal Markers in Circulating Tumor Cells from Colorectal Cancer. *Oncotarget*, **8**, 9293-9302. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14065>
- [11] Matsusaka, S., Suenaga, M., Mishima, Y., *et al.* (2011) Circulating Tumor Cells as a Surrogate Marker for Determining Response to Chemotherapy in Japanese Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Science*, **102**, 1188-1192. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01926.x>
- [12] Aggarwal, C., Meropol, N.J., Punt, C.J., *et al.* (2013) Relationship among Circulating Tumor Cells, CEA and Overall Survival in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Annals of Oncology*, **24**, 420-428. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds336>
- [13] Sastre, J., Vidaurreta, M., Gómez, A., *et al.* (2013) Prognostic Value of the Combination of Circulating Tumor Cells Plus KRAS in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Chemotherapy Plus Bevacizumab. *Clinical Colorectal Cancer*, **12**, 280-286. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2013.06.001>
- [14] van Dalum, G., Stam, G.J., Scholten, L.F., *et al.* (2015) Importance of Circulating Tumor Cells in Newly Diagnosed Colorectal Cancer. *International Journal of Oncology*, **46**, 1361-1368. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2824>
- [15] Coumans, F.A., Ligthart, S.T., Uhr, J.W., *et al.* (2012) Challenges in the Enumeration and Phenotyping of CTC. *Clinical Cancer Research*, **18**, 5711-5718. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1585>
- [16] Tsai, W.S., Chen, J.S., Shao, H.J., *et al.* (2016) Circulating Tumor Cell Count Correlates with Colorectal Neoplasm Progression and Is a Prognostic Marker for Distant Metastasis in Non-Metastatic Patients. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 24517. <https://doi.org/10.1038/srep24517>
- [17] Krebs, M.G., Renehan, A.G., Backen, A., *et al.* (2015) Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, **14**, 115-122.
- [18] Aranda, E., Viéitez, J.M., Gómez-España, A., *et al.* (2020) FOLFOXIRI Plus Bevacizumab versus FOLFOX Plus Bevacizumab for Patients with Metastatic Colorectal Cancer and ≥ 3 Circulating Tumour Cells: The Randomised Phase III VISNÚ-1 Trial. *ESMO Open*, **5**, e944.
- [19] Fan, T., Zhao, Q., Chen, J.J., *et al.* (2009) Clinical Significance of Circulating Tumor Cells Detected by an Invasion assay in Peripheral Blood of Patients with Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology*, **112**, 185-191.
- [20] Galizia, G., Gemei, M., Orditura, M., *et al.* (2013) Postoperative Detection of Circulating Tumor Cells Predicts Tumor Recurrence in Colorectal Cancer Patients. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, **17**, 1809-1818. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2258-6>
- [21] Mamdouhi, T., Twomey, J.D., McSweeney, K.M., *et al.* (2019) Fugitives on the Run: Circulating Tumor Cells (CTCs) in Metastatic Diseases. *Cancer and Metastasis Reviews*, **38**, 297-305. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09795-4>
- [22] Marcuello, M., Vymetalkova, V., Neves, R., *et al.* (2019) Circulating Biomarkers for Early Detection and Clinical Management of Colorectal Cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, **69**, 107-122. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.002>