

· 综 述 ·

循环肿瘤细胞检测在晚期肿瘤患者维持治疗中的应用

连洁, 杨宇*

(哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤内科, 哈尔滨 150001)

【摘要】 循环肿瘤细胞(CTC)检测敏感性和特异性较高,且创伤小、取材方便,具有可重复性,其在肿瘤早期诊断、临床分期、指导治疗及预测预后等方面的优势已得到临床认可,但 CTC 作为维持治疗疗效判定指征的意义尚未明确。本文针对 CTC 提取分离、检测方法、临床应用以及维持治疗期间检测的意义予以综述。

【关键词】 维持治疗;循环肿瘤细胞;晚期肿瘤

【中图分类号】 R730.5

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.05.088

Application of circulating tumor cells detection in maintenance therapy of advanced tumor

LIAN Jie, YANG Yu*

(Department of Oncology, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

【Abstract】 Circulating tumor cells (CTC) detection, due to its good sensitivity and specificity, less trauma, convenience and repeatability of obtaining materials, has gained clinical consensus for its advantages in early diagnosis, clinical staging, guiding treatment and predicting prognosis. However, it still remains unclear that the significance of CTC as an indicator for maintenance therapy. In this paper, we reviewed the extraction, isolation, detection and clinical application of CTC, and its value in maintenance therapy.

【Key words】 maintenance therapy; circulating tumor cells; advanced tumor

Corresponding author: YANG Yu, E-mail: yangyu13836125585@163.com

近年来,恶性肿瘤的发病率和死亡率呈逐年上升的趋势,成为威胁人类生命的重要原因之一。由于大多数晚期恶性肿瘤具有难以治愈的特点,临床治疗目标为改善生活质量、延缓肿瘤进展以及延长生存时间。“维持治疗”理念的提出正是契合了这样的诊疗现状和需要。2003 年美国临床肿瘤学会指南中指出,一线诱导化疗方案不宜 > 6 个周期。6 个周期后继续使用该方案不但不能延长患者生存时间,反而易造成毒性积累以及生存质量的下降^[1]。因此,行一线治疗 4~6 周期后达到最大缓解疗效但仍不能行手术切除的患者,将进入维持治疗阶段,直至疾病出现复发及进展时再行二线治疗。如果能及时评价维持治疗疗效,就能针对患者选择最优治疗方案,以延长患者生存期。但如何精准确定终止维持治疗的时机目前尚无统一标准,临床上通常使用肿瘤标志物、影像学检查及患者临床表现来评估肿瘤进展,进而更换二线治疗方案。及早预测及判断维持治疗期间疾病进展,及时更换治疗方案,对于延长晚期肿瘤患者生存期有重要意义。

近年来,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)以其良好的敏感性、特异性、创伤小、取材方便及可重复性,受到临床医师的青睐。CTC 是指由实体瘤或转移灶脱落进入血液循环的肿瘤细胞,是肿瘤患者出现术后复发和远处转移的重要原因^[2]。CTC 在肿瘤诊断、病程分期、预测疾病进展及评估化疗疗效等方面的作用已经得到验证。那么维持治疗期间使用 CTC 检测,是否可以更早地预测及判断疾病进展,从而精准确定开始二线治疗的时机? 本文就此问题作以下综述。

1 CTC 的提取分离和检测方法

CTC 主要有 2 大类分离技术,分别是形态学方法和抗原抗体方法。形态学方法分为过滤法和梯度离心法。过滤法的原理是根据肿瘤细胞的体积大于白细胞体积分离 CTC。梯度离心法是根据肿瘤细胞与白细胞密度不同,通过梯度离心分离 CTC。抗原抗体方法分为阳性捕获法(免疫磁性分离)、阴性富集法(免疫磁性分离)以及负向筛选法。阳性捕获

法的原理是采用抗上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)结合免疫磁珠捕获EpCAM阳性CTC。阴性富集法的原理是利用CD45磁珠抗体吸附白细胞,在磁场作用下去除白细胞,CTC被富集沉淀。负向筛选是基于免疫磁珠技术的富集原理,采用去除血液中肿瘤细胞之外的其他干扰成分(红细胞、白细胞、血浆蛋白等)的实验方法,达到富集CTC目的。此方法不依赖于肿瘤细胞大小及特异性抗原,所有种类的CTC、循环肿瘤微栓子(circulating tumour microemboli, CTM)等异常细胞都会被富集,是一种理想的CTC富集技术,异常细胞回收率高,可去除>99.99%的白细胞,肿瘤细胞回收率>80%,为进一步鉴定提供技术保障。

CTC的检测方法主要有实时荧光定量PCR^[3]方法、微型芯片技术^[4]和单细胞测序技术。其中单细胞测序技术为第3代检测技术。第3代测序技术不需要PCR扩增即可直接对单个分子进行测序;样品制备简单,测序成本进一步降低;可直接读取RNA的序列和包括甲基化在内的DNA修饰。这些优势可大大改善临床基因测序的成本、速度和质量等。Leung等^[5]研究发现,1例患者通过单细胞测序发现肿瘤细胞在肝转移前出现大量突变,而且肝转移病灶恶性程度很高。在另一例患者的CTC和单细胞测序结果中,发现肿瘤细胞具有多克隆的种子,其中肝转移的2个克隆细胞与原发灶基因图谱完全不同,单个细胞的数据亦揭示了独立的肿瘤基因谱系;另外,数据还揭示了2例结直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者转移的晚期传播模型,但当前CTC在检测方法上仍存在一定不足,需要更多大型的前瞻性试验研究。

2 CTC的临床应用

2.1 CTC与肿瘤早期诊断

受限于CTC的提取方法,以往的研究认为,只有晚期肿瘤患者才可以检测CTC。Jin等^[6]在早期乳腺癌患者血液中检测到了CTC的存在,Chen等^[7]亦研究了CTC对肺癌早期诊断的意义。

在肿瘤细胞中,Ki67指数是细胞增殖的生物标志物。有研究认为,CTC计数和Ki67指数具有潜在诊断CRC的价值。Yang等^[8]在2017年研究中共纳入105例CRC手术患者,分别进行CTC计数和Ki67的表达免疫组织化学检查。结果发现,CTC计数和Ki67指数可作为CRC诊断的生物标志物,且独立于患者的性别、年龄、肿瘤大小和部位及肿瘤进展。有趣的是,Ki67指数被证明与肿瘤分化呈负相

关。此外,CTC计数亦可作为CRC一种转移性相关的生物标志物,独立于Ki67指数。因此,使用CTC可对易感人群进行筛查,从而及早发现肿瘤的存在,以达到早期诊断、早期治疗的目的。

2.2 CTC与肿瘤分期

CTC高表达于部分肿瘤分期较早的肿瘤患者外周血中,可导致肿瘤的快速转移和复发,且CTC数值与肿瘤分期相关^[9]。Sastre等^[10]将每7.5 ml外周血中 ≥ 2 个CTC定为阳性,通过检测外周血中CTC的数量,发现CTC阳性率与结肠癌分期相关。

2.3 CTC与肿瘤个体化医疗

CTC可用于检测肿瘤治疗相关的基因突变或蛋白,获取患者基因信息,从而指导患者个体化治疗^[11]。随着基因检测技术迅速发展,人们发现针对靶向基因的药物可获得很好的疗效。Maheswaran等^[11]在接受吉非替尼治疗的非小细胞肺癌患者CTC中,检测到表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) T790M突变,且结果与肿瘤组织检测保持一致。He等^[12]分别检测了CTC、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, CTDNA)以及组织活检中EGFR突变的情况,得到95%的一致率。可见在难以获得病理标本的患者中,可考虑利用CTC检测替代组织活检判断患者基因突变情况。但受限于CTC分离等技术上的难题,目前临床上仍未广泛应用CTC来指导靶向治疗。

2.4 CTC与肿瘤预后

CTC是一种反应肿瘤负荷的独立指标。研究显示,观察患者治疗前及治疗过程中外周血CTC数目的变化,有助于评估肿瘤进展及药物治疗疗效。有研究发现^[13],在非转移性三阴性乳腺癌患者中,每7.5 ml血液中CTC>2个的患者无进展生存期和总生存期较CTC<2个者短。Rahbari等^[14]研究发现,CRC患者的预后与CTC数量有关。CTC数量越多,患者5年生存率越低,预后越差。另有研究表明,检测CTC可预测转移性前列腺癌的总生存期以及多西他赛的治疗效果^[15]。因此,检测CTC的数量多少并记录化疗前后的数量变化,可反映肿瘤的预后及化疗疗效。

3 维持治疗期间CTC的应用

维持治疗作为由一线到二线的过渡治疗,其益处已经得到广泛的认可。维持治疗的停药指征为出现疾病进展或不可耐受的不良反应。尽早发现维持治疗期间的疾病进展以便调整治疗方案,可改善并延缓病情进展。临床医师大多利用肿瘤标志物、影

影像学检查的实体瘤疗效评价标准(1.1版)^[16]及患者临床表现来评估肿瘤进展,以判断终止维持治疗的时机。这种方法有一定局限性。(1)肿瘤标志物只能用于协助判断;(2)局部的影像学检查不能完全判断全身情况;(3)临床表现有极大的主观性。因而使用以上方法不能及时地反映肿瘤进展。在这种情况下,是否会错误判断维持治疗的终点,从而延误开始二线化疗的时机呢?研究者开始尝试其他检测肿瘤进展的方法。近年来研究发现 CTC 可以比影像学检查更早发现化疗过程中出现的疾病进展^[17]。

研究者针对人 EGFR2 阴性的胃癌患者,制定了贝伐单抗、卡培他滨、奥沙利铂及多西他赛联合治疗 6 周期后,再用卡培他滨联合贝伐单抗维持治疗的方案。其结果为,CTC 阳性(CTC ≥ 2 个)患者无进展生存期 7.9 个月,CTC 阴性患者 14.4 个月;总生存期分别为 10.2 个月和 21.5 个月^[18]。另有研究者对 IV 期黑色素瘤使用生物化学治疗(顺铂、达卡巴嗪、长春新碱、干扰素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)及生物化学维持治疗(白细胞介素-2 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子),并应用 CTC 判断疗效^[19]。以上 2 项试验证实了使用 CTC 判断维持治疗疗效的可行性。

总之,在维持治疗期间尽早发现疾病进展,及早使用二线化疗,可提高患者生存期。如前文所述,CTC 检测作为肿瘤患者化疗疗效的动态监测手段已经为人们认可。尽管还没有试验直接验证 CTC 检测在维持治疗中的应用,但是基于 CTC 在判断化疗疗效、预测疾病进展等方面的优势,考虑利用 CTC 检测比现有检测方法能更早、更准确地判断终止维持治疗并开始二线治疗的时机。这一点有待更多临床研究的证实。

【参考文献】

- [1] Westeel V, Quoix E, Moro-Sibilot D, *et al.* Randomized study of maintenance vinorelbine in responders with advanced non-small-cell lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(7): 499-506. DOI: 10.1093/jnci/dji096.
- [2] Cheung KJ, Ewald AJ. A collective route to metastasis: seeding by tumor cell clusters[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 167-169. DOI: 10.1126/science.1254546.
- [3] Guo M, Li X, Zhang S, *et al.* Real-time quantitative RT-PCR detection of circulating tumor cells from breast cancer patients[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1): 281-289. DOI: 10.3892/ijo.2014.2732.
- [4] Chen J, Li J, Sun Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization and separation[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(10): 1753-1767. DOI: 10.1039/c2lc21273k.
- [5] Leung ML, Davis A, Gao R, *et al.* Single-cell DNA sequencing reveals a late-dissemination model in metastatic colorectal cancer[J]. *Genome Res*, 2017, 27(8): 1287-1299. DOI: 10.1101/gr.209973.116.
- [6] Jin XR, Zhu LY, Qian K, *et al.* Circulating tumor cells in early stage lung adenocarcinoma: a case series report and literature review[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23130-23141. DOI: 10.18632/oncotarget.15506.
- [7] Chen YY, Xu GB. Effect of circulating tumor cells combined with negative enrichment and CD45-FISH identification in diagnosis, therapy monitoring and prognosis of primary lung cancer[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(12): 240-240. DOI: 10.1007/s12032-014-0240-0.
- [8] Yang Y, Li J, Jin L, *et al.* Independent correlation between Ki67 index and circulating tumor cells in the diagnosis of colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 4693-4700. DOI: 10.21873/anticancer.11874.
- [9] Hou JM, Greystoke A, Lancashire L. Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(2): 808-816. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090078.
- [10] Sastre J, Maestro ML, Puente J, *et al.* Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables[J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(5): 935-938. DOI: 10.1093/annonc/mdm583.
- [11] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, *et al.* Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 366-377. DOI: 10.1056/NEJMoA0800668.
- [12] He J, Tan W, Ma J. Circulating tumor cells and DNA for real-time EGFR detection and monitoring of non-small-cell lung cancer[J]. *Future Oncol*, 2017, 13(9): 787-797. DOI: 10.2217/fon-2016-0427.
- [13] Karhade M, Hall C, Mishra P, *et al.* Circulating tumor cells in non-metastatic triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 147(2): 325-333. DOI: 10.1007/s10549-014-3103-7.
- [14] Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, *et al.* Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 1714-1726. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.008.
- [15] Chang K, Kong YY, Dai B, *et al.* Combination of circulating tumor cell enumeration and tumor marker detection in predicting prognosis and treatment effect in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 41825-41836. DOI: 10.18632/oncotarget.6167.
- [16] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(2): 228-247.
- [17] Souza E Silva V, Chinen LT, Abdallah EA, *et al.* Early detection of poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer: tumor kinetics evaluated by circulating tumor cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 7503-7513. DOI: 10.2147/OTT.S115268.
- [18] Meulendijks D, de Groot JW, Los M, *et al.* Bevacizumab combined with docetaxel, oxaliplatin, and capecitabine, followed by maintenance with capecitabine and bevacizumab, as first-line treatment of patients with advanced HER2-negative gastric cancer: a multicenter phase 2 study[J]. *Cancer*, 2016, 122(9): 1434-1443. DOI: 10.1002/cncr.29864.
- [19] Koyanagi K, O'Day SJ, Boasberg P, *et al.* Serial monitoring of circulating tumor cells predicts outcome of induction biochemotherapy plus maintenance biotherapy for metastatic melanoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(8): 2402-2408. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0037.