

循环肿瘤细胞检测方法和技术研究进展*

戚大梁 综述, 王 强, 易维京[△] 审校

(江苏省连云港第八二医院一四九临床部医技科, 江苏连云港 222042)

关键词: 肿瘤循环细胞; 抗原, 肿瘤; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)24-3022-03

恶性肿瘤严重威胁人类健康, 转移是肿瘤患者最主要的死因。肿瘤的早期诊断对于其治疗至关重要^[1]。循环肿瘤细胞相关检测在肿瘤的诊断疗效和预后判断方面具有重要的意义。

1 循环肿瘤细胞的生物学特性和分子特征

在原发肿瘤形成和生长的早期, 部分细胞会从原发灶脱落并进入血液循环, 这些高度异质性的细胞被称为循环肿瘤细胞(CTCs)。来自肿瘤原发灶的 CTCs 可能成为播散肿瘤细胞(DTCs), 导致肿瘤细胞在骨髓、肝、肺、脑和骨等远处组织器官中定植和生长。因此, DTCs 也被称为肿瘤的微转移或肿瘤的微小残留病(MRD)。在乳腺癌、前列腺癌、肺癌和大肠癌等上皮性肿瘤中, 如, 患者体内出现 CTCs 和 DTCs 的情况尤为多见^[2]。

CTCs 可以由原发肿瘤灶脱落, 也可以从各个器官的转移灶上脱落而来, 最基本的特点是高度异质性。这些细胞具有在其他组织器官种植并形成新肿瘤灶的能力, 也可以回到肿瘤原发灶并种植, 这就是肿瘤自种植或者交叉种植^[3-4]。在各种组织器官中, 骨髓是 CTCs 最为集中的场所, 被认为是人体中 CTCs 的最大贮存库, 因此通过骨髓穿刺的方法能相对容易地检测到 CTCs 的存在。越来越多的证据表明, 聚集在骨髓成骨细胞壁龛中的 CTCs, 和该环境中正常的造血干细胞竞争, 以获得更多的生存条件和空间。因此, 经过这种竞争的 CTCs 一旦成为 DTCs, 将具备更强的生存能力, 导致更高效率的种植和生长^[5]。

近年来, 由于相关分析测试技术的发展, 在 CTC 分子特征方面也取得了很大进展, 特别是对雄激素非依赖型前列腺癌患者 CTC 的研究方面。Paris 等^[6]人通过比较基因组技术证实前列腺癌患者中 CTCs 的拷贝数总体上和对照肿瘤组织细胞没有明显差异; Attard 等^[7]通过多色荧光原位杂交证实 CTCs 中存在雄激素受体基因拷贝获得和 PTEN 基因拷贝丢失; 也有报道^[8]证实大多数 CTCs 均为非整倍体, 1、7、8 和 17 号染色体拷贝数存在异常。大量的 CTCs 样本分析结果发现雄激素受体基因存在异常的扩增并且发生了多个位点的突变^[9]。乳腺癌相关的 CSCs 研究结果提示 CSCs 带有肿瘤干细胞的某些特征^[10]。Watson 等^[11]在化疗后的乳腺癌患者骨髓中分离到 CTCs, 全面分析其基因表达谱发现这些细胞相对于原位乳腺癌细胞高表达 TWIST1 蛋白, 而这种蛋白的高表达和肿瘤的转移以及上皮细胞间质化等过程相关。Theodoropoulos 等^[12]也有类似的报道: 部分乳腺癌患者的 CTCs 呈现 CD44⁺/CD24⁻/low 或者 ALDH1high/CD24⁻/low 等典型的干细胞表型。在这群细胞中, 往往有 Notch 分子以及 HER2 等分子的共同高表达。

2 循环肿瘤细胞的检测方法

近十多年来, CTCs 引起了人们的广泛关注并取得较大进展其中很重要的原因在于 CTCs 的检测手段和方法取得了很大进步。骨髓是相对容易检测到 CTCs 标本来源, 但是临床上不可能经常进行骨髓穿刺, 而只能从外周血中分离和检测, 由于 CTCs 在外周血中的频率很低, 因此大多数检测方法在灵敏度和特异性等方面均难以达到要求。近年来, 科学家们建立了多种方法用于 CTCs 的富集和检测。

2.1 CTCs 的富集方法 外周血是临床上 CTCs 检测的主要标本来源, 而 CTCs 在外周血中的频率很低, 一般为 1~10/mL 血液。因此最初的思路就是将 CTCs 从血液环境中富集出来再分析。

基于 CTCs 和血细胞物理特性的不同建立的富集方法包括密度梯度离心(基于 CTCs 与血细胞在密度梯度介质中沉降系数的不同, 如 Ficoll 介质、OncoQuick 系统)、特殊过滤器过滤(基于 CTCs 和血细胞大小的不同, 如 ISET 系统、三维微孔滤膜^[13])、通用的无标记生物芯片^[14](基于 CTCs 比血细胞稍大和两者之间可变形性的差异)、特殊微流控装置^[15](结合 MOFF 和 DEP 细胞分离技术)和 DEP-FFF 装置^[16](基于 CTCs 和血液细胞比较, 由于细胞大小和生物膜特征上的差异, 而对 DEP 的反应存在差异)。

由于某些生物标志物在 CTCs 和普通血细胞之间存在差异表达, 建立了基于生物学特征的富集方法, 包括针对 CTCs 细胞表面高表达的肿瘤相关抗原设计的正向筛选思路和基于白细胞表面特异表达的共同抗原 CD45 设计的负向筛选思路。迄今为止应用最为广泛的正向富集系统是用抗上皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体进行筛选, 然后用抗上皮细胞角蛋白抗体、抗上皮细胞中间丝抗体进行免疫细胞学检测^[2-3]。其中, Veridex LLC 的 CellSearch 系统已经获得美国 FDA 的批准应用于临床, 是公认的金标准^[3, 17]。目前发展较为成熟的有以下筛选系统: (1) MagSweeper 免疫磁珠筛选技术, 可正向富集表达 EpCAM 的 CTCs 并可进行后续的分子分析。Talasaz 等^[18]用该系统在 47 位具有转移性肿瘤的患者标本中富集到 CTCs, 而在健康对照标本中没有检出。(2) 纳米飞纸技术采用硅纳米环, 包被上抗 EpCAM 抗体, 也实现了 CTCs 的富集。(3) MA-INTRAC 平台^[19]是 1 种特殊的流式细胞分析平台, 在大多数的肿瘤患者血液中都检出了 50~3×10⁵ CTCs, 比用其他方法的检出结果高出 3 个数量级。

值得一提的是近年来研究较多的微流控芯片用于 CTCs 的富集和检测, 如 CTC-芯片, 其主要优势在于所需标本量小, 通常在 1 mL 血液以下, 而且耗时少, 试剂成本更低。其中名

* 基金项目: 全军医药卫生科研项目(11MA048)。 [△] 通讯作者, E-mail: yiweijing149@163.com。

为 Ephesia 的 CTC-芯片利用生物功能化的超顺磁珠在磁道阵列中自组装成微流控通道,实现对低频率 CTCs 的高通量筛选、计数和电动力学操作^[20]。

2.2 CTCs 的检测方法 通过上述 CellSearch 系统和 CTC 芯片系统富集得到的 CTCs 采用相同的分析方法:应用不同荧光素标记的抗细胞角蛋白 CK-8 抗体、CK-18 抗体和 CK19 抗体,以及抗白细胞抗原 CD45 抗体对细胞进行荧光染色,并用染料 DAPI 进行细胞核染色,然后在荧光显微镜下进行多色荧光成像分析。一般认为,CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺ 的就是 CTCs。这种方法简便易行,但是缺点在于不能有效区分活细胞和死细胞,不能反映 CTCs 的功能状态^[2]。为此,有学者建立了上皮免疫斑点检测 (EPISPOT) 方案。该方案需要对分离到的 CTCs 进行 24~48 h 的短期培养,在此过程中 CTCs 会产生一些与分泌、脱落、侵袭等行为相关的蛋白质,通过酶联免疫斑点的原理进行检测。现在 EPISPOT 方案已经应用于临床外周血和骨髓来源的 CTCs 的检测^[21-22]。

除了上述通过免疫学方法检测 CTCs 表面的蛋白抗原外,还可以通过分析细胞内某些 mRNA 来检测 CTCs^[1]。近期 Markou 等^[23]从通过免疫磁珠系统富集得到的 CTCs 中分离 mRNA,建立多重 PCR 体系,同时测定 CK-19、HER2、SCGB2A2、MAGEA3、TWIST-1 和 HMBS6 种相关基因的表达情况,大大减少了标本的用量、操作时间和试验成本。

3 循环肿瘤 DNA 的检测

CTCs 为肿瘤相关诊断提供了很有价值的靶标,但是其临床应用,不管在理论上,还是在技术上,都面临一些挑战。来自肿瘤细胞的 DNA,即无细胞循环肿瘤 DNA (cfDNA),提供了新的契机。cfDNA 主要来自肿瘤微环境中凋亡或坏死的肿瘤细胞释放而来,既包括基因组 DNA,也包括线粒体 DNA,可以是编码蛋白质的 DNA,也可非编码蛋白质的 DNA。

相对 CTCs 而言,cfDNA 的研究还处在更加早期,但是人们已经关注到肿瘤患者 cfDNA 和血液中的 CTCs、骨髓中的 DTCs,甚至患者的其他检查结果、临床表现之间存在一定的联系,因此,cfDNA 完全可以成为肿瘤微转移的新的生物标志物。

Nawroz-Danish 等^[24]在头颈鳞状细胞癌患者中,通过荧光微卫星分析,发现患者血液中 DNA 的杂合性缺失 (LOH),而且这种 cfDNA 的存在标志着肿瘤的远处转移。在前列腺癌患者中,通过上皮免疫斑点试验检测患者血液中的 CTCs,CTCs 的存在与肿瘤的分级分期、肿瘤的 Gleason 评分、3 种标志蛋白 (dematin、CDKN2/p16 和 BRCA1) 编码基因区域 (LOH) 显著相关,首次证实了血液中 CTCs 和 cfDNA 之间的相关性^[25]。在乳腺癌患者中也发现 CTCs 和 cfDNA 的浓度、完整性、Her2 基因扩增均明确提示乳腺癌转移的存在^[26]。如果将两者组合起来,既检测 CTCs,又检测 cfDNA,包括经典遗传学层面和表观遗传学层面的,对于判断和预测肿瘤转移的存在、预测治疗效果,以及患者预后,都有更大的价值。

4 存在的问题和展望

肿瘤是全世界的医学难题,难以解决。研究者只能希望某些方法手段能够在一定程度上解决一些问题且带来新思路。CTCs 和 cfDNA 是潜在的肿瘤转移标志物,对其认识有很多新的进展,但是离其临床应用还有很远的路要走。首先,肿瘤细胞高度异质性的,需要寻找更加通用、更加特异的特征来标志 CTCs 和 cfDNA,包括物理特性和生物分子特征。其次,CTCs 各 cfDNA 在血液中都是属于低概率事件,要求方法具

有足够的灵敏度才能实现对其准确检测。在标本用量方面也存在矛盾,一方面肿瘤患者能够提供的血量有限,需要在较低标本量的情况下实现检测;另一方面标本量太小,会影响低概率事件检测结果的准确性。第三,还需要大量的临床试验,提供更加系统准确的临床统计资料,证明 CTCs 相关检测在临床肿瘤相关判断中具有明确的重要作用,才会得到更多的临床认可和临床应用。

参考文献

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [2] Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. Annu Rev Med, 2012, 63: 199-215.
- [3] Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(5): 329-340.
- [4] Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells[J]. Cell, 2009, 139(7): 1315-1326.
- [5] Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(6): 448-456.
- [6] Paris PL, Kobayashi Y, Zhao Q, et al. Functional phenotyping and genotyping of circulating tumor cells from patients with castration resistant prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2009, 277(2): 164-173.
- [7] Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. [J]. Cancer Res, 2009, 69(7): 2912-2918.
- [8] Swennenhuis JF, Tibbe AG, Levink R, et al. Characterization of circulating tumor cells by fluorescence in situ hybridization[J]. Cytometry A, 2009, 75(6): 520-527.
- [9] Leversha MA, Han J, Asgari Z, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6): 2091-2097.
- [10] Smirnov DA, Foulk BW, Doyle GV, et al. Global gene expression profiling of circulating endothelial cells in patients with metastatic carcinomas[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 2918-2922.
- [11] Watson MA, Ylagan LR, Trinkaus KM, et al. Isolation and molecular profiling of bone marrow micrometastases identifies TWIST1 as a marker of early tumor relapse in breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(17): 5001-5009.
- [12] Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer[J]. Cancer Lett, 2010, 288(1): 99-106.
- [13] Zheng S, Lin HK, Lu B, et al. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood[J]. Biomed Microdevices, 2011, 13(1): 203-213.
- [14] Tan SJ, Lakshmi RL, Chen P, et al. Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 26(4): 1701-1705.
- [15] Moon HS, Kwon K, Kim SI, et al. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP)[J]. Lab Chip, 2011, 11(6): 1118-1125.
- [16] Gascoyne PR, Noshari J, Anderson TJ, et al. Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis[J]. Electrophoresis, 2009, 30(8): 1388-1398.

[17] Hofman V, Ilie MI, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method[J]. Int J Cancer, 2011, 129(7): 1651-1660.

[18] Talasz AH, Powell AA, Huber DE, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(10): 3970-3975.

[19] Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(8): 1208-1215.

[20] Saliba AE, Saia L, Psychari E, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(33): 14524-14529.

[21] Alix-Panabières C, Vendrell JP, Slijper M, et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(3): R39.

[22] Alix-Panabières C, Vendrell JP, Pellé O, et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients[J]. Clin Chem, 2007, 53(3): 537-539.

[23] Markou A, Strati A, Malamos N, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay[J]. Clin Chem, 2011, 57(3): 421-430.

[24] Nawroz-Danish H, Eisenberger CF, Yoo GH, et al. Microsatellite analysis of serum DNA in patients with head and neck cancer[J]. Int J Cancer, 2004, 111(1): 96-100.

[25] Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(3): 1032-1038.

[26] Shaw JA, Brown J, Coombes RC, et al. Circulating tumor cells and plasma DNA analysis in patients with indeterminate early or metastatic breast cancer[J]. Biomark Med, 2011, 5(1): 87-91.

(收稿日期: 2012-05-09)

• 综 述 •

雌激素及受体对细胞因子的作用研究进展

李雪璐¹综述, 邢 艳²审校

(1. 川北医学院微生物与免疫学教研室, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000)

关键词: 雌激素; 细胞因子; 免疫调节
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 24. 038 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2012)24-3024-03

雌激素作为脂溶性的皮质激素, 主要由卵巢合成分泌, 主要促进雌性生殖器官的成熟和第二性征发育并维持在正常状态。研究表明, 雌激素对免疫系统有调节作用, 两性在免疫应答和一些自身免疫性疾病的易感性方面存在着差异, 更年期后女性对某些疾病易感性也有差异。细胞因子参与机体免疫细胞的增殖分化活化、免疫调节和致病。雌激素及受体能影响细胞因子的产生。雌激素及受体对免疫系统尤其是细胞因子的作用日益受到研究者的关注。本文就雌激素及受体对细胞因子的研究进展进行综述。

1 雌激素及受体

目前在人体内发现的雌激素有 3 种: 雌二醇(E2)、雌酮和雌三醇, 其中 E2 的生物活性最强。雌激素的各种生理效应主要是通过雌激素受体(ER) α 和 ER β 实现的, 包括雌激素核受体和膜表面相关受体, 目前发现均有 ER α 、ER β 两种亚型。

雌激素核受体属于类固醇激素核受体超家族, 主要存在胞内, 是主要的 ER; 雌激素膜表面相关受体, 主要存在于细胞质膜穴样内陷小泡中。ER 包括 DNA 结合、二聚化作用、配体结合以及转录激活等作用区域。二者存在结构差异, 在氨基末端有 15% 的同源性, 配体非依赖转录激活功能的 AF-1 位于此区域; 在羧基末端有 55% 的同源性, 配体结合域和配体依赖转录激活功能的 AF-2 位于此区域。ER α 、ER β 由不同的基因编码, 具有不同的组织特异性, 但 ER β 分布更广泛^[1]。免疫系统有 ER α 和 ER β 分布, 但在不同免疫细胞甚至在同一细胞不同分化阶段均有所不同。

2 雌激素及受体作用的分子机制

雌激素与 ER 结合后发挥广泛而复杂的生理作用, 可促进

疾病的发生发展, 也可起保护作用。ER 产生生理效应的途径主要有: (1) 核受体的作用途径。主要是经典的雌激素反应元件(ERE)途径, 即雌激素与核 ER 结合, 形成激素-受体复合物, 与靶基因上的 ERE 结合, 调节基因表达。还可与核因子- κ B(NF- κ B)、转录激活蛋白 AP-1(AP-1)等转录因子结合, 调节基因表达。(2) 膜相关受体的作用途径。雌激素通过与细胞膜受体结合, 可影响胞内蛋白质的磷酸化或去磷酸化过程, 可激活胞内多种信号通路, 发挥迅速的非基因组效应。(3) 线粒体相关受体的作用途径。雌激素通过核受体和线粒体相关受体共同协调呼吸链复合物蛋白质的合成。雌激素和受体通过这 3 条作用途径的协同作用来调节细胞, 其中以核内 ERs 发挥作用为主。

3 雌激素及受体对细胞因子表达的作用

雌激素主要通过丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)和免疫细胞的作用影响细胞因子的表达。

HPA 分泌的糖皮质激素, 可抑 IL-2、IFN- γ 等 Th1 细胞因子的生成, 诱导 TGF- β 的产生, 抑制 Th1 细胞介导的免疫应答作用。在促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)基因 5'上游调节区存在 ERE, 激素与其受体结合后, 在 ERE 作用下促进 CRH 基因的表达^[2], 增加糖皮质激素的分泌。雌激素也可下调海马区糖皮质激素受体(GR)的结合力及转录水平。所以雌激素对糖皮质激素具有正性调节作用。动物实验发现 HPA 轴缺陷的 Lewis 大鼠易发生细胞免疫介导的自身免疫性疾病, 而产后甲状腺炎的发生与其低水平的雌激素可下调 HPA 轴的分泌有关。

众多研究认为 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、单核-巨噬细胞、