

循环肿瘤细胞检测应用于肺癌诊治的研究进展*

王 俊 综述, 王 峰, 王自正[△] 审校

(南京医科大学附属南京医院核医学科, 江苏南京 210006)

关键词: 肺癌; 循环肿瘤细胞; 转移; 检测方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)19-2654-03

肺癌是肺部最常见的恶性肿瘤,居恶性肿瘤的首位^[1]。近年来,肺癌的发病率及病死率均迅速增长,严重威胁人类的生命健康。肺癌复发和远处转移是导致患者死亡的主要原因。目前随着诊断方法进步及靶向治疗药物的出现,规范有序的诊断、分期,以及根据肺癌临床行为进行多学科治疗的进步,肺癌患者生存率已经有所增高。早在 1869 年,有学者在 1 例死亡的癌症患者尸检血液发现了类似原发肿瘤的恶性细胞,首次提出循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的概念^[2]。此后,随着各个相关学科的发展及对 CTCs 的认识,出现了多种检测 CTCs 的方法,并逐渐开始应用于乳腺癌、结肠癌、肺癌等。其中,有研究发现,检测 CTCs 在肺癌的诊断及治疗中具有极其重要的作用^[3-4]。

1 CTCs 的定义和转移灶的形成

目前 CTCs 定义为自发或因诊断和治疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血液循环的肿瘤细胞。进入循环未被清除的肿瘤细胞通过迁移、黏附、相互聚集形成微小癌栓,并在一定条件下发展为转移灶^[5]。由于肿瘤细胞生长没有节制,部分肿瘤细胞会丧失黏附能力进而脱落,同时肿瘤细胞释放细胞因子刺激血管壁扩张,使肿瘤细胞穿过血管和淋巴管进入血液循环形成 CTCs。CTCs 随着血液流动,直至游出血管外,在合适的器官部位定植,最终实现肿瘤的转移和生长^[6]。常规转移灶的影像学检查方法有 X 线片、CT、磁共振成像(MRI)等,其特异性和敏感性各有不同,只有转移灶生长到一定体积才出现阳性结果,此时恶性肿瘤已发展至中晚期,不利于患者的治疗和愈后。早期的微转移灶通过常规的影像学等检查很难发现,然而,CTCs 的检测有助于微转移灶的早期发现^[7]。CTCs 在外周血中的数量极少,通常在约 1 亿个白细胞和 500 亿个红细胞中只能寻找到不到 10 个 CTCs,为了提高 CTCs 的检出率,需要在检测前行 CTCs 的富集。

2 CTCs 富集

目前 CTCs 的富集主要有免疫磁珠分离法和基于形态学的富集法。此为 CTCs 检测的重要步骤。

2.1 免疫磁珠分离法 免疫磁珠分离法的基本原理是采用一种不但能被磁铁吸引,还能结合抗体载体的免疫磁珠,磁珠上的抗体能与含有特异性抗原物质的细胞表面结合,形成细胞抗原-抗体-磁珠免疫复合物,在磁力作用下,可使该复合物与其他物质分离,从而达到分离特异性细胞的目的。磁珠可分为阳性分选磁珠和阴性分选磁珠,其中阳性分选磁珠的富集效率与一般的分离方法相比可提高 $(1\sim 10)\times 10^3$ 倍^[8-9]。Devriese 等^[10]对 46 例非小细胞肺癌患者和 46 例健康人进行研究,从

每个参与者获得了 8 mL 的血液,运用免疫磁珠分离法富集表达上皮细胞黏附分子(EpCAM)的细胞,同时运用多标记定量实时 PCR 检测细胞角蛋白 7(CK7)、细胞角蛋白 19(CK19)、人类表皮糖蛋白(EGP)和纤连蛋白 1(FN1)的 mRNA,结果表明免疫磁珠分离法富集后检测的敏感性为 46.00%,特异性为 93.00%。刘志东等^[11]对 45 例非小细胞肺癌患者进行研究,结果显示免疫磁珠分离法联合流式细胞分析检测 CTCs 的敏感性和特异性较高。

2.2 基于形态学的富集法 密度梯度离心法是目前实验室常用的一种基于形态学特点的富集法,如 Onco Quick 分离法。该方法利用不同种类的细胞密度差异,通过离心使其分层进而达到提取 CTCs 的目的,但该方法缺乏特异性,易导致缺乏相应密度的肿瘤细胞丢失^[12]。Onco Quick 分离法已经应用于临床,且具有较好的富集效果^[13]。

3 CTCs 的检测方法

目前 CTCs 的检测方法有很多,但敏感性和特异性高的方法是有效检测 CTCs 的先决条件。

3.1 免疫细胞化学法 免疫细胞化学法是指以显色剂标记的特异性抗体,在细胞原位通过抗原抗体反应和细胞化学呈色反应,对相应抗原进行定位、定性和定量测定的技术^[12]。因肿瘤细胞表面抗原表达的不均一性,会影响检测的敏感性,可能出现一定程度的假阳性率。主要肿瘤标志物有:(1)肿瘤相关糖蛋白(tumor associated glycoprotein, TAG);(2)上皮细胞角蛋白(epithelial cytokeatin, CK),如 CK19、CK20;(3)上皮细胞膜特异性抗原,如上皮细胞膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)等。Wu 等^[14]采用免疫细胞化学法对 41 例肺癌新诊断患者和 6 例肺癌复发患者进行研究,通过检测患者 CK18、CK19 水平和阳性率,发现 CTCs 检测在快速评价和监测肺癌复发患者中具有潜在的临床应用价值。许峰等^[15]应用放射免疫分析法检测 30 例健康人、91 例肺癌患者和 15 例肺部良性疾病患者血清胰岛素样生长因子(IGF)-1 水平,同时应用电化学发光免疫分析法测定同一批研究对象的血清癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平,结论显示 IGF-1 与 CEA、CYFRA21-1、NSE 联合检测可显著提高肺癌诊断的灵敏度,IGF-1+CYFRA21-1 与 IGF-1+CEA+CYFRA21-1 是诊断肺癌较为理想的组合。

3.2 流式细胞术 流式细胞术是运用标记荧光物质的单克隆抗体与 CTCs 特异性的标志物结合,使 CTCs 染色,然后用流式细胞仪进行测量分析。Dong 等^[16]运用流式细胞术检测 31 例非小细胞肺癌患者的肺动脉血液样本中 CD45⁻、CK⁺ 的肿

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81271604);江苏省自然科学基金资助项目(BK2011104)。 作者简介:王俊,女,在读研究生,主要从事分子影像诊断和靶向治疗的研究工作。 [△] 通讯作者, E-mail: ZZWang136@aliyun.com。

瘤细胞,阳性率为 48.4%。此外,沈宗丽等^[17]用 CD45 和 P16 荧光标记抗体分别对 39 例肺癌患者穿刺肿瘤标本中的正常血液细胞和肿瘤细胞进行标记,经流式细胞术测定 CD45⁺ P16⁺ 和 CD45⁻ P16⁺ 细胞,结果显示二者的 P16 蛋白表达阳性率分别为 15.39% 和 69.23%。证实了流式细胞术同步测定血液细胞和肿瘤细胞中的 P16 蛋白表达的可能性,在临床科研中有较好的应用前景。

3.3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR) RT-PCR 是把 mRNA 利用反转录酶转化成为互补的 DNA,以证实 CTCs 的存在。目前 CK19 一直是 RT-PCR 检测 CTCs 最常用的标志物,是检测肺癌患者 CTCs 较为敏感的方法,常与免疫细胞化学法联合检测,可提高特异性。马靓等^[18]收集 72 例非小细胞肺癌患者,10 例肺部良性疾病患者及 12 例健康志愿者的临床资料,以 RT-PCR 法对其外周血进行特异性 X 蛋白(Lunx)mRNA 和黏蛋白(Muc1)mRNA 的检测;以免疫化学发光测定法检测其血清的 CEA 水平,研究发现 Lunx mRNA 和 Muc1 mRNA 是检测非小细胞肺癌微转移的良好指标,二者联合 CEA 检测可以提高肺癌检出率。Zhao 等^[19]为了对转移性乳腺癌(metastatic breast cancer, MBC)患者预后进行评估,对 98 例 MBC 患者和 60 例对照组通过 RT-PCR 法检测其外周血中 EpCAM、CK19 及人乳腺珠蛋白(hMAM),研究发现 98 例 MBC 患者中 EpCAM、CK19 及 hMAM 的阳性率,分别为 51.00%、43.90% 及 69.40%,3 项标志物被检测出的阳性率显著高于对照组;经过 2 年的随访,表明外周血中上述 3 项标志物阳性是 MBC 患者无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)缩短的独立危险因素,临床上可通过检测此 3 项标志物对疾病作出预后评估。

4 CTCs 检测在肺癌患者中的临床应用

手术和化疗是肺癌患者主要的治疗手段,其预后常与肿瘤体积、区域淋巴结受累程度、肿瘤临床分期、转移病灶多少密不可分。近期有研究表明,与原发肿瘤细胞相比,转移灶肿瘤细胞更具侵袭能力和增殖能力。目前,多项研究证明 CTCs 与肿瘤转移密切相关,CTCs 的出现对肺癌患者有重要的诊断价值。

有研究者采用 cell search system 对肺癌患者进行 CTCs 计数,具有较高的特异性、敏感性和有效性^[20-22], cell search system 集免疫磁珠分离富集技术和免疫荧光技术于一体,用免疫磁珠分离法富集 CTCs,在外加磁场的作用下可从血液中提取 CTCs,对分离出来的 CTCs 进行通透、固定,用 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)荧光核染料、CD45 荧光抗体,以及 CK8、CK18、CK19 荧光抗体标记细胞,然后采用半自动四色荧光显微镜检测分析^[23]。Hiltermann 等^[24]使用 cell search system 系统检测 59 例小细胞肺癌患者外周血中的 CTCs 数量,发现 CTCs 数量低的患者比 CTCs 数量高的患者生存期明显延长,说明 CTCs 是评估肺癌患者生存期的一个很有价值的预后影响因素,为指导小细胞肺癌患者的治疗提供了依据。嵇金陵等^[25]对 42 例非小细胞肺癌初治患者进行研究,其中 I 期 7 例、II 期 9 例、III 期 16 例、IV 期 10 例,同时将不同数量(50、100、200、500、1 000 个)的肺癌细胞株(A549)混入 2 mL 健康成人血液标本中以模拟肿瘤患者的血样,与经过免疫磁珠标记 EpCAM 的抗体反应,再与磁标记 EpCAM 抗体反应后的上皮细胞反应,因为磁力的作用被集中在一张玻片上,最后用经典的 HE 染色鉴定 CTCs 并计数。结果显示该试验的回收率在 68.00%~82.00% 之间,42 例肺癌患者中有 18 例(42.86%)

CTCs 阳性,其中, I 期 CTCs 阳性率为 0.00%, II 期 CTCs 阳性率为 11.11%, III 期 CTCs 阳性率为 62.50%, IV 期 CTCs 阳性率为 70.00%。应用免疫磁珠分离法富集 CTCs 可以有效分离和鉴定肺癌患者外周血中的 CTCs,有较高的敏感性和特异性,且随着肺癌患者分期增高和肿瘤体积增大,肺癌细胞发生远处转移逐渐增多,CTCs 检出水平亦增高,对于早期发现肺癌隐形微转移和重新确定肺癌分期具有重要意义。Naito 等^[22]应用 cell search system 对 51 例小细胞肺癌患者外周血样本中的 CTCs 进行计数,发现小细胞肺癌患者较易检测出 CTCs,并且高 CTCs 计数患者的生存期较低 CTCs 计数患者短,其预后也差。Hou 等^[26]检测也发现 CTCs 可作为小细胞肺癌患者预后的一个重要指标。Hirose 等^[27]检测了 33 例转移性非小细胞肺癌患者外周血的 CTCs 数量,发现 CTCs 的存在与转移性非小细胞肺癌患者的预后密切相关。

5 小 结

综上所述,有大量研究证明,早期诊断和早期规范治疗是治愈肺癌的关键^[25-27]。能够迅速准确检测肺癌患者的 CTCs,有助于肺癌患者早期诊断、复发转移监控及预后评估,以便采取更加积极有效的治疗,从而延长患者的生存期。但是,也有研究表明进入循环系统的 CTCs 绝大多数在机体免疫识别和杀伤等作用下发生凋亡,仅有极少数存活下来,并发展成转移灶^[28]。因此,CTCs 与转移灶的形成并无绝对关系,尽管如此,早期发现 CTCs 对肺癌患者仍具有重要价值。随着 cell search system 系统的出现,临床上 CTCs 的检测得以实现,但是检测技术敏感性和特异性的缺乏,导致了假阳性或者假阴性的出现。随着 CTCs 检测技术的不断改进和发展,已经有研究证实 CTCs 检测技术与肿瘤特异性标志物相结合,有利于提高敏感性和特异性,有助于对肿瘤转移和预后评估^[18]。新的诊疗手段出现,将会使肺癌的个体化治疗更加完善和有效。随着分子影像技术在临床中的应用,有研究者已开发出能检测肺癌组织水平的核素探针,有望改变肺癌患者的治疗及疗效监测方法,为个体化靶向治疗方案进行指导,从而进一步提高肺癌患者的疗效^[29]。

参考文献

- [1] Lagerwaard FJ, Aaronson NK, Gundy CM, et al. Patient-reported quality of life after stereotactic ablative radiotherapy for early-stage lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(7): 1148-1154.
- [2] Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4589-4594.
- [3] Bevilacqua S, Gallo M, Franco R, et al. A "live" biopsy in a small-cell lung cancer patient by detection of circulating tumor cells[J]. Lung Cancer, 2009, 65(1): 123-125.
- [4] Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22): 6980-6986.
- [5] Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs[J]. Int J Cancer, 2011, 128(11): 2527-2535.
- [6] Shibue T, Weinberg RA. Metastatic colonization: settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(2): 99-106.
- [7] Danova MT, Mazzini G. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients; technical aspects and clinical implications[J]. Ex-

pert Rev Mol Diagn, 2011, 11(5):473-485.

[8] Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer[J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(6):617-627.

[9] 黄其宇. 利用免疫磁珠分离法(IMS)从患者粪便中检出 EHEC-O157H7 菌[J]. 中国医学检验杂志, 2001, 2(3):204-204.

[10] Devriese LA, Bosma AJ, van de Heuvel MM, et al. Circulating tumor cell detection in advanced non-small cell lung cancer patients by multi-marker QPCR analysis[J]. Lung Cancer, 2012, 75(2):242-247.

[11] 刘志东, 许绍发, 李云松, 等. 非小细胞肺癌循环肿瘤细胞的定量检测[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(9):1130-1131.

[12] Alunni-Fabbini A, Sandri M. Circulating tumor cells in clinical practice: methods of detection and possible characterization[J]. Methods, 2010, 50(4):289-297.

[13] Lagoudianakis EE, Katakaki A, Manouras A, et al. Detection of epithelial cells by RT-PCR targeting CEA, CK20, and TEM-8 in colorectal carcinoma patients using Onco Quick density gradient centrifugation system[J]. J Surg Res, 2009, 155(2):183-190.

[14] Wu C, Hao H, Li L, et al. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients[J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(1):30-36.

[15] 许峰, 吴翼伟, 章斌. 血清 IGF-1 及 CEA、CYFRA21-1、NSE 联合检测在肺癌诊治中的价值[J]. 中华核医学杂志, 2011, 31(3):205-209.

[16] Dong Q, Huang J, Zhou Y, et al. Hematogenous dissemination of lung cancer cells during surgery: quantitative detection by flow cytometry and prognostic significance[J]. Lung Cancer, 2002, 37(3):293-301.

[17] 沈宗丽, 朱月清, 庄一平, 等. 流式细胞术检测肺癌患者 P16 蛋白表达水平的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(10):1051-1053.

[18] 马靓, 茅国新. 外周血 Lunx mRNA、Muc1 mRNA、CEA 联合检测对非小细胞肺癌微转移的诊断价值[J]. 实用肿瘤杂志, 2011, 26(5):481-485.

[19] Zhao S, Yang H, Zhang M, et al. Circulating tumor cells(CTCs) detected by triple-marker EpCAM, CK19 and hMAM RT-PCR and their relation to clinical outcome in metastatic breast cancer patients[J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 65(2):263-273.

[20] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and independent sorting of rare circulating tumor cells[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(179):179ra47.

[21] Coumans FA, Doggen CJ, Attard G, et al. All circulating EpCAM⁺CK⁺CD45⁻ objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer[J]. Ann Oncol, 2010, 21(9):1851-1857.

[22] Naito T, Tanaka F, Ono A, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells in patients with small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(3):512-519.

[23] Hou JM, Krebs M, Ward T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer[J]. Am J Pathol, 2011, 178(3):989-996.

[24] Hiltermann TJ, Pore MM, van den Berg A, et al. Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor[J]. Ann Oncol, 2012, 23(11):2937-2942.

[25] 嵇金陵, 何晓东, 索美芳, 等. 利用新型免疫磁珠富集原理检测肺癌患者外周血循环肿瘤细胞[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(8):727-732.

[26] Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, et al. 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.

[27] Hirose T, Murata Y, Oki Y, et al. Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer[J]. Oncol Res, 2012, 20(2/3):131-137.

[28] Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4):274-284.

[29] 李晓琳, 谢鹏, 孟雪, 等. 表皮生长因子受体分子显像与基因突变在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2012, 32(5):393-396.

(收稿日期:2014-03-25)

• 综 述 •

ERS 与 miRNAs 间的相互作用在类风湿关节炎中的研究进展*

刘玮玮¹, 张富强², 吴 茜¹综述, 李光迪^{1△} 审校
(兰州大学第二医院:1. 检验科;2. 骨科, 甘肃兰州 730000)

关键词: 内质网应激; 微小 mRNA; 类风湿关节炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)19-2656-03

类风湿关节炎是一种慢性的,以滑膜炎为主要特征的自身免疫性疾病^[1]。类风湿关节炎的发病机制十分复杂,目前的研究发现,内质网应激和微小 RNA 可能参与了其病理过程。目前,就内质网应激或微小 RNA 单独对类风湿关节炎的影响已有相关研究涉及,但此二者共同在类风湿关节炎的发生、发展中产生的作用鲜有报道。现就内质网应激与微小 RNA 间的

相互作用及其与类风湿关节炎的关系进行综述。

1 内质网应激和微小 RNA 的概述

细胞蛋白质翻译后的修饰和折叠主要在内质网中完成。很多外在因素,如热量、射线、感染和缺氧等均可损伤内质网正常功能,表现为大量未完成折叠或错误折叠的蛋白质在细胞内质网中聚集,并将引发细胞产生应激反应,这种现象称为内质

* 基金项目:甘肃省科技支撑项目(041255)。 作者简介:刘玮玮,女,在读研究生,主要从事自身免疫性疾病研究工作。 △ 通讯作者, E-mail:guangdi843133@163.com。