

zumab RADIATE study (NCT00106522) [J]. Semin Arthritis Rheum, 2012, 42(2):131-139.

[26] Hashimoto J, Garner P, Van Der Heijde D, et al. Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI; data from the SAMURAI study[J]. Mod Rheumatol, 2011, 21(1):10-15.

[27] De Hair MJ, Zijlstra IA, Boumans MJ, et al. Hunting for the pathogenesis of rheumatoid arthritis: core-needle biopsy of inguinal lymph nodes as a new research tool[J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(11):1911-1912.

[28] Hein G, Eidner T, Oelzner P, et al. Influence of rituximab on markers of bone remodeling in patients with rheumatoid arthritis: a prospective open-label pilot study[J]. Rheumatol Int, 2011, 31(2):269-272.

[29] Bedi B, Li JY, Grassi F, et al. Inhibition of antigen presentation and T cell costimulation blocks PTH-induced bone loss[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1192(1):215-221.

[30] Jung K, Lein M. Bone turnover markers in serum and urine as diagnostic, prognostic and monitoring biomarkers of bone metastasis [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1846(2):425-438.

(收稿日期:2016-01-21)

• 综 述 •

## 循环肿瘤细胞富集检测的研究进展

周婧婷<sup>1</sup>综述,戴启宇<sup>2△</sup>审校

(1. 新乡医学院研究生院,河南新乡 453000;2. 中国人民解放军第三七一中心医院检验科,河南新乡 453000)

**关键词:**循环肿瘤细胞; 富集检测方法; 纳米技术

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.035

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2016)09-1239-02

恶性肿瘤的复发和转移是导致肿瘤患者死亡的重要原因。目前临床上仍主要通过影像学检查及传统肿瘤标志物的检测来发现并诊断肿瘤,发现时患者常常已处于肿瘤进展晚期,影响患者预后<sup>[1]</sup>。循环肿瘤细胞(CTCs)是从原发或转移肿瘤病灶脱落,进入外周血的肿瘤细胞,与肿瘤的转移密切相关,其检测具有重要的临床意义,不仅有助于实时监测肿瘤动态、早期发现肿瘤微转移,还能为评估预后和疗效以及肿瘤的个体化治疗提供可靠参考<sup>[2]</sup>。近年来纳米技术在 CTCs 的富集检测中得到广泛应用,本文对常用的 CTCs 富集检测方法以及相关研究进展进行总结,并对纳米技术在 CTCs 检测中的应用进行探讨。

### 1 CTCs 的生物学特性及其检测的临床意义

CTCs 主要表达上皮源性表面标志,存在于大多数上皮来源的恶性肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、结直肠癌和膀胱癌等多种恶性肿瘤中<sup>[3]</sup>。虽然 CTCs 在血液中水平极低,但是 CTCs 检测是评估临床预后及化疗疗效的重要指标。

### 2 现有 CTCs 富集和检测的方法学

外周血 CTCs 取材方便,重复性强,可实时监测癌细胞动态,相比较骨髓来说,是更为理想的检测标本来源。外周血中白细胞水平较高,而 CTCs 的浓度极低,这就对其检测分析技术提出了较高要求。现有的方法学主要分为 CTCs 分离富集方法和 CTCs 检测鉴定方法两大类<sup>[4]</sup>。

#### 2.1 CTCs 分离富集方法

**2.1.1 物理富集方法** 物理富集方法是基于 CTCs 和血细胞之间直径、密度、变形性、介电性质等物理学特性的不同而建立的方法。目前最常用的 CTCs 富集方法为膜滤过分析法和密度梯度离心法。这两种方法分别根据 CTCs 直径和密度与其他血细胞的差异,通过滤膜过滤法和离心法将 CTCs 分离出,并用于进一步的检测鉴定。基于 CTCs 物理学特性的富集方法操作简便,但特异性低,得到的 CTCs 纯度较低,且存在被漏

检的可能<sup>[5]</sup>。细胞变形性富集法是利用肿瘤细胞的恶性程度增加,变形性增加这一特性而设计的一种微流体装置进行细胞分离富集的方法。目前该方法应用于临床仍有一定的困难。细胞电学特征富集法是根据细胞介电性质的不同而建立的分离富集方法。该方法具有活细胞分选、使用灵活、容易调控、便于自动化、可重复使用的优点。但是由于各种肿瘤细胞的介电性质不同,无法对所有肿瘤进行检测。肿瘤细胞的尺寸和表面电荷与正常细胞存在差异,ApoStream<sup>TM</sup>技术利用这一点通过改变电场频率来捕获 CTCs<sup>[6]</sup>。ApoStream<sup>TM</sup>技术的 CTCs 检出率明显高于 CellSearch 系统,有报道称,ApoStream<sup>TM</sup>技术检出的 CTCs 数超过 CellSearch 系统的 10 倍以上<sup>[7]</sup>。

**2.1.2 生物富集方法** 生物富集方法是基于 CTCs 和普通血细胞之间某些生物标志物的表达差异而建立的方法。免疫磁性分离技术是目前最常用的 CTCs 分离富集方法<sup>[8]</sup>,其原理是形成抗原-抗体-磁珠免疫复合物,通过外加磁场作用使该复合物发生移动,达到分离细胞的目的,主要有阳性富集和阴性富集两种<sup>[9]</sup>。CellSearch 系统是目前唯一获得美国 FDA 的批准应用于临床检测 CTCs 的新技术<sup>[10]</sup>。该技术通过上皮细胞黏附分子 Ep-CAM 标记磁珠从而对上皮细胞进行富集,目前已用于检测结直肠癌、前列腺癌和转移性乳腺癌 CTCs<sup>[11]</sup>。该方法与免疫细胞化学技术、RT-PCR、流式细胞术(FCM)等方法相结合检查 CTCs,可提高检测敏感度和特异性。CellSearch 系统具有很好的重复性<sup>[12]</sup>,可以很好地保存细胞形态结构。缺点则是操作较为复杂,技术要求和检测成本均较高。采用上皮细胞标志筛选将遗漏发生上皮间质转化(EMT)的肿瘤细胞,造成结果的假阴性<sup>[13]</sup>。有研究者发现,增加的标记分子在提高 CTCs 检出率的同时,其与正常细胞的特异性反应和非特异性反应也会增加,所以要求增加的标记分子特异性好、具有一定代表性<sup>[14-15]</sup>。

#### 2.2 CTCs 检测鉴定方法

**2.2.1 FCM** FCM 通过检测细胞标记的荧光信号,从而实现高速、逐一的细胞定量分析和分选<sup>[16]</sup>。FCM 可作为诊断癌前病变发展至癌变的一个重要标志,精确定量 DNA 水平的改变,对癌前病变的性质及发展趋势做出评估,有助于癌变的早期诊断。FCM 的优点是可以定量计数肿瘤细胞,可精确定量 DNA 水平。缺点是敏感度较低,检测价值依赖于可分析细胞数量。

**2.2.2 免疫细胞化学技术** 免疫细胞化学技术方便、直观,在细胞富集的基础上,利用抗原抗体特异性结合的原理,对肿瘤细胞进行检测及鉴定,但敏感度低,特异度较差。

**2.2.3 RT-PCR** RT-PCR 以上皮源性肿瘤细胞的 mRNA 为标志检测 CTCs,灵敏度高,价格较低,可重复操作,是目前检测 CTCs 最有效的方法。缺点是无法计数,缺乏一定的特异度,易造成假阳性结果,在临床应用上仍有局限性。

### 3 纳米技术在 CTCs 富集检测中的应用

早期免疫磁珠技术磁珠大小只达到微米级,细胞分离效率较低,磁珠较难洗脱,不利于进一步分析。随着技术的发展,磁珠的大小达到了纳米级(10~100 nm)<sup>[17]</sup>,使其与细胞的接触概率增加,大幅度提高了 CTCs 的富集率。但是捕获了 CTCs 的纳米磁珠易聚集,会影响细胞的形态及活性,不利于进一步分析检测。

基于上述技术的缺点,非磁性纳米材料在 CTCs 富集中的应用开始得到关注。研究者们将抗体功能化的不同形状的纳米材料固定在基底上富集 CTCs,提高了细胞与纳米材料的接触概率。捕获到的 CTCs 细胞较易洗脱,减少了对细胞形态及活力和进一步分析检测的影响,从而进一步提高了 CTCs 细胞的富集率和检测灵敏度,实现了 CTCs 富集检测的一体化。

有研究者利用血细胞与肿瘤细胞在纳米粗糙表面的不同黏附特性实现 CTC 的分离富集<sup>[18]</sup>。随着粗糙度的增加,肿瘤细胞的黏附增多,而正常细胞不受影响。避免了因特异性抗原丢失所导致的假阴性结果,提高了检测的准确性。

血液中 CTCs 水平相对于白细胞来说极少,这便成为 CTCs 富集检测中的首要困难。微流控芯片具有液体流动可控、消耗试样和试剂极少、分析速度高等特点。有研究者将纳米材料与微流控技术相结合<sup>[19]</sup>,构建一种肿瘤细胞表面特异性识别抗体功能化的鱼骨形芯片,使血液流过一个可视通道,通道内鱼骨形沟回能够引起血液的一个轻微斡旋,从而增强了其与抗体修饰表面的接触。该技术不用对血液样本进行预处理,操作方便,灵敏度更高,且获得的 CTCs 仍能够保持活性,用于进一步分析检测。

### 4 CTCs 富集检测在临床应用存在的问题和前景

CTCs 检测是一种新型的诊断工具,属于非侵入性操作,但也有一定的弊端。如外周血中 CTCs 数量稀少,且具有异质性、易聚集成团。已有微流控技术与纳米材料联合应用的相关研究<sup>[20]</sup>,寻找新的特异性标志或多种检测技术的联合应用是必然的发展趋势。随着技术的发展进步,已经研究出可观的新方法,但是关于 CTCs 的临床实用性的评估仍是必不可少的,还需要建立规范的实验流程使其标准化。CTCs 检测技术成本较高也是需要解决的一个重要问题。随着研究的不断深入和未来科技的发展,CTCs 检测势必在临床肿瘤的诊治过程中得到广泛应用,其检测的同时所伴随的问题也会不断的改进与解决,其检测方法的更加高效、经济、快速是必然的趋势。

### 参考文献

[1] 郭浩,刘剑新. TCT 在泌尿系上皮肿瘤诊断中的应用进展[J]. 浙

江医学,2014,20(2):135-136.

- [2] 申珊珊. 循环肿瘤细胞(CTCs)在监测肿瘤转移中的应用[C]. 北京:第十四届全国肿瘤生物治疗大会论文集,2015:105-106.
- [3] 杨卓,张玉娟,陈倩,等. 循环肿瘤细胞检测及其特性[J]. 协和医学杂志,2013,4(2):191-194.
- [4] 张玉娟. 循环肿瘤细胞检测的方法学建立和改良及在实体瘤中的监测应用研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.
- [5] 戚大梁,王强,易维京. 循环肿瘤细胞检测方法和技术研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(24):3022-3024.
- [6] Gupta V, Jafferji I, Garza M, et al. ApoStream<sup>TM</sup>, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood[J]. *Biomicrofluidics*, 2012, 6(2): 24133.
- [7] 王莹,梁砚菲,陶敏. 循环肿瘤细胞的生物学特性及其检测方法和应用进展[J]. 广西医科大学学报,2014,31(2):329-332.
- [8] 稽金陵,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.
- [9] 李媛,宋丽华,宋现让. 小细胞肺癌患者循环肿瘤细胞检测技术及应用现状[J]. 中华肿瘤防治杂志,2013,20(10):793-796.
- [10] Truini A, Alama A, Coco S, et al. Clinical applications of circulating tumor cells in lung cancer patients by cell search system[J]. *Front Oncol*, 2014, 20(4): 242.
- [11] Cohen SJ, Punt CJ, Nicholas I, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *J of Clin Oncol*, 2008, 26(19):3213-3221.
- [12] Frithiof H, Welinder C, Larsson AM, et al. A novel method for downstream characterization of breast cancer circulating tumor cells following cell search isolation[J]. *Jour Trans Med*, 2015, 13(1):200-202.
- [13] 赵丽娜,蔡莉. 乳腺癌循环肿瘤细胞研究进展与展望[J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(22):1810-1815.
- [14] Isabelle D, Guerrouahen BS, Naoual BF, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. [J]. *Anticancer Research*, 2011, 31(2):427-441.
- [15] 龚学军. CEA 及 CK20 的不同检测方法对结直肠癌诊断及预后评估的初步探讨[D]. 长沙:中南大学,2010.
- [16] 史珂玮,刘春芳. 循环肿瘤细胞与肿瘤恶性行为间的关系[J]. 标记免疫分析与临床,2014,21(5):603.
- [17] Li FR, Li Q, Zhou HX, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer with a refined immunomagnetic nanoparticle enriched assay and nested-RT-PCR[J]. *Nano Med*, 2013, 9(7): 1106-1113.
- [18] Chen W, Weng S, Zhang F, et al. Nanoroughened surfaces for efficient capture of circulating tumor cells without using capture antibodies[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(1):566-575.
- [19] Stott SL, Chia-Hsien H, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(43):18392-18397.
- [20] 刘玉磊. 基于纳米材料的微流控技术在 HIV 和 HCV 检测中的应用研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心,2012.

(收稿日期:2015-12-24)