

• 综 述 •

循环肿瘤细胞检测在三阴乳腺癌疾病中的应用进展*

安 成, 孙士鹏, 程 实 综述, 刘贵建[△] 审校
(中国中医科学院广安门医院检验科, 北京 100053)

摘 要: 循环肿瘤细胞检测在肿瘤疾病预后评估和转移机制研究中的作用倍受关注, 该文通过文献分析, 对循环肿瘤细胞在三阴乳腺癌疾病转移机制和预后评估及治疗监测中的应用进行综述。

关键词: 循环肿瘤细胞; 三阴乳腺癌; 恶性肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.003

中图法分类号: R732.4

文章编号: 1673-4130(2018)16-1944-04

文献标识码: A

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤。基于激素受体和人表皮受体(Her2)的表达方式, 乳腺癌通常分为 3 种亚型: luminal 型(激素受体阳性, Her2 阴性), Her2 扩增型和三阴型(激素受体和 Her2 均为阴性)。三阴乳腺癌(TNBC)具有高度分子异质性, 占全部乳腺癌的 15%~20%。因其特殊的病理特征, 对大多数内分泌治疗及分子靶向治疗(针对 Her-2 基因)均不敏感, 具有侵袭性高、易转移复发、预后差等生物特点。TNBC 发生转移的时间间隔较短^[1], 并且这些肿瘤偏爱血行播散和远端转移^[2], 这使在外周血中检测肿瘤细胞成为可能。循环肿瘤细胞(CTC)是从实体瘤原发灶或转移灶脱落下来进入循环系统的肿瘤细胞, 是具有原发灶或转移灶的生物标志, 可用于临床检测, 是当下液体活检的主要标志物之一, 其在肿瘤预后评估和治疗监测中的价值逐渐被重视。本文就其在 TNBC 中的应用进行综述。

1 CTC 检测技术和方法

CTC 计数是目前 CTC 在临床上应用的主要方式^[3-8], 其检测主要分为 CTC 富集和 CTC 分析 2 个关键步骤。根据 CTC 生物物理特性^[9], 科学家们研究出多种富集方法。这些方法依据反应原理分为阳性富集和阴性富集两大类。阳性富集是基于免疫亲和的方法将肿瘤细胞特有的标志蛋白相对应的抗体标记在载体上, 通过抗原抗体的特异结合, 将 CTC 从众多循环血液细胞中分离出来; 而阴性富集是用能够特异识别血细胞 CD45 的抗体去除血液细胞的方法富集 CTC。由于肿瘤细胞的异质性很大, 即使是同一类型的肿瘤细胞, 细胞表面表达的抗原变化也很大, 尤其是肿瘤细胞的上皮-间质转化现象的出现, 使阳性富集的方法具有一定的局限性, 造成假阴性。因而基于物理特性的富集方法得到发展, 如根据肿瘤细胞大小、变形能力和电荷情况等发展起来的密度梯度离心^[10]、

原子力显微镜^[11]、微孔过滤^[12]、微流控^[13]和双向电泳^[14]等富集技术。基于技术原理不同分离得到的 CTC 有一定的偏差, 不同的分离方法得到的 CTC 并不完全一致。到目前为止, 还没有 1 个通用的标志物能够用来富集或检测所有的肿瘤细胞, 因此要根据检测 CTC 的特性来选择相应的分离或检测方法。检测乳腺癌 CTC 的金标准是美国 FDA 批准的 CellSearch[®] 方法, 大多数临床试验也是基于此方法进行 CTC 在肿瘤疾病预后评估、复发监测和疗效评价研究的。该方法是目前为止经过大量临床数据验证并通过美国 FDA 批准的方法, 适用于乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌疾病的临床相关性评价。

2 CTC 在 TNBC 转移机制研究中的应用

上皮性肿瘤的转移机制研究源于小鼠动物模型, 在肿瘤原发灶内肿瘤细胞的上皮属性向间质属性转化, 导致肿瘤细胞具有向血液侵袭的能力, 进入血流中的 CTC 抵抗血流机械剪切力, 免疫攻击等得以存活, 存活下来的 CTC 在远端向血管外侵袭, 侵袭到血管外的肿瘤细胞由间质属性向上皮属性转化, 并在远端聚居增殖, 形成上皮肿瘤转移灶。肿瘤细胞转移既可单个转移也可协调转移, 乳腺癌肿瘤细胞倾向协调转移, 在循环中以栓子形式存在。ACETO 等^[15]通过试验研究证明 CTC 簇比单个 CTC 更具有抵抗细胞凋亡的能力, 更易在远端器官的毛细血管床停留, 更具有转移的能力。在实验中观察到, 平均每个小鼠模型中检测的 2 486 个 CTC 中, CTC 簇仅占 2.6%, 97.4% 都是单个的 CTC。在平均每个小鼠模型的 323 个肺转移灶中, 有 53% 来自 CTC 簇, 47% 来自单个 CTC。以肺转移灶的数量和分布为标准, 校准单个 CTC 和 CTC 簇的分布和数目, CTC 簇造成的肺转移比单个 CTC 高 23~50 倍。同时, 该研究通过试验推测 CTC 簇是来自原发肿瘤邻近细胞团或单个 CTC

* 基金项目: 中国中医科学院广安门医院所级课题资助项目(2003S65; 2014S301)。

[△] 通信作者, E-mail: liuguojian@163.com。

本文引用格式: 安成, 孙士鹏, 程实, 等. 循环肿瘤细胞检测在三阴乳腺癌疾病中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(16): 1944-

造成转移灶细胞的再转移,而不是单个 CTC 在血管内的聚集。通过 CTC 簇 RNA 测序鉴定发现,盘状球蛋白是人乳腺癌肿瘤细胞簇的关键调解子,以多种方式在原发肿瘤内表达,在小鼠模型中敲除盘状球蛋白能抑制 CTC 簇的形成和减少肿瘤的转移播散。

在外周血中分离 CTC,检测 CTC 中与肿瘤生成相关因子的表达情况,探索与肿瘤生成或转移相关的机制。TP53 突变是 TNBC 发生的重要驱动因子。FERNANDEZ 等^[16]从 TNBC 患者外周血中分离单个 CTC 进行测序,结果显示 CTC 具有明显的异质性,在 TRF001321 病例中,分离到的 6 个单个 CTC,1 个表现为与自身肿瘤组织相一致的 TP53 R110delG 突变,1 个表现为 TP53 R110 delC 突变,4 个表现为与自身白细胞相一致的野生型序列。这个 CTC 测序是在肿瘤组织活检后的 1 年进行的,TP53 R110 delC 突变可能是肿瘤细胞进展中发生的新的突变,是疾病进一步恶化的表现。乳腺癌转移具有器官倾向性,高表达 CXCL12 的器官通常是乳腺癌转移的靶器官,如淋巴结、肺、肝和骨髓,因为乳腺癌组织高表达 CXCR4。

CXCR4-CXCL12 的相互作用能促进乳腺癌细胞向这些高表达 CXCL12 的器官转移。在 MEGO 等^[17]的研究中,发现上皮性 CTC 的样本组有 CXCR4 高表达,血浆中的 SDF-1 水平也与外周血中的上皮性 CTC 相关,说明 CXCR4-SDF-1 轴与上皮性 CTC 的归巢和贩运相关。CD133 被认为是多个肿瘤的起始细胞标志,包括胶质瘤、前列腺癌和结直肠癌。表达 CD133 的肿瘤细胞具有癌干细胞的属性,具有有利于 EMT 的细胞的迁移和模拟血管形成的属性。NADAL 等^[18]应用 CD133 和 CK 将乳腺癌的 CTC 进行分类分析,发现 CK 阳性的 CTC 中有 65% CD133⁺,大部分乳腺癌患者经过治疗后 CD133⁺ CTC 下降,而在 TNBC 患者中却看到上升趋势(从 50% 上升到 66.6%),这个现象还需要大样本进一步验证。其他肿瘤干细胞标志如 ALDH-1 也被用来作为 CTC 检测的标志^[19-20]。在 BOUCHARD 等^[21]研究 TNBC 放射治疗诱导的肺转移与 MT1-MMP 的关系时,将 D2A1 标记 FCC 后接种到鼠的胸部脂肪垫中,用荧光显微镜检测外周血中标记 FCC 的 D2A1 细胞,以判断血行转移。另有研究报道,IL-1 α 是来源于肿瘤细胞的 Th1 细胞因子,其在 TNBC 患者血清中高表达,说明 TNBC 转移可能是通过血循环转移而不是通过淋巴系统转移的^[22]。总之,一些与肿瘤转移机制相关的分子现象,科学家们正通过实验在 CTC 中加以验证。

3 CTC 检测在 TNBC 预后评估和治疗监测中的作用

标准的预后因子如原发肿瘤大小和病理级别高低不能预示 TNBC 的预后。在新辅助治疗后的 TNBC 患者外周血中检测到 CTC 或 CTC 数目增加,表明有不好的无复发生存期(RFS)和总体生存期(OS),

这可以帮助鉴别无转移 TNBC 进展的风险性和因此决定是否进行其他辅助治疗^[23-24]。在 HALL 等^[23]的双盲随机研究中,CTC 的出现与肿瘤的大小、病理级别和患者的病灶附近淋巴结病理状态没有关系,而与 RFS 和 OS 有关。在 40 例没有检测到 CTC 的 TNBC 患者中,病死率为 7.5%,而在检测到 CTC 的 17 例 TNBC 患者中,病死率为 29.4%,说明 CTC 能够预测 RFS 降低。JIANG 等^[3]的多中心临床研究显示,中国 TNBC 患者基线 CTC 数>5 个的患者,其无进展生存期(PFS)和 OS 比<5 个的患者要短,并且在第 1 次、第 2 次随访中也是同样的结果。但是多变量回归分析显示,基线 CTC 数量既不是 PFS 也不是 OS 的独立预测因子,而第 1 次和第 2 次随访的 CTC 计数是 PFS 和 OS 的独立预测因子,这与其他类型乳腺癌不同,MAGBANUA 等^[4]也得到类似的结论。说明 CTC 是 TNBC 随访的预后因子。基线 CTC 与时间-进展无关,但在第 7~14 天的 CTC 数与时间-进展相关,与 OS 相关。而在另一项中国 TNBC 的研究中显示^[5]:基线 CTC 检出阳性率随着 TNBC 的 TNM 分级增高而增加,但是与患者的年龄、肿瘤的大小和月经状态或肿瘤的组织病理级别无关,CTC 数目也随 TNM 分级的级别增高而增加。CTC 数目在基线、术后第 3 天和第 7 天呈动态变化,术后第 3 天的 CTC 数目比基线水平高,但在术后第 7 天有所下降。在手术前,CTC 数目>5 个的 TNBC 患者的生存曲线明显比<5 个的患者陡峭。前者最短的 OS 是 8.3 个月,PFS 是 3.2 个月,后者最短的 OS 是 11.4 个月,PFS 是 5.6 个月。亦有研究表明,在治疗前每 7.5 mL 血液中含有 5 个或 5 个以上 CTC 的患者在经过治疗后,CTC 没有被清除的预后要比治疗前 CTC 数少于 5 个的差。YAN 等^[25]的 meta 分析显示,TNBC 治疗后的 CTC 数目没有像其他类型乳腺癌一样,随着治疗而减少,这也进一步说明 TNBC 预后差的疾病特点。

许多临床病例研究证实 CTC 是乳腺癌患者 PFS 和 OS 的独立预测因子,在任何时间点检测到 CTC 都暗示疾病进展的高风险^[6],而在治疗后的 TNBC 患者外周血中检测到 CTC 和 CTC 数目增加,提示其治疗效果不好,在基线时检测 CTC 的作用不如随访中监测 CTC 的作用明显。亦有研究发现,检测到 CTC 簇对评价疾病的进展和预后比单独检测到 CTC 更有价值。在 PAOLETTI 等^[7]的 II 期临床试验研究中发现,在随访第 15 天和第 19 天,带有 CTC 簇的 TNBC 患者的 PFS 要比无 CTC 簇患者短。QIAO 等^[8]认为手术治疗会增加肿瘤细胞脱落和进入外周血的可能性,因此在手术前和术后应检测 CTC 数量和监测 CTC 数量的动态变化来评估疾病进展情况。

4 问题与展望

检测 CTC 数目和动态变化能够反映肿瘤负载,预示早期复发和转移,监视疾病的进展,帮助临床医师选择最佳治疗和有效干预转移形成的治疗方案,在

控制疾病,减少复发,提高治疗效果和改善预后方面十分重要。与传统检查方法如骨髓活检、组织病理学检查、影像学检查、肿瘤细胞播散检查相比较,CTC 检查有许多优点,该方法取材方便,损伤小,可多次重复检测,能实时动态监测,且具有较高敏感性^[26]。但大多数方法尚局限于科学研究,仅有部分取得临床转化。大多数商品化方法不能捕获活的肿瘤细胞,限制了相关的科学研究和应用。另外,检测方法之间缺乏标准化,评价标准不一,在临床应用上还需要临床专家、检验医学专家和技术研发人员共同制定专家共识,来指导其在临床上的应用。

综上所述,CTC 检测在 TNBC 疾病预后评估和转移机制研究中的作用备受关注并逐步在临床上得到应用,尤其是在随访中监测 CTC 的变化能够帮助医生评估疾病的进展。但该技术还需要多中心的临床实践,建立中国的 CTC 检测技术协作组,从检验前、中、后来规范检测技术和结果解释的标准化,实现其精准个体化诊治的最终目标。

参考文献

- [1] DENT R, TRUDEAU M, PRITCHARD K I, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15 Pt 1): 4429-4434.
- [2] TSUDA H, TAKARABE T, HASEGAWA F, et al. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases[J]. *Am J Surg Pathol*, 2000, 24(2): 197-202.
- [3] JIANG Z F, CRISTOFANILLI M, SHAO Z M, et al. Circulating tumor cells predict progression-free and overall survival in Chinese patients with metastatic breast cancer, HER2-positive or triple-negative (CBCSG004): a multicenter, double-blind, prospective trial [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(11): 2766-2772.
- [4] MAGBANUA M J, CAREY L A, DELUCA A, et al. Circulating tumor cell analysis in metastatic triple-negative breast cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(5): 1098-1105.
- [5] ZHANG Y, LV Y, NIU Y, et al. Role of circulating tumor cell (CTC) monitoring in evaluating prognosis of triple-negative breast cancer patients in China[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3071-3079.
- [6] SAWADA T, ARAKI J, YAMASHITA T, et al. Prognostic impact of circulating tumor cell detected using a novel fluidic cell microarray chip system in patients with breast cancer[J]. *Ebiomedicine*, 2016, 11: 173-182.
- [7] PAOLETTI C, LI Y, MUNIZ M C, et al. Significance of circulating tumor cells in metastatic triple-negative breast cancer patients within a randomized, phase II trial: TBCRC 019[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(12): 2771-2779.
- [8] QIAO Y Y, LIN K X, ZHANG Z et al. Monitoring disease progression and treatment efficacy with circulating tumor cells in esophageal squamous cell carcinoma: A case report [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(25): 7921-7928.
- [9] 安成,程实,王涛,等. 循环肿瘤细胞生物物理特性的研究[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(9): 1280-1282.
- [10] ROSENBERG R, GERTLER R, FRIEDERICH S, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood[J]. *Cytometry*, 2002, 49(4): 150-158.
- [11] LI Q S, LEE G Y, ONG C N, et al. AFM indentation study of breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(4): 609-613.
- [12] ZHENG S, LIN H K, LU B, et al. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood[J]. *Biomed Microdevices*, 2011, 13(1): 203-213.
- [13] GOSSET D R, HENRY T, LEE S A, et al. Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping[J]. *PNAS*, 2012, 109(20): 7630-7635.
- [14] SHIM S, STEMKE-HALE K, NOSHARI J, et al. Dielectrophoresis has broad applicability to marker-free isolation of tumor cells from blood by microfluidic systems [J]. *Biomicrofluidics*, 2013; 7(1): 11808-11812.
- [15] ACETO N, BARDIA A, MIYAMOTO D T, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis[J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1110-1122.
- [16] FERNANDEZ S V, BINGHAM C, FITTIPALDI P, et al. TP53 mutations detected in circulating tumor cells present in the blood of metastatic triple negative breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(5): 445.
- [17] MEGO M, CHOLUJOVA D, MINARIK G, et al. CXCR4-SDF-1 interaction potentially mediates trafficking of circulating tumor cells in primary breast cancer [J]. *Bmc Cancer*, 2016, 16(1): 127.
- [18] NADAL R, ORTEGA F G, SALIDO M, et al. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: Potential role in resistance to chemotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(10): 2398-2407.
- [19] AKTAS B, TEWES M, FEHM T, et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(4): R46.
- [20] RAIMONDI C, GRADILONE A, NASO G, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(2): 449-455.
- [21] BOUCHARD G, THERRIAULT H, GEHA S, et al. Radiation-induced lung metastasis development is MT1-MMP-dependent in a triple-negative breast cancer mouse model[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(4): 479-488.
- [22] VILSMAIER T, RACK B, KNIG A, et al. Influence of circulating tumor cells on production of IL-1 α , IL-1 β and IL-12 in Sera of Patients with primary diagnosis of breast cancer before treatment [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10): 5227-5236.
- [23] HALL C, KARHADE M, LAUBACHER B, et al. Circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy in stage I - III triple-negative breast cancer[J]. *Ann Surg*

Oncol, 2015, 22(3):552-558.

[24] SMITH B L. Neoadjuvant versus adjuvant systemic therapy for operable breast cancer: equivalent outcomes? [J]. Ann Surg, 2013, 257(2):180-181.

[25] YAN W T, CUI X, CHEN Q, et al. Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis [J]. Sci Rep, 2017, 7:43464.

[26] SLADE M J, PAYNE R, RIETHDORF S, et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumor cells and blood-circulating tumor cells in breast cancer patients after primary treatment [J]. Br J Cancer, 2009, 100(1):160-166.

(收稿日期: 2017-12-29 修回日期: 2018-03-06)

• 综 述 •

液体标本在非小细胞肺癌 EGFR 突变检测中的应用

沈才路 综述, 白静慧[△] 审校

(中国医科大学肿瘤医院/辽宁省肿瘤医院综合内科, 辽宁沈阳 110042)

摘 要:驱动基因检测基础上的靶向治疗是晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的一种重要治疗手段。目前肿瘤组织标本仍是基因检测的金标准,但大多数患者往往无法耐受创伤性的检查。探索组织标本的替代品——液体标本活检是当前临床研究的热点。液体活检是指通过检测体液(包括血液、唾液、尿液、痰液、胸腹腔积液等)中的循环肿瘤细胞(CTCs)和循环肿瘤 DNA(ctDNA)等来源于肿瘤的生物标志物,获取相关驱动基因的信息。该文对几种热点液体标本的表皮生长因子受体(EGFR)突变的检测进行综述,并探讨其对指导 NSCLC 精准治疗的应用价值。

关键词:液体标本; 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 精准治疗

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.004 **中图法分类号:**R734.2

文章编号:1673-4130(2018)16-1947-04 **文献标识码:**A

肺癌的发病率和病死率均在所有恶性肿瘤中居于首位^[1],其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌总数的80%~85%。多数NSCLC患者初次就诊时已属于不可手术的局部晚期或发生远处转移,失去了根治性手术的机会。化疗是这类患者最常用的治疗方式,但如今传统细胞毒性化学药物的疗效已经处于平台期^[2]。随着驱动基因的发现和相应靶向药物的使用,NSCLC的治疗走上了以基因为靶点的精准治疗之路^[3]。目前检测肺癌驱动基因的金标准是肿瘤组织,常见的获取病理组织的方式包括支气管镜下活检、纵隔镜或胸腔镜活检、淋巴结活检等^[4]。然而这些取材方法均属于有创操作,不宜多次获取用于追踪病情和观察肿瘤基因状态的变化。近年来新的基因检测技术——液体活检的问世,给肺癌的精准治疗带来了新的希望。液体活检是通过检测体液(如血液、唾液、尿液、痰液、胸腹腔积液等)中的循环肿瘤细胞(CTCs)和循环肿瘤DNA(ctDNA)等来源于肿瘤的生物标志物^[5],获取相关驱动基因的信息。这些体液标本不仅通过相对无创的方式便可获取,而且能够动态反馈疾病的进展,为NSCLC的临床诊断、病情评估、精准治疗、疗效评价、预后预测提供了一种简便有效的手段。

1 NSCLC 中表皮生长因子受体(EGFR)突变检测的意义及研究现状

目前,越来越多的肺癌驱动基因正逐步被发现,众多驱动基因中,对EGFR基因检测技术的应用较为

成熟^[6]。位于细胞膜上的EGFR是原癌基因的表达产物,信号通过EGFR传递至细胞核,核内基因发生转录,促使细胞增殖、分化,若EGFR发生突变则可导致肿瘤的发生^[7]。NSCLC中最常见,且有针对性靶向药物的基因突变就是EGFR突变(mEGFR)。肿瘤组织证实,存在mEGFR的患者接受表皮生长因子受体酪氨酸抑制剂(EGFR-TKIs)靶向治疗,客观有效率可提高到70%左右,无进展生存期(PFS)能提高到8个月左右^[8],总生存期长达2年^[9]。这类患者生存时间的延长,生存质量的提高,得益于mEGFR的检出。因此,针对NSCLC进行的mEGFR检测受到了越来越多的重视。应用商品化的Cobas EGFR PCR试剂盒对肿瘤组织进行mEGFR检测是目前“金标准”^[10]。然而即使是前瞻性试验,也有超过50%的患者无法取到满意的肿瘤组织^[11],而获取的病理组织由于存在肿瘤异质性也会受到选择偏倚。且EGFR敏感基因突变不可避免地发展成耐药基因突变,此时肿瘤组织取材率较初诊时能获取的比例更低,这对mEGFR的初步检测和连续监测而言是一个巨大的挑战。针对组织活检的种种局限性,液体活检应运而生。

2 液体标本活检

2.1 外周血标本 目前国内外学者研究最多的是利用NSCLC外周血进行mEGFR的检测^[12]。BAI等^[13]采用变性高效液相色谱法(DHPLC)对230例晚

[△] 通信作者, E-mail: baijinghui559@163.com。

本文引用格式: 沈才路, 白静慧. 液体标本在非小细胞肺癌 EGFR 突变检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(16):1947-1950.