

• 综 述 •

循环肿瘤细胞在早期肺癌诊断及预后的研究进展^{*}

龚 臣 综述, 闫 萍[△] 审校

广西医科大学第一附属医院老年病学呼吸内科, 广西南宁 530021

摘 要:肺癌在全球恶性肿瘤中发病率和死亡率最高, 直接威胁人类健康。肺癌的早期诊断将直接影响患者的预后。目前证据表明, 早期肺癌仍有潜在转移风险, 局部病灶活检并不能反映肿瘤的真实情况。液体活检预示着一个新时代的到来, 循环肿瘤细胞被广泛用于转移性疾病的诊断及预后复发。该文着重介绍循环肿瘤细胞作为生物标志物在早期肺癌检测、预后评估中的研究进展。

关键词:循环肿瘤细胞; 肺肿瘤; 液体活检

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.23.023

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2023)23-2934-04

文献标志码:A

Research progress of circulating tumor cells in diagnosis and prognosis of early lung cancer^{*}

GONG Chen, YAN Ping[△]

Department of Respiratory Medicine in Geriatrics, the First Affiliated Hospital
of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China

Abstract: Lung cancer has the highest morbidity and mortality among malignant tumors in the world and is a direct threat to human health. The early diagnosis of lung cancer will directly affect the prognosis of patients. Current evidence suggests that early stage lung cancer still has the potential to metastasize, and local focus biopsy does not reflect the true tumor situation. Liquid biopsy herald a new era in which circulating tumor cells are widely used in the diagnosis and prognosis of metastatic disease. This review focuses on the research progress of circulating tumor cells as biomarkers in the detection and prognosis assessment of early lung cancer.

Key words: circulating tumor cells; lung neoplasms; liquid biopsy

肺癌是男性最常见的癌症, 女性肺癌发病率仅次于乳腺癌, 乳腺癌每年估计有 230 万新病例 (11.7%), 其次是肺癌 (11.4%)、结直肠癌 (10.0%)、前列腺癌 (7.3%) 和胃癌 (5.6%)。肺癌是包括中国在内的许多国家的肿瘤死亡首要原因, 每年估计有 180 万人死亡 (18%)^[1]。肺癌可分为两个主要的细胞学亚群: 小细胞肺癌 (SCLC) 占 20%, 非小细胞肺癌 (NSCLC) 占 80%。NSCLC 进一步细分为腺癌、鳞状细胞癌和大细胞癌。由于约 70% 的肺癌患者确诊时已是晚期, 不能行手术治疗, 化疗、放疗和靶向治疗是最常见的治疗选择, 但 5 年生存率较低。对于少数早期 NSCLC 患者, 手术治疗是最常见的治疗选择, 然而仍有肿瘤复发转移, 总体存活率仍然很低。

诊断肺癌的阶段对预后有重大影响。然而, 肺癌的及时检测较为困难, 因为患者在早期通常没有症状。低剂量计算机断层扫描 (LDCT) 是目前最广泛推荐的肺癌筛查方法, 但它会带来辐射风险, 并且单一的 LDCT 检查, 在临床实践中, 区分孤立性肺结节良

恶性仍然是一个挑战。早期肿瘤已经出现潜在转移是导致较低存活率的一个重要因素, 且选择性治疗往往基于单个肿瘤活组织表型和分子检查, 这可能低估了肿瘤异质性, 而没有考虑肿瘤进化和治疗抵抗的能力^[2]。肺癌的监测对治疗的成功至关重要, 然而复发的活组织检查通常较困难。因此, 能够识别早期出现的治疗耐药性并发现新的驱动突变的微创方法对于优化肺癌治疗至关重要。这种微创方法被统称为“液体活检”, 它利用的是肿瘤可以将细胞和分子成分转移到血液中, 在那里它们可以被识别为循环肿瘤细胞 (CTCs) 和循环游离核酸 (cfNAs)。尽管在肺癌中, cfNAs 的检测已经取得了相当大的进展, 尤其是循环肿瘤 DNA (ctDNA) 的检测, CTCs 是循环系统外渗的肿瘤, 是转移的前体, 因此, 它们是包括微转移在内的癌症监测的理想目标^[3-4]。CTCs 仍然是研究肿瘤生物学的重要手段, 因为它们可以用于建立体内和体外模型, 用于测试新药或药物组合, 并识别可能的耐药机制^[5]。

^{*} 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题 (Z20210089)。

[△] 通信作者, E-mail: Yp2000cn@126.com。

CTCs 的分子和遗传特性研究是一个相对较新的领域,在这一过程中逐渐向临床转化。肺癌若在早期发现并干预,将直接影响患者的预后,本篇综述将着重介绍 CTCs 在指导肺癌早期筛查、治疗预后评估、随访过程中的应用。

1 CTCs 作为早期肺癌检测的生物标志物

由于原发肿瘤在其整个发展过程中,甚至在肿瘤发展的早期阶段 CTCs 就能游离出原发组织^[6],因此,检测 CTCs 可能为早期癌症检测提供一种灵敏的方法。早期发现对肺癌患者尤其有益,因为肺癌患者大部分确诊时已是晚期,治疗局限,且效果差。有研究表明,在 168 例慢性阻塞性肺疾病患者中,有 5 例患者检测到 CTCs,预测到随访后的 1~4 年内会出现肺小结节^[7]。最近,一项研究评估了 CTCs 的存在,以区分良恶性肺部病变^[8]。恶性病变患者中有 90% 检测到 CTCs,良性病变患者中有 5% 检测到 CTCs。HASHIMOTO 等^[9]也发现,给予 I 期的 NSCLC 患者术前进行 CTCs 检测,发现 17 例患者检测到 CTCs,其中 2 例病理结果证实为肺内转移灶,对另外 15 例患者进行长期随访发现,术前 CTCs 阳性与术后复发相关。

血液中的 CTCs 可作为有效筛查和诊断的标志物,以区分小的恶性肺结节和良性病变。有学者对直径小于 30 mm 的肺结节患者进行研究,分析 CTCs、CT 检查特征、血清肿瘤标志物浓度及组织病理学特征,发现良恶性肺结节患者的 CTCs 有明显差异,联合使用 CTCs 和 CT 确定的结节密度特征进一步提高了恶性肺结节的诊断效果,以及 TNM 分期的确定^[10]。循环基因异常细胞(CACs)也可以用来鉴别肺癌和良性肺部病变。使用 LDCT 进行肺癌筛查在肺结节≤10 mm 的患者中特异度较低,国内一项多中心前瞻性研究表明,当 CACs 的最佳临界值为 2 时,肺癌的灵敏度和特异度分别为 70.5% 和 86.4%。提示 CACs 对肺结节≤10 mm 有较好的肺癌诊断价值^[11]。

MANJUNATH 等^[12]研究发现,在所有 NSCLC 患者中检测到 CTCs。在肿瘤诊断方面,目前肿瘤早期筛查主要依靠血清肿瘤标志物和 CT 检查;传统检测需要病灶形态提示高度恶性才考虑切除。CTCs 从原发性或转移性肿瘤脱落后在外周血中循环,因此检测不依赖于肿瘤负荷,从而使 CTCs 具有更高的灵敏度和特异度。CTCs 在原发性肺癌诊断中的阳性检出率高于血清肿瘤生物标志物。CTCs 是疾病状态的可靠指标,可作为诊断 NSCLC 有利的生物学标志物。使用新的配体靶向 PCR 检测技术,研究了 CTCs 区分 NSCLC 与肺部良性疾病的诊断价值,检测到的 CTCs 的分子表型可用于区分肿瘤类型。叶酸受体阳性 CTCs 在肺癌诊断中显示出较高的诊断效力^[13]。叶酸受体阳性 CTCs 与其他肿瘤生物标志物的组合可以明显提高区分肺癌和肺部良性疾病的诊断效能^[14]。

因此,液体活检作为一种非侵入性检测方式,操

作简单。CTCs 可能是肺癌早期检测的有效标志物,通过检测 CTCs 来早期诊断癌症十分必要。然而,早期肺癌检测由于所涉及的 CTCs 数量较少,且可能有较高的假阴性,因此,在早期肺癌检测中使用 CTCs 的可行性需要一个大型的、多中心的试验。

2 CTCs 作为预后生物标志物

CTCs 在临床上作为预后标志物的应用前景广阔。液体活检作为监测肿瘤遗传学和肿瘤动力学的新方法引起了肿瘤学的极大兴趣,被证明是检测与肿瘤复发明显相关的微小残留病的重要工具。使用液体活检检测外周血中的肿瘤成分,如血浆中的 CTCs 和 ctDNA,已被证明是监测实时肿瘤基因组变化的微创工具^[15]和对治疗的反应,以及调查耐药性和评估可手术早期癌症的肿瘤复发风险,最终将液体活检整合到临床工作流程中^[16]。美国食品药品监督管理局已经批准了几种单基因检测和多基因检测,以检测浆细胞游离 DNA 的遗传改变,用于与特定分子靶向癌症治疗相匹配的伴随诊断^[17]。这些批准标志着液体活检在临床上广泛应用的一个转折点。

癌症驱动基因突变状态和表达特征等分子改变与早期肺癌预后有关。TNM 分期目前仍然是肺癌中使用最广泛的预后工具。然而,分期组内生存的变异性表明有必要寻找额外的预后参数。与此同时,越来越多的证据支持表观遗传改变的预后价值,但基因突变与早期肺癌的预后研究鲜有报道。研究者分析了 73 例早期肺腺癌患者的分子谱,对表皮生长因子受体(EGFR)和 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因(KRAS)进行突变分析。在 5.47% 的患者中发现了 EGFR 突变,仅检测到外显子 19 缺失;9.58% 的患者中存在 KRAS 突变,而只有 1 例患者为间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性;此外,在 56.16% 的患者中检测到 p53 的异常免疫染色^[18]。总之,EGFR 和 KRAS 突变和 ALK 重排的检出率低于欧洲和亚洲国家,而 p53 异常表达的发生率略高。此外,鉴于该研究的样本量较小,有必要对该患者进行更全面的分析^[18]。因此,早期肺癌亦存在基因突变,其预后价值来自欧洲早期肺癌生物库的 NSCLC 标本研究,以评估 TP53、KRAS 和 EGFR 基因突变的预后意义^[19]。该研究包括 11 例从不吸烟者、86 例既往吸烟者、152 例现吸烟者和 1 例不详吸烟状况的患者;鳞癌 110 例,腺癌 133 例,大细胞癌或混合组织 7 例;该研究发现从冰冻的肿瘤组织中提取 DNA,突变率为 48.8%,TP53 突变状态与预后无关;EGFR 基因突变几乎只在从不吸烟的女性中发现;KRAS 基因突变在 18.5% 的患者中检出,且与疾病进展有关。这些结果表明,突变是不同病因和组织病理形式肺癌的良好标志物,但除了 KRAS 突变外,几乎没有预后价值,KRAS 突变可能对腺癌有预后价值^[19]。CTCs 有望作为监测 NSCLC 患者预后和复发的生物标志物。在 100 例 NSCLC 手术切除患者中,48% 的患者检测到了肺静脉循环肿瘤细胞(PV-

CTC), PV-CTC、基因组分析和计数有可能成为 NSCLC 复发的早期预测指标^[20]。在患者纵向监测血液循环中的 CTCs 比放射学证据更能指示疾病复发^[21]。CTCs 的分子特征可以提供基于细胞计数的有用信息。不同转移潜能患者的 CTCs 具有特定的基因特征和不同的表达谱,可用于识别早期 NSCLC 患者的高复发风险^[22]。

手术仍然是早期肺癌患者的最佳治疗策略,但这种手术干预后的评估和预警机制不够健全。CTCs 检测和血浆代谢物分析可能是诊断早期肺癌和识别有疾病复发风险的患者的有效手段^[23]。CTCs 检测可以识别出那些具有较高疾病复发风险的肺癌患者,从而有可能让临床医生确定哪些患者最有可能从手术后的辅助治疗中获益。一项回顾性研究表明,术前 CTCs 水平是 NSCLC 患者预后的独立、灵敏的生物标志物^[24]。基于术前 CTCs 水平在预测 NSCLC 患者术后转移和复发风险中具有重要价值,CTCs 是晚期 NSCLC 患者无进展生存期和总生存期的独立预后指标,当 CTCs 计数添加到完整的临床病理预测模型时,可以改善预后^[25]。CTCs 的检测与早期和晚期 NSCLC 患者的不良临床结局相关。转移是 NSCLC 患者死亡的主要原因。然而,鉴别术后局部或远处转移的 NSCLC 患者仍然具有挑战性。CTCs 能准确反映循环血液中肿瘤细胞微转移对患者治疗及预后的影响。

早期肺癌治疗后随访复查 CTCs 对预测患者预后复发起关键作用。一项荟萃分析评估早期 NSCLC 液体活检的诊断和预后价值^[26],包括常见生物标志物、CTCs、ctDNA、甲基化标志物和 microRNAs。结果提示生物标志物对早期 NSCLC 的估计诊断价值在 0.84~0.87。TNM I 期、T1 期、N0 期、腺癌、年轻和不吸烟等因素有助于降低肿瘤负担,中位细胞游离 DNA 水平为 8.64 ng/mL。对于预后分析,微小残留病检测的存在是疾病复发的一个强有力的预测因子,从分子层面预测复发到影像学监测到疾病进展的间隔时间为(179±74)d。因而,在临床工作中,如果在早期肺癌随访过程中行液体活检,可以提前约半年发现肺癌复发进展。

程序性死亡配体 1(PD-L1)表达阳性的 CTCs 与早期肺癌不良结局相关。目前多项研究表明,CTCs 与接受免疫检测点抑制剂治疗的 NSCLC 预后有关^[27-29]。外周血 CTCs 表面含有 PD-L1 蛋白的表达,从肺癌的早期阶段分离出的 CTCs 预示着预后不良,并且可以通过定期随访来确定预测复发的生物标志物^[30],但该研究仅包括 36 例肺癌患者,并且患者的分期并不都是早期(I 期患者仅 19 例)。另外一项扩大样本研究表明,对 110 例可手术的肺癌患者通过肺静脉检测 CTCs,其中仅 4 例未发现 CTCs^[31],根据患者肺静脉 CTCs 是否表达 PD-L1,将患者分为 PD-L1 阳性 CTCs 组(56/110,50.1%)和 PD-L1 阴性 CTCs 组

(54/110,49.9%);单变量分析显示 PD-L1 阳性 CTCs 组患者的中位无病生存期缩短,PD-L1 阳性 CTCs 组的中位无病生存期为 16.7 个月,PD-L1 阴性 CTCs 组中位无病生存期为 24.5 个月,因而,CTCs 中 PD-L1 的检测可能为术后辅助免疫治疗提供重要决策。

CTCs 在肺癌放疗预后中亦发挥着重要作用。对于早期 NSCLC 患者行立体定向放射(SBRT)治疗后,监测 CTCs 可能会提前预警疾病复发或进展,治疗后 CTC 计数阴性可能会为疾病控制提供保证^[32]。CTCs 分析可能有助于加强该人群的临床诊断和随访。SBRT 早期 NSCLC 10%~15%的患者会局部失败,20%~25%的患者会出现远处失败。SBRT 治疗 I 期的 NSCLC 患者在治疗前、治疗期间和治疗后 24 个月内连续采集标本。结果发现治疗前,较高的 CTCs 和治疗后 CTCs 的持续存在与靶向治疗部位以外复发风险增加相关^[33]。这表明 CTCs 分析可能会潜在地识别区域或远处复发风险较高的患者,以及可能从全身治疗或及时的局部区域补救治疗中获益。CTCs 检测可作为 SBRT 后复发风险增加的预后标志物。

综上所述,CTCs 作为液体活检在肺癌早期检测、预后的临床价值较高。肺癌重在早诊早治,若在影像学表现之前和手术干预后进行 CTCs 随访检测,对肺癌早期诊断及预后复发进展起着非常重要的作用。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] MESSARITAKIS I, POLITAKI E, PLATAKI M, et al. Heterogeneity of circulating tumor cells (CTCs) in patients with recurrent small cell lung cancer (SCLC) treated with pazopanib[J]. Lung Cancer, 2017, 104: 16-23.

[3] FARES J, FARES M Y, KHACHFE H H, et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 28.

[4] LIU J L, LIAN J R, CHEN Y F, et al. Circulating tumor cells (CTCs): a unique model of cancer metastases and non-invasive biomarkers of therapeutic response[J]. Front Genet, 2021, 12: 734595.

[5] CHANG Y, WANG Y, LI B, et al. Whole-exome sequencing on circulating tumor cells explores platinum-drug resistance mutations in advanced non-small cell lung cancer[J]. Front Genet, 2021, 12: 722078.

[6] RHIM A D, MIREK E T, AIELLO N M, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation[J]. Cell, 2012, 148(1/2): 349-361.

[7] ILIE M, HOFMAN V, LONG-MIRA E, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease

- [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111597.
- [8] FIORELLI A, ACCARDO M, CARELLI E, et al. Circulating tumor cells in diagnosing lung cancer: clinical and morphologic analysis[J]. Ann Thorac Surg, 2015, 99(6): 1899-1905.
- [9] HASHIMOTO M, TANAKA F, YONEDA K, et al. Significant increase in circulating tumour cells in pulmonary venous blood during surgical manipulation in patients with primary lung cancer[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2014, 18(6): 775-783.
- [10] LIU C, CHEN H, SUN T, et al. The value of circulating tumor cells with positive centromere probe 8 in the diagnosis of small pulmonary nodules [J]. Transl Oncol, 2021, 14(5): 101052.
- [11] YE M, ZHENG X, YE X, et al. Circulating genetically abnormal cells add non-invasive diagnosis value to discriminate lung cancer in patients with pulmonary nodules ≤ 10 mm [J]. Front Oncol, 2021, 11: 638223.
- [12] MANJUNATH Y, UPPARAHALLI S V, SUVILESH K N, et al. Circulating tumor cell clusters are a potential biomarker for detection of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2019, 134: 147-150.
- [13] ILLAHI Y, SIDDIQUI N, NADEEM M. WITHDRAWN: diagnostic accuracy of folate receptor-positive circulating tumor cells detected by ligand-targeted polymerase chain reaction in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis[J]. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2020, 11: S1658-3876.
- [14] WANG L, WU C, QIAO L, et al. Clinical significance of folate receptor-positive circulating tumor cells detected by ligand-targeted polymerase chain reaction in lung cancer [J]. J Cancer, 2017, 8(1): 104-110.
- [15] LIU C, XIANG X, HAN S, et al. Blood-based liquid biopsy: insights into early detection and clinical management of lung cancer[J]. Cancer Lett, 2022, 524: 91-102.
- [16] IGNATIADIS M, SLEDGE G W, JEFFREY S S. Liquid biopsy enters the clinic-implementation issues and future challenges[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(5): 297-312.
- [17] NTZIFA A, KOTSAKIS A, GEORGOULIAS V, et al. Detection of EGFR mutations in plasma cfDNA and Paired CTCs of NSCLC patients before and after osimertinib therapy using crystal digital PCR[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(11): 2736.
- [18] DHIEB D, BELGUITH I, CAPELLI L, et al. Analysis of genetic alterations in tunisian patients with lung adenocarcinoma[J]. Cells, 2019, 8(6): 514.
- [19] SCOCCIANTI C, VESIN A, MARTEL G, et al. Prognostic value of TP53, KRAS and EGFR mutations in non-small cell lung cancer: the EUELC cohort[J]. Eur Respir J, 2012, 40(1): 177-184.
- [20] CHEMI F, ROTHWELL D G, MCGRANAHAN N, et al. Pulmonary venous circulating tumor cell dissemination before tumor resection and disease relapse[J]. Nat Med, 2019, 25(10): 1534-1539.
- [21] CHINNIAH C, AGUARIN L, CHENG P, et al. Early detection of recurrence in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer via circulating tumor cell analysis[J]. Clin Lung Cancer, 2019, 20(5): 384-390.
- [22] LIM S B, YEO T, LEE W D, et al. Addressing cellular heterogeneity in tumor and circulation for refined prognostication[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(36): 17957-17962.
- [23] YANG D, YANG X, LI Y, et al. Clinical significance of circulating tumor cells and metabolic signatures in lung cancer after surgical removal[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 243.
- [24] LI Z, XU K, TARTARONE A, et al. Circulating tumor cells can predict the prognosis of patients with non-small cell lung cancer after resection: a retrospective study[J]. Transl Lung Cancer Res, 2021, 10(2): 995-1006.
- [25] LINDSAY C R, BLACKHALL F H, CARMEL A, et al. EPAC-lung: pooled analysis of circulating tumour cells in advanced non-small cell lung cancer[J]. Eur J Cancer, 2019, 117: 60-68.
- [26] SHEN H, JIN Y, ZHAO H, et al. Potential clinical utility of liquid biopsy in early-stage non-small cell lung cancer [J]. BMC Med, 2022, 20(1): 480.
- [27] CASTELLO A, CARBONE F G, ROSSI S, et al. Circulating tumor cells and metabolic parameters in NSCLC patients treated with checkpoint inhibitors [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(2): 487.
- [28] TAMMINGA M, DE WIT S, HILTERMANN T, et al. Circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients are associated with worse tumor response to checkpoint inhibitors[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 173.
- [29] ALAMA A, COCO S, GENOVA C, et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells and circulating cell-free DNA association in metastatic non-small cell lung cancer treated with nivolumab[J]. J Clin Med, 2019, 8(7): 1011.
- [30] MURLIDHAR V, REDDY R M, FOULADDEL S, et al. Poor prognosis indicated by venous circulating tumor cell clusters in early-stage lung cancers[J]. Cancer Res, 2017, 77(18): 5194-5206.
- [31] DONG J, ZHU D, TANG X, et al. Detection of circulating tumor cell molecular subtype in pulmonary vein predicting prognosis of stage I-III non-small cell lung cancer patients[J]. Front Oncol, 2019, 9: 1139.
- [32] FRICK M A, KAO G D, AGUARIN L, et al. Circulating tumor cell assessment in presumed early stage non-small cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiation therapy: a prospective pilot study[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 102(3): 536-542.
- [33] FRICK M A, FEIGENBERG S J, JEAN-BAPTISTE S R, et al. Circulating tumor cells are associated with recurrent disease in patients with early-stage non-small cell lung cancer treated with stereotactic body radiotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(10): 2372-2380.