



DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.003

<http://www.gjbl.net/gjblkx/fileup/PDF/201306473.pdf>

循环肿瘤细胞的检测方法

Klaus Pantel¹, Catherine Alix-Panabières^{2,3,4}

(1. Department of Tumour Biology, Centre of Experimental Medicine, University Cancer Center Hamburg, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; 2. University Medical Centre, University Montpellier I, Saint-Eloi Hospital, Institute of Research in Biotherapy, Laboratory of Rare Human Circulating Cells, Montpellier, France; 3. University Medical Centre, Laboratory of Cell and Hormonal Biology, Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier, France; 4. University Institute of Clinical Research UMI-EA2415-Epidemiology, Biostatistics & Public Health, France)

李金奎¹, 王继纲^{2,3} 译

(1. 福建省肿瘤医院放疗科, 福州 350014; 2. 青岛大学医学院附属医院病理科, 山东 青岛 266003;
3. 复旦大学上海医学院病理学系, 上海 200032)

在原发上皮肿瘤形成和生长的早期, 肿瘤细胞便可以通过血流播散到远处器官。这些循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)可以通过不同技术进行富集和检测, 其分析被认为是对癌症患者的实时“液体活检”。这种活检能对CTCs特异性亚群进行表征, 且有可能为癌症的检测和控制带来革命性的转变。本篇作者将着重讨论当前用于CTCs富集和检测的策略。

CTC检测具有广阔前景, 在过去的几年中出现了许多令人振奋的新技术。然而在技术上, CTCs检测仍然非常具有挑战性, 这是由于CTCs存在的浓度非常低(数百万正常造血细胞中有1个CTC), 因此对它们的鉴定需要极其敏感和特异的分析方法, 通常是富集和检测程序相结合^[1]。

CTC富集包括基于CTCs不同性质的多种技术, 这些性质可用于区分它们和周围正常血细胞, 包括物理性质(大小、密度、电荷、变形性)和生物学性质(表面蛋白表达, 大多数为EpCAM表达)。为了获得更多的CTCs, 基于结合CTC不同性质的新技术得以开发。通常在富集后, CTC成分

中依然含有大量白细胞, 因此CTCs的鉴定需要采用在单细胞水平上能够区分肿瘤细胞和正常血细胞的方法。在基于蛋白检测的策略中, CellSearch®系统(FDA-USA验证)和其他许多CTC检测采用了相同的鉴定步骤: 包括细胞角蛋白(cytokeratin, CK)的荧光染色(阳性标记)、白细胞共同抗原CD45(阴性标记)和一种核染料(DAPI); 被确定的CTCs为CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺细胞。关键在于: 检测到的细胞是存活还是凋亡的, 因为只有功能细胞可以促成转移灶的形成。为了只对存活的CTCs进行检测, 功能EPISPOT检测(上皮免疫斑点法)得以运用, 它可以添加到任一富集步骤中。为了避免与靶细胞直接接触, 这种技术在分泌、脱落和释放蛋白质的48 h短时培养中对CTCs的存在进行评估^[2-4]。过去的4年中, 微流装置(CTC芯片)的发展引起了人们的注意, 它可以检测极少量的血液。第一个CTC芯片由抗EpCAM抗体包被的微球阵列组成, 之后它进一步发展成为人字形结构^[5]。自2008年以来, CTC芯片得到不断改进(如Ephesia芯片^[6]、基于芯片的微型霍尔探测器^[7])以及针对

收稿日期 (Date of reception): 2012-08-20

作者简介 (Biography): Klaus Pantel, 博士, 主要从事乳腺癌、肺癌等的循环肿瘤细胞研究。

通信作者 (Corresponding author): Catherine Alix-Panabières, Email: c-panabieres@chu-montpellier.fr

CK⁺ 和 CK⁻ CTCs的CTC芯片^[8]等)。此外, 在基于mRNA检测的策略中, 针对特异性mRNAs的检测最常作为免疫学检测的替代方法用于鉴定CTCs。CK19 mRNA常被用于乳腺癌的临床研究^[9]。但是, 许多转录本(如编码CK18, CK19, CK20, MUC1, PSA和CEA)在正常血液和BM细胞中也是低水平表达^[9-10], 因此需要经过验证临界值的定量RT-PCR检测来解决这个问题。同时, 基因转录有可能在CTCs中得到修饰, 支持多标记RT-PCR法的应用。最近, Markou等^[11]还介绍了一种新的液珠阵列杂交检测。

在CTC领域, 仍有一个非常重要的生物学问题有待解决: 上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)。EMT是导致细胞去分化的一个复杂过程, 它通过细胞接触连接的重排和细胞黏附力的最终丧失来增加运动性。在这一转化过程中, 细胞上皮表型部分或完全转化(如EpCAM, E-钙黏着蛋白和CK的表达)为间质类(如N-钙黏附素和波形蛋白的表达), 这种转化对CTCs的相关鉴定技术的影响依然是未知的。然而, EMT可能对具有干细胞样特性的肿瘤细胞有特殊影响^[12], 当前基于上皮抗原的检测可能会漏掉最具有侵袭性的CTC亚群^[13]。因此, 迫切需要纳入没有在EMT中被抑制但仍可用于区分CTCs和周围血细胞分析的标志物, 用以对CTC检测方法进行优化。

除了选择适当的CTC标志物, 癌症患者中可获得的血量有限, 这也可能对CTCs等的罕见概率事件的检测造成局限性, 特别是在CTC数量很少的未发生远处转移的局限期肿瘤中更是如此。因此, 可用于大血量样本分析的技术非常重要, 应该引起更多的关注。克服这一局限的一个简单办法就是通过Gilupi nanodetector[®]在体内直接靶向CTCs。这个设备在外周手臂静脉使用30 min, 可以使多达1.5 L的血液(包括CTCs)通过纳米检测仪2 cm的功能化区域, 使大量的CTCs被抗EpCAM抗体捕捉^[14]。另一种替代方法是开展白细胞去除术, 应用于采用流式细胞术和实时PCR进行分子表征的后续体外CTC分析的淘析^[15]。

CTCs检测和分子表征是癌症转化研究中最活跃的一个领域, 共有427个临床研究把CTCs作为新的潜在的独立生物标志物: CTCs反映了癌症的实时进展, 这个信息在系统性治疗的背景中很有价值。这些CTC检测方法的特异性和临床应用意义需要从大规模前瞻性多中心研究中获得高水平证据的

支持, 从而进入临床实践。将来, CTC表征将有助于指导某个治疗时间窗特定癌症患者的特异性靶向治疗, 并将成为个体化医疗的一个标志。

参考文献

1. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Annu Rev Med*, 2012, 63: 199-215.
2. Alix-Panabières C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2012, 195: 69-76.
3. 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.
4. 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.
5. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(43): 18392-18397.
6. Saliba AE, Saias L, Psychari E, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33): 14524-14529.
7. Issadore D, Chung J, Shao H, et al. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(141): 141ra92.
8. Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA, et al. A novel platform for detection of CK⁺ and CK⁻ CTCs[J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(7): 580-586.
9. 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.
10. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(9): 1242-1255.
11. 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.
12. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704-715.
13. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(3/4): 673-687.
14. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, et al. A novel method for the in

vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire[J]. Int J Oncol, 2012, 41(4): 1241-1250.

proof of concept[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2011, 80(2): 100-111.

15. Eifler RL, Lind J, Falkenhagen D, et al. Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation:

(本文编辑 陈丽文)

本文引用: Klaus Pantel, Catherine Alix-Panabières. 循环肿瘤细胞的检测方法 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33(6): 473-475. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.003

本文首先以英文发表于 J Thorac Dis, 2012, 4(5): 446-447. 本刊已获 Journal of Thoracic Disease 和作者同意将该文内容以中文在本刊发表。

本刊常用词汇英文缩写表 (按英文字母排序)

从 2012 年第 1 期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

ABC 法	抗生物素蛋白 - 生物素酶复合物法	FN	纤连蛋白	NF-κB	核因子 -κB
ACh	乙酰胆碱	GFP	绿色荧光蛋白	NK 细胞	自然杀伤细胞
AIDS	获得性免疫缺陷综合征	GSH	谷胱甘肽	NO	一氧化氮
ALT	丙氨酸转氨酶	HAV	甲型肝炎病毒	NOS	一氧化氮合酶
AngII	血管紧张素 II	Hb	血红蛋白	NS	生理氯化钠溶液
APTT	活化部分凝血活酶时间	HBcAb	乙型肝炎病毒核心抗体	PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压
AST	天冬氨酸氨基转移酶	HBcAg	乙型肝炎病毒核心抗原	PaO ₂	动脉血氧分压
ATP	三磷酸腺苷	HBeAb	乙型肝炎病毒 e 抗体	PBS	磷酸盐缓冲液
bFGF	碱性成纤维细胞转化生长因子	HBeAg	乙型肝炎病毒 e 抗原	PCR	聚合酶链反应
BMI	体质指数	HBsAb	乙型肝炎病毒表面抗体	PI3K	磷脂酰肌醇 3 激酶
BP	血压	HBsAg	乙型肝炎病毒表面抗原	PLT	血小板
BSA	牛血清白蛋白	HBV	乙型肝炎病毒	PT	凝血酶原时间
BUN	尿素氮	HCG	人绒毛膜促性腺激素	RBC	红细胞
BUN	血尿素氮	HCV	丙型肝炎病毒	RNA	核糖核酸
CCr	内生肌酐清除率	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	ROS	活性氧
CCU	心脏监护病房	HE	苏木精 - 伊红染色	RT-PCR	反转录 - 聚合酶链反应
COX-2	环氧合酶 -2	HGF	肝细胞生长因子	SABC 法	链霉抗生物素蛋白 - 生物素酶复合物法
Cr	肌酐	HIV	人类免疫缺陷病毒	SARS	严重急性呼吸综合征
CRP	C - 反应蛋白	HRP	辣根过氧化物酶	SCr	血肌酐
CT	计算机 X 线断层照相技术	HSP	热休克蛋白	SO ₂	血氧饱和度
CV	变异系数	IC ₅₀	半数抑制浓度	SOD	超氧化物歧化酶
ddH ₂ O	双蒸水	ICAM	细胞间黏附分子	SP 法	标记的链霉抗生物素蛋白 - 生物素法
DMSO	二甲基亚砜	ICU	重症监护病房	STAT3	信号转导和转录激活因子 3
DNA	脱氧核糖核酸	IFN	干扰素	Tbil	总胆红素
ECG	心电图	IL	白细胞介素	TC	总胆固醇
ECL	增强化学发光法	iNOS	诱导型一氧化氮合酶	TG	三酰甘油
ECM	细胞外基质	IPG	固相 pH 梯度	TGF	转化生长因子
EDTA	乙二胺四乙酸	JNK	氨基末端激酶	Th	辅助性 T 细胞
EEG	脑电图	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	TLRs	Toll 样受体
EGF	表皮生长因子	LOH	杂合性缺失	TNF	肿瘤坏死因子
ELISA	酶联免疫吸附测定	LPS	内毒素 / 脂多糖	TT	凝血酶时间
eNOS	内皮型一氧化氮合酶	MAPK	丝裂原活化蛋白激酶	TUNEL	原位末端标记法
ERK	细胞外调节蛋白激酶	MDA	丙二醛	VEGF	血管内皮生长因子
ESR	红细胞沉降率	MMP	基质金属蛋白酶	VLDL-C	极低密度脂蛋白胆固醇
FBS	胎牛血清	MRI	磁共振成像	vWF	血管性血友病因子
FDA	美国食品药品监督管理局	MTT	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	WBC	白细胞
FLTC	异硫氰酸荧光素	NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	WHO	世界卫生组织