

· 综述 ·

## 液体活检技术及在精准医疗中的应用

胡琨, 向倩, 崔一民\*

(北京大学第一医院药剂科, 北京 100034)

**【摘要】** 液体活检是一种快速、简便的癌症血液检测方法, 是精准医疗重要途径之一, 是非介入性的、可重复性地抽取肿瘤样本。应用液体活检技术实现癌症的预防、诊断、预后, 从而在抗癌药物的选择、药物功效的评估、耐药监测等方面拥有广泛的前景。笔者分别对液体活检技术之循环肿瘤 DNA 和循环肿瘤细胞监测及其在精准医疗中的应用进行综述。

**【关键词】** 循环肿瘤 DNA; 循环肿瘤细胞; 精准医疗

**【中图分类号】** R730.5

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-3384(2016)04-0001-007

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2016.04.001

## Liquid biopsy and its application in precision medicine

HU Kun, XIANG Qian, CUI Yi-min\*

(Department of Pharmacy, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

**【Abstract】** Liquid biopsy is a simple and fast detection method of cancer. It is one of the important ways for precision medicine. The method is non-intrusive and tumor samples can be repeatedly extracted. The use of liquid biopsy in cancer prevention, diagnosis and prognosis can be conducive for medicine selection, evaluation of effectiveness and monitoring of drug resistance. Here, the circulating tumor DNA and circulating tumor cell (CTC) and their application in precision medicine are reviewed.

**【Key words】** circulating tumor DNA; circulating tumor cell CTC; precision medicine

液体活检是一种快速、简便的癌症血液检测方法, 是精准治疗的重要途径之一。它可以为一些病人省去手术活检和穿刺活检, 是第一次非介入性的, 可重复性地抽取肿瘤样本, 医生们从而可以建立基因表达谱, 靶向突变用药, 快速判断疗效, 监测耐药的发生, 随肿瘤的发展而调整治疗方案<sup>[1]</sup>。MIT Technology Review 杂志发布了 2015 年度十大突破技术, 液体活检光荣上榜, 液体活检技术强大的发展前景和潜力。液体活检主要包括循环肿瘤 DNA(ctDNA)、循环肿瘤细胞(CTC)、外泌体检测<sup>[2]</sup>等, 外泌体是液体活检的新贵, 目前对 ctDNA 和 CTC

研究较多。2016 年 1 月, 国家食品药品监督管理局批准了首个 CTC 检测试剂盒, 液体活检技术正式应用于临床。

### 1 液体活检技术之血浆游离循环肿瘤 DNA(ctDNA)

#### 1.1 ctDNA 的生物学特征

1947 年 Mandel 和 Metais 发现了循环核酸<sup>[3]</sup>; 30 年后 Leon 等<sup>[4]</sup>的研究结果表明肿瘤患者外周血清 DNA(循环游离 DNA, cfDNA)水平大大高于正常人, 之后研究者在肿瘤患者的血浆和血清中检测到了癌基因突变, 并且与原发肿瘤相一致。血

[收稿日期] 2016-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目: (81573504, PI3K $\beta$  基因多态性对血小板功能及对抗血小板药物疗效的影响研究); (81273592: PEAR1 受体遗传多态性与抗血栓药物效应的相关性研究)

[作者简介] 胡琨, 女, 硕士研究生, 药师; 研究方向: 药物基因组学与临床药理学相关工作; Tel: (010)66110802; E-mail: hukunpku@qq.com

[通信作者]\* 崔一民, 男, 教授, 博士生导师, 主任药师; 研究方向: 临床药学、临床药理; Tel: (010)66155258; E-mail: cuiymzy@126.com

浆游离循环肿瘤 DNA (ctDNA) 是一种无细胞状态的胞外 DNA, 存在于血液、滑膜液和脑脊液等液体中, 由肿瘤细胞释放到血浆中的单链或者双链 DNA 的混合物组成, 以 DNA 蛋白质复合物或游离 DNA 两种形式存在, 携带有与原发肿瘤组织相一致的分子遗传学改变。长度约 150~200 bp, 浓度约  $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 半衰期约 0.5~2 h。随着基因测序的飞速发展, 目前, 已能在血液中进行检测并计数。

## 1.2 ctDNA 的检测及临床应用

多年来, 科研人员一直都在寻找能够很好地反映肿瘤情况的生物标志物。肿瘤虽然生长在全身各处, 但通过肿瘤标志物检查可以了解肿瘤的组织发生、细胞分化和细胞功能, 以帮助肿瘤的诊断、预后判断以及治疗指导。在临床工作中, 蛋白质已经被用来诊断疾病, 或者监测治疗效果。但是蛋白类生物标志物检测会出现假阳性结果, 因为也有其他原因会导致血液中的蛋白类生物标志物增加。与蛋白质类生物标志物相比, ctDNA 的表现应该会更好。2013 年新英格兰医学杂志研究结果发现: ctDNA 检测作为一种无创的检测方法, 能够真实的反映实体瘤组织中的基因突变图谱与频率, 是治疗效果的评估及治疗后临床随访的重要监测指标<sup>[5]</sup>。ctDNA 作为一种新的肿瘤标志物, 将在肿瘤的诊断、治疗及预后检测等方面发挥重要作用, 尤其对于一些不具有典型临床症状、检查无特异性和诊断困难的肿瘤可避免复杂的、具有创伤性的活检。ctDNA 检测出现假阳性结果的可能性要低得多, 因为检测的不是 ctDNA 的水平, 而是检测它是否携带有肿瘤特异性的突变, 或其它基因组改变信息。

ctDNA 的检测方法包括数字 PCR、SafeSeqS、BEAMing 技术、实时荧光定量 PCR 及高通量测序、标记扩增深度测序 (TAM-Seq)、全基因组测序、全外显子测序等。2014 年, Stanford 大学医学院的研究者们研究出一种检测 ctDNA 的方法: 癌症个体化深度测序 (CAPP-Seq)<sup>[6]</sup>。CAPP-Seq 的检测方法对肿瘤 ctDNA 检测灵敏度更高, 特异性更强, 与全外显子测序等相比更经济可行。

一项关于血浆 cfDNA 完整性在乳腺癌早期诊断价值中的研究<sup>[7]</sup>表明, cfDNA 浓度联合 cfDNA 完整性指数 (CFDI), 可作为原发性乳腺癌和转移性乳腺癌的早期诊断指标。该研究纳入了 383 例乳腺癌患者, 得出 cfDNA 浓度联合 CFDI 可以良

好的区分原发性乳腺癌患者与健康对照组、转移性乳腺癌患者与健康对照组。

Bettegowda 和他的同事报道了 1 篇文章, 称 ctDNA 水平在早期和晚期肿瘤 (各种癌症) 中存在差异。研究人员发现, 在 640 例患者中, ctDNA 可检测超过 75% 的晚期胰腺癌, 卵巢癌、结直肠癌、膀胱癌、胃癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌, 以及头颈癌。然而, 在原发性脑、肾、前列腺癌和甲状腺癌的检测却不到 50%。此外, 在 206 例转移性结直肠癌患者中, 源自 KRAS 基因突变的 ctDNA 具有 87.2% 的敏感性和 99.2% 的异质性。研究人员还发现, 96% 的表皮生长因子受体被抑制后复发的患者体内有 ctDNA, 这就表明在丝裂原活化蛋白激酶途径中发生了单基因或多基因突变<sup>[8]</sup>。

Grutzmann 等<sup>[9]</sup>与 Warren 等<sup>[10]</sup>学者对不同分期 CRC 患病人群开展回顾性研究, 对比血浆 ctDNA 中甲基化 Sept9 基因 (mSEPT9) 水平, 结果显示, SEPT9 基因异常甲基化对 CRC 诊断的敏感度为 72%~90%, 特异度为 88%~90%。1 项大规模、多中心、前瞻性的 CRC 临床筛查试验, 从定期行结肠镜检查的患者中招募了超过 7900 例志愿者, 其中 53 例检查发现患有大肠癌, 血浆 ctDNA 中 SEPT9 基因异常甲基化在无症状 CRC 患者中作为筛查诊断试验的敏感度仅为 48.2%, 特异度为 91.5%<sup>[11]</sup>。两者诊断效价的不同可能归因于研究纳入样本人群的差异。以上研究表明血浆 ctDNA 中 SEPT9 基因异常甲基化检测在 CRC 筛查或诊断中的价值还是非常令人鼓舞的。

不仅 ctDNA 甲基化在肿瘤诊断中存在应用价值, ctDNA 其他特征性改变 (如微卫星不稳定性) 在也有助于肿瘤早期诊断<sup>[12]</sup>。

另外, 1 项基于 qPCR 检测平台的病例对照研究<sup>[13]</sup>, 对胃癌患者术前和术后血浆 cfDNA 水平变化进行比较后发现, 患者术后血浆 cfDNA 浓度明显降低, 且差异具有统计学意义, 因此肿瘤患者外周循环中 cfDNA 定量有望评估肿瘤根治术后切除完整性以及早期预警肿瘤转移复发的指标。Lecomte 等<sup>[14]</sup>对 37 例 CRC 患者进行生存分析, 平均随访 22 个月, 探讨外周血 ctDNA 中 K-ras 基因突变及 CDKN2A 启动子超甲基化在结直肠癌预后判断中的价值。该研究的 COX 回归分析得出, ctDNA 中 K-ras 基因突变或 CDKN2A 启动子超甲

基化是 CRC 的独立预后因素,这表明了其在 CRC 预后判断中具有重要价值,有望成为识别 CRC 复发高风险人群的预测因子。2012 年,有学者<sup>[15]</sup>将一组行西妥昔单抗和伊立替康联合化疗的 108 例转移性 CRC 患者纳入研究,基于 qPCR 检测平台进行治疗前血浆 ctDNA 中 K-ras 和 BRAF 基因突变定量基线水平检测。Cox 回归分析证实了 ctDNA 中 K-ras 基因突变水平与转移性 CRC 预后的相关性,高水平的 K-ras 基因突变与 CRC 较差的预后呈明显相关。因此,血浆 ctDNA 中 K-ras 基因突变分析有望成为组织活检的有效替代品。

### 1.3 机遇与挑战

随着肿瘤分子生物学研究的进展,ctDNA 的检测及其生物学指标的研究,将有可能为临床肿瘤的早期诊断、预后判定及跟踪随访等提供一系列方便、快捷、特异、无创或微创和分子生物学检测手段。相关专家称,多基因的 ctDNA 检测采用新一代测序技术(NGS)将变成“液体活检”,并替代侵入组织性活检。不过,同时专家也提醒,在实践应用之前这个概念需要经过严格的测试。Chapman 博士称,与组织活检相比 ctDNA 检查微创小、无放射性污染、经济、新 DNA 无防腐剂污染等优点,并允许对治疗反应实时监测。根据 ctDNA 片段甲基基团来判断该突变可能会更准确。一项有关单或多乳腺癌基因甲基化的试验发现,检测、诊断转移性乳腺癌准确性为 95%。Park 博士认为,对这些数据的解释还需谨慎而行。Park 博士在 Medscape Oncology 中还讲到,关键的悬而未决的问题包括:我们可以使用 ctDNA 活检鉴定有基因突变的患者,从而对其进行个性化的靶向治疗吗?我们可以使用 ctDNA 活检跟踪转移性疾病患者的治疗反应,从而为患者治疗带来积极的影响吗?我们可以使用 ctDNA 活检作为肿瘤标志物而评估早期癌症的残留病,并确定如果我们可以告诉术后治愈的患者,他们不需要额外的辅助治疗吗?高芑<sup>[16]</sup>指出,现尚无 ctDNA 质控品,需制备相关质控品并应用于全国各级医院以进行高通量测序的质量评价,从而达到对于 ctDNA 检测水平标准化的目的。除了用于癌症筛查,液体活检还可用于帮助人们对抗疾病。医生可以根据驱动癌症发展的特定 DNA 突变选择对应的药物和治疗方案。如何将循环血 DNA 的检

测应用于临床,还有待于认真评估 ctDNA 标记物的检测结果与大宗的、随机的、前瞻性的临床资料间的吻合程度。展望未来,或许循环肿瘤 DNA 的“液体活检”将颠覆癌症治疗领域。

## 2 液态活检技术之循环肿瘤细胞(CTC)监测技术

### 2.1 CTC 的生物学特征

循环肿瘤细胞(Circulating tumor cell, CTC)是指因为侵袭、脱落、手术操作等内外部因素导致的从实体瘤中脱离出来并进入外周血液循环的肿瘤细胞。CTC 检测,就是检查血液循环中的肿瘤细胞。

1869 年,澳大利亚籍医生 Ashworth 发现一名已死亡的男性转移性肿瘤患者血液中存在的一些血细胞同尸检发现的肿瘤细胞相似,首次提出循环肿瘤细胞的概念。1889 年,英国外科医师 Steven Paget 进一步提出了一个“种子与土壤”的假设。他认为癌症之所以会发生转移是因为肿瘤细胞可以随着血液在体内循环,在进入其他器官之后可以如同“种子”遇到“土壤”一样,在那里落地生根发展出新的肿瘤。1976 年 Nowell 将 CTC 的定义修正为:来源于原发肿瘤或转移肿瘤,获得脱离基底膜的能力并入侵通过组织基质进入血管的肿瘤细胞。2003 年,Shook 和 Keller 在胚胎发育中观察到上皮间充质转化(EMT),CTC 关键概念才得以阐述。EMT 使上皮细胞丢失上皮细胞的表型,获得某些间质细胞的表型,从而有能力入侵通过周围的基底膜。2013 年,Heitzer 利用单细胞测序技术发现 CTC 与原发或转移肿瘤组织存在相同的基因变异谱,为 CTC 作为肿瘤替代性样本奠定了最终的基础。目前普遍的观点认为 CTC 是一群异质的肿瘤细胞,可来源于原发肿瘤和不同转移部位的肿瘤。这些不同来源的异质肿瘤细胞进入血液循环后,绝大多数在短期内死亡。只有极少数具有高度活力、高度转移潜能的肿瘤细胞在循环系统中存活下来,相互聚集成微小癌栓,并在一定条件下发展为转移灶。CTC 在外周血中较难分离,大多处于低/不增殖或休眠状态,对化疗药物耐药,并可逃避机体的免疫监测。1g 乳腺癌组织每天大约可向外周血中释放  $1 \times 10^6$  个 CTC,并且在切除原发肿瘤后仍能在患者外周血中检测到 CTC<sup>[17,18]</sup>。

### 2.2 CTC 的检测及临床应用

受到 CTC 本身丰度低的影响,实际能够捕获



的 CTC 的量往往很少。就 DNA 检测而言,即便是二代测序技术也需要微克级别的 DNA 量,而单个 CTC 仅含 6.6 pg 的 DNA,远达不到测序所要求的量。近年来针对单个细胞行 DNA 测序的技术已经能够实现,诸多文献报道了单个细胞测序的研究结果,他们的解决方案是对单个细胞的全基因组做一个预扩增<sup>[19-21]</sup>。利用这一技术手段,Heitzer 等<sup>[22]</sup>研究人员率先对单个 CTC 进行了二代测序,证实了该方法在单个 CTC 的 DNA 分析中的可行性。

随着 CTC 临床应用价值凸显,许多研究机构和研发团队都在推出不同的 CTC 检测技术。分离和富集方法通常基于 CTC 物理性质(密度和大小)或免疫学特征(分子特征),包括梯度离心法、过滤法、免疫磁性分选法等;分析检测技术分为细胞计数法和核酸检测法,如免疫细胞化学法、RT-PCR 等。为了提高检测敏感性,基于上述原理发展出一些新方法,如光纤阵列扫描术、酶联免疫斑点术、CTC-chip 等。目前,CellSearch 系统使用广泛,已被美国食品药品监督管理局批准用于乳腺癌、结直肠癌及前列腺癌等预后评估<sup>[23]</sup>。此外,Gorges 等<sup>[24]</sup>的研究评价了新的 CellCollector 技术与 CellSearch 系统对 CTC 捕捉能力、CTC 数量动

态改变以及在此基础上进行的基因检测的差异。王洁<sup>[25]</sup>认为,CellCollector 技术在 CTC 分选上较 CellSearch 更有优势,在治疗过程中更加敏感的与疗效相关的数量改变以及驱动基因检测与组织标本的高度一致。但 CellCollector 在 CTC 分选中的优势尚需前瞻性大样本研究证实。CTC 主要检测技术见表 1。

Alix-Panabieres<sup>[26]</sup>报道了用 EPISPOT 检测系统对捕获到的 CTC 进行培养及分析其特定蛋白的分泌情况。研究人员探究 CTC 之间蛋白分泌的差异,作为识别不同 CTC 的蛋白指纹。同时,这一检测系统还可以反映 CTC 的状态是正常存活还是正在凋亡。2012 年的 1 项研究对 CTC 膜蛋白的表达情况进行了分析。Miyamoto 等<sup>[27,28]</sup>利用 HB 微流控芯片捕捉前列腺癌患者的 CTC,运用单个 CTC 定量免疫荧光染色技术,对每 1 名患者在化学去势治疗前和治疗后的 CTC 的 PSA 和 PM-SA 的表达情况进行监测,证实了通过这一监测结果能够用来预测雄激素受体的重新激活和去势治疗抵抗的发生。Stott 等<sup>[29]</sup>利用微柱状结构的微流控芯片捕获了前列腺癌患者的 CTC,然后提取其 RNA 进行测序,借此成功探究了进展期前列腺癌患者常见的

表 1 循环肿瘤细胞(CTC)主要检测技术

技术方法	描述	优点	缺点
Oncoquick	基于细胞密度对 CTCs 进行分离	保存细胞活性,有利于进行细胞病理、免疫标记及分子研究	灵敏性低,不稳定,可能遗漏稀有 CTCs
ISCT	依据细胞大小使用孔径约 8 微米滤膜分离 CTCs	一步离心,分离计数等可操作性强,保存活性便于后续分析	直径较小的 CTCs 可能会漏检
MACS	通过免疫磁珠进行上皮性 CTCs 的分离	基于特异性标记物的分离,保存活性便于后续分析	正常细胞表达相同标志物可致假阳性,由于表型异质性可致假阴性
Cell Search	使用 EpCAM 抗体包被的铁磁珠进行免疫分离(CK19, CD45 和 DAPI 标记进行检测)	半自动、高灵敏与可重复性,CTCs 标记、鉴定计数有明确标准, FDA 唯一认可	正常细胞表达相同标志物可致假阳性,由于表型异质性可致假阴性,难以进一步分析
iFISH-CTC	免疫荧光染色结合 FISH 技术进行非血源性细胞染色体异常检测	不局限于上皮来源肿瘤细胞,可通用于更多类型肿瘤的 CTC 分离;富集到的 CTC 处于生存状态,可用于后续一系列相关研究	操作复杂、成本略高
RT-PCR	基于肿瘤特异性基因的表达分析	高灵敏性	正常细胞表达相同标志物可致假阳性,由于表型异质性可致假阴性,难以进一步分析
Adna Test	通过特定抗原表达和肿瘤相关标志物分离,提取 RNA 进行 RT-PCR 分析	高灵敏性与特异性,有助于区分 CTCs 的干细胞属性与表型变化	非肿瘤细胞表达相关分子可致假阳性,表型异质性可致假阴性
CTC-chip	使用含包被 EpCAM 抗体微柱阵列的芯片	高灵敏和高检出率,便于计数及分子表型分析	迄今报道资料有限,缺少临床验证

一个融合基因 *TMPRSS2-ERG* 的表达情况。

从 20 世纪末以来 CTC 检测技术得到了不断的改进,随之带来的是 CTC 检测在临床的应用。乳腺癌患者 Her-2 扩增情况在临床工作中有着重要的意义,针对 CTC 的 HER-2 表达情况的研究也正在开展。最早在 2010 年 Flores 等<sup>[30]</sup>就报道了用 cell search 系统捕获乳腺癌患者 CTC,并进行 FISH 检测 Her-2 的扩增情况。他们的研究结果发现在原发灶或转移灶 Her-2 表达阴性的患者中,有 33% 的患者 CTC 却是 Her-2 扩增阳性,类似的不一致性在 2010 年的另 1 篇文献<sup>[31]</sup>中也有报道。

已经完成及正在进行的大量研究显示,CTC 在临床上具有很大的应用价值。目前,CTC 在临床上的应用主要包括以下几个方面:

**2.2.1 早期筛查** 研究发现,在早期肿瘤患者中,利用影像学还未发现病灶时已经可以在外周血中检测到 CTC,因此 CTC 可以用于肿瘤的早期诊断,2007 年 ASCO 就将 CTC 纳入了肿瘤标志物。一受检者利用 CTC 做肿瘤早期筛查,在外周血中检出 1 个 CTC,后又通过数字 PCR 技术对 ctDNA 进行了定量分析,结果提示该患者肿瘤与结直肠相关性较大。在随后进行的肠镜检查中,在受检者结直肠部位发现一个低分化腺瘤。Bevilacqua 等<sup>[32]</sup>报道了 1 例经肺组织穿刺活检诊断为“低分化神经内分泌瘤”的病例,随后通过 CellSearch 检测到患者外周血中存在上皮细胞黏附分子和细胞角蛋白阳性的 CTC,后经肝脏穿刺活检发现肝内转移灶,最终确诊为小细胞型肺癌,提示了 CTC 检测具有辅助诊断肿瘤早期转移的价值。

**2.2.2 作为肿瘤生物动力学标志物快速疗效评估** 通过 CTC 在不同治疗阶段的数目变化,可辅助快速评估手术、放化疗及其他治疗手段的疗效。2013 年 *Science* 杂志上发表的一篇文章中,Yu 等<sup>[33]</sup>在 HB 微流控芯片捕获 CTC 的基础上,开创性地发明了一种针对被捕捉的 CTC 进行 RNA 原位荧光杂交的技术以直观展示 CTC 内某种 RNA 的量。利用 RNA-ISH 这一手段,作者选取 7 种上皮表型相关蛋白的 RNA 和 3 种间质表型相关蛋白的 RNA 为对象,实施了乳腺癌患者 CTC 发生上皮-间质转变过程的监测。他们发现上皮表型的增多往往与治疗获益、CTC 捕获数目减少相关联,而间质表型 CTC 的增多则与之相反。在 ER 阳性早期乳腺癌患

者,随访他莫昔芬治疗期间 CTC 数目的变化,发现 CTC 数目的升高与患者的不良预后相关,提示这部分患者可能需考虑更换芳香化酶抑制剂或靶向药物治疗<sup>[34]</sup>。

**2.2.3 辅助肿瘤患者分期分级** 通过检测 CTC 数目,辅助评估肿瘤患者的分期及分级。近年来,CTC 检测在临床上的应用使之成为了 TNM 传统分期系统的有效补充,从而指导下一步的治疗。Xu 等<sup>[35]</sup>用磁性细胞分选法对不同临床分期的肝细胞肝癌患者行 CTC 检测,其阳性率和数量均与肝癌 TNM 分期高度相关。王丽娟等<sup>[36]</sup>纳入了 53 例病理诊断为浸润性乳腺癌的患者,通过 CellSearch 检测发现,CTCs 与 TNM 分期具有显著相关性,TNM 分期中各组 CTCs 差异有统计学意义。复发/转移性乳腺癌(Ⅳ/M1 期)患者 CTCs 表达水平显著高于可手术乳腺癌(Ⅰ期、Ⅱ、Ⅲ A 期,M0 期)的患者。CTCs  $\geq 5$  临界基数值时发生远处转移的可能性明显增高。CTCs 计数与乳腺癌患者 Luminal 分型相关:Luminal B 型、TNBC 型乳腺癌的高增殖性与侵袭性可能是导致其更易发生血行转移、CTCs 检出率高的重要原因,而体内出现 CTCs 的差异将直接影响乳腺癌分子亚型患者的生存和预后情况。另一研究<sup>[37]</sup>发现,Dukes A/B 期、Dukes C 期及 Dukes D 期三组之间 CTC 阳性率具有显著差异,且阳性率高易发生肝转移。Sastre 等<sup>[38]</sup>使用 CellSearch 对 94 例大肠癌患者行外周血 CTC 检测,发现 CTC 阳性率与结肠癌的临床分期相关,存在显著差异。

**2.2.4 判断患者是否需要辅助化疗** 术后 CTC 数目大于阈值,建议强化术后辅助化疗;CTC 数目小于阈值,建议采用标准辅助化疗。

**2.2.5 监测癌症转移复发风险** CTC 数目上升,提示肿瘤进展,转移复发风险增大;CTC 数目下降,提示肿瘤缓解,转移复发风险降低。

**2.2.6 提供预后相关的分子生物学特征** 目前研究已经证实血液中检测到的 CTC 可以作为乳腺癌、前列腺癌和结肠癌等肿瘤的独立预后因素。CTC 监测数目越高,提示患者预后较差。在转移性乳腺癌患者接受系统治疗之前,每 7.5 mL 血液中 CTC 计数超过 5 个,提示更短的无进展生存时间和总生存时间<sup>[39]</sup>,同样在晚期直肠癌和前列腺癌中也发现 CTC 的数目与患者的预后显著相关<sup>[40]</sup>。在转移

性结肠癌患者中, 每 7.5 mL 血液中 CTC 计数超过 3 个, 患者中位总存活期和无进展存活期都明显缩短。在早期乳腺癌患者中, Pachmann 等<sup>[41]</sup> 利用激光扫描细胞术, 发现化疗后 CTC 的数目较化疗前增加 10 倍, 则提示患者的预后较差; 而相反, 下降超过 10 倍的患者, 其预后较好。2010 年圣安东尼奥乳腺癌大会报道了一项大型的 III 期临床研究 (SUCCESS), 评估 CTC 对早期乳腺癌患者预后的预测价值, 共入组超过 2000 例患者, 发现在辅助化疗前, 外周血检出 CTC  $\geq 1$  个的患者, 其预后显著差于未检出的患者<sup>[42]</sup>。

**2.2.7 连续样本监测耐药情况** 通过检测 CTC 数目变化, 实时监测肿瘤药物耐药性的发生。用免疫荧光法定量检测转移性肺癌患者 CTC 表面 EGFR, 确定对 EGFR 抑制剂敏感的患者, 检测 CTC 的 EGFR 基因 T790M 突变, 可用于确定对 EGFR 抑制剂药物抵抗的患者<sup>[43]</sup>。而对循环黑色素瘤细胞 B-RAF 和 KIT 基因的突变, 可给予相应的 Raf 激酶抑制剂和 V600E 抑制剂治疗<sup>[44]</sup>。检测治疗前后 CTC 的雄激素受体信号, 可以指导前列腺癌患者个体化治疗, 有助于出现治疗抵抗的患者及时更换治疗方案<sup>[27]</sup>。

## 2.3 机遇与挑战

CTCs 的概念早在 1869 年就已提出了。经过近 150 年的发展, 该领域却并没有取得很大的进展, 原因主要是因为 CTCs 非常稀有, 如何从复杂的血液中鉴定并分离出 CTCs 是一件非常艰难的工作。分离的过程需要到达很高的捕获率和纯度, 且要保证细胞的活性。此外, 由于 CTCs 数量极少, 可能会涉及到多种检测整合到单个细胞中。目前, 大部分的技术以及临床研究局限于对 CTCs 的计数, 对 CTCs 分子表征研究的较少。然而, 计数的结果可能随着癌细胞脱落速度的改变产生波动, 且不同的 CTCs 的功能异质性大, 因此通过 CTCs 计数得到的信息其实非常有限。尽管如此, CTC 在肿瘤诊断、治疗和监控等方面的临床表现已逐渐崭露头角, 目前仍然是极具发展潜力的肿瘤无创诊断和实时疗效监测手段, 临床应用价值极其显著。

## 【参考文献】

[1] Gold B, Cankovic M, Furtado L V, et al. Do Circulating Tumor cells,

Exosomes, and Circulating Tumor Nucleic Acids Have Clinical Utility. A Report of the Association for Molecular Pathology[J]. J Mol Biol, 2015, 17(3):209-224.

[2] 黄依瑶, 郑磊. 重视外泌体的实验诊断价值 [J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(11):724-726.

[3] Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme[J]. C R Hebd Seances Acad Sci (Paris), 1948, 142(3): 241-243.

[4] 邓丽春, 许晨, 姜藻. 恶性肿瘤患者循环血 DNA 的研究进展 [J]. 东南大学学报 (医学版), 2007, 26(5):382-385.

[5] Paricio S A, Aldas C C. The Implications of Clonal Genome Evolution for Cancer Medicine[J]. N Engl J Med, 2013, 368(9): 842-851.

[6] Newman A M, Bratman S V, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage[J]. Nat Med, 2014, 20(5):552-558.

[7] Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 146(1): 163-174.

[8] Bettegowda C, Sausen M, Leary R J, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(224):224.

[9] Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay[J]. PLoS One, 2008, 3(11):e3759.

[10] Warren J D, Xiong W, Bunker A M, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer[J]. BMC Med, 2011, 9(24):133.

[11] Church T R, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer[J]. Gut, 2014, 63(2):317-325.

[12] 赵梦, 虞倩, 郭玮. 循环肿瘤 DNA 临床应用的研究进展 [J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2015, 5, 3(2): 76-81.

[13] Kim K, Shin D G, Park M K, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection[J]. Ann Surg Treat Res, 2014, 83(3): 136-142.

[14] Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis[J]. Int J Cancer, 2002, 100(5):542-548.

[15] Spindler K L, Pallisaard N, Vogelius I, et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(4):1177-1185.

[16] 高芃, 李金明. 循环肿瘤 DNA 与肿瘤精准治疗 [J]. 实用医院临床杂志, 2016, 13(3): 1-6.



- [17] Paterlini-Brechot P, Benali N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions[J]. *Cancer Lett*, 2007, 253(2): 180-204.
- [18] 陈小松, 沈坤炜. 乳腺癌“液体活检”: 血清标志物与循环肿瘤细胞的检测[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 4(6):410-414.
- [19] Hou Y, Song L, Zhu P, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm[J]. *Cell*, 2012, 148(5):873-885.
- [20] Lu S, Zong C, Fan W, et al. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing[J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1627-1630.
- [21] Zong C, Lu S, Chapman A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell[J]. *Science*, 2012, 338(6114):1622-1626.
- [22] Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(10):2965-2975.
- [23] 郭玮, 孙云帆, 潘柏申, 等. 循环肿瘤细胞检测及临床应用价值[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2014, 82(3): 43-48.
- [24] Gorges T M, Penkalla N, Schalk T, et al. Enumeration and molecular characterization of tumor cells in lung cancer patients using a novel in vivo device for capturing circulating tumor cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(9): 2197-2206.
- [25] 王洁, 张秋怡. 循环肿瘤细胞分离及外周血 EGFR 检测的相关研究分析[J]. *循证医学*, 2016, 16(1): 46-48.
- [26] Alix-Panabieres C. EPISPOT assay: Detection of viable DTCs/CTC in solid tumor patients[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2012, 195:69-76.
- [27] Miyamoto D T, Lee R J, Stott S L, et al. Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(11):995-1003.
- [28] 王惠宇, 葛蓉, 刘宝瑞. 肿瘤内部异质性和“实时液体活检”研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(7):1008-1011.
- [29] Stott S L, Lee R J, Nagrath S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(25):25-23.
- [30] Flores L M, Kindelberger D W, Ligon A H, et al. Improving the yield of circulating tumour cells facilitates molecular characterisation and recognition of discordant HER2 amplification in breast cancer[J]. *BrJCancer*, 2010, 102(10):1495-1502.
- [31] Fehm T, Müller V, Aktas B, et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: A prospective, multicenter trial[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 124(2): 403-412.
- [32] 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.
- [33] Yu M, Bardia A, Wittner B S, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition[J]. *Science*, 2013, 339(6119):580-584.
- [34] Pachmann K, Camara O, Kohlhase A, et al. Assessing the efficacy of targeted therapy using circulating epithelial tumor cells (CETC): the example of SERM therapy monitoring as a unique tool to individualize therapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(5): 821-828.
- [35] Xu W, Cao L, Chen L, et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11): 3783-3793.
- [36] 王丽娟, 张研, 吕昭宝. 乳腺癌循环肿瘤细胞与分子生物学特征的相关性分析[J]. *中国实验诊断学*, 2015, 19(11): 1946-1950.
- [37] 孙俊宁, 梁小波, 刘永昌. 结直肠癌患者血液循环中癌细胞微转移的观察[J]. *中国药物与临床*, 2008, 8(4): 274-276.
- [38] Sastre J, Maestro M L, Puente J, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables[J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(5): 935-938.
- [39] Budd G T, Cristofanilli M, Ellis M J, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6403-6409.
- [40] Cristofanilli M, Budd G T, Ellis M J, et al. Circulating tumor cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8): 781-791.
- [41] Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(8): 1208-1215.
- [42] Janni W, Zwingers T, Hepp P, et al. Circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients two years after adjuvant chemotherapy depending on endocrine treatment- The German SUCCESS- Trial[C]. *SABCS*, 2010, PD04-08.
- [43] Punnoose E A, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8): 2391-2401.
- [44] Sakaizawa K, Goto Y, Kuniwa Y, et al. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulation melanoma cell level[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(5):939-946.