

乳腺癌与循环肿瘤细胞

BREAST CANCER AND CIRCULATING TUMOR CELLS

于海波¹ 林平¹ 徐雅莉² 周易冬² 孙强² 徐嘉^{1*}

(1. 北京奥维腾隆生物科技有限公司, 北京 100084; 2. 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院乳腺外科, 北京 100730)

摘要 转移是乳腺癌死亡的主要原因。肿瘤细胞的血行播散途径是启动转移级联的关键步骤。认识乳腺癌患者外周血中肿瘤细胞的生物学特征有助于判断乳腺癌预后、制定治疗方案、监测治疗效果等。

关键词 乳腺癌; 循环肿瘤细胞 (CTC); 肿瘤标识物; 预后; 治疗监测

Breast cancer and circulating tumor cells

Yu Haibo, Lin Ping, Xu Yali, et al. Beijing AVWA Biosciences Corporation, Beijing 100084, China

Abstract Metastases are the major cause of deaths in patients with breast cancer. Hematogenous spreading of tumor cells from the primary tumor can be considered as a crucial step in the metastasis cascade leading eventually to the formation of clinical metastases. It is hoped that biologic characteristics of CTCs, such as protein or mRNA expression, will be used in risk assessment, tailoring of treatment and monitoring of response for patients with breast cancer.

Key words Breast cancer; Circulating tumor cells; Tumor marker; Prognosis; Therapeutic monitoring

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [文章编号] 1606-8025(2007)03-215-04

乳腺癌在全球范围内是严重威胁女性健康的重要疾病。作为女性最常见的恶性肿瘤之一, 近几年的乳腺癌发病率在全世界范围内呈明显上升趋势。欧美国家平均每 7~8 名妇女就有 1 人将在其一生中罹患乳腺癌。女性乳腺癌的死亡率在所有癌症中仅次于肺癌, 位居第二位^[1]。近年来, 随着生活水平的不断改善, 我国北京、上海、天津、广州等大城市乳腺癌发病率也呈上升趋势。

转移是恶性肿瘤的重要特征, 是肿瘤病人死亡的主要原因。对于乳腺癌来说, 一旦发生转移, 即启动了一个瀑布式级联反应^[2]。在癌症发展过程中, 肿瘤细胞发生遗传学异常改变, 无规律生长进而失去相互贴附的特性, 分泌各种生长因子刺激血管生成, 为其进入血循环和淋巴循环提供便利途径。肿瘤细胞进入血循环后, 除非贴附于血管内皮细胞才离开血液循环, 否则将一直游离于外周血中, 直到被免疫系统清除。尽管早期诊断和治疗已经取得了长足的进步, 一旦远处转移病灶形成, 癌症仍将不可治愈, 医学干预也将仅限于延长病人的生存期和减轻病人的痛苦。

当前乳腺癌的诊断主要通过如下检查方法, 包括血清学标志物分析如癌抗原 15.3 (CA15.3) 和癌胚抗原 (CEA) 等; 影像学方法如超声、乳腺 X 线摄影, 计算机断层显像 (CT), 核磁共振 (MRI) 和正电子发射断层显像 (PET) 等; 病理学方法如免疫组织化学方法 (IHC) 等。但是目前这些检查方法在检测单个肿瘤细胞方面缺乏灵敏性, 已经妨碍了它们的应用, 见表 1。

近 40 年来, 关于乳腺癌循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cells, CTC) 的分离和相关特征的研究层出不穷。原发肿瘤尚未被检测到时, 便可发现 CTC 的存在, 当肿瘤复发时, CTC 也会大量出现, 即使原发病灶被切除后, CTC 在某些病人也持续存在。而且 CTC 的检测, 是一种非侵入性的可重复的检查, 一定程度上直接反映了原发肿瘤的特征, 灵敏性和特异性均较高。所以如果在乳腺癌治疗过程中检测循环肿瘤细胞, 在明显转移出现以前对病人施以适当的治疗, 将会显著的改善患者的病情, 降低癌症的死亡率, 而检测原发肿瘤术后或随访的

病人循环血肿瘤细胞对预测早期的复发也有重要的临床价值。除了在早期诊断和预后有潜在作用外, CTC 在遗传学和免疫表型等方面的特征可能有助于指导靶向治疗^[3]。

表 1 乳腺癌诊断方法的比较

Table 1 comparison of diagnostic methods

肿瘤诊断方法	优点	缺点
血清学标志物	肿瘤普查, 肿瘤高危人群的筛选, 辅助肿瘤诊断和鉴别诊断, 监测肿瘤, 费用低廉, 通量高, 可大规模使用	与生理病理过程相关性低; 敏感性和特异性均较差, 较高的假阳性率、假阴性率
影像学	非侵入性检查, 可用于重复性检查, 快速有效的评估实体肿瘤的大小, 使肿瘤可视化, 用于实体瘤疗效的评价	具有一定局限性 (如原发病灶已经切除, 或肿瘤体积太小以至无法检测); 不能提供关于肿瘤转移特性的信息; 费用较贵; 具有一定的辐射危害
病理学	诊断的金标准—病理确诊的依据	侵入性检查, 不能用于常规的可重复性检查, 不能完全反映转移信息
循环肿瘤细胞	灵敏性和特异性均较高, 非侵入性可重复的检查, 反映了原发肿瘤的特征, 可预测转移和复发, 评价肿瘤预后, 治疗监测以及指导治疗	肿瘤标识物在乳腺癌组织表达的异质性, 一定程度上限制了 CTC 检测的灵敏性

目前, 循环肿瘤细胞 (CTC) 检测已被广泛用于转移性乳腺癌的研究。本文将总结近年来关于 CTC 用于乳腺癌方面的研究, 主要包括 CTC 用于乳腺癌研究的临床意义, CTC 检测方法以及用于乳腺癌研究的肿瘤标志物等。

1 CTC 的临床意义

1.1 CTC 与预后 目前大多数研究均支持: CTC 可作为乳腺癌的一个独立的预后因子, 循环血 CTC 的水平对于患者的预后有明显的预示作用。大多数学者均认为: 腋窝淋巴结阳性的乳腺癌患者预示有早期复发的可能, 而淋巴结阴性患者通常有较好的预后, 然而在日本, 大约 10%~15% 的淋巴结阴性患者将死于远端器官的转移。Jotsuka 等研究了 100 例淋巴结阴性并接受手术的乳腺癌患者 CTC 的 CEA mRNA 表达情况,

[作者简介] 于海波 (1976-), 女, 博士, 主要从事循环肿瘤细胞用于乳腺癌的研究。

* 通讯联系人, E-mail: jxu@avivabio.com

发现无论术前还是术后,CTC CEA 阳性的患者存活期均明显短于 CTC 阴性患者,而且术前和术后 CTC 均阳性的患者预后更差^[4]。Wiedswang 等人联合使用阴性免疫磁珠富集方法和免疫细胞化学技术检测 I-III 期乳腺癌病人的 CTC,发现 CTC 阳性的复发率(26.5%)显著高于 CTC 阴性患者(9.1%),且存活期也显著缩短^[5]。

Weigelt 等应用定量 RT-PCR 方法研究了转移性乳腺癌病人 CTC 中 CK19,PIB,PS2 和 EGP2 四个基因 mRNA 的表达,发现 CTC 阳性的转移性乳腺癌患者存活率明显小于 CTC 阴性患者,如 CTC 阳性患者中,无进展存活期(Progression-Free Survival,PFS)为 1 年以上的患者比率为 3%,总存活期(Overall Survival,OS)2 年以上的为 17%,显著少于 CTC 阴性患者(PFS 为 22%,OS 为 36%)^[6]。Cristofanilli 等人进行的一项前瞻性、双盲及多中心的临床实验中,177 名转移性乳腺癌患者参与了此项研究^[7,8],证实 CTC 是高度有效的预后因子,以 7.5ml 血液中 5 个细胞作为临界值,可更加可靠的估计疾病的预后,同时可提供比传统的影像学方法更早的证据。转移性乳腺癌病人启动治疗前的 CTC 水平,可以帮助判断病人的存活(PFS 和 Os),如患者的 CTC 高于临界值,则其存活期将显著缩短。

1.2 CTC 与临床分期 将原发灶(T)、区域淋巴结(N)及远处转移(M)三者组合起来,可以确定乳腺癌的临床分期(TNM 分期)。目前研究表明,CTC 的出现与乳腺癌的淋巴结状态及是否有远处器官的转移有明显的相关性。Kahn 等研究了 131 例乳腺癌病人和 20 例健康人外周血肿瘤细胞,健康人无一例阳性,乳腺癌病人中,远处转移患者 CTC(CK8 阳性)的阳性率为 36/51(71%),较淋巴结阳性 17/36(47%)和淋巴结阴性 17/44(39%)高得多^[9]。Taubert 等人也有类似的发现,乳腺癌原发灶手术时 CTC 阳性(角蛋白阳性)与淋巴结状态和转移灶的发生有显著的相关性,淋巴结阳性(NI)和转移(MI)的病入的 CTC 阳性率分别为 54% 和 75%,而淋巴结(NO)阴性和未转移(MO)病人的阳性率分别为 25% 和 30%^[10]。从上述资料可以看出,CTC 的出现与乳腺癌的分期有明显的相关性。

1.3 CTC 与疗效评价 按照目前的指导方针^[11],早期乳腺癌病人(原发肿瘤病灶较小且无淋巴结转移)约有 80%~90% 接受细胞毒药物或类似的治疗,而这些病人中仅有 20% 将有潜在复发的可能,如果能将这些病人鉴别出来,将有 60%~70% 的病人免于不必要的细胞毒药物治疗。同时,关于转移性乳腺癌治疗的研究已经进行了多年,但是经治疗后完全缓解(CR)的概率却极低,绝大多数病人仅对传统的治疗发生瞬态的反应,治疗 12~24 个月后病情便会恶化。目前,尚无非常行之有效的检测手段监测病人对于治疗的反应,虽然影像学方法也被使用,但是由于价格较贵,不能频繁使用,而且仍有约 50% 患者的病灶在临床上是不可测量的,同时影像学监测的反应时间通常都较长(2~3 个月);血清标识物虽然有一定的帮助,但是其相关性和特异性均较差。

随着 CTC 用于乳腺癌的研究的深入,CTC 不但与预后有明显的相关性,而且近期的研究也提示 CTC 的水平有望用于监测乳腺癌对于治疗的反应,并且指导治疗。Smith 等人应用定量 PCR 方法研究转移性乳腺癌病人外周血表达 CK19 的 CTC 对系统化治疗的反应^[12],发现绝大多数病人 CTC 水平的变化能够反映疾病的临床进展或消退,在治疗过程中,虽然某一点的 CTC 绝对值并不总是反映病人的临床状态,但是一段时间内 CTC 的变化趋势更能体现病情的变化。Cristofanilli 及其同事的研究强烈提示 CTC 不仅可作为一种预后因子,同时也能够辅助用于转移性乳腺癌病人病情的监督和评价^[8,13]。

治疗 3~4 星期后评价患者的 CTC 数目,与 9~12 星期后的影像学结果进行比较,发现经治疗后影像学评价结果较好(Stable disease/Partial Response,S/PR)的病人,从存活期来看,CTC 数目低于临界值(每 75 ml 血液中 5 个 CTC)的病人(26.9 个月)显著长于 CTC 数目高于临界值的病人(15.3 个月);而影

像学评价结果为恶化(Progressive Disease,PD)的病人,CTC 数目低于临界值的病人(19.9 个月)显著长于 CTC 数目高于临界值的病人(6.4 个月),提示 CTC 的信息不但能够更加精确的体现疾病的转归,同时也在时间上也较影像学方法提供更早的信息。同时 Hayes 等人也发现经 3 程或 3 程以上化疗后,如果 CTC 水平升高或者始终居高不下,其存活期将明显缩短^[14]。上述研究提示如果及时改变治疗方案可能会使患者受益,而这些仍需大量的临床资料证实,而与此相关的研究正在进行中。

1.4 CTC 与肿瘤转移 从原发病灶脱落入血的肿瘤细胞(CTC)对于宿主来说是一种外源成分。在每一个阶段,这些细胞必须能够逃离宿主的免疫学反应及不利的代谢条件才能得以生存。绝大多数循环细胞缺乏建立转移性疾病的表型特征,或者其转移的形成已经被宿主的某些不利的防御因素阻止,这些肿瘤细胞的血行播散可能是无效的过程。所以,在转移的早期阶段,宿主的免疫防御系统将会抑制肿瘤细胞在远端的靶器官积聚,一旦血液中出现少量肿瘤细胞,便会启动免疫防御系统。如要成功的产生一个转移性克隆,CTC 必须能够在远端血管床停留,浸润靶器官软组织,进而增殖形成转移灶。据报道估计每 10000 个播散的肿瘤细胞中仅约 1 个癌细胞能够形成转移性病灶^[15]。所以循环肿瘤细胞的出现本质上不应被等同为癌症转移的存在,但转移形成或存在的可能性大大提高。

1.5 其它 目前乳腺癌病人个体化辅助治疗仍不够完善。最近的两个研究证实,如果单独或同时检测到外周血中 CTC 或者骨髓中肿瘤细胞,提示肿瘤对系统化治疗无反应^[16,17],如果基于 CTC 提供的信息,及时改变治疗方案,对及时控制患者的病情进展有重要的意义。血液中 CTC HER-2 的阳性表达,不但提示患者预后不良,同时对于单抗药物赫赛汀(Herceptin)的靶向治疗也有重要的指导意义^[18]。也有学者提出,一旦临床开始常规检测 CTC,其有可能会成为开发抗癌新药的靶点,最终实现抗癌治疗的个体化。

2 CTC 检测方法

2.1 CTC 检测前的富集 由于 CTC 在肿瘤患者外周血含量稀少,所以许多学者在进行 CTC 检测前应用一定的方法对外周血液进行处理,比如密度梯度离心法,过滤法和免疫磁珠等方法富集肿瘤细胞,进而大大提高 CTC 检测的灵敏度和特异性。这些方法中,免疫磁珠分离法具有较高的特异性及富集效率,包括阴性免疫磁珠富集和阳性免疫磁珠富集两种。阴性富集分离法是利用抗白细胞膜表面抗原如 CD45 等的抗体与磁珠偶联,进而将白细胞去除,使肿瘤细胞得到富集。阴性富集的优点是 CTC 未被免疫磁性标记,因此不受此操作过程的影响^[10,19,20]。阳性富集分离法利用标记肿瘤细胞膜表面上皮抗原如 EpCAM, Ber-EP4 或 HEA 等相应抗体的免疫磁珠^[21,22],达到富集外周血上皮细胞的作用。阳性富集分离方法能获得较高的富集效率,肿瘤细胞回收率高且灵敏度增加。由美国 FDA 批准的 CellSearchTM 体外诊断试剂盒即是应用基于 EpCAM 的阳性富集方法。但是,表达 EpCAM 的非恶性上皮细胞或血细胞也将被富集。另外,不是所有病人的肿瘤都表达 EpCAM 抗原,Went 等人观察到在不同类型肿瘤病人此抗原的表达约为 70%^[23]。即使是同一个患者的肿瘤细胞在化疗前后也有不同的 EpCAM 表达,这对使用此方法进行临床检测造成了一定的困难。鉴于以上原因,一些研究者更乐于选择阴性富集的方法,因为后者只是将白细胞去除,肿瘤细胞的富集不依赖于上皮特异抗原的表达。

2.2 基于抗体的检测方法 通过免疫细胞化学和免疫荧光等技术,可区分不同的组织来源的细胞,如上皮细胞和血细胞等。膜抗原(如人乳球蛋白、MUC1、EpCAM 等)或细胞骨架蛋白(如角蛋白的不同亚型 CKS,18,19)等的抗体已被广泛用于 CTC 的检测。抗原与抗体特异结合后,可进行多种下游分析,如荧光显微镜,流式细胞仪分析以及过氧化物酶或碱性磷酸

酶染色的免疫细胞化学技术 (Immunocytochemistry, ICC)。免疫荧光技术在大多数研究中发挥着比较优秀的作用,抗体可以直接或间接标记绿色或红色荧光基团,而且荧光结果分析结束后可进一步进行荧光原位杂交分析^[24]。基于抗体的检测方法也有弊端,比如角蛋白也可在血细胞内表达,或者非特异结合于 Fe 受体阳性细胞,出现假阳性结果^[25],假阳性率在 1%~3% 左右。免疫化学筛选技术对操作人员的技术要求较高,需要特殊的培训方可胜任工作;手工阅片比较耗时费力;不同的阅片者对于同一个细胞可能有多种不同的解释;如果玻片上出现可疑且难以定论的细胞,也难以再次定位在同一个细胞。自动化显微镜阅片系统的问世,正在逐步解决上述问题,不但使 CTC 的判断达到了标准化,提高了检测灵敏度和效率,而且任何时间均可定位同一个细胞,且重复性好,有望投入临床用于 CTC 的研究^[26]。

2.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 此方法通过扩增肿瘤特异性 mRNA 序列逆转录的 DNA 片断,可检测肿瘤细胞中某些基因改变后 mRNA 水平的异常。RNA 在细胞外环境极不稳定,一旦检测到特异性表达提示被检测组织或体液中有肿瘤细胞的存在。应用 RT-PCR 方法检测外周血中肿瘤细胞必须满足如下要求:灵敏性、特异性和重复性^[27]。要达到较高的灵敏性,选择肿瘤组织中高表达肿瘤标识物是非常必要的。另外实体瘤细胞基因突变及肿瘤标识物的表达谱均具有较高的异质性,并不是所有的肿瘤细胞均会表达相同的肿瘤标识物,因此应用多种肿瘤标识物会加强检测的灵敏性。但是 RT-PCR 方法检测外周血中稀有肿瘤细胞最关键的问题是特异性,也就是说选定的肿瘤标识物要准确的区别肿瘤细胞和有核血细胞。主要影响特异性的因素包括:操作污染、非法转录 (illegitimate transcription) 和标识物在非瘤细胞表达等,所有这些将增加检测的假阳性结果。如果血液中存在 PCR 反应的抑制剂 (建议加入内对照,如 Actin 等),肿瘤细胞可能间歇脱落入血液循环,治疗后靶基因下调 (如激素治疗) 或肿瘤细胞分化较差且并不表达被检测的标识物等均会增加假阴性结果^[28]。

2.3.1 荧光原位杂交技术 (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) FISH 是一种利用非放射性的荧光信号对原位杂交样本进行检测的技术。它将荧光信号的高灵敏度、安全性及直观性和原位杂交的高准确性结合起来,通过荧光标记的核酸探针与待测样本的 DNA 进行原位杂交,在荧光显微镜下对荧光信号进行辨别和计数,从而对染色体或基因异常的细胞、组织样本进行检测和诊断,为各种基因相关疾病的分型和预后提供准确的依据。FISH 具有良好的稳定性和可重复性。通过 FISH 方法检测 CTC,可直接观察 Crc 的生物学特性变化,如染色体数目异常,原癌基因扩增等,通过这些遗传学特性可进一步确定 CTC 恶性程度,以及辅助判断病情等,如检测乳腺癌病人 CTC 中 HER-2 基因扩增,为其治疗提供依据^[24]。但其价格昂贵,操作技术复杂,目前还不能普及开展。

2.4 用于乳腺癌研究的 CTC 标识物 结合大量的文献报道,用于乳腺癌研究的 CTC 标识物,主要包括:HER-2/nen,细胞角蛋白 (Cytokeratin, CK), MUC1, 人乳球蛋白, EGFR 和 B-HCG 等,肿瘤细胞肿瘤标识物表达具有一定的异质性,因此多种标识物的联合检测将更有利于提高乳腺癌 CTC 检测的灵敏性和特异性。

2.5 HER-2/neu HER-2/neu (由 C-erbB-2 基因编码) 是一个 185 kD 的跨膜受体,是表皮生长因子酪氨酸激酶受体家族的成员,已被公认是乳腺癌肿瘤标识物检测的金标准。大量的报道证实大约 20%~25% 的乳腺癌病人有 III R-2 蛋白过表达^[29], Her-2/neu 在细胞表面过表达使肿瘤具有侵袭性,表现为病情进展迅速,易于转移,生存期短,并对化疗及内分泌治疗耐药,是独立的预后不良因素。1998 年美国 FDA 批准了以 HER-2 为靶点的单克隆药物赫赛汀 (Herceptin), 临床研究证实治疗早期及转移性乳腺癌有效,与化疗药物联合有更具

著的疗效^[30]。这些研究为 HER-2 用于 CTC 的研究做了很好的铺垫。CTc 在遗传学和免疫表型等方面的特征不但预示疾病的预后,可能有助于指导靶向治疗,如对乳腺癌病人循环血上皮细胞 HER-2 表达进行研究,有可能指导医生更加合理的设计治疗方案^[3]。在一项针对乳腺癌 I-III 期病人的研究中,HER-2 阳性 CTC 的出现以及出现频率可明显影响患者存活期,高水平的 HER-2 阳性 CTC 可能反映了肿瘤的活性^[18]。

2.5.1 细胞角蛋白 (Cytokeratin, CK) 角蛋白属中间丝细胞骨架蛋白,是存在于上皮细胞内分子量为 40~70 kD 的一组蛋白质。根据其不同的分子量和等电点,可分为 20 个亚型,这些亚型在上皮细胞中的分布有一定的特异性。角蛋白分为表皮角蛋白和细胞角蛋白,细胞角蛋白主要存在于内脏器官不角化的上皮细胞内。CK8, CK18 和 CK19 常被组合应用检测转移性乳腺癌循环血中肿瘤细胞。Witzig 等人通过免疫磁珠阳性选择技术分离 CTC;并结合免疫细胞化学技术,25 个转移性乳腺癌病人血液中 18 个乳腺癌病人有 CK 阳性细胞 (76%),而健康对照和淋巴结转移阴性患者未检测到上皮细胞^[20]。

2.5.2 MUC1 MUC1 粘蛋白是一种大分子量的糖蛋白,主要存在于乳腺、胰腺、卵巢等上皮性组织和器官中。作为一种重要的肿瘤相关抗原,它在癌变上皮细胞表面异常高表达,结构发生相应改变,在乳腺癌的发展、转移及预后起到重要作用。应用实时定量 RT-PCR 方法检测免疫磁珠分离的血浆上皮细胞, MUC1 阳性细胞与病人的临床状况有很好的相关性,其中可手术的乳腺癌患者有 8% MUC1 阳性表达,进展期乳腺癌可达到 45% 检测阳性率^[31]。MUC1 也经常与其它分子标识物联合检测 CTC,如与 CK19、CEA 组合,通过 RT-PCR 方法检测肿瘤细胞, 1×10^6 个单核细胞中可检测到一个肿瘤细胞,尽管灵敏度很高,但是 MUC1 缺乏特异性^[32]。

2.5.3 端粒酶 端粒酶是人体唯一携带自身 RNA 模板的逆转录酶,其能以自身 RNA 为模板逆转录合成端粒 DNA 序列添加至端粒末端,以弥补细胞分裂时端粒的进行性缩短。研究表明,85% 以上的恶性肿瘤和大多数永生生化细胞中端粒酶异常激活,且在细胞存在稳定的端粒。因此,端粒酶是目前已知的最为广谱的肿瘤分子标记,并有可能成为肿瘤治疗的新靶点。端粒酶是癌的标志,正常上皮细胞是不存在的。端粒酶活性在 CTC 方面的研究表现出非常高的灵敏性和特异性。Soria 等^[33]运用免疫磁珠分选技术和 PCR-ELISA 方法检测了 25 例 IV 期乳腺癌患者和 9 例健康志愿者外周循环血上皮细胞的端粒酶活性,21 名 (84%) 乳腺癌患者端粒酶阳性,而志愿者皆为阴性。同样,应用相同方法检测其它肿瘤如肺癌 (IIIB 或 IV 期) 和结肠癌 (Dukes C 或 D 期) 外周血上皮细胞,端粒酶激活分别为 72% 和 73%,但是健康志愿者无一例阳性^[34]。由此提示此方法的灵敏性和特异性。

2.5.4 人乳球蛋白 (human mamaglobin, hMAM) 人乳球蛋白主要表达于成人乳腺组织及乳腺癌细胞,是近年来发现的乳腺组织特异性蛋白,其基因仅在乳腺癌中表达,可能是首批发现的具有乳腺器官特异性的肿瘤标识物,在乳腺癌的早期诊断、治疗、监测病程转移及判断预后等方面都有重要意义。与正常乳腺组织相比较,约 80% 的原发性乳腺癌和转移性乳腺癌 hMAM 蛋白免疫染色强阳性, mRNA 水平比正常乳腺组织高数倍^[35]。对于乳腺癌来说, hMAM 是一个灵敏性和特异性较好的分子标识物。应用巢式 RT-PCR 分析方法检测乳腺癌患者 CTC 的 hMAM 表达,转移性乳腺癌患者的阳性率 (约 40% 以上) 显著高于非转移性乳腺癌患者,而健康志愿者皆为阴性^[36,37]。目前关于 CTC hMAM 阳性表达与乳腺癌预后关系和对治疗的反应等方面,仍需要大量的临床实验证实。

3 结 语

自从 20 世纪 60 年代开始, CTC 逐渐被用于乳腺癌的研究,尤以近 20 年居多。但是可以用于临床的检测方法才刚刚开始出现。这其中主要的原因是富集和检测的技术不过关,

灵敏性,特异性和可重复性不能达到临床使用的标准。加之每一家使用的方法不统一,临床数据的可靠性不同,使人们很难从众多报告中找到真正可行的方法。致力于提供标准化的 CTC 检测方法,AVIVA 生物科技公司(美国加州)研发了基于阴性富集的 CTC 检测技术,并在临床上证实了其对癌症病人的诊断和治疗监测具有一定的意义(资料未显示)。CTC 所提供的特殊临床信息必将指导临床医生改变传统的治疗方案,向个体化治疗转变。目前的相关临床研究正在评价辅助治疗过程中,血液中肿瘤细胞的连根拔除与生存期的延长是否存在相关性,以及这种 CTC 指导的治疗是否能够改善转移病人的预后。当然更重要的是能正确的识别转移性肿瘤特异的靶点进而改善治疗,最终提高患者的生存期和生活质量。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer stat^{is} Lics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.
- [2] Jiang WC, Martin TA, Mansel RE. Molecular detection of micro-metastasis in breast cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 43(1): 13-31.
- [3] Hayes DF, Walker TM, Singh B, *et al.* Monitoring expression of HER-2 On circulating epithelial ceUs in patients with advanced breast cancer [J]. Inc J Oncol, 2002, 21(5): 111-1117.
- [4] Jotsuka T, Okurmua Y, Nakano S. *et al.* Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse; a prospective study in node-negative breast cancer[J]. Surgery, 2004, 135(4): 419-426.
- [5] Wiedswang C, BoWen E, Schimer C. *et al.* Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and hone marrow in breast cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 118(8): 2013-2019.
- [6] Weigelt B, Bosma AJ, HarL AA. *et al.* Marker genes for circulating tumor cells predict survival in metastasized breast cancer patients[J]. Br J Cancer, 2003, 88(7): 1091-1094.
- [7] Cnstofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 781-791.
- [8] Cnstofanilli M, Hayes DF, Budd CT, *et al.* Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(7): 1420-1430.
- [9] Kahn HJ, Presta A, Yang LY. *et al.* Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment; conelation with disease stage[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 86(3): 237-247.
- [10] Tauhert H, Blumke K, Bilkenroth U. *et al.* Detection of disseminated tumor cells in penpheral hlood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases [J]. Gynecol Oncol, 2004, 92(1): 256-261.
- [11] Goldhirsch A, Wood W, Gelher R. *et al.* Meeting highlights: Updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer[J]. J Oin Oncol, 2003, 21(17): 3357-3365.
- [12] Smith BM, Slade MJ, English J. *et al.* Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer; companson of quantitative pnymerase chain reaction and immunocytochemical techniques[J]. J Oin Oncol, 2000, 18(7): 1432-1439.
- [13] Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ. *et al.* Circulating tumor cells versus imaging - predicting overall survival in metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6403-6409.
- [14] Hayes DF, Cristofanilli M, Budd CT, *et al.* Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of meteastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14): 4218-4224.
- [15] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis; an imbalance of positive and negahve regulation[J]. Cancer Res, 1991, 51(18): 5054s-5059s.
- [16] Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, *et al.* Isolated tumor cells in Bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(16): 5342-5348.
- [17] Janni W, Hepp F, Rjosk D. *et al.* The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence [J]. Cancer, 2001, 92(1): 46-53.
- [18] Wulfing P, Borchard J, Buerger H, *et al.* HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1715-1720.
- [19] Zigeuner RE, Riesenber R, Pohla H, *et al.* Isolation of circulating cancer cells from whole blood by immunomagnetic cell enrichment and unenriched immunocytochemistry in vitro [J]. J Urol, 2003, 169(2): 701-705.
- [20] Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, *et al.* Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer paunents usmgimmunomagnetic enrichment and digital microscopy [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(5): 1085-1091.
- [21] Racila E, Euhus D, Weiss AJ, *et al.* Detection and characterization of carcinoma cells in the blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4589-4594.
- [22] Naume B, Borgen E, Beiske K, *et al.* Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood[J]. J Hematother, 1997, 6(2): 103-114.
- [23] Went P, Lugli A, Meier S, *et al.* Frequent EpCam protein expression in human carcinomas[J]. Hum Pathol, 2004, 35(1): 122-128.
- [24] Meng S, Tripathy D, Shete S, *et al.* HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer proUesses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(25): 9393-9398.
- [25] Borgen E, Beiske K, Trachsel S, *et al.* Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase[J]. J Pathol, 1998, 185(4): 427-434.
- [26] Kraeft SK, Ladanyi A, Galiger K, *et al.* Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9): 3020-3028.
- [27] Zieglschmid v, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood[J]. CritRev Clin Lab Sci, 2005, 42(2): 155-196.
- [28] Chossein RA, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micro metastases and circulating tumor cells in solid tumon[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(8): 1950-1960.
- [29] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, *et al.* Studies of the HER-21 neu proto-oncogene in hman breast and ovarian cancer[J]. Science, 1989, 244(4905): 707-712.
- [30] Ross JS, Fletcher JA, The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor; Predictive Factor, and Target for Therapy[J]. On cologist, 1998, 3(4): 237-252.
- [31] de Cremoux P, Extra JM, Denis MG, *et al.* Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(8): 3117-3122.
- [32] Berois N, Varangot M, Aizen B, *et al.* Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patents with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(6): 717-723.
- [33] Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, *et al.* Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(5): 971-975.
- [34] Cauthier LR, Granotier C, Soria JC. *et al.* detection of circulating carcinoma cells by telomerase activity[J]. Br J Cancer, 2001, 84(5): 631-635.
- [35] Fleming TP, Watson MA. Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 923: 78-89.
- [36] Zach O, Kasparu H, Wagner H, *et al.* Mammaglobin as a marker for the detection of tumor cells in the penpheral blood of breast cancer patients[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 923: 343-345.
- [37] Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, *et al.* Human mammaglobin mRNA is a reliable molecrlar marker for detecting occultbnastcancer cells in peripheral blood[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24(2): 265-271.