

循环肿瘤细胞 (CTC) 各种分离及鉴别方法的比较与应用

新年伊始，万象更新。国内外有关循环肿瘤细胞 (CTC) 的研究与临床应用也是方兴未艾。由于目前有关 CTC 检测的各种技术手段较多，为了便于大家对此能有一个比较全面的了解，下文将目前国内外检测 CTC 的主要技术手段向大家做一个介绍。

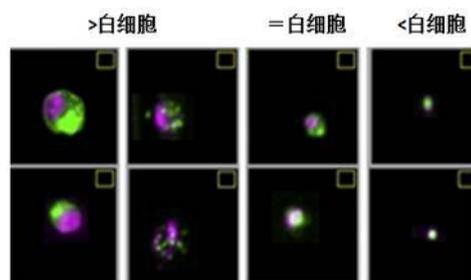
CTC 是从实体肿瘤脱落入血的肿瘤细胞，它与肿瘤的转移、复发等有着极为密切的关系。有些 CTC 入血后随即凋亡，有些则只是在外周血中不断循环，而另外一些 CTC 则随血液至远端器官，形成新的转移灶。这些能够形成转移灶的 CTC 也被称为循环肿瘤干细胞。可见血中的 CTC 无论是生物学特性还是临床意义都差异极大。目前，CTC 检测在国内外已被广泛用于快速评估肿瘤的治疗疗效（包括手术及药物疗效）、预后判断，以及肿瘤耐药与复发的即时性监测等。

CTC 检测主要由两个技术环节构成：分离与鉴别，也就是人们常说的“抓得着”与“看得见”。分离与鉴别方法的有效性决定着 CTC 检测的灵敏度与特异性。让我们首先看看人们是如何解决“抓得着”CTC 的问题的。目前，国内外各种分离 CTC 的技术手段基本可归为 3 大类：过滤法，捕获法及富集法。

过滤法

代表技术为 iSET。该方法使用孔径为 8 微米的细胞筛过滤去除 4-5 微米的白细胞，从而达到分离较大的 CTC 的目的。本方法的最大优点在于便捷。然而随着近年来人们对 CTC 了解的不断加深，发现很多 CTC 实际上与白细胞一样大，有些甚至只有白细胞的一半或更小（图 1）。目前有证据显示，这些小或超小 CTC 的数目比例在有些瘤种中可高达 1/3。人们对于这些小的 CTC 显然不能视而不见。实际上有关过滤法灵敏性较低的

客观评价国外已有多篇报道，而这些小 CTC 的特殊重要临床意义也已经引起了人们的密切关注 (Alunni-Fabbroni and Sandri, 2010, *Methods* 50:289; Coumans, et al., 2010, *Ann. Oncol.* 21:1851)。



Attard et al, 2011 *Curr. Opin. Genetics. & Develop.* 21:50-58

图 1 不同大小的 CTC

捕获法

主要代表方法为 CellSearch 及微流体 (microfluidics)。该方法的原理是将抗 CTC 表面特定蛋白标示物 (EpCAM) 抗体与磁珠或微流体进行偶联，利用这些固相载体上的抗体直接从血中捕获 CTC，也就是人们常说的钓鱼法（图 2）。该方法的优点是简便，但是近来人们发现，间质化肿瘤细胞 (Gorges, et al., 2012, *BMC* 12:178)，以及许多循环肿瘤干细胞 (Zhang, et al., 2013, *Sci. Transl. Med.* 5:180)，尤其是多种不同组织来源的肿瘤细胞上并不表达此特定蛋白 EpCAM。最近的研究显示，在检测的 134 种不同肿瘤标本中，高达 30% 肿瘤的 EpCAM 为阴性 (Went, et al, 2004, *Hum. Pathol.* 35:122)。这种依赖肿瘤细胞自身生物学特性的方法极大地限制了应用该方法检测不同肿瘤的 CTC，而且分离的 CTC 被免疫磁珠所包裹，且又被抗 EpCAM 抗体活化 (Munz, et al., 2009,

Cancer Res.69:5627; Veillete, et al., 1988. Cell 55:301), 故不适于多种后续研究。

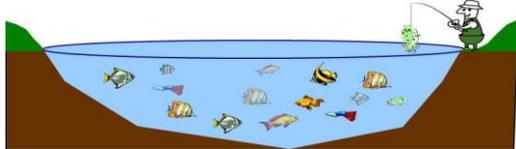


图2 抗体捕获法（钓鱼法）

富集法

原理是有效去除血液中的红细胞、白细胞及血浆等组份，从而达到富集非血源性 CTC 的目的。该方法不依赖于肿瘤细胞表面标志物（如 EpCAM）的表达，且不受 CTC 大小的影响，因而可以有效富集各种不同肿瘤来源且大小不同的 CTC 及癌栓(circulating tumor microemboli, CTM)。富集后的 CTC 没有被抗体触及，维持了较好的自然状态，可适于后续一系列分析。富集法又可分为阴性富集 (negative enrichment) 及差相富集 (subtraction enrichment, SE)。两者最大的区别在于不同于阴性富集的低渗裂解红细胞，SE 选择了非低渗溶破法去除红细胞，因而避开对 CTC 的低渗损伤，从而使得到的 CTC 适于后续的原代肿瘤细胞培养、单细胞分析等。自从赛特生物与北京协和医院在 2009 年共同报道了早期 SE 方法可有效富集各种肺癌 CTC 细胞，并发现 86% 的肺癌复发病人其 CTC 为阳性后(Wu et al.2009, J. Thorac. Oncol. 4:30), 优化后的 SE 方法已被广泛应用于多种肿瘤 CTC 的研究与临床应用 (Li et al, 2014, Oncotarget 5:6594; Chen et al, 2013, CCA 219:57)。

大家对如何“抓得着”CTC 的各种方法已经有了比较全面的了解，我们再看看人们是怎样解决“看得见”CTC 的问题的。CTC 的鉴别方法主要分为多重 PCR，免疫荧光染色及荧光原位杂交 (FISH) 等。

多重 PCR (multiplex PCR) 与 RNA 探针检测

多年前人们已从技术上解决了利用多重 PCR 手段对微量稀有细胞进行检测的技术难题，可在 2 个肿瘤细胞上进行多基因检测。但时至今日，无特异性肿瘤标志物或基因一直还是困扰人们的难题，基于特异性较差等原因，此方法已不再是人们关注的重点 (图 3)。

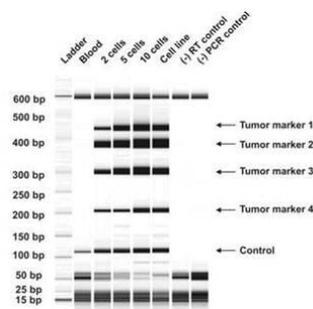


图3 多重 PCR 方法检测瘤标含量

近年来，美国 Affymetrix 公司发明了使用 RNA 探针检测 CTC 的技术，可帮助人们在 mRNA 水平对 CTC 进行检测与研究。但其实际意义还有待于较大样本的临床验证。

抗体染色

实体肿瘤细胞一般均为上皮来源，细胞内会表达角蛋白(cytokeratin, CK)或其他肿瘤标志物 (如 HER2)。借助免疫荧光染色，可对来自实体瘤 CTC 中的瘤标进行识别，从而达到检测 CTC 的目的。这也是目前检测 CTC 的最常见方法 (图 4)。然而近年来大量的临床实验数据显示，在 CTC 形成过程的间质化(EMT)阶段，与 EpCAM 相同，大量的 CK 也会降解 (Willipinski-Stapelfeldt et al, 2005, Clin. Cancer Res. 11:8006)，从而在 CTC 检测过程中出现因“看不见”而造成的假阴性。

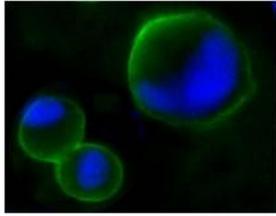


图4 CK染色方法鉴别CTC

免疫荧光染色-FISH检测 (iFISH)

染色体荧光原位杂交 (FISH) 技术检测染色体数目异常的肿瘤细胞早已被人们广泛接受。但有别于常规的 FISH 方法, iFISH 的技术原理是将免疫荧光染色与 FISH 进行了有效整合, 在区分血源性与非血源性细胞的基础上, 对 CTC 细胞同时进行染色体异倍体检与

任一瘤标表达的检测 (图 5)。相对于单一使用免疫荧光染色或 FISH 方法, iFISH 可将染色体或瘤标异常的 CTC 有效检测出来, 从而极大地提高了检测的灵敏性与特异性。此外, 根据同一 CTC 上的瘤标表达与染色体数目, 可将 CTC 进行亚类分型, 每一不同亚类的 CTC 细胞在肿瘤的耐药、药敏、转移与复发等方面都有着不同的临床意义。赛特生物与北京肿瘤医院共同发表的最新临床实验结果提示, 胃癌病人中的 8 号染色体 3 倍体 CTC 具有内源性耐药的特性, 而 4 倍体或 5 倍体的 CTC 则可能具有继发性耐药的特性(Li et al,2014, Oncotarget 5:6594)。该发现为医生今后制定更为合理的肿瘤个体化治疗方案提供了更可靠的依据。

in situ Phenotyping and Karyotyping of CTC Subtypes by iFISH®

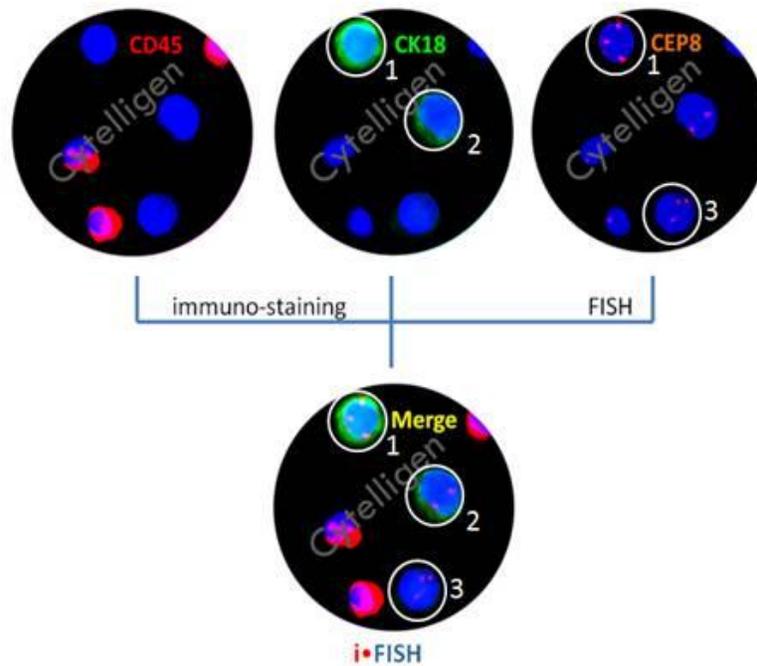


图5 iFISH检测技术对CTC进行有效的鉴别

随着人们对 CTC 了解的不断加深，各种新的 CTC 检测手段也会不断出现。其中由美国 Affymetrix 与 Cytelligen 公司正在联

合开发的差相富集 (SE)-iFISH-RNA FISH 整合技术平台将令人们首次在单一 CTC 细胞上进行 DNA、RNA 及蛋白表达三位一体的研究。