

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.08.050

循环肿瘤细胞检测用于卵巢癌诊治的临床价值*

杨 璨,王 辉[△]

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

摘要:目的 为卵巢癌的临床检测提供参考。方法 分析循环肿瘤细胞(CTCs)的转移规律及检测方法,了解 CTCs 检测的临床价值,对疗效的影响,以及与预后的关系。结果与结论 CTCs 检测可提高附件恶性肿瘤早期发现率,对化学治疗疗效及预后有一定影响,可作为卵巢癌早期诊断指标。

关键词:卵巢癌;循环肿瘤细胞;预后;液体活检

中图分类号:R446;R737.3

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)08-0155-04

Clinical Value of Circulating Tumor Cells Detection in Ovarian Cancer

YANG Can, WANG Hui

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016)

Abstract: Objective To provide a reference for the clinical detection of ovarian cancer. **Methods** The metastasis and detection methods of circulating tumor cells(CTCs) were analyzed to understand the clinical value of CTCs detection, its impact on efficacy, and its relationship with prognosis. **Results and Conclusion** CTCs detection can improve the early detection rate of accessory malignant tumors, have a certain impact on the efficacy and prognosis of chemotherapy, and can be used as an early diagnosis indicator for ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; circulating tumor cells; prognosis; liquid biopsy

卵巢癌作为女性生殖道肿瘤病死率最高的恶性肿瘤^[1],临床早期诊断困难,发现时多为晚期,预后差,治疗方案以切除既有癌组织辅以铂类、紫杉醇为基础的化疗(化疗)为主,以此延长患者的总生存期(OS)及无进展生存期(PFS)^[2]。现今多样化的治疗方案辅以抗肿瘤血管生成药物(如贝伐单抗)、聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶(PARP)抑制剂(如奥拉帕尼)^[3-4]等的临床使用,虽不同程度延长了患者的PFS,但术后残留的病灶或肉眼无法识别的微小病灶依旧是影响预后的重要因素^[5]。目前的手段主要是通过肿瘤标志物或影像学的检测对卵巢癌患者进行随访,而对某些肿瘤标志物阴性的患者,仅可通过影像学的评估变化其状态,缺乏早期诊断、疗效评估及预后评估的有效手段。循环肿瘤细胞(CTCs)检测因具有采用血样标本的可操作性、可重复性及前瞻性的优势,成为卵巢癌临床监测必备手段。

1 CTCs

1.1 定义

CTCs是由自发或诊疗操作,源于实体肿瘤原发灶或转移灶,且只有少数具有高活性的CTCs可逃离机体的免疫损伤而存活,并通过血液运行转移到其他组织器官中形成转移灶的稀有细胞^[6]。自1869年首次报道在1例转移性癌症患者的血液中观察到CTCs开始^[7],再到1889年的“种子土壤学说”——肿瘤微环境提供肿瘤增殖及侵袭的相关分子,如细胞因子、生长因子等可促

进细胞迁移,经过数百年时间,CTCs的临床价值和研究潜力正被逐渐显现。近20年PubMed上相关发文情况见图1。

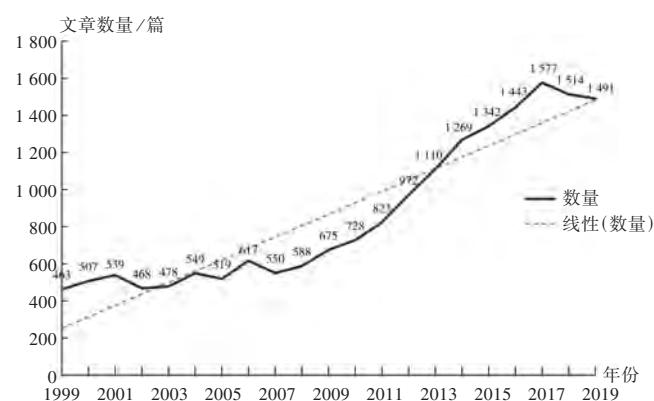


图1 PubMed近20年发表关于CTCs的文章量

1.2 转移

肿瘤患者生存期短的原因主要是肿瘤的复发转移,但转移扩散的机制还远未阐明。最近有研究表明,肿瘤转移存在以下2种模式。

1)传统的模型是单个肿瘤细胞依赖上皮间质转化(EMT),即原发肿瘤的上皮细胞获得脱离原发灶浸润周围组织进入血液的能力,进入血液形成CTCs,逃逸机体免疫,适应新的肿瘤微环境,在患者其他组织器官间质上皮转化(MET)形成新的转移灶^[8]。原发肿瘤以EMT形式进行转移,CTCs在血液中以上皮型、混合型、间质型3种形式

*基金项目:重庆市社会民生科技创新专项[cstc2015shmszx10007]。

第一作者:杨璨,女,在读硕士研究生,研究方向为妇科肿瘤学,(电子信箱)517079165@qq.com。

[△]通信作者:王辉,女,主任医师,研究方向为妇科肿瘤学,(电子信箱)15310918845@163.com。

存在。且相关研究表明,若在血液中发现较多混合型或间质性 CTCs,表明患者转移复发的风险增大^[9]。

2) 原发肿瘤以链、团或聚集成循环肿瘤细胞簇的形式浸入周围组织,并向受损血管内灌注,CTCs 簇吸引血细胞形成微血栓,与单个 CTCs 相比存活率更高、外渗速度更快、侵袭性更强^[10]。LEE 等^[11]在一项纳入 24 例原发性卵巢癌和 30 例复发患者的前瞻性研究中发现,在复发患者和耐药患者血液中能发现更多的 CTCs 簇,提示其与总体生存率呈负相关。无论肿瘤细胞通过何种方式进行转移,患者血液中的 CTCs 被视为最主要的潜在转移因素之一,监测不同类型的 CTCs 更利于准确判断预后、有效诊断及制订更实用的治疗方案。

1.3 检测

1 mL 血液中含有数十亿个细胞,而 CTCs 非常罕见,仅占白细胞总数的 $1/(10^6 \sim 10^7)$,如何克服其数量少带来的技术限制是目前集中研究的问题。CTCs 的检测一般通过富集和鉴定 2 个步骤进行检测。

富集:由于 CTCs 的稀缺性,必须在被发现前进行富集,目前所有技术主要依赖细胞的生物学特性及其固有物理特性。

1) 依赖细胞生物学特性的富集技术,利用特定标志物,这些标志物由肿瘤细胞表达但血细胞不表达[如上皮细胞黏附分子(EpCAM)]及由血细胞表达但 CTCs 不表达(如 CD45),再以磁珠与相应抗体结合,利用其复合物的磁性进行富集^[12]。目前临床最常用的是被美国食品和药物管理局(FDA)批准的依赖 EpCAM 抗体的 Cellsearch 检测系统,利用免疫磁珠对 7.5 mL 外周血中的 CTCs 进行富集^[13-14],多用于评估晚期转移性乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌等的预后,但 VAN BERCKE-LAER 等^[15]指出,在卵巢上皮癌中依赖 EpCAM 的富集方式得到的结果欠佳,其原因可能为卵巢上皮癌中 EpCAM 阳性的 CTCs 较少及 EpCAM 在 EMT 过程中减少。故在此基础上,为了弥补 Cellsearch 只能识别表达 EpCAM 肿瘤的缺陷,新技术利用的抗体不仅能识别上皮肿瘤标志物 EpCAM 和细胞角蛋白(CK)7/8/18/19、白细胞标志物 CD45,还能筛选间质肿瘤标志物波形蛋白(Vimentin)和 Twist 蛋白^[16],从而有效富集各类 CTCs。

2) 依赖细胞固有物理特性的富集技术,可帮助 CTCs 与血液中的正常细胞(如白细胞、内皮细胞、造血干细胞)区分开而无须生物标记。在这些物理特性主要集中在 CTCs 和血细胞特性的差异上,主要是细胞大小、细胞可变性及电学性上,如利用上皮肿瘤细胞比外周血细胞大的膜过滤法(ISET),能迅速在不破坏细胞形态的前提下分离 CTCs^[16];还有利用细胞密度梯度进行

分离的方法,但试验温度及操作时间控制不当会使细胞受到破坏而降低其纯度。

鉴定:CTCs 被富集后需再次鉴定,依赖其本身抗原及肿瘤遗传特异性,主要采用免疫细胞化学(ICC)及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)2 种检测方法^[17]。ICC 是利用荧光抗体与肿瘤标记物特异性结合的技术,具有较高敏感性,再联合流式分析技术,即利用 ICC 标记的荧光信号,对 CTCs 实现快速高效分选及定量分析;RT-PCR 主要是发现血液中肿瘤表达的相关 mRNA,然后将 mRNA 链逆转录成 cDNA,通过 PCR 扩增多个相关肿瘤标志物,分析其表达模式^[18]。

2 卵巢癌的临床诊断

卵巢癌由于发现晚、诊断困难影响了患者的有效治疗时机,故目前临床急需发现早期诊断卵巢癌的有效方法。

ZHANG 等^[19]采用免疫磁珠法对 109 例卵巢癌患者测定 CTCs,并对其中 51 例患者同时检测 CTCs 及糖蛋白 125(CA125),发现 90.00% 的初诊患者检测出 CTCs,且 CTCs 的数量与分期相关($P=0.034$),I A ~ I B 期患者 CTCs 的阳性率为 92.16%,远高于同一患者 CA125 的阳性率(64.47%),提示 CTCs 检测较 CA125 可早期诊断卵巢癌。

PEARL 等^[20]利用功能性富集法收集术前疑似卵巢上皮癌的 129 例患者 CTCs,将其中 58 例良性、I、II 期疾病患者进行对比,发现 CTCs 检测在 I、II 期敏感性为 40.85%,特异性为 95.10%,阳性预测值(PPV)为 77.80%,然而 CA125 特异性仅为 76.20%,再次提示 CTCs 可作为卵巢癌早期诊断指标之一。

SUH 等^[21]前瞻性收集术前未明确附件包块性质的 87 例患者血清肿瘤标志物 CA125、ROMA 值、CT 或 MRI 及 CTCs,发现在早期癌症中 CTCs 检测较其他检测方式敏感性更高,提示 CTCs 对术前附件包块的良恶性鉴别具有重要意义。

RIED 等^[22]以 ISET 法收集癌症患者及有高危因素的但无症状患者的 CTCs,发现所有癌症患者和半数筛查无症状患者均检测到 CTCs,在 CTCs 呈阳性的 10 个月内,20% 的筛查患者中发现了早期癌症病变,提示利用 CTCs 进行筛查可升高附件恶性肿瘤早期发现率。

3 卵巢癌的疗效评估及指导个体化用药

丁凌雁等^[23]利用流式细胞仪收集 60 例晚期卵巢癌(III ~ IV 期)患者化疗 2 周期前后 CTCs,研究结果显示,化疗后患者 CTCs 减少,且提示 CTCs 减少的患者较外周血 CTCs 计数 ≥ 5 的患者平均 PFS 延长约 6 个月(13.2 个月比 6.4 个月),提示 CTCs 与患者化疗疗效及预后有关。

目前,卵巢癌一线化疗方案以铂类为主,铂类药物

主要作用于肿瘤细胞 DNA,引起肿瘤细胞 DNA 复制障碍,从而抑制其分裂,机体由此开始反应,细胞内核酸切除修复系统开始修复铂类药物对细胞造成的损伤,其中最主要的基因为切除修复交叉互补组 1(ERCC1)基因^[24]。

CHEBOUTI 等^[25]采用单链 RT-PCR 对 ERCC1 进行分离,发现以铂类为基础化疗的卵巢癌可能导致 ERCC1 基因阳性的 CTCs 增加,修复铂类药物对癌症细胞造成的损害,从而削弱铂类化疗疗效,提示 ERCC1 基因可作为诊断卵巢癌耐药基因之一。

OBERMAYR 等^[26]还在对比卵巢癌患者外周血样本时发现,化疗后铂耐药的患者比铂敏感的患者更能检测到亲环素 C(PPIC)阳性的 CTCs,提示 PPIC 可能与卵巢癌患者铂耐药有关。

CHEBOUTI 等^[27]检测 91 例卵巢癌患者术前及化疗后 CTCs,发现以铂类为基础化疗的卵巢癌患者出现 EMT-CTC 聚集,并引起 CTCs 的分子表型向间质表型(如 Twist, PI3K α , Akt-2)转化,提示肿瘤可能向铂耐药方向发展。

CTCs 不仅能作为评估卵巢癌患者化疗的参考指标,还提供对化疗可能产生反应的相应特殊基因,为及时更换化疗方案提供可监测的手段。

4 卵巢癌预后

POVEDA 等^[28]通过 Cellsearch 系统纳入 216 例复发的晚期卵巢癌患者 CTCs,并囊括 CA125、铂敏感性、肿瘤最大直径等多因素分析,发现 CTCs 多患者较 CTCs 阴性患者的病情进展及死亡风险高(分别为 1.58 及 1.54 倍),提示 CTCs 数量与预后呈反相关。

董小丽等^[29]收集 31 例术后将行周期化疗的卵巢上皮癌患者,在术后化疗开始前、3 次化疗后 1 周内、6 次化疗后 1 周内收集 CTCs,发现随着化疗的逐步进行,CTCs 整体呈下降趋势,12 例完成 6 个月随访的患者中 4 例复发,CTCs 阳性且以间质型和混合型 CTCs 为主,表明化疗后仍能检测出 CTCs 的卵巢癌患者,复发转移概率越高,预后越差。

ZHOU 等^[30]在 Meta 分析中汇集 11 篇文献,囊括 1 129 例卵巢癌患者,指出与 CTCs 阴性组相比,CTCs 阳性组患者的 OS、PFS 及无病生存期(DFS)更短,且指出 CTCs 的存在与血清肿瘤标志物 CA125 的增加有关,再次提示 CTCs 可作为监测卵巢癌预后的指标之一。

5 结语

CTCs 的优势主要基于其独特的潜力提供了“液体活检”样本,易得到疾病在多个时间点的样本信息,可用于评估早期疗效,帮助建立个性化的治疗方法,提高疗效减少成本。CTCs 在 DNA 和 RNA 及所表达的特征蛋

白质水平均可作为“液体活检”方法。有研究分析 ctDNA 与肿瘤活检中发现的突变和表观遗传变化具有一致性,且可能较 CTCs 对治疗期间的微小残留灶有更高的敏感性^[31-32]。在美国国立卫生研究院(NIH)官方网站(<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>)分别以“Circulating Tumor Cells”“Circulating Tumor DNA”为关键词进行搜索(2020 年 1 月 15 日),显示有 860 篇及 405 篇临床研究正在进行。在寻找各个类型癌症时,发现了系列评估 CTCs 和 ctDNA 作为“液体活检”作用的临床研究(见图 2),虽然这些研究采取不同方式、不同人群、不同标准进行,但仍可能成为推进“液体活检”作为新一代肿瘤标志物检查的证据。

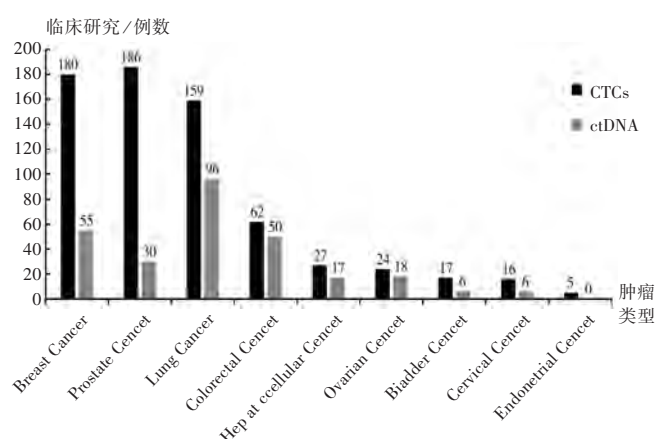


图2 NIH官方网站基于CTCs和ctDNA所获得的各类肿瘤临床研究

目前,CTCs 的临床意义已在多种类型实体肿瘤中得到有效评价,尽管其检测正逐步应用于临床,但还存在以下不足:1)目前找寻外周血 CTCs 的方式有限,尚无统一检测标准;2)检查费用高昂,经济实用性欠佳;3)多数研究无法证明 CTCs 在外周血释放规律,且无大数据随访患者相关生存期及疗效。上述原因可能会影响 CTCs 检测在临床的广泛应用。但通过 CTCs 检测的不断探索、更新及大样本数据临床试验的逐步开展,若能统一 CTCs 相关抗原标记物,增加其敏感性及特异性,逐步降低检测费用,CTCs 检测在卵巢恶性肿瘤中的临床使用前景及实用价值将得到进一步提升。

参考文献:

- [1] 孙选,孔守芳,李旭日,等. 妇科恶性肿瘤患者生存质量的影响因素[J]. 中国医师进修杂志,2012,35(z1):202-204.
- [2] DU BA, REUSS A, PUJADELAURAIN E, et al. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom[J]. Cancer, 2010, 115(6): 1234-1244.
- [3] BURGER RA, BRADY MF, BOOKMAN MA, et al. Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer -

- NEJM[J]. N Engl J Med, 2011, 67(26): 2473 – 2483.
- [4] GIANOPOULOU L, KASIMIR – BAUER S, LIANIDOU ES. Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 2017, 56(2): 186 – 197.
- [5] OBERMAYR E, BEDNARZ – KNOLL N, ORSETTI B, et al. Circulating tumor cells: potential markers of minimal residual disease in ovarian cancer? a study of the OVCAD consortium[J]. Oncotarget, 2017, 8(63): 106415 – 106428.
- [6] LAN F, LIU YP, Clinical Oncology Laboratory. Clinical advances in the detection of circulating tumor cells[J]. Journal of Modern Oncology, 2015, 23(15): 141 – 144.
- [7] ASHWORTH T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death[J]. Aust Med J, 1869, 14(3): 146 – 149.
- [8] 赵荣志, 吴志浩, 周清华. 上皮细胞间质化与肿瘤的转移[J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(7): 620 – 624.
- [9] 张 鹭, 李 力. 循环肿瘤细胞在卵巢癌预测和预后中的应用价值[J]. 国际妇产科学杂志, 2018, 45(6): 11 – 17.
- [10] FABISIEWICZ A, GRZYBOWSKA E. CTC clusters in cancer progression and metastasis[J]. Med Oncol, 2017, 34(1): 12.
- [11] LEE M, KIM EJ, CHO Y, et al. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) captured by microfluidic device in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Gynecologic Oncology, 2017, 145(2): 361 – 365.
- [12] BALIC M, LIN H, WILLIAMS A, et al. Progress in circulating tumor cell capture and analysis: implications for cancer management[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2012, 12(3): 303 – 312.
- [13] 张玉娟. 循环肿瘤细胞检测的方法学建立和改良及在实体瘤中的监测应用研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [14] 郑颖龄, 全进毅. 循环肿瘤细胞检测在妇科恶性肿瘤中应用的研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(1): 123 – 127.
- [15] VAN BERCKELAER C, BROUWERS AJ, PEETERS DJ, et al. Current and future role of circulating tumor cells in patients with epithelial ovarian cancer[J]. European Journal of Surgical Oncology, 2016, 42(12): 1772 – 1779.
- [16] GIOVANNA V, ABDELMAJID S, MALEK L, et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells: A New Method for the Immunomorphological and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells[J]. American Journal of Pathology, 2000, 156(1): 57 – 63.
- [17] WU S, LIU S, LIU Z, et al. Classification of Circulating Tumor Cells by Epithelial – Mesenchymal Transition Markers[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123976.
- [18] CUBERO MJA, LORENTE JA, ROBLES – FERNANDEZ I, et al. Circulating Tumor Cells: Markers and Methodologies for Enrichment and Detection[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.), 2017, 1634: 283 – 303.
- [19] ZHANG XH, HUI L, YU XY, et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer and Their Clinical Value as a Biomarker[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 48(5): 1983 – 1994.
- [20] PEARL M L, ZHAO Q, YANG J, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer[J]. Gynecologic Oncology, 2014, 134(3): 581 – 590.
- [21] SUH DH, KIM M, CHOI JY, et al. Circulating tumor cells in the differential diagnosis of adnexal masses[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 77195 – 77206.
- [22] RIED K, ENG P, SALI A. Screening for Circulating Tumour Cells Allows Early Detection of Cancer and Monitoring of Treatment Effectiveness: An Observational Study[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(8): 2275 – 2285.
- [23] 丁凌雁, 唐朝晖, 黄洪林, 等. 晚期卵巢癌患者外周血循环肿瘤细胞的检测及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(17): 2788 – 2791.
- [24] 孙 昱, 符 达, 刘兴党. 卵巢癌循环肿瘤细胞的生物学特性及其临床应用进展[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2016, 40(1): 60 – 64.
- [25] CHEBOUTI I, KUHLMANN JD, BUDERATH P, et al. ERCC1 – expressing circulating tumor cells as a potential diagnostic tool for monitoring response to platinum – based chemotherapy and for predicting post – therapeutic outcome of ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2016, 8(15): 24303 – 24313.
- [26] OBERMAYR E, MARITSCHNEGG E, AGREITER C, et al. Efficient leukocyte depletion by a novel microfluidic platform enables the molecular detection and characterization of circulating tumor cells[J]. Oncotarget, 2018, 9(1): 812 – 823.
- [27] CHEBOUTI I, KASIMIRBAUER S, BUDERATH P, et al. EMT – like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum – based chemotherapy[J]. Oncotarget, 2017, 8(30): 48820 – 48831.
- [28] POVEDA A, KAYE SB, MCCORMACK R, et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer[J]. Gynecologic Oncology, 2011, 122(3): 567 – 572.
- [29] 董小丽, 杨 雯, 王丽兴, 等. 卵巢癌中循环肿瘤细胞阳性率及分型与临床特征的关系[J]. 解放军医学院学报, 2017, 38(3): 202 – 205.
- [30] ZHOU Y, BIAN B, YUAN X, et al. Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer: A Meta – Analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130873.
- [31] ALIXPANABIERES C, PANTEL K. The circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer[J]. Klin Lab Diagn, 2014(4): 60 – 64.
- [32] LIANIDOU ES, MARKOU A, STRATI A. The role of CTCs as tumor biomarkers[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2015, 867: 341 – 367.

(收稿日期: 2019 – 09 – 27)