

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.002

· 专题(专家论坛) ·

循环肿瘤细胞检测研究进展:从单纯计数到表型与功能分析

毕峰瑞, 颜宏利(第二军医大学附属长海医院 实验诊断科, 上海 200433)

[摘要] 随着靶向治疗、免疫治疗等新技术的发展,肿瘤诊疗已经步入精准医疗的新时代。液体活检作为一种便捷、无创、能够动态反映肿瘤基因谱全貌的方法在肿瘤精准医疗中发挥着越来越重要的作用。血液循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)检测是最早开展的液体活检技术,在肿瘤早期诊断、预后判断、疗效评估等方面获得了广泛应用。初级阶段 CTC 的检测以单纯计数为主,但人们逐渐发现单纯计数无法真实反映肿瘤的负荷及变化情况。随着单细胞测序等技术的不断发展,人们对 CTC 的认识也不断深入,逐渐转向以分子表型和功能分析为主的高级阶段。本文结合近年来的临床实践,重点阐述 CTC 检测从初级阶段发展到高级阶段及其在肿瘤精准医疗中应用的研究进展。

[关键词] 循环肿瘤细胞;液体活检;细胞计数;分子表型;功能分析

[中图分类号] R730.4; R730.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)01-0341-07

Progresses of research on detection of circulating tumor cell, from simple counting to analysis of phenotype and function

BI Fengrui, YAN Hongli (Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] With development of novel techniques for targeted therapy, immunotherapy and so on, the tumor diagnosis and treatment have entered a new era of precision treatment. Liquid biopsy played an increasingly important role in the precision treatment of tumors as a convenient and noninvasive assay which could dynamically reflect the whole pictures of tumor gene spectrum. Detection of circulation tumor cell (CTC) in blood is the earliest liquid biopsy technique and has been widely used in the early diagnosis, prognosis judgment, efficacy evaluation and so on for tumors. At primary stage, the detection of CTC mainly based on a purely counting. However, a fact that the purely counting cannot really reflect the situations of tumor load and changes was gradually found. With continuous developments of sequencing technique and so on for a single cell, understanding of CTC is also deepening and the detection of CTC gradually turned to the advanced stage that is based on analysis of molecular phenotype and function. This paper mainly elaborated a development of CTC detection from a primary stage to an advanced one and progresses of the research on its application in the precision treatment of tumor, combining with clinical practice for recent years.

[Key words] circulating tumor cell (CTC); liquid biopsy; simple counting; molecular phenotype; functional analysis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 341-347. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.002]



颜宏利 教授、博士生导师,现任长海医院实验诊断科副主任,兼任生殖医学中心副主任。美国癌症协会会员,上海检验学会青年委员及分子诊断组副组长,中国抗癌学会转移分会委员,基因-健康委员会委员、上海抗癌学会肿瘤免疫分会委员。主持国家“863”课题、国家“973”子课题(2006-

2016,获滚动资助)、国家自然科学基金(6项)、上海市重点基础研究项目、上海市科技攻关项目等项目,以及上海市弱势学科带头人、浦江人才、上海市优秀青年教师人才基金、国家病毒实验室优秀青年基金、长海医院杰青苗子基金等人才课题。发表论文60余篇,SCI论文42篇(包括 *Hepatology*、

EMBO J、*Oncogene* 等杂志),论文他引500余次。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81672350, No. 81472770, No. 81272280);上海市重点弱势学科支持项目-检验病理学科(No. 2015ZB0202)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81672350, No. 81472770, No. 81272280), and the Key Developing Discipline of Shanghai (No. 2015ZB0202)

[作者简介] 毕峰瑞(1987-),男,博士,主要从事肿瘤的发病机制及标志物检测的基础研究, E-mail: bifengrui@msn.cn

[通信作者] 颜宏利(YAN Hongli, corresponding author), E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn

[优先发表]

血液循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是由于自发或因诊疗操作而脱离实体肿瘤组织(原发灶或转移灶)进入外周血循环的肿瘤细胞,是恶性肿瘤患者术后复发和远处转移的重要原因。虽然早在1869年人们就发现了CTC的存在,但囿于分离和检测技术的限制,一直未能引起研究者的重视^[1]。2004年强生子公司Veridex开发的CellSearch CTC检测技术获得美国FDA的批准,成为CTC研究的里程碑事件。同年有研究^[2]证实,治疗前CTC数目是转移性乳腺癌(metastatic breast carcinoma, MBC)患者无进展生存(PFS)和总生存(OS)的独立预测因子,从而迅速掀起了CTC研究的热潮。短短十多年,从PubMed检索到的CTC研究论文已达19 000篇。与此同时,CTC的临床应用研究也在加速,美国临床试验数据库(ClinicalTrials.gov)可以查到的关于CTC的临床研究有3 010项,涵盖了几乎所有的实体肿瘤,研究内容包括动态监测、疗效评估、药物敏感性筛选等。2007年ASCO将CTC纳入了肿瘤标志物的范畴;2012年中国CFDA批准Veridex循环肿瘤细胞检测;2013年CTC检测纳入美国医保。CTC已成为最具发展潜力的肿瘤微创诊断和实时疗效监测手段之一^[3-5]。

早期阶段CTC的检测主要以单纯计数为主,但在临床实践中发现,由于CTC的异质性、检测方法的不一致以及CTC的动态演化等原因,单纯计数无法真实反映患者病情的进展。为克服这些局限,近年来人们关注的重点逐渐转向CTC的表型分析和功能研究,这些研究进一步加深了人们对CTC的认识,使人们能够更加精准的捕获和鉴定CTC,从而为肿瘤的精准治疗提供更加可靠的诊断、治疗和预后判断证据。

1 CTC检测的初级阶段:细胞计数

1.1 CTC富集和鉴定方法

CTC在肿瘤患者外周血中的数量非常稀少,平均每10 ml外周血中仅有1~10个CTC,但却有500亿个红细胞和上亿个白细胞,如何从血细胞的海洋中分离和鉴定CTC对研究者是一个巨大的挑战。正因为如此,CTC的富集、鉴定和计数就成了早期阶段人们最关心的问题。目前CTC的富集方案主要有4种,且各有利弊。

1.1.1 以CTC表面抗原和免疫荧光为基础的“钓鱼法” 市场上已有多种应用这种原理的检测设备,如CellSearch系统、CTC-Chip、免疫磁性细胞分选仪等。CellSearch利用偶联了上皮细胞黏附分子(epithelial cellular adhesion molecule, EpCAM)抗体

的磁珠与肿瘤细胞表面的抗原相结合,然后结合荧光染料的抗CD45抗体排除白细胞,抗细胞角蛋白(CK8/18/19)抗体鉴定肿瘤细胞,DAPI染色鉴定细胞核,EpCAM⁺CK⁺DAPI⁺CD45⁻的细胞被界定为CTC并进行计数。然而近来人们发现,间质化肿瘤细胞^[6],以及许多循环肿瘤干细胞^[7]并不表达EpCAM。笔者实验室2011年也引进了这套技术平台,但因对肺癌、肠癌和肝癌等肿瘤的检出率太低未获临床认可。也许正是由于这些缺陷,CellSearch系统目前已经停产。但不可否认的是,作为第一代CTC检测技术的代表,CellSearch的出现大大推动了CTC的基础研究和临床应用,目前国外CTC的主流研究也主要是基于CellSearch系统完成的。

1.1.2 阴性富集和减差富集法 阴性富集(negative enrichment, NE)及差减富集(subtraction enrichment, SE)可有效去除血液中的红细胞、白细胞及血浆等组分,可达到富集CTC的目的。两者最大的区别在于NE采用低渗裂解红细胞,而SE采用非低渗溶破法去除红细胞,因而避开了对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^[8]。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及循环肿瘤微栓(circulating tumor microemboli, CTM)。

1.1.3 以细胞大小差异和过滤为基础的方法 该方法使用孔径为8 μl的细胞筛过滤去除4~5 μl的白细胞,从而达到分离较大的CTC(平均20 μl)的目的。该方法不依赖于肿瘤分子标志物,简单有效。然而近年来人们发现,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。目前有证据^[9]显示,这些小或超小CTC在某些肿瘤细胞中的比例可高达1/3,具有特殊的重要临床意义。

1.1.4 以DNA/RNA为基础的检测方法 CTC某些基因表达的mRNA不存在于正常的血细胞中,可通过检测这些特殊RNA进行CTC计数。2016年CFDA批准的Ⅲ类医疗器械证的肺癌叶酸受体阳性CTC检测试剂盒就属于此类。其原理是在免疫磁珠负向富集后,通过高特异性靶向探针与CTC表面的叶酸受体相结合,随后使用靶向PCR的方法将CTC信号放大,显著提高了检测敏感性,最终结果可提示患者循环血中叶酸受体阳性CTC的水平。这种方法非常灵敏,可分析极微量RNA,但因为该技术是以信号放大为基础的,稍有污染就容易造成假阳性的结果出现。随着对CTC认识的不断深入,各种新

的 CTC 检测手段不断出现,例如美国 Affymetrix 与 Cytelligen 公司正在联合开发的差减富集 (SE)-iFISH-RNA FISH 整合技术平台将使人们首次在 CTC 上同时检测 DNA、RNA 及蛋白的表达。

1.2 CTC 计数的临床应用

归纳起来,CTC 计数有六大临床应用:(1)早期诊断,CTC 能够早于影像学发现更小的肿瘤;(2)辅助确诊,CTC 计数结果可作为辅助诊断指标判断肿瘤的良恶性;(3)辅助分型分期: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,指导下一步的治疗;(4)快速评估疗效:治疗后的快速评估,根据 CTC 个数判断治疗效果,无创且快速;(5)辅助评估生存期:根据 CTC 个数预估存活时间,是一个比较好的量化指标;(6)疗效实时监控:对放化疗的疗效进行实时监控,可根据 CTC 的数量判断是否产生耐药性或者转移复发,有助于及时调整用药。这方面的文献很多,不再赘述。

1.3 CTC 计数的局限性

虽然 CTC 计数在临床上得到了较为广泛的应用,但人们逐渐发现,仅局限于 CTC 计数已经不能满足临床的需要。CTC 不只是一种细胞,而是一个异质性很强的细胞群,多数进入血液中的 CTC 会凋亡,只有少数细胞能存活并发生转移,而这少部分具有转移潜能的细胞恰恰是需要关注的重点。随着肿瘤的发生发展,CTC 的组成也在动态演化之中,单纯计数不能准确反映这种变化。目前人们还不清楚 CTC 入血和血浆清除机制,采血时间、采血部位及样品运送等各个环节都会影响到计数的准确性。因此,近年来人们关注的重点转向了 CTC 的表型分析和功能研究,包括细胞表面标志的检测、上皮-间质转化、CTC 全基因组和转录组测序分析以及 CTC 体外培养等。

2 CTC 检测的高级阶段:表型分析

2.1 具有 EMT 特性的 CTC

肿瘤上皮细胞失去其极性和细胞间黏附能力而转变为间质细胞的上皮间质转换 (epithelial mesenchymal transitions, EMT) 是肿瘤细胞获得转移和侵入能力的重要过程^[10]。有研究^[11-12]发现,EMT 在肿瘤化疗抵抗中具有重要作用。Pecot 等^[13]检测了乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌不表达上皮抗原 CK 或 EpCAM 的异倍体 CTC,发现捕获的 CTC 细胞发生了 EMT 转换。对 EMT 的进一步研究^[14-15]发现,完全间质型的肿瘤细胞容易进入血管但是不容易发生远端转移。而介于上皮性和间质性的肿瘤细胞可能

具有肿瘤干细胞样的特征^[16]。因此,对 CTC 进行上皮和间质的分型更有助于认识 CTC 的生物学特性。Yu 等^[17]对 11 个乳腺癌患者 CTC 进行检测,发现 CTC 可以分为上皮型、间质型和上皮-间质混合型,多数 CTC 为上皮-间质混合型。不同类型的 CTC 在治疗过程中发生动态演化,治疗初期有效,上皮型向间质型转化;而治疗后期发生耐药,间质型 CTC 逐渐增多,因此 CTC 的上皮型和间质型转化可以作为耐药标志物和新的治疗靶点。Yokobori 等^[18]应用 Plastin3 作为 CTC 标志物,Plastin3 基因编码 Actin 结合蛋白,对肿瘤细胞形成转移过程如逃逸失巢凋亡、化疗抵抗、增加肿瘤干性、诱导 EMT 十分重要。Plastin3 在上皮、间质型 CTC 均表达。在结直肠癌和乳腺癌中发现,Plastin3⁺ CTC 与预后不良相关,特别是 Duke's B 和 C 类患者,有助于筛选辅助性化疗的适应证人群。Liu 等^[19]报道,乳腺癌 CTC 有明显的间质样 (CD24⁻/CD44⁺) 和上皮样 (ALDH⁺) 表型,前者定位于癌入侵边缘(与基质的毗邻处),后者则位于更中心位置,间质性的 CTC 具有更强的侵袭和转移能力。

2.2 具有干细胞特性的 CTC

越来越多的证据表明,肿瘤干细胞作为一个独特的群体持续存在于肿瘤,能够通过干细胞的自我更新和向多种细胞类型分化发展,在肿瘤发生、复发或转移和化疗耐药等方面具有重要作用^[20-22]。由于肿瘤干细胞更容易转移,在血液中更容易存活,因而在 CTC 中具有更重要的意义,表达肿瘤干细胞标志物的 CTC 被称为循环肿瘤干细胞 (circulating tumor stem cell, CTSC)。研究^[23-25]表明,ALDH1 阳性的 CTSC 更容易发生转移,预后更差。Baccelli 等^[26]发现在乳腺癌患者 OS 和预后更具有相关性的是 EpCAM⁺/CD44⁺/CD47⁺/MET⁺ CTC (而非所有的 EpCAM⁺ CTC)。同时在小鼠模型中证实,EpCAM⁺/CD44⁺/CD47⁺/MET⁺ CTC 具有更强的肿瘤形成能力和远端转移能力。而 Sun 等^[27]研究表明,在肝癌中用 EpCAM 分离的 CTC 也显示 CTSC 特性,并且其存在与高复发率相关。Zhang 等^[7]从乳腺癌患者的 CTC 中鉴定出 EpCAM⁻HER2⁺/EGFR⁺/HPSE⁺/Notch1⁺ CTC 具有特异性脑部转移的能力。Wu 等^[28]研究表明,CD110⁺ 结直肠癌干细胞具有非常强的靶向转移到肝脏的潜能。

2.3 HER2⁺ CTC

HER2 是表皮细胞生长因子受体 (HER/EGFR/ERBB) 家族成员,其基因扩增与过表达在一些侵袭性乳腺癌或胃癌的发生与进展中起重要作用。多项

研究发现 HER2⁺ CTC 患者 PFS 较 HER2⁻ CTC 患者更差。Riethdorf 等^[29]报道, 在 24.1% (14/58) CTC 阳性乳腺癌患者中发现 HER2⁺ CTC, 含 8 例原发灶 HER2⁻ 患者。Fehm 等^[30]也在原发肿瘤 HER2⁻ 患者中发现了 HER2⁺ CTC。因此, Riethdorf 等^[29]建议评估 CTC 的 HER2 状态可协助对乳腺癌患者进行治疗决策。

2.4 ER⁺ CTC

约 70% 乳腺癌患者可表达 ER。ER⁺ 乳腺癌通常对内分泌治疗反应良好, 在所有乳腺癌亚型中预后最好。然而约 20% ER⁺ 疾病患者不能从治疗中获益, 可出现转移进展。Babayán 等^[31]发现 ER⁺ 原发肿瘤转移的乳腺癌患者, 其 CTC 常缺乏 ER 表达。

2.5 PD-L1⁺ CTC

PD-L1 结合 PD-1 通过诱导 T 细胞耐受促进肿瘤进展。Thompson 等^[32]分析 196 例肾细胞癌患者的肿瘤标本发现, 高表达 PD-L1 与肿瘤侵袭性增加相关, 并且死亡风险增加 4.5 倍。Ali 等^[33]在大规模临床研究中发现, 1.7% (66/3 916) 乳腺癌患者的肿瘤细胞表达 PD-L1, 其中 7.9% (24/302) 为基底细胞样癌(属三阴性乳腺癌)。Mazel 等^[34]研究发现, 68.8% (11/16) ER⁺、HER2⁺ 的乳腺癌患者 CTC 的 PD-L1 表达阳性。有人提出假说, 认为 PD-L1⁺ 的 CTC 能够通过和 Treg 细胞相结合, 通过免疫抑制逃避免疫细胞对 CTC 的杀伤, 从而能够在血液循环中存活并转移。但这个假设尚需要更多研究的支持和临床证据。

2.6 CTC 表型分析的发展趋势

可以预见, 随着人们对 CTC 的不断深入, 越来越多的分型标志物会被发现, 比如新的肿瘤干细胞标志、免疫分子标志等。除了蛋白分子标志物以外, 一些表观遗传分子标志物如 DNA 甲基化标志分子、非编码 RNA 分子等也逐渐加入到分型标志物的行列中^[35-36]。这些标志分子的稳定性比蛋白分子更强, 将使人们能够更加精准地进行 CTC 分型。与其他肿瘤分子标志物一样, CTC 的分子分型在临床的应用也将更加的精细化和专门化, 比如肿瘤疗效检测和早期诊断需要不同的 CTC 分型标志; 同样是肺癌, 不同类型患者的 CTC 分型标志也不同, 最终真正实现肿瘤的“个体化液体活检”。

3 CTC 检测的高级阶段: 功能分析

3.1 转录组和基因组分析

单细胞测序技术是测序史上的重大突破。CTC 本身就是单细胞, 是单细胞测序最好的材料之一,

因而 CTC 的单细胞测序引起了人们的极大兴趣^[37-38]。Miyamoto 等^[39]从 13 位出现雄激素抵抗 (androgen resistance, AR) 的前列腺癌患者体内收集了 77 份 CTC 并完成了总 RNA 表达分析, 通过比对出现 AR 患者的 CTC 与未进行治疗患者的样品, 研究人员发现 AR 抗性组 Wnt 信号通路被激活。Lohr 等^[40]对前列腺癌患者血液中 EpCAM 阳性的 CTC 进行了单细胞外显子组测序, 发现可用 SNP 位点追踪肿瘤的演化、指导肿瘤的治疗、监控肿瘤的复发。Catenacci 等^[41]利用超声内镜技术收集胰胆管癌 (pancreaticobiliary cancer, PBC) 患者肝门静脉中的 CTC 来进行 PBC 的分子分型和追踪转移灶, 对于研究 PBC 发生发展机制以及预后监测具有重要作用。

北京大学谢晓亮、白凡课题组与北大肿瘤医院王洁团队^[42-43]使用多重退火和环化循环的扩增技术 (multiple annealing and looping based amplification cycles, MALBAC) 成功实现了对于来自肺癌患者外周血 CTC 的全基因组扩增和深度测序, 发现 CTC 的单核苷酸多态性变异是高度异质的, 但同一患者的 CTC 之间的拷贝数变异可重复。此项研究对于揭示癌症转移的分子机制具有重要意义, 同时还为肿瘤的无创诊断提供了一种新的技术手段。Jiang 等^[44]利用 NanoVelero Assay 分离的单个 CTC 进行全基因组测序, 在后续比较中发现 CTC 和原位肿瘤的 SNP 一致性为 29%。此外, CTC 中 86% 的克隆突变被追溯到原发性或转移性肿瘤。研究小组发现并验证了 chr3 中的染色体内重排和 chr13 和 chr15 之间的染色体间重排。这些肿瘤特异性重排在肿瘤组织和大部分 CTC 之间共享, 但在 WBC 和正常邻近组织中未发现。同时, 在所有肿瘤和 CTC 样品中, 在重要的肿瘤抑制基因 (包括 *PTEN*、*RBI* 和 *BRCA2*) 中发现了高度变异的短重排。Court 等^[45]利用第二代 NanoVelero-LCM 技术追踪胰腺癌 CTC 中 KRAS 突变的表征, 发现固定在 PLGA NanoVelero 底物上的胰腺 CTC 中含有 KRASG12V 和 KRASG12D 突变, 超过 95% 的胰腺癌患者具有 KRAS 激活突变。

单细胞测序技术 2012 年被 Science 列为重点发展技术的六大领域之一。2013 年被 Nature Methods 列为最受关注和影响最广泛的技术成果。CTC 本身就是单细胞, 因而单细胞测序的发展将为 CTC 研究提供了新的利器。前已述及, CTC 是多种细胞组成的细胞群, 不同细胞的生物学特性不同, 细胞的命运及在肿瘤转移中的作用也不同。利用单细胞测序, 人们可以分析不同 CTC 之间在转录组、基因组甚至表观遗传组的差异, 从而为人们全面认识 CTC 的来

源、入血机制、转移能力等提供了帮助。

3.2 体外培养后细胞功能分析

Hodgkinson 等^[46]将肺癌患者 CTC 注射到小鼠皮下获得的 CTC 来源的瘤体组织,其分子特征与患者的组织病理结果高度契合。体外培养对 CTC 分离质量的要求更高,Yu 等^[47]利用 CTC - iChip 技术成功分离活性的 CTC,并据此建立了 5 种乳腺癌 CTC 细胞系。Williams 等^[48]从发生前列腺癌转移的患者体内获得 CTC,随后将 CTC 注射到免疫功能低下的小鼠体内构建 PDX 模型(patient derived xenograft, PDX)。利用这种方法构建的 PDX 模型可以用于功能研究以及描述特定分子的功能特性,该方法虽然也存在一定的局限性,但利用 CTC 构建的 PDX 小鼠仍然能够为前列腺癌研究提供一个良好的实验模型。Lu 等^[49]通过体外培养患者体内的 CTC 并进行相关检测,确定了肺癌、结直肠癌和前列腺癌的组织来源,为后续治疗奠定了基础。Kolostova 等^[50]利用基于细胞大小富集 CTC 的 MetaCell 方法,体外培养 CTC 并进行形态学和分子水平的检测,从而可以作为药物敏感性实验模型,为肿瘤患者的个性化治疗提供帮助。

如果说单细胞测序为人们认识 CTC 提供了一台放大镜,CTC 培养则为实验操作和利用 CTC 提供了一把剪刀,为进一步进行药敏筛选、突变基因功能分析等提供了新的研究材料。但不可否认的是,目前对大多数方法而言,很难在保障检测特异性和灵敏度的基础上,分离出完整、细胞活力强且纯度高的 CTC,因此 CTC 扩增和培养的难度非常大。而且,由于受培养条件影响,扩增后能否真实地反映 CTC 原本的状态仍然有待明确。尽管如此,CTC 的培养扩增为深入认识 CTC 和充分利用 CTC 提供了可能,相信随着技术的不断发展,CTC 的体外培养体系会越来越成熟。

4 结 语

精准治疗的前提是精准诊断,液体活检是肿瘤精准诊断的重要辅助手段,而 CTC 又是液体活检研究最早、最成熟的检测方法。从单纯计数的初级阶段,到分子分型和体外培养后功能研究的高级阶段,人们对 CTC 的认识不断深化,CTC 在未来的肿瘤精准诊断中必将发挥更大的作用^[51-52]。另一方面,CTC 又为进一步深入探讨肿瘤转移、远处定植、放化疗耐受等科学问题提供了很好的研究材料。虽然目前 ctDNA 在肺癌等肿瘤的靶向治疗中显示了巨大的潜力,但 ctDNA 主要是反映基因突变或甲基化的

信息,而 CTC 是活细胞,能够从基因组、转录组等多个层面上反映肿瘤的特性,因而具有不可取代的作用。目前,CTC 研究的另外一个瓶颈是:CTC 富集、分离和鉴定的方法有多种,各个平台之间检出率有较大差异,不同文献所选定的临界值也不同,这就导致不同研究者相互之间的数据很难进行比较,临床也没有固定的参考值。所以,应该建立 CTC 的行业协会,多中心联合,统一制定标准的检测方法和参考值,真正能为临床提供可靠稳定的诊断方法。可以预见,CTC 和 ctDNA 的联合应用,CTC 和分子影像、分子病理的联合诊断,以及 CTC 体外培养后的药敏筛选、耐药机制研究等将成为 CTC 研究的重要方向,也必将在肿瘤的精准治疗领域发挥重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [2] PANTEL K, ALIX-PANABIERES C. Liquid biopsy in 2016: circulating tumour cells and cell-free DNA in gastrointestinal cancer [J]. Nat Rev Gastr Hepatol, 2017, 14(2): 73-74. DOI:10.1038/nrgastro.2016.198.
- [3] ALIX-PANABIERES C, SCHWARZENBACH H, PANTEL K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. Annu Rev Med, 2012, 63(2): 199-215. DOI: 10.1146/annurev-med-062310-094219.
- [4] PLAKS V, KOOPMAN CD, WERB Z. Cancer circulating tumor cells [J]. Science, 2013, 341(6151): 1186-1188. DOI:10.1126/science.1235226.
- [5] WILLIAMS S C. Circulating tumor cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(13): 4861. DOI:10.1073/pnas.1304186110.
- [6] GORGES T M, TINHOFER I, DROSCHE M, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition [J]. BMC Cancer, 2012, 12(2): 178. DOI:10.1186/1471-2407-12-178.
- [7] ZHANG L, RIDGWAY L D, WETZEL M D, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis [J/OL]. Sci Transl Med, 2013, 5(180): 180ra48 [2017-03-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4136707/>. DOI:10.1126/scitranslmed.3005109.
- [8] GAO Y, ZHU Y, ZHANG Z, et al. Clinical significance of pancreatic circulating tumor cells using combined negative enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 66. DOI:10.1186/s13046-016-0340-0.
- [9] ALUNNI-FABBRONI M, SANDRI M T. Circulating tumour cells in clinical practice: methods of detection and possible characterization [J]. Methods, 2010, 50(4): 289-297. DOI:10.1016/j.jymeth.2010.01.027.
- [10] RHIM A D, MIREK E T, AIELLO N M, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation [J]. Cell, 2012, 148

- (1/2): 349-361. DOI:10.1016/j.cell.2011.11.025.
- [11] FISCHER K R, DURRANS A, LEE S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance[J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 472-476. DOI:10.1038/nature15748.
- [12] ZHENG X, CARSTENS J L, KIM J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 525-530. DOI:10.1038/nature16064.
- [13] PECOT C V, BISCHOFF F Z, MAYER J A, et al. A novel platform for detection of CK + and CK- CTCs[J]. *Cancer Dis*, 2011, 1(7): 580-586. DOI:10.1158/2159-8290.CD-11-0215.
- [14] LABELLE M, BEGUM S, HYNES R O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 576-590. DOI:10.1016/j.ccr.2011.09.009.
- [15] KANG Y, PANTEL K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 573-581. DOI:10.1016/j.ccr.2013.04.017.
- [16] ALIX-PANABIERES C, PANTEL K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 623-631. DOI:10.1038/nrc3820.
- [17] 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. DOI:10.1126/science.1228522.
- [18] YOKOBORI T, IINUMA H, SHIMAMURA T, et al. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7): 2059-2069. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-0326.
- [19] LIU Y, NENUTIL R, APPLEYARD M V, et al. Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells[J]. *Brit J Cancer*, 2014, 110(8): 2063-2071. DOI:10.1038/bjc.2014.105.
- [20] KRESO A, DICK J E. Evolution of the cancer stem cell model [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 275-291. DOI:10.1016/j.stem.2014.02.006.
- [21] VELASCO-VELAZQUEZ M A, YU Z, JIAO X, et al. Cancer stem cells and the cell cycle: targeting the drive behind breast cancer [J]. *Expert Rev Anti Ther*, 2009, 9(3): 275-279. DOI:10.1586/14737140.9.3.275.
- [22] FITZGERALD T L, MCCUBREY J A. Pancreatic cancer stem cells: association with cell surface markers, prognosis, resistance, metastasis and treatment[J]. *Adv In Biol Regul*, 2014, 56(1): 45-50. DOI:10.1016/j.jbior.2014.05.001.
- [23] NEUMEISTER V, AGARWAL S, BORDEAUX J, et al. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis[J]. *Amer J Pathol*, 2010, 176(5): 2131-2138. DOI:10.2353/ajpath.2010.090712.
- [24] CHARAFE-JAUFFRET E, GINESTIER C, BERTUCCI F, et al. ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(24): 7290-7300. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-4704.
- [25] YAO T, WU Z, LIU Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) positivity correlates with poor prognosis in cervical cancer[J]. *J Int Med Res*, 2014, 42(4): 1038-1042. DOI:10.1177/0300060514527060.
- [26] BACCELLI I, SCHNEEWEISS A, RIETHDORF S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay[J]. *Nat Biot*, 2013, 31(6): 539-544. DOI:10.1038/nbt.2576.
- [27] SUN Y F, XU Y, YANG X R, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1458-1468. DOI:10.1002/hep.26151.
- [28] WU Z, WEI D, GAO W, et al. TPO-induced metabolic reprogramming drives liver metastasis of colorectal cancer CD110⁺ tumor-initiating cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(1): 47-59. DOI:10.1016/j.stem.2015.05.016.
- [29] RIETHDORF S, MULLER V, ZHANG L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(9): 2634-2645. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-2042.
- [30] FEHM T, MULLER 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*, 2010, 124(2): 403-412. DOI:10.1007/s10549-010-1163-x.
- [31] BABAYAN A, HANNEMANN J, SPOTTER J, et al. Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75038[2017-01-23]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075038>. DOI:10.1371/journal.pone.0075038.
- [32] THOMPSON R H, GILLET M D, CHEVILLE J C, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(49): 17174-17179. DOI:10.1073/pnas.0406351101.
- [33] ALI H R, GLONT S E, BLOWS F M, et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(7): 1488-1493. DOI:10.1093/annonc/mdv192.
- [34] MAZEL M, JACOT W, PANTEL K, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells[J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(9): 1773-1782. DOI:10.1016/j.molonc.2015.05.009.
- [35] FINA E, NECCHI A, BOTTELLI S, et al. Detection of circulating tumour cells in urothelial cancers and clinical correlations: comparison of two methods[J/OL]. *Dis Markers*, 2017: 3414910[2017-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28321147>. DOI:10.1155/2017/3414910.
- [36] WU L L, WEN C Y, HU J, et al. Nanosphere-based one-step

- strategy for efficient and nondestructive detection of circulating tumor cells[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 4: 219-226. DOI: 10.1016/j.bios.2017.03.009.
- [37] 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. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-4140.
- [38] BENDALL S C, NOLAN G P. From single cells to deep phenotypes in cancer[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(7): 639-647. DOI:10.1038/nbt.2283.
- [39] MIYAMOTO D T, ZHENG Y, WITTNER B S, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in anti-androgen resistance[J]. *Science*, 2015, 349(6254): 1351-1356. DOI:10.1126/science.aab0917.
- [40] LOHR J G, ADALSTEINSSON VA, CIBULSKIS K, et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer[J]. *Natur Biotechnol*, 2014, 32(5): 479-484. DOI:10.1038/nbt.2892.
- [41] CATENACCI DV, CHAPMAN C G, XU P, et al. Acquisition of portal venous circulating tumor cells from patients with pancreaticobiliary cancers by endoscopic ultrasound[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(7): 1794-1803. DOI:10.1053/j.gastro.2015.08.050.
- [42] NI X, ZHUO M, SU Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(52): 21083-21088. DOI:10.1073/pnas.1320659110.
- [43] 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. DOI:10.1126/science.1229164.
- [44] JIANG R, LU Y T, HO H, et al. A comparison of isolated circulating tumor cells and tissue biopsies using whole-genome sequencing in prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44781-94473. DOI:10.18632/oncotarget.6330.
- [45] COURT C M, ANKENY J S, SHO S, et al. Reality of single circulating tumor cell sequencing for molecular diagnostics in pancreatic cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18(5): 688-696. DOI:10.1016/j.jmoldx.2016.03.006.
- [46] HODGKINSON C L, MORROW C J, LI Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer[J]. *Nat Med*, 2014, 20(8): 897-903. DOI:10.1038/nm.3600.
- [47] YU M, BARDIA A, ACETO N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility[J]. *Science*, 2014, 345(6193): 216-220. DOI:10.1126/science.1253533.
- [48] WILLIAMS E S, RODRIGUEZ-BRAVO V, CHIPPAVA-VENTA U, et al. Generation of prostate cancer patient derived xenograft models from circulating tumor cells[J]. *J Vis Exp*, 2015(105): 53182. DOI:10.3791/53182.
- [49] LU S H, TSAI W S, CHANG Y H, et al. Identifying cancer origin using circulating tumor cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(4): 430-438. DOI:10.1080/15384047.2016.1141839.
- [50] KOLOSTOVA K, SPICKA J, MATKOWSKI R, et al. Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(7): 1203-1213.
- [51] LACK J, GILLARD M, CAM M, et al. Circulating tumor cells capture disease evolution in advanced prostate cancer[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 44. DOI: 10.1186/s12967-017-1138-3.
- [52] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 27(3): 505. DOI: 10.1007/s10147-017-1105-2.
- [收稿日期] 2017-03-25 [修回日期] 2017-04-05
[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至我们国家带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。
2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”对稿件进行学术不端行为的检查。
3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”。

4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给该文作者以下处理:书面警告,通知作者所在单位,在本领域相关期刊间通报,2年内本刊不刊登有其署名的稿件,相关学术责任人(通信作者)署名的其他稿件延缓审稿和刊登等。

(本刊编辑部)