

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.012

· 病例报道 ·

TumorFisher CTC 检测技术用于晚期肝细胞癌抗 PD-1/PD-L1 治疗决策和疗效评价一例报告及文献复习

TumorFisher CTC detection technology for the treatment decision of anti-PD-1/PD-L1 in advanced hepatocellular carcinoma and its efficacy evaluation: a case report and literature review

田珊^{1,3b}, 范林洋², 罗聪^{3a}, 陈勇毅^{3b}, 胡志远², 徐笑红^{3b} (1. 温州医科大学 检验医学与生命科学学院, 浙江 温州 325006; 2. 国家纳米科学中心, 北京 100190; 3. 浙江省肿瘤医院 a. 腹部肿瘤内科, b. 浙江省肿瘤医院 检验科, 浙江 杭州 310022)

[摘要] 肝细胞癌(HCC)的发病率和病死率正在逐年增长, 严重威胁人类的健康和生命。近年来, 以PD-1/PD-L1 抑制剂为代表的免疫治疗迅速发展, 但对晚期HCC 疗效有限。治疗中实时监测循环肿瘤细胞(CTC)PD-L1 表达, 是评估免疫治疗有效性的一个重要指标之一。本案例通过TumorFisher 检测技术实时监测1例HCC 患者免疫治疗前后总CTC 数及PD-L1⁺ CTC 个数, 结合影像学 and 血清学检查结果进一步评估患者免疫治疗疗效。患者治疗前总CTC 数为5个/2 mL, PD-L1⁺ CTC 为5个/2 mL, PD-L1⁺ CTC/总CTC 为100%。用PD-1/PD-L1 抑制剂行3周期免疫治疗后, PD-L1⁺ CTC/总CTC 逐渐降低, 肿瘤缩小, 血清AFP 及PIVKA-II 逐渐下降, PD-L1⁺ CTC/总CTC 变化与肿瘤标志物、MRI 检查结果一致。PD-L1⁺ CTC/总CTC 可作为HCC 免疫治疗疗效评估的辅助指标。

[关键词] 肝细胞癌(HCC); 液体活检; 循环肿瘤细胞(CTC); PD-1/PD-L1 抑制剂; 免疫治疗

[中图分类号] R735.7; R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)03-0267-04

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是中国最常见的五大恶性肿瘤之一^[1]。研究^[2]发现, 靶向治疗在HCC 诊疗中总体效果不佳, 仅表皮生长因子和血管生长因子相关靶点取得部分进展。近年来, 以循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)为首的液体活检技术在肿瘤相关的PD-L1 检测方面已初步取得重大研究进展^[3-5]。2010年以来, CTC 不断被写入临床诊疗指南, 2022年首次将中国自主研发的CTC 检测方法——TumorFisher 写入原发性肝癌诊疗指南中。对于早期由国外开发并获批进入中国市场的CTC 检测——CellSearch 系统, 其检测灵敏度和特异性均表现不足而致其临床应用受限, 中国的TumorFisher 较好的弥补了CellSearch 系统的不足。TumorFisher 替代了采用上皮源标志物EpCAM 抗体进行CTC 捕获的方法, 采用亲和力更高的自组装纳米多肽最大限度地特异性结合上皮源CTC 上的EpCAM 抗原, 从而获得了更高的CTC 捕获能力^[6]; 近期的研究成果^[3,7-8]显示, 该方法在多种实体瘤中具有较好的检测效果, 在有效识别和鉴定肝癌CTC 的基础上, 还开发完成了对CTC 上PD-L1 表达进行检测的新方法。因此, 本案例采用TumorFisher CTC 检测技术对一例HCC 患者进行全病程监控, 探索在晚期不可切除HCC 患者中开展CTC-PD-L1 检测的临床意义, 为临床医生及时制定和调整抗PD-1/PD-L1 免

疫治疗策略的实践积累经验。

1 病例资料

患者男性, 56岁, 浙江杭州人, 因“发现肝占位1周”于2022年4月20日收住浙江省肿瘤医院。入院诊断为“肝占位性病变, 疑似肝恶性肿瘤”。患者既往有乙肝病史20年, 吸烟30余年, 饮酒20余年。母亲因胃癌去世。近期体质量较前无明显变化。

入院后完善相关检查。消化道肿瘤标志物: AFP 3 984.33 ng/mL、PIVKA-II 1 417.13 mAU/mL、HbsAg>1 000 IU/mL、HbeAg 8.53 IU/mL、HbcAb>8 IU/mL。上腹部增强MRI 成像: 肝左叶巨块型肝癌伴肝门静脉右支癌栓形成, 肝右叶多发小结节(考虑为子灶), 肝多发小囊肿。双肾上腺区肿块, 肝门区及腹膜后多发增大淋巴结, 考虑转移灶(图1)。肝结节穿刺活检: 上皮性癌, 符合HCC(图2)。

该患者被诊断为HCC, 为进一步辅助选择治疗方案, 采用TumorFisher CTC 检测技术检测CTC 及CTC 上PD-L1 表达量。治疗前1d 采集患者外周静

[基金项目] 浙江省卫生健康创新人才项目(No. 2021KY553); 浙江省医药卫生学科平台项目(No. 2018KY293)

[作者简介] 田珊(1994—), 女, 硕士生, 住院医师, 主要从事CTC 检测技术在原发性肝癌中应用的研究, E-mail: Manndy339@163.com

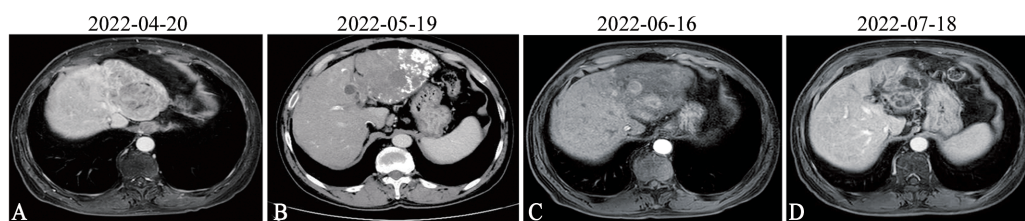
[通信作者] 徐笑红, E-mail: zjhxxh@163.com

脉血 4 mL, 用 TumorFisher 检测试剂盒进行检测。当细胞的形态学特征表现为细胞角蛋白(CK)⁺、白细胞共同抗原(CD45)⁻、PD-L1⁺, 即判定为 PD-L1⁺ CTC, 当细胞的形态学特征表现为 CK⁺、CD45⁻、PD-L1⁻, 即判定为 PD-L1⁻ CTC(图3)。检测结果显示, 该患者血液中总 CTC 个数为 5 个/2 mL, PD-L1⁺ CTC 个数为 5 个/2 mL, PD-L1⁺ CTC/总 CTC 为 100%。

综合考虑患者辅助检查结果和 TumorFisher CTC 检出结果, 设计的治疗方案以 PD-1 抑制剂派安普利单抗(penpulimab)为主, 联合经皮肝动脉栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)和仑伐替尼(lenvatinib)的综合治疗。分别于 2022 年 4 月 29 日、2022 年 5 月 20 日、2022 年 6 月 16 日进行 3 次治疗。PD-1 抑制剂具体方案: 派安普利单抗 200 mg q3w 联合仑伐替尼 8 mg qd。TACE 具体方案: 经导管灌注奥沙利铂 100 mg、贝伐单抗 100 mg 和表柔比星

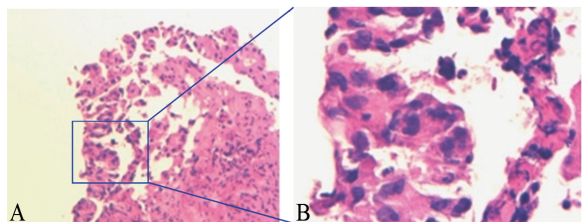
30 mg。

患者每 3 周进行一次免疫治疗, 每次治疗前后均进行血清学和影像学复查, 治疗前及第 1、2、3 周期治疗后的 AFP 分别为 3 984.33、331.56、38.20、40.37 ng/mL, PIVKA- II 分别为 1 417.13、1 483.73、575.53、377.84 mAU/mL, 总 CTC 数分别为 5、9、0、2/2 mL, PD-L1⁺ CTC 个数分别为 5、8、0、0/2 mL, PD-L1⁺ CTC/总 CTC 分别为 100%、89%、0%、0%; 根据 mRESIST 标准^[9], 将治疗后肿瘤反应分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD), 患者在治疗 3 周期后上腹部增强 MRI 成像显示肿块逐渐缩小(图1), 病灶出现 PR, 疾病治疗有效。可见, 该例患者在疾病治疗有效时 PD-L1⁺ CTC/总 CTC 比率逐渐下降, 与血清 AFP、PIVKA- II 及 MRI 检测结果变化一致。



A: 治疗前, 肝左叶内见 13 cm×9.3 cm 的巨大肿块, 肝右叶见多发类似异常信号小结节; B: 治疗 1 周期后肝右叶部分较前缩小; C: 治疗 2 周期后, 左肝内侧段肿块较前有缩小, 肝右叶部分较前缩小; D: 治疗 3 周期后肝右叶部分较前增大, 较大者约 1.7 cm

图1 抗 PD-1/PD-L1 治疗前后上腹部增强 MRI 检测结果比较



A: H-E 染色病理切片图, ×100; B: A 图方框局部放大图, ×400
图2 肝结节穿刺 H-E 染色结果示上皮性癌(符合 HCC 特征)

2 讨论

HCC 起病隐匿, 多数患者确诊时病程已进入中晚期, 导致其预后较差。本病例采纳的原发性肝癌属于 HCC 中最常见的病理类型(约占 75%~85%)^[10], 并且具备 HCC 的经典特征: 肝组织的慢性损害和治疗后易多中心复发。肝癌的诊断主要依赖于临床表现、影像学、血清标志物等。肝癌的治疗方法主要包括外科手术、射频消融、TACE、放化疗及免疫治疗等^[11]。

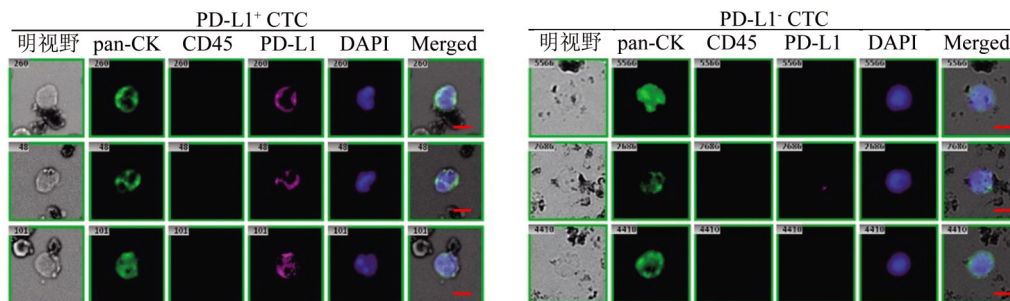


图3 HCC 患者 CTC 荧光图(标尺=10 μm)

CTC检测是一种通过捕获和鉴定患者外周血中肿瘤细胞的创新技术,这些肿瘤细胞来源肿瘤的原发灶和转移灶,不仅可以更早的提示肿瘤转移风险、检测生物标志物的分型(包括PD-L1、HER2等),还可以辅助用药指导,并辅助在临床实践中筛选出最能够从免疫治疗(如抗PD-1治疗)或靶向治疗(如抗HER2治疗)中获益的患者群体。另外,在肿瘤治疗疗效评估、微小残留灶评估、肿瘤上生物标志物改变(如PD-L1表达水平升高)以及对肿瘤复发的实时监控中,CTC检测的作用极为显著,尤其是对于无法获取组织的患者,定期检测CTC在临床上将为这些患者更换治疗方案及合理选择药物组合提供依据^[12]。

近年来,抗PD-1/PD-L1免疫治疗在多个癌种中取得了突破性的进展,在肝癌的研究中也显示出了较为显著的疗效。2022年美国临床肿瘤学会年会(ASCO)大会上发布了KEYNOTE394临床试验历时7年的研究数据,相比常规化疗药物治疗方法,抗PD-1免疫治疗将肝癌的2年生存率上升至38%(24.9% vs 34.3%)。同年10月,中国国家药品监督管理局批准了抗PD-1药物用于HCC的临床治疗。虽然目前该类药物使用时无伴随诊断的要求,但是越来越多的研究报道PD-1/PD-L1的表达评估,尤其是在检测HCC相关PD-L1的表达水平,可以有效地预测PD-1/PD-L1抑制剂的疗效^[13],相关综述^[14]也进一步阐明抗PD-1/PD-L1免疫治疗在HCC中的临床应用。

随着人们对肿瘤发病机制的深入研究,在治疗晚期HCC中有了一定进展,其中包括免疫治疗的临床研究。但有研究^[15]显示,肝癌术后5年的复发率高达70%。多项研究结果^[16-18]表明,使用PD-1/PD-L1抑制剂能明显改善HCC患者预后。常规的免疫组织化学(IHC)检测PD-L1是目前被认为检测肿瘤PD-L1表达最有效的方法。但IHC的价值存在一定的争议。肿瘤的异质性导致该方法检测PD-L1表达可能存在假阴性,穿刺组织不能反应整个肿瘤的PD-L1表达状况,且在患者疾病进展和治疗过程中,PD-L1动态表达的差异性也难以在单次组织检测中有所体现^[19]。缺乏动态监测使得IHC在临床应用价值存在巨大挑战。因此有必要寻找更简便、更有效的方法来检测患者肿瘤相关PD-L1的表达。CTC作为所有肿瘤转移和复发的“种子”,因自发脱落或诊疗操作等原因从实体瘤原发灶或转移灶进入外周血循环中,对其进行定期检测更能实时动态观察患者肿瘤组织的变化^[20-21]。SU等^[22]研究发现,PD-L1⁺ CTC计数可作为HCC患者的独立预测生物标志物。QI等^[23]对112例患者进行研究,发现101例(90.18%)检测到CTC,即

使在疾病早期也发现CTC阳性;在10例患者进行术后监测发现,大多数患者在临床上出现复发结节前其CTC数都增加了。XU等^[24]研究显示,在35例可评估患者中有29例(82.9%)患者有PD-L1高表达的CTC,PD-L1高表达CTC数量>20%的患者中客观缓解率(ORR)为47.8%,<20%的ORR为0%,这表明CTC中PD-L1表达水平越高,患者免疫治疗疗效越显著。FINN等^[24]研究表明,HCC患者使用PD-1/PD-L1抑制剂可明显延长患者的总生存期。在本案例中,可以看见患者在免疫治疗前检测出CTC个数为5个/2 mL,PD-L1⁺ CTC个数为5个/2 mL,PD-L1⁺ CTC/总CTC为100%,免疫治疗有效时CTC及PD-L1⁺ CTC数量虽有波动,但PD-L1⁺ CTC/总CTC明显降低,与血清AFP、PIVKA-II和影像结果变化一致。近年来,CTC PD-L1伴随诊断体系在其他肿瘤如肺癌^[25]、乳腺癌^[26]、肾细胞癌^[27]等也有一定研究。

综上所述,HCC预后较差,及早对疗效进行评估是延长患者生存期的关键。本例病例发现,PD-L1⁺ CTC/总CTC这一关键指标可早期评估抗PD-L1免疫治疗的疗效,辅助临床医生及时调整治疗方案。因此,CTC PD-L1表达在HCC中的临床应用价值具有十分重要的意义。

[参考文献]

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002108.
- [2] GRETEN T F, ABOU-ALFA G K, CHENG A L, *et al.* Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immunotherapy for the treatment of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(9): e002794[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC438858/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-002794.
- [3] XU J M, ZHANG Y, JIA R, *et al.* Anti-PD-1 antibody SHR-1210 combined with apatinib for advanced hepatocellular carcinoma, gastric, or esophagogastric junction cancer: an open-label, dose escalation and expansion study[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(2): 515-523. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2484.
- [4] CHEN J Q, ZHANG D, YUAN Y. Anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in conversion treatment of locally advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Exp Med*, 2022: 1-12. DOI: 10.1007/s10238-022-00873-6.
- [5] WINOGRAD P, HOU S, COURT C M, *et al.* Hepatocellular carcinoma-circulating tumor cells expressing PD-L1 are prognostic and potentially associated with response to checkpoint inhibitors [J/OL]. *Hepatol Commun*, 2020, 4(10): 1527-1540[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7527695/>. DOI: 10.1002/hep4.1577.
- [6] BAI L L, DU Y M, PENG J X, *et al.* Peptide-based isolation of circulating tumor cells by magnetic nanoparticles[J]. *J Mater Chem*

- B, 2014, 2(26): 4080-4088. DOI: 10.1039/c4tb00456f.
- [7] TAN Z L, YUE C Y, JI S J, *et al.* Assessment of PD-L1 expression on circulating tumor cells for predicting clinical outcomes in patients with cancer receiving PD-1/PD-L1 blockade therapies [J/OL]. *Oncologist*, 2021, 26(12): e2227-e2238[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8649012/>. DOI: 10.1002/onco.13981.
- [8] YUE C Y, JIANG Y B, LI P, *et al.* Dynamic change of PD-L1 expression on circulating tumor cells in advanced solid tumor patients undergoing PD-1 blockade therapy[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(7): e1438111 [2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993493/>. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1438111.
- [9] LENCIONI R, LLOVET J M. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(1): 52-60. DOI: 10.1055/s-0030-1247132.
- [10] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [11] 金保, 杜顺达, 毛一雷, 等. 《原发性肝癌诊疗指南(2022年版)》更新要点解读[J]. *协和医学杂志*, 2022, 13(5): 789-795. DOI: 10.12290/xhyxzz.2022-0274.
- [12] KILGOUR E, ROTHWELL D G, BRADY G, *et al.* Liquid biopsy-based biomarkers of treatment response and resistance[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 485-495. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.012.
- [13] YU J L, GREEN M D, LI S S, *et al.* Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination[J/OL]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 152-164[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8095049/>. DOI: 10.1038/s41591-020-1131-x.
- [14] 余滢滢, 孟繁平, 王福生, 等. PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗肝细胞癌的临床试验研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(10): 1029-1036. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.011.
- [15] KLUGER M D, SALCEDA J A, LAURENT A, *et al.* Liver resection for hepatocellular carcinoma in 313 Western patients: tumor biology and underlying liver rather than tumor size drive prognosis[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(5): 1131-1140. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.018.
- [16] CHA J H, CHAN L C, LI C W, *et al.* Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer[J]. *Mol Cell*, 2019, 76(3): 359-370. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.09.030.
- [17] ZHU A X, FINN R S, EDELINE J, *et al.* Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(7): 940-952. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30351-6.
- [18] KIM J W, EDER J P. Prospects for targeting PD-1 and PD-L1 in various tumor types[J]. *Oncology (Williston Park)*, 2014, 28(Suppl 3): 15-28.
- [19] CHAE Y K, ARYA A, CHIEC L, *et al.* Challenges and future of biomarker tests in the era of precision oncology: can we rely on immunohistochemistry (IHC) or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to select the optimal patients for matched therapy? [J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 100863-100898[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725070/>. DOI: 10.18632/oncotarget.19809.
- [20] XU X W, JIANG Z Q, WANG J, *et al.* Microfluidic applications on circulating tumor cell isolation and biomimicking of cancer metastasis[J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(10/11): 933-951. DOI: 10.1002/elps.201900402.
- [21] KIM M Y, OSKARSSON T, ACHARYYA S, *et al.* Tumor self-seeding by circulating cancer cells[J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1315-1326. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.025.
- [22] SU K, GUO L, HE K, *et al.* PD-L1 expression on circulating tumor cells can be a predictive biomarker to PD-1 inhibitors combined with radiotherapy and antiangiogenic therapy in advanced hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 873830[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9379259/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.873830.
- [23] QI L N, XIANG B D, WU F X, *et al.* Circulating tumor cells undergoing EMT provide a metric for diagnosis and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4731-4744. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2459.
- [24] FINN R S, QIN S K, IKEDA M, *et al.* Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(20): 1894-1905. DOI: 10.1056/NEJMoa1915745.
- [25] ACHEAMPONG E, ABED A, MORICI M, *et al.* Evaluation of PD-L1 expression on circulating tumour cells in small-cell lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2022, 11(3): 440-451. DOI: 10.21037/tlcr-21-819.
- [26] LIU Y, LIU Q, WANG T, *et al.* Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: a valuable prognostic and predictive biomarker[J/OL]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 202[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3643882/>. DOI: 10.1186/1471-2407-13-202.
- [27] BOOTSMA M, MCKAY R R, EMAMEKHOO H, *et al.* Longitudinal molecular profiling of circulating tumor cells in metastatic renal cell carcinoma[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(31): 3633-3641[2023-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9622626/>. DOI: 10.1200/JCO.22.00219.

[收稿日期] 2023-02-06

[修回日期] 2023-02-22

[本文编辑] 党瑞山