

# 胰腺癌循环肿瘤细胞检测及其临床应用

余倩 姜立新

**摘要** 胰腺癌肿瘤细胞的转移是造成胰腺癌患者死亡的主要原因。部分肿瘤细胞伴随循环系统迁移至其他组织或器官,这些细胞被称为循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)。目前实现 CTCs 定量检测的技术可分为两类,即体外检测和体内检测。体外检测常用的方法有免疫介导法、聚合酶链式反应(PCR)法等;体内检测方式主要为活体流式细胞术(in vivo flow cytometry, IVFC)。CTCs 对胰腺癌的早期诊断、辅助分期、评价疗效及预后评估方面都具有重要意义。本文将对胰腺癌循环肿瘤细胞的检测及临床应用进行综述。

**关键词** 胰腺癌 循环肿瘤细胞 检测 应用

**中图分类号** R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.11.003

胰腺癌的转移和复发是影响肿瘤患者长期存活的最主要因素,在转移的过程中,原发肿瘤细胞可通过多种途径侵入到血液循环系统中,产生循环肿瘤细胞(CTCs)。这些细胞以单个或聚集成团的形式存在,部分 CTCs 作为肿瘤转移的种子,在脱离原发病灶后能够抑制失巢凋亡,在血液循环中抵抗流体剪切力和躲避免疫监视,具有在机体其他部位附着形成新的癌转移灶的潜能<sup>[1]</sup>。CTCs 有原发灶细胞的生物学特性,因此被认为在反映癌症恶性程度及预后方面有重要的应用潜能。研究表明,CTCs 的检测结果、细胞计数、特定表面标志物识别与胰腺癌患者的诊断及分期、疗效判断和预后显著相关,能够为胰腺癌的个体化诊疗提供可靠依据<sup>[2]</sup>。

## 一、胰腺癌 CTCs 体外检测

胰腺癌 CTCs 进入血液循环后,绝大部分会受到失巢凋亡,流体剪切力和机体免疫识别杀伤作用的影响,最终在外周血中存活的 CTCs 数量稀少(约每 $10^9 \sim 10^{10}$ 个血细胞中有 $1 \sim 10$ 个 CTCs)。体外检测又被称为“液体活检”,主要通过采集血样,对 CTCs 进行计数及亚群特征分析。主要的分离检测方法可分为免疫介导法和分子法(主要为 PCR 介导的检测)两大类<sup>[3]</sup>。此外,利用密度梯度离心和基于细胞尺寸的物理法分离,可对血样中微量的 CTCs 进行富集,从而提高检测敏感度<sup>[4]</sup>。

### 1. 免疫介导法检测胰腺癌 CTCs: 基于抗原-抗

体结合反应的免疫学方法以其特异性、有效性,在胰腺癌 CTCs 检测中发挥了重要作用。胰腺癌为上皮组织来源肿瘤,在其细胞表面表达特殊的表面分子,而血液中的红细胞和白细胞则几乎不表达上皮来源的表面分子。最常见的选择性标志物为上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)。

CellSearch 系统是唯一受美国食品药品监督管理局(FDA)批准的,用于患者体内 CTCs 分离检测的技术,该技术是一种自动化的 CTCs 免疫富集和染色的系统。检测过程中,偶联有 EpCAM 抗体的磁珠捕获 CTCs,通过磁珠分选将其富集<sup>[5]</sup>。然后固定富集的细胞并用 DAPI、CK 和 CD45 染色,通过 CellSpotter 分析仪(Veridex)将  $CK^+$ 、 $DAPI^+$ 、 $CD45^-$  细胞计数为 CTCs。

Hugenschmidt 等<sup>[6]</sup>通过 CellSearch 系统检测可切除的胰腺癌和壶腹周围癌患者外周血 CTCs 与疾病预后,结合患者术后病理分析,高风险患者 CTCs 阳性( $\geq 1/7.5ml$ )占 6.8% (10/147),晚期患者 CTCs 阳性占 6.2% (2/33),低风险和良性肿瘤患者 CTCs 均为阴性,尽管成功切除肿瘤,但术前 CTCs 阳性的患者仍显示出不良预后。Okubo 等<sup>[7]</sup>通过 CellSearch 系统检测不可切除的胰腺癌患者外周血 CTCs 与疾病预后,CTCs 阳性患者(21/65)总生存率明显低于阴性患者,且伴有肝转移的胰腺癌患者 CTCs 数量明显增多,研究表明 CTCs 可预测晚期胰腺癌患者化疗预后和治疗反应。

微流体芯片技术(CTC-Chip)是基于 EpCAM 阳性选择的另一种检测方式,Nagrath 等<sup>[8]</sup>于 2007 年首次报道,CTC-Chip 由一系列具有 EpCAM 抗体的微

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81771850);

上海交通大学医工交叉基金资助项目(YG2017MS19)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院

通讯作者:姜立新,博士生导师,电子信箱:jinger\_28@163.com

柱组成,当外周血样本流过芯片时,因抗原-抗体反应,肿瘤细胞被芯片捕获。Ko等<sup>[9]</sup>研制的CTCs荧光原位杂交芯片可实现分离并检测全血中的CTCs,该芯片将胰腺癌CTCs定义为RNA FISH(CK18<sup>+</sup>、CK19<sup>+</sup>、Ctmd1<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>),并应用于胰腺癌小鼠模型及25例晚期胰腺癌患者血液标本中。

以上两种基于EpCAM阳性选择的胰腺癌CTCs检测方式也存在一定的局限性,由于肿瘤细胞的异质性及上皮-间质转化(EMT)等特性,并非所有肿瘤细胞都表达EpCAM抗原,这有可能会降低CTCs检测率。

免疫磁珠阴性富集可对胰腺癌CTCs进行阴性选择,将患者血样中的红细胞裂解后,通过使用表面带有白细胞特异性抗体(如CD45)的磁珠消耗胰腺癌患者血样中的白细胞,获得未标记的胰腺癌CTCs悬液。Zhang等<sup>[10]</sup>用抗CD45抗体消耗3.75ml血样中的CD45<sup>+</sup>细胞,并通过结合CK、CD45、DAPI和CEP8鉴定胰腺癌患者CTCs。该方法不受肿瘤细胞异质性及EMT特性影响,能够提高CTCs检测率<sup>[11]</sup>。

2. 基于分子法PCR的胰腺癌CTCs检测:该方法将胰腺癌患者血样中肿瘤特异性mRNA高水平表达作为CTCs的替代标志物,通过将正常血样作为对照设定阈值,以便定量检测肿瘤特异性mRNA<sup>[12,13]</sup>。

Chausovsky等首次使用巢式实时定量PCR(nested RT-PCR)检测胰腺癌患者血样中CK20 mRNA的表达,79%(22/28)胰腺癌患者CK20扩增,22例正常对照者CK20扩增均为阴性。Zhou等<sup>[14]</sup>研究表明,多标记比单标记显示出更好的结果,对25例初诊胰腺癌患者进行人端粒酶反转录酶(hTERT)、C-MET、CK20和CEA的RT-PCR,检测阳性表达率分别为100%(25/25)、80%(20/25)、84%(21/25)和80%(20/25)。

基于PCR的胰腺癌CTCs检测具有较高的敏感度,但是由于并缺乏胰腺癌特异性mRNA,常用上皮特异性mRNA替代,因此敏感度往往会伴随着假阳性的出现。

## 二、胰腺癌CTCs体内检测

Lin的研究小组开发了一种用于CTCs检测的体内技术,称为活体流式细胞术(IVFC),它结合了传统流式细胞术和共聚焦显微镜检测。活体检测的方法包括活体荧光流式细胞术(FFC)和活体光声流式细胞术(PAFC):FFC的原理为当带有荧光标记的CTCs流经激光时,被激发的荧光被光电倍增管收集,产生

不同于血液背景的信号,从而实现CTCs的活体检测<sup>[15]</sup>。PAFC利用生物组织的光声效应,当激光照射组织时,组织吸收光能量产生热膨胀,向外辐射超声波,通过分析超声换能器接收的不同声波信号来检测CTCs<sup>[16]</sup>。

IVFC可用于研究活体循环系统中胰腺癌CTCs在特定时间区间内的数量变化趋势,为疗效判断和预后提供依据。目前实验研究多采用胰腺癌细胞体外标记,注射入实验动物循环系统,或异种移植到实验动物体内,对胰腺癌CTCs变化趋势进行连续监测。研究表明,CTC簇比单个CTC有更大的转移潜能,IVFC检测CTC簇的荧光信号显示为多个峰,而单个CTC的荧光信号显示为单峰,CTC簇的信号比单个CTC具有更长的持续时间<sup>[17]</sup>。IVFC可以实时、定量地对胰腺癌CTCs进行活体检测,相较于体外检测方式,具有非侵入性、高敏感度和动态监测的优势,可用于研究胰腺癌发展、转移的CTCs动力学变化。

## 三、CTCs在胰腺癌诊疗中的应用

1. 诊断和分期: Xu等<sup>[11]</sup>通过阴性富集,免疫荧光8号染色体原位杂交(NE-iFISH)来捕获和鉴定胰腺癌患者的CTCs,NE-iFISH系统在胰腺癌患者中表现出极高的CTCs检出率(90%),结合CTCs $\geq$ 2和CA19-9 $>$ 37 $\mu$ mol/L,PC的诊断率可达到97.5%。

Ankeny检测了72例胰腺癌患者和28例其他胰腺疾病患者的CTCs,显示I~II期患者CTCs阳性率为54.84%(17/31)、III期阳性率为78.57%(11/14)、IV期阳性率为96.30%(26/27);28例其他胰腺疾病患者中仅1例检测出1个CTCs。统计表明可以将CTCs $\geq$ 3个/4毫升作为IV期胰腺癌的评判标准,CTCs有望成为胰腺癌诊断和分期的生物学标志物。

2. 疗效和预后: Torphy等<sup>[18]</sup>建立胰腺导管腺癌小鼠模型,随机分为两组,分别使用化疗药物和空白载体治疗28天,并于治疗前后检测CTCs,化疗组CTCs计数治疗后明显减少(26.61个/250微升 vs 2.21个/250微升,  $P=0.021$ ),而空白组治疗前后CTCs计数比较差异无统计学意义(23.26个/250微升 vs 11.89个/250微升,  $P=0.808$ )。CTCs的连续监测可以用作预测治疗反应的微创方法以指导治疗方案。

杨阳<sup>[19]</sup>通过检测48例胰腺癌患者术后外周血CTCs变化情况,探讨高强度聚焦超声消融(high-intensity focused ultrasound, HIFU)与开放手术两种治疗方法对胰腺癌细胞血行性播散的影响,应用免疫

磁珠负性富集结合免疫荧光原位杂交技术检测外周血 CTCs。研究发现,开放手术和 HIFU 治疗均有可能发生医源性癌细胞血行播散,并且手术治疗 CTCs 检出率高于 HIFU 治疗,因此胰腺癌患者接受开放手术或 HIFU 治疗后,应酌情给予化疗、增强免疫力等辅助治疗。

#### 四、展 望

CTCs 诊断胰腺癌的敏感度低于 EUS - FNA,但特异性(100%)与组织病理活检相当,具有低风险、低成本、高特异性等优点<sup>[20]</sup>。目前对胰腺癌 CTCs 的检测尚未形成统一指南,检测方法的差异使得研究之间的比较变得困难,并且在广泛采用之前,必须严格验证“可重复性”。未来的发展中,实现胰腺癌 CTCs 检测的标准化,需要更多独立验证研究以及在大型前瞻性临床试验中的严格评估。

#### 参考文献

- 1 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, 8(2):98 - 101
- 2 陈颀,王小林. 循环肿瘤细胞研究进展及其在胰腺癌诊疗中的应用[J]. *复旦学报:医学版*, 2018, 45(1):119 - 125
- 3 Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, *et al.* Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(2):209 - 221
- 4 Hou HW, Warkiani ME, Khoo BL, *et al.* Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1259 - 1267
- 5 Hayes DF, Smerage J. Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(12):3646 - 3650
- 6 Hugenschmidt H, Labori KJ, Brunborg C, *et al.* Circulating tumor cells are an independent predictor of shorter survival in patients undergoing resection for pancreatic and periampullary adenocarcinoma[J]. *Ann Surg*, 2018, doi:10.1097/SLA.0000000000003035
- 7 Okubo K, Uenosono Y, Arigami T, *et al.* Clinical impact of circulating tumor cells and therapy response in pancreatic cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2017, 43(6):1050 - 1055
- 8 Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. *Nature*, 2007, 450(7173):1235 - 1239
- 9 Ko J, Bhagwat N, Yee SS, *et al.* A magnetic micropore chip for rapid (<1 hour) unbiased circulating tumor cell isolation and in situ RNA analysis[J]. *Lab Chip*, 2017, 17(18):3086 - 3096
- 10 Zhang Y, Wang F, Ning N, *et al.* Patterns of circulating tumor cells identified by CEP8, CK and CD45 in pancreatic cancer[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):1228 - 1233
- 11 Xu Y, Qin T, Li J, *et al.* Detection of circulating tumor cells using negative enrichment immunofluorescence and an in situ hybridization system in pancreatic cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4):622 - 640
- 12 Takai E, Yachida S. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(38):8480 - 8488
- 13 Komatsubara KM, Sacher AG. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy: current clinical applications and future directions[J]. *Oncology (Williston Park)*, 2017, 31(8):618 - 627
- 14 Zhou J, Hu L, Yu Z, *et al.* Marker expression in circulating cancer cells of pancreatic cancer patients[J]. *J Surg Res*, 2011, 171(2): 631 - 636
- 15 Ding Y, Wang J, Fan ZC, *et al.* Signal and depth enhancement for in vivo flow cytometer measurement of ear skin by optical clearing agents [J]. *Biomed Opt Express*, 2013, 4(11):2518 - 2526
- 16 杨萍,魏勋斌. 在体光声流式细胞术在循环肿瘤细胞检测中的研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54(9):7 - 18
- 17 Aceto N, Bardia Aditya, Miyamoto DT, *et al.* Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis [J]. *Cell*, 2014, 158(5):1110 - 1122
- 18 Torphy RJ, Tignanelli CJ, Kamande JW, *et al.* Circulating tumor cells as a biomarker of response to treatment in patient - derived xenograft mouse models of pancreatic adenocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e89474
- 19 杨阳. 胰腺癌不同治疗手段对循环肿瘤细胞的影响[D]. 苏州:苏州大学, 2014
- 20 Iwanicki - Caron I, Basile D, Toure E, *et al.* Usefulness of circulating tumor cell detection in pancreatic adenocarcinoma diagnosis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(1):152 - 155

(收稿日期:2019 - 02 - 26)

(修回日期:2019 - 03 - 30)

欢迎订阅

欢迎赐稿