

第一章

循环肿瘤细胞的概念及生物学特征

2018年9月12日，由美国癌症学会（American Cancer Society，ACS）主办的全球影响力较高的学术期刊 *CA: A Cancer Journal for Clinicians*（IF=244.585）发布了最新版《全球癌症统计报告2018》（Global Cancer Statistics 2018）^[1]。该报告以 GLOBOCAN 2018 的数据为基础，统计了全球 185 个国家、36 种癌症的发病率与死亡率。数据显示，全球癌症负担持续增长，2018 年估计有 1810 万新发病例和 960 万人死亡。全球 1/5 男性和 1/6 女性将在其一生中患上癌症，更有 1/8 男性和 1/10 女性将死于癌症。全球范围内，癌症确诊人群中 5 年内生存人数（5 年患病率）预计为 4380 万。在列入统计范畴的 36 种癌症中，肺癌发病人数和死亡人数均居榜首。乳腺癌发病人数和肺癌相近，但是由于预后相对较好，死亡人数位列第五，远低于肺癌。结直肠癌、前列腺癌和胃癌，分别位列发病人数的第三至第五名。死亡人数中结直肠癌、胃癌和肝癌分别位列第二至第四名。

人们常常把肿瘤与癌症混为一谈，认为肿瘤就是癌症，癌症就是肿瘤，其实两者有根本的不同。肿瘤包括良性肿瘤和恶性肿瘤，以及恶性程度介于两者之间的“交界瘤”，所以肿瘤不等于癌症。医学对良性肿瘤的命名原则是在发生部位名称后加上一个

◇ 循环肿瘤细胞检测技术与临床应用

“瘤”字，如发生在膀胱的肿瘤形状像乳头，就取名为“膀胱乳头状瘤”。若肿瘤来源于结缔组织就直接在组织名称后加上“瘤”字，如纤维瘤、脂肪瘤及血管瘤等。恶性肿瘤共有 1000 多种，主要分为癌和肉瘤两大类。凡是人体结缔组织，如脂肪、肌肉、骨骼、淋巴、造血组织等发生的恶性肿瘤，统称为“肉瘤”，如脂肪肉瘤、平滑肌肉瘤、骨肉瘤、淋巴肉瘤等。生长于上皮组织的恶性肿瘤称为“癌”，如口腔癌、食管癌、胃癌、肠癌等。另有一类来源于多种组织成分的恶性肿瘤则是在名称前加上“恶性”两字，如恶性混合瘤等。凡是来自胚胎细胞或未成熟组织的恶性肿瘤，均称为“母细胞瘤”，如肝母细胞瘤及髓母细胞瘤等。此外，少数恶性肿瘤仍沿用习惯名称，如霍奇金病、非霍奇金病、白血病及黑色素瘤等。

良性和恶性肿瘤的主要区别在于后者有浸润性生长、转移和复发倾向。恶性肿瘤通常生长迅速，呈浸润性生长，可破坏周围组织，无包膜或仅有假包膜，肿瘤分化差，组织及细胞形态与其相应的正常组织相差甚远，显示异形性，排列扰乱，细胞核形状不规则，常有不同程度的深染，核仁增大、增多，并出现病理性核分裂象；肿瘤内多出现继发性改变，如出血、坏死、囊性变及感染等；手术切除后常复发，并容易转移，对周围组织造成广泛破坏。转移是预后不良的征兆，如不及时治疗，常导致死亡。肿瘤转移是指肿瘤细胞从原发灶脱离，侵入细胞外基质，侵袭附近血管和淋巴管进入循环系统，通过与血小板和内皮细胞的相互黏附作用有效逃避机体免疫清除，进而穿出脉管系统，在靶点处形成新克隆的过程。

第一节 循环肿瘤细胞的概念

循环肿瘤细胞（circulating tumor cells, CTCs）泛指存在于外周血中的各类肿瘤细胞，CTCs被认为是一种来源于肿瘤原发灶或转移灶、在特定条件下释放入外周血液循环的肿瘤细胞。CTCs具有肿瘤细胞的特殊表型，在外周血中含量极为稀少。CTCs多为自发形成，也可由诊疗操作致使肿瘤细胞从实体肿瘤病灶（原发灶、转移灶）脱落并进入血液循环而成。大部分CTCs在进入外周血后发生凋亡或被吞噬，少数CTCs能够逃逸并在组织中附着，发展成为转移灶，增加恶性肿瘤患者死亡风险。CTCs在肿瘤发生转移之前即可出现，因此，也被认为是一种转移的前体细胞，是肿瘤获得侵袭性能力的体现^[2]。

肿瘤远处转移的最经典依据是1889年Paget提出的“种子和土壤”学说。该学说认为，肿瘤转移的发生和发展是处于活跃或活化状态的肿瘤细胞作为“种子”，当遇到适合的器官、组织的基质环境，即“土壤”时，就会在此定居、生长，即发生肿瘤的转移，从而部分解释了肿瘤原发灶与转移灶之间的关系。原发部位的肿瘤（种子）是如何到达远处器官或组织（土壤）这一问题一直困扰着人们。

最早在1869年，澳大利亚籍医师托马斯·阿什沃思（Thomas Ashworth）^[3]在1例转移性癌症死亡患者血液中发现类似肿瘤细胞——从实体瘤中脱离出来并进入血液循环的肿瘤细胞。他推测，这些细胞在癌症转移过程中发挥了非常重要的作用，并可能提供疾病进展的相关信息，CTCs的概念初步形成。在CTCs概

◇ 循环肿瘤细胞检测技术与临床应用

念提出近一个多世纪的时间里，由于初期实验条件、技术的限制以及学者对 CTCs 认识的局限性，CTCs 检测及临床应用进展缓慢。直到 1976 年 Nowell 才将 CTCs 的定义修正为：那些来源于原发肿瘤或转移肿瘤，获得脱离基底膜的能力，并通过入侵组织基质进入血管的肿瘤细胞。

由于 CTCs 能够代表原发肿瘤的表型和遗传组成，并能够作为任何转移性肿瘤的“液体活检”靶标，针对 CTCs 的富集分离和特征的研究十分具有吸引力。在血液中，CTCs 极其稀少，数十亿的外周血细胞阻碍了对 CTCs 的分离和分子鉴定。直至 20 世纪末尤其是 21 世纪初，随着分子生物学、计算机技术的发展，免疫标记技术以及分子生物学技术的突飞猛进，CTCs 分离及分析鉴定技术、检测和临床应用才取得了重大进步。这为早期发现肿瘤的复发转移，判断预后，确定肿瘤分子特征，选择合适的个体化治疗方案以及评估疗效等，提供了重要的实验室依据。

现在已经开发了大量的技术用于富集和检测 CTCs，其中有些已经成功地用于测试或者临床评估。例如，CTCs 计数可以作为预测指标，当其大于已知的阈值时，就预示着患者患有转移性乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌等。基于临床试验，美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准了一种临床检测 CTCs 的 Cell Search 技术，用于上述癌症的 CTCs 的富集和计数。Cell Search 技术成功地证明了 CTCs 确实表征疾病的活跃，CTCs 数量的增加预示着病情的恶化；以 CTCs 为基础的分析，还可以帮助人们进行实时诊断和预测，对病情作出判断，并取样检测耐药性。

目前，学者们取得共识的 CTCs 概念：自发或受外界因素作用（如诊疗操作等）由原发灶或转移灶进入外周血液循环的肿瘤

第一章 循环肿瘤细胞的概念及生物学特征 ◇

细胞。肿瘤细胞脱落、侵袭并进入血液循环是肿瘤转移的最初阶段，这一过程为最终形成肿瘤转移灶提供了可能。进入循环系统的肿瘤细胞大部分在机体免疫识别及杀伤等作用下发生凋亡，有极少数肿瘤细胞在循环系统中存活下来，在一定条件下，通过迁移、黏附以及相互聚集形成微小癌栓，并在一定条件下发展为转移灶。

大量研究表明，CTCs 是肿瘤来源的一类子集细胞，以不同形态存在于外周血中，既有游离的单个细胞，也有聚集成群的细胞团。CTCs 具有肿瘤的生物学特性，但不同的是，这类细胞可能会表现出一定的异质性变化，从而促进转移的发生，其中最重要的是上皮 - 间质转化（epithelial-to-mesenchymal transition, EMT）。也就是说，在进入外周循环之前，部分肿瘤细胞会逐渐失去上皮细胞应有的细胞间黏附能力及基底膜极性，并获得类似间叶细胞的特性，从而具有更强的侵袭性。这一类“主动”的 EMT 肿瘤细胞，可以轻易通过细胞外基质，穿过基底膜，进入外周循环并向远处侵犯。与此相对，部分未经过 EMT 转化的肿瘤细胞，也可以通过“被动”的方式侵入外周循环成为 CTCs。当单个或成簇的 CTCs 在某些微小血管内减速并逐渐附着在其内皮细胞表面以后，将发生血管外渗。其中，部分 CTCs 在最终锚定并进展成为转移病灶之前，会一直处于休眠状态，而部分 CTCs 则会发生间质 - 上皮转化（mesenchymal-to-epithelial transition, MET），重新获得细胞间黏附能力以及基底膜的极性，定植并发展为转移病灶^[4]。

据统计，90% 以上的肿瘤患者死于肿瘤的转移和复发，实体肿瘤或转移灶的肿瘤细胞在特定条件下，通过上皮 - 间质转化（EMT），从形态上发生向间充质细胞表型的转变并获得迁移的

◇ 循环肿瘤细胞检测技术与临床应用

能力。间充质细胞与上皮细胞相邻，只是其结构松散，缺乏细胞连接(cell adhesion)和细胞极性，并且具有转移和侵袭能力。因此，脱落的 CTCs 得以进入外周血液循环，这是肿瘤发生转移的必要前提。脱离原发灶入血的 CTCs 至少面临着血流剪切力、失巢凋亡、免疫细胞识别杀伤等三重致命考验，进入循环的大部分肿瘤细胞都会失去活性，只有不足 0.01% 的肿瘤细胞可到达远端器官，通过迁移、黏附、相互聚集形成微小癌栓，并在适合的微环境条件下，CTCs 又发生间质 - 上皮转化，生成新的肿瘤，从而导致肿瘤转移的发生。因此，CTCs 存在不同的表型，包括上皮细胞表型、间质细胞表型和上皮细胞与间质细胞混合表型。

在肿瘤发展进程中，血管生成可以产生数量庞大但结构不完整的微小血管。这类血管上皮细胞之间的连接极为松散，甚至会出现细胞间的缺口。因此，在原发病灶生长挤压的外力辅助下，肿瘤细胞就可以通过这些不完整的微血管，“被动”侵入外周循环并发生远处转移。这种方式为 CTCs 簇集提供了可能。簇集现象可以有效降低单细胞因表面黏附能力丧失而出现的失巢凋亡，增加了抵抗外周循环血流冲击和宿主的免疫防御的能力，从而使 CTCs 在外周循环获得更强的生存能力，最终有利于肿瘤的转移。

第二节 循环肿瘤细胞的生物学意义

恶性肿瘤都会通过血液传播转移到身体的其他器官，而肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因。肿瘤细胞侵入原发肿瘤细胞的周围组织中，进入血液和淋巴管系统，形成循环肿瘤细胞 CTCs，并转运到远端组织，再渗出，适应新的微环境，最终播种、

第一章 循环肿瘤细胞的概念及生物学特征 ◇

增殖并定植，形成转移灶。因此，早期发现血液中的 CTCs，对于患者病情分析、预后判断、疗效评价和个体化治疗都有着重要的指导作用。随着 CTCs 检测技术不断发展，CTCs 富集、分离和分析已在乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、卵巢癌、黑色素瘤等多种恶性肿瘤中得到应用。

1. 利于检测分析

对于肿瘤的常规检测手段来讲，如影像学，肿瘤在 < 1cm 情况下，医师很难发现或者确认其为异常。然而，汇总国内外的 CTCs 研究可见，很多肿瘤在瘤块直径 2 ~ 4mm 情况下已经有肿瘤细胞进入血液循环，从这个角度讲，CTCs 对早期诊断具有不可低估的意义。从临床来讲，在疾病早期要判断患者是否得了肿瘤，一直是一个很难明确回答的问题，很容易造成误诊或者漏诊。在很多难以确诊的患者的血液中，如果能够检查到 CTCs，对于配合医师下肿瘤诊断的结论具有积极意义。

来源于原发或转移病灶的 CTCs 具有肿瘤特殊表型，其可能会出现一些特异性的抗原或是生物标志物，抑或是和原发病灶相似的基因突变，可以实时反映肿瘤的发生发展状况。例如，肺癌相应的 CTCs 中，有人检测到上皮生长因子受体（epithelial growth factor receptor, EGFR）基因突变，Zhou 等^[5]观察到 C-MET、h-TERT、CK20、CEA 可作为循环胰腺癌细胞的标志物，利用免疫磁分离和富集 CTCs 联合这四个基因的检测可将特异性和敏感性提高到 100%。而部分乳腺癌的 CTCs 也可以表现和原发病灶相似的人表皮生长因子受体 2（human epithelial receptor 2, HER2）表型。因此，针对 CTCs 的这一类生物学特性，可以实现肿瘤的无创性检测和分析。

◇ 循环肿瘤细胞检测技术与临床应用

2. 利于治疗监测

CTCs 的另一项重要临床应用是对抗肿瘤治疗效果进行监测。CTCs 检测可作为影像学及临床评分体系的补充, 对患者的治疗应答做出评价。例如在药物治疗后 1 ~ 2 周, 通过 CTCs 检测, 临床医师就可以依据 CTCs 类型和数量的改变预测治疗效果, 效果不佳的患者可及时调整治疗方案, 避免浪费宝贵的治疗时间。

一项 III 期临床随机试验证实, 在使用阿比特龙 (Abitaterone) 治疗的前列腺癌患者中, CTCs 的数量和总体生存率呈负相关。因此, CTCs 能否被有效清除也被认为是评价药物敏感性的一项指标。与此相反, 在治疗过程中 CTCs 数量并未减少甚至出现异质性改变, 则将预示肿瘤耐药性的出现。在对存在 EGFR 突变的非小细胞肺癌患者进行酪氨酸激酶抑制剂治疗时, 部分患者的 CTCs 中出现了 T790 突变, 这种突变间接预示着肿瘤更容易获得对药物的耐受能力。而这一部分患者最终也面临着更短的无进展生存期 (7.7 个月 vs.16.5 个月) [4]。

Cohen [6] 等观察了 430 例转移性结直肠癌患者, 在治疗开始前及第一、二、三线化疗开始后 3 ~ 5 周分别检测 CTCs 水平, 采用 3 个 CTCs/7.5mL 全血为判读界值, 评价治疗应答情况。结果显示, 治疗后影像学检测无肿瘤进展的患者中 93% 为 CTCs 数量少于 3 个, 且无进展生存期明显优于治疗后多于 3 个 CTCs 的患者。此外, 一项 Meta 分析也显示 CTCs 水平在治疗检测中具有重要价值 [7]。

无论是国内还是国外, 一般会在患者注射化疗药物 3 个月后进行疗效评估。因为只有经过 3 个月治疗后, 肿瘤的大小才能出现较明显变化。很多情况下, 经过 3 个月的治疗, 肿瘤细胞非但

没有减小反而继续增大。这对患者来讲是种损失，因为3个月的时间往往是肿瘤治疗的关键时期。随着CTCs技术的成熟，根据测定CTCs数目的变化，医师能够及时采取新的治疗方案：如果CTCs数目显著下降，说明化疗药物有效；如果CTCs数目继续增加，说明药物无效。

3. 利于预后评估

CTCs检测作为一种简单的血液检测手段，可随时获取用于评估患者的预后。对肿瘤转移患者进行预后评估，是目前CTCs临床应用最广泛的领域。恶性肿瘤患者治疗前后的CTCs类型和数目的变化具有重要的预后提示价值。大量实验证明，CTCs的出现与晚期癌症患者的预后密切相关。

肿瘤患者经过治疗后，在恢复过程中是否会发生肿瘤复发？以及何时复发？医师无法对此做出解释。肿瘤复发实际上就是肿瘤转移的过程。很多乳腺癌患者复发后会发生脑转移，而结直肠癌患者复发后往往出现肝转移。这说明即使原发灶已经切除，肿瘤还会转移到其他部位，这实际上就是一个慢性的肿瘤转移过程。既然人们已经认识到肿瘤复发和肿瘤转移过程是直接相关的，医师就可以通过监测CTCs直接监测患者是否肿瘤复发。也就是说，肿瘤的复发不是一日形成的，它是一个持续的、肿瘤不断释放入血并向远端转移的缓慢过程。经过治疗的患者，外周血液循环应该是没有或者只有极少数目标肿瘤细胞，如果在今后的复查过程中检测到CTCs持续增多，很有可能是肿瘤复发的前兆或复发的过程，提示医师应对患者采取适当的治疗来控制CTCs的增多。

对发生转移的肿瘤患者进行预后评估是目前CTCs临床应用

◇ 循环肿瘤细胞检测技术与临床应用

最广泛的领域。恶性肿瘤患者治疗前后 CTCs 水平的变化对预后有着重要的预判价值。一项多中心研究显示,采用 Cell Search 对 177 例转移性乳腺癌患者外周血 CTCs 水平进行检测,按照每 7.5mL 血样本中含有 5 个 CTCs 为判读界值,将患者分为 < 5 个及 ≥ 5 个两组,结果显示, < 5 个组具有显著的无进展生存期和总生存期。CTCs 水平可作为转移性乳腺癌患者预后评估的独立预测因素。此外,CTCs 作为预后预测标志在结直肠癌、前列腺癌中也得到了验证^[4]。

肿瘤的复发转移与 CTCs 密切相关,监测 CTCs 可早于常规影像学检查手段预估肿瘤复发风险。大量研究已经证实,CTCs 检测将有助于复发转移监控、判断患者预后、指导术后辅助治疗等。与肿瘤组织样本相比,血液样本更易获取、创伤性小、可反复采集,是临床上常规检测较为理想的标本来源,大大提高了这一方法的应用价值。此外,很多情况下给患者用化疗药物一开始是有效的,但是过一段时间后肿瘤患者的发病并没有得到控制,这有可能是患者对药物产生了耐药性。而对于肿瘤治疗患者是否会产生耐药以及何时产生耐药是未知的。往往是发现患者产生耐药时,病情已无法控制。随着 CTCs 技术的成熟,对患者进行持续的 CTCs 动态跟踪观察,一旦发现 CTCs 数目显著增加,医师应及时更换新的治疗方案。

4. 利于药物筛选

个体化治疗是指针对每一位不同的肿瘤患者,医师给出不同的治疗方案。目前,已有学者把患者体内的肿瘤细胞进行体外培养,通过体外药理实验来观察哪种化疗药物对肿瘤细胞杀伤作用最大,将其用在患者身上,以增加治疗的目的性。随着 CTCs 捕

获技术的成熟，人们开始考虑是否可以把 CTCs 作为个体化治疗的基础，从目前来看是可行的。即先将 CTCs 捕获出来进行培养，培养好后进行药理实验，在此基础上还可以进行化疗药效的快速评估。

目前，靶向治疗已成为恶性肿瘤治疗的主要手段。靶向治疗药物作用于特定的靶标基因发挥药效，其药物疗效与肿瘤患者的基因信息密切相关。因此，患者接受靶向药物治疗之前，必须接受系列的基因检测，根据患者的基因特点，采用不同的治疗方案，实施个体化治疗。CTCs 是游离于患者血液中的肿瘤细胞，携带了肿瘤的全部基因。为此，CTCs 可以作为基因检测的样本，来反映患者肿瘤的基因信息，指导个体化用药。有学者^[8]在对雌激素受体阳性乳腺癌的研究中发现，部分患者对三苯氧胺、雷洛昔芬和氟维司群的治疗效果并不理想。随后的 CTCs 检测发现了 ESR1 突变，提示需要在常规运用上述药物的基础上，增加 HSP90 抑制剂来重新获得针对肿瘤的药物活性。

国内外很多药厂都投入巨资开发肿瘤新药，在开发的过程中不仅把实体肿瘤作为靶向治疗的一个靶标，同时也认识到可以把 CTCs 作为药物治疗的对象。通过对获取的 CTCs 进行基因分析，能实时反映肿瘤的基因状况，准确地指导药物选择，提高治疗效果。

5. 存在的问题及发展趋势

Cell Search 是目前 FDA 唯一批准应用于临床的体外 CTCs 诊断设备。但是 Cell Search 有一定的局限性，如缺乏肿瘤特异性抗原、敏感性不足等；某些白细胞可能表达 EpCAM，出现假阳性；对于非上皮来源的肿瘤细胞，检测敏感性低；富集和分析过程复

◇ 循环肿瘤细胞检测技术与临床应用

杂，费用高；发生 EMT 转化的肿瘤细胞可能具有更强的侵袭转移潜能，但可能丢失了 EpCAM 而无法检出。因此，建立新的敏感性 & 特异性较高、适用范围广、可行的检测方法很有必要。