

## ·综述·

## 循环肿瘤细胞在卵巢癌临床应用中的研究进展

贺雨南,张瑜<sup>△</sup>

**【摘要】** 液体活检(liquid biopsy, LB)作为新一代检测技术,能更准确地评价肿瘤患者疾病进展,成为具有临床应用价值的管理工具,有望改善卵巢恶性肿瘤疾病的转归。对循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)动态数量变化或肿瘤生物学特性的监测,可应用于卵巢恶性肿瘤的早期筛查、疗效监测和耐药性评估、复发风险预测、患者预后判断等方面。相比目前依赖于肿瘤标志物的临床管理策略,CTCs 的特异度更高,而且可以进行细胞学培养和分析。但 CTCs 与卵巢恶性肿瘤的疾病进展之间的关系尚不十分明确,此外,适用于卵巢癌 CTCs 更高级的分子富集策略有待进一步明确。

**【关键词】** 卵巢肿瘤;早期诊断;肿瘤标记,生物学;循环肿瘤细胞

**Clinical Application of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer** HE Yu-nan, ZHANG Yu. XiangYa School of Medicine, Central South University, Changsha 410008, China (HE Yu-nan); Department of Gynecology and Obstetrics, XiangYa Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (ZHANG Yu)

Corresponding author: ZHANG Yu, E-mail: cszhangyu@126.com

**【Abstract】** Liquid biopsy (LB), as a new generation detection technology, can more accurately evaluate the disease progress of tumor patients and become a valuable management tool of clinical medicine, which is expected to improve outcome of ovarian malignant tumor. It can be used in early screening, curative effect, assessing drug-resistance, relapse and prognosis of ovarian cancer via monitoring quantity changes of circulating tumor cells (CTCs) in body fluid. Comparing present clinical strategy depended on tumor markers, CTCs exhibit higher specificity and can be cytologically analyzed and cultured. However, the relationship between CTCs and the disease progression of ovarian tumors is not yet clear. Besides, more advanced molecular enrichment strategies needs to be applied to ovarian CTCs.

**【Keywords】** Ovarian neoplasms; Early diagnosis; Tumor markers, biological; Circulating tumor cells

(J Int Obstet Gynecol, 2018, 45:318-321)

液体活检(liquid biopsy, LB)是利用分子生物学及其衍生技术[如实时定量荧光聚合酶链反应(RT-PCR),突变扩增聚合酶链反应(AMS-PCR),细胞免疫荧光(ICC)等]对包含肿瘤衍生遗传物质的体液进行分析的新一代检测技术。近年来,该技术以其无创、可重复及精准检测的特性在肿瘤的筛查、病情监测以及产前诊断等方面取得了飞速进展。液体活检研究的肿瘤衍生物包括循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、外泌体(exosome)及微小 RNA(miRNA)等,其中 CTCs 因可探究细胞功能和分析完整的基因分子谱而备受关注。

## 1 CTCs 技术的基本原理和优点

CTCs 是指可以从血管内捕捉鉴定到的肿瘤细胞,包括侵袭到血管内的肿瘤细胞、被动脱落的原发性肿瘤细胞和血液内的转移性肿瘤细胞。它们具有肿瘤干细胞特性(包括特异性表型和基因型特征),能够在新的微环境中生长。CTCs 技术的基本原理是从外周血捕捉到肿瘤细胞,最常使用的是抗体包被的磁性免疫技术,将上皮细胞黏附分子(EpCAM)阳性、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)阳性、细胞角蛋白 19(CK19)阳性、CD45 阴性的 CTCs 进行捕获富集,通过荧光显微镜对细胞进行高分辨率成像,从而完成 CTCs 的计数和鉴定,或者通过电子显微镜进行细胞形态学分析<sup>[1]</sup>。

此外,CTCs 技术还允许分析肿瘤细胞 DNA 分子之外的其他生物学特征,如测定分离的 CTCs 下游高通量基因组、转录组和蛋白质组表征。CTCs 检测具有以下优点:①无创性:无需实体瘤标本,仅需采

作者单位:410008 长沙;中南大学湘雅医学院(贺雨南);中南大学湘雅医院妇产科(张瑜)

通信作者:张瑜, E-mail: cszhangyu@126.com

<sup>△</sup>审校者

集血液、尿液等体液标本,采集方便易行;②可重复性:可多次反复采集标本,便于实时动态监测病情进程;③精准全面:包含肿瘤组织的全部基因组信息,排除非肿瘤细胞的影响。

## 2 CTCs 在卵巢癌中的应用

大多数卵巢癌病例在晚期才被诊断,导致预后不良,生存率低,尽管联合化疗和靶向治疗、运用先进的手术技术和现代化的管理,患者的生存率有所提高,但 5 年生存率仍仅为 30%<sup>[2]</sup>。卵巢癌的早期临床症状具有非特异性,且 CA125 联合经阴道超声(TVS)的早期筛查措施敏感度和特异度不高,并没有显著降低卵巢癌的死亡率,尚未达到预期的目标<sup>[3]</sup>。因此,开发新的卵巢癌筛查手段一直是研究者关注的重点。

目前对于卵巢癌的病情监测和预后判断主要依据:临床症状、肿瘤标志物[CA125、人附睾蛋白 4(HE4)、甲胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)]、影像学检查、腹水肿瘤细胞、淋巴转移等。但是由于肿瘤本身特殊的生物学行为以及患者的自身特性,这些措施不能反映每个患者个性化疾病特征,不足以满足患者精准医疗的需求。同时,尽管使用肿瘤细胞减灭术以及基于铂类、紫杉烷、贝伐单抗和(或)帕唑帕尼的化疗已经显著提高了存活率,但依旧无法降低肿瘤耐药性的发生率和肿瘤高发转移率。以上这些表明迫切需要额外的肿瘤特异性诊断生物标志物来监测癌症进展,并预测体内肿瘤细胞对化学疗法的抵抗作用。

**2.1 CTCs 与早期诊断** 卵巢癌早期诊断的临床措施有限,血清学指标包括 CA125 和 HE4,但肿瘤标志物在卵巢癌早期发展阶段特异度和敏感度不高,因此 CA125 和 HE4 都不被推荐独立用于卵巢癌的早期筛查和诊断<sup>[4]</sup>。在临床应用中,卵巢癌所需生物标志物的诊断特异性至少要克服 99.6%的阈值,以限制进一步昂贵的确诊检查和不必要的治疗。然而,这一目标对于肿瘤生物学标志物来说很难实现。

在一组 71 例接受卵巢恶性肿瘤评估的患者中,探讨了 CTCs 计数的作用以评估疾病分期,发现共 43 例(60.6%)患者检测出 CTCs,包括 0/5 良性患者, I/II 期(早期)CTCs 检出率 1/10(10%), III/IV 期(晚期)39/52(73.1%)和 3/4(75%)未分化患者<sup>[5]</sup>。不幸的是,早期卵巢癌患者血液中的 CTCs 浓度极低(约 1/10<sup>9</sup> 血细胞或 1/10<sup>6</sup> 有核血细胞<sup>[6]</sup>),且卵巢癌的血液转移方式较少,发生也较晚。然而,早期诊断时若

CTCs 计数高,则之后疾病进程出现不良临床病理特征的可能性较高,但不仅限于 CA125 和 HE4 水平升高<sup>[7]</sup>。Zhou 等<sup>[8]</sup>研究发现 CTCs 和 CA125 之间存在相关性,提示 CTCs 计数可以应用于卵巢癌的早期诊断。与 CA125 相比,CTCs 的特异度约为 86%~99%<sup>[9-11]</sup>,但其作为卵巢癌临床应用中有价值的诊断工具还需要统一的标准化方法和大量的前瞻性验证。

仅依靠 CTCs 的卵巢癌早期诊断目前应用有限,最大的问题在于无法定位诊断。与依赖于人乳头瘤病毒(HPV)和液基细胞学检查(TCT)的早期宫颈癌筛查手段不同,宫颈癌筛查样本取自宫颈分泌物可以直接检测宫颈异常细胞。而血液中的 CTCs 来源何种组织或器官目前无法明确定位,因为现阶段的 CTCs 捕捉富集策略十分相似,依照的上皮标志物几乎在同种病理类型各个部位的肿瘤细胞都可以表达。患者往往已经在临床上出现卵巢或盆腔肿块等影像学改变,进而对其进行液体活检等项目检测,这个和早期筛查还是有本质区别。

另外,妊娠合并卵巢肿块时,若肿块性质难以通过保守方式确定,而患者继续妊娠的意愿强烈,检测 CTCs 可能会为患者继续妊娠提供帮助。总之,未来 CTCs 要在卵巢癌早期筛查中发挥临床价值还需要更大量的证据和肿瘤生物学的研究。

**2.2 CTCs 与疗效判断** CTCs 与治疗反应也有关。目前 CA125、HE4 应用于卵巢癌患者的治疗效果评估和疾病状态监测<sup>[12]</sup>,但 CA125、HE4 在妇科良性疾病中也会增高。CTCs 可以评价手术肿瘤残留情况,一般来说,术后完全切除原发卵巢肿瘤患者的 CTCs 检出率明显低于术后有残留的病例(21% vs. 34%)<sup>[13]</sup>;对于少数术后 CA125 等肿瘤标志物水平不下降的患者,CTCs 计数可能为疗效判断提供了另一个参考评估标准<sup>[14]</sup>。检测 CTCs 可能比 HE4 等肿瘤标志物敏感度更高,能在一定程度上反映疾病进展,有一定的临床价值<sup>[10]</sup>。

在卵巢癌患者中分离 CTCs 最有价值的应用之一是有机会检测和监测与耐药性有关的活性突变,甚至对肿瘤细胞进行药敏培养。疾病的疗效很大程度上取决于肿瘤细胞对化疗药物的耐药性,对于铂类化疗药物耐药的卵巢癌患者,CTCs 在数值上高于铂类敏感患者,同时对卵巢癌患者的肿瘤组织和 CTCs 进行基因表达的分析,寻找卵巢癌患者中特异度高的新 CTCs 标记基因及产物。肽脯氨酰顺反异构酶的亲环蛋白(PPIase cyclophilin, PPIC)被认为是免疫抑制药物环孢素 A(CsA)的胞内受体<sup>[15]</sup>。PPIC 阳

性的 CTCs 在铂类耐药患者样品中远高于铂类敏感者<sup>[16]</sup>。一些特定的基因在铂类化疗药物耐药的患者中表达水平增高,其中核苷酸切除修复交叉互补基因 1(excision repair cross-complementing 1, *EERC-1*)、多药耐药基因 1(multidrug resistance 1, *MDR1*)的表达有明显差异,且下游翻译蛋白的特性与肿瘤耐药有关,有望作为铂类耐药的独立预测因子<sup>[17-18]</sup>。此外,卵巢癌耐药患者的 CTCs 还可检测出另一组与化疗耐药相关的蛋白 [多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-related proteins 1~10, *MRP 1~10*),核糖核苷酸还原酶亚基 M1(ribonucleotide reductase subunit M1, *RRM1*)和 *RRM2*]<sup>[19]</sup>,这些蛋白被认为是治疗耐药性卵巢癌的前景靶点。

从外周血分离的 CTCs 可以进行细胞培养,测定 CTCs 衍生细胞系对于化疗药物的敏感性以更好地应用于患者后续治疗<sup>[20]</sup>。CTCs 具有干细胞特性,且肿瘤细胞的增值分化具有特殊的生物学行为,尽管已经对 CTCs 的细胞培养进行了培养时间的限制,尽量短期培养不改变肿瘤细胞的生物学特征,但 CTCs 对化疗药物的反应与原发肿瘤细胞是否一致有待于更深入的研究。

**2.3 CTCs 与复发预测及预后评估** 按照卵巢肿瘤标准化治疗后,高达 50%卵巢癌患者血清 CA125 水平正常,而疾病持续性进展<sup>[21]</sup>。CTCs 已被证明在转移性乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌患者中复发监测和预后评价的研究价值<sup>[22-24]</sup>。与其他肿瘤标志物的临床应用类似,CTCs 对于卵巢癌的复发监测主要依靠于其计数。但是大量研究表明 CTCs 表面蛋白等分子特征和原发肿瘤细胞不同,具有干细胞特性,更容易定植、复发和远处转移。因此,检测 CTCs 分子特征的发展演变不仅可以揭示肿瘤生物学行为,还可以为肿瘤的复发提供证据。过去的一些研究认为,CTCs 的变化与患者的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)无关<sup>[25-26]</sup>,但近年来认为 CTCs 与患者预后有关,原因之一可能是更加高效和特异性的 CTCs 捕捉富集策略和纳米技术的应用。

复发性卵巢癌的后续治疗决策主要根据患者无铂间隔时间(铂类药物化疗和疾病复发之间的时间长度)确定<sup>[27]</sup>,但这种方式不具有个体化和精准医疗的优势,CTCs 可能通过不同分子特征或细胞培养结果精确指导复发的卵巢癌用药。CTCs 数值高于基线数(每 7.5 mL  $\geq 2$  个 CTCs)与 PFS 和 OS 缩短有关<sup>[28]</sup>,提示 CTCs 升高与预后不良有关。进一步探索基于 CTCs 分子特征的价值和局限性,避免患者失去改善

预后的机会。

### 3 CTCs 用于其他妇科恶性肿瘤

CTCs 几乎可以应用于所有的实体肿瘤,因此近期也有很多研究者专注于 CTCs 在子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)和宫颈癌(uterine cervical cancer, UCC)的临床价值。虽 EC 和 UCC 现有的临床早期诊断策略具有侵入性,但是 CTCs 在 EC 和 UCC 的早期诊断尚未建立初步的方式途径,后续研究的重难点在于是否可以取代当前的临床策略并且进行经济学评价。CTCs 在 EC 的复发、转移、耐药性和预后评估上具有远大的前景,CTCs 计数与 EC 肌层侵入和微转移有关,表达特异性蛋白的 CTCs,如膜联蛋白 A2(*ANXA2*)阳性的 CTCs,可能比现有肿瘤标志物对复发转移的监测更为敏感,特异度更强。今后建议将 EC 中的 CTCs 表型与干细胞的特征相关联,以探究解决这一问题的途径。针对 EC 高转移特性,个性化抗转移治疗至关重要。

UCC 与 HPV 之间存在密切联系,超过 95%的 UCC 患者感染高危型 HPV<sup>[29]</sup>,但 HPV 感染并不意味着一定存在 UCC。而直接检测 CTCs 中 HPV 基因转录产物是用于早期诊断 UCC 的理想标志物,例如 HPV E6/E7 转录产物优于 CK19<sup>[30]</sup>,同时基于 RT-PCR 的低通量微流系统检测完整 CTCs,具有更高的敏感度<sup>[31]</sup>。补充和改进 UCC 监测的非侵入性策略和基于 CTCs 高敏感度分子标志物的开发已经成为后续临床研究的主要工作。

### 4 总结和展望

目前可以确定,检测 CTCs 在卵巢癌中有一定的临床价值,表现在:用于肿瘤早期筛查;复发和转移的早期级联反应;寻求药物干预肿瘤生物学行为的靶点,从而抑制肿瘤疾病的进展;鉴定耐药性及耐药性的生物决定因素;评价肿瘤术后或放化疗的疗效;预测患者 PFS、无病生存期(DFS)、OS,从而评价患者预后。

未来 CTCs 更全面展现其临床应用价值还有以下方面需要考虑:利用纳米技术等开发新的 CTCs 检测系统,提高检测敏感度;寻找特异性更强的分子标志有望提高 CTCs 的定位诊断水平;寻找 CTCs 动态数量变化与疾病进展的相关性,阐明不同疾病 CTCs 特异性标志蛋白的临床应用;通过更大量的前瞻性临床研究探讨妇科恶性肿瘤的治疗决策是否应该受到 CTCs 水平的影响;恶性肿瘤合并其他疾病时(如

血管相关疾病) 是否影响外周血中循环肿瘤细胞的数目; CTCs 如何更好地用于精准和个性化医疗。

总之, 基于 CTCs 的液体活检作为一项新的检测技术, 被赋予改善当前肿瘤患者治疗的重要角色, 然而, 替代临床常规病理活检之前, 还需要进一步试验和质量标准化。

### 参 考 文 献

- [1] Cabel L, Proudhon C, Gortais H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 22(3): 421-430.
- [2] Hoosen Y, Pradeep P, Kumar P, et al. Nanotechnology and Glycosaminoglycans: Paving the Way Forward for Ovarian Cancer Intervention[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3). pii: E731.
- [3] Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2017, 7(1). pii: E12.
- [4] Jia LT, Zhang YC, Li J, et al. The role of human epididymis protein 4 in the diagnosis of epithelial ovarian cancer [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(3): 233-239.
- [5] Fan T, Zhao Q, Chen JJ, et al. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112(1): 185-191.
- [6] Gasparri ML, Savone D, Besharat RA, et al. Circulating tumor cells as trigger to hematogenous spreads and potential biomarkers to predict the prognosis in ovarian cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 71-75.
- [7] Romero-Laorden N, Olmos D, Fehm T, et al. Circulating and disseminated tumor cells in ovarian cancer: a systematic review[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 632-639.
- [8] 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): e130873.
- [9] Pearl ML, Dong H, Tulley S, et al. Treatment monitoring of patients with epithelial ovarian cancer using invasive circulating tumor cells (iCTCs)[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(2): 229-238.
- [10] Guo YX, Neoh KH, Chang XH, et al. Diagnostic value of HE4 + circulating tumor cells in patients with suspicious ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(7): 7522-7533.
- [11] Pearl ML, Zhao Q, Yang J, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 134(3): 581-590.
- [12] Rustin GJ, Bast RC Jr, Kelloff GJ, et al. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(11): 3919-3926.
- [13] Aktas B, Kasimir-Bauer S, Heubner M, et al. Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(5): 822-830.
- [14] Ning N, Zhan T, Zhang Y, et al. Improvement of specific detection of circulating tumor cells using combined CD45 staining and fluorescence in situ hybridization[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 433: 69-75.
- [15] Lavin PT, Mc Gee MM. Cyclophilin function in Cancer; lessons from virus replication[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2015, 9(2): 148-164.
- [16] Obermayr E, Castillo-Tong DC, Pils D, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in patients with ovarian cancer improves their prognostic significance -- a study of the OVCAD consortium[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 128(1): 15-21.
- [17] 董小丽. 循环肿瘤细胞中 ERCC1 基因表达在卵巢癌治疗和预后中的应用价值[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2017.
- [18] 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.
- [19] Kolostova K, Pinkas M, Jakobova A, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(5): 973-980.
- [20] 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]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(2): 361-365.
- [21] Martignetti JA, Camacho-Vanegas O, Priedigkeit N, et al. Personalized ovarian cancer disease surveillance and detection of candidate therapeutic drug target in circulating tumor DNA[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(1): 97-103.
- [22] Huebner H, Fasching PA, Gumbrecht W, et al. Filtration based assessment of CTCs and CellSearch® based assessment are both powerful predictors of prognosis for metastatic breast cancer patients [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 204.
- [23] Xu L, Mao X, Guo T, et al. The Novel Association of Circulating Tumor Cells and Circulating Megakaryocytes with Prostate Cancer Prognosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17): 5112-5122.
- [24] Zhang D, Zhao L, Zhou P, et al. Circulating tumor microemboli (CTM) and vimentin+ circulating tumor cells (CTCs) detected by a size-based platform predict worse prognosis in advanced colorectal cancer patients during chemotherapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 6.
- [25] Liu JF, Kindelberger D, Doyle C, et al. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(2): 352-356.
- [26] Behbakht K, Sill MW, Darcy KM, et al. Phase II trial of the mTOR inhibitor, temsirolimus and evaluation of circulating tumor cells and tumor biomarkers in persistent and recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 123(1): 19-26.
- [27] Chase DM, Chaplin DJ, Monk BJ. The development and use of vascular targeted therapy in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(2): 393-406.
- [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]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(3): 567-572.
- [29] 于露露. HPV16/18E6 癌蛋白、p16/Ki-67 表达与高危型 HPV 持续感染的关系及其在宫颈癌筛查中的应用评估[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [30] Ren J, Zhou ZL, Xu S, et al. Prognostic Significance of Cytokeratin 19 and Squamous Cell Cancer Antigen in Histologically Negative Sentinel Lymph Nodes of Cervical Squamous Cell Carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(9): 1679-1685.
- [31] Gogoi P, Sepehri S, Chow W, et al. Microfluidic-Based Enrichment and Retrieval of Circulating Tumor Cells for RT-PCR Analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1634: 55-64.

(收稿日期: 2018-03-15)

[本文编辑 王琳]