

DOI: 10.13376/j.cbls/2022055

文章编号: 1004-0374(2022)04-0477-07

循环肿瘤细胞在乳腺癌诊疗中的应用

马新寓^{1#}, 郑亚赏^{1#}, 周雪冰¹, 杨春宇¹, 任香善^{2,3*}

(1 延边大学医学院, 延吉 133002; 2 延边大学肿瘤研究中心, 延吉 133002;
3 国家民委重点实验室, 吉林省科技厅重点实验室, 延吉 133002)

摘要: 乳腺癌作为在女性中患病率最高的肿瘤, 其对患者造成的生命威胁不容忽视。乳腺癌复发率高、转移性强是导致患者死亡的重要因素, 而循环肿瘤细胞是启动远处转移的重要环节。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)作为液体活检技术的重要检测对象, 现已成为众多乳腺外科学者研究的热点。作为一种无创、可重复且具有代表性的液体活检技术, 循环肿瘤细胞检测在诊断病情、指导治疗以及判断乳腺癌患者预后情况等方面具有重要价值。该文主要针对循环肿瘤细胞在乳腺癌诊断及临床治疗中的作用展开阐述, 以为临床上乳腺癌的诊疗提供新方向。

关键词: 乳腺癌; 循环肿瘤细胞; 检测; 早期诊断; 治疗; 预后

中图分类号: R737.9 文献标志码: A

Application of circulating tumor cells in diagnosis and treatment of breast cancer

MA Xin-Yu^{1#}, ZHENG Ya-Shang^{1#}, ZHOU Xue-Bing¹, YANG Chun-Yu¹, REN Xiang-Shan^{2,3*}

(1 College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China; 2 Cancer Research Center of Yanbian University, Yanji 133002, China; 3 State Key Laboratory Of Civil Affairs/Key Laboratory of Science and Technology Department of Jilin Province, Yanji 133002, China)

Abstract: Breast cancer is the most prevalent tumor in women, and its threat to life can not be ignored. The high recurrence rate and strong metastasis of breast cancer are important factors leading to death. Circulating tumor cells (CTCs) are important steps to initiate distant metastasis. As an important detection object of liquid biopsy technology, circulating tumor cells have become a research hotspot of many breast surgeons. As a non-invasive, repeatable and representative liquid biopsy technology, circulating tumor cell detection is of great value in diagnosing the disease, guiding treatment and judging the prognosis of breast cancer patients. This article mainly focuses on the role of circulating tumor cells in the diagnosis and clinical treatment of breast cancer, so as to provide a new direction for clinical diagnosis and treatment of breast cancer.

Key words: breast cancer; circulating tumor cells; detection; early diagnose; treatment; prognosis

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤^[1], 严重威胁着女性身体健康及生活质量, 虽然科学的发展极大地推动了乳腺癌诊疗水平的提高, 但其造成的死亡人数仍触目惊心。恶性肿瘤的侵袭性行为以及乳腺癌患者对药物的耐受是造成死亡率居高不下的主要原因。目前, 用于乳腺癌诊断的乳腺活检在制定乳腺癌患者诊疗方案中扮演着重要的角色, 但也存在其局限性, 如一过性的创伤性取材及肿瘤异质

性使活检结果存在偏倚^[2-3]。近些年来, 因具备无创、整体性、可多次及实时获取等特点, 液体活检技术

收稿日期: 2021-10-05; 修回日期: 2022-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660609); 吉林省科技厅项目(20180101007JC)

#共同第一作者

*通信作者: E-mail: renxsh@ybu.edu.cn; Tel: 0433-2435092

在乳腺癌患者疗效监测、个体精准化治疗、预后评估等方面的作用愈发显著。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)作为液体活检过程中的重要检测对象,对残留癌细胞的检测、治疗效果的评估以及癌症预后的预测具有很强的可信度,并可以为癌症的治疗提供有效方案。以下就 CTCs 的生物学特征、检测技术,以及其在乳腺癌诊疗中的应用进行论述。

1 循环肿瘤细胞的生物学特征

CTCs 是指由于肿瘤组织自身不稳定或者受外界物理刺激,原发肿瘤细胞由原发灶或转移灶脱落进入局部毛细脉管系统,参与机体循环,进而整合到机体外周血循环中的一种肿瘤细胞亚群^[4]。它存在于许多实体瘤患者的血液中,是原发肿瘤转移到其他部位,从而造成患者死亡的最常见原因^[5]。虽然,目前的研究认为,释放到外周体循环中的 CTCs 半衰期极短,存活数量极少,具有易被全身性治疗消除以及非连续性释放等特点,但是一旦脱离了原发肿瘤的 CTCs 进入循环系统,成功逃避免疫监测且渗透到靶器官的微循环后,就可以在靶器官定植,从而实现肿瘤的转移^[6]。近些年来,学者们发现,CTCs 并不是一个单一的细胞种群,而是由具有不同表型、基因组和特性的细胞组成的异质细胞种群,包括休眠细胞、干细胞和发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的细胞^[7]。

恶性肿瘤具有侵袭性的重要原因之一是可以发生 EMT。EMT 是指上皮细胞转化为具有间充质表型的细胞,该过程通过下调各种细胞黏附分子(例如 E-钙黏蛋白)或上皮抗原(如上皮细胞黏附分子 EpCAM)来破坏细胞间的接触,从而使细胞失去紧密连接和顶-基底极性特征,导致肿瘤细胞运动性和侵袭性增强。随后,CTCs 必须恢复其上皮特征才能重新定植在靶器官中,这个过程称为间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET),是 EMT 的逆过程。

CTCs 的集体迁移和入侵是恶性肿瘤转移的重要模式,且 CTCs 有明显的表型异质性,在众多的 CTCs 表型中,只有少数具备“种子”的特性,即抗失巢凋亡、渗出、转化为播散细胞、对转移前生态位的高度适应性以及诱导血管生成和转移中基质形成的能力,这些细胞应被视为化疗的主要靶点。而 CTCs 最重要的特征之一就是在 EMT 和 MET 过

程中表现的表型异质性,确保它们能够成为转移“种子”^[8]。相关研究表明,肿瘤表面的配体(PD-L1)在大多数 CTCs 表面呈高表达^[9]。Wang 等^[10]提出 PD-L1 高表达的 CTCs 更容易与免疫细胞,如 Treg 和骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)等结合,PD-L1 可以介导 Treg 发挥免疫抑制作用,从而抑制免疫系统对 CTCs 的攻击。CTCs 和免疫细胞之间存在的这种相互作用使其更容易逃避免疫监测并在循环系统中存活。既往研究表明^[7,11],CTCs 的数量与乳腺癌的复发转移有关,但近些年来有研究发现,单个 CTC 同样也会导致转移。因此,准确、动态、实时性地获取 CTCs 的量及分布用于评估肿瘤动态和监测治疗具有重要的临床价值。

2 CTCs检测技术

目前,对 CTCs 的检测尚无金标准,使其无法广泛应用于临床,同时血液标本的复杂性也为 CTCs 的收集带来困难。因此,CTCs 检测技术需要更高的技术水准与要求。

2.1 CTCs的富集与分离

2.1.1 以形态学特点为原理的富集方法

目前,以形态为原理的富集方法主要包括密度梯度离心法、过滤法以及 Apo Stream 法。以往研究发现,相较于白细胞、血小板等其他血细胞,CTCs 的密度与它们不同,相较外周血单核细胞,它的浮力更小。正是利用这一特征,密度梯度离心法能够从全血细胞中分离出 CTCs。目前这一技术较为成熟的方法为 Once Quick 法,但国外研究报道,该方法阳性率较低,分离出的 CTCs 中可混杂较多的淋巴细胞。1964 年,研究发现,CTCs 比血细胞更大且结构和流速较稳定,随后 Vona 等开发出上皮肿瘤细胞大小分离(the isolation by size of epithelial tumor cells, ISET)技术,该技术应用直径孔为 8 μm 的过滤器对 CTCs 进行富集和细胞学检测,但该方法的缺点主要是因为并非所有的 CTCs 直径都大于 8 μm ,ISET 在提取 CTCs 的同时,也提取出许多血细胞,造成假阳性表现。Apo Stream 法则根据细胞电学特征,其缺点是需要初始的离心富集步骤,会造成部分 CTCs 的丢失。

2.1.2 以免疫学原理为基础的CTCs富集方法

迄今为止,通过免疫学技术富集 CTCs 是应用最广泛且最为成功的方法,CellSearch® 系统作为其代表性技术,通过免疫选择并特异性地与 CTCs

表达的肿瘤标记物相结合, 不仅能实现 CTCs 的富集, 而且可以对富集后的 CTCs 进行检测分析。CellSearch® 能对同时表现出 CD45 阴性, EpCAM 阳性, CK8/18 阳性或 CK19 阳性的 CTCs 进行识别捕获。但并非所有的 CTCs 均表达相应的标记物, 特别是三阴性乳腺癌细胞, 因此会丢失一部分不表达特定抗原的 CTCs。CellSearch® 的这种捕获技术是免疫亲和法, 通过肿瘤表面特异性表达的抗原与抗体结合, 属于体外捕获技术。与 CellSearch® 不同的是, CellCollector® 运用了全球首创的体内捕获稀有细胞的平台技术, 除了能用来捕获外周血上皮来源的 CTCs 外, 也可用于血液中其他稀有细胞的捕获。CellCollector® 利用 EpCAM 抗体捕获 CTCs, 以确保捕获的特异性和灵敏度, 其检测遵循 CTCs 经典判断标准并结合荧光染料抗体识别 CTCs。CellCollector® 的基本原理在于: 产品的功能区进入患者体内后, 因其具有特殊涂层, 即特有的专利涂层(黄金涂层+水凝胶涂层)能够有效避免非特异性结合白细胞的同时吸引 CTCs, 确保捕获的 CTCs 具有高特异性和高纯度, 并可将其特异性结合、分离, 具有更高的检出率^[12], 从而实现多样化下游检测分析。

近些年来, 利用纳米材料的富集方法在逐渐兴起。Liu 等^[13]将涂有针对癌细胞特定抗体的磁性纳米粒子(MNPs)放于 CTCs 免疫磁富集的环境中, 发现该方法可以达到富集 CTCs 的效果。但不同种群的癌细胞表面抗原对特定抗体的亲和力有很大的差异, 从而导致对靶点抗原检测的特异性和敏感性不高。靶点抗原的检测效率可以通过使用针对同一抗原的不同抗体来提高, 不同的抗体可以通过氨基-碳基凝结构将链球菌素与同一磁性纳米粒子结合, 间接附着在磁性粒子中, 以便使用多个标记来更有效地富集 CTCs。还有研究表明, 基于三角银纳米粒子(AgNPR)和超面磁铁氧化物纳米粒子(SPION)的超敏 CTCs 分析系统也具有富集 CTCs 的功能^[14]。

2.1.3 应用3D打印免疫磁浓缩仪富集CTCs

三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)发光分析是一种传统的计算细胞内 ATP 的方法。由于其具有灵敏度高、操作简便等优点, 被广泛应用于各类细胞的检测, 还可以用于肿瘤细胞化疗敏感性的测定和细胞活性的测定。然而, 因为血液中的 ATP 干扰了 CTCs 的检测, 所以它还没有被用于检测血液中的 CTCs。而最近有研究报道, 采用 ATP 发光法建立新的 3D 打印免疫磁浓缩仪(3D printed immunomagnetic concentrator, 3DPIC)可用于

血液中 CTCs 的富集和快速检测^[15]。由于其高纵横比结构和抗高流速, 3DPIC 可以使 10 mL 的癌细胞在几分钟内浓缩 100 倍, 比商用试剂盒检测 CTCs 浓度的灵敏度高出 10 倍左右, 这是首次使用 ATP 发光法检测血液中的癌细胞。这些结果表明, 3DPIC 可以提高 ATP 发光法检测 CTCs 检出限的可行性。

2.1.4 分离方法的选择

目前, 从全血中分离 CTCs 后的大多数可视化方法通常基于荧光抗体和染料染色。而这些方法缺乏关于 CTCs 形态的信息, 但基于细胞形态对于通过光学显微镜识别至关重要, 光学显微镜仍然是细胞病理学和组织学检查的金标准。Jesenko 等^[16]在临床前环境中评估了物理和生物分离技术对细胞形态的影响, 并使用常规细胞病理学实验室中使用的技术分析细胞形态, 观察到分离的 CTCs 的形态特征取决于分离技术。

生物分离技术依赖于细胞标记物的表达, Jesenko 等^[16]通过磁激活细胞分离(Miltenyi Biotec, MACS®)技术分离 CTCs, 发现通过该方法分离出的 CTCs 形态学并不完整, 临床上无法对其检测, 表明 MACS® 技术现阶段不适用于临床细胞病理学实验室。另一种被广泛应用的生物分离技术 CellSearch® 是目前 FDA 批准的唯一可以用于患者 CTCs 检测的技术, 其原理是利用细胞表面标志物 EpCAM 对 CTCs 进行分离, 该方法操作较简便并且可以分离出大量 CTCs。

物理分离技术则是通过 Parsortix® 系统实现的, 该系统可根据细胞的大小和变形性从全血中捕获稀有细胞, 可重复进行高效率的捕获。Parsortix® 系统是一种台式微流控装置, 该装置基于大多数癌细胞比外周造血细胞大得多的假设, 将大于 6.5 μm 的细胞捕获于其盒中, 这些通过尺寸依赖性富集到的细胞可以被冲洗并回收以进行进一步分析。

Jesenko 等^[16]证明, 与 MACS® 相比, Parsortix® 分离诱导的 CTCs 退化水平较低。而相关研究表明, 与 CellSearch® 分离得到的细胞相比, 用 Parsortix® 分离的 CTCs 更大, 这表明 Parsortix® 可能错过较小的 CTCs^[17]。同时, 该研究通过比较 Parsortix® 和 CellSearch® 对肿瘤细胞的回收效率发现, 平均而言, 与 Parsortix® 相比, CellSearch® 的回收量要高出 3.5 倍。

正是因为 CellSearch® 在 CTCs 分离时表现出的高覆盖率和 high 收获量, 使得这种生物分离技术更普及, 但是物理分离技术 Parsortix® 能收获更高质量

量形态的细胞,所以,当保留细胞的异质性比细胞收获量更重要时,这种尺寸依赖性的物理分离技术可以用作 CellSearch® 的替代方案。

2.2 CTCs检测分析

2.2.1 流式细胞技术

流式细胞技术 (flow cytometry, FCM) 以测量迅速、可进行多次测量为特点,是一种可以快速测量细胞或亚细胞结构的新型分析和分选技术。它的原理是肿瘤细胞特异性标志物能够与标记荧光物质的单克隆抗体相结合,染色后的肿瘤细胞可用流式细胞仪进行检测和分析。

2.2.2 免疫细胞化学方法

免疫细胞化学方法 (immunocytochemistry, ICC) 是目前对 CTCs 检测分析最常用的方法。该方法利用特定抗原和抗体特异性结合的免疫学原理与细胞化学结合,以直观性强、操作简单迅速、灵敏度高为特点,同时能够满足对 CTCs 形态的可视化要求,进而实现对 CTCs 相应抗原的定性和定位检测分析^[18]。但是,由于 CTCs 形态的多样性以及抗原表达的异质性,可能导致不同学者对结果的分析存在主观上的差异。

2.2.3 逆转录-聚合酶链式反应

逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 作为常用的 CTCs 分析技术,可以通过特异性地识别 CTCs 内的 RNA 来完成检测分析。有研究利用常规 RT-PCR 对选定的 CTCs 进行基因表达分析,发现这种方法虽然在一定程度上会破坏肿瘤细胞的固有形态,但是在 CTCs 的检测上具有可观的敏感度^[19-21]。并且,近年来有学者已利用 RT-PCR 技术证明了 CK19 阳性 mRNA CTCs 的存在与转移性乳腺癌 (metastatic breast cancer, MBC) 患者预后不良有关;且 MGB1 (mammaglobin 1) 阳性 mRNA CTCs 的降低可能有助于预测 MBC 患者对治疗 (例如肿瘤缩小) 的反应^[22-23]。

2.2.4 表面增强拉曼散射生物探针技术

为了有效检测 CTCs,有研究设计了以八面体氧化银 (Ag₂O) 纳米颗粒作为表面增强拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS) 平台,由于其良好的生物相容性、高分散性和显著的 SERS 活性,极大地提高了 CTCs 检测的灵敏度^[24]。该研究以 Ag₂O 为基础的高灵敏度 SERS 生物探针被证明能满足癌症患者外周血中罕见 CTCs 的检测要求,为新型基于半导体的 SERS 癌症诊断平台的开发提供了新的见解。

3 CTCs在乳腺癌诊疗中的应用与进展

3.1 CTCs与乳腺癌患者诊断与预后

为了评估 CTCs 在乳腺癌中的诊断价值,有学者招募了 366 名怀疑患有乳腺癌的女性和 30 名健康女性志愿者参与研究^[25]。将这些患者通过肿瘤的良好恶性分为乳腺癌和良性乳腺疾病两组,并将良性乳腺疾病患者与健康志愿者设为对照组,绘制受试者操作特征 (ROC) 曲线,以评估细胞分类系统在乳腺癌中的诊断效力。统计分析表明,CTCs 可用于区分乳腺癌患者、健康志愿者和良性乳腺疾病患者。CTCs 与患者的癌症分期、肿瘤大小、癌症类型 (侵袭性与非侵袭性) 和淋巴结转移有统计学关联。晚期肿瘤、TNM-T 期、浸润性肿瘤、淋巴结转移患者的 CTCs 较多。此外,在 Tis 和 T1~4 期的乳腺癌患者中,CTCs 检出占比分别为 0.50、0.82、0.91、1 和 1,表明 CTCs 能够作为乳腺癌筛查和分期的辅助手段,并为乳腺癌的早期诊断提供一定参考。

目前,不少研究证明 CTCs 在评估乳腺癌预后方面也有一定价值,早在 2014 年 *Lancet Oncology* 报道了一项临床研究,该研究涉及 20 个临床试验,总计纳入 1 944 例患有转移性乳腺癌的患者,治疗前通过 CellSearch® 计数后发现 CTCs 数目 > 5 个 /7.5 mL 的患者共 911 位。这些患者的无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 和总生存期 (overall survival, OS) 比治疗前 CTCs 数目 < 5 个 /7.5 mL 的患者更差。最近,很多国际专家达成共识,将 CTCs 计数作为 MBC 患者分期与分级的重要工具,该共识将每 7.5 mL 血液中含有 5 个 CTCs 作为分界点,≥ 5 个为 IV 期侵袭型 MBC, < 5 个为 IV 期懒惰型 MBC,进一步阐明了 CTCs 作为 MBC 患者预后标志物的重要价值^[26]。

对 CTCs 的进一步的研究表明,单凭其计数推测晚期乳腺癌患者预后的这种方式过于局限,相比于单一的 CTC,CTC 簇 (2~50 个 CTC 的细胞团) 的转移潜能更强,且 CTC 簇较大的患者死亡风险更高,同时,在治疗过程中患者血液中持续存在 CTC 簇也能够作为预测患者病情恶化的指标^[27]。

3.2 CTCs与乳腺癌新辅助化疗

目前,乳腺癌新辅助化疗 (neoadjuvant chemotherapy, NCT) 的临床价值已经得到了强有力的数据支持。早在 2014 年, *JAMA Oncology* 报道了一项涉及 NCT 的大型回顾性临床研究,结果显示 NCT 后乳腺肿瘤原发病灶和转移淋巴结达到病理完全

缓解 (pathologic complete response, pCR) 的患者, 其 10 年 OS 达到了惊人的 90%^[28]。目前, NCT 临床应用的主要不足是无法精确预测、实时、多元评价其疗效, 且 NCT 后临床评估与术后病理学评估缺乏一致性。

Azim 等^[29]发现, 对于人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阳性乳腺癌患者, CTCs 的检出意味着更低的 pCR 发生率。Pierga 等^[30]的试验发现, 通过使用 CellSearch® 系统检测富集 CTCs 后, 若患者在 NCT 前每 7.5 mL 血液中 CTCs ≥ 1 个, 其无病生存期 (disease free survival, DFS) 和 OS 均降低。

3.3 CTCs与乳腺癌辅助化疗

Shliakhtounou^[31]在最近的一项前瞻性研究中发现, 采用以 CTCs 为导向的个性化辅助治疗方法治疗非转移性乳腺癌, 可使 5 年 DFS 提高 7.4%, 5 年 OS 提高 11.6%。日本的一项临床研究将 148 例 HER2 阴性 MBC 患者随机分为两组, 一组使用卡培他滨联合多西他赛 (XT), 另一组序贯单药多西他赛, 疾病进展时使用单药卡培他滨 (T \rightarrow X)^[32]。使用 CellSearch® 系统计数后发现, 若患者每 7.5 mL 血液 ≥ 2 个 CTCs 时, 其 PFS 和 OS 较差, 且相较于 T \rightarrow X 治疗, 对该类患者使用 XT 联合治疗可以显示更好的 PFS 和 OS, 提示基线 CTCs 评估可能对 MBC 患者是否选择 XT 联合化疗有潜在的帮助作用。并且 Papadaki 等^[33]研究发现, 当部分患者 CTCs 具有干细胞和 EMT 特征时, 这些患者则很难从全身化疗中受益。

3.4 CTCs与乳腺癌免疫治疗

肿瘤免疫疗法是指应用免疫学原理, 特异性地清除肿瘤微小残留病灶、抑制肿瘤生长、打破免疫耐受的治疗方法, 该方法是通过激活体内的免疫细胞和增强机体抗肿瘤免疫应答实现的, 对肿瘤的治疗提供了很大帮助。并且越来越多的证据表明^[34], 乳腺癌特定的分子亚型, 如三阴性和 HER2 阳性亚型, 通常与免疫细胞的大量浸润相关, 这种相关性具有特定的预后和预测价值。在 KEYNOTE-086 研究中^[35], 与第二和后续治疗线中接受彭布罗利珠单抗的患者相比, 未经治疗的转移性三阴性乳腺癌 (mTNBC) PD-L1⁺ 患者的客观缓解率 (objective response rate, ORR) 增加。根据 KEYNOTE-119 试验, PD-L1 过度表达的患者在第二个和后续的治疗线中也表现出对彭布罗利珠单抗免疫治疗的良好反应。因此, 免疫治疗与化疗联合可能在局部晚期和 mTNBC 表

达 PD-L1 的未经治疗的患者中效果最为显著。虽然 PD-L1 作为乳腺癌生物标志物的临床意义尚未确定, 但最近通过 CellSearch® 系统分析发现 CTCs 经常表达 PD-L1^[36-37], 这为实时评估 PD-L1 状态提供了一种有用的非侵入性手段。

3.5 CTCs与乳腺癌内分泌治疗

内分泌治疗和化疗可作为雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 阳性、HER2 阴性 MBC 患者的一线治疗方法, 两种方法的选择基于患者不良预后相关的临床特征。在最近的研究中, Bidard 等^[38]招募了 778 名 ER 阳性、HER2 阴性 MBC 的成年患者, 对比了常规临床治疗和 CTCs 计数驱动治疗的效果。该研究在治疗方案实施之前, 对所有患者按照临床经验进行最佳治疗方案的评估, 随后, 患者被 (1:1) 随机分配为标准组 (临床医生驱动的治疗选择) 和 CTC 组 (CTC 驱动的治疗选择)。在标准组中, 患者根据临床医生的常规治疗方案进行治疗。而在 CTC 组中, 预先定义的常规临床治疗方案被取消, 利用 CellSearch® 系统对 CTCs 检测后, 根据 CTCs 的计数 (如果 < 5 CTCs/7.5 mL, 则 CTC 低, 如果 ≥ 5 CTCs/7.5 mL, 则 CTC 高) 选择患者的治疗方案: 若 CTC 低, 则进行内分泌治疗; 若 CTC 高, 则进行化疗。结果显示, CTC 组的中位 PFS 为 15.5 个月, 标准组为 13.9 个月; 并且, 38.7% 的患者经两种方法评估后选择的治疗方案不一致, 结果显示以 CTCs 计数作为治疗指导方案的患者有更长的 PFS。该随机临床试验的结果进一步证明了通过 CTCs 计数驱动治疗的可靠性和临床价值, 也表明了 CTCs 计数可以作为一种生物标志物, 用于指导临床医生对 ER 阳性、HER2 阴性 MBC 患者是否应该采取内分泌治疗。

还有一项研究对 36 例 ER 呈阳性且接受过内分泌治疗的乳腺癌患者通过 Maintrac® 分析法进行了 CTCs 的检测^[39]。研究发现, 在停止内分泌治疗后, 12 例 CTCs 增加的患者中有 8 例复发, 24 例 CTCs 稳定或减少的患者中只有 2 例复发。而恢复内分泌治疗后, 前者 CTCs 数量不再增加且没有患者在观察期内复发。该研究提示, 对于 CTCs 增加的 ER 阳性乳腺癌患者, 接受并延长内分泌治疗可能有望降低患者的复发转移率, 同时推测 CTCs 可成为预测延长内分泌治疗是否获益的标志物。

3.6 CTCs与乳腺癌靶向治疗

乳腺癌患者 HER-2 的表达状态在制定乳腺癌诊疗方案及判断其预后中的价值已经得到证实^[40]。

外国学者利用 CellSearch® 系统从 HER-2 阴性患者的外周静脉血中检出了 HER-2 阳性的 CTCs, 该研究进一步证实 CTCs 的 HER-2 表达与原发肿瘤的 HER-2 表达并非完全一致^[41]。同时, 有研究报道, 原发肿瘤中 HER-2 呈阴性的患者, 若 CTCs 能够表达 HER-2, 仍可从曲妥珠单抗治疗中获益^[40]。虽然目前已有的试验存在小样本、单中心等不足的问题, 并且对于 HER-2 阳性且接受曲妥珠单抗靶向治疗的患者, CTCs 的 HER-2 与原发肿瘤 HER-2 表达状态的差异能否影响曲妥珠单抗的耐药性仍需进一步研究, 但仍可为 HER-2 阴性乳腺癌患者的治疗提供一个更加精准化、个体化的思路。

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是缺乏靶向治疗的最具侵袭性和转移性的乳腺癌亚型之一, 也是乳腺外科诊疗中的难题。有学者发现, TNBC 患者外周血中表达表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的 CTCs 有很高的检出率^[42-43]。利用 CellSearch® 平台分析和流式细胞术检测后发现, 只有 24.4% 的早期 TNBC 患者中可以检测到 ER⁺PR⁺ 的 CTCs; 同时, 早期患者中只有 20% 可以检测到 CK⁺HER2⁺ 的 CTCs, 但在这些患者中有 40% 可以检测到 EGFR⁺ 的 CTCs。这一结果表明, EGFR⁺ 的 CTCs 明显优于其他表型。因此, 在 TNBC 患者中, CTCs 可能对 EGFR 靶向治疗具有独特的敏感性, 这也为 TNBC 患者的治疗提供一个潜在的治疗思路。

4 展望

2010 年第七版《Cancer Staging Manual》指南首次将 CTCs 列入 TNM 分期系统。随后, 在第八版指南中 CTCs 成为评估乳腺癌预后情况的又一大生物学指标, 其临床价值仅次于 HR、Her-2、Ki-67 和肿瘤组织学分级。同时, NCCN 指南分别于 2017 年、2019 年指出 CTCs 作为乳腺癌诊疗评估工具的重要价值。

未来, 精准化、个体化治疗将成为乳腺癌患者治疗的主旋律, CTCs 将会对乳腺癌患者的这种治疗方案起到有效的指导作用。正如 2019 版 CSCO 乳腺癌诊疗指南中提到, 利用 CTCs 建立个性化癌症治疗方案, 是实现乳腺癌精准治疗重要而可靠的途径。虽然, CTCs 大规模应用于临床仍有问题亟待解决, 如即使在各种癌症中 CTCs 的发生频率是已知的, 而对发生后存活的 CTCs 比例却知之甚少。但目前随着广大医疗工作者的投入, 大量临床研究

的开展, CTCs 必将有望成为乳腺癌治疗中开发靶向药物、影响临床决策和判断临床预后的重要生物标志物。

[参 考 文 献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70: 7-30
- [2] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquidbiopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 2014, 32: 579-86
- [3] Untch M, Jackisch C, Schneeweiss A, et al. Nab-paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer (Gepar Septo - GBG 69): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2016, 17: 345-56
- [4] Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*, 2016, 10: 374-94
- [5] Zhong X, Zhang H, Zhu Y, et al. Circulating tumor cells in cancer patients: developments and clinical applications for immunotherapy. *Mol Cancer*, 2020, 19: 15
- [6] Park HA, Brown SR, Kim Y. Cellular mechanisms of circulating tumor cells during breast cancer metastasis. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5040
- [7] Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): the 'fittest' for metastasis? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1870: 151-7
- [8] Liu X, Li J, Cadilha BL, et al. Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav4275
- [9] Tan Z, Yue C, Ji S, 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. *Oncologist*, 2021, 26: e2227-e2238
- [10] Wang X, Sun Q, Liu Q, et al. CTC immune escape mediated by PD-L1. *Med Hypotheses*, 2016, 93: 138-9
- [11] Harner-Foreman N, Vadakekolathu J, Laversin SA, et al. A novel spontaneous model of epithelial-mesenchymal transition (EMT) using a primary prostate cancer derived cell line demonstrating distinct stem-like characteristics. *Sci Rep*, 2017, 7: 40633
- [12] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, 450: 1235-9
- [13] Liu P, Jonkheijm P, Terstappen LWMM, et al. Magnetic particles for CTC enrichment. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 3525
- [14] Ruan H, Wu X, Yang C, et al. A supersensitive CTC analysis system based on triangular silver nanoprisms and SPION with function of capture, enrichment, detection, and release. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 1073-82
- [15] Park C, Abafogi AT, Ponnuruvelu DV, et al. Enhanced luminescent detection of circulating tumor cells by a 3D printed immunomagnetic concentrator. *Biosensors (Basel)*, 2021, 11: 278
- [16] Jesenko T, Modic Z, Kuhar CG, et al. Morphological features of breast cancer circulating tumor cells in blood after physical and biological type of isolation. *Radiol Oncol*, 2021, 55: 292-304

- [17] Philippon A, Depypere L, Oeyen S, et al. Evaluation of a marker independent isolation method for circulating tumor cells in esophageal adenocarcinoma. *PLoS One*, 2021, 16: e0251052
- [18] 潘印, 陈琪, 卢洪胜, 等. 外周血循环肿瘤细胞检测在乳腺癌转移监测及个体化治疗中的应用价值. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28: 435-7
- [19] 杨贵森, 周毅, 袁双龙. 乳腺癌循环肿瘤细胞临床应用的相关研究. *临床外科杂志*, 2016, 24: 717-9
- [20] Tong X, Yang L, Lang JC, et al. Application of immunomagnetic cell enrichment in combination with RT-PCR for the detection of rare circulating head and neck tumor cells in human peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007, 72: 310-23
- [21] Fellowes VS, Husebekk A, Gress RE, et al. Minimal residual disease detection in breast cancer: improved sensitivity using cytokeratin 19 and epidermal growth factor receptor RT-PCR. *Int J Oncol*, 2004, 24: 861-7
- [22] Park HS, Han HJ, Lee S, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients using cytokeratin-19 real-time RT-PCR. *Yonsei Med J*, 2017, 58: 19-26
- [23] Reinholz MM, Kitzmann KA, Tenner K, et al. Cytokeratin-19 and mammaglobin gene expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients enrolled in North Central Cancer Treatment Group trials, N0234/336/436/437. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 7183-93
- [24] He M, Lin J, Akakuru OU, et al. Octahedral silver oxide nanoparticles enabling remarkable SERS activity for detecting circulating tumor cells. *Sci China Life Sci*, 2022, 65: 561-71
- [25] Jin L, Zhao W, Zhang J, et al. Evaluation of the diagnostic value of circulating tumor cells with CytoSorter® CTC capture system in patients with breast cancer. *Cancer Med*, 2020, 9: 1638-47
- [26] Cristofanilli M, Pierga JY, Reuben J, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): international expert consensus paper. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 134: 39-45
- [27] Costa C, Muínelo-Romay L, Cebey-López V, et al. Analysis of a real-world cohort of metastatic breast cancer patients shows circulating tumor cell clusters (CTC-clusters) as predictors of patient outcomes. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 1111
- [28] Mougalian SS, Hernandez M, Lei X, et al. Ten-year outcomes of patients with breast cancer with cytologically confirmed axillary lymph node metastases and pathologic complete response after primary systemic chemotherapy. *JAMA Oncol*, 2016, 2: 508-16
- [29] Azim HA Jr, Rothé F, Aura CM, et al. Circulating tumor cells and response to neoadjuvant paclitaxel and HER2-targeted therapy: a sub-study from the NeoALTTO phase III trial. *Breast*, 2013, 2: 1060-5
- [30] Pierga JY, Bidard FC, Autret A, et al. Circulating tumour cells and pathological complete response: independent prognostic factors in inflammatory breast cancer in a pooled analysis of two multicentre phase II trials (BEVERLY-1 and -2) of neoadjuvant chemotherapy combined with bevacizumab. *Ann Oncol*, 2017, 28: 103-9
- [31] Shliakhtunou YA. CTCs-oriented adjuvant personalized cytostatic therapy non-metastatic breast cancer patients: continuous non-randomized prospective study and prospective randomized controlled study. *Breast Cancer Res Treat*, 2021, 186: 439-51
- [32] Iwata H, Masuda N, Yamamoto D, et al. Circulating tumor cells as a prognostic marker for efficacy in the randomized phase III JO21095 trial in Japanese patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 162: 501-10
- [33] Papadaki MA, Stoupis G, Theodoropoulos PA, et al. Circulating tumor cells with stemness and epithelial-to-mesenchymal transition features are chemoresistant and predictive of poor outcome in metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18: 437-47
- [34] Winer EP, Lipatov O, Im SA, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-119): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2021, 22: 499-511
- [35] Adams S, Loi S, Toppmeyer D, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, 2019, 30: 405-11
- [36] Mazel M, Jacot W, Pantel K, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol*, 2015, 9: 1773-82
- [37] Strati A, Koutsodontis G, Papaxoinis G, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*, 2017, 28: 1923-33
- [38] Bidard FC, Jacot W, Kiavue N, et al. Efficacy of circulating tumor cell count-driven vs clinician-driven first-line therapy choice in hormone receptor-positive, ERBB2-negative metastatic breast cancer: the STIC CTC randomized clinical trial. *JAMA Oncol*, 2021, 7: 34-41
- [39] Pachmann K, Schuster S. The value of monitoring the behavior of circulating tumor cells at the end of endocrine therapy in breast cancer patients. *Cancers (Basel)*, 2018, 10: E407
- [40] Deutsch TM, Riethdorf S, Fremd C, et al. HER2-targeted therapy influences CTC status in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 182: 127-36
- [41] Jaeger BAS, Neugebauer J, Andergassen U, et al. The HER2 phenotype of circulating tumor cells in HER2-positive early breast cancer: a translational research project of a prospective randomized phase III trial. *PLoS One*, 2017, 12: e0173593
- [42] Agelaki S, Dragolia M, Markonanolaki H, et al. Phenotypic characterization of circulating tumor cells in triple negative breast cancer patients. *Oncotarget*, 2017, 8: 5309-22
- [43] Liu X, Adorno-Cruz V, Chang YF, et al. EGFR inhibition blocks cancer stem cell clustering and lung metastasis of triple negative breast cancer. *Theranostics*, 2021, 11: 6632-43