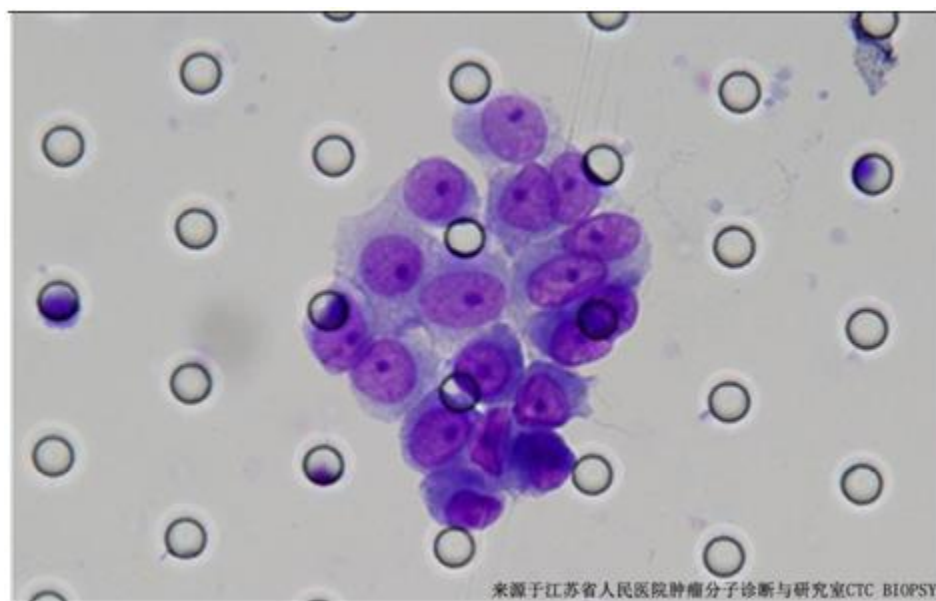


CTCs 和 CTMs 在癌症检测中的应用

外周血循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cell, CTC): 在肿瘤形成和进展过程中从原发灶或转移灶脱落进入血液循环的肿瘤细胞，能够真实反映肿瘤负荷，具有发展为转移病变的潜力。CTC 在血液中比率低 ($1/10^6$ - 10^7)。特性：比血细胞及正常组织细胞大；细胞核大，不规则，核质比高；不易发生形变。

循环肿瘤微栓子(Circulating Tumor Microemboli, CTM): 存在于血液循环系统中，由 3 个及以上 CTC 细胞聚集在一起的细胞团块。



血液循环中的肝癌微栓子

1. CTCs 和 CTMs 的异质性及临床检测应用：

- 1、细胞表面抗原表达差异
- 2、携带不同的分子信息
- 3、转移潜力差异
- 4、形态：单细胞 CTCs，CTM 细胞团和血小板包裹的 CTCs
- 5、类别：上皮细胞表型，间质细胞表型，上皮间质混合表型，成团的 CTMs
- 6、CTCs 检测的临床可行性：便捷，无创，实时检测
- 7、CTC 检测的优点：实时，方便，及时，准确，微创
- 8、10ml 血液中只有几个到几十个 CTCs，而有上亿个白细胞和 500 亿的红细胞，因此需要富集和鉴定？

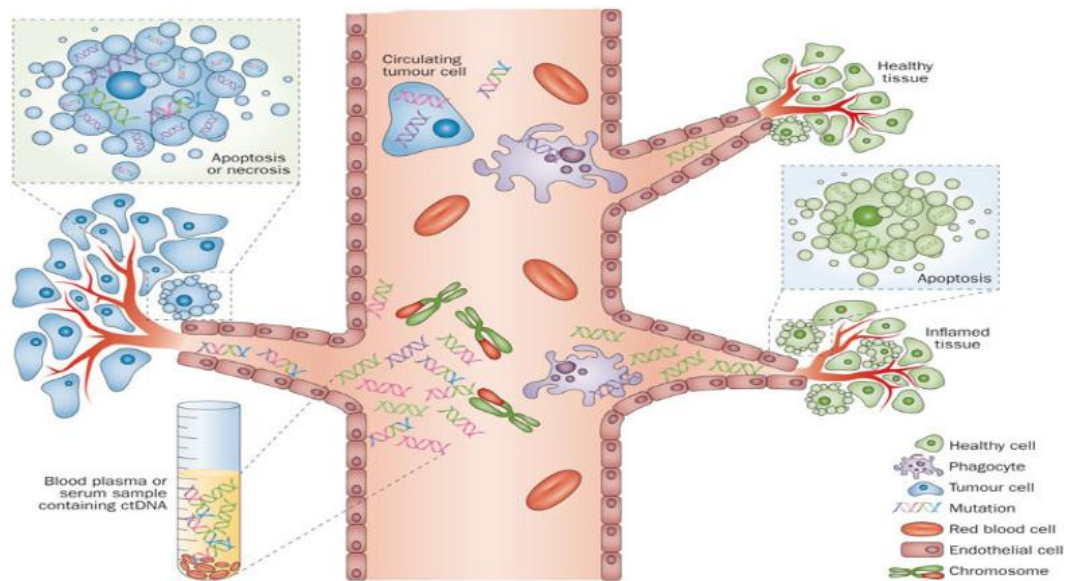
富集法：靶细胞-抗抗原抗体-磁珠法：阳性富集（Cellsearch 系统/MACS CellSeparation 系统）：EpCAM (CD326)，不能捕获到间质细胞；阴性富集(Cyttl/Cytelligen 系统，CD45 磁珠)：可检测出 EpCAM 及 CK 阴性的 CTC 细胞，但复杂，CTC 易丢失。

负性筛选：

滤膜法 (ISET)：采用 8um 聚碳酸酯膜，能捕获到 CTCs，CTMs，但只对 8um 以上的 CTC 有效。而神经内分泌瘤不能用。

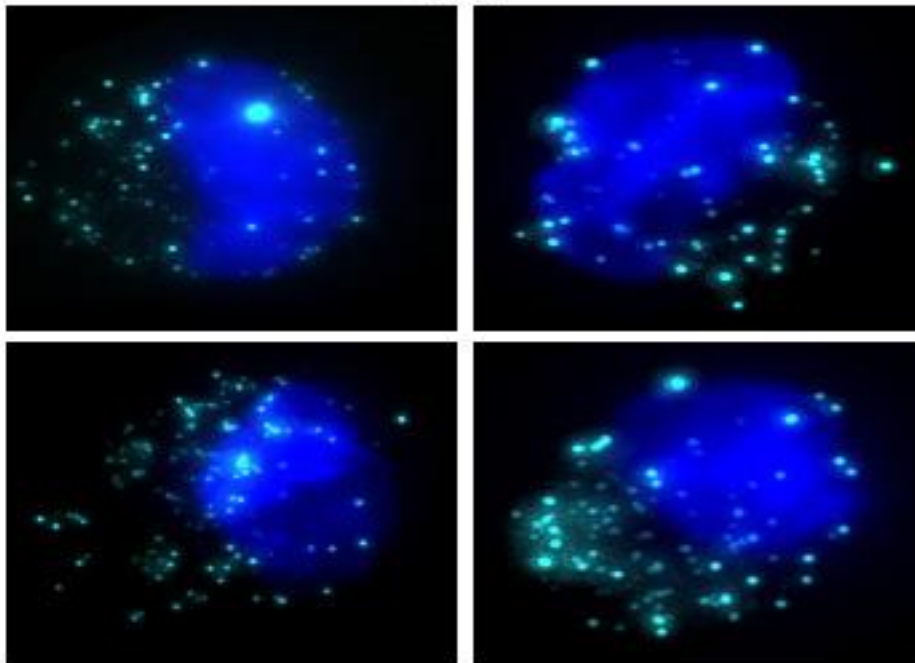
密度梯度离心法: **OncoQuick 系统**, 经过滤膜, CTCs 留在介质层中。细胞分层, 会丢失 CTCs。35ml 血。

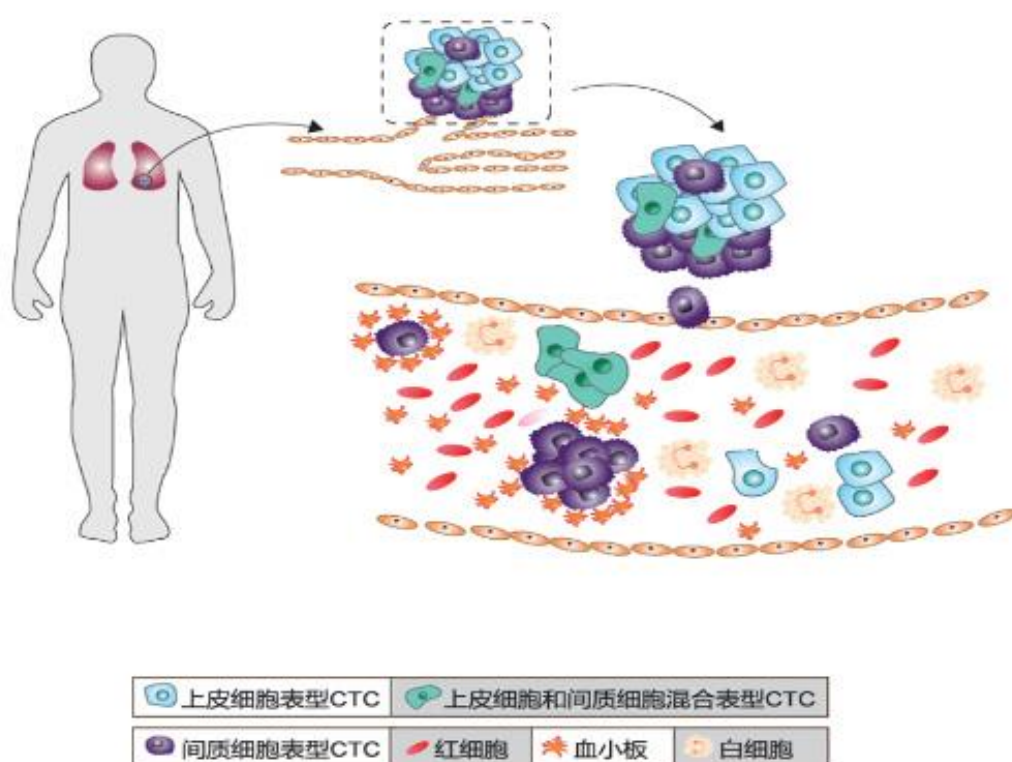
流式细胞术: 采用不同荧光素标记 CD45 、 EpCAM 分离。需要血量多。



液体活检样本之CTCs

CTCs

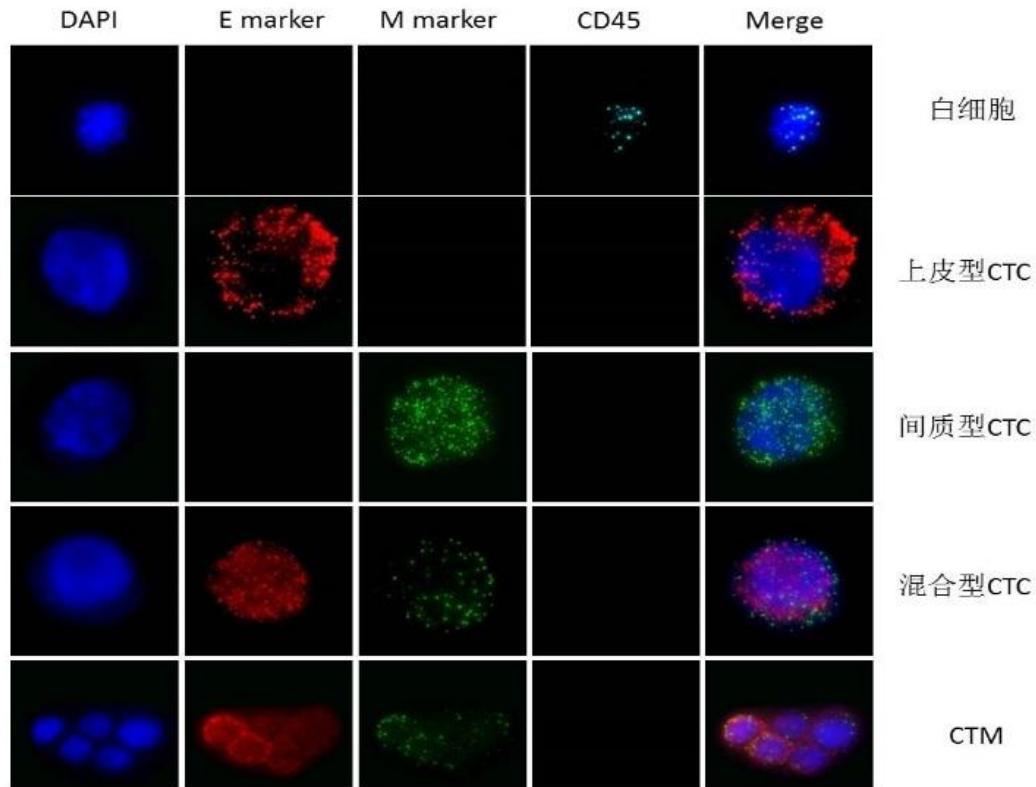




CTCs的检测方法及代表技术产品

原 理	技术产品
免疫捕获法(根据细胞表面标志物)	阳性富集法： •Cellsearch系统 •CTC芯片 (CTC-chip) •MACS® Cell Separation
	阴性筛选法： •Easy Sep •Cytte1
过滤法(根据细胞大小)	ISET膜过滤
密度梯度离心 (根据细胞密度)	OncoQuick分离体系
流式细胞检测法	无

同步实现CTCs鉴定与分型

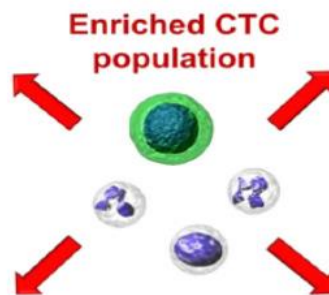
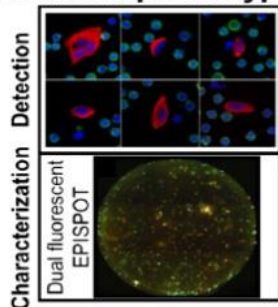


75

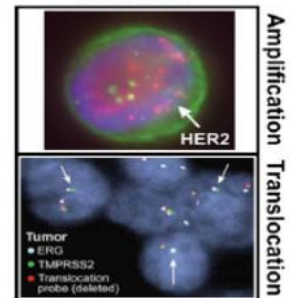
临床实践亟需新技术实现CTCs

分离、分型、分析

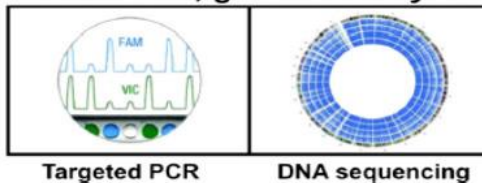
1. Immunophenotyping



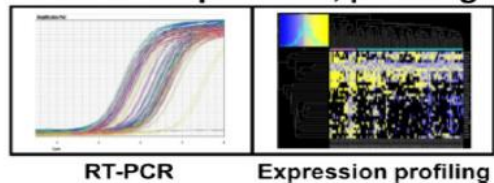
2. FISH

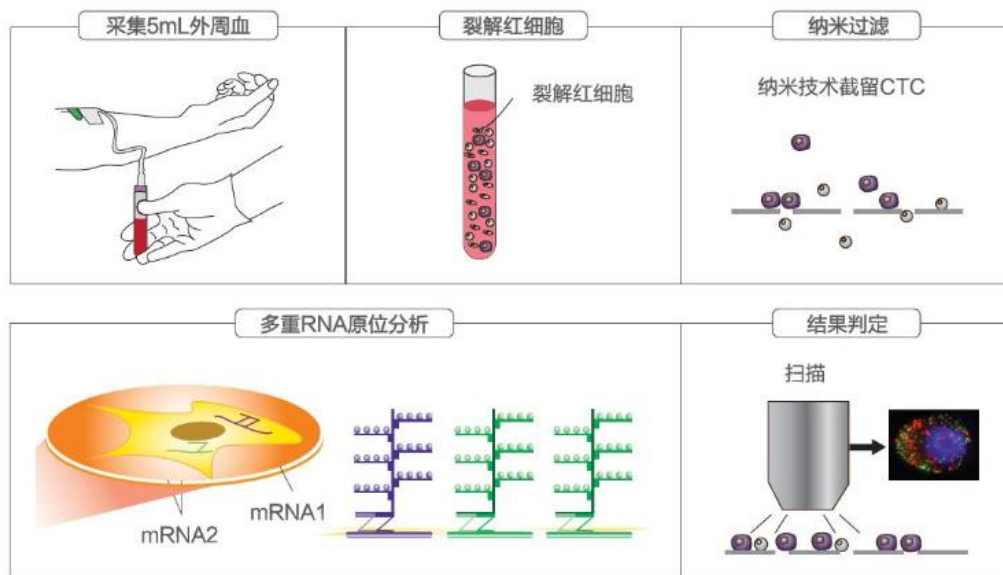


3. Mutation, genome analysis



4. Gene expression, profiling





先分离后鉴定，采用上皮+间质标志物进行鉴定，不同表型的CTC均能检出。

CanPatrol二代CTC检测技术

- **高效**分离所有类型CTCs

- 采用特制纳米滤膜，且不依赖于特定的上皮标志物，可高效、全面分离所有类型CTCs

- 适用于**绝大多数**实体瘤

- 采用国际公认8μm孔径滤膜法截留CTCs，适用于绝大多数实体瘤

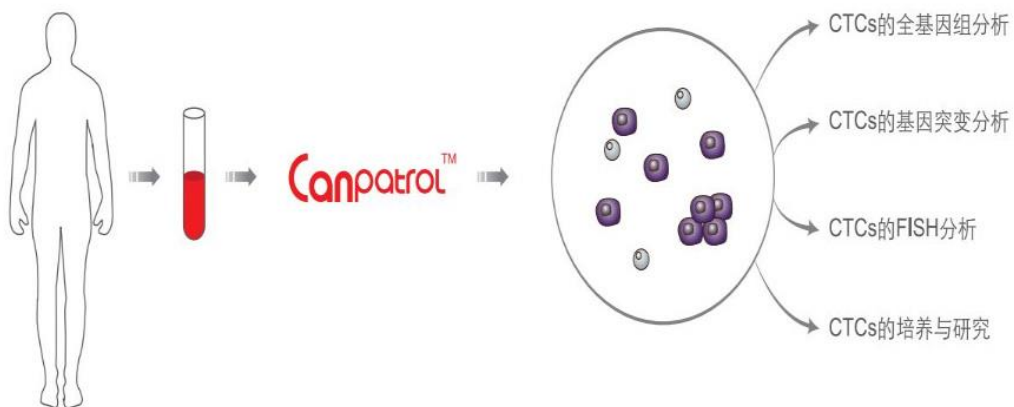
- **最大程度保留**原始信息：

- 物理法（过滤）使CTCs形态及分子信息保存完整，利于深入分析

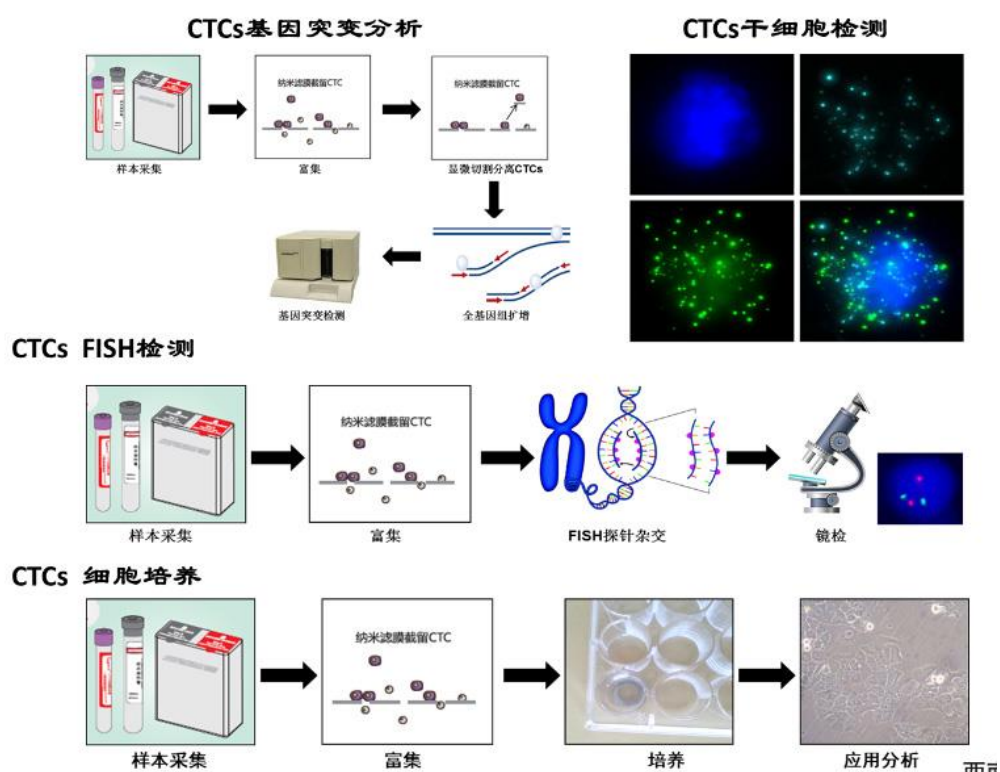
- **唯一**实现分型分析的CTC检测技术：

- 高灵敏度RNA-ISH技术，结合上皮、间质两组特异性RNA探针，实现CTCs精准分型

Canpatrol™ : CTCs的全面深入分析



Canpatrol™ : CTCs的全面深入分析



CanPatrol技术特点和创新

		一代技术	CanPatrol™ 二代技术
方法		免疫捕获法	RNA原位杂交结合纳米过滤技术
原理		1. 运用抗体与CTCs表面特异抗原结合的生物学原理； 2. 依赖特异生物标志物。	1. 运用RNA原位杂交和纳米过滤技术有机结合的原理； 2. 不依赖特异生物标志物。
CTCs分离	总回收率	26%-85%	>80%
	CTM	只能分离部分类型的CTM	能分离所有类别的CTM
	EMT CTC	只能分离个别类型的EMT CTC	能分离所有类别的EMT CTCs
CTCs分型		不能分型	能进行形态分型、细胞分型、分子分型
CTCs分析		只能分析个别类型的CTC	能分析所有类别CTCs
CTCs细胞培养		只能培养个别类型的CTC	能培养所有类别的CTCs

常见CTCs一代检测技术的比较

技术	优势	局限性	阳性率	样本量	参考文献
Cellsearch	特异性好、重复性好、可自动化	不能分型、漏检转移侵袭能力较强的间质型CTCs及CTM	71% (MBC) 47% (MCRG) 78% (AIPC)	7.5mL	N Engl J Med. 2004, 351:781-91. J Clin Oncol. 2008, 26:3213-3221. Clin Cancer Res. 2008, 14:6302-6309.
CTCs-chip (HB-chip)	特异性好、灵敏度高、HB芯片可富集到CTM	不能分型、漏检转移侵袭能力较强的间质型CTCs	93%(MPC)	0.9-5ml	PNAS. 2010, 107: 18392-18397
Cytel	可检测出EpCAM、CK阴性的CTC、未对CTC进行任何标记	不能分型、鉴定不稳定、鉴定时易发生CTCs丢失	64.5%(NSCLC)	5mL	周小昉. 癌症进展. 2010, 8(5): 484-490.
ISET膜过滤	CTC丢失少、适用于CK阴性肿瘤、适用于形态学、免疫学和基因特异性分析	不适合小神经内分泌肿瘤细胞、特异性低、残留大的白细胞	>80% (BC)	1-15ml	Clin Cancer Res. 2010, 16(20): 5011-5018.

CTCs检测技术小结

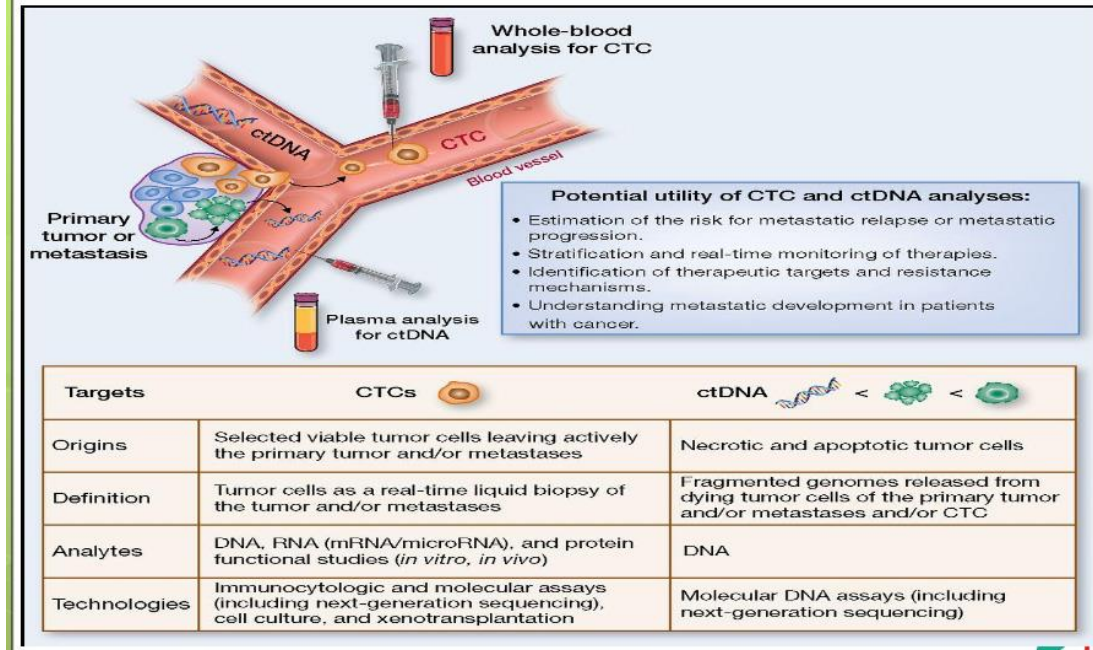
- 基于免疫捕获原理（如以EpCAM等抗体进行阳性筛选）的技术，富集获得的CTC纯度较高，但多项研究均发现该类方法很容易漏掉那些最具有侵袭潜能的肿瘤细胞（间质型CTCs及CTM）；
- 阴性筛选法鉴定不稳定，不能进行分型，同样会发生CTCs丢失；
- 密度梯度离心法也会发生CTCs及CTM的丢失；
- 研究证明ISET法对间质型CTCs及CTM的富集效果比免疫捕获法好。ISET法亦会丢失CTCs，主要是直径小于滤膜孔径的CTC，和存活状态不好甚至是因凋亡而萎缩的CTCs，因此其丢失的大部分CTC是侵袭性较弱的。ISET法的另一个不足是获得的CTC纯度较低，但结合第二种富集参数可显著提高纯度；
- **CanPatrol**唯一实现CTCs全面分离、精准分型和系统分析的二代CTC检测技术；



CanPatrol-CTCs高效捕获

癌种	例数	阳性例数	阳性率	中位值	均值±SD	CTCs范围
非小细胞肺癌	330	286	87%	4	9±19	0-240
肝癌	511	395	77%	4	8±11	0-83
结直肠癌	302	240	79%	3	6±9	0-76
乳腺癌	218	184	84%	4	8±11	0-120
胃癌	148	128	86%	5	8±9	0-46
鼻咽癌	125	96	77%	2	4±6	0-33
宫颈癌	157	41	72%	4	7±11	0-62
肾癌	145	98	67%	2	3±4	0-52
膀胱癌	98	77	83%	2	6±13	0-43
前列腺癌	86	69	80%	3	4±4	0-32
食管癌	29	27	93%	5	8±9	0-43
骨肉瘤	37	33	89%	6	14±20	0-95
胰腺癌	21	18	86%	4	9±11	0-36
子宫内膜癌	12	12	100%	6	7±8	1-29
头颈癌	26	21	81%	2	3±5	0-23
卵巢癌	11	9	82%	2	3±2	0-7
黑色素瘤	6	6	100%	5	11±11	3-26
肠癌	5	4	80%	6	5±4	0-11
恶性淋巴瘤	5	3	60%	1	10±21	0-48
甲状腺癌	6	5	83%	2	3±2	0-7
胸腺癌	6	6	100%	4	7±8	1-21
间质瘤	2	2	100%	7	7±6	3-11
口腔癌	1	1	100%	13	—	13
壶腹癌	3	3	100%	9	12±12	2-26
胆管癌	2	2	100%	4	4±3	2-6
恶性纤维组织细胞瘤	2	2	100%	2	2±1	1-3
肉瘤	8	7	88%	4	5±5	0-12
脑瘤	8	8	100%	5	8±9	2-27
其他癌种	77	60	78%	4	6±9	0-46
共计	2554	2094	82%	4	7±12	0-240

CTCs助力肿瘤实时个体化治疗



并非存在于肿瘤患者外周血中的 CTC/CTM 均可成瘤。有研究者将那些能够导致复发和形成远端转移灶能转移灶的 CTC/CTM 称为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)。它保留了干细胞的特性,具有不断更新、无限增殖的特性,这个特性会导致外周血循环过程中肿瘤细胞成瘤可能的增加。

1. CTC/CTM 检测在肝癌肝移植中的应用

在肿瘤的早期复发转移过程中,无论是血清甲胎蛋白(AFP)还是影像学都不能及时反映出患者的早期复发转移情况,一旦通过血清 AFP、影像学等诊断发现复发转移病灶往往为时已晚,临床治疗难度增加,治疗疗效变差。

移植受体术后服用免疫抑制剂,并长期处于免疫抑制状态,使得 CTC 凋亡数量减少,存活率增加,从而导致肝癌肝移植术后复发及远端转移的可能性也随之增加。选择较低水平的 CTC 患者作为移植受体可能是降低肝癌肝移植术后复发转移率的关键。

2. CTC/CTM 的检测手段

CTC 富集主要技术主要包括根据细胞表面标志物的免疫磁珠法(MACS)、根据细胞密度的密度梯度离心法(DGC)、CTC-chip 微流控芯片技术以及根据细胞大小的过滤法(ISET)。

目前临床上应用较多的是 ISET 膜过滤法, ISET 法可完整分离上皮型 CTC、间质型 CTC 和 CTM, 90%以上的恶性肿瘤均来源于上皮,而上皮细胞的生物特性与其他血细胞的生物特

性截然不同，因此可利用这些差别来实现 CTC 的检测。且该方法 CTM 检出率较高。

根据上文所述，CTM 成瘤性远高于 CTC。与单个 CTC 相比，CTM 癌症转移的可能性可呈 50 倍增加。联合检测 CTC 和 CTM 对拟行肝移植术的肝癌患者进行术前检查，为通过预后评估决定是否进行肝移植术提供了一种新的诊断方法，从而合理选择治疗方案，优化现有的肝癌肝移植的标准，提高肝癌肝移植的疗效。在当前全球供体器官严重短缺的情况下，保证了宝贵的供肝资源得到公平合理的应用，对减少肝癌肝移植等待期的死亡数、降低原发性肝癌肝移植术后的复发转移率显得极为重要。