

循环肿瘤细胞在肝细胞癌诊疗的研究进展

陈猛, 陈晓明, 许荣德, 麦启聪

广东省人民医院肿瘤介入科, 广东 广州 510000

【摘要】 循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是指经过自发或因临床诊疗操作由肿瘤病灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞,发生于肿瘤发展全过程,与恶性肿瘤治疗后复发或转移显著相关。CTC检测逐渐成为一种新颖的液体活检技术,有望在对肝恶性肿瘤的早期诊断、指导分期、监测复发转移与预后评估等方面的超越传统影像或血液检测,为肝恶性肿瘤的综合诊疗提供更有力的科学参考。

【关键词】 循环肿瘤细胞; 肝恶性肿瘤; 检测; 分型

Research progress of circulating tumor cells in the comprehensive treatment of Hepatocellular carcinoma

CHEN Meng, CHEN Xiao-ming, XU Rong-de, MAI Qi-cong

Interventional Department, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510000, China

【Key words】 Circulating tumor cells (CTC) refer to tumor cells that are released from the tumor lesions into the peripheral blood circulation through spontaneous or clinical diagnosis. They occur in the whole process of tumor development and associate with recurrence or metastasis after treatment of malignant tumors significantly. CTC detection has become a novel liquid biopsy technique gradually, which is expected to provide a more powerful scientific reference for comprehensive diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma, like guidance of tumor staging, monitoring recurrence or metastasis and prognosis evaluation of hepatocellular carcinoma.

【Key words】 Circulating tumor cells; Hepatocellular carcinoma; Diagnosis; Classification

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一^[1],原发性肝癌在全世界肿瘤发病率居第六位,肿瘤相关的死亡人数中居第二位,其中一半的新发病例和死亡病例出现在中国^[2]。其发病隐匿,且在根治性术后高复发率及转移率是制约患者总体疗效的重要因素。据统计,根治性切除术后5年的复发率为61.5%,而大肝癌(肿瘤直径 ≥ 5 cm)的复发率则超过80%,即使是小肝癌,5年复发率也高达43.5%^[3]。

然而对肝细胞癌的早期诊断、治疗后预后判断和随访监测一直是学界的难题之一。传统影像(CT、MR、pet-CT、超声等)需要在实体肿瘤复发或转移后才能察觉,且对小病灶缺乏敏感性;AFP、肝功能等灵敏度及特异性欠缺;DSA或穿刺活检等是有创检查,操作困难,且可重复性差。可见以上检测手段均有各自较大的局限性,无法提前预测肿瘤的进展,导致大多数患者错过治疗的最佳时机,因此临床迫切需要对肝癌复发或转移具有较为精确预测价值的指标。循环肿瘤细胞是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,其生成贯穿于

肿瘤发生发展全过程^[4],有望在术后发生复发或转移前预判肿瘤进展情况,为及时治疗提供科学依据。以下将为循环肿瘤细胞在肝恶性肿瘤中的研究进展做一综述。

1 CTC的产生

上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤细胞从病灶脱落进入血液的必经步骤,是肿瘤细胞获得转移能力、耐药性、干细胞特性的关键过程^[5]。Qi等^[6]为了阐明循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)在肝细胞癌(HCC)患者中经历上皮-间质转化(EMT)的重要性,分析鉴定了67个参与癌症相关生物途径(例如,细胞粘附和迁移、肿瘤血管生成和细胞凋亡等)的癌症相关基因,发现BCAT1过表达可能会触发EMT诱导CTC释放,可能是HCC复发或转移的重要生物标志物。另外Lee等^[7]称TM4SF5在HCC转移期间与CD133+/TM4SF5+/CD44+(TM4SF5-结合)/ALDH+/CD24-等互相互作用,具有促进EMT的发生,介导CTC自我更新的作用。

肝恶性肿瘤患者CTC在经过EMT过程后进入血液循环系统,然而体内循环血管系统复杂,CTC在不同血管系统内含量并非一致,Sun YF等^[8]在73例HCC患者中,在肿瘤切除前从外周静脉(PV)、外周动脉(PA)、肝静脉

作者简介:陈猛,在读医学硕士, E-mail:ICEchenmeng@outlook.com

通讯作者:陈晓明,主任医师, E-mail:cxmdj@sina.com

(HV)、下腔静脉(IHVC)和门静脉(PoV)中分别抽取血液,发现原发肿瘤中的EMT活化程度与HV中的总CTC数量呈正相关,随访分析表明CTC在肝静脉和外周循环中的负荷分别预测术后肺转移和肝内复发。此外,CTC在循环系统中亦可发生失巢凋亡或被免疫细胞吞噬。中期因子(midkine,MK)通过中期因子激活的间变性淋巴瘤激酶(ALK)激活PI3K/Akt/NF- κ B/TrkB信号传导通路在CTC抗失巢凋亡中起到了重要作用,中期因子升高的HCC患者具有更高的CTC计数和更少的CTC凋亡,以及更高的复发率和更短的无复发间隔^[9]。

2 CTC的检测

CTC以单个细胞或细胞团(Circulating Tumor Microemboli,CTM)的形式存在于循环系统中,大部分CTC在外周循环的过程中发生凋亡,或直接被免疫细胞吞噬,只有少数能逃逸并发展成为转移灶,因此分离、鉴定和研究最具转移潜能的是广泛应用CTC的关键。

在CTC检测方面,通常使用免疫化学法、核算分析法和流式细胞术,但均存在一定的局限性。Veridex公司开发CellSearch系统是一种半自动化的CTC检测系统,其将富集和检测的技术结合,通过磁珠标记的上皮细胞粘附分子(EpCAM)与外周血肝癌CTCs标记物相结合,利用结合荧光染料的抗-细胞角蛋白(CK)8,18/19,抗-CD45以及细胞核DAPI荧光染色试剂共同识别CTCs。CellSearch系统是目前美国FDA唯一承认的CTC检测系统,但Sanchez-Lorencio研究指出IsoFlux系统可能比CellSearch系统更加适用于CTC检测,具有更高的灵敏度^[10]。

另外,Guo等^[11]提出将负性富集和qRT-PCR结合为基础的CTC检测平台具有较高的灵敏度、特异性和重现性,以及低样品量要求,并且与CellSearch系统表现出76.7%的一致性。Zhang等^[12]提出基于其膜上表达的脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)与其配体的相互作用去分离肝癌患者CTC,可使人工CTC血样的捕获率超过85%,并可使CTC在三维细胞培养测定中扩增形成球状结构,利用该培养试验可以有效地测试释放的CTC对靶向药物或化疗药(索拉非尼或奥沙利铂)的敏感性。

3 CTC分型及其意义

CTC根据是否发生EMT转换可分为间质型、混合型 and 上皮型。Liu和Wang等发现^[13,14]间质表型CTC可能是肝外转移的重要因素,混合表型CTC与肝内转移与肝外转移关系密切,而上皮表型CTC则与肝癌原发病灶大小相关,CTM和间质型CTC与单个普通CTC相比,与预后的相关性可能更强。Ou等^[15]从接受根治性手术前的165例HCC患者中获取外周血样本,发现间质型CTC与高AFP水平、多发肿瘤、晚期TNM、BCLC分期、栓子或微栓子的存在以及早期复发显著相关($P<0.05$);间质型CTC的存在预测了最短的无复发存活率,其次是混合表型CTC,然后

是上皮CTC($P<0.001$)。Liu等的研究^[16]显示,上皮CTC数量与肿瘤大小有关($p=0.008$),混合型CTC与肿瘤数量有关($p=0.015$),间充质CTC与肿瘤转移有关($p=0.032$),而CTC数量与其他临床病理因素(如年龄,血清AFP水平或肝硬化)之间无显著相关性。Wang等^[17]发现,在62例HCC患者术后有26例被诊断为早期复发(ER),36例未复发。复发组与非复发组比较显示,复发组患者的间质型CTC和混合CTC的总数明显高于非复发组,ROC曲线分析显示门静脉癌栓(风险比[HR]=2.905, $P=0.023$)和间质型CTC阳性($HR=3.453$, $P=0.007$)是ER的独立危险因素,间充质CTC阳性患者的术后无病生存率显著缩短($P<0.001$)。根据目前已发表研究可见,间质型CTC阳性往往预示着预后不良,但目前对CTC亚分型的认识尚不足,仍需要更多研究对CTC亚分型去进行更深层次的探讨。

4 CTC在肝恶性肿瘤综合诊疗中的应用

4.1 指导肝恶性肿瘤分期 目前国际上肝恶性肿瘤的诊疗指南普遍根据BCLC分期而制定,但BCLC分期很大程度上受到评分者或影像学精确性所影响,肝内外的隐匿性转移也常常无法被传统影像、血液检测所探查,从而导致分期不准确而造成治疗方案上选择的失误,部分患者术后较短时间内发生复发或转移。引入CTC检测指导肝恶性肿瘤的分期,有助于为肝细胞癌分期及诊疗提供更多的科学参考。Schulze等^[18]利用CellSearch系统检测59例肝癌外周血液肿瘤循环细胞,发现CTCs阳性率与巴塞罗那分期(BCLC)密切相关,与肝癌患者预后显著相关性,能指导BCLC分期。

4.2 CTC检测用于肝恶性肿瘤的综合治疗 在肝恶性肿瘤的外科手术治疗当中,YU等^[19]探讨了肝切除术对围手术期循环肿瘤细胞(CTCs)的影响,该研究共纳入139名HCC患者,术前一天和术后第三天采集血液标本,术后41.7%的患者CTC计数较术前增加,25.2%患者血液CTC含量下降,33.1%患者没有明细变化;术后CTC计数的增加与原发病灶的肿瘤癌栓存在显著相关;术后CTC计数增加的患者无病生存期(DFS)和总生存期(OS)明显短于持续性CTC <2 的患者;持续性CTC水平 ≥ 2 的患者预后最差。然而,该研究所纳入病例有78例患者肿瘤直径大于5cm、33例为肝内多发病灶、55例有血管侵犯、83例为BCLC B期或C期,导致相当部分患者无法行根治性外科手术切除,行姑息性外科切除反而容易引起肝内外肿瘤播散,这可能与术中机械性刺激肿瘤病灶,造成相当一部分患者术后CTC计数较术前明显增多有关。Von等的研究^[20]报道称肝恶性肿瘤不完全切除也与较短的RFS显著相关,在肝切除术前CTC阳性表明HCC复发的风险升高。

在对肝恶性肿瘤介入治疗方面,Huang等^[21]使用CTC预测肝外科切除术联合经动脉化疗栓塞(TACE)治疗的疗效,将171名患者(联合组; $n=81$;对照组; $n=90$)纳入研究,联合组患者在切除后1个月接受TACE,而对照组仅行外

科切除术。结果发现,TACE后联合组平均CTC计数为1.32,而对照组为3.65($P<0.05$);联合组的组间的复发率(RR)为25.9%(21/81),而对照组为56.7%(51/90)($P=0.031$),统计学有显著差异。

在肝恶性肿瘤患者接受肝移植(LTx)治疗方面,Wang等^[22]为了探讨LTx后HCC患者的CTC水平是否与HCC复发相关,纳入了接受LTx治疗的47例患者,并对患者外周静脉CTC进行了至少两次分析,发现肝移植后复发患者的基线Edmondson分期、累积肿瘤直径、微血管癌栓和甲胎蛋白(AFP)水平均较高(均 $p<0.05$),然而并未发现总CTC或CTC亚型的变化与HCC复发之间有显著相关性。另外Court等^[23]评估了波形蛋白(VIM)阳性CTC(混合型CTC亚群)区分肿瘤分期、预测接受根治性切除或肝移植后复发或进展和总生存(OS)的能力。但上述研究样本量均较少,说服力不足,目前尚缺乏CTC数量与分型对肝移植后肝癌复发的影响的更多研究,需要进一步的大型多中心研究来证实这些结果。

对于晚期肝恶性肿瘤的治疗,索拉非尼作为一种多激酶抑制剂,是晚期肝恶性肿瘤的标准治疗方法。然而,对于HCC患者,对索拉非尼的治疗反应并不相同。Li等^[24]通过同时检测从HCC患者分离的循环肿瘤细胞(CTC)中的磷酸化ERK(pERK)和pAkt的表达情况,探索有关索拉非尼相关靶标的定量信息。研究结果显示,在索拉非尼治疗2周后,CTC计数显示pERK+/pAkt-CTC患者的评分下降($P<0.01$),pERK+/pAkt-CTC(11/15;73.3%)和无(13/44;29.5%)患者的疾病控制率差异显著($P<0.05$),pERK+/pAkt-CTC是使用索拉非尼治疗患者的无进展生存期(PFS)的独立预测因子(风险比=9.389; $P<0.01$),pERK+/pAkt-CTC>40%的患者与<40%(8.4 vs 1.3 m, $P<0.05$)相比更高,来自 $\geq 40\%$ pERK+/pAkt-CTC的患者CTC与<40%的患者相比具有显著更高的球状体形成抑制率(61.2 vs 19.8%, $P<0.01$),pERK+/pAkt-CTC对索拉非尼敏感高,是索拉非尼治疗的HCC患者PFS的独立预测因子。

综上所述,CTC检测可能代表着一种重要的新型“液体活检”,其数量及分型有助于鉴别诊断早期肝恶性肿瘤,也有望为肝癌术后复发或转移的预测提供科学参考。但目前尚缺乏CTC作为独立诊断及预后判断的相关有力证据,建议结合AFP、ctDNA、影像学表现等指标。

参考文献

- [1] Torre L, Bray F, Siegel R, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Mazzanti R, Arena U, Tassi R, et al. Hepatocellular carcinoma: Where are we? [J]. World journal of experimental medicine, 2016, 6(1): 21-36.
- [3] Wang J, Wang C, Hung C, et al. Survival comparison between surgical resection and radiofrequency ablation for patients in BCLC very early/early stage hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2012, 56(2): 412-8.
- [4] Masuda T, Hayashi N, Iguchi T, et al. Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer [J]. Molecular oncology, 2016, 10(3): 408-17.
- [5] Kalluri R, Weinberg RA, et al. The basics of epithelial - mesenchymal transition [J]. The Journal of clinical investigation., 2009, 119(6): 1420-8.
- [6] Qi LN, Xiang BD, Wu FX, et al. Circulating Tumor Cells Undergoing EMT Provide a Metric for Diagnosis and Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma [J]. Cancer research, 2018, 78(16): 4731-44.
- [7] Lee D, Lee JW, et al. Self-renewal and circulating capacities of metastatic hepatocarcinoma cells required for collaboration between TM4SF5 and CD44 [J]. BMB reports, 2015, 48(3): 127-8.
- [8] Sun Y, Guo W, Xu Y, et al. Circulating Tumor Cells from Different Vascular Sites Exhibit Spatial Heterogeneity in Epithelial and Mesenchymal Composition and Distinct Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(3): 547-59.
- [9] Sun B, Hu C, Yang Z, et al. Midkine promotes hepatocellular carcinoma metastasis by elevating anoikis resistance of circulating tumor cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 32523-35.
- [10] Sanchez-Lorencio MI, Ramirez P, Saenz L, et al. Comparison of Two Types of Liquid Biopsies in Patients With Hepatocellular Carcinoma Awaiting Orthotopic Liver Transplantation [J]. Transplantation proceedings, 2015, 47(9): 2639-42.
- [11] Guo W, Yang X, Sun Y, et al. Clinical significance of EpCAM mRNA -positive circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma by an optimized negative enrichment and qRT-PCR-based platform [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(18): 4794-805.
- [12] Zhang Y, Zhang X, Zhang J, et al. Microfluidic chip for isolation of viable circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma for their culture and drug sensitivity assay [J]. Cancer biology & therapy, 2016, 17(11): 1177-87.
- [13] Liu Y, Hu B, Li Z, et al. An improved strategy to detect the epithelial - mesenchymal transition process in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients [J]. Hepatol Int, 2016, 10(4): 640-6.
- [14] Wang Z, Luo L, Cheng Y, et al. Correlation Between Postoperative Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma and Mesenchymal Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood [J]. J Gastrointest Surg, 2018, 22(4): 633-9.
- [15] Ou H, Huang Y, Xiang L, et al. Circulating Tumor Cell Phenotype Indicates Poor Survival and Recurrence After Surgery for Hepatocellular Carcinoma [J]. Digestive diseases and sciences, 2018, 09: 63(9)
- [16] Liu YK, Hu BS, Li ZL, et al. An improved strategy to detect the epithelial - mesenchymal transition process in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients [J]. Hepatology international, 2016, 10(4): 640-6.
- [17] Wang Z, Luo L, Cheng Y, et al. Correlation Between

- Postoperative Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma and Mesenchymal Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood [J]. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract, 2018,22(4):633-9.
- [18] Schulze K, Gasch C, Stauffer K, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer,2013,133(9):2165-71.
- [19] Yu J, Xiao W, Dong S, et al. Effect of surgical liver resection on circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. BMC cancer,2018,18(1):835.
- [20] von Felden J, Schulze K, Krech T, et al. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection[J]. Oncotarget,2017,8(52):89978-87.
- [21] Huang JW, Liu B, Hu BS, et al. Clinical value of circulating tumor cells for the prognosis of postoperative transarterial chemoembolization therapy [J]. Medical oncology,2014,31(9):175.
- [22] Wang S, Zheng Y, Liu J, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma recurrence following liver transplantation [J]. Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research,2018,66(5):1-6.
- [23] Court CM, Hou S, Winograd P, et al. A novel multimarker assay for the phenotypic profiling of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma [J]. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2018,24(7):946-60.
- [24] Li J, Shi L, Zhang X, et al. pERK/pAkt phenotyping in circulating tumor cells as a biomarker for sorafenib efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2016,7(3):2646-59.

·读者·作者·编者·

本刊对参考文献撰写的最新要求

针对多数作者来稿中参考文献书写不规范的情况,本刊在此将文稿书写要求刊登出来,烦请各位作者注意。本刊文稿引用参考文献时,必须与其原文核对无误,请按采用顺序编码著录,依照其在正文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。未发表的观察资料一般不作为参考文献,确定需要引用时,可将其在正文相应处注明。2次文献不适宜作为参考文献。尽量避免引用摘要作为参考文献。文献作者在3位以内者,姓名均予以列出;3位以上者,只列出前3位,后加“等”、“et al”(西文)、“他”(日文)、“и.т.д.”(俄文);作者姓名一律姓氏在前,名字在后。外国人名采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;日文汉字请按规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”、“and”等连词。文献类型和电子文献载体标志代码参照 GB 3469《文献类型与文献载体代码》,题名后标注文献类型标志,电子文献必须标注著录项目。外文期刊名称用缩写,以美国国立医学图书馆编辑的 *Index Medicus* 格式为准。每条参考文献必须著录完整的起止页码。