

- [28] 阴健, 郭力弓, 主编. 中药药理现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1996: 328-430.
- [29] 李平, 胡建燃, 铁军. 柴胡总皂苷通过 Akt/NF- κ B 信号通路抑制胃癌细胞 MGC80-3 的增殖和迁移 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(10): 1727-1735.
- [30] 黄靓, 李国庆, 毛振江, 等. 人參多糖注射液对胃癌细胞 SGC-7901 凋亡的诱导作用及机制 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(33): 5114-5117.
- [31] 桂壮, 邵治国, 金笛. 黄芪多糖抑制人胃癌 MKN45、MGC-803 细胞生长的作用机制 [J]. 中医学报, 2018, 33(4): 525-528.
- [32] 王利, 魏品康, 许玲, 等. 葛根素对胃癌多药耐药作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 13(1): 389-392.
- [33] 李靖, 郑旭薇, 贾建光, 等. 人參皂苷 Rh2 对低浓度的奥沙利铂诱导人胃癌 SGC-7901 侧群细胞凋亡的增敏作用 [J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(5): 561-566, 572.
- [34] 鲍舒洁, 张丹, 张红, 等. 白芍总苷脂质体诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡的实验研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(24): 2109-2113.
- [35] 唐燕, 张丹, 孟祥林, 等. 白芍总苷脂质体对荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(21): 2547-2551.
- [36] 吴昊, 李薇, 葛红梅, 等. 芍药苷抑制 NF- κ B 的活性促进人胃癌细胞凋亡 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2008(2): 161-165.
- [37] 王谦, 张玲, 毛海婷, 等. 中药淫羊藿苷抑制肝癌 HepG2.2.15 细胞增殖和免疫逃逸作用研究. 中国免疫学杂志, 2017, 23(10): 908-911.

(收稿: 2019-01-23 发表: 2019-07-31)

综述

胃癌循环肿瘤细胞检测研究进展

王 猛¹, 李 晨¹, 顾萍萍², 谭 琳², 刘 霞², 周永坤¹

摘要: 循环肿瘤细胞 (CTCs) 检测已成为“液体活检”。CTCs 被认为是致肿瘤远处转移的主要原因, 对于发现肿瘤、监测肿瘤动态, 评估疗效、预后等都具有较好作用。检测外周血中的 CTCs 方便无创、敏感度高, 具有可重复检测性。但是目前 CTCs 的检测方法在特异性和敏感性方面面临着严峻的挑战, 迫切需要开发一种新的平台, 以低成本, 大规模高性能实现 CTCs 检测。CTCs 检测在胃癌的早期诊断、评估胃癌术后预后、预测转移性胃癌的化疗反应、评估晚期胃癌的治疗反应和预后、筛选胃癌靶向治疗可能获益的患者方面, 具有重要的作用。

关键词: 循环肿瘤细胞; 胃癌; 检测

中图分类号: R 735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6948(2019)04-0640-04

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.04.053

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 被认为是从肿瘤原发部位和转移部位进入血液循环的各种类型的肿瘤细胞。早在 1869 年, 澳大利亚医生 Ashwonh 等在癌症患者外周血中发现并首次提到了 CTCs 的概念^[1]。CTCs 具有癌症干细胞 (cancer stem cell, CSC) 的特征, 有很强的自我更新、分化能力, 并且有致瘤能力和转移能力等特征。早期的观念认为, 当肿瘤恶化或进展时会发生转移, 但越来越多的证据表明肿瘤的扩散可能在早期发生。在原发肿瘤形成之前甚至可能发生远处转移^[2]。CTCs 被认为是致肿瘤远处转移的主要原因。检测外周血中的 CTCs 方便无

创、敏感度高, 具有可重复检测性, 美国 FDA 认证该检测为目前最可观的检测手段之一。CTCs 可以比影像诊断更早地预测肿瘤细胞的微转移, 然后指导肿瘤的早期诊断。随着科学技术的进步, CTCs 的研究越来越深入, 已成为目前研究的热门内容。胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, CTCs 检测技术对胃癌的早期诊断和早期治疗具有重要的意义。本文将总结近年来 CTCs 的检测技术, 探讨其在胃癌诊治中的应用价值。

1 CTCs 的检测

CTCs 检测被称为“液体活检”, 能够减少侵入组织取样需求的机会。在肿瘤治疗的基础研究和临床应用方面具有很大的潜力; 在肿瘤复发和预后的作用受到越来越多的关注。由于肿瘤患者外周血中 CTCs 的数量非常少, 浓度通常仅为 1~10 个/10 mL^[3], 这要求检测人员在短时间内采用高灵敏度和特异性的检测方法。目前 CTCs 富集方法

基金项目: 山东省重点研发计划 (2017GSF19104); 山东省中医药科技发展计划 (2017-061)

1. 山东中医药大学附属医院普外科 (济南 250014)

2. 山东中医药大学 (济南 250000)

通信作者: 周永坤, E-mail: zhouyongkun@126.com

包括根据物理性质、免疫学原理和微流体装置等。不同类型肿瘤的 CTCs 具有相对类似的物理学特征(如密度、电荷、大小和可变形性)和表面标记,这些特征与血细胞不同^[4]。

1.1 Cell Search 系统检测技术 Cell Search 系统检测是将免疫荧光标记与免疫磁珠分选富集技术相结合,是世界上比较先进的检测技术。具有灵敏度高,可重复性强,有特异性和自动化程度较高等特点^[5]。使用 Cell Search 系统从外周血检测到的 CTCs 对预后的评估具有重要的参考价值,还可能预测胃癌患者对化学疗法的不良反应^[6]。

1.2 楔形微流体芯片检测技术 楔形微流体芯片(名为 CTC- Δ Chip)用三色免疫细胞化学方法(CK+/CD45-/Nucleus+)鉴定标记 CTCs,在癌症患者血液样本量较少的情况下,也能检测到 CTCs,在胃癌患者的诊治中具有重要的临床意义。CTC- Δ Chip 具有低成本,大批量生产的优点,在未来指导癌症治疗和预后监测中具有很大的临床应用潜力^[7]。

1.3 基于肿瘤选择性复制单纯疱疹病毒的技术 基于肿瘤选择性复制单纯疱疹病毒的技术,是根据端粒酶特异性,来复制选择性溶瘤性疱疹病毒-1,使靶向端粒酶-逆转录酶阳性癌细胞能表达绿色荧光蛋白,借此来鉴定 CTCs。与 Cell Search 相比,该试验在 40 例非小细胞肺癌患者中具有较高的阳性率^[8]。

1.4 针状细胞传感器检测技术 针状细胞传感器检测技术,直接在血液中检测和捕获 CTCs,而不改变遗传信息,允许血液的整个循环通过细胞传感器。本检查方法灵敏度高,检测 CTCs 的能力可达 102~106 个细胞/mL,还能避免细胞信息的扭曲^[9]。

1.5 阴性富集和免疫染色-FISH 检测技术 Li 等^[10]使用阴性富集和免疫染色-FISH 提高循环肿瘤细胞的敏感性和特异性,结合负浓缩、免疫细胞化学 CD45 染色和荧光原位杂交来鉴定、表征 CTCs。肺癌、胃癌、乳腺癌和食管癌的阳性率分别为 71.33%、86.21%、76.77%和 78.35%。此外,CTCs 可在 I 期检出,肺癌阳性率为 64.15%,胃癌阳性率为 83.33%,乳腺癌阳性率为 78.95%,食管癌阳性率为 68.18%,可促进早期诊断,影响治疗决策。

1.6 微流控芯片检测技术 微流控芯片技术具有低成本、速度快、高通量、操作简单的优点。微流控芯片技术集成了样本预处理和分析程序,简化了对微小芯片的检测。检测过程可实现自动化,其核心原理是将硅、玻璃或聚二甲基硅氧烷通过微加工,制造具有微米量级的不同结构和尺寸的管道用于细胞分选。捕获和富集是 CTCs 技术的关键所在,目前已经开发了多种微流控芯片平台^[11]。使用这种单细胞回收装置,不仅可以通过检测单细胞水平的遗传畸变,还可以通过跟踪在抗癌治疗期间变化来实施个性化治

疗,而且能够用于活性细胞回收^[12]。

1.7 关于 CTCs 标本的保存 关于收集的 CTCs 血液标本的保存,Brungs 等^[13]比较冷冻保存的标本(2 周到 25.2 个月,中位数 14.6 个月)及新鲜标本(24 h 内)CTCs 检测情况。发现尽管与冷冻保存标本相关的 CTCs 数量有明显减少的趋势。但这主要是在总 CTCs 计数 > 50 的样本中,低 CTCs 计数样本受影响小。冷冻保存时间和 CTCs 数量之间没有显著关联,冷冻保存延迟隔离是一种有效的策略,有助于样本收集,运输和处理。

2 CTCs 检测在胃癌中的应用

CTCs 检测在胃癌的早期诊断、评估胃癌术后预后、预测转移性胃癌的化疗反应、评估胃癌患者长期预后、评估晚期胃癌的治疗反应和预后、筛选胃癌靶向治疗可能获益的患者等方面具有重要的作用。同时,构建了 CTCs 动物模型,为进一步研究奠定了基础。

2.1 CTCs 在胃癌的早期诊断中的作用 作为生物标志物,CTCs 在胃癌的早期诊断中具有潜在的作用。有研究^[14]将 116 名接受胃切除手术的胃癌患者和 31 名健康志愿者进行前瞻性研究。在胃切除术前收集外周血样本,使用离心微流控系统和新型液体辅助分离技术检查 CTCs,检查的灵敏度和特异性几乎在每 7.5 mL 血液 CTCs 阈值 2 时优化。在每 7.5 mL 血液中 CTCs 水平 ≥ 2 的 102 名患者中,99 名患有胃癌。在每 7.5 mL 血液中 CTCs 水平 < 2 的 45 名患者中,28 名是健康对照。郭迎雪等^[15]选择了 80 例胃癌患者、50 例慢性胃炎患者和 50 名健康志愿者,治疗前抽取外周血 7.5 mL 用 Cell Search 方法计数静脉血中 CTCs 数目,发现胃癌患者 CTCs 计数显著高于慢性胃炎患者和健康人,与血清 CA724 水平成正相关。胃癌外周血 CTCs 计数与患者临床特征有一定相关性,并有望成为早期诊断胃癌的新的血液学指标。

2.2 监测胃癌术前和术后 CTCs 的变化评估预后 通过检测 CTCs,评估可切除的胃癌的术前和术后 CTCs 变化以及可能与术后复发的相关性。Zhang 等^[16]研究发现,应用标准化的 Cell Search 系统检测胃癌患者 CTCs,临床病理特征相对较差的患者有更多的术前和术后 CTCs。CTCs $\geq 5/7.5$ mL 患者,3 年无病生存率(disease-free survival, DFS)显著低于 CTCs < 5/7.5 mL 患者。术后血液中 CTCs $\geq 5/7.5$ mL 的患者与其他患者相比,平均 DFS 和总生存期(overall survival, os)均短。根治性手术后不同临床分期胃癌患者的 CTCs 存在差异,术后 2 年复发转移情况存在差异。狄剑士等^[17]研究 60 例胃癌根治术患者外周血中 CTCs,Ⅰ期阳性率 9.1%,Ⅱ期阳性率 33.3%,Ⅲ期阳性率 64.3%,Ⅲ期阳性率与Ⅰ期、Ⅱ期的阳性率不同,Ⅰ期 CTCs 阳性患者 2 年内未转移;Ⅱ期 CTCs 阳性患者 6~12 个月无转

移, 4 例患者 12~24 个月出现不同程度的肝、肺、骨转移; III 期 CTCs 阳性患者 6-12 个月内肝转移 1 例, 12~24 个月出现肝脏转移 2 例、肝肺和骨同时转移 3 例、骨转移 1 例、肺和颅内转移 1 例, 转移率 III 期高于 II 期和 I 期。

2.3 CTCs 预测转移性胃癌化疗反应 CTCs 与转移性胃癌患者化疗反应不佳有关。Lee 等^[18]研究 100 名转移性胃癌患者, 95 名患者中的 27 名检测到 5 个或更多 CTCs (CTCs 阳性)。尽管 CTCs 阳性组和 CTCs 阴性组的临床特征没有显著差异, 但 CTCs 阳性组对化疗有显著反应, CTCs 阳性组的中位无进展生存期明显短于 CTCs 阴性组。对于总体存活, CTCs 阳性组的存活率显著短于 CTCs 阴性组, CTCs 阳性是无进展生存和总体生存的独立不利因素。

2.4 CTCs 评估晚期胃癌患者预后 CTCs 水平可能有助于评估晚期患者的治疗反应并预测其预后, 治疗后 CTCs 的变化可能有助于快速识别无效治疗和不良预后^[19]。Liu 等^[20]纳入 59 例化疗胃癌晚期患者, 经多变量分析表明, 化疗第一周期后 CTCs 计数的增加仅是无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 差的独立预后指标。基线 CTCs 计数 > 2 细胞 / 5 mL 血液是 PFS 和 OS 的独立不良预后标志物。在第一轮化疗后, 基线 CTCs 计数低或 CTCs 计数降低的患者可能会从姑息性化疗中获益。有研究^[21]在晚期胃癌患者中测定 CTCs, 鉴定出两种具有不同阈值的 CTCs 亚型, 为多发性 CTCs 及多倍体 + 三倍体 CTCs。在治疗最初 6 周后, 多倍体 CTCs 增加 ≥ 10% 的患者 PFS 和 OS 较差, 治疗后多倍体 CTCs 增加 ≥ 10% 是 PFS 和 OS 的唯一独立预测因子, CTCs 的非整倍性与晚期胃癌患者的预后相关。朱莹等^[22]将 35 例 HER-2 阴性晚期胃癌患者设为胃癌组, 同时设良性胃病对照组 (20 例) 和健康对照组 (20 例)。在治疗前, 取外周静脉血标本 3.2 mL, 采用免疫磁珠微粒阴性富集技术检测 CTCs。胃癌组 CTCs 检测阳性率为 31.4%, 对照组均未检出 CTCs, 结果 HER-2 阴性晚期胃癌患者外周血 CTCs 检测结果与转移部位数目相关, 可用于预后评估。

2.5 CTCs 评估胃癌患者长期预后 较低数量的 CTCs 与较高的无复发生存率 (relapse-free survival, RFS) 相关, 可预测胃癌长期预后。Ito 等^[23]研究, 手术前从治疗阴性的胃腺癌患者中获取 7.5 mL 外周静脉血样, 使用 OBP-401 检测 CTCs, CTCs 数量随着疾病进展而趋于增加。7.5 mL 外周血中超过 5 个 CTCs 患者, OS 低于 5 个或更少 CTCs 患者。在超过 5 的患者和具有 5 个或更少 CTCs 的患者之间, 发现 RFS 的显著差异。

2.6 CTCs 评估胃癌靶向治疗疗效 成功使用靶向治疗肿瘤的关键, 是能够根据分子标记预选可能从治疗中受益的患者, 而预测治疗反应的评估主要依靠肿瘤活检。Mishima

等^[24]将 CTCs 检测作为补充原发性肿瘤活检的一种非侵入性潜在策略, 以期找到可能从曲妥珠单抗治疗中获益的患者, 发现原发肿瘤为 HER-2, 但其 CTCs 显示 HER-2 扩增以选择可能受益于曲妥珠单抗治疗的患者。

3 CTCs 在胃癌动物模型构建的作用

胃癌 CTCs 动物模型构建为 CTCs 在临床实践中的应用奠定了研究基础。周洲等^[25]构建了 4 种胃癌裸鼠模型, 包括皮下移植瘤、原位移植瘤、腹腔移植瘤、尾静脉移植瘤, 检测各组肿瘤生长、转移水平, 比较各组循环血中 CTCs 数目, 并进一步行单细胞实时荧光定量聚合酶链式反应分析转移相关基因在 CTCs 与原细胞中的表达变化, 免疫组织化学法检测肿瘤组织中血管的生成情况。发现胃癌细胞原位移植模型裸鼠死亡率低, 肿瘤转移明显, CTCs 数量明显高于其他造模方法, 是研究胃癌 CTCs 的理想模型。

循环肿瘤细胞已被认为是包括胃癌在内的多种肿瘤的潜在预后指标; 在癌症治疗的基础研究和临床应用方面具有很大的潜力; 它提供了获得个性化药物开发所需的关键生物信息的机会。CTCs 捕获提供了对癌组织的实时监测, 而无需进行侵入性活组织检查, CTCs 的研究是一个令人兴奋的研究领域。然而, 目前的 CTCs 检测方法在特异性和敏感性方面面临着严峻的挑战, 现有的 CTCs 隔离装置的制造工艺复杂且材料昂贵。因此, 迫切需要开发一种新的平台, 以降低成本, 大规模高性能实现 CTCs 检测。在临床中, CTCs 被认为在癌症转移中具有关键作用, 胃癌患者的死亡主要是由于其复发和转移。而 CTCs 是转移的必要条件, 进行治疗前和治疗后监测 CTCs, 可用于早期检测亚临床患者或疾病复发, 预测肿瘤进展和辅助化疗的效果。CTCs 检测对胃癌的诊断、治疗和预后具有重要意义。

参考文献:

- [1] Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death[J]. Aust Med J, 1869, 14: 146-147.
- [2] Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients[J]. Cancer Cell, 2013, 23 (5): 573-581.
- [3] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(9): 623-631.
- [4] Cui L, Lou Y, Zhang X, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using pi RNAs as markers[J]. Clin Biochem, 2011, 44(13): 1050-1057.
- [5] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and independent sorting of rare circulating tumor cells[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(179): 179ra47.
- [6] Liu J, Wang J, Song Y, et al. A panel consisting of three novel circulating lncRNAs, is it a predictive tool for gastric cancer? [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(7): 3605-3613.

- [7] Yang C, Zhang N, Wang S, et al. Wedge-shaped microfluidic chip for circulating tumor cells isolation and its clinical significance in gastric cancer[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):139.
- [8] Zhang W, Bao L, Yang S, et al. Tumor-selective replication herpes simplex virus-based technology significantly improves clinical detection and prognostication of viable circulating tumor cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(26):39768-39783.
- [9] Weng WH, Ho IL, Pang CC, et al. Real-time circulating tumor cells detection via highly sensitive needle-like ytosensordemonstrated by a blood flow simulation[J]. Biosens Bioelectron, 2018, 116:51-59.
- [10] Li Y, Ma G, Zhao P, et al. Improvement of sensitive and specific detection of circulating tumor cells using negative enrichment and immunostaining-FISH[J]. Clin Chim Acta, 2018, 485:95-102.
- [11] Hajba L, Guttman A. Circulating tumor-cell detection and capture using microfluidic devices[J]. Trend Anal Chem, 2014, 59 (2) :9-16.
- [12] Trifanny Y, Jin TS, Leng LC, et al. Microfluidic enrichment for the single cell analysis of circulating tumor cells[J]. Sci Rep, 2016, 6 (24) :22076.
- [13] Brungs D, Lynch D, Luk AW, et al. Cryopreservation for delayed circulating tumor cell isolation is a valid strategy for prognostic association of circulating tumor cells in gastroesophageal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(7):810-818.
- [14] Kang HM, Kim GH, Jeon HK, et al. Circulating tumor cells detected by lab-on-a-disc: Role in early diagnosis of gastric cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0180251.
- [15] 郭迎雪, 李贵新, 李方超, 等. 胃癌中循环肿瘤细胞与临床特征的关系 [J]. 潍坊医学院学报, 2016, 38(1):73-75.
- [16] Zhang Q, Shan F, Li Z, et al. A prospective study on the changes and clinical significance of pre-operative and post-operative circulating tumor cells in resectable gastric cancer[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):171.
- [17] 狄剑士, 郑桂丽, 李梦岩, 等. 胃癌根治术后患者血循环肿瘤细胞的检测及其意义 [J]. 实用医药杂志, 2016, 33(03):243-244.
- [18] Lee SJ, Lee J, Kim ST, et al. Circulating tumor cells are predictive of poor response to chemotherapy in metastatic gastric cancer[J]. Int J Biol Markers, 2015, 30(4):e382-6.
- [19] Li Y, Gong J, Zhang Q, et al. Dynamic monitoring of circulating tumour cells to evaluate therapeutic efficacy in advanced gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2016, 114(2):138-45.
- [20] Liu Y, Ling Y, Qi Q, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in advanced gastric cancer patients receiving chemotherapy[J]. Mol Clin Oncol, 2017, 6(2):235-242.
- [21] Li Y, Zhang X, Gong J, et al. Aneuploidy of chromosome 8 in circulating tumor cells correlates with prognosis in patients with advanced gastric cancer[J]. Chin J Cancer Res, 2016, 28(6):579-588.
- [22] 朱莹, 易善永, 郭云霞, 等. HER-2 阴性晚期胃癌外周血循环肿瘤细胞检测及临床意义 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2018, 10(3):153-155.
- [23] Ito H, Sato J, Tsujino Y, et al. Long-term prognostic impact of circulating tumour cells in gastric cancer patients[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(46):10232-10241.
- [24] Mishima Y, Matsusaka S, Chin K, et al. Detection of HER2 Amplification in Circulating Tumor Cells of HER2-Negative Gastric Cancer Patients[J]. Target Oncol, 2017, 12(3):341-351.
- [25] 周洲, 赖兵, 高采平, 等. 胃癌循环肿瘤细胞动物模型的构建 [J]. 重庆医学, 2016, 45(35):4917-4921.

(收稿: 2018-11-08 发表: 2019-07-31)

综述

TLR4 对缺血再灌注损伤作用机理的研究进展

杨莹莹¹, 王 猛², 刘 霞¹, 张玉华³, 顾萍萍³, 张云杰²

摘要: Toll 样受体 (TLRs) 属于模式识别受体 (PRRs) 家族, 识别高度保守的微生物组分 - 病原相关分子模式 (PAMPs)。

基金项目: 山东省重点研发计划 (2018GSF119026); 山东省保健科技协会科学技术课题 (SDBJKT20180128)

1. 山东中医药大学中医学院 2017 级硕士研究生 (济南 250000)

2. 山东中医药大学附属医院普外科 (济南 250014)

3. 山东中医药大学第一临床医学院 2017 级硕士研究生 (济南 250000)

通信作者: 张云杰, E-mail: zhangyunjie1130@163.com

关于缺血再灌注损伤的具体机理, 至今尚未明确。越来越多的研究提出, 与先天免疫的重要组成部分 TLRs 相关, 其中对 TLR4 在缺血再灌注损伤中所起作用的研究最为普遍。

关键词: Toll 样受体 4; 缺血再灌注损伤; 先天免疫

中图分类号: R33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6948(2019)04-0643-05

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.04.054