

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230198

• 综述 •

循环肿瘤细胞在肝细胞癌诊疗中的应用及展望

吴雅丽^{1,2}, 张小峰², 沈锋^{1,2*}

1. 广东药科大学第一临床医学院, 广州 510006

2. 海军军医大学(第二军医大学)第三附属医院肝外四科, 上海 200438

[摘要] 肝细胞癌(HCC)是一种高度恶性肿瘤,是癌症相关死亡的第三大原因。血清甲胎蛋白和影像学检查是HCC早期诊治和疗效动态监测最常用的手段。然而这些手段的准确性有限,不能明确反映肿瘤的潜在生物学特性。因此,开发能够更准确、全面地反映HCC生物学特性的新型肿瘤标志物具有潜在的临床应用价值。循环肿瘤细胞(CTC)是来源于原发肿瘤或转移灶并存在于血液循环中的癌细胞,其提供了关于肿瘤进展和转移的重要信息,是早期诊断和复发、转移、预后评估的良好候选指标,甚至是HCC潜在的治疗靶点。本文讨论了CTC在HCC患者临床全程管理中的应用及其局限性和未来研究方向。

[关键词] 肝细胞癌; 循环肿瘤细胞; 检测方法; 临床应用

[引用本文] 吴雅丽, 张小峰, 沈锋. 循环肿瘤细胞在肝细胞癌诊疗中的应用及展望[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(4): 495-499. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230198.

Circulating tumor cells in diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: application and prospect

WU Yali^{1,2}, ZHANG Xiaofeng², SHEN Feng^{1,2*}

1. The First Clinical Medical College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2. Department of Hepatic Surgery (IV), The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

[Abstract] Hepatocellular carcinoma (HCC) is a highly malignant tumor and the third cause of cancer-related death. Serum α -fetoprotein and imaging examination are the most commonly used tests for early diagnosis, treatment and dynamic efficacy monitoring of HCC. However, the accuracy of these approaches is limited and can not clearly reflect the underlying biological characteristics of the tumor. Therefore, novel HCC tumor markers that are more accurate and can comprehensively reflect the biological characteristics of the tumor have potential clinical application value. Circulating tumor cell (CTC), as a kind of cancer cells derived from primary tumors or metastases, provides important information about tumor progression and metastasis, and is good candidate for early diagnosis and evaluation of metastasis, recurrence, and prognosis, and even potential therapeutic target for HCC. This article discusses the application of CTC in the whole clinical course management of HCC patients, as well as its limitations and future research direction.

[Key words] hepatocellular carcinoma; circulating tumor cells; detection methods; clinical application

[Citation] WU Y, ZHANG X, SHEN F. Circulating tumor cells in diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: application and prospect[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(4): 495-499. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230198.

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球癌症相关死亡的第三大原因,且发病率不断上升^[1]。由于HCC早期没有明显的临床症状,大多数患者首次诊断时已为中晚期。现有的治疗方法难以有效延长HCC患者的生存期,5年生存率约为

18%^[2]。目前HCC的诊断和监测主要依靠血清生物标志物和影像学检查,甲胎蛋白作为HCC最常用的血清标志物,其对约1/3的HCC并不灵敏^[3];而当肿瘤直径 ≤ 2 cm时,影像学检查的灵敏度和特异度大大减低。因此,需要寻找新的有效的生物标

[收稿日期] 2023-04-13

[接受日期] 2023-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82173212),上海市人才发展资金(2020065),上海市临床重点专科建设项目(shslczdk02402)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (82173212), Shanghai Talent Development Fund (2020065), and Shanghai Municipal Key Clinical Specialty Project (shslczdk02402).

[作者简介] 吴雅丽,硕士生。E-mail: 1107667079@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875514, E-mail: shenfenghbh@sina.com

志物进行早期诊断和肿瘤疗效监测。液体活检,特别是循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)已经成为肿瘤诊断和动态检测的有用工具^[4]。本文就CTC目前常用的检测技术及其在HCC诊断和疗效预测方面的研究进行介绍。

1 CTC的定义

CTC是从原发肿瘤脱落后进入外周血液并在血液中循环的肿瘤细胞。虽然CTC起源于原发肿瘤,但其与原发部位的肿瘤细胞不同,具有上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)特性,可帮助其脱离原发肿瘤并内渗到外周血液中。此外,CTC可能与成纤维细胞、白细胞、内皮细胞或血小板形成聚集体而产生CTC簇。与单个CTC相比,CTC簇具有更高的转移潜力和生存能力。然而,大多数CTC在循环中死亡,只有少数有限的CTC存活并浸润到远处器官。随着科技的发展,新兴的CTC检测技术使CTC的生物学研究趋于成熟、简便,也促进了CTC在肿瘤筛查、疗效动态监测和预后评估中的临床应用。

2 CTC的检测方法

CTC的检测方法主要有免疫富集法和物理富集法。免疫富集法分为免疫磁珠法和利用微流控芯片的免疫吸附法。免疫磁珠法包括使用针对CTC表面特定肿瘤相关抗原的抗体来捕获CTC的阳性富集法,以及使用针对CD45抗体来耗尽背景中血细胞的阴性富集法^[5]。如CellSearch是CTC阳性富集法的代表性产品,其依赖于涂有上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、细胞角蛋白和CD45抗体的磁珠,是唯一经美国FDA批准的用于转移性癌的CTC检测方法。然而,上皮标志物(如EpCAM)在EMT过程中经常下调或丢失,使免疫捕获方法无效,并可能导致假阴性结果^[6]。阴性富集法通过使用包被CD45抗体的免疫磁珠去除背景血细胞,这种间接富集CTC的方法弥补了CellSearch高度依赖EpCAM的局限性。与阳性富集法相比,阴性富集法具有更高的灵敏度,消耗的抗体更少,富集纯度更高。免疫吸附法基于微流控芯片,微流控芯片技术利用2级电磁泳和针对白细胞的耗竭性抗体分离CTC,因其在测试前不需要对样品进行预标记和处

理而获得了广泛应用,但微流控芯片在处理液体样品方面的整体效率仍然较低,在商业化应用方面也有待进一步探索。

物理富集法是通过利用CTC与血细胞之间直径、密度和电学特性等的差异来富集CTC,这些方法的特异度虽然不及免疫富集法,但是所获得的细胞群体更为全面,有助于CTC异质性分析^[7-8]。Parsortix系统是一种具有特定微尺寸微流控通道的微流控芯片,其允许直径较小的细胞通过,但会阻止CTC等直径较大的细胞。Parsortix系统通过细胞直径过滤分离CTC较为容易和可靠,但存在由于过滤阻力积累导致回收效率降低的缺陷。密度梯度离心法根据CTC与白细胞之间密度及体积等沉降系数的差异对CTC进行分离。OncoQuick[®]系统结合了密度梯度离心和微孔膜过滤方法,操作简单且价格低廉,但由于容易污染血细胞,通常与其他系统联合用于CTC分离的初始步骤。基于电荷的电泳技术利用不同细胞之间电学特性的差异可以准确地选择感兴趣的细胞。DEPArray[™]系统可以将单个细胞困在电泳笼中,同时将回收的单个CTC用于特异性遗传分析。物理富集法的优势是不依赖特定标志物,有利于检出异质型CTC和其他未知抗原的CTC亚型,但存在分离纯度较低、容易漏检部分体积较小的肿瘤细胞等不足。

CTC分离后需进一步鉴定验证,其鉴定方法有基于蛋白质水平鉴定CTC的方法,包括免疫荧光法和流式细胞术;也有基于核酸水平鉴定CTC的方法,包括反转录PCR、荧光原位杂交和单细胞测序等。这些CTC鉴定方法对设备及人员的要求较高,目前相关技术仍有待进一步完善以适应临床需求。

3 CTC在HCC诊疗中的应用

3.1 早诊早筛 研究表明CTC可作为早期筛查HCC的生物标志物,有助于HCC患者的早期诊断和治疗及无病生存期和总生存期的延长。Qi等^[9]使用CanPatrol CTC富集技术和原位杂交技术对HCC患者血液样本中的CTC进行分类和分析,发现即使是在早期HCC中,仍有超过90%的患者CTC检测呈阳性。Cui等^[10]对18项HCC临床研究进行的meta分析结果表明,CTC阳性HCC患者的总生存率低于CTC阴性HCC患者;对5项

HCC 临床研究 (包括 339 例患者) 的 meta 分析显示, 外周血中存在 CTC 会显著增加 HCC 复发的风险。因此, 外周血中的 CTC 可能是诊断 HCC 的有用标志物。另外, Wang 等^[11] 在 53.3% 的早期 HCC 患者和 52.6% 的甲胎蛋白阴性 HCC 患者中检测到 CTC, 进一步分析发现 CTC 可以帮助识别早期 HCC 和甲胎蛋白阴性的 HCC, 并且 CTC 在所有 HCC 患者诊断中的 AUC 值为 0.789, 而当甲胎蛋白和 CTC 联合检测时 AUC 值提高为 0.883, 表明甲胎蛋白联合 CTC 可提高早期 HCC 检测的灵敏度。

3.2 预后判断 研究表明 CTC 对 HCC 预后具有预测价值。Ye 等^[12] 研究了 HCC 根治切除术后 CTC 计数与临床转归的关系, 发现 CTC 计数较低 ($\leq 2/5$ mL) 的患者无病生存期和总生存期均优于 CTC 计数较高 ($>2/5$ mL) 的患者, 提示 CTC 计数较高的 HCC 患者预后较差。除了术后 CTC 的数量外, CTC 的亚型可能与治疗反应有关, 可作为 HCC 分子亚型的补充。Nel 等^[13] 检测了 11 例不同疗法 HCC 患者的 CTC, 发现上皮性、间质性、肝脏特异性和混合性等不同亚型的 CTC 在不同患者中的分布差异显著, 且与治疗结局相关。值得注意的是, 上皮性 CTC 亚型增加的 HCC 患者治疗结果更差。Wang 等^[14] 指出间质性 CTC 亚型是 HCC 早期复发的独立危险因素, 术后间质性 CTC 计数 $\geq 1/5$ mL 的 HCC 患者术后无病生存期更短。Yin 等^[15] 发现扭曲蛋白 (twist) 阳性与较高的转移、复发和死亡率有关, 表明 EMT 相关表型的 CTC 在预测 HCC 复发和转移方面有重要作用。另外, 联合 CTC 和外周血常规检测对 HCC 患者预后也有一定预测作用。Ni 等^[16] 回顾性研究发现, 术前中性粒细胞与淋巴细胞比值 (neutrophil to lymphocyte ratio, NLR) 和 CTC 都与 HCC 预后不良有关, NLR 和 CTC 较高的 HCC 患者往往表现出较短的总生存期。术前 CTC 联合 NLR 可能是根治性肝切除术后 HCC 预后的可靠预测指标。总之, CTC 可能是诊断 HCC 转移和预后的生物标志物, CTC 集群或亚型的动态变化为 HCC 复发的早期发现和干预提供了重要线索。

3.3 疗效评估 除了用于 HCC 的早期诊断、复发和预后判断之外, CTC 对于 HCC 治疗效果的评价也有帮助。当恶性肿瘤患者肿瘤完全切除后, CTC 水平急剧下降, 因而术后 CTC 水平可作为肿瘤负

荷的监测工具用于评估肿瘤是否根治性切除。Fan 等^[17] 将体内流式细胞技术与原位转移肿瘤模型结合进行研究, 结果显示肿瘤切除后 CTC 的数量和早期转移明显减少, 且 HCC 的肿瘤大小和远处转移的数量与 CTC 的动态变化一致。CTC 还可以作为 HCC 长期疗效的监测指标, 其动态变化反映了经导管动脉化疗栓塞、放疗和射频消融等局部治疗方法的治疗反应。Rau 等^[18] 采用阴性富集法检测 CTC 并在治疗不同时间段进行分析, 发现 CTC 有助于动态监测血清甲胎蛋白无明显变化的 HCC 患者的病情。Chen 等^[19] 发现 CTC 的状态可以指导 HCC 患者进行移植前射频消融术, 从而改善 CTC 阳性 HCC 患者的预后。Zhou 等^[20] 检测 49 例 HCC 患者术前 *EpCAM* mRNA 阳性的 CTC 和 CD4 阳性 / CD25 阳性 / 叉头框蛋白 P3 阳性的调节性 T 细胞水平发现, CTC 和调节性 T 细胞水平升高与 HCC 患者术后复发相关。上述研究结果表明 CTC 能用于预测和评价肿瘤治疗效果。有学者针对 CTC 设计了 1 种多点共击纳米药物 GV-Lipo/SF/DT, 通过将索拉非尼和洋地黄毒苷共加载到脂质体中, 并在共载脂质体表面修饰抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 单克隆抗体和抗血管细胞黏附分子 1 单克隆抗体以消除原发肿瘤并抑制相关 CTC 扩散, 从而增强转移抑制和对 HCC 的治疗效果^[21]。

3.4 指导个体化治疗 识别表达特定肿瘤标志物和药物靶点的 CTC 能够更好地指导 HCC 患者个体化治疗。Li 等^[22] 发现磷酸化 ERK 阳性 / 磷酸化 Akt 阴性的 CTC 对索拉非尼敏感, 这有助于选择合适的 HCC 患者进行索拉非尼靶向药物治疗。近年来, 免疫治疗在 HCC 中日益增多。Winograd 等^[23] 评估了 HCC 中程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 阳性的 CTC, 发现接受抗 PD-L1 治疗的 6 例患者中有 3 例对治疗有反应并具有 PD-L1 阳性 CTC, 因此 PD-L1 阳性 CTC 可以作为免疫治疗的一个重要预测因子; 进一步通过更大规模研究发现 PD-L1 阳性 CTC 主要存在于晚期 HCC 中, 并且与接受抗 PD-1 治疗的 HCC 患者的有益治疗反应有关, PD-L1 的表达随着免疫状态、治疗反应和疾病进展而变化。因此, 精确评估 CTC 中 PD-L1 的表达状态可实时评估和监测肿瘤细胞的免疫状态。另外, 一项针对 HCC 转移前 CTC 定植的潜在机制研究发现, 转移前生态位来源的基

质细胞衍生因子1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 可以下调配对相关同源框1 (paired related homeobox 1, Prrx1) 表达, 并通过体外信号转导及转录活化因子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 途径诱导HCC细胞中趋化因子CXC亚家族受体 (chemokine CXC subfamily receptor 4, CXCR4) 的干性、耐药性和表达增加, 而Prrx1表达降低可刺激SDF-1/CXCR4信号转导并有助于HCC中CTC在器官的定植, 因此, 抑制STAT3和特异性阻断CXCR4具有消除晚期HCC器官转移的临床潜力^[24]。除此之外, 有学者预测, 使用CTC的定量和定性分子分型有望为每例患者开发个体化治疗方案, 即从外周血中发现的CTC和其分型特征可能成为患者随访过程的肿瘤标志物, 并且可以通过就诊时检测标志物的表达更新风险评估, 从而更好地对患者进行风险分层以为其制定最佳的个体化治疗方案, 最终达到改善患者预后的目的^[25]。

4 结论和展望

CTC的检测对HCC患者的早期筛查或诊断、疗效监测、预后评估甚至靶向治疗和免疫治疗的耐药性预测都有临床应用价值。然而, CTC在广泛应用于HCC之前仍然面临着重大挑战。首先, 临床缺乏CTC富集和检测的标准化方法, CTC检测结果的不稳定性和不确定性可能影响诊治方案的决策。其次, 在目标患者中检测CTC的成本较高, 与影像学检查相比, 其广泛使用受到限制。最后, 许多临床研究缺乏外部验证, 大多数数据基于小型、单中心、病例对照研究, 患者的特征差异很大, 如种族、肝病病因和HCC分期等都使得验证相对困难。因此, 需要一种高灵敏度和特异度的CTC标准化检测方案, 这可能需要通过使用统一的CTC检测平台及多中心、大样本量、前瞻性研究来实现。未来随着技术的进步CTC检测的不足应当能够克服, CTC检测将是HCC临床全程管理的一个突破, 特别是在早期诊断方面, 可为患者在发生转移前提供根治性手术机会。有限的灵敏度和特异度是CTC检测难以作为HCC独立诊断工具的重要原因, CTC与传统影像学检查方法或其他肿瘤标志物联合使用可提高早期检测的灵敏度, 也会为临床提供更全面的信息并指导个体化治疗方案的决策。

[参考文献]

- [1] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01200-4.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [3] ZHANG Q, RONG Y, YI K, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: single-cell based analysis, preclinical models, and clinical applications[J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 12060-12071. DOI: 10.7150/thno.48918.
- [4] MANN J, REEVES H L, FELDSTEIN A E. Liquid biopsy for liver diseases[J]. *Gut*, 2018, 67(12): 2204-2212. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-315846.
- [5] AHN J C, TENG P C, CHEN P J, et al. Detection of circulating tumor cells and their implications as a biomarker for diagnosis, prognostication, and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2021, 73(1): 422-436. DOI: 10.1002/hep.31165.
- [6] RUSHTON A J, NTELIPOULOS G, SHAW J A, et al. A review of circulating tumour cell enrichment technologies[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(5): 970. DOI: 10.3390/cancers13050970.
- [7] LABIB M, KELLEY S O. Circulating tumor cell profiling for precision oncology[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(6): 1622-1646. DOI: 10.1002/1878-0261.12901.
- [8] PANTEL K, ALIX-PANABIÈRES C. Liquid biopsy and minimal residual disease: latest advances and implications for cure[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(7): 409-424. DOI: 10.1038/s41571-019-0187-3.
- [9] QI L N, XIANG B D, WU F X, et al. Circulating tumor cells undergoing EMT provide a metric for diagnosis and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4731-4744. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2459.
- [10] CUI K, OU Y, SHEN Y, et al. Clinical value of circulating tumor cells for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC): a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(40): e22242. DOI: 10.1097/MD.00000000000022242.
- [11] WANG P X, SUN Y F, JIN W X, et al. Circulating tumor cell detection and single-cell analysis using an integrated workflow based on ChimeraX[®]-i120 platform: a prospective study[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(9): 2345-2362. DOI: 10.1002/1878-0261.12876.
- [12] YE X, LI G, HAN C, et al. Circulating tumor cells as a potential biomarker for postoperative clinical outcome in HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*

- Manag Res, 2018, 10: 5639-5647. DOI: 10.2147/CMAR.S175489.
- [13] NEL I, BABA H A, ERTLE J, et al. Individual profiling of circulating tumor cell composition and therapeutic outcome in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(4): 420-428. DOI: 10.1593/tlo.13271.
- [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): 633-639. DOI: 10.1007/s11605-017-3619-3.
- [15] YIN L C, LUO Z C, GAO Y X, et al. Twist expression in circulating hepatocellular carcinoma cells predicts metastasis and prognoses[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 3789613. DOI: 10.1155/2018/3789613.
- [16] NI H H, YANG X H, YANG C L, et al. Combination of preoperative circulating tumor cell count and neutrophil-lymphocyte ratio for prognostic prediction in hepatocellular carcinoma patients after curative hepatectomy[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 7305953. DOI: 10.1155/2022/7305953.
- [17] FAN Z C, YAN J, LIU G D, et al. Real-time monitoring of rare circulating hepatocellular carcinoma cells in an orthotopic model by *in vivo* flow cytometry assesses resection on metastasis[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2683-2691. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3733.
- [18] RAU K M, LIU C T, HSIAO Y C, et al. Sequential circulating tumor cell counts in patients with locally advanced or metastatic hepatocellular carcinoma: monitoring the treatment response[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(1): 188. DOI: 10.3390/jcm9010188.
- [19] CHEN Z, WANG T, CHEN C, et al. Circulating tumor cell is a clinical indicator of pretransplant radiofrequency ablation for patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 7776389. DOI: 10.1155/2021/7776389.
- [20] ZHOU Y, WANG B, WU J, et al. Association of preoperative EpCAM circulating tumor cells and peripheral Treg cell levels with early recurrence of hepatocellular carcinoma following radical hepatic resection[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 506. DOI: 10.1186/s12885-016-2526-4.
- [21] MU W, CHU Q, YANG H, et al. Multipoint costrking nanodevice eliminates primary tumor cells and associated-circulating tumor cells for enhancing metastasis inhibition and therapeutic effect on HCC[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(9): 2101472. DOI: 10.1002/adv.202101472.
- [22] 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): 2646-2659. DOI: 10.18632/oncotarget.6104.
- [23] WINOGRAD P, HOU S, COURT C M, et al. Hepatocellular carcinoma-circulating tumor cells expressing PD-L1 are prognostic and potentially associated with response to checkpoint inhibitors[J]. *Hepatol Commun*, 2020, 4(10): 1527-1540. DOI: 10.1002/hep4.1577.
- [24] TANG Y, LU Y, CHEN Y, et al. Pre-metastatic niche triggers SDF-1/CXCR4 axis and promotes organ colonisation by hepatocellular circulating tumour cells via downregulation of Prrx1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 473. DOI: 10.1186/s13046-019-1475-6.
- [25] CARISSIMI F, BARBAGLIA M N, SALMI L, et al. Finding the seed of recurrence: hepatocellular carcinoma circulating tumor cells and their potential to drive the surgical treatment[J]. *World J Gastrointest Surg*, 2021, 13(9): 967-978. DOI: 10.4240/wjgs.v13.i9.967.

[本文编辑] 杨亚红