

访林平博士：“抓得着”与“看得见”的 CTC 检测技术

文章转自转化医学网 2015-11-19 olive

导读：2004 年 CellSearch CTC 检测技术被 FDA 认证后，CTC 研究与临床检测应用进展迅猛，并涌现出各种检测技术。SE-iFISH 是 CTC 检测技术的后起之秀。它能够从病人或肿瘤动物模型内的体液标本中有效富集各种肿瘤细胞，并对获得的 CTC 同步进行原位染色体及肿瘤标示物的检测，从而极大地提高了 CTC 检测技术在不同肿瘤间的通用性、敏感性及特异性。转化医学网对循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cell, CTC) 研究领域的专家——林平博士做了采访，以了解了 CTC 的研究进展以及临床最新应用。

CTC 国内外研究进展

转化医学网：林博，您好！您是循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cell, CTC) 研究领域的专家，给我们介绍下 CTC 检测技术在国内外的研究进展。

林平：自 CellSearch CTC 检测技术于 2004 年被美国 FDA 认证后，过去 10 年中有关 CTC 研究与临床检测应用的进展非常迅速，也涌现出了各种相关技术。概括而言，可分为根据细胞大小进行分离的细胞筛，根据肿瘤表面标示物表达的阳性捕获（如 CellSearch, microfluidics 微流控）以及不依赖于肿瘤细胞大小及表面标示物表达的富集法。每种方法都有其各自的特点与优势。以细胞筛及阳性捕获为例，它们的最大特点即为简单，易操作。目前国内外有关这些技术的应用基本是同步的。

“抓的着”与“看得见”

转化医学网：今年，您发表了一篇关于“SE-iFISH, 一种全新的循环肿瘤细胞 (CTC) 检测技术平台应用于肿瘤治疗的疗效评估”的文章，简单介绍一下 SE-iFISH 检测技术平台。

林平：SE-iFISH 是将分离 CTC 的差相富集技术 (subtraction enrichment, SE) 与鉴别 CTC 的瘤标免疫荧光染色及染色体荧光原位杂交技术相整合 (immunostaining-FISH, iFISH)，从而能够从病人或肿瘤动物模型内的体液标本中有效富集各种肿瘤细胞，并对获得的 CTC 同步进行原位染色体异倍体及肿瘤标示物的检测，从而极大地提高了 CTC 检测技术在不同肿瘤间的通用性、敏感性及特异性。同时，根据每个 CTC 的瘤标表达及染色体倍体的不同，亦可将 CTC 进行亚类分型，而我们初步的临床实验显示，每种亚类的 CTC 具有不同的临床意义。

转化医学网：SE-iFISH 检测技术平台与传统的 CTC 检测比较，有哪些优势。

林平：可靠的 CTC 检测主要由有效的分离与鉴别两个关键环节组成，也就是人们常说的“抓得着”与“看得见”。两者相辅相成，缺一不可。分离与鉴别方法的有效性决定着 CTC 检测的灵敏度与特异性。然而迄今为止，人们对 CTC 检测技术的改进基本上是本着头痛医头，脚痛医脚的方式，即针对 CTC 的捕获或鉴别分别进行改进，而不是将其作为一个整体，系统性地优化。目前已有很多发表的文章指出，病人体内的 CTC 细胞形态千差万别，大小各异，很多 CTC 甚至小于白细胞，且在 CTC 形成过程中的必要阶段——肿瘤细胞的间质化过程中，许多 CTC 的上皮标示物（如 EpCAM, 角蛋白 CK）都会缺失，从而使得以往人们使用的细胞筛，或依赖肿瘤细胞上皮标示物的阳性捕获法不能对各种 CTC 进行非常有效的检测。此外，使用阳性捕获法获取的 CTC 因细胞已被相应的捕获抗体所刺激，不再是原有的自然状态的 CTC，故已不再适用于后续一系列分析。

SE-iFISH 从有效富集与鉴别两个方面对 CTC 的检测方法系统性地进行了系列改进。

首先，不同于传统的人们熟知的阴性富集法，相差富集 SE 应用了全新的抗白细胞抗体组合群以对 8.5 毫升血量的白细胞进行高达 5 个数量级 (5 logs) 的有效去除。其次，没有使用常规的低渗裂解法去除红细胞，可以使得 CTC 免受低渗的损害，因而保持了很好的细胞形态并适宜后续的原代肿瘤细胞培养。iFISH 方法的建立更是将原位进行的肿瘤标示物的蛋白表达与染色体倍体分析 (in situ phenotyping and karyotyping of CTC, in situ PK CTC) 成为可能，使得人们首次能够从核酸及蛋白水平同步观察、分析 CTC，从而为 CTC 的研究及临床应用提供了很多独特的技术支持。

CTC 的临床应用

转化医学网：循环肿瘤细胞 (CTC) 在临床有哪些应用？

林平： CTC 在临床上的应用主要有：1) 肿瘤的早期诊断；2) 疗效的快速评估：相对于平均 3 个疗程后使用影像学手段进行疗效评估而言，病人用药 1 个疗程后进行 CTC 检测可以帮助医生更快速、准确的评估疗效，并根据需要调整治疗方案；3) 耐药与复发的实时监测：目前，耐药与复发的监测基本都是依赖于影像学发现原发灶增大或形成了新的转移灶，无论哪种情况对病人来说往往都是致命的。早在 2009 年，我们就与北京协和医院联合报道了“在肿瘤复发早期可在大多数病人体内检测到 CTC”的研究成果，从而为肿瘤复发的及时治疗提供了有效依据。

CTC 临床应用案例分析

转化医学网：给我们列举几个 CTC 检测技术在临床上的案例。

林平： CTC 检测技术在临床上应用的案例是很多的，在这里我简单列举几个。

1) 快速评估 chemo 疗效：我们与北京协和医院肺癌中心联合进行的临床实验发现，3 个疗程后大部分影像学判断病情无进展或稳定的病人，其 CTC 在一个疗程后均有显著下降。而有一个病人的 CTC 数目在经过一个疗程后

不降反升，结果该病人 3 个疗程后的影像学检查显示为肿瘤进展，即肿瘤有显著的增大。初步的实验结果表明，应用 CTC 检测技术为进行疗效的快速评估以及根据病人个体情况更换治疗方案——即精准医学提供了有力依据。该结果已发表于 2009 年的 J. Thorac. Oncol.

2) 恶性胸水的判别：病人胸水可以由肺癌或结核造成，两者在影像学上有相似之处，经常会造成医生的困扰。目前肺癌引起的恶性胸水的临床鉴别主要是观察 H&E 染色细胞形态。此方法的最大缺点即为灵敏性较低。我们在临床上已经遇到几例使用普通 H&E 染色无法判断病人的胸水是否为恶性，或是已经判断为未发现肿瘤细胞的胸水。但经 iFISH 复查，可见明显肿瘤细胞，病人最终也被确诊为患有肺癌。

3) 肿瘤耐药与复发的实时监测：到目前为止，还没有任何方法可以准确实时监测肿瘤的复发。常规的影像学检查均要等到新的转移灶出现后才可发现，对于病人而言显然已经太晚。我们与北京协和医院肺癌中心 2009 年就已联合报道，86% 的肺癌复发病人中 CTC 均呈阳性。对与瘤共生的病患者进行周期性的 CTC 检测，可以在肿瘤复发的早期即可起到实时监测的作用。

目前肿瘤病人耐药的监测一般也是以影像学为主要技术手段。在发现原发灶增大或出现新的转移灶后方可知病人已出现耐药。我们参与的临床实验已经证实，在使用影像学手段确定病人耐药之前的相当一段时间，即可发现病人的 CTC 升高，从而为医生及时更换治疗方案提供了宝贵时间，以上也是 CTC 应用于精准医疗的又一实例。

CTC 的应用前景

转化医学网：您对未来 CTC 检测技术前景是如何预测的？

林平： CTC 检测技术的前景可以从以下 2 点阐述：

1) 自动化 (样本处理及图形采集与分析)：随着越来越多的医生与医院将 CTC 检测作为肿瘤诊断、快速评估疗效及监测肿瘤耐药与复

发的有效手段，自动化高通量处理大量临床标本已成为迫切需要。

2) CTC 单细胞分析：随着人们对 CTC 了解的不断加深，国内外广大医务工作者及科研人员已不再仅仅满足于对 CTC 的有效计数，而是将目光锁定在对具有不同临床意义（如药敏、耐药、转移、复发等）的不同 CTC 亚类细胞进行全面的基因分析，以期能够加深对肿瘤的发生、生长、转移等多方面的了解，并寻找出新的肿瘤标志物（包括蛋白及核酸），从而为肿瘤的有效防治提供更好的客观依据。

SE-iFISH 的未来道路

转化医学网：SE-iFISH 今后的发展方向是什么？

林平：随着人们对肿瘤细胞认识的不断加深，各种新的肿瘤细胞的检测方法也会不断涌现。我们将根据临床需要，不断进一步开发多种适合于不同瘤种的瘤标 SE-iFISH。与此同时，也将密切关注各种新的并且有效的肿瘤细胞检测方法，并将 SE-iFISH 与之进行整合。我们目前关注的重点是如何对 iFISH 锁定的各种具有不同临床意义的 CTC 亚类细胞进行单细胞基因扩增、建库与 NGS 测序。目前我们与相关单位合作，已经取得了非常令人鼓舞的成绩。

林平博士简介：

林平（Peter Lin），医学博士，赛特生物创始人。在中国协和医科大学-北京协和医院攻读硕士期间，与北京医科大学生物物理系、北京大学生物系及化学系合作，在国内首先开发出了利用免疫脂质体溶破技术测定病人地高辛与氨茶碱的血药浓度的方法。

90 年赴美留学，师从著名免疫学及自身免疫病专家 Drs. Carolyn Mold and Terry Duclos 从事 C-反应蛋白及其受体的研究，并获得医学博士学位。同年于美国加州大学医学院，诺贝尔奖获得者 Dr. George Palade 与美国细胞生物学会主席 Dr. Marilyn Farquhar 夫妇实验室进行博士后训练。并与诺贝尔奖得主 Dr. Roger Tsien (钱永健) 教授合作，在肿瘤细胞生物学、内分泌学及脑神经科学等领域就有关 Calnuc 的问题展开深入研究，并取得一系列独创性的实验成果，已发表多篇高质量学术论文。05 年开始带领团队，并致力于循环肿瘤细胞（CTC）相关技术的研发、应用以及临床意义的探讨与研究。该团队通过与美国加州大学旧金山分校（UCSF）综合肿瘤中心的紧密合作，发明了世界首创的差相富集-瘤标免疫荧光染色-染色体原位杂交（SE-iFISH）整合技术。此项技术可对多种肿瘤病人及肿瘤动物模型（PDX 鼠）中具有特殊临床意义的各种 CTC 亚类细胞进行有效捕获、鉴定与分类，从而为靶向 CTC 的单细胞研究奠定了基础。