

IMPROVE REVIEW

标本处理系统篇
Pre-Analytical System

二〇一八年九月刊
September, 2018

Article Reading Guidance
文献导读

Article Abstract Collection
文献摘要

Featured Article
文献精读

Original Article Reading
文献原文

CONTENTS

 Article Reading Guidance
文献导读 | p01

 Article Abstract Collection
文献摘要 | p08

 Featured Article
文献精读 | p28

 Original Article Reading
文献原文 | p35

主编 邓冠华 博士
Chief Editor Dr. Guanhua Deng

联合主编 朱勇 博士
Co-Editor-in-Chief Dr. Yong Zhu

执行主编 高树勇
Executive Editor Shuyong Gao

专刊编辑 李小林 博士 孙其岭 博士 杨艳 博士
Special Editor Dr. Jerry Li Dr. Qiling Sun Dr. Yan Yang

田艳丽 博士 罗江兰
Dr. Yanli Tian Jianglan Luo

审核编辑 吴涛明
Audit editor Taoming Wu

协作单位 阳普学院
Partnership Improve College

广东省医用材料血液相容性研究企业重点实验室
Guangdong Enterprise Key Laboratory of
Blood Compatibility of Medical Materials

美国吉迪思诊断有限公司
GIMDX, Inc.

联系方式 yxsc@improve-medical.com
Contact Us

 **陽普醫療**
IMPROVE MEDICAL



电子文献



Article Reading Guidance

文献导读

本期的文献导读是一篇专家综述《捕获罕见细胞的原理方法及挑战》。随着液体活检技术的发展,以及各种循环肿瘤细胞的发现,针对罕见细胞的追踪和研究,越来越引起人们的关注。要捕获罕见细胞,首先面临的挑战,是这些的稀缺性和由此带来的对捕获技术的精确度和回收率的要求,同时罕见细胞也面临着储存环境和实验环境对其造成的挑战。CellSearch 是第一个成型的罕见细胞的捕获系统,它对循环肿瘤细胞的捕获技术做出了很多关键的定义,尽管它的缺陷时常为后来的研究者所诟病,但是它在罕见细胞领域做出了重要的基础工作,目前它仍然是罕见细胞捕获技术的标准。捕获罕见细胞的基本技术原理有两大类,分别根据细胞的亲和特性以及物理特性来完成。与此相对应的捕获罕见细胞的方法有三类,分别是亲和法、过滤法和芯片法。本文并不企图囊括现有的捕获罕见细胞的技术和平台,而是从大的视野来看罕见细胞技术行业面临的趋势和挑战。罕见细胞的领域,技术和科学体现了相互依存、相辅相成的局面。

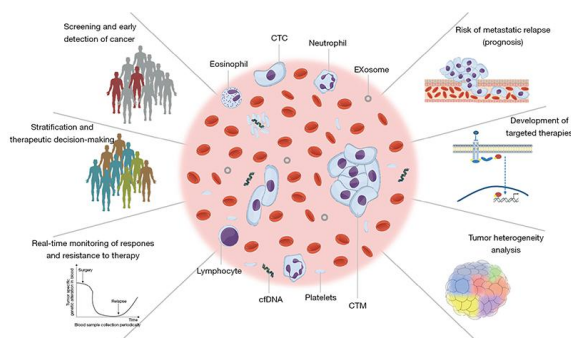
作者介绍:

李小林

北京大学生物化学学士, 杜克大学生物化学博士、博士后。多年从事生物技术的研发、推广、技术以及商务合作。现任美国 GIMDX 公司的市场和技术总监, 兼任阳普医疗标本处理系统产品线首席科学家。

邮件: jli@gimdx.com; 联系地址: GIMDX Inc., Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, USA.

捕获罕见细胞的原理方法及挑战



从临床样品中富集和捕获罕见细胞,是现代诊断学领域的挑战性课题。随着技术的进步,特别是液体活检技术的发展,对罕见细胞的发现和研究也越来越引起人们的关注。在机体内循环的罕见细胞是指在正常生理情况下,存在于血液中但是比例很小的细胞。在很多情况下,循环罕见细胞是突变细胞或者肿瘤细胞,但也可能是特殊的免疫细胞或未知类型的细胞。即便是肿瘤细胞,在确认其肿瘤的性质之前,周

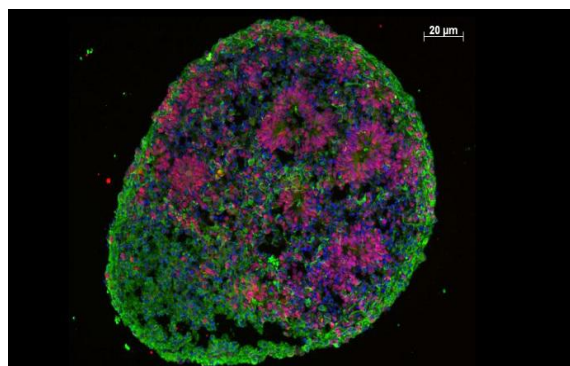
全起见也可以统称为罕见细胞。技术的创新和进步,促进了各种罕见细胞的发现,而接下来的对罕见细胞的识别和学习,促进了科学和认知,进而催生出相应的新技术。所以说,罕见细胞领域的进展,是科学和技术的相互促进的结果。其中,循环肿瘤细胞(CTC)作为最为热门的罕见细胞,推动了罕见细胞技术的建立和发展。

罕见细胞的挑战

罕见细胞提出的首要挑战,是它的稀缺性。拿 CTC 来说,CTC 捕获的技术目标,就是从一定体积的全血样本中(7.5 mL),把少数的肿瘤细胞(等于或小于 5 个)在较短时间内(2 小时或更快)从众多的血液细胞中分离出来^[1-4]。而众多的血液细胞是多少呢?在正常生理情况下,是 3-7 千万的白细胞,加上 5-30 亿个红细胞。这样我们可以看出,在一般情况下 CTC 占整个细胞的比例只有亿分之一(5 个/30 亿),即便是严重的晚期癌症患者,血液中的 CTC 也不过

百万分之一。这就相当于让全球的几十亿人都在一个小时内通过广州火车站，而我们需要把其中特定的 5 个人找出来，同时又不能造成拥堵或者遗落。目标的稀缺性，决定了这项检测的精确度和回收率要求很高。

罕见细胞除了稀缺性的挑战，还面临着储存环境的挑战^[5-7]。从储存环境上看，全血样本一旦离开机体，样本会持续代谢，造成部分血液细胞死亡，基因组核酸、蛋白酶等释放。这些变化对目标的罕见细胞不仅造成掩盖，而且会修饰细胞表面受体，激活细胞内部的信号通路，最终也会造成目标罕见细胞的死亡。而对样品储存常见的低温方法，会激活血小板的凝血通路，迅速改变血液内环境，对稳定和分离单个细胞造成困难。



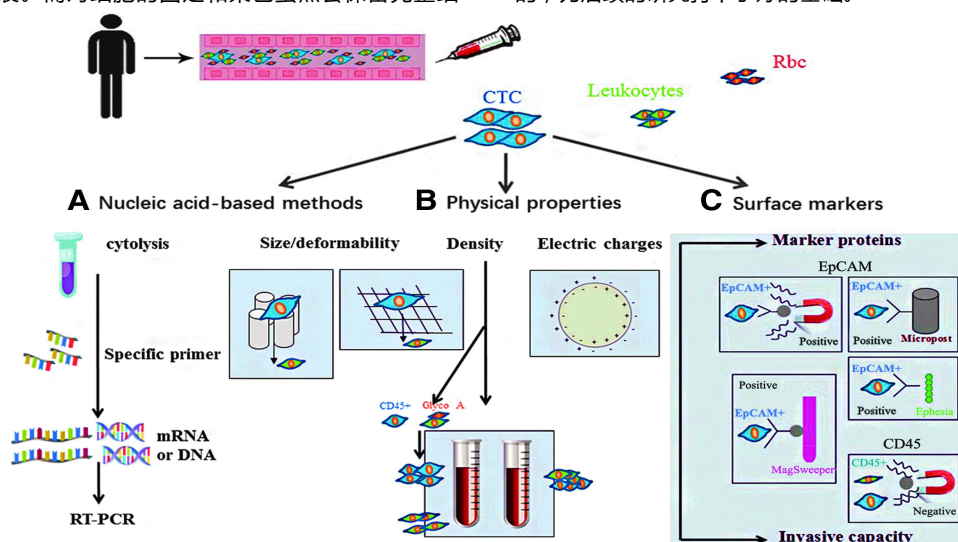
罕见细胞还面临着分离和捕获的实验环境的挑战^[8-11]。罕见细胞之所以能被迅速有效地富集和捕获，是因为医疗器械根据罕见细胞的大小、塑性等物理学性质进行挤压过滤，或者其表面和内部的亲和识别性进行固定和染色。根据物理学性质的分离，不可避免地会对细胞的完整性造成冲击，甚至造成细胞破裂。而对细胞的固定和染色虽然会保留完整细

胞，罕见细胞的计数结果不受影响，但是会造成细胞死亡，核酸泄露，对下游的分析检测造成影响。

CellSearch 技术以及应用

CellSearch 是第一个成型的 CTC 捕获系统，迄今为止它还是唯一的一款通过了 FDA 批准的 CTC 分离系统。在 2004 年 1 月，CellSearch 系统获得了 FDA 的批准，用来对转移型乳腺癌患者的全血进行 CTC 计数，并由此对患者的总存活期和无进展存活期进行预后诊断。几乎与此同时，在 2004 年 8 月份新英格兰医学杂志上的一篇文章验证了 CellSearch 的临床用途^[12]，来自美国的安德森医学中心的一个课题组，使用 CellSearch 系统对 177 名乳腺癌患者进行了 CTC 研究，发现 CTC 计数和患者存活期直接相关。FDA 又相继批准了 CellSearch 用于结直肠癌（2007 年）和前列腺癌（2008 年）的诊断。CellSearch 系统是由 Veridex 公司研发，后来由于公司并购几度易手，但是 CellSearch 本身已经是 CTC 领域的知名品牌。

CellSearch 系统第一次正式地对 CTC 做出了定义，定义工作涵盖了若干关键的技术层面，为此 CellSearch 也就成为了 CTC 捕获和分析领域的金标准。首先它从免疫亲和和方法学上，定义了什么样的细胞是 CTC。根据 CellSearch 的说法，人体血液中的 EpCAM⁺、CK⁺、DAPI⁺和 CD45⁻的细胞，被定义为 CTC。EpCAM⁺是上皮细胞的特征，CK⁺和 DAPI⁺是有核细胞的特征，用来排除无核的红细胞，而 CD45⁻是白细胞的特征，CD45⁻是用来排除白细胞的。从下文我们可以看到，这个定义后来被不断修正、补充甚至质疑，但是这个定义也同时被多次确认，被认为是基本准确的，为后续的研究打下了好的基础。



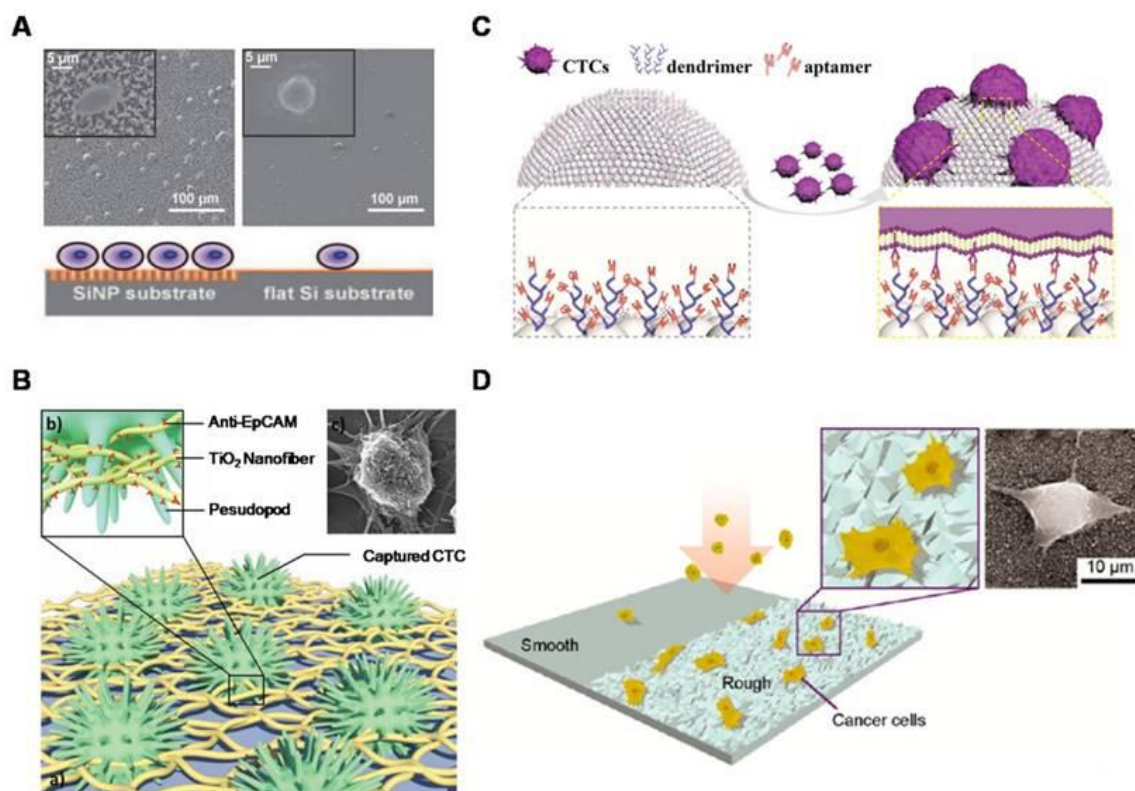
CellSearch 系统还定义了什么是 CTC 的临床分界点。在使用 7.5 毫升全血情况下, 如果发现 5 个 CTC 或者更多, 则乳腺癌患者存活率明显降低^[12,13]。由此, 5 个 CTC 每 7.5 毫升全血, 成为 CTC 计数诊断的临床分界点, 也成为 CTC 领域的计量单位。当然, 不同类型癌症的临床分界点会稍有不同。在后续的医学文献中, 有时干脆对 CTC 数目简称为 5 个, 就是沿用了 CellSearch 的计量单位, 即 5 个 CTC 每 7.5 毫升, 而不是 5 个 CTC 每毫升。

CellSearch 对罕见细胞技术的发展, 以至于对整个液体活检领域, 都起到了决定性的推动作用。这套系统, 提供了最早期的科研文献中所用的 CTC^[12-15], 并在临床研究中多次确认了用 CTC 计数来做肿瘤预后的临床相关性^[16-20]。由于这个系统提供了方便 CTC 来源, 因此催生了更多的 CTC 研究, 包括新的数据分析和新的捕获 CTC 的方法学。CellSearch 本身采用了免疫磁珠分离和荧光染色法, 对 CTC 进行全自动分离操作。在这个平台基础上, 更准确、更有效率的对罕见细胞的富集的概念、方法、算法甚至新的平台被开发出来^[21-26]。几乎所有的改进和更新的方法学, 都是和 CellSearch 这个金标准来对比。

CellSearch 的局限和补充

经过对 CellSearch 捕获了的和漏掉的罕见细胞的研究, 人们逐渐发现 CellSearch 技术的局限。局限之一是它漏掉了一些 CTC, 尤其是对 EpCAM 显示阴性的细胞^[26-32]。用其他方法 (比如 RT-PCR) 可以检出 EpCAM 阴性的肿瘤细胞, 这些细胞在上皮细胞向间质细胞的转化过程中 (EMT), 失去了 EpCAM 的阳性^[33-39]。这些 EpCAM 阴性的细胞, 在特定的检测条件下, 呈现出了很强的肿瘤侵袭能力和扩散能力^[32], 所以这些 EpCAM 阴性的细胞也是 CTC。通过与 CellSearch 的结果进行比较, 人们对 EpCAM 阴性细胞做出更细的分析, 发现了更多的 CTC 细胞亚型。

与此同时, 人们也认识到 CellSearch 方法的可升级性, 只要是通过染色可以识别的细胞, 包括 EpCAM 阴性细胞, 都可以通过更新后的类似 CellSearch 的染色系统来完成捕获。这时人们发现, 是否捕获到全部 CTC 细胞亚型, 对 CellSearch 方法的临床目标, 即 CTC 计数, 是没有很大的影响的。实际上, 即便 CellSearch 漏掉了 EpCAM 阴性的 CTC, 只要正确建立 CTC 计数基准线, 严格使用平行的实验标准, CTC 计数用于预后的结果仍然显示了非常强的临床相关性。



CellSearch 本身的根本局限，是它必须对细胞进行标记和染色，结果造成了大多数被捕获细胞的死亡，自然也终止了这些罕见细胞的可扩增性。罕见细胞技术发展至今，人们已经不满足于 CTC 计数，不满足于只捕获不能培养和扩增的 CTC。无论临床还是科研上，都急需开展对罕见细胞的计数之后的进一步研究。所以，富集和捕获技术急需解决细胞存活的问题。

捕获罕见细胞的技术原理

捕获罕见细胞的基本技术原理有两大类，分别是根据细胞的亲和性（表面抗原、内部抗原等），以及物理性质（大小、塑性、密度、带电性等）来完成。与此相对应的捕获罕见细胞的方法有三类，分别是亲和法、过滤法和芯片法。亲和法是使用抗体或染料对细胞实行标记，通过正向亲和选择和负向亲和选择，来完成罕见细胞的捕获。亲和法的代表产品就是 CellSearch 所采用的磁珠免疫亲和法，此外还有表面免疫亲和法、微阵列亲和法、微流控亲和法、以及无需富集的直接影像分析法等^[40-43]。亲和法的优势，是它对罕见细胞的身份做出了准确的判断，缺点是抗体和染料使用的同时对罕见细胞的活性造成冲击，这对罕见细胞的计数影响不大，但是很大程度上限制了对于罕见细胞的进一步分析。

过滤法是通过细胞的物理性质，主要是细胞大小来分离罕见细胞，一般来说 CTC 比血液中的白细胞和红细胞都大^[44-47]，为此通过微孔过滤技术可以有效地排除大部分血液细胞，在这里细胞无需经过染色和标记，或者只需要轻微的染色和标记，因此捕获后的罕见细胞保留了显著的活性。

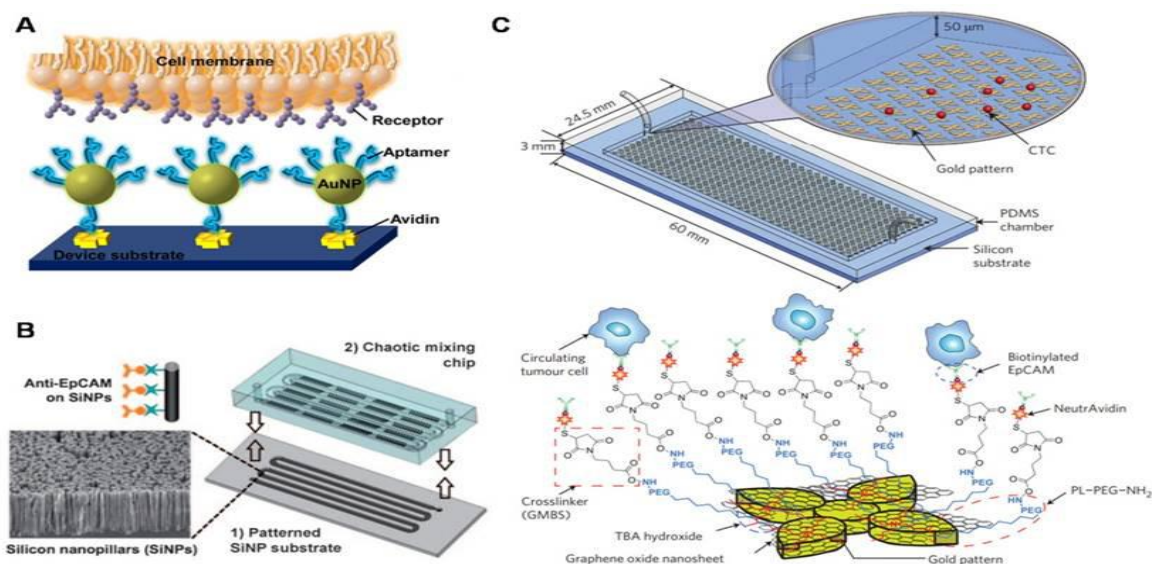
微流控技术广泛应用于罕见细胞的捕获^[48-52]，这个技术结合了亲和法和过滤法的方法学及其优势。微流控技术通过

工程上的集成化，推出了芯片介导的罕见细胞捕获的微系统，我们在这里称它为芯片法。相对于单纯的亲和法或者过滤法，芯片法顺应了罕见细胞捕获的趋势和要求，把过程流程化和模块化，这样在科研和临床使用方面，都更为方便，由此也产生了很多好的研究结果^[53-59]。

挑战机遇同在，技术科学并行

本文并不企图囊括现有的捕获罕见细胞的技术和平台。在一个迅速发展的领域里，包罗万象的总结难度很大也不现实，这样的总结在完成的同时，内容就已经过时了。我们所能做的，是从较大的视野来看捕获罕见细胞的技术，总结行业面临的挑战，这样能让读者对技术发展的趋势，有一个好的把握。

目前对罕见细胞的捕获技术的开发，在取得了诸多进展的同时，也面临着诸多挑战。除了我们前面在讨论提到的罕见细胞本身的问题，即稀缺性、储存环境、实验环境给细胞带来的挑战，罕见细胞技术的本身也还面临挑战。最主要的挑战是罕见细胞的高度异质性，我们感兴趣的罕见细胞，多半是肿瘤细胞和突变产物，他们的数目和状态是未知的。很多情况下在我们发现某一类细胞之前，实际上我们不知道这类细胞的存在。我们在开发和评估细胞捕获的方法学时，常规的流程是使用标准细胞，通常情况下是用有着肿瘤细胞来源的组织培养的细胞，来模拟罕见细胞，从而计算回收率等参数。这些标准细胞的性质、大小、塑性都是稳定均一的，实在是难以模拟罕见细胞的高度异质性。由此而开发的罕见细胞的捕获装置，在评估的时候也面临挑战^[60-62]，普遍做法是和 CellSearch 比对，而 CellSearch 漏掉的细胞则无法计入评估。



从积极的方面看, 罕见细胞技术的进步, 每一次发现了新的种类或亚种的罕见细胞, 都是科学认知的进步。罕见细胞的领域, 技术和科学体现了相互依存、相辅相成的局面, 就像是显微镜的发明开启了细菌学的研究一样。我们期待, 对捕获到的罕见细胞的研究, 会不断丰富我们对这些细胞的认知, 从而指导我们开发出更先进、更实用的罕见细胞捕获的概念和方法。

参考文献

1. Ferreira MM et al. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016 Mar;10(3):374-94.
2. Gabriel MT et al. Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. *Clin Chem*. 2016 Apr;62(4):571-81.
3. Lianidou ES et al. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*. 2011 Sep;57(9):1242-55.
4. Van Berckelaer C et al. Current and future role of circulating tumor cells in patients with epithelial ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2016 Dec;42(12):1772-1779.
5. Wong KHK et al. Whole blood stabilization for the microfluidic isolation and molecular characterization of circulating tumor cells. *Nat Commun*. 2017 Nov 23;8(1):1733.
6. Wong KHK et al. The Role of Physical Stabilization in Whole Blood Preservation. *Sci Rep*. 2016 Feb 15;6:21023.
7. Pantel K et al. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010 Sep;16(9):398-406.
8. Alix-Panabières C1 et al. Characterization of single circulating tumor cells. *FEBS Lett*. 2017 Aug;591(15):2241-2250.
9. Krebs MG et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Mar;11(3):129-44.
10. Xue P et al. Highly efficient capture and harvest of circulating tumor cells on a microfluidic chip integrated with herringbone and micropost arrays. *Biomed Microdevices*. 2015 Apr;17(2):39.
11. Earhart CM et al. Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips. *Lab Chip*. 2014 Jan 7;14(1):78-88.
12. Cristofanilli M et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781-91.
13. Deng G et al. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R69.
14. Hayes DF et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4218-24.
15. Liu Z et al. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med*. 2011 May 19;9:70.
16. Bidard FC et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014 Apr;15(4):406-14.
17. Krebs MG et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1556-63.
18. Adams DL et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch[®] CTC test. *Cytometry A*. 2015 Feb;87(2):137-44.
19. Beije N et al. Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: the clinician's guide to breast cancer treatment? *Cancer Treat Rev*. 2015 Feb;41(2):144-50.
20. Li H et al. Circulating Tumor Cell Analyses in Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Sep;94(38):e1565.
21. Ligthart ST et al. Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. *PLoS One*. 2013 Jun 27;8(6):e67148.
22. Frithiof H et al. A novel method for downstream characterization of breast cancer circulating tumor cells following CellSearch isolation. *J Transl Med*. 2015 Apr 21;13:126.
23. Satelli A et al. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):259-66.
24. Baccelli I et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013 Jun;31(6):539-44.
25. Onstenk W et al. Improved Circulating Tumor Cell Detection by a Combined EpCAM and MCAM CellSearch Enrichment Approach in Patients with Breast Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015 Mar;14(3):821-7.
26. Lustberg MB et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2014 Mar 6;16(2):R23.
27. Schneck H et al. EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLoS One*. 2015 Dec 22;10(12):e0144535.
28. Grover PK et al. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *BMC Cancer*. 2012 May 16;12:178.
29. Cayrefourcq L et al. Establishment and Characterization of a Cell Line from Human Circulating Colon Cancer Cells. *Cancer Res*. 2015 Mar 1;75(5):892-901.
30. Königsberg R et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol*. 2011 Jun;50(5):700-10.

31. Weissenstein U et al. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. *BMC Cancer*. 2012 May 30;12:206.
32. Zhang L et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med*. 2013 Apr 10;5(180):180ra48.
33. Joosse SA et al. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):8-11.
34. Gorges TM et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012 May 16;12:178.
35. Larue L et al. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7443-54.
36. Guarino M et al. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007 Jun;39(3):305-18.
37. Sabbah M et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat*. 2008 Aug-Oct;11(4-5):123-51.
38. Satelli A et al. EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):49329-49337.
39. Hamilton G et al. Mesenchymal-Epithelial Transition and Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2017;994:229-245.
40. Shahneh FZ et al. Sensitive antibody-based CTCs detection from peripheral blood. *Hum Antibodies*. 2013;22(1-2):51-4.
41. Hristozova T et al. A simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers *Cytometry A*. 2012 Jun;81(6):489-95.
42. Watanabe M et al. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. *Cytometry A*. 2014 Mar;85(3):206-13.
43. Marrinucci D et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol*. 2012 Feb;9(1):016003.
44. Yagi S et al. Development of an automated size-based filtration system for isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients. *PLoS One*. 2017 Jun 22;12(6):e0179744.
45. Hosokawa M et al. Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system. *PLoS One*. 2013 Jun 28;8(6):e67466.
46. Hosokawa M et al. Microcavity array system for size-based enrichment of circulating tumor cells from the blood of patients with small-cell lung cancer. *Anal Chem*. 2013 Jun 18;85(12):5692-8.
47. Huang SB et al. High-purity and label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) in a microfluidic platform by using optically-induced-dielectrophoretic (ODEP) force. *Lab Chip*. 2013 Apr 7;13(7):1371-83.
48. Nagrath S et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007 Dec 20;450(7173):1235-9.
49. Dong Y et al. Microfluidics and circulating tumor cells. *J Mol Diagn*. 2013 Mar;15(2):149-57.
50. Lee SW et al. Continuous enrichment of circulating tumor cells using a microfluidic lateral flow filtration chip. *J Chromatogr A*. 2015 Jan 16;1377:100-5.
51. Lee A et al. All-in-one centrifugal microfluidic device for size-selective circulating tumor cell isolation with high purity. *Anal Chem*. 2014 Nov 18;86(22):11349-56.
52. Chiu TK et al. Application of optically-induced-dielectrophoresis in microfluidic system for purification of circulating tumour cells for gene expression analysis-Cancer cell line model. *Sci Rep*. 2016 Sep 9;6:32851.
53. Lin M et al. Nanostructure embedded microchips for detection, isolation, and characterization of circulating tumor cells. *Acc Chem Res*. 2014 Oct 21;47(10):2941-50.
54. Li W et al. Biodegradable nano-films for capture and non-invasive release of circulating tumor cells. *Biomaterials*. 2015 Oct;65:93-102.
55. Chen W et al. Nanoroughened adhesion-based capture of circulating tumor cells with heterogeneous expression and metastatic characteristics. *BMC Cancer*. 2016 Aug 8;16:614.
56. Chikaishi Y et al. EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip'. *Oncol Rep*. 2017 Jan;37(1):77-82.
57. Khamenehfar A et al. Microfluidic Devices for Circulating Tumor Cells Isolation and Subsequent Analysis. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(9):810-21.
58. Hyun KA et al. Two-stage microfluidic chip for selective isolation of circulating tumor cells (CTCs). *Biosens Bioelectron*. 2015 May 15;67:86-92.
59. Kim YJ et al. A microchip filter device incorporating slit arrays and 3-D flow for detection of circulating tumor cells using CAV1-EpCAM conjugated microbeads. *Biomaterials*. 2014 Aug;35(26):7501-10.
60. Huebner H et al. Filtration based assessment of CTCs and CellSearch® based assessment are both powerful predictors of prognosis for metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2018 Feb 20;18(1):204.
61. Sheng W et al. Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip. *Lab Chip*. 2014 Jan 7;14(1):89-98.
62. Reátegui E et al. Tunable nanostructured coating for the capture and selective release of viable circulating tumor cells. *Adv Mater*. 2015 Mar 4;27(9):1593-9.



“百炼成蝶”

ImproSafe® 一次性使用防针刺静脉采血针



权威 · 无菌 · 安全 · 齐全



Article Abstract Collection

文献摘要

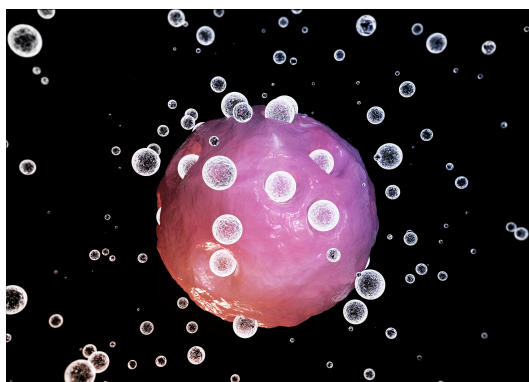
本期的文献摘要，选取了专家综述中的若干重要的引用文献，针对综述做了中文翻译。这些文章代表了捕获罕见细胞技术的现状和前景。这些文献包括的领域是，对罕见细胞或是循环肿瘤细胞捕获技术的综述，CellSearch 系统在科研中应用，CellSearch 在临床研究中的报道，以及针对这项技术的局限性的研究。所选用的文献还包括了论述罕见细胞捕获原理和方法的文章，包括亲和法和物理分离法方面的文章，微流控和芯片介导技术的文章，这些文章代表了最近三年内捕获罕见细胞领域的研究进展。

参考文献摘要翻译

1. Ferreira MM et al. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol.* 2016 Mar;10(3):374-94.

摘要

循环肿瘤细胞是“液体活检”的一个组成部分，具有改变当前癌症治疗领域的巨大潜力。解开 CTC 临床应用的关键挑战在于能够使用适合下游表征和其他应用的方法来检测和分离这些罕见细胞。在这篇综述中，我们将简要介绍用于检测和捕获 CTC 的当前技术，并简要介绍各种技术的工作原理。我们专注于不同平台采用的策略，并讨论每个平台的优势。随着我们对 CTC 的生物学理解日趋成熟，CTC 技术将需要进一步发展，并且我们将围绕着上皮-间质转化、肿瘤起始细胞和 CTC 簇的现有的数据讨论该领域目前面临的一些挑战。



2. Lianidou ES et al. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem.* 2011 Sep;57(9):1242-55.

摘要

背景：循环肿瘤细胞（CTC）分析是一个用于评估癌症患者转移复发和转移进展风险的有前景的新诊断领域。

内容：已经开发了用于免疫细胞化学和分子测定的不同的 CTC 分离和检测分析系统，大多数包括按大小或生物学特征的分离步骤，例如上皮细胞或癌症特异性标记物的表达。CTC 检测和表征的最新技术进步包括基于多重逆转录定量 PCR 的方法和基于成像和微过滤器和微芯片装置的方法。新的研究领域是针对开发用于 CTC 分子表征的新型分析。QC 是 CTC 分析的一个重要问题，微转移细胞检测和表征方法的标准化对于将 CTC 纳入前瞻性临床试验以测试其临床效用非常重要。CTC 的分子特征可以提供关于这些细胞的分子和生物学性质的重要信息，例如激素受体和表皮和其他生长因子受体家族成员的状态，以及干细胞特征的迹象。该信息对于鉴定 CTC 中的治疗靶标和抗性机制以及患者的分层和全身治疗的实时监测是重要的。

总结：CTC 分析是一种可用作乳腺癌和其他癌症的预后

和预测目的的液体活检方法。在这篇综述中，我们专注于最先进的 CTC 分离、成像和检测技术平台、CTC 分析的质量控制和 CTC 的分子表征的持续挑战。

3. **Van Berckelaer C et al. Current and future role of circulating tumor cells in patients with epithelial ovarian cancer. Eur J Surg Oncol. 2016 Dec;42(12):1772-1779.**

摘要

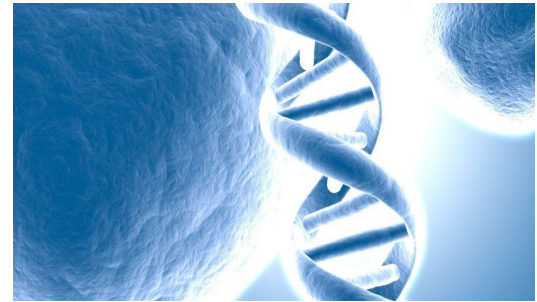
循环肿瘤细胞 (CTC) 是释放到循环系统中的活的肿瘤细胞。CTC 已在许多实体瘤中显示出预后价值。上皮性卵巢癌 (EOC) 的 CTC 研究很少受到关注。由于 EOC 中转移的主要途径被认为是腹腔中的直接腹膜扩散，并且仅在三分之一的患者中发生远处转移，因此认为在循环中没有足够的肿瘤细胞脱落。然而，最近的研究揭示了血液扩散在 EOC 中的重要作用，并显示 CTC 状态与晚期肿瘤分期、CA-125 水平和手术后残留疾病相关。此外，CTC 的存在与较短的总体和无疾病存活相关。然而，CTC 在 EOC 中的这种预后价值似乎取决于所使用的分离和检测方法。基于 EOC 功能或基于密度的富集方法似乎提供了更有希望的结果，然后是基于上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的方法。这可以通过 EOC 中的少量 EpCAM 阳性 CTC 和上皮-间质转化 (EMT) 期间 EpCAM 的下调来解释。CTC 的存在也可能具有预测价值，因为在两项研究中 CTC 的状态与治疗反应相关，CTC 显示在小群体中是 CA-125 的更好的监测工具。CTC 的 (基因型) 表征在未来可能变得更加重要，从而为 CTC 铺平道路，使其成为真正的预测性“液体肿瘤活体组织检查”。

4. **Wong KHK et al. Whole blood stabilization for the microfluidic isolation and molecular characterization of circulating tumor cells. Nat Commun. 2017 Nov 23;8(1):1733.**

摘要

精确的罕见细胞技术需要立即处理或用固定剂稳定血液。这些限制了基于循环肿瘤细胞 (CTC) 的液体活检测定的翻译，这些翻译提供了准确的分子数据以指导临床决策。在这里，我们描述了一种通过将低温保存与针对冷却诱导的血小板活化的靶向策略相结合来保持全血处于其最小改变状态的方法。使用这种方法，可以容易地处理保存长达 72 小时的全血用于微流体分选而不损

害 CTC 产量和活力。肿瘤细胞保持高品质的完整的 RNA 适合于单细胞 RT-qPCR 以及 RNA 测序，从而使癌症特异性转录物，包括在前列腺癌患者中的雄激素受体剪接变体 7 的可靠检测，在新鲜血液和保存血液之间的总体一致性为 92%。这项工作将成为传播各种血液诊断的跳板。



5. **Wong KHK et al. The Role of Physical Stabilization in Whole Blood Preservation. Sci Rep. 2016 Feb 15;6:21023.**

摘要

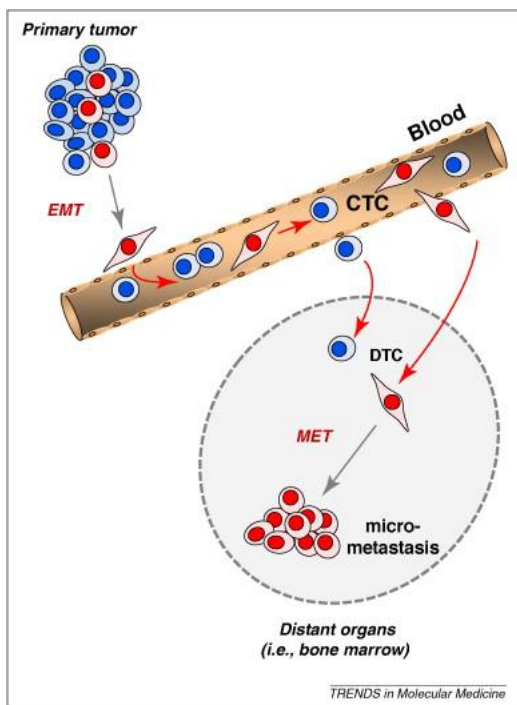
离体血液的快速降解对医学诊断和科学研究中血源性细胞的利用施加了运输上的限制。在这种液体组织的储存中被忽视的方面是血液沉降，其引起物理压力和压紧，聚集血细胞，并且由于白细胞活化引起附带损伤。在这里，我们展示了 70 kDa 的聚合物聚蔗糖可以稳定血液样本并在 72 小时内防止血液沉淀，主要通过抑制耗尽介导的红细胞聚集。物理稳定减少了棘状红细胞的形成，改善了白细胞的活力，并抑制了中性粒细胞弹性蛋白酶的释放——中性粒细胞弹性蛋白酶是中性粒细胞胞外陷阱形成的标志。此外，聚蔗糖稳定的血液与常见的白细胞富集技术相容，包括红细胞裂解和免疫磁性纯化。该研究首次表明，使用聚合物可以预防血液沉降，并对诊断产生影响。

6. **Pantel K et al. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. Trends Mol Med. 2010 Sep;16(9):398-406.**

摘要

最近开发了超灵敏方法来检测癌症患者的骨髓 (BM) 中的外周血和播散性肿瘤细胞 (DTC) 中的循环肿瘤细胞 (CTC)。对这些新方法的研究表明，BM 是一种常见的归巢器官，也是来自各种器官部位 (包括乳腺癌，前列腺癌，肺癌和结肠癌) 的 DTC 的储库。然而，外

周血分析对于患者来说比侵入性 BM 采样更方便, 并且许多研究小组目前正在评估 CTC 对于预后和监测对全身治疗的响应的临床效用。此外, CTCs/DTC 的分子分析为转移生物学提供了新的见解, 对癌症患者的临床管理具有重要意义。



7. Alix-Panabières C1 et al. Characterization of single circulating tumor cells. *FEBS Lett.* 2017 Aug;591(15):2241-2250

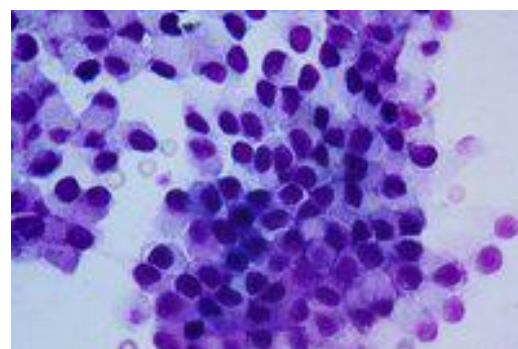
摘要

“液体活组织检查”已被引入用于分析癌症患者血液中的循环肿瘤细胞 (CTC), 这种新的诊断方法受到了极大的关注。CTC 来自来自原发性和转移性病变肿瘤, 因此具有与肿瘤进展和癌症治疗相关的分子特征的重要信息。对 CTC 的分析为个性化医疗铺平了新的诊断途径, 具有明显的临床意义。CTC 的临床应用的关键领域包括癌症的检测、可治愈疾病患者的预后预测、监测全身治疗、以及基于治疗靶标或抗性机制的检测对患者进行分层。本综述将重点介绍当前从 DNA、RNA 和蛋白质水平的 CTC 单细胞分析中获得的知识, 并强调进行功能研究的独特机会, 旨在识别癌症患者的转移-起始细胞并获得指导癌症治疗的预测信息。

8. Krebs MG et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014 Mar;11(3):129-44

摘要

关于肿瘤内异质性越来越多的证据告诉我们, 单点活检不能揭示肿瘤的完整基因组景观。随着靶向试剂的扩展进入临床, 筛选肿瘤的基因组畸变变得越来越重要, 因为基于疾病进展可以询问肿瘤的抗性机制。在空间和时间上分开多个活组织检查是不切实际的, 对患者来说是不舒服的并且并不是没有风险的。在这里, 我们描述了从微创血液检测中捕获的循环肿瘤细胞 (CTC) 如何有可能为肿瘤内异质性和肿瘤进化提供信息, 尽管它在临床上有多大用处将来有待确定。用于检测和分离 CTC 的技术包括经过验证的 CellSearch® 系统, 但其他技术也正在异军突起。我们还讨论了最近的 CTC 发现如何映射到血液学扩散的机制, 先前在临床前模型中描述, 包括上皮-间质转化, 集体细胞迁移和循环内具有肿瘤起始能力的细胞的证据。单细胞分子分析的进展正在增强我们探索转移机制的能力, 并且预期 CTC 和无细胞 DNA 分析的组合可为实时患者监测和治疗分层提供宝贵的血源性生物标志物。



9. Xue P et al. Highly efficient capture and harvest of circulating tumor cells on a microfluidic chip integrated with herringbone and micropost arrays. *Biomed Microdevices.* 2015 Apr;17(2):39.

摘要

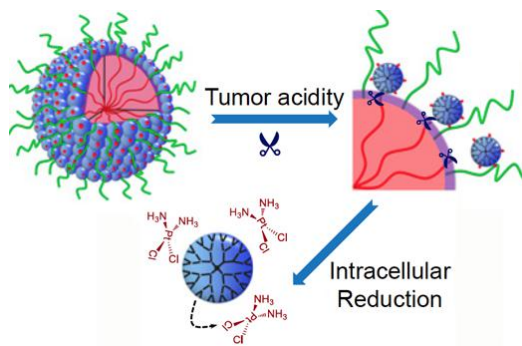
循环肿瘤细胞 (CTC) 来源于原发肿瘤部位并转运至远处器官, 被认为是转移的主要原因。到目前为止, 已经将各种技术应用于 CTC 分离和计数。然而, 仍存在对提高 CTC 捕获灵敏度的巨大需求, 并且从装置中有效洗脱细胞以进行进一步的生物分子和细胞分析仍然具有挑战性。在这项研究中, 我们制造了一个人字形结构和微柱阵列集成的双功能芯片, 通过基于 EpCAM 的免疫反应实现 CTC 捕获和洗脱。选择 Hep3B 肿瘤细胞系作为用于使用该装置进行处理的 CTC 的模型。结果表

明, Hep3B 细胞的捕获限度可达到 10 个细胞 (每 mL 样品体积), 捕获效率平均为 80 %。此外, 捕获的 Hep3B 细胞的洗脱率平均可达到 69.4%, 细胞数从 1 到 100 不等。这些结果表明该装置具有双重功能, 具有相当高的捕获率和洗脱率, 表明其有希望能够用于癌症的诊断和治疗。

10. Earhart CM et al. Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips. *Lab Chip*. 2014 Jan 7;14(1):78-88.

摘要

循环肿瘤细胞 (CTC) 的检测和表征可以揭示对恶性疾病的诊断和治疗。迄今为止开发的用于分离 CTC 的技术受到一个或多个限制, 例如低通量、不能释放捕获的细胞、以及依赖昂贵的仪器进行富集或随后的表征。我们报告了磁力分离装置的持续发展, 磁力分离器是一种微型微流体芯片, 具有密集的磁孔阵列。它能够高效捕获肿瘤细胞, 用磁性纳米粒子标记, 从全血中高通量和有效释放捕获的细胞。对于 CTC 的后续表征, 已经实施了使用具有巨磁阻纳米传感器的蛋白质芯片的测定, 用于对富含磁性筛的 CTC 进行突变分析。使用这些作为独立装置的磁性技术可以引导癌症患者的“液体活体组织检查”的常规制备和表征。



11. Cristofanilli M et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781-91.

摘要

背景: 我们检验了循环肿瘤细胞水平可以预测转移性乳腺癌存活率的假设。

方法: 在一项前瞻性多中心研究中, 我们在患者开始新的治疗方案和第一次随访之前, 对 177 名患有可测量的转移性乳腺癌的患者进行了循环肿瘤细胞水平测试。通过在参与的中心中使用标准成像研究确定疾病的进展或治疗的反应。

结果: 在患者开始转移性疾病的新治疗之前, 根据基线处的循环肿瘤细胞水平评估结果。与 7.5 mL 全血中循环肿瘤细胞数少于 5 个的组相比, 循环肿瘤细胞水平等于或高于每 7.5 mL 全血中 5 个的患者的中位无进展生存期 (2.7 个月对 7.0 个月, $p < 0.001$) 和总生存期 (10.1 个月对大于 18 个月, $p < 0.001$) 较短。在开始治疗后的第一次随访时, 两组之间的这种差异持续存在 (无进展生存期, 2.1 个月对 7.0 个月, $p < 0.001$; 总生存期, 8.2 个月对大于 18 个月, $p < 0.001$)。并且, 预后不良的患者比例降低 (从 49% 降至 30%), 表明治疗有益。多变量 Cox 比例风险回归显示, 在统计模型中的所有变量中, 基线和第一次随访时循环肿瘤细胞的水平是无进展生存期和总生存期的最重要预测因子。

结论: 治疗前循环肿瘤细胞的数量是转移性乳腺癌患者无进展生存期和总生存期的独立预测因子。

12. Deng G et al. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R69.

摘要

引言: 在大多数癌症患者中可检测到循环肿瘤细胞 (CTC), 并且它们可满足在治疗过程中监测癌症患者的现有的医疗需求并帮助确定复发性疾病。在癌症患者的血液中很少发现 CTC, 并且富集是敏感性 CTC 检测所必需的。尽管 CTC 鉴定的标准是细胞角蛋白阳性 (CK+)、CD45 阴性 (CD45-) 和 4'6-二脒基-2-苯基吲哚 (核染色) 阳性 (DAPI+), 但大多数 CTC 富集技术是基于抗-EpCAM 抗体的。然而, 一些肿瘤细胞表达低或没有 EpCAM。在这里, 我们提出了一种高度灵敏和可重复的富集方法, 该方法基于与单独的抗 CK 或抗 CK 和抗 EpCAM 抗体的组合的结合。

方法: 使用 CellSearchtrade 标记系统 (Veridex, LLC, Raritan, NJ, USA) 处理来自 49 名患有转移性乳腺癌

的患者的血液样品，与我们的 CTC 测定方法平行。我们单独使用抗 CK 或与抗 EpCAM 抗体组合用于 CTC 富集。Brightfield 和荧光标记的抗 CK、抗 CD45 和 DAPI（核染色）图像用于 CTC 鉴定。Ariol®系统（Genetix USA Inc, San Jose, CA, USA）用于自动细胞图像捕获和玻璃载玻片上 CTC 的分析。

结果：我们的方法能够富集三种类型的 CTC，包括 CK+和 EpCAM+，CK+和 EpCAM-/低，以及 CK-/低和 EpCAM+细胞。在盲法比较中，我们的抗 CK 抗体富集方法显示出显著更高的 CTC 阳性率（49%对 29%）和更大的动态 CTC 检测范围（1 至 571 对 1 至 270），对比 CellSearchtrade 标记系统共有 49 名乳腺癌患者。在具有较高 CTC 计数（每 7.5 mL 血液 > 20 个 CTC）的患者中，我们的方法检测到比 CellSearchtrade 标记方法多 15-111% 的 CTC。根据来自 Ariol®系统的三个荧光和明场图像建立的 CTC 标准减少了假阳性 CTC 事件的数量。

结论：我们的数据表明肿瘤特异性细胞内 CK 标记可用于有效的富集 CTC。单独使用抗 CK 或与抗 EpCAM 抗体结合使用可显著提高检测灵敏度。使用 Ariol (R) 系统的三个荧光和明场优质图像减少了假阳性 CTC 事件。

13. Hayes DF et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4218-24.

摘要

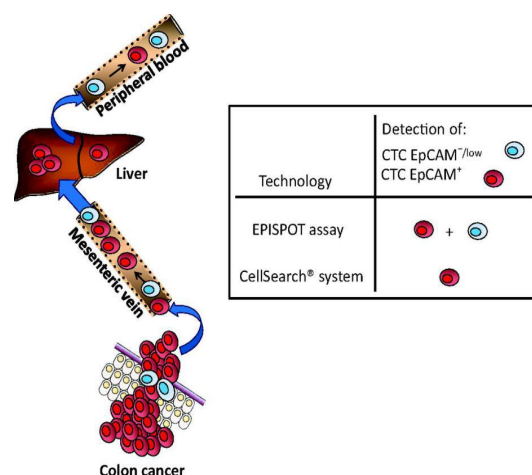
目的：我们之前报道过，在基线上，每 7.5 mL 血液中 ≥ 5 个循环肿瘤细胞（CTC）和 177 例转移性乳腺癌（MBC）患者的首次随访中，与较差的临床结果相关。在本研究中，评估了随后随访时的其他随访数据和 CTC 水平。

实验设计：在开始新疗程（基线）之前和治疗开始后 3-5、6-8、9-14 和 15-20 周，在 177 个 MBC 患者中计数 CTC。从每次随访抽血日期计算无进展存活（PFS）和总存活（OS）时间。在每次抽血时使用 ≥ 5 个 CTC/7.5 mL 的阈值进行 Kaplan-Meier 图和存活分析。

结果：五个抽血时间点中 < 5 个 CTC 患者的中位 PFS 时间分别为 7.0、6.1、5.6、7.0 和 6.0 个月。对于 ≥ 5 个

CTC 的患者，来自这些相同时间点的中位 PFS 显著缩短：分别为 2.7、1.3、1.4、3.0 和 3.6 个月。5 个抽血时间点 < 5 个 CTC 患者的中位 OS 均 > 18.5 个月。对于 ≥ 5 个 CTC 的患者，来自这些相同时间点的中位 OS 显著缩短：分别为 10.9、6.3、6.3、6.6 和 6.7 个月。基线时和治疗开始后 9 至 14 周的中位 PFS 和 OS 时间在统计学上差异显著。

结论：在治疗期间的任何时间检测升高的 CTC 是 MBC 患者随后的快速疾病进展和死亡率的准确指示。



14. Liu Z et al. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med.* 2011 May 19;9:70.

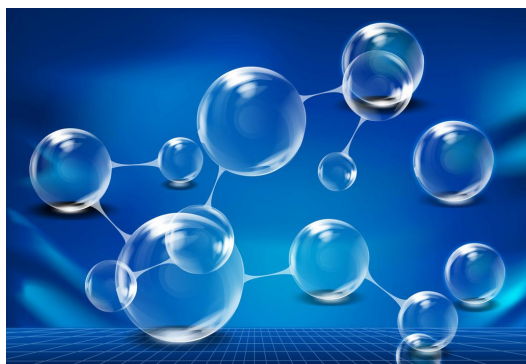
摘要

背景：用于富集循环肿瘤细胞（CTC）的阳性选择策略的限制是可能存在表面靶标记物表达不足的 CTC，可能被该过程遗漏。我们优化了基于去除白细胞的 CTC 富集、后续检测和表征的方法。

方法：开发了两步方案用于处理 20 mL 血液并基于红细胞裂解，然后去除白细胞。剩余物质用上皮标志物 EpCAM 和细胞角蛋白（CK）7/8 染色或用黑素瘤标志物 HMW-MAA/MCSP 染色。通过流式细胞术检测 CTC。从患者的血液中富集的 CTC 被定义为 EpCAM+CK+CD45-。从患有黑素瘤的患者的血液中富集的 CTC 被定义为 MCSP+CD45-。分析了来自 70 名转移性癌（n = 48）或转移性黑素瘤（n = 22）的患者的 116 个连续血样。

结果：在来自癌症患者的 84 个血样中的 47 个（56%）中检测到 CTC，在来自黑色素瘤患者的 32 个样品中的 17 个（53%）中检测到 CTC。在胸腔积液标本以及 NSCLC 患者的外周血样本中检测到 CD45-EpCAM-CK+。EpCAM-CK+ 细胞已成功培养并传代超过 6 个月，表明它们的肿瘤起源。CGH 证实了这一点。通过将癌症患者的 CTC 定义为 CD45-CK+ 和/或 EpCAM+，检出率增加至 73%（61/84）。

结论：使用 CD45 去除富集 CTC 允许检测不显示经典表型的上皮癌细胞。这可能实现更准确地估计 CTC 的数量。如果检测到没有经典上皮表型的 CTC，则需要确定临床相关性。

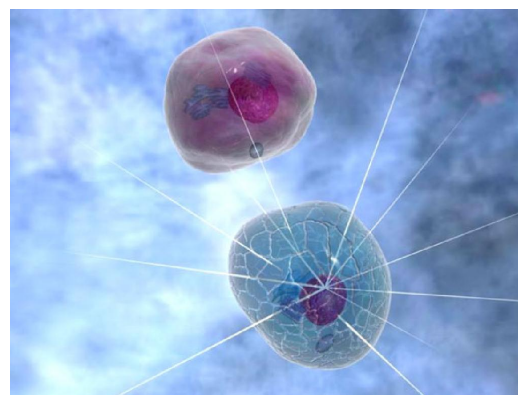


15. Adams DL et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch® CTC test. *Cytometry A*. 2015 Feb;87(2):137-44.

摘要

最近的研究报告了在癌症患者血液中数百至数千个循环肿瘤细胞（CTC），提出了关于 CTC 的普遍的问题，正如 CellSearch®CTC 测试所列举的那样。虽然 CellSearch 已被证明可以持续检测临床相关的 CTC，仅捕获 EpCAM 阳性细胞的能力导致人们猜测它捕获了有限的 CTC 亚群。相反，CTC 分离的替代方法通常被引用为从患者血液中捕获大量 CTC。毫不奇怪，与 CellSearch 相比，通过替代方法分离的细胞数量显示出差的相关性，即使在考虑 EpCAM 存在或不存在时也是如此。为了解决这种差异，我们进行了一项探索性方法比较研究，以使用微滤系统（CellSieve™）和 CellSearch 对来自 30 名乳腺癌和前列腺癌患者的重复血液样本中捕获的 CTC 亚组进行表征和比较。然后，我们将 CellSieve 细胞角蛋白（CK）+/CD45-/DAPI+ 的细胞分为五个形态不同的亚群进行相关分析。与其他过滤技术一样，CellSieve 分离

出比 CellSearch 更多的 CK+/CD45- 细胞。此外，分析显示，无论 EpCAM 存在与否，通过这两种测定捕获的总 CK+/CD45- 细胞之间的相关性低。然而，基于不同的细胞角蛋白染色模式和核形态的 CK+/CD45-/DAPI+ 细胞的亚组分析阐明了与 CellSearch 相关的亚群。使用方法比较分析，我们确定了特定的 CTC 形态，在两种不同的捕获方法之间高度相关。这些数据表明，虽然癌症患者的血液中存在具有相似表型表达的各种形态学的 CTC，但是可以使用非 EpCAM 依赖性分离来鉴定 CellSearch 分离的临床相关细胞。

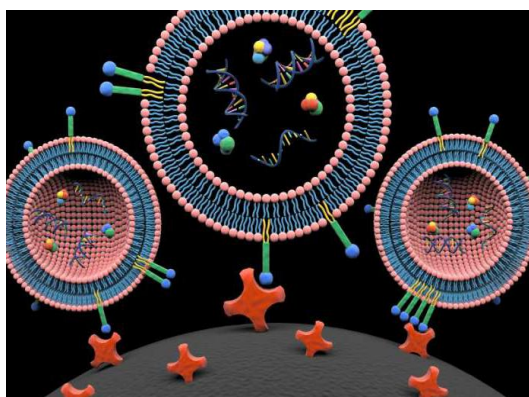


16. Li H et al. Circulating Tumor Cell Analyses in Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *Medicine* (Baltimore). 2015 Sep;94(38):e1565

摘要

在几种上皮恶性肿瘤中，外周血中循环肿瘤细胞（CTC）的检测具有诊断、预后和治疗意义。然而，CTC 在食管鳞状细胞癌（ESCC）中的临床相关性尚未确定。该研究旨在通过使用 2 个 CTC 检测系统，一个上皮标志物依赖性和另一个上皮标志物非依赖性来确定 ESCC 患者中 CTC 的临床意义。在治疗前从 61 名 ESCC 患者中前瞻性地获得配对的外周血样品，并分析通过 CellSearch 系统（CS）分离的 CTC 和通过上皮肿瘤大小（ISET）分离方法分离的 CTC。来自 22 名健康志愿者的血液样品用作对照。在 61 名研究对象中，通过 ISET 方法在 20 名患者（32.8%）中检测到 CTC，通过 CS 方法仅在 1 名患者（1.6%）中检测到 CTC。使用 ISET 的 61 名患者中有 3 名（4.9%）观察到循环肿瘤微栓子（CTM），但是通过 CS 方法在任何患者中都检测不到。两种方法均未在对照组中检测到 CTC/CTM。通

过 ISET 方法，CTC 的存在似乎与 ESCC 的阶段和基线中血小板水平相关。未观察到与任何其他相关临床病理学变量的相关性。我们的结果清楚地表明 CS 和 ISET 方法检测来自 ESCC 患者的外周血样品中的 CTC 的能力。然而，与 ISET 方法相比，CellSearch 系统似乎灵敏度较差。进一步的研究对于评估此类技术在 ESCC 中的作用至关重要。



17. Ligthart ST et al. Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. PLoS One. 2013 Jun 27;8(6):e67148.

摘要

背景：转移性乳腺癌、结肠直肠癌和前列腺癌患者中存在循环肿瘤细胞（CTC）是预后不良的指征。先前开发的用于消除人工计数 CTC（mCTC）的可变性的自动 CTC（aCTC）算法用于提取形态学特征。在这里，我们验证了来自前列腺癌、乳腺癌和结肠直肠癌患者的 CTC 图像上的 aCTC 算法，并研究了定量形态学参数的作用。

方法：使用 CellSearch 系统获得来自患有前列腺癌、乳腺癌和结肠直肠癌、健康对照、良性乳腺和结肠直肠癌患者的样品的存储图像。分析图像中 aCTC 的存在，并测量它们的形态学参数并和存活相关性。

结果：aCTC 和 mCTC 的总生存风险相比没有显著差异。CTC 的数量与生存相关性最强，而 CTC 大小、圆度和凋亡特征在单变量分析中达到显著性，但在多变量分析中则不然。在 204 个健康对照中的 7 个和 694 个良性肿瘤中的 9 个中发现一个 aCTC/7.5 mL 血液。在一名患有良性肿瘤 2 的患者中检测到另外 9 个 aCTC。

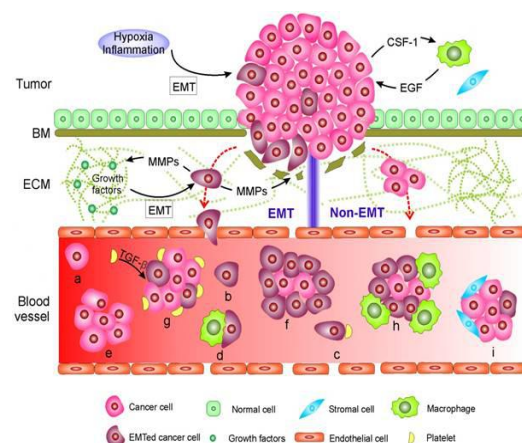
18. Frithiof H et al. A novel method for downstream

characterization of breast cancer circulating tumor cells following CellSearch isolation. J Transl Med. 2015 Apr 21;13:126.

摘要

背景：从微创血液样本中获得的循环肿瘤细胞（CTC）的计数已被充分确立为转移性和早期乳腺癌以及其他几种癌症类型中的有价值的监测工具。用于在数百万白细胞背景下检测血液中 CTC 的金标准技术是 FDA 批准的 CellSearch 系统（Janssen Diagnostics），其依赖于基于 EpCAM 的免疫磁性分离。这些细胞的二次表征可以基于这些细胞中的特定靶标进行治疗选择，以及提供转移过程的实时窗口并提供对肿瘤异质性的独特见解。本研究的目的是开发一种用 CellSearch 系统分离后 CTC 下游表征的方法。

方法：以乳腺癌细胞系 MCF7 [ERα (+)/HER2 (-)] 和 SKBr3 [ERα (+)/HER2 (-)] 为靶点，建立了一种体外 CTC 模型系统，该系统侧重于临床中有用的乳腺癌治疗预测生物标志物，特别是雌激素受体α (ERα) 和人表皮生长因子受体 2 (HER2)。在通过 CellSearch 进行 CTC 分离后，使用内部开发的 CTC-DropMount 技术将捕获的 CTC 进一步富集并固定在显微镜载玻片上。



结果：CellSearch Profile 分析和 CTC-DropMount 后 CTC 的回收率为 87%。优化了选择性和一致的三重免疫染色方案。DAPI 阳性细胞、细胞角蛋白 (CK) 8、18 和 19 阳性，但白细胞特异性标记物 CD45 阴性的细胞被分类为 CTC，随后分析 ERα 和 HER2 表达。该方法在乳腺癌患者样品中得到验证，从而证明其临床相关性。

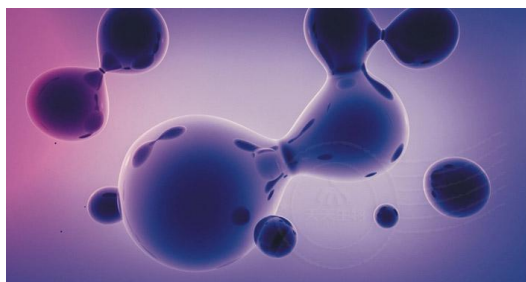
结论：我们的结果表明，使用新开发的 CTC-DropMount

技术可以确定在乳腺癌 CTC 中表达的重要预测生物标志物的状态。使用标准荧光显微镜对多种生物标志物的下游表征表明,可以在 CellSearch 上皮或轮廓分析之后从单个患者血液样品获得重要的临床和生物信息。

19. Baccelli I et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.* 2013 Jun;31(6):539-44.

摘要

据推测,癌症转移是由患者血液中发现的循环肿瘤细胞 (CTCs) 亚群引发的。然而,尽管 CTCs 的存在是一些癌症实体预后不良的指标,CTCs 中转移起始细胞 (MICs) 的存在和表型尚未得到实验证实。这里我们开发了一种异种移植试验,并用它来显示原发性人腔内乳腺癌 CTCs 含有引起小鼠体内骨、肺和肝转移的 MICs。这些含有 MIC 的 CTC 群体表达了 EPCAM、CD44、CD47 和 MET。在一小群转移患者中,EPCAM (+)、CD44 (+)、CD47 (+)、MET (+) CTCs 的数量 [不含大量 EPCAM (+) CTCs] 与总生存率降低和转移部位增多有关。这些数据描述了功能性循环 MICs 和相关标记,这可能有助于设计更好的诊断和治疗转移性乳腺癌的工具。



20. Onstenk W et al. Improved Circulating Tumor Cell Detection by a Combined EpCAM and MCAM CellSearch Enrichment Approach in Patients with Breast Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015 Mar;14(3):821-7.

摘要

通过 CellSearch 系统在 20%-25% 的原发性乳腺癌 (pBC) 患者中检测到了循环肿瘤细胞 (CTC)。为了改善 CTC 的检测,我们研究了黑色素瘤细胞粘附分子 (MCAM) 作为上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 旁边的

富集标记物,并在试验中测试了 HER2 阴性 II/III 期 pBC 开始新辅助化疗 (NAC) 的患者中 MCAM 阳性 CTCs 的临床相关性。利用系统,在基线和第一次 NAC 循环后,分别从 7.5 mL 血液中富集了 EpCAM 阳性和 MCAM 阳性的 CTCs。利用流式细胞术检测了循环内皮细胞 (CEC)。主要目的是结合 EpCAM/MCAM 将 CTC 的检出率提高到 $\geq 40\%$ 。还探讨了 CTC 和 CEC 计数与病理完全反应 (pCR) 的相关性。基线时,我们分别检测了 68 例患者中 12 例 (18%) 和 68 例患者中 8 例 (12%) 的 EpCAM 阳性和 MCAM 阳性 CTCs。一个周期后,又分别检测了 44 例患者中的 7 例 (16%) 和 44 例患者中的 7 例 (16%)。检测率从基线时的 18% 和使用 EpCAM 一个周期后的 16% 分别提高到 25% ($p = 0.08$) 和 30% ($p = 0.02$)。在基线时,没有检出拥有 MCAM 阳性 CTCs 的患者与 23% 没有 MCAM 阳性 CTCs 的患者在基准线时达到 pCR ($p = 0.13$)。EpCAM 阳性的 CTCs 和 CEC 计数与 pCR 无关。联合 EpCAM/MCAM CellSearch 富集,提高了 II/III 期 pBC 中 CTC 的检出率。对于 NAC 我们没有发现 CTC 和 CEC 计数与 pCR 的关联。MCAM 阳性 CTCs 的临床相关性值得进一步研究。

21. Lustberg MB et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2014 Mar 6;16(2):R23.

摘要

引言:循环肿瘤细胞 (CTCs) 通常通过阳性选择靶向上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 从血液中分离。然而,EpCAM 可以在转移进展期间下调,或者它最初可能就不存在。我们设计了目前的前瞻性试验来表征转移乳腺癌妇女血液样品中的 CTCs 和其他循环细胞群,这个试验没有借助依赖 EpCAM 的富集和/或分离技术。

方法:共纳入 32 例转移性乳腺癌患者,血液样品使用前面描述的负耗免疫磁珠方法学进行处理。采用健康志愿者的样本作为对照 ($n = 5$)。进行多步顺序标记以标记和固定细胞表面标记,随后透化细胞角蛋白 (CK) 8、18 和 19。使用 BD LSR 流式细胞仪或 BD FACSAria 或 FACSAria III 细胞分选仪进行多参数流式细胞术 (FCM) 分析。对富集后的标本进行免疫细胞化学染色,用于分析 DAPI、EpCAM、CD45、CK、表皮生长因子受体和波形蛋白。用共聚焦显微镜 (CM) 观察这

些标记的表达。

结果：从阴性富集的患者样品中，用 FCM 和 CM 鉴定了具有 EpCAM+和 EpCAM-表达的 CD45-阴性/CK-阳性（CD45- CK+）群体。此外，还标注了具有 CK+和共表达泛造血标记 CD45 的 EpCAM+和 EpCAM-群体。在 CD45-和 CD45+片段中，CK+EpCAM-events/mL 多于 CK+EpCAM+events/mL（两者在 $p \leq 0.0005$ 时具有统计学意义）。血液样本中每毫升 CK+CD45-和 CK+CD45+events 的数量（无论 EpCAM 状态如何），患者样本高于正常对照样本（分别为 $p \leq 0.0005$ 和 $p \leq 0.026$ ）。此外，很大一部分 CK+CD45+events 也表达 CD68，CD68 是一种与肿瘤相关巨噬细胞有关的标记物。CD45-CK+EpCAM-的水平越高，总体生存期越差（ $p = 0.0292$ ）。

结论：转移性乳腺癌患者血液中循环的非典型细胞是 CK+EpCAM-。因为这些患者中有相当一部分没有 EpCAM+CTCs，还需要进一步的研究来评估 EpCAM-循环细胞作为预后和预测标记物的作用。



22. Cayrefourcq L et al. Establishment and Characterization of a Cell Line from Human Circulating Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 2015 Mar 1;75(5):892-901.

摘要

血液中的循环肿瘤细胞（CTC）是有希望的新生物标记物，有助于预测包括结肠癌在内的实体肿瘤患者的预后和监测治疗的潜力。此外，CTC 研究为了解癌症患者转移生物学开辟了新的途径。然而，由于 CTCs 的数量非常少（特别是在大肠癌患者的血液中），妨碍了对 CTCs 的深入研究。因此，从 CTCs 建立细胞培养物和永久细胞系已成为过去一年中最具挑战性的任务。这里，我们首次描述了一名结肠癌患者 CTCs 细胞培养物和永久细胞系的建立。命名为 CTC-MCC-41 的细胞系已

经培养了一年多，这些细胞已经在基因组、转录组、蛋白质组和分泌蛋白质组水平上进行了鉴定。这种彻底的分析显示，CTC-MCC-41 细胞类似于结肠癌患者中原始肿瘤细胞的特征，并显示了稳定的表型，其特征在于中间上皮/间充质表型、干细胞样特性和表明骨髓来源的骨模拟信号。功能研究表明，免疫缺陷小鼠异种移植后，CTC-MCC-41 细胞可快速诱导体内外上皮细胞形成和体内肿瘤。这第一条结肠癌 CTC 系列的建立，使得现在可以对 CTC 生物学以及体外和体内药物测试进行大量的功能研究。

23. Weissenstein U et al. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. *BMC Cancer.* 2012 May 30;12:206.

摘要

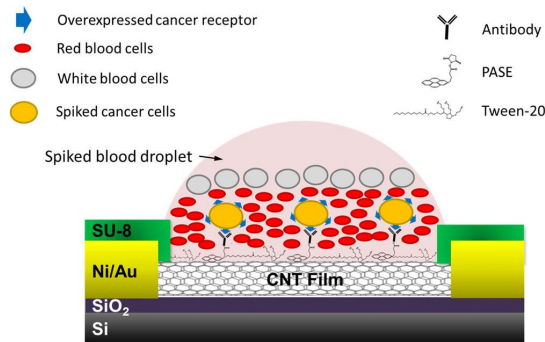
背景：在转移性乳腺癌患者（MBC）的外周血中可检测到循环肿瘤细胞（CTCs）。本文评估了一种结合抗 EpCAM-和抗细胞角蛋白磁性细胞分离的新型 CTC 分离方法，旨在提高低靶抗原密度的 CTC 检测。

方法：用掺入乳腺癌细胞系 HCC1937 的健康献血员的血样测定方法的准确性和精密度。对 10 名健康受试者进行检查以评估特异性。测量了 59 例 MBC 患者的 CTC 计数，以评估其对总生存期的预后价值。

结果：对回收数量与掺入的 HCC1937 细胞的回归分析得到了 $R(2) = 0.957$ 的测定系数。细胞平均回收率为 84%。加标 18 585 个和 30 个细胞的平均内部运行变化系数为 14%。对于 10 个细胞的加标，运行中的 CV 为 30%。10 名健康受试者血液中未检测到 CTCs。将 5 CTC/7.5 mL 血液作为风险组之间的分界点的标准阈值形成了一个非常重要的预后标记（ $p < 0.001$ ）。为了评估中等 CTC 水平的预后价值，我们另外考虑了低风险组（CTC-L：0 CTC）、中风险组（CTC-M：1-4 CTC）和高风险组（CTC-H： ≥ 5 CTC）。这种 CTC-LMH 标记物对总生存率的影响也是显著的（ $p < 0.001$ ）。进行对数比测试来比较具有 3 个风险组的模型和具有 2 个风险组的模型，拒绝了 2 个风险组的模型（ $p = 0.026$ ）。对于作为计数变量的 CTC，我们提出了一个偏移倒数变换 $1/(1+x)$ ，用于总生存期预测（ $p < 0.001$ ）。

结论：结果表明，我们的 CTC 检测方法是可行的，结

果准确可靠。我们的数据表明，精细区分不同 CTC 水平的患者是合理的。



24. Zhang L et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med.* 2013 Apr 10;5(180):180ra48

摘要

脑转移乳腺癌 (BMBC) 是一种致命的癌症，且发病率不断增加。尽管 BMBC 造成了毁灭性的后果，但导致 BMBC 的机制仍然很不明确。涉及转移性疾病 (特别是 BMBC) 中循环肿瘤细胞 (CTCs) 的机制仍然难以捉摸。我们对从乳腺癌患者外周血单个核细胞中分离的 CTC 进行了鉴定，并从其中三名患者中建立了 CTC 细胞系。在上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 阴性 CTCs 中，我们鉴定了脑转移的潜在特征，包括“脑转移选择标记 (BMSMs)” HER2+/EGFR+/HPSE+/Notch1+。分析了这些 CTCs 的细胞侵袭性和体内转移能力，这些 CTCs 由于其 EpCAM 阴性而未被 CellSearch 平台捕获。表达 BMSM 特征的 CTC 系具有高度侵袭性，并且在裸鼠中异种移植时能够产生脑和肺转移。值得注意的是，在过量表达 BMSM 特征的 EpCAM-CTCs 中检测到了增加的脑转移能力、频率和定量。在动物转移病灶中也检测到 BMSM CTC 特征蛋白的存在。总的来说，我们提供了人类乳腺癌 CTCs 独立、定性和长期培养的证明，形成了提示 CTC 向脑转移能力的 BMSM 蛋白特征的说明。

25. Joosse SA et al. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2013 Jan 1;73(1):8-11.

摘要

在癌症患者血液中发现的癌细胞是转移进展的预测因子，并且可以指导治疗决策。目前检测循环肿瘤细胞

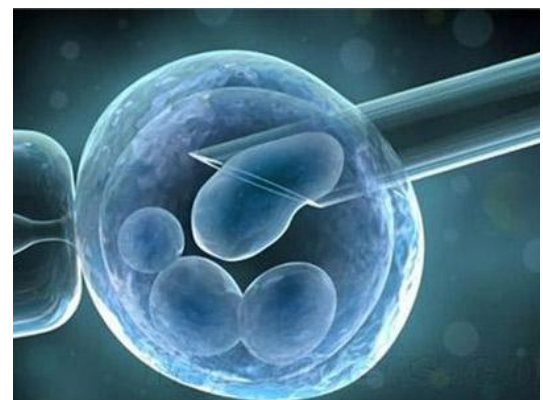
(CTC) 的对策大多基于上皮标记物上皮细胞粘附分子和角蛋白；但是，越来越多的证据表明，在某些肿瘤类型中，这些上皮标记物在肿瘤细胞扩散过程中下调，妨碍了对 CTCs 的监测。本文简短地讨论了 CTC 诊断时转移过程中肿瘤细胞变化的意义。

26. Gorges TM et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012 May 16;12:178.

摘要

背景：循环肿瘤细胞 (CTCs) 在转移性乳腺癌、前列腺癌、结肠癌和胰腺癌中都显示出了预后相关性。为了进一步开发 CTC 作为生物标志物，我们比较了不同方案在小鼠乳腺癌异种移植模型中监测 CTC 的表现 (MDA-MB-231, MDA-MB-468 和 KPL-4)。从携带肿瘤的动物中提取血样 (20 至 200 mm²)，并使用下述手段对 CTCs 进行分析：①一种基于上皮标记的富集方法 (AdnaTest)；②一种针对人类基因转录物的抗体无关技术 (定性 PCR)；③一种针对人类 DNA 序列的抗体无关的方法 (定量 PCR)。此外，通过 EMT 特异性 PCR 试验确定了与上皮-间质转化 (EMT) 相关的基因表达变化。

方法：我们使用市场上可买到的 Adna 测试、管家基因的 RT-PCR 和 AluJ 序列的 PCR 来检测异种移植模型中的 CTCs。用市售的“人上皮-间充质转化 RT-Profiler PCR 阵列”检测 CTCs 的表型变化。



结果：尽管 AdnaTest 在 1 毫升小鼠血液脉冲试验中只检测到 1 个肿瘤细胞，但这种方法在体内没有检测到 CTCs，尽管有可见的转移形成。然而，CTCs 的存在可以通过针对人转录物或 DNA 序列的 PCR 证明，而无需

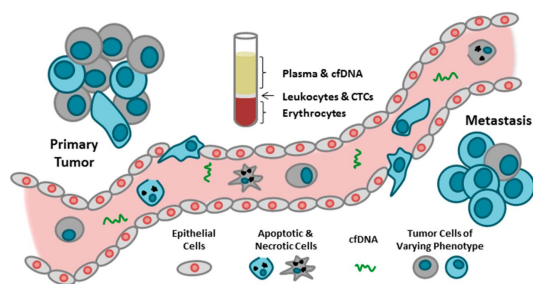
上皮预富集。AdnaTest 检测 CTC 失败是由于 EpCAM 下调，而间充质标记如 Twist 和 EGFR 在 CTCs 上上调。这种肿瘤细胞转移扩散过程中表达谱的改变已经被报道，并与一种被称为上皮-间充质转化（EMT）的生物学程序相关。

结论：使用基于 EpCAM 的富集技术导致未能检测到经历 EMT 的 CTC 群体。有的报道显示即使在晚期转移性癌症患者中，CTC 数也很低，这些结果是鉴定用于检测或捕获 CTCs（包括间充质样亚群）的新标记物的起点。

27. Larue L et al. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7443-54.

摘要

上皮-间质转化（EMT）是上皮细胞获得间质、成纤维细胞样特性、减少细胞间粘附和增加运动能力的重要过程。越来越多的证据表明 EMT 样事件在肿瘤进展和恶性转化过程中起着关键作用，赋予早期癌细胞侵袭性和转移性。几种促癌途径（肽生长因子，Src、Ras、Ets、整合素、Wnt/ β -钙粘蛋白和 Notch）诱导 EMT，一个关键的分子事件是细胞粘附分子 E-钙粘蛋白的下调。近年来，磷脂酰肌醇 3'激酶（PI3K）/AKT 轴的活化正成为 EMT 的一个主要特征。在这篇综述中，我们讨论了 PI3K/AKT 通路在 EMT 发展和癌症过程中的作用，重点是 E-钙粘蛋白调节。PI3K/AKT 和其他 EMT 诱导途径之间的相互作用被呈现，并讨论了调节 EMT 以实现癌症控制的治疗意义。



28. Guarino M et al. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007 Jun;39(3):305-18.

摘要

侵袭，恶性肿瘤的标志，在于肿瘤细胞从最初的肿瘤病灶转移到邻近的宿主组织，并且允许肿瘤细胞穿透血管内皮进入循环形成远处转移。在癌周围发现的组织学模式是存在从肿瘤块分离并独立地停留在基质的间质基质中的单个恶性细胞。虽然病理学家很容易将它们鉴定为侵入的恶性细胞，但它们与肿瘤致密部分的关系以及这种模式发展的机制在组织学水平上并不立即显现。越来越多的证据表明，肿瘤组织结构的这种改变是通过一种称为上皮-间质转化（EMT）的特殊表型调节发生的。EMT 的基本特征是细胞间接接触的中断和细胞运动的增强，从而导致细胞从亲本上皮组织释放。所产生的间质样表型适于迁移，因此，对于肿瘤侵袭和扩散，允许转移进展进行。虽然 EMT 的分子基础尚未完全阐明，但已经确定了几个相互关联的转导途径和一些潜在参与信号分子。这些因素包括生长因子、受体酪氨酸激酶，Ras 和其他小 GTP 酶、Src、 β -连环蛋白和整合素。这些途径大部分集中在上皮分子 E-钙粘蛋白的下调上，这是肿瘤侵袭的关键事件和 EMT 的“主”程序员。E-钙粘蛋白基因在许多弥漫型癌症如乳腺小叶癌和弥漫性胃癌中被体灭活，其中肿瘤细胞贯穿整个肿瘤块已经丧失了许多上皮特征，并表现出高度侵袭性的 EMT 衍生的组织模式。E-钙粘蛋白下调也见于肿瘤间质边界的实体、非弥漫型癌症，在组织切片中可见单一侵入性的 EMT 衍生肿瘤细胞。在后一种情况下，E-钙粘蛋白丢失和 EMT 可能是由肿瘤微环境调节的短暂的、可逆的过程，事实上，在侵袭过程中经历 EMT 的肿瘤细胞似乎在继发病灶中恢复了 E-钙粘蛋白表达及其上皮细胞紧密连接的特性。由于参与 EMT 的分子代表药物的潜在靶点，这些发现为控制恶性肿瘤转移扩散开辟了新的途径。

29. Sabbah M et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat*. 2008 Aug-Oct;11(4-5):123-51

摘要

上皮-间质转化（EMT）所涉及的机制与肿瘤生长、血管生成、转移中调控的主要发育和致癌途径相结合，以及对上皮细胞和间质细胞的特定基因序列的重编程。因此，毫无疑问，EMT 对肿瘤进展，患者存活率以及癌症对治疗剂（紫杉醇、长春新碱、奥沙利铂、EGF-R 靶向治疗和放疗）的耐受性具有深远影响，而不依赖于与遗传毒性药物相关的“经典”耐药机制。因此，使用基因

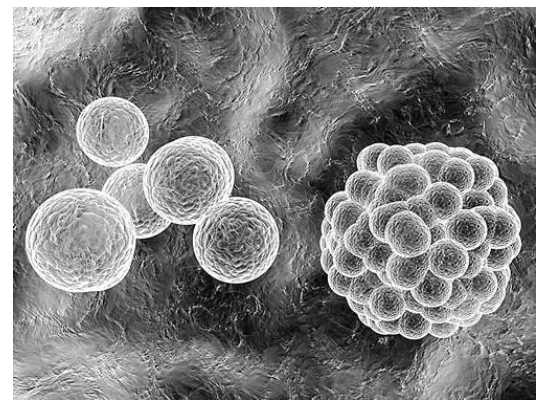
毒性试剂和/或 EMT 信号抑制剂的新型治疗组合可望规避以瞬时或持续 EMT 特征为特征的癌症的化疗耐受性。因此,针对几条 EMT 途径汇合点的关键协调器,例如转录途径 NF- κ B、AKT/mTOR 轴、MAPK、 β -连环蛋白、PKC 和 AP-1/SMAD 因子,提供了一个可以控制 EMT 和人类上皮癌症进展的现实策略。针对这些信号平台的几种抑制剂已经在临床前和临床肿瘤学中进行了测试。此外,受体和非受体酪氨酸激酶(例如 EGF-R、IGF-R、VEGF-R、整合素/FAK、Src)和 G 蛋白偶联受体(GPCR)诱导的上游 EMT 信号通路是临床前研究、临床试验或目前用于癌症治疗的临床的实用选择:例如小分子抑制剂(Iressa:选择性靶向 EGF-R; CP-751871, AMG479, NVP AEW54, BMS-536924, PQIP, AG1024: IGF-R; AZD2171, ZD6474: VEGF-R; AZD0530, BMS-354825, SKI606: SRC; BIM-46174: GPCR; 雷帕霉素, CCI-79, RAD-1001: mTOR)和人源化功能阻断抗体(赫赛汀: ErbB2; 阿瓦斯丁: 血管内皮生长因子-A; 埃比图克斯: 表皮生长因子受体; 阿布林: α -v β 3 整合素)。我们可以假定,沉默 RNA、基于腺病毒基因转移的治疗性 miR、靶向 EMT 通路的显性干扰表达载体以及信号元素将为上皮癌的治疗带来更多的途径。识别启动、调节和实现 EMT 特征的因素及其潜在的上游致癌途径,应该为对抗癌症进展以及遗传和表观遗传形式的耐药性提供更有利的策略。这一目标可以通过使用 EMT 相关的 cDNA、蛋白质组、微粒体和组织阵列对人类临床肿瘤进行全球筛查来实现。

30. **Satelli A et al. EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):49329-49337.**

摘要

循环肿瘤细胞(CTC)领域的最新进展显示了基于液体活检组织检查的患者预后的希望。然而,并非所有循环细胞都是肿瘤细胞,肿瘤特异性标志物缺乏证明了这一点。目前 FDA 捕获 CTCs(细胞搜索)的标准依赖于上皮标志物,并且通过细胞搜索捕获的细胞不能被认为已经经历了 EMT。因此,很难确定任何间质或 EMT 样 CTCs 的存在和相关性。为了弥补这一技术上的差距,我们最近发现了细胞表面波形蛋白(CSV)作为检测肉瘤、乳腺癌和结肠癌间质 CTCs 的标志物。在此我们研究了 48 名前列腺癌(PCA)患者的外周血样本,包括

激素敏感性和去势抗性亚组。分析血样的三种不同性质,包括我们自己的基于 CSV 的 CTC 计数(使用 84-1mAb CSV),基于细胞搜索的上皮 CTC 计数和血清前列腺特异性抗原(PSA)定量。我们的数据表明,与细胞搜索相比,CSV 法具有较高的敏感性和特异性。此外,我们用 CSV 法而不是细胞搜索法,观察到去势抗性患者中 CTCs 的数量显著增加。我们的数据表明,CSV 引导的 CTC 计数可能具有预后价值,并且其作为一种可能的 PCA 向致命的雄激素非依赖形式进展的度量,有待进一步验证。

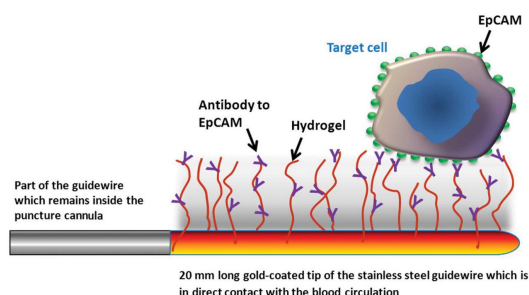


31. **Hamilton G et al. Mesenchymal-Epithelial Transition and Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2017;994:229-245.**

摘要

小细胞肺癌(SCLC)以侵袭性生长、早期播散、晚期预后差为特征。SCLC 的循环肿瘤细胞(CTCs)的计数显著较高,这使得我们的机构首次建立了永久性的 CTC 培养物。CTCs 被认为具有癌症干细胞(CSCs)和上皮-间质转化(EMT)表型的特征,但在远端部位的肿瘤外渗以上皮特征为特征。对两种 SCLC CTC 细胞系 BHGc7 和 BHGc10 以及来源于原发肿瘤和转移瘤的 SCLC 细胞系进行多能干细胞标记物和生长因子的表达分析。流式细胞术检测 E-钙粘蛋白和 β -连环蛋白的表达。干细胞相关标记 SOX17、 α -胎蛋白、OCT-3/4、KDR、Otx2、GATA4、Nanog、HCG、TP63 和 Goosecoid 在两个 CTC 细胞系中均未表达。相比之下, HNF-3 β /FXA2、SOX2、PDX-1/IPF1 和 E-钙粘蛋白表达量高。E-钙粘蛋白的表达仅限于来自胸腔积液(SCLC26A)和骨转移(NCI-H526)的 2 个 CTCs 和 2 个细胞系。因此,这些从扩展疾病 SCLC 患者建立的

SCLC CTCs 缺乏抑制上皮表型的干细胞标记的表达。相反，它们表达高水平的与间质上皮转变（MET 或 EMiT）一致的高水平，E-钙粘蛋白并可能响应一线化疗的选择压力而形成大肿瘤细胞。HNF-3 β /FOXA2 和 PDX-1/IPF1 的表达似乎与生长因子对胰岛素/IGF-1 受体和胰岛素样结合蛋白的生长因子 IGF 依赖性有关。



32. Shahneh FZ et al. Sensitive antibody-based CTCs detection from peripheral blood. *Hum Antibodies*. 2013;22(1-2):51-4.

摘要

循环肿瘤细胞（CTC）的检测是众多肿瘤学研究领域的一个目的。CTCs 从乳腺癌、前列腺癌、肺癌和结直肠癌患者原发部位的转移性、原发性肿瘤扩散到外周血。通过肿瘤特异性标记物在细胞表面的差异表达，肿瘤细胞的不同特性已被用于定义富集方法。基于抗体的亲和方法可以通过在上皮肿瘤细胞或造血细胞表面特异性抗原的表达来提供 CTCs 的分离。CTC 检测方法的发展将改善广泛的临床应用，以及发现预测治疗反应和疾病进展的生物标志物。本综述将对基于循环肿瘤细胞抗体富集的不同 CTCs 检测方法进行讨论，并根据现有知识阐述 CTCs 检测生物标志物的方法。

33. Hristozova T et al. A simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers *Cytometry A*. 2012 Jun;81(6):489-95.

摘要

循环肿瘤细胞（CTCs）不仅可作为预后标志物，而且可用于监测治疗效果。开发了一种多色流式细胞术方案，用于外周血中它们的检测和分子表征，该方案包括红细胞裂解，然后用抗 CD45 的荧光标记抗体和上皮标记 EpCam 和细胞角蛋白 7/8 染色细胞。为了减少通过流式细胞术采集的事件数，应用了来自上皮标记物的荧光信

号的电子阈值。在通过尖峰实验建立该方案之后，验证了它适用于测定头颈部鳞状细胞癌（SCCHN）患者血样中 CTCs 的绝对数量及其表皮生长因子受体（EGFR）和磷酸化形式（磷-EGFR）的表达。尖峰试验表明，该方法具有良好的恢复性（平均 85%）和线性性能 [R (2) = 0.98]。敏感性和特异性与我们以前使用免疫磁性 CTC 预富集的方案相当。对 33 例 SCCHN 患者样本的分析显示，33.3% 的患者样本中存在 CTCs，每 3.75 mL 血液含有 1.5 $\pm$ 0.5 CTCs。100% 的样本中检测到 EGFR 的表达，36.4% 的 CTC+ 样本中检测到磷-EGFR 的表达。我们已经建立了一种简单而灵敏的多色流式细胞术方案，用于检测上皮性癌症患者（包括 SCCHN）中的 CTCs，表征其详细的分子特征。



34. Watanabe M et al. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. *Cytometry A*. 2014 Mar;85(3):206-13.

摘要

实体瘤患者血液中循环肿瘤细胞（CTCs）的存在和数量是其临床预后的检测指标。迄今为止，CellSearch 系统是美国食品和药物管理局批准的唯一一个先进的乳腺癌、前列腺癌和结肠癌 CTC 计数系统。然而，由于上皮细胞粘附分子（EpCAM）的富集和随后分子分析能力有限而引起的敏感性问题必须在 CTCs 可以用作临床设定的预测标记之前解决。我们开发了一种使用交叉无污染流式细胞术的多色 CTC 检测系统，可用于多分子分析的 CTCs 的计数和表征。将具有不同 EpCAM 表达水平的肿瘤细胞系从健康献血者的外周血中扩增出来。使用抗 CD45 包覆的磁珠去除白细胞，然后用 CD45-Alexa Fluor 700，EpCAM-藻红蛋白，细胞角蛋白（CK）-异硫氰酸荧光素抗体，和/或 7-氨基丁酸 D 对细胞核进行固定、标记和染色。优良的检测（斜率 = 0.760-0.888）和

线性性能 [$R(2) = 0.994-0.998$] 在观察到和预期的肿瘤细胞数之间, 独立于 EpCAM 表达式。检测率明显高于使用 CellSearch 系统获得的检测率, 这表明我们的系统在检测 EpCAM 肿瘤细胞方面具有很高的灵敏度。此外, 上皮-间质转化 (EMT) 标记物的加入使我们能够检测 EpCAM-/CK 细胞和 EMT 诱导的肿瘤细胞。综上所述, 我们的多色 CTC 检测系统可以高效地检测以前未被识别的 CTC 种群。

35. **Marrinucci D et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol.* 2012 Feb;9(1):016003.**

摘要

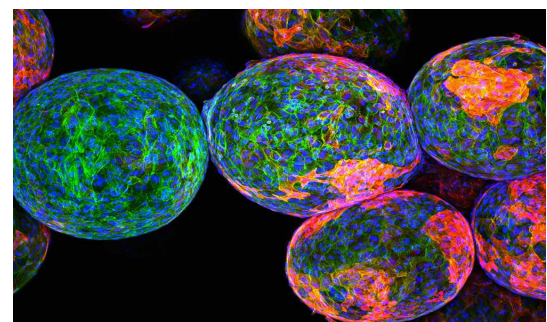
肿瘤的血液传播导致无法治愈的转移; 然而, 血流中癌细胞的基本特征和传播机制尚不清楚。我们已经建立了一种液相活组织检测方法, 该方法能识别循环肿瘤细胞 (CTCs) 而无需使表面蛋白的富集, 并以足够高的清晰度 (HD) 呈现它们, 以满足诊断病理学图像质量要求。这种 “HD-CTC” 检测发现, > 5 HD-CTC/mL 的结果, 在 80% 的转移性前列腺癌患者 ($n = 20$) 中检出, 70% 的转移性乳腺癌患者 ($n = 30$) 中检出, 在 50% 的转移性胰腺癌患者 ($n = 18$) 中检出, 正常对照 ($n = 15$) 检出率为 0%。此外, 在这些癌症患者中, 大多数 HD-CTC 簇从 2 个 HD-CTC 到 30 多个 HD-CTC。这种无富集分析的初步验证证明了我们在大多数前列腺癌、乳腺癌和胰腺癌患者中鉴定大量 HD-CTCs 的能力。

36. **Yagi S et al. Development of an automated size-based filtration system for isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients. *PLoS One.* 2017 Jun 22;12(6):e0179744.**

摘要

循环肿瘤细胞 (CTCs), 定义为在实体肿瘤患者外周血中循环的肿瘤细胞, 比较少见。使用 CTCs 进行诊断有望帮助癌症药物的精确决策。我们开发了一种自动化微腔阵列 (MCA) 系统, 根据肿瘤细胞和正常血细胞的大小和变形能力的不同来检测 CTCs。在此, 我们使用来自非小细胞肺癌 (NSCLC) 和小细胞肺癌 (SCLC) 患者的血样来评估该系统。为了评估 CTCs 的恢复, 通过对非小细胞肺癌细胞系 (NCI-H820、A549、NCI-H23 和 NCI-H441) 注入健康志愿者的外周全血样品中进行临床前实验。所有细胞系的回收率均在 70% 以上。为进

行临床评估, 从 50 名晚期肺癌患者和 10 名健康献血者中采集了 6 mL 外周血。将过滤器上回收的细胞染色。我们将 CTCs 定义为 DAPI 阳性、细胞角蛋白阳性、和 CD45 阴性细胞。50 例肺癌患者的平均年龄为 72 岁 (范围: 48-85 岁); 76% 的人患有非小细胞肺癌, 20% 的人患有 SCLC, 14% 的人患有 III 期疾病, 86% 的人处于 IV 期。在 80% 的肺癌患者中检测到一种或多种 CTCs (中位数 2.5)。将 CellSearch 系统与我们的 MCA 系统进行比较, 利用非小细胞肺癌患者的样本, 证实了我们系统的优越性 (中位数 CTC 计数, CellSearch 与 MCA 0 比 11; $p = 0.0001$, $n = 17$)。研究结果表明, 我们的 MCA 系统在肺癌 CTCs 诊断中具有良好的临床应用前景。



37. **Hosokawa M et al. Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system. *PLoS One.* 2013 Jun 28;8(6):e67466.**

摘要

背景: 基于上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的循环肿瘤细胞计数 (CTC) 对实体瘤患者具有预后价值, 例如晚期乳腺癌、结肠癌和前列腺癌。然而, 据报道非小细胞肺癌 (NSCLC) 的敏感性较差。为了解决这个问题, 我们开发了一种微腔阵列 (MCA) 系统, 该系统与用于 CTC 分离的小型化设备集成, 而不依赖于 EpCAM 表达。在这里, 我们报告了晚期肺癌患者 CTCs 临床研究的结果, 我们将 MCA 系统与 CellSearch 系统进行了比较, CellSearch 系统采用了传统的基于 EpCAM 的方法。

方法: 使用 CellSearch 系统根据制造商的方案和 MCA 系统通过免疫标记和细胞形态学分析从 43 名转移性肺癌患者采集配对的外周血样品以计数 CTC。两种系统随机且独立地评估 CTC 的存在。

结果: 使用 MCA 系统在 22 名 NSCLC 患者中的 17 名中检测到 CTC, 而使用 CellSearch 系统, 22 名患者中有

7 名检测到 CTC。另一方面,使用 MCA 系统的 21 名小细胞肺癌 (SCLC) 患者中有 20 名检测到 CTC,而使用 CellSearch 系统的 21 名患者中有 12 名检测到 CTC。通过 MCA 系统 (中位数 13,范围 0-291 个细胞/7.5 mL) 检测到 NSCLC 患者中的 CTC 明显多于 CellSearch 系统 (中位数 0,范围 0-37 个细胞/7.5 mL),表明统计学优势 ($p = 0.0015$)。虽然观察到 MCA 系统优于 CellSearch 系统的趋势,但未在 SCLC 中达到统计学显著性 ($p = 0.2888$)。MCA 系统从被 CellSearch 系统鉴定为 CTC 阴性的患者中分离出 CTC 簇。

结论:与 CellSearch 系统相比,MCA 系统有可能在晚期肺癌患者中分离出更多的 CTC 和 CTC 簇。

38. Hosokawa M et al. Microcavity array system for size-based enrichment of circulating tumor cells from the blood of patients with small-cell lung cancer. *Anal Chem.* 2013 Jun 18;85(12):5692-8.

摘要

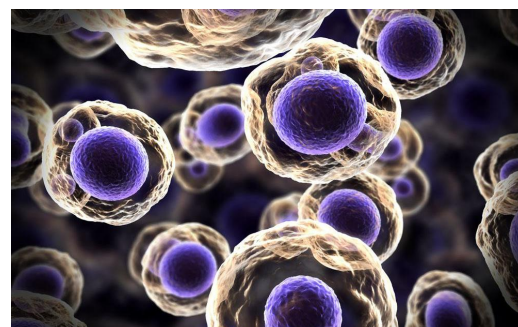
在这项研究中,我们提出了一种有效富集小型循环肿瘤细胞 (CTC) 的方法,如使用微腔阵列 (MCA) 系统在小细胞肺癌 (SCLC) 患者血液中发现的那些。为了从全血中富集 CTC,将具有矩形 MCA [10 (4) 腔/过滤器] 的微制造镍过滤器与小型化装置整合,允许基于肿瘤和血细胞之间的尺寸和变形性的差异来分离肿瘤细胞。MCA 的形状和孔隙率经过优化,可在低流动阻力条件下有效捕获微腔上的小肿瘤细胞,同时允许其他血细胞有效通过。在优化的条件下,成功回收了大约 80% 的加入 1 mL 全血中的 SCLC (NCI-H69 和 NCI-H82) 细胞。在临床样本中,16 名 SCLC 患者中有 16 名可检测到 CTC。此外,在矩形 MCA 上捕获的白细胞数量显著低于圆形 MCA 上的白细胞数量 ($p < 0.001$),这表明使用矩形 MCA 减少了相当数量的携带白细胞。因此,我们的系统具有作为检测小细胞型肿瘤中 CTC 及其分子分析的潜力。

39. Huang SB et al. High-purity and label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) in a microfluidic platform by using optically-induced-dielectrophoretic (ODEP) force. *Lab Chip.* 2013 Apr 7;13(7):1371-83.

摘要

基于阴性选择的循环肿瘤细胞 (CTC) 分离被认为有价

值地捕获更多天然的、特别是所有可能的 CTC,而没有与 CTC 表面抗原性质相关的偏差。然而,在这种细胞分离策略下,CTC 纯度通常受到损害。为了解决这个问题,本研究报告了光学诱导介电泳 (ODEP) 基于力的细胞操作整合,以及微流体平台中的层流状态,基于阴性选择分离未处理的高纯度 CTC。在该设计中,六个部分的移动光栅屏幕连续地同时施加在两个平行的层流中,基于细胞的尺寸差异和电特性同时将癌细胞与白细胞分离。通过两个层流进一步分离,递送和收集分离的细胞群。通过这种方法,可以以连续、有效和高效的方式分离癌细胞。在该研究中,首先确定 ODEP 操作条件:前列腺癌 (PC-3) 和人口腔癌 (OEC-M1) 细胞,以及具有轻微细胞聚集现象的白细胞。此外,实验研究了癌细胞分离方法的性能。结果表明,所提出的 CTC 分离方案能够从白细胞背景中分离 PC-3 细胞或 OEC-M1 细胞,回收率高 (PC-3 细胞:76-83%,OEC-M1 细胞:61-68%) 和纯度高 (PC-3 细胞:74-82%,OEC-M1 细胞:64-66%) (设定流速:0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和样品体积:1 μL)。后者超出了传统 CTC 分离中目前可能的范围。此外,对于 PC-3 和 OEC-M1 细胞,分离的癌细胞的存活率被评估为高达 94 $\pm$ 2% 和 95 $\pm$ 3%。此外,分离的癌细胞保持增殖能力。总的来说,这项研究提出了一种基于 ODEP 的微流体平台,能够以连续、无标记、细胞友好,特别是高纯度的方式分离 CTC。发现所有这些性状对于将捕获的 CTC 用于随后基于细胞或生物化学测定特别有意义。

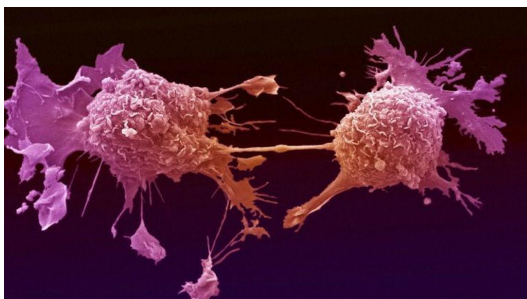


40. Nagrath S et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007 Dec 20;450(7173):1235-9.

摘要

已经从癌症患者的外周血中鉴定了活的肿瘤衍生的上皮细胞 (循环肿瘤细胞或 CTC),并且可能是难治性转移性疾病的起源。虽然极为罕见,但 CTC 代表了侵入性

活组织检查的潜在替代品,可作为肿瘤组织的来源,用于检测、鉴定和监测非血液学癌症。鉴定、分离、繁殖和分子表征 CTC 亚群的能力可以进一步发现癌症干细胞生物标志物并扩展对转移生物学的理解。目前用于分离 CTC 的策略仅限于非常低的产率和纯度的复杂分析方法。在这里,我们描述了一个独特的微流体平台(CTC 芯片)的开发,该平台能够在外周全血样品中有效和选择性地分离活 CTC,由目标 CTC 与抗体(EpCAM)涂覆微柱相互作用介导。受控的层流条件,并且没有必要的预标记或样品处理。CTC 芯片在 116 例(99%)样本中的 115 例中成功鉴定了转移性肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌和结肠癌患者外周血中的 CTC,每毫升含有 5-1 281 个 CTC,纯度约为 50%。此外,在 7/7 患有早期前列腺癌的患者中分离出 CTC。鉴于 CTC 芯片的高灵敏度和特异性,我们测试了其在监测抗癌治疗反应中的潜在效用。在进行全身治疗的转移性癌症患者小组中,通过标准放射摄影方法测量的 CTC 数量的时间变化与疾病的临床过程相关性相当好。因此,CTC 芯片为癌症患者中 CTC 的准确识别和测量提供了一种新的有效工具。它在推进癌症生物学研究和临床癌症管理方面具有广泛的意义,包括癌症的检测、诊断和监测。



41. Dong Y et al. Microfluidics and circulating tumor cells. *J Mol Diagn.* 2013 Mar;15(2):149-57.

摘要

循环肿瘤细胞(CTC)从癌症肿瘤中脱落,进入循环系统,并迁移到远处器官以形成转移,最终导致大多数癌症患者死亡。CTC 的鉴定和表征提供了研究、监测和潜在干扰转移过程的手段。从血液中分离 CTC 是具有挑战性的,因为 CTC 是罕见的并且具有反映癌症异质性的特征。已经开发了各种方法从数百万个正常血细胞中富集 CTC。微流体提供了创造下一代优质 CTC 富集装置的机会。本综述重点介绍迄今为止用于从癌症患者血

液中捕获 CTC 的各种微流体方法。

42. Lee SW et al. Continuous enrichment of circulating tumor cells using a microfluidic lateral flow filtration chip. *J Chromatogr A.* 2015 Jan 16;1377:100-5.

摘要

循环肿瘤细胞(CTC)的分离和表征在癌症诊断和预后中具有重要意义。CTC 的高灵敏度检测可能非常困难,因为它们血液极为罕见[即每 10 (9) 个红细胞中有 1-5 个 CTC]。最近,已经开发了各种利用生物化学(基于亲和力)和物理(大小或密度)方法的装置。基于抗体的分离具有其自身的局限性,因为抗体表位的表达水平由于癌细胞的异质性而变化。与物理方法相关的恶劣条件可能在分离过程中导致 CTC 的变形和损坏。在这里,我们提出了一种微流体侧流过滤(μ -LaFF)芯片,其中横向流动与垂直流动结合到过滤器中以轻柔地捕获 CTC。由于横向流动,CTC 经历了弱的剪切流动并且沿着过滤器通道行进直到最终被捕获。过滤器中的垂直流动使捕获的细胞紧紧地保持,并用作未捕获的血液细胞(白细胞和红细胞)的出口。我们从 μ -LaFF 芯片中获得了高捕获效率(95%)和纯度(99%),最大限度地减少了对 CTC 的损害。我们的 μ -LaFF 技术有望用于各种癌症的诊断和预后。

43. Lee A et al. All-in-one centrifugal microfluidic device for size-selective circulating tumor cell isolation with high purity. *Anal Chem.* 2014 Nov 18;86(22):11349-56.

摘要

循环肿瘤细胞(CTC)由于其在癌症复发和进展中的作用而受到越来越多的关注。由于血液中 CTC 的稀有性,富集过程对于有效的靶细胞表征是必不可少的。然而,在典型的压力驱动的微流体系统中,富集过程通常需要复杂的设备和长时间处理。此外,常用的基于免疫亲和性的阳性选择方法是有限的,因为其回收率依赖于靶 CTC 的 EpCAM 表达,其显示细胞类型之间的异质性。在这里,我们提出了一种基于离心力的尺寸选择性 CTC 分离平台,可以在 30 秒内从全血中分离和计数高纯度的 CTC。使用掺入磷酸盐缓冲液和全血的 MCF-7 乳腺癌细胞系验证该装置,并且实现了 61% 的平均捕获效率,这对于基于尺寸的过滤是典型的。在各种流动条

件和稀释因子下，全血样品的捕获效率从 44% 到 84% 不等。在优化的操作条件下，每 1 mL 全血捕获几百个白细胞，与使用商业化的基于尺寸的 CTC 分离装置获得的相比，减少了 20 倍。在临床验证中，来自胃癌和肺癌患者的 7.5 mL 血液的标准化 CTC 计数从 10 到 60 不等，分别产生 50% 和 38% 的检出率。总的来说，我们的 CTC 分离装置能够快速，无标记地分离高纯度的 CTC，这将极大地改善捕获的 CTC 下游分子分析。

44. Chiu TK et al. Application of optically-induced-dielectrophoresis in microfluidic system for purification of circulating tumour cells for gene expression analysis- Cancer cell line model. Sci Rep. 2016 Sep 9;6:32851.

摘要

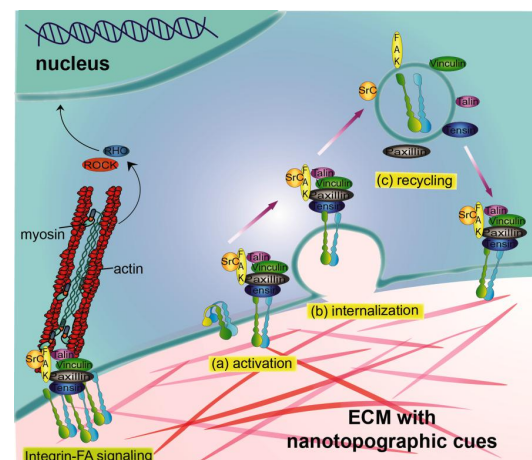
血液循环系统中的循环肿瘤细胞（CTC）与癌症转移相关。对癌症患者的 CTC 耐药基因表达的分析有望为个体患者选择更有效的治疗方案。然而，目前的 CTC 分离方案可能无法为这些应用收获具有足够高纯度的 CTC。为了解决这个问题，本研究提出将光学诱导介电泳（ODEP）基于力的细胞操作和荧光显微成像技术整合到微流体系统中，以在常规 CTC 分离方法之后进一步纯化 CTC。在这项研究中，开发了微流体系统，并评估了其最佳操作条件和 CTC 分离性能。结果显示，所提出的系统能够以高达 100% 的细胞纯度分离 CTC，超出了使用先前技术的可能范围。因此，在 CTC 基因表达的分析中，该方法可以排除细胞样品中白细胞的干扰，从而有助于提高分析灵敏度，如本研究所示。总的来说，这项研究提出了一种基于 ODEP 的微流体系统，能够简单有效地从细胞混合物中分离出特定的细胞种类。

45. Li W et al. Biodegradable nano-films for capture and non-invasive release of circulating tumor cells. Biomaterials. 2015 Oct;65:93-102.

摘要

从全血中选择性分离和纯化循环肿瘤细胞（CTC）是临床医学和生物学研究的重要能力。目前执行该任务的技术将分离的细胞置于过度的压力下，这些压力会降低细胞活力，并可能诱导表型变化，从而失去有关分离细胞的有价值信息。我们在微流体芯片的表面附着上可生物降解的纳米薄膜涂层，其可用于有效捕获 CTC 以及非

侵入性释放癌细胞系，例如 PC-3、LNCaP、DU 145、H1650 和 H1975。我们已经应用逐层（LbL）组装，通过互补的相互作用，使用多种材料创建超薄涂层库。通过开发具有基于亲和力的细胞捕获表面的 LbL 纳米薄膜涂层，该表面能够选择性地全血中分离癌细胞，并且可以在命令下迅速降解，我们能够温和地分离和恢复癌细胞，并在不损害细胞活力或增殖潜力的情况下恢复它们。我们的方法能够克服实际障碍并为下游分析提供可行的癌细胞，例如活细胞成像、单细胞基因组学和回收细胞的体外细胞培养。此外，还使用 LbL 修饰的微芯片捕获、鉴定和成功释放来自癌症患者的 CTC。



46. Chen W et al. Nanoroughened adhesion-based capture of circulating tumor cells with heterogeneous expression and metastatic characteristics. BMC Cancer. 2016 Aug 8;16:614.

摘要

背景：循环肿瘤细胞（CTC）已在许多癌症类型中显示出预后相关性。然而，目前大多数 CTC 捕获方法依赖于阳性选择技术，这些技术需要关于扩散性 CTC 表面蛋白表达的先验知识。

方法：我们开发了一种微流体 CTC 捕获芯片，该芯片结合了纳米粗化玻璃基板，用于捕获血液样本中的 CTC。与正常血细胞相比，我们的 CTC 捕获芯片利用癌细胞对纳米粗化的蚀刻玻璃表面的差异粘附偏好，因此不依赖于 CTC 的物理尺寸或表面蛋白表达。

结果：微流体 CTC 捕获芯片能够实现血液样品中上皮细胞粘附分子阳性（EpCAM⁺）和 EpCAM⁺-癌细胞的优异捕获产率。另外，微流体 CTC 芯片捕获 CTC，其经

历转化生长因子 β 诱导的上皮-间质转化 (TGF- β 诱导的 EMT)，具有动态下调的 EpCAM 表达。在使用 EpCAM 阳性和阴性细胞系的人乳腺癌小鼠模型中，捕获的 CTC 的数量与原发肿瘤的大小正相关，并且与其 EpCAM 表达无关。此外，在使用具有差异转移能力细胞系的肺癌同系小鼠模型中，从具有可检测原发性肿瘤的所有小鼠捕获 CTC，而与细胞系的转移能力无关。

结论：使用新型纳米粗化玻璃基板的微流体 CTC 捕获芯片广泛适用于捕获具有临床意义的异质 CTC 群体，而与其表面标志物表达和转移倾向无关。我们能够从非转移性肺癌模型中捕获 CTC，证明了芯片收集整个 CTC 群体的潜力，包括具有不同生物和表型特征的亚组。进一步探索使用微流体芯片捕获的转移性和可能非转移性 CTC 的生物学潜力，将深入了解它们的相关差异及其对肿瘤进展和癌症结果的影响。

47. Khamenehfar A et al. Microfluidic Devices for Circulating Tumor Cells Isolation and Subsequent Analysis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(9):810-21.

摘要

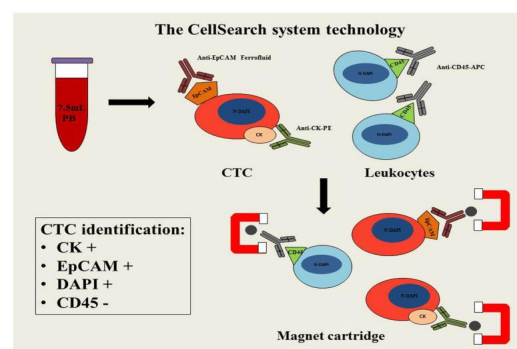
近年来，由于 CTC 在癌症早期诊断、临床治疗管理、转移机制探索和个性化医疗发展方面的潜在价值，循环肿瘤细胞 (CTCs) 的研究备受关注。然而，由于血液中的数量稀少，分离 CTC 在技术上具有挑战性。最近，已经开发了多种用于 CTC 分离的微流体装置，并且这些装置可以实现高捕获效率和高纯度。虽然已经实现了 CTC 的计数，但是对捕获的 CTC 进一步细胞和 DNA 分析报道较少。在本文中，我们回顾了最近关于分离 CTC 的微流体方法以及进行细胞分析的报道。

48. Hyun KA et al. Two-stage microfluidic chip for selective isolation of circulating tumor cells (CTCs). *Biosens Bioelectron.* 2015 May 15;67:86-92.

摘要

在过去的几十年中，已经研究了循环肿瘤细胞 (CTC) 作为克服癌症的手段。然而，CTC 的稀有性和异质性是 CTC 研究中最重要障碍。已经开发了许多用于 CTC 分离的技术，并且可以将其分类为正富集 (即，使用细胞大小、表面蛋白表达等元素特异性地分离靶细胞) 和负富集 (即，特异性地洗脱非靶细胞)。阳性富集方法

纯度高，但可能因其选择标准而有偏差，而负富集方法具有相对低的纯度，但可以分离异质 CTC。为了弥补正负富集的已知缺点，在本研究中我们引入了两阶段微流控芯片。第一阶段涉及微流体磁性激活细胞分选 (μ -MACS) 芯片以洗脱白细胞 (WBC)。第二阶段涉及用于选择性分离 CTC 的几何活化表面相互作用 (GASI) 芯片。我们观察到使用 μ -MACS 芯片以 400 μ L/min 的流速将 5 mL 血液样品中的癌细胞富集达到 763 倍。使用 GASI 芯片以 100 μ L/min 的流速，基于其 EpCAM 或 HER2 表面蛋白表达，成功分离癌细胞，分离效率为 10.19% 至 22.91%。我们的两阶段微流控芯片不仅可以从血细胞中分离出 CTC，还可以根据其特征对异质 CTC 进行分类。因此，我们的芯片可以有助于研究 CTC 异质性，以及个性化的癌症治疗。

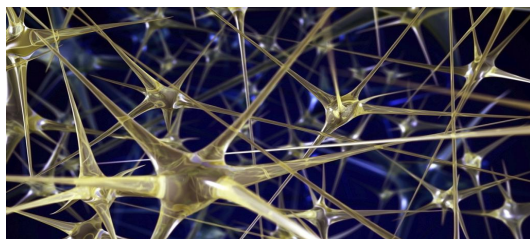


49. Kim YJ et al. A microchip filter device incorporating slit arrays and 3-D flow for detection of circulating tumor cells using CAV1-EpCAM conjugated microbeads. *Biomaterials.* 2014 Aug;35(26):7501-10.

摘要

循环肿瘤细胞 (CTC) 是罕见细胞，这些细胞的存在可能表明预后不良和转移的可能性很高。尽管临床应用非常有前途，但由于 CTC 的分离和鉴定面临许多技术限制，因此尚未对 CTC 进行彻底研究。目前的 CTC 检测技术主要采用上皮标志物上皮细胞粘附分子 (EpCAM)，然而，积累的证据表明，由于上皮-间质转化 (EMT)，CTC 显示异质的 EpCAM 表达。在这项研究中，我们报告了一种微芯片过滤装置，其结合了狭缝阵列和三维流动，可以将异质细胞群与 CTC 标记分开。为了选择目标，我们在延长的乳腺癌培养条件下培养乳腺癌细胞，诱导 EMT 表型。在这些条件下，细胞显示 caveolin1 (CAV1) 的上调，但下调 EpCAM 表

达。所提出的含有 CAV1-EpCAM 共轭珠的装置具有数十倍的通量增加。更重要的是,该平台能够增强转移性乳腺癌患者的捕获产量,并获得表达各种 EMT 标记的细胞。对这些 EMT 相关表型的进一步理解将推动改进的检测技术,并为开发用于有效治疗和预防癌症转移的治疗策略提供机会。



50. Huebner H et al. Filtration based assessment of CTCs and CellSearch® based assessment are both powerful predictors of prognosis for metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2018 Feb 20;18(1):204.

摘要

背景: 循环肿瘤细胞 (CTC) 的评估能够监测治疗反应和早期检测转移性乳腺癌 (MBC) 复发。本研究的目的 是将基于免疫磁性分离的成熟 CTC 检测方法 与基于过滤的新平台进行比较。

方法: 在这项前瞻性研究中, 从 60 名 MBC 患者中获得了两次 7.5 毫升抽血, 并使用 CellSearch® 和新开发的基于过滤的平台评估了 CTC 计数。我们分析了两种方法之间 CTC 阳性的相关性及其预测预后的能力。计算总生存期 (OS) 并估计 Kaplan-Meier 曲线, 阈值 ≥ 1 个 CTC 和 ≥ 5 个 CTC。

结果: CellSearch® 系统的 CTC 阳性率为 56.7%, 基于过滤的平台的 CTC 阳性率为 66.7%。两种方法获得的 CTC 计数具有高度相关性。无论使用何种方法, 未检测到 CTC 的患者 OS 均显著高于一个或多个 CTC 的患者 ($p < 0.001$)。通过 CellSearch® 评估的未检测到 CTC 的患者与 ≥ 1 个 CTC 的患者的中位 OS 分别为 1.83 年 (95% CI: 1.63-2.02) 和 0.74 年 (95% CI: 0.51-1.52)。如果通过基于过滤的方法检测到 CTC, 则中位 OS 时间分别为 1.88 年 (95% CI: 1.74-2.03) 和 0.59 年 (95% CI: 0.38-0.80)。

结论: 新建立的 EpCAM 独立过滤系统是确定 MBC 患者 CTC 计数的合适方法。我们的研究证实, CTC 是

MBC 患者人群预后的强有力预测因子。

51. Sheng W et al. Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip. *Lab Chip*. 2014 Jan 7;14(1):89-98.

摘要

来自外周血的循环肿瘤细胞 (CTC) 具有用于癌症诊断和疾病监测的重要信息。对这种“液体活检”的分析有望为癌症患者带来个性化治疗和实时监测的新时代。但血液中 CTC 的极端罕见使得它们的分离和表征在技术上具有挑战性。本文报道了用于高效和高纯度肿瘤细胞捕获的几何增强混合 (GEM) 芯片的开发。我们还成功地证明了捕获的肿瘤细胞的释放和培养, 以及从癌症患者中分离 CTC。高性能微芯片基于几何优化的微混合器结构, 增强横向流动和流动折叠, 最大化 CTC 和抗体涂层表面之间的相互作用。通过优化的通道几何形状和流速, 捕获效率达到 $> 90\%$, 当在缓冲液中捕获加标的肿瘤细胞时纯度 $> 84\%$ 。通过在 1 mL 裂解的血液和全血中分离多种加标肿瘤细胞 (50-50 000) 进一步验证该系统。通过胰蛋白酶消化和高流速洗涤的组合, 捕获的肿瘤细胞被有效释放。释放的细胞是活的并且能够增殖, 并且与未经捕获和释放过程的完整细胞相比未显示出差异。此外, 我们应用该装置检测转移性胰腺癌患者血液中的 CTC; 从 18 个样本中的 17 个 ($> 94\%$) 中发现了 CTC。我们还测试了该装置在监测胰腺癌患者对抗癌药物治疗反应中的潜在效用, 并且 CTC 数量与肿瘤的临床计算机断层扫描图 (CT 扫描) 相关。所提出的技术显示出准确的 CTC 计数、CTC 生物学研究和癌症转移以及癌症诊断和治疗监测的巨大前景。

52. Reátegui E et al. Tunable nanostructured coating for the capture and selective release of viable circulating tumor cells. *Adv Mater*. 2015 Mar 4;27(9):1593-9.

摘要

提出了逐层明胶纳米涂层用作可调节的双响应生物材料, 用于从癌症患者血液中捕获和释放循环肿瘤细胞 (CTC)。整个纳米涂层可以通过生物相容的温度变化从微流体装置的表面溶解。或者, 可以通过局部施加的机械应力释放单独的 CTC。



DISCOVER PRECISION MORE THAN A TUBE.



除了一支采血管，我们更带给您发现精准的眼睛。



阳普医疗IMPROVACUTER®真空采血管系列

一如既往的卓越。
ALWAYS EXCELLENCE.



Featured Article

文献精读

本期的文献精选是一篇专业文章《移性乳腺癌患者预后的有力预测因子：基于过滤的 CTC 评估和基于 CellSearch® 的评估》。我们知道 CellSearch 是捕获罕见细胞的第一个系统，它使用的是磁珠免疫亲和法，亲和法的优势是它对罕见细胞的身份做出了准确的判断，缺点是抗体和染料使用对罕见细胞的活性造成冲击，很大程度上限制了对于罕见细胞的进一步分析。过滤法是通过细胞的物理性质，主要是细胞大小来分离罕见细胞，细胞无需经过染色和标记，或者只需要轻微的染色和标记，因此捕获后的罕见细胞保留了显著的活性。这篇文章直接对比了过滤法和亲合法，发现它们得到的罕见细胞，都是有效的肿瘤预后因子。

移性乳腺癌患者预后的有力预测因子： 基于过滤的 CTC 评估和基于 CellSearch® 的评估

摘要

背景：循环肿瘤细胞（CTC）的评估已被证明能够监测治疗反应和早期发现转移性乳腺癌（MBC）复发。本研究的目的是将基于免疫磁性分离的成熟 CTC 检测方法 with 基于过滤的新平台进行比较。

方法：在这项前瞻性研究中，从 60 名 MBC 患者采集两管 7.5 mL 血液，并使用 CellSearch® 和新开发的基于过滤平台评估 CTC 计数。我们分析了两种方法之间 CTC 阳性的相关性及其预测预后的能力。计算总生存期（OS），估计 Kaplan-Meier 曲线阈值 ≥ 1 ，且 ≥ 5 检测到 CTCs。

结果：CellSearch® 系统的 CTC 阳性率为 56.7%，基于过滤平台的 CTC 阳性率为 66.7%。两种方法获得的 CTC 计数具有高度相关性。无论使用何种方法，未检测到 CTC 的患者 OS 均显著高于一个或多个 CTCs 患者（ $p < 0.001$ ）。通过 CellSearch® 评估，未检测到 CTC 的患者中位 OS 为 1.83 年（95%CI：1.63-2.02），检测到 ≥ 1 个 CTC 的患者中位 OS 为 0.74 年（95%CI：0.51-1.52）。通过基于过滤的方法评估：未检测到 CTC 的患者中位 OS 时间为 1.88 年（95%CI：1.74-2.03），检测到 ≥ 1 个 CTC 的患者中位 OS 时间为 0.59 年（95%CI：0.38-0.80）。

结论：新建立的 EpCAM 独立过滤系统是确定 MBC 患者 CTC 计数的合适方法。我们的研究证实，CTC 是 MBC 患者人群预后的强有力预测因子。

原文出处：BMC Cancer 2018;18(1):204

作者：Hanna Huebner, Peter A. Fasching, Walter Gumbrecht, et al.

关键词：CTC；CellSearch；乳腺癌；总生存期；过滤

背景

乳腺癌是女性中最常见的癌症，八分之一的女性在生命中患上这种类型的癌症^[1]。尽管在过去几十年治疗管理有显著改善，但特别是转移性乳腺癌（MBC）仍然是一种无法治愈的疾病，其5年生存率低于25%。MBC的这种结果长期受到各种生物因素的影响。通过经典的形态学成像技术难以评估与乳腺癌死亡相关的肿瘤特征，如血源性转移潜能和微转移的存在。在过去几年中，开发了用于获得与转移形成可能性相关的预后信息的液体活检程序^[2-4]。循环肿瘤细胞（CTC）是转移的潜在起始细胞，可以从患者的血液样本中采集和富集。他们的计数已被证明具有高预后影响^[5]，有助于医生推荐个性化治疗并监测治疗反应。

到目前为止，已经报道了用于评估CTC的不同方法。他们中的大多数依靠通过靶向上皮细胞特异性抗原（例如上皮细胞粘附分子，EpCAM）^[6]，物理特征^[7,8]或表达模式^[9,10]来鉴定CTC。CTC计数的黄金标准是FDA批准的半自动化CellSearch®系统（Veridex，LLC，Warren，NJ，USA）。该技术使用免疫磁性选择EpCAM阳性CTCs，然后免疫染色细胞角蛋白（CKs）和CD45^[11]。到目前为止，许多研究表明，CellSearch®（CTCs）评估的CTC计数与MBC患者的无进展和总生存率之间存在显著相关性^[12-15]。因此，CellSearch®代表了一个具有高度影响力的平台，可用于分析乳腺癌患者的预后和治疗反应。然而，这种方法的局限性是EpCAM阴性CTC的缺失检测以及增加下游应用如RNA、DNA或捕获的CTC蛋白质分析的困难。

在本研究中，我们的目的是将已建立的CellSearch®系统与基于过滤的新方法在一体化CTC平台上进行比较，以进行自动化细胞蛋白和核酸分析。总的来说，我们关注的是两种方法的可比性和MBC患者的预后价值。

方法

研究设计和患者特征

对参加iMode-B（成像和分子检测乳房）研究的总共60名MBC患者进行CTC分析。2010年至2012年期间，在弗兰卡尼亚埃朗根大学乳腺中心招募患者。入选标准是放射学可测量的或临床可评估的MBC，患者对其血样使用的书面知情同意。该研究得到了埃尔兰根-纽伦堡弗里德里希-亚历山大大学医学院伦理委员会的批准。没有基于肿瘤亚型，年龄或其他患者特征的排除标准。医生对CTC检测结果不知情，进行CTC分析的研究人员对临床数据不知情。

数据捕获

数据记录在一份专门记录MBC文件的电子病例报告表中，由经过培训的专职人员编写。该数据库具有与PRAEGNANT研究^[16,17]相同的结构，并使用自动合理性检查监测数据。记录的数据包括有关初步诊断、手术、治疗以及进展和死亡信息等。来自病理学报告记录了来自原发性肿瘤的组织病理学数据。如果通过免疫组织学（IHC）染色，患者被认为是雌激素受体（ER）或孕酮受体（PR）阳性，至少1%的细胞被染色阳性。HER2阳性定义为具有3+的IHC评分或基因扩增，如显色原位杂交所示。

使用CellSearch®系统（CTCs）进行循环肿瘤细胞检测

采用CellSave采血管（Veridex，LLC）采集血样，并一夜之间运送到经验丰富的专用实验室（T.N.F.）。如前所述^[6,10,18,19]，CellSearch®上皮细胞测试（Veridex，LLC）用于CTC富集和计数。简而言之，CTC通过自动CELL-TRACKS®AUTOPREP®系统捕获，使用抗EpCAM抗体携带铁磁流体，然后检测CKs 8、18和19的免疫染色以及白细胞共同抗原CD45以及4'，6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI）确保细胞核的完整性。使用CELL-TRACKS ANALYZER II®系统通过自动荧光显微镜鉴定和计数CTC。

使用基于过滤的系统（CTC_{FB}）进行循环肿瘤细胞检测

对于基于过滤的方法，用VERSANT®kPCR样品制备系统（西门子医疗，埃尔兰根）改进的移液机器人处理血液样品（7.5 mL EDTA-血液）。最多可以并行处理8个样本。为此目的，将50 mL Falcon管放入移液机器人的架子中，放入之前每个管填充22.5 mL红细胞裂解缓冲液（1.5 M NH₄Cl，100 mM NaHCO₃，10 mM EDTA二钠溶于密理博水中）。通过机器人将7.5 mL EDTA血液样品转移到单独的Falcon管中，并通过来回吸移液管，在室温下孵育15分钟。随后将RBC裂解的稀释血液样品移液到单独的基于真空的过滤单元（西门子医疗）中。使用具有8 μm和1英寸直径的限定孔径的Whatman核孔径迹蚀刻膜（GE），通过细胞大小选择CTCs。

该过滤系统与专用过滤压力控制（10-30 mbar负压）相结合，可以保留85-100%的肿瘤细胞，背景为约剩余0.1%的白细胞。在细胞捕获并通过PBS中的3.6%甲醛（Sigma Aldrich）固定后，洗涤细胞并用Triton X100（Fluka）使膜透化。为了进行自动免疫染色，使用Blocking溶液（Candor）封闭非特异性结合位点，并对细胞进行细胞角蛋白8和18染色（5 μg/mL小鼠抗CK8/18-Dy550，克隆UCD/PR 10.11，西

门子医疗)和细胞角蛋白 19 (5 µg/mL 小鼠抗 CK19-Dy550, 克隆 A53-B/A2, 西门子医疗), CD45 (20 µg/mL 小鼠抗 CD45-Dy650, 克隆 9.4, 西门子医疗)和 DAPI (1.1 µg/mL, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐, Sigma Aldrich), 通过移取相应的抗体-荧光团-缀合物溶液和 DAPI 进行细胞核染色。加入覆盖培养基 [1,4-二氮杂双环 (2.2.2) 辛烷, DABCO, Sigma Aldrich] 以保持荧光强度。最后, 从处理机器人中取出过滤膜用于光学研究。使用专用软件 (西门子医疗) 通过荧光扫描显微术计数细胞角蛋白阳性/CD45 阴性/DAPI 阳性细胞 (CTCs)。

统计分析

使用两个不同的阈值 ($0 \text{ vs } \geq 1$)^[20]和 ($< 5 \text{ vs } \geq 5$)^[10]交叉表描述 CTC 评估。关于预后值的 CTC 阳性定义为用相应的 CTC 检测方法检测血液样品中的至少一种 CTC。进行 Wilcoxon signed-rank 试验以比较通过不同检测方法评估的 CTC 计数。一项重要的试验结果表明两种检测方法之间存在系统差异。此外, 计算了斯皮尔曼等级相关系数。

如果在观察期间没有发生死亡事件, 总体存活率被定义为抽血和死亡或最后一次随访之间的经过时间。患者的最大观察时间约为 5 年。使用 Kaplan-Meier 产品限制法估计存活率。参照^[21]估计中值存活时间的置信区间。使用对数秩检验比较有或没有 CTCs 患者的存活率。Cox 比例风险模型用于研究每个 CTC 评估的预后价值 (一个模型用于 CTC_{CS}、一个模型用于 CTC_{FB}) 以及其他已知的预后因素^[22]。这些预后因素包括诊断时的年龄 (连续)、激素受体和 HER2 状态 (阳性与阴性)、分级 (序数)、治疗线 (序数)。

所有试验为双侧, $p \leq 0.05$ 被认为具有统计学意义。使用软件包 SPSS (版本 21, IBM) 进行计算。

结果

患者和肿瘤特征

患者人群由 60 名患者组成, 平均年龄为 60.9 岁 (标准偏差 SD 11.2)。共 16 名患者接受一线治疗, 12 名接受二线治疗, 12 名接受三线治疗, 18 名患者接受高于三线治疗 (表 1)。共有 27 名患者在抽血时接受化疗, 18 名患者在抽血时接受抗激素治疗 (AH) 治疗, 42 名患者接受标准 AH 或化疗以外的治疗。所有 60 名患者中, 70.0% ER, 63.3% PR 和 20.0% HER2 阳性肿瘤 (表 1)。进一步详细的患者特征如表 1 所示。

CTC 结果

使用过滤方法的患者中 66.7% ($n = 40$) 中发现至少一个 CTC, 而使用 CellSearch®方法发现 56.7% ($n = 34$)。根据 CellSearch®方法有 4 例 CTC 阳性, 但使用过滤方法 CTC 阴性。反之亦然, 在 10 个案例中, 过滤方法检测到 CTC, 而 CellSearch®方法则没有。比较阳性 vs 阴性测试结果的总体准确率为 76.7% ($n = 46$)。考虑到 CTC 阴性 vs 1-4 个 CTCs vs ≥ 5 个 CTCs 的分类, 总体准确率为 60% ($n = 36$) (表 2)。

比较每位患者通过 CellSearch®方法和基于过滤的系统评估 CTC 计数, 我们发现 CTC 计数的高相关性 (Spearman 相关性 0.733) (Fig.1)。CellSearch®系统检测到 1 到 2 000 个 CTCs, 而基于过滤的方法检测到 1 到 1 900 个 CTC。总体而言, CellSearch®的 CTC 计数 (中位数: 2.5 个细胞) 略高于基于过滤方法评估的 CTC 计数 (中位数: 1.5 个细胞)。过滤方法在 33 例中细胞计数较低, 在 9 例中细胞计数较高, 18 例细胞计数持平, 其中 16 例为 0 和 0 对 ($p < 0.001$, Wilcoxon 检验)。

除了考虑的预测因素外, CTC 显著影响总体存活率。CTCs 的校正风险比 (HR) 为 5.2 (95%CI: 2.2-12.4), CTC_{FB} 的 HR 为 4.2 (95%CI: 1.9-9.4)。两种 Cox 模型的结果显示在表 3 和表 4 中。通过 CellSearch®或基于过滤的方法评估的分组为阳性或阴性 CTC 计数的总存活 Kaplan-Meier 曲线显示在 Fig.2a 和 Fig.2b 中。阈值 ≥ 5 CTCs 的 Kaplan-Meier 曲线显示在 Fig.2c 和 Fig.2d 中。

< 1 CTC_{CS} 患者的中位总生存期为 1.83 年 (95%CI: 1.63-2.02) (Fig.2a) 与无 CTC_{FB} 计数患者的中位总生存期 1.88 年 (95%CI: 1.74-2.03) 相似 (Fig.2b)。相比之下, 通过基于过滤的方法评估的 1 个或多个 CTCs 患者的中位总生存期为 0.59 年 (95%CI: 0.38-0.80) (Fig.2b) 略短于 ≥ 1 CTC_{CS} 的患者的总生存期 0.74 年 (95%CI: 0.51-1.52) (Fig.2a)。类似地, 检测到 CTC_{CS} 和 CTC_{FB} 计数的总体存活率的显著差异, 阈值 ≥ 5 CTCs (Fig.2c 和 Fig.2d)。< 5 CTC_{CS} 患者的中位总生存期为 1.68 年 (95%CI: 1.10-2.26) (Fig.2c), 略长于 < 5 CTC_{FB} 计数患者的中位总生存期 1.29 年 (98%CI: 0.89-1.69) (Fig.2d)。相比之下, ≥ 5 CTC_{CS} 患者的中位总生存期为 0.33 年 (95%CI: 0.00-0.66) (Fig.2c), 与通过基于过滤的方法评估具有 5 个或更多个 CTCs 的患者中位总生存期 0.47 年 (95%CI: 0.00-1.24) (Fig.2d) 相似。

表 1. 患者特征

分组			
年龄, 岁(mean, SD)		60.9	11.2
体重指数(mean, SD)		26.9	6.1
肿瘤阶段(n, %)	T1	18	30.0
	T2-4	40	66.6
	n.a.	2	3.3
N-分期 (n, %)	N+	36	60.0
	N0	18	30.0
	n.a.	6	10.0
ER(n, %)	阳性	2	70.0
	阴性	17	28.3
	n.a.	1	1.7
PR(n, %)	阳性	38	63.3
	阴性	21	35.0
	n.a.	1	1.7
HER2(n, %)	阳性	12	20.0
	阴性	41	68.3
	n.a.	7	11.7
分级(n, %)	G1	4	6.7
	G2	27	45.0
	G3	28	46.7
	n.a.	1	1.7
组织病理学亚型(n, %)	导管肿瘤	50	83.3
	小叶肿瘤	7	11.7
	其他肿瘤	2	3.4
	n.a.	1	1.7
治疗方法 ^a (n, %)	一线治疗	16	26.7
	二线治疗	12	20.0
	三线治疗	12	20.0
	Higher	18	30.0
	n.a.	2	3.3
采血时接受治疗(n, %)	化疗	27	45.0
	AH	18	30.0
	其他 ^b	42	70.0

a. 治疗线是化学疗法、抗激素疗法或其他抗癌疗法。无论疾病进展是否触发治疗开始，每个启动的治疗线都被计为一个。

b. 例如骨修饰药物或单克隆抗体。

表 2. 通过 CellSearch®和基于过滤的方法进行 CTC 计数的比较

		CTC _{FB} n (%)			
		Negative	1–4 CTCs	≥ 5 CTCs	Total
CTC _{CS} n (%)	Negative	16 (26.7%)	8 (13.3%)	2 (3.3%)	26 (43.3%)
	1–4 CTCs	3 (5.0%)	5 (8.3%)	10 (16.7%)	18 (30.0%)
	≥ 5 CTCs	1 (1.7%)	0 (0%)	15 (25.0%)	16 (26.7%)
	Total	20 (33.3%)	13 (21.7%)	27 (45.0%)	60 (100%)

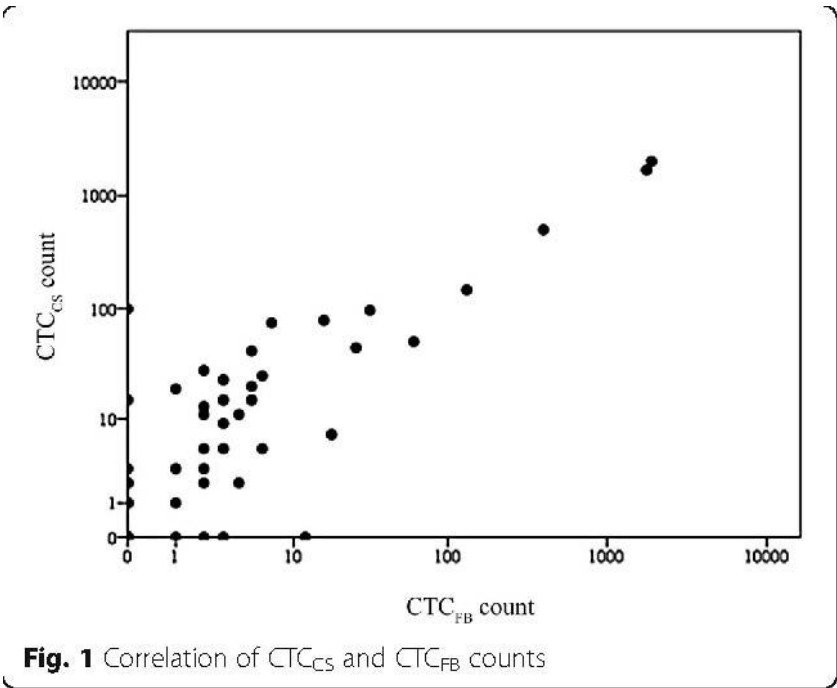


表 3. 通过 CellSearch®和协变量使用 CTC 计数预测 OS 的 Cox 回归模型

Characteristic		HR	95% CI	p-value
Age	Per year	1.00	0.97–1.03	0.91
Hormone receptor status	Negative	1 (reference)		
	Positive	0.44	0.17–0.85	0.08
HER2 Status	Negative	1 (reference)		
	Positive	0.32	0.13–0.85	0.02
Grading	Per grade	1.08	0.58–2.02	0.82
Therapy line	Per line	1.01	0.78–1.32	0.93
CTC count	0	1 (reference)		
	≥1	5.20	2.18–12.43	0.0002

表 4. 通过基于过滤的方法和协变量使用 CTC 计数预测 OS 的 Cox 回归模型

Characteristic		HR	95% CI	p-value
Age	Per year	0.99	0.96–1.02	0.47
Hormone receptor status	Negative	1 (reference)		
	Positive	1.50	0.56–4.06	0.41
HER2 Status	Negative	1 (reference)		
	Positive	0.89	0.35–2.25	0.80
Grading	Per grade	1.45	0.70–3.00	0.32
Therapy line	Per line	0.98	0.75–1.26	0.85
CTC count	0	1 (reference)		
	≥1	4.20	1.86–9.46	0.001

讨论

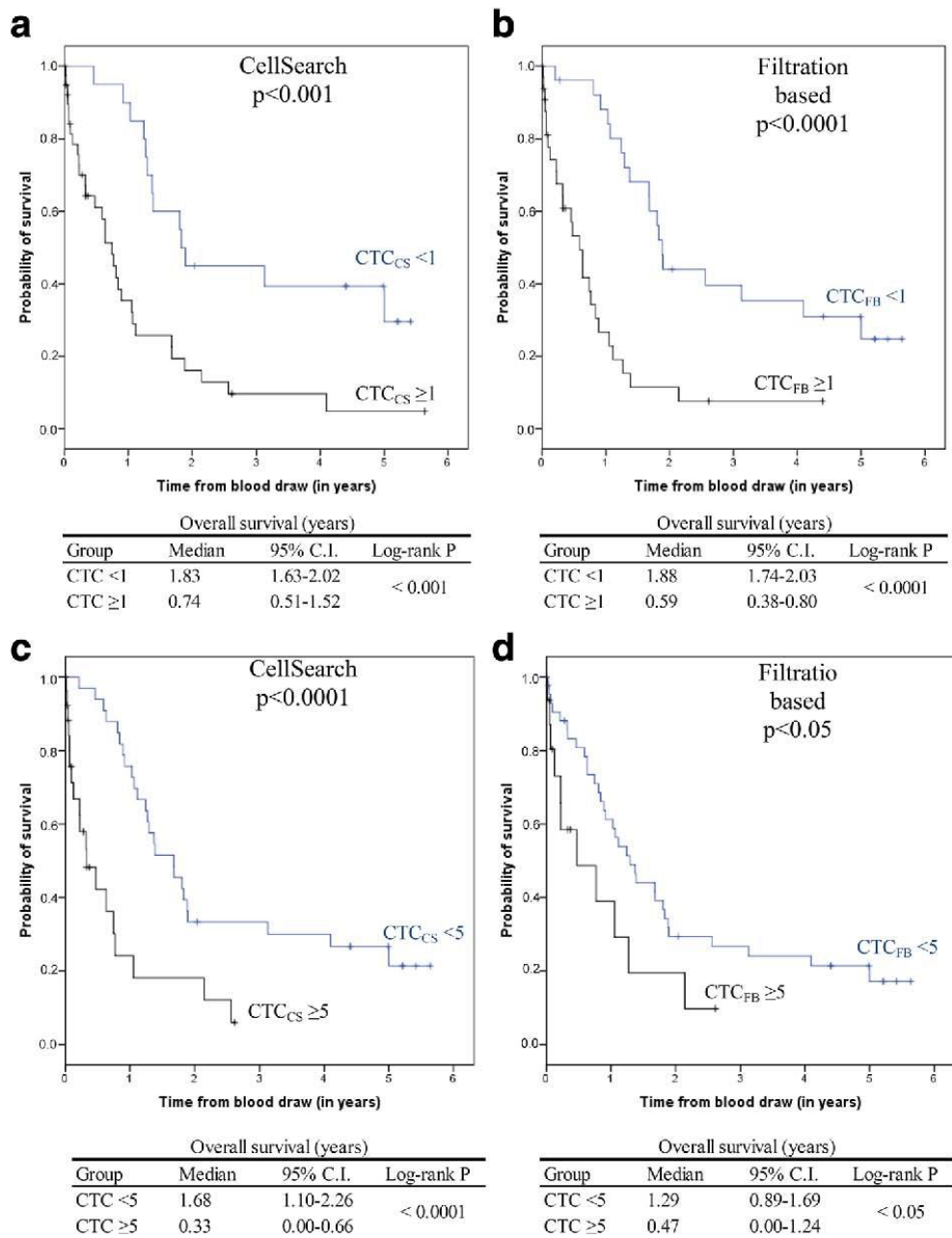
在这项研究中，我们使用 CellSearch®，一种常用的 CTC 检测方法，以及一种新建立的基于自动过滤的方法，用于评估一组 MBC 患者外周血中 CTC 计数的预后价值。在 60 名放射学可测量或临床可评估的 MBC 患者的研究队列中测定 7.5 mL 血液内的 CTC 计数。我们计算了总体存活率，以确定和比较两种方法的预后影响。尽管最常用的 CTC 阳性截止值为 5 或更高，但仍然不清楚是否存在一个或多个 CTC 可能是更准确的预测因子，这取决于所分析的肿瘤亚组^[20,23]。一些前瞻性多中心研究显示，CTC 水平 < 5 或 < 1^[12,14,24] 的 MBC 患者的无进展生存期和总生存期具有显著的预后价值。此外，CTC 评估被证明是治疗反应评估的良好方式，也是转移复发的个体预测试验^[14,24,25]。在这里，我们开始比较两种方法的阈值（≥1 和 ≥5 CTCs）。使用 CellSearch® 以及基于过滤的系统可以实现 CTC 计数的重要预后价值。一个 CTC 或 5 个 CTCs 的阈值之间没有差异，表明新的基于过滤的方法也适用于少于 5 个 CTCs 的灵敏检测。

可能最常讨论的 CellSearch® 方法的缺点是 CTC 检测和分离仅依赖于 EpCAM 阳性^[26]。已知肿瘤细胞，特别是 CTC 是高度异质的，并且能够在癌症生长和扩散期间改变它们的表达谱^[27]。特别是在上皮至间充质转变期间，上皮表面分子丢失以允许肿瘤细胞的分离和侵袭，而这些标记在间充质至上皮转换期间被重新获得^[26,28]。在癌细胞传播期间，上皮表面标志物 EpCAM 可以通过 DNA 甲基化，糖基化或蛋白水解切割来下调，从而允许癌细胞转变为更具间充质和侵袭性的表型^[29,30]。这强调了仅依赖于 EpCAM 阳性的方法可能不适合于检测所有 CTC，因此可能给出关于 CTC 的预后价值或生物分类的不充

分结果。与 CellSearch® 系统相比，基于过滤的系统不选择基于 EpCAM 阳性的 CTC，因此我们假设该系统可能适用于检测具有更广泛的不同表型的 CTC。我们假设检测到具有阳性 CTC_{FB} 计数但 CTC_{CS} 计数阴性的患者可能是由于这些细胞缺失 EpCAM 阳性。

对 CTC 肿瘤特征的评估是避免重复组织活检的有吸引力的机会。来自外周血样品的 CTC 计数定义为液体活检。与组织活检相比，这是一种非侵入性、快速且可行的实时方法，可以获得肿瘤细胞进行进一步分析。肿瘤特征可以帮助分层治疗决策。即使原发性肿瘤活组织检查对某些肿瘤标志物（例如 HER2）呈阴性，CTC 也常表现出不同的表达模式（HER2 阳性）^[23]。CTC 的这些特征是定义治疗策略的重要标志，可以帮助避免过度治疗。正在进行的 DETECT III 试验（NCT01619111）目前正在研究 HER2 靶向治疗对 HER2 阴性组织活检但 HER2 阳性 CTCs 的 MBC 患者的治疗相关性^[32]。此外，蛋白质或基因表达谱以及 DNA 表观遗传或遗传改变的分析可能有助于表征 CTCs，从而进一步表征肿瘤^[33,34]。它甚至可能有助于对 MBC 患者的治疗策略进行分层^[35]。由于基于过滤的 CTC 分离设置基于自动化核酸制备系统（VERSANT® kPCR 样品制备系统），它不仅可以帮助确定 CTC 计数，还可以从 CTC 中纯化 DNA、RNA 或蛋白质以进一步分析^[36]。然而，这项研究有一些局限性。首先，小样本量只允许粗略地比较两种方法的预测值。其次，缺乏标准化治疗是一种潜在的偏倚，因为无论 CTC 计数如何，它都可能影响预后价值。另外，抽血的时间没有精确定义。但总的来说，这种设置代表了常见的临床实践，足以比较两种不同的 CTC 检测技术的总体生存期。

Fig.2 CTC_{CS} (a 阈值≥1 和 c 阈值≥5) 和 CTC_{FB} 计数 (b 阈值≥1 且 d 阈值≥5) 的总体生存率



结论

总之，我们的数据表明，新建立的 EpCAM 独立过滤方法可能与 CellSearch®方法相当，检测 MBC 患者 CTC 的敏感性

和预测预后。基于过滤的方法可能更容易用于从分离的 CTC 中自动提取 RNA、DNA 或蛋白质，从而实现对 CTC 和转移性疾病的相关生物学背景的深入表征。



Filtration based assessment of CTCs and CellSearch® based assessment are both powerful predictors of prognosis for metastatic breast cancer patients

Hanna Huebner¹, Peter A. Fasching¹, Walter Gumbrecht², Sebastian Jud¹, Claudia Rau¹, Mark Matzas², Peter Paulicka², Katja Friedrich², Michael P. Lux¹, Bernhard Volz¹, Paul Gass¹, Lothar Häberle^{1,3}, Franziska Meier-Stiegen⁴, Andreas Hartkopf⁵, Hans Neubauer⁴, Katrin Almstedt⁶, Matthias W. Beckmann¹, Tanja N. Fehm⁴ and Matthias Ruebner^{1*}

Abstract

Background: The assessment of circulating tumor cells (CTCs) has been shown to enable monitoring of treatment response and early detection of metastatic breast cancer (MBC) recurrence. The aim of this study was to compare a well-established CTC detection method based on immunomagnetic isolation with a new, filtration-based platform.

Methods: In this prospective study, two 7.5 ml blood draws were obtained from 60 MBC patients and CTC enumeration was assessed using both the CellSearch® and the newly developed filtration-based platform. We analyzed the correlation of CTC-positivity between both methods and their ability to predict prognosis. Overall survival (OS) was calculated and Kaplan-Meier curves were estimated with thresholds of ≥ 1 and ≥ 5 detected CTCs.

Results: The CTC positivity rate of the CellSearch® system was 56.7% and of the filtration-based platform 66.7%. There was a high correlation of CTC enumeration obtained with both methods. The OS for patients without detected CTCs, regardless of the method used, was significantly higher compared to patients with one or more CTCs ($p < 0.001$). The median OS of patients with no CTCs vs. ≥ 1 CTC assessed by CellSearch® was 1.83 years (95% CI: 1.63–2.02) vs. 0.74 years (95% CI: 0.51–1.52). If CTCs were detected by the filtration-based method the median OS times were 1.88 years (95% CI: 1.74–2.03) vs. 0.59 years (95% CI: 0.38–0.80).

Conclusions: The newly established EpCAM independently filtration-based system is a suitable method to determine CTC counts for MBC patients. Our study confirms CTCs as being strong predictors of prognosis in our population of MBC patients.

Keywords: CTC, CellSearch, Breast cancer, Overall survival, Filtration

Background

Breast cancer is the most common cancer in women, with one out of eight women developing this type of cancer during life [1]. Even though the therapeutic management has significantly improved during the last decades, especially metastatic breast cancer (MBC) is

still an incurable disease with a 5-year survival rate of less than 25%. This long term outcome for MBC is influenced by various biological factors. Tumor characteristics, which are associated with breast-cancer related deaths, like blood-derived metastatic potential and the presence of micrometastases are difficult to assess by classical morphological imaging techniques. Within the last years, liquid biopsy procedures for gaining prognostic information associated with the possibility of metastasis formation were developed [2–4]. Circulating tumor cells (CTCs) are potential founder cells for metastasis

* Correspondence: Matthias.ruebner@uk-erlangen.de

¹Department of Gynecology and Obstetrics, Comprehensive Cancer Center Erlangen-EMN, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nuremberg, Universitätsstraße 21–23, 91054 Erlangen, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

and can be collected and enriched from patients' blood samples. Their numeration has been proven to be of highly prognostic impact [5] and furthermore allows physicians to recommend a personalized therapy and to monitor treatment response.

Different methods for the assessment of CTCs have been described so far. Most of them rely on the identification of CTCs by targeting antigens specific for epithelial cells (e.g. epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) [6], by physical characteristics [7, 8] or expression patterns [9, 10]. The gold standard for CTC counting is the FDA approved semi-automated CellSearch® system (Veridex, LLC, Warren, NJ, USA). This technique uses an immunomagnetic selection of EpCAM-positive CTCs followed by immunostaining of cytokeratins (CKs) and CD45 [11]. So far, many studies presented a significant correlation of the CTC count assessed by CellSearch® (CTC_{CS}) and the progression-free as well as the overall survival of MBC patients [12–15]. Thus, CellSearch® represents a platform of high impact to analyze the prognosis and treatment response of breast cancer patients. However, limitations of this method are the missing detection of EpCam-negative CTCs and the difficulties in adding downstream applications like RNA, DNA or protein analysis of captured CTCs.

In this study we aimed to compare the established CellSearch® system with a new, filtration-based method on an integrated CTC platform for automated cellular protein and nucleic acid analysis. Overall, we focused on the comparability of both units and the prognostic value for MBC patients.

Methods

Study design and patient characteristics

CTC analysis was performed for a total of 60 MBC patients enrolled in the iMode-B (imaging and molecular detection breast) study. Patients were included between 2010 and 2012 at the University Breast Center Franconia, Erlangen. Inclusion criteria were radiologically measurable or clinically assessable MBC and a written informed consent given by the patients for the use of their blood samples. The study was approved by the ethics committee of the Medical Faculty, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nuremberg. There were no exclusion criteria based on tumor subtype, age or other patient characteristics. Physicians were blinded to CTC test results and investigators performing CTC analysis were blinded to the clinical data.

Data capturing

Data was documented in an electronic case report form specialized on the documentation of MBC by trained and dedicated staff. The database had the same structure like the PRAEGNANT study [16, 17] and data are monitored

using automated plausibility checks. The documented data comprised information about primary diagnosis, surgery, treatment as well as progression and information about death. Histopathological data from the primary tumor were documented from pathology reports. Patients were considered estrogen receptor (ER) or progesterone receptor (PR) positive if by immunohistological (IHC) staining at least 1% of cells were stained positive. HER2 positivity was defined as either having an IHC score of 3+ or a gene amplification as shown by chromogenic in situ hybridization.

Circulating tumor cell detection with the CellSearch® system (CTC_{CS})

Blood samples were drawn into CellSave Tubes (Veridex, LLC) and shipped overnight to an experienced and dedicated laboratory (T.N.F.). The CellSearch® Epithelial Cell Test (Veridex, LLC) was applied for CTC enrichment and enumeration as described before [6, 10, 18, 19]. In brief, CTCs were captured with the automated CELL-TRACKS® AUTOPREP® System by using anti-EpCAM-antibody bearing ferrofluid followed by their detection with immunostaining of CKs 8, 18 and 19 and the leukocyte common antigen CD45 as well as 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to ensure integrity of the cell nucleus. CTCs were identified and enumerated by automated fluorescence microscopy using the CELL-TRACKS ANALYZER II® System.

Circulating tumor cell detection with the filtration based system (CTC_{FB})

For the filtration based method blood samples (7.5 ml EDTA-blood) were processed with the modified pipetting robot of the VERSANT® kPCR Sample Prep system (SIEMENS Healthcare GmbH, Erlangen). Up to 8 samples could be processed in parallel. For that purpose, 50 ml Falcon tubes, each filled with 22.5 ml red blood cell- (RBC-) lysis buffer (1.5 M NH₄Cl, 100 mM NaHCO₃, 10 mM disodium EDTA in Millipore water) were placed into a rack of the pipetting robot. The 7.5 ml EDTA blood samples were transferred into individual falcon-tubes by the robot and incubated at RT for 15 min by back and forth aspiration of the pipettes. Subsequently the RBC-lysed diluted blood samples were pipetted into individual vacuum-based filtration units (Siemens Healthcare). CTCs were selected by cell size using Whatman nuclepore track etched membranes (GE) with a defined pore size of 8 µm and 1 inch diameter. This filter system, in combination with dedicated filtration-pressure control (10–30 mbar negative pressure) enables the retention of 85–100% of tumor cells with a background of approx. 0.1% remaining white blood cells. After cell capture and fixation by 3.6% Formaldehyde (Sigma Aldrich) in PBS, the cells were washed and the membrane was permeabilized using Triton X100

(Fluka). In order to perform automated immunostaining, non-specific binding sites were blocked using Blocking Solution (Candor) and cells were stained for cytokeratin 8, 18 (5 µg/ml mouse anti-CK8/18-Dy550, clone UCD/PR 10.11, Siemens Healthcare) and cytokeratin 19 (5 µg/ml mouse anti-CK19-Dy550, clone A53-B/A2, Siemens Healthcare), CD45 (20 µg/ml mouse anti-CD45-Dy650, clone 9.4, Siemens Healthcare) and DAPI (1.1 µg/ml, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma Aldrich) by pipetting corresponding antibody-fluorophore-conjugate solutions together with DAPI for cell nucleus staining. Cover medium (1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane, DABCO, Sigma Aldrich) was added to preserve the fluorescence intensity. Finally, the filtration membranes were removed from the processing robot for optical investigation. Cytokeratin positive/CD45 negative/DAPI positive cells (CTCs) were counted by fluorescence scanning microscopy using a dedicated software solution (SIEMENS Healthcare GmbH).

Statistical analysis

CTC assessments were described with cross tables using two different cut-offs (0 vs. ≥ 1) [20] and (< 5 vs. ≥ 5) [10]. CTC positivity with regard to prognostic value was defined as detecting at least one CTC in the blood samples with the respective method for CTC detection. A Wilcoxon signed-rank test was performed to compare CTC counts assessed by the different detection methods. A significant test result indicates that there are systematic differences between both detection methods. Furthermore, Spearman's rank correlation coefficient was calculated.

Overall survival was defined as the elapse time between the blood draw and the time of death or last follow-up, if no death event occurred during observation time. The maximal observation time of a patient was approximately 5 years. Survival rates were estimated using the Kaplan-Meier product limit method. Confidence interval of median survival time was estimated as described in [21]. Survival rates of patients with or without CTCs were compared using the log-rank test. Cox proportional hazards models were used to investigate the prognostic value of each CTCs assessment (one model for CTC_{CS} and one model for CTC_{FB}) in addition to other known prognostic factors [22]. Those prognostic factors were age at diagnosis (continuous), hormone receptor and HER2 status (positive vs. negative), grading (ordinal), therapy line (ordinal).

All tests were two-sided, and a p -value of ≤ 0.05 was regarded as statistically significant. Calculations were carried out using the software package SPSS (Version 21, IBM).

Results

Patient and tumor characteristics

The patient population consisted of 60 patients with a mean age of 60.9 years (SD, 11.2). A total of 16 patients

were treated with first-line therapy, 12 with second line-therapy, 12 with third-line therapy and 18 with higher therapy-lines than third line (Table 1). A total of 27 patients received a chemotherapy at time of blood draw, 18 were treated with an antihormon treatment (AH) at time of blood draw and 42 patients were treated with a therapy other than the standard AH or chemotherapy. Of all 60 patients 70.0% had an ER, 63.3% PR and 20.0%

Table 1 Patient characteristics

Group			
Age, years (mean, SD)		60.9	11.2
Body mass index (mean, SD)		26.9	6.1
Tumor stage (n, %)	T1	18	30.0
	T2–4	40	66.6
	n.a.	2	3.3
N-staging (n, %)	N+	36	60.0
	N0	18	30.0
	n.a.	6	10.0
ER (n, %)	Positive	42	70.0
	Negative	17	28.3
	n.a.	1	1.7
PR (n, %)	Positive	38	63.3
	Negative	21	35.0
	n.a.	1	1.7
HER2 (n, %)	Positive	12	20.0
	Negative	41	68.3
	n.a.	7	11.7
Grading (n, %)	G1	4	6.7
	G2	27	45.0
	G3	28	46.7
	n.a.	1	1.7
Histopathological subtype (n, %)	Ductal	50	83.3
	Lobular	7	11.7
	Others	2	3.4
	n.a.	1	1.7
Treatment line ^a (n, %)	First line	16	26.7
	Second line	12	20.0
	Third line	12	20.0
	Higher	18	30.0
	n.a.	2	3.3
Treatment at blood draw (n, %)	Chemotherapy	27	45.0
	AH	18	30.0
	Others ^b	42	70.0

^aTherapy lines are either chemotherapies, antihormone therapies or other anti-cancer treatments. Each initiated therapy line is counted as one regardless of whether a disease progression triggered the therapy initiation

^be.g. bone modifying drugs or monoclonal antibodies

HER2 positive tumor (Table 1). Further detailed patient characteristics are shown in Table 1.

CTC results

At least one CTC was found in 66.7% ($n = 40$) of the patients with the filtration method and in 56.7% ($n = 34$) with the CellSearch® method. There were 4 cases which were CTC positive according to the CellSearch® method, but CTC negative using the filtration method. Vice versa, in 10 cases the filtration method detected CTCs and the CellSearch® method did not. Overall accuracy rates comparing positive vs. negative test results was 76.7% ($n = 46$). Considering a classification with CTC negative vs. 1–4 CTCs vs. ≥ 5 CTCs, the overall accuracy rate was 60% ($n = 36$) (Table 2).

Comparing the CTC counts assessed by CellSearch® method and the filtration based system of each patient, we found a high correlation (Spearman's correlation 0.733) of the CTC enumeration (Fig. 1). The CellSearch® system detected a range of 1 to 2000 CTCs while the filtration based method counted CTCs from 1 to 1900. Overall the CTC enumeration by CellSearch® (median: 2.5 cells) was slightly higher compared to the one assessed with the filtration method (median: 1.5 cells). The cell count was lower with the filtration method in 33 cases and higher in 9 cases, a tie was seen in 18 cases of which 16 were a pair of 0 and 0 counts ($p < 0.001$, Wilcoxon test).

CTC significantly influenced overall survival in addition to the considered predictors. The adjusted hazard ratio (HR) for CTC_{CS} was 5.2 (95% CI: 2.2–12.4) and for CTC_{FB} the HR was 4.2 (95% CI: 1.9–9.4). The results of both Cox models are shown in Table 3 and Table 4. Kaplan-Meier curves for overall survival grouped into positive or negative CTC count assessed by CellSearch® or the filtration based method are shown in Fig. 2a and Fig. 2b. Kaplan-Meier curves with a threshold of ≥ 5 CTCs are displayed in Fig. 2c and Fig. 2d.

The median overall survival of 1.83 years (95% CI: 1.63–2.02) for patients with < 1 CTC_{CS} (Fig. 2a) was similar to the median overall survival of 1.88 years (95% CI: 1.74–2.03) for patients with no CTC_{FB} count (Fig. 2b). In contrast the median overall survival of 0.59 years (95% CI: 0.38–0.80) for patients with 1 or

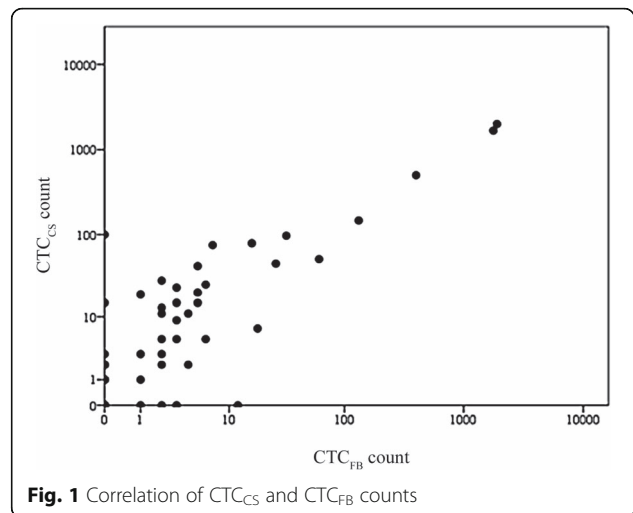


Fig. 1 Correlation of CTC_{CS} and CTC_{FB} counts

more CTCs assessed by the filtration based method (Fig. 2b) was slightly shorter compared to the overall survival of 0.74 years (95% CI: 0.51–1.52) for patients with ≥ 1 CTC_{CS} (Fig. 2a). Similarly, significant differences regarding the overall survival were detected for both CTC_{CS} and CTC_{FB} counts with a threshold of ≥ 5 CTCs (Fig. 2c and Fig. 2d). The median overall survival of 1.68 years (95% CI: 1.10–2.26) for patients with < 5 CTC_{CS} (Fig. 2c) was slightly longer than the median overall survival of 1.29 years (98% CI: 0.89–1.69) for patients with < 5 CTC_{FB} counts (Fig. 2d). In comparison, the median overall survival of 0.33 years (95% CI: 0.00–0.66) for patients with ≥ 5 CTC_{CS} (Fig. 2c) was similar to the median overall survival of 0.47 years (95% CI: 0.00–1.24) for patients with 5 or more CTCs assessed by the filtration based method (Fig. 2d).

Discussion

In this study we used CellSearch®, a commonly used method for CTC detection, and a new established automated filtration-based method to assess the prognostic

Table 2 Comparison of CTC enumeration by CellSearch® and filtration based method

		CTC _{FB} n (%)			
		Negative	1–4 CTCs	≥ 5 CTCs	Total
CTC _{CS} n (%)	Negative	16 (26.7%)	8 (13.3%)	2 (3.3%)	26 (43.3%)
	1–4 CTCs	3 (5.0%)	5 (8.3%)	10 (16.7%)	18 (30.0%)
	≥ 5 CTCs	1 (1.7%)	0 (0%)	15 (25.0%)	16 (26.7%)
	Total	20 (33.3%)	13 (21.7%)	27 (45.0%)	60 (100%)

Table 3 Cox Regression model for the prediction of OS using CTC count by CellSearch® and covariates

Characteristic		HR	95% CI	p-value
Age	Per year	1.00	0.97–1.03	0.91
Hormone receptor status	Negative	1 (reference)		
	Positive	0.44	0.17–0.85	0.08
HER2 Status	Negative	1 (reference)		
	Positive	0.32	0.13–0.85	0.02
Grading	Per grade	1.08	0.58–2.02	0.82
Therapy line	Per line	1.01	0.78–1.32	0.93
CTC count	0	1 (reference)		
	≥ 1	5.20	2.18–12.43	0.0002

Table 4 Cox Regression model for the prediction of OS using CTC count by the filtration based method and covariates

Characteristic		HR	95% CI	p-value
Age	Per year	0.99	0.96–1.02	0.47
Hormone receptor status	Negative	1 (reference)		
	Positive	1.50	0.56–4.06	0.41
HER2 Status	Negative	1 (reference)		
	Positive	0.89	0.35–2.25	0.80
Grading	Per grade	1.45	0.70–3.00	0.32
Therapy line	Per line	0.98	0.75–1.26	0.85
CTC count	0	1 (reference)		
	≥1	4.20	1.86–9.46	0.001

value of CTC count in peripheral blood in a cohort of MBC patients. The CTC count within 7.5 ml of blood draw was determined in a study cohort of 60 radiologically measureable or clinically assessable MBC patients. We calculated the overall survival to determine and compare the prognostic impact of both methods. Even though the most commonly used cutoff for CTC positivity is five or more, it is still unclear whether a presence of one or more CTCs might be an even more accurate predictor depending on the tumor subgroup analyzed [20, 23]. Several prospective, multicenter studies showed a significant prognostic value for progression-free and overall survival of MBC patients with CTC levels < 5 or < 1 [12, 14, 24]. Additionally, CTC assessment was proven to be a good setting for valuation of treatment response and as an individual predictive test for metastatic relapse [14, 24, 25]. Here, we set out to compare both thresholds (≥1 and ≥5 CTCs) for both methods. A significant prognostic value of CTC count could be achieved using the CellSearch® as well as the filtration-based system. There were no differences between a threshold of one CTC or five CTCs, indicating that the new filtration-based method is also suitable for sensitive detection of less than five CTCs.

Probably the most discussed downside of the CellSearch® method is that the CTC detection and isolation relies only on EpCAM positivity [26]. It is known that tumor cells and in particular CTCs are highly heterogeneous and are able to change their expression profiles during cancer growth and spreading [27]. Especially during epithelial to mesenchymal transition epithelial surface molecules get lost to allow detachment and invasion of tumor cells, while these markers are re-acquired during mesenchymal to epithelial transition [26, 28]. During cancer cell dissemination the epithelial surface marker EpCAM can be downregulated by either DNA methylation, glycosylation or proteolytic cleavage allowing the cancer cells to switch to a more mesenchymal

and invasive phenotype [29, 30]. This emphasizes that a method only relying on EpCAM positivity may not be suitable for detection of all CTCs and thus might give inadequate results concerning the prognostic value or the biological classification the CTCs. In contrast to the CellSearch® system, the filtration-based system does not select CTCs based on EpCAM positivity and thus we hypothesize this system might be suitable for detection of CTCs with a wider range of different phenotypes. We assume the detection of patients with a positive CTC_{FB} count but negative CTC_{CS} enumeration might be due to the missing EpCAM positivity of these cells.

Overall, the assessment of the filtration based method was feasible. The CTC positivity was within the expected rate and similar to results from different studies [6, 10]. Interestingly, even though the filtration based method does not only select EpCam positive CTCs but in contrast to the CellSearch® system also EpCAM negative ones, we observed an overall smaller CTC count with the filtration based system compared to CellSearch®. Nevertheless, we could show a significant prognostic value for overall survival using both methods. We hypothesize that the smaller number of detected CTCs might be due to the defined pore size of the filtration based system. It was shown earlier that CTCs from prostate cancer patients, which were isolated using the CellSearch® system, had a significant smaller average diameter (7.97 µm) compared to cultured prostate cancer cells [31]. Even though, to our knowledge, there are no studies regarding the tumor cell size of CTCs from breast cancer patients collected by the CellSearch® system, we assume similar findings would occur. Our filtration based system only collects CTCs with a diameter of 8.0 µm or larger and thus, this might be causative for the overall smaller cell numbers and the CTC_{CS} positive, but CTC_{FB} negative enumerations.

The assessment of tumor characteristics on CTCs is an attractive opportunity to avoid repeated tissue biopsies. CTC counts from peripheral blood samples are defined as liquid biopsies. In contrast to tissue biopsies, this is a non-invasive, quick and feasible real-time method to gain tumor cells for further analysis. Tumor characteristics can help to stratify therapy decisions. Even if primary tumor biopsies are negative for certain tumor markers (e.g. HER2), CTCs often show a different expression pattern (HER2 positive) [23]. These characteristics of CTCs are important hallmarks to define the treatment strategy and can help to avoid overtreatment. The ongoing DETECT III trial (NCT01619111) is currently investigating the therapeutic relevance of HER2-targeted therapy for MBC patients with HER2-negative tissue biopsies but HER2-positive CTCs [32]. Additionally, protein or gene expression profiles and analysis of epigenetic or genetic alterations of the DNA could help to characterize CTCs and thus the tumor even further

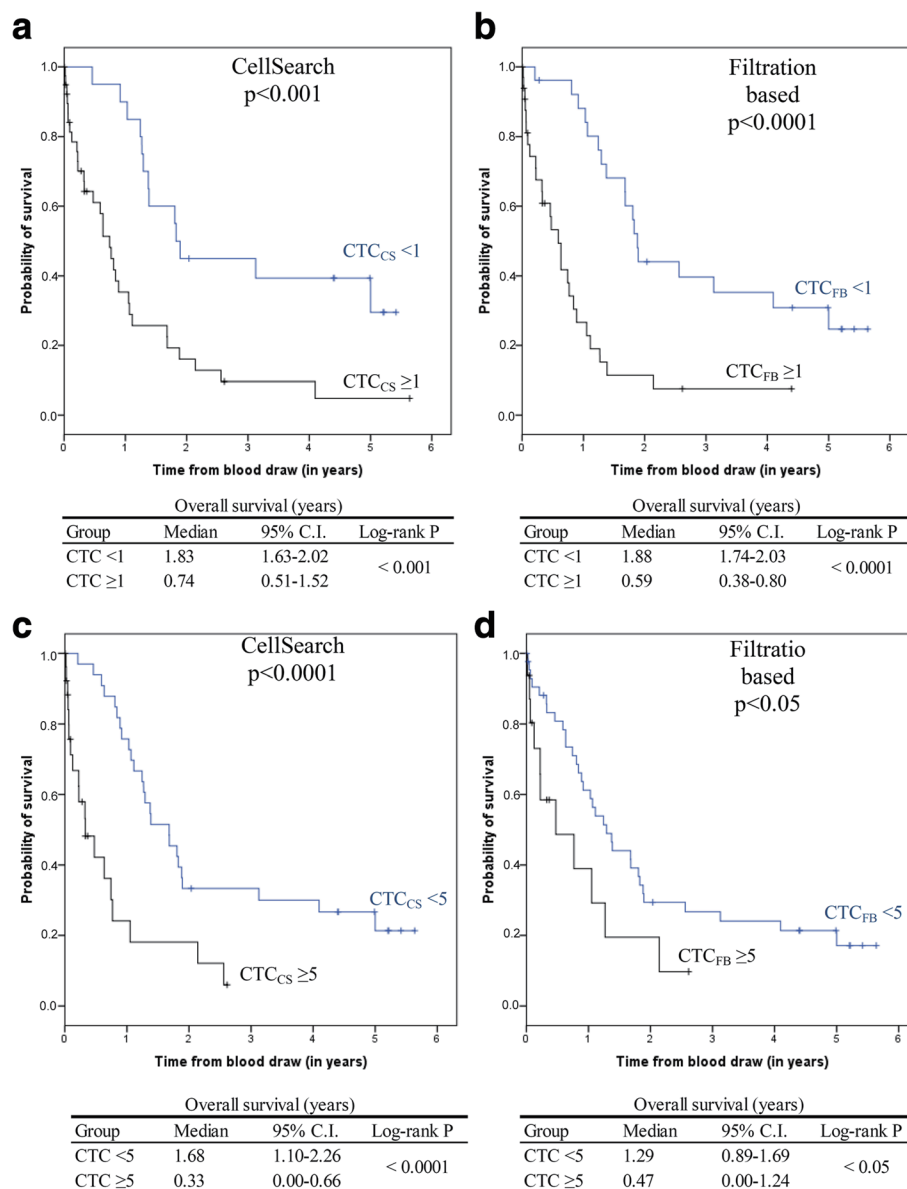


Fig. 2 Overall survival with regard to CTC_{CS} (a threshold ≥ 1 and c threshold ≥ 5) and CTC_{FB} count (b threshold ≥ 1 and d threshold ≥ 5)

[33, 34]. It even might help to stratify the therapeutic strategy for MBC patients [35]. As the filtration-based setting for CTC isolation is based on an automated nucleic acid preparation system (VERSANT® kPCR sample Prep system), it might not only help to determine the CTC count but also to purify DNA, RNA or proteins from CTCs for further analysis [36].

Nevertheless, this study has several limitations. First, the small sample size only allows to coarsely compare the two methods with regard to their prognostic value. Second, the lack of standardized treatment is a potential bias as it might influence the prognostic value regardless of the CTC count. Additionally, the time of blood draw was not defined precisely. But overall this setting

represents the common clinical practice and was sufficient enough to compare two different CTC detection techniques in regard of overall survival.

Conclusions

In summary, our data indicates that the newly established EpCAM independently filtration-based method might be equivalent to the CellSearch® method in regard to sensitivity of detecting CTCs from MBC patients and predicting prognosis. The filtration-based method might be easier to be used for automated RNA, DNA or Protein extraction from isolated CTCs allowing an in-depth characterization of the CTCs and the related biological background of the metastatic disease.

Abbreviation

CTC: Circulating tumor cells; CTC_{CS}: CTCs assessed using CellSearch® method; CTC_{FB}: CTCs assessed using the filtration-based method; ER: Estrogen receptor; IHC: Immunohistological; MBC: Metastatic breast cancer; PR: Progesterone receptor

Acknowledgements

Not applicable

Funding

This work was funded by a research grant of the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) as part of the subproject "Integrated Breast Care" BD-04c/d (Grant-Number: 01EX1012B; grant recipient: PAF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. The described filtration method for the detection of CTCs has been done under research conditions and is no commercial platform for the detection of CTCs.

Authors' contributions

HH, MR and PAF performed the analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. WG, MM, PP and KF developed the filtration-based method and acquisition of CTC count and revised the manuscript critically. SJ, CR, MPL, BV, MWB and PG were responsible for the collection of blood draws, the acquisition of clinical data and revised the manuscript critically. LH performed the statistical analysis and was involved in drafting the manuscript. FMS and TNF performed the analysis of CTC counts using the CellSearch method and revised the manuscript critically. AH, HN and KA contributed to conception and design of the study and revised the manuscript critically. All authors gave final approval of the version to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the ethics committee of the Medical Faculty, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nuremberg and complies with the current laws of the country in which it was performed. A written informed consent was obtained from all patients. This consent included the approval of biomaterial collection and analysis as well as the access of patient/clinical data and storage in a database.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

PAF received honoraria from Novartis, Pfizer, Roche, Celgene and his institution conducts research with research grant from Novartis. MPL received honoraria from Novartis, Pfizer, AstraZeneca, Roche, Celgene and his institution conducts research with research grant from Novartis. CR received honoraria from Novartis and Roche and her institution conducts research with research grant from Novartis. PG has received honoraria from Novartis. WG, MM and PP are employees of Siemens Healthcare GmbH. All other authors declare that they do not have any conflicts of interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Gynecology and Obstetrics, Comprehensive Cancer Center Erlangen-EMN, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nuremberg, Universitätsstraße 21-23, 91054 Erlangen, Germany.

²Siemens Healthcare GmbH, Günther-Scharowsky-Str.1, 91058 Erlangen, Germany. ³Biostatistics Unit, Department of Gynecology and Obstetrics, Comprehensive Cancer Center Erlangen-EMN, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nuremberg, Universitätsstraße 21-23, 91054 Erlangen, Germany. ⁴Department of Gynecology and Obstetrics, Heinrich Heine University of Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany.

⁵Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Tuebingen, Calwerstraße 7, 72076 Tuebingen, Germany. ⁶Department of Obstetrics and Gynecology, Johannes Gutenberg University, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz, Germany.

Received: 23 August 2017 Accepted: 9 February 2018

Published online: 20 February 2018

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66:7–30.
2. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013;59:110–8.
3. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:472–84.
4. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*. 2015;61:112–23.
5. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:1420–30.
6. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system. *Clin Cancer Res*. 2007;13:920–8.
7. Huang T, Jia CP, Jun Y, Sun WJ, Wang WT, Zhang HL, Cong H, Jing FX, Mao HJ, Jin QH, et al. Highly sensitive enumeration of circulating tumor cells in lung cancer patients using a size-based filtration microfluidic chip. *Biosens Bioelectron*. 2014;51:213–8.
8. Kahn HJ, Presta A, Yang LY, Blondal J, Trudeau M, Lickley L, Holloway C, McCready DR, Maclean D, Marks A. Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;86:237–47.
9. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*. 2011;57:1242–55.
10. Muller V, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer E, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Fehm T. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System and AdnaTest Breast in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R118.
11. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421.
12. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:781–91.
13. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*. 2006;12:4218–24.
14. Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, Rao SB, Eng-Wong J, Seillier-Moiseiwitsch F, Noone AM, Isaacs C. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:5153–9.
15. Nakamura S, Yagata H, Ohno S, Yamaguchi H, Iwata H, Tsunoda N, Ito Y, Tokudome N, Toi M, Kuroi K, Suzuki E. Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. 2010;17:199–204.
16. Fasching PA, Brucker SY, Fehm TN, Overkamp F, Janni W, Wallwiener M, Hadji P, Belleville E, Haberle L, Taran FA, et al. Biomarkers in patients with metastatic breast cancer and the PRAEGNANT study network. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2015;75:41–50.
17. Hein A, Gass P, Walter CB, Taran FA, Hartkopf A, Overkamp F, Kolberg HC, Hadji P, Tesch H, Ettl J, et al. Computerized patient identification for the EMBRACA clinical trial using real-time data from the PRAEGNANT network for metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;158:59–65.
18. Hauch S, Zimmermann S, Lankiewicz S, Zieglschmid V, Bocher O, Albert WH. The clinical significance of circulating tumour cells in breast cancer and colorectal cancer patients. *Anticancer Res*. 2007;27:1337–41.
19. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, Roller M, Huober J, Fehm T, Schrader I, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor

- cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res.* 2010;16:2634–45.
20. Gazzaniga P, Raimondi C, Gradilone A, Biondi Zoccai G, Nicolazzo C, Gandini O, Longo F, Tomao S, Lo Russo G, Seminara P, et al. Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: do we need an alternative cutoff? *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139:1411–6.
 21. Barker C. The mean, median, and confidence intervals of the Kaplan-Meier survival estimate—computations and applications. *Am Stat.* 2009;63:78–80.
 22. Loehberg CR, Almstedt K, Jud SM, Haeberle L, Fasching PA, Hack CC, Lux MP, Thiel FC, Schrauder MG, Brunner M, et al. Prognostic relevance of Ki-67 in the primary tumor for survival after a diagnosis of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138:899–908.
 23. Liu Y, Liu Q, Wang T, Bian L, Zhang S, Hu H, Li S, Hu Z, Wu S, Liu B, Jiang Z. Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: a valuable prognostic and predictive biomarker. *BMC Cancer.* 2013;13:202.
 24. Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giachetti S, de Cremoux P, Marty M, Pierga JY. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2010;21:729–33.
 25. Bian L, Wang T, Liu Y, Zhang HQ, Song JJ, Zhang SH, Wu SK, Song ST, Jiang ZF. Evaluation of treatment response for breast cancer: are we entering the era of "biological complete remission". *Chin J Cancer Res.* 2012;24:403–7.
 26. Raimondi C, Nicolazzo C, Gradilone A. Circulating tumor cells isolation: the "post-EpCAM era". *Chin J Cancer Res.* 2015;27:461–70.
 27. Martelotto LG, Ng CK, Piscuoglio S, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res.* 2014;16:210.
 28. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Rose L, Zollner TM, Krahn T, von Ahsen O. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012;12:178.
 29. Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:4393–402.
 30. Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Fong D, Haun M, Grunewald K, Parson W, Eichmann C, Millinger S, Fiegl H, et al. Methylation status of the ep-CAM promoter region in human breast cancer cell lines and breast cancer tissue. *Cancer Lett.* 2007;246:253–61.
 31. Park S, Ang RR, Duffy SP, Bazov J, Chi KN, Black PC, Ma H. Morphological differences between circulating tumor cells from prostate cancer patients and cultured prostate cancer cells. *PLoS One.* 2014;9:e85264.
 32. Hagenbeck C, Melcher CA, Janni JW, Schneeweiss A, Fasching PA, Aktas B, Pantel K, Solomayer EF, Ortmann U, Jaeger BAS, et al. DETECT III: A multicenter, randomized, phase III study to compare standard therapy alone versus standard therapy plus lapatinib in patients (pts) with initially HER2-negative metastatic breast cancer but with HER2-positive circulating tumor cells (CTC). *J Clin Oncol.* 2012;30 Meeting Abstract: TPS1146-TPS1146.
 33. Pixberg CF, Raba K, Muller F, Behrens B, Honisch E, Niederacher D, Neubauer H, Fehm T, Goering W, Schulz WA, et al. Analysis of DNA methylation in single circulating tumor cells. *Oncogene.* 2017;36(23):3223–31.
 34. Schneck H, Blassl C, Meier-Stiegen F, Neves RP, Janni W, Fehm T, Neubauer H. Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol.* 2013;7:976–86.
 35. Lee JS, Magbanua MJ, Park JW. Circulating tumor cells in breast cancer: applications in personalized medicine. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;160:411–24.
 36. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, Andergassen U, Meier-Stiegen F, Czyz ZT, Alberter B, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med.* 2014;6:1371–86.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





OPEN YOUR VISION IN MICRO-ENVIRONMENT.

开启微观血液世界。



阳普医疗IMPROVACUTER®真空采血管系列

一如既往的卓越。
ALWAYS EXCELLENCE.

广州阳普医疗科技股份有限公司出版
仅供医疗专业人士使用。
本刊所连载及翻译文章，版权属原作者及
阳普医疗所有，请勿用于其他用途！

MKD-026

IMPROVE REVIEW



广州阳普医疗科技股份有限公司
GuangZhou Improve Medical Instruments Co.,LTD.

广州市经济技术开发区科学城开源大道102号
No.102 Kaiyuan Avenue, Science City, Guangzhou Economic & Technological
Development District, Guangzhou, China
Tel: +86 20-3231-2678
Fax: +86 20-3201-6465
Website: www.improve-medical.com
PC: 510530