

血液循環腫瘤細胞：腫瘤臨床研究的機遇與挑戰

《Science》、《Nature Medicine》、《Journal of Clinical Oncology》等多項研究證實：血液循環腫瘤細胞 (CTCs) 和稀有免疫細胞，在腫瘤治療中發揮著重要作用。

CTCs 再立戰功- CTCs 研究在全球臨床應用中獲得很大的進步和發展：《Journal of Clinical Oncology》發表於美國 FDA 與紀念斯隆—凱特琳癌症中心展開的一項聯合研究 (5 項 III 期臨床試驗，共計 6,081 例患者)，發現 CTCs 可作為轉移性去勢抵抗性前列腺癌患者用藥早期療效評估的指標【1】。《JAMA Oncology》發表的期刊也指出隨機對照研究 E5103 聯合展開二次分析 (雙盲 III 期臨床試驗，共計 4,994 例患者)，發現 CTCs 可以為乳腺癌患者晚期臨床復發風險提供可靠的預後資訊【2】。2020 年《Science》發表通過研究 CTCs 證明導致轉移 CTCs 的分子標籤是“核糖體相關基因”，發現抑制核糖體翻譯的藥物和阻斷乳腺癌增殖的靶向藥一起使用，可顯著抑制、阻止乳腺癌轉移的發生【3】。2018 年 1 月 1 日在全球啟用的美國 AJCC 第八版指南將 CTC 列為繼 ER/PR、HER2、Ki67 和腫瘤組織學分級四項生物學指標之後，又一項乳腺癌預後評估工具，認為乳腺癌外周血中存在 CTC 提示預後不良【4】。

稀有免疫細胞研究證實：PD-1+CD8+T 細胞特種部隊戰鬥力驚人：研究發現腫瘤細胞的刺激使淋巴系統產生大量的功能性免疫細胞，再運送到腫瘤組織周圍，《Nature Medicine》發表研究說明**從腫瘤患者的外周血裡也可以分離得到腫瘤突變特異性的 T 細胞，有助於免疫治療的進一步研究**【5】。

《The Journal of Clinical Investigation》發表美國 NIH 的科學家的研究成果，說明 PD-1+CD8+T 細胞是攻擊腫瘤細胞的主要族群【6】。另一篇《Nature Medicine》論文說明對非小細胞肺癌患者，用 PD-1 免疫阻斷劑治療時，PD-1+CD8+T 細胞比例高的人，對免疫治療反應較好【7】。2019 年《Nature Medicine》期刊更宣布發現一個全新的免疫抑制靶點 Siglec-15，或可補齊 PD-(L)1 短板，阻斷 Siglec-15 會引起腫瘤免疫微環境的改變，相關臨床試驗已經展開【8】。自身免疫性疾病研究也有突破：2020 年《Cell》刊文揭示某種稀有免疫細胞是自身免疫性疾病的根源【9】。

以上研究都涉及到 CTCs、稀有免疫細胞等稀有細胞的檢測和分析。稀有細胞含量極其稀少，在每毫升全血大概 40 億 ~ 60 億個細胞中僅有不到 100 個，易受其他細胞成分幹擾，所以分離富集非常困難。因此**高純度、高回收率 (不丟失稀有細胞)、快速、高細胞活性的稀有細胞分離、與分析是**

臨床及科研應用的重點。

MiSelect R“稀有細胞高效獲取分析系統”是目前唯一一款可收集稀有細胞與鑒定於一體的全自動設備，技術法寶包括微流控技術、鐳射分選、體積過濾和多通道螢光標記成像，既可以從全血中直接分離富集各類稀有細胞，進行計數、分析和鑒定（生物標誌物分析），又可以獲得高捕獲率、高純度、高活性的稀有細胞，並進行後續培養和基因分析。全過程單機集成、自動運行，**可從 8mL 全血中回收僅有 1 顆的稀有細胞！**對生物標誌物的分析包括：

CTCs 的生物標誌物分析：

1. 檢測 CTCs 中特定抗原 HER-2、EGFR、MUC1 等的表現量；
2. 檢測 CTCs 的 PD-L1 免疫檢查點標誌物的表現量，用於篩選適用於 PD-1/PD-L1 檢查點抑制劑免疫治療（如: Opdivo、Keytruda 等）的患者。

稀有免疫細胞的生物標誌物分析：

1. 稀有功能性免疫細胞的分型分析；
2. 檢測 T 細胞的 PD-1 免疫檢查點標誌物的表達及表達量，用於篩選適用於 PD-1/PD-L1 檢查點抑制劑免疫治療（如: Opdivo、Keytruda 等）的患者；
3. 檢測 T 細胞的二代免疫檢查點標誌物的表達及表達量（如: TIM-3, LAG-3 等），用於篩選適用於相應的免疫檢查點抑制劑的患者。



圖 1. MiSelect R“稀有細胞高效獲取分析系統”。

MiSelect R 的操作方式

步驟一、**全血直接標記上樣**—保留稀有細胞

步驟二、**鐳射分選**—通過微流控晶片和 eDAR 技術，篩選所需之細胞

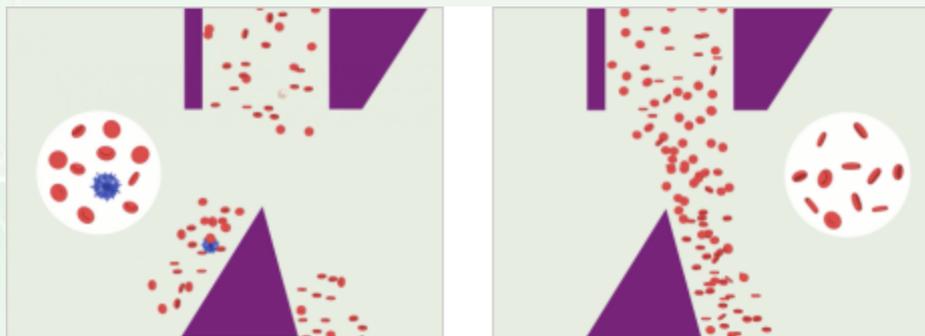


圖 2. 微流控雷射分選【10】。

步驟三、**過濾收集**—過濾掉雜質細胞，保留目標稀有細胞

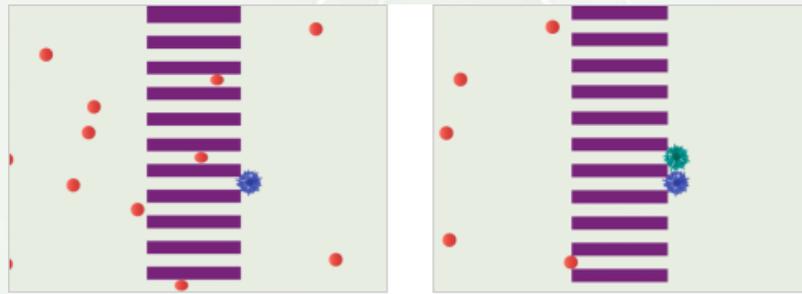


圖 3. 微流控過濾【10】。

步驟四、**多重螢光標記成像分析**—收集純化的細胞在晶片上自動完成固定、染色、清洗及成像。全自動化圖像採集，高解析成像分析，鑒定出稀有細胞

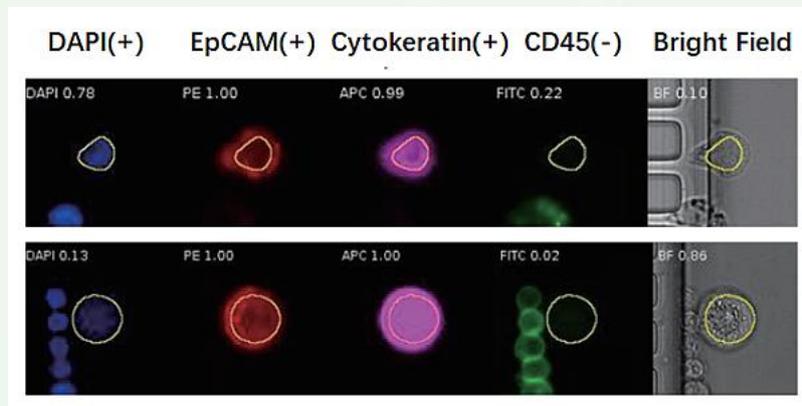


圖 4. 微流控螢光標記成像分析 (CTCs 為例)【10】。

另外，我們也能通過微流控晶片和兩步 eDAR 技術，**回收高活性的稀有細胞**。

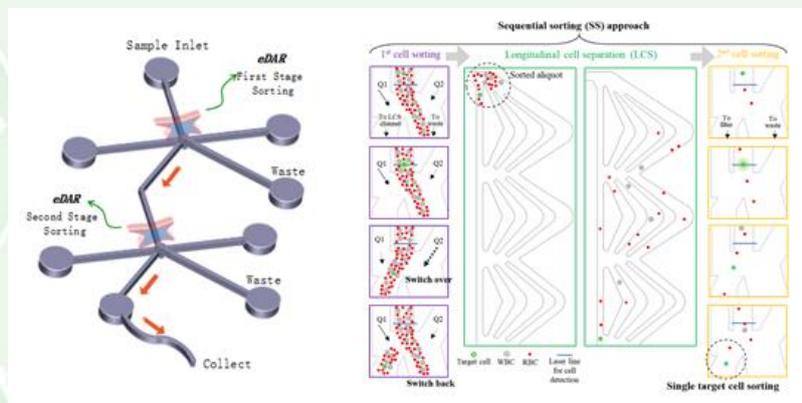


圖 5. 回收高活性的稀有細胞【10】。

- 準確度、重複性和特異性

圖 6 是 MiSelect R 對 SkBr-3 (EpCAM 高表達) 和 MDA-MB-231 (EpCAM 低表達) 的靈敏度 (回收率)、特異性、精密度。表明 MiSelect R 系統對 EpCAM 表達水準低的 CTCs 也有較高的靈敏度。系統檢測的 CV 值均 < 10%，特異性 100%。

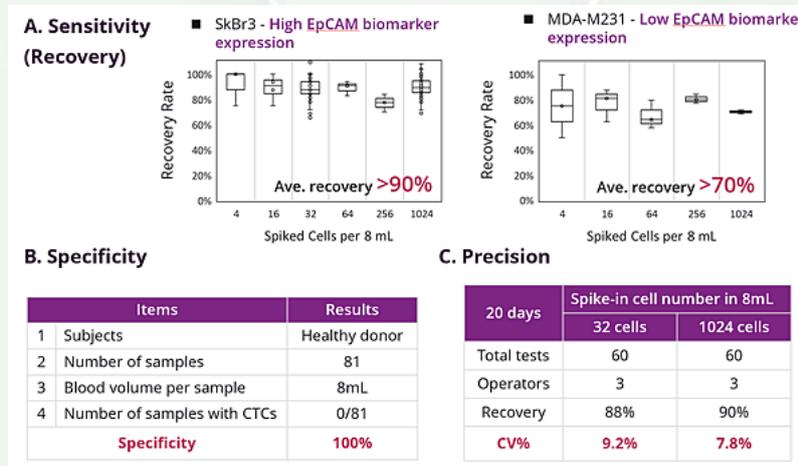


圖 6. MiSelect R 檢測的回收率、特異性、精密度【10】。

CTCs 的應用

CTCs 的應用非常廣泛，目前先列舉三個常用應用，如下：

3.1 轉移性乳腺癌患者 CTCs 上 HER2 的表達分析

檢測轉移性乳腺癌患者 CTCs 上 HER2 的表達分析，結果顯示同一患者和不同患者 CTCs 上的 HER2 表達均具有異質性，MiSelect R 檢測的 CTCs 上 HER2 的狀態顯示與病理評估一致，見圖 7。

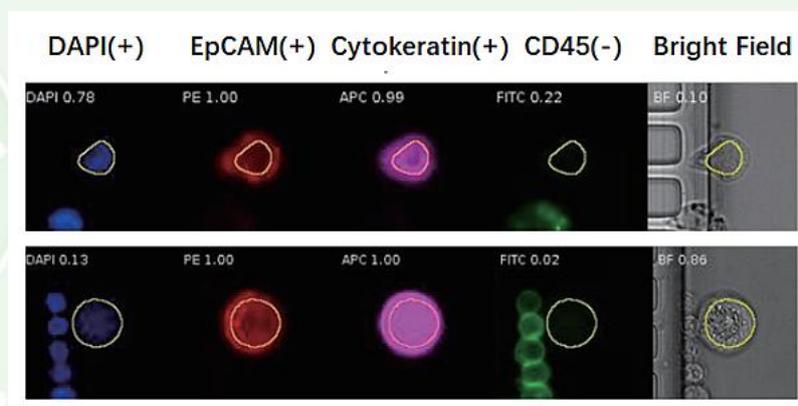


圖 7. 檢測轉移性乳腺癌患者 CTCs 上 HER2 的表達分析【11】。

3.2 腫瘤患者 CTCs 中 PD-L1 的表達

對結直腸癌和頭頸癌患者血液樣本中的 CTCs 進行計數和 PD-L1 的表達分析，結果顯示，同一患者和不同患者 CTCs 中的 PD-L1 表達均具有異質性，見圖 8。且臨床研究發現，結直腸癌 CTCs 上 PD-L1 的表達與腫瘤分期及多個臨床病理指標具有高度相關性，見圖 9。

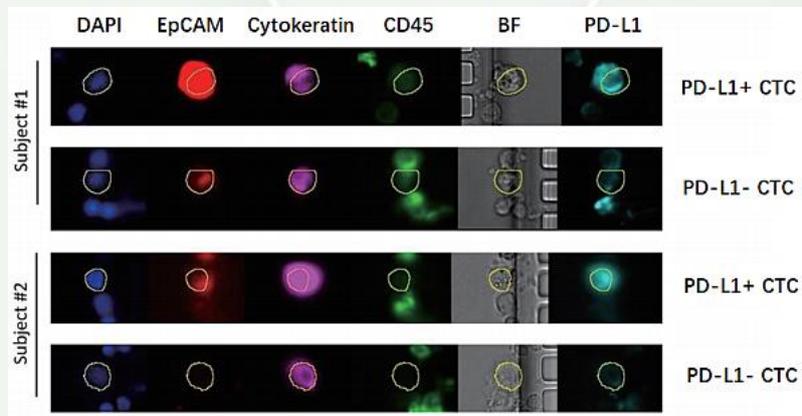


圖 8.結直腸癌和頭頸癌患者 CTCs 上 PD-L1 的表達分析【11】。

Tumor staging	Percentage of all patients with PD-L1(+) CTCs (N = 116)	Percentage of CTC positive patients with PD-L1(+) cells (N = 47)
Stage I	8.3% (2/24)	40.0% (2/5)
Stage II	21.1% (8/38)	50.0% (8/16)
Stage III	35.7% (15/42)	78.9% (15/19)
Stage IV	50.0% (6/12)	85.7% (6/7)
	P-value = 0.0017	P-value = 0.0178

Clinicopathological variables	PD-L1(+) CTCs present	PD-L1(+) CTCs absent	P value
T stage			
T1/T2 (n = 33)	6%	94%	0.016
T3/T4 (n = 83)	48%	52%	
N stage			
N0 (n = 65)	12%	88%	0.013
N(+) (n = 51)	33%	67%	
CEA			
≥ 5ng/mL (n = 47)	36%	64%	0.002
< 5ng/mL (n = 68)	10%	90%	
CA-199			
≥ 37ng/mL (n = 21)	33%	67%	0.13
< 37ng/mL (n = 92)	17%	83%	
Blood Vascular Invasion			
(+) (n=26)	42%	58%	0.014
(-) (n = 84)	17%	83%	
Lymphovascular Invasion			
(+) (n = 30)	36%	64%	0.004
(-) (n = 80)	18%	82%	

圖 9.結直腸癌 MVB CTCs 上 PD-L1 的表達與腫瘤分期及多個臨床病理指標具有高度相關性【12】。

3.3 對外周血 CTCs 進行基因測序分析

MiSelect 可捕獲外周血中單顆 CTC，用“RT-PCR”方式可以在單顆 CTC 上分析超過 11 種基因 (圖 10)。非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者，酪氨酸激酶抑制劑 (TKI) 治療失敗，化療失敗，嘗試用 MiSelect R 獲取外周血 CTCs 進行基因檢測，對 3 顆 CTC 進行了 EGFR 突變分析，指導患者用藥 (圖 11)。

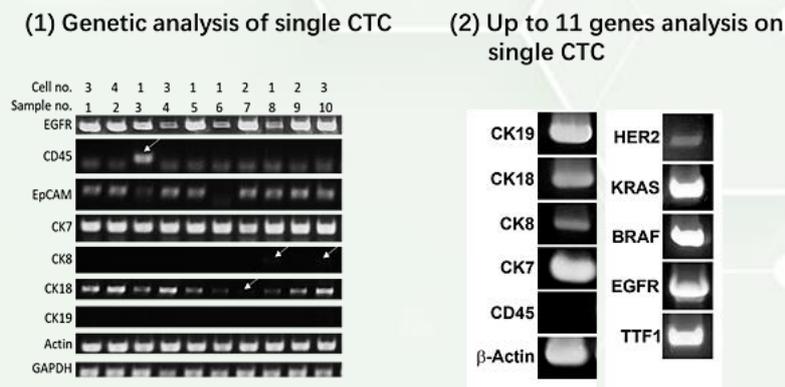


圖 10. 外周血捕獲的單顆 CTC 可以進行高達 11 種的基因分析【12】。



圖 11. 肺癌病患外周血中捕獲的 3 顆 CTC，進行 EGFR 基因突變分析【12】。

- 稀有免疫細胞的應用

4.1 稀有免疫細胞的分型分析

MiSelect R 系統可以對細胞進行多重螢光標記及高解析影像分析，從而識別攜帶特定抗原的免疫細胞 (圖 12)。

Immune Cell	Cell Number	Nucleus	CD8	PD-1	IFN- γ	TIM-3	LAG-3	BF
CD8(+) PD1(+) IFN γ (+) TIM3(+) LAG3(+)	21 / 4mL							
CD8(+) PD1(+) IFN γ (+) TIM3(+) LAG3(-)	51 / 4mL							
CD8(+) PD1(+) IFN γ (-) TIM3(-) LAG3(+)	1 / 4mL							

圖 12. MiSelect R 可鑒定稀有免疫細胞的分型【13】。

4.2 與流式細胞儀的靈敏度對比

流式細胞儀的檢靈敏度不到十萬分之一，100 個/mL 全血以下的細胞就很難檢測出來了，而且絕大多數流式細胞儀不能提供細胞的影像學資訊。《Nature Medicine》刊文說明在黑色素瘤患者的周邊血中，也能發現新抗原特異性的淋巴細胞；與腫瘤組織內部相比，外周血 (PBMC) 中的 PD-1+CD8+ 的 T 細胞數量非常少，流式細胞儀幾乎無法檢測到【14】。MiSelect R 系統不僅可以檢測到 CD3(+)CD8(+)T 細胞，CD3(+)PD-1(+)T 細胞，CD8(+)PD-1(+)T 細胞，並且對罕見細胞亞型靈敏度更加突出 (圖 13)，可檢測、分析含量在 100 個/mL 以下的稀有功能性免疫細胞。另外，使用流式細胞儀需對樣本進行前處理，如梯度離心取白細胞層染色，可能丟失稀有免疫細胞；而 MiSelect R 系統直接對全血進行染色標記，將丟失細胞的可能性降到最低。

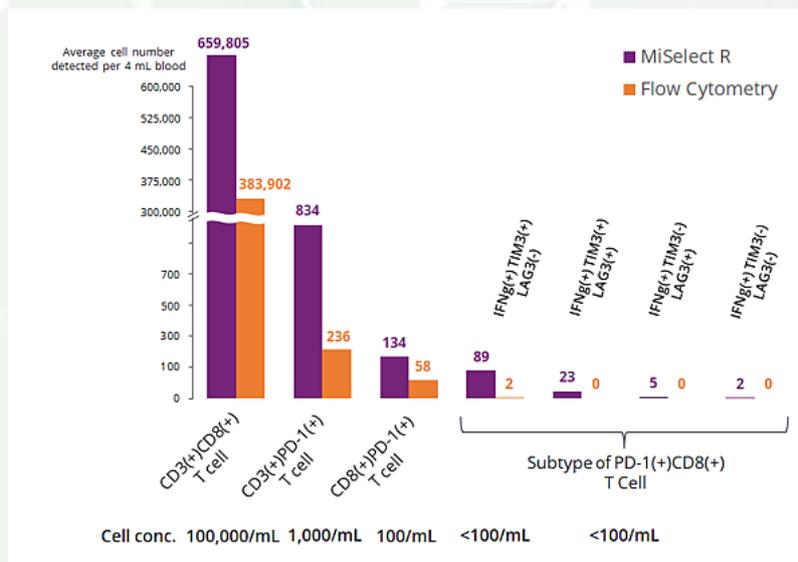


圖 13.對於非常稀有的免疫細胞，MiSelect R 可以檢測出來，而流式細胞儀無法檢測到【13】。

- 母血中胎兒有核紅細胞應用:MiSelect R 在三例懷孕母親血液中，成功分離出迴圈胎兒有核紅細胞 (fNRBC)。

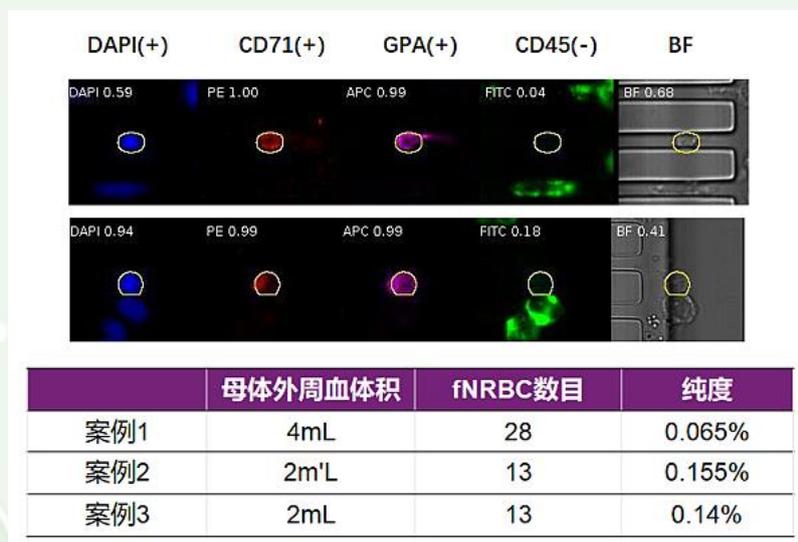


圖 14.母體外周血中的胎兒有核紅細胞【12】。

MiSelect R 的特點小結

- 快速全血樣本上樣，無需細胞裂解、密度梯度離心及磁珠篩選，避免遺漏細胞；
- 可作用於全血、胸水、腹水、腦脊液等多種生物樣本；
- 全自動化操作平臺，單機集成，自動富集、純化、螢光標記、影像分析；
- 快速捕獲關鍵生物標誌物資訊，可在同一細胞上標記 1-13 種生物標誌物；
- 高解析度細胞影像便於判讀分析；
- 可檢測 EpCAM 低表達的腫瘤細胞株，如 MDA-MB-231 細胞；
- 重複性高，重複性可達 90%以上，CV 值低於 10%；
- 超高捕獲率>90%，可高達 98.5%；
- 特異性 100%；
- 可獲得高純度稀有細胞（包括 CTCs）（靶細胞純度>60%，挑取單細胞後純度可達到 100%）；
- 保留細胞完整性，可進一步提取核酸，獲得基因組資訊；
- 操作簡捷，20 分鐘手動操作，3-4 小時完成兩個 8mL 全血樣本的分析；
- 適用於 CTCs、稀有免疫細胞、自身反應性 T 細胞、淋巴母細胞、母體血液中的胎兒細胞、癌症幹細胞等稀有細胞的計數、鑒定和分離。

總結

MiSelect R 獨有的微流道技術結合雷射分選（陽選）、過濾收集（陰選）、多重螢光標記成像分析，可對稀有細胞進行計數、分析、鑒定並獲取活細胞。可用於 CTCs 研究、癌症藥物的伴隨診斷、稀有功能性免疫細胞研究，或產前無創檢測等領域。其“大海撈針”、“億裡挑一”的強大功能能實現在 8mL 全血裡回收到僅有的 1 顆稀有細胞，真正做到超高捕獲率、高靈敏度和 100%特異性。

參考文獻：

1. Heller G, McCormack R, Kheoh T, et al. Circulating Tumor Cell Number as a Response Measure of Prolonged Survival for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Comparison with Prostate-Specific Antigen across Five Randomized Phase III Clinical Trials [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2018.
2. Sparano J, O'Neill A, Alpaugh, Association of Circulating Tumor Cells With Late Recurrence of Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial [J] *JAMA Oncology*, 2018.
3. R.Y.Ebright et al., Dereglulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis, *Science*, 367(6485):1468-1473, 2020.
4. 美國 AJCC 第八版指南
5. Schumacher,T.N.& Scheper,W., A liquid biopsy for cancer immunotherapy, *Nature Medicine*, Volume22, No.4, 2016, pp.340-341.
6. Gros,G.,et al., PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors, *The Journal of Clinical Investigation*, Volume124, No.5, 2014, pp.2246-2259.
7. Thommen,D.S.,et al., A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade, *Nature Medicine*, 24, 994-1004 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0057-z>.
8. Jun Wang, Jingwei Sun, et al. Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy.[J]. *Nature Medicine*, 2019. DOI : 10.1038/s41591-019-0374-x
9. Singh M., et.al., Lymphoma Driver Mutations in the Pathogenic Evolution of an Iconic Human Autoantibody, *Cell*, February 13, 2020.
10. MiCareo website : <https://www.micareo.com/>.
11. Circulating Tumor Cell Enumeration and Multiplexed Biomarker Analysis on the MiSelect R System, Application Note.
12. MiCareo internal clinical materials.
13. Excellent Sensitivity for Immune Cell Detection by the MiSelect R System, Application Note.
14. Gros,A.et.al., Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, *Nature Medicine*, published online 22 February 2016.