

• 综述 •

液体活检技术在前列腺癌中的应用及研究进展*

林智谦¹ 王世博¹ 梁英¹ 田俊强^{1△}

[摘要] 液体活检技术是通过检测患者体液(特别是血液和尿液)中的特异性肿瘤标志物如循环肿瘤细胞(CTCs)、循环肿瘤 DNA 等进行检测并分析,其对肿瘤的临床分期、远处转移、预后判断、耐药性的形成机制以及个体化治疗指导都具有深远意义。前列腺癌早期诊断较为困难,而且部分病例恶性程度高,易复发和转移。近几年来,该技术已经应用在前列腺癌诊治中并积累了许多非常有价值的临床数据和经验。本文对液体活检技术在前列腺癌中的研究现状及面临的挑战作一综述。

[关键词] 液体活检技术;循环肿瘤细胞;循环肿瘤 DNA;前列腺癌

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.02.017

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A

Progress and application of liquid biopsy in prostatic cancer

LIN Zhiqian WANG Shibo LIANG Ying TIAN Junqiang

(Department of Urology, Second Hospital of Lanzhou University, Institute of Urology of Second Hospital of Lanzhou University, Key Laboratory for Urological Diseases of Gansu Province, Gansu Nephro Urological Clinical Center, Lanzhou, 730030, China)

Corresponding author: TIAN Junqiang, E-mail: tjq007263@sina.com

Abstract Liquid biopsy is a popular technology to detect and analyze specific tumor biomarkers (such as circulating tumor cells, circulating tumor DNA, etc.) in the body fluids (especially blood and urine) of cancer patients. It plays a key role in clinical tumor staging, metastasis, prognosis, drug resistance research and individualized treatment. It is well known that early diagnosis of prostate cancer is a little difficult, and part of patients show high malignancy and incidence of recurrence and metastasis. In recent years, this technology has been used in the diagnosis and treatment of prostate cancer and accumulated a lot of very valuable clinical data and experience. This review summarized recent literature and briefly discussed the current status and challenges of liquid biopsy in prostate cancer.

Key words liquid biopsy technology; circulating tumor cells; circulating tumor DNA; prostatic cancer

前列腺癌是危害男性健康最常见的恶性肿瘤之一,虽然因生活方式、地域或种族不同世界各国的发病率存在差异,其致死率在癌症相关的死因中始终位居前 5 位^[1]。近 10 年来,我国前列腺癌发病率呈快速上升趋势,在男性恶性肿瘤发病率中已上升至第 6 位^[2]。目前检测方法主要包括直肠指诊(DRE)、前列腺特异性抗原(PSA)、超声、CT 以及 MRI^[2]。这些方法或凭借医生经验或费用昂贵,无法全面客观的评估患者的病情。

液体活检技术通过对癌症患者体液(特别是血液和尿液)中的特异性肿瘤标志物[如循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)、循环肿瘤 DNA

等]进行检测并分析。相比传统的手术活检和穿刺活检,是一种方便快捷、微创、能动态反映病情变化的癌症血液检测方法。通过分析患者血液样本,可以对疾病的疗效及预后进行判断,同时兼顾耐药性检测和治疗方案的调整。该检测技术主要包括 CTCs、血浆游离 DNA(cell-free DNA,cfDNA)和外泌体(exosomes)等^[3,4]。将其应用于前列腺癌的早期诊断、疗效及预后评估等方面,将为前列腺癌的研究开辟新的领域。本文主要对液体活检技术在前列腺癌诊治领域的研究进展及面临的挑战作一综述。

1 CTCs 与前列腺癌

1.1 概念和形成机制

CTCs 是指从原发或转移灶脱落下来并进入外周血循环中的单个肿瘤细胞或 2~5 个肿瘤细胞构成的癌细胞团^[5]。它是形成肿瘤转移灶的主要原因,具有生存期短、生存能力强和侵袭力高的特点。其参与肿瘤转移过程的重要机制为上皮间质

*基金项目:甘肃省卫生行业科研计划项目(编号 GWGL2013-30);兰州大学第二医院 2015 年度第二批院内博士科研基(编号 ynbskyjj2015-2-7)

¹兰州大学第二医院泌尿外科 兰州大学第二医院泌尿外科研究所 甘肃省泌尿系统疾病重点实验室 甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心(兰州,730030)

[△]审校者

通信作者:田俊强,E-mail:tjq007263@sina.com

转化(epithelial mesenchymal transition, EMT),上皮细胞在原发灶发生 EMT,间质化的肿瘤细胞通过降解其周围基质,使上皮间质化和非间质化肿瘤细胞侵入血管内,形成了肿瘤的转移。此外,研究表明血小板^[6]、流体剪切力、细胞失巢凋亡的抑制、肿瘤存活相关的免疫逃逸机制等也对肿瘤转移有作用。

1.2 CTCs 检查方法

在外周血中,平均每 $10^5 \sim 10^7$ 个单核细胞中存在 1 个 CTCs,因此对 CTCs 进行检测、计数和分子鉴定是非常困难的^[7]。如何提高检测的精确性、敏感性及特异性是目前面临的最大挑战。虽然 CTCs 检测方法种类繁多,但基本原理是依据 CTCs 表面标记或体积大小不同进行分离和鉴定,大致分为以下 2 种方法:一是依 CTCs 的生物学特性,通过识别其表面的上皮黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)和角蛋白标志物来进行检测。比如 CellSearch[®] 系统,该方法的缺点是对 EMT 过程中表现出非上皮特征的肿瘤和缺失上皮标志物的肿瘤检测的灵敏性降低。二是依据 CTCs 的物理学特性,根据 CTCs 的大小、密度、可变性等将其分离和识别。常用的检测方法包括微流控芯片技术^[8]、微腔阵列技术^[9]等。目前该技术面临的难题是如何对捕捉到的 CTCs 进行体外培养和增殖,以及对其进行基因型或表型的检测^[10,11]。

1.3 CTCs 检测在前列腺癌中的应用

因为 CTCs 具有肿瘤细胞的分子特征,对其分子病理学研究已成为近年来的新热点。相比单独使用 CTCs 计数,对前列腺癌患者 CTCs 进行分子学检测能提供更多的信息。例如在基因变异的研究中发现,通过原位杂交 RT-PCR 和荧光检测技术发现前列腺癌患者血液中分离出的 CTCs 中有 TMPRSS2-ERG 融合基因导致的染色体易位。在对 CTCs 蛋白标志物中发现,增殖细胞核抗原 Ki-67 作为一种与细胞周期相关的蛋白质,在 CTCs 中 Ki-67 的增殖指数的增加和抗去势治疗密切相关。在对 CTCs 的雄激素受体信号通路的研究显示,尽管有抗雄治疗,出现去势抵抗性前列腺癌的主要原因是 AR 基因扩增和突变等引起 mCRPC 中 AR 信号通路激活所致。此外,研究发现去势抵抗性前列腺癌患者的 CTCs 中存在 AR 剪切体(Androgen Receptor-V7, AR-V7)对阿比特龙和恩杂鲁胺产生耐药的主要原因,此类患者使用卡巴他赛可以取得更好的疗效^[12~15]。随着循环肿瘤单细胞分子病理学检测技术的发展,以上机制将在更大规模的临床试验中得到证实。

在局限性前列腺癌患者中,无法依据术前

CTCs 检测来判断肿瘤是否复发。Meyer 等^[16]对 152 例实施前列腺癌根治术的患者术前使用 CellSearch[®] 系统检测外周血中 CTCs,研究其与 PSA 和标本的病理结果之间的关系,未发现相关性。Kolostova 等^[17]使用 MetaCell 分离技术对 55 例前列腺癌患者进行 CTCs 检测,在 28 例患者中检测到该种细胞并进行分离,并且在 18 例患者中培养出具有增殖能力的 CTCs,但没有发现其与 Gleason 评分和肿瘤分期有直接关系。

转移性前列腺癌中 CTCs 可以作为判断预后和疗效的标志物。Josefsson 等^[18]研究表明在转移性前列腺癌的初始抗雄治疗中,检测 CTCs 中表皮生长因子受体可以作为独立的预后标记物来判断无进展生存期。Lorente 等^[19]通过对 2 个前瞻性的临床随机对照试验 IMMC-38 和 COU-AA-301 再研究发现 CTCs ≥ 5 个/7.5 ml 去势抵抗性前列腺癌患者治疗后 CTC 值下降 30% 与总生存期延长有相关性。在去势抵抗性前列腺癌中检测 CTCs 中的 AR-V7 可以作为评价疗效的标记物^[20,21]。

2 循环肿瘤 DNA 与前列腺癌

2.1 血浆游离循环肿瘤 DNA 的概念及检测方法

游离 DNA 是以无细胞状态的细胞外 DNA 形式存在的,由单链或双链 DNA 或二者组成的混合物。健康者的游离 DNA 主要来自细胞凋亡时释放游离循环肿瘤 DNA (cell-free-circulating-tumor DNA, ctDNA) 小片段,而肿瘤患者的 ctDNA 主要由肿瘤坏死、自噬、有丝分裂的突变^[22]和疾病特异性的体细胞突变产生。体细胞突变只存在于肿瘤细胞的 DNA 中,当肿瘤细胞凋亡和坏死后,其 DNA 释放进入血液循环^[23],这种来自原发灶或转移灶的 ctDNA 可以作为肿瘤转移的前兆进行检测,进而确诊肿瘤是否存在及其是否具有侵袭性。ctDNA 检测的优点是对癌细胞的突变以非侵入性的方式进行动态监测,其检测方法大致可分为以下 2 种:①定量分析,即从患者的尿液或血液中分离和检测 ctDNA;②定性分析,即对 ctDNA 的甲基化、等位基因失衡、异质性缺失的进行检测。ctDNA 的含量可以作为微小残留病灶和非侵入性肿瘤基因分型检测时的客观评价指标^[24],但 ctDNA 检测易受炎症等因素的影响出现假阳性率,而将 CTCs 检测和游离 DAN 分析结合起来形成的对血源性标记物进行检测的新技术将为癌症患者病情的实时监测和分层治疗提供有价值的信息^[25]。

2.2 ctDNA 检测技术在前列腺癌中的应用

可以通过 PCR 法、免疫分析法、分光光度法、荧光酶标法和荧光定量检测法对血液或尿液中的 ctDNA 含量进行定量分析。在前列腺癌的早期诊断中,如果患者前列腺穿刺活检前血清 ctDNA 含

量高,则患前列腺癌的风险增加。Gordian 等^[26]对 252 例怀疑前列腺癌[PSA>4 ng/ml 和(或)DRE 异常]患者进行的研究发现,PSA≤10 g/ml、ctDNA>180 ng/ml 患者与 ctDNA≤180 ng/ml 的患者相比,前者患前列腺癌风险增加($HR=4.27$, $95\%CI:2.05\sim8.88$, $AUC=0.742$, $P<0.001$)。同时,血清 ctDNA 含量升高可作为评估前列腺癌侵袭性的指标之一。对根治性前列腺切除术后患者的随访发现,血浆 ctDNA 值>5.75 ng/ml 和血清 ctDNA 值>140 ng/ml 的患者中位复发时间分别是 24 个月和 13.5 个月。

3 小结与展望

综上所述,可以通过各种不同的方法对 CTCs 进行分离和计数,但对其进行分子和基因水平的检测是非常具有挑战性的。Helzer 等^[27]设计了一种改良的 CTC-Chip,从原位异体移植小鼠模型中捕获 CTCs,用激光捕获显微镜将这些细胞收集到一起,比较纯化的 CTCs 与原发瘤和转移瘤的转录物质,发现它们有高度的一致性。不久的将来,通过对循环肿瘤单细胞进行分子病理学检查,特别是肿瘤基因型或表型的检测,同时结合 ctDNA 检查技术,将使我们更深刻认识肿瘤形成、侵袭和发生转移的机制^[28]。相信随着对液体活检技术研究的不断深入以及标准化检测流程的建立,该技术将广泛应用在前列腺肿瘤筛查、早期诊断、疗效评估、预后判断、肿瘤耐药性及复发的实时监测等方面,使更多的癌症患者受益。

【参考文献】

- Richman D M, Tirumani S H, Hornick J L, et al. Beyond gastric adenocarcinoma: Multimodality assessment of common and uncommon gastric neoplasms[J]. *Abdom Radiol(NY)*, 2017, 42(1): 124—140.
- Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115—132.
- Masuda T, Hayashi N, Iguchi T, et al. Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(3): 408—417.
- 谢建湖, 潘宏信, 李伟东. 前列腺癌循环肿瘤细胞的检测及其临床应用的研究进展[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2016, 31(7): 674—678.
- King M R, Phillips K G, Mitrugno A, et al. A physical sciences network characterization of circulating tumor cell aggregate transport[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(10): C792—C802.
- Cooke N M, Spillane C D, Sheils O, et al. Aspirin and P2Y12 inhibition attenuate platelet-induced ovarian cancer cell invasion[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 627.
- Lianidou E S, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2014, 51(3): 160—171.
- Huang T, Jia C P, Jun-Yang, et al. Highly sensitive enumeration of circulating tumor cells in lung cancer patients using a size-based filtration microfluidic chip[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 51: 213—218.
- Hosokawa M, Kenmotsu H, Koh Y, et al. Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67466.
- Nurwidya F, Zaini J, Putra A C, et al. Circulating Tumor Cell and Cell-free Circulating Tumor DNA in Lung Cancer [J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(3): 151—158.
- Lack J, Gillard M, Cam M, et al. Circulating tumor cells capture disease evolution in advanced prostate cancer [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 44.
- Onstenk W, Sieuwerts A M, Kraan J, et al. Efficacy of Cabazitaxel in Castration-resistant Prostate Cancer Is Independent of the Presence of AR-V7 in Circulating Tumor Cells[J]. *Eur Urol*, 2015, 68(6): 939—945.
- Antonarakis E S, Lu C, Luber B, et al. Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2015, 1(5): 582—591.
- Taneja S S. Re: Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer [J]. *J Urol*, 2016, 195(5): 1472—1473.
- Gupta S, Li J, Kemeny G, et al. Whole Genomic Copy Number Alterations in Circulating Tumor Cells from Men with Abiraterone or Enzalutamide-Resistant Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(5): 1346—1357.
- Meyer C P, Pantel K, Tennstedt P, et al. Limited prognostic value of preoperative circulating tumor cells for early biochemical recurrence in patients with localized prostate cancer [J]. *Urol Oncol*, 2016, 34(5): 235 e11—235 e16.
- Kolostova K, Broul M, Schraml J, et al. Circulating tumor cells in localized prostate cancer: isolation, cultivation in vitro and relationship to T-stage and Gleason score [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(7): 3641—3646.
- Josefsson A, Linder A, Flondell Site D, et al. Circulating Tumor Cells as a Marker for Progression-free Survival in Metastatic Castration-naïve Prostate Cancer [J]. *Prostate*, 2017, 77(8): 849—858.
- Lorente D, Olmos D, Mateo J, et al. Decline in Circulating Tumor Cell Count and Treatment Outcome in Advanced Prostate Cancer [J]. *Eur Urol*, 2016, 70(6): 985—992.

- noma: correlation with clinicopathological factors and prognosis[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(4): 579—588.
- 20 Schaefer-Klein J L, Murphy S J, Johnson S H, et al. Topoisomerase 2 Alpha Cooperates with Androgen Receptor to Contribute to Prostate Cancer Progression[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142327.
- 21 Labbé D P, Sweeney C J, Brown M, et al. TOP2A and EZH2 Provide Early Detection of an Aggressive Prostate Cancer Subgroup[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22): 7072—7083.
- 22 Bromberg K D, Burgin A B, Osheroff N. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II α [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 7406—7412.
- 23 朱永锋. 多西他赛/米托蒽醌联合泼尼松治疗激素抵抗性前列腺癌的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(9): 728—730.
- 24 邵牧民, 徐华, 余学问, 等. 基底型乳腺癌中拓扑异构酶 II α 基因状态分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(4): 421—424.
- 25 Monger A, Boonmuen N, Suksen K, et al. Inhibition of Topoisomerase II α and Induction of Apoptosis in Gastric Cancer Cells by 19-Tr II sopropyl Andrographolide[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(10): 2845—2851.

(收稿日期: 2017-09-19)

(上接第 156 页)

- 20 Antonarakis E S, Lu C, Luber B, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First-and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(19): 2149—2156.
- 21 Leibrand C R, Price D K, Figg W D. Androgen receptor splice variant 7 (AR-V7) and drug efficacy in castration-resistant prostate cancer: Biomarker for treatment selection exclusion or inclusion? [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(5): 467—469.
- 22 Delgado P O, Alves B C, Gehrkefde S, et al. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2): 983—986.
- 23 Ulivi P, Silvestrini R. Role of quantitative and qualitative characteristics of free circulating DNA in the management of patients with non-small cell lung cancer[J]. *Cell Oncol(Dordr)*, 2013, 36(6): 439—448.
- 24 Bratman S V, Newman A M, Alizadeh A A, et al. Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(6): 715—719.
- 25 Krebs M G, Metcalf R L, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3): 129—144.
- 26 Gordian E, Ramachandran K, Reis I M, et al. Serum free circulating DNA is a useful biomarker to distinguish benign versus malignant prostate disease[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(8): 1984—1991.
- 27 Helzer K T, Barnes H E, Day L, et al. Circulating tumor cells are transcriptionally similar to the primary tumor in a murine prostate model[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7860—7866.
- 28 丁辉, 吴振启. 核酸检测在前列腺癌诊断中的研究现状[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2016, 31(9): 857—861.

(收稿日期: 2017-09-12)