

目前，一种新颖的不依赖肿瘤表面标示物、不采用低渗溶破法去除红细胞的差相富集技术（Subtraction Enrichment, SE）已被大量临床实验证明，可有效富集源于各种实体瘤的 CTC，且获得的具有生物活性的 CTC 可适于后续的一系列检测，包括原代肿瘤细胞培养等。

CTC 的常见鉴别方法为角蛋白 CK 染色。然而，EMT 导致 CTC 中的 CK 降解，势必会造成 CTC 检测的大量假阴性。有鉴于此，我们与国内外多所院校通力合作，在大量临床样本鉴定的基础上，首次成功地将 CTC 上的各种肿瘤标示物的荧光染色与染色体倍体检测相结合，形成了全新的 iFISH 鉴别体系（图 3）。

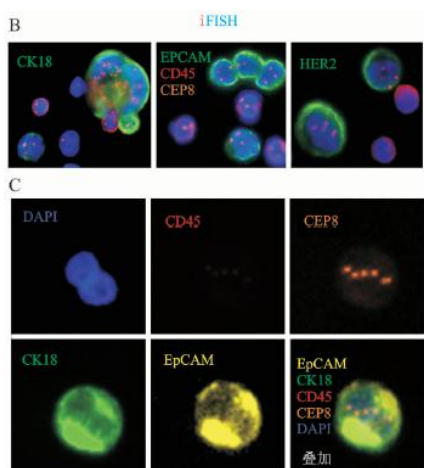


图 3 iFISH 原理 A. 1 个细胞为 CD45 阳性(红色)的血源性白细胞, 2 个细胞为 CD45 阴性的非血源性细胞; 其中, 细胞 1 瘤标表达阳性(绿色); 而 FISH 检测则显示非血源性细胞 1、2 均为异常的染色体三体; iFISH 合成图像显示, 细胞 1 为瘤标表达阳性的染色体 3 体细胞, 而细胞 2 则为瘤标表达阴性的三体细胞; B. 单瘤标-iFISH (4 色通道): CK, EpCAM 或 HER-2-iFISH; C. 双瘤标-iFISH (5 色通道): 在骨髓 DTC 癌栓(≥2 肿瘤细胞)原位同步进行细胞核(蓝色) + EpCAM(黄色) + CK18(绿色) + CD45(红色) + CEP8(橙色)-

图 3 iFISH 技术原理

CK、EpCAM 具有上皮标示物及肿瘤生物标示物的双标作用，CK 或 EpCAM 蛋白表达的高低、有无与各种肿瘤的进展、分化、转移、耐药等密切相关（其中包括前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、结直肠癌、食道癌、肾细胞癌、鼻咽癌、口腔癌等，详见本综述讨论）。SE-iFISH 可专门针对 CTC 上的多种肿瘤标示物（包括 CK, EpCAM, HER2, Vimentin, CD133, CD44 等）的蛋白表达

进行检测，并结合染色体倍体数目，可精确锁定具有不同临床意义的各种 CTC 亚类细胞。北京大学肿瘤医院与赛特生物合作完成的临床实验揭示了胃癌病人中不同倍体的 CTC 具有对顺铂不同的耐药特性 (Li et al., 2014 Oncotarget 5:6594)。此现象也在我们参与的胃癌肺转移 mPDX 肿瘤动物模型实验中得到了进一步验证 (Jiang et al., 2015 Oncotarget 6:15639)。SE-iFISH 已被证明可有效检测多种肿瘤的 CTC（见表 1）。

表 1 不同瘤种患者 CTC 检测阳性率

肿瘤类型	n	阳性率(%)
乳腺癌	75	97.3
肺癌	205	88.3
肝癌	314	96.2
食管癌	56	87.0
骨肉瘤	18	100.0
胃癌	518	88.6
胰腺癌	262	80.6
肾癌	76	86.3
嗜铬细胞瘤	14	100.0
胶质瘤	342	80.7

免疫治疗是近年来发展极为迅猛的一种新颖的肿瘤治疗手段。最近，已有多个 PD-1 抑制剂被美国 FDA 批准应用于临床晚期黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌等的治疗。PD-1 抑制剂用于免疫治疗的临床疗效主要取决于肿瘤细胞上的 PD-L1 的表达量。赛特生物选用国外业内广为接受的 PD-L1 抗体，率先开发出 PD-L1-iFISH 检测技术，通过检测肿瘤患者外周血 CTC 表面 PD-L1 蛋白表达，为免疫治疗用药提供准确的客观依据，从而提高药物使用的有效率（图 4）。相关临床实验已在顺利开展之中。

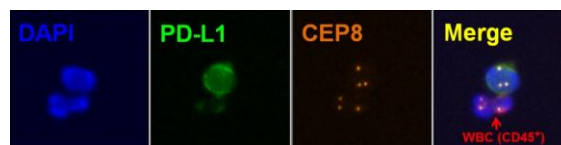


图 4 PD-L1-iFISH CTC 细胞图像

为了便于大家对 CTC 的各种检测方法有一完整的了解，本篇综述将各种 CTC 的分离与鉴别方法汇总如下（图 5）：

随着在 iFISH CTC 上开展单细胞测序等相关技术的成熟，相信该独特的技术平台会为人们深入了解 CTC 及开展相关的 CTC 临床实验与检测提供更大的帮助。

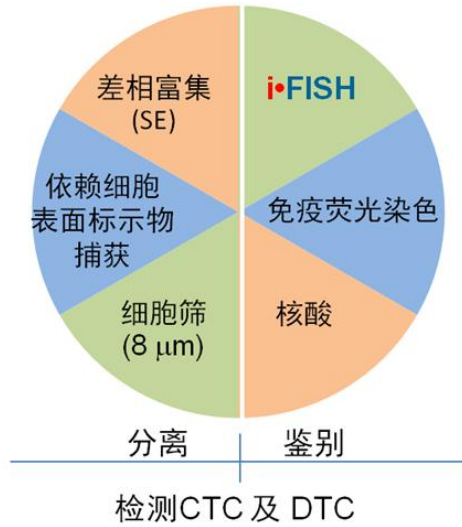


图 5 不同的 CTC 捕获与鉴别技术汇总

注明：赛特生物拥有中国国家知识产权局颁发的 CTC 富集 (ZL 2009 1 0137289.0)，授权日期 (2013.01.16) 与 iFISH 检测 (ZL 2011 1 0340544.9，授权日期 2015.01.07) 两项发明专利，及中国国家商标局颁发的 iFISH 商标证书 (第 10960117 号，颁发日期 2013.09.14)。