

CTC 检测在预测肺癌复发转移及患者预后中的意义

李娜, 姚丽*

(连云港市第二人民医院东院检验科, 江苏 连云港 222000)

摘要: 探讨肺癌患者循环肿瘤细胞(CTC)检测在复发转移及预后预测中的应用效果。选择71例肺癌患者设为观察组,所有患者经过化疗、手术治疗,术后3年随访。选择同期在本院体检健康者55例为对照组。采用免疫磁珠富集联合免疫荧光染色法测定两组CTC阳性表达情况,分析CTC阳性率与肺癌患者复发、转移及预后的相关性。结果显示,观察组CTC阳性率显著高于对照组;肺癌患者复发、转移与CTC阳性率呈显著正相关性;肺癌患者预后与CTC阳性率呈显著负相关性。结果提示,CTC在肺癌患者中阳性率较高,能预测患者复发、转移,有助于评估患者预后。

关键词: 循环肿瘤细胞; 肺癌; 复发; 转移; 预后

中图分类号:R734.2

文献标识码:A

Implication of CTC detecting in the predicting recurrence and metastasis of lung cancer and prognosis of patients

LI Na, YAO Li*

(Clinical Laboratory, East Clinic of the Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222000, Jiangsu, China)

Abstract: To investigate the detecting of circulating tumor cells (CTC) in prediction of recurrence, metastasis and prognosis in the patients with lung cancer. Seventy-one patients with lung cancer were enrolled in the observation group. All patients underwent chemotherapy and surgery, and 3 years follow-up period. 55 cases with healthy physical examination at the same time served as the control group. The positive expression of CTC was detected by immunomagnetic beads enrichment combined with immunofluorescence staining. The correlation between the recurrence, metastasis and prognosis of patients with lung cancer and CTC positive rate were analyzed. The results showed, positive rate of CTC in the observation group was significantly higher than that in the control group. The positive rate of CTC and the recurrence and metastasis were positively correlated. The prognosis of lung cancer patients was negatively correlated with the positive rate of CTC. The study indicated that CTC has a high positive rate in lung cancer patients, which can predict recurrence, metastasis and assess the prognosis of patients.

Key words: circulatory tumor cells; lung cancer; recurrence; metastasis; prognosis

肺癌是临床上常见的恶性肿瘤,且男性发病率略高于女性,成为威胁人群健康、生命的主要疾病之一^[1]。肺癌病因复杂,普遍认为与长期大量吸烟、职业、电离辐射及遗传因素有关^[2]。患者发病早期临床症状缺乏典型性,随着病情的发展可表现为局部症状、全身症状、浸润和转移症状等^[3]。目前,临床上对于肺癌以手术、化疗治疗为主,虽然能延缓病情发展,延长患者寿命,但是部分患者治疗

后由于缺乏有效的预测指标,导致患者复发、转移率较高,难以达到预期的治疗效果^[4]。循环肿瘤细胞(CTC)是指从原发病灶进入外周血液中的肿瘤细胞,但是临床上,关于CTC水平与预测肺癌的复发、转移及患者预后相关性研究较少^[5]。因此,本文探讨CTC在预测肺癌复发、转移及患者预后中的应用价值,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2014 年 4 月至 2015 年 4 月治疗的肺癌患者 71 例作为对象,设为观察组,男 41 例,女 30 例,年龄 35 ~ 88 岁,平均 (61.20 ± 6.71) 岁;病理类型:鳞癌 25 例,腺癌 27 例,腺鳞癌 19 例;肿瘤分期: I ~ II 期 34 例, III ~ IV 期 37 例;分化程度:低分化 23 例,中分化 36 例,高分化 12 例。纳入标准:(1)均符合肺癌临床诊断标准^[6],均经病理组织检查确诊;(2)所有患者均为初次诊断,能在医生指导下完成有关检查与治疗。选择同期在本院体检健康者 55 例,设为对照组,男 30 例,女 25 例,年龄 34 ~ 87 岁,平均 (60.28 ± 6.69) 岁。排除标准:(1)合并其它肺部疾病或其它恶性肿瘤者;(2)合并精神异常、认知功能障碍、自身免疫系统疾病或凝血功能异常者;(3)近期使用其它方法治疗或影响预后评估者。两组临床资料均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 仪器与设备

Abbott i2000 全自动免疫分析仪(雅培公司)、常温台式离心机(型号:TDL-40C)(上海安亭仪器公司)、Promax 摇床(德国海盜尔夫 Heidolph 公司)、GL-802B 型微型台式真空泵(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、荧光显微镜(上海顺宇科技有限公

司)、原位杂交仪(美国 Westwood 公司)、DAPI 荧光保存液(赛特生物医药科技有限公司)、Triton X-100(上海波光生物科技有限公司)。

1.3 循环肿瘤细胞富集方法

1.3.1 标本采集 观察组患者均为初次诊断后入院治疗,分别于治疗前和治疗完成后,采集患者早晨空腹静脉血 10 mL,对照组健康体检当天空腹状态下取静脉血 10 mL,并放置在含 EDTA 的抗凝管中备用。

1.3.2 磁珠富集 取淋巴细胞分离液与血液标本,混合后进行加热,控制加热温度为 18 ~ 25 °C,充分混合抗凝血 7.5 mL 及等量 PBS 液,经贴壁后缓慢导入淋巴细胞分离层,常温下进行 20 min 离心,离心力 1463 g,获得环状乳白色单个核细胞层,采用 PBS 清洗 2 次,15 min 离心,离心力 1463 g。将细胞沉淀悬浮在磁珠缓冲液 80 μ L 中,向缓冲液中加入 CD45 抗体 20 μ L,充分混合后进行 15 min 孵育,温度为 4 °C,加入磁珠缓冲液 2 mL,10 min 离心,离心力 1463 g。去除上层清液,向获得的细胞沉淀中加入缓冲液 500 μ L 完成细胞重悬,经磁珠 MS 分流柱后加入磁珠缓冲液 500 μ L,采用 MS 分流柱进行 2 次清洗。取分流柱分流出的液体,10 min 离心,离心力 1463 g 后去除上清,将细胞沉淀放置在防脱载玻片中风干,在浓度为 4% 多聚甲醛中固定,见图 1^[7]。

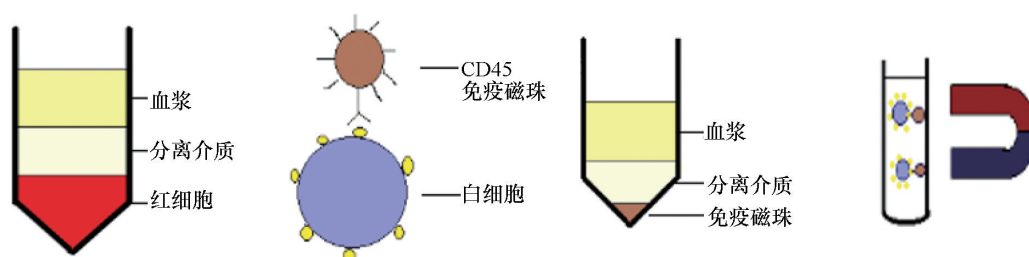


图 1 循环肿瘤细胞富集过程部分示意图

1.4 荧光染色

利用 PBS 对制备的载玻片进行 3 次清洗,每次清洗 5 min,清洗完毕后采用 BAS 进行 0.5 h 封闭,然后再用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。向获得的溶液中加入小鼠抗人广谱细胞角蛋白,4 °C 下过夜, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,然后向溶液中加入小鼠 IgG(采用 FITC 标记),常温下孵育 120 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min。在细胞区域加入 DAPI 感染的细胞核 7 μ L,加入盖玻片封固,在免疫荧光显微镜下观察、拍照^[8-9]。

1.5 复发转移及预后评估

统计观察组患者的性别、年龄、肿瘤病理类型、肿瘤分期、转移、复发、预后等资料,分析 CTC 阳性率与患者临床病理特征和预后、复发、转移的关系。

患者预后情况采用 recist 标准评价^[10]:①完全缓解(CR):病灶全部消失;②部分缓解(PR):病灶范围较前缩小 30% 以上;③疾病稳定(SD):病灶范围缩小不超过 30%,增大小于 20%;④疾病进展(PD):病灶范围增大超过 20% 或出现新发的转移灶或远处转移灶。将 CR、PR 归为预后良好,将 SD、

PD 归为预后一般。CT 和 MRI 等影像学检查发现原发病灶和局部有新的病灶出现定义为肺癌复发,当发现大脑或肝脏、脾脏、骨骼等其它部位转移病灶时定义为肺癌转移。

1.6 统计分析

采用 SPSS18.0 软件处理,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验,采用 Pearson 分析肺癌患者复发、转移及预后与 CTC 阳性率的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 CTC 阳性率比较

观察组有 39 例发现 CTC 阳性,CTC 阳性率为 54.93%,对照组有 2 例 CTC 阳性,CTC 阳性为 3.64%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明肺癌患者外周血 CTC 阳性率高于健康人群。

2.2 CTC 阳性率与患者临床病理特征和预后、复发、转移的关系

肺癌患者 CTC 阳性率与肿瘤分期、分化程度、预后、复发及转移有关,Ⅲ ~ Ⅳ 期肿瘤、低分化程度、预后一般、存在复发转移的患者,其 CTC 阳性率明显大于 I ~ II 期肿瘤、中高分化程度、预后良好、不存在复发转移的患者,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。肺癌患者 CTC 阳性率与性别、年龄、病理类型无关,不同性别、年龄和病理类型的患者,其 CTC 阳性率比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.3 肺癌患者复发、转移及预后与 CTC 阳性率相关性

Pearson 相关性分析结果表明:肺癌患者复发、转移与 CTC 阳性率呈正相关性 ($P < 0.05$);肺癌患者预后与 CTC 阳性率呈负相关性 ($P < 0.05$),见表 2。

3 讨 论

目前,临床上对于肺癌以手术治疗、放化疗为主,手术能有效的切除病灶组织,延长患者寿命^[11];放化疗则能杀死肿瘤组织,控制病情持续发生。但是,无论何种治疗方法均存在明显的局限性,再加上患者治疗后由于缺乏有效的预后评估指标,导致患者死亡率、复发率较高,影响患者预后^[12]。

表 1 39 例 CTC 阳性患者临床病理特征和预后、复发、转移的关系

病理资料	n	CTC 阳性率 $n(\%)$	χ^2	P
性别				
男	41	21(53.85)	1.386	0.216
女	30	18(46.15)		
年龄				
≥60	40	23(58.97)	0.634	0.447
<60	31	16(41.03)		
病理类型				
鳞癌	25	15(38.46)	2.143	0.682
腺癌	27	14(35.89)		
腺鳞癌	19	10(25.64)		
肿瘤分期				
I-II 期	34	12(30.76)	6.493	0.028
III-IV 期	37	27(69.23)		
分化程度				
低分化	23	15(38.46)	6.121	0.011
中分化	36	19(48.72)		
高分化	12	5(12.82)		
预后				
良好	47	17(43.59)	5.498	0.042
一般	24	22(56.41)		
转移				
是	29	28(71.79)	8.904	0.019
否	42	11(28.21)		
复发				
是	18	18(46.15)	5.216	0.034
否	53	21(53.85)		

表 2 肺癌患者复发、转移及预后与 CTC 阳性率相关性

相关性	复发	转移	预后良好
r	0.683	0.691	-0.669
P	0.032	0.017	0.029

目前临床上对于肺癌的诊断、预后和复发转移的判断主要依靠 CT、MRI 等影像学检测以及病理活检手段,然而这些手段对于微小病灶的检出能力有限,很难做出准确的判断,而且在肺癌的治疗过程中很难实现动态监测。CTC 不同于影像检查和病理诊断,只需要通过采集外周血即可获取,所以能够实现动态监测,在肺癌的治疗过程中,可通过 CTC 的动态变化来评估治疗效果,从而及时调整肺癌的治疗方案。此外 CTC 在肺癌复发转移的风险评估中也有重要作用,影像学检测是无法判断患者复发转移的风险,当能够检测到病灶存在时实际上已经发生了复发转移。而 CTC 则不同,肿瘤的复发转移主要就是通过血液系统传播的,可以通过检测血液中的 CTC,提前评估复发转移的风险。

本研究中,观察组肺癌患者中 CTC 阳性率显著高于对照组,说明 CTC 在肺癌患者中阳性率较高,能参与疾病的发生、发展。CTC 最早在 19 世纪首次提出,后经不断研究探索发现其存在于恶性肿瘤患

者外周血循环中,且在良性疾病或健康人群中水平较低。对于肺癌患者而言,肿瘤细胞可自发,亦可由于治疗过程中挤压、器械触碰等进入血液中^[13]。部分 CTC 进入外周循环中可以通过机体免疫识别及自然杀伤细胞作用而凋亡,仅有极少数 CTC 能逃避免疫监视存活,并且通过迁移、相互聚集、黏附等方式形成微小癌栓,在特定的作用下演变为转移灶,从而影响患者预后。本研究中,观察组肺癌组织中 CTC 阳性率与肿瘤分期、分化程度、预后、复发及转移具有统计学意义($P<0.05$),说明 CTC 在肺癌患者中水平受到的影响因素较多,加强 CTC 细胞测定能反应患者的疾病严重程度。临床研究表明^[14]:对于肺癌患者而言,CTC 检测对预测患者预后具有更高的敏感性,它能对患者疾病严重程度和治疗效果进行准确评估^[15]。本研究中,Pearson 相关性分析结果表明:肺癌患者复发、转移与 CTC 阳性率呈正相关性($P<0.05$);肺癌患者预后与 CTC 阳性率呈负相关性($P<0.05$),说明 CTC 细胞阳性率与患者的预后、转移及复发存在紧密的联系。

综上所述,CTC 在肺癌患者中阳性率较高,能预测患者复发、转移,有助于评估患者预后,能为临床治疗方案的调整提供依据和参考。

参考文献:

- [1] 徐细明,陈嘉羽,高艳蓉,等.循环肿瘤细胞检测在乳腺癌疗效评价和预后判断中的研究进展[J].山东医药,2016,56(41):102-5.
- [2] 董小丽,赵恩锋.上皮-间质型循环肿瘤细胞在卵巢癌复发转移中的作用[J].解放军医学杂志,2016,41(9):788-91.
- [3] PRIONAS ND, AGGARWAL S, SHAFFER J, et al. Temporal change in quantitative positron emission tomography metrics predicts recurrence in early-stage lung cancer patients treated with stereotactic ablative radiation therapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2016, 96(2):E457.
- [4] 刘春花,巩平,杨杰.肺癌患者外周血中循环肿瘤细胞与 D-二聚体纤维蛋白原及血小板的关系[J].中华肿瘤杂志,2016,38(5):368-71.
- [5] 何文杰,江波,金从国,等.老年晚期非小细胞肺癌患者循环肿瘤细胞与 EGFR-TKI 疗效的相关性研究[J].重庆医学,2016,45(32):4507-10.
- [6] 刘宇宁,王小兵,王腾,等.巨噬细胞抑制因子-1 与早期非小细胞肺癌诊断及预后相关性[J].中国肺癌杂志,2016,19(4):207-15.
- [7] 王杰,陈大兴,郭宁,等.CCNB2 过表达对非小细胞肺癌不良预后的预测效果研究[J].中国现代医学杂志,2017,27(17):45-9.
- [8] 江波,金从国,涂长玲,等.外周血循环肿瘤细胞 EGFR 表达对晚期非小细胞肺癌患者 TKI 治疗效果及预后的影响[J].山东医药,2016,56(40):86-8.
- [9] 朱颖,江波,杨承纲,等.晚期非小细胞肺癌外周血 CTC 与肿瘤组织 EGFR 表达的相关性[J].中国现代医学杂志,2017,27(29):32-8.
- [10] VAN PERSIJN VAN MEERTEN EL, GELDERBLUM H, BLOEM JL. RECIST revised: implications for the radiologist. A review article on the modified RECIST guideline[J]. Eur Radiol,2020,20(6):1456-7.
- [11] 刘鑫,王一星,李冠宏,等.Cytokeratin 和 CD133 在胰腺癌患者外周血中的联合检测及临床病理分析[J].第三军医大学学报,2017,39(20):2004-9.
- [12] 郭巧梅,乔理华,王琳,等.循环肿瘤细胞检测对非小细胞肺癌的诊断价值[J].中华检验医学杂志,2016,39(8):589-94.
- [13] NAGATA H, ISHIHARA S, KISHIKAWA J, et al. CD133 expression predicts post-operative recurrence in patients with colon cancer with peritoneal metastasis[J]. Int J Oncol, 2018, 52(3):721-32.
- [14] 李晓燕,杨辉,许华艳,等.厄洛替尼治疗脑脊液检测 EGFR 敏感突变的肺腺癌一例[J].中国肺癌杂志,2016,19(1):52-6.
- [15] 莫威,何芬,易炜,等.全肺及患侧肺正常肺组织高、低剂量区肺体积预测急性放射性肺炎的价值[J].实用医学杂志,2017,33(8):1258-61.

(本文编辑:秦旭平)