

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.01.013

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2015.01.013>

非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞与临床特征关系的初步研究

万佳蔚^{1,2}, 沈洪远², 黄红宇², 韩志君², 严子禾², 高明珠², 黄新祥¹

(1. 江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏 镇江 212013; 2. 无锡市第二人民医院检验科, 江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的: 评价非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的外周静脉血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)计数的临床应用价值。方法: 收集2013年1月~2013年12月无锡市第二人民医院诊断的50例NSCLC作为研究对象, 同时收集良性肺部疾病患者35例及28例体检健康者。采集上述各研究组静脉血标本, 检测静脉血CTC的数量, ≥ 8.7 单位判定为阳性。分析CTC计数与患者年龄、性别、病理类型及临床分期之间的关系。结果: NSCLC患者CTC计数显著高于良性肺部疾病对照组和健康对照组。NSCLC患者外周血中CTC与患者性别、年龄、病理类型无明显关系($P>0.05$), CTC数值随着肿瘤临床分期递进而增加($P<0.01$)。结论: NSCLC的CTC计数与患者临床特征具有一定相关性, 可初步反映患者的疾病状态。

[关键词] 循环肿瘤细胞; 非小细胞肺癌; 临床特征

A preliminary study on the relationship between circulating tumor cells count and clinical features in patients with non-small cell lung cancer

WAN Jiawei^{1,2}, SHEN Hongyuan², HUANG Hongyu², HAN Zhijun², YAN Zihé²,
GAO Mingzhu², HUANG Xinxiang¹

(1. School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;

2. Department of clinical laboratory of Wuxi No. 2 people's Hospital, Wuxi 214002, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the clinical value of circulating tumor cells (CTC) count in peripheral venous blood of patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC). **Methods:** Totally 50 patients with NSCLC in Wuxi No. 2 people's Hospital were selected for study from January 2013 to December 2013, 35 patients with lung benign tumor and 28 normal volunteers were selected as the control groups. CTC collected from 3 mL venous blood of all people above were counted. Patients with 8.7 units or more CTC were judged to be positive. The relationship between the positive rate of CTC and the age, sex, pathological type and clinical stage was analyzed. **Results:** CTC

收稿日期 (Date of reception): 2014-10-27

通信作者 (Corresponding author): 高明珠, Email: gaomingzhujewel@163.com

基金项目 (Foundation item): 无锡市医院管理中心医学科技项目 (YGZXQ1310)。This work was supported by Science and Technology Projects of Wuxi City (YGZXQ1310), P. R. China.

count was significantly higher in NSCLC patients than in benign lung patients and healthy controls. CTC count in NSCLC patients was rarely related to the sex, age or the pathological type ($P>0.05$) and was closely related to clinical stage ($P<0.01$). Among NSCLC patients, CTC count significantly increased along with tumor progression. **Conclusion:** The progression of patients with non-small-cell lung carcinoma was associated with the level of CTC count which can reflect the status of the patients to some extent.

Keywords circulating tumor cells (CTC); non-small cell lung carcinoma (NSCLC); clinical features

肺癌是我国发病率和死亡率居首位的恶性肿瘤^[1], 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的80%以上, 晚期预后较差, 5年生存率不到20%^[2]。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)指存在于原发瘤和转移瘤之外的肿瘤细胞, 其源于实体瘤的肿瘤细胞不断增殖, 具有侵袭性, 细胞逃离肿瘤组织进入循环系统, 成为具有侵袭转移能力的循环肿瘤细胞^[3-4]。血液中出现CTC是肿瘤发生远处转移的信号, 而常规的影像学、组织学和细胞学则可能无法发现。

已有文献^[5-6]表明, CTC检测是一种简便易行、可重复操作、微创的新型诊断手段。本研究选择初诊NSCLC患者作为研究对象, 分析患者外周血中肿瘤细胞与其临床病程之间的关系, 为临床预测疾病发展趋势以及制定个体化治疗方案等方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 一般临床资料

选取2013年1月~2013年12月我院确诊的首诊NSCLC患者50例为研究对象, 临床诊断标准参照2011年版《非小细胞肺癌临床实践指南》。其中, 男27例, 女23例, 年龄47~81岁(中位年龄62岁); 腺癌25例, 鳞癌25例; 临床分期I期9例, II期11例, III期7例, IV期23例。纳入标准: 1)病理学检查确诊为NSCLC的患者; 2)新诊断且未接受放、化疗的患者。排除标准: 1)合并终末期肝病或者肾病患者; 2)入组前5年内合并其他恶性肿瘤的患者。同时, 收集35例良性肺疾病患者(肺炎性病变19例, 肺结核7例, 错构瘤5例, 肺囊肿4例)。男21例, 女14例, 年龄34~83岁(中位年龄61岁)及28例健康体检者男13例, 女15例, 年龄28~62岁(中位年龄40)作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器

1)试剂: (格诺思博生物科技(上海)有限公司)

CytoploRare试剂盒, 包括红细胞裂解液、反应缓冲液、抗CD45免疫磁珠、抗CD14免疫磁珠、探针标记液(肿瘤特异性配体的叶酸偶联物与合成的寡核苷酸相连形成的复合物)、细胞活化液、细胞洗涤液、细胞洗脱液、中和缓冲液、PCR反应液、引物工作液以及去离子水。2)仪器: ABI 7300实时荧光定量PCR仪。

1.2.2 检测原理

叶酸受体高表达于肺癌肿瘤细胞表面, 外周血正常细胞表面则不表达或低表达^[7-10]。本实验首先利用试剂盒富集NSCLC患者外周血中的CTC, 然后用特异性小分子探针对CTC进行标记并结合形成复合物, 最后利用特异性引物对探针上的寡聚核苷酸分子进行PCR定量检测, 从而换算出外周血CTC的数量。

1.2.3 检测方法

1.2.3.1 引物与探针序列

反转录引物5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGTTCTAA-3'; 正向引物: 5'-TATGATTATGAGGCATGA-3'; 反向引物: 5'-GGTGTCGTGGAGTTCG-3'; 荧光定量探针: 5'-FAM-CAGTTGAGGGTTC-MGB-3'。

1.2.3.2 循环肿瘤细胞的分离富集

1)裂解红细胞 采集受试对象3 mL空腹静脉血, 加入EDTA抗凝管, 加入12 mL红细胞裂解液, 混匀后于4 °C孵育15 min后离心10 min, 弃上清。加入10 mL反应缓冲液, 轻柔吹打10次后重悬沉淀。2)去除白细胞 加入150 μ L抗CD45和50 μ L CD14免疫磁珠悬液, 4 °C孵育20 min。3)探针标记细胞 取出探针标记液, 室温平衡后向样本中加入10 μ L, 室温孵育40 min后终止反应离心10 min。4)洗涤未结合探针 加入1 mL细胞洗涤缓冲液充分洗涤3次后离心。5)洗脱探针复合物 弃上清, 加入120 μ L洗脱缓冲液, 将与细胞表面叶酸受体结合的配体-寡聚核苷酸复合物洗脱下来。重悬沉淀后离心。将上清转移至新的Ep管中, 加入24 μ L中和缓冲液, 充分混匀后用于PCR检测。

1.2.3.3 靶向PCR及荧光检测

在反应管中加入2.5 μ L样品液以及22.5 μ L反应

液, ABI 7300实时荧光定量进行扩增。同时设置6个PCR校准品以及3个PCR质控品。反应条件: 95 °C 2 min, 40 °C 30 s, 60 °C 60 s, 8 °C 5 min循环一次。然后95 °C 10 s, 35 °C 30 s, 72 °C 10 s共循环40次。操作流程参照格诺思博生物科技(上海)有限公司提供的CytoploRare试剂盒系统流程^[11-12]。

1.2.4 检测结果计算

通过前期大量研究发现, 平均每个肿瘤细胞上的叶酸受体量为 7.5×10^{-18} mol^[12]。为方便样品检测时对CTC进行计量, 将表达上述叶酸受体量的肺癌肿瘤数定义为一个CTC Unit(CU)。

将PCR校准品的标示值(浓度为 $10^{-14} \sim 10^{-11.5}$ M, 相当于 $1.39 \times 10^3 \sim 4.40 \times 10^3$ CU/mL)作横坐标, PCR检出的CT值作纵坐标, 对校准品的测量值作线性回归分析, 得出校准品定量曲线。通过定量曲线计算出样品的检测值。

1.2.5 判定标准

CTC数量 < 8.7 CU为检出阴性, ≥ 8.7 CU为检出阳性。

1.3 统计学处理

采用Sigmaplot 12.0 和SPSS 17.0进行统计学分析。连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 独立样本 t 检验或者Mann-Whitney U 检验比较两组均数或者分布位置之间的差异是否有统计学意义, 以单因素方差分析或Kruskal-Wallis H 检验比较多组之间的差异是否具有统计学意义。两组连续变量之间的相关性分析采用Spearman相关法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各研究组全血 CTC 值比较

肺癌组、肺部良性病变组以及健康对照组的全血CTC水平均呈偏态分布。肺癌组全血CTC值为41.01 CU, 显著高于良性肺部疾病组的1.03 CU和健康对照组0.34 CU($F=37.12$, $P < 0.01$)。见图1。

2.2 初诊 NSCLC 患者全血中 CTC 数值与临床基本特征的关系

结果显示, 初诊NSCLC患者全血肿瘤细胞数值与患者性别($t=-1.152$, $P > 0.05$)、年龄($t=-0.125$, $P > 0.05$)之间无明显差异(图2)。

2.3 初诊 NSCLC 患者全血中 CTC 数值与病理类型、TNM 分期的关系

进一步分析不同病理类型和临床分期NSCLC

患者全血中CTC数量, 结果发现, NSCLC患者不同病理类型之间, 腺癌组为40.72 CU, 鳞癌组为41.31 CU, 差异无统计学意义($t=-0.055$, $P > 0.05$, 图3A)。

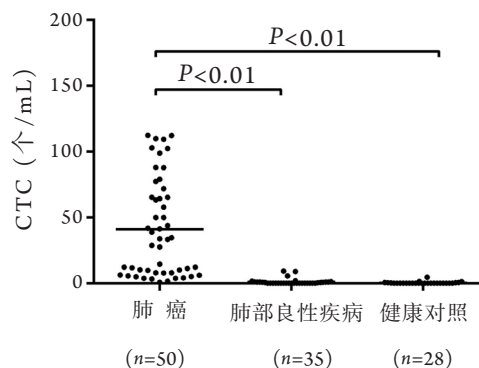


图1 肺癌组、肺部良性病变组以及健康对照组的全血CTC水平的比较

Figure 1 Comparison of CTC count in NSCLC group, lung benign tumor group and control group

此外, I期患者CTC水平是5.38 CU, II期是22.31 CU, III期是53.39 CU, IV期是60.14 CU。随着临床分期的增高, NSCLC患者CTC水平逐渐增高($F=9.01$, $P < 0.01$, 图3B)。

3 讨论

目前传统的肺癌检测方法有X线胸片、胸部CT、纤维支气管镜、痰脱落细胞学检查等, 但因检测敏感度低、患者耐受性差、无法早期动态监测等而受到相关限制^[13]。外周血CTC检测具有标本易获得、创伤小、可反复采集等优势, 属临床上较为理想的标本来源。

本研究采用免疫磁性分离与免疫荧光定量PCR相结合的方式, 对NSCLC患者外周血中的CTC进行检测。此法能从大量外周血细胞中筛选出极少量的肿瘤细胞, 具有较高的敏感性和特异性。用此法对50例NSCLC患者、35例肺部良性病变患者和28名健康人的血CTC进行检测, 发现NSCLC患者血CTC水平显著高于肺部良性病变患者和健康人群, 初步说明血CTC水平对于肺癌诊断具有一定的参考意义。同时, I期肺癌中也可以检测到少量CTC, 表明在临床分期早期就发生了肺癌的微转移。进一步分析NSCLC患者CTC数量, 发现其与患者年龄、性别、病理类型无明显关系, 而与临

床分期有显著的相关性。晚期肺癌患者血CTC水平明显高于早期肺癌患者, 这与国内陈燕、刘春花等^[14-15]的研究结果一致。然而亦有国外学者提出相反的观点, SieneI等^[16]用抗CK抗体免疫细胞化学方法检测CTC, 研究后指出CTC阳性率与标准的临床

分期没有相关性。这可能与检测方法不同有关。在接下来的研究中将扩大样本量做进一步的研究。虽然目前还未证实CTC可用作判断分期的标准检测, 但它确实有助于反应肿瘤的进展程度, 便于临床医生提高警惕, 采取更加积极的治疗。

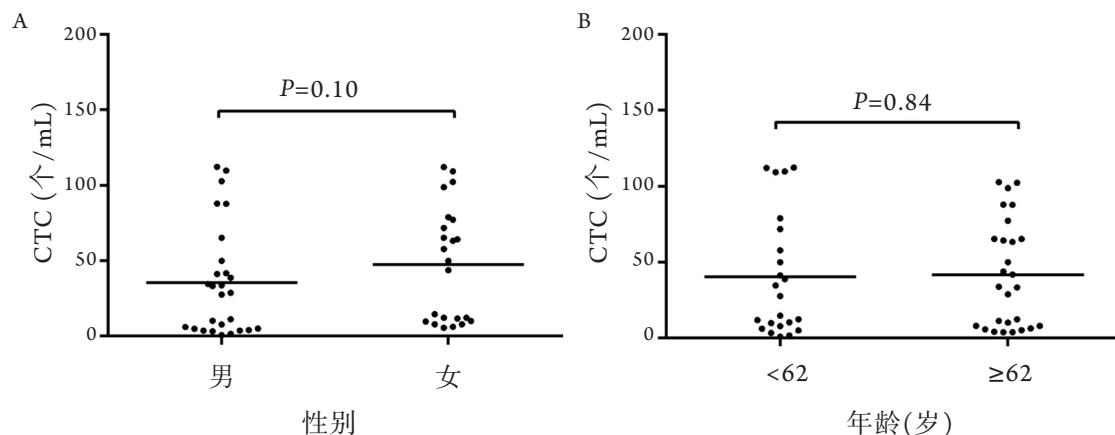


图2 不同性别和年龄NSCLC患者外周血中循环肿瘤细胞水平差异

Figure 2 A distribution of CTC count in NSCLC patients according to sex and age

A: A distribution of CTC count in NSCLC patients according to sex; B: A distribution of CTC count in NSCLC patients according to age.

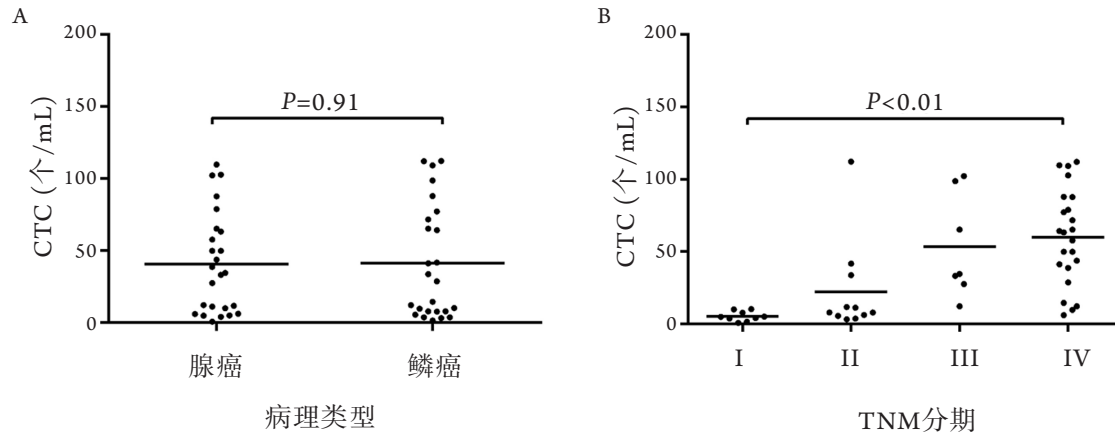


图3 不同病理类型和临床分期NSCLC患者外周血中循环肿瘤细胞水平差异

Figure 3 A distribution of CTC count in NSCLC patients according to pathological type and clinical stage

A: A distribution of CTC count in NSCLC patients according to pathological type; B: A distribution of CTC count in NSCLC patients according to clinical stage.

本研究的局限性鉴于目前尚无国际公认的CTC阳性判定标准, 因此仅依据试剂盒说明书进行判定可能会造成假阳性或假阴性的结果。此外, 本研究的患者例数还相对较少, 需要扩大样本数以进行更深入的研究。

鉴于目前肺癌血行转移的机制尚未完全阐

明, CTC在肺癌诊断中的应用价值仍需继续探索。相信随着检测技术水平的提高和方法学的不断优化, CTC的检测和研究将有助于肺癌的诊断及转移的早期发现, 或将成为临床肺癌诊治中新的辅助手段。

参考文献

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
2. Molina JR, Adjei AA, Jett JR. Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer[J]. Chest, 2006, 130(4): 1211-1219.
3. Joosse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells[J]. Cancer Res, 2013, 73(1): 8-11.
4. Khan MS, Kirkwood A, Tsigani T, et al. Circulating tumor cells as prognostic markers in neuroendocrine tumors[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(3): 365-372.
5. Bevilacqua S, Gallo M, Franco R, et al. A "live" biopsy in a small-cell lung cancer patient by detection of circulating tumor cells[J]. Lung Cancer, 2009, 65(1): 123-125.
6. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(13): 2177-2184.
7. Parker N, Turk MJ, Westrick E, et al. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay[J]. Anal Biochem, 2005, 338(2): 284-293.
8. O'Shannessy DJ, Yu G, Smale R, et al. Folate receptor alpha expression in lung cancer: diagnostic and prognostic significance[J]. Oncotarget, 2012, 3(4): 414-425.
9. Nunez MI, Behrens C, Woods DM, et al. High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and EGFR [corrected] mutation[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(5): 833-840.
10. Christoph DC, Asuncion BR, Hassan B, et al. Significance of folate receptor alpha and thymidylate synthase protein expression in patients with non-small-cell lung cancer treated with pemetrexed[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(1): 19-30.
11. Yu Y, Chen Z, Dong J, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cells as a novel diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. Transl Oncol, 2013, 6(6): 697-702.
12. Lou J, Ben S, Yang G, et al. Quantification of rare circulating tumor cells in non-small cell lung cancer by ligand-targeted PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80458.
13. 刘广杰. 肺癌早期诊断进展[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2008:5. LIU Guangjie. Progress in the early diagnosis of lung Cancer[D]. Shi Jia Zhuang: Hebei Medical University, 2008: 5.
14. 陈燕, 李虎, 秦秦, 等. 非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞的检测及与病理分期关系[J]. 临床军医杂志, 2014, 42(2): 192-194. CHEN Yan, LI Hu, QIN Qin, et al. Relationship between pathological staging and circulating tumor cells in non small cell lung cancer[J]. Clin J Med Offic, 2014, 42(2): 192-194.
15. 刘春花, 杨政, 李娜, 等. 循环肿瘤细胞与肺癌临床病理特征的关系[J]. 重庆医学, 2014, 43(20): 2565-2567. LIU Chunhua, YANG Zheng, LI Na, et al. The relationship between circulating tumor cells and clinicopathologic characteristics of primary lung cancer patients[J]. Chong qing medicine, 2014, 43(20): 2565-2567.
16. Sienel W, Seen-Hibler R, Mutschler W, et al. Tumour cells in the tumour draining vein of patients with non-small cell lung cancer: detection rate and clinical significance[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2003, 23(4): 451-456.

本文引用: 万佳蔚, 沈洪远, 黄红宇, 韩志君, 严子禾, 高明珠, 黄新祥. 非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞与临床特征关系的初步研究[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(1): 43-47. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.01.013

Cite this article as: WAN Jiawei, SHEN Hongyuan, HUANG Hongyu, HAN Zhijun, YAN Zihe, GAO Mingzhu, HUANG Xinxiang. A preliminary study on the relationship between circulating tumor cells count and clinical features in patients with non-small cell lung cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2015, 35(1): 43-47. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.01.013