

· 临床探讨 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.14.041

外周血循环肿瘤细胞对卵巢癌预后的评估价值

莫美绒¹, 崔 尖², 赵晓慧^{1△}

(1. 北京市顺义区中医医院检验科 101300; 2. 陕西省结核病防治院检验科, 西安 710000)

摘要:目的 探索卵巢癌患者外周血循环肿瘤细胞(CTC)与临床病理因素及其预后的关系。方法 收集北京市顺义区中医医院 2012 年 5 月至 2014 年 3 月术前诊断为卵巢癌且行规范分期手术的患者 56 例,采用 CellSearch 系统检测患者外周血 CTC 计数,分为 CTC 阳性组和阴性组,分析其与临床病理因素的关系;采用 Kaplan-Meier 法行生存分析, Cox 比例风险模型行单因素及多因素分析。结果 CTC 在外周血的阳性率为 37.5%(21/56), CTC 阳性与肿瘤分化程度($P=0.003$)、FIGO 分期($P=0.003$)、淋巴结转移($P=0.004$)及复发($P<0.001$)相关,与年龄、血清糖类抗原 199(CA199)、CA125 及人附睾分泌蛋白 4(HE4)无相关性。CTC 阳性组 5 年总生存率(47.62%)低于 CTC 阴性组(91.43%),差异有统计学意义($P=0.032$); CTC 阳性组 5 年累计复发率(76.19%)高于 CTC 阴性组(17.14%),差异有统计学意义($P=0.033$)。单因素分析示 FIGO 分期、淋巴结转移、肿瘤分化及 CTC 阳性为影响总生存率及累计复发率的影响因素;多因素分析示肿瘤分化、淋巴结转移及 CTC 阳性为影响总生存率及累计复发率的独立影响因素。结论 CTC 阳性为影响卵巢癌预后的独立危险因素。

关键词:糖类抗原; 人附睾分泌蛋白 4; 循环肿瘤细胞; 卵巢癌

中图分类号: R735.8

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)14-2151-03

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,2012 年全球卵巢癌新发病例 239 000 例,死亡 152 000 例^[1]。尽管 80% 的卵巢癌血清糖类抗原(CA)125 会升高,但由于灵敏度及特异度较低,仍无法作为评估术后复发及远处转移的指标^[2]。循环肿瘤细胞(CTC)作为液体活检的新型指标,已广泛用于多种恶性肿瘤的预后评估^[3]。本研究旨在探讨基于 CellSearch 系统检测 CTC 在卵巢癌中的阳性情况和临床意义,了解 CTC 与卵巢癌临床病理特征的关系,进一步为临床个体化治疗及预后评估提供指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 5 月至 2014 年 3 月在北京顺义区中医医院诊断为卵巢癌患者 56 例,平均年龄(58.71±8.57)岁,患者肿瘤分期采用国际妇产科联合会(FIGO)2009 标准。纳入标准:(1)病理结果显示卵巢癌;(2)接受规范分期手术的患者;(3)术前未接受放化疗或内分泌治疗;(4)随访资料齐全。排除标准:(1)手术治疗前已接受过放化疗或内分泌治疗;(2)5 年内曾有其他肿瘤病史;(3)未能进行规范分期手术;(4)有凝血相关疾病无法采血者;(5)拒绝采集外周血进行检测;(6)随访资料不全者。本研究征得患者及家属同意,并经医院伦理委员会批准实施。

1.2 仪器与试剂 采用强生 CellSearch 系统进行检测,所用 CTC 试剂盒(CellSearch CTC KIT)购自强生公司; Celltracks-AutoPrep 样本处理系统(强生公

司), Celltracks-analyzer 分析系统, CellSave 含乙二胺四乙酸抗凝剂的储存管(强生公司), 试验所需的一抗购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 CTC 检测 纳入研究的患者于术前采集外周静脉血 7.5 mL 放入 CellSave 管,充分混匀,防止凝集; 72~96 h 内送 CellSearch 系统检测 CTC 时,采用免疫磁珠方法富集表达上皮细胞黏附分子(EpCAM)的上皮细胞,所富集的细胞经固定、透化等处理后采用角蛋白 Cytokerins 抗体(CK8、CK18、CK19 等)、CD45 抗体进行免疫染色,最后采用 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色来鉴定细胞核。染色完成后,细胞集中进入多通道荧光显微镜进行分析, CTC 细胞特征为 CK⁺/DAPI⁺/CD45⁻,并由 2 名经验丰富的检验专家进行计数。

1.3.2 CTC 分组 将纳入研究患者按照 CTC 计数进行分组,计数大于或等于 1 个者即为 CTC 阳性组,等于 0 个者即为 CTC 阴性组。

1.3.3 随访 采用电话随访的方式,自手术当日起随访,截止时间为 2017 年 3 月 1 日,每 3 个月随访 1 次;随访内容包括肿瘤复发时间、部位、死亡及死亡原因等,共失访 4 人,平均随访时间为(22.3±17.2)个月。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 及 Graphpad 软件进行分析,计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法;生存分析采用 Kap-

△ 通信作者, E-mail: xiaohuizhao880@126.com。

lan-Meier 法 log-rank 检验;单因素及多因素分析采用 Cox 比例风险模型。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CTC 在卵巢癌中的阳性表达情况 CTC 在卵巢癌中的阳性率为 37.5% (21/56), CTC 计数范围为 0~7 个。CTC 表现为卵圆形, 标记物 DAPI⁺/CK⁺/CD45⁻ 的细胞。其中核与角蛋白不重合或 CD45⁺ 的细胞均为非 CTC。

2.2 CTC 阳性与临床病理因素的关系 将 CTC 阳性组、阴性组与卵巢癌患者临床病理因素分析, 结果显示 CTC 阳性患者与肿瘤分化 ($P = 0.003$)、FIGO 分期 ($P = 0.003$)、淋巴结转移 ($P = 0.004$) 及复发 ($P < 0.001$) 相关, 而与年龄、血清 CA199、血清 CA125 及血清人附睾分泌蛋白 4 (HE4) 无相关性, 见表 1。

2.3 CTC 与卵巢癌预后的关系 CTC 阳性组术后 5 年总生存率为 47.62%, 而 CTC 阴性组为 91.43%, CTC 阳性组 5 年总生存率低于 CTC 阴性组, 差异有统计学意义 ($P = 0.032$); CTC 阳性组 5 年累计复发率为 76.19%, CTC 阴性组为 17.14%, CTC 阳性组 5 年累计复发率高于 CTC 阴性组, 差异有统计意义 ($P = 0.033$)。

2.4 CTC 与卵巢癌预后因素分析 单因素分析示 FIGO 分期、淋巴结转移、肿瘤分化及 CTC 阳性为影响总生存率及累计复发率的影响因素, 见表 2; 多因素分析示肿瘤分化、淋巴结转移及 CTC 阳性为影响总生存率及累计复发率的独立影响因素, 见表 3。

表 1 CTC 与卵巢癌患者临床病理因素的关系 [n(%)]

参数	CTC		χ^2	P
	阳性 (n=21)	阴性 (n=35)		
年龄(岁)				
≥60	8(38.1)	12(34.3)	0.083	0.773
<60	13(61.9)	23(65.7)		
血清 CA199(ng/mL)				
≥37	9(42.9)	11(31.4)	0.747	0.388
<37	12(57.1)	24(68.6)		
血清 CA125(U/mL)				
≥35	9(42.9)	12(34.3)	0.411	0.521
<35	12(57.1)	23(65.7)		
血清 HE4(pmol/L)				
≥70	10(47.6)	13(37.1)	0.595	0.440
<70	11(54.4)	22(62.9)		
淋巴结转移				
有	12(57.1)	7(20.0)	8.077	0.004
无	9(42.9)	28(80.0)		
FIGO 分期				
Ⅲ/Ⅳ	13(61.9)	8(22.9)	8.538	0.003
I/Ⅱ	8(38.1)	27(77.1)		
肿瘤分化				
低	14(66.7)	9(25.7)	9.095	0.003
高	7(33.3)	26(74.3)		
复发				
有	16(76.2)	6(17.1)	19.186	<0.001
无	5(23.8)	29(82.9)		

表 2 单因素分析总体生存率和累计复发率的影响因素

因素	总生存率		累计复发率	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
年龄	1.191(0.663~2.131)	0.556	1.146(0.698~2.214)	0.456
血清 CA199	0.829(0.458~1.502)	0.537	0.819(0.451~1.252)	0.476
血清 HE4	1.163(0.634~2.137)	0.601	1.397(0.771~2.531)	0.261
FIGO 分期	0.413(0.224~0.769)	0.005	0.401(0.121~0.764)	0.005
肿瘤分化	0.395(0.206~0.762)	0.005	0.420(0.224~0.842)	0.011
淋巴结转移	0.402(0.220~0.771)	0.007	0.490(0.263~0.913)	0.026
CTC	2.441(1.265~4.747)	0.006	2.072(1.104~3.889)	0.004

表 3 多因素分析总体生存率和累计复发率影响因素

因素	OS		累计复发率	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
肿瘤分化	0.520(0.311~0.867)	0.024	0.572(0.338~0.934)	0.027
FIGO 分期	0.648(0.374~1.127)	0.124	0.552(0.314~0.968)	0.038
淋巴结转移	0.713(0.443~1.148)	0.002	0.670(0.430~1.070)	0.023
CTC	2.050(1.364~3.110)	0.013	1.717(1.131~2.607)	0.011

3 讨 论

研究结果显示,尽管已有多种治疗方法对卵巢癌患者进行治疗和干预,仍然有 70% 的患者将在 18 个月内复发^[4]。2017 年美国预计因卵巢癌死亡的患者将达 14 080 例^[5]。

CTC 作为新型液体活检标志物,在多种研究中已证实其对药效评估及复发转移的预测作用^[6]。本研究应用唯一通过美国 FDA 批准的 CellSearch 系统对卵巢癌患者外周血行 CTC 检测,结果提示阳性率为 37.5% (21/56)。而在 LEE 等^[7]的研究中,通过微流体平台对患者血浆 CTC 检测提示阳性率可高达 98.1% (53/54),但其 CTC 计数与卵巢癌患者的无进展生存并不相关。在本研究中,随访结果提示 CTC 阳性组与阴性组的患者相比总体生存率更低 ($P=0.032$),术后累计复发率更高 ($P=0.033$)。该结果与另一项同样适用 CellSearch 系统进行检测的研究结果相一致^[8],即 CTC 计数升高是预后不佳的指标之一。此外,本研究发现 CTC 阳性与肿瘤分化 ($P=0.003$)、FIGO 分期 ($P=0.003$)、淋巴结转移 ($P=0.004$) 及复发 ($P<0.001$) 密切相关。但 LIU 等^[9]的研究则表明 CTC 计数无论与临床病理参数或患者预后均不相关。且在本文中,CTC 计数的范围波动为 0~7 枚,该结论也与既往研究相接近^[9]。KOLOSTOVA 等^[10]的研究提示在卵巢癌中,CTC 主要提示血液扩散情况,而 CA125 主要提示淋巴结转移情况。但在其他肿瘤研究中提示血清学肿瘤标志物联合 CTC 评估肿瘤预后的能力更佳^[11]。本研究中,阳性 CTC 与 CA125 之间并无相关性,提示淋巴转移及血液转移可能是独立不相关的两种因素。此外,在对肿瘤治疗的应答评估中,传统的方法主要依赖临床及影像学资料,但在 THALGOTT 等^[12]的研究中表明治疗过程中 CTC 计数的变化与影像学实体肿瘤的变化相一致。且通过体外培养捕捉到 CTC,对其进行后续药效试验及测序分析,可为患者个体化治疗提供可靠依据。

本研究也存在一些不足,如本研究为单中心小样本研究,且当肿瘤发生上皮间质转化而失去上皮标志物时,极有可能无法被依赖于上皮标志物检测的 CellSearch 系统所检测到。且对于所获得的 CTC,并未进行后续相关分子分析。未来仍需要更大样本和更为成熟的检测方法和体系来对外周血 CTC 进行深度分析。

综上所述,本研究表明在卵巢癌患者外周血中可检测到阳性 CTC,且其与临床病理特征相关,CTC 阳性患者 5 年总生存率低于 CTC 阴性者,5 年累计复发率高于 CTC 阴性者,CTC 阳性为影响总生存率及无瘤复发率的独立危险因素。

参考文献

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide; sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Inter J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] BOTTONI P, SCATENA R. The role of CA 125 as tumor marker; biochemical and clinical aspects[A]//SCATENA R. *Advances in Cancer Biomarkers*[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2015: 229-244.
- [3] HELISSEY C, BERGER F, COTTU P, et al. Circulating tumor cell thresholds and survival scores in advanced metastatic breast cancer; the observational step of the CircCe01 phase III trial[J]. *Cancer Lett*, 2015, 360(2): 213-218.
- [4] REID B M, PERMUTH J B, SELLERS T A. Epidemiology of ovarian cancer; a review[J]. *Cancer Bio Med*, 2017, 14(1): 9.
- [5] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 Rebecca[J]. *Cancer*, 2013, 63(1): 408-414.
- [6] 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.
- [7] LEE M, KIM E J, CHO Y, et al. Predictive value of circulating tumor cells(CTCs) captured by microfluidic device in patients with epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(2): 361-365.
- [8] POVEDA A, KAYE S B, MCCORMACK R, et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(3): 567-572.
- [9] LIU J F, KINDELBERGER D, DOYLE C, et al. Predictive value of circulating tumor cells(CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(2): 352-356.
- [10] KOLOSTOVA K, MATKOWSKI R, JEDRYKA M, et al. The added value of circulating tumor cells examination in ovarian cancer staging[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(11): 3363.
- [11] CHEN X, WANG X, HE H, et al. Combination of circulating tumor cells with serum carcinoembryonic antigen enhances clinical prediction of non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126276.
- [12] THALGOTT M, HECK M M, EIBER M, et al. Circulating tumor cells versus objective response assessment predicting survival in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel chemotherapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(8): 1457-1464.