

上皮性卵巢癌患者 外周血循环肿瘤细胞检测的临床意义*

赵 枰¹, 洪煜婧², 陈 相¹, 周 峰¹, 鲁晓燕¹, 洪 宏³, 李 晗¹

(1. 南通市第一人民医院, 江苏南通 226001;

2. 南通大学公共卫生学院预防医学 141 班, 江苏南通 226019; 3. 南通市中医院, 江苏南通 226001)

摘要:目的 评估循环肿瘤细胞检测对上皮性卵巢癌的诊断价值, 并探讨上皮性卵巢癌患者循环肿瘤细胞与临床病理特征的关系。方法 应用免疫磁珠为基础的阴性筛选结合流式细胞术检测南通市第一人民医院 65 例上皮性卵巢癌患者、21 例卵巢良性疾病患者及 10 例健康者外周血循环肿瘤细胞。多组比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 两组比较采用 Mann-Whitney *U* 检验, 阳性率比较采用卡方检验, 并绘制 ROC 曲线分析。结果 根据受试者工作特性曲线分析: 外周血循环肿瘤细胞的临界值为 4.5(>4) 个时, 其 AUC 为 0.806, 诊断上皮性卵巢癌的灵敏度、特异度和阳性预测值分别为 55.4%, 96.8% 和 97.3%; 外周血循环肿瘤细胞含量与上皮性卵巢癌患者的年龄、组织学类型、病理分化程度、腹腔积液量、肿瘤大小以及有无淋巴结转移无关(均 $P>0.05$), 而与肿瘤的国际妇产科联盟(FIGO)分期和远处转移有关(均 $P<0.05$)。结论 外周血循环肿瘤细胞检测对上皮性卵巢癌的的诊断有一定的价值, 与 FIGO 分期和存在远处转移相关。

关键词: 循环肿瘤细胞; 上皮性卵巢癌

中图分类号: R737.31; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)04-050-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.014

Clinical Significance of Circulating Tumor Cells Detection from Peripheral Blood of Patients with Epithelial Ovarian Cancer

ZHAO Ping¹, HONG Yu-jing², CHEN Xiang¹, ZHOU Feng¹, LU Xiao-Yan¹, HONG Hong³, LI Han¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital in Nantong,

Jiangsu Nantong 226001, China; 2. Department of Preventive Medicine, School of

Public Health, Nantong University, Jiangsu Nantong 226019, China;

3. Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: Objective To estimate the diagnostic value of circulating tumor cells (CTCs) detection for epithelial ovarian cancer, and investigate the relationship between the presence of CTCs and the clinic pathologic characteristics of epithelial ovarian cancer patients. **Methods** Quantification of CTCs were performed using immunomagnetic bead based negative enrichment combined with flow cytometry in 65 patients with epithelial ovarian cancer, 21 patients with benign ovarian diseases, and 10 healthy subjects. The differences among groups were analyzed by the Kruskal-Wallis *H* test (multi group comparison) and the Mann-Whitney *U* test (two group comparison), and the chi-square test was used in the positive rate comparison, the receiver operating characteristic (ROC) curve was established. The relationship between CTCs and clinic pathologic characteristics of epithelial ovarian cancer patients were analyzed. **Results** The receiver operating characteristic analysis showed the cut off value was 4.5(>4), the AUC was 0.806, and sensitivity, specificity and positive value (PPV) were 55.4%, 96.8% and 97.3% respectively, in detecting patients with ovarian carcinoma malignancy. Quantification of CTCs in epithelial ovarian cancer was correlated with FIGO stages or distance metastasis (all $P<0.05$), but not with patient age, histological types, pathologic differentiation, amount of ascites, tumor size and lymph node metastasis (all $P>0.05$). **Conclusion** The detection of peripheral CTCs has a certain diagnosis value in epithelial ovarian cancer, especially with related to FIGO stages and distant metastasis.

Keywords: circulating tumor cells (CTCs); epithelial ovarian cancer

卵巢上皮性癌(卵巢癌)是妇科病死率最高的恶性肿瘤, 由于早期缺乏典型的临床症状, 70% 以上的患者在确诊时已为晚期^[1], 且预后较差, 5 年生存率不足 25%^[2]。及早、准确地发现转移、预测复发有助于改善预后。1869 年, Ashworth 等^[3]人

提出了循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的概念, 被誉为“实时肿瘤活检”^[4], 目前已成为肿瘤研究领域的新热点。本研究旨在应用免疫磁珠阴性富集联合流式细胞术检测上皮性卵巢癌、卵巢良性疾病和健康者外周血 CTCs, 分析其

* 基金项目: 南通市卫生局青年基金资助项目(编号: WQ2015021), 南通市科技计划项目(编号: HS2014060)。

作者简介: 赵 枰(1977—), 男, 硕士, 副主任技师, 主要从事免疫学检验工作, E-mail: zhaopinghonghong@163.com。

通讯作者: 李 晗, 副主任技师, E-mail: ntlh.999@163.com。

与患者临床病理因素的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取本院2015年6月~2016年8月收治的上皮性卵巢癌患者共65例,均为首发病例,未进行放、化疗等抗癌治疗,手术病理分期:按国际妇产科联盟(FIGO,2014)的分期标准,I期9例,II期3例,III期38例,IV期15例;病理类型:浆液性腺癌49例,非浆液性癌16例(包括黏液性癌13例、透明细胞癌1例、子宫内膜样腺癌2例);病理分化程度:高分化16例,中分化23例,低分化及未分化26例;发生淋巴结转移40例,远处转移25例。年龄41~71岁,平均年龄54.1岁;同期卵巢良性疾病患者21例(囊腺瘤12例、子宫内膜异位症4例、巧克力囊肿3例、纤维瘤2例),健康体检者10例,共31例为对照,年龄42~68岁,平均年龄50.6岁,无恶性肿瘤史。

1.2 试剂和仪器 Ficoll淋巴细胞分离液(上海朗顿生物科技有限公司);Miltenyi磁珠(德国Miltenyi Biotech公司);单克隆抗体CD45-APC,EpCAM-FITC(德国Miltenyi Biotech公司);流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 方法 上皮性卵巢癌患者、对照者术前静脉穿刺7.5 ml于EDTA抗凝管中,24 h内进行下列操作。①肿瘤细胞富集,以Ficoll淋巴细胞分离液提取单个核细胞,加入少许红细胞裂解液溶解混有的红细胞,所得细胞与Miltenyi磁珠混合,加入已润湿的LD柱中,在强磁场作用下收集未吸附的细胞组分(含CTCs),血细胞仪计数、重悬。②流式细胞术检测EpCAM阳性的CTCs,单个核细胞悬液经固定、并加入透膜剂后,测定管加单克隆抗体CD45-APC,EpCAM-FITC,对照管加同型对照,避光孵育,PBS液洗涤,加入多聚甲醛,混匀、流式细胞仪检测。每例样本检测 $(1\sim2)\times10^4$ 个细胞,重复三次。参考国内外相关文献,CD45-/EpCAM+细胞为CTCs,结果以外周血每 10^6 单个核细胞中EpCAM+细胞数来表示外周血中的肿瘤细胞含量,即CTCs单位为 $\times10^{-6}$ 。

1.4 统计学分析 采用SPSS13.0软件进行统计分析。首先用Kolmogorov-Smirnov Z检验进行正态性检验,非正态分布资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。两两比较用Mann-Whitney U检验,3组数据比较采用非参数Kruskal-Wallis H检验;分析受试者工作特征曲线(ROC曲线)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血CTCs检测的ROC曲线分析 见图1。以术后病理诊断为“金标准”,以上皮性卵巢癌

65例为疾病组,以健康体检者10例及卵巢良性病患者21例为对照组(合计31例),应用ROC曲线分析,外周血CTCs检测诊断上皮性卵巢癌的AUC为0.806(95%CI:0.722~0.890),最佳临界值为4.5(>4)个,敏感度为55.4%,特异度为96.8%,阳性预测值为97.3%。

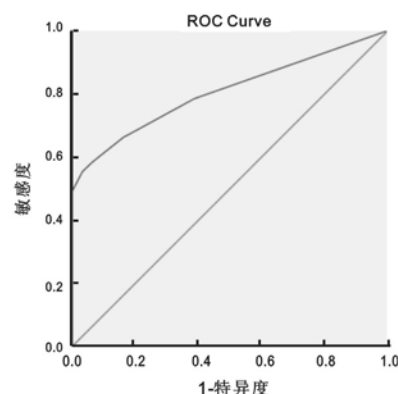


图1 上皮性卵巢癌患者与对照者
(卵巢良性疾病及健康对照)

外周血循环肿瘤细胞的受试者工作特征曲线

2.2 上皮性卵巢癌患者外周血CTCs含量与临床特征的关系 见表1。

表1 上皮性卵巢癌患者外周血循环肿瘤细胞含量与临床特征的关系

临床病理特征	n	$M(P_{25}-P_{75})$	U值/H值	P
年龄(岁)				
≤50	28	3.5(0~11)	462.0	0.454
>50	37	5(1~13)		
组织学类型				
浆液性癌	49	5(0~10)	277.5	0.079
非浆液性癌	16	11(1.25~32)		
病理分期				
I+II	12	10(0~6)	175.0	0.015
III+IV	53	6(1~15.5)		
病理分化程度				
高分化	16	1(0~9.75)	5.672	0.059
中分化	23	4(0~25)		
低分化及未分化	26	7.5(4.25~12.5)		
腹腔积液量(ml)				
≤500	32	2(0.25~10)	421.0	0.157
>500	33	7(0.50~15.5)		
术前肿块最大直径(cm)				
≤10	46	5(0~12.5)	416.5	0.765
>10	19	6(1~11)		
淋巴结转移				
无	25	6(0.5~12)	462.2	0.605
有	40	4(0.25~17.75)		
远处转移				
无	43	5(0~8)	310.0	0.023
有	22	11(1~40.25)		

65例上皮性卵巢癌患者中, (下转56页)

(上接 51 页)外周血 CTCs 含量与上皮性卵巢癌患者的年龄、组织学类型、病理分化程度、腹腔积液量、肿块大小以及有无淋巴结转移无关(均 $P > 0.05$),而与肿瘤的国际妇产科联盟(FIGO)分期和远处转移有关(均 $P < 0.05$)。

3 讨论 CTCs 是指来源于肿瘤原发灶或转移灶,自发或因诊疗操作释放进入外周血循环的肿瘤细胞(非血液来源)^[6]。是肿瘤进展的早期事件,与肿瘤的转移、复发关系密切,对多种恶性肿瘤的早期筛查、疗效评价、转移复发监测和预后判断都具有特定的临床价值^[6]。CellSearch 系统是通过美国食品和药物管理局(FDA)的审核,主要应用于乳腺癌等患者外周血 CTCs 的检测^[7]。而流式细胞术是一种可快速、高效地对细胞进行分析的技术,它可利用抗肿瘤细胞表面单克隆抗体结合荧光物质使肿瘤细胞染色,然后进行分析。是当前作为肿瘤细胞学研究领域的一线仪器,广泛应用于临床。EpCAM 是一种参加细胞间黏附的细胞表面分子,几乎在所有的上皮性肿瘤中都有高表达,国内外也有一些关于 EpCAM 作为循环肿瘤细胞检测的临床研究报告。本研究采用免疫磁珠为基础的阴性筛选结合流式细胞术,检测上皮性卵巢癌患者外周血中的 CTCs,结果显示外周血 CTCs 检测在诊断上皮性卵巢癌的灵敏度、特异度和阳性预测值分别为 55.4%,96.8%和 97.3%,ROC 曲线下面积(AUC) >0.8 ,具有较高的诊断准确性,其中灵敏度不尽人意,可能与肿瘤细胞脱落入血过程中出现凋亡、抗原表达减弱和为上皮-间质细胞转换(Epithelial mesenchymal transitions, EMT)等有关,但 CTCs 在诊断方面还是体现出一定的临床应用价值。外周血 CTCs 含量与上皮性卵巢癌患者的临床 FIGO 分期(I+II, III+IV)和远处转移有关,提示其与上皮性卵巢癌的临床进展密切相

关,动态检测患者 CTCs,有利于及早发现转移、及时评估患者预后,为患者合理化及个体化治疗方案提供依据。

总之,CTCs 检测的临床应用仍处于起步阶段,也存在着一些分歧,但不可否认其有着很好的临床应用前景和研究价值,对上皮性卵巢癌的诊断有一定的价值,与 FIGO 分期、存在远处转移相关。

参考文献:

- [1] 郑福利,张颖,王建.血清 S100A6 检测对卵巢上皮性癌的诊断价值[J].现代检验医学杂志,2015,30(5):22-23,27.
Zheng FL,Zhang Y,Wang J. Study on diagnostic value of detecting serum s100A6 in the epithelial ovarian carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2015,30(5):22-23,27.
- [2] Jenks S. Setting the bar higher for ovarian cancer survival[J]. J Natl Cancer Inst,2014,106(1):dju037.
- [3] Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death[J]. Aust Med J,1869(14):146-149.
- [4] Weissenstein U,Schumann A,Reif M,et al. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies[J]. BMC Cancer,2012,12(1):206.
- [5] Liu MC,Shields PG,Warren RD,et al. Circulating tumor cells;a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol,2009,27(31):5153-5159.
- [6] Krebs MG,Sloane R,Priest L,et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non small-cell-lung cancer[J]. J Clin Oncol,2011,29(12):1556-1563.
- [7] Mego M,Gao H,Cohen EN,et al. Circulating tumor cells (CTC) are associated with defects in adaptive immunity in patients with inflammatory breast cancer[J]. Journal of Cancer,2016,7(9):1095-1104.

收稿日期:2017-01-24

修回日期:2017-03-21