

乳腺癌病人循环肿瘤细胞检测的临床意义

李艳¹, 崔珍¹, 李玲玲¹, 王效静², 李多杰¹

[摘要] **目的:**探讨乳腺癌外周静脉血中循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)检测的临床意义。**方法:**收集女性乳腺癌病人60例,在新阶段治疗前采集病人外周静脉血,采用密度梯度离心法联合流式细胞术法检测CTCs,免疫组织化学法检测ER、PR、HER-2、p53、Ki-67表达。同期选取20名健康女性志愿者作为阴性对照组。**结果:**观察组CTCs阳性表达率为38.3%(23/60),对照组均未检出CTCs阳性表达,2组CTCs阳性表达差异有统计学意义($P < 0.01$)。不同年龄、不同病理类型病人间CTCs阳性表达差异均无统计学意义($P > 0.05$);不同TNM分期病人CTCs阳性表达差异有统计学意义($P < 0.01$);转移性乳腺癌病人CTCs阳性表达明显高于非转移性病人($P < 0.01$)。不同ER、PR、HER-2、Ki-67表达病人的CTCs阳性表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),不同分子分型病人间的CTCs阳性表达差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**CTCs与乳腺癌TNM分期及肿瘤细胞转移有关,对指导乳腺癌的诊断、治疗及预后判断有重要意义。

[关键词] 乳腺肿瘤;循环肿瘤细胞;微转移

[中图分类号] R 739.9

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.007

Clinical significance of the detection of circulating tumor cells in breast cancer

LI Yan¹, CUI Zhen¹, LI Ling-ling¹, WANG Xiao-jing², LI Duo-jie¹

(1. Department of Radiotherapy, 2. Respiratory Disease Clinical base Anhui Key Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical significance of the detection of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral venous blood of breast cancer patients. **Methods:** The CTCs in peripheral venous blood of 60 patients with breast cancer before new stage treatment were examined using density gradient centrifugation combined with flow cytometry (FCM), and the expression levels of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2), p53 and Ki-67 were detected using the immunohistochemical method. Twenty healthy female volunteers were set as the control group at the same time. **Results:** The positive rate of CTCs in observation group was 38.3% (23/60), the positive CTCs was not detected in control group, and the difference of the positive expression of CTCs between two groups was statistically significant ($P < 0.01$). The differences of the positive expression of CTCs in different ages and pathological types patients were not statistically significant ($P > 0.05$). The difference of the positive expression of CTCs in different TNM stages patients was statistically significant ($P < 0.01$). The positive expression of CTCs in metastatic breast cancer patients was significantly higher than that in nonmetastatic breast cancer patients ($P < 0.01$). The differences of the positive expression of CTCs in patients with different ER, PR, HER-2, Ki-67 and molecular classification were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions:** The CTCs is related to the TNM staging and metastasis of breast cancer, which has a great significance in the diagnosis, treatment and evaluating prognosis of breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; circulating tumor cells; micrometastasis

乳腺癌发病率在我国女性恶性肿瘤中居首位^[1]。尽管治疗的规范性与全面性不断完善,转移与复发仍是当前乳腺癌治疗失败的最主要原因。1896年,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的概念于澳大利亚被首次提出,其被定义为

“自发或因诊疗操作引起的、由实体瘤或转移灶释放进入外周血的肿瘤细胞”^[2]。CTCs检测分析为微浸润病变提供了“液体活检”的机会^[3]。研究^[4]证明,CTCs检测对乳腺癌早期微转移和进一步诊断及治疗方案的选择、预后评估等均有重要的价值。我们检测乳腺癌病人外周静脉血CTCs,并探讨其与乳腺癌病人临床特征、免疫组织化学指标的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年6月至2017年2月我院女性乳腺癌病人60例作为观察组,根据美国癌症联合会2017年第8版乳腺癌AJCC分期标准对

[收稿日期] 2017-04-27

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2017A218);蚌埠医学院研究生科研创新计划(Byycx201630)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1. 放疗科, 2. 呼吸系病临床基础安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233000

[作者简介] 李艳(1991-),女,硕士研究生。

[通信作者] 李多杰, 硕士研究生导师, 副主任医师, 副教授。E-mail: liduojie@163.com

病人行 TNM 分期。纳入标准:(1)经乳腺肿块空芯针穿刺活检病理或术后病理证实为浸润性乳腺癌;(2)经乳腺超声、钼靶检查,胸片、腹部超声检查,必要时 CT、MRI 或 ECT 检查,中晚期病人必要时行 PET-CT 检查;(3)排除其他恶性肿瘤病史;(4)均取得病人知情同意并签署知情同意书。排除标准:(1)怀孕期或哺乳期病人;(2)合并其他恶性肿瘤;(3)因经济等其他原因不宜入组试验者。同期选取 20 名健康体检志愿者作为阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 密度梯度离心法富集联合流式细胞术检测 2 组病人 CTCs

采集新阶段治疗前观察组和对照组肘静脉血 7.5 mL,加入肝素抗凝,冷却 10 min;加入 5 mL PBS 液稀释,加入 Ficoll 淋巴细胞分离液 3 mL,离心;去除血浆后加入 2 mL PBS 液混匀,离心;去除上清液,加入各抗体 0.5 μ L[上皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体、细胞角蛋白(panCK)抗体、CD45、波形蛋白(vimentin)抗体,均购于美国 BD 公司]混匀,避光 30 min,离心,检测。所有血液样本均于采集后 12 h 内进行细胞检测。

依据 Flow Cytometry 分析,以侧向反散射(SSC)对前向散射(FSC)作二维散射点,设 R1 门。取 R1 门细胞,以 SSC 对 CD45-PE 作二维散射点,选择 CD45(-)细胞。取 CD45(-)细胞,以 SSC 对 pan-CK 作二维散射点,选择 CK(+)细胞设 R2 门。取 R2 门细胞,以 vimentin 对 EpCAM 作二维散射点,取 vimentin(+)与 EpCAM(+)做 R3 门。软件自动生成各种散点图及数据结果。以 EpCAM(+),CK(+),vimentin(+),CD45(-)定义为阳性;CTCs $\geq 5/7.5$ mL 定义为外周血微转移阳性(所有阳性标本经过专业研究人员审核)。

1.2.2 免疫组织化学指标检测

应用免疫组织化学法检测观察组病人雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)、p53 和 Ki-67 表达情况。原发肿瘤细胞核染色 $\geq 1\%$ 时,定义为 ER 或 PR 阳性;HER-2(0 或+)为阴性,HER-2(3+)为阳性,HER-2(2+)需加做荧光原位杂交。

1.3 统计学方法

采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 2 组受试者 CTCs 阳性表达比较

观察组 CTCs 阳性检出 23 例,阳性率为 38.3%;对照组均未

检出 CTCs 阳性表达。2 组间 CTCs 阳性表达差异有统计学意义($\chi^2 = 10.76, P < 0.01$)。

2.2 不同特征乳腺癌病人的 CTCs 阳性表达比较

不同年龄、不同病理类型病人间 CTCs 阳性表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。不同 TNM 分期病人 CTCs 阳性表达差异有统计学意义($P < 0.01$);转移性(M1 期)乳腺癌病人 CTCs 阳性表达明显高于非转移性(M0 期)病人($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 不同特征乳腺癌病人的 CTCs 阳性表达比较[n;百分率(%)]

指标	n	阳性表达	χ^2	P
年龄/岁				
>50	41	17(41.4)	0.54	>0.05
≤ 50	19	6(31.6)		
病理类型				
浸润型导管癌	51	21(41.2)	0.50	>0.05
浸润型小叶癌	9	2(22.2)		
TNM 分期				
I 期	7	0(0.0)	35.02	<0.01
II 期	17	0(0.0)		
III 期	15	5(33.3)		
IV 期	21	18(85.7)		
M 分期				
M0 期	39	5(12.8)	30.68	<0.01
M1 期	21	18(85.7)		

2.3 不同免疫组织化学指标、分子分型乳腺癌病人的 CTCs 阳性表达比较

不同 ER、PR、HER-2、Ki-67 表达病人的 CTCs 阳性表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),不同分子分型病人的 CTCs 阳性表达差异亦无统计学意义($P > 0.05$)(见表 2)。

3 讨论

与传统的组织学及影像学检查相比,CTCs 检测技术有更佳的可重复性和敏感性,并可作为实时液体活检检测标志物,能更早地提供评估信息^[4]。CTCs 检测过程主要包括细胞的富集与检测,富集方法有免疫磁珠分离法、黏附分离法、密度梯度离心法等,检测方法包括免疫细胞化学法、流式细胞术、核酸检测技术、细胞检测等。本研究应用密度梯度离心法富集联合流式细胞术检测乳腺癌病人外周血 CTCs 计数,研究共纳入 60 例乳腺癌病人,检测到 CTCs 阳性 23 例,阳性率为 38.3%;而健康对照组均未检出 CTCs 阳性,2 组 CTCs 阳性表达差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表2 不同免疫组织化学指标、分子分型病人的 CTCs 阳性表达比较[*n*;百分率(%)]

指标	<i>n</i>	阳性表达	χ^2	<i>P</i>
ER				
+ ~3 +	34	15(44.1)	1.11	>0.05
-	26	8(30.7)		
PR				
+ ~3 +	35	13(37.1)	0.05	>0.05
-	25	10(40.0)		
HER-2				
3 +	21	10(47.6)	1.18	>0.05
-	39	13(33.3)		
p53				
+ ~3 +	37	16(43.2)	0.98	>0.05
-	23	237(30.4)		
Ki-67				
≥14%	27	9(33.3)	0.52	>0.05
<14%	33	14(42.4)		
分子分型				
LuminalA 型	13	4(30.7)	1.68	>0.05
LuminalB 型	18	7(38.8)		
HER-2 阳性型	21	10(47.6)		
三阴性	8	2(25.0)		

仅约30%的早期乳腺癌病人术后可能从辅助治疗中受益,而CTCs能在晚期转移乳腺癌病人的外周血中检测到,故CTCs对临床分期具有重要的指导意义,可有助于TNM分期。有研究^[5]检测乳腺癌病人外周血CK19 mRNA水平,发现Ⅲ期病人阳性率为31.2%,而Ⅳ期病人则达40.4%。PARK等^[6]采用实时定量RT-PCR法对30例健康献血者、早期乳腺癌病人、47例局部晚期乳腺癌病人和126例转移性乳腺癌病人的外周血样本CTCs进行前瞻性分析,研究结果得出CTCs计数在转移性疾病的检出率略高于早期或局部晚期乳腺癌。而吕海通等^[7]对126例可手术乳腺癌病人进行CTCs检测,共检测出CTCs阳性9例,检出率7.1%,结果并未发现CTCs阳性率与肿瘤分期存在相关。并非所有M1期病人都检出CTCs,M0期早期可手术的乳腺癌病人中也能检测到CTCs。本研究结果显示,不同TNM分期病人CTCs阳性表达差异有统计学意义;转移性乳腺癌病人CTCs阳性表达明显高于非转移性病人。提示CTCs表达与乳腺癌分期及转移存在相关性。

雌、孕激素的表达是乳腺癌重要的预后因素及预测激素治疗的疗效的指标。P53基因是肿瘤抑制

基因P53的产物,是判断乳腺癌预后的依据指标之一。Ki-67是一种增殖细胞相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,在细胞增殖中不可缺少,Ki-67标记的是处于增殖周期中的细胞,该标记阳性率越高,肿瘤生长越快,组织分化越差,对化疗也越敏感,预后较差^[8]。根据2011年St Gallen共识,乳腺癌分子亚型临床分为4型,即LuminalA型、LuminalB型、HER-2过表达型和三阴性。乳腺癌的内分泌治疗主要依据ER、PR的表达水平,靶向治疗主要依据HER-2的表达水平,不同分子分型又影响着病人的预后与生存。RACK等^[9]研究显示,CTCs阳性率与与肿瘤大小、病理分级、ER、PR、HER-2状态以及分子分型均无相关性。而王丽娟等^[10]采用Cell Search系统对53例乳腺癌病人进行CTCs检测,结果发现CTCs计数与与肿瘤分期、远处转移、分子分型有关,而与ER、PR、HER-2、Ki-67均无明显相关性。LÜ等^[11]荟萃分析24项研究(3701例转移性乳腺癌病人),包括13项前瞻性研究和11项回顾性研究,结果显示HER-2阳性是CTCs阳性存在的风险因素。而本研究结果显示,不同ER、PR、HER-2、Ki-67表达病人的CTCs阳性表达差异均无统计学意义,不同分子分型病人间的CTCs阳性表达差异亦无统计学意义。

综上,CTCs与乳腺癌TNM分期及肿瘤细胞转移有关,对指导乳腺癌的诊断、治疗及预后判断有重要意义。而CTCs检测技术作为一种非侵入性的肿瘤诊断方法,也更容易为病人所接受。但目前CTCs检测技术并未广泛应用于临床,可能与CTCs富集和检测技术的精确度以及分子标志物选取不一致有关,因此,需进一步提高其检测手段的敏感性和特异性,以在肿瘤诊疗过程中发挥更大的应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Cancer J Clin*, 2016, 66 (2): 115.
- [2] 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(14): 146.
- [3] FORTE VA, BARRAK DK, ELHODAKY M, *et al.* The potential for liquid biopsies in the precision medical treatment of breast cancer [J]. *Cancer Biol Med*, 2016, 13(1): 19.
- [4] CHIKAISHI Y, YONEDA K, OHNAGA T, *et al.* EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a universal CTC-chip [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 7.
- [5] STATHOPOULOU A, GIZI A, PERRAKI M, *et al.* Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the light cycler system [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14): 5145.

表 3 早产儿 BPD 影响因素的 logistic 回归分析

影响因素	回归系数	χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i>
胎龄	1.428	4.528	<0.05	10.235
使用肺表面活性物质	1.587	4.254	<0.05	6.253
羊水污染	2.241	5.358	<0.05	5.241
动脉导管未闭合	1.524	4.021	<0.05	4.526
机械通气	1.557	4.125	<0.05	4.325

病例 986 例,回顾性分析早产儿中 BPD 发生率,探讨 BPD 的影响因素。结果显示,BPD 发生率为 14.00% (138/986);BPD 和非 BPD 患儿的胎龄、出生体质量、用氧时间、住院时间以及输血量差异均有统计学意义;不同性别、有无呼吸窘迫综合征早产儿的 BPD 发生率差异均无统计学意义,而不同胎龄和是否母亲妊娠期高血压、羊水污染、使用肺表面活性物质、肺出血、动脉导管未闭合、早产儿贫血及机械通气早产儿间的 BPD 发生率差异均有统计学意义;多因素 logistic 回归分析显示,低胎龄、使用肺表面活性物质、羊水污染、动脉导管未闭合和机械通气均为早产儿 BPD 的独立影响因素。

胎儿胎龄 30 周时处于管道形成期结束和囊泡期开始阶段,对外界刺激较敏感,炎症、氧自由基以及机械通气等均可能导致早产儿肺部发育的停止^[8-9]。本研究结果提示,早产儿胎龄越小,BPD 的发生风险越高,可能与胎龄越小,出生体质量越低,胎儿肺成熟程度越差有关。而羊水污染是导致新生儿早产的主要因素,同时,羊水污染可导致新生儿缺氧以及吸入性肺炎的发生,可能引发 BPD。动脉导管未闭合的病理生理变化为肺循环、左心房、左心室血流量增加以及体循环血流量不足,进而引起肺循环、左心超负荷以及体循环灌注不足,因此易引发 BPD。贫血早产儿的 BPD 发生风险高,可能是由于贫血早产儿机体免疫功能更差,早产相关合并症更多。在机械通气过程中,肺泡过度膨胀,萎陷的肺泡被强行打开,机械通气对肺泡产生剪切力可引起肺

泡破坏,而长期机械通气也会直接影响肺以及肺泡的发育,更可能导致肺部相关感染,因此,行机械通气早产儿更易发生 BPD,在保证早产儿健康的前提下,应尽早停止机械通气,有助于降低早产儿 BPD 的发生率^[10]。本研究结果提示,对于胎龄 < 30 周的早产儿,避免羊水污染、使用肺表面活性物质及合理减少机械通气时间有助于降低 BPD 的发生率。

综上,影响 BPD 发生的常见影响因素包括胎龄、妊娠期高血压、羊水污染、使用肺表面活性物质、肺出血、动脉导管未闭合、早产儿贫血以及机械通气。其中,胎龄、使用肺表面活性物质、羊水污染、动脉导管未闭合及机械通气均为 BPD 发生的独立影响因素,应在临床上引起足够重视。

[参 考 文 献]

- [1] 胡晓光,张海邻,张维溪,等. 支气管肺发育不良的风险因素分析及生后第 1 年随访[J]. 医学研究杂志,2013,42(6): 148.
- [2] JOBE AH. 肺表面活性物质替代治疗[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(4):348.
- [3] 胡小娟. 早产儿支气管肺发育不良严重程度的影响因素分析[J]. 当代医学,2015,21(26):33.
- [4] 鲜于舒铭. 降低早产儿支气管肺发育异常发生率的策略[J]. 中国热带医学,2006,6(7):1317.
- [5] 孙永强. 支气管肺发育不良高危因素分析及其相关因子 TGF- β 1 的表达变化[D]. 山西医科大学,2010.
- [6] 孙波. 早产儿出生早期呼吸治疗与肺、脑发育及损害的关系研究[C]. 全国早产儿学术研讨会论文集,2009:37.
- [7] 李贤,黄中新. 肺泡的发育与早产儿肺透明膜病[J]. 四川解剖学杂志,2002,10(1):21.
- [8] 常立文,李文斌. 胎儿和早产儿肺发育[J]. 中华实用儿科临床杂志,2011,26(14):1065.
- [9] 赵畅,石来军,柯炜,等. 吸入普米克令舒等预防早产儿肺发育不良[J]. 临床肺科杂志,2014,19(5):921.
- [10] 张国强,刘欣,刘曼,等. 早产儿支气管肺发育不良从经典到新型的研究进展[J]. 中国儿童保健杂志,2015,23(11): 1163.

(本文编辑 卢玉清)

(上接第 1320 页)

- [6] PARK HS,HAN HJ,LEE S, *et al.* Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients using cytokeratin-19 Real-Time RT-PCR[J]. Yonsei Med J,2017,58(1):19.
- [7] 吕海通,施宇梅,安胜利,等. 循环肿瘤细胞在可手术乳腺癌病人中的检出率及特征分析[J]. 广西医学,2016,37(12): 1819.
- [8] 任秋华,肖明明,侯慧,等. ER、PR、CerbB-2、p53 和 Ki-67 蛋白在乳腺癌中的表达及其意义[J]. 中国肿瘤临床与康复,2010,17:13.

- [9] RACK B,SCHINDLBECK C,JÜCKSTOCK J, *et al.* Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients[J]. J Natl Cancer Inst,2014,106(5):66.
- [10] 王丽娟,张研,吕昭宝,等. 乳腺癌循环肿瘤细胞与分子生物学特征的相关性分析[J]. 中国实验诊断学,2015,19(11): 1946.
- [11] LÜ Q,GONG L,ZHANG T, *et al.* Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a systemic review and meta-analysis[J]. Clin Transl Oncol,2016,18(3):322.

(本文编辑 卢玉清)