

· 论 著 ·

卵巢癌外周血循环肿瘤细胞水平及其与临床病理特征之间的关系

焦丽敏¹, 梁进¹, 王琼¹, 李纪强²

1. 佛山市南海区第六人民医院妇科, 广东 佛山 528200; 2. 南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广东 广州 510282

摘要: **目的** 探讨卵巢癌患者外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)的水平及其与临床病理特征的关系。**方法** 收集 2012 年 1 月至 2013 年 12 月确诊的卵巢癌患者 40 例,均行手术切除,所有患者经病理组织学证实为卵巢上皮来源恶性肿瘤。同时收集 22 例良性卵巢上皮囊肿组织作为对照组。空腹时抽取静脉血 5 ml,4 h 内采用优化的 CanPatrol CTC 富集技术检测血液中的 CTC,并分析其与临床特征之间的关系。**结果** 对照组均未检测出外周血 CTC;卵巢癌组外周血 CTC 阳性率为 77.5%,荧光显微镜下($\times 100$)观察 CTC 计数(个数/视野):上皮型 CTC 为 3.72 ± 4.18 ,混合型 CTC 为 6.94 ± 8.72 ,间质型 CTC 为 3.56 ± 3.31 。不同年龄、临床分期的卵巢癌患者所有类型外周血 CTC 水平差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);高分化和中分化患者外周血 CTC 无差异($P > 0.05$),与高分化和中分化患者比较,低分化患者混合型、间质型 CTC 水平明显增高($P < 0.05$);上皮型和混合型 CTC 区域淋巴结转移无明显差异($P > 0.05$),区域淋巴结转移阳性的患者间质型 CTC 水平较区域淋巴结阴性患者显著增多($P < 0.05$)。生存期分析提示,不同 CTC 水平的上皮型、混合型 CTC 组的无进展生存期差异无统计学意义($P > 0.05$),低间质型 CTC 组无进展生存期长于高间质型 CTC 组($P < 0.05$)。**结论** 卵巢癌患者外周血中 CTC 水平较高,并且与细胞低分化、转移、复发等不良预后因素相关,可以作为评估病情的指标之一。

关键词: 卵巢癌; 循环肿瘤细胞; 卵巢上皮囊肿; 外周血; 临床病理特征; 无进展生存期

中图分类号: R 737.31 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)01-0001-04

Circulating tumor cells level in peripheral blood and its association with clinicopathologic features in patient with ovarian carcinoma

JIAO Li-min*, LIANG Jin, WANG Qiong, LI Ji-qiang

* Department of Gynecology, Sixth People's Hospital of Nanhai District, Foshan, Guangdong 528200, China

Corresponding author: LI Ji-qiang, E-mail: banlangen12@163.com

Abstract: Objective To investigate the circulating tumor cells (CTC) level in peripheral blood and its association with clinicopathologic features in patient with ovarian carcinoma. **Methods** Forty patients with ovarian carcinoma admitted in our hospital between January 2012 and December 2013 (ovarian carcinoma group) were enrolled in this study. All patients received surgery excision of tumor, and the postoperative samples were confirmed as malignant tumors originated from ovarian epithelium by histopathologic examination. The tissue specimens of 22 benign ovarian epithelial cysts patients were collected as control group. Within 4 hours after collecting fasting venous blood samples, CTCs of peripheral blood were detected by optimized CanPatrol CTC enrichment technique. The relationship between CTC and clinical features was analyzed. **Results** There was no CTC in peripheral blood to be found in control group. The positive rate of CTC of peripheral blood in ovarian carcinoma group was 77.5%. With fluorescence microscope observation ($\times 100$), the counts of CTCs (number/view) were 3.72 ± 4.18 in epithelium type, 6.94 ± 8.72 in mixed type and 3.56 ± 3.31 in interstitial type, respectively. There were no significant differences in the levels of all types CTCs of peripheral blood in patients with different ages and different clinical stages (all $P > 0.05$). The levels of mixed type and interstitial type CTCs in patients with poorly differentiated ovarian carcinoma were significantly higher than those in patients with well-differentiated and moderately differentiated ovarian carcinoma (all $P < 0.05$), but the CTCs levels of peripheral blood in patients with well-differentiated and moderately differentiated ovarian carcinoma were similar ($P > 0.05$). There was no significant difference in regional lymph

node metastasis between epithelium type and mixed type CTCs ($P > 0.05$), and the CTC level in patients with positive regional lymph node metastasis increased compared with negative regional lymph node metastasis patients ($P < 0.05$). Survival analysis prompted that there was no significant difference in the progress-free survival period in epithelium type and mixed type groups with different CTC levels ($P > 0.05$), and the progress-free survival period in interstitial type group with low CTC level was longer than that with high CTC level ($P < 0.05$). **Conclusion** The CTCs level of peripheral blood in ovarian carcinoma patients is higher which may be correlated with adverse prognostic factors such as poor differentiation, metastasis and recurrence, so it could be served as one of the indexes evaluating state of the illness for ovarian carcinoma patients.

Key words: Ovarian carcinoma; Circulating tumor cells; Ovarian epithelial cysts; Peripheral blood; Clinicopathologic features; Progress-free survival period

卵巢癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,据最新统计,在全球范围内,卵巢癌在妇科肿瘤中的发病率居于第 3 位,而死亡率居于第 1 位^[1]。卵巢癌由于在早期缺乏特异性症状和体征,能够早期诊断且能够进行根治性手术治疗的患者比例较低,同时由于卵巢癌细胞对于放、化疗敏感性较差,因此卵巢癌患者总体预后不良^[2]。卵巢癌术后复发是造成卵巢癌治疗失败的主要原因之一。目前临床上应用的卵巢癌肿瘤标志物主要包括糖类抗原 125 (CA125) 和人附睾蛋白 4 (HE4),二者对于卵巢癌的诊断有一定价值,但对于预测卵巢癌复发及预后存在明显局限性^[3]。研究发现,血液中存在循环肿瘤细胞 (CTC),它通过上皮-间质转化 (EMT),在原发肿瘤部位穿过血管壁,进入血液循环^[4]。血液中的 CTC 增多同肿瘤的恶性程度、转移和复发具有密切联系。因为检测外周血肿瘤细胞具有无创、简便等特点,非常适合实时监控肿瘤进展和预测病人生存^[5]。本文通过检测卵巢癌患者外周血 CTC,探讨其水平与卵巢癌临床特征之间的关系。

1 材料与方法

1.1 患者及标本采集 本院妇科和肿瘤科 2012 年 1 月至 2013 年 12 月经过病理组织学确诊的 40 例卵巢癌患者和 22 例卵巢上皮囊肿患者 (良性对照组)。所有患者均经过术后病理学并影像学确认,在取得标本时,均未进行手术或放化疗。空腹抽取肘正中静脉血 5 ml 至含 EDTA 抗凝管中,每次抽血时弃掉前 2 ml 血,防止穿刺皮肤时可能的皮肤细胞污染。

1.2 主要试剂与仪器 8 μm 孔径的校准膜 (Millipore, USA), 过滤膜 (SurExam, China), 真空板 (SurExam, China), E-Z 96 vacuum manifold (Omega, USA), 真空泵 (Auto Science, China), 移液器 (Eppendorf, GER); 低温高速离心机 (Beckman, USA); 24 孔板 (Corning, USA); 荧光显微镜 (Olympus BX53, Japan); PBS 溶液 (Sigma, USA); 4% 甲醛溶液 (Sigma, USA);

蛋白酶 (Qiagen, Germany); 30% 马血清 (Sigma, USA)。

1.3 实验方法 采用优化的 CanPatrol CTC 富集技术。

1.3.1 通过细胞形态分离 CTC 空腹时抽取静脉血 5 ml, 配置红细胞裂解液 (154 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 和 0.1 mM EDTA 加入到去离子水中配制) 裂解红细胞, 然后将剩余的细胞重悬于含有 4% 甲醛的 PBS 液中 5 min。将细胞悬液移至过滤管中, 由真空泵固定压力将细胞进行过滤。

1.3.2 三色 RNA 原位杂交检测 检测在 24 孔板上进行, 膜表面的细胞给予蛋白酶处理, 然后利用捕获探针 (分别针对上皮生物标记物 EpCAM、CK8/18/19; 间质细胞生物标记物 vimentin、twist; 白细胞生物标记物 CD45) 进行杂交, 具体探针设计详见文献^[6]。在 42 $^{\circ}\text{C}$ 下杂交 2 h, 未结合的探针通过 1000 μl 的洗涤缓冲液洗涤 3 次。然后, 在细胞中加入 100 μl 预扩增溶液, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。膜冷却, 1000 μl 的洗涤缓冲液洗涤 3 次, 再次用 100 μl 扩增溶液进行孵育。加入三种类型的荧光标记探针 Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 647 后再次 42 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min, 再次洗涤后, 剩余细胞进行 DAPI 染色 5 min, 通过荧光显微镜进行观察。

1.4 无进展生存期随访 从随访截至于 2015 年 1 月 1 日, 定期复诊病人根据每次门诊或住院期间的资料进行随访; 未能复诊的病人采用电话随访。总随访率为 92.86%。主要随访指标为无进展生存期 (指从随机分组开始到肿瘤进展或死亡时间), 因随访时间较短, 未进行总生存期统计。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 14.0 统计学软件对数据进行统计学处理。计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验。生存期采用 Kaplan-Meier 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTC 检测结果 对照组 22 例外周血中均未检

测出 CTC。卵巢癌组中 31 例检测出 CTC, 阳性率 77.5%; 在 100 倍荧光显微镜下, 一个视野计数上皮型 CTC 为 3.72 ± 4.18 , 混合型 CTC 为 6.94 ± 8.72 , 间质型 CTC 为 3.56 ± 3.31 。3 种类型 CTC 荧光显微镜观察结果见图 1。

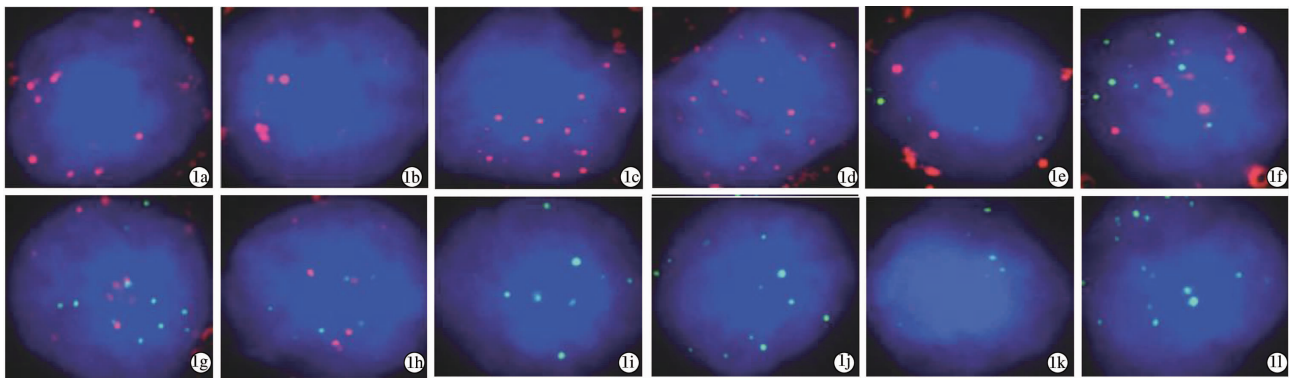
2.2 卵巢癌患者外周血 CTC 水平和临床病理特征之间的关系 不同年龄、临床分期的卵巢癌患者所有类型外周血 CTC 水平均无统计学意义 (P 均 > 0.05); 在分化程度方面, 高分化和中分化患者外周血 CTC 无差异, 与高分化和中分化患者比较, 低分化患者混合型、间质型 CTC 水平明显增高 (P 均 < 0.05); 在区域淋巴结转移方面, 上皮型和混合型 CTC 无明显差异 ($P > 0.05$), 间质型区域淋巴结转移明显增加, 即区域淋巴结转移阳性的患者间质型 CTC 水平较区域淋巴结阴性患者显著增多 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 卵巢癌患者 CTC 水平和无进展生存期之间的

关系 截至到随访时间, 40 例卵巢癌患者中有 25 例存活, 以上皮型、混合型和间质型 CTC 的均数为分界点, 分为高 CTC 组和低 CTC 组。不同 CTC 水平的上皮型、混合型 CTC 组的无进展生存期差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。低间质型 CTC 组无进展生存期优于高间质型 CTC 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

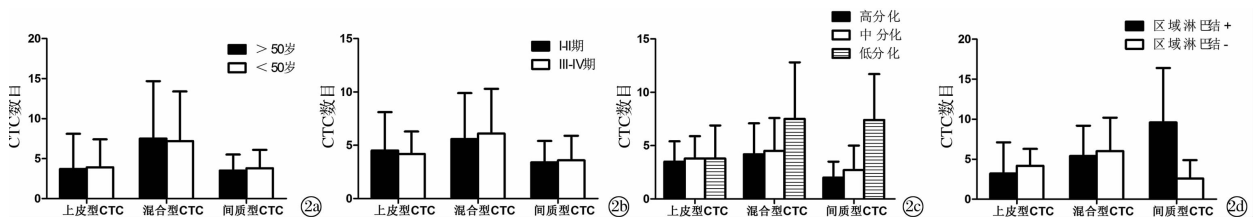
3 讨论

CTC 是指由肿瘤原发灶或转移灶脱落进入血液循环系统的肿瘤细胞。肿瘤病灶长至一定大小后, 即可发生 EMT, EMT 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程, 其主要的特征有细胞黏附分子表达的减少、细胞角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白为主的细胞骨架及形态上具有间充质细胞的特征等。发生 EMT 的肿瘤细胞由于具备间质细胞特征, 容易脱离原发病灶而进入血液循环成为 CTC。目前, 通过检测 CTC 来帮助临床诊断和判断预



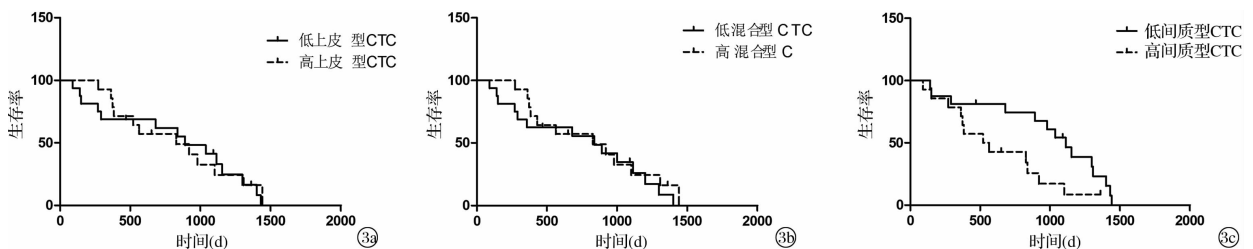
注: 1a~1d: 上皮型 CTC, 为 EpCAM、CK8/18/19 等上皮细胞标记物标记; 1e~1h: 混合型 CTC, 为上皮型和间质型双重标记; 1i~1l: 间质型 CTC, 为 vimentin、twist 等间质细胞标记物标记。

图 1 荧光显微镜下 ($\times 100$) 观察外周血中 CTC 计数 (每视野)



注: 2a: 年龄; 2b: 临床分期; 2c: 分化程度; 2d: CTC 分型。

图 2 卵巢癌患者外周血中 CTC 数与临床病理特征分析



注: 3a: 上皮型 CTC; 3b: 混合型 CTC; 3c: 间质型 CTC。

图 3 CTC 数目和卵巢癌患者无进展生存期关系

后,已经在很多常见肿瘤中实施。在卵巢癌中,CTC 的应用价值也已初步得到证实。Pearl 等^[7]通过 CD44 作为肿瘤标志物筛选 CTC,并对其在临床的应用进行分析后发现:CTC 在预测肿瘤进展和复发方面优于 CA125,因此更适合评价卵巢癌患者进行紫杉醇联合卡铂化疗后的疗效评价;采用 CAM 标记的细胞富集方法分离卵巢癌患者 CTC 后发现,在早期卵巢癌阶段既可以检测到 CTC,且 CTC 的数目和患者 OS 和 PFS 成负相关^[8];Sang 等^[9]采用 MAGE-A 基因作为筛选标记物筛选 CTC,发现 CTC 数目较高的患者生存期显著下降。本研究结果表明,卵巢癌患者 CTC 水平较高,并且同细胞低分化、转移、复发等不良预后因素相关,再次验证了上述研究结果。

CTC 作为一个极具潜力的肿瘤诊断和预后指标,目前仍然存在许多问题。其中最为重要的一点是缺乏标准的检测方法,由于 CTC 在循环系统中的含量极低,如何实现检测的高灵敏度和特异度至关重要^[10]。根据 CTC 的体积、密度、电荷和变形性等物理特征以及生物学特性的不同,已有多种技术应用于 CTC 的分离,比如在裂解红细胞后,在利用 CD45、CD14 等白细胞特异性表面抗原来去除白细胞,进而通过观察细胞体积、细胞核多倍体等判定 CTC,这类方法为负性分选;或用上皮细胞黏附分子(EpCAM)、CK8、人表皮生长因子受体(HER-2)等抗体进行细胞富集(正性分选)。本文采用的检测方法综合了目前的检测机制,通过对上皮细胞和间质细胞标记物进行细胞标记,并结合细胞形态学进行判定,提高了分离速度、效率与收获肿瘤细胞的纯度,而且能保持细胞的形态与性质,不仅可以检测上皮来源肿瘤,还可以检测间质来源肿瘤,同时便于后续对细胞的分析。

本研究初步发现 CTC 可以有助于卵巢癌患者预后的判断,良性疾病组均检测不到 CTC,而在分化较差的卵巢癌患者或者已经出现淋巴结转移的患者,CTC 数目显著增高,这提示 CTC 数目,尤其是间质型 CTC 数目同较差分化以及淋巴结转移等不良预后因素有关。CTC 预测肿瘤预后的作用已经在乳腺癌、结肠癌和前列腺癌得到证实^[11-13]。同时,由于血液 中发生 EMT 的 CTC 具有更高的转移能力,因此在理论上应该具有更好的预测价值。在本研究中,间质型 CTC 的水平与卵巢癌患者预后的关系更为密切,间质型 CTC 的数目增高提示较差的预后,可能提示临床医师在治疗上可以选择作用较强的方法。CTC 的另一个优势是允许非侵入性、多次、实时获取,因此对于患者在不同时间点进行连续性多次检测,可能更有利于评估治疗效果或预后。本研究由于样本量较少

及经费原因,未进行多次连续检测。

综上所述,卵巢癌患者 CTC 水平与分化不良、转移等不良临床特征有关,且在卵巢癌诊断和预后评估中有一定的价值,可用于卵巢癌的辅助诊断和预后评估。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Bacalbasa N, Balescu I, Dima S, et al. Ovarian sarcoma carries a poorer prognosis than ovarian epithelial cancer throughout all FIGO stages; a single-center case-control matched study [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(12): 7303-7308.
- [3] Gasiorowska E, Michalak M, Warchol W, et al. Clinical application of HE4 and CA125 in ovarian cancer type I and type II detection and differential diagnosis [J]. *Ginekol Pol*, 2015, 86(2): 88-93.
- [4] Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition; a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells [J]. *Pathobiology*, 2012, 79(4): 195-208.
- [5] Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Cancer. Circulating tumor cells [J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1186-1188.
- [6] Wu S, Liu S, Liu Z, et al. Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e123976.
- [7] Pearl ML, Dong H, Tulley S, et al. Treatment monitoring of patients with epithelial ovarian cancer using invasive circulating tumor cells (iCTCs) [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(2): 229-238.
- [8] Pearl ML, Zhao Q, Yang J, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 134(3): 581-590.
- [9] Sang M, Wu X, Fan X, et al. Multiple MAGE-A genes as surveillance marker for the detection of circulating tumor cells in patients with ovarian cancer [J]. *Biomarkers*, 2014, 19(1): 34-42.
- [10] Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(6): 539-544.
- [11] Cristofanilli M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer [J]. *Semin Oncol*, 2006, 33(3 Suppl 9): S9-S14.
- [12] Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(19): 3213-3221.
- [13] Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(11): 1136-1142.

收稿日期: 2015-10-12 编辑: 王国品