

循环肿瘤细胞检测预测尿路上皮癌淋巴结转移的价值

刘佳 曹煜东 汤星星 王硕 杨勇 张宁 杜鹏

北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所泌尿肿瘤外科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室 100142

通信作者:杜鹏,Email:dupeng9000@126.com

【摘要】目的 探讨采用叶酸受体探针标记的循环肿瘤细胞(CTCs)检测在预测尿路上皮癌淋巴结转移中的应用价值。**方法** 回顾性分析北京大学肿瘤医院 2017 年 9 月至 2019 年 9 月接受 CTCs 检测的 96 例尿路上皮癌患者的临床病理资料。男 74 例,女 22 例。年龄 40~87 岁,平均 62 岁。上尿路肿瘤(肾盂癌、输尿管癌)13 例,膀胱癌 83 例。12 例存在淋巴结转移。初发病例 77 例,复发病例 19 例。单病灶组 68 例,多病灶组 28 例。肿瘤 T 分期: T_a 期(非浸润性)29 例, T₁ 期(浸润固有层)42 例, T₂ 期(浸润肌层)16 例, ≥T₃ 期(肌层外侵犯)9 例。采集患者禁食 ≥8 h 后的外周血 3 ml,裂解、离心后加入免疫磁珠,再加入叶酸探针标记,最后进行扩增,计算每毫升血液中 CTCs 拷贝数值(CNC)。分析 CTCs 表达情况与病理结局的关系,采用 logistic 线性回归进行单因素和多因素分析发生淋巴结转移的危险因素。**结果** 所有患者 CNC 为 12.3 ± 7.3。≤62 岁组 CNC 为 10.8 ± 4.2, >62 岁组为 13.7 ± 9.2;初发病例 CNC 为 11.5 ± 5.3,复发病例为 15.5 ± 12.2;年龄($P=0.135$)及发病次数($P=0.087$)对 CNC 没有影响。病灶单发组 CNC 为 10.5 ± 5.2,多发组为 16.5 ± 9.7; T_a 期 CNC 为 8.2 ± 2.3, T₁ 期为 12.0 ± 4.4, T₂ 期为 16.4 ± 6.8, ≥T₃ 期为 19.5 ± 16.6;病灶数($P<0.001$)与病理 T 分期($P<0.001$)与 CNC 有显著相关性。单因素回归分析结果显示, T 分期($P<0.001$)、CNC($P=0.02$)与淋巴结转移相关;多因素分析结果显示仅 T 分期可以作为淋巴结转移的独立预测因素($P=0.002$)。**结论** CTCs 检测可以用于预测尿路上皮癌淋巴结转移。采用叶酸受体探针标记的 CTCs 可以用于尿路上皮癌的临床研究。

【关键词】 癌,移行细胞; 尿路上皮癌; 膀胱癌; 循环肿瘤细胞; 淋巴结转移; 危险因素

DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6702.2019.12.

The value of detection of circulating tumor cells in predicting lymph node metastasis of urothelial carcinoma

Liu Jia, Cao Yudong, Tang Xingxing, Wang Shuo, Yang Yong, Zhang Ning, Du Peng

Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Urological Surgery, Peking University Cancer Hospital and Institute, Beijing 100142, China

Corresponding author: Du Peng, Email: dupeng9000@126.com

【Abstract】Objective To investigate the application experience and predictive value of circulating tumor cells for urothelial carcinoma. **Methods** The clinical data of 96 patients with urothelial carcinoma treated by Beijing Cancer Hospital Urologic Department between September 2017 and September 2019 were analyzed retrospectively to evaluate relationship between the number of CTCs and pathological outcome. The mean age of the entire cohort was 62 (40–87) years, with 74 males and 22 females. There were 13 cases of upper urinary tract tumors (pyelocarcinoma and ureteral carcinoma), 83 cases of bladder carcinoma, and 12 cases of lymph node metastasis. There were 77 cases of primary onset and 19 cases of recurrence. 68 cases in single focus group and 28 cases in multiple group. There were 29 cases in non infiltrative T_a stage, 42 cases in infiltrative lamina propria T₁ stage, 16 cases in infiltrative muscle T₂ stage, and 9 cases in extramuscular ≥T₃ stage. At least 3ml of peripheral blood was collected after fasting for at least 8 hours. After cleavage and centrifugation, immunomagnetic beads were added, folate probe was added, and then amplification was carried out. Then the copy number of CTCs in each ml of blood was calculated. Logistic linear regression was used to analyze the risk factors of lymph node metastasis. **Results** The mean CNC of

all patients was 12.3 ± 7.3 ; the mean CNC of ≤ 62 years old group was 10.8 ± 4.2 ; the mean CNC of > 62 years old group was 13.7 ± 9.2 ; the mean CNC of initial cases was 11.5 ± 5.3 ; the mean CNC of recurrent cases was 15.5 ± 12.2 . Age ($P=0.135$) and frequency of onset ($P=0.087$) had no effect on the number of CTCs. The average CNC of single focus group was 10.5 ± 5.2 , multiple focus group was 16.5 ± 9.7 , T_a stage group was 8.2 ± 2.3 , T_1 stage group was 12.0 ± 4.4 , T_2 stage group was 16.4 ± 6.8 , and $\geq T_3$ stage group was 19.5 ± 16.6 . The number of lesions ($P < 0.001$) was significantly correlated with pathological T stage ($P < 0.001$) and the number of CTCs. Univariate regression analysis showed that T stage ($P < 0.001$) and the number of CTCs ($P = 0.02$) might be correlated with lymph node metastasis; multivariate analysis showed that only T stage could be used as an independent predictor of lymph node metastasis ($P = 0.002$). **Conclusions** CTCs can be used to predict lymph node metastasis of urothelial carcinoma. FR labeled CTCs can be used in the clinical study of urothelial carcinoma.

【Key words】 Carcinoma, transitional Cell; Urothelial carcinoma; Bladder cancer; Circulating tumor cells (CTCs); Lymph node metastasis; Risk factor

DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6702.2019.12.

尿路上皮癌包括肾盂癌、输尿管癌、膀胱癌、尿道癌,其中膀胱癌是世界范围内第9大常见肿瘤^[1]。我国膀胱癌发病率略低于欧美国家,但肾盂癌和输尿管癌发病率明显较高^[2]。尿路上皮癌作为一大类肿瘤,具有极为相似的病理和临床特征,常表现为多中心发病、高复发率、出现淋巴结转移的预后较差^[3]。尽早发现并采取积极的治疗手段是改善此类患者预后的关键,但目前尚缺乏准确而有效的肿瘤标志物。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)检测作为液态活检方式的一种,具有简便、微创、成本低、可重复性高等优势,近年来广泛应用于临床肿瘤学研究,已证实其与肺癌、宫颈癌、结肠癌、前列腺癌以及恶性淋巴瘤等多种肿瘤的转归存在显著关联^[4]。在尿路上皮癌领域,最新的一项 Meta 分析纳入了 30 项相关研究共 2 161 例患者,结果显示外周血细胞中的 CTCs 可以作为不良预后的独立预测因子^[5]。本研究回顾性分析北京大学肿瘤医院 2017 年 9 月至 2019 年 9 月接受 CTCs 检测的尿路上皮癌患者的临床和病理资料,探讨叶酸受体标记的 CTCs 检测在临床工作中的应用价值。

对象与方法

一、一般资料

本研究 96 例,男 74 例,女 22 例。年龄 40~87 岁,平均 62 岁。初发病例 77 例,复发病例 19 例。病灶单发 68 例,多发 28 例。肿瘤 T 分期: T_a 组(非浸润性)29 例, T_1 组(浸润固有层)42 例, T_2 组(浸润肌层)16 例, $\geq T_3$ 组(肌层外侵犯)9 例。所有患者围手术期影像学评估均无远处转移。上尿路肿瘤(肾盂癌、输尿管癌)13 例,均行肾输尿管全长切除术加肾蒂周围淋巴结清扫术,其中 3 例病理检查证

实淋巴结转移;膀胱癌 83 例,行经尿道膀胱肿瘤切除术 71 例,根治性膀胱切除术 12 例,根治手术患者均行标准盆腔淋巴结清扫术,9 例病理检查证实淋巴结转移。

二、CTCs 检测方法

术前采集患者禁食 ≥ 8 h 后的外周血 3 ml, EDTA 抗凝管 4°C 保存。2 h 内加入红细胞裂解剂,裂解后离心,加入去除白细胞的磁珠(表面携带 CD45、CD14B、CD11 抗体),洗涤,加入叶酸受体探针标记,洗涤未标记的细胞,PCR 扩增后计算每毫升血液中 CTCs 拷贝数值(copy number of CTCs, CNC)。

三、统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件处理数据,多组样本均数比较采用方差分析。为评估临床特征与淋巴结转移之间可能存在的关系,将患者临床病理特征和 CNC 作为预测因素,采用 logistic 线性回归进行单因素和多因素分析淋巴结转移的危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

本组 96 例的 CNC 为 12.3 ± 7.3 。根据临床病理特征分组, ≤ 62 岁组为 10.8 ± 4.2 , > 62 岁组为 13.7 ± 9.2 ,两组差异无统计学意义($P = 0.135$);初发病例为 11.5 ± 5.3 ,复发病例为 15.5 ± 12.2 ,两组差异无统计学意义($P = 0.087$);病灶单发组为 10.5 ± 5.2 ,多发组为 16.5 ± 9.7 ,两组间差异有统计学意义($P < 0.001$);病理分期 T_a 期为 8.2 ± 2.3 , T_1 期为 12.0 ± 4.4 , T_2 期为 16.4 ± 6.8 , $\geq T_3$ 期为 19.5 ± 16.6 ,组间比较差异有统计学意义($P < 0.001$)。

单因素结果显示, T 分期(HR 13.49, 95% CI 4.512~34.190, $P < 0.001$)和 CNC(HR 1.21, 95%

CI 1.070 ~ 1.373, $P = 0.020$) 与淋巴结转移有相关性, 而发病次数 ($HR 2.30, 95\% CI 0.612 \sim 8.642, P = 0.217$) 及病灶数 ($HR 2.82, 95\% CI 0.822 \sim 9.658, P = 0.099$) 与淋巴结转移无明显关系。多因素回归分析结果显示, T 分期 ($HR 16.05, 95\% CI 3.296 \sim 76.071, P = 0.002$) 是淋巴结转移的独立预测因素, 而 CNC ($HR 1.20, 95\% CI 0.982 \sim 1.464, P = 0.074$) 不是淋巴结转移的独立预测因素。

讨 论

根据恶性肿瘤的微转移假说, 当肿瘤大小超过 2 mm 时, 便可诱导血管生成, 进而在趋化因子的引导下, 一部分具有转移倾向的癌细胞迁移入血或体液, 被称为 CTCs^[6]。大部分的 CTCs 会在迁徙过程中死亡或变性, 少部分长期处于休眠状态, 只有极少数 CTCs 侵袭入原发灶以外的器官, 形成微转移灶。因此 CTCs 最早被广泛用于转移性前列腺癌、乳腺癌和结肠癌的研究^[4]。后来, 有学者在局限性癌症甚至是癌前病变的人群中也发现了 CTCs 的存在, 并证实其与肿瘤的进展和转移倾向存在一定的关联^[7]。

在尿路上皮癌领域, 关于 CTCs 的研究始于 2007 年。Gradilone 等^[8]对 26 例膀胱癌患者的外周血进行了 CTCs 检测, 其中 12 例局限性肿瘤均未检出 CTCs, 而 14 例转移性患者中 10 例 (71.4%) 检出 CTCs。Gallagher 等^[9]检测了 33 例转移性尿路上皮癌患者, 其中膀胱癌 20 例, 肾盂及输尿管癌 13 例; 转移灶 > 2 处的患者与仅有 1 处转移的患者相比, CTCs 数量明显增加 (3.5 与 0, $P = 0.04$)。Rink 等^[10]检测了 55 例接受膀胱癌根治手术患者的外周血 CTCs, 局限性患者的阳性率为 30%, 而转移患者为 100%; CTCs 数量越多, 患者预后越差。本研究结果显示, CTCs 数量与肿瘤的多中心性和病理 T 分期存在显著关系。单因素分析结果显示, CTCs 数量与淋巴结转移存在显著相关性; 在多因素分析中, 可能由于本研究例数不足, CTCs 数量仅显示出作为淋巴结转移预测因素的趋势, 但差异无统计学意义。而相关研究结果已明确, 在尿路上皮癌患者中, 淋巴结转移预示肿瘤特异性生存和总生存均显著变差, 临床上需要更加积极的治疗 (如早期联合化疗或免疫治疗)^[11]。上述研究结果均提示了 CTCs 在尿路上皮癌预后分析中所潜在的预测价值。

CTCs 最早被定义为体液中一种有核的、上皮起源的具有完整膜结构的大直径细胞。但随着研究的

不断深入, 证实其形态特征会随疾病的分级、分期产生变化。此外, 恶性肿瘤上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 理论也提示了 CTCs 存在表型变异。目前普遍认为 CTCs 的基本表型应该为 EpCAM⁺/CK⁺/CD45⁻, 但这类细胞也存在于一些良性疾病患者血液中^[12]。

CTCs 的检测方法很多, 包括梯度离心法、免疫细胞化学法、RT-PCR 以及流式细胞仪等。其中美国食品和药品监督管理局批准的 CellSearch 半自动检测系统应用最广泛, 目前国际上大多数关于膀胱癌类似研究均采用该系统。其采用的是梯度离心与免疫磁珠相结合的技术, 难度相对较低, 但研究结果已证实其敏感性不足。该技术一般需要约 7.5 ml 的外周血, 但每毫升血中可检测到的 CTCs 数量仅为 0 ~ 10 个^[13]。本研究采用的是我国自主研发的新型 CTCs 检测系统, 其由免疫磁珠富集纯化单元、靶向探针标记单元和荧光定量 PCR 单元组成, 相较于传统的 CellSearch 系统, 在计数方面具有更高的敏感性和特异性, 而且能够将提纯的细胞进行二代测序, 发现 CTCs 表面的基因表型变化。

本研究采用叶酸受体探针捕获活性 CTCs。叶酸受体是一种跨膜单链糖蛋白, 与叶酸结合后将其转运至细胞内, 在肿瘤细胞的 DNA 甲基化过程中扮演重要角色^[14]。研究结果已证实叶酸受体在肺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、鼻咽癌、前列腺癌、膀胱癌等大部分恶性肿瘤中均有特异性的高表达, 而在正常组织中极少表达^[15]。相较于传统的 EpCAM 和 CK 标记, 叶酸受体不受肿瘤异质性及 EMT 过程的影响, 检测结果更加可靠^[16]。但目前国内外使用叶酸受体标记的 CTCs 研究尿路上皮癌的文献报道罕见。Qi 等^[17]对比分析了 57 例膀胱癌、48 例健康对照以及 15 例膀胱良性病变患者血细胞及组织样本, 发现膀胱癌患者的叶酸受体表达水平远高于健康人群和膀胱良性病变患者; 而膀胱癌患者外周血叶酸受体标记的 CTCs 数量也远高于健康人群和膀胱良性病变患者。本研究结果显示, 96 例均检测到叶酸受体标记的 CTCs 表达, CNCs 为 12.28 ± 7.3 , 远高于目前报道的其他类似研究; CTCs 的数量与肿瘤的多中心性和病理 T 分期存在显著关系, 证实了叶酸受体标记的 CTCs 在尿路上皮癌临床研究中的可用性。

本研究受限于样本例数, 未将上尿路尿路上皮癌与膀胱癌进行分组比较, 而两者的转移和进展机制可能不尽相同, CTCs 出现的概率可能也会不同。

此外,因运用了新的检测方法,随访时间不足,故暂时无法对患者进行生存分析。

已有的研究表明,CTCs 检测不仅可以用于临床诊断和评估预后,还能评价治疗效果^[18]。但迄今为止,国内外相关报道均为小样本研究。本研究结果证实了 CTCs 数量可以作为尿路上皮癌淋巴结转移的一个预测因素;叶酸受体标记的 CTCs 可以用于尿路上皮癌的临床研究,在本研究中显示出了较高的敏感性。但要评估 CTCs 检测对于肿瘤生物学行为的影响以及作为治疗靶点的应用价值,仍需要更多、更大样本量以及更加深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends[J]. *Eur Urol*, 2017, 71: 96-108. DOI: 10. 1016/j. eururo. 2016. 06. 010.
- [2] 周利群,张雷. 上尿路尿路上皮癌临床诊疗关键及争议问题[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2017, 38: 881-884. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1000-6702. 2017. 12. 001.
- [3] 钟文龙,熊耕砚,张雷,等. 上尿路尿路上皮癌患者性别差异与预后分析:单中心 942 例报告[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2017, 38: 901-904. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1000-6702. 2017. 12. 005.
- [4] Cabel L, Proudhon C, Gortais H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 22: 421-430. DOI: 10. 1007/s10147-017-1105-2.
- [5] Zhang Z, Fan W, Deng Q, et al. The prognostic and diagnostic value of circulating tumor cells in bladder cancer and upper tract urothelial carcinoma: a meta-analysis of 30 published studies[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 59527-59538. DOI: 10. 18632/oncotarget. 18521.
- [6] Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 1508-1511. DOI: 10. 1200/JCO. 2010. 34. 0026.
- [7] Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 138. DOI: 10. 1186/1479-5876-10-138.
- [8] Gradilone A, Petracca A, Nicolazzo C, et al. Prognostic significance

of survivin-expressing circulating tumour cells in T1G3 bladder cancer[J]. *BJU Int*, 2010, 106: 710-715. DOI: 10. 1111/j. 1464-410X. 2009. 09130. x.

- [9] Gallagher DJ, Milowsky MI, Ishill N, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20: 305-308. DOI: 10. 1093/annonc/mdn627.
- [10] Rink M, Chun FK, Minner S, et al. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer[J]. *BJU Int*, 2011, 107: 1668-1675. DOI: 10. 1111/j. 1464-410X. 2010. 09562. x.
- [11] 袁易初,黄吉炜,陈勇辉,等. 淋巴血管侵犯对行上尿路尿路上皮癌根治术患者预后的影响[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2017, 38: 891-895. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1000-6702. 2017. 12. 003.
- [12] Pantel K, Deneve E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases[J]. *Clin Chem*, 2012, 58: 936-940. DOI: 10. 1373/clinchem. 2011. 175570.
- [13] Azevedo R, Soares J, Peixoto A, et al. Circulating tumor cells in bladder cancer: emerging technologies and clinical implications foreseeing precision oncology[J]. *Urol Oncol*, 2018, 36: 221-236. DOI: 10. 1016/j. urolonc. 2018. 02. 004.
- [14] Malara N, Coluccio ML, Limongi T, et al. Folic acid functionalized surface highlights 5-methylcytosine-genomic content within circulating tumor cells[J]. *Small*, 2014, 10: 4324-4331. DOI: 10. 1002/sml. 201400498.
- [15] Ledermann JA, Canevari S, Thigpen T. Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26: 2034-2043. DOI: 10. 1093/annonc/mdv250.
- [16] Luan C, Wang H, Han Q, et al. Folic acid-functionalized hybrid photonic barcodes for capture and release of circulating tumor cells[J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2018, 10: 21206-21212. DOI: 10. 1021/acsami. 8b06882.
- [17] Qi F, Liu Y, Zhao R, et al. Quantitation of rare circulating tumor cells by folate receptor alpha ligand-targeted PCR in bladder transitional cell carcinoma and its potential diagnostic significance[J]. *Tumour Biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2014, 35: 7217-23. DOI: 10. 1007/s13277-014-1894-0.
- [18] Wang LH, Pfister TD, Parchment RE, et al. Monitoring drug-induced gammaH2AX as a pharmacodynamic biomarker in individual circulating tumor cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 1073-1084. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-09-2799.

(收稿日期:2019-10-13)

(本文编辑:黄鹿)