

叶酸受体阳性循环肿瘤细胞检测诊断早期肺癌

张孝侠¹, 吴友涛², 杨海霞¹

1. 山东省济宁医学院济宁市第二人民医院检验科, 山东 济宁 272011; 2. 济宁市第二人民医院

摘要:目的 探讨叶酸受体(FR)阳性循环肿瘤细胞(CTC)检测对早期肺癌的诊断效能。方法 选取济宁市第二人民医院 2017 年 1 月-2018 年 1 月入治的可疑肺癌患者 50 例,测试中所有的患者收集血液样本,前肘脉操作和储存在 4 ℃ 24 h 完成血液处理,所有的患者执行 FR 阳性 CTC 检测。结果 术后病理诊断结果显示,早期肺癌 35 例,肺良性病变 15 例的 FR 阳性 CTC 分别为(11.35±2.14) FU/3 ml、(8.31±2.12) FU/3 ml,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。根据此结果为诊断肺癌的金标准,kappa 一致性检查显示 FR 阳性 CTC 诊断肺结节具有一定的准确性(kappa=0.649, $P<0.05$)。以 FR 阳性 CTC 作为肺癌的诊断指标,其 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.837(95%CI 为 0.650~1.000),截断值为 8.69 FU/3 ml,诊断灵敏度为 88.32%、特异度为 76.56%。结论 FR 阳性 CTC 检测对早期肺癌的诊断效能较好,可广泛推广。通过 FR 阳性 CTC 检测可以进行孤立性肺结节、诊断早期肺癌判别筛选,将结果作为生物标志物有效结果。同时,可以通过深层次检验,实施大样本前瞻性实验证明上述结论。

关键词:叶酸受体阳性循环;肿瘤细胞检测;早期肺癌;诊断效能

中图分类号:R446.1

文献标识码:A

文章编号:1003-5052(2020)04-169-02

DOI:10.16286/j.1003-5052.2020.04.075

很多肺癌患者通常有一个相对有限的生存概率诊断和治疗,晚期阶段肺癌的生存概率相对较低。肺癌的早期诊断和完整切除可以在一定程度上提高患者的生存率。目前临床上鉴别肺部结节的良恶性主要途径是成像、肿瘤标志物和组织病理学检查。对于早期肺癌及癌前病变标志物的含量相对有限,在一定程度上影响了最终诊断的准确性,但病变部位的影像学检测发现,如果不及时进行,也会导致肿瘤病变的趋势。叶酸受体(FR)的表达在皮肤恶性肿瘤细胞相对较高,肺癌和卵巢癌细胞配体的目标酶聚合酶链反应可用于检测肺癌 FR 阳性循环肿瘤细胞(CTC)检测。本研究通过 ligand-targeted PCR 胸部 CT 检测 FR 阳性 CTC 疑似孤立肺结节患者的肺癌,讨论对于早期肺癌诊断的有效性,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取我院 2017 年 1 月-2018 年 1 月收治的疑似肺癌患者 50 例为研究对象,其中男性 22 例,女性 28 例;年龄 41~75 岁,平均(58.62±4.31)岁;根据术后病理诊断结果显示:早期肺癌 35 例,肺良性病变 15 例。纳入标准:(1)患者无症状或表现为咳嗽、胸部胀痛、低热等,胸部 CT 检查提示为可疑肺癌的孤立性肺部结节,未伴有纵隔淋巴结肿大或其他转移灶;(2)知情自愿参与本次研究,且

签署知情同意书。排除标准:(1)胸部 CT 检查显示肺多发结节者;(2)既往接受手术及放化疗者;(3)肺部肿瘤复发患者。

1.2 FR 阳性 CTC 检测 即将进行手术时抽取全部患者肘前静脉血 3 ml,EDTA 抗凝,储存于 4 ℃ 环境下,24 h 内完成血液处理并开展 FR 阳性 CTC 的检测。首先使用免疫磁珠负向富集法,在 3 ml 外周血中将 CTC 捕获,之后使用配体靶向 PCR 法对 FR 阳性 CTC 进行定量检测。检测试剂盒由格诺思博生物有限公司提供。通过试剂盒说明书进行操作,将红细胞裂解液放入 3 ml 全血样本中,4 ℃ 裂解 15 min,将红细胞去除,之后放入 150 μl 的抗 CD45 磁珠和 50 μl CD14 磁珠,4 ℃ 进行 30 min 孵育,将白细胞和巨噬细胞清除;将 CTC 加入 10 μl 的具有肿瘤特异性叶酸配体-寡核苷酸偶合物的探针标记液,在室内进行 30 min 孵育,之后将 1 ml 的洗涤缓冲液加入到上述样品中,4 ℃,500 g,进行 10 min 离心处理,共进行 3 次,将未结合的探针去除,之后加入 120 μl 的洗脱缓冲液,4 ℃ 进行 2 min 的孵育,洗脱下已完成结合的探针;对结合的探针进行离心收集,将 24 μl 中和缓冲液放入其中,主要作用为荧光定量 PCR 扩增,使用 ABI7300 仪器完成 PCR 信号与数据的收集。在 3 ml 血液中检测到 1 个 FR 阳性 CTC,则定义为 1 Folate Unit(自我定义测量单位)。

1.3 统计学处理 此次研究中,应用的数据统计软

作者简介:张孝侠,硕士,实验师,研究方向:医学检验

通讯作者:张孝侠,E-mail:zhangzhen19837@163.com

件为 Excel,通过 SPSS 20.0 软件进行系统分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行 t 检验,计数资料用 % 表示,行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

根据术后病理诊断结果显示早期肺癌 35 例,肺良性病变 15 例。术后病理诊断结果显示早期肺癌 35 例,肺良性病变 15 例的 FR 阳性 CTC 分别为 (11.35 ± 2.14) FU/3 ml、 (8.31 ± 2.12) FU/3 ml,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。以 FR 阳性 CTC 作为肺癌的诊断指标,其 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.837 (95%CI 为 0.650~1.000),截断值为 8.69 FU/3 ml,诊断灵敏度为 88.32%、特异度为 76.56%。

3 讨论

肺癌的发病率与死亡率重要决定性因素之一为肺小结中第一检出无肿瘤相关的因素,其与肺癌及肺结节间有较高影响,当前尚且无准确对肺癌肿瘤标志物进行预测及标记的物质,通过可靠的技术能够实现对外周肿瘤血细胞的检查,实现可靠的技术再生隔离,同时对外周的血肿瘤细胞进行检测,但因为方式的限制,在检查中,没有标准的 CTC 测试方法,在临床实践中,早期检测 CTC 细胞系统能够对肿瘤细胞的形态进行呈现,CTC 技术应用原理基础为细胞形态学差异,根据细胞的表面形态特征,分析肿瘤细胞数据,而不需要细胞表面信息^[1]。其优点是它不依赖于 CTC 表面抗原,CTC 的形态和活动保持不变,但其纯度很低,很容易失去小直径 CTC。FR 是肺癌中高度表达,特别是在非小细胞肺癌细胞的表面,FR 表面细胞没有 FR 健康的血细胞^[2]。因此,理想的目标检测为 FR 阳性 CTC。在这项研究中,folate-linked deoxyoligonucleotides 被 ligand-specific 标签聚合酶链式反应(PCR)和量化定量聚合酶链反应(Q-PCR)。CTC 是放大了至少 500 000 表面受体分子^[3]。

通过 5 000 000 的高保真放大和实时检测 PCR 分子,实现最终的双层次的放大,能够完成最终检测 CTC 3 ml 血液样本效果,检测设备极大地提高了 CTC 的敏感性检测^[4]。CTC 测试中发挥着关键作用不仅在肺癌的诊断,而且在肺癌的治疗和预后。CTC 检测不仅在肺癌诊断中起重要作用,其在肺癌治疗评价和预后判断当中也扮演着重要角色。根据相关临床研究显示,CTC 计数与肺癌患者无进展生存期(PES)和总生存期(OS)呈负相关关系,多因素分析显示 CTC 计数可预测患者的 PES 和 OS^[5]。并且相关临床研究显示使用 Ceusearch 系统对于 CTC 进行检测,CTC 计数变化能够作为预测 OS 的指标之一^[6]。

研究肺癌患者根据 fr-positive ctc 计数 PFS 和手术预测系统,在早期肺癌患者有较好应用效果。由此可见,借助 FR 阳性 CTC 检测能够进行孤立性肺结节、诊断早期肺癌判别筛选,将结果作为生物标志物有效结果。同时,可以通过深层次检验,实施大样本前瞻性实验证明上述结论。

参考文献

- [1] 陈罗军,李娜,宋启斌,等.FR α 联合 EpCAM 用于非小细胞肺癌循环肿瘤细胞的检测[J].临床肿瘤学杂志,2018,23(11):1012-1016.
- [2] 苏雷,支修益,张毅,等.56 例循环肿瘤细胞检测阳性的亚厘米肺结节患者术后病理分析[J].医学研究杂志,2019,48(5):51-54.
- [3] 刘慧敏,刘远洪,陈晓青,等.叶酸受体介导的宫颈特殊染色检测宫颈上皮内瘤变的价值[J].中国微创外科杂志,2018,18(10):885-887.
- [4] 陈玉霞,刘艳红.叶酸受体介导的宫颈特殊染色在宫颈异常病变中的临床筛查意义[J].临床医学工程,2018,25(10):1417-1418.
- [5] 潘世泽,汪巍,方一凡,等.叶酸受体阳性循环肿瘤细胞检测对早期肺癌的诊断效能[J].山东医药,2017,57(47):69-72.
- [6] 杨畅,胡珺,赵青,等.叶酸靶向荧光量子点脂质体纳米探针的体内外评价研究[J].中国药理学杂志,2018,53(3):210-217.

责任编辑:康金东,校对:苏秋玲