

外周血叶酸受体阳性循环肿瘤细胞检测 在非小细胞肺癌筛查中的应用价值

唐兴, 蒋东, 赵军

苏州大学附属第一医院胸外科, 江苏 苏州 215006

摘要:目的 观察非小细胞肺癌患者外周血叶酸受体阳性循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)水平变化, 探讨外周血叶酸受体阳性 CTCs 在非小细胞肺癌筛查中的应用价值。方法 非小细胞肺癌患者 136 例为肺癌组, 肺部良性病变患者 10 例为良性病变组, 健康志愿者 54 例为对照组。3 组均采用以叶酸受体为靶点的免疫磁珠阴性富集+实时荧光定量 PCR 法检测外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平; 采用化学发光免疫分析法检测血清癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)、糖链抗原(carbohydrate antigen, CA)125、CA724、细胞角蛋白 19 片段(cytokeratin 19 fragment, CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)水平。比较 3 组 CTCs 水平; 比较不同临床特征非小细胞肺癌患者 CTCs 水平; 绘制 ROC 曲线, 评价 CTCs 及血清 CEA、CA125、CA724、CYFRA21-1、NSE 5 项指标联合诊断非小细胞肺癌的价值。结果 肺癌组 CTCs 水平[11.21(8.58, 15.30) FU/3 mL]高于良性病变组[7.55(5.23, 10.25) FU/3 mL]和对照组[4.95(3.55, 7.62) FU/3 mL]($P < 0.05$), 良性病变组高于对照组($P < 0.05$)。TNM 分期 I、II、III、IV 期非小细胞肺癌患者 CTCs 水平[11.00(8.58, 13.30)、13.25(10.48, 16.88)、14.77(11.47, 16.55)、17.89(17.07, 19.22) FU/3 mL]两两比较差异均有统计学意义($H = 16.443, P < 0.05$); 不同年龄、性别、肿瘤最大径、T 分期、分化等级、病理类型非小细胞肺癌患者 CTCs 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。ROC 曲线分析结果显示, CTCs 以 8.70 FU/3 mL 为最佳截断值, 诊断非小细胞肺癌的 AUC 为 0.953(95% CI: 0.926~0.979, $P < 0.05$), 灵敏度为 79.40%, 特异度为 98.10%, 诊断效能优于 CEA、CA125、CA724、CYFRA21-1、NSE 联合检测。结论 非小细胞肺癌患者外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平升高, 且增高程度与 TNM 分期有关; 外周血叶酸受体阳性 CTCs 可用于非小细胞肺癌的早期筛查。

关键词:非小细胞肺癌; 循环肿瘤细胞; 叶酸受体阳性

Peripheral blood folate receptor-positive circulating tumor cells detection in the screening of non-small cell lung cancer

TANG Xing, JIANG Dong, ZHAO Jun

Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China

Corresponding author: ZHAO Jun, E-mail: 107210415@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the application value of peripheral blood folate receptor-positive circulating tumor cells (CTCs) detection to the screening of non-small cell lung cancer (NSCLC) by observing the changes of CTCs in NSCLC patients. **Methods** The CTCs levels were detected by tumor specific folate ligand oligonucleotide conjugates and real-time fluorescence quantitative PCR in 136 patients with NSCLC (NSCLC group), 10 patients with benign lung diseases (benign group) and 54 healthy volunteers (control group). The serum carcino-embryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA)125, CA724, cytokeratin 19 fragments (CYFRA21-1) and neuron-specific enolase (NSE) were detected by chemiluminescence immunoassay. The levels of CTCs were compared among groups, and among patients with different clinical features. ROC was drawn to assess the values of CTCs combined with serum CEA, CA125, CA724, CYFRA21-1 and NSE to the diagnosis of NSCLC. **Results** The level of CTCs was higher in NSCLC group (11.21(8.58, 15.30) FU/3 mL) than that in benign group (7.55(5.23, 10.25) FU/3 mL) and control group (4.95(3.55, 7.62) FU/3 mL) ($P < 0.05$), and higher in benign group than that in control group ($P < 0.05$). Significant statistic difference was found in multiple comparison in the level of CTCs among TNM stage I, II, III and IV (11.0(8.58, 13.30), 13.25(10.48, 16.88), 14.77(11.47, 16.55), 17.89(17.07, 19.22) FU/3 mL) ($H = 16.443, P < 0.05$). There were no significant differences in CTCs level among different ages, genders, maximum diameters of tumors,

T stages, differentiated degrees and pathological types ($P>0.05$). When the optimal *cut-off* value of CTCs was 8.70 FU/3 mL, the AUC was 0.953 (95%CI: 0.926-0.979, $P<0.05$), the sensitivity was 79.40%, and the specificity was 98.10%. The diagnostic efficacy of CTCs was superior to the joint detection of CEA, CA125, CA724, CYFRA21-1 and NSE. **Conclusion** The level of folate receptor-positive CTCs in peripheral blood increases in NSCLC patients, and is correlated with TNM stage. The detection of peripheral blood folate receptor-positive CTCs can be used in the early screening of NSCLC.

Keywords: non-small cell lung cancer; circulating tumor cells; folate receptor-positive

近年来,我国肺癌发病率和病死率居恶性肿瘤首位^[1]。常见血清肿瘤标志物如癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)已广泛用于肺癌的诊断,但其单独诊断的灵敏度和特异度有一定局限性^[2]。液体活检技术通过非侵入性的取样方式从外周血获取循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)进行分析,方便快捷,可重复性好,易操作,在肺癌的早期诊断、疗效及预后评估、抗肿瘤药物研发等过程中有一定价值^[3]。本研究探讨外周血叶酸受体阳性 CTCs 在非小细胞肺癌筛查中的应用价值,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2016年1月—2019年12月苏州大学附属第一医院行手术治疗的非小细胞肺癌患者136例为肺癌组,男55例,女81例;年龄31~81(65.68±20.14)岁;其中鳞癌14例,腺癌120例,腺鳞癌1例,大细胞癌1例。入选标准:(1)均首次行手术治疗,术后组织病理证实为非小细胞肺癌;(2)临床资料完整。排除标准:(1)术前接受过放、化疗或靶向治疗者;(2)有其他恶性肿瘤者;(3)临床资料不完整者;(4)不配合资料提供和标本采集者。同期诊治肺部良性病变患者10例为良性病变组,男8例,女2例;年龄24~72(46.34±16.39)岁;其中炎性病变6例,肺结核2例,肺大泡2例。入选标准:(1)经影像学或实验室检查等确诊为肺部良性病变;(2)临床资料完整。排除标准:(1)有其他严重器质性疾病或精神疾病者;(2)临床资料不完整者;(3)不配合资料提供和标本采集者。同期体检健康者54例为对照组,男36例,女18例;年龄20~65(49.2±18.33)岁。本研究经苏州大学附属第一医院伦理委员会批准通过,研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 采集各组临床资料,包括年龄、性别及肺癌患者肿瘤最大径、TNM分期、分化等级、病理类型。

1.2.2 外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平检测 采用以叶酸受体为靶点的免疫磁珠阴性富集+实时荧光定量 PCR 法,叶酸受体细胞检测试剂盒购自格诺思博生物科技南通公司。取患者肘正中静脉血 3 mL,加入细胞裂解液 12 mL,混匀后 4 °C 孵育 15 min,反复离心去

除红细胞;加入反应缓冲液 1 mL 反复吹打,重悬沉淀后离心静置;加入 150 μL 抗 CD45 磁珠和 50 μL 抗 CD14 磁珠,涡旋振荡后充分混匀,4 °C 孵育 30 min;加入反应缓冲液 120 μL,置于磁场中 10 min,去除白细胞和单核巨噬细胞;取上清液,离心后得到沉淀物即为富集的 CTCs。加入细胞活化液 10 μL,反复吹打,重悬沉淀后离心,去除目标肿瘤细胞上所结合的叶酸,以空出叶酸结合位点;加入反应缓冲液 120 μL,室温平衡后涡旋振荡,4 °C 孵育,去除细胞上非特异性核酸结合位点后离心静置;加入探针标记液 10 μL(该探针在叶酸受体表面标记了一段 16 bp 的寡核苷酸链,作为后续 PCR 的检测模板),室温平衡后涡旋振荡,4 °C 孵育 40 min;加入细胞洗涤液终止反应后离心;加入细胞洗涤液 120 μL,去除过量未结合的探针,离心后吸取上清液,再加入细胞洗脱液 24 μL 反复吹打,充分重悬沉淀后离心,洗脱肿瘤细胞上结合的叶酸表面标记的探针,用反应中和液中和强酸性的洗脱液后 2~8 °C 保存。应用瑞士罗氏公司 PCR 反应仪,采用实时荧光定量 PCR 法检测叶酸受体阳性 CTCs。PCR 反应体系:反应液 12.5 μL,引物及探针 1 μL,去离子水 9 μL。反应条件:95 °C 变性 2 min,40 °C 退火 30 s,60 °C 延伸 1 min,8 °C 冷却 5 min,95 °C 变性 1 min,40 个循环,95 °C 变性 10 s,35 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 5 s。35 °C 退火时,检测荧光信号 5-羧基荧光素,并用 ROX 进行校正。计算出各校准品循环 Ct 值均值,进行线性回归分析(纵坐标为校准品所检 Ct 值均值,横坐标为标示值的对数值)得出相应的校准品定量曲线图,根据定量曲线图计算所检测血液样品每个复孔数值,计算所检测血液样品与 PCR 质控品的均值,结果用叶酸受体单位(folate receptor unit, FU)表示。PCR 引物由格诺思博生物科技南通公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

项 目	引物序列
RT22-1	5'-TCAACTGGTGTCTGGAGTTCGGCAATTCAGT-TGAGGGTTCTAA-3'
FP16-5	5'-TATGATTATGAGGCATGA-3'
RP22-1	5'-GGTGTCTGGAGTTCG-3'
TaqM-4	5'-FAM-CAGTTGAGGGTTC-MGB-3'

1.2.3 血清学指标检测 于入院次日清晨采集空腹外周静脉血 5 mL,保存于含 EDTA 抗凝管中。离心半径 10 cm, 3 000 r/min 离心 20 min 分离血清, -80 °C 冰箱保存。应用 I2000SR 化学发光免疫分析仪及配套试剂(美国 Abbott 公司),采用化学发光免疫分析法测定血清 CEA、糖类抗原(carbohydrate antigen, CA) 125、CA724、细胞角蛋白 19 片段(cytokeratin 19 fragment, CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)水平均严格按照试剂盒说明书进行操作。各指标正常参考值: CEA < 5 μg/L, CA125 < 35 u/mL, CA724 < 6 u/mL, CYFRA21-1 < 3.07 μg/L, NSE < 7 μg/L。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,非正态分布计量资料以中位数(四分位数) [M(Q₁, Q₃)]表示,2 组比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,事后两两比较采用 Bonferroni 法;计数资料采用 χ² 检验;绘制 ROC 曲线,评估外周血叶酸受体阳性 CTCs 及血清 CEA、CA125、CA724、CYFRA21-1、NSE 诊断非小细胞肺癌的效能;检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 3 组外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平比较 肺癌组、良性病变组、对照组外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平比较差异均有统计学意义 [11.21(8.58, 15.30) FU/3 mL, 7.55(5.23, 10.25) FU/3 mL, 4.95(3.55, 7.62) FU/3 mL] (H = 88.665, P = 0.018), 肺癌组外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平高于良性病变组及对照组 (P = 0.026), 良性病变组外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平高于对照组 (P = 0.031)。

2.2 不同临床特征非小细胞肺癌患者外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平比较 TNM 分期 I、II、III、IV 期者外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平比较差异均有统计学意义 (P < 0.05)。IV 期者外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平高于 III 期者 (P = 0.015), III 期者高于 II 期者 (P = 0.032), II 期者高于 I 期者 (P = 0.036)。不同年龄、性别、肿瘤最大径、T 分期、分化等级、病理类型者外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平比较差异均无统计学意义 (P > 0.05)。见表 2。

表 2 不同临床特征非小细胞肺癌患者外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平比较 [M(Q₁, Q₃)]

项目	例数	CTCs/(FU/3 mL)	U/H 值	P 值
年龄			862.500	0.249
<60 岁	61	10.7(9.07, 13.23)		
≥60 岁	75	11.75(9.56, 14.35)		
性别			1002.500	0.739
男	55	11.23(8.99, 13.59)		
女	81	11.14(9.80, 14.15)		

续表

项目	例数	CTC/(FU/3 mL)	U/H 值	P 值
肿瘤最大径			808.500	0.322
≤3 cm	124	11.09(9.29, 13.64)		
>3 cm	12	12.00(10.07, 15.74)		
T 分期			2.799	0.254
T ₁	119	11.09(9.29, 13.64)		
T ₂	13	11.43(9.15, 15.39)		
T ₃	3	12.88(11.75, 16.34)		
T ₄	1	11.23		
TNM 分期			16.443	0.001
I	99	11.00(8.58, 13.30)		
II	22	13.25(10.48, 16.88)		
III	12	14.77(11.47, 16.55)		
IV	3	17.89(17.07, 19.22)		
分化等级			1.717	0.424
G ₁	92	11.30(10.10, 13.59)		
G ₂	18	10.55(6.79, 13.65)		
G ₃	26	11.70(9.61, 15.65)		
病理类型			2.380	0.497
腺癌	120	11.30(4.46, 13.80)		
鳞癌	14	10.58(6.95, 14.07)		
腺鳞癌	1	14.70		
大细胞癌	1	12.88		

2.3 外周血叶酸受体阳性 CTCs 及血清 CEA、CA125、CA724、CYFRA21-1、NSE 诊断非小细胞肺癌的效能 CTCs、CEA、CA125、CA724、CYFRA21-1、NSE 单独及联合检测时最佳截断值见图 1 及表 3。

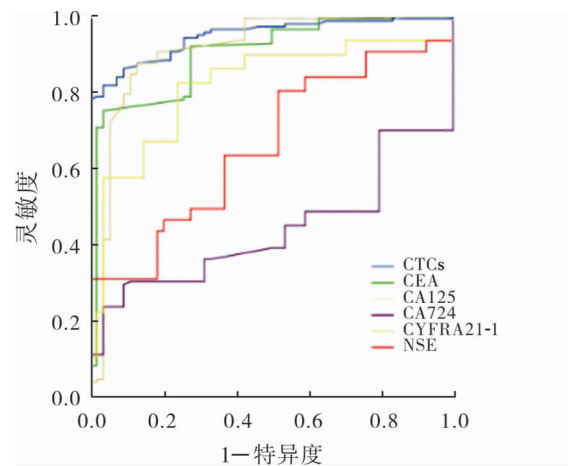


图 1 外周血叶酸受体阳性 CTCs 及血清 CEA、CA125、CA724、CYFRA21-1、NSE 诊断非小细胞肺癌的 ROC 曲线图

表 3 各指标诊断非小细胞肺癌的 ROC 曲线结果

项目	最佳截断值	AUC	95%CI	灵敏度/%	特异性/%	P 值
CTCs	8.70 FU/3 mL	0.953	0.926~0.979	79.40	98.10	<0.001
CEA	5 μg/L	0.904	0.857~0.951	5.88	90.74	<0.001
CA125	35 u/mL	0.914	0.859~0.969	3.68	96.30	<0.001
CA724	6 u/mL	0.441	0.362~0.521	9.56	96.30	0.206
CYFRA21-1	3.07 μg/L	0.821	0.757~0.885	17.65	96.30	<0.001
NSE	7 μg/L	0.665	0.585~0.745	7.35	100.00	<0.001
CEA+CA125+CA724+CYFRA21-1+NSE		0.862	0.596~0.896	25.74	75.93	<0.001

3 讨论

健康人的血液循环中很少有细胞能表达叶酸受体。叶酸受体在上皮源性恶性肿瘤,如肺癌、卵巢癌等中呈高表达甚至过表达。Nunez 等^[4]研究结果证实,约75.7%的非小细胞肺癌患者高表达叶酸受体,肺腺癌细胞表面叶酸受体数量明显多于肺鳞癌细胞。因此,叶酸受体可作为鉴别非小细胞肺癌 CTCs 的潜在细胞表面标志物。

本研究根据配体靶向 PCR 反应的检测原理,由叶酸类似物和寡核苷酸链两部分构成检测探针。叶酸类似物能够与 CTCs 上的 α -叶酸受体相结合,而寡核苷酸链主要用于后续的 PCR 扩增分析。单个 CTC 能够结合数以万计个探针,通过 PCR 扩增后,一个探针被放大千万倍,因此,即使是含量极少的 CTCs 也可在少量血液中被检测出来。本研究结果显示,肺癌组外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平明显高于良性病变组和对照组,TNM 分期 I、II、III、IV 期者外周血叶酸受体阳性 CTCs 水平依次升高,表明叶酸受体阳性 CTCs 对非小细胞肺癌的早期诊断具有一定价值。

肿瘤标志物是由肿瘤组织刺激产生并分泌到血液或体液中的物质,包括蛋白质、酶、激素和多巴胺、癌基因产物。CEA 是癌胚抗原相关黏附分子家族的成员,不仅广泛应用于肺癌早期诊断,亦可用于肺癌治疗疗效监测。肺癌患者血清 CEA 明显高于肺良性组织病变者和对照组,非小细胞肺癌患者血清 CEA 高于小细胞肺癌患者^[5-6]。Ding 等^[7]研究结果发现,检测 CEA 可提高肺腺癌诊断率。CA125 和 CA724 均是糖链抗原物质,在临床用于肺癌的辅助诊断。CYFRA21-1 是一种细胞角蛋白 19 的可溶性片段,主要来源于上皮肿瘤组织,对鳞癌诊断的灵敏度较高^[8]。NSE 有神经内分泌特性,可鉴别不同肺癌组织病理类型^[9]。因为单个血清肿瘤标志物诊断的灵敏度和特异度相对较低,临床常联合检测多种肿瘤标志物,以提高肿瘤的筛查率。有研究^[10-11]发现,联合检测血清 CEA、CA125、NSE、CYFRA21-1 等 6 种标志物在肺癌诊断及病理分型诊断中有一定价值,可提高检测灵敏度。本研究结果显示,5 种肿瘤标志物联合检测诊断非小细胞肺癌的灵敏度为 25.74%,特异度为 75.93%,灵敏度较低可能是由于入组的 I 期和 II 期肺癌患者有 121 例,5 种肿瘤标志物阳性率相对较低。

Chen 等^[12]研究发现,236 例非小细胞肺癌患者外周血叶酸受体阳性 CTCs 以 8.93 FU/3 mL 为最佳截断值,诊断非小细胞肺癌的灵敏度和特异度分别为 74.4% 和 86.6%。连欢欢等^[13]研究发现,97 例非小细胞肺癌患者外周血叶酸受体阳性 CTCs 以 8.70 FU/3 mL 为最佳截断值,诊断肺癌的灵敏度和特异度分别为 82.5% 和 72.2%。本研究结果显示,外周血叶酸受体阳性 CTCs 以 8.70 FU/3 mL 为最佳截断值,

诊断非小细胞肺癌的 AUC 为 0.953,灵敏度为 79.40%,高于上述其他 5 种肿瘤标志物联合检测,与上述研究结果相近。

本研究结果提示,检测外周血叶酸受体阳性 CTCs 具有操作简便、精准客观、可重复性高、非侵入性等优点,可作为早期肺癌筛查的指标之一。但本研究为单中心回顾性研究,数据选择存在一定的偏差,且部分患者随访资料缺失,未做进一步预后生存分析,外周血叶酸受体阳性 CTCs 检测在非小细胞肺癌诊断中的应用价值需进一步研究证实。

参考文献

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 代婉清,周英欣,李金金,等. 肺癌患者血清癌胚抗原和 Ki-67 对预测预后的作用[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(2): 177-180.
- [3] 肖庆清,吴兆红,谭博,等. 循环肿瘤细胞联合癌胚抗原检测在非小细胞肺癌中的临床价值[J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(7): 859-863, 868.
- [4] NUNEZ M I, BEHRENS C, WOODS D M, et al. High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and mutation[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(5): 833-840.
- [5] ZHAO W, YU H X, HAN Z F, et al. Clinical significance of joint detection of serum CEA, SCCA and bFGF in the diagnosis of lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8): 9506-9511.
- [6] HOLDENIEDER S, WEHNL B, HETTWER K, et al. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2017, 116(8): 1037-1045.
- [7] DING C, ZHOU X F, XU C, et al. Circulating tumor cell levels and carcinoembryonic antigen: an improved diagnostic method for lung adenocarcinoma[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(11): 1413-1420.
- [8] CUI C, SUN X, ZHANG J, et al. The value of serum CYFRA21-1 as a biomarker in the diagnosis of patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10(2): 131-134.
- [9] 黄冬云,许文景,周锐,等. 血清 CYFRA21-1、NSE 和 CEA 在非小细胞肺癌辅助诊断中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(6): 1378-1380.
- [10] 刘琳娟,张书耕,张青云,等. 肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(2): 177-179.
- [11] 陈倩倩,宋佳,孙淑艳. 五种肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(7): 1597-1598.
- [12] CHEN X X, ZHOU F, LI X F, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cell detected by LT-PCR-based method as a diagnostic biomarker for non-small-cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(8): 1163-1171.
- [13] 连欢欢,丁志丹,袁东风,等. 应用 FR 靶向 PCR 法检测 CTC 在肺癌诊断中的临床价值: 初步研究[J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(12): 813-820.

收稿日期: 2020-10-29 修回日期: 2020-11-21 本文编辑: 李立华