

叶酸受体阳性循环肿瘤细胞联合肿瘤标记物检测对 NSCLC 诊断价值

秦坤¹, 金翔凤¹, 衣腾飞¹, 李烁¹, 孙昭赞², 刘玉洪¹

(1 青岛大学附属医院胸外科, 山东 青岛 266003; 2 复旦大学附属上海市第五人民医院)

[摘要] 目的 探讨叶酸受体阳性循环肿瘤细胞(FR⁺-CTCs)联合肿瘤标志物外周血癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)检测在非小细胞肺癌(NSCLC)诊断中的价值。方法 对 146 例 NSCLC 病人(肺癌组)、25 例肺良性疾病病人(肺良性疾病组)和 20 例健康体检者(健康对照组)的 CEA、CYFRA21-1 和 FR⁺-CTCs 检测结果进行回顾性分析,利用受试者工作特征(ROC)曲线分析各指标诊断价值。结果 肺癌组 FR⁺-CTCs 阳性率(75.3%)较健康对照组(5.0%)和肺良性疾病组(8.0%)明显升高($\chi^2=11.412, P<0.01$)。肿瘤直径和肿瘤分期是影响 NSCLC 病人 FR⁺-CTCs 表达的主要因素($Z=2.354, P<0.01; H=9.924, P<0.01$),与病人的年龄、性别、有无吸烟史无关($P>0.05$)。NSCLC 组 CEA、CYFRA21-1 及 FR⁺-CTCs 联合检测的曲线下面积(AUC)为 0.778 (95%CI=0.720~0.816),诊断灵敏度为 77.50%,特异度为 78.08%,与 CYFRA21-1、CEA 联合检测(AUC=0.707, 95%CI=0.660~0.756, 诊断灵敏度为 66.53%,特异度为 71.95%)相比有更高的诊断价值。结论 FR⁺-CTCs 联合肿瘤标志物 CEA、CYFRA21-1 检测可提高 NSCLC 诊断的灵敏度及特异度。

[关键词] 肿瘤细胞;循环;癌;非小细胞肺;癌胚抗原;角蛋白 19

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2021)01-0073-04

doi: 10.11712/jms.2096-5532.2021.57.015

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20200804.1150.001.html>; 2020-08-04 12:46:03

VALUE OF FOLATE RECEPTOR-POSITIVE CIRCULATING TUMOR CELLS COMBINED WITH TUMOR MARKERS IN THE DIAGNOSIS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER QIN Kun, JIN Xiangfeng, YI Tengfei, LI Shuo, SUN Zhaoyun, LIU Yuhong (Department of Thoracic Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the value of folate receptor-positive circulating tumor cells (FR⁺-CTCs) combined with the tumor markers carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) in the diagnosis of non-small lung-cancer (NSCLC). **Methods** A retrospective analysis was performed for the results of CEA, CYFRA21-1, and FR⁺-CTCs of 146 patients with NSCLC (NSCLC group), 25 patients with benign lung diseases (benign lung disease group), and 20 individuals who underwent physical examination (healthy control group), and the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to investigate the diagnostic value of each index. **Results** The NSCLC group had a significantly higher positive rate of FR⁺-CTCs than the healthy control group and the benign lung disease group (75.3% vs 5.0%/8.0%, $\chi^2=11.412, P<0.01$). Tumor diameter and tumor stage were the main factors affecting the expression of FR⁺-CTCs in the patients with NSCLC ($Z=2.354, P<0.01; H=9.924, P<0.01$), which was not associated with age, sex, and smoking history ($P>0.05$). In the NSCLC group, the combined measurement of CEA, CYFRA21-1, and FR⁺-CTCs had an area under the ROC curve (AUC) of 0.778 (95%CI=0.720-0.816), a diagnostic sensitivity of 77.50%, and a specificity of 78.08%, while the combined measurement of CEA and CYFRA21-1 had an AUC of 0.707 (95%CI=0.660-0.756), a diagnostic sensitivity of 66.53%, and a specificity of 71.95%, suggesting that the combined measurement of CEA, CYFRA21-1, and FR⁺-CTCs had a higher diagnostic value than the combined measurement of CEA and CYFRA21-1. **Conclusion** FR⁺-CTCs combined with the tumor markers CEA and CYFRA21-1 can improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of NSCLC.

[KEY WORDS] neoplastic cells, circulating; carcinoma, non-small-cell lung; carcinoembryonic antigen; keratin-19

据统计,肺癌是所有癌症类型中发病率和致死率最高的恶性肿瘤^[1],其中占比最高的是非小细胞

肺癌(NSCLC)。有研究发现, I 期肺癌病人接受手术治疗 5 年生存率为 58%~73%,远高于肺癌总体 5 年生存率 15%^[2]。对肺癌高危人群进行低剂量螺旋 CT(LD-CT)筛查,对高度怀疑肺癌的病人进行手术治疗,术后组织病理学检查显示有 21.4%为良性病变^[3]。组织病理学和细胞病理学为肺癌诊断的

[收稿日期] 2020-02-16; **[修订日期]** 2020-07-10

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS383)

[第一作者] 秦坤(1991-),男,硕士研究生。

[通信作者] 刘玉洪(1968-),男,硕士,副主任医师,硕士生导师。E-mail: lyhong@sohu.com。

金标准,虽然其准确度高,但因为其创伤性和花费巨大,不适合作为门诊筛查的常规手段。血清肿瘤标志物可用于肺癌病人的诊断和预后监测^[4],但不同肿瘤标志物在不同病理类型肺癌病人中表达的灵敏度和特异度不同^[5],且在早期肺癌病人中呈低表达,因此在早期肺癌的诊断中阳性率低。已有研究结果表明,循环肿瘤细胞(CTCs)在肺癌的诊断中具有较高的灵敏度^[6],在肺癌早期就可检测到,但特异度较低。本文探讨叶酸受体阳性循环肿瘤细胞(FR⁺-CTCs)联合癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)在早期 NSCLC 诊断中的作用。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集青岛大学附属医院胸外科 2018 年 6 月 15 日—2019 年 8 月 15 日收治肺癌病人 146 例(肺癌组, C 组)、肺良性疾病病人 25 例(肺良性疾病组, B 组)的临床资料,肺癌组 146 例均为 NSCLC;肺良性疾病组病人中肺炎 11 例,肺结核 7 例,支气管扩张 2 例,错构瘤 5 例。肺癌、肺良性疾病病人术前经胸部 CT 检查证实肺部结节,术后经组织病理学或者细胞病理学检查确诊。按照国际肺癌研究协会第 8 版 TNM 分期系统进行临床疾病分期。排除标准:①重要脏器功能严重不全病人;②合并其他脏器恶性肿瘤病人;③合并严重感染性疾病病人;④合并造血系统疾病者;⑤精神异常、依从性较差者;⑥临床资料不完善者。选取同期健康体检者 20 例为健康对照组(A 组),均接受了低剂量螺旋 CT 扫描,以排除潜在的胸部疾病。本研究获得青岛大学附属医院伦理委员会批准,研究对象均知情同意。

1.2 FR⁺-CTCs 及肿瘤标志物的检测

采集受检者肘静脉血 3 mL,应用配体靶向聚合酶链式反应(LT-PCR)方法检测 FR⁺-CTCs,在 3 mL 血液中检测到 1 个叶酸受体(FR)阳性细胞定义 1 个叶酸单位(FU)^[7],以 FR⁺-CTCs \geq 8.70 FU 作为 FR⁺-CTCs 阳性标准。采集肘静脉血 5 mL,以 2 500 r/min 离心 10 min,使用罗氏免疫学分析仪(德国)检测 CEA 及 CYFRA21-1,CEA $>$ 3.4 μ g/L 定义为阳性,CYFRA21-1 $>$ 3.3 μ g/L 定义为阳性。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。非正态分布计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 形式表示,两组数据间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,多组间比较采用

Kruskal-Wallis 秩和检验。应用 GraphPad Prism 8 软件绘制受试者工作曲线(ROC 曲线),计算曲线下面积(AUC)。应用 Logistic 回归分析比较联合肿瘤标志物检测和单独肿瘤标志物检测的灵敏度和特异度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 FR⁺-CTCs 及肿瘤标志物表达比较

肺癌组 FR⁺-CTCs 阳性病人占比高于肺良性疾病组及健康对照组($\chi^2 = 11.412, P < 0.01$);肺癌组 CEA 和 CYFRA21-1 阳性率与肺良性疾病组及健康对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。随着肺癌分期的进展,FR⁺-CTCs、CEA 和 CYFRA21-1 表达明显升高,差异有显著性($\chi^2 = 11.345 \sim 13.632, P < 0.01$)。见表 1~2。

表 1 各组 FR⁺-CTCs 及肿瘤标志物表达的阳性率比较(例(%))

组别	n	FR ⁺ -CTCs 阳性	CEA 阳性	CYFRA21-1 阳性
A 组	20	1(5.0)	1(5.0)	2(10.0)
B 组	25	2(8.0)	3(12.0)	2(8.0)
C 组	146	110(75.3)	84(57.5)	88(60.3)

表 2 不同 TNM 分期肺癌病人 FR⁺-CTCs 及肿瘤标志物检测结果比较(例(%))

TNM 分期	n	FR ⁺ -CTCs 阳性	CEA 阳性	CYFRA21-1 阳性
I 期	74	53(71.6)	39(52.7)	41(55.4)
II 期	41	31(75.6)	25(61.0)	28(68.3)
III 期	20	16(80.0)	14(70.0)	15(75.0)
IV 期	11	10(90.9)	9(81.8)	10(90.9)

2.2 肺癌病人 FR⁺-CTCs 影响因素

不同年龄、性别以及有无吸烟史肺癌病人的 FR⁺-CTCs 检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而最大肿瘤直径 $<$ 3 cm 与 \geq 3 cm、不同 TNM 分期肺癌病人 FR⁺-CTCs 检测结果比较,差异具有统计学意义($Z = 2.354, P < 0.01; H = 9.924, P < 0.01$)。见表 3。

2.3 CEA、CYFRA21-1 及 FR⁺-CTCs 单独检测及联合检测对 NSCLC 的诊断价值

Logistic 回归及 ROC 曲线分析显示,血清肿瘤标志物 CEA 和 CYFRA21-1 联合检测诊断 NSCLC 的 AUC=0.707(95%CI=0.660~0.756),诊断灵敏度为 66.53%,特异度为 71.95%,均低于 FR⁺-CTCs、CEA、CYFRA21-1 联合检测组(AUC=0.778, 95%CI=0.720~0.816,诊断灵敏度为 77.50%,特异

度为 78.08%), 但 AUC 值和诊断灵敏度及特异度均高于 FR⁺-CTCs、CEA、CYFRA21-1 单独检测。见图 1、表 4。

表 3 NSCLC 病人 FR⁺-CTCs 表达影响因素

影响因素	FR ⁺ -CTCs ($M(P_{25}, P_{75})$)	Z 或 H 值	P 值
年龄(岁)			
>60	10.12(9.60, 10.64)		
≤60	10.31(9.82, 10.80)	0.545	0.718
性别			
男	10.26(9.82, 10.50)		
女	10.52(9.96, 10.86)	0.519	0.917
吸烟史			
有	10.61(10.04, 11.08)		
无	10.44(9.82, 10.76)	0.844	0.412
最大肿瘤直径(d/cm)			
<3	9.15(8.05, 9.90)		
≥3	12.32(11.50, 13.02)	2.354	<0.01
TNM 分期			
I 期	7.62(7.11, 8.13)		
II 期	9.94(9.22, 10.66)		
III 期	11.62(10.51, 12.73)	9.924*	<0.01

注: * H 值。

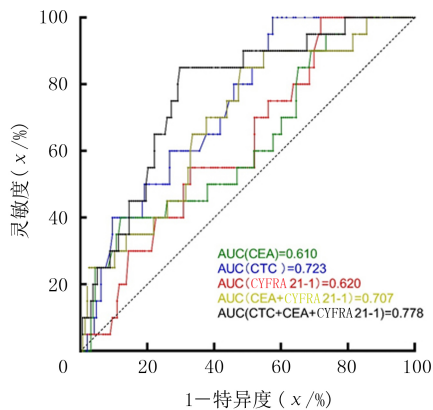


图 1 CEA、CYFRA21-1 和 FR⁺-CTCs 诊断 NSCLC 的 ROC 曲线

表 4 CEA、CYFRA21-1 及 FR⁺-CTCs 不同组合检测对 NSCLC 的诊断价值

指标	AUC(95%CI)	灵敏度 (X/%)	特异度 (X/%)
FR ⁺ -CTCs	0.723(0.676~0.766)	68.05	75.91
CEA	0.610(0.581~0.641)	55.99	71.91
CYFRA21-1	0.621(0.589~0.670)	60.80	65.56
CEA+CYFRA21-1	0.707(0.660~0.756)	66.53	71.95
CTC+CEA+CYFRA21-1	0.778(0.720~0.816)	77.50	78.08

3 讨 论

ASHWORTH 教授在 19 世纪 60 年代提出了 CTCs 概念^[8], CTCs 常见于恶性肿瘤病人的血液

中, 在良性疾病病人和健康者的血液中较少表达或者不表达^[9]。细胞搜索(Cell Search)系统是第一个也是唯一一个获得美国食品和药物管理局(FDA)批准, 用于除肺癌以外的乳癌、结直肠癌和前列腺癌的 CTCs 检测, 但其应用于 NSCLC 病人检测阴性比例升高^[10-11], 需要改进检测方法来提高检测的准确度和灵敏度。

近年来, 出现了一种新的检测方法, 即 FR⁺-CTCs 方法。叶酸是人体必需的维生素, 但人自身不能合成, 需要由外界摄取。叶酸通过与细胞表面叶酸受体(FR)结合后被内吞进入细胞, 在正常人的血液中, 除 FR 活化的巨噬细胞外几乎检测不到 FR 的表达^[12]。相反, FR 在各种肿瘤细胞表面过度表达, NSCLC 病人 FR 在 CTCs 表面的表达也明显升高^[13-14]。在 NSCLC 病人中有 72%~83% 检测到 FR 阳性^[15]。采用新型的 LT-PCR 方法检测 FR⁺-CTCs 在 NSCLC 病人中表达具有良好的临床应用价值。

肿瘤标志物是由肿瘤细胞产生、正常细胞缺乏或含量极微的抗原性物质, 可以用于临床肿瘤筛查、预后监测及治疗效果监测等。CEA 和 CYFRA21-1 是最早应用于 NSCLC 检测的肿瘤标志物^[16-17], 常被用来辅助诊断 NSCLC 病人, 但其灵敏度较低, 仅为 20%~70%^[18-19]。与 CEA 和 CYFRA21-1 相比, 基于 LT-PCR 方法检测到的 FR⁺-CTCs 水平在诊断 NSCLC 时显示出较高的灵敏度^[20-21], 但特异度较低。因此, FR⁺-CTCs 水平可以作为 NSCLC 有效的辅助诊断指标。

本文研究探讨 FR⁺-CTCs 联合肿瘤标记物检测对 NSCLC 诊断的灵敏度和特异度。研究结果显示, FR⁺-CTCs 对 NSCLC 病人诊断的灵敏度和特异度均高于血清肿瘤标志物 CEA、CYFRA21-1, 且 FR⁺-CTCs 联合 CEA、CYFRA21-1 对 NSCLC 诊断的灵敏度和特异度高于 CEA 与 CYFRA21-1 联合诊断及 FR⁺-CTCs 检测单独诊断。WANG 等^[19]的一项研究纳入 197 例肺癌病人、119 例肺良性疾病病人以及 52 例健康对照组, 应用 ROC 曲线对诊断的特异度以及灵敏度进行分析, 其研究结果显示 $AUC_{CEA+CYFRA21-1+NSE}(0.6495) < AUC_{FR+CTCs}(0.7956) < AUC_{CEA+CYFRA21-1+NSE+FR+CTCs}(0.8267)$, FR⁺-CTCs 的灵敏度为 77.7%, 特异度为 89.5%。而本文的研究结果显示, FR⁺-CTCs 诊断 NSCLC 的灵敏度为 77.50%, 特异度为 78.08%。

综上所述,FR⁺-CTCs 联合 CEA、CYFRA21-1 检测对 NSCLC 诊断的特异度和灵敏度较单纯 FR⁺-CTCs 检测或 CEA、CYFRA21-1 联合检测均有明显提高。但由于本次纳入研究的肺癌病人绝大多数属于早期肺癌,导致本文联合检测的灵敏度和特异度较低。FR⁺-CTCs 与 CEA、CYFRA21-1 联合检测在 NSCLC 病人的早期诊断中的作用需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2018,68(6):394-424.
- [2] WOOD S L, PERNEMALM M, CROSBIE P A, et al. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2015,41(4):361-375.
- [3] VERONESI G, MAISONNEUVE P, SPAGGIARI L, et al. Diagnostic performance of low-dose computed tomography screening for lung cancer over five years[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2014,9(7):935-939.
- [4] LIU L J, TENG J L, ZHANG L J, et al. The combination of the tumor markers suggests the histological diagnosis of lung cancer[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 2013989.
- [5] CHEN Z Q, HUANG L S, ZHU B. Assessment of seven clinical tumor markers in diagnosis of non-small-cell lung cancer[J]. *Disease Markers*, 2018, 2018:9845123.
- [6] 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]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2015,10(8):1163-1171.
- [7] WAN J W, GAO M Z, HU R J, et al. A preliminary study on the relationship between circulating tumor cells count and clinical features in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2015,3(22):352.
- [8] PARKER N, TURK M J, WESTRICK E, et al. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005,338(2):284-293.
- [9] ALLARD W J, MATERA J, MILLER M C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with non-malignant diseases[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2004,22(14 suppl): 9552.
- [10] LECHARPENTIER A, VIELH P, PEREZ-MORENO P, et al. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer[J]. *British Journal of Cancer*, 2011,105(9):1338-1341.
- [11] SEQUIST L V, NAGRATH S, TONER M, et al. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2009,4(3):281-283.
- [12] STOTT S L, HSU C H, TSUKROV D I, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010,107(43):18392-18397.
- [13] CHENG Y, LIU X Q, FAN Y, et al. Circulating tumor cell counts/change for outcome prediction in patients with extensive-stage small-cell lung cancer[J]. *Future Oncology (London, England)*, 2016,12(6):789-799.
- [14] YU Y, CHEN Z L, DONG J S, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cells as a novel diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. *Translational Oncology*, 2013,6(6): 697-702.
- [15] LOU J T, BEN S Q, YANG G H, et al. Quantification of rare circulating tumor cells in non-small cell lung cancer by ligand-targeted PCR[J]. *PLoS One*, 2013,8(12):e80458.
- [16] NUNEZ M I, BEHRENS C, DENISE M W, et al. High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and mutation[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2012,7(5):833-840.
- [17] MOLINA R, AUGÉ J M, BOSCH X, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology[J]. *Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2009,30(3):121-129.
- [18] TAKAHASHI H, KURISHIMA K, ISHIKAWA H, et al. Optimal cutoff points of CYFRA21-1 for survival prediction in non-small cell lung cancer patients based on running statistical analysis[J]. *Anticancer Research*, 2010,30(9):3833-3837.
- [19] WANG L, WU C Y, QIAO L H, et al. Clinical significance of folate receptor-positive circulating tumor cells detected by ligand-targeted polymerase chain reaction in lung cancer[J]. *Journal of Cancer*, 2017,8(1):104-110.
- [20] ZHOU Qianjun, GENG Qing, WANG Lin, et al. Value of folate receptor-positive circulating tumour cells in the clinical management of indeterminate lung nodules: a non-invasive biomarker for predicting malignancy and tumour invasiveness[J]. *Ebio Medicine*, 2019,41:236-243.
- [21] DING C, ZHOU X F, XU C, et al. Circulating tumor cell levels and carcinoembryonic antigen: an improved diagnostic method for lung adenocarcinoma[J]. *Thoracic Cancer*, 2018,9(11):1413-1420.

(本文编辑 黄建乡)