

叶酸受体阳性循环肿瘤细胞检测对早期肺癌的诊断效能

潘世泽,汪巍,方一凡,郭小波,耿庆
(武汉大学人民医院,武汉 430060)

摘要:目的 探讨叶酸受体(FR)阳性循环肿瘤细胞(CTC)检测对肺癌的诊断效能。方法 胸部 CT 检查提示可疑肺癌的孤立性肺小结节患者 38 例,术后病理诊断为早期肺癌 29 例、肺良性病变 9 例。术前均留取静脉血检测 FR 阳性 CTC。结果 29 例早期肺癌及 9 例肺良性病变患者的 FR 阳性 CTC 分别为 (10.87 ± 2.62) 、 (8.03 ± 2.56) FU/3 mL,两者相比, $P < 0.05$ 。以术后病理检查结果作为诊断肺癌的金标准,kappa 一致性检验显示 FR 阳性 CTC 诊断肺结节具有一定的准确性($kappa = 0.649, P < 0.01$)。以 FR 阳性 CTC 作为肺癌的诊断指标,其 ROC 曲线下面积为 0.837(95% CI 为 0.650 ~ 1.000),最佳截断值为 8.7 FU/3 mL,诊断灵敏度为 89.7%、特异度为 77.8%。结论 FR 阳性 CTC 检测对早期肺癌具有较好的诊断效能。

关键词:叶酸受体;循环肿瘤细胞;叶酸受体阳性循环肿瘤细胞;肺癌;肺肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2017.47.021

中图分类号:R734.2 文献标志码:B 文章编号:1002-266X(2017)47-0069-04

大多数肺癌确诊时已处于晚期,只能得到有限的治疗,患者 5 年生存率仅为 15%,如果肺癌在发生早期就能诊断并完全切除,患者 5 年生存率将会提升至 67%^[1,2]。孤立性肺结节公认的定义为单一的、边界清的、影像不透明的、直径 ≤ 30 mm 的、周围完全由含气肺组织所包绕的病变,没有肺不张、肺门增大或胸腔积液表现^[3]。目前临床上鉴别肺部结节的良恶性主要依靠影像学、肿瘤标志物及组织病理检查等。常用于肺癌诊断的肿瘤标志物主要有癌胚抗原(CEA)、肿瘤相关糖类抗原、细胞角蛋白(CYFRA)片段、神经元特异性烯醇化酶(NSE)等,但在早期肺癌或者某些癌前病变中上述标志物表达量相对较低^[4],致使其诊断早期肺癌的灵敏度和特异度均不高。即使影像学检测发现肺部有小结节,做不做手术也成了一件难以抉择的事情,若肺部结节癌变倾向不明显,多根据 Fleischner 学会的推荐^[5,6]进行随访,但进行随访有利有弊,一些肺癌患者因为随访时间长错过了早期切除的机会。肿瘤细胞自发地从原发肿瘤和转移灶释放入血液循环中,或者由于侵入性操作导致的肿瘤细胞进入血液循环中,即为循环肿瘤细胞(CTC)^[7]。CTC 逃避免疫系统识别和杀伤,聚集形成微肿瘤栓,在合适的条件下发展为转移病灶^[8]。虽然 CTC 的发现很早,但直到近几年其临床应用潜力才得到认可^[9,10]。上皮细

胞黏附分子(EpCAM)是表达于人类部分正常上皮细胞和大多数恶性上皮肿瘤细胞表面的糖蛋白,目前主要通过检测 EpCAM 来确认 CTC,但非小细胞肺癌(NSCLC)患者的 CTC 经常不表达 EpCAM,通过检测 EpCAM 来确认 NSCLC 患者的 CTC 敏感性低^[11]。叶酸受体(FR)在许多上皮源性恶性肿瘤细胞中高表达,尤其在肺癌和卵巢癌细胞中几乎都有表达,可采用配体靶向酶联聚合反应检测 FR 阳性的肺癌 CTC^[12~14]。本研究采用配体靶向 PCR 法对 38 例胸部 CT 检查提示可疑肺癌的孤立性肺小结节患者的 FR 阳性 CTC 进行了检测,并探讨分析了其对早期肺癌的诊断效能。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 2016 年 6 ~ 12 月武汉大学人民医院收治的可疑肺癌的孤立性肺小结节患者 38 例,男 16 例,女 22 例;年龄 41 ~ 74 岁。纳入标准: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(结节最大直径 < 3 cm),未伴有纵隔淋巴结肿大或其他转移灶;患者纳入本研究前未接受抗肿瘤药物治疗。所有患者接受手术治疗,术后病理诊断早期肺癌 29 例(腺癌 21 例、鳞癌 8 例,均未发现淋巴结转移灶和远处转移灶)及肺良性病变 9 例。排除标准:胸部 CT 检查提示肺多发结节者,其他部位肿瘤继发肺转移、既往接受手术及放化疗治疗者;肺部肿瘤复发患者。

1.2 FR 阳性 CTC 的检测 纳入的 38 例患者在

即将手术时抽取肘前静脉血 3 mL, EDTA 抗凝, 4 ℃ 储存, 24 h 内完成血液处理并进行 FR 阳性 CTC 的检测。首先通过免疫磁珠负向富集法从 3 mL 外周血中捕获 CTC, 然后通过配体靶向 PCR 法定量检测 FR 阳性 CTC, FR 阳性 CTC 检测试剂盒由格诺思生物科技(上海)有限公司提供。根据试剂盒说明书, 将 3 mL 全血样本中加入红细胞裂解液(体积: 体积 = 1: 4), 4 ℃ 裂解 15 min, 去除红细胞; 然后加入 150 μL 的抗 CD₄₅ 磁珠和 50 μL 的抗 CD₁₄ 磁珠, 4 ℃ 孵育 30 min, 分别去除白细胞和巨噬细胞; 将富集的 CTC 加入 10 μL 的含有肿瘤特异性叶酸配体-寡核苷酸偶合物的探针标记液, 室温孵育 40 min; 接着将这些样品加入 1 mL 的洗涤缓冲液, 4 ℃、500 g 离心 10 min, 重复 3 次, 去除未结合的探针; 最后加入 120 μL 的洗脱缓冲液, 4 ℃ 孵育 2 min, 洗脱下已结合的探针; 离心收集已结合的探针, 加入 24 μL 的中和缓冲液, 用于荧光定量 PCR 扩增, PCR 信号与数据的收集通过 ABI7300 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 仪器完成 (ABI7300 仪器反应条件: 95 ℃ 变性 2 min, 40 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 8 ℃ 冷却 5 min; 40 个循环, 95 ℃ 变性 10 s, 35 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 10s^[14, 15])。3 mL 血液中检测到 1 个 FR 阳性 CTC, 就定义为 1 Folate Unit (FU, 这是一个自我定义的测量单位)^[11]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS21.0 统计软件。两组间计量资料的比较用独立样本 *t* 检验, 多个样本之间的比较用 Kruskal-Wallis 检验; 诊断一致性分析采用 kappa 一致性检验; 灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) × 100%, 特异度 = 真阴性 / (真阴性 + 假阳性) × 100%; 以灵敏度为纵坐标、(1 - 特异度) 为横坐标绘制 ROC 曲线, 利用 ROC 曲线计算 Youden 指数, 将 Youden 指数最大的切点确定为 FR 阳性 CTC 诊断肺癌的最佳临界点。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

29 例早期肺癌及 9 例肺良性病变患者的 FR 阳性 CTC 分别为 (10.87 ± 2.62)、(8.03 ± 2.56) FU/3 mL, 两者相比, P < 0.05。

以术后病理检查结果作为诊断肺癌的金标准, kappa 一致性检验显示 FR 阳性 CTC 诊断肺结节具有一定的准确性 (kappa = 0.649, P < 0.01)。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 8.7 FU/3 mL, 诊断灵敏度为 89.7%、特异度为 77.8%, 说明 FR 阳性 CTC 检测对肺癌具有较好的诊断效能。

3 讨论

随着环境变化, 肺癌的发生率越来越高, 死亡率也排在肿瘤病死率的首位, 人们逐渐开始注重体检, 肺部小结节检出率较前大大提升。但肺部结节是不是肺癌的问题, 是否需要立刻行手术活检还是随访, 都是干扰医师和患者的问题。目前没有一种肿瘤标志物可以准确预测或诊断肺部肿瘤, 特别是早期肺癌, 即使多种肺癌肿瘤标志物联合检测 (CEA + SCC + CYFRA21-1), 其对于早期肺癌的诊断阳性率也仅为 19.4%^[16]。本研究结果显示, FR 阳性 CTC 检测对肺癌具有较好的诊断效能, 其诊断早期肺癌的敏感度为 89.7%, 明显高于一般的肺癌肿瘤标志物。

目前已经有一些可靠且可重现的技术用于分离和检测外周血中的肿瘤细胞, 然而这些方法均有不同的局限性, 在临床实践中尚没有一种标准的方法来检测 CTC^[17]。CellSearch 系统是较早用于检测 CTC 的标准系统, 已经获得了美国食品药品监督管理局批准作为某些肿瘤如前列腺癌、乳腺癌患者 CTC 的检测, 该技术是依赖上皮细胞标记物 (如 EpCAM) 来识别 CTC, 然而由于上皮间质转化的存在, 其对晚期肺癌患者的阳性检出率只有 32%^[18]。同理也很难通过 EpCAM 微流体 CTC 芯片检测到 NSCLC 患者的 CTC。另外, 可以通过肿瘤细胞的大小分离检测 CTC, 该技术基于细胞的形态学特征, 而不利用细胞表面免疫标记物, 其优点在于不依赖 CTC 的表面抗原, 保持了 CTC 形态和活性, 但获得的 CTC 纯度很低, 而且很容易丢失直径比较小的 CTC。

FR 具有很强的组织和肿瘤特异性, 在肺癌特别是在非小细胞肺癌细胞表面高度表达, 每个细胞表面的 FR 高达几十万, 而 FR 在健康人血液细胞中几乎未见有表达^[19], 所以 FR 是理想的 CTC 检测靶点。本研究采用的配体靶向 PCR 技术是用叶酸连接的寡核苷酸进行标记并用定量 PCR 进行定量分析, 通过这种方法, 将 1 个 CTC 放大成至少 50 万个表面受体分子, 然后通过荧光定量 PCR 将这 50 万个分子再高保真地进行放大扩增检测, 通过这两级放大, 可以检测到 3 mL 血液样本中极少量的 CTC, 这即是人 CTC 检测试剂盒的工作原理, 这种检测方法大大增加了检测 CTC 的敏感性。本研究用此方法检测可疑肺癌患者的 CTC, 也增加了本研究的可信度。

本研究共入组了 29 例早期肺癌患者、19 例肺部良性病变患者, 研究结果显示两组受检者的 FR 阳性 CTC 差异有统计学意义。ROC 曲线分析确定了 8.70 FU/3 mL 的 FR 阳性 CTC 为诊断早期肺癌

的最佳截断值,这也与之前的大样本分析研究结论相符^[12,14]。在此截断值的基础上,FR 阳性 CTC 诊断早期肺癌的灵敏度为 89.7%、特异度为 77.8%,与 Lian 等^[11]的研究结果相符(以 8.70 FU/3 mL 为最佳截断值,其灵敏度为 82.5%,特异度为 72.2%,其中对 I 期肺癌的诊断灵敏度高达 86.6%)。然而,却与 Wang 等^[15]的研究结果有所差别,在他们的研究中得出 CTC 灵敏度仅为 77.7%,而特异度达 89.5%,这可能是因为本研究入组患者胸部 CT 表现癌倾向明显(将胸部 CT 表现为磨玻璃影、半实性结节或实性结节伴有周围不光滑的患者入组),CTC 可能释放入外周血的量较多,这也间接提示 CTC 检查联合胸部 CT 检查可能会提高肺癌诊断阳性率;此外,本研究纳入的病例较少,可能也会影响实验结果。本研究还发现,以 FR 阳性 CTC 作为肺癌的诊断指标,其 AUC 值较高(0.837),高于 CEA、NSE、CYFRA21 的 AUC 值(分别为 0.617、0.613、0.527)。这说明 FR 阳性 CTC 更容易辨别肺结节的良恶性,较一般肿瘤标志物具有较好的诊断效能,与 Lian 等^[11]的研究结果相符(FR 阳性 CTC 对肺癌及 I 期肺癌具有较高的诊断准确性,AUC 值分别为 0.859 和 0.912。此外,本研究 kappa 一致性检验结果显示 FR 阳性 CTC 诊断肺结节具有一定的准确性($\kappa = 0.649, P < 0.01$)。

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。研究^[9]发现,CTC 计数与肺癌患者无进展生存期(PFS)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 PFS 和 OS;另外,Krebs 等^[18]在对 101 例晚期 NSCLC 的研究中,应用 CellSearch 系统检测 CTC,CTC 计数变化可作为晚于 IIIA 期的 NSCLC 的预后判断因子,其也是预测 OS 的最有价值指标之一。CTC 与化疗或放射治疗 NSCLC 的疗效也有关联,有学者^[20]在对 43 例接受化疗的 NSCLC 患者的研究中发现,患者 CTC 计数越高,其 OS 和 PFS 越低,提示 CTC 可作为评估放 NSCLC 化疗疗效的指标之一。本研究入组的肺癌患者也在持续随访中,将进一步观察其 FR 阳性 CTC 计数是否能够预测早期肺癌的 PFS 和 OS。

综上所述,FR 阳性 CTC 检测可作为筛查孤立性肺结节、诊断早期肺癌的有效生物标志物。鉴于此次纳入的病例较少,进一步进行大样本前瞻性实验来验证我们的结论是非常必要的。

参考文献:

[1] Ghosal R, Kloer P, Lewis KE. A review of novel biological tools

used in screening for the early detection of lung cancer[J]. Postgradua Med J, 2009,85(1005):358-363.

[2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(2):87-108.

[3] 中国抗癌协会肺癌专业委员会. 孤立性肺结节的处理[J]. 循证医学,2009,9(4):243-246.

[4] Schillaci O, Calabria FF. Comments on characterization of solitary pulmonary nodules with 18F-FDG PET/CT relative activity distribution analysis[J]. J Thorac Dis, 2015,7(10):1708-1712.

[5] Gould MK, Fletcher J, Lannetoni MD, et al. Evaluation of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)[J]. Chest, 2007,132(3 Suppl):108S-130S.

[6] Aoki T, Nakata H, Watanabe H, et al. Evolution of peripheral lung adenocarcinomas: CT findings correlated with histology and tumor doubling time[J]. AJR Am J Roentgenol, 2000,174(3):763-768.

[7] Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007,13(23):7053-7058.

[8] Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited-the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs [J]. Int J Cancer, 2011,128(11):2527-2535.

[9] Yoon SO, Kim YT, Jung KC, et al. TTF-1 mRNA-positive circulating tumor cells in the peripheral blood predict poor prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2011,71(2):209-216.

[10] Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2012,30(5):525-532.

[11] Lian H, Ding Z, Yuan D, et al. Diagnostic value of folate receptor-positive circulating tumor cell in lung cancer: a pilot study[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2016,19(12):813-820.

[12] Chen X, Zhou F, Li X, 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] Lou J, Ben S, Yang G, 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.

[14] Yu Y, Chen Z, Dong J, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cells as a novel diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. Transl Oncol, 2013,6(6):697-702.

[15] Wang L, Wu C, Qiao L, et al. Clinical significance of Folate receptor-positive circulating tumor cCells detected by ligand-targeted polymerase chain reaction in lung cancer[J]. J Cancer, 2017,8(1):104-110.

[16] 郭巧梅,乔理华,王琳,等.循环肿瘤细胞检测对非小细胞肺癌的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志,2016,39(8):589-594.

[17] Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions [J]. Cancer Lett, 2007,253(2):180-204.

骑跨型肺动脉栓塞合并多处巨大血栓的临床特点、诊断及治疗(附 1 例报告)

廖世均, 吴鹏, 梁卫东

(成都医学院第一附属医院, 成都 610000)

摘要:目的 探讨骑跨型肺动脉栓塞合并多处巨大血栓的临床特点、诊断及治疗方法。方法 对 1 例骑跨型肺动脉栓塞合并多处巨大血栓患者的临床资料进行回顾性分析。结果 患者因“2 d 内反复晕厥 3 次”入院,入院时无胸闷、胸痛、气紧、咳嗽、心悸,无抽搐、大小便失禁等表现,有长期饮酒史及吸烟史。心脏彩超检查显示右心房巨大血栓。肺动脉和下腔静脉 CT 血管三维成像平扫、增强扫描显示双肺动脉主干骑跨型肺栓塞(急性),双肺门水平肺动脉主干及叶、段分支内血栓,下腔静脉血栓。予低分子肝素钙 5 000 IU,每 12 h 1 次,连续 5 日抗凝;注射用尿激酶 50 万单位,持续泵入 12 h,间隔 24 h,连续 3 次溶栓。并予以下腔静脉滤器植入,治疗后第 5 日复查显示右心房巨大血栓、肺动脉骑跨型血栓消失,肺动脉分支主干、叶段等血栓明显减小,下腔静脉巨大血栓、左侧腓静脉血栓明显好转,停止抗凝、溶栓治疗,予以华法林 1.25 mg(1 次/d)抗血小板治疗,好转出院。继续华法林 1.25 mg(1 次/d)抗血小板治疗,随访 18 个月,未见新发血栓。结论 骑跨型肺动脉栓塞合并多处巨大血栓患者最常见的临床表现为呼吸困难、晕厥等,临床表现虽然急、重,但死亡比例不高;诊断主要依靠 CT 血管造影,可以结合 D-二聚体、超声等判断是否有血栓存在;常规的治疗包括抗凝、溶栓、手术取栓术等手段。

关键词:骑跨型肺栓塞;巨大血栓;CT 血管造影;D-二聚体;溶栓

doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2017.47.022

中图分类号:R563.5 文献标志码:B 文章编号:1002-266X(2017)47-0072-03

骑跨型肺栓塞是跨越肺动脉主干分叉的可见血栓^[1],是肺栓塞的一种特殊类型,由 CT 肺动脉造影检查确认,其出现时提示患者当时血流动力学不稳定,若不及时治疗可能致死。骑跨型肺栓塞由于临床症状特异性差、发生几率低,诊治时具有一定迷惑性,准确诊断及恰当治疗有重要作用。2015 年 8 月,我们收治了 1 例骑跨型肺动脉栓塞合并多处巨大血栓患者,现结合患者的临床资料,探讨该病的临床特点、诊断及治疗方法。

1 资料分析

患者男,78 岁,因“2 d 内反复晕厥 3 次”,于 2015 年 8 月 24 日入我院。入院时无胸闷、胸痛、气紧、咳嗽、心悸、抽搐、大小便失禁等表现。查体:T 36.6℃,R 20 次/min,BP 117/74 mmHg,SpO₂ 98%,

全身未见皮下出血点,口唇无紫绀,无颈静脉怒张,肺部闻及散在湿罗音,心律齐,心率 100 次/min,心界稍增大,双下肢无水肿,足背动脉搏动可,四肢肌力正常,相关神经反射正常引出。既往体健,有长期饮酒史及吸烟史,无相关疾病史。

2015 年 8 月 24 日,外院胸部 CT:双肺散在感染;双侧胸腔少量积液。血气分析:二氧化碳分压 4.10 kPa,血液酸碱度 7.47。凝血检测:凝血酶原时间(PT)13.0 s,纤维蛋白原(FIB)6.78 g/L。血液分析:中性粒细胞百分比 88%。心蛋白酶谱:肌钙蛋白-I 1.22 μg/L,肌酸激酶同工酶 6.6 μg/L。B 型钠尿肽 1 147 pg/mL。2015 年 8 月 26 日,我院心脏彩超:右心房内探及一长条形状中等回声物,宽约 0.9 cm,随心脏搏动自由摆动,不时进入右心室及下腔静脉内,长度难以测量,估计约 10 cm 以上,未见明显附着点。2015 年 8 月 27 日,肺动脉和下腔静脉

通信作者:梁卫东(E-mail:53701944@qq.com)

- [18] Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2011,29(12):1556-1563.
- [19] Parker N, Turk MJ, Westrick E, et al. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay[J]. Anal Biochem, 2005, 338(2):284-

293.

- [20] Zhang Z, Xiao Y, Zhao J, et al. Relationship between circulating tumour cell count and prognosis following chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. Respirology, 2016, 21(3):519-525.

(收稿日期:2017-08-18)