

# 叶酸受体 $\alpha$ 监测循环肿瘤细胞 诊断非小细胞肺癌的效能研究

刘天成 马志红 田萍 刘矿 刘红松 臧金

**【摘要】** 目的 探讨叶酸受体  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) 监测循环肿瘤细胞(CTCs)诊断非小细胞肺癌(NSCLC)的效能。方法 应用新型配体靶向聚合酶链反应(LT-PCR)分别检测 2016 年 1 月至 2020 年 12 月在湖州市中心医院确诊的 149 例 NSCLC 患者、60 例肺部良性疾病患者(良性对照组)和 60 例健康体检者(阴性对照组)外周血中叶酸受体  $\alpha$  阳性循环肿瘤细胞(FR $\alpha^+$  CTCs)的水平,绘制 ROC 曲线评估其诊断 NSCLC 的效能。结果 NSCLC 组外周血中 FR $\alpha^+$  CTCs 水平为 12.31 (9.48, 16.52) FU/3 ml, 高于良性对照组的 6.23(4.90, 8.30) FU/3 ml 和阴性对照组的 5.50(4.54, 7.82) FU/3 ml(均  $P < 0.01$ ), 而后两者之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。FR $\alpha^+$  CTCs 水平仅与 NSCLC 患者的临床分期有关( $P < 0.05$ )。ROC 曲线分析显示, FR $\alpha^+$  CTCs 水平最佳截断值为 9.370 FU/3 ml 时, 用于鉴别诊断 NSCLC 和肺部良性疾病患者的灵敏度为 0.758, 特异度为 0.917; FR $\alpha^+$  CTCs 水平最佳截断值为 9.495 FU/3 ml 时, 用于鉴别 NSCLC 患者和健康体检者的灵敏度为 0.752, 特异度为 0.917。结论 NSCLC 患者外周血 FR $\alpha^+$  CTCs 水平显著升高, 可作为 NSCLC 筛查和鉴别诊断的肿瘤标志物。

**【关键词】** 叶酸受体  $\alpha$  非小细胞肺癌 循环肿瘤细胞 诊断

Application of folate receptor- $\alpha$  in monitoring circulating tumor cells for diagnosis of non-small cell lung cancer

LIU Tiancheng, MA Zhihong, TIAN Ping, LIU Kuang, LIU Hongsong, ZANG Jin

First-author's address: Department of Thoracic Surgery, Huzhou Central Hospital(Affiliated Central Hospital of Huzhou Normal College, Huzhou 313000, China

Corresponding author: MA Zhihong, E-mail: mazhihong@hzhospital.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the application of folate receptor alpha(FR $\alpha$ ) in circulating tumor cells(CTCs) (FR $\alpha^+$ CTCs level) for diagnosis of non-small cell lung cancer(NSCLC). **Methods** One hundred and forty nine patients with NSCLC, 60 patients with lung benign lesions(LEL) and 60 healthy subjects were enrolled in Huzhou Central Hospital from January 2016 to December 2020. FR $\alpha^+$  CTCs level(FU/3 ml) was detected using novel ligand targeted polymerase chain reaction(LT-PCR) method in peripheral blood. The diagnostic efficacy of FR $\alpha^+$  CTCs was evaluated by receiver operating characteristic(ROC) curve. **Results** FR $\alpha^+$  CTCs level was 12.31(9.48, 16.52) FU/3 ml in NSCLC patients, which was significantly higher than that in other groups( $P < 0.01$ ), while there was no significant difference between LEL patients[6.23(4.90, 8.30) FU/3 ml] and healthy subjects[5.50(4.54, 7.82) FU/3 ml,  $P > 0.05$ ]. Elevated FR $\alpha^+$  CTCs level was only related to the clinical stage of NSCLC patients ( $P < 0.05$ ). Using a cut-off of 9.370 FU/3 ml, the sensitivity and specificity of FR $\alpha^+$  CTCs to differentiate patients with NSCLC and LEL were 0.758 and 0.917, respectively. Using a cut-off of 9.495 FU/3 ml, the sensitivity and specificity of FR $\alpha^+$  CTCs to differentiate NSCLC patients and healthy subjects were 0.752 and 0.917, respectively. **Conclusion** FR $\alpha^+$  CTCs level was increased in NSCLC patients, the up-regulated FR $\alpha^+$  CTCs level might be used as a potential non-invasive molecular marker for the diagnosis of NSCLC.

**【Key words】** Folate receptor alpha Non-small cell lung cancer Circulating tumor cells Diagnosis

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.6.2021-2671

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2019ZD052)

作者单位:313000 湖州市中心医院(湖州师范学院附属中心医院)心胸外科(刘天成、臧金),精准医学临床研究中心(马志红),放射科(田萍、刘矿),护理部(刘红松)

通信作者:马志红, E-mail: mazhihong@hzhospital.com

肺癌是我国目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其 5 年生存率不到 15%<sup>[1]</sup>。有报道认为,肺癌的早期诊断、及时治疗可使患者 5 年生存率提高到 85%<sup>[2]</sup>。因此,探寻新的肺癌早期诊断方法或标志物对提高肺癌的治疗效果及疾病转归具有重要的临床意义。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是存在于外周血中各类肿瘤细胞的统称,系自发或诊疗操作从实体瘤病灶脱落,进入外周血循环的肿瘤细胞或细胞簇。通过对 CTCs 的检测可动态监测原发肿瘤灶癌细胞入血情况,能够提高患者的早期诊断率,并对患者的治疗效果及预后作出客观评价。早期的研究表明,采用检测上皮细胞黏附分子阳性 CTCs (EpCAM<sup>+</sup> CTCs)的方法诊断非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),晚期 NSCLC 患者的阳性率仅为 50%<sup>[3]</sup>,究其原因,CTCs 在发生上皮间质转化时会发生上皮细胞表型丢失,从而造成 EpCAM<sup>+</sup> CTCs 的漏检或假阴性。叶酸受体  $\alpha$ (folate receptor alpha, FR $\alpha$ )是一种与叶酸结合的糖基化磷脂酰肌醇锚定糖蛋白,在多种肿瘤的细胞膜上过度表达,而在大多数正常组织中表达水平极低<sup>[4-7]</sup>。因此,本研究以 FR $\alpha$  为靶点,检测 NSCLC 患者外周血中叶酸受体  $\alpha$  阳性循环肿瘤细胞(FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs)水平,探讨其诊断 NSCLC 的效能。

## 1 对象和方法

1.1 对象 选取 2016 年 1 月至 2020 年 12 月湖州市中心医院收治的 149 例 NSCLC 患者,其中男 83 例,女 66 例,年龄 45~74(63.2 $\pm$ 8.3)岁;鳞癌 63 例,腺癌 86 例;TNM 分期 I~II 期 56 例,III~IV 期 93 例。所有患者均确诊为原发 NSCLC,无其他上皮性肿瘤或传染病病史,临床资料完整,均未接受放化疗。选择本院同期肺部良性疾病患者 60 例为良性对照组,男 35 例,女 25 例,年龄 46~80(62.8 $\pm$ 9.3)岁;其中肺结核 8 例,肺部炎性假瘤 12 例,支气管扩张症 15 例,慢性阻塞性肺疾病 25 例。选择本院同期健康体检者 60 名作为阴性对照组,男 37 名,女 23 名,年龄 40~71(60.8 $\pm$ 9.6)岁。3 组对象性别、年龄比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。本研究经本院医学伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。

1.2 方法 取 3 组对象清晨空腹静脉血 3 ml,使用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,30 min 内进行检测,采用配体靶向聚合酶链式反应(ligand target PCR, LT-PCR)方法检测 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平。检测步骤按照格诺思生物科技有限公司提供的 Cytolorare 循环肺癌细胞试剂

盒说明书操作,以 FU/3 ml 为 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 单位。比较 3 组对象外周血中 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平,分析 NSCLC 患者外周血中 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平与性别、年龄、吸烟史(从不吸烟或平均吸烟少于 1 次/月定义为不吸烟)、肿瘤组织类型、分化程度、大小、淋巴结转移、临床分期等临床特征的关系。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件。非正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,两组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis  $H$  秩和检验。采用 ROC 曲线评估 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平鉴别诊断 NSCLC 组和良性对照组、NSCLC 组和阴性对照组的效能,并计算灵敏度、特异度。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 3 组对象外周血中 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平的比较 NSCLC 组外周血中 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平为 12.31(9.48, 16.52) FU/3 ml,良性对照组为 6.23(4.90, 8.30) FU/3 ml,阴性对照组为 5.50(4.54, 7.82) FU/3 ml,NSCLC 组外周血中 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平较良性对照组和阴性对照组明显升高( $Z = -7.021, -7.262$ , 均  $P < 0.01$ ),而后两者间比较差异无统计学意义( $Z = -1.291, P > 0.05$ )。

2.2 NSCLC 患者 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平与临床特征的关系 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平与 NSCLC 患者临床病理特征之间的关系见表 1。结果发现,FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平仅与 NSCLC 患者肿瘤临床分期有关( $P < 0.05$ ),与性别、年龄、吸烟史、肿瘤组织类型、分化程度、大小、淋巴结转移均无关(均  $P > 0.05$ )。

2.3 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平用于诊断 NSCLC 的效能 ROC 曲线分析表明,FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平是 NSCLC 的潜在肿瘤标志物。FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 用于鉴别诊断 NSCLC 组和良性对照组、NSCLC 组和阴性对照组的 AUC 值分别为 0.811(95% CI: 0.746~0.875)和 0.820(95% CI: 0.758~0.885)。此外,取 Youden 指数最大值,最佳截断值为 9.370 FU/3 ml,FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 诊断 NSCLC 组和良性对照组的灵敏度为 0.758,特异度为 0.917;最佳截断值为 9.495 FU/3 ml,FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 诊断 NSCLC 组和阴性对照组的灵敏度为 0.752,特异度为 0.917。见图 1。

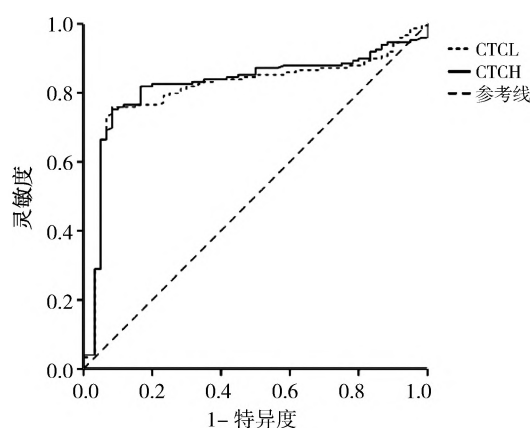
## 3 讨论

FR $\alpha$  是糖基化磷脂酰肌醇锚定糖蛋白,在多种癌症中高表达,如头、颈部肿瘤<sup>[4]</sup>,乳腺癌和卵巢癌<sup>[5]</sup>以及 NSCLC<sup>[6]</sup>。有研究表明,72%~83%的肺腺癌患者在细胞

表 1 NSCLC 患者 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平与临床病理特征的关系(FU/3 ml)

组别	n	FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs	Z 值	P 值
性别				
男	83	12.21(9.53, 16.53)	-0.520	0.603
女	66	12.59(8.96, 16.56)		
年龄				
<60 岁	54	12.59(7.07, 17.07)	-0.190	0.850
≥60 岁	95	12.21(9.85, 15.99)		
吸烟史				
有	106	12.29(9.34, 16.55)	0.073	0.942
无	43	12.47(9.53, 16.08)		
组织类型				
腺癌	86	12.39(9.53, 16.82)	0.763	0.446
鳞癌	63	12.26(9.09, 14.82)		
分化程度				
高分化	70	12.12(8.54, 16.63)	-0.557	0.577
中、低分化	79	12.47(9.53, 16.29)		
肿瘤大小				
≤3 cm	90	12.55(9.34, 16.34)	-0.316	0.752
>3 cm	59	11.84(9.53, 16.61)		
淋巴结转移				
N <sub>0</sub>	92	12.62(9.45, 16.52)	-0.176	0.860
N <sub>1-3</sub>	57	12.03(9.41, 16.54)		
临床分期				
I~II	93	11.35(8.06, 14.71)	-2.385	0.017
III~IV	56	12.65(9.88, 16.74)		

注: NSCLC 为非小细胞肺癌; FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 为叶酸受体  $\alpha$  阳性循环肿瘤细胞



注: CTCL 为 NSCLC 组和良性对照组比较; CTCH 为 NSCLC 组和阴性对照组比较; NSCLC 为非小细胞肺癌; FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 为叶酸受体  $\alpha$  阳性循环肿瘤细胞

图 1 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 用于诊断 NSCLC 效能的 ROC 曲线

膜上过度表达 FR $\alpha$ , 但在正常成人组织中表达有限<sup>[7]</sup>。因此, 采用检测外周血 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 可有效避免 EpCAM<sup>-</sup> CTCs 的丢失, 提高诊断有效率。

本研究发现, NSCLC 组外周血 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平高

于良性对照组和阴性对照组(均  $P < 0.01$ ), 而后两者间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 这表明外周血 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平可能是监测肺部疾病恶化的潜在肿瘤标志物。进一步分析 NSCLC 患者 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平与临床病理特征之间的关系, 发现 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平与 NSCLC 患者的性别、年龄、吸烟史、肿瘤组织类型、分化程度、大小、淋巴结转移均无关(均  $P > 0.05$ ), 但与 NSCLC 的临床分期有关( $P < 0.05$ )。III~IV 期 NSCLC 患者 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平显著高于 I~II 期 NSCLC 患者, 该结果提示, 随着 NSCLC 病程的进展, 外周血中更易检测到 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs, 此结果与 Chen 等<sup>[8]</sup>报道类似。笔者认为, 这可能与肿瘤细胞的侵袭性有关, 在肿瘤进展的中晚期, 有更多的侵袭性、转移性强的 CTCs 播散到血液中, 从而检测水平更高。

由于缺乏特异性的 CTCs 检测标志物, 目前常用检测主要基于肿瘤细胞表面 EpCAM 的表达来分离 CTCs, 并对其计数。然而这一方法可能明显低估了 CTCs 的数量。尹寒露等<sup>[9]</sup>采用阴性-磁性法分离和富集 CTCs, 经 EpCAM 免疫荧光染色后, 流式细胞仪鉴定 CTCs 并计数, 结果显示 47 例患者的血液样品中, EpCAM<sup>+</sup> CTCs 的检出率仅为 48.9%<sup>[8]</sup>。本研究中, ROC 曲线分析表明, FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 诊断 NSCLC 组和良性对照患者的最佳截断值为 9.370 FU/3 ml, AUC 值为 0.811 (95% CI: 0.746~0.875), 灵敏度为 0.758, 特异度为 0.917; FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 鉴别诊断 NSCLC 组和阴性对照的最佳截断值为 9.495 FU/3 ml, AUC 值为 0.820 (95% CI: 0.758~0.885), 灵敏度为 0.752, 特异度为 0.917。该结果提示, 采用检测 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平可有效提高 NSCLC 的诊断率, 是其潜在有效的诊断标志物。

综上所述, 检测外周血 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平是一种简单、无创可用于 NSCLC 鉴别诊断的方法, 但由于本研究的样本量较小, 应进一步招募更多的 NSCLC 患者样本以证实本研究结果, 如能采用联合 EpCAM<sup>+</sup> CTCs 和 FR $\alpha$ <sup>+</sup> CTCs 水平检测, 将会为 NSCLC 非侵入性诊断提供更多重要的信息。

#### 4 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1):7-30. DOI:10.3322/caac.21442.
- [2] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 global cancer statistics?[J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1):22. DOI:10.1186/s40880-019-0368-6.

(下转第 597 页)

- [17] 刘妍琛, 张晓曙, 崔旭东, 等. 基于 Group LASSO logistic 回归分析模型分析流行性乙型脑炎早期临床症状与预后的关联[J]. 中华疾病控制杂志, 2021, 25(8):891-897. DOI:10.16462/j.cnki.zhjbkz.2021.08.005.
- [18] Chen Y, Du H, Wei BH, et al. Development and validation of risk-stratification delirium prediction model for critically ill patients: a prospective, observational, single-center study[J]. *Medicine*, 2017,96(29):e7543. DOI:10.1097/MD.0000000000007543.
- [19] 邢焕民, 吕冬梅, 等. 术后谵妄风险预测模型的构建及应用[J]. 中华护理杂志, 2019, 54(1):8-13. DOI:10.3761/j.issn.0254-1769.2019.01.001.

(收稿日期:2021-08-19)

(本文编辑:严玮雯)

(上接第 566 页)

- dial contraction? Redefining heart failure with a preserved ejection fraction[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(3):873-878. DOI:10.1016/j.jcmg.2019.12.021.
- [25] Rubin J, Steidley DE, Carlsson M, et al. Myocardial contraction fraction by M-Mode echocardiography is superior to ejection fraction in predicting mortality in transthyretin amyloidosis[J]. *J Card Fail*, 2018, 24(8):504-511. DOI:10.1016/j.cardfail.2018.07.001.
- [26] Pagourelis ED, Duchenne J, Mirea O, et al. The relation of ejection fraction and global longitudinal strain in amyloidosis: implications for differential diagnosis[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2016, 9(11):1358-1359. DOI:10.1016/j.jcmg.2015.11.013.
- [27] Boldrini M, Cappelli F, Chacko L, et al. Multiparametric echocardiography scores for the diagnosis of cardiac amyloidosis[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(4):909-920. DOI:10.1016/j.jcmg.2019.10.011.
- [28] Pagourelis ED, Mirea O, Duchenne J, et al. Echo parameters for differential diagnosis in cardiac amyloidosis: a head-to-head comparison of deformation and nondeformation parameters[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2017, 10(3):e005588. DOI:10.1161/CIRCIMAGING.116.005588.
- [29] 丁雪晏, 李一丹, 魏丽群, 等. 左心室压力-应变环评价心脏淀粉样变性患者心肌做功[J]. 中华超声影像学杂志, 2021, 30(7):604-608. DOI:10.3760/cma.j.cn131148-20210207-00097.
- [30] Fortuni F, Butcher SC, van der Kley F, et al. Left ventricular myocardial work in patients with severe aortic stenosis[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2021, 34(3):257-266. DOI:10.1016/j.echo.2020.10.014.
- [31] Gonçaves AV, Rosa SA, Branco L, et al. Myocardial work is associated with significant left ventricular myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2021, 37(7):2237-2244. DOI:10.1007/s10554-021-02186-3.
- [32] Roger-Rollé A, Cariou E, Rguez K, et al. Can myocardial work indices contribute to the exploration of patients with cardiac amyloidosis?[J]. *Open Heart*, 2020, 7(2):e001346. DOI:10.1136/openhrt-2020-001346.
- [33] Clemmensen TS, Eiskjær H, Ladefoged B, et al. Prognostic implications of left ventricular myocardial work indices in cardiac amyloidosis[J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2021, 22(6):695-704. DOI:10.1093/ehjci/jeaa097.
- [34] Chacko L, Martone R, Bandera F, et al. Echocardiographic phenotype and prognosis in transthyretin cardiac amyloidosis[J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(14):1439-1447. DOI:10.1093/eurheartj/ehz905.

(本文由浙江省医学会推荐)

(收稿日期:2022-02-25)

(本文编辑:严玮雯)

(上接第 579 页)

- [3] Yahyazadeh Mashhadi SM, Kazemimanesh M, Arashkia A, et al. Shedding light on the EpCAM: an overview[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8):12569-12580. DOI:10.1002/jcp.28132.
- [4] Mohanty V, Shah A, Allender E, et al. Folate receptor alpha upregulates Oct4, Sox2 and Klf4 and downregulates miR-138 and miR-let-7 in cranial neural crest cells[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(11):2721-2732. DOI:10.1002/stem.2421.
- [5] Kalli KR, Block MS, Kasi PM, et al. Folate Receptor alpha peptide vaccine generates immunity in breast and ovarian cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(13):3014-3025. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-17-2499.
- [6] Christoph DC, Asuncion BR, Hassan B, et al. Significance of folate receptor alpha and thymidylate synthase protein expression in patients with non-small-cell lung cancer treated with pemetrexed[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(1):19-30. DOI:10.1097/JTO.0b013e31827628ff.
- [7] Chen L, Peng M, Li N, et al. Combined use of EpCAM and FR $\alpha$  enables the high-efficiency capture of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):1188. DOI:10.1038/s41598-018-19391-1.
- [8] 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. DOI:10.1097/JTO.0000000000000606.
- [9] 尹寒露, 阴建, 陈立文, 等. 分类检测非小细胞肺癌患者外周血中循环肿瘤细胞的临床价值[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(9):677-681. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2016.09.008.

(收稿日期:2021-09-02)

(本文编辑:严玮雯)