



[DOI]10.3969/j.issn.1005-6483.2022.04.018

http://www.lcwzz.com/CN/10.3969/j.issn.1005-6483.2022.04.018

Journal of Clinical Surgery, 2022, 30(4):364-367

· 论 著 ·

叶酸受体阳性循环肿瘤细胞检测对肝细胞癌病人合并血管侵犯的诊断价值

林美龙 王文强 李剑 张二雷 黄志勇

[摘要] **目的** 探讨叶酸受体阳性循环肿瘤细胞(FR⁺-CTCs)检测对肝细胞癌病人(HCC)合并血管侵犯的诊断价值。**方法** 前瞻性收集 2020 年 10 月~2021 年 8 月我院收治的 HCC 住院病人 91 例,利用免疫磁珠负向筛选+靶向荧光定量 PCR 法检测其外周血液中的 FR⁺-CTCs。根据病人术前影像学检查和术后病理结果分为无血管侵犯(NVI)组 30 例,微血管侵犯(MVI)组 26 例,门静脉癌栓(PVTT)组 35 例。分析 3 组病人 FR⁺-CTCs 检测值差异。**结果** 3 组病人 FR⁺-CTCs 检测值的平均水平分别为(10.52±2.21)FU/3 ml,(12.35±2.47)FU/3 ml,(14.79±3.68)FU/3 ml,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。FR⁺-CTCs 检测值与 HCC 血管侵犯程度存在正相关性($r=0.499, P<0.05$)。分别以 FR⁺-CTCs 作为有无血管侵犯和 PVTT 的辅助诊断指标,其 ROC 曲线下面积分别为 0.769(95% CI 为 0.668~0.869)和 0.830(95% CI 为 0.733~0.928);当分别取截断点为 12.35 FU/3 ml 和 11.8 FU/3 ml 时,其诊断灵敏度分别为 0.672 和 0.829、特异度分别为 0.767 和 0.733。**结论** FR⁺-CTCs 检测值与 HCC 血管侵犯程度存在正相关,FR⁺-CTCs 检测值对有无血管侵犯和 PVTT 有较高的辅助诊断价值,但对 MVI 诊断价值较低。

[关键词] 循环肿瘤细胞; 叶酸受体; 肝细胞癌; 血管侵犯

The diagnostic value of folate receptor-positive circulating tumor cells detection in patients with hepatocellular carcinoma with vascular invasion LIN Meilong, WANG Wenqiang, LI Jian, et al. (Department of Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective** To explore the diagnostic value of folate receptor-positive circulating tumor cells (FR⁺-CTCs) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** From October 2020 to August 2021, 91 cases of HCC in the Department of Liver Surgery of Tongji Hospital were prospectively collected, and the detection values of FR⁺-CTCs in peripheral blood bodies were measured by immunomagnetic bead negative screening and targeted fluorescence quantitative PCR. The patients were divided into non-vascular invasion group (NVI) ($n=30$), microvascular invasion group (MVI) ($n=26$) and portal vein tumor thrombus group (PVTT) ($n=35$) according to preoperative imaging and postoperative pathological results. The difference of FR⁺-CTCs among 3 groups was analyzed. **Results** The average values of FR⁺-CTCs in the three groups were (10.52±2.21)FU/3 ml, (12.35±2.47)FU/3 ml, (14.79±3.68)FU/3 ml ($P<0.05$). There was a positive correlation between the detection value of FR⁺-CTCs and the degree of vascular invasion in patients with HCC ($r=0.499, P<0.05$). FR⁺-CTCs were used as auxiliary diagnostic indicators for vascular invasion and PVTT, and the area under the ROC curve was 0.769 (95% CI was 0.668-0.869) and 0.830 (95% CI was 0.733-0.928), respectively. When the cut-off points were 12.35 FU/3 ml and 11.8 FU/3 ml, respectively, the diagnostic sensitivity was 0.672 and 0.829, and the specificity was 0.767 and 0.733, respectively. **Conclusion** The detection value of FR⁺-CTCs was positively correlated with the degree of vascular invasion in HCC patients, and the detection value of FR⁺-CTCs had higher auxiliary diagnostic value for patients with vascular invasion and PVTT, but lower diagnostic value for MVI in patients with HCC.

[Key words] circulating tumor cells; folate receptor; hepatocellular carcinoma; vascular invasion

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的血管侵犯与肝切除术后的复发、转移有相关性^[1]。HCC 发生的血管侵犯主要分为大血管侵犯和微血管侵犯(mi-

基金项目:湖北省科技创新专项(2021BCA115)
作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院肝脏外科中心
通信作者:黄志勇,Email:zyhuang126@126.com

crovascular invasion, MVI)^[2], 大血管侵犯主要发生于门静脉、肝静脉、腔静脉及其主要分支, 其中门静脉癌栓(portal vein tumor thrombus group, PVTT)是主要的大血管侵犯形式, 常通过影像学检查发现; MVI 是指癌细胞见于内皮细胞衬覆的血管腔内, 多见于癌旁肝组织内的门静脉小分支^[3], 只能通过病理检查发现。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指从原发肿瘤病灶脱落后进入到外周血液循环中的肿瘤细胞^[4-6]。叶酸受体(folate receptor, FR)是一种表达于细胞膜表面的糖蛋白, 它具有很强的组织及肿瘤特异性, 在乳腺癌, 肺癌, 卵巢癌等多种实体肿瘤的细胞表面高表达^[7-11]。有研究表明, 肝原发肿瘤细胞表面的 FR 也有一定水平的表达^[8]。本文探讨 FR 阳性 CTCs (FR⁺-CTCs) 与 HCC 血管侵犯的相关性及诊断价值。

对象与方法

一、对象

2020 年 10 月 ~ 2021 年 8 月我院收治 HCC 住院病人 91 例。纳入标准: 病理学检查确诊为 HCC; 临床资料完善。排除标准: 合并严重的心肺疾病或器质性病变; 合并其他肿瘤性疾病; 有叶酸服用史。病人已了解且同意加入研究。本研究符合医学伦理学要求。91 例病人的一般资料见表 1。根据术前影像结果和术后病理结果分为无血管侵犯(non-vascular invasion, NVI)组 30 例(32.97%), MVI 组 26 例(28.57%), PVTT 组 35 例(38.46%)。

二、方法

FR⁺-CTCs 测试试剂盒(免疫磁珠负向筛选 + 靶向荧光定量 PCR 法)购于南通格诺思博生物科技有限公司。选取试管抽取 4ml 以上的 HCC 的病人的外周血液, 去除红细胞, 然后用免疫磁珠的方式去除绝大多数的白细胞, 剩余样品中包含 FR 阳性细胞。使用特异性小分子探针对 FR 阳性细胞进行标记, 这种特异性小分子探针由识别 FR 的化学小分子与寡聚核苷酸偶联形成。在小分子探针与 FR 阳性细胞充分结合后, 洗涤去除未结合的探针; 然后洗脱受体结合的探针, 用于后续定量检测。利用荧光定量 PCR, 对 FR 结合的小分子探针中的寡聚核苷酸进行定量检测; 最终依据校准曲线定量检测。

三、统计学方法

采用 SPSS 26 软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计数资料以例(%)表示。对 91 例病人的 FR⁺-CTCs 数值进行 Kruskal-Wallis H 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用 Spearman 相关性分析探讨 FR⁺-CTCs 数值和血管侵犯

程度之间的相关性, 绘制受试者工作曲线(receiver operating characteristic curves, ROC 曲线), 计算 ROC 曲线下面积(area under roc curve, AUC), 并根据约登指数计算出敏感度和特异度。

表 1 91 例 HCC 病人一般资料

一般资料	数值
年龄(岁)	54.78 ± 12.60
性别(例, %)	
男	80(87.91)
女	11(12.09)
HBsAg(例, %)	
阳性	82(90.11)
阴性	9(9.89)
肝功能(例, %)	
A 级	83(91.21)
B 级	8(8.79)
总胆红素(μmol/L)	18.00 ± 19.52
AFP(例, %)	
<400 ng/ml	55(60.44)
≥400 ng/ml	36(39.56)
肿瘤直径(cm)	6.14 ± 3.92
肿瘤数目(例, %)	
1 个	63(69.23)
≥2 个	28(30.77)
肝硬化(例, %)	
有	59(64.84)
无	32(35.16)
血管侵犯类型(例, %)	
NVI	30(32.97)
MVI	26(28.57)
PVTT	35(38.46)

结 果

3 组病人 FR⁺-CTCs 检测值的平均水平分别为 (10.52 ± 2.21) FU/3 ml, (12.35 ± 2.47) FU/3 ml, (14.79 ± 3.68) FU/3 ml, 3 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。根据 Kruskal-Wallis H 检验, 不同血管侵犯类型的病人的 FR⁺-CTCs 检测值差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 NVI 和 MVI 的 FR⁺-CTCs 检测值差异无统计学意义 ($P = 0.085$), NVI 与 PVTT 组的 FR⁺-CTCs 检测值差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MVI 组和 PVTT 组的 FR⁺-CTCs 检测值差异无统计学意义 ($P = 0.068$) (图 1)。采用 Spearman 相关性分析, FR⁺-CTCs 检测值和 HCC 血管侵犯程度之间具有正相关性 ($r = 0.499$) ($P < 0.05$)。其中 FR⁺-CTCs 检测值与 MVI 之间的相关性为 $r = 0.320$ ($P < 0.05$), FR⁺-CTCs 检测值与 PVTT 之间的相关性为 $r = 0.571$ ($P < 0.05$)。

绘制 FR⁺-CTCs 的 ROC 曲线, 计算 ROC 曲线下面积(AUC), FR⁺-CTCs 诊断 HCC 有无血管侵犯的

AUC 为 0.769(95% CI 为 0.668 ~ 0.869, $P < 0.05$), 差异有统计学意义, 其中约登指数为 0.439, 临界值为 12.35 FU/3 ml, 敏感度为 0.672, 特异度为 0.767。FR⁺-CTCs 诊断 MVI 的 AUC 为 0.579, $P = 0.312$, 差异无统计学意义。FR⁺-CTCs 诊断 PVTT 的 AUC 为 0.830(95% CI 为 0.733 ~ 0.928, $P < 0.05$), 其中约登指数为 0.562, 临界值为 11.8 FU/3 ml, 敏感度为 0.829, 特异度为 0.733(图 2)。

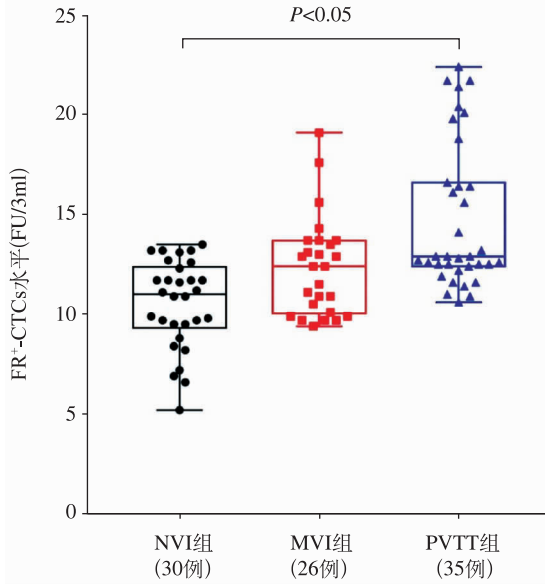


图 1 91 例 HCC 不同血管侵犯类型的 FR⁺-CTCs 分布范围

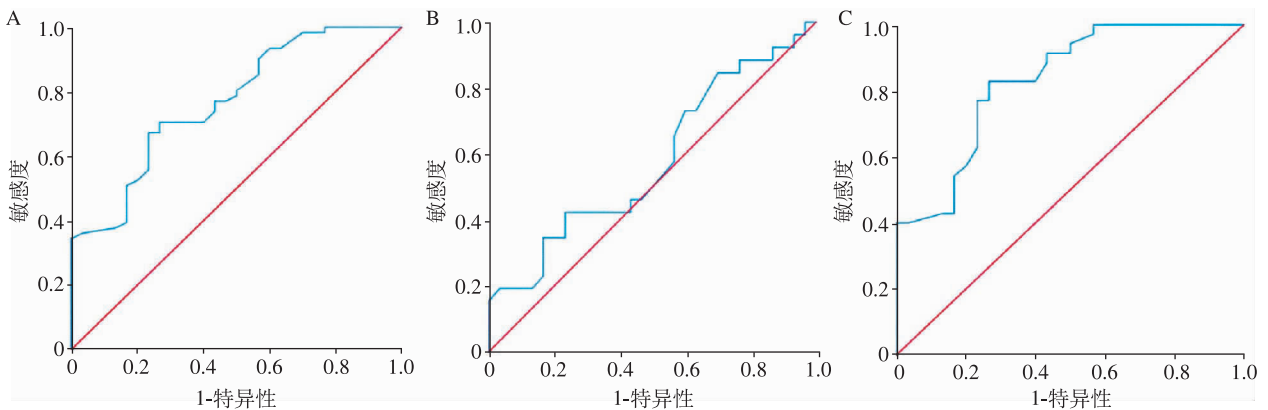
讨 论

CTCs 作为一种新型液体活检, 已经在多种肿瘤病人的外周血液中检测出, 并且显著高于健康人^[12]。Cheng 等^[13]研究表明, CTCs 对 HCC 具有诊断价值, 与甲胎蛋白联合检测可以提升 HCC 诊断的有效性。有研究表明, 通过上皮细胞黏附分子阳性的免疫靶点来识别并检测 CTCs, 发现其计数的动态变化与疾病变化进展相关^[14]。Yan 等^[15]利用体内流式细胞术动态检

测 CTCs 的数量变化, 提出 CTCs 可以作为预测疾病进展和监测疗效的标志物。而且高计数量的上皮细胞黏附分子阳性 CTCs 预示着 HCC 有更高的复发率和更差的生存率^[16]。HCC 发生血管侵犯时, 肿瘤细胞可从原发病灶迁移至血管内, 形成微血管癌栓或者 PVTT, 导致 HCC 切除术后 5 年复发率可高达 40% ~ 70%^[17]。原发病灶的肿瘤细胞侵袭血管后脱落而形成 CTCs 是造成肝内外播散或者远处转移的重要原因。近年来, 随着对肿瘤表面特异性标志物的研究, 发现 FR 具有很强的组织及肿瘤特异性, 在卵巢癌、肾癌、子宫内膜癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌和胰腺癌等肿瘤中有明显的表达, 但在正常组织几乎不表达。因此, FR 作为一种新型的靶点来检测 CTCs 具有很大潜力^[8]。利用 FR 检测 CTCs 在非小细胞肺癌, 前列腺癌和大肠癌等恶性肿瘤上已得到应用, 同时对多种肿瘤的诊断和预测疗效具有重要的临床意义^[18-20]。

本研究结果表明, FR⁺-CTCs 的检测值与 HCC 的血管侵犯程度呈正相关, 血管侵犯程度越严重, 其检测值越高, 特别是发生 PVTT 的 FR⁺-CTCs 检测值对比 NVI 的检测值增加更明显。FR⁺-CTCs 对 PVTT 的预测价值较高, 但是对 MVI 的预测价值较低, 无法通过 FR⁺-CTCs 数值的差异将 NVI 和 MVI 区别开来。由于 HCC 的 CTCs 的 FR 表达量不太高, 导致 HCC 不同程度的血管侵犯的 FR⁺-CTCs 检测存在一定困难和遗漏, 这可能是导致 MVI 预测价值较低的一个重要因素。

HCC 常可出现 PVTT 或门静脉血栓 (portal vein thrombosis, PVT), 临床上通过影像学来对二者进行鉴别也有一定困难, 存在一定的诊断误差^[21-22]。有研究表明, HCC 合并 PVTT 的发生率高达 44.0% ~ 62.2%^[23]; HCC 通常合并肝硬化, 由于血流动力学的改变, 也容易出现 PVT, 单纯肝硬化病人 PVT 发生率为 5% ~ 20%^[24-25], 但在肝硬化合并 HCC 病人中 PVT



A. 91 例病人发生血管侵犯的 ROC 曲线; B. 26 例病人发生 MVI 的 ROC 曲线; C. 35 例病人发生 PVTT 的 ROC 曲线

图 2 FR⁺-CTCs 在 HCC 不同血管侵犯类型的诊断效能

发生率可高达 35%^[26-27]。这时可以参考 FR⁺-CTCs 的数值对其加以区分,如果 FR⁺-CTCs 较高,特别是高于临界值 11.8 FU/3 ml,应该注意血管侵犯的可能性。

血管侵犯与肝切除术后肿瘤的复发率高有密切相关性,术前作出是否有血管侵犯的准确诊断对于制定合理的手术方法,优化肝切除范围,尽早开展全身靶向及免疫治疗具有重要意义。本检测手段具有无创,简便,快速的优点,可以在一定程度上弥补现有影像学检查和病理学检查滞后的短板。本研究为单中心研究,纳入样本量相对不多;FR⁺-CTCs 的检测数值也受多因素影响,包括检测仪器,试剂活性和纯度等。将来需要开展多中心、大样本量的研究,进一步深入研究 FR⁺-CTCs 检测在对 MVI 的预测作用,探讨治疗前后包括手术、靶向和免疫治疗前后病人 FR⁺-CTCs 水平的变化,分析 FR⁺-CTCs 水平的变化与病人预后的相关性。

参考文献

[1] Hirokawa F, Hayashi M, Miyamoto Y, et al. Outcomes and predictors of microvascular invasion of solitary hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology research; the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 2014, 44(8):846-853.

[2] Pawlik TM, Gleisner AL, Anders RA, et al. Preoperative assessment of hepatocellular carcinoma tumor grade using needle biopsy: implications for transplant eligibility[J]. *Annals of surgery*, 2007, 245(3):435-442.

[3] Roayaie S, Blume IN, Thung SN, et al. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(3):850-855.

[4] Alix-panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. *Nature reviews Cancer*, 2014, 14(9):623-631.

[5] Martin OA, Anderson RL, Narayan K, et al. Does the mobilization of circulating tumour cells during cancer therapy cause metastasis[J]? *Nature reviews Clinical oncology*, 2017, 14(1):32-44.

[6] Danila DC, Pantel K, Fleisher M, et al. Circulating tumors cells as biomarkers: progress toward biomarker qualification[J]. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*, 2011, 17(6):438-450.

[7] Zhao J, Cao S L, Zheng XL, et al. Folate receptor-mediated antitumor drugs[J]. *Yao Xue Xue Bao/Acta pharmaceutica Sinica*, 2009, 44(2):109-114.

[8] Parker N, Turk MJ, 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] 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.

[10] Assaraf YG, Leamon CP, Reddy JA. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment [J]. *Drug resistance updates; reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer*

cer chemotherapy, 2014, 17(4-6):89-95.

[11] Nunez MI, Behrens C, Woods DM, et al. High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and EGFR corrected mutation[J]. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2012, 7(5):833-840.

[12] Li P, Stratton ZS, Dao M, et al. Probing circulating tumor cells in microfluidics[J]. *Lab Chip*, 2013, 13(4):602-609.

[13] Cheng Y, Luo L, Zhang J, et al. Diagnostic Value of Different Phenotype Circulating Tumor Cells in Hepatocellular Carcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2019, 23(12):2354-2361.

[14] Cabel L, Proudhon C, Gortais H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility [J]. *International journal of clinical oncology*, 2017, 22(3):421-430.

[15] Yan J, Fan Z, Wu X, et al. Circulating tumor cells are correlated with disease progression and treatment response in an orthotopic hepatocellular carcinoma model[J]. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2015, 87(11):1020-1028.

[16] Shen J, Wang WS, Zhu XL, et al. High Epithelial Cell Adhesion Molecule-Positive Circulating Tumor Cell Count Predicts Poor Survival of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma Treated with Transcatheter Arterial Chemoembolization [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2018, 29(12):1678-1684.

[17] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2022, 42(3):241-273.

[18] Lian S, Yang L, Feng Q, et al. Folate-Receptor Positive Circulating Tumor Cell Is a Potential Diagnostic Marker of Prostate Cancer[J]. *Frontiers in oncology*, 2021, 11:708214.

[19] Yan S, Guo W, Liu Y, et al. The role of folate receptor-positive circulating tumor cell analysis in the diagnosis of colorectal cancer: a retrospective cohort study [J]. *International journal of clinical oncology*, 2022, 27(3):538-544.

[20] 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]. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2015, 10(8):1163-1171.

[21] Furuse J, Matsutani S, Yoshikawa M, et al. Diagnosis of portal vein tumor thrombus by pulsed Doppler ultrasonography [J]. *Journal of clinical ultrasound; JCU*, 1992, 20(7):439-446.

[22] 周伟, 蒋雪峰, 宋玉春, 等. 肝脏门静脉血栓与癌栓的发病机制及影像学表现[J]. *基层医学论坛*, 2018, 22(01):120-122.

[23] Zhang ZM, Lai EC, Zhang C, et al. The strategies for treating primary hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus [J]. *International journal of surgery (London, England)*, 2015, 20:8-16.

[24] Tsochatzis EA, Senzolo M, Germani G, et al. Systematic review: portal vein thrombosis in cirrhosis [J]. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2010, 31(3):366-374.

[25] Chen H, Trilok G, Wang F, et al. A single hospital study on portal vein thrombosis in cirrhotic patients - clinical characteristics & risk factors [J]. *The Indian Journal of Medical Research*, 2014, 139(2):260-266.

[26] Loudin M, Ahn J. Portal Vein Thrombosis in Cirrhosis [J]. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2017, 51(7):579-585.

[27] Chawla YK, Bodh V. Portal vein thrombosis [J]. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2015, 5(1):22-40.

(收稿日期:2022-03-06)

(本文编辑:孙清源)