doi:10.16118/j.1008-0392.2020.01.008

·临床研究·

胃癌患者围手术期循环肿瘤细胞变化及其与临床病理分期的相关性

葛海燕[1,2],张振宇[1],茅丽玲[3],纪 昉[1],朱 哲[1],高 玮[1],付正伟[1]

(1. 同济大学附属东方医院胃肠肛肠外科,上海 200120;2. 浙江省平湖市第二人民医院,浙江 平湖 314200;
3. 上海市嘉定区南翔镇社区卫生服务中心,上海 201802)

【摘要】目的 了解胃癌患者围手术期外周血中循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)数量的变化及其与肿瘤病理分期的相关性。**方法** 应用肿瘤细胞微流控芯片技术检测手术前 1 天、手术后 1 周胃癌患者 CTCs,并与其临床病理资料进行对比,阐明两者之间的相关性。**结果** 在 92 例胃癌患者中,术前外周血 CTCs 阳性者 58 例,阳性率为 63%;CTCs 阳性的胃癌患者与肿瘤浸润深度、脉管侵犯、神经侵犯都具有相关性($P=0.02$);术后 1 周 60.5%患者 CTCs 消失或减少,CTCs 数量没有变化甚至增多者主要见于 TNM 分期晚(Ⅳ期)患者。**结论** 胃癌患者外周血中 CTCs 与其临床病理分期具有密切相关性。

【关键词】胃癌;循环肿瘤细胞;肿瘤病理分期;胃癌根治术;临床研究

【中图分类号】R730.49 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1008-0392(2020)01-0047-04

Correlation of perioperative circulating tumor cells with clinicopathologic features of gastric cancer patients

GE Hai-yan[1,2], *ZHANG Zhen-yu*[1], *MAO Li-ling*[3], *JI Fang*[1], *ZHU Zhe*[1], *GAO Wei*[1], *FU Zheng-wei*[1]

(1. Dept. of Gastrointestinal Surgery, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China;
2. Second People's Hospital, Pinghu 314200, Zhejiang Province, China;
3. Nanxiang Community Health Service Center, Jiading District, Shanghai 201802, China)

【Abstract】Objective To investigate the correlation of perioperative circulating tumor cells (CTCs) with clinicopathologic features in gastric cancer patients. **Methods** The circulating tumor cells were detected with micro-fluid chip technique in 92 gastric cancer patients at 1 day before operation and 1 week after operation. The relationship between the CTCs and tumor clinicopathologic features of patients was analyzed. **Results** The positive CTCs were detected in 58 cases (63%) 1 day before operation. The positive CTCs were significantly correlated with cancer infiltration depth, blood vessel infiltration, and nerve infiltration ($P=0.02$). The CTCs was negative or decreased in 60.5% of patients after 1 week of operation. The CTCs were increased or not changed mainly in TNM stage Ⅳ patients. **Conclusion** The positive CTCs in gastric cancer patients are closely correlated with clinicopathologic features.

【Key words】gastric cancer; circulating tumor cells; tumor pathologic stages; radical resections for gastric cancer; clinical research

收稿日期:2019-08-07
基金项目:上海市科学技术委员会项目(16411970800);浙江省嘉兴市科技局课题项目(2015AY23071)
作者简介:葛海燕(1958—),男,主任医师、教授,硕士.E-mail:gesurgery@163.com
通信作者:付正伟.E-mail:fzwtjd@163.com

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,而且大多数胃癌患者在首次诊断时就属于进展期胃癌,这些患者虽然接受了根治性手术和化疗等综合治疗,但仍然存在较高的肿瘤复发或者远处转移的风险,导致这些患者的预后差,5年生存率低。如何尽早发现胃癌,预判肿瘤病理分期,对提高胃癌患者的远期生存率有重要意义。

肿瘤患者外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)近年来受到普遍关注[1]。由于CTCs可能具有生物学活性和转移潜能,近年来对于CTCs与临床肿瘤病理之间的相关性问题,引起了广泛的重视。一些研究者认为,通过检测肿瘤患者外周血中CTCs的数量,可以为判断肿瘤的临床病理分期和预后提供客观的依据[2]。本研究检测了92例胃癌患者术前、术后1周的外周血中CTCs的变化,并且将CTCs检测结果与其肿瘤病理分期进行相关性分析,探讨胃癌患者外周血中CTCs与肿瘤病理分期之间的联系。

1　资料与方法

1.1　研究对象

将同济大学附属东方医院自2015年6月—2018年12月收治的胃癌患者纳入本研究。纳入标准:(1)年龄不限;(2)经胃镜检查和活组织病理学检查明确诊断为胃癌;(3)患者入组前未接受任何化学药物、放射、免疫制剂、中医中药等治疗。以胃部良性疾病(慢性胃炎、胃十二指肠溃疡、胃息肉)患者作为对照组。患者签署知情同意书,研究方案经过医院伦理委员会审核同意[(2016)研审第(056)号]。

1.2　CTCs检测

分别于手术前1天、术后第7天清晨抽取肘正中静脉血5 mL,用EDTA抗凝管收集保存;裂解红细胞后,使用微流控芯片进行液体处理和CTCs捕获,利用anti-CD45抗体荧光染色白细胞,DAPI染色细胞核,CEP8(8号染色体探针)荧光原位杂交(FISH)染色体呈现异倍体(2倍以上)细胞,荧光显微镜下观察,并计数目标细胞。

1.3　CTCs判断标准[1-2]

(1)光镜下有完整的细胞核,细胞呈圆形、椭圆形或长形;(2)荧光下细胞形态及边缘完整,CD45(抗白细胞表面抗原)阴性;(3)细胞核DAPI核染色阳性,细胞核直径大于8 μm,并且核形状不规则;(4)CEP8>两个信号点;(5)同一个标本中符合上述标准的细胞≥2个视为CTCs阳性。

1.4　胃癌患者资料收集

记录胃癌患者手术后的病理检查资料,包括肿瘤细胞的浸润深度、淋巴结转移数量、神经侵犯、脉管浸润、TNM分期等信息,并进行胃癌患者CTCs与肿瘤浸润深度、肿瘤分化、淋巴结转移数量、TNM分期等相关性分析。

1.5　统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示并采用t检验分析,采用χ^2检验或Rsher确切概率法分析原发肿瘤浸润深度、肿瘤分化、淋巴结转移数量、TNM分期与CTCs检出水平之间的关系,均为双侧检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　一般资料

列入本研究的胃癌患者共92例(男性56例,女性36例),年龄分别为32~82岁,平均年龄(65.3±12.6)岁。手术前1天从患者外周血中检出CTCs阳性58例,阳性率63%。CTCs阳性的鉴别标准为DAP1染色(+)、CEP8染色(+)、CD45染色(−),见图1。

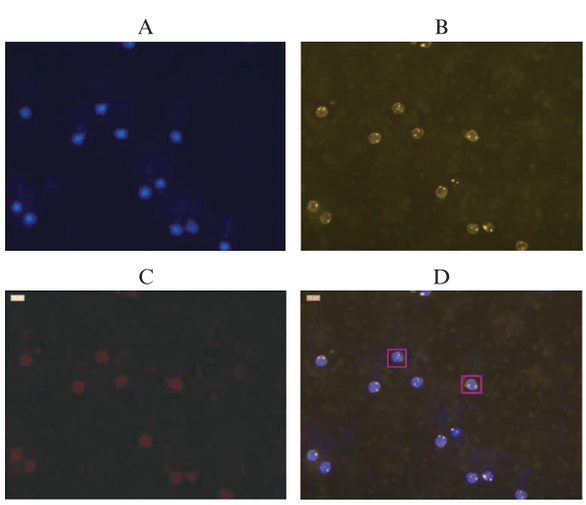


图1　CTCs阳性的鉴别标准

Fig.1　The criteria for identifying positive CTCs

主机:Leica DM3000;软件版本:Leica Application Suite Version 4.9.0;放大倍数×400;A:DAPI标记阳性细胞;B:CEP8标记阳性细胞;C:CD45阴性细胞;D:将三者叠加的效果图,具备DAP1(+)CEP8(+)CD45(−)特征的细胞为CTCs

2.2　胃癌患者外周血 CTCs 与临床病理之间的相关性

92 例胃癌患者手术前的外周血 CTCs 检测结果以及与性别、年龄、肿瘤浸润深度、TNM 分期、神经侵犯、脉管侵犯等主要临床病理资料的统计分析结果见表 1。结果显示，胃癌患者外周血中 CTCs 的阳性率与他们的年龄、性别没有相关性（$P>0.05$），但是，胃癌患者 CTCs 的阳性率与肿瘤浸润深度、TNM 分期、神经与脉管侵犯的差异都具有统计学意义（$P<0.05$）。在肿瘤的浸润深度和 TNM 分期方面，不同组别之间差异也有统计学意义（$P<0.05$），随着肿瘤侵犯深度的加深，外周血中循环肿瘤细胞的阳性率也随之增加，患者中具有脉管侵犯的 CTCs 阳性率显著高于没有脉管侵犯者（$P<0.05$）。

表 1　CTCs 阳性率与患者的性别、年龄，肿瘤的 T 分期、TNM 分期及神经、脉管侵犯的相关性

Tab.1　The relationship of positive CTCs with gender, age, T stage, TNM stage, nerve and vascular invasion

因素	n	阳性数（率）	P
性别			>0.05
男	56	37（66%）	
女	36	21（58.3%）	
年龄/岁			>0.05
≤65	51	32（62.7%）	
>65	41	26（63.4%）	
T 分期			<0.05
T1	4	1（25%）	
T2	12	6（50%）	
T3	45	29（64.4%）	
T4	31	22（70.9%）	
TNM 分期			<0.05
Ⅰ期	4	1（25%）	
Ⅱ期	11	6（54.5%）	
Ⅲ期	52	32（61.5%）	
Ⅳ期	25	19（76%）	
神经侵犯			<0.05
（+）	56	37（66.1%）	
（-）	36	21（58.3%）	
脉管侵犯			<0.01
（+）	62	48（77.4%）	
（-）	28	12（42.9%）	

2.3　肿瘤不同浸润程度对 CTCs 的影响

将肿瘤组织不同浸润深度的病例进行分组，将肿瘤分期为 T1、T2 分为一组，肿瘤分期为 T3、T4 分为一组。从表 2 可以看到浸润程度深的患者，CTCs 阳性率显著高于浸润深度浅的患者（$P<0.05$）。

表 2　胃癌患者不同 T 分期与 CTCs 阳性率的比较

Tab.2　The relationship between CTCs and T stages in gastric cancer patients

分期	例数	检出数	阳性率（%）	P
T1+T2	4	1	25	<0.05
T3+T4	22	9	40.9	

2.4　手术前后胃癌患者 CTCs 阳性率的变化

86 例患者在术后 1 周进行了 CTCs 检测，占 93.5%，其余患者由于提前出院、标本保存等因素，未能检测。手术前 CTCs 阳性的 58 例胃癌患者术后 1 周的检测结果：CTCs 数量减少或者归零者 35 例，占 60.3%；CTCs 数量无变化者 15 例，占 25.9%；CTCs 数量增加者 8 例，占 13.8%。这些结果表明，胃癌根治术后短期内就能够有效减少患者的 CTCs 负荷，获益人群达到 60%左右。但是还有近 26%的患者 CTCs 并没有减少，甚至少部分患者（占 13.8%）术后 CTCs 反而升高。分析这部分患者的临床病理资料，发现术后 CTCs 没有减少甚至是增加者，主要是 TNM 分期较晚（Ⅲ、Ⅳ期）患者，伴有血管内癌栓、周围组织癌结节和腹膜癌结节形成等晚期现象，见表 3。

表 3　58 例胃癌患者术后 CTCs 变化与临床病理的关系

Tab.3　The relationship between the CTCs after operation of 58 gastric cancer patients and clinical pathological changes

CTCs 数量	Ⅰ期	Ⅱ期	Ⅲ期	Ⅳ期
测不出	1	6	5	2
数量减少	0	3	12	6
数量无变化	0	1	8	6
数量增加	0	0	3	5

3　讨　　论

实体癌的微转移是肿瘤恶性特征的重要表现之一，与肿瘤的临床病理分期、转移与复发、预后具有十分紧密的关系[3-4]。

CTCs 检测是近年来兴起的一项临床新技术，通过对外周血中 CTCs 的分离富集以及对 CTCs 的检测等步骤，直接检测外周循环血液中肿瘤细胞的存在与否[5]。因此，文献报道在肺癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、结直肠癌等等多种实体瘤患者的外周血中都能检测到 CTCs，并且 CTCs 的恶性度与原发肿瘤细胞大致相同[6-8]。一些研究表明，CTCs 的存在与

肿瘤分期具有明显的相关性,CTCs数量越多,患者面临远处转移的肿瘤细胞负荷越重,未来发生转移的可能性就越大[9-10]。外周血中的异倍体细胞被认为是CTCs的标志之一[2]。

从本研究结果可以看出,胃癌患者的外周血中确实能够检测到CTCs,阳性率为63%,与文献报道基本相同。田晓坤等[10]报道在41例胃癌患者外周血中,有29例CTCs检测结果为阳性,阳性率为70.7%。本研究结果还表明,胃癌患者外周血中CTCs的阳性率与临床肿瘤病理分期具有相关性,分期越晚,CTCs阳性率越高,而早期患者的CTCs阳性率很低。但是也有文献报道,胃癌患者外周血中CTCs阳性率与肿瘤的分期、分化程度和淋巴结转移均无明显相关性[9]。因此,对于胃癌患者外周血中CTCs阳性率与临床肿瘤病理的联系,值得在更大范围,纳入更多病例进一步深入研究。

对于胃癌根治性手术后CTCs的变化,目前文献仍然报道很少。本次初步观察结果表明,多数患者在行胃癌根治性手术后,CTCs转阴或者减少(60.5%),反映随着原发肿瘤的切除,外周血中CTCs也随之减少或消失,表明了手术的根治性与彻底性。但是,仍有总数近25.9%的患者CTCs没有明显变化,13.8%的患者CTCs数量还有所增加,并且与其TNM分期晚(Ⅲ、Ⅳ)密切相关。这些现象提示:(1)对于病理分期晚的胃癌患者,单纯的手术切除并不能消除所有的CTCs,需要联合术后化疗等综合治疗措施,以完善治疗方案;(2)对于胃癌根治术后CTCs仍然阳性的患者,观察术后1周还是不够的,需要增加术后2、4周等节点的检测,以便能够更加全面地了解手术后CTCs的变化规律;(3)目前的CTCs检测技术还不能完全反映外周血中肿瘤细胞的状况,由于CTCs的数量极少,不可能在外周血中形成均匀分布,随机的单次采血检测,就大大增加了捕捉CTCs的难度和偶然性。因此,研究团队认为即使CTCs检测阴性,也并不能代表外周血中没有CTCs。今后可以考虑联合应用microRNAs检测等技术[11],进一步丰富外周血中肿瘤信号的检测。

志谢　在本研究实施过程中,得到宁波美晶医疗技术有限公司的技术支持,在此深表谢意!

【参考文献】

[1] PACHMANN K, CLEMENT J H, SCHNEIDER C P, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer[J]. Clin Chem Lab Med, 2005,43(6): 617-627.

[2] KRAJCOVIC M, OVERHOLTZER M. Mechanisms of ploidy increase in human cancers: a new role for cell cannibalism[J]. Cancer Res, 2012,72(7): 1596-1601.

[3] AZEVEDO A S, FOLLAIN G, PATTHABHIRAMAN S, et al. Metastasis of circulating tumor cells: favorable soil or suitable biomechanics, or both?[J]. Cell Adhesion Migr, 2015,9(5): 345-356.

[4] SPRING B Q, ABU-YOUSIF A O, PALANISAMI A, et al. Selective treatment and monitoring of disseminated cancer micrometastases *in vivo* using dual-function, activatable immunoconjugates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014,111(10): E933-E942.

[5] 黄子凌,宇小婷,易祥华.循环肿瘤细胞检测技术的研究进展[J].同济大学学报(医学版),2018,39(3):123-127.

[6] COURT C M, ANKENY J S, HOU S, et al. Improving pancreatic cancer diagnosis using circulating tumor cells: prospects for staging and single-cell analysis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015,15(11): 1491-1504.

[7] TANG L H, ZHAO S S, LIU W, et al. Diagnostic accuracy of circulating tumor cells detection in gastric cancer: systematic review and meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2013,13: 314.

[8] HARDINGHAM J E, GROVER P, WINTER M, et al. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer: 20 years of progress[J]. Mol Med, 2015,21(Suppl 1): S25-S31.

[9] ZHANG Z Y, GE H Y. Micrometastasis in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2013,336(1): 34-45.

[10] 田晓坤,李玉明,胡宝光,等.胃癌患者外周血Cyttel循环肿瘤细胞检测及临床意义[J].中华实验外科杂志,2017,34(2): 208-210.

[11] ZHANG Z Y, DAI Z L, YIN X W, et al. Meta-analysis shows that circulating tumor cells including circulating microRNAs are useful to predict the survival of patients with gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2014,14: 773.