

外周血循环肿瘤细胞在 49 例鼻咽癌中表达

毛燕娇,徐剑锋,尹伟

(杭州市肿瘤医院,浙江 杭州 310002)

摘要: [目的] 分析外周血循环肿瘤细胞在鼻咽癌中的表达及其临床意义。[方法] 采用 CanPatrol™ 循环肿瘤细胞分型检测技术检测循环肿瘤细胞在 49 例初治鼻咽癌和 20 例正常人中的表达情况,分析循环肿瘤细胞的表达与分期和 EB 病毒的关系。[结果] 鼻咽癌患者中循环肿瘤细胞阳性率为 57.1%,而正常人阳性率为 0,差异有统计学意义($\chi^2=16.991, P<0.05$)。M₀ 期和 M₁ 期患者中,循环肿瘤细胞阳性率分别为 48.8% 和 87.5%,差异有统计学意义($\chi^2=6.853, P=0.008$);EBV-DNA 阴性和阳性患者中,阳性率分别为 39.4% 和 88.2%,差异有统计学意义($\chi^2=6.983, P=0.013$)。[结论] 循环肿瘤细胞与鼻咽癌有无全身转移和 EBV-DNA 密切相关,可用于鼻咽癌病情的评估。

关键词: 循环肿瘤细胞;鼻咽癌;CanPatrol™

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)02-0097-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.02.B005

Expression of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of 49 Cases with Nasopharyngeal Carcinoma

MAO Yan-jiao, XU Jian-feng, YIN Wei

(Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China)

Abstract: [Objective] To analyze the expression of circulating tumor cells (CTCs) in patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) and its clinical significance. [Methods] The expression of CTCs in 49 non-treated NPC patients and 20 healthy persons was detected by CanPatrol™ CTC detection technology. The relationship of CTCs expression with stage and EB virus were analyzed. [Results] The positive rate of CTCs in NPC patients and healthy person was 57.1% and 0 respectively ($\chi^2=16.991, P<0.05$). The positive rate in M₀ and M₁ NPC patients was 48.8% and 87.5% respectively ($\chi^2=6.853, P=0.008$). The positive rate in NPC patients with negative EBV-DNA and positive EBV-DNA was 39.4% and 88.2% ($\chi^2=6.983, P=0.013$). [Conclusion] CTCs are closely related to systemic metastasis and EBV-DNA of nasopharyngeal carcinoma, it can be used to evaluate the condition of nasopharyngeal carcinoma.

Subject words: circulating tumor cells; nasopharyngeal carcinoma; CanPatrol™

我国是鼻咽癌高发地区,随着影像和放疗技术的发展,鼻咽癌患者 5 年总生存率达到 70%~80%,失败的主要原因是远处转移^[1,2],因此寻找鼻咽癌评估预后的指标非常重要。

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTC) 因分离检测方法的突破,近年受到临床日益关注。大部分 CTCs 在伴随外周循环的过程中发生凋亡,或直

接被血细胞吞噬,只有少数能逃逸并锚着发展成为转移灶,因此分离、鉴定和研究最具转移潜能的 CTC 是关键^[3,4]。循环肿瘤细胞在血液循环中的比例极低,每 10⁸~10⁹ 个外周血细胞中才可能有 1 个^[5]。最近的研究结果显示,在肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌等实体肿瘤中,CTC 已被发现对肿瘤的辅助诊断、疗效评价、复发转移监测和预后判断有重要意义^[6-10]。而目前关于鼻咽癌 CTCs 与患者临床特征及转移相关性的研究仍较有限,临床意义尚无确切定论。因此,本研究旨在分析外周血 CTC 的表达与鼻咽癌的临床相关性,为鼻咽癌病情评估提供依据。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划 A 类项目(2016KYA157)

通信作者: 毛燕娇,副主任医师,硕士;杭州市肿瘤医院耳鼻咽喉科,浙江省杭州市上城区严官巷 34 号(310002);E-mail: 1441470646@qq.com

收稿日期: 2018-08-26; **修回日期:** 2018-12-16

1 资料与方法

1.1 一般资料

杭州市肿瘤医院放疗科 2016 年 7 月至 2017 年 6 月收治的 49 例鼻咽癌患者纳入研究,同期选取 20 名健康志愿者作为对照,检测 CTCs。49 例患者病理类型为分化型非角化性癌 6 例,未分化型非角化性癌 43 例。经患者知情同意后,在治疗前检测其 CTCs,同时检测 EB 病毒 DNA (EBV-DNA) 和衣壳抗原 IgA (viral capsid antigen-IgA, VCA-IgA)。对照组男性、女性各 10 例;实验组男性 35 例,女性 14 例,年龄 26~77 岁,平均年龄 49 岁;临床分期采用鼻咽癌 2008 分期标准^[11], I 期 1 例(2.0%), II 期 5 例(10.2%), III 期 19 例(38.7%), IVa 期 20 例(40.8%), IVb 期 4 例(8.2%)。I 期患者接受根治性放疗; II~IVa 期患者接受根治性的联合铂类的同期放化疗(鼻咽部和颈部阳性淋巴结剂量 70.5Gy/6 周;颈部阴性淋巴结给予预防量 54Gy/6 周); IVb 期患者接受顺铂联合多西紫杉醇为主的姑息性化疗,如转移灶完全缓解则接受根治性放疗。该项目经杭州市肿瘤医院伦理委员会审核批准。

1.2 检测方法

采用广州益善公司开发的 CanPatrolTM 方法检测鼻咽癌患者外周血中的 CTCs。其实验原理为:首先裂解外周血中的红细胞,并利用 CTCs 与白细胞的大小差异通过纳米技术进行 CTCs 的分离和富集,然后通过多重 mRNA 原位分析方法对富集的 CTCs 进行特异性基因核酸定位,从而达到对 CTCs 进行分型和鉴定的目的,所用到的核酸探针及序列见 Table 1,具体步骤如图 1。

1.2.1 样本采集

使用 8 号采血针和 EDTA 抗凝采血管采集 10ml 外周血,血样采集后,将 EDTA 抗凝采血管上下颠倒混匀 10 次,再经样本采集连通器将血液输入样本保存管内,上下颠倒 10 次,充分混匀,室温放置 30min。

1.2.2 人外周血 CTCs 富集

将样本保存管内的血液离心,去除上清,再将样本保存管中的液体转移至过滤器中,过滤后用甲醛溶液室温固定 60min。

1.2.3 多重 RNA 原位分析检测

经透化和消化后依次加入探针工作液、预扩增工作液、显色工作液,在样本上加抗淬灭剂(含 DAPI)后,再放置 5min 于显微镜下直接进行观察。

Table 1 Nucleic acid probe sequence

Gene	Sequence (5'→3')
EpCAM	TGGTGCTCGTTGATGAGTCAAGCCAGCTTTGAGCAAATGA
	AAAGCCCATCATTTGTTCTGGCTCTCATCGCAGTCAGGATC
	TCCTTGCTCTGTTCTTCTGACCTCAGAGCAGGTTATTTTCAG
CK8	CGTACCTTGTCTATGAAGGAACCTTGCTCTCCAGCATCTTG
	CCTAAGGTTGTTGATGTAGCCTGAGGAAGTTGATCTCGTC
	CAGATGTGTCCGAGATCTGGTGACCTCAGCAATGATGCTG
CK18	AGAAAGGACAGGACTCAGGCGAGTGCTGAAGCTCATGCTG
	TCAGGTCCTCGATGATCTTGCAATCTGCAGAACGATGCGG
	AAGTCATCAGCAGCAAGACGCTGCAGTCGTGTGATATTGG
CK19	CTGTAGGAAGTCATGGCGAGAAGTCATCTGCAGCCAGACG
	CTGTTCCGTCTCAAACCTTGTTCTTCTTCAGGTAGGCCAG
	CTCAGCGTACTGATTTCTCTGTAACCAGGCTTCAGCATC
Vimentin	GAGCGAGAGTGGCAGAGGACCTTTGTCGTTGGTTAGCTGG
	CATATTGCTGACGTACGTCAGAGCGCCCCTAAGTTTAA
	AAGATTGCAGGGTGTTTTTCGGGCCAATAGTGTCTTGGTAG
Twist	ACAATGACATCTAGGTCTCCCTGGTAGAGGAAGTCGATGT
	CAACTGTTTCAGACTTCTATCCCTCTTGAGAATGCATGCAT
	TTTCAGTGGGCTGATTGGCACTTACCATGGGTCCTCAATAA
CD45	TCGCAATTTCTTATGCGACTCTGTATGAGACAGTCATGT
	GTATTTCCAGCTTCAACTTCCCATCAATATAGCTGGCATT
	TTGTGCAGCAATGTATTTCTACTTGAACCATCAGGCATC

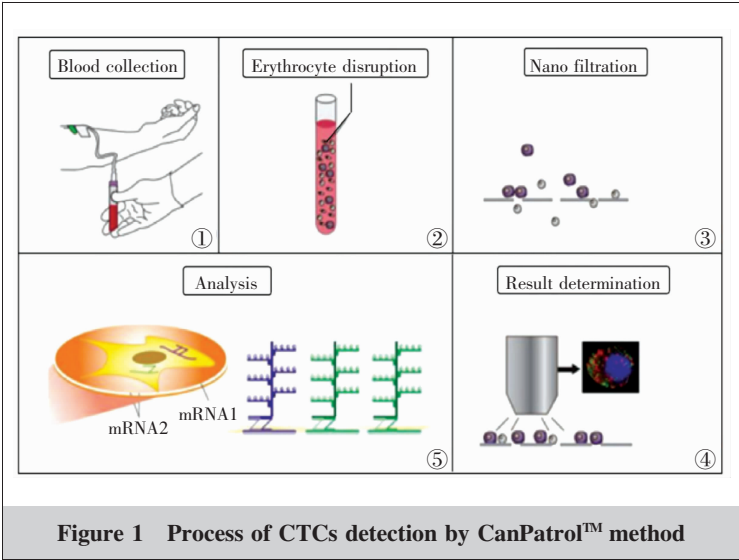
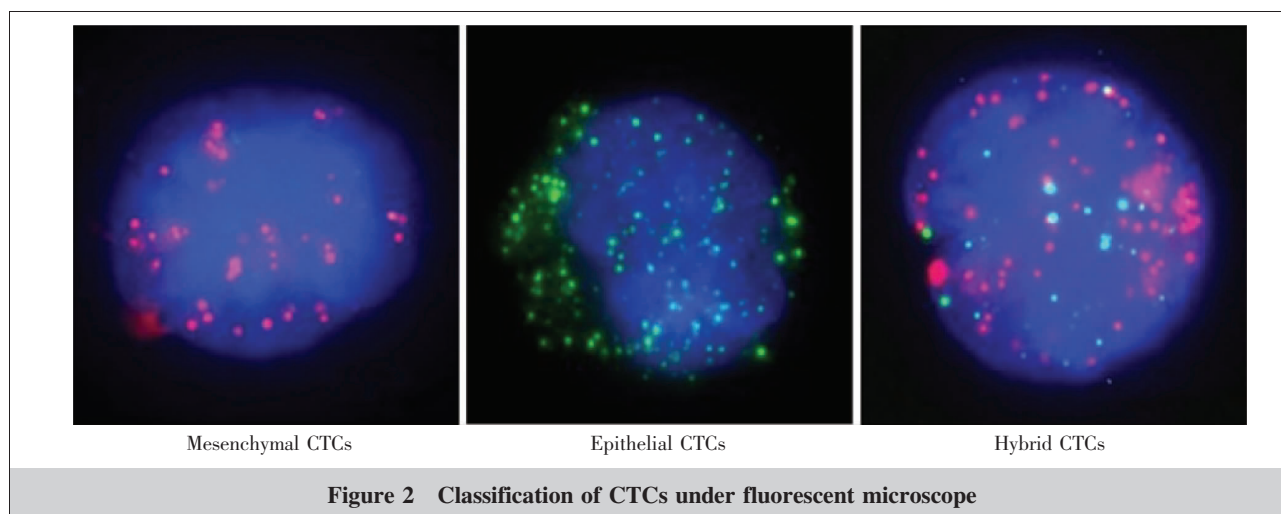


Figure 1 Process of CTCs detection by CanPatrolTM method



1.3 CTCs 阳性判定标准

采用多重 RNA 探针,分别针对多种 CTCs 特异性基因,通过不同颜色荧光信号将 CTCs 分型:细胞内 CD45(-)、EpCAM(+) 和 CK8/18/19(+) 时,显微镜下可见红色荧光信号,为上皮型 CTCs;细胞内 CD45(-)、vimentin(+) 和 twist(+),显微镜下可见绿色荧光信号,为间质性 CTCs;细胞内同时显示红色荧光及绿色荧光信号的则为混合型 CTCs (Figure 2)。定义鼻咽癌患者外周血中检测到的 CTCs 数量 ≥ 2 个/5ml 为 CTCs 阳性,CTCs 数量 < 2 个/5ml 为 CTCs 阴性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件包进行统计学分析。各组资料的比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鼻咽癌患者与正常人中 CTCs 的表达差异

鼻咽癌患者中 CTCs 阳性患者 28 例,阳性率为 57.1%,而正常人中 CTCs 阳性率为 0,两者差异有统计学意义 ($\chi^2=16.991, P < 0.05$)。

2.2 鼻咽癌患者 CTCs 与临床特征的关系

M₀ 期和 M₁ 期患者中,CTCs 阳性率分别为 48.8% (20/41) 和 87.5% (7/8),差异有统计学意义 ($\chi^2=6.853, P < 0.05$)。不同性别、年龄、病理类型、T 分期、N 分期和总分期各组中,CTCs 阳性率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见 Table 2。

与 EBV-DNA、VCA-IgA 的关系

EBV-DNA 阴性的鼻咽癌患者中,CTCs 阳性率为 39.4% (13/33),而在 EBV-DNA 阳性的患者中阳性

Table 2 Correlation between CTCs and clinical characteristics in NPC patients

Clinical characteristics	n	CTCs		χ^2	P
		+	-		
Gender				0.005	0.898
Male	35	20	15		
Female	14	8	6		
Age(years)				0.902	0.325
≤ 49	25	15	10		
> 49	24	13	11		
Pathologic type				0.102	0.803
Differentiated nonkeratosis	6	3	3		
Undifferentiated nonkeratosis	43	25	18		
T stage				1.715	0.701
T ₁	10	6	4		
T ₂	17	9	8		
T ₃	10	6	4		
T ₄	12	7	5		
N stage				0.846	0.749
N ₀	3	2	1		
N ₁	18	10	8		
N ₂	21	12	9		
N ₃	7	4	3		
M stage				6.853	0.008
M ₀	41	20	21		
M ₁	8	7	1		
Clinical stage				7.824	0.089
I	1	0	1		
II	5	2	3		
III	19	9	10		
IVa	16	10	6		
IVb	8	7	1		

率为 88.2%(15/17), 两者差异有统计学意义 ($\chi^2=6.983, P<0.05$)。VCA-IgA 阴性和阳性的患者中 CTCs 阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。以 VCA-IgA 中位值 4.23 将患者分为 VCA-IgA ≤ 4.23 组和 VCA-IgA > 4.23 组, 两组间 CTCs 阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见 Table 3。

Table 3 Correlation between CTCs and EBV-DNA, VCA-IgA in NPC patients

Clinicopathological parameters	n	CTCs		χ^2	P
		+	-		
EBV-DNA				6.983	0.013
<400	33	13	19		
≥ 400	17	15	2		
VCA-IgA				2.211	0.117
<1:10	7	3	4		
$\geq 1:10$	42	25	17		
VCA-IgA num				0.014	0.985
≤ 4.23	26	15	11		
> 4.23	23	12	10		

3 讨 论

鼻咽癌是我国南方和东南亚各国高发的恶性肿瘤之一, 近年来, 随着调强放疗等技术的普及, 其生存率获得进一步提高^[12]。治疗失败的主要原因是远处转移和局部失败^[1]。分子靶向治疗的兴起, 越来越多的分子标志物被用来对肿瘤进行疗效预测和预后评价^[13]。1896 年, 澳大利亚学者 Ashworth 从 1 例转移性肿瘤患者血液中发现了一种血细胞与肿瘤细胞极为相似, 并率先提出 CTCs 概念^[14]。由于 CTCs 易于获取, 不需要进行肿瘤活检, 可用于检测肿瘤的基因状态, 指导靶向治疗, 被称为“液体活检”^[15]。近些年受到越来越多关注, 目前, CTCs 的检测方法有很多种, 如 Cell Search System、ELISPOT (酶联免疫斑点技术)、CTC 芯片技术、FAST (光导纤维阵列扫描)、LSC (激光扫描细胞计量技术) 及 qRT-PCR 等。CanPatrol™ 系统是目前唯一可以同步实现 CTCs 形态分型、细胞分型和分子分型的先进检测技术, 该系统主要通过纳米过滤技术来富集 CTCs, 而不需要依赖特异生物标志物 (如 EpCAM), 从而可以减少鼻咽癌患者 CTCs 的丢失, 具有高灵敏度、高特异性、可重复性等优点^[16]。

本研究中, 鼻咽癌患者中 CTCs 阳性率为

57.1%, 而正常人阳性率为 0, 两者差异有统计学意义 ($\chi^2=16.991, P<0.05$)。说明本研究使用的 CTCs 检测方法有较好的敏感度和特异性, 在正常人中检测不到 CTCs。

蔡清清等^[17]应用改良免疫磁珠富集联合免疫荧光细胞化学技术检测鼻咽癌患者外周血 CTCs, 20 例正常人的外周血中未检测到 CK8/18, 鼻咽癌患者外周血 CK8/18 阳性率为 82.9% (63/76, $P<0.05$)。此结果与本研究类似, 阳性率有差异可能因检测方法不同。本研究的检测方法使用纳米技术富集肿瘤细胞, 不受上皮标志物表达限制, 可提高 CTCs 检出的敏感度和特异性。

本研究发现, 在 M₀ 期和 M₁ 期患者中, CTCs 阳性率分别为 48.8% 和 87.5% ($P<0.05$)。由于 CTCs 是脱落进入血液循环系统的肿瘤细胞, 因此极易随着血液循环进入其他器官, 导致肿瘤转移。在乳腺癌患者中发现, CTCs 可以早期预测肿瘤的转移^[7]。肝细胞癌患者外周血 CTCs 的数量与肿瘤转移及预后有关, CTCs 的数量 ≥ 5 时, 可能肿瘤更具转移倾向, 预后更差, 患者生存期更短^[18]。蔡清清等^[18]的研究结果显示, 鼻咽癌患者外周血 CTCs 个数分别为 0、1、2、3、4、5、6 者的 2 年无复发生存率分别为 100%、100%、100%、94.1%、71.4%、53.3% 和 44.4% ($P<0.01$), 2 年总生存率分别为 100%、100%、100%、100%、100%、80.0% 和 77.8% ($P>0.05$)。吴君心等^[19]应用鼻咽癌患者外周血中单个核细胞进行不同抗体的标记检测显示, 鼻咽癌外周血 CTCs 阴性患者的 OS 长于 CTCs 阳性患者, 3 年总生存率分别为 100% 和 85.7%, 但差异无统计学意义 ($P=0.067$), 而鼻咽癌外周血 CTCs 阳性患者的 PFS 较 CTCs 阴性患者显著缩短, 3 年无进展生存率分别为 73.7% 和 92.9% ($P=0.029$)。提示 CTCs 阳性鼻咽癌患者的总生存期和无复发生存期更短, 应高度怀疑肿瘤转移的可能性, 提示预后不良。

本研究还发现, 在 EBV-DNA 阴性的鼻咽癌患者中, CTCs 阳性率为 39.4%, 而在 EBV-DNA 阳性的患者中阳性率为 88.2%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=6.983, P<0.05$)。EB 病毒感染与鼻咽癌关系密切, EBV-DNA 可用于鼻咽癌的早期诊断和分期, 并可监测鼻咽癌的复发和转移。CTCs 和 EBV-DNA 相关, 提示 CTCs 与鼻咽癌的疾病进展密切相关, 对鼻咽

癌的诊断和复发转移监测具有临床价值。

综上所述,CTCs 与鼻咽癌转移和 EBV-DNA 密切相关,可用于鼻咽癌病情的评价。后续继续随访追踪患者总生存和无进展生存时间对评估预后提供基础。同时将扩充样本量,对于 CTCs 的预后预测价值还有待以后随访进一步验证。

参考文献:

- [1] Li JX,Huang SM,Jiang XH,et al. Local failure patterns for patients with nasopharyngeal carcinoma after intensity-modulated radiotherapy[J]. Radiat Oncol,2014,9:87.
- [2] Ng WT, Lee MC, Hung WM, et al. Clinical outcomes and patterns of failure after intensity-modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 79(2): 420–428.
- [3] Attard G, De Bono JS. Utilizing circulating tumor cells: challenges and pitfalls[J]. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(1): 50–58.
- [4] Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells [J]. Cell, 2009, 139(7): 1315–1326.
- [5] Ross JS, Slodkowska EA. Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2009, 132(2): 237–245.
- [6] Dorsey JF, Kao GD, MacArthur KM, et al. Tracking viable circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing definitive radiation therapy: pilot study results[J]. Cancer, 2015, 121(1): 139–149.
- [7] Mu Z, Wang C, Ye Z, et al. Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 154(3): 563–571.
- [8] van Dalum G, Stam GJ, Scholten LF, et al. Importance of circulating tumor cells in newly diagnosed colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2015, 46(3): 1361–1368.
- [9] Huang X, Gao P, Sun J, et al. Clinicopathological and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with gastric cancer: a meta-analysis [J]. Int J Cancer, 2015, 136(1): 21–33.
- [10] Zhang Y, Wang F, Ning N, et al. Patterns of circulating tumor cells identified by CEP8, CK and CD45 in pancreatic cancer[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): 1228–1233.
- [11] China Working Committee on Clinical Staging of Nasopharyngeal Carcinoma. Report on the revision of 92 stages of nasopharyngeal carcinoma[J]. Chinese Journal of Radiation Oncology, 2009, 18(1): 2–6. [中国鼻咽癌临床分期工作委员会. 鼻咽癌 92 分期修订工作报告 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2009, 18(1): 2–6.]
- [12] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115–132.
- [13] Mehta S, Shelling A, Muthukaruppan A, et al. Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine[J]. Ther Adv Med Oncol, 2010, 2(2): 125–148.
- [14] Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death[J]. Austral Med J, 1869, 20(14): 146–147.
- [15] Wu S, Liu S, Liu Z, et al. Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers [J]. PLoS One, 2015, 10(4): 76–81.
- [16] Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer[J]. Clin Chem, 2013, 59(1): 110–118.
- [17] Cai QQ, Ding Y, Lin TY, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with nasopharyngeal carcinoma by modified IME-FICC and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2011, 27(10): 1896–1901. [蔡清清, 丁颖, 林天歆, 等. 改良 IME-FICC 法检测鼻咽癌患者外周血循环肿瘤细胞及其临床意义分析 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(10): 1896–1901.]
- [18] Federico A, Orditura M, Coticelli G, et al. Safety and efficacy of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and Child-pugh A or B cirrhosis [J]. Oncol Lett, 2015, 9(4): 1628–1632.
- [19] Wu JX, He JY, Du KX, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with nasopharyngeal carcinoma and its correlation with prognosis[J]. Modern Oncology Medicine, 2017, 25(7): 1035–1039. [吴君心, 贺俊彦, 杜开新, 等. 鼻咽癌患者外周血循环肿瘤细胞的检测及其与预后的相关性 [J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(7): 1035–1039.]