

·技术研究·

早中期结直肠癌手术前后外周血循环肿瘤细胞的监测及预后分析

曹霞¹, 吴伟², 赵小玉³, 李曾¹, 韩亚兵⁴, 李翔¹, 田姗¹, 张丹¹

(1. 西安交通大学医学部附属三二〇一医院肿瘤内科, 2. 胃肠外科, 陕西汉中 723000; 3. 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 上海 200433; 4. 上海宝藤生物医药科技股份有限公司, 上海 201204)

摘要:【目的】通过动态监测早中期结直肠癌患者手术前后外周血循环肿瘤细胞(CTC)的变化, 研究外周血 CTC 与临床病理特征的关系, 并评估外周血 CTC 在早中期结直肠癌中的诊断和预后预测价值。【方法】本研究前瞻性地纳入 67 例早中期结直肠癌患者, 同期收集 20 例健康志愿者作为对照组。分别采集患者根治性手术前 24 h、术后 3 个月以及对照组的外周静脉血(7.5 mL), 采用差减富集-免疫荧光原位杂交(SE-iFISH)技术分离和鉴定 CTC。利用受试者工作曲线(ROC)及约登指数判定 CTC 诊断结直肠癌的临界值, 采用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 方法进行生存分析, 多因素 COX 回归分析进行多因素校正, 综合评估 CTC 诊断早中期结直肠癌的价值, 然后结合临床病理特征以及术后随访资料, 分析外周血循环肿瘤细胞与临床病理特征及预后的关系。【结果】早中期结直肠癌患者 CTC 阳性率显著高于健康人(91.0% vs. 5.0%, $P < 0.01$)。术后 CTC 的数值与侵袭深度及肿瘤部位显著有关($P = 0.001$; $P = 0.044$), 与性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期、CEA 水平以及 CA-199 水平无相关性。术前 CTC 的数值与上述临床病理参数均不相关。术前 CTC 对无病生存期(DFS)和总生存期(OS)无预测意义($AUC = 0.359$, $P = 0.068$; $AUC = 0.428$, $P = 0.423$); 术后 CTC 临界点为 3 个/7.5 mL 对 DFS 和 OS 有预测意义($AUC = 0.936$, $P < 0.001$; $AUC = 0.863$, $P < 0.001$)。早中期结直肠癌术后分为良好预后组(术后 CTC < 3 或者术后 CTC 数目比术前 CTC 数目减少或持平)和不良预后组(术后 CTC ≥ 3 或者术后 CTC 数目比术前 CTC 数目增加), 良好预后组的 DFS 较不良预后组显著延长(43.7 月 vs. 20.4 月, $P < 0.001$; 48.7 月 vs. 26.8 月, $P < 0.001$), 并且总生存期(OS)也显著延长(54.4 月 vs. 43.3 月, $P < 0.001$; 54.8 月 vs. 45.1 月, $P < 0.001$)。多因素分析发现术后 CTC ≥ 3 个/7.5 mL 是 DFS 和 OS 的不良独立因素。【结论】CTC 在早中期结直肠癌患者中具有较高的临床诊断价值。术前 CTC 数值不能预测早中期结直肠癌的预后, 但术后 CTC 数值和动态检测手术前后 CTC 的变化均可以独立预测早中期结直肠癌的预后。

关键词: 结直肠癌; 手术; 循环肿瘤细胞; 预后

中图分类号: R73 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2019)04-0604-11

Monitoring and Prognostic Analysis of Peripheral Blood Circulating Tumor Cell Before and After Operation for Early and Middle Stage Colorectal Cancer

CAO Xia¹, WU Wei², ZHAO Xiao-yu³, LI Zeng¹, HAN Ya-bing⁴, LI Xiang¹,
TIAN Shan¹, ZHANG Dan¹

(1. Department of Medical Oncology, 3201 Hospital of Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Hanzhong 723000, China; 2. Department of General Surgery, 3201 Hospital of Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Hanzhong 723000, China; 3. State Key Laboratory of Genetic Laboratory Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 4. Biotencan Medical Diagnostics Co., Ltd, Shanghai 201204, China)

Correspondence to: CAO Xia; E-mail: hzcaoxia@163.com

收稿日期: 2019-04-07

基金项目: 国家自然科学基金(81572358, 81572332, 81201936)

作者简介: 曹霞, 主治医师, 通信作者, 研究方向: 肿瘤微创与生物治疗, E-mail: hzcaoxia@163.com

Abstract: 【Objective】 To study the relationship between circulation tumor cell (CTC) and clinicopathological characteristics in early and middle stage colorectal cancer, and to evaluate the diagnostic and prognostic value of peripheral blood CTC through dynamically monitoring the changes of peripheral blood CTC in the patients before and after operation. 【Methods】 Prospectively 67 patients with early and middle stage colorectal cancer were included, and 20 healthy volunteers served as contrast during the same period. Peripheral venous blood (7.5 mL) was collected 24 h before radical operation, 3 months after radical operation and in control group. SE-iFISH technique was used to isolate and identify CTC. The cutoff value of CTC in diagnosis of colorectal cancer was determined by the receiver operating curve (ROC) and Youden index. Kaplan-Meier and log-rank methods were used for survival analysis and multivariate COX regression analysis for multivariate correction. The value of CTC in the diagnosis of early and middlestage colorectal cancer was evaluated comprehensively, and then the relationship between CTC in peripheral blood and clinicopathological characteristics and prognosis was synthetically evaluated combined with clinicopathological characteristics and postoperative follow-up data. 【Results】 The positive rate of CTC in patients with early and middle stage colorectal cancer was significantly higher than that in healthy people (91.0% vs. 5.0%, $P < 0.01$). The CTC enumeration was significantly correlated with the depth of invasion and tumor location ($P = 0.001$, $P = 0.044$), but not with gender, age, tumor size, lymph node metastasis, TNM stage, CEA level and CA-199 level. The preoperative CTC enumeration were not correlated with the above-mentioned clinicopathological parameters. Preoperative CTC had no predictive significance for disease free survival (DFS) and total survival (OS) (AUC = 0.359, $P = 0.068$; AUC = 0.428, $P = 0.423$), and postoperative CTC critical point of 3/7.5 mL had predictive significance for DFS and OS (AUC = 0.936, $P < 0.001$; AUC = 0.863, $P < 0.001$). It was found that patients with early and middle stage colorectal cancer were divided into two groups: good prognosis group (CTC < 3 after operation or the number of CTC after operation was equal or decreased with the number of CTC before operation) and bad prognosis group (CTC \geq 3 after operation or the number of CTC after operation was higher than the number of CTC before operation). The DFS of the good prognosis group was significantly longer than that of the poor prognosis group (43.7 months vs. 20.4 months, $P < 0.001$; 48.7 months vs. 26.8 months, $P < 0.001$), and the OS was also significantly longer (54.7 months vs. 43.3 months, $P < 0.001$; 54.8 months vs. 45.1 months, $P < 0.001$). Multivariate analysis showed that CTC \geq 3/7.5 mL was a bad independent factor of DFS and OS. 【Conclusions】 CTC has high clinical value in patients with early and middle stage colorectal cancer. Preoperative CTC values can not predict the prognosis of early and middlestage colorectal cancer, but postoperative CTC values and dynamic detection for CTC changes before and after operation can independently predict the prognosis of early and middle stage colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; operation; circulating tumor cells; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(4): 604-614]

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,其发病率居全球第3、死亡率居全球第4位^[1]。早中期结直肠癌以根治性手术治疗为主,然而术后局部复发和转移仍是早中期结直肠癌的主要死亡原因。文献报道CEA、CA199可作为结直肠癌疗效预测的生物标志物,但敏感性及特异性均较低^[2-3]。因此,发现早中期结直肠癌治疗后复发转移相关危险因素并早期筛选出这部分高危复发转移病人是目前国内外学者研究的重点。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)从肿瘤组织脱离进入外周血液,部分肿瘤细胞的表型发生改变,出现上皮-间质转化,使肿瘤细胞具有较强的转移性和侵袭性,在一定条件下发展成为转移灶^[4]。

CTC可以从乳腺癌、肺癌、结直肠癌及前列腺癌等多种上皮性恶性肿瘤患者的外周血中分离出来。CellSearch系统是美国食品药品监督管理局(FDA)唯一批准用于临床的CTC检测平台,主要通过带有抗上皮细胞粘附分子(EpCAM)抗体的磁珠阳性捕获CTC,然后结合抗细胞角蛋白(CK)抗体识别CTC。但CTC形成及发展过程中会发生上皮-间质转化或自身上皮特异性抗原表达缺失,引起肿瘤细胞表面EpCAM和CK的表达下调甚至缺失^[5]。因此,基于EpCAM和CK表达的CellSearch系统在上应用上存在局限性。近年来新发展的SE-iFISH技术,利用抗白细胞标记的抗体去除白细胞,采用检测染色体倍数结合细胞表面肿瘤标记物的方法

判定 CTC,富集和识别的过程中不受 EpCAM 和 CK 表达的影响,提高了检出率^[6-7]。本文通过一个前瞻性队列研究,采用 SE-iFISH 检测技术动态检测早中期结直肠癌患者手术前后的 CTC,分析 CTC 与临床特征的关系,评价 CTC 作为生物标记物在早中期结直肠癌治疗后的预测价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集自 2014 年 7 月至 2016 年 7 月期间陕西省汉中市 3201 医院肿瘤科收治的结直肠癌患者作为研究对象,符合纳入标准的患者共 67 人,其中男性 44 例,女性 23 例,平均年龄(56.9±12.1)岁。收集同期 20 例健康志愿者,作为空白对照组,其中男性 14 例,女性 6 例,平均年龄(57.3±6.6)岁。本研究获患者知情同意和医院伦理委员会批准实施。

研究组纳入标准为:①经病理新确诊的结直肠癌,不伴有肠梗阻、穿孔或出血等需要急诊处理的患者;②根据 2017 版 AJCC/UICC 结直肠癌分期系统,分期为 I~III 期;③未接受过任何术前抗癌治疗;④无其他恶性肿瘤史;⑤结直肠癌患者手术方式均按照标准进行根治性切除术;⑥自愿参加研究并签署知情同意书的患者。

研究组排除标准为:①不能按照标准接受结直肠癌标准根治术的患者,如病理提示切缘阳性的患者;②有结直肠癌,行手术治疗后复发,再次手术的患者;③既往或现在患有其他肿瘤性疾病的患者;④合并感染的患者;⑤依从性差,不能按期随访的患者。

1.2 样本收集方法

67 例患者分别在结直肠癌根治性手术前 24 h 和术后 3 个月,同时抽取外周血 7.5 mL 行 CTC 检测,以及外周血 4 mL 行 CEA、CA199 检测。同期抽取 20 例健康志愿者外周血 7.5 mL 行 CTC 检测,以及外周血 4 mL 行 CEA、CA199 检测。

1.3 循环肿瘤细胞检测方法

1.3.1 CTC 试剂盒及仪器 人外周血循环稀有细胞差相富集试剂盒(货号 SHE-003B),CK-iFISH 人肿瘤细胞检测试剂盒(货号 FSH-002B);TDL-5M 型台式冷冻离心机(湘仪,最大离心力 4390×g),S500-24 型原位杂交仪(ThermoBrite),尼康 Ni-U 型荧光显微镜等。

1.3.2 CTC 阴性分离富集 7.5 mL 外周静脉血采集到 ACD 抗凝血管中。去除血清:常温 800×g 离心 8 min,去除上层血清,保留下层血细胞。去除红细胞:50 mL 离心管中加入 3 mL 样本密度分离液,在样本密度分离液上层叠加血细胞,450×g 离心 8 min 后,将含有白细胞和 CTC 的白膜层吸到新的 50 mL 离心管中。去除白细胞:在放有白细胞混液的离心管中加入处理好的 200 μL 磁珠,将离心管倾斜(约 30 °C)置于摇床上,130 r/min,摇动 20 min,450×g 离心 8 min,然后去除白细胞和磁珠混合物,吸取上清至新的 15 mL 离心管中,加入清洗液清洗后弃上清至 50 μL。液染抗体:加入 2 μL 抗原修复液修复 10 min 后加入 anti-CD45 抗体、anti-PanCK 抗体和抗体稀释液的混合液室温避光孵育 20 min,650×g 离心 5 min,弃上清至 100 μL。固定和涂片:混匀细胞沉淀后加入 100 μL 固定液混匀、涂片,过夜烘干玻片。

1.3.3 CTC 免疫荧光原位杂交(iFISH)和分析烘干的玻片 经过晾置、杂交洗液清洗和无水乙醇洗涤、脱水后,进行 CEP8(8 号染色体着丝粒探针)杂交。杂交条件为 76 °C 变性 10 min,37 °C 杂交 4 h。杂交结束清洗液清洗后滴加 5 μL DAPI 染液封片并于荧光显微镜下观察。

1.3.4 CTC 判断标准 采用细胞角蛋白(CK)、白细胞分化抗原(CD45)、DNA 强力结合荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)及 8 号染色体着丝粒探针(CEP-8)共同识别结直肠癌患者血液中的 CTC。因此 CTC 具体定义为:CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺/CEP=2; CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺/CEP8>2; CK⁻/CD45⁻/DAPI⁺/CEP8>2^[8]。白细胞具体定义:CK⁻/CD45⁺/DAPI⁺/CEP8=2^[9](图 1A)。

1.4 治疗及随访

患者均采用开腹结直肠癌根治术,根据中国临床学会(CSCO)结直肠癌诊疗指南进行术后辅助放化疗。治疗结束后患者每 3 个月行体格检查、肝脏超声、肿瘤标志物等检查;每 6 个月至 1 年行胸腹壁 CT、结肠镜和骨扫描检查。通过电话询问和随诊的方式对所有患者进行规律随访,并收集患者术后复查结果。患者死亡或者失访作为随访终点。

1.5 统计学方法

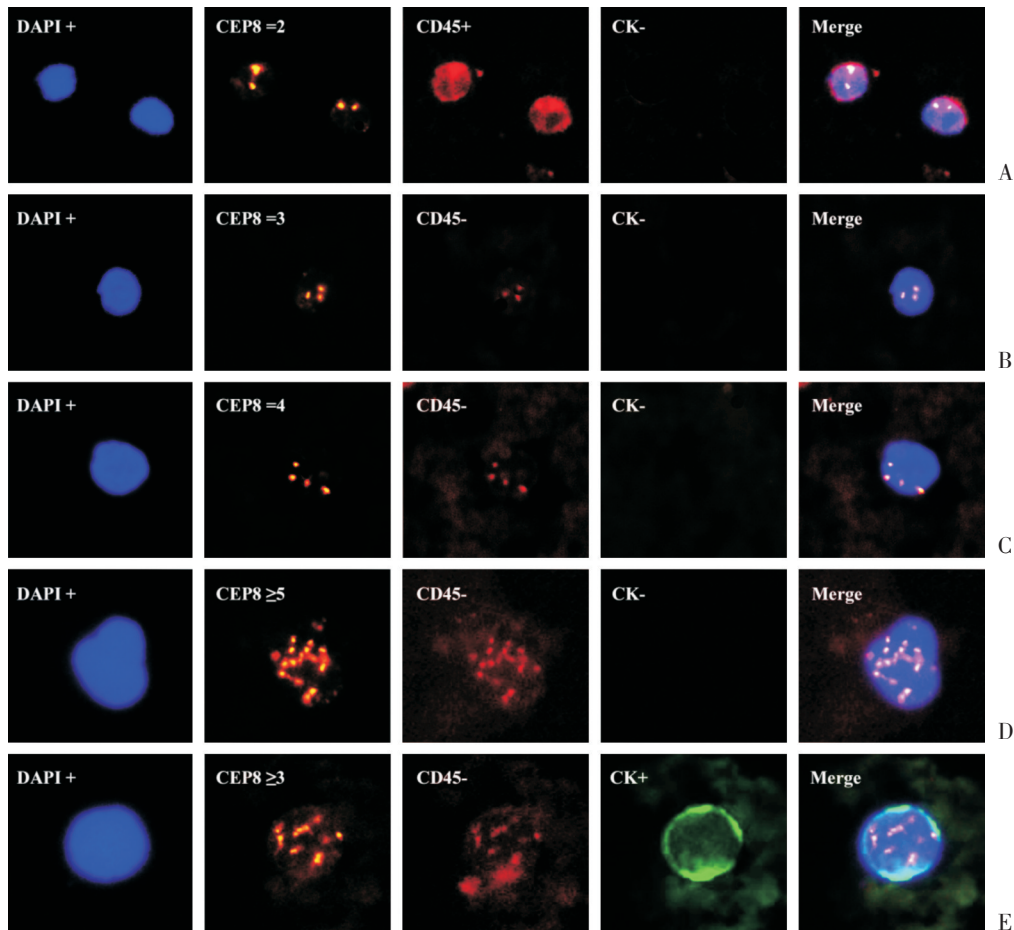
采用 SPSS 22.0 软件包进行数据统计分析,统计图采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制。患者平均年龄采用 $\bar{X} \pm S$ 表示,CTC 阳性率的比较采用卡

方检验。使用受试者工作特征(ROC)曲线判定CTC诊断结直肠癌的临界值并计算该方法的灵敏度、特异度。CTC的数值采用中位数/四分位数进行统计描述,并采用非参数检验进行统计分析。本研究的主要观察终点为无病生存时间(disease free survival, DFS)和总生存时间(overall survival, OS)。DFS自根治性手术日期开始至疾病复发或由于疾病进展导致患者死亡等任一个首次出现的时间或最后随访日期。OS自根治性手术开始计算至患者出现死亡或最后随访日期。采用Kaplan-Meier法计算生存率,并用Log-rank法比较各组的生存差异。通过单因素Cox比例风险回归分析临床病理参数及各组CTC数与DFS和OS的预测价值;对于单因素分析有意义的参数($P < 0.05$)进一步纳入多因素Cox回归分析。双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术前患者CTC及健康组CTC的鉴定

手术前67例结直肠癌患者中有61例患者检出CTC,共253个单个CTC。其中232个CTC的特点是 $CK^-/CD45^-/DAPI^+/CEP8 > 2$ (图1B~D);21个CTC的特点 $CK^+/CD45^-/DAPI^+/CEP8 > 2$ (图1E),分布在15个患者中。全组未发现 $CK^+/CD45^-/DAPI^+/CEP8 = 2$ 或者 $CK^-/CD45^-/DAPI^+/CEP8 = 2$ 的二倍体细胞。在253个CTC中,三倍体($CEP8 = 3$)123个,分布在48例患者中(图1B);四倍体($CEP8 = 4$)39个,分布在24例患者中(图1C);多倍体($CEP8 \geq 5$)占91个,分布在18例患者中(图1D)。在20例健康对照组中只发现了1个CTC,其细胞特点: $CK^-/CD45^-/DAPI^+/CEP8 = 3$ 。



A: $CK^-/CD45^-/DAPI^+/CEP8 = 2$ (WBC); B: $CK^-/CD45^-/DAPI^+/CEP8 = 3$; C: $CK^-/CD45^-/DAPI^+/CEP8 = 4$; D: $CK^-/CD45^-/DAPI^+/CEP8 \geq 5$; E: $CK^+/CD45^-/DAPI^+/CEP8 \geq 3$. DAPI: blue; CEP8: orange; CD45: red; CK: green; iFISH: immunostaining and fluorescence in situ hybridization; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; WBC: white blood cells; CEP8: centromere probe 8.

图1 SE-iFISH对术前患者CTC及健康组CTC的鉴定

Fig.1 Identification of CTC in colorectal cancer using the SE-iFISH platform

2.2 结直肠癌术前 CTC、CEA 及 CA199 在结直肠癌诊断中的作用

术前患者 CTC 阳性率($CTC \geq 1$ 个/7.5 mL)为 91.0%,健康组 CTC 阳性率 5.0%,两组有显著性差异($P < 0.01$)。使用受试者工作特征(ROC)曲线判断区分结直肠癌患者与健康对照组的临界值。分别设定临界值(cutoff value)为 1 个 CTC, 2 个 CTC 和 3 个 CTC, AUC 面积分别为 0.950、0.866、0.761;约登指数分别为 0.86、0.70、0.47;灵敏度分别为 91.0%、69.8%和 46.5%;特异度分别为 95.3%、100%和 100%。当 $CTC=1$ 个/7.5 mL 时, AUC 面积和约登指数最大($AUC = 0.950$; Youden index = 0.86)。所以将 $CTC=1$ 个/7.5 mL 定为结直肠癌的诊断临界值,相应的灵敏度为 91.0%,特异度为 95.3%,假阳性率为 4.7%,假阴性率为 9.0%,准确性 92.0% (图 2A)。

术前 $CEA > 5$ ng/mL 的 28 例(41.8%);术前 $CA-199 > 37$ U/mL 的 18 例(26.7%)。将 CEA 的临界值设定为 5 ng/mL, CA-199 为 37 U/mL 时,进一步使用受试者工作特征曲线(ROC)分析, CEA 和 CA-199 曲线下面积分别为 0.63 和 0.63,其灵敏度分别为 51.0%和 49.0%,其特异度均为 85.0% (图 2A)。进一步分析 CTC 与 CEA、CA-199 之间的关系, CEA 和 CTC 之间的相关性系数为 -0.012 ($P = 0.734$),表明 CEA 和 CTC 是相对独立的参数(图 2B)。CA-199 与 CTC 的相关性系数 $-0.000 45$ ($P = 0.923$),因此 CA-199 和 CTC 也是相对独立的参数(图 2C)。

2.3 结直肠癌 CTC 数值与临床病理参数的相关性

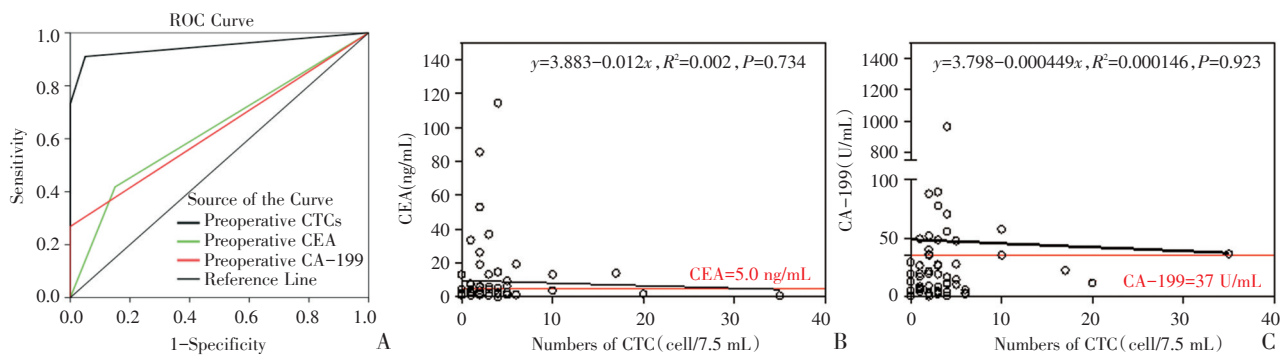
术前 CTC 的阳性率在 I 期 88.9%, II 期为 89.2%, III 期为 90.4% ($P = 0.592$);术前 CTC 中位值 I 期 3 个(IQR 1, 3), II 期为 3 个(IQR 1, 4.5), III 期为 2 个(IQR 1.5, 4; $P = 0.529$)。术后 CTC 的阳性率 I 期 88.9%, II 期 100%, III 期 95.2% ($P = 0.102$);术后 CTC 中位值 I 期 2 个(IQR 2, 3.5), II 期为 2 个(IQR 2, 3), III 期为 3 个(IQR 2.5, 4; $P = 0.138$)。术后 CTC 数值与侵袭深度和肿瘤部位有关($P = 0.001$; $P = 0.044$),与性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、CEA 水平以及 CA-199 水平没有相关性。术前 CTC 数值与上述临床病理参数均不相关(表 1)。

2.4 结直肠癌 CTC 数值与 DFS 和 OS 的相关性研究

2.4.1 术前 CTC 数值不能预测无病生存期(DFS)和中位总生存期(OS)

全组病例均获完整的随访资料,失访 0 例,随访率 100%。末次随访日 2018 年 12 月 31 日,随访时间 53.0 个月。随访期间出现远处转移 15 例,局部复发 5 例,其中死亡 13 例(远处转移 10 例,局部复发 3 例)。中位 DFS 为 32.3 个月(IQR 20.7~48.5),中位 OS 为 43.9 个月(IQR 33.0~49.00)。

使用 ROC 曲线分析 CTC 与无病生存期(DFS)和总生存期(OS)的关系。术前 CTC 对 DFS 和 OS 预测意义不大($AUC = 0.359$, $P = 0.068$; $AUC = 0.428$, $P = 0.423$);术后以 $CTC = 3$ 个/7.5 mL 为临界点对 DFS 和 OS 预测意义显著, AUC 值最大($AUC = 0.936$, $P < 0.001$; $AUC = 0.863$, $P < 0.001$; 图 3)。



A: The sensitivity of CTC, CEA and CA-199 in the diagnosis of colorectal cancer was compared using the subject operating curve analysis. B: Comparison of CTC and CEA as blood-based markers. The red horizontal line indicated the CEA threshold of 5.0 ng/mL. C: Comparison of CTC and CA-199 as blood-based markers. The red horizontal line indicated the CA-199 threshold of 37 U/mL.

图 2 结直肠癌患者 CTC 与血清 CEA 和 CA-199 水平的关系

Fig.2 Association of CTC number with serum CEA and CA-199 levels from colorectal cancer patients

表1 术前、术后 CTC 数值和临床参数的相关性
Table 1 Association of preoperative and postoperative CTC with clinicopathological parameters

| Variations | <i>n</i> | Preoperative CTC | <i>P</i> | Postoperative CTC | <i>P</i> |
|-----------------------|----------|------------------|----------|-------------------|----------|
| Gender | | | 0.588 | | 0.339 |
| Male | 44 | 3(1.25,4) | | 3(2,4) | |
| Female | 23 | 3(1,4) | | 2(2,3) | |
| Age/years | | | 0.438 | | 0.902 |
| ≤ 60 | 33 | 2(1,4) | | 3(2,4) | |
| > 60 | 34 | 3(1.25,4) | | 3(2,3.75) | |
| Tumor site | | | 0.351 | | 0.044 |
| Colon | 35 | 2(1,4) | | 3(2,4) | |
| Rectal cancer | 42 | 3(2,4) | | 2(2,3) | |
| Tumor differentiation | | | 0.748 | | 0.835 |
| Poor | 11 | 3(2,5) | | 3(2,4) | |
| Moderate | 48 | 2.5(1,4) | | 2.5(2,4) | |
| High | 8 | 3(2,4) | | 3(3,3) | |
| Diameter/cm | | | 0.201 | | 0.990 |
| ≥ 4.5 | 28 | 3(1,5) | | 3(2,4) | |
| < 4.5 | 39 | 2(1,4) | | 3(2,3.75) | |
| Invasion depth | | | 0.269 | | 0.001 |
| T1-T2 | 10 | 2.5(1,3) | | 2(1.2,3.25) | |
| T3-T4 | 57 | 3(1,4) | | 3(2.5,4) | |
| Lymph node | | | 0.805 | | 0.056 |
| N0 | 45 | 3(1,4) | | 2(2,3) | |
| N1-2 | 22 | 2(1.5,4) | | 3(2.5,4) | |
| TNM | | | 0.529 | | 0.529 |
| I | 9 | 3(1,3) | | 2(2,3.5) | |
| II | 37 | 3(1,4.5) | | 2(2,3) | |
| III | 21 | 2(1.5,4) | | 3(2.5,4) | |
| CEA/(ng/mL) | | | 0.234 | | 0.591 |
| ≤ 5 | 39 | 2(1,4) | | 3(2,4) | |
| > 5 | 28 | 3(2,5) | | 3(2,3) | |
| CA199/(U/mL) | | | 0.382 | | 0.779 |
| ≤ 37 | 49 | 2(1,4) | | 3(2,4) | |
| > 37 | 18 | 3(2,4) | | 3(2,3) | |

使用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 方法进一步分析发现术前 CTC 各组数值与 DFS 和 OS 无统计学意义 ($P = 0.155, P = 0.729$; 图4)。

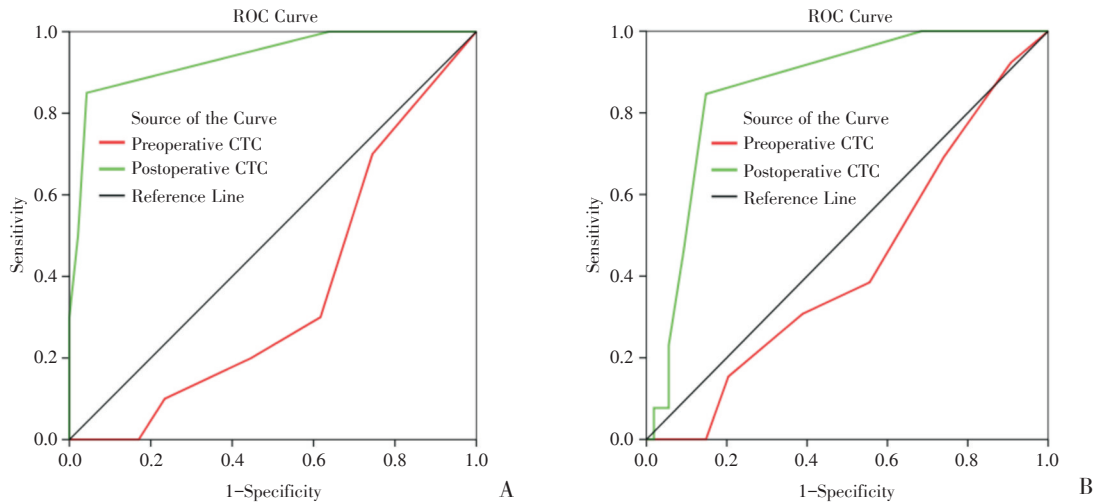
2.4.2 术后 CTC 数值可以预测 DFS 和 OS 术后 CTC < 3 的 48 例 (71.6%), 术后 CTC ≥ 3 的 19 例 (28.4%)。术后 CTC < 3 组的 DFS 和 OS 均较 CTC ≥ 3 组显著延长 (DFS: 43.7 月 vs 20.4 月, $P < 0.001$; OS: 54.4 月 vs 43.3 月, $P < 0.001$; 图5)。

术后 CTC 升高的 25 例 (37.3%), 持平或降低的 42 例 (62.7%)。CTC 持平或降低组的 DFS 和 OS

均较术后 CTC 增高组显著延长 (DFS: 48.7 月 vs 26.8 月, $P < 0.001$; OS: 54.8 月 vs 45.1 月, $P < 0.001$; 图6)。

2.5 结直肠癌预后的单因素和多因素分析

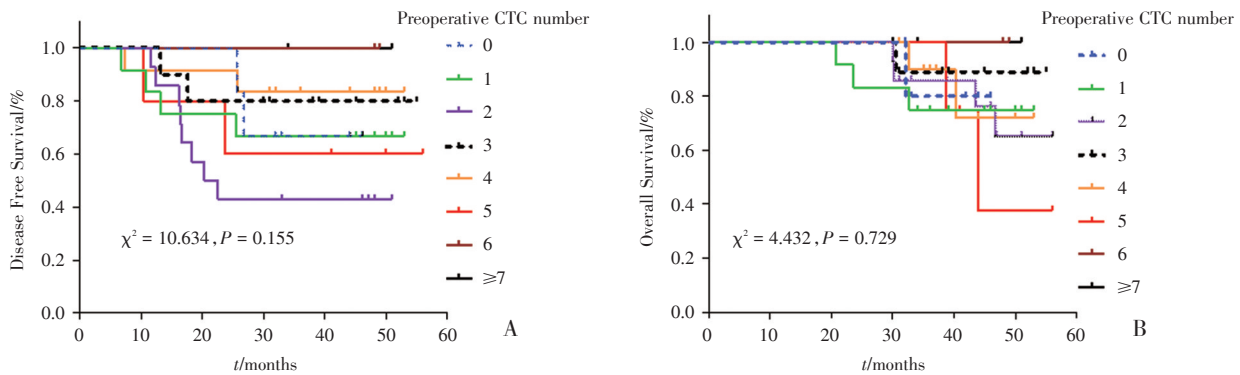
利用单因素 Cox 比例风险回归模型对性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、侵袭深度、淋巴结转移、CEA 水平、CA199 水平以及 CTC 数值进行分析。发现术后 TNM 分期、术后 CEA > 5 ng/mL、术后 CTC ≥ 3 个/7.5 mL、术后 CTC 数值增加与 DFS 不良预后有关。然后将上述 4 个变量纳入多因



A: Postoperative CTC has greater significance in predicting DFS, while preoperative CTC has less significance in predicting DFS. B: Postoperative CTC has greater significance for OS prediction, while preoperative CTC has less significance for OS prediction.

图3 ROC曲线分析CTC与无病生存期和总生存期的关系

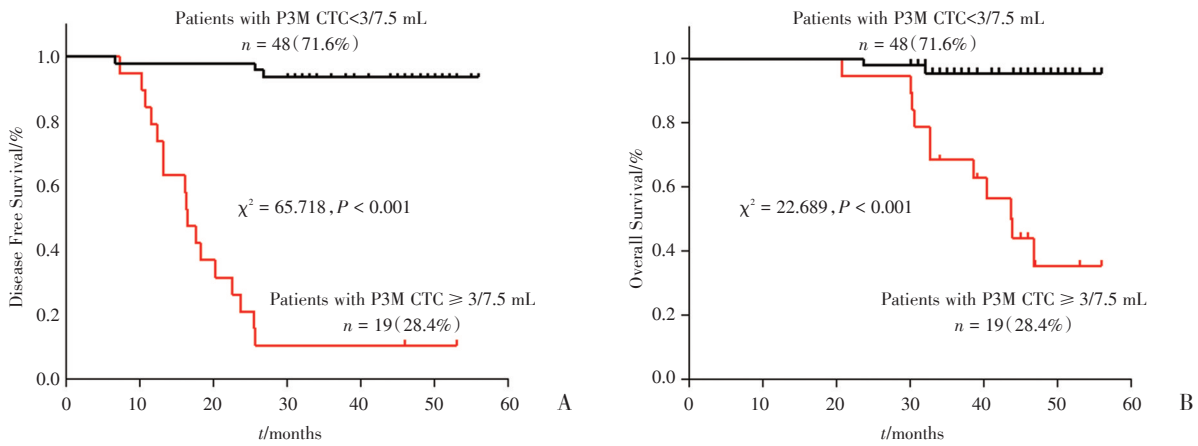
Fig.3 Prediction effect of CTC on disease free survival and overall survival by ROC curve



A: There was no significant relationship between the average DFS in patients and preoperative CTC ($P = 0.155$). B: There was no significant relationship between the average OS in patients and preoperative CTC ($P = 0.729$).

图4 术前CTC各组数值与无病生存期和总生存期的关系

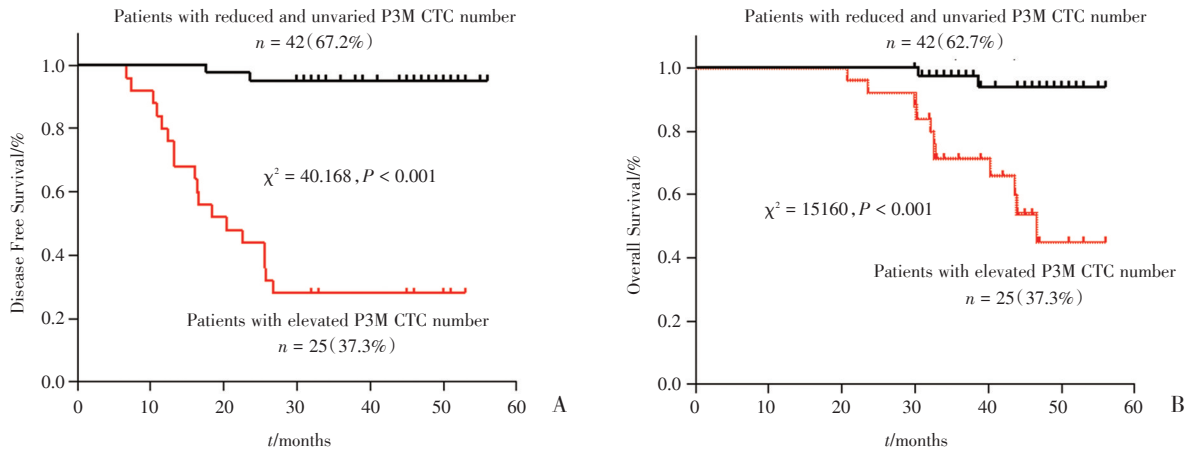
Fig.4 Relationship between preoperative CTC values and disease free survival and overall survival



A: The average DFS in patients with P3M (postoperative 3 months) CTC < 3 was significantly better than that P3M CTC number ≥ 3 ($P < 0.001$). B: The average OS in patients with P3M CTC < 3 was significantly better than that P3M CTC number ≥ 3 ($P < 0.001$).

图5 术后CTC数值与无病生存期和总生存期的关系

Fig.5 The relationship between postoperative CTC value and disease free survival and overall survival



A: The average DFS in patients with those with P3M CTC reduced and unvaried P3M CTC number (compared with preoperative CTC number) was significantly better than those with elevated P3M CTC number ($P < 0.001$). B: The average OS in patients with those with P3M CTC reduced and unvaried P3M CTC number (compared with preoperative CTC number) was significantly better than those with elevated P3M CTC number ($P < 0.001$).

图6 手术前后CTC数值变化与无病生存期和总生存期的关系

Fig.6 The relationship between CTC value before and after surgery and disease free survival and overall survival

素 Cox 比例风险回归模型中,结果发现术后 CEA > 5 ng/mL 和术后 CTC ≥ 3 个/7.5 mL 是早中期结直肠癌 DFS 不良预后的独立判断因素(表2)。其次术后 TNM 分期、淋巴结分期、术后 CEA > 5 ng/mL、术后 CTC ≥ 3 个/7.5 mL 及术后 CTC 数值增加(与术前比较)与 OS 不良预后有关。然后将上述 5 个变量纳入多因素 Cox 比例风险回归模型中,结果发现临床 TNM 分期、淋巴结分期及术后是早中期结直肠癌 OS 不良预后的独立判断因素(表 2,3)。

3 讨论

随着肿瘤医学科学的发展,结直肠癌的治疗进入全程精确管理模式。尤其对早中期结直肠癌患者,如何早期发现、有效治疗以减少肿瘤的转移和复发,同时避免不必要的治疗以及相应的副作用是目前临床研究的重点。CTC 检测作为一种相对无创且可以重复进行的液体活检技术对结直肠

表2 早中期结直肠癌单因素和多因素回归分析赋值表
Table 2 Univariate and multivariate Cox regression assignment table

| Variations | Assignment | |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|
| Gender | 1=Male | 2=Female |
| Age/years | 1= ≤ 60 | 2= > 60 |
| Tumor site | 1= Colon cancer | 2= Rectal cancer |
| Tumor differentiation | 1= Poor | 2= Moderate 3= High |
| Diameter/cm | 1= < 4.5 | 2= ≥ 4.5 |
| Invasion depth | 1=T1-T2 | 2=T3-T4 |
| Lymph node stage | 1=N0 | 2=N1-N2 |
| TNM stage | 1=I stage | 2=II stage 3=III stage |
| CEA | 1= ≤ 5 ng/mL | 2= > 5 ng/mL |
| CA-199 | 1= ≤ 37 U/mL | 2= > 37 U/mL |
| CTC | 1= < 3 numbers/7.5 mL | 2= ≥ 3 numbers/7.5 mL |
| Change in CTC values | 1= Elevated CTC | 2= Reduced and unvaried |

表3 早中期结直肠癌无进展生存期和总生存期的单因素和多因素回归分析
Table 3 Univariate and multivariate Cox regression for disease free survival and overall survival

| Variations | DFS | | | OS | | |
|-----------------------------------------------|--------|-------|---------------|--------|-------|--------------|
| | HR | P | 95% CI | HR | P | 95% CI |
| Univariate Cox analysis | | | | | | |
| Gender | 0.745 | 0.547 | 0.286~1.940 | 0.742 | 0.620 | 0.228~2.412 |
| Age | 0.787 | 0.594 | 0.326~1.900 | 0.669 | 0.481 | 0.219~2.045 |
| Tumor site | 1.070 | 0.886 | 0.427~2.682 | 1.084 | 0.894 | 0.332~3.545 |
| Tumor differentiation | 0.814 | 0.624 | 0.358~1.850 | 0.494 | 0.174 | 0.178~1.366 |
| Diameter | 1.186 | 0.703 | 0.494~2.850 | 1.991 | 0.229 | 0.648~0.621 |
| Invasion depth | 3.742 | 0.198 | 0.501~27.598 | 2.008 | 0.503 | 0.261~15.456 |
| Lymph node stage | 2.384 | 0.052 | 0.991~5.732 | 5.088 | 0.006 | 1.596~16.865 |
| TNM stage | 2.153 | 0.041 | 1.032~4.492 | 3.523 | 0.017 | 1.255~9.892 |
| Preoperative CEA | 1.397 | 0.455 | 0.581~3.357 | 0.908 | 0.865 | 0.297~2.777 |
| Preoperative CA199 | 1.640 | 0.310 | 0.642~4.039 | 1.573 | 0.428 | 0.513~4.822 |
| Postoperative CEA | 3.882 | 0.003 | 1.603~9.400 | 3.244 | 0.035 | 1.089~9.665 |
| Postoperative CA199 | 2.307 | 0.067 | 0.942~5.651 | 1.603 | 0.433 | 0.493~5.212 |
| Preoperative CTC | 0.427 | 0.083 | -0.851~0.490 | 0.547 | 0.290 | 0.179~1.673 |
| Postoperative CTC | 35.522 | 0.000 | 9.968~126.583 | 15.406 | 0.000 | 3.411~69.579 |
| Change in CTC values (Pre- and Postoperative) | 2.541 | 0.001 | 1.473~4.384 | 2.644 | 0.008 | 1.289~5.505 |
| Multivariate Cox analyses | | | | | | |
| Postoperative CEA | 2.351 | 0.001 | 1.190~4.660 | 1.664 | 0.406 | 0.500~5.538 |
| Postoperative CTC | 33.473 | 0.000 | 7.916~141.541 | 8.011 | 0.011 | 1.619~39.628 |
| Change in CTC values (Pre- and Postoperative) | 2.004 | 0.140 | 0.795~5.047 | 2.413 | 0.128 | 0.775~7.512 |
| TNM stage | 1.950 | 0.161 | 0.766~4.969 | 2.438 | 0.000 | 1.459~4.074 |
| Lymph node stage | / | / | / | 18.69 | 0.000 | 2.110~165.91 |

癌的诊断具有潜在的应用价值^[10-11]。

外周血循环肿瘤细胞的鉴定主要经过CTC细胞的富集和识别两个过程,但不同实验室的标准并未完全统一。目前CellSearch系统是检测CTC最常用的平台,通过藕联了抗EpCAM抗体的磁珠捕获上皮细胞,使用CK(8、18、19)识别CTC。本研究使用广谱细胞角蛋白抗体(pan-CK antibody)识别CK家族成员(CK4、5、6、8、10、13和18),但结果显示CK阳性的结直肠癌患者只有22.4%(15/67)。这一结果也在一定程度上证明循环肿瘤细胞EMT过程中CK的表达出现下调甚至缺失。先前多项研究证明,CellSearch系统阳性检出率在4.9%~47.5%之间,不适合早期非转移性结直肠癌的监测^[12-13]。

本研究采用的差减富集技术(subtraction enrichment technology, SET)可以有效去除红细胞、白细胞,而最大程度的留取CTC用于后续实验。免疫荧光原位杂交技术(iFISH)是将免疫荧光染

色方法与原位荧光杂交方法相整合。在本研究中使用CK、CD45、DAPI分析细胞表面蛋白表型的同时,使用CEP-8检测染色体核型,共同识别CTC。多倍体是肿瘤细胞主要的染色体异常,细胞核不稳定的表现,极易发生基因突变,驱动癌症的发展^[14-15]。使用CEP8检测CTC染色体数目的变化,根据染色体拷贝数的不同,CTC可以分为单倍体、二倍体、三倍体、四倍体和 ≥ 5 倍体等不同亚型^[16]。本组研究中有123个三倍体细胞(占48.6%);39个四倍体细胞(占15.4%);91个 ≥ 5 倍体细胞(占36.0%)。由此我们可以认为,iFISH与单纯的免疫荧光染色方法或者单纯染色体的原位荧光杂交方法相比,其生物信息量更大。利用SE-iFISH可以检测肺癌、肝癌、鼻咽癌及骨肉瘤等多种实体肿瘤的CTC,CTC的阳性率统计结果在75%~100%^[17-18]。本研究中的结直肠癌患者CTC阳性率91.04%,与CEA和CA199相比,在早期结直肠癌检测上具有更高的灵敏性与特异性,

而且是相对独立的血清标志物,因此CTC有望成为早期结直肠癌筛查与诊断的有效指标。

目前,结直肠癌患者CTC和临床病理各参数之间的关系仍无统一认识。Hinz等^[19-20]采用CK20 RT-PCR技术检测分别对术前辅助放化疗后的267例直肠癌和299例结肠癌进行CTC检测,发现在结肠癌中CTC的检出率与肿瘤分期、淋巴结分期、肝脏转移呈正相关,但在直肠癌中却没有相关性。有趣的是,在本研究中我们发现术前CTC计数与各临床病理参数无显著差异,但是术后结肠癌的CTC计数比直肠癌显著升高,其次T3-T4的CTC计数比T1-T2显著升高。这一结果可能与直肠癌和结肠癌在解剖、功能和胚胎起源方面存在差异,以及结肠癌与直肠癌的治疗存在差异有关。

外周血CTC在晚期结直肠癌的预测作用已经得到了肯定,但对于早中期结直肠癌,尤其是围手术期的结直肠癌,是否同样可以预测预后仍存在争议。Rahbari等^[21]虽然证明外周血CTC对早期结直肠癌的预后具有预测意义,但认为在这项分析中只有2项研究是根据手术前后循环肿瘤细胞提供独立预后数据,因此提出需要对同一患者群体的术前和术后样本进一步研究,以评估术后肿瘤细胞检测是否为预测预后最准确的指标。在我们的研究中,分别在术前24h和术后3月检测CTC,发现术前CTC的预后预测意义较小,但术后CTC临界值3个/7.5 mL对预后预测意义显著。研究发现早中期结直肠癌术后分为良好预后组(术后CTC<3或者术后CTC数目持平或减少)和不良预后组(术后CTC≥3或者术后CTC数目增加),良好预后组的DFS和OS均较不良预后组显著延长。多项研究表CTC可以反映结直肠

癌患者的化疗敏感性^[22-23],并与接受化疗的结直肠癌患者的放射影像进展相关^[24]。但Chu等^[25]研究提示CTC与结直肠癌新辅助化疗疗效无相关性。本研究中术后辅助放化疗在术后一个月开始,所以术后3个月的CTC值可能反应辅助放化疗的疗效,有望成为判断辅助放化疗敏感性的指标;其次术前与术后CTC预测意义不同,也可能与术后进行了辅助放化疗有关,但仍需扩大样本进一步研究。

影响早中期结直肠癌的预后有多种因素,在本研究中我们发现术前CTC数值与预后不相关,但是术后CEA>5 ng/mL和术后CTC≥3个/7.5 mL是PFS独立不良预后因素,TNM分期、淋巴结分期及术后CTC≥3个/7.5 mL是OS独立不良预后因素。这个结果与之前Yang等^[26]在211例I-III期结直肠癌的发现类似,术后CTC阳性是不良预后的独立指标,而术前CTC阳性与预后无关;术后CTC阳性的患者复发风险高于术前CTC阳性的患者数量。因此术后进行CTC检测具有重要临床意义,可以独立预测早期结直肠癌的进展和生存,从而确定治疗方案;还可以在治疗过程中实时监测治疗进程和效果,对治疗方案加以修正,为个体化治疗提供有用参考。

综上所述,本研究通过前瞻性队列研究,利用SE-iFISH技术检测循环肿瘤细胞数目,并证实SE-iFISH技术检测早中期结直肠癌患者外周血的CTC具有高灵敏性与高特异性的优势。本研究还发现,术前CTC不能预测早中期结直肠癌的预后,但术后CTC可以独立预测早中期结直肠癌的预后;其次动态监测手术前后CTC的变化也可以预测早中期结直肠癌的预后。

参考文献

- [1] Jeon J, Du M, Schoen RE, et al. Determining risk of colorectal cancer and starting age of screening based on life style, environmental, and genetic factors [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(8):2152-2164.
- [2] Lee SY, Jo JS, Kim HJ, et al. Clinicopathologic features and oncologic outcomes of colorectal cancer patients with extremely high carcinoembryonic antigen [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2015, 30(1): 63-69.
- [3] Polat E, Duman U, Duman M, et al. Diagnostic value of preoperative serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen19-9 in colorectal cancer [J]. *Curr Oncol*, 2014, 21(1): e1-e7.
- [4] Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells [J]. *Embo Mol Med*, 2015, 7(1): 1-5.
- [5] Plaks V, Koopm CD, Werb Z. Circulating tumor cells [J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1186-1188.
- [6] Grover PK, Cummins AG, Price TJ, et al. Circulating tumour cells: The evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(8): 1506-1516.

- [7] Sheng Y, Wang T, Li H, et al. Comparison of analytic performances of CellSearch and iFISH approach in detecting circulating tumor cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8801-8806.
- [8] 田晓坤, 李玉明, 胡宝光, 等. 胃癌患者外周血Cytel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.
- Tian XK, Li YM, Hu BG, et al. Detection and clinical significance of Cytel circulating tumor cells in peripheral blood of patients with gastric cancer [J]. *Chin J Exp Surg*, 2017, 34(2): 208-210.
- [9] Gao Y, Zhu Y, Zhang Z, et al. Clinical significance of pancreatic circulating tumor cells using combined negative enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization [J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 66.
- [10] Khak S, Georgiou A, Gerlinger M, et al. Circulating tumour DNA, a promising biomarker for the management of colorectal cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 122: 72-82.
- [11] Cabel L, Proudhon C, Gortais H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility [J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 22(3): 421-430.
- [12] Bork U, Rahbari NN, Scholch S, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(8): 1306-1313.
- [13] Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, et al. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(3): 535-541.
- [14] Davoli T, Xu AW, Mengwasser KE, et al. Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome [J]. *Cell*, 2013, 155(4): 948-962.
- [15] Ge F, Zhang HS, Wang DD, et al. Enhanced detection and Comprehensive in situ phenotypic characterization of circulating and disseminated heteroploid epithelial and glioma tumor cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 27049-27064.
- [16] Seo AN, Yang JM, Kim H, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of c-MYC copy number gain in lung adenocarcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(11): 2688-2699.
- [17] Zhang J, Shi H, Jiang T, et al. Circulating tumor cells with karyotyping as a novel biomarker for diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1133.
- [18] 张浩强, 李明辉, 王臻, 等. 免疫荧光联合原位杂交技术检测骨肉瘤患者外周血中循环肿瘤细胞的表达及临床意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2017, 39(7): 485-489.
- Zhang HQ, Li MH, Wang Z, et al. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in osteosarcoma using immunofluorescence combined with in site hybridization [J]. *Clin J Oncol*, 2017, 39(7): 485-489.
- [19] Hinz S, Roder C, Tepel J, et al. Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are marker for response after neoadjuvant chemoradiation but not for prognosis in patients with rectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 953.
- [20] Hinz S, Hendricks A, Wittig A, et al. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients: A prospective study [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17: 53.
- [21] Rahbari N, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 1714-1726.
- [22] Sastre J, Vidaurreta M, Gómez A, et al. Prognostic value of the combination of circulating tumor cells plus KRAS in patients with metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2013, 12(4): 280-286.
- [23] Zhang DJ, Zhao L, Zhou PF, et al. Circulating tumor microemboli (CTM) and vimentin+ circulating tumor cells (CTCs) detected by a size-based platform predict worse prognosis in advanced colorectal cancer patients during chemotherapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 6.
- [24] Huang XZ, Gao P, Song YX, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the Cell Search System in colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 202.
- [25] Chu HY, Lu LS, Cho W, et al. Enumerating circulating tumor cells with a Self-Assembled Cell Array (SACA) chip: A feasibility study in patients with colorectal cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(1): 56.
- [26] Yang C, Shi D, Wang S, et al. Prognostic value of pre- and post-operative circulating tumor cells detection in colorectal cancer patients treated with curative resection: a prospective cohort study based on ISET device [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 4135-4144.

(编辑 刘清海)