·论　　著·

结直肠癌患者外周血循环肿瘤细胞的检测及其临床病理诊断与预后意义分析

葛祖荫　石海权　郝敬铎　宋坤

[摘要] **目的**　探讨结直肠癌患者外周血循环肿瘤细胞(CTCs)的检测及其临床病理诊断与预后意义。**方法**　选取结直肠癌103例,分析CTCs阳性检出率与临床病理的关系,并采用*Cox*回归模型分析影响结直肠癌患者预后生存的危险因素。**结果**　CTCs阳性检出率为66.01%(68/103)。不同的临床分期、是否有肝转移的CTCs阳性检出率比较,差异有统计学意义(χ^2分别=8.12、11.13,P均<0.05),在不同病理类型、分化程度、区域淋巴结转移、大体形态中CTCs阳性检出率差异均无统计学意义(χ^2分别=0.06、0.02、3.44、0.92,P均>0.05);103例结直肠患者总生存期为1～68个月,中位生存期38.91个月;CTCs阳性组患者1年、3年、5年生存率分别为83.82%(57/68)、61.76%(42/68)、47.05%(32/68),经*Log-rank*检验明显低于CTCs阴性组91.42%(32/35)、82.85%(29/35)、74.28%(26/35),差异均有统计学意义(χ^2分别=6.29、5.79、6.02,P均<0.05)。多因素*Cox*模型分析结果显示临床分期(Ⅲ～Ⅳ期)、肝转移(有)、区域淋巴结转移(有)、CTCs阳性是影响结直肠患者预后生存的危险因素(*HR*分别=3.49、3.06、3.39、2.77,P均<0.05)。**结论**　CTCs与结直肠癌患者临床分期、肝转移密切相关,术前CTCs阳性者预后较差,可通过检测CTCs对患者预后进行相关评估。

[关键词]　结直肠癌;　循环肿瘤细胞;　预后;　临床病理诊断

Detection of peripheral blood circulating tumor cells in patients with colorectal cancer and its clinical significance of pathological diagnosis and prognosis　GE Zuyin, SHI Haiquan, HAO Jingduo, et al. Department of General Surgery, Zhenhai People's Hospital of Ningbo, Ningbo 315200, China

[Abstract] **Objective**　To explore the expression of peripheral blood circulating tumor cells in patients with colorectal cancer and its clinical significance of pathological diagnosis and prognosis. **Methods**　Totally 103 cases with colorectal cancer were selected. The relationship between the positive rate of CTCs and clinical pathology was analyzed. Cox regression model was used to analyze the prognostic factors for patients with colorectal cancer. **Results**　In this study, the positive rate of CTCs was 66.01% (68/103). The positive rates of CTCs were significantly different between the patients with clinical stage Ⅰ～Ⅱ and Ⅲ～Ⅳ as well as whether combined with liver metastasis or not (χ^2=8.12, 11.13, P <0.05). The differences in CTCs positive rate among different pathological types, differentiation degree, regional lymph node metastasis, and shapes were not statistical significant (χ^2=0.06, 0.02, 3.44, 0.92, P>0.05). The survival time of 103 cases with colorectal cancer was 1～68 months and the median survival time was 38.91 months. The one year, 3 years, 5 years survival rate of CTCs positive group were 83.82% (57/68), 61.76% (42/68) and 47.05% (32/68) respectively, which was significantly lower than those of CTCs negative group by the Log-rank test [91.42% (32/35), 82.85% (29/35), 74.28% (26/35)] (χ^2=6.29, 5.79, 6.02, P<0.05). Cox multivariate analysis showed that clinical stage (III～IV), Liver metastasis, regional lymph node metastasis and positive CTCs were risk factors for survival prognosis of colorectal cancer (*HR*=3.49, 3.06, 3.39, 2.77, P<0.05). **Conclusion**　CTCs is closely related to clinical stage and liver metastasis in patients with colorectal cancer. The prognosis of patients with CTCs positive before operation is poor, which can be evaluated by detecting CTCs.

[Key words]　colorectal cancer;　circulating tumor cell;　prognosis;　clinicopathological diagnosis

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.05.006

基金项目:宁波市科技局项目(2015C50023)

作者单位:315200　浙江宁波,宁波市镇海区人民医院普外二科

结直肠癌是临床中常见的恶性消化道肿瘤之一[1]。由于目前临床对结直肠癌主要的致病机制尚未明确，临床治疗结直肠癌主要以控制患者病情进展及延缓患者生存期限为主。诸多文献研究报道，结直肠癌患者治疗后其预后效果并不乐观，而选取准确、快捷的检测方法临床可及时对结直肠癌患者的病情发展及预后作出准确评估[2-4]。外周血循环肿瘤细胞（circulating tumor cell，CTCs）是临床上常规运用于检测恶性肿瘤患者的手段之一。本次研究旨在探讨结直肠癌患者CTCs的检测及其临床病理诊断与预后意义。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2010年1月至2011年12月宁波市镇海区人民医院收治的结直肠癌103例，其中男性63例、女性40例；年龄26～79岁，平均年龄（58.22±13.12）岁。入选标准：①经病理活检或手术确诊为结直肠癌者；②一般资料、临床资料及随访资料完整无丢失者。排除标准：①存在严重心、肝等脏器疾患者；②合并其他恶性肿瘤者；③排除存在血液系统疾病者，如白血病；④有凝血功能障碍者。

1.2 方法 于患者手术前1 d采集患者清晨空腹血3～5 ml，去除前1 ml，加入乙二胺四乙酸抗凝管，24 h内进行CTCs捕获。采用免疫化学荧光将捕获了CTCs的芯片进行染色，福马林溶液固定15 min，磷酸缓冲盐溶液冲洗。首先对样品免疫组织化学染色，其中先用异硫氰酸荧光素标记的CK抗体200 μl在常温下孵育45 min，然后用200 μl磷酸缓冲盐溶液轻洗，Cy5荧光染料标记的CIM5抗体，在常温下孵育45 min，然后用200μl磷酸缓冲盐溶液轻轻冲洗芯片，在4'，6-二脒基-2-苯基吲哚200 μl在常温下孵育10 min，再次磷酸缓冲盐溶液轻冲。对固定在纳米芯片上特异性捕获的CTCs和非特异性捕获的细胞，用荧光显微镜进行鉴别确认。由两位资深检验科医师对在CTCs结果进行判定。

1.3 随访方式 对103例患者均进行定期随访，随访方式包括回院复查、电话随访、短信随访等，随访截止日期：患者发生死亡或至2016年12月31日。

1.4 统计学方法 采用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。计量资料采用t检验；计数资料采用χ^2检验。生存分析采用*Log-rank*检验和多因素*Cox*回归分析。设$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTCs阳性检出与临床病理的关系见表1

表1 CTCs阳性率与临床病理的关系/例(%)

类别		CTCs阳性(n=68)
病理类型	腺癌	57(83.82)
	其他	11(16.18)
临床分期	Ⅰ～Ⅱ	37(54.41)
	Ⅲ～Ⅳ	31(45.59)
大体形态	溃疡型	30(44.12)
	隆起型	38(55.88)
分化程度	高分化	30(44.12)
	中或低分化	38(55.88)
区域淋巴结转移	有	51(75.00)
	无	17(25.00)
肝转移	有	30(44.12)
	无	38(55.88)

由表1可见，CTCs阳性检出率为66.01%（68/103）。不同的临床分期、是否有肝转移的CTCs阳性检出率比较，差异有统计学意义（χ^2分别=8.12、11.13，$P<0.05$），在病理类型、分化程度、区域淋巴结转移、大体形态中CTCs阳性检出率差异均无统计学意义（χ^2分别=0.06、0.02、3.44、0.92，P均＞0.05）。

2.2 103例结直肠患者预后生存情况 103例结直肠癌患者全部获得随访，随访时间1～68个月，中位随访时间35.32个月，总生存期为1～68个月，中位生存期38.91个月。CTCs阳性组患者1年、3年、5年生存率分别为83.82%（57/68）、61.76%（42/68）、47.05%（32/68），经*Log-rank*检验明显低于CTCs阴性组91.42%（32/35）、82.85%（29/35）、74.28%（26/35），差异均有统计学意义（χ^2分别=6.29、5.79、6.02，P均＜0.05）。

2.3 影响结直肠患者预后生存的*Log-rank*检验 单因素分析结果显示不同年龄、临床分期、肝转移、区域淋巴结转移、分化程度、手术方式、CTCs的结直肠患者的生存曲线有明显差异（χ^2分别=12.31、11.90、10.20、11.32、11.96、11.62、9.89，P均＜0.05），不同性别、大体形态、病理类型的结直肠患者的生存曲线无明显差异（χ^2分别=0.05、1.01、1.12，P均＞0.05）。

2.4 影响结直肠患者预后生存的多因素*Cox*模型分析见表2

表2 影响结直肠患者预后生存的多因素 *Cox* 模型分析

类别	β	*SE*	Wald χ^2	*P*	*HR*	95%*CI*
≥60岁	0.12	1.01	1.58	>0.05	1.13	0.15 ~ 8.23
Ⅲ ~ Ⅳ期分化程度	1.25	0.21	12.63	<0.05	3.49	2.29 ~ 5.32
中或低分化	1.22	1.96	1.62	>0.05	3.38	0.07 ~ 158.15
肝转移	1.12	0.26	11.23	<0.05	3.06	1.82 ~ 5.15
有区域淋巴结转移	1.22	0.48	10.94	<0.05	3.39	1.32 ~ 8.70
姑息手术	1.02	1.69	0.69	>0.05	2.77	0.10 ~ 76.35
CTCs阳性	1.02	0.36	10.36	<0.05	2.77	1.36 ~ 5.63

由表2可见,进一步多因素 *Cox* 模型分析结果显示临床分期(Ⅲ ~ Ⅳ期)、肝转移(有)、区域淋巴结转移(有)、CTCs阳性是影响结直肠患者预后生存的危险因素(*P*均<0.05)。

3 讨论

近年来我国结直肠癌发病率逐渐上升,虽目前临床于对结直肠癌的诊治已趋向成熟化,但由于对结直肠癌具体的发病机制尚未明确且其远处转移率较高,患者预后仍不太乐观[5~8]。基于此,目前临床对于结直肠癌的治疗主要以控制患者病情进展、提高患者预后为主,常规治疗模式为外科手术切除病变部位后,辅助相关剂量放化疗,巩固其手术疗效,但对于TNM分期较高者,术后短时间内出现远处转移率较高[9~11]。基于此,于手术前排除或降低影响患者治疗的危险因素对提高患者预后生存时间具有重要意义。在既往研究中报道,CTCs作为一类从原发瘤或者转移瘤脱离而进入外周血中播散的肿瘤细胞,检测价值重大,与肿瘤组织样本相比更易获取,临床实用性佳[12~16]。

本次研究结果显示,手术前103例结直肠癌患者CTCs阳性者为66.01%,且CTCs阳性检出率与临床分期、肝转移密切相关,CTCs阳性率随临床分期的上升而上升,出现肝转移者CTCs阳性率也高于未出现肝转移者,与Carluccio等[17]学者研究文献相一致。在整理随访资料后,发现CTCs阳性组患者1年、3年、5年生存率明显低于CTCs阴性组(*P*均<0.05),表明CTCs与结直肠癌患者预后生存密切相关,其阳性者的预后生存时间明显低于CTCs阴性者。国内外较多文献报道,癌症患者机体内癌细胞和微环境之间的关系密切,较多学者认为肿瘤转移的形成因素均基于发展状态的肿瘤细胞,在肿瘤细胞游离中遇到合适的器官、组织的基质环境时,就会发生肿瘤的转移[18~20]。为探究CTCs与结直肠癌患者预后的具体关系,本次研究在单因素中发现年龄、临床分期、肝转移、区域淋巴结转移、分化程度、手术方式、CTCs是影响结直肠患者预后生存的单因素(*P*均<0.05),进一步*Cox*多因素分析结果证实了高临床分期、存在肝转移、存在区域淋巴结转移及CTCs阳性是影响结直肠患者预后生存的危险因素(*P*均<0.05),且笔者认为CTCs检测与传统的影像学以及病理学诊断相比,优势更为明显,通过分离富集CTCs只需抽取患者少量外周血,即可对患者实时生物学变化进行评估,进而实时的个体化治疗。

综上所述,CTCs与结直肠癌患者临床分期、肝转移密切相关,术前CTCs阳性者预后较差,可通过检测CTCs对患者预后进行相关评估。本次研究存在不足之处为研究病例数较低,研究结论仍然需要扩大样本量进一步探讨。

参考文献

1 唐金凤,肖久长,陈先春,等.结直肠癌血清CEA与CA199及CA724联合检测价值分析[J].中华肿瘤防治杂志,2016,22(2):125-126.

2 陈晓龙,许岸高.白细胞介素-11信号通路与大肠癌关系的研究进展[J].广东医学,2015,53(2):314-316.

3 黄青,郑树,杨姣,等.循环肿瘤细胞的形成机制及其在Ⅰ~Ⅲ期结直肠癌中的应用进展[J].中华胃肠外科杂志,2015,18(8):848-850.

4 李延东,姜训忠,耿正伟,等.联合检测血清CEA、AFP、CA19-9对结直肠癌的诊断价值[J].解放军医药杂志,2015,26(5):53-55.

5 白东晓,杨海军.循环肿瘤细胞检测与结直肠癌复发转移的研究进展[J].中国肿瘤临床,2017,44(3):142-145.

6 古豫,赵莹.结肠癌中趋化因子受体1表达的临床意义研究[J].中国中西医结合消化杂志,2017,24(2):141-143.

7 伍婧,招丽蓉,林秀强,等.结直肠癌患者血浆循环游离DNA的RAS突变与临床特征的关系[J].南方医科大学学报,2017,36(7):36-38.

8 刘芳腾,欧阳喜,张官平,等.循环miRNA在结直肠癌诊断中的应用价值[J].实用医学杂志,2016,32(13):2241-2243.
9 李燕,吴密璐,骆玉霜,等.紧密连接蛋白1和血管内皮生长因子C蛋白与大肠癌的关系研究[J].重庆医学,2016,45(7):909-911.
10 吕国庆,叶德敬,刘超英,等.循环肿瘤细胞检测对直肠癌同步放化疗的临床意义[J].中国肿瘤临床与康复,2017,23(3):284-287.
11 张东,魏寿江.趋化因子CXCL12及其受体CXCR4与结直肠癌肝转移的相关性研究进展[J].保健医学研究与实践,2016,13(2):87-92.
12 乔媛媛,史成和,张达矜.实体肿瘤循环肿瘤细胞的研究进展[J].实用医学杂志,2017,33(1):33-35.
13 刘彦魁,王晓莉,金琳芳,等.外周血循环肿瘤细胞在评估结直肠癌患者KRAS基因突变中的价值[J].国际肿瘤学杂志,2015,42(9):653.
14 施少军,薛峰,Shi SJ,等.消化系统肿瘤外周血循环肿瘤细胞的研究进展[J].胃肠病学,2016,21(2):107-110.
15 孙文洁,章真.结直肠癌患者外周血循环肿瘤细胞的检测及临床研究进展[J].中国癌症杂志,2015,25(11):854-860.
16 肖建国,康红军,刘辉,等.直肠癌术后并发急性坏死性筋膜炎及脓毒性休克诊治体会[J].临床误诊误治,2017,30(2):62-65.
17 Carluccio S, Delbue S, Signorini L, et al. Generation of tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes from the peripheral blood of colorectal cancer patients for adoptive T-cell transfer[J]. J Cellul Physiol, 2015, 230(7):1457-1465.
18 任丽丽,耿建.老年结肠癌病人循环与肿瘤组织中Galectin-3水平及临床意义[J].实用老年医学,2017,31(2):153-156.
19 陈庆民,汤庆超,陈瑛罡,等.循环肿瘤细胞检测在结直肠癌中的应用及展望[J].中华胃肠外科杂志,2016,19(6):717-720.
20 Gogenur M, Hillig T, Gogenur I. Cytotrack analysis reveals low presence of circulating tumor cells in the perioperative period in patients with non-metastatic colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2017, 37(6):3099.

(收稿日期 2017-10-10)
(本文编辑 蔡华波)

(上接第492页)

17 Olszanecki R, Gebska A, Korbut R. The role of haemoxygenase-1 in the decrease of endothelial intercellular adhesion molecule 1 expression by curcumin[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007, 101(6):411-415.
18 Oh SW, Cha JY, Jung JE, et al. Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice through NF-κB inhibition[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3):414-421.
19 简燕婷,王继德,麦国丰.姜黄素对模型大鼠肠粘膜炎症因子的调控[J].第一军医大学学报,2004,24(12):1353-1358.
20 王灵聪,张微,吴建浓,等.姜黄素对急性肺栓塞大鼠ERK、PI3K、Akt的影响[J].中医杂志,2013,54(18):1592-1595.

(收稿日期 2018-04-03)
(本文编辑 蔡华波)