

· 生物治疗 ·

肝细胞癌循环肿瘤细胞与肿瘤转移和预后关系的研究

王真^{1,2}, 徐增辉¹, 郑罗凝³, 王颖¹, 孙保木⁴, 金华君¹, 钱其军^{1,2,3} (1. 东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438; 2. 东方肝胆外科医院生物治疗科, 上海 200438; 3. 浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018; 4. 东方肝胆外科医院中西医结合科, 上海 200438)

[摘要] 目的 研究肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)与肿瘤转移和预后的关系。方法 选取 35 例肝细胞癌患者,应用密度梯度离心法联合免疫磁珠阴性富集法富集 CTC,然后利用染色体荧光原位杂交和细胞免疫荧光技术进行 CTC 鉴定并计数,同时记录临床相关特征,对数据进行统计学分析。结果 所有患者均检出 CTC,阳性率为 100%,CTC 个数均值为(4.1±2.5)个。对患者进行分组,I 组的 CTC 个数<5,II 组的 CTC 数量≥5。I 组、II 组的 CTC 数量差异有统计学意义($P=0.001$),患者的性别、年龄与肿瘤转移无关($P=0.581,0.531$),CTC 的数量与转移及预后有关($P=0.024,0.01$),I 组、II 组的转移和预后差异有统计学意义。结论 HCC 患者外周血 CTC 的数量与肿瘤转移及预后有关,CTC 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。

[关键词] 肝细胞癌;循环肿瘤细胞;转移;预后

[中图分类号] R73,R4

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)02-0159-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.018

Study on the relationship of circulating tumor cells and metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma

WANG Zhen^{1,2}, XU Zenghui¹, ZHENG Luoning³, WANG Ying¹, SUN Baomu⁴, JIN Huajun¹, QIAN Qijun^{1,2,3} (1. Laboratory of Gene and Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China; 2. Department of Biotherapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China; 3. College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 4. Department of Integration of Traditional Chinese and Western medicine, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of the patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and its metastasis and prognosis. **Methods** 35 patients with hepatocellular carcinoma were collected as the research objects. CTCs density were enriched through gradient centrifugation and negative-immunomagnetic methods, then the cells were detected by chromosome fluorescence in situ hybridization combined with immunofluorescence tests to identify CTCs. The clinical characters were recorded and the data were statistically analyzed. **Results** All the patients were detected CTC positive. The number of CTC was (4.1±2.5). The patients were divided into 2 groups. Group I included patients whose CTCs were <5, and others were included in group II. The difference between number of group I and group II had significant significance ($P=0.001$); Metastasis had nothing to do with patients' sex and age ($P=0.581,0.531$); The number of CTCs was related to metastasis and prognosis ($P=0.024,0.01$), and there was significant statistic significance between group I and group II. **Conclusion** The number of CTCs was related to tumor metastasis. The tumor may be more prone to occur metastasis and may had worse prognosis, and the patients may had shorter life time when the number of CTCs was ≥5.

[Key words] hepatocellular carcinoma; circulating tumor cell; metastasis; prognosis

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81301307); 国家传染病防治重大专项(No. 2013ZX10002-010-007); 上海细胞治疗工程技术研究中心科研基金(No. 12DZ2251600); 上海市卫生局科研基金(No. 20114179)

[作者简介] 王真, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤免疫治疗及循环肿瘤细胞的研究. Tel: 15821381861; E-mail: wangzhenyanguang@163.com

[通讯作者] 钱其军, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤基因-病毒治疗和免疫治疗、循环肿瘤细胞研究. E-mail: qianqj@sino-gene.cn

目前,对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的检查手段和治疗方法不断增多,但由于出现癌症的复发和转移,HCC 的病死率仍较高^[1]。HCC 转移、复发最重要的机制之一就是出现循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)。CTC 随血液循环到全身各处,在适宜的地方就会定居、增殖、生长,形成转移瘤^[2]。近年来,对 CTC 的研究越来越多,在前列腺癌^[3]、结直肠癌^[4]、乳腺癌^[5]、肺癌^[6]、卵巢癌^[7]等一系列实体瘤患者的外周血中都发现了

CTC的存在,CTC正逐渐成为肿瘤患者预后和实时监测治疗反应的独立预测因素。对于HCC患者,CTC具有同样的意义。但是,目前关于HCC的CTC研究还比较少。HCC患者中CTC的数量与肿瘤侵袭、转移及预后究竟存在怎样的关系,尤其是在亚洲人群中HCC与CTC的关系如何,尚缺乏相关的临床研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 HCC患者 收集2013年6月至2014年1月东方肝胆外科医院生物治疗科收治的35位肝细胞癌患者。所有患者均经术后病理或细针穿刺活检诊断为肝细胞癌;其淋巴结转移情况经术后病理或影像学联合临床症状、甲胎蛋白确诊。所有患者肿瘤分期不等,但近1个月内均未接受过相关抗肿瘤治疗。所有患者均已取得知情同意并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂和器材 细胞密度梯度分离介质60 ml、抗CD45免疫磁珠3 ml、2%多聚甲醛4 ml、8号染色体探针(CEP-8)200 μ l、AlexaFluor 594标记的抗CD45抗体20 μ l、Alexa Fluor 488标记的抗人细胞角蛋白18(CK18)抗体20 μ l、DAPI荧光保存液120 μ l(均赛特生物医药科技有限公司)。Triton X-100(上海博光生物科技有限公司)、TDL-40C型低速台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂)、XMTA-6000型数显鼓风干燥箱(上海叶拓仪器仪表有限公司)、GL-802B型微型台式真空泵(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、EDTA抗凝真空采血管(美国BD公司)、S500-24型ThermoBrite原位杂交仪(美国Westwood公司)、荧光显微镜(上海舜宇科技有限公司)。

1.2 实验方法 CTC的富集和鉴定分别借鉴文献^[8-10],富集利用密度梯度离心和免疫磁珠负筛法;CTC的鉴定利用FISH和IF法。具体操作稍有改动,简略描述如下:采集患者外周血7.5 ml于ED-

TA抗凝采血管中,以800 \times g离心7 min,去除大部分血浆,然后利用密度梯度离心法,使用细胞分离介质以450 \times g离心8 min,去除红细胞,再用150 μ l的抗CD45免疫磁珠去除大部分白细胞,阴性富集CTC,最后用100 μ l的2%多聚甲醛过夜固定CTC于载玻片上。第2天,先用10 μ l的CEP-8探针进行DNA FISH杂交,然后用1 μ l的抗CK18和1 μ l的抗CD45免疫荧光抗体孵育,最后5 μ l的DAPI染色,荧光显微镜下观察、计数。

1.3 CTC的判断标准 HCC的CTC为上皮来源的细胞,不表达CD45,且常有染色体异常,其CEP-8可为二倍体、三倍体,甚至多倍体;虽然CTC为上皮来源的细胞,但在其进入外周血的过程中可能已经发生了上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),故其可以表达CK18,也可以不表达CD18;DAPI则是细胞核的标志,故CTC的判断标准为:CD45⁻/CD18⁺/二倍体/单个DAPI或CD45⁻/CD18⁻/二倍体/单个DAPI或CD45⁻/CD18⁺/三倍体/单个DAPI或CD45⁻/CD18⁻/三倍体/单个DAPI或CD45⁻/CD18⁺/多倍体/单个DAPI或CD45⁻/CD18⁻/多倍体/单个DAPI。例如,图1为1个二倍体CTC,图2为1个多倍体CTC。

1.4 统计学分析 采用SPSS20.0统计软件,所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 χ^2 检验或单侧非配对两样本 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本资料 本实验共纳入原发性HCC患者35例,基本资料见表1。所有患者均已签署知情同意书。35例患者多为中老年,年龄(51.8 \pm 10.7)岁,且多为中晚期肿瘤患者。患者的性别和年龄与肿瘤有无远处和(或)淋巴结转移无关($P=0.581$ 、 0.531 , $\alpha=0.05$)。同时,由于肿瘤的TNM

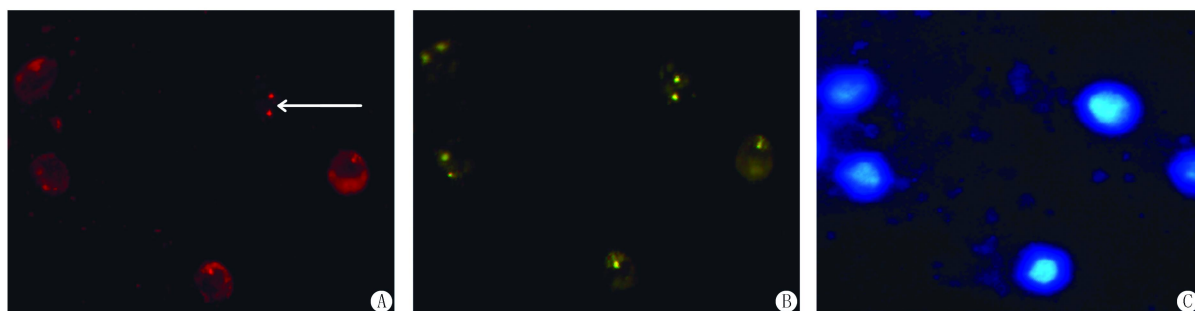


图1 1个二倍体CTC($\times 30$)

A.细胞的CD45阴性表达图;B.CEP-8情况图,为三倍体;C.DAPI染色图

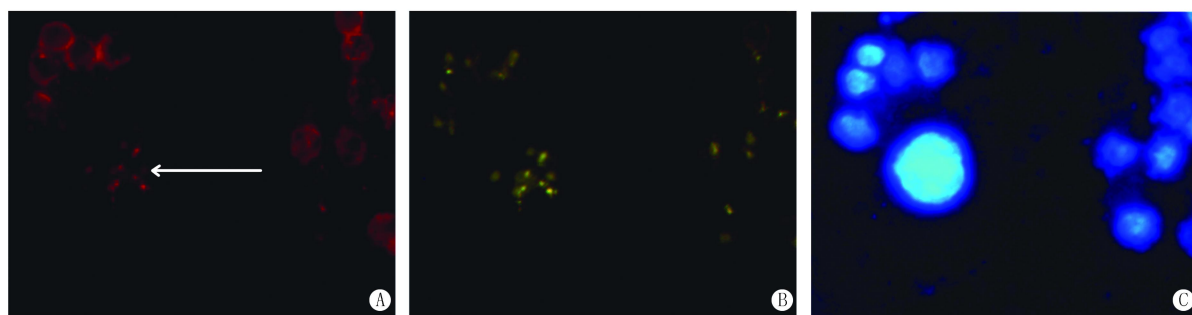


图2 1个多倍体 CTC($\times 30$)

A. 细胞的 CD45 阴性表达图; B. CEP-8 情况图, 为多倍体; C. DAPI 染色图

分期需要考虑肿瘤的转移情况, 故肿瘤的分期与肿瘤的转移有关 ($P=0.039, \alpha=0.05$)。

表1 患者基本资料

项目	例数 (%)	有转移 (%)	χ^2	P
性别				
女	3(8.6)	1(33.3)	0.305	0.581
男	32(91.4)	16(50)		
年龄(岁)				
0~30	1(2.9)	1(100)	4.261	0.531
30~40	6(17.1)	2(33.3)		
40~50	7(20)	4(57.1)		
50~60	12(34.3)	5(41.7)		
60~70	7(20)	3(42.9)		
≥ 70	2(5.7)	2(100)		
肿瘤分期				
I	1(2.9)	1(0)	8.357	0.039
II	4(11.4)	0(0)		
III	11(31.4)	4(36.4)		
IV	19(54.3)	13(68.4)		
CTC 数量(个)				
< 5	23(65.7)	8(34.8)	5.016	0.024
≥ 5	12(34.3)	9(75)		

2.2 患者 CTC 检测结果 35 例患者的 CTC 数量检测结果为 (4.1 ± 2.5) 个, 笔者据此将所有患者分为两组(图 3): I 组为 CTC 数量 < 5 个的患者, 共 23 例, CTC 个数介于 0~4 个不等, 为 (2.7 ± 1.3) 个, 平均约 3 个; II 组为 CTC 数量 ≥ 5 个的患者, 共 12 例, CTC 个数介于 5~10 个不等, 为 (6.8 ± 1.8) 个, 平均约 7 个。两组间的 CTC 数量差异有统计学意义 ($P=0.001, \alpha=0.05$)。

I 组的年龄介于 27~64 岁之间, 为 (50.8 ± 11.09) 岁, 平均 51 岁, II 组的年龄介于 39~72 岁之间, 为 (53.8 ± 10.19) 岁, 平均 54 岁, 两组的年龄无明显差异 ($P=0.446, \alpha=0.05$)。

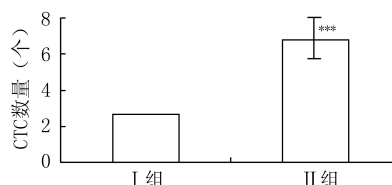


图3 基于 CTC 数量的患者分组情况
(*** $P < 0.001$, 与 I 组比较)

2.3 循环肿瘤细胞的数量与肿瘤有无淋巴结和(或)远处转移的关系 患者入组时已有淋巴结和(或)远处转移的患者共 17 例(48.6%), I 组 8 例, II 组 9 例, CTC 数量介于 0~10 个不等, 为 (4.8 ± 2.8) 个; 无淋巴结和远处转移的患者有 18 例(51.4%), I 组 15 例, II 组 3 例, CTC 数量介于 1~10 个, 为 (3.6 ± 2.0) 个。两组患者的 CTC 数量差异有统计学意义 ($P=0.024, \alpha=0.05$), 可以认为 HCC 患者外周血 CTC 的数量与肿瘤有无远处和(或)淋巴结转移有关, HCC 患者外周血 CTC 的数量 ≥ 5 个时, 可能肿瘤更容易发生淋巴结和(或)远处转移(图 4)。

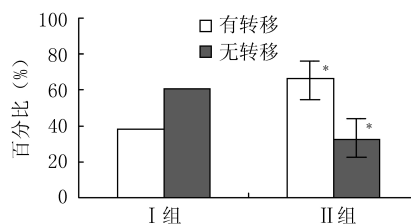


图4 两组患者肿瘤有无转移情况比较
(* $P < 0.05$, 与 I 组比较)

2.4 循环肿瘤细胞的数量与患者预后的关系 中晚期肝癌患者的预后较差, 平均生存期可能仅 3~6 个月, 笔者在试验开始 6 个月后统计 35 例入组患者的生存情况, 死亡 20 例, I 组 10 例(43.5%), II 组 10 例(83.3%), CTC 的数量介于 1~10 个, 为 (5.1 ± 2.5) 个, 平均约 5 个; 存活 15 例, I 组 13 例

(56.5%), II组2例(16.7%), CTC的数量介于0~7个,为(2.9±1.8)个,平均约3个。两组患者CTC的数量差异有统计学意义($P=0.01, \alpha=0.05$),可以认为CTC的数量与肿瘤预后有一定关系,当HCC患者外周血CTC的数量 ≥ 5 个时,可能肿瘤预后更差,患者生存期更短,病死率更高(图5)。

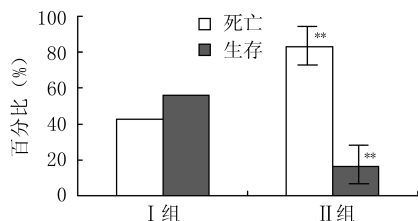


图5 两组患者预后比较

(** $P < 0.01$, 与I组比较)

3 讨论

目前,虽然HCC的诊断和治疗方法不断提高,但预后仍较差,病死率居高不下,其主要原因就是晚期肿瘤的复发和转移。HCC复发和转移的机制尚不明确,CTC的出现被认为是其中一个重要因素。早在1869年就有人提出了CTC的概念^[11],即肿瘤从原发部位脱落进入外周血并随之循环的肿瘤细胞,广义上的CTC还包括进入淋巴系统循环的肿瘤细胞^[2]。对于上皮来源肿瘤的CTC,毋庸置疑的具有上皮性表型。但是,近年来越来越多的研究报道发现,CTC会发生EMT,即上皮细胞为更好的存活并利于发生转移和侵袭,通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,CTC经过EMT,丢失部分上皮性表型,获得了部分间质性表型^[12,13]。

以往对于CTC的检测多通过单一的肿瘤表面特异性分子鉴定,比如上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、细胞角蛋白(cytokeratin, CK),由于肿瘤本身特异性分子标志物较难确定以及上述EMT过程的存在,导致单一鉴定肿瘤表面分子标记的方法容易造成许多CTC被漏检。

国内外对于HCC的CTC研究还比较少见,较为成熟的CTC研究方法如CellSearch™也仅适用于乳腺癌等,并不适用于肝癌。曹宇勃等^[14]检索了常用的包括Pubmed在内的9大数据库,检索其自建库至2013年8月1日期间所有关于HCC的CTC研究,并对其进行荟萃(Meta)分析,最后仅纳入12项研究,这个数量相对于关于乳腺癌、结直肠癌等的CTC研究而言是极少的,其中关于中国人的研究仅4项,且所用的都是qRT-PCR方法;另外,此荟萃分析虽然得出了CTC与患者预后相关的结

论,但未指出与HCC预后相关的具体CTC数量阈值。本研究为更多地富集到HCC患者的CTC细胞,采用阴性免疫磁珠和密度梯度离心联合的方法来富集CTC,从而避免了阳性富集CTC方法中由于肿瘤表面标记物表达较高的异质性,而导致的CTC抓捕效果欠佳。同时,本研究采用了染色体荧光原位杂交和肿瘤表面分子标记免疫荧光的双重方法来精确鉴定CTC细胞。

值得注意的是,检测到的CTC均不表达CK18,考虑其原因可能为CTC发生EMT。Sun等^[15]应用CellSearch™检测肝癌患者CTC的数量发现,有66.7%的患者术前CTC阳性,51%的患者术前的CTC数量 ≥ 2 个,而且,这部分患者术后复发时间比CTC数量 < 2 个的患者要早。本研究得出的肝癌患者CTC阳性率为100%,且影响肿瘤转移和预后的CTC数量分界值为5,均高于Sun等的研究结果。两项研究的主要区别在于Sun等采用的是CellSearch方法,基于上皮肿瘤细胞表面标记物EpCAM进行免疫磁珠捕获,然后再用表面标记物CK进行鉴定。如前所述,可能由于肿瘤表面标记物表达的高异质性以及EMT转化等过程的原因,以及后期单一的免疫荧光鉴定方法的缺陷,导致针对HCC患者的CTC分析结果与本研究有一定的差异;另外,本研究纳入患者多为中晚期,而Sun等研究的纳入患者则多为早期患者。因而,本研究得出的HCC患者的CTC阳性率以及与转移、预后相关的CTC数量会与Sun等的研究有一定差异。

CTC的检测具有重要的临床意义。它有助于肿瘤的早期诊断、辅助诊断和预后评估,有助于快速评估手术、化疗、放疗、免疫治疗等治疗方案的疗效和监测肿瘤的复发,还有助于寻找新的基因突变、治疗靶点,研发新的治疗药物。尤其对于肿瘤的免疫治疗,由于影像学变化出现得晚,难以及早判断治疗是否有效,而CTC这一指标则能通过数量的变化反映治疗效果。检测CTC的数量有望成为免疫治疗疗效的评估标准之一。目前关于CTC的临床应用价值的研究(如前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌等)越来越多,CTC正在成为肿瘤患者预后及对治疗反应的独立预测因素。本实验为研究肝癌患者CTC提供了一种可借鉴的方法,也初步揭示了肝癌患者CTC与肿瘤的转移及预后的一些相互关系。今后仍需要更多的基础研究和临床数据的积累,以阐明CTC在肝癌转移中的机制,以期建立基于CTC的肝癌早期诊断和预后指标。

物因素。

病例1 盐酸头孢替安的一次用量为3 g,剂量过大;说明书上明确标注:成人推荐剂量为0.5~2 g/d,败血症者可增至4 g,分2~3次给药。将1 g头孢替安加入100 ml溶媒溶解,药物浓度过高,可导致体内头孢替安过度蓄积,血浆浓度及游离型药物浓度升高,引发不良反应。

2例不良反应均发生于老年患者,这与老年人肝、肾功能减退,肝脏解毒能力下降,肾脏排泄减慢有关;并且还和老年患者组织器官功能减退、靶器官对某些药物作用的敏感性增加、药效阈值变窄、易发生药物蓄积有关^[2]。静脉给药相对于其他给药方式更易引发不良反应,静脉注射液的pH值、渗透压、不溶性微粒、细菌内毒素等都可能引发不良反应,提醒广大医生临床用药时尽量首选口服给药。在静脉给药前应注意询问患者过敏史,静脉给药时尽量避免联合用药,注意控制剂量、配伍和滴注速度^[3]。

这2例不良反应事件提示广大医护人员用药前应详细询问患者的药物过敏史,对β-内酰胺类过敏

者应慎用或禁用头孢替安;而对于老年患者,特别是伴有肾功能不全的患者,应减量使用该药,并密切观察,一旦发生过敏性休克应立即停药并紧急抢救,对症治疗。建议对临床医生加强安全用药方面的知识培训,用药时一定要严格掌握用药指征,避免药物滥用,做到安全、合理、有效地用药,减少或避免不良反应事件的发生。同时,在用药后应密切注意观察患者的病情变化,一旦出现意识不清、呼吸困难、心悸等异常现象,应立即停用该药,及时对症治疗,以确保患者安全。

【参考文献】

- [1] 金有豫.药理学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2001:321-324.
- [2] 雷招宝.头孢吡肟的不良反应及其防治[J].中国药物应用与监测,2005,6(2):58.
- [3] 郭钦惠.注射用盐酸头孢替安不良反应56例相关因素评析[J].现代医药卫生,2010,26(4):506.

【收稿日期】 2014-07-07 【修回日期】 2014-11-11

【本文编辑】 李睿旻

(上接第162页)

【参考文献】

- [1] Cha C, Fong Y, Jarnagin WR, et al. Predictors and patterns of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma[J]. J Am Coll Surg, 2003, 197(5): 753-758.
- [2] Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(6): 448-456.
- [3] Shao C, Liao CP, Hu P, et al. Detection of live circulating tumor cells by a class of near-infrared heptamethine carbocyanine dyes in patients with localized and metastatic prostate cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88967.
- [4] Seeberg LT, Waage A, Brunborg C, et al. Circulating tumor cells in patients with colorectal liver metastasis predict impaired survival[J]. Ann Surg, 2015, 261(1): 164-171.
- [5] Mikulova V, Cabinakova M, Janatkova I, et al. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: clinical utility for monitoring of therapy efficacy[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2014, 74(2): 132-142.
- [6] Muinelo-Romay L, Vieito M, Abalo A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced NSCLC patients receiving first-line systemic treatment[J]. Cancers (Basel), 2014, 6(1): 153-165.
- [7] Poveda A, Kaye SB, McCormack R, et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2011, 122(3): 567-572.
- [8] Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, et al. Isolation of cir-

culating cancer cells from whole blood by immunomagnetic cell enrichment and unenriched immunocytochemistry *in vitro* [J]. J Urol, 2003, 169(2): 701-705.

- [9] Wu C, Hao H, Li L, et al. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients[J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(1): 30-36.
- [10] Gisselsson D. Refined characterisation of chromosome aberrations in tumours by multicolour banding and electronic mapping resources[J]. Methods Cell Sci, 2001, 23(1-3): 23-28.
- [11] Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death[J]. Aust Med J, 1869, 14(146-149).
- [12] Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition[J]. Science, 2013, 339(6119): 580-584.
- [13] Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis[J]. Cancer Cell, 2011, 20(5): 576-590.
- [14] 曹宇勃,许崇安.循环肿瘤细胞预测肝细胞癌患者临床预后价值的Meta分析[J].中国全科医学,2014,17(12):1394-1399.
- [15] Sun YF, Xu Y, Yang XR, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1458-1468.

【收稿日期】 2014-11-01 【修回日期】 2015-01-29

【本文编辑】 李睿旻