

循环肿瘤细胞对 II 期结直肠癌根治术预后的预测价值 73 例分析

于军辉^{1,2}, 金 岚², 王 今², 姚宏伟², 张忠涛², 杨盈赤²

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038; 2. 首都医科大学附属北京友谊医院, 国家消化系统疾病临床医学研究中心, 北京 100050)

摘要: [目的] 阐明循环肿瘤细胞(CTC)在 II 期结直肠癌(CRC)患者根治术预后的预测作用。 [方法] 采集 73 例 II 期 CRC 患者静脉血, 应用阴离子富集和免疫荧光原位杂交法(imFISH)鉴定 CTC。并对 73 例患者的临床病理特征和无复发生存期(RFS)进行分析。 [结果] II 期 CRC 患者的 CTC 总阳性率为 65.8%。无复发与复发患者 CTC 阳性率分别为 62.7% 和 87.5%。平均 RFS 为 42.6 个月, CTC 阳性者 vs CTC 阴性者平均 RFS 分别为 40.7 个月 vs 46.0 个月 ($P=0.043$)。CTC 阳性并且行辅助化疗患者未出现复发, 而 CTC 阳性未行辅助化疗患者平均 RFS 为 45.8 个月。 [结论] CTC 可用作预测 II 期 CRC 患者平均 RFS 的预后因素, 并有可能筛选出可以进行辅助化疗的 II 期 CRC 患者。

关键词: 循环肿瘤细胞; 结直肠癌; 辅助化疗; 预后因素

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2020)03-0230-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2020.03.A012

Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Stage II Colorectal Cancer Undergoing Curative Resection: Seventy-three Cases Report

YU Jun-hui^{1,2}, JIN Lan², WANG Jin², YAO Hong-wei², ZHANG Zhong-tao², YANG Ying-chi²

(1. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, National Clinical Research Center of Digestive Disease, Beijing 100050, China)

Abstract: [Purpose] To clarify the role of circulating tumor cell(CTC) in stage II colorectal cancer (CRC) patients treated with curative surgery. [Methods] CTCs were detected using a negative enrichment and immuno-fluorescence in situ hybridization (imFISH) staining method from the venous blood samples obtained from 73 stage II CRC patients. The clinic-pathologic characteristics and recurrence free survival(RFS) were collected. [Results] 73 stage II CRC patients were included in this study. The CTC positive rate was 65.8% in all patients, 62.7% in no recurrence patients and 87.5% in recurrent patients. The average RFS was 42.6 months for all patients, 40.7 months for CTC-positive patients, and 46.0 months for CTC-negative patients ($P=0.043$). No recurrence occurred for CTC-positive patients treated with adjuvant chemotherapy. The average RFS for CTC-positive patients without adjuvant chemotherapy was 45.8 months. [Conclusion] CTC could be used as a prognostic factor to predict average RFS for stage II CRC patients, and may have potential in selecting stage II CRC patients for adjuvant chemotherapy.

Key words: circulating tumor cell; colorectal cancer; adjuvant chemotherapy; prognostic factor

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是中国常见

的恶性肿瘤之一, 在女性肿瘤中排名第 4 位, 在男性中排名第 5 位^[1]。目前, 根治性手术是 CRC 首选治疗方法, 术后根据 TNM 分期决定是否需要辅助化疗。众所周知, 辅助化疗对 I 期 CRC 患者没有益处, II 期 CRC 患者较少获益。然而, 大约有 10% I 期和 20% II 期 CRC 患者在根治术后 5 年内复发或转移^[2]。

收稿日期: 2019-11-10; 修回日期: 2020-01-10

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目国家科技支撑计划课题(2015BAI13B09); 北京市医管局临床医学发展专项经费资助项目(ZYLX201504); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(2015-3-005)

通信作者: 杨盈赤, E-mail: yangyingchi@ccmu.edu.cn

对Ⅱ期CRC患者是否使用辅助化疗仍存在争议,有文献报道^[2],因为目前对大多数Ⅱ期CRC患者是“过度治疗”,而对小部分Ⅱ期CRC患者是“治疗不足”。传统临床病理特征在选择这小部分患者中的作用有一定局限性^[3]。因此,迫切需要找到更为敏感的标志物用来选择需要辅助化疗的Ⅱ期CRC患者。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)指来源于原发肿瘤或转移灶肿瘤细胞脱落,已被用于判断预后和评价治疗。在高危结直肠癌患者中,完成辅助化疗后CTC阳性的患者复发率较高^[4-5],CTC可能是造成这些患者复发的原因。此外,在原发肿瘤确诊或切除后,早期CRC患者可以通过检测CTC来判断是否有复发或转移性的风险,以及是否会从辅助治疗中获益^[6]。然而,CTC能否用来指导早期患者进行辅助化疗仍存在争议。在本研究中,我们收集了73例Ⅱ期CRC患者的血液样本,采用阴离子富集和免疫荧光原位杂交法(immuno-fluorescence in situ hybridization,imFISH)鉴定CTC,旨在阐明CTC在根治性手术后的Ⅱ期CRC患者中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床病理资料

选取2015年3月至2017年12月在北京友谊医院接受根治性手术的73例Ⅱ期CRC患者。全组平均年龄63岁(29~75岁),男性44例,女性29例;分化程度:高分化4例,中分化66例,低分化3例;肿瘤位置:升结肠14例,横结肠4例,降结肠6例,乙状结肠29例,直肠20例;肿瘤类型:溃疡型54例,隆起型19例;手术入路:腹腔镜43例,开腹21例,中转开腹9例;T分期:T₃67例,T₄6例。所有患者术前病理确诊CRC,根治术后进行病理分期^[7]。术后化疗者化疗方案为:卡培他滨+奥沙利铂。排除标准:有其他恶性肿瘤史。术后随访:病史采集、体检、CEA测定,2年内每3~6个月随访一次,然后3年内每6个月随访一次;胸部+腹部+盆腔CT,5年内每3~6个月随访一次;结肠镜检查:术后1年内,若发现进展期腺瘤,1年内再次复查;若未发现,3年内复查,然后每5年复查^[7]。无复发生存期(recurrence free survival,RFS)定义:术后到发现肿瘤复发的时间。该研究设计通过了北京友谊医院伦理委员会的

批准(伦理编号:BJFH-EC/2014-086)。入组之前所有患者签订知情同意书。

1.2 主要材料及试剂

细胞核染料4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)(美国Sigma公司),抗白细胞表面抗原CD45磁珠(德国美天旎公司),CTC富集和鉴别试剂盒(江苏莱尔生物医药科技有限公司),枸橼酸抗凝采血管(美国BD公司)。

1.3 标本采集

术后1周进行采血:采集肘正中静脉血,弃去前2ml以防上皮细胞污染,保留之后3.2ml,立即轻柔颠倒混匀8次。

1.4 CTC阴性富集法

按照试剂盒使用说明,首先用缓冲液将所采集3.2ml血标本转至离心管中,室温离心(650g/5min)后去除血浆。加入缓冲液,垂直混匀仪混匀(20r/8min),红细胞裂解后,离心弃上清。将清洗过的微磁粒加入血样中,室温混匀(100~120r/20min),室温离心(300g/5min)。轻柔吸取上面两层溶液至新离心管,磁力架静置3min,室温离心(2070g/3min),弃上清液至100μl,涂于载玻片。

1.5 免疫荧光原位杂交法鉴定CTC

仔细观察标本片是否完全干燥,若仍有湿润处,可置于30℃~37℃无风烘箱中,每10min观察一次标本,若干燥则立刻取出。用科普林氏染色缸I~VII中加入以下试剂,试剂量以保证标本片完全浸入为宜:溶液2×SSC,2×SSC,75%乙醇,85%乙醇,无水乙醇、甲酰胺、工作液、甲酰胺、工作液。调节pH值:将染色缸I、II、VI、VII中的溶液调pH至6.7~7.2;将染色缸I(2×SSC)放入37℃水浴锅预热。

FISH操作:①预固定:取1×CF2工作液(以下简称CF2)完全覆盖标本区域,室温固定8~10min(注意不可多于10min)。②洗涤:小心吸去标本区上的CF2,放入已预热的染色缸I中静置10min。③脱水:标本片依次在染色缸III、IV、V中静置2~5min,室温晾干。④避光。⑤盖片:每个标本区加入10μl L CEP8探针,盖上盖玻片,注意避免气泡。取探针前可瞬时离心,轻轻吹打混匀,并在液面处吸取。⑥封片:吸取RubberCement,完全封住盖玻片边缘。⑦杂交:A.杂交仪设置程序:变性76℃,5min;杂交37℃,1.5h;B.将已封好的载玻片放入杂交仪,并启动杂交

程序。⑧洗片:A.43℃水浴锅中预热染色缸Ⅵ、Ⅶ;B.取出标本片,小心撕去 RubberCement,注意切勿移动盖玻片;将标本放入已预热的缸Ⅵ,小心甩去盖玻片;C.将已甩去盖玻片的标本置于已预热的缸Ⅶ中,计时 15min,期间每 5min 轻摇一次。⑨洗涤:室温下,在染色缸Ⅰ、Ⅱ中各静置 1 次,每次 5min。取出后用吸水纸擦去除标本区以外的液体。

免疫荧光染色:①抗体配制:按每人份 20μl CD45-AF594 荧光抗体加入 180μl 2%BSA 溶液的比例,配制抗体工作液,混匀,避光待用。抗体取用前,可瞬时离心。②洗片:用 0.2%BSA 洗标本区 2 次,确保覆盖满整个标本区。③孵育:吸去标本区上的 0.2%BSA,将配制好的抗体加至标本区,室温下避光孵育 1~1.5h。注意防止标本区干片,建议采用湿盒,并置于 33℃~37℃烘箱内孵育。④洗片:用 0.2%BSA 洗标本区 2 次,吸净残留液体。⑤复染:将 DAPI 瞬时离心后,液面处取 10μl DAPI 染液,加至标本区。最后盖片,在荧光显微镜下观察(Figure 1)。

1.6 CTC 细胞的阳性判定

CTC 判定标准:①光镜下:细胞核完整(蓝色),细胞呈圆形、长形或椭圆形,长径>10μm。②荧光镜下:细胞核荧光原位杂交信号点>2,白细胞表面抗原 CD45 着色 (-)。CTC≥2 判定为 CTC 阳性(Figure 2)。

2 结果

2.1 CTC 检测结果分析

73 例患者 CTC 检测中位数为 2 (范围 0~9)。CTC 总阳性率为 65.8%(48/73)。复发与无复发阳性率分别为 87.5%(14/16) 和 62.7%(34/57),差异有统计学意义($P=0.038$)。只有性别与术后 CTC 阳性率显著相关(Table 1)。

2.2 无复发生存期分析

RFS 为 38.6 个月 (95%CI:36.905~40.295)。所有患者平均 RFS 为 42.6 个月 (95%CI:40.330~44.931)。CTC 阳性者 vs CTC 阴性者平均 RFS 为 40.7 个月 (95%CI:37.662~43.699) vs 46.0 个月 (95%CI:43.490~48.526)($P=0.043$)(Figure 3)。

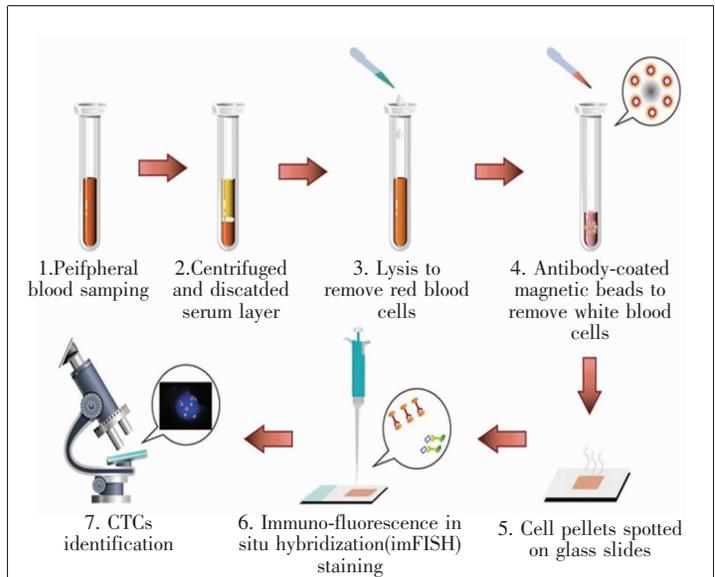
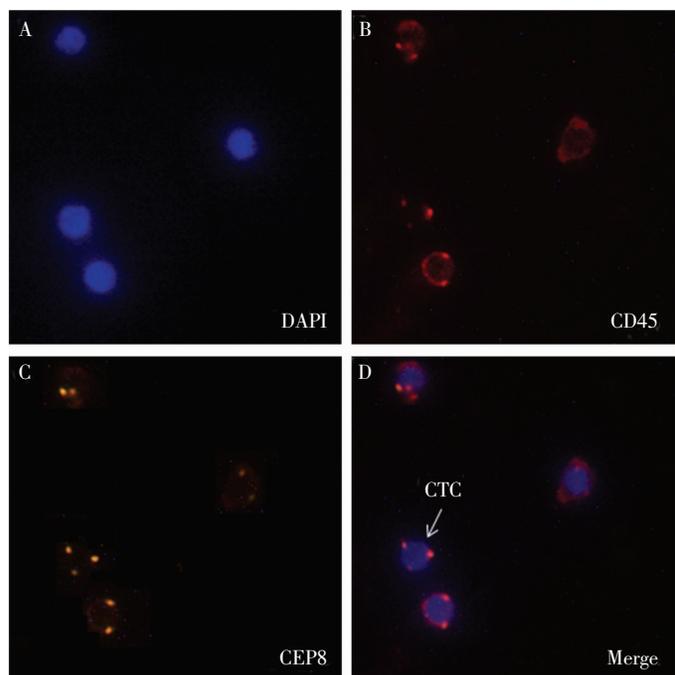


Figure 1 Flow chart of CTCs enrichment and identification



(A) DAPI;blue; (B) CD45:red; (C) CEP8:orange; (D) Merged image. The cell was considered as a CTC,when it was CD45 negative and CEP8 with hyperdiploid

Figure 2 Identification of CTCs by imFISH staining

根据 CTC 检测结果和术后辅助化疗,将患者分为 4 个亚组:CTC+CHEMO+组,CTC-CHEMO+组,CTC+CHEMO-组和 CTC-CHEMO-组。CTC-CHEMO-组平均 RFS 为 454 个月 (95%CI:42329~48536);CTC+CHEMO-组中位 RFS 为 45.8 个月;CTC+CHEMO+组和 CTC-CHEMO+均未出现复发($P=0.038$)(Figure 4)。

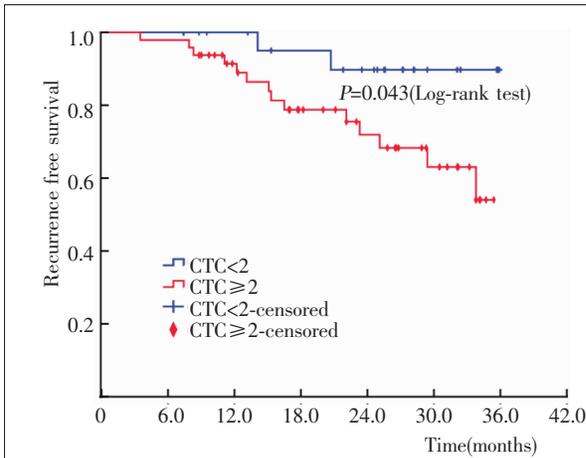


Figure 3 RFS analysis depending on post-operative CTCs of stage II CRC

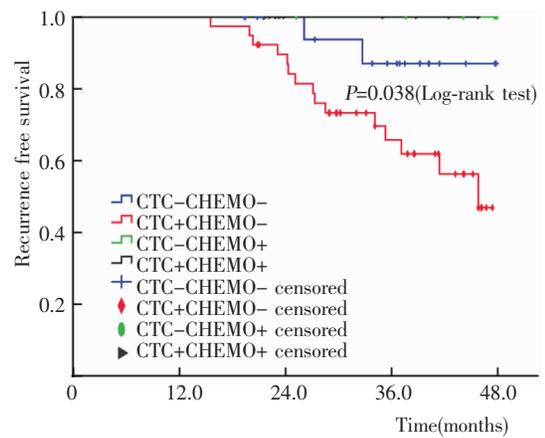


Figure 4 RFS analysis depending on post-operative both CTCs and adjuvant chemotherapy

Table 1 Correlation between CTC and major clinicopathological characteristics

Characteristics	Cases		P
	CTCs<2	CTCs≥2	
Gender			
Female	4	25	0.005
Male	21	23	
Differentiation			
Well	1	2	0.820
Moderate	22	44	
Poor	1	2	
Tumour localization			
Ascending colon	2	12	0.465
Transverse colon	1	3	
Descending colon	2	4	
Sigmoid colon	11	18	
Rectum	9	11	
Tumor type			
Ulcerative	17	37	0.575
Protrude	8	11	
Surgical approach			
Laparoscopic	15	28	0.777
Open	6	15	
Converted	4	5	
T stage			
T ₃	24	43	0.423
T ₄	1	5	

3 讨论

II期CRC患者使用辅助化疗被认为是“过度治疗”，即使这些患者中约20%会在5年内复发或转移。本研究发现，CTC阴性的II期CRC患者平均

RFS显著优于CTC阳性患者。此外，辅助化疗可以使两者的平均RFS无差异。这些结果表明，CTC可用作选择II期CRC患者进行辅助化疗的敏感标志物。

但是，目前不推荐在II期CRC患者中常规使用辅助化疗，因为只有一小部分患者从化疗中获益，对于其他患者有害、生活质量下降甚至没有任何益处^[8-9]。没有完全准确的临床病理特征用来决定需要进行辅助化疗的II期CRC患者。Benson等^[9]研究发现T₄期、穿孔、组织低分化者CRC患者可进行辅助化疗，但仍然没有足够的证据支持。我们发现这三个特征对II期CRC患者的平均RFS没有显著影响。虽然一些新的分子生物标志物和高风险基因检测已经证实，CTC可以为II期CRC患者制定治疗方案提供依据，但是，尚没有任何一种检测方法能够准确地评估所有II期CRC患者的预后。然而，应用imFISH法测得的CTC阴性患者平均RFS显著优于CTC阳性患者。

从肿瘤患者的体液中检测到的CTC或肿瘤衍生的生物标志物被称作是实体瘤中的“液体活检”^[10]。其优点包括创伤小、快速周转期、动态监测，与传统病理只提供肿瘤局部病变相比，提供了更全面的疾病信息^[3]。液体活检已被越来越多地研究或用于CRC患者的临床管理，目的是从早期诊断到早期CRC的预后评估，预测进展期CRC的预后，以及对治疗效果进行监测^[3]。Peach等^[11]认为非mCRC患者术后外周血中检测到CTC是复发的独立预测因素。

早期CRC的CTC检测依赖于更敏感和特异的检测方法。在本研究中，我们采用阴离子富集和免疫

荧光原位杂交法(imFISH)鉴定 CTC。该方法比传统基于 EpCAM 的富集方法更有效,灵敏度和特异性都更高^[12]。Uen 等^[13]认为,采样的时机也很重要,手术会影响 CTC 检测结果的准确性,从手术当天到术后 7 天内检测的 CTC 时没有预后意义的。因此,我们选择在术后第 7 天检测 CTC。结果显示 CTC 阳性率为 65.8%,统计显示与性别显著相关,与其他临床病理特征无显著相关性,但需要更多的样本量进一步证实该结果的可靠性。这些结果与转移性 CRC 的结果不一致^[14],这意味着 CTC 可能是早期 CRC 患者的独立预后因素。

根据文献报道,Ⅱ期 CRC 患者根治术后的复发率为 10%~30%^[15-16]。在本研究中,复发率为 18.92% (14/74),与之前的结果相似。复发患者与未复发患者的 CTC 阳性率存在显著差异。此外,CTC 阳性患者平均 RFS 比 CTC 阴性患者更短,两者差异具有显著性($P=0.043$)。这一结果与 QUASAR 试验:辅助化疗可以提高Ⅱ期结肠癌患者的生存率的结果一致^[17]。另外,9 例接受了辅助化疗的 CTC 阳性患者均未发生复发,另外 40 例 CTC 阳性患者未接受化疗,12 例患者复发,两者差异具有显著性($P=0.038$)。

本项研究存在局限性。首先,总体样本量较小;其次,随访时间较短,阳性事件相对较少,不得使用平均 RFS 来取代中位 RFS,这降低了证据力度;最后,在本研究中仅使用平均 RFS 进行分析,而不是中位 RFS 和总体生存率(overall survival, OS)的整体分析。综上,CTC 可用作预测Ⅱ期 CRC 患者平均 RFS 的预后因素,并有可能筛选出Ⅱ期 CRC 患者进行辅助化疗。

参考文献:

[1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.

[2] Boland CR,Goel A. Prognostic subgroups among patients with stage II colon cancer [J]. N Engl J Med,2016,374(3):277-278.

[3] Normanno N,Cervantes A,Ciardiello F,et al. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: current applications and future scenarios [J]. Cancer Treat Rev,2018,70:1-8.

[4] Lu CY,Tsai HL,Uen YH,et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage III colon

cancer[J]. Br J Cancer,2013,108(4):791-797.

[5] 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.

[6] Tol J,Koopman M,Miller MC,et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents[J]. Ann Oncol,2010,21(5):1006-1012.

[7] Provenzale D,Gupta S,Ahnen DJ,et al. NCCN guidelines insights:colorectal cancer screening,version 1.2018 [J]. J Natl Compr Canc Netw,2018,16(8):939-949.

[8] Lewis C,Xun P,He K. Effects of adjuvant chemotherapy on recurrence,survival,and quality of life in stage II colon cancer patients:a 24-month follow-up [J]. Support Care Cancer,2016,24(4):1463-1471.

[9] Benson AB,Schrag D,Somerfield MR,et al. American society of clinical oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer [J]. J Clin Oncol,2004,22(16):3408-3419.

[10] Lianidou ES,Markou A,Strati A. The role of CTCs as tumor biomarkers[J]. Adv Cancer Biomarker,2015,867:341-367.

[11] Peach G,Kim C,Zacharakis E,et al. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers:a systematic review [J]. Br J Cancer,2010,102(9):1327-1334.

[12] Li Y,Ma G,Zhao P,et al. Improvement of sensitive and specific detection of circulating tumor cells using negative enrichment and immunostaining-FISH[J]. Clin Chim Acta,2018,485:95-102.

[13] Uen YH,Lu CY,Tsai HL,et al. Persistent presence of post-operative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I~III colorectal cancer after curative resection[J]. Ann Surg Oncol,2008,15(8):2120-2128.

[14] Das A,Kunkel M,Joudeh J,et al. Clinico-pathological correlation of serial measurement of circulating tumor cells in 24 metastatic colorectal cancer patients receiving chemotherapy reveals interpatient heterogeneity correlated with CEA levels but independent of KRAS and BRAF mutation[J]. Cancer Biol Ther,2015,16(5):709-713.

[15] Hutchins G,Southward K,Handley K,et al. Value of mismatch repair,KRAS,and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer[J]. J Clin Oncol,2011,29(10):1261-1270.

[16] Tsikitis VL,Larson DW,Huebner M,et al. Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer[J]. BMC Cancer,2014,14:336.

[17] Quasar Collaborative G,Gray R,Barnwell J,et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer:a randomised study [J]. Lancet,2007,370(9604):2020-2029.