

晚期胃癌外周循环肿瘤细胞与血液高凝状态及预后的相关性研究

黄薇, 轩乾坤, 吴寅, 刘冬, 薛俊丽

(同济大学附属东方医院, 上海 200123)

摘要: [目的] 研究晚期不可切除胃癌患者外周循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 与凝血功能指标之间关系, 探讨 CTCs 及血液高凝指标在晚期胃癌患者生存及预后中的作用。[方法] 收集晚期不可切除胃癌患者 28 例, 采用阴性富集法检测基线 CTCs, 并检测血常规及凝血功能指标, 分析 CTCs 与凝血功能指标及血小板之间相关性; 随访分析基线 CTCs、凝血功能指标与患者生存的关系, Cox 回归分析各因子在患者预后中的作用。[结果] 28 例晚期不可切除胃癌患者中, 基线 CTCs 及凝血指标异常, 尤其是 D-二聚体、纤维蛋白原降解产物 (FDG) 升高明显, 与患者年龄、性别、是否存在远隔脏器转移无关 ($P>0.05$)。相关分析显示基线 CTCs 与凝血指标 D-二聚体、FDG 呈正相关 ($P<0.001$), 而与抗凝血指标 AT-III 呈负相关 ($P<0.05$); 抗肿瘤及抗凝治疗后, 高凝指标较治疗前有明显改善 ($P<0.01$)。基线 CTCs <4 个/ 3.2ml 外周血患者 PFS 较 CTCs ≥ 4 个/ 3.2ml 患者明显延长 ($P<0.01$), 但 OS 在两组间差异未达统计学意义 ($P=0.051$)。Cox 回归分析显示 D-二聚体升高是晚期不可切除胃癌患者疾病进展独立预后因子 ($\text{HR}=1.440, 95\%\text{CI}: 1.151\sim 1.803, P<0.05$), 而与 OS 无明显相关性 ($\text{HR}=1.239, 95\%\text{CI}: 0.992\sim 1.547, P>0.05$)。[结论] 晚期不可切除胃癌患者 CTCs 与患者高凝状态、疾病进展相关, 可能存在 CTCs-高凝-转移的恶性循环, 积极抗凝及抗肿瘤治疗可能阻断这一恶性循环, 改善高凝状态减少转移。

关键词: 胃肿瘤; 晚期; 循环肿瘤细胞; 高凝状态; D 二聚体

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)08-0691-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.08.B003

Association of Circulating Tumor Cells with Hypercoagulation Status and Prognosis of Patients with Advanced Gastric Cancer

HUANG Wei, XUAN Qian-kun, WU Yin, LIU Dong, XUE Jun-li

(Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200123, China)

Abstract: [Objective] To study the relationship of circulating tumor cells (CTCs) with coagulation factors and the prognosis of patients with advanced gastric cancer. [Methods] Blood samples were collected from 28 patients with advanced unresectable gastric cancer, the CTCs were enriched by negative immunomagnetic separation and identified by immunofluorescence method. Plasma coagulation factors, including D-Dimer, PT, APTT, FDG, AT-III, PLT and FIB were determined. The relationship between CTCs and coagulation factors was analyzed before and after anti-cancer treatment. The prognostic factors of advanced gastric cancer were examined by Cox regression analysis. [Results] CTCs and coagulation factors, especially D-dimer and FDG were abnormal in advanced gastric cancer patients, which were not correlated with age, gender or distant metastasis of patients ($P>0.05$). CTCs were positively correlated with D-Dimer and FDG ($P<0.001$), and negatively correlated with AT-III ($P<0.05$). Hypercoagulation status was improved significantly after chemotherapy and anti-coagulation treatment ($P<0.01$). Patients with baseline CTCs $<4/3.2\text{ml}$ had longer PFS than those $\geq 4/3.2\text{ml}$ ($P<0.01$), but the difference in OS was not significant between the two groups ($P=0.051$). Regression analysis revealed that D-Dimer was independent prognostic factor for PFS ($\text{HR}=1.440, 95\%\text{CI}: 1.151\sim 1.803, P<0.05$), but not for OS ($\text{HR}=1.239, 95\%\text{CI}: 0.992\sim 1.547, P>0.05$). [Conclusion] CTCs is associated with hypercoagulation status of patients, which would further affect the progression of advanced unresectable gastric cancer.

Subject words: gastric cancer; advanced; circulating tumor cells; hypercoagulation; D-Dimer

基金项目: 国家自然科学基金 (81502510); 上海市卫生与计划委员会课题 (201440318); 上海市科学技术委员会课题 (17411968800); 东方旭日人才计划

通信作者: 薛俊丽, 主治医师, 硕士生导师, 博士; 同济大学附属东方医院肿瘤科, 上海市浦东新区云台路 1800 号 (200123); E-mail: 1310666xuejunli@tongji.edu.cn

收稿日期: 2018-02-25; **修回日期:** 2018-07-17

我国是胃癌发病率较高地区之一^[1]。根据中国肿瘤登记统计数据,我国胃癌发病率与死亡率均居恶性肿瘤发病与死亡第2位,每年新发病例占全球47%^[2]。然而,与日、韩等胃癌高发国家不同,我国多数胃癌患者确诊时已属晚期,预后较差。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)被认为是肿瘤的“液体活检”^[3]。研究显示在胃癌患者中,CTCs计数与CEA水平、术后复发率、肿瘤大小、血管受累、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM分期和神经受累情况相关^[4-6]。为此,CTCs在监测肿瘤病情、判断肿瘤预后中有重要作用^[7-8]。

凝血功能异常及血栓相关事件在恶性肿瘤患者中多有发生^[9]。研究认为,1/5的肿瘤患者均有血栓相关事件发生,已成为肿瘤患者第二大死亡原因^[10]。胃癌患者肿瘤相关高凝状态和血栓相关事件发生仅次于胰腺癌,居第2位^[11]。有研究认为,CTCs与肿瘤高凝状态有密切关系^[12]。CTCs作为循环中组织因子(TF)的重要来源,参与患者血栓形成的过程,并激活凝血系统和血小板^[13-14]。但是,晚期胃癌患者中CTCs与血液高凝状态的研究较少。为此,本研究通过分析晚期胃癌患者外周CTCs与高凝状态指标D-二聚体、纤维蛋白原(FIB)及其降解产物(FDG)等之间的相关性,及其与肿瘤预后的关系,探讨抗肿瘤治疗及抗凝治疗对改善晚期胃癌患者高凝状态、减少血栓不良事件、改善预后的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集我院2016年5月至2017年9月初发初治晚期不可切除胃腺癌患者28例。排除标准:年龄<18岁或≥80岁;合并其他肿瘤或非腺癌患者;合并严重心、肝、肾等基础疾病;有血栓栓塞史或脑转移、妊娠、哺乳或1个月内曾用过抗凝药的患者以及其他疾病需长期口服抗凝药物者;PS评分≥3分者;既往曾接受化疗或放疗患者。共入组28例患者,其中男性16例,女性12例;年龄33~78岁,中位年龄54岁;伴远隔脏器转移15例,无远隔脏器转移13例。所有患者取得知情并签署知情同意后入组。患者血栓风险采用Caprini评分法评估,对于Caprini评分≥2分患者,先行采集外周血检测CTCs及凝血

功能指标,而后排除潜在出血风险后开始给予低分子肝素4250IU,每日1次皮下注射抗凝治疗。在行外周血CTCs检测后,患者进行系统性姑息一线治疗,采用奥沙利铂联合氟尿嘧啶为主方案(XELOX/FOLFOX/SOX等),对Her-2表达阳性患者,联合赫赛汀靶向治疗。全部患者随访至2017年12月31日,每3个月随访1次,收集全部数据,进行生存分析。

1.2 检测方法

1.2.1 CTCs 检测方法

入组当日空腹,抽取外周血3.2ml送检,采用免疫磁微粒富集及荧光原位杂交(FISH)鉴定CTCs。CTCs检测由上海赛安医学检验所完成。具体方法如下:①抽取外周血3.2ml,15~30℃保存,24h内进行富集处理。②富集实验:将外周血移至50ml离心管中,依据试剂盒说明书补充CS1至45ml,650g离心5min,去上清至12ml,混匀。加CS2至45ml,于混匀仪室温混匀8min(20转/min)。再离心5min,弃上清至500μl,混匀后补加CS1至5ml。按每份150ul的比例将磁微粒缓慢加入样本中,摇床室温摇动20min。移至有3ml CS3的离心管内,300g离心5min。吸取最上2层溶液,加CS1至14ml,颠倒混匀3次后离心(950g,室温,5min),弃上清至300μl,加入1ml CS1,重悬沉淀细胞。将标本转移至新2ml离心管中,靠于磁力架上2~3min,而后将液体分别转移至新1.5ml离心管中,2070g离心3min,弃上清至100μl,加入100μl CF1固定液,充分吹打混匀10次以上,涂片至20×20mm²的标本框中,干燥标本。③荧光原位杂交:以CF2固定液室温固定标本8min后置已预热的SSC中静置10min,依次在梯度酒精中脱水,室温晾干。取10μl探针加入标本区染色,Rubber Cement封片。76℃变性5min,37℃杂交1.5h。而后以43℃甲酰胺洗片。④免疫荧光染色:配置CD45-AF594荧光抗体,避光待用。0.2%BSA洗涤标本区2次后,将配置好的抗体加至标本区,室温并避光孵育1h。再以用0.2%BSA洗标本区,DAPI染色,封片。

1.2.2 凝血功能指标检测方法

入组当日,患者空腹,经肘静脉采取外周血2ml,减少组织因子激活,枸橼酸钠抗凝管收集标本,检测凝血功能指标:D二聚体,凝血酶原时间(PT),部分凝血酶原时间(APTT),凝血酶时间(TT),纤维

蛋白原(FIB),纤维蛋白原降解产物(FDG),抗凝指标检测(抗凝血酶Ⅲ,AT-Ⅲ);EDTA抗凝管收集2ml外周血标本检测血常规(血小板计数,PLT);凝血功能指标检测仪器为SYSMEX CS5100全自动凝血仪及其配套试剂,血常规检测仪器为迈瑞BC6800全自动血细胞分析仪及其配套试剂。

1.2.3 结果判断

各指标正常范围如下:D二聚体:0~0.55mg/L;PT:11~13s;APTT:25~31.3s;TT:14~21s;FDG:0~5mg/L;FIB:1.8~3.5g/L;AT-Ⅲ:75%~125%;PLT:125×10⁹/L~350×10⁹/L。

CTCs阳性标准:CEP≥3/DAPI⁺/CD45⁻,即核内信号大于等于三倍体,细胞核DAPI染色阳性,CD45染色阴性为异常细胞;CEP=2/DAPI⁺/CD45⁻为白细胞。Figure 1~2为标准阳性及阴性对照,Figure 3为检测到典型单细胞CTC图像。

1.3 统计学处理

采用IBM SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料的比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验;自身对照采用配对样本 t 检验;相关分析采用Pearson相关分析;生存分析采用Kaplan-Meier法,并采用Log-rank检验进行比较;针对CTCs及与其有明显相关的凝血指标D-二聚体、FDG等作为自变量,采用Cox回归分析统计各变量与胃癌进展及预后关系;结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTCs检出情况及与临床资料相关性

3.2ml外周血,CTCs检出最高值为11个,中位数为4个/3.2ml外周血。28例患者中,除3例患者未检出CTCs外,其余外周血均有CTCs检出,其中15例患者检出4个及以上CTCs(≥4个/3.2ml),10例患者检出CTCs少于4个(<4个/3.2ml)。本研究依据中位数值,采用4个CTCs/3.2ml外周血值为分析临界值。两组患者基线特征见Table 1,各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

不同性别、年龄、远隔部位转移患者间CTCs计数、凝血功能指标及血小板计数差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见Table 2)。

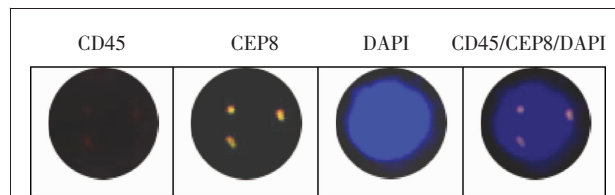


Figure 1 CTCs images

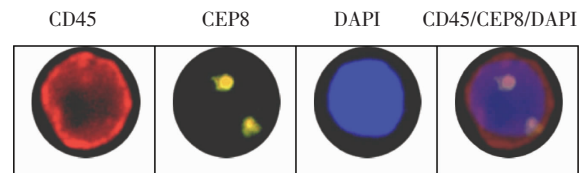


Figure 2 Non-CTCs images

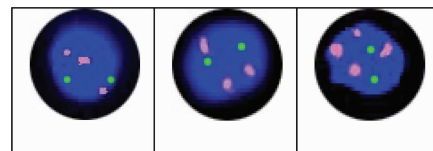


Figure 3 Typical detected CTCs images

Table 1 The baseline characteristics of 28 advanced gastric cancer patients

Index	CTC<4	CTC≥4	χ^2	P
Gender				
Male	7	9	/	1.0
Female	6	6		
Age(years)				
<55	7	7	/	1.0
≥55	6	8		
Metastasis				
Distant metastasis	6	7	/	1.0
Local advanced	7	8		
ECOG				
0	8	7	/	0.476
1	5	8		
Histology				
Differentiated	7	6	/	0.705
Undifferentiated	6	9		
Tumor location				
Lesser curvature	4	5	0.672	1.0
Greater curvature	4	3		
Upper	3	4		
Lower	2	3		
Her-2 expression				
Negative	11	13	/	1.0
Positive	2	2		
Chemotherapy				
FOLFOX	5	6	1.444	1.0
XELOX	6	7		
SOX	1	2		
Others	1	0		
Anti-coagulation				
With	5	10	/	0.255
Without	8	5		

Table 2 CTCs and coagulation factors in different age, gender or metastatic status in advanced gastric cancer patients

Index	$\bar{x} \pm s$	Gender			Age(years)			Metastasis		
		Male	Female	P	<55	≥55	P	Yes	No	P
CTCs	3.89±2.87	4.00±2.76	3.75±3.14	0.825	3.85±2.21	3.92±3.50	0.949	4.53±3.20	3.15±2.34	0.211
D-Dimer	9.71±10.37	10.79±12.29	8.29±7.37	0.537	8.15±7.73	11.29±12.59	0.433	10.21±12.66	9.15±7.39	0.792
PT	14.25±1.58	14.36±1.73	14.12±1.44	0.700	14.54±1.38	13.97±1.77	0.356	14.15±1.63	14.38±1.59	0.709
APTT	27.92±3.81	27.76±3.13	28.14±4.70	0.800	28.18±4.63	27.67±2.91	0.732	28.97±3.85	26.72±3.53	0.122
TT	16.58±2.32	16.46±2.98	16.74±1.01	0.759	16.03±3.07	17.14±1.02	0.212	16.48±3.14	16.66±0.77	0.841
FDG	31.75±35.38	35.19±44.10	27.17±19.51	0.563	25.95±21.35	37.56±45.51	0.395	34.55±45.49	28.54±19.52	0.663
FIB	3.16±0.97	3.11±0.89	3.23±1.10	0.753	3.30±1.13	3.01±0.79	0.445	3.30±0.94	2.99±1.01	0.410
AT-Ⅲ	86.03±17.75	85.33±15.14	86.95±21.42	0.817	86.44±20.43	85.61±15.37	0.904	86.19±14.52	85.84±21.51	0.959
PLT	178.68±78.68	201.94±88.75	147.67±51.18	0.070	159.29±83.67	198.07±71.06	0.198	197.93±79.87	156.46±74.09	0.168

2.2 晚期胃癌患者外周 CTCs 与凝血功能指标相关性

Pearson 相关分析显示, 晚期胃癌患者中, CTCs 与 D-二聚体及 FDG 呈明显正相关 ($P<0.001$), 而与 AT-Ⅲ呈明显负相关 ($P<0.05$), 提示 CTCs 可能参与晚期肿瘤患者血液凝血-纤容系统异常过程。另外, 对凝血功能指标之间相关分析结果显示, D-二聚体与 FDG 呈显著正相关 ($r=0.963, P<0.001$); APTT 与 PT 呈正相关 ($r=0.413, P=0.029$), 而与 AT-Ⅲ呈负相关 ($r=-0.656, P<0.001$), 提示各凝血指标之间存在相互影响, 晚期肿瘤血液高凝与抗凝系统之间平衡破坏, 形成恶性循环机制, 加重肿瘤相关高凝或血栓不良事件发生 (Table 3)。

2.3 化疗联合抗凝治疗对晚期胃癌患者高凝状态作用

本研究中, 28 例患者均接受姑息一线治疗, 化疗方案依据 NCCN 指南制定, 包括 FOLFOX、XELOX、SOX 及其他 (单药 S1)。其中, HER-2 表达阳性患者联合赫赛汀靶向治疗。在治疗开始前留取外周血样本检测 CTCs 及相关凝血功能指标后, 依据患者 Caprini 评分, 对评分 ≥2 分的中危以上血栓患者, 除外出血风险后给予低分子肝素皮下注射抗凝治疗 (4250 IU, 每日 1 次), 共 15 例患者接受低分子肝素抗凝治疗。化疗 2 个周期及低分子肝素抗凝治疗 1 个月后, 复查血液高凝相关指标。结果显示, 在化疗联合抗凝治疗后, 患者高凝指标明显改

Table 3 The relationship between CTCs and coagulation factors in advanced gastric cancer

Index	D-Dimer	PT	APTT	TT	FDG	FIB	AT-Ⅲ	PLT
r	0.650	0.118	0.216	-0.239	0.604	-0.087	-0.409	-0.258
P	<0.001	0.551	0.270	0.221	0.001	0.659	0.031	0.186

Table 4 The coagulation factors before and after chemotherapy and anti-coagulation treatment

Coagulation factors	Baseline	After treatment	t	P
D-Dimer	9.71±10.37	2.21±1.95	4.117	<0.001
PT	14.25±1.58	14.26±1.67	-0.010	0.992
APTT	27.92±3.81	27.66±3.48	0.283	0.779
TT	16.56±2.32	17.39±1.19	-1.962	0.060
FDG	31.75±35.38	9.03±7.91	3.670	0.001
FIB	3.16±0.97	3.42±1.01	-1.047	0.304
AT-Ⅲ	86.03±17.75	87.98±14.62	-0.526	0.603
PLT	178.68±78.68	168.79±74.86	0.678	0.503

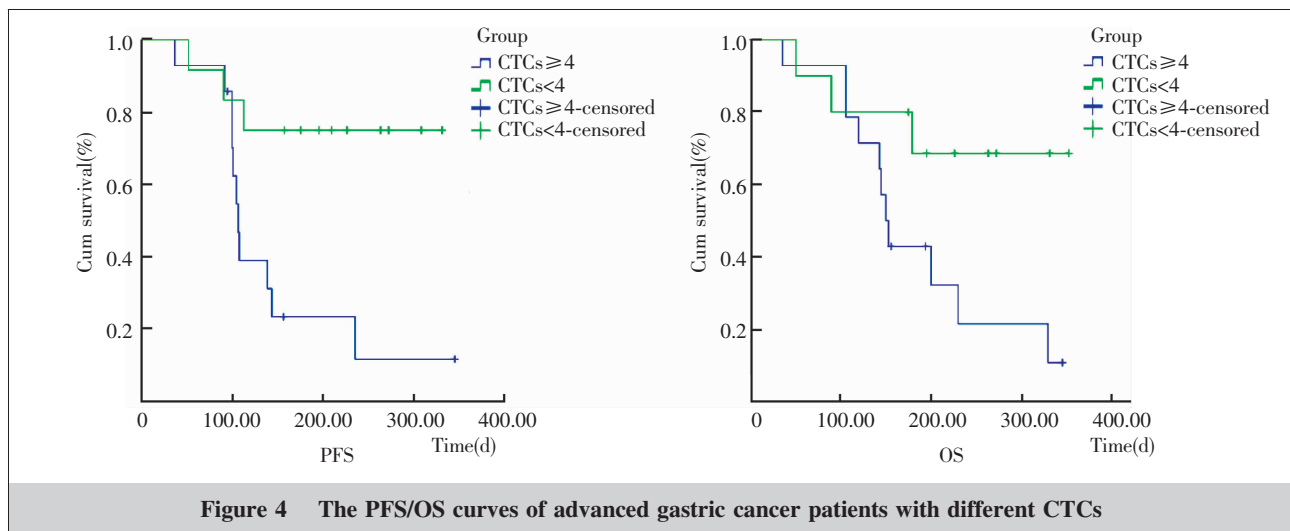
Table 5 Cox regression analysis of different covariates in advanced gastric cancer

Covariates	B	SE	Wald	P	HR(95%CI)
PFS					
CTCs	0.229	0.146	2.454	0.117	1.258(0.944~1.676)
D-Dimer	0.365	0.114	10.173	0.001	1.440(1.151~1.803)
FDG	-0.089	0.032	7.967	0.051	0.914(0.859~0.973)
OS					
CTCs	0.215	0.145	2.199	0.138	1.240(0.933~1.648)
D-Dimer	0.214	0.113	3.564	0.059	1.239(0.992~1.547)
FDG	-0.056	0.033	2.924	0.087	0.946(0.888~1.008)

善, D-二聚体及 FDG 下降明显, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) (Table 4)。

2.4 晚期胃癌患者基线 CTCs 与预后关系

PFS 为签署知情同意书入组后至第一次疾病进展时间; OS 为入组后至死亡时间。生存分析 CTCs 分组界值采用中位数值, CTCs <4 个/3.2ml 外周血为低危组, ≥4 个/3.2ml 外周血为高危组; 其他高凝指标



分组界值均采用中位数。结果显示,基线 CTCs<4 个/3.2ml 患者,PFS 较 CTCs≥4 个/3.2ml 患者长 ($P<0.01$)。此外,基线 CTCs 为低危组(<4 个/3.2ml)患者较高危组患者(≥4 个/3.2ml)OS 也有延长,但差异无统计学意义($P=0.051$)(Figure 4,5)。

Cox 回归分析显示,D-二聚体升高为晚期胃癌患者疾病进展的独立预后因子 ($HR=1.440, 95\%CI: 1.151\sim1.803, P<0.05$), 而与 OS 尚无明显相关性 ($HR=1.239, 95\%CI: 0.992\sim1.547, P>0.05$)(Table 5)。

3 讨论

晚期胃癌患者,尤其是不可切除胃癌患者预后差,5 年生存率低于 20%^[15]。为此,采用敏感指标早期诊断胃癌并监测肿瘤病情是目前临床待解决的问题之一。CTCs 是从原发肿瘤或转移灶脱落进入外周循环的肿瘤细胞。自 2004 年 FDA 批准 CellSearch 应用于临床以来,CTCs 检测方法也在不断改进。传统的 CTCs 检测方法(包括 CellSearch)主要是根据细胞表面标志物(EpCAM⁺/CD45⁻)开展。深入研究发现,因 CTCs 异质性明显,以细胞表面标志物为基础的检测假阴性率较高。为此,新的检测方法不断见诸报道,如 Ficoll-Hypaque、OncoQuick、RosetteSep 等方法^[16]。但是因细胞富集过程中丢失、检测特异性/敏感性差、肿瘤细胞表面标志物不同等因素,上述检测方法都难以覆盖全部外周 CTCs。本研究方法在细胞筛选过程中采用阴性富集法,减少了细胞在富集过程中丢失;而后采用染色体 CEP8 探针进行免疫

荧光原位杂交,摒除了细胞表面标志物不同而导致的检测结果差异,具有较强的特异性及较高敏感性,已经在临床中有较广泛使用。

晚期肿瘤患者多有凝血功能异常及血栓相关事件发生^[9]。研究认为血栓相关事件已成为肿瘤患者第二大死亡原因^[10,17]。Li 等^[15]曾有个案报道,晚期胃癌患者伴发血液高凝和弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation,DIC),而 CTCs 是晚期胃癌患者监测病情、揭示治疗效果的主要预测因子。本课题纳入晚期胃癌患者 28 例,分析显示晚期不可切除胃癌患者处于血液高凝状态,尤其是 D-二聚体与 FDG 升高为主,与患者性别及年龄无关。相关分析结果显示,CTCs 与 D-二聚体、FDG 呈正相关,而与 AT-III 呈负相关,提示 CTCs 与晚期胃癌凝血功能异常相关。

体外实验研究认为,肿瘤相关高凝的发生过程中,循环组织因子(tissue factor,TF)和膜磷脂起了重要作用,而肿瘤细胞是循环中 TF 的重要来源。表达 TF 的肿瘤细胞参与患者血栓形成的过程,进而通过激活凝血系统和血小板,促进转移^[13-14]。Bourcy 等^[18]研究证实发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transitions,EMT)的 CTCs 表面 TF 表达增高,促凝作用增强,致肿瘤转移能力也较强;阻断 TF 表达或阻断 EMT 过程,CTCs 促凝作用及转移能力均下降。因此,CTCs 诱发肿瘤高凝状态,而肿瘤高凝状态可能促进转移,但临床数据尚少。本研究显示,在 28 例晚期胃癌患者中,姑息一线抗肿瘤治疗及抗凝治疗可改善晚期胃癌高凝状态,28 例患者经 2 个周期

姑息一线化疗及一个月抗凝治疗后,血液高凝指标有明显改善。从临床角度说明外周 CTCs 与胃癌高凝状态有关;抗凝及抗肿瘤治疗可改善胃癌患者高凝状态。此外,动物实验也证实,抗凝治疗也能够减少发生 EMT 转化的 CTCs,进而减少转移^[18],与本研究结果一致。

在 CTC 引起肿瘤相关高凝过程中,血小板亦发挥了重要作用。多种恶性肿瘤发展过程中,均有血小板的激活,如前列腺癌、肺癌、乳腺癌及结直肠癌、胃癌等^[19]。血小板的激活会进一步激活肿瘤细胞表面蛋白酶激活受体,如 PAR-1、PAR-2 等,促进组织因子释放,进而促进高凝状态发生^[20-21]。而肿瘤细胞表面也可表达 P 选择素糖蛋白类配体 1、粘蛋白类、CD44、整合素等,均与可血小板相互作用,促进高凝状态发生及转移形成^[20-21]。另一种与肿瘤高凝状态相关的是血小板微颗粒,其表面表达的受体,包括 GPIIb/IIIa、GPIIb-IX-V 受体复合物、P 选择素等均参与肿瘤相关高凝过程^[22]。不过,本研究中尚未发现 CTCs 与外周循环血小板有相关性,可能系本课题纳入病例数较少,尚未达到统计学结果;亦可能系晚期胃癌患者中 CTCs 致血液高凝过程确实与血小板激活无关。

近年研究认为 CTCs 对肿瘤病情监测、治疗效果评估等有重要作用^[23-24]。在前列腺癌^[25]、胰腺癌^[26]、乳腺癌^[27]、小细胞肺癌^[28]等研究中均证实,外周 CTCs 计数与患者 PFS 及 OS 均有关,是判断患者预后的因素。胃癌中研究证实,CTCs 与肿瘤分期、PFS、OS 均相关^[29],可作为监测病情、评价疗效及判断预后的敏感指标,有一定临床应用价值^[30-32]。本研究也证实,晚期胃癌患者中 CTCs 升高,研究采用中位数为 CTCs 临界值, Kaplan-Meier 分析显示基线 CTCs ≥ 4 个/3.2ml 外周血患者 PFS 较 CTCs < 4 个/3.2ml 差,但 OS 在两组之间未达统计学差异。究其原因可能为以下 2 点:(1)本课题样本量较小,随访周期较短,在统计学尚未观察到 CTCs 对患者总生存期影响,今后需扩大样本量,开展前瞻性临床研究分析;(2)可能与课题所设定 CTCs 临界值有关。Pernot 等^[33]研究发现,不同 CTCs 界值在胃癌中的预测作用并不相同。Aggarwal 等^[28]也报道,CTCs 界值设定较高,对病情预后作用更强。因此,在胃癌中,CTCs 临界值设定,因目前尚无统一标准,仍需大样本研究进一步分析确定。

Cox 回归分析结果显示,D-二聚体升高是晚期胃癌患者病情进展的独立预后因子,但在 OS 中无统计学意义;行积极抗凝及抗肿瘤治疗后,患者高凝状态有明显改善,纠正高凝状态对改善患者预后可能有一定作用。然而,目前抗肿瘤治疗可依据相关指南开展,而肿瘤抗凝治疗尚无循证医学证据。在临床工作中,如何调整抗凝剂使用,如何确定开始抗凝的临界值,仍需进一步研究。

自 1860 年,Armand Trousseau 等报道恶性肿瘤与静脉血栓不良事件有关以来^[34],众多研究证实肿瘤患者易发生静脉血栓^[35],而异常凝血功能又促进肿瘤生长及转移^[36]。在当今精准医疗背景之下,肿瘤“液体活检”CTCs 与血栓发生及其机制研究也越来越多。CTCs 表面表达组织因子(TF)并激活外周血小板,均与肿瘤血栓发生有关^[21]。抗凝治疗能够减少血液高凝状态及转移。1968 年,Gasic 等^[37]首次报道抗凝药物神经氨酸苷酶减少肺转移,且与抑制循环血小板有关。此后,Amirkhosravi 等^[38]及 Kasthuri 等^[13]均发现组织因子抑制物减少肿瘤转移;而 Bambace 和 Holmes 研究发现抗血小板治疗抑制肿瘤转移及复发。这些研究均表明恶性肿瘤易发生高凝及静脉血栓,而高凝又促进肿瘤转移。本研究结果也证实,晚期胃癌患者外周 CTCs 与血液高凝状态呈正相关,预示患者不良预后;抗肿瘤及抗凝治疗能够改善高凝状态。而目前已有研究采用凝血因子标记的荧光探针检测外周血致高凝的 CTCs,以预测肿瘤患者血液高凝及血栓不良事件发生可能性,进而及早采取干预措施,减少肿瘤相关凝血功能异常^[12,17]。

本研究尚存在一些不足之处:首先,课题样本量较小,未做分层分析探讨单独抗凝治疗在减少 CTCs 转移中的作用,需深入研究探讨,并研究抗凝治疗的剂量及治疗周期;其次,本课题未监测化疗后患者 CTCs 计数,故未能证明抗肿瘤治疗后外周 CTCs 与凝血功能关系。今后工作需扩大样本收集晚期胃癌患者病例,并做长期随访,探讨 CTCs-高凝-转移之间的关系,作分层分析,揭示抗肿瘤、抗凝治疗在阻断这一循环中的作用,以指导临床工作开展。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in

- China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–132.
- [3] Li Y, Wu S, Bai F. Molecular characterization of circulating tumor cells-from bench to bedside [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 75: 88–97.
- [4] Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(11): 3092–3100.
- [5] Takeuchi H, Kitagawa Y. Detection of circulating tumor cells in gastrointestinal cancer: Has its time come? [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2012, 3(2): 84–85.
- [6] Zhang ZY, Ge HY. Micrometastasis in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336(1): 34–45.
- [7] Alonso-Alconada L, Barbazan J, Candamio S, et al. PrediCTC, liquid biopsy in precision oncology: a technology transfer experience in the Spanish health system[J]. *Clin Transl Oncol*, 2018, 20(5): 630–638.
- [8] Zhu Z, Qiu S, Shao K, et al. Progress and challenges of sequencing and analyzing circulating tumor cells [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2017 Nov 22. [Epub ahead of print]
- [9] Lee EC, Cameron SJ. Cancer and thrombotic risk: the platelet paradigm[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 67.
- [10] Dammacco F, Vacca A, Procaccio P, et al. Cancer-related coagulopathy (Trousseau's syndrome): review of the literature and experience of a single center of internal medicine [J]. *Clin Exp Med*, 2013, 13(2): 85–97.
- [11] Hillen HF. Thrombosis in cancer patients [J]. *Ann Oncol*, 2000, 3: 273–276.
- [12] Lee AM, Tormoen GW, Kanso E, et al. Modeling and simulation of procoagulant circulating tumor cells in flow[J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 108.
- [13] Kasthuri RS, Taubman MB, Mackman N. Role of tissue factor in cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(9): 4834–4838.
- [14] Malik G, Knowles LM, Dhir R, et al. Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4327–4334.
- [15] Li Y, Zhang X, Ge S, et al. Clinical significance of phenotyping and karyotyping of circulating tumor cells in patients with advanced gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6594–6602.
- [16] Xue J, Xie VK, Wang P, et al. Interrelationships of circulating tumor cells with metastasis and thrombosis: role of microRNAs[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(33): 5298–5308.
- [17] Tormoen GW, Cianchetti FA, Bock PE, et al. Development of coagulation factor probes for the identification of procoagulant circulating tumor cells[J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 110.
- [18] Bourcy M, Suarez-Carmona M, Lambert J, et al. Tissue factor induced by epithelial-mesenchymal transition triggers a procoagulant state that drives metastasis of circulating tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 4270–4282.
- [19] Sierko E, Wojtukiewicz MZ. Inhibition of platelet function: does it offer a chance of better cancer progression control? [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33(7): 712–721.
- [20] Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2): 123–134.
- [21] Tormoen GW, Haley KM, Levine RL, et al. Do circulating tumor cells play a role in coagulation and thrombosis? [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 115.
- [22] Varon D, Hayon Y, Dashevsky O, et al. Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration[J]. *Thromb Res*, 2012, 130 Suppl 1: S98–S99.
- [23] Gallo M, De Luca A, Maiello MR, et al. Clinical utility of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2017, 6(4): 486–498.
- [24] Ma S, Ling F, Gui A, et al. Predictive Value of circulating tumor cells for evaluating short- and long-term efficacy of chemotherapy for breast cancer [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 4808–4816.
- [25] De Laere B, Oeyen S, Van Oyen P, et al. Circulating tumor cells and survival in abiraterone- and enzalutamide-treated patients with castration-resistant prostate cancer [J]. *Prostate*, 2018, 78(6): 435–445.
- [26] Stephenson D, Nahm C, Chua T, et al. Circulating and disseminated tumor cells in pancreatic cancer and their role in patient prognosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 107223–107236.
- [27] Rossi G, Mu Z, Rademaker AW, et al. Cell-free DNA and circulating tumor cells: comprehensive liquid biopsy analysis in advanced breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(3): 560–568.
- [28] Aggarwal C, Wang X, Ranganathan A, et al. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with small cell lung cancer undergoing chemotherapy [J]. *Lung Cancer*, 2017, 112: 118–125.
- [29] Yang C, Zou K, Yuan Z, et al. Prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in patients with gastric cancer: evidence from a meta-analysis [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 1013–1023.
- [30] Liu Y, Ling Y, Qi Q, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in advanced gastric cancer patients receiving chemotherapy[J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 6(2): 235–242.
- [31] Zheng X, Fan L, Zhou P, et al. Detection of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in gastric cancer[J]. *Transl Oncol*, 2017; 10(3): 431–441.
- [32] Zhou J, Ma X, Bi F, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in gastric cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 25713–25720.
- [33] Pernot S, Badoual C, Terme M, et al. Dynamic evaluation of circulating tumour cells in patients with advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma: prognostic value and early assessment of therapeutic effects[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 79: 15–22.
- [34] Donati MB, Lorenzet R. Thrombosis and cancer: 40 years of research[J]. *Thromb Res*, 2012, 129(3): 348–352.
- [35] Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited [J]. *Blood*, 1983, 62(1): 14–31.
- [36] Lima LG, Monteiro RQ. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression [J]. *Biosci Rep*, 2013, 33(5): e00064.
- [37] Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968, 61(1): 46–52.
- [38] Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, et al. Assessment of anti-metastatic effects of anticoagulant and antiplatelet agents using animal models of experimental lung metastasis[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 663: 241–259.