论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0850-04

乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征关系的初步研究

齐晓伟,姜 军,杨新华,范林军,张 毅,张 帆,陈 莉,周 艳 (第三军医大学西南医院乳腺疾病中心,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨乳腺癌循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)与原发肿瘤临床病理特征的关系。**方法** 128例乳腺癌及30例乳腺纤维腺瘤患者首次住院时抽取静脉血5 ml,用密度梯度离心法富集分离单个核细胞,以免疫荧光法检测所获单个核细胞中细胞角蛋白(cytokeratin, CK)8/18阳性的CTC,分析CTC与患者临床病理特征的关系。**结果** 在128例乳腺癌患者中CTC阳性率为40.6%(52/128),30例乳腺纤维腺瘤患者均未检出CTC。不同淋巴结病理分期(pN_0、pN_1、pN_2和pN_3期)患者CTC阳性率分别为15.4%(6/39)、27.0%(10/37)、64.7%(11/17)和66.7%(12/18),各组CTC阳性率差异有统计学意义($P=0.000\ 6$);转移性(M_1期)乳腺癌患者CTC阳性率为80%(16/20),较非转移性(M_0期)乳腺癌患者CTC总阳性率33.3%(36/108)显著升高($P=0.000\ 9$);不同TNM分期(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期)患者CTC阳性率分别为12.5%(3/24)、32.0%(16/50)、50.0%(17/34)和80.0%(16/20),各组CTC阳性率差异有统计学意义($P=0.000\ 3$)。**结论** 部分乳腺癌患者血液中存在CTC。CTC与淋巴结转移、远处转移及TNM分期密切相关。检测CTC有利于进行更精确的病情评估。

关键词: 乳腺癌;循环肿瘤细胞;TNM分期;雌激素受体;孕激素受体;人表皮生长因子受体2

中图法分类号: R73-37; R730.23; R737.9 **文献标识码:** A

Circulating tumor cells and clinicopathologic characteristics of primary tumor of breast cancer patients: report of 128 cases

QI Xiao-wei, JIANG Jun, YANG Xin-hua, FAN Lin-jun, ZHANG Yi, ZHANG Fan, CHEN Li, ZHOU Yan (Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the presence of circulating tumor cells (CTCs) and the clinicopathologic characteristics of primary tumor of breast cancer patients. Methods Samples of peripheral blood (5 ml) from 128 cases of patients with breast cancer and 30 cases of patients with breast fibroadenoma hospitalized for the first time were enriched by density gradient centrifugation for mononuclear cells, and then the cells were detected by immunofluorescence with anti-cytokeratin8/18 antibody. The relations between the positive rate of CTC and clinicopathologic characteristics of breast cancer patients were analyzed. Results The positive rate of CTC in breast cancer patients was 40.6% (52/128), while CTC was not detected in any patient with breast fibroadenoma. The positive rates of CTC in patients at pathologic lymph node stages (pN_0, pN_1, $pN_2$and pN_3) were 15.4% (6/39), 27.0% (10/37), 64.7% (11/17) and 66.7% (12/18), respectively. There was significant difference in positive rate of CTC between patients at different pN stages ($P=0.000\ 6$). The positive rate of CTC in metastatic breast cancer patients (80.0%, 16/20) was significantly higher than that in non-metastatic breast cancer patients (33.3%, 36/108) ($P=0.000\ 9$). The positive rate of CTC in patients at TNM stage Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ was 12.5% (3/24), 32.0% (16/50), 50.0% (17/34) and 80.0% (16/20), respectively. There was significant difference in positive rate of CTC between patients at different TNM stages ($P=0.000\ 3$). Conclusion The presence of CTCs in peripheral blood is correlated positively with lymph mode metastasis, distant metastasis and TNM stage. CTC detection is useful for more accurate risk assessment of patients with breast cancer.

Key words: breast cancer; circulating tumor cell; TNM stage; estrogen receptor; progesterone receptor; human epidermal growth factor receptor 2

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,远处转移是导致患者死亡的主要原因。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)的出现是发生远处转移的前提和基础,在转移灶形成中起重要作用。研究显示CTC不仅可有效判断乳腺癌患者预后,而且还能预测和监测辅

作者简介:齐晓伟,男,河南省灵宝市人,硕士研究生,主要从事乳腺癌循环肿瘤细胞方面的研究。电话:(023)68754160,E-mail:qxw9908@yahoo.com.cn

通信作者:姜 军,电话:(023)68754160,E-mail:jcbd@medmail.com.cn

收稿日期:2008-12-15;修回日期:2009-02-13

助治疗效果,具有重要的临床意义[1,2]。本研究抽取128 例乳腺癌患者外周静脉血,用密度梯度离心法富集分离单个核细胞,以免疫荧光法检测所获单个核细胞中的 CTC,分析其与患者临床病理因素的联系,初步探讨乳腺癌原发肿瘤特征与患者出现 CTC 的关系。

1　材料与方法

1.1　一般资料

收集本中心 2008 年 1 – 6 月乳腺浸润性导管癌女性患者 128 例。年龄 25 ~ 73 岁,中位年龄 46.5 岁。左侧 65 例,右侧 63 例。专人取腋窝淋巴结,空心针穿刺或手术切除标本均经规范病理检查,免疫组化 S-P 法检测雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)和人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2,HER-2)表达,以 Allred Score 法[3] 评估 ER 和 PR 状况、HercepTest 评分系统[4] 评估 HER-2 状况。按照 AJCC (American Joint Commission on Cancer) 2002 年第 6 版乳腺癌分期标准对患者行 TNM 分期。临床病理资料见表 1。取患者第 1 次住院健侧上肢浅静脉血。以同期手术治疗的 30 例乳腺纤维腺瘤患者静脉血为阴性对照。两组患者一般资料具有可比性。

表 1　128 例乳腺癌患者 CTC 与临床病理因素的关系

参数	病例数	CTC		χ^2	P
		阳性例数	阳性率(%)		
原发肿瘤分期					
T_1	46	17	37.0	1.327 1	0.722 7
T_2	64	26	40.6		
T_3	15	7	46.7		
T_4	3	2	66.7		
淋巴结病理分期[a]					
pN_0	39	6	15.4	22.117 8	0.000 6
pN_1	37	10	27.0		
pN_2	17	11	64.7		
pN_3	18	12	66.7		
远处转移					
M_0	108	36	33.3	15.235 6	0.000 9
M_1[b]	20	16	80.0		
骨	10	7	70.0		
肝脏	9	8	88.9		0.084 5[c]
肺脏	6	6	100.0		
TNM 分期					
Ⅰ	24	3	12.5	23.506 4	0.000 3
Ⅱ	50	16	32.0		
Ⅲ	34	17	50.0		
Ⅳ	20	16	80.0		
ER 状态					
+ ~ +++	70	24	34.3	2.573 7	0.108 7
–	58	28	48.3		
PR 状态					
+ ~ +++	57	18	31.6	3.486 2	0.061 9
–	71	34	47.9		
HER-2 状态					
+++	30	13	43.3		
++	21	9	42.8	0.223 0	0.894 5
– ~ +	77	30	39.0		

a:共 111 例(108 例Ⅰ ~ Ⅲ期和 3 例Ⅳ期)患者接受手术治疗;b:3 例患者伴多器官转移;c:Fisher 确切概率法

1.2　主要试剂

人淋巴细胞分离液为天津灏洋生物公司产品。小鼠抗人细胞角蛋白(cytokeratin, CK) 8/18 单克隆抗体为北京中杉公司产品。异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate,FITC)标记羊抗小鼠 IgG 为武汉博士德公司产品。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)为美国 Chemicon 公司产品。MDA-MB-231 乳腺癌细胞株系本中心张帆博士惠赠。

1.3　循环肿瘤细胞检测方法

1.3.1　密度梯度离心法富集　取抗凝全血 5 ml,等量 Hanks 液稀释混匀,缓慢加至人淋巴细胞分离液(5 ml)层面上。水平离心机室温下 4 000 r/min 离心 20 min。吸取环状乳白色单个核细胞层,加入 5 ml Hanks 液洗涤 2 次(每次 2 000 r/min, 10 min,室温),置于液氮罐保存待统一检测。

1.3.2　免疫荧光法染色　将富集获得的单个核细胞均匀涂于防脱载玻片上,室温下放置 15 ~ 30 min,涂层干燥后 4% 多聚甲醛固定 10 min(室温),PBS 漂洗 5 min × 3 次。0.1% Triton X-100 通透胞膜 15 min(室温),PBS 漂洗 5 min × 3 次。5% BSA 封闭 30 min(37 ℃),PBS 漂洗 5 min × 3 次。加入小鼠抗人 CK8/18(1∶100), 4 ℃过夜。PBS 漂洗 5 min × 3 次,加入 FITC 标记羊抗小鼠 IgG (1∶200),37 ℃,孵育 1 h。PBS 漂洗 5 min × 3 次, 加 DAPI 染细胞核 5 min(室温)。PBS 漂洗中止反应, 滴加封片剂,盖上盖玻片。激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)观察、照相。以对数期生长的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株为阳性对照,以 PBS 代替一抗为阴性对照。整个过程注意避光操作。

1.3.3　激光共聚焦显微镜观察　镜下细胞满足以下条件定义为 CTC:同时染绿色(CK8/18 阳性)和蓝色(DAPI 阳性)荧光且核质比例较血细胞明显增大[5,6]。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件统计分析,当 1/5 以上格子的理论频数小于 5 时采用 Fisher 确切概率法,余均采用皮尔逊 χ^2 检验。

2　结果

2.1　循环肿瘤细胞的检出情况

阴性对照组(30 例乳腺纤维腺瘤患者)均未检出 CTC(图 1)。乳腺癌患者组(128 例患者)中 52 例检出 CTC(图 2),阳性率为 40.6%。

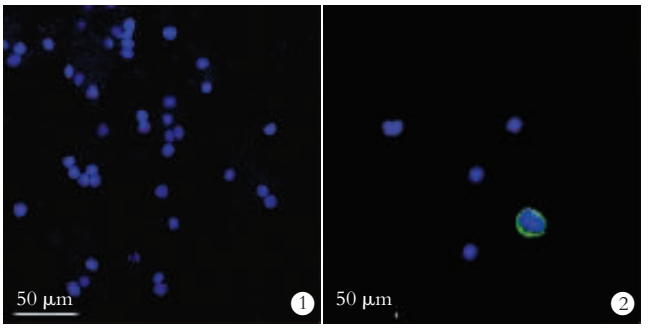


图 1　LSCM 观察乳腺纤维腺瘤患者血细胞形态　只染蓝色荧光、不染绿色荧光

图 2　LSCM 观察乳腺癌循环肿瘤细胞形态　同时染绿色和蓝色荧光且核质比大

2.2 循环肿瘤细胞与 TNM 分期的关系

共111例(108例Ⅰ~Ⅲ期和3例Ⅳ期)患者接受手术治疗,不同淋巴结病理分期(pN_0、pN_1、pN_2和pN_3)患者 CTC 阳性率分别为 15.4%(6/39)、27.0%(10/37)、64.7%(11/17)和66.7%(12/18),各组 CTC 阳性率差异有统计学意义($P=0.000\ 6$)。转移性(M_1期)乳腺癌患者 CTC 阳性率为80%(16/20),较非转移性(M_0期)乳腺癌患者 CTC 总阳性率 33.3%(36/108)显著升高($P=0.000\ 9$),但 CTC 与 M_1期患者远处转移部位(骨、肝脏和肺脏)无关($P>0.05$)。不同 TNM 分期(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期)患者 CTC 阳性率分别为 12.5%(3/24)、32.0%(16/50)、50.0%(17/34)和80.0%(16/20),各组 CTC 阳性率差异有统计学意义($P=0.000\ 3$)。CTC 与原发肿瘤分期无关($P>0.05$)。见表1。

2.3 循环肿瘤细胞与分子标记物的关系

CTC 阳性与患者 ER 状态(+~+++和-)、PR 状态(+~+++和-)和 Her-2 状态(+++、++和-~+)无关(P均>0.05)。见表1。

3 讨论

乳腺癌是一种全身性疾病,在疾病早期肿瘤细胞即可发生全身扩散[7]。研究表明,30%~40%的初治乳腺癌患者静脉血、骨髓及常规病理检查转移阴性的区域淋巴结中存在微转移(micrometastasis)[8];同时,20%~30%的无腋窝淋巴结转移的乳腺癌患者在治疗后5~10年内会发生局部复发和远处转移[9],提示微转移是导致乳腺癌患者术后复发转移的重要原因。CTC 指存在于血循环中而不能被常规手段检出的癌细胞。本研究发现24例Ⅰ期患者中有3例(12.5%)检出 CTC,T_1期患者 CTC 阳性率达37.0%(17/46),进一步证明肿瘤细胞的全身扩散是乳腺癌发生、发展过程中的早期事件。因此检测乳腺癌患者 CTC 状态,有助于及早确定复发转移高危人群,加强这部分患者的随访并采取相应的治疗措施,对减少肿瘤的复发转移、提高生存率具有重要意义。

伴随现代生物学技术的飞速发展,细胞富集技术、免疫学技术等在 CTC 检测中得到广泛应用,使检测的敏感性和特异性明显提高[10]。密度梯度离心法具有操作性强、经济实用、细胞回收率高等优点,是目前常用的 CTC 富集分离方法;免疫荧光法是最常用的 CTC 检测方法之一,结合细胞富集技术检测的敏感性显著升高;结合细胞形态学分析,可排除非特异染色细胞的干扰,检测的特异性进一步增强。CK 作为乳腺癌微转移肿瘤细胞的检测标志物具有极高的敏感性和特异性[11]。本研究用密度梯度离心法富集分离单个核细胞,以免疫荧光法检测其中 CK8/18 阳性的 CTC,结果显示128例乳腺癌患者中共52例检出 CTC,总阳性率为40.6%(Ⅰ~Ⅲ期33.3%,Ⅳ期80%),与文献[2,6]报道基本一致;30例乳腺纤维腺瘤患者均未检出 CTC,证实检测具有极高的特异性(100%)。

肿瘤大小、腋窝淋巴结状况、组织学分级等乳腺癌传统预后因素并不能完全准确预测肿瘤的复发转移。而血循环微转移肿瘤细胞 CTC 在乳腺癌复发转移机制中起重要作用,是可能更有效评估患者预后的指标。Cristofanilli 等[12]检测177例Ⅳ期乳腺癌患者外周血 CTC,发现治疗前 CTC≥5个/7.5 ml 患者的中位无疾病进展期(progression-free survival,PFS)和总生存期(overall survival,OS)分别为2.7个月和10.1个月。而 CTC<5个/7.5 ml 患者的中位 PFS 和 OS 分别为7个月和18个月,明显长于 CTC≥5个/7.5 ml 的患者;多因素分析显示 CTC 可作为 PFS 和 OS 的独立预测指标。Ignatiadis 等[13]检测444例Ⅰ~Ⅲ期乳腺癌患者外周血 CTC,通过中位时间为53.5个月的随访,发现与 CTC 阴性患者相比,CTC 阳性患者的局部复发率和远处转移率显著升高而无病生存期(disease-free survival,DFS)和 OS 显著缩短;多因素分析显示 CTC 和 ER 状态是 DFS、OS 最有价值的独立预测指标。因此,检测乳腺癌 CTC 状态,分析患者原发肿瘤在何种状态下易于出现 CTC,可作为 TNM 分期的有益补充,对准确判断预后及制定个体化治疗方案具有重要意义。

本研究分析128例乳腺癌 CTC 与患者临床病理特征的关系,结果显示不同 pN 分期患者 CTC 阳性率差异有统计学意义,提示 CTC 阳性与淋巴结转移相关,pN 分期高,患者出现 CTC 的概率大。39例 pN_0期患者中有6例检出 CTC,提示乳腺癌发生早期,播散肿瘤细胞可不经淋巴途径直接进入血循环中[14]。由于肿瘤异质性,CTC 转移潜能不一,仅0.1%的 CTC 能成功定植于转移组织和器官并最终形成转移病灶[15]。但本研究结果显示 M_1期乳腺癌患者 CTC 阳性率较 M_0期患者 CTC 总阳性率显著升高,提示 CTC 阳性与远处转移密切相关,进一步证实 CTC 在远处转移病灶形成中的重要作用;但 CTC 与 M_1期乳腺癌患者远处转移部位无明显相关性。不同 TNM 分期患者 CTC 阳性率差异有统计学意义,提示 CTC 阳性与 TNM 分期密切相关,分期越晚,CTC 阳性率越高。激素受体(ER、PR)阴性或 HER-2 阳性提示乳腺癌患者预后不良[16,17]。本研究显示 CTC 阳性率在不同受体状态患者中无显著性差异,但激素受体阴性患者 CTC 阳性率较激素受体阳性患者高;HER-2(+++)和(++)患者

CTC 阳性率较 HER-2(0 ~ +)患者高,可能与激素受体表达缺失及 HER-2 高表达肿瘤的恶性程度高、侵袭力强有关,但尚需进一步研究证实。

CTC 是远处转移病灶形成的重要前提和基础,及早检测 CTC 对指导临床医师准确判断患者预后和病情具有重要意义;动态监测 CTC 变化,有利于及时了解患者病情,为制定个体化综合治疗方案提供依据。本研究显示 CTC 与淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期密切相关,初步揭示了原发肿瘤特征与患者出现 CTC 的关系。未来的研究应通过随访观察,进一步阐述 CTC 与乳腺癌患者预后的关系,并对 CTC 在乳腺癌综合治疗中的应用价值进行深入探讨。

参考文献:

[1] Pantel K, Brakenhoff R H, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(5): 329 - 340.

[2] Hayes D F, Smerage J. Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(12): 3646 - 3650.

[3] Harvey J M, Clark G M, Osborne C K, *et al*. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(5): 1474 - 1481.

[4]《乳腺癌 HER2 检测指南》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(10): 631 - 633.

[5] Fehm T, Solomayer E F, Meng S, *et al*. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells [J]. Cytotherapy, 2005, 7(2):171 - 185.

[6] 蔡清清,黄慧强,林天歆,等. 乳腺癌患者外周血中循环癌细胞的检测及其临床意义[J]. 癌症, 2005,24(7):837 - 841.

[7] Husemann Y, Geigl J B, Schubert F, *et al*. Systemic spread is an early step in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(1): 58 - 68.

[8] Reuben J M, Krishnamurthy S, Woodward W, *et al*. The role of circulating tumor cells in breast cancer diagnosis and prediction of therapy respons[J]. Expert Opin Med Diagn, 2008, 2(4): 339 - 348.

[9] Smith B L. Approaches to breast-cancer staging [J]. N Engl J Med, 2000, 342(8): 580 - 581.

[10] Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (16): 5013 - 5021.

[11] Fehm T, Braun S, Muller V, *et al*. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation[J]. Cancer, 2006, 107(5): 885 - 892.

[12] Cristofanilli M, Budd G T, Ellis M J, *et al*. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 781 - 791.

[13] Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, *et al*. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(33): 5194 - 5202.

[14] Pantel K, Brakenhoff R H. Dissecting the metastatic cascade[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(6): 448 - 456.

[15] Dawood S, Cristofanilli M. Integrating circulating tumor cell assays into the management of breast cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2007, 8(1): 89 - 95.

[16] 左文述. 现代乳腺肿瘤学[M]. 第 2 版. 济南:山东科学技术出版社, 2006: 319 - 333.

[17] 朱娟英, 高丽虹. 59 例乳腺癌的临床与病理分析[J]. 重庆医学, 2006,35(23):2144 - 2145.

(编辑　汪勤俭)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字,而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如:公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称,1995 年不能写成 95 年或 95′年;1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如 2,431 改为 2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5 位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部