DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.005

· 专题报道(临床研究)·

循环肿瘤细胞联合血清胃泌素释放前肽及神经元特异性烯醇化酶水平对 SCLC 化疗疗效的评估意义

苗欣,赵家义△,范银星,李佳浓,韩一平(第二军医大学附属长海医院 呼吸与危重症医学科,上海 200433)

[摘 要] 目的: 探讨外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)数量联合胃泌素释放前肽(gastrin releasing peptide, pro-GRP)及神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)对小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)患者化疗疗效的评估意义。方法: 收集 2015 年 10 月 1 日至 2016 年 12 月 30 日长海医院呼吸与危重症科收治的 40 例 SCLC 患者作为观察对象,分别于第 1、3 周期化疗前抽取患者外周血,检测其 CTC、pro-GRP 及 NSE 水平,分析 CTC 数目及其联合 pro-GRP、NSE 水平与化疗疗效的关系;第 1、3 周期化疗前行胸部 CT,对比 CTC、pro-GRP 及 NSE 联合判断化疗疗效与实体瘤疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST)标准判断化疗疗效的差异性;分析 CTC 数与患者临床特征的关系。结果: 40 例 SCLC 患者中初次、二次检测到 CTC 的阳性率为 82. 5%、87. 5%。化疗后外周血 CTC 数下降越多,疗效越好。根据 RECIST标准,肿瘤进展组与肿瘤控制组 CTC 的变化差异有统计学意义(P<0.05)。CTC 数目评价标准下,肿瘤控制与否与患者的年龄、性别、吸烟与否、初诊时肿瘤大小、肿瘤分期无明显关联(P>0.05)。CTC 数目评价化疗疗效与 RECIST 两者存在一致性。联合检测 CTC、pro-GRP 及 NSE,三者量值评价化疗疗效与 RECIST 疗效评价结果同样一致(P>0.05),且三者联合检测可提高疗效判断的灵敏性。结论: CTC 数目与化疗疗效量负相关,联合检测 CTC、pro-GRP 及 NSE 评估 SCLC 患者化疗疗效灵敏性更高。

[关键词] 小细胞肺癌;循环肿瘤细胞;胃泌素释放前肽;神经元特异性烯醇化酶;化疗疗效

[中图分类号] R734.2; R730.7

[文献标识码] A

「文章编号] 1007-385X(2017)04-0362-05

Significance of circulating tumor cells combined with gastrin releasing peptide and neuron specific enolase levels in evaluating the efficacy of chemotherapy for patients with small cell lung cancer

MIAO Xin, ZHAO Jiayi[^], FAN Yinxing, LI Jianong, HAN Yiping (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective: To explore the significance of peripheral blood circulating tumor cells (CTCs) combined with gastrin releasing peptide (pro-GRP) and neuron specific enolase (NSE) in evaluating the chemotherapy efficacy for small cell lung cancer (SCLC) patients. Methods: Forty SCLC patients treated in the department of respiratory and critical care of Changhai Hospital from October 1, 2015 to November 30, 2016 were included in this study. The peripheral blood was extracted from patients before the chemotherapy of first and third cycle to determine the level of CTCs, pro-GRP and NSE, and to analyze their relationship to the efficacy of chemotherapy. Meanwhile, all patients underwent the chest CT before the first and the third cycle of chemotherapy, to compare the differences between CTCs combined with pro-GRP, NSE evaluation and RECIST standard in judging the efficacy of chemotherapy. In addition, the correlation between CTCs number and clinical characteristics of patients were also analyzed. Results: In 40 SCLC patients, the CTCs positive rates detected

[基金项目] 国家卫生部科技发展研究基金资助(No. W2012F2043)。 Project supported by the Science and Technology Development Program from Ministry of Health of China (No. W2012F2043)

[**作者简介**] 苗欣(1991 –),女,硕士生,主要从事肺癌的临床研究,E-mail;miaoxin12345@ qq. com;赵家义(1986 –),男,硕士生,主要从事肺癌的临床研究,E-mail;rayzhaojiayi@163. com。△共同第一作者

[通信作者] 韩一平(HAN Yiping), 教授,博士生导师,主要从事肺癌的基础和临床研究, E-mail; yphan2006@163. com

[优先发表] http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170413.1025.008.html

at two times were 82.5%, 87.5%, respectively. The more CTCs number decreased after chemotherapy, the better effect of chemotherapy was. According to RECIST criteria, there was significant difference in the change of CTCs number between tumor progression group and tumor control group(P < 0.05). According to CTCs number evaluation criteria, tumor control was not significantly correlated with age, sex, smoking, tumor size and tumor stage (P < 0.05). There was a consistency in evaluating the efficacy of chemotherapy between CTCs number evaluation criteria and RECIST criteria (P > 0.05). Combined detection of CTCs, pro-GRP and NSE in evaluating the chemotherapy efficacy has the same result as RECIST evaluation (P > 0.05), and the joint detection can improve the sensitivity of efficacy judgment. **Conclusion:** There was a negative correlation between the change of CTCs number and the efficacy of chemotherapy. Combing detection of CTCs, pro-GRP and NSE to evaluate the efficacy of chemotherapy for SCLC patients has a higher sensitivity.

[Key words] small cell lung cancer (SCLC); circulating tumor cells (CTCs); gastrin releasing peptide(pro-GRP); neuron specific enolase(NSE); chemotherapy efficacy

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 362-366. DOI:10.3872/j. issn. 1007-385X. 2017. 04. 005]

肺癌目前发病率和病死率均较高,其中小细胞 肺癌(small cell lung cancer, SCLC)所占比例为 20%~25%^[1]。SCLC 具有恶性程度高、生长速度 快、远处转移率高、对放化疗敏感等生物学特征, 90%的患者诊断时已失去手术机会,5年生存率几 乎为零。其主要死因为肿瘤的复发和转移,血道播 散则是肿瘤转移的重要途径之一。外周血循环肿瘤 细胞(circulating tumor cell, CTC)为自发或因诊疗操 作导致肿瘤细胞从实体瘤原发灶或转移灶脱落进入 外周血循环,正常人血循环中极少见,其在恶性肿瘤 细胞血道转移中起重要作用[23]。SCLC 具有神经 内分泌的特性,而检测神经内分泌相关的神经肽类、 激素类分泌物可指导 SCLC 的早期诊断、疗效评估、 判断预后。研究[4]表明,胃泌素释放前肽(gastrin releasing peptide, pro-GRP)及神经元特异性烯醇化 酶(neuron specific enolase, NSE)有促进神经内分泌 的功能,在 SCLC 患者血清中含量较高。本研究通 过免疫荧光原位杂交法(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测 SCLC 患者化疗两周期前后外周 血 CTC 数目的变化,结合化学发光微粒子免疫检测 技术(chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA)和电化学发光免疫分析(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)分别检测的 pro-GRP 及 NSE 变化情况,探讨 CTC、pro-GRP 及 NSE 对 SCLC 患者化疗疗效的评估。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2015 年 10 月 1 日至 2016 年 12 月 30 日长海医院呼吸与危重症科收治的经组织病理明确诊断为 SCLC 的患者 40 例,其中男 35 例、女 5 例,年龄 41~79岁,中位年龄 60 岁。所有人组患者均为初次

确诊,未行任何抗肿瘤治疗,无合并其他类型恶性肿瘤,SCLC 分期III或IV期,所有患者均采用伊立替康和卡铂(irinotecan and carboplatin, IC)化疗。

1.2 免疫磁珠法富集(CMIA)及 FISH 检测 SCLC 患者外周血 CTC 数目

收集患者外周血 5 ml 于抗凝管中,室温放置,并在 24 h 内处理样本。采用人外周血 CTC 鉴别试剂盒(购自江苏莱尔生物医药科技有限公司),基于 CMIA的前处理富集方法及 FISH 原理的肿瘤细胞鉴别方法检测恶性肿瘤患者外周血 CTC 数。不论单色探针还是双色探针,任一探针信号点 > 2 个,且无血源性白细胞表面抗原(红圈或红色片状)着色时,均可计为一个阳性细胞。当细胞有血源性白细胞表面抗原(红圈或红色片状),或信号≤2 个,均为阴性细胞。

1.3 CMIA 及 ECLIA 技术检测 SCLC 患者化疗前后 血清 pro-GRP、NSE 水平

收集患者外周血 2 ml,运用 CMIA 技术在 AR-CHITECT i 系统上定量测定人血清中的 pro-GRP 水平,正常人参考值范围为 $0\sim70$ pg/ml;运用 ECLIA 方法,在 Cobas e 免疫分析仪上定量检测人血清中的 NSE 水平,正常人参考值范围为 $0\sim20$ μ g/L。

1.4 疗效评价标准

RECIST 评价标准: 完全缓解(complete remission, CR),部分缓解(partial remission, PR),稳定(stabilization of disease, SD)和进展(progression of disease, PD)。其中, CR+PR+SD表示肿瘤控制。

CTC 数目评价疗效标准:5 ml 外周血中 CTC 数目变化(Δ CTC,化疗2周期后-化疗前)减少 \geq 3个为 CR+PR+SD,减少<3个为 PD。

pro-GRP 数值评价疗效标准: 2 ml 外周血中 pro-GRP 数值变化(Δpro-GRP, 化疗 2 周期后 – 化疗 前)降低 ≥ 1 183 pg/ml 为 CR + PR + SD, 降低 <

1 183 pg/ml 为 PD。

NSE 数值评价疗效标准: 2 ml 外周血中 pro-GRP 数值变化(Δ NSE, 化疗 2 周期后 – 化疗前)降低 \geq 41 μ g/L为 CR + PR + SD, 数目降低 < 41 μ g/L 为 PD。

1.5 统计学处理

采用软件 SPSS 20.0 进行统计分析,数据用 \bar{x} ± s 表示,计量资料符合正态性检验,利用独立样本 t 检验进行分析;计数资料采用 χ^2 检验(fisher 精确检验法)进行分析。CTC、pro-GRP、NSE 的标准界值根据四分位数值及均值的约登指数决定,见表 1。利用灵敏度和特异度测试指标对化疗疗效进行评估。P<0.05 或 P<0.01 表示差异具有统计学意义。

表 1 CTC 变化值标准界值的制定 Tab. 1 The standard of CTCs change value

Index	25%	50%	75%	Mean
ΔСТС	-2.750	-1.000	0.000	-1.35
Sensitivity	0.714	0.257	0.171	0.029
Specificity	0	0.400	0.600	0.800
Youden index	0.714	-0.143	-0.429	-0.771

The standard of CTCs change value is determined by the Youden index of the quartile value and the mean value. The maximum value of Youden's index as positive value

2 结果

2.1 SCLC 患者外周血中 CTC 检出率较高

40 例 SCLC 患者中初次、二次检测到 CTC 例数分别为 33、35 例,阳性率为 82.5%、87.5%,说明检测技术的敏感性较高(图1)。

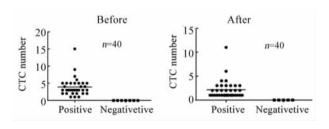


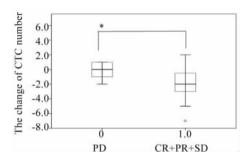
图 1 化疗前后 SCLC 患者外周血 CTC 检出情况(n = 40) Fig. 1 CTCs in peripheral blood of patients with SCLC before and after chemotherapy(n = 40)

2.2 化疗疗效越好的 SCLC 患者 CTC 数下降越多根据 RECIST 标准, PD 组 ΔCTC 均值为(0.80±3.11), CR + PR + SD 组 ΔCTC 均值为(-1.66±1.98)个,两者比较差异存在统计学意义

(P < 0.05, 图 2)。

2.3 不同疗效组患者临床特征无显著差异

按照 CTC 数目评价标准, PD 组与 CR + PR + SD 组患者的年龄、性别、吸烟与否、初诊时肿瘤大小、肿瘤分期均无显著性差异(*P* > 0.05, 表 2)。



* P < 0.05 vs CR + PR + SD

图 2 CTC 数目变化与 SCLC 患者化疗疗效的关系 Fig. 2 Polationship between the change of CTC number

Fig. 2 Relationship between the change of CTC number and the efficacy of chemotherapy in patients with SCLC

表 2 CTC 数目评价标准下不同疗效组间患者的临床特征 Tab. 2 Comparison of clinical characteristics between different efficacy groups under CTCs number evaluation criteria

Search of the se					
Characteristic	CR + PR + SD	PD	χ^2	P	
Age(t/a)					
≤60	15	5	0.000	1.000	
>60	15	5			
Sex					
Male	26	9	0.000	1.000	
Female	4	1			
Smoked					
Yes	23	11	0.000	0.162	
No	6	0			
Newly-diagnosed tumor	size				
T1	3	1	1.689	0.639	
T2	14	6			
T3	4	2			
T4	9	1			
Tumor stage					
III A	8	1	1.236	0.744	
∭ B	7	3			
IV(Oligo metastasis)	12	5			
IV(Multiple metastase	es) 3	1			

2.4 CTC 数目评价与 RECIST 疗效评价相一致

检测结果表 3 显示,CTC 数目表达评价化疗疗效 与 RECIST 两者比较,差异无统计学意义(P > 0.05)。 2.5 联合检测 CTC、pro-GRP 及 NSE 数目评价与 RECIST 疗效评价相一致

联合检测 CTC、pro-GRP 及 NSE 结果(表 3)显示,三者数目评价化疗疗效与 RECIST 疗效评价比较,差异无统计学意义(P > 0.05)。

表 3 CTC、pro-GRP 及 NSE 评价 与 RECIST 疗效评价标准之间的关系

Tab. 3 Comparison of the relationship between CTCs, pro-GRP and NSE numerical evaluation and RECIST evaluation criteria

Evaluation]	D	
Evaluation	PD	CR + PR + SD	P
ΔCTC			
PD	5	25	0.306
R + PR + SD	0	10	
$\Delta \text{CTC} + \text{pro-}\Delta \text{GRP} + \Delta \text{NSE}$			
PD	4	25	0.554
R + PR + SD	0	9	

2.6 联合检测 CTC、pro-GRP、NSE 评价化疗疗效灵 敏度更高

检测结果(表4)显示,联合检测 CTC、pro-GRP 及 NSE 评价比单独 CTC、pro-GRP、NSE 数目评价判 断疗效的灵敏度更高。

表 4 CTC、pro-GRP、NSE 评价标准灵敏度及特异度对比 Tab. 4 Comparison of sensitivity and specificity of CTCs, pro-GRP and NSE evaluation criteria

Evaluation	Sensitivity	Specificity
ΔCTC	71.4	0.0
$\Delta \mathrm{GRP}$	70.6	0.0
$\Delta ext{NSE}$	67.6	0.0
Δ CTC + pro- Δ GRP + Δ NSE	73.5	0.0

3 讨论

CTC 存在可逆的上皮间质转化与间质上皮转换的能力^[5-6],保留肿瘤干细胞的特性^[7],调控肿瘤血管生成及内皮降解^[8-9]。

富集外周血循环肿瘤细胞的方法包括 CellSearch系统、上皮肿瘤细胞膜过滤(isolation by size of epithelial tumor cell, ISET)技术、AdnaTest 系统、免疫磁珠分离法、密度梯度离心法等;不同的富集方法可归纳为根据细胞表面标记分子即生物学方法和物理学方法。对比生物学方法与物理学方法检测的差异性显示,抗体依赖型和非抗体依赖型差异显著,主要原因为肿瘤细胞基因突变丧失了某些上皮细胞的活性乃至细胞表面标志蛋白[10-11]。因此,一些依赖上皮细胞表面标记物的检测方法,如CellSearch 系统,可能相较于物理学方法有所缺陷。常用的鉴别检测方法有免疫荧光法、TelomeScan 法等[12-13]。通过富集和鉴别检测相结合,可以提高检测 CTC 的敏感性和特异性。

本研究采用免疫磁珠 + 免疫荧光相结合的方法,敏感性较高。研究中 CTC 对化疗疗效的评估同RECIST 标准有良好的一致性,可间接指导临床治疗方案。临床辐射减少、不需专门的设备、条件受限的情况下可实时动态观察判断临床疗效,临床可用性较强。多个研究已证实 CTC 对肺癌的诊断、预后的提示作用、疗效的预测作用等。例如,55 名肾良性肿瘤患者中仅有 1 人发现 CTC,而在 36 名肾恶性肿瘤中有 50% 的患者检测到 CTC^[14];广泛期膀胱癌患者 CTC 数量与局限期患者 CTC 数量存在显著性差异^[15];231 名胰腺癌患者中有 57% 外周血中 CTC 数目 > 5 个,且这些患者的生存期明显缩短^[16]。

pro-GRP、NSE 有促进神经内分泌的功能,在 SCLC 患者血清中含量较高^[4]; NSE 是对 SCLC 有较 高的灵敏度和特异性的肿瘤标志物^[17]。结合临床 实际情况,多数患者可能 pro-GRP、NSE 峰值在化疗 前后变化值未达标,造成两者的临床应用的局限性。

研究提示 CTC 的数量与肿瘤病理分期和或肿瘤转移情况相关,本研究中发现 CTC 数量评价标准下,疗效不同组间患者的临床特征无明显差异,亦无需比较其相关性。结合本例研究,考虑是否与样本量大小相关。本研究还观察到有 4 例患者在 RE-CIST 标准下化疗两周期后病情评估为 PR,但 CTC 数目不降反升,这一现象是否由于肿瘤坏死吸收入血,造成 CTC 一过性升高相关尚未可知。若相关,那么 CTC 一过性升高的时间窗为多久,又需要更多的研究分析探索。

综上, CTC 在肺癌患者中具有潜在评价和预测价值。随着 CTC 富集及检测技术进步及其与肺癌复发机制^[18-20]的深入研究, 其可为肺癌患者精准治疗、个体化治疗提供新的辅助手段。

[参 考 文 献]

[1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer

- incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): 359-386. DOI: 10.1002/ijc.29210.
- [2] MASSAGUÉ J, OBENAUF A C. Metastatic colonization by circulating tumour cells[J]. Nature, 2016, 529(7586): 298-306. DOI:10.1038/nature17038.
- [3] ALIX-PANABIÉRES C, PANTEL K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer [J]. Bull Cancer, 2014, 101(1): 17-23. DOI:10.1373/clinchem.2012.194258.
- [4] MOLINA R, AUGÉ J M, BOSCH X, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology[J]. Tumour Biol, 2008, 30(3): 121-129. DOI:10.1159/000224628.
- [5] NIETO M A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. [J]. Science, 2013, 342(6159): 708-715. DOI: 10.1126/science.1234850.
- [6] FABISIEWICZ A, GRZYBOWSKA E. CTC clusters in cancer progression and metastasis [J]. Med Oncol, 2016, 34(1): 12. DOI:10.1007/s12032-016-0875-0.
- [7] TINHOFER I, SAKI M, NIEHR F, et al. Cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells [J]. Int J Rad Biol, 2014, 90
 (8): 622-627. DOI: 10.3109/09553002.2014.886798.
- [8] CROCIANI O, ZANIERI F, PILLOZZI S, et al. hERG1 channels modulate integrin signaling to trigger angiogenesis and tumor progression in colorectal cancer [J]. Sci Rep., 2013, 3(11): 3308-3321. DOI: 10.1038/srep03308.
- [9] WU L, FU Z, ZHOU S, et al. HIF-1α and HIF-2α: siblings in promoting angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma after high-intensity focused ultrasound ablation [J]. PLoS One, 2014, 9(2): 88913. DOI:10.1371/journal.pone.0088913.
- [10] HILTERMANN T J, VAN DER WEKKEN A J, GROEN H J.

 Moving forward with circulating tumor cells and lung cancer [J]. J

 Thor Dis, 2012, 4(5): 440-441. DOI: 10.3978/j. issn. 20721439.2012.08.08.
- [11] HOU J M, KREBS M, WARD T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. [J]. Amer J Pathol, 2011, 178(3): 989-996. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.003.
- [12] 王汉萍, 张力. 非小细胞肺癌免疫治疗的最新进展[J]. 癌症

- 进展, 2014(3): 250-255. DOI:10.11877/j. issn. 1672-1535. 2014.12.03.09.
- [13] ANDREE K C, DALUM G V, TERSTAPPEN L W M M. Challenges in circulating tumor cell detection by the cell search system
 [J]. Mol Oncol, 2015,10(3): 395-407. DOI: org/10.1016/j. molonc. 2015.12.002.
- [14] MCKIERNAN J M, BUTTYAN R, BANDER N H, et al. The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9[J]. Cancer, 2015, 86(3): 492-497. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19990801)86:33.0.CO;2-R.
- [15] RINK M, CHUN F K, MINNER S, et al. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer [J]. B J U Int, 2011, 107(10): 1668-1675. DOI:10.1111/j.1464-410X.2010.09562.x.
- [16] de BONO J S, SCHER H I, MONTGOMERY R B, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008,14 (19): 6302-6309. DOI:10.1158/1078-0432. CCR-08-0872.
- [17] BERNARDI L A, SCOCCIA B. The effects of maternal thyroid hormone function on early pregnancy[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2013, 25 (4): 267-273. DOI: 10. 1097/GCO. 0b013e3283630d80
- [18] MCDANIEL A S, FERRALDESCHI R, KRUPA R, et al. Phenotypic diversity of circulating tumour cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer [J/OL]. B J U Int, 2016 [2017-02-24]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27539393. DOI:10.1111/bju.13631.
- [19] CHANG M C, CHANG Y T, CHEN J Y, et al. Clinical significance of circulating tumor microemboli as a prognostic marker in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Clin Chem, 2016, 62(3): 505-513. DOI:10.1373/clinchem.2015. 248260.
- [20] HODGKINSON C L, MORROW C J, LI Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer [J]. Nat Med, 2014, 20(8): 897-903. DOI:10.1038/nm.3600.

[收稿日期] 2016-12-12 [修回日期] 2017-03-08 [本文编辑] 韩丹

・读者・作者・编者・

文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH 用正体除外),例如 m(质量)、t(时间)、c(浓度)、V(体积)、p(压力)、F(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时,一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成 mg/kg/d 的形式,应写成 mg/kg/kg·d)或 mg·kg⁻¹·d⁻¹的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号 A° (埃)已不用,应写作 0.1 nm;时间单位"小时"符号为 h(不是 hr)、"秒"符号为 h(不是 hr)、"秒"符号为 h(不是 hr);量浓度单位符号为 hr/hr的单位"牛顿"符号为 hr/hr,不是 hr,从算 hr,从第 hr,从 hr,从