

外周血循环肿瘤细胞检测与胰腺癌化疗反应及肿瘤复发转移的关系^{*}

刘娇 卢熹微 曹军丽 郑磊 徐红梅

(秦皇岛市第一医院肿瘤科, 河北 秦皇岛 066000)

【摘要】 目的 分析外周血循环肿瘤细胞(CTCs)检测与胰腺癌化疗反应、肿瘤复发转移的关系。**方法** 选取 2018 年 2 月~2019 年 10 月我院收治的胰腺癌患者 100 例及同期健康体检者与胰腺良性疾病患者各 30 例为研究对象, 检测其外周血 CTCs 表达情况, 术后随访记录胰腺癌患者肿瘤复发转移及生存情况, 分析 CTCs 表达与胰腺癌患者临床特征、化疗疗效及肿瘤复发转移的关系。**结果** 胰腺癌组 CTCs 阳性率明显高于良性疾病组与对照组($P<0.05$); 肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期、低分化患者 CTCs 阳性率明显高于Ⅰ~Ⅱ期、高/中分化患者($P<0.05$); Logistic 回归分析显示, 胰腺癌患者肿瘤分期、分化程度与 CTCs 阳性有关($P<0.05$); 化疗客观缓解 42 例(42.00%), 疾病控制 71 例(71.00%), 疾病控制患者术后 CTCs 阳性率明显低于疾病进展患者($P<0.05$); Kaplan-Meier 生存分析发现, 术后 CTCs 阳性患者 1 年生存率明显低于 CTCs 阴性患者($\chi^2=5.114, P=0.024$), CTCs 阳性患者 1 年内复发转移率明显高于 CTCs 阴性患者($\chi^2=4.479, P=0.034$)。**结论** 外周血 CTCs 表达情况与胰腺癌肿瘤分期、分化程度密切相关, 术后 CTCs 阳性患者化疗疗效较差, 存在更高肿瘤复发转移及死亡风险。

【关键词】 胰腺癌; 循环肿瘤细胞; 化疗; 复发; 转移

【中图分类号】 R735 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 09. 020

Relationship between circulating tumor cells in peripheral blood and chemotherapy response, tumor recurrence and metastasis of pancreatic cancer

LIU Jiao, LU Xiwei, CAO Junli, ZHENG Lei, XU Hongmei

(Department of Oncology, Qinhuangdao First Hospital, Qinhuangdao 066000, Hebei, China)

【Abstract】 Objective To analyze the relationship between circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood and chemotherapy response, tumor recurrence and metastasis of pancreatic cancer. **Methods** 100 patients with pancreatic cancer, 30 healthy individuals and 30 patients with benign pancreatic diseases were enrolled. The expression of CTCs in peripheral blood was detected. Tumor recurrence and metastasis, and survival of patients with pancreatic cancer during postoperative follow-up were recorded. The relationship between CTCs expression and clinical characteristics of pancreatic cancer patients, chemotherapy efficacy, tumor recurrence, metastasis were analyzed. **Results** The positive rate of CTCs in pancreatic cancer group was significantly higher than that in benign disease group and that in control group ($P<0.05$). The positive rates of CTCs in patients in tumor stage Ⅲ-Ⅳ and with poor differentiated tumors were significantly higher than those in patients in tumor stage Ⅰ-Ⅱ and with highly/moderately differentiated tumors ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that tumor staging and differentiation degree were related to CTCs positive in patients with pancreatic cancer ($P<0.05$). There were 42 cases (42.00%) with objective remission and 71 cases (71.00%) with disease under control by chemotherapy. The positive rate of CTCs in patients with disease control was significantly lower than that with disease progression ($P<0.05$). It was found by Kaplan-Meier survival analysis that the 1-year survival rate in CTCs positive patients was significantly lower than that in CTCs negative patients ($\chi^2=5.114, P=0.024$), and

基金项目: 秦皇岛市重点研发计划科技支撑项目(202004A106)

通信作者: 曹军丽, E-mail: qhdlj@163.com

引用本文: 刘娇, 卢熹微, 曹军丽, 等. 外周血循环肿瘤细胞检测与胰腺癌化疗反应及肿瘤复发转移的关系[J]. 西部医学, 2022, 34(9): 1356-

1360. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 09. 020

recurrence metastasis rate within 1 year was significantly higher than that in CTCs negative patients ($\chi^2 = 4.479$, $P = 0.034$). **Conclusion** The expression of CTCs in peripheral blood is closely related to tumor staging and differentiation degree of pancreatic cancer. The chemotherapy effect is relatively worse in CTCs positive patients after surgery, and there are higher risks of tumor recurrence, metastasis and death.

【Key words】 Pancreatic cancer; Circulating tumor cell; Chemotherapy; Recurrence; Metastasis

近年来,全球胰腺癌发病率呈逐年升高趋势,且患者 5 年生存率低至 6%^[1-2]。现阶段,临床主要采取手术方式治疗胰腺癌,但患者术后复发转移及死亡风险仍较高^[3]。有报道称,术后辅助化疗能够有效延长胰腺癌患者生存时间^[4]。故临床已将手术切除联合术后辅助化疗方案作为胰腺癌标准疗法,尽管予以术后辅助化疗,依然有部分患者存在复发转移风险,导致预后不良^[5]。以往研究表明,循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells, CTCs)发生早期微转移是肿瘤复发转移重要环节^[6]。CTCs 主要指从原位肿瘤或继发肿瘤病灶脱落之后进入血液循环系统的肿瘤细胞,其能通过血液循环系统造成微转移或者引发微小癌栓,在一定条件下能够进展为转移癌。近年来,人们越来越关注 CTCs 在肿瘤早期诊断、病情及预后评估中的检测价值。相关研究称,CTCs 属于肿瘤患者预后影响因素及靶向治疗过程中重要标志物^[7]。随着现代细胞检测方式与鉴定技术不断发展,通过外周血 CTCs 检测进行胰腺癌诊断、临床疗效评估与患者预后判定逐渐成为可能。当前,关于外周血 CTCs 与胰腺癌化疗反应的研究较少。本文主要探究外周血 CTCs 与胰腺癌患者化疗反应及肿瘤复发转移的关系,希望为临床提供可靠指导依据,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 2 月~2019 年 10 月我院收治的胰腺癌患者 100 例。纳入标准:①经病理确诊为胰腺癌。②具有正常认知,意识清晰。③对研究知情,签署研究知情同意书。排除标准:①以往有胰腺癌手术、靶向治疗或者放化疗史。②其他部位恶性肿瘤患者。③合并自身免疫性疾病或者血液系统疾病。④发生远处转移。同时选取健康体检者(体检结果正常)与胰腺良性疾病患者各 30 例,其中胰腺良性疾病包括急性胰腺炎 20 例,慢性胰腺炎 8 例,胰腺囊腺瘤 2 例。本研究经我院伦理委员会审批。

1.2 方法 胰腺癌患者均行手术切除(达到 R0 切除)与术后辅助化疗,化疗方案为:第 1 d、第 8 d、第 15 d,采用静脉滴注予以吉西他滨(国药准字: H20030104,生产厂家:江苏豪森药业集团有限公司) 1000 mg/m²,每 28 d 治疗是 1 周期。对患者随访 1 年,记录生存情况。分别在患者术前与术后 7 d(化疗

前),抽取胰腺癌患者外周静脉血 7.5 mL,采取阴性富集联合免疫荧光染色体原位杂交法(FISH)检测 CTCs,将富集后细胞均匀抹于玻片上,通过八号染色体扩增探针以及白细胞表面抗原有效标记 CD45-Alexa594,然后行免疫荧光染色处理,于荧光显微镜下,采用双免疫标记法进行富集细胞样本的分析。CTCs 阳性判定^[8]:单个细胞核 4'6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色阳性,同时细胞核没有重叠;无血源性白细胞上有抗原红圈着色;单个细胞核里面 8 号染色体呈现异常扩增现象,异常 FISH 信号点不少于 3 个,且于 40 倍镜下发现信号不重叠。化疗效果评估参照影像学 RECIST 标准^[9],完全反应(CR):患者目标病灶消失,维持时间 ≥ 4 周;部分反应(PR):患者基线病灶长径和减短 $\geq 30\%$,维持时间 ≥ 4 周;疾病稳定(SD):患者基线病灶长径和尽管有所变小,但没有达到 PR 或变大未达 PD;疾病进展(PD):患者基线病灶长和变大 $\geq 20\%$ 或有新病灶产生。其中客观缓解:PR + CR;疾病控制:PR + CR + SD。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计数资料表示为“频数与频率”,以 χ^2 检验;计量资料均经正态分布检验,以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组比较使用单因素方差分析法;生存分析使用 Kaplan-Meier 生存曲线;使用 Logistic 回归模型分析肿瘤分期、分化程度与 CTCs 阳性的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组患者一般资料比较 3 组患者性别、年龄及体重指数(BMI)等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 3 组患者一般资料比较 $[n, n(\times 10^{-2}), \bar{x} \pm s]$

Table 1 Comparison of general data of three groups

组别	n	性别		年龄(岁)	BMI(kg/m ²)
		男	女		
胰腺癌组	100	62(62.00)	38(38.00)	54.18 $\pm$ 7.46	22.75 $\pm$ 2.31
良性疾病组	30	18(60.00)	12(40.00)	53.09 $\pm$ 7.25	22.94 $\pm$ 2.34
正常组	30	17(56.67)	13(43.33)	55.34 $\pm$ 6.93	23.06 $\pm$ 2.38
χ^2/F		0.281		0.708	0.236
P		0.869		0.494	0.790

2.2 3 组患者 CTCs 阳性率比较 胰腺癌组 CTCs 阳性率明显高于良性疾病组与对照组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 3 组患者 CTCs 阳性率比较[$n, n(\times 10^{-2})$]

Table 2 Comparison of CTCS positive rate among three groups		
组别	<i>n</i>	CTCs 阳性
胰腺癌组	100	62(62.00)①②
良性疾病组	30	0(0.00)
正常组	30	0(0.00)
χ^2		60.735
<i>P</i>		<0.001

注:与正常组比较,① $P<0.05$;与良性疾病组比较,② $P<0.05$

2.3 不同临床特征患者 CTCs 阳性率比较 不同性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤直径及有无淋巴结转移患者 CTCs 阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$);肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期、低分化患者 CTCs 阳性率明显高于Ⅰ~Ⅱ期、高/中分化患者($P<0.05$)。见表 3。

表 3 不同临床特征患者 CTCs 阳性率比较[$n, n(\times 10^{-2})$]

Table 3 Comparison of positive rates of CTCS in patients with different clinical features				
临床特征	<i>n</i>	CTCs 阳性	χ^2	<i>P</i>
性别			0.438	0.508
男	62	40(64.52)		
女	38	22(57.89)		
年龄(岁)			0.031	0.860
<60	59	37(62.71)		
≥60	41	25(60.98)		
肿瘤位置			0.180	0.671
胰头	76	48(63.16)		
胰体尾部	24	14(58.33)		
肿瘤直径(cm)			2.032	0.154
≥4	35	25(71.43)		
<4	65	37(56.92)		
肿瘤分期			4.787	0.029
Ⅰ~Ⅱ期	39	19(48.72)		
Ⅲ~Ⅳ期	61	43(70.49)		
分化程度			9.076	0.003
低分化	37	30(81.08)		
高/中分化	63	32(50.79)		
淋巴结转移			3.277	0.070
有	78	52(66.67)		
无	22	10(45.45)		

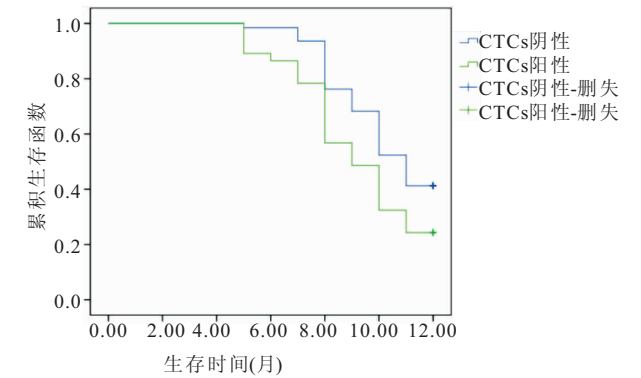


图 1 总生存分析
Figure 1 Total survival analysis figure

2.4 肿瘤分期、分化程度与 CTCs 阳性的关系 Logistic 回归分析显示,胰腺癌患者肿瘤分期、分化程度与 CTCs 阳性有关($P<0.05$),见表 4。

表 4 肿瘤分期、分化程度与 CTCs 阳性的关系

Table 4 Relationship between CTCS positive and tumor stage and differentiation		
项目	CTCs 阳性	
	OR(95%CI)	<i>P</i>
肿瘤分期	5.948(4.538~7.795)	<0.001
分化程度	6.373(4.862~8.352)	<0.001

2.5 不同化疗疗效患者术后 CTCs 阳性率比较 术后 CTCs 阳性 37 例,化疗客观缓解 42 例(42.00%),疾病控制 71 例(71.00%),疾病控制患者 CTCs 阳性率明显低于疾病进展患者($P<0.05$),见表 5。

表 5 不同化疗疗效患者术后 CTCs 阳性率比较[$n, n(\times 10^{-2})$]

Table 5 Comparison of postoperative CTCS positive rate in patients with different chemotherapy efficacy		
化疗疗效	<i>n</i>	CTCs 阳性
疾病控制	71	20(28.17)
疾病进展	29	17(58.62)
χ^2		8.191
<i>P</i>		0.004

2.6 患者预后情况 中位随访时间为 9.87 个月,术后 CTCs 阳性患者生存 9 例(24.32%),死亡 28 例(75.68%),复发转移 30 例(81.08%);阴性患者生存 26 例(41.27%),死亡 37 例(58.73%),复发转移 42 例(66.67%);Kaplan-Meier 生存分析发现,CTCs 阳性患者 1 年生存率明显低于 CTCs 阴性患者($\chi^2=5.114, P=0.024$),CTCs 阳性患者 1 年内复发转移率明显高于 CTCs 阴性患者($\chi^2=4.479, P=0.034$)。见图 1、图 2。

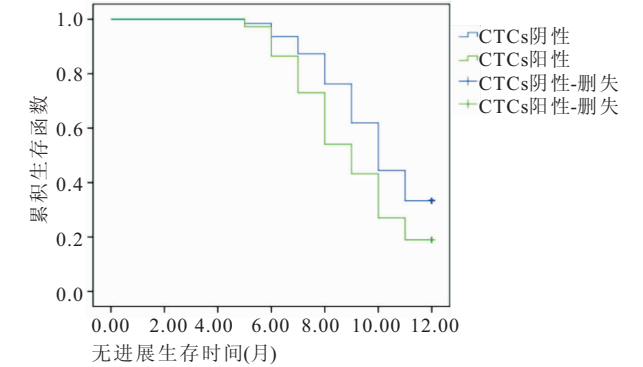


图 2 无进展生存分析
Figure 2 No progress survival analysis

3 讨论

本研究显示,胰腺癌组 CTCs 阳性率较高于良性疾病组,明显高于对照组,表明胰腺癌患者 CTCs 阳性率呈异常升高趋势。以往研究指出,CTCs 检测结果和肿瘤分化程度与患者预后存在密切相关性^[10-11]。本研究经 Logistic 回归分析发现,胰腺癌患者肿瘤分期、分化程度与 CTCs 阳性有关,与上述研究结果基本一致,证实外周血 CTCs 阳性表达影响因素主要为肿瘤发展至晚期、低分化,可能与 CTCs 继承了相应肿瘤干细胞较高侵袭性与转移潜能有关。本研究发现,淋巴结转移与胰腺癌患者外周血 CTCs 表达无关,分析原因可能是肿瘤病灶和淋巴结转移在其血运行转移原理上存在较大差异,后者主要通过人体淋巴系统管道而产生逐站以及跳跃式转移,因此转移的肿瘤细胞能够不经血液循环系统。相关研究表明,肿瘤直径与 CTCs 检测结果存在显著相关性,直径越大,则其水平越高^[12]。本研究则显示肿瘤直径与胰腺癌患者外周血 CTCs 无关,与上述研究观点不一致,可能与本次研究样本较少,存在一定局限性有关。

有研究指出,肿瘤患者 CTCs 里面 Toll 样受体/髓样分化因子 88(TLRs/myd88)信号通路和其化疗效果存在紧密联系^[13]。以往关于外周血 CTCs 表达与胰腺癌化疗效果关系的研究少,此为本次研究创新性分析点。本研究中,疾病控制患者 CTCs 阳性率明显低于疾病进展患者,提示 CTCs 阳性患者术后辅助化疗效果较差。可能由于 TLRs 能够在 CTCs 中表达,而 TLRs 能够对肿瘤细胞凋亡产生抑制作用,加快肿瘤细胞侵袭及转移,同时避免部分 CTCs 被机体免疫系统识别并且清除。有研究对胰腺癌手术患者进行 5 年随访,发现其中位生存时间只有 12~20 个月^[14-15]。本研究显示,胰腺癌患者 1 年总体生存率 35.00%,CTCs 阳性患者为 24.32%,明显低于阴性患者 41.27%,表明胰腺癌术后生存率偏低,特别是 CTCs 阳性患者。大部分胰腺癌患者临床诊断时已发展至中晚期,并且病灶恶性程度高,因此相较于其他消化系统肿瘤,胰腺癌患者生存率更低^[16]。有研究称,复发转移为胰腺癌患者治疗失败主因^[17]。以往有研究对乳腺癌患者进行观察,发现治疗前 CTCs 显示阴性的患者无进展生存期与总生存期均优于 CTCs 阳性患者,且连续动态检测 CTCs 数>5 个者,具有较高复发/转移风险^[18]。本研究中,CTCs 阳性患者术后复发转移率较 CTCs 阴性患者明显更高,表明外周血阳性与胰腺癌患者术后复发转移密切相关。还有研究称,CTCs 一般因肿瘤发展至晚期而被迫进入相应体循环,从而使外周血中可以检测到 CTCs,其为血液

中微转移主要方式,可以形成新转移灶^[19]。现阶段的研究表明,肿瘤迁移性一般是双向的,人体多种癌细胞(包括黑色素瘤、乳腺癌以及结肠癌等)内均有原位种植现象^[20]。或许原位种植现象可以解释 CTCs 与胰腺癌患者术后复发转移的关系。与传统组织学以及影像学检查相比,外周血 CTCs 检测对人体近似无创,可以动态监测患者肿瘤变化情况,方便进行疗效以及术后复发转移评估,从而为临床治疗提供可靠指导。

4 结论

综上所述,胰腺癌患者肿瘤分期、病灶分化程度与外周血 CTCs 表达存在密切联系,CTCs 阳性患者术后辅助化疗反应较差,更容易出现复发转移或者死亡事件,临床可通过其检测有效评估患者病情、化疗效果及预后。关于 CTCs 影响胰腺癌患者化疗效果及肿瘤复发转移的具体机制,有待后续大样本、多中心研究进一步补充与完善。

【参考文献】

- [1] MORRISON A H, BYRNE K T, VONDERHEIDE R H. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer[J]. Trends Cancer, 2018, 4(6): 418-428.
- [2] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, *et al.* Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(43): 4846-4861.
- [3] COLLISSON E A, BAILEY P, CHANG D K, *et al.* Molecular subtypes of pancreatic cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(4): 207-220.
- [4] MOTOI F, KOSUGE T, UENO H, *et al.* Randomized phase II / III trial of neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and S-1 versus upfront surgery for resectable pancreatic cancer (Prep-02/JSAP05)[J]. Jpn J Clin Oncol, 2019, 49(2): 190-194.
- [5] Klaiber U, Leonhardt C S, Strobel O, *et al.* Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer[J]. Langenbecks Arch Surg, 2018, 403(8): 917-932.
- [6] Cabel L, Proudhon C, Gortais H, *et al.* Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. Int J Clin Oncol, 2017, 22(3): 421-430.
- [7] MALY V, MALY O, KOLOSTOVA K, *et al.* Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer[J]. In Vivo, 2019, 33(4): 1027-1037.
- [8] 朱国栋, 刘丰, 朱志刚, 等. 老年胰腺癌患者外周血循环肿瘤细胞对预后的影响[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(13): 2146-2148, 2149.
- [9] DUFFAUD F, THERASSE P. Nouvelles recommandations pour l'évaluation de la réponse tumorale dans les tumeurs solides [New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors][J]. Bull Cancer, 2000, 87(12): 881-886.
- [10] 黄天臣, 冯留顺, 肖建安, 等. 进展期结直肠癌患者循环肿瘤细

- 胞水平及其与患者临床特征和预后的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(12):2314-2317.
- [11] 陈泽昊, 江建新. 环状 RNA 在胰腺癌中的诊断及治疗作用的研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(1):179-183.
- [12] 陈治国, 胡红玲, 陈宝钧. 外周血循环肿瘤细胞与非小细胞肺癌临床病理因素及预后的关系[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(23):3894-3898.
- [13] 杨静, 周颖, 金咏梅, 等. 胰腺癌患者循环肿瘤细胞及 TLR4、TLR9、myd88 的表达水平与其化疗效果及转移、复发的关系[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(28):5524-5527, 5556.
- [14] RIQUELME E, ZHANG Y, ZHANG L, *et al.* Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes[J]. Cell, 2019, 178(4):795-806, e12.
- [15] 傅潇, 姚煜. 循环肿瘤细胞临床应用的研究进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(3):244-249.
- [16] 王卓, 刘德军, 霍砚森, 等. 淋巴结转移对胰腺癌患者生存期的影响[J]. 中华肝胆外科杂志, 2016, 22(10):672-676.
- [17] 吴鹏飞, 陆子鹏, 尹杰, 等. 后腹膜整块切除扩大清扫术治疗胰腺癌 28 例疗效分析[J]. 中国实用外科杂志, 2016, 36(8):880-884.
- [18] ARKADIUS P, VOLKMAR M, JENS H, *et al.* Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: clinical relevance and biological potential[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2019, 31(1):76-81.
- [19] KUHN P, KEATING S M, BAXTER G T, *et al.* Lessons Learned: Transfer of the High-Definition Circulating Tumor Cell Assay Platform to Development as a Commercialized Clinical Assay Platform [J]. Clin Pharmacol Ther, 2017, 102(5):777-785.
- [20] 王厚东, 杨关根, 张秀峰, 等. 载血管生成抑制剂脂质微泡联合聚焦超声定向辐照治疗结肠癌肝转移的实验研究[J]. 中华普通外科杂志, 2020, 35(8):644-648.
- (收稿日期: 2021-03-23; 修回日期: 2022-04-30; 编辑: 张翰林)

(上接第 1355 页)

- [23] LUNA-ORTIZ K, GÓMEZ-PEDRAZA A, ANUWONG A. Lessons Learned from the Transoral Endoscopic Thyroidectomy with Vestibular Approach (TOETVA) for the Treatment of Thyroid Carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2020, 27(5):1356-1360.
- [24] 闫巍, 张能维, 彭吉润, 等. 腔镜甲状腺切除手术操作要点及喉返神经显露的技巧[J]. 中华普通外科杂志, 2016, 31(12):993-996.
- [25] 蒋琪霞, 周济宏, 程东瑞, 等. 132 例手术切口感染患者临床特征及干预效果分析[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(2):178-183.
- [26] GUO F, WANG W, ZHU X, *et al.* Comparative Study Between Endoscopic Thyroid Surgery via the Oral Vestibular Approach and the Areola Approach[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2020, 30(2):170-174.
- (收稿日期: 2021-11-09; 修回日期: 2021-12-17; 编辑: 张翰林)