

• 论 著 •

循环肿瘤细胞分型检测及其在晚期肺癌中的临床应用研究

周 政,孟凡萍,赵 丹,牛晓昶,范 慧,李思颖,康菊香,赵 昕<sup>△</sup>  
重庆大学附属三峡医院检验科,重庆 404000

**摘 要:**目的 对晚期肺癌患者外周血循环肿瘤细胞(CTCs)的数量和分型进行检测、分析,探讨其与患者临床特征的关系。**方法** 收集 43 例晚期肺癌患者的临床资料。基于 CanPatrol<sup>®</sup> CTCs 分型检测平台,通过 RNA 原位杂交技术及分子 DNA 技术荧光标记特异信使 RNA(mRNA),将患者外周血中 CTCs 分为上皮型、混合型、间质型 3 种亚型,分析其与患者临床特征的关系。**结果** 43 例晚期肺癌患者的 CTCs 阳性率为 100.0%,其中上皮型 CTCs、混合型 CTCs 和间质型 CTCs 的阳性例数分别是 33 例、42 例和 34 例,阳性率分别为 76.7%、97.7%和 79.1%。总 CTCs 和各亚型 CTCs 在患者各临床特征(肿块位置、肺叶分布、临床分期、病理亚型)间的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。发生器官转移的患者共 30 例,其中 27 例为肺外转移。有肺外转移的患者与无肺外转移的患者,上皮型 CTCs、混合型 CTCs、总 CTCs 数量差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 晚期肺癌患者外周血中 CTCs 的数量及分型与是否发生肺外转移有关,其中混合型 CTCs 可能为晚期肺癌患者发生远处转移提供线索。此外,CTCs 的分型检测可用于发现 CTCs 转移的器官偏向性,与 CTCs 的动态监测结合,可进一步推动晚期肺癌精准诊疗的发展。

**关键词:**循环肿瘤细胞; 肺癌; 临床分期; 肺外转移  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.15.018 **中图法分类号:**R446.69  
**文章编号:**1673-4130(2021)15-1874-06 **文献标志码:**A

Typing detection of circulating tumor cells and its clinical application in advanced lung cancer

ZHOU Zheng, MENG Fanping, ZHAO Dan, NIU Xiaochang,  
FAN Hui, LI Siying, KANG Juxiang, ZHAO Xin<sup>△</sup>  
Department of Clinical Laboratory, Chongqing University Three  
Gorges Hospital, Chongqing 404000, China

**Abstract:** **Objective** To detect and analyze the number and type of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of the patients with advanced lung cancer, and to investigate their relationships with the clinical characteristics. **Methods** The clinical data of 43 patients with advanced lung cancer were collected. Based on the CanPatrol<sup>®</sup> CTCs typing detection platform, specific messenger RNAs (mRNA) were fluorescently labeled by using RNA in situ hybridization technique and molecular DNA technique. The peripheral blood CTCs were divided into the three subtypes of epithelial, mixed and interstitial types, and their relationships with the clinical characteristics of the patients were analyzed. **Results** The CTCs positive rate in 43 cases of advanced lung cancer was 100.0%, in which the epithelial type, mixed type and interstitial types were in 33 cases, 42 cases and 34 cases respectively, and their positive rates were 76.7%, 97.7% and 79.1% respectively. The differences in clinical characteristics (tumor location, pulmonary lobe distribution, clinical stage and pathological subtype) between the total CTCs and various subtypes had no statistical significance ( $P>0.05$ ). The organ metastasis occurred in 30 cases, in which 27 cases were extrapulmonary metastasis. The numbers of epithelial CTCs, mixed CTCs and total CTCs had statistical difference between the patients with extrapulmonary metastasis and the patients with non-pulmonary metastasis ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The number and type of CTCs in the peripheral blood of the patients with advanced lung cancer are correlated with extrapulmonary metastasis occurrence, in which the mixed CTCs may provide the clues for the distant metastasis of the patients with advanced lung cancer. In addition, the typing detection of CTCs can be used to find the organ bias of the CTCs metastasis. Its combination with the dynamic monitoring of CTCs can further promote the development of precision diagnosis and treatment for advanced lung cancer.

**作者简介:**周政,男,副主任技师,主要从事分子生物学和临床免疫学研究。 <sup>△</sup> **通信作者,** E-mail: 552126624@qq.com。  
**本文引用格式:**周政,孟凡萍,赵丹,等.循环肿瘤细胞分型检测及其在晚期肺癌中的临床应用研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(15):1874-1879.

**Key words:** circulating tumor cells; lung cancer; clinical stage; extrapulmonary metastasis

肺癌是我国发病率、病死率最高的癌症,每年有超过 78 万新发病例<sup>[1]</sup>。确诊时间晚、发生远处转移是肺癌整体生存率较低的两大主要原因<sup>[2]</sup>。肺癌已成为我国主要的公共卫生问题<sup>[3-4]</sup>。尽管现代医学在肺癌的诊治方面取得了重大进展,但肺癌的 5 年生存率仍低<sup>[5]</sup>。早期诊断、早期治疗以提高肺癌长期生存率仍然任重而道远。外周血循环肿瘤细胞(CTCs)是自发或因诊疗操作(手术、穿刺等)从实体肿瘤的原发灶或转移灶脱落进入外周循环或淋巴系统的肿瘤细胞,是研究肿瘤转移生物学行为的实时活检标本。CTCs 可在肿瘤发生、发展的各个阶段检测到,血液标量为 7.5 mL 时,其阳性率为 30.4%(38/125)~52.9%(18/34)<sup>[6-7]</sup>。CTCs 有 3 个亚群,即上皮型、间质型、混合型<sup>[8]</sup>。在肿瘤发展过程中,循环系统中的 CTCs 会经历上皮-间质转化(EMT),即上皮表达减少、间质表达增加,导致细胞结构发生变化,细胞黏附力降低,从而促进肿瘤细胞迁移和浸润<sup>[9-10]</sup>。CTCs 是导致恶性肿瘤患者肿瘤复发及发生远处转移的重要因素,与肿瘤诊断及疾病状态紧密相关。尽管外周血中 CTCs 的数量相对于血细胞而言,极其稀少(1~10 亿个单核血细胞里可以找到 1 个 CTCs)<sup>[11-12]</sup>,但随着检测技术突飞猛进的发展,CTCs 检测已经发展成一种新兴的非侵入性的临床辅助诊断方法。结合影像学或病理学检查结果可更综合地评估患者疗效及预后,实现对肿瘤术后复发、转移及时有效的管理。本研究探讨了晚期肺癌患者外周血 CTCs 的数量及分型与患者临床特征之间的关系,旨在为 CTCs 检测的临床应用提供依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 以本院 2018 年 2 月至 2019 年 11 月诊断的 43 例初治或复治的原发性晚期(Ⅲ期及Ⅳ期)肺癌患者纳入研究组。其中男 22 例,女 21 例;年龄 49~72 岁,中位年龄 60.8 岁。根据修订的世界卫生组织(WHO)分类法和国际肺癌研究协会(IASLC)的第八版 TNM 分期建议,结合临床资料确定入组的晚期肺癌患者<sup>[13]</sup>。收集患者的一般特征(年龄、性别、吸烟史、是否为初治)和临床特征(肿块位置、肺叶分布、临床分期、病理亚型、器官转移状况)。在患者进行手术或治疗之前,行胸部 CT、骨扫描、头颅 MRI、腹部彩超或全身 PET/CT 影像学检查,并采集患者的外周血标本。另选择同期本院健康体检者 31 例作为对照组,其中男 19 例,女 12 例;年龄 45~71 岁,中位年龄 59.7 岁。两组研究对象年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者及家属均签署知情同意书。

**1.2 仪器与试剂** 仪器:CanPatrol<sup>®</sup> CTCs(益善生

物公司);Axio Observer A1 荧光显微镜(德国 Zeiss);恒温孵育箱(Thermo Fisher 3111);KDC60 低速离心机(中科中佳公司);QY-31 真空抽滤机(上海岐耀公司)。主要试剂:人 CTCs 分型检测试剂盒[多重信使 RNA(mRNA)原位分析法(益善生物)];红细胞裂解液;4%甲醛溶液;磷酸盐缓冲液(PBS);洗涤液( $0.1\times$ SSC);前置扩增溶液(30%马血清、1.5%十二烷基硫酸、3 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl、0.5 fmol 的前置序列);扩增溶液(30%马血清、1.5%十二烷基硫酸、3 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl、1.0 fmol 的扩增序列);4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI);蛋白酶。除蛋白酶购自 Qiagen 公司外,其余试剂购自 Sigma 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 采样** 使用真空采血系统(EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管)采集患者 5 mL 外周血,立即轻柔颠倒混匀 8 次,防止凝血。不能及时进行制膜可于 2~8℃ 保存,预处理需在标本采集后 4 h 内完成。

**1.3.2 制膜** 进行 CanPatrol<sup>®</sup> CTCs 检测前,先将红细胞裂解,步骤如下:(1)将抗凝血转移至标本保存管于室温静置 30 min;(2)1 850 r/min( $600\times g$ )低速离心 5 min 后弃上清液;(3)加入 4 mL PBS 和 1 mL RI 固定剂混匀,静置 8 min 后转移至过滤柱;(4)采用真空泵(负压 0.06 MPa)进行抽吸,使细胞吸附于滤膜;(5)于过滤器中加入 1 mL 4%甲醛溶液,固定 1 h 后弃溶液;(6)依次加入 1 mL 50%、70%、100%乙醇溶液,分别室温静置 2 min 后完成细胞滤膜制备。

**1.3.3 杂交** 取下滤膜进行如下操作:亲水、透化、消化、探针杂交、预扩增、扩增、显色、复染。具体操作按试剂盒说明书进行。

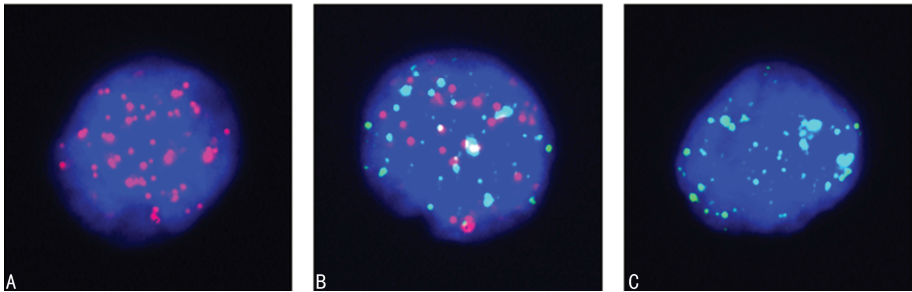
**1.3.4 镜检** 于-20℃或室温直接镜检:采用全自动荧光显微镜染色体分析系统软件,首先进行 20 倍镜下预扫,而后于 40 倍镜下进行细胞核型拍摄及荧光拍摄,最后进行图片导出。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件分析数据。非正态分布的计量资料以  $M(P_{25}\sim P_{75})$  表示,多组间比较行 Kruskal-Wallis  $H$  非参数检验,两组间比较行 Man-Whitney  $U$  非参数检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CTCs 表性特征** 经 CanPatrol<sup>®</sup> CTCs 平台,将 43 例晚期肺癌患者的外周血 CTCs 分离出来,并分为上皮型、间质型、混合型 3 种亚型。患者外周血 CTCs 的表型特征如图 1 所示,其中深色荧光(图 1A 中全部斑点及图 1B 中对比度稍暗的斑点)标记的是上皮分子标志物(EpCAM 及 cytokeratin8/18/19),浅色荧光

(图 1C 中全部斑点及图 1B 中对比度更亮的斑点)标记的是间质分子标志物(Vimentin 及 Twist)。



注:A 为上皮型 CTCs;B 为混合型 CTCs;C 为间质型 CTCs。

图 1 患者外周血 CTCs 的表型特征(荧光显微镜×40)

**2.2 CTCs 检出情况** CTCs 的检出范围为 2~49 个,中位数为 13 个;上皮型 CTCs 的检出范围为 0~13 个,中位数为 2 个;混合型 CTCs 的检出范围为 0~31 个,中位数为 8 个;间质型 CTCs 的检出范围为 0~33 个,中位数为 2 个。43 例患者全都检出 CTCs,阳性率为 100.0%;上皮型 CTCs、混合型 CTCs 和间质型 CTCs 的阳性患者分别是 33 例、42 例和 34 例,阳性率分别为 76.7%、97.7%和 79.1%。此外,43 例晚期肺癌患者中,31 例(72.1%,31/43)以混合型 CTCs 为主。混合型 CTCs 在数量和阳性率上相较于上皮型 CTCs 和间质型 CTCs 更高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。对照组均未检出 CTCs,与研究组相比,

差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 CTCs 与患者一般特征的关系** 总 CTCs 和各类亚型 CTCs 在患者的一般特征(年龄、性别、吸烟史、是否为初治)间的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示总 CTCs 数量及不同表型 CTCs 的数量与晚期肺癌患者的年龄、性别、吸烟史以及是否为初治均无关。见表 1。

**2.4 CTCs 与患者临床特征的关系** 总 CTCs 和各类亚型 CTCs 在患者各临床特征(肿块位置、肺叶分布、临床分期、病理亚型)间的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。

表 1 CTCs 与患者一般特征的关系[ $M(P_{25} \sim P_{75})$ ,个]

| 特征    | <i>n</i> | 上皮型 CTCs        | 混合型 CTCs         | 间质型 CTCs        | 总 CTCs             |
|-------|----------|-----------------|------------------|-----------------|--------------------|
| 年龄(岁) |          |                 |                  |                 |                    |
| <60   | 20       | 2.00(1.00~2.50) | 7.50(3.00~10.00) | 2.00(1.00~3.00) | 11.00(9.50~15.50)  |
| ≥60   | 23       | 2.00(0.50~4.00) | 8.00(4.50~19.00) | 3.00(1.00~7.00) | 13.00(8.00~30.50)  |
| 性别    |          |                 |                  |                 |                    |
| 男     | 22       | 2.00(1.00~3.80) | 7.50(3.30~12.00) | 3.00(2.00~6.00) | 13.50(6.50~20.00)  |
| 女     | 21       | 2.00(1.00~4.00) | 8.00(4.00~14.00) | 2.00(1.00~3.00) | 13.00(10.00~26.00) |
| 吸烟史   |          |                 |                  |                 |                    |
| 有     | 16       | 2.00(0.75~4.00) | 7.00(5.25~12.50) | 2.00(0.75~6.75) | 12.50(10.00~18.00) |
| 无     | 27       | 2.00(1.00~4.00) | 8.00(5.00~13.50) | 2.00(1.00~3.50) | 13.00(10.00~23.50) |
| 初诊/复治 |          |                 |                  |                 |                    |
| 初治    | 11       | 4.00(1.00~5.00) | 9.00(5.00~13.50) | 3.00(2.00~4.00) | 14.00(10.50~25.50) |
| 复治    | 32       | 2.00(1.00~3.00) | 7.50(3.00~12.50) | 2.00(0.80~5.30) | 12.50(7.50~20.25)  |

**2.5 CTCs 与患者器官转移的关系** 由于 CTCs 与肿瘤的转移特性密切相关,因此将肿瘤的器官转移分为肺内转移(同侧肺转移、对侧肺转移)和肺外转移(脏器转移、骨转移、脑转移),以进一步探讨不同器官转移与 CTCs 数量及亚型的关系。在本研究中,共 30 例晚期肺癌患者发生了器官转移,占 69.8%(30/43)。这 30 例患者的总 CTCs、上皮型 CTCs、混合型 CTCs 和间质型 CTCs 数量分别为 12.50(7.00~20.75)、

2.00(1.00~4.00)、7.50(3.00~14.00)、2.00(1.00~5.00)个。

有肺外转移的患者与无肺外转移的患者:上皮型 CTCs 的数量分别为 1.00(0.00~2.00)个和 0.00(0.00~0.50)个,差异有统计学意义( $P<0.05$ );混合型 CTCs 的数量分别为 3.00(2.50~8.50)个和 2.00(2.00~2.50)个,差异有统计学意义( $P<0.05$ );二者总 CTCs 数量比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

总 CTCs 数量和各亚型 CTCs 数量在其他分组中的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。但值得注意的是,对于有脏器转移或骨转移(椎骨更易出现转移灶,尤其是胸椎)的患者,其总 CTCs、上皮型 CTCs、混合型 CTCs 和间质型 CTCs 数量均多于无脏器转移或骨转移的患者。见表 3。

表 2 CTCs 与患者临床特征的关系[ $M(P_{25} \sim P_{75})$ ,个]

| 特征    | <i>n</i> | 上皮型 CTCs        | 混合型 CTCs           | 间质型 CTCs        | 总 CTCs             |
|-------|----------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| 肿瘤位置  |          |                 |                    |                 |                    |
| 左肺    | 17       | 2.00(0.00~4.00) | 9.00(3.00~17.00)   | 3.00(0.00~6.00) | 14.00(8.00~31.00)  |
| 右肺    | 26       | 2.00(1.00~4.00) | 7.00(4.25~12.00)   | 2.00(1.00~3.75) | 11.50(10.00~18.50) |
| 肺叶分布  |          |                 |                    |                 |                    |
| 上叶    | 26       | 2.00(1.00~3.75) | 6.00(3.00~13.80)   | 2.00(1.00~3.00) | 11.00(6.00~18.50)  |
| 中叶    | 2        | 2.50(1.75~3.25) | 9.00(8.00~10.00)   | 5.00(3.00~7.00) | 16.50(14.25~18.75) |
| 下叶    | 15       | 2.00(0.00~4.00) | 10.00(6.00~13.00)  | 4.00(1.00~9.50) | 14.00(11.00~31.00) |
| 临床分期  |          |                 |                    |                 |                    |
| Ⅲ期    | 13       | 2.00(1.00~4.00) | 7.50(6.00~12.00)   | 2.00(2.00~3.00) | 12.00(10.00~21.00) |
| Ⅳ期    | 30       | 2.00(1.00~4.00) | 9.00(3.00~13.75)   | 3.00(1.00~4.75) | 13.50(7.00~20.75)  |
| T 分期  |          |                 |                    |                 |                    |
| T1 期  | 9        | 1.00(0.00~2.00) | 4.00(2.00~9.00)    | 2.00(0.00~9.00) | 13.00(6.00~14.00)  |
| T2 期  | 9        | 2.00(1.00~3.00) | 6.00(3.00~14.00)   | 2.00(0.00~3.00) | 10.00(6.00~20.00)  |
| T3 期  | 13       | 2.00(2.00~4.00) | 10.00(7.00~14.00)  | 2.00(1.00~4.00) | 14.00(11.00~21.00) |
| T4 期  | 12       | 1.50(0.00~4.00) | 8.00(4.50~12.30)   | 2.50(1.00~6.00) | 12.00(9.00~23.50)  |
| N 分期  |          |                 |                    |                 |                    |
| N0 期  | 12       | 1.50(0.80~3.30) | 8.50(2.75~14.5)    | 4.00(0.00~9.30) | 13.50(9.50~27.00)  |
| N1 期  | 1        | 2.00(0.00~2.00) | 9.00(8.00~10.00)   | 0.00(0.00~3.00) | 11.00(7.00~12.00)  |
| N2 期  | 15       | 2.00(1.00~4.00) | 10.00(4.50~17.50)  | 2.00(0.50~4.00) | 14.00(7.00~25.50)  |
| N3 期  | 15       | 2.00(0.50~3.00) | 7.00(4.00~10.00)   | 2.00(2.00~3.00) | 11.00(10.00~19.50) |
| M 分期  |          |                 |                    |                 |                    |
| M0 期  | 13       | 2.00(1.00~4.00) | 9.00(6.00~12.00)   | 3.00(2.00~3.00) | 13.00(10.00~21.00) |
| M1a 期 | 5        | 1.00(0.00~1.04) | 3.00(2.00~7.00)    | 1.00(1.00~2.00) | 11.00(6.00~12.00)  |
| M1b 期 | 6        | 3.50(2.30~5.50) | 14.00(10.00~16.00) | 2.00(1.00~4.00) | 19.00(14.75~24.75) |
| M1c 期 | 19       | 2.00(0.50~3.50) | 6.00(2.50~13.00)   | 3.00(2.00~7.00) | 11.00(6.00~25.00)  |
| 病理亚型  |          |                 |                    |                 |                    |
| 肺腺癌   | 32       | 2.00(0.00~4.00) | 9.00(3.00~13.30)   | 2.00(0.00~6.50) | 13.00(7.50~22.25)  |
| 肺鳞癌   | 5        | 3.00(2.00~4.00) | 7.50(5.25~12.80)   | 2.50(1.30~3.80) | 13.50(11.50~16.25) |
| 小细胞肺癌 | 6        | 2.00(1.00~2.00) | 7.00(6.00~8.00)    | 3.00(2.00~4.00) | 11.00(10.00~13.00) |

表 3 CTCs 与患者器官转移的关系[ $M(P_{25} \sim P_{75})$ ,个]

| 特征    | <i>n</i> | 上皮型 CTCs         | 混合型 CTCs         | 间质型 CTCs        | 总 CTCs             |
|-------|----------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| 肺内转移  |          |                  |                  |                 |                    |
| 有     | 12       | 1.00(0.00~2.50)  | 3.50(2.75~10.50) | 2.00(1.75~5.00) | 12.50(5.75~20.00)  |
| 无     | 18       | 2.00(1.00~4.00)  | 9.00(5.25~15.5)  | 2.00(1.00~4.75) | 12.00(10.00~29.00) |
| 同侧肺转移 |          |                  |                  |                 |                    |
| 有     | 6        | 0.50(0.00~3.25)  | 8.00(3.25~12.75) | 3.50(2.25~9.25) | 19.50(14.5~20.75)  |
| 无     | 24       | 2.00(1.00~4.00)  | 7.50(2.75~14.00) | 2.00(0.75~4.25) | 11.00(6.00~21.5)   |
| 对侧肺转移 |          |                  |                  |                 |                    |
| 有     | 11       | 1.00(0.00~2.00)  | 3.00(2.50~8.50)  | 2.00(1.50~5.50) | 12.00(5.50~19.50)  |
| 无     | 19       | 2.00(1.00~4.00)  | 9.00(5.50~15.00) | 2.00(1.00~4.50) | 13.00(10.00~28.00) |
| 肺外转移  |          |                  |                  |                 |                    |
| 有     | 27       | 1.00(0.00~2.00)* | 3.00(2.50~8.50)* | 2.00(1.50~5.50) | 12.00(5.05~19.05)* |

续表 3 CTCs 与患者器官转移的关系[M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>),个]

| 特征   | n  | 上皮型 CTCs        | 混合型 CTCs          | 间质型 CTCs        | 总 CTCs             |
|------|----|-----------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| 无    | 3  | 0.00(0.00~0.50) | 2.00(2.00~2.50)   | 2.00(1.00~6.50) | 5.00(4.00~9.00)    |
| 脏器转移 |    |                 |                   |                 |                    |
| 有    | 6  | 3.00(1.00~7.00) | 10.00(7.30~16.00) | 3.00(2.00~4.00) | 16.50(10.75~28.25) |
| 无    | 24 | 2.00(0.00~3.00) | 6.50(2.00~13.00)  | 2.00(0.80~3.80) | 11.50(6.00~20.25)  |
| 骨转移  |    |                 |                   |                 |                    |
| 有    | 13 | 2.00(1.00~3.00) | 10.00(5.00~15.00) | 3.00(2.00~8.00) | 20.00(11.00~30.00) |
| 无    | 17 | 1.00(0.00~4.00) | 7.00(2.00~10.00)  | 2.00(1.00~4.00) | 11.00(6.00~14.00)  |
| 脑转移  |    |                 |                   |                 |                    |
| 有    | 16 | 2.00(0.75~4.00) | 10.00(5.25~15.25) | 2.00(1.00~3.50) | 15.50(10.00~22.25) |
| 无    | 14 | 2.00(1.00~2.75) | 4.50(2.25~8.75)   | 3.00(1.30~7.00) | 11.00(6.00~18.25)  |

注:与未发生转移患者比较,\*P<0.05。

3 讨 论

为了有效地分离和检测 CTCs,大量新技术和新方法被研发出来,但都未能突破只能单标记 CTCs 或检测上皮型 CTCs 的局限,因而实现对各表型 CTCs 的同时检测是一个技术方面的难题<sup>[14]</sup>。而 CanPatrol® CTCs 分型检测技术不仅实现了对外周血 CTCs 的快速分离,还实现了对各种表型 CTCs 的同时检测。其细胞采集系统的高效性依赖于纳米级滤膜的使用;此外,该技术选用特异性 mRNA 标志物(Ep-CAM、CK、Vimentin、Twist 等)作为原位检测的靶标,相较于以往使用蛋白靶标的 CTCs 检测技术,该技术对 CTCs 的检出时间更早,检测特异性更高<sup>[15]</sup>。

本研究中 43 例晚期肺癌患者均检出 CTCs,其中混合型 CTCs 阳性率最高,72.1%(31/43)的患者以混合型 CTCs 为主,表明混合型 CTCs 的检出与晚期肺癌具有相关性,与文献<sup>[16]</sup>报道结果一致。但其对于早、晚期肺癌的鉴别诊断作用还需要进一步收集早期肺癌患者进行对比分析。此外,晚期癌症以混合型 CTCs 为主的现象也见于结直肠癌等其他癌症<sup>[17]</sup>。

发生器官转移的患者有 30 例,其中发生肺外转移的患者所对应的混合型 CTCs 与上皮型 CTCs,与未发生肺外转移的患者相比,差异有统计学意义(P<0.05),总 CTCs 数量也多于未发生肺外转移的患者(P<0.05)。CTCs 脱离原发病灶后只有极少数能达到定植器官形成转移灶,而转移、定植后的 CTCs 增殖能力依赖于上皮型标记物的表达。在 CTCs 发生 EMT 后细胞凋亡受到抑制,表型与外周间质成分极其相似,免疫系统不易识别,进而可逃避免疫系统的攻击<sup>[18]</sup>。混合型 CTCs 与上皮型 CTCs 相比,有更强的转移能力,与间质型 CTCs 相比,有更强的增殖能力,因此,混合型 CTCs 能有效地播散及增殖,形成转移灶<sup>[19-20]</sup>。

发生肺外转移的患者共 27 例,发生脑转移的患者数量最多(16 例),其次是骨转移(13 例)和脏器转

移(6 例)。脑是 CTCs 肺外转移最常定植的器官,其次是骨骼(尤其是胸椎)。HANSSEN 等<sup>[21]</sup>研究表明,出现脑转移的非小细胞肺癌(NSCLC)患者外周血中的总 CTCs 可作为预后评估的参照。也有研究表明,脑可作为转移储存库,但骨是 CTCs 最常寄居的部位,是最常见的储存库<sup>[22]</sup>。本研究发现,在骨转移的 13 例患者中,不同的骨形成转移灶的潜力是不同的,其中椎骨更易出现转移灶(尤其是胸椎)。此外,在发生脏器转移的 6 例患者中,3 例为肝转移,3 例为肾转移。对于转移的偏好和倾向性,还需要进一步收集相关病例进行探讨。

在 43 例晚期肺癌患者中,Ⅳ期肺癌患者的总 CTCs、混合型 CTCs 和间质型 CTCs 数量均多于Ⅲ期患者,且总 CTCs 数随晚期肺癌分期的升高而呈升高趋势,但差异无统计学意义(P>0.05)。KREBS 等<sup>[23]</sup>研究证明,Ⅳ期 NSCLC 患者的总 CTCs 数明显多于Ⅲa 期和Ⅲb 期患者。孙雯雯等<sup>[16]</sup>研究显示,在 N 分期中,N3 期的上皮型 CTCs 数多于 N2 期,但 N0 期的上皮型 CTCs 数多于 N2 期;在 M 分期中,M1c 期的上皮型 CTCs 数多于 M0 期和 M1a 期。而本研究数据显示,在 T 分期中,T3 期的总 CTCs 数多于其他不同分期的间质型 CTCs;在 N 分期中,N2 期的总 CTCs 数多于其他不同分期;在 M 分期中,M1b 期的混合型 CTCs 数多于其他所有亚型。

本研究中入组的肺癌包括肺腺癌、肺鳞癌、小细胞肺癌 3 种病理亚型,各病理亚型的总 CTCs 数和各亚型 CTCs 的数量差异均无统计学意义(P>0.05)。HUANG 等<sup>[24]</sup>荟萃分析结果表明,CTCs 数量与肿瘤分期和淋巴结转移呈正相关,而与病理分型无关。CHEN 等<sup>[25]</sup>对肝细胞癌 CTCs 的研究结果也显示,发生 EMT 的 CTCs 数量和亚型与对应的病理分型无关。

综上所述,CTCs 在晚期肺癌患者的外周血中具有较高的检出率,尤其是混合型 CTCs,可作为晚期肺

癌转移评估的辅助判断指标。CTCs 分型检测对于探讨 CTCs 转移的器官偏向性也具有重要价值。CTCs 检测技术属于非侵入性检测手段,可连续动态监测患者术后 CTCs 数量和比例变化,持续观察患者的疾病进展,推动晚期肺癌的精准诊疗进程。

## 参考文献

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Epidemiology of lung cancer in China[J]. Thorac Cancer, 2015, 10(2):3-7.
- [2] ROSS K, PAILLER E, FAUGEROUX V, et al. The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer[J]. Exp Rev Mol Diagn, 2015, 15(12):1605-1629.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1):7-34.
- [4] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics [J]. Cancer Commun, 2019, 39(1):22-33.
- [5] YUN J K, LEE G D, KIM H R, et al. Validation of the 8th edition of the TNM staging system in 3 950 patients with surgically resected non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(7):2955-2964.
- [6] TANAKA F, YONEDA K, KONDO N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22):6980-6986.
- [7] DUAN G C, ZHANG X P, WANG H E, et al. Circulating tumor cells as a screening and diagnostic marker for early-stage non-small cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13:1931-1939.
- [8] YU M, BARDIA A, WITTNER B S, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. Science, 2013, 339(6119):580-584.
- [9] WU S Y, LIU S Y, LIU Z M, et al. Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers[J]. PLoS One, 2015, 10(4):1251-1257.
- [10] GUISLAINE B, MICHEL T, MICHEL R, et al. Epithelial mesenchymal transition: a new insight into the detection of circulating tumor cells[J]. ISRN Oncol, 2012, 11(4):1-6.
- [11] YU M, STOTT S, TONER M, et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization [J]. J Cell Biol, 2011, 192(3):373-382.
- [12] NELSON N J. Circulating tumor cells: will they be clinically useful [J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(3):146-148.
- [13] GOLDSTRAW P, CHANSKY K, CROWLEY J, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM Stage groupings in the forthcoming (

- eighth) edition of the TNM classification for lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(1):39-51.
- [14] SIEUWERTS A M, KRAAN J, BOLT-DE V J, et al. Response: anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(12):896-897.
- [15] KÖNIGSBERG R, OBERMAYR E, BISES G, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients [J]. Acta Oncol, 2011, 50(5):700-710.
- [16] 孙雯雯, 徐志红, 高蓓莉, 等. 晚期非小细胞肺癌循环肿瘤细胞特征性的初步探究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2016, 21(7):626-632.
- [17] HOU J, GUO C, LYU G. Clinical significance of epithelial: mesenchymal transition typing of circulating tumour cells in colorectal cancer [J]. Colorectal Dis, 2020, 22(5):581-587.
- [18] JOOSSE S A, GORGES T M, PANTEL K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells [J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(1):1-11.
- [19] NATALIA B K, CATHERINE A P, KLAUS P. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies [J]. Cancer Metast Rev, 2012, 31(3/4):673-687.
- [20] WAI L T, ROBERT A W. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer [J]. Nature Med, 2013, 19(7):1438-1449.
- [21] HANSSEN A, RIEBENSAHM C, MOHME M, et al. Frequency of circulating tumor cells (ctc) in patients with brain metastases: implications as a risk assessment marker in oligo-metastatic disease [J]. Cancers, 2018, 10(12):1016-1025.
- [22] HOEFELER H, DURAN I, HECHMATI G, et al. Health resource utilization associated with skeletal-related events in patients with bone metastases: results from a multinational retrospective-prospective observational study - a cohort from 4 European countries [J]. J Bone Oncol, 2014, 3(2):40-48.
- [23] KREBS M G, SLOANE R, PRIEST L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(12):1556-1563.
- [24] HUANG J W, WANG K, XU J J, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis. [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e78070.
- [25] CHEN Y Y, LI S M, LI W, et al. Circulating tumor cells undergoing EMT are poorly correlated with clinical stages or predictive of recurrence in hepatocellular carcinoma. [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):7084.