

循环肿瘤细胞(CTC)、肿瘤标记物(AFP、CEA) 诊断原发性肝癌价值的研究

王学斌¹,董勤^{2*}

(1.首都医科大学附属北京友谊医院 普外科,北京 100050;

2.内蒙古医科大学附属医院 普外科,内蒙古 呼和浩特 010050)

【摘要】目的 探索循环肿瘤细胞、经典临床肿瘤标记物甲胎蛋白及癌胚抗原对原发性肝癌诊断的临床价值。方法 选取2017年8月至2018年10月在我院就诊并明确诊断为原发性肝癌,且同期接受肝癌根治术的42例患者为实验组,以同期在我院诊断为肝硬化、重症肝炎的42例患者为肝良性病对照组。实验组及对照组均行CTC、AFP、CEA检测,分析比较两组间的阳性率;比较各单测组对肝癌诊断的敏感性、特异性、准确性、准确诊断指数;对各单检测项及联合检测组进行诊断准确性工作特征曲线(ROC)绘制。结果 实验组中CTC、AFP、CEA检测阳性率明显高于对照组;各单独检测项目其敏感性、特异性、准确性、准确诊断指数比较结果:CTC>AFP>CEA;诊断价值依次为:CTC>AFP>CEA;联合测试组CTC+AFP+CEA、CTC+AFP、CTC+CEA、AFP+CEA诊断价值依次为:CTC+AFP+CEA=CTC+AFP>CTC+CEA>AFP+CEA。结论 CTC和AFP、CEA用于临床患者的原发性肝癌诊断方面具有明显价值;CTC的诊断敏感性、特异性、准确性、准确诊断指数均优于AFP、CEA;在联合测试组中,最终实验结果表明,CTC联合AFP检测拥有对原发性肝癌诊断的最高效能。

【关键词】循环肿瘤细胞;甲胎蛋白;癌胚抗原;原发性肝癌

中图分类号:R476

文献标识码:B

文章编号:2095-512X(2022)03-0296-04

目前恶性肿瘤性疾病严重威胁人类生命,而原发性肝癌是世界上常见的恶性肿瘤之一,其发病率高、进展迅速、预后差,致死率在癌症性疾病中排第二位^[1]。中国是肝病大国,其中肝癌呈高发态势,世界范围内大约一半的新发肝癌和死亡病例发生在我国^[2]。肿瘤标记物血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP),癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是目前临床上原发性肝癌诊疗中最常用的肿瘤标记物,具有确切的临床价值。但单独检测某项血液中肿瘤标记物对病情诊断仍然具有局限性。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是一种新型的“液体活检”方式,其采集仅需通过外周血液而无需通过有创手段获得实体肿瘤细胞,因此CTC检测与传统的病理检查相比具有高效、无创、可重复等诸多优点^[3],但CTC作为一种特殊状态的肿瘤细胞,检测过程仍面临众多挑战,许多肝良性病患者中,也可出现CTC升高的情况^[4],具有一定局限性。因此,本研究通过对CTC、AFP、CEA单项检测及各单项联合后检测进行分析,旨在探索不同肿瘤标记物(单独或联

合)对原发性肝癌的诊断价值,为原发性肝癌患者提供高效的实验室诊断依据。现报道如下。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选取2017年8月至2018年10月在我院行肝癌根治术的患者为研究对象,所有患者术后均留取切除肝脏组织进行病理诊断,以肝癌根治术后经过病理确诊原发性肝癌患者共42例(男女、年龄均不限)为肝癌测试组,以同期在我院因肝硬化、重症肝炎患者(男女、年龄均不限)共42例为肝病良性对照组。肝癌根治术前所有患者行CTC、AFP、CEA检测。本研究通过医院伦理委员会审查,所有患者均签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 AFP、CEA测定 AFP、CEA测定由我院检验科完成。所有研究对象术前抽取静脉血至一次性采血管内,充分离心抽取血清,不应有溶血及细胞

收稿日期:2022-02-05;修回日期:2022-04-12

第一作者:王学斌(1989-),男,博士,医师。研究方向:肝脏移植外科及医工交叉方向。E-mail:famaser@163.com

*通信作者:董勤,男,硕士,主任医师。研究方向:肝胆外科。E-mail:731172970@qq.com

颗粒,血清标本4℃存放,当天检测,若不能及时检测应在-20℃下冻藏。血清AFP、CEA检测使用化学发光酶免疫测定法在UniCel DxI 800(Beckman Coulter, Atlanta, GA, USA)平台上测定完成。AFP、CEA按照医院实验室正常参考值以AFP ≥7 ng/mL、CEA ≥5 ng/mL为阳性阈值。

1.2.2 CTC富集和细胞的鉴定 所有研究对象手术前抽取外周血7.5 mL血液吸入EDTA收集管中,缓慢充分混匀,防止溶血,24~48 h送检。CTC富集采用阴性富集法,将血液转移到50 mL离心管中,以600 g离心5 min,吸出上清液。加入45 mL红细胞裂解缓冲液,然后离心(600 g, 5 min)以去除红细胞。该过程重复两次。将产物细胞沉淀重悬并用PBS缓冲液洗涤。我们使用20 μL CD45微珠和MACS分离器(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)用于去除混杂白细胞并将分选后的CTC浓缩到新管中以捕获CTC。所富集的含有CTC载玻片经固定、透化等处理,最后用抗细胞角蛋白荧光素异硫氰酸酯(抗CK-FITC; Miltenyi Biotec)和抗CD45-藻红蛋白(抗CD45-PE; Miltenyi Biotec)进行双重免疫荧光染色^[5]。用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶; Sigma, MO, USA)染色细胞核。使用激光扫描共聚焦显微镜(Lecia, Wetzlar, Germany)计数细胞。白细胞的鉴定标准为:细胞为圆形或卵圆形,DAPI+/CD45+/CK-,大小≤6 μm。CTC鉴定标准为:细胞为圆形或卵圆形,DAPI+/CD45-/CK+,大小≥6 μm^[6]。由2名经验丰富的检验专家进行计数,以CTC > 2(个/7.5 mL(正))为阳性阈值,荧光染色图片见图1。

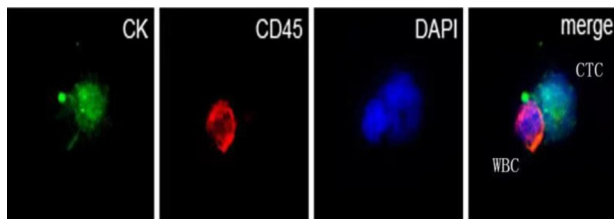


图1 CTC及WBC免疫荧光染色图片

1.2.3 统计学方法 本研究采用SPSS 22.0软件对数据进行分析。计数资料以百分率表示;计数资料比较采用 χ^2 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。以敏感性作为纵坐标、以(1-特异性)为横坐标构建非参数受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,以Logistic回归确立联合组预测因子,绘制联合组ROC曲线,以曲线下面积(area under the curve, AUC)判断诊断准确性。

2 结果

2.1 原发性肝癌与良性肝病CTC、AFP、CEA阳性率比较

原发性肝癌CTC、AFP、CEA阳性率明显高于良性肝病对照组 χ^2 分别为:(26.403、14.775、10.163), P 值分别为:(0.000、0.000、0.001),组间差异有统计学意义($P < 0.05$,见表1)。

表1 原发性肝癌与良性肝病CTC、AFP、CEA阳性率比较[n(%)]

测试组	原发性肝癌 (n=42)	良性肝病 (n=42)	χ^2	P
CTC	66.7(28/42)	11.9(5/42)	26.403	0.000
AFP	57.1(24/42)	16.7(7/42)	14.775	0.000
CEA	52.4(22/42)	19.0(8/42)	10.163	0.001

2.2 CTC、AFP、CEA测试组诊断肝癌效率

CTC、AFP、CEA对肝癌诊断敏感性依次为:(66.7%、57.1%、52.4%),敏感性依次为:CTC > AFP > CEA;特异性分别为:(88.1%、83.3%、80.9%),特异性依次为:CTC > AFP > CEA;准确度分别为:(77.4%、70.2%、66.7%),准确度依次为:CTC > AFP > CEA;约登指数分别为:(0.55、0.40、0.33),准确诊断指数依次为:CTC > AFP > CEA(表2)。

表2 CTC、AFP、CEA单项测试组诊断肝癌效率[n(%)]

指标	敏感度	特异度	准确度	约登指数
CTC	66.7(28/42)	88.1(37/42)	77.4(65/84)	0.55
AFP	57.1(24/42)	83.3(35/42)	70.2(59/84)	0.40
CEA	52.4(22/42)	80.9(34/42)	66.7(56/84)	0.33

2.3 各检测组及各联合组对肝癌诊断准确性工作特征曲线(ROC)分析

单个测试组:

CTC曲线下面积为:0.876,标准误为0.040,其95%可信区间为(0.798,0.953);AFP曲线下面积为0.777,标准误为0.052,其95%可信区间为(0.675,0.878);CEA曲线下面积为0.602,标准误为0.066,其95%可信区间为(0.473,0.730)。

联合测试组:

CTC+AFP曲线下面积为0.898,标准误为0.037,其95%可信区间为(0.825,0.971);CEA+AFP曲线下面积为0.786,标准误为0.053,其95%可信区间为(0.682,0.980);CTC+CEA曲线下面积为0.876,标准误为0.040,其95%可信区间为(0.798,0.953);CTC+AFP+CEA曲线下面积为0.898,标准误为0.037,其95%可信区间为(0.825,0.971)。因此单个测试组:

诊断价值依次为: CTC > AFP > CEA;联合测试组: CTC + AFP + CEA=CTC + AFP > CTC + CEA > AFP + CEA,见图2。

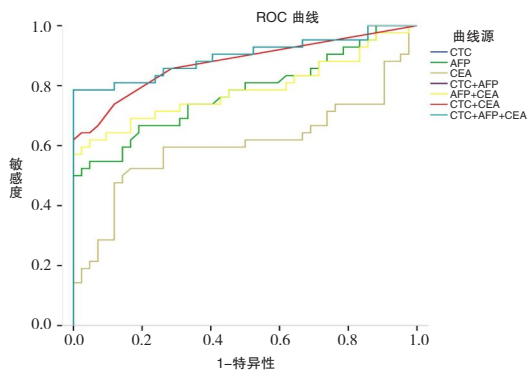


图2 CTC,AFP,CEA及联合诊断肝癌受试者工作特征曲线

3 讨论

近代科学技术不断进步的同时医疗水平也飞速发展,然而各种类型的恶性肿瘤性疾病依然是威胁人类健康并导致死亡的主要原因之一。其中,在导致癌症患者死亡的病因中,肝细胞肝癌占据了第二位。在过去的二十年里,全世界死于原发性肝癌的患者逐年增加,并且大部分的肝癌病例都出现在亚太地区,因此,该病成为亚太地区乃至世界性的健康问题^[7]。然而,原发性肝癌早期症状不明显,出现明显临床症状时病情已发展为中晚期,且多数出现浸润或全身转移,给肿瘤治疗带来极大困难^[8]。有研究表明,肝癌能否早期发现并接受治疗与患者预后关系密切,例如在肝癌晚期的情况下5年内病死率接近100%,而肝癌早期患者接受根治性治疗后,5年生存率可提高30%^[9],因此原发性肝癌的早期发现,早期诊断,早期治疗尤为重要。

目前临床常用的肿瘤诊断方法主要包括外周血生化检查、组织病理学检查和B超、CT、MRI等影像学检查。其中在外周血生化检查中,AFP、CEA被证明与原发性肝癌密切相关,在辅助诊断和疗效判断具有确切的临床价值。目前临床上,AFP主要作为原发性肝癌的血清标志物,用于原发性肝癌的诊断及疗效监测,但在部分原发性肝癌患者中,AFP检测持续表现为阴性^[10],另外,在许多肝良性病患者中,也可出现AFP升高的情况,因此单靠AFP诊断原发性肝癌存在漏诊或者误诊可能^[11]。癌胚抗原简称CEA,是一种广谱性肿瘤标志物,酸性糖蛋白,存在于癌细胞的表面,可通过癌细胞的细胞膜分泌到细胞外并少量分布于正常人的血清中,在恶性肿瘤

的诊断及其对患者病情的判断方面具有不可替代的临床价值,也可以作为早期癌症筛查的重要手段。CEA最初发现于结肠癌和胎儿肠道组织中,升高常见于大肠癌、胰腺癌、胃癌、小细胞肺癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌等。Rizeq等^[13]研究表明,CEA与多种肿瘤有相关性,但吸烟、妊娠期和心血管疾病、糖尿病、非特异性结肠炎等疾病,15%~53%的病人血清CEA也会升高^[12]。因此,CEA单项检测血清肿瘤标记物对诊断原发性肝癌也具有局限性。

早在1896年,Ashworth曾报道1例因癌症死亡的患者外周血中发现了类似肿瘤的细胞,并首次提出循环肿瘤细胞的概念^[14]。区别于病理诊断通过有创手段获得实体肿瘤标本再进行组织病理学检测,CTC可直接从患者外周血中获得,因此CTC检测也被称为“液体活检”^[15]。随着人们研究探索,尤其是伴随细胞生物学及免疫组化及肿瘤学发展,CTC被越来越多的学者所重视。目前认为CTC可被看作肿瘤的种子,进入外周血后转移到身体其他器官组织,在一定条件下继续生长,最终形成肿瘤复发或转移^[16]。多个研究也发现血液中CTC数量高的患者预后差,复发风险高,生存率低^[17]。因此原发性肝癌患者的CTC检测是明确诊断、监测肿瘤复发转移及评估预后的重要手段,也可用于肿瘤药物的耐药评估及个性化用药方案制定^[18],因此具有良好的应用前景。

本研究对原发性肝癌组和良性肝病组进行CTC、AFP、CEA检测,证实CTC与目前对原发性肝癌有确切诊断价值的常规肿瘤标记物AFP、CEA具有同样的诊断价值。另外,研究显示CTC、AFP、CEA各独立检测项目对原发性肝癌诊断敏感性依次为:CTC > AFP > CEA;特异性依次为:CTC > AFP > CEA;准确性依次为:CTC > AFP > CEA;准确诊断指数依次为:CTC > AFP > CEA。这表明CTC对肝癌的诊断效率明显高于AFP、CEA,为CTC日后作为常规指标早期诊断肝癌提供科学依据。CTC、AFP、CEA各独立检测项目对肝癌诊断准确性工作特征曲线(ROC)分析,CTC测试组曲线下面积为0.876,AFP曲线下面积为0.777,CEA曲线下面积为0.602,结果表明肝癌诊断价值依次为CTC > AFP > CEA,进一步证明CTC对肝癌的诊断价值。之后,我们将CTC、AFP、CEA各独立检测项目进行相互组合形成联合测试组,进一步行诊断准确性工作特征曲线(ROC)分析,结果提示联合组对肝癌诊断价值依次为:CTC+AFP+CEA=CTC+AFP > CTC+CEA >

(下转第309页)

- [20]于治凡,刘英华,肖均财,等.山慈菇对甲状腺癌SW579细胞增殖及凋亡的影响[J].癌症进展,2018,16(10):1292-1294+1298
- [21]Banerjee I, Fisher PB, Sarkar D. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): a key driver of hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Adv Cancer Res, 2021, 152(2):329-381
- [22]王洋,唐娟,孙鹏,等.山慈菇提取物对人结直肠癌SW480细胞增殖和凋亡的影响[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(11):1754-1758+1842
- [23]方健,王辰男,孟庆刚.山慈菇提取物对肝癌细胞Huh7增殖、凋亡的影响及其机制[J].山东医药,2020,60(11):11-15
- [24]Chen XK, Tian HQ. Therapeutic status and progress of triple negative breast cancer[J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 31(11): 135-140
- [25]Zhang X, Bi C, Shi H, et al. Structural studies of a manno-glucan from *Cremastra appendiculata* (Orchidaceae) by chemical and enzymatic methods[J]. Carbohydr Polym, 2021, 272(1): e118524
- [26]郑舒丹,程诗萌,董亚兵,等. RACK1与肿瘤细胞的侵袭和转移相关性研究进展[J].中国美容整形外科杂志,2019,30(8):500-503+511
- [27]程清波,杨艳萍,王滢,等.山慈菇对肝癌细胞凋亡和上皮间质转化的影响[J].中医学报,2021,36(10):2202-2207
- [28]张楠,曹晓东,刘颖,等.山慈菇酯提取物对4T1乳腺癌免疫微环境的影响[J].科学技术与工程,2021,21(10):3940-3949

(上接第298页)

AFP+CEA,表明CTC联合AFP、CEA各检测项目组成联合测试组后均能提高诊断价值,其中联合组CTC+AFP+CEA和CTC+AFP诊断效能相等且最高,考虑实验成本原因,CTC+AFP联合诊断组为最佳组合,高于某一检测项目单独使用和其他联合测试组,弥补了单项测试组不足,提高了诊断效能。

综上所述,CTC和AFP、CEA相比,CTC对肝癌早期诊断有明显突出的价值,通过CTC、AFP、CEA各单项测试组相互组合,CTC+AFP联合组对肝癌早期诊断弥补了单项测试组不足且具有诊断高效能,同时为以后CTC作为新的肝癌肿瘤标记物提供实验依据。

参考文献

- [1]Liu Z, Mao X, Jiang Y, et al. Changing trends in the disease burden of primary liver cancer caused by specific etiologies in China[J]. Cancer Med, 2019, 8(12): 5787-5799
- [2]陈猛,陈晓明,许荣德,等.循环肿瘤细胞在肝细胞肝癌诊疗的研究进展[J].消化肿瘤杂志:电子版,2019,11(2):75-77
- [3]Vaidyanathan R, Soon RH, Zhang P, et al. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond[J]. Lab Chip, 2019, 19(1):11-34
- [4]刘霞,方喜生,翁成音,等.原发性肝癌患者循环肿瘤细胞检测及其与术后复发转移的关系[J].广州医药,2020,51(2):36-39
- [5]Ren C, Han C, Zhang J, et al. Detection of apoptotic circulating tumor cells in advanced pancreatic cancer following 5-fluorouracil chemotherapy[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(8): 700-706
- [6]Court CM, Hou S, Winograd P, et al. A novel multimarker assay for the phenotypic profiling of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Transpl, 2018, 24(7): 946-960
- [7]Cornberg M, Tacke F, Karlsen, et al. European association for the study of the L.clinical practice guidelines of the european association for the study of the liver advancing methodology but preserving practicability[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 5-7
- [8]Momin B, Millman AJ, Nielsen DB, et al. Promising practices for the prevention of liver cancer: a review of the literature and cancer plan activities in the national comprehensive cancer control program[J]. Cancer Causes Control, 2018, 29(12): 1265-1275
- [9]Wang C, Yang L, Liang Z, et al. Long-term survival and prognostic factors of pulmonary metastasectomy in liver cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. World J Surg, 2018, 42(7): 2153-2163
- [10]Priya VV, Jainu M, Mohan SK. Biochemical evidence for the antitumor potential of *Garcinia mangostana* Linn. on diethylnitrosamine induced hepatic carcinoma[J]. Pharmacogn Mag, 2018, 14(54): 186-190
- [11]王娟,贺峥雯.甲胎蛋白异质体在肝脏疾病诊断及预后价值中的研究进展[J].检验医学与临床,2021,18(11):1629-1630
- [12]杨柯,胡亚男,陈晓文.血清AFP、CEA、CA125、CA199水平联合检测在原发性肝癌患者诊断中的应用价值[J].临床研究,2021,29(2):146-147
- [13]Rizeq B, Zakaria Z, Ouhtit A. Towards understanding the mechanisms of actions of carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6 in cancer progression[J]. Cancer Sci, 2018, 109(1): 33-42
- [14]Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death[J]. Aust Med J, 1869, 14(1): 146-149
- [15]Emre O, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells[J]. Science Translational Medicine, 2013, 5(179): 17-19
- [16]Yang C, Xia BR, Jin WL, et al. Circulating tumor cells in precision oncology: clinical applications in liquid biopsy and 3D organoid model[J]. Cancer Cell Inter, 2019, 19: 341
- [17]郝义杰,牛哲禹.循环肿瘤细胞在肝癌中的研究及应用进展[J].中国肿瘤临床,2019,46(13):690-693
- [18]王丹,陈凤娇,汤青霞,等.循环肿瘤细胞在肝癌精准诊疗中的研究进展[J].国际医学检验杂志,2020,41(9):1116-1120