

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.03.011

文章编号: 1005-8982(2020)03-0053-06

新进展研究·论著

循环肿瘤细胞在晚期食管鳞癌患者 疗效评估中的临床价值*

李彦¹, 胡正宇², 李祥华¹, 杨林¹

(安徽医科大学第一附属医院 1. 肿瘤放疗科, 2. 普外科, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 探究循环肿瘤细胞(CTC)在评估晚期食管鳞癌患者同步放化疗疗效的临床应用。**方法** 选取2015年12月31日—2016年12月31日安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科的食管鳞癌晚期患者(Ⅲ、Ⅳ期)38例,予以50 Gy的三维适形放疗联合TP方案(紫杉醇135 mg/m²;顺铂25 mg/m²)化疗,在放化疗前采集患者的外周血检测CTC,并对患者进行2年密切随访,运用t检验,Z检验分析CTC值变化,Kaplan-Meier方法及Log-rank χ^2 检验分析患者CTC值与生存率的关系,并运用Cox回归模型进行多因素分析。**结果** 食管鳞癌患者同步放化疗后肿瘤直径较治疗前明显减小,同步放化疗前后CTC差值(dCTC)、CEA的差值(dCEA)、CA199的差值(dCA199)、放疗前CA125值对患者预后有影响,dCTC和放疗前CA125值是评估入组患者预后的独立影响因素。**结论** 对食管癌同步放化疗的患者,放疗前后CTC的差值,放疗前CA125值相比较放疗前CTC、CEA及CA199值,能更好地评估患者的预后。

关键词: 食管鳞癌/食管肿瘤;循环肿瘤细胞;同步放化疗

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Clinical value of circulating tumor cells in evaluating the efficacy of patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma*

Yan Li¹, Zheng-yu Hu², Xiang-hua Li¹, Lin Yang¹

(1. Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China; 2. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical application of circulating tumor cells (CTCs) in evaluating the efficacy of concurrent chemoradiotherapy in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** Thirty eight patients with advanced (III, IV) esophageal squamous cell carcinoma were enrolled in this study. 50 Gy three-dimensional radiotherapy combined with TP regimen (paclitaxel 135 mg/m² d1; cisplatin 25 mg/m² d1-3) was given. Peripheral blood samples were collected from patients before chemotherapy, and the 38 patients with esophageal cancer were followed closely for 2 years. The t-test and z-test were used to analyze the change of CTC value. Kaplan-Meier method, Log rank test and Cox regression methods were used to analyze the relationship between CTC value and survival rate of patients. **Results** The tumor diameter value of patients with esophageal squamous cell carcinoma was significantly reduced compared with the previous. The differences of CTC (dCTC), CEA (dCEA), CA199 (dCA199) and CA125 value before and after radiotherapy and CA 125 before radiotherapy affected the prognosis of patients. dCTC and pre-radiation CA125 values were independent factors influencing the

收稿日期: 2019-07-13

* 基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目 (No: KJ2016A358)

[通信作者] 杨林, E-mail: Yanglin_ah@163.com; Tel: 0551-62923545

prognosis of enrolled patients. **Conclusion** For patients with concurrent chemoradiotherapy for esophageal cancer, compared with CTC before radiotherapy, CEA and CA199, the difference of CTC before and after radiotherapy and CA125 before radiotherapy are superior indexes to evaluate the prognosis of patients.

Keywords: esophageal neoplasms; neoplastic cells, circulating; concurrent chemoradiotherapy

中国是食管癌高发的国家, 每年因肿瘤死亡的患者中, 约有一半为食管癌患者^[1]。食管癌是中国第 5 大常见的肿瘤, 也是病死率排名第 4 的肿瘤^[2]。对不具备手术指征的患者, 同步放化疗为美国国立综合癌症网络 (NCCN) 指南中治疗的金标准^[3]。患者的外周血中存在可自发扩散入血的肿瘤细胞, 其已被定义为循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTC)^[4], 2007 年美国临床肿瘤学会 (ASCO) 将 CTC 纳入肿瘤标志物, 可用于证实肿瘤的存在、发病过程、评估患者的预后、识别患者接受治疗后的临床治疗效果; 2010 年美国癌症联合委员会 (AJCC) 将 CTC 作为远端转移标准 [M 分期, cMO (i+)]。本研究通过监测食管鳞癌患者外周血中 CTC 的动态变化, 评估 CTC 与患者预后的相关性, 进一步研究 CTC 是否可作为食管鳞癌患者疗效评估的指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 12 月 31 日—2016 年 12 月 31 日安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科的食管鳞癌患者 38 例。其中, 男性 28 例, 女性 10 例; 年龄 46 ~ 90 岁, 中位年龄 72 岁。纳入标准: 年龄 ≥ 20 岁的患者; 经病理或者细胞学确诊为食管鳞癌; 患者自身情况不适宜手术, 或术前评估病灶无法切除的 III 期患者; 出现远处寡转移的 IV 期患者 (任何 T、N、M₁、N₃ 或 T_{4b}); 具有临床易于观察的可测量病灶; ECOG 评分 ≤ 2 , 无严重合并症及放疗禁忌证; 患者可自行理解且自愿参加并签署知情同意书。排除标准: 合并其他恶性肿瘤的患者; 放化疗不耐受的患者; 有严重的心肺肝肾功能障碍。本研究经医院伦理委员会批准。

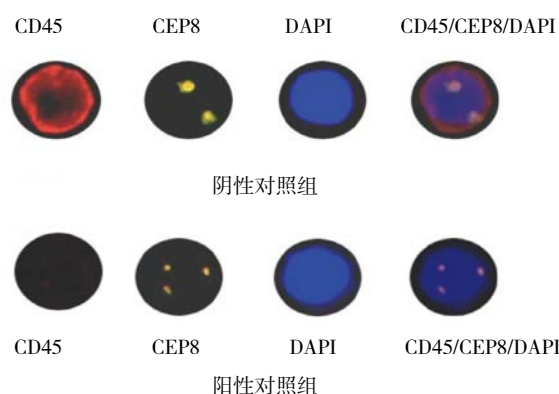
1.2 治疗方案

1.2.1 放疗方案 仪器设备采用 6 MV X 射线, 使用西门子直线加速器行单纯三维适形放疗; 所有入组患者的放疗总剂量为 DT: 50 Gy/25 F (d1-33), 1.8 ~ 2.0 Gy/次; GTV 包括食管癌原发病灶及肿大的淋巴结, CTV 包含 GTV 及淋巴引流区; PTV: 在 CTV 的基础上各外放 0.5 cm, 以及勾画出需保护的周围重要脏器。

1.2.2 化疗方案 本研究中入组患者均采用 TP 方案: 紫杉醇 135 mg/m² 第 1 天静脉滴注; 顺铂 20 mg/m² 第 1 ~ 5 天; 放疗第 1 天予以第 1 个周期化疗, 放疗 20 次左右行第 2 个周期化疗, 放疗结束后继续行 2 个周期巩固化疗, 28 d 为 1 个化疗周期。

1.3 CTC 的检测

本研究采用阴性富集法外周静脉血中筛检 CTC, 对每位研究对象, 在放疗前 7 d 内, 同步放化疗疗程结束后的 7 d 内均用真空采血管采集肘正中静脉血, 采集 3.2 ml 静脉血于 ACD 抗凝管中, 采血完毕后立即颠倒混匀 8 次。采集的血液在 24 h 内去除血清, 裂解液去除红细胞, 磁珠孵育混匀去除白细胞, 分离液分离富集的肿瘤细胞。使用 CD45 抗体进行细胞免疫荧光检测, 8 F 着丝粒探针 (CEP8) 进行免疫荧光原位杂交 (imFISH), CEP ≥ 3 /DAPI+/CD45⁻, 也即核内信号 ≥ 3 倍体, 细胞核 DAPI 染色阳性, CD45 染色阴性定义为循环肿瘤细胞; CEP=2/DAPI+/CD45⁺ 为白细胞。见图 1。



采用 imFISH 技术对食管鳞癌患者富集的 CTC 进行染色, 黄色为 CEP8 探针, 仅 CTC 会被抗 CEP8 抗体染色, 且不被 CD45 抗体染色显影, DAPI 为核染色染料。

图 1 CTC 镜下视野

1.4 CTC 值及 CTC、CEA、CA125、CA199 差值的定义

CTC > 3 个定义为 CTC 阳性, CTC ≤ 3 个定义为 CTC 阴性^[5-6]。放疗前后 CTC 的差值 dCTC = 放疗前 CTC - 放疗后 CTC, 放疗前后 CEA、CA125、CA199 的差值 dCEA = 放疗前 CEA - 放疗后 CEA, dCA125 = 放疗前 CA125 - 放疗后 CA125, dCA199 = 放疗前 CA199 - 放疗后 CA199。

1.5 疗效评估

根据实体肿瘤的疗效评价标准 RECIST 1.1 版, 选取 CT 所示食管病变最大层面的食管直径为靶病灶, 评估食管癌患者同步放化疗前后靶病灶直径的变化^[7]。

1.6 随访

对 38 例患者进行放疗后维持 2 年的追踪随访。随访内容包括: 体格检查, 复查常规的血液学指标, 颈、胸、腹部增强 CT, 依据检查结果评估患者是否复发。随访于 2019 年 5 月 1 日截止。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布的采用 *t* 检验, 不符合正态分布的采用中位数和四分位数 [M (P₂₅, P₇₅)] 表示, 比较采用秩和检验 (Z 检验), 患者生存率比较用 Kaplan-Meier 法及 Log-rank χ^2 检验, 运用 Cox 回归模型筛选影响预后的独立影响因素, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放疗前后 CTC 和随访指标的变化

本研究中 38 例患者接受 50 Gy 的放疗剂量联合

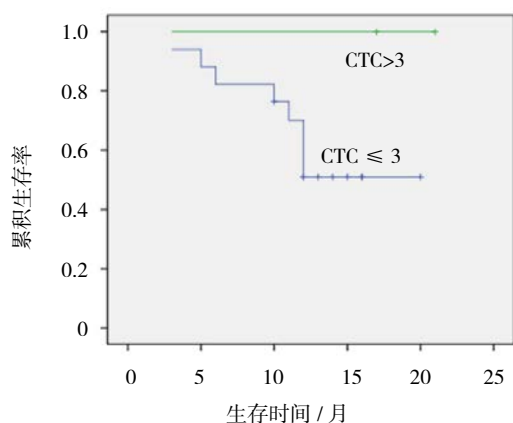
同步化疗后, 靶病灶直径均明显缩小 (*P* < 0.05), 考虑 50 Gy 的剂量即可达到临床缓解。放疗后的 CTC、CEA、CA199、CA125 与放疗前比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。放疗前后白细胞, 血红蛋白, 白蛋白和血小板差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 肿瘤指标下降。见表 1。

2.2 CTC 值与患者预后的生存分析

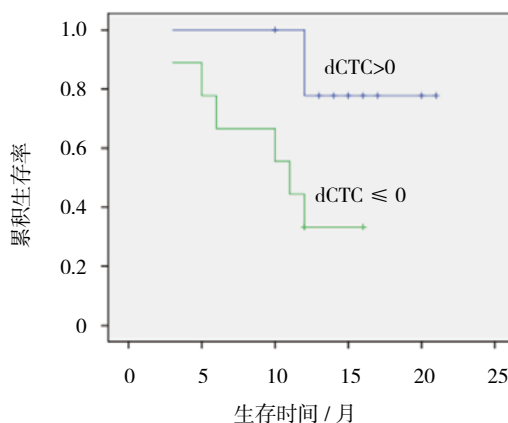
放疗前 CTC 阴性患者与放疗前 CTC 阳性的患者 2 年生存率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=2.743, P=0.098$) (见图 2A); dCTC > 0 与 dCTC ≤ 0 患者生存曲线提示两者 2 年生存率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=10.844, P=0.001$), 即放疗后外周血 CTC 数值未增加的患者, 预后较好 (见图 2B)。CEA、CA199、dCA125 的取值对患者的预后无影响 (见图 2C、E、H)。放疗前 CA125 值高于正常范围的患者预后明显优于 CA125 值低于正常范围的患者 ($\chi^2=15.989, P=0.000$) (见图 2G), dCTC、dCEA、dCA199、放疗前 CA125 值对患者的 2 年生存率有影响。dCEA > 0, dCA199 > 0 的患者生存期较 dCEA ≤ 0, dCA199 ≤ 0 的患者生存期长 (见图 2D、F)。

表 1 放化疗前后食管癌患者一般资料变化

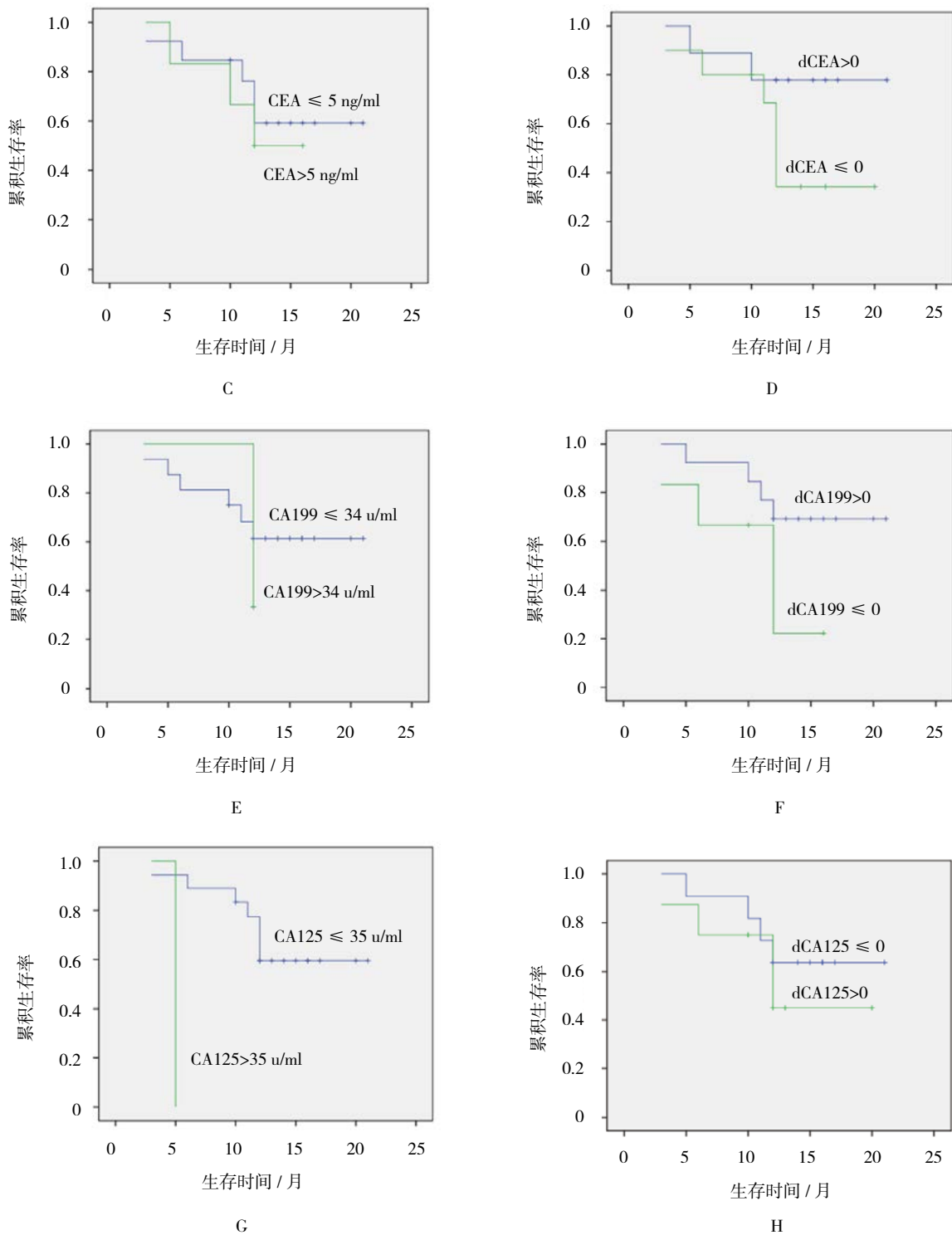
| 时间 | 肿瘤直径 / (mm, $\bar{x} \pm s$) | CTC / (个 / 3.2 ml, $\bar{x} \pm s$) | 白细胞 / ($\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$) | 血红蛋白 / (g/L, $\bar{x} \pm s$) | 血小板 / ($\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$) | 白蛋白 / (g/L, M (P ₂₅ , P ₇₅)) | CEA / (ng/ml, $\bar{x} \pm s$) | CA19-9 / (u/ml, M (P ₂₅ , P ₇₅)) | CA125 / (u/ml, M (P ₂₅ , P ₇₅)) |
|----------------|-------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------|--|---|---------------------------------|---|--|
| 放疗前 | 43.92 ± 6.62 | 2.74 ± 1.77 | 5.20 ± 1.38 | 124.05 ± 17.17 | 199.68 ± 48.08 | 39.9 (38.1, 44.4) | 3.95 ± 2.93 | 16.11 (8.73, 24.62) | 12.49 (7.37, 18.80) |
| 放疗后 | 25.89 ± 14.76 | 1.95 ± 1.87 | 4.03 ± 1.42 | 116.68 ± 22.41 | 154.53 ± 55.99 | 39.2 (33.7, 42.1) | 3.93 ± 2.40 | 13.58 (7.90, 20.98) | 15.3 (11.98, 25.79) |
| <i>t</i> / Z 值 | 9.380 | 1.726 | 4.875 | 2.938 | 6.017 | -2.663 | 0.040 | -1.917 | -1.008 |
| <i>P</i> 值 | 0.000 | 0.093 | 0.000 | 0.006 | 0.000 | 0.008 | 0.968 | 0.055 | 0.313 |



A



B



A: CTC 阳性和 CTC 阴性; B: dCTC>0 和 dCTC ≤ 0 比较; C: 高 CEA 值和低 CEA 值; D: dCEA>0 和 dCEA ≤ 0 比较; E: 高 CA199 值和低 CA199 值; F: dCA199>0 和 dCA199 ≤ 0 比较; G: 高 CA125 值和低 CA125 值; H: dCA125>0 和 dCA125 ≤ 0 比较。

图 2 同步放化疗前后患者生存曲线比较

2.3 放化疗前后 CTC 患者最大直径的比较

放化疗前后 CTC 患者肿瘤最大直径比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 放疗前后 CTC 阳性患者靶病灶最大直径大于 CTC 阴性患者。见表 2。

2.4 多因素 Cox 回归分析

将 dCTC>0、CTC>3、dCEA>0、dCA199>0、放疗前 CA125>35 u/ml 值进行 Cox 回归分析, 结果显示 dCTC>0 是食管癌患者同步放化疗后预后的独立影响因素

[$\hat{HR}=3.970$ (95% CI : 1.043, 15.117), $P=0.043$], 放疗前 CA125>35 u/ml 也是入组患者预后的独立影响因素

[$\hat{HR}=31.642$ (95% CI : 2.939, 340.656), $P=0.004$], 见表 3。

表 2 放化疗前后 CTC 患者最大直径的比较

| CTC 数值 | 放疗前 | | 放疗后 | |
|--------|------------|---|------------|---|
| | 例 (%) | 肿瘤最大直径 [mm, M (P ₂₅ , P ₇₅)] | 例 (%) | 肿瘤最大直径 [mm, M (P ₂₅ , P ₇₅)] |
| ≤ 3 个 | 31 (81.58) | 41.47 (39.66, 43.28) | 34 (89.47) | 24.75 (19.45, 30.05) |
| >3 个 | 7 (18.42) | 50.63 (46.33, 54.94) | 4 (10.52) | 35.52 (30.03, 40.99) |
| Z 值 | - | 0.360 | - | 8.894 |
| P 值 | - | 0.000 | - | 0.002 |

表 3 同步放化疗后食管癌患者预后的多因素分析参数

| 相关因素 | <i>b</i> | <i>S_b</i> | Wald χ^2 | \hat{HR} | <i>P</i> 值 | 95% CI | |
|-------------------|----------|----------------------|---------------|------------|------------|--------|---------|
| | | | | | | 下限 | 上限 |
| dCTC>0 | 1.379 | 0.682 | 4.086 | 3.970 | 0.043 | 1.043 | 15.117 |
| CTC>3 | -11.615 | 5.822 | 0.000 | 0.000 | 0.984 | - | - |
| dCEA>0 | 1.619 | 0.911 | 3.159 | 5.049 | 0.076 | 0.847 | 30.109 |
| dCA199>0 | -0.056 | 0.710 | 0.006 | 0.945 | 0.945 | 0.235 | 3.798 |
| 放疗前 CA125>35 u/ml | 3.454 | 1.212 | 8.118 | 31.642 | 0.004 | 2.939 | 340.656 |

3 讨论

对不能手术的食管癌患者, 同步放化疗是治疗的金标准, 根据 2018 年 NCCN 指南, 50.0 ~ 50.4 Gy 剂量即可达到根治剂量。王玉芳等^[8]指出, 配合足够剂量的紫杉醇联合放疗, 50 Gy 组和 60 Gy 组无生存差异, 且高剂量组副反应较大, 难以耐受后续化疗, 故本研究予以入组患者的放疗剂量为 50 Gy, 放疗后患者靶病灶最大直径与放疗前比较, 差异有统计学意义, 考虑 50 Gy 即可达到有效局控, 患者的 CTC 值同样有差异, 即 50 Gy 剂量, 患者血液循环中的肿瘤细胞较治疗前明显减少, 认为该治疗方案有效。

本研究发现食管癌患者经过 50 Gy 剂量放疗, 联合 TP 方案同步化疗后, CTC 值较治疗前总体降低, 与许刚等^[5]对食管癌患者同步放化疗后 CTC 值变化相致, LIU 等^[9]对食管癌手术患者也有相同发现, 手术患者术后和术后 3 天外周血中 CTC 的含量较术前都下降。再次验证 50 Gy 的剂量即可改善患者病情, 局部控制肿瘤进展, 为有效的治疗。

国内外已有多项研究表明, CTC 与胸部肿瘤预后具有明显相关性^[10-12], 对食管癌的患者, 国内外相关文献提示 CTC 可以作为判断食管癌预后的独立影响

因素^[13]。许刚等^[5]认为, 对食管癌患者放化疗前后的 CTC 均与患者的预后密切相关, 本研究结果提示食管癌放疗前 CTC 与患者的预后相关性欠佳, 经同步放化疗后, 放疗前后 CTC 的差值与患者预后明显相关, 即食管癌局部晚期患者经同步放化疗后, CTC 值减少的患者预后较好, CTC 未见减少甚至增加的患者预后欠佳。经 Cox 多因素分析显示, dCTC 为判断食管癌患者放化疗后预后的独立预后影响因素。CEA、CA199、dCA125 虽与患者的预后相关, 但不能作为患者的预后独立影响因素, 需结合其他指标共同判断。得到本结果的原因可能较放疗前 CTC 的值, dCTC 更能体现治疗过程中 CTC 值的动态变化, 更能体现治疗在改善患者预后中的重要作用, 即患者得到可改善预后的治疗后, CTC 值较前减少, 预后得到改善。

本研究中的血清学指标 CEA、CA125、CA199 均为消化道肿瘤的重要的肿瘤标志物, CA125 最早用于评估卵巢癌患者的复发及转移, 同时也被多项研究指出可作为评估食管癌发生、发展的重要指标^[14-15]。ZHAO 等^[16]在其研究中指出 CA125 可以预测食管鳞癌患者淋巴结的转移, 血行转移, 并是独立预后影响因素, 且优于 CA199 和 CEA。在本研究中, 通过对放疗前后肿瘤指标值的对比发现, 放疗前 CA125 值也可

以作为食管癌患者同步放化疗后的患者预后的独立影响因素,与患者的预后密切相关。这可能与肿瘤细胞不仅可以合成 CA125,且能主动将其分泌到细胞外相关^[17],仍需更大样本量及专项的研究探讨。

综上所述,放疗前后 CTC 的差值,放疗前 CA125 值可作为食管癌 III、IV 期接受同步放化疗治疗患者预后的独立影响因素,本实验仍有许多不足,纳入患者的样本量尚有限,目前正在入组更多的患者,更大样本的实验正在设计中,同时将对患者进行更长时间的随访,日后将进行更深一步的探讨。

参 考 文 献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] CHEN W, SUN K, ZHENG R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1-12.
- [3] AJANI J A, D'AMICO T A, ALMHANNA K, et al. Esophageal and esophagogastric junction cancers, version 12015[J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2015, 13(2): 194-227.
- [4] ASHWORTH T R. 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.
- [5] 许刚,王燕,王承伟,等.食管癌放化疗中循环肿瘤细胞的变化及其临床意义[J].*中国肿瘤临床*, 2016, 43(9): 381-384.
- [6] MILLER M C, DOYLE G V, TEMTAPPEN L W. Significance of circulating tumor cells detected by the cellsearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer[J]. *J Oncol*, 2010, 2010: 617421. DOI: 10.1155/2010/617421.
- [7] EISENHAEUER E A, THERASSE P, BOGAERTS J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(2): 228-247.
- [8] 王玉芳,刘文学,孙莹莹,等.紫杉醇联合两种不同剂量的放疗治疗胸段食管癌的比较[J].*实用医学杂志*, 2015, 31(21): 3587-3589.
- [9] LIU Z, JIANG M, ZHAO J, et al. Circulating tumor cells in perioperative esophageal cancer patients: quantitative assay system and potential clinical utility[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(10): 2992-2997.
- [10] BIDARD F C. Circulating tumor cells, a tremendous prognostic factor in inflammatory breast cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, DOI: 10.1093/jnci/djv281.
- [11] LIANIDOU E S, MARKOU A, STRATI A. The role of CTCs as tumor biomarkers[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867: 341-367.
- [12] MALTONI R, FICI P, AMADORI D, et al. Circulating tumor cells in early breast cancer: a connection with vascular invasion[J]. *Cancer Lett*, 2015, 367(1): 43-48.
- [13] MATSUSHITA D, UENOSONO Y, ARIGAMI T, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2015, 22(11): 3674-3680.
- [14] 刘文洁,许海生,韩金利.血清 CA199、CA724、CEA、CYFRA21-1 联合检测在食管癌诊断及恶性程度判断中的应用[J].*山东医药*, 2010, 50(10): 68-69.
- [15] 豆亚伟,吕珊珊,田伟,等.多西他赛注射液及卡培他滨片与奥沙利铂注射液联合应用在食管癌术后化疗中的疗效分析[J].*中国胸心血管外科临床杂志*, 2017, 24(11): 853-857.
- [16] ZHAO H, CHEN W, WU J, et al. Clinical significance of preoperative serum tumor markers in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2014, 10(2): 179-185.
- [17] YIN B W, LLOYD K O. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(29): 27371-27375.

(张西倩 编辑)

本文引用格式:李彦,胡正宇,李祥华,等.循环肿瘤细胞在晚期食管鳞癌患者疗效评估中的临床价值[J].*中国现代医学杂志*, 2020, 30(3): 53-58.