

乳腺癌患者 CTCs、ctDNA 检测及其诊断价值研究

季福庆, 李梦斐, 印玉龙, 吕勇刚

西北大学附属医院/西安市第三医院甲乳外科, 陕西 西安 710018

【摘要】 目的 探讨乳腺癌患者的循环肿瘤细胞(CTCs)、循环肿瘤细胞DNA(ctDNA)检测水平及其诊断价值,为患者的临床诊断提供指导。方法 选取2017年1月至2019年1月西北大学附属医院收治的60例乳腺癌患者作为观察组,同期体检健康者50例作为对照组。采集两组受检者的外周血实施CTCs及ctDNA检测,比较观察组不同特征患者及对照组的CTCs阳性率与ctDNA水平。结果 观察组患者的CTCs阳性率为38.33%(23/60),ctDNA水平为(152.6±12.4) ng/mL;对照组CTCs均为阴性,ctDNA水平为(28.1±4.3) ng/mL,观察组CTCs阳性率与ctDNA水平明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);不同年龄与病理类型乳腺癌患者的CTCs阳性率与ctDNA水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$);TNM分期I期患者的CTCs阳性率为0,ctDNA水平为(110.2±8.6) ng/mL,TNM分期II期患者的CTCs阳性率为25.00%,ctDNA水平为(143.6±10.2) ng/mL,TNM分期III期患者的CTCs阳性率为51.43%,ctDNA水平为(168.9±8.5) ng/mL,不同乳腺癌TNM分期患者CTCs阳性率与ctDNA水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$);M0期患者的CTCs阳性率为12.50%,ctDNA水平为(125.8±8.9) ng/mL,M1期患者的CTCs阳性率为90.00%,ctDNA水平为(176.5±10.8) ng/mL,不同乳腺癌M分期患者CTCs阳性率与ctDNA水平比较差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 乳腺癌患者CTCs、ctDNA检测可为患者的临床诊断提供指导。

【关键词】 乳腺癌;循环肿瘤细胞;循环肿瘤细胞DNA;诊断价值

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)07-0838-04

Detection of CTCs and ctDNA in breast cancer patients and its diagnostic value. Ji Fu-qing, Li Meng-fei, Yin Yu-long, Lv Yong-gang. Department of Thyroid and Breast, Xi'an No.3 Hospital, the Affiliated Hospital of Northwest University, Xi'an 710018, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To explore the detection and diagnostic value of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor cell DNA (ctDNA) in breast cancer patients, and to provide guidance for clinical diagnosis of patients. **Methods** A total of 60 patients with breast cancer, who admitted to the Affiliated Hospital of Northwest University from January 2017 to January 2019, were selected as the observation group. During the same period, 50 personnel of routine physical examination in our hospital were enrolled as the control group. The peripheral blood samples of the two groups were collected for CTCs and ctDNA detection, and the positive rates of CTCs and ctDNA level of the patients with different characteristics in the observation group and the control group were compared. **Results** The positive rate of CTCs in the observation group was 38.33%(23/60), and the level of ctDNA was (152.6±12.4) ng/mL; the CTCs in the control group were all negative, and the level of ctDNA was (28.1±4.3) ng/mL, the positive rate of CTCs and ctDNA in the observation group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$); there was no significant difference in CTCs positive rate and the level of ctDNA between breast cancer patients of different ages and pathological types ($P>0.05$). The positive rate of CTCs in patients with TNM stage I was 0 and the level of ctDNA was (110.2±8.6) ng/mL; the positive rate of CTCs in patients with TNM stage II was 25.00% and the level of ctDNA was (143.6±10.2) ng/mL; the positive rate of CTCs in patients with TNM stage III was 51.43%, and the level of ctDNA was (168.9±8.5) ng/mL; there was statistically significant difference in the positive rate of CTCs between patients with different breast cancer TNM stages and ctDNA levels ($P<0.05$). The positive rate of CTCs in M0 patients was 12.50%, and the ctDNA level was (125.8±8.9) ng/mL; the positive rate of CTCs in M1 patients was 90.00%, and the level of ctDNA was (176.5±10.8) ng/mL; the difference of CTCs positive rate and ctDNA level in different breast cancer M stages was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The detection of CTCs and ctDNA in breast cancer patients can provide guidance for clinical diagnosis of patients.

【Key words】 Breast cancer; Circulating tumor cells (CTCs); Circulating tumor cell DNA (ctDNA); Diagnostic value

乳腺癌在临床上具有较高的发病率,其属于导致女性肿瘤患者发生死亡的主要原因^[1]。同时有资料显示,乳腺癌患者的发病年龄呈现出年轻化的趋势,已经成为急需解决的公共卫生问题^[2]。目前临床上对乳腺癌患者开展治疗的方法包括手术治疗、放射治疗、化疗以及内分泌治疗等,若患者存在放疗适应证,则在为其开展手术治疗后,实施放射治疗进行辅助,可有效降低患者的疾病复发率^[3]。有资料报道称,在乳腺癌疾病转移和复发的过程中,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)和循环肿瘤细胞DNA (circulating tumor cell DNA, ctDNA)均发挥着重要作用^[4]。因此通过检测 CTCs 与 ctDNA 水平,可为乳腺癌的诊断及预后评估起到积极作用^[5]。本研究旨在探讨乳腺癌患者 CTCs、ctDNA 的检测水平及其诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2019 年 1 月西北大学附属医院收治的乳腺癌患者 60 例作为观察组,选取同期在我院接受体检的女性健康者 50 例作为对照组。观察组患者年龄 22~75 岁,平均(51.8±6.1)岁;病理分期中,Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 30 例,Ⅲ期 25 例;绝经前 35 例,绝经后 25 例。对照组健康者年龄 21~77 岁,平均(51.8±6.5)岁;绝经前 30 例,绝经后 20 例。两组受检者的年龄和绝经情况比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准,受检者均知情并签署同意书。

1.2 病例选择 纳入标准:(1)乳腺癌经术后病理检查或穿刺活检确诊;(2)具备完整临床资料及影像学资料;(3)乳腺癌患者病灶未出现转移。排除标准:(1)机体存在其他恶性肿瘤疾病者;(2)凝血功能异常者;(3)肝肾功能严重障碍者;(4)先天性心脏疾病患者;(5)入组前近期行内分泌外相关治疗的患者。

1.3 观察指标 比较不同特征患者及对照组受检者的 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平,包括 TNM 分期为Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期,Ⅲ分期为 M0 期与 M1 期,浸润型导管癌与浸润型小叶癌,>50 岁与 ≤50 岁患者。

1.4 检测方法 采集所有受检者肘静脉血 7.5 mL,应用肝素实施抗凝处理,在冷却 10 min 后采用 5 mL 磷酸缓冲盐溶液稀释,加入淋巴细胞分离液 3 mL,离心取血清,加入磷酸缓冲盐溶液 2 mL,混合均匀后离心,去除上清液,加入波形蛋白抗体、细胞角蛋白抗体、CD45 各 0.5 μL 后混匀,静置 30 min,离心后实施检测。采用流式细胞分析术开展分析,依靠侧向反散射对前向散射做二维散点图,然后设立 R1 门,同时应用 CD45⁻细胞,根据侧向反散射对细胞角蛋白进行二维散点图制作,并应用细胞角蛋白(+)细胞设置 R2 门。应用 R2 门细胞通过波形蛋白对上皮细胞黏附分子进行二维散点图制作,采用上皮细胞黏附分子(+)和波形蛋白(+)进行 R3 门制作,从而获取散点图,对数据开展分析。若检查结果显示波形蛋白(+),CD45(-)、上皮细

胞黏附分子(+)以及细胞角蛋白(+),则可判定为阳性,若 CTCs 水平在 5/7.5 mL 及以上,则可判定为转移阳性。采集晨起空腹静脉血 5 mL,放入含有乙二胺四乙酸(EDTA)的抗凝管内,离心机中以 1 600 r/min 速度离心 10 min,采集上层血浆,将其装入离心管内,离心管容量为 2 mL,将下层血细胞放入到冻存管内,则得到检测所需要的血细胞。血浆放入离心机中实施离心处理,残余细胞去除后,将上清液转入到离心管内,则得到所需要的血浆,保存于冰箱内待检。应用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 操作流程开展血浆游离 DNA 提取,实施传统 DNA 测序。

1.5 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受检者的 CTCs 阳性率比较 观察组受检者的 CTCs 阳性率为 38.33% (23/60), ctDNA 水平为 (152.6±12.4) ng/mL;对照组 CTCs 均为阴性,ctDNA 水平为 (28.1±4.3) ng/mL,观察组 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平明显高于对照组,差异均具有统计学意义($t=67.644, P=0.001$)。

2.2 观察组不同特征患者的 CTCs 阳性率和 ctDNA 水平比较 不同年龄与病理类型乳腺癌患者的 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$);不同乳腺癌 TNM 分期患者 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 观察组不同特征患者的 CTCs 阳性率和 ctDNA 水平比较

项目	例数	CTCs 表达[例(%)]		ctDNA 水平 ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)
		阳性(n=23)	阴性(n=37)	
年龄(岁)				
>50	38	16 (42.11)	22 (57.89)	148.6±11.2
≤50	22	7 (31.82)	15 (68.18)	154.7±12.6
χ^2 值		0.624		1.254
P值		0.430		0.211
TNM 分期				
Ⅰ	5	0 (0)	5 (100.00)	110.2±8.6
Ⅱ	20	5 (25.00)	15 (75.00)	143.6±10.2
Ⅲ	35	18 (51.43)	17 (48.57)	168.9±8.5
χ^2 /F值		16.876		20.451
P值		<0.05		<0.05
M 分期				
M ₀ 期	40	5 (12.50)	35 (87.50)	125.8±8.9
M ₁ 期	20	18 (90.00)	2 (10.00)	176.5±10.8
χ^2 值		33.878		19.357
P值		<0.05		<0.05
病理类型				
浸润型导管癌	51	21 (41.18)	30 (58.82)	141.3±10.8
浸润型小叶癌	9	2 (22.22)	7 (77.78)	158.3±8.8
χ^2 值		1.163		1.654
P值		0.281		0.087

3 讨论

乳腺癌是女性高发恶性肿瘤,主要特征为乳头回缩、乳房皮肤橘皮样改变和乳头溢液等^[6]。以往临床上主要采用乳房切除联合腋窝淋巴结清扫术对患者进行治疗,对机体创伤大,手术时间长,容易产生多种并发症,且术后乳房美观度差,影响患者的身心健康^[7]。近年来,保留乳房手术逐渐受到患者的青睐,同时可达到和传统手术相似的治疗效果,可明显提高患者术后生活质量^[8]。

在乳腺癌的诊断方面,临床上主要通过传统影像学检查和组织学检查。但是,临床研究显示传统的诊断措施对患者的诊断敏感性不高。近年来随着液体活检技术的不断发展,CTCs 检测和 ctDNA 检测在临床上的应用率不断提升。ctDNA 属于新型肿瘤标志物,通过对外周血中传统 DNA 总量进行测量,或检测特定基因发生,可能会为肿瘤疾病的疗效评价及预后评估提供参考^[9-10]。有研究人员通过选取乳腺癌患者,分别为其开展糖类抗原 153、CTCs、影像学检查与 ctDNA 检测,评估 4 种检测方法所具备的敏感度,结果显示 ctDNA 可对疾病状况进行更为高效的反映^[11]。同时也有资料报道称,通过对转移性乳腺癌与卵巢癌患者的血 ctDNA 水平实施检测,可使疾病的临床进程得到有效反映^[12]。当机体处于健康状态时,外周血内的 ctDNA 水平较低,通常为 3~63 ng/mL,而当机体出现肿瘤时,由于循环癌细胞发生坏死和凋亡,将会导致血液内的 DNA 水平明显升高,从而使 ctDNA 水平明显高于健康人群,其浓度通常可达到 122~462 ng/mL^[13]。

相较于传统影像学检查和组织学检查,CTCs 检测和 ctDNA 检测的敏感性更高,可重复性好。在对 CTCs 实施检测时,需做好细胞检测与富集工作,可应用的检测方法种类多,包括细胞检测、流式细胞检测、核酸检测与免疫细胞化学检测,富集方法包括黏附分离法、密度梯度离心法与免疫磁珠分离法。本研究结果显示,对照组 CTCs 均为阴性,ctDNA 水平为(28.1±4.3) ng/mL,观察组 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平明显高于对照组。有资料报道称,对于早期乳腺癌患者而言,其能够从辅助治疗中受益的比例达到接近 30%,而对于晚期转移乳腺癌患者而言,也可在其机体外周血内检测到 CTCs,因此通过对患者的 CTCs 进行检测,可为患者的疾病分期提供参考。本次研究结果显示,Ⅱ期乳腺癌患者的 CTCs 阳性率明显高于Ⅰ期乳腺癌患者,同时 CTCs 阳性率在不同 TNM 分期乳腺癌患者中也具有明显差异化。

本研究结果显示,不同年龄与病理类型乳腺癌患

者的 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平无明显差异;不同乳腺癌 TNM 分期患者 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平具有明显差异。提示随着乳腺癌分期的改变,患者机体内的 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平会出现明显变化,因此通过对 CTCs 阳性率与 ctDNA 水平进行检测,可为患者的疾病分期提供一定参考,从而可使患者的疾病治疗更具有针对性。同时有资料报道称,在肿瘤疗效评估中 CTCs 也可发挥一定价值,相较于 ctDNA,CTCs 检测可对完整的肿瘤细胞进行提供,可采用多种 RNA、DNA 与蛋白质组学测量方法,对癌症过程进行全面了解^[14-15]。但 CTCs 的应用过程中存在稀释以及分离困难等情况,因此当患者的疾病处于早期阶段时,难以在血浆中发现 CTCs,当患者的疾病发生转移后,血浆中的 CTCs 数量才会明显增加,从而也使得 CTCs 的检测应用受到一定限制^[16]。同时有资料报道称,CTCs 与匹配肿瘤细胞间具有一定差异,因此也可能对其分子生物学特征的可靠性产生一定影响^[17]。因此在检测过程中,将 CTCs 与 ctDNA 进行联合应用,可有效提升诊断的准确性和可靠性^[18]。

综上所述,CTC 与 ctDNA 检测可为乳腺癌的诊断提供有效参考,可作为乳腺癌临床诊断的有效指标。

参考文献

- CRISTOFANILLI M, PIERGA JY, REUBEN J, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 134: 39-45.
- BERGER LA, JANNING M, VELTHAUS JL, et al. Identification of a high-level MET amplification in CTCs and ctDNA of an ALK-Positive NSCLC patient developing evasive resistance to crizotinib [J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(12): e243-e246.
- WANG S, ZHENG G, CHENG B, et al. Circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR and its prognostic role in gastric cancer: a meta-analysis of published literature [J]. *PLoS One*, 2017, 9(6): e99259.
- 蒲倩, 吕艳蓉, 高海东. OTUD3 与 p53 在乳腺癌中表达及对 DNA 损伤应答的研究[J]. *中国现代普通外科进展*, 2019, 22(4): 275-279.
- 王丹, 郑立红, 李芙蓉, 等. MMP-9 基因 rs17576 位点多态性与汉族女性乳腺癌易感性的相关性[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(11): 2463-2466.
- 杜兴, 阿迪力江·买买提明, 地力木拉提·艾斯木吐拉. 外周血循环肿瘤细胞对非转移性乳腺癌预后预测价值的 Meta 分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2014, 14(6): 721-728.
- 朱彦辉, 姚广裕, 陈路嘉, 等. 循环肿瘤 DNA 检测及其在乳腺癌中的临床应用[J]. *肿瘤*, 2018, 38(1): 73-77.
- 王惠宇, 夏丹丹, 许隽颖, 等. 基于 CELLSEARCH-(TM) 系统的乳腺癌循环肿瘤细胞临床研究概览[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2018, 23(8): 757-763.
- 李艳, 陶苏玉, 崔彩霞, 等. 外周静脉血循环肿瘤细胞在Ⅳ期乳腺癌寡转移与广泛转移中检测的临床价值[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33

特发性矮小症患儿血清 25(OH)D、IGF-1 水平与体质量的相关性

梁小红¹, 谭迪², 简杨湄¹

1. 广州市花都区妇幼保健院(胡忠医院)儿童保健科, 广东 广州 510800;

2. 广州市花都区梯面卫生院妇幼科, 广东 广州 510800

【摘要】 目的 检测特发性矮小症患儿血清 25 羟维生素 D [25(OH)D]、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 水平, 并探讨其与体质量的相关性, 为患者的临床诊断提供指导。方法 选取 2017 年 1 月至 2019 年 6 月期间广州市花都区妇幼保健院接诊的 85 例特发性矮小症患儿作为观察组, 另选择同期在我院体检的 50 例儿童作为对照组。受检者入组后, 空腹采集静脉血液标本, 检测并比较两组患儿的 25(OH)D、IGF-1 水平、体质量和身高状况, 并采用 Spearman 相关分析法分析 25(OH)D、IGF-1、身高与体质量的相关性。结果 观察组和对照组患儿的血清 25(OH)D [(24.59±9.31) ng/mL vs (33.28±11.21) ng/mL]、IGF-1 [(237.16±37.33) ng/mL vs (309.35±71.52) ng/mL]、体质量[(15.67±2.01) kg/m² vs (18.42±1.65) kg/m²]、身高[(115.49±10.61) cm vs (138.35±10.09) cm]比较, 观察组明显低于对照组, 差异均具有统计学意义(P<0.05); 观察组患儿的体质量与血清 25(OH)D、IGF-1 水平呈正相关(r=0.229、0.258, P<0.05), 身高与血清 25(OH)D、IGF-1 水平也呈正相关(r=0.676、0.404, P<0.05)。结论 特发性矮小症患儿血清 25(OH)D、IGF-1 水平均较低, 且其与体质量和身高呈正相关, 血清 25(OH)D、IGF-1 水平检测对特发性矮小症患儿的病情预测及防治都具有重要意义。

【关键词】 特发性矮小症; 25 羟维生素 D; 胰岛素样生长因子-1; 体质量; 相关性

【中图分类号】 R729 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)07-0841-04

Correlation between serum 25 (OH)D, IGF-1, and body weight in children with idiopathic dwarfism. LIANG Xiao-hong¹, TAN Di², JIAN Yang-mei¹. 1. Department of Child Health, Guangzhou Huadu District Maternity & Child Care Hospital (Huadu Huzhong Hospital), Guangzhou 510800, Guangdong, CHINA; 2. Department of Maternal and Childhood, Guangzhou Huadu District Timian Health Center, Guangzhou 510800, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To detect the serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in children with idiopathic dwarfism, and to explore the correlation between them and body mass, so as to provide guidance for the clinical diagnosis of the patients. **Methods** A total of 85 children with idiopathic dwarfism, who admitted to Guangzhou Huadu District Maternal and Child Health Care Hospital from January 2017 to June 2019, were selected as the observation group, and 50 children who had physical examination in the same hospital at the same time were selected as the control group. After the subjects were enrolled into the groups, the venous blood samples were collected on an empty stomach to detect and compare the levels of 25(OH)D, IGF-1, body mass and height of the

通讯作者: 梁小红, E-mail: 920620945@qq.com

(16): 2764-2768.

[10] 吕海通, 施宇梅, 安胜利, 等. 循环肿瘤细胞在可手术乳腺癌患者中的检出率及特征分析[J]. 广东医学, 2016, 37(12): 1819-1822.

[11] 汪忠森. TE 与 TEC 新辅助化疗方案对乳腺癌患者外周血循环肿瘤细胞及 TSCs 的影响[J]. 河北医学, 2017, 23(2): 204-208.

[12] 吕艳, 庞华, 庞春森, 等. 负载抗原 DC 与 CIK 共培养对富集培养乳腺癌循环肿瘤细胞杀伤作用研究[J]. 天津医药, 2013, 41(12): 1173-1176, 1235.

[13] 赵丽娜, 李鹏飞, 蔡莉, 等. 转移性乳腺癌循环肿瘤细胞的上皮间质转化水平对化疗疗效的预测意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(11): 971-975.

[14] 单海琳, 苏瑛, 周斌, 等. 血循环肿瘤细胞检测在中晚期乳腺癌疗效评价及转移监测中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(9): 988-991, 997.

[15] 张聚良, 姚青, 陈江浩, 等. 曲妥珠单抗对 HER-2 阳性早期乳腺癌外周血循环肿瘤细胞的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(2): 279-281.

[16] 李伟, 李文杰, 钱诚. 循环肿瘤 DNA 在三阴性乳腺癌中的检测及其潜在应用价值[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(1): 7-11.

[17] 古林, 李梦欣, 范励雯, 等. 循环肿瘤 DNA 检测在乳腺癌中应用研究进展[J]. 中国实用外科杂志, 2019, 39(2): 185-188.

[18] 李萌辉, 刘俊田. BRCA1/2 基因检测在恶性肿瘤中的应用[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(7): 361-365.

(收稿日期: 2019-11-20)