

# 循环肿瘤细胞在膀胱癌诊疗中的应用价值

苗岳松, 刘杰, 刘昕, 王志勇

(承德医学院附属医院泌尿外科, 河北 承德 067000)

**摘要:**目的 检测膀胱癌患者外周血中循环肿瘤细胞(CTCs)的表达情况,探究在膀胱癌手术前后动态监测 CTCs 的价值。方法 选择 2018 年 10 月~2019 年 6 月就诊于承德医学院附属医院泌尿外科的 92 例膀胱癌患者作为试验组,另外选择同期 22 例健康志愿者作为对照组,采用免疫磁珠阴性富集法结合荧光细胞化学染色技术(SE-iFISH)检测两组外周血中 CTCs 水平,绘制受试者工作曲线(ROC),确定 cut-off 值,分析外周血中 CTCs 与试验组肿瘤浸润程度、病理分级、肿瘤分期及多样性的关系。结果 试验组 CTCs 阳性率高于对照组(91.30% vs 4.50%),差异有统计学意义( $P<0.05$ );当 cut-off 值为 1 个/7.5 ml 时,CTC 诊断膀胱癌的敏感性和特异性分别为 91.30%、95.50%;不同浸润程度、病理分级的膀胱癌患者 CTCs 阳性率比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );不同年龄、性别、肿瘤分期、多样性的膀胱癌患者 CTCs 阳性率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 CTCs 可作为诊断膀胱癌的评价指标,具有潜在的临床应用价值,可作为监测膀胱癌治疗疗效的肿瘤标志物,且其表达与肿瘤的浸润程度、病理分级有一定关系。

**关键词:**循环肿瘤细胞;膀胱癌;肿瘤标志物;免疫磁珠阴性富集法

中图分类号:R737.14

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.08.019

文章编号:1006-1959(2021)08-0072-04

## The Application Value of Circulating Tumor Cells in the Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer

MIAO Yue-song, LIU Jie, LIU Xin, WANG Zhi-yong

(Department of Urology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei, China)

**Abstract:** Objective To detect the expression of circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of patients with bladder cancer, and to explore the value of dynamic monitoring of CTCs before and after bladder cancer surgery. Methods 92 patients with bladder cancer who were admitted to the Department of Urology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University from October 2018 to June 2019 were selected as the experimental group. In addition, 22 healthy volunteers during the same period were selected as the control group, and the CTCs levels in the peripheral blood of the two groups were detected by the immunomagnetic bead negative enrichment method combined with the fluorescent cytochemical staining technique (SE-iFISH). Draw receiver operating curve (ROC), determine cut-off value, and analyze the relationship between CTCs in peripheral blood and tumor infiltration degree, pathological grade, tumor stage and diversity of the experimental group. Results The positive rate of CTCs in the experimental group was higher than that in the control group (91.30% vs 4.50%), the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ); When the cut-off value was 1/7.5 ml, the sensitivity and specificity of CTC in diagnosing bladder cancer were 91.30% and 95.50%, respectively; comparison of the positive rates of CTCs in bladder cancer patients with different infiltration degrees and pathological grades, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ); There was no significant difference in the positive rate of CTCs among bladder cancer patients of different ages, genders, tumor stages, and diversity ( $P>0.05$ ). Conclusion CTCs can be used as an evaluation index for the diagnosis of bladder cancer and have potential clinical application value. They can be used as tumor markers to monitor the therapeutic effect of bladder cancer, and their expression has a certain relationship with the degree of tumor invasion and pathological grade.

**Key words:** Circulating tumor cells; Bladder cancer; Tumor markers; Immunomagnetic bead negative enrichment method

膀胱癌(bladder cancer)在泌尿系统疾病中比较常见,是严重影响居民生命健康的恶性肿瘤,且膀胱癌的发病率位列全球恶性肿瘤的第9位<sup>[1]</sup>,但在我国泌尿系统肿瘤中发病率和死亡率排第1位<sup>[2]</sup>。近年来,由于膀胱癌诊疗的技术不断发展,膀胱癌患者的预后生存时间比过去有显著增加,但影响膀胱癌患者无进展生存期的重要因素仍然是肿瘤的复发和转移。研究表明,原发灶肿瘤脱落的细胞能够进入血液循环系统并发生远处转移,而循环系统中肿瘤细胞的细胞学和基因遗传学特征与原发灶内肿瘤的一致<sup>[3-6]</sup>,原发灶内的肿瘤细胞进入外周血形成循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs),进而导致肿瘤的复发或转移。有学者报道,影像学检查显示

的变化较外周血中 CTCs 含量的变化滞后,提示循环肿瘤细胞的存在对肿瘤早期发生微转移具有非常重要的意义<sup>[7]</sup>。已有研究证实,外周血中 CTCs 含量可有效预测结直肠癌的预后、进展和总生存率<sup>[8]</sup>。因此,检测膀胱癌患者外周血中 CTCs 含量可辅助诊断膀胱癌。基于此,本研究通过检测膀胱癌患者外周血中 CTCs 含量,探究 CTCs 阳性率与膀胱癌患者临床特征的相关性,以期发现 CTCs 在膀胱癌诊疗中的作用,为临床诊治膀胱癌提供理论依据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2018 年 10 月~2019 年 6 月河北省承德医学院附属医院泌尿外科研究所收治的 92 例膀胱肿瘤患者作为试验组,其中男 77 例,女 22 例,年龄 38~87 岁,平均年龄(66.10±9.67)岁,中位年龄 64 岁。依据术后病理结果,将试验组分为低级别尿路上皮癌 30 例,高级别尿路上皮癌 62 例, T<sub>1</sub>+T<sub>2</sub> 期 40 例, T<sub>3</sub>+T<sub>4</sub> 期 52 例,非肌层浸润性膀胱癌 39

作者简介:苗岳松(1992.4-),男,河北邯郸人,硕士研究生,主要从事泌尿系肿瘤研究

通讯作者:王志勇(1966.8-),男,河北承德人,硕士,主任医师,教授,主要从事泌尿系肿瘤研究

例,肌层浸润性膀胱癌 53 例。对照组选自我院门诊同期健康体检者 20 例,其中男 12 例,女 8 例,年龄 38~82 岁,平均年龄(65.20±10.94)岁,中位年龄 68 岁。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究已通过河北省承德医学院附属医院伦理委员会审查。

**1.2 纳入和排除标准** 纳入标准:①未接受过放疗、化疗、免疫治疗及靶向治疗;②无其他部位恶性肿瘤;③膀胱肿瘤患者的组织标本均经过病理确诊为膀胱癌;④试验组均达到相同的手术标准。排除标准:①原发病灶非膀胱的肿瘤;②患有免疫系统疾病;③有结核病史;④随访治疗期间放弃治疗或转院者。

### 1.3 方法

**1.3.1 富集** CTCs 采用上海宝藤医学检验中心开发的 SE-iFISH 技术富集及液染。先采用阴性富集法和免疫荧光染色技术从外周血中粗略获取 CTCs,再通过非血源性细胞分离介质将外周血中的红细胞和白细胞去除后洗涤,获得 CTCs。

**1.3.2 液染** 选用荧光原位杂交技术染色鉴定 CTCs 含量。

**1.3.3 实验步骤** ①外周血采集:使用 8 号采血针和 EDTA 抗凝采血管采集大于 7.5 ml 的外周血,将样本摇晃混匀。②富集和液染 CTCs:取 7.5 ml 外周血,离心后弃去上清液,将去上清后的剩余样本倒入 A 管中;把其中的血细胞堆积到分离介质上;将洗涤 A 管的洗涤液沿壁倒进带有分离液的 B 管;离心后把

上清和白膜层放入 C 管;将磁珠放于加有清洗液平底离心管,混匀后放在磁力架上,静置后弃上清,重悬至原体积;将清洗后的磁珠加入 C 管后,把 C 管放在摇床上,摇动;加分离液于 D 管中,把 C 管中的磁珠混悬液滴在分离介质上;离心后把上清液倒入 E 管中,再向 E 管中加入清洗液,离心后弃上清,加入清洗液,将液体加至平底离心管中;把平底离心管放在磁力架上后用移液枪将管内液体转移至 F 管中;向 F 管中加入清洗液,离心后弃上清,混匀细胞加入离心管中,将洗涤 F 管后的洗涤液也加入 H 管中;加入清洗液离心后弃上清;向细胞液中加入抗原修复液,向 H 管中加入配制好的血细胞分析用染色液混合液,室温避光孵育;洗涤液染后的细胞。加入组织固定液,涂片,室温过夜晾干玻片。

**1.4 荧光显微镜结果判读** 对已进行原位杂交免疫荧光染色后的 iFISH CTCs 玻片使用荧光显微镜进行结果判读。荧光信号释义:红色:抗人白细胞单克隆抗体群 CD45;橙色:8 号染色体探针 CEP-8 探针;绿色:CD31;蓝色:细胞核定位染色剂 DAPI。

**1.5 结果分析** 橙色荧光点为染色体着丝粒探针 i-FISH 检测结果。正常非肿瘤细胞为二倍体细胞,胞内两个荧光点;肿瘤细胞为多倍体细胞,胞内大于两个荧光点。蓝色为 DAPI 细胞核染色,所有有核细胞均为阳性。细胞无绿色信号,有橙色亮点,符合 DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CEP8<sup>+</sup>(多倍体)CTCs 判定标准,见图 1。

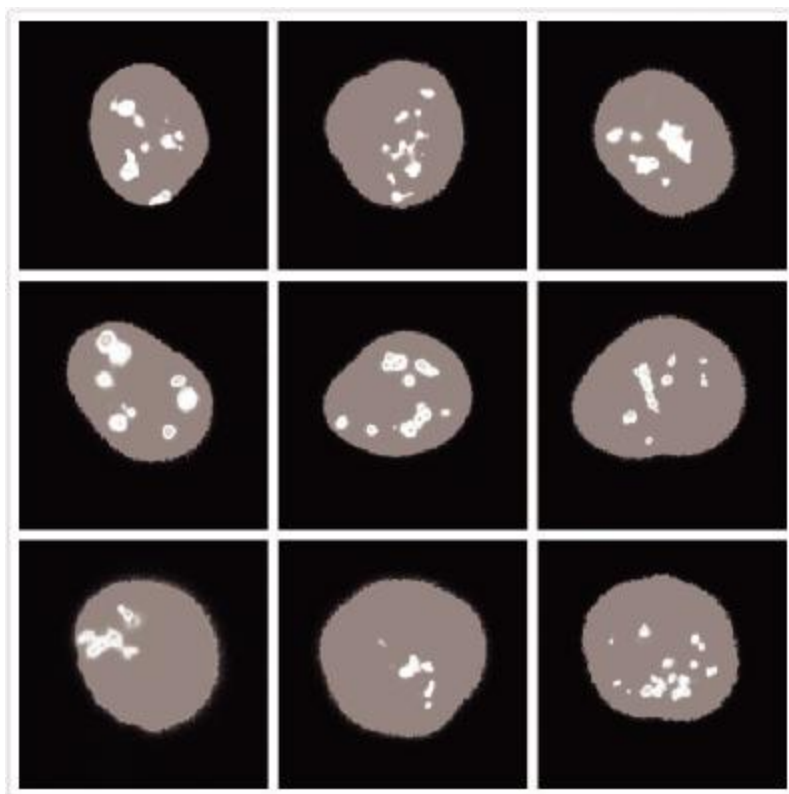


图 1 SE-iFISH 对患者 CTCs 的鉴定

1.6 观察指标 所有患者每月电话随访1次,每隔3个月门诊随访1次,每隔6个月复查1次腹部和盆腔CT。对患者性别、年龄、浸润程度、病理分级、肿瘤分期、多样性进行分析。

1.7 统计学方法 用SPSS 25.0软件进行统计分析,用Graph Pad Prism 8.0软件绘制统计图。计数资料以(n,%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验;计量资料采用[M(P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]表示,行非参数检验;ROC曲线分析CTCs诊断膀胱癌的临界值,并计算其灵敏度、特异度、约登指数。P<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 术前CTCs在膀胱癌诊断中的作用 使用ROC曲线判定区分膀胱癌组与对照组的临界值,临界值为1个CTCs时,AUC面积和约登指数最大(AUC=0.951; Youden index =0.868),相应的灵敏度为91.30%,特异度为95.50%,假阳性率为4.50%,假阴性率为8.70%,准确性91.30%。因此,确立CTCs=1个/7.5 ml为诊断膀胱癌的临界值,术前膀胱癌患者外周血中CTC的阳性率(CTC≥1个/7.5ml)为91.30%,对照组外周血中CTC的阳性率4.50%,差异有统计学意义(P<0.05),见图2。

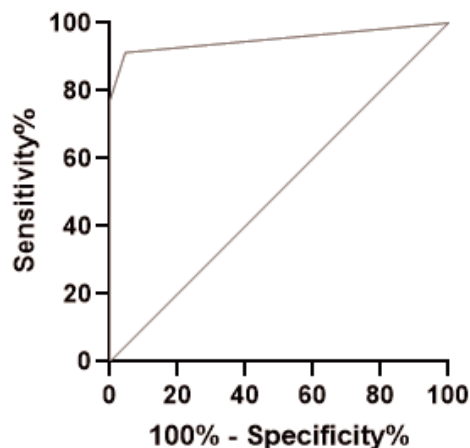


图2 CTCs对膀胱癌诊断的敏感性

2.2 CTCs与膀胱癌患者临床特征的关系 92例膀胱癌患者检测出CTCs共计515个,CTCs范围0~20个/7.5ml,中位数为4个/7.5ml。不同浸润程度、病理分级的膀胱癌患者CTCs阳性率比较,差异有统计学意义(P<0.05);不同年龄、性别、肿瘤分期、多样性的膀胱癌患者CTCs阳性率比较,差异无统计学意义(P>0.05),见表1。

表1 CTCs与膀胱癌患者临床特征的关系(n)

临床特征	术前	术前 CTC 阳性例数	$\chi^2$	P	术后	术后 CTC 阳性例数	$\chi^2$	P
性别			0.259	0.611*			0.988	0.320*
男	70	65			45	42		
女	22	19			15	12		
年龄(岁)			2.074	0.150*			1.128	0.288*
<64	41	35			23	19		
≥64	51	49			37	35		
浸润肌层			5.418	0.020*			8.022	0.005*
无	39	32			23	17		
有	53	52			37	37		
病理分级			5.208	0.022*			5.785	0.016*
低级别	30	24			19	14		
高级别	62	60			41	40		
肿瘤分期			0.000	0.987*			0.072	0.789*
T <sub>1</sub> +T <sub>2</sub>	40	36			22	19		
T <sub>3</sub> +T <sub>4</sub>	52	48			38	35		
多样性			0.582	0.446*			0.611	0.434*
孤立性	52	49			34	32		
多发性	40	35			26	22		

注:\*表示连续校正

## 3 讨论

CTCs主要由原发灶或转移灶自发脱落或因手术操作释放进入外周血中<sup>[9]</sup>,在肿瘤细胞改变细胞外基质成分的情况下,促使肿瘤细胞进入血管内<sup>[10]</sup>,形成能提高肿瘤细胞转移能力的CTCs簇,使少量

肿瘤细胞逃避掉失巢凋亡机制存活的肿瘤细胞<sup>[11]</sup>,从而导致肿瘤的复发及转移。CTCs在健康人中很少检测到,不过却可以在大多数实体肿瘤患者的外周血液中检测到CTCs<sup>[12]</sup>。因此,针对血液微转移以及膀胱癌转移的患者,可从循环系统中检测CTCs直

接证明患者存在血液微转移和肿瘤膀胱外转移,进而辅助临床的诊断和治疗<sup>[13,14]</sup>。目前已有多位学者证实 CTCs 可以用于结直肠癌、前列腺癌的疗效监测和预后评价<sup>[15]</sup>,且采用 SE-iFISH 技术检测膀胱癌 CTCs 的研究较少。因此,本研究利用 SE-iFISH 技术检测检测膀胱癌患者外周血中的含量,探究 CTCs 阳性率与膀胱癌患者临床特征的相关性,分析其在诊疗方面的应用价值。

本研究显示,试验组 CTCs 阳性率为 91.30%,高于 CellSearch 系统 CTCs 的 4.90%~47.50%<sup>[16,17]</sup>,与其他同样采用 SE-iFISH 系统检测 CTCs 阳性率的研究结果基本一致<sup>[18,19]</sup>,进一步证实了 SE-iFISH 检测系统优于 CellSearch 检测系统。本研究结果显示,CTCs 的阳性率与浸润程度和病理分级有相关性,与患者的性别、年龄、肿瘤分期、多样性、淋巴结转移均无关,原因可能有以下两点:①临床医师对肿瘤的分期和分级具有一定程度的主观性;②本研究采用的检测技术和肿瘤分组不同有关,有研究采用的流式细胞术是利用荧光标记相应抗体检测 CTCs,该法敏感度较低<sup>[20]</sup>,只能间接反映肿瘤患者外周血液 CTCs 的含量,而本研究采用的 SE-iFISH 检测系统是将免疫荧光染色法与原位荧光杂交法结合,可直接检测肿瘤患者外周血的 CTCs 含量。

本研究还存在一定的局限性:样本量较少,随访时间较短,未能对膀胱癌患者进行生存分析。后期计划进一步加大样本量,动态监测,延长随访时间,探究 CTCs 与膀胱癌患者预后的关系。

综上所述,CTCs 检测相较于传统的组织学检测具有相对无创,且重复性好以及节省时间和成本的优点,有利于对患者的诊疗及预后情况观察。CTCs 有望成为膀胱癌患者治疗效果的观察指标,检测 CTCs 能够对膀胱癌的治疗效果起到较为准确的预测作用。

#### 参考文献:

- [1]Torre LA,Bray F,Siegel RL,et al.Global cancer statistics,2012[J].CA Cancer J Clin,2015,65(2):87-108.
- [2]贺宇彤,李道娟,梁迪,等.2014 年中国膀胱癌发病和死亡分析[J].中华肿瘤杂志,2018,40(9):647-652.
- [3]De Velasco G,Wankowicz SA,Madison R,et al.Targeted genomic landscape of metastases compared to primary tumours in clear cell metastatic renal cell carcinoma[J].Br J Cancer,2018,118(9):1238-1242.
- [4]Dhar M,Pao E,Renier C,et al.Label-free enumeration, collection and downstream cytological and cytogenetic analysis of circulating tumor cells[J].Sci Rep,2016(6):35474.
- [5]Kulemann B,Rosch S,Seifert S,et al.Pancreatic cancer:Circulating Tumor Cells and Primary Tumors show Heterogeneous KRAS Mutations[J].Sci Rep,2017,7(1):4510.
- [6]Whitworth J,Smith PS,Martin JE,et al.Comprehensive Cancer-

Predisposition Gene Testing in an Adult Multiple Primary Tumor Series Shows a Broad Range of Deleterious Variants and Atypical Tumor Phenotypes[J].Am J Hum Genet,2018,103(1):3-18.

[7]Langlands F,Cornford E,Rakha E,et al.Imaging overview of metaplastic carcinomas of the breast:a large study of 71 cases[J].Br J Radiol,2016,89(1064):20140644.

[8]Hashimoto M,Tanaka F,Yoneda K,et al.The clinical value of circulating tumour cells (CTCs)in patients undergoing pulmonary metastasectomy for metastatic colorectal cancer [J].J Thorac Dis,2018,10(3):1569-1577.

[9]Li Z,Zhang X,Jiang X,et al.Outcome of surgical resection for brain metastases and radical treatment of the primary tumor in Chinese non-small-cell lung cancer patients [J].Onco Targets Ther,2015(8):855-860.

[10]Wang XX,Levi J,Luo Y,et al.SGLT2 Protein Expression Is Increased in Human Diabetic Nephropathy:SglT2 Protein Inhibition Decreases Renal Lipid Accumulation,Inflammation,And The Development Of Nephropathy In Diabetic Mice [J].J Biol Chem,2017,292(13):5335-5348.

[11]Giuliano M,Shaikh A,Lo HC,et al.Perspective on Circulating Tumor Cell Clusters:Why It Takes a Village to Metastasize [J].Cancer Res,2018,78(4):845-852.

[12]Bergmann S,Coyne A,Ott L,et al.Evaluation of PD-L1 expression on circulating tumor cells (CTCs)in patients with advanced urothelial carcinoma (UC) [J].Oncoimmunology,2020,9(1):1738798.

[13]Chou R,Gore JL,Buckley D,et al.Urinary Biomarkers for Diagnosis of Bladder Cancer:A Systematic Review and Meta-analysis[J].Ann Intern Med,2015,163(12):922-931.

[14]Micalizzi DS,Maheswaran S,Haber DA.A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology [J].Genes Dev,2017,31(18):1827-1840.

[15]Thalgott M,Rack B,Horn T,et al.Detection of Circulating Tumor Cells in Locally Advanced High-risk Prostate Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Prostatectomy [J].Anticancer Res,2015,35(10):5679-5685.

[16]Bork U,Rahbari NN,Scholch S,et al.Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer:a prospective study[J].Br J Cancer,2015,112(8):1306-1313.

[17]Sotelo MJ,Sastre J,Maestro ML,et al.Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer[J].Ann Oncol,2015,26(3):535-541.

[18]Zhang J,Shi H,Jiang T,et al.Circulating tumor cells with karyotyping as a novel biomarker for diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma[J].BMC Cancer,2018,18(1):1133.

[19]张浩强,李明辉,王臻,等.免疫荧光联合原位杂交技术检测骨肉瘤患者外周血中循环肿瘤细胞的表达及临床意义 [J].中华肿瘤杂志,2017,39(7):485-489.

[20]许扬梅,刘巧珍,刘沁颖,等.流式细胞术检测结直肠癌根治术前后循环肿瘤细胞和循环肿瘤干细胞及其临床预测价值 [J].中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(4):355-361.

收稿日期:2020-10-21;修回日期:2020-11-09

编辑/成森