



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.025
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.025
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(9):1333-1337.

· 简要论著 ·

分化型甲状腺癌围手术期循环血微转移相关因素分析

刘勤江, 马世红, 田尤新

(甘肃省肿瘤医院 头颈外科, 甘肃 兰州 730050)

摘要

目的: 探讨分化型甲状腺癌围手术期循环血微转移存在状况及影响因素。

方法: 采用流式细胞术 (FCM) 对 327 例手术治疗的分化型甲状腺癌, 围手术期检测外周血微转移并对其进行相关因素分析。

结果: 分化型甲状腺癌术前循环血微转移阳性 93 例 (28.4%), 其中 74 例 (74/93) 术后 1 周持续阳性、35 例 (35/74) 术后 4 周仍呈阳性。循环血微转移在术前及术后 1 周阳性率与肿瘤大小、淋巴结分期有关 ($P < 0.05$), 与病理分化程度无明显关系 ($P > 0.05$); 在术后 4 周时微转移阳性率仅与肿瘤的病理分化程度有关 ($P < 0.05$)。在术前微转移阴性者中, 有 34 例 (17.3%) 术后 1 周转呈阳性, 其阳性率仅与肿瘤大小有关 ($P < 0.001$)。

结论: 分化型甲状腺癌循环血微转移与肿瘤大小、淋巴结分期及手术刺激密切相关, 肿瘤分化程度是循环血微转移阳性持续存在的主要因素。

关键词

甲状腺肿瘤; 肿瘤转移; 流式细胞术; 循环肿瘤细胞

中图分类号: R736.1

分化型甲状腺癌 (differentiated thyroid cancer, DTC) 包括甲状腺乳头状癌和滤泡状癌,

基金项目: 甘肃省中医药科研立项课题资助项目 (GZK-2010-Z9)。

收稿日期: 2014-11-14; **修订日期:** 2015-06-11。

作者简介: 刘勤江, 甘肃省肿瘤医院主任医师, 主要从事头颈肿瘤方面的研究。

通信作者: 刘勤江, Email: liuqj99@126.com

约占甲状腺癌90%左右, 通常发展缓慢、恶性程度低, 10年存活率可达85%以上。但是如果发生转移则预后会明显受到影响^[1-2]。目前尚无有效的生物学指标用来检测和评估甲状腺癌的早期复发, Tg和TgAb对监测全甲状腺切除术后的复发和转移有一定意义, 但对于甲状腺未全切除的病例诊断价值较小^[3]。为此, 笔者采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 对手术治疗的327例分化型甲状

转移研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(3):222-224.

[16] Wang J, Yu JC, Kang WM, et al. The predictive effect of cadherin-17 on lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(5):1529-1534.

[17] Yu JW, Wu JG, Tajima Y, et al. Study on lymph node metastasis correlated to lymphangiogenesis, lymphatic vessel invasion, and lymph node micrometastasis in gastric cancer[J]. J Surg Res, 2011, 168(2):188-196.

[18] Cao L, Hu X, Zhang Y, et al. Adverse prognosis of clustered-cell versus single-cell micrometastases in pN0 early gastric cancer[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(1):53-56.

[19] Li Y, Du P, Zhou Y, et al. Lymph node micrometastases is a poor prognostic factor for patients in pN0 gastric cancer: a meta-analysis of observational studies[J]. J Surg Res, 2014, 191(2):413-422.

[20] 吴泽宇, 詹文华, 李靖华, 等. 淋巴结微转移检测对胃癌病理分期的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2006, 9(3):217-220.

[21] Jeuck TL, Wittekind C. Gastric carcinoma: stage migration by immunohistochemically detected lymph node micrometastases[J]. Gastric Cancer, 2015, 18(1):100-108.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 王海磊, 冯美燕, 刘春晓, 等. pT_{1-4a}N₀M₀胃癌淋巴结微转移检测的临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(9):1329-1333. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.024

Cite this article as: WANG HL, FENG MY, LIU CX, et al. Clinical significance of lymph node micrometastasis in patients with pT_{1-4a}N₀M₀ gastric cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(9):1329-1333. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.024

腺癌手术前后循环血微转移进行了检测和分析,旨在探讨分化型甲状腺癌围手术期循环血微转移存在状况及影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2008年2月—2013年9月甘肃省肿瘤医院头颈外科手术治疗的分化型甲状腺癌327例,男76例,女251例;年龄14~72岁,中位年龄38.7岁。所有患者均经病理确诊,按统一标准进行诊断及治疗^[4]。患者采样前未接受化疗、放射治疗及核素治疗,并知情同意。所有患者随访0.5~6年,中位随访时间3.6年。

1.2 临床及病理特征

分化型甲状腺癌327例,肿瘤最大径 ≤ 2 cm者86例,2~4 cm者178例,>4 cm者63例。全部患者按照统一标准进行常见病理亚型分类^[5]。高分化型248例,包括普通乳头状癌106例,普通滤泡状癌32例,乳头状微癌67例,乳头状癌滤泡亚型43例;中间分化型79例,包括高细胞型变异46例,柱状细胞型变异4例,弥漫性硬化性变异2例,岛状细胞癌5例,Hurthle细胞癌22例。淋巴结分期为N₀ 126例,N₁ 201例。全部患者手术均无肿瘤组织残留。

1.3 主要设备及试剂

FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司)。Anti-CK19/FITC及相应的阴性对照IgG1-FITC(美国eBioscience公司),CD45-PerCP-Cy5.5荧光单克隆抗体、破膜剂(No.641776)及FACS溶血素(No.349202)(美国BD Biosciences公司),FACS溶血素(No.349202)使用前用无离子水1:10稀释。Muc1/CD227抗体(美国Abcam公司)。

1.4 标本采集

空腹静脉采血5 mL,用10% EDTA-Na₂抗凝,样本采集后24 h内检测,所有样本均由专人采集,并获得受检者的知情同意。采集时间分别在患者手术前1 d、手术中、术后1周及术后4周。

1.5 抗体标记

Anti-CK19:取抗凝全血500 μ L分别加入对照管和测定管,每管加10 μ L CD45-PerCP抗体,置室温暗处15 min,加入破膜剂A100 μ L,室温暗处放置10 min,加入1:10溶血剂5 mL,放置5 min,800 xg离心5 min,弃上清,阳性管加入破膜剂2及

CK19,对照管加破膜剂2及阴性对照,置室温放置暗处25 min后加入1 mL PBS洗涤1遍,弃上清,再加入1 mL PBS液上机检测。

MUC1/CD227:测定管加10 μ L MUC1/CD227抗体及10 μ L CD45-PerCP抗体,对照管加入10 μ L CD45-PerCP抗体,取抗凝全血500 μ L分别加入对照管和测定管,置室温暗处15 min,加入1:10 FACS溶血素5 mL,放置5 min,800 xg离心5 min,弃上清,加入PBS液1 mL洗涤后,再加入1 mL PBS液上机检测。

1.6 流式细胞仪检测

应用FACS Calibur流式细胞仪,激发光源为15 mW氩离子激光器,输出功率300 uw,激发波长为488 nm。设置前向角散射(forward scatter, FSC)和侧向角散射(side scate, SSC)来排除样品中的各种碎片和溶液中的小颗粒,以避免对被测细胞的干扰。试验管和对照管的实验数据采集使用单参数直方图,横坐标为对数形式表达的荧光强度相对值,单位为道数,纵坐标表示细胞出现的频率,既相对细胞数。

1.7 统计学处理

所有数据通过SPSS 17.0 软件进行统计分析,两组数据比较采用Fisher's精确概率检验或 χ^2 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分化型甲状腺癌术前循环血微转移与临床病理特征的关系

本研究剔除分化型甲状腺癌循环血CK19或MUC1单项阳性的病例,对CK19及MUC1两项同时阳性表达者,确定为循环血微转移阳性病例。手术治疗前的分化型甲状腺癌327例中循环血微转移阳性93例(28.4%)。循环血微转移与肿瘤大小及淋巴结分期有关($\chi^2 = 7.13, 3.88, P = 0.028, 0.048$)、与肿瘤分化程度无明显关系($\chi^2 = 3.47, P = 0.062$)(表1)。

2.2 分化型甲状腺癌手术前后循环血微转移比较

分化型甲状腺癌术前1天循环血微转移阳性93例(28.4%),其中74例(79.6%)手术后1周持续阳性,15例(16%)转阴性,另4例术后未检测。术后1周持续阳性者与肿瘤大小及淋巴结分期均有关($\chi^2 = 13.43, 12.23, P = 0.001, 0.000$)、与肿瘤分化程度无关($\chi^2 = 0.61, P = 0.435$)(表2)。

在手术后1周循环血微转移持续阳性的74例中,术后4周仍呈阳性者35例(35/74),另39例(39/74)转阴性。手术后1周检测阴性患者术后4周检测,无1例阳性。

在手术前1天循环血微转移阴性的234例中,手术后1周检测了197例,阳性34例(17.3%),该34例术后4周检测无1例阳性。微转移术前阴性术后1周阳性者与肿瘤大小有关($\chi^2=23.54$, $P=0.000$),与淋巴结分期及肿瘤分化程度无关($\chi^2=1.78, 1.43, P=0.182, 0.231$)(表3)。手术中随机采血样本23例,循环血微转移阳性11例(47.8%)。

2.3 分化型甲状腺癌术后4周循环血微转移与临床病理特征的关系

分化型甲状腺癌术后4周检测174例,循环血微转移阳性35例(20.1%),该35例系术前及术后1周持续阳性且术后4周仍呈阳性者。其阳性与肿瘤大小及淋巴结分期无关($\chi^2=3.45, 1.82, P=0.178, 0.177$),与肿瘤分化程度有关($\chi^2=5.62, P=0.016$)(表4)。

表1 分化型甲状腺癌术前循环血微转移与临床病理特征的关系

病理项目	手术前		χ^2	P
	n	微转移(+)		
肿瘤最大径(cm)				
≤ 2	86	17	7.13	0.028
2~4	178	51		
> 4	63	25		
淋巴结分期				
N ₀	126	28	3.88	0.048
N ₁	201	65		
病理亚型分类				
高分化型	248	64	3.47	0.062
中间分化型	79	29		

表2 循环血微转移术前阳性术后1周持续阳性者与临床特征关系

病理项目	n	持续阳性	χ^2	P
肿瘤最大径(cm)				
≤ 2	17	9	13.43	0.001
2~4	48	43		
> 4	24	22		
淋巴结分期				
N ₀	26	16	12.23	0.000
N ₁	63	58		
病理亚型分类				
高分化型	61	52	0.61	0.435
中间分化型	28	22		

注:术前阳性者中有4例患者术后未检测(n=89)

表3 循环血微转移术前阴性术后1周阳性者与临床特征关系

病理项目	n	阳性	χ^2	P
肿瘤最大径(cm)				
≤ 2	58	2	23.54	0.000
2~4	107	18		
> 4	32	14		
淋巴结分期				
N ₀	84	11	1.78	0.182
N ₁	113	23		
病理亚型分类				
高分化型	154	24	1.43	0.231
中间分化型	43	10		

注:术前阴性者中有37例患者术后未检测(n=197)

表4 分化型甲状腺癌循环血微转移与临床病理特征的关系

病理项目	术后4周		P
	n	微转移(+)	
肿瘤最大径(cm)			
≤ 2	41	7	0.178
2~4	98	17	
> 4	35	11	
淋巴结分期			
N ₀	67	10	0.177
N ₁	107	25	
病理亚型分类			
高分化型	131	21	0.016
中间分化型	43	14	

2.4 随访结果

分化型甲状腺癌327例中完成随访152例,其中发生肺转移3例,骨转移1例。颈部复发2例,无死亡病例。

3 讨论

自1869年Ashworth在外周血中发现癌细胞以来,肿瘤微转移的概念便在临床中建立起来,并逐渐成为研究热点之一^[6-8]。血行转移是恶性肿瘤转移的主要途径之一,如果能在亚临床阶段检测到外周血微转移,则对肿瘤的分期、治疗和预后具有重要意义。甲状腺癌的远处转移是其重要的生物学行为,也是导致患者死亡的主要原因^[9-10]。循环血是肿瘤细胞发生远处转移的必经途径,但是,由于肿瘤转移过程机制复杂,影响因素众多,不少方面尚有争议^[11-12]。在肿瘤生长的早期阶段,隐匿性癌细胞即可通过血循环或淋巴途径扩散,而这一现象往往被现今的临床和病理分期手段所忽略。同时,目前仍然不清楚甲状腺癌发生、发展

和浸润转移的具体分子机制,如果在早期能找到其浸润转移的指标,对于指导治疗、提高术后生存率有重要的意义。细胞角蛋白19(cytokeratin 19, CK19)是一种低分子量角蛋白。它是上皮细胞骨架的一部分,只表达于上皮细胞和上皮源肿瘤细胞,是上皮来源的肿瘤微转移检测的特异性标志^[13-14]。多态性上皮黏蛋白1(polymorphic epithelial mucin, MUC1)是一种高分子量蛋白,在人体内主要存在于上皮组织,具有调节细胞间相互作用,介导细胞间的信号转导和细胞黏附功能并参与机体免疫调节等。MUC1异常表达常提示肿瘤侵袭转移,同时,MUC1抑制了肿瘤细胞之间的黏附,使肿瘤细胞的侵袭性增强^[15-16]。正常血液中不存在上皮来源的细胞,因此外周血CK19和MUC1出现表达,则可以作为甲状腺癌循环血游离肿瘤细胞的标志。

外周循环血肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)的存在与远处转移灶形成的关系目前尚不明了。普遍认为循环血中的游离肿瘤细胞很少生存下来并发展成为远处转移灶,但若患者术后外周血中持续性地存在癌细胞,则这部分患者可能属于远处转移的高危人群,发生远处器官转移的可能性大^[12, 17]。也有学者^[6, 11]认为CTC是发生远处转移的前提和基础,对疾病早期诊断预后及疗效实时监测都具有重要意义。本文分化型甲状腺癌手术前循环血微转移阳性93例(28.4%),其中15例(16.0%)术后1周转阴性。手术前循环血微转移与肿瘤大小、淋巴结分期有关($P<0.05$)。在肿瘤直径超过4 cm的甲状腺癌63例中,微转移阳性25例(39.7%),随着瘤体的增大,其肿瘤负荷增大、肿瘤内部压力增加,以及肿瘤细胞固有的转移倾向等因素,致使肿瘤细胞向外溢出进入外周血。理论上手术前外周血中的肿瘤细胞与肿瘤负荷及肿瘤细胞的生物学特性等因素有关,手术后肿瘤负荷减少,肿瘤细胞来源的消失及免疫功能的作用,外周血的肿瘤细胞自然会减少。但是,手术刺激可以导致肿瘤细胞从瘤体脱落进入外周血循环,这也是造成循环血游离肿瘤细胞存在的一个重要因素。这种由于手术刺激而导致的循环血游离肿瘤细胞,多数在短期内被机体免疫系统所消灭,如果存在机体免疫系统功能低

下,则增加了远处转移的危险。本研究结果显示在术前循环血微转移阴性的234例中,手术后1周检测了197例,阳性34例(17.3%),术后4周时全部转为阴性。该34例属于术前阴性、术后1周转阳性者,其与肿瘤大小有关($\chi^2=23.54$, $P=0.000$)、与淋巴结分期及肿瘤分化程度均无关($\chi^2=1.78, 1.43, P=0.182, 0.231$)。这种手术前循环血微转移阴性而手术后转为阳性者,可能与手术中对肿瘤的牵拉挤压促使原发灶肿瘤细胞脱落,通过血管和淋巴管进入体循环有关。瘤体越大、手术操作难度越大,手术对机体的干扰也随之增加,其导致进入循环血的肿瘤细胞就越多,这种现象与临床实际相符。个别情况下在手术中肿瘤组织或被肿瘤转移的淋巴结出现包膜浸润、破碎等情况,致使肿瘤细胞可能经破损组织断面进入血循环。本文手术中随机采样23例,循环血微转移阳性11例(47.8%),说明手术操作可以促使肿瘤细胞进入外周血中,增加了术后转移灶的发生。因此手术过程应该采取预防措施减少癌细胞的扩散,强化并遵循无瘤操作技术,尽量减少对瘤体的牵拉挤压。清除各组淋巴结时,尽量保持每一枚淋巴结的完整性,瘤体组织破损断面尽量缝扎完好,最大限度的减少围手术期医源性癌细胞扩散的可能^[18]。

本研究结果显示,分化型甲状腺癌手术后4周时仍然有20.2%(35/174)患者循环血微转移阳性,该35例系术前阳性、术后1周持续阳性且术后4周仍呈阳性者。这部分患者在手术切除肿瘤后肿瘤细胞来源的消失的情况下,外周血持续存在游离肿瘤细胞,该组患者更具转移的危险性。同时,手术后4周时循环血微转移持续阳性者仅与肿瘤分化程度有关($P=0.016$),与肿瘤大小、淋巴结分期的差异均无关($P>0.05$)。笔者认为,可能是手术切除了肿瘤并清除淋巴结,同时机体自身免疫调节的作用,使得对手术刺激、瘤体大小和淋巴结转移所造成循环血肿瘤细胞的影响,已经基本消除。而病理亚型中分化程度相对差的肿瘤细胞增值快、侵袭及转移能力强,外周血循环扩散的机会较大,靠机体自身免疫能力很难消除,此类患者容易最后形成远处脏器转移灶。本组随访中有2例术后发生双肺转移、1例发生骨转移,该3例中,2例肺转移患者术前、术后1周及

术后4周循环血微转移持续阳性,另1例骨转移患者在术前及术后1周循环血微转移持续阳性,术后4周转阴性。因此,循环血微转移是远处转移病灶形成的重要前提和基础,早期检测循环血微转移并动态监测变化,对指导临床准确判断患者预后和病情变化具有重要意义。

分化型甲状腺癌提倡实行个体化的治疗原则^[19]。对于存在循环血微转移者,单独手术治疗无法达到根治,这一点应给予重视。外周血游离肿瘤细胞的存在形式以及详细的分子生物学及其功能分析,有利于对肿瘤转移的更深入了解。循环血微转移作为肿瘤转移的早期参考指标,对指导治疗、估计预后及有效抑制肿瘤转移有重要意义。根据循环血游离肿瘤细胞存在的水平和基因表型改变,结合患者的具体情况选择适宜的辅助治疗,对提高治愈率和生存率有重要价值。

参考文献

- [1] Caminha LS, Momesso DP, Vaisman F, et al. Long-term follow-up of patients with differentiated thyroid cancer who had negative 131I whole-body scan at first evaluation after treatment[J]. Clin Nucl Med, 2013, 38(10):765-769.
- [2] Huang IC, Chou FF, Liu RT, et al. Long-term outcomes of distant metastasis from differentiated thyroid carcinoma[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2012, 76(3):439-447.
- [3] 曾繁余, 张显岚. 分化型甲状腺癌诊治现状及后指南时代的展望[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(5):638-642.
- [4] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 第3版. 上海:复旦大学出版社, 2011:1370-1383.
- [5] 纪小龙, 吉米. 甲状腺病理诊断[M]. 北京:人民军医出版社, 2011:183-256.
- [6] Cristofanilli M, Braun S. Circulating tumor cells revisited[J]. JAMA, 2010, 303(11):1092-1093.
- [7] Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2014, 51(3):160-171.
- [8] Yoon HJ, Kozminsky M, Nagrath S. Emerging role of nanomaterials in circulating tumor cell isolation and analysis[J]. ACS Nano, 2014, 8(3):1995-2017.
- [9] Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, et al. A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up[J]. Surgery, 2013, 154(6):1436-1446.
- [10] Shaha AR. Recurrent differentiated thyroid cancer[J]. Endocr Pract, 2012, 18(4):600-603.
- [11] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024):1559-1564.
- [12] Akagi Y, Kinugasa T, Adachi Y, et al. Prognostic significance of isolated tumor cells in patients with colorectal cancer in recent 10-year studies[J]. Mol Clin Oncol, 2013, 1(4):582-592.
- [13] Strati A, Kasimir-Bauer S, Markou A, et al. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(2):R20.
- [14] 曾晶, 陈东妮, 徐进. 角蛋白与肿瘤[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(5):485-492.
- [15] Yin L, Kufe T, Avigan D, et al. Targeting MUC1-C is synergistic with bortezomib in downregulating TIGAR and inducing ROS-mediated myeloma cell death[J]. Blood, 2014, 123(19):2997-3006.
- [16] Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression[J]. Trends Mol Med, 2014, 20(6):332-342.
- [17] Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells[J]. Cancers (Basel), 2014, 6(1):595-624.
- [18] 郎桂清, 刘晓红. 无瘤技术在肿瘤手术中的实施与管理[J]. 中国卫生标准管理, 2014, 5(13):30-31.
- [19] 李铎伟, 车向明, 刘俊松, 等. 分化型甲状腺癌手术方式选择的Meta分析[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(5):526-531.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 刘勤江, 马世红, 田尤新. 分化型甲状腺癌围手术期循环血微转移相关因素分析[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(9):1333-1337. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.025

Cite this article as: LIU QJ, MA SH, TIAN YX, et al. The related factor analysis on circulating blood micrometastasis in differentiated thyroid cancer patients during perioperative period[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(9):1333-1337. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.025