

循环肿瘤细胞与其多巴胺受体 1 表达联合检测在乳腺癌疗效监控中的应用研究

徐彬¹ 杨清峰² 赵小玉³ 余元勋¹ 李建平¹ 刘萍¹ 冷雪峰³ 王迎新¹

摘要 目的 研究乳腺癌患者外周血中的循环肿瘤细胞 (CTCs) 和其多巴胺受体 1 (DRD1) 的表达水平对乳腺癌进展、疗效监控的影响。方法 对 20 例健康对照者和 20 例未治疗的乳腺癌患者,采集其外周血,通过差相富集-免疫荧光原位杂交技术 (SE-iFISH) 及荧光定量 PCR 技术 (Q-PCR) 检测 CTCs、CTCs DRD1 的表达水平。之后在 20 例患者中,选择 6 例进行手术的乳腺癌患者,并在术后 3、6 个月,采集外周血,检测 CTCs 和 CTCs DRD1 的表达水平,并分析其与疾病进展的关系。结果 20 例健康对照者外周血中均未检测出 CTCs; 20 例未治疗的乳腺癌患者检出 CTCs 18 例 (90.0%), 有较高的灵敏度和特异度。3 例 T2 期乳腺癌患者术后 3、6 个月时均未出现复发和转移, CTCs 和 CTC DRD1 的水平呈现下降趋势。3 例 T3 期乳腺癌患者术后 3、6 个月时出现了复发和转移, CTCs 和 CTCs DRD1 的水平呈现升高趋势。结论 在 CTCs 高检出率和 CTCs DRD1 高表达的乳腺癌患者,随访常会提示预后不良; 相反,在 CTCs 低检出率和 CTCs DRD1 低表达的患者中,随访提示疾病控制佳、预后较好。因此,无创的 CTCs 和 CTCs DRD1 检测,在乳腺癌疗效监控中,可能有较高的临床应用价值。

关键词 循环肿瘤细胞; 多巴胺受体 1; 乳腺癌; 疗效评估
中图分类号 R 73.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0597-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.022

在全球,乳腺癌是女性恶性肿瘤中发病率与死亡数最高的肿瘤,每年乳腺癌新发病例约 167.1 万,死亡病例约 52.2 万^[1]; 中国乳腺癌发生率占全球发病例数和死亡例数的 11.2% 和 9.2%, 乳腺癌的复发率、转移率较高^[2]。近年来分子生物液体活检在乳腺癌筛查、监测、转移、复发预测中有较大进展,循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 是目前生

物液体活检中应用较多的疗效监控的肿瘤检测指标,检测 CTCs 有其无创性、可重复性、时效性的特点^[3]。CTCs 检测技术常用的 Cell Search 系统,已被美国 FDA 批准可应用于临床检测,计数 CTCs 作为监测转移性乳腺癌无进展生存期和总生存期的预后生物标志物^[4],但单一标志物容易造成部分 CTCs 会被漏检^[5],故联合其他标志物,是提高 CTCs 检测的敏感度、特异度的重要方法。血液中的乳腺癌 CTCs 能表达 5 种多巴胺受体 (dopamine receptor, DR) (DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DRD5)^[6]等,但在正常造血干细胞不表达; DR 有可能成为检测血中 CTCs 的生物标志物。已有学者正在研发 DR 调节剂,以进行乳腺癌治疗试验^[7]。

现在经常用差相富集-免疫荧光原位杂交技术 (subtraction enrichment and immunostaining fluorescence in situ hybridization, SE-iFISH) 检测 CTCs,同时联合荧光定量 PCR 技术 (fluorescent quantitative PCR, Q-PCR) 检测 CTC 多巴胺受体表达水平,探索其在乳腺癌监测、转移、复发预测中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 样本随机选取自 2018 年 4 月~2019 年 5 月安徽省妇幼保健院就诊患者,均为安徽汉族人,共计 40 例; SE-iFISH 测试组包括: ① 20 例健康体检女性,年龄 41~55 (48.7±6.16) 岁; ② 20 例为治疗前乳腺癌女性,均未接受相关治疗,年龄 48~69 (55.6±8.21) 岁。另在 20 例治疗前乳腺癌女性中选取 6 例乳腺癌患者为术后观察组。参与研究者均签署知情同意书。

对 SE-iFISH 测试组,采集外周血 7.5 ml、ACD 抗凝,应用 SE-iFISH 检测 CTCs,评判检测的灵敏度、特异度。再在术后 3、6 个月对观察组 6 例乳腺癌患者进行外周血采集、SE-iFISH 检测 CTCs、Q-PCR 检测 CTC DRD1。

1.2 SE-iFISH 检测 SE-iFISH 检测 CTCs 的试剂盒,由赛特生物医药科技有限公司提供,具体操作步骤基本如下:

2019-11-25 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2018A0798)

作者单位: ¹ 安徽医学高等专科学校,安徽省优生优育医学遗传中心,合肥 230061

² 安徽省妇幼保健院,合肥 230001

³ 上海宝藤医学检验所有限公司,上海 201204

作者简介: 徐彬,男,副研究员,责任作者, E-mail: 646651372@qq.com

采集 7.5 ml 外周静脉血到 ACD 抗凝管中。2 000 r/min 离心 8 min, 去除血浆; 在离心管中, 加入 3 ml 密度梯度分离液, 离心并去除该分离液上叠加的红细胞。再 1 800 r/min 离心 8 min, 将含白细胞和 CTCs 的液层, 吸到另一离心管中, 加 200 μl 磁珠, 摇床摇动室温孵育 20 min 后, 1 800 r/min 离心 8 min, 去除白细胞和磁珠, CTCs 混合液移到 15 ml 离心管中。加入抗原修复液修复抗原后, 再加入 anti-D45 抗体与 anti-CK18 抗体、抗体稀释液的混合液, 室温避光孵育 20 min, 2 500r/min 离心 5 min, 弃大部分上清液至余下 100 μl, 沉淀细胞后, 加入 100 μl 固定液混匀、涂片, 32 °C 过夜烘干玻片。在玻片进行原位 CEP8 探针杂交。最后滴加 5 μl DAPI 染液封片并于荧光显微镜下观察。

结果判读: CTCs 的表型为: CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺/CEP8⁺ = 2; CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺/CEP8⁺ > 2; CK⁻/CD45⁻/DAPI⁺/CEP8⁺ > 2。

1.3 CTCs DR Q-PCR 检测 采集 7.5 ml 外周静脉血到 ACD 抗凝管中。按照上述步骤去除血浆、红细胞、白细胞后, 将含有 CTCs 的细胞混合液, 通过细胞总 RNA 提取试剂盒 (DP430), 进行 CTCs 的 RNA 抽提, 然后用 Quant one step qRT-PCR Kit (SYBR Green, FP303) 进行 Q-PCR 检测。引物序列见表 1。最后进行数据分析。

表 1 相关引物序列

名称	引物序列(5'-3')
DRD1 F	CTCCGTTTCCAATACATTCCA
R	CACTGTTGATTCTTTGCCCT
DRD2 F	AGCATCGACAGGTACACAG
R	CTCGTTCTGGTCTGCCCT
DRD3 F	GTGGTATACCTGGAGGTGAC
R	GCAGTGTACCTGTCTATGCT
DRD4 F	CCGCTCTTCGCTACTC
R	ACAGGTTGAAGATGGAGG
GAPDH F	CCTGCACCACCAACTGCTTA
R	GGCCATCCACAGTCTTCTGAG

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 使用 Graph Pad Prism V7.0 技术进行图像分析, 计算资料以 $\bar{x} \pm s$ 的方式记录, 用 Fisher 检验方法 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌术后患者 CTCs 计数与临床病理特征的关系 CTCs 的计数与乳腺癌的分子分型有关 (P

= 0.007), 但与患者的年龄、肿瘤分期、组织分级、淋巴结转移、病理类型、ER、PR、HER-2、Ki-67 表达情况无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 20 例乳腺癌术后患者 CTC 计数与临床病理特征的关系 [n(%)]

项目	CTC 阳性 病例	CTC 阴性 病例	Fisher 精 确检验值	P 值
年龄(岁)				1.000
≤50	1(5.56)	0(0.00)		
>50	17(94.44)	2(100.00)		
肿瘤分期			2.054	1.000
T1	1(5.56)	1(50.00)		
T2	9(50.00)	1(50.00)		
T3	7(38.89)	0(0.00)		
T4	1(5.56)	0(0.00)		
组织分级			4.051	0.284
I 级	1(5.56)	1(50.00)		
II 级	16(88.89)	1(50.00)		
III 级	1(5.56)	0(0.00)		
淋巴结转移				1.000
有	4(22.22)	0(0.00)		
无	14(77.78)	2(100.00)		
病理类型				1.000
浸润性导管癌	15(83.33)	2(100.00)		
浸润性小叶癌	3(16.67)	0(0.00)		
ER 状态				1.000
阳性	13(72.22)	2(100.00)		
阴性	5(27.78)	0(0.00)		
PR 状态				0.368
阳性	15(83.33)	1(50.00)		
阴性	3(16.67)	1(50.00)		
HER-2 状态				0.51
阳性	11(61.11)	2(100.00)		
阴性	7(38.89)	0(0.00)		
Ki-67 状态				0.495
≥20%	10(55.56)	2(100.00)		
<20%	8(44.44)	0(0.00)		

2.2 SE-iFISH 在乳腺癌外周血 CTCs 检测中有较高的灵敏度、特异度 结果显示 20 例健康人 CTCs 的检出率为 0。而随机选取的 20 例治疗前乳腺癌患者中, 18 例检出了 CTCs(90.0%), 其平均值为 7.85 CTCs/7.5 ml 外周血(图 1A、B、C)。说明该检测方法灵敏度、特异度较好, 适合本研究应用。

2.3 DRD1 在乳腺癌 CTCs 上的表达量比 DRD2、DRD3 和 DRD4 更高 结果显示 20 例乳腺癌患者 CTCs 细胞的 DRD 平均 CT 值: DRD1 为 21.60、DRD2 为 40.02、DRD3 为 32.62、DRD4 为 41.40, 对照 GAPDH 为 18.68(图 2)。与 DRD2、DRD3 和 DRD4 的反应 CT 值比, DRD1 的反应 CT 值较高, 可能较适合本实验研究。

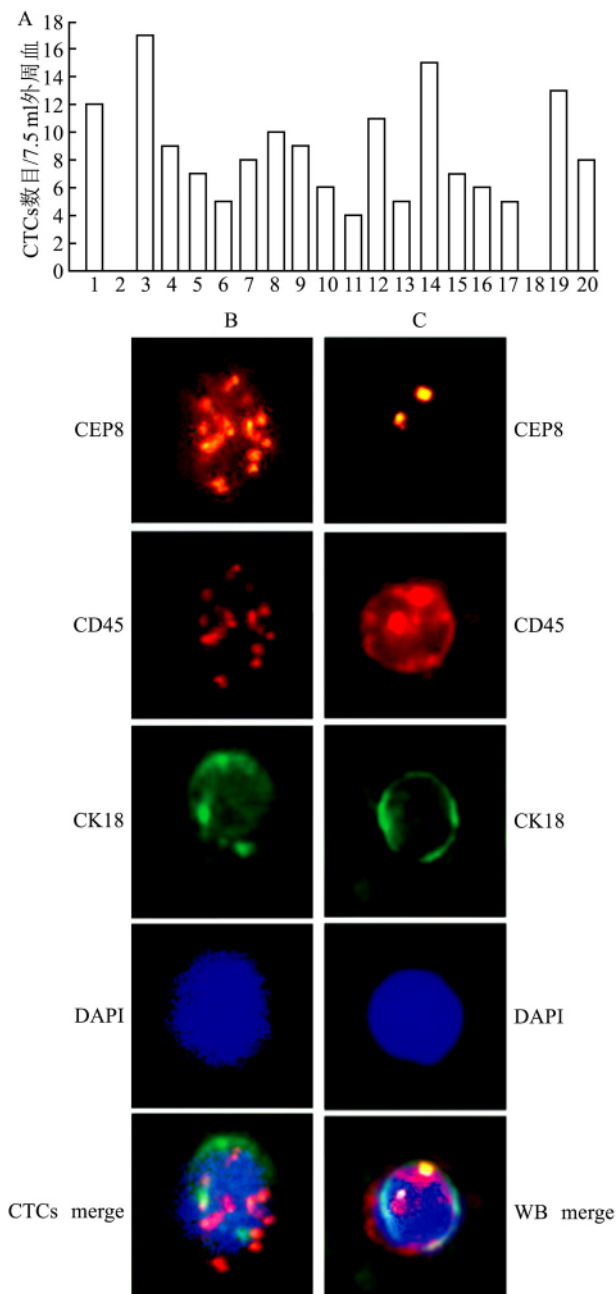


图1 SE-iFISH 检测 CTCs 结果 ×400(merge 即合并图)

A: 20 例治疗前乳腺癌患者 7.5 ml 外周血的 CTCs 检出值; B 图: CTCs 细胞相关标志物检测结果; C: 红细胞相关标志物检测结果; 橙色: CEP8 染色; 红色: CD45 染色; 绿色: CK18 染色; 蓝色: DAPI 染色

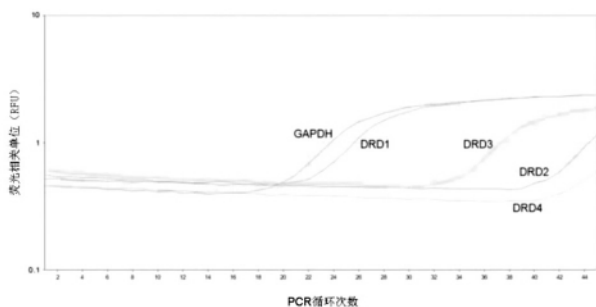


图2 乳腺癌 CTCs 细胞的 DRD1、DRD2、DRD3 和 DRD4 表达量的 Q-PCR 检测

2.4 联合 CTCs、CTC DRD1 表达量检测对乳腺癌监控有较好的效果 为了研究 CTCs 和 CTCs DRD1 表达量在乳腺癌病情进展中的变化,选择 6 例治疗前乳腺癌患者(患者 1、2、6 为 T3 期,患者 3、4、5 为 T2 期)进入术后观察组,进行术后 3、6 个月时的外周血采集、SE-iFISH 检测 CTCs 结果见图 3、Q-PCR 检测 CTCs DRD1 见图 3;同时结合临床 B 超、CT 检查,观察患者乳腺癌疗效、进展情况。

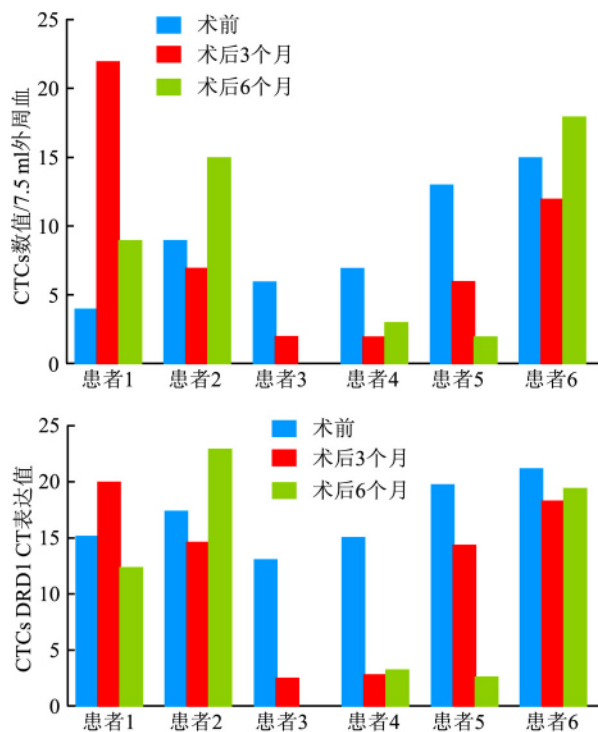


图3 患者 1、2、3、4、5、6 术前、术后 3、6 个月 CTCs 数值和 CTC DRD1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表达值检测统计图

总体看,结果分两类:第一类是 T2 期的患者 3、4、5 的 CTCs 和 CTCs DRD1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 都呈下降趋势(图 4);临床 CT、B 超等的后续监控结果也显示预后良好。第二类是 T3 期的患者 1、2、6 的 CTCs 和 CTCs DRD1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 开始呈下降趋势,后来呈上升趋势(图 4),后续监控发现第二类患者病情预后不良,并发生转移。总体看,两类患者 CTCs 和 CTCs DRD1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 与 T 分期、乳腺癌进展有较好的一致性,可以有效辅助临床监控。

3 讨论

Cell Search 平台检测的 CTCs 数量变化对转移性乳腺癌患者有预后价值,可评估转移复发风险,动态监测疗效,指导个体化用药, Yu et al^[8] 研究发

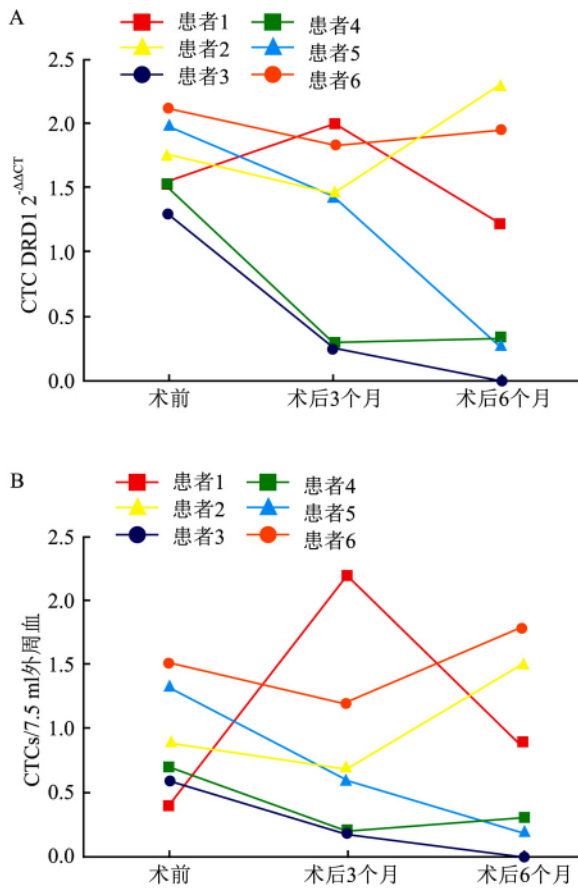


图4 患者1,2,3,4,5,6术前、术后3,6个月CTCs和CTCs DRD1 2^{-ΔΔCt} 监控统计图

现 乳腺癌患者血常含有间质细胞表型的 CTCs ,并能通过上皮细胞 - 间质细胞转化迁入血循环 ,其中含有少数有高度转移潜能的 CTCs ,在肿瘤的发生、浸润、进展中有重要作用。乳腺癌患者外周血中 CTCs 数量极少 ,约为单个核细胞数目的 1/105 [9] ,因此要有高度特异和灵敏的 CTCs 检测方法。本研究通过 SE-iFISH CTCs 检测 20 例健康人 CTCs 的筛查结果为 0 ,而 20 例治疗前的乳腺癌患者的 CTCs 有 90% 的检出阳性率 ,说明该方法灵敏度和特异度较好 ,对后续鉴定所使用标志物的选择更为灵活。

Giordano et al [10] 分析发现 ,CTCs 能预测转移性乳腺癌患者的生存率 ,外周血 CTCs 数量与患者的转移、耐药、预后不良相关。乳腺癌患者在接受有效治疗后 ,血中 CTCs 数量会减少。Jiang et al [11] 对 294 例转移性乳腺癌患者研究证实 ,CTCs 在我国转移性乳腺癌监控中有应用价值 ,115 例患者中 ,检出 CTCs ≥ 5/7.5 ml ,CTCs 数量增加与转移相关。CTCs 已被写入美国 AJCC 指南(第八版)和 2019 年中国乳腺癌诊治指南 ,作为远处转移的标准之一。对血

CTCs 的筛查 ,有利于发现转移、监测疗效、评估预后 [12]。

Sachlos et al [13] 发现 ,DR 可能是乳腺癌肿瘤干细胞(cancer stem cells ,CSCs) 的生物标志物 ,DR 在有 5 种(正常乳腺干细胞不表达) ,参与乳腺癌细胞的增殖、转移 ,DR 拮抗剂硫利达嗪、三氟拉嗪 ,能抑制 CSCs 细胞膜的 D2 受体 ,抑制 CTCs 增殖;提示其外周血 CSCs 的 DR 是较理想的标志物 ,与乳腺癌治疗、预后相关 ,约 30% 晚期乳腺癌表达 DRD1 ,常有更大肿瘤、更多淋巴结转移、更短生存 [14]。CTCs DRD1 的表达量更高 ,本实验选取检测 DRD1。

在进行乳腺癌病情监控时 ,因各种原因一些受试者未进行多次检测 ,只有术前检测数据 ,仅 6 例乳腺癌患者做了术后 3、6 个月的 DRD1 血水平检测。从检测总体结果看 ,T3 期的患者其 CTCs 和 CTC DRD1 术前检出值比 T2 期患者的高;6 个月时复查检出 CTCs 较多、CTCs DRD1 水平升高 ,后续发生癌症转移 ,且预后不良。T2 期患者 6 个月复查检出 CTCs 较少、CTCs DRD1 水平降低 ,其后续预后良好 ,目前没有复发迹象。但因入组人数较少 ,监控次数较少 ,后续还需要继续入组更多的患者 ,并对其疾病进展进行长期监控 ,从而获得更多的数据 ,并进行更加精确的分析以明确 CTCs DRD1 检测对乳腺癌患者临床应用的价值 ,为乳腺癌 DR 靶向药的应用提供更多的理论依据 ,研究中患者的随访工作还在进行中。

参考文献

- [1] Torre L A , Bray F , Siegel R L , et al. Global cancer statistics , 2012 [J]. CA Cancer J Clin , 2015 , 65(2) : 87 - 108.
- [2] Kahroba H , Hejazi M S , Samadi N. Exosomes: from carcinogenesis and metastasis to diagnosis and treatment of gastric cancer [J]. Cell Mol Life Sci , 2019 , 76(9) : 1747 - 58.
- [3] Kim M Y , Oskarsson T , Acharyya S , et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells [J]. Cell , 2009 , 139(7) : 1315 - 26.
- [4] Cristofanilli M , Budd G T , Ellis M J , et al. Circulating tumor cells , disease progression , and survival in metastatic breast cancer [J]. N Engl J Med , 2004 , 351(8) : 781 - 91.
- [5] Riethdorf S , Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization [J]. Pathobiology , 2008 , 75(2) : 140 - 8.
- [6] Beaulieu J M , Gainetdinov R R. The physiology , signaling , and pharmacology of dopamine receptors [J]. Pharmacol Rev , 2011 , 63(1) : 182 - 217.

- [7] Pornour M , Ahangari G , Hejazi S H , et al. New perspective therapy of breast cancer based on selective dopamine receptor D2 agonist and antagonist effects on MCF-7 cell line [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* , 2015 , 10(2) : 214 - 23.
- [8] Yu M , Bardia A , Wittner B S , et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. *Science* , 2013 , 339(6119) : 580 - 4.
- [9] Sun Y F , Yang X R , Zhou J , et al. Circulating tumor cells: advances in detection methods , biological issues , and clinical relevance [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* , 2011 , 137(8) : 1151 - 73.
- [10] Giordano A , Gao H , Anfossi S , et al. Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *Mol Cancer Ther* , 2012 , 11(11) : 2526 - 34.
- [11] Jiang Z F , Cristofanilli M , Shao Z M , et al. Circulating tumor cells predict progression-free and overall survival in Chinese patients with metastatic breast cancer , HER2-positive or triple negative (CBC-SG004) : a multicenter , double-blind , prospective trial [J]. *Ann Oncol* , 2013 , 24(11) : 2766 - 72.
- [12] Scatena R , Bottoni P , Giardina B. Circulating tumour cells and cancer stem cells: a role for proteomics in defining the interrelationships between function , phenotype and differentiation with potential clinical applications [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2013 , 1835(2) : 129 - 43.
- [13] Sachlos E , Risueño R M , Laronde S , et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells [J]. *Cell* , 2012 , 149(6) : 1284 - 97.
- [14] Borcherding D C , Tong W , Hugo E R , et al. Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (DR1) in breast cancer [J]. *Oncogene* , 2016 , 35(24) : 3103 - 13.

The application research of CTCs and its DRD1 expression combined detection on curative effect monitoring of breast cancer

Xu Bin¹ , Yang Qingfeng² , Zhao Xiaoyu³ , et al

(¹AnHui Medical College , AnHui Proviner Medical Genetics Center , Hefei 230061; ²Anhui Women and Child Health Care Hospital , Hefei 230001; ³Shanghai Baoteng Medical Laboratory Co. , Ltd , Shanghai 201204)

Abstract Objective To study the effect of the circulating tumor cells (CTCs) and the CTCs dopamine receptor 1 (DRD1) expression level in peripheral blood of breast cancer patients on breast cancer progression and curative effect monitoring. **Methods** Peripheral blood was collected from 20 healthy people and 20 untreated breast cancer patients , and CTCs and CTCs DRD1 expression levels of them were detected through the differential phase concentration-immune fluorescence in situ hybridization technique (SE-iFISH) in combination with the fluorescent quantitative PCR(Q-PCR) . Then 6 cases of breast cancer were selected for operation , and their peripheral blood was collected at 3 and 6 months after operation , to detect CTCs and CTCs DRD1 expression levels and analyze their relationship with disease progression and curative effect. **Results** CTCs were not detected in peripheral blood of 20 healthy persons while detected in 18 of 20 (90. 0%) untreated breast cancer patients , which presented high sensitivity and specificity. CTCs and CTCs DRD1 levels evidently decreased in 3 T2 stage patients 3 months and 6 months after surgery (they did not appear recurrence and metastasis) . On the contrary , CTCs and CTCs DRD1 levels evidently increased in 3 T3 stage patients 3 months and 6 months after surgery (they appeared prominent recurrence and metastasis) . **Conclusion** Breast cancer patients with high CTCs detection rate and CTCs DRD1 expression often have poor prognosis. On the contrary , patients with low CTCs detection rate of CTCs and expression of CTCs DRD1 show better disease control and good prognosis. Hence , noninvasive CTCs and CTCs DRD1 detection may have high clinical application value in monitoring the efficacy of breast cancer.

Key words circulating tumor cells; dopamine receptor 1; breast cancer; efficacy evaluation