56 例循环肿瘤细胞检测阳性的亚厘米肺结节患者术后病理分析

苏　雷　支修益　张　毅　高　艳　滕梁红　许庆生　胡　牧　钱　坤　李元博　刘灵逸

摘　要　目的　探讨叶酸受体循环肿瘤细胞检测在亚厘米孤立性肺结节(solitary pulmonary nodule,SPN)临床诊断和外科治疗策略的应用。**方法**　对笔者医院 2017 年 9 月 ~2018 年 6 月期间 56 例术前叶酸受体循环肿瘤细胞检测阳性的亚厘米 SPN 病历进行回顾性分析。所有患者术前均行 2 次以上胸部 CT 扫描,随访观察时间 1 ~6 个月(平均 4.2 个月)。52 例患者行术前病变定位。术式包括胸腔镜肺叶切除术 7 例,亚肺叶切除 49 例,包括肺楔形切除术 41 例,肺段切除术 8 例。**结果**　术前胸部 CT 肺窗测定,病变直径≤5mm 22 例,6 ~9mm 34 例。实性结节 9 例,半实性结节 36 例,纯磨玻璃样病变 11 例。术后病理证实恶性结节 54 例(96.4%),良性结节 2 例(3.6%)。均为原发肺恶性肿瘤,包括非典型性腺瘤样增生(AAH)5 例,原位腺癌(AIS)22 例,微浸润腺癌(MIA)21 例,贴壁生长为主的浸润腺癌(LPA)4 例,肺鳞癌 1 例,类癌 1 例。**结论**　亚厘米 SPN 影像学静态特征相对缺乏,需要通过随访观察确定诊疗策略。叶酸受体循环肿瘤细胞检测有助于弥补亚厘米 SPN 在影像学特征相对缺乏的不足,有希望成为提高早期肺癌诊断率的新辅助手段。

关键词　亚厘米肺结节　循环肿瘤细胞　胸腔镜外科　诊断　治疗

中图分类号　R734.2　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2019.05.013

Postoperative Pathological Analysis of 56 Patients with Subcentimetre Pulmonary Nodules with Positive Detection of Circulating Tumor Cells.

Su Lei, Zhi Xiuyi, Zhang Yi, et al. Department of Thoracic Surgery, Xuan wu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract　Objective　To investigate the diagnostic value of folate receptor - positive circulating tumor cell(FR + CTCs) in patient with subcentimetre solitary pulmonary nodules (SPN). **Methods**　A retrospective analysis was performed on 56 cases of subcentimetre SPN patients with positive detection of preoperative FR + CTCs in our hospital from September 2017 to June 2018. All patients underwent chest CT scan more than 2 times before operation. The follow - up time was 1 - 6 months (average 4.2 months). Preoperative lesion localization was performed in 52 patients. In the 56 patients, resection was lobectomy in 7 and sublobectomy in 49, including pulmonary wedge resection in 41, segmentectomy in 8. **Results**　According to the preoperative chest CT lung window, the diameter of the lesion was ≤5mm in 22 cases, and 6 - 9mm in 34 cases. Solid nodule was seen in 9 cases, semisolid nodule in 36 cases, pure grinding glass lesions in 11 cases. Postoperative pathological examination confirmed malignant nodules in 54 cases (96.4%), benign nodules in 2 cases (3.6%). All of them were primary lung malignant tumors, including 5 cases of atypical adenomatoid hyperplasia (AAH), 22 cases of adenocarcinoma in situ (AIS), 21 cases of minimally invasive adenocarcinoma (MIA), 4 cases of lepidic predominant adenocarcinoma (LPA), 1 case of lung squamous cell carcinoma and 1 case of carcinoid. **Conclusion**　Due to the lack of imaging features in chest CT scan, we have to follow up the subcentimetre SPN to determine the diagnosis and treatment strategy. The detection of FR + CTCs would remedy for the deficiency of subcentimetre SPN in imaging features, which was expected to be a new auxiliary means to improve the diagnosis rate of early lung cancer.

Key words　Subcentimetre SPN; FR + CTCs; Video - assisted thoracic surgery; Diagnosis; Treatment

早期肺癌的影像学征象大多是孤立性肺结节(solitary pulmonary nodule,SPN)。SPN 是指肺内直径≤30mm 的类圆形病灶。但通过体检发现的肺结节中,早期肺癌的比例不足 10%[1~3]。对于孤立性 SPN 的定性诊断和外科治疗策略逐渐成为胸部肿瘤外科的临床工作重点和研究热点[4~6]。笔者曾在 2013、2015 和 2017 年报告了包括亚厘米 SPN 在内的 SPN 外科治疗结果[2,6,7]。目前对亚厘米 SPN(又称为肺微小结节)的临床资料相对较少。主要是亚厘米 SPN 在影像学上更缺乏特征性表现,大多通过反

基金项目:国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2011CB510100)

作者单位:100053　北京,首都医科大学宣武医院胸外科(苏雷、支修益、张毅、许庆生、胡牧、钱坤、李元博、刘灵逸),放射科(高艳),病理科(滕梁红)

复的随访观察确定是否需要手术治疗[1~4,8,9]。叶酸受体循环肿瘤细胞(FR + CTC)检测技术在2015年获得国家食品药品监督管理局批准用于临床拟诊肺癌患者的辅助手段[9,10]。笔者对2017年9月~2018年6月56例术前FR + CTC检测阳性而行手术治疗的亚厘米SPN病历进行回顾性分析,探讨FR + CTC检测在亚厘米SPN临床诊断和外科治疗策略的应用意义。

资料与方法

1. 一般资料:纳入本研究56例患者,其中男性22例,女性34例。患者年龄31~65岁,平均年龄48.3岁。45例因体检发现SPN,11例有咳嗽、胸痛症状行胸部CT检查发现。

2. SPN影像学特点:根据测定胸部CT肺窗SPN最大直径,病变直径≤5mm 22例,6~9mm 34例;肺叶分布:右肺上叶26例,右肺中叶3例,右肺下叶12例,左肺上叶6例,左肺下叶9例;肺野分布:病变位于肺野外1/3的49例,肺野内2/3的7例;SPN影像学边缘征象,清晰49例,不清晰或毛刺征7例;SPN内部影像学征象,实性结节8例,半实性结节37例,纯磨玻璃样病变(GGNs)11例。胸部CT复查时间:病变直径≤5mm的患者均行3次胸部CT检查,>5mm的SPN患者,根据SPN的影像学征象和CTC检测结果选择2~3次复查。平均随访时间4.2个月。

3. FR + CTC检测时间:对于首次检出病变直径≤5mm的SPN和6~9mm GGNs的病例,根据患者的具体症状选择对症处理或单纯随访1~6个月,复查胸部CT"肺结节评估"检查[1,2,6~8]。对于病变持续存在和首次检出病变直径6~9mm非GGNs的患者建议行FR + CTC检测。选择2016年通过国家食品药品监督管理局批准用于临床拟诊肺癌患者的FR + CTC试剂盒(CytoploRare, 格诺思博生物科技)。结果判定,检测值≥10.1判读为阳性,检测值<8.7判读为阴性,检测值8.7~10.1判读为可疑阳性。

4. SPN定位:采用在CT引导下在病灶临近部位注射生物胶的定位方法,对52例SPN(包括位于肺野外1/3的49例和肺野内2/3的3例)进行术前SPN定位[2,6]。

5. 手术方法:常规采用静脉复合麻醉下双腔气管插管,健侧卧位。选择患侧腋中线第7或8肋间做胸腔镜观察孔。根据病变具体部位和术前定位标志选择单孔或单操作孔操作,在术中获得病变组织。对于周围性SPN,用内镜切割缝合器(Endo - GIA)或铥激光距病变2cm处楔形切除病变所在部位肺组织;对于肺实质内深在的结节病变,通过肺段切除方法获取病变组织送检。根据术中冰冻病理结果及患者耐受情况选择肺叶、肺段或肺楔形切除及附加纵隔淋巴结清扫术或采样[2,6,7]。

6. 病理诊断:均行术中快速冷冻病理和常规病理检查。术后病理均经病理科3位高级职称医师确认。

结　　果

1. FR + CTC检测结果:2017年9月~2018年6月期间共行FR + CTC检测72例。检测结果判读为阳性者51例,可疑阳性者12例,判读为阴性者9例。其中47例阳性和9例可疑阳性者选择手术治疗。4例检测阳性、3例检测可疑阳性患者未接受手术建议和9例检测结果阴性患者仍在定期随访中。

2. SPN定位效果:在52例经CT引导穿刺定位的SPN患者中,定位过程顺利,无严重血气胸发生,有2例患者定位后出现咳嗽,1例合并胸痛,在服用止痛止咳药后缓解。

3. 术式:全组术式胸腔镜肺叶切除术7例,亚肺叶切除49例,包括肺楔形切除术41例,肺段切除术8例。术后无严重并发症发生。

4. 病理结果:从术后病理诊断中,恶性结节54例(96.4%),包括非典型性腺瘤样增生(AAH)5例,原位腺癌(AIS)22例,微浸润腺癌(MIA)21例,贴壁生长为主的浸润腺癌(LPA)4例,肺鳞癌1例,类癌1例。良性结节2例(3.6%),包括炎性淋巴结肿大1例,肺错构瘤1例。

5. SPN影像学特点与术后病理:从SPN影像学边缘征象看,49例边缘清晰中1例为肺错构瘤,7例不清晰或毛刺征有1例为炎性淋巴结;从SPN内部影像学征象,8例实性结节中包括MIA 2例、LPA 3例、肺鳞癌1例、类癌1例、错构瘤1例,37例半实性结节包括AIS 18例,MIA 17例,LPA 1例、炎性淋巴结1例,11例纯磨玻璃样病变包括AAH 5例、AIS 4例,MIA 2例。从SPN大小看,病变直径≤5mm的22例中,AAH 2例、AIS 14例、MIA 5例、炎性淋巴结1例;6~9mm 34例中,AAH 3例、AIS 8例、MIA 16例、LPA 4例、肺鳞癌1例,类癌1例、错构瘤1例。

6. FR + CTC检测结果与术后病理:47例FR + CTC检测结果阳性患者的术后病理包括AAH 1例、AIS 19例、MIA 20例、LPA 4例、鳞癌1例、类癌1例、炎性淋巴结1例,9例可疑阳性患者术后病理包括

AAH 4 例、AIS 3 例、MIA 1 例、错构瘤 1 例。

7. 术后治疗及随访:浸润前病变在内共 54 例恶性 SPN 患者术后均建议服药中药,并根据检测机体细胞免疫水平选择应用免疫增强治疗。随访按照术后每 3 个月复查胸部 CT 扫描。目前随访的恶性 SPN 病例中没有发现复发证据。

讨 论

随着国内肺癌发生率的逐年升高,越来越多孤立性肺结节(SPN)的临床案例需要得到临床医生的诊治[1~7]。临床医生的诊疗策略应基于以下两方面:(1)重视早期肺癌病例的诊断,因为早期肺癌病例术后可以获得更多的生存机会,文献报道的 T_1 或 $T_2N_0M_0$ 非小细胞肺癌外科治疗效果明显,5 年生存率达到 70% 以上,$T_1N_1M_0$ 的 5 年生存率为 52%,而Ⅲ期 N_2 病例仅为 25%[1~3,5~8]。(2)尽量避免对可能的良性结节实施外科手术而带来的风险[1~5]。虽然在早期有关 SPN 文献中,以肺部良性病变为主,占 50% ~70%,恶性占 35% ~50%,恶性病例的可能性随着结节的增大而增大,但并不能够排除小结节恶性病变的可能性。尤其是对于亚厘米 SPN,不能因为其体积小而轻视[3,5,8,9]。

目前对 SPN 的诊断主要基于其在胸部 CT 扫描的影像学特征,其中包括 SPN 的静态征象包括边缘征象(分叶征、毛刺征、多边形、周围晕轮征等)、内部征象(空泡征、支气管充气征等)和周围征象(血管集束征和胸膜凹陷征等)和动态观察(如三维重建后的密度和体积变化评估)[1~8,10,11]。但与 10 ~30mm 的 SPN 病例比较,亚厘米 SPN 的影像学表现更缺乏特征性,而且 PET - CT 对于亚厘米 SPN 的鉴别意义不大[1~6]。因此在目前的针对肺结节诊疗的“共识”中更多的建议是随访为主。在 2015 年发表的相关肺结节随访共识中,结节直径 4 ~6mm 者,当无肺癌风险时建议在第 12 个月时重新评估;当有肺癌风险时建议 6 ~12 个月随访,如果没有变化,则在 18 ~24 个月之间再次随访;结节直径 6 ~8mm 者,当无肺癌风险时建议在 6 ~12 个月进行随访,当有肺癌风险时建议,应在最初的 3 ~6 个月内随访,随后在 9 ~12 个月随访,如果没有变化,在 24 个月内再次随访,建议使用低剂量平扫技术[3~8,11,12]。但在临床实践中,所谓的“肺癌风险因素”并不是特别清楚,没有所谓“肺癌风险因素”而确诊肺癌的病例不在少数。笔者认为单凭不太确定的所谓的“肺癌风险因素”来确定 SPN 患者随访时间的依据不充分,而且,随访过程中不可避免地给患者带来放射性损伤和不同程度的心理压力[2]。

笔者认为 SPN 的临床诊疗策略离不开病理诊断学。文献回顾中研究发现,2011 年 WHO 肺腺癌新分类中将非典型腺瘤样增生(AAH)和原位腺癌(AIS)均归入肺腺癌的浸润前病变。其中 AAH 病变局限应≤5mm,AIS 应≤30mm,且必须是纯的贴壁生长方式。而当形态学相似于 AIS 或 MIA,但病变灶至少 1 个最大直径 >5mm 时,则定义为贴壁生长为主的浸润性腺癌(LPA)[2,13,14]。理论上讲,当 SPN 直径 > 5mm 时,已经不能除外 LPA 的可能性[1~5]。也就是说单凭影像学所发现 SPN 的直径大小作为临床医生制定 SPN 诊疗策略的依据缺乏病理基础。因此,迫切需要一种新的辅助手段帮助对于缺乏影像学特征的亚厘米 SPN 患者制定科学、正确的诊疗计划。

随着精准治疗策略和生物诊断技术的发展,肿瘤液态活检应用日趋广泛。液态活检主要包括:CTCs(circulating tumor cells,CTCs)、循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA,ctDNA)以及肿瘤外泌体(exosome)等[9,10,15]。理论上,当实体肿瘤发展到 1.0mm^3 时,外周血就能够查到 CTCs。CellSearch™系统是惟一被美国食品和药物管理局批准应用于临床检测患者外周血 CTCs 的方法,已被证实对乳腺癌、前列腺癌及大肠癌等恶性肿瘤的诊断和预后有重要的临床价值。但这项技术在肺癌领域的应用不令人满意[9,15]。国内研究发现,肺癌肿瘤细胞表面过量表达叶酸受体(folate receptor,FR)的特点,并运用配体介导的靶向 PCR 法成功将 1 个 CTCs 信号放大约 1012 倍。最新研究报道,125 例肺癌患者和 25 例肺部良性病变患者的 CTCs 阳性率进行比较,发现肺癌患者阳性率明显增高(30.6% vs 12.0%),而且明显优于目前常用的常规肿瘤标志物(CEA 等)[9,10,15]。目前该技术已被中国国家食品药品监督管理局批准用于临床检测。

本研究 SPN 病变直径≤5mm 的 22 例中,浸润癌前期病变有 16 例(AAH 2 例、AIS 14 例)、MIA 5 例;6 ~9mm 34 例中,浸润癌前期病变有 11 例(AAH 3 例、AIS 8 例)、浸润期病变 20 例(MIA 16 例、LPA 4 例)、肺鳞癌 1 例,类癌 1 例、错构瘤 1 例。与之前报道的亚厘米 SPN 术后原发肺恶性肿瘤所占的比例(79.0%,49/62)做了比较,本研究 56 例 CTC 检测阳性患者术后病理中原发肺恶性肿瘤的比例有明显提高(96.4%,54/56),差异有统计学意义($P<0.005$)。结合文献分析认为,CTC 检测对以亚厘米 SPN 为影像学

表现的早期肺部恶性肿瘤起到重要的辅助诊断作用。

对于恶性亚厘米 SPN 的术式尚不完全一致。目前普遍接受的是,如果术中快速冷冻病理报告浸润癌,应该考虑做肺叶切除[1~4,12,13]。但还应该结合患者的具体病情和身体耐受情况。

虽然本研究的病例数较少,但对于缺乏影像学特征的亚厘米 SPN 患者,CTC 检测能够起到重要的辅助诊断作用,提高早期肺癌诊断率,实现早期肺癌的精准治疗。这一结论还有待于多中心、大数据的验证。辅助 CTC 检测还能够减少亚厘米 SPN 患者复查胸部 CT 扫描次数和缩短复查随访时间。本研究所有患者复查胸部 CT 扫描不超过 3 次,从首诊到手术时间少于 6 个月(平均 4.2 个月)。文献报告中有患者随访时间为 72 个月[2~7]。减少了胸部 CT 扫描对患者的放射性损伤,而且在某种程度上解除或缓解了患者的心理压力。

参考文献

1 Sakurai H, Nakagawa K, Watanabe S, *et al*. Clinicopathologic features of resected subcentimeter lung cancer[J]. Ann Thorac Surg, 2015, 99(5): 1731 – 1738

2 苏雷,支修益,张毅,等. 亚厘米肺结节的外科诊疗分析[J]. 中国微创外科杂志, 2017, 17(1): 11 – 14

3 Shin KE, Lee KS, Yi CA, *et al*. Subcentimeter lung nodules stable for 2 years at LDCT: long – term follow – up using volumetry[J]. Respirology, 2014, 19(6): 921 – 928

4 Van Schil PE. How to deal with subcentimeter lung cancer: a moving target[J]. Thorac Dis, 2016, 8(10): E1221 – E1225

5 Flores R, Bauer T, Aye R, *et al*. Balancing curability and unnecessary surgery in the context of computed tomography screening for lung cancer[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 147(5): 1619 – 1626

6 苏雷,支修益,张毅,等. 胸腔镜治疗孤立性肺小结节的分析[J]. 首都医科大学学报, 2015, 36(4): 525 – 528

7 苏雷,支修益,张毅,等. 胸腔镜辅助治疗孤立性肺结节 120 例分析[J]. 中国微创外科杂志, 2013, 13(11): 966 – 973

8 Patel VK, Naik SK, Naidich DP, *et al*. A practical algorithmic approach to the diagnosis and management of solitary pulmonary nodules: part 1: radiologic characteristics and imaging modalities[J]. Chest, 2013, 143(3): 825 – 839

9 Christoph DC, Asuncion BR, Hassan B, *et al*. Significance of folate receptor alpha and thymidylate synthase protein expression in patients with non – small – cell lung cancer treated with pemetrexed[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(1): 19 – 30

10 连欢欢,丁志丹,袁东风,等. 应用 FR 靶向 PCR 法检测 CTC 在肺癌诊断中的临床价值:初步研究[J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(12): 813 – 820

11 Bak SH, Lee HY, Kim JH, *et al*. Quantitative CT scanning analysis of pure ground – glass opacity nodules predicts further CT scanning change[J]. Chest, 2016, 149(1): 180 – 191

12 Tsutani Y, Miyata Y, Nakayama H, *et al*. Appropriate sublobar resection choice for ground glass opacitydominant clinical stage IA lung adenocarcinoma. Wedge resection or segmentectomy [J]. Chest, 2014, 145(1): 66 – 71

13 Gupta S, Chandrakumar D. Meta – analysis of intentional sublobar resections versus lobectomy for early stage non – small cell lung cancer [J]. Ann Cardiothorac Surg, 2014, 3(2): 134 – 141

14 Travis WD, Brambilla E, Burke AP, *et al*. International association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(2): 244 – 285

15 Wang L, Wu C, Qiao L, *et al*. Clinical significance of folate receptor – positive circulating tumor cells detected by ligand – targeted polymerase chain reaction in lung cancer[J]. Cancer, 2017, 8(1): 104 – 110

(收稿日期:2018 – 08 – 01)
(修回日期:2018 – 08 – 01)

(上接第 19 页)

14 Bussard KM, Mastro AM. Ex – vivo analysis of the bone microenvironment in bone metastatic breast cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009, 14(4): 387 – 395

15 Liu W, Vivian CJ, Brinker AE, *et al*. Microenvironmental influences on metastasis suppressor expression and function during a metastatic cell's journey [J]. Cancer Microenviron, 2014, 7(3): 117 – 131

16 Wu C, Yang S, Sun Z, *et al*. Characterization of the attenuation of breast cancer bone metastasis in mice by zoledronic acid using 99mTc bone scintigraphy [J]. Pathol Oncol Res, 2014, 20(3): 747 – 754

17 Arrigoni C, Bersini S, Gilardi M, *et al*. In vitro co – culture models of breast cancer metastatic progression towards bone [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): E1405

18 Haider M, Holen I, Dear TN, *et al*. Modifying the osteoblastic niche with zoledronic acid in vivo – potential implications for breast cancer bone metastasis [J]. Bone, 2014, 66: 240 – 250

19 Steinman RA, Brufsky AM, Oesterreich S. Zoledronic acid effectiveness against breast cancer metastases – a role for estrogen in the microenvironment [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(5): 213

20 Wan S, Liu Y, Weng Y, *et al*. BMP9 regulates cross – talk between breast cancer cells and bone marrow – derived mesenchymal stem cells [J]. Cell Oncol (Dordr), 2014, 37(5): 363 – 375

21 Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, *et al*. Mesenchymal stem cell – derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow[J]. Cancer Res, 2016, 76(19): 5832 – 5844

22 吴玲, 王佳, 吴英, 等. 乳腺癌骨转移过程中的分子机制[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2017, 9(1): 55 – 57

23 麻丽珍, 陈勇, 叶冠东, 等. 乳腺癌细胞骨形态形成蛋白、骨桥蛋白表达与乳腺癌细胞的侵袭性及转移性的关系[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(3): 473 – 475

(收稿日期:2017 – 10 – 12)
(修回日期:2018 – 09 – 12)