

骨髓微转移肿瘤细胞预测乳腺癌患者预后的 Meta 分析

尹婧婧,周礼鲲,李鸿立,巴 一

(天津医科大学附属肿瘤医院消化肿瘤内科,天津市肿瘤防治重点实验室,天津 300060)

[摘要] 目的:系统性评价骨髓中微转移肿瘤细胞(disseminating tumor cell,DTC)在乳腺癌患者预后预测中的作用。方法:检索 Medline、Embase、中国数字化期刊全文数据库(CNKI)、万方数据库及维普全文网,收集 DTC 预测乳腺癌患者预后的研究,以无进展生存期(progression-free survival,PFS)和总生存期(overall survival,OS)为观察终点,采用 Review Manager 5.1.4 进行 Meta 分析。结果:14 篇英文文献包含 4 091 例乳腺癌患者纳入荟萃分析。结果提示 DTC 阳性组较阴性组在 PFS[HR=1.83(95%CI:1.51~2.22), $n = 12, I^2 = 75%$]和 OS[HR=1.59(95%CI:1.39~1.83), $n = 12, I^2 = 58%$]上均有统计学差异($P < 0.000 01$)。根据检测时间不同进行亚组分析,结果提示术前、术中和术后组 DTC 阳性的乳腺癌患者比 DTC 阴性者预后差;根据检测方法不同进行亚组分析,用免疫细胞化学(immunocytochemistry,ICC)或逆转录定量聚合酶链反应(reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)方法检测 DTC 阳性与其阴性者相比,预后差异均有统计学意义($P < 0.000 01$)。结论:术前、术中和术后 DTC 阳性的乳腺癌患者较 DTC 阴性者预后差。

[关键词] 微转移肿瘤细胞;乳腺癌;预后;无进展生存期;总生存期

[中图分类号] C81;R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-726-07

A Meta-analysis of disseminating tumor cells in bone marrow predicting prognosis of patients with breast cancer

YIN Jing-jing, ZHOU Li-kun, LI Hong-li, BA Yi

(Department of Digestive Oncology, Cancer Institute and Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the prognostic relevance of disseminating tumor cells (DTCs) detection in the bone marrow of patients with breast cancer. **Methods:** The literature was searched from Medline, Embase, China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Wanfang Data and VIP information database. Review Manager 5.1.4 was used for Meta-analysis and main outcome measures included progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). **Results:** A total of 4 091 patients from 14 studies were enrolled. Meta-analysis associated the presence of DTCs with both poor PFS [HR=1.83 (95%CI:1.51~2.22), $n = 12, I^2 = 75%$] and OS [HR=1.59 (95%CI:1.39~1.83), $n = 12, I^2 = 58%$]. The subgroup analyses on different sampling time showed that the detection of DTCs was a potential prognostic factor before, during and after operation. Stratification by different detection methods also showed that there were statistically significant differences in PFS and OS between DTCs-positive patients and DTCs-negative ones both in iICC (immunocytochemistry) and RT-(q)PCR (reverse transcriptionase quantitative polymerase chain reaction) compartment ($P < 0.000 01$).

Conclusion: The presence of DTCs before, during and after operation indicates early recurrence and death in breast cancer patients.

[Key words] disseminating tumor cells; breast cancer; prognosis; progression-free survival; overall survival

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 726-732]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在我国尤其是大中城市的发病率逐年上升^[1]。随着乳腺癌诊断和治疗的不断进步,乳腺癌的生存率有了很大的提高,但远处转移仍然是乳腺癌的主要致死原因。腋淋巴结阴性的乳腺癌患者中约 30%会发生远处转移^[2],而腋淋巴结阳性者约 40%无进展生存期(progression-free survival,PFS)在 10 年以上^[3],提示

淋巴结的转移情况并不能准确预测远处转移的发生风险,临床需要高敏感性和特异性的标志物用于预测乳腺癌患者的复发和转移。微转移肿瘤细胞(disseminating tumor cell,DTC)是存在于肿瘤患者骨髓中的肿瘤细胞,在淋巴结阴性的恶性肿瘤患者中检出率为 30%~40%^[4],是肿瘤复发和转移的来源^[5],可以预测肿瘤患者的复发和生存,指导临床

治疗。Braun 等^[6]的 Meta 分析表明用免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)的方法术前检测出 DTC 的乳腺癌患者预后不良,但术后检测 DTC 是否与乳腺癌患者的预后相关仍有待证实。为此,本研究收集国内外杂志公开发表的相关研究数据进行 Meta 分析。

1 材料和方法

1.1 文献收集

计算机检索 Medline (1965 年 1 月~2011 年 9 月)、Embase(1950 年 1 月~2011 年 9 月)、中国数字化期刊全文数据库(CNKI)(1979 年 1 月~2011 年 9 月)、万方数据库(1987 年 1 月~2011 年 9 月)及维普全文网(1989 年 1 月~2011 年 9 月)。英文检索词为“disseminating tumor cell, breast cancer”,相应的中文检索词为“微转移肿瘤细胞,乳腺癌”。

1.2 方法

1.2.1 文献纳入标准

研究对象为乳腺癌患者,UICC 肿瘤分期不限。观察终点为 PFS 和/或总生存期(overall survival, OS),DTC 阳性定义为每 1×10^6 个有核细胞中 DTC 的数目 ≥ 1 个,比较 DTC 阳性(+)组与 DTC 阴性(-)组患者的预后差异。

1.2.2 文献排除标准

病例总数低于 20 例者。风险比(hazard ratio, HR)和 95%可信区间(confidence interval, CI)不能从原文中直接提取且无足够的信息计算者。有病例重复或交叉的文献,若随访时间不同,则取最新文献;若取材时间不同,则优先纳入术后的研究结果。

1.2.3 资料提取

对纳入文献逐一摘录如下信息:①第一作者、发表年份;②研究对象的基本特征:病例总数、年龄、UICC 肿瘤分期、DTC+患者数目及比例;③实验设计:取材时间、DTC 检测方法、靶基因/抗原、随访时间及观察终点;④评价指标:如果 HR 和 95%CI 无法直接从原文中提取到,则根据 Tierney 等^[7]提供的方法提取相关统计学信息并计算。通过讨论解决所有分歧。

1.2.4 偏倚风险评估

按照 Cochrane 评价手册 5.1.0 的偏倚风险评估标准对以下 6 条标准进行评估:①患者纳入标准严格明确;②危险因素及观察指标的衡量标准唯一;③混杂因素控制良好;④随访数据完整;⑤研究结果报道无选择性;⑥无其他偏倚来源。针对每个研

究,对上述 6 条内容做出是、否或不清楚的判断。若上述 6 条标准评价均为是,则该研究属低度偏倚研究,否则归为高度偏倚研究。

1.2.5 亚组分析、敏感性分析和发表偏倚

根据取材时间及 DTC 检测方法不同进行亚组分析。通过排除异质性较大的研究和排除高度偏倚研究等方法对结果进行敏感性分析。用漏斗图分析法来描述发表偏倚。

1.3 统计学方法

使用 Review Manager 5.1.4 (The Cochrane Collaboration, 2011)软件中的方差倒数法估计合并 HR 及 95%CI。对合并 HR 值进行 z 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。各试验结果间的统计学异质性采用 Q 检验, $P > 0.05$ 为异质性不显著,选用固定效应模型, $P \leq 0.05$ 为异质性显著,选用随机效应模型,随机效应模型将给出比固定效应模型更宽的可信区间。

2 结果

2.1 文献基本特征

共检索到英文文献 946 篇、中文文献 89 篇,按纳入以及排除标准逐一筛选,共 14 篇^[8-21]英文文献纳入 Meta 分析。纳入研究分别来自比利时、朝鲜、德国、法国、荷兰、日本、瑞典、希腊和英国共 9 个国家,发表于 1998~2011 年,样本量 34~733,共计 4 091 例乳腺癌患者。8 个研究为术前取材,2 个研究为术中取材,3 个研究为术后取材,1 个研究同时在术前和术后取材;4 个研究采用了逆转录定量聚合酶链反应(reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)的检测方法,10 个研究采用 ICC;除 Mansi 等^[20]外 13 个研究的靶基因/抗原中包含细胞角蛋白;中位随访时间均在 2 年以上。

纳入研究的偏倚风险评估中 4 个研究^[9,15-16,21]未使用多因素分析被评为高度偏倚,其余 10 个研究被评为低度偏倚(表 1)。

2.2 整体分析

各有 12 个研究报道了 PFS($n = 3\ 815$)和 OS($n = 3\ 998$)的数据,一致性检验分别为 $P < 0.000\ 01$ 和 $P = 0.006$,均选用随机效应模型,Meta 分析结果提示 DTC(+)组与 DTC(-)组在 PFS(HR=1.83, 95%CI: 1.51~2.22)和 OS(HR=1.59, 95%CI: 1.39~1.83)上均有统计学差异($P < 0.000\ 01$,图 1),提示 DTC 阳性预示乳腺癌患者预后不良。

2.3 亚组分析

表 1 偏倚风险评估

Table 1 Risk of bias summary

研究小组	患者纳入标准 严格明确	危险因素及观察指标 的衡量标准唯一	混杂因素 控制良好	随访数据 完整	研究结果报道 无选择性	无其他 偏倚来源
Benoy IH, 2006 ^[11]	+	+	+	+	+	+
Bidard FC, 2008 ^[10]	+	+	+	+	+	+
Daskalaki A, 2009 ^[9]	+	+	-	+	+	+
Gebauer G, 2001 ^[18]	+	+	+	+	+	+
Janni W, 2005 ^[13]	+	+	+	+	+	+
Jung YS, 2003 ^[16]	+	+	-	+	+	+
Landys K, 1998 ^[21]	+	+	-	+	+	+
Leinung S, 2000 ^[19]	+	+	+	+	+	+
Mansi JL, 1999 ^[20]	+	+	+	+	+	+
Molloy TJ, 2011 ^[8]	+	+	+	+	+	+
Nogi H, 2003 ^[15]	+	+	-	+	+	+
Pierga JY, 2004 ^[14]	+	+	+	+	+	+
Schindlbeck C, 2005 ^[12]	+	+	+	+	+	+
Solomayer EF, 2001 ^[17]	+	+	+	+	+	+

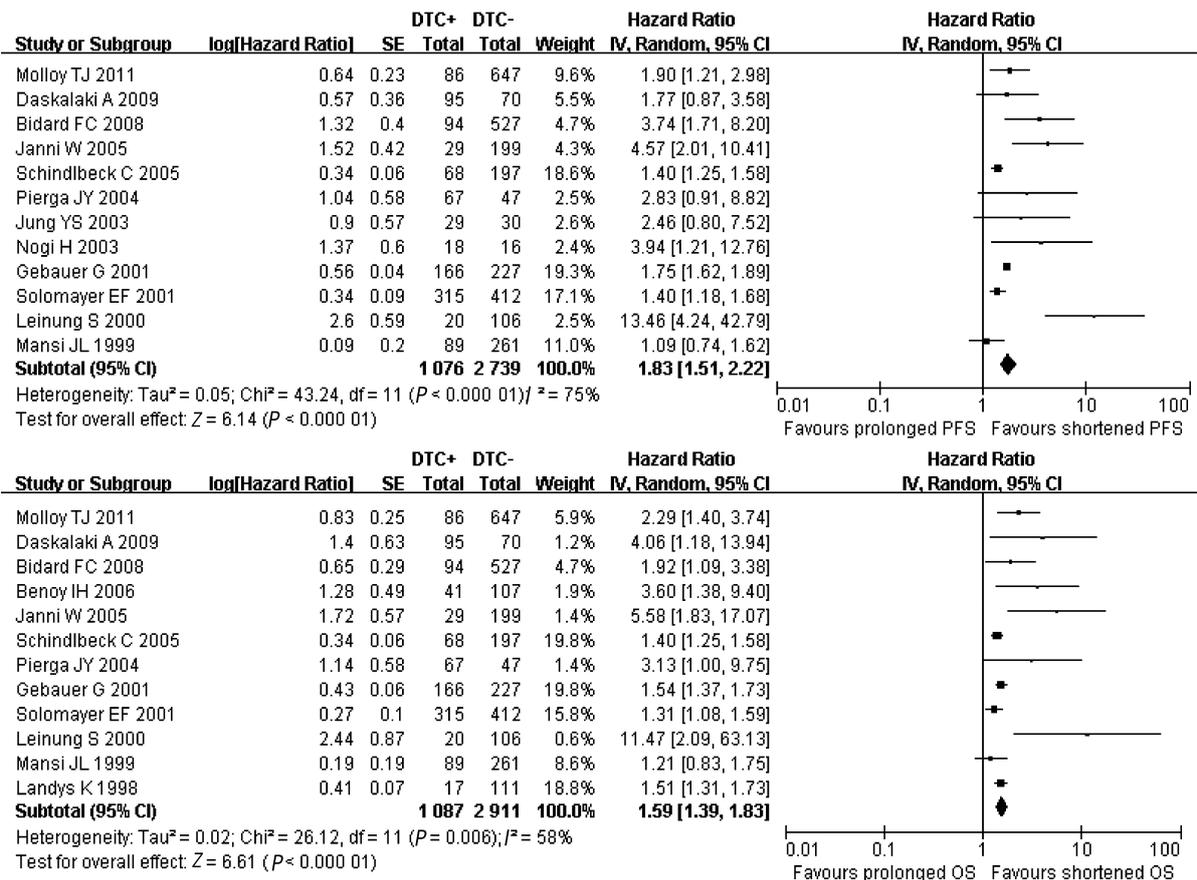


图 1 微转移肿瘤细胞(DTC)预测乳腺癌患者无进展生存期(PFS)与总生存期(OS)的 Meta 分析

Figure 1 Meta-analysis of disseminating tumor cell (DTC) predicting progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) of breast cancer patients

2.3.1 样本采集时间不同

以 PFS 为观察终点的研究中, 术前和术后检测 DTC 的研究异质性检验 P 值分别为 0.006 和 0.003, 采用随机效应模型, 术中检测 DTC 的研究异质性检验 P =

0.33, 采用固定效应模型, 结果提示检测 DTC 阳性者较阴性者在 PFS 方面均有统计学差异。术前: HR = 1.88, 95%CI: 1.36~2.61, n = 2 476, P = 0.000 1; 术中: HR = 1.42, 95%CI: 1.20~1.70, n = 786, P < 0.000 1; 术后: HR =

3.31, 95%CI: 1.39~7.88, $n = 637$, $P = 0.007$, 见图 2A~C。

以 OS 为观察终点的研究中, 术中检测 DTC 的研究只有 1 个, 术前和术后检测 DTC 的研究异质性检验 P 值分别为 0.02 和 0.07, 分别采用随机效应模型和固定效应模型, 结果提示检测 DTC 阳性者较阴性者在 OS 方面均有统计学差异。术前: $HR=1.71$, 95%CI: 1.40~2.08, $n = 2\ 752$, $P < 0.000\ 01$; 术后: $HR=1.55$, 95%CI: 1.38~1.75, $n = 603$, $P < 0.000\ 01$, 见图 2D~E。

2.3.2 检测方法不同

以 PFS 为观察终点的研究中, 以 RT-qPCR 和 ICC 为检测方法的两个亚组异质性检验分别为 $P = 0.51$ 和 $P < 0.000\ 01$, 分别采用固定效应模型和随机效应模型, 结果提示 DTC 阳性者与 DTC 阴性者在 PFS 方面有统计学差异。RT-qPCR: $HR=2.24$, 95%CI: 1.32~3.82, $n = 258$, $P = 0.003$; ICC: $HR=1.79$, 95%CI: 1.45~2.20, $n = 3\ 557$, $P < 0.000\ 01$, 见图 3A~B。

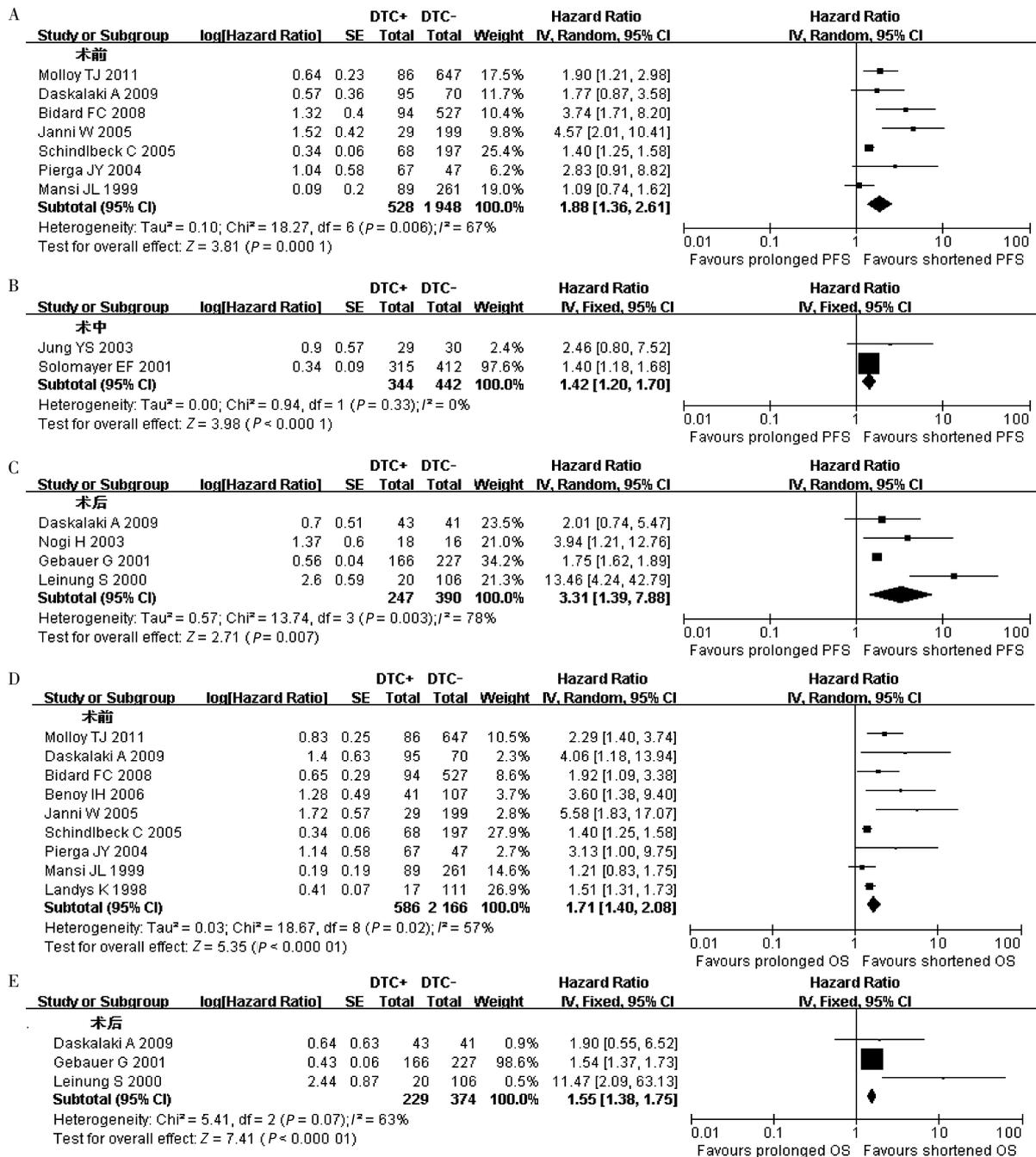


图 2 微转移肿瘤细胞(DTC)预测乳腺癌患者无进展生存期(PFS)与总生存期(OS)不同取材时间 Meta 亚组分析

Figure 2 Subgroup analysis by sampling time of disseminating tumor cell (DTC) predicting progression free survival (PFS) and overall survival(OS) of breast cancer patients

以 OS 为观察终点的研究中,以 RT-qPCR 和 ICC 为检测方法的两个亚组异质性检验分别为 $P = 0.88$ 和 $P = 0.02$, 分别采用固定效应模型和随机效应模型,结果提示 DTC 阳性者与 DTC 阴性者在 OS 方面有统计学差异:RT-qPCR:HR=3.76,95% CI: 1.76~8.03, $n = 313, P = 0.0006$; ICC:HR=1.53,95% CI: 1.35~1.74, $n = 3685, P < 0.00001$,见图 3C~D。

2.4 敏感性分析

排除异质性较大的研究 [13,18-19] 后,PFS 和 OS

组异质性检验 P 值分别为 0.07 和 0.09, 选用固定效应模型,Meta 分析结果均无显著改变。排除高度偏倚研究后,PFS 和 OS 方面的 Meta 分析结果均无明显变化。纳入研究中 3 篇文献 [8,15,17] 以无远处转移生存期(distant metastasis-free survival, DMFS)为观察终点,1 篇文献 [8] 以乳腺癌特异性生存期(breast cancer specific survival, BCSS)为观察终点,分别排除后 PFS 和 OS 组的 Meta 分析结果亦无明显变化。

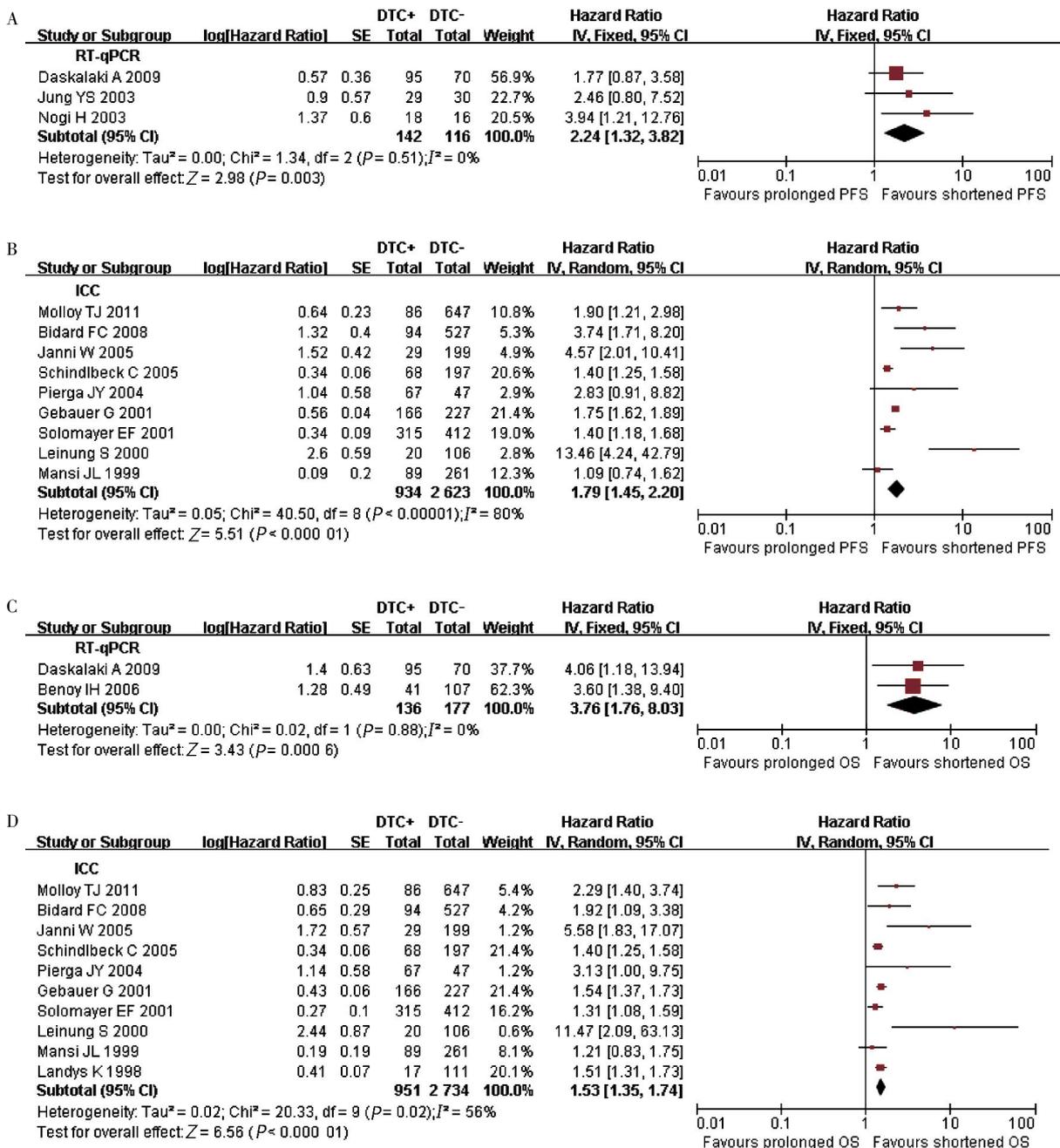


图 3 微转移肿瘤细胞(DTC)预测乳腺癌患者无进展生存期(PFS)与总生存期(OS)不同取材方法 Meta 亚组分析

Figure 3 Subgroup analysis by detection method of disseminating tumor cell (DTC) predicting progression free survival (PFS) and overall survival(OS) of breast cancer patients

2.5 漏斗图分析

对提供 PFS 和 OS 数据的研究分别进行漏斗图分析,未见明显发表偏倚。

3 讨论

我国女性乳腺癌发病率在近 30 年内增加了 1 倍,成为女性发病率最高的恶性肿瘤,严重威胁女性健康^[22]。目前临床肿瘤治疗指南主要根据 TNM 分期选择最佳治疗方案,淋巴结的转移情况起了关键性的作用,但仍有部分淋巴结阴性的乳腺癌患者出现过度治疗或未能发现潜在的复发或死亡高风险,而检测骨髓中的 DTC 可以更准确地判断乳腺癌患者是否存在远处转移,指导临床治疗。本研究纳入了 1998~2011 年的 14 个研究,共 4 091 例乳腺癌患者,分析结果提示术前和术后检测乳腺癌患者骨髓中的 DTC 在 PFS 和 OS 方面均有预测作用 ($P < 0.000 01$),DTC 阳性提示预后不良。既往 2005 年 Braun 等^[6]的 Meta 分析纳入了 1996~2003 年的 8 个研究,汇总了共 4 703 例 I~III 期乳腺癌患者,研究结果提示术前检测 DTC 阳性的乳腺癌患者预后较差。

DTC 的水平在术前、术中和术后并不一致,理论上术后 DTC 的水平更能代表乳腺癌患者的微转移,它不仅包括了术前已存在的微小病变,也包括术中手术操作新形成的微小残留病变。本研究亚组分析结果提示术前、术中和术后 DTC 的水平均与 PFS 和 OS 相关,可见手术前后多次检测 DTC 有助于更好地预测预后。术后检测 DTC 是否能更好地预测乳腺癌患者的预后还需大量对同组患者手术前后同时检测 DTC 的临床试验。有研究提出 DTC 持续存在会明显增加原位复发和远处转移的风险^[4]。DTC 水平在化疗前后的变化与化疗疗效是否相关,能否进一步作为监测指标指导临床治疗仍无定论。进一步在 UICC 各分期或 TNM 分期完全相同的患者中研究 DTC 与辅助治疗疗效和预后的关系有利于更好地指导临床治疗。

本研究亚组分析亦提示分别用 RT-qPCR 或 ICC 的方法检测 DTC 的研究中,DTC 阳性的乳腺癌患者均比 DTC 阴性者预后差,说明两种方法检测均可。ICC 和 RT-qPCR 各有其优缺点。前者是最早用于检测 DTC 的免疫学方法,选择最佳的靶基因/抗原来区分肿瘤细胞和其他不相关的细胞是最大的挑战,目前应用最广泛的是细胞角蛋白,自动化检测设备 (automated cellular imaging system, ACIS) 的出现降低了观察者本身造成的误差;后者目前被认

为是敏感性最高的肿瘤相关标志物的检测方法,同时特异性引物的设计和选择也提高了 DTC 检测的特异性,但这种检测方法目前未能实现自动化,也不能提供 DTC 的具体数目。

综上所述,本研究汇总目前 DTC 用于乳腺癌患者预后预测的研究并进行 Meta 分析,结果提示术前、术中和术后 DTC 阳性均预示乳腺癌患者预后不良,敏感性分析和漏斗图分析结果提示该研究结果可信度高。DTC 提供了早期诊断原位复发和远处转移的新方法,但骨髓穿刺术受技术因素影响较大且可重复性差,限制了 DTC 作为肿瘤患者的预后标志物应用于临床。

[参考文献]

- [1] Ziegler RG, Anderson WF, Gail MH. Increasing breast cancer incidence in China; the numbers add up [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(19):1339-1341
- [2] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (E-BCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival; an overview of the randomised trials [J]. *Lancet*, 2005, 365(9472):1687-1717
- [3] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (E-BCTCG). Polychemotherapy for early breast cancer; an overview of the randomised trials [J]. *Lancet*, 1998, 352(9132):930-942
- [4] Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse—a European pooled analysis [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9):2967-2976
- [5] Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(5):329-340
- [6] Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(8):793-802
- [7] Tierney JF, Stewart LA, Ghersi D, et al. Practical methods for incorporating summary time-to-event data into meta-analysis [J]. *Trials*, 2007, 8:16
- [8] Molloy TJ, Bosma AJ, Baumbusch LO, et al. The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(3):R61
- [9] Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood

- and bone marrow of patients with operable breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(4): 589-597
- [10] Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S, et al. Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(11): 3306-3311
- [11] Benoy IH, Elst H, Philips M, et al. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(5): 672-680
- [12] Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, et al. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(6): 1174-1185
- [13] Janni W, Rack B, Schindlbeck C, et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence [J]. *Cancer*, 2005, 103(5): 884-891
- [14] Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 1392-1400
- [15] Nogi H, Takeyama H, Uchida K, et al. Detection of MUC1 and keratin 19 mRNAs in the bone marrow by quantitative RT-PCR predicts the risk of distant metastasis in breast cancer patients [J]. *Breast Cancer*, 2003, 10(1): 74-81
- [16] Jung YS, Lee KJ, Kim HJ, et al. Clinical significance of bone marrow micrometastasis detected by nested rt-PCR for keratin-19 in breast cancer patients [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(4): 167-172
- [17] Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12): 4102-4108
- [18] Gebauer G, Fehm T, Merkle E, et al. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(16): 3669-3674
- [19] Leinung S, Wurl P, Schonfelder A, et al. Detection of cytokeratin-positive cells in bone marrow in breast cancer and colorectal carcinoma in comparison with other factors of prognosis [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000, 9(6): 905-911
- [20] Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, et al. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study [J]. *Lancet*, 1999, 354(9174): 197-202
- [21] Landys K, Persson S, Kovarik J, et al. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: results of a 20-year median follow-up [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, 49(1): 27-33
- [22] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(4): 281-285

[收稿日期] 2012-02-07



Journal of Biomedical Research (生物医学研究杂志) 简介

Journal of Biomedical Research (生物医学研究杂志), 是一本生物医学专业的英语杂志, 全球发行, 目前已经被 Scopus、哥白尼和荷兰文摘等数据库收录, 在中国南京和美国加州戴维斯市设有办事处。本刊是一本综合性期刊, 欢迎多学科尤其是交叉学科的来稿。本刊接受综述(以约稿为主)、论著和病例报道, 不收取版面费, 欢迎广大作者来稿。

地 址: 江苏省南京市汉中路 140 号 2 号楼 352 室

电 话: 025-86862036

邮 箱: jbr@njmu.edu.cn

主 页: <http://www.jbr-pub.org>

投稿网址: <http://mc03.manuscriptcentral.com/jbrint>