

· 临床研究 ·

## 基于外周血循环肿瘤细胞和 ROMA 指数联合检测在早期卵巢上皮性癌诊断中的初步评价

官燕飞<sup>1</sup>, 陈志强<sup>2</sup>, 袁春雷<sup>1</sup>, 袁 斌<sup>1</sup>, 彭建明<sup>1</sup>, 陈 昂<sup>2\*</sup><sup>1</sup>南方医科大学附属中山博爱医院检验科, <sup>2</sup>病理科, 广东 中山 528400

**[摘要]** **目的:**探究外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)联合罗马(ROMA)指数检测在早期卵巢上皮性癌(epithelial ovarian cancer, EOC)诊断中的价值。**方法:**选取2017年6月—2019年4月期间于中山市博爱医院和中山大学肿瘤防治中心就诊的105例早期EOC患者(恶性组:手术病理分期为I A期和I B期)、152例卵巢上皮性良性肿瘤患者(良性组)和183例女性健康体检者(对照组)为受试者,采集受试者术前静脉血,检测CTC、人附睾蛋白(human epididymal protein, HE4)及糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)水平,结合受试者的绝经状况计算ROMA指数,比较CTC与ROMA指数单项和联合检测结果在3组受试者之间、EOC I A期与I B期之间的差异,综合评估CTC、ROMA指数及联合检测诊断早期EOC效能的差异。**结果:**①CTC、ROMA指数检测结果及单项和联合检测阳性率均在恶性组中最高。②EOC的I B期CTC、ROMA指数检测结果大于I A期,差异具有统计学意义( $Z=3.135, P=0.002; t=34.56, P<0.001$ )。联合检测阳性率在EOC的I A期和I B期之间差异具有统计学意义( $\chi^2=5.24, P=0.02$ )。③CTC诊断早期EOC的特异度和符合率最高,但是与联合检测相比差异均无统计学意义;联合检测诊断早期EOC的灵敏度最高,与CTC、ROMA指数单项检测相比差异均具有统计学意义(均 $P<0.001$ );联合检测诊断早期EOC的约登指数最大;联合检测诊断早期EOC的整体综合效能较高,灵敏度、特异度、符合率、约登指数分别为94.29%、84.18%、86.59%、0.785。**结论:**CTC和ROMA指数单项检测在诊断早期EOC均有一定意义,其检测结果跟I A和I B分期相关。与单项检测相比,联合检测对于诊断早期EOC及分期预测表现出了较高的综合效能,具有较高的临床实用价值。

**[关键词]** 循环肿瘤细胞; ROMA指数; 卵巢上皮性癌**[中图分类号]** R737.31**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)04-570-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20200419

## Preliminary evaluation of combined detection of peripheral blood circulating tumor cells and ROMA index in the diagnosis of early ovarian epithelial carcinoma

GUAN Yanfei<sup>1</sup>, CHEN Zhiqiang<sup>2</sup>, YUAN Chunlei<sup>1</sup>, YUAN Bin<sup>1</sup>, PENG Jianming<sup>1</sup>, CHEN Ang<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, <sup>2</sup>Department of Pathology, Zhongshan BOAI Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan 528400, China

**[Abstract]** **Objective:** To explore the value of peripheral blood circulating tumor cells (CTC) combined with ROMA index in the diagnosis of early epithelial ovarian cancer (EOC). **Methods:** From June, 2017 to April, 2019, 105 patients with early EOC (malignant group: stage I A and stage I B), 152 patients with benign ovarian epithelial tumors (benign group) and 183 healthy women (control group) were selected as subjects. Preoperative venous blood samples were collected and the CTC, human epididymal protein (HE4), and carbohydrate antigen 125 (CA125) were measured. The ROMA index was calculated according to the menopausal status of the subjects. The differences of single and combined test results of CTC and ROMA index among the three groups and the differences between the I A and I B stages of EOC were compared. The efficacy differences in early EOC diagnoses by using CTC and ROMA index and their joint detection were comprehensively evaluated. **Results:** ①The values of CTC and ROMA index, and the positive rates of single or combined detection were all the highest in the malignant group. ②The values of CTC and ROMA index in the I B stage of

**[基金项目]** 广东省医学科学技术研究基金立项课题(A2019348, B2019124); 中山市社会公益科技研究专项立项(2018B1035, 2019B1090); 中山市卫生健康局医学科研立项(2019J165)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 361782947@qq.com

EOC were higher than those in the I A stage ( $Z=3.135, P=0.002; t=34.56, P < 0.001$ ). The difference in the positive rate of combined detection between the I A and I B stages of EOC was statistically significant ( $\chi^2=5.24, P=0.02$ ). ③The specificity and coincidence rate of CTC for early EOC were the highest, but there was no significant difference from those of combined CTC and ROMA detection ( $P > 0.05$ ). The combined detection shows the highest sensitivity in the diagnosis of early EOC, and its differences from the single detection of CTC and ROMA index has statistical significance ( $P < 0.001$ ). The Youden index of early EOC was the highest by combined detection. The sensitivity, specificity, coincidence rate and Youden index of combined detection are 94.29%, 84.18%, 86.59%, and 0.785, respectively, showing a relatively high overall efficacy in the diagnosis of early EOC. **Conclusion:** Single detection of CTC and ROMA index has some significance in the diagnosis of early EOC and the results are correlated with I A and I B staging. Compared with the single detection, combined detection shows a higher comprehensive efficacy in the diagnosis of early EOC and for staging prediction, and thus is of a higher clinical value.

[Key words] circulating tumor cell; ROMA index; epithelial ovarian cancer

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04): 570-574]

卵巢上皮性癌(epithelial ovarian cancer, EOC)病死率高居妇科恶性肿瘤之首,5年生存率约为30%,EOC的早期症状非常隐匿,严重威胁妇女健康<sup>[1]</sup>。目前临床上缺乏一种公认高效而无创的早期EOC诊断方法,因此,寻找EOC的早期诊断方法具有非常实用的临床意义。Ning等<sup>[2]</sup>检测了21例卵巢癌患者外周血,发现有16例患者的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)为阳性。Yanaranop等<sup>[3]</sup>研究发现,大约50%的卵巢癌I期患者糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)呈假阴性,同时在卵巢良性病变也出现了CA125假阳性的病例。人附睾蛋白(human epididymal protein, HE4)在诊断早期无症状卵巢癌的灵敏度较高而特异度较低。学者Moore等<sup>[4]</sup>和Sasa等<sup>[5]</sup>研究表明,CA125和HE4构建的罗马(ROMA)指数相对于单项检测指标,更利于女性盆腔肿块癌变风险的评估。本研究通过综合评估分析CTC、ROMA指数单项及联合检测诊断早期EOC效能的差异,为建立一种无创、便捷、精准的早期EOC诊断方法提供实验依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取2017年6月—2019年4月于中山市博爱医院和中山大学肿瘤防治中心就诊的105例早期EOC患者(恶性组:手术病理分期为I A期和I B期)、152例卵巢上皮性良性肿瘤患者(良性组)和183例女性健康体检者(对照组)为受试者。患者均为卵巢原发性肿瘤,所有受试者经临床多学科证实均未合并其他肿瘤。恶性组:绝经前41例,绝经后64例;年龄31.5~82.4岁,平均年龄(54.82±9.31)岁。良性

组:绝经前43例,绝经后109例;年龄28.5~81.3岁,平均年龄(52.79±7.86)岁。对照组:绝经前68例,绝经后115例;年龄27.9~78.3岁,平均年龄(53.67±8.36)岁。EOC的入选标准按照世界卫生组织2014年制定的分类标准执行<sup>[6]</sup>。EOC的肿瘤分期根据国际妇产科联盟2015年的手术病理分期标准执行<sup>[7]</sup>。受试者绝经标准:①年龄>60岁者;②年龄<60岁者,自然闭经时间>1年,雌激素检测值在40~100 pmol/L之间<sup>[8]</sup>。本研究经中山市博爱医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 ROMA指数检测及判定标准

使用非抗凝管收集受试者术前静脉血液标本4 mL(含抗凝剂),4 000 r/min,离心5 min,分离血清2 h内完成CA125和HE4的检测。COBAS E601化学发光分析仪、CA125和HE4检测试剂盒均购自罗氏诊断产品(上海)有限公司。操作过程严格按试剂说明书进行,分别使用质控品(PreciControl Tumor Marker)和Elecsys PreciControl HE4 1和2进行质控。结合受试者的绝经状况计算ROMA指数。绝经前 $PI=-12.0+2.38 \times \ln HE4+0.062 6 \times \ln CA125$ ;绝经后 $PI=-8.09+1.04 \times \ln HE4+0.732 \times \ln CA125$ 。 $ROMA=\exp(PI)/[1+\exp(PI)] \times 100\%$ 。绝经前患者检测数值 $\geq 11.4\%$ 定为阳性;绝经后患者检测数值 $\geq 29.9\%$ 定为阳性;其他情况定为阴性。

#### 1.2.2 CTC富集、检测及判断标准

人外周血CTC富集和检测试剂盒购自江苏莱尔生物医药科技有限公司。CTC富集、检测流程参考文献<sup>[9]</sup>:使用ACD抗凝管收集受试者术前静脉血液标本4 mL(含抗凝剂),混匀,血浆分离、红细胞裂解、白细胞分离、涂片自然干燥、免疫荧光原位杂

交法(FISH)染色。按照试剂说明书判定 CTC 结果:将细胞核内 FISH 信号 2 个以上,无血源性白细胞表面抗原(红色)阳性的细胞定为 CTC。正常人血液 CTC 参考范围为 0~1 个/4 mL,若受试者 CTC 数目 2 个以上提示血液中存在恶性肿瘤细胞,定为 CTC 阳性受试者。

1.2.3 CTC 和 ROMA 指数联合检测方式

本研究中联合检测方式是并联试验:CTC 和 ROMA 指数检测结果中只要有 1 个以上结果为阳性即为联合检测的阳性结果。只有 2 个检测结果同时为阴性才判定为联合检测的阴性结果。

1.3 统计学方法

使用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理。计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验。计量资料的数据服从近似正态分布时,采用均数和标准差( $\bar{x} \pm s$ )进行统计描述,3 组以上的数据比较采用方差分析,两组之间的数据比较采用 *t* 检验进行统计分析。数据服从非正态分布时,采用中位数(四分位数)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示,非参数秩和检验进行比较。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组绝经状态及年龄

对照组、良性组及恶性组平均年龄总体差异无统计学意义( $F=1.80, P=0.17$ ),在绝经状态构成比总体差异无统计学意义( $\chi^2=4.13, P=0.13$ ,表 1)。

表 1 3 组受试者绝经状态及年龄的比较

Table 1 Comparison of the menopausal status and age among three groups

组别	年龄(岁)	绝经[n(%)]
恶性组(n=105)	54.82 ± 9.31	64(61.0)
良性组(n=152)	52.79 ± 7.86	109(71.7)
对照组(n=183)	53.67 ± 8.36	115(62.8)
$\chi^2/F$ 值	1.80	4.13
<i>P</i> 值	0.17	0.13

2.2 3 组 CTC、ROMA 指数检测结果和阳性率

CTC、ROMA 指数单项和联合检测阳性率分别在对照组、良性组和恶性组之间的总体差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ),CTC、ROMA 指数单项和联合检测阳性率均在恶性组中最高,与对照组及良性组比较,差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.001$ )。CTC 和 ROMA 指数检测数值分别在对照组、良性组与恶性组之间的总体差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.001$ ),CTC 和 ROMA 指数检测数值均在恶性组中最高。与对照组及良性组比较,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.001$ ,表 2)。

2.3 CTC、ROMA 指数单项和联合检测阳性率和数值在恶性组 I A 期和 I B 期之间的比较

EOC 的 I B 期 CTC、ROMA 指数检测单项和联合检测阳性率均大于 I A 期,但 CTC、ROMA 指数检测阳性率在 I A 期和 I B 期之间的差异均无统计学意义(CTC:  $\chi^2=2.21, P=0.140$ ; ROMA 指数:  $\chi^2=1.50, P=0.220$ ),而联合检测阳性率在 EOC 的 I A 期和 I

表 2 各组受试者之间 CTC、ROMA 指数检测数值和阳性率比较

Table 2 Comparison of values and positive rates of CTC and ROMA index among three groups

组别	CTC 检测		ROMA 指数		联合检测
	数值[个, $M(P_{25}, P_{75})$ ]	阳性率[n(%)]	数值[%, $M(P_{25}, P_{75})$ ]	阳性率[n(%)]	阳性率[n(%)]
恶性组(n=105)	4(0,6)	68(64.76)	68.39(15.78, 90.01)	64(60.95)	99(94.29)
良性组(n=152)	0(0,0)	2(1.32)	12.93(7.78, 17.82)	45(29.61)	47(30.92)
对照组(n=183)	0(0,0)	0(0.00)	9.69(7.10, 13.56)	6(3.28)	6(3.28)
$Z/\chi^2$ 值	245.70	246.13	119.08	116.40	245.73
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

B 期之间的差异具有统计学意义( $\chi^2=5.24, P=0.020$ )。EOC 的 I B 期 CTC、ROMA 指数检测数值均大于 I A 期,两者间差异具有统计学意义( $Z=3.14, P=0.002; t=34.56, P < 0.001$ ,表 3)。

2.4 CTC、ROMA 指数诊断早期 EOC 的效能比较

CTC、ROMA 指数单项和联合检测诊断早期 EOC 的灵敏度、特异度、符合率总体差异具有统计学意义( $P < 0.001$ )。CTC 检测法诊断早期 EOC 的

特异度和符合率最高,但是与联合检测法相比差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。联合检测法诊断早期 EOC 的灵敏度最高,与 CTC、ROMA 指数单项检测法相比差异均具有统计学意义(均  $P < 0.001$ )。联合检测法诊断早期 EOC 的约登指数最大。联合检测诊断早期 EOC 的整体综合效能较高,灵敏度、特异度、符合率、约登指数分别为 94.29%、84.18%、86.59%、0.785(表 4)。



表3 CTC、ROMA指数检测结果和阳性率在EOC的IA期和IB期之间的比较

Table 3 Comparison of values and positive rates of CTC and ROMA index between stage IA and IB of epithelial ovarian cancer

手术病理分期	CTC检测		ROMA指数		联合检测阳性率[n(%)]
	数值[个, M(P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	阳性率[n(%)]	数值[% , M(P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	阳性率[n(%)]	
IA期(n=41)	2(0,5)	23(56.10)	31.41 ± 32.05	22(53.66)	36(87.80)
IB期(n=64)	5(0,7)	45(70.31)	69.68 ± 32.86	42(65.63)	63(98.44)
χ <sup>2</sup> /Z/t值	3.14	2.21	34.56	1.50	5.24
P值	0.002	0.140	<0.001	0.220	0.020

表4 CTC、ROMA指数诊断早期EOC的效能

Table 4 Diagnosis efficacy of CTC and ROMA index in early epithelial ovarian cancer

检测方法	总计	EOC		灵敏度(%)	特异度(%)	符合率(%)	约登指数
		阳性(n=105)	阴性(n=335)				
CTC检测				64.76	99.40	91.14	0.642
阳性	70	68	2				
阴性	370	37	333				
ROMA指数检测				60.95	84.78	79.09	0.457
阳性	115	64	51				
阴性	325	41	284				
联合检测				94.29	84.18	86.59	0.785
阳性	152	99	53				
阴性	288	6	282				

### 3 讨论

目前的EOC诊断方法中,B型超声可发现1 cm以上的早期病变,但对于1 cm以下的实性肿瘤灵敏度较差。腹腔镜、细胞学和金标准的病理组织学检查是有创性的检测手段,易对患者造成生理负担和心理影响,无法成为早期EOC的常规筛查手段。

CTC是指进入人体外周血循环的肿瘤细胞。Sun等<sup>[10]</sup>研究发现,EOC发展的任何一个阶段,以早期癌变细胞形式存在的染色体异常细胞CTC都可能脱落入血,CTC出现有可能早于影像学发现或临床表现。本文的初衷是探讨能否通过CTC和ROMA并联的联合检测方式达到诊断及鉴别诊断早期EOC的平衡点,确保联合诊断早期EOC的综合诊断效能维系在较高的灵敏度、特异度、符合率和约登指数,弥补单项检测方法的不足。

为确保CTC来源于卵巢组织的特异性,本研究纳入对象均为卵巢原发性肿瘤,所有受试者经临床多学科证实未合并其他肿瘤。3组病例在绝经状态构成比及年龄上总体差异无统计学意义,排除了绝经状态构成比与年龄差异对检测结果的影响,确保了研究的准确性与严谨性。表2的实验数据从阳性

率及检测值角度反映出CTC、ROMA指数单项和联合检测法跟卵巢病变程度相关,阳性率及检测值均随着卵巢病变程度的加重而不断上升。至于CTC出现于良性组患者中,作者认为可能是卵巢良性肿瘤(如本研究的2例体积较大的成熟囊性畸胎瘤的患者)发生后,机体处于应急状态,故外周血中检测到了CTC。比较EOC的IA期和IB期之间的CTC、ROMA指数单项和联合检测阳性率及数量,结果显示,单项或联合检测阳性率和检测数值均随着分期的增加而增加,提示CTC、ROMA指数单项和联合检测跟EOC的早期分期相关。与Lee等<sup>[11]</sup>和冯艾等<sup>[12]</sup>研究报道CTC、ROMA指数检测结果随着卵巢癌病理分期的增加逐渐增加的结论一致。此外,本研究中出现了一个有趣的现象是:CTC、ROMA指数检测阳性率分别在EOC的IA期和IB期之间差异无统计学意义,而联合检测阳性率在EOC IA期和IB期之间差异具有统计学意义。提示联合检测可能更有助于EOC IA期和IB期的预测。表4的结果说明CTC、ROMA指数单项和联合检测都有助于早期EOC的诊断,但是,相对于CTC、ROMA指数单项检测,联合检测灵敏度最高,约登指数最大,说明联合检测对于早期EOC的整体综合诊断效能较高,

建议临床根据妇科病史结合使用。郭晓英等<sup>[13]</sup>使用ROMA指数诊断108例I~IV期卵巢癌患者,发现ROMA指数诊断卵巢癌灵敏度为85.19%,特异度为83.34%。而本文的灵敏度为60.95%,特异度为84.78%。作者认为之所以与文献报道不一致,主要是因为郭晓英等<sup>[13]</sup>研究的是手术病理分期为I~IV期的卵巢癌患者,而本文仅为EOC的IA与IB期患者,本文的实验结论更适用于IA与IB期EOC患者的早期诊断。Pearl等<sup>[14]</sup>对129例卵巢癌患者术前进行CTC检测,CTC诊断卵巢癌的灵敏度为46.4%、特异度为100.0%,与本文报道的灵敏度64.76%和特异度99.40%不一致,究其原因可能是Pearl等<sup>[14]</sup>采用的CTC检测方法是功能捕获技术法,而本文采用的是免疫磁微粒阴性富集结合imFISH技术,该技术不依赖于肿瘤细胞表面抗原及标志物的表达,具有较高的稀有细胞回收率,进而提高了检测效率。

本研究认为,CTC作为一种新兴的分子标志物,与传统ROMA指数检测技术并不矛盾,反之,两者的联合检测也许能为早期EOC诊断带来新的发现。下一步的目标是收集更多的EOC样本,进一步深入探讨CTC联合ROMA指数检测与EOC肿瘤期别、病理类型与分级等的相关性,以期获得更多关于早期EOC的生物学特征信息,指导临床精准诊断与治疗。

#### [参考文献]

- [1] 骆潇洁,沈宇飞. 间皮素对卵巢癌诊断价值的Meta分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(4): 514-518
- [2] NING N,ZHAN T,ZHANG Y, et al. Improvement of specific detection of circulating tumor cells using combined CD45 staining and fluorescence *in situ* hybridization [J]. Clin Chim Acta, 2014, 433: 69-75
- [3] YANARANOP M, JANTARATEPEWAN N, TIYAYON J, et al. Significance of serum human epididymis protein 4 and cancer antigen 125 in distinguishing type I and type II epithelial ovarian cancers [J]. Int J Gynecol Cancer, 2018, 28(6): 1058-1065
- [4] MOORE R G, MCMEEKIN D S, BROWIL A K, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4-and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass [J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 40-46
- [5] SASA K, ALEKSANDAR S, KATARINA J, et al. The utility of human epididymal protein 4, cancer antigen 125, and risk for malignancy algorithm in ovarian cancer and endometriosis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2012, 22(2): 238-244
- [6] KURMAN R J, CARCANGIU M L, HERRINGTON C S, et al. WHO classification of tumours of female reproductive organs [M]. 4th ed, Lyon: IARC Press, 2014
- [7] PRAT J, BELHADJ H, BEREK J, et al. Abridged republication of FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2015, 36(4): 367-369
- [8] 陈燕,林莺莺,郑瑜宏,等. 血清HE4、CA125和ROMA指数评估卵巢癌风险性的初步评价[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(2): 168-174
- [9] 田晓坤,李玉明,胡宝光,等. 胃癌患者外周血Cytel循环肿瘤细胞检测及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(2): 208-210
- [10] SUN D, CHEN Z, WU M, et al. Nanomaterial-based microfluidic chips for the capture and detection of circulating tumor cells [J]. Nanotheranostics, 2017, 1(4): 389-402
- [11] LEE M, KIM E J, CHO Y, et al. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) captured by microfluidic device in patients with epithelial ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2017, 145(2): 361-365
- [12] 冯艾,张琳,陈艳炯,等. 不同绝经状态女性血清HE4、CA125和ROMA指数在卵巢癌诊断中的意义[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(1): 78-83
- [13] 郭晓英,王晓静,李炳霞,等. 卵巢恶性肿瘤风险值在卵巢癌及其FIGO分期中应用与诊断价值[J]. 国际免疫学杂志, 2015, 38(4): 329-332
- [14] PEARL M L, ZHAO Q, YANG J, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2014, 134(3): 581-590

[收稿日期] 2019-05-17