

2020
5



临床实验室

Clinical Laboratory

May 2020 Volume 14, No. 5

京工商印广登字20060012号 发布单位: 北京亿邦联合广告有限公司 www.ivdchina.com 第十四卷 2020年 第5期 (总第157期)

【综述】

应用 **SE-i•FISH[®]** 同步联合检测异倍体 **CTC** 与 **CTEC** 的重要临床意义

程洪艳¹ 李一林² 王书航³ 刘颖⁴ 王丹丹⁴ 林平⁴ 昌晓红¹

¹ 北京大学人民医院妇科肿瘤中心

² 北京大学肿瘤中心, 北京肿瘤医院消化肿瘤内科

³ 中国国家癌症中心, 国家肿瘤临床医学研究中心, 中国医学科学院, 北京协和医学院肿瘤医院

⁴ 赛特生物医药科技有限公司 (中国医药城)

通讯作者: 北京大学人民医院妇科肿瘤中心副主任 昌晓红教授

Cheng et al., 2020 *Clinical Laboratory* 14(5):43-48



昌晓红，研究员、博士生导师，北京大学人民医院妇科肿瘤研究室副主任。中国女医师协会干细胞与免疫细胞专业委员会主委、中国医药生物技术协会理事、中国医药生物技术协会医药生物技术临床应用委员会委员、中国医药生物技术协会慢病管理分会第一届委员会委员、中国女医师协会妇产科专业委员会委员、中国整形美容协会干细胞研究与应用分会第一届理事会常务理事、医学参考报干细胞与再生医学频道第一届编辑委员会常务编委、《中国妇产科临床杂志》编委、《中国医药生物技术杂志》编委。主要从事卵巢癌和子宫内膜异位症的科学研究以及妇产科临床工作，在卵巢癌治疗性疫苗的开发和卵巢癌免疫治疗方面有着深入的研究，参与研发的6B11抗独特型微抗体负载DC和细胞因子诱导的自体卵巢癌杀伤细胞（6B11-OCIK）注射液获得FDA临床I期批件（2015L00426）；建立了国内首个子宫内膜异位症永生细胞系，积极探索子宫内膜异位症蛋白质组学和药物治疗方面的研究。主持国家自然科学基金项目5项，北京市自然科学基金2项，作为子课题主持国家重大新药创制项目1项，863子课题1项，参与国家863、211、北京市重点项目等。参与获得中国国家发明专利3项，美国专利1项。2019年获第六届中国女医师协会五洲女子科技奖基础医学科研创新奖，获2017年中国产学研合作创新奖。以第6完成人获得国家科技进步二等奖。以第3完成人获得2007年高等学校科学技术奖技术发明一等奖。第2完成人获得2008年中华医学科技奖三等奖。在国外及国内核心期刊发表学术论文100余篇，参加编辑妇产科及临床肿瘤学专著3部。

应用SE-i · FISH同步联合检测异倍体CTC与CTEC的重要临床意义

程洪艳 李一林 王书航 刘颖 王丹丹 林平 昌晓红

【摘要】 肿瘤患者的外周血存在循环肿瘤细胞（CTC）及循环肿瘤血管内皮细胞（CTEC），分别表达不同的标志物并具有染色体异倍体特征，共同构成了外周血中一对最重要的“细胞型循环肿瘤标志物”。CTC与CTEC两者相辅相成，在肿瘤的发生、发展、转移、肿瘤新血管生成等方面可能发挥非常重要的作用。“差相富集-多重瘤标免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交（SE-i · FISH）”技术，首次将CTC、CTEC的富集与后续染色体异倍体及多种肿瘤标志物蛋白表达的检测进行了有效整合，并成功应用于一系列CTC/CTEC的临床检测与科学研究，结果显示，独特的SE-i · FISH可以为开展CTC/CTEC在肿瘤早期诊断、疗效快速评估、肿瘤耐药与复发的实时监测、以及单细胞基因分析等方面提供可靠的技术保障。该文对应用SE-i · FISH有效检测CTC和CTEC的相关研究和临床意义做一综述，为开展相关检测与实验提供指导。

【关键词】 CTC；CTEC；肿瘤转移；肿瘤新生血管形成；染色体异倍体；肿瘤标志物

作者单位：北京大学人民医院妇产科，北京大学人民医院妇科肿瘤中心（程洪艳 昌晓红）；北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所消化肿瘤内科，恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室（李一林）；中国国家癌症中心，国家肿瘤临床医学研究中心，中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院（王书航）；赛特生物医药科技有限公司（刘颖 王丹丹 林平）

通讯作者：昌晓红

循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cell, CTC) 是指存在于外周血中的肿瘤细胞, 其由原发、转移或复发肿瘤的某些肿瘤细胞发生上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 入血形成, 与肿瘤转移、复发等有着极为密切的关系, 被称为潜在转移性肿瘤的“液体活检”。CTC先后被美国FDA和中国CFDA批准用于转移性乳腺癌、肠癌和前列腺癌的临床诊断和预后评估, 在多种肿瘤的诊断、预后评估、疗效评价、耐药及复发监测、精准治疗靶点筛选等方面均表现出临床应用价值, 成为肿瘤研究的热点^[1-3]。

当人们的目光还在聚焦于CTC的同时, “细胞型循环肿瘤标志物”的另一重要组成部分——循环肿瘤血管内皮细胞 (Circulating Tumor-derived Endothelial Cell, CTEC) 已开始进入人们的视野^[4]。CTEC可能来源于肿瘤组织内血管上的“肿瘤内皮细胞” (Tumor-derived Endothelial Cell, TEC), 一群存在CD31⁺及8号染色体异倍体的特殊的内皮细胞^[5-6]。TEC从血管进入循环成为CTEC, 在转移肿瘤新生血管形成中可能发挥重要作用, 可作为新型肿瘤标志物^[7-8]。

随着CTEC的发现以及相关高特异性检测技术的成熟, 人们已意识到以往检测的CTC中实际上含有显著数量的CTEC, 两者各不相同, 但均具有非常重要的临床意义。与单一检测CTC不同, 原位、同步、联合检测CTC与CTEC在肿瘤辅助诊断、疗效快速评估 (包括手术、放化疗及靶向药物效)、预后判断以及肿瘤耐药与复发的实时监测等临床应用方面显得尤为重要, 可为肿瘤患者个体化精准诊疗提供有效的技术保障。

一、肿瘤细胞的染色体异倍体

染色体异倍体是肿瘤细胞共有的生物学特性, 同时也是被人们广泛接受的判断肿瘤细胞的标准^[9]。染色体异倍体分为天生性 (constitutional) 及体细胞性 (somatic) 两种类型。前者源自生殖细胞减数分

裂时期因染色体分离不当, 而导致全身所有不同器官的细胞均具有异倍体的特性; 而后者来自体内某些细胞在特定诱导条件下的有丝分裂偏差, 形成整条染色体或某条染色体大片段的异倍体性状, 是肿瘤细胞最常见的特征, 与肿瘤的发生、发展密不可分。

大约90%的实体瘤和75%的血液癌表现出染色体非整倍性^[10-11]。特别是在多种实体瘤的肿瘤细胞中观察到8号染色体异倍体, 包括肺癌、胃癌、胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、食管癌、肝癌等^[12]。此外, 在肿瘤包块的内皮细胞TEC中也发现8号染色体异倍体^[5, 13]。异倍体可导致细胞基因组的不稳定性, 影响基因的表达, 进而产生显著的表型变化, 并导致肿瘤细胞的高异质性、耐药以及治疗无效。染色体异倍体作为肿瘤细胞的标志性特征, 不仅广泛存在于实体肿瘤、血液肿瘤的细胞中, 同时也存在于CTC、CTEC中^[14]。

二、常见CTC检测方法

CTC检测主要由“分离”与“鉴别”两个环节构成。“抓得住”与“看得见”是CTC检测有效性的关键指标, 对保障检测的灵敏度与特异性起着关键作用。

已被报道的CTC检测技术手段种类繁多。其中用于分离CTC的方法可归纳为三大类, 即基于EpCAM等上皮抗原表达的阳性捕获法、基于细胞大小的过滤法以及基于CD45抗体去除白细胞的阴性富集法。阳性捕获法也即是人们熟知的“钓鱼法”, 主要原理是使用固相载体 (如芯片、磁珠等) 上的抗体或多肽直接抓取表达了EpCAM等上皮抗原的CTC, 但受上皮抗原高异质性表达及EMT过程大量降解等严重影响, 导致检出率降低。过滤法虽然比较便捷, 不受抗原表达和EMT影响, 但在过滤去除体积较小的白细胞的同时, 很多具有重要临床意义的小细胞CTC (如肝癌CTC、间质化CTC等) 也会被滤掉。常规阴性富集法的主要问题是不能有效去除血液中的大部分白细胞, 而且采用低渗裂解法溶破去除红细胞的同时, 也会对CTC造成

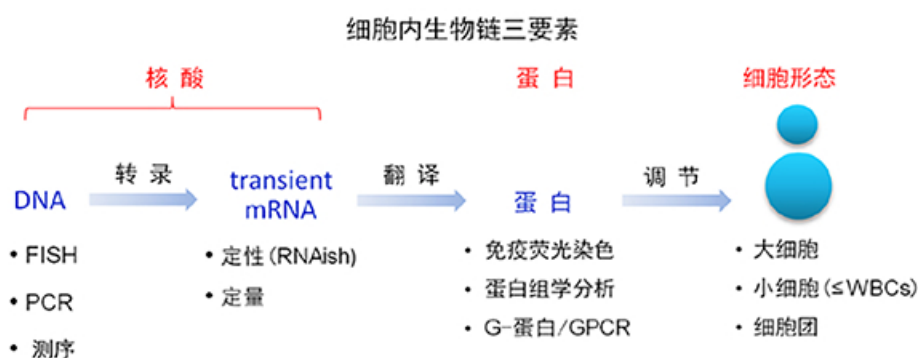


图1. 细胞内生物链三要素
肿瘤细胞内的生物链三要素主要由核酸（包括DNA、RNA等）、蛋白及细胞形态三者构成

极大的损害，获取的失活CTC已不再适于后续肿瘤细胞的原代培养、功能性研究及RNA测序等。

有关CTC鉴别方法，目前最具代表性的技术为核酸检测（RT-PCR等）和免疫染色（ICC/IF）。但由于大多肿瘤标志物尚不明确，上皮黏附因子EpCAM与角蛋白CK目前仍然是CTC鉴定的主要标志物，其受异质性表达和EMT降解的严重影响而产生不可忽视的假阴性检测结果。

三、SE-i·FISH 有效分离、鉴别、分型CTC与CTEC 各种亚类细胞

最近，一种新颖的整合技术“差相富集-蛋白抗体染色合并染色体荧光原位杂交”（SE-i·FISH）已被报道，在国内外广泛应用于CTC/CTEC的临床与基础研究^[1]。其使用了特殊的非血源性细胞分离介质去除红细胞，利用多种抗白细胞表面标志物抗体组合包被的磁珠最大程度去除血液中的白细胞，差相富集（Subtraction Enrichment, SE）循环肿瘤细胞；在鉴定中将蛋白染色与染色体荧光原位杂交有效结合（immunostaining-FISH, iFISH），原位、同步对细胞进行蛋白表型与染色体核型的联合检测，兼顾了DNA、蛋白表达及细胞形态这三大“细胞内生物链要素”（图1）^[14]，有效检测各种肿瘤标志物表达的异倍体CTC及CTEC^[16]（图2）。SE-iFISH CTC检测方法不受细胞表面标志物表达和细胞大小限制，可以高效获得异质性循环肿瘤细胞，进行分型分析及后续功能机制研究。

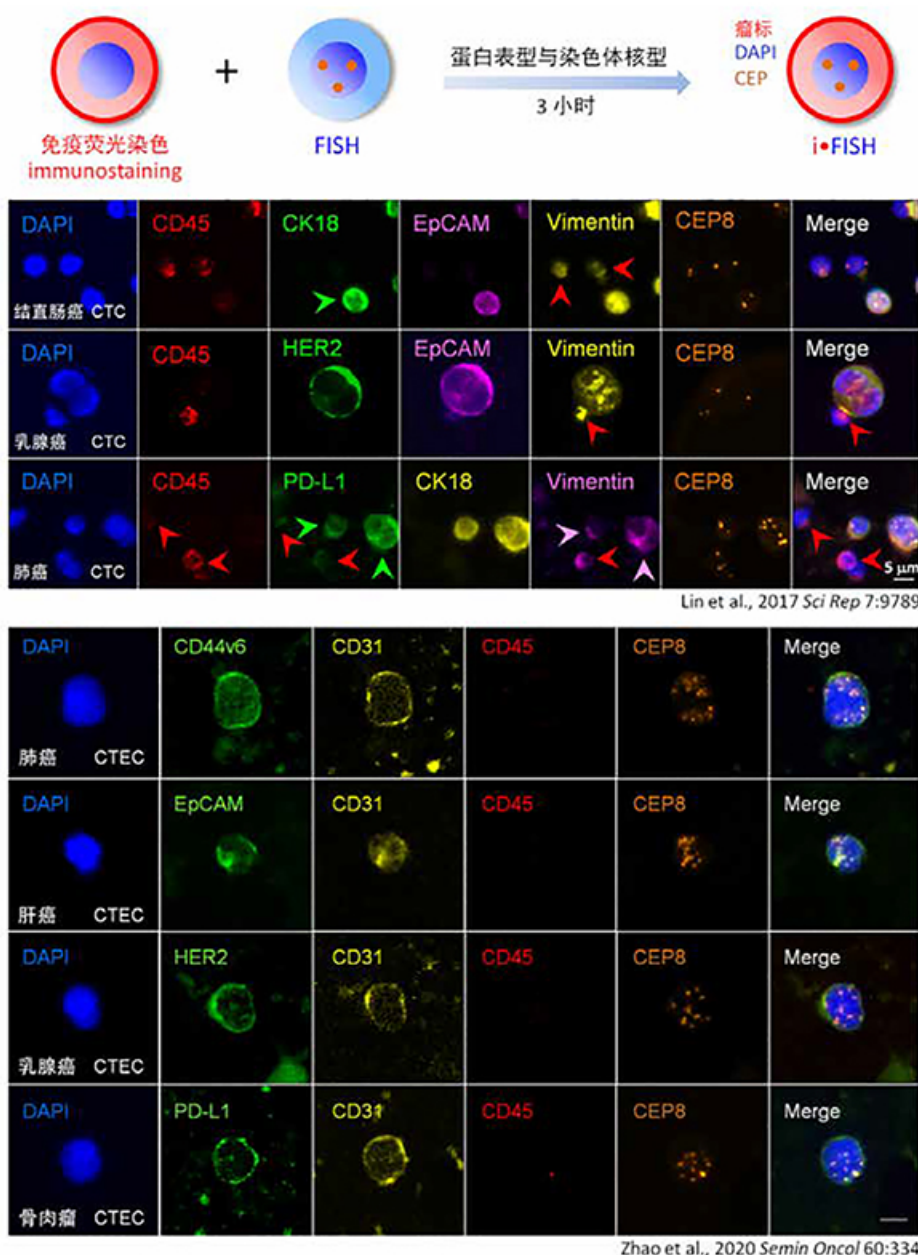


图2. iFISH鉴别、检测异倍体CTC及CTEC。

iFISH主要由免疫荧光染色及染色体荧光原位杂交（FISH）整合而成，可对待检细胞同步、原位开展染色体核型及蛋白表型联合检测与分析。

四、血液中异倍体循环稀有细胞分类

血液中异倍体循环稀有细胞（aneuploid circulating rare cell, apCRC）可以分为血源性apCRC（CD45⁺）（如淋巴瘤、骨髓瘤细胞）及非血源性apCRC（CD45⁻），后者主要由异倍体CTC（CD31⁻）及CTEC（CD31⁺）组成^[14]（图3）。某些CTC、TEC可表达肿瘤标志物。

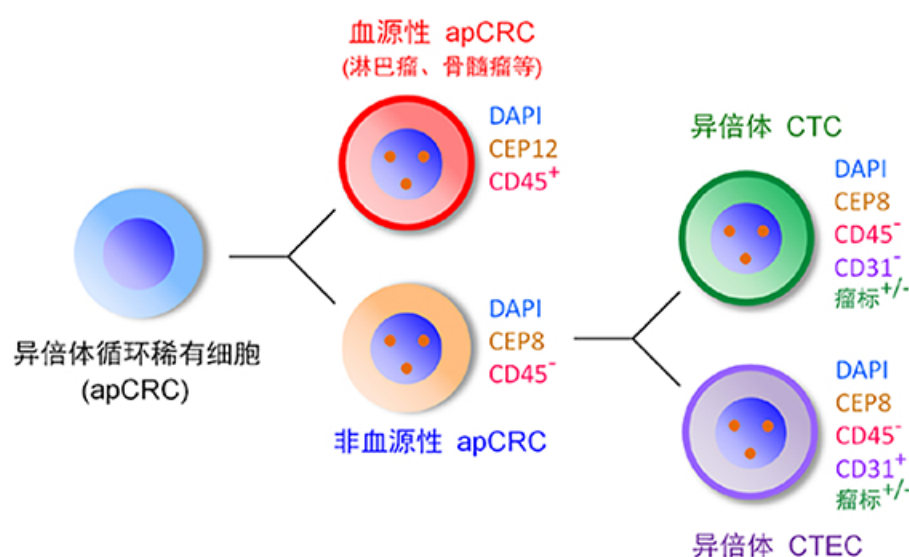


图3. 血液中异倍体循环稀有细胞分类

血液中异倍体循环稀有细胞apCRC主要由血源性及非血源性两大类细胞组成。其中非血源性循环稀有细胞的主要组成成分为异倍体CTC (CD45⁻/CD31⁻) 及异倍体CTEC (CD45⁻/CD31⁺)。某些CTC、CTEC可表达肿瘤标志物

五、SE-i · FISH用于检测与分类异倍体CTC、CTEC的重要临床意义

使用赛特生物SE-i · FISH方法检测CTC/CTEC，无论细胞大小或者是否表达了肿瘤标志物，都可以在高灵敏、高特异的基础上对各类细胞做到有效检测并确定具有不同临床意义的CTC/CTEC亚类细胞。

上海第一人民医院与德国慕尼黑医学中心的SE-i · FISH联合实验证实，EpCAM⁺的多倍体乳腺癌CTC及骨髓中的DTC与肿瘤远端转移、较差预后密切相关^[17]。北京清华大学长庚医院应用SE-i · FISH的临床研究发现，肝癌患者术后一周检测出的特殊CTC亚类细胞（小细胞、≥5倍体、EpCAM⁺）的数量与患者术后复发密切相关^[18]。北京大学肿瘤中心/北京肿瘤医院消化内科的临床比对实验结果显示，传统的CellSearch阳性捕获方法在已确诊的胃癌患者中的CTC检出率为54.8%，而SE-i · FISH在同一临床实验相同患者中的检出率为90.5%。进一步针对这些胃癌患者的蛋白表型与染色体核型分析发现，胃癌CTC的亚类细胞（CK18⁻，8号染色体三倍体）对顺铂具有内源性耐药的特征，而另一亚类CTC（CK18⁻，≥4倍体）具有对顺铂继发性耐药的特性^[19]。类似的结果在转移型人源肿瘤动物模型（mPDX）的实验中也得到了证实^[20]。应用相同技术手段，北京肿瘤医院消化内科团队进一步成功锁定了与耐药相关的HER2⁺胃癌CTC^[21]。此外，华西医院开展的临床实验也揭示了鼻咽癌患者的CTC亚类细胞与肿瘤分期等密切相关^[22]。北京协和医院与中国医学科学院基础医学研究所联合使用SE差相富集技术，在获取的肺癌CTC寡细胞上成功开展了EGFR点突变检测以评估靶向药物易瑞沙治疗的可靠性^[23]。

最近，北京胸科医院应用SE-i · FISH开展了评估肺癌NSCLC患者PD-L1⁺ CTEC在免疫治疗过程中的临床意义的研究。获得的研究成果发现，与同步检测出的PD-L1⁺ CTC不同，多倍体PD-L1⁺ CTEC具有对0药（Opdivo）“内源性耐药”特性，而三倍体PD-L1⁺ CTEC则呈现“诱发性耐药”特性。8号染色体多倍体PD-L1⁺ CTEC的PD患者，无进展生存期（PFS）明显缩短^[24]。

六、结论

CD31⁻ CTC与CD31⁺ CTEC是两类不同的“细胞型循环肿瘤标志物”，具有不同的临床意义。在检测过程中不能将两者混为一谈。SE-i·FISH可以帮助人们根据不同瘤种以及不同临床需求，将自由选取的各种特异性肿瘤标志物的免疫荧光染色与FISH相结合，在进一步提高CTC检测的灵敏性与特异性的基础上，能够获取其它单一技术手段所不能提供的CTC/CTEC及其亚类细胞的生物学信息，并进一步锁定不同瘤种的CTC/CTEC各种亚类细胞与肿瘤患者的预后、转移、耐药、复发的相关性，指导对具有不同临床意义的CTC、CTEC亚类单细胞进行RNA、DNA单细胞测序，从而提高肿瘤的临床治疗疗效、加深对肿瘤发生和发展的了解、以及寻找新的肿瘤标志物、开发抗肿瘤新药等方面提供更多的帮助。

参考文献

- [1] Rossi E, Fabbri F. CTCs 2020: Great Expectations or Unreasonable Dreams. *Cells*. 2019; 27, 8(9). pii: E989.
- [2] Heller G, McCormack R, Kheoh T, Molina A, Smith MR, Dreicer R, Saad F, Wit R, Aftab DT, Hirmand M, Limon A, Fizazi K, Fleisher M, Bono JS, Scher HI. Circulating Tumor Cell Number as a Response Measure of Prolonged Survival for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Comparison with Prostate-Specific Antigen across Five Randomized Phase III Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 2018; 36(6):572-580.
- [3] Moon DH, Lindsay DP, Hong S, Wang AZ. Clinical indications for, and the future of, circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;125:143-150.
- [4] Lin PP, Gires O, Wang DD, Li L, Wang H. Comprehensive in situ co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells. *Sci Rep* 2017, 7(1): 9789.
- [5] Hida, K.; Klagsbrun, M. A new perspective on tumor endothelial cells: Unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res*. 2005, 65, 2507-2510.
- [6] Hida, K.; Hida, Y.; Amin, D.N.; Flint, A.F.; Panigrahy, D.; Morton, C.C.; Klagsbrun, M. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res*. 2004, 64, 8249-8255.
- [7] Bhakdi SC, Suriyaphol P, Thaicharoen P, et al. Accuracy of Tumour-Associated Circulating Endothelial Cells as a Screening Biomarker for Clinically Significant Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1064.
- [8] Cima, I.; Kong, S.L.; Sengupta, D.; Tan, I.B.; Phyo, W.M.; Lee, D.; Hu, M.; Iliescu, C.; Alexander, I.; Goh, W.L.; et al. Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer. *Sci. Transl. Med*. 2016, 8, 345-389.
- [9] Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW: On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(10):773-785.
- [10] Weaver, B.A.; Cleveland, D.W. Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol*. 2006, 18, 658-667.
- [11] Williams, B.R.; Amon, A. Aneuploidy: Cancer's fatal flaw? *Cancer Res*. 2009, 69, 5289-5291.

- [12] Lin, P.P. Integrated EpCAM-independent subtraction enrichment and iFISH strategies to detect and classify disseminated and circulating tumors cells. *Clin. Transl. Med.* 2015, 4, 38.
- [13] Akino, T.; Hida, K.; Hida, Y.; Tsuchiya, K.; Freedman, D.; Muraki, C.; Ohga, N.; Matsuda, K.; Akiyama, K.; Harabayashi, T.; et al. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. *Am. J. Pathol.* 2009, 175, 2657–2667.
- [14] Lin PP: Aneuploid CTC and CEC. *Diagnostics (Basel)* 2018, 8(2):26.
- [15] Lin PP: Integrated EpCAM-independent subtraction enrichment and iFISH strategies to detect and classify disseminated and circulating tumors cells. *Clin Transl Med* 2015, 4(1):38
- [16] Zhao Y, Li J, Li D, Wang Z, Zhao J, Wu X, Sun Q, Lin PP, Plum P, Damanakis A et al: Tumor biology and multidisciplinary strategies of oligometastasis in gastrointestinal cancers. *Semin Cancer Biol* 2020, 60:334–343
- [17] Liu X, Li J, Cadilha BL, Markota A, Voigt C, Huang Z, Lin PP, Wang DD, Dai J, Kranz G et al: Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis (SA Highlight). *Sci Adv* 2019, 5(6):eaav4275.
- [18] Wang L, Li Y, Xu J, Zhang A, Wang X, Tang R, Zhang X, Yin H, Liu M, Wang DD et al: Quantified postsurgical small cell size CTCs and EpCAM(+) circulating tumor stem cells with cytogenetic abnormalities in hepatocellular carcinoma patients determine cancer relapse. *Cancer Lett* 2018, 412:99–107.
- [19] Li YL, Zhang XT, Ge S, Gao J, Gong JF, Lu M, Zhang QY, Cao YS, Wang DD, Lin PP et al: Clinical significance of phenotyping and karyotyping of circulating tumor cells in patients with advanced gastric cancer. *Oncotarget* 2014, 5(16):6594–6602.
- [20] Jiang J, Wang DD, Yang M, Chen D, Pang L, Guo S, Cai J, Wery JP, Li L, Li H et al: Comprehensive characterization of chemotherapeutic efficacy on metastases in the established gastric neuroendocrine cancer patient derived xenograft model. *Oncotarget* 2015, 6(17):15639–15651.
- [21] Li Y, Zhang X, Liu D, Gong J, Wang DD, Li S, Peng Z, Wang X, Lin PP, Li M et al: Evolutionary Expression of HER2 Conferred by Chromosome Aneuploidy on Circulating Gastric Cancer Cells Contributes to Developing Targeted and Chemotherapeutic Resistance (CCR Highlight). *Clin Cancer Res* 2018, 24(21):5261–5271.
- [22] Zhang J, Shi H, Jiang T, Liu Z, Lin PP, Chen N: Circulating tumor cells with karyotyping as a novel biomarker for diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma. *BMC cancer* 2018, 18(1):1133.
- [23] Ran R, Li L, Wang M, Wang S, Zheng Z, Lin PP: Determination of EGFR mutations in single cells microdissected from enriched lung tumor cells in peripheral blood. *Anal Bioanal Chem* 2013, 405(23):7377–7382.
- [24] Zhang L, Zhang X, Liu Y, Zhang T, Wang Z, Gu M, Li Y, Wang DD, Li W, Lin PP: PD-L1(+) aneuploid circulating tumor endothelial cells (CTECs) exhibit resistance to the checkpoint blockade immunotherapy in advanced NSCLC patients. *Cancer Lett* 2020, 469:355–366.