

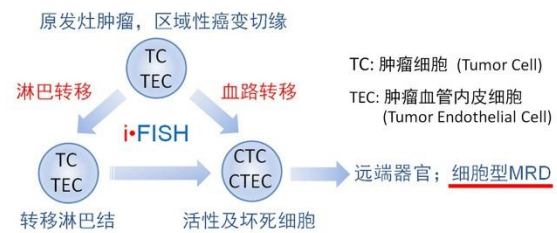
iFISH 肿瘤组织与液体活检精准定位区域性癌变手术切缘及有效检测细胞型 MRD

循环肿瘤细胞 (CTC) 和循环肿瘤血管内皮细胞 (CTEC) 构成了肿瘤患者术后的“细胞型 MRD”，CTC、CTEC 数目升高与肿瘤复发的密切相关性已被广泛证实^[1-3]，然而关于这些术后增高的细胞来源的研究却始终为空白。随着人们对肿瘤原发灶周围“区域性癌变 (field cancerization, FC)”的认知不断加深，意识到以往区域性癌变在肿瘤术后复发过程中的重要作用被严重低估^[4]。因此，“肿瘤切除过程中是否存在区域性癌变手术切缘、切缘与术后升高的 CTC、CTEC 是否具有关联性”等问题近来已开始受到人们的密切关注。区域性癌变细胞是具有正常细胞形态的一类细胞，不适于常规病理检测^[4,5]。MD Anderson 分子病理中心明确指出区域性癌变细胞最大的特点在于其染色体异倍体及基因突变^[5]，但目前广泛应用的病理组织切片又会造成细胞核及所含染色体数目不完整，难以有效检测肿瘤原发灶周围的区域性癌变细胞。

最近，广州南方医科大学皮肤病医院暨广东省皮肤病医院外科、皮肤科肿瘤学组、病理科及首都医科大学附属北京胸科医院与赛特生物首次应用“双相 iFISH 肿瘤组织与液体定量活检技术”，沿着黑色素瘤诊断-转移-手术-术后免疫治疗-细胞型 MRD 轴线，从肿瘤细胞三要素 (染色体、瘤标蛋白、细胞形态) 三维层面，在兼顾肿瘤组织与肿瘤液体活

检的基础上，首次对淋巴转移通路中的肿瘤原发灶、区域性癌变手术切缘、前哨淋巴结 (SLNs) 中表达了 PD-L1、肿瘤细胞增殖标志物 Ki67、抑癌蛋白 p16 及细胞间质化标志物 Vimentin 的各种完整异倍体肿瘤细胞 TC、肿瘤血管内皮细胞 TEC 开展了全方位检测与分析。该研究同时检测了患者免疫治疗过程中及治疗后外周血中的“细胞型 MRD”活性及坏死 PD-L1+ CTC、CTEC。

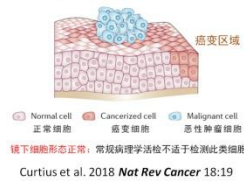
诊断 → 手术 → 术后动态评估免疫治疗疗效 → 细胞型MRD



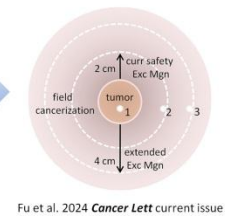
nature reviews cancer

An evolutionary perspective on field cancerization

区域性癌变 (Field Cancerization)



iFISH 肿瘤组织定量活检
精准定位区域性癌变手术切缘



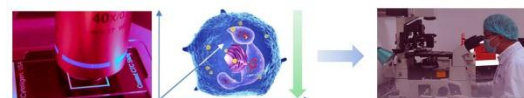
iFISH 病理组织活检 (iFISH Tumor Tissue Biopsy)

针对原发灶肿瘤组织开展“多维度分子病理检测”- TC, TEC

各种新鲜病理组织标本 → 制备完整的 TC、TEC 游离单细胞 → iFISH

iFISH 6-通道3D全自动图像扫描与分析系统

精准单细胞测序与分析
(分别挑取各种 iFISH 亚类细胞)



获得的研究成果为肿瘤精准诊疗、合理定位手术最佳切缘位置、实时评估疗效提供了十分有效的新途径，并揭示了肿瘤转移过程中各种亚类细胞是如何相互关联的。相关文章刚刚得到发表 (Fu et al. 2024 *Cancer Letters* 598:217099)(2021IF=9.756)。南方医科大皮肤病医院外科何仁亮主任与赛特生物林平博士为本文通讯作者。



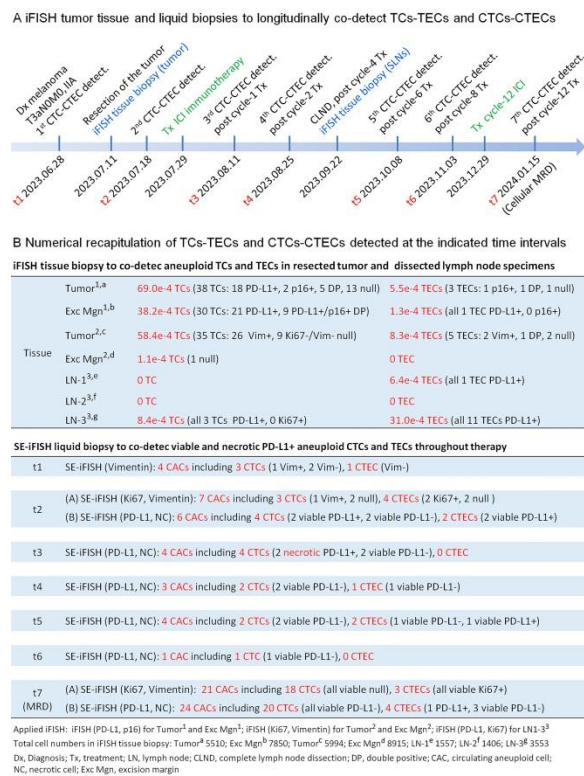
本文要点:

- 该研究首次在分子病理层面全方位观察并展现了肿瘤原发灶、区域性癌变切缘、肿瘤转移前哨淋巴结中的 TC、TEC 及动态监测的治疗过程中外周血 CTC 和 CTEC、治疗后“细胞型 MRD” CTC、CTEC 各亚类细胞在肿瘤治疗及转移过程中如何分布与相互关联

- 采用“**i-FISH 肿瘤组织活检**”技术检测肿瘤原发灶及手术切缘部位完整肿瘤细胞，发现切缘部位富含大量 PD-L1⁺TC 及 PD-L1⁺/CD31⁺TEC，首次定量证实“区域性癌变切缘”的存在，以及术后残留的区域性癌变细胞与术后“细胞型 MRD” CTC、CTEC 相关
- 早期患者转移淋巴结内，TEC 比例极高 (TEC:TC=4)，其与晚期患者转移淋巴结中的细胞比例相反 (TEC:TC<1)
- 与肿瘤原发灶细胞和血中 CTC、CTEC 的染色体倍体及 PD-L1 表达呈现极大异质性不同，该早期患者转移的前哨淋巴结与区域性癌变切缘部位检出的所有 TC、TEC 均为 PD-L1⁺，且几乎全部表现为 8 号染色体缺失的单体
- “**SE-i-FISH 肿瘤液体活检**”显示，黑色素瘤患者 PD-L1⁺ CTCs 对免疫治疗敏感并伴有 PD-L1⁺ 坏死 CTCs 的检出，但血中 PD-L1⁺ CTECs 及 Ki67⁺ CTECs 对免疫治疗耐药，ICI 不能提升致敏 T 淋巴细胞对标志物阳性 CTECs 的杀伤作用，这与机体组织中存在抑制免疫功能的 TECs (immunosuppressive TECs) 相一致
- 从治疗到 MRD 形成过程中，“细胞型 MRD” CTC 与 CTEC 的形态发生极大变化。CTC 从小细胞为主转变为大细胞为主，而 CTEC 全部变为大细胞并表达与肿瘤细胞增生及浸润高度相关的 Ki67 蛋白

iFISH 肿瘤组织、淋巴结活检及动态检测活性与坏死 CTC、CTEC

作者对该黑色素瘤患者从诊断到治疗过程进行了涵盖肿瘤组织及血液标本的全程检测，其中包含肿瘤原发灶 (Tumor)、切缘(Exc Mgn, excision margin)和前哨淋巴结 (SLN, sentinel lymph node) 的“iFISH 肿瘤组织活检”及 7 次“iFISH 肿瘤液体活检”(t1-t7)。检测出的各种亚类细胞数量分析汇总如下：



在该患者的肿瘤组织、切缘及外周血中检出大量 PD-L1⁺ 肿瘤细胞为术后有针对性地开展抗 PD-1 免疫治疗提供了充足的客观依据。在后续动态监测免疫治疗疗效过程中，患者于第一疗程结束后检测出 2 个坏死 PD-L1⁺ CTCs (t3)。在总共 12 个疗程期间，CTC、

CTEC 数目总体维持在较低水平 (1-4 个 /3 ml, t3-t6)。由于术后免疫治疗过程中 CTC、CTEC 始终为阳性，研究者对临床判别为普通炎性增生的双侧腹股沟肿大前哨淋巴结进行了 iFISH 组织活检。在检测的 3 个淋巴结中，其中 1 个为 TC、TEC 阴性，另外 2 个 SLNs 分别各检测出 1 个 TEC 及多个 TEC 与 TC，所有这些细胞均为 PD-L1⁺。

全程治疗结束后，患者产生耐药，细胞型 MRD CTC、CTEC 数目增至 20 个以上，其中以裸细胞异倍体 CTC 占主要多数，PD-L1⁺ CTECs 在治疗中及治疗后 MRD 检测过程中始终呈现阳性。与我们之前发表的非小细胞肺癌 NSCLC PD-L1⁺ CTECs 对 O 药 (ICI Opdivo) 耐药并致使患者较差预后的结论相似^[6]，黑色素瘤 PD-L1⁺ CTECs 及 Ki67⁺ CTECs 同样对 PD-1 抑制剂耐药，即对 PD-1 抑制剂致敏的 T 细胞不敏感！此点与患者体内存在抑制免疫功能的 TECs 相一致^[7]。

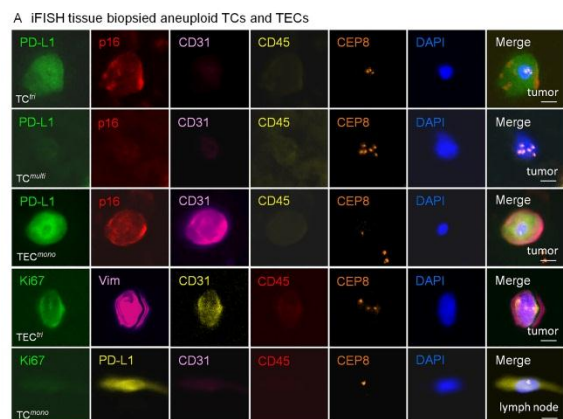
三维度 iFISH 肿瘤组织与液体活检细胞数据解析

本文作者利用 iFISH 技术平台，基于细胞三要素，对分布在不同部位的 TC、TEC、CTC、CTEC 进行了系统性检测与分析。

iFISH 肿瘤组织定量活检：

对肿瘤原发灶、切缘、淋巴结中的 TC 及 TEC 从多种肿瘤标志物蛋白表达、染色体倍体、核浆比进行的三合一检测结果显示，TC

存在于肿瘤灶及切缘部位，以 8 号染色体缺失的单体为主，而 TEC 主要见于肿瘤灶，单体及三倍体居多。转移淋巴结中以 TEC 为主，所有 TEC 均为单体。



B Quantitative and molecular characterization of iFISH tissue biopsied tumor and SLNs

Tumor markers	Haploid		Triploid		Tetraploid		Multiploid		Sum 2	
	tumor	Mgn	tumor	Mgn	tumor	Mgn	tumor	Mgn	tumor	Mgn
CD31 ⁺ TC (tumor and Exc Mgn)										
PD-L1- / p16-	0	0	6	0	4	0	3	0	13	0
PD-L1+ / p16-	17	20	1	1	0	0	0	0	18	21
PD-L1- / p16+	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0
PD-L1+ / p16+	4	9	1	0	0	0	0	0	5	9
Sum 1	21	29	10	1	4	0	3	0	38 (69e-4)	30 (38e-4)
% (Sum 1/Total)	55%	97%	26%	3%	11%	0	8%	0		
Ki67- / Vimentin-	0	0	6	1	3	0	0	0	9	1
Ki67+ / Vimentin-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ki67- / Vimentin+	22	0	3	0	1	0	0	0	26	0
Ki67+ / Vimentin+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sum 1	22	0	9	1	4	0	0	0	35 (58e-4)	1 (1e-4)
% (Sum 1/Total)	63%	0	26%	100%	11%	0	0	0		
CD31 ⁺ TEC (tumor and Exc Mgn)										
PD-L1- / p16-	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
PD-L1+ / p16-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
PD-L1- / p16+	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
PD-L1+ / p16+	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Sum 1	2	1	1	0	0	0	0	0	3 (5e-4)	1 (1e-4)
% (Sum 1/Total)	67%	100%	33%	0	0	0	0	0		
Ki67- / Vimentin-	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0
Ki67+ / Vimentin-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ki67- / Vimentin+	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Ki67+ / Vimentin+	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Sum 1	2	0	2	0	1	0	0	0	5 (8e-4)	0
% (Sum 1/Total)	40%	0	40%	0	20%	0	0	0		

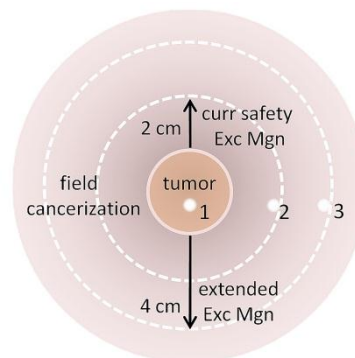
SLN-1: 1 TEC (6.4e-4); SLN-3: 3 TCs (8.4e-4) and 11 TECs (31.0e-4); SLN-2: none of detectable TC or TEC
lymph nodes SLN-3 TEC/TC ratio=3.7 compared to the inverted TC/TEC ratio=14 (tumor), and 38 (Exc Mgn)
All TCs and TECs in metastatic SLN-1,3 are PD-L1+ and haploid

i•FISH 肿瘤组织定量活检的特殊技术优势在其它不同瘤种 (包括胰腺癌、肝癌、胆管癌、肺癌、卵巢癌、骨肉瘤、胶质瘤等)的肿瘤原发灶或宫颈刮片细胞检测过程中得到了有效验证。

区域性癌变切缘 (field cancerized excision margin, FCEM)与基于细胞形态、免疫组化的常规病理活检不同，“i•FISH 肿瘤组织活检”可原位、同步检测细胞的染色体、瘤标蛋白

及细胞形态，三合一综合检测病理组织中各种完整的细胞 (包括 TC、TEC 等)，首次使精准量化定位“区域性癌变”成为可能。

“i•FISH 肿瘤组织活检”检测多种肿瘤 (皮肤癌、胰腺癌、肝癌、骨肉瘤、胶质瘤等) 位于区域性癌变部位的手术切缘发现，切缘位置含有大量 TC、TEC，有些病例切缘的 TC、TEC 密度甚至高于肿瘤灶。目前，黑色素瘤公认的安全切缘距离为 2 cm，但本文研究者在有些皮肤癌患者距离原发灶 4 cm 的切缘位置亦可检测出相当数量的 TC、TEC，颠覆了人们以往对安全性切缘的认知，为今后如何有效降低术后复发提供了新的研究方向。

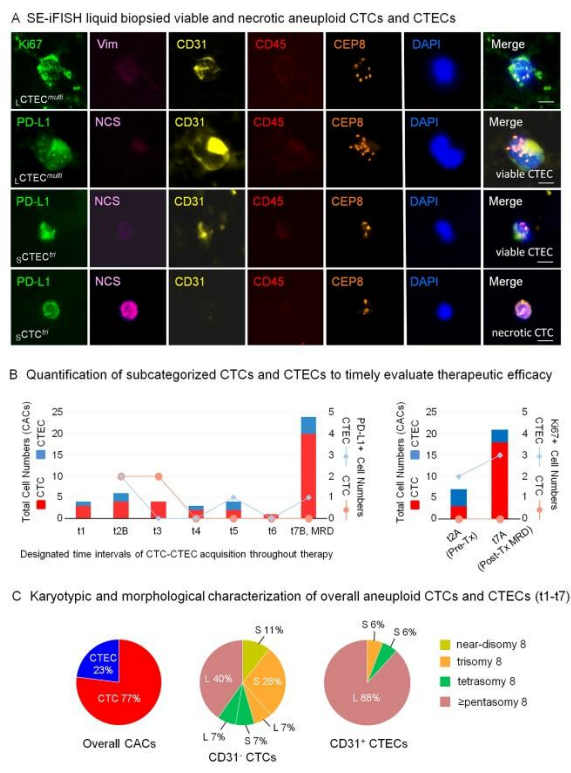


i•FISH 肿瘤组织活检为针对一系列问题开展相关深入研究提供了有效的技术手段，比如手术切缘部位的 TC、TEC 与术后细胞型 MRD CTC、CTEC 及预后如何关联、如何根据区域性癌变位置更加合理的定位切缘距离、切缘部位 TC、TEC 及相应比例是否可作为独立风险因素、如何根据切缘部位 TC、TEC 设定风险评估的 cut-off 值以及如何据此开展术

后辅助性治疗，这些研究将对降低患者术后复发风险具有非常重要的现实意义。

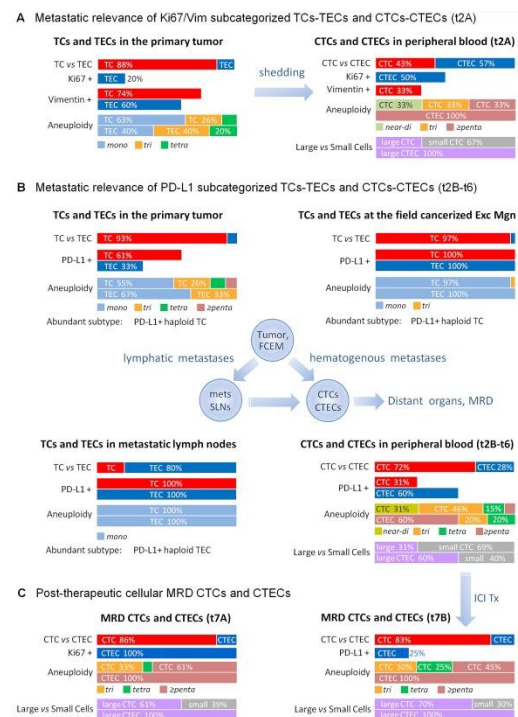
SE-iFISH 肿瘤液体活检:

作者对患者治疗前、中、后期进行了 7 次 SE-iFISH 肿瘤动态液体活检。结果显示，12 疗程过程中，虽然仍可以检测出 CTC、CTEC，但数目始终维持在较低水平。全程治疗结束后，可检测出大量细胞型 MRD CTC、CTEC，其中裸细胞型 CTC 占主要比例，CTEC 中可见 PD-L1⁺ 及 Ki67⁺ 细胞。在所有检测出的循环异倍体细胞(CAC)中，CTC 占比 77%，主要为多倍体大细胞。



TC、TEC、CTC、CTEC 各亚类细胞在淋巴与血路转移过程中的相关性

肿瘤原发灶、切缘及转移淋巴结含有大量高异质性的 TC、TEC，血液中亦富含各种不同亚类的 CTC、CTEC，然而并不是所有 TC、TEC、CTC、CTEC 都参与肿瘤转移。以乳腺癌为例，只有 EpCAM⁺三倍体或多倍体小细胞 CTC 与乳腺癌肺转移密切相关^[8]。有鉴于此，作者基于细胞三要素，按免疫治疗前、中、后三个阶段，将不同部位检测出的各种细胞亚类以量化图解方式进行了详细分析，展现了不同部位检测出的各种细胞在肿瘤治疗与进展过程中是如何分布的，以及各类细胞的相关生物学特征，同时清晰地展现了不同部位的各种亚类细胞在淋巴及血路转移过程中是如何相互关联的。



图中显示，外周血 CTC、CTEC 异质性最高，其次为肿瘤原发灶 TC、TEC。切缘部位

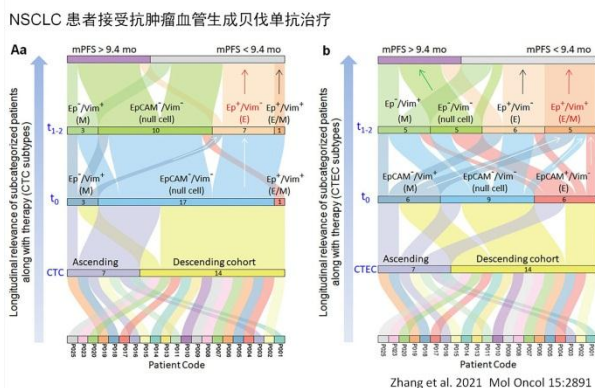
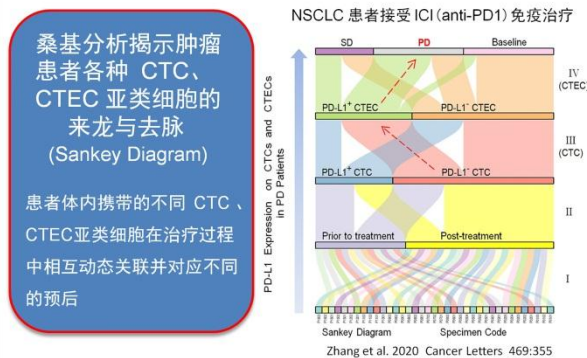
及转移淋巴结中检测出的 TC 及 TEC 基本全部为 PD-L1⁺ 单倍体细胞，揭示了这些细胞在转移过程中具有潜在相关性。需要特别指出的是，与晚期黑色素瘤患者转移淋巴结中的 TC 比例远高于 TEC 不同，该早期患者转移淋巴结中 TEC 的数量是 TC 的 3.7 倍，提示 TEC 在肿瘤早期淋巴转移过程中具有重要意义！治疗结束后的细胞型 MRD 检测显示，所有的 CTEC 均为多倍体大细胞。

本研究在细胞层面展示了从肿瘤原发灶、区域性癌变切缘、前哨淋巴结中的 TCs、TECs、血中的 CTCs、CTECs 之间如何相互关联。作者之前发表的利用桑基分析 (Sankey Diagram) 可以在肿瘤患者群体层面清晰地展示治疗过程中不同 CTC、CTEC 亚类细胞如何动态关联

及与预后的相关性。在今后的研究中，将上述细胞层面及群体层面的相关研究与精准 i•FISH 单细胞测序^[9]相结合，将有助于人们深入了解位于不同部位的各种亚类肿瘤细胞与肿瘤血管内皮细胞如何在分子层面相互演变与关联，以及各自对应的临床意义。

结论

“i•FISH 肿瘤组织活检”与“SE-i•FISH 肿瘤液体活检”相结合，可在分子病理层面全方位检测处于淋巴与外周血转移途径中不同部位的各种 TC、TEC、CTC、CTEC，有助于人们更加全面、客观地揭示肿瘤组织及血液中不同亚类细胞在肿瘤转移过程是如何相互关联，以及它们各自与疗效、预后的相关性。本研究为今后使用“双相 i•FISH 肿瘤组织与液体活检”开展大规模临床实验与研究奠定了坚实基础。



SE-i•FISH® 一网打尽 CTC、CTEC

一管血样，一次检测，两类细胞，多重指标

参考文献

1. Hong, Y., et al. (2021) Small Cell Size Circulating Aneuploid Cells as a Biomarker of Prognosis in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*11:590952.
2. Wang, L., et al. (2018) Quantified postsurgical small cell size CTCs and EpCAM(+) circulating tumor stem cells with cytogenetic abnormalities in hepatocellular carcinoma patients determine cancer relapse. *Cancer Lett*412:99.
3. Xing, C., et al. (2021) CD44+ Circulating Tumor Endothelial Cells Indicate Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma After Radical Surgery: A Pilot Study. *Cancer Manag Res*13:4417.
4. Curtius, K., et al. (2018) An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat Rev Cancer*18:19.
5. Kadara, H., et al. (2012) Field cancerization in non-small cell lung cancer: implications in disease pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc*9:42.
6. Zhang, L., et al. (2020) PD-L1(+) aneuploid circulating tumor endothelial cells (CTECs) exhibit resistance to the checkpoint blockade immunotherapy in advanced NSCLC patients. *Cancer Lett*469:366.
7. Zeng, Q., et al. (2023) Understanding tumour endothelial cell heterogeneity and function from single-cell omics. *Nat Rev Cancer* 23:544.
8. Liu, X., et al. (2019) Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Sci Adv* 5:eaav4275.
9. Chen, Y., et al. (2021) Dysregulated KRAS gene-signaling axis and abnormal chromatin remodeling drive therapeutic resistance in heterogeneous-sized circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Cancer Lett*517:78.

原文下载:

<http://www.cytointelligen.com/zlwz>, 第 74 篇文献