

揭密脑胶质瘤 CD31⁻ CTC 及 CD31⁺ CTEC 的重要临床意义

胶质瘤 (glioma) 是脑部最常见的恶性肿瘤，患者预后差，术后复发及死亡率高。胶质瘤发病率近年来逐渐增长，且有年轻化趋势，已引起人们的密切关注。如何通过肿瘤液体活检手段检测胶质瘤患者血脑屏障受损的关联细胞、动态监测肿瘤治疗耐药的产生及有效评估患者预后一直是临床上亟需解决的重要问题。最近，首都医科大学附属北京天坛医院神经外科林松主任团队、中国国家神经系统疾病研究中心、北京脑肿瘤研究中心、浙江省人民医院神经外科、美国俄克拉荷马州大学医学中心及赛特生物密切合作，针对上述热点问题，利用赛特 SE-i-FISH 对胶质瘤患者外周血中的 CD31⁻ 异倍体循环肿瘤细胞 CTC 及 CD31⁺ 循环肿瘤血管内皮细胞 CTEC 进行了系统性研究，获得的一系列重要成果刚刚在《Cancer Science》(IF=6.716) 上得到发表。

本文要点

- 入组 111 例不同级别的胶质瘤患者，临床实验结果显示：血脑屏障 BBB 受损的患者，外周血 CD31⁺ CTECs (多倍体大细胞, ≥ 4 倍体, $> 5 \mu\text{m}$, $\text{CTEC}^{\text{multi}}$) 显著升高
- 术前三倍体小细胞 CD31⁻ CTCs ($\leq 5 \mu\text{m}$, sCTC^{tri}) 作为有效的“不良预后指标”，与显著缩短的 PFS 及 OS 密切相关
- 多倍体大细胞 CD31⁻ CTCs ($\text{CTC}^{\text{multi}}$) 可作为有效的“疗效指标”，实时评估患者术后化疗疗效与耐药
- 若不加以区分具有不同临床意义的 CD31⁻ CTC 及 CD31⁺ CTEC 两类细胞，而是单纯检测异倍体细胞，则无法有效判断患者预后，PFS 无统计学意义

血脑屏障与胶质瘤远端转移

Received: 13 Mar 2022 | Revised: 12 July 2022 | Accepted: 25 July 2022
DOI: 10.1111/csc.15518

ORIGINAL ARTICLE

Cancer Science WILEY

Nonhematogenic circulating aneuploid cells confer inferior prognosis and therapeutic resistance in gliomas

Mingxiao Li^{1,2} | Fallang Gao^{3,4} | Xiaohui Ren^{1,2} | Gehong Dong⁵ | Hongyan Chen⁶ | Alexander Y. Lin⁷ | Daisy Dandan Wang⁸ | Mingyang Liu⁸ | Peter Ping Lin⁷ | Shaoping Shen^{1,2} | Haihui Jiang^{1,2} | Chuanwei Yang^{1,2} | Xiaokang Zhang^{1,2} | Xuzhe Zhao^{1,2} | Qinghui Zhu^{1,2} | Ming Li^{1,2} | Yong Cui^{1,2} | Song Lin^{1,9,10}

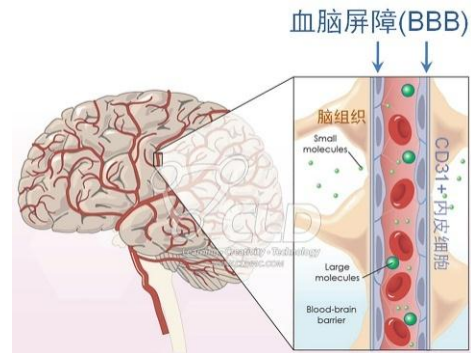
¹Department of Neuro-Surgical Oncology, National Clinical Research Center for Neurological Diseases, Capital Medical University, Beijing, China
²Department of Neurosurgery, Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, Beijing, China
³Department of Neurosurgery, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang, China
⁴Key Laboratory of Endocrine Gland Diseases of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang, China
⁵Department of Pathology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing, China
⁶Department of Radiology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing, China
⁷CytelGen, San Diego, California, USA
⁸Department of Medicine, University of Oklahoma Health Science Center, Oklahoma City, Oklahoma, USA
⁹Center of Brain Tumor, Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing, China
¹⁰Beijing Key Laboratory of Brain Tumor, Beijing, China

Correspondence
Yong Cui, Department of Neurosurgical Oncology, Beijing Tiantan Hospital, Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, Beijing 100070, China.
Email: cuiyong@20102022@163.com

Song Lin, Department of Neurosurgical Oncology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Center of Brain Tumor, Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing Key Laboratory of Brain Tumor, China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, Beijing 100070, China.
Email: lin-song@20102022@163.com

Funding information
Capital Funds for Health Improvement and Research, Grant/Award Number: 2020-2-3070; National Natural Science Foundation of China, Grant/Award Number: 82171209

Abstract
Aneuploidy is the hallmark of malignancy. Our previous study successfully detected nonhematogenic circulating aneuploidy cells (CACs) in types of gliomas. The current prospective clinical study aims to further precisely subcategorize aneuploid CACs, including CD31⁻ circulating tumor cells (CTCs) and CD31⁺ circulating tumor endothelial cells, and thoroughly investigate the clinical utilities of these different subtypes of cells. Co-detection and analysis of CTCs and circulating tumor-derived endothelial cells (CTECs) expressing CD133, glial fibrillary acidic protein (GFAP), or epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) were performed by integrated subtraction enrichment and immunostaining fluorescence in situ hybridization (SE-iFISH) in 111 preoperative primary diffuse glioma patients. Aneuploid CACs could be detected in most de novo glioma patients. Among detected CACs, 45.6% were CD31⁻/CD45⁻ aneuploid CTCs and the remaining 54.4% were CD31⁺/CD45⁻ aneuploid CTECs. Positive detection of CTECs significantly correlated with disruption of the blood-brain barrier. The median number of large CTCs (CTCs , $> 5 \mu\text{m}$, 2) in

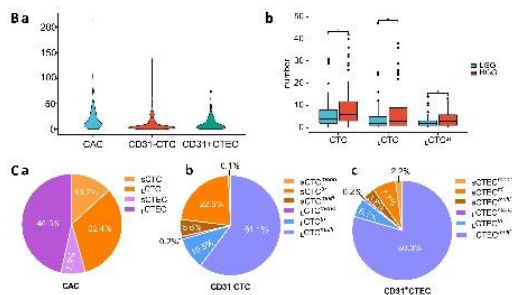
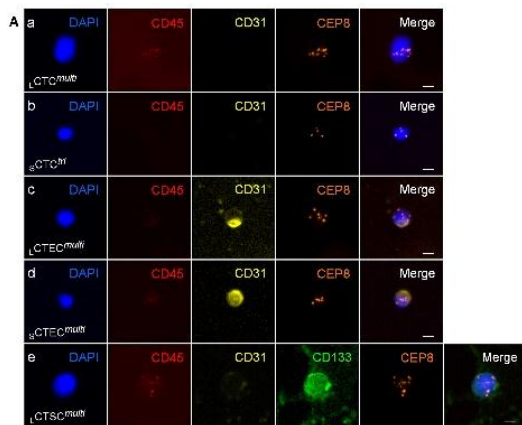


颅内脑细胞、脑脊液与血液之间存在着由紧密连接的 CD31⁺ 内皮细胞构成的特殊屏障，被称为血脑屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB)，它能够阻止血细胞及有害物质 (如细菌等大分子) 由血液进入脑组织，但允许小分子 (如 O₂, 荷尔蒙等) 自由穿透^[1]。作为起源于神经上皮组织胶质细胞的肿瘤，胶质瘤可破

坏 BBB, 使肿瘤细胞自脑部进入血循环, 经 CTC 形成远端器官转移灶^[2, 3]。然而参与组成 BBB 的胶质瘤血管内皮细胞是否会脱落入血形成 CD31⁺ CTEC、是否呈现染色体异倍体特征以及它们的临床意义等一系列重要问题, 一直悬而未解。以往胶质瘤 CTC 虽有报道, 但仅局限于高级别胶质瘤 (GBM), 对其它类别胶质瘤 CTC 的研究鲜有报道^[4]。本实验入组的 111 例病人包含了不同级别的胶质瘤患者。

SE-i-FISH 同步检测胶质瘤患者的异倍体 CD31⁻ CTC 与 CD31⁺ CTEC

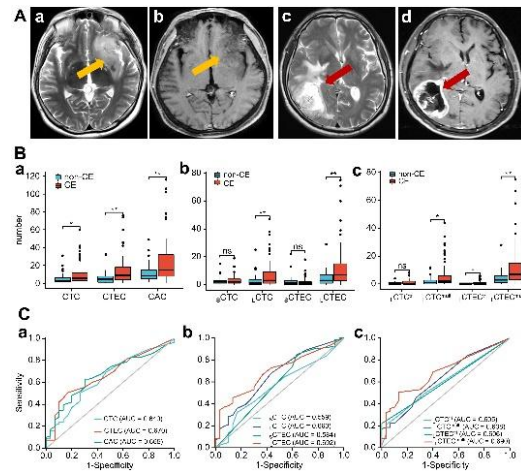
本文作者此前使用 SE-i-FISH 技术已成功在外周血和脑脊液中对乳腺癌脑转移^[5]、胶质瘤 CTC、DTC 进行有效检测^[6]。本研究中, 作者利用改进的 SE-i-FISH 在胶质瘤患者外周血中成功检测出多种不同亚类的 CD31⁻ CTC、CD31⁺ CTEC 及 CD133⁺ 循环肿瘤干细胞 CTSC。这些细胞染色体倍体不同, 大小各异。



分析显示, 检测出的所有 CTC 中, 多倍体大细胞 ($1CTC^{multi}$, 61.1%) 及三倍体小细胞 ($sCTC^{tri}$, 22.6%) 为主要组成部分, 而 CTEC 中多倍体大细胞 ($1CTEC^{multi}$) 占比可高达 80%。进一步的分析显示, 低级别和高级别胶质瘤患者体内大细胞 CTC ($1CTC$) 或三倍体大细胞 CTC ($1CTC^{tri}$) 的含量存在显著性差异。

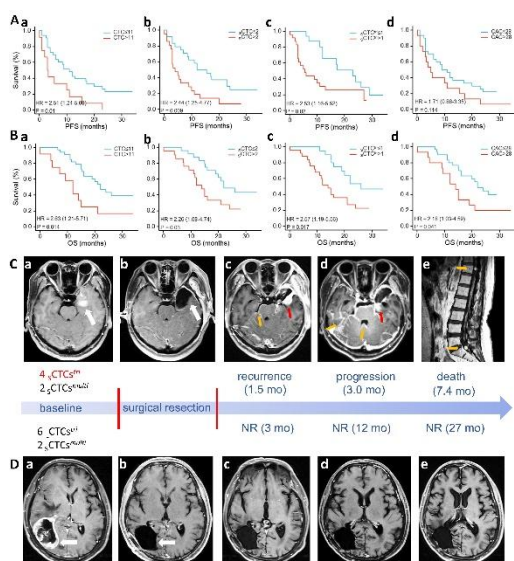
胶质瘤患者血脑屏障 BBB 受损致使 CD31⁺ CTEC 显著升高

胶质瘤的 MRI 强化病灶 (CE, 红色箭头) 意味 BBB 受损。本临床实验重点研究了外周血中 CD31⁺ 异倍体 CTEC 是否与 BBB 受损存在显著关联。



结果显示, 与 BBB 未受损 (MRI 非强化病灶 non-CE, 黄色箭头) 患者相比, BBB 受损患者外周血中的异倍体 CTC 及 CTEC 总数均显著升高。伴随着 BBB 受损, 异倍体脑胶质瘤细胞及肿瘤血管内皮细胞均会入血, CTC 及 CTEC 增加。亚类细胞分析显示, BBB 受损的患者体内, $1CTC$ 、 $1CTC^{multi}$ 、 $1CTEC$ 、 $1CTEC^{tri}$ 及 $1CTEC^{multi}$ 均显著升高。AUC-ROC 曲线分析表明, 大细胞 CTEC 及多倍体大细胞 CTEC 具有最大 AUC 值 ($1CTEC^{multi}$, $**0.690$), 与 BBB 受损关联性最为密切。

基线三倍体小细胞胶质瘤 CTC (sCTC^{tri}) 与不良预后密切相关

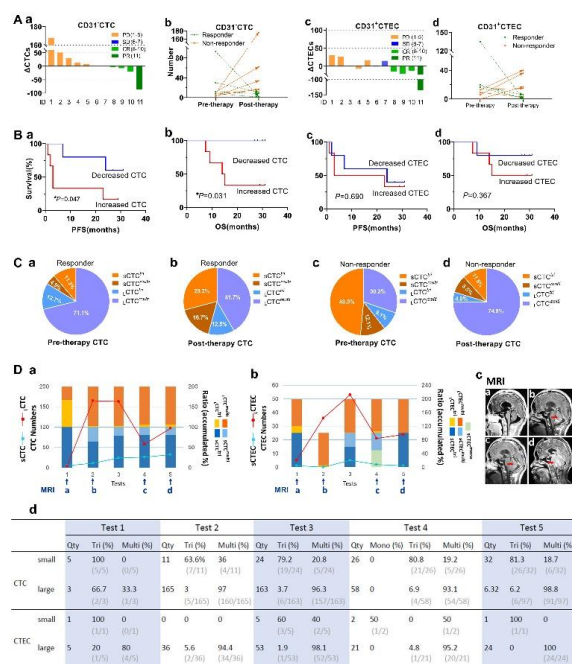


层次性群体临床数据分析显示，患者 (IDHwtHGA) 术前 CTC 总数 >11 或小细胞 sCTC >2 或三倍体小细胞 sCTC^{tri} >1，术后无进展生存期(PFS) 及总生存期 (OS) 均显著缩短。此发现与已报道的肺癌治疗前 (手术、化疗) 三倍体小细胞与患者远处肝转移及较差预后密切相关的结论相一致^[7, 8]。个案分析显示，患者 (C) 术前具有 4 个 sCTCs^{tri}，术后 1.5 个月复发并进展，7.4 个月死亡；患者 (D) 术前未检出 sCTC^{tri}，术后稳定期超过 27 个月，至今无复发。

需要特别指出的是，若不将 CTC、CTEC 加以区分，而只是单纯检测染色体异倍体细胞时，这些患者的 PFS 差异无统计学意义 (Ad, P=0.114)，从而再次证明了有效区分并单独评估 CD31⁻ CTC 与 CD31⁺ CTEC 不同临床意义的重要性！

术后多倍体大细胞 CTC (LCTC^{multi}) 与放化疗疗效密切相关

作者对接受手术切除及放化疗的胶质瘤患者 (HGA) 的 CTC、CTEC 的动态变化进行了追踪，结果发现，在所有治疗无效、肿瘤进展 (PD) 的患者中，CTC 数目显著增加，CTEC 有少量增加；治疗有效的患者中，CTC 及 CTEC 均明显下降，但只有 CD31⁻ CTC 的数量变化与患者的 PFS 和 OS 具有相关性。进一步的分析结果显示，治疗有效组的患者，其三倍体小细胞 sCTC^{tri} 的数量显著少于治疗无效者，而放化疗后检测出的多倍体大细胞 LCTC^{multi} 比例在治疗有效组显著下降，在治疗无效组显著上升。



动态监测放化疗后肿瘤复发患者的 CTC、CTEC，结果显示，伴随患者出现脑膜播散性复发 (MRI-Cb, 红色箭头) 至肿瘤假性短暂消退，到肿瘤再次出现 (MRI-Cd)，过程中可见大细胞 LCTC 及 LCTEC 的数量呈现与肿瘤动态进展完全一致的变化，而小细胞 sCTC 的数量始终稳定上升，即使患者出现肿瘤假性消退时数量也没有下降，而是与肿瘤的最终进展状态相吻合。在此动态变化过程中可见 LCTC^{tri} 的比例显著下降，LCTEC^{tri} 完全消失。

结论

- 本研究首次发现血中特定 CD31⁺ CTEC 亚类细胞 (\downarrow CTEC^{multi}) 与血脑屏障 BBB 受损密切相关, 从而证实了参与胶质瘤患者颅内 BBB 组成的脑血管内皮细胞与其它实体瘤的肿瘤血管内皮细胞一样, 亦具有染色体异倍体特性
- 本研究证实了胶质瘤基线 CD31⁻ sCTC^{tri} 与较差预后密切相关, 是有效的预后指标 (prognosticator)。与已报道的治疗前肺癌基线三倍体小细胞 CD31⁻ CTC (sCTC^{tri}) 相一致
- 多倍体大细胞 CD31⁻ CTCs (\downarrow CTC^{multi}) 作为实时性“疗效指标”(indicator), 可用于快速评估术后放化疗疗效的概念在被研究中被首次提出
- **CTC 与 CTEC 相辅相成, 但功能各异。**为了有效评估患者预后, 须将 CD31⁻ CTC 与 CD31⁺ CTEC 加以区分, 不能笼统检测染色体异倍体细胞, 从而影响对这两类不同细胞临床意义的判别

文献

1. Qian et al. (2017) Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells. *Sci Adv* 3:e1701679.
2. Anghileri et al. (2016) Extraneural metastases in glioblastoma patients: two cases with YKL-40-positive glioblastomas and a meta-analysis of the literature. *Neurosurg Rev* 39:37.
3. Cai et al. (2018) Clinical characteristics associated with the intracranial dissemination of gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* 166:141.
4. Sullivan et al. (2014) Brain Tumor Cells in Circulation are Enriched for Mesenchymal Gene Expression. *Cancer Discov* 4:1299.
5. Li et al. (2018) Clinical significance of detecting CSF-derived tumor cells in breast cancer patients with leptomeningeal metastasis. *Oncotarget* 9:2705.
6. Gao et al. (2016) Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget* 7:71330.
7. Hong 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.
8. Wang et al. (2019) Vimentin expression in circulating tumor cells (CTCs) associated with liver metastases predicts poor progression-free survival in patients with advanced lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 145:2911.