

本文要点

- 由于受细胞内一系列调节作用的影响，mRNA 阳性检出与其相对应的蛋白表达的实际吻合性只有 40% [3,4]，即 mRNA 检测阳性并不意味着一定会产生最终发挥重要作用的特定蛋白质 [4,5]。因此，作者利用 SE-i-FISH 技术，从染色体及蛋白表达层面，原位、联合检测 4 种型别的异倍体 CTC、及 4 种型别的异倍体 CTEC 亚类细胞，从而为细胞分型提供了更加准确、眼见为实的可靠依据：
- 新颖的“桑基分析”(Sankey Diagram) 为揭示携带 CTC、CTEC 各种亚类细胞的患者在治疗过程中如何通过 EMT、EndoMT 相互关联及预后提供了可视性分析手段
- CTC、CTEC 总数：异倍体 CTC 及 CTEC 呈相似变化趋势；治疗后总数升高的患者，疗效差，PFS 及 OS 显著较短
- 有效区分及联合检测 CD31⁻ CTC 及 CD31⁺ CTEC 的各亚类细胞，才能更加合理选择适宜患者、准确预测、评估疗效、监测肿瘤耐药、转移与复发

	预后差	疗效好
治疗前(基线)	间质型 CTEC	裸细胞型 CTEC
治疗开始后	上皮型 CTC、CTEC，混合型 CTEC	裸细胞型 CTEC

- 利用 Cox 回归分析，在以上 8 种型别 CTC、CTEC 中锁定具有高风险的亚类细胞，以指导进一步逐一分析其相关临床意义：
治疗前：基线含有间质型 CTEC 的患者，疗效较差，但含有裸细胞 CTEC 的患者预后好，此发现将有助于区分、选择适于抗血管生成治疗的 NSCLC 患者；
治疗开始后：出现上皮型 CTEC、CTC 或混合型 CTEC 的患者，提示肿瘤耐药及较快的肿瘤进展；但出现裸细胞型 CTEC 的患者，则显著获益，伴有明显延长的 PFS。汇总如下：

正常二倍体 CEC 与肿瘤异倍体 CTEC

血管内皮细胞 (EC) 构成了正常脉管系统的内膜，而肿瘤脉管内膜主要由“肿瘤血管内皮细胞”(Tumor Endothelial Cell, TEC) 构成。EC 与 TEC 均表达 CD31 (血小板及内皮细胞粘附分子-1, PECAM-1)，但不表达 CD45 (蛋白酪氨酸磷酸酶 C 型受体, PTPRC)。TEC 可由肿瘤细胞在体内或体外缺氧条件下通过转分化形成，或由肿瘤细胞-内皮细胞融合而来，是细胞表面表达了 CD31 的一类特殊肿瘤细胞。EC、TEC 脱落入

异倍体 CD31⁻ CTC、CD31⁺ CTEC 分类及占比

分类及数目	上皮型 (E 型, EpCAM ⁺)	间质型 (M 型, Vimentin ⁺)	混合型 (H 型, E ⁺ /M ⁺)	裸细胞型 (Null cell N 型, E ⁻ /M ⁻)
CTC (626)	11%			89%
CTEC (362)	25%			75%

血后分别形成循环 EC (CEC)、循环 TEC (CTEC)。其中，CTEC 兼具了肿瘤、内皮的双重特性，被形象地比喻为四处游走的“披着羊皮的狼”[6]。不同亚类的 TEC 或 CTEC 分别参与肿瘤血管生成、肿瘤转移、调节免疫监视及患者预后等 [6, 7]。

以往人们通常使用 CEC 评估贝伐单抗疗效，但血液中含有大量与肿瘤并不相干的正常二倍体 CEC，因此不同实验室发表的数据差异极大，甚至相互矛盾。本文作者在排除正常 CEC 干扰的基础上，利用 Cox 回归模型分析异倍体 CTC、CTEC 各亚类细胞中的独立风险因素并进行风险评估，以指导后续围绕这些细胞型高风险变量开展相关生存分析，从而揭示 CTC、CTEC 各亚类细胞在贝伐单抗治疗肺癌过程中各不相同的重要临床意义。

6-通道 SE-i-FISH 联合检测上皮、间质及混合型异倍体 CTCs、CTECs

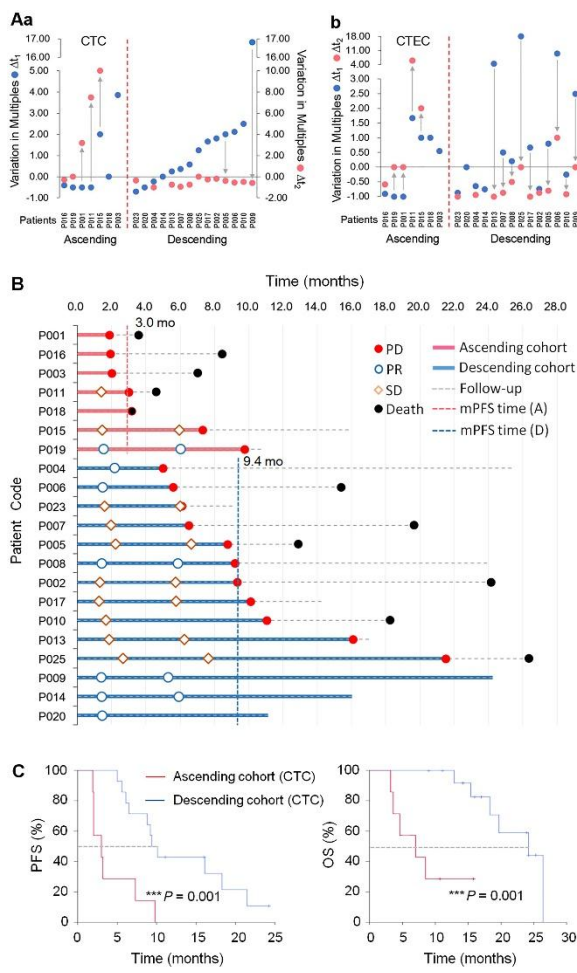
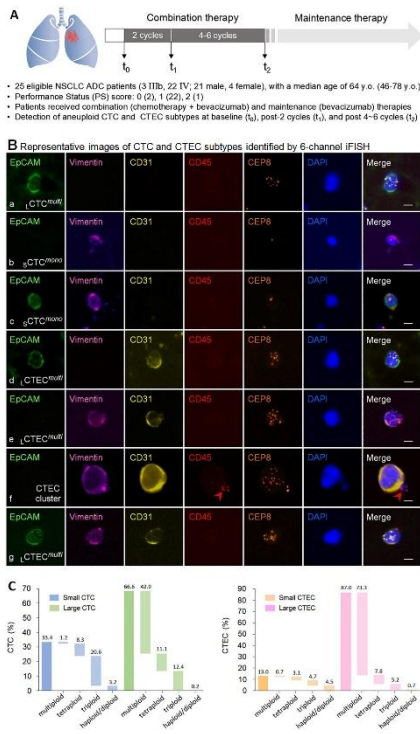
应用 SE-i-FISH 可有效检测出 CTC、CTEC 各种亚类细胞。瀑布图分析显示，

肺癌 CD31⁻ CTC 倍体及大小多样，其中 3 倍体小细胞 (sCTCs^{tri}, 20.6%) 及多倍体大细胞 (LCTCs^{multi}, 42.9%) 为主要代表，而在 CD31⁺ CTEC 中，多倍体大细胞 (LCTECs^{multi}, 73.3%) 占据多数。

治疗后 CTC、CTEC 总数变化与患者 PFS、OS 密切相关

如 (A) 所示，与治疗前基线相比，患者治疗后 CTC 和 CTEC 数目呈现同步上升或下降。泳图 (B)展示了每个患者的疾病进展情况。与 CTC、CTEC 数目下降组相比，上升组伴有不良预后，显示较短的 mPFS 及 mOS。

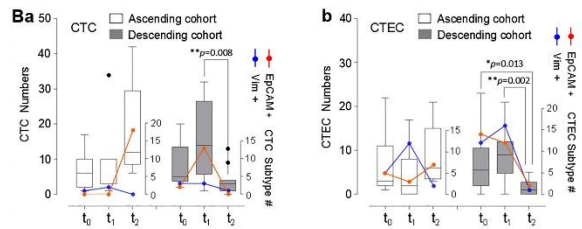
治疗过程中 CTC、CTEC 亚类细胞动态变化分析



作者对上升组与下降组的 CTC 及 CTEC 各种亚类细胞在治疗过程中的动态变化做了进一步深入分析。热表 (heatable, A) 显示了不同采血点时上皮及间质型 CTC、CTEC 数量与比例的动态变化, 其中 N 型裸细胞在数量上占据多数。上皮型 CTC 及 CTEC 亚类细胞数目在治疗过程中的动态变化与相应细胞总数变化一致。间质型 CTEC 无论在上升组或是下降组均表现为先上升后下降的变化, 该现象在局部晚期乳腺癌

A Cell numbers and percentages of the CTC and CTEC subtypes

Detection		Ascending				Descending			
		total	EpCAM+	Vim+	%	total	EpCAM+	Vim+	%
CTC	t ₀	46	0	1	2.2%	120	2	3	2.5%
	t ₁	59	0	2	3.4%	268	13	3	1.1%
	t ₂	88	18	0	0	45	0	1	2.2%
CTEC	t ₀	46	5	5	10.9%	99	14	12	12.1%
	t ₁	33	3	12	36.4%	123	12	16	13.0%
	t ₂	43	7	2	4.7%	18	2	1	5.6%



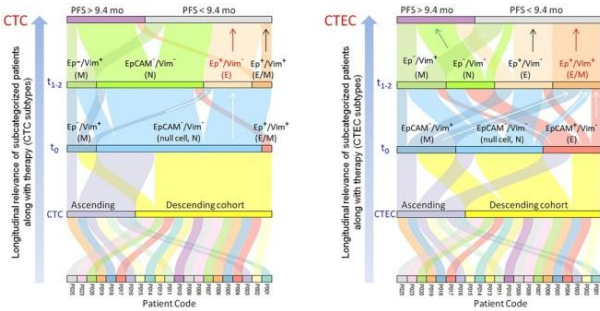
C Compositional analysis of EpCAM⁺ or Vim⁺ CTCs and CTECs in small (S) and large (L) cell sizes

	CTC		CTEC	
	Ascending sCTCs	Descending lCTCs	Ascending sCTECs	Descending lCTECs
t ₀			EpCAM ⁺ (100%) (multiploid 80%)	EpCAM ⁺ (100%) (multiploid 85.7%)
			Vim ⁺ (80%) (multiploid 75%)	Vim ⁺ (66.7%) (multiploid 100%)
t ₁		EpCAM ⁺ (82.3%) (multiploid 91.7%)	EpCAM ⁺ (100%) (multiploid 100%)	EpCAM ⁺ (100%) (multiploid 100%)
			Vim ⁺ (75%) (diploid/near-diploid 77.8%)	Vim ⁺ (87.5%) (multiploid 50%) (tetraploid 21.4%) (triploid 14.3%)
t ₂	EpCAM ⁺ (77.8%) (diploid/near-diploid 100%)			EpCAM ⁺ (100%) (multiploid 85.7%)

患者接受新辅助化疗时也有相同报道 [8], 其临床意义有待进一步深入研究。图 C 显示了 CTC 及 CTEC 个亚类细胞的组成比例。

桑基分析: CTC、CTEC 各亚类细胞在治疗前后的转换及预后

与 CTC 形成过程中的 EMT 相同, 不同型别的 CTEC 亦可通过 EndoMT 进行相互转换。作者使用新颖的桑基分析,

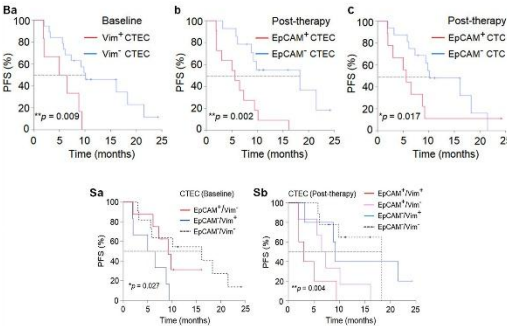


对 CTC 和 CTEC 亚类患者分组、相互转换等方面进行了系统性分析, 揭示了治疗前及治疗后出现不同亚类细胞的患者对应衍生关系 (箭头所示), 以及相应的预后情况。上升及下降组患者的 CTC 及 CTEC 在治疗前的基线阶段分别存在 3 种亚类, 其中在 CTC 的 3 种亚类细胞 (M, N, E/M) 中, 以裸细胞 N 型为主, 而 CTEC 的各个亚类 (M, N, E) 较为平均。治疗后, 如患者出现新的上皮型 CTC 亚类细胞及混合型 (E/M) CTEC 亚类细胞 (红色标注), 则预后较差 (mPFS<9.4 mo)。桑基分析为在治疗前合理选择适于接受贝伐单抗治疗的肿瘤患者及有效预测疗效提供了重要的分析手段与参考依据。

CTC、CTEC 亚类细胞与肿瘤进展相关

A Correlation of subcategorized cohorts of patients with disease progression

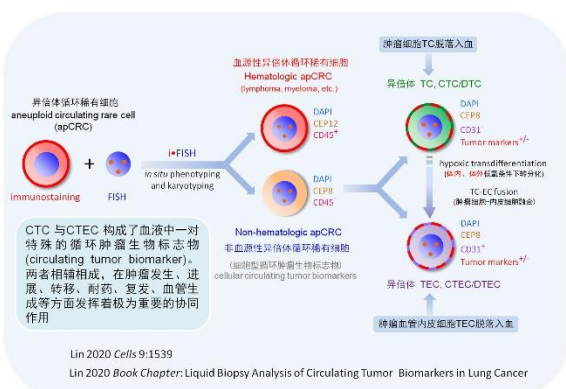
Classification	Subtypes	Sum	PD with new mets Patients (n=11)	SD/PO without new mets Patients (n=10)	Total patients (n=21)	Fisher's X ²	P
CTC	baseline						
	Ep+/Vim+ (I/M)	0	1	1			
	Ep-/Vim+ (M)	2	2	2	4		
	sum Vim+	2 (2/4, 50.0%)	2 (2/4, 50.0%)				
	Ep+/Vim- (E)	0	0	0			
	Ep-/Vim- (null)	9	8	17			
	sum Vim-	9 (9/17, 52.9%)	8 (8/17, 47.1%)	17		0.203	0.652
	post-therapy						
	Ep+/Vim- (E)	6	1	7			
	Ep+/Vim+ (E/M)	1	0	1			
	sum Ep+	7 (7/8, 87.5%)	1 (1/8, 12.5%)	8			
	Ep-/Vim+ (M)	1	1	2			
	Ep-/Vim- (null)	3	7	10			
	sum Ep-	4 (4/13, 30.8%)	9 (9/13, 69.2%)	13		4.32	0.037
CTEC	baseline						
	Ep+/Vim+ (E/M)	0	0	0			
	Ep+/Vim- (M)	6	0	6			
	sum Vim+	6 (6/6, 100%)	0 (0/6, 0)	6			
	Ep+/Vim- (E)	1	5	6			
	Ep-/Vim- (null)	4	5	9			
	sum Vim-	5 (5/15, 33.3%)	10 (10/15, 66.7%)	15		5.19	0.023
	post-therapy						
	Ep+/Vim- (E)	4	2	6			
	Ep+/Vim+ (E/M)	5	0	5			
	sum Ep+	9 (9/11, 81.8%)	2 (2/11, 18.2%)	11			
	Ep-/Vim+ (M)	2	3	5			
	Ep-/Vim- (null)	0	5	5			
	sum Ep-	2 (2/10, 20%)	8 (8/10, 80%)	10		5.74	0.017



定量分析显示，治疗前含有间质型 CTEC 及治疗后出现上皮型 CTEC 或 CTC 的患者，治疗效果差，肿瘤进展快 (mPFS=5.0~5.6 mo)。其中，治疗后出现混合型 (E⁺/M⁺) CTEC 的患者疗效最差，mPFS 最短 (mPFS=3.0 mo)，而治疗前或治疗后带有裸细胞 N 型 CTEC 的患者则显示治疗效果较好，肿瘤进展较慢 (mPFS=18.3 mo)。该发现对进一步有效开展抗血管生成治疗肿瘤具有重要的参考价值。

结论与展望

异倍体 CTEC 和 CTC，两者相辅相成、功能各异，共同构成了血液中一对“细胞型循环肿瘤标志物”。继本文作者在以前的工作中揭示了间质型 CTC 和 CTEC 与肺癌不良预后及肝转移密切相关 [9]，以及 PD-L1⁺ CTEC 和 CTC 在肺癌免疫治疗过程中的重要意义后 [10]，本研究进一步证实，相对于 CTC，检测多重功能的异倍体 CTEC 亚类细胞在肿瘤治疗过程中 (包括精准用药指导、疗效预测与评估等) 具有特殊重要的临床意义。



国内外的新近研究显示，与 TKI 单药相比，贝伐单抗和针对 NSCLC 不同基因突变的 TKI 联合用药 (A+T) 效果更好，患者具有显著的 PFS 和 OS 获益。例如针对 EGFR-T790M 抑制性突变的第

三代靶向药奥希替尼 (osimertinib)/泰瑞沙 [11]，针对 EGFR-L858R 激活性突变的厄洛替尼 (erlotinib)/特罗凯 [1,12] 或吉非替尼 (gefitinib)/易瑞沙 [13]。此外，anti-PD1 或 anti-PD-L1 免疫治疗与贝伐单抗 (A+I) 联合治疗肺癌也在 I-III 期临床实验中取得了相对任一单药更好的疗效 [14,15]。随着 PD-L1⁺ CTEC 和 CTC 在肺癌 O 药免疫治疗的临床意义被报道 [10]，加上今后对这些 A+T 或 A+I 联合用药治疗的肿瘤患者深入开展 CTC 与 CTEC 的检测与研究，将有助于临床更精准、有效地选择适于治疗的患者，并进一步提高肿瘤治疗疗效及揭示疗效增强的机理。

多项临床研究已证实，如果对 CD31⁻ CTC、CD31⁺ CTEC 不加区分，而只是笼统检测血液中的非血源性异倍体细胞，这些混为一谈的非血源性异倍体细胞数目往往不具备有意义的临床价值。但如将两者进行有效区分，则可分别揭示 CD31⁻ CTC、CD31⁺ CTEC 各自的重要临床意义。SE-i-FISH 作为“捕狼能手”，可在排除正常二倍体循环血管内皮细胞 CEC 干扰的基础上，对源于所有实体瘤、表达了各种肿瘤标志物蛋白的异倍体 CTC、CTEC 亚类细胞进行有效识别及同步检测。



随着可进一步区分与检测活性及坏死 CTC、CTEC 的 **SE-i-FISH (NC)** 技术已被成功开发 [16], 应用 **SE-i-FISH** 或 **SE-i-FISH (NC)** 对不同瘤种的肿瘤患者开展相关检测, 将为人们进一步探索、揭秘异倍体 CD31⁻ CTC 及 CD31⁺ CTEC 的重要临床意义提供极大的帮助!

文献

- Zhou et al. (2021) Bevacizumab plus erlotinib in Chinese patients with untreated, EGFR-mutated, advanced NSCLC (ARTEMIS-CTONG1509): A multicenter phase 3 study. **Cancer Cell** 39:1279.
- Zhang et al. (2021) Role of aneuploid circulating tumor cells and CD31(+) circulating tumor endothelial cells in predicting and monitoring anti-angiogenic therapy efficacy in advanced NSCLC. **Mol Oncol** 15:2891.
- De Sousa Abreu et al. (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. **Mol Biosyst** 5:1512.
- Vogel et al. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nat Rev Genet** 13:227.
- Guo et al. (2008) How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. **Acta Biochim Biophys Sin** 2008, 40:426.
- Lin (2020) Aneuploid Circulating Tumor-Derived Endothelial Cell (CTEC): A Novel Versatile Player in Tumor Neovascularization and Cancer Metastasis. **Cells** 9:1539.
- Goveia et al. (2020) An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates. **Cancer Cell** 37:21.
- Ma et al. (2020) Dynamic monitoring of CD45(-)/CD31(+)/DAPI(+) circulating endothelial cells aneuploid for chromosome 8 during neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. **Ther Adv Med Oncol** 12:1758835920918470.
- 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.
- Zhang et al. (2020) PD-L1(+) aneuploid circulating tumor endothelial cells (CTECs) exhibit resistance to the checkpoint blockade immunotherapy in advanced NSCLC patients. **Cancer Lett** 469:355.
- Yu et al. (2020) Effect of Osimertinib and Bevacizumab on Progression-Free Survival for Patients With Metastatic EGFR-Mutant Lung Cancers: A Phase 1/2 Single-Group Open-Label Trial. **JAMA Oncol** 6:1048.
- Saito et al. (2019) Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 20:625.
- Ichihara et al. (2015) Phase II trial of gefitinib in combination with bevacizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR gene mutations: the Okayama Lung Cancer Studu Group Trial 1001. **J Thorac Oncol** 10:486.
- Chen et al. (2018) Combinations of bevacizumab with cancer immunotherapy. **Cancer J** 24:193.
- Manegold et al. (2017) The Potential of Combined Immunotherapy and Antiangiogenesis for the Synergistic Treatment of Advanced NSCLC. **J Thorac Oncol** 12:194.
- Lin et al. (2021) Identification and Comprehensive Co-Detection of Necrotic and Viable Aneuploid Cancer Cells in Peripheral Blood. **Cancers** 13:5108.