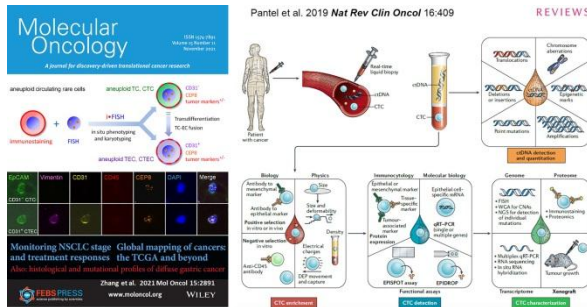


非小细胞肺癌：CTEC-CTC 和 cfDNA-ctDNA、PET-CT 灵敏度和特异性的比较

“细胞型循环肿瘤标志物”(循环肿瘤细胞 CTC、循环肿瘤血管内皮细胞 CTEC、) [1,2] 与“核酸型循环肿瘤标志物”(cfDNA、ctDNA) 构成了肿瘤液体活检的两大主要板块。虽然以往对于这两类循环肿瘤标志物检测的临床意义已有所报道^[3]，但两者直接对比的研究一直处于空白。



为此，上海交大附属上海第一人民医院肿瘤中心、胸外科、病理科在非小细胞肺癌 (NSCLC) 诊断、区分良、恶性孤立性肺结节 (solitary pulmonary nodules, SPNs) 等领域，联合开展了多学科回顾性临床研究。研究者利用赛特 SE-i-FISH 有效检测异倍体 CD31⁺CTEC、CD31⁻CTC 等各种亚类细胞，与 cfDNA-ctDNA (cell free DNA- circulating DNA) 检测、多项血清肿瘤标志物检测及医学影像学

CT/PET-CT 进行了系统性对比，取得的一系列重要成果已经发表^[4,5]。

要点

● 肺癌诊断

总体 **CD31⁻CTCs**: cut-off (11.5 CTCs/6 ml); 灵敏度 67.3%、特异性 83.9%; 三倍体小细胞 CTC 亚类特异性可高达 95%; 总体 **CD31⁺CTECs**: cut-off (10.5 CTECs/6 ml); 灵敏度 77.6%、特异性 77.4%; 三倍体小细胞 CTEC 亚类特异性显著升高

● 区分、诊断恶性孤立性肺结节 (malignant SPNs)

总体 **CD31⁻CTCs**: cut-off (6.5 CTCs/6 ml); 灵敏度 82.4%、特异性 56.7%; 三倍体或多倍体 CTC 亚类细胞特异性高达 90%;

总体 **CD31⁺CTECs**: cut-off (11.5 CTECs/6 ml); 灵敏度 55.9%、特异性 83.3%; 三倍体 CTEC 亚类细胞特异性高达 96.7%

● SE-i-FISH 检测 CTC、CTEC 应用于恶性 SPNs 及肺癌诊断，灵敏性、特

异性均显著高于 CT/PET-CT 及肿瘤标志物检测 (SCC、CEA、Cyfra21-1)

- 检测出的 cfDNA 含量仅与肿瘤大小及 Cyfra21-1 浓度相关，与 CTC、CTEC 数量无关；绝大部分肿瘤原发灶检出的基因突变 (tDNA) 在 ctDNA 上无法检出

CTEC-CTC、cfDNA-ctDNA 检测应用于肺癌诊断

(一) CTEC-CTC

入组肺癌患者 (I-II 早期 59.2%、III-IV 晚期 40.9%、腺癌 73.4%、鳞癌 16.3%、腺鳞癌 6.1%、其它类型 4.1%)、肺部良性病变患者及健康受检者共 104 人接受肿瘤液体活检、血清瘤标检测、CT/PET-CT 检查，再与病理结果进行对比。

鉴于雅培 (Abbott Lab) 8 号染色体着丝粒探针 (Vysis CEP8) 是目前唯一被美国 FDA 批准用于鉴别实体瘤肿瘤细胞的探针，本文作者利用 SE-i-FISH 检测 8 号染色体异倍体的 CD31⁺ CTEC、CD31⁻ CTC，其 cut-off 值分别为 10.5 及 11.5 个细胞/6 ml 外周血，阳性率 (77.6%，CTEC 总数) 及特异性 (96.8%，三倍体小细胞 CTC) 均明显高于血清瘤标检测

(SCC, CEA, Cyfra21-1, 灵敏度 52.2%、特异性 75.8%) 及 CT/PET-CT 检测 (灵敏度 57.1%、特异性 77.4%)。

Xie et al. Journal of Translational Medicine (2023) 21:873
https://doi.org/10.1186/s12967-023-04746-8

Journal of Translational Medicine

RESEARCH

Open Access

A comparative study on ctDNA and tumor DNA mutations in lung cancer and benign cases with a high number of CTCs and CTECs

Jianzhu Xie^{1†}, Binjie Hu^{1†}, Yanping Gong^{1†}, Sijia He¹, Jun Lin², Qian Huang^{1*} and Jin Cheng^{1*}

Xie et al. 2023 J Transl Med 21:873

上海交大医学院·上海第一人民医院 肿瘤中心·上海第一人民医院 胸外科、病理科

Table 2 Statistical parameters for ROC analysis of CTCs and CTECs for NSCLC

| Test Item | AUC | Cutoff value | Std. Error | P | 95% CI |
|-----------------------------|-------|--------------|------------|---------|-------------|
| Total CTCs | 0.815 | 11.5 | 0.047 | <0.0001 | 0.722-0.907 |
| CTCs | 0.663 | 6.5 | 0.061 | 0.015 | 0.544-0.782 |
| CTECs | 0.815 | 6.5 | 0.046 | <0.0001 | 0.724-0.906 |
| Triploid CTCs | 0.809 | 6.5 | 0.047 | <0.0001 | 0.717-0.901 |
| Tetraploid CTCs | 0.698 | 4.5 | 0.056 | <0.001 | 0.634-0.852 |
| Multiploid CTCs | 0.646 | 6.5 | 0.062 | 0.029 | 0.525-0.766 |
| Total CTECs | 0.739 | 10.5 | 0.062 | <0.001 | 0.618-0.860 |
| CTECs | 0.691 | 8.5 | 0.064 | 0.004 | 0.566-0.815 |
| CTECs | 0.781 | 2.5 | 0.053 | <0.0001 | 0.679-0.884 |
| Triploid CTECs | 0.716 | 3.5 | 0.058 | 0.001 | 0.602-0.830 |
| Tetraploid CTECs | 0.677 | 2.5 | 0.063 | 0.008 | 0.555-0.799 |
| Multiploid CTECs | 0.675 | 7.5 | 0.063 | 0.009 | 0.550-0.799 |
| Total CTCs + CTECs | 0.826 | - | 0.047 | <0.0001 | 0.734-0.917 |
| CTCs + CTECs | 0.898 | - | 0.036 | <0.0001 | 0.826-0.968 |
| TriploidCTCs + CTECs | 0.872 | - | 0.040 | <0.0001 | 0.794-0.950 |

Large CTCs, CTCs, small CTCs, CTCs, Large CTECs, CTECs, small CTECs, CTECs

Table 3 Evaluation of the diagnostic efficiency of single and combined tests for NSCLC (%)

| Test Item | SEN% | SPE% | PPV% | NPV% | AC% | LR+ |
|------------------------------|-------------|-------------|------|------|------|------|
| Total CTCs | 67.3 | 83.9 | 86.8 | 61.9 | 73.8 | 4.2 |
| CTCs | 38.8 | 67.7 | 65.5 | 41.2 | 50.0 | 1.2 |
| CTECs | 65.3 | 93.5 | 94.1 | 63.0 | 76.3 | 10.1 |
| Triploid CTCs | 57.1 | 96.8 | 96.6 | 58.8 | 72.5 | 17.7 |
| Tetraploid CTCs | 51.9 | 67.1 | 86.2 | 52.9 | 65.0 | 4.0 |
| Multiploid CTCs | 28.6 | 96.8 | 93.3 | 46.2 | 55.0 | 8.9 |
| Total CTECs | 77.6 | 77.6 | 84.4 | 68.6 | 77.5 | 3.4 |
| CTECs | 67.3 | 67.7 | 76.7 | 56.8 | 67.5 | 2.1 |
| CTECs | 67.3 | 77.6 | 82.5 | 60.0 | 71.3 | 3.0 |
| Triploid CTECs | 49.0 | 90.3 | 88.9 | 52.8 | 65.0 | 5.1 |
| Tetraploid CTECs | 36.7 | 71.0 | 66.7 | 41.5 | 50.0 | 1.3 |
| Multiploid CTECs | 59.2 | 74.2 | 78.4 | 53.5 | 65.0 | 2.3 |
| SCC + CEA + Cyfra21-1 | 52.2 | 75.8 | 77.4 | 50.0 | 61.3 | 2.17 |
| CT/PET-CT diagnosis | 57.1 | 77.6 | 80.0 | 53.3 | 65.0 | 2.48 |

Large CTCs, CTCs, small CTCs, CTCs, Large CTECs, CTECs, small CTECs, CTECs

SEN Sensitivity; SPE Specificity; PPV Positive predictive value; NPV Negative predictive value; LR+ Positive likelihood ratio; SCC Squamous cell carcinoma antigen; CEA Carcinoembryonic antigen; Cyfra21-1 Cytokeratin fragment antigen 21-1

根据细胞形态与染色体倍体特性联合考量 CTC 与 CTEC，其 ROC 曲线下面积 (AUC) 数值有所增加，更加趋近于 1：CTC + CTEC 总数 (AUC 0.826)；小细胞 sCTC + sCTEC (AUC 0.898)；三倍体 CTC + CTEC (AUC 0.872)，提示相对于单一考量 CTC 或 CTEC，统筹综合考量 CTC 及 CTEC 各亚类细胞数值能够更加有效地应用于肺癌诊断。

研究人员应用 CK-i•FISH 对 CTC、CTEC 中的角蛋白 (cytokeratin, CK) 表达同步进行了检测, 只在 2 个患者体内检测到 CK⁺ CTC (2/48, 4.2%), 证实 CK 在 CTC 及 CTEC 中表达极低, CK 染色不适于鉴定肺癌 CTC、CTEC。

(二) cfDNA 与 ctDNA

cfDNA 是游离于细胞之外、存在于血浆中的 DNA 微小碎片, 它们可来自于肿瘤细胞或其它不相关细胞。携带肿瘤相关突变基因的 ctDNA 是 cfDNA 的组成部分之一。文章作者对检出 CTC、CTEC 最高数量的 20 例肺癌患者、8 例良性肺部疾病受试者, 利用罗氏 Roche AVENIO ctDNA 系列试剂盒及 Illumina 测序仪, 通过 NGS 检测 cfDNA 及 ctDNA 含量, 并利用 xGen 泛癌种 474 基因试剂盒检测了 9 例患者肺癌组织的突变基因 (tDNA), 与相同患者体内的 ctDNA 基因突变进行对比, 研究发现, 仅在 III-IV 晚期或肺鳞癌患者体内可检测出较高含量的 cfDNA。cfDNA 仅与肿瘤灶最大直径及 Cyfra21-1 浓度相关, 与 CEA、SCC 及 CTC、CTEC 数量无关, 说明 cfDNA 不全是由凋亡的肿瘤细胞释放而来。

cell free DNA (cfDNA), circulating tumor DNA (ctDNA), tumor DNA (tDNA)

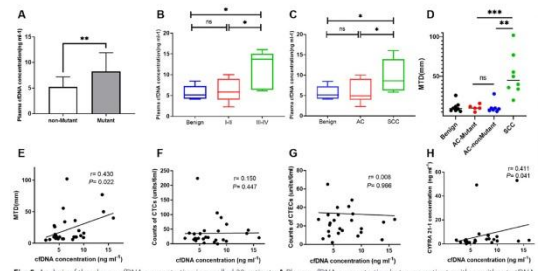


Fig. 5 Analysis of the plasma cfDNA concentration in enrolled 28 patients. A Plasma cfDNA concentration between patients with or without ctDNA mutations. B Plasma cfDNA concentration between different TNM stages. C Plasma cfDNA concentration between different pathological types. D Tumor size (Maximum tumor diameter, MTD) between different pathological types. E The correlation between cfDNA concentration and tumor size (MTD). F The correlation between cfDNA concentration and counts of CTCs. G The correlation between cfDNA concentration and counts of CTECs. H The correlation between the concentration of cfDNA and Cyfra 21-1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney U test

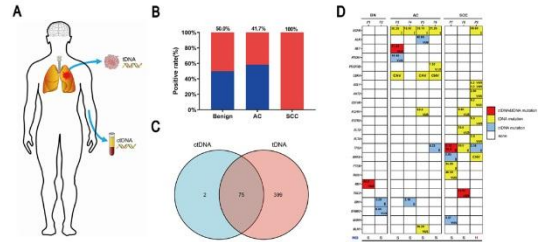


Fig. 6 Characteristics of the mutant genes detected in circulating tumor DNA (ctDNA) and tumor DNA (tDNA). A Schematic figure illustrating the sources of ctDNA and tDNA. B The positive rates of ctDNA mutations among benign, adenocarcinoma (AC), and squamous cell carcinoma (SCC) subgroups of the enrolled 28 patients. C Venn figure showing the target genes covered in panels of both ctDNA and tDNA. D Heatmap detailing the mutant genes detected in the ctDNA and matched tDNA of the 9 patients with fractional abundance in the upper left corner as well as the microsatellite instability (MSI) status and tumor mutation burden (TMB) score. VUS: variant of uncertain significance.

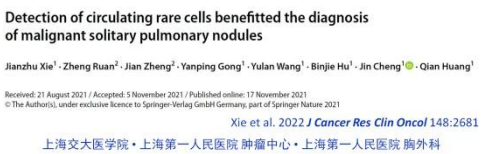
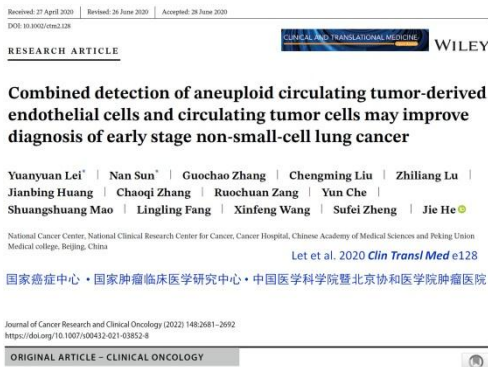
研究进一步发现, ctDNA 携带的突变基因仅在高含量 cfDNA 的患者 (17/28, 60.7%) 及 4 例良性病变患者体内 (50%) 检测出来 (主要为 TP53 突变), 但 ctDNA 上检出的基因突变与肿瘤灶中检测出的 92 个基因突变 (主要代表为 EGFR L858R) 并不匹配, 绝大多数肿瘤灶中检出的突变基因 (包括 EGFR L858R) 在 ctDNA 上检测不到。

CTEC-CTC 检测应用于诊断恶性孤立性肺结节 (SPNs)

国家癌症中心、中国医学科学院肿瘤医院贺捷院士、院长团队已报道了 SE-i•FISH 检测 CTC、CTEC 对区分良、恶性肺小结节及肺癌早筛具有非常重要的临

床价值^[6]。在此基础上,上海第一人民医院多个科室密切合作,实验入组 213 位受检者,包括 164 例 SPN 的患者、25 例晚期 NSCLC、24 例正常人,利用 3 年时间进一步在大样本的基础上深入研究了 CTC、CTEC 诊断恶性 SPNs 的重要临床意义。

显著高于良性 SPNs 患者 ($P < 0.0001$)。CTC、CTEC 亚类细胞诊断恶性 SPNs 的敏感性 (最高可达 91.2%, 四倍体 CTC) 与特异性 (最高可达 96.7%, 三倍体 CTEC) 均显著高于血清瘤标检测 (SCC, CEA, Cyfra21-1, 灵敏度 50.0%、特异性 71.4%) 及 CT/PET-CT 检测 (灵敏度 42.4%、特异性 75.9%)。



诊断恶性孤立性肺结节 (Solitary Pulmonary Nodules, SPN)

| Test item | Cutoff value | AUC (95%CI) | P | SEN% | SPE% | LR+ |
|---------------------|--------------|---------------------|---------|------|------|-----|
| Total CRCs | 21.5 | 0.778 (0.666-0.889) | 0.0001 | 67.6 | 73.3 | 2.5 |
| ₁ CRCs | 7.5 | 0.689 (0.560-0.818) | 0.0096 | 79.4 | 50.0 | 1.6 |
| ₂ CRCs | 6.5 | 0.849 (0.751-0.947) | <0.0001 | 82.4 | 73.3 | 3.1 |
| Triploid CRCs | 9.5 | 0.841 (0.745-0.938) | <0.0001 | 55.9 | 93.3 | 8.4 |
| Tetraploid CRCs | 3.5 | 0.731 (0.607-0.855) | 0.0015 | 70.6 | 66.7 | 2.1 |
| Multiploid CRCs | 9.5 | 0.699 (0.571-0.826) | 0.0064 | 58.8 | 73.3 | 2.2 |
| Total CTCs | 6.5 | 0.748 (0.629-0.867) | 0.0007 | 82.4 | 56.7 | 1.9 |
| ₁ CTCs | 10.5 | 0.559 (0.417-0.700) | 0.420 | 26.5 | 93.3 | 4.0 |
| ₂ CTCs | 6.5 | 0.800 (0.687-0.913) | <0.0001 | 67.6 | 90.0 | 6.8 |
| Triploid CTCs | 5.5 | 0.818 (0.713-0.923) | <0.0001 | 61.8 | 86.7 | 4.6 |
| Tetraploid CTCs | 0.5 | 0.683 (0.550-0.815) | 0.0121 | 91.2 | 40.0 | 1.5 |
| Multiploid CTCs | 6.5 | 0.557 (0.416-0.698) | 0.435 | 26.5 | 93.3 | 4.0 |
| Total CTECs | 11.5 | 0.728 (0.605-0.851) | 0.0018 | 55.9 | 83.3 | 3.4 |
| ₁ CTECs | 8.5 | 0.699 (0.569-0.828) | 0.0064 | 52.9 | 83.3 | 3.2 |
| ₂ CTECs | 2.5 | 0.719 (0.595-0.843) | 0.0027 | 58.8 | 73.3 | 2.2 |
| Triploid CTECs | 4.0 | 0.650 (0.516-0.783) | 0.040 | 32.4 | 96.7 | 9.7 |
| Tetraploid CTECs | 1.5 | 0.682 (0.551-0.812) | 0.013 | 52.9 | 76.7 | 2.3 |
| Multiploid CTECs | 3.5 | 0.688 (0.558-0.819) | 0.0098 | 79.4 | 50.0 | 1.6 |
| SCC+CEA+CYFRA 21-1 | 2.5,5.0,3.3 | 0.652 (0.513-0.790) | 0.0439 | 50.0 | 71.4 | 1.8 |
| CT/PET-CT Diagnosis | - | 0.585 (0.444-0.727) | 0.247 | 42.4 | 75.9 | 1.8 |

₁CRCs, large CRCs; ₂CRCs, small CRCs; ₁CTCs, large CTCs; ₂CTCs, small CTCs; ₁CTECs, large CTECs; ₂CTECs, small CTECs; SEN, sensitivity; SPE, specificity; LR+, positive likelihood ratio

结果显示,恶性 SPNs 患者的 CTC、CTEC 数量与晚期肺癌患者接近,两者均

结论

相较于 cfDNA-ctDNA、血清肿瘤标志物和影像学检查,利用 SE-i-FISH 检测异倍体 CTEC、CTC 各亚类细胞在肺癌早期诊断、鉴别良、恶性孤立性肺结节等方面显示出更高的灵敏性与特异性,具有重要的临床意义与应用价值。

文献

1. Lin et al. 2017 *Sci Rep* 7:9789
2. Zhang et al. 2021 *Mol Oncol* 15:2891
3. Pantel et al. 2019 *Nat Rev Clin Oncol* 16:409
4. Xie et al. 2023 *J Transl Med* 21:873
5. Xie et al. 2022 *J Cancer Res Clin Oncol* 148:2681
6. Lei et al. 2020 *Clin. Transl Med* e128