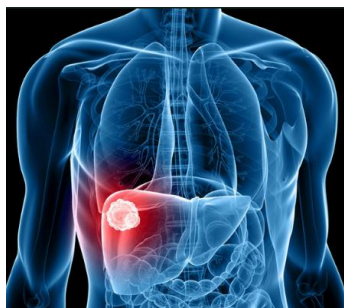


SE-iFISH 检测与肝癌复发密切相关的术后 CTC 亚类细胞



应用 CTC 评估手术疗效及锁定与肿瘤快速复发密切相关的术后 CTC 亚类细胞, 近年来已受到人们的广泛关注。

肝癌是我国高发的恶性肿瘤之一。2015 年中国肝癌发病率和死亡率均占据了亚洲所有国家总和的 70% (Chen et al., 2016 CA Cancer J Clin 66:115)。手术切除是早期肿瘤治疗的首选方案, 然而手术效果对于不同患者而言, 差异颇大。以肝癌为例, 高达 76% 的肝癌患者术后可发生快速复发 (Portolani et al., 2006 Ann Surg 243:229), 这也是肝癌患者生存期较短的主要原因。

有关 CTC 在肿瘤转移与复发过程中的重要作用已有很多报道。国外最新的研究发现, 不同瘤种的肿瘤患者 (如肺癌、乳腺癌、食管癌) 手术后仍可检测出 CTC, 且这些 CTCs 与肿瘤早期复

发的相关性已得到证实 (Sandri et al., 2010 Ann Surg Oncol 17:1539; Bayarri-Lara et al., 2016 PloS One 11:e0148659)。然而有关肝癌患者术后 CTC 与肿瘤快速复发的相关性研究一直处于空白。

最近, 由清华大学北京长庚医院肝胆胰外科、病理科、北京大学肿瘤中心 (北京肿瘤医院) 消化道肿瘤科、解放军 301 总医院肝胆疾病中心及赛特生物 (Cytointelligen/中国医药城, Cytelligen/USA) 紧密合作, 利用赛特 SE-iFISH[®] 技术平台, 在国际上首次成功对肝、胆肿瘤患者手术前后各种 CTC 亚类细胞 (CD31⁺) 进行动态监测, 并锁定了与肝癌快速复发相关的术后 CTC 亚类细胞。研究发现, 大部分 (高达 67%) 肝癌 CTC 为小细胞 (直径 ≤ 5 微米白细胞), 患者术后检测出的 8 号染色体三体小细胞 CTC 数量 (cut-off: ≥ 5 CTCs/6 ml 血液)、8 号染色体多体 EpCAM⁺ 循环肿瘤干细胞 (CTSC) 数量和癌栓 (肿瘤细胞团, CTM) 数量 (cut-off: ≥ 1), 均与肝癌患者术后无病生存率 (Disease-Free Survival, DFS) 及快速复发密切相关。该研究成果刚刚发表在 Cancer Letters 杂志上 (Wang et al., 2017 Cancer Lett 412:99-107) (图 1)。

Cancer Letters 412 (2018) 99–107



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Original Article

Quantified postsurgical small cell size CTCs and EpCAM⁺ circulating tumor stem cells with cytogenetic abnormalities in hepatocellular carcinoma patients determine cancer relapse

Liang Wang^{a,1}, Yilin Li^{b,1}, Jing Xu^a, Aiqun Zhang^c, Xuedong Wang^a, Rui Tang^a, Xinjing Zhang^a, Hongfang Yin^d, Manting Liu^a, Daisy Dandan Wang^c, Peter Ping Lin^e, Lin Shen^{b,*,*}, Jiahong Dong^{a,*,*}

^a Departments of Hepatobiliary and Pancreas Surgery, TUCH, Beijing, China

^b Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Gastrointestinal Oncology, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing, China

^c Center for Hepatobiliary Diseases, PLA General Hospital, Beijing, China

^d Department of Pathology, Tsinghua University Changgung Hospital, Beijing, China

^e Cytelligen, San Diego, CA, USA

图 1 肝癌 CTC 文章

对于肝癌细胞而言，EpCAM 为干细胞标示物，只表达在少数肿瘤干细胞上 (Terris et al., 2010 J Hepatol 52:280; Munz et al., 2009 Cancer Res 69:5627)，而以 CellSearch 为代表的阳性捕获技术只能偏见性地检出 EpCAM 及角蛋白 CK 双阳性的 CTC 细胞，因此该技术手段只可对肝癌部分 CTC 进行检测，且对于其它瘤种的 CTC 检测也会造成不可忽视的大量假阴性，已远远不能满足人们客观、全面研究 CTC 的迫切需要。

全新优化的适于检测肝癌等实体瘤 CTC 的瘤标-iFISH® 技术

FISH 方法是病理科广泛开展的用于检测肿瘤细胞的常规手段。首先，本研究在赛特 SE-iFISH 技术平台的基础上 (由磊等 2017, 临床与实验病理学杂志 33:297; Lin 2015, Clin Transl Med 4:38)，针对肝癌等 CTC 的特点及临床不同需求，进一步优化了 EpCAM、PD-L1、Vimentin、CK 等多重瘤标 iFISH 系列检测系统，以达到同步、原位检测肝癌等实体瘤 CTC 上多重肿瘤标示物蛋白表达与异常染色体的目的 (图 2)。

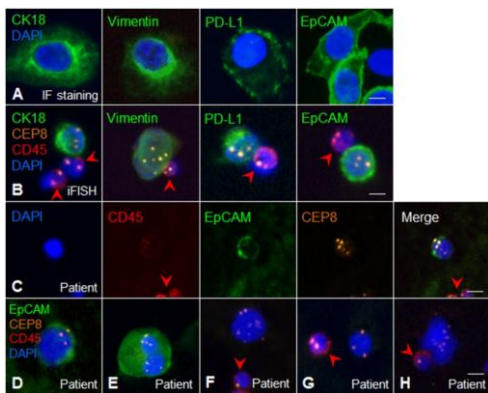


图 2 各种瘤标-iFISH CTC 检测图像

血液中非血源性循环异倍体细胞 nCAC (non-hematopoietic circulating aneuploid cell) 主要由循环肿瘤细胞 CTC (CD31⁻/CD45⁻) 及异倍体循环血管内皮细胞 CEC (CD31⁺/CD45⁻) 构成 (Lin et al., 2017 Sci Rep 7:9789) (图 3)。对 CTC、CEC 进行有效鉴别与区分，是特异性检测 CTC

的必要前提!



(Lin et al., 2017 Sci Rep 7:9789 赛特生物公众号 2017. 10. 18)

图 3 循环异倍体细胞 CAC 分类

鉴于肝癌细胞上干细胞标示物 EpCAM 表达的特殊意义，本研究应用优化的 EpCAM-iFISH，并借助 Metafer-iFISH® CTC 全自动扫描与分析系统，在有效区分外周血中异倍体 CEC (CD31⁺) 与 CTC (CD31⁻) 的基础上，对肝癌、胆管细胞癌患者手术前、后系统性地进行了 CTC 检测，并首次发现术后 CTC 与肿瘤快速复发密切相关。

各 CTC 亚类细胞在手术前、后的数量变化及比例分布

本研究分析统计了各亚类 CTC 在手术前后 CTC 总数中的比例分布 (图 4)，其中，EpCAM⁺ 循环肿瘤干细胞 (CTSC) 占总检出 CTC 的 9%。同时，文章对比了手术前后 EpCAM⁺ 循环肿瘤干细胞、EpCAM⁻ 异倍体 CTC 及循环肿瘤细胞栓 (CTM) 的数量，结果发现，患者术后除 CTSC 数目有明显下降外，其余各种 CTC 亚类细胞及癌栓的数量并没有随着原发肿瘤灶的切除而显著降低。

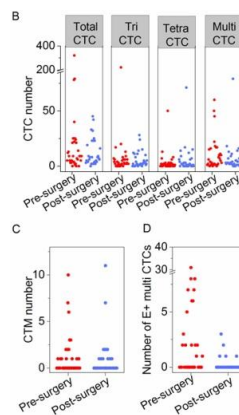


图 4 手术前后各亚类 CTC 数目比较

近年来，有关术后 CTC 的来源已成为肿瘤界同行日益关注的焦点。除去手术过程本身可能造成肿瘤细胞释放入血外，术后存留的 CTC 也许并不全都来自于这些切除的实体瘤，一部分可能来源于“早期播散型冬眠肿瘤细胞”(dormant early disseminated cancer cells, eDCCs)。eDCCs 在肿瘤形成的初始阶段即已存在于血液或潜伏在不同器官的组织中，它们可能永远处于冬眠状态而不致瘤，也可能被特定因素唤醒、激活，从而造成全身广泛的肿瘤转移 (Harper et al., 2016 Nature 540:558; Aguirre-Ghiso et al., 2013 Nat Med 19:276)。需要特别指出的是，8 号染色体异常扩增 (异倍体) 已被证实为是唤醒冬眠肿瘤细胞的主要因素之一 (Hosseini et al., 2016 Nature 540:552)。因此可以合理地认为，本研究检测出的术后肝癌 CTC，部分可能属于被唤醒的冬眠肿瘤细胞。

大部分肝、胆肿瘤患者手术前后 CTC 检出均为阳性，且过半的肝癌患者术后快速复发，有鉴于此，本文对手术前后肝癌 CTC 及其临床意义进行了深入研究，结果发现肝癌患者术前 CTC 与病理分期高度相关，而术后 CTC 数目与肿瘤复发密切相关。

肝癌患者术前染色体三体 CTC 及癌栓 CTM 数量与病理及临床分期相关

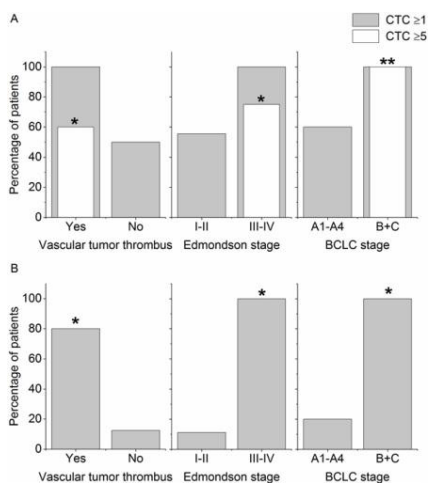


图 4 手术前后各 CTC 亚类细胞数目比较

如图 4 所示，肝癌患者手术前检测出的较高 8 号染色体三体 (trisomy 8) CTC 数量 (A, ≥ 5 CTCs/6 ml 血液) 及 CTM 阳性数量 (B, ≥ 1) 与患者微血管癌栓、病理分期 Edmondson stage III-IV、肝癌临床晚期分期 (巴塞罗那 BCLC stage B+C) 密切相关。

手术后 CTC、CTSC 及癌栓 CTM 数量与肝癌快速复发密切相关

本研究进一步分析了不同亚类 CTC 与术后肝癌复发的相关性 (图 5)。结果显示，手术后一周患者检出的 8 号染色体三体 CTC 数量 $\geq 5/6$ ml 血液、阳性检出 EpCAM⁺ 循环肿瘤干细胞 CTSC (≥ 1) 或 CTM (≥ 1)，均与肿瘤患者快速复发、较短的无病生存率 DFS 密切相关。

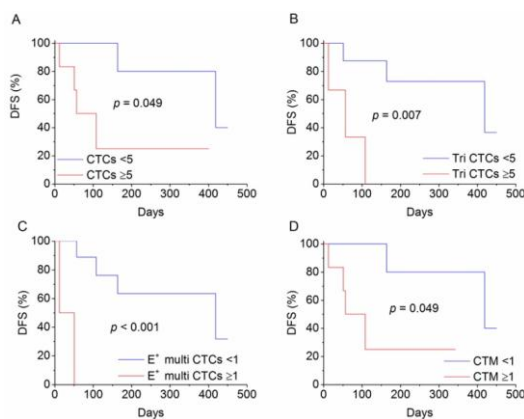


图 5 各亚类 CTC 与肝癌复发的相关性

肝癌小细胞 CTC 检测的特殊临床意义

肝癌患者手术前后检出的 CTC 大部分为小细胞 (≤ 5 微米白细胞)，且手术前后小细胞 CTC 均维持了 67% 的较高比例，中位数由术前 2 升为术后 4 个细胞，而胆管细胞癌 (cholangiocarcinoma, CC) 小细胞 CTC 的比例由术前的 53.3% 降低为术后的 24%，中位数也相应地由 7 降为 5 个细胞 (图 6)。

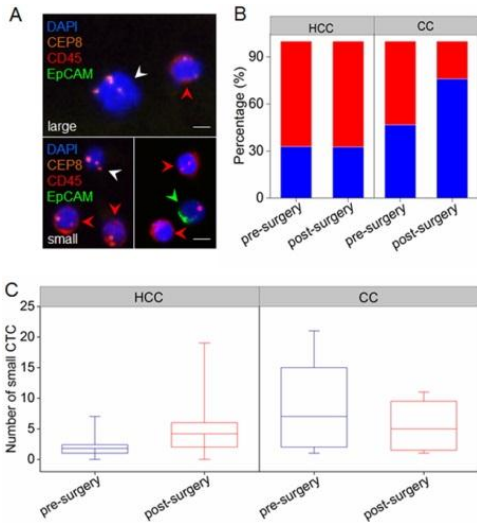


图6 手术前后小细胞 CTC 的变化

进一步的分析显示（图 7），肝癌快速复发的患者，术后 8 号染色体三体的小细胞 CTC 数量较术前有明显升高。

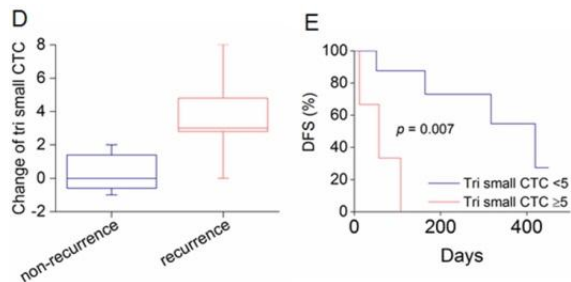


图7 8 号染色体三体的小细胞 CTC 与肝癌复发相关

虽然过滤法分离 CTC 的过程相对简单，但是采用 8 微米孔径的细胞筛过滤去除 5 微米白细胞以分离 CTC 的过程中，不可避免地丢失大量的小细胞 CTC (Alunni-Fabbroni et al., 2010 Methods 50:289)。

本研究发现大部分肝癌 CTC 为小细胞，从而合理解释了一直困扰人们的使用细胞过滤法不能有效检测肝癌 CTC 的问题。

结论

- 本研究证实 SE-iFISH®可同步检测肝癌等实体瘤 CTC (CD31) 的异常染色体、及对调控细胞起决定性作用的各种肿瘤蛋白表达，而非检测细胞内“DNA→mRNA→蛋白质”生物链中的过渡性中间产物 mRNA
- 大部分肝癌患者手术前后均可检测出 CTC，但术前与术后 CTC 具有不同的临床意义，术前 CTC 数量与肿瘤病理分期及肝癌临床晚期分期高度相关，而术后 CTC 数量与肝癌快速复发密切相关
- 大部分肝癌 CTC 为小细胞 (≤ 5 微米白细胞)，且手术前后小细胞所占的高比例基本维持不变
- 本研究在术后肝癌患者体内首次锁定了与肿瘤快速复发密切相关的 CTC 亚类细胞，并确定了相应阈值：1) 8 号染色体三体小细胞 CTC ($\geq 5/6$ ml 血液)；2) EpCAM⁺ 循环肿瘤干细胞 CTSC (≥ 1)；3) 循环肿瘤细胞团 CTM (≥ 1)。此外，术后 8 号染色体三体小细胞 CTC 较术前呈增加的变化趋势亦与肝癌快速复发密切相关。

本研究及国外的多个临床实验已证实，肝癌等实体瘤患者术后体内存在与肿瘤预后、复发等密切相关的 CTC 亚类细胞。与检测血浆中不具生物活性的残留核酸片段 ctDNA 不同，实时监测具有细胞及生物活性的 CTC，可为患者手术后进一步开展个体化精准治疗、监测肿瘤复发等提供重要参考依据。