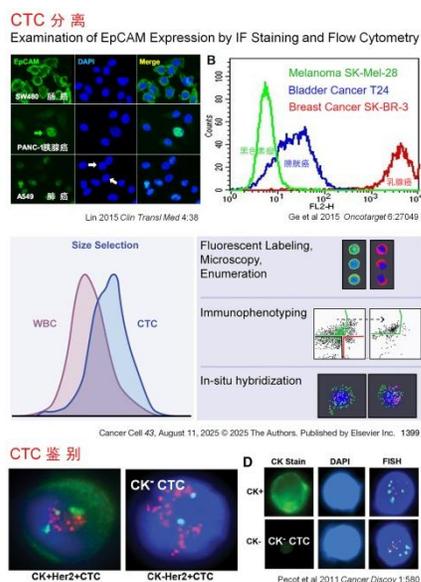


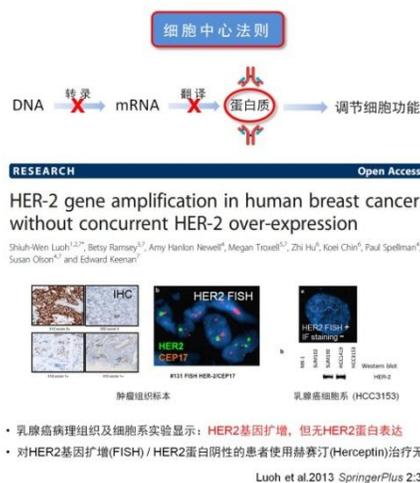
重制约了依赖 EpCAM 表达的泛癌种 CTC 检测。迄今为止，依赖 EpCAM 的 CTC 捕获检测技术只适于 FDA 认证的肠癌、乳腺癌及前列腺癌三种肿瘤。

当人们试图用细胞过滤法去除白细胞以丰富集 CTC 时 (size selection)，发现不少 CTC 与白细胞大小相当，细胞尺寸高度重叠 (下图)，因而此方法在去除白细胞的同时会丢失显著数量的小细胞 CTC^[3]。目前已有报道，重要的间质化 CTC 及 70% 的肝癌 CTC 均为小细胞^[6]。



CTC 的鉴别技术大都使用角蛋白 (CK) 抗体染色或核酸杂交，但这种依赖单一要素的鉴别技术有很大的局限性。世界著名的美国安德森癌症中心 (MD Anderson) 报道了他们的研究成果，如图所示，类似 EpCAM 在 CTC 中的低表达或不表达，很多 CTC 同样呈现角蛋白 CK 不表达，从而导致 CTC 检出

的假阴性，这些 CK⁻ CTC 可以用 HER2 基因探针或染色体荧光原位杂交 (FISH) 方法进行识别^[7]。虽然各种厂家的 CTC 检测技术不断出现 (文章中有详细描述，此处不再赘述)^[3]，但大部分还是围绕细胞三要素的核酸、蛋白、细胞形态 (大小、细胞团) 中的单一要素进行局部优化，并没有实质性改进，致使 CTC 检测的灵敏度及临床应用仍有很大局限性。例如，HER2 基因扩增被用来鉴别包括 CTC 在内的 HER2⁺ 肿瘤细胞，并用于指导抗 HER2 治疗，但 DNA 经 mRNA 产生具有生物学功能蛋白质的过程中，受转录、翻译环节的调控，DNA 扩增并不会必然导致相关蛋白的表达。

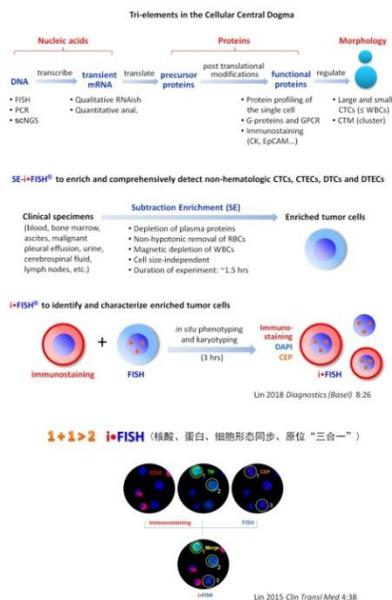


检测肿瘤细胞上 HER2 靶点蛋白表达才能有效指导靶向治疗!

研究发现有些乳腺癌病理组织标本或肿瘤细胞系虽然存在 HER2 基因扩增，但并无 HER2 蛋白表达，即 DNA \neq mRNA \neq 蛋白质，对这类患者使用赫赛汀抗 HER2 治疗无效^[8]。

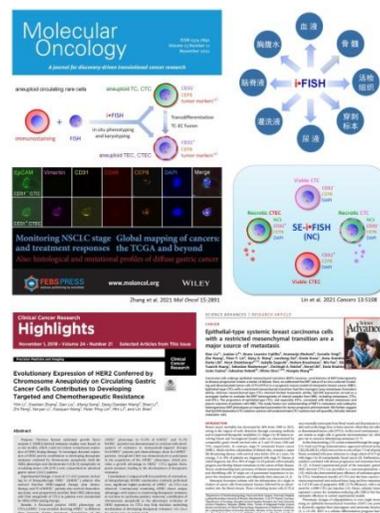
因此，针对细胞三要素中的单一要素进行检测势必会带来以偏概全的误判。

为了避免盲人摸象的局限性，有必要兼顾细胞三要素，对 CTC 进行三位一体的全方位综合检测。为此，赛特生物 (www.cytointelligen.com) 和国内外多家著名医学院校经过多年合作，开发出了不依赖 EpCAM 及细胞大小的非血源性细胞富集技术 (SE, subtraction enrichment) 和相应的“多重免疫荧光蛋白染色-染色体荧光原位杂交整合技术” (i•FISH)^[9]，其中使用了 USFDA 认证的实体肿瘤通用标志物 8 号染色体异倍体的检测试剂 CEP8 作为 FISH 探针。



如图所示，单一的免疫荧光染色 (IF) 或染色体荧光原位杂交 (FISH)，分别检测出 2 个肿瘤细胞，而整合的 IF+FISH (i•FISH) 却可检出 3 个肿瘤细胞，展现出了“1+1>2”

的特殊技术优势。研究人员利用 SE-i•FISH 首次证实肿瘤组织中具有抑制机体免疫功能的 CD31⁺ 异倍体肿瘤血管内皮细胞 TEC^[10,11] 也会以 CTEC 的形式广泛存在于各种肿瘤患者的外周血循环中^[2]。现已证实，TEC、CTEC 来自于肿瘤细胞 TC，“肿瘤细胞血管内皮化”及“血管内皮细胞肿瘤化”构成了 TEC 形成的主要机制，过程中包括了 TC 与正常血管内皮细胞 EC 相融合，或低氧环境下 TC 的最终转分化 (transdifferentiation)^[12]。TEC、CTEC 兼具了肿瘤细胞及内皮细胞造血管的双重特性。利用衍生的 SE-i•FISH(NC) (坏死细胞 NC, necrotic cell) 技术可进一步有效区分，并同步、原位检测对治疗敏感 (坏死) 或耐受 (活性) 的各种 CD31⁻ CTC、CD31⁺ CTEC 亚类细胞^[13]。该技术以其独特的创新性被“科学”杂志特别报道 (Life Sci Tech Sect 2013, Science 341)，同时也被国际著名“分子肿瘤学”杂志 (Mol Oncol, FEBS press) 以封面形式向全球读者做了专题介绍^[5]。



随着各种技术不断发展，CTC、CTEC 检测已不再局限于对血液样本的简单细胞计数，而是扩展到对其它多种生物体液 (如胸腹水、骨髓、尿液、脑脊液、灌洗液等) 中的播散性肿瘤细胞 DTC、DTEC^[14-16] 以及肿瘤组织中的各类细胞的多维度指标检测。根据 SE-i•FISH 或 SE-i•FISH(NC) 检测出的多项综合指标，包括与肿瘤细胞恶性度密切相关的染色体倍体数目 (扩增或缺失)^[17,18]、多种肿瘤标志物蛋白是否表达、细胞形态 (大小、细胞团等) 及细胞活性或坏死状态等，可将这些细胞进行亚类分型，每种亚类细胞各自分别具有不同的重要临床意义。与此同时，SE-i•FISH 可将被比喻为“羊”的脱落于正常血管内皮组织的“循环血管内皮细胞”CEC (CD31⁺, 二倍体) 与“披着羊皮的狼”的“循环肿瘤血管内皮细胞”CTEC (CD31⁺, 异倍体) 进行有效区分，避免了检测过程中 CEC 对 CTEC 的干扰，有助于更加客观、准确评估 CTEC 的临床意义。



有别于小片段“核酸型循环肿瘤标志物” ctDNA, 作为一对伴随肿瘤进展、实时携带细胞三要素 (完整核酸信息、瘤标蛋白表达、细

胞形态及活性状态) 的“细胞型循环肿瘤标志物”，CTC、CTEC 在肿瘤发生、进展、转移、复发等过程中相互协调、相互作用。

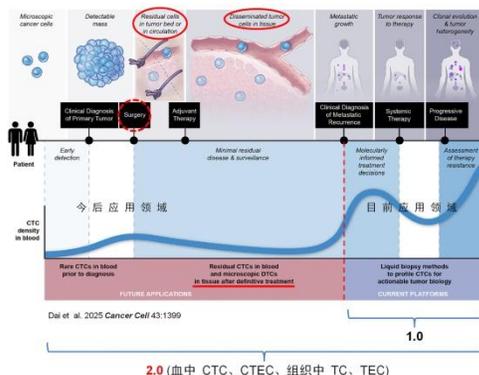
SE-i•FISH、SE-i•FISH(NC) 已被广泛应用于多种肿瘤的临床、基础与转化医学研究。现已证实，胃癌三倍体 (trisomy 8) CTC 对一线化疗药物顺铂内源性耐药^[19]。非小细胞肺癌 PD-L1⁺ CTC 对免疫治疗敏感，但 PD-L1⁺ CTEC 则对免疫治疗药物 Opdivo 致敏的 T 细胞耐受，并与患者较差预后密切相关；依据倍体不同，PD-L1⁺ 多倍体 (\geq pentasomy 8)、三倍体 CTEC 分别具有对 O 药内源性和继发性耐药特征^[20]，此点与已报道的肿瘤组织中的 TEC 抑制机体免疫功能 (包括淋巴细胞功能) 相一致^[10,11]，但该研究对细胞的精确锁定已精准到单细胞的染色体及蛋白表达层面^[20]。经过失巢凋亡、血流剪应力、血中免疫细胞攻击等多重选择性淘汰后，适者生存的 CTC 表面肿瘤标志物 (如 HER2) 表达可以与原发灶完全不同^[21]。北京大学肿瘤中心沈琳主任团队在全球首次报道了应用 SE-i•FISH 可在高达 76% 的 102 例胃癌组织 HER2⁻ 患者中动态检测出 HER2⁺ CTC，并成功据此指导抗 HER2 靶向治疗^[22]。此外，通过 SE-i•FISH 检测不同亚类 CTC、CTEC，首都医科大学附属北京胸科医院张同梅主任团队报道了在排除 CEC 干扰的前提下，可有效预测并实时监测抗血管生成药物贝伐单抗对 NSCLC 的疗效^[5]；解放军 301 总医院肝胆中心/清华大学长庚医院董家鸿院士团队、

北京协和医院外科戴梦华主任团队分别锁定了肝癌、胰腺癌患者手术后升高并与复发密切相关的干细胞性 CTC 及 CD44v6⁺ 干性 CTEC 亚类细胞类型^[6,23]。上海复旦肿瘤医院王红霞主任团队利用此技术揭示了在乳腺癌肺转移过程中起决定性作用的 CTC 亚类细胞及其作用原理^[24]。

展望：CTC、CTEC 2.0 的临床应用及 i-FISH 精准靶向单细胞多组学研究

一、临床应用展望

目前 CTC 1.0 的临床应用主要集中在疗效评估、耐药监测及确诊由肿瘤转移介导的远端复发，CTC 数量在这些应用场景中一般较高。

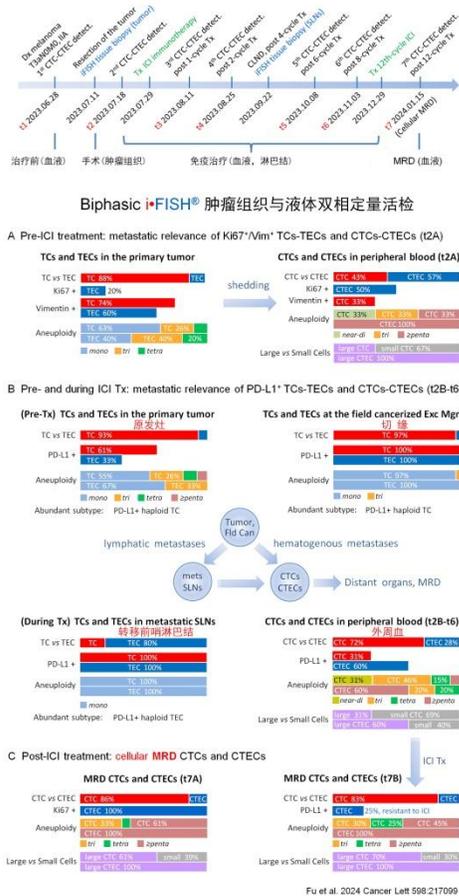


Haber 团队在图中展示了随着 CTC 检测灵敏度、特异性的不断提升，相对于假阳性率较高且无法定位组织来源的 ctDNA 检测^[3]，今后微量 CTC、CTEC 2.0 检测的临床应用将在 1.0 的基础上进一步扩展到两个方面，1) 在患者毫无症状、影像学尚未发现原发灶形

成的肿瘤超早期阶段，进行细胞层面的肿瘤早诊与早筛。中国医学科学院肿瘤医院、国家癌症中心赫捷院士、院长团队已率先报道了利用 SE-i-FISH 联合检测 CTC、CTEC 在区分良、恶性肺小结节及肺癌早诊过程中具有重要临床意义^[25]；2) 检测手术后肿瘤灶周边 (切缘) 残留的 MRD 肿瘤细胞 TC、TEC 及术后外周血中的 MRD CTC、CTEC，并根据这些术后组织、血中残留的 MRD 细胞指导术后辅助治疗 (adjuvant therapy)、评估疗效及预后。其中，病理组织中具有播散能力的肿瘤细胞在图中被反复描述，提示如何有效检测这类残留于组织中 (如手术切缘部位) 的恶性细胞具有重要的临床价值^[3]。这些藏匿于被病理学诊断为正常组织中的、具有正常细胞形态的恶性细胞被定义为“癌变细胞” (cancerized cells)，它们与具有异常细胞形态的“癌细胞” (cancer cell) 不同，常规病理学检查无法识别这类癌变细胞^[26]。美国安德森 (MD Anderson) 癌症分子病理诊断中心报道了染色体异倍体和基因突变是组织中“癌变细胞”的主要分子特征^[27]。

Haber 团队对于 CTC 今后应用前景的展望与广州南方医科大学皮肤病医院何仁亮主任团队与赛特生物去年就已首次联合报道的研究方向及成果相一致^[28]。在这项基于“i-FISH 肿瘤组织与液体双相定量活检”的临床实验研究中，研究人员针对恶性黑色素瘤患者沿着“诊断-手术-动态评估免疫治疗疗效-检测细胞型 MRD”时间轴线，利用赛

特 6-通道 Ki67/Vimentin、PD-L1/p16、PD-L1/Ki67、PD-L1/NC- β -FISH 对肿瘤原发灶、切缘、前哨淋巴结中的 TC、TEC、术后免疫治疗过程中不同阶段的 CTC、CTEC，以及 12 程治疗结束后的 MRD CTC、CTEC 分别进行了系统性检测与动态监测^[28]。



除定量检测各亚类细胞数目外，该研究首次可视化、全方位展示了位于不同部位的各种 TC、TEC、CTC、CTEC 亚类细胞的组成比例、8 号染色体 (Chr8) 的倍体分布、不同瘤标表达率以及大、小细胞比例等。值得密切关注的是，此项研究首次发现了根据病

理学细胞形态检查定义的“2 cm 常规安全性切缘”实际富含显著数量的异倍体“癌变细胞”TC (CD31⁺) 及 TEC (CD31⁺)，它们构成了病理学检查无法判断的“癌变切缘”(CEM, cancerized excision margin)^[26-28]。首次报道的“癌变切缘”^[28]也在其它多瘤种、多中心临床实验中得到了证实。此项研究还发现，与原发灶和外周血中各类细胞展示的高异质性不同，该黑色素瘤患者“癌变切缘”残留的 MRD 细胞以 TC 为主 (97%)，而转移淋巴结中则以 TEC 为主 (80%)，但这些处于两个完全不同部位的几乎所有 TC、TEC 均为 8 号染色体缺失 (单体) 且 PD-L1⁺ 表达。这些深度分析对揭示“癌变切缘”与术后升高的 MRD CTC、CTEC 之间的相关性、如何根据量化的细胞型 MRD TC、TEC、CTC、CTEC 的不同数量有效指导肿瘤术后辅助治疗，以及解析各类细胞在肿瘤转移、进展、复发过程中如何相互作用，从不同视野提供了多层面的新颖独特且可靠的技术手段与依据。

此外，Haber 团队没有提及的利用 CTC、CTEC 评估术前新辅助化疗 (neoadjuvant therapy) 疗效也是今后值得密切关注的一个方向，江苏省人民医院乳腺癌中心已报道了他们在此领域利用 SE-iFISH 技术取得的开创性先期成果^[29]。

二、CTC、CTEC 精准靶向单细胞多模态研究

目前几乎所有单细胞测序在样本制备时，研究人员对每一个受检单细胞的详细生物学性状及其临床意义，包括染色体倍体数目、瘤标表达、CD31 表达、细胞形态、对药物敏感或耐受的凋亡状态等并不充分了解，只是不加区分地单纯分离个体细胞进行高通量测序，这类混合检测的方式也被称之为“盲测”，这当中的局限性已引起人们的高度重视^[10]。如果能在排除非目的细胞干扰的前提下，有针对性地对具有明确生物学及临床意义的各个目的细胞特异性开展精准单细胞分析，势必会为人们提供更加准确、完整的生物信息。



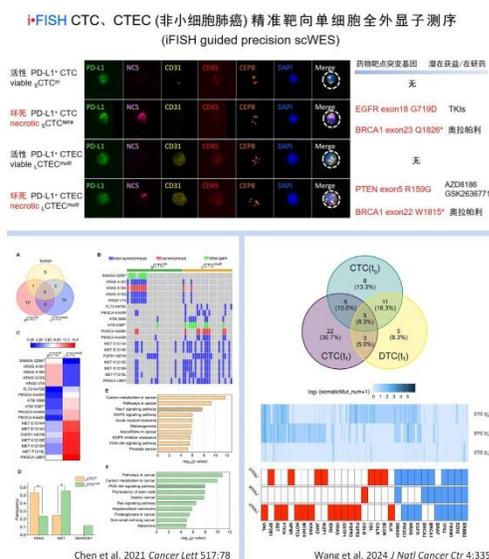
大量临床实验已证实，iFISH 可在不同来源的肿瘤组织或血液样本中有效检测并锁定具有不同临床意义的 TC、TEC、CTC、CTEC 各亚类细胞。利用赛特生物联合开发的“iFISH® 固/液双相单细胞非激光显微分离系统” (n-MSM, non-laser microscopic single cell manipulator)，读取与之匹配的“iFISH® CTC 6-通道 3D 图像扫描与分析系统”记录的靶细胞定位坐标，根据研究目的，

逐一特异性挑取待检靶细胞，可以避开并杜绝不相关细胞对后续检测与分析的干扰。相对于较常用的、只适于固态工作环境的激光捕获显微切割技术 (LCM)，n-MSM 展示了明显的技术优势：1) 可在固态和液态两种环境下挑取**完整**靶细胞供后续各种分析 (包括转录组分析)；2) 操作过程中不存在因激光高温、标本干燥引起的 mRNA 降解或蛋白变性；3) 避免了取样过程中丢失因激光切割而产生的细胞碎片，从而确保了每个待检细胞所有生物信息的完整性。

1. iFISH 靶向单细胞全外显子测序 (targeted scWES) – 药敏坏死细胞 vs 耐药活性细胞

如期进行的实验显示，利用 SE-iFISH(NC) 可精确识别、区分检测同一 NSCLC 患者体内对治疗敏感的坏死 PD-L1⁺ 四倍体小细胞 CTC (necrotic CD31⁻ sCTC^{tetra})、坏死 PD-L1⁺ 多倍体大细胞 CTEC (necrotic CD31⁺ LCTEC^{multi}) 及对治疗耐药的活性 PD-L1⁺ 三倍体小细胞 CTC (viable CD31⁻ sCTC^{tri}) 及活性 PD-L1⁺ 多倍体大细胞 CTEC (viable CD31⁺ LCTEC^{multi})。针对 n-MSM 挑取的各个单细胞分别开展单细胞全基因组扩增 (scWGA) 及全外显子测序 (scWES) 显示，与治疗药物相关的 EGFR、BRCA1、PTEN 基因突变只在治疗药物敏感的坏死 CTC 及 CTEC 中检测到，而耐药

的活细胞中没有检测出与治疗药物相关的基因突变。

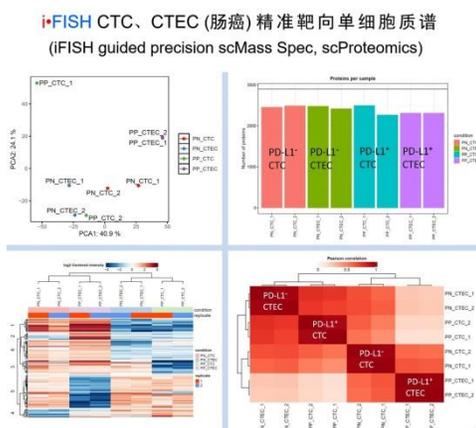
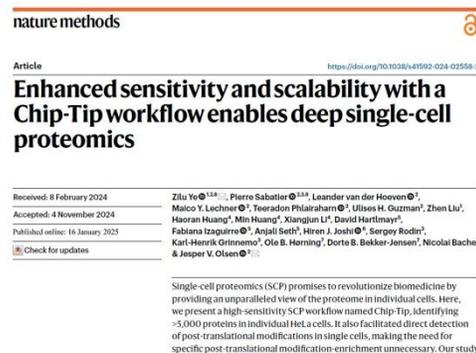


此检测及挑取技术在其它瘤种的研究中帮助人们揭示了治疗后的非小细胞肺癌 (SCLC) 患者在肿瘤进展时, 其骨髓内的 DTC 仅与治疗前的外周血 CTC 共享更多的同源性体细胞基因突变^[14]; 阐明了大、小不同的胃癌 CTC 具有不同的耐药机制, 其中 MET/PI3K/AKT 通路和 SMARCB1 介导的染色质重塑、K-Ras/Rap1 信号传导通路, 分别在大、小 CTC 耐药过程中发挥着重要作用^[30]。

2. 基于 iFISH 靶向单细胞质谱的 CTC、CTEC 精准单细胞蛋白质组学 (targeted scProteomics, tSCP)

相对于遗传信息源头 DNA (基因组学) 及中间桥梁 mRNA (转录组学), 蛋白质才是最终直接实现一系列生物学功能的关键物质,

能实时反应机体或细胞的病理或生理状态。受转录与翻译两个主要环节的复杂调控, 某些“细胞中心法则”的生物链可发生断裂, 致使 DNA、mRNA、蛋白质之间并不存在必然的前后因果关系, 即 DNA ≠ mRNA ≠ 蛋白质, 因此单纯的基因组、转录组检测并不能如实反应蛋白质层面的变化, 而蛋白质组学能在高度动态变化的整体蛋白质层面, 从功能执行、机制研究、临床应用等方面为人们探索肿瘤奥秘、寻找肿瘤新抗原、开发新的蛋白靶点药物等方面提供更加直接与客观的帮助。



近期报道的最新单细胞质谱技术使得开展单细胞深度蛋白质组学研究成为可能^[31]。

赛特生物、艾信博生物医学和中国医学科学院暨北京协和医学院系统医学研究所密切合作，将此最新单细胞质谱技术与 iFISH 靶向单细胞检测及挑取技术相结合，针对同一肠癌患者体内检测出的四类细胞，包括 PD-L1⁻ CTC (组 1)、PD-L1⁻ CTEC (组 2)、PD-L1⁺ CTC (组 3) 及 PD-L1⁺ CTEC (组 4)，按平均每组 2 个细胞，逐个挑取目的单细胞，成功进行了精准靶向单细胞质谱检测 (targeted scMass Spec)。如图所示，蛋白质组学分析显示，每个细胞可以检测出 2500 个左右的蛋白，不同组间的细胞其蛋白表达有很大的异质性，但同一组内的细胞却显示蛋白表达具有很高的 consistency，这些动态检测出的、伴随肿瘤进展的不同 CTC、CTEC 亚类细胞展现了独特且鲜明的“组间高差异、组内高一致”生物学特征，能够清晰地被可视化、特异性、明确聚类。基于单细胞质谱的“iFISH 精准靶向单细胞蛋白质组学”得到了可行性验证，为今后开展大样本实验奠定了基础。

随着各种检测技术不断推陈出新，在锁定并挑取具有明确生物学及临床意义的靶向单细胞前提下，针对 CTC、CTEC 精准开展以揭示执行功能的蛋白质组学研究 (proteomics) 为基础，联合可提供遗传背景的 DNA 基因组

(genomics)、显示基因表达趋势的 mRNA 转录组 (transcriptomics)、展示最终产物与表型的代谢组 (metabolomics)，以及涵盖细胞表观遗传修饰的表观组 (epigenomics，如 DNA 甲基化、组蛋白修饰等)，将能够帮助人们更加全面地深度解析肿瘤的发生、进展、转移、耐药等机理，从而更加有效地助力肿瘤的预防与治疗。

文献

1. Hida et al. *Cancer Res* 64:8249
2. Lin et al. 2017 *Sci Rep* 7:9789
3. Dai et al. 2025 *Cancer Cell* 43:1399
4. Went et al. 2004 *Hum Pathol* 35:122
5. Zhang et al. 2021 *Mol Oncol* 15:2891
6. Wang et al. 2018 *Cancer Lett* 412:99
7. Pecot et al. 2011 *Cancer Discov* 1:580
8. Luoh et al. 2013 *SpringerPlus* 2:386
9. Lin 2015 *Clin Transl Med* 4:38
10. Zeng et al. 2023 *Nat Rev Cancer* 23:544
11. Goveia et al. 2020 *Cancer Cell* 37:21
12. Lin 2020 *Cells* 9:1539
13. Lin et al. 2021 *Cancers* 13:5108
14. Li et al. 2024 *Gastric Cancer* 27:519
15. Wang et al. 2024 *J Natl Cancer Ctr* 4:335
16. Wang et al. 2018 *Oncotarget* 9:2705
17. Kronenwett et al. 2004 *Cancer Res* 6:904
18. Duesberg et al. 1998 *PNAS* 95:13692
19. Li et al. 2014 *Oncotarget* 5:6594
20. Zhang et al. 2020 *Cancer Lett* 469:355
21. Wurth et al. 2025 *Nat Cancer* 6:67
22. Li et al. 2018 *Clin Cancer Res* 24:5261
23. Xing et al. 2021 *Cancer Manag Res* 13:4417
24. Liu et al. 2019 *Sci Adv* 5:eaav4275
25. Lei et al., 2020 *Clin Transl Med* 10:e128
26. Curtius et al. 2018 *Nat Rev Cancer* 18:19
27. Kadara et al. 2012 *Proc Am Thorac Soc* 9:38
28. Fu et al. 2024 *Cancer Lett* 598:217099
29. Ma et al. 2020 *Ther Adv Med Oncol* 12:1
30. Chen et al. 2021 *Cancer Lett* 517:78
31. Ye et al. 2025 *Nat Methods* 22:499