

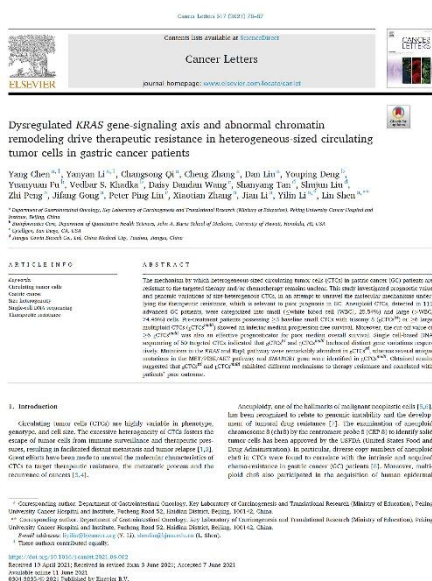
i•FISH 单细胞测序揭密大、小 CTC 的不同耐药机制

肿瘤细胞耐药是阻碍有效治疗肿瘤的主要原因之一，实时监测耐药及揭示相关耐药机理对提高肿瘤治疗疗效具有非常重要的作用。最近，北京大学肿瘤中心消化肿瘤内科沈琳主任团队、美国夏威夷大学医学院、江苏健为医学及赛特生物密切合作，应用赛特 **SE-iFISH** 技术针对 111 例晚期胃癌患者体内的大、小 CTC 在肿瘤耐药和预后评估等方面进行了深入研究，并通过靶向单细胞测序揭示了这些不同类别 CTC 的耐药机理，为进一步更好地开展肿瘤精准治疗提供了有意义的依据。相关重要成果刚刚在国际著名期刊 *Cancer Letters* 上得到发表 (Chen et al., 2021 *Cancer Lett* 517:78, 影响因子 IF=7.360)。这是继已报道的 **SE-iFISH** 检测出早期肺癌患者术前小细胞 CTC^[1] 和晚期肺癌患者化疗前小细胞 CTC^[2] 均与不良预后密切相关，以及 **iFISH** CTC 单细胞测序揭示了乳腺癌肺转移过程中 EpCAM⁺ CTC 起决定作用之后^[3]，再次证明应用 **iFISH** 检测各种具有不同临床意义的 CTC 亚类细胞及对这些亚类细胞进行单细胞测序的有效性与必要性。

文章重点

- **SE-i•FISH** 检测 111 例入组的晚期胃癌患者 CTC 显示， 3 倍体小细胞 (${}_5\text{CTCs}^{tri}$) 及多倍体大细胞 (${}_L\text{CTCs}^{multi}$) 构成了 CTC 的主要组成成分
- 治疗前基线小细胞 CTC 与胃癌肝转移密切相关
- 治疗前患者含有 ≥ 3 个 ${}_5\text{CTCs}^{tri}$ 或 ≥ 6 个 ${}_L\text{CTCs}^{multi}$ ，预后较差，中位无进展生存期 (mPFS) 较短
- 治疗前患者含有 ≥ 6 个 ${}_L\text{CTCs}^{multi}$ ，中位总生存期 (mOS) 明显较短
- 单细胞测序及相关分析显示， ${}_L\text{CTCs}^{multi}$ 中的 MET/ PI3K/AKT 通路和 *SMARCB1* 介导的染色质重塑 (chromatin remodeling)，及 ${}_5\text{CTCs}^{tri}$ 中的 K-Ras、Rap1 信号传导通路，分别在大、小 CTC 耐药过程中发挥重要作用

人体内肿瘤细胞大小、形态各异。小细胞 CTC ($\leq$ 白细胞) 作为间质化肿瘤细胞的代表性特征, 在肿瘤转移与不良预后过程中的重要作用近年来已受到人们日益密切的关注。本文作者对晚期胃癌患者接受紫杉醇或铂类化疗前后的不同大、小的 CTC 细胞进行了有效检测, 通过群体数据分析锁定了与耐药及不良预后相关的 CTC 亚类细胞, 再利用赛特“固/液双相单细胞显微分离系统”(non-laser microscopic single-cell manipulator, n-MSM) 特异性挑选具有特殊临床意义的 CTC 单细胞, 并进行后续改良的单细胞全基因扩增及 NGS 测序(健为医学)。



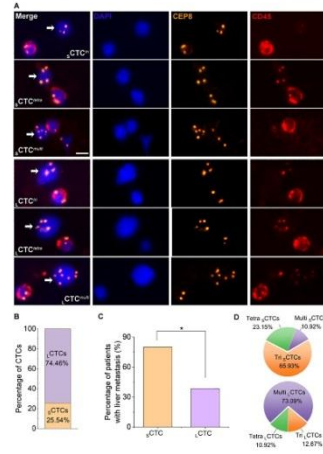
i-FISH® CTC 临床意义及指导靶向单细胞特异性NGS测序

SE-i-FISH® 有效检测各种CTC细胞

群体数据分析：锁定具有不同临床意义（如预后、耐药）的CTC亚类靶细胞

特异性挑取靶向单细胞：使用赛特NMSCM固/液双相单细胞分离系统挑取锁定的靶细胞

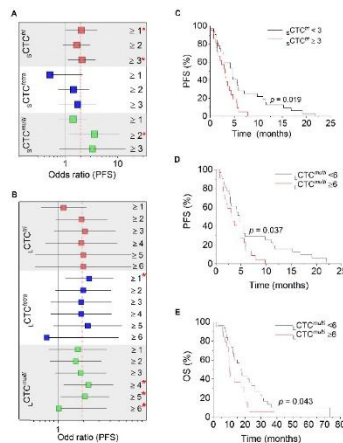
靶向单细胞全基因组扩增及NGS测序：溯源CTC及检测CTC内各种基因突变



本研究检测出的胃癌 CTC 中，多倍体大细胞 ($4CTCs^{multi}$) 及三倍体小细胞 ($3CTCs^{tri}$) 为主要组成部分，其中小细胞 CTC 与胃癌的肝转移密切相关！这与我们已报道的 Vimentin⁺ 的间质化小细胞 CTC 与肺癌肝转移密切相关一致^[2]。

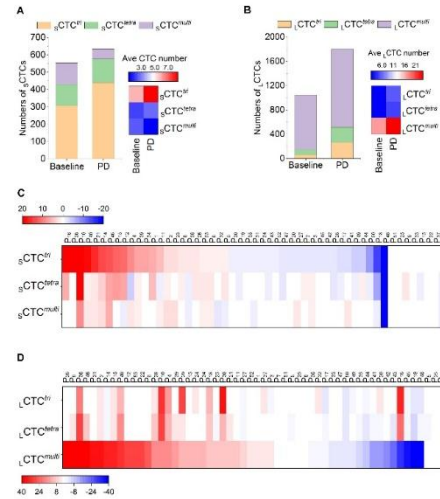
胃癌三倍体小细胞、多倍体大细胞 CTC 的预后价值

三倍体小细胞 ($3CTCs^{tri}$) 及多倍体大细胞 ($4CTCs^{multi}$) 的多重 cut-off 分析显示，治疗后的患者含有 ≥ 3 个 $3CTCs^{tri}$ ，或 ≥ 6 个 $4CTCs^{multi}$ ，其 mPFS 明显较短，预后较差。治疗后含有 ≥ 6 个 $4CTCs^{multi}$ 的患者，预后较差，总生存率也明显降低。因此，3 个 $3CTCs^{tri}$ 及 6 个 $4CTCs^{multi}$ 为胃癌预后判断的 cut-off 值。



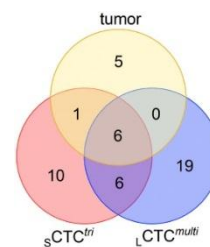
胃癌三倍体小细胞、及多倍体大细胞 CTC 与耐药密切相关

作者对预后较差、产生耐药的 PD 患者体内各种 CTC 亚类细胞进行了全面综合分析，群体结果显示，三倍体小细胞 ($3CTCs^{tri}$) 及多倍体大细胞 CTC ($4CTCs^{multi}$) 显著升高。进一步的个体肿瘤进展热图也证实了此一发现。



NGS 单细胞测序溯源 CTC

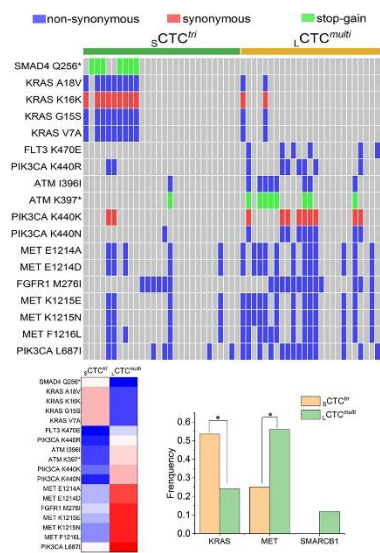
为了证明这些与耐药相关的大、小不同的 CTC 的确来自于原发灶肿瘤，作者在不同患者体内采集原发灶肿瘤、三倍体小细胞及多倍体大细胞 CTC，进行 CTC 单细胞及肿瘤组织的 targeted bulk 测序（健为医学）。通过 Venn diagram 对比这三者的基因突变发现，三者共同拥有 6 个相同的点突变基因，从而证明检测出的大、小 CTC 与原发灶肿瘤同源。CTC 携带与原发灶肿瘤不同的其它基因突变是因为肿瘤细胞入血形成 CTC 后，经过不断演变，形成了具有各自特点的基因变异及不同形态。



NGS 测序也曾成功证明，使用赛特 SE 方法在脑脊液中富集到的乳腺癌脑转移肿瘤细胞与原发灶乳腺癌同源，并对测序检测出具有特异突变靶点的乳腺癌细胞进行体外筛药^[4]。

NGS 单细胞测序揭示胃癌三倍体小细胞和多倍体大细胞 CTC 具有各自不同的基因突变特征

作者接下来对来自 6 个治疗前患者的 28 个小细胞 $sCTCs^{tri}$ 及 25 个大细胞 $lCTCs^{multi}$ ，使用适于 iFISH CTC 的改良型 MDA 全基因组扩增方法，逐一进行了 CTC 单细胞全基因组扩增及 NGS 测序（健为医学），以检测这些 CTC 上的所有点突变、插入或缺失突变 (Indels)。

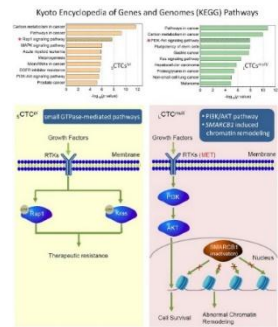


如图显示，大、小不同的两类 CTC 共检测出 18 个基因突变，包括 14 个非同义 (non-synonymous) 突变、2 个同义 (synonymous) 突变及 2 个 stop-gain 突变。这些突变有些是 $sCTCs^{tri}$ 独有，有些是 $lCTCs^{multi}$ 特有，也有一些是两类共有，但突变数量在两类细胞上具有显著性差异。其中，KRAS 的 V7A、G15S 及 A18V 三种突变常见于小细胞 $sCTCs^{tri}$ ，MET 基因的多个突变多见于大细胞 $lCTCs^{multi}$ 。此外，

在大细胞 CTC 中还检测到了特异的 SMARCB1 突变，该基因与染色质重塑及调控产生 mRNA 的翻译过程密切相关。

大、小 CTC 细胞中与耐药相关的不同信号传导通路

KEGG 分析显示，小细胞 $sCTCs^{tri}$ 及大细胞 $lCTCs^{multi}$ 内检测出的基因突变分别涉及了 10 余种信号传导通路 (SMP) 及细胞功能。其中，小细胞 CTC 内，small GTPase Rap1 发生了高频突变，而 Rap1 与另一个著名的 small GTPase KRAS 高度相似，两者与肿瘤细胞耐药密切相关^[5]。大细胞 CTC 中，多种基因突变主要集中于 PI3K-AKT 通路。



与预后密切相关的胃癌小细胞 $sCTCs^{tri}$ 及大细胞 $lCTCs^{multi}$ 具有各自不同的耐药机理。三倍体小细胞 CTC 内，Rap1 和 K-Ras small GTPase 通过调节 G-protein、G 蛋白受体 (GPCR) 形成肿瘤细胞的耐药，而多倍体大细胞 CTC 主要通过 PI3K/AKT 通路、SMARCB1 介导的染色质重塑以及对形成 mRNA 的“翻译”过程进行调控，从而使肿瘤细胞产生耐药。

讨论

本文对血液中的非血源性循环异倍体细胞 (circulating aneuploid cell, CD45⁻ CAC) 进行了深入研究，并取得了一系列有意义的成果。此外，本文作者已报道了胃癌三倍体 CAC 具有对顺铂内源性耐药的特性^[6]。最近，北京

大学肿瘤中心胸外科、胸内科、北京胸科医院与赛特生物合作，联合报道了早期肺癌患者手术前和晚期肺癌患者化疗前的基线三倍体小细胞 CAC、间质型三倍体小细胞 CTC (Vim⁺ sCTC^{tr}) 与肿瘤侵袭、进展、肝转移、不良预后及术后复发高度相关^[1, 2, 7]。

CAC 主要由 CD31⁻ CTC 和 CD31⁺ CTEC (循环肿瘤血管内皮细胞) 组成，CTC 可在低氧条件下通过转分化形成 CTEC^[8-10]。CTC 及 CTEC 在肺癌^[11, 12]、乳腺癌^[13]、胰腺癌^[14]等肿瘤中的不同重要作用已被不断报道。随着 SE-iFISH 技术的普及，有效区分及全方位联合检测 CTC 与 CTEC，以同步深入研究 CTC、CTEC 各亚类细胞的不同临床意义已成为迄今有关 CTC 研究的主要发展方向之一。

结论

iFISH 可在细胞三要素（染色体倍体、多重肿瘤蛋白标志物表达、细胞形态）的基础上对 CTC、CTEC 进行原位、综合检测。本研究证实了在 iFISH CTC 上应用改良的 MDA 全基因组扩增开展单细胞测序的可行性与必要性（健为医学）。不同形态的 CTC 和 CTEC，其肿瘤细胞生物学特点各不相同，分别具有非常重要的临床意义。对包括各种异质性极高的 CTC、CTEC 亚类细胞进行全方位检测，才能为更好地开展肿瘤个体化精准治疗提供更加全面、客观的可靠依据。随着 iFISH CTC/CTEC 单细胞测序技术的成熟与临床应用，将为人们进一步分子解析同一瘤种中不同肿瘤细胞的各种不同性状及相关临床意义、以及深入理解肿瘤细胞在不同治疗过程中 (如化疗、放疗、靶向、抑制血管生成、免疫治疗等) 如何形成耐药的各机理提供极大帮助。

相关文献

1. 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.
2. 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.
3. Liu et al. (2019) Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Sci Adv* 5:eaav4275.
4. Li et al. (2018) Clinical significance of detecting CSF-derived tumor cells in breast cancer patients with leptomeningeal metastasis. *Oncotarget* 9:2705.
5. Shah et al. (2019) Ras and Rap1: A tale of two GTPases. *Semin Cancer Biol* 54:29.
6. Li et al. (2014) Clinical significance of phenotyping and karyotyping of circulating tumor cells in patients with advanced gastric cancer. *Oncotarget* 5:6594.
7. Satelli et al. (2011) Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* : CMLS 68:3033.
8. Lin (2018) Aneuploid CTC and CEC. *Diagnostics (Basel)* 8:26.
9. Lin (2020) Aneuploid Circulating Tumor-Derived Endothelial Cell (CTEC): A Novel Versatile Player in Tumor Neovascularization and Cancer Metastasis. *Cells* 9:1539.
10. Lin et al. (2017) Comprehensive in situ co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells. *Sci Rep* 7:9789.
11. Lei et al. (2020) Combined detection of aneuploid circulating tumor-derived endothelial cells and circulating tumor cells may improve diagnosis of early

- stage non-small-cell lung cancer. Clin Transl Med :e128.
12. 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.
 13. 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 12:1-14.
 14. Xing et al. (2021) CD44+ Circulating Tumor Endothelial Cells Indicate Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma After Radical Surgery: A Pilot Study. Cancer Manag Res 13:4417.