

多中心临床研究：动态检测 CD44v6+ 干性 CTC/CTC 助力小细胞肺癌精准治疗

小细胞肺癌 (SCLC) 易发生肿瘤早期转移及产生耐药，是致死率最高的肺癌类别，其 5 年生存率低于 7%。SCLC 的初期治疗主要是根据影像学将患者简单分为局限期 (LD) 和广泛期 (ED) 两大类，然而该分期体系不能有效反映分期相同 (尤其是 LD) 的不同患者中与疗效 (如耐药、微转移等) 密切相关的肿瘤异质性及微转移负荷，从而制约了 SCLC 的有效治疗。为进一步提高 SCLC 治疗疗效，最近，首都医科大学附属北京胸科医院张同梅主任团队联合中国医学科学院暨北京协和医学院肿瘤医院、国家癌症中心、国家肿瘤临床医学研究中心、首医北京潞河医院、德国慕尼黑大学医学中心及赛特生物应用赛特 **SE-iFISH** 技术，针对 SCLC 干细胞性 CTC-CTC 开展了系统性体外基础研究与大样本、多中心的临床实验，沿着转移-生存轴线揭示了异倍体循环肿瘤血管内皮细胞 (CD31⁺ CTC) 及循环肿瘤细胞 (CD31⁻ CTC) 在 SCLC 远端转移、患者临床分层、及有效预后中的特殊临床意义。该项有关小细胞肺癌转化医学研究的重要成果刚刚在国际著名肿瘤专业杂志上发表 (Wang et al., 2023 *Cancer Lett* 571:216337) (IF=9.7)。

本文要点

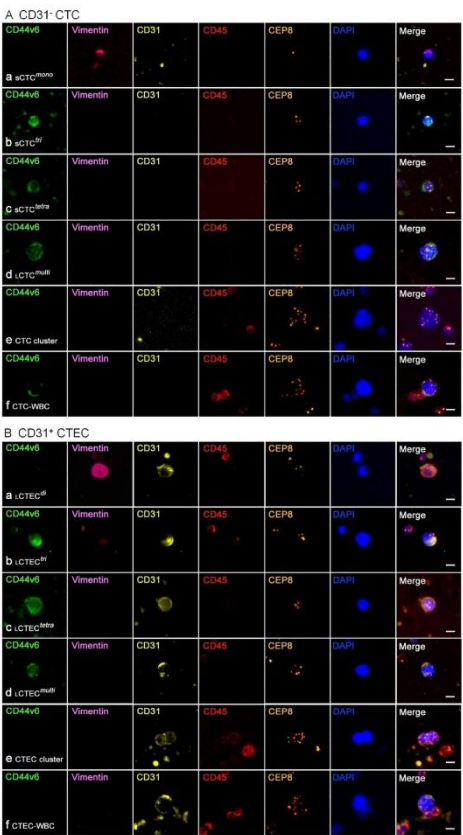
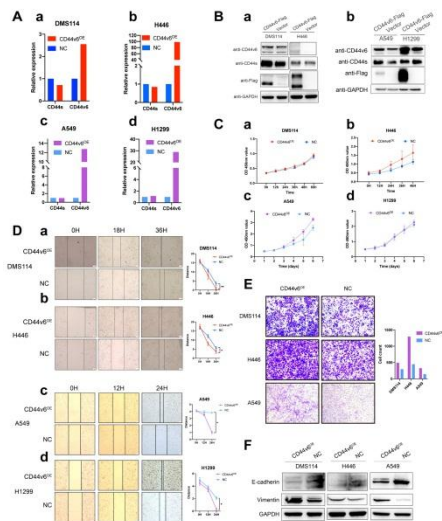
- 通过慢病毒 (lentivirus) 体外感染使 SCLC 及非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞过量表达干细胞标志物 CD44v6，可促进与肿瘤转移相关的 EMT 及细胞侵袭与迁移功能
- 本前瞻性临床实验检测 124 例 SCLC 患者 (有效入组 120 例：55 LD, 65 ED)，在放-化疗(顺铂) 治疗过程中动态监测了异倍体 CD31⁺ CTCs、CD31⁻ CTCs 及它们各自的 CD44v6⁺ 干细胞性亚型
- CTCs、CTECs 及它们的干性亚型与 SCLC 远端转移密切相关，这是继北京协和医院利用赛特 **SE-iFISH** 首次揭秘 CD44v6⁺ 干性 CTCs 与胰腺癌术后快速复发显著关联后^[1]，其重要临床意义再次得到证明
- 治疗前基线 CTC 数量联合其治疗过程中的变化趋势可有效预测患者预后
- 多倍体干性 CTCs (CD44v6⁺/CD31⁻) 可作为小细胞肺癌 (尤其是局限期 LD-SCLC) 远端转移及不良预后 (PFS 及 OS) 的重要独立风险因素
- 根据 CD44v6⁺ 干性 CTCs、CTECs 对 SCLC 患者进行新颖分类，有助于开展肿瘤个体化精准治疗

体外功能性实验 - CD44v6 高表达促进肿瘤转移

作者使用慢病毒感染技术 (lentivirus infection) 将 SCLC (DMS114, H446) 及 NSCLC (A549, H1299) 细胞系高表达 CD44v6 (mRNA-cDNA, 如图所示)，使 SCLC 及 NSCLC 细胞增殖 (proliferation) 明显提高。细胞侵袭



(transwell assays) 与划痕 (wound scratch assays) 实验结果显示所有受检细胞的迁移能力均有上升。与此同时, CD44v6 高表达细胞中的上皮标志物 E-cadherin 下降, 而间质化标志物 Vimentin 的表达则升高, 提示 CD44v6 高表达可通过 EMT 促进与肿瘤转移密切相关的细胞侵袭与迁移能力。



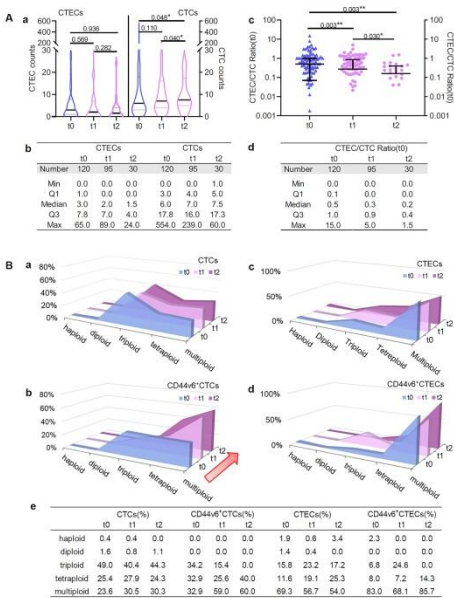
原位联合检测 CD44v6⁺ CTECs 与 CTCs

上述体外实验证实了 CD44v6⁺ 肿瘤干细胞在肿瘤转移中的重要作用。作者在后续开展的临床实验中应用赛特 6-通道 SE-i⁺FISH 技术, 在严格区分 CD31⁺ CTEC 与 CD31⁻ CTC 的基础上, 对前瞻性入组的 120 例 SCLC 患者各种异倍体 CTEC 及 CTC 亚类细胞进行了原位联合检测, 并对这些细胞的倍体、大小、干性标志物 CD44v6 的表达、Vimentin⁺ 间质化状态、细胞团癌栓、与 WBC 形成细胞团等多重性状进行了深入分析。

在上述分析的基础上, 作者分别对检测出的 SCLC 各亚类细胞与肿瘤转移及生存的关联性临床意义做了详尽的系统分析。

细胞定量与倍体动态变化分析

细胞量化分析显示, 伴随治疗的 CTEC 与 CTC 总数变化趋势并不一致, CD31⁺ CTEC 呈现下降, 而 CD31⁻ CTC 则为上升。



针对实体瘤的重要特征 - 8 号染色体异倍体的分析表明，CTCs、CTECs、干性 CTCs 中的单倍体、近二倍体、三倍体、四倍体及多倍体在细胞中的比例基本不随治疗开始而发生改变，然而唯独干性 CTCs 中的多倍体细胞比例伴随着疗程增加而显著升高 (红色箭头)，提示多倍体干性 CTCs (CD44v6⁺/CD31⁻) 可能构成了伴随 SCLC 进展而产生肿瘤耐药与转移的重要因素。染色体倍体增加与肿瘤细胞恶性度增高密切相关已被报道^[2]。

动态检测治疗前、后 CD31⁻ CTC 总数变化与患者生存期密切相关

根据基线细胞数目高低及治疗开始后 CTC 持续升高或降低，局限期(LD)及广泛期(ED)的 SCLC 患者分别被分为 1) 低基线-降低组 (LB-DESC, 基线 CTC 数量 0-17)、2) 低基线-升高组 (LB-ASC)、3) 高基线-降低组 (HB-DESC, 基线 ≥ 18)、4) 高基线-升高组 (HB-ASC, 仅 1 例患者) (图 A)。

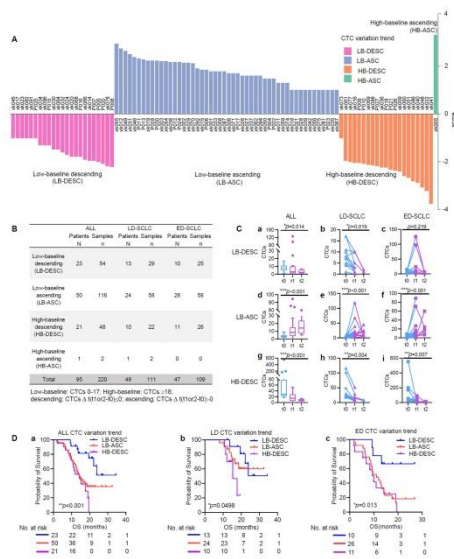


图 C 显示了不同组别患者治疗开始后的 CTC 动态变化。其中，低基线-降低组 (LB-DESC) 的部分 ED 患者 (图 C-c)、低基线-升高组

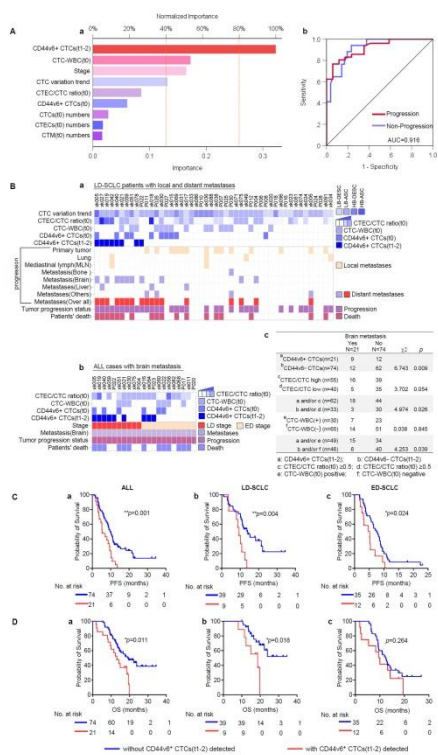
(LB-ASC) 的部分 LD 及 ED 患者 (C-e,f)，CTC 数目对治疗呈现二相反应 (biphasic response)，即先升高后降低 (Cc)，从而证实了对接受治疗的患者进行多点动态监测 CTC 的必要性。此二相反应现象亦广泛见于接受新辅助化疗的乳腺癌 CTECs^[3]。生存分析显示 (图 D)，低基线-降低组 (LB-DESC) 患者，无论 LD 或 ED，中位生存期明显优于低基线-升高组和高基线-降低组的患者。

干性 CD44v6⁺ CTC、CTEC 与小细胞肺癌远端转移及较差预后 (PFS、OS) 密切相关

作者首先分析了所有患者 (LD+ED) 治疗前基线干性 CD44v6⁺ CTC、CTEC 含量与 SCLC 远端多器官转移 (骨、脑、肝脏) 的相关性，发现高频肝转移与基线 CD44v6⁺ CTC 及 CTEC 数量密切关联。

脑转移是 SCLC 诊断及治疗过程中比较常见的现象，作者对脑转移及其它远端器官转移患者的 CTEC、CTC 相关因素做了进一步分析：

- 局限期 LD 患者：治疗前基线 CTEC/CTC 比值 ≥ 0.5 与脑转移相关；治疗过程中 CD44v6⁺ 干性 CTCs 的阳性检出与 SCLC 远端多器官及脑转移转移密切相关
- 局限期+广泛期患者：治疗过程中干性 CD44v6⁺ CTCs 与脑转移密切相关；若将基线 CTC-WBC 细胞团、CTEC/CTC 比值 ≥ 0.5 、尤其是动态变化的干性 CD44v6⁺ CTCs 纳入统筹考量范围进行多变量的神经网络算法 (neural network algorithm) 分析，可更有效地预测 SCLC (尤其是局限期 LD-SCLC) 脑转移及其它器官的远端转移



SCLC 患者治疗全程 (包括治疗前) 呈现干细胞性 CTCs (CD44v6⁺/CD31⁻) 阳性, 或治疗开始后全程可检测出干性 CTCs, 患者的中位无进展生存期 mPFS 及中位总生存期 mOS 均明显短于治疗全程干性 CTCs 阴性患者。对于局限期 LD 患者, 动态监测的干性 CTC 数量与 PFS 及 OS 相关, 而广泛期 ED 患者的干性 CTC 数量只与 PFS 有明确关联。

结论

本临床研究再次证明区分性原位联合检测 CD31⁺ CTECs 及 CD31⁻ CTCs 在肿瘤治疗过程中的必要性。这是继本文作者使用 6-通道 SE-iFISH 阐明 PD-L1⁺ CTECs、上皮型 (EpCAM⁺) 及间质型 (Vimentin⁺) CTECs 在免疫治疗及抗肿瘤血管生成贝伐单抗治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的重要意义后^[4,5], 再一次证实干细胞性 CD44v6⁺ CTECs 及

CTCs 与小细胞肺癌 (SCLC) 耐药、转移、预后的密切相关。CD31⁻ CTCs 及 CD31⁺ CTECs 作为血液中的一对“细胞型循环肿瘤标志物”, 两者相辅相成, 在肿瘤发生、进展、转移、耐药、MRD 等过程中发挥着重要作用。本临床研究首次报道的多倍体干细胞性 CD44v6⁺/CD31⁻ CTCs 可作为 SCLC 脑转移及不良预后的重要独立风险因素, 将有助于开展小细胞肺癌的精准个体化治疗。

文献

- 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
- Kronenwett et al. (2004) Improved grading of breast adenocarcinomas based on genomic instability. *Cancer Res* 64:904
- 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
- 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
- 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