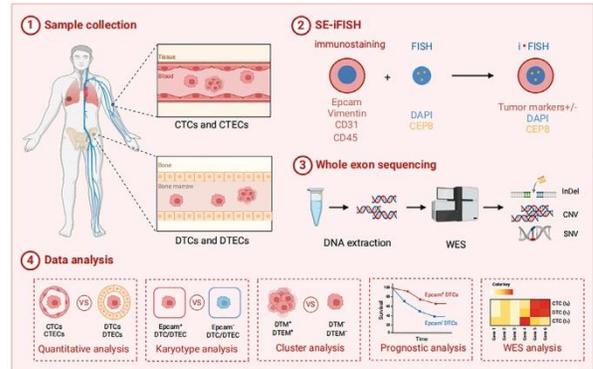


小细胞肺癌骨髓上皮型 EpCAM+ DTC 与 DTEC 的重要临床意义

小细胞肺癌 (SCLC) 因具有肿瘤细胞快速生长、极易发生早期转移与耐药、治疗后短期内复发等特征, 已成为致死率最高的肺癌类别, 其主要分为局限期 (LD) 和广泛期 (ED) 两大类。SE-i-FISH 联合检测 SCLC 外周血中异倍体 CD31⁻ CTC/CD31⁺ CTEC (循环肿瘤血管内皮细胞)^[1] 及干细胞性 CD44v6⁺ CTC/CTEC^[2] 临床意义的研究日前已被报道。鉴于骨髓中的“播散性肿瘤细胞”(CD31⁻ DTC, disseminated tumor cell) 及“播散性肿瘤血管内皮细胞”(CD31⁺ DTEC, disseminated tumor endothelial cell) 在肿瘤转移过程中起着极为关键的作用, NCCN 指南已将骨髓病理活检作为 SCLC 分级的重要指标, 然而常规病理活检并不能有效检测肿瘤细胞上与转移密切相关的蛋白表型, 如 EMT 过程中的上皮型标志物 EpCAM 的蛋白表达。为此, 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肿瘤医院暨国家癌症中心、国家肿瘤临床医学研究中心、首医北京宣武医院、首医多个肿瘤相关研究所与临床医学实验室、陕西中医药大学第一临床医学院及赛特生物, 应用 SE-i-FISH 对 SCLC 患者骨髓中的 EpCAM⁺ DTCs、DTECs 的重要临床意义开展了深入研究, 取得的成果刚刚在线发表【Wang et al. 2024 J Natl Cancer Ctr (JNCC) doi.org/10.1016/j.jncc.2024.07.003】(IF=7.6)。

本研究前瞻性入组 30 例不可手术的 SCLC 患者 (15 例 LD-SCLC, 15 例 ED-SCLC)。所有患者骨髓及血液采样后, 按照 NCCN/CSCO 指南开始接受标准的一线治疗, 2 个疗程后评估其疗效。



本文要点

- 检测结果显示, 骨髓 DTC 数量 (0-1380/3 ml, 中位数 61.5) 显著高于等体积外周血中 CTC 数量 (0-277/3 ml, 中位数 61.5), DTEC 数量 (0-75/3 ml, 中位数 20.5) 同样高于 CTEC 数量 (0-5/3 ml, 中位数 0.5)

ARTICLE INFO

Keywords: Bone marrow; Atypical DTCs and DTECs; SE-iFISH; Prognosis; SCLC.

ABSTRACT

Background: Small cell lung cancer (SCLC) is a highly aggressive disease characterized by early metastasis. Atypical CD31⁻ disseminated tumor cells (DTCs) and CD31⁺ disseminated tumor endothelial cells (DTECs) residing in the bone marrow are generally considered as the initiators of metastatic process. However, the clinical significance of DTCs and DTECs in SCLC remains poorly understood. The aim of this study is to investigate the clinical implication of diverse subtypes of highly heterogeneous DTCs and DTECs in SCLC patients.

Methods: Subtraction enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization (SE-iFISH) was applied to verify and perform comprehensive morphologic, karyotypic, and phenotypic characterization of atypical DTCs and DTECs in 30 patients. Additionally, co-detection of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor endothelial cells (CTECs) was conducted on 24 of the enrolled patients. Proof-of-concept of the whole-exon sequencing (WES) on precisely selected different subtypes of CTCs or DTCs, incidentally detected from a representative case with pathologically confirmed bone marrow metastasis, was validated to feasibly reveal genetic mutations in these cells.

Results: DTCs, DTECs and their subtypes were readily detectable in SCLC patients. Comparative analysis revealed that the number of DTCs and DTECs was significantly higher than that of their corresponding CTCs and CTECs ($P < 0.001$ for both). Positive detection of disseminated tumor microemboli (DTMs) or disseminated tumor endothelial microemboli (DTEMs) was associated with inferior survival outcome ($P = 0.046$ and $P = 0.048$). Patients with EpCAM⁺ DTCs detectable displayed significantly lower disease control rate (DCR) (16.67% vs 73.33%, $P = 0.010$), reduced median progression free survival (mPFS) and median overall survival (mOS) compared with those with EpCAM⁻ DTCs ($P = 0.028$ and $P = 0.002$, respectively). WES analysis indicated that post-treatment DTCs isolated from bone marrow at the time of disease progression shared more homologous somatic gene mutations with pre-treatment CTCs compared with post-treatment CTCs.

Conclusions: Our findings suggest that bone marrow sampling and characterization of DTC subtypes provided a valuable tool for predicting treatment response and the prognosis in SCLC. Moreover, DTECs harbor a greater amount of homologous somatic information from pre-treatment CTCs, indicating their potential role in disease progression and treatment resistance.

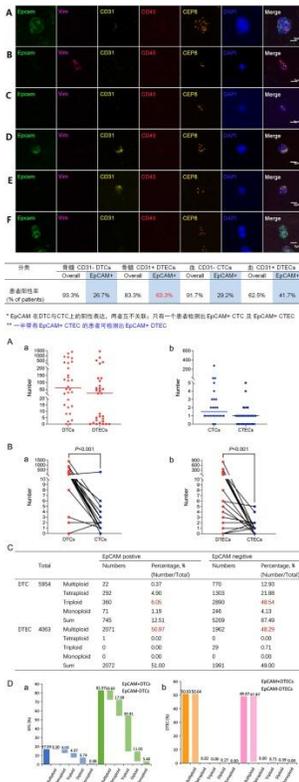
Corresponding authors:
Email address: lvsongm@163.com (L. Hu), tongmei@163.com (T. Zhang).
These authors contributed equally to this work.

Received 26 March 2024; Received in revised form 27 June 2024; Accepted 20 July 2024
Available online xxx
2667-0054/© 2024 Chinese National Cancer Center. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

- 检出 EpCAM⁺ DTC 的患者伴有显著降低的疾病控制率 (DCR, 16.67% vs 73.33%) 及较差预后 (较短的中位无进展生存期 mPFS 及中位总生存期 mOS)
- DTM (DTC 细胞团, microemboli) 及 DTEM (DTEC 细胞团) 的阳性检出与患者较差预后密切相关
- 精准单细胞全外显子测序 (precision scWES) 显示, 患者治疗后发生疾病进展 (PD) 时, 骨髓 DTC 仅与治疗前血中的 CTC 共享更多的体细胞基因突变 (somatic mutations)

量化分析骨髓中 DTC、DTEC 及外周血 CTC、CTEC

依据不同倍体、不同 EpCAM/Vim 蛋白表达及细胞形态 (大小、细胞团) 进行分类的各种 CD31⁻ DTC 与 CD31⁺ DTEC 亚类细胞如图所示。

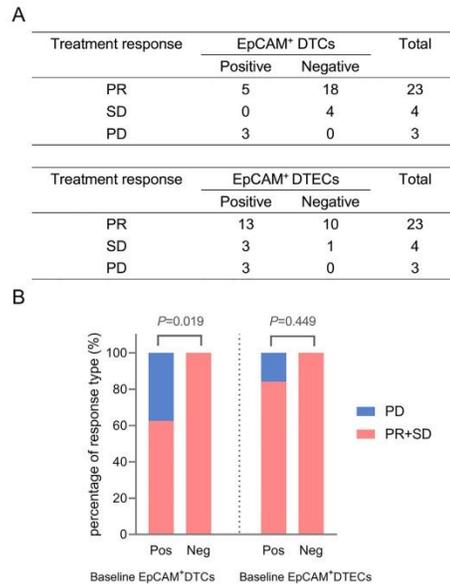


群体分析: 患者各类细胞检出率分别为 CTC (92%, 其中 EpCAM⁺ 患者 29%), DTC (93%, EpCAM⁺ 患者 27%), CTEC (63%, EpCAM⁺ 患者 42%) 及 DTEC (83.3%, EpCAM⁺ 患者 63%)。其中 50% 的 EpCAM⁺ CTEC 患者检测到 EpCAM⁺ DTEC, 而 EpCAM⁺ CTC 与 EpCAM⁺ DTC 两者间无任何相关性, 只有一位患者同时检出这两类细胞。

细胞分析: CTCs vs CTECs 以及 DTCs vs DTECs 的量化对比见上图 (B)。在所有 DTCs 中, EpCAM⁺ DTCs 占比 12.5%, 以三倍体为主。EpCAM⁺ DTECs 在所有 DTECs 中的占比为 51%, 以多倍体为主, 无三体或单体细胞检出。

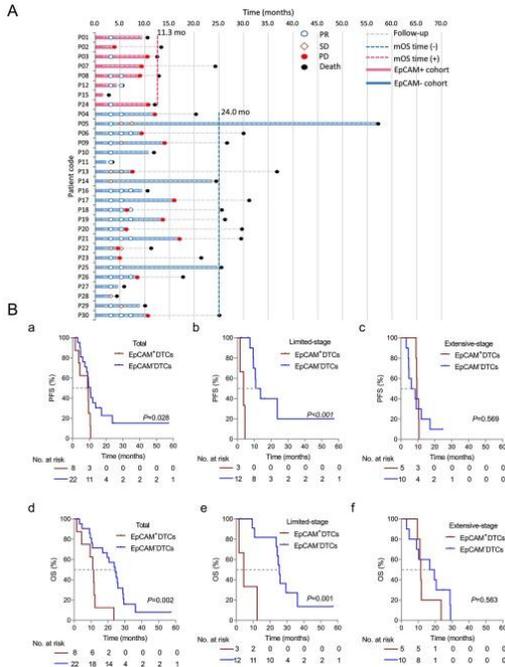
EpCAM⁺ DTCs 与 SCLC 预后密切相关

作者首先比较了 EpCAM⁺ DTCs、EpCAM⁺ DTECs 与疗效的相关性。结果显示, 只有 EpCAM⁺ DTCs 与疗效 (DCR 降低) 显著相关, 而 EpCAM⁺ DTECs 与疗效无明显相关性。



有关 EpCAM⁺ DTCs 与预后相关性研究显示, 阳性检出 EpCAM⁺ DTCs 的 SCLC 患者, 其 mPFS 及 mOS 均明显短于阴性患者。进一步

的研究显示, EpCAM⁺ DTCs 只与 LD-SCLC 较差预后明显相关, 与 ED-SCLC 无显著相关性。



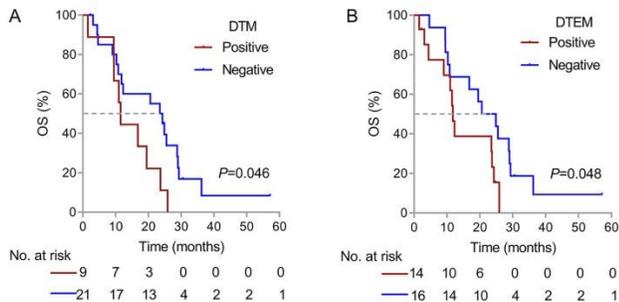
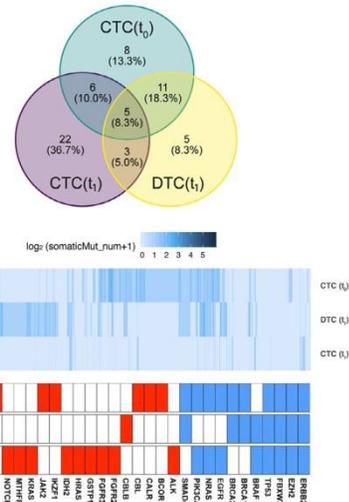
结果显示, DTM⁺ 患者中位总生存率 (mOS, 11.5 mo) 明显小于 DTM⁻ 患者 (mOS, 23.5 mo) ($P=0.046$)。与此类似, DTEM⁺ 患者 (mOS 11.8 mo) 小于 DTEM⁻ 患者 (mOS 20.6 mo, $P=0.048$)。

精准 CTC、DTC 单细胞全外显子测序 (Precision scWES)

为进一步了解肿瘤进展过程中处于不同时期的 CTC、DTC 在分子层面的变化与相关性, 作者针对一例病理活检证实骨髓转移的 ED-SCLC 患者, 利用赛特“固/液双相单细胞非激光显微分离系统 (n-MSM)”, 精准挑取治疗前 (t0) CTC 及治疗后疾病开始进展时 (t1) 的 CTC、DTC 单细胞进行全外显子测序。

DTM、DTEM 的临床意义

与血中 CTC、CTEC 可分别形成细胞团 CTM、CTEM 相类似, DTC 及 DTEC 在骨髓中也可形成各自相应的细胞团 DTM、DTEM。患者各类细胞团阳性检出率分别为 DTM (26.7%), DTEM (46.7%), CTM (8.3%), CTEM (12.5%)。本实验重点研究了 DTM 与 DTEM 的临床意义。



CTC (t1)、DTC (t1) 中的基因突变数目明显少于治疗前的 CTC (t0) (图 A)。不同于 CTC (t1) 与 CTC (t0) 共同拥有 11 个相同的单核苷酸突变基因(SNV), DTC (t1) 与 CTC (t0) 共享 16 个同源性体细胞基因突变 (图 B)。泛癌突变基因分析显示, CTC (t0) 具有 7 个特异性专属突变基因 (红色), DTC (t1) 具有 1 个专属突变基因 *CBLB*, 而 CTC (t1) 具有 12 个专属突变

基因。这三类包括从治疗前到治疗后的细胞共享 4 个突变基因 (蓝色): *ERBB2*, *EZH2*, *FBXW7* 和抑癌基因 *TP53*。此外, 治疗前 CTC (t0) 无 *BRAF* 基因突变, 但治疗后此基因突变在 CTC(t1)、DTC(t1) 中均为阳性。

结论

骨髓 DTC 在 SCLC 的疾病进展、耐药、判断预后及预测疗效过程中具有重要作用。本实验中的精准单细胞测序为今后有的放矢地开展不同亚类细胞的大样本测序研究奠定了坚实基础。

文献

1. Zhu et al. (2021) Circulating tumor cells (CTCs)/circulating tumor endothelial cells (CTECs) and their subtypes in small cell lung

cancer: Predictors for response and prognosis. *Thorac Cancer* 12:2749
(赛特网址文章下载:
<http://www.cytointelligen.com/zlwz>, 64R1)

2. Wang et al. (2023) Longitudinal detection of subcategorized CD44v6⁺ CTCs and circulating tumor endothelial cells (CTECs) enables novel clinical stratification and improves prognostic prediction of small cell lung cancer: a prospective, multi-center study. *Cancer Lett* 571:216337
(赛特网址文章下载:
<http://www.cytointelligen.com/zlwz>, 71)

原文下载:

<http://www.cytointelligen.com/zlwz>, 第 75 篇文献