

瘤标-i•FISH® (NC) 全方位检测坏死及瘤标阳性 CTC、CTEC

与小片段“核酸型循环肿瘤标志物”ctDNA 不同，循环肿瘤细胞 (CD31⁻ CTC) 及循环肿瘤血管内皮细胞 (CD31⁺ CTEC) 构成了血液中的一对独特的、具有生物活性的“细胞型循环肿瘤标志物”^[1]，它们包含了伴随肿瘤动态进展的完整核酸信息、广谱肿瘤标志物蛋白表达及具有重要临床意义的细胞形态 (大、小细胞，细胞团等)。CTC 与 CTEC 相辅相成，在肿瘤血管生成及肿瘤发生、进展、转移、耐药、复发、MRD 等过程中发挥着重要作用。

相对于目前市面上无法区分 CTC、CTEC 活细胞及死细胞 (necrotic cell, NC) 的常规检测，赛特生物应广大肿瘤界医生及科研人员的需要，在全球率先开发出了可有效区分、检测肿瘤患者体内活性及坏死异倍体 CTC、CTEC 的独特 SE-i•FISH® (NC) 技术 (Lin et al. 2021 Cancers 13:5108)。该技术为肿瘤个体化精准治疗提供了全新评估手段，可以快速、客观、准确评估疗效，并有效指导开展对治疗敏感或耐药的靶向单细胞测序，从而为肿瘤转化医学及临床应用研究开辟了新的途径。



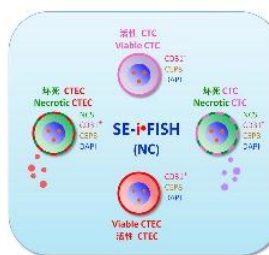
Article Identification and Comprehensive Co-Detection of Necrotic and Viable Aneuploid Cancer Cells in Peripheral Blood

Alexander Y. Lin, Daisy Dandan Wang, Linda Li and Peter Ping Lin 

Cytelligen, San Diego, CA, USA;  alex.lin@cytelligen.com (A.Y.L.); daisy.danwang@cytelligen.com (D.D.W.); linda.li@cytelligen.com (L.L.);  peter.lin@cytelligen.com (P.P.L.)

* Correspondence: peter.lin@cytelligen.com; Tel.: +1-858-536-5785

Simple Summary: Circulating tumor cells (CTCs) and CD31⁺ circulating tumor endothelial cells (CTECs) constitute an important part of cellular circulating tumor biomarkers and play a critical role in cancer metastasis and disease progression. Precise detection of live and necrotic aneuploid CTCs and CTECs in therapeutic cancer patients, though clinically highly demanded, has yet to be achieved in the field. The goal of this study is to develop a targeted assay strategy to effectively distinguish, not only detect viable and dead (or necrotic) cancer cells but also detect aneuploid chromosomes and sequencing various biomarkers. The innovative strategy developed in the present study will assist in an efficient assessment of therapeutic effectiveness, rapid detection of emerging treatment resistance and bringing more insights into the comprehension of cancer cells in circulation.



Lin et al. 2021, Cancers 13:5108

有效检测活性及坏死肿瘤细胞的重要意义

肿瘤治疗过程中做到有效检测并消除外周血中具有活性的肿瘤细胞，以减少肿瘤转移并降低复发风险已成为人们的共识^[2, 3]。肿瘤患者接受抗肿瘤治疗（放化疗、靶向、免疫、介入、物理疗法等）过程中，针对其生物体液（外周血、胸腹水、骨髓、尿液、脑脊液等）或肿瘤组织穿刺标本定量检测其中的活性及坏死肿瘤细胞，可更加快速、客观地判断治疗方法的有效性，并有助于进一步揭示这些对不同治疗手段敏感或耐药的不同亚类肿瘤细胞的重要意义。

- 治疗初期快速评估疗效：肿瘤患者治疗初期，体内大部分 CTC、CTEC 如果呈现为坏死细胞，提示治疗方案有效；反之，大量活性 CTC、CTEC 提示药效不佳
- 动态监测：治疗过程中一旦开始出现大量活细胞 CTC、CTEC，则提示肿瘤产生耐药并可能伴有肿瘤进展或转移
- 全程治疗结束后，患者体内仍残存有大量活性 MRD CTC、CTEC，提示可能还未达到预期疗效，患者存在较高复发风险

六色瘤标-i•FISH®(NC) 技术特点与优势

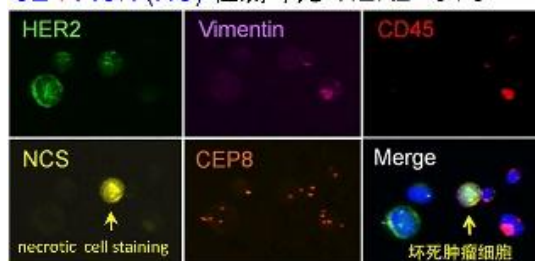
国内外发表的多项实验已证明，大部分 CTC、CTEC 为裸细胞，只有一小部分细胞表达通常用于细胞分离的表面粘附因子 EpCAM 或间质化标志物 - 波形蛋白 Vimentin。因此，使用依赖细胞表面标志物的方法分离 CTC、CTEC 势必会造成因肿瘤细胞自身生物学特性而引起的不可避免的假阴性，导致产生大量漏网之鱼。此外，细胞分离过程中充分保护细胞膜的完整性是开展检测 CTC、CTEC 坏死细胞的首要前提。目前常见的微流控、低渗裂解红细胞、压力过滤去除白细胞等方法均易对细胞膜造成损伤，从而使胞膜的通透性增加^[4-6]，引起坏

死细胞染料进入活细胞，人为造成坏死细胞的假象。有鉴于此，赛特生物开发的不依赖细胞表面标志物表达的“差相富集技术 (SE)”已被国内外多家医学院校证明在有效富集各种 CTC、CTEC 的同时，能充分保护细胞膜的完整性并维持细胞极高的生物活性^[7]。此富集方法具有泛癌种特性，可通用于所有实体瘤。

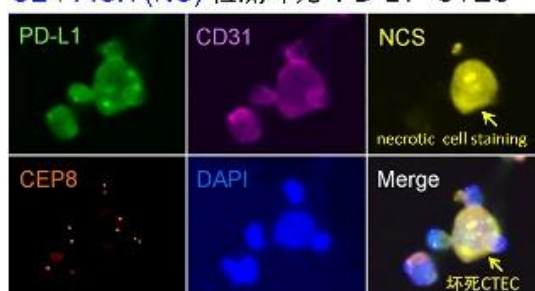
由于只有部分 CTC、CTEC 表达肿瘤标志物蛋白，因此单纯使用免疫荧光染色已不能满足临床有效检测 CTC、CTEC 的目的。常规瘤标-i•FISH 技术可对 CTC、CTEC 进行染色体异倍体、肿瘤标志物蛋白表达及细胞形态三位一体的全方位分子病理检测，能够确保检测的高灵敏性与高特异性。i•FISH 已得到国内外广大肿瘤界同行与专家的高度认可，相关研究成果发表在多篇国内外一流专业杂志上，并被著名的欧盟生化学会唯一官方肿瘤杂志 - 《分子肿瘤学》(Molecular Oncology) 以封面形式向全球读者作了特别报道与推广^[8]。然而常规瘤标-i•FISH 并不能区分活性与坏死 CTC 及 CTEC。最新优化的六色瘤标-i•FISH® (NC) 技术，可原位联合检测表达了多种肿瘤标志物的活性及坏死 CTC、CTEC 亚类细胞。根据需要，可选用不同瘤标进行任意组合。比如，针对 HER2⁺ 或 PD-L1⁺ CTC、CTEC 进行活性及坏死细胞检测，可满足临床亟需，有效判断相应靶向及

免疫治疗对不同 CTC、CTEC 细胞的杀伤或耐药作用。

SE-i•FISH (NC) 检测坏死 HER2⁺ CTC



SE-i•FISH (NC) 检测坏死 PD-L1⁺ CTEC



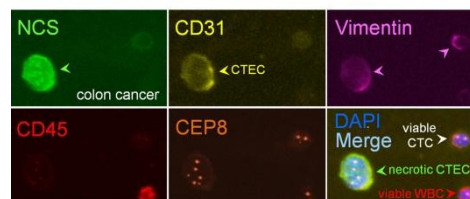
SE-i•FISH[®] (NC) 原位联合检测 CTC、CTEC 技术特点汇总如下：

- 泛癌种、高灵敏、高特异。不依赖肿瘤表面标志物表达富集肿瘤细胞
- 与单纯免疫荧光染色不同，可整合染色体异倍体、多种瘤标蛋白表达、细胞形态，三位一体原位检测各种活性及坏死 CTC、CTEC 亚类细胞，以确定不同亚类细胞的临意义
- 适于后续针对性地开展靶向单细胞测序

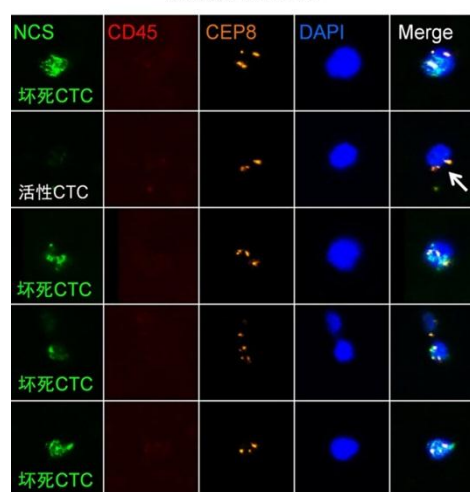
临床应用案例

SE-i•FISH[®] (NC) 已被国内外多家医疗单位成功应用于多个瘤种的相关检测。

SE-i•FISH (NC) 检测肠癌化疗后
活性CD31⁻ CTC及坏死间质化CD31⁺ CTEC



SE-i•FISH (NC) 检测前列腺癌治疗后
活性及坏死CTC



北京协和医院 • 赛特生物

如图所示，肠癌患者接受化疗后，可检测出对治疗敏感的间质化多倍体 CTEC 坏死细胞 (CD31⁺/Vimentin⁺)、对药物耐药的活性间质化三倍体 CTC (CD31⁻/Vimentin⁺) 及活性白细胞 (CD45⁺)。北京协和医院泌尿外科开展的检测显示，一位具有 4 年病史、没有接受手术切除的前列腺癌患者，以往长期接受激素治疗，病情稳定。患者最近开始出现肿瘤远端转移征兆。SE-i•FISH[®] (NC) 检测出此患者含有 4 个坏死 CTC 及 1 个三倍体活性 CTC，

提示虽然激素治疗对该患者原发灶肿瘤细胞 (CTC 数目不高) 及入血的大部分 CTC 仍具有杀伤作用, 但有些 CTC 已产生耐药, 这些活性 CTC 可能是患者出现肿瘤转移的重要原因。对这些原位联合检测出的活性及坏死 CTC、CTEC 进行转录组研究、单细胞 NGS 测序比对等^[9,10], 将有助于锁定肿瘤细胞内与药敏、耐药及转移相关的基因, 并深入研究细胞特性。

随着 SE-i•FISH® (NC)不断优化, 该技术平台将为人们从全新视角、全新领域进一步深入研究 CTC、CTEC 的重要临床意义及开展靶向单细胞测序提供可靠的技术保障。



相关文献

1. Lin 2020 Aneuploid Circulating Tumor-Derived Endothelial Cell (CTEC): A Novel Versatile Player in Tumor Neovascularization and Cancer Metastasis. **Cells** 9:1539.
2. Pantel et al., 2004 Dissecting the metastatic cascade. **Nat Rev Cancer** 4:448.
3. Pierga et al., 2008 Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. **Clin Cancer Res** 14:7004.
4. Regmi et al., 2017 High Shear Stresses under Exercise Condition Destroy Circulating Tumor Cells in a Microfluidic System. **Sci Rep** 7:39975.
5. Suter 1977 Flow-induced trauma to blood cells. **Circulation Res** 41:2.
6. Vuorte et al., 2001 Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. **Cytometry A** 43:290.
7. Lin et al., 2017 Comprehensive in situ co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells. **Sci Rep** 7:9789.
8. 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.
9. Chen et al., 2021 Dysregulated KRAS gene-signaling axis and abnormal chromatin remodeling drive therapeutic resistance in heterogeneous-sized circulating tumor cells in gastric cancer patients. **Cancer Lett** 517:78.
10. Liu et al., 2019 Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. **Science Advances** 5, eaav4275