

首次发现：外周血中异倍体循环血管内皮细胞 CEC

文章转自转化医学网 2017-08-31

肿瘤病人外周血循环稀有细胞(circulating rare cells, CRCs) 主要包括循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs) 和循环血管内皮细胞(circulating endothelial cells, CECs)。CECs 不仅与血管生成和肿瘤生长、播散有关, 还能够作为抗血管生成药物的靶点和疗效评估的标志物。

CTC 的染色体异倍体特征及其临床意义以往已有很多论述, 而对于 CEC 的染色体倍体研究目前还没有任何相关报道。最近, 由国际著名的德国 Ludwig-Maximilians 大学医学中心(LMU)、上海第一人民医院肿瘤中心及赛特生物(Cytelligen/Cytointelligen) 密切合作, 应用 SE-IFISH[®] 整合技术, 在共同完成的多瘤种、多中心的联合临床实验中首次发现, 肿瘤病人体内不仅

存在染色体异倍体 CTCs (CD31⁻/CD45⁻), 同时也存在着显著数量的染色体异倍体 CECs (循环肿瘤血管内皮细胞, CD31⁺/CD45⁻), 以及“肿瘤上皮-内皮融合型细胞和癌栓”(tumor epi-endo fusion cells and clusters)。该研究不仅可以帮助人们进一步深入了解 CEC 在肿瘤血管生成与肿瘤生长、转移过程中的相关性, 更重要的是, **使人们首次能够有效区分、鉴别肿瘤病人血液中的异倍体 CTCs 及异倍体 CECs 这两类完全不同的细胞**。在极大地提高了 CTC 检测的特异性同时, 亦可同步对 CEC 的临床意义, 以及 CEC 与 CTC 如何相互协同等方面开展深入研究。该研究成果经 Nature Biotechnology(自然·生物技术)编辑部特别推荐, 已发表在 Scientific Reports 杂志上(Lin et al., 2017 Sci Rep 7:9789) (图 1)。

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Comprehensive *in situ* co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells

Peter Ping Lin¹, Olivier Gires^{2,3}, Daisy Dandan Wang¹, Linda Li¹ & Hongxia Wang⁴

Conventional circulating tumor cell (CTC) detection strategies rely on cell surface marker EpCAM and intracellular cytokeratins (CKs) for isolation and identification, respectively. Application of such methods is considerably limited by inherent heterogeneous and dynamic expression or absence of EpCAM and/or CKs in CTCs. Here, we report a novel strategy, integrating antigen-independent subtraction enrichment and immunostaining-FISH (SE-IFISH), to detect a variety of aneuploid circulating rare cells (CRCs), including CTCs and circulating tumor endothelial cells (CECs). Enriched CRCs, maintained at high viability and suitable for primary tumor cell culture, are comprehensively characterized by *in situ* co-examination of chromosome aneuploidy by FISH and immunostaining of multiple biomarkers displayed in diverse fluorescence channels. We described and quantified for the first time the existence of individual aneuploid CD31⁺ CECs and co-existence of "fusion clusters" of endothelial-epithelial aneuploid tumor cells among enriched non-hematopoietic CRCs. Hence, SE-IFISH is feasible for efficient co-detection and *in situ* phenotypic and karyotypic characterization as well as quantification of various CRCs, allowing for their classification into diverse subtypes upon biomarker expression and chromosome ploidy. Enhanced SE-IFISH technology, assisted by the Metafer-IFISH automated CRC imaging system, provides a platform for the analysis of potential contributions of each subtype of CRCs to distinct clinical outcome.

¹Cytelligen, San Diego, CA, USA. ²Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Grosshadern Medical Center, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Marchionistr. 15, 81377, Munich, Germany. ³Clinical Cooperation Group Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health GmbH, 85764, Neuherberg, Germany. ⁴Department of Oncology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.P.L. (e-mail: plin@cytelligen.com) or H.W. (e-mail: whx365@126.com)

图 1 CTC 与 CEC 文章

染色体异倍体 CEC

染色体异倍体是恶性细胞的最典型特征 (Kops et al., 2005 Nat Rev Cancer 5:773; Gordon, et al., 2012 Nat Rev Genet 13:189)。正

常组织中的内皮细胞为二倍体, 一般统称为血管内皮细胞; 肿瘤组织中的异倍体内皮细胞, 定义为肿瘤血管内皮细胞 (tumor endothelial cells, CD31⁺/CD45⁻) (Hida et al., 2004 Cancer Res

64:8249)。循环内皮细胞 CEC 在肿瘤血管生成及肿瘤转移过程中具有极其重要的临床意义 (Bertolini et al., 2006 Nat Rev Cancer 6:835), 然而以往对于外周血 CEC 染色体倍体的鉴别及相关临床意义的研究则一直处于空白。本实验研究人员借助赛特 SE-i-FISH® 及 Metafer-i-FISH® 全自动六通道 CRC 扫描与图像分析系统的特殊技术优势, 对肿瘤病人体内的 CTC 与 CEC 进行了

系统性的检测、鉴别与比较, 首次发现了染色体异倍体循环肿瘤血管内皮细胞 CEC 的存在。文中大量研究证实, 除少部分表达 CD31⁺/CD34⁺ (循环内皮祖细胞, CEP) 或 CD31⁺/CD146⁺ (成熟 CEC, 图 2) 外, 大部分该类细胞具有未曾报道过的特殊蛋白表型 CD31⁺/CD34⁻/CD133⁻/CD105⁻/CD146⁻/CD45⁻。

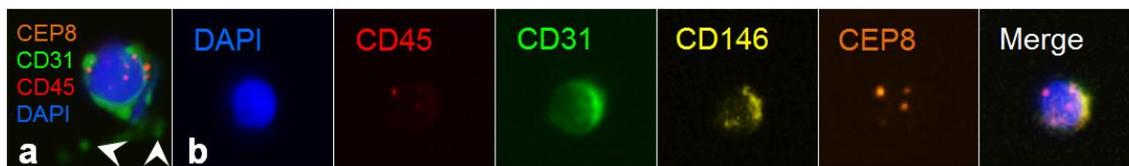


图 2 CD31⁺/CD146⁺ 的成熟 CEC

进一步的研究发现, 除异倍体 CECs 外, 某些肿瘤病人体内还存在着异倍体 epi-endo 融合型肿瘤细胞及癌栓, 且该类融合型细胞

或癌栓具有迄今为止没有报道过的独特蛋白表型 (CD31⁺/EpCAM⁺/Vimentin⁺/CD45⁻) (图 3)。

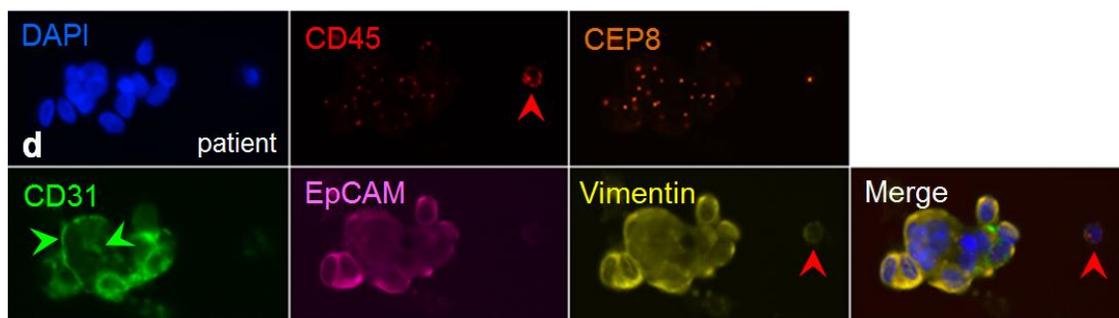


图 3 异倍体 epi-endo 融合型癌栓

染色体异倍体 CEC 存在于肿瘤病人与正常人体内

进一步的临床对照实验发现, 异倍体 CECs 不仅存在于所有肿瘤病人体内, 66% 受检的正常人群 (n=47) 中也发现了该类细胞。但病人与正常人相比 (6 ml 血液), 无论异倍体 CECs 的阳性率 (肿瘤病人 vs 正常人: 100% vs 66%), 还是人均异倍体 CEC 细胞数目 (肿瘤病人 vs 正常人:

8.8±14.3 vs 2.8±3.6, mean ± SD), 均呈现显著性差异 (图 4)。

异倍体 CEC 在肿瘤病人与正常人群中的表型差异、功能的异同、以及循环肿瘤 CEC 在肿瘤生成、转移等过程中的临床意义仍有待进一步深入研究。

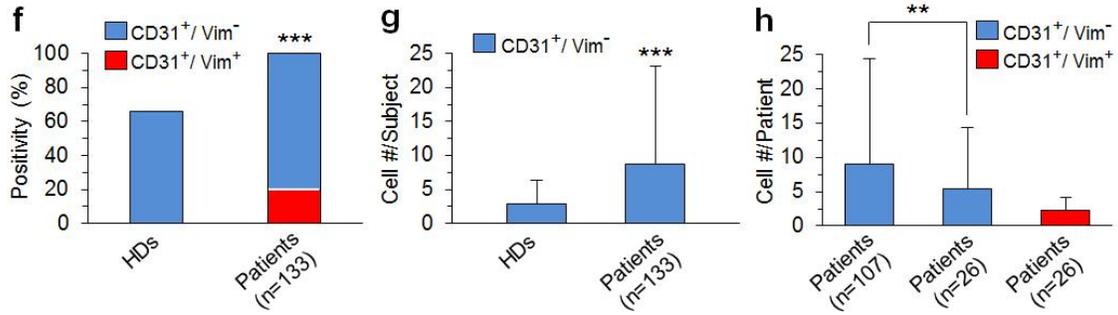


图4 肿瘤病人与正常人 CEC 阳性率及平均数

异倍体循环肿瘤血管内皮细胞 CEC (CD31⁺) 与异倍体循环肿瘤上皮细胞 CTCs (CD31⁻) 是两类完全不同的细胞，且具有不同的临床与生物学意义。随着本文的发表，人们对这两类细胞的认知日渐清晰，两者绝不能再混为一谈！显而易见，对异倍体 CECs 与 CTCs 的有效区分与鉴别，已成为高特异性地准确检测 CTC 的必要前提！

多重瘤标-iFISH

本文不仅向人们展示了独特的 SE-iFISH[®] 技术用于同步检测 CECs 与 CTCs，而且也为广大肿瘤界同行提供了研究 CTC 上多重肿瘤细胞标示物的有效技术平台。借助赛特生物与蔡司、MetaSystems 联合开发的 Metafer-iFISH[®] 全自

动 CTC 图像扫描与分析系统（图 5），5 通道双瘤标-iFISH 及 6 通道三瘤标-iFISH 将有助于人们研究、检测 CRCs 上不同肿瘤标示物是如何与染色体倍体相互协同，从而在肿瘤转移、耐药、复发等过程中发挥重要作用。

Metafer-iFISH[®] CTC 全自动图像扫描与分析系统

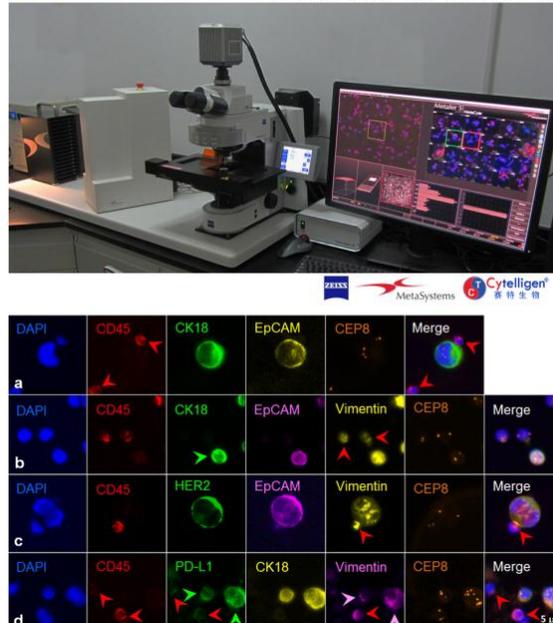


图5 Metafer-iFISH 全自动 CTC 图像扫描与分析系统与瘤标-iFISH 图像

SE 细胞活性

赛特生物 CTC 差相富集 (Subtraction Enrichment, SE) 与其它阴性富集方法的最大区别之一在于, SE 富集避免使用低渗裂解法, 而是使用本研究作者发明的特殊离心介质去除红细胞 (Lin et al., 1999 J Cell Biol 145:279; Lin et al., 2009 Mol Neurodegener 4:1), 从而避免了低渗对 CRC 造成的损伤。本研究对经过 SE 富集及优化的液态免疫荧光染色 (Lin et al., 2000 PNAS 97:674) 后的肿瘤细胞进行了细胞活性评估。实验结果显示, 经过 SE 富集及免疫染色, 无论是肿瘤细胞还是残留的白细胞, 均保持了极高的细胞活性, 存活率分别为 $95.3 \pm 2\%$ (肿瘤细胞) 及 $93 \pm 2.1\%$ (白细胞) (mean \pm SD) (图 6)。

SE CTC 原代细胞培养、CDX 肿瘤模型、肿瘤活细胞生物样本库

为了便于人们对赛特生物 SE-iFISH 的技术

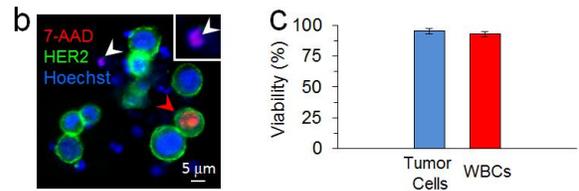


图 6 肿瘤细胞及白细胞活性检测

差相富集过程及本文采用的免疫荧光染色方法对细胞活性的影响微乎其微。

实验结果提示, SE 富集 CTC 后, 采用 Hoechst 标记细胞核, 7-AAD 标记坏死细胞 (necrotic cell), 同时结合液态免疫荧光染色, 可以为人们提供额外的技术手段, 用于观测肿瘤治疗方法对体内 CTC 或体外培养的肿瘤细胞的杀伤效果, 从而达到筛选肿瘤用药及评估疗效的目的。

路线及各种应用有一个比较清晰的了解, 本文将相关信息汇总成流程图如下 (图 7) :

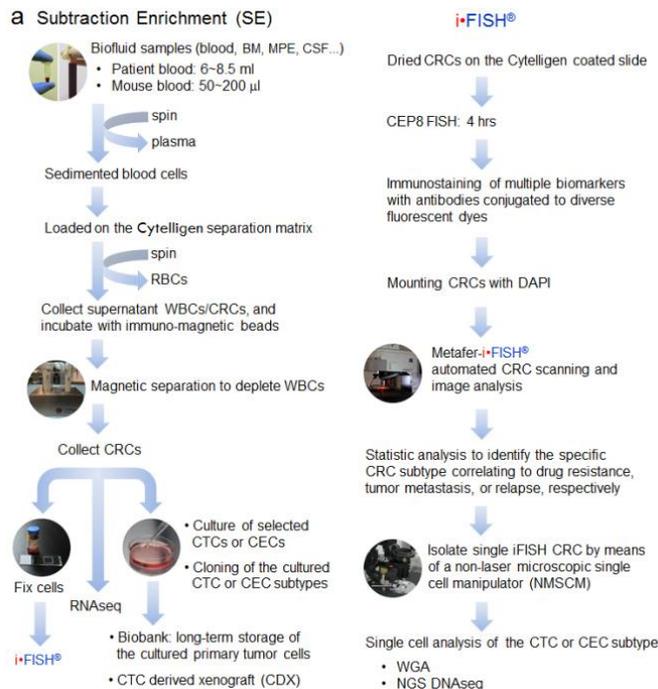


图 7 SE-iFISH 技术路线及应用

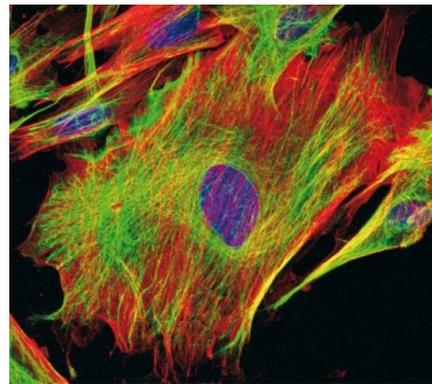
需要特别指出的是，SE 富集分离出具有极高生物活性的各种体液来源（如血液、胸水、腹水、骨髓、尿液、脑脊液、淋巴穿刺等）的肿瘤细胞可适于原代细胞培养。本文作者与美国加州大学圣地亚哥分校肿瘤中心 (UCSD Moores Cancer Ctr) 的联合实验证明，原代培养的肿瘤细胞纯度在培养过程中明显不断提高，且可反复冻融。这些培养的 CTC 原代细胞，或克隆化培养的具有不同临床意义的 CTC 亚类细胞，可用于后续 CDX 肿瘤动物模型的建立 (Hodgkinson et al., 2014 Nat Med 20:897; Alix-Panabieres et al., 2016 Mol Oncol 10:443) 及肿瘤活细胞标本库的建立。相对于石蜡包埋的病理组织切片，或单纯的血浆蛋白、血浆核酸片段，SE 富集得到的各种肿瘤细胞 (包括 CTC) 不但具有生物活性，而且包含了完整的肿瘤细胞核酸与蛋白信息，从而为进一步开展肿瘤研究及建立具有真正意义与应用价值的“肿瘤活细胞生物样本库” (Biobank for Viable Tumor Cells) 奠定了坚实基础。

iFISH 单细胞测序

类似于肿瘤的高异质性，不同 CTC 之间也存在着极大的差异。借助 SE-iFISH 技术，根据染色体异倍体数目及肿瘤标示物的蛋白表达，对 CTC 进行亚类分型 (Lin, 2015 Clin Transl Med 4:38)，发现各个亚类的 CTC 具有不同的临床意义，如肿瘤耐药 (Li et al., 2014 Oncotarget 5:6594)、病人预后 (Li et al., 2015 Chin J Cancer Res 28:579) 等。对于今后开展 CTC 单细胞分析工作，显然不再是随意挑取检测出的 CTC，而是应针对性地挑取与不同临床意义 (如肿瘤转移、耐药、复发等) 密切相关的 CTC 亚类单细胞。

多瘤种、多中心、多瘤标 CTC 临床实验及展望

目前国际上至少有 22 个多瘤种、多中心的 CTC 临床实验正在积极进行中 (Wang et al., 2017 Oncotarget 8:1884)。除 CTC 计数外，这些临床研究更加关注与 CTC 相关的 20 个肿瘤标示物及与 CTC 相关的 14 个瘤标 (EpCAM, Vimentin, HER2 等) 蛋白表达的临床意义。



随着赛特生物 SE-iFISH® 技术的不断普及应用，人们不仅可以在 CTC 上联合检测具有特定临床意义的染色体异倍体及各种瘤标蛋白表达，同时还可以对循环肿瘤血管内皮细胞 CEC 的临床意义进行深入研究。循环肿瘤内皮细胞 CEC (Carmeliet & Jain, 2000 Nature 407:249)、肿瘤 CEC 细胞栓 (Cima et al., 2016 Sci Transl Med 8:345)、CTC 癌栓 (Cheung et al., 2016 Science 352:167) 及 Vimentin (Tsai & Yang et al., 2013 Genes Dev 27:2192) 在肿瘤形成、转移、耐药、预后、复发等过程中发挥着极为关键的作用。因此，在同一标本上同时完成对 CTC 与 CEC 的有效鉴别及检测，不仅极大地提高了 CTC 检测的特异性，同时可以帮助人们进一步探索 CTC 与 CEC 在肿瘤生成、转移等过程中如何不断相互协同，并发挥重要作用。