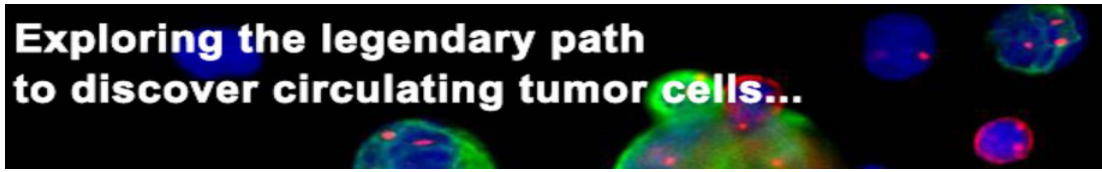


在异倍体循环肿瘤细胞(CTC)中原位检测肿瘤标示物蛋白表达的特殊意义



自美国“科学”杂志 2013 年将 SE-iFISH[®] 作为检测 CTC 的新技术向全球读者进行报道以来 (*Science* 2013, 341:415), 该方法目前在国内外已被广泛应用于 CTC 及其亚类细胞的临床检测与科学研究。应用 SE-iFISH[®] 技术除了能够在肿瘤病人及 mPDX 肿瘤转移动物模型体内有效检测 CTC, 同时还可用于检测恶性胶质瘤病人脑脊液中脱落的肿瘤细胞 (disseminated tumor cell, DTC), 我们在 *Oncotarget* 杂志上刚刚发表的文章着重介绍了应用 SE-iFISH[®] 方法原位检测异倍体 CTC 各种肿瘤标示物 (CK, EpCAM, HER2...) 蛋白表达的特殊临床与科研意义 (Ge, et al. 2015 *Oncotarget* 6:27049-27064)。

(一) Cytelligen 差相富集技术 (Subtraction Enrichment, SE) 用于富集 CTC 的技术优势

肿瘤细胞上皮标示物 EpCAM 在不同瘤种细胞上的表达有很高的异质性。有报道指出, 人们在 134 种实体上皮肿瘤的检查中发现, 只有 70% 的肿瘤表达了高低不等的 EpCAM (Went, et al. 2004 *Hum Pathol* 35:122-8)。在本研究中, 我们首先使用流式细胞仪比较了 3 种有代表性的肿瘤细胞的 EpCAM 表达 (图 1)。

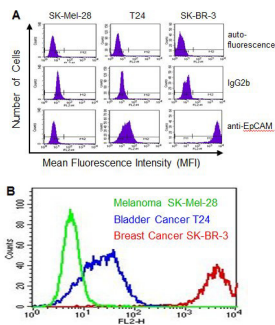


图 1 EpCAM 表达的异质性

结果显示, 乳腺癌细胞 (红色) 表达极高的 EpCAM, 而膀胱癌 (蓝色) 表达较低, 黑色素瘤细胞 (绿色) 则完全不表达。

根据上述实验结果, 我们使用这 3 种肿瘤细胞比较了差相富集技术 (SE) 与 *CellSearch* 方法的肿瘤细胞回收率 (图 2)。

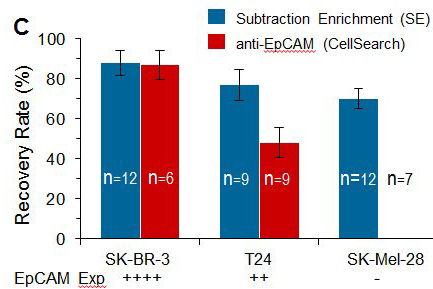
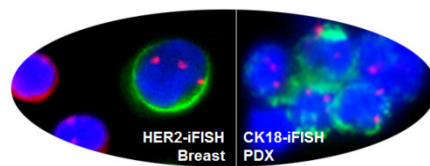


图 2 CTC 回收率比较

结果显示, 无论 EpCAM 表达量高低, SE 方法 (蓝色) 肿瘤细胞的回收率一直稳定在 70-90%。而 *CellSearch* 方法 (红色) 则随着 EpCAM 表达量的降低, 回收率从 90% (乳腺癌) 递减至 50% (膀胱癌), 最终降为 0 (黑色素瘤)。结果提示, SE 方法不依赖于 EpCAM 表达, 可以有效富集各种肿瘤细胞。

(二) 应用 iFISH[®] 原位检测瘤标示蛋白在异倍体 CTC 与 DTC 中表达的重要意义



人体细胞内的 DNA-RNA-蛋白质始终处于被调控的动态过程中，而肿瘤细胞内的调控由正常转变为异常，导致了细胞内蛋白产物的变化，从而引起细胞功能的变化，可见细胞内的最终产物—蛋白质（如肿瘤标示物）及其修饰（post-translational modification）在肿瘤检测与研究过程中具有无可替代的重要性。对细胞的标示物进行免疫荧光染色，可使我们从蛋白水平定性和定量观察肿瘤细胞内相关瘤标的变化。不同于单纯从核酸水平利用探针杂交检测 DNA 或 RNA 的 FISH 方法，iFISH® 方法将 FISH 与瘤标免疫荧光染色相结合，对同一肿瘤细胞同时进行核酸与蛋白的复合观察与研究，在进一步提高 CTC 检测的敏感性与特异性的基础上，还能为人们提供更多前所未有的重要信息。

我们与北京大学肿瘤医院密切合作，利用晚期胃癌病人标本比较了 SE-iFISH® 与 CellSearch 方法的 CTC 检出率（图 3）。

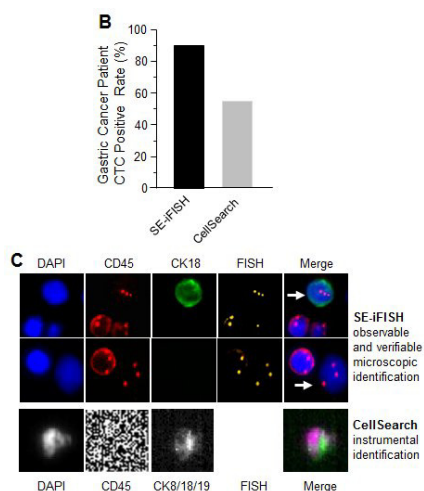


图 3 CTC 检出率比较

结果显示，SE-iFISH® 的胃癌 CTC 检出率为 90.5%，而 CellSearch 为 54.8%。

此外，与 CellSearch 仪器“肉眼不可见”的 CTC 电子成像不同，SE-iFISH® 检测出的所有阳性细胞均可“眼见为实”地在显微镜下观察、核实。

应用 SE-iFISH® 技术，我们与上海复旦大学附属华山医院神经外科经过长期友好合

作，成功建立了在恶性胶质瘤病人脑脊液中有有效检测脱落胶质瘤细胞（disseminated tumor cell, DTC）的方法（图 4）。

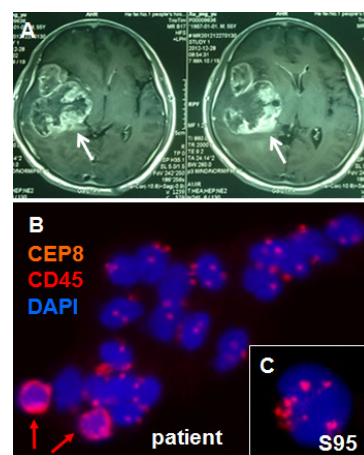


图 4 脑脊液中脱落胶质瘤细胞检测

图中显示，（A）核磁共振扫描清晰可见患者脑部恶性胶质瘤（白色箭头）；（B）利用 SE-iFISH® 方法，可在该患者脑脊液中检测出脱落的 CD45- 恶性胶质瘤细胞团（tumor microemboli）；（C）S95 细胞为原代培养的恶性脑胶质瘤细胞（glioblastoma）。

我们正使用进一步优化的 SE-iFISH® 方法在更多病人样本中深入研究体液中胶质瘤细胞检测的重要临床意义。

除了能够提高 CTC 检测的灵敏性与特异性以外，iFISH® 的独特技术优势在于能够同位、同步地检测 CTC 中各种肿瘤标示物的蛋白表达。目前，我们已将多种瘤标染色与 FISH 进行了有效整合，包括 CK18, PanCK, HER2, EpCAM, Vimentin, CD133-iFISH® 等，以供人们根据瘤种及研究需要进行选择（图 5）。同时我们也正积极开发或协助开发更多的瘤标-iFISH®（包括分泌蛋白、细胞膜蛋白、细胞浆蛋白、核蛋白等）。

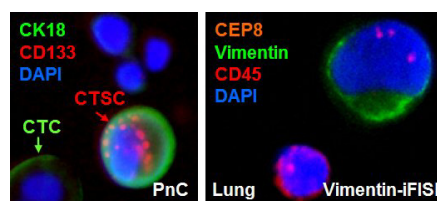


图 5 各种瘤标-iFISH 方法鉴别 CTC

通过与国内外多家医院合作进行的临床实验发现，每种肿瘤蛋白在 CTC 里的表达都有其特殊的重要意义。根据每种肿瘤 CTC 瘤蛋白表达的不同及相应染色体倍体数目，可将 CTC 进行亚类分型。我们在有关肿瘤病人 (Li, et al. 2014 **Oncotarget** 5:6594-602) 及 mPDX 肿瘤转移动物模型 (Jiang, et al. 2015 **Oncotarget** 6:15639-51) 的研究中可以精确锁定对化疗药物敏感或耐受的 CTC 亚类细胞。下面我们就各种瘤标及检测意义向大家做一些相关介绍:

1. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2):

肿瘤组织细胞与 CTC 上的 HER2 蛋白表达虽有关联，但并不一致 (Riethdorf, et al. 2010 **Clin Cancer Res** 16:2634-45)。鉴于常用的靶向药物抗体赫赛汀 (Herceptin) 是与肿瘤细胞 (包括 CTC) 表面的 HER2 蛋白相结合而产生药效，所以相对于目前常规的肿瘤组织细胞 HER2 基因检测，借助免疫荧光染色检测 CTC 表面的 HER2 蛋白表达 (图 6)，以监测、评估赫赛汀疗效则更具临床意义。这一点已在我们与北京大学肿瘤医院针对胃癌 HER2 阳性病人联合进行的相关 CTC 临床实验中得到了证实 (Li, et al. 2014 **Oncotarget** 5:6594-602)。

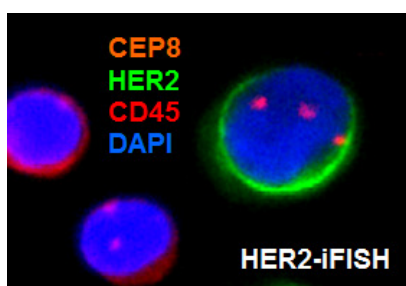


图 6 HER2-iFISH 方法鉴别 CTC

2. EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule):

除了作为上皮细胞标示物 (epithelial marker) 用于捕获 CTC，EpCAM 更重要的作用在于其作为肿瘤生物标示物 (tumor biomarker) 具有的特殊意义。EpCAM 最早就

被证明为肿瘤相关抗原之一 (Baeuerle and Gires 2007 **Br J Cancer** 96:417-23) 及肝癌的干细胞标示物 (Yamashita, et al. 2007 **Cancer Res** 67:10831-9)。此外，EpCAM 作为细胞内信息传导通路的重要一员 (Maetzel, et al. 2009 **Nat Cell Biol** 11:162-71; Munz, et al. 2009 **Cancer Res** 69:5627-9)，在多种肿瘤细胞上受间质化 (EMT) 等多重因素的调控，一直呈动态表达与分布 (Gires and Stocklein, 2014 **Cell Mol Life Sci** 71:4393-4402)。

EpCAM 较常表达于子宫腺瘤、食道鳞癌及胃肠道肿瘤细胞 (Went, et al. 2008 **J Cancer Mol** 3:169-74)，其生物学功能往往因瘤种不同而存有很大差异。在不同肿瘤细胞上 EpCAM 表达量升高或降低具有不同的临床意义。有报道指出，EpCAM 的过量表达与前列腺癌的早期进展和转移密切相关 (Massoner, et al. 2014 **Br J Cancer** 111:955-64)。而另一项大规模的胃癌临床实验则显示，肿瘤细胞 EpCAM 与 CD44 的持续高表达预示着病人较高的 10 年生存率 (Songun, et al. 2005 **Br J Cancer** 92:1767-72)。近来有关肿瘤细胞内 EpCAM 表达降低的临床意义也有很多报道。人们在乳腺癌等肿瘤上发现，随着细胞内 EpCAM 的降低或消失，乳腺癌、结直肠癌等肿瘤的进展、出芽 (budding)、迁移能力及远端转移增强 (Zhang, et al. 2013, **Sci Transl Med** 5:180ra48; Drimel, et al. 2013 **Oncogene** 33:4904-15; Gosens, et al. 2007 **Modern Pathol** 20:221-32)。显而易见，研究 CTC 上的 EpCAM 蛋白表达与临床观测指标的相关性具有非常重要的意义 (图 7)。

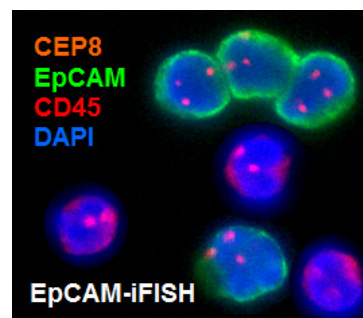


图 7 EpCAM-iFISH 方法鉴别 CTC

3. 角蛋白 CK18 (Cytokeratin 18):

虽然低分子量的 I 型酸性蛋白 CK18 总是与高分子量的 II 型碱性蛋白 CK8 结合为复合物 (CK8/18)，并被作为上皮细胞标示物用于鉴别 CTC (*CellSearch*)，但我们获得的大量实验数据显示，不同于 mPDX 模型中的大部分人源 CTC 呈 CK18 阳性 (Jiang, et al. 2015 *Oncotarget* 6:15639-51)，肿瘤病人体内的 CK18 阳性 CTC 数目则相对较少。

以本篇我们与北京首都医科大学肿瘤医院合作发表的文章为例，肺癌及食道癌 CK18+ 细胞在 CTC 总数中分别只占 14% 及 24% (图 8)。显然，单独的 CK18 作为上皮细胞标示物用于检测 CTC 势必会造成极大的假阴性，这也部分解释了为什么 *CellSearch* 在很多肿瘤 CTC 的检测过程中一直被很高的假阴性所困扰。

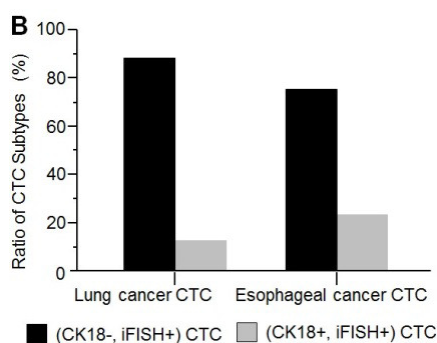


图 8 CK18+、CK18- 的 CTC 比例

虽然 CK18 在 CTC 中的阳性表达率比较低，但作为肿瘤细胞的生物标示物 (biomarker)，CK18 蛋白具有非常重要的特殊意义。来源于凋亡细胞的 CK18 半胱天冬酶 (caspase) 酶切片段游离于血浆中，是公认的凋亡肿瘤细胞的生物标示物 (Linder, et al. 2004 *Cancer Lett* 214:1-9)。相对于血浆中的 CK18 片段，活细胞内完整的 CK18 蛋白则有着更重要的生物学意义。

肿瘤细胞 (包括 CTC) 内 CK18 蛋白表达量的高低与乳腺癌 (Woelfle, et al., 2004 *Clin Cancer Res* 10:2670-4) 和结直肠癌 (Knosel, et al. 2006 *Cell Oncol* 28:167-75) 的肿瘤进展、细胞迁移 (Fortier, et al. 2013 *J*

Biol Chem 288:11555-71)、分期、转移与复发 (Weng, et al. 2012 *Mol Cancer Res* 10:485-93) 等有着紧密关联。已有很多报道指出，肿瘤细胞内 CK18 蛋白表达的升高与多种肿瘤的低分化、快速进展至晚期密切相关，这些肿瘤包括了肺癌 (Nagashio, et al. 2010 *Pathol Int* 60:71-7)、食管癌 (Makino, et al. 2009 *Br J Cancer* 101:1298-1306)、肾细胞癌 (Rees, et al. 2006 *Cancer Res* 66:9583-90)、口腔癌 (Fillies, et al. 2006 *BMC Cancer* 6:1-10)、鼻咽癌 (Weng, et al. 2012 *Mol Cancer Res* 10:485-93) 及肝癌 (Zulehner, et al. 2010 *Am J Pathol* 176:472-81) 等。

我们借助 CK18-iFISH[®] 技术手段获得的初步临床随访数据显示，具有特定 8 号染色体倍体数目的 CK18 蛋白表达强阳性的 CTC 与肺癌、胆管细胞癌及胃癌病人的肿瘤快速进展及死亡具有高度的相关性，有些甚至发生在 TNM 早期病人，提示 CTC 内的 CK18 蛋白表达还可能受到除肿瘤细胞间质化 (EMT) 以外的其它机制的调控。因此，利用 iFISH[®] 原位 (*in situ*) 检测 CK18 蛋白在异倍体 CTC 中的表达有着极为重要的临床与科研意义 (图 9)。

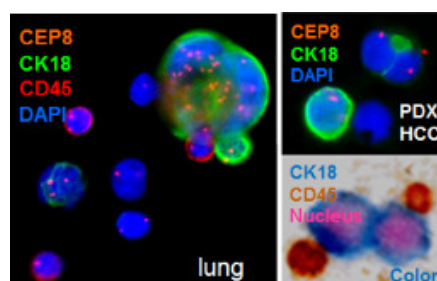


图 9 CK-iFISH 方法鉴别 CTC

正如本篇发表的文章所指出的，我们与国内外数十家医院经过 10 年的密切合作，建立并系统性优化了 SE-IF (免疫荧光染色) 及 SE-iFISH[®] 技术，并在 2000 多个肿瘤标本上深入进行了临床验证。涉及的瘤种涵盖肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌、食管癌、宫颈癌、卵巢癌、结直肠癌、膀胱癌、肾细胞癌、脑胶质瘤、骨肉瘤、黑色素瘤、嗜铬细胞瘤、甲状旁腺肿瘤等；标本来源包括了血液、胸水、腹水、骨髓、尿液、脑脊液等 (图 10)。

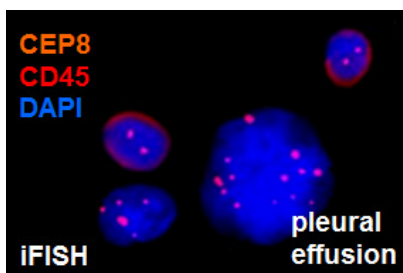


图 10 iFISH 方法胸水中的肿瘤细胞

不同于其它根据单一瘤标表达（如 CK 蛋白，CellSearch）或单纯的核酸探针杂交方法检测 CTC，SE-iFISH[®]可以帮助人们根据

临床或研究的具体不同需求，将检测肿瘤细胞内各种生物标示物蛋白表达的免疫荧光染色与染色体 FISH 相结合，在高灵敏、高特异性地检测 CTC 的基础上，还能够获取其它单一技术手段所不能提供的 CTC 及其亚类的重要临床意义与生物信息。大量的临床实验证明，SE-iFISH[®]可以对不同来源的生物体液中的各种肿瘤细胞进行有效富集、分离、培养、检测及分类。我们目前正在与国内外多家单位联合进行大规模的临床实验，以确定不同瘤种间与各个临床指标相关的 CTC 亚类，并对这些 CTC 亚类细胞进行单细胞分析。相关研究将会陆续给大家带来更多、更有意义的信息。