

从另一个视角看 CTC

文章转自转化医学网 360zhyx.com

随着人们对 CTC 了解的日益加深,有关 CTC 的研究与临床应用已不再局限、纠结于以往的单纯定量或计数。揭示 CTC 细胞内的核酸、蛋白如何调控 CTC 及其临床意义已成为近来的研究热点。北京大学肿瘤中心(北京肿瘤医院)首次发现并报道了胃癌 CTC 内的染色体倍体与肿瘤化疗药物顺铂的耐药性密切相关(Li et al. 2014 *Oncotarget* 5:6594)。随后,类似的发现在有关 PDX 肿瘤动物模型的研究中得到了进一步证实(Jiang et al. 2015 *Oncotarget* 6:15639)。最近,由美国加州大学圣地亚哥分校(UC San Diego, UCSD)牵头,多国合作的最新研究发现,结直肠癌 CTC 内的鸟苷酸交换因子(Guanine nucleotide exchange factors, GEFs)的升高,与病人较短的无进展生存期(PFS)呈明显正相关。该项研究成果刚刚发表在 *Nature* 子刊(Barbazan et al. 2016 *Scientific Reports* 6:22112),已引起人们的广泛讨论与密切关注。

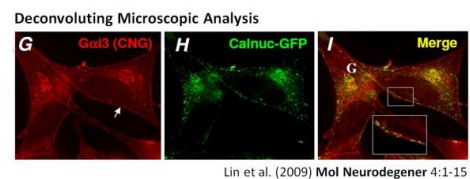
GEFs 介绍: 鸟苷酸结合蛋白(G 蛋白, Gproteins)是细胞内最重要的信号传导通路蛋白之一。活化后的 G 蛋白在肿瘤细胞的生长及转移过程中发挥着极为重要的作用(Dorsam and Gutkind 2013 *Nat Rev Cancer* 13:412)。如图 1 所示, G 蛋白平时以无活性的三聚体(G $\alpha\beta\gamma$)形式存在于细胞内,在特定条件下可被相应的 G 蛋白受体(GPCRs)或 GEFs 活化,此时 G $\beta\gamma$ 脱落,形成与 GTP 相结合的活性 G α 单体,并发挥一系列重要的生物学作用。GEFs 由一组蛋白组成,因瘤种不同,组成各异,其中,Calnuc 被认为是最重要的 GEF 蛋白之一。



图 1 G 蛋白的活化

Calnuc 介绍: 赛特生物林平博士在 UCSD 与 Drs. Marilyn Farquhar (前美国细胞生物学会主席) 和 Roger Tsien(钱永健教授, 诺贝尔奖得主) 共同研究 Calnuc 多年, 发表了一系列重要科研成果。研究证实, Calnuc 作为钙结合蛋白, 可存在于肿瘤细胞内的不同部位(Lin et al. 1998 *J Cell Biol* 141:1515), 或分泌出细胞(Lavoie et al. 2002 *Mol Endocrinol* 16:2462)。不同部位的 Calnuc 具有不同的生物学功能, 例如, 高尔基体内的 Calnuc 是构建高尔基体 Ca²⁺库的决定性蛋白(Lin et al. 1999 *J Cell Biol* 145:279), 其在调节与老年痴呆(Alzheimer)疾病密切相关的 β -APP(β -amyloid precursor protein) 生物合成方面起着重要作用(Lin et al. 2007 *J Neurochem* 100:1505)。

大量实验证明, 除了存在于高尔基体内, Calnuc 也存在于细胞浆, 这些胞浆内的 Calnuc 可与 G 蛋白结合。FRET (fluorescence resonance energy transfer) 提供了这两种蛋白可在活细胞内结合的直接证据(Weiss et al. 2001 *PNAS* 98:14961), 而显微断层扫描(Deconvoluting microscopic analysis)则进一步确定了两者在细胞内相互结合的具体位置(图 2), 包括细胞膜、分泌小体及高尔基体



Lin et al. (2009) *Mol Neurodegener* 4:1-15

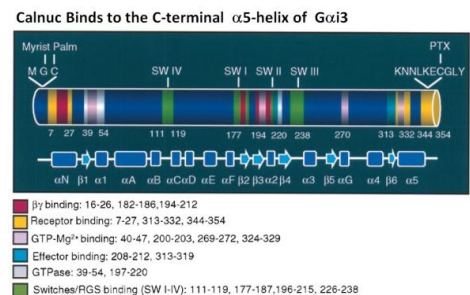


图 2 Calnuc 与 G 蛋白的结合

表面等 (Lin et al. 2009 Mol Neurodegener 4:1)。目前, Calnuc 与 G 蛋白相互结合的位点已被确定。Calnuc 通过其 EF-hand 与 G α 羧基末端的 α 5-helix 相结合, 而此部位亦覆盖了 G 蛋白受体 GPCR 的结合位点 (Lin et al. 2000 PNAS 97:674)。

UCSD 的 Barbazan 实验组在这项最新研究中发现, 结直肠癌病人 CTC 中, 包括 Calnuc 在内的 GEF mRNA 水平明显升高, 从而导致 GEF 蛋白表达量增加, 并进一步激活细胞内的 G 蛋白, 最终促进肿瘤的扩散及无进展生存期 PFS 的缩短。与此报道相似, 几年前美国德州大学 Dr. Jianying Zhang 教授实验室通过 Tissue Array 就已发现, 结直肠癌病理组织可见大量 Calnuc 蛋白表达, 而正常的结直肠组织细胞中并没有发现阳性 Calnuc 染色 (Chen et al. 2007 Intl J Oncol 30:1137) (图 3)。这些研究提示, 作为 GEF 最重要成员之一的 Calnuc, 在肿瘤细胞 (尤其是 CTC 中) 具有许多亟待揭示的重要临床与生物学意义。

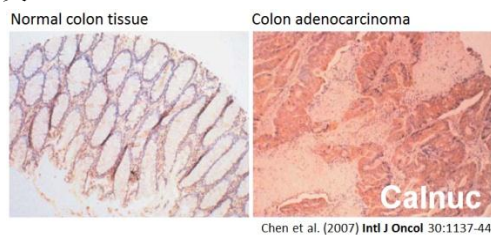


图 3 结直肠正常和肿瘤组织 Calnuc 表达

相关 CTC 研究:

如图 4 所示, 对细胞形态与功能起最终决定作用的是细胞内的功能性蛋白。在形成功能性蛋白的过程中, 从起始物质 DNA, 至中间产物 mRNA, 再到成熟、完整的功能性蛋白要经过若干步骤与调节。因此严格来讲, 仅仅进行核酸检测还不能完全如实地反映其编码的相应蛋白在细胞内是否具有生物学功能, 以及蛋白含量是如何变化的。显而易见的例子比比皆是, 如 CK/EpCAM 基因阳性的 CTC 因 EMT 作用, 其蛋白已转为阴性, 而 HER2 基因阳性的细胞其 HER2 蛋白不一定阳性。鉴于临床使用的肿瘤靶向药物赫赛汀 (Herceptin) 针对的是 HER2 蛋白而不是 HER2 基因, 因而检

测 CTC 中的功能性蛋白无论从临床意义或细胞研究角度而言都是不可忽略的。

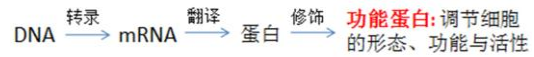


图 4 细胞的功能性蛋白的形成

与力学三要素 (大小、方向、作用点) 相似, CTC 作为细胞, 对其检测与研究时, “细胞三要素”的考量也是必不可少的, 它们包括核酸 (基因、染色体倍体检测), 蛋白 (肿瘤标示物、功能性蛋白) 及形态 (细胞大小、单细胞与癌栓等)。鉴于小细胞 CTC (Coumans et al. 2010 Annal Oncol 21:1851)、CTC 细胞团 (癌栓) 及肿瘤标示物在 CTC 上的非均一异质性表达具有特殊的临床意义, 有效的分离与鉴别手段是 CTC 检测与研究的必要前提。

如图所示, 对各种 CTC 检测方法的分类、比较已有很多报道, 在此不再赘述。差相富集 (Subtraction Enrichment, SE) 与 iFISH 的整合技术有效地解决了 CTC 检测过程中的“抓得着”与“看得见”两个重要难题, 适于不同瘤种、不同细胞大小及不同瘤标表达的来自于病人 (Ge et al. 2015 Oncotarget 6:27049) 或肿瘤动物模型体内的各种 CTC 检测 (图 5)。SE-iFISH 首次使人们可以对 CTC 的任意瘤标 (包括细胞膜、细胞浆及细胞核内的各种蛋白)

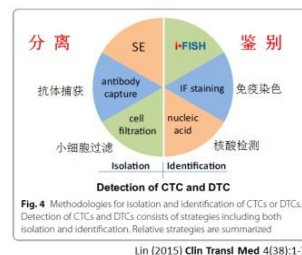
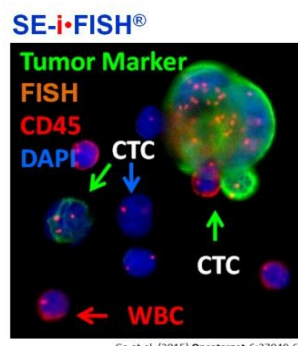


Fig. 4 Methodologies for isolation and identification of CTCs or DTCs. Detection of CTCs and DTCs consists of strategies including both isolation and identification. Relative strategies are summarized
Lin (2015) Clin Transl Med 4(38):1-7



Ge et al. (2015) Oncotarget 6:27049-64
图 5 CTC 检测各种方法及 SE-iFISH 技术

及染色体进行原位、同步检测, 并可对瘤标表达进行定量分析 (Li et al. 2014 *Oncotarget* 5:6594)。根据 CTC 染色体倍体及瘤标表达的不同, 可以对 CTC 进行分型, 以确定具有特殊临床意义 (如耐药、转移、复发等) 的 CTC 亚类细胞, 从而为后续 CTC 单细胞研究提供了明确的指导意义 (Lin 2015 *Clin Transl Med* 4:38)。

目前, 人们已开始注重通过多重复合手段从基因、蛋白及细胞形态三方面对 CTC 进行多位一体的同步研究, 以进一步观察、检测

CTC 细胞内的细胞生物学及功能方面的变化及临床意义。Barbazan 等人在这篇刚刚发表的文章中, 只是初步观察了 Calnuc 等 GEFs 的 mRNA 含量在 CTC 中的变化, 还没有深入到蛋白水平。虽只是冰山一角, 但可谓抛砖引玉。借助瘤标-iFISH 以及我们与 Carl Zeiss (蔡司) 及德国 MetaSystems 最近在全球共同联合开发的 iFISH-CTC 全自动显微扫描系统, 可以高通量地观测及定量分析 CTC 细胞内的各种瘤标或 GEF 蛋白含量及染色体倍体的变化, 从而为 CTC 研究提供更多更有价值的信息。