

NGS 溯源脑脊液中转移的实体瘤肿瘤细胞及指导体外个体化筛药

肿瘤患者颅内软脑膜转移 (leptomeningeal metastasis, LM) 具有极高的致死率及较短的生存时间 (约 10 个月)。针对 LM 患者的有效治疗需要基于灵敏、可靠的 LM 诊断及能够动态监测肿瘤进展、实时评估治疗效果的手段, 然而目前临床常规使用的金标准 - 普通细胞学检查, 因其敏感性较低且不适于动态监测, 早已不能满足临床迫切需求(Macket al., 2016 Cancer Treat Rev 43:83)。

最近, 从美国哈佛医学院归国的 Dr. P. Liu 教授率领的大连医科大学肿瘤干细胞研究所及药学院相关课题组, 与大连医大二附属医院肿瘤科、乳腺外科、赛特生物密切合作, 应用独特的 SE-iFISH 技术平台, 成功建立了一套完整的技术流程, 包括从患者脑脊液中富集、检测、培养原代肿瘤细胞, 并结合 NGS 二代测序检测培养的肿瘤细胞基因突变, 进行肿瘤细胞的溯源, 并指导体外个体化筛药, 从而为乳腺癌等多种肿瘤患者的精准治疗及相关科学研究的开展奠定了坚实基础。该研究成果已刚刚得到发表(Li et al., 2018 Oncotarget 9:2705)。

文章要点:

- 应用 SE-iFISH[®]有效富集、检测脑脊液中肿瘤细胞 (CSFTC)
- 体外培养原代肿瘤细胞
- 肿瘤细胞基因扩增、并应用 NGS 测序证实脑脊液中的肿瘤细胞来源于原发灶实体肿瘤
- NGS 检测培养的脑脊液中乳腺癌细胞的多重基因突变, 为肿瘤患者个体化临床筛药及精准治疗提供明确的指导意义
- 利用培养的原代肿瘤细胞建立体外个体化筛药体系

SE-iFISH[®]动态监测脑脊液中肿瘤细胞 (CSFTC) 的临床意义

SE-iFISH 动态监测肿瘤患者治疗前后 CSFTCs 变化与多项临床指标具有明显的相关性, 而利用医院常规细胞学方法检测出的 CSFTCs 阳

性率较低, 与其它临床检测指标无相关性。结果提示, 利用 SE-iFISH 检测脑脊液中的肿瘤细胞, 可有效评估、监测乳腺癌脑转移病人的病情进展及疗效 (图 1)。

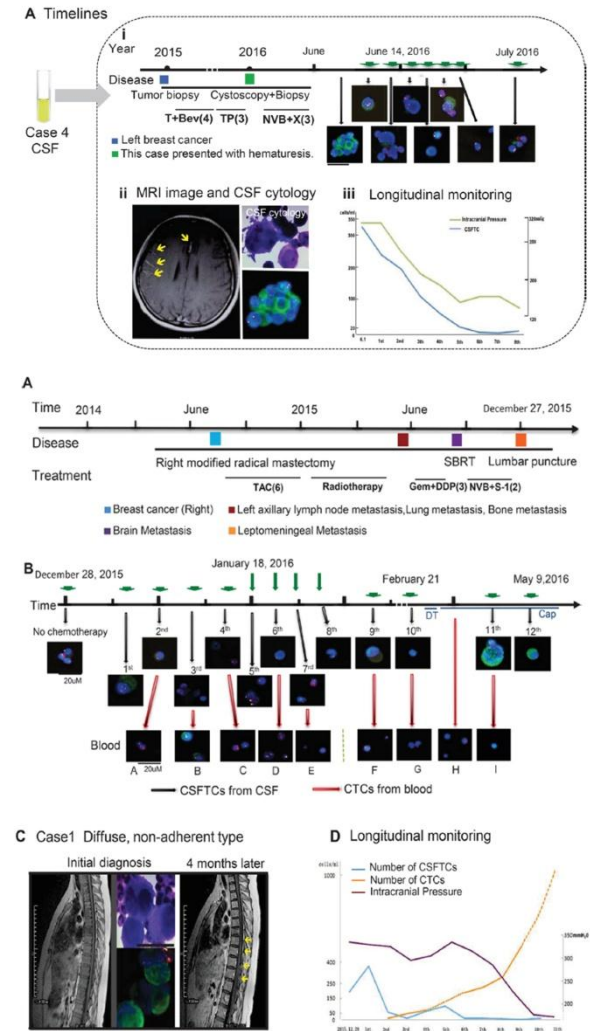


图 1 SE-iFISH 检测脑脊液中的肿瘤细胞

体外培养原代肿瘤细胞(Ex vivo culture)

为了维持原代肿瘤细胞的原始状态, 不进一步分化, 经差相富集 (subtraction enrichment, SE) 得到的肿瘤细胞, 悬浮培养于不含血清的培养基中 (Yu et al., 2014 Science 345:216), 细胞

可在 7 周内增殖，然而 90 天后逐渐老化、凋亡。但如果将这些培养的原代 CSFTCs 维持在富含血清的 3D 培养环境中，细胞可以不断增殖。需要特别指出的是，原代肿瘤细胞由无血清培养转为富含血清培养 2~3 周后，可观察到肿瘤细胞呈现明显不同的形态变化：成团或分化为小细胞 (≤ 5

微米白细胞)，而小细胞在肿瘤转移过程中的特殊意义此前已有报道(Wang et al., 2018 Cancer Lett 412:99 ; Chen et al., 2015 Cancer 121:3240)。扫描电镜显示，这些小细胞具有完整的亚细胞结构(图 2)。

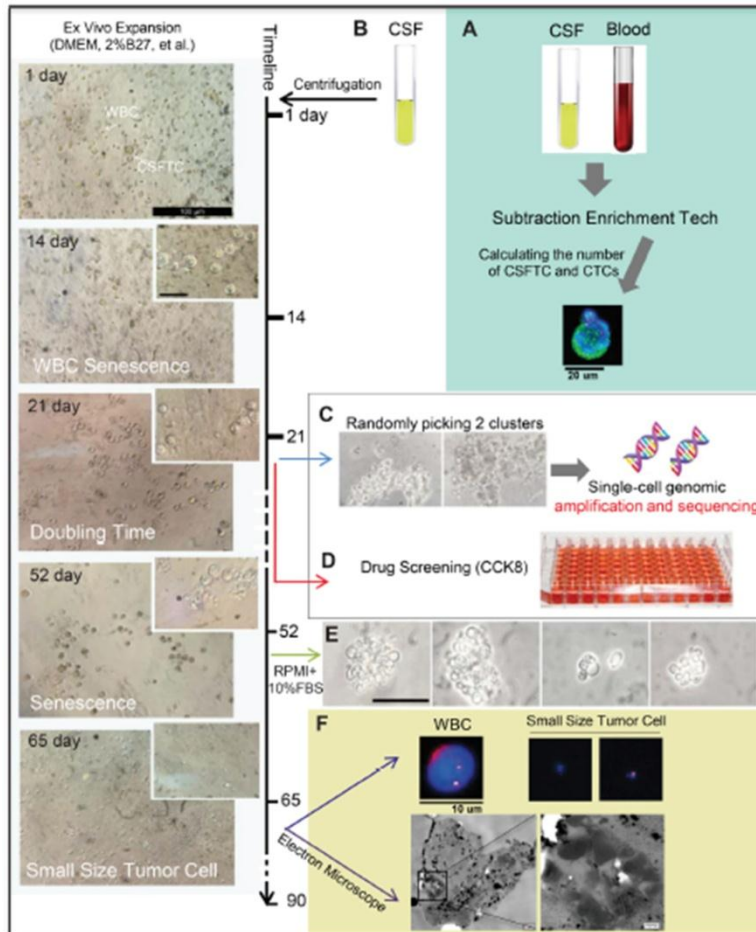


图 2 差相富集后肿瘤细胞原代培养

NGS 测序证实脑脊液中原代肿瘤细胞来源于原发灶实体肿瘤

应用 NGS 测序，比对原发灶乳腺癌与 CSFTCs 的基因突变结果(somatic mutations)，

发现 CSFTCs 与原发灶肿瘤细胞拥有相同 NOTCH2 和 MUTM2A 基因的错义(非同义)、单核苷酸突变(non-synonymous SNVs)或 TP53 SNV 突变，提示脑脊液中的 CSFTCs 来自原发灶实体肿瘤(图 3)。

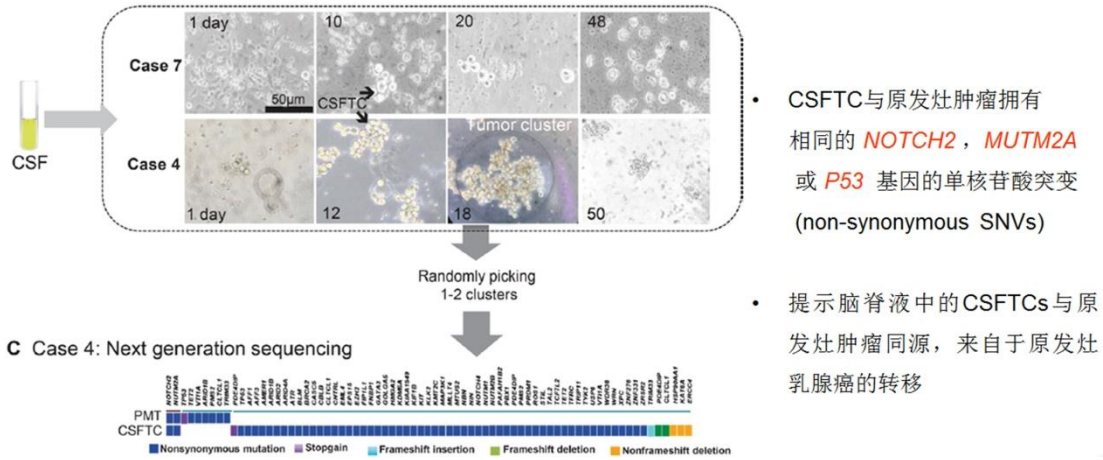


图3 NGS 测序证实脑脊液中肿瘤细胞来源于原发灶实体肿瘤

NGS 检测原代肿瘤细胞多重基因突变指导体外个体化筛药

NGS 测序结果显示，培养后的患者(NM01) CSFTCs 上携带多个适于治疗的靶向基因突变点，包括 CDK6 基因的点突变 (V77G)。有鉴于此，研究者对培养后的 CSFTCs 在体外同步筛选了 PARP 抑制剂(Olaparib)、PI3K 抑制剂 (BKM120)、

酪氨酸激酶抑制剂(lapatinib)、CDK4/6 抑制剂 (palbociclib) 及顺铂等一系列临床用药，以寻找、锁定对该患者肿瘤细胞最具杀伤效果的治疗药物 (图 4)。

NGS 测序：检测培养的个体化CSFTC基因突变，指导体外筛选临床用药

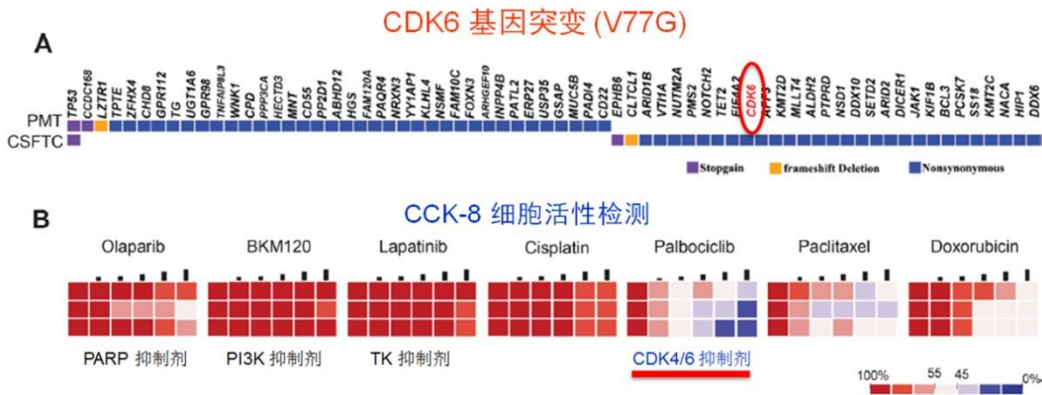


图4 NGS 检测原代肿瘤细胞多重基因突变指导体外个体化筛药

本实验中，采用 CCK-8 方法检测细胞活性用于药效评估。体外药敏实验结果显示，唯有 CDK4/6 抑制剂对该肿瘤患者的 CSFTCs 具有最佳的抗癌特性。

本研究成果及我们已发表的一系列 CTC 临床

应用与研究证实，赛特 SE-i-FISH®技术平台可以有效富集、检测及培养各种原代肿瘤细胞，培养后的肿瘤细胞可用于体外药物筛选、建立肿瘤模型，也可用于后续一系列功能检测、molecular profiling 等，从而为人们开展与肿瘤相关的早筛、防治与研究等提供可靠的技术保障。