

SE-i•FISH®检测人源转移肿瘤模型 (mPDX) CTC 的意义与应用



我们前段时间向大家介绍了目前国内有关人外周血 CTC 研究的各种技术手段，今天再接着向大家介绍肿瘤动物模型 CTC 研究的重要意义及应用，分享我们在人源肿瘤模型 (Patient Derived Xenograft, PDX) CTC 研究上取得的最新进展及成果。

目前国内外有关肿瘤病人体内 CTC 的研究进行得如火如荼。随着人们对 CTC 认识的不断加深，对于肿瘤动物模型 CTC 相关研究的关注度亦是与日俱增。以小鼠为主要代表的肿瘤动物模型的讨论已有很多报道(Couzin-Frankel, 2014, *Science* 346:24)，其中，直接构建于病人肿瘤组织的小鼠 PDX 模型已被公认为肿瘤研究的最佳动物模型。在前不久举行的美国 AACR-2015 大会上，PDX 模型的建立与应用已成为会议广泛讨论的议题之一。与经过多次传代、培养的肿瘤细胞系相比，PDX 模型与病人体内肿瘤的各种性状最为接近 (Tentler, et al., 2012, *Nat Rev Clin Oncol* 9:338)。自从英国 Caroline Dive 实验室去年利用小细胞肺癌 (SCLC) CTC 成功构建了肿瘤动物模型 CDX (CTC Derived Xenograft)，并发现 CDX 中的肿瘤细胞基因突变与供体病人体内的肿瘤细胞基因突变相一致后 (Hodgkinson, et al., 2014, *Nat Med* 20:897)，在 PDX 或 CDX 肿瘤模型上开展各种相关实验将成为今后肿瘤研究的主要方向

之一。

对于如何建立“人源肿瘤模型”(PDX)已有不少相关报道，但是怎样建立更具特殊意义的“人源转移肿瘤模型”(metastatic PDX, mPDX)则一直是困扰人们的重要难题，且在建立的 mPDX 模型上开展 CTC 方面的研究，以前鲜有报道。究其原因，主要是因为以往既难以建立真正的 mPDX 模型，同时也没有任何技术手段能在小鼠微量血样内有效地检测出 CTC、及动态监测 CTC 的数目变化。可谓“巧妇难为无米之炊”，所以人们自然也就一直无法“品尝、享用”mPDX-CTC 的“大餐”啦。

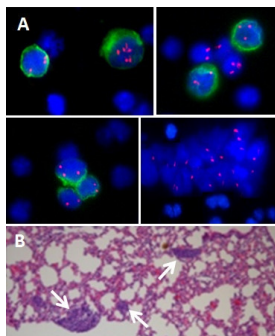
近期，美国 Cytelligen (赛特生物) 与国际著名的 PDX 公司 Crown Bioscience (冠科生物) 联合开展的大规模科学研究在全球率先成功解决了上述技术难题。利用冠科生物构建的胃癌肺转移 HuPrime®mPDX 模型，我们使用 SE-i•FISH®技术手段成功地对 mPDX 小鼠体内的 CTC 进行了有效检测与连续监测，并精准锁定出对化疗药物顺铂敏感与耐受的 CTC 亚类细胞，从而为后续开展的 CTC 单细胞研究奠定了坚实基础，也为人们今后开展类似研究提供了有效依据与平台。这一重要科研成果已在 *Oncotarget* 上发表 (Jiang, et al., *Oncotarget* 2015, 6:15639-15651)，该项成果与我们和北京大学肿瘤医

院使用 SE-iFISH®技术，在胃癌病人体内首次成功检测出对顺铂具有内源性或继发性耐药的 CTC 亚类细胞的报道相吻合 (Li, et al., Oncotarget 2014, 5:6594-6602)。

鉴于肿瘤细胞及 CTC 内真正起决定性生物学作用的是相关蛋白质，iFISH®技术在 CTC 检测过程中，同时兼顾了对某一肿瘤标示物蛋白（如 CK 等）的表型分析与染色体倍体 FISH 核型分析(*in situ* phenotyping and karyotyping CTC, *in situ* PK CTC)，从而使人们首次在同一 CTC 上原位进行染色体数目与肿瘤标示物蛋白表达分析（如 EpCAM, Gires and Stoecklein, Cell. Mol. Life Sci. 2014, 71:4393），这种新颖的联合检测可以使人们在 CTC 研究上获得更多重要的信息。有关 CK18 作为生物学标示物，其在肿瘤的进展、转移与复发中的特殊作用，我们今后再向大家详细介绍。国际顶级期刊“科学”杂志已将独特的 SE-iFISH®新技术向全球读者进行了报道(Science 2013, 341:415)，该技术目前已被用于 CTC 相关的多项研究。

下面我们把实验成果中的部分要点与经验同大家分享一下。在本实验中，mPDX 模型小鼠分为给药组与对照组，在 76 天的实验过程中，给药组分别接受 5 次化疗药物顺铂的注射，对肿瘤肺转移的小鼠，在整个实验结束后的当天进行解剖与病理检查。我们利用 SE-iFISH®技术对所有小鼠 CTC 进行连续监测（每次每只取血 200 微升，共 9 次），从而可以准确地评估顺铂疗效，并精确锁定对顺铂敏感或耐受的 CTC 亚类细胞。

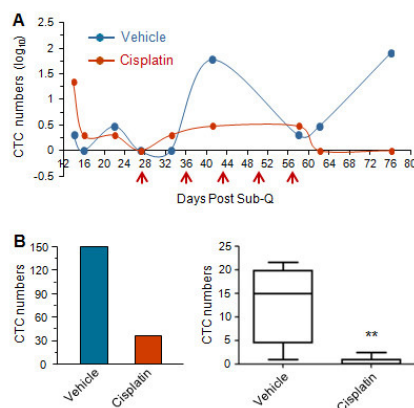
1. CTC 与肿瘤转移灶的影像学检测



(A) SE-iFISH®可以有效富集与检测出 mPDX 小鼠体内各种大小的 CTC（小可至白细胞大小）、CK18 表达不同的 CTC，以及 CTC 细胞团（癌栓、CTM）；

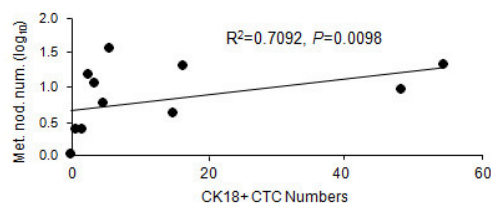
(B) mPDX 小鼠的肿瘤肺转移灶清晰可见。

2. CTC 数目连续监测动态分布图



我们对所有小鼠每次给药前、后的不同时间段进行了 CTC 监测，以实时检测对药物敏感或耐药的 CTC 的消亡或存活时间，从而确定 CTC 亚类的临床意义。给药组的 mPDX 小鼠 CTC 数量明显低于对照组（vehicle）。对照组的 CTC 数目以波浪形式显现。

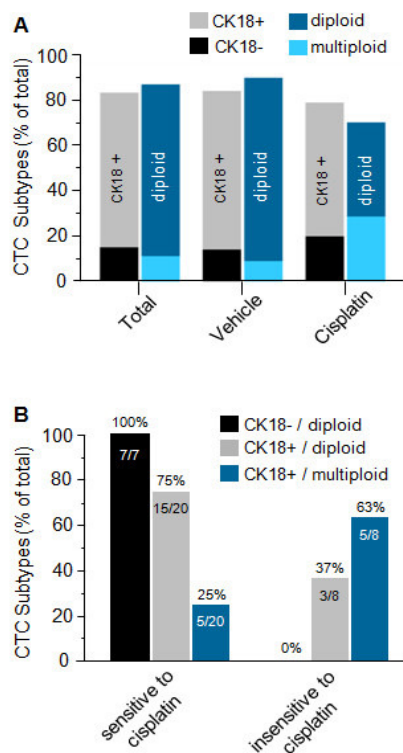
3. CTC 数量与转移灶数目的相关性



进一步的生物统计学分析显示，CTC 数目与传统的病理解剖检测到的肺部肿瘤转移灶数目具有很好的相关性。

4. 具有不同临床与生物学意义的 CTC 亚类细胞

利用独特的 SE-iFISH® 技术手段，我们对每一个 CTC 同位进行了 CK18 表达的表型分析与 8 号染色体数目变化的核型分析 (*in situ* PK CTC) (图 A、B)。



(图 A) 对照组与给药组 mPDX CTC 中的 CK18 表达及不同 8 号染色体数目的分析结果，CK18+ CTC 可高达 84%；

(图 B) 对给药组小鼠体内检测到的对化疗敏感与耐受的 CTC 亚类细胞的分析结果，各种 CTC 亚类细胞的存在比例如图所示。

通过本研究，我们发现几个非常值得人们关注的地方：

1) 供体 (donor) 病人为 TNM II 期，并没有

发现肿瘤转移，然而由其构建的 PDX 却为转移模型，且富含大量 CK18+ CTC，这就提示我们用 iFISH® 首先在供体病人体内检测 CK18+ 及相关特定 8 号染色体拷贝数的 CTC (而非 TNM 分期)，有可能是构建 mPDX 的有效预测指标 (predictor)。

2) CTC 作为疗效评估指标 (indicator)，与传统的对解剖小鼠肿瘤转移灶计数相结合，可以有效评估化疗药物对肿瘤转移的抑制作用。

3) CTC 亚类用于疗效评估的独特优势：根据对比给药组与对照组，以及给药组中注射顺铂后每种 CTC 亚类细胞的有无或存活长短，通过 iFISH® 进行 *in situ* PK CTC 分析，便可准确锁定对药物有着不同敏感性以及耐药性的 CTC 亚类细胞。以本研究为例，通过实时监测发现，给药组中对顺铂不敏感的 CTC，有些甚至可以在给药 5 周后依然检测到。利用上面的分析方法，不难精确找出对顺铂耐药的 CTC 亚类细胞，从而为后续开展相关的 CTC 单细胞研究提供了更加明确的指导对象。

4) 本研究我们使用了 CK-iFISH® 对 CTC 亚类细胞进行了有效检测 (detection) 与实时监测 (monitoring)。鉴于 PDX 模型与病人肿瘤的高度一致性，本文中的实验方法亦可用于肿瘤病人的相关研究。在实验过程中，人们可根据实验目的以及瘤种的不同，同步观测其他重要标示物的蛋白表达及染色体倍体变化的重要临床意义，如 EpCAM, CD133 或 CD44-iFISH® 等。

以上是我们取得的一些经验与成果，希望能够给大家在 CTC 研究上带来一些启发，同时也希望利用我们的技术优势能够给大家带来一些帮助。我们相信并预祝各位同行在此领域能够取得更多、更好的研究成果！