

· 国外医学报道 ·

循环乳腺癌细胞体外培养技术应用于 药物敏感性的个体化检测

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)零星地存在于实体瘤患者的外周血中。加强对 CTC 分离、体外培养以及鉴定技术的研究,可能有助于对肿瘤中新发突变进行鉴定,从而实现对患者药物敏感性变化的无创性监测。Yu 等从 6 例 ER 阳性乳腺癌患者外周血中成功分离出 CTC 并建立了 CTC 细胞系。对 5 种 CTC 细胞系进行测试,其中 3 个可使小鼠成瘤。对 CTC 细胞系进行基因测序,除了检测到原位癌中存在的 PIK3CA 基因突变,还在基因 ESR1、PIK3CA 和 FGFR2 中发现了新获得的突变。对这些携带多个突变位点的 CTC 细胞系进行药物敏感实验,发现了一些潜在的新的治疗靶标。该研究发表在 Science 2014 年第 6193 期 216~220 页。

分离活的 CTC 难度非常大。大部分的方法只能获取少量不够纯的 CTC,且在分离前就被固定,或在纯化过程中被破坏,或不可逆的被固定在黏附基质上。Yu 等前期报道了一种可以有效排除正常血液细胞而剩下未经处理的 CTC 微流体技术(CTC-iChip)。该平台分离的 CTC 细胞外形、染色特点以及 RNA 完整性提示其可能是活的细胞。为了考察这些细胞是否真的存活,研究者用 CTC-iChip 技术来分离 ER 阳性的转移性乳腺癌患者的血样,发现在无血清培养基中添加表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF),并在低氧环境培养(4% O₂),可以使 CTC 以球状良好扩增。非贴附的培养条件至关重要,因为 CTC 在黏附的单层细胞培养中,发生数次分裂后就衰老了。研究者从 6 例 Luminal 亚型转移性乳腺癌患者体内分离了 CTC 并进行了长期的单克隆培养(体外存活超过 6 个月)。只有在治疗期病情继续发展的患者中才成功地进行了 CTC 培养。

培养出的 CTC 与 CTC-iChip 捕获的原代 CTC 细胞外形相近,且符合标准的 CTC 定义,其表皮细胞角蛋白染色阳性(>95%),CD45 阴性。CTC 细胞系的增殖指数约为 30%,如同 Ki67 指数为

28.1%(范围 24%~32%),而 CTC 最初的倍增时间从 3 d 至 3 周不等。6 例原发癌都是 ER 阳性,其中 5 例在培养成细胞系的过程中保持 ER 阳性(在>10%的细胞中),1 例(病例编号:BRx-07)失去此特性。

研究者采用单细胞测序技术对每个细胞系都进行了 RNA 测序,并与 10 例患者的 29 种未培养的单个 CTC 以及 13 种已建立的常用乳腺癌细胞系进行比较。CTC 细胞系被归为一类,而与乳腺癌细胞系或者未培养的单个 CTC 区分开来。与未培养的单个 CTC 相比,CTC 细胞系和已建立的乳腺癌细胞系都具有更多的增殖特点。与已建立的乳腺癌细胞系相比,在 CTC 细胞系中已知信号通路(包括干细胞相关特性通路)的标志物表达并未升高。

研究者观察了 CTC 细胞系的成瘤性。在检测的 5 种细胞系中,3 种(病例编号:BRx-07、BRx-68、BRx-61)在 3 个月内成瘤。新形成的肿瘤与原发灶的组织特性和免疫组织化学特性相同,BRx-07 还重新获得了 ER 表达特性。

所有 6 例患者在分离 CTC 之前都接受了化疗及其他治疗。原发肿瘤标本(病例编号:BRx-68、BRx-42)或治疗前的转移癌(病例编号:BRx-33、BRx-07、BRx-50、BRx-61)在之前已进行了 25 个基因约 140 个突变点的检测。其中 2 例(病例编号:BRx-68、BRx-42)检出了 PIK3CA(H1047R、G1049R)的点突变,另外 4 例未检出突变。CTC 细胞系的可用性使研究者有可能从更多纯化的肿瘤细胞群进行全面的基因突变分析。对 CTC 细胞系进行基因突变筛查,采用二代测序技术检测了 1000 个已注释的基因。二代测序在两种 CTC 细胞系(BRx-68、BRx-42)中验证了前期在原发肿瘤中发现的 PIK3CA 基因突变,而且在其他多个肿瘤相关基因中也发现了突变。研究者还分析了这些突变不是在体外建立 CTC 细胞系时获得的。

ESR1 基因的激活突变于 1997 年被发现,在原发性乳腺癌中比较罕见。多个研究小组报道在芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitors, AIs)治疗的患者中其突变频率达到 18%~54%,该药抑制雌

激素合成,因此可能促进配体非依赖性的 ER 突变。研究者也在 6 个细胞系中的 3 个检测到了 ESR1 突变(BRx-33、BRx-68、BRx-50)。这几例患者都接受了 AIs 的延续治疗,而对其原发癌和治疗前转移癌的检测却没有发现 ESR1 突变。鉴定出的其他突变还包括 PIK3CA、TP53、KRAS 和 FGFR2 中的新发突变。在 BRx-07 细胞系中,也发现了与其小叶型特点相符的 CDH1 突变,还发现了与肿瘤亚群相关的罕见突变位点。一个 ESR1 突变在 BRx-50 中等位基因频率最初只有 6%,但经过低雌激素培养基的长期培养后上升到 49%,提示携带该突变的细胞在此条件下具有某种增殖优势。值得注意的是,6 例中有 3 例在进展过程中出现了被认为很少出现在 Luminal 型原发性乳腺癌中的 TP53 突变。

研究者接下来检测了 CTC 细胞系对药物及药物组合的敏感性,包括标准临床用药和针对特定突变的实验室制剂。CTC 药物敏感性测试对于临床病史和患者治疗选择采用了盲法,但 CTC 药物敏感性检测的部分结果与临床病史相符。研究者选取了两种在 CTC 中发现而在原位癌中未发现的突变药物靶标进行更深入的分析,分别是 ESR1 和 PIK3CA 突变,并分析药物组合的效果。ESR1 中的三个新发突变影响了 ER 配体结合区域相邻的三个残基,在单克隆 CTC 细胞系中以不同的等位基因频率存在。其中最常见 ESR1 突变(Y537S)在 BRx-68 细胞中被发现(等位基因频率 47%),D538G 和 L536P 的等位基因频率则分别为 24% 和 6%。每个突变都伴有各自不同的其他突变。值得注意的是,ESR1 突变阳性的 CTC 细胞系在培养时都保持了 ER 表达。

哪种治疗适合 ER 阳性伴 ESR1 突变的乳腺癌患者目前尚不清楚。与前人建立的模型一样,研究者发现选择性 ER 调节剂他莫昔芬(tamoxifen)和雷洛昔芬(raloxifene)以及选择性 ER 降解剂氟维司群(fulvestrant)对 BRx-68 细胞无效,无论是单独给药还是按临床做法与 PI3K-mTOR 通路抑制剂依维莫司(everolimus)合用。但是,HSP90 抑制剂 STA9090 单独给药或者与 raloxifene 及 fulvestrant 合用均显示出细胞毒性。ER 是 HSP90 的宿主蛋白(client protein),突变后的受体稳定性高度依赖于这个分子伴侣。事实上,用小剂量 STA9090(32 nmol/L)就能抑制 BRx-68 细胞中的 ER 水平,但对携带野生型 ER

的 MCF-7 乳腺癌细胞或 BRx-50 细胞(其 ESR1 突变与 HSP90 抑制剂敏感性无关)却无效。

BRx-07 同时携带 PIK3CA 和 FGFR2 的激活突变。根据其等位基因频率,PIK3CA 在所有细胞中是纯合子突变,而 FGFR2 突变则为杂合子。培养的 CTC 对 PIK3CA 抑制剂 BYL719 和 FGFR2 抑制剂 AZD4547 高度敏感,对 FGFR1 抑制剂 PD173074 中度敏感。对 PIK3CA 和 FGFR2 的联合抑制显示出联合效应,提示两者都在肿瘤中扮演了获得性肿瘤启动因素的作用。研究者又进一步在乳腺癌细胞系中开展试验,在 7 种 PIK3CA 突变乳腺癌细胞系中,6 种对 BYL719 有反应。除了 PIK3CA 的突变,其中两个细胞系还携带有重要性未知的 FGFR4 突变(Y367CMDA-MB-453 细胞)和 FGFR2 突变(K570EEFM-19 细胞)。在前者中 BYL719 和 AZD4547 具有联合效应,而后者对 FGFR 抑制剂不敏感。5 种不带有 FGFR 突变的 PIK3CA 突变细胞系中,1 种对 AZD4547 中度敏感(细胞系 CAL51),其余皆耐药。

联合应用 PIK3CA 靶标试剂的筛查试验还发现了 IGF1R 抑制剂(OSI906、BMS754807)和 HSP90 抑制剂(STA9090、Ganetespib)的作用。研究者进一步开展了对小鼠植入肿瘤的药物敏感性研究,用 BRx-07 细胞使动物成瘤并用 BYL719、AZD4547 单独或联合处理,或用溶剂对照处理。单独给药可抑制肿瘤,而联合给药则可完全消除肿瘤生长。

对乳腺癌患者的 CTC 进行培养是研究药物敏感性的好途径。这种无创、可重复的肿瘤活细胞分析技术有助于对携带不同突变和药物敏感特性的亚克隆进行监测。培养的 CTC 呈非贴壁的球形,这与上皮性肿瘤细胞培养物有所不同,可能反映了其脱离基底膜附着,在血流中保持存活时的某些内在特点。在本技术应用于临床之前,还有许多工作要做,例如需 CTC 培养条件进行优化等。在未来,本文所述的策略可能成为肿瘤“精准治疗”的关键要素。

【关键词】 循环肿瘤细胞; 体外培养; 药物敏感性; 个体化检测

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

(阎文婷 摘译 刘军兰 姜军 审校)

(收稿日期:2015-01-13)

(本文编辑:宗贝歌 刘军兰)