

• 综述 •

激光捕获显微切割技术在癌症中的应用

郑睿

(安徽理工大学, 安徽 合肥)

摘要: 分子谱分析对生物医学研究和疾病管理产生了深远的影响。激光捕获显微切割技术 (LCM) 可辅助科研人员对疾病的分子谱分析, 能够探测特定细胞群的遗传学、生理学、解剖学特征和功能。利用 LCM 我们可以整理正常细胞群、癌前细胞群和恶性细胞群之间的遗传、表观遗传学和基因表达差异, 它对特定细胞群的选择性有望大大改善许多人类疾病的诊断和管理。LCM 在癌症研究中得到了广泛的应用, 通过突变检测、克隆分析、表观遗传改变评估、基因表达谱、蛋白质组学和代谢组学, 使我们对肿瘤生物学有更深刻的认识。在本综述中, 我们将着重介绍 LCM 在生物标志物、基因表达谱、癌症的化学预防以及诊断中的应用。这些分析可用于临床癌症诊断、临床管理、基因组谱研究和靶向治疗。

关键词: 激光捕获显微切割; 癌症; 生物标志物; 诊断与预防

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.16.063

本文引用格式: 郑睿. 激光捕获显微切割技术在癌症中的应用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(16): 124-125.

0 引言

若要分析正常发育和病变组织进展中的关键基因表达和蛋白模式, 我们需要先从复杂的组织环境中对微观均质细胞亚群进行解剖和提取, 然后将此亚群与同一组织中相邻的、相互作用的、但不同的细胞亚群进行比较。从异质性组织中获得纯细胞群体的方法, 如果要进行定量分析, 特别是基于 PCR、逆转录酶 PCR 或酶功能的灵敏扩增方法, 应充分保留细胞分子的状态^[1]。LCM 是一种直接在显微镜下观察组织细胞亚群的方法, 可以直接获取感兴趣的细胞, 也可以通过切割不需要的细胞来分离特定的细胞, 从而获得组织学上纯富集的细胞群。LCM 在下游分析的应用是极其普遍的, 例如 DNA 基因分型和杂合性缺失分析、RNA 转录谱分析、cDNA 文库生成、蛋白质组学发现和信号通路分析。因此, 利用 LCM 可以简便地从复杂组织中获得同源细胞群, 使病理分子分析方法难度明显降低。LCM 的发展使研究人员能够从单个患者的组织中确定特定的基因表达模式。在 cDNA 芯片上, 可以获得纯细胞群, 进行基因杂交, 最终获得鉴定个体化病理分子基因表达谱。研究人员使用这类多因素分析将基因表达谱与病因学和临床治疗效果联系起来^[2]。

1 应用多样性

LCM 适用于组织的分子图谱分析, 使细胞分子特征与特定细胞群体存在相关性, 允许组织微环境中细胞元素具有可比性。LCM 的应用包括肿瘤微环境相互作用的评价、植物和细胞生物学, 近年来还广泛应用于精子发生的基因印迹和 DNA 甲基化研究。DNA、RNA 或蛋白质分析可与微解剖组织以任何方法进行, 具有足够的敏感性。例如, 从细胞中提取 DNA 通过这种技术可以用于杂合性缺失分析、DNA 甲基化分析、基因表达分析; 从显微切割的细胞中提取的蛋白质可用于反相蛋白微阵列、二维凝胶电泳、免疫印迹和质谱分析^[3]。LCM 技术还涉及微生物学研究领域, 数据显示其可辅助研究动植物宿主-微生物相互作用、生物膜内细菌、鉴定未培养细菌和分析单原核细胞^[4]。接下来我们主要从生物标志物、基因表达谱、癌症的化学预防以及诊断等方面展开讨论。

2 利用 LCM 发现生物标志物

Arion 等将 LCM 与 DNA 转录组图谱相结合, 识别人新皮层舌上和舌下细胞层差异表达的基因在 69 个差异表达基因中, 有 6 个基因对神经元分布具有特异性, 这些遗传差异有助于我们对大脑皮层区域结构和功能的认识。^[5]在脑生物标志物研究中, Demuth 等人利用 LCM 和全基因组表达微阵列技术, 通过 3D 肿瘤球侵袭实验获得相对稳定的同源侵袭性胶质瘤细胞转录组, 发现 MKK3 是胶质瘤中 p38 的关键激活因子, 进一步证明 p38 抑制剂可干扰 MKK3 信号通路, 进而增加胶质瘤对化疗的易感性^[6]。Buckanovich 团队采用免疫组化引导的 LCM 和全基因组转录谱技术, 对肿瘤血管细胞的分子分析, 鉴定人上皮性卵巢癌血管细胞与健康卵巢间差异表达基因, 发现不同于正常卵巢和其他肿瘤的肿瘤血管细胞图谱。首次鉴定卵巢肿瘤血管的分子结构并证明肿瘤血管标志物可作为卵巢癌和多种实体肿瘤的潜在生物标志物和分子靶点^[7]。鼻窦黏膜黑色素瘤 (SMM) 是一种罕见但极具侵袭性

的疾病, 转移性 SMM 缺乏生物标志物。Zou B 等人采用 LCM 结合 microRNA 芯片和 Q-PCR 等实验技术, 对 SMM 患者的组织标本展开实验并进行随访研究后发现 miR-4633-5p 可作为转移性 SMM 的预测生物标志物和负向调节黑色素瘤细胞侵袭性生长的关键肿瘤抑制因子。定量检测 miR-4633-5p 可以诊断预测 SMM 患者的转移风险, 进而可能促使治疗更加个性化, 预后更佳^[8]。

3 基因表达谱的分析

微阵列相当于一个芯片上的多通路传输的实验室。它是固体基质上的二维阵列, 使用高通量筛选、微型化、多路复用和并行处理和检测方法对大量生物材料进行分析。Oku 团队采用 LCM 结合 cDNA 芯片分析和探讨两种结直肠癌表面病变及侵袭情况后发现了与结直肠癌侵袭前的去分化相关的转化生长因子- β 、Wnt 和 Hedgehog 信号通路中的 8 个基因构建的分子机制^[9]。也有研究者利用 LCM 对高度发育不良/非发育不良的巴雷特氏食管 (BE) 上皮细胞进行基因芯片分析, 确定了两组标本的差异性转录组, 鉴定出数个与 BE 发育不良发病机制相关的基因以及有待进一步研究的新候选基因^[10]。几项基于微阵列的研究结果表明, DSG3 基因在肺鳞癌中表达上调。因此研究者采用来自肺鳞癌、肺腺癌的大体积 LCM 芯片数据对 DSG3 的 mRNA 表达进行检测。在同一组芯片数据中比较 DSG3 与其他鳞状细胞分化的标志物 p63、CK5 和 CK6 的表达水平, 进行免疫组化实验后发现 DSG3 在鳞癌中过表达, 但在腺癌和非肿瘤性肺中表达受限。最终证明 DSG3 可作为有效的辅助检查标志物, 将鳞癌与其他亚型肺癌区分开^[11]。Kosari 等人利用 LCM 技术在 100 多个非肿瘤性前列腺上皮; Gleason 3、4、5 级前列腺癌和淋巴结转移性前列腺癌标本挖掘异常高表达基因。在病例对照研究中, 他们找出与侵袭性前列腺癌表型相关和与增殖相关的基因, 如 SSTR1 和 TOP2A, 这些基因为临床治疗措施提供附加信息, 可以改善前列腺癌的预后^[12]。LCM 和 cDNA 微阵列的联合应用为阐明肿瘤恶性进展和表型相关的分子事件提供了强有力的证明, 这些信息有助于科研人员设计化学预防、筛选和肿瘤治疗试验。

4 癌症的化学预防

癌症的化学预防是 LCM 技术的一个潜在应用。为了在化学预防试验中发挥作用, 替代性终点标记物必须在化疗或化学保护干预后显示出调节作用。这些生物标志物用于选择高危患者进行癌症监测, 并评估化学预防制剂的疗效。然而, 表型生物标志物并非不能长久可靠地评价化疗预防作用。微卫星不稳定性被认为是遗传性非息肉性结直肠癌的重要特征, 在小细胞肺癌中发现的遗传不稳定性, 促使 Mao 等人开始研究其他肿瘤中可能存在的微卫星改变。他们利用微卫星改变作为标记, 对病理样本中克隆肿瘤来源细胞群的可能性进行检测后发现, 微卫星位点在许多恶性肿瘤中经常发生改变, 可作为检测肿瘤的克隆标记^[13]。

因此, 毗邻替代性终点标记物的正常上皮细胞的基因型变化也应该归类为基因变化。在缺乏分子数据以加强组织学缓解的情况下, 许多高危患者可能会过早终止化疗预防和干预。在此背景下, LCM 技术有助于鉴别侵袭前病变中可逆分子事件, 这是监测化疗预防干预效果所必需。从靶细胞群体中获得高质量 RNA 是

基因表达分析的基础。然而,细胞异质性的存在增加了系统的污染物,降低了肿瘤特异性基因的表达^[14]。

5 癌症的诊断与预防

肿瘤的基因突变与肿瘤的复发、进展、治疗反应和临床结果有关。缺乏纯细胞群往往是临床应用突变分析的障碍,找到有效的突变检测是病理学专家正在攻克的难题。肝局灶性结节性增生的生物学特性尚未明确,Zheng 等人借助 LCM 技术分析 15 例女性患者局灶性结节性增生的临床资料。在 13 例资料女性病例中,有 4 例表现出 x 染色体失活的非随机模式,与单克隆起源一致。所有局灶性结节性增生病例均未检测到 TP53 突变。数据显示相当一部分局灶性结节性增生病例为单克隆起源,提示其为肿瘤而非反应性的^[15]。通常,上皮成分只占整个前列腺的 10%。前列腺癌通常以浸润的方式生长,个别肿瘤腺泡浸润间质,直接侵犯相邻的良性前列腺。在确保无恶性细胞污染的情况下,利用 LCM 识别癌细胞的分子突变。对循环肿瘤细胞(CTC)进行蛋白组学分析为疾病进展和 CTC 在癌症转移中的意义提供重要见解。Zhu Y 等人通过免疫密度梯度离心法分析从全血中富集的 CTC 整体蛋白表达谱,采用 LCM 技术对富集的 CTC 加以纯化和收集,然后利用基于纳米滴的平台进行加工、制备和分析。对一组前列腺癌特异性蛋白进行识别和定量分析,用于区分特定的 CTC 和白细胞^[16]。

6 总结

目前 LCM 技术的分辨率仍处于单细胞水平,未来的技术将支持细胞器和亚细胞结构的显微切割。下一个前沿将是活体组织激光显微解剖。活体组织显微切割为研究正常干细胞、肿瘤干细胞、胚胎或发育中的组织相互作用的细胞群的分子特性提供了新途径。

参考文献

- [1] Espina V, Heiby M, Pierobon M, et al. Laser capture microdissection technology[J]. *Expert Rev Mol Diagn*,2007,7(5): 647-57.
- [2] Benoyahu D, Akavia UD, Socher R, Shur I. Gene expression in skeletal tissues: application of laser capture microdissection[J]. *J Microsc*,2005,220(Pt 1): 1-8.
- [3] Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, et al. Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA

libraries[J]. *Oral Oncol*,2000,36(5): 474-83.

- [4] Podgorny OV, Lazarev VN. Laser microdissection: A promising tool for exploring microorganisms and their interactions with hosts[J]. *J Microbiol Methods*,2017,138: 82-92.
- [5] Arion D, Unger T, Lewis DA, Mirnics K. Molecular markers distinguishing supragranular and infragranular layers in the human prefrontal cortex[J]. *Eur J Neurosci*,2007,25(6): 1843-54.
- [6] Demuth T, Reavie LB, Rennert JL, et al. MAP-kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007,6(4): 1212-22.
- [7] Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, et al. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*,2007,25(7): 852-61.
- [8] Zou B, Zhu W, Liu H, Wang S, Zhu H. Identification and Functional Evaluation of miR-4633-5p as a Biomarker and Tumor Suppressor in Metastatic Melanoma[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,49(4): 1364-1379.
- [9] Oku Y, Shimoji T, Takifuji K, et al. Identification of the molecular mechanisms for dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by a gene expression analysis[J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(22): 7215-22.
- [10] Sabo E, Meitner PA, Tavares R, et al. Expression analysis of Barrett's esophagus-associated high-grade dysplasia in laser capture microdissected archival tissue[J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(20): 6440-8.
- [11] Savci-Heijink CD, Kosari F, Aubry MC, et al. The role of desmoglein-3 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Am J Pathol*,2009,174(5): 1629-37.
- [12] Kosari F, Munz JM, Savci-Heijink CD, et al. Identification of prognostic biomarkers for prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(6): 1734-43.
- [13] Mao L, Lee DJ, Tockman MS, et al. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1994,91(21): 9871-5.
- [14] Maitra A, Gazdar AF. Tissue microdissection and processing[J]. *Cancer Treat Res*, 2001,106: 63-84.
- [15] Zheng S, Cummings OW, Saxena R, et al. Clonality and TP53 mutation analysis of focal nodular hyperplasia of the liver[J]. *Am J Clin Pathol*, 2010,134(1): 65-70.
- [16] Zhu Y, Podolak J, Zhao R, et al. Proteome Profiling of 1 to 5 Spiked Circulating Tumor Cells Isolated from Whole Blood Using Immunodensity Enrichment, Laser Capture Microdissection, Nanodroplet Sample Processing, and Ultrasensitive nanoLC-MS[J]. *Anal Chem*,2018,90(20): 11756-11759.

(上接第 123 页)

沙必利分散片同上治疗 21 例;C 组给予铝镁加混悬液 + 莫沙必利分散片同上治疗 19 例。其中总有效率分别为 92.86%、80.95%、78.95%,各组经统计学处理, A 组总有效率优于 B 组、C 组总有效率($P < 0.05$), B 组与 C 组之间无明显差异($P < 0.05$)。结果清肝健脾方能够有效的缓解 Barrett 食管相关症状,逐步修复受损黏膜,并能降低磷酸化的 p38MAPK 蛋白和 Cdx2 表达。郭文洁^[13]等使用补清养胃汤治疗 Barrett 食管(脾虚胃热型,补气养阴,清热化淤) 4 例约一年后复查胃镜见 BE 消失。曹景龙^[4]总结治疗 BE 的单方验方:(1)取老牛涎沫,如枣核大,置水中饮之。(2)杵头上糠,细末蜜丸,弹子大,非时含一丸,咽津。(3)黑驴尿一盅,服之。亦有记载服白马尿者。(4)干柿饼连蒂捣为细末,酒调服。(5)魏灵丹:阿魏、五灵脂等分为末,狗胆汁和为丸,如绿豆大,白滚汤或姜汤下。但治疗疗效不明确。

5 总结

目前对于中医治疗 BE 的研究多是单方验方研究,对于其作用机制的研究尚少,且总的样本量及研究方向不多,在以后的研究中建议增大样本量,探索更多研究方向及有效方法。

参考文献

- [1] 中华医学会消化病学分会.Barrett 食管诊治共识(2011 修订版,重庆)[S].

中华消化内镜杂志,2011,28(8):421-422.

- [2] 张军.Barrett 食管和腺癌[J]. 中华消化内镜杂志,2011,28(8):431-432.
- [3] 吴东南,范世平,肖政,等. 饶振芳运用半夏泻心汤加味治疗 Barrett 食管经验[J].2016,38(6):25-26.
- [4] 曹景龙.Barrett 食管可从噎证论治[J]. 吉林中医药,2004,24(12):37.
- [5] 刘刚,陈宝财,康玉杰,等. 苓桂半夏汤加味治疗无反流症状 Barrett 食管临床观察[J]. 河南中医,2017,37(9):1637-1639.
- [6] 沈建冲,朱曙东,叶淑云.Barrett 食管的辨证论治探讨[J]. 新中医,2013,45(3):12-14.
- [7] 祁友松,邢燕玲. 试探 Barrett 食管的中医病机及辨治王施台台[J]. 中医临床研究,2014,6(23):32-33.
- [8] 朱建江.Barrett 食管辨治三法[J]. 浙江中医杂志,2013,48(1):24-25.
- [9] 齐红军. 浅探 Barrett 食管的中医病因病机及治则治法[J]. 上海中医药杂志,2008,42(8):27-28.
- [10] 彭卓嵩.Barrett 食管从肝论治[J]. 云南中医中药杂志,2012,33(1):10-11.
- [11] 李翌萌,阎超,白长川. 白长川谈中医药治疗 Barrett 食管[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(8):1063-1066.
- [12] 王俊,孙懿,黄雅慧,等. 清肝健脾方治疗 Barrett 食管临床疗效及其对 Cdx2 和 p38MAPK 的表达影响[J]. 中华中医药学刊,2016,34(2):496-498.
- [13] 郭文洁,赵志华,艾茜,等. 补清养胃汤治疗 Barrett 食管 4 例[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(25):2804-2805.