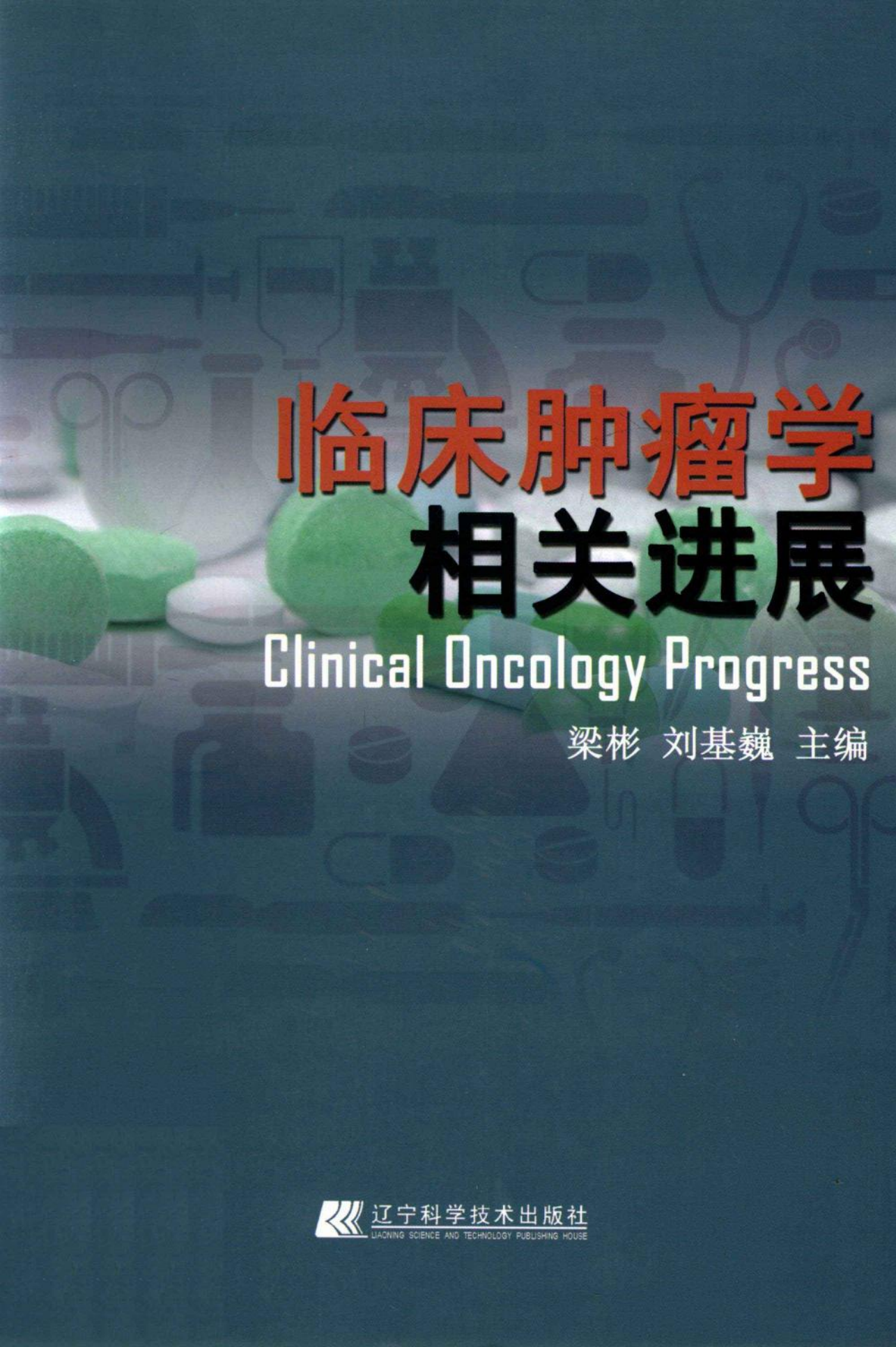




临床肿瘤学 相关进展

Clinical Oncology Progress

梁彬 刘基巍 主编



辽宁科学技术出版社

LIAONING SCIENCE AND TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE

临床肿瘤学相关进展

梁 彬 刘基巍 主编

辽宁科学技术出版社

·沈 阳·

图书在版编目(CIP)数据

临床肿瘤学相关进展 / 梁彬 刘基巍主编. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2012.10

ISBN 978-7-5381-7666-7

I. ①临… II. ①梁… ②刘… III. ①肿瘤学 IV. ①R73

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 210318 号

出版者: 辽宁科学技术出版社

(地址: 沈阳市和平区十一纬路 29 号 邮编: 110003)

印刷者: 新民市印刷厂

经销者: 各地新华书店

幅面尺寸: 185mm × 260mm

印 张: 18.75

字 数: 550 千字

出版时间: 2012 年 10 月第 1 版

印刷时间: 2012 年 10 月第 1 次印刷

责任编辑: 王 实

封面设计: 张碧野

版式设计: 于 浪

责任校对: 潘莉秋

书 号: ISBN 978-7-5381-7666-7

定 价: 40.00 元

联系电话: 024-23284354

邮购热线: 024-23284502

E-mail: ganluhai@163.com

http: //www.lnkj.com.cn

编著者名单

主 编

梁 彬 刘基巍

副主编

高亚杰 周 涛 李 丽

编写者

(以姓氏笔画为序)

于佩瑶	于 湛	王 玲	王艺茜	邓晓琴
方凤奇	白 松	孙亮新	刘基巍	刘素勤
刘 磊	李 丽	李 静	李 颖	李 爽
李 佳	关小倩	乔京京	邹 阳	吕秀鹏
陈雅敏	张 洁	张春霞	周 涛	赵 翌
班丽英	高亚杰	高 萍	殷 柳	崔晓楠
梁 彬	董 岩	赖邻宁	蔡 欣	谭小新

前 言

近年来,许多医学院校开设了肿瘤分子生物学的研究生课程,越来越多的研究生选择肿瘤分子生物学课题。我院肿瘤科自2004年至今,每月定期举办1~2次肿瘤分子生物学和肿瘤相关新影像学学术讲座。授课后研究生恳切要求,将讲座编辑成册。为了满足研究生对肿瘤领域前沿知识的渴求,从历年讲题选择50余篇,编辑成《临床肿瘤学相关进展》一书。全书共分三章:肿瘤分子生物学;肿瘤相关新影像学;肿瘤诊治的临床进展。内容注重其先进性、实用性,对某些热点和有应用前景问题进行了有益的探讨。不拘泥于固有思维模式,对一些较难理解的讲题分设了基础篇与临床篇。

2004—2006年授课期间,医院尚缺少如PET-CT等先进设备和仪器,故引用了国内外相关书刊上的内容、图像资料,在此对原著者表示感谢。

肿瘤学进展较快,学术讲座又有较强的时效性,深感能力有限,难免存有错漏、不足之处,尚祈读者批评指正。

本书编写过程得到了医院各级领导、医生的热情支持,研究生参加整理工作,在此一并表示衷心感谢。

梁 彬 刘基巍

2012年8月

目 录

第一章 肿瘤分子生物学	1
1 干细胞与肿瘤干细胞的研究现状	1
2 基因组异常分析在恶性淋巴瘤临床中的应用	8
3 微阵列分析 (Microarray analysis)	15
4 反义 RNA 技术与肿瘤研究进展	18
5 四种靶向抑制剂的临床	25
6 RNA 干扰与肿瘤靶向治疗	32
7 肝、胆、胰癌分子靶向治疗的基础与临床	34
8 骨转移瘤的分子机制及治疗进展	42
9 细胞学分子生物学解读多发性骨髓瘤	51
10 甲状腺、前列腺肿瘤标记物的检测及肿瘤标记物优选组合	61
11 蛋白质组学在肿瘤标记物研究中的应用	66
12 以人端粒酶逆转录酶为靶点的肿瘤治疗	68
13 Notch 信号通路与 T 细胞系肿瘤	71
14 肿瘤转移的分子生物学	74
15 肿瘤病毒治疗进展	84
16 溶瘤腺病毒的临床	86
17 纳米技术治疗肿瘤的进展	88
18 细胞角蛋白与肿瘤	92
19 非小细胞肺癌 ALK 融合基因研究的现状	94
20 飞行质谱在结直肠癌血清蛋白质中的应用	96
21 抗体药物应用与生物标记物的检测	98
22 分子靶向药物的作用机制	101
23 肿瘤体内成像荧光探针的开发	104
参考文献	110
第二章 肿瘤相关新影像学	113
1 PET 检测癌生物学特性影像	113
2 磁共振进展简介, 磁共振胰胆管成像 (MRCP) 的临床	115
3 PET-CT 的临床应用	121
4 小肝癌、微小肝癌的影像学诊断	126
5 乳腺癌 MR 功能及分子成像	129
6 急性肺动脉栓塞的影像学诊断	131
7 前上纵隔肿瘤的影像学鉴别诊断	133
8 MRI 在乳腺癌淋巴结转移中的应用	137
9 低剂量螺旋 CT 筛查早期肺癌	139

10 脑肿瘤 MR 功能分子成像	140
参考文献	144
第三章 肿瘤诊治的临床进展	146
1 小肺癌的诊疗进展	146
2 消化道早期癌的治疗变迁 (外科手术→EMR→ESD)	157
3 肿瘤个体化治疗效果、预后、副作用、预测标记物的研究 (附肿瘤个体化检测指南) ...	164
4 肺腺癌新分类——从病理学、分子生物学和影像学解读	179
5 近年肿瘤学领域进展	184
6 小肠胶囊内镜的临床应用	189
7 替吉奥 (S-1) 的基础与临床	195
8 神经内分泌肿瘤 (Neuroendocrine Tumor, NET) ——新概念、诊断与治疗	201
9 寻找转移性肿瘤的原发灶 (Eancer with Unknown Primary, CUP)	210
10 电子超声气管镜导向活检——诊断肺门、纵隔淋巴结转移	221
11 电子荧光气管镜——诊断早期肺癌	226
12 末梢循环肿瘤细胞检出系统的介绍	231
13 循环肿瘤细胞的临床研究	235
14 早期胃癌诊断进展——固有荧光技术、内镜分光技术、超声内镜与 CT 仿真内镜 - - -	236
15 乳腺癌的诊断进展	242
16 恶性肿瘤与血栓形成	245
17 急性肺栓塞的诊断、治疗现状	250
18 头颈部癌分子靶向疗法	255
19 乳腺癌循环肿瘤细胞检测	260
20 原发肺癌与乳腺癌肺转移的鉴别诊断	262
21 ¹²⁵ I 放射性粒子置入治疗肺癌	264
22 癌性胸、腹水, 心包积液, 癌性脑膜炎治疗现状	266
23 常见非霍奇金淋巴瘤诊断治疗	274
24 T 细胞淋巴瘤的化疗和靶向治疗	280
25 结节病与肺部肿瘤的鉴别诊断	282
参考文献	291

第一章 肿瘤分子生物学

1 干细胞与肿瘤干细胞的研究现状

干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的原始细胞。干细胞的自我更新调节通路异常与肿瘤形成密切相关。恶性肿瘤的进行性生长、转移和复发与干细胞的基本特征相似，推测肿瘤组织中存在少数干细胞，研究证明急性粒细胞白血病、乳腺癌及脑瘤中的肿瘤干细胞已得到分离和鉴定。以下对肿瘤干细胞的研究进展作简要讲述。

1.1 干细胞的定义和特点

干细胞的“干”英文为“stem”，意为“树”、“干”和“起源”，干细胞可理解为起源细胞。公认的定义是：干细胞是具有无限或可被延长的自我更新能力的细胞，它们能够形成至少一种高分化的后代。干细胞有以下特点：

①干细胞本身不处于分化途径的终端。

②干细胞能无限增殖分裂。

③干细胞可连续分裂几代，也可较长时间内处于静止状态。

④干细胞通过两种方式生长，一种是对称分裂，形成两个相同的干细胞；另一种是非对称分裂，由于细胞质中的调节分化蛋白不均匀地分配，使得一个子细胞不可逆的趋向分化，最终成为功能专一的分化细胞，另一个则保持亲代特征仍作为干细胞保留下来。干细胞的对称和不对称的分裂模型（见图1）。

⑤干细胞是一种慢周期性细胞。

其中自我更新能力是干细胞最基本的特征，也是检测干细胞最为准确的标准。干细胞的分化和自我更新（见图2）。

1.2 干细胞分类

1.2.1 根据分化潜能分类

(1) 全能干细胞

能发育成一个完整个体的干细胞，称为全能干细胞。哺乳动物的生命始于受精卵，受精卵具有分化体内 200 多种不同细胞类型的潜能，并能发育成为一个完整的个体，细胞的这种潜能被称

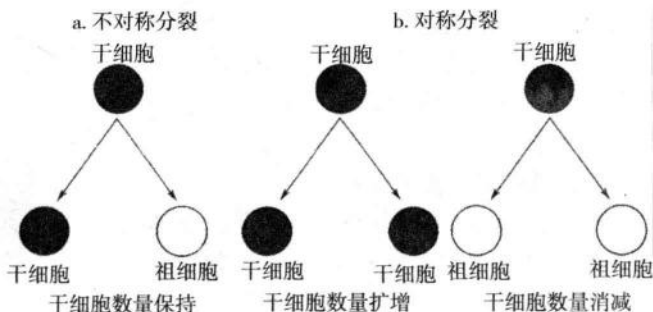


图1 干细胞的对称和不对称的分裂模型

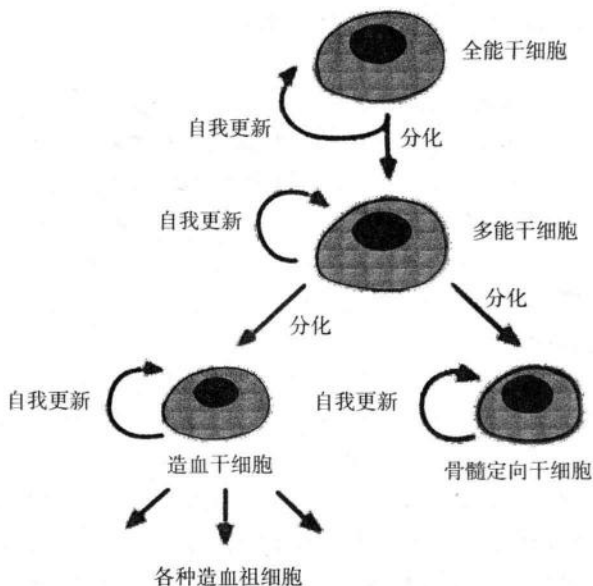


图2 干细胞的分化和自我更新 (赵春华, 2006)

为全能性 (topipotency)。具有这种潜能的细胞被称为全能干细胞。受精卵在从输卵管向子宫运行的过程中不断地进行卵裂,当受精卵分裂到 8~16 个细胞时为一实性球体,称为桑葚胚 (morula) (见图 3)。此时每个卵裂球仍保持这种全能性,将任意一个卵裂球放置到适当的子宫中都可以发育成一个完整个体。

2006 年 8 月 3 日美学者称不破坏胚胎可获取干细胞 (见图 4)。该方法不损毁胚胎,处理后的胚胎仍可发育正常,可减少胚胎干细胞研究中的伦理学争议。



图 3 桑葚胚 (全能干细胞)

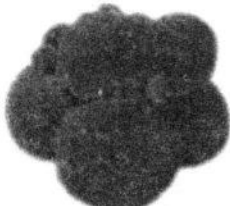


图 4 早期胚胎中获取的干细胞

(2) 三胚层多能干细胞

失去了发育成完整个体的能力,但仍具有向个体中任何一种细胞 (包括生殖细胞) 分化的潜能的干细胞被称为三胚层多能干细胞。桑葚胚进入子宫后不久,分裂成为由 32~64 个细胞组成的早期囊胚或称胚泡,开始出现腔隙,成为胚泡腔或囊胚腔 (见图 5)。囊胚腔由一层细胞围成,这层细胞被称为滋养外胚,一端为内细胞团,这是在整个胚胎发育过程中最早发生的细胞分化。内细胞团细胞虽然失去了发育完整个体的能力,但仍具有分化成个体中包括生殖细胞在内的各种细胞的潜能,因此属于三胚层多能干细胞。

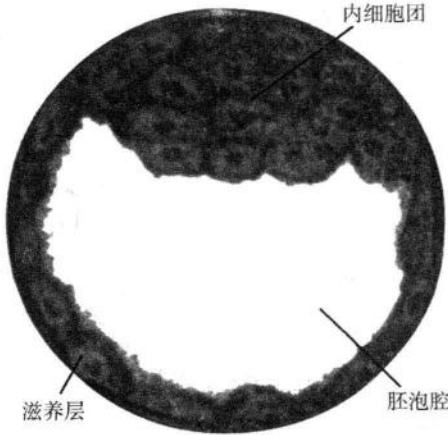


图 5 胚泡 (三胚层多能干细胞)

(3) 单胚层多能干细胞

只具有向同一胚层细胞类型分化的干细胞被称为单胚层多能干细胞。它的分化潜能较前两者要窄很多,只能分化几种特定类型的细胞,如一般意义上的间充质干细胞通常只能分化成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞及其他结缔组织,却不能分化为除此之外的其他组织细胞。

(4) 单纯干细胞

有的干细胞只能分化成一种细胞,如神经元干细胞只能分化成神经元而不能分化为星形胶质细胞或少突胶质细胞,这种细胞被称为单能干细胞。

1.2.2 根据来源分类

就来源而论,干细胞可以分为两类:

第一类来源于胚胎组织包括胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 和胚胎生殖细胞 (embryonic gerom cell, EG);

第二类来源于成熟组织中,如多能造血干细胞、神经干细胞等为成体干细胞。一般认为 ES 和 EG 细胞在理论上可以分化成为各种类型的组织细胞。而已成熟组织中的干细胞仅具有向几个方向分化的能力,故称为多能干细胞。

成体干细胞可横向分化 (trans-differentiation) 如神经干细胞经照射后可形成不同类型血细胞,骨髓可以分化形成骨骼肌细胞和肝细胞。与直接利用胚胎性干细胞相比,由于面临的伦理道德压力相对较小,成体干细胞的这种跨系统分化的“可塑性 (plasticity)”使它在组织工程中的应用前景更为广阔。成体干细胞在新的微环境下,分化为其他类型细胞,这一特性称为成体干细胞的可塑性 (见图 6)。

(1) 胚胎干细胞

胚胎干细胞 (embryonic stem cells) 简称 ES 细胞, 是由囊胚的内细胞群 (inner cell mass, ICM) 体外培养而成的。ES 细胞具备干细胞定义的所有条件, 最大特点是可在体外无限期的生长。另一特点是 ES 细胞可分化成任何组织细胞。人的 ES 细胞的种类和来源还不够多, 其生物学特性还不十分清楚, 有待解决。

由于 ES 细胞来源于早期胚胎, 对人的 ES 细胞研究遇到一些伦理问题和限制, 媒体将 ES 细胞研究与克隆人混为一谈, 实际上是两个领域, 相信将来这种误解会被消除。胚胎干细胞可以为组织移植提供无尽的供应, 组织移植程序见图 7。

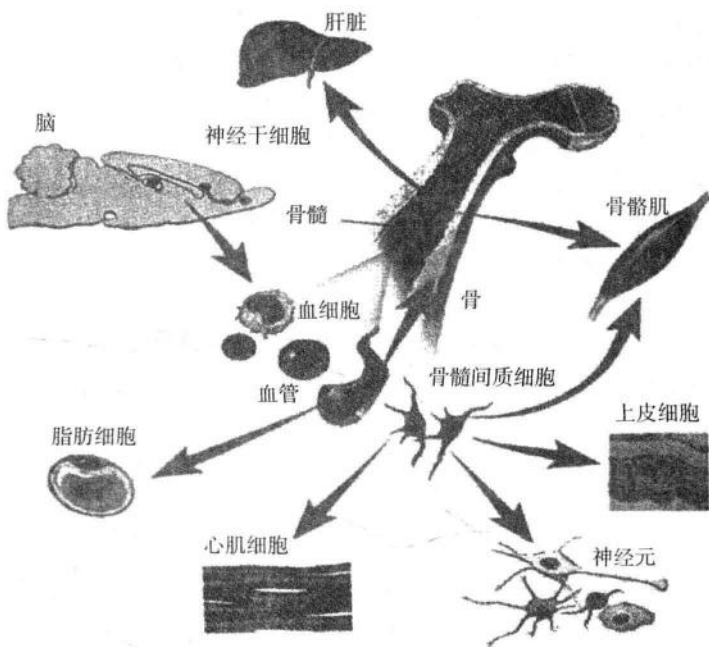


图 6 成体干细胞的可塑性

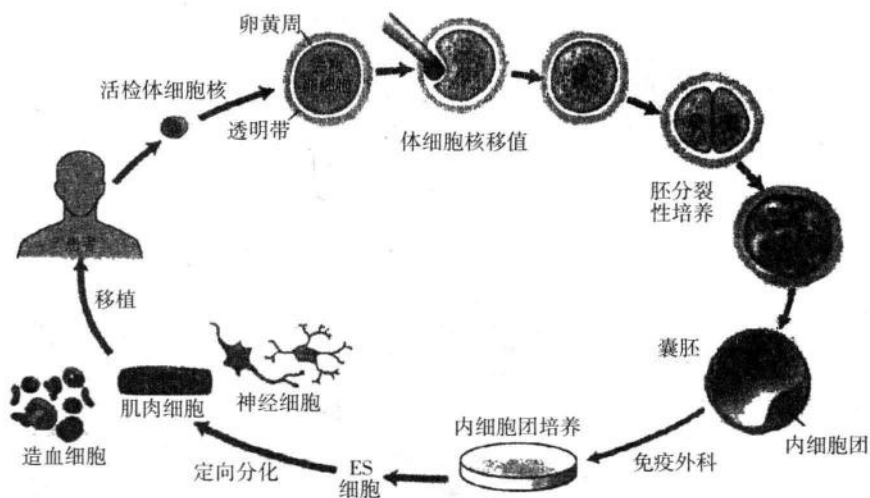


图 7 组织移植程序 (赵春华, 2006)

组织移植程序是取患者的活检的体细胞核移植到去核的供体卵细胞内, 待胚胎发育至囊胚后通过免疫外科方式获得体内细胞团 (ICM) 并进行培养, 从而获得胚胎干细胞 (ES)。再根据需要诱导 ES 细胞定向分化后, 移植到患者体内。(摘自: Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work Science, 1999, 283:1468-1470)

(2) 成体干细胞

成体干细胞 (Adult stem cell), 即存在于成体某特定组织或器官中的干细胞。在生理情况下, 特定组织的成体干细胞只分化为该组织的成熟细胞。最早发现成体干细胞存在于造血组织中, 称为造血干细胞 (Hematopoietic stem cells, HSC)。HSC 是公认的临床上取得成功的干细胞。其他再生旺盛的组织或器官如小肠上皮、皮肤和生殖腺等都证明有干细胞的存在。后来又在不能再生的神经细胞内发现干细胞, 另在肝、胰、支气管、肺、骨骼肌、乳腺等中发现有干细胞, 但完全不

符合上述干细胞标准。成体干细胞在组织中含量极少，HSC 为骨髓中总数的十万分之一。现运用识别细胞表面标记以及流式细胞仪技术对干细胞纯化有一定提高。近年来，人们已从心肌组织中分离出能够分化生长为正常心肌细胞的干细胞，并逐步完善了体外分离培养、诱导分化和增殖扩增的方法和技术，为心肌再生医学领域开启了新的希望。2009 年 7 月美国洛杉矶西奈心脏中心完成第一人自体心肌干细胞冠脉输注移植手术取得成功。2010 年日本完成 4 例移植治疗取得了成功。2012 年 1 月《柳叶刀》上刊登两名失明的女性经过数周的胚胎干细胞治疗后，视力得到了改善。这是干细胞研究领域的一个重大进步。

(3) 间充质干细胞

间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSC) 是成体干细胞的一种，来源于骨髓基质细胞，也有其他组织如骨骼肌脂肪组织等分离而出。MSC 只占骨髓细胞 0.0001%, MSC 可在体内分化为骨骼、软骨和脂肪等间充组织。

无论是胚胎干细胞还是成体干细胞都有各自的优缺点 (见表 1)。目前对这两类干细胞的生物学研究是十分重要的。

表 1 胚胎干细胞和成体干细胞的优缺点

	优点	缺点
胚胎干细胞	来源于胚胎的 Blastocyte (囊胚)	只有同种异体, 有免疫排斥问题
	能形成纯系	移植后有形成肿瘤的倾向
	理论上能产生各种组织	体外分化不是十分有效
	有些组织容易产生 (心肌)	有些组织不易分化 (血细胞)
	可在体外无限生长	有伦理学问题
	容易进行体外遗传修饰	
成体干细胞	来源于自体	在组织中含量极少
	有多种类型来源	难以分离纯化
	有些类型有很强的自我更新能力 (造血干细胞)	体外建系或扩增十分困难
	无致癌性	多数组织的干细胞自我更新能力低下
	能自主分化	跨系分化能力低下
	可用于基因转移的靶细胞, 无伦理学问题	

(4) 羊水干细胞

美国研究人员在 2007 年 1 月 7 日发表文章 (Nat Biotechnol 2007, 25:100) 从羊水中可以分离出多能干细胞, 这些干细胞可以分化为多种类型的细胞。这一重要发现为获取干细胞提供了第三种路径, 且避开了伦理的争议。

美国 Wake Forest 大学组织工程专家 Atala 称, 这种干细胞 “既不是胚胎干细胞, 也不是成体干细胞, 它介于两者之间”。羊水干细胞经羊水穿刺获取, 简单易行, 羊水干细胞占羊水标本细胞总数的 1%。羊水干细胞也可从胎盘中获取。

在人和鼠的羊水中分离出有胚胎干细胞和成体干细胞表达标记物的羊水干细胞 (Amniotic Fluid-derived Stem cell, AFS)。羊水干细胞具有良好的多能性。通过逆转录病毒标记的克隆人体细胞系可以被诱导分化成胚胎各胚层的细胞类型, 包括脂肪细胞、骨细胞、肌细胞、内皮细胞、神经元细胞和肝细胞系, 并表现出特定的功能, 如神经元细胞系可分泌神经递质, 肝细胞产生尿素。

Atala 解释说这些未分化的羊水干细胞在没有饲养细胞的情况下就可迅速生长, 在 36 小时内即实现细胞数增倍, 不显示致癌特性, 经 250 次增倍后仍保持长端粒和正常核型。而胚胎干细胞

由于扩增速度快,可能发展为肿瘤,成体干细胞虽不会发展成为肿瘤,但其生长十分缓慢。

羊水干细胞也表现出相对低的免疫原性,这可能与在妊娠过程中免疫原性受到抑制有关,这更有利于进行同种异体之间的移植。

2006年11月瑞士学者在美国心脏病学会上报告,他们从羊水中提取干细胞,并成功培育出人类心脏瓣膜,但离临床应用尚有距离。

目前仍不能确定羊水干细胞到底能培育出多少类型的细胞,期望数年后这些羊水干细胞能为组织工程和器官组织修复提供有价值的来源。

另外也发现皮肤干细胞、脂肪干细胞、肌肉干细胞、肝脏干细胞、胰腺干细胞、小肠黏膜干细胞、呼吸道干细胞和消化道干细胞。例如,胃干细胞坐落在胃腺颈部定向分化祖细胞(见图8)。

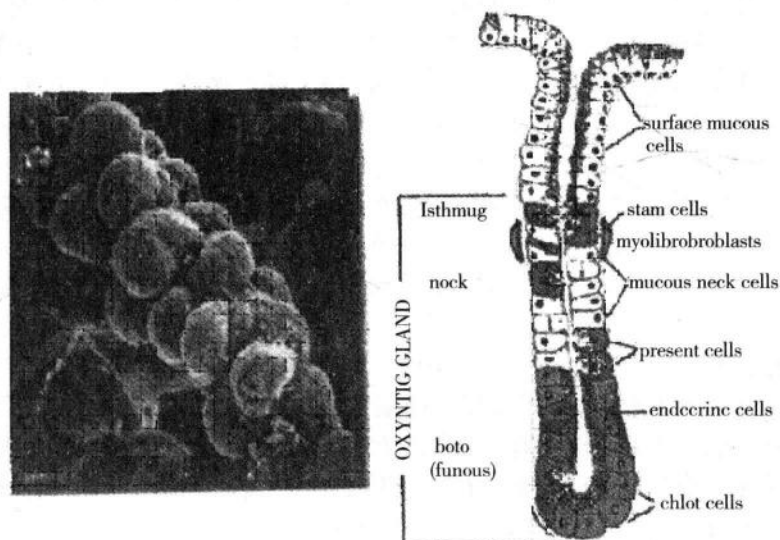


图8 胃腺的电镜图和腺体结构示意图(请注意胃腺颈部的干细胞及干细胞盒)

1.3 肿瘤干细胞及其存在的证据

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)是极少量存在于肿瘤组织中的一类具有自我更新能力的肿瘤细胞,是维持肿瘤组织不断生长的根源。目前研究最多的是白血病干细胞,在实体瘤中也发现肿瘤干细胞。研究肿瘤干细胞对肿瘤本身以及探索肿瘤新的治疗方法都有重大意义。

1.3.1 白血病干细胞

白血病细胞的培养 单个白血病细胞悬液体外克隆培养,只有0.1%~1%的白血病细胞能在体外琼脂上生长。

白血病细胞的移植试验 用流式细胞仪和非肥胖型糖尿病/重联合免疫缺陷型小鼠(NOD/SCID)模型系统研究白血病干细胞。根据细胞的表面标记将急性髓性白血病(AML)病人的骨髓细胞分离出多种亚型并移植到NOD/SCID小鼠体内。发现只是具有 $\text{Thy}^+\text{CD}_{34}^+\text{CD}_{38}^-$ 标记的细胞亚群能够在小鼠体内植活并引起相同的白血病。这一群细胞只占白血病细胞的极小一部分,命名为白血病的起源细胞,这一结果提供了白血病干细胞的直接证据。

1.3.2 乳腺癌干细胞

与白血病相比,在实体瘤中研究干细胞更为困难。研究人员根据乳腺癌细胞表面标志 CD_{44} 和 CD_{24} 分为 $\text{CD}_{44}^+\text{CD}_{24}^{-/\text{low}}$ 和 $\text{CD}_{44}^+\text{CD}_{24}^+$ 标记细胞亚群,将 2×10^5 的细胞注入到免疫缺陷小鼠腺体,12周后只有 $\text{CD}_{44}^+\text{CD}_{24}^{-/\text{low}}$ 的1000个细胞能够产生肿瘤。进一步从中分离出上皮细胞特异抗原(ESA)阳性的细胞,则低于200个细胞就能引发肿瘤。不仅如此,从初次移植的小鼠肿瘤中分离出各种

细胞亚群并移植到新小鼠体内，只有 $ESA^+CD_{44}^+CD_{24}^{-low}$ 能够再次引发肿瘤，证明 $ESA^+CD_{44}^+CD_{24}^{-low}$ 细胞是乳腺癌起源的肿瘤干细胞。

1.3.3 脑肿瘤细胞

Peter Dirks 和同事证明脑肿瘤干细胞的表面标记为 CD_{133} 。在体外培养中， CD_{133} 阳性的细胞能产生表达神经元和 / 或胶质细胞表面标记的细胞，这与原发脑肿瘤细胞组成相似。进一步实验证明这群细胞的确可在小鼠体内引发肿瘤。

1.4 肿瘤干细胞的来源

1.4.1 肿瘤干细胞起源于正常细胞

对白血病的研究证明，不少类型白血病可能由正常干细胞突变来。例如，慢性髓性白血病 (CML) 95% 具有 ph 染色体即 t (9; 22) 染色体易位，导致形成 BCR/ABL 融合基因并产生 210KDa 的融合蛋白，这是 CML 一个分子标记。BCR/ABL 融合蛋白可在髓系、红系、B 淋巴细胞和偶然在 T 淋巴细胞中检测到，提示最初的染色体易位是发生在造血干细胞 (HSC) 水平。

另一个实例是急性髓性白血病有一种常见的染色体易位 t (8; 21)，导致位于 21 号染色体上的 Aml1 基因与 8 号染色体上的 Eto 基因融合而形成 Aml1-Eto 融合基因。白血病完全缓解后长期存活的病人中仍可检测到 Aml1-Eto 的存在，表明 Aml1-Eto 的表达是在干细胞水平。

但也有人提出，正常干细胞不易发生突变如小肠上皮新陈代谢速度快，但小肠发生肿瘤的几率极低。

1.4.2 肿瘤干细胞起源于分化的祖细胞或成熟细胞

分化的早期或晚期祖细胞也可能为突变靶细胞，成为肿瘤干细胞。在这种情形下，祖细胞获得与干细胞相似的特性即自我更新能力。如早幼粒细胞白血病，转化过程发生在更加分化的细胞亚群，而不是造血干细胞中。引起儿童 ALL 的靶细胞多认为是已向 B 或 T 系列分化的祖细胞。成人 ALL 和 ph 染色体阳性的 ALL 起源于较原始的祖细胞。

1.5 肿瘤干细胞的生物学特性

肿瘤干细胞与正常干细胞生物学特性的比较 (见表 2)。

表 2 肿瘤干细胞与正常干细胞生物学特性的比较

	正常干细胞	肿瘤干细胞
自我更新能力	高度增殖的潜力	增殖失控
	受严格的调控	致癌性
分化能力	成体组织的再生和修复	形成肿瘤细胞的异质性
	在一种组织内产生多种细胞	分化受阻
	器官发育	
DNA 修复能力	有 DNA 修复性	DNA 修复机制多有缺陷
对损伤试剂的抵抗力	增加运转能力和有毒物排出	药物抵抗性
迁移能力	迁移和归巢	肿瘤转移

如果将肿瘤比作体内一个发育异常的器官，是由突变的肿瘤干细胞通过不断的增殖和异常分化所致，则不难理解肿瘤干细胞的许多生物学特性与正常细胞的相似之处。

肿瘤干细胞的表面标记如白血病干细胞与正常干细胞有许多相同的表面标记。调控正常干细

胞自我更新的几个重要信号途径如 Notch、Wnt、转录因子 HOX、基因家族 Shh、PTEN 及 Bmi-1 等对肿瘤干细胞的自我更新能力也同样有重要作用。正常干细胞分化是完全的和有功能的，而肿瘤干细胞的分化是不完全的或向异常方向分化，产生没有功能的细胞。

1.6 当前肿瘤干细胞的分离及鉴定模式

1.6.1 分离方法

目前分离肿瘤干细胞的主要方法是流式细胞术 (FACS)，以应用于人白血病、乳腺癌及神经胶质瘤的肿瘤干细胞的分离。FACS 分离过程：

步骤一：按各细胞表面标志进行细胞群筛选（分为 +、- 细胞如 CD_{34}^{+} 、 CD_{34}^{-} ）各细胞群按不同浓度接种到非肥胖型糖尿病 - 重症联合免疫缺陷 (NOD-SCID) 小鼠体内，根据肿瘤生长情况，区别各组的成瘤能力，筛选出优势细胞的表面标志。

步骤二：针对优势细胞表面标识进行组合（如 CD_{34}^{+} 、 CD_{38}^{-} 、 $Thy-1^{-}$ ）筛选组合细胞群，按不同的浓度接种至 NOD-SCID 小鼠体内，比较各组成瘤能力，确定目的细胞。分离技术是依赖于细胞表面的大分子标志物的识别，目前除了以明确的肿瘤干细胞急性粒细胞白血病为 $CD_{34}^{+}CD_{38}^{-}Thy-1^{-}$ ，乳腺癌为 $CD_{44}^{+}CD_{24}^{-/low}Lim^{-}$ 、脑肿瘤为 CD_{133}^{+} 外，其余存在的肿瘤干细胞缺乏明确的细胞表面标志物可供分离使用。

1.6.2 鉴定模式

多数研究者采用把肿瘤细胞分离纯化不同的亚细胞群进行小鼠体内功能检测，挑选出具有成瘤性的细胞。

Passegut 等将分离出的细胞再植入 NOD-SCID 小鼠体内，发现表型为 $CD_{34}^{+}CD_{38}^{-}Thy-1^{-}$ 的细胞是唯一能在这种小鼠体内形成肿瘤细胞，从而证实其为急性粒细胞白血病干细胞。

Jordan 等把表型为 CD_{133}^{+} 的细胞种植到 NOD-SCID 小鼠体内，发现该细胞能诱发肿瘤，证实具有成瘤性，从而认为 CD_{133}^{+} 细胞为脑瘤的肿瘤干细胞。

Clarre 等经流式细胞仪筛选出表达 CD_{44} 、 $B_{38.1}$ 和 ESA 的细胞注入 NOD-SCID 小鼠体内，小鼠长出肿瘤细胞，有成瘤性，分离出乳腺癌的肿瘤干细胞。

1.7 肿瘤干细胞与耐药性

许多干细胞和肿瘤细胞一样含有耐药基因，如多药耐药基因 (MDRI、MRP、BCRPI) 相关的转运子，称为 ABC (ATP 结合盒) 转运子，能将药物和荧光染料泵出细胞外。

肿瘤干细胞具有特殊的自我更新能力，是肿瘤复发的根源，治疗肿瘤必须消灭 TSC。

TSC 与正常干细胞有许多共性：寿命长，相对静止，属于慢周期细胞，表达 ABC 转运子，而对药物和毒素有抗性，修复 DNA 能力活跃和抗凋亡。干细胞表达高水平的特殊的 ABC 药物转运子，如造血干细胞表达高水平的 ABCG2，但在定向祖细胞和成熟血细胞中却不表达。

干细胞中 ABC 转运子通过水解提供能量，肿瘤药物从细胞内泵出，保护细胞免受细胞毒损害。ABC 药物转运子也是分离和分析造血干细胞的一个重要标志物。

经过复发化疗后肿瘤往往产生多药耐药。一般认为肿瘤获得了耐药的遗传改变，成为肿瘤中的优势群体。但根据肿瘤干细胞观点，TSC 就抗化疗，属于慢周期细胞，表达 ABC 转运子。结果化疗后有些 TSC 存活，支持肿瘤的复发。药物杀灭肿瘤干细胞的情况见图 9。

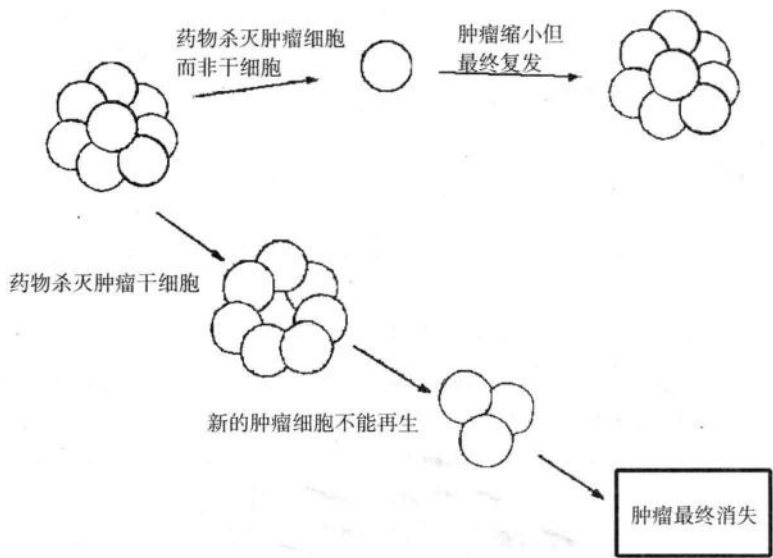


图9 药物杀灭肿瘤干细胞的情况

1.8 总结

1.8.1 近年来对干细胞和肿瘤干细胞的研究突飞猛进，为肿瘤的基础和临床研究开辟了新的道路。

1.8.2 肿瘤干细胞学说的提出，打破了单一从基因水平研究肿瘤的模式，树立了用细胞水平来研究肿瘤的形成机制和生物学特征的思路。

1.8.3 肿瘤干细胞学说解释了在传统的治疗中出现肿瘤细胞耐药现象。肿瘤治疗在多数细胞被杀灭的同时，肿瘤干细胞由于具有抗凋亡蛋白（Bax/Bcl-2 等）及 ABC 转运体，仍可存活，同时又具有无限的生殖能力，故在临床好转或治愈一段时间后可出现肿瘤复发。

1.8.4 通过对肿瘤干细胞表面大分子标志物的识别，更早地检测出肿瘤的发生，在肿瘤干细胞大量增殖子代细胞形成瘤体之前，就对肿瘤干细胞及其分化细胞进行治疗。

通过研究肿瘤干细胞的生物特性及信号传导，研发针对肿瘤干细胞的治疗，使肿瘤复发绝缘。

1.8.5 在癌变原理的研究方面开辟了新的研究方向，将集中研究正常成体干细胞如何转化为肿瘤干细胞，这是巨大挑战，也将产生丰硕的成果。

2 基因组异常分析在恶性淋巴瘤临床中的应用

2.1 基础篇

分子细胞遗传学技术（molecular cytogenetic），是传统的细胞遗传学与分子遗传学结合的产物，已经应用于临床诊断。分子细胞遗传学的发展始于荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization, FISH）。从最早的 FISH 发展成现在的 24 色 FISH 的过程中，所采用的方法包括多色 FISH、光谱核型分析、物种交叉色带、CCK（color changing karyotyping）和比较基因组杂交（comparative genomic hybridization, CGH）等。这些新兴技术将 FISH 的敏感性和特异性与传统的细胞遗传染色体分析技术结合起来，能一次性地筛查整个基因组的染色体异常，特别是在检查复杂的肿瘤染色体畸变方面显示了独特的优势。分子细胞遗传学在医学遗传学的研究中起到了推动性的作用，并在临床

诊断中发挥了日益重要的作用。

2.1.1 荧光原位杂交技术

其基本原理与原位杂交一样是利用 DNA 碱基互补配对的特点,在体外的一定条件下,使同源的 DNA 链或 DNA-RNA 单链结合成双链。FISH 使用荧光标记的 DNA、RNA 或与 mRNA 互补的 cDNA 探针和染色体或基因杂交,从而在中期染色体、间期核、组织切片、裂殖细胞或配子细胞上检测 DNA 顺序。

FISH 方法首先将靶 DNA 及其周围物质固定于玻片上,通过加热和甲酰胺处理,使靶 DNA 双链变性成单链,再使双链 DNA 探针变性形成单链,然后在适当条件下使单链探针 DNA 与单链靶 DNA 结合或杂交形成新的双链 DNA。如果探针 DNA 与待测 DNA 上同源序列(靶序列)互补结合,即可在该染色体上原位显示杂交信号。这种探针不仅能与中期染色体进行杂交,而且还能与非分裂细胞固定的间期核直接进行杂交。因而 FISH 技术具有快速、安全、经济、灵敏度高和特异性强等优点,且可长期保存而不失活性。因此, FISH 技术已广泛应用于医学生物学研究中,如基因定位、基因扩增及染色体畸形的检测等。

2.1.2 比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH)

比较基因组杂交技术是在 FISH 的基础上建立起来的。探针是整个基因组 DNA,而不是一个点或一个区域。可在全部染色体或在染色体亚带水平上,对不同基因组之间的 DNA 序列拷贝进行检测和定位。主要用于确定未知区域的 DNA 的扩增或缺失,如染色体不平衡片段的识别和染色体重排的研究,相关种属间或同一属内不同个体之间基因组差异的研究等。尤其是 CGH 回避了实体肿瘤染色体制备的难题,这是其他 FISH 方法难以替代的。目前 CGH 已广泛应用于肿瘤遗传的研究中。

2.2 临床篇

恶性淋巴瘤可见到与疾病特征有关的染色体易位,特别在 B 细胞淋巴瘤,出现特定的染色体易位常伴有基因异常。如滤泡性淋巴瘤 (follicular lymphoma, fl) (14 号染色体易位于 18 号染色体上 t (14; 18), 伴有 Bcl-2 基因异常。Burkitt 淋巴瘤细胞中 t(8; 14)引起 myc 基因异常。套细胞淋巴瘤 t (11; 14) 引起 CCND1/CYCLINO1 基因异常。

自从阵列比较基因组杂交法 (array CGH: array-based Comparative genomic hybridization) 用于分析恶性淋巴瘤。不只是分析染色体易位,并在基因拷贝数异常即基因扩增及缺失在多数病人中出现也作了分析。T 细胞淋巴瘤无特征性染色体易位。因此对恶性淋巴瘤基因拷贝数的异常分析是重要的。

本文对恶性淋巴瘤基因异常的探索是应用阵列比较基因组杂交法。阵列 CGH 法是网罗全染色体的人工染色体 (BAC 克隆) 硅片,染色体硅片比从前应用的 CGH 的解像度高出约 10 倍。

阵列 CGH 法可以了解恶性淋巴瘤基因的微细构造异常,靶基因的相关基因及抑癌基因异常。本文以基因检测得出结果,分析“复数疾病”的弥漫大 B 细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤和成人 T 细胞淋巴瘤/白血病。另外以弥漫大 B 细胞淋巴瘤和套细胞淋巴瘤为例,将 CGH 阵列资料应用于临床诊断。

2.2.1 阵列 CGH 法分析恶性淋巴瘤的基因组异常

恶性淋巴瘤占全部癌症约 3%, 高龄发病相对较高,在欧美 T 细胞淋巴瘤、胃黏膜相关淋巴瘤发病较高。

恶性淋巴瘤中弥漫大 B 细胞和滤泡淋巴瘤占半数 (见图 1a),在日本九州成人 T 细胞淋巴瘤/白血病较多。

弥漫性大 B 淋巴瘤和成人 T 细胞淋巴瘤/白血病是“复数疾病”,基因分析发现,可把它们分成亚型。作者以亚型为特征进行基因组异常的阵列 CGH 检查。下面对阵列比较基因组杂交作简要说

明。

阵列 CGH 是基因拷贝数异常及全部基因组检出的方法。肿瘤的 DNA 是 CY3（绿色）标记，正常 DNA 是 CY5（红色）标记，其 2304 个人工染色体是以斑点状在载片上配对杂交，正常拷贝数克隆是黄色（= 绿 + 红）的斑点，肿瘤 DNA 多数场合是绿斑点，肿瘤 DNA 缺失是红色斑点。红和绿斑点的荧光强度的平均值，基因拷贝数异常可被检出（见图 1b）。

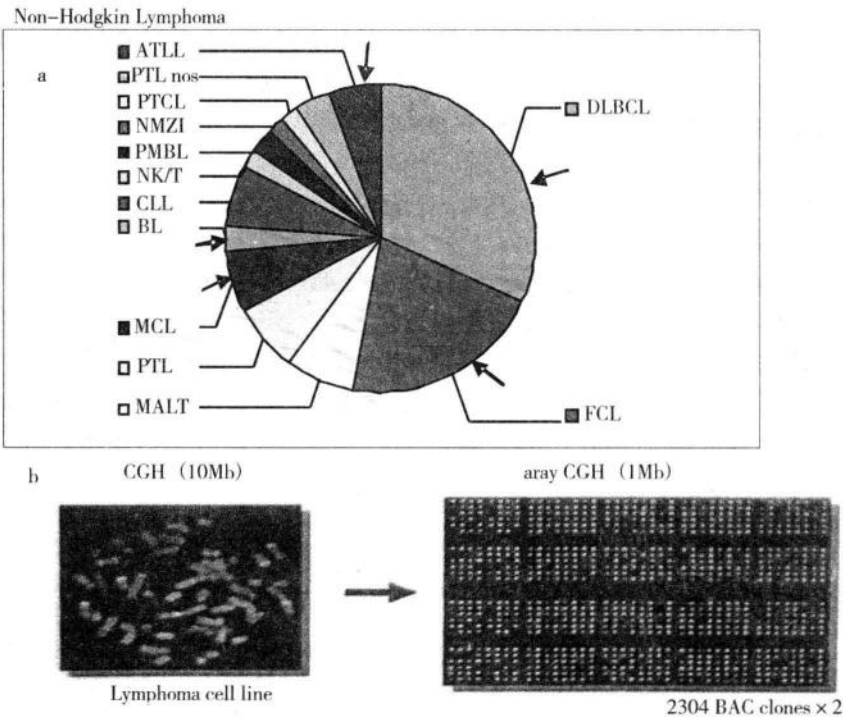


图 1

a. WHO 蓝本中淋巴瘤亚型分布。箭头代表基因拷贝数进行分析的淋巴瘤
DLBCL: 弥漫性 B 淋巴瘤; FCL: 滤泡性淋巴瘤; MCL: 套细胞淋巴瘤; BL: 伯基特淋巴瘤; ATLL: 成人 T 细胞淋巴瘤 / 白血病
b.传统 CGH (10Mb) 与阵列 CGH (1Mb) 精确度比较

2.2.2 恶性淋巴瘤亚型特征的基因组异常，基因异常

(1) 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤占非何杰金氏淋巴瘤 40%，是病因学、病理学、分子细胞遗传学不均一的疾病群。Doxorubicin 标准化疗半数可治愈，半数难治的疾病考虑存在“复数疾病”。

Staudt 淋巴瘤白血病研究所做基因分析，发现 DLBCL 至少有两个不同的亚型即 ABC (Activated B cell type = 活化 B 细胞) 型和 GCB (germinal center B cell= 滤泡中心 B 细胞) 型。ABC 型应用 CHOP 化疗预后不好，GCB 型预后良好。

对 ABC 型、GCB 型进行基因组分析，对两者基因组异常频度进行了比较，两者的基因组异常模式完全不同。ABC 型 3q、18q、19q 扩增，6q、9p21 缺失为特征，GCB 型 1q、2p、7、12q 扩增是此亚型特异的（见图 2）。