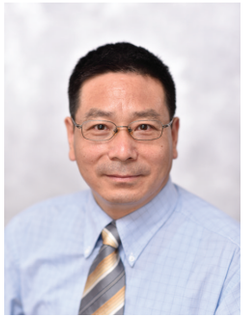
·专题论坛·

浅谈胃癌转化医学研究的“瑞金体会”

扫码阅读电子版

李建芳 朱正纲 刘炳亚
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海消化外科研究所
上海市胃肿瘤重点实验室 200025
通信作者:刘炳亚,Email:liubingya@sjtu.edu.cn



刘炳亚

【摘要】 转化医学是指将医学生物学基础研究成果迅速有效地转化为可在临床实际应用的理论、技术、方法和药物。目前胃癌的临床诊治仍存在很多问题需要解决,如何以临床急需解决的问题为出发点,以提高患者诊疗效果为宗旨,以基础研究为基本手段,以多学科交叉融合为途径,加强转化医学研究,是进一步提高胃癌总体疗效的关键所在。本文从瑞金医院团队转化研究经验出发,对胃癌的病因与发病机制、早期诊断的肿瘤标志物、复发转移的预测、分型标准、化疗评估、肿瘤异质性、靶向治疗、免疫治疗及研究平台的建立等目前胃癌转化医学研究的重点发展方向进行了介绍,并就胃癌血清标志物、胃癌特异性抗体研究以及改善胃癌药物输送手段等转化研究,分享作者的看法。

【关键词】 胃肿瘤; 转化医学; 生物学标记; 抗体; 药物载体
DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2020.02.008

Translational research on gastric cancer: Ruijin experience

Li Jianfang, Zhu Zhenggang, Liu Bingya
Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai Key Laboratory of Gastric Neoplasms, Shanghai 200025, China
Corresponding author: Liu Bingya, Email: liubingya@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Translational medicine refers to translating basic research achievements into the clinical application for diagnosis and treatment. There are still many issues of gastric cancer to be solved in clinical diagnosis and treatment. We need to focus on clinical questions, by means of basic research and multidisciplinary intersection approach, to further improve the overall efficacy of gastric cancer. Based on Ruijin Hospital's translational research experiences, in this paper, the authors describe the future direction in the field of translational research, such as the etiology and pathogenesis of gastric cancer, tumor markers for early diagnosis, prediction of recurrence and metastasis, classification criteria, evaluation of chemotherapy, tumor heterogeneity, targeted therapy, immunotherapy and research platform establishment. In addition, here we share our perspective of the research on serum biomarkers, specific antibodies and improvement of drug delivery for gastric cancer.

【Key words】 Stomach neoplasms; Translational medicine; Biological markers; Antibody; Drug delivery
DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2020.02.008

随着人们对健康、疾病的认识进一步加深,医学模式逐步发生重大转变,在目前常用的“4P”医学模式[预防性(preventive)、预测性(predictive)、个体化(personalized)和参与性(participatory)]的基础上,研究者进一步提出“5P”医学,即增加精准医学(pricision medicine)的概念,依据患者内在生物学信息以及临床症状和体征,对患者实施关于健康医疗和临床决策的量身定制[1-2]。这也呼唤了转化医学的全面开展。相对临床医学研究发展缓慢的现状而言,细胞分子生物学、免疫学等基础学科的研究发展异常迅速,但其研究成果却未能在人类健康、疾病的诊疗中得以充分体现。转化医学,又称为转化研究,其核心是将医学生物学基础研究成果迅速、有效地转化为可在临床实际应用的理论、技术、方法和药物,在实验室到病房之间架起相互沟通的桥梁[3-5]。本文从瑞金医院团队转化研究经验出发,就目前胃癌转化医学研究的重点发展方向,分享笔者的看法,谨供同道参考。

一、胃癌转化医学的需求与努力方向

胃癌的发生发展机制非常复杂,其转化医学研究应该从两方面考虑,首先是临床上的重要问题,即目前单纯以临床手段难以解决的问题;第二是应

用基础研究手段可以加以解决的问题,需以临床应用为终极目标,以求为临床医生提供更新、更便捷、更有效的诊疗手段。为此,胃癌的转化医学研究的重点发展方向将包括以下几个方面。

1.胃癌的病因与发病机制:对于大多数疾病来说,根据病因与发病机制的治疗才是根本,那么胃癌病因和发病机制是什么、如何深入系统全面地研究胃癌的发病机制并针对发病机制研发新的治疗方法,将是胃癌研究者长期奋斗的目标。

2.胃癌的早期诊断标志物:目前胃癌的早期诊断率低,缺乏能用于早期诊断的肿瘤标志物。这些标志物要可用于胃癌的筛查、预警,要便于临床应用,便于推广。

3.胃癌复发转移的预测:复发转移是导致胃癌死亡的主要因素,目前仍缺乏能够预测胃癌复发转移的分子指标、早期诊断胃癌复发转移的手段以及复发转移后的有效治疗手段。

4.胃癌的分型标准:随着人类基因组学及其后的转录组、蛋白质组以及代谢组等相关学科的诞生及快速发展,以及分子靶向治疗、免疫治疗的发展,为回答哪些患者可以获益、如何监测疗效等问题,胃癌更精准的分子分型势在必行。

5.胃癌的化疗评估:除手术外,化疗是较为有效而广泛被接受的疗法,而化疗应答率一直难以提高。影响化疗应答的因素是什么?其分子机制是什么?如何逆转化疗耐药?这些问题都有望通过基础研究的进展解答。

6.胃癌的肿瘤异质性:胃癌的异质性很大,如何识别肿瘤异质性?如何针对异质性采取精准有效的治疗?也是转化医学的重大挑战。

7.胃癌的靶向治疗:对于大多数治疗方法来说,往往并不特异,在杀伤肿瘤细胞同时,也杀伤了正常细胞,靶向治疗以及开发药物治疗的新靶点是值得深入研究的课题。

8.胃癌的免疫治疗:除了手术和化疗外,胃癌缺乏有效的新治疗手段。有必要加强肿瘤免疫治疗的研究,开发新型肿瘤疫苗,以及其他新的治疗方法。

9.研究平台的支持:为配合各种研究和总结经验教训,建立病例数据库和组织标本库,建立适合的细胞模型、动物模型等研究模型,也将是胃癌研究的基础性、关键性工作。

二、本课题组胃癌转化医学研究尝试

为了能将现代基础研究思路应用于胃癌的诊断、治疗等,给胃癌患者带来生存获益,本课题组开展了以下几方面转化性研究,在此分享给读者,希望能起到抛砖引玉之效。

1.应用蛋白芯片技术和肿瘤患者产生自身抗体原理寻找胃癌血清标志物:B淋巴细胞可以识别自身病源性抗原,产生自身抗体;而肿瘤细胞会产生各种变异蛋白,这些变异蛋白均可成为病源性抗原。免疫系统能识别这些异常蛋白而产生相应的自身抗体,有些自身抗体具有一定的抗肿瘤作用,可作为肿瘤标志物[6-7]。为鉴别这些自身抗体,可以用蛋白质抗原与之结合。为此,本课题组利用蛋白质芯片平台,采用包含17 000余种蛋白质的人蛋白质组芯片分析胃癌患者、胃癌相关癌前疾病患者和健康人的血清中自身抗体,进行大规模筛选,根据差异程度,挑选出50个候选标志物。再将上述候选标志物制作成小芯片,通过大规模筛查缩小范围,以获得敏感性特异性均较高的标志物。为便于临床应用,可将候选标志物制成酶联免疫吸附试验试剂盒。

经大样本(超过1 400例样本)多中心临床验证,笔者团队筛选出了7个胃癌血清标志物(CCDC49、RNF19、BFAR、COPS2、CTSF、NT5E、TERF1)[7]。这7个标志物对于胃癌进行诊断,其敏感性、特异性和准确性均明显高于临床上常用的传统标志物[癌胚抗原(CEA)、糖类蛋白(CA)25、CA72-4、CA199]及其联合,其中COPS2、CTSF、NT5E、TERF1诊断胃癌的敏感性分别达到92%、96%、84%和80%,特异性达到88%、88%、92%和88%,准确性分别达到92%、96%、89%和85%。而相比之下,联合应用CEA、CA25、CA72-4和CA199的敏感性、特异性和准确性仅为40%、76%和51%。这提示,上述标志物如被应用于胃癌的筛查和早期诊断,将具有较高的临床价值。此外,我们的研究还发现,这些标志物也具有预测预后的价值。产生高浓度的COPS2、CTSF、NT5E、TERF1抗体的胃癌患者,其生存时间明显长于自身抗体浓度低者,产生高浓度自身抗体的胃癌患者生存率也高于自身抗体浓度低者,进一步说明,患者产生的自身抗体具有对抗肿瘤的作用[8]。该研究得到国家科技部和国家自然科学基金的资助,并获得了7项发明专利。

在这项研究中,我们创新性地应用“组学”的高通量研究思路,改变传统的用T细胞识别或者用已知抗体寻找肿瘤抗原的方法,而利用肿瘤产生自身

抗体，用抗原去识别肿瘤患者的自身抗体，以自身抗体作为肿瘤标志物。

2. 血清小分子RNA（miRNA）作为胃癌分子标志物的研究：血清中存在大量的miRNA，而肿瘤细胞通过微囊泡或者凋亡等途径向循环血中释放miRNA，这些肿瘤释放的miRNA可以作为胃癌的诊断标志物[9]。为筛选特异miRNA血清标志物，本团队采用miRNA芯片，检测胃癌患者和健康对照者血浆中miRNA的表达谱，比较并筛选出具有显著差异的miRNA，经定量RT-PCR验证获得候选可作为标志物的miRNA，再用大样本病例进行验证[10-11]。结果发现，胃癌患者血浆中miRNA-199a-3p的表达量为57.2±7.3，分别较健康对照者（13.9±2.7）、胃癌前病变者（19.2±2.5）和结直肠癌患者（21.1±2.5）均显著升高（均$P<0.05$）；且胃癌患者血浆中miRNA-199a-3p的高表达与肿瘤浆膜侵犯（$P<0.001$）、N_{2-3}期淋巴结转移（$P=0.014$）及Ⅲ~Ⅳ期肿瘤（$P=0.003$）有关，而与性别、年龄、肿瘤大小、位置及病理分化类型无关（均$P>0.05$）。此外，随着胃癌TNM分期的进展，血浆中miRNA-199a-3p的表达也相应逐步升高。

血浆中miRNA-199a-3p表达对胃癌判断的受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve，ROC）曲线下面积（area under curve，AUC）为0.837，显著高于联合血清CEA、CA72-4、CA19-9和CA12-5四个肿瘤指标检测的0.681（$P=0.001$）。当血浆miRNA-199a-3p表达的截断值为12.15时，其对胃癌判断的敏感性为80%，特异性为75%，准确性为78%。

为进一步检验上述血浆miRNA对早期胃癌诊断的临床价值，我们发现，早期胃癌患者血浆中miRNA-199a-3p的表达为38.6±12.0，显著高于健康对照组。而胃癌前病变者和健康对照者间血浆miRNA-199a-3p的表达相近。血浆中miRNA-199a-3p表达对早期胃癌判断的AUC为0.808，显著高于联合肿瘤指标检测的0.549（$P<0.001$）。当血浆miRNA-199a-3p表达的截断值为13.06时，其对早期胃癌判断的敏感性为76%，特异性为74%，准确性为75%。血浆miRNA-199a-3p可作为敏感性和特异性均较好的候选的胃癌血液肿瘤标志物[10-11]。

3. 利用活细胞免疫筛选制备胃癌特异性抗体：本课题组利用活性胃癌细胞株（MKN45、SGC7901、NGC823及MKN28）的混合免疫A/J小鼠，通过杂交瘤联合高通量流式技术筛选并获得抗胃癌单克隆抗体，对其中的MS57-2.1单抗进行了鉴定及其功能研究[12]。结果表明，MS57-2.1单克隆抗体可以高亲和地与特定胃癌细胞株结合，而几乎不与正常人外周血细胞结合。酶联免疫吸附试验结果表明，MS57-2.1单克隆抗体可与胃癌组织膜蛋白结合，而不与临床常用的胃癌相关抗原结合。免疫荧光检测表明，MS57-2.1单克隆抗体的靶抗原定位于胃癌细胞膜表面。MS57-2.1单抗处理胃癌细胞MKN45和BGC823后，其移动能力和侵袭能力受到明显抑制。在裸鼠肿瘤腹腔播散实验中，MS57-2.1单抗处理后小鼠肿瘤播散收到明显抑制。经免疫沉淀结合质谱鉴定，MS57-2.1抗体所识别的肿瘤抗原为ALPI和ALPPL。上述结果证明，单克隆抗体MS57-2.1是具有胃癌特异性的功能性单克隆抗体，在体外和体内具有抑制胃癌细胞迁移和侵袭的作用，是具有潜在应用价值的、胃癌靶向治疗候选抗体药物[12]。本项研究已经获得两项发明专利，其中一项为美国专利。目前一方面向治疗性抗体开发[13-14]；另一方面向嵌合抗原受体T细胞免疫疗法（chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy，CAR-T）开发[15]。

以往多是在有目标抗原的情况下制备相应的抗体，但是目前对胃癌发生发展中的关键抗原还知之甚少。因此，在本项研究中，我们以活细胞、全抗原免疫的思路，再结合高通量筛选，最终获得胃癌特异性抗体。

4. 多嵌段共聚物自组装纳米胶束输送miRNA和抗癌药物用于胃癌治疗的研究：近年来，关于miRNA在肿瘤中的生物学作用研究越来越多，不少研究认为miRNA可以作为治疗的“药物”。然而，miRNA的输送是个关键瓶颈。为此，我们设计一种纳米颗粒可以包装miRNA，使其可靶向肿瘤细胞并在肿瘤细胞内释放出miRNA，达到治疗目的。

多嵌段共聚物自组装纳米胶束，是通过分子胶将亲水模块、疏水模块以及含氮模块的大分子连接起来，形成一类多嵌段共聚物。作为基因药物和疏水的抗癌药物的双重运输载体，共聚物的支化度、疏水模块、亲水模块以及含氮模块的分子量及其比例，对改善疏水药物的水溶性、载药量以及提高miRNA的转染效率和降低毒性等都具有重要影响。载体运载抗癌药物与miRNA进入肿瘤组织，由于肿瘤部位的谷胱甘肽浓度远远高于正常组织，可使运输载体的二硫键断裂，将运载的抗癌药物及miRNA释放出来，可帮助逆转抗癌药物的多药耐药性。

基于此,我们首先合成一系列基于分子胶的嵌段共聚物模块,然后利用分子胶组合灵活的特点,得到多种组合的嵌段共聚物自组装纳米胶束,以便快速筛选针对具体药物分子的稳定的纳米胶束结构。根据初步的筛选结果,合成该多嵌段共聚物胶束,并根据生物学评价结果,再次调整嵌段共聚物各模块的结构及其组成比例,构建一种载药量大、转染效率高、毒性低的稳定纳米胶束。该纳米胶束可同时运载疏水的抗癌药物与miRNA,并且在该类纳米胶束的表面进一步修饰如叶酸等靶向分子,以及双功能螯合剂DTPA,使其与核素Tc^{99m}或Gd螯合,以便利用活体动物SPECT/CT或MR成像,观察载药纳米胶束在体内的分布以及对肿瘤的治疗效果。我们将该合成纳米材料用于细胞学实验和动物体内实验,为最终发展成为一种多功能、靶向抗癌药物/基因药物的双重运输载体奠定良好基础[16-17]。本纳米颗粒也可以输送脂溶性药物,对于治疗腹膜转移灶具有潜在应用价值。该项研究已经在体内体外实验得到证实,并获得3项发明专利。

总体而言,基础研究与临床研究的紧密结合,需要以临床亟需解决的问题为出发点,以提高患者诊疗效果为宗旨,以基础研究为基本手段,以多学科交叉融合为途径。加强转化医学研究,一定能够不断提高我国胃癌的诊治水平,提高胃癌患者的总体生存率,改善胃癌患者的生存质量。

参 考 文 献

[1] Engel GL. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine[J]. Science, 1977, 196(4286): 129-136. DOI: 10.1126/science.847460.

[2] 巩睿智,吴晋,张琼,等. 从“4P”到“5P”医学模式的转变及其对肿瘤研究的影响[J]. 医学与哲学, 2017, 38(10): 1-3. DOI: 10.12014/j.issn.1002-0772.2017.05b.01.

[3] Choi DW. Bench to bedside: the glutamate connection [J]. Science, 1992, 258 (5080) : 241 - 243. DOI: 10.1126 / science. 1357748.

[4] Geraghty J. Adenomatous polyposis coli and translational medicine [J]. Lancet, 1996, 348 (9025) : 422. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)64535-7.

[5] Zerhouni E. Medicine. The NIH Roadmap [J]. Science, 2003, 302(5642): 63-72. DOI: 10.1126/science.1091867.

[6] Desmetz C, Mange A, Maudelonde T, et al. Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(10): 2013-2024. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01355.x.

[7] Tan HT, Low J, Lim SG, et al. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection[J]. FEBS J, 2009, 276(23): 6880-6904. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07396.x.

[8] Yang L, Wang J, Li J, et al. Identification of serum biomarkers for gastric cancer diagnosis using a human proteome microarray [J]. Mol Cell Proteomics, 2016, 15(2): 614-623. DOI: 10.1074/mcp.M115.051250.

[9] Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2014, 11(3): 145-156. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.5.

[10] Li C, Li JF, Cai Q, et al. MiRNA - 199a - 3p: a potential circulating diagnostic biomarker for early gastric cancer [J]. J Surg Oncol, 2013, 108(2): 89-92. DOI: 10.1002/jso.23358.

[11] Li C, Li JF, Cai Q, et al. miRNA - 199a - 3p in plasma as a potential diagnostic biomarker for gastric cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20 Suppl 3: S397-S405. DOI: 10.1245/s10434-012-2600-3.

[12] Li M, Gao J, Feng R, et al. Generation of monoclonal antibody MS17 - 57 targeting secreted alkaline phosphatase ectopically expressed on the surface of gastrointestinal cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77398. DOI: 10.1371/journal.pone.0077398.

[13] Adams JL, Smothers J, Srinivasan R, et al. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology[J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(9): 603-622. DOI: 10.1038/nrd4596.

[14] Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer [J]. Lancet Oncol, 2004, 5(5): 292-302. DOI: 10.1016/S1470-2045(04)01467-6.

[15] Wang RF, Wang HY. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine[J]. Cell Res, 2017, 27(1): 11-37. DOI: 10.1038/cr.2016.155.

[16] He C, Zhang Z, Yang Q, et al. Reductive triblock copolymer micelles with a dynamic covalent linkage deliver antimiR-21 for gastric cancer therapy[J]. Polym Chem, 2016, 7(26): 4352-4366. DOI: 10.1039/C6PY00651E.

[17] He C, Yang Q, Tan L, et al. Design and synthesis of redox and oxidative dual responsive block copolymer micelles for intracellular drug delivery[J]. Eur Polym J, 2016, 85: 38-52.

(收稿日期:2019-09-05)

(本文编辑:朱雯洁)

本文引用格式

李建芳,朱正纲,刘炳亚. 浅谈胃癌转化医学研究的“瑞金体会”[J]. 中华胃肠外科杂志, 2020, 23(2): 140-143. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2020.02.008.