

ICP - Mass Spectrometry
High Content Imaging

传统化药

机制研究

精准治疗

单细胞水平研究顺铂化疗药物耐药机制

——单细胞 ICP-MS 联合高内涵成像系统揭秘顺铂类化疗药物对宫颈癌和三阴性乳腺癌耐药机制，结合基因组学等先进技术，加快精准治疗研究进程。



单细胞 ICP-MS
Nexlon2000

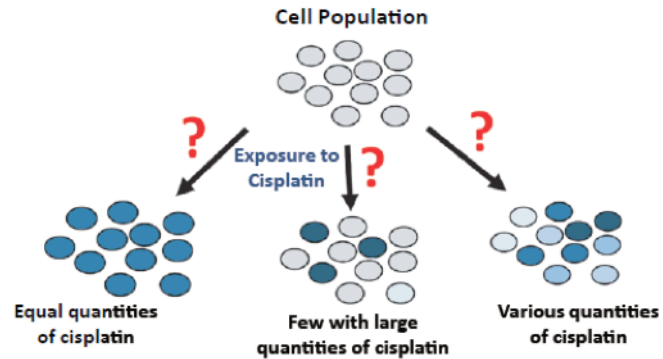


高内涵成像分析系统
Operetta CLS

顺铂 (Cisplatin) 是 1978 年经 FDA 批准用于临床治疗癌症的化疗药物。顺铂药物的治疗机制是通过结合形成 Pt-DNA 复合物，干扰 DNA 复制合成，从而杀死快速增殖的癌细胞，属于细胞周期非特异性药物。许多癌症患者最初对基于铂类的治疗比较敏感，但一段时间后，患者通常对顺铂治疗表现出耐药性，导致了癌症复发。因此在化疗后细胞必须修复 DNA 损伤，否则 DNA 复制受阻会导致细胞死亡。对于顺铂的耐药机制研究，也是目前抗癌药物研究热点。目前三种主要的分子机制包括 DNA 修复加速，胞浆失活加速和细胞摄取药物能力的变化。其中，细胞摄取药物能力的变化主要表现在细胞对顺铂的摄入能力降低及顺铂转运加速。

单细胞水平顺铂摄入研究^[1]

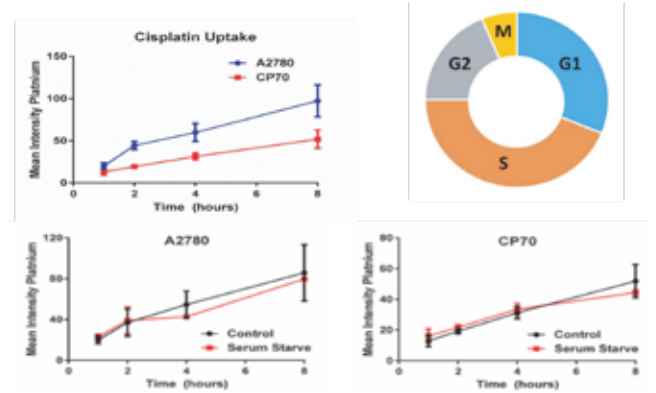
细胞内顺铂的摄入与肿瘤负荷相关，也就是说肿瘤对顺铂反应降低会导致细胞内顺铂的含量降低。所以，分析单个细胞水平对顺铂的摄入和分布对于评估治疗的有效性具有非常重要的意义。过多顺铂进入细胞内会增加DNA损伤和细胞死亡的频率。了解单个细胞水平及细胞亚群对顺铂的摄入的机制将能为新疗法的开发提供科学依据，以改善肿瘤对顺铂的耐药性，降低肿瘤复发率。



单细胞电感耦合等离子体质谱 (SC-ICP-MS) 是以单颗粒电感耦合等离子体质谱技术为基础，测量单个细胞（或单个纳米颗粒）在进入等离子体时产生的离散信号，对溶液中对金属元素进行评估与定量。每个细胞中的金属成分离子化，产生离子流，检测器以每秒 100000 数据点的速度快速对信号采集测量，从而使得单个细胞中的金属含量能被定量到阿克 (ag) / 每细胞的水平。相比测量细胞内顺铂摄入的传统方法，SC-ICP-MS 所得结果的信息量更加全面。



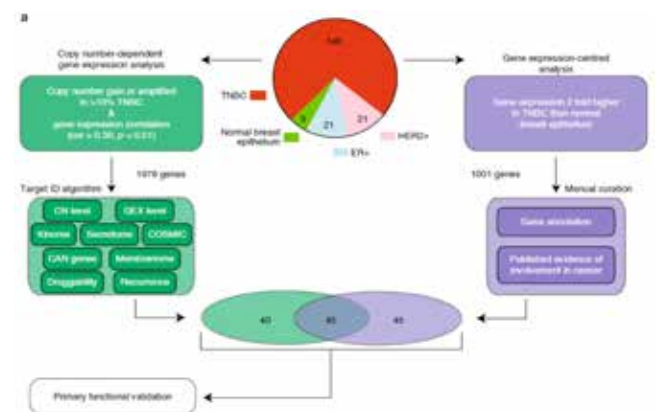
通过对两株卵巢癌细胞系 A2780（顺铂敏感型）和 A2780/CP70（顺铂耐药型）顺铂摄入量的实时检测发现：相比 A2780 敏感细胞系，顺铂摄入在耐药性的 A2780/CP70 细胞系上水平降低；但顺铂摄入的细胞差异性不是由于细胞周期的不同，因为血清饥饿细胞并不改变顺铂的整体摄入。顺铂摄入的胞内差异性是由于其他尚未确定的因素造成的。



单细胞水平中心粒扩增 (Centrosome Amplification) 研究

“三阴性”乳腺癌 (Triple-Negative Breast Cancers, TNBC) 是指雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 和人表皮生长因子受体 (HER2) 均阴性的一种特殊类型乳腺癌。“三阴性”乳腺癌约占所有乳腺癌的 10-20%，但因其缺乏内分泌及抗 HER2 治疗的靶点，目前治疗尚以传统外科切除、化疗及放疗为主。铂类药物化疗是目前针对晚期乳腺癌治疗的标准治疗方案。^[2] 顺铂类药物已被报道通过解偶联 DNA 复制周期和中心粒复制调控造成中心粒扩增，从而抑制肿瘤细胞增殖。^[3]

Nirmech Patel 等人 2018 年 Nature communication 杂志上，结合整合基因组学、RNAi 技术和功能型验证，在乳腺癌和非恶性细胞上对 130 多个潜在基因研究发现，有 13 个基因簇通过影响细胞周期检验点、DNA 损伤应答和恶性细胞选择性分裂上调“三阴性”乳腺癌发病倾向。其中 KIFC1 驱动蛋白作为高选择性的恶性细胞靶标，通过顺铂化疗与 KIFC1 联合协同效果的研究结果进一步表明，KIFC1 最有潜力成为新型药物靶点。^[4]



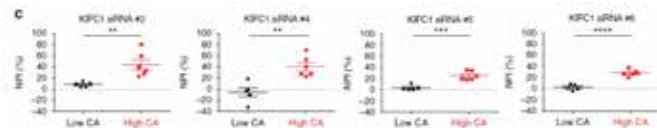
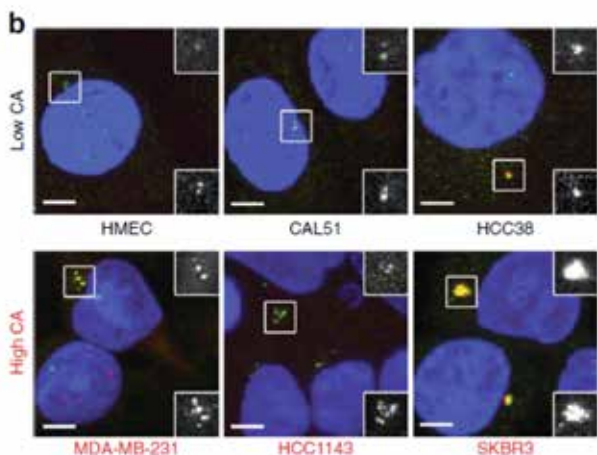
在研究顺铂化疗药物与 KIFC1 协同治疗实验设计中，两个关键的单细胞水平研究方法：中心粒扩增打分和多极性有丝分裂实验，都是使用 Operetta 高内涵成像系统进行共聚焦高分辨率图像采集后，再通过 Hamony 软件对中心粒扩增和多极性有丝分裂进行自动数据分析及数据挖掘。

中心粒扩增打分实验设计：

为在乳腺癌细胞模型上确认 KIFC1 与中心粒扩增的相关性，11 种乳腺癌相关的细胞株用于中心粒扩增打分实验。免疫荧光方法标记中心粒组装关键蛋白激酶 Aurora A (绿色) 和中心粒标记物 CP110 (红色)，Hoechst 标记细胞核 (蓝色)，通过 Operetta 高内涵成像获取高分辨率图像，如下图所示，Low CA 组中心粒数量、荧光强度和面积都远低于 High CA 组，后续通过 Hamony 软件对中心粒扩增进行分析打分，发现针对 KIFC1 基因的 #2/#4/#5/#6 四组 SiRNA 能有效增加 KIFC1 依赖的中心粒扩增。

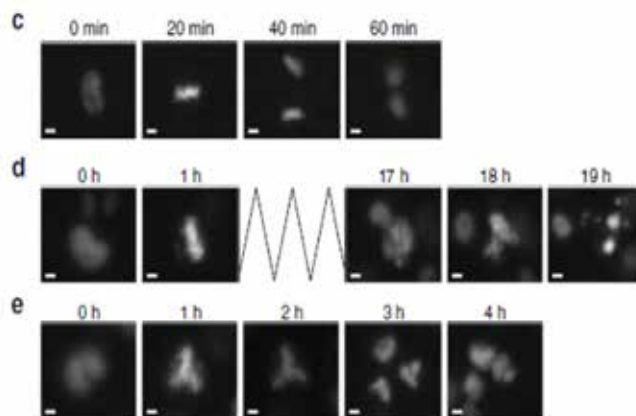
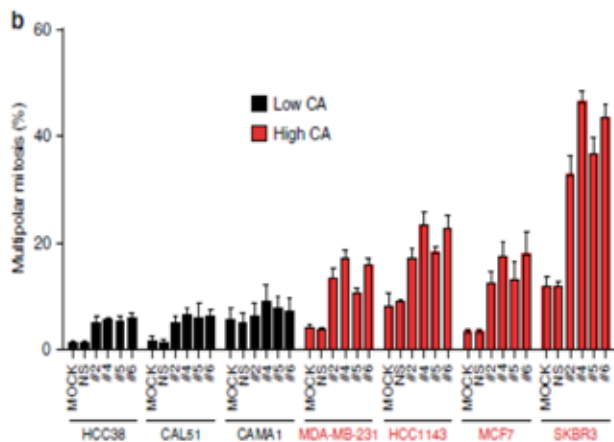
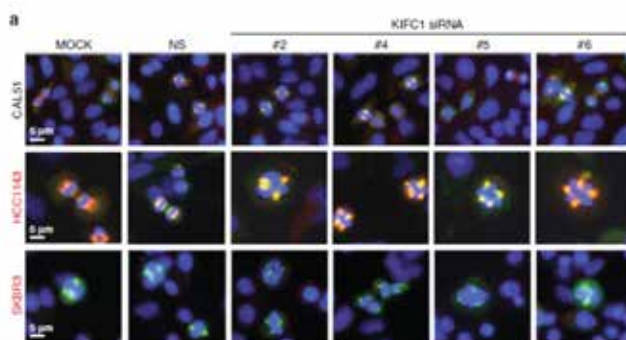
a

| Cell Line | CA Score |
|------------|----------|
| HMEC | 0–2% |
| CAL51 | 0–2% |
| HCC38 | 0–2% |
| CAMA1 | 0–2% |
| SUM149 | 3–7% |
| BT20 | 18–22% |
| MDA-MB-231 | 18–22% |
| HCC1143 | 22–24% |
| MCF7 | 25–30% |
| HCC1954 | 40–43% |
| SKBR3 | 55–60% |



多极性有丝分裂实验设计：

免疫荧光标记 Aurora A (绿色) 和双极有丝分裂驱动蛋白 Eg5 (红色)，Hoechst 标记细胞核 (蓝色)，通过 Operetta 高内涵成像获取高分辨率图像及 Hamony 软件进行多极性有丝分裂分析打分，发现在 3 株中心粒高扩增的细胞系和 4 株中心粒低扩增细胞系中，KIFC1 沉默都能显著提高单个细胞的纺锤体数量，造成有丝分裂多极性 (下图 a-b)。并且通过在 MDA-MB-231 细胞株上的实时动态检测进一步验证了 KIFC1 沉默对有丝分裂多极性的影响 (下图 c)。



后续通过进一步实验研究验证，顺铂药物能提高中心粒扩增，且能在 KIFC1 沉默的情况下，提高顺铂药物对中心粒扩增的敏感性。这就意味着 KIFC1 蛋白可以作为顺铂化疗药物联合治疗的潜在药物靶点，用于针对三阴性乳腺癌患者的精准治疗方案。

参考文献：

1. 最新研究进展——利用单细胞电感耦合等离子体质谱评估卵巢癌细胞对顺铂的摄入
2. Untch, M. et al. ABC3 consensus commented from the perspective of the German guidelines: Third International a Consensus Conference for Advanced Breast Cancer (ABC3), Lisbon, 07. 11. 2015. Geburtshilfe Frauenheilkd. (2016) 76,156–163.
3. Zou, J. et al. FancJ regulates interstrand crosslinker induced centrosome amplification through the activation of polo-like kinase 1. Biol. Open (2013) 2,1022–1031.
4. Nirmesh Patel et al. Integrated genomics and functional validation identifies malignant cell specific dependencies in triple negative breast cancer. Nature Communication (2018) 9:1044.

珀金埃尔默企业管理（上海）有限公司
地址：上海张江高科技园区张衡路1670号
邮编：201203
电话：021-60645888
传真：021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取我们全球办公室的完整列表，请访问 www.perkinelmer.com/ContactUs

©2017, PerkinElmer, Inc. 版权所有。保留所有权利。PerkinElmer® 是 PerkinElmer, Inc. 的注册商标。所有其他商标均为其各自所有者的财产。所有解释权归PerkinElmer.

200018_CHN_01 PKI



欲了解更多信息，
请扫描二维码关注我们的
微信公众账号