

特邀综述

非损伤微测技术在肿瘤个体化治疗中的潜在应用

刘蕴琦^{1,*}, 叶斌², 陆旭³, 杨鑫³¹ 中关村 NMT 联盟, 北京 100080; ² 旭月 (北京) 科技有限公司, 北京 100080; ³ 北京医院, 北京 100730

摘要: 非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 是一种研究活体材料生理功能的技术, 可在不损伤样品的前提下检测分子 / 离子进出生物活体的三维流速信息。因其活体检测、非损伤性、高分辨率、动态实时等特点, 常用于探索其它技术难以测得的生理特征。NMT 虽广泛应用于医学生理学、植物学、动物学等领域, 而且已成为植物逆境研究的必备技术, 但作为二十一世纪的一门新兴技术, 在各学科研究方向愈加细化的发展趋势下, NMT 研究依旧存在众多空白地带。当前, 在国内外恶性肿瘤死亡率持续高企的背景下, 非损伤微测技术在肿瘤研究中的成果与日俱增。本文介绍了 NMT 近年来在肿瘤生理研究特别是肿瘤个体化治疗中的潜在应用, 其中包括神经、消化系统等与肿瘤研究相关的应用。

关键词: 非损伤微测技术; 肿瘤; 流速; 离子; 分子

1. 非损伤微测技术

1.1. 非损伤微测技术概念

非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology: NMT) 是一种超高灵敏度, 非接触、流速为单位, 检测材料外部离子分子浓度及其梯度的技术。

1.2. 非损伤微测技术起源

非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology: NMT) 及其命名, 是前美国航空航天局高级研究员、美国扬格公司

和北京旭月公司创始人许越教授, 在匡廷云院士、杨福愉院士、林克椿教授的启发和帮助下, 以美国科学家 Lionel Jaffe 离子振荡电极技术为理论基础, 经过 20 多年的不懈努力, 经过模块化、自动化、专业化、智能化、标准化的技术创新, 商品化、商业化、产业化、国产化、国际化的应用创新, 拥有自主知识产权, 并于 2021 年通过科技部认定机构的 ‘国际领先’ 评审。

1.3. 非损伤微测技术特点

NMT 具有诸多优于同类技术的特点。

(1) 活体非损伤, 即能够保持被测样品完

收稿日期: 2022-10-10; 接收日期: 2022-10-10

* 通讯作者 E-mail: yunqi@nmtia.org.cn

整且在真实生理环境状态下进行检测；(2) 实时动态，获取的是一段时间内样品的实时动态数据；(3) 高分辨率，NMT 的流速分辨率能够达到 $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，相比于测浓度，高出 3-6 个数量级；(4) 样品尺寸范围广，从富集的细胞器到单细胞、细胞层、组织、器官甚至生物整体 [6]，均可以检测；(5) 样品无需标记，便捷且安全环保；(6) 可测分离离子指标众多， Ca^{2+} 、 H^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 O_2 、 H_2O_2 、吲哚乙酸 (IAA)、谷氨酸 (Glu) 等指标 [2, 6] 均已实现商业化检测。随着技术的发展，NMT 能够测量的离子分子种类也在不断增加，为获得生物样品内外分子 / 离子运动的信息提供了理想的实验平台，其目前已广泛运用于医学、植物学、动物学、农业科学、药理学、环境科学等研究领域。

2. 肿瘤个体化治疗研究现状

近年来肿瘤化疗进展显著，但在不同种族乃至个体间仍存在比较明显的化疗敏感性差异。当前常用的肿瘤治疗药物的有效性低

于 70%，20%-40% 的患者甚至可能接受了错误的治疗 [7]。如何鉴别患者之间存在的个体差异，并利用这些差异来合理地指导临床用药，已经成为医学界日益关注的焦点。在肿瘤个体化治疗研究中，基因组学、蛋白质组学、代谢组学等被广泛应用，推动着新靶点筛选、靶向药研发、化疗方案等的优化和改进 [7]。但是，当前研究依然立足于“肿瘤是一种分子病，根本原因是基因的改变” [8] 这一观点，研究对象也为离体的肿瘤细胞。事实上，机体内肿瘤细胞周围环境深刻影响着其增殖的速度、方式等特性，而离体培养的细胞是在特殊环境下进行增殖，极有可能出现与原位肿瘤细胞不同的表现型。随着后基因组时代组织微结构理论和干细胞理论 [9, 10] 的出现，研究人员发现，肿瘤细胞和组织微环境对于肿瘤的个体化治疗起着举足轻重的作用。但是，如何精确测量活体肿瘤细胞和组织与其所处微环境之间的物质和能量交换，成为这一研究的桎梏。

3. 非损伤微测技术在肿瘤个体化治疗中的潜在应用

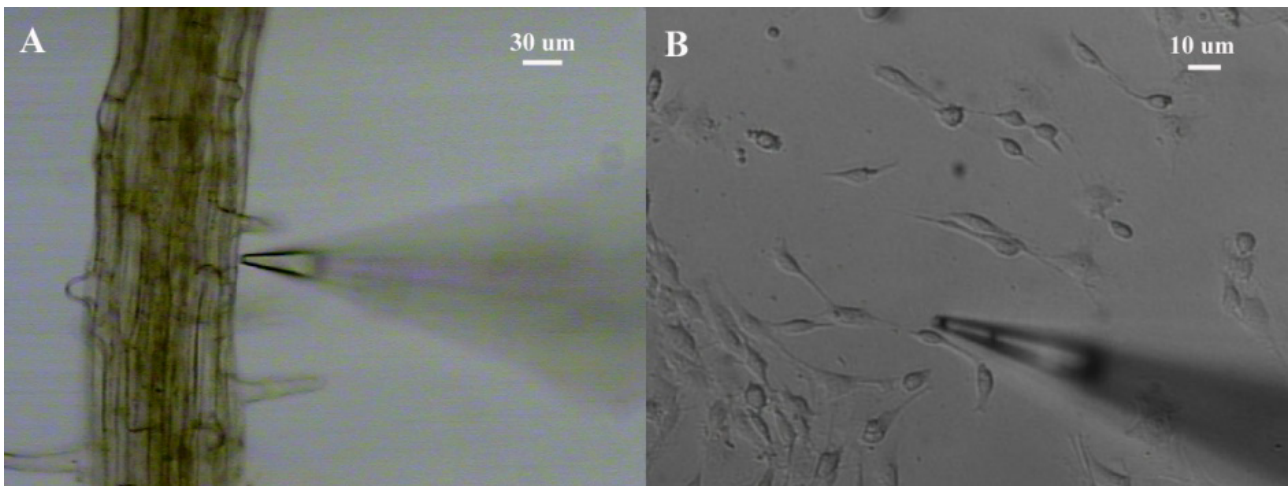


图 1. 非损伤微测技术检测实时截图。A. 拟南芥根部成熟区，B. 神经元细胞

3.1. 非损伤微测技术在肿瘤药敏试验中的潜在应用

3.1.1. 肿瘤药敏试验指导化疗药物个体化现状

在恶性肿瘤治疗的诸多手段中，化疗作为一种全身性的肿瘤治疗方法，可最大限度地杀灭患者体内的肿瘤细胞。但在临床实践中，化疗效果往往不尽如人意，这其中，肿瘤细胞对化疗药物产生耐药是困扰肿瘤治疗的关键性问题。据美国癌症协会估计，90%以上的肿瘤死亡者，在不同程度上受到耐药影响。随着分子生物学、细胞生物学的进展，目前已创立体内和体外两大系列、十多种药敏试验方法。

3.1.2. NMT 用于肿瘤抗药性研究

肿瘤胞外呈酸性可以有效地阻断药物进入细胞或中和药物，并且将药物隔绝在酸性的细胞囊泡中以阻止药物到达细胞内的作用靶点，从而降低其对肿瘤细胞的杀伤作用。宋谨等 [4] 使用非损伤微测技术建立了药物抗性研究方法 (drug resistance study method, DRSM)，该方法可用于研究器官、组织、细胞外离子、分子活性与肿瘤细胞耐药性之间的相互关系。结果显示，耐药株乳腺癌细胞 H^+ 流在加阿霉素前趋近于零，而敏感株乳腺癌细胞 H^+ 呈明显内流。敏感株和耐药株加阿霉素后 H^+ 均呈外流，但耐药株的 H^+ 外流为敏感株 5 倍 (图 2)。研究为胞外 H^+ 活性与肿瘤耐药性的相互关联提供了直接证据。

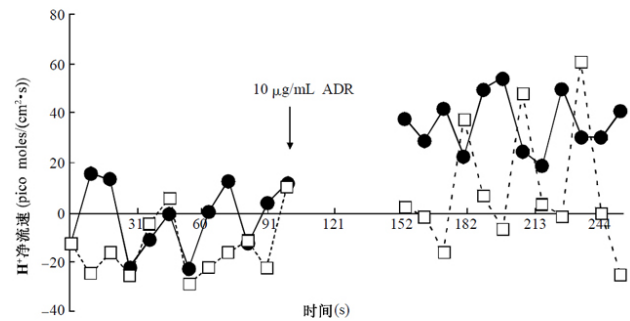


图 2. ADR (阿霉素) 处理前后乳腺癌细胞 H^+ 净流速。正值表示外排，负值表示内流。

●耐药株 MCF-7/R, □敏感株 MCF-7/S

3.1.3. 非损伤微测技术在药理学研究中的应用

在化疗药物敏感性检测方法中，原代肿瘤细胞培养是迄今为止最为理想的药敏试验方法之一。但近期的研究表明，组织结构的变化为组织内细胞的增殖分化提供了不利的微环境，导致肿瘤的发生。从对肿瘤细胞的研究深入到对肿瘤组织的研究，更能够从本质上解释肿瘤的发病机理。Zhu 等 [13] 利用非损伤微测技术，直接实现了对大鼠结肠粘膜的 Cl^- 流速的检测，研究结果显示，恩他卡朋诱导了大鼠结肠粘膜中 cAMP 依赖的 Cl^- 外流 [11, 12]。此外，还发现大鼠结肠粘膜在大黄素作用下出现大量的 Cl^- 外流是与肥大细胞脱粒以及粘膜下胆碱能和非胆碱能神经元的激活密切相关。

3.2. 非损伤微测技术在肿瘤代谢组学中的应用

3.2.1. 代谢组学在肿瘤个体化治疗中的应用现状

肿瘤细胞独特的代谢特点使其在生长增殖中产生异于寻常的代谢物。利用代谢组学技术对这些特异性代谢物进行分析,寻找新型标记物,目前已在肿瘤的筛查及早期诊断中取得了可喜的成果 [14-16]。代谢组学能够通过药物代谢动力学及对药物引起的内源性代谢物变化方面的研究,检测出药物引起的内源性代谢物的变化,直接反映体内生物化学过程和原因,阐明药物作用靶点或受体,指导抗肿瘤细胞药物的个体化治疗,以评价临床疗效及安全性。

3.2.2. NMT 在肿瘤细胞凋亡标志物研究中的应用

NMT 目前可检测到的分子、离子相对分子量均小于 1000,从广义的概念上说,NMT 检测到的分离子流速,可归为代谢组学的范畴。由于 NMT 的活体检测优势,相对于传统代谢组学,可以在不损伤样品的情况下检测代谢产物,可谓“活体代谢组学”。目前,在化疗、放疗法等疗效不稳定且有较大的副作用的背景下,光动力疗法 (PDT) 作为一种微损伤的治疗手段逐渐地进入人们的视野。Song 等 [17] 以口腔鳞状癌细胞 (OSCC) 作为研究对象,通过非损伤微测技术检测显示, PDT 处理后, O_2 内流逐渐增加, Ca^{2+} 外排速率也明显高于未处理组,同时,细胞凋亡率、凋亡因子等各项指标均上升。这一研究结果表明, O_2 及 Ca^{2+} 流速变化可能是 PDT 诱导的细胞凋亡的早期信号。Hu 等 [18] 发现,正常状态下 C6 神经胶质瘤细胞 Ca^{2+} 少量外流, K^+ 内流, PDT 干预后,发生明显的 Ca^{2+} 内流和 K^+ 外流,细胞发生死亡。这项研究更进一步的揭示了

PDT 引起神经胶质瘤细胞死亡的分子机制,显示出癌细胞的死亡可能与 Ca^{2+} 内流和 K^+ 外流这个转变的发生有关。

3.3. 非损伤微测技术在靶向个体化抗癌药物研究中的潜在应用

3.3.1. 靶向个体化抗癌药物研究现状

分子靶向抗肿瘤药 (molecularly targeted cancer therapy) 是指针对在肿瘤发生、发展过程中具有关键作用的特定分子靶标进行治疗的药物 [19]。目前已经成为恶性肿瘤治疗的新手段,日益受到临床重视。靶向抗肿瘤药物包括具有靶向性的表皮因子阻断剂、针对某种特定细胞标志物的单克隆抗体、针对某些癌基因和癌细胞的遗传学标志的药物、抗肿瘤疫苗及基因治疗等 [20]。黄灿等 [21] 应用 SP600125 抑制剂后,发现肿瘤细胞 p-JNK 蛋白的表达和细胞凋亡率均增加,同时还发现 JNK 信号传导途径参与肝癌多药耐药 MDR 基因及多药耐药蛋白 p-gp 的表达,对肿瘤耐药有调控作用。JNK 作为促细胞凋亡因子,是肿瘤治疗研究的方向之一, NMT 也已经在细胞凋亡及凋亡因子方向的研究取得了一定的成果。

3.3.2. 非损伤微测技术在细胞凋亡研究中的应用

Keefe 等 [22] 检测了受精卵在 H_2O_2 处理下的形态和胞外 K^+ 的变化。实验发现细胞凋亡被 H_2O_2 等物质激活,并利用非损伤微测技术观察到显著的 K^+ 外流,这是由于细胞启动程序性死亡时会激活 K^+ 通道。

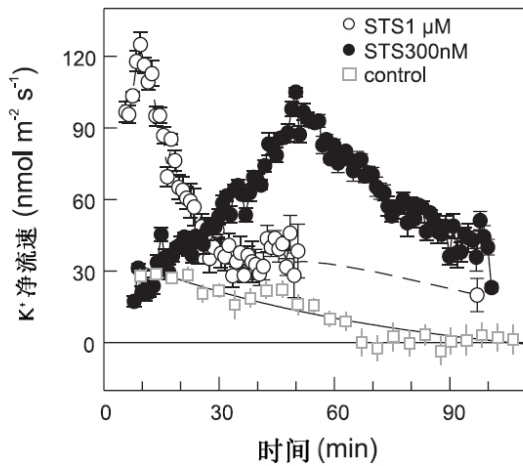


图 3. STS (十字孢碱) 处理 T 淋巴细胞后的 K⁺ 净流速, 正值表示外排, 负值表示内流。高浓度 STS 处理较低浓度 STS 处理, K⁺ 外排更迅速, 峰值更大。

Valencia 等 [23] 发现 1 μ M 十字孢碱处理 T 细胞后, 在引起 T 细胞凋亡的同时, 利用非损伤微测技检测到快速的 K⁺ 外流, 约 15min 达到峰值, 随后减弱 (图 3)。与此同时, 利用膜片钳技术也记录到 K⁺ 通道的电流增加, 并伴随着膜去极化的急剧下降。研究认为离子流作为细胞凋亡的早期事件, K⁺ 外排引起了细胞的收缩, 激活了凋亡蛋白酶, 从而诱发凋亡。Bcl-xL 促进线粒体和胞质之间代谢物的交换, 是成年大脑中主要的抗细胞凋亡蛋白, Bcl-xL 过表达增加了突触的数量和大小。Alavian 等 [24] 发现 Bcl-xL 过表达的神经元有更高的 ATP 水平, 且外源 Bcl-xL 能够减少或者抑制 ATP。神经元 O₂ 流速检测结果显示, Bcl-xL 过表达神经元的 O₂ 内流速率相对较小 (图 4), 非损伤微测技术为 Bcl-xL 引起神经元代谢效率增加提供了又一代谢上的证据。

3.4. 非损伤微测技术在离子失衡诱导的疾病中的应用

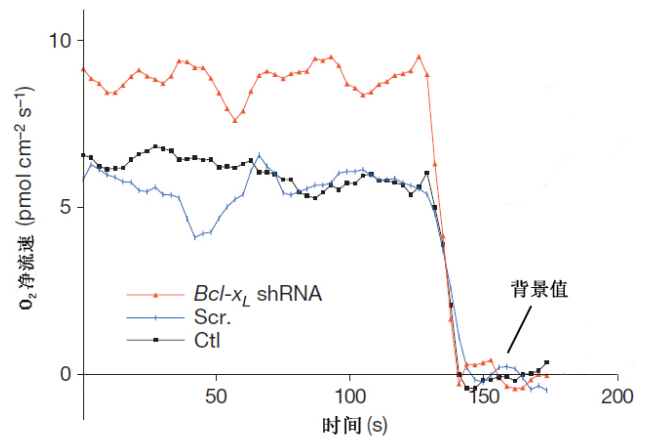


图 4. 神经元 O₂ 净流速, 正值表示内流, 负值表示外流。神经元 Bcl-xL 的表达量与 O₂ 内流速率成正比。Ctl: 正常对照组, Bcl-xL shRNA: Bcl-xL 表达抑制组, Scr.: Bcl-xL 超表达组; 背景值: 垂直方向上远离细胞 200 μ m 后的测量值。

Ca²⁺ 是机体各项生理活动不可缺少的离子。它对于维持细胞膜两侧的生物电位、神经传导功能、正常的肌肉伸缩与舒张功能起着重要的作用, 某些激素的作用机制也是通过 Ca²⁺ 表现出来的。Ca²⁺ 的失衡会引起诸如糖尿病、风湿病、呼吸道疾病、神经疾病等等, 其与肿瘤的形成也有密不可分的关系。

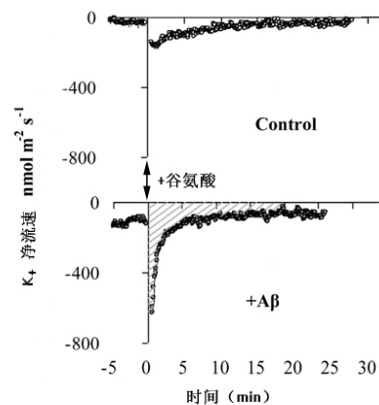


图 5. 对照组以及 A β (β 淀粉样蛋白) 处理后的初级皮层神经元在谷氨酸刺激下 K⁺ 的净流速, 正值表示吸收, 负值表示外排。A β 处理后的神经元, 在谷氨酸的刺激下 K⁺ 外排速率明显大于对照组。

Shabala 等 [25] 研究 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 在阿尔茨海默症发病机理中的作用时发现, $1\mu M A\beta$ 处理初级皮层神经元后, 在谷氨酸的诱导下 K^+ 外排速率明显大于未经 β -淀粉样蛋白处理的对照组 (图 5), Ca^{2+} 也出现了同样的外排速率增大趋势。研究表明神经元失去维持 Ca^{2+} 和 K^+ 平衡的能力可能是细胞对 $A\beta$ 早期反应的指示。Chung 等 [26] 在研究阿尔茨海默症的金属螯合疗法时发现 Zn7MT-2A 可阻止 $Cu(II)A\beta$ 诱导的氧化胁迫对神经元产生的不利影响, 非损伤微测技术检测结果显示, $Cu(II)A\beta$ 引起神经元 K^+ 外流, Ca^{2+} 内流, 而加入 Zn7MT-2A 会阻止 $Cu(II)A\beta$ 引起的流的改变, Zn7MT-2A 维持了神经元的 K^+ 、 Ca^{2+} 平衡, 降低了 $Cu(II)A\beta$ 对神经元的损伤作用。

3.5. 非损伤微测技术与膜片钳技术结合在肿瘤研究中的应用

非损伤微测技术已经与激光共聚焦技术、膜片钳技术等技术结合, 实现了分离信息交换的内外兼测。Yang 等 [27] 利用 NMT 与膜片钳技术, 发现鼻咽癌细胞在低渗环境发生细胞调节性容积减小这一过程中, K^+ 外流指出现在最初的一段时间, 随着胞内 H^+ 外流至细胞外表面导致膜上的 K^+ 通道关闭后, H^+ 的外流代替了 K^+ 的外流。这是第一次发现在低渗诱导的细胞调节性容积减小过程中 K^+ 和 Cl^- 的转运不偶联, 一定程度上推翻了先前膜片钳研究的结论, 而且发现 H^+ 外流在细胞体积调控中扮演着重要作用。未来, 非损伤微测技术将在主动运输离子或分子泵和协同运输载体的研究方面发挥重大的作用。

4. 展望

非损伤微测技术已被广泛应用于植物逆境、光合机理、神经疾病、信号转导等诸多研究领域, 尤其在植物逆境研究中, 已形成了一套完善的实验方法体系, 并且成为该领域研究中的必备技术。而肿瘤个体化治疗正处于应用研究的初级阶段, 空白领域多, 研究空间广, 成果前瞻性强, 且国内外相关的理论和实践研究已经确认了肿瘤患者间的异质性和肿瘤内的异质性, 前者已被广泛认知: 任意两个癌症患者的临床过程和治疗方案不可能完全相同, 这一直是个性化治疗的重要原则 [28]。而组织微结构理论和干细胞理论指出 [9, 10], 细胞外间质成分和各种致癌因素首要的攻击靶点, 它所引发的细胞间信号交流异常是细胞失控性增殖的主要原因。这为当前肿瘤个体化治疗研究开辟了一条崭新的道路, 即根据个体患者体内组织或细胞微环境的特点, 灵活选择相应的治疗手段。非损伤微测技术以其特有的活体检测、非损伤性、高分辨率、动态实时等优势, 为该理论提供了极为重要的技术支持, 纵观非损伤微测技术在植物研究领域的成功轨迹, 其必将成为活体组织及细胞微环境生理研究的利器。

除了本文介绍的有关肿瘤个体化治疗研究外, 非损伤微测技术在肿瘤研究的其他领域中也具有非常广阔的应用前景。比如, 在肿瘤发生机制研究中, 目前对于物理、化学、生物、遗传等致癌因素对正常活体组织或细胞生理功能, 尤其是分子离子进出情况影响的研究还比较少, 而分子离子进出细胞膜的速率和方向实时表征了该活体组织或细胞的大部分生理活动, 对于研究各种致癌因素对

人体不同部位正常活体的组织或细胞的影响机制具有重要意义；非损伤微测技术不但能够实时监测一种或多种致癌因素对特定组织或细胞分子离子流速的短时间或长时间影响，进行相关机理研究，而且能够通过正常与癌变的活体组织或细胞的分子离子流速的对比，来绘制癌变的组织细胞分子离子流速谱图，以此为依据指导临床研究。综上所述，利用非损伤微测技术开展更深入的与肿瘤直接有关的研究日益受到重视，必将成为今后研究的热点。

参考文献

- [1] Shabala S. Non-Invasive Microelectrode Ion Flux Measurements In Plant Stress Physiology[M]. Plant Electrophysiology, Ag V, Berlin: Springer-Verlag, 2006., 35-71.
- [2] Volkov A G J G, Feijó. 5 Use of Non-Invasive Ion-Selective Microelectrode Techniques for the Study of Plant Development[M]. Plant Electrophysiology, Prof. Dr. Volkov A G, Springer Berlin Heidelberg, 2006., 1-55.
- [3] Lucas W J, Kochian L V. Ion transport processes in corn roots: an approach utilizing microelectrode techniques[M]. Advanced agricultural instrumentation, Springer, 1986., 402-425.
- [4] 宋瑾, 唐勇, 许越. 用非损伤微测技术研究肿瘤细胞的耐药性与其胞外 H^{+} 流变化的相关性 [J]. 生物物理学报, 2008(03): 191-197.
- [5] Smith P J. Non-invasive ion probes—tools for measuring transmembrane ion flux[J]. Nature, 1995, 378(6557): 645-646.
- [6] 印莉萍, 上官宇, 许越. 非损伤性扫描离子选择电极技术及其在高等植物研究中的应用 [J]. 自然科学进展, 2006(03): 262-266.
- [7] 府伟灵, 黄庆. 肿瘤个体化治疗 [J]. 重庆医学, 2008(03): 225-226.
- [8] 姜润德, 李春海. 肿瘤研究亟需观念的改变 [J]. 科学, 2003, 55(2): 31-35.
- [9] 刘雨潇, 杨继建, 张惠茹, 等. 干细胞与肿瘤研究进展 [J]. 中国农学通报, 2005(06): 18-20.
- [10] 廖世奇, 张渭波, 曾家豫, 等. 干细胞、肿瘤干细胞和肿瘤关系的探究 [J]. 甘肃医药, 2010(05): 490-496.