

## 免疫磁珠负性富集结合免疫荧光抗体技术 检测卵巢癌患者外周血 CTCs 的方法建立和应用\*

赵 枰<sup>1</sup>, 洪煜婧<sup>2</sup>, 陈 相<sup>1</sup>, 鲁晓燕<sup>1</sup>, 洪 宏<sup>3</sup> (1. 南通市第一人民医院, 江苏南通 226001;  
2. 南通大学公共卫生学院预防医学系, 江苏南通 226001; 3. 南通市中医院, 江苏南通 226001)

**摘要:**目的 建立基于细胞学水平的循环肿瘤细胞负性富集技术来检测卵巢上皮性癌(卵巢癌)患者外周血循环肿瘤细胞。方法 体外培养卵巢癌 SKOV-3 细胞,按一定比例掺入到 2 ml 健康人外周静脉血中,应用免疫磁珠为基础的负性富集结合免疫荧光抗体技术对循环肿瘤细胞进行定量检测。评价该方法富集靶细胞的回收率,并用上述方法检测 32 例卵巢癌患者和 10 例对照者外周血中的循环肿瘤细胞。结果 ①在健康志愿者 2 ml 外周血掺入不同数目 SKOV-3 细胞的条件下,肿瘤细胞的回收率在 64%~80%之间,掺入细胞间回归方程为  $Y=0.782X-1.408$ ,相关系数为 0.998。②10 例对照者外周血中未检测到 CK8/18+,18 例卵巢癌患者的外周血中检测到 CK8/18+,阳性率为 56.3%(18/32,  $\chi^2=7.681$ ,  $P<0.01$ )。③CTCs 阳性与远处转移密切相关( $\chi^2=5.776$ ,  $P<0.05$ )。结论 免疫磁珠负性富集结合免疫荧光抗体技术检测卵巢癌患者外周血循环肿瘤细胞的方法可能具有一定的临床应用价值。

**关键词:**循环肿瘤细胞;卵巢上皮性癌;负性富集技术;免疫荧光抗体技术

中图分类号:R737.31;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)03-056-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.015

### Establishment and Application of Immunomagnetic Bead Negative Enrichment and Immunofluorescence Antibody Technique for Detection of CTCs in Peripheral Blood of Patients with Ovarian Cancer

ZHAO Ping<sup>1</sup>, HONG Yu-jing<sup>2</sup>, CHEN Xiang<sup>1</sup>, LU Xiao-yan<sup>1</sup>, HONG Hong<sup>3</sup>

(1. Nantong First People's Hospital, Jiangsu Nantong 226001, China; 2. Department of Preventive Medicine, School of Public Health of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China; 3. Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Nantong 226001, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a cell level-based negative enrichment technique to detect circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer. **Methods** The colon cancer SKOV-3 cells were mixed with 2 ml whole blood from healthy donors at different ratio. Quantification of CTCs was performed using immunomagnetic bead based negative enrichment combined with immunofluorescence antibody method. The method was evaluated the recovery rate of target cells. Samples of 32 patients with ovarian cancer and 10 controls were assayed for CTCs detection by above method. **Results** ①The recovery rate was ranging from 64%~80% by spiking varying numbers of SKOV-3 into 2 ml blood samples of healthy volunteers. Regression analysis of number of recovered SKOV-3 cells yielded a regression equation of  $Y=0.782X-1.408$  and a coefficient of determination of  $R^2=0.998$ . ②Did not detect CK8/18+ circulating tumor cells in 10 controls, and CK8/18+ circulating tumor cells in 18 cases of 32 Patients with ovarian cancer. The positive rate of CK 8/18+ circulating tumor cells was significantly differences between the two groups ( $\chi^2=7.681$ ,  $P<0.01$ ). ③The presence of CTCs was significantly correlated with distant metastasis ( $\chi^2=5.776$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The method of immunomagnetic bead based negative enrichment combined with immunofluorescence antibody technique for CTCs detection in peripheral blood of patients with ovarian cancer has a clinical value of application and extension.

**Keywords:** circulating tumor cells (CTCs); ovarian epithelial cancer; negative enrichment; immunofluorescence antibody technique

卵巢上皮性癌(卵巢癌)是妇科病死率最高的恶性肿瘤,由于早期缺乏典型的临床症状,超过70%的患者就诊时已为晚期<sup>[1]</sup>,虽然经过满意的肿瘤细胞减灭术和术后的联合化疗,但复发率仍高达80%,预后较差,5年生存率不足25%<sup>[2]</sup>。1896年, Ashworth等<sup>[3]</sup>人提出了循环肿瘤细胞(circu-

lating tumor cells, CTCs)的概念,被誉为“实时肿瘤活检”<sup>[4]</sup>。本研究立足于现有的技术,即联合应用免疫磁珠负性富集和免疫荧光抗体技术,建立一种通过外周血快速、灵敏、简便的检测卵巢癌患者CTCs的方法,并探讨临床应用价值。

#### 1 材料和方法

\* 基金项目:南通市卫生局青年基金资助项目(WQ2015021)。

作者简介:赵 枰(1977—),男,医学硕士,副主任技师,研究方向:临床免疫学, E-mail: zhaopinghonghong@163.com。

1.1 研究对象 选取本院2015年6月~2016年4月收治的卵巢癌患者共32例,均为首发病例,未进行放、化疗等抗癌治疗,且术后均经病理组织确诊,包括浆液性腺癌22例和黏液性腺癌10例,年龄45~71岁,平均年龄55.2岁;同期卵巢良性病变(卵巢囊肿)患者5例,健康体检者5例,共10例为对照,年龄47~68岁,平均年龄53.7岁,无恶性肿瘤史。卵巢癌细胞系SKOV-3。

1.2 试剂与仪器 Ficoll淋巴细胞分离液购自上海朗顿生物科技有限公司,胎牛血清购自上海浩然生物技术有限公司,鼠抗人角蛋白8/18(CK 8/18)购自美国zymed公司,山羊抗鼠IgG-FITC购自美国Santa Cruz公司,DAPI购自美国西格玛公司,CD45免疫磁珠(简称“Miltenyi磁珠”),LD柱和强磁场磁性细胞分离器购自德国美天旎公司,仪器采用德国欧蒙公司的PML型荧光显微镜。

### 1.3 方法

1.3.1 SKOV-3细胞体外培养:①将人卵巢癌SKOV-3细胞株加入含10 ml/dl胎牛血清的RMPI 1640培养液(内含1 g/dl青霉素和链霉素)中,37℃,5%(v/v)CO<sub>2</sub>培养箱中培养。②实验选用对数生长期细胞,经胰酶消化、并吹打成单个细胞,悬浮于RMPI 1640细胞培养液中,制成单细胞悬液计数备用。

1.3.2 标本制备:调整SKOV-3细胞至所需浓度,按照一定梯度(0,10,50,100,500个)分别掺入健康体检者2 ml的外周血中。卵巢癌患者、对照者静脉穿刺后弃去前2 ml,留7.5 ml于EDTA抗凝管中。上述标本24 h内进行下列操作。

1.3.3 肿瘤细胞富集:以Ficoll淋巴细胞分离液提取单个核细胞,红细胞裂解液去除单个核细胞中混有的少量红细胞,所得细胞与Miltenyi磁珠混合,加入已润湿的LD柱中,在强磁场作用下收集未吸附的CD45-细胞组分(含CTCs)。

1.3.4 肿瘤细胞检测:富集所得单个核细胞悬液涂于载玻片上,多聚甲醛固定,通透细胞膜,血清封闭,加一抗(鼠抗人角蛋白8/18)、孵育,加FITC标记的二抗(山羊抗鼠IgG-FITC),孵育,细胞区加入DAPI进行细胞核染色。封片剂封片,荧光显微镜下观察、计数,重复3次。进行回收率计算,以评估该方法的性能,如下:回收率 =  $N1/N2 \times 100\%$  (N1是经过富集后可检测的SKOV-3数;N2是添加到2 ml外周血的SKOV-3细胞数)。CTCs判定标准:细胞体积大,核大,核浆比较大,核分裂增多及病理性核分裂,多核细胞,DAPI染色明亮;胞浆抗CK 8/18(+),细胞形态明确、边界清楚;细胞核(蓝色)与相应细胞浆(绿色)染色部位基本重合。

1.4 统计学分析 采用SPSS13.0统计软件进行统计学处理,计数资料比较采用校正 $\chi^2$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CTCs检测方法的回收率 见图1。不同数量的卵巢癌SKOV-3细胞被掺入到5例健康志愿者的外周血中,其回收率在64%~80%之间。回收的细胞与添加细胞间数量有显著相关性,相关系数为0.998( $P < 0.002$ ),掺入细胞间回归方程为 $Y = 0.782X - 1.408$ 。

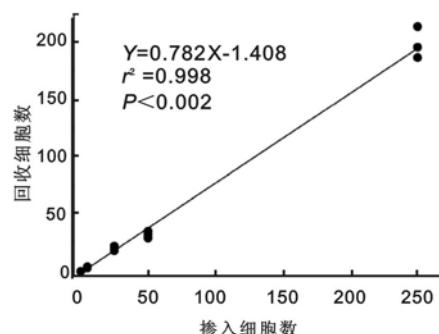
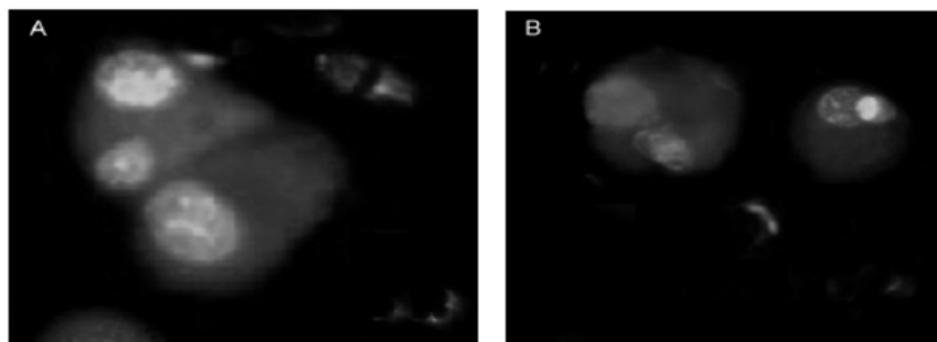


图1 卵巢癌SKOV-3细胞回归曲线

2.2 免疫荧光法检测卵巢癌CTCs 见图2。



A. 卵巢癌患者;B. 卵巢癌细胞株SKOV-3。

图2 富集肿瘤细胞免疫荧光染色

10例对照者外周血(7.5 ml)中均未检测到CTCs阳性,检出率为0%(0/10),32例卵巢癌患

者外周血中检测到的 CTCs 数目范围为 0~41 个,中位数为 4.1 个/7.5 ml, CTCs 检出阳性率为 56.3% (18/32),明显高于对照者,差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.681, P < 0.01$ )。卵巢癌细胞株 SK-OV-3(对照)和卵巢癌患者外周血富集后,经荧光染色,其胞浆处表达 CK8/18 而被染上绿色荧光,胞核被 DAPI 染成蓝色,呈现强蓝白色荧光。

**2.3 CTCs 与卵巢癌远处转移的关系** CTCs 与卵巢癌患者有无远处转移明显相关,有远处转移患者 CTCs 阳性率(73.7%, 14/19)亦显著高于无远处转移者(30.8%, 4/13),差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.776, P < 0.016$ ),且随着转移部位个数的增多,CTCs 阳性率呈增高趋势。

**3 讨论** CTCs 是指来源于肿瘤原发灶或转移灶,自发或因诊疗操作释放进入外周血循环的肿瘤细胞(非血液来源)。是肿瘤进展的早期事件,与肿瘤的转移、复发关系密切,对多种恶性肿瘤的早期筛查、疗效评价、转移复发监测和预后判断都具有特定的临床价值<sup>[5,6]</sup>。目前,对 CTCs 的检测主要分为富集和鉴定两部分。富集是提高检测效率的关键,随着细胞分选技术的快速发展,使得从外周血中分离富集出稀有肿瘤细胞成为可能<sup>[7]</sup>。现行的主要见于免疫磁珠富集法<sup>[8]</sup>(包括负性筛选策略),根据肿瘤细胞表达的某些生物标志物与血细胞存在差异,将特殊标记的单抗结合到细胞上进行识别和分选。鉴定方法有免疫细胞化学、流式细胞术及 RT-PCR 等<sup>[9,10]</sup>,有 CellSearch 系统通过美国食品和药物管理局(FDA)审核,应用于乳腺癌等患者外周血 CTCs 的检测<sup>[11]</sup>。

本研究联合应用免疫磁珠负性富集和免疫荧光染色技术,建立了一种检测卵巢癌患者外周血 CTCs 的方法。首先采用密度梯度离心和红细胞裂解的方法提取外周血中的单个核细胞,然后用负性富集的方法去除单个核细胞中的绝大部分白细胞;接着运用免疫荧光技术对 CTCs 进行定量检测,并能提供有关细胞形态方面的信息,确认容易,进一步在光镜下获得病理学的支持。CK 是一种细胞角蛋白,属于细胞结构蛋白,是上皮组织来源细胞的独有特征。我们选用 CK8/18 作为 CTCs 的标记物,在荧光显微镜下肿瘤细胞胞浆处呈现绿色荧光,加入的 DAPI 特异性染色细胞核,镜下呈蓝色,可区分杂质,减少假阳性。由于 CTCs 是完整细胞,因此 CK8/18 和 DAPI 均显色,而杂质则是 DAPI-, CK8/18+ 和 DAPI+ 者符合 CTCs 特点。本研究对健康志愿者外周血中加入培养细胞及卵巢癌患者外周血标本进行检测,对建立的富集方法进行了验证,结果表明掺入试验具有较好的回

收率,在 64%~80%,当以最少量(10 个)SKOV-3 细胞掺入到 2 ml 的外周血中时,找到平均 7 个肿瘤细胞,可能与富集过程中细胞破坏、丢失等有关;而在检测临床样本时,有 56.3% 的卵巢癌患者可以检测到 CTCs 阳性,可能与肿瘤细胞脱落入血过程中出现凋亡、抗原表达减弱和 EMT 等有关;CTCs 与卵巢癌患者有无远处转移明显相关,进一步证实了 CTCs 在远处转移病灶形成中的重要作用,可监测患者的病情发展。另外,10 例对照者标本均未检测到 CTCs,表明该实验方法有一定的特异性。但由于本实验组病例数较少,不足以形成定论,今后还需进一步扩充病例来进行相关验证。下一步将扩大样本量,并对患者进行随访跟踪。

综上,本研究采用免疫磁珠负性富集结合免疫荧光抗体技术检测卵巢癌患者外周血中的 CTCs,结合细胞形态学分析,可排除非特异染色细胞的干扰,检测的特异性进一步增强,具有一定的临床应用价值。为了解转移生物学,加深对肿瘤转移的理解提供了有力的工具。

#### 参考文献:

- [1] 郑福利,张颖,王建.血清 S100A6 检测对卵巢上皮性癌的诊断价值[J].现代检验医学杂志,2015,30(5):22-23,27.  
Zheng FL, Zhang Y, Wang J. Study on diagnostic value of detecting serum S100A6 in the epithelial ovarian carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(5): 22-23, 27.
- [2] Jenks S. Setting the bar higher for ovarian cancer survival[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(1): dju037.
- [3] Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death[J]. Aust Med J, 1869(14): 146-149.
- [4] Weissenstein U, Schumann A, Reif M, et al. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies[J]. BMC Cancer, 2012(12): 206.
- [5] Normanno N, Rossi A, Morabito A, et al. Prognostic value of circulating tumor cells reduction in patients with extensive small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2014, 85(2): 314-319.
- [6] Wang Z, Cui K, Xue Y, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis[J]. Med Oncol, 2015, 32(5): 164.
- [7] Wu S, Liu Z, Liu S, et al. Enrichment and enumeration of circulating tumor cells by efficient depletion of leukocyte fractions[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2014, 52(2): 243-251.
- [8] Lapin M, Tjensvoll K, Oltedal S, et al. MINDEC-an enhanced negative depletion strategy for circulating tumour cell enrichment[J]. Sci Rep, 2016(6): 28929.

(下转 62 页)

可以通过抑制 BCL-W 基因的表达促进炎症细胞的凋亡、缓解哮喘发作,在哮喘发病过程中起着重要的保护作用。

随着研究的不断深入 miRNA 在儿童支气管哮喘中的诊断价值会不断提高,与其他检测方法相比较,miRNA 的检测简单、快捷,且成本较低,其在血液中稳定表达更有利于提高检测的敏感度。因此 miRNA 在儿童支气管哮喘诊断中具有广阔的应用前景,其有望成为哮喘的重要辅助诊断指标。

#### 参考文献:

- [1] 全国儿科哮喘协作组,中国环境与健康相关产品安全所,中国疾病预防控制中心.第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J].中华儿科杂志,2013,51(10):729-736.  
The National Cooperative Group on Childhood Asthma, Institute of Environmental Health and Related Product, safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention. Third nationwide survey of childhood asthma in urban areas of China[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2013, 51(10): 729-736.
- [2] 赵秋剑,王登峰.支气管哮喘患者变应原检测及免疫分子研究[J].现代检验医学杂志,2014,29(6):96-98.  
Zhao QJ, Wang DF. Study on allergen detection and immune molecules in the patients with bronchial asthma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(6): 96-98.
- [3] 姜波,王玉明,段勇. MicroRNA 的研究进展及其与肺癌的关系[J].现代检验医学杂志,2012,27(1):5-9.  
Jiang B, Wang YM, Duan Y. Research progress of microRNA and its relationship with lung cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(1): 5-9.
- [4] Dissanayake E, Inoue Y. MicroRNAs in allergic disease[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2016, 16(9): 67.
- [5] Rutledge H, Baran-Gale J, de Villena FP, et al. Identification of microRNAs associated with allergic airway disease using a genetically diverse mouse population[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 633.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,中华儿科杂志编委会.儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J].中华儿科杂志,2016,54(3):167-181.  
The Subspecialty Group of Pediatrics Respiratory Diseases, Chinese Journal of Pediatrics Editorial Committee. Guidelines on the diagnosis and management of Bronchial asthma in children[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2016, 54(3): 167-181.
- [7] Shani Z, Scott RG, Schofield LS, et al. Effect of a home intervention program on pediatric asthma in an environmental justice community[J]. Health Promotion Practice, 2015, 16(2): 291-298.
- [8] Wang Y, Yang L, Li P, et al. Circulating microRNA signatures associated with childhood asthma[J]. Clinical Laboratory, 2015, 61(5/6): 467-474.
- [9] Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5): 1423-1432.
- [10] 尹静波,黄永富.炎症细胞因子在支气管哮喘发病机制中的作用[J].国际检验医学杂志,2011,26(4):1087-1089.  
Yi JB, Huang YF. The role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2011, 26(4): 1087-1089.
- [11] 黄永富,杭杲.免疫细胞在支气管哮喘发病机制中的作用[J].现代检验医学杂志,2011,26(4):154-159.  
Huang YF, Huang G. Role of immunocells in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(4): 154-159.
- [12] 郝敏,林江涛.糖皮质激素抵抗性支气管哮喘诊治进展[J].中华结核和呼吸杂志,2014,37(4):296-298.  
Hao M, Lin JT. The progress of diagnosis and treatment of glucocorticoid resistance in bronchial asthma[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2014, 37(4): 296-298.
- [13] Chen JJ, Liu SX, Chen MZ, et al. Has miR 125a and 125b are induced by treatment with cisplatin in nasopharyngeal carcinoma and inhibit apoptosis in a p53 dependent manner by targeting p53 mRNA[J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12(3): 3569-3674.
- [14] 姚云峰,王俊,王宝成. miR-133b 与肿瘤的关系及其作用机制[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2015,22(6):811-814.  
Yao YF, Wang J, Wang BC. The relationship between miR-133b and the progression of tumors and its mechanism[J]. Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 811-814.
- [15] Xu W, Guo G, Li J, et al. Activation of Bcl-2-Caspase-9 apoptosis pathway in the testis of asthmatic mice[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149353.  
收稿日期:2017-01-18  
修回日期:2017-03-08

(上接 58 页)

- [9] Kolostova K, Pinkas M, Jakabova A, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(5): 973-980.
- [10] Pearl ML, Zhao Q, Yang J, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2014, 134(3): 581-590.
- [11] Mego M, Gao H, Cohen EN, et al. Circulating tumor cells (CTC) are associated with defects in adaptive immunity in patients with inflammatory breast cancer[J]. J Cancer, 2016, 7(9): 1095-1104.  
收稿日期:2016-07-26  
修回日期:2017-03-20