

循环肿瘤细胞富集和鉴定技术在乳腺癌患者中的临床验证

邢晓雁¹, 王东民²

1. 内蒙古鄂尔多斯市中心医院, 内蒙古鄂尔多斯 017000
2. 北京大学第一医院乳腺中心, 北京 100034

摘要 临床验证了一种有效的循环肿瘤细胞富集和鉴定方法,并探讨了该方法应用于乳腺癌循环肿瘤细胞(CTC)的临床检测。分别取 10 名健康志愿者外周抗凝静脉血 7.5mL,加入经标记的培养乳腺癌细胞 SKBR-3,抗白细胞抗体偶联的纳米磁珠阴性富集后在荧光显微镜下读取细胞并计数,通过细胞的回收率对富集方法予以评价;分别取 20 名健康志愿者、15 名临床诊断为浸润性乳腺癌患者外周抗凝静脉血 7.5mL,对所取血液进行编盲处理,经富集、免疫荧光加免疫细胞化学染色后在显微镜下读取并判定循环肿瘤细胞,通过两组间检测到的循环肿瘤细胞的差异对该研究方法的特异性和敏感性进行评价。研究结果表明,10 名健康志愿者血液中加入培养细胞的平均回收率为 75%;加入的培养细胞抗角化蛋白(CK18)染色阳性、抗 Her2 染色阳性、抗 CD45 染色阴性,符合乳腺癌细胞的特征;揭盲后结果显示,20 名健康志愿者血液均未报告有循环肿瘤细胞,而在乳腺癌患者中,CTC 数目小于 3 个(0—2)者占所检测患者的 33.3%,大于 3 个者占 66.7%。由此得出结论:该循环肿瘤细胞富集和鉴定方法对外周血 CTC 具有较好的回收率,且对于 CTC 的临床诊断具有很好的特异性和灵敏度。

关键词 循环肿瘤细胞;纳米磁珠;乳腺癌

中图分类号 R73-3

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.21.008

Clinical Validation of an Enrichment and Identification method of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients

XING Xiaoyan¹, WANG Dongmin²

1. Inner Mongolia Ordos Central Hospital, Ordos 017000, Inner Mongolia, China
2. Breast Disease Center, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Abstract An effective enrichment and identification method of Circulating Tumor Cells (CTC) was clinically validated and the specificity and sensitivity of the method in CTCs detection from breast cancer patients was evaluated as well in this paper. Fluorescent labeled cultured breast cancer cell line, SKBR-3 cells were added into 7.5mL peripheral blood obtained from ten of healthy volunteers respectively in this paper. After enrichment by using anti-leukocyte antigen antibody conjugated nanobeads, the slides were observed with fluorescent microscope and the fluorescent labeled cells were counted. The enrichment efficiency was evaluated by average cells recovery rate. The peripheral bloods from 20 of healthy volunteers and 15 of patients with clinical diagnosis of invasive breast cancer were extracted and blind coded. Then the CTCs were enriched and identified by immunofluorescent plus immunocytochemical stains. By comparing the difference of CTCs number between healthy volunteers and breast cancer patients, the specificity and sensitivity of the method were evaluated. The results show that the average spiked cells recovery rate was 75%. The spiked cells were anti-keratin (CK18) stain positive, anti-Her2 stain positive and anti-CD45 stain negative, which consist with the antigen expression characters of breast cancer cells. The unblinding result revealed that there were none of CTCs found in bloods from 20 of healthy volunteers, while among 15 of breast cancer patients, less than 3 CTCs (0—2) were detected in 33.3% patients and more than 3 CTCs were detected in 66.7%

收稿日期: 2012-07-01;修回日期:2012-07-12

作者简介: 邢晓雁, 博士, 研究方向为肿瘤细胞生物学, 电子信箱: xingxiaoyan9605@hotmail.com; 王东民(通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M160100735M), 副主任医师, 研究方向为乳腺、甲状腺良恶性肿瘤及肿瘤细胞生物学, 电子信箱: wangdongmin@medmail.com.cn

patients. The enrichment and identification method used could well recover spiked cells in peripheral blood and have significant specificity and sensitivity in CTCs clinical detection.

Keywords circulating tumor cells; nano-beads; breast cancer

0 引言

尽管目前对肿瘤的研究和治疗获得了很大的进展,但肿瘤依然是严重威胁人类健康和导致死亡的主要原因之一。肿瘤的原发病灶往往并不具有致死性后果,而肿瘤转移疾病所引起的死亡则占实体瘤所致死亡的约 90%^[1]。因此,肿瘤转移的早期发现对于肿瘤的治疗和预后至关重要。

研究发现,在肿瘤转移的过程中,可以在患者的外周血中检测到循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells, CTC),因此,对此类循环肿瘤细胞的早期发现和检测可能成为发现肿瘤早期转移的一种手段^[2]。与传统的抽取骨髓检查播散肿瘤细胞(Disseminated Tumor Cells, DTC)相比较,循环肿瘤细胞检查具有取样简单(外周静脉血)、可重复多次监测、无创等诸多优点^[3],因而,此方向的研究越来越多^[4-6],以期将这一技术完善成熟并应用于肿瘤转移的早期诊断、预后判断和治疗效果评价等方面。

一般而言,循环肿瘤细胞的研究基本分为 CTC 富集和 CTC 检测两个步骤。由于循环肿瘤细胞在外周血中的数量相对较少,因此首先需要将这种“稀有”细胞先筛选出来、予以浓缩(富集),才可能进行进一步的分析和鉴定。筛选和浓缩的基础是针对循环肿瘤细胞与正常血液细胞的区别。目前,对 CTC 的富集主要基于循环肿瘤细胞与正常血液细胞在物理性质(如 CTC 与血液细胞在悬浮力和体积的不同)或抗原特性(CTC 细胞一般有着与血液细胞不同的表面抗原)两个方面。富集问题是制约 CTC 检测的关键问题,而对富集效果的考量主要集中在回收率方面;对富集得到的细胞,下游常见的鉴定方法有分子生物学方法(如定量 PCR)和细胞生物学(如免疫荧光、免疫细胞化学染色、FISH 等)方法。现状是,各种研究方法所基于的原理不尽相同,有些方法需要的仪器设备和技术要求等较高^[7],这些都不同程度地制约了 CTC 富集和检验在临床的应用。如果可以开发出一种相对简单、有效的循环肿瘤细胞的富集和鉴定方法,才有可能使这一技术在将来真正应用于临床检验。

本研究的目的,就是临床验证一种简单、有效的循环肿瘤细胞富集和鉴定方法,并探讨该方法应用于 CTC 检测的应用意义。

1 对象与方法

1.1 对象

30 名健康志愿者,均无慢性疾病、恶性肿瘤病史和家族史。其中,男性 15 名,女性 15 名,年龄 20—32 岁,平均年龄 28 岁。其中 10 名健康志愿者血样用于体外培养细胞加入

(spike)试验,20 名健康志愿者血样用于循环肿瘤细胞富集和鉴定方法的评价;15 名就诊于北京大学第一医院诊断为浸润性乳腺癌的患者,均为女性,年龄 26—63 岁,平均年龄 45 岁。对于所有献血者,取血前均仔细告知取血目的及个人信息保密等事项,所有献血者在取血前均签署了知情同意书。

1.2 癌细胞系

人乳腺癌细胞 SKBR-3 来自美国模式培养集存库(ATCC)。

1.3 样本的处置

用真空 ACD 抗凝管抽取受试者的静脉血 7.5mL(为了避免皮肤及血管上皮细胞的污染,将第 1 管血(2mL)去除),并且立即轻柔充分混匀抗凝管 8 次,防止血块形成,室温存放,并于 24h 内富集 CTC。

1.4 主要试剂与仪器

ACD 采血管(美国 BD 公司),抗 Her2 抗体(Herceptin,美国 Genentech 公司),Mitotracker(美国 invitrogen 公司),封片剂 VectorShield(美国 Vector Laboratories),BSA(美国 Sigma-Aldrich 公司),载玻片和盖玻片(美国 Fisher 公司),免疫荧光显微镜(日本 Nikon 公司),离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。其余实验用主要试剂由美国 Cytelligen 公司提供。

1.5 操作步骤

1.5.1 培养细胞加入(健康志愿者血样)

(1) 实验前一天在 1 个 1cm 培养皿中传代培养 SKBR-3 细胞,至实验当天细胞汇合度达 80%;

(2) 实验当天,在 1mL 培养基中加入 1 μ L MitoTracker, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;

(3) 吸弃细胞培养基,用 1mL 1XPBS 洗涤细胞 2 次后,加入 1mL 胰酶消化细胞,在显微镜下观察至细胞变圆,加入细胞培养基中止消化;

(4) 细胞在离心机中离心,1000r/min,3min 后,吸弃上清液;

(5) 用 1XPBS 重悬细胞,细胞在显微镜下计数,调整细胞浓度,至 100 个细胞/mL;

(6) 加此细胞悬液至 100 μ L—7.5mL 健康志愿者血液中,进行如下 CTC 富集步骤。

1.5.2 CTC 富集步骤

(1) 将收集的外周血(7.5mL)转移到 50mL 离心管中 350g 离心,5min 后弃上层血清;

(2) 收集沉积细胞,其包括红细胞、白细胞和肿瘤细胞;

(3) 加入红细胞裂解液,室温转动 8min 后离心,350g, 5min,弃上清;

- (4) 收集沉积细胞,包括白细胞和肿瘤细胞;
- (5) 加入预热到室温的 AS1 至总体积 10mL,再加入 0.2mL Apa-1 磁珠;
- (6) 室温下,将此 50mL 离心管 10°—15° 倾斜置于水平摇床 150r/min 振荡 5min;
- (7) 取一 50mL 离心管,加入 3mL 分离液;
- (8) 将 10mL 血液混合液轻柔地加在分离液的上层,注意不要搅动分离液;
- (9) 室温 350g (Beckman GP 离心机,1300r/min) 离心 5min,注意离心选项为不使用制动;
- (10) 轻柔收集位于红细胞层(红色)以上的所有上清到一个 15mL 离心管,加入 AS1 至总体积 15mL,并混合均匀;
- (11) 室温 1200g (Beckman GP 离心机,2400r/min) 离心 5min,注意离心选项为使用低速制动;
- (12) 吸弃上清,留取 20—30 μ L 沉淀,加入相等体积的细胞固定液并轻轻地吹悬起沉淀;
- (13) 将悬起的沉淀液涂在载玻片上,自然风干;
- (14) 用防乙醇的记号笔对载玻片进行编号。由专门指定人员(其不参与实验操作)记录载玻片的原始编号及相应的血液标本情况(健康志愿者或患者),然后对载玻片上记录编号的部位用统一的不透光标签纸进行覆盖,并按照事先编制好的盲态编码对载玻片重新编号;
- (15) 如不立即进行下面的免疫荧光及免疫细胞化学染色,将风干的载玻片置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.5.3 培养细胞加入后回收率的计算

- (1) 将风干的载玻片置于荧光显微镜下观察,逐个视野观察 MitoTracker 染色阳性的具有荧光的细胞,并计数;
- (2) 同一编号的载玻片由另一实验操作者在不知晓前一实验者计数结果的情况下重新读取、计数;
- (3) 回收率=富集前加入的细胞数/荧光显微镜下 MitoTracker 染色阳性细胞数 \times 100%。

1.5.4 CTC 免疫荧光和免疫细胞化学染色步骤

- (1) 将载玻片从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出至室温,20—30min;
- (2) 将载玻片浸泡于 95%乙醇中,室温,10min;
- (3) 载玻片取出后用 1 \times PBS 洗涤 3 次,每次 1min;
- (4) 将荧光标记抗体(抗 Herceptin Alexa 488 1:100 或抗 CK18Alexa 594 1:500)加入抗体孵育缓冲液,每张载玻片上加 200 μ L,避光室温孵育 30min;
- (5) 用洗涤缓冲液洗涤 3 次,每次 1min;
- (6) 使用前,准备 Vector[®] Blue 底物工作溶液,每张载玻片上加 200 μ L,避光室温孵育 15min;
- (7) 用 1 \times PBS 洗涤 3min,然后将载玻片在去离子水中快速地浸蘸润洗一次;
- (8) 用加入 DAPI 的封片剂 VectorShield 封片,荧光显微镜下进行观察、计数;
- (9) 同一编号的载玻片由另一实验操作者在不知晓前一

实验者计数结果的情况下重新读取、计数。

1.6 典型 CTC 判定标准

- (1) 细胞体积:大于周围白细胞的体积(一般而言,并非必须)。
- (2) 细胞核特征:DAPI 染色明亮、核较大或小,但是一定为较确定的(solid)核;核浆比例较大;核分裂增多及病理性核分裂;多核巨细胞。
- (3) 标记物免疫荧光染色情况:胞浆抗 CK18 染色阳性,显示为明确的细胞形态、具有清楚的细胞边界;胞浆抗 Her2 染色阳性,显示为明确的细胞形态、并具有清楚的细胞边界,但此染色阳性不是必须的。
- (4) 免疫细胞化学染色结果:明场观察,抗 CD45 抗体染色阴性。

2 结果

2.1 加入培养细胞的回收率

共 10 份血液,每份血液在加入培养细胞并经富集后经两位实验人员分别计数,共计 20 份计数结果,计算其平均值和标准差,平均回收率为(75 \pm 5)%。

2.2 加入培养细胞的免疫荧光和免疫细胞化学染色结果

图 1 为加入培养细胞的免疫荧光和免疫细胞化学染色结果。图(a)为免疫荧光染色结果,加入培养细胞抗角化蛋白(CK18)染色阳性、抗 Her2 染色阳性;加入培养细胞和未去除白细胞 DAPI 核染色阳性。图(b)为免疫细胞化学染色结果,加入培养细胞抗 CD45 染色阴性,而未去除的白细胞抗 CD45 染色阳性。染色结果符合乳腺癌细胞和白细胞的抗原特性。

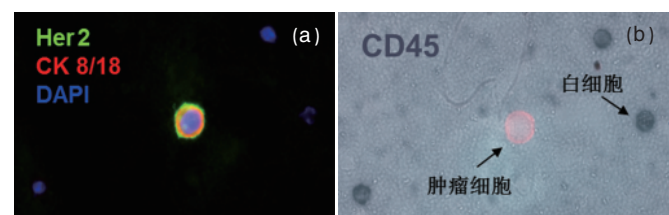


图 1 加入培养细胞的免疫荧光(a)和免疫细胞化学染色(b)结果

Fig. 1 Immunofluorescent plus immunocytochemical stains results of enriched spiked SKBR-3 cells

2.3 乳腺癌患者血样中 CTC 细胞的免疫荧光和免疫细胞化学染色结果

图 2 为由患者外周血中富集获得的 CTC 细胞的免疫荧光和免疫细胞化学染色典型结果。图(a)为由患者外周血中富集获得的 CTC 细胞的免疫荧光染色结果,抗角化蛋白(CK18)染色阳性、抗 Her2 染色阳性、DAPI 核染色阳性;图(b)为由患者外周血中富集获得的 CTC 细胞的免疫细胞化学染色结果,抗 CD45 染色阴性,周围未被去除的白细胞抗 CD45 染色阳性。在结果判定时,只有当富集获得的 CTC 细胞

的染色结果符合上述 CTC 细胞判定标准时才予以计数。

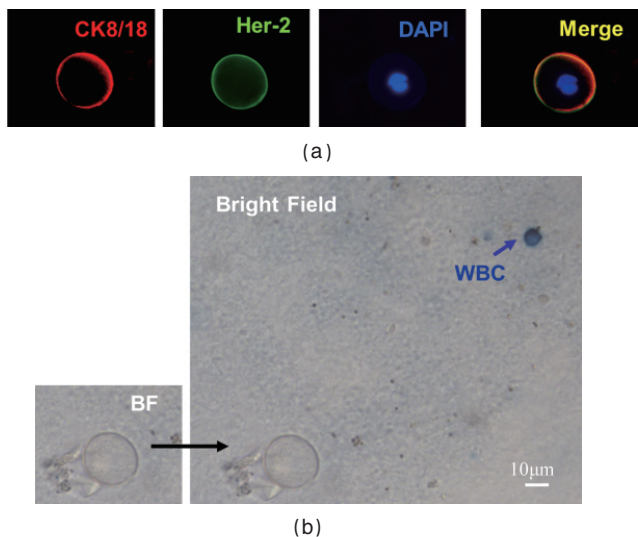


图2 富集自患者外周血中 CTC 免疫荧光(a)和免疫细胞化学染色(b)结果

Fig. 2 Immunofluorescent plus immunocytochemical stains results of enriched CTC from the peripheral blood of a breast cancer patient

2.4 健康志愿者和乳腺癌患者 CTC 检测结果

检测结果揭盲后显示,在 20 名健康志愿者的血样中未见到典型的 CTC 细胞,而 15 名乳腺癌患者的血样中发现,有 4 名 CTC 为 0 个,1 名 CTC 为 1,3 名 CTC 为 3,4 名 CTC 为 4,1 名 CTC 为 7,1 名 CTC 为 8,1 名 CTC 为 16。每 7.5mL 外周静脉血中的 CTC 数量,健康志愿者 100% 为 0,而在乳腺癌患者中,CTC < 3 个(0—2)者占所检测患者的 33.3%, > 3 个者占 66.7%。

3 讨论

CTC 的富集可以基于肿瘤细胞表面的特定抗原进行阳性或阴性富集。大多数采用的是基于磁珠的方法,即肿瘤细胞表面(抗原)-抗体(磁珠)。如果抗原为上皮细胞特有的标记物(如 EpCAM,) ,则称为阳性分选/富集;如果抗原为血液细胞特有、而 CTC 细胞不具有的标记物(如 CD45),则称为阴性分选/富集。一般而言,阳性分选方法的特异性较高,阴性分选的回收率较高。并且,由于有些在循环血液中的 CTC 细胞,其表面的抗原表达发生了变化(EpCAM 低表达)^[8],这样,基于抗 EpCAM 抗体的阳性富集方法就会“漏掉”一些循环肿瘤细胞。本实验中用到的技术,是对基于肿瘤细胞表面特定抗原阴性富集和基于循环肿瘤细胞物理性质的两种方法的结合,一方面,采用密度梯度离心的方法,使得与 CTC 相似漂浮力的细胞被分离;另一方面,通过表面偶联了 CD45 抗体的磁珠去除掉大多数的白细胞。两种方法的结合,大大地提高了单独使用一种方法的回收率和特异性。通常,选用基于磁珠的

分选方法一般会采用磁体将磁珠与上清相分离,但是,本研究采用离心的方法,将吸附于磁珠上的细胞去除,同样可达到相似的细胞回收率和白细胞去除率,并且还可以增加同时处理样品的数量。

对于 CTC 富集方法,一个重要的考量指标即为回收率。文献报道的回收率由于实验原理的不同而变化较大^[9-11]。本实验方法的回收率与文献报道的回收率基本相当。

对于 CTC 鉴定,重要的考量指标为:特异性、敏感性及可自动化程度等。本实验中,健康正常人 100% 未检测到 CTC,特异性较高,而乳腺癌患者中,CTC > 3 个者达 66.7%,灵敏性也较高。文献报道的,唯一获得美国 FDA 批准的富集/检测系统 CellSearch[®] 在 60% 的转移性乳腺癌患者中检测到 CTC^[12]。由于对最终的 CTC 判定和计数是通过在荧光显微镜下逐个视野进行的,工作量是非常大的,同时也带来了不确定因素,在本实验中,采用盲法加不同实验人员重复读片的方法对此进行了克服,并希望在后续的工作中将读片工作机械化、自动化,这样就可以提高实验的速度和一致性。

本研究所采用的鉴定标记物为细胞角蛋白和 Her2。需要注意的是,有文献报道^[13],由于 CTC 会经历上皮-间充质转化(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT),一些角蛋白的表达会下调,这样,抗 CK 抗体检测时有些 CTC 细胞就会角蛋白阴性。在本实验中,只细胞角蛋白表达阳性的细胞予以计数。

由于 CTC 在实际判断中有时会有困难,因此,采用多个标记物的多重分析可能更有助于 CTC 的鉴定。本研究中所采用的方法,结合了免疫荧光和免疫细胞化学染色方法,充分利用了常见荧光显微镜的 3 个荧光通道(蓝色用于 DAPI 核染色、绿色用于肿瘤特异性标记物 Her2、红色用于上皮细胞特异标记物角蛋白)和 1 个明场(用于抗 CD45 的免疫细胞化学染色),综合多通道的染色结果进行判断,提高了判断的准确性,并且在只具备普通荧光显微镜的实验室开展本检测方法提供了可能。

由于本研究的目的是探讨我们所建立的这种实验方法对 CTC 细胞富集和检测的有效性,因此所研究的患者数量较少、并且在患者的选择(疾病分期、治疗情况、病理类型等等)方面也没有做严格的规定,但本研究的结果有趋势表明,本研究方法可以作为一种循环肿瘤细胞的检测手段。

目前有很多 CTC 富集和检测方法,虽然有很高的灵敏度,但还只停留于研究阶段,并没有进行临床意义的证实^[14]。本研究方法在临床意义方面进行了初步的探索,本研究结果提示,本研究方法有着很好的临床应用前景,值得进一步的改进和完善。并且,本研究方法所用仪器设备比较简单,操作步骤简便,这也有利于本研究方法将来在临床应用的推广。

4 结论

本文利用在健康志愿者外周血中加入培养细胞及乳腺癌

患者外周血标本,对建立的循环肿瘤细胞富集和鉴定方法进行验证,实验结果表明此富集和鉴定方法对外周血 CTC 具有较好的回收率、对于 CTC 的临床诊断具有很好的特异性和灵敏度,具有进一步应用于实际临床诊断的开发前景。

参考文献 (References)

- [1] Gupta G P, Massagué J. Cancer metastasis: Building a framework[J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679-695.
- [2] Lianidou E S, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: Detection systems, molecular characterization, and future challenges[J]. *Clinical Chemistry*, 2011, 57(9): 1242-1255.
- [3] Zhe X, Cher M L, Bonfil R D. Circulating tumor cells: Finding the needle in the haystack[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2011, 1(6): 740-751.
- [4] Ring A, Smith I E, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer [J]. *The Lancet Oncology*, 2004, 5(2): 79-88.
- [5] Lurje G, Schiesser S, Hoffmann C, et al. Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies: Current techniques and clinical implications [J]. *Journal of Oncology*, 2010: 392652, doi:10.1155/2010/392652.
- [6] Pavlos M, Michael K. Diagnostic value of circulating tumor cell detection in bladder and urothelial cancer: Systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(1): 336.
- [7] Stott S L, Hsu C H, Tsukrov D I, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip [J]. *PNAS*, 2010, 107(43): 18392-18397.
- [8] Sieuwerts A M, Kraan J, Bolt J, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009, 101(1): 61-66.
- [9] Desitter I, Guerrouahen B S, Benali-Furet N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells [J]. *Anticancer Research*, 2011, 31(2): 427-441.
- [10] 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(1): 206.
- [11] Xu W, Cao L, Chen L, et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(11): 3783-3793.
- [12] Cristofanilli M, Hayes D F, Budd G T, et al. Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(7): 1420-1430.
- [13] Mego M, De Giorgi U, Dawood S, et al. Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells [J]. *International Journal of Cancer*, 2011, 129(2): 417-423.
- [14] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology [J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-1239. (责任编辑 朱宇)

· 学术动态 ·



“2012 年中国电机工程学会 电力系统专委会学术年会”征稿

中国电机工程学会电力系统专业委员会决定于 2012 年 10 月举行 2012 年学术年会,会议将邀请国内各行业的知名院士、专家、教授就广泛关注的热点问题做主旨发言,并就大家广泛关注的热点学术问题进行交流讨论。

征稿范围:(1) 人型交直流输电系统规划;(2) 特高压交直流输电关键技术;(3) 人电网仿真计算分析技术;(4) 输电系统电力电子技术;(5) 电力系统安全稳定控制及保护技术;(6) 智能电网技术;(7) 新能源接入系统技术;(8) 人电网的运行及管理技术等。

联系电话:010-82813113-106。

通信地址:北京市海淀区清河小营东路 15 号中国电力科学研究院系统所,100192。

电子信箱:wanglm@epri.sgcc.com.cn。

会议网站:<http://www.csee.org.cn/tplt002.aspx?PageId=690C53E7-F7B9-481A-B771-B26578A08DB4&ArticleId=31d901c0-74f0-48c3-93bc-eb52fb7dfc7d>。