技术方法

文章编号:1000-5404(2005)16-1700-02

肝细胞癌免疫磁珠的制备及鉴定

Preparation and identification of immunomagnetic beads against hepatocellular carcinoma cells

左国华,梁 平,李洪艳 (第三军医大学新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

提 要:目的 制备能与肝癌细胞特异结合的免疫磁珠(IMB)。**方法** 单抗HAb18经耦联法包被磁珠制备IMB后,将HepG2细胞与外周血单个核细胞混匀,经免疫磁性细胞分离,检测IMB的特异性和敏感性。**结果** 制备的IMB与HepG2细胞敏感而特异地结合,单个核细胞与HepG2细胞比为1×10^6:1时可检测到癌细胞,结合免疫细胞化学方法可检出外周血单个核细胞中57.2%的微量癌细胞,无假阳性。**结论** 制备的IMB检测微量的肝癌细胞有较高的特异性和敏感性。

肝细胞癌主要经血液转移,在肝癌切除或肝移植前,部分病人已有肿瘤细胞进入血循环(循环肿瘤细胞, circulating tumor cells, CTCs),它们是导致肝癌复发转移的关键,而常规方法对CTCs检测不到[1]。免疫磁珠(immunomagnetic beads, IMB)技术是近年来发展起来一项新的免疫学技术,具有简便易行、分离纯度高、保留细胞活性的优点。本实验构建了一种肝癌IMB,探讨其分离检测微量肝癌细胞的特异性和敏感性,为临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肝癌细胞HepG2及肺癌细胞A549常规贴壁培养,消化计数,取少量细胞悬液涂片,检测细胞AFP的表达。HepG2细胞的胞膜及胞浆染成棕黄色,A549细胞呈阴性染色。

1.2 IMB制备[2]

用含0.1% BSA的PBS清洗聚苯乙烯磁性微珠(山东赫磁生物技术公司,直径2.5 μm),每mg磁珠加入10 mg耦联剂碳二亚胺(美国Sigma公司),调节pH至6.0,按磁珠:抗体=1 mg:50 μg加入鼠抗人肝癌的单抗HAb18(第四军医大学细胞生物工程中心),室温缓慢摇动2 h,磁场中弃上清,洗涤2次,重悬,即得IMB,4 ℃保存。

1.3 IMB鉴定

1.3.1 IMB表面结合抗体活性检测 用含0.1% BSA的PBS封闭IMB后,加入FITC标记的兔抗鼠抗体,4 ℃反应30 min,洗涤3次,荧光显微镜下观察。以空白磁珠作对照。

1.3.2 IMB特异性检测 分别取HepG2及A549细胞悬液,加入IMB(磁珠:细胞应>5:1),4 ℃下缓慢震荡孵育30 min,离心涂片,HE染色。镜下观察磁珠靶细胞结合情况,以结合3个或3个以上磁珠的细胞为阳性,计算玫瑰花环形成率。台盼蓝染色检测细胞活性,同时送扫瞄电镜观察磁珠细胞的结合情况。

1.3.3 IMB敏感性检测 抽取10份正常人外周血10 ml,分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),洗涤2次后计数,将HepG2细胞按比例加入PBMCs悬液中,使PBMCs与HepG2细胞比分别为:10^4:1、10^5:1、5×10^5:1、10^6:1、2×10^6:1、5×10^6:1、10^7:1。每份标本加入20 μl IMB,4 ℃下震荡孵育30 min,缓慢通过MPC-1型磁性细胞分离器(德国Miltenyi Biotec公司)中的分离柱,移开分离柱,收集柱内细胞,清洗3次,离心涂片,HE染色。显微镜下观察有无分离出的肿瘤细胞。每个浓度进行5次实验。

1.4 模拟检测血中微量肝癌细胞

调节HepG2悬液细胞浓度为5×10^3/ml,抽取10份正常人外周血2 ml,加入10 μl HepG2细胞悬液。按前述步骤行磁性细胞分离涂片,AFP的免疫组化染色,镜下计数分离出癌细胞的数量。

2 结果

2.1 IMB生物学活性

荧光显微镜下可见磁珠表面有均匀的荧光(图1),说明HAb18已与磁珠表面活性基团结合并有良好生物学活性。

2.2 IMB鉴定

特异性检测示:光镜下见HepG2细胞与IMB可紧密结合形成玫瑰样花环(图2),玫瑰样花环形成率为93%,台盼蓝拒染率为92%。A549细胞不与IMB结合,呈分散分布。扫描电镜见多个IMB紧密结合在HepG2细胞表面。敏感性检测示:在各浓度的5次实验中,当浓度比为10^6:1及2×10^6:1时分别

作者简介:左国华(1971-),男,湖南省双峰县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肝癌转移诊治方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68774606

收稿日期:2005-05-24;修回日期:2005-07-10

有 3 次及 1 次检测到癌细胞，浓度比为 5×10^6∶1、10^7∶1 时未检测到癌细胞，其余各浓度 5 次均检测到癌细胞。

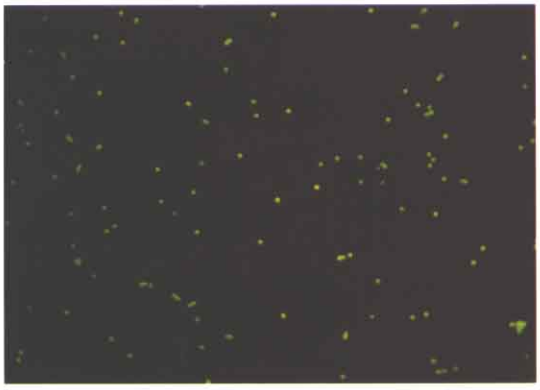


图 1　IMB 免疫荧光显微显像　（FITC ×400）

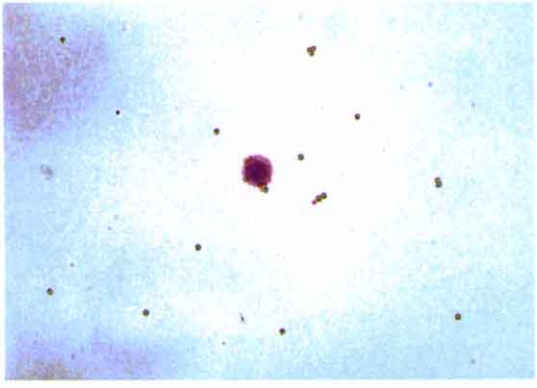


图 2　IMB 技术检测出的癌细胞，与 IMB 结合形成玫瑰样花环　（HE ×400）

2.3　IMB 检测微量肝癌细胞

10 例标本中均可检测出癌细胞，数量为 21 ~ 44 个，平均（28.6 ± 8.2）个，检出率为 57.2 %。

3　讨论

CTCs 的含量很低，目前常用检测方法有 RT-PCR 及 IMB 技术。RT-PCR 灵敏度较高，但有一定假阳性率[3]，不能直接分离出癌细胞。而 IMB 细胞分选技术敏感性高，可对肿瘤患者血中的肿瘤细胞进行富集、分离，结合免疫细胞化学技术能在 10^6 个单核细胞中分离检测出 1 个肿瘤细胞，可直观计数癌细胞并将假阳性降低，同时分离的细胞具有良好生物学活性，利于后续研究[4]。本实验构建肝细胞癌 IMB 是为临床分离骨髓和外周血中的微量 CTCs 打下基础。

IMB 细胞分选技术的基本原理在于用单抗与磁珠结合形成 IMB，在磁场作用下，可使与 IMB 特异性相连的细胞同其他细胞分离开来，故选用的抗体应特异性好、抗原抗体亲和性强，有利其导向作用。本实验选用的 HAb18 是一种特异性较好、亲和力高的人肝癌单抗，其相应抗原为肝癌细胞膜上的一种糖蛋白[5]。免疫荧光检测显示，HAb18 经耦联法包被到磁珠上，生物学活性仍保持良好；玫瑰花环实验表明制备的 IMB 有较好特异性，能特异地与肝癌 HepG2 细胞结合，而与肺癌 A549 及 PBMCs 无结合。敏感性检测亦表明当 PBMCs 与 HepG2 细胞比为 10^6∶1 时可检测到恶性细胞，与免疫细胞化学方法结合可检出外周血单个核细胞中 57.2% 的微量癌细胞，无假阳性结果。

近年来 IMB 技术在检测多种肿瘤的 CTCs 中的应用价值已得到证实[6]，本实验选用的是 2.5 μm 的磁珠，我们体会分选实验操作简便，耗时短，连续 2 ~ 3 次过柱分选可提高分离细胞的纯度，IMB 与样本在 4 ℃ 孵育 30 min 即可，分选后细胞活力保持良好。延长孵育时间、提高温度会增加非特异结合并影响细胞活性。采用 IMB 技术富集癌细胞后，将靶细胞离心涂在小范围内再通过免疫细胞化学鉴定，可直观计数癌细胞并将假阳性降低到最低水平。

IMB 细胞分离技术是一项新颖、简便易行的微量细胞检测方法，构建肝癌特异性 IMB 对进一步临床肝癌 CTCs 的检测将有着良好的应用前景。

关键词：肝细胞癌；免疫磁珠；单克隆抗体

中图法分类号：R446.6　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Ijichi M, Takayama T, Matsumura M, *et al*. Alpha-Fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study [J]. Hepatology, 2002, 35(4): 853 - 860.

[2] Prioult G, Turcotte C, Labarre L, *et al*. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads [J]. Inter Dairy J, 2000, 10(9): 627 - 633.

[3] Baker M, Gillanders W E, Mikhitarian K, *et al*. The molecular detection of micrometastatic breast cancer[J]. Am J Surg, 2003, 186(4): 351 - 358.

[4] Zigeuner R E, Riesenberg R, Pohla H, *et al*. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry *in vitro*[J]. J Urol, 2000, 164(5): 1834 - 1837.

[5] 郭晓楠，陈志南. 肝癌膜相关抗原 HAb18 为 CD147 分子的鉴定[J]. 肿瘤防治研究，2000，27(1)：7 - 10.

[6] Hu X C, Wang Y, Shi D R, *et al*. Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells[J]. Oncology, 2003, 64(2): 160 - 165.

（编辑　龙　亮）