DOI:10.16016/j.1000-5404.201507139

利用微流控免疫磁珠分选仪高效富集外周血循环肿瘤细胞

邱 林*,杜 娟*,王海燕,孙剑会,蒋建新,曾 灵 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 观察利用微流控免疫磁珠分选仪富集外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)的效果。**方法** 采用 IsoFlux 系统(微流体免疫磁珠分选系统),对 16 例肺癌患者(TMN 分期法,Ⅰ~Ⅳ各 4 例患者)外周血中循环肿瘤细胞进行分离富集,并通过免疫荧光的方法标记 CTCs 的标记蛋白,对分选出的 CTCs 细胞进行了鉴定。**结果** 16 位肺癌患者血样中 10 位患者的血样中均发现了 Cytokeratine 阳性和 CD45 阴性的 CTCs,Ⅰ~Ⅳ期各 4 例患者的血样中检出 CTCs 细胞检出率分别为 50%、50%、75% 和 100%。**结论** 利用微流控免疫磁珠分选仪可以有效地富集外周血中稀有的循环肿瘤细胞,具有较高的灵敏性及特异性。

[关键词] 循环肿瘤细胞;Isoflux;免疫磁珠分选仪;外周血
[中图法分类号] R197.39;R446.11;R73 [文献标志码] A

Efficient enrichment of circulating tumor cells from peripheral blood by microfluidic immunomagnetic bead sorter

Qiu Lin*, Du Juan*, Wang Haiyan, Sun Jianhui, Jiang Jianxin, Zeng Ling (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a method for isolation and enrichment of circulating tumor cells (CTCs) from peripheral blood utilizing Isoflux system (microfluidic immunomagnetic bead sorter). **Methods** IsoFlux system was used to separate and enrich CTCs in peripheral blood of 16 patients with lung cancer (clinical stage Ⅰ~Ⅳ, 4 cases in each stage), and the marker protein of CTCs was marked and then identified by immunofluorescence assay. **Results** There were 11 patients with cytokeratine-positive and CD45-negative CTCs, and the detection rates of CTCs in clinical stages Ⅰ~Ⅳ were 50%, 50%, 75% and 100%, respectively. **Conclusion** CTCs can be simply isolated and enriched from peripheral blood using the IsoFlux system at high specificity and sensitivity.

[**Key words**] circulating tumor cells; Isoflux; immunomagnetic bead sorter; peripheral blood

Supported by the "1135" Talent Program of the Third Affiliated Hospital of the Third Millitary Medical University (Young Talents). Qiu Lin and Du Juan are co-first anthors who contributed equally to the article. Corresponding author: Jiang Jianxin. E-mail: hellojjx@126.com; Zeng Ling, E-mail: zrgling_1025@126.com

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)是肿瘤发生转移时从肿瘤原发灶脱落进入血液循环中的肿瘤细胞,是实现肿瘤转移的最初阶段[1]。CTCs 与肺癌临床分期关系密切,对肺癌的临床早期诊断、预后评估和个体化治疗有重要的临床意义[2-3]。研究显示,对 CTCs 的研究可以指导临床应用,虽然学术界对 CTCs 的严谨性和准确性仍存在争论,但其对揭示肿瘤的转移行为、反映肿瘤的侵袭性、对预后的评估等方面的作用已逐步得到认可[4]。研究报道,CTCs 在外周血中的数量非常稀少,105~107 个单核细胞中才有一个 CTC[4]。目前虽有许多分离 CTCs 稀有细胞的方法,如半自动免疫磁珠浓集平台[5]、上皮肿瘤细胞大小分离法[6]、纳米免疫磁珠、多色荧光标记、流式分选系统以

[基金项目] 第三军医大学第三附属医院"1135"人才工程(青年人才)
*:同等贡献者
[通信作者] 蒋建新,电话:(023)68757401,E-mail:hellojjx@126.com
曾 灵,电话:(023)68757448,E-mail:zengling_1025@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1036.012.html(2015-12-04)

及细胞生物学的分选芯片等技术[7-9],但是都不能高效地获得理想的 CTCs 细胞。所以如何有效的分选出 CTCs 是目前首要解决的问题。IsoFlux 系统是一种具有高灵敏度的新型细胞提取仪,能够打破现有分离系统不能有效分离到稀有细胞的局限性,分离提取到样本中特别稀少的细胞。该系统使用的免疫磁珠标记有单个或多个抗体分子,可捕获到靶细胞;被磁珠标记的 CTCs 通过分离区的微流体管道时,与 CTCs 结合的磁珠被外加的磁场吸附在上样盒隔离区的上表面。然后再用小体积培养基重悬细胞,可以直接进行下一步分子分析[10-12]。IsoFlux 系统分离的 CTCs 细胞能够保持完整的分子特性及其细胞活性,可用于分离提取细胞中的 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子。本研究采用 IsoFlux 系统、ISOFLUXTM 循环肿瘤细胞富集试剂盒对肺腺癌患者外周血 CTCs 进行分选,观察富集效果,并对细胞进行了鉴定,为后续循环肿瘤细胞的研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

收集第三军医大学大坪医院野战外科研究所 2014 年 3-6 月接受单纯手术治疗的 16 例肺癌患者静脉血,每例患者采血 7 mL。16 名肺癌病例根据国际 TNM 对肺癌患者进行分期:Ⅰ期 4 例(肺腺癌 2 例,肺鳞癌 2 例);Ⅱ期 4 例(肺腺癌 2 例,肺鳞癌 2 例);Ⅲ期 4 例(肺腺癌 2 例,肺鳞癌 2 例),Ⅳ期 4 例(肺腺癌 2 例,肺鳞癌 2 例)。16 例患者均为初诊患者,且无其他上皮源性肿瘤病史及证据。健康志愿者均经系统健康体检,无肺部相关疾病史和恶性肿瘤家族史。所有患者和健康志愿者均签署知情同意书。

IsoFlux 系统、循环肿瘤细胞富集试剂盒(Circulating Tumor Cell Enrichment Kit)、循环肿瘤细胞检测试剂盒(Circulating Tumor Cell Enumeration Kit)均购自美国 Fluxion Biosciences Inc;FicollPaque 分离液(GE Healthcare,USA)。

1.2　方法

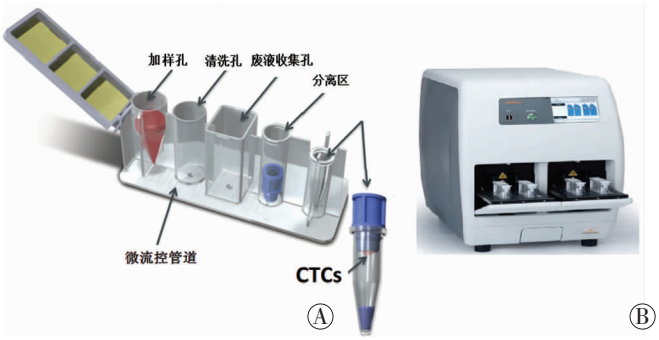
1.2.1　样本采集　　采集外周血液 10 mL,收集后立刻将抗凝管上下颠倒混匀,避免血液凝固,标本放在 4 ℃ 冰箱中 6 h 内处理。

1.2.2　全血处理　　在 50 mL 的 Leucosep 管内加入 15.2 mL FicollPaque 分离液,300 × *g* 离心力,离心 5 min,离心后,Ficoll 沉至管底。将 10 mL 血液样本沿着管壁缓慢加入 Leucosep 管内,再分别取 10 mL PBS 润洗采血管 2 次,以便充分收集残余在管壁的血液样本,1 000 × *g* 离心 10 min;离心后,将血浆和血细胞层吸入另一个 50 mL 离心管内,300 × *g* 离心 8 min;小心吸去上清,得到血液细胞。

1.2.3　血细胞处理　　在血液细胞内加入 40 μL 封闭液,吹吸均匀,封闭 5 min。将样本移至加入 5 μL 磁珠的 EP 管内,加入 400 μL Binding Buffer。颠倒混匀数次后将 EP 管放入摇床,置于 4 ℃冰箱,使磁珠与细胞充分孵育 1 h。

1.2.4　细胞分选　　在微流控试剂仓清洗孔中加入 2 mL 结合液(binding buffer),选择仪器控制面板的“初始化”,仪器产生电动控制压(2psi),使结合液从清洗孔中进入仓底部的微流管道,最终进入“废液收集孔”(图 1 A)。此步骤目的是去处管道中的气泡,为细胞分选做准备。

微流控磁珠分选:将磁珠标记好的血细胞悬液加入试剂仓中的加样孔内。将试剂仓放入 IsoFlux 仪器的样本仓,点击仪器控制面板的“运行”,开始运行。细胞以约 300 个/s 的速度通过微流控管道进入“分离区”(图 1),磁场在分离区上方,磁珠标记的细胞被吸附到“细胞收集盖”上(图 2)。分选结束后,立即用 3 μL 培养基重悬细胞收集盖上的细胞,转移至 EP 管中。



A:微流控试剂仓　由加样孔、清洗孔、废液收集孔、分离区和细胞收集管组成,试剂仓底部是微流控管道;B:IsoFlux 仪器　有 4 个仓门,可同时进行 4 个通道的分选

图 1　IsoFlux 仪器和微流控试剂仓示意图

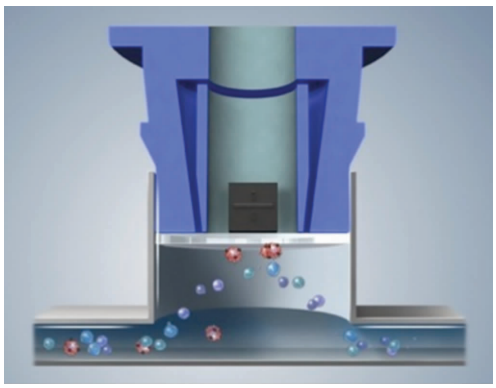


图 2　微流体磁珠分选示意图

1.2.5 细胞免疫荧光鉴定 CTCs 细胞的标记蛋白为细胞角蛋白(Cytokeratin)阳性,CD45 阴性。将细胞吸至管底,加入 25 μL 固定液常温固定细胞 10 min;再加 50 μL 驴血清封闭液常温封闭 5 min;然后加入 25 μL CD45 一抗和 Cytokeratin 一抗,常温孵育 15 min;最后加入 25 μL CY3 标记的二抗显色。蔡司荧光显微镜照相观察(PRIMOSTAR-FL2)。

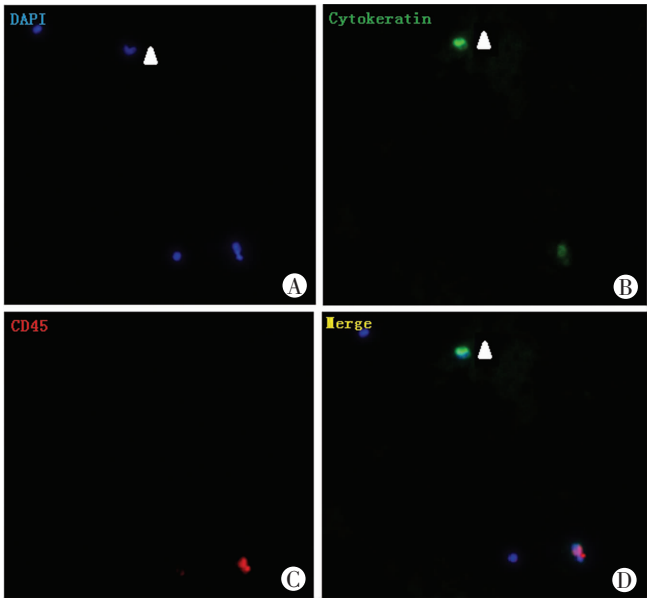
1.3 统计学分析

实验重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 CTCs 鉴定

通过 Cytokeratine 和 CD45 的双重免疫荧光染色对分选出的 CTCs 进行了鉴定。结果发现,16 位肺癌患者血样中 10 位患者的血样中均发现了 Cytokeratine 阳性和 CD45 阴性的 CTCs 细胞。显微镜观察,CTCs 细胞形态呈圆形,体积较小,胞核较大,细胞核质比大(图 3)。



A: DAPI; B: Cytokeratin; C: CD45; D:融合 细胞表达 Cytokeratin 阳性(绿色荧光,白色箭头示);CD45 阴性(红色荧光)

图 3 CTCs 细胞的免疫荧光染色

2.2 细胞检出率

Ⅰ~Ⅳ期各 4 例患者的血样中检出 CTCs 细胞检出率分别为 50%,50%,75% 和 100%,检测到的 CTCs 分别为 2.8±0.9、5.3±1.7、5.8±1.7 和 10.3±1.9 个(表 1)。可见,微流控免疫磁珠分选法可以高效的富集 CTCs 细胞。

表 1 肺癌患者临床特征及检测到 CTCs 的数量

临床特诊	例数	检测到 CTCs 患者例数(%)	检测到 CTCs 数量 年龄(岁)
年龄			
<50	5	4(80.0)	8.20±3.71
≥50	11	6(54.5)	5.00±2.41
性别			
男性	12	7(58.3)	5.50±2.65
女性	4	3(75.0)	7.5±4.4
TNM 分期			
Ⅰ	4	2(50.0)	2.8±0.9
Ⅱ	4	2(50.0)	5.3±1.7
Ⅲ	4	3(75.0)	5.8±1.7
Ⅳ	4	4(100)	10.3±1.9

3 讨论

循环肿瘤细胞(CTCs)是实体肿瘤细胞脱落、侵袭并进入血液循环中的肿瘤细胞,是研究肿瘤的转移的基础。但其在外周血中的数量极少,导致其检测非常困难[12]。目前用于检测 CTCs 的技术主要包括:RT-PCR、滤过技术、免疫磁珠浓集技术和 CTC 芯片等。其中,美国 Immunicon 公司推出的 Cellsearch 系统就是利用免疫磁珠浓集技术检测 CTCs,但操作步骤复杂,使细胞回收率差距较大,此外,价格昂贵也限制了其大规模的应用于临床[14]。

本研究采用一种新的检测 CTCs 的系统--IsoFlux 系统,对 16 例肺腺癌患者外周血的 CTCs 进行分选,高效富集了外周血中稀有的 CTCs。IsoFlux 分选肺癌患者Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期和Ⅳ期 CTCs 细胞的效率分别为:50%、50%、75% 和 100%,较之采用新型免疫磁珠富集原理检出肺癌患者外周血 CTCs 的检出率大幅提高(Ⅰ期 CTCs 检出率为 0,Ⅱ期 11.1%,Ⅲ期 62.5%,Ⅳ期 70%)[10]。

IsoFlux 系统使用的免疫磁珠标记有磁珠标记的人 EpCAM 抗体,捕获到特殊病变的靶细胞后,样品通过分离区的微流体管道时,与 CTCs 结合的磁珠被外加的磁场吸附。传统的磁珠分选时,细胞悬液在几秒内全部通过磁场,而 IsoFlux 的试剂仓底部微流控管道长 250 μm,宽 47 μm,在 2psi 的电动控制压情况下,细胞悬液以非常慢的速度在微流控管道中流动(约 300 个/s)。一般磁珠分选时,所有细胞在几秒内同时通过磁场,这样分离得到的磁珠标记的细胞中会有较大比

例的杂细胞。而 IsoFlux 系统采用了微流控原理,使细胞缓慢通过磁场,使得细胞分选纯度大大提高。更为重要的是,这种缓慢的流速可以高效率分选出稀有细胞。富集的细胞可用现有所知的临床诊断、分子生物学领域的技术来处理,比如 qPCR、免疫荧光原位杂交技术、新一代测序技术等。

本研究的局限性在于,研究的样本量较少。下一步实验拟扩大样本量,进一步验证 IsoFlux 系统对 CTCs 细胞分选的效率以及分选出 CTCs 的纯度。

参考文献:

[1] Hunter K. Host genetics influence tumour metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(2): 141 - 146.

[2] Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, *et al*. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22): 6980 - 6986.

[3] Adamczyk L A, Williams H, Frankow A, *et al*. Current Understanding of Circulating Tumor Cells - Potential Value in Malignancies of the Central Nervous System[J]. Front Neurol, 2015, 6: 174.

[4] Paterlini-Brechot P, Benali N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions[J]. Cancer Lett, 2007, 253(2): 180 - 204.

[5] Jiang Y, Palma J F, Agus D B, *et al*. Detection of androgen receptor mutations in circulating tumor cells in castration-resistant prostate cancer[J]. Clin Chem, 2010, 56(9): 1492 - 1495. DOI:10.1373/clinchem.2010.143297

[6] Krebs M G, Hou J M, Sloane R, *et al*. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approachs [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(2): 306 - 315. DOI:10.1097/JTO.0b013e31823c5c16

[7] Yin J, Wang Y, Yin H, *et al*. Circulating Tumor Cells Enriched by the Depletion of Leukocytes with Bi-Antibodies in Non-Small Cell Lung Cancer: Potential Clinical Application [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0137076.

[8] Zhang H, Jia Z, Wu C, *et al*. In Vivo Capture of Circulating Tumor Cells Based on Transfusion with a Vein Indwelling Needle[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015 7(36): 20477 - 20484. doi: 10.1021/acsami.5b06874.

[9] Sun N, Wang J, Ji L, *et al*. A Cellular Compatible Chitosan Nanoparticle Surface for Isolation and In Situ Culture of Rare Number CTCs [J]. Small, 2015, 11(40): 5444 - 5451. doi: 10.1002/smll.201501718.

[10] 嵇金陵,何晓东,索美芳, 等. 利用新型免疫磁珠富集原理检测肺癌患者外周血循环肿瘤细胞[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(8): 727 - 732. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009 - 9158.2013.08.013.

[11] Kristensen L S, Kjeldsen T E, Hager H, *et al*. Competitive amplification of differentially melting amplicons (CADMA) improves KRAS hotspot mutation testing in colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2012, 12: 548. DOI:10.1186/1471 - 2407 - 12 - 548

[12] Hamilton G, Rath B, Klameth L, *et al*. Receptor tyrosine kinase expression of circulating tumor cells in small cell lung cancer[J]. Oncoscience, 2015, 2(7): 629 - 634.

[13] Kubisch I, de-Albuquerque A, Schuppan D, *et al*. Prognostic Role of a Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Advanced Gastric and Gastroesophageal Adenocarcinomas [J]. Oncology, 2015, 89(5): 294 - 303.

[14] Helo P, Cronin A M, Danila D C, *et al*. Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with CellSearch assay and association with bone metastases and with survival [J]. Clin Chem, 2009, 55(4): 765 - 773. DOI:10.1373/clinchem.2008.117952

(**收稿**:2015-07-23;**修回**:2015-09-24)

(编辑 汪勤俭)