

- vival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: A randomized trial [J]. J Clin Oncol, 1997, 15(6): 2403~2413
- 6 Jeffrey WC, Arvin SG, Harold JW. Systemic and adjuvant therapy for patients with pancreatic carcinoma[J]. Cancer, 1996, 78(suppl): 688~693
- 7 夏廷毅. 体部 γ -刀的治疗现状及进展. 见: 于金明, 主编. 肿瘤放射治疗研究进展[M]. 济南: 济南出版社, 2003. 205~210
- 8 武迎梅, 时水治. 金龙胶囊配合中草药治疗中晚期胰腺癌 21 例临床观察[J]. 北京中医杂志, 2002, 21(6): 349~351
- 9 杨光伟, 高时荣, 谭强. 金龙胶囊合并放射治疗鼻咽癌临床观察[J]. 中国肿瘤临床, 2002, 29(7): 529~532
- (2003-10-29 收稿)
(2004-01-20 修回)
(柏敏霜校对)

利用免疫磁珠技术检测大肠癌细胞*

王文秀 路丹 赫文 徐玉清

哈尔滨医科大学附属第二临床医院肿瘤内科 (哈尔滨市 150086)

关键词 免疫磁珠 大肠癌 抗 CEA 单克隆抗体 检测 分离

中图分类号: R735.3⁴ 文献标识码: A 文章编号: 1000-8179(2004)19-1131-03

目前, 大肠癌的发病率呈逐年上升的趋势^[1], 虽然治疗已取得了可喜的成果, 但仍有较高的死亡率, 其中癌的侵袭转移是影响疗效并引起患者死亡的主要原因之一。本组采用免疫磁珠技术^[2,3], 利用大肠癌细胞 CEA 的高表达特性^[4], 进行肿瘤细胞的检测及分离, 为临床中早期发现大肠癌微小残留及转移病变的检测提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 人大肠癌 CCL187 细胞株; 2) 人大肠癌 HRC 9698 细胞株; 3) 健康人抗凝血; 4) 鼠抗人 CEA 单克隆抗体, 福建迈新生物技术开发公司; 5) 包被羊抗鼠 IgG 免疫磁珠 (型号 M-450), Dynal 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 体外培养肿瘤细胞 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养大肠癌细胞 CCL 187 和 HRC 9698, 待细胞数达到培养瓶底面 80%~90% 时, 进行消化并分别制成 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液。台盼蓝染色, 检测细胞活性。对两种细胞株进行 CEA 免疫组织化学检测。

1.2.2 免疫磁珠特异性检测 将两种细胞悬液置 4℃ 下冷却 10min, 加入一定量的抗 CEA 单克隆抗体, 在 4℃ 下孵育, 充分作用 90min。使用冷却的 DPBS (pH7.4) 洗涤细胞, 反复 3 次, 以去除未与细胞结合的抗体。按照细胞与免疫磁珠比为 1:5~1:25 的比例加入用 DPBS 清洗过的免疫磁珠 M-450, 室温下缓慢震荡 60min, 涂片、HE 染色, 显微镜下观察。

以结合 3 个及 3 个以上磁珠的细胞为阳性细胞 (玫瑰花环形成), 计算阳性细胞占细胞总数的比率。判定不同细胞在不同反应条件下与免疫磁珠结合的情况, 摸索最佳反应条件。

1.2.3 免疫检测 采集健康人抗凝血 10ml, 制成外周血单个核细胞 (PBMC) 悬液。取对数生长的 CCL187 细胞, 吹打成单个细胞悬液, 有限稀释法稀释, 按比例加入前述获得的 PBMC 悬液中。并按上述方法将细胞混合液与抗 CEA 单抗及免疫磁珠作用后, 置于磁性分离器的磁场中, 弃上清, 反复洗涤 3 次, 常规涂片, 显微镜下观察肿瘤细胞。

1.2.4 细胞分离 取健康人抗凝血, 每 ml 加入一定数量的 CCL 187 细胞。并按上述方法将细胞混合液与抗 CEA 单抗及免疫磁珠作用后, 置于磁场中, 弃上清, 反复洗涤 3 次, 常规涂片, 显微镜下观察肿瘤细胞。

1.3 统计学处理

采用 χ^2 检验进行统计学差异性分析, 以 $P < 0.001$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 免疫磁珠特异性检测

光镜下可见较多的 CCL 187 细胞与免疫磁珠紧密结合形成玫瑰花环, 且吹打不散, 而在相同条件下 HRC 9698 与免疫磁珠结合的非常少。CCL187 细胞, HRC 9698 细胞及 PBMC 与免疫磁珠 M-450 的最高结合率分别为 90%, 8% 和 0%; CEA 免疫组化染色阳性率分别为 70%, 55% 和 0%。统计学分析结果

* 本文课题受黑龙江省九五攻关项目基金资助 (编号: G98L19-4)

显示 CCL 187 细胞与其他两种细胞的磁珠结合率具有显著差异($P<0.001$)。在细胞浓度,磁珠与细胞比例不变的情况下,改变单抗的浓度,可得到不同的玫瑰花环形成率(图 1,2):当单抗浓度从 0 增加到 $20\mu\text{g/ml}$ (即 $2\mu\text{g}/10^6$ 细胞)时,CCL 187 的玫瑰花环形成率达到最高(90%),单抗浓度继续增加时,形成率不再升高,并略有下降;而单抗浓度增加到 $10\mu\text{g/ml}$ (即 $1\mu\text{g}/10^6$ 细胞),HRC 9698 的形成率达到 8%,继续增加单抗浓度,形成率不再升高。在 CCL 187 细胞浓度不变,单抗浓度为 $20\mu\text{g/ml}$ 时,改变细胞与磁珠的比率,即磁珠与细胞的比由 5:1 增至到 15:1 时,玫瑰花环形成率逐渐增至最高,当比例继续增加时,形成率不变(图 3)。

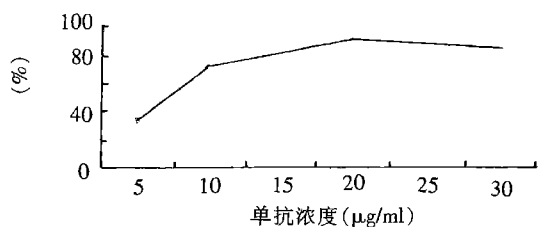


图 1 CCL 187 细胞玫瑰花环形成率与抗 CEA 单抗浓度的关系

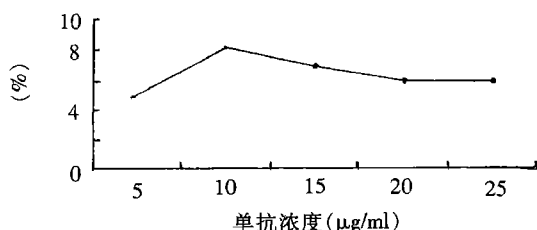


图 2 HRC 9698 细胞玫瑰花环形成率与抗 CEA 单抗浓度的关系

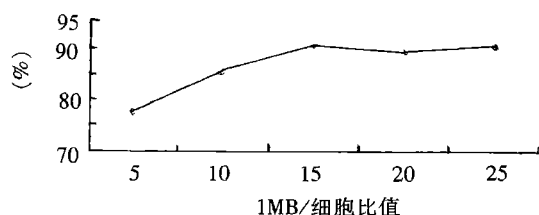


图 3 CCL 187 细胞玫瑰花环形成率与 1MB/细胞比值的关系

2.2 免疫检测

10ml 健康人抗凝血共获得 10^7 个 PBMC, 分别加入 1000, 200, 100, 50, 20, 10 个 CCL 187 细胞, 使得 PBMC 与 CCL 187 的浓度比为 $10^4:1$, $5\times 10^4:1$, $10^5:1$, $2\times 10^5:1$, $5\times 10^5:1$, $10^6:1$ 。每个浓度进行 5 次实

验。结果显示浓度比 $2\times 10^5:1$ 时, 有 3 次可以检测到 CCL 187 细胞, 浓度比 $5\times 10^5:1$, $10^6:1$ 时未检测到肿瘤细胞, 其余各浓度 5 次实验均可检测到肿瘤细胞。

2.3 细胞分离

1ml 新鲜抗凝血中分别加入 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 1 个 CCL 187 细胞, 每个浓度各进行 5 次实验, 其中 10 个细胞及 1 个细胞组中未分离到 CCL 187 细胞, 20 个细胞组有 3 次分离出 CCL 187 细胞, 其余各组均可检测分离出与免疫磁珠形成玫瑰花环的肿瘤细胞。

3 讨论

大肠癌的转移与浸润是一个复杂的多步骤过程, 其中以血行转移的发生率最高^[5]。早期检测到血液中的微小转移病变, 及时采取相应的治疗措施, 对抑制肿瘤的发展, 降低死亡率具有重要意义。本实验采用的免疫磁珠方法可以提高血液中肿瘤细胞的检出率, 即 1ml 血中有 20 个肿瘤细胞即可被检测出来, 而且该方法只需抗体和磁铁, 具有操作简便快速, 可靠等优点。就该实验细胞分离效率高的原因及遇到的相关问题分析如下: 1) 利用大肠癌细胞表面表达 CEA 的特性, 采用包被有羊抗鼠 IgG 的免疫磁珠, 特异性的与结合到细胞表面的抗 CEA 单抗牢固结合, 在磁场作用下将与免疫磁珠结合的细胞与其它细胞分离, 纯化所需要的细胞, 从而达到分离细胞的目的。与现有的细胞分离技术相比, 该方法不但可以获得高纯度的细胞, 而且细胞活性基本不受影响, CCL 187 细胞在细胞免疫检测及分离前后细胞活性变化不大(分离前 96%, 分离后 94%), 且方法操作简单, 不需要昂贵的设备, 易在无菌条件下进行, 适于临床推广。本实验建立的免疫磁珠方法结合分离细胞的效率很高, 其主要原因之一是我们采用了新型的 Dynal-450 免疫磁珠, 其直径为 $4.5\mu\text{m}$, 表面光滑, 大小形状一致, 可以使靶细胞迅速和有效的结合到磁珠上^[6]; 它的球形结构可以消除与不规则形状粒子有关的非特异性结合; 超顺磁性可使磁珠置于磁场时, 显示其磁性, 从磁场移出时, 磁性消除, 磁珠分散, 有利于细胞的分离操作。2) 本实验采用免疫磁珠技术对两种大肠癌细胞株的免疫检测显示: CCL 187 细胞与免疫磁珠 M-450 的最高结合率可以达到 90%, 而采用同样的实验方法 HRC 9698 细胞株的最高结合率不超过 8%, 分析有以下原因: ①根据大肠癌 CEA 免疫组化染色情况, CEA 在大肠癌细胞中的分布特征分为三种: 膜型、浆型、间质型。CCL 187 细胞的 CEA 主要定位于细胞膜上, 即膜型; HRC 9698 细胞的 CEA 主要定位于细胞浆中, 即

浆型。免疫磁珠方法要求实验在细胞混合液中进行,必须保持细胞的完整性,抗体仅能与细胞膜上所表达的抗原发生相互作用。因此在采用适宜的抗体浓度,恰当的磁珠细胞比率条件下,抗 CEA 单抗可以充分与 CCL 187 细胞表面的抗原作用,获得较高的结合率;而由于 HRC 9698 细胞膜上的 CEA 表达很低,即使增加单抗的浓度,也不能增加其与细胞的结合率。②一般认为癌细胞的分化程度越低,恶性程度越高,其 CEA 的含量越高。但根据近年的研究结果表明,高分化腺癌 CEA 强阳性标记的细胞检出率明显高于分化程度低的其它类型癌。其原因可能是由于分化差的癌细胞抗原性发生变异转化,且细胞排列紊乱,极性消失,阻碍了 CEA 的产生分泌^[7]。本实验中使用的 CCL 187 细胞是一种高分化腺癌,而 HRC 9698 细胞为中分化腺癌,恶性程度高于前者,免疫组化结果亦显示其 CEA 表达阳性率低于 CCL 187 细胞。③CEA 分子上有着无数抗原决定簇,抗原构造在不同脏器肿瘤和不同癌肿分化程度之间的差异很大^[8],由于 CEA 结构的复杂性,抗原多样性及相关抗原的存在使得 CEA 家族成员多而复杂,与同一抗体结构上的相匹配性会存在某种程度上的差异,影响到抗原抗体的结合率。3)玫瑰花环形成率的影响因素较多,如细胞类型,单抗的类型,单抗的浓度,物理条件等。4)免疫检测结果显示 2×10^5 个单个核细胞中有一个 CCL 187 细胞即可被检测出来,但较一些文献所报道的结果仍有一定的差距^[9],分析原因如下:①本实验中选用的单抗虽然与 CCL 187 细胞的结合率较高,但它只是一种相关性抗体,而非该细胞的特异性抗体。而大部分实验室多采用自制的肿瘤细胞免疫动物所获得的特异性抗体,抗原抗体匹配性强,因而结合率很高。②一些实验室将该免疫磁珠技术与其它方法相结合,如 RT-PCR 方法^[10],这将明显的提高检测率。③在分离单个核细胞时,即使经过反复洗涤,也难免会残留一些抗原性物质影响单抗与目标抗原的特异性结合或混有其它可能干扰结合的物质,从而影响到实验的结果。5)从全血中分离细胞的结果显示:1ml 血中有 20 个 CCL 187 细胞即可被检测出来。这对于微小转移病变的检测具有重要意义。该方法不但敏感度高,而且可以

特异性的将细胞分离出来,用于进一步的分析检测。但实验中尚有一些因素影响检测结果。①全血中有血清,红细胞,白细胞,血小板等,含有多种具有抗原性的物质,影响单抗与目标抗原的特异性结合。②在分离过程中,因为反复需要进行细胞的洗涤,会破坏肿瘤细胞的抗原性,影响单抗与细胞,磁珠与细胞的结合,导致分离效率的降低。③混悬液中的有形成分,如大量的红细胞,白细胞,血小板等会在空间上阻碍单抗,磁珠及肿瘤细胞的结合。如果能进一步探索最佳实验条件及操作方法,必将提高细胞的分离效果,并使之应用于临床实践中。

综上所述,免疫磁珠技术在肿瘤学领域的应用已经越来越广泛,并趋向于实用性。随着该技术的逐步开展,相信免疫磁珠技术在肿瘤的诊断治疗中将会发挥更大的作用。

参考文献

- 1 周际昌.实用肿瘤内科学[M].北京:人民卫生出版社,1999.480~483
- 2 Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B. Immunobead-PCR: A Technique for the Detection of Circulating Tumor Cells Using Immunomagnetic Beads and the Polymerase Chain Reaction[J]. Cancer Res, 1993, 53(15): 3455~3458
- 3 Soria JC, Gauthier LR, Raymond E. Molecular Detection of Telomerase-positive Circulating Epithelial Cells in Metastatic Breast Cancer Patients[J]. Clinical Cancer Res, 1999, 5(5): 971~975
- 4 吴 军,王晓怀.CEA 分泌性肿瘤疫苗的研究及进展[J].广东医学, 2000,21(12):1065~1066
- 5 夏振龙. 大肠癌肝转移的诊断与治疗 [J]. 中国实用外科杂志, 1999,19(10):579
- 6 牟贤龙,方跃明,郑茂容,等.免疫磁珠法分离恶性黑色素肿瘤细胞 [J].临床检验杂志,1996,14(5):262
- 7 吕文玲. 大肠癌免疫组织化学染色探讨 [J]. 中国现代医学杂志, 1998,8(3):75~77
- 8 韩方海,左文述.癌胚抗原基础和临床[J].齐鲁肿瘤杂志,1998,5(1): 64~66
- 9 范 蓉,钱和年,冯 捷,等.免疫磁珠技术在卵巢癌研究中的应用 [J].北京医科大学学报,1998,30(4):367~368
- 10 黄 毅,陈忠新,谢蜀生,等.应用免疫磁珠-PCR 技术分选及检测尿中的膀胱癌细胞[J].肿瘤防治研究,1999,26(1):18~20

(2003-08-29 收稿)

(2004-04-29 修回)

(柏敏霜校对)