

· 技术研究 ·

改良 IME-FICC 方法对乳腺癌外周血微转移的检测

蔡清清^{1,3}, 黄慧强^{1,3}, 林天歆², 姜文奇^{1,3}(中山大学 1. 肿瘤防治中心内科, 广东 广州 510060; 2. 附属第二医院泌尿外科, 广东 广州 510120;
3. 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探讨一种改良 IME-FICC(免疫磁珠富集-免疫荧光细胞化学)法检测乳腺癌外周血微转移癌细胞及其意义。【方法】通过与磁珠共价结合的表皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体富集外周血中表达 EpCAM 的癌细胞, 结合免疫荧光化学法检测细胞角蛋白(CK)8/18 阳性的癌细胞(呈绿荧光)。放置 MCF-7 乳腺癌细胞于正常人外周血标本中以检验本方法癌细胞回收率及敏感度, 检测 20 例正常女性志愿者及 12 例 期乳腺癌患者治疗前的外周血标本, 探索其特异性及临床应用可行性。【结果】免疫磁珠富集后癌细胞回收率达 86%~93%, 可在 10^7 外周血单个核细胞中检测到 1 个癌细胞, 特异性为 100%。 期乳腺癌患者外周血中 CK8/18 阳性细胞检出率 75%。【结论】改良 IME-FICC 法是一种简便、省时、敏感性及特异性高的检测方法, 有较大的临床应用前景。

关键词: 乳腺癌; 微转移; 免疫磁珠富集; 免疫细胞化学

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0596-04

Detection of Micrometastases in Peripheral Blood of Breast Cancer with Modified Immunomagnetic Enrichment Combined with Fluorescent Immunocytochemistry

CAI Qing-qing^{1,3}, HUANG Hui-qiang^{1,3}, LIN Tian-xin², JIANG Wen-qi^{1,3}

(1. Department of Medical Oncology, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;

2. Department of Urology Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University,

Guangzhou 510120, China; 3. State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】 To establish the method of modified immunomagnetic enrichment combined with fluorescent immunocytochemistry to detect micrometastases in peripheral blood of breast cancer and study its significance.【Methods】 The magnetic beads covalently binding epithelial cell adhesion molecule (EpiCAM) antibody (Ab) can enrich the tumor cells in peripheral blood expressing EpiCAM, combined with the method of fluorescent immunocytochemistry to detect the tumor cells expressing cytokeratin 8/18 (stained with green fluorescence). The tumor cell recovery rate and the sensitivity of the detection method were evaluated by sparking the MCF-7 breast carcinoma cell into the blood samples of volunteers. The specificity and the possibility of clinical usage of the detection method were also determined by comparing the twenty peripheral blood samples of the normal volunteers and the twelve blood samples of the patients with advanced breast cancer.【Results】 The tumor cell recovery rate of immunomagnetic cell enrichment ranged from 86% to 93%. One tumor cell in 10^7 peripheral blood mononuclear cells can be detected, with a specificity of 100%. Circulating tumor cells can be detected in 75% of the patients with stage IV breast cancer.【Conclusion】 The study shows the technique is a time-saving, easily-performed, highly sensitive and specific method. The technique shows potentially great clinical value and further clinical trial is warranted.

Key words: breast cancer; micrometastases; immunomagnetic enrichment; immunocytochemistry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005 26(5):596-599]

乳腺癌的复发与转移主要是由于已存在的但未
被常规临床诊断手段检测到的微转移。检测微

转移的部位主要有腋窝淋巴结、骨髓、外周血等。
由于外周血标本易获得, 创伤性小, 可反复采集,

收稿日期: 2005-04-03

基金项目: 广东省医学科学研究基金资助项目(B2005052)

作者简介: 蔡清清(1976-), 女, 广东湛江人, 硕士生, 医师; 黄慧强, 教授, 硕士生导师。E-mail: caiqingqing199@hotmail.com

是临床上最为理想的检测微转移的部位。本研究探索建立一种新的改良的免疫磁珠富集联合免疫荧光细胞化学技术(Immunomagnetic enrichment combined with fluorescent immunocytochemistry, IME-FICC),以检测乳腺癌患者外周血中的循环癌细胞。此技术主要是通过与磁珠共价结合的表皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体富集外周血中表达EpCAM的癌细胞,结合免疫荧光化学法检测细胞角蛋白(cytokeratin, CK)8/18阳性的癌细胞(呈绿荧光)。本实验同时放置MCF-7乳腺癌细胞于正常人外周血标本中。

1 材料和方法

1.1 分离单个核细胞

选取20例正常女性志愿者及12例按AJCC分期为I-III期的乳腺癌患者治疗前的外周血标本。用负压针筒抽血,留取第2管血,以防止由于静脉穿刺把皮肤表皮细胞带进血管中而造成假阳性结果。共采集15 mL静脉血,肝素抗凝。使用Histopaque-1077(购自美国sigma公司),利用密度梯度原理,分离单个核细胞。

1.2 操作方法

取50 μL 的磁珠颗粒,与上述含有外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的细胞悬液共950 μL 混合,在低速旋转器上孵育2 h,转速2-5 r/min,将细胞磁珠颗粒混合物加到EpiSep玻片的加样孔中。随后用950 mL/L乙醇固定10 min,加生物素标记的抗CK8/18抗体孵育15 min,洗涤。加链亲和素-碱性磷酸酶溶液,孵育15 min,洗涤。加荧光悬液孵育4 min,洗涤。最后,用DAPI孵育4 min,荧光标记胞核的双链DNA,洗涤。每次分析都用MCF-7细胞作阳性对照,正常人分离出的PBMC作阴性对照。最后在荧光显微镜下分析,计数阳性细胞数。

1.3 检测免疫磁珠富集后的癌细胞回收率

取对数生长期的MCF-7乳腺癌细胞(购自美国细胞培养库),胰酶消化并吹打成单个细胞,离心沉淀,用PBS重悬细胞沉淀($2.7 \times 10^6/\text{mL}$)。再按1:10稀释度依次稀释3次,终浓度为 $2.7/\mu\text{L}$ 。

取20 μL ,其中10 μL 直接加到普通的玻片上,计数细胞数,重复3次,取平均值;另10 μL 加入正常供者的500 μL 全血中(正常血细胞不表达CK8/18),按上述步骤“1.1”及“1.2”进行实验,计数被荧光染色的CK8/18阳性细胞,重复5次,取平

均值。将使用EpiSep玻片得出的实验结果除以在普通玻片上计数的结果,计算出本实验免疫磁珠富集后的癌细胞回收率。类似的实验在不同的日期重复1次。

1.4 检测IME-FICC法的敏感性

将MCF-7细胞依次加入正常供者分离出来的PBMC中,MCF-7细胞与PBMC的比例分别为 1×10^5 , 1×10^6 , 1.2×10^6 , 1.5×10^6 , 1×10^7 。然后分别与免疫磁珠颗粒孵育,在EpiSep玻片里进行免疫磁珠富集表达EpCAM的细胞,荧光标志CK及细胞核,在荧光显微镜下计数阳性细胞数。

1.5 统计学处理

用SPSS10.0软件包对数据进行统计分析;样本均数与总体均数的比较采用t检验,计数资料率的比较采用列联表 χ^2 检验。

2 结果

2.1 免疫磁珠富集后的癌细胞回收率

在两次不同日期进行癌细胞回收试验(具体实验步骤详见材料和方法1.2),第一次实验普通玻片的癌细胞数是 13.3 ± 5.9 ,EpiSep的癌细胞数是 11.4 ± 4.3 ,以EpiSep玻片计数的结果作为分子,普通玻片计数作为分母,将两者进行比较,免疫磁珠富集后的癌细胞回收率为86%,第二次实验普通玻片的癌细胞数是 36 ± 8.2 ,EpiSep的癌细胞数是 33.6 ± 8.8 ,癌细胞回收率为93%。本实验证明,运用改良免疫磁珠富集和免疫荧光细胞化学方法能回收绝大多数癌细胞。

2.2 IME-FICC法检测外周血CK8/18阳性细胞的敏感性

在荧光显微镜下,被荧光染色的表皮性MCF-7细胞能较容易地在暗色背景下被区分开来(见图1)。该方法的敏感性较高,可检测到 10^7 个PBMC中的1个MCF-7细胞(表1)。每个稀释度分析6张玻片,然后取其平均值。比较实际检测到的癌细胞数(最后一列)及理论的癌细胞数(第一列),结果显示两者无显著性差异(t检验)。

2.3 检测乳腺癌患者外周血中癌细胞的特异性及临床应用可行性

12例I-III期乳腺癌患者的外周血中有9例检测到CK8/18+细胞(见图2),阳性率为75%;20例正常女性志愿者外周血中无1例检测到CK8/18+细胞,两组用 χ^2 检验,具有统计学意义($P < 0.05$)。本实验,检测外周血CK+癌细胞的特异性为100%(20/20)。

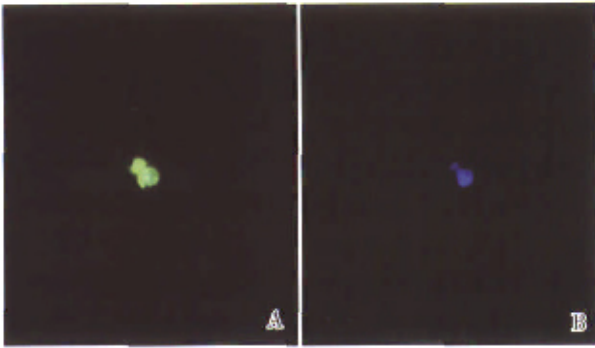


图 1 CK8/18 阳性的 MCF-7 乳腺癌细胞

Fig 1 Cytokeratin 8/18 positive MCF-7 breast cancer cell

A: The cell appears bright green fluorescent light in long Pass UV filter; B: Only DAPI visible in Narrow band pass UV filter

表 1 检测外周血循环癌细胞的敏感性

Table 1 Sensitivity of detection of circulating tumor cells in peripheral blood

Cells added per 10^7 PBMCs	Total number of cells detected	Total cell count	Cells detected per 10^7 PBMC	t	P
100 (1×10^6)	155	1.6×10^7	98 ± 1.8	2.486	0.055
10 (1×10^6)	23	2.1×10^7	11 ± 1.3	1.232	0.273
5 (1.2×10^6)	8	1.5×10^7	5 ± 1.0	1.171	0.295
2 (1.5×10^6)	7	3.3×10^7	2 ± 0.4	1.217	0.278
1 (1×10^7)	8	6.0×10^7	1 ± 0.3	2.204	0.079

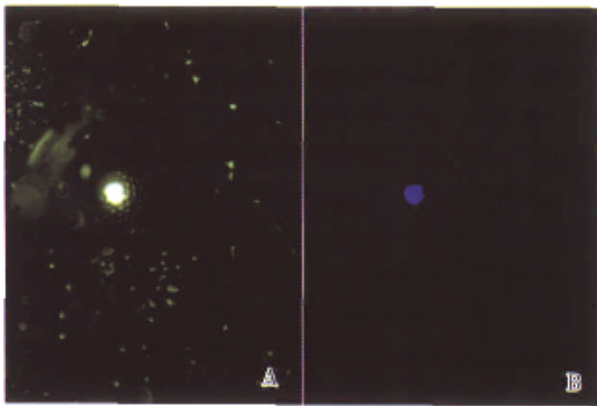


图 2 乳腺癌患者外周血中检测到的循环癌细胞

Fig 2 Circulating tumor cell detected in the peripheral blood of patients with breast cancer

A: Cytokeratin 8/18 positive cell detected in long Pass UV filter; B: Only positive cell nuclei expressing blue fluorescent light stained by DAPI visible in Narrow band pass UV filter

3 讨论

3.1 IME-FICC 法原理

通过磁珠颗粒上共价结合的 EpCAM 抗体富集外周血中表达 EpCAM 的癌细胞,再用免疫荧光

细胞化学法检测 CK8/18 阳性的癌细胞。免疫荧光法简述如下: 生物素标记的抗 CK8/18 抗体可特异地与富集的癌细胞反应,再通过与链亲和素-碱性磷酸酶复合物反应,最后加入碱性磷酸酶的底物 ELF-97 荧光悬液, ELF-97 被特定波长的光照射后,可被激发出强绿荧光,再用 DAPI 蓝荧光标记细胞核的双链 DNA,排除由于细胞碎片引起的假阳性。

本技术的改良之处在于: 特制的 EpiSep 玻片中央有一个椭圆形的加样孔,两边装备着两个黑盒子使荧光物质免受光降解,玻片被固定在磁铁板上,则结合有表达 EpCAM 癌细胞的磁珠颗粒被滞留,未与磁珠结合的细胞则流向加样孔的两侧,被两侧的棉花吸收,从而达到纯化富集的作用。荧光双标 CK8/18 及细胞核。

为了区分 DAPI 发出的蓝荧光(最大激发波长为 358 nm,发射波长为 461 nm)及 ELF97 酶解反应物发出的绿荧光(最大激发波长为 345 nm,发射波长为 530 nm),本研究使用显微镜同时装备了两个滤板,窄波段滤板用于检测蓝荧光;宽波段滤板用于检测绿荧光。移动滤板到不同位置,就可观察到被荧光染色的核发出的蓝荧光及 CK8/18 发出的绿荧光,并能观察到阳性细胞的形态学特征。

3.2 免疫磁珠富集后的癌细胞回收率

本研究使用的 EpiSep 玻片使免疫磁珠富集及荧光双标技术能同时在一块玻片里进行,使癌细胞丢失降低到最低程度,该方法癌细胞回收率高达 93%,而常规的 cytopsin 玻片有约 2/3 的癌细胞的丢失。Kraeft 等^[2]直接裂解红细胞,将单个核细胞沉积到具黏附力的玻片上,免疫荧光标记癌细胞,然后使用专门检测稀有细胞的影像装置检测、分析循环血中的乳腺癌细胞,癌细胞回收率最高可达 89%,但步骤繁多复杂,且需要特殊的影像装置,使其广泛运用受到限制。而本研究所应用的 EpiSep 玻片,由于其独特的设计,使实验的癌细胞回收率和应用简便程度大大提高。因此, EpiSep 玻片有较大的临床应用价值。

3.3 改良免疫磁珠富集和荧光免疫细胞化学方法的敏感性

传统的免疫细胞化学方法处理超过 10^7 的大量单个核细胞,操作复杂,耗费时间,且敏感度降低,采用免疫磁珠分选(immunomagnetic separation, IMS)方法富集癌细胞,能明显提高免疫细胞化学检测的敏感性与特异性,而且操作简单快捷。本检测方法敏感性较其他免疫磁珠富集结合免疫细胞化学方法高,能在 10^7 个 PBMCs 中检测到 1 个 CK 阳性的细胞,这是因为本研究方

有如下优点: 免疫磁珠富集及荧光双标技术能同时在一张玻片里进行,简化了实验操作过程,提高了癌细胞回收率及检测的敏感性。使用的EpiSep玻片,其独特的黑匣子结构,避免了荧光染料的光降解作用,而且玻片两侧的吸收垫片可将废液吸收,使背景清晰。使用绿荧光标记癌细胞的CK8/18,蓝荧光标记胞核DNA,这两种强荧光信号同时存在,使癌细胞很容易从周围的荧光信号较低的PBMC中被辨认出来,从而提高了检测的敏感性和特异性。

3.4 检测IME-FICC法的特异性

最广泛使用于检测癌症患者骨髓或外周血中癌细胞的特异性标志物是细胞角蛋白又名cytokeratin,简称CK,CK是表皮细胞或表皮细胞来源的癌细胞胞浆内的细胞骨骼蛋白的主要组成成分^[3-5],已有大量临床研究证实,CK是检测乳腺癌、前列腺癌、胃癌及结直肠癌的一个特异性较高的标志物,本研究检测了20例正常女性志愿者的外周血,无1例检测到表达CK8/18的癌细胞,其特异性高达100%。

该方法具有广泛应用前景,值得在大规模的临床研究中进一步确定其临床价值。

(本研究得到了美国南加州大学分子病理实验研究室Dr Jianping Zheng及美国OncoQuest公司Dr Christopher C. Feistel的技术支持,谨此致谢)

参考文献:

[1] McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast disease. Breast cancer epidemiology, risk factors, and

genetics [J]. Br Med J, 2000, 321(7261):624-8.

- [2] Kraeft SK, Sutherland R, Gravelin L, et al. Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(2):434-42.
- [3] Braun S, Cevatli BS, Assemi C, et al. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy [J]. J Clin Oncol, 2001, 19(5): 1468-75.
- [4] Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(12): 4102-8.
- [5] Wiedswang E, Borgen R, Kresen G, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(18): 3469-78.
- [6] Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2000, 26(1): 53-65.
- [7] Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases [J]. Cancer, 1989, 63(1):181-7.
- [8] Naume B, Borgen E, Beiske K, et al. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood [J]. Hematother, 1997, 6(2):103-13.

(编辑 黄小延)