

论著·基础研究

EPCAM 联合 CK8 免疫磁珠制备及循环肿瘤细胞检测*

任慧子, 陈 健, 丁世凯[△]

(甘肃省医学科学研究院/甘肃省肿瘤医院, 兰州 730050)

摘要:目的 研究循环肿瘤细胞(CTCs)富集和鉴定方法。方法 分别用羧基磁珠制备 EPCAM、CK8 2 种免疫磁珠, 分成 EPCAM 组、CK8 组、2 种磁珠均等混合检测的 EPCAM/CK8 组 3 组, 对循环肿瘤细胞进行富集, 采用 HE 染色和免疫细胞化学法鉴定细胞。结果 EPCAM 组、CK8 组、EPCAM/CK8 组检测值分别为 12.4 ± 7.3 、 9.8 ± 4.2 、 21.6 ± 5.9 个肿瘤细胞, 检测效率差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 EPCAM 与 CK8 联合检测可有效提高非小细胞肺癌 CTCs 检出效率。

关键词: 循环肿瘤细胞; EPCAM; CK8; 非小细胞肺癌; 免疫磁珠

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.010 **中图法分类号:** R730.4

文章编号: 1673-4130(2018)14-1698-03 **文献标识码:** A

EPCAM and CK8 immunomagnetic beads preparation and circulating tumor cells detection*

REN Huizi, CHEN Jian, DING Shikai[△]

(Gansu Provincial Academic Institute for Medical Research/Gansu Provincial Cancer Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To study the enrichment and identification of circulating tumor cells (CTCs). **Methods** Two kinds of immunomagnetic beads, EPCAM and CK8, were prepared by carboxyl magnetic beads. There were three groups: EPCAM group, CK8 group, and EPCAM/CK8 group in which two kinds of magnetic beads homogeneously mixed for detection. Tumor cells were enriched, and HE staining and immunocytochemical method were used to identify cells. **Results** The detection values of EPCAM group, CK8 group and EPCAM/CK8 group were 12.4 ± 7.3 , 9.8 ± 4.2 , 21.6 ± 5.9 tumor cells, respectively, and the difference in detection efficiency was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The combined detection of EPCAM and CK8 could effectively improve the detection efficiency of CTCs in non-small cell lung cancer.

Key words: circulating tumor cells; EPCAM; CK8; non-small cell lung cancer; immunomagnetic beads

肺癌具有发病率高、早期难以发现、治疗效果不佳等特点^[1]。其中 80% 的肺癌为非小细胞肺癌, 它对放化疗均不敏感。非小细胞肺癌以腺癌居多。原发肿瘤灶癌细胞的转移是导致患者死亡的主要原因。近年大量研究结果提示, 肿瘤的转移与循环肿瘤细胞(CTCs)密切相关^[2]。通过对 CTCs 的检测可动态监测原发肿瘤灶癌细胞入血情况, 能够对患者的治疗效果及预后作出客观的评价^[3]。本研究选择偶联 EPCAM 抗体和 CK8 抗体的羧基磁珠对外周血 CTCs 进行富集, 对富集 CTCs 采用 HE 染色和免疫细胞化学法进行鉴定。

1 资料与方法

1.1 一般资料 15 份 7.5 mL 外周静脉血样本来自于甘肃省医学科学研究院省肿瘤医院检验科健康体检者。

1.2 仪器与试剂 层流超净工作台和 CO₂ 培养箱购自上海力申科学仪器有限公司; 磁分离架购自上海奥润微纳新材料科技有限公司; 倒置光学显微镜和免疫荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。肺腺癌 NCI-H1975 细胞系购自齐氏生物科技有限公司。细胞培养用双抗(100 U/mL)、RMPI1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自 HyClone 公司; 人外周血淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限公司; 羧基磁珠由该院分子生物中心提供; HE 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。鼠抗人 EPCAM 单克隆抗体(VU-1D9, ab187372, 500 μL)、兔抗人 CK8 单克隆抗体(500 μL)购自 Abcam 公司; HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗购自 ImmunoWay 公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; PE 和 FITC 标记的荧光二抗购自 Abcam 公司。

* 基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSKY-2014-17)。

作者简介: 任慧子, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤标志物方向研究。 [△] 通信作者, E-mail: Renhz2005@126.com。

本文引用格式: 任慧子, 陈健, 丁世凯. EPCAM 联合 CK8 免疫磁珠制备及循环肿瘤细胞检测[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(14): 1698-

1.3 方法

1.3.1 常规贴壁培养细胞系 NCI-H1975 取出 25 cm² 培养瓶,75%酒精擦拭培养瓶,拆下封口膜,放入 37 ℃,5% CO₂ 细胞培养箱中静置过夜,以稳定细胞状态,待细胞密度达 80%时,用 0.25%胰酶消化后传代,用新鲜完全培养液继续培养至细胞达对数生长期后消化离心收集细胞并计数。

1.3.2 磁珠 ELISA 测定抗体活性 取 100 μL 磁珠到 1.5 mL EP 管中,于气浴恒温振荡器中 37 ℃活化 1 h,用 0.01%PBS 清洗磁珠 3 次,将鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体和兔抗人 CK8 单克隆抗体稀释 10、100、1000 倍后与 100 μL 磁珠偶联 1 h,加 1 mL 封闭液于 37 ℃封闭 1 h,0.01% PBS 清洗 2 遍,加 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 100 μL 37 ℃ 1 h,0.25%吐温洗 3 遍,0.01%PBS 洗 1 遍,换 EP 管,加 A 液、B 液各 1 滴,避光,37 ℃孵育 15 min,加终止液 50 μL,吸上清液 100 μL 至全自动酶标仪读板,阴性对照 OD 值为 0.295,10 倍稀释抗体 OD 值为 1.533。

1.3.3 EPCAM、CK8 免疫磁珠制备 按本院医学分子实验室提供的磁珠最大蛋白结合量 15 μg/mL,在 50 μL 活化磁珠中加入鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体和兔抗人 CK8 单克隆抗体各 100 μL,37 ℃气浴恒温振荡器中偶联 2 h,离心管进行磁分离,移除上清,加 1 mL 封闭液 37 ℃封闭 1 h,0.01%PBS 清洗 2 遍室温放置待用,长期于 4 ℃ 50%甘油保存。

1.3.4 非小细胞肺癌 CTCs 模型制备 收集达对数生长期的 NCI-H1975 细胞后消化离心收集细胞,计数后按 100 个细胞加入 7.5 mL 健康体检外周血样本中,模拟 CTCs 模型。

1.3.5 外周血模型 CTCs 富集 将 15 份 7.5 mL 外周血(含 NCI-H1975 细胞)转移到 50 mL 离心管中,等比例加入人淋巴细胞分离液,2 000 r/min 离心 20 min,吸取白膜层,用 0.01%PBS 清洗 2 次,分 3 组免疫磁珠(50 μLEPCAM 磁珠,50 μLCK8 磁珠,25 μLEPCAM 磁珠+25 μL CK8 磁珠),每组检测 5 份 7.5 mL 外周血(含 NCI-H1975 细胞),37 ℃气浴恒温振荡器中偶联 2 h,离心管进行磁分离,移除上清液。0.01%PBS 清洗 2 遍,重悬样本后行 HE 染色。

1.3.6 HE 染色 参照文献判断标准^[4]由 2 名检验医师分别对染色后细胞进行鉴定:细胞体积偏大,核质比增大,细胞核大成圆形或椭圆形且有免疫磁珠结合者即判定为 CTCs。

1.3.7 免疫细胞化学法鉴定 CTCs 载玻片洗涤后,将荧光标记抗体按 1:100 取 200 μL 加入抗体孵育缓冲液,避光室温孵育 30 min;洗涤缓冲液洗涤 3 次,使用前玻片上加 200 μL 准备底物工作溶液,避光室温孵育 15 min;PBS 洗涤 3 min,加入 DAPI 封片剂封片,荧光显微镜下进行观察。

1.3.8 典型 CTCs 判定标准 细胞核较大,细胞膜完整,边界清楚,DAPI 染色呈现亮蓝。细胞质和细胞

膜抗 CK8 染色阳性,胞膜抗 EPCAM 染色阳性。

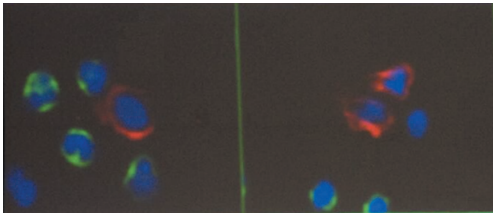
1.4 统计学处理 采用统计学软件 SPSS10.0 进行数据分析,检出率的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTCs 的检出率 3 组共 15 份外周血标本,加入培养细胞的每份血液经 2 名检验医师分别计数,计算 15 份计数结果的平均值和标准差。结果显示,EP-CAM/CK8 免疫磁珠组比单独用 EPCAM 和 CK8 免疫磁珠检出率高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组免疫磁珠检出率			
磁珠分组	每组检出细胞数 (n)	平均检出数($\bar{x}\pm s$)	检出率 (%)
EPCAM	10,8,12,7,25	12.4±7.3	12.4
CK8	7,5,9,13,15	9.8±4.2	9.8
EPCAM/CK8	15,18,20,25,30	21.6±5.9	21.6

2.2 加入培养细胞的免疫细胞化学法结果 荧光显微镜下见细胞核 DAPI 染色呈亮蓝,细胞质和细胞膜抗 CK8 染色呈红色,细胞膜抗 EPCAM 染色呈绿色。见图 1。



注:绿色为 EPCAM,红色为 CK8,蓝色为 DAPI
图 1 CTCs 免疫细胞化学法染色(×1 000)

2.3 HE 染色结果 HE 染色后镜下见与磁珠结合的肺腺癌细胞体积大,细胞核大,核质比大,形状成圆形。见图 2。

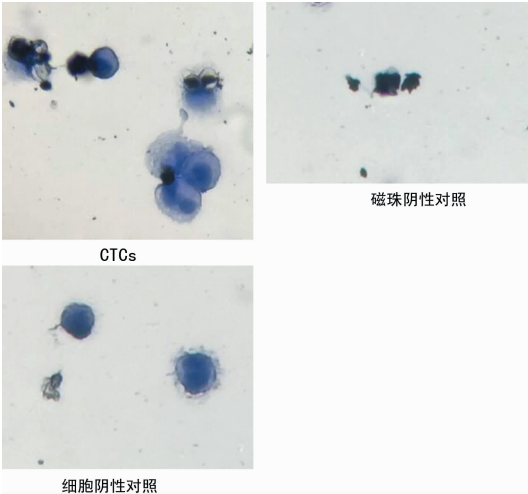


图 2 HE 染色结果(×1 000)

3 讨论

原发性肺癌是发病率和病死率均位于第一的恶性肿瘤。近年来有数据显示其发病率仍呈现逐年上升趋势^[5]。肺癌的高发病率与人口老龄化、农村城镇

化及城市现代化步伐加快、环境污染和吸烟相关。研究者预计未来 5 年内,我国肺癌发病人数将突破 80 万人,死亡人数将接近 70 万人^[6]。肺癌源于支气管黏膜上皮,其组织学分型可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,非小细胞肺癌包括鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌。肿瘤的局部浸润及血道转移是导致患者死亡的主要原因^[7]。传统的组织病理学诊断主要为明确有无肿瘤及肿瘤组织病理类型^[8],它无法用于肿瘤是否转移的动态监测。“2015 年度十大突破技术”之一的液体活检技术使得动态监测肿瘤是否复发转移成为可能。这一技术虽然处于初级阶段,但是由于其具有非侵入性、能实现动态监测及方便快捷等优点,已成为目前国内外研究的热点。CTCs 指由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞^[9]。Cell Search 系统是美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于 CTCs 检测的系统,应用该系统已经在转移性乳腺癌^[10]、转移性前列腺癌^[11]、转移性结直肠癌^[12]、肺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌等肿瘤中开展研究。研究结果显示,CTCs 的数量与患者无进展生存期及总生存期显著相关。免疫磁珠分选方法被广泛应用于 CTCs 检测。美国 FDA 批准用于 CTCs 检测的 Cell Search 系统就是基于 EPCAM 免疫磁珠检测。由于肿瘤细胞进入外周血会发生上皮间充质转化,上皮源性的标志物会弱化^[13],因此本研究采用 EPCAM 免疫磁珠与 CK8 免疫磁珠进行联合分选,对分选 CTCs 采用 HE 染色和免疫细胞化学法进行特异度检测。通过 EPCAM、CK8、EPCAM/CK8 3 组免疫磁珠分别检测 5 份外周血 CTCs,结果显示 EPCAM/CK8 联合检测比单独用 EPCAM 或者 CK8 检测灵敏度高。但是 CTCs 模型实验中 3 组数据结果标准差值较大,说明采用人工操作计数会产生人为误差,影响细胞回收率。对于 CTCs 富集效率,一个重要的衡量指标即为回收率。文献报道的磁珠回收率由于所用实验不同而波动较大^[14-16]。传统病理学形态诊断方法为诊断肿瘤的金标准,虽然显微镜检比较耗时,但仍不失为检测 CTCs 的有效方法。本研究由 2 名经验丰富的检验医师在 HE 染色后进行镜检,镜检中未见免疫磁珠与白细胞结合,提示用 EPCAM 和 CK8 2 种抗体检测 CTCs 具有较高特异度。免疫细胞化学法检测结果提高了 CTCs 判断的准确性。

4 结 论

本研究采用 EPCAM 和 CK8 联合检测提高了 CTCs 的检出率。说明本研究方法有很好的临床应用前景,值得进一步的改进和完善。

参考文献

- [1] 康艳丽,曹颖平. 肺癌的液体活检和检测技术进展[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(17):2429-2431.
- [2] CHAFFER C L, WEINBERG R A. A perspective on cancer cell metastasis [J]. Science, 2011, 331 (6024):

- 1559-1564.
- [3] MITRA A, MISHRA L, LI S, et al. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance [J]. Oncotarget, 2015, 6(13):10697-10711.
- [4] GERGES N, RAK J, JABADO N. New technologies for the detection of circulating tumor cells [J]. Bri Med Bull, 2010, 94(1):49-64.
- [5] YUAN M Z, LI F, TIAN X, et al. Risk factors for lung infection in stroke patients: a meta-analysis of observational studies [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(10):1289-1298.
- [6] CHEN W, ZHENG R, BAADA P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [7] ILIE M, HOFMAN V, LONG E, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? [J]. Ann Transl Med, 2014, 2(11):107.
- [8] 石远凯,孙燕,余金明,等. 中国晚期原发性肺癌诊治专家共识(2016 年版) [J]. 中国肺癌肿瘤杂志, 2016, 9(1):1-15.
- [9] HAN Y, SU C, LIU Z. Methods for detection of circulating cells in non-small cell lung cancer [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19(5):896-903.
- [10] Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3):920-928.
- [11] DE BONO J S, SCHER H I, MONTGOMERY R B, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(19):6302-6309.
- [12] COHEN S J, PUNT C J, IANNOTTI N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(19):3213-3221.
- [13] 王振丹,赵文华,李胜,等. 循环肿瘤细胞检测方法研究现状 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(17):1391-1394.
- [14] BORGES E, NAUME B, NESLAND J M, et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells [J]. Cytotherapy, 1999, 1(5):377-388.
- [15] ZHAO X, LI J, ZHUO J, et al. Reexpression of ARHI inhibits tumor growth and angiogenesis and impairs the mTOR/VEGF pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Biophys Res Commun, 2010, 403(3):417-421.
- [16] HUANG J, LIN Y, LI L, et al. ARHI, as a novel suppressor of cell growth and downregulated in human hepatocellular carcinoma, could contribute to hepatocarcinogenesis [J]. Mol Carcinog, 2009, 48(2):130-140.