

· 论著 ·

免疫磁珠阴性法富集恶性胸腔积液中肿瘤细胞方法的建立

杨俊俊 徐兴祥 闵凌峰 LIN Ping 钱桂生

【摘要】 目的 建立免疫磁珠阴性法富集恶性胸腔积液肿瘤细胞的方法,探讨该方法富集胸腔积液中肿瘤细胞的敏感性、特异性及其应用价值。**方法** 将 5、10、20、50、100 个 4,6-二咪-2 苯吡啶 (DAPI) 染色的肺腺癌细胞系 A549 细胞分别加入 20 ml 心力衰竭患者的胸腔积液中[约含 $(1 \sim 10) \times 10^6$ 个细胞],通过免疫磁珠阴性法富集瘤细胞,荧光显微镜检测体外加入瘤细胞的回收率。收集 2010 年 7 月至 2011 年 7 月江苏省苏北人民医院呼吸科 53 例患者的胸腔积液,其中包括经活检病理证实的 36 例肿瘤患者的胸腔积液标本,男 25 例,女 11 例,年龄 40~78 岁,平均 (63 ± 9) 岁;17 例非肿瘤患者的胸腔积液标本,男 8 例,女 9 例,年龄 25~81 岁,平均 (53 ± 18) 岁。应用免疫磁珠阴性法及密度梯度离心法富集 53 份胸腔积液标本并涂片,然后分别应用瑞姬染色、免疫荧光染色及荧光原位杂交 (FISH) 法进行肿瘤细胞鉴定。**结果** 分别加入 5、10、20、50、100 个经 DAPI 染色的肺腺癌 A549 细胞的回收率分别为 75%、78%、82%、85% 和 88%,平均回收率为 81.6%。应用免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色检测恶性胸腔积液中肿瘤细胞的阳性率为 81% (29/36),免疫磁珠阴性法联合免疫荧光染色检出表达细胞角蛋白 18 (CK18) 和 DAPI 阳性、白细胞共同抗原 (CD₄₅) 阴性细胞的阳性率均为 100%,免疫磁珠阴性法联合荧光原位杂交 (FISH) 检出肿瘤细胞的阳性率为 86% (31/36);密度梯度离心法联合瑞姬染色检出肿瘤细胞的阳性率为 61% (22/36)。免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色或 FISH 与密度梯度离心法联合瑞姬染色比较,差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 4.00$, $P = 0.039$; $\chi^2 = 5.818$, $P = 0.012$)。良性胸腔积液患者应用免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色或 FISH、密度梯度离心法联合瑞姬染色均未检出肿瘤细胞,而应用免疫磁珠阴性法联合免疫荧光染色检出 CK18 及 DAPI 阳性、CD₄₅ 阴性细胞的阳性率为 100%。**结论** 应用免疫磁珠阴性法富集胸腔积液肿瘤细胞的方法可行,且该方法联合瑞姬染色或 FISH 对恶性胸腔积液的诊断具有较高的敏感性和特异性,对于良恶性胸腔积液的鉴别具有重要意义;而联合 CK18、DAPI、CD₄₅ 标记的免疫荧光染色不能有效鉴别胸腔积液中的肿瘤细胞和间皮细胞,还需寻找更特异的肿瘤细胞抗体标志物。

【关键词】 纳米粒子; 胸腔积液,恶性; 原位杂交,荧光

The negative enrichment by immunomagnetic beads for tumor cells from malignant pleural effusions

YANG Jun-jun*, XU Xing-xiang, MIN Ling-feng, LIN Ping, QIAN Gui-sheng. * Respiratory Department, The 88th Hospital of PLA, Taian 271000, China

Corresponding author: XU Xing-xiang, Email: xuxx63@sina.com

【Abstract】 Objective To establish a method (negative enrichment by immunomagnetic beads) for detection of tumor cells in pleural effusions and to evaluate the sensitivity and specificity of the method for clinical application. **Methods** Five, 10, 20, 50 and 100 A549 (lung adenocarcinoma) cells were labeled with DAPI and added into 20 ml pleural effusions [containing $(1 - 10) \times 10^6$ cells] from heart failure patients, followed by immunomagnetic negative enrichment method. Recovered cancer cells were enumerated using a fluorescent microscope. Tumor cells were enriched from pleural effusion samples by means of density gradient centrifugation and negative enrichment by immunomagnetic beads method, followed by identification

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2012.09.011

基金项目:江苏省“六大人才高峰”项目(2010WS007)

作者单位:271000 山东泰安,解放军第八十八医院呼吸科(杨俊俊);扬州大学临床医学院苏北人民医院呼吸科(徐兴祥,闵凌峰);Department of Cellular & Molecular Medicine, University of California at San Diego (UCSD) School of Medicine, California, USA. (LIN Ping);第三军医大学附属新桥医院呼吸病研究所(钱桂生)

通信作者:徐兴祥,Email: xuxx63@sina.com

with cytology analysis (Wright's Giemsa's staining), immunofluorescence staining (IF) and fluorescence in situ hybridization (FISH) using centromere DNA probes of chromosome 7 and 8. Cytology, IF and FISH evaluations were performed in 53 pleural effusion samples, including 36 cases of malignant disease (25 male and 11 female patients aging 40 to 78 years, mean age (63 ± 9)) and 17 cases of benign disease (8 male and 9 female patients aging 25 to 81 years, mean age (53 ± 18)). **Results** After DAPI staining and mixing with pleural effusions from heart failure patients, the cell recovery rates of A549 cells evaluated under fluorescence microscope were 75%, 78%, 82%, 85%, 88%, and the average recovery rate was 81.6%. Using negative enrichment method and density gradient centrifugation combined with cytology analysis, the positive rates of tumor cells in 36 malignant pleural effusion samples were 81% (29/36) and 61% (22/36), respectively ($\chi^2 = 4.00$, $P = 0.039$). Using negative enrichment method combined with IF, the positive rate of CK18(+), DAPI(+), CD45(-) cells was 100%. Moreover, using negative enrichment method combined with FISH analysis, the positive rate of tumor cells was 86% (31/36), much higher than that using density gradient centrifugation combined with cytology analysis ($\chi^2 = 5.818$, $P = 0.012$). In 17 cases of benign pleural effusions, using negative enrichment method combined with IF, the positive rate was 100%. But other methods didn't find cancer cells from benign pleural effusions. **Conclusions** It was applicable to enrich tumor cells from pleural effusions using negative enrichment method by immunomagnetic beads. This method combined with cytology analysis or FISH significantly enhanced the sensitivity and specificity of tumor cell detection in pleural effusions. But it was difficult to distinguish cancer cells from mesothelial cells using immunofluorescence staining with CK18, DAPI and CD45 label. More specific markers were needed to recognize tumor cells from pleural effusions.

[Key words] Nanoparticles; Pleural effusion, malignant; In situ hybridization, fluorescence

目前,诊断恶性胸腔积液的金标准是脱落细胞的病理学检查,但常规脱落细胞检查恶性胸腔积液的检出率较低,因此临床上良恶性胸腔积液的鉴别存在困难,需要寻求一种新的胸腔积液中肿瘤细胞的富集方法,从而提高恶性胸腔积液的检出率。免疫磁珠技术主要用于细胞的分离和纯化,包括免疫磁珠阳性捕获法和阴性富集法,常用于外周血循环中肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)的富集^[1]。其中免疫磁珠阴性富集法的敏感性和特异性均较高,其原理是通过免疫磁珠技术去除白细胞、红细胞及蛋白等成分,使目标细胞得以纯化,从而提高外周血循环中肿瘤细胞的检出率。目前国内尚未见免疫磁珠阴性法用于恶性胸腔积液中肿瘤细胞的富集。本研究利用免疫磁珠阴性法富集恶性胸腔积液中的肿瘤细胞,以提高肿瘤细胞的检出率,对良恶性胸腔积液的鉴别诊断及治疗有重要意义。

对象与方法

1. 对象:收集 2010 年 7 月至 2011 年 7 月江苏省苏北人民医院呼吸科 53 例患者的胸腔积液,其中包括经活检病理证实的 36 例肿瘤患者的胸腔积液标本,男 25 例,女 11 例,年龄 40~78 岁,平均(63 ± 9)岁;17 例非肿瘤患者的胸腔积液标本(结核性渗出性胸膜炎 11 例,肺炎旁积液 6 例),男 8 例,女 9 例,年龄 25~81 岁,平均(53 ± 18)岁。另有 5 例心力衰竭患者的胸腔积液用于回收率验证试验。本研究获得本院临床研究伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。严格按照无菌操作对患者行胸腔穿

刺术或闭式引流术,用无菌离心管取 100 ml 胸腔积液,尽快送检并于 1 h 内富集肿瘤细胞。

2. 主要试剂与仪器:癌细胞系为人肺腺癌细胞系 A549,来自美国模式培养集存库(ATCC)。抗白蛋白共同抗原(CD45)标记的纳米磁珠、抗细胞角蛋白 18(CK18)-Alexa488 抗体、抗 CD45-Alexa594、细胞核荧光染料 4,6-二脒-2 苯吡啶(DAPI)、含人 7,8 号染色体特异性 DNA 片段探针、达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM 培养基)、灭活胎牛血清、PBS 缓冲液、单核细胞分离缓冲液(CS1、CS2、CS3)及固定液均由美国加州大学圣地亚哥分校林平教授无偿提供。条形磁力架(美国 Promega 公司)、垂直混悬仪(宁波新芝公司)、电子显微镜及荧光显微镜(日本 Nikon 公司)等。

3. 细胞培养:将人肺腺癌细胞系 A549 置于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)中,5% CO₂、37℃ 孵箱中培养,每 4~5 天传代 1 次,传 6 代。

4. 回收试验:将培养的肺腺癌 A549 细胞与适量 DAPI 混匀并置于培养箱中孵育 2 h,然后在荧光显微镜下计数,将倍比稀释至 5、10、20、50、100 个细胞的 20 μ l 细胞液,分别加到 20 ml 心力衰竭患者的胸腔积液中[约含($1 \sim 10$) $\times 10^6$ 个细胞],然后通过免疫磁珠阴性法富集,之后在双盲的情况下由其他技术人员对回收的肿瘤细胞在荧光显微镜下计数,每份样本重复 3 次。回收率(%) = 20 ml 胸腔积液中回收肿瘤细胞数/实际加入 20 ml 胸腔积液中肿

瘤细胞数 $\times 100\%$ 。

5. 胸腔积液中肿瘤细胞富集实验: (1) 免疫磁珠阴性法: 按参考文献[2]中循环肿瘤细胞的富集方法并做部分改动, 取 45 ml 胸腔积液离心 (1900 r/min, 室温, 5 min), 弃上清至 5 ml, 加 CS1 缓冲液至 45 ml, 轻柔颠倒混匀离心 (1900 r/min, 室温, 5 min), 弃上清至 12 ml 并将细胞沉淀混匀后加 CS2 红细胞裂解液至 45 ml, 将其置于垂直混匀仪混匀 3~7 min, 离心 (1900 r/min, 室温, 5 min), 弃上清至 1~2 ml, 轻轻混匀后补加 CS1 至 5 ml, 按每 10^7 个白细胞加 40 μ l 磁珠比例加入抗 CD₄₅ 纳米磁珠, 混匀后置于水平摇床上室温孵育 20 min; 后将所有液体轻轻叠加至 3 ml CS3 顶层, 离心 (1500 r/min, 室温, 5 min) 后可见 3 层溶液, 轻柔吸取最上 2 层溶液, 移至新的 15 ml 离心管内, 加 CS1 至 14 ml, 轻柔颠倒混匀后离心 (2300 r/min, 室温, 5 min), 弃上清至 300 μ l; 加入 1 ml CS1, 混匀沉淀细胞, 将液体转移至 2 ml 离心管中, 靠于条形磁力架上 2~3 min 后将液体移至 1.5 ml 离心管中, 离心 (3400 r/min, 室温, 3 min), 去上清至 300 μ l, 然后进行细胞计数, 取适量细胞与固定液混匀后加入适量 CS1 缓冲液稀释至 10^4 及 10^6 个细胞/10 μ l 的密度, 并取 10 μ l 细胞悬液进行涂片, 室温至涂片干燥, 分别用于荧光原位杂交 (FISH) 法检测、瑞姬染色及免疫荧光染色。 (2) 密度梯度离心法: 将 53 份胸腔积液标本 (每份标本 45 ml) 同时用密度梯度离心法富集, 用于同免疫磁珠阴性法比较, 富集方法参考文献[3]。离心后取单个核细胞层细胞至新管, PBS 洗涤细胞 2 次 (1300 r/min, 室温, 5 min), 弃上清, 用 1 ml PBS 重悬细胞, 然后进行细胞计数, 取适量细胞与固定液混匀后加入适量 CS1 缓冲液稀释至 10^6 个细胞/10 μ l 的密度, 并取 10 μ l 细胞悬液进行涂片, 室温至涂片干燥, 进行瑞姬染色, 光镜下观察。

6. 免疫荧光染色检测阳性肿瘤细胞: 按参考文献[2]的方法, 细胞涂片经 PBS 缓冲液润洗 5 min, 0.1% Trion X-100 膜通透 5 min, PBS 洗涤 3 次, 以 2% BSA-PBS 室温封闭 30 min, 加 1:200 稀释的 CK18 和 1:400 稀释的 CD₄₅ 荧光抗体, 室温孵育 60 min, 0.2% BSA-PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 3 min, 避光晾干, 加 5 μ l DAPI 复染、封片。免疫荧光染色鉴定阳性肿瘤细胞的标准: CK18 和 DAPI 阳性、CD₄₅ 阴性, 且细胞核与细胞质的比例较大者判定为肿瘤细胞。

7. FISH 检测胸腔积液肿瘤细胞 7, 8 号染色体

拷贝数: 按参考文献[4]的方法, 将 10^4 个细胞密度的涂片通过杂交前标本处理后进行原位杂交及检测, 荧光显微镜下观察。FISH 检测肿瘤细胞的标准: 计数涂片上的细胞 7, 8 号染色体着丝粒探针的信号, 剔除破损、重叠、边界不清及具有明显非特异性杂交背景和信号模糊不清的细胞, 杂交信号 > 2 个判断为拷贝数增多, 视为超二倍体细胞。

8. 统计学分析: 用 SSPS 16.0 软件进行统计分析。应用 McNemar 试验分析不同富集及检测方法对胸腔积液肿瘤细胞检出率的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 体外肺腺癌 A549 细胞回收试验结果: 肺腺癌 A549 细胞在不同倍比稀释的 5 个批次的回收试验中均能有效回收癌细胞, 其回收率分别为 75%、78%、82%、85% 及 88%, 平均回收率为 81.6%。

2. 免疫荧光染色鉴定胸腔积液中肿瘤细胞的结果: 经免疫磁珠阴性法富集后通过免疫荧光染色呈现 CK18 和 DAPI 阳性、CD₄₅ 阴性的细胞被判定为阳性肿瘤细胞 (图 1~4)。36 份恶性胸腔积液及 17 份良性胸腔积液标本经富集及免疫荧光染色后均出现 CK18 及 DAPI 阳性、CD₄₅ 阴性细胞, 应用免疫荧光染色检测阳性细胞的敏感度达 100%。

3. 瑞姬染色鉴定胸腔积液中肿瘤细胞的结果: 经免疫磁珠阴性法及密度梯度离心法富集后, 通过瑞姬染色观察细胞形态, 判定肿瘤细胞 (图 5~8)。经瑞姬染色后肿瘤细胞形态具有明显的恶性肿瘤细胞形态, 体积较大, 细胞核与细胞质比例失调。36 例恶性胸腔积液经免疫磁珠阴性法富集瑞姬染色后有 29 例找到肿瘤细胞, 阳性率为 81%; 经密度梯度离心法富集瑞姬染色后有 22 例找到肿瘤细胞, 阳性率为 61%。其中 21 例恶性胸腔积液经两种方法富集后瑞姬染色均找到肿瘤细胞, 6 例恶性胸腔积液经两种方法富集后瑞姬染色均未找到肿瘤细胞; 1 例恶性胸腔积液经密度梯度离心法联合瑞姬染色检测为阳性, 而免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色为阴性。免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色同密度梯度离心法联合瑞姬染色相比, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.00$, $P = 0.039$)。17 例良性胸腔积液中两种方法富集后均未找到肿瘤细胞。

4. FISH 鉴定胸腔积液中肿瘤细胞的结果: 经免疫磁珠阴性法富集后, 利用 7, 8 号染色体着丝粒探针标记细胞, 通过杂交信号判断是否存在超二倍体

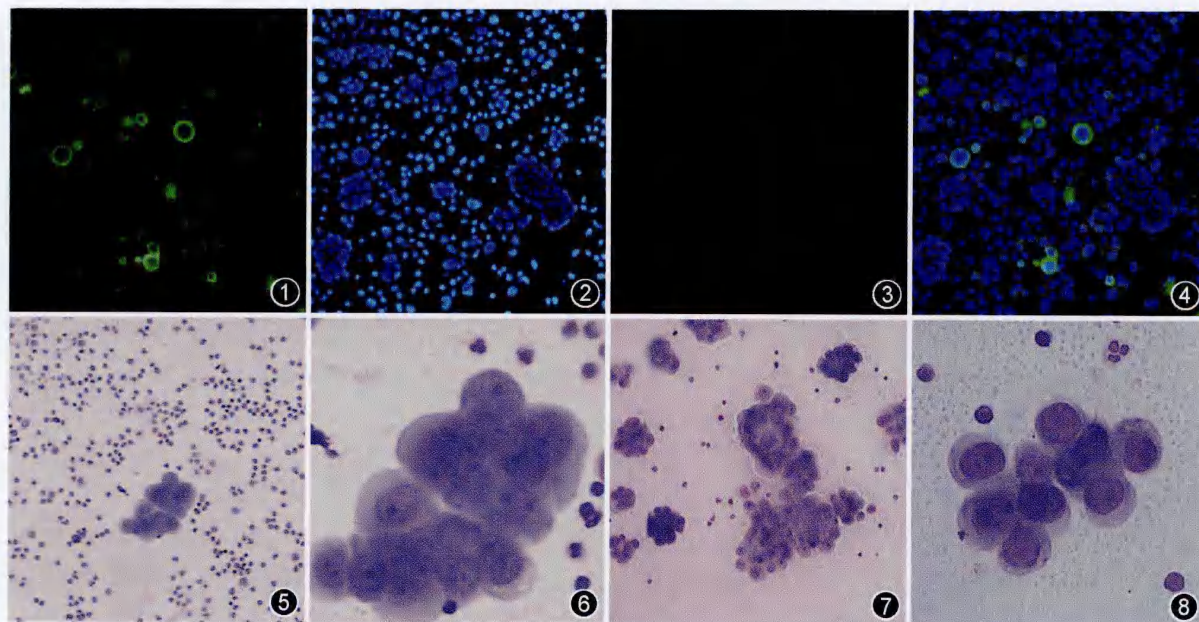


图 1~4 恶性胸腔积液中免疫荧光染色阳性细胞。图 1 为细胞角蛋白(CK)18 阳性细胞(呈绿光);图 2 为图 1 中细胞的细胞核,4,6-二脒-2 苯吡啶(DAPI)染色,呈蓝光;图 3 为 CD₄₅ 抗体染色细胞,呈红光,几乎无 CD₄₅ 阳性细胞;图 4 为三色下的细胞,其中阳性细胞为 CK18 及 DAPI 阳性、CD₄₅ 阴性,且细胞呈团样分布,呈桑葚样、腺腔样结构,细胞体积较大,核质比例失调。图 5~8 瑞姬染色后的恶性胸腔积液肿瘤细胞:图 5 为密度梯度离心法富集后瑞姬染色细胞涂片,低倍放大;图 6 为密度梯度离心法富集后瑞姬染色细胞涂片,高倍放大;图 7 为免疫磁珠阴性法富集后瑞姬染色细胞涂片,低倍放大;图 8 为免疫磁珠阴性法富集后瑞姬染色细胞涂片,高倍放大,图中细胞呈现明显的恶性肿瘤细胞特征,细胞成团簇状分布,边界不清,体积较大,核质比例失调。

细胞(图 9~14)。36 例恶性胸腔积液中 31 例出现 7,8 号染色体拷贝数增多,即超二倍体细胞,阳性率为 86%,同密度梯度离心法联合瑞姬染色法(阳性率为 61%)相比,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.82$, $P = 0.012$);而在 17 例良性胸腔积液中未出现超二

倍体细胞。36 例恶性胸腔积液经免疫磁珠阴性法富集后,用 FISH 或瑞姬染色检测肿瘤细胞的差异无统计学意义($\chi^2 = 0.500$, $P = 0.5$)。另 1 例恶性胸腔积液经密度梯度离心法联合瑞姬染色找到肿瘤细胞,而经免疫磁珠阴性法富集法联合瑞姬染色或 FISH 均未找到肿瘤细胞;4 例恶性胸腔积液患者经密度梯度离心法及免疫磁珠阴性法富集法联合瑞姬染色或 FISH 均未找到肿瘤细胞。

讨 论

胸腔积液是呼吸内科常见病,其病因主要有恶性肿瘤(肺癌胸膜转移、胸膜间皮瘤、淋巴瘤等)、细菌感染(结核分枝杆菌等)、免疫功能损伤(系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等)及心功能不全等。鉴别胸腔积液的良恶性对患者的诊断、治疗及预后具有重要意义,但某些良恶性胸腔积液的鉴别存在困难。目前,胸腔积液的诊断以脱落细胞病理学检查为金标准,此方法虽然

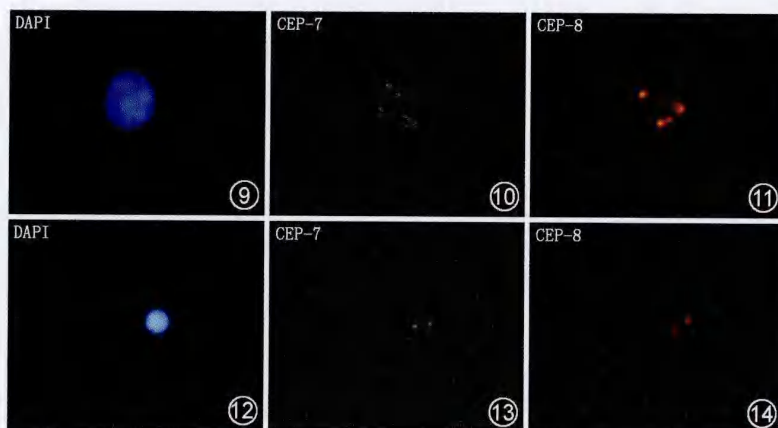


图 9~14 恶性胸腔积液中肿瘤细胞 7,8 号染色体荧光原位杂交检测图。图 9 所示为 DAPI 染色细胞核;图 10 为图 9 中细胞核的 7 号染色体,拷贝数为 9 个(绿色荧光标记探针);图 11 为图 9 中细胞核的 8 号染色体,拷贝数为 5 个(红色荧光标记探针),判定为超二倍体细胞;图 12 为 DAPI 染色细胞核;图 13 为图 12 中细胞核的 7 号染色体,拷贝数为 2 个;图 14 为图 12 中细胞核的 8 号染色体,拷贝数为 2 个,判定为二倍体细胞。

简单、快捷,但阳性率低,仅为33%~72%^[5],容易漏诊,且不利于判断肿瘤细胞的来源。其他常用的胸腔积液肿瘤细胞富集检测方法有密度梯度离心法(连续/不连续密度梯度法)和免疫磁珠阳性法^[3,6-7],较常规脱落细胞学检查均具有较高的阳性率。王文秀等^[7]应用免疫磁珠阳性法与常规离心涂片法分别对30例癌症患者的胸腔积液和腹水进行脱落细胞检查,两组的阳性率分别为63.3%及23.3%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。并且富集后的细胞较纯,可进行后续肿瘤细胞生物学特性分析,可确定肿瘤细胞的来源。但免疫磁珠阳性法富集检测肿瘤细胞需要特异性的肿瘤细胞抗体,不仅成本较高,对于部分不表达特异性抗体或抗原抗体难以结合的肿瘤细胞容易漏诊,造成假阴性;并且经抗体抗原反应后,肿瘤细胞的生物学特性会受到一定影响,从而影响其后续生物学特性分析的准确性。对于密度梯度离心法而言,由于肿瘤细胞具有异质性,当收集某一密度或某一段密度上的细胞时,容易丢失一部分肿瘤细胞,从而造成假阴性,且富集后的肿瘤细胞纯度不高,易掺杂其他非肿瘤细胞,如单核细胞或淋巴细胞等。目前,胸腔积液中各种肿瘤分子标志物的联合检测及DNA倍体分析等对良恶性胸腔积液的鉴别有一定的辅助作用^[8],但多因价格昂贵或特异性不高易出现假阳性而使其应用受到限制。对于部分高度可疑恶性肿瘤的患者,胸腔积液中肿瘤细胞的检出可以减少一些有创的检查,如胸腔镜胸膜活检,既可减轻患者的痛苦,也可节省开支,因此探索一种敏感性和特异性均较高的肿瘤细胞检测方法十分必要。免疫磁珠阴性法起初用于外周血循环中肿瘤细胞的富集及检测^[2],其敏感性 & 特异性均较高,原理是通过免疫磁珠技术去除无关细胞而使目标细胞得以纯化,从而提高外周血循环中肿瘤细胞的检测率;并且阴性法富集后的肿瘤细胞纯度较高,且没有被抗体触及而处于自然状态,从而可进行一系列后续分析测定。近期Liu等^[9]首次报道了应用免疫磁珠阴性法富集胸腔积液及腹腔积液中的肿瘤细胞,利用该方法富集了3例胸腔积液及4例腹水标本,并通过上皮细胞黏附分子(EpCAM)、CK7、8及CD₄₅的表达情况进行肿瘤细胞检测,最后通过细胞培养进行鉴定,结果显示胸腔积液及腹水中均存在EpCAM阴性、CK阳性、CD₄₅阴性的肿瘤细胞,且占很大比例;并且对应患者的外周血中同样存在EpCAM阴性、CK阳性、CD₄₅阴性及EpCAM阳性、CK阴性、CD₄₅阴性的肿瘤细胞。这说

明对于实验中的上皮源性肿瘤来说,肿瘤细胞存在异质性,并不一定完全表达上皮源性标记,从而进一步证实了免疫磁珠阳性法的局限性及免疫磁珠阴性法的优势所在。虽然Liu等^[9]的研究通过细胞培养方法证实了EpCAM阴性、CK阳性、CD₄₅阴性细胞的肿瘤起源,但实验中没有利用良性胸腔积液进行对比,无法完全证明EpCAM阴性、CK阳性、CD₄₅阴性的细胞均是肿瘤细胞,可能存在部分间皮细胞。在本研究中我们应用免疫磁珠阴性法联合免疫荧光染色检测良恶性胸腔积液中的肿瘤细胞,其敏感度达100%,但后经瑞姬染色及FISH证实其特异性差,CK表达阳性的细胞并非都是肿瘤细胞,其中部分为间皮细胞,因此单纯应用上皮细胞源性抗体检测无法区分二者。

本研究中建立的免疫磁珠阴性法通过人腺癌A549细胞系回收试验证实平均回收率为81.6%,方法较稳定。因恶性胸腔积液中肿瘤细胞来源丰富,无特异性肿瘤相关抗原,而同时应用几种相对特异性的抗体检测价格较昂贵。本研究中的免疫磁珠阴性法通过对胸腔积液中CD₄₅的标记并去除无关细胞,从而提高了肿瘤细胞的纯度及检出率。本方法较免疫磁珠阳性法成本低,且实验中不涉及肿瘤细胞抗原抗体反应,突破了肿瘤检测受特异性抗体的限制,无需考虑肿瘤细胞的来源。

应用免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色或FISH对恶性胸腔积液中肿瘤细胞的检出率均明显高于密度梯度离心法联合瑞姬染色,其原因为免疫磁珠阴性法利用包被有抗CD₄₅抗体的免疫磁珠与CD₄₅特异性结合后,在磁场作用下将胸腔积液中的白细胞去除,同时利用红细胞裂解液及缓冲液去除胸腔积液中红细胞及蛋白成分,从而提高肿瘤细胞的纯度,理论上保留了所有的肿瘤细胞,但未去除间皮细胞,仍需有经验的病理科医生对反应性的间皮细胞和肿瘤细胞进行鉴别。而应用密度梯度离心法部分肿瘤细胞易被白细胞黏附包绕,富集后肿瘤细胞纯度不高,易致病理科医生漏诊。本研究中有1例恶性胸腔积液经密度梯度离心法联合瑞姬染色检测为阳性,而免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色及FISH均为阴性,分析原因可能与下列因素有关:(1)患者胸腔积液中肿瘤细胞含量较少,且混匀不充分,大部分聚集于进行密度梯度离心法的标本中;(2)洗脱过程中肿瘤细胞发生丢失。

本研究还从分子遗传学角度分析利用7,8号染色体着丝粒探针和FISH技术检测胸腔积液超二倍

体肿瘤细胞,结果显示应用免疫磁珠阴性法富集后经 FISH 检测胸腔积液中肿瘤细胞的敏感性和特异性均高于密度梯度离心法,而经免疫磁珠阴性法富集后应用瑞姬染色或 FISH 检测二者结果无统计学差异,这更体现了免疫磁珠阴性法的优势所在。在本研究中我们还发现,1 例患者已确诊为结核性胸腔积液,经临床及常规实验室检查未发现肿瘤诊断依据,应用密度梯度离心法及免疫磁珠阴性法富集后联合瑞姬染色均未找到肿瘤细胞,而免疫磁珠阴性法联合 FISH 检测可见超二倍体细胞,但因无病理证实也未找到原发灶,故给予患者正规抗结核治疗,并定期随访,3 个月后患者复查胸部 CT 见患侧胸腔积液及右上肺斑片状阴影较前明显吸收,但可见到结节影,考虑到之前 FISH 检测找到超二倍体细胞,因此同患者沟通后行 CT 引导下肺穿刺活检术,术后病理示腺癌。另 1 例患者为右侧乳糜样胸腔积液,经各项检查未能确诊,胸部 CT 提示纵隔淋巴结肿大,但多次送检胸腔积液均未找到肿瘤细胞,后经密度梯度离心法及免疫磁珠阴性法联合瑞姬染色也未找到肿瘤细胞,但免疫磁珠阴性法联合 FISH 可见超二倍体细胞,遂建议患者行气管镜针吸活检术,术后病理示低分化癌,但一直未找到原发病灶。由上述 2 例可见,通过染色体数目分析,FISH 检测能更早发现尚未出现形态学变化的肿瘤细胞。FISH 检测的优势为:(1)从分子遗传学角度分析细胞染色体数目的变化,较普通细胞学检查能更早发现肿瘤细胞,尤其是病变早期尚未出现形态学变化者;(2)由于肿瘤细胞的异质性及病理科医生经验的限制,普通细胞学检查容易漏诊,而 FISH 检测能直接反映细胞的遗传学变化,较为客观。FISH 检测可作为普通细胞学检查的有效辅助手段,对于临床上可疑肿瘤及良恶性疾病鉴别诊断困难的病例有辅助作用。由于本研究中病例尚少,且多数病例均为晚期患者,未能完全体现出 FISH 的优势。另外,研究中有 4 例患者经活检病理证实为恶性胸腔积液,但应用密度梯度离心法及免疫磁珠阴性法联合瑞姬

染色或 FISH 均未检测到肿瘤细胞,分析原因可能为胸腔积液中肿瘤细胞较少,洗脱过程中发生丢失。

总之,本研究建立的免疫磁珠阴性法富集鉴定胸腔积液中肿瘤细胞的方法可行,且具有较高的敏感性和特异性,利于良恶性胸腔积液的鉴别诊断,且富集后的肿瘤细胞纯度较高,信息量大,一方面有助于判断肿瘤细胞来源及细胞分化程度,另一方面可进行肿瘤细胞其他生物学活性分析,如耐药基因、增殖活性检测等,有望成为肺癌甚至其他实体瘤组织的替代标本,从而用于指导肺癌及其他实体瘤患者个体化治疗方案的选择及实时疗效评估,具有重要的临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] Balic M, Dandachi N, Hofmann G, et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005, 68: 25-30.
- [2] Wu C, Hao H, Li L, et al. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients. *J Thorac Oncol*, 2009, 4: 30-36.
- [3] 叶安霞, 向旭东, 谭国姣, 等. 密度梯度离心法在癌性胸腔积液细胞病理学检测中的应用. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24: 420.
- [4] 吴家璐, 李龙芸. 应用 7.8 号人染色体着丝粒特异探针和 FISH 技术检测胸腔积液中的超二倍体肿瘤细胞. *癌症进展杂志*, 2005, 3: 500-505.
- [5] Johnston WW. The malignant pleural effusion: a review of the cytopathologic diagnosis of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer*, 1985, 56: 905-909.
- [6] Hamburger AW, Dunn FE, White CP. Percoll density gradient separation of cells from human malignant effusions. *Br J Cancer*, 1985, 51: 253-258.
- [7] 王文秀, 杨艳丽, 于泽, 等. 免疫磁珠技术检测癌症患者胸腹水. *中国癌症杂志*, 2008, 18: 685-688.
- [8] Motherby HK, Pomjanski N, Kube M, et al. Diagnostic DNA-flow-vs image cytometry in effusion cytology. *Anal Cel Pathol*, 2002, 24: 5-15.
- [9] Liu Z, Fusi A, Klopocki E, et al. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med*, 2011, 9: 70.

(收稿日期: 2012-07-03)

(本文编辑: 李文慧)