

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2005.03.07

• 临床研究 •

细胞芯片捕获胸腔积液中癌细胞的应用价值

吴广平 侯伟建 赵雨杰 王恩华 方长青 刘树立 宋今丹

【摘要】 背景与目的 免疫细胞化学对良恶性胸腔积液的鉴别具有重要的应用价值,然而单纯一种肿瘤标志物的诊断价值是有限的。该研究应用了多种肿瘤标志物,以探讨细胞芯片捕获肺癌胸腔积液中癌细胞的应用价值。方法 应用一种新型的细胞芯片,芯片上固定了上皮特异性抗原(ESA)、CD44V6、ND1、T 细胞(CD3)、CD45RO、B 细胞(CD20)、CD79a、霍奇金细胞(CD15)、CD30、巨噬细胞(CD68)等共 10 种抗体,对 42 例肺癌胸腔积液及 20 例良性胸腔积液中细胞进行免疫杂交。结果 阳性杂交点细胞呈圆形分布,界限清楚,细胞形态显示良好;42 例肺癌胸腔积液经过细胞芯片杂交,阳性杂交点例数分别为 ESA(35 例)、CD44V6(30 例)、ND1(38 例),20 例良性胸腔积液中分别在 ESA 和 ND1 点上各发现 1 例有淋巴细胞及中性粒细胞,有 3 例在 CD44V6 点上发现少量淋巴细胞;另 7 种抗体仅捕获肺癌胸腔积液和良性胸腔积液中的淋巴细胞、中性粒细胞和巨噬细胞,未见捕获癌细胞。结论 细胞芯片对肺癌胸腔积液中癌细胞的诊断及鉴别诊断可能有较重要的应用前景。

【关键词】 细胞芯片 微阵列 胸腔积液 肺肿瘤

【中图分类号】 R734.2; R730.3

Clinical value of capture of cancer cells in pleural fluid of patients with lung cancer by cytochip WU Guangping*, HOU Weijian, ZHAO Yujie, WANG Enhua, FANG Changqing, LIU Shuli, SONG Jindan.
* Pathological Diagnosis Center, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, P. R. China

Corresponding author: WANG Enhua, E-mail: wangeh@hotmail.com

【Abstract】 Background and objective Immunocytochemistry is valuable in differentiating malignant fluids from benign ones. However, the diagnostic value of a single tumor marker is limited. The aim of this study is to evaluate the clinical value of capture of cancer cells in pleural fluids of patients with lung cancer by cytochip. **Methods** A new pattern cytochip was developed to immunize hybridization of cells in pleural fluids of patients with 42 lung cancers and with 20 lung benign lesions. Ten antibodies were fixed on the cytochip, they were epithelial specific antigen (ESA), CD44V6, ND1, T cell (CD3), CD45RO, B cell (CD20), CD79a, Hodgkin's cell (CD15), CD30 and macrophage (CD68). **Results** The point of positive hybridization showed round distribution with clear border, and the shape of cell displayed well. The positive numbers of ESA, CD44V6, ND1 were 35, 30, 38 respectively in pleural fluids of 42 patients with lung cancers; lymphocytes and neutrophils were found on the 1 ESA and 1 ND1 respectively, and only lymphocytes were found on the 3 CD44V6 in 20 ones with lung benign lesions; the other 7 antibodies did not capture cancer cells except for lymphocytes, neutrophils and macrophages from two pleural fluids. **Conclusion** The cytochip could be an important practical foreground in clinic for diagnosing cancer cells in pleural fluids of patients with lung cancer.

【Key words】 Cytochip Microarray Pleural fluid Lung neoplasms

This work was supported by a grant from Key Project of Science Foundation of Liaoning Province (to WANG Enhua) (No. 20033002).

肿瘤标志物是对肿瘤进行诊断、分期、预后、监测

治疗效果的重要参考指标。以往对肺癌胸腔积液中癌细胞的认定主要依据光镜下的细胞形态进行确认和分型,由于腺癌细胞与反应性间皮细胞十分相似^[1],故诊断率较低。近来采用免疫细胞化学技术作为辅助手段^[2],但其应用受到标本量的限制,且需要抗体量较大,因此,一种省时、价廉、高通量的检测方法是细胞诊

本研究受辽宁省科委重大攻关项目基金(No. 20033002)资助
作者单位: 110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院病理诊断中心
(吴广平),中国医科大学生物芯片技术开发中心(侯伟建、赵雨杰),中国医科大学病理教研室(王恩华、方长青、刘树立),细胞生物实验室(宋今丹)(通讯作者:王恩华, E-mail: wangeh@hotmail.com)

断学发展的必要条件之一^[3]。我们设计了一种新型的细胞芯片,其原理是应用细胞膜表面不同的抗原物质,与固定在玻片上的不同抗体发生特异性结合,通过自动捕获将所获细胞固定在特定区域,以此对肺癌胸腔积液中癌细胞进行诊断和鉴别诊断。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集中国医科大学附属第一医院 2003 年 5 月~ 2004 年 5 月间门诊及住院胸腔积液患者 62 例,其中男 26 例,女 36 例,年龄 24~ 72 岁;肺癌转移性胸腔积液 42 例(包括腺癌 38 例,鳞癌 4 例),良性胸腔积液 20 例(包括炎性胸腔积液 13 例,结核性胸腔积液 7 例);收集每例胸腔积液标本 100 ml,取 20 ml 常规离心(2 000 r/min, 10 min),取沉渣制芯片细胞悬液,同时涂片进行常规细胞学检查。所有病例均经气管镜组织活检和刷取涂片细胞学检查所证实。

1.2 所用试剂 上皮特异性抗原(ESA)、CD44V6、ND-1、T 细胞(CD3)、CD45RO、B 细胞(CD20)、CD79a、霍奇金细胞(CD15)、CD30、巨噬细胞(CD68),均为单克隆抗体。ND-1 是我校宋今丹等研制,其余均为美国迈新公司生产,购于福州迈新公司。

1.3 细胞芯片的制作 每种抗体与 pH 10.2 的 Tris-HCl 缓冲液等体积稀释,通过生物芯片点样仪自动点样,将 10 种抗体分别点在富含生物大分子手臂的醛基玻片上,每一抗体点 4 个点,直径约 2 mm 左右,形成 4 × 10 微阵列。点样后迅速将玻片置于湿盒中,4℃ 冰箱水化,过夜(图 1)。

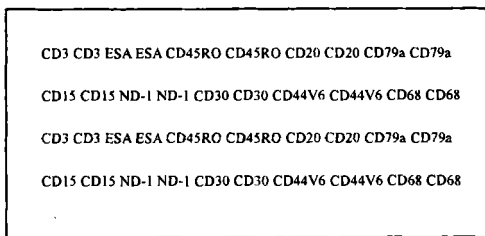


图 1 抗体点排列微阵列
Fig 1 Microarrays of antibodies

1.4 细胞芯片的杂交与染色 用 2.5% 酪蛋白(casein)

PBS 溶液室温下封闭芯片 1 h,封闭抗体点以外的非特异结合区,PBS 冲洗 1 次。取 EDTA-K 冲洗收集的细胞 3 次,每次 3 min,使细胞膜抗原充分暴露,最后调整细胞浓度在 10⁸/L 左右,制成细胞悬液。将细胞悬液直接滴在芯片上孵育 30 min,使细胞与特异抗体充分结合。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。1% 戊二醛固定细胞 10 min。染色方法用巴氏染色方法。

2 结果

2.1 杂交点图像 应用普通光学显微镜 40、100、200、400 等倍数对图像进行逐级观察,阳性杂交点细胞呈圆形分布,界限清楚,细胞形态保存良好,杂交点以外几乎无非特异性结合细胞(图 2)。

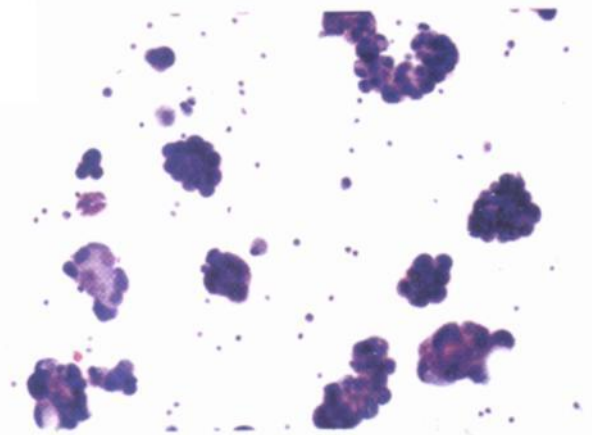


图 2 ESA 捕获,腺癌细胞呈不典型腺腔样排列(巴氏 × 200)
Fig 2 Adenocarcinoma cells captured by ESA, which showed atypical glandular cavity-like distribution (PAP × 200)

2.2 杂交细胞分布 42 例癌细胞悬液经过细胞芯片杂交,阳性杂交点例数分别为 ESA 35 例、CD44V6 30 例、ND-1 38 例,这些杂交点中 80% 以上为癌细胞,少部分为红细胞和淋巴细胞,未发现间皮细胞;20 例良性细胞悬液经过细胞芯片杂交,分别在 ESA 和 ND-1 点上各发现 1 例有淋巴细胞及中性粒细胞,有 3 例在 CD44V6 点上发现少量淋巴细胞;另 7 种抗体仅捕获肺癌胸腔积液和良性胸腔积液中的淋巴细胞、中性粒细胞和巨噬细胞,未捕获到癌细胞(表 1)。

表 1 62 例胸腔积液中细胞在细胞芯片上的捕获结果
Tab 1 The results of 62 cells in the pleural fluid captured by the cytochip

Pleural fluid	n	Antibody Points										
		ESA	CD44V6	ND-1	CD3	CD45RO	CD20	CD79a	CD15	CD30	CD68	(-)*
A denocarcinoma	38	32	28	35	20	22	30	31	18	21	20	
Squamous cell carcinoma	4	3	2	3	2	2	3	3	1		2	
Inflammation	13		2	10	10	10	11	12	11	9	8	1
Tuberculosis	7	1	1		4	5		6	5	5	4	

* : one case failed in the hybridization

2.3 阳性杂交点及细胞学阳性诊断率的比较 根据 3 种阳性杂交点单独或联合捕获及细胞学诊断的比

较,综合评价各项诊断指标,结果显示 ESA 和 ND-1 联合捕获较好,敏感性达 95.2% (40/42) (表 2)。

表 2 3 种阳性杂交点及细胞学阳性诊断率的比较 (%)

Tab 2 Comparison of positive diagnosis rate from 3 positive hybridization points and cytology (%)

Group	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Accuracy
ESA	83.3	95.0	97.2	73.1	87.1
CD44V6	71.1	80.0	90.9	58.6	75.8
ND-1	90.5	95.0	97.4	82.6	91.9
ESA+ ND-1	95.2	90.0	95.2	90.0	93.6
Cytology	69.1	100.0	100.0	60.6	79.0

3 讨论

本实验是根据抗原抗体的免疫反应原理^[4],应用细胞膜表面不同的抗原物质,与结合在玻片上的不同抗体发生特异性结合,通过自动捕获能力将所获细胞固定在特定区域,以此对胸腔积液中恶性肿瘤细胞进行诊断和分类。笔者暂时称这种技术为细胞芯片(cytochip),实质上它是一种细胞抗体微阵列,根据需要它可将数个、数十个、数百个乃至数千个抗体整齐的排列在一个普通的载玻片上^[5,6],它具有如下特点。

1. 高通量 本实验将原来需要分别进行 10 次的免疫细胞化学程序,在一个仅占 20 mm × 16 mm 大小的玻片上集中于一体,一次实验就得到了所有结果。同时每一抗体在不同的区域设计了 4 个点,相当于同一实验在相同的条件下进行了 4 次,成功率较大,结果可靠。本实验 62 例胸腔积液中 61 例杂交成功,仅 1 例杂交失败,复习原始实验记录该例细胞 4℃冰箱保存 1 周后才进行杂交,很可能是细胞保存时间过长,膜抗体丢失过多所引起。

2. 体积小,信息量大 根据不同的需求,可进行大量抗体组合。本实验中共有 10 种抗体整齐地排列在同一张载玻片上,形成 4 × 10 的微阵列。综合评价中,ESA 和 ND-1 联合捕获较好,敏感性(95.2%)明显高于常规细胞学诊断率,准确度达 93.6%。随着新的抗体不断出现,未来的细胞芯片信息量还将不断扩大。

3. 具有自动识别能力 以往的辅助技术手段,都是人为操作,存在着偶然性和假阳性,而本实验微阵列中特定区域的抗体对过往的癌细胞具有自动识别能力,自动捕获效应细胞,这一重大突破必将对未来细胞学的发展起到巨大的推动作用。

4. 可比性强 在一张载玻片上同时观察了 10 个结果,自然形成了阳性对照,易于比较;并且每一结果都处在相同实验条件下,误差小。

5. 费用低,应用范围广泛 本实验每一种抗体一

及耗材也明显减少。另外以往免疫细胞化学的抗体最小包装量为 30 例,一旦开封必须在半年内用完,否则效价减低失效。而本芯片不受病例数的限制,因此该项技术适用于各级医院应用,包括基层医院。

6. 操作简单,无需特殊设备 验证实验结果只需一台普通显微镜即可,且实验结果直观、细胞形态特点不变,容易接受,在此基础上还可对细胞进行更深入的研究,例如免疫细胞化学标记,从而大大地节约了人力、物力和财力。

7. 需标本量少 以往的免疫细胞化学实验,标记一个抗体需一张涂片,完成一项诊断,需要大量的标本量,而细胞学的标本量是有限的,细胞芯片恰巧解决了标本量不足这一难点。

当然,本细胞芯片技术也有一定的局限性:本实验所用抗体均为细胞膜抗体,细胞浆阳性抗体还不能应用,因此其应用范围受到限制;另外实验例数只有 62 例,其实验结果尚需进一步验证,这些都有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

- 1 He DN, Zhu HS, Zhang KH, et al. E-cadherin and calretinin as immunocytochemical markers to differentiate malignant from benign serous effusions. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(16): 2406-2408.
- 2 Morgan RL, DeYoung BR, McGaughy VR, et al. MOG-31 aids in the differentiation between adenocarcinoma and reactive mesothelial cells. *Cancer*, 1999, 87(6): 390-394.
- 3 Oode K, Furuya T, Harada K, et al. The development of a cell array and its combination with laser-scanning cytometry allows a high throughput analysis of nuclear DNA content. *Am J Pathol*, 2000, 157(3): 723-728.
- 4 Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol*, 2002, 33(10): 968-974.
- 5 MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 2000, 289(5485): 1760-1763.
- 6 Stillman BA, Tonkinson JL. FAST slides: a novel surface for microarrays. *Biotechniques*, 2000, 29(3): 630-635.

(收稿:2004-09-10 修回:2004-11-18)

(本文编辑 张世雯)