



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277697 A

(43) 申请公布日 2016.01.27

(21) 申请号 201510707696.6

(22) 申请日 2015.10.27

(71) 申请人 上海芯超生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区李冰路151号5号楼4楼

(72) 发明人 王超 郜恒骏 张宝峰 周雁霞
张小燕

(74) 专利代理机构 上海华工专利事务所(普通合伙) 31104

代理人 缪利明 刘淑芹

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,所述方法包括以下步骤:A、从测试对象处获得测试项目的血液样本,样本为抗凝全血,怀疑其中含有上皮肿瘤细胞;B、阴性富集去除血液样本中的非目的细胞,它们包括红细胞和绝大多数白细胞;C、将富集后血样与荧光标记抗体混合,孵育使得目的细胞与荧光抗体充分结合;D、将荧光标记细胞悬液涂于防脱玻片上,静置片刻,与荧光显微镜下观察、分析样品,以便确定循环上皮肿瘤细胞的存在与数量;E、将观察到的目的细胞保存为直接可视图像。与现有技术相比,本发明的有益效果为:其检测将有助于肿瘤早期诊断、转移及复发监测、疗效及预后评估、耐药监测、及个体化治疗的指导等。

1. 一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

A、从测试对象处获得测试项目的血液样本,样本为抗凝全血,怀疑其中含有上皮肿瘤细胞 ;B、阴性富集去除血液样本中的非目的细胞,它们包括红细胞和绝大多数白细胞 ;

C、将富集后血样与荧光标记抗体混合,孵育使得目的细胞与荧光抗体充分结合 ;

D、将荧光标记细胞悬液涂于防脱玻片上,静置片刻,与荧光显微镜下观察、分析样品,以便确定循环上皮肿瘤细胞的存在与数量 ;

E、将观察到的目的细胞保存为直接可视图像。

2. 根据权利要求 1 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述抗凝全血用柠檬酸葡萄糖溶液抗凝保存,不超过 24 小时。

3. 根据权利要求 1 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述红细胞去除通过裂解液裂解后离心分离上清和沉淀,弃去上清,沉淀重悬成细胞悬液,悬液中含有白细胞与上皮肿瘤细胞。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述白细胞通过免疫磁性方法去除,包括以下步骤包括:

A、将细胞悬液与包被抗白细胞表面抗原抗体的磁珠混匀,孵育使得白细胞与免疫磁珠充分结合 ;

B、混合液通过磁场中的磁性分选柱,去除绝大多数白细胞,收取过柱后悬液,悬液中含有少量白细胞与上皮肿瘤细胞。

5. 根据权利要求 1 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述荧光标记抗体包括:

a) FITC 标记抗上皮肿瘤细胞特异性抗体 ;

b) PE、PE-TaxRed 或 APC 标记抗白细胞表面抗原抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述 FITC 标记抗上皮肿瘤细胞特异性抗体包括抗 EpCAM 抗体、抗 CK 抗体。

7. 根据权利要求 5 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述 PE、PE-TaxRed 或 APC 标记抗白细胞表面抗原抗体为抗 CD45 抗体。

8. 根据权利要求 1 或 5 或 6 或 7 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述荧光标记抗 EpCAM 抗体与抗 CD45 抗体应用细胞表面染色技术,荧光标记抗 CK 抗体应用细胞内染技术。

9. 根据权利要求 1 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,所述防脱玻片为多聚赖氨酸包被玻片。

10. 根据权利要求 1 所述的测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,其特征在于,确定上皮肿瘤细胞的步骤包括:

a) DAPI 标记阳性,蓝色,标记核 ;

b) FITC 标记阳性,绿色,标记细胞表面或骨架 ;c) PE、PE-TaxRed 或 APC 标记阳性,标记白细胞。

一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及涉及量化上皮肿瘤患者血液中重要上皮肿瘤细胞的浓度的测定,具体来说是一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法。

背景技术

[0002] 人类记载肿瘤的存在已有 3000 多年的历史。据统计有 100 多种肿瘤已被人们所发现。人体的任何部位均可能受到肿瘤的侵袭,恶性肿瘤已成为人类致死的第 1 或第 2 位原因。上皮性恶性肿瘤是癌症实体瘤的最常见形式。大多数肿瘤患者的病故原因并不是原发性肿瘤,而是肿瘤的转移。然而早期转移与复发在初期诊断时常常被忽略。

[0003] 本发明涉及指示实体瘤的存在。实体瘤的转移与复发是癌症高死亡率的主要原因。它是由散播在淋巴结或外周血中的肿瘤细胞引起的。不少文献证据表明,循环上皮肿瘤细胞代表了转移的最早指征。在某种环境条件下,一些循环肿瘤细胞可以到达机体远端移植生长。在一些肿瘤案例中,移植部位是已知的。乳腺癌、大肠癌的一个移植部位即骨髓,正常骨髓细胞中肿瘤细胞的发病率至多 10^{-3} 到 10^{-7} 。获取样本用于骨髓诊断需要一个特殊的步骤,跟手术同步进行或手术后进行。常规诊断要求重复这个步骤。考虑到带给患者的不便以及费用和时间支出,力图尽可能地减少手术,我们致力于一种更加便捷又有效的方法检测循环上皮肿瘤细胞。

[0004] 在样本的获取中,外周血的获取较容易实现,检测外周血就有很大的可能性。问题在于,外周血中存在的肿瘤细胞数量极少。而另一个困难之处在于高剂量化疗或自体外周血干细胞移植时循环肿瘤细胞会传染。因此,要求有高灵敏度的系统来检测如此少量的残留肿瘤细胞。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决现有技术中循环肿瘤细胞的富集过程容易因为多种原因造成循环肿瘤细胞的丢失或破坏的缺陷,提供一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法来解决上述问题。

[0006] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0007] 一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,所述方法包括以下步骤:

[0008] A、从测试对象处获得测试项目的血液样本,样本为抗凝全血,怀疑其中含有上皮肿瘤细胞;

[0009] B、阴性富集去除血液样本中的非目的细胞,它们包括红细胞和绝大多数白细胞;

[0010] C、将富集后血样与荧光标记抗体混合,孵育使得目的细胞与荧光抗体充分结合;

[0011] D、将荧光标记细胞悬液涂于防脱玻片上,静置片刻,与荧光显微镜下观察、分析样品,以便确定循环上皮肿瘤细胞的存在与数量;

[0012] E、将观察到的目的细胞保存为直接可视图像。

[0013] 优选地,所述抗凝全血用柠檬酸葡萄糖溶液抗凝保存,不超过 24 小时。

[0014] 优选地,所述红细胞去除通过裂解液裂解后离心分离上清和沉淀,弃去上清,沉淀重悬成细胞悬液,悬液中含有白细胞与上皮肿瘤细胞。

[0015] 优选地,所述白细胞通过免疫磁性方法去除,包括以下步骤包括:

[0016] A、将细胞悬液与包被抗白细胞表面抗原抗体的磁珠混匀,孵育使得白细胞与免疫磁珠充分结合;

[0017] B、混合液通过磁场中的磁性分选柱,去除绝大多数白细胞,收取过柱后悬液,悬液中含有少量白细胞与上皮肿瘤细胞。

[0018] 优选地,所述荧光标记抗体包括:

[0019] a) FITC 标记抗上皮肿瘤细胞特异性抗体;

[0020] b) PE、PE-TaxRed 或 APC 标记抗白细胞表面抗原抗体。

[0021] 优选地,所述 FITC 标记抗上皮肿瘤细胞特异性抗体包括抗 EpCAM 抗体、抗 CK 抗体。

[0022] 优选地,所述 PE、PE-TaxRed 或 APC 标记抗白细胞表面抗原抗体为抗 CD45 抗体。

[0023] 优选地,所述荧光标记抗 EpCAM 抗体与抗 CD45 抗体应用细胞表面染色技术,荧光标记抗 CK 抗体应用细胞内染技术。

[0024] 优选地,所述防脱玻片为多聚赖氨酸包被玻片。

[0025] 优选地,确定上皮肿瘤细胞的步骤包括:

[0026] a) DAPI 标记阳性,蓝色,标记核;

[0027] b) FITC 标记阳性,绿色,标记细胞表面或骨架;c) PE、PE-TaxRed 或 APC 标记阳性,标记白细胞。

[0028] 优选地,所述可视图象为蓝、绿、红三色图像。

[0029] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:其检测将有助于肿瘤早期诊断、转移及复发监测、疗效及预后评估、耐药监测、及个体化治疗的指导等。在局部疾病患者的外周血中若检测到肿瘤细胞,不仅具有较早检测肿瘤的潜力,而且能够提供潜在肿瘤入侵的指征。若在肿瘤患者术后检测到循环肿瘤细胞,如果是复发迹象,可以及时开始用药治疗。治疗过程监测中,若循环肿瘤细胞数量改变,可以预测进展(增加)或反应(减少)来判断疗效。

具体实施方式

[0030] 为使对本发明的结构特征及所达成的功效有更进一步的了解与认识,用以较佳的实施例详细的说明,说明如下:

[0031] 一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法,所述方法包括以下步骤:

[0032] A、从测试对象处获得测试项目的血液样本,样本为抗凝全血,怀疑其中含有上皮肿瘤细胞;B、阴性富集去除血液样本中的非目的细胞,它们包括红细胞和绝大多数白细胞;

[0033] C、将富集后血样与荧光标记抗体混合,孵育使得目的细胞与荧光抗体充分结合;

[0034] D、将荧光标记细胞悬液涂于防脱玻片上,静置片刻,与荧光显微镜下观察、分析样品,以便确定循环上皮肿瘤细胞的存在与数量;

[0035] E、将观察到的目的细胞保存为直接可视图像。

[0036] 血样来自肿瘤患者和正常捐献者。正常捐献者血中混入人宫颈癌细胞株

Hela229(中国科学院细胞所)。Hela229用Mitotracker预染。外周血白细胞和肿瘤细胞用血球计数板计数。细胞株细胞数10-100不等,并与1ml健康全血混匀。

[0037] 正常捐献者混肿瘤细胞株细胞测试:1ml全血中加入10ml红细胞裂解液(Qiagen)冷藏反应8-10min。800g离心获取白细胞团,并用1ml Buffer重悬。离心清洗后弃上清至100 μ l。(加磁珠略),加入1ml Buffer混匀,(靠磁力架略),离心清洗后弃上清至100 μ l,(加荧光抗体略),加入1ml Buffer混匀,弃上清至100 μ l,加入DAPI 5 μ l反应10-15min,体积增至600 μ l,涂片两张计数肿瘤细胞数。回收率平均值达80%以上。

[0038] 肿瘤患者血测试:9ml(全血7.5ml)血样分管裂解细胞,每毫升血样用10ml裂解液处理,冷藏反应8-10min。800g离心获取白细胞团,各管用1ml Buffer重悬,转移至同一支离心管。离心清洗后弃上清至200 μ l。重悬至800 μ l加入40 μ l抗CD45抗体(STEM CELL EasySep),混匀孵育15min,再加入配套磁珠80 μ l,混匀孵育10min。将反应液转移到2ml EP管靠磁力架两次去除磁珠(即去除与磁珠结合的白细胞)。离心获取剩余细胞,重悬至400 μ l进行细胞表面染色,加入40 μ l抗EpCAM荧光抗体和40 μ l抗CD45荧光抗体,冷藏反应30-40min。离心清洗后弃上清至100 μ l,重悬至400 μ l,加入400 μ l固定液固定20min。离心清洗后弃上清至100 μ l,加入300 μ l抗体混合液(内含40 μ l抗CK荧光抗体)冷藏反应30min。加入1ml Buffer混匀离心清洗细胞,弃上清后重悬至400 μ l,加入10 μ l DAPI,反应10-15min后涂片计数肿瘤细胞。因患者情况差异,检测值少时可得1-10个,多时可达1000以上。

[0039] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和改进,这些变化和进步都落入要求保护的本发明的范围内。本发明要求的保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

专利名称(译)	一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法		
公开(公告)号	CN105277697A	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201510707696.6	申请日	2015-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	上海芯超生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海芯超生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海芯超生物科技有限公司		
[标]发明人	王超 郜恒骏 张宝峰 周雁霞 张小燕		
发明人	王超 郜恒骏 张宝峰 周雁霞 张小燕		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/533		
代理人(译)	缪利明 刘淑芹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种测定血液中循环上皮肿瘤细胞数量的方法，所述方法包括以下步骤：A、从测试对象处获得测试项目的血液样本，样本为抗凝全血，怀疑其中含有上皮肿瘤细胞；B、阴性富集去除血液样本中的非目的细胞，它们包括红细胞和绝大多数白细胞；C、将富集后血样与荧光标记抗体混合，孵育使得目的细胞与荧光抗体充分结合；D、将荧光标记细胞悬液涂于防脱玻片上，静置片刻，与荧光显微镜下观察、分析样品，以便确定循环上皮肿瘤细胞的存在与数量；E、将观察到的目的细胞保存为直接可视图像。与现有技术相比，本发明的有益效果为：其检测将有助于肿瘤早期诊断、转移及复发监测、疗效及预后评估、耐药监测、及个体化治疗的指导等。