

基于明胶膜基底捕获和原位培养循环肿瘤细胞

张珂, 张陶冶, 黄慧明

武汉大学物理科学与技术学院, 湖北 武汉 430072

【摘要】目前从血液中分离得到高活力的循环肿瘤细胞(CTCs)仍面临一定的挑战,本研究设计了一个明胶膜基底,可以同时实现捕获和原位培养CTCs。该明胶基底对CTCs的捕获效率最高可达86.8%。由于明胶具有良好的生物相容性,明胶膜基底在捕获到CTCs后可直接进行原位培养,减少了释放过程中对细胞的损害,有利于后续细胞分析。该明胶膜基底有望在临床CTCs检测中发挥作用。

【关键词】循环肿瘤细胞;明胶膜基底;原位培养

【中图分类号】R-33

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)12-1549-05

Capture and culture *in situ* of circulating tumor cells based on gelatin film substrate

ZHANG Ke, ZHANG Taoye, HUANG Huiming

School of Physics and Technology, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: At present, there are some challenges in obtaining circulating tumor cells (CTCs) with high viability from blood. Herein a gelatin film substrate is designed for realizing the capture and culture *in situ* of CTCs. The maximum capture efficiency of the proposed substrate for CTCs reaches 86.8%. Because of the good biocompatibility of gelatin, CTCs can be directly cultured *in situ* after being captured by gelatin film substrate, which reduces the damages to the cells during the release process and is more beneficial for subsequent cellular analysis. The gelatin film substrate is expected to play a role in the clinical detection of CTCs.

Keywords: circulating tumor cells; gelatin film substrate; culture *in situ*

前言

循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells, CTCs)是从原发性肿瘤脱落经过迁移转化等过程进入外周血液循环的癌细胞,其携带着肿瘤部位的全部信息^[1-2]。有研究表明,CTCs随着血液循环可以在人体的不同组织处沉降继而形成继发性肿瘤,是造成癌症患者死亡的主要原因^[3]。对患者血液中分离出的CTCs进行分子学分析,不仅有助于了解肿瘤转移的机理,而且对癌症诊断、预后疾病监测和个性化治疗起着至关重要的作用^[4-8]。获得高活力的CTCs对随后的分子学分析具有十分重要的意义。近年来,开

发了各种方法用于从癌症患者血液中分离CTCs,包括免疫磁分离、微流控技术、密度梯度离心、流式细胞术和静态细胞分离技术等^[9-13]。虽然这些方法各有优点,但从血液中分离得到高活性的CTCs仍面临一定的技术挑战。首先,CTCs在血液含量极少;其次,在CTCs分离的过程中,细胞活性会受到影响。例如,在梯度密度离心分离时,长时间的分离过程会破坏细胞的结构完整性并干扰细胞的微结构^[14-16];利用微流控芯片分离CTCs时,细胞在芯片中流动时受流体动力学作用,CTCs挤压到硬质硅或玻璃过滤器时产生的外部压力会破坏和影响CTCs完整性和生存能力^[17-18]。因此,需要采用更加优良的分离方法来获得具有高活力的CTCs,以便更好地用于后续细胞培养和分子分析。

为获得具有高活力的CTCs,需要更加温和的分离方法。静态细胞分离方法捕获细胞过程温和,通常是捕获基底和细胞在合适的条件下共孵育,利用捕获基底结合特异性捕获抗体,从而实现对CTCs的捕获,对细胞活性损伤极小。其中,基于二氧化锰

【收稿日期】2021-06-15

【基金项目】武汉应用基金会前沿项目(2019010701011386);深圳市知识创新计划基础研究项目(JCYJ20180302173424902)

【作者简介】张珂,硕士在读,研究方向:循环肿瘤细胞的捕获和鉴定, E-mail: 2018282020096@whu.edu.cn

【通信作者】黄慧明,副教授,硕士生导师,研究方向:微流控芯片、循环肿瘤细胞捕获与鉴定, E-mail: huiming1918@sina.com

(MnO_2)、二氧化钛(TiO_2)等基底被广泛应用于CTCs捕获^[19-20]。Huang等^[21]制备了一种基于 MnO_2 薄膜平面基底,引入EpCAM抗体作为亲和捕获分子来识别和捕获CTCs,然后通过低浓度草酸溶解 MnO_2 膜来释放CTCs。Li等^[22]制备了涂有 MnO_2 颗粒的 TiO_2 柱基底来捕获CTCs,并通过草酸来释放CTCs。

迄今为止,大多数的研究都集中在CTCs的捕获,但是也应该关注CTCs的下游分析,例如增殖、基因分析等,故控制细胞释放而不受损害对于后续细胞分析至关重要。有研究表明,当抗体作为捕获剂时,CTCs回收方法大多为对细胞膜外抗原蛋白的水解消化,例如胰蛋白酶和EDTA等,这种类型的释放过程在一定程度上影响细胞活力,必须要精确控制反应时间和试剂浓度^[23]。另外,还可以通过热力学释放、电化学释放、激光刺激等实现在抗体修饰的基底上CTCs的释放。考虑到实际捕获和释放CTCs复杂而精细的操作方法,亟需一种更加简单而可行的方法。Sun等^[24]提出一种新颖的集捕获和原位培养CTCs于一体的方法,利用电喷雾在基底制备一层壳聚糖颗粒,将PEG分子连接到壳聚糖颗粒上,然后缀合上细胞特异性适配体DNA,实现对CTCs的高效捕获。由于壳聚糖是细胞组织工程的天然衍生物,无毒且细胞相容性好,可实现对捕获细胞的原位培养。血液中CTCs数量极少,因此稀有CTCs的增殖将会是进一步进行分子表征和功能分析的重要尝试^[24]。目前鲜见有关于基底捕获的稀有CTCs的原位培养的研究。原位培养可减少释放过程中对细胞活性的损害,这种方法给我们提供了一种新的思路。在基底捕获中,选择生物相容性好且适合细胞培养的基底材料可以同时实现CTCs的捕获和原位培养。

明胶是天然的生物高分子材料,无毒且生物相容性好,是细胞培养良好的基质材料^[25-26]。明胶分子链含有氨基、羧基等官能团,有利于功能修饰,且明胶价格便宜,来源易得。本实验制备了一个明胶膜基底来捕获和原位培养CTCs。通过在小培养皿底上制备一层明胶膜基底,引入抗体作为亲和捕获分子实现对CTCs的捕获;对捕获到的细胞进行原位培养可进一步增殖稀有细胞,用于后续分子表征和功能分析。该方法具有巨大的潜在价值,并且有望在临床上发挥作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)购于阿拉丁试剂(上海)有限公司。戊二醛水溶液(25%)、无水乙醇(AR, $\geq 99.7\%$)购于中国国药化学试剂有限公司。明胶(A型)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸

盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、吗啉乙磺酸(MES)、荧光素二乙酸酯(Fluorescein Diacetate, FDA)、碘化丙啶(Propidium, PI)、honest33258、多聚甲醛(PFA, 4%)、Tween-20、人白细胞分离液(Ficoll-Paque)购于Sigma-Aldrich公司。生物素标记的上皮细胞粘附因子抗体(anti-EpCAM)购于R&D systems公司。磷酸盐缓冲液(PBS)(Hyclone, 1X)和细胞培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Hyclone, 高糖)、胎牛血清(FBS)、正常山羊血清(NGS)、牛血清白蛋白(BSA)、0.25%Trypsin-EDTA(Gibco, 1X)购于赛默飞世尔科技公司。PE标记的抗细胞角蛋白(CK)(CAM5.2)、FITC标记的抗人CD45(Ms IgG, clone H130)购于BD Biosciences。链霉亲和素(SA)购于Solarbio。

1.2 细胞培养

人的乳腺癌细胞系(MCF-7)在DMEM培养基中孵育。培养基分别补充有10%的热灭活FBS和1%的链霉素-青霉素。每3 d更换一次培养基。所有细胞均在37℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。MCF-7由武汉大学中南医院提供。

1.3 实验方法

1.3.1 明胶膜基底的制备及抗体修饰 (1)明胶膜基底制备。戊二醛作为交联剂,在基底上形成一层明胶膜。小培养皿用酒精清洗干净并放入烘箱中烘干后放入plasma机中处理15 min,然后加入无水乙醇配置的2%的APTES溶液,室温下放置4 h。分别用无水乙醇和DI水清洗基底3遍后加入5%的戊二醛水溶液37℃反应30 min;然后用DI水冲洗基底3次;接着加入PBS配置的5%的明胶溶液,37℃下反应30 min;反应完成后,用PBS清洗基底3次,烘干后放入4℃冰箱备用。

(2)明胶膜基底抗体修饰。向制备好的明胶膜基底加入EDC(4 mg/mL)和NHS(6 mg/mL)溶液(MES配置),37℃反应30 min,分别用MES和PBS洗3次。加入SA溶液(0.1 mg/mL),37℃反应1 h后用PBS洗3次;加入anti-EpCAM溶液(1 $\mu\text{g/mL}$),37℃反应1 h后用PBS洗3次。抗体修饰过程和捕获CTCs示意图如图1所示。

1.3.2 最佳捕获时间 向修饰好EpCAM抗体的6组明胶膜培养皿基底中分别加入5 000个MCF-7,做好标记后放入37℃、5% CO_2 培养箱进行捕获。当捕获时间达到10、20、30、60、90、120 min时,分别拿出对应的捕获装置,取出上清充分吹悬后,取样并在显微镜下对样本CTCs计数,最后通过换算得到不同捕获时间的效率。

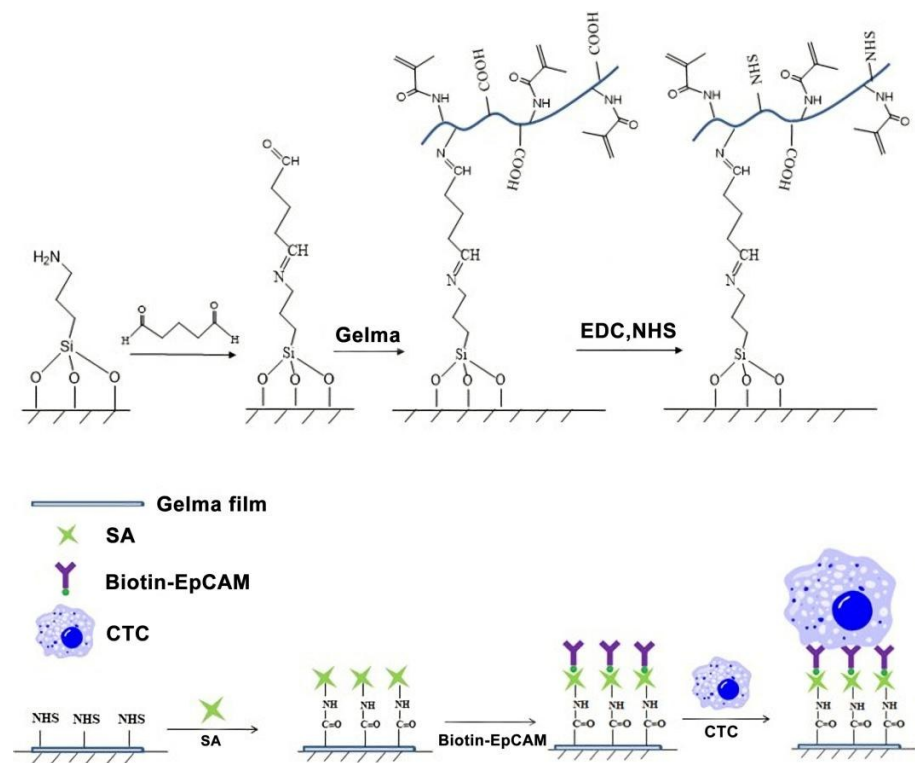


图1 明胶膜基底捕获 CTCs 示意图

Fig.1 Schematic of capturing circulating tumor cells by gelatin film substrate

1.3.3 明胶膜基底的捕获性能 分别取 500、1 000、5 000、10 000 个 MCF-7 细胞(取样步骤大概为:对于 500 个和 1 000 个细胞,将细胞原液稀释到 5 000 个/mL,随后分别取 100 和 200 μL 细胞液;对于 5 000 个和 10 000 个细胞,将细胞原液稀释到 10 万个/mL,分别取 50 和 100 μL 细胞液)加入到修饰好捕获抗体的明胶基底上,再用细胞培养基(DMEM)补足 0.5 mL,放入 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育 60 min 后取出,将上清收集到 1.5 mL 离心管中,在显微镜下取样计算上清中未被捕获到的细胞数,进而得知明胶基底上捕获到的细胞数,细胞的捕获效率定义为:捕获效率=基底上捕获到的细胞数/加入的细胞总数。

1.3.4 三色荧光鉴定 从健康人血中提取白细胞,取适量白细胞和 MCF-7 加入 1 mL PBS 中,吹匀后加入修饰好 EpCAM 抗体的捕获基底共孵育,将捕获后的基底进行三荧光染色,在荧光显微镜下观察捕获情况。

1.3.5 捕获细胞的活性 传代下来的 MCF-7 与修饰好 EpCAM 的捕获基底共同孵育 60 min,然后利用 FDA/PI 双染色法染色;用 PBS 洗涤后在荧光显微镜下观察。培养的 MCF-7 也用 FDA/PI 染色作为对照组。被激发出绿色荧光的是活细胞,被激发出红色荧光的是死细胞。细胞活性定义为活细胞数与总细胞数之比。

1.3.6 细胞原位培养 将基底捕获到的 MCF-7 用 PBS 冲洗 2 遍,加入 1 mL DMEM 完全培养基,放入 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养,分别培养 1、24 和 48 h 后,在

显微镜下观察细胞生长情况,并利用 FDA/PI 双染色法观察细胞活性。

2 结果

2.1 明胶膜基底的表征

图 2 是明胶膜基底的场发射扫描电镜图,对比空白基底,明显可以看出样品基底上修饰上了一层膜,即明胶膜。

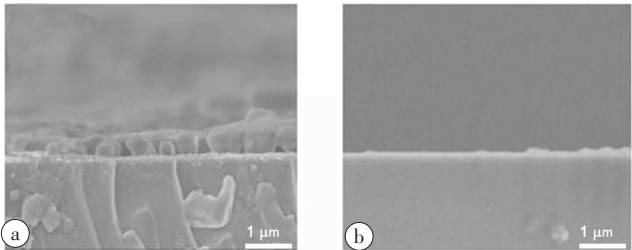


图2 明胶膜基底(a)及空白对照(b)场发射扫描电镜图

Fig.2 Field emission scanning electron microscopy images of gelatin film substrate (a) and blank control (b)

2.2 最佳捕获时间的确定

基底对靶细胞的孵育时间会影响基底对靶细胞的捕获效率。为了确定明胶膜基底的最佳捕获时间,本研究采用 EpCAM 高表达的 MCF-7。捕获效率随时间的变化结果见图 3,随着捕获时间的延长,捕获效率在不断增加,当捕获时间达到 60 min 左右时,

捕获效率达到稳定水平。故本研究选择 60 min 作为细胞孵育的最佳捕获时间。

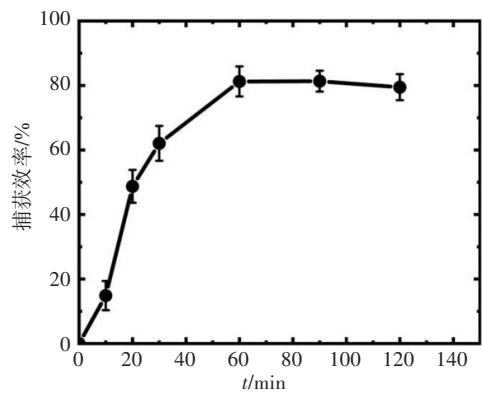


图3 细胞捕获效率
Fig.3 Cell capture efficiency

2.3 不同细胞数量的捕获效率

图4为明胶膜基底对不同数量MCF-7的捕获效率图。明胶膜基底对MCF-7的平均捕获效率为81.06%，表明修饰有EpCAM的明胶膜基底可以高效捕获癌细胞。

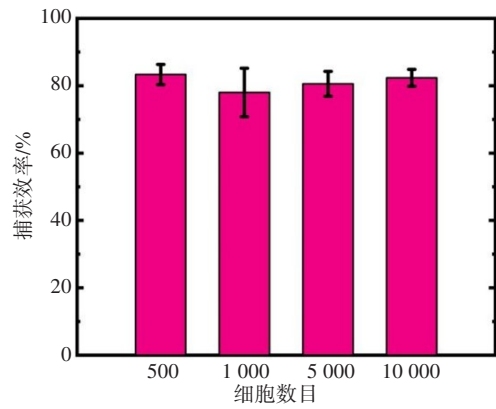


图4 细胞捕获效率和细胞数目关系
Fig.4 Relationship between cell capture efficiency and cell number

2.4 三色荧光鉴定

本研究主要考虑白细胞对CTCs捕获的干扰,采用三色荧光免疫化学法鉴定CTCs和白细胞。图5显示该捕获基底可以在大量白细胞存在时捕获到CTCs。

2.5 捕获细胞的活性

捕获到的肿瘤细胞具有高细胞活性对CTCs的下游分析具有重要的意义。图6分别为活死细胞染

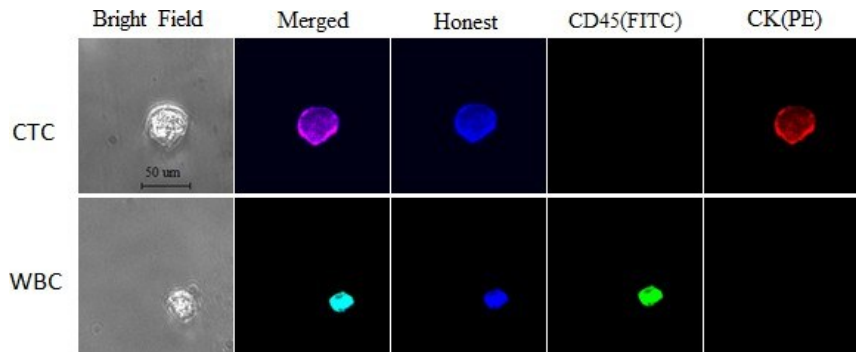


图5 三色荧光化学免疫法鉴定细胞(标尺为 50 μm)
Fig.5 Three-color fluorescence chemical immunoassay for identification of cells (scale bar=50 μm)

色鉴定捕获细胞的活性,从图中可以看出,明胶膜基底捕获后的细胞活性(实验组)和原始细胞活性(对照组)几乎没有差异,捕获细胞和原始细胞中活细胞百分比分别为84.29%和86.80%,表明明胶膜捕获基底具有良好的生物相容性,对后续的细胞研究和培养具有重要意义。

2.6 细胞原位培养

图7为基底捕获细胞后分别进行1、24和48 h的再培养,对细胞进行活死细胞染色后在荧光显微镜下观察CTCs的生长状态。可以看出明胶膜基底捕获到细胞后,细胞仍具有较强的活性,且随着时间的增长,细胞贴壁开始分裂生长,生长状态良好。

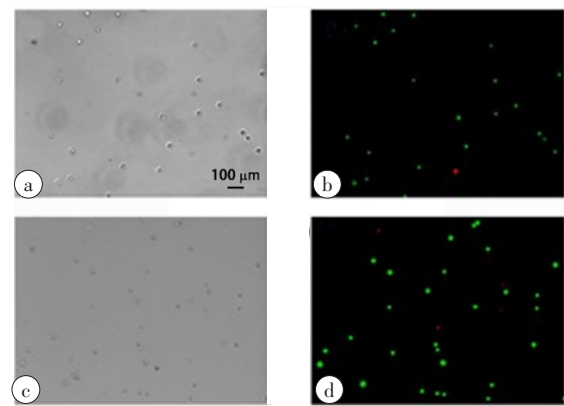


图6 捕获细胞活性图
Fig.6 Cytoactive of the captured cells
图6a-d为FDA/PI双染色法鉴定细胞活性。其中,图6a、b为实验组,图6c、d为对照组,图中标尺为100 μm

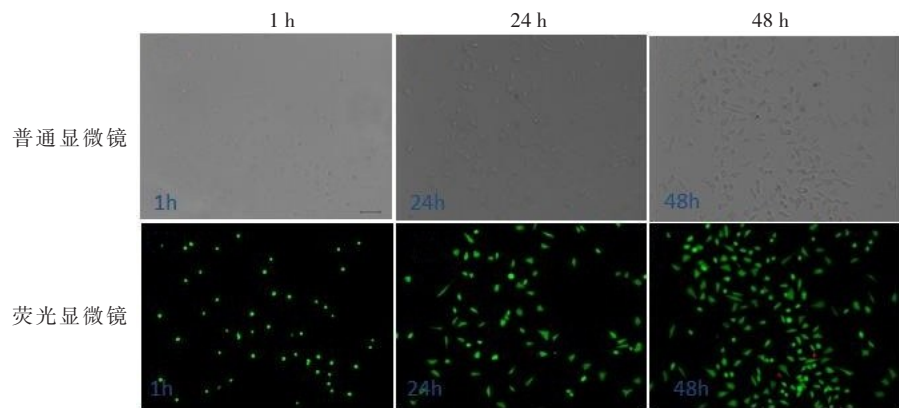


图7 细胞原位培养(标尺为 100 μm)
Fig.7 Cell culture *in situ* (scale bar=100 μm)

3 结 论

本研究构建了一个简单可行的基底捕获装置, 基于明胶膜基底接枝上捕获抗体 EpCAM, 从而实现对 CTCs 的捕获。由于明胶具有良好的生物相容性且是细胞培养的良好材料, 捕获后的细胞具有良好的活性, 可直接在原位进行再培养, 减少了释放过程对细胞的损害。基于上述优点, 明胶膜基底捕获装置在临床 CTCs 检测中具有巨大的潜在应用价值。

【参考文献】

[1] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility[J]. Int J Clin Oncol, 2017, 22(3): 421-430.

[2] YU M, STOTT S, TONER M, et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization[J]. J Mol Cell Biol, 2011, 192(3): 373-382.

[3] MARX V. Tracking metastasis and tricking cancer[J]. Nature, 2013, 494: 133-138.

[4] DAWSON S J, TSUI D W, MURTAZA M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2013, 368(13): 1199-1209.

[5] KRIVACIC R T, LADANYI A, CURRY D N, et al. A rare-cell detector for cancer[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2004, 101(29): 10501-10504.

[6] AZEVEDO R, SOARES J, PEIXOTO A. Circulating tumor cells in bladder cancer: emerging technologies and clinical implications foreseeing precision oncology[J]. Urol Oncol, 2018, 36(5): 221-236.

[7] HONG S, WANG A Z. Nanotechnology enabling the use of circulating tumor cells (CTCs) as reliable cancer biomarkers[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2018, 125: 1-2.

[8] BIDARD F C, WEIGELT B, REIS-FILHO J S. Going with the flow: from circulating tumor cells to DNA[J]. Sci Transl Med, 2013, 5: 207ps14.

[9] MARTA T G, LIDIA R C, ANTOINE C, et al. Circulating tumor cells: a review of non-EpCAM-based approaches for cell enrichment and isolation[J]. Clin Chem, 2016, 62(4): 571-581.

[10] HUANG Q Q, WANG F B, YUAN C H, et al. Gelatin nanoparticle-coated silicon beads for density-selective capture and release of heterogeneous circulating tumor cells with high purity [J]. Theranostics, 2018, 8(6): 1624-1635.

[11] PANCHAPAKESAN B, CAPRARA R, VELASCO V, et al. Micro- and nanotechnology approaches for capturing circulating tumor cells[J]. Cancer Nanotechnol, 2010, 1(1-6): 3-11.

[12] ZHANG N, DENG Y, TAI Q, et al. Electrospun TiO₂ nanofiber-based cell capture assay for detecting circulating tumor cells from colorectal and gastric cancer patients[J]. Adv Mater, 2012, 24(20): 2756-2760.

[13] PARK M H, REATEGUI E, LI W, et al. Enhanced isolation and release of circulating tumor cells using nanoparticle binding and ligand exchange in a microfluidic chip[J]. J Am Chem Soc, 2017, 139(7): 2741-2749.

[14] RIZVI I, GURKAN U A, TASOGLU S, et al. Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2013, 110: E1974-E1983.

[15] WAN Y, LIU Y, ALLEN P B, et al. Capture, isolation and release of cancer cells with aptamer-functionalized glass bead array[J]. Lab Chip, 2012, 12(22): 4693-4701.

[16] ZHU J, NGUYEN T, PEI R, et al. Specific capture and temperature-mediated release of cells in an aptamer-based microfluidic device[J]. Lab Chip, 2012, 12 (18): 3504-3513.

[17] MCFAUL S M, LIN B K, MA H. Cell separation based on size and deformability using microfluidic funnel ratchets[J].Lab Chip, 2012, 12(13): 2369-2376.

[18] CHAO J, MCFAUL S M, DUFFY S P, et al. Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments[J]. Lab Chip, 2014, 14(1): 32-44.

[19] LI M, ANAND R K, AM J. High-throughput selective capture of single circulating tumor cells by dielectrophoresis at a wireless electrode array [J]. Chem Sci, 2017, 139(26): 8950-8959.

[20] CUI H, WANG B, WANG W, et al. Frosted slides decorated with silica nanowires for detecting circulating tumor cells from prostate cancer patients[J]. ACS Appl Mater Inter, 2018, 10(23): 19545-19553.

[21] HUANG Q, CHEN B, HE R, et al. Capture and release of cancer cells based on sacrificeable transparent MnO₂ nanosphere thin film[J]. Adv Healthc Mater, 2014, 3(9): 1402-1405.

[22] LI R, CHEN F F, LIU H Q, et al. Efficient capture and high activity release of circulating tumor cells by using TiO₂ nanorod arrays coated with soluble MnO₂ nanoparticles[J]. ACS Appl Mater Inter, 2018, 10: 16327-16334.

[23] SONG Y, TIAN T, SHI Y, et al. Enrichment and single-cell analysis of circulating tumor cells[J]. Chem Sci, 2017, 8(3): 1736-1751.

[24] SUN N, WANG J, JI L, et al. A cellular compatible chitosan nanoparticle surface for isolation and *in situ* culture of rare number CTCs[J]. Small, 2015, 11, 40: 5444-5451.

[25] HUANG Q, CAI B, CHEN B, et al. Efficient purification and release of circulating tumor cells by synergistic effect of biomarker and SiO₂@gel-microbead-based size difference amplification[J]. Adv Healthc Mater, 2016, 5(13): 1554-1559.

[26] LI Y, LIN C S, WANG L, et al. Maintenance of human embryonic stem cell on gelation[J]. Chin Sci Bull, 2009, 54(18): 2813-2818.

(编辑:谭斯允)