



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103908306 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201410153597. 3

(22) 申请日 2014. 04. 17

(71) 申请人 山东师范大学

地址 250014 山东省济南市历下区文化东路  
88 号

(72) 发明人 张鸿雁 贾真珍 武传琛 唐波

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限  
公司 37221

代理人 彭成

(51) Int. Cl.

A61B 10/02(2006. 01)

A61M 5/158(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置及  
方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,包括留置针,留置针外表面包覆有可吸附蛋白的材料,可吸附蛋白的材料上吸附有用于特异性识别与捕获循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体。本发明还公开了利用该捕获装置捕获循环肿瘤细胞的方法:采用本发明的留置针给癌症患者输液,在输液过程中,癌症患者血管中的循环肿瘤细胞即被留置针上修饰的特异性抗体捕获;输液过程完成后,将留置针拔出,从而将捕获的循环肿瘤细胞清除出体外,用洗脱液洗脱,洗脱下来的细胞可以置于显微镜下观察计数,或针对细胞内待测目标分子做免疫染色,共聚焦显微镜观测。本发明的循环肿瘤细胞在体捕获方法,操作简单,可以实现对目标细胞高效率和高选择性的捕获。

1. 一种基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,其特征在于:包括留置针,留置针外表面包覆有可吸附蛋白的材料,可吸附蛋白的材料上吸附有用于特异性识别与捕获循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体。

2. 根据权利要求1所述的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,其特征在于:所述可吸附蛋白的材料是指可通过共价偶联、氢键作用、疏水作用或者分子间作用力吸附蛋白质的材料。

3. 根据权利要求1所述的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,其特征在于:所述可吸附蛋白的材料选自聚二甲基硅氧烷。

4. 根据权利要求1所述的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,其特征在于:所述上皮细胞特异性抗体选自多克隆抗体、单克隆抗体、重组抗体或核酸适配体。

5. 根据权利要求1所述的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,其特征在于:所述上皮细胞特异性抗体根据需要捕获的目标肿瘤细胞而选择。

6. 根据权利要求1所述的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,其特征在于:需要捕获乳腺癌细胞时,所述上皮细胞特异性抗体选自抗上皮细胞粘附分子抗体。

7. 权利要求1~6中任一项所述的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置的制备方法,其特征在于:步骤如下:

(1)PDMS 包覆:PDMS 前体液及其固化剂按体积比 5:1 比例混合均匀,得混合液,然后将留置针浸没于该混合液中,顺时针旋转留置针 1 周以上使包覆均匀,然后取出,置于 65℃干燥箱中固化 3 小时,得包覆有 PDMS 的留置针;

(2) 抗体的吸附:将包覆有 PDMS 的留置针浸没于浓度为  $1 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的上皮细胞特异性抗体溶液中,振摇 2 小时,取出后用 PBS 缓冲液清洗 3 次,即得。

8. 利用权利要求1~6中任一项所述的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置捕获循环肿瘤细胞的方法,其特征在于:利用基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置给携带有目标循环肿瘤细胞的癌症患者输液,在输液过程中,癌症患者血管中的循环肿瘤细胞即被留置针上修饰的特异性抗体捕获;输液过程完成后,将留置针拔出,从而将捕获的循环肿瘤细胞清除出体外,用洗脱液洗脱,将循环肿瘤细胞洗下。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述洗脱液选自磷酸盐缓冲溶液(pH7.4,  $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、甘氨酸缓冲溶液(pH2.7,  $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )或氢氧化钠溶液(pH13.6,  $0.4 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

## 基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置及方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置及方法。

### 背景技术

[0002] 几十年前人们就已经认识到癌症的转移很大程度上是由于原位癌将癌细胞播散到血液里,由血液携带至其他器官,从而形成新的肿瘤。目前,对于循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)的捕获与检测已经被用作一种新的液体诊断方法,用于追踪癌症的扩散或者预测治疗的预后效果。迄今为止,几乎所有关于 CTCs 捕获与检测的方法都是基于从血液中取若干毫升样品,进而捕获检测此样品中的 CTCs。分析化学中取样的基本规律是样品要具有代表性,而 CTCs 的播散是无规律的,间或会有一团细胞播散到血液中,因此血液中 CTCs 的分布是不均匀的。这势必会导致随机从血液中取到的样品是不具有代表性的,从而会造成此类基于取样的检测方法极有可能出现假阴性。即便所建立的检测方法能检测到 1 毫升血液里的 1 个细胞,相对于全身血液中 CTCs 的不均匀分布来说,这也不是一个准确的结果。因此,有必要研发一种更加准确有效的捕获与检测方法。

### 发明内容

[0003] 针对上述关于 CTCs 捕获与检测方法的研究现状,本发明提供了一种基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置及方法。可用于对 CTCs 实现更加准确有效的检测。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0005] 一种基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置,包括留置针,留置针外表面包覆有可吸附蛋白的材料,可吸附蛋白的材料上吸附有用于特异性识别与捕获循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体。

[0006] 所述留置针,是指可以用于输液、并能在体内留置 1h 以上的所有不同规格、类型的输液针。

[0007] 所述可吸附蛋白的材料,是指可以通过共价偶联、氢键作用、疏水作用或者分子间作用力等吸附蛋白质的材料,优选聚二甲基硅氧烷(Poly(dimethylsiloxane),PDMS)。可吸附蛋白的材料可以物理附着在留置针外表面。

[0008] 所述上皮细胞特异性抗体,包括针对循环肿瘤细胞表面特异性抗原的所有抗体种类,可以是多克隆抗体、单克隆抗体或重组抗体,以及核酸适配体。

[0009] 所述上皮细胞特异性抗体,根据需要捕获的目标肿瘤细胞而选择,比如:需要捕获乳腺癌细胞时,可选用抗上皮细胞粘附分子(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体。

[0010] 所述基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置的制备方法为:

[0011] (1) PDMS 包覆:PDMS 前体液及其固化剂(PDMS 前体液及其固化剂都是现有技术中已有的常规产品)按体积比 5:1 比例混合均匀,得混合液,然后将留置针浸没于该混合液中,顺时针旋转留置针 1 周以上使包覆均匀,然后取出,置于 65℃干燥箱中固化 3 小时,得包覆

有 PDMS 的留置针；

[0012] (2) 抗体的吸附：将包覆有 PDMS 的留置针浸没于浓度为  $1 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的（优选  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）上皮细胞特异性抗体溶液中，轻轻振摇 2 小时（目的是使上皮细胞特异性抗体充分吸附在 PDMS 上），取出后用 PBS 缓冲液清洗 3 次，置于  $4^{\circ}\text{C}$  环境下保存，待用。

[0013] 利用上述基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置捕获循环肿瘤细胞的方法：利用基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置给携带有目标循环肿瘤细胞的癌症患者输液时，在输液过程中，癌症患者血管中的循环肿瘤细胞即被留置针上修饰的特异性抗体捕获；输液过程完成后，将留置针拔出，即可将捕获的循环肿瘤细胞清除出体外，用洗脱液洗脱，即可将循环肿瘤细胞洗下，洗脱下来的细胞可以置于显微镜（光学显微镜或激光共聚焦显微镜）下观察计数，或针对细胞内待测目标分子做免疫染色，共聚焦显微镜观测。

[0014] 所述洗脱液，选自磷酸盐缓冲溶液（ $\text{pH}7.4, 0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）、甘氨酸缓冲溶液（ $\text{pH}2.7, 0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）或氢氧化钠溶液（ $\text{pH}13.6, 0.4\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）。

[0015] 本发明的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置及方法，留置针采用上皮细胞特异性抗体修饰，可以实现对目标细胞高选择性和高特异性的捕获。临床采用此种经过修饰的留置针输液时，即可同时实现对循环肿瘤细胞的捕获。输液完成后，留置针拔出时即可将捕获的循环肿瘤细胞清除出体外。在体外将留置针上的循环肿瘤细胞洗脱后，即可对肿瘤细胞进行各种目的的检测（早期诊断、治疗反应等）。本发明的基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获方法，无需抽血，对人体不会造成任何额外伤害，成本低廉且高效，操作简单，可用于癌症患者的早期诊断及治疗反应的预测。

## 具体实施方式

[0016] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0017] 实施例 1

[0018] 一种基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置，包括留置针，留置针外表面包覆有 PDMS，PDMS 上吸附有用于特异性识别与捕获循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体（目标循环肿瘤细胞为 MCF-7 细胞，所选用的上皮细胞特异性抗体为抗 EpCAM 抗体，购自北京博奥森生物技术有限公司）。

[0019] 所述留置针的规格型号，为  $24\text{G} \times 0.75''$ ， $0.7\text{mm} \times 19\text{mm}$ 。

[0020] 所述基于留置针的循环肿瘤细胞在体捕获装置的制备方法为：

[0021] (1) PDMS 包覆：PDMS 前体液及其固化剂按体积比 5:1 比例混合均匀，得混合液，然后将留置针浸没于该混合液中，顺时针旋转留置针使包覆均匀，然后取出，置于  $65^{\circ}\text{C}$  干燥箱中固化 3 小时，得包覆有 PDMS 的留置针；

[0022] (2) 抗体的吸附：将包覆有 PDMS 的留置针浸没于  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的上皮细胞特异性抗体溶液中，轻轻振摇 2 小时，取出后用 PBS 缓冲液清洗 3 次，置于  $4^{\circ}\text{C}$  环境下保存，待用。

[0023] 试验例：选取兔子和小鼠两种动物作为循环肿瘤细胞在体捕获的实验动物，以可商业化购得的乳腺癌细胞株——MCF-7 为例，验证在体捕获方法的有效性。

[0024] 为了考察动物免疫系统对注入 MCF-7 细胞的清除作用，选取免疫缺陷的裸鼠用于在体捕获实验。将配制好的含有一定 MCF-7 细胞数（具体见表 1）的溶液，分别注入兔左耳耳缘静脉，小鼠、裸鼠尾部一条静脉中，将实施例 1 制备的经过修饰的留置针刺入兔右

耳耳缘静脉,小鼠、裸鼠尾部另一条静脉中,3 小时后将留置针取出,用 pH 为 2.7、浓度为  $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Gly-HCl 溶液将捕获的 MCF-7 细胞从留置针上洗脱至酶标板的孔中,置于显微镜下观测,计数细胞数。

[0025] 表 1 统计了添加不同细胞数时实际捕获的细胞数及捕获效率。由表 1 可见,注入兔子、小鼠及裸鼠的不同数目的 MCF-7 细胞均可被成功捕获,由于留置针表面面积及对细胞的吸附容量限制,捕获效率随添加细胞数增加而降低,由于病人血液中的循环肿瘤细胞数目非常少,因此,此方法用于临床检测时,这种捕获效率的降低不会产生实质性的影响。由于裸鼠有免疫缺陷,注入裸鼠静脉的 MCF-7 不会被免疫系统破坏,因此留置针用于裸鼠的捕获效率远高于野生小鼠,这也进一步验证了本方法的可行性。由于留置针表面修饰有抗体,起到了对 PDMS 吸附位点的封闭作用,可大大降低非特异性吸附,实验发现,经修饰的留置针不会比未经 PDMS 包被及抗体吸附的留置针吸附出更多的红细胞与白细胞。

[0026] 表 1

	添加的 细胞数	捕获的细胞 数平均值 (n=3)	捕获效率 (%)
[0027] 兔子	50	6	$11.0 \pm 4.2$
	500	24	$4.9 \pm 1.4$
	1000	34	$3.4 \pm 1.8$
	5000	95	$1.9 \pm 0.6$
[0027] 小鼠	50	8	$15.0 \pm 7.1$
	500	26	$5.3 \pm 0.6$
	1000	31	$3.1 \pm 1.0$
	5000	47	$0.9 \pm 0.1$
[0027] 裸鼠	5	2	$33.0 \pm 23.1$
	25	8	$32.0 \pm 10.8$
	50	14	$28.0 \pm 6.9$
	200	34	$16.8 \pm 4.6$
	500	46	$9.3 \pm 0.3$