

文章编号: 1673-3851 (2015) 05-0699-07

## 基于 OptiPrep 的循环肿瘤细胞富集体系研究

郑罗凝<sup>1</sup>, 徐增辉<sup>2</sup>, 王真<sup>2</sup>, 钱其军<sup>1,2</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

**摘要:** 建立一种简易高效的外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)富集方法。配比不同浓度的 OptiPrep 溶液梯度离心分离外周血各细胞成分,比较 OptiPrep 液与现行 Ficoll 液富集肿瘤细胞的效率、回收率、活性率。以此系统富集肿瘤患者血样中的 CTC,结合免疫磁珠筛选、染色体原位荧光杂交和表面抗原免疫荧光技术精确定义 CTC 细胞。结果显示 OptiPrep 液以 1.079 g/mL 的密度浓度在 1 900 r/min 离心 20 min 为最优分离条件。32 例临床肿瘤患者血样的 CTC 检测实验中,均发现有循环肿瘤细胞的存在。结果表明基于 OptiPrep 液结合免疫磁珠筛选能有效富集外周血循环肿瘤细胞,为实验室常规开展 CTC 的计数、培养等研究奠定基础。

**关键词:** OptiPrep 分离介质; 密度梯度离心法; 循环肿瘤细胞; 免疫磁珠

**中图分类号:** R73-37 **文献标志码:** A

### 0 引言

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)从原发肿瘤病灶脱落下来,通过血液循环系统传播到远端器官,在新的环境中生长并形成转移病灶。目前认为,肿瘤复发的关键在于 CTC 潜在的侵袭能力<sup>[1]</sup>。有报道显示 CTC 检测及其预后相关性对于评估临床治疗效果十分有意义。除了转移性癌症患者的预后价值以外,CTC 对于早期癌症的预测价值也很有吸引力<sup>[2]</sup>。因而 CTC 成为研究癌症治疗和转移潜在机制的重要生物标志物。然而,外周血中能检测到的 CTC 个数极少,每 7.5 mL 血液中可能仅含几个<sup>[3]</sup>,从而对血液中富集 CTC 这一技术提出了挑战。

当前的富集方法主要是基于细胞的物理特性(大小和密度),包括密度梯度离心分离,微孔过滤, ISET(上皮肿瘤细胞大小分选)等<sup>[4-5]</sup>。已经获得美国 FDA 批准的 CellSearch 用作晚期乳腺癌、结肠直肠癌以及前列腺癌的预后<sup>[6]</sup>。它是基于细胞表面特异生物标记物,从而分离血液中的 CTC,以此为技

术的方法必须预先了解待测癌细胞的特异抗原,因而不能通用于所有癌症,容易漏检或错检。另外,此技术试验成本高(约 5000 元/例),设备费用更是高昂,一般实验室难以承受。为了克服这种局限性,考虑去除血液中的红细胞、血浆和大量白细胞,留存 CTC 以达到富集的目的。

密度梯度离心是根据细胞密度分选多种细胞,可有效去除红细胞和血浆等。分离的关键因素是高质量的分离介质。目前应用于细胞分离的介质主要有 Ficoll、Percoll、Nycodenz 和 Onco-Quick<sup>[7]</sup>,Percoll 的价格虽然较低,但是很难聚集细胞形成清晰的条带, Nycodenz 为固体,配制复杂且不易控制浓度。本研究为采用 OptiPrep 法分离外周血 CTC。OptiPrep 是一种 60% 的 Iodixanol 水溶液, Iodixanol 则是非离子等渗分子<sup>[8]</sup>。相比而言,OptiPrep 液体配制简便,对细胞的损伤较小,富集条带明显,细胞纯度高。已有研究发现 OptiPrep 主要应用于鼠原代肝星状细胞的分离纯化,且使用 OptiPrep 纯化胰岛细胞可能有助于增加胰岛移植的成功<sup>[9]</sup>。本文旨在探讨 OptiPrep 液富集 CTC 的可行性,建立一种合理、便

收稿日期: 2014-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(81071850,81301307)

作者简介: 郑罗凝(1986-),女,浙江台州人,硕士研究生,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

通信作者: 钱其军, E-mail: qianqj@163.com

捷的分离方法,为实验室进行常规的 CTC 检测和分析奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 血样:取长海医院血库健康人外周血 10 mL 全血 30 份用于试验;实体肿瘤患者血样由东方肝胆外科医院生物治疗科提供,入组患者多为中晚期肿瘤,采血前多接受过手术、放疗、化疗等相关治疗,均已获得患者知情同意。

1.1.2 人肿瘤细胞株:肝癌细胞 QGY-7701、SMMC-7721、Huh-7,卵巢癌细胞 HO-8910,肺癌细胞 A549 均来自东方肝胆外科医院基因与病毒治疗实验室。

1.1.3 试剂与仪器:Hepes(上海博光生物科技有限公司),OptiPrep(Sigma 公司),Ficoll(GE Healthcare 公司),Viacount(密理博中国有限公司),CD45-FITC(美国 BD 公司),CFSE(eBioscience 公司)。低速台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂),Guava 流式细胞仪(密理博中国有限公司),光学显微镜(上海梯可光电科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 OptiPrep 离心分离外周血

最佳离心条件的确定:离心机使用时选择慢制动状态,避免短时加速使各密度梯度细胞发生混杂。将外周血与生理盐水 1:1 混合稀释,沿壁缓慢加至 1.079 g/mL 细胞分离液液面上。分别以不同离心转速分离,记录不同时间红细胞沉淀体积。

各层细胞 CD45 标记流式检测:密度梯度离心后分别吸取上清液、白膜层和分离液,各取 200 uL 细胞悬液,加 CD45-FITC 荧光单抗,轻轻混匀,4℃ 避光孵育 15~30 min,重悬细胞后上机检测 CD45<sup>+</sup> 阳性细胞比例。

#### 1.2.2 筛选 OptiPrep 分离液最佳密度浓度

3 种密度浓度的 OptiPrep 分离液配制:室温条件下,将 60% OptiPrep 原液稀释至 40% 工作液,与缓冲液按比例混合,充分混匀后得到 3 种密度浓度的分离液:1.074、1.079、1.085 g/mL。4℃ 避光保存。

Viacount 试剂盒检测 3 种密度浓度的 OptiPrep 液分离外周血单核细胞的细胞数和细胞活力。

#### 1.2.3 OptiPrep 离心分离肿瘤细胞

CFSE 荧光标记肿瘤细胞:用 PBS 等合适的缓冲液调整细胞浓度少于  $10^7$  个/mL;加入 1 uL 浓度为 5 uM 的 CFSE 工作液,轻轻吹打混匀;37℃ 避光孵育 15 min;加入 4~5 倍体积的完全培养基,冰上

孵育 5 min;离心后去上清,加入 1 mL PBS 溶液,再离心后去上清,重复清洗 3 遍。流式检测肿瘤细胞 CFSE 荧光表达。

外周血肿瘤细胞的分离:将带有荧光标记的肿瘤细胞株 QGY-7701 加入外周血混匀,以此模拟 CTC,密度梯度离心后分别吸取白膜层和分离液,各取 200 uL 细胞悬液上机检测 CFSE 阳性细胞比例。

#### 1.2.4 比较 OptiPrep 液与 Ficoll 液的富集效率

将带有荧光标记的肿瘤细胞 QGY-7701、SMMC-7721、Huh-7、HO-8910、A549 等量加入外周血混匀 ( $1 \times 10^5$  个/mL),分别在两种分离液中密度梯度离心后吸取白膜层,流式检测富集细胞中 CFSE 阳性细胞的比例并进行比较。

#### 1.2.5 比较 OptiPrep 液与 Ficoll 液的回收效率

由于实际患者血液中 CTC 数量极少,为检验建立的方法是否能够富集到极少量的肿瘤细胞,逐个挑取了 50 个左右的单细胞加入 5 mL 外周血中,密度梯度离心分离进行回收率实验。单个肿瘤细胞的挑选采用 CellEctor Plus 细胞分选系统。

极少量肿瘤细胞的富集回收效率:将带有荧光标记的肿瘤细胞 QGY-7701 适量加入 5 mL 外周血混匀(以 50 个为宜),分别在两种分离液中密度梯度离心后吸取白膜层,固定细胞后将细胞悬液涂于载玻片上,避光晾干后盖上盖玻片,荧光显微镜下观察带有荧光的细胞即为回收得到的肿瘤细胞,计数并记录结果。

#### 1.2.6 肿瘤患者循环肿瘤细胞的检测试验

患者 7.5 mL 外周血进行 OptiPrep 介质分离富集后,结合免疫磁珠纯化,将获得的细胞固定后,进行原位荧光杂交和免疫细胞化学染色以鉴别循环肿瘤细胞。

### 1.3 统计学分析

测定数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。分离外周血细胞数和细胞活性率及回收率采用单因素方差分析,用方差的单变量分析不同肿瘤细胞株两种分离介质的富集效率。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 OptiPrep 离心分离外周血

#### 2.1.1 细胞分层效果的研究

OptiPrep 液离心后细胞分层效果明显,利用不同密度细胞沉降系数的不同能够有效地富集单核细胞形成云雾状的白膜层,清晰可见于分离液上层(图 1b)。

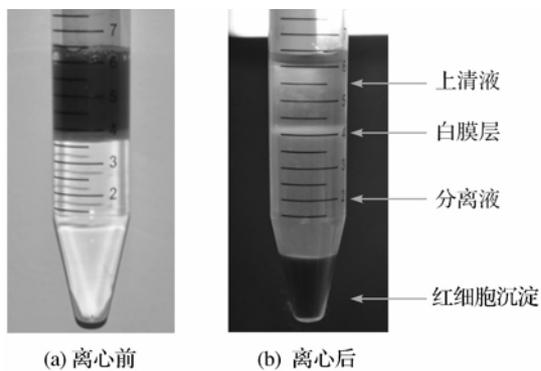


图 1 OptiPrep 液密度梯度离心细胞分层情况

OptiPrep 液离心条件的优选:外周血密度梯度分离后,在不同时间观察红细胞沉淀体积随着时间的增加而增长,分离液由浑浊逐渐变清,并且比较 20 min 和 30 min 没有显著差异。同时选取不同离心转速重复实验,由表 1 可见 1 600、1 800 r/min 离

心力较弱,液体分层不明显,红细胞沉降体积较少,而 1 900 r/min 和 2 100 r/min 的分离效果相似,为保护细胞活性因而选择 1 900 r/min 离心 20 min 为最优条件进行后续分离实验(表 1)。

表 1 OptiPrep 液不同离心转速不同离心时间红细胞沉降体积  $\mu\text{L}$

离心时间/min	离心转速/(r/min)			
	1 600	1 800	1 900	2 100
5	140	280	390	420
10	340	600	700	710
15	710	750	860	890
20	780	860	960	950
30	880	900	960	950

### 2.1.2 流式检测各层单核细胞

流式结果显示,白膜层中大部分细胞表达 CD45<sup>+</sup>,分离液中仅部分细胞表达 CD45<sup>+</sup>,而上清液中的细胞量很少且均为 CD45<sup>-</sup> 细胞(图 2)。

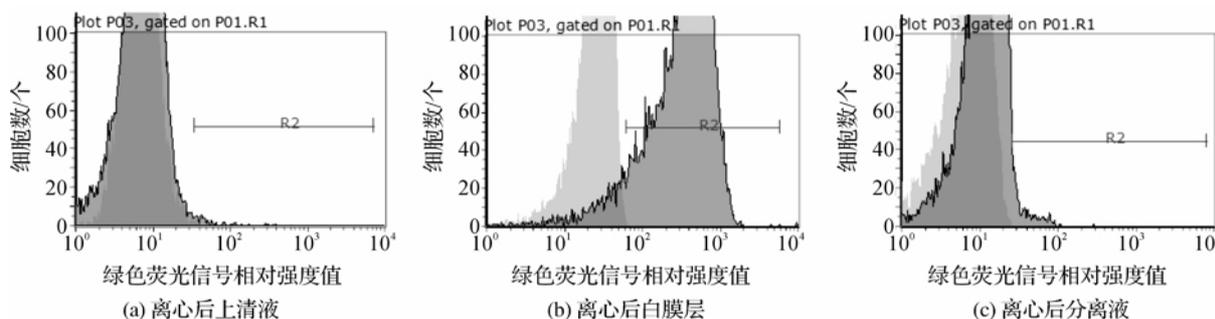


图 2 OptiPrep 液分离外周血单核细胞 CD45-FITC 表达

### 2.1.3 筛选 OptiPrep 最优密度浓度

从表 2 可知,外周血中单核细胞数在 OptiPrep 液密度浓度 1.085 g/mL 时最多,并随分离液密度浓度的减少而呈现下降趋势;同时,3 种密度浓度的 OptiPrep 液获得的细胞活性率均在 90% 以上,活力较高。比较分析 1.079 g/mL 的细胞数量和细胞活性率比 1.074 g/mL 的有显著差异( $P < 0.05$ ),对比 1.085 g/mL 无显著差异;细胞活性率 1.079 g/mL 的最高,并且所有报道中细胞分离液的密度为 1.077 g/mL,因而选取 1.079 g/mL 的 OptiPrep 液进行后续实验。

表 2 不同密度浓度的 OptiPrep 液分离外周血单核细胞总数及细胞活性率( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分离液密度浓度/(g · mL <sup>-1</sup> )	细胞数/ 10 <sup>6</sup> 个	细胞活性率/%
1.074	0.57 ± 0.08	94.85 ± 1.13
1.079	1.03 ± 0.07	98.00 ± 0.93
1.085	1.06 ± 0.06	97.80 ± 0.93

## 2.2 OptiPrep 离心分离肿瘤细胞

选取肝癌细胞株 QGY-7701,CFSE 标记肿瘤细胞后,流式检测荧光信号表达为 100%(图 3a)。

将带有荧光的肝癌细胞 QGY-7701 加入外周血中,模拟外周血分离循环肿瘤细胞,流式检测 CFSE 荧光发现,在白膜层中部分细胞表达 CFSE,分离液中细胞不表达 CFSE(图 3b、c)。

## 2.3 比较 OptiPrep 液与 Ficoll 液的富集效率

### 2.3.1 不同肿瘤细胞株的比较

将 CFSE 荧光标记的肿瘤细胞 QGY-7701、SMMC-7721、Huh-7、HO-8910、A549 流式检测(见图 4),完全阳性表达的细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 加入外周血混匀后分离获取细胞富集层。流式细胞术检测 QGY-7701-CFSE 阳性细胞百分比,在 OptiPrep 液与 Ficoll 液中分别为 4.67% 和 2.89%,OptiPrep 液富集肿瘤细胞的效率高于 Ficoll 液。其他几种肿瘤细胞 Huh7、SMMC-7721、HO-8910 和 A549 在 OptiPrep 液中 CFSE 的阳性

细胞百分比为 2.07%、3.34%、3.70%、3.50%，均高于 Ficoll 液中 CFSE 的阳性细胞百分比

1.38%、1.89%、2.52%、2.91%，两组间差异均有统计学意义。

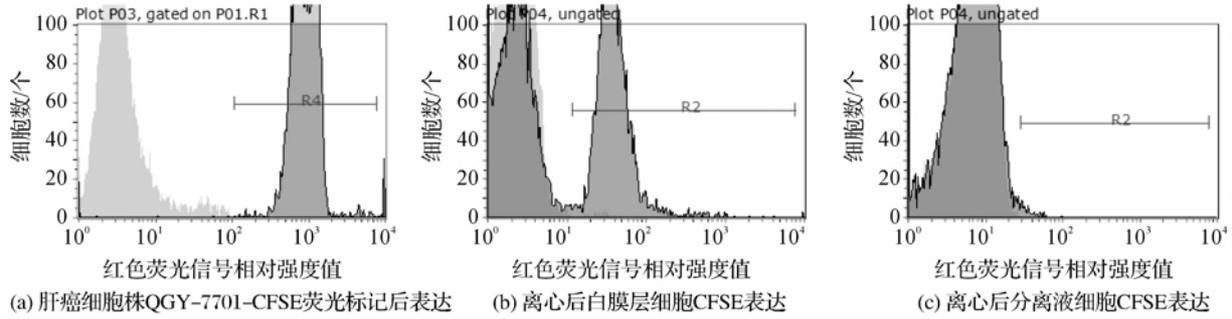


图3 OptiPrep 液分离外周血肿瘤细胞 QGY-7701-CFSE 表达

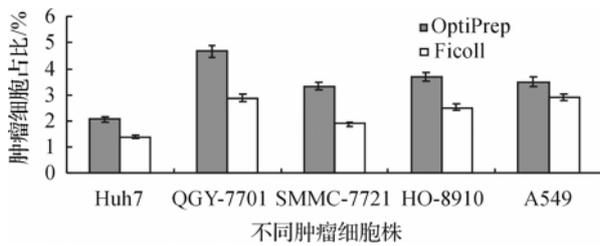


图4 OptiPrep 液与 Ficoll 分离外周血中不同肿瘤细胞的效率分析(n=4)

注:OptiPrep 细胞富集效率优于 Ficoll, P<0.05。

### 2.3.2 比较 OptiPrep 液与 Ficoll 液的回收效率

单个肿瘤细胞的挑选:由于 CTC 的稀有性,利用少量肿瘤细胞混入血液模拟外周血循环肿瘤细胞。

借助光学立体显微镜直接观察到目的细胞,通过操作毛细玻璃管吸取单个肿瘤细胞(图5)。

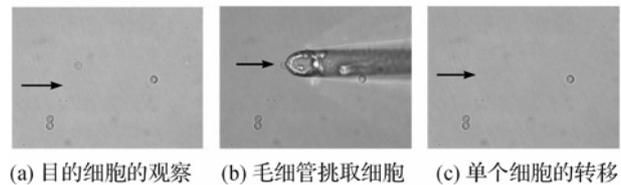


图5 单细胞分选过程

比较两种分离介质的肿瘤细胞回收率结果(表3):5次 OptiPrep 的回收率平均值为 84.6%,比 Ficoll 的 81.9%略高(P=0.086),表明 OptiPrep 分离红细胞、富集肿瘤细胞的效果与商品化的 Ficoll 试剂有较好的一致性。

表3 OptiPrep 液与 Ficoll 分离外周血肿瘤细胞回收率

组别	OptiPrep			Ficoll		
	入血肿瘤细胞数/个	回收肿瘤细胞数/个	回收率/%	入血肿瘤细胞数/个	回收肿瘤细胞数/个	回收率/%
1	55	45	81.8	58	48	82.8
2	46	39	84.8	42	35	83.3
3	40	34	85.0	72	56	77.8
4	45	38	84.4	50	42	84.0
5	61	53	86.9	49	40	81.6
平均			84.6			81.9

### 2.4 患者循环肿瘤细胞的检测

用 OptiPrep 法对 32 例肿瘤患者外周血循环肿瘤细胞进行富集,再用抗 CD45 免疫磁珠进一步去除大量的白细胞,最后通过免疫荧光染色和荧光原位杂交技术对 CTC 进行鉴定和计数。细胞表型为 DAPI<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>,并且染色体异常或 CK18<sup>+</sup>的即定义为循环肿瘤细胞。32 例患者均检测到有循环肿瘤细胞,CK18 表达阴性的有 25 例,其中 14 例肝癌相关的患者均无法检测到 CK18 表达(表4)。

肿瘤细胞具有异质性,不同肿瘤以及同一种肿瘤、甚至是同一患者的不同发展阶段,其肿瘤细胞表面抗原均会发生变化<sup>[10]</sup>。本研究联合了肿瘤细胞表面抗原的免疫荧光染色和染色体的原位荧光杂交技术检测 CTC,从表面标记和染色体异常双重角度鉴定 CTC,相比 CellSearch 系统单一的表面抗原免疫荧光鉴定方法更具优势。实际检验结果也表明,肝癌中 CK18 表达很少或不表达,因而本研究采用的双重鉴定法更能有效预防对 CTC 的漏检、错检(图6)。

表 4 肿瘤患者的 CTC 检测结果

编号	性别	年龄/岁	诊断	CTC 染色体/个			CTC 总数/个	CK18 表达
				三倍体	四倍体	多倍体		
1	男	49	原发性肝癌	0	0	1	1	—
2	男	49	原发性肝癌	0	0	7	7	—
3	男	46	左肺腺癌	2	1	1	4	—
4	男	49	胰腺癌伴淋巴结转移	1	0	1	2	—
5	女	47	胸腺瘤术后 III 级	1	1	0	2	—
6	女	64	左上肺癌术后伴多发转移	0	1	0	1	+
7	男	62	直肠癌术后	5	7	2	14	—
8	男	61	肝癌术后 III 期	2	1	1	4	—
9	男	45	结肠癌术后多发转移	3	3	0	6	—
10	女	58	乙状结肠癌术后复发伴转移	2	0	0	2	+
11	男	54	小细胞肺癌放化疗后	4	0	0	4	—
12	男	27	肝内胆管癌术后多发转移	5	2	0	7	—
13	男	44	原发性肝癌	0	0	6	6	—
14	男	51	右肝胆管细胞癌	1	1	0	2	—
15	男	47	原发性肝癌	5	0	1	6	—
16	男	49	右肺癌伴转移	2	0	2	4	+
17	女	55	结肠癌术后肝转移癌术后	2	0	0	2	—
18	女	73	食管癌伴肝转移	2	0	0	2	—
19	男	53	原发性肝癌	0	2	1	3	—
20	男	49	肝内胆管细胞癌	1	0	3	4	—
21	女	50	原发性肝癌	4	2	2	8	—
22	男	66	胰腺癌伴腹膜转移	2	2	0	4	+
23	女	56	肺腺癌 IV 期	1	0	1	2	—
24	男	58	原发性肝癌	3	0	1	4	—
25	男	44	十二指肠乳头癌术后伴转移	3	1	1	5	—
26	女	41	右上肺腺癌术后	2	1	0	3	+
27	女	49	胆囊癌术后	2	2	0	4	—
28	男	76	左上肺腺癌	1	1	1	3	+
29	女	42	卵巢癌术后	1	0	0	1	—
30	女	37	原发性肝癌	0	0	4	4	—
31	男	64	直肠癌,肝转移	1	0	0	1	+
32	男	59	原发性肝癌	3	0	0	3	—

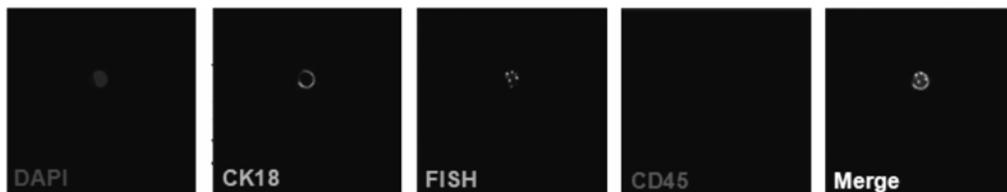


图 6 肺癌患者循环肿瘤细胞荧光表达情况

### 3 讨论

循环肿瘤细胞(CTC)可作为一种癌症血源性转移的生物标记物。现有充分证据显示 CTC 的检测与癌症的预后相关,在临床上通过监测 CTC 评估治疗效果,以减少疾病的复发和改善病人的管理,同时对于早期癌症的发现也有意义<sup>[11]</sup>。但是,CTC 在血

液中的含量浓度非常低,数百万的血液细胞中可能仅有一个肿瘤细胞,而目前的技术对检测 CTC 十分困难,因而富集稀有 CTC 细胞并最大程度地去除血液中其他成分细胞是研究 CTC 的关键。目前最为常用的 CTC 富集方法是经由 FDA 批准上市的 CellSearch 系统,它利用上皮细胞特异性抗原 EpCAM 阳性筛查 CTC,但事实上这一标志物的表

达并不稳定,多数恶性肿瘤会发生上皮-间质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT),甚至约30%的上皮源性肿瘤不表达 EpCAM,因而 CellSearch 方法限定 CTC 为 EpCAM 阳性细胞则可能漏检上皮间质化的肿瘤细胞。密度梯度离心结合免疫磁珠法能很好地避免这一缺陷,而其中分离介质的选择是密度梯度离心法的关键环节。

比较几种常用的血液分离介质:Percol 是一种包有乙烯吡咯烷酮的硅胶颗粒,价格较低,但很难聚集细胞形成清晰的条带;Nycodenz 为固体,溶解度小,配制复杂且不易控制浓度;Onco-Quick 增加了一层滤膜,可避免全血与分离液的混合,但其敏感度低,易造成肿瘤细胞的丢失。选择 OptiPrep 液作分离介质是由其为无菌液体,易于稀释为各种密度浓度,低渗透压和不穿过生物膜等分子特性决定的。实验结果显示,OptiPrep 液分离外周血能有效形成云雾状的单核细胞层,清晰可见于分离液上层。离心后各分层细胞的流式检测表明,白膜层细胞中 CD45 标记的白细胞和 CFSE 标记的 QGY-7701 肿瘤细胞阳性均较高,而分离液和上清中两种细胞的阳性率很低甚至为阴性,上清中的细胞量也不多,说明需要富集的单核细胞主要聚集于白膜层中。

多数文献报道中,外周血分离介质的密度浓度一般为 1.077 g/mL。本研究中涉及的 3 种密度浓度 OptiPrep 液中,3 种密度浓度的 OptiPrep 液获得的细胞活性率均在 90%以上,活力较高,有助于后期获取 CTC 并进行培养研究。比较分析 1.079 g/mL 的细胞数量和细胞活性率比 1.074 g/mL 的有显著差异( $P < 0.05$ ),对比 1.085 g/mL 无显著差异;细胞活性率 1.079 g/mL 的最高,并且所有报道中细胞分离液的密度为 1.077 g/mL,因而选取 1.079 g/mL 的 OptiPrep 液作为最佳密度浓度分离外周血 CTC。

由于 CTC 的稀有性,便于更好地收集 CTC,使后期的检测和鉴定实验相对简单,需要进一步检测富集细胞中 CTC 的纯度。通过 3 种肝癌细胞株和肺癌细胞株以及卵巢癌细胞株混入外周血模拟循环肿瘤细胞,比较 OptiPrep 液和 Ficoll 分离液的肿瘤细胞回收实验,研究发现几种肿瘤细胞在 OptiPrep 液中的富集效率均高于 Ficoll 液。另外,为了更真实的验证 OptiPrep 液富集 CTC 的效率并进行回收率的计算,本研究中用毛细管进行单细胞挑取 50 个左右的肿瘤细胞,混合入血后进行回收率的研究。结果表明 OptiPrep 分离红细胞、富集肿瘤细胞的效

果较好。

综上所述,本研究采用 OptiPrep 液作为分离外周血中循环肿瘤细胞的分离介质,其液体具有配制方便稳定,分层清晰易于获取细胞,渗透压低对细胞损伤较小,富集的 CTC 纯度高等优点,建立了一种简易高效的 CTC 富集体系。在此基础上,结合免疫磁珠筛选、染色体原位杂交和表面抗原免疫荧光技术,建立了高效精确的 CTC 鉴定体系,为进一步研究 CTC 甚至获取单个 CTC 进行分子鉴定奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Williams S C. Circulating tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(13): 4861.
- [2] Balic M, Williams A, Lin H, et al. Circulating tumor cells: from bench to bedside[J]. Annual Review of Medicine, 2013, 64: 31-44.
- [3] Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. Annual Review of Medicine, 2012, 63: 199-215.
- [4] Pinzani P, Salvadori B, Simi L, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection[J]. Human Pathology, 2006, 37(6): 711-718.
- [5] Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(1): 57-63.
- [6] Alemar J, Schuur E R. Progress in using circulating tumor cell information to improve metastatic breast cancer therapy[J]. Journal of Oncology, 2013, 2013: 1-8.
- [7] Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood[J]. Cytometry, 2002, 49(4): 150-158.
- [8] Mita A, Ricordi C, Messinger S, et al. Antiproliferative effects of iodixanol (optiprep)-based density gradient purification on human islet preparations [J]. Cell Transplantation, 2010, 19(12): 1537-1546.
- [9] Mita A, Ricordi C, Miki A, et al. Purification method using iodixanol (optiprep)-based density gradient significantly reduces cytokine chemokine production from human islet preparations, leading to prolonged beta-cell survival during pretransplantation culture [J]. Transplantation Proceedings, 2009, 41(1): 314-315.

- [10] Yu M, Bardia A, Wittner B S, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. *Science*, 2013, 339 (6119): 580-584.
- [11] Nole F, Munzone E, Zorzino L, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications[J]. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2008, 19(5): 891-897.

## Study on OptiPrep-based Enrichment System of Circulating Tumor Cell

ZHENG Luo-ning<sup>1</sup>, XU Zeng-hui<sup>2</sup>, WANG Zhen<sup>2</sup>, QIAN Qi-jun<sup>1,2</sup>

- (1. School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**Abstract:** This study aimed to establish a simple and efficient enriching method of CTC (circulating tumor cell, CTC) in the peripheral blood. OptiPrep solutions with different concentration was prepared to separate different types of cells in peripheral blood, and the efficiency of enrichment, recovery, and cell viability of OptiPrep solution and Ficoll solution were compared. This system was used to enrich CTC in blood samples of cancer patients. CTC cells were identified in combination of immunomagnetic beads, chromosome fluorescence in situ hybridization and surface antigen immunofluorescence technique. The results show that the optimal separation condition is as follows: OptiPrep density 1.079 g/mL; the centrifugation speed and time 1 900 r/min, 20 min. During CTC examination of blood samples of 32 enrolled cancer patients, it is found that there exist circulating tumor cells. This study demonstrates that OptiPrep-based enrichment system combined with immunomagnetic beads could effectively capture circulating tumor cells in peripheral blood, which lays a foundation for CTC count, culture and other researches in laboratory.

**Key words:** OptiPrep separation medium; density gradient centrifugation; circulating tumor cells; immunomagnetic beads

(责任编辑: 许惠儿)