



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109100504 A

(43)申请公布日 2018.12.28

(21)申请号 201810659309.X

(22)申请日 2018.06.25

(71)申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山  
武汉大学

(72)发明人 刘威 饶浪

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务  
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 彭劲松

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

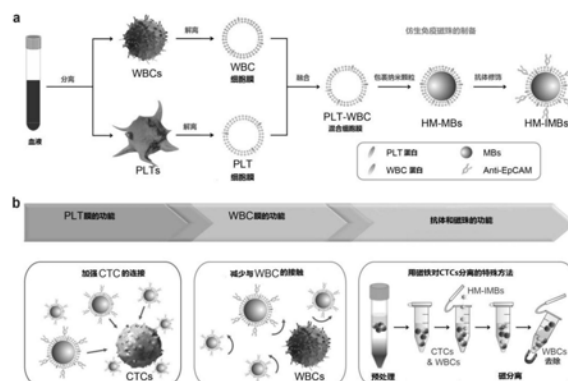
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

## (54)发明名称

一种血小板-白细胞混合膜包被免疫磁珠及其制备方法与应用

## (57)摘要

本发明公开了一种血小板-白细胞混合膜包被免疫磁珠及其制备方法与应用。通过使用血小板(PLT)-白细胞(WBC)的杂交膜包被磁珠,然后用循环肿瘤细胞(CTCs)特异性抗体修饰其表面,得到PLT-WBC混合膜包被的免疫磁珠(HM-IMBs)。HM-IMBs继承了来自PLT的增强的CTC结合能力以及来自WBC的减少同源WBC相互作用的能力,有效地提高了细胞分离的效率和纯度。通过使用HM-IMBs,成功鉴定了16例从结直肠癌,乳腺癌或胃癌患者采集的临床血液样本中的CTCs,同时,分离的CTCs的纯度大于85%。因此,这种液体活检工具将为癌症诊断和治疗开辟新的技术领域。



1. 一种用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠HM-IMBs, 其特征在于, 所述免疫磁珠为核-壳结构, 包含磁珠、血小板-白细胞杂交膜HMs、HMs包被的磁珠上偶联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所述的免疫磁珠HM-IMBs, 其特征在于, 所述磁珠, 是具有超顺磁性的磁性微球, 含有聚苯乙烯,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ , 脲醛树脂,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 中的一种或多种, 直径为50nm~10  $\mu\text{m}$ 。

3. 根据权利要求1所述的免疫磁珠HM-IMBs, 其特征在于, 所述偶联是指通过共价偶联、疏水作用或者分子间作用力连接在一起。

4. 根据权利要求1所述的免疫磁珠HM-IMBs, 其特征在于, 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多克隆抗体、单克隆抗体或重组抗体, 以及核酸适配体的任意一种, 优选为抗EpCAM抗体。

5. 一种如权利要求1-4任一项所述的用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠HM-IMBs的制备方法, 其特征在于, 包括下列步骤:

1) 制备血小板 (PLT) -白细胞 (WBC) 杂交膜HMs:

A. 制备PM-囊泡;

B. 制备WM-囊泡;

C. HMs囊泡的制备: 将得到的PM-囊泡和WM-囊泡按照1:1的质量比进行混合, 然后在37  $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌10分钟, 混合均匀; 再用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS重复三次洗涤后, 将沉淀的膜悬浮于PBS中, 使用浴超声波仪以53kHz的频率和100W的功率在封盖的玻璃小瓶中超声处理5分钟, 然后在迷你挤推机上通过400和200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出;

混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS的配制: 一片蛋白酶抑制剂片剂溶于10mL的PBS中;

2) 将HMs囊泡涂布到磁珠上获得HM-MBs:

将1mL含有50 $\mu\text{g}$ MBs的PBS与从1mL血中分离得到的HMs囊泡混合; 随后将混合物在迷你挤推机上通过200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出11次, 然后以1,000g离心以除去多余的HMs囊泡; 最后, 将得到的HM-MBs在4  $^{\circ}\text{C}$ 下置于PBS中过夜以供进一步使用;

3) 将循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体缀合到HM-MBs得到HM-IMBs。

6. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 步骤1)

A. PM-囊泡的制备: 将10mL人全血以100  $\times$  g离心20分钟, 无制动; 之后, 将上清液以800  $\times$  g离心20分钟, 获得沉淀为PLT, 用PBS洗涤PLT; 将血小板悬浮液在-80  $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻, 在室温下解冻, 在4000  $\times$  g下离心3分钟使其沉淀, 再用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS重复三次洗涤, 然后将沉淀的膜悬浮于PBS中, 使用浴超声波仪以53kHz的频率和100W的功率在封盖的玻璃小瓶中超声处理5分钟, 然后在迷你挤推机 (Avanti Polar Lipids, USA) 上通过400和200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出, 制得PM-囊泡;

B. WM-囊泡的制备: 将1mL人全血加入到1mL Hank's平衡盐溶液中, 然后将2mL混合物加入到2mL淋巴细胞分离介质中; 将混合物在1800rpm下离心30分钟, 无制动器; 之后, 收集中间的白色单核细胞层, 将上清液重悬于汉克平衡盐溶液中, 并以2000rpm离心10分钟, 收集沉淀; 将得到的WBC用PBS洗涤, 然后用常规显微镜监测; 为了获得WM-囊泡, 将WBC在1000rpm下离心5分钟, 并将沉淀重悬于2mL Hepes B缓冲液 (2.38g/L Hepes, 0.476g/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.292g/L EDTA, 0.154g/L DTT, 0.746g/L KCl, pH7.6) 与一片蛋白酶抑制剂片剂混合; 使用

杜恩斯匀浆器将细胞去核;合并所得上清液,并置于不连续蔗糖密度梯度中,所述蔗糖密度梯度由Hepes B缓冲液中55% (w/v),40% (w/v),30% (w/v) 蔗糖组成;超速离心后,从30%/40%界面收集富含质膜的条带,并用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS稀释1倍,将沉淀的膜悬浮在PBS中;然后进行超声处理和机械挤出处理,处理条件与上述PLT的制备方法一样,制得WM-囊泡。

7. 根据权利要求5或6所述的制备方法,其特征在于,当上皮细胞特异性抗体为抗EpCAM抗体时,步骤3) 为:

将50 $\mu$ g HM-MBs与100 $\mu$ g DSPE-PEG-COOH混合30分钟,并通过离心从HM-MBs中去除过量的DSPE-PEG-COOH;在室温下,将100 $\mu$ L制备的DSPE-PEG-COOH官能化的HM-MBs水溶液(1mg/mL) 与100 $\mu$ L的EDC(4mg/mL) /NHS(6mg/mL) 室温下活化30分钟;用PBS洗涤混合溶液3次后,将混合物用SA(50 $\mu$ g/mL) 在4 $^{\circ}$ C处理10h;之后,将溶液再次用PBS洗涤,然后在室温下用生物素化的循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体(比如10 $\mu$ L10 $\mu$ g/mL抗EpCAM抗体) 再处理2小时,以将这些抗体引导至HM-MBs的表面上,制得HM-IMBs。

8. 一种权利要求1-4任一项所述的用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠HM-IMBs在制备用于富集、分离或检测循环肿瘤细胞的产品中的应用。

9. 一种权利要求1-4任一项所述的用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠HM-IMBs在制备用于治疗肿瘤转移相关疾病的药物中的应用。

10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述肿瘤转移相关疾病为细胞上皮粘附因子高表达相关的肿瘤,优选为结肠直肠癌、乳腺癌和胃癌。

## 一种血小板-白细胞混合膜包被免疫磁珠及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,主要涉及一种血小板-白细胞混合膜包被免疫磁珠及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞 (CTC) 是由实体瘤进入循环系统的恶性细胞,在癌症早期检测,监测和预后方面已被证明是重要的。迄今为止,已经开发了各种平台来选择性地从循环中分离 CTC,包括免疫磁珠 (IMBs),抗体-共轭纳米结构以及基于其物理特性的一些方法。其中,使用磁珠 (MBs) 作为分离介质的 IMBs 方法和 MBs 上特异性结合 CTC 的抗体是最常用的方法。由于外周血中循环肿瘤细胞的数量极其稀少,故捕获效率及纯度一直是限制循环肿瘤细胞研究的重要因素,目前大多数方法无法同时达到高效率及高纯度的捕获与检测。CellSearch 系统是目前美国食品和药品管理局 (FDA) 唯一批准的检测循环肿瘤细胞的方法,虽然能实现捕获与检测,但该系统在加标血液样品中的细胞回收率只达到约 40%,并且每毫升样品仍含有 1000-3000 个白细胞 (WBC),导致纯度低于 0.5%,且价格昂贵。因此,急需制备即能够有效增强 IMBs 与 CTCs 结合,同时亦减少 IMBs 与 WBCs 相互作用的新的免疫磁珠。

### 发明内容

[0003] 针对上述现有技术,本发明提供了一种用于分离循环肿瘤细胞的免疫磁珠及其制备方法与应用。细胞间相互作用在许多生理和病理过程中起着至关重要的作用。最近的报道表明,血小板 (PLTs) 可以识别 CTCs 并与其通讯,同源 WBCs 不会在循环中形成簇。通过用血小板 (PLT)-白细胞 (WBC) 杂交膜 (HMs) 包被磁珠,然后用 CTC 特异性抗体修饰 PLT-WBC 杂交膜包被的免疫磁珠的表面,获得了高性能 CTC 分离免疫磁珠 (HM-IMBs)。所得到的 HM-IMBs 具有来自 PLT 的与 CTC 结合能力增强的特性,及来自 WBC 的与同源 WBC 相互作用减少的特征,有效地提高了细胞分离效率和纯度。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0005] 第一方面,提供一种用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠 HM-IMBs,所述免疫磁珠为核-壳结构,包含磁珠、血小板-白细胞杂交膜 HMs、HMs 包被的磁珠上偶联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] 所述磁珠是具有超顺磁性的磁性微球,含有聚苯乙烯,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ , 脲醛树脂,  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  中的一种或多种,直径为 50nm~10 $\mu\text{m}$ 。

[0007] 所述偶联是指通过共价偶联、疏水作用或者分子间作用力连接在一起。

[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 MCF-7 细胞时,选用抗 EpCAM 抗体。

[0010] 第二方面,提供一种用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠HM-IMBs的制备方法,包括下列步骤:

[0011] 1) 制备血小板(PLT)-白细胞(WBC)杂交膜HMs:

[0012] A. PM-囊泡的制备:

[0013] 将10mL人全血以 $100 \times g$ 离心20分钟,无制动;之后,将上清液以 $800 \times g$ 离心20分钟,获得沉淀为PLT,用PBS洗涤PLT;将血小板悬浮液在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下冷冻,在室温下解冻,在 $4000 \times g$ 下离心3分钟使其沉淀,再用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS重复三次洗涤,然后将沉淀的膜悬浮于PBS中,使用浴超声波仪以53kHz的频率和100W的功率在封盖的玻璃小瓶中超声处理5分钟,然后在迷你挤推机(Avanti Polar Lipids, USA)上通过400和200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出,制得PM-囊泡;

[0014] 混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS的配制:一片蛋白酶抑制剂片剂溶于10mL的PBS中;

[0015] B. WM-囊泡的制备:

[0016] 将1mL人全血加入到1mL Hank's平衡盐溶液中,然后将2mL混合物加入到2mL淋巴细胞分离介质中;将混合物在1800rpm下离心30分钟,无制动器;之后,收集中间的白色单核细胞层,将上清液重悬于汉克平衡盐溶液中,并以2000rpm离心10分钟,收集沉淀;将得到的WBC用PBS洗涤,然后用常规显微镜监测;为了获得WM-囊泡,将WBC在1000rpm下离心5分钟,并将沉淀重悬于2mL Hepes B缓冲液(2.38g/L Hepes, 0.476g/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.292g/L EDTA, 0.154g/L DTT, 0.746g/L KCl, pH7.6)与一片蛋白酶抑制剂片剂混合;使用杜恩斯匀浆器将细胞去核;合并所得上清液,并置于不连续蔗糖密度梯度中,所述蔗糖密度梯度由Hepes B缓冲液中55% (w/v), 40% (w/v), 30% (w/v) 蔗糖组成;超速离心后,从30%/40%界面收集富含质膜的条带,并用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS稀释1倍,将沉淀的膜悬浮在PBS中;然后进行超声处理和机械挤出处理,处理条件与上述PLT的制备方法一样,制得WM-囊泡;

[0017] C. HMs囊泡的制备:

[0018] 将得到的PM-囊泡和WM-囊泡按照1:1的质量比进行混合,然后在 $37^{\circ}\text{C}$ 下搅拌10分钟,混合均匀;再用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS重复三次洗涤后,将沉淀的膜悬浮于PBS中,使用浴超声波仪以53kHz的频率和100W的功率在封盖的玻璃小瓶中超声处理5分钟,然后在迷你挤推机上通过400和200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出;

[0019] 2) 将HMs囊泡涂布到磁珠上获得HM-MBs:

[0020] 将1mL含有 $50\mu\text{g}$  MBs的PBS与从1mL血中分离得到的HMs囊泡混合;随后将混合物在迷你挤推机上通过200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出11次,然后以1,000g离心以除去多余的HMs囊泡;最后,将得到的HM-MBs在 $4^{\circ}\text{C}$ 下置于PBS中过夜以供进一步使用;

[0021] 3) 将循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体缀合到HM-MBs得到HM-IMBs:

[0022] 将 $50\mu\text{g}$  HM-MBs与 $100\mu\text{g}$  DSPE-PEG-COOH混合30分钟,并通过离心从HM-MBs中去除过量的DSPE-PEG-COOH;在室温下,将 $100\mu\text{L}$ 制备的DSPE-PEG-COOH官能化的HM-MBs水溶液( $1\text{mg/mL}$ )与 $100\mu\text{L}$ 的EDC( $4\text{mg/mL}$ )/NHS( $6\text{mg/mL}$ )室温下活化30分钟;用PBS洗涤混合溶液3次后,将混合物用SA( $50\mu\text{g/mL}$ )在 $4^{\circ}\text{C}$ 处理10h;之后,将溶液再次用PBS洗涤,然后在室温下用生物素化的循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体(比如 $10\mu\text{L}$   $10\mu\text{g/mL}$ 抗EpCAM抗体)再处理2小时,以将这些抗体引导至HM-MBs的表面上,制得HM-IMBs。

[0023] 制备用于高效分离CTC的HM-IMBs的过程如图1所示。

[0024] 第三方面,本发明提供一种本发明所述的用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠HM-IMBs在制备用于富集、分离或检测循环肿瘤细胞的产品中的应用。

[0025] 优选地,所述产品为试剂盒或试剂。

[0026] 第四方面,本发明提供一种上述本发明所述的用于分离循环肿瘤细胞的血小板-白细胞混合膜包被的免疫磁珠HM-IMBs在制备用于治疗肿瘤转移相关疾病的药物中的应用。

[0027] 优选地,所述肿瘤转移相关疾病为细胞上皮粘附因子(EpCAM)高表达相关的肿瘤。

[0028] 更优选地,所述细胞上皮粘附因子高表达相关的肿瘤包括结肠直肠癌、乳腺癌和胃癌。

[0029] 与现有技术相比本发明具有如下优点:

[0030] 本发明通过使用血小板(PLT)-白细胞(WBC)的混合膜HMs包被磁珠,然后用CTC特异性抗体修饰其表面,开发了一种高性能的CTC分离平台。所得到的HM-IMBs具有来自PLT的与CTC结合能力增强的特性,及来自WBC的与同源WBC相互作用减少的特征,有效地提高了对CTC细胞分离的效率和纯度。通过使用人造病人血样,我们证明,与商业的免疫磁珠相比,仿生HM-IMBs的细胞分离效率从63.60%提高到91.61%,细胞纯度从66.53%提高到96.98%。此外,通过使用HM-IMBs,本发明成功鉴定了16例从结直肠癌,乳腺癌或胃癌患者采集的临床血液样本中的CTCs,同时,分离的CTCs的纯度大于85%。这种液体活检工具将为癌症诊断和治疗开辟新的可能。

## 附图说明

[0031] 图1为制备用于高效分离CTC的HM-IMBs的示意图;

[0032] a) 从血液样品中分离白细胞(WBC)和血小板(PLT),制备PM和WM囊泡,融合,然后涂布到磁珠(MB)上;用抗体对得到的HM-MB进行表面修饰以形成HMs包被的HM-IMBs;

[0033] b) HM-IMBs继承了来自PLT的增强的循环肿瘤细胞(CTC)结合,并且与来自WBC的同源WBC的相互作用降低的性质,被用于CTC的高效和高纯度分离。

[0034] 图2为HM-IMBs的物理化学表征图;

[0035] a) HM-MBs的TEM图像,比例尺,50纳米,TEM样品用醋酸铀酰染色阴性;

[0036] b) 通过DLS测量的MBs,HMs和HM-MBs的流体动力学尺寸和 $\zeta$ 电势;

[0037] c) MBs,PLT膜(PMs),WBC膜(WMs),HMs,PM-MBs,WM-MBs和HM-MBs的SDS-PAGE蛋白质分析,红色和蓝色箭头分别表示PMs和WMs的特定蛋白质;

[0038] d) 与HM-MBs孵育后的单个MCF-7细胞的CLSM图像,比例尺,10微米,用DAPI(蓝色),FITC(绿色)和Cy5(红色)分别标记细胞核,PMs和WMs;

[0039] e) 用磁铁处理之前和之后的水溶液中的HM-MBs样品的照片;

[0040] f) HM-MBs的磁化曲线;

[0041] g) 生物素-Cy5标记的HM-MBs的CLSM图像,比例尺,20微米;

[0042] h) 由HM-IMBs捕获的单个MCF-7细胞的SEM图像;比例尺,2微米,黄色箭头表示HM-IMBs的位置;

[0043] i) 使用HM-IMBs或HM-MBs捕获MCF-7细胞的效率;

[0044] j) 分别在MCF-7 (EpCAM+), HCT116 (EpCAM+) 和HeLa (EpCAM-) 细胞上捕获HM-IMB的效率, 数据表示为平均值 $\pm$ s.d. (n=3)。

[0045] 图3为HM-IMBs增强了与CTC的结合;

[0046] a) 与商业DynaBeads® MBs, PM-MBs, WM-MBs和HM-MBs温育后的单个MCF-7细胞的CLSM图像, 比例尺, 5微米, 细胞核和各种MBs分别用DAPI (蓝色) 和Cy5 (红色) 标记;

[0047] b) MCF-7细胞与各种MBs之间结合的ICP-AES测量;

[0048] c) 基于细胞培养基中的各种癌细胞的各种IMBs的捕获效率;

[0049] d) 实验和e) 基于来自健康供体的全血中掺入的不同量的MCF-7细胞拟合各种IMBs的捕获效率, 数据表示为平均值 $\pm$ s.d. (n=3)。

[0050] 图4为HM-IMBs降低了与WBC的相互作用;

[0051] a) 与商业DynaBeads® MBs, PM-MBs, WM-MBs和HM-MBs温育后的单个J774A.1细胞的CLSM图像, 比例尺, 5微米, 细胞核和各种MBs分别用DAPI (蓝色) 和Cy5 (红色) 标记;

[0052] b) 人源白细胞与各种MBs之间结合的ICP-AES测量;

[0053] c) CLSM图像和d) 使用各种IMBs从加标血样中捕获的细胞的流式细胞术分析; 比例尺, 10微米, 用抗-CK-PE (红色) 和CD45-FITC (绿色) 分别标记MCF-7细胞和WBC, 数据表示为平均值 $\pm$ s.d. (n=3)。

[0054] 图5为用HM-IMBs对癌症患者血液中的CTC进行鉴定与计数;

[0055] a) 通过使用HM-IMBs从患者血液样品中捕获的单一CTC和WBC的免疫荧光图像, 比例尺, 15微米, CD45, CK和细胞核分别用FITC (绿色), PE (红色) 和DAPI (蓝色) 标记;

[0056] b) 从结肠直肠癌, 乳腺癌和胃癌患者收集的1.0mL临床血液样品的CTC计数; CTC的纯度被定义为捕获的CTC与捕获的细胞总数的比率。

[0057] 图6为MCF-7细胞与不同浓度的DynaBeads® MBs或HM-MBs共培养24小时的细胞存活率图。

## 具体实施方式

[0058] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明, 而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

### [0059] 一、实验部分

#### [0060] 材料和试剂

[0061] 磷酸盐缓冲盐水 (PBS), Hank's 平衡盐溶液, 淋巴细胞分离介质和市售的SA共轭DynaBeads® IMB购自Thermo-Fisher (USA)。胎牛血清 (FBS), 链霉亲和素 (SA) 和Tween-20购自Invitrogen (USA)。十二烷基硫酸钠 (SDS) 样品缓冲液和SDS-聚丙烯酰胺凝胶获自Invitrogen (USA) 和Beyotime (中国)。通用的MBs购自北京中科雷鸣科技有限公司 (中国)。乙二胺四乙酸 (EDTA), DL-二硫苏糖醇 (DTT), 多聚甲醛 (PFA), 二辛可宁酸 (BCA) 测定试剂盒, 山羊血清, Triton X-100, 牛血清白蛋白 (BSA), 4', 6-二脒基-2 (DAPI), 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8), 胰蛋白酶和醋酸铀酰获自Sigma-Aldrich (USA)。不含EDTA的迷你蛋白酶抑制剂片剂得自Roche (瑞士)。生物素化的抗人EpCAM抗体从R&D systems (USA) 获得。藻红蛋白-缀合的抗细胞角蛋白 (PE-抗CK) 和异硫氰酸荧光素缀合的抗人CD45 (FITC-抗CD45) 获自BD Biosciences (USA)。生物素-[甲氧基 (聚乙二醇)-2000]-Cy5 (生物素-PEG-Cy5), 1, 2-二硬

脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]-COOH (DSPE-PEG-COOH), 1, 2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]-Cy5 (DSPE-PEG-Cy5) 和1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]-FITC (DSPE-PEG-FITC) 购自Avanti Polar Lipids (USA) 和Nanocs (USA)。所有水溶液均使用用纯化系统 (Direct-Q3, Millipore, USA) 纯化的去离子水(去离子水) 制备。本工作中使用的其他试剂购自国药集团化学试剂(中国) 和阿拉丁试剂(中国)。

[0062] 本发明中混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS的配制:一片蛋白酶抑制剂片剂溶于10mL 的PBS中。

[0063] 细胞,小鼠和临床血液样本

[0064] 人乳腺癌MCF-7细胞,人结肠直肠癌HCT116细胞,人宫颈癌HeLa细胞和鼠巨噬细胞样J774A.1细胞由武汉大学医学院药学院、生命科学学院及口腔医学院提供。细胞在美国典型培养物保藏中心(ATCC) 推荐的标准细胞培养基中培养。ICR小鼠(雄性,6-8周龄) 购自湖南思莱克金达实验动物有限公司(中国)。健康捐献者和癌症患者的临床血样由武汉大学口腔医院,人民医院和中南医院提供。

[0065] PM-囊泡的制备和表征

[0066] 通过梯度离心从全血分离血小板(简称PLT)。将10mL人全血以 $100 \times g$ 离心20分钟,无制动。之后,将上清液以 $800 \times g$ 离心20分钟。用PBS洗涤PLT,然后使用常规显微镜(Olympus, Japan) 进行监测,制得血小板悬浮液,将血小板悬浮液的等分试样在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下冷冻,在室温下解冻,并通过在 $4000 \times g$ 下离心3分钟使其沉淀。再用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBSPM重复三次洗涤后,将沉淀的膜悬浮于PBS中,使用浴超声波仪以53kHz的频率和100W的功率在封盖的玻璃小瓶中超声处理5分钟,然后在迷你挤出机(Avanti Polar Lipids, USA) 上通过400和200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出。通过使用动态光散射(DLS; Nano-Zen 3600, Malvern Instruments, UK) 测量每一步后产物的流体动力学直径和 $\zeta$ 电势来监测PLT膜衍生的囊泡(PLT-囊泡) 的制备。

[0067] WM-囊泡的制备和表征

[0068] 首先通过梯度离心从全血中分离WBC。将1mL人全血加入到1mL Hank's平衡盐溶液中,然后将2mL混合物加入到2mL淋巴细胞分离介质中。将混合物在1800rpm下离心30分钟,无制动器。之后,收集中间位置的白色单核细胞层,将上清液重悬于汉克平衡盐溶液中,并以2000rpm离心10分钟。将得到的WBC用PBS洗涤,然后用常规显微镜监测。为了获得WM-囊泡,将WBC在1000rpm下离心5分钟,并将沉淀重悬于2mL Hepes B缓冲液(2.38g/L Hepes, 0.476g/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.292g/L EDTA, 0.154g/L DTT, 0.746g/L KCl, pH7.6) 与一片蛋白酶抑制剂片剂混合。通过使用杜恩斯匀浆器将细胞去核。合并所得上清液并置于由Hepes B缓冲液中55% (w/v), 40% (w/v), 30% (w/v) 蔗糖组成的不连续蔗糖密度梯度中。超速离心后,可清楚地检测到三个带状样品。收集这三条谱带用于连续的蛋白质表征。从30%/40%界面收集富含质膜的条带,并用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS稀释。将沉淀的膜悬浮在PBS中,使用浴超声波仪以53kHz的频率和100W的功率在封盖的玻璃小瓶中超声处理5分钟,然后在迷你挤出机上通过400和200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出。通过使用DLS监测WM-囊泡的制备。

[0069] HM-囊泡的制备和表征

[0070] 将得到的PM-囊泡和WM-囊泡按照1:1的质量比进行混合,然后在 $37^{\circ}\text{C}$ 下搅拌10分

钟,使得两者混合均匀。再用混有蛋白酶抑制剂片剂的PBS重复三次洗涤后,将沉淀的膜悬浮于PBS中,使用浴超声波仪以53kHz的频率和100W的功率在封盖的玻璃小瓶中超声处理5分钟,然后在迷你挤出机(Avanti Polar Lipids,USA)上通过400和200nm聚碳酸酯多孔膜依次挤出。通过使用动态光散射(DLS;Nano-Zen 3600,Malvern Instruments,UK)测量每一步后产物的流体动力学直径和 $\zeta$ 电势来监测混合膜的制备过程。

#### [0071] HM-MBs的制备和表征

[0072] 首先使用X射线衍射仪(XRD;D8Advance,AXS Instruments,德国)和扫描电子显微镜(SEM;6700F,JEOL,日本)来表征所购买的MBs。将1mL含有50 $\mu$ g MBs的PBS与从1mL血中制备的HM-囊泡混合。随后将混合物通过200nm聚碳酸酯多孔膜挤出11次,然后以1,000g离心以除去多余的HM-囊泡。最后,将得到的HM隐形MB(HM-MBs)在4 $^{\circ}$ C下置于PBS中过夜以供进一步使用。

[0073] 用DLS测量HM-MBs的流体动力学直径和 $\zeta$ 电位。将50 $\mu$ g HM-MBs悬浮于1mL PBS中,并在室温下进行测量。通过透射电子显微镜(TEM;JEM-2010ES500W,日本)来表征HM-MBs的形态。将HM-MBs的液滴与铜网格接触60s,用乙酸双氧铀负染色30s并在表征之前在环境条件下干燥来制备TEM样品。使用物理性质测量系统(PPMS-9量子设计)在室温下测量HM-MBs的磁性。使用DLS在PBS或10%FBS中测量HM-MBs 15天以进行稳定性实验。作为对照,按照上述程序制备了PM-包被的MB(PM-MBs)和WM-包被的MB(WM-MBs),只是在制备过程中使用PM-囊泡和WM-囊泡代替HM-囊泡,并通过TEM和DLS对PM-MBs和WM-MBs的形态,尺寸和zeta电位进行了表征。

#### [0074] 膜蛋白的SDS-PAGE表征

[0075] 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白质。通过BCA试剂盒进行测量,在SDS样品缓冲液中制备MBs,PMs,WMs,HMs,PM-MBs,WM-MBs和HM-MBs。将样品在95 $^{\circ}$ C加热5分钟,并将20 $\mu$ g样品加载到10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶的每个孔中。然后将样品在120V下运行2小时,将所得聚丙烯酰胺凝胶在考马斯蓝染色2小时,并过夜洗涤,随后在凝胶文件系统(GBOX,Syngene,UK)中观察。

#### [0076] HM涂层的荧光表征

[0077] 将PM-囊泡与DSPE-PEG-FITC混合30分钟,并将WM-囊泡与DSPE-PEG-Cy5混合30分钟。通过离心从PM-囊泡和WM-囊泡中去除过量的DSPE-PEG-FITC或DSPE-PEG-Cy5。然后,将FITC标记的PM-囊泡和Cy5-标记的WM-囊泡融合以形成HM-囊泡,并且如上所述将得到的HM-囊泡进一步包被到MB上。之后,将MCF-7细胞接种在共聚焦培养皿中并培养12小时。然后将100 $\mu$ g HM-MBs与MCF-7细胞一起温育4小时。接着用PBS洗涤细胞三次,在室温下用PFA固定30分钟,用DAPI染色,最后使用共焦激光扫描显微镜(CLSM;IX81,Olympus,Japan)成像。

#### [0078] HM-IMB的制备和表征

[0079] 将50 $\mu$ g HM-MBs与100 $\mu$ g DSPE-PEG-COOH混合30分钟,并通过离心从HM-MB中去除过量的DSPE-PEG-COOH。在室温下,将100 $\mu$ L制备的DSPE-PEG-COOH官能化的HM-MBs水溶液(1mg/mL)与100 $\mu$ L的EDC(4mg/mL)/NHS(6mg/mL)混合30分钟以激活羧基。用PBS洗涤混合溶液3次后,将混合物用SA(50 $\mu$ g/mL)在4 $^{\circ}$ C处理10h。之后,将溶液再次用PBS洗涤,然后在室温下用生物素化的抗EpCAM(10 $\mu$ g/mL)再处理2小时以将这些抗体引导至HM-MBs的表面上。为了测试抗EpCAM是否缀合到HM-MBs上,使用荧光生物素-PEG-Cy5代替生物素化的抗EpCAM。

将生物素-PEG-Cy5与SA官能化的HM-MBs混合30分钟,然后通过离心除去过量的生物素-PEG-Cy5。最后,用CLSM观察颗粒。

[0080] SEM和癌细胞特异性结合的SEM表征

[0081] 玻璃载玻片首先加入到12孔板中,将MCF-7细胞接种于12孔板中,培养12小时,与100 $\mu$ g HM-MBs或HM-IMBs一起温育1小时,然后用PBS洗涤三次。之后,将含有细胞的载玻片用2%PFA固定处理2小时,并通过一系列乙醇溶液(即50%,70%,90%和100%)梯度脱水,每步15分钟,然后真空冷冻脱水以保持基质固定化细胞的形态。在完全干燥之后,在SEM观察之前将样品溅射镀金。

[0082] 用CLSM评估MBs与MCF-7细胞的结合

[0083] 首先通过如上所述的DSPE-PEG-COOH,SA和生物素-PEG-Cy5的有序表面缀合用Cy5荧光标记PM-MBs,WM-MBs和HM-MBs。并且通过直接偶联生物素-PEG-Cy5,用商业化的SA偶联的MB也用Cy5荧光标记。之后,将MCF-7细胞接种在共聚焦培养皿中并培养12小时。然后将100 $\mu$ g Cy5标记的Dynabeads<sup>®</sup> MBs,PM-MBs,WM-MBs和HM-MBs与MCF-7细胞一起温育另外4小时。然后用PBS洗涤细胞三次,在室温下用PFA固定30分钟,用DAPI染色,然后用CLSM成像。使用Image-Pro Plus 6.0软件(Media Cybernetics,USA)进一步分析图像以测量发光强度。

[0084] 用ICP-AES评估MB和MCF-7细胞之间的结合

[0085] 将MCF-7细胞接种在12孔板中并培养12小时。将100 $\mu$ g Dynabeads<sup>®</sup> MBs,PM-MBs,WM-MBs和HM-MBs添加到培养基中,并且使用没有任何颗粒生长的细胞作为对照。然后将细胞孵育4小时并用PBS洗涤三次。为了定量Fe含量,通过向各孔中加入0.5mL 1%吐温80将细胞裂解。然后将来自每个孔的细胞裂解物加入到1mL硝酸中。将混合物在室温下放置12小时,然后在80 $^{\circ}$ C下退火6小时以除去酸。然后用1mL去离子水重新悬浮样品,通过使用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP-AES;虹膜Intrepid II XSP,Thermo Elemental,USA)测定每个样品中的Fe含量。

[0086] PBS中的MCF-7细胞捕获效率

[0087] 收获MCF-7细胞,洗涤,用血细胞计数器测定细胞数。将大约 $10^5$ 个细胞重悬于1mL PBS中。向含有PBS的细胞中加入100 $\mu$ g HM-MBs或HM-IMBs,并将PBS中的HM-MBs或HM-IMBs和MCF-7细胞在37 $^{\circ}$ C下以30rpm进一步温育60分钟。之后,通过使用外部磁体分离细胞。最初捕获的细胞数量和上清液中的细胞数量均已确定。捕获效率被定义为捕获细胞与加标细胞总数的比率。此外,还根据上述程序测试了基于各种细胞(即MCF-7,HCT116和HeLa细胞)的捕获效率,只是将HCT116和HeLa细胞代替MCF-7细胞。

[0088] 细胞培养基中的细胞捕获效率

[0089] 首先按照如上所述制备HM-IMBs的程序获得PM-IMBs和WM-IMBs。并且通过将市售的SA偶联的MBs与生物素化的抗EpCAM直接缀合获得Dynabeads<sup>®</sup> IMB,其也与如上所述的制备HM-IMBs的程序类似。收获MCF-7,HCT116和HeLa细胞,洗涤,并用血细胞计数器测定细胞数量。将约 $10^5$ 个细胞重悬于1mL细胞培养基中。向含有细胞的培养基中加入100 $\mu$ g Dynabeads<sup>®</sup> IMBs,PM-IMBs,WM-IMBs或HM-IMBs,并在37 $^{\circ}$ C,30rpm下进一步温育60分钟。之后,通过使用外部磁体分离细胞并计算捕获效率。

[0090] 人造CTC血液样品中的MCF-7细胞捕获效率

[0091] 将各种数量的MCF-7细胞(即约50,100,200,500和1000个细胞)重悬于来自健康供体的1mL全血中。将100 $\mu$ g Dynabeads<sup>®</sup> IMBs,PM-IMBs,WM-IMBs或HM-IMBs加入人造CTC血液样品中,并进一步在37 $^{\circ}$ C,30rpm下孵育60分钟。之后,通过使用外部磁体分离细胞并计算捕获效率。

[0092] 用CLSM评估MBs与J774A.1细胞的相互作用

[0093] 将J774A.1细胞接种在共聚焦培养皿中并培养12小时。然后将100 $\mu$ g Cy5标记的MBs,PM-MBs,WM-MBs和HM-MBs与J774A.1细胞一起温育另外4小时。按照上述步骤处理细胞,最后用CLSM成像。图像也使用Image-Pro Plus6.0软件进行分析。

[0094] 用ICP-AES评估MB和J774A.1细胞之间的相互作用

[0095] 将J774A.1细胞接种在12孔板中并培养12小时。将100 $\mu$ g Dynabeads<sup>®</sup> MB,PM-MBs,WM-MBs和HM-MBs添加到培养基中,并且使用没有任何颗粒生长的细胞作为对照。然后对细胞进行裂解处理,最后用ICP-AES测定样品中的Fe含量。

[0096] 人造CTC血液样品中MCF-7细胞捕获纯度

[0097] 将大约 $5 \times 10^3$ 个MCF-7细胞重悬于来自健康供体的1mL全血中。将100 $\mu$ g Dynabeads IMBs,PM-IMBs,WM-IMBs或HM-IMBs加入人造CTC血液样品中,并进一步在37 $^{\circ}$ C,30rpm下孵育60分钟。之后,通过使用外部磁体分离细胞。随后,将4%PFA加入管中以固定细胞10分钟。进一步将细胞浸入0.2%Triton X-100中10分钟以诱导细胞渗透性并允许细胞内染色。然后用PBS中的5%正常山羊血清,3%BSA和0.1%Tween-20作为阻断剂进行阻断30分钟,这在免疫荧光染色过程中降低了非特异性结合。最后,将细胞浸入10 $\mu$ L FITC-抗-CD45储备溶液和10 $\mu$ L PE-抗CK储备溶液中,在4 $^{\circ}$ C在黑暗中10小时,然后用CLSM观察。此外,流式细胞术也用于分析细胞纯度。使用没有荧光标记的细胞作为对照。通过胰蛋白酶消化制备单细胞悬液,用PBS洗涤三次。最后,样品在流式细胞仪(FACScaliber,Becton Dickinson,USA)上运行,并使用FlowJo软件(Tree Star,USA)分析所得数据。将MCF-7细胞鉴定为CK+/CD45-,并且将WBC鉴定为CK-/CD45+。CTC的纯度定义为捕获的MCF-7细胞与捕获的细胞总数的比率。

[0098] 从临床患者血样中分离CTC

[0099] 为了测试本发明制得的HM-IMBs在临床血液样品上的CTC-捕获性能,将100 $\mu$ g HM-IMBs分别加入来自结肠直肠癌,乳腺癌和胃癌患者的1mL外周血样品中,并进一步在37 $^{\circ}$ C孵育60分钟在30rpm下37 $^{\circ}$ C。并且通过使用外部磁体分离细胞。使用标准三色免疫细胞化学(ICC)方法鉴定捕获的CTC,其中按照上述步骤将细胞用FITC-抗CD45和PE-抗CK染色,然后用DAPI染色CLSM观察前10分钟。将50 $\mu$ g HM-MBs与100 $\mu$ g DSPE-PEG-COOH混合30分钟,并通过离心从HM-MBs中去除过量的DSPE-PEG-COOH;在室温下,将100 $\mu$ L制备的DSPE-PEG-COOH官能化的HM-MBs水溶液(1mg/mL)与100 $\mu$ L的EDC(4mg/mL)/NHS(6mg/mL)室温下活化30分钟;用PBS洗涤混合溶液3次后,将混合物用SA(50 $\mu$ g/mL)在4 $^{\circ}$ C处理10h;之后,将溶液再次用PBS洗涤,然后在室温下用生物素化的循环肿瘤细胞的上皮细胞特异性抗体(比如10 $\mu$ L 10 $\mu$ g/mL抗EpCAM抗体)再处理2小时,以将这些抗体引导至HM-MBs的表面上,制得HM-IMBs。最后,将捕获得到的细胞进行计数并对其中的CTC的纯度进行计算。

[0100] 细胞毒性分析

[0101] 使用CCK-8测定来评估MB对MCF-7细胞的细胞毒性。将细胞接种在96孔板中并培养

12小时。然后将不同浓度的Dynabeads® IMB和HM-IMB(即25, 50, 100, 200和400 $\mu$ g/mL)添加到培养基中,并且以没有任何颗粒的细胞生长作为对照。在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时,然后用PBS洗涤三次。孵育结束时,加入5mg/mL CCK-8PBS溶液,再继续培养4小时。最后,通过使用酶标仪(Emax Precision, USA)在450nm处测定细胞的吸光度值。测量孔板的背景吸光度并减去。通过用处理组的光密度值除以对照值来计算细胞毒性。

#### [0102] 血液毒性分析

[0103] 为了测试细胞膜包被的纳米颗粒的潜在体内毒性, ICR小鼠血液首先用于制备HM-IMBs。然后, 8只ICR小鼠(n=4)接受了i.v.注射剂量为5mg/kg的100 $\mu$ L含有HM-IMBs的PBS或PBS。兽医每天评估小鼠的一般状况。注射后第30天将所有小鼠安乐死, 并使用血液生化自动分析仪(7080, HITACHI, 日本)采集他们的血液样本进行血液生化和全血检测。

#### [0104] 二、结果部分

[0105] 透射电子显微镜(TEM)显示HM-MBs由直径约80nm的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>核心和厚度约9nm的外脂质双层壳组成(图2a), 为核-壳结构。动态光散射(DLS)结果表明, 产生的HM-MBs比未涂覆的MBs大18nm, 并具有与HMs相似的表面电位(图2b)。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测HM-MBs的蛋白质含量, 同时结果证实PMs和WMs转移到HM-MBs上(图2c)。此外, 将人乳腺癌MCF-7细胞与HM-MB一起温育, 其中PM和WM分别用异硫氰酸荧光素(FITC)和Cy5标记, 共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)图像显示Cy5(红色)和FITC(绿色)信号的重叠(图2d), 也表明用HMs成功涂覆MBs。

[0106] 使用物理性质测量系统(PPMS), 我们发现HM-MB具有优异的水溶性和超顺磁性(图2e, f), 这对于下游用外部磁体快速分离CTC很关键。为了证明抗EpCAM的成功偶联到HM-MBs表面, 将SA功能化的HM-MBs与荧光生物素-PEG-Cy5而不是生物素化的抗EpCAM混合并证实了HM-MBs表面明亮的Cy5荧光(图2g)。

[0107] 确认磁性和抗体修饰后, 通过将MCF-7细胞与HM-MBs或HM-IMBs孵育来测试HM-IMBs特异性捕获癌细胞的能力。扫描电子显微镜(SEM)图像显示, 许多HM-IMBs粘附在MCF-7细胞表面(图2h), 表明抗EpCAM修饰后识别增强。另外, HM-MBs的抗EpCAM修饰导致接近100%的细胞分离效率(图2i)。为了进一步检测识别的特异性, 采用EpCAM阳性MCF-7和人结肠癌HCT116细胞作为阳性靶细胞和EpCAM阴性人宫颈癌HeLa细胞作为阴性对照细胞, 发现EpCAM阳性细胞的捕获效率接近~95%(图2j), 而EpCAM阴性细胞的这个值急剧下降到约35%。总体而言, 我们证明HM-IMB具有高度特异性, 可以区分不同的癌症。

[0108] HM-IMBs增强了PLT介导的CTC结合: 将Cy5标记的商品化的MBs、PM-MBs和WM-MBs与MCF-7细胞一起温育并通过CLSM显现, 其显示PM-MBs和HM-MBs组显示更亮的Cy5发光(图3a), 表明PM和HM涂层能够有效地增强MBs和癌细胞的结合。通过使用电感耦合等离子体-原子发射光谱法(ICP-AES)测量Fe含量来进一步定量分析和确定结合(图3b)。

[0109] 为了进一步评估PLT事件, 在MCF-7, HCT116和HeLa细胞中加入了与生物素化抗EpCAM结合的HM-IMBs和Dynabeads® MBs, PM-MBs和WM-MBs, 正如预期的那样, 与Dynabeads® IMBs(图3c)相比, PM-IMBs和HM-IMBs表现出更好的EpCAM阳性细胞(即MCF-7和HCT116细胞)的捕获能力。对于EpCAM阴性的HeLa细胞, PM-IMBs和HM-IMBs的捕获效率几乎比Dynabeads® IMBs和WM-IMBs(图3c)高2倍, 表明PMs单独可以显著增强癌细胞捕获。为

了模拟复杂的生理环境,将MCF-7细胞加入健康的供体血液样品中并进行相同的实验,同样,PM-IMBs和HM-IMBs比Dynabeads® IMBs具有更好的细胞分离性能(图3d),表明即使在全血中,PLTs和CTCs之间的相互作用也能有效地提高细胞分离效率。

[0110] HM-IMBs继承了WBC减少与其他WBC相互作用的能力:为了测试这一点,将各种Cy5标记的MBs与鼠类巨噬细胞样J774A.1细胞一起温育,并用CLSM和ICP-AES分析摄取能力。正如预期的那样,WM-MBs和HM-MBs在J774A.1细胞中表现出较少的积累(图4a,b),表明WM和HM涂层可以有效地减少MB和WBC之间的相互作用。另外,本发明评估了具有高背景WBC的加标血样中各种MBs捕获的细胞的纯度。分别用FITC缀合的抗CD45(绿色)和藻红蛋白缀合的抗细胞角蛋白(PE-抗CK,红色)标记WBC和MCF-7细胞。CLSM图像显示,WM-IMB和HM-IMB可以有效地捕获几乎没有任何WBC的MCF-7细胞(图4c),而由IMBs和PM-IMBs捕获的细胞含有许多WBC,进一步证明了这种生物激发的WBC涂层策略可以减少WBCs的吸附。捕获的细胞通过流式细胞术分析,当使用Dynabeads® IMBs作为富集系统时,3092MCF-7细胞与1511WBC一起被捕获(图4d),相反,当使用HM-IMBs捕获相同数量的细胞时几乎没有检测到WBC。

[0111] 在确认本发明的HM-IMBs能够有效地在加标血液样品中高效率和高纯度地分离CTC之后,进一步在来自癌症患者的外周血样品上测试了HM-IMBs的CTC捕获性能。通过使用典型的三色免疫细胞化学方法鉴定捕获的CTC,其中使用FITC抗CD45,PE抗CK和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色来识别WBC(CD45+/CK-/DAPI+,细胞大小<30μm)和CTCs(CD45-/CK+/DAPI+,10μm<细胞大小<30μm)(图5a)。每1mL结直肠癌患者血液中分离的CTC数量为1至6个,每1mL乳腺癌患者血液3至16个,以及每1mL胃癌患者血液中2至11个(图5b)。在这个患者群体中,本发明的HM-IMBs显示出很高的捕获效率和纯度,证明了本发明的HM-IMBs在分离CTC时的高性能。最后,通过细胞毒性分析及血液毒性分析显示HM-IMBs在培养物和血液中具有优异的生物相容性(图6和表1),确保了这些捕获的CTC的细胞学分析质量。

[0112] 表1.注射含HM-IMBs的PBS或PBS的小鼠全血成分分析

	组别	单位	对照	HM-IMBs
[0113]	WBC	10 <sup>9</sup> /L	8.23 ± 2.87	8.15 ± 3.02
	RBC	10 <sup>12</sup> /L	12.16 ± 3.05	11.97 ± 2.77
	HGB	g/L	141.08 ± 17.22	145.69 ± 18.01
	HCT	CV%	45.95 ± 6.84	47.14 ± 7.05
	MCV	fL	55.74 ± 3.91	57.66 ± 4.03
	MCH	pg	13.89 ± 0.75	13.22 ± 0.92
	MCHC	g/L	278.10 ± 48.67	282.14 ± 6.32
	PLT	10 <sup>9</sup> /L	930.21 ± 188.77	947.96 ± 202.45
	RDW	CV%	10.93 ± 0.72	10.64 ± 0.81

[0114] #WBC:白细胞;RBC:红细胞;HGB:血红蛋白;HCT:红细胞压积;MCV:红细胞平均体积;MCH:平均红细胞血红蛋白量;MCHC:红细胞平均血红蛋白浓度;PLT:血小板;RDW:红细胞体积分布宽度;

[0115] 总之,本发明已经成功开发出一种生物启发式的高性能CTC隔离系统,它使用由

MBs为核心的HM-IMBs和工程化的PLT-WBC HMs作为壳。仿生HMs壳显著增强MBs和CTCs之间的相互作用,同时防止WBCs的非特异性结合。MBs核心实现了对CTC的可控磁隔离。所有这些优点使我们能够快速分离90%以上的肿瘤细胞,并避免几乎所有的WBCs。

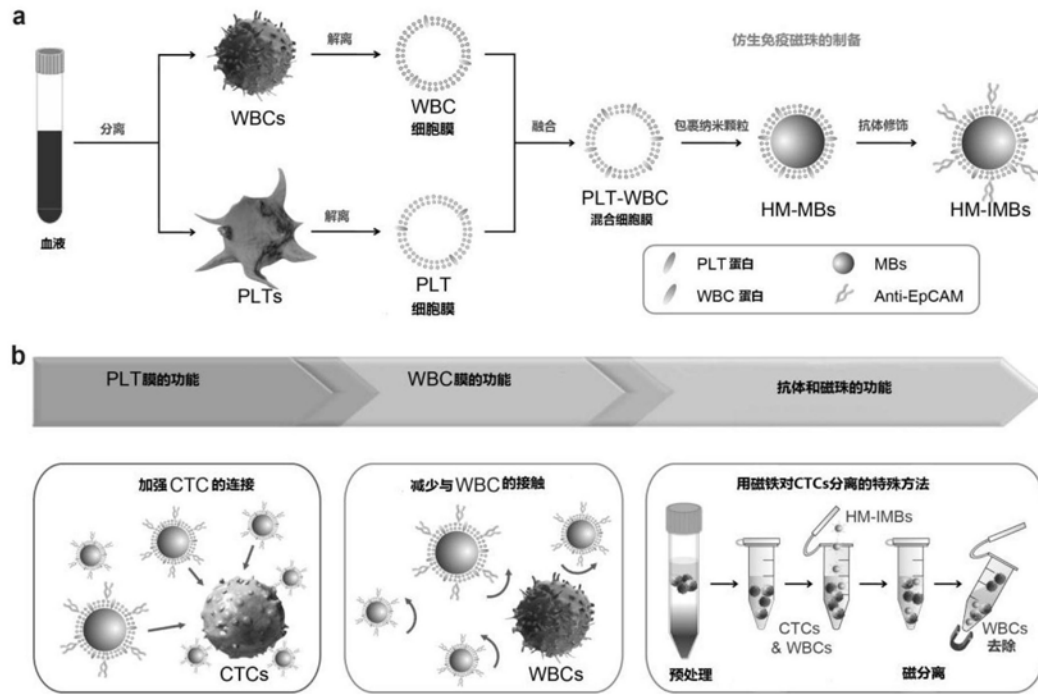


图1

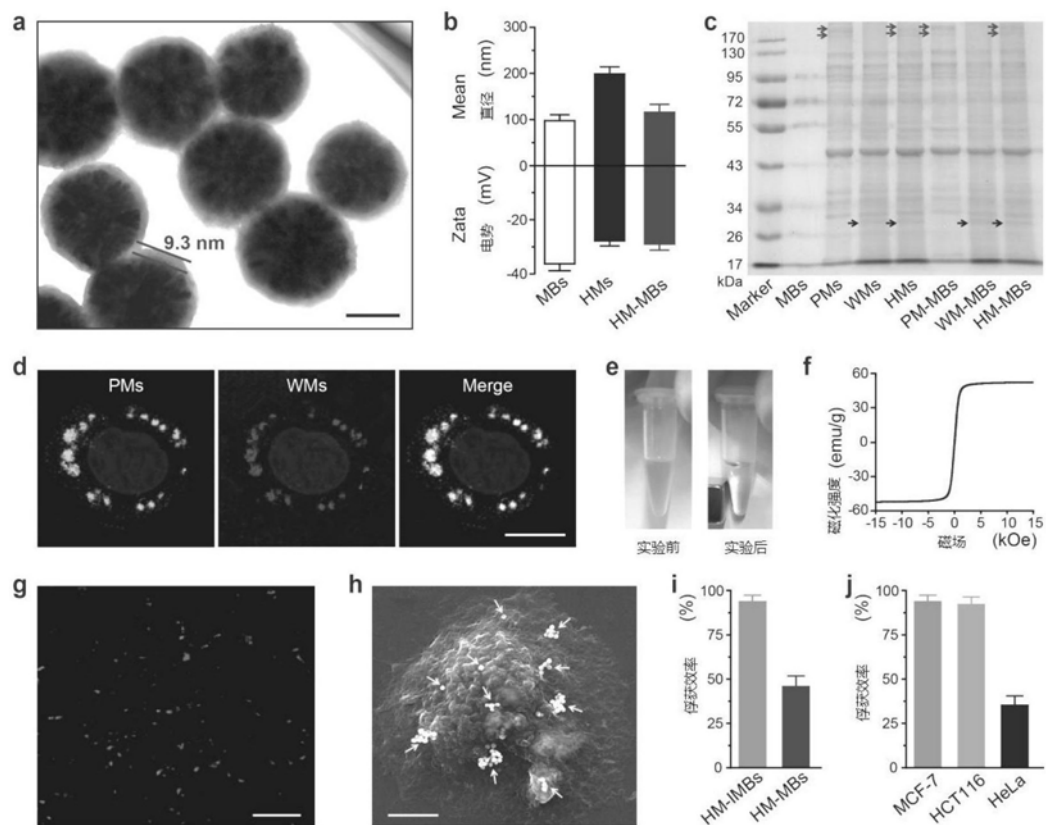


图2

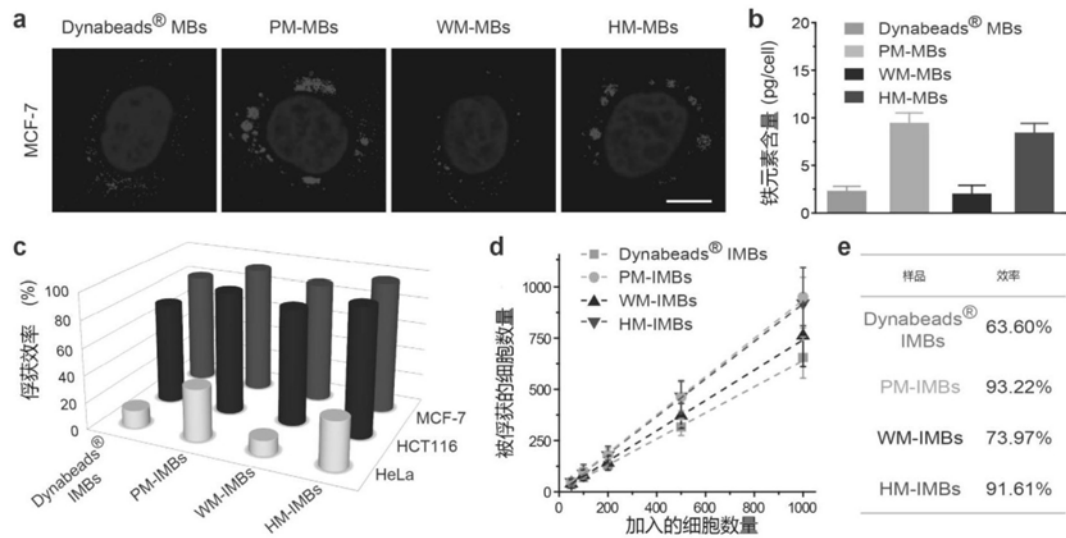


图3

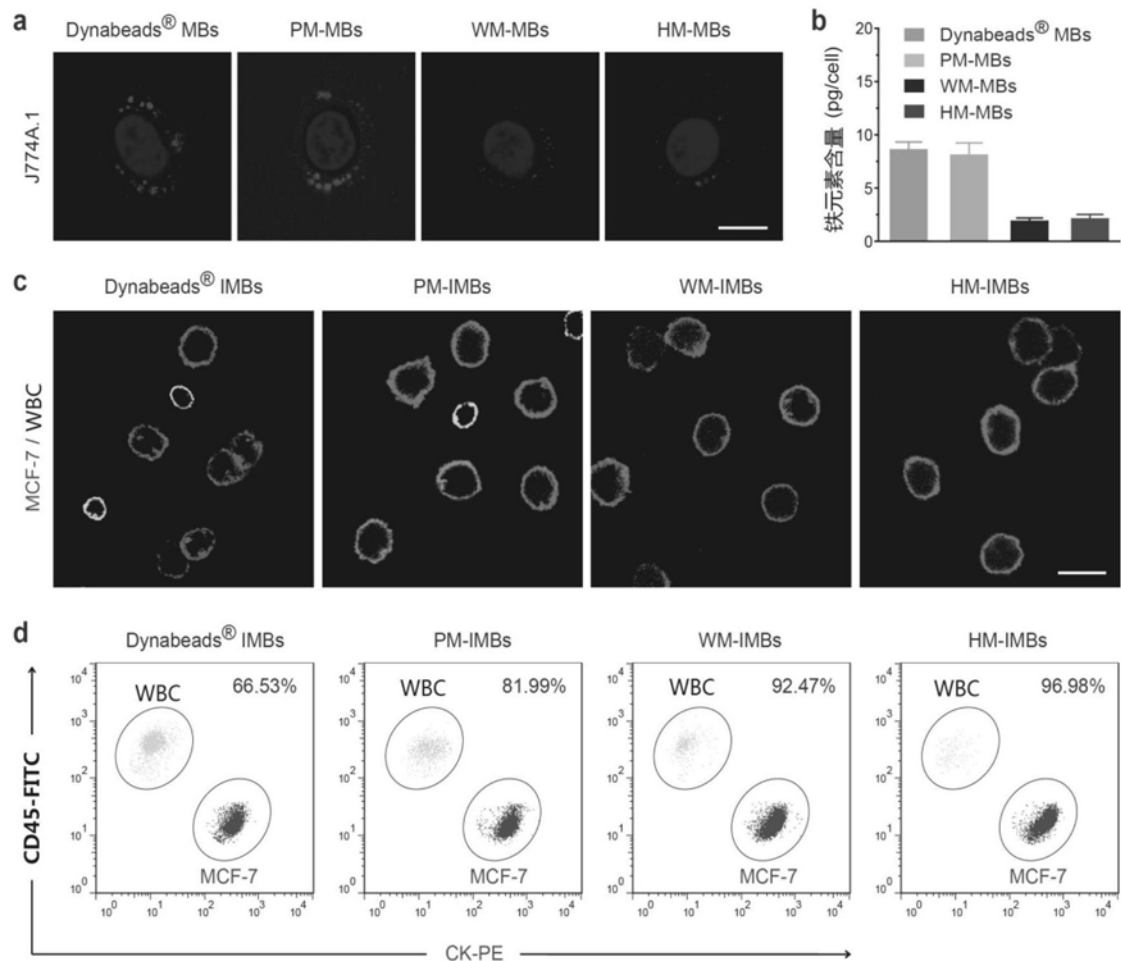


图4



图5

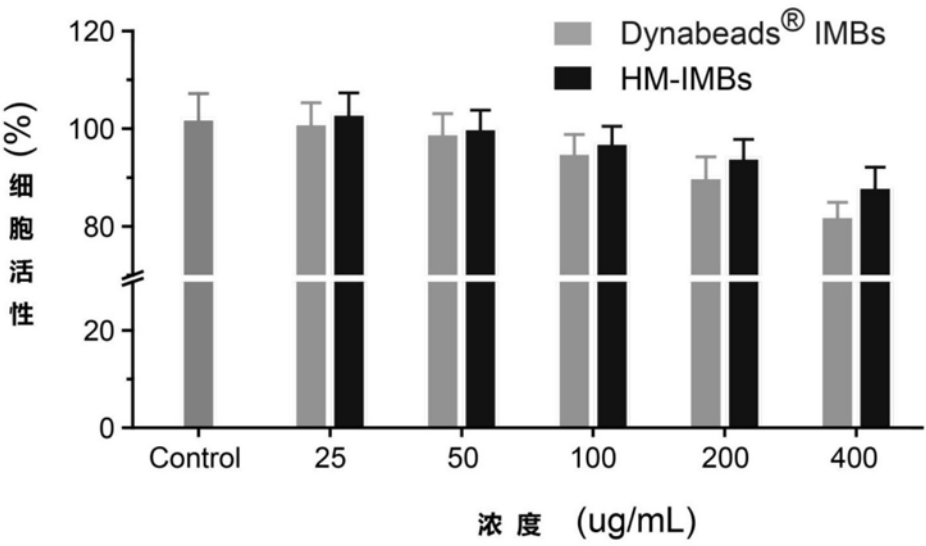


图6

专利名称(译)	一种血小板-白细胞混合膜包被免疫磁珠及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109100504A</a>	公开(公告)日	2018-12-28
申请号	CN201810659309.X	申请日	2018-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	刘威 饶浪		
发明人	刘威 饶浪		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/531 G01N33/54333 G01N33/574		
代理人(译)	彭劲松		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

# 摘要(译)

本发明公开了一种血小板-白细胞混合膜包被免疫磁珠及其制备方法与应用。通过使用血小板 ( PLT ) - 白细胞 ( WBC ) 的杂交膜包被磁珠，然后用循环肿瘤细胞 ( CTCs ) 特异性抗体修饰其表面，得到PLT-WBC混合膜包被的免疫磁珠 ( HM-IMBs )。HM-IMBs继承了来自PLT的增强的CTC结合能力以及来自WBC的减少同源WBC相互作用的能力，有效地提高了细胞分离的效率和纯度。通过使用HM-IMBs，成功鉴定了16例从结直肠癌，乳腺癌或胃癌患者采集的临床血液样本中的CTCs，同时，分离的CTCs的纯度大于85%。因此，这种液体活检工具将为癌症诊断和治疗开辟新的技术领域。

