

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00807024.5

[45] 授权公告日 2006年4月12日

[11] 授权公告号 CN 1250719C

[22] 申请日 2000.4.4 [21] 申请号 00807024.5

[30] 优先权

[32] 1999. 4. 15 [33] US [31] 09/292,358

[32] 2000. 3. 30 [33] US [31] 09/539,080

[86] 国际申请 PCT/US2000/008799 2000.4.4

[87] 国际公布 WO2000/063358 英 2000.10.26

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.31

[71] 专利权人 帕德马纳班·P·奈尔

地址 美国马里兰

[72] 发明人 帕德马纳班·P·奈尔

审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书4页 说明书12页 附图3页

[54] 发明名称

结肠直肠癌和其它胃肠病理学的非侵入性检测

[57] 摘要

本发明描述了一种在正常环境温度下分离存活的、生物学上基本纯的、脱落的粪便结肠细胞的方法。阐述了指示某种胃肠道状况的免疫粪便细胞和炎症细胞以及检测结肠直肠癌的一种非侵入性方法。详述了用于分离结肠细胞的运送和悬浮介质的组成。

1. 用于收集粪便样品的运送介质，其包含：
 - (a) 足量的螯合粪便材料中蛋白酶的试剂；
 - (b) 足量的破坏粪便材料中粘液的粘液溶解剂；
 - (c) 足量的抑制粪便材料中细菌活性的杀菌剂。

2. 权利要求 1 的运送介质，其中所述的蛋白酶螯合剂选自血浆蛋白质、凝胶形成聚合物以及合成树脂。

3. 权利要求 2 的运送介质，其中所述的血浆蛋白质是牛血清白蛋白、卵白蛋白或人血清白蛋白。

4. 权利要求 3 的运送介质，其中所述的粘液溶解剂选自 N-乙酰半胱氨酸、 β -巯基乙醇、辣椒碱、二硫苏糖醇、愈创木酚和愈创木酚甘油醚。

5. 权利要求 4 的运送介质，其中所述的杀菌剂选自硫柳汞、抗生素、叠氮化钠、甘草酸及 α 和 β 甘草次酸。

6. 权利要求 5 的运送介质，其是一种溶液，该溶液包含：

碳酸氢钠	350-500 毫克；
牛血清白蛋白	2.5-15 克；
愈创木酚甘油醚	2.5-5.0 克；
甘草酸	2.0-4.0 克；和
Puck's 盐水 G:	500 毫升。

7. 悬浮介质，其含有权利要求 1-4 和 6 之任一项目的运送介质，但没有杀菌剂。

8. 在正常环境温度下从粪便样品中分离的完整的脱落粪便结肠细胞，其中从粪便样品中分离细胞包括步骤：

(a) 将粪便样品收集在正常环境温度下的权利要求 1-6 任一项的运送介质中；

(b) 将粪便样品分散在以权利要求 7 的悬浮介质稀释的所述运送介质中；

(c) 通过将细胞悬液在更大比重介质上层叠，沉降步骤(b)的稀释运送介质中的细胞，以使该细胞与杂质分离；

(d) 将步骤(c)中的细胞离心，在与所述更大比重介质的界面上和在更大比重介质和沉淀中形成细胞区带，由此从所述粪便样品获得分离的、完整的、存活的脱落结肠细胞，所述分离的结肠细胞是基本上纯的，其产率为每克粪便材料高于八百万个活结肠细胞。

9. 权利要求 8 的结肠细胞，其携带指示特定胃肠状况的标志。

10. 权利要求 9 的结肠细胞，其携带指示肿瘤转化的标志。

11. 权利要求 9 的结肠细胞，其携带指示免疫机能障碍的标志。

12. 权利要求 9 的结肠细胞，其呈现异常，该异常指示非肿瘤性胃肠病理状态。

13. 权利要求 8 的结肠细胞，其是上皮细胞或非上皮细胞。

14. 权利要求 8 的结肠细胞，其表达一种嵌合的免疫球蛋白 IgC。

15. 权利要求 8 的结肠细胞，其只表达 IgA 和 CFc。

16. 权利要求 8 的结肠细胞，其只表达 CFc。

17. 在正常环境温度下分离生物学上基本纯的、脱落的粪便结肠细胞的方法，包括步骤：

(a) 将粪便样品收集在维持于正常环境温度的权利要求 1-6 任一项的运送介质中；

(b) 将粪便样品分散在以权利要求 7 的悬浮介质稀释的所述运送介质中；

(c) 通过将细胞悬液在更大比重介质上层叠，沉降步骤(b)的稀释运送介质中的细胞，以使该细胞与杂质分离；

(d) 将步骤(c)中的细胞离心，导致在与所述更大比重介质的界面上形成细胞区带，并在更大比重介质和沉淀中形成细胞组分；和

(e)从所述的细胞区带中及更大比重介质和沉淀中回收生物学上基本纯的结肠细胞。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述更大比重介质的比重是从 1.033 至 1.25。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述更大比重介质的比重是 1.25。

20. 体外检测结肠直肠癌的方法，包括步骤：

(a) 获得权利要求 8 的结肠细胞；然后

(b) 将所述结肠细胞与试剂反应来检测确定癌症的标志的存在，所述结肠细胞与所述试剂发生阳性反应指示癌的存在。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述试剂是产生显色产物的荧光标记抗体或植物凝集素。

22. 体外检测胃肠道粘膜免疫的方法，包括将从待测胃肠道粘膜免疫的受实验者回收的权利要求 8 的结肠细胞中的免疫粪便细胞的数目与从正常受实验者回收的权利要求 8 的结肠细胞中的免疫粪便细胞的数目进行比较，与正常值的统计学显著的偏离指示免疫机能障碍的水平。

23. 权利要求 22 的方法, 其中所述试剂是抗 IgG 单克隆抗体和/或特异性抗 IgC 单克隆抗体。

24. 体外诊断胃肠道病理状态的方法, 包括在怀疑有胃肠道病理状态的受实验者粪便样品中测定权利要求 8 的结肠细胞中的炎症细胞的存在, 炎症细胞的存在指示胃肠道病理状态。

25. 权利要求 24 的方法, 其中通过将细胞与 CD45 或 COX-2 的抗体反应测定炎症细胞的存在, 与所述抗体结合的细胞是炎症细胞。

26. 产生抗原特异的单克隆抗体的方法, 包括在标准杂交瘤技术中使用从权利要求 8 的结肠细胞分离的抗原特异的免疫粪便细胞作为克隆, 并回收抗原特异的单克隆抗体。

结肠直肠癌和其它胃肠病理学的非侵入性检测

此申请是 1999 年 4 月 15 日提交的、未决的美国申请 09/292, 358 的部分继续。

发明背景

发明领域

本发明涉及分离的能够早期非侵入性检测结肠直肠癌和其它胃肠疾病的结肠细胞 (colonocyte)。更为具体地, 本发明涉及从少量粪便样品中获得的、生物学上基本纯的、起源于淋巴系统的分离活免疫粪便细胞 (immunocoprocytes) 与非上皮细胞。本发明还涉及提供用于在正常环境温度下从粪便样品中分离存活的结肠细胞的运送介质和分散或悬浮介质, 以及使用本发明的分离结肠细胞进行结肠直肠与其它胃肠病理学检测的方法。所分离的结肠细胞还可用于其它异常的状况、症状、紊乱或病理状态的研究和测定。

现有技术

人类常见的一种胃肠道恶性肿瘤是结肠直肠癌。据估计, 在美国结肠直肠癌占有所有与癌症相关死亡男性和女性的 14%, 并且它的发病率仍就很高 (Boring 等人, 加拿大临床癌症杂志 (CA Cancer J. Clin.) 1994; 44:7-26)。如同其它恶性肿瘤的治疗一样, 早期的检测对于这种癌症的成功治疗是至关重要的。

目前, 检测结肠和结肠直肠肿瘤的筛选检查方法基于使用 (a) 粪便潜血检验 (FOBT), (b) 可弯曲的乙状结肠镜检查, (c) 双对照钡灌肠法, 和 (d) 结肠镜检查。在这些筛选检验中, 只有 FOBT 是非侵入性的、简便且相对便宜, 它的依据是相对高可能性的结肠直肠癌出血。然而, FOBT 频繁的假阳性与假阴性结果很大程度上限制了它的特异性和灵敏度。其它的操作都是昂贵的, 并且是侵入性的。因此, 确实需要提供一种简便、非侵入性的、可信赖的并且不昂贵的方法来检测结肠直肠癌、胃肠 (GI)

道疾病和其它病理状态。

结肠细胞是信息标志分子的一个重要来源，可提供受实验者胃肠道刚刚完成的代谢史景象。另外，这种细胞代表取自统计学大样本框的细胞群体，以非侵入性方式反映全长结肠上的结肠粘膜的状态，与使用涉及内窥镜检查的侵入性方法通过结肠活检的有限取样形成对照。

结肠细胞经历某种变化或转化，携带指示结肠病理学包括癌前和癌的状况的某种生物或化学标志。因此，结肠细胞可以作为胃肠道中肿瘤过程发作和其它病理生理变化的有价值的早期指标。基因和表面蛋白的微妙变化是这种肿瘤标记的实例。特别是 Ki67、肿瘤表面糖蛋白 CD4 和肿瘤相关抗原 19-9 以及外源凝集素结合都是胃肠道中肿瘤转化的特异生物标志。因为快速分裂的细胞中含有较多的 DNA，所以分离的结肠细胞中的 DNA 数量与肿瘤的存在也有着密切的相关性。众所周知，结肠腺瘤息肉和癌的形成是一个涉及癌基因 (ki-ras) 激活、肿瘤抑制基因 (p53 和 APC) 失活、以及 DNA 错配修复基因变更的多步骤过程。

迄今，在本发明所属的领域中通常认为，一旦结肠细胞脱落到粪便中，它们就会受到损害，其原因是它们一暴露到大气中细胞就开始破裂。粪便中的酶、粘液和细菌参与破坏结肠细胞的过程。例如，在美国专利 #5, 094, 956、#5, 380, 647 和 #5, 455, 160 中已经描述将新鲜收集的粪便样品冷冻到 -20℃ 以下的温度，只是为保存化学成分，而没有考虑到细胞组分。因此，这些操作不保持细胞的完整性，不适于分离完整存活的、无其它杂质的细胞。

Dutta 和 Nair (肠胃病学 (Gastroenterology), 114: 1333-1335, 1998) 提及 Albaugh 等人 (Int. J. Cancer, 52: 347-350, 1992) 和 Iyengar 等人 (FASEB J. 5: 2856-2859, 1991) 曾成功分离到存活的结肠细胞。Albaugh 等人基于 Iyengar 等人的早期工作描述了一种运送介质和方法从粪便样品中获得结肠细胞。但是，现有技术的运送介质与本发明的运送介质不同，Albaugh 等人的介质差不多是由盐溶液组成的，其中除无脂肪酸的 BSA 之外，还添加了抗生素。换句话说，现有技术中的运送介质至少缺少一种标准，即不含有粘液分解剂，而依照本发明，对于运送介质的配制

它是绝对必需的。

此外，在 Albaugh 等人的系统中，收集后的粪便样品在运送到实验室进行进一步研究时必须在冰中冷却，并且在冰中只能保存大约 1 小时。相反，本发明的系统不要求在冰中冷却，可在正常环境温度下完成所希望的结果，这是本发明的一个重要特征。而且，Albaugh 等人声称尽管他们的细胞存活率超过 80%，但不能排除吞噬细胞和其它细胞的存在。确实，Iyengar 等人的图 3 和 4 中清楚地显示所得到的细胞制备物是相当不纯的。因此，Iyengar 等人和 Albaugh 等人的方法可以提供存活的结肠细胞，但对于获得基本纯的结肠细胞这一目的，它们是不能胜任的。总之，到目前为止，还没有可能从少量的粪便物中，在正常的环境温度条件下，分离得到存活的、生物学上基本纯的特定细胞类型的样品。

发明概述

因此，本发明的一个目的是提供在正常环境温度下分离的存活的、生物学上基本纯的、脱落的粪便结肠细胞。

本发明的另一个目的是提供存活的、分离的免疫粪便细胞。

本发明的另一个目的是提供存活的、分离的淋巴或非淋巴谱系的炎症细胞。

本发明的另一个目的是提供用于在正常环境温度下分离存活的脱落粪便结肠细胞的运送介质和分散或悬浮介质。

本发明的另一个目的是提供一种依照本发明的讲授，利用在正常环境温度下分离的脱落粪便结肠细胞来检测胃肠道紊乱（包括结肠直肠癌）的非侵入性方法。

本发明的多种其它目的和优势将从发明详述或附图简述中得到明确。

附图简述

参考附图将能更好地理解前述的和其它的目的、方面和优势，其中：

图 1 是在正常环境温度下从少量粪便材料样品分离存活的脱落结肠

细胞的方法示意图;

图 2 是依照本发明所分离结肠细胞经流式细胞仪分析的直方图资料,显示纯度超过 96%;

图 3 是根据免疫球蛋白特征确定的结肠细胞类别的示意图。

发明详述

本发明的多种目的和优势是通过在正常大气条件和环境温度下从粪便样品中分离得到活的、均一的期望细胞类型的结肠细胞而得以实现的。

应当理解,除非另外定义,此处所使用的技术以及科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的含义相同。尽管与此处所描述的那些相似或等同的任何方法和材料都可用于本发明的实施和试验,但优选此处所描述的方法与材料。除非另外提及,此处使用的或考虑到的技术都是本领域普通技术人员熟知的标准方法。材料、方法和举例仅是示例性的并且没有限制性。

此处使用的术语“基本上纯的”意味着本产品是均质或均一的一种类型,经流式细胞术或此处所描述的程序测定,其纯度大于 96%,通常是 98%-99%的纯度,并且没有物质干扰或其它类型细胞的污染。

迄今,粪便材料中脱落的结肠细胞所遇的问题是那些细胞一旦暴露到正常的大气条件下,由于粪便材料中蛋白水解酶、微生物系统、粘液等的存在,就会遭到破坏。因此,必须设计一个系统来抑制所有那些阻碍在正常环境温度下从粪便材料中分离完整、存活结肠细胞的因素或要素的作用。这将通过本发明配制的两种不同介质得以实现:(1)运送介质,和(2)分散或悬浮介质。运送介质是由生理盐水溶液组成,其中含有致酶失活量的捕酶剂或蛋白酶螯合剂(protease sequestering agent)、足量的抑制细菌活性的杀菌剂或制菌剂,以及溶解粘液量的破坏粪便材料中粘液的试剂。

本领域的普通技术人员可建议多种捕酶剂、制菌剂和粘液溶解剂,依照本发明的讲授,任何不干扰本发明目的的适当试剂都可用于配制运送介质。

在捕酶剂中优选蛋白水解活性抑制剂以及动物蛋白。适当的蛋白水解活性抑制剂的实例包括 PMSF、胃蛋白酶抑制剂 A、苯丁抑制素、胰凝乳蛋白酶抑制剂。抑制或钝化酶活性的试剂包括甲醛、金属螯合剂、重金属离子、某些氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸）以及高浓度的锌或无机磷酸盐。适当的动物蛋白是那些非免疫性的水溶性化合物，包括兔（RSA）、山羊（GSA）、绵羊（SHA）、马（ESA）、牛（BSA）、以及人（HSA）来源的血清白蛋白。不干扰随后实验程序的某些多聚氨基酸也可用作酶的钝化剂。这样的多聚氨基酸的适当实例有多聚 L-赖氨酸、多聚 L-脯氨酸、多聚 L-酪氨酸等。捕酶剂的其它优选例子有血浆蛋白质、凝胶形成聚合物和合成树脂。优选的血浆蛋白质是牛血清白蛋白、卵白蛋白或人血清白蛋白。

制菌剂的适当实例有叠氮化钠、苯甲酸钠、抗生素（例如青霉素、链霉素、两性霉素 B、庆大霉素、多粘菌素 B 等）、甘草酸、甘草次酸（ α 和 β ）、其适当的衍生物等。优选的杀菌剂是硫柳汞（Sigma 化学公司），优选的制菌剂是甘草酸。

粘液溶解剂的适当实例有愈创木酚甘油醚、愈创木酚、碘化钾、N-乙酰半胱氨酸、 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇、辣椒碱、甘草酸等。优选的粘液溶解剂为愈创木酚甘油醚（Sigma 化学公司）。

优选的生理盐水溶液来源是 Puck's 盐水 G。

优选的运送介质按照如下配制：

Puck's 盐水 G	500 毫升
碳酸氢钠	350-500 毫克
BSA	2.5-15gms
愈创木酚甘油醚	2.5-5 gms
甘草酸	2-4 gms

分散或悬浮介质与运送介质不同在于杀菌剂/制菌剂（如甘草酸），在配制分散或悬浮介质时，不加入该杀菌剂/制菌剂。

正常环境温度下分离基本纯的结肠细胞的程序：

现在参考图 1，将少量粪便样品 10（大约 0.5-1.0gm）放入含有运

送介质和少量玻璃珠 12 的试管 11 中，接着用塞子将试管密封。然后将粪便样品 10 在介质 12 中充分分散，例如，通过旋转振荡，接着将试管 11 中的内容物用网筛（大约 300 微米孔径）过滤到一支新的试管 13（50 毫升聚丙烯或类似的圆锥形离心管）中，并用一种比重（density）大约为 1.033 到大约 1.25 的重介质 14 铺底，在台式离心机中，制动关闭的状态下， $200 \times g$ 离心大约 10 分钟。

结肠细胞积聚在重基质中，形成沉淀位于试管底部，取出重介质 14 与上面较轻的悬浮液 18 之间界面的一层较轻细胞（次要成分）17 后，用塑料移液管 15 吸出回收结肠细胞。将从重介质和沉淀中回收的细胞放入一支新的 50 毫升离心管 19 中，用大约 40 毫升的悬浮介质 20 稀释。然后将这样得到的细胞悬浮液在大约 $900 \times g$ 下离心约 10 分钟，丢弃澄清的上清液，将离心管底部的细胞沉淀 21 重新悬浮在含有 1% 牛血清白蛋白（BSA）的磷酸盐缓冲盐水中。将那层较轻细胞（次要成分）17 放入另一支新的 50 毫升离心管 22 中，如对从重基质和沉淀得到细胞所描述的那样洗涤。回收含有基本生物学纯的、分离的、脱落的存活结肠细胞的细胞沉淀 21，在适当的盐溶液（例如 PBS）中分散，并通过 45 微米网筛过滤器过滤。

为测定所分离结肠细胞的生活力，将一部分沉淀 21 分散在 PBS/BSA 介质 26（1ml/gm 粪便样品）中。然后，使用锥虫蓝，将 1/10 稀释的悬浮液在血细胞计数器下记数。本领域技术人员众所周知，不摄取锥虫蓝的细胞被认为是存活的并被记数来测定细胞产量。

试管和小瓶可用任何适当的材料包括塑料、聚苯乙烯、聚丙烯等来制造。

指出本发明创造性的方面是配制运送介质和分散或悬浮介质十分重要，它们联合使用可以于正常环境温度下在分离过程中或分离后保持粪便样品中脱落结肠细胞的存活状态。换句话说，本发明可以在整个分离程序中，不经过冷藏或冷冻，在约 22°C 至约 25°C 的正常环境温度下，从粪便材料的少量样品（例如，0.5-1.0gm）中分离完整的、活的脱落结肠细胞。依照本发明的技术，从一克粪便样品中可得到大约 8,000,000 至

10,000,000 个活的结肠细胞。

将分离的结肠细胞保存在本发明的悬浮介质中，在正常的环境温度下，可保持延长时期的存活状态。表 1 显示了产量和存活力对保存时间与温度条件的函数。

当然，在分离程序中可以替换为不同的技术。例如，粪便样品在运送介质 12 中的悬浮液可以通过筛子（149 微米、105 微米和 52 微米）过滤。另外，分散介质中的沉淀可以轻轻地覆盖在较高比重的 Percoll 梯度上，离心，这样可从梯度顶层中回收细胞。这样的修饰在本领域中十分普遍，属于本发明的范围。

当然可以理解，适当的任何时候都可使用来自无病受实验者的结肠细胞建立一种参考或基线，以使用来自怀疑有疾病或病理状态的受实验者的结肠细胞进行比较、诊断或评估研究。

已经发现，本发明非侵入性获得的结肠细胞的一个重要和有利特征是，这些分离的结肠细胞携带胃肠道病理学的标志或转化特征，因此，它们可用作胃肠道病理学的诊断和预测指标。

免疫粪便细胞 (IMMUNOCOPROCYTES)

因为发现从粪便中分离的结肠细胞真实地代表整个结肠解剖学和病理生理学状况，这些细胞还可用于监测粘膜免疫等其它用途中。胃肠道的粘膜是免疫球蛋白介导的免疫学防御确立的主要位点。已经发现从通过本发明方法学得到的脱落细胞中，可鉴定与分离一种功能特殊的细胞群，此处称为免疫粪便细胞。免疫粪便细胞独特之处是表达一种特异的、此处称为 IgC 的免疫球蛋白，认为它是一种能被 IgG 和 IgA 的抗体所识别的嵌合免疫球蛋白。此外，免疫粪便细胞是无性系的、抗原特异的，其特征存在于存在 Fc 受体与免疫球蛋白 A (IgA)。

由于免疫粪便细胞与 IgG 和 IgA 的抗体具有亲和力，本领域的普通技术人员将可以提出多种分离免疫粪便细胞的方法。例如，使用抗 IgG 或特异的抗 IgC 的单克隆抗体可以成功地从来自粪便、结肠清洗物 (purges) 或冲出物的细胞混合物，或从外科的和尸体解剖样品中选择

性分离免疫粪便细胞。间接的免疫粘着方法是利用淘洗技术，使得这些细胞粘着在抗 IgG 或特异的抗 IgC 抗体包被的培养皿上。抗 IgG 抗体用作免疫粪便细胞的捕获剂是根据本发明的如下发现：在正常条件下，不能检测到纯的表达单特异性 IgG 的（即没有 IgA 的共表达）结肠细胞。期望类型的单克隆抗体的制备是本领域的技术人员所熟知的，可常规获得。

另一种获得基本纯的免疫粪便细胞的方法是使用荧光染料结合的抗 IgG 或抗 IgC，利用荧光激活细胞分选术（FACS）。在一个实施方案中，将结肠细胞与 FITC（异硫氰酸荧光素）标记的 IgG 孵育，冲掉过量的试剂，在荧光激活细胞分选仪中分选荧光标记的免疫粪便细胞。

在另一个实施方案中，IgG 和 IgC 的单克隆抗体共价或非共价连接到固体基质上，例如，技术人员所熟知的琼脂糖珠、玻璃珠、聚苯乙烯珠、中空纤维、磁珠、塑料组织培养皿等。通过机械的、磁性的或其它任何适当的方法，简便地将基质和悬浮液分开，使结合到抗体包被的支持物上的细胞从细胞悬液中得到分离。正如本领域任何技术人员所熟知的，免疫粪便细胞还可结合到通过接头包括了抗 IgG 或抗 IgC 的组织培养瓶表面上，将结肠细胞悬液在培养瓶中孵育后，轻轻地倒出未结合的非免疫粪便细胞。然后通过刮取或适当酶学断裂接头，回收结合的免疫粪便细胞。连接到珠基质（如 Sepharose）上的接头在商业上可获得（如 Pharmacia）。

使用双色免疫荧光流式细胞术测定免疫粪便细胞的数量或种群。将结肠细胞与抗 IgG FITC（绿色荧光）和抗 IgA PE（藻红蛋白，红色荧光）一同孵育。用缓冲液冲洗细胞除去过量的抗体后，将细胞在流式细胞仪中分析，来记数具有单种荧光（绿色或红色）的细胞和那些具有双重荧光（绿色和红色）的细胞。具有双重荧光的细胞是嵌合 IgC 免疫粪便细胞，而具有红色荧光的细胞是分泌 IgA 的结肠上皮细胞。在大多数来自正常受实验者的结肠制备物中，没有可测量数目的仅仅识别抗 IgG FITC 的细胞。换句话说，只具有 IgG 的结肠细胞是罕见的，它们的存在可能与异常的粘膜或系统免疫机能障碍有关。

通过流式细胞术对免疫荧光标记细胞的分析揭示，至少存在三种结

肠细胞。为了区别免疫粪便细胞的 Fc 受体与其它的 Fc 受体, 此处将免疫粪便细胞 Fc 受体命名为 CFc 受体。表 2 显示这些细胞中 IgC、CFc 和 IgA 的一些具有代表性的正常分布。与正常值的偏离将显示涉及免疫系统的疾病过程。图 3 是通常检测到的至少三种结肠细胞的示意图: “A” 表示具有多个独特的嵌合免疫球蛋白 IgC (用在每个分子 2 上有两个抗体结合位点来代表) 及多个 CFc 受体 3 的免疫粪便细胞。“B” 表示与“A” 类似的结肠细胞, 但是具有多个 IgA 免疫球蛋白分子 5 及多个 CFc 受体 3。“C” 表示与“A” 和“B” 类似的结肠细胞, 但没有免疫球蛋白而只有 CFc 受体。

以上所描述的免疫粪便细胞、携带 IgA 的结肠细胞与携带 CFc 受体的结肠细胞在胃肠道的免疫监视和维持整个生物体的系统体液免疫中起着不同的作用。这些细胞执行重要的功能: (i) 维持结肠微生物区系建群的平衡; (ii) 它们是无性系的并包含一群多潜能细胞, 每一种都可识别饮食或生物学来源的可溶的或微粒的单一抗原; (iii) 它们可以作为与肠有关的淋巴组织的抗原呈递细胞; (iv) 它们可以是检测病原体(例如, 轮状病毒、志贺菌、脊髓灰质炎、肠道寄生虫、分支杆菌等) 侵入的标志; 以及 (v) 缺乏它们则可能预示医源性免疫无反应性或先天的免疫球蛋白缺乏的状态。因为这些结肠细胞(包括免疫粪便细胞) 是抗原特异的, 它们可以通过用致癌物、癌基因 DNA、EBV、SV-40 等转化而永生, 并且通过本领域技术人员所熟知的杂交瘤技术产生对所选抗原特异的抗体分泌细胞系。

以下的实施例将阐明本发明所鉴别或分离的结肠细胞的具体用途。这些实施例仅仅是例证性的并且不以任何方式限制本发明。

实施例-1

通过本发明所描述的程序从正常受实验者分离的结肠细胞基本上无任何炎症细胞。在炎症性肠道疾病 (IBD), 例如溃疡性结肠炎和局限性回肠炎中, 大量的炎症细胞都调动到结肠粘膜的表面并随上皮细胞一同脱落。

将来自 IBD 患者粪便的 1 至 2 克等分试样悬浮在运送介质中，与大约 150 毫升的悬浮介质在细菌分离器中搅匀。将等分试样（30 毫升）悬浮液用 10 毫升 Histopaque 1077（比重为 1.077）铺底，在制动关闭的状态下， $200 \times g$ 室温下离心 30 分钟。回收水性悬浮液与 Histopaque 1077 之间的界面，重复离心洗涤 3 次。经此过程，除正常全部结肠细胞以外还回收了炎症细胞。

将混合细胞中的炎症细胞用抗-CD45/FITC（绿色荧光）标记，阳性细胞在流式细胞仪中记数。又称为白细胞共同抗原的 CD45（分化簇）是淋巴样细胞谱系特异的标志，存在于炎症细胞上。另外还有一个炎症标志，抗-COX-2/PE（红色荧光），也可用来检测炎症细胞。因为结肠上皮细胞对 CD45 呈阴性，分离物中 CD45 阳性细胞的数目是 IBD 中炎症过程严重性的直接估量。监测 CD45 和 COX-2 均呈阳性的细胞对跟踪治疗过程中疾病的发展是一种极其有用的非侵入性方法。

实施例-2

粘膜免疫状况的评定：

如上所述，从怀疑有无免疫应答消化道的受实验者获得细胞。将细胞的等分试样（大约 110K）悬浮在 PBS 缓冲液中，与下面一种荧光标记抗体组合于 37°C 孵育 45 分钟：抗-IgG FITC（绿色）、抗-IgA PE（红色）、和抗-IgC FITC+抗 IgA PE。还提供一个含有携带同型对照抗体的细胞的平行管来测定非特异的抗体结合。进行直接的免疫荧光测定来测量抗体与不同组结肠细胞的结合。免疫粪便细胞（表达 IgC）或携带 IgA 的细胞数目的显著减少对免疫缺陷具有诊断意义。表 2 列出了来自正常受实验者的数值。任何偏离正常数值都将指示着免疫机能障碍。应当指出，可类似地进行直接和间接免疫荧光测定评定例如细胞因子、信号转导中间体、生长因子等高分子的所有组成成分（repertoire）。

实施例-3

结肠癌相关生物标志的表达：

如上所述从怀疑有结肠癌或结肠癌前体（息肉）的患者获得细胞。在这种技术的一个实施方案中，经过间接免疫荧光实验测定 CD44 或它的分子变体例如 CD44V3、CD44V6 和 CD44V10 的表达；CD44 或它的分子变体的存在将被诊断为结肠癌。

实施例-4

作为可非侵入性得到的体细胞的来源，本发明结肠细胞的表型和基因型都是典型的。因此，它们在 DNA 分型和检测生物高分子（例如 DNA、RNA、蛋白质等）对例如药理学因素及环境因素的反应以及多重耐药性的评定是有用的。这些分离的细胞也可用于本领域技术人员容易提出的其它多种方法中。

显而易见，鉴于此处所提供的指导、图表和实施例，本领域技术人员将会建议多种本发明的修改实施方案、修饰或操作，这些将包括在此申请的精神和范围以及附加的权利要求的范围之内。

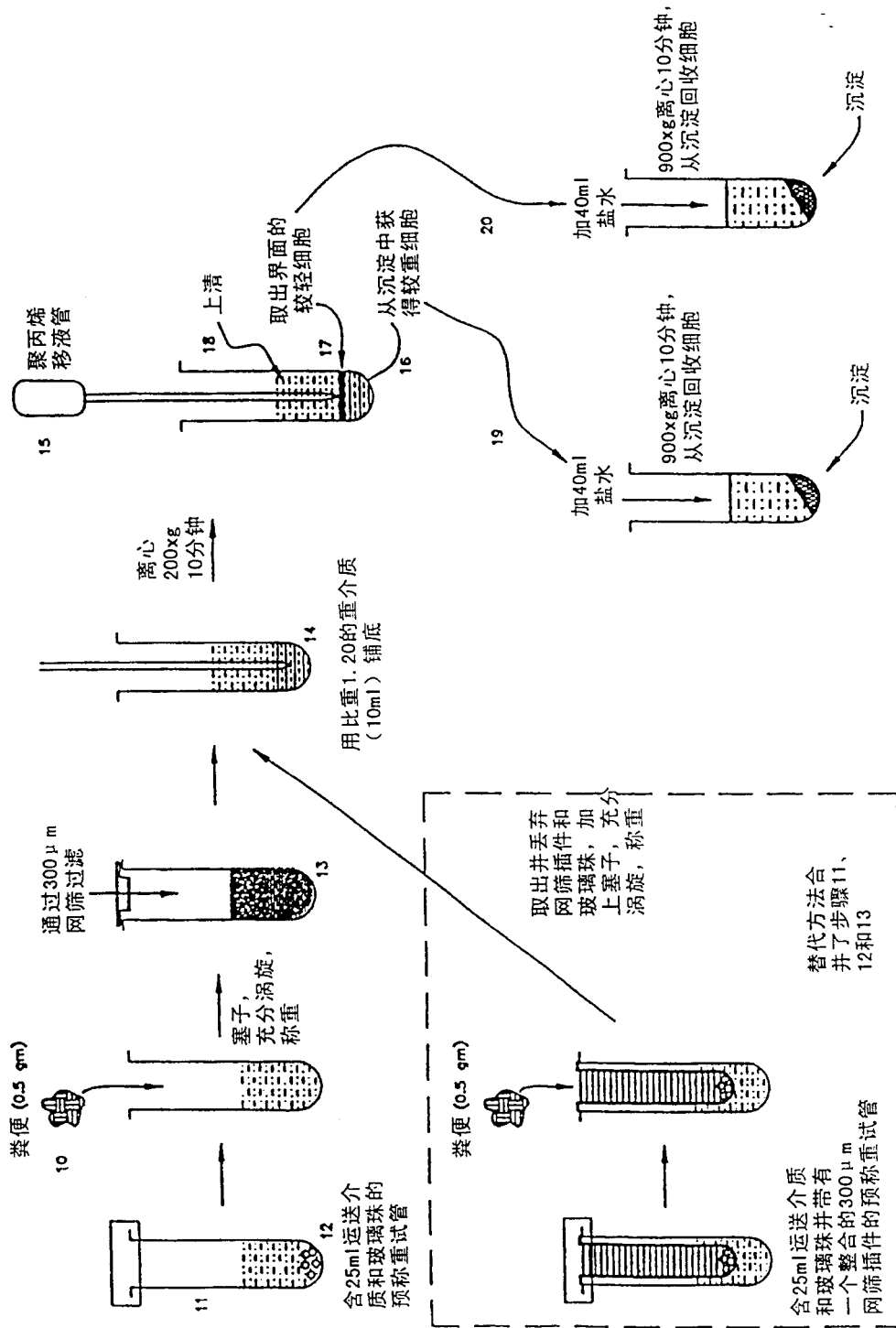
表 1 贮存对细胞产量的影响

贮存时间	条件	细胞产量%	存活力%
1-6 小时	室温	100	85+
3 天	室温	135	85+
3 天	4℃	70.2	85+
8 天	室温	97.5	80+
8 天	4℃	142	75+

表 2 携带 IgC、IgA 和 CFc 的结肠细胞的分布

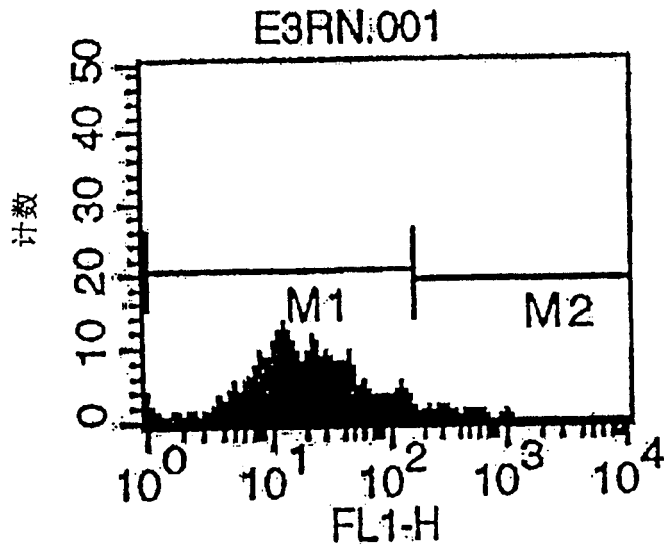
受实验者编码	IgC	CFc 受体	IgA
308-S1	18.5	90.3	46.5
308-S2	20.8	87.8	42.0
318-S1	12.2	86.9	47.7
318-S2	26.5	91.2	37.7
319-S1	27.5	88.9	44.0
319-S2	32.9	90.9	30.0
325-S1	20.2	88.9	40.0
325-S2	16.8	82.2	24.0

注释：数字表示携带相应分子的细胞占总细胞的百分数（%）。这些结果是采用流式细胞术分析通过本申请中所描述的技术分离的、免疫荧光标记的结肠细胞而得到的。



分离基本上纯的存活结肠细胞的步骤图解。

图1



直方图统计表

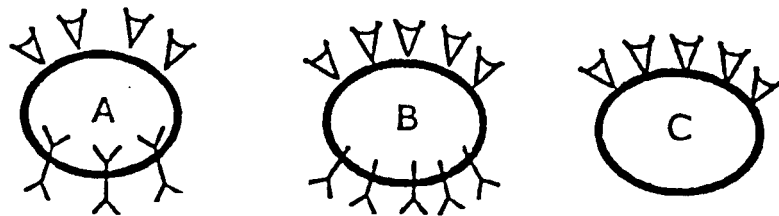
文件: E3RN.001
 样品ID: 结肠细胞
 管:
 采集时间: 8-Dec-98
 闸门事件: 1489
 X参数: FL1-H(Log)

Log数据单位: 线性值
 患者ID:
 组:
 闸门: G3
 总事件: 10000

标记	左, 右	事件	%闸门	%总计	均值	几何平均数	CV	中值	峰 Ch
全部	1, 9910	1489	100.00	14.69	36.30	20.00	179.56	18.11	11
M1	1, 165	1418	96.53	14.18	28.09	18.15	97.70	17.00	11
M2	165, 9910	52	3.54	0.52	317.36	293.10	45.83	278.81	198

根据本发明程序分离的结肠细胞的流式细胞仪分析直方图数据, 显示纯度为 96.5%。横坐标上的数值代表细胞的大小分布。纵坐标上的数值代表细胞计数。M₁代表流式细胞仪检测的单个峰, M₂指示残余杂质。

图2



图例: Y IgG Y IgA ∇ CFC

根据免疫球蛋白的特征确定的免疫粪便细胞类别的示意图。
A: 共表达嵌合IgG和 CFC受体的免疫粪便细胞。B: 共表达IgA和CFC受体的免疫粪便细胞。C: 仅表达CFC受体的免疫粪便细胞。

图3

专利名称(译)	结肠直肠癌和其它胃肠病理学的非侵入性检测		
公开(公告)号	CN1250719C	公开(公告)日	2006-04-12
申请号	CN00807024.5	申请日	2000-04-04
[标]发明人	帕德马纳班P奈尔		
发明人	帕德马纳班·P·奈尔		
IPC分类号	C12N15/00 C12N5/00 C12N5/02 G01N33/53 A61B10/00 C07K16/00 C07K16/40 C12N1/04 C12N5/071 C12N5/09 C12N15/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/68		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	09/292358 1999-04-15 US 09/539080 2000-03-30 US		
其他公开文献	CN1349559A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了一种在正常环境温度下分离存活的、生物学上基本纯的、脱落的粪便结肠细胞的方法。阐述了指示某种胃肠道状况的免疫粪便细胞和炎症细胞以及检测结肠直肠癌的一种非侵入性方法。详述了用于分离结肠细胞的运送和悬浮介质的组成。

