

# 粪便中大肠脱落细胞提取方法的探讨

范如英<sup>1</sup>,李世荣<sup>1</sup>,吴霞<sup>2</sup>,武子涛<sup>1</sup>,晨智敏<sup>1</sup>

**摘要:**目的 探讨粪便中脱落细胞提取方法,进一步了解粪便脱落细胞对大肠癌诊断的意义。方法 以 31 例均经病理证实为大肠腺癌的患者为研究对象。分别采取免疫磁珠法及改良的淘洗法提取粪便中的脱落细胞。结果 改良的淘洗法与免疫磁珠法对大肠癌的阳性检出率存在差异显著性( $P < 0.01$ )。结论 改良后的粪便中脱落细胞提取方法操作简便、费用低,易于推广应用。对大肠癌的诊断具有积极意义。

**关键词:**结直肠肿瘤;粪便;脱落细胞

中图分类号:R446.13,R735.3<sup>+</sup>4 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2002)06-0477-02

## Extraction of colorectal exfoliated cells in stool

FAN Ru-ying, LI Shi-rong, WU Xia, et al

Department of gastroenterology general hospital of Beijing army region, Beijing 100700, China

**Abstract: Objective** To improve the approaches of isolating exfoliated cells from faeces, further to analyze the role of exfoliated cells in diagnosis of colorectal cancer. **Methods** Thirty-one patients with colorectal cancer were entered in our study. Exfoliated cells in the stool of patients were isolated by both methods of elutriation and immunomagnetic beads (IMB). The method of IMB was performed according to Loktionov's method and elutriation means was Iyengar's method with slight modification. **Results** The exfoliated cytology sensitivity for colorectal cancer by elutriation was significantly higher than that by IMB ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The improved method of isolation of exfoliated cells from stool has advantages of easy operation and low cost, so it is applied to be widespread. Detection of exfoliated cells in stool plays an important role in diagnosis of colorectal cancer.

**Keywords:** Colorectal neoplasm; Faeces; Exfoliated cell

大肠上皮细胞更新快,每天有近  $10^{10}$  正常上皮细胞脱落入肠腔随粪便排出体外<sup>[1]</sup>,因而粪便提供了丰富的细胞来源。近年人们尝试检测粪便脱落细胞以助大肠癌的早期诊断,但文献中介绍的脱落细胞提取方法繁琐,不利于临床应用。为此我们在粪便细胞采集技术方面进行了探索研究。

### 1 材料和方法

1.1 病例资料 31 例大肠癌患者为北京军区总医院 1999 年 9 月~2001 年 1 月住院患者,均经病理证实为腺癌,男 15 例,女 16 例。年龄分布 36~90 岁。

#### 1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集大肠癌患者新鲜粪便标本,立即进行脱落细胞的提取。

1.2.2 粪便中脱落细胞的提取方法 (1)免疫磁珠法参考 Loktionov<sup>[2]</sup> 创建的方法进行。(2)淘洗法:参考 Iyengar<sup>[3]</sup> 等法并加以改进:采集新鲜成形粪便 3~5g 或水样便 50~100ml;加入 100ml MEM 细

胞营养液,营养液中另含 PN500u/L, SM500mg/L, 庆大霉素 50mg/L, 二性霉素 B1.25mg/L, BSA10g/L, N-乙酰半胱氨酸 5mmol/L; 搅拌混合;经孔径 600 $\mu$ m 筛网过滤,滤液中加入过饱和量的硼酸以溶解粪便中的粘液,依次经孔径 150 $\mu$ m 和 76 $\mu$ m 筛网过滤;离心弃上清,0.9% 的生理盐水重悬沉淀,加入适量 95% 的乙醇,经孔径 50 $\mu$ m 筛网过滤;离心后取沉淀涂片。涂片经乙醇固定,常规 HE 染色,光镜下观察。

1.2.3 结果判断 根据脱落细胞异型程度分为轻度、中度、重度核异质或异型增生细胞、可疑癌、癌。涂片中找到中重度核异质、可疑癌或癌即判断为异型细胞阳性。

1.2.4 统计学处理 采用<sup>2</sup>检验。

### 2 结果

脱落细胞涂片经 HE 染色后由一位资深的细胞病理学医生协助阅片。检测结果为:31 例大肠癌患者的粪便中,淘洗法检出癌 21 例,可疑癌 3 例,异型增生 2 例,阴性 5 例,共检出异型细胞 26 例。免疫磁珠法检出癌 9 例,可疑癌 1 例,异型增生 2 例,阴性

收稿日期:2001-12-20;修回日期:2002-03-13

作者单位:1.100700 北京军区总医院消化内科,2. 病理科

19 例,共检出异型细胞 12 例,见表 1。

表 1 免疫磁珠法及淘洗法提取粪便中脱落细胞结果比较

方法	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)
淘洗法	26	5	83.87
免疫磁珠法	12	19	38.71 *

\*与免疫磁珠法比较,  $\chi^2=13.07$ ,  $P<0.01$

脱落入粪便的大肠癌细胞存在不同程度的退变,表现为胞浆崩解呈现裸核,胞浆或核内出现空泡等改变,但不影响癌细胞形态学观察。脱落的癌细胞特征为:癌细胞可以单个脱落,但大多以细胞团形式脱落。癌细胞体积大,核浆比例失调,核大浓染,染色质呈斑块状分布不均,有的癌细胞含有多个核,有的癌细胞胞浆内含有粘液空泡,将核挤向一侧。同一群癌细胞大小不等,形态不一等特征。异型增生细胞表现为:细胞体积比正常细胞增大,染色质增粗,呈颗粒状,核深染,表现出一定的异型性,但异型程度不及癌细胞。免疫磁珠法提取的细胞涂片,杂质少,背景清晰,细胞周围有磁珠环绕,免疫磁珠不仅可和大肠腺癌细胞结合,也可与正常柱状上皮及鳞状上皮结合,见图 1~4。

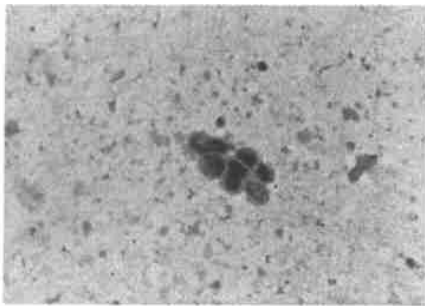


图 1 一群癌细胞,核浆比例失调,核深染,核大小不等,形态不一(HE10 ×40)

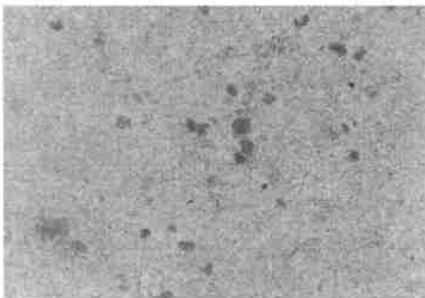


图 2 三个中、重度异型增生细胞(HE10 ×40)

### 3 讨论

大肠脱落细胞的检测起始于五十年代<sup>[4]</sup>,以灌肠的方法获取脱落细胞。Rosman<sup>[5]</sup>应用提取清肠液中的脱落细胞,结果表明脱落细胞对大肠癌检出的敏感性达 93%,特异性为 100%。清肠方法不足之处在于需采集腹泻液,年老体弱者难以耐受频繁的腹泻,因而受试者的依从性较差。近年人们探讨直接从自然排便中提取脱落细胞的方法,目前国外粪便中脱落

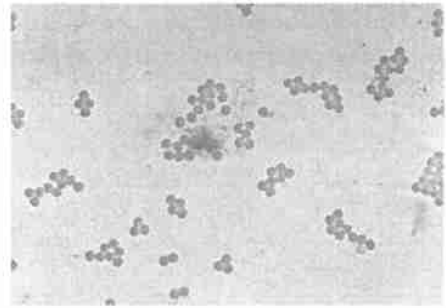


图 3 免疫磁珠结合的脱落癌细胞(HE10 ×40)

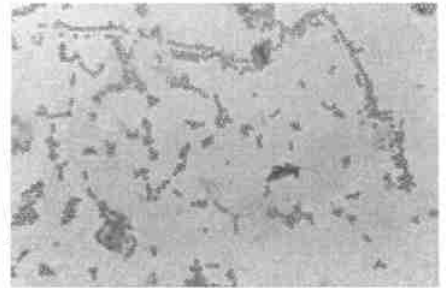


图 4 免疫磁珠结合的脱落柱状上皮(右上)鳞状上皮(左下)(HE10 ×40)

细胞的提取方法有离心淘洗法<sup>[6]</sup>、密度梯度离心法<sup>[7]</sup>及免疫磁珠(IMB)法。IMB 是指单克隆抗体通过共价键方式与磁珠相结合,经抗原抗体反应使靶细胞与磁珠结合,结合在磁珠上的靶细胞就会被磁场吸附而达到与其它物质分开的目的。Ber-Ep4 为由人乳腺癌细胞株 MCF-7 免疫小鼠,利用杂交瘤技术制备的单抗。研究表明<sup>[8]</sup> Ber-Ep4 抗原为位于细胞膜表面的两种糖多肽,分子量分别 34000 和 39000。它广泛分布于正常上皮细胞及起源于上皮的肿瘤细胞,将大肠癌上皮膜抗原的 Ber-Ep4 单抗包被在磁珠上,结合磁珠的 Ber-Ep4 单抗与大肠癌细胞膜表面的抗原结合即可达到富集大肠癌细胞的目的。Loktionov 等<sup>[2]</sup>应用免疫磁珠法成功提取自然排便中的脱落细胞。我们应用 Ber-Ep4 包被的免疫磁珠参照 LoktionovA 创立的方法提取粪便中脱落细胞,提取的细胞经 HE 染色后光镜下观察可见涂片背景清晰,杂质少。细胞周围有免疫磁珠环绕,是由于细胞膜上的抗原与包被在磁珠上的抗体结合的结果。研究中还发现免疫磁珠除了能与结直肠柱状上皮及腺癌细胞结合外,还可与粪便中来自肛门附近的鳞状上皮相结合,该实验结果说明 Ber-Ep4 的抗原同时存在于柱状上皮及鳞状上皮,与 Latza<sup>[8]</sup>研究结果相一致。31 例大肠癌患者中异型细胞阳性检出率为 38.71%,远低于我们建立的淘洗法的异型细胞 83.87% 的阳性检出率( $P<0.01$ )。分析免疫磁珠法阳性检出率低的原因如下:1.脱落的细胞发生退变,胞浆崩解,癌细胞

(下转第 481 页)

同,如无其他器官转移,则可行相应的根治性手术,术后补充放疗或化疗,治疗效果也相当,本组乳腺癌、黑色素瘤的治疗效果与文献报道相近<sup>[3,4]</sup>。肺癌出现腋窝淋巴结转移则属晚期,一般不适于手术,预后差,但本组 1 例因原发灶小且无其他器官转移,行肺叶切除加腋窝转移瘤切除,获得 2 年以上生存。甲状腺癌腋窝转移少见,作甲癌根治再加患侧腋窝清扫也能获得较好的近期效果,本组 1 例甲状腺乳头状癌术后生存了 4 年。其他转移癌以化疗为主,但预后差,生存均不超过 1 年。对于腋窝 CUPS 我们以化疗为主,分化型癌预后较好。

参考文献:

[1] Blum A, Schla genhauff B, Stroebel W, et al. Ultrasound examination of regional lymph nodes significantly improves early detection of locoregional metastases during the follow-up of patients with cutaneous melanoma: results of a prospective study of 1288 patients [J]. *Cancer*, 2000, 88 (11): 2534-2539.

[2] 张天泽, 徐光炜. 肿瘤学 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1996, 2500.

[3] Haskell C, Cochran AJ, Barsky SH. Metastasis of unknown origin [J]. *Curr Probl Cancer*, 1988, 12 (1): 5.

[4] Dailey SH, Sataloff RT, Lymphoma: an update on evolving trends in management [J]. *Ear Nose Throat J*, 2001, 80 (3): 164-170.

(李奇明校对)

(上接第 478 页)

以裸核的形式存在。早期退变的裸核在形态上仍然保持了恶性肿瘤细胞的特征,光镜下观察仍有一定的诊断价值。由于与 Ber-Ep4 抗体结合的抗原位于胞膜,因而用免疫磁珠不能与癌细胞核结合,引起漏检导致阳性检出率较低。2. 粪便中的非细胞成分及其粘液可与免疫磁珠发生非特异性的结合,影响脱落细胞的提取。

我们将离心淘洗法、密度梯度离心法及免疫磁珠法进行归纳比较,并在此基础上进行了如下几方面的改进: 1. 在滤液中加入过饱和量的硼酸以溶解粪便中的粘液。2. 在孔径 150 $\mu$ m 筛网过滤前先经孔径 600 $\mu$ m 筛网过滤,去掉较大的粪便颗粒。3. 孔径 50 $\mu$ m 筛网过滤前加固定液可以溶解食物残渣中的脂滴,明显提高涂片背景的清晰度。利用该方法可使异型细胞的阳性率达 83.87% (26/31),而且改良后的方法简化了操作程序,耗材成本低,尤其适用于大肠癌临床诊断及筛查。但淘洗法提取的脱落细胞纯度欠佳,仍含有大量的细菌及食物残渣,虽然不影响光镜下细胞形态学观察,但进一步进行分子生物学检测仍存在一定的困难,因此粪便中脱落细胞的提取方法仍需进一步改进。

参考文献:

[1] Ratto C, Flamini G, Sofio L, et al. Detection of occult neoplastic cells in feces [J]. *Dis Colon Rectum*, 1996, 39 (11): 1238-1244.

[2] Loktionov A, Oneill K, Silvester K, et al. Quantitation of DNA from exfoliated colonic crypts isolated from human stool surface as a novel noninvasive screening test for colorectal cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 1998, 4: 337-342.

[3] Iyengar V, Albaugh G, P., Lohani A, et al. Human stool as a source of viable colonic epithelial cells [J]. *FASEB J*, 1991, 5 (13): 2856-2859.

[4] Bader GM, Panicolaou GN. The application of cytology in the diagnosis of cancer of the rectum, sigmoid and descending colon [J]. *Cancer*, 1951, 5 (2): 307-314.

[5] Rosman AS, Federman Q, Feinman L. Diagnosis of colon cancer by lavage cytology with or without administered balanced electrolyte solution [J]. *Am J Gastroenterol*, 1994, 89 (1): 51-56.

[6] Albaugh G, P., Iyengar V, Lohani A, et al. Recovery and characterization of exfoliated intestinal tract cells from fresh human stool by countercentrifugation [J]. *J Cell Biol*, 1989, 107: 575a.

[7] Harding JE, Kotasek D, Farmer B, et al. Immunobead-PCR: a technique [J]. *J Cancer*, 1992, 52 (3): 347-350.

[8] Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, et al. Ber-Ep4: a new monoclonal antibody which distinguishes epithelial from mesothelial [J]. *J Clin Pathol*, 1990, 43 (2): 213-219.

(李奇明校对)