

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.17.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 17-0006-07

分选卵巢癌腹水中癌细胞的实验研究*

邢宝玲¹, 郭存存¹, 唐正华¹, 董一善², 葛素梅¹

(南京医科大学附属常州市妇幼保健院 1. 病理科, 2. 妇科, 江苏 常州 213003)

摘要: **目的** 探讨免疫荧光细胞化学法 (ICC) 联合荧光原位杂交法 (FISH) 分离卵巢癌腹水中癌细胞的可行性。 **方法** 复制卵巢癌腹水模型, 分阴性对照组和 4 个阳性组 (A、B、C、D 组), 即 4 ml 良性腹腔冲洗液中分别有 0、5、10、20 和 40 个标记线粒体绿色荧光 (Mito-Tracker Green) 的卵巢癌 SKOV3 细胞, 每组样本制备 3 份。复制卵巢癌裸鼠原位移植模型, 分阳性组和阴性对照组, 每组 6 只 BALB/c 裸鼠, 阳性组裸鼠在卵巢接种 SKOV3 细胞, 各组分别在接种后 4、6 和 8 周取 2 只裸鼠收集腹水。采用磁激活细胞分选法富集癌细胞, 用 ICC-FISH 鉴别分离样本中的癌细胞, 以 8 号染色体探针 (CEP8) 信号 >2 个为 FISH 阳性标准, 规定 DAPI+/EBA-1+/Mito-Tracker Green+/CEP8+ 细胞为检测癌细胞。 **结果** 腹水模型: 阴性对照组和阳性组均可见 EBA-1 阳性细胞, 阳性组均有标记的 SKOV3 细胞, 癌细胞的回收率为 20% ~ 50%, 12 个阳性样本中 9 个样本的检测率为 100%。裸鼠模型: 在 200 倍显微镜视野下, 4、6 和 8 周每个视野的 SKOV3 细胞数最多分别为 3、8 和 15 个。 **结论** 将卵巢癌腹水磁富集后, ICC-FISH 可以准确地识别其中的癌细胞, 该方法为研究和治疗卵巢癌提供了新思路。

关键词: 卵巢癌; 腹水; 癌细胞; 免疫细胞化学; 荧光原位杂交

中图分类号: R 737.3

文献标识码: A

Establishment of methodology of sorting tumor cells from ovarian cancer peritoneal fluids*

Bao-ling Xing¹, Cun-cun Guo¹, Zheng-hua Tang¹, Yi-shan Dong², Su-mei Ge¹

(1. Department of Pathology, 2. Department of Gynecology, Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

Abstract: Objective To investigate the viability of the protocol to sort tumor cells from ovarian cancer peritoneal fluids by combining immunocytochemistry (ICC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Methods** The ovarian cancer peritoneal fluid model was established and divided into a negative control group and four positive groups by adding 0, 5, 10, 20 and 40 ovarian cancers SKOV3 cells marked by Mito-Tracker Green into 4 ml benign peritoneal washing fluid respectively, 3 duplications per group. The nude mouse model bearing orthotopically transplanted human ovarian cancer SKOV3 cells was established, including the negative control group and the positive group, with 6 BALB/c nude mice per group and 2 nude mice at each time point. Peritoneal fluids of the nude mice in the positive group were collected at the 4th, 6th and 8th w after transplanting SKOV3 cells under the capsule of the left ovary. SKOV3 cells were enriched from the peritoneal fluids by magnetic activated cell sorting (MACS). Then, the cancer cells were identified exactly by EBA-1-ICC and CEP8-FISH (Chromosome Enumeration Probe). The cells with the characteristic of DAPI+/EBA-1+/Mito-Tracker Green+/CEP8+ were classified as detected

收稿日期: 2016-12-01

* 基金项目: 江苏省常州市科技计划项目 (No: CJ20159040)

cancer cells by the positive standard of CEP8 >2. **Results** In the peritoneal fluid model, the EBA-1-positive cells were found in the negative control group and all SKOV3 cell-positive groups, the marked SKOV3 cells were found in all SKOV3 cell-positive groups and their recovery rates were 20%-50%, the detection rates in 9 of 12 SKOV3 cell-positive samples were 100%. In the nude mouse model, under every 20×10 microscopic field, the maximum number of SKOV3 cancer cells was 3, 8 and 15 respectively at the 4th, 6th and 8th w. **Conclusions** The protocol of combining ICC and FISH can exactly identify cancer cells from ovarian cancer peritoneal fluids which have been enriched by MACS. The technique provides new ideas for studying ovarian cancers.

Keywords: ovarian cancer; ascites; cancer cell; immunocytochemistry; fluorescence *in situ* hybridization

卵巢癌是死亡率最高的妇科肿瘤, >75% 卵巢癌发现时已是进展期, 腹腔液中是否有癌细胞对判断卵巢癌分期、制定治疗方案及监测复发有重要价值^[1-2]。目前, 检测腹水中恶性细胞主要依靠光镜下的细胞识别和免疫细胞化学技术, 当细胞量少时, 易出现漏诊或过诊断, 而且不能分离癌细胞, 以检测生物学特性^[3]。本研究采用磁激活细胞分选法 (magnetic activated cell sorting, MACS) 富集腹水中的卵巢癌细胞, 用免疫荧光细胞化学法 (Immunocytochemistry, ICC) 联合荧光原位杂交法 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 识别癌细胞, 旨在探讨新方法对精准分离恶性腹水中癌细胞的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司), RPMI 1640 (美国 Hyclone 公司), CD326 磁珠分选试剂盒 (德国美天旎公司), EpCAM 荧光抗体 (EBA-1) (美国 BD 公司), 8 号染色体探针 (chromosome enumeration probe 8, CEP8) (美国雅培公司), 线粒体绿色荧光探针 (Mito-Tracker Green) (英国 Shandon 公司), 卵巢癌 SKOV3 细胞 (上海诺辰生物公司), 7 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 (常州卡文斯实验动物公司)。

1.2 仪器与设备

细胞培养箱 (英国 Thermo 公司), 光学显微镜 XDS-1A (上海精美仪器公司), 倒置显微镜 IX71 (日本 Olympus 公司), 低速离心机 TDZ4B-WS (上海卢湘仪离心机仪器公司), 共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.3 体外卵巢癌腹水模型的复制

1.3.1 细胞培养 SKOV3 细胞在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 的饱和湿

度恒温培养箱中培养。

1.3.2 Mito-Tracker Green 标记 SKOV3 细胞 用细胞培养液稀释 Mito-Tracker Green 至终浓度为 100 nmol/L, 加入培养的细胞中, 37℃ 条件下孵育 45 min, 形成 Mito-Tracker-Green-SKOV3 细胞, 去除 Mito-Tracker Green 染色工作液, 加入 37℃ 预温育的新鲜细胞培养液。

1.3.3 体外卵巢癌腹水模型 收集江苏省常州市妇幼保健院子宫平滑肌瘤患者的腹腔冲洗液, 将 Mito-Tracker-Green-SKOV3 细胞浓度调整为 1×10^4 个/ml, 取 100 μl 细胞悬液加入 96 孔板, 经反复稀释并计数后, 加入腹腔冲洗液中, 将阳性组按加入细胞数目的不同分为 A、B、C、D 组, 同时设立阴性对照组 (见表 1), 每组样本制备 3 份。

1.4 卵巢癌裸鼠原位移植模型的复制

1.4.1 分组 15 只 7 周龄雌性 BALB/c 裸鼠在无特定病原体环境下饲养。阳性组和阴性对照组各 6 只, 分别在卵巢注射 SKOV3 细胞悬液后 4、6 和 8 周各处死 2 只; 空白对照组 3 只, 不做处理, 分别在 4、6 和 8 周各处死 1 只。

1.4.2 卵巢癌裸鼠原位移植模型的复制 乙醚麻醉裸鼠后, 从背部开口, 找到左侧卵巢。阳性组用微量

表 1 体外卵巢癌腹水模型

组别	SKOV3 细胞 / 个	腹腔冲洗液 /ml
阴性对照组	0	4
A 组	5	4
B 组	10	4
C 组	20	4
D 组	40	4

注射器向卵巢内接种 $2\mu\text{l}$ SKOV3 细胞悬液 (浓度 1×10^7 个/ml); 阴性对照组注射 $2\mu\text{l}$ RPMI 1640 培养基, 缝合背部伤口, 正常饲养。

1.4.3 腹水收集 水合氯醛麻醉裸鼠后, 打开腹腔, 收集腹水; 无腹水者收集 0.9% 生理盐水的腹腔冲洗液 2ml。

1.5 MACS 技术富集腹腔液或腹水的 SKOV3 细胞

采用 MACS 技术富集腹腔液或腹水的 SKOV3 细胞。离心腹腔液或腹水, 取细胞 5×10^7 个, 加入 $100\mu\text{l}$ FeR 封闭液后混匀, 加入 $100\mu\text{l}$ CD326 磁珠, 混匀后 4°C 条件下放置 30 min, 洗涤、离心后用 $500\mu\text{l}$ 缓冲液重悬细胞。将细胞悬液加入磁力架的 MS 分选柱中, 待细胞悬液流净后用缓冲液洗涤柱子, 将 MS 分选柱从磁力架中取出, 放置于收集管中, 用适量的缓冲液将柱子上标记的 CD326 细胞洗涤下来, 再次洗涤、离心后用 $50\mu\text{l}$ 缓冲液重悬, 涂片。

1.6 ICC-FISH

1.6.1 涂片固定 室温下丙酮固定细胞涂片 10 min, 晾干。

1.6.2 ICC 涂片上加藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 标记的 EBA-1 抗体, 4°C 过夜, 4°C 条件下磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 3 次, 0.1% Triton 室温作用 5 min, PBS 室温洗涤 3 次, 70%、85% 和 100% 冰冷酒精梯度脱水, 在甲醇、冰醋酸 (比例 3 : 1) 液中固定 10 min, 蒸馏水冲洗。 4°C 条件下用 1% 多聚甲醛 ($2 \times \text{SSC}$ 缓冲液, pH 7.6) 固定 10 min, 蒸馏水冲洗, 70%、85% 和 100% 冰冷酒精梯度脱水, 晾干。

1.6.3 FISH 将橙色荧光标记的 CEP8 $1\mu\text{l}$ 、双蒸水 $2\mu\text{l}$ 及 Buffer $7\mu\text{l}$ 混匀, 将 $10\mu\text{l}$ 探针液加于涂片的待杂交区, 盖上盖玻片封片, 放于 72°C 水浴锅 8 min, 然后置于 37°C 的湿盒 16 h。

1.6.4 洗片 去除盖玻片, 将涂片置于 65°C 的 $0.4 \times \text{SSC}$ 缓冲液或 0.3% 吐温中洗涤 2 min, 再置于室温 $2 \times \text{SSC}$ 缓冲液或 0.1% 吐温中洗涤 1 min, 风干。

1.6.5 复染 涂片上滴加 $10\mu\text{l}$ 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 于杂交区, 15 min 后在激光扫描共聚焦显微下观察。

2 结果

2.1 体外卵巢癌腹水模型的检测结果

阴性对照组和阳性组可见 EBA-1 阳性细胞, D

组 EBA-1 阳性细胞数量最多。阴性对照组无 Mito-Tracker Green 阳性细胞, 阳性组均见 Mito-Tracker Green 阳性细胞, 随着各组癌细胞数量增多, Mito-Tracker Green 阳性细胞数量呈增多趋势, 共计 73 个。按公式: 回收率 = Mito-Tracker Green 阳性细胞数 / SKOV3 细胞数, 计算各样本 SKOV3 细胞的回收率为 20% ~ 50%。以 CEP8 > 2 个为 FISH 阳性标准, 规定 DAPI+/EBA-1+/Mito-Tracker Green+/CEP8+ 细胞为癌细胞, 阴性对照组和 1 个 A 组 (5 个癌细胞) 样本为 FISH 阴性, 其他阳性组均见 FISH 阳性细胞, 共 69 个, 比 Mito-Tracker Green 阳性细胞少 4 个, 4 个未检测到的细胞中, 1 个细胞见 2 个着丝粒, 1 个细胞见 1 个着丝粒, 2 个细胞的荧光信号模糊不清, 无法判读。按公式: 检测率 = FISH 阳性细胞 / Mito-Tracker Green 阳性细胞, 12 个 SKOV3 细胞阳性样本中有 9 个样本的检测率为 100%。见表 2。

表 2 卵巢癌腹水模型的检测结果

组别	EBA-1 阳性细胞 / 个	Mito-Tracker Green 阳性细胞 / 个	FISH 阳性细胞 / 个	回收率 / %	检测率 / %
阴性对照组					
1	20	0	0		
2	12	0	0		
3	18	0	0		
A 组					
1	16	1	1	20.0	100.0
2	10	1	0	20.0	0.0
3	20	2	2	40.0	100.0
B 组					
1	12	4	4	40.0	100.0
2	18	5	5	50.0	100.0
3	10	5	5	50.0	100.0
C 组					
1	23	7	5	35.0	71.4
2	28	6	6	30.0	100.0
3	20	8	8	40.0	100.0
D 组					
1	34	11	10	27.5	90.9
2	40	13	13	32.5	100.0
3	41	10	10	25.0	100.0

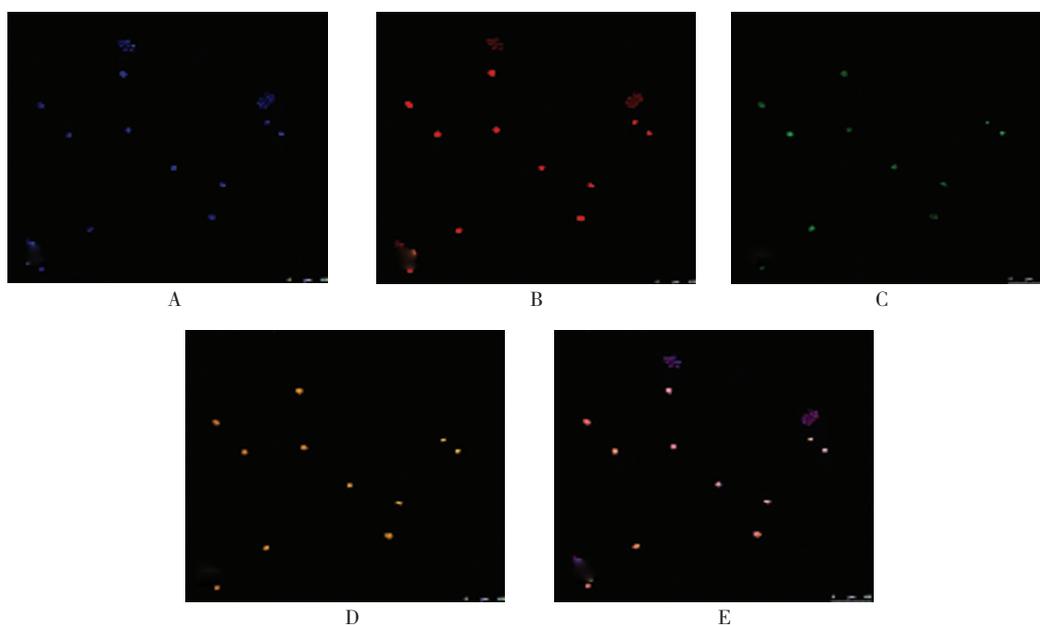
以 D 组为例, 在涂片上可见单个和簇状排列的细胞, 簇状细胞的荧光信号较弱, 而单个细胞的荧光信号较强, Mito-Tracker Green 阳性细胞为单个排列的细胞, 即 SKOV3 细胞, 其 DAPI 和 EBA-1-PE 染色均为阳性, 且多数细胞有 ≥ 3 个 8 号染色体着丝粒信号。Mito-Tracker green 阴性细胞多数呈簇状排列, DAPI 和 EBA-1-PE 染色为阳性, 一般可见 2 个 8 号染色体着丝粒信号, 被判读为良性上皮细胞。见图 1。

大多数 Mito-Tracker Green 阳性的 SKOV3 细胞有 ≥ 3 个 8 号染色体着丝粒信号, 但有 1 个 SKOV3 细胞仅见 1 个信号, 另 1 个细胞见 2 个信号。见图 2。

2.2 卵巢癌裸鼠原位移植模型的检测结果

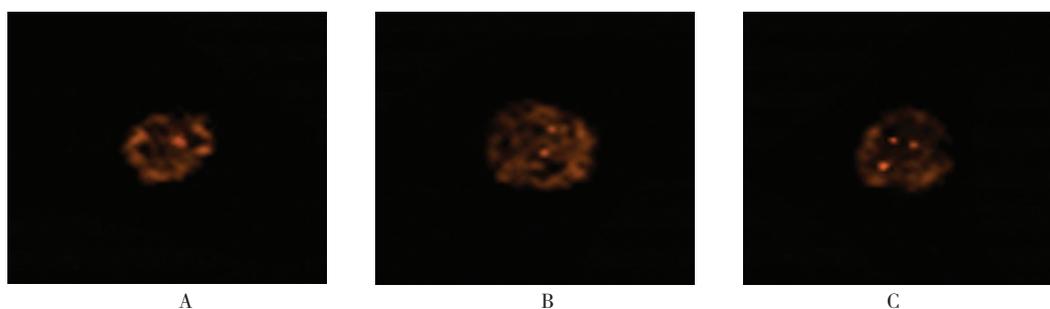
阳性组裸鼠注射 SKOV3 细胞 4 周后腹部增大, 收集到 2 ml 血性浑浊腹水。随着饲养时间延长, 阳性组裸鼠腹围不断增大, 逐渐消瘦, 6 周收集的腹水量 3.5 ~ 4.0 ml, 8 周收集的腹水量约 5 ml 左右。阴性对照组裸鼠与空白对照组裸鼠一样, 生长良好, 无腹水, 以 2 ml 腹腔冲洗液替代腹水。

随着实验时间延长, 阳性组裸鼠腹水中的细胞总数不断增多, 分离出的 SKOV3 细胞数量也逐渐增多。在显微镜下, 4、6 和 8 周每个视野的 SKOV3 细胞数最多分别为 3、8 和 15 个。阴性对照组和空白对照组未分选出 CD326 和 EBA-1 阳性细胞。见图 3。



A: DAPI 染色 (蓝色); B: EBA-1-PE 免疫荧光染色 (红色); C: Mito-Tracker Green 标记 (绿色); D: CEP8-FISH (桔色); E: 叠加图像

图 1 D 组的 SKOV3 细胞 (ICC-FISH $\times 100$)



A: 1 个; B: 2 个; C: 3 个

图 2 SKOV3 细胞 8 号染色体着丝粒信号 (ICC-FISH $\times 400$)

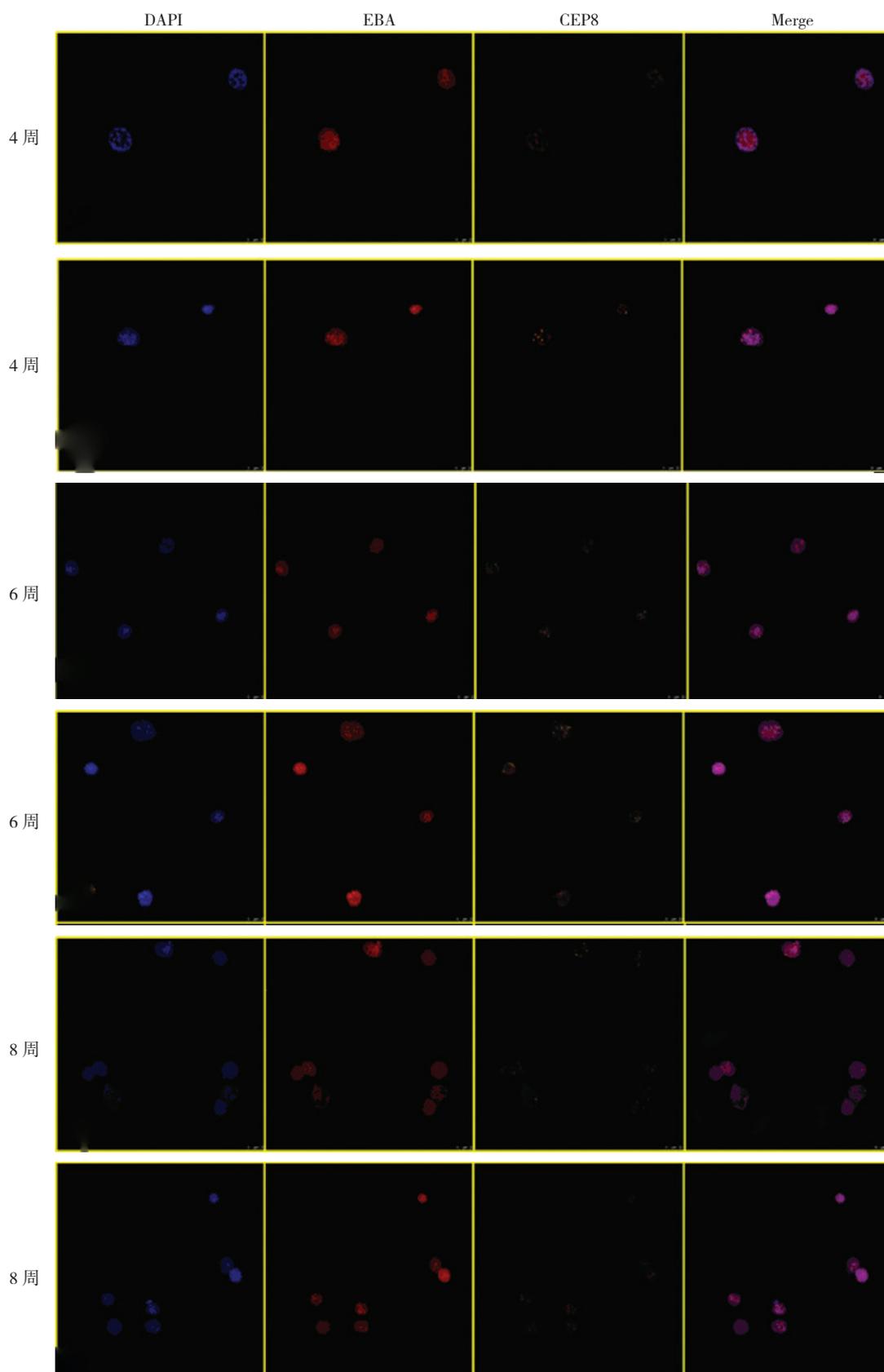


图 3 卵巢癌裸鼠原位移植模型腹水中的 SKOV3 细胞 (ICC-FISH × 200)

3 讨论

迄今为止, 尚无行之有效方法可降低卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌的致死率。卵巢癌被发现时, 往往已形成较大肿块或处于进展期, 盆腹腔内除肉眼可见的转移灶外, 还会有广泛的微转移, 这些病灶不可能被切除, 致使 2 ~ 3 年后疾病复发, 故需要更详尽地了解卵巢癌种植转移情况。卵巢癌的发生、发展具有复杂的遗传学及微环境因素。卵巢癌起源于输卵管伞端的脱落上皮细胞或癌细胞, 与大多数其他实体瘤不同, 卵巢癌较少血行转移, 多数为腹腔种植转移。其腹腔种植的早期事件是在蛋白酶的介导下, 单个癌细胞或细胞球脱离进入腹腔, 黏附于间皮被覆的腹膜或器官, 扎根于间皮下基质并形成继发性肿瘤。卵巢癌播散性转移与腹水的产生密切相关, 腹水的微环境有利于单个或簇状癌细胞的种植转移^[4], 而种植转移直接影响患者的死亡率。所以, 腹腔液是研究卵巢癌及其微环境的良好取材来源, 可以提供癌细胞及其他细胞, 以了解卵巢癌转移过程中的细胞分子改变^[5]。

液体活检是一种新型的无创检测技术, 是通过采集患者的体液对体内肿瘤进行检测的方法, 在科研和临床上广泛用于检测外周循环血癌细胞的数量及其分子病理特征, 其包括分离富集、分析检测 2 个步骤。分离富集通常基于癌细胞的物理性质(密度和大小)或免疫学特征(分子特征), 包括梯度离心法、过滤法、免疫磁性分选法等; 分析检测可分为细胞计数法和核酸检测法, 如免疫细胞化学法、逆转录聚合酶链反应等^[6]。已经有一些学者用免疫磁珠富集胸腹水中的癌细胞^[7-8]。KIMURA 等^[7]用 CD45⁺ 免疫磁珠负分选卵巢癌腹水后, 用 FACS 鉴定分选后的癌细胞纯度, 然后用纯化的癌细胞提取癌细胞溶解产物, 以制备肿瘤特异性疫苗。HUANG 等^[8]用 Immunomagnetic Flow 系统检测外周血中游离叶酸受体和叶酸受体阳性的癌细胞, 证明该系统可以用于检测卵巢癌腹水中的叶酸受体阳性细胞。伴随着组织学分析、重要生物学检测等发展, 从体液中分选细胞的关键挑战不再是分选效率, 而是目的细胞的高纯度^[9]。纯度好的癌细胞被分离后, 可精确了解癌细胞的生物学特性及治疗变化等。AHMED 等^[10]分离了未化疗卵巢癌和复发后化疗耐药患者的腹水癌细胞, 用蛋白组学技术识别到癌细胞上的 353 种蛋白, 发现这两组细胞在免疫监视、DNA 修复机制、细胞骨架重排、细胞间黏附、细胞周期、细胞运输等的蛋白编码上有很大的不同; 其路径分析显

示, 耐药癌细胞具有丰富的新陈代谢途径、DNA 修复机制及能量代谢途径。

文献报道 EpCAM 在 87% ~ 100% 的癌性腹水中表达, 高表达 EpCAM 的癌细胞是化疗耐药细胞, 这些细胞是化疗后复发的根源, 与患者预后差相关^[11]。CD326 和 EBA-1 都是 EpCAM 的单克隆抗体。根据癌性腹水或腹腔冲洗液量多的特点, 本实验采用 MACS 技术, 用 CD326 免疫磁珠进行正分选, 除去腹水中的炎症细胞、间皮细胞及纤维细胞等, 使 CD326 阳性细胞富集, 以适用于后继的纯化或鉴定过程。既往实验显示, 恶性腹腔液正分选后的液体中既有良性的上皮细胞又有癌细胞^[9]。因此识别肿瘤相关上皮性抗原的技术不能精确地鉴定分离腹腔液中的癌细胞, 而文献报道卵巢癌频繁出现 8 号染色体多倍体^[12], 针对以上特点, 本实验选择 ICC-FISH 来区分癌细胞与良性上皮细胞。实验结果显示, 阴性组和阳性组均有 EBA-1 阳性而 Mito-Tracker Green 无着色的细胞, 再次验证腹水中存在较多的良性上皮细胞, 这些上皮细胞黏附性好, 在涂片上主要呈簇状排列, Mito-Tracker Green 着色的 SKOV3 细胞主要呈分散单个排列。以观察到的 Mito-Tracker Green 标记细胞为准, SKOV3 细胞的回收率为 20% ~ 50%, 为提高癌细胞的回收率, 实验使 SKOV3 细胞与 CD326 免疫磁珠充分混匀孵育, 并控制进入 MS 柱子的细胞的浓度, 务必使连接了癌细胞的免疫磁珠与柱子充分结合, 以提高正分选的效率。可能在磁珠富集和后续鉴定操作过程中的细胞损失太多, 也可能是正常上皮细胞对少量癌细胞的干扰太大, 所以本实验难以像分选外周血循环细胞一样回收得到仅 1 个癌细胞^[12-14]。FISH 检测结果显示, 大多数 SKOV3 细胞有 3 个 CEP8 信号, 仅少数细胞可见 1 或 2 个 CEP8 信号, 9/12 个 SKOV3 细胞阳性样本的检测率为 100%, 说明用 FISH 检测多倍体细胞来识别卵巢癌细胞是可行的。但是, 如果用既表达 EpCAM 抗原, 且 CEP8>2 的标准来鉴定癌性腹水富集液, 可能会导致癌细胞的遗漏。另外, EpCAM 抗体不能捕获或检测到发生上皮间质转化的癌细胞, 这种癌细胞最易从癌灶脱落进入腹腔或脉管, 所以应设计对卵巢癌腹水更特异的免疫磁珠或荧光抗体, 如选用 CD45⁺ 免疫磁珠进行负分选, 根据不同卵巢癌的特征搭配叶酸受体、P53、Pax8 等抗体进行特异的癌细胞分选。

卵巢癌裸鼠原位模型复制了卵巢癌的发生、发展过程, 其恶性腹水的产生也经历了从无到有, 到量多

的过程。由于卵巢癌患者早期无明显症状, 本实验选择裸鼠腹围出现肉眼可见的增大时开始收集腹水。实验证明, ICC-FISH 在腹水中癌细胞量少或量多时都能可靠地分离出癌细胞, 与分离循环血癌细胞相似^[12]。

与腹腔镜下活检相比, 从腹水或腹腔冲洗液中分离并检测癌细胞, 损伤小、可重复, 腹水中的癌细胞有上皮样表型, 也有发生上皮间质转化的表型, 这些细胞高表达肿瘤干细胞标志物, 具有强大的自我更新、转移和肿瘤形成能力^[15], 分离腹水中的癌细胞可以实时了解肿瘤的生物特性, 从而更有机会辨识和确定药物治疗靶点及预后标志物^[16]。本实验结果证明, 将恶性腹水磁富集后, ICC-FISH 可以稳定、敏感地分离其中的少量癌细胞, 该方法为卵巢癌的早期发现、监测复发及指导治疗提供新思路。

参 考 文 献:

- [1] ZEPERNICK F, MEINHOLD-HEERLEIN I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer[J]. Arch Gynecol Obstet, 2014, 290(5): 839-842.
- [2] HOHN A K, EINENKEL J, WITTEKIND C, et al. New FIGO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer[J]. Pathologie, 2014, 35(4): 322-326.
- [3] 邢宝玲, 葛素梅, 焦练, 等. 细胞量少的卵巢癌腹腔液漏诊和过度诊断的实验分析 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(11): 1199-1203.
- [4] MO L, BACHELDER R E, KENNEDY M, et al. Syngeneic murine ovarian cancer model reveals that ascites enriches for ovarian cancer stem-like cells expressing membrane GRP78[J]. 2015, 14(3): 747-756.
- [5] LENGYEL E, BURDETTE J E, KENNY H A, et al. Epithelial ovarian cancer experimental models[J]. Oncogene, 2014, 33(28): 3619-3633.
- [6] PAOLETTI C, HAYES D F. Circulating tumor cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 882: 235-258.
- [7] KIMURA Y, HARADA Y, YASUDA N, et al. Effective recovery of highly purified CD326 (+) tumor cells from lavage fluid of patients treated with a novel cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (KM-CART)[J]. Springerplus, 2015, 17, 4: 780.
- [8] HUANG W, CHANG C L, CHAN B D, et al. Concurrent detection of cellular and molecular cancer markers using an immunomagnetic flow system[J]. Anal Chem, 2015, 87(20): 10205-10212.
- [9] PLOUFFE B D, MURTHY S K. Perspective on microfluidic cell separation: a solved problem[J]. Anal Chem, 2014, 86(23): 11481-11488.
- [10] AHMED N, GREENING D, SAMARDZIJA C, et al. Unique proteome signature of post-chemotherapy ovarian cancer ascites-derived tumor cells[J]. Sci Rep, 2016, 6: 30061.
- [11] TAYAMA S, MOTOHARA T, NARANTUYA D, et al. The impact of EpCAM expression on response to chemotherapy and clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(27): 44312-44325.
- [12] 张玉娟, 崔巍. 循环肿瘤细胞检测的方法学建立和改良及在实体瘤中的监测应用研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [13] MASARRU W, MASAKUNI S, TAKESHI S, et al. A novel flow cytometry-based cell capture platform for the detection, capture and molecular characterization of rare tumor cells in blood[J]. Translational medicine, 2014, 12: 143-154.
- [14] LEE M, KIM E J, CHO Y, et al. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) captured by microfluidic device in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2017, 145(2): 361-365.
- [15] KIM S, KIM B, SONG Y S, et al. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer[J]. Cancer Sci, 2016, 107(9): 1173-1178.
- [16] KIPPS E, TAN D S, KAYE S B. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(4): 273-282.

(童颖丹 编辑)