



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107179413 A

(43)申请公布日 2017.09.19

(21)申请号 201710420810.6

(22)申请日 2017.06.07

(71)申请人 王亚帝

地址 121001 辽宁省锦州市古塔区重庆路
二段28号

(72)发明人 王亚帝 何东宁 任立群 陈素贤
李敏 范仲凯 佟青

(74)专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务
所(普通合伙) 22210

代理人 南小平

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法

(57)摘要

本发明涉及一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法,包括以下步骤:步骤1、样本组织收集;步骤2、HLA-DR免疫组织化学染色;步骤3、结果判断与图像分析;步骤4、内分泌治疗后血脂异常可能性判断。本发明提供的预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法,通过HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1表达水平有效区分乳腺癌内分泌前血脂异常,从而为乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的判断提供了新途径,为乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性提供了参考依据。

1. 一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1、样本组织收集:

取乳腺癌组织及癌旁相对正常组织,一部分进行石蜡切片,另一部分进行冰冻切片;

步骤2、HLA-DR免疫组织化学染色:

从每一例样本中随机取多张切片,对样品组织进行HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1基因免疫组织化学染色;

步骤3、结果判断与图像分析:

每个样本在显微镜下随机选取不重叠的多个高倍视野,进行阳性细胞率分析和染色分数分析,其中:

阳性细胞率分析为:

阳性肿瘤细胞率在10%以下,评分为0分;

阳性肿瘤细胞率在11%~30%,评分为1分;

阳性肿瘤细胞率在31%~70%,评分为2分;

阳性肿瘤细胞率在71%~100%,评分为3分;

染色分数分析为:

肿瘤细胞无着色,评分为0分;

肿瘤细胞为浅黄色,评分为1分;

肿瘤细胞为棕黄色,评分为2分;

肿瘤细胞为深棕色,评分为3分;

步骤4、内分泌治疗后血脂异常可能性判断:

以染色分数评分与阳性细胞率评分的乘积作为染色指数,当染色指数 <3 时,判断为低表达,乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性低于80%;当染色指数 ≥ 3 时,判断为高表达,乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性高于或等于80%。

2. 根据权利要求1所述的预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法,其特征在于,步骤2具体为:

取保存的石蜡切片,常规脱蜡至水;用枸橼酸盐溶液通过煮沸法进行抗原热修复后进行SABC法免疫组织化学染色;

取冰冻切片,吹干,放入冷丙酮中固定10min,然后进行SABC法免疫组织化学染色。

3. 根据权利要求1所述的预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法,其特征在于,步骤3具体为:

用HPIAS图像分析仪进行图像分析,每例样本检测3块标本,每块标本切30片,随机取5张切片检测,每片间隔24 μm ,每个标本随机选取不重叠的10个视野,选择切片空白处进行校正,并调整灰度,然后对细胞核或细胞质内的阳性物质进行二值化处理和图像修整,由计算机系统自动计算出阳性表达的面数密度,并进行阳性细胞率分析和染色分数分析。

一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种预测血脂异常的方法,具体涉及一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法。

背景技术

[0002] 多数乳腺癌患者为激素依赖性肿瘤,内分泌治疗的主要对象就是雌激素受体(ER)和/或孕激素受体(PR)阳性的乳腺癌患者,ER阳性乳腺癌占全部乳腺癌的60-75%,其中65%PR阳性。内分泌治疗是ER阳性乳腺癌患者术后重要治疗手段,它是一种作用温和、作用持久的治疗方式。其疗程往往达5-10年,甚至15年之久,是绝经后早期乳腺癌患者的标准治疗方案。内分泌治疗以降低患者体内雌激素水平为主要环节,涉及的药物有抗雌激素类、芳香化酶抑制剂、促黄体生成素释放激素类药物和孕激素等。

[0003] 血脂异常是内分泌治疗的常见不良反应之一,血脂异常还会导致罹患心血管疾病的风险增加。目前,血脂检测的项目较多,基本检测项目为总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇。绝经后患者体内雌激素水平显著降低,从而导致绝经后乳腺癌患者胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白水平升高,部分表现为高密度脂蛋白的轻度降低。对于血脂异常的乳腺癌患者而言,血脂异常增加乳腺癌妇女的复发转移风险、心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease,ASCVD)及代谢综合征的风险。如果能够事先预测乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性,就可以尽早进行干预治疗,减少上述风险的发生。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法,该方法通过HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1基因在不同乳腺组织内的表达水平可以有效区分乳腺癌内分泌前血脂异常,从而为乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性提供了参考依据。

[0005] 为了实现上述目的,本发明的技术方案具体如下:

[0006] 一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法,包括以下步骤:

[0007] 步骤1、样本组织收集:

[0008] 取乳腺癌组织及癌旁相对正常组织,一部分进行石蜡切片,另一部分进行冰冻切片;

[0009] 步骤2、HLA-DR免疫组织化学染色:

[0010] 从每一例样本中随机取多张切片,对样品组织进行HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1基因免疫组织化学染色;

[0011] 步骤3、结果判断与图像分析:

[0012] 每个样本在显微镜下随机选取不重叠的多个高倍视野,进行阳性细胞率分析和染色分数分析,其中:

[0013] 阳性细胞率分析为：

[0014] 阳性肿瘤细胞率在10%以下，评分为0分；

[0015] 阳性肿瘤细胞率在11%~30%，评分为1分；

[0016] 阳性肿瘤细胞率在31%~70%，评分为2分；

[0017] 阳性肿瘤细胞率在71%~100%，评分为3分；

[0018] 染色分数分析为：

[0019] 肿瘤细胞无着色，评分为0分；

[0020] 肿瘤细胞为浅黄色，评分为1分；

[0021] 肿瘤细胞为棕黄色，评分为2分；

[0022] 肿瘤细胞为深棕色，评分为3分；

[0023] 步骤4、内分泌治疗后血脂异常可能性判断：

[0024] 以染色分数评分与阳性细胞率评分的乘积作为染色指数，当染色指数 <3 时，判断为低表达，乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性低于80%；当染色指数 ≥ 3 时，判断为高表达，乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性高于或等于80%。

[0025] 在上述技术方案中，步骤2具体为：取保存的石蜡切片，常规脱蜡至水；用枸橼酸盐溶液通过煮沸法进行抗原热修复后进行SABC法免疫组织化学染色；

[0026] 取冰冻切片，吹干，放入冷丙酮中固定10min，然后进行SABC法免疫组织化学染色。

[0027] 在上述技术方案中，步骤3具体为：用HPIAS图像分析仪进行图像分析，每例样本检测3块标本，每块标本切30片，随机取5张切片检测，每片间隔24 μ m，每个标本随机选取不重叠的10个视野，选择切片空白处进行校正，并调整灰度，然后对细胞核或细胞质内的阳性物质进行二值化处理和图像修整，由计算机系统自动计算出阳性表达的面数密度，并进行阳性细胞率分析和染色分数分析。

[0028] 本发明的有益效果是：

[0029] 本发明提供的预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法，通过HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1表达水平有效区分乳腺癌内分泌前血脂异常，从而为乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的判断提供了新途径，为乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性提供了参考依据。

具体实施方式

[0030] 本发明的发明思想为：

[0031] 目前，学界普遍认为存在于乳腺癌微环境中的免疫细胞可有效促进与抑制肿瘤的生长，可作为较好的预后指标。免疫反应在血脂代谢、动脉粥样硬化形成及发展过程中起到十分重要的作用。特别是HLA-II类基因与免疫性疾病的相关性。研究发现多种自身免疫性疾病与HLA-DR或DQ相关，疾病的易感性有时可能与一种HLA等位基因相关，一般情况下可能是多个HLA基因共同作用的结果。

[0032] 本发明的预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法，在公共数据库GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) 中筛选出HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1基因，以其基因表达水平作为血脂异常可能性判断的根据。

[0033] 血脂相关指标

[0034] 根据《中国成人血脂异常防治指南》，定义血脂异常为：高胆固醇血症 $TC > 5.18 \text{ mmol/L}$ ；高甘油三酯血症 $(TAG > 1.70 \text{ mmol/L})$ ；低水平的高密度脂蛋白血症 $(HDL-C < 1.04 \text{ mmol/L})$ ；高水平的低密度脂蛋白血症 $(LDL-C > 3.37 \text{ mmol/L})$ 。血脂检查项目包括：甘油三酯(TG)，血清总胆固醇(TC)，血清高密度脂蛋白(HDL)，低密度脂蛋白(LDL)，极低密度脂蛋白(VLDL)。

[0035] 实施例：

[0036] 本发明的预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法具体包括以下步骤：

[0037] 临床资料收集

[0038] 收集普外科手术切除的人乳腺癌组织及癌旁相对正常组织(离癌组织5cm以上)。乳腺癌组织及癌旁相对正常组织，一部分经液氮骤冷，恒冷切片机制片，切片厚 $6 \mu\text{m}$ ，每片间隔 $24 \mu\text{m}$ ， -20°C 冰箱保存；一部分经4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋切片，切片厚 $6 \mu\text{m}$ ，每片间隔 $24 \mu\text{m}$ 。

[0039] HLA-DR免疫组织化学染色

[0040] 取保存的石蜡切片，常规脱蜡至水；用枸橼酸盐溶液通过煮沸法进行抗原热修复后进行SABC法免疫组织化学染色。

[0041] 取冰冻切片，吹干，放入冷丙酮中固定10min，然后进行SABC法免疫组织化学染色。

[0042] 每一例标本中随机取5张切片进行HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1基因免疫组织化学染色。染色时需要用到：HLA-DR抗血清1:200；兔抗鼠IgG1:50，ABC复合物1:100；DAB- H_2O_2 显色液。

[0043] 结果判断和图像分析

[0044] 每个标本在显微镜下随机选取不重叠的10个高倍视野，对HLA-DR癌细胞计数分析，每张切片由两人双盲观测。

[0045] 具体的说，将所有的冰冻切片和石蜡切片标本进行SABC免疫组织化学染色后，用HPIAS图像分析仪进行图像分析，每例检测3块标本，每块标本切30片，随机取5张切片检测，每片间隔 $24 \mu\text{m}$ ，每个标本随机选取不重叠的10个视野，选择切片空白处进行校正，并调整灰度，然后对细胞核或细胞质内的阳性物质进行二值化处理和图像修整，由计算机系统自动计算出阳性表达的面数密度(SD)，并进行染色分数分析和阳性细胞率分析。面数密度(SD)是指某种待测目标的面积占全部参照面积的比例，如：细胞核面密度=细胞核面积/整个细胞面积，核浆面密度=细胞核面积/(整个细胞面积-细胞核面积)。

[0046] 染色分数分析评定：肿瘤细胞无着色为阴性(0分)，浅黄色为弱阳性(1分)，棕黄色为阳性(2分)，深棕色为强阳性(3分)。

[0047] 阳性细胞率分析评定：阳性肿瘤细胞率10%以下为0分，11%~30%为1分，31%~70%为2分，71%~100%为3分。

[0048] 染色指数是染色分数评分与阳性细胞率评分的乘积。当染色指数 < 3 时，判断为低表达，为阴性，乳腺癌内分泌治疗后5年内出现血脂异常的可能性低于80%；当染色指数 ≥ 3 时，判断为高表达，为阳性，乳腺癌内分泌治疗后5年内出现血脂异常的可能性高于或等于80%。

[0049] 根据中国成人血脂异常防治指南，血脂是否异常可以通过其LDL-C的水平来判断。一般认为LDL-C的水平 $< 3.4 \text{ mmol/L}$ 为无心血管疾病危险的血脂正常水平。

[0050] 本发明的上述实施例中，“乳腺癌内分泌治疗后5年内出现血脂异常的可能性低于80%是指，经过乳腺癌内分泌治疗后的每100人中，有不到80人在5年内出现血脂异常；“乳腺癌内分泌治疗后5年内出现血脂异常的可能性高于或等于80%”的情况与上述内容道理相同，这里不再赘述。

[0051] 显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

专利名称(译)	一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法		
公开(公告)号	CN107179413A	公开(公告)日	2017-09-19
申请号	CN2017110420810.6	申请日	2017-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	王亚帝		
申请(专利权)人(译)	王亚帝		
当前申请(专利权)人(译)	王亚帝		
[标]发明人	王亚帝 何东宁 任立群 陈素贤 李敏 范仲凯 佟青		
发明人	王亚帝 何东宁 任立群 陈素贤 李敏 范仲凯 佟青		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/531 G01N33/574 G01N33/57415 G01N2405/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法，包括以下步骤：步骤1、样本组织收集；步骤2、HLA-DR免疫组织化学染色；步骤3、结果判断与图像分析；步骤4、内分泌治疗后血脂异常可能性判断。本发明提供的预测乳腺癌内分泌治疗后血脂异常的方法，通过HLA-DRB5/HLA-DRB4/HLA-DRB3/HLA-DRB1表达水平有效区分乳腺癌内分泌前血脂异常，从而为乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的判断提供了新途径，为乳腺癌内分泌治疗后出现血脂异常的可能性提供了参考依据。