



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103743907 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201310314467. 9

G01N 33/533(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 24

(71) 申请人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11 号

(72) 发明人 黄晓军 孔圆 常英军 王亚哲
袁晓英 胡玥 王昱 刘代红
许兰平

(74) 专利代理机构 石家庄众志华清知识产权事
务所(特殊普通合伙) 13123

代理人 王苑祥 墨伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

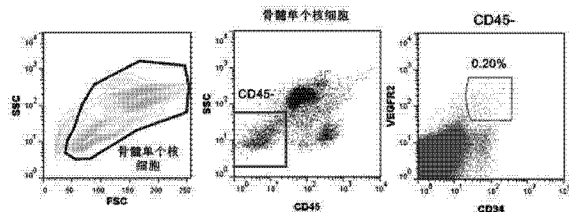
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境
评测的试剂盒、系统及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒、系统和方法,该试剂盒、系统和方法的应用基于流式细胞仪,所述试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂:CD34-FITC、VEGFR2-PE、CD45-PerCP 和 CD133-APC。所述系统中设有主控计算机单元和存储有前瞻性研究的数据和图形的存储单元,该硬件的配置是实现测定的重要保证。本发明首次将 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺在骨髓单个核细胞中的表达比例作为评价造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境品质的指标之一,对于预测造血干细胞移植后血液病患者植入不良的发生具有指导意义,对于临床治疗方案的制定具有重要的参考价值。



1. 一种测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒,该试剂盒的应用基于流式细胞仪,其特征在于该试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂:CD34-FITC、VEGFR2-PE、CD45-PerCP 和 CD133-APC。

2. 根据权利要求 1 所述的测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒,其特征在于所述试剂盒中还配备了红细胞溶解液、pH 为 7.2~7.4 的 10×PBS 缓冲液和配套计量的小牛血清。

3. 根据权利要求 1 所述的测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒,其特征在于所述试剂盒中每种荧光标记的单克隆抗体试剂容量标准单元是:5 μL 的 CD34-FITC、5 μL 的 VEGFR2-PE、10 μL 的 CD45-PerCP 和 3 μL 的 CD133-APC,配套设置有不小于 3-5mL 的流式细胞仪专用试管至少 2 个。

4. 一种测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测系统,系统结构中包括流式细胞仪和配套的数据分析模块,其特征在于所述系统中还包括主控计算机单元(1),以及连接在主控计算机单元(1) 配套接口上的存储有主控程序的系统管理模块(2)、配置缓存器模块(13) 的监控显示器(LCD)、存储有前瞻性研究的数据和图形的存储模块(3)、暂存器模块(4)、设置在系统操控台上的操控面板(5)、存储有内外数据通讯协议和数据规格转换模式的通讯模块(6)、打印机及接口电路(7),流式细胞仪(8) 通过通讯接口电路(12) 和主控计算机单元(1) 的数据总线连接,且流式细胞仪(8) 结构中配套设有用于测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的专用试剂盒(11),所述专用试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂:CD34-FITC、VEGFR2-PE、CD45-PerCP 和 CD133-APC。

5. 根据权利要求 4 所述的测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测系统,其特征在于所述前瞻性研究的数据和图形包括按照年龄、性别为标记,分别标示的健康人、植入良好和植入不良患者的骨髓做样本的骨髓微循环环境流式数据图库;所述流式数据图库中存储着采用所述专用试剂盒(11) 中的染色单克隆抗体为试剂制成的骨髓样本按照特定的数据采集条件所测得的散点图、流式设门分析图和测定的 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 细胞表达比例、及该骨髓样本相关的临床特征。

6. 根据权利要求 5 所述的测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测系统,其特征在于流式设门分析图的分析方法是:先建立 FSC/SSC 点图,将活细胞区域划为 R1 区;设 CD45/SSC 点图,根据各群细胞 CD45 和 SSC 的强度,画出 CD45⁻ 区,对 CD45⁻ 区中的 CD34⁺VEGFR2⁺ 细胞进行设门分析,得出 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中的表达比例。

7. 根据权利要求 4 所述的测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测系统,其特征在于监控显示器(LCD) 借助暂存器模块(13) 与主控计算机单元(1) 的数据总线相连、配套设置触摸式电子鼠标。

8. 基于权利要求 4 所述的系统实现造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

A、将待测骨髓样本采用专用试剂盒中的试剂在流式细胞仪专用试管中进行荧光标记,制成测试样本;

B、将装有测试样本的专用试管置入流式细胞仪中,启动流式细胞仪(8) 及配套的分析软件,按照存储模块(3) 中特定的数据采集条件采集相关数据,形成散点图,并进行流式设

门分析,传输并分类标记存入暂存器模块(4);

C、调出在存储模块(3)中前瞻性研究的数据和图形,显示在高清晰度的监控显示器(LCD)的上半区,在下半区调出暂存器模块(4)中的对应图谱,借助光标尺进行对照定量分析;

D、确定 $CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 在骨髓单个核细胞中表达比例的分界线值的位置;

E、将测定的 $CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 表达比例 \geq 分界线值定义为骨髓微循环环境良好;
 $CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 表达比例 $<$ 分界线值定义为骨髓微循环环境不良;

F、从经验数据模块(3)中调出造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境检测报告表,填入测定数据、相关图表,比对后将“良好”、“不确定”、“不良”选择填入评测结论栏中,从激光打印机上输出。

9. 根据权利要求8所述的检测造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境评测方法,其特征在于步骤A中所述测试样本的制备步骤包括:

A1、取试剂盒配套设置的专用试管,在试管中分别加入 $5\mu\text{L}$ 的 $CD34\text{-FITC}$, $5\mu\text{L}$ 的 $VEGFR2\text{-PE}$, $10\mu\text{L}$ 的 $CD45\text{-PerCP}$ 和 $3\mu\text{L}$ 的 $CD133\text{-APC}$,再加入不少于 $300\mu\text{L}$ 的待测骨髓样本、且保证骨髓细胞数在 $5\times 10^6\text{-}1\times 10^7$ 个,混匀,室温避光放置 15 分钟孵育;

A2、加入用 $1\times\text{PBS}$ 稀释 10 倍后的红细胞溶解液 2mL,混匀后避光,室温放置 8 分钟;

A3、1500 转 / 分离心 5 分钟,弃上清液,加入 2mL 含 0.5wt.%~2wt.% 血清的 PBS,混匀;

A4、1500 转 / 分离心 5 分钟,弃上清液,加入 0.3mL $1\times\text{PBS}$ 缓冲液、混匀,制成测试样本。

10. 根据权利要求8所述的检测造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境的方法,其特征在于步骤B中所述流式设门分析的步骤包括:

B1、先建立 FSC/SSC 点图,将活细胞区域划为 R1 区;

B2、设 $CD45$ /SSC 点图,根据各群细胞 $CD45$ 和 SSC 的强度,画出 $CD45^-$ 区;

B3、对 $CD45^-$ 区中的 $CD34^+VEGFR2^+$ 细胞进行设门分析,得出 $CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 在骨髓单个核细胞中的表达比例。

测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒、系统及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种特殊应用环境中使用的细胞表型专用试剂盒及系统,具体涉及一种用于测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒、测定系统及实现定性定量分析的方法。

背景技术

[0002] 异基因造血干细胞移植是治疗血液恶性疾病的有效方式之一,但是移植后植入不良(英文名称Poor graft function,缩写PGF)的发生率在5-27%之间,仍然是异基因造血干细胞移植后的主要并发症之一,严重时影响移植患者的长期生存。尽管文献报道,植入不良可能与移植前预处理剂量、免疫排斥、移植物抗宿主病、病毒感染、移植的CD34⁺细胞数等诸多因素有关,但移植后植入不良的发病机制尚未阐明,骨髓微循环环境在特定的植入条件下是否在与后期并发症具有重要内在联系尚未明确的研究结果。

[0003] 采用骨髓细胞体外长期培养实验和集落形成实验是替代体内研究来评估血液病患者骨髓基质细胞造血支持作用的常用方法。既往研究借助于上述研究方法证实,接受长期化疗的血液病患者骨髓基质细胞受损,接受自体造血干细胞移植的患者在移植前和移植后1年均可检测到骨髓基质细胞受损。我们由此推测骨髓微循环环境受损也可能参与了造血干细胞移植后植入不良的发生。但是骨髓细胞体外长期培养实验和集落形成实验具有一定的局限性:其目标细胞群包括成纤维细胞、脂肪细胞和内皮细胞等一组异质性的骨髓基质细胞组分。特别是在造血干细胞移植后的早期,患者体内重建的骨髓基质细胞数量很少,严重限制了上述研究方法的推广应用。因此,迫切需要建立新的、方便快捷的检测方法对造血干细胞移植后血液病患者的骨髓微循环环境组分进行有效性评估。这涉及到造血干细胞移植后植入不良能否及时预测以及临床治疗方案的制定是否更加科学、高效与个体化。

[0004] 对于血液病患者来讲,骨髓配对找到合适的骨髓捐献者本来就是十分不易之事,如果因为某种因素延误了后期的治疗与恢复,浪费了宝贵的社会资源,则是医学界的悲哀。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种用于测定造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境评测的试剂盒、系统及方法,利用该试剂盒中的经过精确标定和定量的专用试剂、配套的设备系统及技术操控方法,可以快速、准确地测定CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺在骨髓单个核细胞中所占比例,从而得出造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境品质的定性和定量结论,从而可以快速、准确地预测造血干细胞移植后血液病患者植入不良的发生,对临床治疗方案的制定具有重要的指导意义。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案1是:

提供了一种测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒,该试剂盒的应用基于流式细胞仪,该试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂:CD34-FITC、

VEGFR2-PE、CD45-PerCP 和 CD133-APC。

[0007] 采用上述试剂盒与流式细胞仪配合使用,可以准确、定量测定 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中的表达比例,为骨髓微循环环境的评测奠定了基础。

[0008] 本发明还提供了一种基于上述试剂盒的专用系统,该系统的结构中包括流式细胞仪和配套的数据分析模块,所述系统中还包括主控计算机单元,以及连接在主控计算机单元配套接口上的存储有主控程序的系统管理模块、配置缓存器模块的监控显示器 LCD、存储有前瞻性研究的数据和图形的存储模块、暂存器模块、设置在系统操控台上的操控面板、存储有内外数据通讯协议和数据规格转换模式的通讯模块、打印机及接口电路,流式细胞仪通过通讯接口电路和主控计算机单元的数据总线连接,且流式细胞仪结构中配套设有用于测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的专用试剂盒,所述专用试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂:CD34-FITC、VEGFR2-PE、CD45-PerCP 和 CD133-APC。

[0009] 本发明的关键技术在于借助主控计算机系统的完善配备和针对性任务明确的控制方法与配套软、硬件的配套,将关键的采样设备—流式细胞仪改造成为造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境评测报告专用的系统装备。流式细胞仪的用途是测定带有荧光标记的骨髓样本,记录二维散点图。但是,被测定细胞特异性内涵的定性和进一步定量分析,流式细胞仪和配套的分析软件是无能为力的。特定任务的实现,取决于染色标记的选配是否合理,前瞻性研究的定标分界线值的选取是否的具有普遍性以及操作方法是否能为临床的结果所验证。

[0010] 本发明的发明关键还在于设计了基于本发明所说的系统,测定造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境的方法,该方法包括以下步骤:

A、将待测骨髓样本采用专用试剂盒中的试剂在流式细胞仪专用试管中进行荧光标记,制成测试样本;

B、将装有测试样本的专用试管置入流式细胞仪中,启动流式细胞仪及配套的分析软件,按照存储模块中特定的数据采集条件采集相关数据,形成散点图,并进行流式设门分析,传输并分类标记存入暂存器模块;

C、调出在存储模块中前瞻性研究的数据和图形,显示在高清晰度的监控显示器 LCD 的上半区,在下半区调出暂存器模块中的对应图谱,借助光标尺进行对照定量分析;

D、确定 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中表达比例的分界线值的位置;

E、将测定的 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例 \geq 分界线值定义为骨髓微循环环境良好; CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例 $<$ 分界线值定义为骨髓微循环环境不良;

F、从经验数据模块中调出造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境检测报告表,填入测定数据、相关图表,比对后将“良好”、“不确定”、“不良”选择填入评测结论栏中,从激光打印机上输出。

[0011] 借助以上的方法,可以指导编制本系统中的主控程序中的管理软件,形成全自动式的设备,以快速检测、评估造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境。本发明对流式细胞仪的测定结果借助苏木精-伊红(英文名称 Hematoxylin-eosin staining,缩写 HE)染色和 CD34 免疫组化(IHC)染色对患者骨髓活检标本中骨髓微循环环境中的血管进行原位定量验证,证明了本发明测定方法的科学性、对本发明的研究奠定了基础。

[0012] 采用本发明的试剂盒、系统和方法测定造血干细胞移植后血液病患者肝素抗凝

骨髓单个核细胞中 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 的表达比例,并进一步通 HE 染色和 CD34 免疫组化(IHC)染色对患者骨髓活检标本中骨髓微循环环境中的血管进行原位定量验证。通过临床试验和统计学分析,结果表明:通过四色流式细胞仪检测到的异基因造血干细胞移植后植入不良患者(n=19)CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 的表达比例明显低于植入良好(英文名称 Good graft function,缩写 GGF)的血液病患者(n=38)和健康供者(n=15)(0.008% vs. 0.16% vs. 0.18%, P<0.0001);根据操作者工作曲线(ROC 曲线)确定 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中表达比例=0.055%为分界值,将 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例<0.055%定义为骨髓微循环环境不良(或异常),将 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例≥0.055%定义为骨髓微循环环境良好(或正常);通过 HE 和 CD34 免疫组化染色进一步在骨髓原位证实移植后 PGF 患者(n=19)骨髓血管数量明显低于 GGF 患者(n=38)和健康供者(n=15)(2 vs. 4 vs. 6 / 骨小梁, P<0.05);多因素预后分析提示 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例<0.055%是造血干细胞移植后血液病患者发生植入不良的独立危险因素。虽然本发明所测定 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中的表达比例不能够直接得出诊断结果或者健康状况,但其作为中间结果可以作为预测造血干细胞移植后血液病患者植入不良的发生以及指导制定植入不良患者的临床治疗方案的参考信息之一。

[0013] 采用上述技术方案产生的有益效果在于:(1)本发明首次将 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中的表达比例作为评价造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境品质的指标之一,并通过大量试验进行了验证,对于预测造血干细胞移植后血液病患者植入不良的发生具有指导意义,并且对于指导制定植入不良患者的临床治疗方案具有重要的参考价值;(2)采用本发明的试剂盒、系统以及配套的方法,可以快速测定骨髓单个核细胞中 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 的表达比例,对骨髓微循环环境的评价提供了一种快速、准确评价的途径,是现有技术的有力补充。

附图说明

[0014] 图 1 中 A1、A2、A3 别是健康供者、植入良好和植入不良患者的骨髓细胞增生程度典型 HE 染色图(×10);

图 2 是对 1 例健康供者骨髓细胞进行 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 测定的典型流式设门分析图;

图 3A 是植入不良患者与植入良好患者之间移植后 CD34⁺ 的数目的差异;

图 3B 和图 3C 分别是健康者、植入不良患者以及植入良好患者 CD34⁺ 细胞和 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 细胞占骨髓单个核细胞比例的相关性结果;

图 4 中 A1-A3 分别是健康供者、植入良好和植入不良患者骨髓血管的典型 HE 染色图(×40),

图 5 中 B1-B3 分别是健康供者、植入良好和植入不良患者骨髓血管免疫组化的典型 CD34 染色图(×40);

图 6 是本发明系统的结构示意图;

其中,1 代表主控计算机单元,2 代表存储有主控程序的系统管理模块,LCD 代表配置缓存器模块 13 的监、控显示器,3 代表经验数据和图形存储模块,4 代表暂存器模块,5 代表设置在系统操控台上的操控面板,6 代表存储有内、外数据通讯协议和数据规格转换模式的通讯模块,7 代表打印机及接口电路,8 代表流式细胞仪,该仪器通过通讯接口电路 12 和主控

计算机 1 的数据总线连接,流式细胞仪 8 结构中配套有对标本进行激光扫描采样的测试窗口 9,10 是专用标本试管,11 代表专用试剂盒。

具体实施方式

[0015] 实施例 1

本实施例提供一种测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒,该试剂盒的应用基于流式细胞仪,该试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂:CD34-FITC、VEGFR2-PE、CD45-PerCP 和 CD133-APC。各单克隆抗体的荧光标记及成分等信息参见表 1。

[0016] 表 1 流式单克隆抗体信息

名称	荧光标记	克隆	产品目录号	公司
CD34	FITC	8G12	348053	BDBiosciences
VEGFR2	PE	89106	580494	BDBiosciences
CD45	PerCP	无	347464	BDBiosciences
CD133	APC	293C3	130-090-854	MiltenyiBiotec

所述试剂盒中还配置了红细胞溶解液、pH 为 7.2~7.4 的 10×PBS 缓冲液、以及配套计量的小牛血清。

[0017] 具体地,所述试剂盒中每种荧光标记的单克隆抗体试剂容量标准单元是:5 μL 的 CD34-FITC、5 μL 的 VEGFR2-PE、10 μL 的 CD45-PerCP 和 3 μL 的 CD133-APC,配套设置有不小于 3-5mL 的流式细胞仪专用试管至少 2 个。试验时,直接用微量吸枪吸取试剂盒中的每种荧光标记的单克隆抗体试剂即可,采用上述配比的试剂,测试结果重现性好、测试结果准确。

[0018] 本实施例还提供了一种测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测系统,系统结构中包括流式细胞仪和配套的数据分析模块,所述系统中还包括主控计算机单元 1,以及连接在主控计算机单元 1 配套接口上的存储有主控程序的系统管理模块 2、配置缓存器模块 13 的监控显示器 LCD、存储有前瞻性研究的数据和图形的存储模块 3、暂存器模块 4、设置在系统操控台上的操控面板 5、存储有内外数据通讯协议和数据规格转换模式的通讯模块 6、打印机及接口电路 7,流式细胞仪 8 通过通讯接口电路 12 和主控计算机单元 1 的数据总线连接,且流式细胞仪 8 结构中配套设有用于测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的专用试剂盒 11,所述专用试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂:CD34-FITC、VEGFR2-PE、CD45-PerCP 和 CD133-APC。

[0019] 以上的硬件设置保证了系统的专用性、方便了操作过程的完整性和快速、准确率。特别是前瞻性研究的数据和图形的存储模块的设立和配套管理程序模块的设置,包含了课题组的全部经验和成果,将复杂而繁琐的试验和分析过程转化为,简单的、自动化的数据与图形比对。使得染色、定性、定量实验室课题转化为普通医院的常规化验项目。

[0020] 所述前瞻性研究的数据和图形包括按照年龄、性别为标记,分别标示的健康人、植入良好和植入不良患者的骨髓做样本的骨髓微循环环境流式数据图库;所述流式数据图库中存储着采用所述专用试剂盒 11 中的染色单克隆抗体为试剂制成的骨髓样本按照存储模块 3 中特定的数据采集条件采集相关数据所测得的散点图、流式设门分析图和测定的 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 细胞表达比例、及该骨髓样本相关的临床特征。其中特定的数据采集条

件是指采集数据时流式细胞仪所设置的采样条件,包括电压,设门位置、大小及形状,采样数量(比如体积、细胞个数)等信息。

[0021] 流式设门分析图的分析方法是:先建立 FSC/SSC 点图,将活细胞区域划为 R1 区,以排除死细胞和细胞碎片;设 CD45/SSC 点图,根据各群细胞 CD45 和 SSC 的强度,画出 CD45⁻SSC^{low},即 CD45⁻区,对 CD45⁻区中的 CD34⁺VEGFR2⁺ 细胞进行设门分析,得出 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中的表达比例。

[0022] 监控显示器 LCD 借助暂存器模块 13 与主控计算机单元 1 的数据总线相连、配套设置触摸式电子鼠标。因为大量的图形数据处理和分析,要求该显示器配套中的暂存器模块 13 和配套设置触摸式电子鼠标以实现图形的快速拖动、进行比较分析。

[0023] 本系统的硬件结构和含有前瞻性研究的数据和图形的存储模块的配备,是实现本发明目的的基础条件。控制和引导具体操作的管理软件的汇编方法是实现发明目的又一个关键。

[0024] 该方法包括以下步骤:

A、将待测骨髓样本采用专用试剂盒中的试剂在流式细胞仪专用试管中进行荧光标记,制成测试样本;

B、将装有测试样本的专用试管置入流式细胞仪中,启动流式细胞仪 8 及配套的分析软件,按照特定的数据采集条件采集相关数据,形成散点图,并进行流式设门分析,传输并分类标记存入暂存器模块 4;

C、调出在存储模块 3 中前瞻性研究的数据和图形,显示在高清晰度的监控显示器 LCD 的上半区,在下半区调出暂存器模块 4 中的对应图谱,借助光标尺进行对照定量分析;

D、确定 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中表达比例的分界线值的位置;

E、将测定的 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例 \geq 分界线值定义为骨髓微循环环境良好; CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例 $<$ 分界线值定义为骨髓微循环环境不良;

F、从经验数据模块 3 中调出造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境检测报告表,填入测定数据、相关图表,比对后将“良好”、“不确定”、“不良”选择填入评测结论栏中,从激光打印机上输出。

[0025] 步骤 A 中所述测试样本的制备步骤包括:

A1、取试剂盒配套设置的专用试管,在试管中分别加入 5 μ L 的 CD34-FITC, 5 μ L 的 VEGFR2-PE, 10 μ L 的 CD45-PerCP 和 3 μ L 的 CD133-APC,再加入不少于 300 μ L 的待测骨髓样本、且保证骨髓细胞数在 5×10^6 - 1×10^7 个,混匀,室温避光放置 15 分钟孵育;

A2、加入用 1 \times PBS 稀释 10 倍后的红细胞溶解液 2mL,混匀后避光,室温放置 8 分钟;

A3、1500 转/分离心 5 分钟,弃上清液,加入 2mL 含 0.5wt.%~2wt.% 血清的 PBS,混匀;

A4、1500 转/分离心 5 分钟,弃上清液,加入 0.3mL 1 \times PBS 缓冲液、混匀,制成测试样本。

[0026] 其中,10 \times PBS 缓冲液的配制方法:称取 Na₂HPO₄·12H₂O 26.3g、NaH₂PO₄·2H₂O 3.0g 和 NaCl 85.0g 于容量瓶中,加蒸馏水至 1000mL,常温保存。将 10 \times PBS 缓冲溶液稀释 10 倍为 1 \times PBS。

[0027] 步骤 B 中所述流式设门分析包括:

B1、先建立 FSC/SSC 点图,将活细胞区域划为 R1 区,以排除死细胞和细胞碎片;

B2、设 CD45/SSC 点图,根据各群细胞 CD45 和 SSC 的强度,画出 CD45⁻SSC^{low},即 CD45⁻区;

B3、对 CD45⁻ 区中的 CD34⁺VEGFR2⁺ 细胞进行设门分析,得出 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中的表达比例。如图 2 所示,是对 1 例健康供者骨髓细胞进行 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 测定的典型流式设门分析图。

[0028] 据 ROC 曲线确定 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 在骨髓单个核细胞中表达比例 =0.055% 为分界线值,将 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例 <0.055% 定义为血管内皮祖细胞减少,骨髓微循环环境不良,将 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例 ≥ 0.055% 定义为血管内皮祖细胞正常,骨髓微循环环境不良。

[0029] 下面首先验证采用上述试剂盒、系统和方法对骨髓微循环环境进行研究的科学性。分别通过实施例 2 和实施例 3 中关于造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境组分的 HE 染色和造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境组分的免疫组化染色进行验证。

[0030] 实施例 2、造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境组分的 HE 染色

1、固定:取骨髓组织切成小块,10% 中性福尔马林溶液内固定 24 小时;1×PBS 缓冲液洗 5 分钟,5 次;

2、脱水:把固定好的组织标本分别在 70% 乙醇 1 小时,80% 乙醇 1 小时,95% 乙醇 I 1 小时,95% 乙醇 II 2 小时,95% 乙醇 III 2 小时,100% 乙醇 I 1 小时和 100% 乙醇 2 小时;

3、透明:将脱水后标本分别在二甲苯 I 和二甲苯 II 中放置 10 分钟和 20 分钟;

4、浸蜡:经透明后的组织放入熔化的石蜡中浸透,反复 3 次,每次 0.5-1 小时;

5、包埋:在包埋器中倒入熔化的新石蜡,在其凝固之前迅速放入组织块,放入前要分清组织的各个面,将所需断面朝下;包埋有腔组织时,把组织平放或立放;

6、切片:在切片机上切下厚度为 4 μm 的切片,在 37 °C 水浴展开,并捞于免疫组化专用玻片上;在 60 °C 烤箱中烘烤 4 小时;

7、脱蜡:把切片放置于二甲苯 I、II 各 5 分钟;

8、进水:把切片分别放置于 100%、95%、85%、75%、50% 乙醇中各 5 分钟,放置于自来水 5 分钟;

9、HE 染色:把切片放于苏木精染液中 5 分钟,1% 盐酸水溶液分化数秒钟(3 ~ 4 秒),流水冲洗后放置于 0.5% 伊红乙醇溶液中 1 分钟;

10、脱水:将切片放置于 85%、95% 乙醇各数秒钟,100% 乙醇 I、II 各 1 分钟;

11、二甲苯中放置数秒透明,采用中性树胶封片;

12、光学显微镜下观察 HE 染色组织切片,如图 1 和图 4 所示,研究结果发现健康供者的骨髓造血容量以及每个骨小梁中的血管数量大于植入良好患者大于植入不良患者。

[0031] 实施例 3 造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境组分的免疫组化染色

1、应用抗人 CD34 单克隆抗体对骨髓组织切片中的血管进行免疫组化检测,同 HE 染色一样先对石蜡切片进行脱蜡和进水;

2、抗原修复:切片放入已预热的 0.01M 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)内煮沸 20 分钟,自然冷却 20 分钟;

3、用 3% 过氧化氢室温孵育 20 分钟,以消除内源性过氧化物酶的活性;

4、应用蒸馏水冲洗切片,PBS 缓冲液中浸泡 5 分钟;

5、除去 PBS 缓冲液，每张切片加 1 滴或 50u1 正常非免疫动物血清，封闭，室温下孵育 10 分钟，倾去血清，勿洗，滴加 1:100 稀释的抗人 CD34 单克隆抗体(美国 Abcam 公司)，4 摄氏度湿盒过夜；

6、PBS 液冲液洗切片，每次 5 分钟，共 3 次；

7、滴加 Envision 工作液，室温中放置 30 分钟

8、PBS 液冲液洗切片，每次 5 分钟，共 3 次；

9、除去 PBS 缓冲液，每张切片加 2 滴或 100u1 新鲜配制的 DAB 溶液，显微镜下观察 3-10 分钟；

10、自来水冲洗，苏木精染液复染 1 分钟，自来水冲洗返蓝；

11、将切片放置于 85%、95%乙醇各数秒钟，100%乙醇 I、II 各 1 分钟，二甲苯中放置数秒透明，采用中性树胶封片；

12、光学显微镜下观察各切片中每个骨小梁中 CD34 阳性血管的数量；如图 5 所示，研究结果发现健康供者每个骨小梁中 CD34 阳性血管的数量多于植入良好患者多于植入不良患者。

[0032] 实施例 4

采用实施例 1 中的试剂盒、系统和方法对 2012 年 4 月 1 日~2013 年 4 月 15 日在北京大学人民医院、北京大学血液病研究所收治的异基因造血干细胞移植后植入不良 (poor graft function, PGF) 和植入良好 (good graft function, GGF) 的血液病患者，按照 1:2 比例进行前瞻性配对研究，对采用实施例 2 和 3 中的方法对实施例 1 的结果进行验证。对于每例 PGF 患者，均随机选取 2 例在年龄、移植前化疗疗程、移植时疾病状态以及移植后骨髓微循环环境的评估时间方面相匹配的 GGF 患者纳入本研究。GGF 入组标准：在造血干细胞移植 +28 天之后持续保持成功植入 (中性粒细胞绝对值 [ANC] $>0.5 \times 10^9/L$ 持续 3 天以上；血小板计数 [PLT] $>20 \times 10^9/L$ 持续 7 天以上；血红蛋白水平 [Hb] $>70g/L$ 并脱离红细胞输注)。PGF 入组标准：在造血干细胞移植 +28 天之后出现 2-3 系血细胞减少持续 3 天以上 (ANC $\leq 0.5 \times 10^9/L$ 持续 3 天以上；PLT $\leq 20 \times 10^9/L$ ；或 Hb $\leq 70g/L$)，不能脱离血制品输注，伴有低增生性骨髓，不伴有严重移植物抗宿主病及血液学复发。

[0033] 全部患者均在北京大学血液病研究所接受标准化诊断与异基因造血干细胞移植治疗。异基因造血干细胞移植方案按照北京大学血液病研究所的移植常规进行。本研究已经通过北京大学人民医院伦理委员会审批，全部入组患者均签署了知情同意书。

[0034] 下面对造血干细胞移植后植入不良和植入良好的两组血液病患者的临床特征以及骨髓血管内 CD45⁻CD34⁺VEGFR2⁺ 表达比例进行统计学分析。

[0035] 1、临床特点

本组患者植入不良的中位发生时间是移植后 90 天 (58-264 天)。植入不良组和植入良好组患者骨髓检测时间均为移植后 90 天 ($P>0.05$)。DNA 指纹图检测提示所有患者均为完全供者型。GGF 和 PGF 两组患者的临床特征如表 2 所示。

[0036] 表 2 移植后植入良好和植入不良患者的临床特征

患者特征	植入不良组 (n=19)	植入良好组 (n=38)	P-Value ^b
骨髓微循环评估时间 (移植后天数)	90(58-264)	90(30-270)	0.61
骨髓细胞增生程度 (%) (范围)	10(5-15)	45(30-50)	<0.0001
骨髓微循环环境成分			
CD45 CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ 比例 (%) (范围)	0.008(0.001-0.14)	0.16(0.07-0.25)	<0.0001
CD34 ⁺ 血管数量 (每个骨小梁) (范围)	2(0-4)	4(2-6)	<0.0001
外周血细胞计数			
中位白细胞计数 ($\times 10^9/L$) (范围)	1.73(0.32-5.34)	5(3.10-7.60)	<0.0001
中位中性粒细胞计数 ($\times 10^9/L$) (范围)	1.10(0.16-6.50)	3.65(1.55-6.38)	<0.0001
中位血红蛋白水平 (g/L) (范围)	76(56-103)	120(78-151)	<0.0001
中位血小板计数 ($\times 10^9/L$) (范围)	17(9-142)	119(61-243)	<0.0001
移植时年龄 (岁, 中位值, 范围)	27(16-57)	35.5(16-55)	0.48
性别 (男/女)	9/10	23/15	0.40
疾病诊断			
急性髓细胞白血病	4	9	1.00
急性淋巴细胞白血病	9	17	1.00
慢性粒细胞白血病	2	4	1.00
骨髓增生异常综合征	4	8	1.00
移植时疾病状态			
标危	16	25	0.11
高危	3	13	
确诊到移植的中位时间 (月, 范围)	12(4-20)	10(2-30)	0.32
干细胞来源			
骨髓和外周血	17	34	1.00
外周血	2	4	
移植的单个核细胞数 ($\times 10^8$ /公斤, 中位值, 范围)	8.06(5.34-15.34)	7.59(3.50-10.08)	0.12

从表 2 可以看出,本研究共入组 57 例接受异基因造血干细胞移植的血液病患者,包括 19 例植入不良患者和 38 例植入良好患者,两组患者之间的年龄、性别、疾病诊断、移植前化疗疗程及疾病状态、干细胞来源、供受者之间 HLA 匹配程度、供受者之间 ABO 血型匹配程度、供受者之间性别匹配程度、移植的单个核细胞数和 CD34⁺ 细胞数、确诊到移植的时间、移植后进行骨髓微循环环境检测的时间、预处理方案、移植物抗宿主病病史、巨细胞病毒感染病

史和抗巨细胞治疗疗程等临床特征无显著性差异($P>0.05$)。植入不良组患者外周血细胞计数(包括 ANC、Hb、PLT)和骨髓增生程度、 $CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 比例和 $CD34^+$ 血管数量明显低于植入良好组患者($P<0.0001$)。

[0037] 健康供者、植入良好和植入不良患者的骨髓细胞增生程度典型 HE 染色图($\times 10$)也证实:健康供者的骨髓细胞增生程度依次优于植入良好患者和植入不良患者。

[0038] 图 3 表明,尽管植入不良和植入良好两组患者之间移植的 $CD34^+$ 细胞数量无显著差异,但是移植后植入不良组患者的 $CD34^+$ 细胞比例和血管内皮祖细胞比例均明显低于植入良好组患者,而植入良好组患者和健康供者之间无上述细胞比例无统计学差异。

[0039] 2、植入不良患者和植入良好患者外周血和骨髓的细胞数量分析

进行骨髓微循环环境检测时植入不良组患者的外周血细胞计数明显低于植入良好组患者。植入不良组患者的中位白细胞计数 ($1.73 \times 10^9/L$ vs. $5 \times 10^9/L$, $P<0.0001$), 中性粒细胞计数 ($1.1 \times 10^9/L$ vs. $3.65 \times 10^9/L$, $P<0.0001$), 血红蛋白水平 (76 g/L vs. 120 g/L , $P<0.0001$) 和血小板计数 ($17 \times 10^9/L$ vs. $119 \times 10^9/L$, $P<0.0001$) 均明显低于植入良好组患者。

[0040] 植入不良患者骨髓病理表现为造血容量减少,脂肪细胞比例增高。植入不良组患者的造血容量明显低于植入良好组患者和健康供者 (10% vs. 45% vs. 45% , $P<0.0001$)。

[0041] 3、通过流式细胞术定量检测骨髓 $CD34^+$ 细胞和 $CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 比例

如图 3 所示,尽管植入不良组和植入良好组患者所移植的 $CD34^+$ 细胞数量无明显统计学差异,但是植入不良组患者的骨髓 $CD34^+$ 细胞比例明显低于植入良好组患者和健康供者 (0.07% vs. 0.26% vs. 0.26% , $P<0.0001$)。

[0042] 植入不良组患者骨髓 $CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 比例明显低于植入良好组患者和健康供者 (0.008% vs. 0.16% vs. 0.18% , $P<0.0001$)。

[0043] 4、植入不良的危险因素分析

如表 2 所示,应变量为移植后发生植入不良,自变量包括患者的年龄、性别、疾病诊断、移植前化疗疗程及疾病状态、干细胞来源、供受者之间 HLA 匹配程度、供受者之间 ABO 血型匹配程度、供受者之间性别匹配程度、移植的单个核细胞数和 $CD34^+$ 细胞数、确诊到移植的时间、移植后进行骨髓微循环环境检测的时间、预处理方案、移植物抗宿主病病史、巨细胞病毒感染病史和抗巨细胞治疗疗程、骨髓血管内皮祖细胞比例等临床特征。单因素预后分析结果显示疾病诊断(骨髓增生异常综合征 vs. 白血病)、移植物抗宿主病病史和骨髓血管内皮祖细胞($CD45^-CD34^+VEGFR2^+$ 表达比例) ($<0.055\%$ vs. $\geq 0.055\%$)是影响移植后患者发生植入不良的危险因素。

[0044] 多因素预后分析显示,疾病诊断(骨髓增生异常综合征 vs. 白血病)、和骨髓血管内皮祖细胞($<0.055\%$ vs. $\geq 0.055\%$)为影响造血干细胞移植后植入不良发生的独立危险因素。

[0045] 综上所述,本发明的系统和方法可以定量、定性测定造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境的,从而对移植后患者的后续治疗具有重要的指导意义。

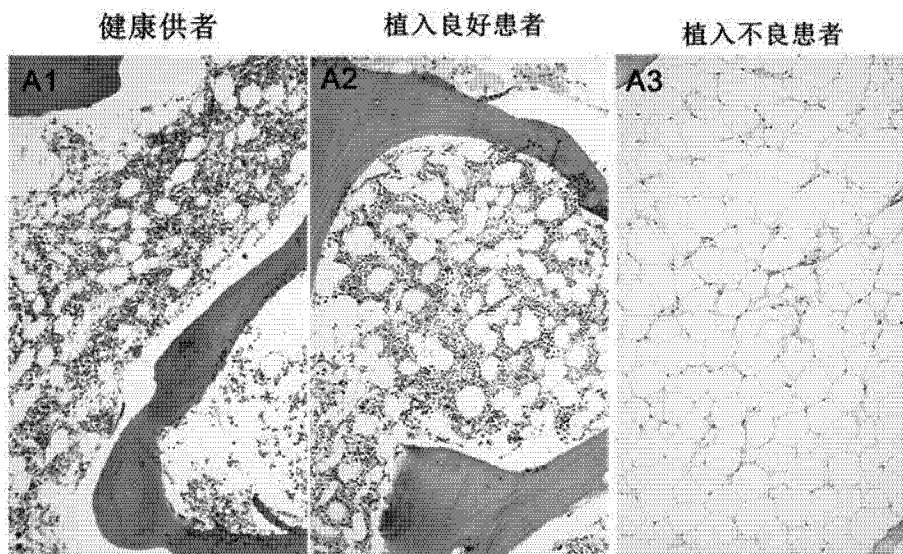


图 1

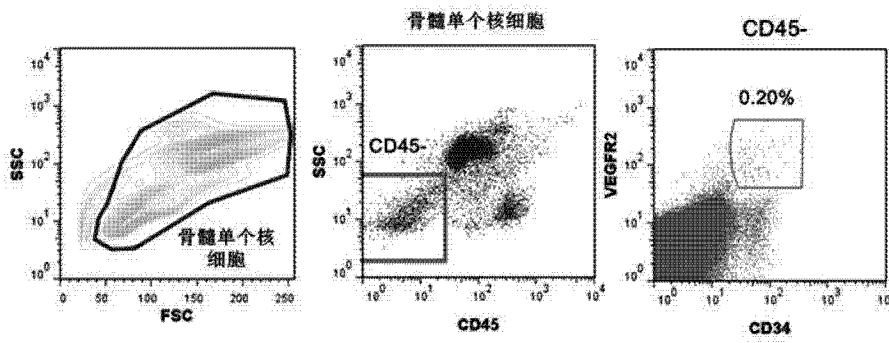


图 2

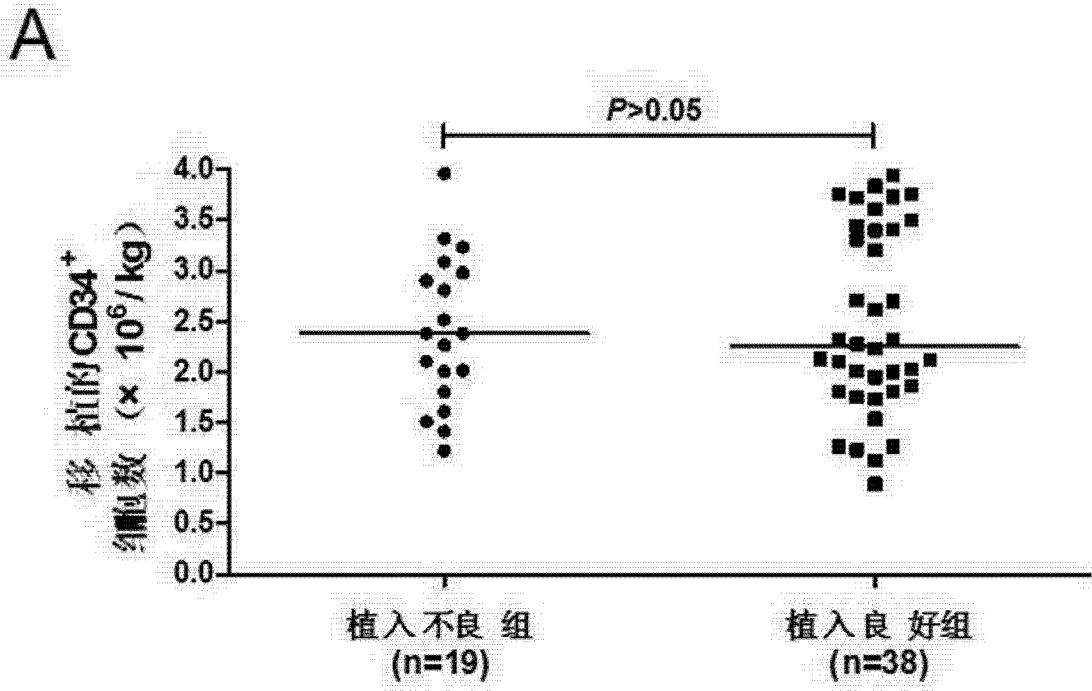


图 3A

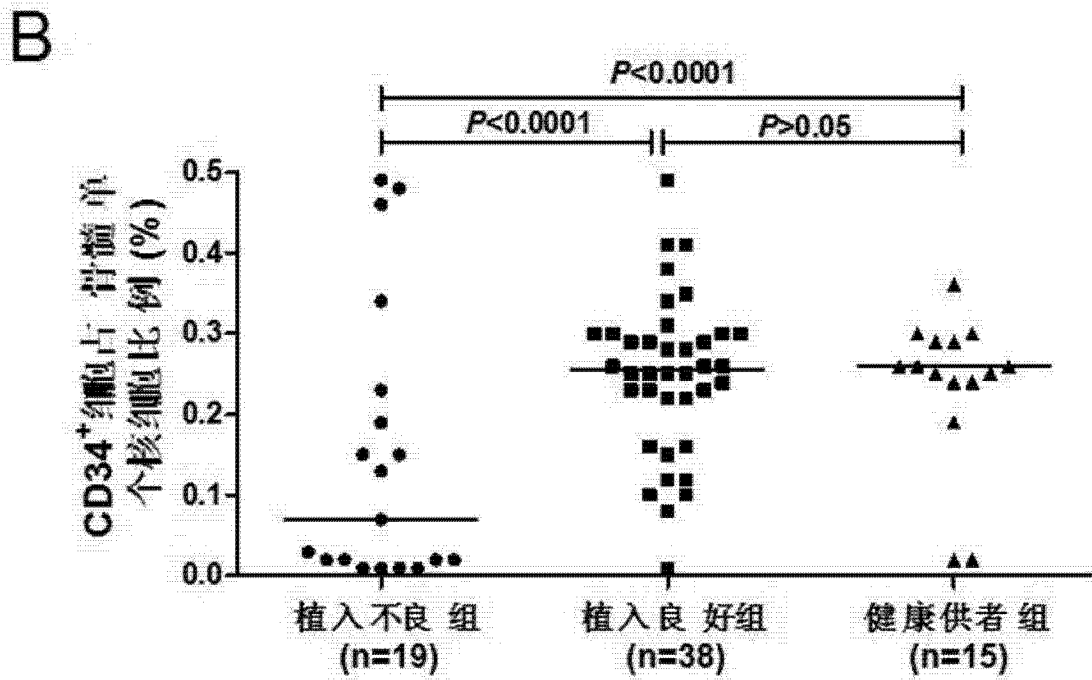


图 3B

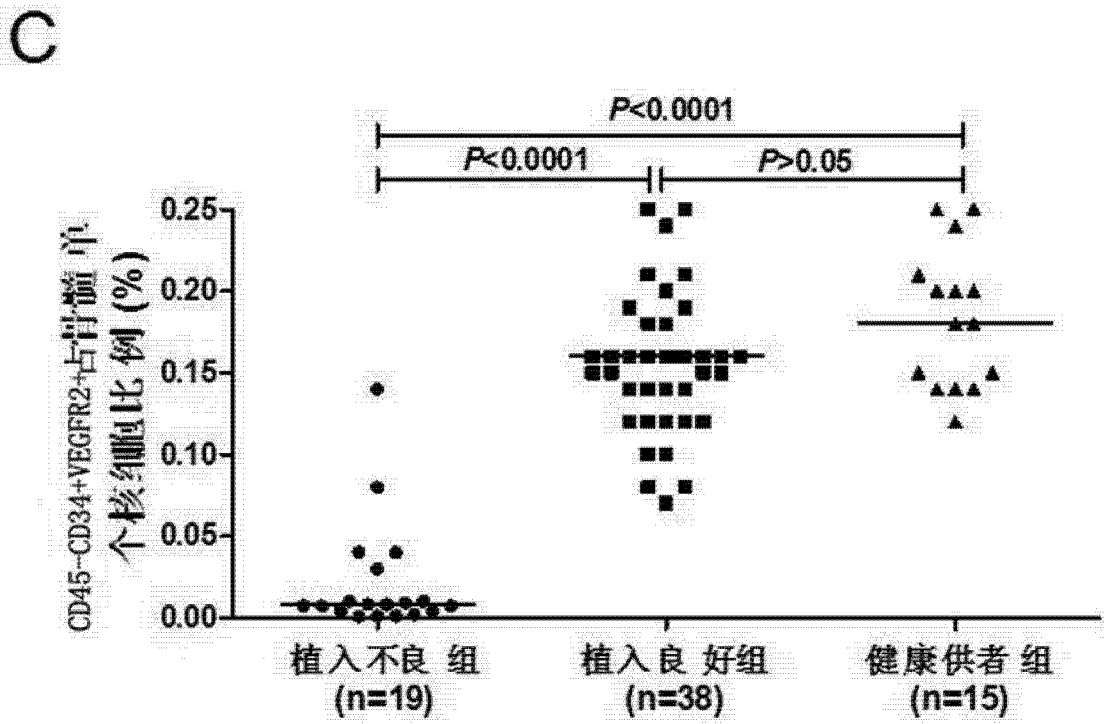


图 3C

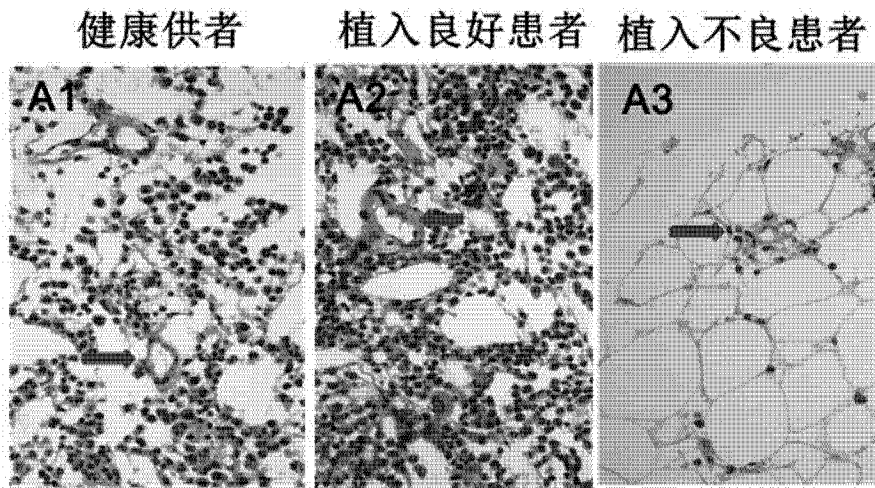


图 4

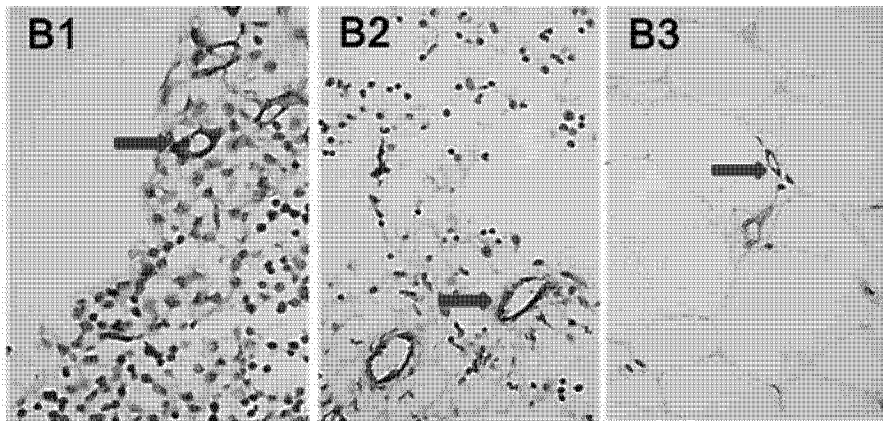


图 5

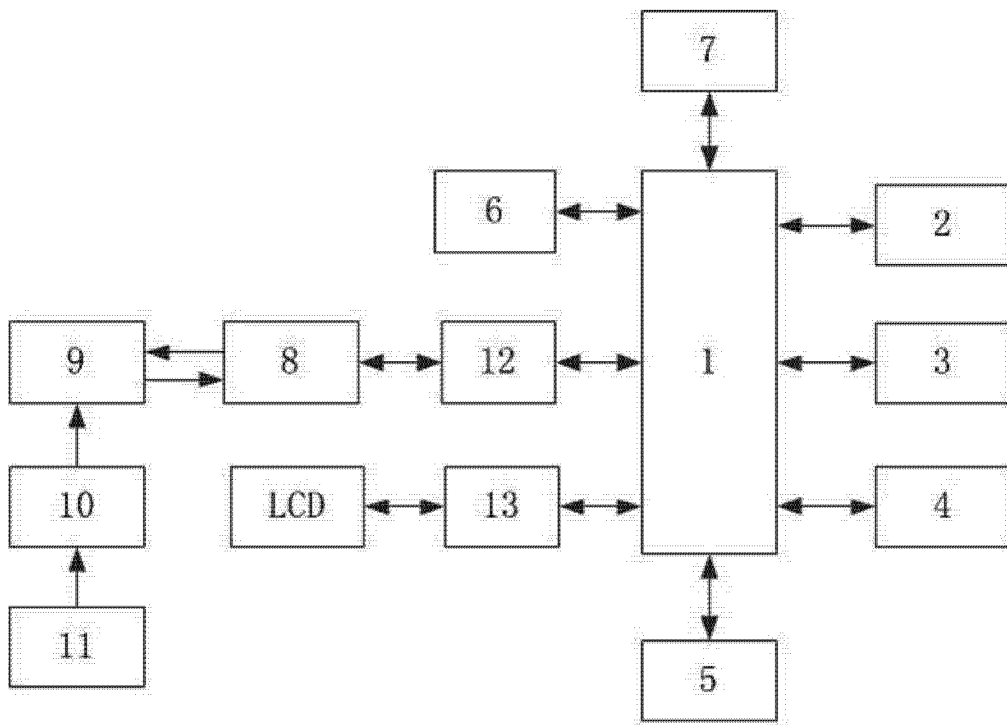


图 6

专利名称(译)	测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒、系统及方法		
公开(公告)号	CN103743907A	公开(公告)日	2014-04-23
申请号	CN201310314467.9	申请日	2013-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
[标]发明人	黄晓军 孔圆 常英军 王亚哲 袁晓英 胡玥 王昱 刘代红 许兰平		
发明人	黄晓军 孔圆 常英军 王亚哲 袁晓英 胡玥 王昱 刘代红 许兰平		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N15/14 G01N33/5073 G01N33/533 G01N33/577		
其他公开文献	CN103743907B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定造血干细胞移植后患者骨髓微循环环境评测的试剂盒、系统和方法，该试剂盒、系统和方法的应用基于流式细胞仪，所述试剂盒中配置了下述荧光标记的单克隆抗体试剂：CD34-FITC、VEGFR2-PE、CD45-PerCP和CD133-APC。所述系统中设有主控计算机单元和存储有前瞻性研究的数据和图形的存储单元，该硬件的配置是实现测定重要保证。本发明首次将CD45-CD34+VEGFR2+在骨髓单个核细胞中的表达比例作为评价造血干细胞移植后血液病患者骨髓微循环环境品质的指标之一，对于预测造血干细胞移植后血液病患者植入不良的发生具有指导意义，对于临床治疗方案的制定具有重要的参考价值。

