



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108627641 A

(43)申请公布日 2018.10.09

(21)申请号 201810400121.3

(22)申请日 2018.04.28

(71)申请人 璞晞(广州)生物免疫技术有限公司

地址 510000 广东省广州市海珠区广州国际生物岛寰宇三路36号合景星辉广场北塔201A

(72)发明人 曾首杰

(74)专利代理机构 广州新诺专利商标事务所有

限公司 44100

代理人 罗毅萍 刘婉

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

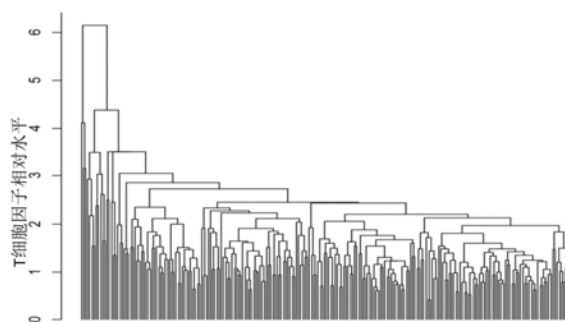
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

肝病T细胞功能的检测评估方法及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种肝病相关T细胞功能的检测评估方法,包括步骤:1)利用单个细胞通过流式细胞仪,使用抗细胞因子抗体与细胞表面或胞内特定标记组合,即可检测不同细胞因子的分泌,根据不同的标记获取结果;同时采用特殊化学与抗体选择,该特殊化学与抗体为特异性与细胞表面分泌的细胞因子结合的抗体,该抗体带有颜色的荧光标记化合物,能清楚区分无分泌该种细胞因子的免疫细胞;2)利用全新的大数据生物统计学分析技术,对每一个细胞因子对造成整体免疫功能的贡献/作用/影响进行判读。本发明还公开了一种肝病T细胞功能检测试剂盒。本发明的试剂盒能够有效检测T细胞的总体功能。



对肝病患者T细胞免疫因子指标进行k-means系统聚类 (N=629)

1. 一种肝病T细胞功能的检测评估方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 利用单个细胞通过流式细胞仪,使用抗细胞因子抗体与细胞表面或胞内特定标记组合,检测不同细胞因子的分泌,根据不同的标记获取结果;所述抗细胞因子抗体带有颜色的荧光标记的化合物,能够清楚地区分无分泌相应细胞因子的免疫细胞;

2) 利用大数据生物统计学分析技术,对每一个细胞因子对造成整体免疫功能的贡献/作用/影响进行判读,根据数据模型,最终形成对整体免疫功能的判读。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述抗体为以下多种:CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤1) 具体包括:PBMC分离培养;流式细胞术检测T细胞表面共抑制分子;流式细胞术检测T细胞胞内因子。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述PBMC分离培养包括以下步骤:

1) 采EDTA抗凝血20ml;离心,500g,8min,升9,降9,分离血浆,标记,血浆-80 $^{\circ}$ C保存待用,血细胞层留用;稀释:将血细胞移至50ml离心管,加PBS至约30ml,并吹打均匀;

2) 取4支15ml离心管,每管加4.5ml淋巴细胞分离液,然后将血液加至所述分离液上面;

3) 无刹车密度梯度离心:25 $^{\circ}$ C,450g,25min,升5,降0;

4) 取出试管,见其分为以下四层:上层为PBS及部分剩余血浆,即血浆层,下层为红细胞及粒细胞;中层为淋巴细胞分离液,在淋巴细胞分离液与血浆层之间可见白膜层,吸取白膜层细胞,以1:5体积比,用PBS洗涤细胞2次,500g,8min;

5) 沉淀细胞加入培养基重悬,用2%的苔盼蓝染色,证实活细胞数在95%以上,调密度为 1×10^7 /ml。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述流式细胞术检测T细胞表面共抑制分子包括以下步骤:

1) 流式抗体的使用量为2-5 μ l,每只流式管取用RPMI 1640+10%FBS完全培养基重悬的细胞 1×10^5 个;

2) 4 $^{\circ}$ C,400g,8min离心,弃上清,倒置吸水,利用管中残余的液体弹匀细胞;加入带有各自荧光标记的抗体:CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3各2 μ l,4 $^{\circ}$ C孵育30min,隔15min弹匀一下;

3) 加入PBS 1ml洗1次,4 $^{\circ}$ C,400g,8min,弃上清,倒置吸水;120 μ l PBS+40 μ l 4%PFA涡旋器上立刻重悬,固定;

4) 上机检测。

6. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述流式细胞术检测T细胞胞内因子包括以下步骤:

1) 取待用PBMC细胞500 μ l,加入淋巴细胞刺激剂10 μ l,50 \times ,弹匀,37 $^{\circ}$ C细胞培养箱与白细胞活化物刺激孵育4h;

2) 加入表面抗体PECF-594 CD3 2 μ l、APC CD4 2 μ l、V450 CD8 2 μ l、弹匀,4 $^{\circ}$ C冰箱孵育30min,隔15min晃动一次;

3) 每管加1ml PBS,450g 8min离心,洗涤,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞;

4) 每管加FIX&PERM 400 μ l,立即涡旋混匀,室温孵育30min或4 $^{\circ}$ C孵育45min;

5) 每管加入1ml PBS离心洗涤,750g,10min离心,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞;

6) 每管加Perm缓冲液500 μ l离心洗涤,4 $^{\circ}$ C,750g,10min离心,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞;

7) 加胞内抗体IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3弹匀,4 $^{\circ}$ C孵育45min,中间弹匀一次;

8) 每管加入Perm缓冲液500 μ l洗1次,750g,10min;

9) 150 μ l PBS重悬,上机进行流式检测。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤2)中,所述大数据生物统计学分析所采用的方法包括:

采用聚类分析法利用免疫指标将T细胞功能状态分类为免疫状况好和免疫状况差。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:通过聚类,获得每个T细胞因子的标化数值,形成标化数值模型。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:构建以下方程进行判读;

$$Z=c+a_1X_1+a_2X_2+\dots+a_pX_p \quad (\text{公式2})$$

以上方程满足2类间的距离最大,即:

$$D^2 = \frac{(\bar{Z}_1 - \bar{Z}_2)^2}{S_Z^2} \quad (\text{公式3})$$

其中, \bar{Z}_1 、 \bar{Z}_2 分别表示两类人群的评分得分, S_Z^2 为方差;寻找这样一组系数 a_1, a_2, \dots, a_p ,使得 D^2 最大,即距离最大,那么对应公式2即为判别方程。

10. 一种肝病T细胞功能检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含用于检测以下多种T细胞因子群的试剂:IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3。

肝病T细胞功能的检测评估方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学和免疫检验领域,涉及一种乙肝肝病相关的总体T细胞功能检测和评估方法,具体地说,涉及一种总体T细胞功能的检测评估方法,以及用于该方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 虽然乙肝疫苗推广已有30余年,目前仍有2.4亿乙肝感染者,每年约有100万人死于乙肝肝病,我国占有9300万,占全球38.75%。乙肝病毒(HBV)是非细胞毒性的嗜肝病毒,肝细胞炎症损伤不是病毒直接作用引起,而是由宿主免疫反应所介导。同时,机体清除病毒也主要依赖免疫反应,其中T细胞免疫起重要作用(见图1)。T细胞分为CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞,其功能由T细胞活化性因子和衰竭因子水平决定,活化性因子主要有:白介素2(IL-2)、 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α);衰竭分子有:PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、2B4(图2)。

[0003] 随着HBV进入肝脏,大量炎症细胞也随之涌入肝脏,尤其是HBV特异性及非特异性T细胞,通过分泌细胞因子或通过直接细胞裂解作用进一步清除病毒,但在清除病毒的同时也引起受感染肝细胞凋亡、坏死,临床上即表现为转氨酶升高、HBV-DNA下降、清除。急性HBV感染时,机体的固有免疫及适应性免疫能够产生大量的抗病毒因子及足量、功能全面的T细胞,以至完全清除病毒。HBV慢性感染者体内却不能产生强烈的固有免疫和适应性免疫反应,造成后续大量的HBV抗原在血液及肝组织中蓄积,进一步引起T细胞功能缺失、衰竭和凋亡,T细胞衰竭是机体不能清除病毒、造成慢性持续感染的主要原因。因此,T细胞功能评估至关重要。

[0004] 目前缺乏用于有效评估乙肝T细胞总体功能的临床检测试剂盒。

[0005] 随着生命组学的发展,免疫系统的相关技术不断进步,从70年代开始的免疫球蛋白、补体等测定,能粗略和间接地估计机体的免疫状态,已经逐步被淋巴细胞亚群、细胞因子的检测替代,代表性的检测手段包括:

[0006] 1) 基于DNA检测的生物学方法,如PCR、RNA印迹、原位杂交等技术,这类方法能够对单一细胞免疫因子进行检测,并研究其调控通路;

[0007] 2) 生物活性检测方法,如ELISA、ELISPOT等,这类方法只对单一细胞或者单一免疫细胞分泌因子进行检测,而非对某一群免疫细胞的平均细胞因子水平进行检测;

[0008] 3) 流式细胞技术和液态芯片检测:目前较为精准的检测技术,可对多个细胞因子进行检测,根据不同细胞因子水平对免疫状态进行预估;然而,带有较强的主观性。

发明内容

[0009] 本发明的一个目的是针对以上要解决的技术问题,提供一种较为准确、高效的T细胞功能的检测评估方法。

[0010] 本发明的另一个目的是提供一种准确、高效的肝病T细胞功能检测试剂盒。

[0011] 本发明的目的是采用以下技术方案来实现的。

[0012] 本发明提供了一种肝病T细胞功能的检测评估方法,其包括:

[0013] 1) 利用单个细胞通过流式细胞仪,使用抗细胞因子抗体与细胞表面或胞内特定标记组合,检测不同细胞因子的分泌,根据不同的标记获取结果;所述抗细胞因子抗体带有颜色的荧光标记的化合物,能够清楚地区分无分泌相应细胞因子的免疫细胞;

[0014] 2) 利用大数据生物统计学分析技术,对每一个细胞因子对造成整体免疫功能的贡献/作用/影响进行判读,根据数据模型,最终形成对整体免疫功能的判读。

[0015] 优选地,所述抗体为以下多种:CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3。更优选地,所述抗体为CD4_IFN- γ 、CD4_IL-2、CD4_TNF- α 、CD4_CTLA-4、CD4_2B4、CD4_PD-1、CD8_IFN- γ 、CD8_IL-2、CD8_PD-1、CD8_Tim3、CD8_CTLA-4、CD8_2B4、CD8_LAG3。

[0016] 所述T细胞为肝脏疾病相关的T细胞。

[0017] 优选地,步骤(1)具体包括:PBMC分离培养;流式细胞术检测T细胞表面共抑制分子;流式细胞术检测T细胞胞内因子。

[0018] 更优选地,PBMC分离培养包括以下步骤:

[0019] 1) 采EDTA抗凝血20ml;离心,500g,8min,升9,降9,分离血浆,标记,血浆-80℃保存待用,血细胞层留用;稀释:将血细胞移至50ml离心管,加PBS至约30ml,并吹打均匀;

[0020] 2) 取4支15ml离心管,每管加4.5ml淋巴细胞分离液,然后将加至分离液上面;

[0021] 3) 无刹车密度梯度离心:25℃,450g,25min,升5,降0;

[0022] 4) 取出试管,见其分为以下四层:上层为PBS及部分剩余血浆,即血浆层,下层为红细胞及粒细胞;中层为淋巴细胞分离液,在淋巴细胞分离液与血浆层之间可见白膜层,吸取白膜层细胞,以1:5体积比,用PBS洗涤细胞2次,500g,8min;

[0023] 5) 沉淀细胞加入培养基重悬,用2%的苔盼蓝染色,证实活细胞数在95%以上,调密度为1* 10^7 /ml。

[0024] 更优选地,流式细胞术检测T细胞表面共抑制分子包括以下步骤:

[0025] 1) 流式抗体的使用量为2-5 μ l,每只流式管取用RPMI 1640+10%FBS完全培养基重悬的细胞1* 10^5 个;

[0026] 2) 4℃,400g,8min离心,弃上清,倒置于吸水纸吸一下,利用管中残余的液体弹匀细胞;加入带有各自荧光标记的抗体:CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3各2 μ l,4℃孵育30min,隔15min弹匀一下;

[0027] 3) 加入PBS 1ml洗1次,4℃,400g,8min,弃上清,倒置于吸水纸吸一下;120 μ l PBS+40 μ l 4%PFA涡旋器上立刻重悬,固定;

[0028] 4) 上机检测。

[0029] 更优选地,流式细胞术检测T细胞胞内因子包括以下步骤:

[0030] 1) 取待用PBMC细胞500 μ l,加入淋巴细胞刺激剂10 μ l (50 \times),弹匀,37℃细胞培养箱与白细胞活化物刺激孵育4h;

[0031] 2) 加入表面抗体PECF-594 CD3 2 μ l、APC CD4 2 μ l、V450 CD8 2 μ l、弹匀,4℃冰箱孵育30min,隔15min晃动一次;

[0032] 3) 每管加1ml PBS,450g 8min离心,洗涤,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用

剩余液体弹匀细胞；

[0033] 4) 每管加FIX&PERM 400 μ l,立即涡旋混匀,室温孵育30min或4 $^{\circ}$ C孵育45min;

[0034] 5) 每管加入1ml PBS离心洗涤,750g,10min离心,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞;

[0035] 6) 每管加Perm缓冲液500 μ l离心洗涤,4 $^{\circ}$ C,750g,10min离心,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞;

[0036] 7) 加胞内抗体IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3弹匀,4 $^{\circ}$ C孵育45min,中间弹匀一次;

[0037] 8) 每管加入Perm缓冲液500 μ l洗1次,750g,10min;

[0038] 9) 150 μ l PBS重悬,上机进行流式检测。

[0039] 优选地,所述步骤(2)中,所述大数据生物统计学分析所采用的方法包括:采用聚类分析法利用免疫指标将T细胞功能状态分类为免疫状况好和免疫状况差。

[0040] 更优选地,通过聚类,获得每个T细胞因子的标化数值,形成标化数值模型。

[0041] 更优选地,构建以下方程进行判读;

[0042] $Z = c + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_pX_p$ (公式2)

[0043] 以上方程满足2类间的距离(即马氏距离)最大,即:

[0044] $D^2 = \frac{(\bar{Z}_1 - \bar{Z}_2)^2}{S_z^2}$ (公式3)

[0045] 其中, \bar{Z}_1 、 \bar{Z}_2 分别表示两类人群的评分得分, S_z^2 为方差;寻找这样一组系数 a_1 , a_2, \dots, a_p ,使得 D^2 最大,即距离最大,那么对应公式2即为判别方程。

[0046] 本发明的T细胞功能检测评估方法,1)利用单个细胞通过流式细胞仪,使用抗细胞因子抗体与细胞表面或胞内特定标记组合,即可检测不同细胞因子的分泌,根据不同的标记获取结果;同时采用特殊的化学与抗体选择,确保静止与无细胞因子分泌的细胞的最小荧光背景,即能够有效去除假阳性结果,有助于结果的精确度。该特殊化学与抗体是指特异性与细胞表面分泌的细胞因子结合的抗体,该抗体带有颜色的荧光标记的化合物,能清楚地区分无分泌该种细胞因子的免疫细胞。2)利用全新的大数据生物统计学分析技术,对每一个细胞因子对造成整体免疫功能的贡献/作用/影响进行判读,根据精密的数据模型,对所用细胞因子对免疫功能的作用形成最终对T细胞的整体免疫功能判读。

[0047] 本发明还提供了一种肝病T细胞功能检测试剂盒,所述试剂盒包含包含用于检测以下多种T细胞因子群的试剂:CD4+T和CD8+T细胞表达的IFN- γ 、IL2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3。

[0048] 本发明的肝病T细胞功能检测试剂盒,抗体为以下多种:CD4+T和CD8+T细胞表达的IFN- γ 、IL2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3。

[0049] 本发明的肝病T细胞功能检测试剂盒,所述肝病T细胞为乙肝肝病相关的T细胞。

[0050] 本发明具有如下优点和有益效果:

[0051] 本发明通过先进的流式细胞技术对乙型肝炎大样本中T细胞活化因子群和T细胞表达的衰竭分子群进行检测,获得每个细胞免疫因子的具体数值,并利用全新的生物大数据分析,得到这系列T细胞因子对T细胞免疫功能的综合贡献,最终获得准确体现T细胞免疫功能的指标。

[0052] 此外,本发明还提供了多信息优势:可提供代表性的13个T细胞活化因子和衰竭因子的实际数值,代表这些细胞免疫因子实时的数量和水平;可提供每一个细胞因子的水平对形成T细胞总体功能的作用;可提供总体T细胞功能状况。

附图说明

- [0053] 图1是慢性乙型肝炎T细胞表面因子的相互作用示意图。
- [0054] 图2是慢性HBV感染T细胞衰竭时其抑制性分子表达及细胞因子分泌示意图,表明肝脏中T细胞炎症因子与抑制性因子的相互制衡。
- [0055] 图3是流式细胞检测T细胞各亚群分泌功能的代表图。
- [0056] 图4是T细胞功能活化因子与衰竭因子的相关性示意图,有颜色填充表示有相关性,颜色填充越深,相关性越强;空白无填充的表示无相关性。
- [0057] 图5是T细胞功能判别进行的Kmeans系统聚类分析图。

具体实施方式

- [0058] 以下通过具体实施例对本发明作进一步详细说明,但并不仅限于以下实施例。
- [0059] 本发明采用聚类分析(K-means法)利用免疫指标将T细胞免疫功能分为免疫状况好和免疫状况差。

1、K-means法聚类分析的统计原理

[0061] 聚类分析的目的是使得距离较近(性质相似)的样本聚为不同的类别。常见的衡量距离的聚类统计量为欧氏距离。其计算如下(见表1):

[0062] 表1:聚类分析的数据结构

样本	变量(因子)					
	X_1	X_2	X_j	X_m
1	X_{11}	X_{12}	X_{1j}	X_{1m}
2	X_{21}	X_{22}	X_{2j}	X_{2m}
...
i	X_{i1}	X_{i2}	X_{ij}	X_{im}
...
k	X_{k1}	X_{k2}	X_{kj}	X_{km}
...
n	X_{n1}	X_{n2}	X_{nj}	X_{nm}
均值	\bar{X}_1	\bar{X}_2	\bar{X}_j	\bar{X}_m
标准差	S_1	S_2	S_j	S_m

[0064]
$$d_{ik} = \sqrt{(x_{i1} - x_{k1})^2 + (x_{i2} - x_{k2})^2 + \dots + (x_{im} - x_{km})^2} = [\sum_{j=1}^m (x_{ij} - x_{kj})^2]^{1/2}$$
 (公式1)

[0065] 其中 x_{ij} 和 x_{kj} 分别代表第j个变量的i个和k个样本。为了消除量纲不同造成的影响,在计算之前,应该先进行数据的标准化。

2、K-means法的具体计算过程为:

[0067] ①随机选择聚类的种子,以它为聚类的中心(自己设定个数,我们设定了2个);

[0068] ②计算各个样本到这些中心的距离,并把样本归为距离最近的中心,这些结果产生了暂时的类别;

[0069] ③基于上述的暂时类别,算法计算了新的中心,基于新的中心,样本又被重新聚类;

[0070] ④算法一直迭代,直到样本的聚类结果没有变化(图5)。

[0071] 我们进行聚类分析的选择过程,利用标化后的13个因子进行聚类分析;

[0072] 上述聚类方法均会得到每个样本的归类(聚类),我们命名为immu_1和immu_2。对比每种方法的immu_1组和immu_2组之间13个免疫因子(包括免疫荧光方法等)的组间差异。

[0073] 3、判别分析(用的是Fisher's Discriminant Analysis,又称linear Discriminant Analysis)

[0074] K-means法聚类分析的统计原理:

[0075] 我们想使两个人群分开,如上述的聚类结果的2类(免疫力高低水平),假设这两类人群的解释变量相同,那么我们可以构建这么一个方程;

[0076] $Z = c + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_pX_p$ (公式2)

[0077] 这个方程满足2类间的距离(马氏距离)最大

[0078]
$$D^2 = \frac{(\bar{Z}_1 - \bar{Z}_2)^2}{S_Z^2}$$
 (公式3)

[0079] 其中, \bar{Z}_1 、 \bar{Z}_2 分别表示两类人群的评分得分, S_Z^2 为方差。我们的目的是寻找这样一组

[0080] 系数 (a_1, a_2, \dots, a_p), 使得 D^2 最大, 即距离最大。那么对应公式2即为判别方程。

[0081] 本发明通过先进的流式细胞技术对乙型肝炎大样本中T细胞活化因子群和T细胞表达的衰竭分子群进行检测,获得每个细胞免疫因子的具体数值,并利用全新的生物大数据分析,得到这系列T细胞因子对T细胞免疫功能的综合贡献,最终获得准确体现T细胞免疫功能的指标(图3)。

[0082] 此外,本发明还提供了多信息优势:可提供代表性的13个T细胞活化因子和衰竭因子的实际数值,代表这些细胞免疫因子实时的数量和水平;可提供每一个细胞因子的水平对形成T细胞总体功能的作用;可提供总体T细胞功能状况(图4)。

[0083] 本发明还试图提供一种T细胞功能检测试剂盒,包含:1) T细胞因子群的检测试剂,所述T细胞因子群有:CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3;2) 包含有评估T细胞功能的数学模型。

[0084] 概括地讲,本发明用于检测评估T细胞功能的方法包括:

[0085] 1) 利用单个细胞通过流式细胞仪,使用抗细胞因子抗体与细胞表面或胞内特定标记组合,即可检测不同细胞因子的分泌,根据不同的标记获取结果;同时选择特殊的化学与抗体,所述特殊化学与抗体为特异性与细胞表面分泌的细胞因子结合的抗体,其带有颜色的荧光标记的化合物,能够清楚地区分无分泌该种细胞因子的免疫细胞;

[0086] 2) 利用全新的大数据生物统计学分析技术,对每一个细胞因子所造成整体免疫功能的贡献/作用/影响进行判读,根据精密的数据模型,评价所用细胞因子对免疫功能的作

用并因此形成最终对整体免疫功能的判读。

[0087] 本发明利用流式细胞技术对肝病大样本中总体T细胞群以及T细胞亚群数量和功能进行鉴定,获得每个细胞免疫因子的具体数值,并利用生物大数据分析,得到此系列每一个T细胞因子对T细胞免疫总体功能的综合贡献,最终获得准确体现T细胞免疫功能的指标,从而检测T细胞的总体功能。

[0088] 上述检测方法的具体操作如下:

[0089] (一) 周围血单个核细胞(PBMC)分离:

[0090] 1) 采EDTA抗凝血20ml;离心,500g,8min,升9,降9,分离血浆,标记,血浆-80℃保存待用,血细胞层留用;稀释:将血细胞移至50ml离心管,加PBS至约30ml,并吹打均匀。

[0091] 2) 取4支15ml离心管,每管加4.5ml淋巴细胞分离液。然后将离心管倾斜45度角,用巴氏吸管将血液在距淋巴细胞分离液界面1cm处沿试管壁缓慢加至分离液上面,注意保持两界面清晰,勿使血液混入分离液中。

[0092] 3) 无刹车密度梯度离心:25℃,450g,25min,升5,降0。

[0093] 4) 取出试管,见其分为以下四层:上层为PBS及部分剩余血浆,下层为红细胞及粒细胞;中层为淋巴细分离液,在分离液与血浆层之间可见薄膜层,吸管小心吸取白膜层细胞,以1:5体积比,用PBS洗涤细胞2次(500g,8min)。

[0094] 5) 沉淀细胞加入培养基重悬,用2%的苔盼蓝染色,证实活细胞数在95%以上。调密度 1×10^7 /ml,待用。

[0095] (二) 流式细胞术检测T细胞表面共抑制分子

[0096] 1) 流式抗体的使用量一般为2-5 μ l,每只流式管取用RPMI1640+10%FBS完全培养基重悬的细胞 1×10^5 个。

[0097] 2) 4℃,400g,8min离心,弃上清,倒置于吸水纸吸一下,弹匀细胞(利用管中残余的液体)。加入带有各自荧光标记的抗体:CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3,各2 μ l,4℃孵育30min,隔15min弹匀一下。

[0098] 3) 加入PBS 1ml洗1次(4℃,400g,8min),弃上清,倒置于吸水纸吸一下;120 μ l PBS+40 μ l 4%PFA涡旋器上立刻重悬,固定。

[0099] (4) 上机检测。

[0100] (三) 流式细胞术检测T细胞胞内因子(如图3所示,为流式细胞技术检测并分析获得CD3⁺T细胞与CD4⁺T细胞的水平。)

[0101] 1) 取(一)中待用细胞500 μ l,加入淋巴细胞刺激剂10 μ l(50 \times),弹匀,37℃细胞培养箱刺激孵育4h with Leukocyte Activation Cocktail(白细胞活化物)。

[0102] 2) 加入表面抗体PECF-594 CD3(2 μ l)、APC CD4(2 μ l)、V450 CD8(2 μ l),弹匀,4℃冰箱孵育30min,隔15min晃动一次。

[0103] 3) 每管加1ml PBS,450g 8min离心,洗涤,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞。

[0104] 4) 每管加FIX&PERM(ebioscience, FIX&PERM kit) 400 μ l,立即涡旋混匀,室温孵育30min或4℃45min。

[0105] 5) 每管加入1ml PBS离心洗涤,750g,10min离心,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞。

[0106] 6) 每管加Perm缓冲液500 μ l离心洗涤,4 $^{\circ}$ C,750g,10min离心,弃上清,管口倒扣于吸水纸上一次,利用剩余液体弹匀细胞。

[0107] 7) 加胞内抗体CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3,弹匀,4 $^{\circ}$ C孵育45min,中间弹匀一次)。

[0108] 8) 每管加入Perm缓冲液500 μ l洗1次,750g,10min。

[0109] 9) 150 μ l PBS重悬,上机进行流式检测。

[0110] 利用以上流式细胞技术对800例肝病健康和250例健康人进行检测,共获得13个免疫指标的数据的均数(%淋巴细胞总数),如表2所示;

[0111] 表2:流式检测获得各细胞因子的频数分布(均数 \pm 标准差)

细胞因子(%细胞数)/免疫功能级别	Immu_high	Immu_low
CD4_PD1	25.94 \pm 13.51	32.28 \pm 12.74
CD4_2B4	35.80 \pm 22.00	73.63 \pm 22.03
CD4_CTLA4	18.25 \pm 23.32	20.78 \pm 17.08
CD4_IFN- γ	12.91 \pm 3.78	5.06 \pm 12.73
CD4_IL-2	47.02 \pm 11.97	23.2 \pm 11.06
[0112] CD4_TNF- α	24.61 \pm 7.81	10.35 \pm 7.49
CD8_PD1	21.20 \pm 16.63	38.39 \pm 15.9
CD8_TIM3	3.12 \pm 3.52	18.18 \pm 7.82
CD8_2B4	12.57 \pm 12.37	21.64 \pm 15.23
CD8_LAG3	41.26 \pm 22.07	72.33 \pm 20.99
CD8_IFN- γ	15.16 \pm 6.28	8.93 \pm 17.18
CD8_IL-2	19.15 \pm 4.36	9.27 \pm 3.99
CD8_CTLA4	27.14 \pm 14.58	19.95 \pm 15.49

[0113] 这些数据通过K-means聚类分析,获得每个数据对总体T细胞免疫功能的贡献,从而获得每个数据的T细胞功能标化值。(如图4和图5所示,其中,图4表明CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞分泌的细胞因子间相关性,>0.5为阳性,即有相关性存在;图4中,有颜色填充表示有相关性,颜色填充越深,相关性越强;空白无填充的表示无相关性。图5为聚类方法建立的数学模型示意图)

[0114] 表3:上述表2中各细胞因子的标化值如以下表3所示:

[0115] 表3:各细胞因子的标化值(均数)

[0116]

细胞因子名称/T细胞功能级别	Immu_high	Immu_low
CD4_PD-1	0.75	0.92
CD4_2B4	0.56	0.82
CD4_CTLA4	1.09	0.92
CD4_IFN- γ	1.11	0.83
CD4_IL-2	1.92	0.30
CD4_TNF- α	1.02	0.86

CD8_PD-1	0.82	0.87
CD8_TIM3	0.97	0.95
CD8_2B4	0.83	0.81
CD8_LAG3	0.60	0.52
CD8_CTLA4	1.03	0.85
CD8_IFN- γ	1.13	0.82
CD8_IL-2	1.70	0.38

[0117] (五) 根据表3各细胞因子在T细胞功能分组 (Immu_high和Immu_low) 里的空间位置,对总体T细胞功能进行评价:

[0118] (1) 与Immu_high距离定为distance-1,与Immu_low距离定为distance-2;

[0119] (2) 根据距离长短进行功能分类:与distance-1距离较短为Immu_high,提示T细胞免疫功能较高;与distance-2距离较短为Immu_low,提示T细胞免疫功能低下。

[0120] 例如:其中一位检测样本的T细胞因子的标化空间如以下表4所示:

[0121] 表4:某位检测样本的T细胞因子的标化空间

[0122]

distance-1	6.571491346
distance-2	5.332081736

[0123] 由于该检测对象的T细胞因子标化值与“distance-2”较接近,提示其T细胞功能属于Immu_low,即T细胞功能低下。

[0124] 实例操作与分析:

[0125] 使用50ml外周血进行T淋巴细胞功能检测:

[0126] 1) 人淋巴淋巴细胞分离液分离新鲜外周血中PBMC,重悬细胞于完全血清培养液中,调密度 $0.5-1 \times 10^7/\text{ml}$,待用。

[0127] 2) 流式抗体的使用量一般为 $2-5 \mu\text{l}$,每只流式管取用RPMI 1640+10%FBS完全培养基重悬的细胞 $1-2 \times 10^5$ 个。

[0128] 3) 4°C ,400g,8min离心,弃上清,倒置于吸水纸吸一下,弹匀细胞(利用管中残余的液体)。加入FITC LAG3、FITC CD8、PE-CY7CD4,以及加入带有各自荧光标记的抗体:CD4+T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3,表面抗体各 $2 \mu\text{l}$, 4°C 孵育30-45min,隔15min弹匀一下。

[0129] 4) 取出,每管加入Perm缓冲液 $500 \mu\text{l}$ 洗1次, 750g ,10min。

[0130] 5) $150 \mu\text{l}$ PBS重悬,上机进行流式检测。

[0131] 实验结果:

[0132] 结果1:如表5所示,T细胞因子实际检测水平。

[0133] 表5:各种T细胞因子的实际检测水平:

[0134]

T细胞因子名称	实际数值
CD4_IFN- γ	6.42
CD4_IL-2	0.5
CD4_TNF- α	68.7

CD8_IFN- γ	18
CD8_IL-2	0.21
CD4_PD-1	32.4
CD4_2B4	58
CD4_CTLA4	15.2
CD8_PD-1	38.9
CD8_TIM3	48.6
CD8_2B4	87.2
CD8_CTLA4	3.94
CD8_LAG3	0.4

[0135] 结果2:如表6所示,为T细胞因子标化的水平:

[0136] 表6:T细胞因子标化的水平

[0137]

T细胞因子名称	标化数值
CD4_IFN- γ	-1.16815
CD4_IL-2	-0.75151
CD4_TNF- α	2.15087
CD8_IFN- γ	-0.76154
CD8_IL-2	-0.69823
CD4_PD-1	0.541622
CD4_2B4	1.407876
CD4_CTLA4	-1.92606
CD8_PD-1	1.270279
CD8_TIM3	-1.04996
CD8_2B4	1.456711
CD8_CTLA4	-1.03625
CD8_LAG3	-0.60203

[0138] 结果3:如表7所示,将其划分到标准T细胞功能类别:

[0139] 表7:T细胞功能的标化空间距离:

[0140]

distance1	5.438312188
distance2	7.686902686

[0141] 结果4:结果判断,根据聚类结,该实例的总体T细胞因子标化空间距离与“distance1”较为接近,因此判断该实例的总体T细胞功能属于“Immu-high”,即T细胞功能活跃。

[0142] 由此,即可判定T细胞的整体免疫功能状态,对其进行较为准确、有效的检测。

[0143] 以下为具体应用实施案例。

[0144] 应用实例1:

[0145] 根据以下步骤进行T细胞功能判别。

[0146] 步骤1:抽取脂肪肝患者外周静脉血50ml;

[0147] 步骤2:根据上述流式细胞检查技术方法和步骤,对50ml静脉血标本进行T细胞因子(CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3)检测;

[0148] 步骤3:通过流式细胞检测技术获得各细胞因子的实际数值;同时利用本发明的聚类技术,根据各个细胞因子对形成T细胞功能的贡献,获得各个T细胞因子的标化值,结果如下表8所示。

[0149] 表8:各T细胞因子的实际数值和标化值

[0150]

T细胞因子名称	实际数值	标化数值
CD4_IFN- γ	15.43	1.36
CD4_IL-2	4.50	1.73
CD4_TNF- α	5.70	-0.48
CD8_IFN- γ	2.80	2.48
CD8_IL-2	9.04	5.06
CD8_CTLA4	33.2	4.23
CD4_PD-1	52.4	3.52
CD4_2B4	14.3	1.40
CD4_CTLA4	5.20	-0.45
CD8_PD-1	18.32	0.44
CD8_TIM3	10.83	-4.04
CD8_2B4	31.20	1.43
CD8_LAG3	19.21	-1.0

[0151] 步骤4:根据本发明的判别数据模型,获得该实例T细胞因子的在模型中的空间位置,如下表9所示。

[0152] 表9:T细胞因子在模型中的空间位置

[0153]

distance1	4.4375188
distance2	6.8475297

[0154] 步骤5:最后根据数学模型进行判断,该实例的总体T细胞因子标化空间距离与“distance1”略微接近,因此判断该实例的总体T细胞功能属于“Immu_high”,即T细胞功能活跃。

[0155] 应用实例2

[0156] 根据以下步骤进行T细胞功能判别。

[0157] 步骤1:抽取乙型肝炎患者外周静脉血50ml;

[0158] 步骤2:根据上述流式细胞检查技术方法和步骤,对50ml静脉血标本进行T细胞因子(CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表达的IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、CTLA-4、Tim3、2B4、PD-1、LAG3)检测;

[0159] 步骤3:通过流式细胞检测技术获得各细胞因子的实际数值;同时利用本发明的聚类技术,根据各个细胞因子对形成T细胞功能的贡献,获得各个T细胞因子的标化值,结果如

下表10所示:

[0160] 表10:各T细胞因子的实际数值和标化值

[0161]

T细胞因子名称	实际数值	标化数值
CD4_IFN- γ	5.43	0.33
CD4_IL-2	5.80	2.73
CD4_TNF- α	1.70	-3.43
CD8_IFN- γ	0.80	-1.43
CD8_IL-2	5.04	1.39
CD4_PD-1	42.40	4.52
CD4_2B4	25.30	1.44
CD4_CTLA4	35.20	-5.55
CD8_PD-1	14.45	0.45
CD8_TIM3	14.83	-4.04
CD8_2B4	36.20	1.44
CD8_CTLA4	34.24	3.24
CD8_LAG3	21.21	-1.03

[0162] 步骤4:根据本发明的判别数据模型,获得该实例T细胞因子的在模型中的空间位置,如下表11所示:

[0163] 表11:T细胞因子在模型中的空间位置

[0164]

distance1	7.4375108
distance2	3.8455257

[0165] 步骤5:最后根据数学模型进行判断,该实例的总体T细胞因子标化空间距离与“distance2”接近,因此判断该实例的总体T细胞功能属于“Immu_low”,即T细胞功能低下。

[0166] 值得注意的是,本发明的方法仅用于评估T细胞的功能,属于间接的实验数据,而不能直接用于诊断或评估肝脏疾病,对于疾病本身的诊断,还需要结合多种其他临床指标方能够确定。

[0167] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,故凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围。

Antigen presentation to both CD4+ and CD8+ T-cells

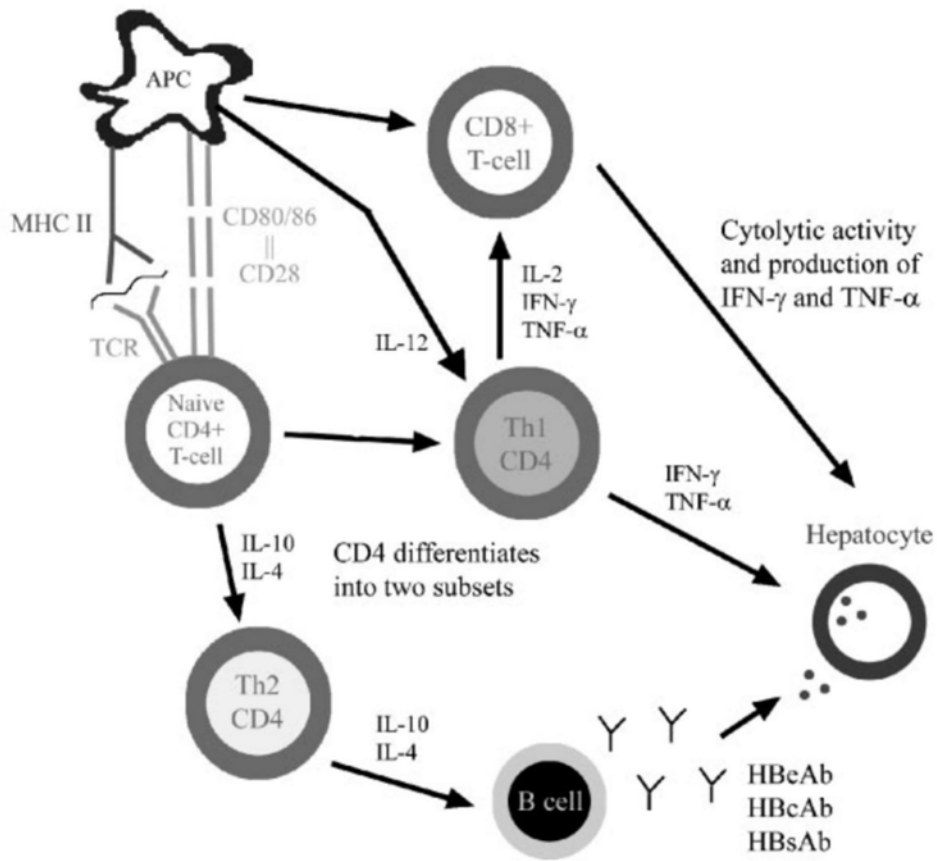


图1

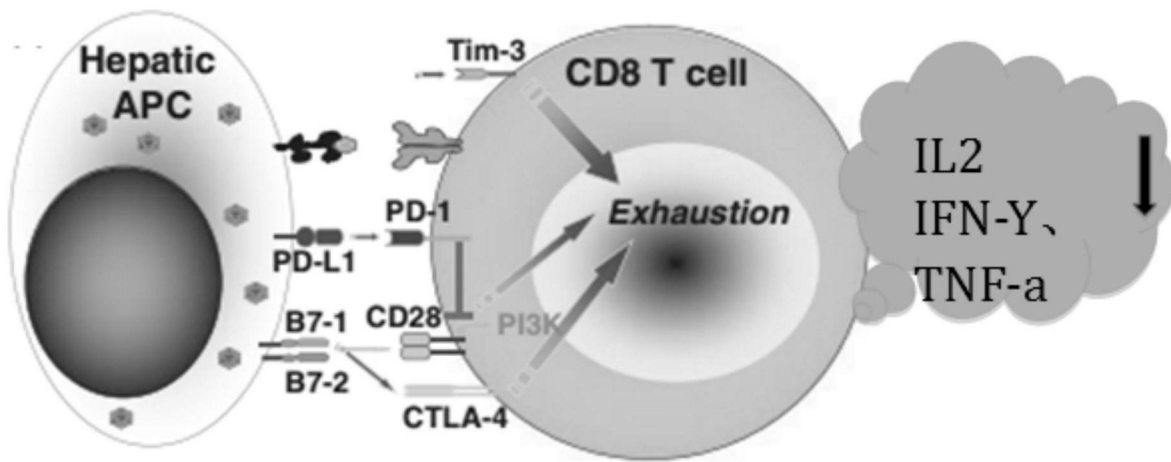


图2

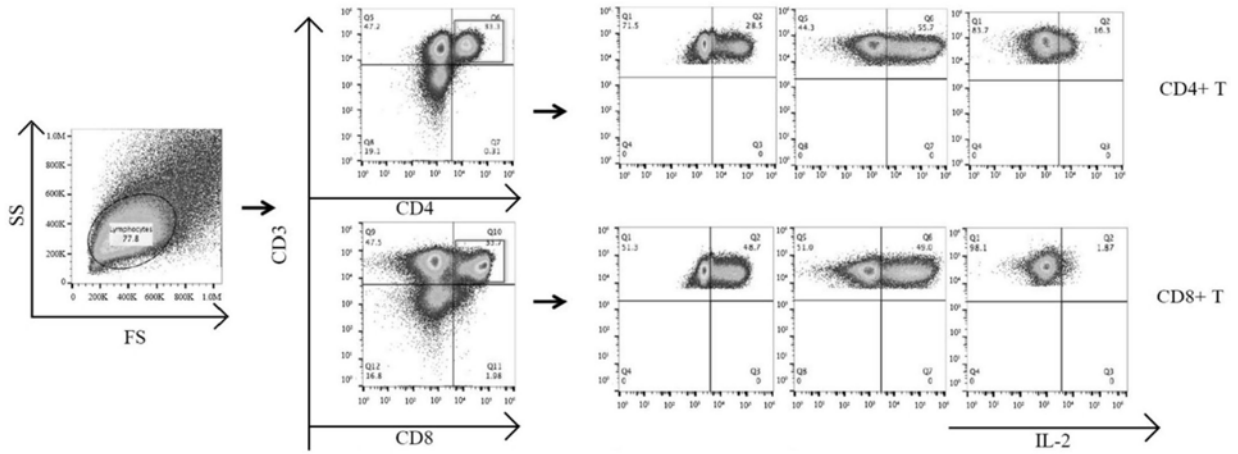


图3

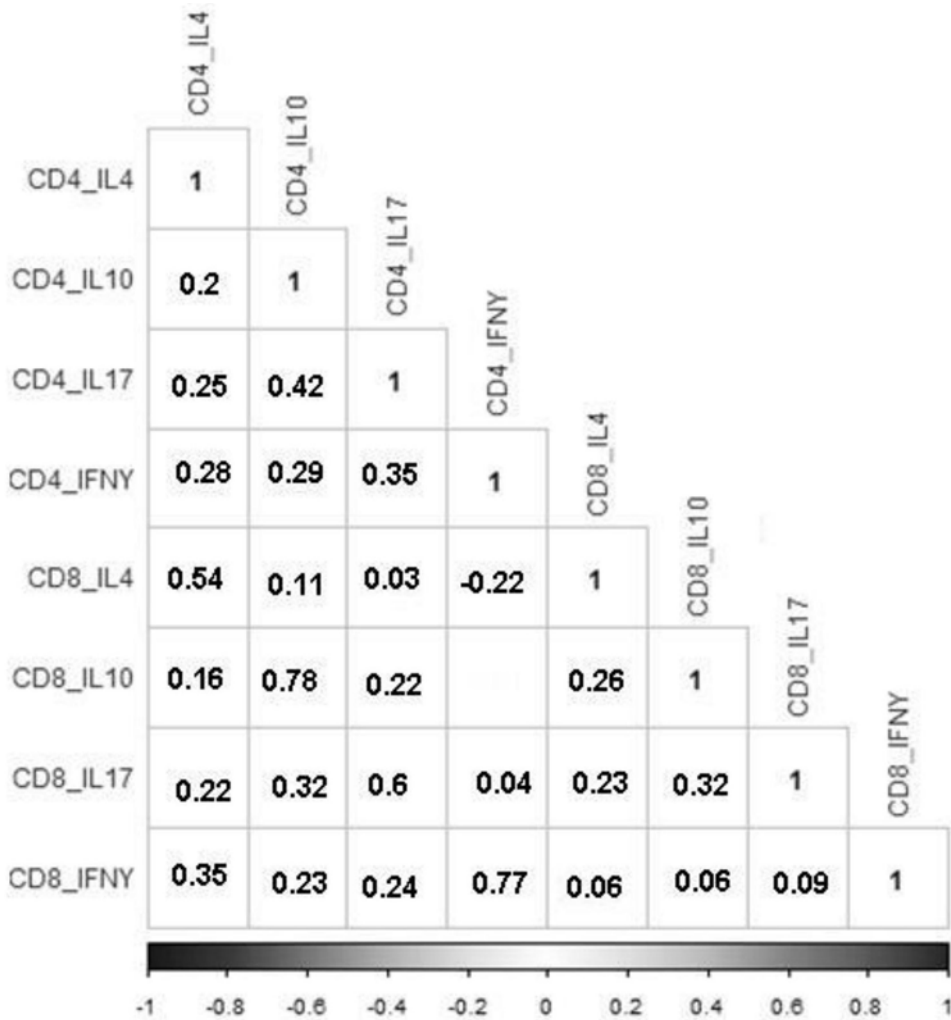


图4

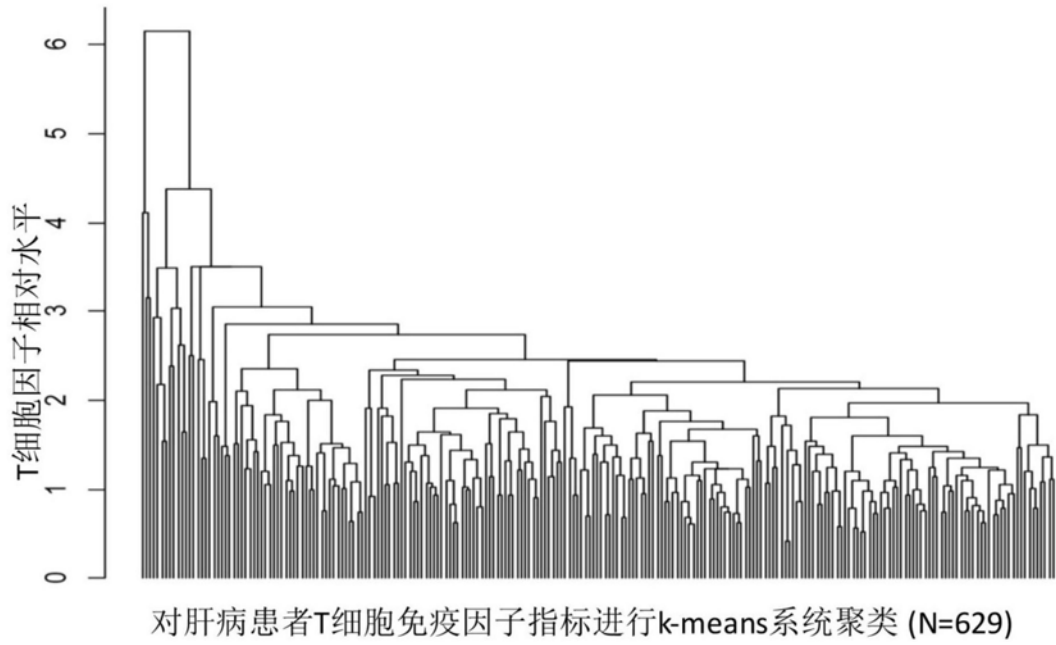
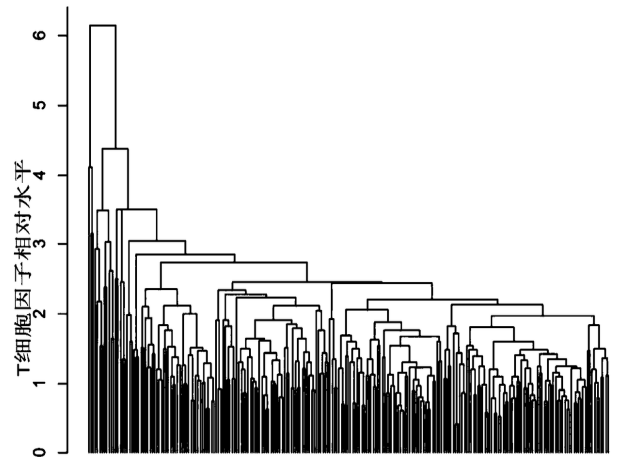


图5

专利名称(译)	肝病T细胞功能的检测评估方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN108627641A	公开(公告)日	2018-10-09
申请号	CN201810400121.3	申请日	2018-04-28
[标]发明人	曾首杰		
发明人	曾首杰		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	刘婉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肝病相关T细胞功能的检测评估方法，包括步骤：1)利用单个细胞通过流式细胞仪，使用抗细胞因子抗体与细胞表面或胞内特定标记组合，即可检测不同细胞因子的分泌，根据不同的标记获取结果；同时采用特殊化学与抗体选择，该特殊化学与抗体为特异性与细胞表面分泌的细胞因子结合的抗体，该抗体带有颜色的荧光标记化合物，能清楚区分无分泌该种细胞因子的免疫细胞；2)利用全新的大数据生物统计学分析技术，对每一个细胞因子对造成整体免疫功能的贡献/作用/影响进行判读。本发明还公开了一种肝病T细胞功能检测试剂盒。本发明的试剂盒能够有效检测T细胞的总体功能。



对肝病患者T细胞免疫因子指标进行k-means系统聚类 (N=629)