



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108663510 A

(43)申请公布日 2018.10.16

(21)申请号 201810400061.5

(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)

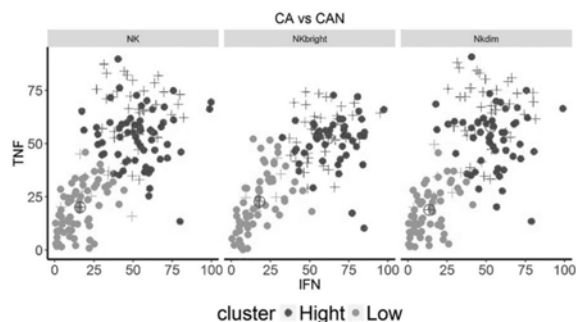
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

肝病NK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NK细胞功能的检测评估方法。该检测评估方法包括以下步骤：(1)利用单个细胞通过流式细胞仪，使用不同的抗细胞因子或NK细胞表面受体的抗体与细胞表面或胞内特定标记组合，检测相应的细胞因子分泌或表面受体水平；(2)利用大数据生物统计学分析技术，对每一个免疫因子造成整体免疫功能的贡献、作用及影响进行判读，对所用免疫因子对免疫功能的作用形成最终对NK细胞整体免疫功能判读。本发明还提供了一种肝病NK细胞功能检测试剂盒，其包含以下多种表面分子抗体：CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NK-G2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NK-G2A、NK-PD-1、NK-Tim3。本发明的检测评估方法和试剂盒能够有效检测NK细胞总体功能。



1. 一种肝病NK细胞功能的检测评估方法,其特征在于,其包括:

(1) 利用单个细胞通过流式细胞仪,使用不同的抗细胞因子和NK细胞表面受体的抗体与细胞表面或胞内特定标记组合,检测出相应的细胞因子分泌或表面受体,根据不同的标记获取结果;所述抗体为以下多种:CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3;

(2) 利用大数据生物统计学分析技术,对每一个免疫因子对形成整体免疫功能的贡献、作用及影响进行判读,根据数据模型,对所用细胞因子和NK细胞表面受体对免疫功能的作用形成最终对NK细胞整体免疫功能判读;

其中,利用流式细胞技术对肝病大样本中总体NK细胞群以及NK细胞亚群数量和功能进行鉴定,获得每个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NK免疫因子对NK细胞免疫总体功能的综合贡献,最终获得准确体现NK细胞免疫功能的指标,从而检测NK细胞的总体功能。

2. 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NK细胞表面和胞内分子或受体。

3. 根据权利要求2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℃保存待用,血细胞层留用;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;

3) 无刹车密度梯度离心,25℃,450g,25min,升5,降0;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,中层为淋巴细胞分离液,在分离液与血浆层之间可见白膜层,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;

4) 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。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,所述流式细胞术检测NK细胞表面和胞内分子包括以下步骤:

1) 流式抗体的使用量为2~5 μ l,每只流式管取用RPMI1640+10%FBS完全培养基重悬的细胞 1×10^5 个;4℃,400g,8min离心,弃上清,倒置吸水,弹匀细胞;

2) 加入CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3抗体各2 μ l,4℃孵育30min,隔15min弹匀一下;

3) 加入PBS 1ml洗1次,4℃,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;上机检测。

5. 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NK细胞按照总体免疫功能逐渐递增进行分级,分为:I、II、III、IV级,即依次为NK细胞功能衰竭、较差、较好、强。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述聚类分析法的具体计算过程为:

- 1) 随机选择聚类的种子,以它为聚类的中心;
- 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,这些结果产生暂时的类别;
- 3) 基于所述暂时的类别和算法,计算新的中心,基于所述新的中心,将样本重新聚类;
- 4) 算法一直迭代,直到样本的聚类结果没有变化;
- 5) 聚类结果产生清晰划分的四群数据,每一群分别代表NK细胞功能的I、II、III、IV级;同时,获得每个实际检测数据的NK细胞因子的标化值,体现每个数值对总体NK细胞免疫功能划分的贡献;
- 6) 根据标本检测的数值,代入标化值模型,获得检测标本与模型中空间距离最接近的级别,即代表检测标本的NK细胞功能为相应级别的NK细胞功能。
7. 一种肝病NK细胞功能检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包含以下多种抗体:CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3。
8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于:所述NK细胞为乙肝肝脏疾病相关的NK细胞。

肝病NK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,涉及一种肝脏疾病相关的自然杀伤细胞(NK)总体功能检测和评估方法,以及用于该方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 肝病严重危害人类健康,免疫途径是肝病诊疗最重要的策略之一。

[0003] 我国是肝病大国,目前有接近2亿肝病,包括乙型肝炎、丙型肝炎、酒精肝、脂肪肝、药物性肝炎、自身免疫性肝炎;从肝炎—肝硬化—肝癌的疾病三部曲严重威胁人类健康,我国每年因为肝病死亡达60万,每年用于肝病相关的医药费用高达2千亿,造成严重的经济社会负担和医疗资源的耗竭。

[0004] 免疫系统在人体健康维护、抗衰老、抗肿瘤起着关键作用,其功能包括:(1)免疫防御:识别和清除外来入侵和已经入侵的病原体,包括病毒、细菌、污染物质及疾病的攻击。(2)免疫监视:识别和清除体内自身来源的突变细胞,这些突变细胞是潜在的肿瘤细胞;识别和清除体内衰老细胞、死亡细胞或其他有害成分或异己成分。(3)免疫调节:保持免疫系统内环境稳定,通过修补免疫细胞来修补受损器官和组织。免疫系统由免疫细胞组成,包括:1)以自然杀伤细胞(NK)为主的天然免疫;2)以T细胞和B细胞为主的适应性免疫。NK细胞在清除肿瘤细胞、病原体感染的细胞、某些自身组织细胞(如血细胞)、寄生虫等扮演着重要角色,是机体抗肿瘤、抗感染的主要免疫防线之一;尤其在慢性炎症、肿瘤等严重疾病进展期,体内的T细胞功能塌陷,NK细胞的作用更为重要。因此,客观评价NK细胞功能对进一步的机体免疫状态及功能研究评估至关重要。

[0005] 然而,目前缺乏用于评价肝病NK细胞总体功能的临床检验技术和相关的试剂盒。

[0006] 肝脏是人体最大的免疫器官,病变肝脏充满和浸润着大量免疫细胞,肝病临床结局与体内免疫功能的修复和改善息息相关;然而,对许多慢性肝病和肝癌患者,目前缺乏对总体免疫功能评估的可靠手段。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,但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:

[0007] 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免疫细胞因子进行检测,并研究其调控通路;

[0008] 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;

[0009] 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。

[0010] 以上的所有检测技术都没有涉及免疫细胞总体功能评价的方法。

发明内容

[0011] 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NK

细胞功能的检测评估方法。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种准确、高效的NK细胞功能检测试剂盒。

[0013] 本发明的目的是采用以下技术方案来实现的。

[0014] 本发明提供了一种肝病NK细胞功能的检测评估方法,其包括:

[0015] (1) 利用单个细胞通过流式细胞仪,使用抗细胞因子和NK细胞表面受体的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以及NK细胞表面受体水平,根据不同的标记获取结果;所述抗体为以下多种:CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3;

[0016] (2) 利用大数据生物统计学分析技术,对每一个免疫因子对形成整体免疫功能的贡献、作用及影响进行判读,根据数据模型,对所用的细胞因子和NK细胞表面受体对免疫功能的作用形成最终对NK细胞整体免疫功能判读;

[0017] 其中,利用流式细胞技术对肝病大样本中总体NK细胞群以及NK细胞亚群数量和功能进行鉴定,获得每个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NK免疫因子对NK细胞免疫总体功能的综合贡献,最终获得准确体现NK细胞免疫功能的指标,从而检测NK细胞的总体功能。

[0018] 优选地,所述NK细胞为肝脏疾病相关的NK细胞。

[0019] 优选地,所述步骤(1)具体包括:PBMC分离培养;流式细胞术检测NK细胞表面和胞内分子。

[0020] 更优选地,所述PBMC分离培养包括以下步骤:

[0021] 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;将血细胞移至50ml离心管,加PBS至约30ml,并吹打均匀;

[0022] 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;

[0023] 3) 无刹车密度梯度离心,25℃,450g,25min,升5,降0;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,中层为淋巴细胞分离液,在分离液与血浆层之间可见白膜层,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;

[0024] 4) 沉淀细胞加入培养基重悬,用2%的台盼蓝染色,证实活细胞数在95%以上;调密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。

[0025] 更优选地,所述步骤(3)中,所述流式细胞术检测NK细胞表面和胞内分子,包括以下步骤:

[0026] 1) 流式抗体的使用量为2~5 μl ,每只流式管取用RPMI1640+10%FBS完全培养基重悬的细胞 1×10^5 个;4℃,400g,8min离心,弃上清,倒置吸水,弹匀细胞;

[0027] 2) 加入CD56、IFN- γ 、TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NK-G2A、NK-PD-1、NK-Tim3抗体各2 μl ,4℃孵育30min,隔15min弹匀一下;

[0028] 3) 加入PBS 1ml洗1次,4℃,400g,8min,弃上清,倒置吸水;120 μl PBS+40 μl 4%PFA涡旋器上立刻重悬,固定;上机检测。

[0029] 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:

[0030] 采用聚类分析法将NK细胞按照总体免疫功能逐渐递增进行分级,分为:I、II、III、IV级,即依次为NK细胞功能衰竭、较差、较好、强。

[0031] 更优选地,所述聚类分析法的具体计算过程为:

[0032] 1) 随机选择聚类的种子,以它为聚类的中心;

[0033] 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;

[0034] 3) 基于所述暂时的类别和算法,计算新的中心,基于新的中心,样本被重新聚类;

[0035] 4) 算法一直迭代,直到样本的聚类结果没有变化;

[0036] 5) 聚类结果产生清晰划分的4群数据,获得每个数据的NK细胞因子和NK细胞表面受体的标化值,体现每个数值对总体NK细胞免疫功能划分的贡献;

[0037] 6) 根据标本检测的数值,代入标化值模型,获得检测标本与模型中空间距离最接近的级别,即代表检测标本的NK细胞功能为相应级别的NK细胞功能。例如检测标本与模型中I级空间距离最接近,可判断该检测标本的NK细胞总体功能为I级,即NK细胞功能衰竭。

[0038] 因此,利用该技术,即可判断NK细胞总体功能。

[0039] 本发明还提供了一种肝病NK细胞功能检测试剂盒,其包含以下多种抗体溶液:

[0040] 所述抗体为以下多种:CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NKp46、NKp30、NKp44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3。

[0041] 进一步而言,所述NK细胞为肝脏疾病相关的NK细胞。

[0042] 本发明具有如下优点和有益效果:

[0043] (1) 通过先进的流式细胞技术对肝病大样本中总体NK细胞群以及NK细胞亚群数量和功能进行鉴定,获得每个免疫细胞因子的具体数值,并利用全新的生物大数据分析,得到该系列每一个NK细胞免疫因子对NK细胞免疫功能的综合贡献,最终获得准确体现NK细胞免疫功能的指标,从而检测出NK细胞的总体功能。

[0044] (2) 提供多信息优势:可提供代表性的13个NK细胞活化因子、活化性受体、和抑制性受体的实际数值,代表这些免疫细胞因子实时的数量和水平;可提供每一个免疫因子的水平对形成NK细胞总体功能的作用;可提供总体NK细胞功能状况。

附图说明

[0045] 图1是流式细胞检测NK细胞各亚群分泌功能的代表图;其中,CA:慢性乙肝活动期;CAN:慢性乙肝非活动期;HC:健康对照。

[0046] 图2是不同疾病状态的慢性乙型肝炎外周血NK细胞总体及其亚型(NK^{dim}和NK^{bright})分泌细胞因子的水平。

[0047] 图3是NK细胞因子的聚类示意图。

[0048] 图4表明了NK细胞及其亚型分泌各个细胞因子间的相关性。

具体实施方式

[0049] 下面结合附图和具体实施例,对本发明的技术方案作进一步的详述。

[0050] 如未特别指出,本发明的方法所涉及的实验操作及所用试剂,以及各试剂所用百分比/百分浓度单位(例如重量百分比、体积百分比、质量体积浓度)为本领域常规所知晓

的。

[0051] 本发明涉及的肝病NK细胞功能检测评估方法中,使用了以下多种抗体,包含CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3多种抗细胞因子或NK细胞表面受体的抗体。

[0052] 本发明还试图提供一种肝病NK细胞功能检测试剂盒,其包含:(1)NK细胞因子群的检测试剂,该NK细胞因子群包括:CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3;2) 包含有评估NK细胞功能的数学模型。

[0053] 概括地讲,本发明用于检测和评估NK细胞功能的方法包括:

[0054] 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和NK细胞表面受体的抗体与细胞表面或胞内特定标记组合,检测不同细胞免疫因子的分泌,根据不同的标记获取结果;同时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。以上抗体包含CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NKG2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3多种抗细胞因子或NK细胞表面受体的抗体。

[0055] 步骤2:利用全新的大数据生物统计学分析技术,对每一个免疫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,对所用细胞免疫因子对免疫功能过的作用形成最终对NK细胞整体免疫功能判读。

[0056] 其中,利用流式细胞技术对肝病大样本中总体NK细胞群以及NK细胞亚群数量和功能进行鉴定,获得每个免疫细胞因子的具体数值,并利用生物大数据分析,得到此系列每一个NK细胞免疫因子对NK细胞免疫总体功能的综合贡献,最终获得准确体现NK细胞免疫功能的指标,从而检测NK细胞的总体功能。

[0057] 本发明采用了聚类分析(K-means法)利用免疫指标进行分级。

[0058] 本发明的大数据生物统计学分析所采用的方法包括:

[0059] 采用聚类分析法利用免疫指标将NK细胞按照总体免疫功能逐渐递增进行分级,可分为:I、II、III、IV级,即依次为NK细胞功能衰竭、较差、较好、强。

[0060] 聚类分析法的具体计算过程为:

[0061] 1) 随机选择聚类的种子,以它为聚类的中心;

[0062] 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;

[0063] 3) 基于上述的暂时类别和算法,计算了新的中心,基于新的中心,样本又被重新聚类;

[0064] 4) 算法一直迭代,直到样本的聚类结果没有变化;

[0065] 5) 聚类结果产生清晰划分的四群数据,获得每个数据的NK细胞因子和NK细胞表面受体的标化值,体现每个数值对总体NK细胞免疫功能划分的贡献:

[0066] 6) 根据标本检测的数值,代入标化值模型,获得检测标本与模型中空间距离最接近的级别,即代表检测标本的NK细胞功能为相应级别的NK细胞功能,例如检测标本与模型中I级空间距离最接近,可判断该检测标本的NK细胞总体功能为I级,即NK细胞功能衰竭。

[0067] 因此,利用该技术,即可判断NK细胞总体功能。

[0068] K-means法聚类分析的统计原理:

[0069] 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。其计算如以下表1所示:

[0070] 表1:聚类分析的数据结构

[0071]

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

[0072] $d_{ik} = \sqrt{(x_{i1} - x_{k1})^2 + (x_{i2} - x_{k2})^2 + \dots + (x_{im} - x_{km})^2} = [\sum_{j=1}^m (x_{ij} - x_{kj})^2]^{1/2}$ (公式1)

[0073] 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。

[0074] K-means法的具体计算过程为:

[0075] ①随机选择聚类的种子,以它为聚类的中心(自己设定个数,本方法设定了4个);

[0076] 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;

[0077] ③基于上述的暂时类别和算法,计算了新的中心,基于新的中心,样本又被重新聚类;④算法一直迭代,直到样本的聚类结果没有变化。

[0078] 判别分析(用的是Fisher's Discriminant Analysis,又称linear Discriminant Analysis)

[0079] 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;

[0080] $Z = c + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_pX_p$ (公式2)

[0081] 这个方程满足2类间的距离(马氏距离)最大

[0082] $D^2 = \frac{(\bar{Z}_1 - \bar{Z}_2)^2}{S_z^2}$ (公式3)

[0083] 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。

[0084] 上述步骤1的具体操作如下:

[0085] (一)周围血单个核细胞(PBMC)分离:

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 3) 无刹车密度梯度离心:25℃,450g,25min,升5,降0。

[0089] 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白膜层,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)。

[0090] 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,待用。

[0091] (二) 流式细胞术检测NK细胞数量、NK细胞亚型(CD56^{bright}和CD56^{dim})及其表面因子

[0092] 1) 流式抗体的使用量优选为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。

[0093] 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CD56、IFN- γ 、TNF- α 、NKG2D、NKp46、NKp30、NKp44、NK-LAIRs、NK-KIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3等表面抗体各1.5-3 μ l,4℃孵育30min,隔15-25min弹匀一下。

[0094] 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 lPBS+40 μ l4%PFA涡旋器上立刻重悬,固定。

[0095] 4) 上机检测。

[0096] 结果见图1,显示的是流式细胞检测NK细胞各亚群分泌功能的代表图。其中,CA为肝炎活动状态;CAN为肝炎非互动状态。图1为不同慢乙肝疾病组NK细胞及其亚型的频数分布,其中:(A)流式细胞技术检测慢乙肝中NK细胞在PBMC中的百分比,CA:慢性乙型肝炎(活动);CAN:慢性乙型肝炎(非活动型)。(B、C、D、E)不同慢乙肝疾病组中NK细胞、NK^{dim}亚型、NK^{bright}亚型的频数及分布。

[0097] 图2表明了NK细胞表面表达或分泌的细胞免疫因子水平。具体为,不同疾病状态的慢性乙型肝炎外周血NK细胞总体及其亚型(NK^{dim}和NK^{bright})分泌细胞因子或表达NK细胞表面受体的水平。其中,(A)分泌IFN- γ 水平;(B)分泌TNF- α 水平。

[0098] (三) 以上是对860例肝病患者和269例健康人群的NK细胞分泌的细胞因子和表达的表面受体进行流式细胞技术检测,共获得13个免疫指标的数据,按照设定的四组进行聚类分析,获得聚类后各组的免疫细胞因子实际检测均值,如以下表2所示;

[0099] 表2:聚类分组后免疫指标的实际检测值数据的均值:

[0100]

NK免疫因子/级别	I	II	III	IV
NK_IFN- γ	39.87	45.27	67.46	80.26
NK_TNF- α	15.26	28.37	73.51	77.15
NK_G2D	76.51	83.71	90.52	92.73
NK_p46	45.13	42.31	54.23	59.26

NK_p44	33.21	35.43	48.92	73.85
NK_p30	55.23	57.66	64.29	83.52
NK_Perforin	59.26	69.17	72.54	80.93
NK_Grazyme B	67.42	73.76	79.45	93.65
NK_PD1	86.35	68.84	74.29	83.87
NK_Tim3	57.32	23.12	18.22	9.370
NK_G2A	45.32	36.98	20.28	10.97
NK_KIRs	56.39	47.20	37.28	21.52
NK_LAIRs	87.45	78.76	63.54	34.27

[0101] 以上级别表示NK细胞总体功能级别,为从弱至强递增,即I级为NK细胞功能衰竭、II级为NK细胞总体功能低下、III级为NK细胞总体功能良好或正常、NK细胞总体功能活跃。

[0102] (四) 获得每个数据的NK细胞功能标化值,体现每个数值对总体NK细胞免疫功能划分的贡献。以下表3为聚类分组后免疫细胞因子的标化数值(图3为示意图,由于黑白立体图的四维空间难以显示,图3表示两群免疫因子的聚类图)。

[0103] 表3:聚类分组后免疫细胞因子的标化数据的均值:

[0104]

NK免疫因子/级别	I	II	III	IV
NK_G2D	0.3991986	0.5251871	0.8272856	1.341831
NK_p46	0.7662886	0.8147925	1.1006796	1.3320079
NK_IFN- γ	0.7320831	0.988186	1.1200692	1.9629514
NK_p30	0.3366253	0.5510567	0.8807224	1.4295792
NK_TNF- α	0.746091	1.0337759	1.0578685	1.6395921
NK_PD1	0.8514188	1.0039877	0.7780669	0.9083069
NK_G2A	0.8389988	0.7918488	0.6798417	0.2241281
NK_KIRs	0.8810637	0.5273076	0.5800213	0.482519
NK_LAIRs	0.9256056	0.7048717	0.661796	0.5205148
NK_Tim3	0.7301014	0.9539598	1.1359089	1.071772
NK_perforin	0.3989615	0.3432585	0.6823519	1.7257044
CD56bright	0.7430564	0.9497143	1.1304844	1.1304844
CD56dim	0.4260946	0.3651129	1.7459432	1.7459432
NK_grazymB	0.0341493	0.8510245	1.133018	1.820184
NK_p44	0.7003743	1.0164915	0.8565951	1.3833899

[0105] 图3为NK细胞因子的聚类示意图。随机选择聚类的种子,以它为聚类的中心(图中设了2个,由于黑白立体图的四维空间难以显示);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;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;算法一直迭代,直到样本的聚类结果没有变化而显示明显的两组:深色(NK细胞功能活跃组)和浅色(NK细胞功能衰竭组)。

[0106] 图4表明了NK细胞及其亚型分泌各个细胞因子和表面受体间的相关性以及临床指标的相关性,从而综合评价体内NK细胞总体功能。

[0107] (五)对每个标本/病例总体NK细胞功能的综合评估:

[0108] 1) 人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。

[0109] 2) 流式抗体的使用量一般为 $2-5 \mu\text{l}$,每只流式管取用RPMI1640+10%FBS完全培养基重悬的细胞 $1-2 \times 10^5$ 个。

[0110] 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CD56-FITC、NKG2D-PE、NKp46-PE-CY7、NKp-30-APC、NKp44-PE、NKG2A-APC、LAIR1-PE、IFN- γ -PE、TNF- α -PE、PE-CF594Perforin、PE-CY7KIRs、APC TIM3、APC GrazymeB、BV421PD1(各 $1.5-3 \mu\text{l}$),弹匀,表面抗体 $2 \mu\text{l}$, 4°C 孵育 $30-45\text{min}$,隔 15min 弹匀一下。

[0111] 4) 取出,每管加入Perm buffer $500 \mu\text{l}$ 洗1次, 750g , 10min 。

[0112] 5) $150 \mu\text{l}$ PBS重悬,上机进行流式检测。

[0113] 实验结果:

[0114] 结果1如以下表4所示,为各NK细胞因子实际数值和标化的均数:

[0115] 表4:各NK细胞免疫因子实际数值和标化值的均值:

[0116]

NK细胞	实际数值	标化值
NK_NKG2D	64.65	0.21
NK_NKGP46	24.45	0.27
NK_NKP30	22.57	-0.76
NK_NKP44	48.95	0.55
NK_LAIR1	98.30	-1.15
NK_KIRs	19.20	-1.93
NK_NKG2A	33.45	1.27
NK_PD-1	22.06	-1.05
NK_Tim3	46.26	1.41
NK_IFN-	45.50	0.38
NK_TNF-	55.87	1.08
NK_perforin	70.98	0.61
NK_grazymB	87.44	2.30

[0117] 结果2:以上检测标本队列群体中,其中一例被划分到标准NK细胞功能类别,如下表5所示,

[0118] 表5:NK细胞功能类别的相应距离

[0119]

distance1	4.5967271
distance2	6.3947216
distance3	5.3957251
distance4	7.3948611

[0120] 结果判别:以上“distance1、distance2、distance3、distance4”为大数据聚类分

析后形成的空间数据群,分别代表NK细胞总体免疫功能的I、II、III、IV级的空间位置,即“distance1”为“I级”NK细胞总体免疫功能、“distance2”为“II级”NK细胞总体免疫功能、“distance3”为“III级”NK细胞总体免疫功能、“distance4”为“IV级”NK细胞总体免疫功能。该实例的总体NK细胞免疫因子标化空间距离与“distance1”较为接近,因此判断该实例的总体NK细胞功能属于“I级”NK细胞总体免疫功能,由于:NK细胞功能从衰竭到活跃顺序为:I、II、III、IV级,即“I级”为NK细胞功能衰竭、“II”级为NK细胞功能低下、“III”级为NK细胞功能正常、“IV”为NK细胞功能亢进。本实例的NK细胞功能划分为“I”级,即为衰竭状态。

[0121] 由此,即可判定NK细胞的免疫功能状态,对其进行较为准确、有效、高效的检测。

[0122] 以下为效果试验例内容。

[0123] 应用实例1

[0124] 根据以下步骤进行乙型肝炎NK细胞功能判别。

[0125] 步骤1:抽取外周静脉血50ml,

[0126] 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NK细胞因子/表面分子(CD56、IFN- γ 、TNF- α 、NK-G2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-LAIRs、NK-KIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NK-G2A、NK-PD-1、NK-Tim3)检测。

[0127] 步骤3:通过流式细胞检测技术获得各细胞因子和表面受体的实际数值;同时利用本发明的聚类技术,根据各个细胞免疫因子对形成NK细胞功能的贡献,获得各NK细胞免疫因子的标化值,结果如下表6所示:

[0128] 表6:各NK细胞免疫因子的实际数值和标化值

[0129]

NK细胞	实际数值	标化值
NK_NKG2D	35.65	0.45
NK_NKGP46	56.45	0.34
NK_NKP30	45.544	-2.01
NK_NKP44	34.94	1.55
NK_LAIR ₁	18.30	-5.15
NK_KIRs	23.2	-0.22
NK_NKG2A	32.45	2.23
NK_PD-1	28.06	-3.44
NK_Tim3	46.56	5.41
NK_IFN-	54.50	1.38
NK_TNF-	50.87	4.08
NK_perforin	72.98	1.61
NK_grazymB	57.44	3.30

[0130] 步骤4:利用本发明的聚类技术,获得该实例在空间中与本发明数据模型的位置如下表7所示:

[0131] 表7:NK细胞的免疫因子在模型中的空间距离

[0132]

distance1	6.5945271
-----------	-----------

distance2	5.3947216
distance3	8.3957251
distance4	7.3948611

[0133] 结果判别:NK细胞及其因子距离distance2的距离最短(6.5945271),说明NK细胞功能接近distance2,因此NK细胞免疫功能属于II级,为NK细胞功能低下。

[0134] 应用实例2

[0135] 根据以下步骤进行酒精肝NK细胞功能判别。

[0136] 步骤1:抽取外周静脉血50ml,

[0137] 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NK细胞因子/表面分子(CD56、IFN- γ 、TNF- α 、NKG2D、NKp46、NKp30、NKp44、NK-LAIRs、NK-KIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NKG2A、NK-PD-1、NK-Tim3)检测。

[0138] 步骤3:通过流式细胞检测技术获得各细胞免疫因子的实际数值;同时利用本发明的聚类技术,根据各个细胞免疫因子对形成NK细胞功能的贡献,获得各NK细胞免疫因子的标化值,结果如下表8所示。

[0139] 表8:各NK细胞免疫因子的实际数值和标化值

[0140]

NK细胞	实际数值	标化值
NK_NKG2D	14.35	2.45
NK_NKGP46	16.45	1.34
NK_NKP30	36.544	-1.23
NK_NKP44	23.94	1.55
NK_LAIR ₁	11.30	-5.15
NK_KIRs	22.20	-0.22
NK_NKG2A	22.42	1.227
NK_PD-1	12.06	-2.44
NK_Tim3	16.53	3.41
NK_IFN-	14.50	7.38
NK_TNF-	10.87	6.08
NK_perforin	23.98	1.61
NK_grazymB	27.44	3.31

[0141] 步骤4:利用本发明的聚类技术,获得该实例在空间中与本发明数据模型的位置如下表9所示。

[0142] 表9:NK细胞的免疫因子在模型中的距离

[0143]

distance1	4.3594371
distance2	5.3947216
distance3	5.3957251
distance4	7.3948611

[0144] 结果判别:NK细胞及其因子距离distance1的距离最短(4.3594371),说明NK细胞

功能接近distince1,因此NK细胞免疫功能属于I级,为NK细胞功能处于衰竭状态。

[0145] 值得注意的是,本发明的方法仅用于评估NK细胞的功能,属于间接的实验数据,而不能够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。

[0146] 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内。

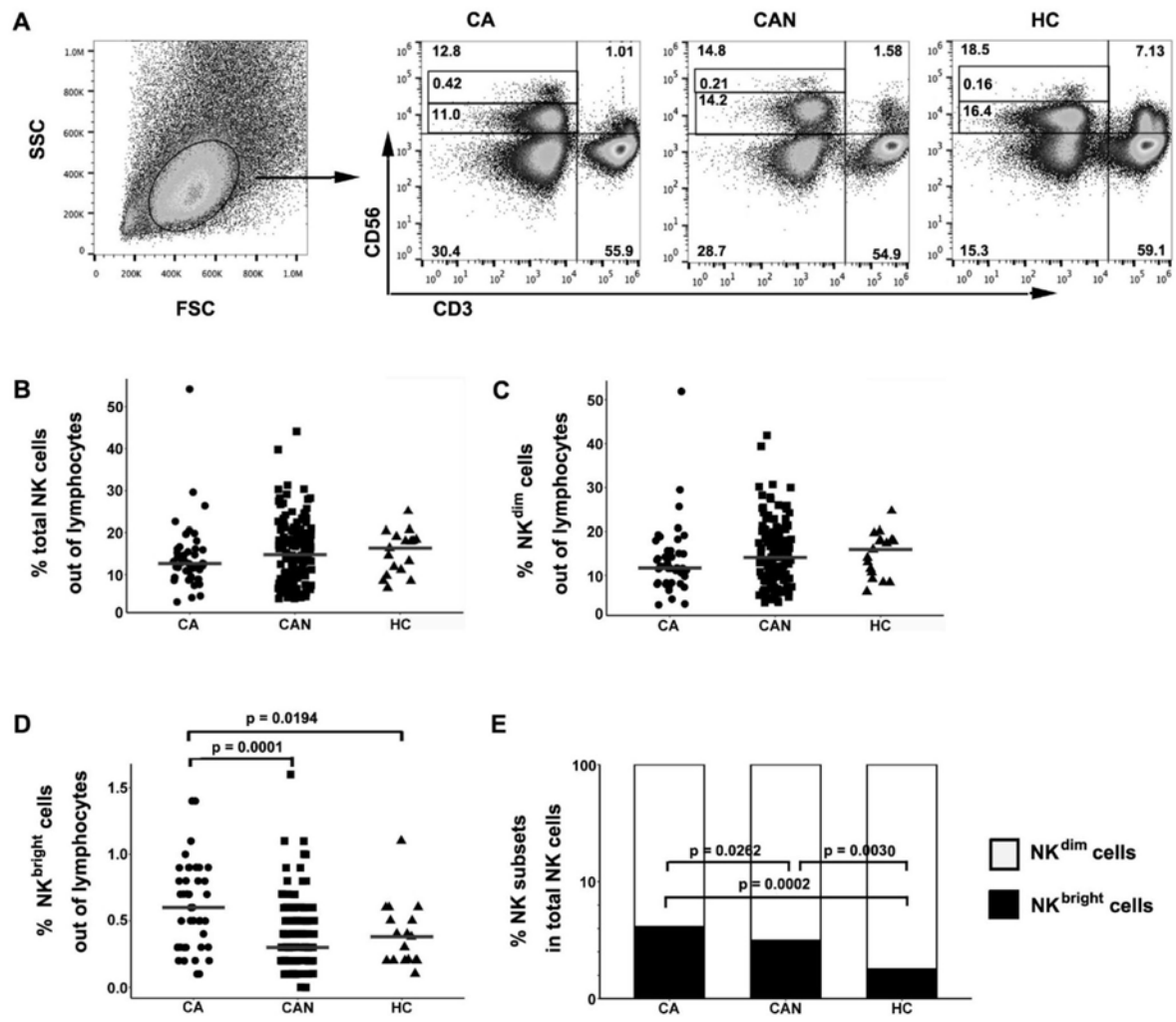


图1

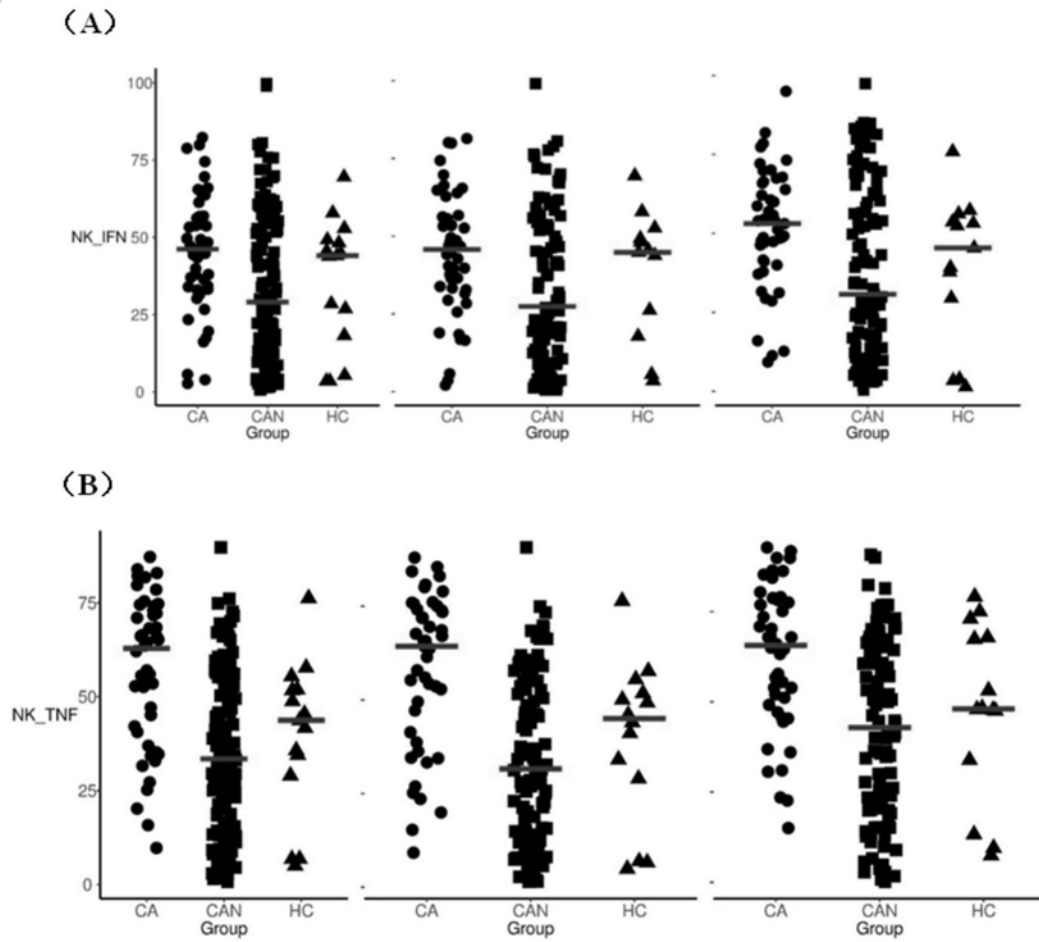


图2

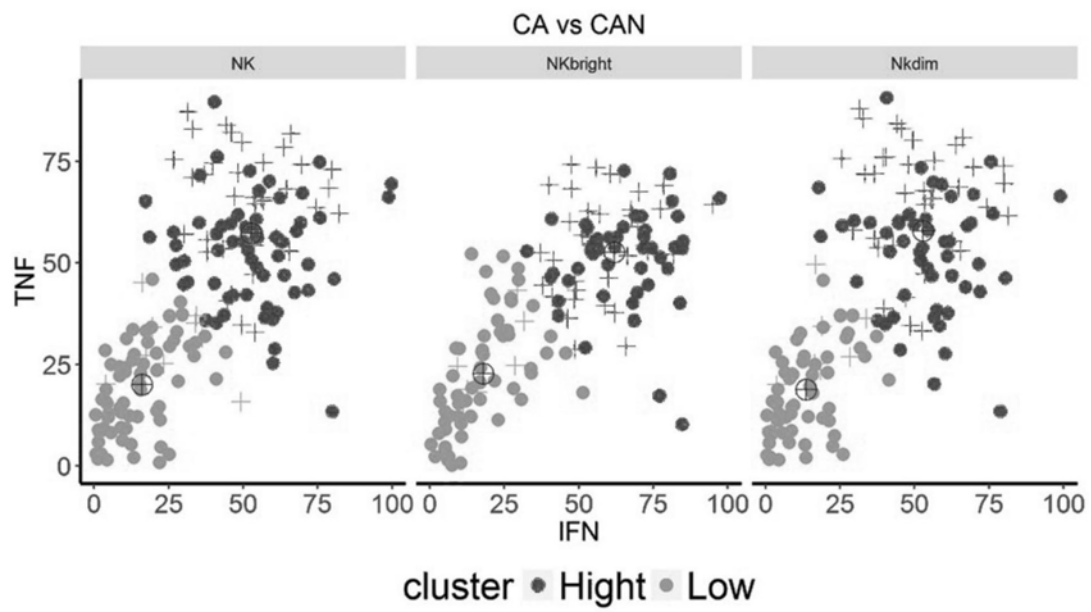


图3

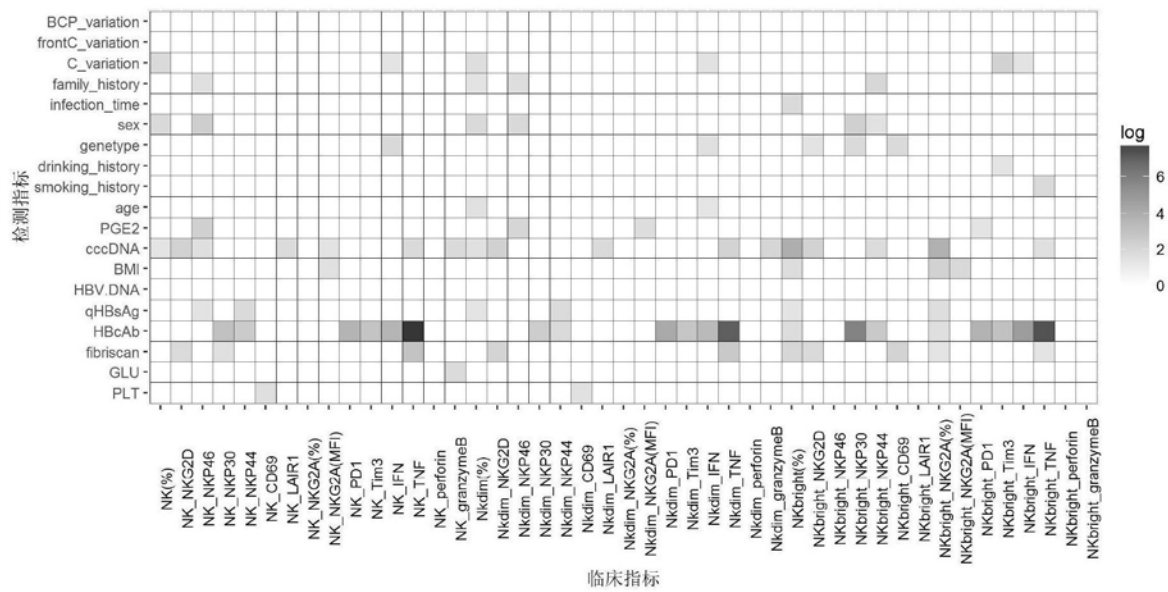


图4

专利名称(译)	肝病NK细胞功能的检测评估方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN108663510A	公开(公告)日	2018-10-16
申请号	CN201810400061.5	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NK细胞功能的检测评估方法。该检测评估方法包括以下步骤：(1)利用单个细胞通过流式细胞仪，使用不同的抗细胞因子或NK细胞表面受体的抗体与细胞表面或胞内特定标记组合，检测相应的细胞因子分泌或表面受体水平；(2)利用大数据生物统计学分析技术，对每一个免疫因子造成整体免疫功能的贡献、作用及影响进行判读，对所用免疫因子对免疫功能的作用形成最终对NK细胞整体免疫功能判读。本发明还提供了一种肝病NK细胞功能检测试剂盒，其包含以下多种表面分子抗体：CD56、NK-IFN- γ 、NK-TNF- α 、NK-G2D、NK-p46、NK-p30、NK-p44、NK-KIRs、NK-LAIRs、NK-Perforin、NK-GrazymeB、NK-G2A、NK-PD-1、NK-Tim3。本发明的检测评估方法和试剂盒能够有效检测NK细胞总体功能。

