



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107748256 A
(43)申请公布日 2018.03.02

(21)申请号 201710943050.7

(22)申请日 2017.10.11

(71)申请人 上海医盈网络科技有限公司
地址 201800 上海市嘉定区菊园新区环城
路2222号1幢J698室

(72)发明人 贺红 刘剑飞 洪丰

(74)专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事
务所 23109
代理人 贾泽纯

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

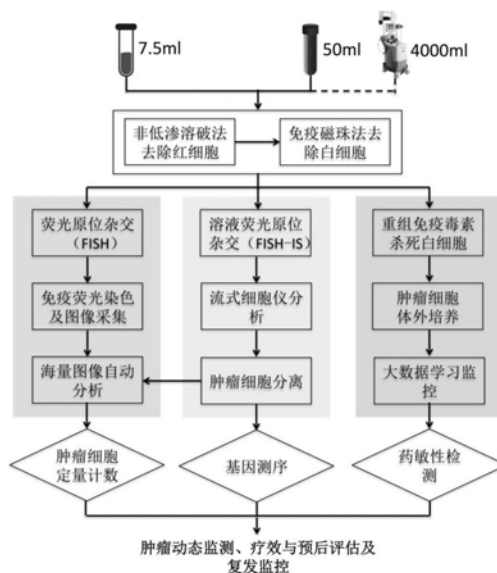
权利要求书3页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法

(57)摘要

一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,它涉及液体活检检测方法,该系统包括富集样本中的循环肿瘤细胞;分离、鉴别出所述循环肿瘤细胞;单位体积内循环肿瘤细胞定量计数。本发明的智能化液体活检方法综合了最新的计算机科学和生物技术,开创性地发明出循环肿瘤细胞定量检测方法、循环肿瘤细胞分离方法,以及循环肿瘤细胞体外培养方法。该方法可实现动态监测肿瘤性状,肿瘤治疗和预后评估,以及肿瘤复发监控等,因此将极大地促进中国个体化精准治疗的发展。



1. 一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于该方法是在富集样本中的循环肿瘤细胞过程中,采用非低渗溶破法去除红细胞;然后采用免疫磁珠法去除白细胞,获得肿瘤细胞富集提取液。

2. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于在免疫磁珠法去除白细胞后,采用免疫毒素进一步杀死富集提取液中白细胞。

3. 根据权利要求2所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于所述的免疫毒素为抗CD45重组免疫毒素。

4. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于对获得循环肿瘤细胞富集提取液中的循环肿瘤细胞进行双重标记;即通过溶液荧光原位杂交的方式,对富集提取液中的所有细胞直接进行DNA探针标记;然后进行免疫法抗原抗体结合为基础的标记,观察同时显示两种不同标记的循环肿瘤细胞。

5. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于对获得循环肿瘤细胞富集提取液中的循环肿瘤细胞进行分离;具体为:通过溶液荧光原位杂交的方式,即对富集提取液中的所有细胞直接进行DNA探针标记;对标记后的富集提取液利用流式细胞仪分离出循环肿瘤细胞。

6. 根据权利要求5所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于对分离后的循环肿瘤细胞,通过多因子培养基与三维微载体相结合进行体外立体培养。

7. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于采用非低渗溶破法去除红细胞具体过程为:

将采集的7.5mL富集样本,在室温、700xg的条件下,离心5min,去掉上清血浆后,将剩余部分加入到10mL细胞分离介质顶层,在室温、500xg的条件下,离心5min,分离去除红细胞。

8. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于对获得肿瘤细胞富集提取液肿瘤进行细胞定量计数;具体为:在不丢失细胞悬液,及滴片区域完整采集荧光原位杂交图像的前提下,对采集的图像采用荧光原位杂交图像计数方法,检测单位体积内肿瘤细胞的数量。

9. 根据权利要求8所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,其特征在于所述的荧光原位杂交图像计数方法包含荧光原位杂交的杂交信号的检测和细胞区域分割两部分;

所述的荧光原位杂交的杂交信号的检测步骤如下:

步骤一:图像去噪及增强

采用全变差图像去噪方法进行图像去噪;该方法去噪的算法为:

$$\partial_t u = \operatorname{div} \left(\frac{\nabla u}{|\nabla u|} \right) \quad u(t=0) = I$$

其中,I是荧光原位杂交灰度图像, ∂ 代表偏微分数学,t代表图像的去噪程度变量,u代表去噪后的图像;

在上述去噪图像的基础之上,运用灰度图像形态学算子,顶帽变换,对亮点荧光原位杂交的杂交信号区域进行增强,以增强杂交信号强度,同时抑制非荧光原位杂交杂交信号区域;其中,增强杂交信号强度算法为:

$$\text{Tophat}(I) = I - I \circ B$$

其中,B是结构元素,o表示形态学算子中的开运算,I是荧光原位杂交灰度图像;

步骤二:信号提取

采用最大类间方差法,对上一步增强荧光原位杂交的杂交信号图像提取,确定荧光原位杂交的杂交信号和非荧光原位杂交的杂交信号区域的最佳阈值 v ,其算法为:

$$\sigma_{\omega}^2(v) = \min_v (\omega_f(v)\sigma_f^2(v) + \omega_{nf}(v)\sigma_{nf}^2(v))$$

其中, $\omega_f(v)$ 和 $\omega_{nf}(v)$ 是在阈值 v 条件下,荧光原位杂交的杂交信号和非荧光原位杂交信号区域的概率值; $\sigma_f^2(v)$ 和 $\sigma_{nf}^2(v)$ 分别为 $\omega_f(v)$ 和 $\omega_{nf}(v)$ 的方差;

步骤三:信号筛选

计算出上一步提取的荧光原位杂交的杂交信号的面积、亮度和圆率,设置三个阈值, $s1, s2, s3$;如果荧光原位杂交的杂交信号面积 $< s1$,则认为是噪声,该信号予以去除;荧光原位杂交的杂交信号亮度 $< s2$,则认为是假阳性信号,该信号予以去除;荧光原位杂交的杂交信号圆率 $< s3$,该信号是噪声,该信号予以去除;

所述的荧光原位杂交的杂交信号的面积指荧光原位杂交的杂交信号所占的图像像素数目;

所述的荧光原位杂交的杂交信号的亮度指当前荧光原位杂交的杂交信号所占区域的像素平均值;

所述的荧光原位杂交的杂交信号的圆率为: $(4 * \text{荧光原位杂交的杂交信号的面积} * \pi) / (\text{荧光原位杂交的杂交信号的区域边界长度}^2)$;

其中, $s1 = 0.65 * \text{杂交信号的平均面积}$,所述的杂交信号的平均面积为通过提取的荧光原位杂交信号的数目计算当前图像中所有杂交信号的平均面积得到的;

$s2 = 0.55 * \text{杂交信号的平均亮度}$,所述的杂交信号的平均亮度为通过提取的荧光原位杂交信号的数目计算当前图像中所有杂交信号的平均亮度得到的;

$s3 = 0.9 * \text{杂交信号的平均圆率}$,所述的杂交信号的平均圆率为通过提取的荧光原位杂交信号的数目计算当前图像中所有杂交信号的平均圆率得到的;

步骤四:信号分类

采用最大稳定极值区域法去除非荧光原位杂交信号;

所述的细胞区域分割步骤如下:

步骤五:细胞粗提取

采用与步骤二相同的最大类间方差法对细胞和非细胞区域进行分离;

步骤六:粘连细胞分离

将上一步粗提取的细胞区域进行距离变换,将细胞区域的二值图转变成灰度图,即将每个白色物体所在的像素点都被赋予该点到边界点的最短距离值,采用洪水填充算法寻找距离变换灰度图中的最大值像素点;

以最大值像素点作为种子点,再次进行距离变换,即将每个白色物体所在的像素点被赋予该点到种子点的最短距离值,使用分水岭算法分离粘连细胞;

步骤七:细胞筛选

对通过上一步分水岭算法所得到的每个细胞区域进行形状和亮度分析,去除非细胞区域,得到细胞区域;

步骤八:细胞边界提取

采用二维等值线提取算法提取出上一步筛选得到的细胞区域内所有细胞的边界曲线；最后，将步骤四得到的荧光原位杂交信号检测结果映射到步骤八提取的细胞边界内的细胞区域，算出每个细胞所包含的红色通道和绿色通道中的信号个数，从而最终得出荧光原位杂交图像的自动计数。

10. 根据权利要求9所述的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法，其特征在于步骤七的细胞筛选是通过下述步骤进行的：

对通过上一步分水岭算法所得到的每个细胞区域进行形状和亮度分析，计算出每个细胞区域的细胞直径、大小、圆度以及该细胞区域的平均亮度；设置三个阈值， s_1, s_2, s_3, s_4 ；如果每个细胞区域的直径 $< s_1$ ，则认为是噪声，该信号予以去除；每个细胞区域的大小 $< s_2$ ，则认为是假阳性信号，该信号予以去除；每个细胞区域的圆度 $< s_3$ ，该信号是噪声，该信号予以去除；每个细胞区域的平均亮度 $< s_4$ ，该信号是噪声，该信号予以去除；

所述的每个细胞区域的细胞直径是由该区域细胞面积得出，而该区域细胞面积指每个细胞区域所占的图像像素数目；

所述的每个细胞区域的细胞大小为该区域包含的像素数目；

所述的每个细胞区域的圆率为： $(4 * \text{每个细胞区域的面积} * \pi) / (\text{每个细胞区域的区域边界长度}^2)$ ；

每个细胞区域的平均亮度为该区域的所有像素点的平均像素值；

其中， $s_1 = 0.7 * \text{杂交信号的平均直径}$ ，所述的杂交信号的平均直径为通过提取的荧光原位杂交信号的数目计算当前图像中所有杂交信号的平均直径得到的；

$s_2 = 0.45 * \text{杂交信号的平均大小}$ ，所述的杂交信号的平均大小为通过提取的荧光原位杂交信号的数目计算当前图像中所有杂交信号的平均大小得到的；

$s_3 = 0.95 * \text{杂交信号的平均圆度}$ ，所述的杂交信号的平均圆度为通过提取的荧光原位杂交信号的数目计算当前图像中所有杂交信号的平均圆度得到的；

$s_4 = 0.5 * \text{杂交信号的平均亮度}$ ，所述的杂交信号的平均亮度为通过提取的荧光原位杂交信号的数目计算当前图像中所有杂交信号的平均亮度得到的。

一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子细胞生物学领域,具体涉及一种从人或动物生物体液中富集,鉴定,单位体积定量循环肿瘤细胞的检测方法。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞和血液中循环肿瘤DNA(ctDNA)的检测方法统称为液体活检。液体活检具有快速简便、无创性、样本量充足、可连续性监测疾病等优点,因此成为个体化精准治疗研究的一个热点。

[0003] 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)是从实体肿瘤脱落入外周循环血液的具有特殊性状的肿瘤细胞,它与肿瘤的转移复发等有着极为密切的关系,对它的检测有助于肿瘤的临床进展、疗效与预后评估及肿瘤复发监控,具有极其重要的临床意义。近年来的研究对CTC的临床意义已经有了较为清晰的认识。治疗前中后不同阶段CTC检测的临床应用及意义涵盖了从早期诊断,辅助诊断,疗效评估与预后评估,药敏和耐药监测,肿瘤复发监测等各个环节。

[0004] CTCs液体活检主要包括循环肿瘤细胞的捕获,鉴别,和后期的计数,捕获细胞基因检测以及捕获活细胞培养,用药指导。特别是动态变化的一系列某一特定病人的CTC计数,可以用来评估该病例的肿瘤负荷,在这一点上与CTC评估肿瘤的大小形成的完美的互补。也可以评估患者对治疗反应,还是判断复发的最佳或者说最敏感的指标之一。

[0005] 目前,多数CTC检测方法都是以肿瘤细胞表面的上皮细胞标志物为靶点,如上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule,EPCAM),用相应的抗体捕获CTC,以细胞表达CKs作为主要诊断依据,这类方法涉及的EPCAM和CKs都具有上皮细胞特异性。目前代表性检测方法是目前唯一通过美国FDA批准进行临床应用的CellSearch系统,该系统虽然进行了有益的尝试,但是其计数的结果并不完全真实,有漏检率很高的问题,受到很多的技术局限。国内cFDA批准的友芝友公司开发的设备,也有CTC计数漏检和操作不便的问题,以叶酸检测为鉴别标准的系统,有临床接受度不高的问题。

[0006] 近年来大量的科研与临床实验已证明通过去除血中的血缘性有核细胞(如白细胞等)从而达到富集提取血中的非血缘性有核细胞是最为有效的手段。虽然此手段过程中涉及的某些单一方法已经有所报道,如免疫磁珠法去除白细胞,血型糖蛋白-A(glycophorin A)交联法去除红细胞,以及必须借助特殊细胞分离器械的免疫磁性颗粒与密度离心结合的初步尝试等,但这些方法耗时长,白细胞去除率低,靶细胞回收率差,且须使用特殊器材从而带来应用的不便,而且,免疫磁珠无法完全清除白细胞。

[0007] 荧光原位杂交(Fluorescence in situ Hybridization,FISH)技术用于病理组织中的肿瘤细胞检测已被临床广泛的接受,有的基因异常和相关的诊断方法步骤,并成为称作临床分子病理诊断的金标准。比如乳腺癌胃癌当中的Her2基因拷贝扩增,肺癌中的ALK基因位置改变等。近年来,也有数项技术应用使用荧光标记的染色体着丝粒特异探针对体液中处于间期的肿瘤细胞进行染色体数目的识别(正常细胞染色体为二倍体)。找到并且计数

循环肿瘤细胞。

[0008] 针对FISH技术发展出了FISH图像自动计数,它涉及到两方面问题的研究,即细胞的自动分割和细胞内FISH杂交信号点的检测。目前市场上有多家公司开发了相关的软件,如Bioview,ISIS,以及VideoTest-FISH等图像分析系统。这些分析软件的核心算法通常包含1)前处理图像均衡化,配准及融合不同种类的杂交信号图像;2)拉普拉斯算子、模糊聚类或混合高斯模型对杂交信号的自动识别;3)阈值法、形态学算子、区域生长、Watershed分水岭算法、K-均值聚类法、图论方法或者轮廓线形变法实现细胞的自动分割。这些算法能够满足组织切片中杂交信号的自动计数,但是对从液体活检的大量血液细胞背景下发现个别癌细胞却缺乏临床的验证,存在着不能准确灵敏的检测微量癌细胞的问题。

[0009] 近年来也有报道,对富集后的细胞同步实施各种抗体免疫荧光染色,以及染色体荧光原位杂交来区别循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)。从细胞鉴定的角度而言确实是提供了进一步的确认方法,但是其两种方法同时操作所带来的互相之间的干扰,对单位体积内CTC计数形成的时间延后,以及难于自动分析,还是对于临床应用埋下了不利的种子。

发明内容

[0010] 本发明的目的是为了解决上述问题,即免疫磁珠不能完全清除白细胞;抗体免疫荧光染色以及染色体荧光原位杂交两种方法互相干扰;海量血液细胞内的微量癌细胞检测不灵敏,富集后的循环肿瘤细胞培养困难等问题,而提供了一种循环肿瘤细胞的液体活检监测方法。

[0011] 本发明的一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法,是在富集样本中的循环肿瘤细胞过程中,采用非低渗溶破法去除红细胞;然后采用免疫磁珠法去除白细胞,获得肿瘤细胞富集提取液。

[0012] 我们认为目前对某些肿瘤CTC的有效检测应该可以做成:捕获,鉴别,单位体积内定量,培养,分子生物检测的成套方法,各技术环节不能截然分开,共同有效地决定着CTC检测的灵敏性和特异性。近来大量的科研与临床实验已证明通过去除血中的血缘性有核细胞(如白细胞等)从而达到富集提取血中的非血缘性有核细胞是最为有效的手段。此方法具有稀有细胞回收率高,不依赖于肿瘤细胞大小及特异性抗原,临床应用范围广,对肿瘤细胞影响小的特点,被我们选定为富集循环肿瘤细胞的基本方法,并在此基础上进行了工艺上的部分改进,加之创新性使用抗CD45重组免疫毒素,总体命名为“医盈富集法”(图1所示)。

[0013] “医盈富集法”包括以下内容:

[0014] 1)使用了调配的溶液进行非低渗溶破法去除红细胞;2)使用了免疫磁珠;使用了两次移除(即红细胞移除以及白细胞移除),以及改进的磁力架收集白细胞。3)加入抗CD45重组免疫毒素进一步杀死富集提取液中白细胞。

[0015] 上述在原有基础上改进的“医盈富集法”不但符合尽最大程度保留血液中循环肿瘤细胞不受破坏,被不当移除,以利肿瘤细胞计数准确这样一种检测目的,而且为实现活细胞捕获并进行后续基因检测以及用药指导创造了极好的机会。

[0016] 除“医盈富集法”外,本发明还进行了如下四大发明创新:

[0017] 首先,本发明开发出了CTC荧光原位杂交(FISH)和海量FISH细胞图像分析技术,即

FISH图像自动计数方法。具体路径如图1所示:1)使用“医盈富集法”;2)采用改进滴片最大程度保留所有富集到的循环肿瘤细胞;3)进行荧光原位杂交(FISH)或溶液荧光原位杂交(FISH-IS);4)通过镜下观察进行人工采集,或借助全自动扫描荧光显微镜采集FISH图像;5)对海量FISH图像运用自主开发的灰度值形态学算子自动检测荧光杂交信号,使用图论分割算法自动识别细胞,结合两者分析结果自动检测单位体积内循环肿瘤细胞的数量(7.5mL血液)。本发明设计的系统实用可靠,临床医生可及时获得循环肿瘤细胞数量信息。该技术采用临床广泛接受的肿瘤细胞辨认标准,(比如Her2基因扩增,ALK基因位置改变),逐一鉴别收集到的所有的细胞并计数其中的影响临床进展的肿瘤细胞,从而精确计数单位体积中循环肿瘤细胞数量,解决了上述问题。

[0018] 本发明所述的FISH图像自动计数方法由两部分组成,即FISH杂交信号的检测和细胞区域分割。首先,FISH图像包括同一切片位置对应的包含FISH杂交信号的红色通道图像和绿色通道图像,以及包含细胞信息的蓝色通道图像。其中,FISH杂交信号的检测是通过检测红色通道和绿色通道图像内的FISH杂交信号并将杂交信号分类,识别出每个FISH杂交信号信息。而细胞区域的分割是通过蓝色通道图像中包含的细胞信息进行自动分割,并且提取出所有细胞的边界曲线。然后,将前一步得到的FISH杂交信号检测结果映射到自动分割的细胞区域,可以自动算出每个细胞所包含的红色通道和绿色通道中的信号个数,从而最终得出FISH图像的自动计数。

[0019] 第二处创新在于使用了溶液FISH杂交(FISH in suspension,FISH-IS)技术,本发明使用的溶液FISH杂交技术,在溶液中对富集提取液中的所有细胞进行特定的DNA探针标记;该技术最大的特点是:直接在细胞溶液中进行探针标记,而不是现有技术玻片上做杂交,通过在循环肿瘤细胞溶液中进行探针标记,可以形成双染色。使原位杂交标记和免疫染色过程互不干扰。也可使用流式细胞术,方便追随荧光信号,实际分离血样中循环肿瘤细胞。提供了对分离的细胞进行分子生物学检测,甚至单细胞测序了解肿瘤组织的各种细胞基因谱的可能性。本发明的分离循环肿瘤细胞操作步骤如下:1)在已去除红、白细胞后富集提取液中,创新性的使用溶液FISH杂交(FISH in suspension,FISH-IS)技术,并在溶液中对富集提取液中的所有细胞进行特定的DNA探针标记;2)追随荧光信号,将用于测定细胞表面抗体染色的流式细胞仪,分离已荧光标记的特定的循环肿瘤细胞。提高了分离的循环肿瘤细胞特异性。使用溶液FISH杂交技术是本发明的主要的创新点之一,具有重要的研究价值和实际应用价值。

[0020] 第三个创新在于,本发明很好的实现了循环肿瘤细胞体外培养。目前极少有进行CTC细胞体外培养的报道。而这恰好是临床所需治疗指导的基本环节。成功培养循环肿瘤细胞,不仅可以进行多种化疗药的药敏实验及分子生物实验,而且对新药的开发,疗效判定将有无可估量的影响。肿瘤细胞原代培养药敏实验,进入门槛高,国内大部分的科研单位和医学独立检验所无法完成的。本发明发明人经过多年研究,研究出相关的培养基以及三维微载体构建三维培养微环境,可进行体外培养。

[0021] 本发明的肿瘤细胞体外培养具体步骤如下:1)从病人体内采集50mL血样(对特殊病例也可使用血细胞分离器从4000ml血中提取循环肿瘤细胞)以捕获一定量的肿瘤细胞用于体外培养;2)使用“医盈富集法”对循环肿瘤细胞进行富集提取;3)加入抗CD45重组免疫毒素进一步杀死富集提取液中白细胞。4)运用多因子培养基,三维微载体;构建三维培养微

环境,培养和扩增循环肿瘤细胞;5) 开发深度机器学习方法模拟体外肿瘤细胞培养专家经验,建立培养监控信息系统,实现自动追踪,适时干预。6) 药敏性测试。

[0022] 第四处创新在于我们采用了CD45重组免疫毒素,用CD45抗原结合区与百喉毒素的生物活性区(Activity domain,A区)和跨膜转运区(transmembrane domain,T区)组成的一种融合蛋白。高特异性,高亲和性地与白细胞表面的CD45结合,可以把免疫毒素带到白细胞,然后整个rIT-YL1分子被内吞进白细胞,百喉毒素的生物活性区被释放进入细胞质。终止蛋白质合成,导致白细胞死亡。以达到在免疫磁珠法处理以后,进一步去除白细胞并对富集的CTC无任何损伤的目的。

[0023] 本发明的发明人团队利用各成员不同的专业背景,结合最新的计算机科学和生物技术,针对现有的液体活检热点,发明了智能化高效液体活检监测方法,如图1所示。该系统采用多项国内外领先或首创技术,包括1) 荧光原位杂交(FISH)和海量FISH图像自动分析相结合的肿瘤细胞定量监测技术;2) 溶液荧光原位杂交(FISH-IS)和流式细胞仪结合的肿瘤细胞分离技术;3) 独家开发的多因子肿瘤细胞培养液、3D体外肿瘤细胞培养平台以及基于大数据学习肿瘤培养实时监控方法对不同治疗阶段的肿瘤进行药敏性分析技术。4) 引入抗CD45重组免疫毒素,其是CD45抗原结合区与百喉毒素的生物活性区(Activity domain,A区)和跨膜转运区(transmembrane domain,T区)组成的一种融合蛋白。它特异地去除血中的白细胞,不损害肿瘤细胞。

[0024] 本发明的智能化高效液体活检监测方法还具有如下特点:

[0025] 1. 本发明改进了破坏红细胞的方法,即采用溶液进行非低渗溶破法去除红细胞,使红细胞的融破更加彻底并且减少对后续步骤的影响。

[0026] 2. 本发明使用的原位杂交标记,是临床广泛接受的肿瘤细胞认定标准,加之使用全面的扫描和电脑医学图像处理技术,使这种循环肿瘤细胞的检测步骤,也具有实际上第二次拦截富集液中残存的白细胞的功能,也就是首先用磁珠将白细胞去除后,按照目标FISH信号图像进行了第二次挑选,务求挑选出待检标本中所有的目标类型癌细胞,实现单位体积定量循环肿瘤细胞的目标。

[0027] 3. 我们引入了鲜少有人运用的在细胞溶液中而不是在玻片上做杂交的方式,使后续技术的衔接具有更多的可塑和可能性。后续衔接免疫组化可以进一步的帮助正确的鉴定每一个循环肿瘤细胞;溶液FISH杂交(FISH in suspension,FISH-IS)也使后续衔接流式细胞仪技术成为可能,可以开启更多革命性的变革。

[0028] 综上所述,本发明的智能化液体活检系统综合了最新的计算机科学和生物技术,开创性地发明出循环肿瘤细胞定量检测方法、循环肿瘤细胞分离方法,以及循环肿瘤细胞体外培养方法。该系统可实现动态监测肿瘤性状,肿瘤治疗和预后评估,以及肿瘤复发监控等,因此将极大地促进中国个体化精准治疗的发展。

附图说明

[0029] 图1为本发明的肿瘤细胞的液体活检监测方法流程图;

[0030] 图2通过荧光原位杂交的方式(FISH图像),辨认血CTC细胞富集提取液中血细胞和肿瘤细胞图;

[0031] 图3为采用本发明的FISH图像自动计数方法检测的肿瘤细胞和杂交信号的照片;

[0032] 图4为FISH图像自动计数方法流程图；

[0033] 图5为FISH杂交信号自动检测图；其中，a为绿色通道图；b为图像去噪图；c为图像增强图；d为信号提取图；e为信号筛选图；f为信号分类图；

[0034] 图6为细胞自动分割图；其中，a为蓝色通道图；b为细胞粗提取图；c为粘连细胞分裂图；d为细胞筛选图；e为细胞边界提取图；f为FISH图像计数图；

[0035] 图7和图8为我们开发的三维微载体图；

[0036] 图9,图10为采用本发明三维微载体培养脉络膜黑色素瘤细胞图。

具体实施方式

[0037] 通过以下实例验证本发明的有益效果：

[0038] 实施例1

[0039] 循环肿瘤细胞智能定量FISH杂交诊断平台

[0040] 富集并且计数循环肿瘤细胞。追踪动态观察，研究循环肿瘤细胞数量变化与临床表现，临床诊断，临床治疗之间的关系是液体活检领域最有临床应用价值的项目之一，但是难以成功拿到数据。动态变化的一系列某一特定病人的CTC计数，可以用来评估该病例的肿瘤负荷，在这一点上与CTC评估肿瘤的大小形成的完美的互补。也可以评估患者对治疗反应，还是判断复发的最佳或者说最敏感的指标之一。

[0041] 基于以上情况，本实施例采用本发明的“医盈富集法”，结合本发明的智能化液体活检系统对病人的循环肿瘤细胞进行如下定量检测：

[0042] 采集血样·病人：7.5mL——非低渗溶破法去除红细胞——免疫磁珠法去除白细胞（对富集的CTC无任何损伤）——FISH特异性杂交——免疫荧光染色固定于玻片上的CTC，EpCAM免疫荧光染色——通过镜下观察进行人工采集，或借助全自动扫描荧光显微镜进行自动采集图像——大量图像分析，FISH杂交信号自动计数，得到单位体积（7.5mL）内循环肿瘤细胞的数量，实现智能定量的循环肿瘤细胞检测。

[0043] 这套技术方案，吸取目前被广泛认可的差减富集法的优点，辅之以我们改良的去除红细胞技术和我们特选的磁珠以及改良的磁珠收集技术，引入了在溶液中完成FISH（即FISH-IS）的全新理念，有利于得到FISH和免疫组化染色互不干扰的最佳结果。这套方案特别强调要获得7.5毫升血液中循环细胞数的总数目，并使用改造过的FISH生物技术和高超的生物图像软件分析相结合的方法，高效地实现单位体积里面肿瘤细胞定量。

[0044] 基于实施例1的方案，以乳腺癌，胃癌，食道癌的循环肿瘤细胞作为定量检测对象，我们设计以Her2基因作探针，鉴定富集提取液中的循环肿瘤细胞，结果如图2和图3所示。从图2和图3可以看出，本实施例的方案很好的实现循环肿瘤细胞的自动计数。图2和图3的实验是基于FISH杂交技术与本发明的FISH杂交信号自动计数方式得出的。

[0045] 在本实施例中所述的FISH杂交信号自动计数详细说明如下：

[0046] 本发明的FISH图像自动计数方法，主要包括（1）FISH杂交信号的检测；（2）细胞区域分割。具体的流程如图4所示。

[0047] 如图4所示，本发明的FISH图像自动计数方法由两部分组成，即FISH杂交信号的检测和细胞区域分割。首先，FISH图像包括同一切片位置对应的包含FISH杂交信号的红色通道图像和绿色通道图像，以及包含细胞信息的蓝色通道图像。其中，FISH杂交信号的检测是

通过检测红色通道和绿色通道图像内的FISH杂交信号并将杂交信号分类,识别出每个FISH杂交信号信息。而细胞区域的分割是通过蓝色通道图像中包含的细胞信息进行自动分割,并且提取出所有细胞的边界曲线。然后,将前一步得到的FISH杂交信号检测结果映射到自动分割的细胞区域,可以自动算出每个细胞所包含的红色通道和绿色通道中的信号个数,从而最终得出FISH图像的自动计数。接下来将针对FISH杂交信号的检测和细胞区域分割这两部分进行详细阐述。

[0048] 1.FISH杂交信号自动检测

[0049] FISH杂交信号自动检测技术分四大步,如下图5中所示,以绿色通道信号自动检测为例,相同算法流程也运用于检测红色通道信号。

[0050] 1.1图像去噪及增强

[0051] 自动检测FISH杂交信号(图5(a)中的亮点)的难点之一是细胞核与FISH探针的杂交程度不一致导致的不同FISH杂交信号强度,因此增强可能的FISH杂交信号区域将大大地简化检测FISH杂交信号难度。绿色通道FISH图像首先被转换成灰度图像以便于图像处理。全变差图像(total variation flow)去噪法被选择用于图像去噪并增强FISH杂交信号强度,该方法可表达为:

$$[0052] \quad \partial_t u = \operatorname{div} \left(\frac{\nabla u}{|\nabla u|} \right) \quad u(t=0) = I \quad (1)$$

[0053] 其中I是FISH灰度图像。方程(1)显示FISH图像的去噪程度只取决于单一变量t的大小,因此便于用户实现和控制图像的去噪过程。图5(b)给出了通过方程(1)得到的去噪结果。全变差图像(total variation flow)去噪法既简单易操作,又能最大程度的保留杂交信号信息。

[0054] 在去噪图像的基础之上,我们接下来运用灰度图像形态学算子,顶帽变换(Tophat),对亮点FISH杂交信号区域进行增强,同时抑制非FISH杂交信号区域。

$$[0055] \quad \text{Tophat}(I) = I - I \circ B \quad (2)$$

[0056] B是结构元素, \circ 表示形态学算子中的开运算。图5(c)显示了顶帽变换后图像增强的结果。通过对亮点信号区域的增强,我们可以清楚地发现非FISH杂交信号区域被粗略的去除,同时FISH杂交信号区域被保留。

[0057] 1.2信号提取

[0058] 该步骤的目的是从增强图像(图5(c))中提取出实际的FISH杂交信号区域。最大类间方差法(Otsu's algorithm)被选择用于自适应的确定FISH杂交信号和非FISH杂交信号区域的最佳阈值v。自适应过程是评估FISH杂交信号和非信号之间的类间方差值,方差越大,说明构成FISH图像的二部分的差别越大,当部分FISH杂交信号被错分为非FISH杂交信号区域或部分非FISH杂交信号区域错分为FISH杂交信号区域时,都会导致二部分差别变小。因此,使类间方差最大的分割意味着错分概率最小。该方法的数学表达为

$$[0059] \quad \sigma_{\omega}^2(v) = \min_v \left(\omega_f(v) \sigma_f^2(v) + \omega_{nf}(v) \sigma_{nf}^2(v) \right) \quad (2)$$

[0060] 其中 $\omega_f(v)$ 和 $\omega_{nf}(v)$ 是在阈值v条件下,FISH杂交信号和非FISH信号区域的概率值。 $\sigma_f^2(v)$ 和 $\sigma_{nf}^2(v)$ 是它们的方差。图5(d)显示了最大类间方差提供FISH杂交信号的结果,表明最大类间方差法可以最大程度地提取出FISH杂交信号。

[0061] 1.3信号筛选

[0062] 但是,前一步提取出的FISH杂交信号仍然既有可能包含亮度值高的非FISH杂交信号区域,也有可能因为FISH杂交误差所产生的阴性FISH信号(尽管有杂交信号,但是正常细胞)和真实的阳性FISH杂交信号(肿瘤细胞)。接下来,对前一步提取出的每个FISH杂交信号区域进行扫描,得到每个FISH杂交信号区域的大小,亮度,和圆率,通过对这些值设置不同的阈值可有效地去除非FISH杂交信号区域,如图5(e)所示,从而尽可能的区分筛选出真实的阳性FISH杂交信号区域(肿瘤细胞)。

[0063] 1.4信号分类

[0064] 信号分类步骤通过图像及其它宏观特征信息进一步过滤非阳性FISH信号,以提高信号检测的精度。

[0065] 真实的FISH杂交信号具有稳定性强,形状和大小固定等特征,因此我们运用最大稳定极值区域法(Maximally Stable Extreme Region)去除非FISH信号。该方法除了运用亮度值最大这一特征以外,还增加了检测区域必须稳定且形状必须符合靶基因杂交信号等一系列额外的要求,从而最大限度的提取出真实的FISH杂交信号。

[0066] 尽管宏观特征信息不能定位出肿瘤细胞,但是它可以事先检验出血液中是否包含肿瘤细胞,并且肿瘤细胞数目越多,宏观特征信息强度越大。因此我们使用非线性回归方法建立宏观特征强度和实际阳性FISH杂交信号亮度值之间的对应关系,从而可事先通过宏观特征强度来决定FISH杂交信号亮度值的阈值。通过该阈值我们可以分类出阳性和阴性FISH信号。图5(f)显示了最终检测的阳性FISH杂交信号。

[0067] 2.细胞自动分割

[0068] 细胞自动分割算法应用于蓝色通道图像,用于实现如前所述的红色通道或者绿色通道图像对应的同一切片的蓝色通道图像的细胞自动分割。该图像通道只记录了细胞信息,如图6(a)所示。细胞自动分割流程主要分为四步:

[0069] 2.1细胞粗提取

[0070] 最大类间方差法(Otsu's algorithm)被用于分离细胞和非细胞区域,因为该方法能够自适应地寻找划分两类区域的最佳阈值。图6(b)给出了分离结果,尽管所有细胞区域都被提取出,但是一些非细胞区域也被错误的归纳为细胞区域,因此此步骤的分离结果称为细胞的粗提取。

[0071] 2.2粘连细胞分离

[0072] 除了区分细胞粗提取结果中的非细胞区域,粘连细胞的分离也是精确细胞分割的难点。为实现细胞的分割,我们首先对粗提取结果进行距离变换,将图6(b)中的二值图转换成灰度图,即图6(b)中每个白色物体所在的像素点都被赋予该点到边界点的最短距离值。洪水填充(flood-fill)算法被用于寻找距离变换灰度图中的最大值像素点,这些点通常都相对应于每个细胞区域的中心点。

[0073] 接下来以每个中心点作为种子点,再次进行距离变换。同前次距离变换不同,图6(b)中的每个白色物体所在的像素点被赋予该点到种子点的最短距离值。我们使用分水岭算法来分离粘连细胞。距离变换灰度图可以理解成地形表面,其中灰度值的大小就表示地貌的高度。在全图范围内降水,盆地部分慢慢被填满,当不同集水盆将要相互连通时,筑起水坝,水坝也就是分水线。当所有的区域都被水淹过后,分水岭也就都建完成了,整个算法

结束。每个分水岭所包含的区域就是单个细胞所占区域,如图6(c)所示。

[0074] 2.3细胞筛选

[0075] 分水岭算法所得到的每个细胞区域可以进行形状和亮度分析,可计算出每个细胞区域的直径,大小,圆度,以及该细胞区域的平均亮度。通过对这些值设置不同的阈值可有效地去除非细胞区域,如图6(d)所示。

[0076] 2.4细胞边界提取

[0077] 在精准提取除单个细胞区域后,我们使用二维等值线提取算法提取出所有细胞的边界曲线,如图6(e)显示。

[0078] FISH图像自动计数

[0079] 最后,将前一步得到的FISH杂交信号检测结果映射到自动分割的细胞区域,我们可以自动算出每个细胞所包含的红色通道和绿色通道中的信号个数,从而最终得出FISH图像的自动计数,如图6(f)所示。

[0080] 本实施例中,在自动检测FISH杂交信号的过程中,引入了宏观特征信息,极大的提高了检测的精度。由于海量血液细胞中可能仅包含非常微量的癌细胞,单纯的微观图像的分析检测可能会面临着无法有效的准确的捕捉到癌细胞的问题,而宏观特征信息可以事先检验出血液中是否包含肿瘤细胞,并且肿瘤细胞数目越多,宏观特征信息强度越大。通过宏观特征信息检测到微量癌细胞后再结合微观图像处理分析,即可准确的捕捉微量癌细胞,从而实现本实施例的目的。

[0081] 实施例2循环肿瘤细胞溶液FISH杂交(FISH-IS)双染色诊断平台

[0082] 采集血样·病人:7.5mL——非低渗溶破法去除红细胞——免疫磁珠结合,去除白细胞——FISH-IS(FISH in suspension)特异性杂交——进行免疫法抗原抗体结合为基础的标记,形成双染色。通过镜下观察进行人工采集,或借助全自动扫描荧光显微镜进行自动采集图像——大量图像分析。

[0083] 此实施例引入了在溶液中完成FISH(即FISH-IS)的全新理念,有利于得到FISH和免疫组化染色互不干扰的最佳结果。

[0084] 实施例3

[0085] 溶液FISH杂交(FISH-IS)为基础的,修改的BD FACS Melody循环肿瘤细胞检测捕获平台采集血样·病人:7.5mL——非低渗溶破法去除红细胞——免疫磁珠结合,去除白细胞——FISH-IS(FISH in suspension)特异性杂交——流式细胞仪分析(flow cytometry)。流式细胞分析技术是通过对单个细胞性状的快速测定并结合先进的计算机系统使得在短期内可对大量细胞进行定性定量测定,甚至特定的目标CTCs捕获。

[0086] 流式细胞仪分析(flow cytometry)。流式细胞分析技术是通过对单个细胞性状的快速测定并结合先进的计算机系统使得在短期内可对大量细胞进行定性定量测定。以前这种方法主要是用来测定细胞表面的抗体染色,我们将采用在溶液中进行过特异性DNA探针荧光原位杂交的标记的细胞,在我们这种溶液FISH(FISH-IS)杂交的基础上,将产生一种新的鉴定循环肿瘤细胞的方法。

[0087] 本实施例创造性地引入FISH-IS技术,经过改造使用到循环肿瘤细胞的检测当中来,衔接流式细胞仪检测和建立基于DNA异常指征的循环肿瘤细胞分离。这将提高的循环肿瘤细胞特异性,FISH-IS这一杂交技术的引入,将可以引出更多的后续新技术生长点。

[0088] 实施例4

[0089] 通过上述3个实施例能够得到我们想要的循环肿瘤细胞,但是如何对其进行体外扩增培养,目前还没有相关研究,本发明将多细胞因子培养基与呈多层网状的三维微载体相结合,进行体外扩增培养循环肿瘤细胞。由于这种3D细胞培养系统更接近体内肿瘤的生长环境,原代肿瘤细胞可在支架网内生长旺盛,快速增殖。这种三维细胞培养更接近体内的肿瘤生长状态,可以增加肿瘤药敏实验的可信度。另外,我们所开发的基于深度机器学习的方法可实时监控肿瘤细胞的培养情况,这将极大地降低肿瘤细胞体外培养技术对实验人员技术和经验的要求,可快速商业化推广我们的培养方法。

[0090] 采集血样·病人:30ml——非低渗溶破法去除红细胞——免疫磁珠法去除白细胞——加入抗CD45重组免疫毒素——采用本发明的洪氏培养法。对循环肿瘤细胞进行短时的原代培养,然后开展体外化疗药物药敏实验或其他分子生物检测。

[0091] 本实施例设计了一种药物体外去除白细胞,捕获循环肿瘤细胞,原代培养药敏实验的方法。这是一种除免疫磁珠法以外,去除白细胞并对富集的CTC无任何损伤的新方法。操作简便易行。这种方法,将可以用于循环肿瘤细胞原代培养,去除培养物中的白细胞,提高循环肿瘤细胞纯度医生们从而可以优先尝试使用药敏实验选出的有效化疗药物及制定个体化治疗方案。

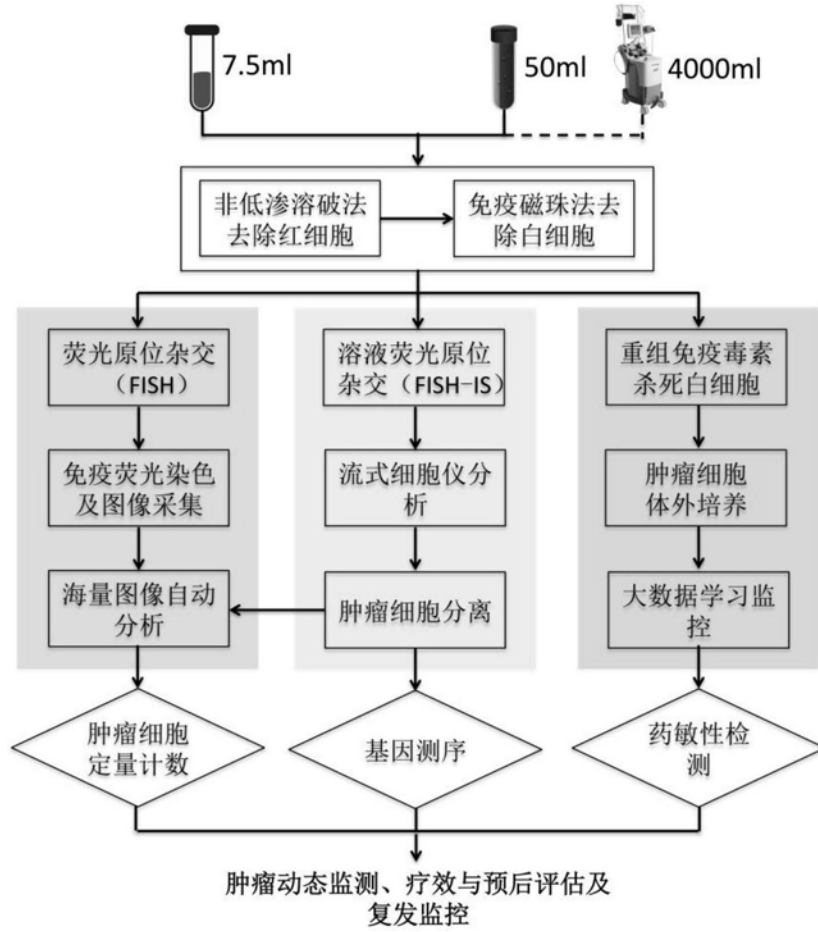


图1

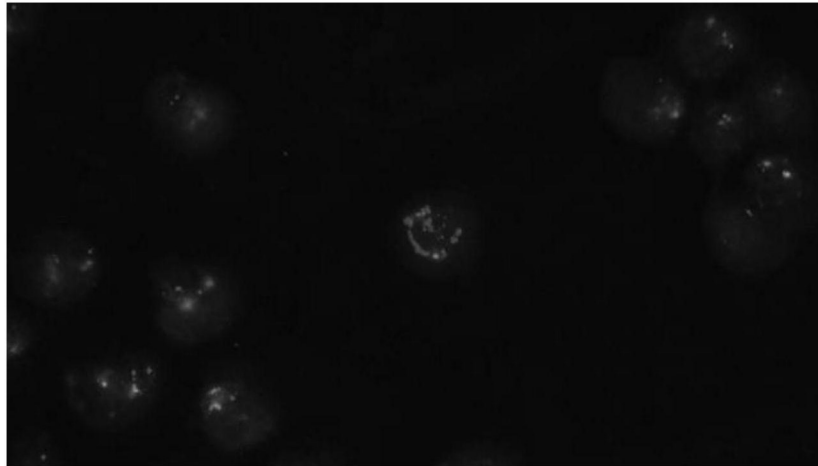


图2

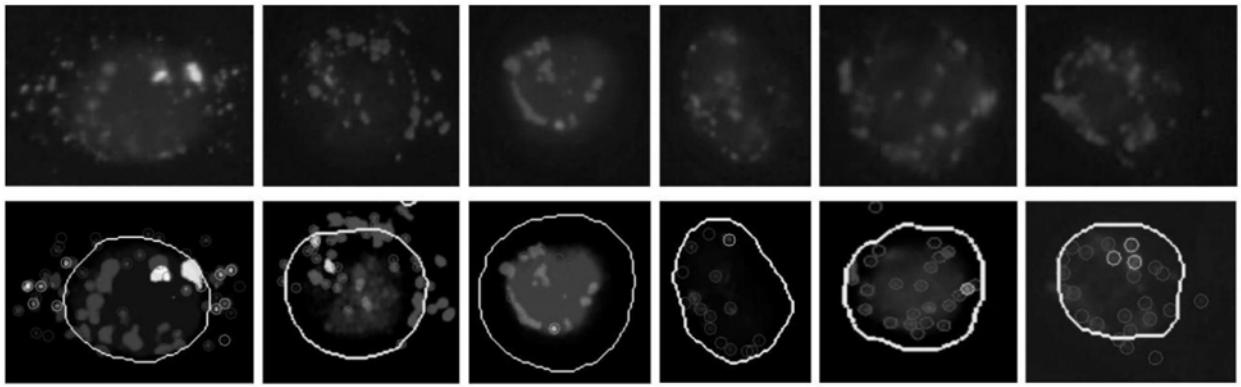


图3

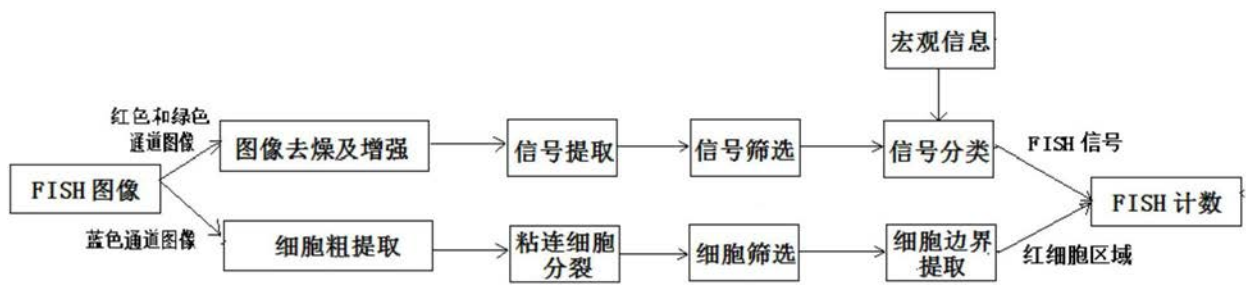


图4

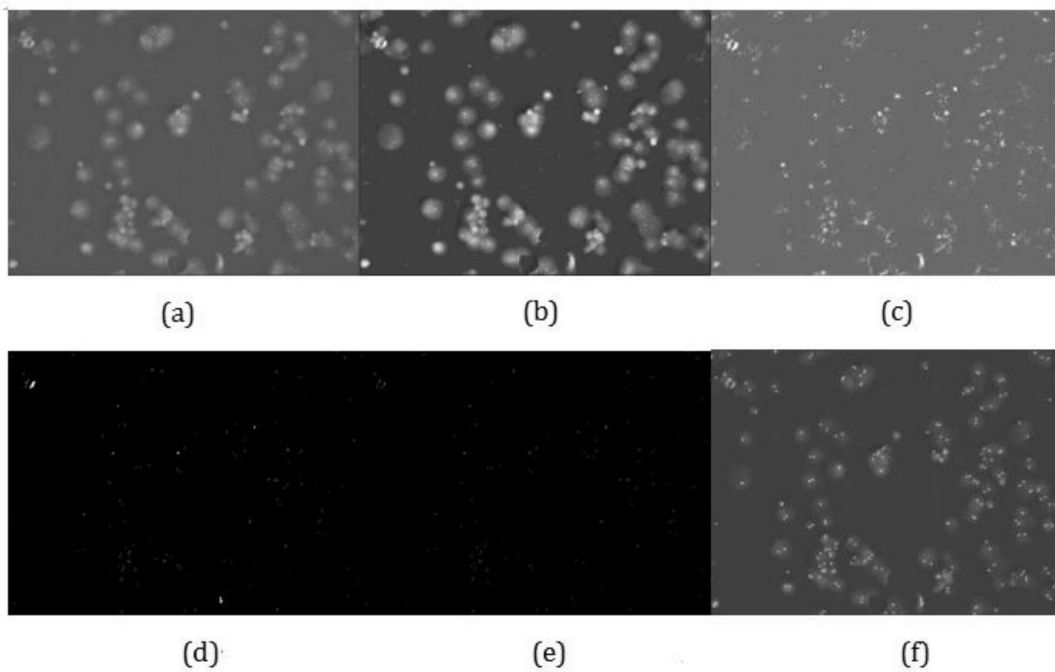


图5

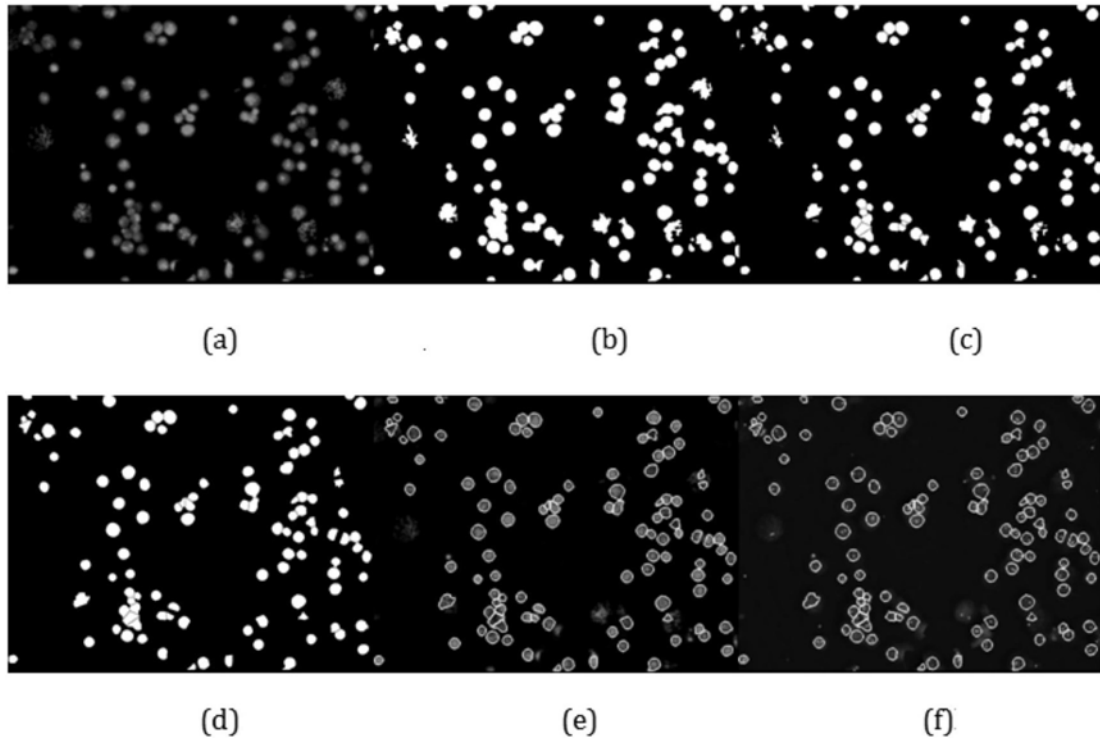


图6



图7

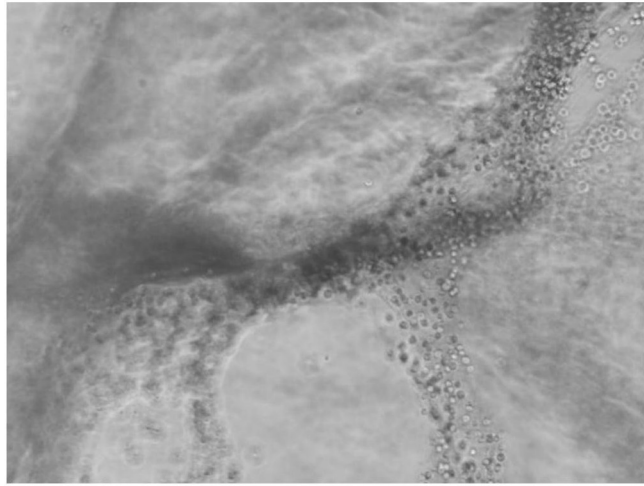


图8

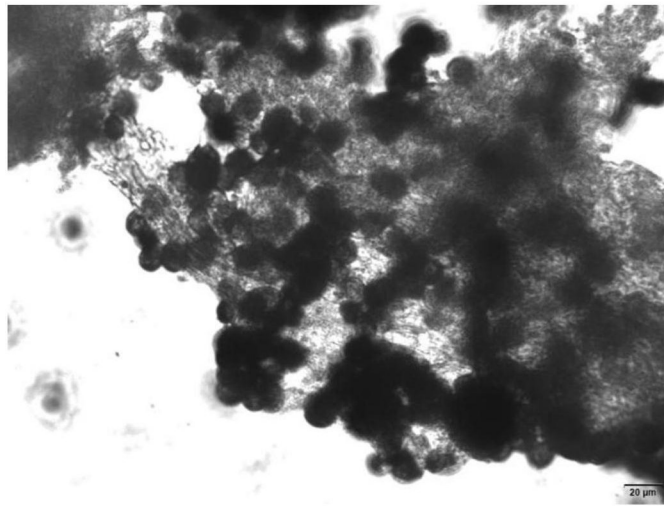


图9

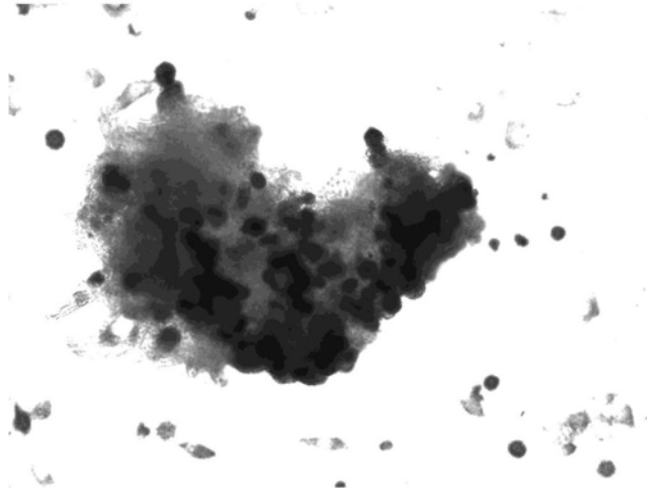


图10

专利名称(译)	一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法		
公开(公告)号	CN107748256A	公开(公告)日	2018-03-02
申请号	CN2017110943050.7	申请日	2017-10-11
[标]发明人	贺红 刘剑飞 洪丰		
发明人	贺红 刘剑飞 洪丰		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N21/64 G01N15/14		
CPC分类号	G01N15/14 G01N21/6486 G01N33/531 G01N33/574		
其他公开文献	CN107748256B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种循环肿瘤细胞的液体活检检测方法，它涉及液体活检检测方法，该系统包括富集样本中的循环肿瘤细胞；分离、鉴别出所述循环肿瘤细胞；单位体积内循环肿瘤细胞定量计数。本发明的智能化液体活检方法综合了最新的计算机科学和生物技术，开创性地发明出循环肿瘤细胞定量检测方法、循环肿瘤细胞分离方法，以及循环肿瘤细胞体外培养方法。该方法可实现动态监测肿瘤性状，肿瘤治疗和预后评估，以及肿瘤复发监控等，因此将极大地促进中国个性化精准治疗的发展。

