



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107942046 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201710632413.5

(22)申请日 2017.07.28

(71)申请人 中山大学肿瘤防治中心

地址 510000 广东省广州市东风东路651号

(72)发明人 郑利民 陈敏山 吴翀 林洁

张耀军 周仲国

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司

公司 44202

代理人 刘孟斌 刘宇峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种用于肝癌切除术后预后的检测试剂盒。本发明所述的用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒,包括第一抗体和第二抗体,所述第一抗体是选自对于以下蛋白分子标记物的抗体的两个或两个以上的组合:CD33(细胞分化抗原33)、CD11b(ITGAM)、CD169(唾液酸黏附素)。本发明所述的用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒采用双抗体/三抗体结合指标,可以更加精确地预测患者术后的预后情况,从而更好地帮助医生选择合适的治疗人群和方式,并为有效诊治提供更加有力的支持。

1. 一种用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒,包括第一抗体和第二抗体,其特征在于:所述第一抗体是选自对于以下蛋白分子标记物的抗体的两个或两个以上的组合:CD33(细胞分化抗原33)、CD11b(ITGAM)、CD169(唾液酸黏附素)。

2. 根据权利要求1所述的免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述第一抗体是对于三种蛋白分子标记物CD33、CD11b和CD169的抗体的组合。

3. 根据权利要求1所述的免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述第一抗体是对于两种蛋白分子标记物CD33和CD11b的抗体的组合。

4. 根据权利要求1所述的免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述第一抗体是对于两种蛋白分子标记物CD11b和CD169的抗体的组合。

5. 根据权利要求1所述的免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述第二抗体是辣根过氧化物酶标记的第二抗体。

用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒,具体涉及一个用于预测肝细胞肝癌患者接受切除术后总体生存的双抗体及三抗体组合的免疫组化检测试剂盒。

背景技术

[0002] 原发性肝细胞肝癌(简称肝癌)是一种常见的恶性肿瘤,发病率和死亡率分居第六和第三位,而中国是肝癌高发区。近年来肝癌发病率有明显上升的趋势,严重危害人类的健康与生命安全。肝癌易发生血管侵犯和转移,是导致其预后差、生存期短的主要原因。因此,有效预测患者术后总体生存将可以帮助选择合适的治疗人群和方式,为有效诊治提供有力的支持。

[0003] 目前临床常用病理诊断以及单独分子标记物对患者术后预后进行判断,包括:(1)肝癌临床特征(如肿瘤数目和大小等);(2)组织病理指标(如肿瘤细胞分化程度);(3)免疫学指标,主要集中于淋巴细胞,或单个髓系细胞标记,尚未有方案能揭示肝癌患者肿瘤中髓系细胞反应的整体特征。然而,现有技术存在以下不足:(1)以上传统临床病理诊断或单一的分子标记物对患者术后预后判断的效力较低,精确度较差;(2)目前对于指示肝癌中免疫反应的分子指标模型大多使用淋巴细胞标记,而忽视了髓系细胞对于患者预后和抗肿瘤治疗的重要影响;(3)单个髓系细胞标记虽然也可以一定程度上预测患者预后,但实际上并不能全面反映肿瘤中髓系细胞反应乃至整体免疫反应的实际情况。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于肝癌切除术后预后的检测试剂盒,它采用双抗体/三抗体结合指标,可以更加精确地预测患者术后的预后情况,从而更好地帮助医生选择合适的治疗人群和方式,并为有效诊治提供更加有力的支持。

[0005] 本发明所述的用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒,包括第一抗体和第二抗体,所述第一抗体是选自对于以下蛋白分子标记物的抗体的两个或两个以上的组合:CD33(细胞分化抗原33)、CD11b(ITGAM)、CD169(唾液酸黏附素)。

[0006] 优选地,所述第一抗体是对于三种蛋白分子标记物CD33、CD11b和CD169的抗体的组合。

[0007] 优选地,所述第一抗体是对于两种蛋白分子标记物CD33和CD11b的抗体的组合。

[0008] 优选地,所述第一抗体是对于两种蛋白分子标记物CD11b和CD169的抗体的组合。

[0009] 根据本发明所述的免疫组化检测试剂盒的进一步特征,所述第二抗体是辣根过氧化物酶标记的第二抗体。

[0010] 通过本发明所述的免疫组化检测试剂盒,对肝癌切除术后提供的肝癌组织样本进行免疫组化检测,综合分析上述3种第一抗体所特异性标记的蛋白分子标记物在样本中的表达水平,可以达到评估患者接受手术切除肿瘤后的存活率的目的。

- [0011] 本发明所述的免疫组化检测试剂盒具有以下优点：
- [0012] (1) 试验方法非常成熟，检测过程简便，直观，易于重复，由普通技术员均可以完成；
- [0013] (2) 可采用人工辅助的半自动图像定量分析，结果客观准确，优于人工半定量分析；
- [0014] (3) 较单一标记物对患者预后的预测结果更加准确，而采用双标记物或三标记物进行检测，在保证精确性的情况下，较多标记物联合指标更简便快捷。

附图说明

- [0015] 图1为本发明试剂盒包括的三种第一抗体在肝癌组织切片中的免疫组化染色结果。
- [0016] 图2为本发明试剂盒的三种蛋白分子标记物的生存分析结果。
- [0017] 图3为本发明试剂盒的两种蛋白分子标记物联合模型的生存分析结果。
- [0018] 图4为本发明试剂盒的两种蛋白分子标记物比值划分法的生存分析结果。

具体实施方式

- [0019] 实施例一：本发明所述的免疫组化检测试剂盒所采用的抗体的筛选
- [0020] 本发明选用三种髓系免疫细胞的蛋白分子标记 (CD169, CD33, CD11b)，该三个标记物对于患者预后具有独立预测能力。其中，CD169用于标记CD169⁺的髓系细胞，CD33用于标记CD33⁺的髓系细胞，CD11b用于标记CD11b⁺的髓系细胞。
- [0021] 表1. 抗体的来源和具体实验条件

[0022]

标记物	抗体来源	修复方法	显色时间
CD33	Leica, 货号:NCL-L-CD33	高压10min, EDTA (pH9.0)	10min
CD11b	Abcam, 货号:ab52478	高压10min, 10mMCB (pH6.0)	0.5min
CD169	R&D, 货号:AF5197	微波20min, EDTA (pH9.5)	5min

- [0023] EDTA: 乙二胺四乙酸; CB: 柠檬酸缓冲液。
- [0024] 本发明所述的免疫组化检测试剂盒是通过以下实验来确定的：
- [0025] 首先，利用免疫组化的方法检测三种分子标记物在466例接受根治性切除的肝癌石蜡切片肿瘤部位的表达。
- [0026] 然后，利用专业图像软件分别统计上述3个分子标记物在肿瘤组织的阳性细胞数量。
- [0027] 最后，采用最小p值法对各分子进行“高”与“低”的分组。单因素分析中表明以上3个分子标记物获得的两组患者的总体生存率均有显著差异 (表2)。
- [0028] 表2. 单因素分析三个分子标记物与患者总体生存的关系

[0029]

变量	总体生存的单因素分析	
	中位生存的月份数 (95% CI)	P 值
CD169 (低 vs. 高)	40(36-43) / 52(49-55)	<0.001
CD33 (低 vs. 高)	40(36-44) / 50(47-53)	<0.001
CD11b (低 vs. 高)	51(48-54) / 40(36-44)	<0.001

[0030] 实施例二：本发明所述的免疫组化检测试剂盒的双抗体及三抗体组合方案

[0031] 本发明所述的免疫组化检测试剂盒的制备方法与常规的免疫组化检测试剂盒相同，区别在于该试剂盒采用的第一抗体所检测的蛋白分子分别为：CD33、CD11b、CD169。这三种第一抗体均可以在肝癌组织石蜡切片中检测到清晰的阳性信号。

[0032] 对于本发明所述的免疫组化检测试剂盒，通过以下步骤检测其有效性。

[0033] (一) 标本检测

[0034] 1. 选取465例包含肿瘤区域的肝癌组织蜡块，并确保无大片坏死；

[0035] 2. 对每一例蜡块选点后排成芯片阵列，获取4 μ m的组织芯片石蜡切片，在60 $^{\circ}$ C烤片2小时，取出，略冷；

[0036] 3. 室温下用二甲苯脱蜡2次，每次10分钟；

[0037] 4. 在100%乙醇中洗去二甲苯，再依次经过95%酒精、80%酒精、70%酒精，每次5分钟；

[0038] 5. 双蒸水中洗5分钟；

[0039] 6. 用0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶活性，室温10分钟；

[0040] 7. 双蒸水中洗4次，每次5分钟；

[0041] 8. 抗原修复：不同抗原的修复条件如表1所示。

[0042] 9. 室温自然冷却30分钟；

[0043] 10. PBS缓冲液中洗4次，每次3分钟；

[0044] 11. 将第一抗体（详见表1）分别滴加在组织切片上，4 $^{\circ}$ C孵育12小时；

[0045] 12. PBS缓冲液洗4次，每次5分钟；

[0046] 13. 滴加辣根过氧化物酶标记的第二抗体，37 $^{\circ}$ C孵育30分钟；包括2种第二抗体，分别是山羊抗鼠/兔IgG的多克隆抗体（与CD33和CD11b配合使用；购自Dako公司，货号为K5007）和驴抗绵羊IgG的多克隆抗体（与CD169的第一抗体配合使用；购自R&D公司，货号为NL010）。

[0047] 14. PBS洗4次，每次5分钟；

[0048] 15. 滴加DAB显色剂，室温孵育显色，具体时间如表1所示；

[0049] 16. 双蒸水洗4次，每次5分钟；

[0050] 17. 苏木素复染，室温2分钟；

[0051] 18. 双蒸水洗4次，每次5分钟；

[0052] 19. PBS缓冲液冲洗3分钟；

[0053] 20. 自来水冲洗3分钟;

[0054] 21. 晾干, 封片。

[0055] (二) 图像分析

[0056] 1. 在20倍视野下获取肿瘤区域的图片2张, 分辨率为2560×1920;

[0057] 2. 选定需要分析的肿瘤区域, 并利用分析软件识别阳性信号;

[0058] 3. 统计细胞膜阳性信号的细胞个数, 得到每单位面积图中的阳性细胞数量;

[0059] 4. 最终结果为2个视野图片的平均值。

[0060] (三) 结果分析

[0061] 1. 采用最小p值法对各标记物进行“高”与“低”的分组。如下: 当CD33阳性细胞数量高于308/mm²时, 划分为高表达组, 记为1分, 反之记为0分; 当CD169阳性细胞数量高于122/mm²时, 划分为高表达组, 记为1分, 反之记为0分; 当CD11b阳性细胞数量高于205/mm²时, 划分为高表达组, 记为0分, 反之记为1分。

[0062] 2. 三标记物联用方案: 联合三个标记物的评分数值可得到4个分组, 分别为Mr0, Mr1, Mr2和Mr3 (详见表3)。生存分析表明按照评分后分组的四类患者之间的总体生存率均有显著差异 (图2; P<0.001)。

[0063] 表3. 多个标记物组合的评分方案

[0064]

编号	检测结果	评分			评分后的分组
		CD33 (1/0)	CD169 (1/0)	CD11b (0/1)	
A	CD33 高 CD169 高 CD11b 低	1	1	1	Mr3
B	CD33 高 CD169 高 CD11b 高	1	1	0	Mr2
C	CD33 高 CD169 低 CD11b 低	1	0	1	
D	CD33 低 CD169 高 CD11b 低	0	1	1	
E	CD33 低 CD169 低 CD11b 低	0	0	1	Mr1
F	CD33 高 CD169 低 CD11b 高	1	0	0	
G	CD33 低 CD169 高 CD11b 高	0	1	0	
H	CD33 低 CD169 低 CD11b 高	0	0	0	Mr0

[0065] 3. 双标记物联用方案 (一): 为了简化试剂盒的使用, 分别采取CD33和CD11b双指标, 或CD169和CD11b双指标联合, 可分别将患者分为3组。生存分析表明, 在简化的两种双指标模型中, 各组之间总体生存率的显著差异 (图3, P<0.001)。4. 双标记物联用方案 (二): 为了便于临床应用, 在同上的两组双指标联合模型中, 患者分组方法也可将双指标的比值作为标准进行划分。具体标准如下: 在CD33和CD11b双指标模型中, CD33/CD11b数量的比值小于0.6时, 定为CD33/CD11b^少; 比值大于2.1时, 定为CD33/CD11b^多; 比值介于0.6和2.1之间时

为CD33/CD11b^中。同理,在CD169和CD11b双指标中,CD169/CD11b的数量的比值小于0.25时,定为CD169/CD11b^少;比值大于1.25时,定为CD169/CD11b^多;比值介于0.25和1.25之间时,定为CD169/CD11b^中。生存分析表明,在简化的两种双指标模型中,各组之间总体生存率的显著差异(图4,P<0.001)。

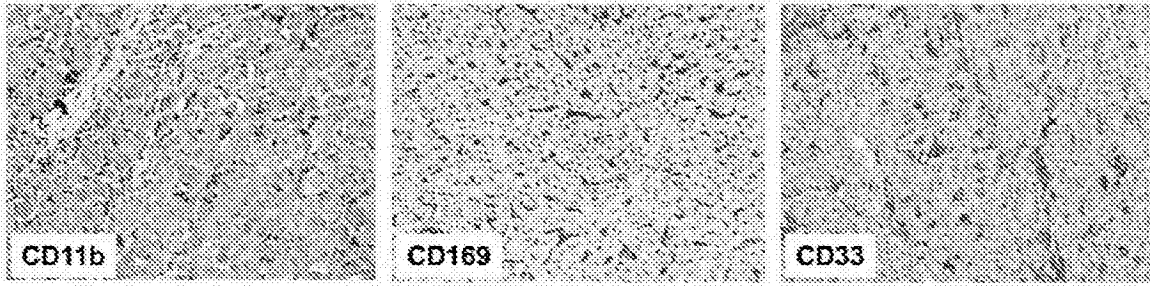


图1

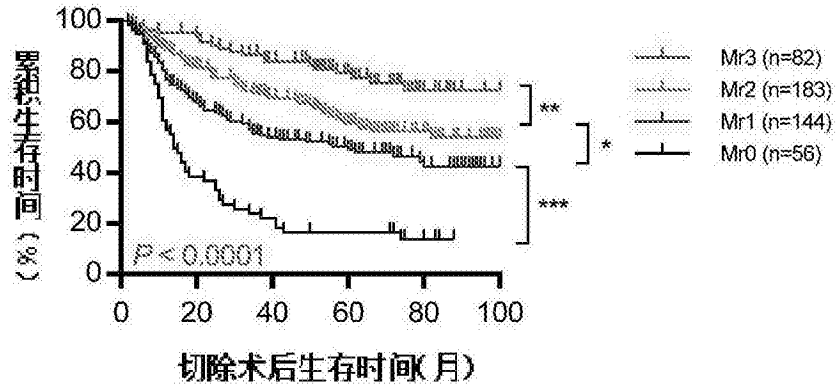


图2

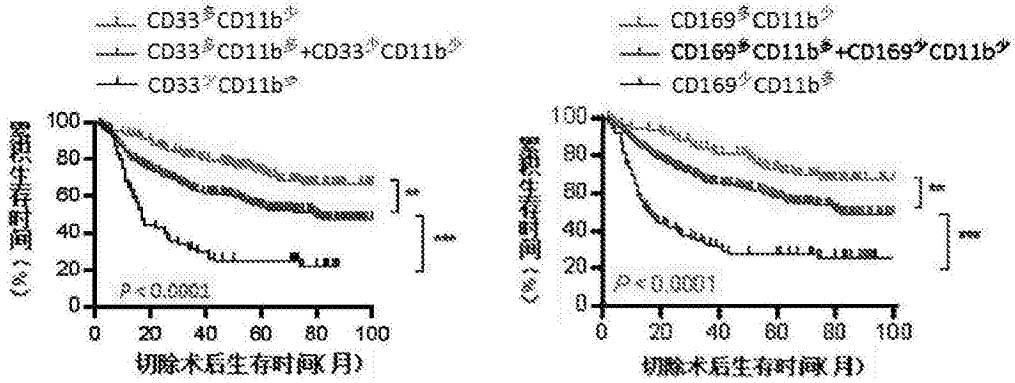


图3

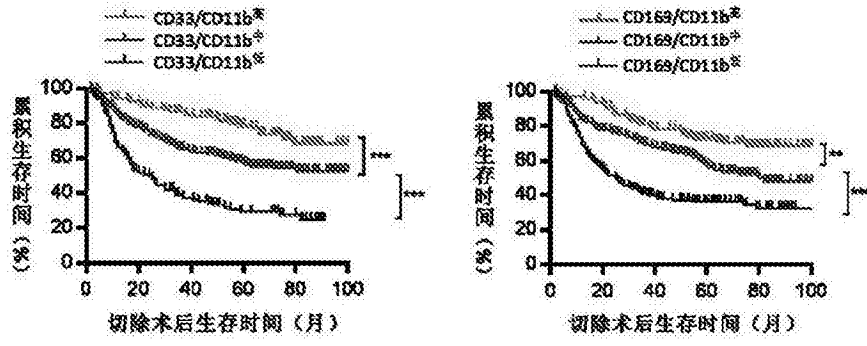


图4

专利名称(译)	用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒		
公开(公告)号	CN107942046A	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN201710632413.5	申请日	2017-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学肿瘤防治中心		
申请(专利权)人(译)	中山大学肿瘤防治中心		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学肿瘤防治中心		
[标]发明人	郑利民 陈敏山 吴翀 林洁 张耀军 周仲国		
发明人	郑利民 陈敏山 吴翀 林洁 张耀军 周仲国		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	刘宇峰		
其他公开文献	CN107942046B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于肝癌切除术后预后的检测试剂盒。本发明所述的用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒，包括第一抗体和第二抗体，所述第一抗体是选自对于以下蛋白分子标记物的抗体的两个或两个以上的组合：CD33(细胞分化抗原33)、CD11b(ITGAM)、CD169(唾液酸黏附素)。本发明所述的用于肝癌切除术后预后的免疫组化检测试剂盒采用双抗体/三抗体结合指标，可以更加精确地预测患者术后的预后情况，从而更好地帮助医生选择合适的治疗人群和方式，并为有效诊治提供更加有力的支持。

变量	总体生存的单因素分析	
	中位生存的月份数 (95% CI)	P 值
CD169(低 vs. 高)	40(36-43) / 52(49-55)	<0.001
CD33(低 vs. 高)	40(36-44) / 50(47-53)	<0.001
CD11b(低 vs. 高)	51(48-54) / 40(36-44)	<0.001