



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110456054 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201910746150.X

(22)申请日 2019.08.13

(71)申请人 臻悦生物科技江苏有限公司

地址 225300 江苏省泰州市医药城口泰路
西侧、陆家路东侧G57幢73号二层东侧

(72)发明人 张恒辉 陈衍辉 王雅婷 罗红丽

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 路秀丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书4页 说明书20页 附图6页

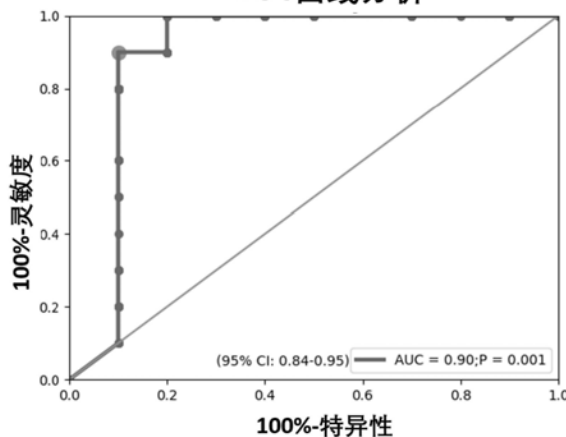
(54)发明名称

胰腺癌检测试剂、试剂盒、装置及应用

(57)摘要

本发明提供了一种胰腺癌检测试剂、试剂盒、装置及应用。该检测试剂包括如下任意两个或两个以上的分子标志物的抗体，其中，CD3、CD4、CD8及CD68属于A组，CD11b、CD14、CD33、CD45RO、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组，至少一个分子标志物选自B组。本申请所提供的上述两种或两种以上的分子标志物的抗体来对胰腺癌进行检测，具有检测灵敏度高，特异性好的优势。因此，适合用于多重免疫组化的方法来检测胰腺癌患者肿瘤微环境是十分具有优势的，进而能够相对准确地预测该患者的是否有较长的生存期，即预后更好。

ROC曲线分析



1. 一种胰腺癌检测试剂,其特征在于,所述检测试剂包括如下任意两个或两个以上的分子标志物的抗体,其中,

CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45R0、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个所述分子标志物选自B组。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂,其特征在于,所述检测试剂包括如下所述分子标志物的抗体的组合中的任意一组或多组:

(1) CD8和PD1; (2) CD68和CD163; (3) CD8和PDL1; (4) CD33和PD1; (5) CD8、CD163和PDL1; (6) CD8、CD68和PD1; (7) CD8、PD1和PDL1; (8) CD3、CD8、FoxP3和PD1及 (8) CD8、PD1、CD68和PDL1;

优选地,所述检测试剂选自任意五个或五个以上的所述分子标志物的抗体的组合;更优选地,所述检测试剂包括如下所述分子标志物的抗体的组合中的任意一个或多个组合:

组合1:CD163、CD68、CD4、CD8、CD3;

组合2:CD163、CD68、PDL1、CD8、PD1、CD57;

组合3:FoxP3、CD45R0、CD4、CD8、CD3、PD1;

组合4:LAG3、CD8、TIM3、PD1、TIGIT、PDL1;

组合5:CD8、CD66b、CD11b、CD14、PD1、CD33;

组合6:panCK、CD8、PDL1、CD3、PD1。

3. 根据权利要求1或2所述的检测试剂,其特征在于,所述分子标志物的抗体记为一抗,所述检测试剂还包括二抗,

优选地,所述二抗选自辣根过氧化物酶、PV-6001、PV-6002或PV-8000。

4. 根据权利要求3所述的检测试剂,其特征在于,所述检测试剂还包括发光试剂,

优选地,所述发光试剂选自带荧光基团的酪胺盐、520-FITC、540-AF517、570-Cy3、620-Cy3.5、650-Cy5或690-Cy5.5。

5. 一种胰腺癌检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1至4中任一项所述的检测试剂。

6. 胰腺癌分子标志物组合在制备检测胰腺癌的试剂盒中的应用,其中,所述胰腺癌分子标志物组合为如下任意两个或两个以上的分子标志物的组合,其中,

CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45R0、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个所述分子标志物选自B组。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述应用包括采用免疫组化的方法进行检测;优选所述免疫组化为多重免疫组化。

8. 根据权利要求6或7所述的应用,其特征在于,所述胰腺癌分子标志物组合包括任意五个或五个以上的所述分子标志物的组合;

优选地,所述胰腺癌分子标志物组合选自如下组合之一:

组合1:CD163、CD68、CD4、CD8、CD3;

组合2:CD163、CD68、PDL1、CD8、PD1、CD57;

组合3:FoxP3、CD45R0、CD4、CD8、CD3、PD1;

组合4:LAG3、CD8、TIM3、PD1、TIGIT、PDL1;

组合5:CD8、CD66b、CD11b、CD14、PD1、CD33;

组合6: panCK、CD8、PDL1、CD3、PD1。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在於,所述分子标志物的组合为CD8和PD1,所述应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率,优选判断所述CD8+PD1-的细胞阳性率是否大于等于第一阈值,更优选所述第一阈值 ≥ 2.5 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD68和CD163,所述应用为统计CD68+CD163-的细胞阳性率,优选判断所述CD68+CD163-的细胞阳性率是否大于等于第二阈值,更优选所述第二阈值 ≥ 0.68 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8和CD163,所述应用为统计CD8+的细胞阳性率及CD163+的细胞阳性率,优选判断CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值是否大于等于第三阈值,更优选所述第三阈值 ≥ 2.41 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8和PDL1,所述应用为统计CD8+的细胞阳性率和PDL1+的细胞阳性率,优选判断所述CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第四阈值,更优选所述第四阈值 ≥ 2.46 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD33和PD1,所述应用为统计CD33+PD1+的细胞阳性率,优选判断所述CD33+PD1+的细胞阳性率的比值是否小于等于第五阈值,更优选所述第五阈值 ≤ 2.07 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、CD163和PDL1,所述应用为统计CD8+的细胞阳性率以及CD163+PDL1+的细胞阳性率,优选判断所述CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第六阈值,更优选所述第六阈值 ≥ 14.51 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、CD163和PD1,所述应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率及CD163+的细胞阳性率,优选判断所述CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值是否大于等于第七阈值,更优选所述第七阈值 ≥ 2.5 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,所述应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率及PDL1+的细胞阳性率,优选判断所述CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第八阈值,更优选所述第八阈值 ≥ 4.3 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,所述应用为统计CD8+PD1+的细胞阳性率及PDL1+的细胞阳性率,优选判断所述CD8+PD1+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否小于等于第九阈值,更优选所述第九阈值 ≤ 3.39 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD3、CD8、FoxP3和PD1,所述应用为统计CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率,优选判断所述CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率是否大于等于第十阈值,更优选所述第十阈值 ≥ 8.75 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、PD1、CD68和PDL1,所述应用为统计CD8+PD1+的细胞阳性率及CD68+PDL1+的细胞阳性率,优选判断所述CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第十一阈值,更优选所述第十一阈值 ≥ 1.85 。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在於,在利用所述分子标志物的组合制备所述试剂盒的过程中,所述应用还包括统计PDL1+的细胞阳性率,优选判断所述PDL1+的细胞阳性率是否小于等于第十二阈值,更优选所述第十二阈值 ≤ 1.88 。

11. 一种胰腺癌检测装置,其特征在於,所述装置内置有胰腺癌分子标志物组合,所述胰腺癌分子标志物组合为如下任意两个或两个以上的分子标志物的组合,其中,CD3、CD4、

CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45RO、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个所述分子标志物选自B组。

12. 根据权利要求11所述的装置,其特征在于,所述装置内置有参照指标,

所述分子标志物的组合为CD8和PD1,所述参照指标为CD8+PD1-的参照细胞数量,优选所述CD8+PD1-的参照细胞数量 ≥ 2.5 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD68和CD163,所述参照指标为CD68+CD163-的参照细胞数量,优选所述CD68+CD163-的参照细胞数量 ≥ 0.68 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8和CD163,所述参照指标为CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的第一参考比值,优选所述第一参考比值 ≥ 2.41 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8和PDL1,所述参照指标为CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第二参考比值,优选所述第二参考比值 ≥ 2.46 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD33和PD1,所述参照指标为CD33+PD1+的细胞阳性率的第三参考比值,优选所述第三参考比值 ≤ 2.07 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、CD163和PDL1,所述参照指标为CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的第四参考比值,优选所述第四参考比值 ≥ 14.51 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、CD163和PD1,所述参照指标为CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的第五参考比值,优选所述第五参考比值 ≥ 2.5 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,所述参照指标为CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第六参考比值,优选所述第六参考比值 ≥ 4.3 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,所述参照指标为CD8+PD1+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第七参考比值,优选所述第七参考比值 ≤ 3.39 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD3、CD8、FoxP3和PD1,所述参照指标为CD3+CD8+FoxP3-PD1-的参照细胞数量,更优选所述CD3+CD8+FoxP3-PD1-的参照细胞阳性率 ≥ 8.75 ;

优选地,所述分子标志物的组合为CD8、PD1、CD68和PDL1,所述参照指标为CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的第八参考比值,优选所述第八参考比值 ≥ 1.85 。

13. 根据权利要求12所述的装置,其特征在于,所述参照指标还包括PDL1+的参照细胞数量,优选所述PDL1+的参照细胞数量 ≤ 1.88 。

14. 根据权利要求12中所述的装置,其特征在于,所述装置还包括:

获取模块,所述获取模块用于获取待测样本免疫组化检测的结果指标,所述结果指标包括如下至少之一:CD8+PD1-的细胞阳性率、CD68+CD163-的细胞阳性率、CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值、CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD33+PD1+的细胞阳性率、CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率及CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的比值;

比较模块,所述比较模块用于比较所述结果指标与所述参照指标。

15. 根据权利要求14所述的装置,其特征在于,所述装置还包括输出模块,用于在所述结果指标与所述参照指标相符时,将所述结果指标输出为第一生存期,否则输出为第二生存期,所述第一生存期的长度 \geq 所述第二生存期。

16. 根据权利要求14所述的装置,其特征在于,所述结果指标还包括PDL1+的细胞阳性率。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的装置,其特征在于,所述装置还包括检测模块,所述检测模块用于通过免疫组化方法利用所述胰腺癌分子标志物组合对所述待测样本进行所述免疫组化检测,得到所述结果指标。

胰腺癌检测试剂、试剂盒、装置及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及多重免疫组化检测领域,具体而言,涉及一种胰腺癌检测试剂、试剂盒、装置及应用。

背景技术

[0002] 现有的免疫组化常用二氨基联苯胺(即3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色,其原理是因为二氨基联苯胺是过氧化物酶的生色底物,在过氧化氢的存在下失去电子而呈现出颜色变化积累,形成棕褐色不溶性产物。DAB主要和蛋白质的NH₂或SH基团结合,形成稳定的N-N键或N-S键,然后DAB中的显色基团就能显示出颜色,标记到已经暴露的蛋白质上,从而显示目标细胞的蛋白质分布及种类等。现有技术在一张切片上一般标记一个分子。

[0003] 多重免疫组化(mIHC,multiple immno)分析:能在一张组织切片上标记多个免疫细胞及免疫检查点分子($n \leq 6$, n 表示分子标记或抗原标记的数量)。

[0004] 第一个分子(抗原)标记:同传统免疫组织化学基本原理,一抗识别抗原,带有辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,HRP)的二抗结合一抗,随后在含有H₂O₂的反应中,带有荧光基团的酪胺盐(Tyramide),在辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,HRP)催化下形成含有共价键结合位点酶促产物,与周围(包括抗原上、一抗上和二抗上)的蛋白残基(包括色氨酸、组氨酸和酪氨酸残基)结合,这样在抗原-抗体结合部位就有大量的Tyramide-荧光基团,抗原越多,Tyramide-荧光基团越多,其检测信号越强。

[0005] 第 n 个分子(抗原)标记:在每个抗原标记循环结束后,使用微波法去除上一轮的一抗,二抗(由于抗原抗体反应是分子表面的非共价键结合,所形成的复合物并不牢固,可以随时解离。微波法对标记在抗原上的酪胺盐荧光信号影响甚小,所以可以在保证上一轮标记信号不丢失的前提下,彻底去除上一轮抗体,而不会对下一轮标记造成干扰。此步骤较易实现)。洗脱去除非特异性标记,进行下一轮标记,从而实现多重免疫组化分析。

[0006] 优势:同一张切片上可以标记多个分子。多个分子标记的过程中,可以用相同种属来源的不同一抗,以顺次单标的方式将带有不同波长荧光基团的酪胺盐共价结合到目标抗原上(对抗原直接进行标记),随后通过微波加热去除抗体(抗体没了但荧光信号仍留在抗原上)。清除上一轮抗体后即可使用新的抗体继续染色,无需担心交叉反应。

[0007] 多重免疫组化标记之后,多光谱成像需特定的分析仪器达到多重免疫组化分析的目的。多光谱成像依赖于光谱数据采集和光谱拆分计算两个过程。光谱数据采集:多光谱数据采集的技术手段有很多种,比如光栅分光、棱镜分光、液晶可调谐滤波器分光等等。运用PerkinElmer公司的Vectra系统(液晶可调滤波器,LCTF)过滤采集特定波段的光谱信号。LCTF由液晶材料组成,通过调整附加的电压改变光线在晶体中的光程,选择性输出特定波长的光信号,实现分光的目的。CCD曝光配合LCTF的连续滤波,就可以准确记录不同波长段的图像信号。

[0008] 光谱拆分:光谱图像的每个像素点信号都是不同染料和样本自发信号的叠加,以每种染料的光谱特征曲线为标准,通过数学方法对光谱图像中叠加的信号进行还原运算,

从而获得单通道图像的过程称为光谱拆分计算。光谱拆分计算是整个光谱成像不可缺少的重要环节,直接影响数据结果的准确性。

[0009] 使用“纯光谱拆分算法”可以拆分多达10色叠加的颜色信号,将光谱图像中隐藏的“纯”染料信号准确的解析出来,得到每种染料在图像中的特异分布。而且可以将“真实的目标信号”从自发荧光背景中抽提出来,得到超高信噪比的图像,让弱表达的荧光信号得以从背景中显现出来。

[0010] 因此,上述光谱采集及拆分方法能够为多重免疫组化分析提供保证。而多重免疫组化分析是病理检测的一种重要手段,以胰腺癌为例,胰腺癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,其具有恶性程度高,诊断治疗困难的特点。其中导管腺癌占比可达到90%以上。根据近年来数据显示,胰腺癌的发病率和死亡率均有上升的趋势。目前治疗胰腺癌的手段主要依靠切除手术或是放化疗。即使经过手术,化疗等综合治疗,其5年的生存率也仅有5%,说明此癌种具有预后差的特点。因此胰腺癌的免疫治疗近年来成为了肿瘤专家们关注的热点。

[0011] 但是与肺癌和黑色素瘤比较,胰腺癌免疫治疗成功的研究结果相对较少。这与胰腺癌组织本身的特殊性具有密不可分的关系。众多研究文献表明,胰腺癌的肿瘤微环境呈现为免疫抑制细胞增多(如Treg,MDSC等)、免疫细胞失活以及低肿瘤突变负荷的现象。相关文献报道指出,胰腺癌患者的肿瘤微环境并不缺失适应性免疫应答,而是由于抗肿瘤的效应细胞和调节分子的相互作用,最终导致了抗肿瘤活性的衰弱。并且研究指出具有较多杀伤性T细胞和效应性T细胞的患者,其预后性更好。

[0012] 因此,通过多重免疫组化方法对胰腺癌患者的肿瘤免疫微环境进行的研究,寻找划分不同胰腺癌患者的生物标志物,有助于对患者的预后进行评估。然而,现有技术中尚无有效的生物标志物来检测胰腺癌的报道。

发明内容

[0013] 本发明的主要目的在于提供一种胰腺癌检测试剂、试剂盒、装置及应用,以解决现有技术中尚无有效的生物标志物来检测胰腺癌的问题。

[0014] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种胰腺癌检测试剂,该检测试剂包括如下任意两个或两个以上的分子标志物的抗体,其中,CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45R0、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个分子标志物选自B组。

[0015] 进一步地,检测试剂包括如下分子标志物的抗体的组合中的任意一组或多组:(1) CD8和PD1;(2) CD68和CD163;(3) CD8和PDL1;(4) CD33和PD1;(5) CD8、CD163和PDL1;(6) CD8、CD68和PD1;(7) CD8、PD1和PDL1;(8) CD3、CD8、FoxP3和PD1;及(8) CD8、PD1、CD68和PDL1;优选地,检测试剂选自任意五个或五个以上的分子标志物的抗体的组合;更优选地,检测试剂包括如下分子标志物的抗体的组合中的任意一个或多个组合:组合1:CD163、CD68、CD4、CD8、CD3;组合2:CD163、CD68、PDL1、CD8、PD1、CD57;组合3:FoxP3、CD45R0、CD4、CD8、CD3、PD1;组合4:LAG3、CD8、TIM3、PD1、TIGIT、PDL1;组合5:CD8、CD66b、CD11b、CD14、PD1、CD33;组合6:panCK、CD8、PDL1、CD3、PD1。

[0016] 进一步地,分子标志物的抗体记为一抗,检测试剂还包括二抗,优选地,二抗选自辣根过氧化物酶、PV-6001、PV-6002或PV-8000。

[0017] 进一步地,检测试剂还包括发光试剂,优选地,发光试剂选自带荧光基团的酪胺盐、520-FITC、540-AF517、570-Cy3、620-Cy3.5、650-Cy5或690-Cy5.5。

[0018] 为了实现上述目的,根据本发明的第二个方面,提供了一种胰腺癌检测试剂盒,试剂盒包括上述任一种检测试剂。

[0019] 为了实现上述目的,根据本发明的第三个方面,提供了胰腺癌分子标志物组合在制备检测胰腺癌的试剂盒中的应用,其中,胰腺癌分子标志物组合为如下任意两个或两个以上的分子标志物的组合,其中,CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45R0、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个分子标志物选自B组。

[0020] 进一步地,应用包括采用免疫组化的方法进行检测;优选免疫组化为多重免疫组化。

[0021] 进一步地,胰腺癌分子标志物组合包括任意五个或五个以上的分子标志物的组合;优选地,胰腺癌分子标志物组合选自如下组合之一:组合1:CD163、CD68、CD4、CD8、CD3;组合2:CD163、CD68、PDL1、CD8、PD1、CD57;组合3:FoxP3、CD45R0、CD4、CD8、CD3、PD1;组合4:LAG3、CD8、TIM3、PD1、TIGIT、PDL1;组合5:CD8、CD66b、CD11b、CD14、PD1、CD33;组合6:panCK、CD8、PDL1、CD3、PD1。

[0022] 进一步地,分子标志物的组合为CD8和PD1,应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1-的细胞阳性率是否大于等于第一阈值,更优选第一阈值 ≥ 2.5 ;优选地,分子标志物的组合为CD68和CD163,应用为统计CD68+CD163-的细胞阳性率,优选判断CD68+CD163-的细胞阳性率是否大于等于第二阈值,更优选第二阈值 ≥ 0.68 ;优选地,分子标志物的组合为CD8和CD163,应用为统计CD8+的细胞阳性率及CD163+的细胞阳性率,优选判断CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值是否大于等于第三阈值,更优选第三阈值 ≥ 2.41 ;优选地,分子标志物的组合为CD8和PDL1,应用为统计CD8+的细胞阳性率和PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第四阈值,更优选第四阈值 ≥ 2.46 ;优选地,分子标志物的组合为CD33和PD1,应用为统计CD33+PD1+的细胞阳性率,优选判断CD33+PD1+的细胞阳性率是否小于等于第五阈值,更优选第五阈值 ≤ 2.07 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、CD163和PDL1,应用为统计CD8+的细胞阳性率以及CD163+PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第六阈值,更优选第六阈值 ≥ 14.51 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、CD163和PD1,应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率及CD163+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值是否大于等于第七阈值,更优选第七阈值 ≥ 2.5 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率及PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第八阈值,更优选第八阈值 ≥ 4.3 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,应用为统计CD8+PD1+的细胞阳性率及PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否小于等于第九阈值,更优选第九阈值 ≤ 3.39 ;优选地,分子标志物的组合为CD3、CD8、FoxP3和PD1,应用为统计CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率,优选判断CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率是否大于等于第十阈值,更优选第十阈值 ≥ 8.75 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、PD1、CD68和PDL1,应用为统计CD8+PD1+的细胞阳性

率及CD68+PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第十一阈值,更优选第十一阈值 ≥ 1.85 。

[0023] 进一步地,在利用分子标志物的组合制备试剂盒的过程中,应用还包括统计PDL1+的细胞阳性率,优选判断PDL1+的细胞阳性率是否小于等于第十二阈值,更优选第十二阈值 ≤ 1.88 。

[0024] 为了实现上述目的,根据本发明的第四个方面,提供了一种胰腺癌检测装置,该装置内置有胰腺癌分子标志物组合,胰腺癌分子标志物组合为如下任意两个或两个以上的分子标志物的组合,其中,CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45R0、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个分子标志物选自B组。

[0025] 进一步地,装置内置有参照指标,分子标志物的组合为CD8和PD1,参照指标为CD8+PD1-的参照1,优选CD8+PD1-的参照细胞数量 ≥ 2.5 ;优选地,分子标志物的组合为CD68和CD163,参照指标为CD68+CD163-的参照细胞数量,优选CD68+CD163-的参照细胞数量 ≥ 0.68 ;优选地,分子标志物的组合为CD8和CD163,参照指标为CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的第一参考比值,优选第一参考比值 ≥ 2.41 ;优选地,分子标志物的组合为CD8和PDL1,参照指标为CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第二参考比值,优选第二参考比值 ≥ 2.46 ;优选地,分子标志物的组合为CD33和PD1,参照指标为CD33+PD1+的细胞阳性率的第三参考比值,优选第三参考比值 ≤ 2.07 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、CD163和PDL1,参照指标为CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的第四参考比值,优选第四参考比值 ≥ 14.51 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、CD163和PD1,参照指标为CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的第五参考比值,优选第五参考比值 ≥ 2.5 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,参照指标为CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第六参考比值,优选第六参考比值 ≥ 4.3 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,参照指标为CD8+PD+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第七参考比值,优选第七参考比值 ≤ 3.39 ;优选地,分子标志物的组合为CD3、CD8、FoxP3和PD1,参照指标为CD3+CD8+FoxP3-PD1-的参照细胞数量,更优选CD3+CD8+FoxP3-PD1-的参照细胞阳性率 ≥ 8.75 ;优选地,分子标志物的组合为CD8、PD1、CD68和PDL1,参照指标为CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的第八参考比值,优选第八参考比值 ≥ 1.85 。

[0026] 进一步地,参照指标还包括PDL1+的参照细胞数量,优选PDL1+的参照细胞数量 ≤ 1.88 。

[0027] 进一步地,装置还包括:获取模块和比较模块,获取模块用于获取待测样本免疫组化检测的结果指标,结果指标包括如下至少之一:CD8+PD1-的细胞阳性率、CD68+CD163-的细胞阳性率、CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值、CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD33+PD1+的细胞阳性率的比值、CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率及CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的比值;比较模块用于比较结果指标与参照指标。

[0028] 进一步地,装置还包括输出模块,用于在结果指标与参照指标相符时,将结果指标

输出为第一生存期,否则输出为第二生存期,第一生存期的长度 \geq 第二生存期。

[0029] 进一步地,结果指标还包括PDL1+的细胞阳性率。

[0030] 进一步地,装置还包括检测模块,检测模块用于通过免疫组化方法利用胰腺癌分子标志物组合对待测样本进行免疫组化检测,得到结果指标。

[0031] 应用本发明的技术方案,本申请所提供的上述两种或两种以上的分子标志物的抗体来对胰腺癌进行检测,具有检测灵敏度高,特异性好的优势。因此,适合用于多重免疫组化的方法来检测胰腺癌,而多重免疫组化法同时标记上述多个免疫细胞标志物、肿瘤细胞标志物及免疫检查点分子来检测胰腺患者肿瘤微环境是十分具有优势的,进而能够相对准确地预测该患者的是否有较长的生存期,即预后更好。

附图说明

[0032] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0033] 图1a至图1e示出了根据本发明的优选实施例中采用panel 1至panel 5的生物标志物组合对样本进行免疫组化检测结果图,其中,图1a示出的是panel 1免疫组化的检测结果,图1b显示的是panel 2免疫组化的检测结果,图1c示出的是panel 3免疫组化的检测结果,图1d示出的是panel 4免疫组化的检测结果,图1e示出的是panel 5免疫组化的检测结果;图1f示出的是panel 6免疫组化的检测结果;

[0034] 图2示出了是实施例中不同生物标志物重要性显示的重要因子森林图。

[0035] 图3所示的是实施例中不同生物标志物在不同疗效的两组中的ROC曲线;

[0036] 图4示出的是panel 1的多重免疫组化的结果;以及

[0037] 图5a至图5e示出的是现有技术中对单一标记分子进行免疫组化检测的结果,其中,图5a显示的是CD3免疫组化的检测结果,图5b显示的是CD4免疫组化的检测结果,图5c显示的是CD8免疫组化的检测结果,图5d显示的是CD68免疫组化的检测结果,图5e显示的是CD163免疫组化的检测结果。

具体实施方式

[0038] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0039] Treg:调节性T细胞,Regulatory cells,简称Tregs。是一类控制体内自身免疫反应性的T细胞亚群。可以分为天然产生的自然调节性T细胞(n T-regs)和诱导产生的适应性调节性T细胞(i T-regs)。调节性T细胞与类风湿性关节炎、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性肝病及多种肾脏疾病等多种自身免疫性疾病有关。

[0040] MDSC:骨髓来源的抑制性细胞,是骨髓来源的一群异质性细胞,是树突状细胞、巨噬细胞和粒细胞的前体,具有显著抑制免疫细胞应答的能力。

[0041] 如背景技术部分所提到的,现有技术中尚无采用多重免疫组化方法有效检测胰腺癌的方案,为改善这一现状,发明人对现有的胰腺癌的免疫细胞及免疫检查点分子进行了研究和筛选,发现以下18个检测分子能够有效地标识胰腺癌。具体的免疫细胞及免疫检查点分子包括:CD3(T细胞标志物)、CD8(CTL细胞标志物)、CD4(T细胞标志物,如Th,Treg等)、

CD68 (巨噬细胞标志物)、CD163 (M2型巨噬细胞标志物)、CD33 (髓型抑制性细胞标志物)、CD57 (自然杀伤细胞标志物)、FoxP3 (主要为Treg细胞标志物)、CD66B (中性粒细胞标志物)、CD11B (单核细胞标志物)、CD14 (单核细胞标志物)、CD45RO (记忆性T细胞标志物)、PDL1 (免疫检查点分子)、PD1 (免疫检查点分子)、LAG3 (免疫检查点分子)、TIM3 (免疫检查点分子)、TIGIT (免疫检查点分子)、panCK (细胞光谱角蛋白) 共18个检测分子。

[0042] 进一步地,发明人对这18个检测分子对胰腺癌的标记效果进行了优化组合,发现按照如下方式组合形成的panel (组合) 进行多重免疫组化检测时,效果更优。

[0043] 优选的panel组合如下:

[0044] Panel1:CD3、CD4、CD8、CD68及CD163;

[0045] Panel2:CD8、CD57、CD68、CD163、PD1及PDL1;

[0046] Panel3:CD3、CD4、CD8、CD45RO、FOXP3及PD1;

[0047] Panel4:CD8、PD1、LAG3、TIM3、TIGIT及PDL1;

[0048] Panel5:CD11B、CD14、CD33、CD8、CD66B及PD1;

[0049] Panel6:CD3、CD8、PD1、PDL1及panCK。

[0050] 在上述研究结果的基础上,申请人提出了本申请的技术方案。在本申请一种典型的实施方式中,提供了一种胰腺癌检测试剂,该检测试剂包括如下任意两个或两个以上的分子标志物的抗体,其中,CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45RO、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个分子标志物选自B组。

[0051] 本申请所提供的上述两种或两种以上的分子标志物的抗体来对胰腺癌进行检测,具有检测灵敏度高,特异性好的优势。因此,适合用于多重免疫组化的方法来检测胰腺癌,而多重免疫组化法同时标记上述多个免疫细胞标志物、肿瘤细胞标志物及免疫检查点分子来检测胰腺患者肿瘤微环境是十分具有优势的,进而能够相对准确地预测该患者的是否有较长的生存期,即预后更好。

[0052] 在检测时,可以根据实际需要选择合适的分子标志物进行组合使用。优选地,按照区分不同细胞亚群,并对应有相关免疫检查点的原则来进行组合。

[0053] 在一种优选的实施例中,上述检测试剂包括如下分子标志物的抗体的组合中的任意一组或多组:(1) CD8和PD1;(2) CD68和CD163;(3) CD8和PDL1;(4) CD33和PD1;(5) CD8、CD163和PDL1;(6) CD8、CD68和PD1;(7) CD8、PD1和PDL1;(8) CD3、CD8、FoxP3和PD1;及(8) CD8、PD1、CD68和PDL1。

[0054] 在一种优选的实施例中,上述检测试剂包括任意五个或五个以上的分子标志物的抗体的组合;优选地,检测试剂选自如下分子标志物组合之一中的分子标志物的抗体的组合:组合1:CD163、CD68、CD4、CD8、CD3;组合2:CD163、CD68、PDL1、CD8、PD1、CD57;组合3:FoxP3、CD45RO、CD4、CD8、CD3、PD1;组合4:LAG3、CD8、TIM3、PD1、TIGIT、PDL1;组合5:CD8、CD66b、CD11b、CD14、PD1、CD33;组合6:panCK、CD8、PDL1、CD3、PD1。

[0055] 采用上述6种组合中的任意一种组合的分子标志物的抗体进行检测时,对胰腺癌的检测灵敏度和特异性更高。

[0056] 本申请所提供的分子标志物的抗体对胰腺癌进行检测时,通常作为识别分子标志物的一抗,为了进行标记和检测,通常采用带有可检测标记的二抗特异性地识别二抗,从而

起到检测分子标志物的目的。因此,在一种优选的实施例中,分子标志物的抗体记为一抗,检测试剂还包括二抗,优选地,二抗选自辣根过氧化物酶、PV-6001、PV-6002或PV-8000。

[0057] 根据所使用的二抗的种类的不同,在上述检测试剂中还可以同时包含与上述二抗配合使用的发光试剂。在一种优选的实施例中,检测试剂还包括发光试剂,优选地,发光试剂选自带荧光基团的酪胺盐、520-FITC、540-AF517、570-Cy3、620-Cy3.5、650-Cy5或690-Cy5。

[0058] 在本申请第二种典型的实施方式中,提供了一种胰腺癌检测试剂盒,试剂盒包括上述任一种检测试剂。采用本申请上述检测试剂的试剂盒,对胰腺癌的检测具有灵敏度高和特异性好的优势。

[0059] 本申请所发现的用于标志胰腺癌的分子标志物可以用于任何能够检测胰腺癌的相关试剂或产品的制备中。在本申请第三种典型的实施方式中,提供了胰腺癌分子标志物组合在制备检测胰腺癌的试剂盒中的应用,其中,胰腺癌分子标志物组合为如下任意两个或两个以上的分子标志物的组合,其中,CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45R0、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个分子标志物选自B组。

[0060] 在一种优选的实施例中,胰腺癌分子标志物组合包括任意四个或四个以上的分子标志物的组合;优选地,胰腺癌分子标志物组合选自如下组合之一:组合1:CD163、CD68、CD4、CD8、CD3;组合2:CD163、CD68、PDL1、CD8、PD1、CD57;组合3:FoxP3、CD45R0、CD4、CD8、CD3、PD1;组合4:LAG3、CD8、TIM3、PD1、TIGIT、PDL1;组合5:CD8、CD66b、CD11b、CD14、PD1、CD33;组合6:panCK、CD8、PDL1、CD3、PD1。

[0061] 采用上述组合的分子标志物制备成检测胰腺癌的试剂盒时,该试剂盒中可以包含上述一种组合,或者两种组合,或者更多组合,比如全部的六种组合。当试剂盒中含有多种组合时,该试剂盒提供了检测胰腺癌的多种选择,为合理使用提供了灵活度和便利性。而且,这六种组合在检测胰腺癌方面的灵敏度更好,特异性更好。

[0062] 具有采用上述分子标志物对胰腺癌进行检测的方法并物特殊限定,任何能够利用这些分子标志物对胰腺癌进行检测的方法都可以应用在该试剂盒的制备过程中。在一种优选的实施例中,该应用包括采用免疫组化的方法进行检测,此时该试剂盒中还可以包括与免疫组化检测方法相关的其他试剂,比如这些分子标志物的抗体、抗这些抗体的二抗及发光试剂等。

[0063] 在一种优选的实施例中,上述免疫组化为多重免疫组化,将本申请的上述多个分子标志物的组合通过多重免疫组化的方式对乳腺癌进行检测,一方面能充分发挥多重免疫组化检测的优势,另一方面又能充分利用上述各分子标志物的高灵敏度和高特异性的优势,因而,对胰腺癌的检测结果也更准确。

[0064] 本申请通过利用上述生物标志物,对胰腺癌患者生存期短和生存期长的两个组别的肿瘤组织进行多重免疫组化检测发现,不同标志物组合显示的细胞阳性率或者不同标志物组合的细胞率的比值在不同组别中具有显著性差异。因此,这些不同标志物组合显示的细胞阳性率或者不同标志物组合的细胞率的比值同样具有检测胰腺癌的用途。

[0065] 因此,在一种优选的实施例中,上述分子标志物的组合为CD8和PD1,上述应用为统计CD8+PD-的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1-的细胞阳性率是否大于等于第一阈值,更优选

第一阈值 ≥ 2.5 。

[0066] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD68和CD163,应用为统计CD68+CD163-的细胞阳性率,优选判断CD68+CD163-的细胞阳性率是否大于等于第二阈值,更优选第二阈值 ≥ 0.68 。

[0067] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8和CD163,应用为统计CD8+的细胞阳性率及CD163+的细胞阳性率,优选判断CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值是否大于等于第三阈值,更优选第三阈值 ≥ 2.41 。

[0068] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8和PDL1,应用为统计CD8+的细胞阳性率和PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第四阈值,更优选第四阈值 ≥ 2.46 。

[0069] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD33和PD1,应用为统计CD33+PD1+的细胞阳性率,优选判断CD33+PD1+的细胞阳性率小于等于第五阈值,更优选第五阈值 ≤ 2.07 。

[0070] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、CD163和PDL1,应用为统计CD8+的细胞阳性率以及CD163+PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第六阈值,更优选第六阈值 ≥ 14.51 。

[0071] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、CD163和PD1,应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率及CD163+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值是否大于等于第七阈值,更优选第七阈值 ≥ 2.5 。

[0072] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,应用为统计CD8+PD1-的细胞阳性率及PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第八阈值,更优选第八阈值 ≥ 4.3 。

[0073] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,应用为统计CD8+PD1+的细胞阳性率及PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值是否小于等于第九阈值,更优选第九阈值 ≤ 3.39 。

[0074] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD3、CD8、FoxP3和PD1,应用为统计CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率,优选判断CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率是否大于等于第十阈值,更优选第十阈值 ≥ 8.75 。

[0075] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、PD1、CD68和PDL1,应用为统计CD8+PD1+的细胞阳性率及CD68+PDL1+的细胞阳性率,优选判断CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的比值是否大于等于第十一阈值,更优选第十一阈值 ≥ 1.85 。

[0076] 在一种优选的实施例中,在利用分子标志物的组合制备试剂盒的过程中,应用还包括统计PDL1+的细胞阳性率,优选判断PDL1+的细胞阳性率是否大于第十二阈值,更优选第十二阈值 ≥ 1.88 。

[0077] 在上述各优选实施例可以分为两组,一组是其细胞的阳性率或细胞的阳性率的比值高于对应阈值时,预测待测个体的生存期更长,预后可能更好。而另一组是其相应的指标低于对应的阈值时,其生存期更长,预后可能更好。而且,根据实际样本所检测的指标数量,指标数量越多,综合评价其生存期及预后效果相对越准确。

[0078] 在本申请第四种典型的实施方式中,提供了一种胰腺癌检测装置,该装置内置有

胰腺癌分子标志物组合,胰腺癌分子标志物组合为如下任意两个或两个以上的分子标志物的组合,其中,CD3、CD4、CD8及CD68属于A组,CD11b、CD14、CD33、CD45RO、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组,至少一个分子标志物选自B组。

[0079] 本申请所提供的装置通过利用上述两种或两种以上的分子标志物来对胰腺癌进行检测,具有检测灵敏度高,特异性好的优势。利用上述多个免疫细胞的标志物、肿瘤细胞标志物及免疫检查点分子来检测胰腺患者肿瘤微环境是十分具有优势的,进而能够相对准确地预测该患者的是否有较长的生存期,即预后更好。

[0080] 在一种优选的实施例中,装置内置有参照指标,分子标志物的组合为CD8和PD1,参照指标为CD8+PD1-的参照细胞数量,优选CD8+PD1-的参照细胞数量 ≥ 2.5 。

[0081] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD68和CD163,参照指标为CD68+CD163-的参照细胞数量,优选CD68+CD163-的参照细胞数量 ≥ 0.68 。

[0082] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8和CD163,参照指标为CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的第一参考比值,优选第一参考比值 ≥ 2.41 。

[0083] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8和PDL1,参照指标为CD8+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第二参考比值,优选第二参考比值 ≥ 2.46 。

[0084] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD33和PD1,参照指标为CD33+PD1+的细胞阳性率的第三参考比值,优选第三参考比值 ≤ 2.07 。

[0085] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、CD163和PDL1,参照指标为CD8+的细胞阳性率/CD163+PDL1+的细胞阳性率的第四参考比值,优选第四参考比值 ≥ 14.51 。

[0086] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、CD163和PD1,参照指标为CD8+PD-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的第五参考比值,优选第五参考比值 ≥ 2.5 。

[0087] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,参照指标为CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第六参考比值,优选第六参考比值 ≥ 4.3 。

[0088] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、PD1和PDL1,参照指标为CD8+PD1+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的第七参考比值,优选第七参考比值 ≤ 3.39 。

[0089] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD3、CD8、FoxP3和PD1,参照指标为CD3+CD8+FoxP3-PD1-的参照细胞数量,更优选CD3+CD8+FoxP3-PD1-的参照细胞数量 ≥ 8.75 。

[0090] 在一种优选的实施例中,分子标志物的组合为CD8、PD1、CD68和PDL1,参照指标为CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的第八参考比值,优选第八参考比值 ≥ 1.85 。

[0091] 在一种优选的实施例中,参照指标还包括PDL1+的参照细胞数量,优选PDL1+的参照细胞数量 ≤ 1.88 。

[0092] 上述各优选实施例中,通过在检测装置内置各种生物标志物组合的参照指标,便于对待测样本的相应指标进行比较和判断,从而相对准确地预测待测样本的生存期及预后状况。

[0093] 在一种优选的实施例中,装置还包括:获取模块及比较模块,获取模块用于获取待测样本免疫组化检测的结果指标,结果指标包括如下至少之一:CD8+PD1-的细胞阳性率、CD68+CD163-的细胞阳性率、CD8+的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值、CD8+的细胞

阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD33+PD1+的细胞阳性率、CD8+的细胞阳性率/CD163+PD1+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1-的细胞阳性率/CD163+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1-的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD8+PD1+的细胞阳性率/PDL1+的细胞阳性率的比值、CD3+CD8+FoxP3-PD1-的细胞阳性率及CD8+PD1+的细胞阳性率/CD68+PDL1+的细胞阳性率的比值；比较模块用于比较结果指标与参照指标。

[0094] 上述优选的实施例，通过同时还包括获取模块和比较模块，使得该装置本身能够获取待测样本的相关结果指标，并通过比较模块与参照指标进行比较，进而能够直接显示比较结果，便于检测装置使用者直接获得比较结果。

[0095] 在一种优选的实施例中，装置还包括输出模块，用于在结果指标与参照指标相符时，将结果指标输出为第一生存期，否则输出为第二生存期，第一生存期的长度 \geq 第二生存期。优选地，第一生存期指生存12个月及以上，第二生存期是短于12个月。

[0096] 上述结果指标与参照指标相符是指结果指标的数值落入参照指标的范围内。比如，CD8+PD1-的细胞阳性率的结果指标为3.1，而参照指标是 ≥ 2.5 ，则该结果指标与参照指标相符。

[0097] 该优选实施例对比较结果进一步进行了归类，根据比较结果的差异，将待测样本分成了具有不同生存期的两种类别。

[0098] 在一种优选的实施例中，结果指标还包括PDL1+的细胞阳性率。该指标可以在前述一个或多个结果指标的基础上，进一步提供参考依据，进而使得结果相对更准确。

[0099] 在一种优选的实施例中，装置还包括检测模块，检测模块用于通过免疫组化方法利用胰腺癌分子标志物组合对待测样本进行免疫组化检测，得到结果指标。

[0100] 下面将结合具体的实施例来进一步说明本申请的有益效果。

[0101] 实施例1

[0102] 选取20例胰腺癌患者的肿瘤组织：生存较短（样本编号1-10）和生存较好（样本编号11-20月）的病例各10例（总体生存期（Overall Survival, OS），具体生存期见表1。

[0103] 表1. 20例肺癌患者生存期

[0104]

样本编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OS/月	5	6	8	8	8	10	10	11	12	12
样本编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OS/月	20	21	22	22	22	24	26	26	35	51

[0105] 对上述20例病例的肿瘤组织石蜡切片进行进行免疫细胞及免疫检查点分子检测的多重免疫组化分析。每例患者6张切片，共6个染色panel，共标记18个分子。18个染色分子及6个panel中各分子染色顺序为：

[0106] Panel1:CD163,CD68,CD4,CD8,CD3;

[0107] Panel2:CD163,CD68,PDL1,CD8,PD1,CD57;

[0108] Panel3:FoxP3,CD45RO,CD4,CD8,CD3,PD1;

[0109] Panel4:LAG3,CD8,TIM3,PD1,TIGIT,PDL1;

[0110] Panel5:CD8,CD66b,CD11b,CD14,PD1,CD33;

[0111] Panel6:panCK,CD8,PDL1,CD3,PD1。

- [0112] 具体操作步骤如下：
- [0113] 1. 将20例石蜡切片放置在60℃恒温箱中烘烤120分钟；
- [0114] 2. 脱蜡和水化：二甲苯(10min) → 二甲苯(10min) → 无水乙醇(5min×2次) → 95%乙醇(5min×2) → 90%(5min) → 85%乙醇(5min) → 80%乙醇(5min) → 75%乙醇(5min)；
- [0115] 3. 蒸馏水冲洗2次5min；
- [0116] 4. 抗原修复：用Opal™ 7-色荧光染色试剂盒内抗原修复液微波修复，预热5min，高火2min，中低火15min；
- [0117] 5. 室温自然冷却；
- [0118] 6. 洗涤：TBST缓冲溶液洗3次，5min/次；
- [0119] 7. 封闭：用封闭液，室温封闭10min；
- [0120] 8. 一抗孵育：滴加一抗（一抗工作液100~300ul），
- [0121] Panel1染色顺序为：CD163, CD68, CD4, CD8, CD3, 其中CD4为4℃过夜孵育，其余为37℃孵育；
- [0122] Panel2的染色顺序为：CD163, CD68, PDL1, CD8, PD1, CD57, 其中CD163和CD8为4℃过夜孵育，其余为37℃孵育1Hr；
- [0123] Panel3染色顺序为：FoxP3, CD45RO, CD4, CD8, CD3, PD1, 其中CD4和PD1为4℃过夜孵育，其余为37℃孵育1Hr；
- [0124] Panel4染色顺序为：LAG3, CD8, TIM3, PD1, TIGIT, PDL1, 其中TIM3和PDL1为4℃过夜孵育，其余为37℃孵育1Hr；
- [0125] Panel5染色顺序为：CD8, CD66b, CD11b, CD14, PD1, CD33, 其中CD11b和CD33为4℃过夜孵育，其余为37℃孵育1Hr；
- [0126] Panel6: panCK, CD8, PDL1, CD3, PD1, 其中PDL1为4℃过夜孵育，其余为37℃孵育；
- [0127] 9. 洗涤：TBST缓冲溶液洗3次，5min/次；
- [0128] 10. 二抗孵育：滴加试剂盒内二抗，37℃孵育10min；每个Panel二抗使用信息详见表格2。
- [0129] 11. 洗涤：TBST缓冲溶液洗3次，5min/次；
- [0130] 12. 荧光显色：滴加TSA稀释后的Opal荧光染色，室温10min；
- [0131] 13. 洗涤：TBST缓冲溶液洗3次，5min/次；
- [0132] 14. 抗体依次染色：第一个抗体染色结束，后续每个抗体均需重复步骤4) 到步骤13)，依次标记所有抗体；抗体染色顺序为详见步骤8，；
- [0133] 15. 微波处理：重复步骤4) 到步骤6)；
- [0134] 16. DAPI染色，室温5~10min；
- [0135] 17. 洗涤：TBST洗3次，5min/次；
- [0136] 18. 封固：防淬灭剂封片；
- [0137] 19. 连续光谱成像，图像处理 and 观察分析。
- [0138] 表2. 6个Panel一抗、二抗及荧光染料信息

[0139]

抗体名称 Panel1	CD163	CD68	CD4	CD8	CD3	
货号	ZM0428	ZM0060	ZM0418	ZA0508	ZM0417	
一抗种属	鼠	鼠	鼠	兔	鼠	
一抗稀释倍数	200	500	100	100	50	
一抗孵育	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜	37°C 1Hr	37°C 1Hr	
二抗名称	PV-6002	PV-6002	PV-6002	PV-8000	PV-6002	
染料发射波长	520	650	570	620	690	
抗体名称 Panel2	CD163	CD68	PDL1	CD8	PD1	CD57
货号	ZM0428	ZM0060	CST13684	ZA0508	ZM0381	ZM-0058
一抗种属	鼠	鼠	兔	兔	鼠	鼠
一抗稀释倍数	200	500	100	100	50	100
一抗孵育	4°C 过夜	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜	37°C 1Hr	37°C 1Hr
二抗名称	PV-6002	PV-6002	PV-6001	PV-8000	PV-8000	PV-6002
染料发射波长	520	650	570	540	690	620
抗体名称 Panel3	FoxP3	CD45RO	CD4	CD8	CD3	PD1
货号	ab20034	ZM0055	ZM0418	ZA0508	ZM-0417	ZM0381
一抗种属	鼠	鼠	鼠	兔	鼠	鼠
一抗稀释倍数	200	200	100	100	50	50
一抗孵育	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜
二抗名称	PV-6002	PV-6002	PV-6002	PV-6001	PV-6002	PV-8000
染料发射波长	650	620	570	520	690	540
抗体名称 Panel4	LAG3	CD8	TIM3	PD1	TIGIT	PDL1
货号	ab40466	ZA0508	CST45208S	ZM0381	ab243903	CST13684
一抗种属	鼠	兔	兔	鼠	兔	兔
一抗稀释倍数	50	100	100	50	50	100
一抗孵育	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜
二抗名称	PV-6002	PV-8000	PV-6001	PV-8000	PV-6001	PV-6001
染料发射波长	620	520	650	690	540	570
抗体名称 Panel5	CD8	CD66b	CD11b	CD14	PD1	CD33
货号	ZA0508	ab214175	ab133357	ZA0532	ZM0381	ab199432
一抗种属	兔	兔	兔	兔	鼠	兔
一抗稀释倍数	100	100	1000	100	50	400
一抗孵育	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜	37°C 1Hr	37°C 1Hr	4°C 过夜
二抗名称	PV-8000	PV-6001	PV-6001	PV-6001	PV-8000	PV-6001

[0140]

染料发射波长	520	620	570	540	650	690
抗体名称 Panel6	panCk	CD8	PDL1	CD3	PD1	
货号	ZM0069	ZA0508	CST13684	ZM0417	ZM0381	
一抗种属	鼠	兔	兔	鼠	鼠	
一抗稀释倍数	100	100	100	50	50	
一抗孵育	37℃ 1Hr	37℃ 1Hr	4℃ 过夜	37℃ 1Hr	37℃ 1Hr	
二抗名称	PV-6002	PV-6001	PV-6001	PV-6002	PV-800	
染料发射波长	520	650	570	690	620	

[0141] 根据以上操作步骤,完成对20例胰腺癌肿瘤组织切片的免疫细胞标志物及免疫检查点分子的多重标记。运用PerkinElmer公司的Vectra系统进行连续光谱采集,并做图像处理 and 观察分析。其中,在光谱采集的过程中,对各panel中不同标志物分子的标记颜色分别按表3所示选择不同的伪色进行信号采集。最终的检测结果见图1a至图1f。

[0142] 表3. 6-Panel对应伪色选择

[0143]

标志物panel1	CD163	CD68	CD4	CD8	CD3	/
颜色	绿色	青色	橙色	红色	洋红色	/
标志物panel2	CD163	CD68	PDL1	CD8	PD1	CD57
颜色	绿色	青色	橙色	黄色	洋红色	红色
标志物panel3	FoxP3	CD45RO	CD4	CD8	CD3	PD1
颜色	青色	红色	橙色	绿色	洋红色	黄色
标志物panel4	LAG3	CD8	TIM3	PD1	TIGIT	PDL1
颜色	红色	绿色	青色	洋红色	黄色	橙色
标志物panel5	CD8	CD66b	CD11b	CD14	PD1	CD33
颜色	绿色	红色	黄色	橙色	青色	洋红色
标志物panel6	panCK	CD8	PDL1	CD3	PD1	/
颜色	绿色	青色	橙色	洋红色	红色	/

[0144] 对肿瘤区域的各标志物分子进行统计分析,20例患者的免疫细胞标志物及免疫检查点分子的阳性百分比统计结果如下表4所示:

[0145] 表4. 肿瘤区域中各分子的阳性表达百分比统计结果(%)

[0146]

组别	CD8+	CD8+PD1-	CD8+PD1+	CD8+PDL1+
生存 期<12 个月	5.32	4.31	1.01	0.09
	4.87	2.07	0	0.087
	3.89	1.76	2.13	0.056
	1.76	1.75	0.01	0
	8.23	3.09	0	0.034

[0147]

	1.65	1.56	0.09	0.019
	2.74	1.62	1.12	0.07
	10.05	9.89	0.16	0
	3.02	2.04	0	0.023
	2.01	1.56	0.45	0.79
生存 期≥12 个月	10.03	9.96	0.07	0
	4.79	1.09	3.7	0.082
	2.98	2.07	0.91	0.095
	8.72	8.65	0.07	0.082
	6.15	3.1	0	0.092
	4.39	4.27	1.02	0
	3.67	2.56	0	0.027
	12.63	8.98	3.65	0.01
	7.53	7.09	0.44	0.056
	9.05	8.56	0	0
组别	CD57+	CD57+PD1+	CD57+PDL1+	CD68+
生存 期<12 个月	1.87	0.27	1.3	2.56
	1.54	0	1.08	3.04
	1.38	0.045	0.97	2.98
	0.97	0.23	0.34	1.23
	0.93	0	0.021	1.67
	2.08	0.012	0.3	2.8
	1.76	0.13	0.29	5.89
	1.42	0	0.78	3.45
	1.63	0	1.02	1.23
1.72	0.07	0.35	4.76	
生存 期≥12 个月	2.01	0	1.05	1.23
	0.99	0.23	1.28	3.21
	1.32	0.099	0.79	2.13
	1.79	0	0.3	5.34
	1.06	0.89	0.56	2.45
	1.02	1.25	1.01	1.67
	2.01	0.19	0.03	2.06
	1.68	0.034	0.42	3.08
	1.49	0	0.089	1.89
1.87	0.087	0.023	2.01	
组别	CD68+CD163+	CD68+CD163-	CD68+PD1+	CD68+PDL1+
生存 期<12 个月	2.34	0.22	0	0
	2.98	0.06	0.03	1.01
	2.59	0.39	0.18	0.12
	1.2	0.03	0	0.87
	1.5	0.17	0.08	0
	2.5	0.3	0.09	0.25
	0.63	2.34	0.24	1.78

[0148]

	2.87	0.58	0	0.34
	1.02	0.21	0.12	0.98
	4.5	0.26	0	1.07
生存期≥12个月	1.19	0.04	0.26	0
	2.31	0.9	0	1.25
	1.02	1.11	0.02	2.97
	4.79	0.55	0	0.56
	1.02	1.43	0.012	1.05
	0.98	0.69	0.08	0.55
	1.35	0.71	0.092	0.98
	2.01	0.07	1.01	1.75
	1.5	0.17	0	0
	1.25	0.27	0.25	0.75
组别	CD163+	CD163+PD1+	CD163+PDL1+	PD1+
生存期<12个月	2.45	0	1.08	1.02
	3.21	1.03	0.56	0.98
	3.76	0	0	1.02
	1.78	0	0	0.87
	1.69	0.98	1.78	2.01
	2.19	0	0	1.05
	2.89	0.95	0.34	0.99
	4.65	0	0.78	0.94
	1.32	2.01	0.75	1.23
	2.12	1.05	0.98	0.59
生存期≥12个月	1.56	0	0.02	0.28
	1.98	0.98	0.86	1.02
	2.05	0	0.79	1.01
	2.67	0.95	0	0.43
	1.24	0.68	0.03	0.75
	3.98	1.21	0.85	1.85
	4.65	1.98	1.21	1.58
	2.01	0	0.87	1.02
	1.23	0.87	0.12	2.01
	2.96	0	0.59	0.96
组别	PDL1+	CD3+	CD3+PD1+	CD3+CD4+FoxP3+
生存期<12个月	1.21	17.98	0.54	2.31
	0.98	7.65	0	5.67
	2.01	16.23	0.67	3.42
	2.02	8.16	0	0
	2.01	9.02	0	0
	1.89	12.18	1.01	0
	1.96	8.56	0	3.58
	0.98	12.32	0	10.79
	1.32	5.89	0	0

[0149]

	1.55	9.42	0.087	2.18
生存 期≥12 个月	1.29	15.67	0	0
	1.09	15.72	0	5.67
	1.59	3.48	0	0
	2.01	10.19	0	2.32
	2.04	11.23	0	0
	1.78	14.32	0.098	8.97
	1.23	5.79	0.12	0
	0.98	7.05	0	0
	1.21	20.87	0.21	5.89
	1.08	22.31	0	3.45
	组别	FoxP3+	CD45RO+	CD4+
生存 期<12 个月	3.87	6.51	6.54	2.13
	6.09	5.12	6.03	1.23
	3.67	7.98	6.12	2.19
	1.89	14.52	6.34	0.78
	2.32	5.18	7.88	0.065
	1.87	8.76	9.13	0.21
	5.78	6.72	6.67	1.21
	12.39	12.34	10.98	3.21
	0.87	3.45	4.32	1.02
	6.56	6.98	8.65	0.65
生存 期≥12 个月	3.01	4.32	13.43	1.23
	5.89	13.21	11.2	3.78
	2.36	4.32	16.78	2.13
	4.89	6.51	7.89	0.056
	0	9.87	8.92	1.21
	11.96	10.16	2.67	3.89
	0	5.43	2.78	0.98
	2.67	15.67	5.89	0.23
	7.98	3.79	8.23	1.02
	5.02	13.98	10.79	0.76
组别	CD8+CD45RO+ FoxP3-PD1-	CD3+CD4+ FoxP3-PD1-	CD3+CD8+ FoxP3-PD1-	CD4+CD45RO+ FoxP3-PD1-
生存 期<12 个月	2.13	4.56	5.02	3.21
	0	5.71	0	0
	1.21	4.56	2.12	5.64
	10.78	0	1.72	0
	0	3.01	0	8.78
	8.12	0	3.59	5.98
	0	4.32	0	12.1
	5.72	10.67	9.98	6.98
	1.02	4.32	3.01	0
	0	5.31	0	2.54

[0150]

生存 期≥12 个月	8.67	8.51	9.89	4.89
	6.42	3.29	11.99	6.79
	10.26	0	9.25	12.13
	0	4.91	2.25	2.15
	0	5.76	8.97	6.98
	9.87	9.93	3.46	0
	0	3.65	0	6.21
	2.19	0	0	0
	5.42	8.76	4.21	8.31
	6.31	10.98	8.76	6.89
组别	CD8+TIM3+	CD8+TIGIT+	LAG3+	TIM3+
生存 期<12 个月	1.21	1.03	3.29	2.31
	2.34	1.29	3.98	3.89
	1.23	2.09	2.98	2.98
	0.65	1.21	2.19	1.21
	0.087	0.21	1.29	1.02
	0.12	0.56	2.13	0.98
	1.01	0.25	2.19	1.89
	2.19	1.23	4.56	3.89
	1.01	0.76	2.32	3.21
	0.34	1.01	1.36	1.09
生存 期≥12 个月	0.98	1.01	2.32	2.98
	1.23	2.01	4.31	3.45
	2.18	1.49	4.75	4.02
	0.089	0.21	0.97	1.21
	0.65	2.12	2.01	1.09
	1.23	1.03	4.02	3.45
	0.42	1.28	2.39	1.21
	1.01	0.89	1.21	3.32
	0.75	1.01	2.34	1.76
	0.23	0.76	1.43	1.67
组别	TIGIT+	CD11b+CD33+CD14-	CD66b+	CD66b+PD1+
生存 期<12 个月	1.98	2.13	1.21	0.98
	2.09	0	2.31	1.09
	3.98	3.08	1.23	1.07
	2.31	0	1.09	0.23
	1.09	2.19	1.56	1.21
	1.29	3.07	2.01	1.02
	0.98	1.23	3.01	1.89
	2.56	2.39	1.35	0.98
	1.89	0.98	1.89	1.01
	3.02	0	1.56	0.98
生存	2.76	1.25	1.01	0.32
	3.06	1.02	2.01	1.21

[0151]

期≥12 个月	2.31	0.98	1.34	0.45
	1.34	2.13	1.75	0.67
	2.97	0	2.01	1.09
	2.01	0.98	3.01	2.54
	2.34	2.69	0.98	0.21
	1.07	0	1.07	0.34
	2.31	0.29	2.09	1.08
	1.56	0	1.01	0.47
组别	CD14+	CD14+PD1+	CD33+	CD33+PD1+
生存 期<12 个月	4.56	3.02	3.67	2.12
	3.21	2.19	4.09	1.21
	9.78	7.91	4.78	2.39
	3.79	1.23	6.98	3.29
	6.79	3.45	3.43	3.02
	8.32	7.52	4.98	2.08
	7.82	6.34	3.98	1.79
	4.89	2.38	3.89	2.08
	3.97	1.24	2.32	3.01
	6.69	5.67	3.82	2.89
生存 期≥12 个月	3.45	2.89	4.82	1.21
	4.78	2.19	2.69	1.01
	8.97	5.63	2.45	0.98
	4.35	2.19	3.82	1.67
	9.78	4.32	4.45	2.01
	6.56	2.98	3.38	1.01
	3.87	1.34	2.32	3.45
	3.45	1.21	3.94	2.56
	4.01	2.79	2.82	2.02
	7.62	5.65	1.25	0.98
组别	CD11b+	CD11b+PD1+	panCK+PDL1+	panCK
生存 期<12 个月	4.32	3.01	0	10.97
	3.29	2.01	0	10.23
	3.98	1.89	0	11.76
	4.67	2.12	0.012	12.34
	4.32	1.23	0.21	11.23
	4.78	1.05	0.087	10.76
	3.95	1.42	0.34	9.98
	4.56	3.01	0	11.23
	5.29	3.98	0.021	10.34
	5.43	4.98	0.034	9.78
生存 期≥12 个月	4.39	2.31	0.087	12.31
	3.87	2.91	0	6.78
	2.98	1.02	0	10.23
	4.59	3.97	0.021	11.23

[0152]

	4.52	3.21	0.23	10.01
	4.32	2.97	0.56	11.23
	4.02	3.01	0	9.76
	4.31	3.15	0.21	11.23
	5.25	4.09	0	10.08
	2.08	1.55	0.032	8.79

[0153] 从上述表4中可以看出,在胰腺癌肿瘤组织的微环境中存在着各种各样的免疫细胞,但同其它癌种相比,各种免疫细胞的阳性率并不高,这可能是造成胰腺癌免疫治疗效果不好的重要原因。

[0154] 采用随机森林算法 (bagging+CART (Classification and Regression Trees, CART) 分类决策树) 对免疫治疗疗效差和疗效好的两组进行多因素分析。设有N个样本,M个变量,随机森林算法具体流程简介如下(具体可以参考Breiman L,Breiman L,Cutler R A.Random Forests Machine Learning[J].Journal of Clinical Microbiology,2001,2: 199-228):

[0155] 1) 确定一个值m,它用来表示每个树分类器选取多少个变量。

[0156] 2) 从数据集中有放回的抽取k个样本集,用它们创建k个树分类器。同时还伴随生成了k个袋外数据,用来做检测。

[0157] 3) 输入待分类样本后,每个树分类器都会对它进行分类,然后所有分类器按照少数服从多数原则,确定分类结果。

[0158] 权重的确定:

[0159] 1) 从数据集中有放回的抽取k个样本集,用它们创建k个树分类器。同时还伴随生成了k个袋外数据,用来做检测。

[0160] 2) 对每一棵决策树,选择相应的袋外数据计算袋外数据误差,记为err00B1。随机对袋外数据所有样本的特征X加入噪声干扰,再次计算袋外数据误差,记为err00B2。

[0161] 3) 特征X的重要性 = $\sum (\text{err00B2} - \text{err00B1}) / k$ 。

[0162] 重要因子的确定方法为:计算每个特征的重要性并降序排序。重要因子为特征数的top20%。

[0163] ROC曲线的绘制:对每一棵决策树,测定样本的真阳性率和假阳性率。以真阳性率(灵敏度%)为纵坐标,假阳性率(1-特异度%)为横坐标绘制ROC曲线。免疫治疗疗效差和疗效好的两组的多因素分析结果:重要因子森林图见图2,ROC曲线如图3所示。

[0164] 从图2所示的多因素分析结果来看,区分预后的重要因子在肿瘤区域内有12个,分别为CD8+PD1-,CD68+CD163-,CD8+/CD163+PDL1+比值,CD3+CD8+FoxP3-PD1-,CD8+/CD163+比值,CD8+/PDL+比值,CD8+PD1+/CD68+PDL1+比值,CD8+PD1-/CD163+比值,CD33+PD1+,CD8+PD1+/PDL1+比值,CD8+PD1+/PDL1+比值以及PDL1+。

[0165] 采用Mann-Whitney试验对生存期较短和较长的两组进行单因素分析,得到12个重要指标的阈值。12个指标的阈值如下,见表5:

[0166] 表5. 12个指标的阈值

[0167]

序号	指标	阈值
----	----	----

1	CD8+PD1-	2.5
2	CD68+CD163-	0.68
3	CD8+/CD163+PDL1+	14.51
4	CD3+CD8+FoxP3-PD1-	8.75
5	CD8+/CD163+	2.41
6	CD8+/PDL1+	2.46
7	CD8+PD1+/CD68+PDL1+	1.85
8	CD8+PD1-/CD163+	2.5
9	CD33+PD1+	2.07
10	CD8+PD1-/PDL1+	4.3
11	CD8+PD1+/PDL1+	3.39
12	PDL1+	1.88

[0168] 表5的结果表明:当CD8+PD1-,CD68+CD163-,CD8+/CD163+PDL1+比值,CD3+CD8+FoxP3-PD1-,CD8+/CD163+比值,CD8+/PDL1+比值,CD8+PD1+/CD68+PDL1+比值,CD8+PD1-/CD163+比值,CD8+PD1-/PDL1+比值高于对应的阈值时,其生存期更长,预后可能更好;当CD33+PD1+,CD8+PD1+/PDL1+比值,PDL1+值低于对应的阈值时,其生存期更长,预后可能更好。

[0169] 图3所示的ROC曲线中,红色点表示该点的Youden指数最大(Youden指数=灵敏度+特异度-1),即灵敏度和特异度最好。 $AUC=0.90$, $P=0.001$,表示具有统计学意义。

[0170] 即当一位受试者检测了以上12个指标,且相关指标及其比值符合或优于对应的阈值时,说明这位受试者将会获得比其他人更长的生存期。由此可见,多重免疫组化同时标记多个免疫细胞标志物、肿瘤细胞标志物及免疫检查点分子对于测试胰腺患者肿瘤微环境是十分具有优势的,并且可预测该患者的是否有较长的生存期,即预后更好。

[0171] 对比例

[0172] 以上述实施例中的panel1能够在一张切片上同时标记多个分子($n \leq 6$)为例,比较现有技术的免疫组化检测结果。现有免疫组化检测在一张切片上一般标记一个分子。结果比较分别见图4和图5,其中,图4示出的是panel 1的多重免疫组化的结果,图5a至图5e示出的是现有技术中对单一标记分子进行免疫组化检测的结果,其中,图5a显示的是CD3免疫组化的检测结果,图5b显示的是CD4免疫组化的检测结果,图5c显示的是CD8免疫组化的检测结果,图5d显示的是CD68免疫组化的检测结果,图5e显示的是CD163免疫组化的检测结果。

[0173] 从以上的描述中,可以看出,本发明上述的实施例实现了如下技术效果:采用本申请所提供的标志物分子及其组合对胰腺癌进行检测时,能够更准确地检测对应患者的肿瘤微环境,从而能够更有效地对待测样本的生存预后进行指导和预测。

[0174] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

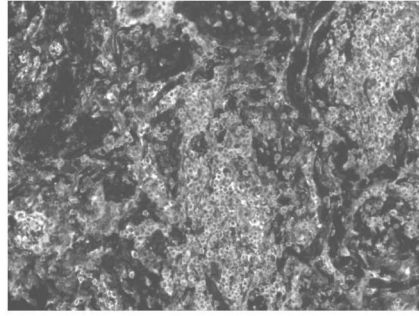


图1a

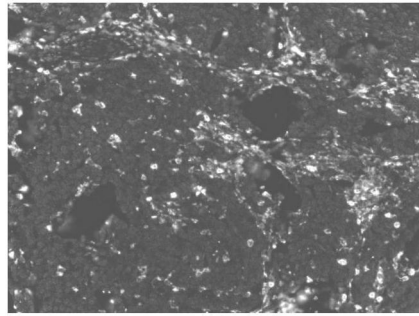


图1b

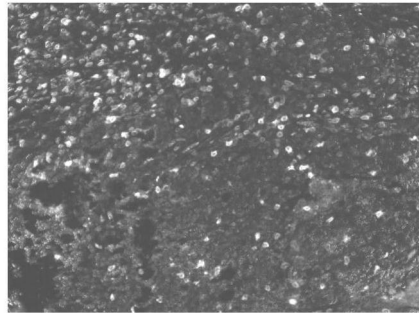


图1c

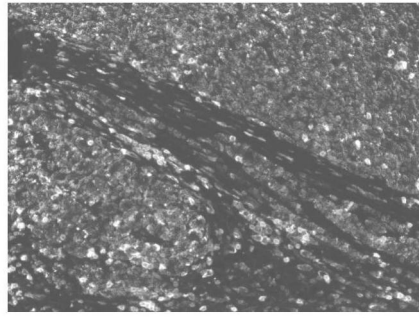


图1d

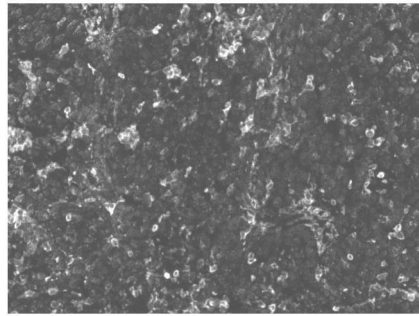


图1e

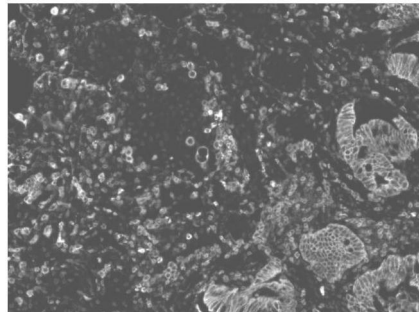


图1f

ROC曲线分析

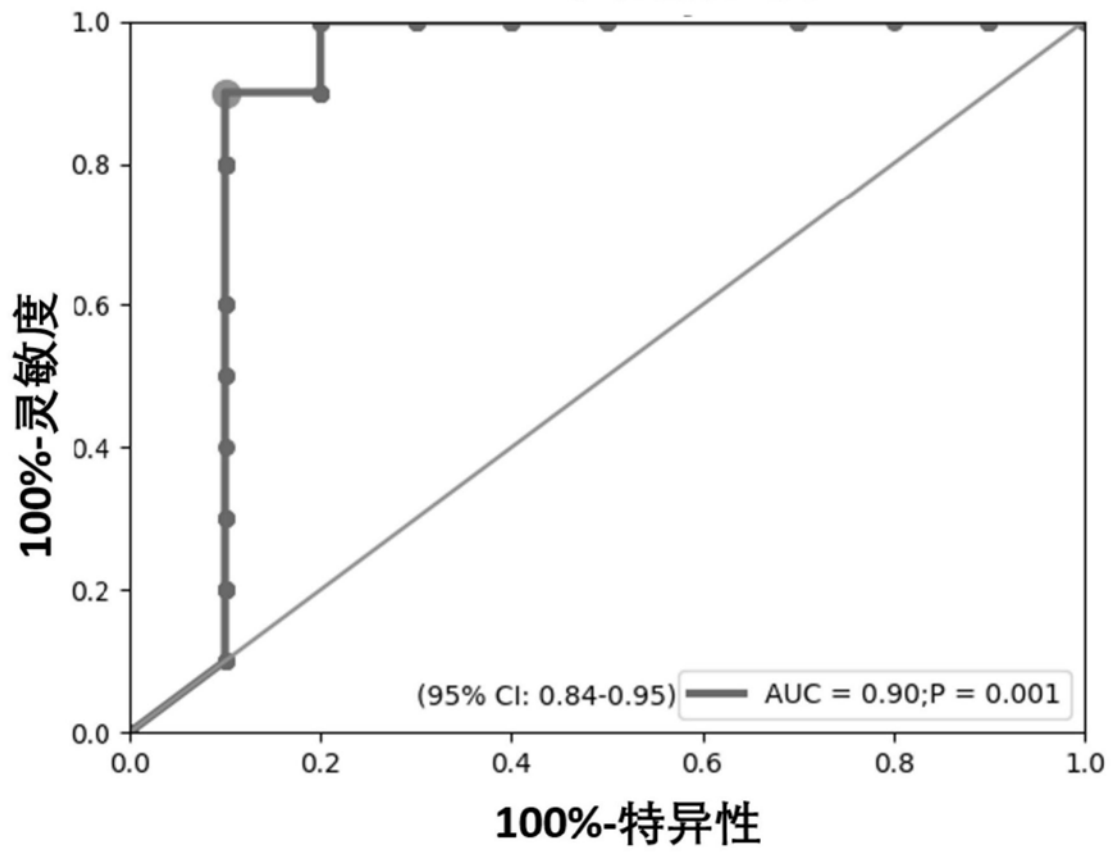


图3

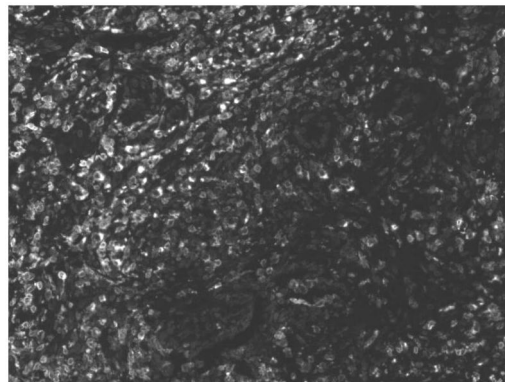


图4

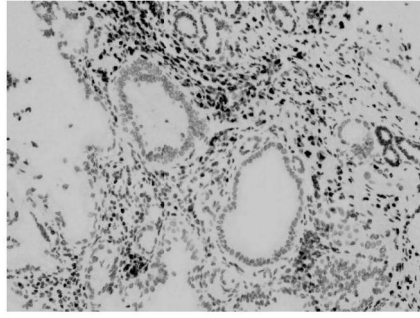


图5a

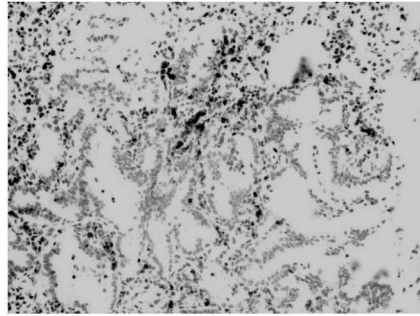


图5b

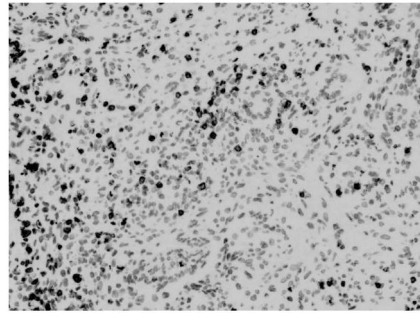


图5c

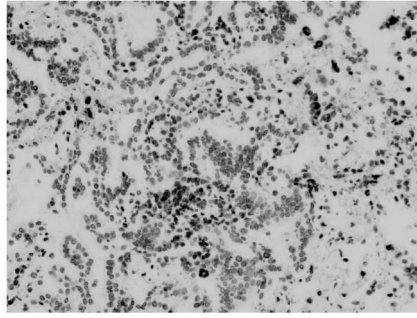


图5d

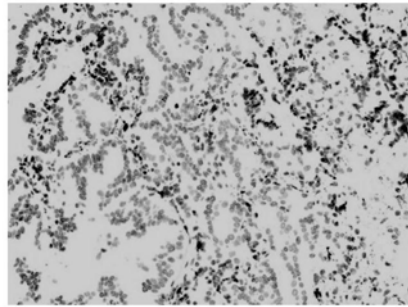


图5e

专利名称(译)	胰腺癌检测试剂、试剂盒、装置及应用		
公开(公告)号	CN110456054A	公开(公告)日	2019-11-15
申请号	CN201910746150.X	申请日	2019-08-13
[标]发明人	张恒辉 陈衍辉 王雅婷 罗红丽		
发明人	张恒辉 陈衍辉 王雅婷 罗红丽		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57438 G01N33/57484 G01N33/57496 G01N33/6893 G01N2333/4746		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种胰腺癌检测试剂、试剂盒、装置及应用。该检测试剂包括如下任意两个或两个以上的分子标志物的抗体，其中，CD3、CD4、CD8及CD68属于A组，CD11b、CD14、CD33、CD45RO、CD57、CD66b、CD163、FoxP3、LAG3、PD1、PDL1、TIGIT、panCK及TIM3属于B组，至少一个分子标志物选自B组。本申请所提供的上述两种或两种以上的分子标志物的抗体来对胰腺癌进行检测，具有检测灵敏度高，特异性好的优势。因此，适合用于多重免疫组化的方法来检测胰腺癌患者肿瘤微环境是十分具有优势的，进而能够相对准确地预测该患者的是否有较长的生存期，即预后更好。

