

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710173600.8

[43] 公开日 2009年7月1日

[11] 公开号 CN 101470119A

[22] 申请日 2007.12.28

[21] 申请号 200710173600.8

[71] 申请人 上海交通大学医学院附属瑞金医院

地址 200025 上海市瑞金二路197号

共同申请人 上海生物芯片有限公司

[72] 发明人 李军民 张庆华 夏祖光 赵维莅  
沈志祥 宋凯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 张宜红

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

[54] 发明名称

弥漫性大B细胞淋巴瘤分子病理分型方法及应用

[57] 摘要

本发明提供了一种对弥漫大B细胞淋巴瘤进行预后比较和/或治疗方案的选择的试剂盒及其用途,其特征是,所述试剂盒包括:i)检测生物样品中CD10蛋白表达的一种或多种试剂;ii)检测生物样品中Bcl-6蛋白表达的一种或多种试剂;以及iii)检测生物样品中MUM1蛋白表达的一种或多种试剂。采用本发明的试剂盒及方法可对弥漫大B细胞淋巴瘤患者采取有针对性的治疗方案,从而提高治疗方案的预后效果并节省医疗费用。

1. 一种试剂盒,其用于弥漫大B细胞淋巴瘤的预后比较和/或治疗方案的选择,其特征在于,所述试剂盒包括:

- i)检测生物样品中CD10蛋白表达的一种或多种试剂;
- ii)检测生物样品中Bcl-6蛋白表达的一种或多种试剂; 以及
- iii)检测生物样品中MUM1蛋白表达的一种或多种试剂。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述预后比较和/或治疗方案的选择是针对联合化疗和联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗的。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中的试剂 i)、ii)和 iii)分别用于对生物样品中 CD10、Bcl-6 和 MUM1 的表达进行免疫组织化学检测。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述生物样品获自未经临床治疗的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的新鲜组织、福尔马林固定或石蜡包埋组织。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含选自下组的一种或多种:阳性对照物、阴性对照物、使用说明书、一抗稀释缓冲剂、DAB、抗原修复剂、封闭液、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇、或苏木精。

6. 如权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述使用说明书中写明:当检测结果显示CD10(+)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-)则表明该患者为GCB型患者,对该患者采用联合化疗方案治疗与采用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗方案治疗预后无明显差异;当CD10(-)/Bcl-6(-)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+))则表明该患者为非GCB型患者,对该患者采用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗方案治疗其预后优于采用联合化疗方案。

7. CD10、Bcl-6 和 MUM1 的表达检测试剂或试剂组在制备用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后比较的试剂盒中的用途。

8. CD10、Bcl-6 和 MUM1 联合作为弥漫大 B 细胞淋巴瘤治疗方案选择和/或预后比较的分子标志物的用途。

9. 一种对弥漫大B细胞淋巴瘤预后效果进行体外比较的方法,所述方法包括:

- a) 检测生物样品中 CD10、Bcl-6 和 MUM1 的表达情况;

b) 分析由步骤 a)所得的检测结果;

其中: CD10(+)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-)则表明对所述弥漫大B细胞淋巴瘤患者采用CHOP方案治疗与采用R-CHOP方案治疗预后无明显差异;

CD10(-)/Bcl-6(-)、或 CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+)则表明对所述弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者采用 R-CHOP 方案治疗的预后优于采用 CHOP 方案治疗。

10. 一种对弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案进行选择的方法, 所述方法包括:

a) 检测生物样品中 CD10、Bcl-6 和 MUM1 蛋白的表达情况;

b) 分析由步骤 a)所得的检测结果;

其中: CD10(+)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-)则表明宜对所述弥漫大B细胞淋巴瘤患者采用CHOP方案治疗;

CD10(-)/Bcl-6(-)、或 CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+)则表明宜对所述弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者采用 R-CHOP 方案治疗。

## 弥漫性大B细胞淋巴瘤分子病理分型方法及应用

### 技术领域

本发明涉及血液肿瘤学和医学领域。更具体地，涉及弥漫性大B细胞淋巴瘤的分子分型标志物、检测方法及该检测方法涉及的试剂盒。

### 背景技术

弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤，约占每年初发非霍奇金淋巴瘤的40%左右。我国目前非霍奇金淋巴瘤的发病率约为3-4/10万，并以每年2-3%的速度增长，其中弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)最为常见，约占每年所有淋巴瘤的50%，因此，每年全国新发病例约为4-5万。

DLBCL具有显著的生物学异质性，病人对治疗的反应差异显著，常规的联合化疗方案(CHOP，环磷酰氨、阿霉素、长春新碱和泼尼松)只能使约40%的患者获得长期缓解。随着人-鼠嵌合性抗CD20单克隆抗体(利妥昔单抗，Rituximab)联合化疗(R-CHOP)的应用，进一步提高DLBCL的临床疗效，但是利妥昔单抗每个疗程治疗费用为10-15万元，对于国内大部分患者来说是沉重经济负担。由于利妥昔单抗并不能提高某些类型患者的疗效(具体为如下文所述的GCB型患者)，故鉴定患者的分子病理分型后，选择合理的治疗方案，有利于节约这部分患者的医疗支出。

因此，加强DLBCL生物学特性的研究，制定相应的治疗方案成为目前DLBCL的研究热点。当前临床对DLBCL进行危险分层，主要是通过国际预后指数(International Prognostic Index, IPI)，包括：年龄、体力状态、临床Ann Arbor分期、节外病灶数目、乳酸脱氢酶水平。由于这种评价只是临床参数的组合，不能反映肿瘤发生过程中内在的分子生物学异质性，因此对于相当一部分病例的预后不能进行准确评价，一些被分在低危、低中危组的病人5年生存率仍仅有32%。

基因芯片技术的应用为阐明DLBCL潜在的生物学异质性提供了一个高通

量平台，通过DLBCL基因表达谱(gene expression profiling, GEP)分析，鉴别出了三种DLBCL亚型，提示肿瘤性B细胞处在不同的分化阶段：一种称为生发中心B细胞样DLBCL(germinal center B cell-like DLBCL, GCB)，此亚型因与正常生发中心B细胞表达的基因标志相同而得名；另一种亚型称为活化B细胞样DLBCL(activated B cell-like DLBCL, ABC)，此亚型表达的基因型与促有丝分裂刺激后外周血B细胞相似，GCB与ABC之间有数千基因表达差异。除以上两型之外，仍有17%-40%的DLBCL无法用细胞起源来分型，被统称为3型(type3)，ABC和type3统称为非GCB(non-GCB)。

DLBCL亚型是独立于IPI的预后评价指标，各亚型对传统的联合化疗CHOP方案的反应性和疗效各不相同，ABC和GCB的五年生存率分别为31%和59%，GCB的生存率明显好于ABC，而3型本身具有异质性，无确定的生存率，但其总体预后情况与ABC亚型相似，从而为DLBCL的分子病理分型奠定了基础。基因芯片技术加深了对DLBCL生物学特性的理解，但因其对标本的要求较高(新鲜标本、适宜的冷冻保存等)、操作复杂、且基因芯片检测代价较高，使用基因芯片检测费用为每例患者7000-9000元，故制约了其临床实用性。

因此，本领域迫切需要寻找到DLBCL分子分型与其临床治疗之间的联系，从而采用简单、低费用而可靠分型的分子标志物、方法以及相应的试剂盒对不同治疗方案的预后效果进行评估比较，并治疗方案进行选择。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种弥漫大B细胞淋巴瘤分子分型的免疫组织化学诊断试剂盒。本发明的另一目的在于为弥漫大B细胞淋巴瘤临床治疗方案的选择以及预后效果的评估比较提供临床指导。

在本发明的第一方面，提供了一种试剂盒，其用于弥漫大B细胞淋巴瘤的预后比较和/或治疗方案的选择，所述试剂盒包括：

- i)检测生物样品中CD10蛋白表达的一种或多种试剂；
- ii)检测生物样品中Bcl-6蛋白表达的一种或多种试剂；以及
- iii)检测生物样品中MUM1蛋白表达的一种或多种试剂。

在本发明的一个实施方式中，所述预后比较和/或治疗方案的选择是针对联合化疗和联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗的。

在另一优选例中，所述联合化疗为 CHOP 联合化疗，即环磷酰胺-阿霉素-

长春新碱-泼尼松联合化疗。

在本发明的另一个实施方式中，所述试剂盒中的试剂 i)、ii)和 iii)分别用于对生物样品中 CD10、Bcl-6 和 MUM1 的表达进行免疫组织化学检测。

在本发明的另一个实施方式中，所述生物样品获自未经临床治疗的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的新鲜组织、福尔马林固定或石蜡包埋组织。

在本发明的另一个实施方式中，所述试剂盒还包含选自下组的一种或多种：阳性对照物、阴性对照物、使用说明书、一抗稀释缓冲剂、DAB、抗原修复剂、封闭液、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇、或苏木精。

在本发明的另一个实施方式中，所述使用说明书中写明：当检测结果显示 CD10(+)、或 CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-) 则表明该患者为 GCB 型患者，对该患者采用联合化疗方案治疗与采用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗方案治疗预后无明显差异；当 CD10(-)/Bcl-6(-)、或 CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+) 则表明该患者为非 GCB 型患者，对该患者采用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗方案治疗其预后优于采用联合化疗方案。

在另一优选例中，所述说明书写明推荐 GCB 型患者仅采用传统 CHOP 方案治疗，而非 GCB 患者则推荐采用 R-CHOP 方案治疗。

本发明的第二方面，提供了 CD10、Bcl-6 和 MUM1 的表达检测试剂或试剂组在制备用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后比较的试剂盒中的用途。

在一个优选例中，所述预后比较和/或治疗方案的选择是针对联合化疗和联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗的。

本发明的第三方面，提供了 CD10、Bcl-6 和 MUM1 联合作为弥漫大 B 细胞淋巴瘤治疗方案选择和/或预后比较的分子标志物的用途。

本发明的第四方面，提供了一种对弥漫大 B 细胞淋巴瘤预后效果进行体外比较的方法，所述方法包括：

a) 检测生物样品中 CD10、Bcl-6 和 MUM1 的表达情况；

b) 分析由步骤 a) 所得的检测结果；

其中：CD10(+)、或 CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-) 则表明对所述弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者采用 CHOP 方案治疗与采用 R-CHOP 方案治疗预后无明显差异；

CD10(-)/Bcl-6(-)、或 CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+) 则表明对所述弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者采用 R-CHOP 方案治疗的预后优于采用 CHOP 方案治疗。

在一个优选例中，所述方法还包括对国际预后指数进行评估。

在本发明的第五方面，提供了一种对弥漫大B细胞淋巴瘤的治疗方案进行选择的方法，所述方法包括：

- a) 检测生物样品中 CD10、Bcl-6 和 MUM1 蛋白的表达情况；
- b) 分析由步骤 a) 所得的检测结果；

其中：CD10(+)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-)则表明宜对所述弥漫大B细胞淋巴瘤患者采用CHOP方案治疗；

CD10(-)/Bcl-6(-)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+)则表明宜对所述弥漫大B细胞淋巴瘤患者采用R-CHOP方案治疗。

#### 附图说明

图1所示为：弥漫大B细胞淋巴瘤免疫组化分子分型树示意图。

图2所示为：DLBCL的免疫组化分子分型。

图3所示为：42例GCB型患者的生存曲线。

图4所示为：62例非GCB型患者的生存曲线。

#### 具体实施方式

有报道通过检测代表B细胞不同分化阶段的三种基因(CD10、Bcl-6和MUM1)的表达，可以对弥漫大B细胞淋巴瘤进行分子分型并评估预后。本发明人以该国际上弥漫大B细胞淋巴瘤分子病理研究为背景，对弥漫大B细胞淋巴瘤病人进行基因芯片分析及病理切片上CD10、Bcl-6和MUM1的表达检测，并将检测的这三种标志物蛋白表达的试剂组成试剂盒，以其检测结果比较不同治疗方案的预后效果，并指导治疗方案的选择，完成了本发明。

具体而言，将检测CD10、Bcl-6和MUM1蛋白表达水平的试剂组合，同时检测这三种标志物蛋白表达情况，根据蛋白表达情况对弥漫大B细胞淋巴瘤进行分子分型，指导临床治疗方案的选择。国内外尚未与本发明提出的弥漫大B细胞淋巴瘤分子病理试剂盒及相关治疗方案选择指导相似的研究。

发明人通过免疫组化的方法对所选的三种标志物进行了验证：将分别针对以上三种蛋白的单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb, 可市售获得)及相关二抗和显色剂组合成试剂盒，利用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)等方法，对104例DLBCL标本进行了CD10、Bcl-6和MUM1蛋白的表达情况检测，

对结果进行了分析。结果证明通过检测三种蛋白表达情况，可简便而灵敏地对弥漫大B细胞淋巴瘤进行分型并指导临床治疗方案的选择，采用传统的CHOP方案GCB型患者预后优于非GCB型患者；利妥昔单抗(Rituximab)可以使非GCB型患者受益，而并不能提高GCB型患者的疗效。因此，在临床实践中对BCB型患者宜采用CHOP治疗方案，而对非GCB型患者则宜采用R-CHOP治疗方案。因此本发明的方法和试剂盒对于对于联合化疗(CHOP)和结合利妥昔单抗的联合化疗(R-CHOP)的选择和预后比较尤其具有重要意义。

在此基础上，组成了弥漫大B细胞淋巴瘤分子病理试剂盒，并建立了使用此试剂盒进行弥漫大B细胞淋巴瘤分子分型并指导临床治疗方案的选择的方法，完成了本发明。

### 弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的分型

如背景技术部分所述，弥漫大B细胞淋巴瘤可分为GCB型与非GCB型两个大类。利用基因芯片的分型方法复杂且检测费用较高，以CD10、Bcl-6和MUM1这三个基因相应的蛋白表达情况进行分子分型，检测费用较低、方便易行。其中CD10和Bcl-6为生发中心B细胞标志，而MUM1为后生发中心B细胞标志。在本发明中，术语“表达”是指CD10、Bcl-6和MUM1基因经过、翻译等步骤，在细胞中产生相应的蛋白质分子，即产生CD10、Bcl-6和MUM1蛋白。

如本发明图1的弥漫大B细胞淋巴瘤分子分型树示意图所示，CD10、Bcl-6和MUM1蛋白表达情况与DLBCL分子分型的关系。

在本发明中，“分子标志物”、“指标”可互换使用，均表示本发明中可用于指示DLBCL分型、预后效果和/或对其临床治疗方案选择具有指导意义的分子。本发明的分子标志物具体为CD10、Bcl-6和MUM1。

本发明中，“CD10”、“Bcl-6”和“MUM1”代表着B细胞分化的不同阶段的分子基因标志，其中CD10和Bcl-6为生发中心B细胞标志，而MUM1为后生发中心B细胞标志。

当CD10(+)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-)则表明所述弥漫大B细胞淋巴瘤为GCB型；当CD10(-)/Bcl-6(-)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+)则表明所述弥漫大B细胞淋巴瘤为非GCB型。

在本发明中，“(+)”表示检测结果为阳性，“(-)”则表示检测结果为阴性。在本发明中，术语“阴性”是指检测结果显示标志物分子在样品中不表达或与

阴性对照相比无统计学或组织学上的差异。反之，术语“阳性”是指检测结果显示标志物分子在样品中表达或与阴性对照相比表达增加或存在统计学或组织学上的明显差异。本领域技术人员可根据具体的检测方法、检测需要和检测条件，选择适当的阳性和阴性对照、选择检测方法并设定对照和阳性判定标准。在本发明的一个具体实施方式中，采用了免疫组织化学检测方法，CD10阳性定位于细胞膜，Bcl-6、MUM1阳性定位于细胞核，>30%的肿瘤细胞着色判为阳性。

在本发明中，如果只标明某一基因或某两个基因的表达情况，则表明只要这一或这两个基因符合所述条件，就可以对弥漫大B细胞淋巴瘤作出分型或预后评估或治疗方案选择指导。例如当CD10(+)时表明所述弥漫大B细胞淋巴瘤为GCB型，在本发明中是指只要测得CD10的表达为阳性，就表明该弥漫大B细胞淋巴瘤为GCB型，而无需再考虑Bcl-6和MUM1的表达情况。

用于检测CD10、Bcl-6和MUM1表达情况的方法优选免疫组织化学检测，但也可采用本领域技术人员已知的其它检测方法。

### 治疗方案选择及预后比较

目前国内外常用于DLBCL治疗的方案为CHOP联合化疗方案(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和泼尼松)、结合人-鼠嵌合性抗CD20单克隆抗体利妥昔和CHOP联合化疗(R-CHOP)。

CHOP联合化疗方案只能使约40%的患者获得长期缓解，但其治疗费用相对低廉。而利妥昔单抗与CHOP的联合治疗方案可进一步提高DLBCL的临床疗效，改善患者的预后，然而该方案每个疗程治疗费用为10-15万人民币，对于大部分患者而言是沉重经济负担。

因此区分适用不同治疗方案的患者，尤其是仅采用CHOP联合化疗方案就可获得良好预后的患者和必须采用联合利妥昔单抗治疗的患者，对于提高DLBCL的临床治疗的效果、改善预后、减轻医患负担均有重要的意义。

采用CD10、Bcl-6和MUM1可对弥漫大B细胞淋巴瘤病人进行病理分型，即CD10(+)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-)则表明该患者为GCB型患者，而CD10(-)/Bcl-6(-)、或CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(+)则表明该患者为非GCB型患者。

本发明人在研究中意外地发现CD10、Bcl-6和MUM1除了可对弥漫大B细胞淋巴瘤病人进行分型以外，还可用于比较临床治疗方案的预后效果，对临

床治疗方案进行选择指导(尤其是对中国患者而言)。

本发明证实了采用传统的 CHOP 方案 GCB 型患者预后优于非 GCB 型患者；利妥昔单抗(Rituximab)可以使非 GCB 型患者受益，而并不能提高 GCB 型患者的疗效。因此，在临床实践中对 BCB 型患者宜采用 CHOP 治疗方案，而对非 GCB 型患者则宜采用 R-CHOP 治疗方案。因此本发明的方法和试剂盒对于对于联合化疗(CHOP)和结合利妥昔单抗的联合化疗(R-CHOP)的选择和预后比较尤其具有重要意义。

本发明的治疗方案选择及预后评估还可结合国际预后指数(IPI)等其它生理病理预后评价指标进行，以进一步提高其准确性。

在本发明中可采用 CD10、Bcl-6 和 MUM1，仅对治疗方案进行选择或仅对预后进行评估，也可同时将两者结合在一起综合考虑以对指导患者整个疗程的总体治疗。

## 试剂盒

本发明中还提供了一种试剂盒，该试剂盒中含有：i)检测生物样品中CD10蛋白表达的一种或多种试剂；ii)检测生物样品中Bcl-6蛋白表达的一种或多种试剂；以及iii)检测生物样品中MUM1蛋白表达的一种或多种试剂。

本发明的试剂盒可用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的分型、治疗方案选择、和/或预后评估。

生物样品是获自弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的淋巴瘤组织。样品主要以组织切片形式供检测，可采用福尔马林固定、石蜡包埋切片或新鲜组织切片标本。样品采集优选先于患者接受临床治疗。

用于本发明中的检测方法优选免疫组织化学检测法，该方法可极为简便而有效地检测并确定样品中 CD10、Bcl-6 和/或 MUM1 表达的状况，非常适用于临床应用。当然，本发明也不排除本领域技术人员可采用的其它检测方法，诸如蛋白质印迹法、ELISA 法、流式细胞法、生物芯片法等，但其操作过程可能较本发明中优选的免疫组化方法繁琐，本领域技术人员可根据需要进行选择。

可根据多种检测原理和方法，按照需要在试剂盒中配备检测 CD10、Bcl-6 和/或 MUM1 蛋白表达的试剂或试剂组。在本发明中，“试剂组”是指包含了检测所需的多种试剂的试剂组合。

在本发明的一个具体实施方式中，所采用的检测方法是免疫组织化学检测

法，因此在试剂盒中所包含的检测 CD10、Bcl-6 和 MUM1 的试剂包括：各自抗 CD10、Bcl-6 和 MUM1 蛋白的一抗、二抗、免疫组化所需的其它试剂等。

此外，本发明的试剂盒还可根据需要包括：容器、对照物(包括阳性或阴性对照)、使用说明书、缓冲剂、免疫助剂等，本领域技术人员可根据具体情况对其进行选择。

### 有益效果

1. 通过分子分型对弥漫大B细胞淋巴瘤进行危险分层，揭示其内在的分子异质性，有利于及早识别高危患者，以及选择合理的治疗方案。

2. 通过选择的三种蛋白分子标志物组成的试剂盒进行弥漫大B细胞淋巴瘤分子分型，解决了基因芯片技术对DLBCL进行分型的过程中对标本的要求高、操作复杂、代价高的问题，提高了临床实用性。使用基因芯片的检测费用为每例患者7000-9000元，而使用DLBCL分子病理分型诊断试剂盒检测为每例患者200-300元，费用明显降低，且检测效果相似、重复性好。

3. 利妥昔单抗每个疗程治疗费用为10-15万元，对于国内大部分患者来说是沉重经济负担，因为利妥昔单抗并不能提高GCB型患者的疗效，故鉴定患者的分子病理分型后，选择合理的治疗方案，有利于节约这部分GCB型患者的医疗支出。

### 实施例

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室指南(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

#### 实施例1. DLBCL标本收集、处理与检测

##### 1. 标本收集

入选本研究的病例为104例初治DLBCL患者。DLBCL标本均以10%中性甲醛固定，常规脱水，石蜡包埋切片，苏木精-伊红染色，由专门从事淋巴瘤研究的医生按新的WHO分类诊断。

## 2. 标本处理

(1)准备组织切片(石蜡切片脱蜡至水，冰冻切片和细胞培养片并固定)。

(2)抗原修复(微波加热法，适用石蜡切片)将切片置于耐高温容器中，注入抗原修复液Tris/EDTA(50mM Tris, 2mM EDTA, PH9.0)，使切片位于液面以下。置微波炉内加热使容器内液体温度保存在92℃-98℃之间并持续5分钟，取出容器，室温冷却，30-50分钟后降至室温。

### 实施例2. 弥漫大B细胞淋巴瘤分子病理分型的免疫组化检测及结果判定

1. 用TBS冲洗切片4-5次，甩干，擦净，加20 μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇溶液，于室温湿盒中封闭30分钟。

2. 取出切片，用TBS冲洗4-5次，甩干，擦净。用封闭液20 μl覆盖，室温湿盒孵育30分钟。用吸水纸将封闭液吸去，勿洗，滴加适当比例稀释的市售一抗工作液(CD10, 购自Novocastra, 1: 80; Bcl6, 购自DAKO, 1: 10; MUM1, 购自DAKO, 1: 40)。37℃孵育1-2小时或4℃过夜。

3. TBST冲洗4-5次，甩干，擦净。滴加二抗(HRP标记，ChemMate TME nVision+/HRP)20 μl，室温湿盒孵育1-2小时。

4. TBST冲洗4-5次，滴加DAB约30 μl/片，着色后迅速(约一分钟内)冲洗干净。

5. 20 μl苏木精复染。

6. 冲洗干净脱水封片。

7. 镜检。

8. CD10、Bcl6和MUM1的检测结果判定

CD10阳性定位于细胞膜，Bcl-6、MUM1阳性定位于细胞核，>30%的肿瘤细胞着色判为阳性，反之为阴性(见图2)。

### 实施例3. 弥漫大B细胞淋巴瘤患者分子分型

CD10、Bcl-6作为生发中心细胞来源的标志物，CD10(+)或

CD10(-)/Bcl-6(+)/MUM1(-), 为GCB类; CD10(-)/bcl-6(-), 为非GCB类。MUM1作为后生发中心细胞来源的标志物, 若CD10(-)/bcl-6(+), 则以MUM1来分类: MUM1(+) 为非 GCB 类, MUM1(-) 为 GCB 类 (见图 1 和图 2), 即 CD10(-)/bcl-6(+)/MUM1(+) 为非GCB类, CD10(-)/bcl-6(+)/MUM1(-) 为GCB类。

根据该分子分型方法, 依据前述实施例中的免疫组化检测结果, 所采集的104例初治DLBCL患者中, 有42例分型为GCB型患者, 而其余62例为非GCB型患者。

#### 实施例4. 弥漫大B细胞淋巴瘤患者病理分型与治疗选择和预后比较的相关性分析

##### 1. 治疗分组

实施例1中的104名入选患者按照院所要求签定知情同意。患者接受6个疗程标准剂量的CHOP或R-CHOP方案治疗, 根据病情加或不加用放疗。

CHOP方案具体组成如下: 环磷酰胺750 mg/m<sup>2</sup>, 静推, 第1天; 阿霉素50 mg/m<sup>2</sup>, 静推, 第1天; 长春新碱1.4 mg/m<sup>2</sup> (最大剂量, 2.0 mg), 静推, 第1天; 和泼尼松60 mg, 口服, 第1-5天。

R-CHOP方案具体组成如下: 利妥昔单抗375 mg/m<sup>2</sup>, 缓慢静滴, 第1天; 环磷酰胺750 mg/m<sup>2</sup>, 静推, 第2天; 阿霉素50 mg/m<sup>2</sup>, 静推, 第2天; 长春新碱1.4 mg/m<sup>2</sup> (最大剂量, 2.0 mg), 静推, 第2天; 和泼尼松60 mg, 口服, 第2-6天。

疗效评估在6个疗程治疗后1个月进行。所有患者必须进行颈、胸、腹部CT扫描的检查, 不论发病时这些部位是否受累。根据国际工作组标准(International Workshop criteria), 将治疗反应分为完全缓解(CR)、临床完全缓解(Cru)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD)。总有效率定义为CR, Cru和PR之和。

对病例中可随访病例进行随访截止时间为2007年12月。本研究的主要研究终点是不同患者的累积存活率(Cumulated Survival Rate)。OS定义为初次确诊至死亡或末次随访时间。

##### 2. 结果与分析

应用SPSS13.0软件, 对弥漫大B细胞淋巴瘤患者进行生存分析, 研究不同亚型、不同治疗方案对预后的影响( $P < 0.05$ 为有统计学意义)。

结果显示, 42例分型为GCB型的患者, 采用CHOP方案与采用R-CHOP方案预后无明显差异( $P=0.26287$ )(见图3); 62例分型为非GCB型的患者, 采用R-CHOP方案治疗其预后显著优于采用CHOP方案治疗( $P=0.00766$ )(见图4)。

以上结果表明, 采用传统的CHOP方案GCB型患者预后优于非GCB型患者; 利妥昔单抗(Rituximab)可以使非GCB型患者受益, 而并不能提高GCB型患者的疗效。因此, 在临床实践中对GCB型患者宜采用CHOP治疗方案, 而对非GCB型患者则宜采用R-CHOP治疗方案。

### 实施例 5. 检测试剂盒

按如下组成制备本实施例中的试剂盒:

抗CD10、Bcl-6和MUM1蛋白的一抗(各50  $\mu$ l,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存);

HRP标记的二抗, 即用型(5 ml,  $2-8^{\circ}\text{C}$ );

DAB工作液 F1-浓缩缓冲液 100  $\mu$ l( $20\times$ ),  $2-8^{\circ}\text{C}$ (避光);

F2-DAB 溶液 100  $\mu$ l( $20\times$ )  $2-8^{\circ}\text{C}$ (避光);

F3-浓缩 $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu$ l( $20\times$ ),  $2-8^{\circ}\text{C}$ (避光);

抗原修复剂(Unmasking Buffer, 5.1g,  $2-8^{\circ}\text{C}$ );

封闭液 50ml;  $\text{H}_2\text{O}_2$ -甲醇 15ml;

苏木精 15ml。

使用该试剂盒按照实施例1-3的方法, 可检测样品中CD-10、Bcl-6和MUM1蛋白的表达情况。采用本发明的方法和该试剂盒, 根据所得结果对患者的预后做出评估, 评估结果与临床实践相吻合。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文章被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

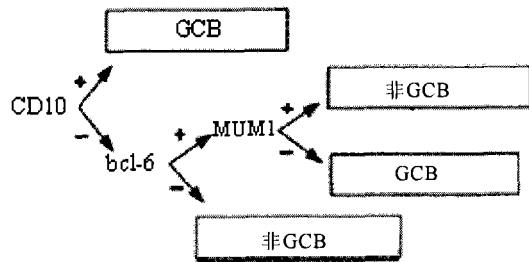


图 1

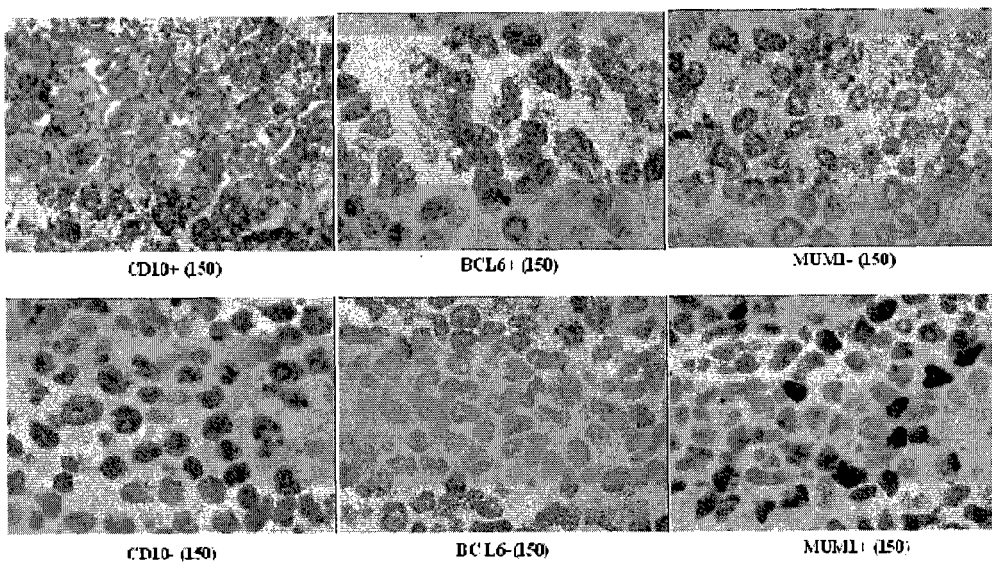


图 2

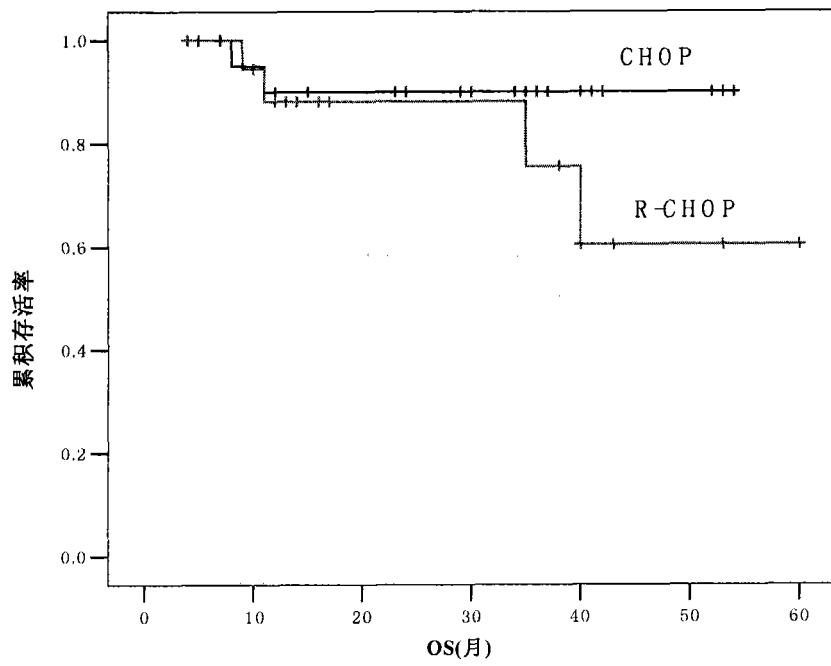


图 3

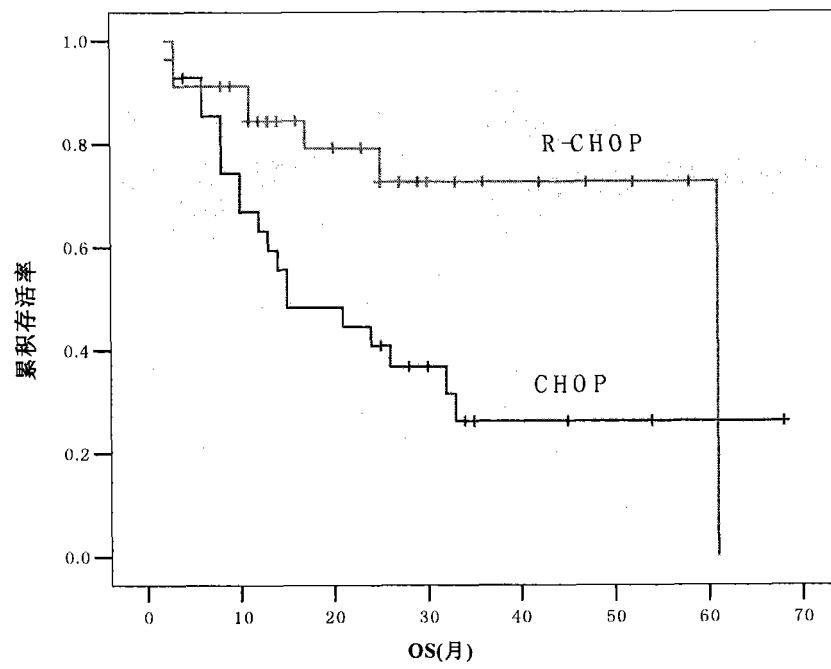


图 4

专利名称(译)	弥漫性大B细胞淋巴瘤分子病理分型方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101470119A</a>	公开(公告)日	2009-07-01
申请号	CN200710173600.8	申请日	2007-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海生物芯片有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海生物芯片有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海生物芯片有限公司		
[标]发明人	李军民 张庆华 夏祖光 赵维莅 沈志祥 宋凯		
发明人	李军民 张庆华 夏祖光 赵维莅 沈志祥 宋凯		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种对弥漫大B细胞淋巴瘤进行预后比较和/或治疗方案的选择的试剂盒及其用途，其特征在于，所述试剂盒包括：i)检测生物样品中CD10蛋白表达的一种或多种试剂；ii)检测生物样品中Bcl - 6蛋白表达的一种或多种试剂；以及iii)检测生物样品中MUM1蛋白表达的一种或多种试剂。采用本发明的试剂盒及方法可对弥漫大B细胞淋巴瘤患者采取有针对性的治疗方案，从而提高治疗方案的预后效果并节省医疗费用。

