



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110389221 B

(45) 授权公告日 2021.03.16

(21) 申请号 201910818357.3

(22) 申请日 2019.08.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110389221 A

(43) 申请公布日 2019.10.29

(73) 专利权人 广州中科蓝华生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城揽月路3号广州国际企
业孵化器F区F401号房间

(72) 发明人 周放 陈小平 秦莉 古艳丽

许文龙 卢永 常旭 韦国建
容志恩(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51) Int.Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2018044238 A1, 2018.03.08

US 2007048803 A1, 2007.03.01

US 2006275752 A1, 2006.12.07

CN 105911292 A, 2016.08.31

Stephanie M. Dillon et al.. Human
intestinal lamina propria CD1c⁺ dendritic
cells display an activated phenotype at
steady state and produce IL-23 in
response to TLR7/8 stimulation.《The
Journal of Immunology》.2010,第184卷第
6612-6621页.Stephanie M. Dillon et al.. Human
intestinal lamina propria CD1c⁺ dendritic
cells display an activated phenotype at
steady state and produce IL-23 in
response to TLR7/8 stimulation.《The
Journal of Immunology》.2010,第184卷第
6612-6621页.

审查员 胡晓佳

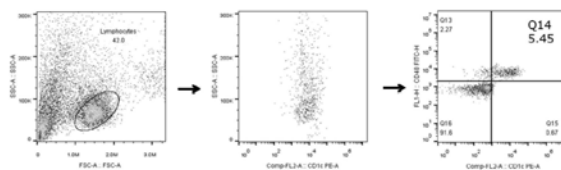
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于分析CD1c⁺树突状细胞亚群表型和
功能的组合配方试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于分析CD1c⁺树突状细胞亚群表型和功能的组合配方试剂盒及其应用,所述试剂盒检测对象包括CD1c、CD40、IL-6和IL-10。本发明的检测试剂盒可用于高效快速地鉴别外周血中CD1c⁺树突状细胞亚群表型同时分析其功能,保证准确率的同时降低因检测大量表面抗原分子导致的经济成本,且检测方法简单易行。



1. CD1c、CD40、IL-6和IL-10的抗体在制备用于非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群功能分析的试剂盒中的应用,其特征在于,所述抗体由四种不同的荧光色素标记;

所述荧光色素标记选自FITC、PE-Cy7、PerCP-Cy5.5、Amcyan、APC-Cy7或Q-Dot;

所述非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群功能分析包括:

通过CD1c的表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群表型的比例,

通过CD40分子的表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群的分化成熟状况,

通过IL-6的分泌表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群介导的免疫功能低下,以及

通过IL-10的分泌表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群的免疫抑制功能。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中,采用所述试剂盒进行检测时,包括如下步骤:

(1) 外周血的预处理,分离出树突状细胞,加入白细胞刺激因子孵育;

(2) 将步骤(1)得到的血细胞染色,然后加入不同荧光色素标记的CD40和CD1c抗体进行首次孵育,再次染色,然后将得到的树突状细胞用福尔马林溶液固定,再次孵育备用;

(3) 将步骤(2)所得细胞重悬于细胞穿透液,离心弃上清,将沉淀的细胞重悬于细胞穿透液,加入不同荧光色素标记的IL-6和IL-10抗体孵育;

(4) 将步骤(3)孵育好的细胞重悬于细胞穿透液,离心去上清,将沉淀细胞重悬于细胞染色液,用流式细胞仪进行分析检测。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,步骤(1)所述外周血的体积为10-100 μ L;所述白细胞刺激因子的体积浓度为0.1%-0.3%。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,步骤(1)所述孵育的时间为4-6h。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,步骤(1)所述孵育的温度为37-40 $^{\circ}$ C。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,步骤(2)所述首次孵育的条件为室温下30-60min。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,步骤(2)所述福尔马林溶液的质量分数为2-4%。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,步骤(2)所述再次孵育的条件为室温避光条件下15-20min。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,步骤(3)所述孵育的条件为4 $^{\circ}$ C避光条件下12-24h。

10. 根据权利要求2-9任一项所述的应用,其特征在于,采用所述试剂盒进行检测时,包括如下步骤:

(1) 取10-100 μ L外周血抗凝处理,外周血全血混合1 $\times$ 红细胞裂解液中,旋转震荡10s后,室温避光静置15min,350g离心5min,弃上清,将沉淀细胞重悬于细胞染色液,按照0.08-0.1%体积浓度的比例加入白细胞刺激因子37 $^{\circ}$ C孵育4-6h;

(2) 将步骤(1)得到的血细胞染色,然后加入不同荧光色素标记的CD40和CD1c抗体进行室温孵育25-35min,再次染色,然后将得到的树突状细胞用2%的福尔马林溶液固定,室温避光孵育15min备用;

(3) 将步骤(2)所得细胞重悬于细胞穿透液,离心弃上清,将沉淀的细胞重悬于细胞穿透液,加入不同荧光色素标记的IL-6和IL-10抗体,在4℃避光条件下孵育12h;

(4) 将步骤(3)孵育好的细胞重悬于细胞穿透液,离心去上清,将沉淀细胞重悬于细胞染色液,用流式细胞仪进行分析检测,通过CD1c的表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群表型的比例,通过CD40分子的表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群的分化成熟状况,通过IL-6的分泌表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群介导的免疫功能低下,以及通过IL-10的分泌表达情况分析非小细胞肺癌病人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群的免疫抑制功能。

一种用于分析CD1c+树突状细胞亚群表型和功能的组合配方 试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,用流式细胞光度术进行免疫检测分析人外周血树突状细胞,具体是涉及一种用于分析CD1c+树突状细胞亚群表型和功能的组合配方试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 流式细胞仪分析技术已做为免疫学主要技术而用于临床和科研工作。树突状细胞做为人体内免疫系统起主要调控作用的细胞是免疫学研究热点之一。目前树突状细胞的检测主要依靠流式细胞仪分析技术,但目前测定树突状细胞的流式细胞仪分析方案多种多样,没有一个统一标准化的模式。这主要是由于树突状细胞的研究日新月异,发展一日千里,多个不同的树突状细胞亚型已被报导发现,目前针对树突状细胞的流式细胞仪分析方案未免粗放,已不能满足目前临床针对不同亚型的树突状细胞的精确分析要求。

[0003] 流式细胞仪(Flow cytometry)是对细胞进行自动分析和分选的装置。它可以快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量,并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分选出来。多数流式细胞计是一种零分辨率的仪器,它只能测量一个细胞的诸如总核酸量,总蛋白量等指标。流式细胞仪主要由四部分组成。它们是:流动室和液流系统;激光源和光学系统;光电管和检测系统;计算机和分析系统。

[0004] 流式细胞仪可同时进行多参数测量,信息主要来自特异性荧光信号及非荧光散射信号。测量是在测量区进行的,所谓测量区就是照射激光束和喷出喷孔的液流束垂直相交点。液流中央的单个细胞通过测量区时,受到激光照射会向立体角为 2π 的整个空间散射光线,散射光的波长和入射光的波长相同。散射光的强度及其空间分布与细胞的大小、形态、质膜和细胞内部结构密切相关,因为这些生物学参数又和细胞对光线的反射、折射等光学特性有关。未遭受任何损坏的细胞对光线都具有特征性的散射,因此可利用不同的散射光信号对不经染色活细胞进行分析和分选。经过固定的和染色处理的细胞由于光学性质的改变,其散射光信号当然不同于活细胞。散射光不仅与作为散射中心的细胞的参数相关,还跟散射角、及收集散射光线的立体角等非生物因素有关。

[0005] 在流式细胞光度术测量中,常用的是两种散射方向的散射光测量:①前向角(即0角)散射(FSC);②侧向散射(SSC),又称90角散射。这时所说的角度指的是激光束照射方向与收集散射光信号的光电倍增管轴向方向之间大致所成的角度。一般说来,前向角散射光的强度与细胞的大小有关,对同种细胞群体随着细胞截面积的增大而增大;对球形活细胞经实验表明在小立体角范围内基本上和截面积大小成线性关系;对于形状复杂具有取向性的细胞则可能差异很大,尤其需要注意。侧向散射光的测量主要用来获取有关细胞内部精细结构的颗粒性质的有关信息。侧向散射光虽然也与细胞的形状和大小有关,但它对细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感,也能对细胞质内较大颗粒给出灵敏反映。

[0006] 在实际使用中,仪器首先要对光散射信号进行测量。当光散射分析与荧光探针联合使用时,可鉴别出样品中被染色和未被染色细胞。光散射测量最有效的用途是从非均一的群体中鉴别出某些亚群。

[0007] 荧光信号主要包括两部分:①自发荧光,即不经荧光染色,细胞内部的荧光分子经光照射后所发出的荧光;②特征荧光,即由细胞经染色结合上的荧光染料受光照而发出的荧光,其荧光强度较弱,波长也与照射激光不同。自发荧光信号为噪声信号,在多数情况下会干扰对特异荧光信号的分辨和测量。在免疫细胞化学等测量中,对于结合水平不高的荧光抗体来说,如何提高信噪比是个关键。一般说来,细胞成分中能够产生的自发荧光的分子(例核黄素、细胞色素等)的含量越高,自发荧光越强;培养细胞中死细胞/活细胞比例越高,自发荧光越强;细胞样品中所含亮细胞的比例越高,自发荧光越强。

[0008] 减少自发荧光干扰、提高信噪比的主要措施是:①尽量选用较亮的荧光染料;②选用适宜的激光和滤片光学系统;③采用电子补偿电路,将自发荧光的本底贡献予以补偿。

[0009] 对于流式细胞仪常用的技术指标有荧光分辨率、荧光灵敏度、适用样品浓度、分选纯度、可分析测量参数等。流式细胞仪分析技术已成为免疫学和细胞生物学研究领域最主要的技术之一。

[0010] $CD1c^+$ 树突状细胞分布于人外周血中,是近年来新发现的一个树突状细胞亚群。临床和基础研究表明 $CD1c^+$ 树突状细胞亚群在多种疾病的发生中起重要作用。例如某些恶性肿瘤如肺癌,黑色素瘤,前列腺癌和肾癌,皮炎,某些病毒感染如HIV-1感染,某些传染病如疟疾感染以及一些自身免疫病如类风湿关节炎等,临床数据表明在这些疾病中 $CD1c^+$ 树突状细胞都显现出表型和功能的异常。因此 $CD1c^+$ 树突状细胞的表型和功能测定临床数据可成为临床医生判断上述疾病发展状况和临床治疗效果的辅助判断指标之一。具有十分重要的临床诊断意义。

[0011] CN105911292A公开了一种用于组合分析 $CD11c^+CD11b^+$ 树突状细胞亚群及其分化程度和功能的试剂盒,包含以下8种抗体: $CD11c$ 、 $CD80$ 、 $CD86$ 、 $CD11b$ 、 $HLA-DR$ 、 $IL-12$ 、 $IL-23$ 和 $IL-27$ 。该发明还提供了一种用于组合分析 $CD11c^+CD11b^+$ 树突状细胞亚群及其分化程度和功能的方法,可一次性地检测 $CD11c^+CD11b^+$ 树突状细胞亚群及其分化程度和功能的全套数据。但树突状细胞的形态、免疫功能不尽相同,其表面抗原分子数量众多,针对不同树突状细胞亚群需要选择不同的特异性检测分子。例如,研究表明 $CD11c+CD11b+DC$ 亚群的功能与 $CD1c+DC$ 亚群的功能完全不同,并且在不同的疾病中起用。因此,上述 $CD11c+CD11b+DC$ 亚群检测试剂盒不能满足研究 $CD1c+DC$ 亚群的需要。有鉴于此,研发提供一种用于鉴定 $CD1c^+$ 树突状细胞亚群表型和功能的免疫检测试剂盒具有重要意义。

发明内容

[0012] 针对现有技术的不足及实际的需求,本发明提供一种用于分析 $CD1c^+$ 树突状细胞亚群表型和功能的组合配方试剂盒及其应用,本发明的针对 $CD1c+DC$ 亚群的组合配方设计可高效快速地分析外周血中 $CD1c^+$ 树突状细胞亚群表型及其功能,保证准确率的同时降低因检测大量表面抗原分子导致的经济成本,且检测方法简单易行。

[0013] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0014] 第一方面,本发明提供一种用于分析 $CD1c^+$ 树突状细胞亚群表型和功能的组合配

方,所述分子组合配方设计包括CD1c、CD40、IL-6和IL-10。

[0015] 现有技术中通过流式细胞仪鉴定树突状细胞亚群通常需要分离提取外周血单核细胞,该过程复杂繁琐,时间周期长,若通过细胞分子表面抗原检测的方式分析细胞亚群则通常选择大量树突状细胞表面抗原分子进行检测,提高检测的准确性和特异性,但大量表面抗原的检测分析需要较长时间并提高了检测的经济成本,不利于快速高效地进行树突状细胞亚群分析研究。本发明通过特异性选择四个分子,即CD1c、CD40、IL-6和IL-10,该配方设计可以高特异性和灵敏度检测CD1c⁺树突状细胞亚群,为相关科学研究奠定基础。

[0016] 第二方面,本发明提供一种如第一方面所述的组合配方试剂盒,是用于分析CD1c⁺树突状细胞亚群表型和功能的产品。所述试剂盒包括CD1c、CD40、IL-6和IL-10的抗体,所述抗体由四种不同的荧光色素标记。

[0017] 目前市场上出售的关于树突状细胞测试的试剂盒只能笼统地分析总体树突状细胞的数据,且不包括功能分析。随着科学研究日新月异地发展,人外周血中多个DC新亚群,如CD1c⁺DC等已经被发现,他们的表型,功能各不相同,非常需要将它们分别列出,逐个加以研究。现有的分析方案显然满足不了如此需求。本发明的CD1c⁺DC表型及功能分析方案针对新近已被报道的人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群,并加入功能相关性细胞因子(CD40、IL-6和IL-10)。本发明的试剂盒则可以精细地提供人外周血已被报道的最新的CD1c⁺DC亚群及其功能的全套数据。

[0018] 优选地,所述荧光色素标记选自FITC、PE-Cy7、PerCP-Cy5.5、Amcyan、APC-Cy7或Q-Dot。

[0019] 第三方面,本发明提供一种鉴定CD1c⁺树突状细胞亚群表型和功能的方法,所述方法采用如第一方面所述的组合配方设计或如第二方面所述的试剂盒进行检测,所述方法包括如下步骤:

[0020] (1) 外周血的预处理,分离出树突状细胞,加入白细胞刺激因子孵育;

[0021] (2) 将步骤(1)得到的血细胞染色,然后加入不同荧光色素标记的CD40和CD1c抗体进行首次孵育,再次染色,然后将得到的树突状细胞用福尔马林溶液固定,再次孵育备用;

[0022] (3) 将步骤(2)所得细胞重悬于细胞穿透液,离心弃上清,将沉淀的细胞重悬于细胞穿透液,加入不同荧光色素标记的IL-6和IL-10抗体孵育;

[0023] (4) 将步骤(3)孵育好的细胞重悬于细胞穿透液,离心去上清,将沉淀细胞重悬于细胞染色液,用流式细胞仪进行分析检测。

[0024] 本方法采用人体全血一步法测定人外周血树突状细胞亚群及其功能,较之先前用分离外周血单核细胞(PBMC)法测定DC的繁琐步骤来说,要简便易行得多,节约大量人力,物力和财力。用传统的PBMC法分离DC,需要较大的采血量(通常几十毫升不等),消耗时间长,而我们采用全血测定,只需患者一滴血(10-100μl)即可得到我们所需的全套信息。省却了分离PBMC的大量时间,做到简单,快速一步测定到位。适合临床大批量样品的测试。

[0025] 优选地,步骤(1)所述外周血的体积为10-100μL,例如可以是10μL、20μL、30μL、40μL、50μL、60μL、70μL、80μL、90μL或100μL。

[0026] 优选地,所述白细胞刺激因子的体积浓度为0.1%-0.3%,例如可以是0.1%、0.2%或0.3%。

[0027] 优选地,步骤(1)所述孵育的时间为4-6h,例如可以是5.5h或6h。

- [0028] 优选地,步骤(1)所述孵育的温度为37-40℃,例如可以是37℃、38℃、39℃或40℃。
- [0029] 优选地,步骤(2)所述首次孵育的条件为室温下30-60min,例如可以是30min、40min、50min或60min。
- [0030] 优选地,步骤(2)所述福尔马林溶液的质量分数为2-4%,例如可以是2%、3%或4%。
- [0031] 优选地,步骤(2)所述再次孵育的条件为室温避光条件下15-20min,例如可以是15min、16min、17min、18min、19min或20min。
- [0032] 优选地,步骤(3)所述孵育的条件为4℃避光条件下12-24h或者室温30min。
- [0033] 优选地,所述分析检测包括如下步骤:通过CD1c的表达情况分析树突状细胞亚群表型CD1c⁺的比例,通过CD40分子的表达情况分析CD1c⁺树突状细胞亚群的分化成熟状况,通过IL-6和IL-10的分泌表达情况分析CD1c⁺树突状细胞亚群的功能。
- [0034] 作为本发明的优选技术方案,所述方法具体包括如下步骤:
- [0035] (1)取10-100μL外周血抗凝处理,外周血全血混合1×红细胞裂解液中,旋转震荡10s后,室温避光静置15min,350g离心5min,弃上清,将沉淀细胞重悬于细胞染色液,按照0.08-0.1%体积浓度的比例加入白细胞刺激因子37℃孵育4-6h;
- [0036] (2)将步骤(1)得到的血细胞染色,然后加入不同荧光色素标记的CD40和CD1c抗体进行室温孵育30min,再次染色,然后将得到的树突状细胞用2%的福尔马林溶液固定,室温避光孵育15min备用;
- [0037] (3)将步骤(2)所得细胞重悬于细胞穿透液,离心弃上清,将沉淀的细胞重悬于细胞穿透液,加入不同荧光色素标记的IL-6和IL-10抗体,在4℃避光条件下孵育12h;
- [0038] (4)将步骤(3)孵育好的细胞重悬于细胞穿透液,离心去上清,将沉淀细胞重悬于细胞染色液,用流式细胞仪进行分析检测,通过CD1c的表达情况分析树突状细胞亚群表型CD1c⁺的比例,通过CD40分子的表达情况分析CD1c⁺树突状细胞亚群的分化成熟状况,通过IL-6和IL-10的分泌表达情况分析CD1c⁺树突状细胞亚群的功能。
- [0039] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:
- [0040] (1)快速简便易行:本方法采用人体全血一步法测定人外周血树突状细胞亚群及其功能,较之先前用分离外周血单核细胞(PBMC)法测定DC的繁琐步骤来说,要简便易行得多,节约大量人力,物力和财力。用传统的PBMC法分离DC,需要较大的采血量(通常几十毫升不等),消耗时间长,而我们采用全血测定,只需患者一滴血(10-100μl)即可得到我们所需的全套信息。省却了分离PBMC的大量时间,做到简单,快速一步测定到位。适合临床大批量样品的测试;
- [0041] (2)信息的全面性:目前市场上出售的关于树突状细胞测试的试剂盒只能笼统地分析总体树突状细胞的数据,随着科学研究日新月异地发展,人外周血中多个树突状细胞新亚群如CD1c⁺树突状细胞等已经被发现,他们的表型,功能各不相同,非常需要将它们分别列出,逐个加以研究。现有的分析方案显然满足不了如此需求。我们设计的CD1c⁺树突状细胞表型及功能分析方案针对新近已被报道的人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群,并加入功能相关性细胞因子(CD40、IL-6和IL-10),使我们能够一次性测定CD1c⁺树突状细胞表型及其功能;
- [0042] (3)准确性:流式细胞仪分析技术是免疫学会和细胞生物学领域的高精尖技术,相

较其它技术具有灵明度高,特异性好的优点。我们的分析方案建立在这一先进分析技术基础之上,使我们的结果更加准确可靠;

[0043] (4) 创新性:目前市场上销售的树突状细胞(DC)分析试剂盒分析方案只能测试总体DC的数据,且不包括功能分析。而基于我们设计的方案的研发试剂盒则可以精细地提供人外周血已被报道的最新的CD1c⁺DC亚群及其功能的全套数据,相较于先前已开发的方案,我们首次把CD1c⁺DC表型与功能相结合来进行测试。

附图说明

- [0044] 图1为实施例中CD40在肺小细胞癌病人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例;
[0045] 图2为实施例中IL-6在肺小细胞癌病人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例;
[0046] 图3为实施例中IL-10在肺小细胞癌病人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例;
[0047] 图4为实施例中CD40在健康人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例;
[0048] 图5为实施例中IL-6在健康人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例;
[0049] 图6为实施例中IL-10在健康人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例;

具体实施方式

[0050] 为更进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案,但本发明并非局限在实施例范围内。

[0051] 实验材料

[0052] 流式细胞仪(BD,C6);

[0053] 抗人CD1c,CD40,IL-6抗体(Biolegend) IL-10抗体(BD)。

[0054] 实施例1非小细胞肺癌病人/健康人外周血的预处理

[0055] 预处理步骤如下:

[0056] (1) 分别取非小细胞肺癌病人和健康成年人静脉外周血1滴(10-100μl),并进行抗凝处理;

[0057] (2) 将外周血全血混合于2毫升1×红细胞裂解液(Biolegend)中,旋转震荡10秒后,室温避光静置15分钟;

[0058] (3) 用离心机离心(350g×5分钟),倾倒上清液,然后将沉淀细胞悬浮于2毫升细胞染色液(含2.5%胎牛血清的PBS溶液)中;

[0059] (4) 以0.1%浓度比例加入白细胞刺激因子(BD)在37度恒温孵育细胞6小时备用。

[0060] 实施例2非小细胞肺癌病人外周血/健康人CD1c⁺树突状细胞亚群发育分化程度分析

[0061] 将备用血细胞离心(350g) 5分钟,倾倒上清液,然后细胞悬浮于100μl细胞染色液中。然后各加入2μl抗人CD1c、CD40抗体(Biolegend),室温孵育30分钟,然后加2毫升细胞染色液,(350g)重复离心两次,每次5分钟。倾倒上清液后,用2毫升2%福尔马林溶液固定细胞,室温避光孵育20分钟备用。

[0062] 实施例3非小细胞肺癌病人/健康人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群功能分析

[0063] (1) 将固定好的备用细胞悬浮于2毫升细胞穿透液(Biolegend)中,然后重复离心(350g) 10分钟两次;

[0064] (2) 将离心后的沉淀细胞重新悬浮于100 μ l细胞穿透液中,然后各加2 μ l IL-6 (Biolegend) 和IL-10抗体(BD),在室温避光孵育30分钟;

[0065] (3) 孵育好的细胞悬浮于2毫升细胞穿透液中,然后重复离心(350g) 5分钟两次;

[0066] (4) 最后,倾倒入清液,将沉淀细胞重新悬浮于0.5毫升细胞染色液中,用流式细胞仪分析测试。

[0067] 检测和结果分析

[0068] 1、采用流式细胞仪检测共信号刺激分子CD40在人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群上的表达状况,(此数据用于评估人外周血CD1c⁺树突状细胞亚群的分化成熟状况);

[0069] 2、人外周血CD1c⁺树突状细胞功能分析:测定细胞因子IL-6和IL-10在CD1c⁺树突状细胞中的分泌表达情况(用%比表示),结果见图1-6,其中肺小细胞癌病人CD1c⁺树突状细胞中CD40、IL-6、IL-10的表达情况分别见图1-3,健康人CD1c⁺树突状细胞中CD40、IL-6、IL-10的表达情况分别见图4-6。

[0070] 由图1-3可知,CD40、IL-6、IL-10在非小细胞肺癌病人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例分别为5.45%、2.22%和7.4%,而CD40、IL-6、IL-10在健康人CD1c⁺树突状细胞上的表达比例分别为96.9%、27.3%和3.19%,证明本发明的分子组合物以及鉴定方法可以有效鉴别外周血中的CD1c⁺树突状细胞亚群,并分析其分化成熟情况以及功能。例如,已知如果DC表面CD40表达越高,则表明DC的分化成熟度越高,我们的结果表明,健康人的DC表面CD40的表达明显多于肺癌病人的(图1和图4),表明肺癌病人体内的CD1c⁺DC的分化成熟程度显著低于健康人体内的CD1c⁺DC;又比如,IL-6是一个促进免疫反应的细胞因子,如果DC能分泌较多的IL-6,表明DC能够通过分泌较多的IL-6来促进免疫反应,我们的结果显示正常健康人CD1c⁺DC分泌的IL-6显著多于肺癌病人CD1c⁺DC分泌的IL-6(图2和图5),这表明肺癌病人体内的CD1c⁺DC通过分泌IL-6来加强免疫反应的能力不如健康人的强。这是提示肺癌病人体内的CD1c⁺DC介导的免疫功能低下的一个标志。而与此相反,IL-10是一个能抑制免疫功能的细胞因子,DC如果分泌较多的IL-10,表明DC具有免疫抑制功效,能够通过分泌较多的IL-10来抑制免疫反应,我们的结果表明:肺癌病人体内的CD1c⁺DC恰恰比正常健康人的CD1c⁺DC分泌较多的IL-10(图3和图6),这表明肺癌病人体内的CD1c⁺DC能比健康人的CD1c⁺DC通过分泌更多的IL-10来抑制免疫功能,肺癌病人体内的CD1c⁺DC相较于健康人体内的CD1c⁺DC是一种具有免疫抑制功能的DC。

[0071] 综上所述,本发明的检测方案能够高效快速比较非小细胞肺癌病人与健康人外周血CD1c⁺DC的发育分化差异以及功能差异;本发明的方法采用人体全血一步法测定人外周血树突状细胞亚群及其功能,较传统的分离PBMC法更加简便易行,节约了大量人力、物力和财力,只需患者一滴血(10-100 μ l)即可得到所需的全套信息,省却了分离PBMC的大量时间,做到简单、快速一步测定到位,适合临床大批量样品的测试。

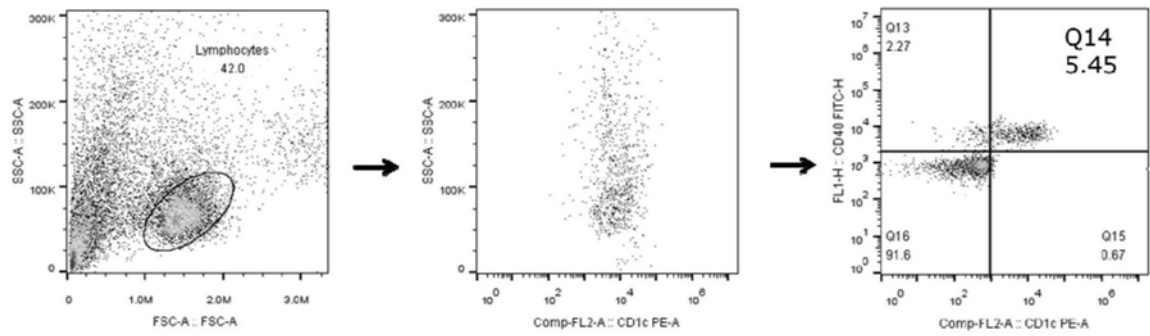


图1

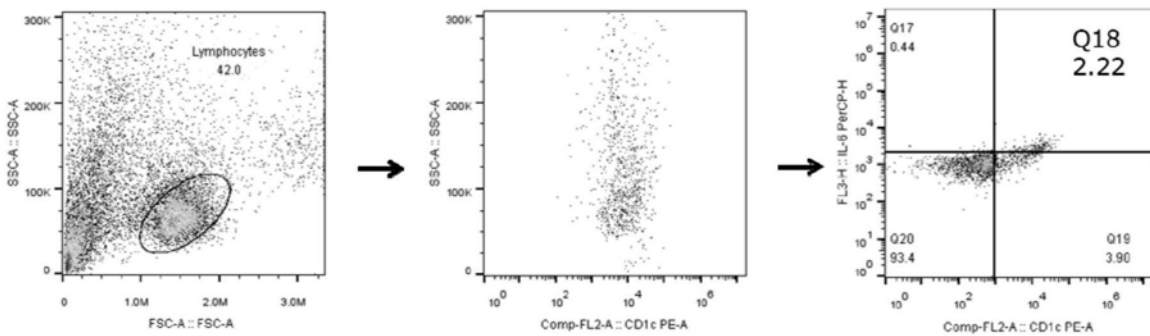


图2

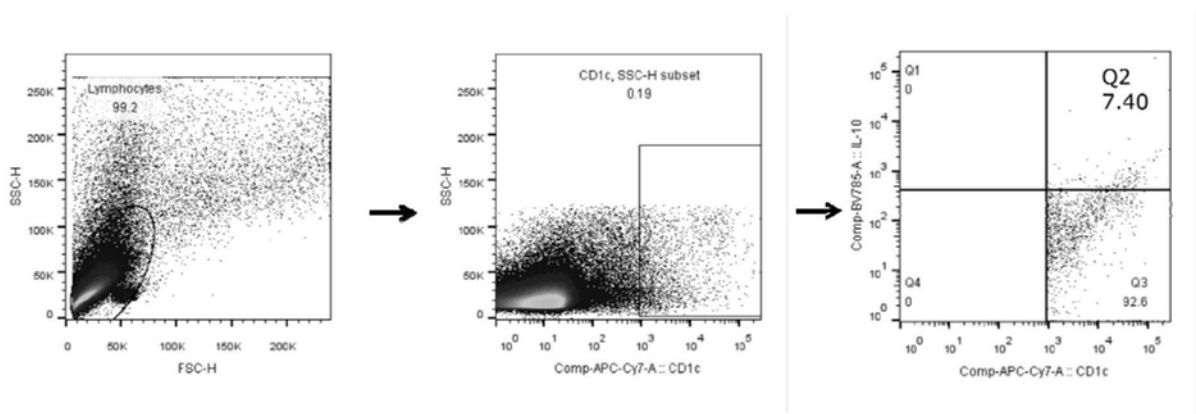


图3

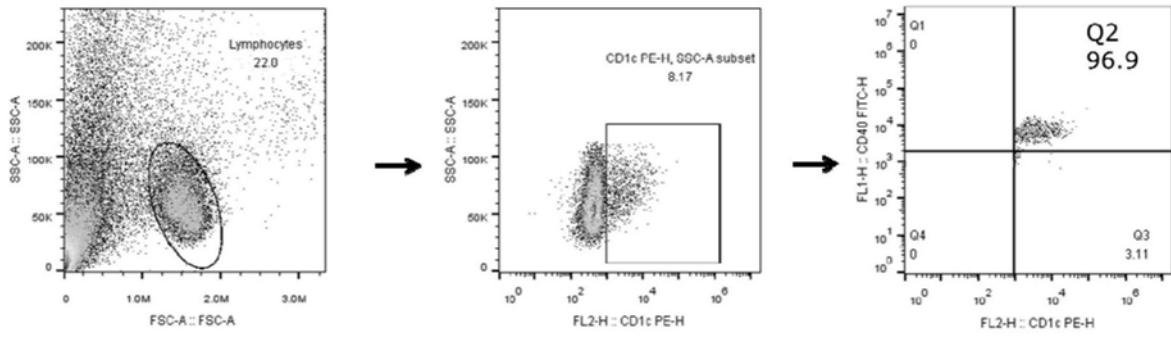


图4

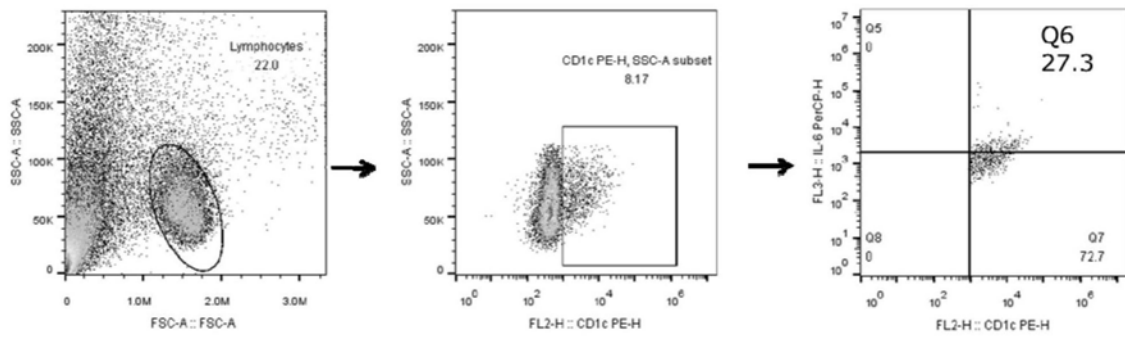


图5

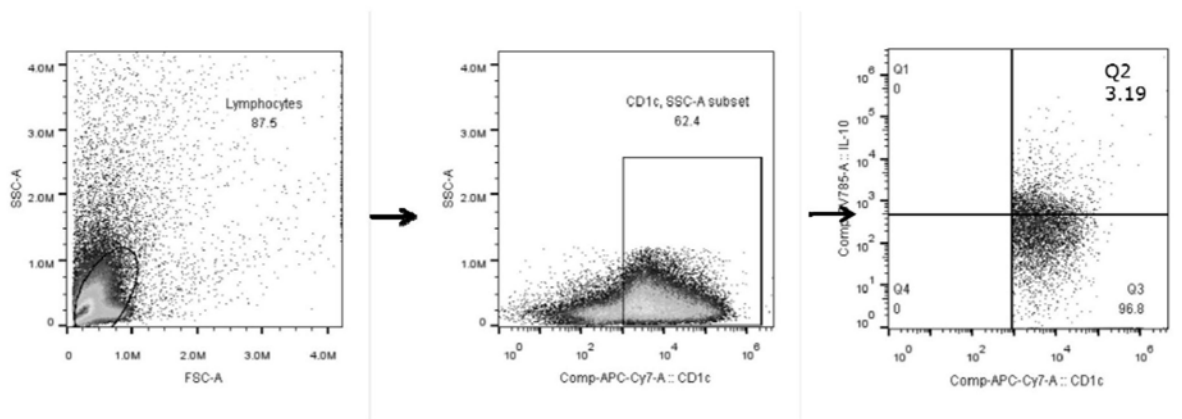


图6