



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105223361 A

(43) 申请公布日 2016.01.06

(21) 申请号 201510540898.6

G01N 1/30(2006.01)

(22) 申请日 2015.08.28

G01N 1/38(2006.01)

(71) 申请人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11 号

(72) 发明人 刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐
袁晓英 黄晓军

(74) 专利代理机构 石家庄众志华清知识产权事
务所(特殊普通合伙) 13123

代理人 墨伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

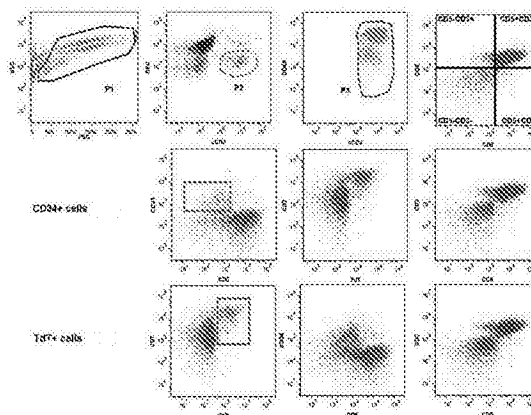
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的
试剂盒、应用及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒、应用及方法,属于生物医药领域,采取的技术方案是:一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒,该试剂盒的应用基于流式细胞仪,所述试剂盒中配置了针对包括下述物质的单克隆抗体:TdT、cCD3、CD34、CD5、CD7、mCD3 和 CD45,所述抗体分别带有荧光标记。本发明还提供了上述试剂盒在制备诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产品中的应用。采用本发明产生的有益效果在于:(1) 采用本发明的试剂盒可快速、准确地对所有 T-ALL 患者微量 LBTC 的抗原表达进行分析及定量;(2) 采用本试剂盒提供的设门方法及多个抗原标志综合评判,特异度高,敏感度高。



1. 一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒, 该试剂盒的应用基于流式细胞仪, 其特征在于, 所述试剂盒中配置了针对包括下述物质的单克隆抗体: TdT、cCD3、CD34、CD5、CD7、mCD3 和 CD45, 所述抗体分别带有荧光标记。

2. 根据权利要求 1 所述的检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒, 其特征在于, 所述针对 TdT、cCD3、CD34、CD5、CD7、mCD3 和 CD45 的单克隆抗体依次带有下列荧光标记: FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7 和 Pacific Blue。

3. 根据权利要求 1 所述的检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中还包括红细胞溶解液和包含细胞固定液、破膜液的固定 / 破膜剂。

4. 权利要求 1-3 任一所述的试剂盒在制备诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产物中的应用。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒在制备诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产物中的应用, 其特征在于, 应用时对样本依次进行下列预处理步骤:

① 将样本与 CD34-PerCP-Cy5.5、CD5-PE-Cy7、CD7-APC、mCD3-APC-Cy7 和 CD45-Pacific Blue 混匀后避光室温孵育 10-20 分钟, 得混合液 I;

② 向混合液 I 加入红细胞溶解液, 混匀后避光, 室温放置 5-10 分钟, 以 1000-2000 转 / 分、离心 5-10 分钟, 弃上清, 向沉淀中加入细胞固定液, 混匀后避光孵育 10-20min;

③ 加入 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液, 混匀, 1000-2000 转 / 分、离心 5-10 分钟, 弃上清, 向沉淀中加入破膜液, 同时加入 TdT-FITC 和 cCD3-PE, 混匀, 避光孵育 5-10 分钟;

④ 加入含血清 0.5%~2% 的 PBS 缓冲液, 混匀, 1000-2000 转 / 分离心 5-10 分钟, 弃上清, 向沉淀中加入的 PBS 缓冲液, 混匀即得待测样本。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒在制备诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产物中的应用, 其特征在于, 所述待测样本采用流式细胞仪进行测试, 并借助分析软件按下列步骤分析数据:

① 先建立 FSC/SSC 密度图, 将有核细胞区域设门标记为 P1;

② 对 P1 内细胞建立 cCD3/SSC 二维散点图, 将 cCD3+SSC 小细胞设门标记为 P2;

③ 对 P2 门内细胞建立 CD45/cCD3 二维散点图, 将 cCD3+CD45+/dim+ 细胞设门标记为 P3;

④ 对 P3 门内细胞建立 CD34/CD5、TdT/CD7 和 CD5/mCD3 二维散点图, 分别显示各群细胞的比例及 CD34+ 和 TdT+ 细胞在有核细胞中的比例, 比较 CD34、TdT、CD7、CD5 和 mCD3 的荧光表达强度与正常 T 细胞的表达强度。

7. 一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的方法, 基于流式细胞仪, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

(1) 对样本依次进行下列预处理:

① 将样本与 CD34-PerCP-Cy5.5、CD5-PE-Cy7、CD7-APC、mCD3-APC-Cy7 和 CD45-Pacific Blue 混匀后避光室温孵育 10-20 分钟, 得混合液 I;

② 向混合液 I 加入红细胞溶解液, 混匀后避光, 室温放置 5-10 分钟, 以 1000-2000 转 / 分、离心 5-10 分钟, 弃上清, 向沉淀中加入固定 / 破膜剂中细胞固定液, 混匀后避光孵育 10-20min;

③ 加入 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液, 混匀, 1000-2000 转 / 分、离心 5-10 分钟, 弃上

清,向沉淀中加入破膜液,同时加入 TdT-FITC 和 cCD3-PE,混匀,避光孵育 5-10 分钟;

④ 加入含血清 0.5%~2% 的 PBS 缓冲液,混匀,1000-2000 转 / 分离心 5-10 分钟,弃上清,向沉淀中加入 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液,混匀即得待测样本;

(2) 所述待测样本采用流式细胞仪进行测试,并借助分析软件按下述步骤分析数据:

① 先建立 FSC/SSC 密度图,将有核细胞区域设门标记为 P1;

② 对 P1 内细胞建立 cCD3/SSC 二维散点图,将 cCD3+SSC 小细胞设门标记为 P2;

③ 对 P2 门内细胞建立 CD45/cCD3 二维散点图,将 cCD3+CD45+/dim+ 细胞设门标记为 P3;

④ 对 P3 门内细胞建立 CD34/CD5、TdT/CD7 和 CD5/mCD3 二维散点图,分别显示各群细胞的比例及 CD34+ 和 TdT+ 细胞在有核细胞中的比例,比较 CD34、TdT、CD7、CD5 和 mCD3 的荧光表达强度与正常 T 细胞的表达强度。

一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒、应用及方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及细胞表型确认的专用试剂盒,具体涉及一种用于分析急性 T 淋巴细胞白血病的白血病幼稚 T 细胞(leukemic blastic T cell, LBTC)表型的试剂盒、应用及方法。

背景技术

[0002] 急性 T 淋巴细胞白血病(T-lineage acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)在儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)和成人 ALL 中分别占 15% 和 25%,异质性大。随着治疗方案的优化,儿童 ALL 的诱导缓解率和长期生存率得到了显著提高,但 T-ALL 的预后仍然较差;成人 ALL 总体的 5 年无事件生存仅在 30% 左右,而 T-ALL 的长期生存更差。由于目前微小残留检测水平有限,复发成为 T-ALL 患者治疗失败的主要原因,也是影响长期生存的重要问题,复发后的患者,即使加强化疗或进行造血干细胞移植等挽救措施,预后仍然较差,多数患者因此而丧生。

[0003] T-ALL 是一种骨髓中幼稚 T 细胞恶性增长的疾病, T 细胞分化发育的主要场所是胸腺,正常机体胸腺内可见不同发育阶段的 T 细胞,胸腺内早期幼稚 T 细胞表达 CD34、TdT、CD7 和胞浆 CD3(cCD3),CD45 表达较弱,胞膜 CD3(mCD3) 阴性,随着细胞成熟,CD34 和 TdT 相继消失,CD45 表达增强,mCD3 转为阳性;骨髓中的正常 T 细胞为成熟 T 细胞,表型为 CD45^{str}+cCD3+CD7+mCD3+CD5+TdT-CD34-,CD34+ 和 TdT+ 的幼稚 T 细胞比例极低。T-ALL 患者主要表现为骨髓或外周血中幼稚 T 细胞明显增加,常伴早期抗原 CD34 和 TdT 表达、mCD3 多为阴性或弱表达、CD5 阴性或弱表达、CD4 和 CD8 双阴或双阳等,与成熟 T 细胞表型有明显差别,这些标志均是 LBTC 相关免疫表型特点,用以区别正常 T 细胞。LBTC 表型还可出现:抗原不同步表达(如 mCD3 和 CD2 同时弱阳性)、抗原系列不保真(髓系抗原 CD13 和 CD33 阳性)、抗原表达缺失(如 CD2 阴性)或抗原表达强度改变(如 CD7 强表达、CD45 弱表达)等。

[0004] 由于发病率较低,有关初诊及治疗后 T-ALL 患者的检测报道较少,且多是采用三色或四色抗体组合,在检测治疗后 ALL-T 幼稚细胞时国际上普遍根据初诊时的免疫表型,设计治疗后检测的抗体,一般采用 3-4 管 3 色或 4 色抗体组合,如果没有初诊时的免疫表型,则无法利用较少的抗体组合进行治疗后白血病细胞的检测。而国内部分患者由于初诊时就诊医院的医疗条件较差,没有进行全面的抗原检测,缺乏初诊时免疫表型资料,对此类患者,按照国际上的惯例则不能利用较少的抗体进行检测,需按照初诊时检测免疫表型的方法,使用多种抗体对患者进行全面的抗原分析,费用较高。

[0005] 另一方面,早期文献报道,胸腺中的幼稚 T 细胞出现在骨髓或外周血时,称为异位性表达。胸腺中早期幼稚 T 细胞表达 CD34 和 / 或 TdT,当时依据的主要抗原是 TdT 和 CD7,因此认为当骨髓或外周血中 TdT+CD7+ 幼稚 T 细胞比例增高时,则为微小残留病阳性,但对于 T-ALL 治疗后骨髓中 CD34+TdT+cCD3+ 的 T 细胞比例增高的样本,其是否是 LBTC、是否说明白血病细胞增加还是非特异性结合尚不清楚。因此,对治疗后患者检测 LBTC 时,如何准

确、快速、简单的对非特异结合的细胞进行排除性鉴别也是本领域的难题之一。

[0006] 可见,开发具有疾病特异性的、较少量抗体组合的试剂,广泛适用于初诊患者,同时对于多数治疗后 T-ALL 患者、T-ALL L 复诊患者,可不依赖于初诊时的免疫分型资料,鉴别 LBTC 对本领域技术的进步具有重要意义。

发明内容

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒、应用及方法,利用该试剂盒中的专用试剂和配套使用方法、借助七色流式细胞仪的辅助,可以快速、准确地分析 T-ALL 患者 LBTC 的抗原表达,对 T-ALL 患者体内异常幼稚 T 细胞快速、准确分类,还可作为组成用于制备诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产品。

[0008] 本发明采取的技术方案是:

一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的试剂盒,该试剂盒的应用基于流式细胞仪,所述试剂盒中配置了针对包括下述物质的单克隆抗体:TdT、cCD3、CD34、CD5、CD7、mCD3 和 CD45,所述抗体分别带有荧光标记。

[0009] 优选的,所述针对 TdT、cCD3、CD34、CD5、CD7、mCD3 和 CD45 的单克隆抗体依次带有下述荧光标记:FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7 和 Pacific Blue。

[0010] 优选的,所述试剂盒中还包括红细胞溶解液和和包含细胞固定液、破膜液的固定/破膜剂。

[0011] 本发明还提供上述试剂盒在制备诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产品中的应用,对样本依次进行下述预处理步骤:

① 将样本与 CD34-PerCP-Cy5.5、CD5-PE-Cy7、CD7-APC、mCD3-APC-Cy7 和 CD45-Pacific Blue 混匀后避光室温孵育 10-20 分钟,得混合液 I;

② 向混合液 I 加入红细胞溶解液,混匀后避光,室温放置 5-10 分钟,以 1000-2000 转/分、离心 5-10 分钟,弃上清,向沉淀中加入细胞固定液,混匀后避光孵育 10-20min;

③ 加入 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液,混匀,1000-2000 转/分、离心 5-10 分钟,弃上清,向沉淀中加入破膜液,同时加入 TdT-FITC 和 cCD3-PE,混匀,避光孵育 5-10 分钟;

④ 加入含血清 0.5%~2% 的 PBS 缓冲液,混匀,1000-2000 转/分离心 5-10 分钟,弃上清,向沉淀中加入 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液,混匀即得待测样本。

[0012] 优选的,所述待测样本采用流式细胞仪进行测试,并借助分析软件按下述步骤分析数据:

①先建立 FSC/SSC 密度图,将有核细胞区域设门标记为 P1;

②对 P1 内细胞建立 cCD3/SSC 二维散点图,将 cCD3+SSC 小细胞设门标记为 P2;

③对 P2 门内细胞建立 CD45/cCD3 二维散点图,将 cCD3+CD45+/dim+ 细胞设门标记为 P3;

④对 P3 门内细胞建立 CD34/CD5、TdT/CD7 和 CD5/mCD3 二维散点图,分别显示各群细胞的比例及 CD34+ 和 TdT+ 细胞在有核细胞中的比例,比较 CD34、TdT、CD7、CD5 和 mCD3 的荧光表达强度与正常 T 细胞的表达强度。

[0013] 本发明还提供了一种检测急性 T 淋巴细胞白血病幼稚 T 细胞的方法,基于流式细胞仪,所述方法包括以下步骤:

(1) 对样本依次进行下述预处理：

① 将样本与 CD34-PerCP-Cy5.5、CD5-PE-Cy7、CD7-APC、mCD3-APC-Cy7 和 CD45-Pacific Blue 混匀后避光室温孵育 10-20 分钟，得混合液 I；

② 向混合液 I 加入红细胞溶解液，混匀后避光，室温放置 5-10 分钟，以 1000-2000 转 / 分、离心 5-10 分钟，弃上清，向沉淀中加入固定 / 破膜剂中细胞固定液，混匀后避光孵育 10-20min；

③ 加入 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液，混匀，1000-2000 转 / 分、离心 5-10 分钟，弃上清，向沉淀中加入破膜液，同时加入 TdT-FITC 和 cCD3-PE，混匀，避光孵育 5-10 分钟；

④ 加入含血清 0.5%~2% 的 PBS 缓冲液，混匀，1000-2000 转 / 分离心 5-10 分钟，弃上清，向沉淀中加入 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液，混匀即得待测样本；

(2) 所述待测样本采用流式细胞仪进行测试，并借助分析软件按下述步骤分析数据：

① 先建立 FSC/SSC 密度图，将有核细胞区域设门标记为 P1；

② 对 P1 内细胞建立 cCD3/SSC 二维散点图，将 cCD3+SSC 小细胞设门标记为 P2；

③ 对 P2 门内细胞建立 CD45/cCD3 二维散点图，将 cCD3+CD45+/dim+ 细胞设门标记为 P3；

④ 对 P3 门内细胞建立 CD34/CD5、TdT/CD7 和 CD5/mCD3 二维散点图，分别显示各群细胞的比例及 CD34+ 和 TdT+ 细胞在有核细胞中的比例，比较 CD34、TdT、CD7、CD5 和 mCD3 的荧光表达强度与正常 T 细胞的表达强度。

[0014] 上述技术方案中，本发明提供的试剂盒利用较少的抗体数量设计合适的抗体组合，提供一组七色抗体组合，在七色流式细胞仪的基础上，运用本发明提供的方法，在一个样本只需在同一试管中处理，特异性的设门分析，即可对 LBTC 的抗原表达情况综合的、准确的分析，可有效鉴别正常 T 细胞、微量的幼稚 T 细胞及非特异性结合，所述七色抗体组合可对所有初诊和复发 T-ALL 患者 LBTC 上的抗原表达进行鉴别并定量，适用于所有形态学完全缓解的 T-ALL 患者。本发明提供上述试剂盒在制备诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产物中的应用，作为诊断急性 T 淋巴细胞白血病的产物中的一种组成。

[0015] 采用本发明产生的有益效果在于：(1) 采用本发明的试剂盒可对一个样本只用一个试管就快速、准确地对 LBTC 的抗原表达进行分析及定量；(2) 该试剂盒广泛适用于所有 T-ALL 患者的微量 LBTC 分析；(3) 采用本试剂盒提供的设门方法及多个抗原标志综合评判，特异度高，敏感度高；(4) 所需样本量少，即可得到检测结果，时间、成本都有效降低。

附图说明

[0016] 图 1 是采用本发明试剂盒对 T-ALL 患者 LBTC 的抗原表达进行设门分析；

图 2 是初诊 T-ALL 患者 T 细胞抗原表达的阳性比例。

具体实施方式

[0017] 本发明提供一种检测急性 T 淋巴细胞白血病中 LBTC 抗原表达的试剂盒，其包括针对下列抗原表型的单克隆抗体：TdT、cCD3、CD34、CD5、CD7、mCD3 和 CD45，依次分别带有下述荧光标记：FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7 和 Pacific Blue，各单克隆抗体的荧光标记及成分等信息见下表 1。

[0018] 表 1 单克隆抗体信息

名称	荧光标记	成分	克隆	产品目录号	公司
TdT	FITC	Mouse IgG1	TdT-6	MHTDT015	Invitrogen
cCD3	PE	Mouse IgG1	UCHT1	555333	BD Pharmingen
CD34	PerCP-Cy5.5	Mouse IgG1	581	343522	Biolegend
CD5	PE-Cy7	Mouse IgG1	UCHT2	300622	Biolegend
CD7	APC	Mouse IgG2a	CD7-6B7	343108	Biolegend
mCD3	APC-Cy7	Mouse IgG2a	HIT3a	300318	Biolegend
CD45	Pacific Blue	Mouse IgG1	HI30	304022	Biolegend

[0019] 上述试剂盒中还可以包括红细胞溶解液和细胞的固定 / 破膜剂, 本实施例选用购于 BD 公司的红细胞溶解液 (10×, 货号 :555899) 和购于 Multisciences 公司的固定 / 破膜剂 (货号 :GAS006, 包括 A 液 20ml 和 B 液 20ml, A 液作用为固定细胞, B 液用于破膜, 使抗体顺利进入胞内, 并使细胞形态仍然保存完整), 另配制 pH 为 7.2~7.4 的 10×PBS 缓冲液, 10× PBS 缓冲溶液的配制方法如下: 称取 26.3g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3.0g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 85.0g NaCl, 加水至 1L, 搅拌均匀。

[0020] 采用本发明的试剂盒对 T-ALL 患者骨髓 T 细胞的抗原表达进行分析测定的步骤如下:

步骤一、试剂的制备

1、以蒸馏水:10× PBS 缓冲液按照体积比 9:1 混合, 将 10× PBS 缓冲液稀释为 PBS 缓冲液, pH 为 7.2~7.4, 备用;

2、以体积比计, 将 10× 红细胞溶解液用 PBS 缓冲液稀释 10 倍, 得 1× 红细胞溶解液, 备用;

3、向 PBS 缓冲液中加入小牛血清和 NaN_3 , 使血清终浓度为 0.5%~2% (体积比)、 NaN_3 终浓度为 0.1% (质量比), 得含血清 0.5%~2% 的 PBS 缓冲液, 4℃ 保存;

步骤二、待测样本的制备

1、取一支洁净的流式细胞仪专用试管, 向该试管中分别加入 CD34-PerCP-Cy5.5 2.5 μL、CD5-PE-Cy7 2.5 μL、CD7-APC 10 μL、mCD3-APC-Cy7 2.5 μL 和 CD45-Pacific Blue 2.5 μL, 再加入 150 μL 骨髓样本 (含 1×10^6 个细胞), 轻轻混匀, 室温 (环境温度保持在 22℃ 左右) 避光孵育 15 分钟;

2、向试管中加入 1× 红细胞溶解液 2mL, 混匀后避光, 室温放置 8 分钟, 溶解红细胞;

3、将试管放入离心机, 以 1500 转 / 分、离心 8 分钟, 弃上清液, 向试管中加入固定 / 破膜剂中 A 液 100 μL, 震荡混匀, 避光孵育 15min;

4、加入 PBS 缓冲液 500 μL, 混匀, 再放入离心机, 以 1500 转 / 分、离心 8 分钟, 弃上清

液,向试管中加入破膜剂中 B 液 100 μ L,并同时加入 5 μ L TdT-FITC 和 5 μ L cCD3-PE,轻微混匀,避光孵育 15min;

5、加入 2mL 含血清 0.5%~2% 的 PBS 缓冲液,混匀,放入离心机,以 1500 转/分离心 8 分钟,弃上清液,将未结合的游离抗体去除,再向试管中加入 300 μ L PBS 缓冲液,混匀即得待测样本。

[0021] 步骤三、采用流式细胞仪进行检测

按照流式细胞仪的操作规程,对步骤二中制备的待测样本进行测试,获取 750,000 个有核细胞;用流式细胞仪分析软件进行数据分析。

[0022] 参见附图 1,设门分析过程如下:

①先建立 FSC/SSC 密度图,将有核细胞区域划为 P1,以排除死细胞和细胞碎片;②对 P1 细胞显示 cCD3/SSC 散点图,将 cCD3+SSC 小细胞划为 P2,初步选定 T 细胞;③对 P2 门内细胞显示 CD45/cCD3 散点图,将 cCD3+CD45+/dim+ 细胞划为 P3;④对 P3 内细胞显示 CD34/CD5、TdT/CD7 和 CD5/mCD3 图,分别显示各群细胞的比例及 CD34⁺和 TdT⁺细胞在有核细胞中的比例,比较 CD34、TdT、CD7、CD5 和 mCD3 的荧光表达强度与正常 T 细胞的表达情况。

[0023] 数据说明:计算抗原表达的阳性比例,<20% 定义为阴性(-), $\geq 20\%$ 为阳性(+),其中 20%~60% 和 $\geq 60\%$ 分别定义为部分表达(1+)和全部阳性(2+);以正常 T 细胞的抗原表达强度为标准,当白血病细胞的抗原表达比正常 T 细胞抗原表达强的定义为强表达(str+),反之为弱表达(dim+)。初诊和复发患者的 LBTC 异常表型及所涉及的异常抗原表达情况见表 3 及表 4。

[0024] 采用上述方法,对收集的 1146 份样本进行 LBTC 抗原表达分析,样本来自 2001 年 11 月-2013 年 3 月在北京大学人民医院、北京大学血液病研究所收治的 112 例初诊 T-ALL 患者,中位年龄 20(1.5-83) 岁,共 112 份样本;2010 年 1 月-2013 年 2 月期间治疗后的 T-ALL 患者 140 例,中位年龄 22(2-61) 岁,其中包括复发患者 44 例,106 份样本,治疗后患者在不同时期分别采集有多个样本。

[0025] 1. 初诊及复发 T-ALL 患者的 LBTC 抗原表达比例分析

首先,分析 112 例初诊和 44 例复发 T-ALL 患者的抗原表达特点,结果见表 2,所有患者全部表达 CD45 和 cCD3,几乎全部患者表达 CD7,大部分患者表达 CD5,50% 以上的患者表达早期抗原 CD34 和 TdT,而 mCD3 的表达以阴性为主。初诊和复发患者 CD34 的阳性表达率均在 50%~60% 之间,初诊患者 TdT 的阳性表达较高,为 74.4%,复发患者 TdT 的阳性表达率略低,为 54.5%;初诊和复发患者的 mCD3 均以阴性表达为主,阴性率分别为 53.2% 和 95.5%。初诊患者 TdT 和 CD34 的阳性表达、mCD3 和 CD5 的阴性表达均是 LBTC 的特点,可与正常 T 细胞区分开来。

[0026] 表 2 初诊和复发 T-ALL 患者 LBTC 中抗原表达的比例分析

抗原	初诊 (N=112)		复发 (N=44)	
	N	%	N	%
CD45 ⁺	112	100.0%	44	100.0%
cCD3 ⁺	112	100.0%	44	100.0%
CD7 ⁺	111	99.1%	41	93.2%
CD34 ⁺	61	55.4%	24	54.5%
TdT ⁺	61	74.4%	24	54.5%
CD5 ⁺	30	27.3%	9	20.5%
mCD3 ⁺	59	53.2%	42	95.5%

[0027] 将上述初诊 T-ALL 患者的 LBTC 分析结果以抗原表达的阳性率形式显示, 见附图 2, 可以看出, TdT、CD34、mCD3 和 CD5 的阳性率差异较大, 虽然异常表达率较高, 但采用其中任一抗体均不能代表所有白血病细胞; 而且, 抗原多为部分异常表达, 阳性表达比例在 20%-60% 之间, 这样会影响 LBTC 的分析, 因此, 有必要联合采用多种抗体检测治疗后 T-ALL 患者体内微量的白血病细胞, 以提高准确性与敏感性。

[0028] 2. 初诊及复发 T-ALL 患者的 LBTC 异常表型的发生率分析

进一步的采用本试剂盒的抗体组合, 分析初诊及复发 T-ALL 患者的 LBTC 异常表型, 由于收集患者比较困难, 年份跨度比较大, 实验过程中样本人员有变动, 部分测定指标并非对所有样本进行测试, 最终以实际所采集的样本数目为准进行统计分析并列表, 初诊和复发患者的 LBTC 异常表型及所涉及的异常抗原表达情况见表 3 及表 4, 根据表 3 结果可见, 在 80 例初诊及 44 例复发患者中, TdT+ 或 CD34+ 或 TdT 和 CD34 同时阳性的发生率均较高, 分别占 87.5% 和 81.8%, 因此 TdT+ 和 CD34+ 是识别 LBTC 较敏感的抗原标志。少数患者为 TdT-CD34-, 初诊患者中占 12.5%, 复发患者中占 18.2%。在 TdT-CD34- 的 10 例初诊和 8 例复发患者中, mCD3- 或部分表达者各有 8 例, 这些患者 cCD3 均为阳性, 同时 CD45dim+, 与正常 T 细胞的 mCD3+cCD3+CD45str+ 表型明显不同, 因此 mCD3-cCD3+CD45dim+ 也是 LBTC 的表型特点。

[0029] LBTC 的异常表型还包括抗原表达完全缺失或部分缺失, 结果见表 4, 尤以 CD5 缺失的发生率较高, 112 例初诊患者完全缺失和部分缺失的发生率分别为 26.8% 和 25.9%; 44 例复发患者以完全缺失为主, 完全缺失和部分缺失分别占 20.5% 和 2.3%。另外, LBTC 的抗原表达强度会发生变化, 与正常骨髓 T 细胞相比, CD45dim+、CD7str+ 和 CD5dim+ 最常见。

[0030] 另在 TdT-CD34- 的 10 例初诊患者中, 有 2 例表型为 mCD3+cCD3+, 其中 1 例 CD45dim+CD7-, 1 例 CD45dim+CD5-, 本试剂盒均可以识别这些异常的抗原表达, 从而与正常 T 细胞及非特异性结合进行鉴别。

[0031] 以上结果说明, 本发明的试剂盒几乎可以识别所有初诊和复发患者的 LBTC 表型, 即使缺乏初诊时特异的抗原表达资料, 仍可以利用本试剂盒进行分析。

[0032] 表 3 初诊和复发 T-ALL 患者的 LBTC 异常表型发生率 I

异常表型	初诊 (N=80)		复发 (N=44)	
	N	%	N	%
TdT ⁺ CD34 ⁺ 伴其它抗原异常	25	31.3	12	27.3
TdT ⁺ CD34 ⁺ 伴其它抗原异常	34	42.5	12	27.3
TdT ⁺ CD34 ⁺ 伴其它抗原异常	11	13.8	12	27.3

。

[0033] 表 4 初诊和复发 T-ALL 患者的 LBTC 异常表型发生率 II

异常表型			初诊 (N=112)		复发 (N=44)	
			N	%	N	%
抗原表达缺失	完全缺失	CD7-	1	0.9	3	6.8
		CD5-	30	26.8	9	20.5
		mCD3-	59	52.7	43	97.7
	部分缺失	CD7(1+)	3	2.7	1	2.3
		CD5(1+)	29	25.9	1	2.3
		mCD3(1+)	32	28.6	1	2.3
		cCD3(1+)	12	10.7	0	0.0
	抗原表达强度改变	CD45dim+		109	97.3	40
cCD3str+		17	15.2	13	29.5	
cCD3dim+		17	15.2	7	15.9	
mCD3dim		31	27.7	0	0.0	
CD7str+		76	67.9	6	13.6	
CD7dim+		8	7.1	10	22.7	
CD5dim+		34	30.4	16	36.4	

[0034] 3. 初诊、复发及治疗后 T-ALL 患者中存在微量 LBTC (LBTC+) 的患者 LBTC 表达的异常抗原数

LBTC 的抗原表达存在以下一种或多种异常: TdT+、CD34+、CD45dim+、cCD3dim+、CD7dim+/str+/-、CD5dim+/str+/- 和 mCD3dim+/str+/-。由于 T-ALL 发病率较低, 收集患者比较困难, 年份跨度比较大, 对初诊患者中的 79 例和复发患者 44 例同时应用七种抗体检测表达异常的抗原数目及其所占比例, 结果见表 5, 若测定结果中异常抗原数越多, 表明检测的准确性和特异度越高, 采用本发明试剂盒, 初诊和复发患者 LBTC 全部具有异常表型, 且所有初诊患者和复发患者的 LBTC 的异常抗原数 ≥ 2 个, 说明本试剂盒包含的抗体组合适用于初诊患者及复发患者的 LBTC 表型分析, 且准确性和特异度高。

[0035] 采用本试剂盒对治疗后 T-ALL 患者的不同时间点所采集的样本进行了检测, 其中有 69 份样本在形态学上完全缓解, 但流式结果提示存在异常表型的 LBTC, 数据见表 5 中

LBTC+ 列,异常表型的 LBTC 同时有 2-5 个异常抗原表达异常,结果提示,采用本试剂盒可以用于对治疗后 T-ALL 患者体内微量的 LBTC 表型进行分析,其表达的异常抗原数多,准确可靠。

[0036] 表 5 初诊、复发及治疗后患者 LBTC 表达的异常抗原数目

异常抗原数	初诊 (N=79)		复发 (N=44)		LBTC+ (N=69)	
	N	%	N	%	N	%
1	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2	5	6.3	8	18.2	15	21.7
3	15	19.0	7	15.9	26	37.7
4	28	35.4	19	43.2	22	31.9
5	18	22.8	9	20.5	6	8.7
6	12	15.2	1	2.3	0	0.0
7	1	1.3	0	0.0	0	0.0

[0037] 4. 治疗后 T-ALL 患者的 LBTC 与基因及临床综合分析

运用本发明试剂盒提供的七色抗体组合检测治疗后 T-ALL 患者,对 92 例形态学完全缓解患者在治疗后的不同时间点进行了连续追踪,共检测 1040 份样本。

[0038] (1) 流式结果为 LBTC+ 患者

46 例患者 69 份样本形态学缓解,但采用本发明试剂盒中的七色抗体组合在流式细胞仪上检测可见微量的 LBTC,中位比例为 0.97% (0.03%-17.67%)。14 份样本初诊时特异性基因 (SIL-TAL1) 阳性,同时进行基因残留追踪,结果显示有 13 份样本阳性,1 份样本阴性,说明与特异性 PCR (聚合酶链反应) 基因检测相比,本发明的试剂盒检测的符合率为 92.9% (13/14),说明运用本发明提供的方法具有较高的特异性和准确性。46 例患者中 20 例最终出现血液学复发,复发率为 43.5%;共包括 30 份样本,其中 26 份复发的样本同时检测泛白血病的基因标志 -WT1,12 份样本 WT1 阳性,14 份样本 WT1 阴性。结果说明,与 WT1 基因检测相比,本试剂盒检测微量 LBTC 的敏感性高于 WT1,比 WT1 基因检测适用范围更广、复发的预测能力更强。

[0039] 本组数据检测到的 LBTC 最低比例为 0.03%,由于正常骨髓和外周血不存在 LBTC,本组试剂盒推荐获取 75 万个细胞,理论上灵敏度至少可达 0.01%。

[0040] (2) CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞比例增高患者

A. CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞在正常骨髓和外周血中的表达:

利用本发明的试剂盒,我们对 10 例正常骨髓和 15 例正常外周血进行了检测,结果发现,CD34+ 细胞在有核细胞中的中位比例分别为

0.005%(0.000%-0.020%) 和 0.002%(0.000%-0.006%), TdT+ 细胞在有核细胞中的中位比例分别为 0.005%(0.002%-0.028%) 和 0.002%(0.000%-0.018%), 表型均为 CD45str+cCD3+CD7+CD5+mCD3+, 与胸腺 CD34+TdT+ 且 CD45dim+mCD3- 幼稚 T 细胞的表达明显不同, 所有的骨髓和外周血样本中, 均未见与报道的胸腺表型相同的幼稚 T 细胞。因此, 这些细胞应该不属于异位表达。但这些 CD34+ 和 / 或 TdT+ CD45str+cCD3+CD7+CD5+mCD3+ 是否为骨髓及外周血中正常的幼稚 T 细胞, 我们对其比例增加的样本进行了分析。

[0041] B. CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞比例位于 0.00%-0.10% 之间:

65 例治疗后 T-ALL 患者 507 份样本中, cCD3+TdT+ 和 cCD3+CD34+ 细胞在有核细胞中的比例位于 0.00%-0.10% 之间, 中位比例均为 0.01%, 表型为 CD45str+cCD3+CD7+CD5+mCD3+, 均未见抗原表达强度改变, 不似 LBTC, 经临床随访, 这些患者长期处于缓解状态, 没有出现临床复发。基因结果也没有出现异常, 说明所检测到的 CD34+ 和 TdT+ 细胞不是 LBTC, 也不属异位表达细胞, 其在有核细胞中的比例均低于 0.10%。

[0042] C. CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞比例高于 0.10%, 但表型仍为 CD45str+cCD3+CD7+CD5+mCD3+ 的样本

8 份(8/1040) 份样本中, CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞比例高于 0.10% 且表型均为 CD45str+cCD3+CD7+CD5+mCD3+, 比例位于 0.11%-0.27% 之间。因这些患者均不存在特异基因异常, 故无法与特异基因进行比较以鉴别是否为 LBTC。其中 2 份样本同时 WT1 表达稍高于正常, 但在随后的随访中全部归于正常。其他患者全部为 WT1 阴性; 8 份样本中 3 份在随访过程中曾出现异常的 LBTC, 但与此表型不符, 除 CD34 和 / 或 TdT 表达外, 均存在其它抗原表达异常, 与发病时相同; 剩余 5 份样本随访过程中未出现 LBTC, 且随访期内(16m-60m) 未见复发。另外, 此 8 份样本均具有较多增殖期 B 细胞, 这些 B 细胞部分表达 CD34 和 TdT, 通过同时标记 B 细胞抗原 CD10 和 CD19 证实, CD34+ 和 / 或 TdT+ 且 CD45str+cCD3+CD7+CD5+mCD3+ 细胞同时表达 B 细胞标志。结果说明, 这些 CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞不是 LBTC, 是因为骨髓处于增生期而造成的非特异性结合。因此, 提示在分析中, 尤其是对增生较旺盛的骨髓样本, 要注意与这些非特异性结合染色造成的假的 CD34+ 和 / 或 TdT+ “幼稚 T 细胞” 进行鉴别。

[0043] D. CD34 和 TdT 在 LBTC 的表达分析

69 份样本检测到 LBTC, CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞比例增高的样本共 54 份, 均可见其它抗原标志异常, 无 1 份表型与正常 T 细胞的 CD45str+cCD3+CD7+CD5+mCD3+ 相同。。

[0044] 结果提示, 利用本发明的试剂盒检测 LBTC 时, 通过全面的抗原分析, 可以鉴别 LBTC、正常的 T 细胞及非特异性信号; 尤其是骨髓处于增殖期, 存在较高比例的幼稚 B 细胞时, 可以有效避免将非特异的 CD34+ 和 / 或 TdT+ 细胞判断为 LBTC, 从而为临床提供准确的分析结果。

[0045] 综上所述, 本研究结果表明, 通过本发明的试剂盒并借助七色流式细胞仪有助于精确识别 LBTC, 适用于所有复发和治疗后 T-ALL 患者 LBTC 的分析, 具有较高的敏感性, 可与基因检测互相补充, 为临床诊疗评价疗效及预测复发提供参考。

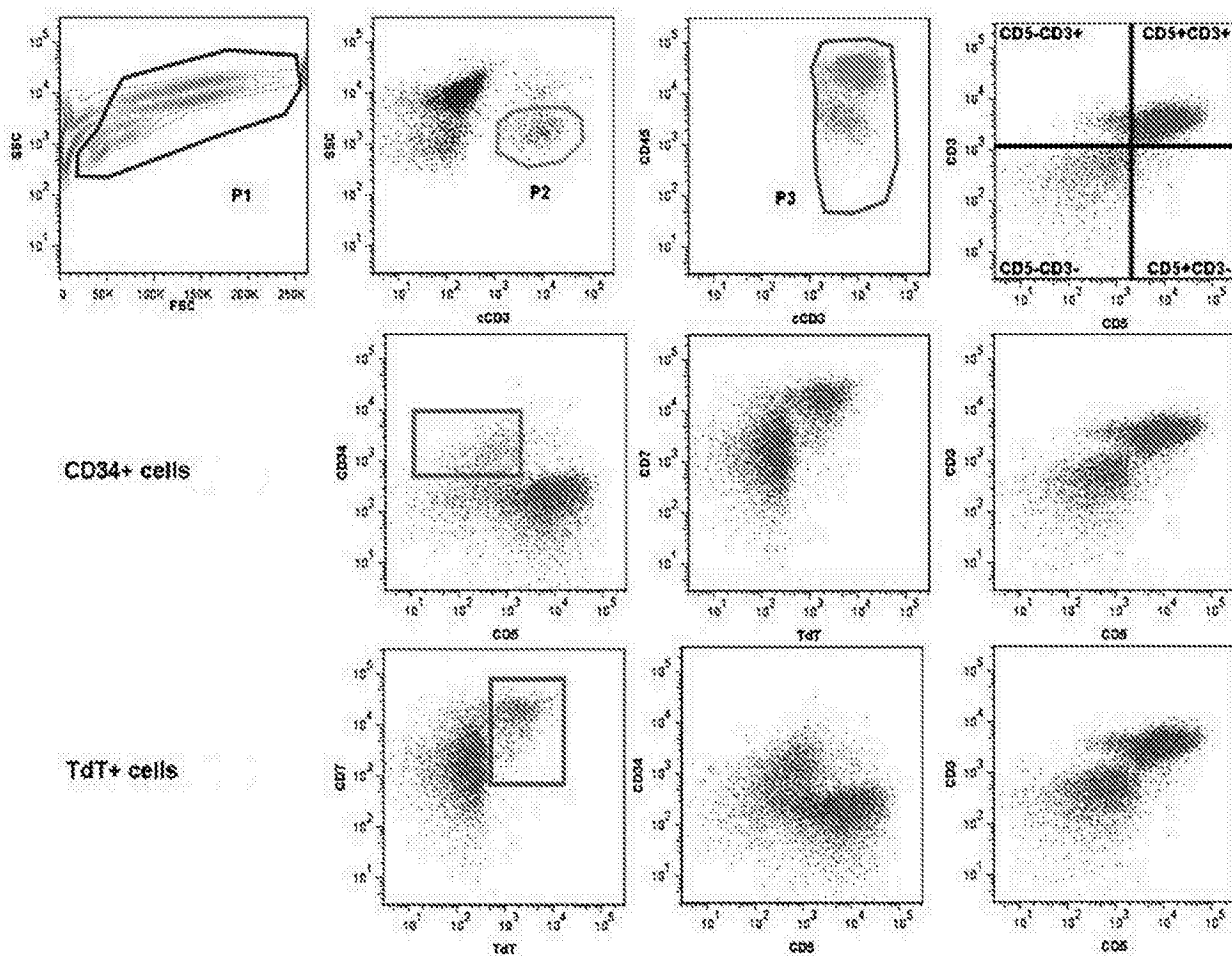


图 1

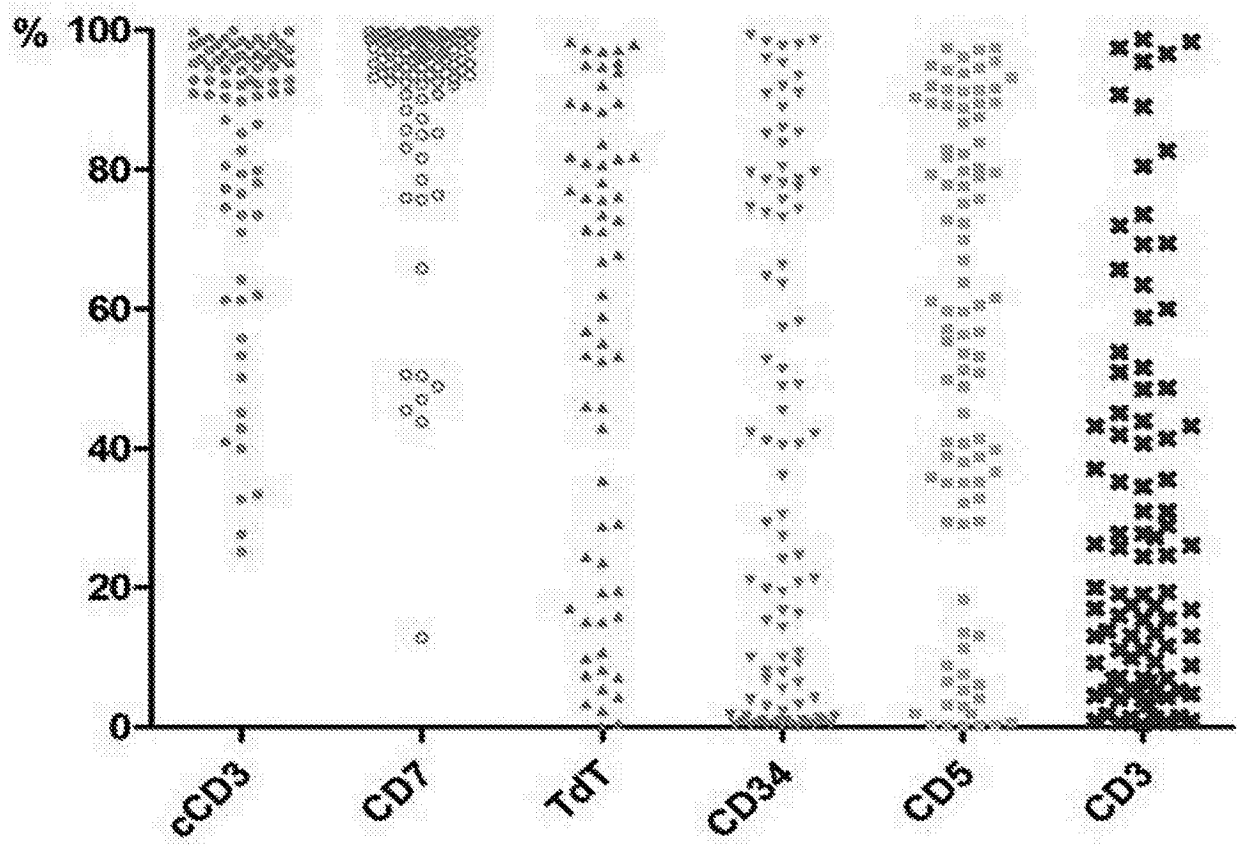


图 2

专利名称(译)	一种检测急性T淋巴细胞白血病幼稚T细胞的试剂盒、应用及方法		
公开(公告)号	CN105223361A	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN201510540898.6	申请日	2015-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
[标]发明人	刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐 袁晓英 黄晓军		
发明人	刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐 袁晓英 黄晓军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N15/14 G01N1/30 G01N1/38		
CPC分类号	G01N1/30 G01N1/38 G01N15/14 G01N33/533 G01N33/577 G01N2001/388		
其他公开文献	CN105223361B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测急性T淋巴细胞白血病幼稚T细胞的试剂盒、应用及方法，属于生物医药领域，采取的技术方案是：一种检测急性T淋巴细胞白血病幼稚T细胞的试剂盒，该试剂盒的应用基于流式细胞仪，所述试剂盒中配置了针对包括下述物质的单克隆抗体：TdT、cCD3、CD34、CD5、CD7、mCD3和CD45，所述抗体分别带有荧光标记。本发明还提供了上述试剂盒在制备诊断急性T淋巴细胞白血病的产品中的应用。采用本发明产生的有益效果在于：（1）采用本发明的试剂盒可快速、准确地对所有T-ALL患者微量LBTC的抗原表达进行分析及定量；（2）采用本试剂盒提供的设门方法及多个抗原标志综合评判，特异度高，敏感度高。

