



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108761078 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810483625.6

(22)申请日 2018.05.19

(71)申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

(72)发明人 赛音贺西格 马丽香

(74)专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 陆飞 陆尤

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01B 11/02(2006.01)

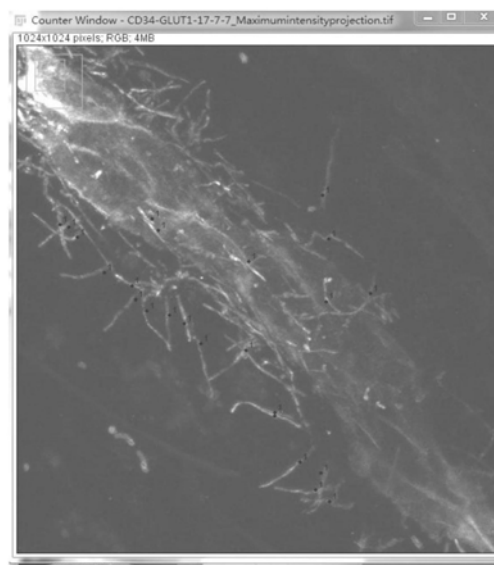
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

胰腺癌基底微绒毛的检测方法和应用

(57)摘要

本发明属于临床医学和诊断领域,具体涉及利用微血管内皮细胞基底微绒毛物理参数预测肿瘤内部的代谢水平,其利用免疫荧光染色和激光共聚焦的扫描重建方法,重建肿瘤微循环内皮细胞的微绒毛完整结构,测量微绒毛的物理参数密度和长度,与病人的PET-CT SUV_{max}值对比分析,预测肿瘤组织内的代谢水平。结果显示,微血管基底微绒毛长度和密度的均值和中位数均与肿瘤组织的糖摄取能力直接相关;微血管基底微绒毛密度和长度的均值和中位数的联合参数与肿瘤组织糖摄取能力相关性更强。微血管皮细胞基底微绒毛只存在于恶性肿瘤内,而且该指标是病理学技术指标,属于肿瘤诊断黄金标准范畴,因此这个指标的特异性远高于代谢相关其它影像学指标。



1. 一种测量胰腺癌基底微绒毛物理参数的方法,其特征在于,具体步骤包括:病理切片3D免疫荧光染色,微血管基底微绒毛长度和密度的检测、计数;其中:

(一)病理切片3D免疫荧光染色,具体流程为:

病理切片:对肿瘤组织用4%多聚甲醛固定24-48小时,再用10%-30%蔗糖依次脱水至组织下沉;然后利用冰冻切片机制作40-50微米切片,放入含有PBS溶液的6孔板中保存;

免疫荧光染色,具体步骤为:

(1)将组织切片挑入孔板中用PBS清洗3-6次,每次10-30分钟;再挑入封闭液中室温封闭50-90分钟;封闭液成分为:10% 驴血清、0.01%-0.2% Triton X-100和PBS;

(2)挑入含I抗的孵育液中,在4℃摇床上孵育过夜;孵育液成分为5%驴血清、0.01%-0.2% triton X-100和PBS;

(3)将组织切片在PBS溶液中洗3-6次,每次10-30分钟;然后挑入含相应的荧光II抗和DAPI孵育液中,摇床上室温孵育1.5-2.5个小时或4℃过夜;

(4)II抗缓冲液孵育完成后再用PBS清洗3-6次,每次10-30分钟;

(5)清洗完以后,将组织切片移到载玻片上展片,用水溶性封片剂封片;

(6)室温闭光过夜,然后进行扫描、记数;

(二)微血管基底微绒毛长度和密度的检测、计数;

(1)采用3D扫描;

(2)通过Image J软件把Z-轴扫描图片Z-stacked,然后测量微血管的表面面积,计算微绒毛数量并测量微绒毛长度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述采用3D扫描的具体流程为:

1)在Zeiss 710 63倍油镜下寻找组织内基底微绒毛最多的微血管;

2)Z-轴确定微血管的厚度;

3)激光共聚焦显微镜下Z-stack扫描;Zeiss 710激光共聚焦显微镜扫描参数为:

像素:1024*1024 (pixel),线性:2;

Z-stack 间距: 1μm;

扫描速度: 5;

Digital offset: 100-250;

组织之间会有一定的染色背景差异,因此其它参数可以根据需求进行调整。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述计算微绒毛数量是利用软件中的细胞计数菜单计数功能进行计数,具体流程如下:

1)首先初始化图片,进入计数界面;

2)选择计数类型按钮;

3)利用鼠标右键计数血管表面微绒毛;

4)计数后把数据存入到excel数据表。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述测量微绒毛长度的流程为:

1)使用分段线勾画出为微绒毛轮廓,然后利用测量按钮测量其长度;

2)保存数据。

5. 由根据权利要求1-4所述方法得到的胰腺癌基底微绒毛物理参数,在预测胰腺癌肿瘤组织糖摄取能力中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,微血管基底微绒毛长度的均值和中位数均与肿瘤组织的糖摄取能力直接相关, $p<0.001$,相关系数分别是0.799 和0.805;微血管基底微绒毛密度的均值和中位数也与肿瘤组织糖摄取能力直接相关, $p<0.001$,相关系数分别(r)是0.767 和0.813;微血管基底微绒毛密度和长度的均值和中位数的联合参数与肿瘤组织糖摄取能力相关性更强,相关系数分别(r)为0.883 和0.894 。

7. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,将肿瘤组织的糖摄取能力分为四个等级:1级,弱:PET SUVmax 值2.5-5.6; 2级,中等:PET SUVmax 值5.7-7.5;3级,强:PET SUVmax 值7.6-8.8;4级,超强:PET SUVmax 值 >8.9 ;

据此,用基底微绒毛的各种参数预测肿瘤代谢的方式如下:

(1)微绒毛密度平均值为4.85(95%CI 2.79-7.104)为糖摄取能力弱;微绒毛密度平均值为6.85(95%CI 3.94-9.48)为糖摄取能力中等;微绒毛密度平均值是8.13(95%CI 5.94-10.69)为糖摄取能力强;微绒毛密度平均值是8.38(95%CI 5.43-10.97)为糖摄取能力超强;

(2)微绒毛密度中位数值是4.52 (95%CI 2.35-6.36) 为糖摄取能力弱;微绒毛密度中位数值是6.30(95%CI 3.58-8.60)为糖摄取能力中等;微绒毛密度中位数是7.78(95%CI 5.61-10.27)为糖摄取能力强;;微绒毛密度中位数是8.02 (95%CI 5.33-10.38)为糖摄取能力超强;

(3)微绒毛长度平均值是9.58 (95%CI 6.81-12.33)为糖摄取能力弱;微绒毛长度平均值是11.80 (95%CI 10.26-13.90)为糖摄取能力中等;微绒毛长度平均值13.50 (95%CI 12.90-14.36)为糖摄取能力强;微绒毛长度平均值是15.47 (95%CI 12.158-27.20)为糖摄取能力超强;

(4)微绒毛长度中位数是8.94 (95%CI 6.51-11.40) 为糖摄取能力弱;微绒毛长度中位数是11.28 (95%CI 9.59-13.80) 为糖摄取能力中等;微绒毛长度中位数是12.95 (95%CI 12.27-13.99)为糖摄取能力强;微绒毛长度中位数是14.14 (95%CI 11.32-18.31)为糖摄取能力超强;

(5)微绒毛密度和长度平均值参数是1.47(95%CI 0.70-2.21) 为糖摄取能力弱;微绒毛密度和长度平均值参数是2.54 (95%CI 1.50-3.83) 为糖摄取能力中等;微绒毛密度和长度平均值参数是3.42 (95%CI 2.68-4.34)为糖摄取能力强;微绒毛密度和长度平均值参数是4.06 (95%CI 2.24-6.07)为糖摄取能力超强;

(6)微绒毛密度和长度中位数参数是1.28(95%CI 0.59-1.81) 为糖摄取能力弱;微绒毛密度和长度中位数参数是2.23 (95%CI 1.32-3.52)为糖摄取能力中等;微绒毛密度和长度中位数参数是3.14(95%CI 2.45-4.07)为糖摄取能力强;微绒毛密度和长度中位数参数是3.59 (95%CI 2.07-5.27)为糖摄取能力超强。

胰腺癌基底微绒毛的检测方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于临床肿瘤代谢水平检测技术领域,具体涉及胰腺癌基底微绒毛的检测方法与系统和应用。

背景技术

[0002] 肿瘤是体内正常功能细胞演变而形成的一种器官,它具有特殊的代谢习性、强大的破坏和侵袭其它器官的能力(Egeblad et al., 2010)。肿瘤器官包含具有特殊代谢习性的肿瘤细胞、支持作用的间质细胞、自身的循环系统和免疫细胞(Egeblad et al., 2010)。肿瘤形成的主要原因是积累相应癌基因的各种突变,这些基因突变会导致肿瘤细胞基础代谢途径的改变(Cantor and Sabatini, 2012; Hsu and Sabatini, 2008; Ward and Thompson, 2012)。正常细胞癌变以后,肿瘤细胞的代谢习性会改变,与人体其它细胞相比,癌细胞主要依靠糖酵解途径获得ATP,即使在有足够的充足氧气供给的条件下,肿瘤细胞仍然依靠糖酵解途径获得ATP。研究发现,增加氧的供给会抑制肿瘤细胞的生长。糖酵解途径产生的ATP远少于有氧条件下的三羧酸循环所产生的ATP (1/19),因此肿瘤器官的糖需求量往往远大于正常组织。与之相应的是肿瘤往往具有超强的糖摄取能力(Cuperlovic-Culf et al., 2012)。这样的超强的糖摄取能力的习性也给早期检测和发现体内的肿瘤提供便利条件。依据这些特殊的代谢习性,研究人员开发出许多检测肿瘤的手段。这种依据肿瘤组织的特殊代谢特征开发出的检测手段,提示肿瘤的功能,灵敏度高、特异性好的优点。这种依赖功能学的检测指标具有极高的临床价值。这种指标不仅可以指导外科医生手术过程,也可以预测肿瘤病人的预后和药物治疗效果。目前临床上,常利用放射性同位素标记的葡萄糖检测肿瘤和肿瘤糖摄取能力,FDG PET-CT是最常见的一种。PET-CT的优点是检测到的信号体现肿瘤的糖摄取能力,属于临床影像学的范畴。该方法灵敏度高,很容易发现糖代谢异常的区域和微小的病灶(Kinahan and Fletcher, 2010; Schellenberg et al., 2010)。PET-CT缺点是只是提供的代谢异常部位整体代谢水平,无法提供组织内病理变化的信息。人体内局部的炎症也会增强糖摄取能力,因此PET-CT一般很难区分肿瘤和炎症(Kinahan and Fletcher, 2010)。此外,机体诸多生理因素,例如生理状态、血糖浓度、胰岛素浓度等,都会影响其敏感性和准确性,甚至部分患者例如糖尿病、严重心血管病人是不能用PET-CT进行身体检查(Kinahan and Fletcher, 2010)。

[0003] 胰腺癌是一种恶性程度极高的肿瘤,它的组织学特征是微血管贫乏、间质丰富、组织内压力极高、糖摄取能力很强(Vincent et al., 2011)。研究人员发现糖摄取能力高的胰腺癌病人预后差。胰腺癌中广泛存在KRAS基因的突变,这个突变会导致细胞代谢的改变,胰腺癌细胞更依赖糖酵解获得所需ATP;这个突变也会导致胰腺癌细胞线粒体的损伤和丢失(Ying et al., 2012)。虽然胰腺癌可以大量摄取糖,但它如何在短时间内获得大量的糖等营养物质,从而满足自己的生长需求,仍然是个谜。葡萄糖是通过血管内皮细胞表面的糖蛋白受体运输到组织内,常见的受体有糖转运蛋白GLUT-1 到GLUT-5(Kayano et al., 1990)。正常组织通过增加微循环的面积和增加细胞表面的糖转运受体来获得更多葡萄糖。

人的脑组织和肌肉组织不仅微循环丰富,且微血管内皮细胞糖蛋白转运受体也极其丰富,从而可以高效获得代谢所需的营养物质并清除体内产生代谢产物(Mann et al., 2003; Thomas et al., 1992)。增加细胞表面面积是提高物质交换能力最原始和直接途径,例如小肠微绒毛和肾皮质的远端小管微绒毛。表面面积大的上皮细胞物质交换能力往往很强(Lange, 2011)。如果肿瘤细胞有扩大血管内皮细胞表面积或增强细胞物质交换的能力,那肿瘤细胞可以短时间内获得大量的营养物质。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种简便、可靠的测量胰腺癌基底微绒毛物理参数(长度和密度)方法,并以胰腺癌基底微绒毛物理参数预测肿瘤糖摄取水平。

[0005] 在前期研究中,发明人发现胰腺癌微循环中存在一种特殊的“毛毛虫”似的毛细血管,这些血管内皮基底面有基底微绒毛。基底微绒毛的超微结构和物质运输系统均显示此微绒毛具有物质交换能力。同时,发明人也观察到在糖摄取能力强的肿瘤中基底微绒毛异常发达,而在糖摄取能力低的肿瘤中基底微绒毛相对少。糖摄取能力高的肿瘤微血管基底微绒毛异常长,可以达到血管直径的10倍,有的甚至可以达到胰腺癌导管内部。因此,推测基底微绒毛可能是胰腺癌获取营养物质的主要通道,微绒毛的物理参数,例如长度和密度等,可能反映该肿瘤的糖摄取能力。临床上,物理参数具有稳定性强、重复性高、使用方便等优点。如基底微绒毛的物理参数可以显示肿瘤糖摄取能力,将有助于胰腺癌病人的诊断、术后治疗及预测复发等。为了检测微循环内皮细胞微绒毛的物理参数,发明人利用激光共聚焦断层扫描技术,重建免疫荧光染色后的58例胰腺癌病人的肿瘤微血管,测量了微血管内皮细胞基底微绒毛的参数,并与病人的PET-CT SUV_{max}值进行相关性分析。发明人发现血管内皮细胞基底微绒毛的长度和密度与PET-CT SUV_{max}值高度相关。基底微绒毛的长度和密度参数可以反映肿瘤组织糖摄取水平。

[0006] 基于此,本发明提出一种测量肿瘤微循环内皮细胞基底微绒毛物理参数的方法,并由此预测胰腺癌肿瘤代谢水平,具体涉及胰腺癌肿瘤微血管内皮细胞的微绒毛染色,扫描和测量及计数等。

[0007] 病理学诊断是诊断“黄金标准”。病理学诊断技术依赖组织的平面结构做出诊断,组织的平面结构无法提供组织内部细胞在空间中的立体状态,例如细胞突起和细胞之间相互作用等功能相关信息。然而,这些功能相关信息中可能包含了许多肿瘤独特行为或功能的信息。为了探索这些功能相关信息,本发明通过长时间摸索,建立了一套病理切片3D免疫荧光染色方法。这项技术弥补了传统病理学的不足之处,3D免疫荧光染色不仅提供清晰的组织结构图,而且可以显示肿瘤内部细胞之间的空间分布及完整的细胞结构(参见图3)。

[0008] 本发明提供的测量胰腺癌基底微绒毛物理参数(长度和密度)方法,具体步骤包括:病理切片3D免疫荧光染色,微血管基底微绒毛长度和密度的检测、计数;

其中:

(一)病理切片3D免疫荧光染色;具体流程为:

病理切片:对肿瘤组织用4%多聚甲醛固定24-48小时,再用10%-30%蔗糖依次脱水至组织下沉;然后利用冰冻切片机制作40-50微米切片,放入含有PBS溶液(磷酸缓冲液)的6孔板中保存。

[0009] 免疫荧光染色,具体步骤为:

(1)将组织切片挑入孔板中用PBS清洗3-6次,每次10-30分钟(放在摇床上);再挑入封闭液中室温封闭50-90分钟;封闭液成分为:10% 驴血清、0.01%-0.2% Triton X-100和PBS;

(2)挑入含I抗的孵育液中,在4℃摇床上孵育过夜;孵育液成分为5%驴血清、0.01%-0.2% triton X-100和PBS;

(3)将组织切片在PBS溶液中洗3-6次,每次10-30分钟(放在摇床上);然后挑入含相应的荧光II抗和DAPI孵育液中,摇床上室温孵育1.5-2.5个小时或4℃过夜(此步以后注意避光!);

(4)II抗缓冲液孵育完成后再用PBS清洗3-6次,每次10-30分钟(放在摇床上);

(5)清洗完以后,将组织切片移到载玻片上展片,用水溶性封片剂封片;

(6)室温闭光过夜,然后进行扫描、记数。

[0010] (二)微血管基底微绒毛长度和密度的检测、计数;

(1)采用3D扫描;

(2)通过Image J软件把Z-轴扫描图片Z-stacked,然后测量微血管的表面面积,计算微绒毛数量并测量微绒毛长度。

[0011] 本发明中,所述采用3D扫描的具体流程为:

1)在Zeiss 710 63倍油镜下寻找组织内基底微绒毛最多的微血管;

2)Z-轴确定微血管的厚度;

3)激光共聚焦显微镜下Z-stack扫描。Zeiss 710激光共聚焦显微镜扫描参数为:

像素:1024*1024 (pixel),线性(liner):2;

Z-stack 间距: 1μm;

扫描速度: 5;

Digital offset(数字补偿): 100-250;

组织之间会有一定的染色背景差异,因此其它参数可以根据需求进行调整。

[0012] 本发明中,微绒毛的计数利用软件中的细胞计数(cell counter)菜单计数功能进行计数,具体流程如下:

1)首先初始化图片(initialize),进入计数界面;

2)选择计数类型按钮(counter type);

3)利用鼠标右键计数血管表面微绒毛;

4)计数后把数据存入到excel数据表。

[0013] 本发明中,测量微绒毛长度方法:

1)使用分段线(segmented line)线勾画出为微绒毛轮廓,然后利用测量按钮(measure)测量其长度;

2)保存数据。

[0014] 本发明利用人胰腺癌组织厚切片的免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜重建肿瘤微循环的方法,通过3D重建带基底微绒毛的微血管,测量得到血管内皮细胞基底微绒毛的长度和密度。

[0015] 检测出的结果表明,微血管基底微绒毛物理参数,包括长度和密度,均可以预测肿

瘤的糖摄取能力;长度和密度的联合参数具有更好的预测胰腺肿瘤的糖摄取能力效果。结果显示,微血管基底微绒毛长度的均值和中位数均与肿瘤组织的糖摄取能力直接相关($p < 0.001$),相关系数分别是0.799 和0.805;微血管基底微绒毛密度的均值和中位数也与肿瘤组织糖摄取能力直接相关($p < 0.001$),相关系数分别(r)是0.767 和0.813;微血管基底微绒毛密度和长度的均值和中位数的联合参数与肿瘤组织糖摄取能力相关性更强,相关系数分别(r)为0.883 和0.894 (参见图4)。这个结果证明这些微血管基底微绒毛长度和密度均具有显示肿瘤代谢水平的能力。因此,本发明进一步将测得微血管内皮细胞基底微绒毛的长度和密度,用于预测肿瘤组织糖摄取能力。

[0016] 依据上述实验结果,我们制作了一条标准曲线(图4)。同时把糖摄取能力分为四个等级:1,弱 (PET SUVmax 值2.5-5.6); 2,中等 (PET SUVmax 值5.7-7.5), 3,强 (PET SUVmax 值7.6-8.8); 4,超强 (PET SUVmax 值 >8.9 , 8.9-20)。

[0017] 据此,用基底微绒毛的各种参数预测肿瘤代谢的方式如下:

(1)微绒毛密度平均值为4.85 (95%CI 2.79-7.104)为糖摄取能力弱;微绒毛密度平均值为6.85 (95%CI 3.94-9.48)为糖摄取能力中等;微绒毛密度平均值是8.13 (95%CI 5.94-10.69)为糖摄取能力强;微绒毛密度平均值是8.38 (95%CI 5.43-10.97)为糖摄取能力超强;

(2)微绒毛密度中位数值是4.52 (95%CI 2.35-6.36)为糖摄取能力弱;微绒毛密度中位数值是6.30 (95%CI 3.58-8.60)为糖摄取能力中等;微绒毛密度中位数是7.78 (95%CI 5.61-10.27)为糖摄取能力强;微绒毛密度中位数是8.022 (95%CI 5.33-10.38)为糖摄取能力超强;

(3)微绒毛长度平均值是9.58 (95%CI 6.81-12.33)为糖摄取能力弱;微绒毛长度平均值是11.80 (95%CI 10.26-13.90)为糖摄取能力中等;微绒毛长度平均值13.50 (95%CI 12.90-14.36)为糖摄取能力强;微绒毛长度平均值是15.47 (95%CI 12.158-27.20)为糖摄取能力超强;

(4)微绒毛长度中位数是8.94 (95%CI 6.51-11.40)为糖摄取能力弱;微绒毛长度中位数是11.28 (95%CI 9.59-13.80)为糖摄取能力中等;微绒毛长度中位数是12.95 (95%CI 12.27-13.99)为糖摄取能力强;微绒毛长度中位数是14.14 (95%CI 11.32-18.31)为糖摄取能力超强;

(5)微绒毛密度和长度平均值参数是1.47 (95%CI 0.70-2.21)为糖摄取能力弱;微绒毛密度和长度平均值参数是2.54 (95%CI 1.50-3.83)为糖摄取能力中等;微绒毛密度和长度平均值参数是3.42 (95%CI 2.68-4.34)为糖摄取能力强;微绒毛密度和长度平均值参数是4.06 (95%CI 2.24-6.07)为糖摄取能力超强;

(6)微绒毛密度和长度中位数参数是1.28 (95%CI 0.59-1.81)为糖摄取能力弱;微绒毛密度和长度中位数参数是2.23 (95%CI 1.32-3.52)为糖摄取能力中等;微绒毛密度和长度中位数参数是3.14 (95%CI 2.45-4.07)为糖摄取能力强;微绒毛密度和长度中位数参数是3.59 (95%CI 2.07-5.27)为糖摄取能力超强。

[0018] 基底微绒毛预测肿瘤代谢的实践过程中,肿瘤中的炎症细胞,例如中性粒细胞和巨噬细胞等的比例,会影响预测效果,但不会影响最终评价。基底微绒毛的生长过程可能与仅肿瘤细胞的代谢有关。

附图说明

[0019] 图1为计数基底微绒毛数量方法图示。

[0020] 图2为测量基底微绒长度方法图示。

[0021] 图3为不同糖摄取能力的胰腺癌组织内的微血管内皮细胞基底微绒毛的分布特点。这组图显示了不同糖摄取能力的8个胰腺癌病人的肿瘤中微绒毛最多的4个微血管。可以观察到微绒毛的长度和密度随着PET-CT SUV_{max}值的增加而变密和变长。标尺, 20 μ m。

[0022] 图4为微血管基底微绒毛密度和长度的均值和中位数的联合参数与肿瘤组织糖摄取能力相关性图示;微血管基底微绒毛长度和密度均值和中位数均与PET-CT SUV_{max}值相关性图示。

具体实施方式

[0023] 1. 人胰腺癌组织标本收集

病理科医生或外科医生收集肿瘤标本,所收集的肿瘤组织的长度0.5-1.2 cm,宽度约0.5-1.2 cm,厚度 0.2-0.5 cm。肿瘤取样时,尽量靠近肿瘤中心部分,可以不取肿瘤周围组织。取样后,快速放入新鲜配制的4% 多聚甲醛(PFA)固定,放入4度冰箱保存。固定24-48小时,然后放入30% 蔗糖/PBS (磷酸缓冲溶液)进行脱水过夜。

[0024] 2. 肿瘤组织厚切片的制作和免疫荧光染色

免疫荧光染色,具体步骤为:

(1) 将组织切片挑入孔板中用PBS清洗3-6次,每次10-30分钟(放在摇床上);再挑入封闭液中室温封闭1小时;封闭液成分为:10% 驴血清、0.01%-0.2% Triton X-100和PBS;

(2) 挑入含I抗的孵育液中,在4℃摇床上孵育过夜;孵育液成分为5%驴血清、0.01%-0.2% triton X-100和PBS;

(3) 将组织切片在PBS溶液中洗3-6次,每次10-30分钟(放在摇床上);然后挑入含相应的荧光二II抗和DAPI孵育液中,摇床上室温孵育2个小时或4℃过夜(此步以后注意避光!);

(4) II抗缓冲液孵育完成后再用PBS清洗3-6次,每次10-30分钟(放在摇床上);

(5) 清洗完以后,将组织切片移到载玻片上展片,用水溶性封片剂封片;

(6) 室温闭光过夜,然后利用激光共聚焦显微镜进行扫描。

[0025] 3. 血管内皮细胞基底微绒毛的扫描

用6-12张CD34 和GLUT-1或cytokeratin抗体免疫荧光双染的切片扫描一个胰腺癌病人微循环内皮细胞基底微绒毛,GLUT-1 抗体的染色确定肿瘤细胞位置和部位。

[0026] 第一步,在Zeiss 710 63倍油镜下寻找组织内基底微绒毛最多的微血管;

第二步,Z-轴确定微血管的厚度;

第三步,激光共聚焦显微镜下Z-stack扫描。

[0027] Zeiss 710激光共聚焦显微镜扫描参数:

像素:1024*1024 (pixel),线性(liner):2;

Z-stack 间距: 1 μ m;

扫描速度: 5;

Digital offset: 100-250;

组织之间会有一定的染色背景差异,因此其它参数可以根据需求进行调整。

[0028] 4.检测基底微绒毛所用的相关试剂

抗体:CD34抗体(公司和货号:abcam, 8536)、GLUT-1 抗体(abcam,18356);

荧光显色抗体:免疫荧光II抗(Invitrogen: Alexa-555 标记的驴抗小鼠II抗和Alex-488 标记的驴抗兔II抗);

封闭使用血清:驴血清(Sigma);

水溶性封片剂:Fluoromount-G荧光封片剂(southern biotechnology)。

[0029] 5.图像分析使用软件:

Image J (NCI)和Zen 2009 (Zeiss, Germany)。

[0030] 6. 血管内皮细胞基底微绒毛的测量和计数

通过Image J软件把Z-轴扫描图片Z-stacked (maximum intensity projection), 然后测量微血管的表面面积,计数微绒毛数量并测量微绒毛长度。微绒毛计数使用细胞计数(cell counter)菜单计数功能(见图1);长度测量使用分段(segmented line)线勾画出长度然后进行测量(见图2)。

基底微绒毛的直径约为1微米。依据平均直径,我们把基底微绒毛假设成一个圆柱体,计算基底微绒毛表面面积,并估算了基底微绒毛增加内皮细胞表面面积的多少,以增加的表面面积为作为参数:

计算公式如下:

基底微绒毛的均数参数---Index of BM mean values = $[\pi \times l(\text{diameter}) \times \text{length}(\text{mean}) \times \text{mean number of basal microvilli}]/100$;

基底微绒毛的中位数参数---Index of BM median values = $[\pi \times l(\text{diameter}) \times \text{length}(\text{median}) \times \text{median number of basal microvilli}]/100$ 。

[0031] 7.统计分析

采用SPSS20.0 软件进行统计分析,利用相关性分析方法的spearsman correlation或pearson correlation分析, PET-CT SUVmax 值与微血管基底微绒毛密度和长度的均值和中位数及密度和长度联合参数进行相关性分析。

[0032] 实施例2

1、病人术后肿瘤标本的取样和固定在医院病理科或外科医生完成。具体方法,参见技术方法部分;

2、标准化的实验室中完成胰腺癌肿瘤标本切片、血管内皮细胞基底微绒毛染色和组织切片的封片;

3、两个受过训练的病理科医生利用Zeiss 710激光共聚焦显微镜读5-8免疫荧光染色的肿瘤切片,读完荧光切片后,确定肿瘤组织内微血管微绒毛最多5-10个以上微血管,每个病理科医生激光共聚焦显微镜扫描4-10个带基底微绒毛最多的微血管;

4、图像分析软件测量基底微绒毛的参数长度,密度和血管等;

5、与已建立的标准曲线进行对比,根据标准曲线上的位置预测肿瘤糖摄取能力;

6、出预测肿瘤糖摄取能力报告,提供外科医生或肿瘤科医生,作为一种术后治疗和预测预后的指标。

[0033] 归纳:

1、基底微绒毛的生长规律

为了对血管内皮细胞基底微绒毛的物理参数进行测量,通过CD34 抗体的厚组织切片免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜重建,得到了完整和清晰的肿瘤微循环结构及微绒毛结构。与我们前期观察到现象一致的是肿瘤PET-CT SUVmax 值越高,肿瘤组织内的血管内皮细胞基底微绒毛密度越密长度越长。我们观察到SUVmax 值低的肿瘤中较小的微血管中内皮细胞基底微绒毛较为发达,但较大的微血管很少看到长出来的微绒毛。然而,SUVmax值高的病人肿瘤内部的小的微血管(直径3-10微米左右)和较大一点微血管 (10-30微米)均长出较长和比较密的微绒毛。我们同时发现随着SUVmax值的增高,肿瘤内部带有基底微绒毛的血管比例也会增加。肿瘤内部内皮细胞基底微绒毛的物理参数有几个共同的特点:SUVmax值越高肿瘤内部的血管内皮细胞基底微绒毛密度越密、长度越长,反之亦然(参见图3)。同时观察到,随着SUVmax值增加,血管内皮细胞基底微绒毛分支也会有所增多。这些结果提示肿瘤器官形成过程中基底微绒毛首先出现在直径较小的微血管中,随着糖摄取能力的提高这些结构会在较大一点微血管中出现,并逐渐变长,提示着血管内皮细胞基底微绒毛的这种变化是一个系统的有规律的变化。内皮细胞基底微绒毛的伴随肿瘤PET-CT SUVmax 值的有规律变化,提示内皮细胞基底微绒毛的物理参数具有成为一种新的显示肿瘤代谢能力指标的潜力。

[0034] 2、微循环内皮细胞基底微绒毛物理参数可以预测肿瘤组织糖摄取能力

为了测量和计数肿瘤微血管内皮细胞基底微绒毛物理参数,首先使用image J 图像分析软件,通过z-轴叠加所扫描图片,使基底微绒毛变得清晰,保证测量前能见到完整的微血管基底微绒毛结构。观察到完整的微血管基底微绒毛结构后,对微血管基底微绒毛结构进行测量和计数(图1 和2)。为了系统具有较容易的操作性,只测量了长度和密度两个参数。根据标本大小和肿瘤内部肿瘤细胞比值,每个肿瘤扫描了5-15根微血管。基底微绒毛参数与病人的肿瘤PET-CT SUVmax值的相关性分析发现,肿瘤内部微血管基底微绒毛长度的均值和中位数与肿瘤组织的PET-CT SUVmax值直接相关,微血管基底微绒毛长度的均值和中位数均与肿瘤组织的糖摄取能力直接相关($p<0.001$),相关系数分别是0.799 和0.805;微血管基底微绒毛密度的均值和中位数也与肿瘤组织糖摄取能力直接相关($p<0.001$),相关系数分别(r)是0.767 和0.813;微血管基底微绒毛密度和长度的均值和中位数的联合参数与肿瘤组织糖摄取能力相关性更强,相关系数分别(r)为0.883 和0.894(参见图4)。这个结果显示这些微血管基底微绒毛物理参数即长度和密度的均数和中位数具有显示肿瘤代谢水平的能力,长度和密度的联合参数预测肿瘤代谢水平的能力更强。

[0035] 3、胰腺癌微循环血管内皮细胞基底微绒毛参数的临床应用价值和前景

在临床实践过程中,体现肿瘤功能的检测指标往往具有极高的临床参考价值。这些指标不仅可以指导医生开展相应治疗,而且可以预测病人对各种疗法的敏感性和疾病复发及预后。遗憾的是,目前临床上体现肿瘤细胞功能的临床指标屈指可数。FDG PET-CT是最常用的方法之一。FDG PET-CT检测中常用参数是PET-CT SUVmax值,该指标体现肿瘤组织的最高糖摄取能力,属于临床影像学技术的范畴。该方法灵敏度高,很容易发现糖代谢异常的区域和微小的病灶病人。但是肿瘤组织糖总摄取能力受诸多因素的影响,包括炎症反应、不同炎症细胞比值、血糖浓度、间质比值和循环系统的特质等。胰腺癌是一个富含间质、乏血管、组织内部压力很高、炎症细胞丰富的肿瘤。因此,PET-CT SUVmax值显示胰腺癌组织的总体

代谢水平,包括炎症细胞和间质细胞的糖摄取等等。血管内皮细胞基底微绒毛在单纯炎症组织中没有发现。内皮细胞基底微绒毛参数是肿瘤组织内肿瘤细胞代谢能力的指标,而不是炎症细胞和肿瘤细胞的代谢能力的总和,因而具有更明确的指向性。病理学诊断是医学的“金”标准。基底微绒毛的检测技术是传统的病理学技术的延伸,且该指标是病理学技术指标,属于肿瘤诊断“黄金标准”范围。临床实践中有很好的推广性、实用性及准确性。该技术具有非常好的延伸潜力。可以与肿瘤免疫学指标、肿瘤细胞特异性抗体、间质特异性指标联合应用,可以全方位体现肿瘤的内部的病理变化和代谢和功能改变。帮助医生做出更好的治疗方案和对策,给患者带来更多好处。

[0036] 在胰腺癌的诊断中,FDG PET-CT可以用于检测、筛查肿瘤和评估疗效。但PET-CT也有些不足之处:1、患者的血糖水平影响检查结果,糖尿病病人血糖控制不佳的情况下,检查结果不准,而这是临床常见的现象;2、PET-CT在炎症的情况下、尤其是与胰腺癌鉴别诊断相关的疾病,如自身免疫性胰腺炎、肿块型慢性胰腺炎、胰腺结核的情况下,SUV值也会明显升高。内皮细胞基底微绒毛物理参数是一个与PET-CT SUV_{max} 值互补性非常强的指标。PET-CT SUV_{max} 值显示的肿瘤器官的整体宏观指标,无法知道这个值代表的是肿瘤细胞代谢能力还是其它炎症细胞的代谢能力。内皮细胞基底微绒毛物理参数是一个病理学的微观指标,可能只代表肿瘤细胞的代谢能力,因此具有非常好的细胞特异性。临床上,对于那些无法进行PET-CT检查肿瘤病人,内皮细胞基底微绒毛参数可以成为可选的肿瘤细胞代谢能力检测指标。内皮细胞基底微绒毛参数是一个物理学参数,物理学参数稳定性和重复性高,容易测量和检测等优点。这项技术与临床病理技术密切结合,标本使用的手术或活检标本,不会增加病人的额外的创伤和负担。

[0037] 参考文献

Cantor, J. R., and Sabatini, D. M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery* 2, 881-898.

Cuperlovic-Culf, M., Culf, A. S., Touaibia, M., and Lefort, N. (2012). Targeting the latest hallmark of cancer: another attempt at 'magic bullet' drugs targeting cancers' metabolic phenotype. *Future Oncol* 8, 1315-1330.

Egeblad, M., Nakasone, E. S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell* 18, 884-901.

Hsu, P. P., and Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707.

Kayano, T., Burant, C. F., Fukumoto, H., Gould, G. W., Fan, Y. S., Eddy, R. L., Byers, M. G., Shows, T. B., Seino, S., and Bell, G. I. (1990). Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* 265, 13276-13282.

Kinahan, P. E., and Fletcher, J. W. (2010). Positron emission tomography-computed tomography standardized uptake values in clinical practice and

assessing response to therapy. *Seminars in ultrasound, CT, and MR* 31, 496-505.

Lange, K. (2011). Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *J Cell Physiol* 226, 896-927.

Mann, G. E., Yudilevich, D. L., and Sobrevia, L. (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological reviews* 83, 183-252.

Saiyin, H., Ardito-Abraham, C. M., Wu, Y., Wei, Y., Fang, Y., Han, X., Li, J., Zhou, P., Yi, Q., Maitra, A., *et al.* (2015). Identification of novel vascular projections with cellular trafficking abilities on the microvasculature of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol* 236, 142-154.

Schellenberg, D., Quon, A., Minn, A. Y., Graves, E. E., Kunz, P., Ford, J. M., Fisher, G. A., Goodman, K. A., Koong, A. C., and Chang, D. T. (2010). 18Fluorodeoxyglucose PET is prognostic of progression-free and overall survival in locally advanced pancreas cancer treated with stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77, 1420-1425.

Thomas, H. M., Brant, A. M., Colville, C. A., Seatter, M. J., and Gould, G. W. (1992). Tissue-specific expression of facilitative glucose transporters: a rationale. *Biochemical Society transactions* 20, 538-542.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., and Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607-620.

Ward, P. S., and Thompson, C. B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297-308.

Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., *et al.* (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149, 656-670..

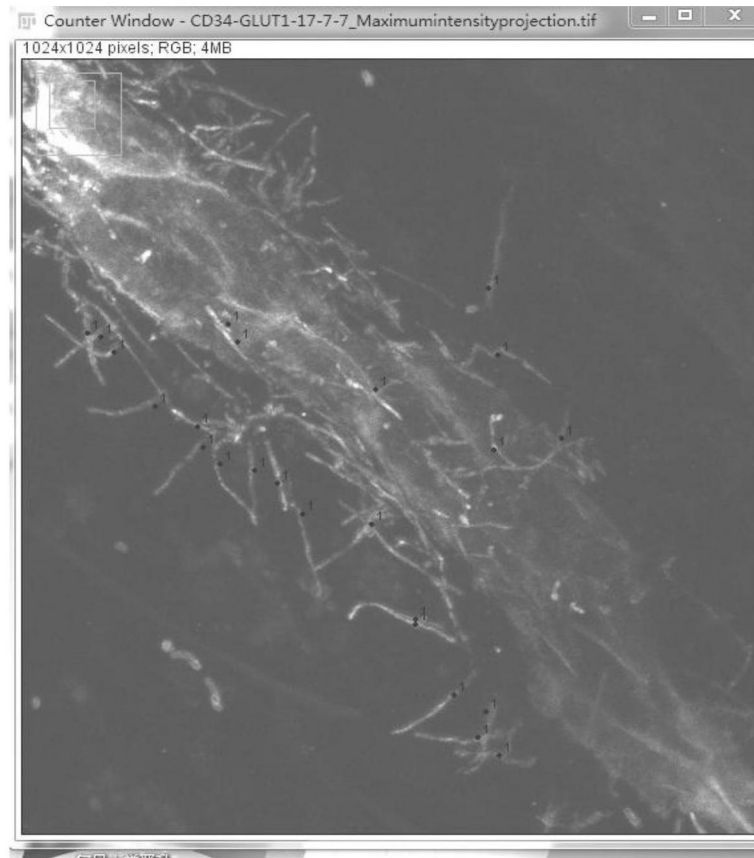


图1

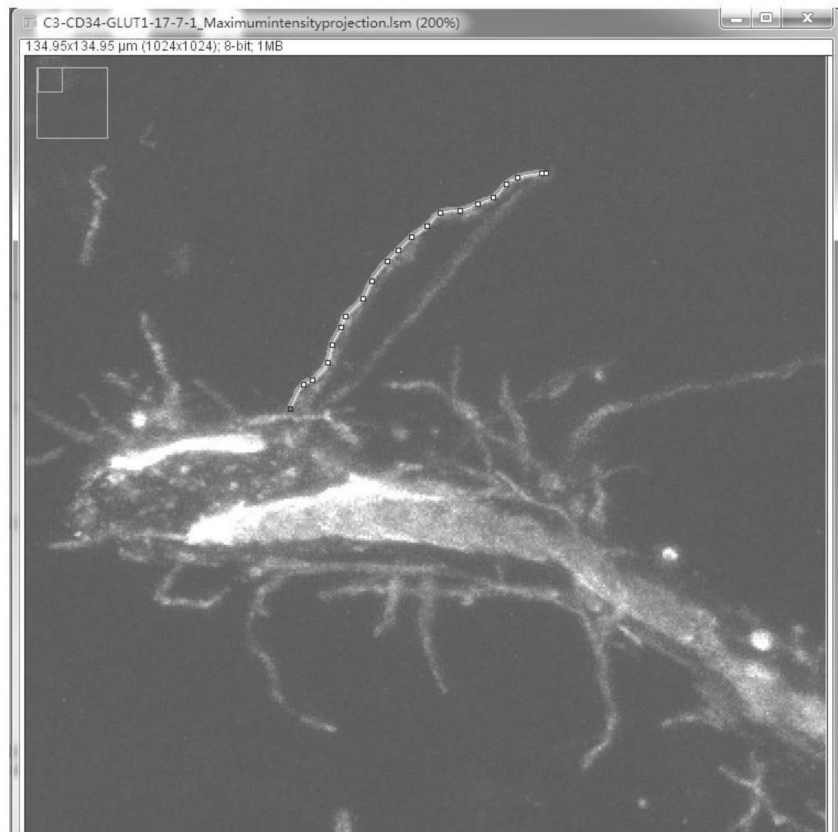


图2

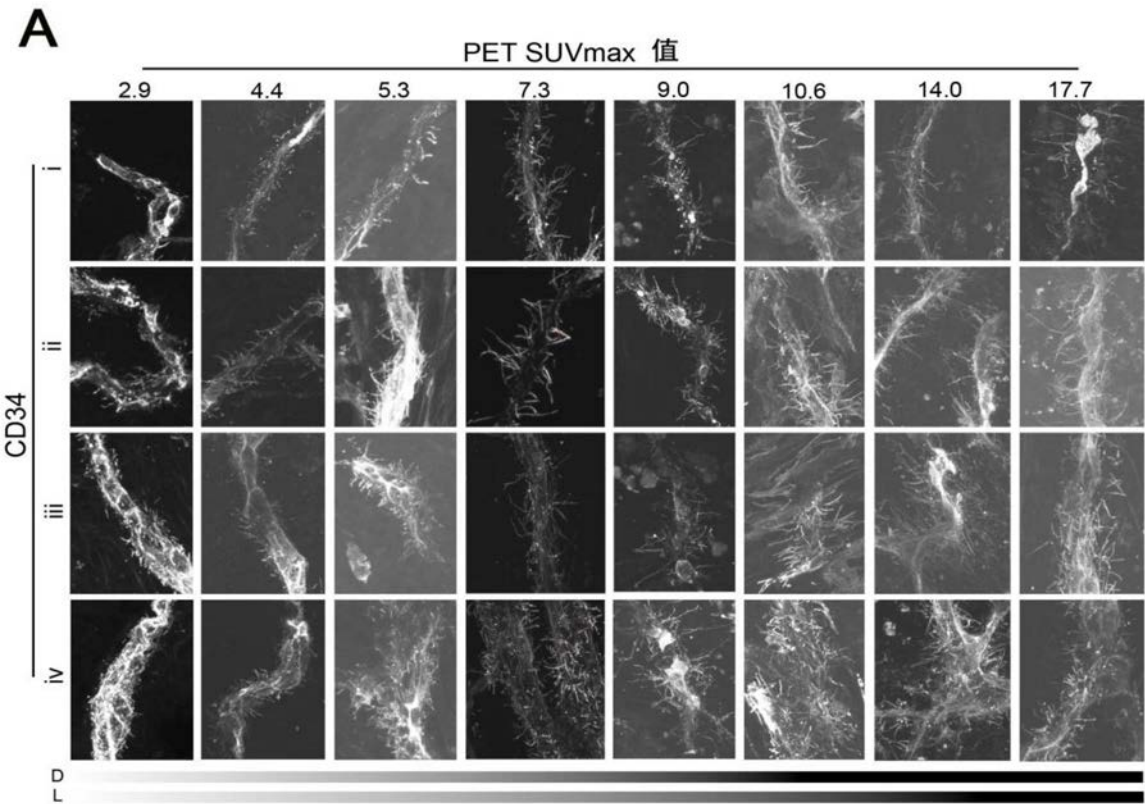


图3

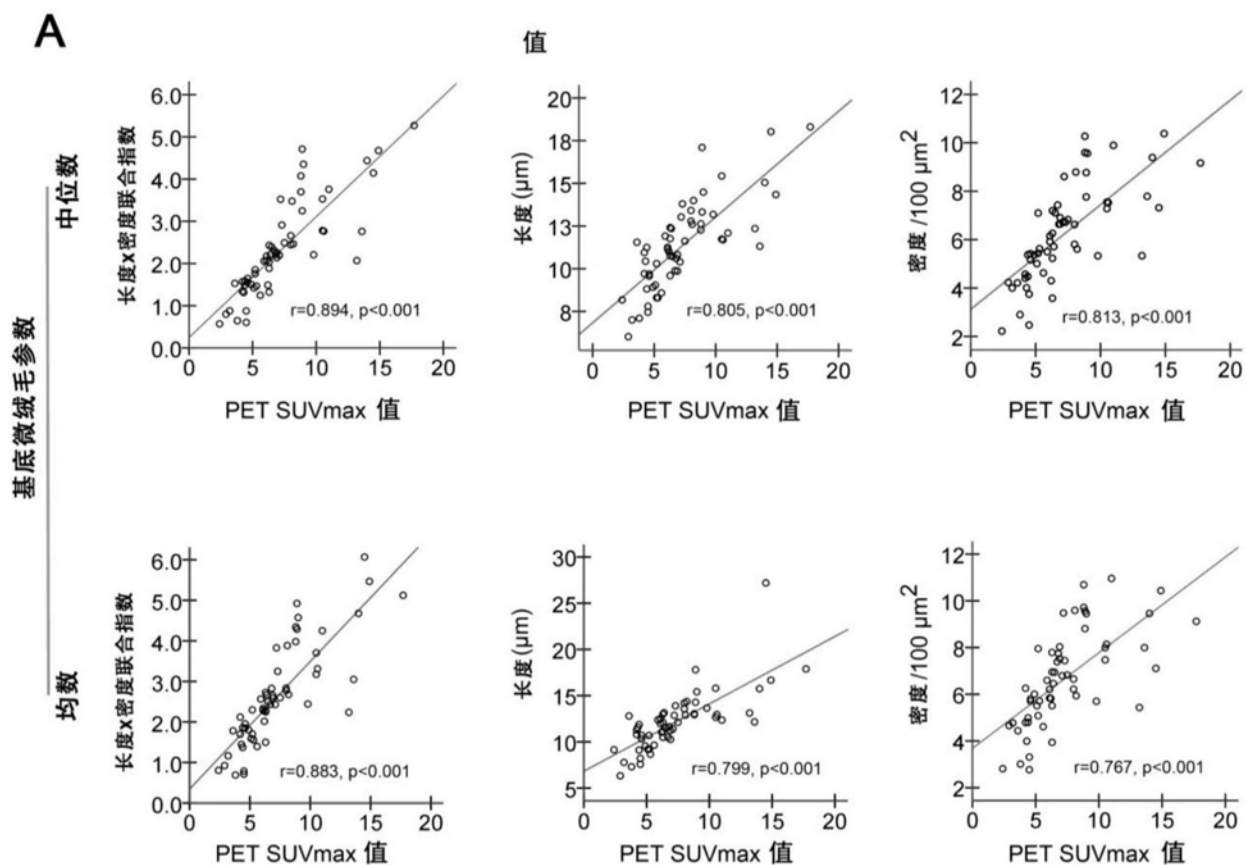


图4

专利名称(译)	胰腺癌基底微绒毛的检测方法和应用		
公开(公告)号	CN108761078A	公开(公告)日	2018-11-06
申请号	CN201810483625.6	申请日	2018-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	赛音贺西格 马丽香		
发明人	赛音贺西格 马丽香		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533 G01N21/64 G01B11/02		
CPC分类号	G01N33/57438 G01B11/02 G01N21/6402 G01N21/6458 G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/574		
代理人(译)	陆飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于临床医学和诊断领域，具体涉及利用微血管内皮细胞基底微绒毛物理参数预测肿瘤内部的代谢水平，其利用免疫荧光染色和激光共聚焦的扫描重建方法，重建肿瘤微循环内皮细胞的微绒毛完整结构，测量微绒毛的物理参数密度和长度，与病人的PET-CT SUVmax值对比分析，预测肿瘤组织内的代谢水平。结果显示，微血管基底微绒毛长度和密度的均值和中位数均与肿瘤组织的糖摄取能力直接相关；微血管基底微绒毛密度和长度的均值和中位数的联合参数与肿瘤组织糖摄取能力相关性更强。微血管皮细胞基底微绒毛只存在于恶性肿瘤内，而且该指标是病理学技术指标，属于肿瘤诊断黄金标准范畴，因此这个指标的特异性远高于代谢相关其它影像学指标。

