



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541209 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811123407.8

(22)申请日 2018.09.26

(71)申请人 汕头大学医学院

地址 515000 广东省汕头市金平区新陵路
22号

(72)发明人 许丽艳 何建忠 许秀娥 吴健谊
李恩民

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

代理人 曹江 周增元

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

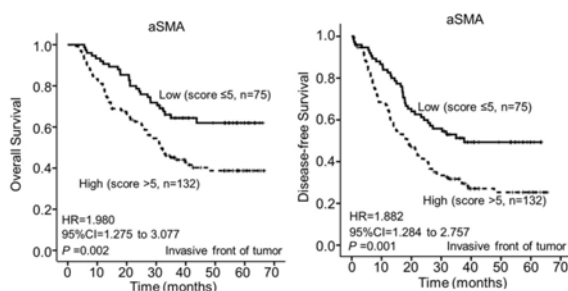
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型及其应用,分子模型主要包括 α -SMA⁺ (侵袭前沿)成纤维细胞、CD163⁺ (同质)巨噬细胞、CD117⁺ (固有层)肥大细胞、CD117⁺ (侵袭前沿)肥大细胞;可以用于预测食管鳞癌患者预后及对辅助治疗敏感性群体分组。试剂盒主要包括抗CD117蛋白抗体、抗CD163蛋白抗体和抗 α -SMA蛋白抗体。本发明所采用的3个分子结合病理组织学特征联合预测患者的预后比单个指标检测具有更高的预测效果,同时也明显区分食管鳞癌辅助治疗敏感性患者,并且本发明所基于的免疫组织化学超敏型二步法是一种成熟可靠、可在基层医院广泛使用的方法。跟国际TNM分期相比预测效果更加高,更加简单、易行,更具有敏感性及特异性。



1. 一种预测食管鳞癌患者预后的试剂盒,其特征在于,包括抗CD117蛋白抗体、抗CD163蛋白抗体和抗 α -SMA蛋白抗体。

2. 根据权利要求1所述预测食管鳞癌患者预后的试剂盒,其特征在于,还包括山羊血清,0.01M柠檬酸盐修复液,3% H_2O_2 ,Polymer增强剂,Polymer聚合物,DAB显色试剂与PBS溶液。

3. 根据权利要求1所述预测食管鳞癌患者预后的试剂盒在制备联合预测食管鳞癌患者预后及对辅助治疗敏感性群体分组试剂盒的应用。

4. 根据权利要求3所述应用,其特征在于,所检测的标本为中性福尔马林固定和石蜡包埋的组织蜡块。

5. 根据权利要求3所述应用,其特征在于,使用的检测方法为免疫组织化学超敏型二步法,具体步骤如下:对中性福尔马林固定和石蜡包埋的组织蜡块进行切片,切片经脱蜡至水化、抗原修复、灭活内源性过氧化物酶和山羊血清封闭后,分别与抗CD117蛋白抗体、抗CD163蛋白抗体和抗 α -SMA蛋白抗体在保湿盒内4 $^{\circ}C$ 孵育过夜;随后分别与Polymer增强剂和Polymer聚合物孵育后,DAB显色和苏木素复染细胞核;最后经酒精脱水和二甲苯透明后用中性树脂封片,并对每张染色切片进行评分。

6. 根据权利要求5所述应用,其特征在于,所述抗CD117蛋白抗体标记食管鳞癌固有层及侵袭前沿的肥大细胞,所述抗CD163蛋白抗体标记M2型巨噬细胞,所述抗 α -SMA蛋白抗体标记肿瘤相关性成纤维细胞,利用Vectra多光谱切片自动分析系统计算固有层、侵袭前沿的肥大细胞个数,以及肿瘤间质M2型巨噬细胞个数,以及镜下判别侵袭前沿 α -SMA阳性肿瘤相关性成纤维细胞表达值;CD117蛋白、CD163蛋白和 α -SMA蛋白高低表达的cut-off值由X-tile软件确定。

7. 一种食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型,其特征在于,主要包括 α -SMA⁺(_{侵袭前沿})成纤维细胞、CD163⁺(_{间质})巨噬细胞、CD117⁺(_{固有层})肥大细胞、CD117⁺(_{侵袭前沿})肥大细胞。

8. 根据权利要求7所述食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型,其特征在于,构建分子模型的方程式为:为 $Y=0.812 \times A+1.788 \times B+(-0.931) \times C+0.967 \times D$;其中A、B、C、D分别为 α -SMA⁺(_{侵袭前沿})成纤维细胞、CD163⁺(_{间质})巨噬细胞、CD117⁺(_{固有层})肥大细胞和CD117⁺(_{侵袭前沿})肥大细胞的表达状态,0代表低表达,1代表高表达;在计算出Y值后,根据X-tile软件把食管鳞癌患者分为高-,中-,低-风险组,即Y值大于2.76的为高风险组,Y值大于等于1.80小于等于2.763为中风险组,Y值小于1.80的为低风险组。

9. 根据权利要求7或8所述食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型的应用,其特征在于,可以用于预测食管鳞癌患者预后及对辅助治疗敏感性群体分组。

10. 根据权利要求9所述应用,其特征在于,评价个体食管鳞癌患者预后和辅助治疗敏感性的信息时,只需把该患者3个蛋白的免疫组化结果所对应的表达状态代入公式中,就可以得出Y值,然后与确定的cut-off值比较。

食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及联合多个蛋白抗体及病理组织学特征,并利用免疫组织化学超敏型二步法,去检测食管鳞癌患者标本的表达情况,进而预测患者预后和辅助治疗敏感性。

背景技术

[0002] 食管鳞状细胞癌(Esophageal Squamous Cell Carcinoma,ESCC),简称食管鳞癌,在我国是一种常见的上消化道恶性肿瘤,在国人的恶性肿瘤死亡率中位居第四位。全世界每年40余万的新发食管鳞癌病例中,一半以上发生在我国,我国也是世界上公认的食管鳞癌第一高发国。上世纪70年代,在全国范围内实施了恶性肿瘤普查,确立河北磁县、河南林县、山西阳泉、四川盐亭、广东潮汕和江苏淮安等地区为中国食管鳞癌六大高发区。

[0003] 准确预测食管鳞癌患者的预后及辅助治疗的敏感性对于临床进一步的决策具有重要意义。然而,目前除了国际TNM分期外还没有一种简便有效的方法可以更加准确地预测食管鳞癌患者的预后。然而,TNM分期预测患者的预后比较繁琐,需要准确地评价肿瘤的浸润深度、转移淋巴结的个数、肿瘤有无远处转移等,况且国际TNM分期的制定缺少大量国人食管鳞癌的病例资料,因此在评价我国患者的预后时适用性比较差;在预测放化疗敏感性方面更是缺少可用的分子标记物。

[0004] α -SMA标记的肿瘤相关性成纤维细胞,是多种恶性实体肿瘤微环境的主要间质成分,在肿瘤的进程和治疗上发挥着关键作用。肿瘤相关性成纤维细胞由于其组织来源不同可分泌不同的细胞因子和细胞外基质而发挥各种不一样的功能。

[0005] CD163标记的巨噬细胞是肿瘤微环境中最常见的一类炎症细胞,它在肿瘤中发挥着多种关键作用,具有很高的可塑性,甚至影响着肿瘤的治疗。有文章报道,肿瘤相关性成纤维细胞分泌IL-6上调单核细胞的巨噬细胞集落刺激因子表达,从而使单核细胞分化为CD163⁺的M2型巨噬细胞。

[0006] CD117标记的肥大细胞,在肿瘤微环境中是比较有争议的一类细胞,往往在肿瘤中发挥不一样甚至相反的作用。

发明内容

[0007] 为解决上述问题,本发明提供了一种食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型及其应用。

[0008] 一种预测食管鳞癌患者预后的试剂盒,包括抗CD117蛋白抗体、抗CD163蛋白抗体和抗 α -SMA蛋白抗体。

[0009] 本发明发现在食管鳞癌侵袭前沿存在一亚群肿瘤相关性成纤维细胞不直接影响肿瘤细胞EMT,而与微环境的重塑和炎症细胞的激活、浸润相关。食管鳞癌中CD163⁺巨噬细胞数量与患者不良预后显著相关,并且与肿瘤大小,肿瘤浸润深度紧密相关。食管鳞癌侵袭前沿成纤维细胞与巨噬细胞数量呈正相关。食管鳞癌固有层的肥大细胞与患者的良好预后相关,而侵袭前沿的肥大细胞与患者的不良预后紧密相关。而侵袭前沿成纤维细胞与肥大

细胞数量呈负相关。

[0010] 虽然CD117蛋白、CD163蛋白和 α -SMA蛋白均具有预测食管鳞癌患者预后的能力,但肿瘤微环境作为一个复杂整体,其细胞组分是一个动态变化且相互作用共同影响肿瘤发生发展和治疗的。因此把3种相关分子结合组织学的特征联合起来预测食管鳞癌患者的预后则具有更强的判断效能,甚至高于国际公认的TNM分期的预测能力,而且能把食管鳞癌辅助治疗敏感的患者区分出来。

[0011] 其中试剂盒的检测试剂分别是山羊血清,0.01M柠檬酸盐修复液,3% H₂O₂, Polymer增强剂, Polymer聚合物, DAB显色试剂与PBS溶液。

[0012] 上述预测食管鳞癌患者预后的试剂盒在制备联合预测食管鳞癌患者预后及对辅助治疗敏感性群体分组试剂盒的应用。

[0013] 其中,使用试剂盒所检测的标本为中性福尔马林固定和石蜡包埋的组织蜡块。

[0014] 其中,所使用的检测方法为免疫组织化学超敏型二步法,具体步骤如下:对中性福尔马林固定和石蜡包埋的组织蜡块进行切片,切片经脱蜡至水化、抗原修复、灭活内源性过氧化物酶和山羊血清封闭后,分别与抗CD117蛋白抗体、抗CD163蛋白抗体和抗 α -SMA蛋白抗体在保湿盒内4℃孵育过夜;随后分别与Polymer增强剂和Polymer聚合物孵育后, DAB显色和苏木素复染细胞核;最后经酒精脱水和二甲苯透明后用中性树胶封片,并对每张染色切片进行评分。

[0015] 其中,所述抗CD117蛋白抗体标记食管鳞癌固有层及侵袭前沿的肥大细胞,所述抗CD163蛋白抗体标记M2型巨噬细胞,所述抗 α -SMA蛋白抗体标记肿瘤相关性成纤维细胞,利用Vectra多光谱切片自动分析系统计算固有层、侵袭前沿的肥大细胞个数,以及肿瘤间质M2型巨噬细胞个数,以及镜下判别侵袭前沿 α -SMA阳性肿瘤相关性成纤维细胞表达值(染色强度 \times 阳性面积)。三种蛋白高低表达的cut-off值由X-tile软件确定,其中CD117的cut-off值是100,CD163的cut-off值是600, α -SMA的cut-off值是5分。

[0016] 一种食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型,主要包括 α -SMA⁺(_{侵袭前沿})成纤维细胞、CD163⁺(_{间质})巨噬细胞、CD117⁺(_{固有层})肥大细胞、CD117⁺(_{侵袭前沿})肥大细胞。。

[0017] 其中,构建分子模型的方程式为:每例标本在应用3种蛋白抗体分别检测后,其3种蛋白联合表达的计算公式为 $Y = \alpha \times A + \beta \times B + \gamma \times C + \delta \times D$,其中 α 、 β 、 γ 、 δ 为系数,可以通过Cox回归得出,故该公式转换为 $Y = 0.812 \times A + 1.788 \times B + (-0.931) \times C + 0.967 \times D$;A、B、C、D分别为该例标本中 α -SMA⁺(_{侵袭前沿})成纤维细胞、CD163⁺(_{间质})巨噬细胞、CD117⁺(_{固有层})肥大细胞和CD117⁺(_{侵袭前沿})肥大细胞的表达状态,0代表低表达,1代表高表达;在计算出每例标本的Y值后,根据X-tile软件把食管鳞癌患者分为高-,中-,低-风险组(cut-off值分别为1.80和2.76),即Y值大于2.76的为高风险组,Y值大于等于1.80小于等于2.763为中风险组,Y值小于1.80的为低风险组。

[0018] 上述食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型的应用,可以用于预测食管鳞癌患者预后及对辅助治疗敏感性群体分组。

[0019] 评价个体食管鳞癌患者预后和辅助治疗敏感性的信息时,只需把该患者3个蛋白的免疫组化结果所对应的表达状态代入公式中,就可以得出Y值,然后与确定的cut-off值比较。得到对应的1年、3年、5年的总生存率和无瘤生存率,及对应单纯手术组和手术+辅助治疗组的生存情况,同时得到不同治疗方式的预后建议。

[0020] 与现有技术相比,本发明所采用的3个分子结合病理组织学特征联合预测患者的预后比单个指标检测具有更高的预测效果,同时也明显区分食管鳞癌辅助治疗敏感性患者,并且本发明所基于的免疫组织化学超敏型二步法是一种成熟可靠、可在基层医院广泛使用的方法。跟国际TNM分期相比预测效果更加高,更加简单、易行,更具有敏感性及特异性。

附图说明

[0021] 图1是侵袭前沿 α -SMA⁺成纤维细胞在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线(总生存率:P=0.002;无瘤生存率:P=0.001)。

[0022] 图2是间质CD163⁺巨噬细胞在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线(总生存率:P<0.001;无瘤生存率:P<0.001)。

[0023] 图3是固有层和侵袭前沿CD117⁺肥大细胞在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线;固有层CD117⁺肥大细胞的高表达延长食管鳞癌患者预后,而侵袭前沿CD117⁺肥大细胞与患者预后不良相关(固有层:总生存率:P<0.001,无瘤生存率:P=0.003;侵袭前沿:总生存率:P=0.001,无瘤生存率:P=0.011)。

[0024] 图4是侵袭前沿 α -SMA⁺成纤维细胞与间质CD163⁺巨噬细胞、CD117⁺肥大细胞的相关关系;侵袭前沿 α -SMA⁺成纤维细胞与间质CD163⁺巨噬细胞呈正相关($R=0.239, P=0.001$),侵袭前沿 α -SMA⁺成纤维细胞与固有层、侵袭前沿CD117⁺肥大细胞呈负相关(固有层: $R=-0.359, P<0.001$;侵袭前沿: $R=-0.207, P=0.003$)。

[0025] 图5是分子模型判断该人群的Kaplan-Meier生存曲线(总生存率:P<0.001;无瘤生存率:P<0.001)。

[0026] 图6是ROC曲线;分子模型总生存率及无瘤生存率的ROC曲线下面积明显高于TNM分期。

[0027] 图7是分子模型与治疗的关系;相对于低风险组和中风险组,高风险组手术+辅助治疗明显延长食管鳞癌患者的总生存和无瘤生存。

具体实施方式

[0028] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,本实施例收集了207例2012-2014年的食管鳞癌患者的手术标本存档蜡块。下面将结合附图对本发明作进一步地详细描述。

[0029] 免疫组织化学超敏型二步法步骤如下:

[0030] 标本经连续切片、二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,用超敏型二步法检测目的蛋白的表达。具体方法如下:

[0031] (1)切片经0.01M柠檬酸盐修复液抗原修复、3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶、山羊血清封闭后,分别与 α -SMA、CD163和CD117抗体4℃孵育过夜;

[0032] (2)切片与Polymer增强剂和Polymer聚合物分别孵育后,DAB显色;

[0033] (3)切片经苏木素复染核,梯度酒精脱水,二甲苯透明和中性树胶封片;

[0034] (4)切片在完成上述每步后均经PBS溶液洗涤。

[0035] 所有的免疫染色切片经2位病理医师采用盲法独立评分。 α -SMA主要评估侵袭前沿阳性成纤维细胞,评分方法为表达强度 \times 阳性面积。染色强度分为4级:0,阴性;1,弱染色;

2, 中度染色; 3, 强染色。阳性细胞百分数分为5级: 0, 0~5%; 1, 6~25%; 2, 26~50%; 3, 51~75%; 4, ≥76%。每个标本的总分数是由肿瘤细胞染色强度和肿瘤细胞阳性百分数两部分的乘积得出, 范围是0~12。CD163⁺巨噬细胞和CD117⁺肥大细胞数目由Vectra多光谱切片自动分析系统计算。按照标准的Vectra多光谱切片自动分析系统的操作说明, 首先在40倍镜下自动扫描组织切片, 然后200倍镜下采集图片, 通过Vectra系统自动识别CD163⁺巨噬细胞和CD117⁺肥大细胞, 然后对阳性细胞数最多的前20张图片求和。为了方便统计, 把所有病例分为低表达和高表达2组, 0代表低表达组, 1代表高表达组, 其cut-off值根据X-tile软件确定。a-SMA: 0~5分为低表达组, 6~12分为高表达组; CD163⁺巨噬细胞数目: 0~600为低表达组, 大于600为高表达组; CD117⁺肥大细胞数目: 0~100为低表达组, 大于100为高表达组。

[0036] 侵袭前沿a-SMA⁺成纤维细胞、间质CD163⁺巨噬细胞、固有层CD117⁺肥大细胞和侵袭前沿CD117⁺肥大细胞联合起来构建分子模型的方程式如下:

[0037] $Y = \alpha \times A + \beta \times B + \gamma \times C + \delta \times D$, 其中 α 、 β 、 γ 、 δ 为系数, 可以通过Cox回归得出, 故该公式转换为 $Y = 0.812 \times A + 1.788 \times B + (-0.931) \times C + 0.967 \times D$; A、B、C、D分别为该例标本中a-SMA⁺ (侵袭前沿) 成纤维细胞、CD163⁺ (间质) 巨噬细胞、CD117⁺ (固有层) 肥大细胞和CD117⁺ (侵袭前沿) 肥大细胞的表达状态, 0代表低表达, 1代表高表达; 在计算出每例标本的Y值后, 根据X-tile软件把食管癌患者分为高-, 中-, 低-风险组 (cut-off值分别为1.80和2.76), 即Y值大于2.76的为高风险组, Y值大于等于1.80小于等于2.763为中风险组, Y值小于1.80的为低风险组。接着在进行单因素多因素分析及ROC分析。

[0038] 数据的统计学处理:

[0039] 使用SPSS 19.0统计软件处理数据。各间质组分的表达与患者的生存时间的关系使用Kaplan-Meier生存分析; 预测影响患者预后的独立危险因素使用Cox比例风险回归模型; 各间质组分的表达与临床病理参数的关系使用Fisher's Exact Test分析; 每种组分预测食管鳞癌患者预后的效能使用ROC曲线; $P < 0.05$ 被认为有统计学显著性。

[0040] 结果显示:

[0041] a-SMA⁺ (侵袭前沿) 成纤维细胞、CD163⁺ (间质) 巨噬细胞、CD117⁺ (固有层) 肥大细胞、CD117⁺ (侵袭前沿) 肥大细胞和分子模型与食管鳞癌患者的生存关系见图1-3。如图1所示, 侵袭前沿a-SMA⁺成纤维细胞的高表达缩短食管鳞癌患者的总生存和无瘤生存。图2生存分析发现, CD163⁺ (间质) 巨噬细胞与食管鳞癌患者的不良预后相关。图3结果显示, 固有层CD117⁺肥大细胞增多明显延长食管鳞癌患者的总生存和无瘤生存, 而侵袭前沿CD117⁺肥大细胞高表达组食管鳞癌患者的总生存和无瘤生存较低表达组显著降低。

[0042] 如图4所示, 相关性分析发现, 侵袭前沿a-SMA⁺成纤维细胞的表达与CD163⁺ (间质) 巨噬细胞的数量呈正比, 与固有层CD117⁺肥大细胞、侵袭前沿CD117⁺肥大细胞呈负相关。

[0043] 图5生存分析发现, 分子模型高风险组相对于低, 中风险组明显缩短食管鳞癌患者的总生存和无瘤生存。

[0044] 图6ROC分析发现, 分子模型对食管鳞癌患者总生存和无瘤生存的预测效能明显高于Ptnm-stage。

[0045] 图7生存分层分析发现, 分子模型高风险组对辅助治疗显著受益, 高风险组的手术患者1年总生存率和无瘤生存率分别为12.5%, 0%; 而高风险组的手术+辅助治疗患者1年总生存率和无瘤生存率分别为66.7%, 37.5%。分子模型高风险组食管鳞癌患者对辅助治

疗明显受益。

[0046] a-SMA⁺ (侵袭前沿) 成纤维细胞、CD163⁺ (间质) 巨噬细胞、CD117⁺ (固有层) 肥大细胞、CD117⁺ (侵袭前沿) 肥大细胞的表达都与食管鳞癌患者临床病理参数的关系如表1所示: 表1结果示侵袭前沿a-SMA⁺成纤维细胞和CD163⁺ (间质) 巨噬细胞与肿瘤大小, 浸润深度相关; CD117⁺ (固有层) 肥大细胞与肿瘤大小, 浸润深度, 淋巴结转移以及临床分期相关。

[0047] 表1各标志物与食管鳞癌患者临床病理参数的关系

[0048]

Variables	a-SMA ^a		P*	CD163 ^b		P*	CD117 ^c		P*	CD117 ^d		P*
	Low	High		Low	High		Low	High		Low	High	
Age (year)												
<58	33	66	0.406	22	77	0.118	36	63	0.752	36	63	0.549
≥58	42	66		15	93		37	71		35	73	
Gender												
Male	57	104	0.643	27	134	0.438	61	100	0.140	52	109	0.256
Female	18	28		10	36		12	34		19	27	
Therapies												
Only Surgery	37	48	0.309	18	67	0.096	27	58	0.312	31	54	0.680
Surgery + Radiotherapy	6	16		3	19		10	12		5	17	
Surgery + Chemotherapy	18	36		13	41		16	38		19	35	
Surgery + Radiochemotherapy	14	32		3	43		20	26		16	30	
Tumor size												
≤3cm	32	36	0.008	20	48	0.008	14	54	<0.001	20	48	0.584
3-5cm	35	60		13	82		32	63		35	60	
>5cm	8	36		4	40		27	17		16	28	
Tumor location												
upper	4	11	0.093	1	14	0.022	3	12	0.309	7	8	0.342
middle	47	62		27	82		37	72		33	76	
lower	24	59		9	74		33	50		31	52	
Histologic grade												
G1	12	31	0.297	6	37	0.752	13	30	0.219	17	26	0.705
G2	51	87		26	112		48	91		45	93	
G3	12	14		5	21		13	13		9	17	
Invasive depth												
T1+T2	35	18	<0.001	16	37	0.007	11	42	0.010	14	39	0.161
T3+T4	40	114		21	133		62	92		57	97	
Lymph node metastasis												
N0	44	60	0.068	22	82	0.216	25	79	0.001	37	67	0.697
N1+N2+N3	31	72		15	88		48	55		34	69	
pTNM-stage												
I	10	11	0.133	7	14	0.076	6	15	0.004	10	11	0.393
II	40	59		19	80		25	74		33	66	
III	25	62		11	76		42	45		28	59	

[0049] *Fisher's Exact Test; P value < 0.05 was considered significant.

[0050] ^a a-SMA (Invasive front of tumor), low, ≤4 scores; high, >4 scores

[0051] ^b CD163 (Stroma), low, ≤600 cells; high, >600 cells

[0052] ^c CD117 (Lamina propria), low, ≤100 cells; high, >100 cells

[0053] ^d CD117 (Invasive front of tumor), low, ≤100 cells; high, >100 cells

[0054] Cox风险回归模型预测患者的独立危险因素如下:

[0055] 从表2分析结果发现分子模型具有更强的食管鳞癌预后预测能力, 同时也是独立

的预后因子。

[0056] 表2食管鳞癌患者总生存率和无瘤生存率的单变量以及多变量分析结果

[0057]

	OS		DFS	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
Univariate analysis				
Age (>58 vs ≤58)	0.989(0.671 to 1.459)	0.957	0.992(0.703 to 1.399)	0.962
Gender (Female vs Male)	0.876(0.542 to 1.416)	0.590	1.054(0.694 to 1.602)	0.804
Therapies (Surgery +	0.918(0.619 to 1.362)	0.672	1.178(0.826 to 1.679)	0.366
[0058]				
adjuvant therapy vs Only Surgery)				
Tumor Size		0.072		0.165
3-5cm vs ≤ 3cm	1.483(0.928 to 2.370)	0.099	1.442(0.956 to 2.175)	0.081
>5cm vs ≤ 3cm	1.866(1.082 to 3.219)	0.025	1.484(0.911 to 2.417)	0.113
pTNM-stage (III+IV vs I+II)	1.879(1.349 to 2.617)	<0.001	2.012(1.501 to 2.697)	<0.001
molecular prognostic model		<0.001		<0.001
Medium-risk vs ≤ Low-risk	3.039(1.768 to 5.221)	<0.001	2.468(1.592 to 3.827)	<0.001
High-risk vs ≤ Low-risk	9.649(5.207 to 17.882)	<0.001	7.383(4.365 to 12.487)	<0.001
Multivariate analysis				
pTNM-stage (III+IV vs I+II)	1.439(1.003 to 2.063)	0.048	1.586(1.169 to 2.152)	0.003
molecular prognostic model		<0.001		<0.001
Medium-risk vs ≤ Low-risk	2.997(1.737 to 5.169)	<0.001	2.341(1.508 to 3.634)	<0.001
High-risk vs ≤ Low-risk	8.777(4.497 to 17.133)	<0.001	5.628(3.251 to 9.740)	<0.001

[0059] 注：多因素分析，Cox比例风险回归模型。单因素分析变量的预后意义。

[0060] 评价个体食管鳞癌患者预后和辅助治疗敏感性的信息时，只需把该患者3个蛋白的免疫组化结果所对应的表达状态代入公式中，就可以得出Y值，然后与确定的cut-off值比较，对应各风险组的生存情况如表3所示：

[0061] 表3 207例食管鳞癌患者分子模型各风险组的生存情况

[0062]

	低风险组	中风险组	高风险组
5年总生存率	73.5%	41.8%	4.9%
5年无瘤生存率	57.6%	29.2%	0%
单纯手术组			
5年总生存率	70.5%	40.1%	12.5% (1年总生存率)
5年无瘤生存率	56.3%	35.1%	0% (1年无瘤生存率)
手术+辅助治疗组			
5年总生存率	76.8%	43.9%	66.7% (1年总生存率)
5年无瘤生存率	59.1%	26.3%	37.5% (1年无瘤生存率)

[0063] 得到对应的1年、3年、5年的总生存率和无瘤生存率，及对应单纯手术组和手术+辅助治疗组的生存情况，同时得到不同治疗方式的预后建议。

[0064] 分子模型及各单独分子标记物、pTNM-stage的预测效能比较

[0065] 从表4发现，分子模型比单个指标、pTNM-stage预测效能更佳。

[0066] 表4 ROC分析结果

[0067]

	总生存率的 ROC		无瘤生存率的 ROC	
	AUROC	<i>P</i> value	AUROC	<i>P</i> value
pTNM-stage	0.633	0.001	0.668	<0.001
Molecular prognostic model	0.722	<0.001	0.724	<0.001
[0068]				
a-SMA	0.596	0.017	0.604	0.012
CD163	0.609	0.007	0.637	0.001
CD117 (Lamina propria)	0.422	0.054	0.436	0.126
CD117 (Invasive front of tumor)	0.616	0.004	0.589	0.033

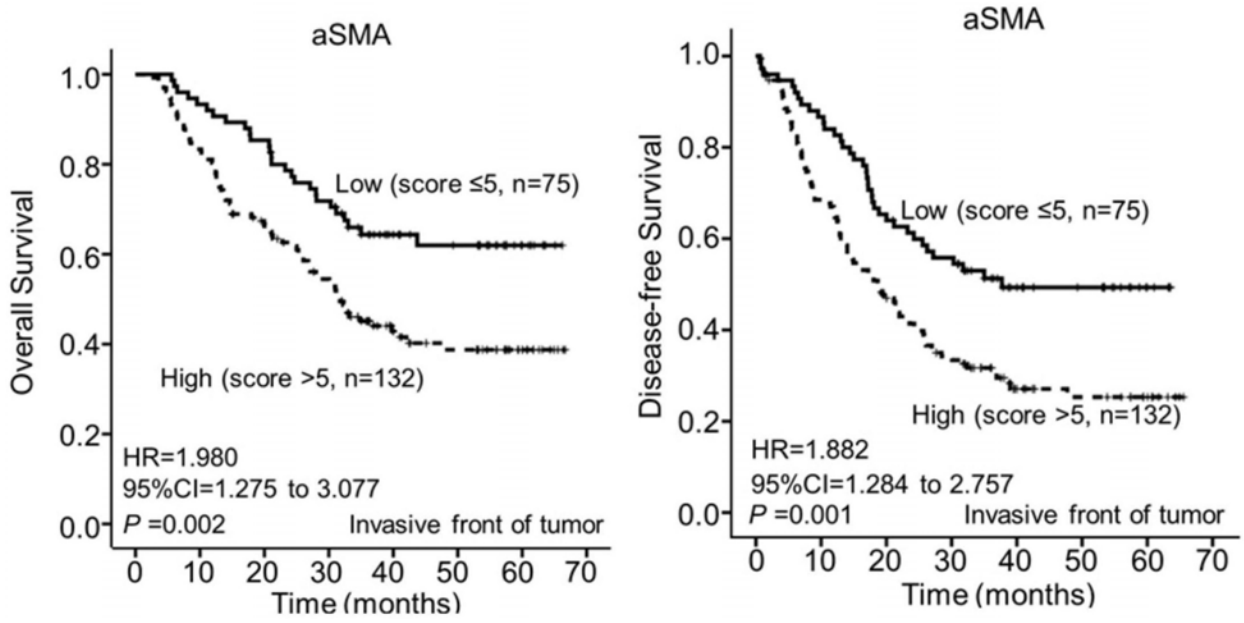


图1

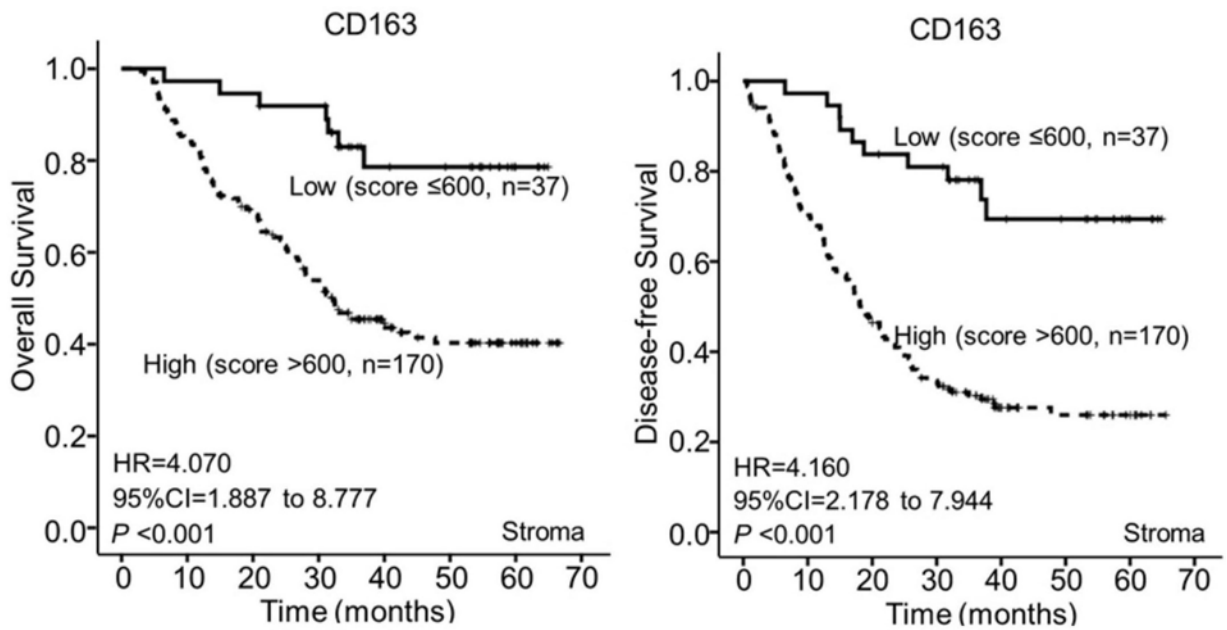


图2

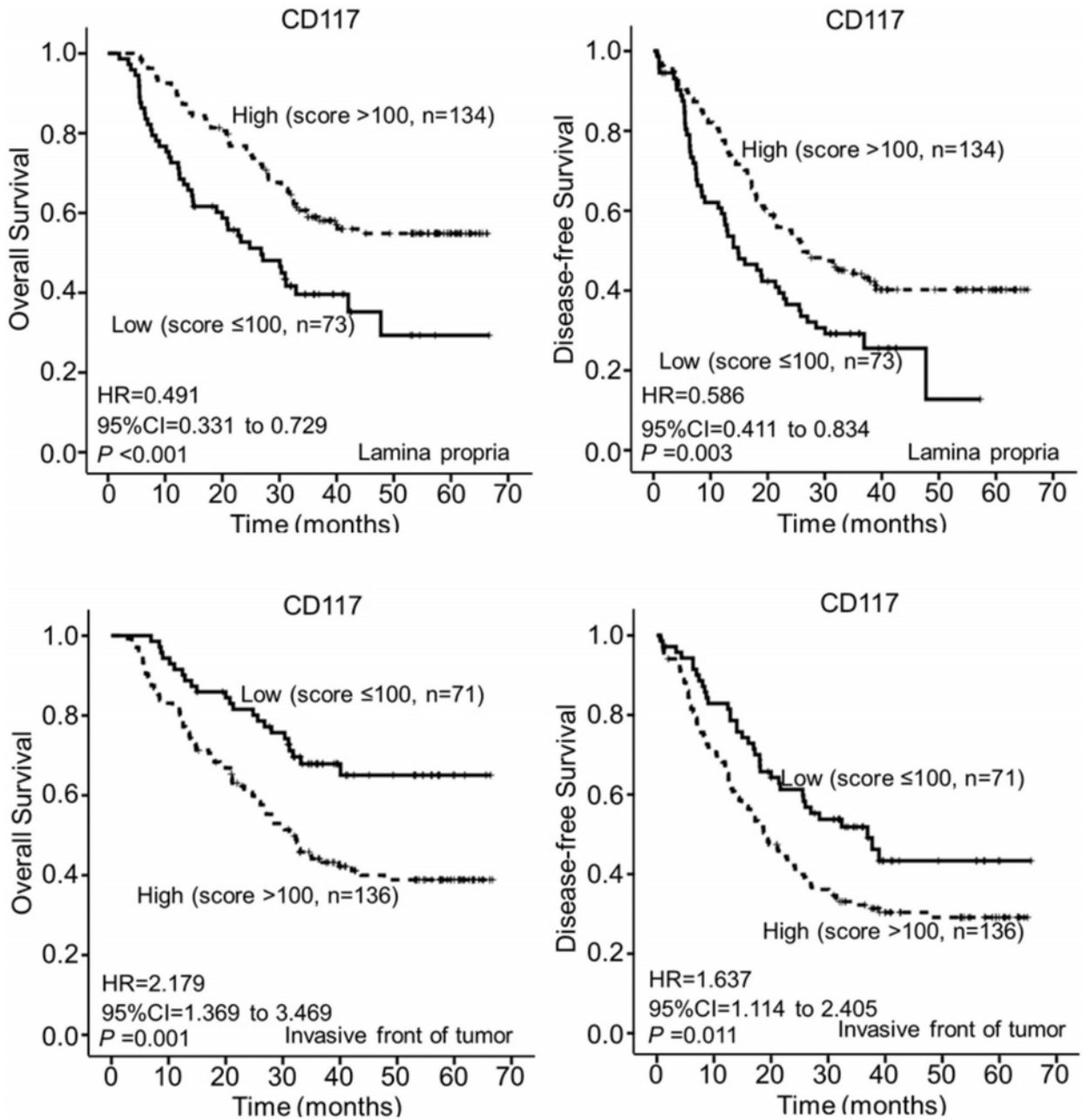


图3

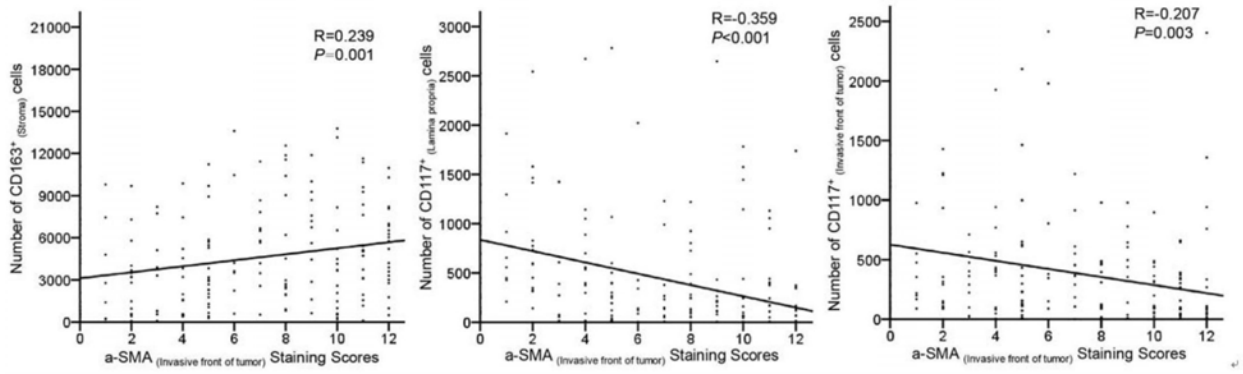


图4

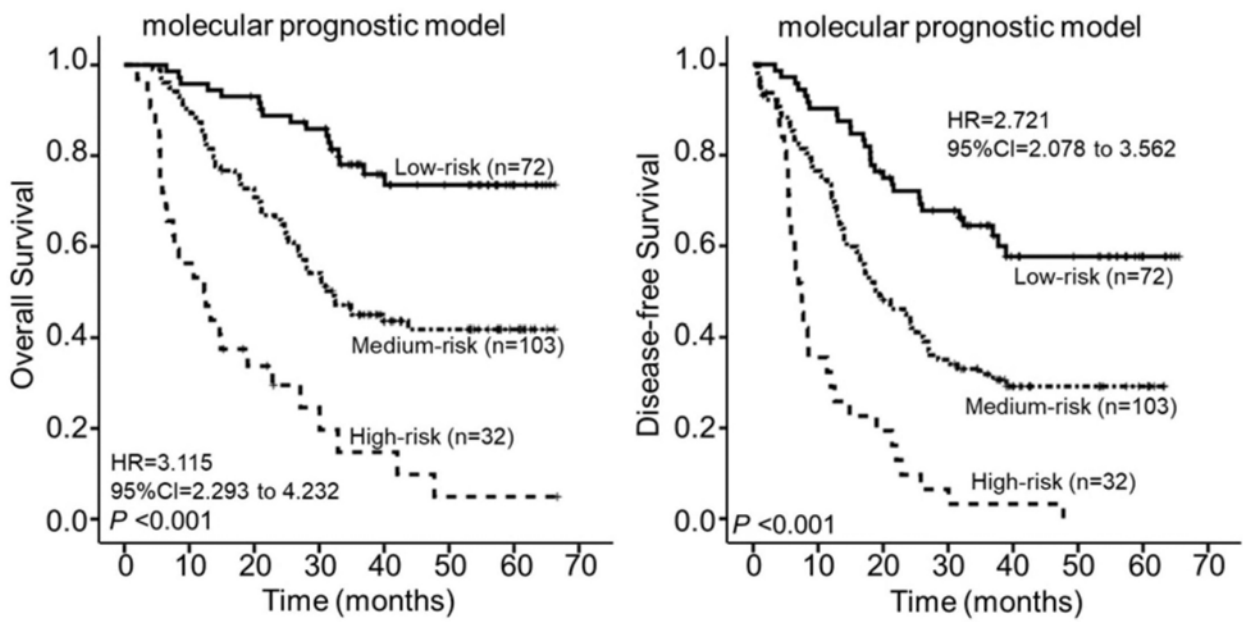


图5

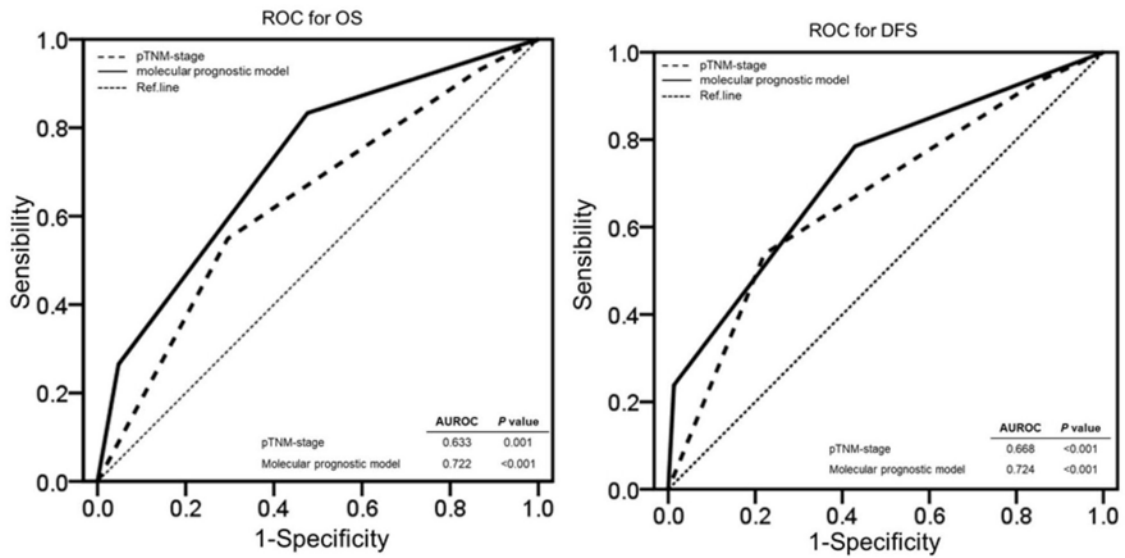


图6

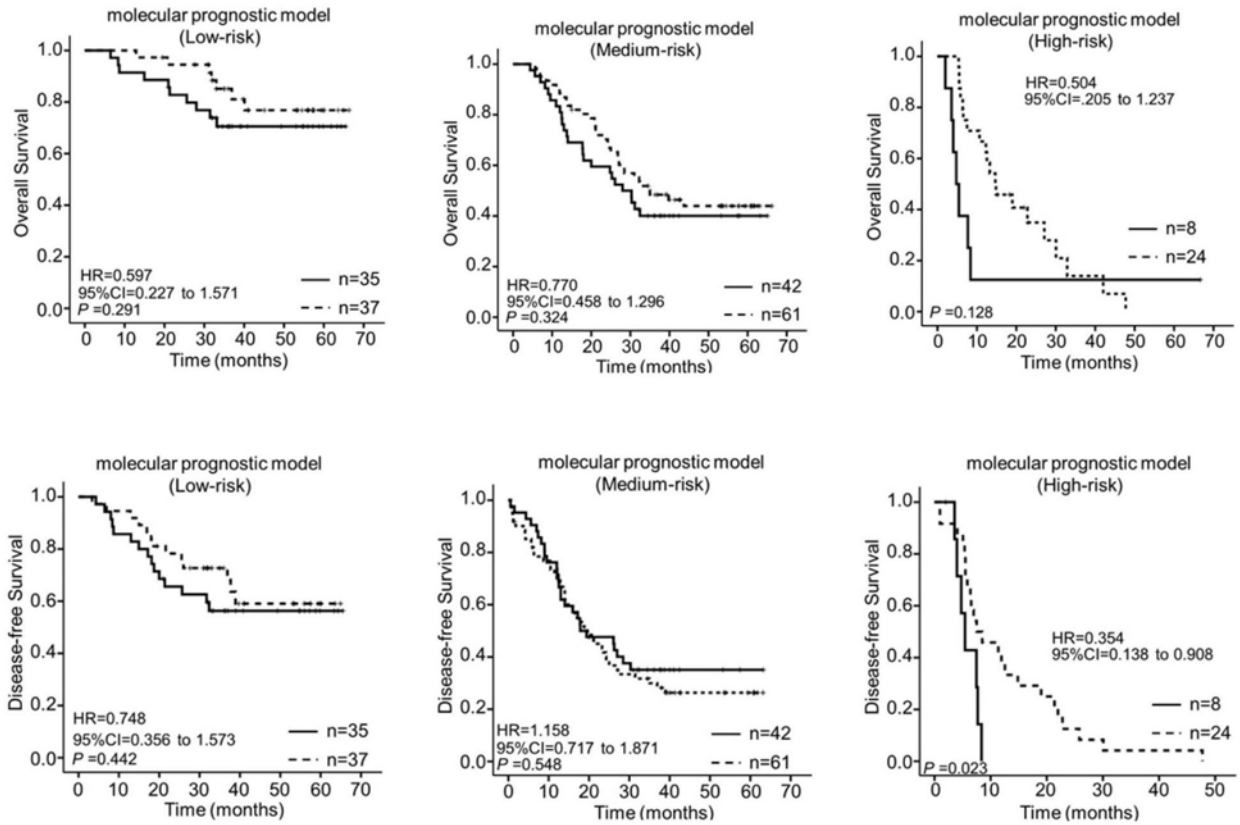


图7

专利名称(译)	食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型及其应用		
公开(公告)号	CN109541209A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811123407.8	申请日	2018-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	汕头大学医学院		
申请(专利权)人(译)	汕头大学医学院		
当前申请(专利权)人(译)	汕头大学医学院		
[标]发明人	许丽艳 何建忠 许秀娥 吴健谊 李恩民		
发明人	许丽艳 何建忠 许秀娥 吴健谊 李恩民		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N33/532		
代理人(译)	曹江		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种食管鳞状细胞癌微环境细胞标志物分子模型及其应用，分子模型主要包括a-SMA+(侵袭前沿)成纤维细胞、CD163+(间质)巨噬细胞、CD117+(固有层)肥大细胞、CD117+(侵袭前沿)肥大细胞；可以用于预测食管鳞癌患者预后及对辅助治疗敏感性群体分组。试剂盒主要包括抗CD117蛋白抗体、抗CD163蛋白抗体和抗a-SMA蛋白抗体。本发明所采用的3个分子结合病理组织学特征联合预测患者的预后比单个指标检测具有更高的预测效果，同时也明显区分食管鳞癌辅助治疗敏感性患者，并且本发明所基于的免疫组织化学超敏型二步法是一种成熟可靠、可在基层医院广泛使用的方法。跟国际TNM分期相比预测效果更加高，更加简单、易行，更具有敏感性及特异性。

