



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110161225 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201910441183.3

(22)申请日 2019.05.24

(71)申请人 中国人民解放军联勤保障部队第九  
0四医院

地址 214008 江苏省无锡市兴源北路101号

(72)发明人 周志华 赵海滨 板那 张俊杰

(74)专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务  
所 31233

代理人 黄志达

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

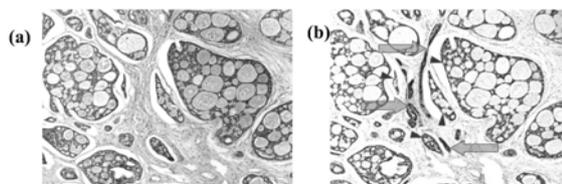
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒,所述试剂盒包括混合性一抗,还包括一种酶标二抗。本发明的免疫组织化学双标试剂盒,可一次性标记、显示癌细胞和神经纤维,对癌细胞神经侵犯的识别高效而准确。



1. 一种用于癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括混合性一抗和一种酶标二抗。
2. 根据权利要求1所述双标试剂盒,其特征在于,所述混合性一抗为S100抗体和Cytokeratin (pan) 抗体。
3. 根据权利要求2所述双标试剂盒,其特征在于,所述S100抗体和Cytokeratin (pan) 抗体属于同一种属来源。
4. 根据权利要求1所述双标试剂盒,其特征在于,二抗同时与混合性一抗中的两种抗体发生反应。
5. 根据权利要求1所述双标试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗中的显色酶为HRP或AP。
6. 根据权利要求5所述双标试剂盒,其特征在于,所述显色酶为HRP时,采用的显色剂为DAB或AEC;显色酶为AP时,采用的显色剂为AP-Red或BCIP/NBT。
7. 根据权利要求1所述双标试剂盒,其特征在于,所述混合性一抗所包含的两种一抗在同一切片上同时标记癌细胞和神经纤维。
8. 一种权利要求1所述检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒的应用。

## 一种检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫组织化学技术领域,特别涉及一种检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒。

### 背景技术

[0002] 癌症进展过程中,可通过直接浸润的方式侵犯、破坏机体的神经组织。目前,病理学上将癌细胞侵入、包绕或穿透神经纤维的现象定义为神经周围侵犯(Perineural invasion,PNI),简称为神经侵犯。在胰腺癌、胃癌、结直肠癌、前列腺癌等多种肿瘤中均可发现神经侵犯的现象,其中胰腺癌有95%以上的病例具有神经侵犯。

[0003] 神经侵犯对癌症的诊断和预后评估都具有重要的价值。首先,对肿瘤进行病理诊断时,鉴定有无神经侵犯对肿瘤良恶性的判断十分重要。例如,诊断口腔唾液腺的腺样囊性癌时,神经侵犯是一个重要依据。其次,在癌症的预后评估方面,神经侵犯也具有十分重要的意义。以往的许多研究发现,在头颈部癌神经侵犯是提示肿瘤易于复发且预后较差的一个显著标志,因此美国病理医师学院(College of American Pathologists)建议在头颈部癌的病理诊断报告中必须注明有无神经侵犯。除了头颈部癌,近年来对结直肠癌、食管癌、胃癌等肿瘤的研究也证实,神经侵犯的存在提示患者的生存期较短,可作为预后评估的重要指标。

[0004] 鉴于神经侵犯在癌症诊断和预后评估等方面的重要意义,在肿瘤诊断过程中确定有无神经侵犯十分必要。然而,病理医师在HE染色的切片中,识别或判断癌细胞的神经侵犯时常会遇到某些困难或障碍,表现为:1)需要在组织切片中搜寻神经纤维,在此基础上再观察有无神经侵犯,当组织块较大时该过程耗时费力;2)神经纤维在形态上与胶原纤维束及平滑肌束有一定的相似性,有时难以识别神经纤维,导致无法判断有无神经侵犯;3)某些情况下难以识别癌细胞,例如,在低分化的胃腺癌或印戒细胞癌,癌细胞的形态与炎症细胞尤其是浆细胞难以区分,神经纤维周围出现较多炎症细胞时可能被误判为神经侵犯,或者癌细胞侵犯神经纤维时却被误判为炎症细胞浸润神经纤维。

[0005] 现有如CN 104730242 A公开了一种用于肝细胞良、恶性肿瘤辅助诊断的双染试剂盒及其应用。该试剂盒成分较为复杂,使用的两个一抗来自两个不同的动物种属,而且需要两个不同的二抗以对应两个不同种属的一抗;同时,该试剂盒使用了两个不同的显色系统,染色过程中两个显色系统可能会互相干扰。

### 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒,检测癌细胞是否侵犯神经时,使用该试剂盒可以避免常规H.E染色时导致的假阳性或假阴性结果;同时,与以往的免疫组化双染试剂盒相比,该试剂盒的抗体成分更为简单,而且只使用一个显色系统,避免使用两个显色系统可能导致的显色系统互相干扰的问题。本发明中设计了一种同时标记癌细胞和神经纤维的免疫组化试剂盒,该试剂盒包含混合性的

第一抗体(一抗),该混合性一抗中含有针对S100和Cytokeratin(pan)的抗体,其中S100用于标记神经纤维,而Cytokeratin(pan)用于标记癌细胞。使用该试剂盒可在一张切片上同时且清晰地显示神经纤维和癌细胞。

[0007] 本发明的一种用于癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒,所述试剂盒包括混合性一抗和一种酶标二抗。

[0008] 所述混合性一抗为S100抗体和Cytokeratin(pan)抗体。

[0009] 所述S100抗体和Cytokeratin(pan)抗体属于同一种属来源。

[0010] 所述酶标二抗中该二抗同时与所述混合性一抗中的两种抗体发生反应。

[0011] 只使用一种显色系统(检测放大系统),显色酶为HRP或AP。

[0012] 所述酶标二抗中的显色酶为HRP或AP。

[0013] 所述显色酶为HRP时,采用的显色剂为DAB或AEC;显色酶为AP时,采用的显色剂为AP-Red或BCIP/NBT。

[0014] 所述混合性一抗所包含的两种一抗在同一切片上同时标记癌细胞和神经纤维。

[0015] 本发明还提供一种所述用于癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒的应用,该试剂盒用于显示癌细胞的神经侵犯。

[0016] 用于癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒的应用,具体为:

[0017] (1) 检测材料的准备:取石蜡包埋的组织蜡块进行切片,切片厚度3-5 $\mu$ m,将切片置于56 $^{\circ}$ C烤片10min;

[0018] (2) 组织切片的脱蜡及水化:将组织切片在二甲苯内浸泡2次,每次15min;而后用梯度酒精(100%,95%,85%,75%)浸洗,酒精浓度由高及低,每个浓度3min;再将组织切片在自来水中浸泡1min,转入PBS内浸泡5min;

[0019] (3) 抗原修复(煮沸法):选用pH 9.0的EDTA抗原修复液,先将修复液煮沸,再将组织切片完全浸入修复液,在电磁炉上加热10min(加热功率1000W,维持煮沸状态);而后降低电磁炉功率至400W,保温10min;修复结束后,自然冷却;

[0020] (4) 灭活内源性的过氧化氢酶:取出修复后的组织切片,PBS浸泡3min,而后滴加3% $H_2O_2$ 作用10min以灭活组织的内源性过氧化氢酶;(但显色酶为HRP时使用该步骤,如显色酶为AP则该步骤可省略);

[0021] (5) 血清封闭:去除 $H_2O_2$ 液,PBS浸洗2次,每次10min,而后滴加山羊封闭血清,作用10min;

[0022] (6) 一抗孵育:去除封闭血清,在组织切片上滴加混合性一抗,要求完全覆盖切片上的组织,并距离组织边缘至少2mm以避免边缘效应;随后将切片置于4 $^{\circ}$ C条件下过夜,或置于37 $^{\circ}$ C条件下60min;

[0023] (7) 二抗孵育:取出孵育一抗的组织切片,彻底去除一抗,在PBS内浸洗3次,每次10min;随后滴加针对一抗种属的二抗(连接有显色酶),37 $^{\circ}$ C条件下孵育25min;

[0024] (8) 显色:彻底去除二抗,PBS内浸洗3次,每次10min;而后滴加显色底物进行显色,显色时光学显微镜下观察着色情况,当组织着色深浅适中时立即去显色底物以终止显色,将切片放入自来水中浸泡清洗;

[0025] (9) 苏木精复染细胞核:取出组织切片,将其浸入苏木精溶液内染色5min,随后用自来水充分漂洗,再浸入盐酸酒精分化液内作用15s后取出,在45 $^{\circ}$ C自来水中浸泡10min返

蓝；

[0026] (10)脱水、透明及封固：取出返蓝后的组织切片在光学显微镜下观察，如细胞核复染效果满意，则将切片依次浸入梯度酒精(75%，85%，95%，100%)，酒精浓度由低及高，每个浓度3min；随后将切片浸入二甲苯溶液内透明2次，每次2min；取出组织切片，滴加中性树脂50 $\mu$ l，用盖玻片封片，注意避免气泡。

[0027] 有益效果

[0028] (1)本发明的试剂盒可在一张切片上使神经纤维和癌细胞同时着色，将两者与背景中的其他细胞或成分区分开来(例如，能避免将神经纤维与平滑肌束、胶原纤维束混淆，或将癌细胞与炎症细胞混淆)。同时，使用本发明的试剂盒，观察者无需费力搜寻就能快速地在切片中发现神经纤维和癌细胞，继而通过观察癌细胞是否与神经纤维有接触或进入神经纤维内，判断是否存在神经侵犯。因此，使用本发明的试剂盒能高效准确的检测有无神经侵犯。

[0029] (2)本发明的试剂盒中包含的S100和Cytokeratin (pan)的一抗属于同一种属来源，故只需针对一种种属的第二抗体(二抗)和一种显色系统，由于癌细胞与神经纤维在组织切片中具有截然不同的形态，即使两者着色相同也容易区分，不影响对神经侵犯的判断；本发明的试剂盒的单一显色系统的设计不同于以往的免疫组化双染试剂盒(需要两种二抗和两种显色系统)，因此本发明的试剂盒更为简单、廉价，易于操作，并且避免了两种显色系统可能出现的互相干扰。

## 附图说明

[0030] 图1为颌下腺腺样囊性癌的神侵犯切片图；其中(a)为肿瘤组织的常规HE染色切片，观察该切片难以判断有无神经侵犯；(b)为使用本发明试剂盒进行免疫组化双标后的组织切片，是图(a)同一区域的连续切片，癌细胞团(三角形)和神经纤维(箭头)均呈棕色着色(黑白图中显示深色)，可将两者尤其是神经纤维快速识别出来，并根据癌细胞与神经纤维已发生接触(两者间的空隙为制片导致的假象)，判断出癌细胞已侵犯神经；

[0031] 图2为胃癌的神侵犯的切片图；其中(a)为肿瘤组织的常规HE染色切片，观察该切片难以判断有无神经侵犯；(b)为使用本发明试剂盒进行免疫组化双标后的组织切片，是图(a)同一区域的连续切片，癌细胞(三角形)和神经纤维(箭头)均呈棕色着色(黑白图中显示深色)；(c)为图(b)方框区域的放大，可见绳索样的神经纤维(箭头)以及圆形、卵圆形的癌细胞(三角形)，两者易于识别，在此基础发现癌细胞已接触神经纤维，得出癌细胞侵犯神经的结论。

## 具体实施方式

[0032] 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适用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，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。

[0033] 实施例中所用的材料、试剂等均可从商业途径得到。

[0034] 混合性一抗包括两个抗体：S100抗体和Cytokeratin (pan) 抗体。两抗体来自同一

动物种属,如果S100为兔抗人抗体,则Cytokeratin (pan) 抗体也应为兔抗人抗体。

[0035] 本发明的实施例中,S100抗体和Cytokeratin (pan) 抗体均为小鼠抗人单克隆抗体,其中S100抗体的克隆号为:15E2E2+4C4.9,稀释度为1:100,生产厂家:北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0036] Cytokeratin (pan) 抗体的克隆号为:AE1/AE3,稀释度为1:100,生产厂家:北京中杉金桥生物技术有限公司。两抗体混合后制备成混合性一抗,每个抗体最终的稀释度均为1:200。

[0037] 二抗为针对一抗的通用型二抗,如果一抗的种属来源为兔抗人抗体,则二抗为抗兔抗体,能与所有兔来源的一抗发生反应。

[0038] 本发明实施例中的一抗均为小鼠抗人抗体,选用的二抗为抗小鼠型二抗,同时该二抗连接有显色酶HRP(可催化显色底物DAB,产生棕黄色着色),生产厂家:北京中杉金桥生物技术有限公司,产品编号PV-6002。

[0039] 实施例1

[0040] (1) 检测材料的准备:取石蜡包埋的组织蜡块进行切片,切片厚度3-5 $\mu$ m,将切片置于56 $^{\circ}$ C烤片10min。

[0041] (2) 组织切片的脱蜡及水化:将组织切片在二甲苯内浸泡2次,每次15min;而后用梯度酒精(100%,95%,85%,75%)浸洗,酒精浓度由高及低,每个浓度3min;再将组织切片在自来水中浸泡1min,转入PBS内浸泡5min。

[0042] (3) 抗原修复(煮沸法):选用pH 9.0的EDTA抗原修复液,先将修复液煮沸,再将组织切片完全浸入修复液,在电磁炉上加热10min(加热功率1000W,维持煮沸状态);而后降低电磁炉功率至400W,保温10min;修复结束后,自然冷却。

[0043] (4) 灭活内源性的过氧化氢酶:取出修复后的组织切片,PBS浸泡3min,而后滴加3% $H_2O_2$ 作用10min以灭活组织的内源性过氧化氢酶。

[0044] (5) 血清封闭:去除 $H_2O_2$ 液,PBS浸洗2次,每次10min,而后滴加山羊封闭血清,作用10min。

[0045] (6) 一抗孵育:去除封闭血清,在组织切片上滴加混合性一抗,要求完全覆盖切片上的组织,并距离组织边缘至少2mm以避免边缘效应;随后将切片置于4 $^{\circ}$ C条件下过夜,或置于37 $^{\circ}$ C条件下60min。

[0046] (7) 二抗孵育:取出孵育一抗的组织切片,彻底去除一抗,在PBS内浸洗3次,每次10min;随后滴加针对一抗种属的二抗(连接有显色酶),37 $^{\circ}$ C条件下孵育25min。

[0047] (8) 显色:彻底去除二抗,PBS内浸洗3次,每次10min;而后滴加显色底物进行显色,显色时光学显微镜下观察着色情况,当组织着色深浅适中时立即去显色底物以终止显色,将切片放入自来水中浸泡清洗。

[0048] (9) 苏木精复染细胞核:取出组织切片,将其浸入苏木精溶液内染色5min,随后用自来水充分漂洗,再浸入盐酸酒精分化液内作用15s后取出,在45 $^{\circ}$ C自来水中浸泡10min返蓝。

[0049] (10) 脱水、透明及封固:取出返蓝后的组织切片在光学显微镜下观察,如细胞核复染效果满意,则将切片依次浸入梯度酒精(75%,85%,95%,100%),酒精浓度由低及高,每个浓度3min;随后将切片浸入二甲苯溶液内透明2次,每次2min;取出组织切片,滴加中性树

胶50u1,用盖玻片封片,注意避免气泡。

[0050] 实施例2

[0051] 样本信息:患者,女,41岁,临床诊断:右侧颌下腺肿块。手术切除颌下腺肿块(大小 $1.8\times 1.5\times 1.2\text{cm}$ ),送病理科检查,

[0052] 根据肿瘤的组织形态学特点,尤其是免疫组化双标(具体同实施例1)发现神经侵犯现象,明确诊断为腺样囊性癌。

[0053] 颌下腺腺样囊性癌的神侵犯,如图1(a),为常规HE染色的切片,神经纤维与背景中的胶原纤维难以区分,即使有经验的病理医师也不易判断神经纤维是否受到癌细胞侵犯。图1(b)图,为图1(a)同一区域的连续切片,采用本发明的双标试剂盒同时标记并突出显示神经纤维(箭头)和癌组织(三角形),两者均呈棕色(黑白图中显示深色),有无神经侵犯一目了然,可明确判定为神经侵犯,这是诊断腺样囊性癌的重要依据。(注:以上两图中神经纤维和癌组织之间的空隙为组织脱水后的人工假象,癌组织实际上已接触并侵犯了神经纤维)。

[0054] 实施例3

[0055] 样本信息:患者,女,48岁,因腹痛在我院行胃镜检查,活检提示为胃腺癌。遂进行全胃切除,标本送病理科检查。病理检查,于幽门部见一溃疡型肿块,大小 $7.5\times 4.0\text{cm}$ ;组织切片见大量低分化的腺癌细胞,弥漫浸润胃壁,并见淋巴结转移;同时,通过免疫双标(具体同实施例1),发现癌细胞侵犯神经。最终病理诊断:胃低分化腺癌,伴印戒细胞癌分化,侵及浆膜外,并见神经侵犯;淋巴结查见癌转移(20/25)。神经侵犯提示该例胃癌侵袭性强,易于复发,患者预后不良。

[0056] 胃癌的神侵犯,如图2所示。图2a为H.E染色切片,神经纤维和癌细胞难以识别,不能明确有无神经侵犯。图2b,为图2a同一区域的连续切片,采用本发明的双标试剂盒对神经纤维和癌细胞进行了染色标记,可见绳索样的神经纤维,呈深棕色(黑白图中显示深色),神经纤维周围可见较多散在的癌细胞,亦呈棕色着色(黑白图中显示深色)。图2(c),为中图(图2b)方框内区域的放大,箭头示绳索样的神经纤维,三角形示散在的癌细胞,围绕并侵犯神经纤维。通过使用本发明的免疫双标试剂盒可快速并明确诊断有无神经侵犯。

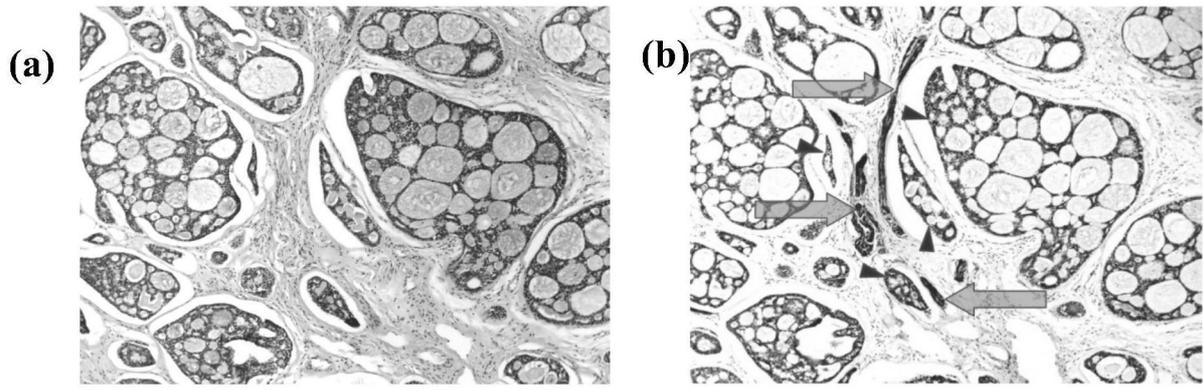


图1

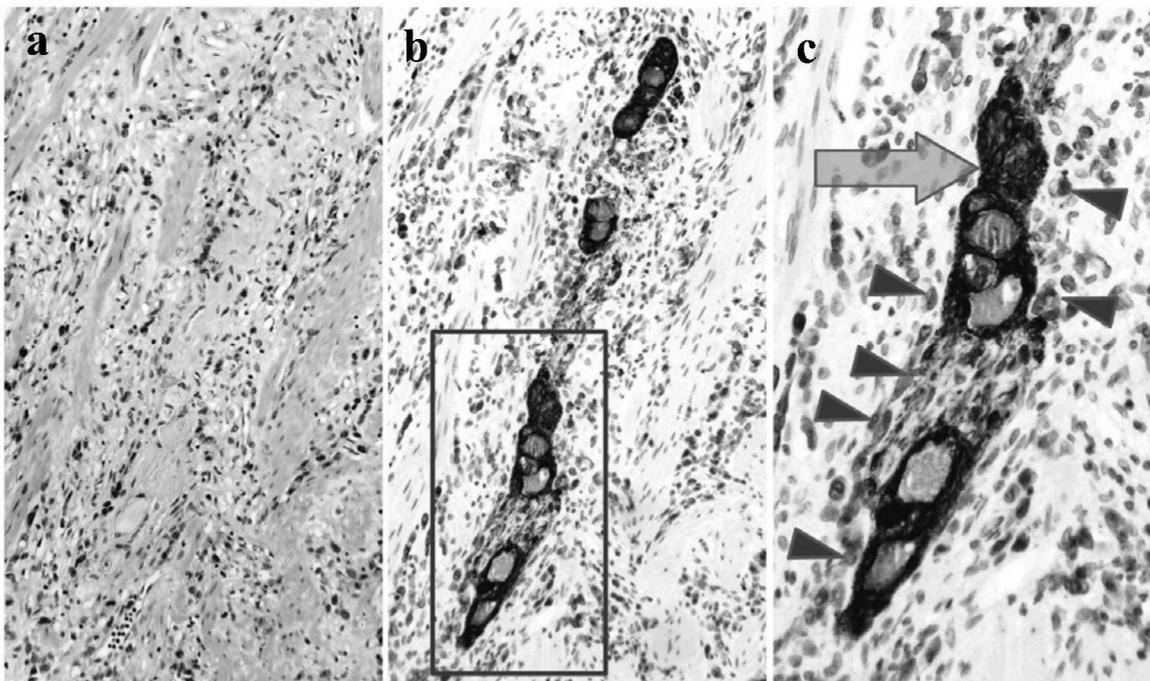


图2

专利名称(译)	一种检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN110161225A</a>	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201910441183.3	申请日	2019-05-24
[标]发明人	周志华 赵海滨 张俊杰		
发明人	周志华 赵海滨 板那 张俊杰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/574		
代理人(译)	黄志达		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测癌细胞侵犯神经的免疫组化双标试剂盒，所述试剂盒包括混合性一抗，还包括一种酶标二抗。本发明的免疫组织化学双标试剂盒，可一次性标记、显示癌细胞和神经纤维，对癌细胞神经侵犯的识别高效而准确。

