



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114076707 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 22

(21) 申请号 202111359964.1

(22) 申请日 2021.11.17

(71) 申请人 梅傲科技(广州)有限公司

地址 510530 广东省广州市黄埔区国际生物岛螺旋三路6号第二层202-21单元

(72) 发明人 童艳铮 董跃进 孙延红 李霖 陆佳益

(74) 专利代理机构 上海剑秋知识产权代理有限公司 31382

代理人 施建婷

(51) Int. Cl.

G01N 1/36 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 21/84 (2006.01)

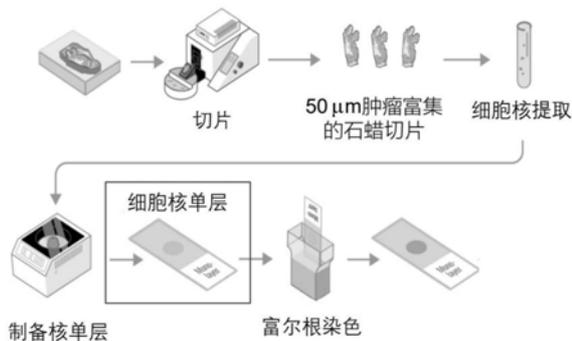
权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法及试剂盒, 通过从石蜡包埋肿瘤组织样本获得细胞核单层, 用染色试剂对细胞核进行染色, 用数字病理扫描分析系统采集图像。通过对细胞核的灰度、IOD值的图像分析, 检测异常组织内细胞DNA的含量, 反映DNA倍性; 通过对细胞核纹理的图像分析, 量化染色质结构, 该结构综合反映了基因改变及表观遗传学改变。本发明利用数字病理扫描分析系统对石蜡包埋组织样本通过一次取样和一次处理流程实现两种预后风险因素的联合定量分析, 分析结果可用于患者预后的评估, 大大提高了评估工作的效率和准确性, 指导合理用药。



1. 一种用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其特征在于,包括步骤:

- 1) 从石蜡包埋肿瘤组织样本中提取细胞核,制成细胞核单层;
- 2) 用DNA染色液对细胞核单层进行染色;
- 3) 用数字病理扫描分析系统采集染色后的细胞核单层图像,并抓取单个细胞核图像;
- 4) 将待分析的单个细胞核图像分类,并剔除不合格的细胞核图像;
- 5) 进行DNA倍性分析;
- 6) 进行染色质构型定量分析。

2. 如权利要求1所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其特征在于,步骤1) 具体为:从石蜡包埋肿瘤组织样本中获得组织切片,经过脱蜡、漂洗、消化、纯化,得到单个细胞核,并以细胞核单层形式平铺到载玻片上,固定。

3. 如权利要求1所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其特征在于,步骤2) 的染色方法为:对细胞核单层进行酸水解,然后用细胞核染色液对细胞核进行浸泡染色,用洗脱液进行洗脱,再经过脱水、封装,获得染色后的细胞核单层涂片。

4. 如权利要求1所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其特征在于,步骤3) 中采集染色后的细胞核单层图像的方法是:先采集全玻片图像,然后使用基于图像的静态分割算法定位细胞核单层的位置,使用细胞核单层外部图像区域进行背景校正。

5. 如权利要求1所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其特征在于,步骤4) 中单个细胞核图像分类的方法是通过细胞核图像分类算法进行自动分类。

6. 如权利要求1所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其特征在于,步骤5) 中DNA倍性分析的方法是:利用淋巴细胞作为二倍体的标准内参进行倍性的分析和计算。

7. 如权利要求1所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其特征在于,步骤6) 中染色质构型定量分析的方法是:将图像标准化为灰度图像,通过计算细胞核图像子区域中像素灰度级的熵来量化核纹理。

8. 用于如权利要求1-7任一项所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的试剂盒,其特征在于,包括:蛋白裂解酶、细胞缓冲液、洗脱剂A、洗脱剂B、洗脱剂C、洗脱剂D、固定液、酸性水解液、DNA染色液、洗脱液,其中洗脱剂A为二甲苯,洗脱剂B为无水乙醇或85%以上乙醇溶液,洗脱剂C为65%~84%乙醇溶液,洗脱剂D为蒸馏水,固定液为福尔马林,酸性水解液为3-7M浓度的盐酸,DNA染色液为雪芙试剂,洗脱液为焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾的酸性溶液。

9. 用于如权利要求1-7任一项所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的细胞核提取试剂盒,其特征在于,包括:蛋白裂解酶、细胞缓冲液、洗脱剂A、洗脱剂B、洗脱剂C、洗脱剂D和固定液,其中洗脱剂A为二甲苯,洗脱剂B为无水乙醇或85%以上乙醇溶液,洗脱剂C为65%~84%乙醇溶液,洗脱剂D为蒸馏水,固定液为福尔马林。

10. 用于如权利要求1-7任一项所述的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的细胞核单层涂片DNA染色试剂盒,其特征在于,包括酸性水解液、DNA染色液、洗脱液,其中酸性水解液为3-7M浓度的盐酸,DNA染色液为雪芙试剂,洗脱液为焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾的酸性溶液。

用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于病理诊断技术领域,具体涉及一种用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 肿瘤是异质性的,同一种肿瘤患者的肿瘤恶性程度是不同的,即使同样经肿瘤手术切除后,患者的预后情况也各有差异,针对危险程度不同的患者,其使用的化疗药物和治疗后的复查频率要求也不同,有些药物对于低危患者是非必要,甚至是无效或有害的。为了提高肿瘤的治疗效果,同时改善生存质量,降低治疗成本,则应实现精准用药,也就需要对肿瘤患者进行预后评估,并对危险程度进行分层。

[0003] 进行预后评估检测的肿瘤样本最好是现有的、容易获得的。石蜡包埋组织样本是目前最常见的肿瘤病理组织样本,为了进一步对肿瘤性质进行诊断,病理学家通常会从石蜡包埋组织样本中提取DNA或RNA进行分子生物学分析,如单核苷酸多态性分析、DNA倍性分析、RNA表达量分析等。现有研究显示DNA倍性与患者的预后有关联,现有的DNA倍性分析方法主要是通过流式细胞术进行,但是流式细胞术检测获得的DNA倍性定量只是一个数量上的结果,无法对动态的成因给出解释,也无法进一步解释同样倍数危险程度却可能不同。而事实上细胞核染色质排列紊乱、方向发生改变、增粗、出现裂纹等等都是DNA倍性发生改变的原因,也都对肿瘤的预后有不小的影响。因此,在通过肿瘤细胞DNA变化来评估肿瘤预后时,仅仅关注DNA倍性是不够的,DNA形态结构的变化也应纳入考量范围。

[0004] 因此,本领域的技术人员致力于开发一种能结合DNA倍性和DNA构型的预后评估指标及其评估方法,并针对这种方法开发出流程简单、可重复性强的样本处理方法及其试剂盒。

发明内容

[0005] 有鉴于现有技术的上述缺陷,本发明的目的是提供一种只需经过一次样品制备和检测可同时获得DNA倍性分析和染色质异质性分析结果的方法及其试剂盒,从而帮助医生更准确、更高效地评估肿瘤患者的预后,进而指导用药。

[0006] 为实现上述目的,本发明第一个方面提供了一种用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法,其包括步骤:

[0007] 1) 从石蜡包埋肿瘤组织样本中提取细胞核,制成细胞核单层;

[0008] 2) 用DNA染色液对细胞核单层进行染色;

[0009] 3) 用数字病理扫描分析系统采集染色后的细胞核单层图像,并抓取单个细胞核图像;

[0010] 4) 将待分析的单个细胞核图像分类,并剔除不合格的细胞核图像;

[0011] 5) 进行DNA倍性分析;

[0012] 6) 进行染色质构型定量分析。

[0013] 进一步,步骤1)具体为:从石蜡包埋肿瘤组织样本中获得组织切片,经过脱蜡、漂洗、消化、纯化,得到单个细胞核,并以细胞核单层形式平铺到载玻片上,固定。

[0014] 优选地,步骤1)中所述组织切片的厚度为40-60 μm ;切片不可过薄或过厚,过薄碎片多,过厚则脱蜡不易彻底。

[0015] 优选地,步骤1)中制成细胞核单层的细胞核数量为1000-1500个。

[0016] 优选地,步骤1)中所述脱蜡所用的试剂包括二甲苯、无水乙醇和/或乙醇溶液,所述漂洗所用的试剂包括乙醇溶液和/或蒸馏水。

[0017] 优选地,步骤1)中所述消化是使用蛋白裂解酶进行消化,所述蛋白裂解酶选自胰蛋白酶、组织蛋白酶、木瓜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶中的一种或几种。进一步优选地,消化缓冲液的pH值为7-8,优选缓冲液为PBS。

[0018] 在本发明的一种实施方式中,所述蛋白裂解酶为枯草杆菌蛋白酶,其消化缓冲液为PBS,消化温度为24-26 $^{\circ}\text{C}$,消化时长为60-90分钟,优选为70-80分钟。

[0019] 优选地,步骤1)中所述纯化的过程包括过滤、细胞离心涂片。进一步优选地,所述过滤包括筛网过滤和滤纸过滤,其中所述筛网的孔径优选为50-70 μm ,所述滤纸的孔径优选为10-30 μm 。

[0020] 优选地,步骤1)中所述固定使用的固定液为福尔马林。

[0021] 进一步,步骤2)的染色方法为:对细胞核单层进行酸水解,然后用细胞核染色液对细胞核进行浸泡染色,用洗脱液进行洗脱,再经过脱水、封装,获得染色后的细胞核单层涂片。

[0022] 优选地,步骤2)中所述酸水解使用的酸为盐酸,其浓度为3-7M,酸水解的时间优选为40-80分钟。

[0023] 优选地,步骤2)中所述细胞核染色液为雪芙(Schiff)试剂,染色后细胞核内DNA呈红紫色。可选地,所述雪芙试剂由品红与偏亚硫酸钾或偏亚硫酸钠配制而成。进一步优选地,浸泡染色时间为1-4小时。

[0024] 优选地,步骤2)中所述洗脱液为焦亚硫酸钾或焦亚硫酸钠溶液。

[0025] 优选地,步骤2)中所述脱水使用一系列浓度梯度递增的乙醇溶液及无水乙醇进行洗脱。

[0026] 优选地,步骤2)中还包括对阴性对照进行染色,所述阴性对照即不经酸水解直接用细胞核染色液浸泡染色的细胞核单层。

[0027] 进一步,步骤3)中采集染色后的细胞核单层图像的方法是:先采集全玻片图像,然后使用基于图像的静态分割算法定位细胞核单层的位置,使用细胞核单层外部图像区域进行背景校正。

[0028] 优选地,步骤3)中抓取单个细胞核图像的方法是:将采集的细胞核单层图像分割成若干图像单元,然后使用形态学信息获取完整细胞核图像。

[0029] 进一步,步骤4)中单个细胞核图像分类的方法可以通过细胞核图像分类算法进行自动分类,也可以是由病理医生进行人工分类,或者是先由分类算法进行自动分类,再由病理医生对已分类的细胞核图像的准确性进行人工验证。

[0030] 优选地,步骤4)中单个细胞核图像分类包括将细胞核图像分为五种类型:上皮细胞核图像、淋巴细胞核图像、浆细胞核图像、间质细胞核图像以及不合格的细胞核图像。

[0031] 优选地,步骤4)中所述不合格的细胞核图像包括不完整的细胞核图像、被切割的细胞核图像和重叠的细胞核图像。

[0032] 进一步,步骤5)中DNA倍性分析的方法是:利用淋巴细胞作为二倍体的标准内参进行倍性的分析和计算。

[0033] 进一步,步骤5)中DNA倍性分析的过程包括单个细胞核DNA倍性分析和整个细胞核单层的DNA倍性分析,通过对非整倍体细胞核的比例设定阈值来得出样本是整倍体或非整倍体的最终结果。

[0034] 更进一步,步骤5)中所述倍性的分析和计算的方法是:将图像标准化为灰度图像,通过对细胞核图像中每个像素的光密度值累加来计算每个细胞核图像的积分光密度值(IOD),将IOD值和总细胞核计数绘制成直方图,并根据倍性判读公式自动计算得到倍性结果。

[0035] 进一步,步骤6)中染色质构型定量分析的方法是:将图像标准化为灰度图像,通过计算细胞核图像子区域中像素灰度级的熵来量化核纹理;其中,熵是热力学中通常使用的无序度的一种度量,但此处用于评估染色质组织是否在具有不同缩合的更多交错的染色质区室的意义上无序。

[0036] 优选地,步骤6)中所述子区域为正方形区域,该区域的熵与该区域中心像素的灰度值耦合在一起,以整合对无序染色质组织和DNA含量的测量。

[0037] 优选地,步骤6)中所述灰度图像的灰阶为64级以上。

[0038] 进一步,步骤6)是通过对样本整体染色质值设定阈值来得出染色质同质性或异质性的最终结果的。

[0039] 在本发明的一些实施方式中,将上述石蜡包埋组织样本处理方法获得的DNA倍性结果和染色质构型结构用于评估肿瘤预后的方法为:非整倍体和染色质异质性作为高风险因素,具有两个高风险因素的肿瘤患者为高风险,具有一个高风险因素的肿瘤患者为中风险,不具有高风险因素的肿瘤患者为低风险。

[0040] 进一步,所述用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法还包括:从所述石蜡包埋肿瘤组织样本中获得组织切片,对其进行苏木素-伊红(HE)染色,用数字病理扫描分析系统进行肿瘤间质比分析,获得肿瘤间质比结果。其中,肿瘤间质由癌症相关的成纤维细胞、内皮细胞、淀粉样细胞、周细胞、淋巴细胞和细胞外基质组成,在肿瘤生长、侵袭和转移中起重要作用,检测异常组织细胞周围间质的比例可评估肿瘤生长、侵袭和转移的风险。

[0041] 进一步,所述间质比分析通过设定阈值来得出高间质比和低间质比的结果。

[0042] 在本发明的一些实施方式中,增加了肿瘤间质比结果后的肿瘤预后评估方法为:将高间质比、DNA非整倍体、染色质异质性作为三个高风险因素,其中具有三个高风险因素的肿瘤患者为高风险,具有两个高风险因素的肿瘤患者为中风险,否则为低风险。

[0043] 第二个方面,本发明提供了一种用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的试剂盒,所述试剂盒包括:蛋白裂解酶、细胞缓冲液、洗脱剂A、洗脱剂B、洗脱剂C、洗脱剂D、固定液、酸性水解液、DNA染色液、洗脱液,其中洗脱剂A为二甲苯,洗脱剂B为无水乙醇或85%以上乙醇溶液,洗脱剂C为65%~84%乙醇溶液,洗脱剂D为蒸馏水,固定液为福尔马林,酸性水解液为3-7M浓度的盐酸,DNA染色液为雪芙试剂,洗脱液为焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾的酸性溶液。

[0044] 本发明所述乙醇溶液为乙醇的水溶液,其百分比浓度为乙醇的体积百分比。

[0045] 进一步,所述蛋白裂解酶保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$,所述DNA染色液避光保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$,所述试剂盒的有效期为12-24个月。

[0046] 优选地,所述蛋白裂解酶为枯草杆菌蛋白酶,所述细胞缓冲液为PBS,所述福尔马林为3-6%的甲醛溶液。

[0047] 优选地,所述洗脱液为新鲜配制的焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾的酸性溶液;在本发明的一种优选实施方式中,洗脱液被分为三种试剂,分别为洗脱粉、洗脱A液和洗脱B液,其中洗脱粉为焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾,洗脱A液为1-3M浓度的盐酸溶液,洗脱B液为蒸馏水。

[0048] 优选地,所述试剂盒还包括筛网、滤纸、磁力搅拌子、黑色卡纸、玻璃瓶、载玻片、离心管、铝箔纸、锡纸中的一种或几种;其中,所述筛网的孔径优选为 $50-70\mu\text{m}$,所述滤纸的孔径优选为 $10-30\mu\text{m}$,可用于细胞涂片离心机。

[0049] 优选地,所述试剂盒还包括肿瘤间质比分析所需苏木素-伊红染色相关试剂。

[0050] 第三个方面,本发明提供了用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的细胞核提取试剂盒,包括:蛋白裂解酶、细胞缓冲液、洗脱剂A、洗脱剂B、洗脱剂C、洗脱剂D和固定液,其中洗脱剂A为二甲苯,洗脱剂B为无水乙醇或85%以上乙醇溶液,洗脱剂C为65%~84%乙醇溶液,洗脱剂D为蒸馏水,固定液为福尔马林。

[0051] 进一步,所述蛋白裂解酶保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

[0052] 优选地,所述蛋白裂解酶为枯草杆菌蛋白酶。

[0053] 优选地,所述细胞缓冲液为PBS,所述福尔马林为3~6%的甲醛溶液。

[0054] 优选地,所述细胞核提取试剂盒还包括筛网、滤纸、磁力搅拌子、黑色卡纸、玻璃瓶、载玻片、离心管、铝箔纸中的一种或几种;其中,所述筛网的孔径优选为 $50-70\mu\text{m}$,所述滤纸的孔径优选为 $10-30\mu\text{m}$,可用于细胞涂片离心机。

[0055] 第四个方面,本发明提供了用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的细胞核单层涂片DNA染色试剂盒,包括酸性水解液、DNA染色液、洗脱液,其中酸性水解液为3-7M浓度的盐酸,DNA染色液为雪芙试剂,洗脱液为焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾的酸性溶液。

[0056] 进一步,所述DNA染色液避光保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0057] 优选地,所述洗脱液为新鲜配制的焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾的酸性溶液;在本发明的一种优选实施方式中,洗脱液被分为三种试剂,分别为洗脱粉、洗脱A液和洗脱B液,其中洗脱粉为焦亚硫酸钠或焦亚硫酸钾,洗脱A液为1-3M浓度的盐酸溶液,洗脱B液为蒸馏水。

[0058] 优选地,所述细胞核单层涂片DNA染色试剂盒还包括70%~95%乙醇溶液、无水乙醇、二甲苯、封固剂中的一种或几种。

[0059] 优选地,所述细胞核单层涂片DNA染色试剂盒还包括锡纸。

[0060] 本发明提供的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法及其相关试剂盒可应用于各种实体肿瘤的预后评估中,包括肛门癌、胆道癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胃癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、肾细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、小细胞肺癌、胸腺癌、甲状腺癌。

[0061] 本发明提供的用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法通过从石蜡包埋肿瘤组织样本获得细胞核单层,用染色试剂对细胞核进行染色,用数字病理扫描分析系统采集图像。通过对细胞核的灰度、IOD值的图像分析,检测异常组织内细胞DNA的含量(体拷

贝数分析),反映DNA倍性,细胞DNA含量异常(多倍性和非整倍性)与疾病发生、发展,以及免疫反应有关;通过对细胞核纹理的图像分析,量化染色质结构,该结构综合反映了基因改变及表观遗传学改变,患者分为染色质同质性或异质性,异质性患者预后更差。本发明利用数字病理扫描分析系统只需对石蜡包埋组织样本进行一次取样和一次处理流程,即可实现两种预后风险因素的联合定量分析,分析结果可应用于患者预后的评估,大大提高了评估工作的效率和准确性。此外,增加肿瘤间质比分析可获得第三种风险因素的结果,该分析也可通过对同一石蜡包埋组织样本切片染色处理后用数字病理扫描分析系统完成,三种联合检测的应用可进一步提高评估的准确性,指导合理用药。

[0062] 以下将结合附图对本发明的构思、具体结构及产生的技术效果作进一步说明,以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

- [0063] 图1是由石蜡包埋组织样本至细胞核单层染色涂片的制作流程图;
[0064] 图2是DNA染色后显微镜下显示的细胞核单层照片,DNA成红紫色;
[0065] 图3是数字病理扫描分析系统对单个细胞核图像采集和分类的流程图;
[0066] 图4是DNA倍性分析中二倍体示例图谱;
[0067] 图5是DNA倍性分析中四倍体示例图谱;
[0068] 图6是DNA倍性分析中非整倍体示例图谱。

具体实施方式

[0069] 实施例1由石蜡包埋组织样本制作细胞核单层染色涂片的流程

[0070] 本实施例中细胞核单层染色涂片的制作流程如图1所示,具体可包括如下步骤:

[0071] 从石蜡包埋肿瘤组织样本中获得肿瘤富集的50 μ m厚度的组织切片,经过脱蜡、漂洗、消化、筛网过滤后,用细胞离心涂片机离心、过滤、制备核单层;

[0072] 对细胞核单层进行酸水解,然后用细胞核染色液对细胞核进行浸泡染色,用洗脱液进行洗脱,再经过脱水、封装,获得染色后的细胞核单层涂片。

[0073] 实施例2石蜡包埋组织样本细胞核的提取

[0074] 本实施例使用用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的试剂盒或细胞核提取试剂盒,该试剂盒至少含有:

- | | |
|---------------------|---------|
| 裂解酶(枯草杆菌蛋白酶) | 3 mg; |
| 细胞缓冲液(PBS) | 120 mL; |
| 洗脱剂 A(二甲苯) | 50 mL; |
| [0075] 洗脱剂 B(95%乙醇) | 25 mL; |
| 洗脱剂 C(80%乙醇) | 25 mL; |
| 洗脱剂 D(蒸馏水) | 25 mL; |
| 固定液(4%的甲醛水溶液) | 50 mL。 |

[0076] 上述试剂的量可供5份样品提取细胞核。该试剂盒可在2-8 $^{\circ}$ C下运输,裂解酶保存于-20 \pm 5 $^{\circ}$ C,其它试剂常温保存,试剂盒的有效期为18个月。

[0077] 该试剂盒还可包括耗材：尼龙细胞筛网(孔径60 μm) 5个、滤纸(孔径15 μm) 5张、磁力搅拌子10个、黑色卡纸2张、硼硅小玻璃瓶(10mL) 5个、硼硅载玻片10片、离心管(15mL) 10个。

[0078] 细胞核提取的步骤如下：

[0079] 2.1切片

[0080] 制备50 μm 厚的石蜡包埋组织切片2片，切片不可过薄或过厚，过薄碎片多，过厚则脱蜡不易彻底。

[0081] 2.2脱蜡

[0082] 2.2.1将每个样本分别放入10mL小玻璃瓶内，用电子移液器向每个样本中加入4mL洗脱剂A，轻轻摇晃使组织充分浸润。用铝箔纸盖住瓶口孵育15分钟。

[0083] 2.2.2用胶头滴管除去洗脱剂A，动作要轻，避免吸出组织。

[0084] 2.2.3重复用电子移液器向每个样本中加入4mL洗脱剂A，轻轻摇晃使组织充分浸润。用铝箔纸盖住瓶口孵育15分钟。然后用胶头滴管除去洗脱剂A。

[0085] 2.2.4用连续加样器加入4mL洗脱剂B，转动玻璃瓶使组织充分浸润，孵育5分钟。

[0086] 2.2.5每个样品使用一个单独的胶头滴管移除洗脱剂B。

[0087] 2.3补液和漂洗

[0088] 2.3.1用连续加样器精准加入4mL洗脱剂C并孵育5分钟。

[0089] 2.3.2更换枪头后用连续加样器精准加入2mL洗脱剂D，间隔2分钟，再次加入2mL洗脱剂D，等待2分钟。

[0090] 2.3.3将小玻璃瓶的内容物倾倒到15mL离心管中，确保玻璃瓶内无组织残留且组织在离心管底部。

[0091] 2.3.4调节离心机降速设置为“3”、1500rpm/min离心10分钟，用黑色比色卡衬托离心管内的组织，轻柔弃去上清液，倒扣吸水纸上吸干水分，全程通过黑色比色卡观察离心管内的组织，确保组织不流失。

[0092] 2.3.5用连续加样器加入8mL细胞缓冲液。确保组织沉淀在离心管底部。调节离心机降速设置为“3”、1500rpm/min离心10分钟。用黑色比色卡衬托组织，先倒去上清液确保组织不流失，再用玻璃滴管小心吸去剩下的上清液，倒扣吸水纸上吸干水分。

[0093] 2.4酶消化和细胞核提取

[0094] 2.4.1取出裂解酶，加入6mL细胞缓冲液混匀，配制0.5mg/mL裂解酶溶液后室温放置。

[0095] 2.4.2把配制好的0.5mg/mL裂解酶溶液放入恒温的37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中预热待用。

[0096] 2.4.3向15mL离心管加入1mL 0.5mg/mL裂解酶溶液。再向样品中加入1-2个磁力搅拌子。在磁力搅拌器上室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下消化1小时15分钟，若未消化好则等待5分钟，最多等待10min，消化完成后使用涡旋仪混匀10秒钟。

[0097] 2.4.4加入8mL在4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的细胞缓冲液，以阻止酶活性。

[0098] 2.4.5取新15mL离心管，将60 μm 筛网对称折叠2次，取圆锥型插入新管中。过滤样品通过60 μm 筛网过滤到新管中。

[0099] 2.4.6调节离心机降速设置为“3”、2500rpm/min离心20分钟，用黑色比色卡衬托离心管内的组织，轻柔弃去上清液，倒扣吸水纸上吸干水分，全程通过黑色比色卡观察离心管内的组织，确保组织不流失。

- [0100] 2.4.7向15mL离心管加入0.5-3mL细胞缓冲液,取决于颗粒的大小。震荡吹打均匀。
- [0101] 2.5制备细胞核单层载玻片
- [0102] 2.5.1滤纸与载玻片编号标记,先将载玻片放入离心夹中,再放滤纸,最后放入漏斗夹好。向漏斗加入细胞核混悬液100 μ L,调节细胞涂片离心机以“low”、600rpm/min离心5分钟。离心完成时,取出载玻片。
- [0103] 2.5.2镜检。根据细胞数目的多少,适当增减悬液的量再次涂片。细胞在显微镜高倍视野下间隔以1-3个细胞为宜。良好的单层细胞核,细胞核不应重叠。
- [0104] 2.5.3细胞核单层载玻片显微镜镜检完成后使用固定液固定(试剂需浸泡没过核单层)至少15分钟。
- [0105] 实施例3细胞核单层涂片DNA染色
- [0106] 本实施例使用用于肿瘤预后评估的石蜡包埋组织样本处理方法的试剂盒或细胞核单层涂片DNA染色试剂盒,该试剂盒至少含有:
- | | |
|---------------|--------|
| 水解液(5 M 盐酸) | 50 mL; |
| DNA 染色液(雪芙试剂) | 50 mL; |
- [0107] 洗脱粉(焦亚硫酸钠) 0.75 g;
- | | |
|----------------|-----------|
| 洗脱 A 液(1 M 盐酸) | 7.5 mL; |
| 洗脱 B 液(蒸馏水) | 142.5 mL。 |
- [0108] 上述试剂的量可供5片涂片染色。该试剂盒可在2-8 $^{\circ}$ C下运输,DNA染色液避光保存于2-8 $^{\circ}$ C,其它试剂常温保存,试剂盒的有效期为18个月。
- [0109] 该试剂盒还可包括试剂:70%乙醇溶液、95%乙醇溶液、无水乙醇、二甲苯、Eukitt封固剂。
- [0110] 该试剂盒还可包括耗材:锡纸6张,1张尺寸为30cm \times 30cm,另5张尺寸为7cm \times 7cm。
- [0111] 细胞核染色的步骤如下:
- [0112] 3.1酸水解
- [0113] 3.1.1将先前用固定液固定的细胞核单层载玻片转移至玻璃染色缸,用自来水缓慢冲洗10秒后弃去,往染色缸加入蒸馏水润洗10秒钟(蒸馏水应没过核单层载玻片),倒扣吸水纸上吸干水分。
- [0114] 3.1.2用水解液填充玻璃染色缸,试剂浸泡并没过载玻片上的核单层,盖好盖子,孵育60分钟。
- [0115] 3.2染色液染色
- [0116] 3.2.1除去水解液,用自来水缓慢冲洗10秒后弃去,再加入蒸馏水润洗10秒,倒扣吸水纸上吸干水分。
- [0117] 3.2.2用染色液填充染色缸,试剂浸泡并没过载玻片上的核单层,用铝箔纸包好以避光,孵育2小时。
- [0118] 3.3漂洗
- [0119] 3.3.1配制洗脱液:0.75g洗脱粉+142.5mL洗脱B液+7.5mL洗脱A液
- [0120] 3.3.2弃去染色缸中的染色液。
- [0121] 3.3.3将配制好的洗脱液倒入玻璃染色缸中,试剂浸泡并没过载玻片上的核单层,

铝箔纸包好避光处理10分钟,弃去洗脱液。再重复以上操作2遍。

[0122] 3.3.4把载玻片放到玻片架上,流水缓慢冲洗5分钟,避免冲到核单层。

[0123] 3.4脱水

[0124] 3.4.1使用一系列浓度梯度递增的乙醇(70%乙醇一次1分钟,95%乙醇I、II各2分钟和无水乙醇I、II各2分钟)和二甲苯I、II各2分钟。

[0125] 3.5封装

[0126] 3.5.1使用Eukitt封固剂用盖玻片封装载玻片。

[0127] 3.5.2干燥10分钟后,放入玻片盒中,2-8℃冰箱避光保存。

[0128] 上述步骤还包括制作阴性对照,即不经过水解(跳过步骤3.1),直接染色,洗脱后,应没有着色。染色步骤完成后,细胞核内DNA呈红紫色,在40倍显微镜下观察到的图像如图2所示。

[0129] 实施例4单个细胞核图像采集和分类

[0130] 本实施例中细胞核单层图像采集步骤为:先采集全玻片图像,然后使用基于图像的静态分割算法定位细胞核单层的位置,使用细胞核单层外部图像区域进行背景校正,然后捕获需要分割和采集的图像。将采集的细胞核单层图像分割成若干图像单元,然后使用形态学信息获取完整细胞核图像。

[0131] 将待分析的细胞核通过细胞核分类算法为五种类型:上皮细胞核、淋巴细胞核、浆细胞核、间质细胞核以及不合格的细胞核(剔除)。然后由病理医生对已分类的细胞核准确性进行人工验证,并确保细胞核是完整的、未切割和不重叠的(手动剔除不合格的细胞核),确定数字图像集合,利用淋巴细胞作为二倍体的标准内参进行倍性和染色质值的分析和计算。

[0132] 上述步骤的流程如图3所示。

[0133] 实施例5DNA倍性分析

[0134] 本实施例利用淋巴细胞作为二倍体的标准内参进行倍性和染色质值的分析和计算。具体地,将细胞核中每个像素的光密度值累加来计算每个细胞核的积分光密度值(IOD),将IOD值和总细胞核计数绘制成直方图,并根据倍性判读公式自动计算得到倍性结果。

[0135] 图4、图5和图6所示为DNA倍性分析中二倍体、四倍体和非整倍体图谱示例,为非正常DNA含量的细胞核的比例设定阈值,高于阈值为非整倍体。

[0136] DNA倍性的判断标准如下:

[0137] 二倍体:在G0或G1期只有一个波峰(2C或 $DI=0.9-1.1$);

[0138] 四倍体:位于4C(代表细胞周期的G2期)的细胞核的比例($DI=1.9-2.1$)>样本DNA总量的10%;

[0139] 非整倍体:含有偏离二倍体波峰、非正常DNA含量的细胞核的比例>2.5%,或者DNA数量>5C或9C的细胞核的比例超过1%。非整倍体进一步被分为近二倍体非整倍体($DI=1.1-1.29$)和非整倍体($DI=1.30-1.89$);

[0140] 其中DI为DNA指数值。

[0141] 实施例6染色质构型定量分析

[0142] 本实施例计算细胞核子区域中像素灰度级的熵来量化核纹理分析染色质组织,包

括以下步骤:

[0143] 6.1将图像标准化为64级灰阶图像;

[0144] 6.2将细胞核按照图像面积分组:细胞核的灰度值与熵值和细胞核的大小有很大的相关性,因此,在算法中按照像素大小将细胞核分为11组;

[0145] 6.3绘制灰度值-熵值矩阵:以细胞核图像左上角像素为中心,划出 3×3 像素窗口,计算中心像素的灰度值和窗口熵值,将每个像素依次操作,形成一个灰度值与熵值的矩阵(GLEM),所有细胞均执行此操作;矩阵反映了染色质的超螺旋程度,DNA的含量以及二者之间的相互关系;

[0146] 6.4绘制四维矩阵:在 5×5 、 7×7 …… 31×31 像素窗口中重复以上操作,最终形成包含细胞核大小、取样窗口大小、灰度以及熵值的四维信息的矩阵,称为GLEM4D;取样窗口小,可反映更精细的局部染色质的结构变化,取样窗口大,可反映整体的染色质的分布情况;

[0147] 6.5计算染色质值:将患者GLEM4D元素值(矩阵中的灰度和熵值)按权重求和,得到该患者的染色质值,据此判断患者的细胞核染色质异质性程度。

[0148] 6.6设定染色质值阈值:染色质值大于或等于阈值为染色质同质,染色质值小于阈值为染色质异质,如本实施例设定阈值为0.044。

[0149] 实施例7非小细胞肺癌预后风险评估

[0150] 本实施例对67例早中期非小细胞肺癌(腺癌42例+鳞癌25例)患者进行了DNA倍性分析和染色质构型分析,他们的石蜡包埋肿瘤组织样本采集自外科手术切除的肿瘤组织。

[0151] 先用单风险因素进行预后风险评估。经数字病理扫描分析系统分析,其中二倍体19例,患者五年PFS(无进展生存率)为68.4%,非二倍体48例,患者五年PFS为45.8%。经数字病理扫描分析系统分析,其中染色质同质型47例,患者五年PFS为57.4%,染色质异质型20例,患者五年PFS为40%。

[0152] 将上述样本的DNA倍性分析和染色质构型分析结合起来评估,非二倍体和异质型作为两种高危因素,两者都有为高危型,两者有一为中危型,两者都无为低危型,经分析确定高危型有19例,中危型有30例,低危型有18例,低危型五年后的PFS为66.7%,中危型为53.3%,高危型为36.8%。

[0153] 在现行的肿瘤治疗方案中,一些辅助化疗的药物应用与否没有统一的标准,一些药物可使高危和/或中危患者辅助化疗获益显著,但低危患者辅助化疗无获益,医生都是根据自己的经验来选择用药,根据上述危险型分类标准进行分类后,可将药物种类、用药方式根据危险型进行更精确的分类,在后期应用中,这些危险类型分类结果可用于提供辅助治疗决策。

[0154] 实施例8结直肠癌预后风险评估

[0155] 本实施例对81例早中期结直肠癌患者进行了DNA倍性分析、染色质构型分析和肿瘤间质比分析,他们的石蜡包埋肿瘤组织样本采集自外科手术切除的肿瘤组织。

[0156] 先用单风险因素进行预后风险评估。经数字病理扫描分析系统分析,其中二倍体25例,患者五年和七年OS(总生存率)均为100%,非二倍体56例,患者五年OS为92.4%,七年OS为86.3%。经数字病理扫描分析系统分析,其中同质型49例,患者五年OS为97.9%,七年OS为95.1%,异质型32例,患者五年OS为89.5%,七年OS为82.1%。

[0157] 肿瘤间质比分析以同一样本的石蜡包埋组织切片(4-6 μ m),用苏木素-伊红染色液进行染色后,用同一台数字病理扫描分析系统进行分析,大于等于50%为高间质比,小于50%为低间质比。经分析确定高间质比63例,患者五年OS和七年的OS均为81.3%;低间质比18例,患者五年OS为98.3%,七年的OS为93.4%。

[0158] 将上述样本的DNA倍性分析、染色质构型分析和肿瘤间质比分析结合起来评估,非二倍体、异质型和高间质比作为三种高风险因素。经分析确定三种高风险因素都有的患者有9例,患者五年OS为71.4%,七年的OS为0%;有两种高风险因素的患者有26例,患者五年OS为91.8%,七年的OS为85.3%;有一种高风险因素的患者有27例,患者五年OS为100%,七年的OS为95%,没有高风险因素的患者有18例,患者五年和七年的OS均为100%。

[0159] 由上述结果可知三联风险因素评估的区分度要高于单风险因素评估。

[0160] 实施例9胃癌预后风险评估

[0161] 本实施例对22例早中期胃癌患者进行了DNA倍性分析、染色质构型分析和肿瘤间质比分析,他们的石蜡包埋肿瘤组织样本采集自外科手术切除的肿瘤组织。

[0162] 先用单风险因素进行预后风险评估。经数字病理扫描分析系统分析,其中二倍体8例,患者五年OS为100%,非二倍体14例,患者五年OS为66.8%。由于数据量较少,单因素分析中的染色质构型和肿瘤间质比所作的生存分析函数都没有差异。

[0163] 但是将DNA倍性分析与染色质构型分析结合评估则显现出差异,经分析确定具有两种高风险因素的高危型有6例,具有一种高风险因素的中危型有12例,没有高风险因素的低危型有4例,低危型五年后的OS为100%,中危型为87.5%,高危型为44.4%。

[0164] 将上述样本的DNA倍性分析、染色质构型分析和肿瘤间质比分析结合起来评估,非二倍体、异质型和高间质比作为三种高风险因素,经分析确定三种高风险因素都有的患者有1例,其五年OS为0%,有两种高风险因素的患者有9例,其五年OS为66.7%,有一种高风险因素的患者有9例,其五年OS为85.7%,没有高风险因素的患者有3例,其五年OS为100%。

[0165] 由以上结果可知,在单风险因素出现没有区分度的情况下,二联或三联风险因素能获得更细致的分类结果。

[0166] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术人员无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

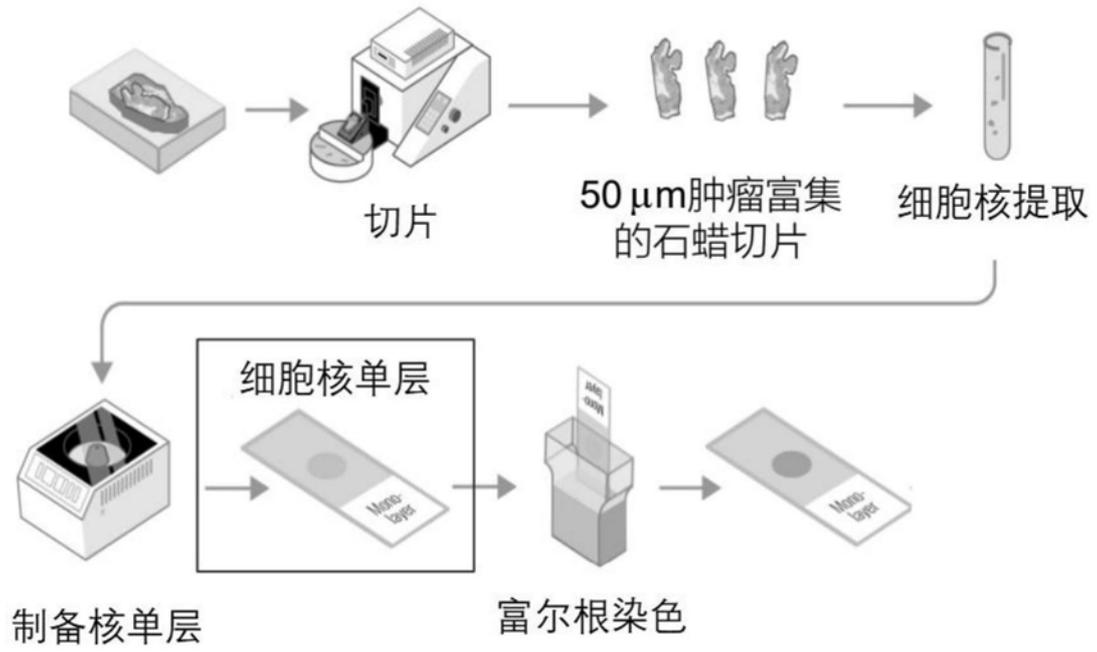


图1

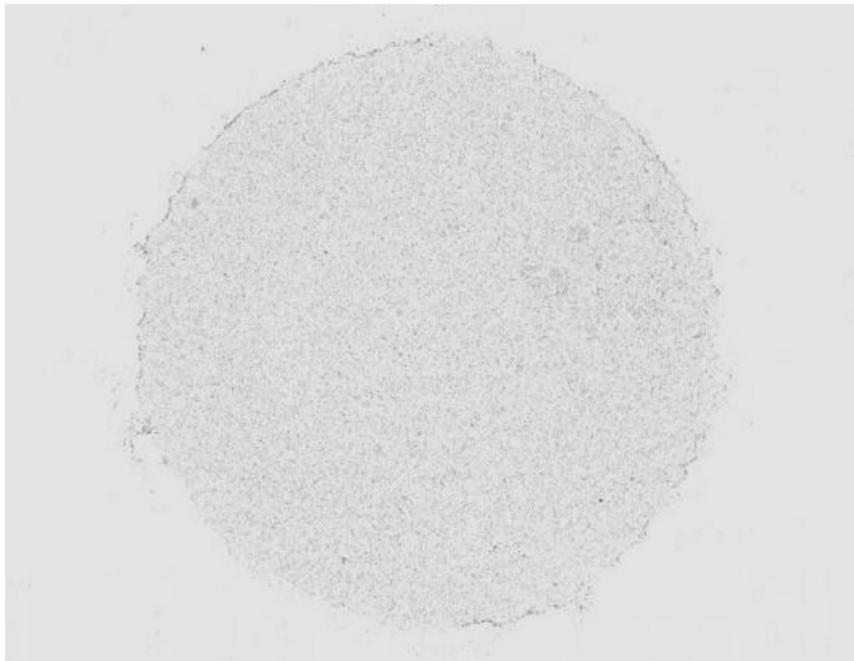


图2

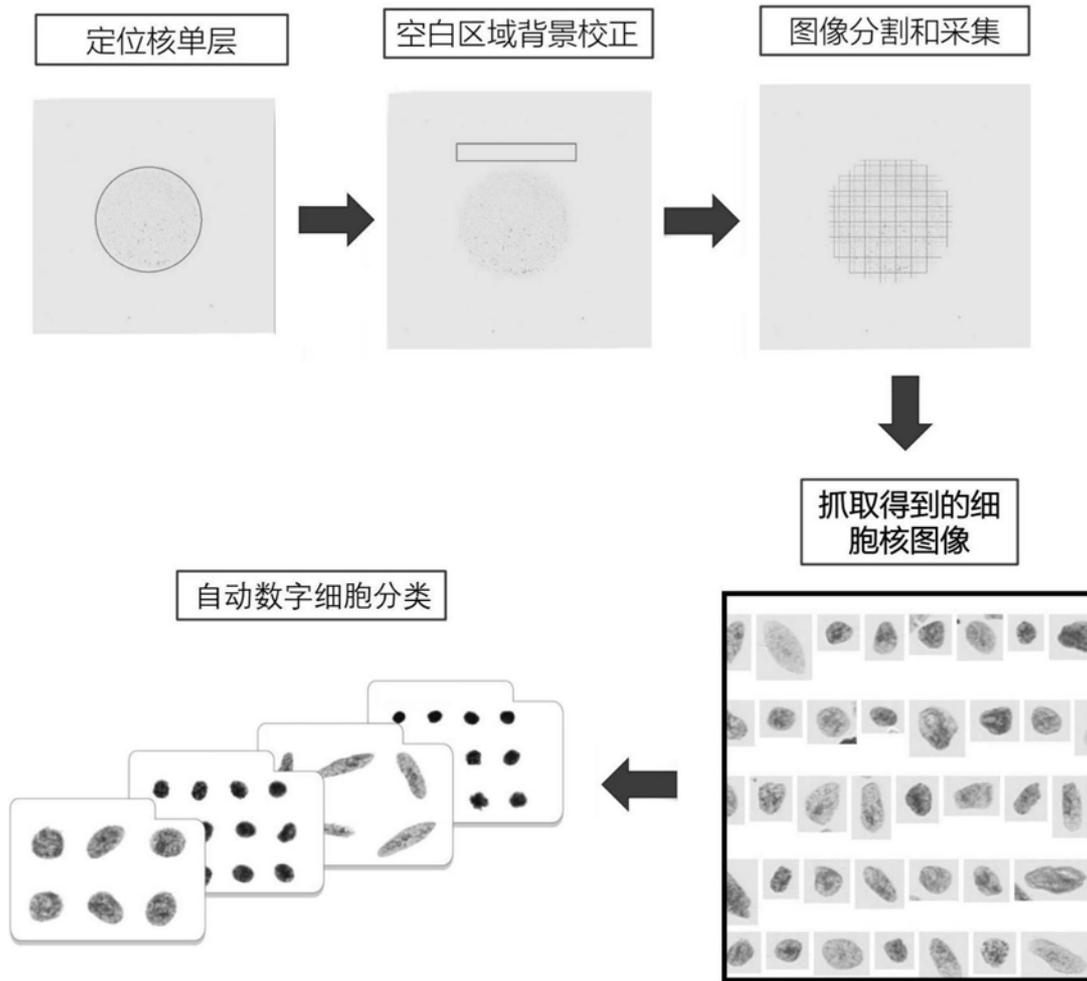


图3

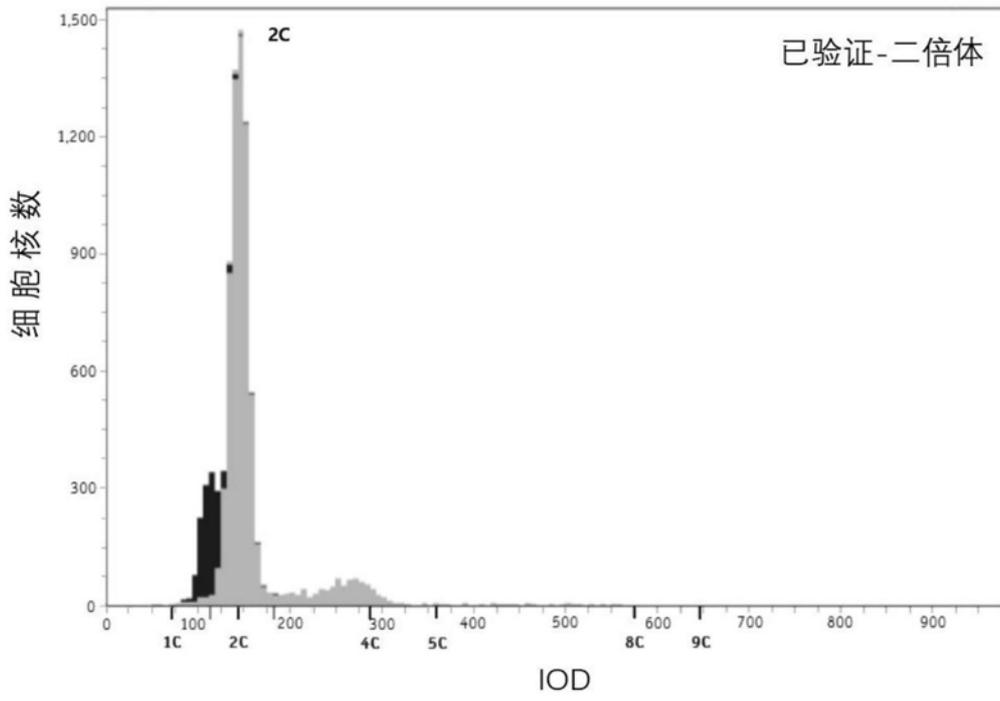


图4

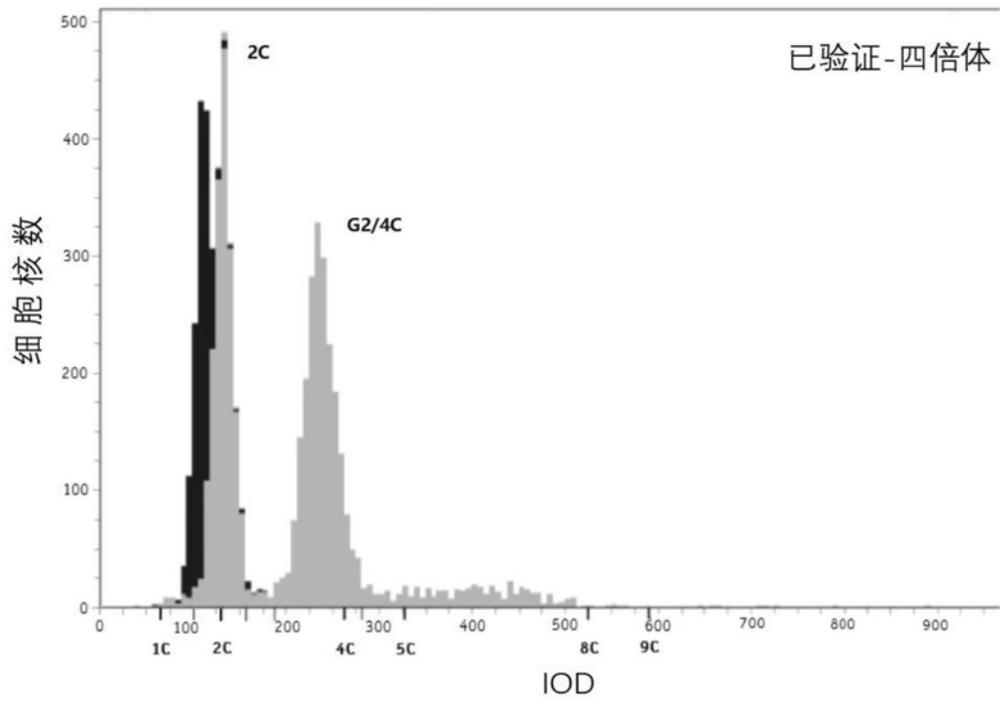


图5

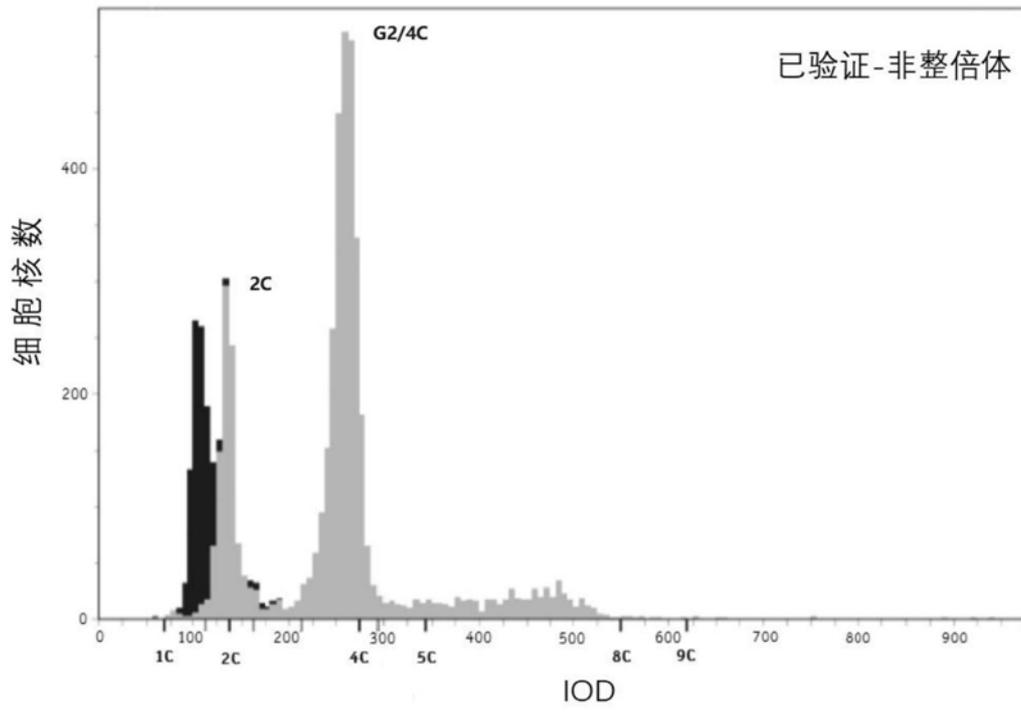


图6