



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103675277 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201310559467. 5

(22) 申请日 2013. 11. 12

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路  
38 号

(72) 发明人 舒强 沈红强 赵正言 汤永民

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限  
公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

流式细胞术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的荧光探针及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种流式细胞术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的荧光探针及试剂盒,所述荧光探针包括四种荧光标记抗体,所述四种荧光标记抗体为均带有荧光标记的GD2 抗体、CD90 抗体、CD45 抗体和 CD56 抗体,其中,不同的抗体带有不同的荧光标记。所述试剂盒包括探针溶液;溶血剂;磷酸盐缓冲液和阳性标准品。本发明的荧光探针分别能够与骨髓中的横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤细胞及急性白血病原始细胞特异性结合,能够通过流式细胞术快速准确鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病细胞这三类儿童骨髓中常见的肿瘤细胞,指导临床治疗,具有较好的应用前景。

1. 一种流式细胞术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的荧光探针,包括四种荧光标记抗体,其特征在于,所述四种荧光标记抗体为均带有荧光标记的 GD2 抗体、CD90 抗体、CD45 抗体和 CD56 抗体,其中,不同的抗体带有不同的荧光标记。

2. 如权利要求 1 所述的荧光探针,其特征在于,所述四种荧光标记抗体为 GD2-FITC 抗体、CD90-PE 抗体、CD45-PerCP 抗体和 CD56-APC 抗体。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的荧光探针,其特征在于,四种荧光标记抗体为单克隆抗体。

4. 一种流式细胞技术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的试剂盒,其特征在于,包括:

(1) 探针溶液,包含有四种荧光标记抗体,其中,四种荧光标记抗体为均带有荧光标记的 GD2 抗体、CD90 抗体、CD45 抗体和 CD56 抗体,不同的抗体带有不同的荧光标记;

(2) 溶血剂;

(3) 磷酸盐缓冲液;

(4) 阳性标准品。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,所述的探针溶液以磷酸盐缓冲液为溶剂。

6. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,所述的四种荧光标记抗体为 GD2-FITC 抗体、CD90-PE 抗体、CD45-PerCP 抗体和 CD56-APC 抗体。

7. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,四种荧光标记抗体的浓度比为 1:1:1:1。

8. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,所述的探针溶液含有防腐剂。

9. 如权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在于,所述防腐剂为叠氮钠。

## 流式细胞术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的荧光探针及试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种医疗检测试剂,尤其涉及一种流式细胞术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的荧光探针及试剂盒。

### 背景技术

[0002] 在临床上,儿童骨髓中出现肿瘤细胞常见的是白血病、横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤,正确鉴别三者对患者的治疗具有重要的指导意义。横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤是儿童常见的恶性实体肿瘤,对儿童生命有严重的威胁和危害。部分患者可以通过手术治疗得到康复。但本病易发生骨髓转移,常危及患儿生命,需及时采取化疗、放疗甚至自体干细胞移植等治疗措施。因此对骨髓转移的早期发现、早期诊断及早期治疗是提高治愈率、降低死亡率的关键。

[0003] 目前国内外主要通过骨髓细胞形态学检查来诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移,但细胞形态学对于早期转移的患者的诊断不敏感,容易产生假阴性结果,且两者细胞形态学与原始淋巴细胞和原始粒细胞相似,极易被误诊为白血病,同时横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤在骨髓中的细胞形态学也相似而较难鉴别。

[0004] 正是由于目前的对诊断和鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移的各种检查方法还无法满足临床医生的要求,寻求一种快速简便且准确性和敏感性高的方法来诊断和鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的方法极为重要。流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)是近年来发展起来的高科学技术,它集计算机技术、激光技术、流体力学、细胞化学、细胞免疫学于一体,同时具有分析和分选细胞功能。它不仅可测量细胞大小、内部颗粒的性状,还可检测细胞表面和细胞浆抗原、细胞内 DNA、RNA 含量等,可对群体细胞在单细胞水平上进行多参数分析,即在同一细胞上进行 2-3 种或多种抗原的共同表达的分析,在短时间内检测 分析大量细胞,并收集、储存和处理数据,进行多参数定量分析,具有敏感性和准确性高的特点,目前临床上多运用于白血病和淋巴瘤的骨髓标本的诊断,而对横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤的诊断和鉴别诊断罕见报道。由于两者细胞目前没有单一的特异性的抗原标志物,流式细胞术对鉴别诊断横纹肌肉瘤与瘤神经母细胞瘤骨髓转移及白血病关键在于多种抗体的组合。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了一种流式细胞术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的荧光探针,利用该荧光探针可以快速、准确的得到诊断结果。

[0006] 一种流式细胞术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的荧光探针,包括四种荧光标记抗体,所述四种荧光标记抗体为均带有荧光标记的 GD2 抗体、CD90 抗体、CD45 抗体和 CD56 抗体,其中,不同的抗体带有不同的荧光标记。

[0007] 横纹肌肉瘤是儿童最常见的软组织肿瘤,神经母细胞瘤属于神经内分泌性肿瘤,

而 CD56 是一类免疫球蛋白样区域的膜糖蛋白神经细胞粘附分子,在神经外胚层来源的细胞表面表达。CD90 和 CD56 作为粘附分子表达在横纹肌肉瘤细胞及神经母细胞瘤上, NK 细胞主要也表达这种 140kDa 的 CD56 异构体,而 CD45 是血细胞系列限制性的膜蛋白分子,表达在除了红细胞外的包括造血干细胞到成熟血细胞(包括 NK 细胞)膜表面上,因此 CD90+CD56+/CD45- 表型可以避免误诊为 NK 细胞肿瘤和白血病,并可以作为判断神经内分泌肿瘤及横纹肌肉瘤存在的指证。

[0008] 神经母细胞瘤细胞来源于分化差的神经节细胞,其表面有神经黏附分子 CD56 抗原和神经节苷脂 GD2 的表达,而不表达白细胞共同抗原 CD45,横纹肌肉瘤是起源于横纹肌细胞或向横纹肌细胞分化的间叶细胞的一种恶性肿瘤,不表达神经节苷脂 GD2。同样白血病细胞不表达 GD2 但其表达白细胞共同抗原 CD45 及原始细胞标志 CD90,因此可以通过多色流式细胞术测定这四种抗原的不同表达来识别横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤及白血病原始细胞这三类儿童骨髓标本中常见的肿瘤细胞。三者具有不同的免疫表型,即:

[0009] 横纹肌肉瘤细胞 :GD2<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>;

[0010] 神经母细胞瘤细胞 :GD2<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>;

[0011] 急性白血病原始细胞 :GD2<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>。

[0012] 本发明联合 GD2、CD90、CD56 和 CD45 四种荧光标记抗体作为探针,运用目前医院常见的多色流式细胞仪检测细胞的免疫表型(一管法)即可鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病,特异性可达 100%。

[0013] 具体的,所述四种荧光标记抗体为 GD2-FITC 抗体、CD90-PE 抗体、CD45-PerCP 抗体和 CD56-APC 抗体。

[0014] 为保证检测的特异性,四种荧光标记抗体为单克隆抗体。

[0015] 本发明还提供了一种流式细胞技术鉴别诊断横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤骨髓转移及白血病的试剂盒,包括:

[0016] (1) 探针溶液,包含有四种荧光标记抗体,其中,四种荧光标记抗体为均带有荧光标记的 GD2 抗体、CD90 抗体、CD45 抗体和 CD56 抗体,不同的抗体带有不同的荧光标记;

[0017] (2) 溶血剂;

[0018] (3) 磷酸盐缓冲液;

[0019] (4) 阳性标准品。

[0020] 所述的探针溶液以磷酸盐缓冲液为溶剂。

[0021] 所述的四种荧光标记抗体具体为 GD2-FITC 抗体、CD90-PE 抗体、CD45-PerCP 抗体和 CD56-APC 抗体。其中,CD90-PE 可购自美国 BD 公司,货号:555596、CD45-PerCP 可购自美国 BD 公司,货号:347464、CD56-APC 可购自美国 BD 公司,货号:341025、GD2-FITC 制备方法可参照 CANCER RESEARCH,1986 年 46 期 2988 页,Highly selective recognition of human neuroblastoma cells by mouse monoclonal antibody to a cytoplasmic antigen。

[0022] 所述四种荧光标记抗体的浓度比为 1:1:1:1。

[0023] 所述的溶血剂的组成为:8.3% 氯化铵和 15% 多聚甲醛。

[0024] 所述探针溶液包含防腐剂,所述防腐剂为叠氮钠。

[0025] 所述磷酸盐缓冲液也含有含防腐剂,所述防腐剂为叠氮钠。

[0026] 所述叠氮钠的添加量为 0.05 ~ 0.1%,优选为 0.1%。

[0027] 试剂盒中所使用的磷酸盐缓冲液的浓度均为 0.8 ~ 1M, 优选为 1M, 该磷酸盐缓冲液的 pH=7.4。

[0028] 需要指出的是, 由于儿童无慢性淋巴细胞白血病, 慢性粒细胞白血病极少, 如无特殊说明, 本申请中所提及的白血病均指的是急性白血病。

[0029] 与现有技术相比, 本发明的有益效果为:

[0030] 本发明的荧光探针能够与骨髓中的肿瘤细胞特异性结合, 无交叉反应, 能够准确快速通过流式细胞术检测横纹肌肉瘤与神经母细胞瘤是否骨髓转移, 具有很高的特异性(可达 100%)和灵敏度, 同时可区别急性白血病原始细胞, 简单快速准确, 具有较好的临床应用前景。

#### 附图说明

[0031] 图 1 为本发明对实施例 1 患者骨髓标本的瑞氏染色结果图; 其中, A 为横纹肌肉瘤骨髓转移, B 为神经母细胞瘤骨髓转移。

[0032] 图 2 为本发明对实施例 1 横纹肌肉瘤患者骨髓标本的流式细胞术检测结果图; 其中, A:CD45<sup>-</sup> 和 CD56<sup>+</sup> 细胞设 R1 门, B:GD2<sup>-</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 细胞设 R2 门; C:FSC 和 SSC 细胞设 R3 门; R2 来源于 R1, R3 来源于 R2。

[0033] 图 3 为本发明对实施例 1 神经母细胞瘤患者骨髓标本的流式细胞术检测结果图; 其中, A:CD45<sup>-</sup> 和 CD56<sup>+</sup> 细胞设 R1 门, B:GD2<sup>+</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 细胞设 R2 门; C:FSC 和 SSC 细胞设 R3 门; R2 来源于 R1, R3 来源于 R2。

[0034] 图 4 为实施例 1 急性白血病原始细胞的瑞氏染色结果图。

[0035] 图 5 为本发明对实施例 1 急性白血病患者骨髓标本的流式细胞术检测结果图; 其中, A:CD45<sup>+</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 细胞设 R1 门, B:来源于 R1 的细胞显示 GD2<sup>-</sup> 和 CD45<sup>+</sup>; C:来源于 R1 的细胞显示 GD56<sup>-</sup> 和 CD45<sup>+</sup>。

[0036] 图 6a 为本发明对实施例 1 横纹肌肉瘤患者骨髓标本(稀释比例为 1:100)的流式细胞术敏感性检测结果图。

[0037] 图 6b 为本发明对实施例 1 横纹肌肉瘤患者骨髓标本(稀释比例为 1:1000)的流式细胞术敏感性检测结果图。

[0038] 图 6c 为本发明对实施例 1 横纹肌肉瘤患者骨髓标本(稀释比例为 1:10000)的流式细胞术敏感性检测结果图。

[0039] 图 7 为本发明对实施例 2 横纹肌肉瘤患者脑脊液标本的瑞氏染色结果图。

[0040] 图 8 为本发明对实施例 2 横纹肌肉瘤患者脑脊液标本的流式细胞术检测结果图, 其中, A:CD45<sup>-</sup> 和 CD56<sup>+</sup> 细胞设 R1 门, B:GD2<sup>-</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 细胞设 R2 门; C:FSC 和 SSC 细胞设 R3 门; R2 来源于 R1, R3 来源于 R2。

#### 具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施方式进一步阐释本发明。

[0042] 实施例 1

[0043] GD2-FITC (自备, 以神经母细胞瘤细胞株 LAN-1 免疫 BALB/c 小鼠, 取小鼠 B 淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞株 NS1 融合成杂交瘤细胞制备单克隆抗体 GD2 并标记 FITC 荧光

素,具体技术步骤参考杂志 CANCER RESEARCH,1986 年 46 期 2988 页;Highly selective recognition of human neuroblastoma cells by mouse monoclonal antibody to a cytoplasmic antigen)、CD90-PE (美国 BD 公司,货号:555596)、CD45-PerCP (美国 BD 公司,货号:347464)、CD56-APC (美国 BD 公司,货号:341025)。

[0044] 一、试剂盒组成:

[0045] 1) 探针溶液(2mL×1 瓶):

[0046] GD2-FITC:2mL PBS (含 0.1% 叠氮钠) 含异硫氰酸荧光素标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0047] CD90-PE:2mL PBS (含 0.1% 叠氮钠) 含藻红蛋白标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0048] CD45-PerCP:2mL PBS (含 0.1% 叠氮钠) 含草履虫叶绿素蛋白标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0049] CD56-APC:2mL PBS (含 0.1% 叠氮钠) 含异藻蓝蛋白标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0050] 组合物抗体浓度比例 GD2-FITC:CD90-PE:CD45-PerCP:CD56-APC 为 1:1:1:1。

[0051] 2) 10× 溶血剂(100mL×1 瓶):8.3% 氯化铵,含 15% 多聚甲醛;

[0052] 3) 10× 磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4, 1M, 含 1% 叠氮钠)(100mL×1 瓶);

[0053] 4) 阳性标准品(2mL×1 瓶):固定和保存液处理的细胞株( $5 \times 10^7$  个细胞/mL)。

[0054] 二、试剂盒的应用

[0055] 研究对象:15 例非白血病及肿瘤儿童、21 例横纹肌肉瘤、25 例神经母细胞瘤及 22 例急性粒细胞白血病患者的骨髓标本,骨髓标本均来自浙江大学医学院附属儿童医院门诊及住院患者。

[0056] 操作步骤:100 μL 骨髓液,分别加入单克隆荧光标记抗体(GD2-FITC、CD90-PE, CD45-PerCP 和 CD56-APC) 各 20 μL,4℃ 避光反应 30 分钟,加入溶血剂 1mL,静置 5 分钟,加 PBS5mL,500G 离心沉淀 5 分钟,弃上清,沉淀物加 PBS300 μL,混匀,上流式细胞仪检测 50000 个细胞。

[0057] 流式图像分析策略:

[0058] 横纹肌肉瘤:1、CD45<sup>-</sup> 和 CD56<sup>+</sup> 设 R1 门;2、GD2<sup>-</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 细胞设 R2 门;3、FSC 和 SSC 细胞设 R3 门分析;4、计算 R3 门内的阳性细胞数。(R2 来源于 R1;R3 来源于 R2)。

[0059] 神经母细胞瘤:1、CD45<sup>-</sup> 和 CD56<sup>+</sup> 设 R1 门;2、GD2<sup>+</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 细胞设 R2 门;3、FSC 和 SSC 细胞设 R3 门分析;4、计算 R3 门内的阳性细胞数。(R2 来源于 R1;R3 来源于 R2)。

[0060] 急性白血病原始细胞:1、CD45<sup>+</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 设 R1 门;2、分析 CD45<sup>+</sup> 和 GD2<sup>-</sup> 细胞;3、分析 CD45<sup>+</sup> 和 CD56<sup>-</sup> 细胞。

[0061] 同时设立阴性对照。

[0062] 阳性结果以免疫表型判断细胞类型如下:

[0063] 表型呈 GD2<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 为横纹肌肉瘤细胞;

[0064] 表型呈 GD2<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 为神经母细胞瘤细胞;

[0065] 表型呈 GD2<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> 为急性白血病原始细胞。

[0066] 检测敏感性测定:分别将横纹肌肉瘤细胞用正常骨髓细胞稀释成 1:100,1:1000,

1:10000 的比例,同样用以上方法检测。

[0067] 统计方法:利用软件 SPSS11.5(SPSS Inc., Chicago, IL, USA),分析评价诊断方法的敏感性和特异性。

[0068] 各类型标本的检测结果如图 1、图 2、图 3、图 4、图 5、图 6a、图 6b、图 6c 所示。

[0069] 结果表明:15 例非白血病及肿瘤儿童均未检测到以上三类免疫表型细胞;21 例横纹肌肉瘤细胞患者中 5 例检测到 GD2<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 免疫表型细胞,临床最终确诊该 5 例为横纹肌肉瘤骨髓转移;25 例神经母细胞瘤患者中 11 例检测到 GD2<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 免疫表型细胞,临床最终确诊该 11 例为神经母细胞瘤骨髓转移;22 例急性白血病细胞均为 GD2<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> 细胞免疫表型;流式细胞术对骨髓中三类肿瘤细胞诊断的特异性均为 100%,敏感性为  $1/10^{-4}$ (即在 10000 个正常细胞中可检测到 1 个肿瘤细胞)。

[0070] 实施例 2

[0071] 一、试剂盒组成:

[0072] 1) 探针溶液(2mL×1 瓶):

[0073] GD2-FITC:2mL PBS(含 0.1% 叠氮钠)含异硫氰酸荧光素标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0074] CD90-PE:2mL PBS(含 0.1% 叠氮钠)含藻红蛋白标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0075] CD45-PerCP:2mL PBS(含 0.1% 叠氮钠)含草履虫叶绿素蛋白标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0076] CD56-APC:2mL PBS(含 0.1% 叠氮钠)含异藻蓝蛋白标记的 100 μg 抗体蛋白(50 μg/mL);

[0077] 组合物抗体浓度比例 GD2-FITC:CD90-PE:CD45-PerCP:CD56-APC 为 1:1:1:1。

[0078] 2) 10× 溶血剂(100mL×1 瓶):8.3% 氯化铵,含 15% 多聚甲醛;

[0079] 3) 10× 磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4, 1M, 含 1% 叠氮钠)(100mL×1 瓶);

[0080] 4) 阳性标准品(2mL×1 瓶):固定和保存液处理的细胞株( $5 \times 10^7$  个细胞/mL)。

[0081] 二、试剂盒的应用

[0082] 研究对象:2 例疑是横纹肌肉瘤脑脊液转移患者穿刺脑脊液标本。

[0083] 操作步骤、分析策略和统计方法同实施例 1。

[0084] 结果表明:2 例横纹肌肉瘤临床怀疑为脑脊液转移患者进行穿刺脑脊液经本抗体组合流式细胞仪检测,发现 GD2<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 免疫表型细胞(图 7、图 8),最终临床诊断该两例为横纹肌肉瘤脑脊液转移,并进行鞘内化疗及颅脊柱的放射治疗。表明本发明的荧光探针能够监测横纹肌肉瘤脑脊液转移,指导临床合理用药。

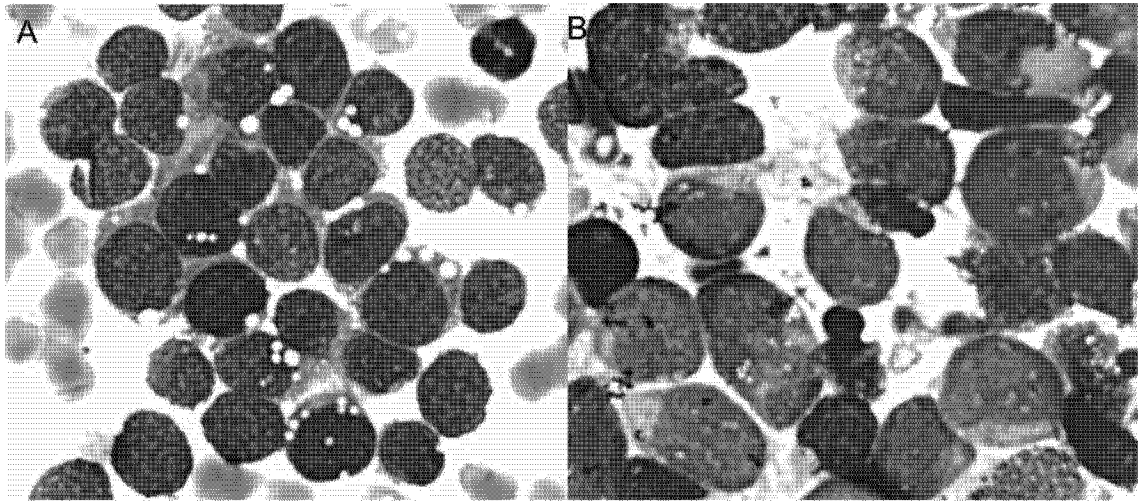


图 1

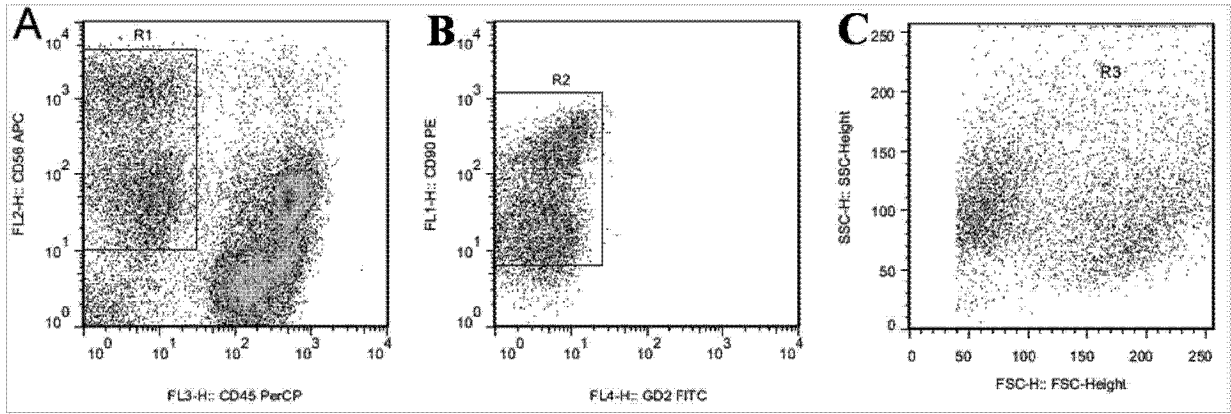


图 2

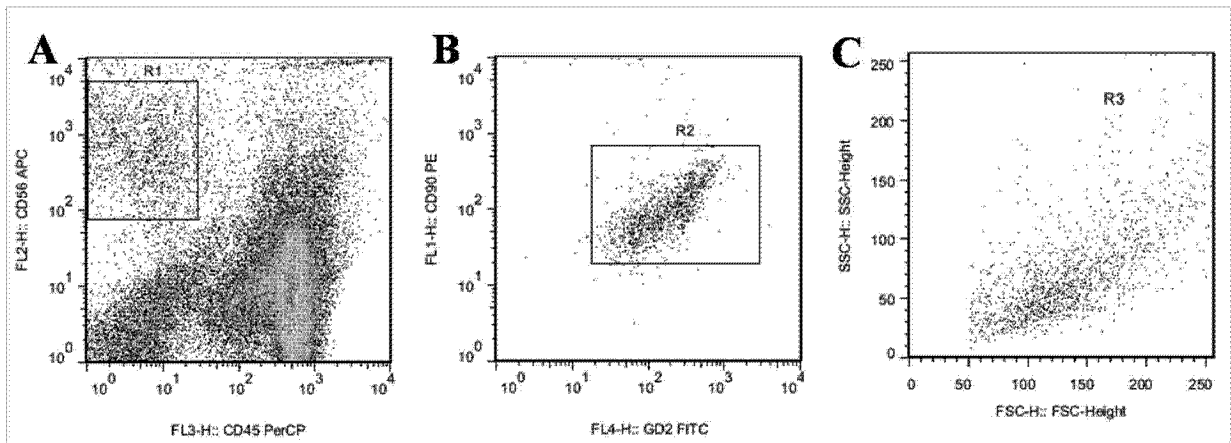


图 3



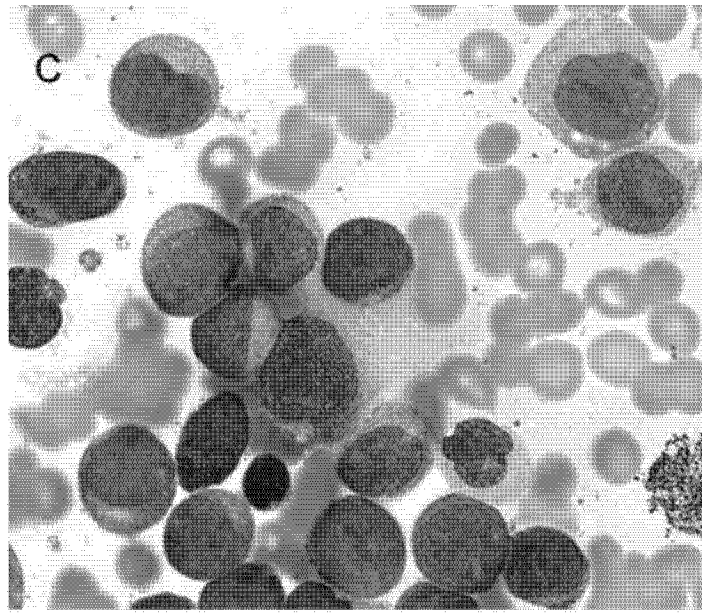


图 4

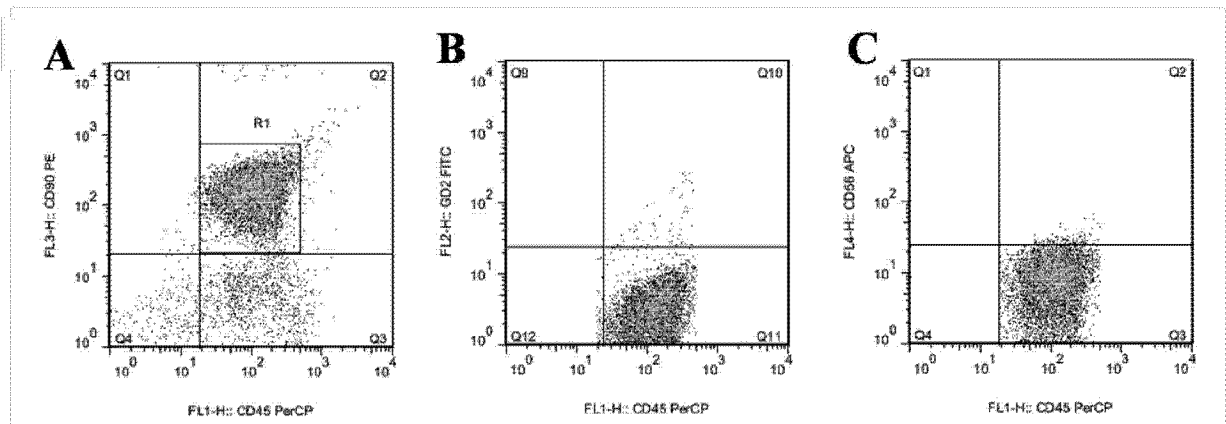


图 5

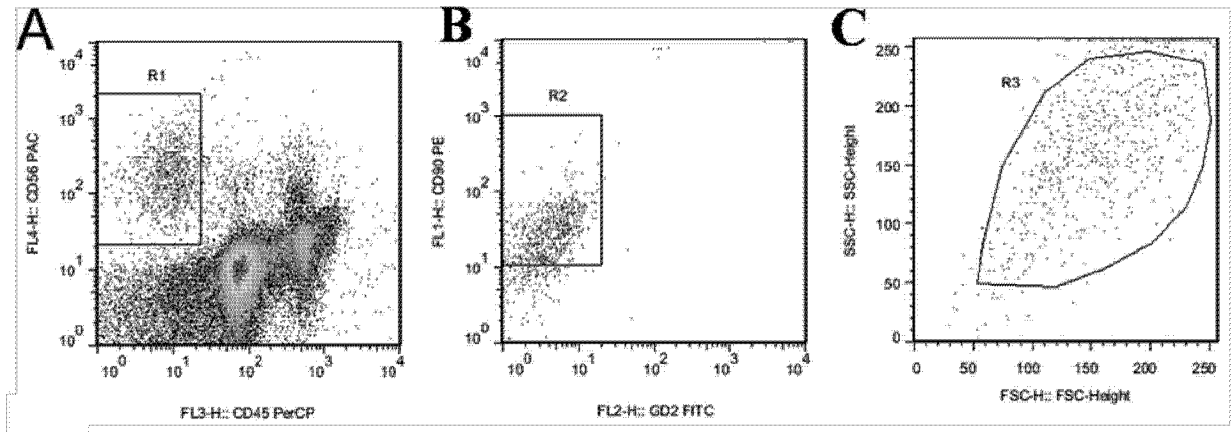


图 6a

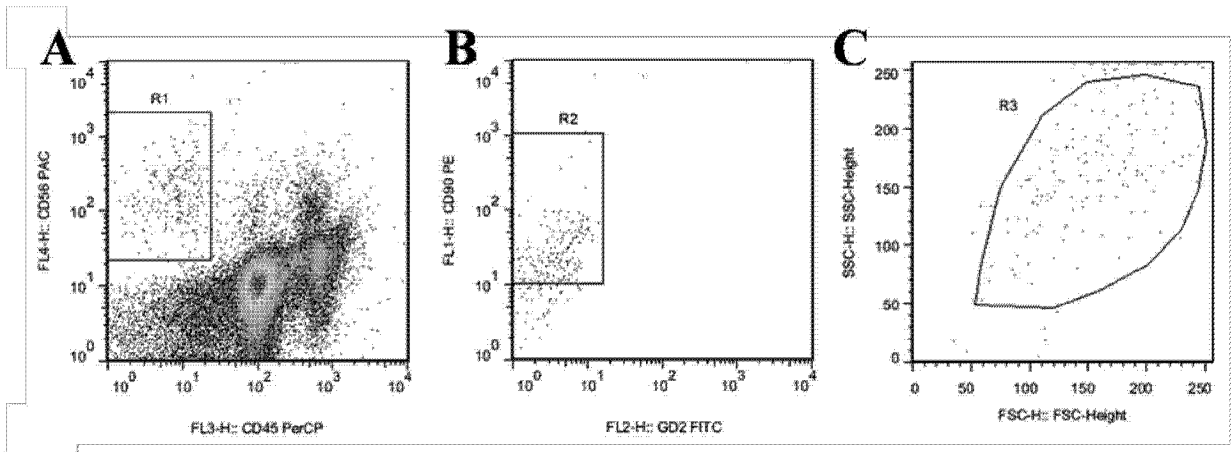


图 6b

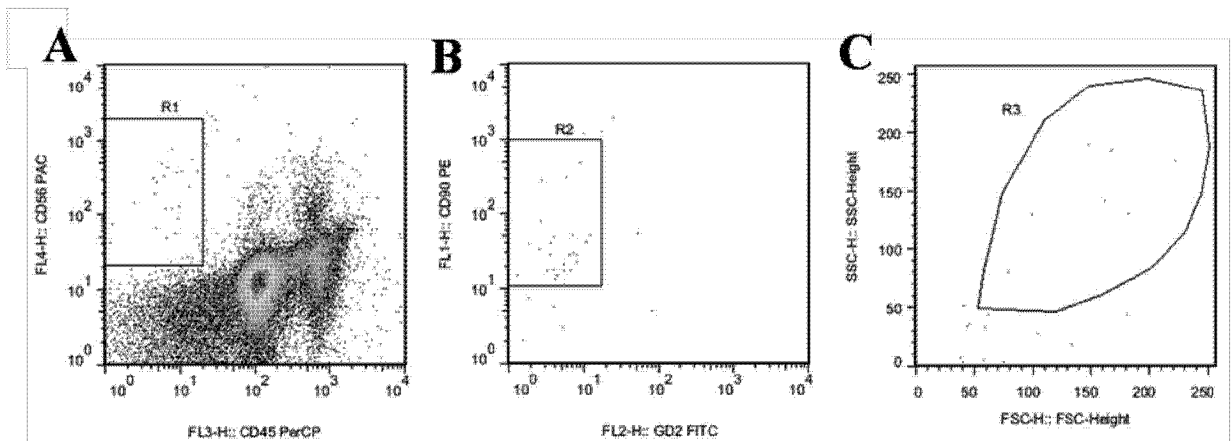


图 6c

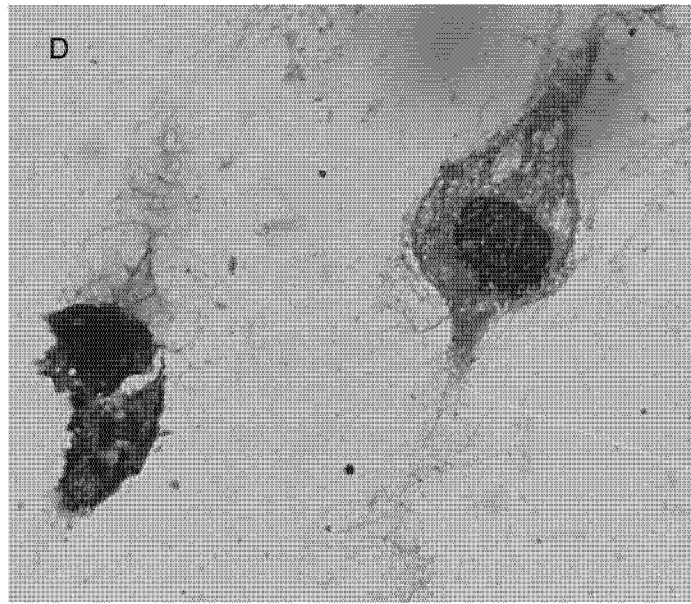


图 7

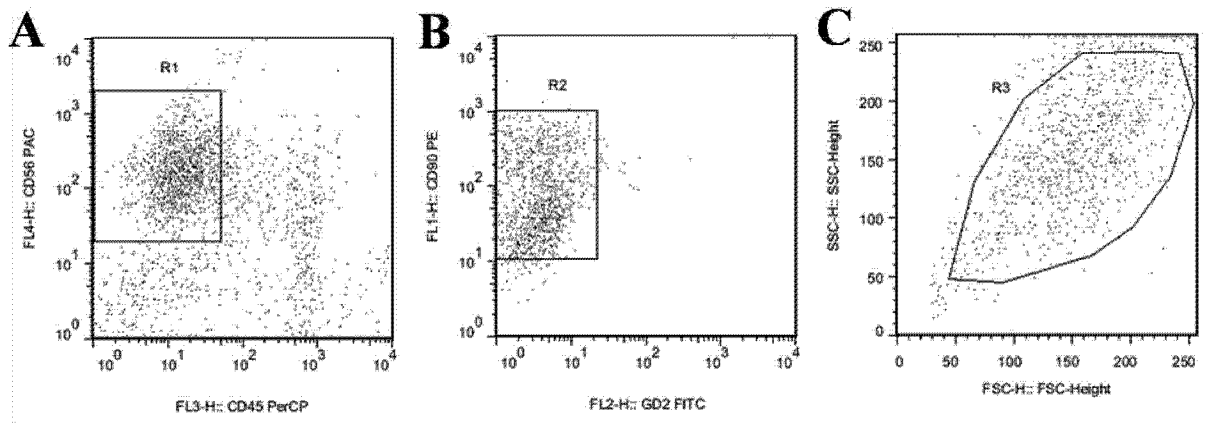


图 8