

2018

项目编号

P X 2 0 1 8 0 2 9



北京市属医院科研培育计划项目任务书

(2018版)

项目名称: 三阴性乳腺癌患者肿瘤免疫抑制状态与MAPK、

PD-L1表达水平的相关性研究

项目类别: 西医(√) 中医() 管理()

所属二级学科: 流行病与卫生统计学

委托单位: 北京市医院管理局

承担单位: 首都医科大学附属北京世纪坛医院

项目负责人: 宋清坤

联系电话: 18210982367

起止年限: 2018.1-2020.12

北京市医院管理局制

1

一、项目任务与目标、考核指标

(目标、考核指标应客观、具体、可查、可测、可看,具有成果的依附形式或载体。)

1、项目任务:

(项目任务应明确完成本研究工作的范围、界限,即项目全部工作和成果的整体描述。)

本研究拟招募100例2010年至2017年在首都医科大学附属北京世纪坛医院进行乳腺外科切除手术并被病理诊断为三阴性乳腺癌的女性患者,检测肿瘤组织切片中TIL、PD-1+TIL、PD-L1和磷酸化MAPK水平,分析PD-L1和磷酸化MAPK与TIL、PD-1+TIL的关系,阐明PD-L1和Ras/MAPK信号通路对三阴性乳腺癌抑制性免疫微环境的关系。

2、项目目标:

(项目目标内容应完整、明确,并能够考查项目完成的程度和实际效果。包括定性、定量两个部分,定性的内容应概括项目预期效果的几个方面,定量的内容应说明预期效果的程度和范围。)

1. 收集100例三阴性乳腺癌患者的临床信息和组织样本,建立生物样本库。
2. 完成100例样本的TIL、PD-1+TIL、PD-L1和磷酸化MAPK的检测,并分析彼此之间的关系。
3. 明确PD-L1表达水平与三阴性乳腺癌抑制性免疫微环境的关系。
4. 阐明Ras/MAPK信号通路活化对三阴性乳腺癌抑制性免疫微环境的影响。
5. 揭示Ras/MAPK信号通路活化和肿瘤细胞上PD-L1表达水平对肿瘤微环境免疫抑制的联合作用。

3、考核指标:

(考核指标应体现项目目标预期完成程度和水平,以及对项目各项研究开发内容预期完成情况考核,指标体系应系统、完整,客观可查。)

完成100例三阴性乳腺癌生物样本库的建立,完成100例患者TIL、PD-1+TIL、PD-L1和磷酸化MAPK的检测,分析PD-L1和磷酸化MAPK与TIL、PD-1+TIL的关系,揭示PD-L1和Ras/MAPK信号通路对三阴性乳腺癌抑制性免疫微环境的关系,发表相关论文,完成团队成员的培养以及申报更高级课题。

二、项目研究内容

(项目主要研究内容、现有研究基础、关键技术创新点,对完成项目目标和考核指标的充分性)

1. 建立三阴性乳腺癌组织样本库

收集 2010 年至 2017 年所有在世纪坛医院做乳腺癌外科手术并病理确诊为三阴性乳腺癌的组织标本,结合临床信息组建生物标本信息库。

2. 进一步明确三阴性乳腺癌肿瘤微环境的免疫状态

检测三阴性乳腺癌肿瘤组织中 TIL 水平、CD4⁺TIL、CD8⁺TIL 和 PD1⁺TIL 水平。

3. 检测三阴性乳腺癌肿瘤细胞上 PD-L1 的表达水平

在肿瘤组织上通过免疫组化的方法检测 PD-L1 的表达水平。

4. 检测肿瘤细胞上 Ras/MAPK 通路的活化水平

检测乳腺癌组织上活化 MAPK (磷酸化) 的水平。

5. 分析 Ras/MAPK 信号通路活化以及 PD-L1 表达水平对三阴性乳腺癌抑制性免疫微环境的影响

通过采用不同的分析方法验证 MAPK 活化与 PD-L1 的表达水平与肿瘤微环境中 TIL 数量和 PD1⁺TIL、CD4⁺TIL 和 CD8⁺TIL 的关系。

本团队前期研究发现三阴性乳腺癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞数量明显高于 luminal A 型患者,而且可预测患者的生存时间。既往研究发现三阴性乳腺癌患者组织中 PD1⁺TIL 水平明显高于 luminal A 型乳腺癌患者,而且 PD1⁺的辅助性 TIL 和 PD1⁺的杀伤性 TIL 的数量均高于 luminal A 型乳腺癌患者,差别均有统计学意义。提示三阴性乳腺癌肿瘤免疫微环境呈抑制性状态,前期研究还发现三阴性乳腺癌组织中磷酸化 MAPK 明显过表达。

关键技术及创新点

本研究针对治疗手段少、临床疗效差的三阴性乳腺癌,在发现三阴性乳腺癌的免疫抑制微环境特点后,进一步验证免疫检查点(PD-L1)和 Ras/MAPK 信号通路中磷酸化 MAPK 水平与免疫抑制的关系,为进一步开展免疫治疗以及靶向治疗提供科学依据。本研究基于三阴性乳腺癌独特的免疫微环境,拟通过明确 PD-L1 和 Ras/MAPK 信号通路活化与肿瘤免疫抑制状态的关系,探索在三阴性乳腺癌中开展免疫治疗和靶向治疗的前期临床研究。

三、项目技术路线与实施方案

2

1、项目研究方案与技术路线

(主要阐述项目研究方案与技术路线。依据项目任务要求,结合国内外技术发展和各单位实际情况,明确关键技术,拟定科学、合理、可行的研究方案和技术路线。)

研究对象

于 2010 年至 2017 年在首都医科大学附属北京世纪坛医院进行乳腺外科切除术并被病理诊断为三阴性乳腺癌的女性患者。三阴性乳腺癌是指免疫组化检测 ER 阴性、PR 阴性以及免疫组化检测 HER2 没有过表达或 Fish 检测 HER2 未扩增的患者。纳入标准:于我院住院治疗的女性乳腺癌患者,病理诊断为原发性乳腺癌,分子分型为三阴性乳腺癌的患者,签署知情同意书。排除标准:之前接受任何形式的免疫治疗的患者,伴有自身免疫性疾病的患者,由于各种疾病不能参加该研究的患者。

研究方法

本研究以临床流行病学横断面研究设计,检测三阴性乳腺癌患者组织中 TIL 数量和 PD1⁺TIL、CD4⁺TIL 和 CD8⁺TIL 的数量,并检测 PD-L1 表达水平和 Ras/MAPK 信号通路中 MAPK 的活化水平,分析 PD-L1 和磷酸化 MAPK 水平与 TIL、PD1⁺TIL、CD4⁺TIL 和 CD8⁺TIL 数量的关系。

TIL 检测通过 2 名病理医生独立对本标进行 HE 染色后,评估肿瘤基质中 5 个高倍视野下 (HPF) 中 TIL 的平均数量,并将 2 为医生的取值进行平均得到最终 TIL 数量/HPF。

PD-L1、MAPK、PD-1、CD4 和 CD8 均采用自动免疫组化仪以 EnVision 二步法进行检测,抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。具体步骤:标本蜡块制备成 4 μm 连续切片,经脱蜡和水化后,滴加 3%过氧化氢溶液室温作用 10 min, PBS 冲洗 3 遍,每遍 5 min,置于 pH6.0 柠檬酸盐缓冲液中微波加热 20 min 进行抗原修复,自然冷却至室温, PBS 冲洗 3 遍,每遍 5 min,滴加鼠抗人 PD-1 单克隆抗体 (1:200 稀释)、鼠抗人 CD4 单克隆抗体 (1:200 稀释)、鼠抗人 CD8 单克隆抗体 (1:200 稀释)、鼠抗人 MAPK 单克隆抗体 (1:200 稀释) 和兔抗人 PD-L1 多克隆抗体 (1:200 稀释), 4℃ 孵育过夜, PBS 冲洗 3 遍,每遍 5 min,使用 PV-6000 二抗试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 每张切片滴加二抗 50 μl, 室温条件下孵育 20 min, PBS 冲洗 3 遍,每遍 5 min,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂封片。

免疫组化结果由 2 名资深病理科医师“双盲”独立判读。CD4、CD8、PD-L1 和 PD-1 以细胞质或细胞膜出现黄至棕褐色颗粒为阳性显色, MAPK 以细胞核、细胞质或细胞膜呈

棕黄色为阳性显色。采用半定量积分法,结合染色强度和阳性细胞百分比来评定阳性表达病例。

样本量计算

前期预实验发现,在三阴性乳腺癌患者组织中 PD-L1 与 PD-1 的 Pearson 相关系数为 0.37,在 I 类错误概率为 5%,研究效能为 80% 时计算样本量为 55 名三阴性乳腺癌患者,考虑分层分析等因素,计划样本量为 100 名三阴性乳腺癌患者,而此时的研究效能超过 90%。

技术路线

本研究技术路线如图 4 所示,邀请女性原发性三阴性乳腺癌患者加入研究后,收集术后切除的组织标本和临床信息并建立生物信息样本库,检测肿瘤组织中间质中 TIL、PD1⁺TIL、CD4⁺TIL 和 CD8⁺TIL 的水平,进而检测肿瘤细胞上 PD-L1 水平和 Ras/MAPK 通路磷酸化 MAPK 的水平,分析 PD-1 和活化 Ras/MAPK 对三阴性乳腺癌抑制性免疫微环境的影响。

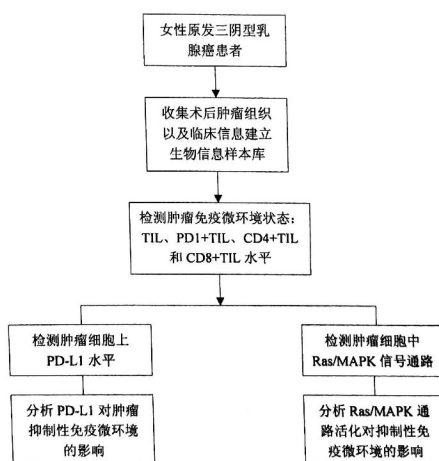


图 4. 技术路线图

统计方法

所有检测指标均采用平均值±标准差的形式进行描述,以 Pearson 或者 Spearman 相关性检测分析 TIL、PD1⁺TIL、CD4⁺TIL 和 CD8⁺TIL 水平与 PD-L1 以及磷酸化 MAPK 的关系,以 Wilcoxon 秩和检验和独立样本 t 检验比较不同分类 TIL、PD1⁺TIL、CD4⁺TIL 和 CD8⁺TIL 状态下 PD-L1 以及磷酸化 MAPK 水平的差别。以 General Linear Regression model 和 Unconditional Logistic regression model 分析 PD-L1 以及磷酸化 MAPK 水平与 TIL、PD1⁺TIL、CD4⁺TIL 和 CD8⁺TIL 的关系。所有分析均为双侧检验,显著性水平为 0.05。

质量控制

在整个研究的过程中,从研究的各个环节,包括研究对象选择、实验室检测、数据收集和分析,需严格遵循质量控制原则。

1. 研究人员培训:在项目正式开展之前,对于所有参与项目的工作人员进行培训,培训的内容包括,血样选择、编码实验室检测以及数据管理。所有操作步骤需严格按照原则进行,以保证项目的质量;
2. 研究对象选择:所有的研究对象均经过病理学诊断为三阴性乳腺癌的患者;
3. 实验室检测:所有检测均设空白及标准品对照,采用重复测定以减少组内差异;
4. 检测结果判读:免疫组化结果的判读需经 2 名病理科医生在“双盲”的前提下独立判读;
5. 数据收集及分析:将检测数据双录入至数据库后,采用科学推荐的统计学方法进行分析总结,得出经得起推敲的结论;
6. 定期督导:在项目正式开展以后,定期到基层研究现场,组织项目工作人员进行项目工作反馈、监督与指导,从各个环节控制研究质量。

2. 项目组织实施与管理措施

(项目负责人应切实履行项目管理职责,落实项目实施所需配套条件、研究团队和配套仪器设备、经费等条件,有完善的项目管理制度,项目的组织管理和协调措施应能保障项目按计划顺利实施。)

我院有完善的科技管理制度,建立了多个实验平台用于协助临床基础研究工作的发展。本课题以项目管理的模式进行组织管理,在保证研究质量的前提下确保课题可以按时完成。

样本量可行，目前研究团队已收集了70余例三阴性乳腺癌患者组织标本和临床信息，我院乳腺外科每个月可完成20余例乳腺癌患者手术，按三阴性乳腺癌比例为10%算，15个月内可完成所有标本的收集。

检测方法可行，有关分子标志物的EnVision二步免疫组化检测法已在我院病理科为常规使用检测方法，具备熟练的操作技术和流程。

本课题小组成员既包括长期从事临床人群研究的科研人员、还包括负责现场数据和生物样品采集的工作人员、实验室分子标志物检测方向的科研人员、数据管理和分析的统计人员。团队成员满足开展该项科研工作的条件。

研究组成员，本研究团队具备方法学人员、临床专家、病理检测专家和数据管理人员，可以满足研究的需要。

四、项目分年度计划进度及考核指标

(项目应按年度填写计划进度，各年度任务目标清晰，研究内容具体，考核指标明确可查，并能够满足项目计划进度的要求)

年度	年度计划进度	年度考核指标
第一年	完成大部分数据收集和实验室检测	完成至少80例三阴性乳腺癌临床数据收集和实验室检测，分析数据
第二年	完成所有样本检测工作并分析相关结果	完成100例三阴性乳腺癌患者的临床检测工作，得出初步分析结果，投递会议论文
第三年	完成该研究并结题	发表1-2篇SCI论文并结题

五、项目经费预算(金额单位:万元)

预算科目名称	第一年	第二年	第三年	合计
1、设备费				
2、材料费	4.00	2.00	0.00	6.00
3、测试化验加工费				
4、差旅费				
5、会议费				
6、国际合作与交流费				
7、出版/文献/信息传播/知识产权事务费				
8、劳务费				
9、专家咨询费				
10、临床应用费用				
11、绩效支出				
12、其他支出				
合计	4.00	2.00		6.00

六、项目预期成果形式、知识产权归属与管理

(各承担单位就项目产生的知识产权归属进行书面约定,正式发表的论文、论著应注有“北京市属医院科研培育计划”项目,编号:*****,英文翻译为“Beijing Municipal Administration of Hospitals Incubating Program”, code:*****)

1. 发表 1-2 篇 SCI 论文。
2. 依据研究结果,进一步申报临床研究项目
3. 晋升正高职称 1 名
4. 晋升副高职称 1 名
5. 研究报告 1 份
6. 知识产权归首都医科大学附属北京世纪坛医院所有

七、项目成果推广方案

(成果推广方案应明确项目成果的应用推广领域、拟采取的具体推广措施或推广计划等)

明确了三阴性乳腺癌抑制性免疫微环境与 PD-L1 和 Ras/MAPK 通路的关系,可以通过免疫治疗和靶向治疗改善免疫微环境,为进一步制定治疗策略提供参考依据,可以为广大三阴性乳腺癌患者提供更多的治疗选择,改善临床预后。拟在乳腺癌临床治疗领域进行推广,以举办培训、学术会议的形式推广该研究成果,为开展乳腺癌精准化免疫治疗提供实时的参考依据,具有极大的社会效益和经济效益。

8

八、项目负责人、项目组研究人员

1、项目负责人




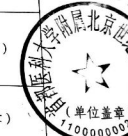
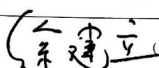
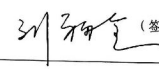

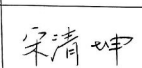
姓名	宋清坤	性别	男	职称	副研究员
学历	博士研究生	从事专业	临床流行病学	职务	科技处处长助理
手机	18210982367	通讯地址	北京市海淀区羊坊店铁医路10号首都医科大学附属北京世纪坛医院	邮政编码	100038
传真	010-63926603	电子信箱	songqingkun@aliyun.com		

2、项目研究人员

姓名	性别	出生年月	身份证号	技术职称	职务	学历	专业	主要分工	所在科室
宋清坤	男		7	副研究员	科技处处长助理	博士	临床流行病学	研究设计、数据收集和分析、文章撰写	科技处
周全	女		1	副主任医师	病理科主任助理	博士	病理分子生物学	实验室检测	病理科
石峰	女			主治医师	无	硕士	病理分子生物学	实验室检测	病理科
赵艳杰	女			主治医师	无	博士	肿瘤学	临床数据收集	肿瘤内科

9

九、任务书各方签字盖章

市 医 管 局	单位名称	北京市医院管理局	邮编	100053	 北京市 医院管理局 (单位盖章)
	主管局长	 (签章)			
	主管处长	 (签章)			
	地址	北京市西城区寒林前街70号			
项 目 所 在 单 位	单位名称	首都医科大学附属北京世纪坛医院			 首都医科大学附属北京世纪坛医院 (单位盖章)
	单位负责人	 (签章)			
	单位科教管理部门负责人	 (签字/签章)			
	财务负责人	 (签字/签章)			
	地址	北京市海淀区丰坊店铁匠路10号			
项目负责人		 (签字)			2018年1月23日

11

4、课题研究人员									
姓名	性别	出生年月	身份证号	技术职称	职务	学 历	从事专业	主要分工	工作单位
李艳萍	女		0	高级	乳腺外科副主任	博士	肿瘤学	研究组织实施、协调、质量控制	首都医科大学附属北京世纪坛医院
周全	女			高级	病理科副主任	博士	分子病理学	实验室检测及判读	首都医科大学附属北京世纪坛医院
石峰	女			高级	无	硕士	分子病理学	实验室检测及判读	首都医科大学附属北京世纪坛医院
赵艳杰	女			高级	无	博士	肿瘤学	患者随访	首都医科大学附属北京世纪坛医院
吕淑贞	女			中级	无	硕士	肿瘤学	数据分析、结果汇总、解读	首都医科大学附属北京世纪坛医院
伍江平	男			中级	无	大本	检验医学	实验室检测	首都医科大学附属北京世纪坛医院
袁可玉	女			其他	无	大本	肿瘤学	随访数据管理、标本运输	首都医科大学附属北京世纪坛医院

北京市科技计划
课题任务书

课题名称: 乳腺癌患者外周血中免疫检查点分子 PD-1 / PD-L1 反映组织中表达水平的临床应用价值研究—“双盲”诊断试验

所属项目名称: 首都临床特色应用研究

课题委托单位: 北京市科学技术委员会

课题承担单位: 首都医科大学附属北京世纪坛医院

起止年限: 2018 年 06 月至 2021 年 05 月

北京市科学技术委员会制

一、课题任务与目标、考核指标
<p>1、课题任务:</p> <p>本研究以 200 例乳腺癌患者为研究对象,采用诊断试验的研究方法,通过测外周血可溶性和淋巴细胞上 PD-1/PD-L1 的水平,观察与肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 检测水平的相关性,建立外周血 PD-1/PD-L1 对组织中 PD-1/PD-L1 表达水平的回归模型,绘制 ROC 曲线、进行内部一致性、灵敏度、特异度等分析,评价外周血 PD-1/PD-L1 水平反映组织中表达水平的能力以及对组织检测的替代作用。</p>
<p>2、课题目标:</p> <p>完成 200 例 I、II 期原发性乳腺癌手术,根据 200 例患者外周血可溶性和淋巴细胞上 PD-1/PD-L1 水平以及肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 的表达水平,建立乳腺癌临床数据库,评估外周血 PD-1/PD-L1 检测反映和替代肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 水平的能力和价值。</p>
<p>3、考核指标及年度分解:</p> <p>1. 评价外周血 PD-1/PD-L1 反映组织中水平的能力和替代性检测的价值,建立以外周血 PD-1/PD-L1 检测替代组织中检测的评估体系;</p> <p>2. 发表 SCI 论文 1-2 篇;</p> <p>3. 申报发明专利 1 项。</p> <p>年度分解</p> <p>1. 2018 年:完成 150 例乳腺癌患者生物样本检测,建立生物样本库。</p> <p>2. 2019 年:完成剩余 50 例乳腺癌患者生物样本检测,数据分析得出初步结论,投递参会摘要 1 份。</p> <p>3. 2020 年:完成所有数据分析,研究数据结果,完成研究组 1-2 名成员职称晋</p>

二、课题研究开发内容

1. 主要研发内容

本研究以诊断试验的研究方法,以横断面研究设计,对原发性乳腺癌患者进行外周血 PD-1/PD-L1 检测,金标准以免疫组化的方法检测肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 的表达情况,以内部一致性检验、ROC 曲线下面积、灵敏度、特异度等评估外周血 PD-1/PD-L1 反映组织中 PD-1/PD-L1 的能力和替代组织中检测的价值。

1) 建立乳腺癌生物样本信息库。

收集 2018 年至 2020 年所有在我院乳腺外科手术治疗而且病理确诊为乳腺癌的患者外周血、组织标本,结合临床信息组建生物样本信息库。

2) 检测乳腺癌患者组织中 PD-1/PD-L1 表达水平

通过免疫组化的方法检测手术切下来的组织标本中 PD-1/PD-L1 的水平。

3) 检测乳腺癌患者外周血中可溶性 PD-1/PD-L1 并分析与组织中 PD-1/PD-L1 的相关性。

以 ELISA 方法测定外周血中可溶性 PD-1/PD-L1 的水平,进而分析外周血中 PD-1/PD-L1 是否与组织中 PD-1/PD-L1 存在相关性。

4) 检测乳腺癌患者外周血中淋巴细胞 PD-1/PD-L1 的水平、分析与组织中 PD-1/PD-L1 的关系。

以流式细胞仪检测外周血中表达 PD-1/PD-L1 的淋巴细胞数量,分析表达 PD-1/PD-L1 的淋巴细胞与组织中 PD-1/PD-L1 表达水平的关系。

5) 评估外周血中 PD-1/PD-L1 的水平反映组织中 PD-1/PD-L1 的诊断价值。

通过一致性分析确定外周血可溶性 PD-1/PD-L1 的水平、淋巴细胞 PD-1/PD-L1 表达水平对肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 的预测作用,并进一步通过描绘 ROC 曲线评估外周血中 PD-1/PD-L1 水平反映组织中 PD-1/PD-L1 水平的价值,评估在灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。

2. 关键技术与创新点

通过测定乳腺癌外周血和组织上 PD-1/PD-L1 的水平,明确了外周血可溶性、淋巴细胞上 PD-1/PD-L1 检测替代组织上 PD-1/PD-L1 检测的可行性。该方法克服了用手术标本进行检测难以实时动态评估患者 PD-1/PD-L1 水平的困难并降低了多次穿刺活检对患者造成的身体创伤和心理压力,简化了免疫治疗关键分子的检测途径,可以及时为进一步开展免疫治疗提供参考依据。

第 7 页 共 29 页

三、课题技术路线与实施方案

1、技术方案与技术路线

1.1 研究设计(包括研究开展的类型、研究假设及可能涉及的治疗方案)

本研究采用诊断性试验的设计方法,以病理确诊的乳腺癌患者为研究对象,通过 ELISA 和流式细胞仪检测外周血中可溶性和淋巴细胞 PD-1/PD-L1 的水平,评估外周血中 PD-1/PD-L1 与组织中 PD-1/PD-L1 水平的相关性,进而估计外周血检测反映组织检测的诊断能力以及替代组织检测的价值。

1.2 研究对象(含纳入和排除标准)

研究对象为 2018 年至 2020 年收治于我院乳腺外科病理确诊为原发性乳腺癌的女性患者。

纳入标准:在乳腺外科住院经手术治疗的女性乳腺癌患者,病理诊断为原发性乳腺癌,术后分期为 I-II 期,术前未进行新辅助化疗,年龄不超过 75 岁,签署知情同意书。

排除标准:之前接受任何形式的免疫治疗的患者,伴有自身免疫性疾病的患者,ECOG 评分>2 分,心、脑、肾等其他重要器官功能不全不能参加该研究的患者。

1.3 可溶性 PD-1/PD-L1 检测

本研究采用 ELISA 法检测血清中的 PD-1/PD-L1,具体步骤如下

1) 标准品的稀释与加样:在酶标包被板上设标准品孔 10 孔,在第一、第二孔中分别加标准品 100 μ l,然后在第一、第二孔中加标准品稀释液 50 μ l,混匀;然后从第一孔、第二孔中各取 100 μ l 分别加到第三孔和第四孔,再在第三、第四孔分别加标准品稀释液 50 μ l,混匀;然后在第三孔和第四孔中先各取 50 μ l 弃掉,再各取 50 μ l 分别加到第五、第六孔中,再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液 50 μ l,混匀;混匀后从第五、第六孔中各取 50 μ l 分别加到第七、第八孔中,再在第七、第八孔中分别加标准品稀释液 50 μ l,混匀后从第七、第八孔中分别取 50 μ l 加到第九、第十孔中,再在第九、第十孔分别加标准品稀释液 50 μ l,混匀后从第九、第十孔中各取 50 μ l 弃掉。(稀释后各孔加样量都为 50 μ l,浓度分别为 12ng/L, 8ng/L, 4ng/L, 2ng/L, 1ng/L)。

2) 加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶试剂,其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l,

第 8 页 共 29 页

下解育 20min, PBS 冲洗 3 遍, 每遍 5min,, 梯度酒精脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

免疫组化结果由 2 名资深病理科医师“双盲”独立判读。PD-L1 和 PD-1 以细胞质或细胞膜出现黄至棕褐色颗粒为阳性显色。采用半定量积分法, 结合染色强度和阳性细胞百分比来评定阳性表达病例。PD-L1 以阳性细胞数 $\geq 1\%$ 判为阳性, $< 1\%$ 判为阴性, 评价肿瘤细胞中 PD-L1 的表达情况。PD-1 表达于间质肿瘤浸润淋巴细胞上, 以阳性细胞数 $\geq 5\%$ 判为阳性, $< 5\%$ 判为阴性。

1.6 血液样本采集、处理及储存

患者在手术前抽取外周静脉血 5ml, EDTA-K2 抗凝处理。储存于 -4°C 冰箱中, 24 小时内进行外周血淋巴细胞 PD-1/PD-L1 流式细胞仪检测; 检测完后将血样进行离心处理并收集血浆, 将血浆储存于 -80°C 超低温冰箱中以备 ELISA 法检测可溶性 PD-1/PD-L1。

1.7 观察指标

主要指标: 乳腺癌患者肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 表达水平、外周血中可溶性 PD-1/PD-L1 的水平和外周血中淋巴细胞 PD-1/PD-L1 的水平。次要指标: 患者年龄、病理类型、病理分期、病理分级、分子分型、月经史、生育史、家族史和母乳喂养史等相关因素的信息。

1.8 结局评价指标

外周血 PD-1/PD-L1 检测水平反映乳腺癌组织中 PD-1/PD-L1 的能力; 内部一致性水平、ROC 曲线下面积、最优分界值、最优分界值下的准确度(灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值等)。

1.9 样本量确定

预实验发现 80% 的乳腺癌患者肿瘤组织中 PD-1 阳性, 35% 的患者组织中 PD-L1 阳性, 外周血可溶性 PD-L1 对肿瘤组织上 PD-L1 预测 ROC 曲线下面积为 0.80, 外周血淋巴细胞 PD-L1 对肿瘤组织上 PD-L1 预测 ROC 曲线下面积为 0.86, 外周血可溶性 PD-1 对肿瘤组织上 PD-1 预测 ROC 曲线下面积为 0.76, 外周血淋巴细胞 PD-1 对肿瘤组织上 PD-1 预测 ROC 曲线下面积为 0.73, 显著性水平为 0.05, 采用单一 ROC 曲线样本量计算公式 (https://www.statstodo.com/SSizROCs_Pgm.php), 计算分别需要 94、91、170 和 160 例乳腺癌患者, 故本研究计划收集 200 例乳腺癌患者。

1.10 数据收集和管理

第 10 页共 29 页

采取“双盲”的方式进行实验室检测和数据采集, 通过将研究对象编号设置或关键变量, 分别在实验室和临床通过不同的 CRF 表采集实验室检测数据和临床信息, 以 Epidata 制作数据库, 通过双录入的形式将采集数据录入到实验室检测数据库和临床信息数据库中, 通过关键变量将实验室检测数据库和临床信息数据库合并为最终数据库, 并对数据进行管理。

1.11 统计分析方法

表达水平采用平均数 \pm 标准差或者中位数、四分位距进行描述, 以 Pearson 或 Spearman 相关性检验分析外周血 PD-1/PD-L1 水平与组织中 PD-1/PD-L1 的相关性, 通过一般线性模型分析外周血 PD-1/PD-L1 对组织中 PD-1/PD-L1 的回归系数并评估决定系数。以 innerclass correlation coefficient 评估外周血 PD-1/PD-L1 水平与组织中 PD-1/PD-L1 水平的一致性。根据组织中 PD-1/PD-L1 的表达状态, 评估外周血中可溶性、淋巴细胞上 PD-1/PD-L1 水平反映组织 PD-1/PD-L1 的准确度和替代作用, 绘制 ROC 曲线, 评估外周血 PD-1/PD-L1 的分界值(cut-off point)和曲线下面积(AUC), 进而估计灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、似然比、约登指数、准确率和 OR 值。

2. 技术路线

本研究技术路线如图 8 所示, 邀请女性原发性乳腺癌患者加入研究后, 获得知情同意, 收集术前外周血、切除的组织标本和临床信息并建立生物信息样本库, 检测肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 的水平, 进而检测外周血可溶性 PD-1/PD-L1 水平和外周血淋巴细胞 PD-1/PD-L1 水平, 分析外周血 PD-1/PD-L1 水平与肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 的关系以及替代作用。

第 11 页共 29 页

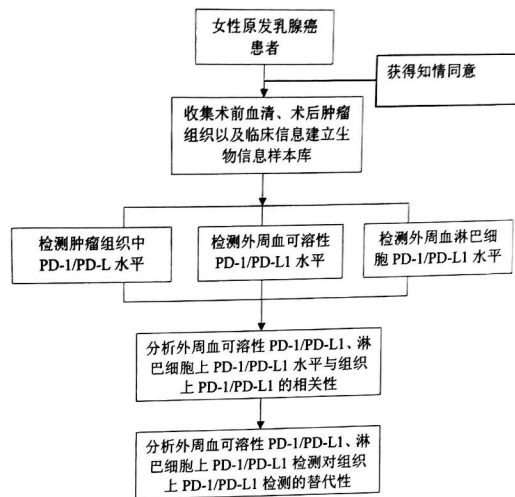


图 8. 技术路线图

3. 临床研究过程中质量控制措施

在整个研究的过程中，从研究的各个环节，包括研究对象选择、实验室检测、数据收集和分析，需严格遵循质量控制原则。

- 1) 研究人员培训：在项目正式开展之前，对于所有参与项目的工作人员进行培训，培训的内容包括，血样采集及储存、编码实验室检测以及数据管理。所有操作步骤需严格按照原则进行，以保证项目的质量；
- 2) 制定标准化操作流程（SOP）：针对课题开展的研究对象选择、招募、生物样本采集、处理、储存和检测，制定 SOP，确保研究质量；
- 3) 研究对象选择：所有的研究对象均经过病理学诊断为乳腺癌的患者，病理分期为 I-II 期且尚未接受新辅助化疗的患者；
- 4) 实验室检测：对于基线采集的血清和血细胞进行编码，以“盲法”进行实验

室检测，实验室工作人员并不知晓受检患者的组织中 PD-1/PD-L1 的检测水平，并且所有检测均设空白及标准品对照并采用 3 个平行样重复测定（取平均值）以减少组内差异；

5) 数据收集及分析：将检测数据双录入至数据库后，采用科学推荐的统计学方法进行分析总结，得出经得起推敲的结论；

6) 中期督导：在项目正式开展以后，定期邀请临床研究专家并组织项目工作人员进行项目工作反馈、监督与指导，从各个环节控制研究质量。

2、课题组织实施与管理措施

我院有完善的科技管理制度，建立了多个实验平台用于协助临床基础研究工作的开展。本课题以项目管理的模式进行组织管理，在保证研究质量的前提下确保课题可以按时完成。

本项目在肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室和我院中心实验室开展外周血淋巴细胞上 PD-1/PD-L1 以及外周血可溶性的 PD-1/PD-L1 检测，该实验室从事多年的肿瘤患者免疫功能对临床疗效和预后影响的研究，在该领域有着丰富的经验和高质量的实验条件，完全满足本项目的要求。

肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室和中心实验室具备研究所用实验条件，例如流式细胞仪、酶标仪、移液枪、自动免疫组化仪、无菌工作台、离心机、冰箱等，以及本项目中血液采集、处理和储存等。

本课题小组成员既包括长期从事临床人群研究的科研人员、还包括负责现场数据和生物样品采集的工作人员、实验室分子标志物检测方向的科研人员、数据管理和分析的统计人员。团队成员满足开展该项科研工作的条件。

目前研究团队已经完成了将近 80 例乳腺癌患者的临床信息收集和生物样本工作，而我院乳腺外科每个月有超过 20 例的患者进行乳腺外科手术手术治疗，所以可以在 15 个月内完成符合样本量要求的研究对象入组工作。

3、课题委托任务（需另附委托或合作协议）

无

4、课题研究人员									
姓 名	性 别	出生年月	身份证号	技术职称	职务	学 历	从事专业	主要分工	工作单位
李艳萍	女			高级	乳腺外科副主任	博士	临床医学	乳腺癌患者筛选、协调与管理	首都医科大学附属北京世纪坛医院
吕大鹏	男			高级	乳腺外科副主任	博士	临床医学	研究组织实施、患者协调、质量控制	首都医科大学附属北京世纪坛医院
周全	女			高级	病理科副主任	博士	临床医学	实验室组织检测及判读	首都医科大学附属北京世纪坛医院
吕淑贞	女			中级	无	硕士	临床医学	临床患者管理与协调	首都医科大学附属北京世纪坛医院
石峰	女			中级	无	硕士	临床医学	实验室组织检测及判读	首都医科大学附属北京世纪坛医院
李雨晨	女			中级	无	硕士	基础医学	实验室可溶性PD-1/PD-L1检测	首都医科大学附属北京世纪坛医院
吴广江	男			初级	无	大本	预防医学	数据收集及	首都医科大学附属北

第 22 页 共 29 页

十、任务书各方					
市科委	单位名称	北京市科学技术委员会		邮编	100195
	主管主任	(签字)			
	主管处长	(签字)			
	主管工程师	(签字)			
	地 址	北京市海淀区四季青路7号院2号楼			
	电 话		传 真		
电子信箱					
课题承担单位一	单位名称	首都医科大学附属北京世纪坛医院			
	法人代码	400003225	邮编	100038	
	单位负责人	(签字)			
	单位科技管理部门负责人	(签字)			
	课题负责人	(签字)			
	财务负责人	(签字)			
	联系人	宋清坤			
	通讯地址	北京市海淀区羊坊店铁医路10号			
	电 话	18210982367	传 真	63926677	
	电子信箱	ybbjsjth@126.com			
户 名	首都医科大学附属北京世纪坛医院				
开户银行	北京银行阜裕支行				
帐 号	01090373100120109085866				

十一、承担单位拨款明细					单位：万元
单位名称	2018 年	2019 年	2020 年	2021 年	合计
首都医科大学附属北京世纪坛医院	16.0	0.0	0.0	0.0	16.0

十二、预留印鉴卡

供应商或收款单位名称 (全称)	首都医科大学附属北京世纪坛医院		
供应商或收款单位法人	徐建立	帐户名称	首都医科大学附属北京世纪坛医院
法人代码	40000323-5	其他代码 (无法人代 码请填此 项)	
联系电话	63926618 (办公室) 63926637 (财务)	银行帐号	01090373100120109 085866
经办部门	财务处	开户银行	北京银行阜裕支行
经办人	石宝新	银行行号	373
联系电话	63926637 (办公室) 15301378567 (手机)	启用日期	1990-01-01
供应商或收款单位地址	北京市海淀区羊坊店铁医路 10号	邮政编码	100038
供应商或收款单位公章		银行预留印鉴	
			

供应商或收款单位编号:

十二、预留印鉴卡

供应商或收款单位名称 (全称)	首都医科大学附属北京世纪坛医院		
供应商或收款单位法人	徐建立	帐户名称	首都医科大学附属北京世纪坛医院
法人代码	40000323-5	其他代码 (无法人代 码请填此 项)	
联系电话	63926618 (办公室) 63926637 (财务)	银行帐号	01090373100120109 085866
经办部门	财务处	开户银行	北京银行阜裕支行
经办人	石宝新	银行行号	373
联系电话	63926637 (办公室) 15301378567 (手机)	启用日期	1990-01-01
供应商或收款单位地址	北京市海淀区羊坊店铁医路 10号	邮政编码	100038
供应商或收款单位公章		银行预留印鉴	
		 	

供应商或收款单位编号:

十、任务书各方		单位名称	北京市科学技术委员会	邮编	100744
市科委	主管主任	(签字)			
	主管处长	(签字)			
	主管工程师	(签字)			
	地址	北京市通州区运河东大街 57 号院 1 号楼			
	电话		传真		
	电子信箱				
课题承担单位	单位名称	首都医科大学附属北京世纪坛医院			
	法人代码	4006423-5	邮编	100038	
	单位负责人	(签字)			
	单位科技管理部门负责人	(签字)			
	课题负责人	(签字)			
	财务负责人	(签字)			
	联系人	沈侠薇			
	通讯地址	北京市海淀区羊坊店铁路路 10 号			
	电话	63926636	传真	63926677	
	电子信箱	ybbjsjth@126.com			
户名	首都医科大学附属北京世纪坛医院				
开户银行	北京银行阜裕支行				
帐号	01090373100120109085866				

十一、承担单位拨款明细						单位(万元)
单位名称	2019 年	2020 年	2021 年	2022 年	2023 年	合计
首都医科大学附属北京世纪坛医院	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.0

第 26 页 共 28 页

为 I-II 期且尚未接受新辅助化疗的患者;

4) 实验室检测及判读: 所有组织切片的检测均在我院病理科进行, 由资深技术人员完成分子病理的检测, 由两名高级职称病理医师以“盲法”分别进行判读, 但判读结果不一致时由更高年资医师进行判读;

5) 数据收集及分析: 将检测数据双录入至数据库后, 采用科学推荐的统计学方法进行分析总结, 得出经得起推敲的结论;

6) 中期督导: 在项目正式开展以后, 定期邀请临床研究专家并组织项目工作人员进行项目工作反馈、监督与指导, 并从队列研究的各个环节控制研究质量。

2、课题组织实施与管理措施

我院有完善的科技管理制度, 建立了多个实验平台用于协助临床基础研究工作的发展。本课题以项目管理的模式进行组织管理, 在保证研究质量的前提下确保课题可以按时完成。

研究中肿瘤组织中 CD96、CD226 和 TIGIT 检测在病理科进行, 病理科具备自动免疫组化仪等仪器, EnVision 法已成为病理科的常规检测方法, 所以组织检测在我院可行。且课题组中两名病理科前期已经积累了大量判读肿瘤组织内和基质中肿瘤浸润淋巴细胞上分子表达水平的经验, 完全可以胜任本研究中分子的检测及判读要求。

我院北京市重点实验室具备研究所用实验条件, 例如流式细胞仪、酶标仪、移液枪、自动免疫组化仪、无菌工作台、离心机、冰箱等, 以及本项目中标本采集、处理和储存等。

本课题小组成员既包括长期从事临床人群研究的科研人员、还包括负责现场数据和生物样品采集的工作人员、实验室分子标志物检测方向的科研人员、数据管理和分析的统计人员。团队成员满足开展该项科研工作的条件。

3、课题委托任务 (需另附委托或合作协议)

无

第 13 页 共 28 页

随访患者的复发转移状况，分析不同表型肿瘤浸润淋巴细胞对患者术后复发的影响，以及探索3种表型的肿瘤浸润淋巴细胞对术后复发转移的联合作用。

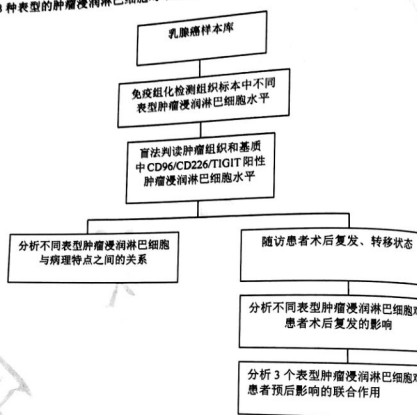


图 11. 技术路线

临床研究过程中质量控制措施

在整个研究的过程中，从研究的各个环节，包括研究对象选择、实验室检测、数据收集和分析，需严格遵循质量控制原则。

- 1) 研究人员培训：在项目正式开展之前，对于所有参与项目的工作人员进行培训。培训的内容包括，样本采集及储存、编码实验室检测以及数据管理。所有操作步骤需严格按照原则进行，以保证项目的质量；
- 2) 制定标准化操作流程（SOP）：针对课题开展的研究对象选择、招募、生物样本采集、处理、储存和检测，制定 SOP，确保研究质量；
- 3) 研究对象选择：所有的研究对象均经过病理学诊断为乳腺癌的患者，病理分期

CD226	0.017	80%	26.7%	6.7%	144
TIGIT	0.017	80%	13.3%	53.3%	56

1.7 统计分析方法

依据肿瘤浸润淋巴细胞上 CD96/CD226/TIGIT 的表达情况分为阳性组和阴性组，采用 t 检验或者 Wilcoxon 秩和检验分析连续变量在阳性组和阴性组间的差别，采用卡方检验进行分析分类有序变量的差别，采用 Wilcoxon 秩和检验或者 Spearman 相关性检验分析分类有序变量的差别，多因素分析采用 Logistic 回归进行比较病理特点在 CD96/CD226/TIGIT 表达阳性和阴性组的差别；在分析对乳腺癌预后的影响双向队列研究中，采用 Kaplan-Meier 曲线评估患者的生存，以 Cox Hazard Proportional Regression Model 分析 CD96、CD226 和 TIGIT 分子的不同表达状况对乳腺癌术后复发转移影响的风险比（HR）；通过 ROC 曲线下面积评估每个分子对乳腺癌术后复发转移的预测能力。

通过 Cox 回归模型中的参数 β_1 、 β_2 、 β_3 ，建立评估 CD96/CD226/TIGIT 整体表达状态的 Logistic 回归模型建（图 11），通过该模型和每个患者三个分子的表达状况，评估模型的回归得分，再依据回归的分值来分析 CD96/CD226/TIGIT3 个分子对预后的联合作用。

$$Y = \frac{e^{(\beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + e)}}{1 + e^{(\beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + e)}}$$

图 11. CD96/CD226/TIGIT 分子整体表达得分回归模型

1.8 数据采集和管理

采取“双盲”的方式进行实验室检测和数据采集，通过将研究对象编号设置成关键变量，分别在实验室和临床通过不同的 CRF 表采集实验室检测数据和临床信息。以 Epidata 制作数据库，通过双录入的形式将采集数据录入到实验室检测数据库和临床信息数据库中，通过关键变量将实验室检测数据库和临床信息数据库合并为最终数据库，并对数据进行管理。

技术路线

技术路线如图 12，在已有的乳腺癌样本库中，检测患者肿瘤组织标本中 CD96/CD226/TIGIT 在肿瘤浸润淋巴细胞上的表达情况，以“盲法”判读肿瘤组织内和基质内 CD96/CD226/TIGIT 阳性肿瘤浸润淋巴细胞的水平，分析与肿瘤病理特点的关系；

患者术后复发包括局部复发、远处转移和死亡,通过新发病灶病理活检、胸部CT、腹部超声、盆腔超声和骨扫描及进一步检查进行确诊;对于失访的患者尽量通过各种途径收集失访原因。

免疫组化检测:CD96、CD226和TIGIT均采用自动免疫组化仪以EnVision二步法进行检测,抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。具体步骤:标本蜡块制成4 μ m连续切片,经脱蜡和水化后,滴加3%过氧化氢溶液室温作用10min,PBS冲洗3遍,每遍5min,置于pH6.0柠檬酸盐缓冲液中微波加热20min进行抗原修复,自然冷却至室温,PBS冲洗3遍,每遍5min,滴加兔抗人CD96多克隆抗体(1:200稀释)和兔抗人CD226多克隆抗体(1:200稀释)和兔抗人单克隆抗体TIGIT(1:500稀释),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS冲洗3遍,每遍5min,使用PV-6000二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),每张切片滴加二抗50 μ l,室温条件下孵育20min,PBS冲洗3遍,每遍5min,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂封片。

免疫组化结果由2名资深病理医师“双盲”独立判读。CD96、CD226和TIGIT以细胞质或细胞膜出现黄至棕褐色颗粒为阳性显色。采用半定量积分法,结合染色强度和阳性细胞百分比来评定阳性表达比例,分别记录每个分子在各个表达强度下的表达比例。当该2名病理医师判读结果不一致时,由高年资医师进行结果判读。

1.5 研究结局

主要研究结局:乳腺癌5年复发状况。

次要研究结局:乳腺癌5年生存状况。

1.6 样本量的确定依据

前期预实验发现在5年发生复发转移的患者中CD96、CD226和TIGIT表达的阳性率为33.3%、6.7%和53.3%,而在5年未发生复发转移的患者中CD96、CD226和TIGIT表达的阳性率为13.3%、26.7%和13.3%,研究把握度为80%,显著性水平为0.017,依据样本量计算公式计算最多需要184例乳腺癌患者,考虑将失访率控制在10%以内,共需要203例乳腺癌患者(表1)。

表1.不同分子计算样本量

分子	显著性水平	把握度	5年内未复发患者	5年内发生复发转移的患者	共需样本量
CD96	0.017	80%	13.3%	33.3%	184

三、课题技术路线与实施方案

1、技术方案与技术路线

技术方案

1.1 已有样本库介绍

共收集了228例复合研究纳入标准的乳腺癌患者信息和组织标本;收集的临床信息包括患者的一般信息(年龄、身高、体重、吸烟、饮酒史、生育史等)、诊断信息、病理信息(病理型、分期、淋巴结转移情况、远端器官转移情况、激素受体表达情况、分子分型等)和治疗信息(手术方式、辅助化疗、内分泌治疗和靶向治疗信息等)。

该数据库于2018年已经开始随访,目前随访已完成70%,失访率为10.3%。

1.2 研究设计

本研究通过采用横断面研究设计和双向队列研究设计,检测228例乳腺癌患者手术标本肿瘤微环境中肿瘤浸润淋巴细胞上CD96、CD226和TIGIT表达水平,分析与患者病理特点的关系;随访患者预后,分析三个表型肿瘤浸润淋巴细胞对患者复发转移的单独和联合作用。

1.3 研究对象

研究对象为2012年至2014年收治于我院乳腺外科病理确诊为原发性乳腺癌的女性患者。

纳入标准:在乳腺外科住院经手术治疗的女性乳腺癌患者,病理诊断为原发性乳腺癌,术后分期为I-II期,术前未进行新辅助化疗,年龄不超过75岁,签署知情同意书。

排除标准:之前接受任何形式的免疫治疗的患者,伴有自身免疫性疾病患者,ECOG评分 \geq 2分,心、脑、肾等其他重要器官功能不全不能参加该研究的患者。

1.4 观察指标和随访计划

观察指标:乳腺癌患者肿瘤微环境中肿瘤组织和基质中浸润淋巴细胞上CD96、CD226和TIGIT表达水平、患者年龄、病理特点(病理类型:导管型,小叶型;病理分期:I,II,III;病理分级:低分化,中分化,高分化;分子分型:Luminal A, Luminal B, HER2过表达,三阴性)、月经史、生育史、家族史、母乳喂养史、手术类型、辅助化疗和放疗等治疗因素的信息。

随访计划:从2018年开始每6个月由治疗团队通过电话或门诊随访样本库中患者的复发和生存情况;随访起点为患者手术当日;随访终点为患者术后5年的复发状况;

关键技术及创新点

判读 CD96/CD226/TIGIT 在乳腺癌肿瘤组织和基质中的表达状态为本研究的关键技术, 研究团队长期从事乳腺癌肿瘤微环境中免疫状态的相关研究已经积累了丰富的判读经验; 有效的随访患者术后复发转移情况是本研究的另一个关键问题, 本研究是在已经建立完成的样本库的基础上开展的, 该样本库已包含患者的临床病理信息而且 2018 年已经展开了随访工作, 目前随访已完成大部分, 失访率为 10.3%, 可以在保证质量的前提下按时完成随访工作。

本研究紧跟恶性肿瘤免疫治疗这一研究热点, 针对我国乳腺癌患者 PD-L1 表达率低限制了 Atezolizumab 在三阴性乳腺癌中应用这一问题, 研究发现 CD155-CD96/CD226/TIGIT 这一免疫检查点通路在乳腺癌中高表达, 进而探索肿瘤组织和基质中 CD96/CD226/TIGIT 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌术后复发转移的影响以及与临床病理特点的关系, 为进一步在乳腺癌中开展针对 CD155-CD96/CD226/TIGIT 的免疫检查点抑制剂治疗提供必要的参考依据, 具备一定的创新性和临床需求。

二、课题研究开发内容

主要研发内容

本研究充分利用已经建立的乳腺癌术后样本库, 以横断面和双向队列研究的方法, 对 228 例原发性乳腺浸润性导管癌患者肿瘤微环境中浸润淋巴细胞上 CD96、CD226 和 TIGIT 表达水平进行检测, 分析分子表达状态与病理特征的关系, 对患者随访后, 分析这不同表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌预后的影响, 并进一步分析这 3 个表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌预后的联合作用。

(1). 随访已有的乳腺癌生物样本库

2017 年已完成收集 2012-2014 年我院乳腺外科收治并且手术治疗的原发性乳腺浸润性导管癌患者的标本 228 例, 储存手术切下组织标本, 收集完成相应的临床信息建立了数据库, 目前随访工作已完成了 70%, 失访率为 10.3%。

(2). 检测乳腺癌肿瘤微环境中肿瘤组织和基质内肿瘤浸润淋巴细胞上分子水平

以免疫组织化学检测方法检测乳腺癌肿瘤组织和基质内肿瘤浸润淋巴细胞上 CD96、CD226 和 TIGIT 的表达水平

(3). 分析淋巴细胞上 CD96、CD226 和 TIGIT 的表达水平与乳腺癌病理特点的关系
分析肿瘤组织内和基质中 CD96、CD226 和 TIGIT 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞水平与乳腺癌临床分期、分级、肿瘤大小、激素受体及分子分型等的关系。

(4). 探索不同表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌预后的影响

随访乳腺癌患者的术后复发转移情况, 以 Kaplan-Meier 曲线和 Cox-Hazard 回归分析这 3 个表型肿瘤浸润淋巴细胞对患者预后的影响。

(5). 探索 CD96/CD226/TIGIT 三个表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌预后的联合作用

通过前期分析得到的三个免疫检查点调控分子的预后回归参数, 建立回归模型评估 CD96、CD226 和 TIGIT 三个分子的整体表达得分, 并进一步评价这三个分子的整体表达水平对预后的联合作用。

通过该横断面和双向队列研究, 可以明确 CD96、CD226 和 TIGIT 单个表型肿瘤浸润淋巴细胞与乳腺癌病理特点和预后的影响; 并可以进一步评估 CD96、CD226 和 TIGIT 三个表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌术后复发转移的联合作用。

查点调节蛋白与患者临床病理特点的关系，完成样本库随访和检测工作；

(2) . 2021.1-2021.12，分析不同表型（CD96/CD226/TIGIT）肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌术后复发转移的影响，完成相关分析，发表SCI论文1-2篇；参加1-2次国内外学术会议，以口头报告或者展板的形式交流研究成果；

(3) . 2022.1-2023.8，建立评估CD96、CD226、TIGIT整体表达状态的数学模型，分析3个表型（CD96/CD226/TIGIT）肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌术后复发转移影响联合作用，发表SCI论文1-2篇；完成人才培养：专利申报：按时结题：参加2-4次国内外学术会议，以口头报告或者展板的形式交流研究成果。

一、课题任务与目标、考核指标

1、课题任务：

本课题以横断面和双向队列研究的方法，通过对228例已经建立完成的原发性乳腺浸润性导管癌临床样本库中患者肿瘤微环境中浸润淋巴细胞上CD96、CD226和TIGIT表达状况进行检测，分析与病理特征的关系；随访患者术后复发状况，分析这不同表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌预后的影响，并进一步分析这3个表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌预后的联合作用。明确CD96/CD226/TIGIT分子单独与整体表达状态对乳腺癌预后的影响，为进一步开展针对CD155-CD96/CD226/TIGIT免疫检查点通路的免疫治疗提供必要的前期参考依据。

2、课题目标：

定性指标：明确乳腺癌肿瘤微环境中淋巴细胞上免疫检查点CD96、CD226和TIGIT的表达情况与病理特点的关系，不同表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌术后复发转移的影响以及三个表型肿瘤浸润淋巴细胞对预后的联合作用。

定量指标：

- (1) . 完成228例乳腺癌患者的检测，明确CD96、CD226和TIGIT的表达情况与病理特点的关系；
- (2) . 确定不同表型肿瘤浸润淋巴细胞（CD96/CD226/TIGIT）的表达对乳腺癌复发转移的影响；
- (3) . 明确三个表型肿瘤浸润淋巴细胞对乳腺癌预后的联合作用。

3、考核指标及年度分解：

- (1) 明确乳腺癌肿瘤微环境中肿瘤浸润淋巴细胞上CD96、CD226和TIGIT表达对患者预后的影响；
- (2) 申报发明专利1项；
- (3) 发表SCI论文2-4篇；
- (4) 完成1-2名成员职称的晋升培养。

度分解：

- (1) . 2019.8-2020.12，检测分子水平，随访患者生存状态，完成分析免疫检

2019-A25

课题编号: Z191100006619041

密级: 非密

北京市科技计划 课题任务书

课题名称: 乳腺癌肿瘤微环境中 CD96、CD226、TIGIT 阳性淋
巴细胞对术后复发影响的队列研究

所属项目名称: 首都临床诊疗技术研究及示范应用

课题委托单位: 北京市科学技术委员会

课题承担单位: 首都医科大学附属北京世纪坛医院

起止年限: 2019 年 08 月至 2023 年 08 月

北京市科学技术委员会制

第 1 页 共 28 页

后查看

京医通
保险(在
: 124767
费: 60.0
): 40.00
账户余
: 20.00
式: 北京
: 40000
: 1006
商家据
自助)
自助
二办埋
为保护
医一

首都医科大学重点实验室 开放研究课题申请书

重点实验室名称: 肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室

批复部门: 北京市科委

课题名称: 外周血中 PD-1/Tim-3 介导的 T 淋巴耗竭对乳腺癌患者临床
特点和预后的影响

学科领域: 肿瘤学

申请人: 石峰

所在单位: 首都医科大学附属北京世纪坛医院

申请日期: 2017. 2. 16

首都医科大学科技处

二〇一六年一月

2

年 鼠

1 2

8 9

5 16

2 23

9 30

1 2

2 13

3 20

3 27

2 1

9 1

16 1

23 2

30

联系 1

电话

首都医科大

肿瘤科

特别提醒

研究内容和意义摘要 (附 300 字)

研究 课题	课题名称	外周血中 PD-1/Tim-3 介导的 T 淋巴细胞对乳腺癌患者临床特点和预后的影响						
	研究类别	A、基础研究 <input checked="" type="checkbox"/> B、应用基础研究 C、应用研究 D、开发研究						
	申请经费	5 万元		起止时间	2017 年 4 月至 2019 年 3 月			
	研究方向	病理分子生物学						
申 请 人	姓 名	石峰		性 别	女		出生年月	1980 年 5 月
	专业技术职务	主治医师		学 位	A、博士 <input checked="" type="checkbox"/> B、硕士 C、学士			
	所在单位（所）	首都医科大学附属北京世纪坛医院						
	邮政编码	100038						
				联系电话	63926603			
课 题 组 成 员	姓名	出生年月	专业技术职务	所在单位	课题中的分工		签字	
	宋清坤	1982.10	副研究员	首都医科大学 附属北京世纪 坛医院	数据统计分析, 数据管理		宋清坤	
	周全	1975.12	副主任医师	首都医科大学 附属北京世纪 坛医院	实验室检测		周全	

本研究

秀和家也生於子而及

研究内容和意义摘要
(限 300 字)

乳腺癌已成为威胁我国女性健康最严重的恶性肿瘤之一,而且发病率逐年增高。临床诊断出的乳腺癌中,晚期病例比例已见人数。据最近全国十家大型临床研究中心研究报告全国 7 家三级甲等医院诊断出的乳腺癌患者死于 II 期 IV 期的比例超过 80%, 化疗研究仍然作为其主要的治疗手段。但是不同的患者对 II 期 IV 期的反应不同,免疫系统中调节肿瘤细胞死亡的反应过程中发挥着重要的作用。T 细胞耗竭是发生在肿瘤患者体内 T 细胞功能丧失的。T 细胞耗竭可以降低机体的免疫功能,抑制效应 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤力,对癌症的免疫治疗和预防乳腺癌具有一定的指导意义。因此本研究旨在分析外周血 T 细胞耗竭及与相关标志物和乳腺癌临床特点 and 预后的影响。

二、立项依据

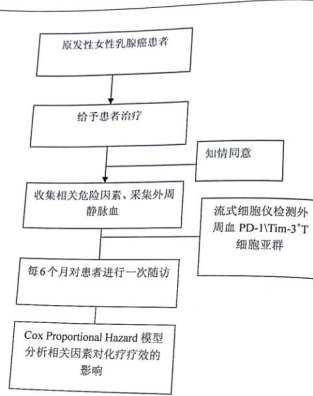
本项研究方向的现状及发展趋势, 本项研究的实际意义和理论意义。

在研究方向的现状及发展趋势, 本项目的实施意义和对比意义。

乳腺癌已成为影响我国女性最为严重的恶性肿瘤, 然而针对中国妇女乳腺癌的临床研究不足。2003年我国女性乳腺癌的发病率为 $21.2/10^5$, 占女性恶性肿瘤发病率的最高恶性肿瘤, 且新发病例逐年增加(1)。至 2009 年发病率率为 $23.2/10^5$, 占女性恶性肿瘤的 17% (2)。然而针对我国女性乳腺癌患者的临床治疗特点及现状的临床流行病学研究不足。2011 年由我国医学科学院肿瘤医院等 7 家国内医学 7 个地区大型三级甲等医院联合开展了一项多中心临床流行病学研究项目: 我国女性乳腺癌患者临床诊断时年龄分布、中晚期临床特点、雌激素/孕激素受体表达情况、HER2 表达情况、三阴性乳腺癌比例较高、临床治疗规范性、治疗的防治学开展情况等(3, 4)。该研究提示我国乳腺癌患者西方国家比较发病较早, 恶性程度较高, 因此针对我国女性乳腺癌临床特点所开展的研究尤为重要。由于中国女性乳腺癌患者的病理学和行为流行病学特点明显不同于西方国家, 而肿瘤的免疫治疗也已逐步在我国开展起来, 因此探索中国女性乳腺癌患者自身免疫状态以及对肿瘤治疗的影响具有显著的意义。

免疫系统的调节作用广泛参与了乳腺癌对治疗的反应,但 T 细胞耗竭对乳腺癌患者治疗效果的影响报道较少

免疫耐受 是研究关于肿瘤免疫的成因和预防,Slattery 等开展的 The Breast Cancer Immunotolerance Study 试验发现,与免疫功能低下和细胞因子基因多态性可能影响不同人种女性乳腺癌的发病风险和死亡风险^[5]。国外学者指出肿瘤内淋巴细胞的数量与辅助治疗的疗效有显著的关系,肿瘤内淋巴细胞明显提示患者肿瘤的生长速度和总体生存率^[6]。而每增加 10% 的肿瘤浸润淋巴细胞可使同一乳腺癌患者的复发率减少,术后进展生存期明显延长 (HR=0.77, 95%CI 0.61-0.98)^[7]。对 HER2-1 乳腺癌,淋巴瘤浸润增加 10% 可明显降低复发率和总生存时间^[8]。T 淋巴细胞功能受损直接导致乳腺癌患者免疫杀伤功能的降低。T 细胞耗竭可以降低 T 淋巴细胞的功能和细胞因子释放功能。T 细胞耗竭在癌症患者体内具有较高的水平,而且 T 细胞耗竭的水平与肿瘤的分期有明显的正相关性。即早期切除的患者体内 T 细胞耗竭水



3、可行性分析

本项目申请者曾进行过乳腺癌分子标志物的研究,具有临床研究设计、数据及标本采集、统计分析以及报告的经验;本研究其他参与者开展过多次T细胞亚群和细胞因子方面的研究,熟悉流式细胞仪和ELISA检测方法;而且本研究实验室条件满足项目对实验操作的要求。本研究拟采用双向队列研究的方法,以COX Proportional Hazard Model分析免疫调节作用对疗效的影响。该研究方法可有效地降低人群研究的选择性偏移以及信息偏移,而且COX模型可以校正其他因素的作用,控制混杂偏移对结果的影响。

五、研9
课题申请
并

五、研究基础

课题申请人的学术经历,与本课题有关的前期研究成果,完成研究任务所具备的条件和基础。本课题申请人一直致力于分子病理学的相关研究,开展过针对乳腺癌的分子检测和研究工作并发表了相关文章。申请人所在科室具备开展该研究的条件和基础。

- 申请人部分发表文章:
1. 石峰,高颖,周全,吕红. 三联乳腺癌中MAPK的表达及意义. 临床与实验病理学杂志. 2013; 29 (11): 1187-9.
 2. 石峰,吕红,陈奕至. 腹膜后肿瘤112例临床病理分析. 临床与实验病理学杂志. 2012; 28 (12): 1346-50.
 3. 石峰,高颖,陈奕至,周全,张维新,吕红. 慢性淋巴细胞性白血病皮肤原发CD5阳性的弥漫性大B细胞淋巴瘤1例并文献. 临床与实验病理学杂志. 2014; 30 (2): 208-10.



五	六
3	4
10	11
17	18
24	25

五	六
7	8
14	15
21	22
28	29

五	六
4	5
11	12
18	19
25	26

:386566
l@qq.cc

信保持联系
请给信

六、成果形式

本研究的最终成果形式、成果署名、成果转化方式、去向及预期效益。

1. 预期成果形式

SCI 论文 1-2 篇

2. 成果署名

课题研究成果属于肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室所有。

3. 成果转化方式和预期效益

八、申请

我保证，
承担全部责

七、经费预算

项 目	年 度	2017 年	2018 年	合计 (万元)
1 材料费		3	2	5
2 动物费				
3 出版/文献/信息传播/知识 产权事务费				
总计 (万元)		3	2	5

九、申请

十、实验室学术委员会意见

立项的必要性、研究方案的可行性、经费预算的合理性等

本课题属于实验室的研究方向范围，主要对实验室中*****的问题开展研究，研究方案可行。

实验室学术委员会主任签章：

年 月 日


十一、实验室意见

实验室负责人签章

2017 年 4 月 6 日

八、申请人承诺

我保证申请书内容的真实性，如获资助，将严格遵守学校和实验室的管理规定，保证时间，认真工作，按时报送材料。若填报失实或违反规定，本人将承担全部责任。

签字: 

2017年2月27日

九、申请人所在单位意见



单位公章:

年 月 日