[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00809068.8

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 100557445C

[22] 申请日 2000.4.26 [21] 申请号 00809068.8

[30] 优先权

[32] 1999. 4.21 [33] AU [31] PP9911

[86] 国际申请 PCT/AU2000/000363 2000.4.26

[87] 国际公布 WO2001/006259 英 2001.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.17

[73] 专利权人 生物权威控股有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 M·斯莱特 J·巴登

[56] 参考文献

AU199864184B2 1998.12.3

High prognostic significance of Mdm2/p53 co - overexpressionin soft tissue sarcomas of theextremities. WURL P. ET AL. ONCOGENE, Vol. 16 No.9. 1998

嘌呤能 P2Z 受体介导白血病细胞凋亡的研究. 彭黎明等. 中华医学杂志，第 78 卷第 7 期. 1998

审查员 熊 茜

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 9 页

[54] 发明名称

一种鉴定哺乳动物前肿瘤和/或肿瘤状态的方法

[57] 摘要

本发明涉及鉴定哺乳动物前肿瘤和/或肿瘤状态的方法，尤其涉及一种根据嘌呤能受体在这些细胞中的差异表达来鉴定组织和体液中前肿瘤细胞和肿瘤细胞的方法。

1．P2X 嘌呤能受体抗体试剂在制备用来对哺乳动物对象的前列腺组织的前肿瘤和/或肿瘤状态进行分期和/或诊断的试剂中的用途，其中所述的 P2X 嘌呤能受体抗体试剂对 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$、$P2X_4$、$P2X_5$、$P2X_6$ 或 $P2X_7$ 有特异性。

2．P2X 嘌呤能受体抗体试剂在制备用来确定哺乳动物对象的前列腺组织中癌发生病原学的试剂中的用途，其中所述的 P2X 嘌呤能受体抗体试剂对 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$、$P2X_4$、$P2X_5$、$P2X_6$ 或 $P2X_7$ 有特异性。

3．根据权利要求 1 或 2 的用途，其中哺乳动物是人。

4．根据权利要求 1 或 2 项所述的用途，其中 P2X 嘌呤能受体抗体试剂是多克隆抗血清。

5．根据权利要求 1 或 2 项所述的用途，其中 P2X 嘌呤能受体抗体是单克隆抗血清。

6．根据权利要求 1 或 2 所述的用途，其中 P2X 嘌呤能受体抗体试剂对 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 或 $P2X_7$ 有特异性。

7．根据权利要求 4 所述的用途，其中 P2X 嘌呤能受体抗体试剂是一套多克隆抗体。

8．根据权利要求 5 所述的用途，其中 P2X 嘌呤能受体抗体试剂是一套单克隆抗体。

9．根据权利要求 7 或 8 所述的用途，其中该套 P2X 受体抗体包含对 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 和 $P2X_7$ 有特异性的抗体的组合。

10．一种诊断哺乳动物的前列腺组织的前肿瘤和/或肿瘤状态的试剂盒，该试剂盒包括

检测含哺乳动物细胞和/或组织的样品中一种或多种 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$、$P2X_4$、$P2X_5$、$P2X_6$ 或 $P2X_7$ 的嘌呤能受体表达分布情况的工具；和

将该表达水平与预定表达水平相比较的工具。

11．根据权利要求 10 所述的试剂盒，其中检测工具包含 P2X 嘌呤能受体特异性抗体试剂。

12．根据权利要求 11 所述的试剂盒，其中 P2X 嘌呤能受体抗体试剂包含多克隆抗血清。

13．根据权利要求 11 所述的试剂盒，其中 P2X 嘌呤能受体抗体试剂包含

单克隆抗血清。

14. 根据权利要求 11 所述的试剂盒，其中抗体试剂对 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 或 $P2X_7$ 有特异性。

15. 根据权利要求 10-14 任一项所述的试剂盒，其中用免疫组织化学试验检测 P2X 嘌呤能受体表达分布情况。

16. 根据权利要求 15 所述的试剂盒，其中试验是 ELISA。

17. 根据权利要求 15 所述的试剂盒，其中试验是 RIA。

18. 根据权利要求 10 所述的试剂盒，其中样品是体液。

19. 根据权利要求 10 所述的试剂盒，其中样品是数字式直肠检查分泌物。

20. 根据权利要求 10 所述的试剂盒，其中样品是活检样品。

一种鉴定哺乳动物前肿瘤和/或肿瘤状态的方法

技术领域

本发明涉及鉴定哺乳动物前肿瘤和/或肿瘤状态的方法，具体涉及一种根据前肿瘤细胞和肿瘤细胞中嘌呤能受体的差异表达来鉴定组织和体液中的这些细胞的方法。

背景

在诊断癌症时，对活检样品中的细胞特征加以考虑，这些特征例如癌细胞大小和形状的差异程度、分裂活跃的细胞的比例以及侵入毗邻结构。通常采用的组织学染色剂是苏木精(初染)和伊红(复染)，它们可对亚细胞成分作不同的标记。其它诊断方法采用针对细胞或组织中(通过胞内表位)或细胞表面上(通过胞外表位)的特定诊断性分子的抗体，这些抗体可用显微镜分析来显示，例如癌胚抗原(CEA)。下面讨论一些具体例子。

前列腺癌

在西方国家，前列腺癌的发病率正以令人担忧的速度增加，在过去五年中增加了1倍以上。它是肿瘤中发病率最高的，仅次于全球男性癌症死亡最常见病因肺癌，是澳大利亚主要的死亡病因[1]。良性前列腺增生(BPH)在50岁以上男性中常见，它可能是前列腺上皮内肿瘤(PIN)的先兆，而后者是前列腺癌的先兆。死后研究表明，70%的男性在活到80岁时前列腺中有恶性细胞[2]。该疾病的特征是有惊人的种间差异，其在非洲人-美洲人中最盛行，其次是高加索人，拉丁美洲人稍低一些，亚洲人中最不盛行。然而，在亚洲人群中，它是增长最迅速的肿瘤形式。直到最近，还不清楚这些差异是由于种间遗传差异还是饮食引起的。现在的研究显示饮食是主要的影响因素[3]。

目前前列腺癌的诊断和治疗

尽管这一情况很严重，但是诊断方法却很少，而且不精确。目前评价预后的方法，如数字式直肠检查(DRE)、超声、前列腺酸(prostatic acid)磷酸酶水平、雄激素减少、前列腺特异性抗原(PSA)密度、PSA周转率、PSA年龄特异性参考范围和Gleason组织病理学等级评分，不能提供有关前列腺癌临床结果的可靠的预测信息[4]。例如，研究已经表明，DRE产生36.9%的假阴性率[5]。PSA是一种33-kDa的丝氨酸蛋白酶，它与前列腺以外的许多组织有关[6]，它受到雄激素、糖皮质激素和孕激素的上调。据

信它参与了生长因子的调控。不幸的是，血清 PSA 水平有 23%的假阴性和 36.7%的假阳性诊断[6]。甚至有人提出，新筛选检测出的病例有半数以上实际上是假阳性[7]。通过引入其它测试(如 PSA 密度、周转率、年龄特异性参考范围)以试图改进筛选方法，结果仍不明确。一个研究表明，采用将正常 PSA 上限升高至 4.5 毫微克/毫升的年龄特异性 PSA 参考范围导致不能检测出大量临床表现明显的癌症病例[8]。由于该不确定性，通常要进行前列腺活检来确认恶性肿瘤，但是该测试的假阴性诊断也高得不能令人满意(23%)[9]。

治疗的选择很大程度上取决于基于组织切片显微镜分析的临床分期(staging)[10]。该技术依靠判断和大量实验将组织学外观与临床结果关联。不幸的是，众所周知前列腺癌组织是非均质的，在检查的切片中很容易漏掉重要的诊断特征。病情进一步严重时，还没有随机的和控制的实验来检验外科和放疗的结果[2]。治疗选择包括根治性前列腺切除术、放射治疗、去除雄激素和“警戒等待”。对于根治性前列腺切除术的“警戒等待”问题的明确答案是等待前列腺癌干扰对观察试验的结论[11]。这些决定的后果对患者的影响很严重。例如，根治性前列腺切除术通常导致尿失禁、阳痿、膀胱颈狭窄和机能衰退[12]。显然，迫切需要能可靠区分良性前列腺增生(BPH)、前列腺上皮内肿瘤(PIN)、非典型性腺瘤性增生(AAH)和前列腺癌的改进的标记。

P2X 受体在癌中的作用

神经传递介质(如去甲肾上腺素和乙酰胆碱)不仅在突触和神经肌肉接头中起作用，而且还作用于各种组织和器官中的神经传递介质特异性细胞受体。这些受体是将离子引入细胞内的孔样跨膜通道。腺苷三磷酸(ATP)(众所周知是胞内储能的分子流通物)首先被认为是外周神经传递介质，因为它能使平滑肌收缩[13]。ATP 以和其它神经传递介质相同的方式起作用，并能激活 G 蛋白偶联的组织受体(P2Y)(较慢)、最近鉴定出的配体门控嘌呤能($P2X_{1-7}$)离子通道(快)，还能起辅助传递介质的作用。尽管它是最近发现的，但嘌呤能传递介质系统可能在进化中很早发展[14]。

目前有 7 个遗传上不同的 P2X 受体亚型。它们和胆碱能以及肾上腺素能系统的受体一样广泛分布，且发现存在于大多数哺乳动物细胞中[14]。这些受体构成了一类新的快速反应的、结合膜的、配体门控的、钙渗透的、阳离子选择性通道，该类通道由神经末端或局部组织来源的胞外 ATP 激活[15-18]。它们主要使钙离子透过，但是也让其它阳离子(如钾和钠)透过，从而介导了去极化[19]。例如，在肺上皮中，P2X 通道刺激 Cl^-通道上调、K^+分泌并抑制 Na^+吸收[21]。ATP 能通过上调 P2X 受体来刺激 DNA 合成和细胞增殖[14]。该功能与刺激肌醇磷酸敏感型胞内储存物以及其它信号转导通道释放离子性钙和磷脂酶 C 有关。这些作用可因多肽生长因子和 ATP 的协同作

用而加强[20]。钙通过 P2X 受体的流入也触发了其它神经传递介质的分泌，起激活钙依赖性钾通道信号的作用，使其它类型的钙通道失活，调节突触囊泡膜的胞吞收回作用，增强神经传递介质的合成，调节分泌可利用的突触囊泡的合并，并触发几种形式的突触可塑性。对 P2X 受体单一刺激的反应的多样性提示有许多钙激活通道[21]。

通过嘌呤能受体起作用的胞外 ATP 对人乳房癌细胞、前列腺癌细胞、人腺癌细胞和成纤维细胞系也有直接的抗癌作用。细胞毒性 T 淋巴细胞和天然杀伤(NK)细胞在攻击肿瘤细胞时释放 ATP[22]。可通过诱导 S 期阻断、凋亡，增强对核苷酸、糖磷酸、离子的渗透性以及与其它抗癌药协同可抑制转化的细胞生长。这些作用均未提到未转化的细胞[14]。

令人好奇的是，已知肿瘤细胞含有格外高水平的 ATP[23]。腺苷和 ATP 均通过刺激内皮的氮氧化物合成来提高肿瘤内血流量，从而诱导有效的血管舒张[24]。在这种情况下，ATP 通过 P2Y 受体来起作用[26]。氮氧化物的释放也与 P2X 受体功能关联。例如，非孕羊子宫肌层中发现的 90%氮氧化物合成酶活性是钙离子通道依赖型的[25]。

上皮粘附蛋白也在癌扩散中起主要作用[26]。在伤口愈合中，细胞受损信号通过胞外 P2X 受体和胞内缝隙连接点而扩大，刺激钙离子诱导的波扩增[27]。通过 P2X 进入的胞内钙离子触发膜结合细胞器沿微管输送，重新塑造 ECM 和上调粘附分子 E 钙粘着蛋白[28]。前列腺上皮腺泡中发现的肌上皮细胞在原位和体外对癌细胞均有重要的旁泌性作用。癌细胞也受高表达的 ECM 分子、蛋白酶抑制剂和血管生成抑制剂的影响[29]。在转移性侵入期间，胞外钙流量激活膜结合的金属蛋白酶，该酶有利于组织被侵入细胞穿透。尿激酶纤溶酶原激活剂也与几种恶性肿瘤(包括乳房和前列腺癌)的进展密切相关[30]。

为了用较简单的技术来提供更可靠的结果，需要对目前的癌症分期和诊断技术加以改进。适合自动化的诊断方法也是有利的。

本发明的一个目的是提供一种鉴定前肿瘤细胞和/或肿瘤细胞的方法，该方法克服或基本上改善了现有技术中的至少某些缺陷，或将提供有用的备选方案。

发明概述

嘌呤能神经系统与较为熟知的但作用较慢的肾上腺素能和胆碱能神经系统并行作用。和它们一样，嘌呤能神经系统作用于脑、突触、神经肌肉接点、外周神经系统和平滑肌。激活这些快速作用的配体门控的阳离子受体通道的传递介质是 ATP，它通过触发组织中的嘌呤能受体来起作用，从而产生各种代谢反应(包括离子流入细胞)。

一套独特的能区分各 P2X 嘌呤能受体亚型胞外结构域的高特异性抗体已被开发

出来。这些受体易用免疫细胞化学方法来显示，以各种表达方式呈现(如细胞表面、管状和点状标记)。惊奇地发现，P2X 受体的表达是癌前期和癌阶段的特征，也是年轻哺乳动物(对于年老哺乳动物)组织的特征。这些变化伴随有生长、胞外基质、代谢和神经支配因素的显著差异和上皮下离子性钙以及微管的增加。因此，本发明提供了一种新的工具，利用该工具能诊断处于癌前的情况(如增生)、癌症分期以及研究癌发生的生理学和病原学。

本发明第一方面提供一种对哺乳动物前肿瘤和/或肿瘤状态进行分期和/或诊断的方法，该方法包括检测所述哺乳动物细胞和/或组织的 P2X 嘌呤能受体表达分布情况(profile)，并与预先测定的正常细胞和/或组织的表达分布情况比较。

本发明第二方面提供一种确定哺乳动物癌发生病原学的方法，该方法包括检测该哺乳动物细胞和/或组织的 P2X 嘌呤能受体表达分布情况(profile)，并与预先测定的正常细胞和/或组织的表达分布情况比较。

本发明第三方面提供一种诊断对象前列腺癌的方法，该方法包括用 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 和/或 $P2X_7$ 抗体分别检测对象的前列腺细胞和/或组织中 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 和/或 $P2X_7$ 嘌呤能受体的表达分布情况，其中与具有良性前列腺增生的前列腺细胞和/或组织的表达分布情况相比，患者前列腺细胞和/或组织中的 P2X 嘌呤能受体表达分布情况强度增加即诊断为存在前列腺癌。

本发明第四方面提供一种诊断对象乳房癌的方法，该方法包括用 $P2X_2$ 或 $P2X_3$ 抗体分别检测对象的乳房细胞和/或组织中 $P2X_2$ 或 $P2X_3$ 嘌呤能受体的表达分布情况，其中从正常对象乳房的乳房细胞和/或组织中 P2X 嘌呤能受体表达 分布情况强度减少即诊断为存在乳房癌。

本发明第五方面提供了 P2X 嘌呤能受体抗体试剂用来对哺乳动物对象前肿瘤和/或肿瘤状态进行分期和/或诊断的用途。

本发明第六方面提供了 P2X 嘌呤能受体抗体试剂用来确定哺乳动物对象癌发生病原学的用途。

本发明第七方面提供了与 P2X 嘌呤能受体特异性抗体试剂合用的分离的哺乳动物细胞或组织样品。

本发明第八方面提供了一种诊断哺乳动物前肿瘤和/或肿瘤状态的试剂盒，该试剂盒包括检测含该哺乳动物细胞和/或组织的样品中 P2X 嘌呤能受体表达分布情况的工具和用于将该表达水平与预定表达水平相比较的工具。

本发明第九方面提供了一种 P2X 嘌呤能受体特异性抗体试剂，其中该试剂能区

分前肿瘤或肿瘤细胞和/或组织与正常的细胞和/或组织。

本发明第十方面提供了一种用于区分前肿瘤或肿瘤细胞和/或组织与正常的细胞和/或组织的 P2X 嘌呤能受体特异性抗体试剂。

本发明第十一方面提供了一种用于区分细胞和/或组织中功能性和非功能性 P2X 受体的 P2X 嘌呤能受体特异性抗体试剂。

哺乳动物宜为人，但对于本领域技术人员来说，该方法显然适用于任何哺乳动物。细胞宜为前列腺组织和/或细胞或乳房组织和/或细胞。细胞可通过活检获得，也可从体液获得，或者在前列腺组织和/或细胞的情况下，可从数字式直肠检查分泌物或精液获得。

较佳的抗体试剂包含多克隆抗血清。较佳的 P2X 抗体试剂对 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$、$P2X_4$、$P2X_5$、$P2X_6$ 或 $P2X_7$ 受体(最佳的是 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 或 $P2X_7$ 受体)有特异性。对于本领域技术人员显而易见的是，抗体试剂可以是一套抗体，可以是多克隆或单克隆抗体。本领域技术人员也能明了该套 P2X 受体抗体可包含 P2X 受体亚型的任何组合，尤其是 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 和 $P2X_7$ 的组合。

P2X 受体表达分布情况的检测宜用免疫组织化学方法。本领域技术人员也知道，P2X 受体可用包括 ELISA、RIA 或类似免疫学技术等其它方法来检测，这取决于细胞或组织样品的来源以及可获得的试剂。较佳的，P2X 受体用比色试验来检测。本领域技术人员也知道，Western 印迹技术和 P2X 嘌呤能受体 mRNA 的检测也可用于测定 P2X 受体的表达分布情况。

在本发明的描述中，术语“前肿瘤细胞”包括增生或肥大的细胞。

在本发明的描述中，术语“抗体套”包含多克隆抗体，它含有对相同或不同抗原有特异性的几个不同抗体，而且能特异性地区分各个 P2X 受体亚型。当抗体是单克隆抗体时，术语“抗体套”还包含能特异性区分各个 P2X 受体亚型的一组抗体。

在本发明的描述中，“表达分布情况”的检测包括表达图谱或强度的检测。

除非描述内容明确要求，在全篇说明书和权利要求书中，术语“包含”“包括”等理解为是与排他或穷举的含义相反的包含含义；即，表示“包括，但不局限于”的含义。

附图简述

图 1 显示了取自正常人前列腺(左)和晚期前列腺癌患者(右)的活检样品中 $P2X_1$ 标记水平的例子。

图 2 显示了年轻(12 周龄)大鼠前列腺上皮(左)和年老大鼠(18 月龄；右)组织的比

较。年老的组织显示出显著的增生。

图 3 显示了正常乳房(右)中的 $P2X_1$ 标记和在乳房肿瘤组织(左)中的大幅度下调。

图 4a, b,d 和 e 显示了具有增加的 PSA 的 71 岁年老男性的核心活检。诊断-BPH。H&E 染色(4a)显示在前列腺腺泡(A)的顶部上皮(箭头)中有轻微的增生。图 4d 是该区域(箭头)的高倍镜显微照片。在同一区域中的抗 P2X 标记(4b)显示了 BPH 特征性的 P2X 受体完全消除表达(4b-箭头)。图 4e 是该区域的高倍镜显微照片，该图显示在轻微增生的上皮中 P2X 表达完全消除(图 4e-箭头)。图 4c，69 岁老年男性的核心活检切片。PSA 未知。该病例也作 BPH H&E 染色诊断(未显示)，但是具有特征不同的 1 期 P2X 标记，其特征是有显著的上皮胞核(PEN)(4c-箭头)。图 4f 是如图 4c 所示这些密集标记的细胞核的高倍镜显微照片(4f-箭头)。图 4a 和 4d 是 H&E 染色。图 4b, c, e 和 f 是抗 P2X 免疫过氧化物酶标记。没有复染。低倍镜显微照片(4a, b 和 c)的标尺为 1 厘米＝150 微米。高倍镜显微照片(4d, e 和 f)的标尺为 1 厘米＝40 微米。

图 5a-c 显示了 PSA 增加的 57 岁老年男性的核心活检(以 3 个核心的形式提供)。两个核心诊断为含有毗邻于晚期癌区域的 BPH 区域(Gleason 评分为 8)。图 5a 显示了 H&E 染色的没有癌标记的 BPH 区域(5a-箭头)。图 5b 是用 $P2X_1$ 抗体标记的同一组织块的一系列切片。P2X 标记是转位 2 期的特征。H&E 染色诊断为 BPH 的组织中存在这些特征表明不仅存在前肿瘤变化，而且那些变化有进一步发展。图 5c 是图 5b 箭头所示腺泡的一系列切片的高倍镜显微照片。它显示出 2 期的特征如下：有一些 PEN 残留(箭头 N 所示)，但是大多数标记现在呈点状和细胞质状(箭头 P 所示)。以前的实验已经表明各个点是单独标记的 P2X 受体或是局部化的小片受体。侧面的质膜被清楚地标记(箭头 L 所示)，在顶部上皮中有标记(箭头 A 所示)。

图 5d-f 显示了 PSA 为 8.1 的 81 岁老年男性的核心活检(3 个核心)。该病例诊断为渗透性腺瘤(Gleason 评分为 6)。H&E 染色(图 5d)显示了 BPH 区域和侵入性癌(显著的核仁、基底膜侵入和异常的腺泡结构)的区域。图 5c 显示了在顶部上皮中 P2X 标记增加(箭头所示)，但是总体信号普遍降低。高倍镜显微照片(图 5f)显示 P2x 转位 3 期典型的这些 P2X 标记特征。由于顶部上皮中的标记浓度之故，标记强度比 2 期所见(图 5b)弱。细胞核除核膜(箭头 N)以外没有标记。标记是均匀的而不是点状，大多数发现于顶部上皮(箭头 A)。在转位过程完成时，P2X 标记通常浓集于顶部上皮中，随后其表达消除(D)。图 5a 和 5d 为 H&E 染色。图 5b、c、e 和 f 为 P2X 免疫过氧化物酶标记。没作复染。低倍镜显微照片(5a, b, d 和 e)的标尺为 1 厘米＝150 微米。高倍镜显微照片(5e 和 f)的标尺为 1 厘米＝40 微米。

图 6a-m 显示了与正常组织相比的乳房癌活检中的染色图案。

发明详述

下面仅仅参照实施例和附图来描述本发明的较佳实施方案。

实施例 1-免疫组织化学程序

本研究中所用免疫组织化学方法根据 Barclay[31]的方法加以改进。用 Reichert Jung 2800 Frigocut 冷冻切片机将未固定的冷冻组织切成厚 8 微米的切片。在抗体标记前，使切片在室温下空气干燥 1 小时，-20℃丙酮中固定 12 小时，室温下空气干燥 1 小时。然后使它们在室温下和家兔或绵羊抗 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$、$P2X_4$、$P2X_5$、$P2X_6$ 或 $P2X_7$ 任一抗体一起培育。洗涤后，使切片与第二抗体(对于家兔一抗，是 HRP 偶联的山羊抗家兔二抗(Dako)；对于绵羊一抗，是 HRP 偶联的山羊抗绵羊二抗(Dako))一起培育 30 分钟。再次淋洗载玻片，然后在 15%四盐酸二氨基联苯胺(DAB-Sigma)中浸泡 10 分钟。清洗该切片，空气干燥，固定在 DPX(Merck)中。在第一次培育期间将对照载玻片培育在稀释剂缓冲液中，然后用和试验用载玻片相同的方式处理。阴性对照载玻片用与试验载玻片相同的方法处理，只是用非免疫血清代替一抗。

实施例 2-抗体的生产

按照 Hansen 等人[15]的方法，检查大鼠 $P2X_1$[32]、$P2X_2$[33]、$P2X_3$[34]、大鼠 $P2X_4$[35]、大鼠 $P2X_5$[36]、大鼠 $P2X_6$[36]、大鼠 $P2X_7$[37]、人 $P2X_7$[38]、人 $P2X_1$[39]、人 $P2X_3$[40]、人 $P2X_4$[41]和人 $P2X_5$[42]克隆受体的共有序列中的合适表位。将大鼠 $P2X_1$ 中所用的对应于片段 Lys199-Cys217 的非同源表位用于大鼠 $P2X_3$、大鼠 $P2X_6$ 和大鼠 $P2X_7$ 中。对大鼠 $P2X_4$ 加以改进，采用序列 Ile235-Gly251(其与 C 端 Cys 残基相连以便与 6kDa 白喉毒素结构域交联)。$P2X_2$ 表位选自 C1 结构域[15]中的区域 Cys130-Gly153。大鼠 $P2X_5$ 表位选自较接近于第二跨膜结构域但仍在胞外的区域(Lys314-Ile333，其 C 端加有 Cys 以便偶联)。尽管与大鼠 $P2X_4$ 很大程度上同源，但是 $P2X_4$ 和 $P2X_5$ 不发生交叉标记。所有抗大鼠序列的抗体能标记对应的人受体。对于人 $P2X_1$ 和 $P2X_7$ 序列采用分开的表位。这取自紧靠第一跨膜结构域 C 端的 Lys68-Val184，其 N 端有一个 Cys 以便用马来酰亚胺基己酰-N-羟基琥珀酰亚胺和白喉毒素结构域偶联。人 $P2X_3$ 抗体的表位是大鼠所用的等价序列，而人 $P2X_4$ 和人 $P2X_5$ 的表位分别是 Cys270-Asn287 和 Cys272-Ser288。所有合成采用标准的 t-BOC 化学技术在 ABI 合成仪上进行[43]。以 5 毫克/毫升的浓度将肽抗原偶联物悬于水中，取等份与完全 Freund 佐剂混合来加以乳化。肌内注射含有 2 毫克肽的 1 毫升体积的乳液，以后隔 2 周用不完全 Freund 佐剂作第二、第三、第四和第五次免疫接种。于确定每个表位所用家兔或

绵羊中已经获得足够的抗体滴度后，在 10-12 周通过静脉穿刺获得最终的血液。血液 37℃培育 30 分钟，4℃保藏 15 小时，然后离心收集血清，-20℃以小等份保藏。用 ELISA 试验测试血清对各表位的特异性抗体[15]。抗体滴度定义为在 ELISA 试验中使得吸光度比本底高 1.0 时的血清稀释度的倒数，与免疫前样品(225±25)相比，在 75000±4000 的范围内。

针对该抗体的特异性表位亲合纯化各抗体，结果使本底降低，但是标记趋势相同。

实施例 3-抗体特异性

所用各种 P2X 抗血清在许多情况中显示具有相似的分布，但是在其它情况中有显著不同的分布，这表明抗血清没有丧失特异性。特异性可通过用相关肽亲合纯化血清来证实。为了进一步确认抗体特异性，将各个抗体(如 $P2X_1$ 抗体)在 10mM 浓度 $P2X_1$ 表位存在和不存在下加入用相应 $P2X_1$ cDNA 转染的细胞中。转染的非洲爪蟾属卵母细胞的免疫标记和共焦图象显示，表达的 $P2X_1$ 如所预计的那样位于细胞膜内，加入作为吸收对照的浓度为 10mM 的相关肽导致阻断了 $P2X_1$ 染色[18]。

同样，所有其它抗体的各自特异性均被证实。

实施例 4-制备用于形态学超微结构检查的组织

如下所述，对组织进行加工以便进行形态学检查：使大小约为 3 毫米×3 毫米的切片在 0.1M Tris 缓冲液(pH 7.2)中 2.5%戊二醛中固定 1 小时。然后洗涤，在 2%四氧化锇水溶液中再次固定 2 小时。再次洗涤后，使组织在分级系列醇中脱水，包埋于 Spurr's 树脂中。在 50℃下固化 18 小时。然后用菱形刀切成 100nm 切片，以常用方式用乙酸双氧铀和 Reynolds 柠檬酸铅染色，在 Phillips 400 透射电子显微镜上检查。

实施例 5-超微结构免疫细胞化学

采用 Slater[44]的方法。简言之，切下薄切片(100nm)，在 300 目镍栅格上回收。在封闭溶液(1%BSA 的 PBS)中培育 30 分钟后，将切片置于一滴封闭液(加入 0.05%吐温 20)表面上室温 1 小时，该封闭液含有 HRP 偶联的山羊抗家兔二抗或 HRP 偶联的山羊抗绵羊二抗(1：100 稀释)。然后用 PBS 清洗栅格 3 次 10 分钟，室温下置于数滴偶联 10nm 金的山羊抗家兔二抗(Nanoprobe)上 1 小时。然后用 PBS 洗涤栅格两次，然后用蒸馏水洗涤一次，每次 10 分钟，然后在 2%四氧化锇水溶液蒸汽中放置 1 分钟。然后用乙酸双氧铀溶液对切片染色 20 分钟，用柠檬酸铅染色 10 分钟，用蒸馏水清洗两次 10 分钟，在 80kV 下用 Phillips 400 电子显微镜检查。

实施例 6-人癌组织中的 P2X 受体

在 4 名正常人和 6 名人前列腺癌病人的研究中，人前列腺癌组织中的 $P2X_1$、$P2X_3$ 和 $P2X_4$ 亚型显著增加。这些亚型在正常组织中一点没有标记。癌组织中 $P2X_1$ 的标记图案(图 1)特别令人感兴趣，因为在前列腺疾病的各期都有更大比例的标记的腺泡上皮细胞，这暗示肿瘤转化和 $P2X_1$ 腺泡标记程度之间直接关联。在一些前列腺癌细胞中，$P2X_5$ 也有增加(数据未显示)。在正常组织中，$P2X_5$ 标记很少或没有。

实施例 7-年轻对年老 Wistar 大鼠中的 P2X 受体、生长、神经分布和代谢因素、离子性钙调节

P2X 受体和凋亡：

研究比较 4 只 12 周龄大鼠和 4 只 1.5 年龄大鼠的前列腺，结果检测出年老大鼠中上皮增生显著增加，这与人中的 BPH 相似(图 2)。和人癌组织一样，与年轻大鼠相比，年老大鼠前列腺上皮中的 $P2X_1$、$P2X_3$ 和 $P2X_4$ 受体和酪氨酸激酶 A 受体抗体上调。如以前所讨论的，这表明蛋白质磷酸化(激活)、DNA 合成、胞内微管表达(细胞器输送)增加，其它神经传递介质毗邻受体上调，细胞增殖，离子(主要是钙离子)流入上皮细胞(表明凋亡)。在年老大鼠前列腺中还发现α(1B)(电压门控钙通道)增加，钙调节激素 stanniocalcin 减少。PDGF 和 IGF-1 均抑制凋亡，它们在年老大鼠中减少[45]。因此，年老大鼠前列腺经历凋亡以及与人前列腺癌组织中类似的 P2X 受体表达变化，因此可用来研究前列腺癌病原学。

神经分布、其它因子和代谢因素：

在年老大鼠中，前列腺上皮下面的纤维肌性间隔中微管结构增加。这些结构在显微照片中看起来相类似，照片显示凋亡相关的嘌呤能受体 $P2X_1$、$P2X_7$、钙离子和神经分布因子 VAMP、毒蕈碱性受体(M2)、SV-2、SNAP-25、S100 和运铁蛋白受体，年老大鼠中的所有这些均有上调。年老大鼠中的α(1B)电压门控钙通道和酪氨酸激酶 A 受体也上调。stanniocalcin 下调，而 $P2X_1$ 和 $P2X_7$ 凋亡性钙通道受体上调。这些数据表明老年大鼠中的钙离子流入、代谢速度、微管输送和前列腺上皮的神经分布增加，也暗示该模型可用来研究人前列腺癌。

实施例 8-乳房癌细胞系

在以冷冻切片形式提供的 6 个乳房癌细胞系中，用与前列腺组织标记相同的技术对 $P2X_1$、$P2X_3$ 和 $P2X_4$ 嘌呤能亚型进行标记。标记图谱(图 3)提供了人前列腺癌组织(图

1)和雄性年老 Wistar 大鼠(图 2)前列腺中所见的标记图谱。

实施例 9-前列腺癌诊断(图 4a-f 和 5a-f)

检查代表前列腺疾病各期(正常、BPH、前肿瘤和癌症(Gleason 评分为 5-9))的 65 例病例的正常和病理性前列腺组织的嘌呤能钙受体通道($P2X_{1-7}$)的表达特征。在用 $P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 和 $P2X_7$ 标记的组织中注意到有清楚的转位特征。经过 P2X 抗体产生和标记程序的长期优化和标准化过程后，开发出了一种标准化程序。$P2X_1$、$P2X_2$、$P2X_3$ 和 $P2X_7$ 亚型混合物(各 IgG 浓度为 0.5 微克/毫升，用 PBS 以 1：100 稀释)证实是显示所述转位特征的最佳试剂。$P2X_4$、$P2X_5$ 或 $P2X_6$ 标记的意义较低。利用该试剂来标记各类前列腺癌的组织切片，发现 P2X 标记连续从细胞核表达并转位到细胞质和侧面的质膜，最终如癌症进展的那样主要表达在顶部上皮中(图 4f、5c、5f)。

P2X 标记在 BPH 组织中完全去表达(de-express)(图 4b、4e)。前肿瘤 P2X 转位发生在三个不同期。第 1 期的特征是浅色本底上有稠密的、显著的 P2X 标记的上皮细胞核(PEN)(图 4c、4f)。第 2 期的特征是进行性 PEN 去表达，和出现稠密的明显点状胞质标记、核膜和侧面质膜标记，顶部上皮上的信号增加(图 5b、5c)。第 3 期表现为胞核只有核膜(NO)被标记，没有细胞质信号，标记均一而非点状，且顶部上皮有密集的标记(图 5e，5f)。

在本研究中，苏木精和伊红(H&E)染色诊断为正常或 BPH 的病例中有 56%显示处于 1 期或 2 期 P2X 标记。其余的病例(Gleason 评分为 G5-G9)具有 2 期或 3 期 P_2X 标记特征。第 3 期标记始终伴随癌症的组织学特征(图 5e)。通过上皮和基质中所有 P2X 亚型的完全去表达，不难区分真正的非肿瘤性 BPH 组织。我们建议，组织学诊断为正常、但显示出 P2X 标记特征的活检组织可能在代谢水平上处于早期(前肿瘤)转化的过程。“正常”组织中表现出 2 期特征提示该组织中的前肿瘤过程更进一步发展。所述 P2X 标记特征是期特异性的，其在代表各组织学类别的细胞整个区域中是一致的。在有 BPH 和癌区域的核心中，P2X 标记清楚一致地划分为 BPH 或一种癌标记图谱。建议该技术可用来排除(再次保证)早期癌症患者中具有非肿瘤性前列腺情况的患者，还可用来鉴定迅速发展的可能会导致恶性肿瘤的前肿瘤。该信息使得能够更早地作出更准确的治疗决定。

实施例 10-乳房癌诊断

与正常组织相比，乳房癌活检组织中的亚型 $P2X_2$、$P2X_3$ 和 $P2X_7$ 显著下调。亚型 $P2X_1$、$P2X_4$、$P2X_5$ 和 $P2X_6$ 在正常组织和癌组织中均未标记。使组织预先与 3%过氧

化氢和5%马血清一起培育，以抑制内源过氧化物酶活性。染色图谱例子显示在图6a-m中。

尽管本发明参照具体实施例作了描述，但本领域技术人员应理解本发明可通过许多其它方式来实施。

参考文献

1．Lian FR, Bhuiyan M, Li YW, Wall N, Kraut M 和 Sarkar FH, 1998“染料木黄酮诱导的非小细胞肺癌细胞系的 G(2)-M 停滞、P21(Wafl)上调和凋亡”Nutr. & Cancer. 31:184-191.

2．Hoey J. 1998 “前列腺癌：进展和困惑”，CMAJ 159:1-3.

3．Kolonel LN, Nomura AM, Hinds MW, Hirohata T, Hankin JH 和 Lee J, 1983 “饮食在夏威夷癌症发病率中的作用”Cancer Res. 43:2397s-2402s.

4．Festuccia C, Vincentini C, di Pasquale AB, Aceto G, Zazzeroni F, Miano L,和 Bologna M, 1995“纤溶酶原激活剂在良性前列腺增生和前列腺癌瘤的短期组织培养中的活性” Oncol. Res. 7:131-138.

5．Saxena S, Mohanty NK 和 Jain AK, 1997“筛选前列腺病态男性中的前列腺癌”Ind. J. Pathol. Micro. 40:441-450.

6．Diamandis EP 和 Yu H, 1997 “前列腺特异性抗原的非前列腺来源”Urol. Clin. Nth. Am. 24:275-282.

7. Weyler J, 1999 “前列腺癌：筛选还是警戒等待？” Ann. Oncol. 9:9-11.

8．Bassler TJ, Orozco R, Bassler IC, Odowd GJ, 和 Stamey TA, 1998“因提高 60 岁男性正常前列腺特异性抗原上限而遗漏的大多数前列腺癌在临床上是明显的”Urol. 52:1064-1069.

9．Rabbani F, Strournbakis N, Kava BR, Cookson MS,和 Fair WR, 1998“假阴性六分仪前列腺活检的发病率和临床意义”J.Urol. 159:1247-1250.

10．Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE 和 Honn KV, 1997“人前列腺癌的诊断和预后标记”Prostate 31:264-281.

11．Small EJ, 1997 “前列腺癌”Curr. Opin. Oncol. 9:277-286.

12．Moul JW, Mooneyhan RM, Kao TC, McLeod DG,和 Cruess DF，1998“预计根治性前列腺切除术后失禁、阳痿和狭窄的手术前因素和手术因素”Prost. Can & Prost. Dis. 1:242-249.

13. Drury A 和 Szent-Gyorgyi A, 1929“腺嘌呤化合物的生理学活性，尤其是它们对哺乳动物心脏的作用”J. Physiol. 68:213-237.

14. Abbracchio M 和 Burnstock G, 1998“嘌呤能信号传导：病理生理学作用”Jap. J. Pharmacol. 78:113-145.

15. Hansen MA, Barden JA, Balcar VJ, Keay KA,和 Bennett MR, 1997“P2X 受体胞外结构域的结构基序和特征”Biochem. Biophys. Res. Commun. 236：670-675.

16. Hansen MA, Balcar VJ, Barden JA 和 Bennett MR, 1998“信号 P2X1 受体簇在平滑肌上的分布与大鼠膀胱中神经静脉曲张的关系”J. Neurocytol. 27:529-539.

17. Hansen M, Dutton J, Balcar V, Barden J,和 Bennett M, 1999“P2X(嘌呤能)受体在大鼠血管中的分布”J. Auton. Nerv. Syst. 75:147-155.

18. Dutton J, Hansen M, Balcar V, Barden J, 和 Bennett MR, 1998“平滑肌细胞上的 P2X 受体簇与大鼠膀胱中神经静脉曲张有关的进展”J. Neurocytol.在出版中

19. Filipovic DM, Adebanjo OA, Zaidi M,和 Reeves WB, 1998“P2x 受体在 Llc-Pk1 细胞中的功能和分子证据”Am. J. Physiol. 43:F1070-F1077

20. Abbracchio M, 1996“细胞生长和分化中的 P1 和 P2 受体”Drug. Dev. Res. 39:393-406.

21. Augustine G, Betz H, bommert K, Charlton M, DeBello W, Hans M,和 Swandulla D,“神经传递介质释放的分子和细胞机制中的突触前钙信号传导的分子途径”L. stjarne 等人编辑，1994，Raven Press: New York. 139-155 页。

22. Di Firgilio F, Pizzo P, Zanovello P, Bronte V,和 Collavo D, 1990“作为细胞介导细胞毒性的可能介质的胞外 ATP”Immunol. Today 11:274-277.

23. Siems W, Grune T, Schmidt H, Tikhonov Y, 和 Pimenov A, 1993“携带欧利希氏腹水肿瘤的小鼠在肿瘤不同生长阶段宿主组织中的嘌呤核苷酸水平”Cancer Res. 53:5143-5147.

24. Natori Y, Moriguchi M, Fujiwara S, Takeshita I, Fukui M, Iwaki T,和 Kanaidc H, 1992“L-NMMA 和 L-NNA 对于选择性 ATP 诱导的肿瘤内血流增强的影响”J.Cereb. Blood Flow Metab. 12:120-127.

25. Figueroa JP 和 Masmann GA，1995“雌激素增加了未孕绵羊子宫中氮氧化物合成酶活性”Am. J. Obstet. Gynecol. 173:1539-1545.

26. Rabbani SA 和 Xing RH，1998“尿激酶(uPA)及其受体(uPAR)在激素依赖型恶性肿瘤的侵入和转移中的作用”Int. J. Oncol. 12:911-920

27. Ciccarelli R, Di Iorio P, Ballerini P, Ambrosini G, Giuliani P, Tibone G,和 Caciagli

F, 1994“外源 ATP 和相关类似物对于大鼠星形细胞的解离原初培养物增殖率的影响” J. Neurosci. Res. 39:556-566.

28. Potter Sw, Gaza G,和 Morris JE，1996“雌二醇诱导发情周期和早孕期间小鼠子宫上皮中的 E-钙粘着蛋白降解” J. Cell. Physiol. 169:1-14.

29. Kedeshian P, Stermlicht MD, Nguyen M, Shao ZM,和 Barsky SH，1998“Humatrix，一种具有独特的生物化学和生物学性质的新的肌上皮性基质凝胶”Cancer Lett. 123:215-226.

30. Dethlefsen SM, Raab G, Moses MA, Adam RM, Klagsbrun M, 和 Freeman MR, 1998“胞外钙流入刺激金属蛋白酶断裂和肝素结合 EGF-样生长因子不依赖于蛋白激酶 C 的分泌” J. Cell. Biochem. 69:143-153.

31. Barclay A, 1981“用单克隆抗体确定大鼠淋巴结组织中淋巴细胞群的位置” Immunology 42:593-600.

32. Valera S, Hussy N, Evans RJ，Adami N, North RA, Surprenant A,和 Buell G，1994“P2x 受体确定的针对胞外 ATP 的一类新的配体门控离子通道[见评价]” Natures 371:516-519.

33. Brake AJ, Wagenbach MJ,和 Julius D, 1994“亲离子 ATP 受体确定的配体门控例子通道的新的结构基序” Nature 371:519-523.

34. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G,和 Surprenant A, 1995“P2X2 和 P2X3 受体亚单位的共表达能说明感觉神经元中 ATP 门控的流动[见评价]” Nature 377:432-435.

35. Buell G, Collo G,和 Rassendren F, 1996“P2X 受体：一个新兴的通道家族” Eur. J. Neurosci. 8:2221-2228.

36. Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A,和 Buell G, 1996“P2X5 和 P2X6 受体的克隆和 ATP 门控离子通道延伸家族的分布和性能” J, Neurosci. 16:2495-2507.

37. Surprenant a, Rassendren F, Kawashima E, North RA,和 Buell GS，735-738，1996“胞外 ATP 的溶细胞 P2Z 受体被鉴定为 P2X 受体(P2X7)” Science 272:735-738.

38. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA 和 Surprenant A, 1997“渗透性 ATP 受体 P2X7. 人 cDNA 的克隆和表达” J. Biol. Chem.272：5482-5486.

39. Longhurst PA, Schwegel T, Folander K, 和 Swanson R, 1996“人 P2x1 受体：分子克隆、组织分布和定位于染色体 17” Biochim. Biophys. Acta 1308:185-188.

40. Garcia-Guzman M, Stuhmer W 和 Soto F, 1997“人 P2X3 嘌呤能受体的分子鉴

定和药物学性能”Brain Res. Mol. Brain Res.47,59-66.

41. Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE, 和 Stuhmer W, 1997 “重组人 P2X4 受体的特征分析揭示了与大鼠同源物的药物学差别”Mol. Pharmacol. 51, 109-118.

42. Le KT, Paquet M, Nouel D, Babinski K 和 Seguela P, 1997 “大脑和免疫系统的天然截短的人 P2X ATP 受体亚单位的一级结构和表达”FEBS Lett. 418, 195-199.

43. Barden JA, Cuthbertson RM, Jia-zhen W, Moseley JM,和 Kemp BE, 1997 “15 位有 Ala 取代 Ile 的甲状旁腺激素相关蛋白的溶液结构(残基 1-34)”J. Biol. Chem. 272:29572-29578.

44. Slater M, Patava J, Kingham K,和 Mason RS, 1994 “17β雌二醇对体外掺入人成骨细胞样细胞胞外基质中的生长因子的调节”Am.j. Physiol. 267:E990-E1001.

45. Kiess W 和 Gallaher B, 1998 “编程性细胞死亡/凋亡的激素控制”Eur. J. Endocrinol. 138:482-491.

下图显示了取自正常人前列腺(左)和晚期前列腺癌患者(右)的活检样品中P2X1标记水平的例子。

图 1

下图表明，与年轻(12周龄)大鼠的前列腺上皮(左)相比，年老大鼠(18月龄)组织显示出显著的增生(右)。



图 2

下图显示了正常乳房中的P2X1标记(右)和乳房肿瘤组织中P2X1的大幅度下调(左)。



乳房肿瘤组织 正常乳房组织

图 3

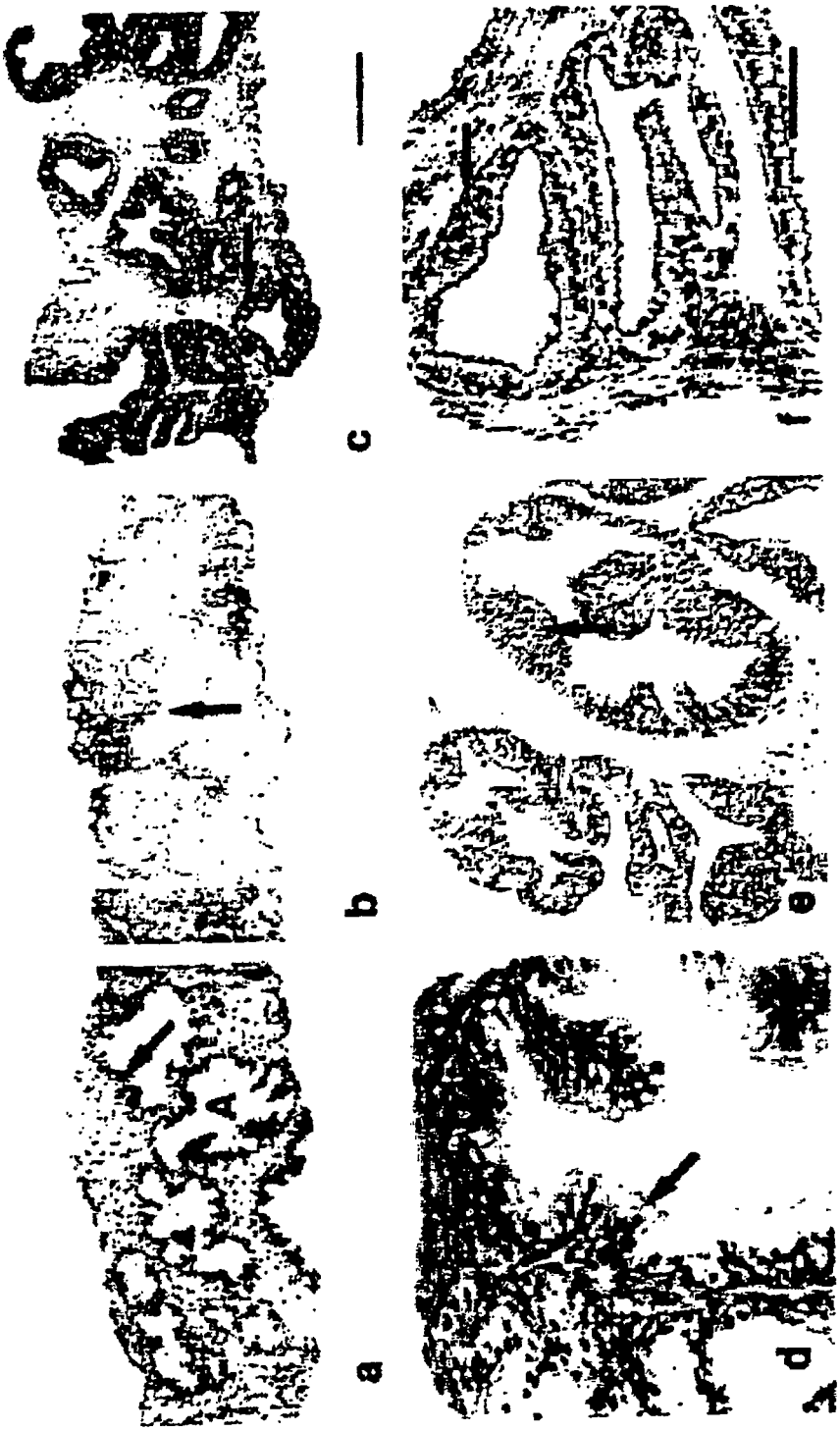


图 4



图 5

(a) 低倍镜：正常组织，P2X2标记。
标尺条-50微米

(b) 低倍镜：乳房癌，P2X2

(c) 低倍镜：正常组织，H&E染色。
标尺条-50微米

(d) 低倍镜：乳房癌，H&E染色

图 6



(e) 高倍镜：正常组织，H&E染色



(f) 高倍镜：乳房癌，H&E染色

(g) 高倍镜：正常组织，P2X2标记

(h) 高倍镜：癌组织，P2X2标记

图 6



(i) 高倍镜：正常组织，P2X3标记。
标尺条＝20微米，箭头＝上皮腺泡



(j) 高倍镜：癌组织，P2X3标记



(k) 高倍镜：正常组织，P2X7标记。
标尺条＝20微米，箭头＝上皮腺泡



(l) 高倍镜：癌组织，P2X7标记

图　6

图 6