

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580048449.4

[43] 公开日 2008 年 2 月 13 日

[11] 公开号 CN 101124340A

[22] 申请日 2005. 12. 9

[21] 申请号 200580048449.4

[30] 优先权

[32] 2005. 2. 18 [33] US [31] 60/654,331

[86] 国际申请 PCT/US2005/044723 2005. 12. 9

[87] 国际公布 WO2006/091254 英 2006. 8. 31

[85] 进入国家阶段日期 2007. 8. 17

[71] 申请人 美国政府健康及人类服务部

地址 美国马里兰州

共同申请人 庞塞医学院

[72] 发明人 伊达哈里兹·弗洛里斯

斯皮罗·莫萨斯

埃斯特尔·罗森布卢姆

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

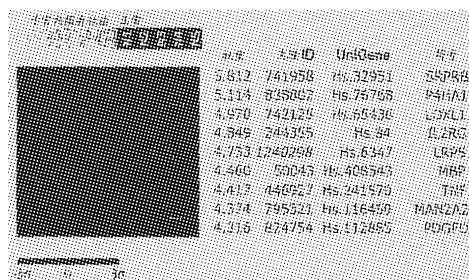
权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图 9 页

[54] 发明名称

血液淋巴细胞中子宫内膜异位症的分子诊断标志物的鉴定

[57] 摘要

本发明包括在女性个体中鉴定或预测易患子宫内膜异位症体质的方法，包括测定个体的外周血白细胞或外周血样本中外周血白细胞的至少一种差异表达的基因或蛋白或肽的基因表达水平以提供第一值，测定对照或参考标准中所述白细胞的至少一种差异表达的基因或蛋白或肽的基因表达水平以提供第二值，比较所述第一值与第二值是否有差异。



1. 在女性个体中鉴定或预测易患子宫内膜异位症体质的方法，所述方法包括：

(a) 测定个体的外周血白细胞或外周血样本中外周血白细胞的至少一种差异表达的基因的基因表达水平以提供第一值；

(b) 测定对照或参考标准中所述白细胞的所述至少一种差异表达的基因的基因表达水平以提供第二值；以及

(c) 比较所述第一值与第二值是否有差异。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中从没有患有子宫内膜异位症的个体或一组个体中确定所述对照或参考标准。

3. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述第一值高于第二值指示子宫内膜异位症的存在或预测。

4. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述第一值低于第二值指示子宫内膜异位症的存在或预测。

5. 权利要求 1-4 中任一个权利要求所述的方法，其中对子宫内膜异位症存在的预测有至少 50% 的概率。

6. 权利要求 1-5 中任一个权利要求所述的方法，其中所述第一值比第二值高或低至少 20%。

7. 权利要求 1-6 中任一个权利要求所述的方法，其中所述基因表达水平的测定包括测量所述基因的转录的多核苷酸的基因表达。

8. 权利要求 7 所述的方法，其中所述转录的多核苷酸是 mRNA 或 cDNA。

9. 权利要求 7 或 8 所述的方法，其中通过微阵列分析、Northern 印迹分析、逆转录 PCR 或 RT-PCR 检测所述表达水平。

10. 权利要求 1-9 中任一个权利要求所述的方法，其中测定选自 LOXL1、IL2RG、LRP5、MPB、TNF、MAN2A2、P4HA1 和 PDGF 的成员的基因表达水平。

11. 在女性个体中鉴定或预测易患子宫内膜异位症体质的方法，所述方法包括：

(a) 测定个体的外周血白细胞或外周血样本中外周血白细胞的至少一种差异表达的蛋白或肽的水平以提供第一值；

(b) 测定对照或参考标准中所述白细胞中所述至少一种差异表达的蛋白或肽的水平以提供第二值；以及

(c) 比较所述第一值与第二值是否有差异。

12. 权利要求 11 所述的方法，其中所述第一值高于第二值指示子宫内膜异位症的存在或预测。

13. 权利要求 11 所述的方法，其中所述第一值低于第二值指示子宫内膜异位症的存在或预测。

14. 权利要求 1 所述的方法，其中所述基因表达水平的测定包括测量蛋白表达产物。

15. 权利要求 11 所述的方法，其中用特异结合所述蛋白的抗体、抗体衍生物或抗体片段来检测所述蛋白或肽的含量。

16. 对确定患有子宫内膜异位症的个体在治疗前后进行监控的方法，所述方法包括：

(a) 在治疗前测定所述个体的外周血白细胞或外周血样本中外周

血白细胞的至少一种差异表达的基因的基因表达水平以提供第一值；

(b) 在治疗后测定所述白细胞的所述至少一种差异表达的基因的基因表达水平以提供第二值；以及

(c) 比较所述个体治疗前和治疗后的基因表达水平的差异。

17. 筛选用于治疗子宫内膜异位症的候选试剂的方法，所述方法包括：

(a) 使能够表达至少一种差异表达基因的细胞离体与候选试剂接触；

(b) 测定所述细胞中所述的至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第一值；

(c) 测定没有候选试剂存在时细胞中相同的至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第二值；以及

(d) 比较所述第一值与第二值，其中基因表达水平的差异指示试剂潜在能够被用于治疗子宫内膜异位症。

18. 治疗或预防子宫内膜异位症的方法，包括给予个体有效量的试剂，所述试剂能够诱导至少一种差异表达的基因或基因表达产物的基因表达、合成或活性水平升高或降低。

19. 生产用于治疗或预防子宫内膜异位症的药物的方法，所述药物包括有效量的试剂，所述试剂能够诱导至少一种差异表达的基因或基因表达产物的基因表达、合成或活性水平升高或降低。

20. 鉴定或预测女性个体中易患子宫内膜异位症体质的试剂盒，所述试剂盒包括用于以下目的的装置：

(a) 测定个体的外周血白细胞或外周血样本中外周血白细胞的至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第一值；

(b) 测定对照或参考标准中所述白细胞的所述至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第二值；以及

(c) 比较所述第一值与第二值是否有差异。

血液淋巴细胞中子宫内膜异位症的分子诊断标志物的鉴定

相关申请

本申请要求于 2005 年 2 月 18 日提交的美国 60/654,331 号临时申请的权益，在此通过引用的方式将该申请整体并入。

发明领域

使用 DNA 微阵列鉴定的基因目标对子宫内膜异位症患者外周血白细胞的基因表达模式的分析，用于对所述疾病的非侵入式诊断测定。

发明背景

子宫内膜异位症是一种相当普遍的妇科疾病，影响多达 10% 的育龄妇女 (Mahmood, T.A. and Templeton, A. 1991 *Hum Reprod* 6:544-549)。子宫内膜异位症的发病机理仍然不清楚，并且对子宫内膜异位症损害的建立、发展及迁移到盆外位置的机理也还没有充分理解 (Witz, C.A. et al. 2003 *Hum Fertil* 6:34-40)。子宫内膜异位症的诊断通常是通过腹腔镜对盆腔进行视觉检查 (Attaran, M. et al. 2002 *Cleve Clin J Med* 69:647-653)。这种诊断方法依赖于外科医生的专业技术因此本质上是不精确的。另外，腹腔镜方法的侵入性及与之关联的疾病排除了其用于监控疾病的复发及对治疗的响应。尽管迫切需要诊断子宫内膜异位症的非手术方法及用于预后及治疗监控的非侵入式手段，目前仍然没有基于血液中标志物鉴定的特异性实验室检验 (Falcone, T. and Mascha, E. 2003 *Fertil Steril* 80:886-888)。此外，那些遭受长期剧烈痛苦、不育及精神痛苦的患病妇女没有多少治疗选择，这些治疗方式都不能治愈该病。寻找用以建立子宫内膜异位症特异性检验的候选基因被证明很有挑战性。因此，我们决定应用 DNA 微阵列技术来加速鉴定子宫内膜异位症的分子生物标志物。

DNA 微阵列日益被用于鉴定与诸如癌症、糖尿病和心血管疾病等复杂基因疾病相关的基因表达谱(Hughes, T.R. and Shoemaker, D.D. 2001 *Curr Opin Chem Biol* 5:21-25)。这种有效的技术揭示了基因表达中的疾病特异模式, 因此加速了候选基因的鉴别(Albertson, D.G. and Pinkel, D. 2003 *Hum Mol Genet* 12:R145-52)。迄今为止, 关于用 DNA 微阵列来发现子宫内膜异位症相关基因只有 5 篇报道。所有 5 项研究都将腹腔镜手术中得到子宫内膜异位组织的基因表达谱与正常的子宫内膜比较, 但分别关注该病的不同方面(即不育、深部子宫内膜异位及卵巢子宫内膜异位囊肿)。在 Eyster 等人(2002)的一项研究中, 所分析的 4,133 个基因中的 8 个与对比的子宫内膜相比在子宫内膜异位囊肿中显示过表达(Eyster, K.M. et al. 2002 *Fertil Steril* 77:38-42)。过表达的基因是细胞骨架元件(波形蛋白、 β -肌动蛋白及 α -2-肌动蛋白), 管家基因(40S 核糖体蛋白 S23)或免疫相关蛋白(Ig γ 轻链、Ig 胚系 H 链、补体、主要组织相容性复合体 I 类)。作者提出诸如波形蛋白的细胞骨架蛋白的表达水平提高能够解释子宫内膜异位细胞的侵入潜力, 以及免疫细胞渗透进子宫内膜移植物能够说明所观察到的免疫球蛋白基因的过表达。Arimoto 等人(2003)也应用 DNA 微阵列来鉴定卵巢子宫内膜异位囊肿的基因表达谱(Arimoto, T. et al. 2003 *Int J Oncol* 22:551-560)。子宫内膜囊肿中显示上调的基因包括 HLA 抗原, 补体因子, 核糖体蛋白及转化生长因子 B1 (TGFBI)。下调的基因包括 TP53、生长停滞及 DNA 损伤诱导蛋白(GADD34、GADD45A 及 GADD45B)、p53 诱导的蛋白(PIG11)以及输卵管糖蛋白(OVGP1)。Lebovic 及其同事(2002)比较了在子宫内膜异位中被 IL-1 β 诱导的 597 个人类基因与正常的子宫内膜活组织检查的基因表达水平(Lebovic, D.I. et al. 2002 *Fertil Steril* 78:849-854)。他们观察到细胞周期调节基因 Tob-1 在异位的基质细胞中被 IL-1 β 下调, 并且提出抑制该基因的表达可能促进子宫内膜异位细胞的生长。Kao 等人(2003)用 DNA 微阵列分析与子宫内膜异位相关的不育症的分子基础(Kao, L.C. et al. 2003 *Endocrinology* 144:2870-2881)。在植入的时间窗口期间在正常子宫内膜中通常上表达, 但在子宫内膜异位症中被发现下降的基因包括 IL-15 (NK 细胞增

殖及功能的强促进因子)、补体 4 结合蛋白(C4BP; 其可能通过与 LRP5 相互作用而干扰 Wnt 信号传导)及 glycodeclin (其受孕酮调节且被认为干扰受精)。最后,最近发现深部子宫内膜异位损害具有增加的血小板衍生生长因子受体 α (PDGFRA)、蛋白激酶 C β 1 (PKC β 1)及 janus 激酶 1 (JAK1)的表达,提供了 RAS/RAF MAPK 途径参与子宫内膜异位症的病理生理学的证据(Matsuzaki, S. et al. 2004 *Mol Hum Reprod* 10:719-728)。

发明延续

本研究的目的是为了鉴定来自子宫内膜异位症患者与对照组的血液淋巴细胞的基因表达谱的区别。尽管在子宫内膜异位症中血液可能不是主要的靶组织,但有一些证据表明这种疾病与炎性成分有关,且可以在外周血淋巴细胞中被监控甚至测定(Bedaiwy, M.A. et al. 2002 *Hum Reprod* 17:426-431)。即使血液淋巴细胞不直接参与疾病过程,已经显示这些细胞的基因表达谱指示并诊断疾病的状态(Tang, Y. et al. 2001 *Ann Neurol* 50:699-707)。因此,我们假设鉴定在外周血淋巴细胞中差异表达的基因会揭示能用于理解疾病发病机理并且,非常重要的,用于设计特异的能够辅助诊断的非侵入式分子检验的基因目标。我们报导基因目标的鉴定,这种鉴定被预想为使用血液样本诊断子宫内膜异位症的基础。

发明概述

本发明包括在女性个体中鉴定或预测易患子宫内膜异位症体质的方法,包括测定个体的外周血白细胞或外周血样本中外周血白细胞的至少一种差异表达的基因或蛋白或肽的基因表达水平以提供第一值,测定对照或参考标准中所述白细胞的至少一种差异表达的基因或蛋白或肽的基因表达水平以提供第二值,比较所述第一值与第二值之间是否有差异。

本发明包括方法,其中测定选自 LOXL1、IL2RG、LRP5、MPB、TNF、MAN2A2、P4HA1 及 PDGF 的成员的基因表达水平。

本发明还包括方法，其中对于选自 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 及 PDGF 的成员，比较的蛋白或肽水平提高或降低。

本发明还包括对被鉴定患有子宫内膜异位症的个体在治疗前后进行监控的方法，所述方法包括在治疗前测定个体的外周血白细胞或外周血样本中外周血白细胞的至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第一值，在治疗后测定所述白细胞的至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第二值，比较治疗前后所述个体的基因表达水平的差异。

本发明还包括筛选用于治疗子宫内膜异位症的候选试剂的方法，包括使能够表达至少一种差异表达的基因的细胞离体与候选试剂接触，测定细胞中至少一种差异表达的基因的基因表达水平以提供第一值，测定候选试剂不存在时细胞中相同的至少一种差异表达的基因的基因表达水平以提供第二值，并比较所述第一值与第二值，其中基因表达水平的差异表示试剂可能能够用于子宫内膜异位症的治疗。

本发明还包括治疗或预防子宫内膜异位症的方法，包括给予个体有效量的试剂，该试剂能够诱导至少一种差异表达的基因或基因表达产物的基因表达、合成或活性水平的升高或降低。

本发明还包括生产用于治疗或预防子宫内膜异位症的药物的方法，该药物包括有效量的试剂，该试剂能够诱导至少一种差异表达的基因或基因表达产物的基因表达、合成或活性水平的升高或降低。

本发明还包括鉴定或预测女性个体中的易患子宫内膜异位症体质的试剂盒，包括下列装置：测定个体的外周血白细胞或外周血样本中外周血白细胞的至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第一值，测定对照或参考标准中所述白细胞的至少一种差异表达基因的基因表达水平以提供第二值，比较所述第一值与第二值是否有差异。

附图的简要说明

图 1. 根据基因选择程序(arrayanalysis.nih.gov, 见实施例 1)的 9 个最能够区别的基因的表达。每行代表一种基因，每列代表一个样品。

对于每个基因，红色(深灰色)表示比平均值水平高的表达，绿色(浅灰色)表示比平均值水平低的表达。下面的标尺表示偏离平均值的标准偏差的数值。(斜体的克隆 ID 不是 IMAGE 克隆。Unigene/基因符号来自 UniGene build #173)。

图 2. 子宫内膜异位症患者对正常对照组的相对基因表达。y-轴显示 9 个最能够区别的基因经管家基因 GAPDH 的表达进行标准化之后的平均相对表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。p 值用双边不成对 t 检验来计算。

**p<0.001; *p<0.01。

图 3. 子宫内膜异位症患者对正常对照组的基因的 mRNA 表达(组 1)。

图 4. 子宫内膜异位症患者对正常对照组的基因的 mRNA 表达(组 2)。

图 5. 子宫内膜异位症患者对正常对照组的相对基因表达(组 2)。

图 6. 组 1 对组 2 的相对表达比较。

图 7. 相对表达(全部)。

优选实施方案详述

本研究的目的是为了用 DNA 微阵列鉴定外周血淋巴细胞中的子宫内膜异位症的分子生物标志物。作为多中心学术研究计划的一部分进行了病例-对照研究。分析了患有或未患有子宫内膜异位症的绝经前妇女，其是否患病是由妇产科专家在手术过程中确定的。微阵列分析包括 6 位子宫内膜异位症患者和 5 位对照；15 位子宫内膜异位症患者和 15 位对照用实时 RT-PCR 分析。包含了不同疾病阶段的患者。将子宫内膜异位症患者及对照组的血液淋巴细胞中的 mRNA 表达水平与标准总 RNA 的表达水平进行比较。基因表达数据用实时 RT-PCR 分析验证。基因选择程序鉴定在子宫内膜异位症患者的样本中差异表达的基因。为验证基因表达数据，用实时 RT-PCR 分析了 9 个最能够区别的基因。所鉴定的 9 个基因中的两个，白介素 2 受体 γ (严重联合免疫缺陷) (IL2RG) 和赖氨酰氧化酶样 1 (LOXL1) 显示有显著的表达差异，白介素 2 受体 γ 包含如 Genbank 登记号 AY692262 的核苷酸及氨

基酸序列，赖氨酰氧化酶样 1 包含如 Genbank 登记号 BC015090 的核苷酸及氨基酸序列。这是首次报道在子宫内膜异位症患者的外周血淋巴细胞中差异表达的基因，这为该病的发病机理提供了重要的线索。此外，预期将它们考虑作为子宫内膜异位症的非侵入式诊断化验的目标并预期在更大量人群中得到验证。

除非另外定义，本文所用的技术及科学术语与本领域普通技术人员的一般理解具有相同的含义。例如参见 Singleton P and Sainsbury D., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (微生物学及分子生物学词典) 3rd ed., J. Wiley & Sons, Chichester, New York, 2001 及 The Glossary of genetics (遗传学词汇), 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)。

本发明文中的“差异表达”是指与对照组个体(如诊断为阴性或患有无法察觉的子宫内膜异位症的人、正常或健康的个体)相比，在患有子宫内膜异位症的个体的外周血白细胞中以不同的量表达的转录表达产物及基因表达产物(如蛋白或肽、mRNA、cDNA)。

“转录本”是指用另一条核酸链作为模板合成的核酸的一条链。

本发明中“蛋白或多肽或肽”预期包括它们的任何片段，特别是免疫学上可检测的片段。本领域技术人员会认识到细胞释放的蛋白能够被降解或切割成这样的片段。另外，某些蛋白或多肽以未活化的形式被合成，随后通过蛋白水解得到活化。特定蛋白的这样的片段可以作为蛋白本身的替代品被检测。

蛋白可以是分泌的(排出的)或非分泌的。非分泌的蛋白可以是细胞内的(在细胞内部的)或在细胞表面上的。

本文所用的术语“样本”是指从个体得到的用于鉴定、诊断、预测或监控目的的样本。在本发明的某些方面中采集这样的样本可以是为了确定正在发生的疾病状态的结果或子宫内膜异位症的治疗方案的效果。优选的测试样本包括血液、血清或血浆。另外，本领域技术人员会认识到有些测试样本在分离或纯化程序后会更容易分析，这些程序例如将全血分成血清或血浆成分。

本文所用的术语“血液”是指未经过事先分离的全血、外周血白细胞、外周血单核细胞(PBMCs)或血液的其它亚组分。

术语“外周血”是指系统循环中的血液。

“基因表达水平”或“肽水平”中的差异是相对差异。例如，其可以从患有子宫内膜异位症的个体中取得的样本的基因表达水平与对照组个体或参考标准之间的差异。可以比较有患子宫内膜异位症风险的个体与已知不患有给定疾病状态的，即“正常的”或“对照组”个体的基因表达水平。或者，可以与已知与良好结果(如不患有子宫内膜异位症)相关的“参考标准”进行比较，这种“参考标准”例如是在不患有子宫内膜异位症的正常个体群中发现的平均水平。根据本发明，能够进行基因表达水平与发展出子宫内膜异位症的个体的鉴定或体质之间的比较。

检测样本中存在的基因表达水平或蛋白/肽的水平可以是绝对量的(如 $\mu\text{g/ml}$)或相对量的(如信号的相对强度)。

如果一个样本中基因表达的量或蛋白/肽的水平在统计学上与另一个样本中的基因表达的量或蛋白/肽的水平显著不同，则两个样本之间存在差异。例如，如果一个样本中基因表达的量或蛋白/肽的水平比另一个样本中高至少约 20%、至少约 30%、至少约 50%、至少约 80%、至少约 100%、至少约 200%、至少约 400%、至少约 600%、至少约 800% 或至少约 1000%，则两个样本的基因表达或蛋白/肽的水平之间存在差异。

鉴定或预测易患子宫内膜异位症的体质可以被认为是一种诊断技术。诊断方法的灵敏性和特异性不同。技术人员往往在一个或多个诊断指标的基础上做出诊断。在本发明中，这些指标为差异表达基因的表达水平和/或其多肽水平。差异表达基因或其多肽的存在、缺失或含量表示子宫内膜异位症的存在、严重程度或不存在。

可以进行对一种或多种基因的基因表达和/或多肽水平的多次测定，以及测定基因表达或多肽丰度随时间的变化，这可以用来监控疾病的发展或疾病的治疗。例如，可以在初始时间测定基因表达/多肽丰度，然后在第二时间再次测定。在这方面，基因表达和/或多肽水平从

初始时间到第二时间的升高可以诊断子宫内膜异位症。类似地，基因表达和/或多肽水平从初始时间到第二时间的下降可以表示个体对子宫内膜异位症特定治疗方式的反应。此外，一种或多种基因的基因表达的变化可能与子宫内膜异位症的严重程度以及未来的不利事件相关。

在本发明的一个实施方案中，测定至少一种基因的基因表达水平和/或其多肽水平。在一个实施方案中，测定下列基因的基因表达水平和/或其多肽水平：赖氨酰氧化酶样 1 (LOXL1) 如 Genbank 号 BC015090；白介素 2 受体 γ (严重联合免疫缺陷) (IL2RG)，如 Genbank 号 AY692262；低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP5)，如 Genbank 号 AF064548；髓鞘碱性蛋白 (MBP)，如 Genbank 号 L18866；肿瘤坏死因子 (TNF 超家族，成员 2；TNF)，如 Genbank 号 BC028148；甘露糖苷酶， α ，2A 类，成员 2 (MAN2A2)，如 Genbank 号 NM_006122；前胶原脯氨酸，2-氧代戊二酸酯 4-加双氧酶(脯氨酸 4-羟化酶) α 多肽 1 (P4HA1)，如 Genbank 号 AK222960；或血小板衍生生长因子 D/DNA 损伤诱导蛋白 1 (PDGFD)，如 Genbank 号 AF336376。在另一个实施方案中，测定 LOXL1，IL2RG，LRP5，MPB，TNF，MAN2A2，P4HA1 及 PDGF 多个基因的表达水平。

技术人员会理解，尽管在特定的方面对基因表达的比较测定是通过相同基因在多个时间点进行测定来进行的，还可以在一个时间点测定一种给定的基因，在第二个时间点测定第二种基因，并且比较这些基因的基因表达可以提供诊断信息或监控疾病的发展。

在本发明的一个方面，可以在不同的时间点比较地测定一种或多种基因的基因表达。

本文所用的用语“子宫内膜异位症存在的可能性”指的是技术人员能够用来预测个体状况的方法。它不是指 100% 精确地预测子宫内膜异位症的能力。相反，技术人员会理解，它指的是子宫内膜异位症存在或发展的增加了的可能性。例如，当与对照或参考标准如未患有子宫内膜异位症或不具有易患子宫内膜异位症体质的个体比较时，在 IL2RG 高水平表达和/或 IL2RG 多肽水平提高和/或 LOXL1 表达水平

下降和/或 LOXL1 多肽水平下降的个体中, 子宫内膜异位症更有可能发生。在本发明的一个方面中, 存在子宫内膜异位症的可能性为约 50% 的机会、约 60% 的机会、约 75% 的机会、约 90% 的机会和约 95% 的机会。此处术语“约”是指 $\pm 1\%$ 。

技术人员会理解, 将特定的基因与易患子宫内膜异位症的体质相关联是一个统计学分析。另外, 基因表达和/或肽的水平相对于基线的变化可能反映患者的预后, 基因表达的变化程度与不利事件的严重程度相关。经常通过比较两组或更多组个体并确定 p 值来确定统计显著性。优选的 p 值为 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001 及 0.0001。

在另一个方面, 本发明涉及鉴定个体中子宫内膜异位症的试剂盒。这些试剂盒中包括测量个体样本中的基因表达和/或测定多肽水平的装置和试剂以及进行测定和阐释结果的说明书。这样的试剂盒优选含有足够的试剂以进行一次或多次这样的测定。

按照本发明, 测定的“灵敏度”为检验为阳性的患病个体(患有子宫内膜异位症的)的百分数(“真阳性”的百分数)。测定没有检验出的患病个体为“假阴性”。没有患病也检验为阴性的个体称为“真阴性”。诊断检验的“特异性”为 1 减去假阳性率, 其中“假阳性率”定义为那些没有患病却被检验为阳性的部分。尽管特定诊断方法不一定提供疾病状态的确定诊断, 但如果该方法提供帮助诊断的阳性指示就足够了。

基因表达的测量

技术人员公知许多检测和分析本发明的基因表达以及测量多肽水平的方法和设备。术语“基因表达”指的是特定基因的存在或其含量, 所述基因包括但不限于 mRNA、cDNA 或特定基因的多肽、肽或蛋白表达产物。在本发明的优选方面中, 测定 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 和/或 PDGF 的基因表达和/或相应多肽的水平。

在本发明的一个实施方案中, 通过测量 RNA 水平来测定基因表达。可以使用基于 PCR 的测定来检测基因表达。例如, 逆转录酶 PCR

(RT-PCR)用于检测 RNA 的表达。在 RT-PCR 中,使用逆转录酶将 RNA 转变为 cDNA。然后该 cDNA 被用作 PCR 反应的模板。可以用任何合适的方法检测 PCR 产物,这些方法包括但不限于凝胶电泳以及使用 DNA 特异染料染色或与标记的探针杂交。在本发明的另一个方面,可以使用含有竞争性模板的标准化混合物的定量 RT-PCR。

在本发明的另一个实施方案中,用杂交测定来检测基因表达。在杂交测定中,根据样本中的核酸杂交互补核酸分子的能力确定生物标志物的存在与否,所述互补核酸分子例如寡核苷酸探针。有多种杂交测定可供使用。在本发明的一些实施方案中,通过可视化结合的探针来直接检测探针和目的序列的杂交,例如通过 Northern 或 Southern 测定。在这些测定中,分离 DNA (Southern)或 RNA (Northern)。然后用一系列在基因组中很少切割且不在任何一个被测定标志物的附近切割的限制酶来切割 DNA 或 RNA。然后分离该 DNA 或 RNA,例如在琼脂糖凝胶上,并将其转移到膜上。使诸如通过结合放射性核苷酸而被标记的一个或多个探针在低、中和高严谨条件下与膜接触。除去未结合的探针,通过可视化标记的探针来检测结合的存在。在本发明中,测定 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 和/或 PDGF 的基因表达。

核酸阵列

核酸阵列包括产生于核酸转录本或与其互补的或为其区域的核酸序列的任何组合,包括血液中的核酸转录本种类。本发明的微阵列优选包括介于 10、100、500、1000、5000、10,000 和 15,000 个之间的核酸成员,并且更优选地包括至少 5000 个核酸成员。该核酸成员是已知的或是本文描述的新的核酸序列或是它们的任意组合。本发明的微阵列用于测定健康人与患病者相比,血液样本中存在的转录本 RNA 表达谱的差异水平。

微阵列包括那些包含在个体中表达的转录本的阵列。在一个实施方案中,微阵列包含在人中表达的转录本。在另一个实施方案中,本发明的微阵列可以是基于 cDNA 的阵列或基于寡核苷酸的阵列。

定量实时 RT-PCR

在本发明的另一个方面，可以用定量方法测定本发明的一个或多个种类的转录本的水平，这些方法包括 QRT-PCR，使用定量逆转录(RT)联合聚合酶链式反应(PCR) PCR 来自血液的 RNA。

来自血液的总 RNA 或 mRNA 被用作模板，对本发明基因的转录部分特异的引物被用于引发逆转录。可以用可商购的软件(如 Primer Designer 1.0, Scientific Software 等)来完成引物设计。逆转录的产物随后被用作 PCR 的模板。

PCR 提供快速扩增特定核酸序列的方法，该方法使用由热稳定的、DNA 依赖的 DNA 聚合酶催化的 DNA 复制的多次循环来扩增感兴趣的目标序列。PCR 要求存在待扩增的核酸、位于待扩增序列两侧的两条单链寡核苷酸引物、DNA 聚合酶、脱氧核苷三磷酸盐、缓冲液以及盐。

PCR 方法为本领域公知。如 Mullis and Faloona, 1987, *Methods Enzymol.*, **155**:335 中所述进行 PCR。

使用模板 DNA 或 cDNA (至少 fg; 更有效地, 1-1000ng)以及至少 25 pmol 的寡核苷酸引物进行 PCR。典型的反应混合物包括: 100 ng 的 DNA、25 pmol 的寡核苷酸引物、2.5 μ l 的 10X PCR 缓冲液 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)、0.4 μ l 的 1.25 μ M dNTP、0.15 μ l (或 2.5 单位)的 Taq DNA 聚合酶(Perkin Elmer, Foster City, CA), 加去离子水至总体积 25 μ l。任选用矿物油覆盖, 用可编程的热循环仪进行 PCR。

根据有效力的严紧性要求调节 PCR 循环的每一步的时间和温度以及循环次数。退火温度及时间由期望的引物退火到模板上的效率及可以容忍的错配程度来决定。对引物退火条件严紧性的优化在本领域普通技术人员的能力范围内。所用的退火温度为 30°C 至 72°C。模板分子的初始变性通常在 92°C 至 99°C 进行 4 分钟, 然后进行 20-40 个循环, 每个循环包括变性(94-99°C, 15 秒至 1 分钟)、退火(如上所述确定温度; 1-2 分钟)及延伸(72°C, 1 分钟)。通常在 72°C 进行 4 分钟的最后延伸步骤, 可以随后在 4°C 下进行无限期(0-24 小时)步骤。

还可以进行性质上定量的 QRT-PCR, 使用两步过程的逆转录和 PCR, 或者一步方案的逆转录和 PCR, 使得提供血液中一种或多种 RNA 转录本水平的定量测量。这些技术之一是用转录本特异的反义探针来进行的, 对于该技术已有可商购的试剂盒, 例如 Taqman® (Perkin Elmer, Foster City, CA)。这种探针对 PCR 产物(如来自基因的核酸片段)是特异的, 它是用淬灭剂和复合在寡核苷酸 5'末端的荧光报道探针制备的。在不同的报道物上连接不同的荧光标志物, 使得能够在一个反应中测量两个产物。Taq DNA 聚合酶活化后, 依靠其 5'至 3'核酸外切酶活性来切割掉结合到模板上的探针的荧光报道物。当不存在淬灭剂时报道物发荧光。报道物的颜色变化与每一种特异产物的含量成比例并且可以用荧光计测量; 由此测量每种颜色的量并确定 PCR 产物的量。PCR 反应在 96 孔板上进行, 使得可以同时处理和测量源自许多个体的样本。Taqman 系统具有不要求凝胶电泳的额外优点, 而且在与标准曲线一起使用时可以做到定量。

不用电泳方法定量检测 PCR 产物的第二种技术是使用插入染料, 例如可商购的 QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Valencia, CA)。RT-PCR 的进行是用于在 PCR 阶段结合到 PCR 产物中的 SYBR® green 作为荧光标记, 产生与 PCR 产物的含量成比例的荧光。

Taqman®和 QuantiTect™ SYBR®系统都可以用在 RNA 的逆转录之后。

另外, 已知其它定量测量一种或多种转录本的系统, 包括分子信标(Molecular Beacons), 它利用含有荧光分子和淬灭剂分子的探针, 所述探针能够形成发夹结构, 使得在发夹形式时荧光分子被淬灭, 而当杂交后荧光增加, 给出一种或多种 RNA 转录本的定量测量。

按照本发明还可以使用几种其它的不用电泳检测 PCR 产物的技术(例如参见 PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (PCR 方案: 方法及应用指南), Innis et al., Academic Press, Inc. N.Y., (1990))。

蛋白表达的测量

在本发明的另一个实施方案中，通过测量多肽基因表达产物来测定基因表达。在本发明的优选方面，通过鉴定由 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 和/或 PDGF 基因编码的一种或多种多肽的含量来测量基因表达。本发明不受检测或测量基因表达的方法的限制。

可以用合适的方法检测由 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 和/或 PDGF 基因编码的蛋白或多肽或肽表达产物。对于样本中的肽、多肽或蛋白，经常使用免疫测定装置和方法。这些装置和方法能够在各种“夹心”、竞争性或非竞争性测定形式中使用标记的分子以产生与目的分析物的存在或含量相关的信号。另外，某些方法和装置，如生物传感器和光学免疫测定，可用于测定分析物的存在或含量而不需要标记的分子。

通常通过使用特异抗体和检测特异结合来测定蛋白或多肽或肽的存在或含量。可以使用任何合适的免疫测定，如酶联免疫测定(ELISA)，放射性免疫测定(RIAs)，竞争结合测定等等。抗体与蛋白或多肽的特异免疫结合能够被直接或间接地检测。直接标记包括连接在抗体上的荧光或冷光标签、金属、染料、放射性核等。间接标记包括本领域公知的各种酶，如碱性磷酸酯酶、辣根过氧化物酶等等。

本发明还考虑使用对蛋白或多肽特异的固定抗体。可以将抗体固定在各种固体载体上，如磁性或色谱基质微粒、测定板的表面(如微量滴定孔)、固体基层材料片(如塑料、尼龙、纸)等等。通过使用抗体或阵列排列的多种抗体包被固体载体能够制备测定条。可以把测定条浸入试样中，然后通过洗涤及检测步骤迅速处理以产生可测量的信号，如有颜色的点。

可以分别进行或用一个试样同时进行对本发明的多个基因和/或多肽的分析。另外，本领域技术人员会认识到测试来自同一个体的多个样本(例如，在连续的时间点)的价值。这种连续样本的测试使得能够确定基因表达和/或多肽水平随时间的变化。基因表达水平的提高或降低以及基因表达和/或多肽水平的不变能够提供关于疾病状态的有用信息，包括但不限于，确定从事件发生开始的大概时间，可回收的

样本的存在及含量，药物治疗的适当性，由症状消退显示的不同疗法的有效性，不同类型子宫内膜异位症的区别，事件严重性的鉴定，疾病严重性的鉴定以及包括未来事件风险在内的患者结果的鉴定。

可以构建含有上述基因的组以提供与子宫内膜异位症的诊断或预后以及患有子宫内膜异位症的个体的管理有关的信息。这样的组可以优选地用 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 和/或 PDGF 的序列来构建。本领域技术人员可以单独分析单一基因或含有更大组基因的基因子集，也可以合并分析单一的多肽或多肽的子集以最优化灵敏度或特异性。

也可以用各种物理形式进行基因表达的分析 and/或多肽水平的测定。例如可以使用微量滴定板或自动控制以帮助以高通量方式处理大量的试样。

在本发明的另一方面中提供阵列，在序列上与基因产物，如 cDNAs、mRNAs、cRNAs、多肽及其片段对应的探针能够在所述阵列的已知位置上特异杂交或结合。在本发明的一个实施方案中，所述阵列是基质，其中每个位置代表一个供产物结合的离散的结合点，所述产物是由 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2 和/或 PDGF 的基因编码的。在本发明的另一个方面，“结合点”，以下称“点”，为特定关联 cDNA 能够特异杂交的核酸或核酸类似物。结合点的核酸或类似物例如可以是合成低聚物、全长 cDNA、短于全长的 cDNA 或基因片段。

另一方面，本发明提供用于分析基因表达和/或多肽水平的试剂盒。这样的试剂盒优选包括用于分析至少一个试样的装置和试剂以及进行测定的说明书。试剂盒可任选地包含一种或多种将基因表达和/或多肽的含量转变成个体中子宫内膜异位症的诊断或预后的装置。个体中基因表达的模式与对照或参考标准的比较可以显示该个体是否患有子宫内膜异位症。

在本发明的一个实施方案中，所述试剂盒包含对 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 和/或 PDGF 中至少一种特异的抗体。在其它实施方案中，所述试剂盒包含对检测核酸特异的试剂，

例如寡核苷酸探针或引物。在一些实施方案中,所述试剂盒包含进行检测测定所必需的所有成分,包括所有的对照物以及进行检测和结果分析的说明书。在本发明的一个实施方案中,所述试剂盒包含说明书,其中按照美国食品及药物管理局(FDA)或国外对等机构对体外诊断测定和/或药物或食品产品标注的要求包括了关于预期应用的陈述。

本发明的另一个方面提供筛选用于治疗子宫内膜异位症的试剂的方法。特别考虑能够诱导 IL2RG 的基因表达水平、合成或活性下降和/或诱导 LOXL1 的基因表达水平、合成或活性提高的试剂。

例如,在一个实施方案中,首先用测试试剂治疗已知患有子宫内膜异位症的测试个体,然后分析该个体的典型样本中基因或序列的表达水平和/或多肽水平,所述的基因或序列的表达响应子宫内膜异位症而变化。然后将样本的分析与已知患有子宫内膜异位症,但没有给予所述测试化合物的对照组比较以鉴定能够改变所述基因表达的测试化合物。

在本发明的另一个实施方案中,治疗可以基于 LOXL1, IL2RG, LRP5, MPB, TNF, MAN2A2, P4HA1 和/或 PDGF 的序列。例如试图降低 IL2RG 的表达和诱导 LOXL1 水平的提高。

本领域技术人员会了解提高或降低所述基因的表达的方法。补充表达的实例包括向个体提供基因的额外拷贝。降低表达的一个实例包括 RNA 反义技术或药物介入。

使用 DNA 微阵列鉴定血液淋巴细胞中子宫内膜异位症的分子标志物 微阵列数据分析

如实施例 1 所述对数据进行分析。如通常在 DNA 微阵列数据分析中应用的,将认为是过表达的倍数差别设定为 ≥ 2 。我们用来自患者和对照组的外周血淋巴细胞总 RNA 分析了总共 15,097 个 cDNA 克隆(14,185 个已知的基因和 912 个表达序列标签位点)。每个基因的区别两个组的区别能力用 t-统计(权重,见表 1)来评价。列出了最能够区别的上调节及下调节的基因。从与对照组相比,发现在患者中过表达的基因中选出 9 种权重超过 4 且平均比率差异大于 2.0 的做进一步分析

(图 1)。这些基因是：信号识别颗粒受体 B 亚基(SRPRB)；前胶原-脯氨酸,2-氧代戊二酸酯 4-加双氧酶(脯氨酸 4-羟化酶) α 多肽 1 (P4HA1)；赖氨酰氧化酶样 1 (LOXL1)；白介素 2 受体 γ (严重联合免疫缺陷) (IL2RG)；低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP5)；髓鞘碱性蛋白 (MBP)；肿瘤坏死因子(TNF 超家族, 成员 2; TNF)；甘露糖苷酶, α , 2A 类, 成员 2 (MAN2A2)及血小板衍生生长因子 D/DNA 损伤诱导蛋白 1 (PDGFD) (表 1)。与对照组相比, 所有 9 种基因在患者的外周血淋巴细胞中的表达都增加了 ≥ 2 倍。

表 1: 子宫内膜异位症患者和对照组中基因的微阵列及相对实时 RT-PCR 分析。

基因	微阵列		RT-PCR	
	表达倍数	权重 微阵列分析 ^a	表达倍数 ^b	<i>P</i> RT-PCR
SRPRB	3.59	5.812	1.02	0.2369
P4HA1	3.74	5.114	0.77	0.0594
LOXL1	3.96	4.970	0.06	0.0002
IL2RG	2.32	4.849	6.49	0.0037
LRP5	2.92	4.733	3.80	0.1274
MBP	3.03	4.460	3.62	0.6503
TNF	2.79	4.417	3.44	0.2973
MAN2A2	2.41	4.374	12.93	0.1998
PDGFD	2.56	4.316	1.96	0.6708

^a6 名患者对 5 名对照得到的结果。^b15 名患者对 15 名对照得到的结果。如实施例 1 所述确定区别权重值。用双边不成对 t 检验确定 RT-PCR 数据的 *p* 值, 显著性设为 0.05。

用实时 RT-PCR 确认微阵列数据

用相对实时 RT-PCR 在来自另外的患者(N=15)及对照组(N=15)的血液淋巴细胞中进一步评价了 9 种最能够区别的基因的表达。结果总

结于表 1。实时 RT-PCR 证明选出的 9 种基因中的 2 种有差异表达：患者相对于对照组，IL2RG 被上调(6.49 倍； $p=0.0037$)，LOXL1 被下调(0.06 倍； $p=0.0002$) (图 2)。虽然 RT-PCR 显示 LRP5, MBP, TNF, MAN2A2 及 PDGFD 上调超过 2 倍，但病例与对照组的基因表达水平之间的差异没有达到统计显著。

讨论

近年来致力于寻找生物标志物的研究大大增加(Colburn, W.A. 2003 *J Clin Pharmacol* 43:329-341; Frank, R. and Hargreaves, R. 2003 *Nat Rev Drug Discov* 2:566-580)。根据生物标志物定义工作组(Biomarkers Definition Working Group)的定义，生物标志物是“被客观地测量和评价的特征，指示正常生物学过程、致病过程或对治疗干涉的药理学反应”(Biomarkers Definitions Working Group 2001 *Clin Pharmacol Ther* 69:89-95)。然而，潜在的诊断生物标志物的数量比那些被看作药物开发的潜在目标的生物标志物少得多(Levenson, V.V. 2004 *Pharmacogenomics* 5:459-461)。基因表达的全面分析可能加快新的诊断或预后生物标志物的发现，这些生物标志物随后需要在更大量人群中进行验证。

因此，我们进行本研究是出于这样的假定：对非常容易得到的组织——外周血淋巴细胞中基因表达模式的表征可能加速可用作子宫内膜异位症诊断或预后生物标志物的基因的鉴定。与研究子宫内膜异位植入物、子宫内膜异位囊肿或腹膜液的目的相反，我们假设血液淋巴细胞转录本谱的微阵列分析能更好地服务于寻找用于所述疾病的非侵入式标志物。这个假设是基于最近的研究显示在患有和未患有子宫内膜异位症妇女的血清和腹膜液中各种炎性分子/生长因子的水平显著不同(Bedaiwy, M.A. et al. 2002 *Hum Reprod* 17:426-431; Navarro, J. 2003 *Obstet Gynecol Clin North Am* 30:181-192; Iwabe, T. et al. 2002 *Gynecol Obstet Invest* 53 Suppl 1:19-25)。另外，有足够的证据证明在子宫内膜异位症患者与不患病的个体之间存在遗传差异，且这些差异在血液淋巴细胞中可以很明显(Taylor, R.N. et al. 2002 *Fertil Steril*

78:694-698; Nakago, S. et al. 2001 *Mol Hum Reprod* 7:1079-1083)。最后,大家广泛接受免疫系统在子宫内膜异位症中起着重要作用,因此全身免疫应答的分析可以反映局部(即腹膜腔)的免疫应答(Gagne, D. et al. 2003 *Fertil Steril* 80:43-53; Gagne, D. et al. 2003 *Fertil Steril* 80:876-885)。

到目前为止,在血清或血液淋巴细胞中只检测到几种子宫内膜异位症的可能标志物,主要是细胞因子、生长因子、粘附分子及激素。Bedaiwy 及其同事(2002)显示血清 IL-6 及腹膜液 TNF- α 可以被用来区分患有或未患有宫内膜异位症的个体,其具有很高的灵敏度和特异性(Bedaiwy, M.A. et al. 2002 *Hum Reprod* 17:426-431; Bedaiwy, M.A. and Falcone, T. 2004 *Clin Chim Acta* 340:41-56)。但腹膜液 TNF- α 的测量仍然需要侵入式方法,因此不能构成子宫内膜异位症简化测试的基础。Barrier 和 Sharpe-Timms (2002)报道了患有晚期子宫内膜异位症的妇女具有更高的血清 VCAM-1 水平和更低的血清 ICAM-1 水平(Barrier, B.F. and Sharpe-Timms, K.L. 2002 *J Soc Gynecol Investig* 9:98-101)。他们推断,可溶粘附分子的异常水平不仅帮助解释子宫内膜异位症的发病机理,而且还能够用作判断该病阶段的生物标志物。Pizzo 及其同事(2002)显示患有子宫内膜异位症的患者具有较高的血清 TNF- α 、IL-8 及 MCP-1 水平,这些水平随着病情严重性而下降,与之相反,血清 TGF- β 水平随严重性而上升(Pizzo, A. et al. 2002 *Gynecol Obstet Invest* 54:82-87)。另外,与对照组相比,患者中血管内皮生长因子(VEGF)的溶解水平也显著增加,虽然该观察不能被其它研究所重复(Matalliotakis, I.M. et al. 2004 *Int Immunopharmacol* 4:159-160; Gagne, D. et al. 2003 *Hum Reprod* 18:1674-1680)。其它在子宫内膜异位症患者的血清中显著增加的蛋白有促黄体素(LH), Fas 配体,可溶性肿瘤坏死因子受体及 ICAM-1,虽然后面两个只在患者月经周期的特定阶段显著升高(Illera, J.C. et al. 2001 *Reproduction* 121:761-769; García-Velasco, J.A. et al. 2002 *Fertil Steril* 78:855-859; Koga, K. et al. 2000 *Mol Hum Reprod* 6:929-933; Steff, A.M. et al. 2004 *Hum Reprod* 19:172-178)。总而言之,上面所有的研究都没有能够鉴定子宫内膜异

位症的非侵入式标志物, 这种标志物对于诊断不同病情阶段的患者是有用的, 且其表达在测试时不依赖于患者的月经周期阶段。

迄今为止, 关于用 DNA 微阵列技术鉴定基因表达的子宫内膜异位症特异模式的报导只有 5 篇(Hughes, T.R. and Shoemaker, D.D. 2001 *Curr Opin Chem Biol* 5:21-25; Albertson, D.G. and Pinkel, D. 2003 *Hum Mol Genet* 12:R145-52; Eyster, K.M. et al. 2002 *Fertil Steril* 77:38-42; Arimoto, T. et al. 2003 *Int J Oncol* 22:551-560; Lebovic, D.I. et al. 2002 *Fertil Steril* 78:849-854; Kao, L.C. et al. 2003 *Endocrinology* 144:2870-2881; Matsuzaki, S. et al. 2004 *Mol Hum Reprod* 10:719-728; Giudice, L.C. et al. 2002 *Ann NY Acad Sci* 955:252-264; Discussion 293-295, 396-406)。但这些研究中没有一个特别专注于这样的事实, 即没有用于这种使人虚弱的疾病的基于血清或血液的特异诊断测试。因此虽然收集了能够帮助仔细研究涉及子宫内膜异位症病理生理学的分子机理的重要数据, 但这些研究没有能够鉴定能够通过检测血液或血清而帮助诊断和治疗监控的通用特异标记。此外, 由于这些研究着眼于疾病的不同亚型(即不育、深部子宫内膜异位症或卵巢子宫内膜异位症), 而实际上这些亚型可以用截然不同的基因表达谱来表征, 因此报道的数据有分歧, 不能被广泛应用。

为了鉴定在血液中子宫内膜异位症的分子生物标志物, 我们比较了从 6 名患者和 5 名对照分离的血液淋巴细胞中约 15,000 个基因/ESTs 的基因表达。列出了上调节和下调节的基因, 用实施例 1 中所述的 t-统计来评价每个基因区分两个试验组的区别能力。在过表达的基因中, 我们进一步分析了 9 种权重超过 4.0 及组平均倍数改变超过 2 的基因。它们被分为以下几组: i) 与免疫应答有关的蛋白: TNF, 它是一种促炎性细胞因子, 以前显示其在子宫内膜异位症患者的腹膜液中以升高的水平存在(Eisermann, J. et al. 1988 *Fertil Steril* 50:573- 579), 以及 IL-2 R γ 链(IL2RG), 也叫做公共 γ 链, 它是功能性 IL-2、IL-4 及 IL-7 受体的重要组分(Nakajima, H. et al. 1997 *Exp Med* 185:189-195); ii) 与胶原代谢有关的酶: 脯氨酸-4 羟化酶(P4HA1)催化胶原中 4-羟基脯氨酸的形成(Annunen, P. et al. 1997 *J Biol Chem* 272:17342-17348), 以及

赖氨酰氧化酶样 1 (LOXL1), 其调节胞外基质中不溶性胶原的形成 (Molnar, J. et al. 2003 *Biochim Biophys Acta* **1647**:220-224); iii) 与促进细胞增殖/致癌有关的基因: α -甘露糖苷酶(MAN2A2)是一种处理 N-连接聚糖的糖基水解酶, 其表达水平与体外恶性行为相关 (Misago, M. et al. 1995 *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:11766-11770; Yue, W. et al. 2004 *Int J Cancer* **108**:189-195); 低密度脂蛋白受体 5 (LRP5), 其作为癌基因 Wnt 的共同受体而起作用, 显示它能够正向调节乳腺癌细胞的细胞增殖和侵入 (Li, Y. et al. 1998 *Invasion Metastasis* **18**:240-251); 信号识别颗粒 B 亚基(SRPRB), 其在凋亡细胞和恶性细胞中上调 (Yan, W. et al. 2003 *World J Gastroenterol* **9**:1719-1724); 以及血小板衍生生长因子 D/DNA 损伤诱导蛋白 1 (PDGFD), 其特征是在间叶细胞起源的细胞中有促有丝分裂的作用 (Hamada, T. et al. 2000 *FEBS Lett* **475**:97-102); 以及 iv) 髓鞘碱性蛋白 (MBP), 它是髓磷脂鞘的主要蛋白, 在中枢神经系统和造血细胞中表达, 并且显示 TNF 提高其表达 (Marty, M.C. et al. 2002 *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:8856-8861; Huang, C.J. et al. 2002 *Int J Dev Neurosci* **20**:289-296)。当用实时 RT-PCR 分析来自患者和对照组的另外样本时, 显示 IL2RG 及 LOXL1 的相对 mRNA 表达的差异显著。

IL-2RG 或公共 γ 链是所有已知 T 细胞生长因子受体 (例如 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 及 IL-21) 的一部分 (Habib, T. et al. 2003 *J Allergy Clin Immunol* **112**:1033-1045)。这样, 此受体链关键性地涉及调节 Th1 免疫应答发展的信号的产生。众所周知, 子宫内膜异位症患者显示提高的活化免疫细胞及包括 IL-2 和 IL-4 在内的可溶细胞因子水平 (Iwabe, T. et al. 2002 *Gynecol Obstet Invest* **53 Suppl 1**:19-25; Szylllo, K. et al. 2003 *Mediators Inflamm* **12**:131-138; Wu, M.Y. and Ho, H.N. 2003 *Am J Reprod Immunol* **49**:285-296)。此外, 已经显示患有 II 期至 IV 期子宫内膜异位症的狒狒的外周血中具有升高的 IL-2R⁺ 细胞水平 (D'Hooge, T.M. et al. 1996 *Human Reprod* **11**:1736-1740)。在子宫内膜异位症患者中观察到该基因的表达提高。另一方面, LOXL1 被暗示为肿瘤抑制基因, 尽管这种作用还没有被完全阐明 (Contente, S. et al. 1990 *Science* **249**:796-798; Hamalainen, E.R. et al. 1995 *J Biol Chem*

270:21590-21593)。LOXL1 涉及 TGF- β 信号转导途径, 并且已经显示在头颈鳞片细胞癌和前列腺癌中下调节(Dairkee, S.H. et al. 2004 *BMC Genomics* 5:47; Rost, T. et al. 2003 *Anticancer Res* 23:1565-1573; Ren, C. et al. 1998 *Cancer Res* 58:1285-1290)。虽然我们并不能解释 LOXL1 的实时 RT-PCR 和微阵列数据之间的差异, 但该推定的肿瘤抑制基因在用 RT-PCR 研究的所有子宫内膜异位症患者中均显著下调节的事实让人很感兴趣, 值得进一步研究。关于微阵列与实时 PCR 结果在两个方向及表达水平的差异以前有报导(Orr, W.E. et al. 2003 *Mol Vis* 9:482-496; Jenson, S.D. et al. 2003 *Mol Pathol* 56:307-312; Ginestier, C. et al. 2002 *Am J Pathol* 161:1223-1233; Mutch, D.M. et al. Nov 2001 *Genome Biol* 2:PREPRINT0009 (电子出版); Goodsaid, F.M. et al. 2004 *Environ Health Perspect* 112:456-460)。由于 RT-PCR 被看作基因表达水平测定的黄金标准(Goodsaid, F.M. et al. 2004 *Environ Health Perspect* 112:456-460), 并且考虑到在用 RT-PCR 研究的所有患者中 LOXL1 均显著降低的事实, 后面的结果可能更好地反映了在患者身上发生的事实。

对另外样本的 RT-PCR 分析能够确认 LRP5、MBP、TNF、MAN2A2 及 PDGFD 的微阵列数据, 尽管患者与对照组之间的相对 mRNA 表达的差异没有达到统计显著。这可能是由于个体差异及分析样本较少。虽然患者中 MAN2A2 的表达是对照组的 12.93 倍, 但大的标准误(7.4)可以解释该差异没有达到统计显著的事实。众所周知, TNF 与子宫内膜异位症的病理生理学有很强的联系。但已经显示其表达随着月经周期的阶段而变化(Hunt, J.S. et al. 1997 *J Reprod Immunol* 35:87-99), 并且证明其表达在轻微患者中比在严重患者中具有更高的水平(Pizzo, A. et al. 2002 *Gynecol Obstet Invest* 54:82-87), 这能够解释该特定基因缺乏显著性。本研究还显示, DNA 微阵列分析显示在患者样本中 PDGFD 的表达上调。这个观察结果与 Matsuzaki 等人(2004)报道的数据一起支持血小板衍生生长因子系统在此疾病中的关键作用: 他们报道了在深部子宫内膜异位损害中 PDGF 受体的表达提高, 而我们证明了其配体在子宫内膜异位症患者的血液淋巴细胞中上调。PDGFD 已经被显

示能够刺激细胞增殖及转化,并且在血管发生中起作用(Ustach, C.V. et al. 2004 *Cancer Res* **64**:1722-1729; Li, H. et al. 2003 *Oncogene* **22**:1501-1510); 因此诱导人推测 PDGF 系统的活化可以帮助促进子宫内膜细胞在异常位置的生长。

这是关于子宫内膜异位症患者的外周血淋巴细胞中差异表达基因的首次报导,可能会为该疾病的发病机理提供重要的线索。我们的分析导致基因的鉴定,考虑对这些基因与疾病的共分离,结构改变或表达谱进行进一步研究以更好地明确它们作为疾病标志物的用途。在另一个实施方案中,我们提出对基因组合的基因表达水平的分析会提高最小侵入性子宫内膜异位症检测方法的特异性和灵敏度。同样,用微阵列分析和 RT-PCR 在更大量人群中进行的确认研究被预想为通过候选基因血清蛋白水平的测量和通过子宫内膜异位样本的高密度组织微阵列分析来补足。

可以根据疾病的严重程度(如严重、中度、轻微、最小)或症状(如不育、痛经或二者均有)将本研究中分析的患者分成各种不同的临床类别;这种分析又可以反映不同的遗传类型。同样,考虑诸如月经周期阶段、合并感染及当前药物治疗等可能影响淋巴细胞基因表达模式的因素是很重要的(Willis, C. et al. 2003 *Hum Reprod* **18**:1173-1178; Dosiou, C. et al. 2004 *J Clin Endocrinol Metab* **89**:2501-2504)。由于每一类中患者数目太少,不可能比较这些类之间的差异。因此,基于现有的数据,比较子宫内膜异位症患者和对照组的表达分析只能检测所研究的所有患者类别中共同的基因表达差异。这些发现的价值在于——IL-2RG 及 LOXL1 基因表达的差异显著,而与疾病亚型、当前药物治疗或患者月经周期阶段无关。我们实验室正在进行的预期研究经特别设计以阐明目的基因的表达模式,即基因表达水平的差异是否根据月经周期阶段变化,以及是否能够将这些差异与临床表现或疾病特征(如严重疾病或轻微疾病;痛经或不育)联系起来。

总之,本研究揭示了新的子宫内膜异位症的靶遗传基因座,它们被预想作为开发非侵入的、特异的诊断测定以及这种慢性的、致虚弱的疾病的新疗法的基础。

实施例 1

研究人群

通过在整个波多黎各开业的合作妇产科诊所推举来招募研究个体(患者及对照组)。所研究的患者人群包括在手术中被妇产科专家诊断患有子宫内膜异位症的绝经前妇女,并且包括所有疾病阶段的患者:严重(11),中度(6),轻微(3),最小(1)。用于微阵列的患者样本(N=6;年龄范围 32-39 岁;平均 35.5 岁)以及用于实时 RT-PCR 确认的患者样本(N=15;年龄范围 26-39 岁;平均 31.2 岁)是从我们的核酸库中随机选取的。在取得样本的时候 21 名患者中的 13 名(62%)没有接受任何药物治疗。那些接受药物治疗的患者服用了 GnRH 激动剂(6)、口服避孕药(1)及炔萆醇(1)。对照组(N=4 对于微阵列; N=15 对于 RT-PCR)是那些为无关的妇科疾病状态(如子宫肌瘤, DUB, 绝育)而进行腹腔镜检查或剖腹手术的妇女,她们经手术证明不患有子宫内膜异位症。从一位男性志愿者得到的样本在微阵列实验中被包括在对照组中。对照组样本是完全匿名的,因此与人口统计学信息没有关联。用于微阵列和 RT-PCR 实验的来自患者和对照组的样本没有重叠。在任何实验之前,研究方案经庞塞医学院和 NHGRI-NIH 的 IRB 委员会评价和批准。所有的参与者在进入本研究之前阅读和签署了一份告知同意表。

血液样本

在得到书面的告知同意后,由研究护士使用标准的无菌方法通过静脉穿刺采集血液样本。进入实验室后,首先在 Histopaque (Sigma, St. Louis, MO)中通过在 2000 rpm 离心 40 分钟将淋巴细胞从全血中分离。用 Trizol LS 并遵循厂商的说明书(Invitrogen, Carlsbad, CA)从淋巴细胞中分离总 RNA。用 cDNA 微阵列进行的表达分析:我们用基因选择程序(见下文)分析了 6 个患病妇女和 5 个对照组的血液样本。所用的阵列有 15097 个 cDNA 克隆,用先前描述的方法制备并将它们印刷在玻璃片上(DeRisi, J. et al. 1996 *Nat Genet* 14:457-460; Shalon, D. et al. 1996 *Genome Res* 6:639-645; Mousses, S. et al. in Gene expression analysis by cDNA microarrays (通过 cDNA 微阵列的基因表达分析), in

Functional Genomics (功能基因组), F.J. Livesey and S.P. Hunt (Eds.), 2000, Oxford University Press, Oxford, pp. 113-137)。在这些克隆中, 912 个是表达序列标签, 其余 14,185 个克隆是已知的基因。按先前所述的方法进行杂交和杂交后的洗涤(Mousses, S. et al. in Gene expression analysis by cDNA microarrays (通过 cDNA 微阵列的基因表达分析), in Functional Genomics(功能基因组), F.J. Livesey and S.P. Hunt (Eds.), 2000, Oxford University Press, Oxford, pp. 113-137; Monni, O. et al. 2001 *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:5711-5716; Pollack, J.R. et al. 2002 *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:12963-12968)。简单地说, 通过使用 SuperScript 逆转录酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)的逆转录分别用 Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ)标记约 15 至 20 μ g 的来自个体的血液淋巴细胞总 RNA 和等量的标准参照物(Universal Human Reference RNA, Stratagene, La Jolla, CA)。标记的探针经过碱水解, 纯化, 用 Microcon 30 (Millipore, Billerica, CA)浓缩。在密封的增湿的腔中, 在 65°C 下在水溶液中进行杂交过夜(16-24 hr)。

cDNA 微阵列数据的统计学分析

为了鉴定在两组(患有和未患有子宫内膜异位症)中显著差异表达的基因, 使用先前描述的基因选择程序(arrayanalysis.nih.gov) (Bittner, M. et al. 2000 *Nature* **406**:536-540; Hedenfalk, I. et al. 2001 *N Engl J Med* **344**:539-548)。首先通过测量质量评价过滤基因表达数据, 并且计算 t-统计作为区别权重值。除去那些不含有有意义生物信息和多余的数据后, 我们列出了最能区别的基因(即那些权重超过 4.0, 组平均倍数改变(两组之间的平均比率差异)超过 2.0 的基因)。首先将基因表达比率进行对数转换, 然后根据它们相对于所有实验的平均表达水平的标准偏差(σ)用颜色编码, 过表达用红色(深灰)表示, 低表达用绿色(浅绿)表示(图 1)。

用实时 RT-PCR 确认基因表达数据

为了确认用 DNA 微阵列得到的基因表达数据,我们用来自另外的患者(N=15)和女性对照(N=15)的外周血淋巴细胞的总 RNA 进行了相对实时 RT-PCR。所有的实验都重复 3 次。简而言之,用 Trizol LS 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)从外周血淋巴细胞中分离总 RNA。为除去污染 DNA,用 DNase I (DNA-free, Ambion, Austin, TX)处理样本。在 PTC-200 热循环仪(MJ Research, Waltham, MA)上按照厂商说明书用 iScript cDNA 合成试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA)进行逆转录。cDNA 合成之后,用 iQ SYBR Green Super Mix 试剂盒按照厂商的推荐(Bio-Rad, Hercules, CA)用特异寡聚引物对进行 PCR 反应。PCR 扩增程序如下: 94°C/4 分钟,然后是 50 个循环的 94°C/30 秒变性,基因特异退火温度/30 秒和 72°C/40 秒延伸。在每次实验后产生熔解曲线以检验引物的特异性。用 iCycler iQ 光学系统软件 3.0a 版 (Bio-Rad, Hercules, CA)进行 PCR 扩增的实时分析。从公共数据库得到特异寡聚引物对并在新泽西医学院的分子资源设施(Molecular Resource Facility)处合成。在相对管家基因 GAPDH (Livak, K.J. 2001 *Methods* 25:402-408)进行标准化之后计算了每个样本的相对表达水平。用不成对双边 t 检验进行统计学分析以比较患者和对照组的相对 mRNA 表达水平(GraphPad InStat 3)。将统计学显著定义为 p 值 <0.05 。

实施例 2

我们完成了来自另外 14 名患者的数据分析。我们包括了原始数据(组 1)的散点图以更好地代表这些标志物的个体变化(图 3)。重要的,散点图显示 LOXL1 的低表达水平出现在迄今为止测试的所有患者中。

同样,我们包括了另一亚组 14 名患者的另外的数据(组 2),这些数据确认了最初的发现。下面的图给出所研究的第二组患者的结果总结。图 4 包括显示组 2 中每个基因的个体变化的散点图。图 5 表示组 1 (上图)和组 2 (下图)患者的平均倍数表达结果,而图 6 显示两组结果的比较。图 7 将迄今为止测试的 39 名患者的数据作图。

尽管为了清楚和理解的目的对本发明进行了某些具体的描述，本领域技术人员会理解，可以在不背离本发明的实际范围的情况下作出形式及细节上的各种改变。据此以参考的形式包括所有的图、表和附件以及上述的专利、申请及出版物。

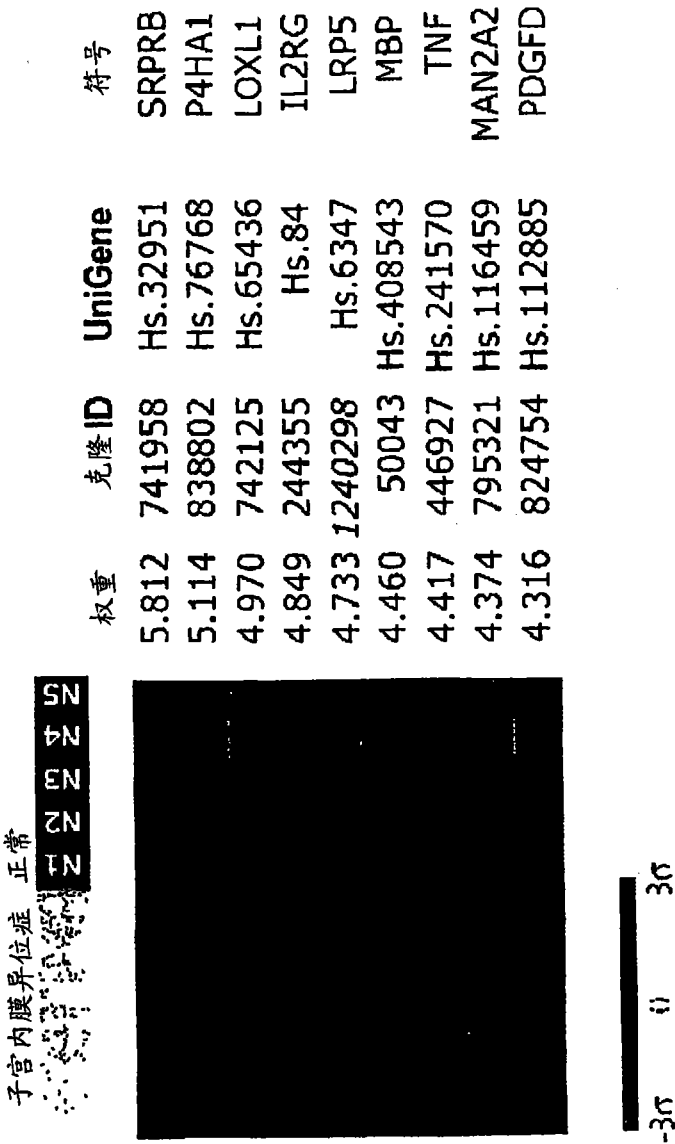


图 1

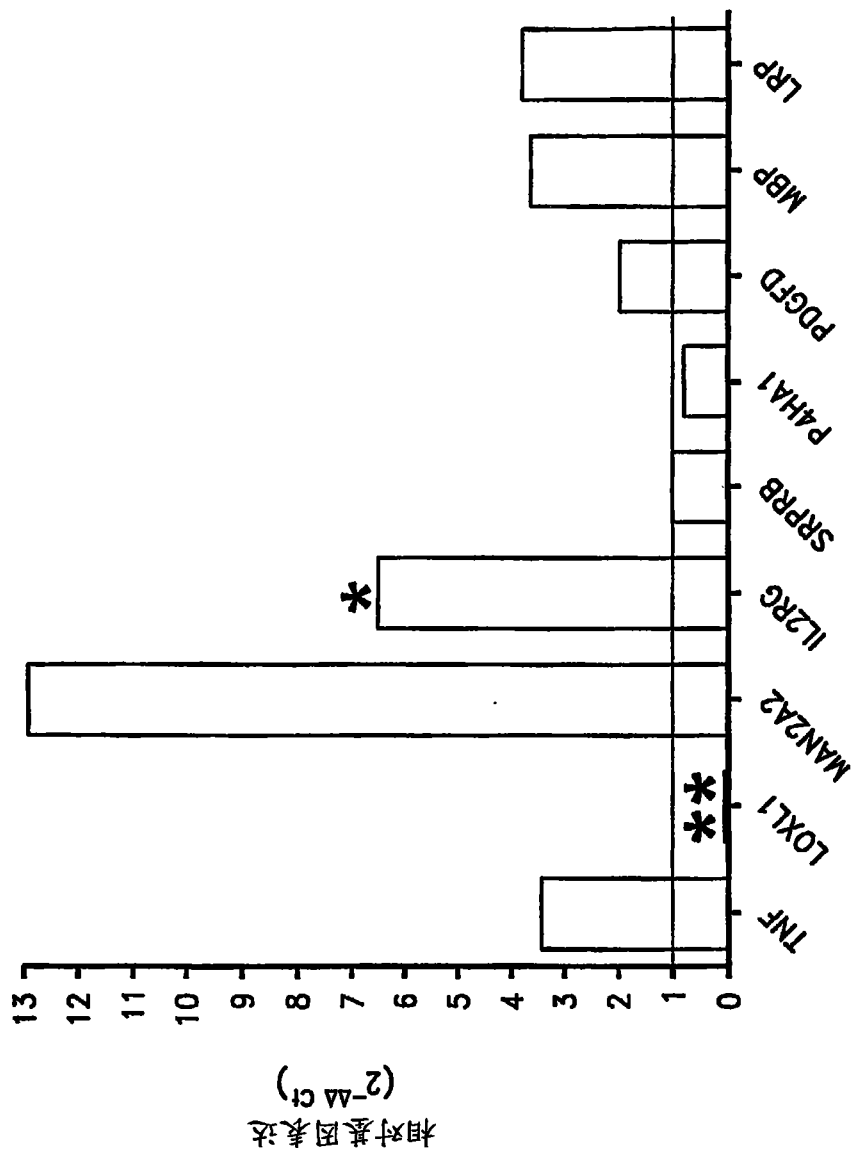


图 2

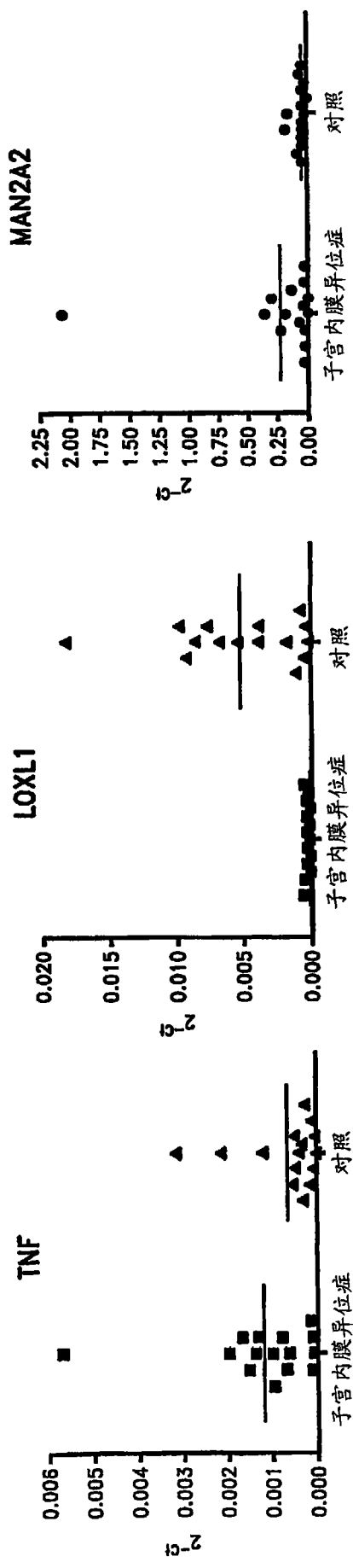


图 3A

图 3B

图 3C

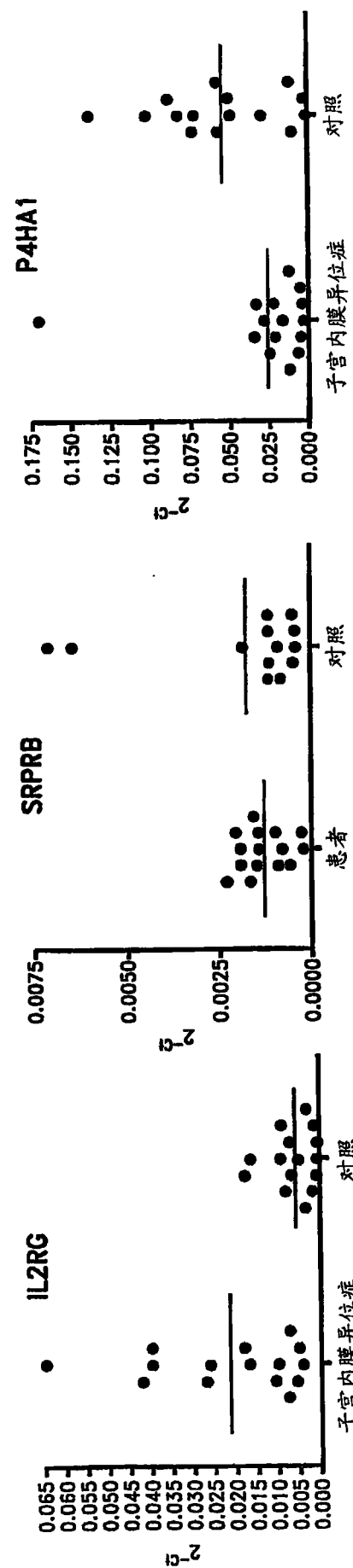


图 3D

图 3E

图 3F

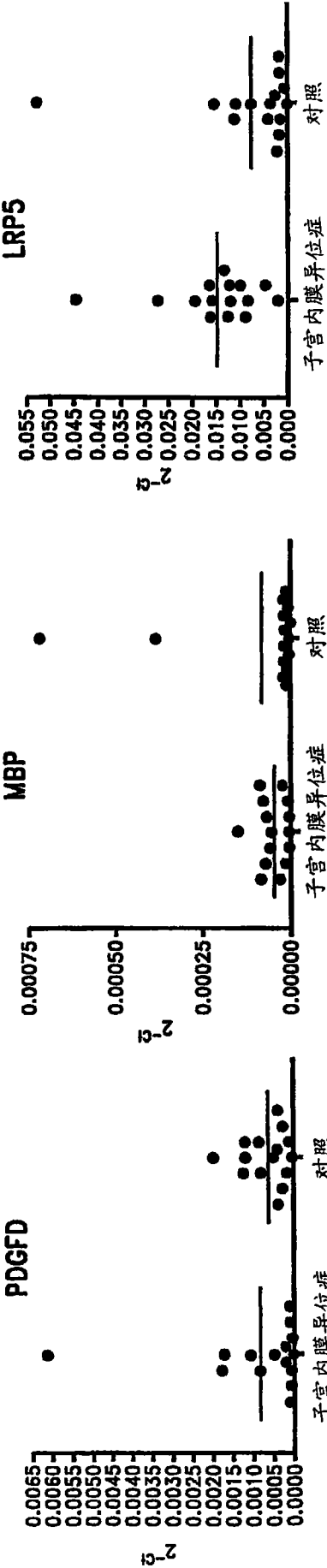


图 3G

图 3H

图 3I

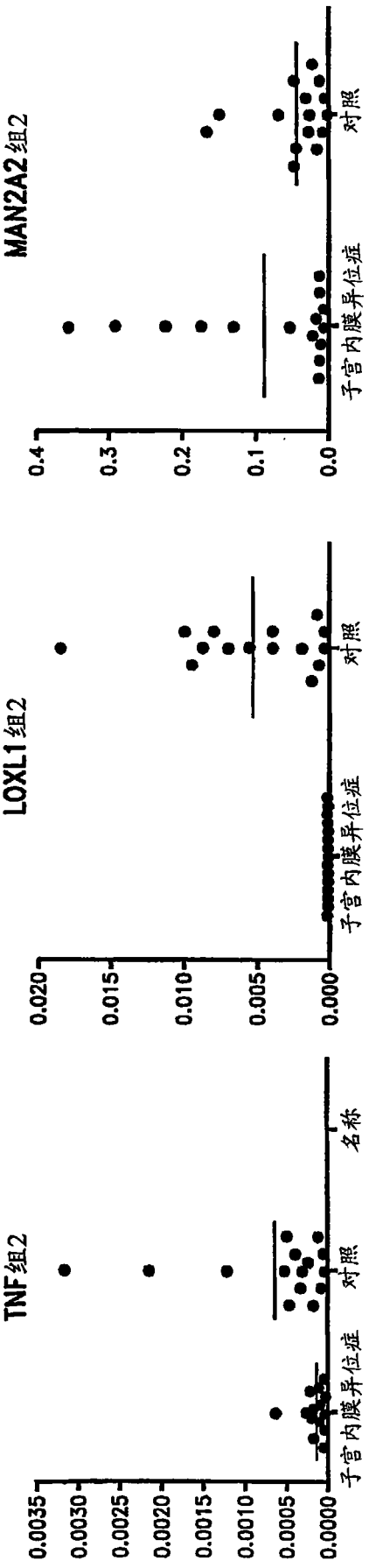


图 4A

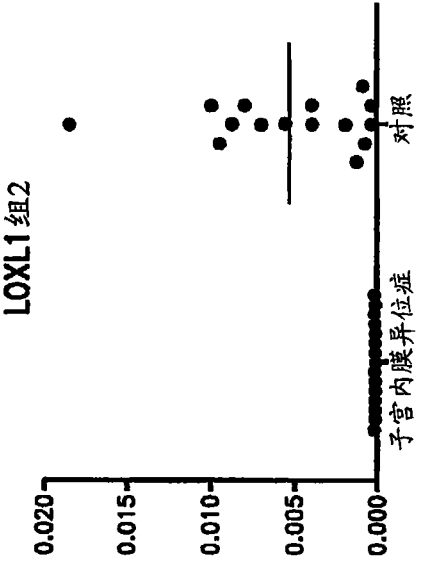


图 4B

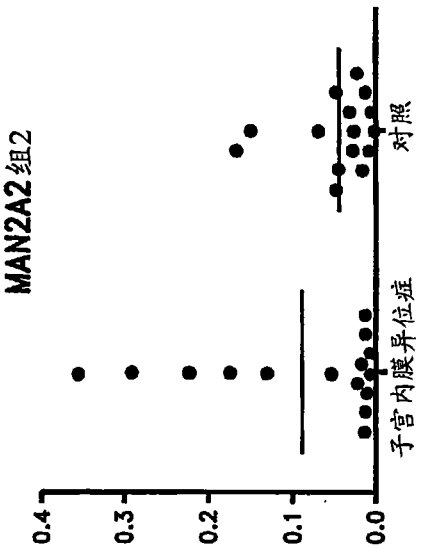


图 4C

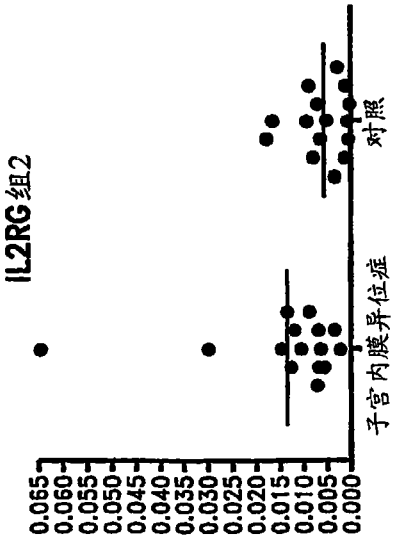


图 4D

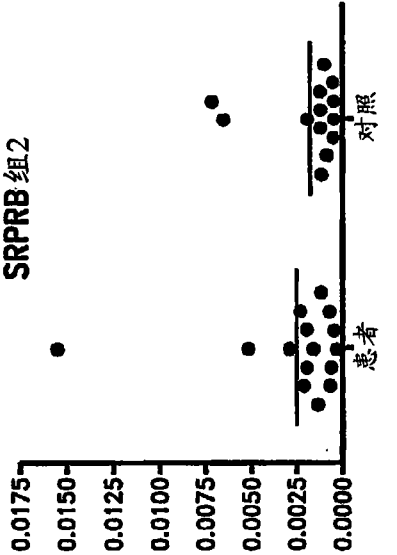


图 4E

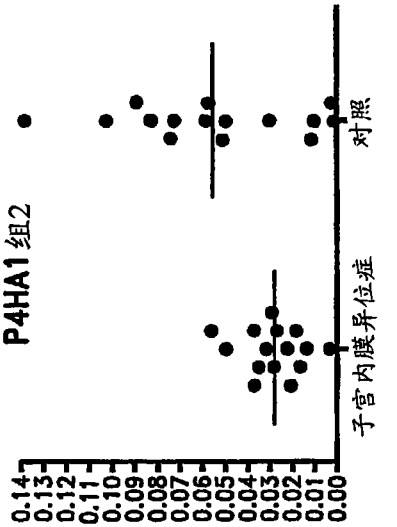


图 4F

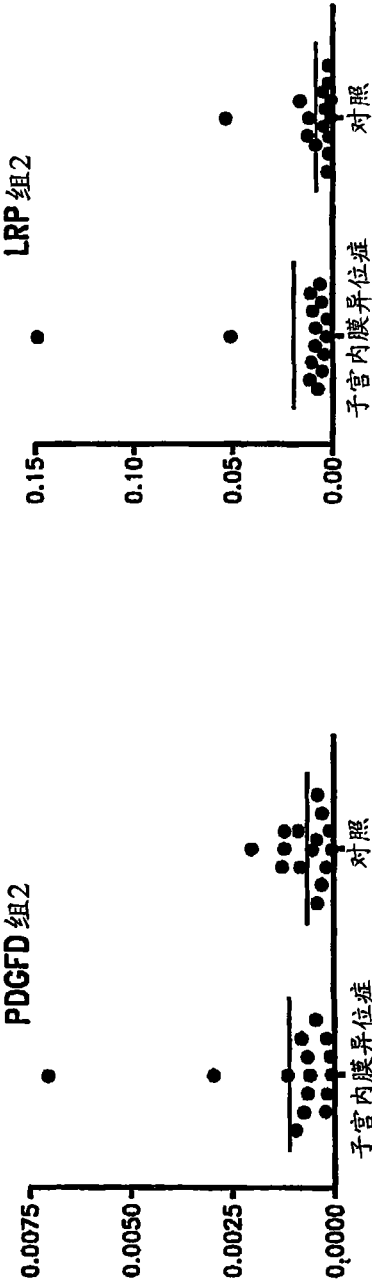
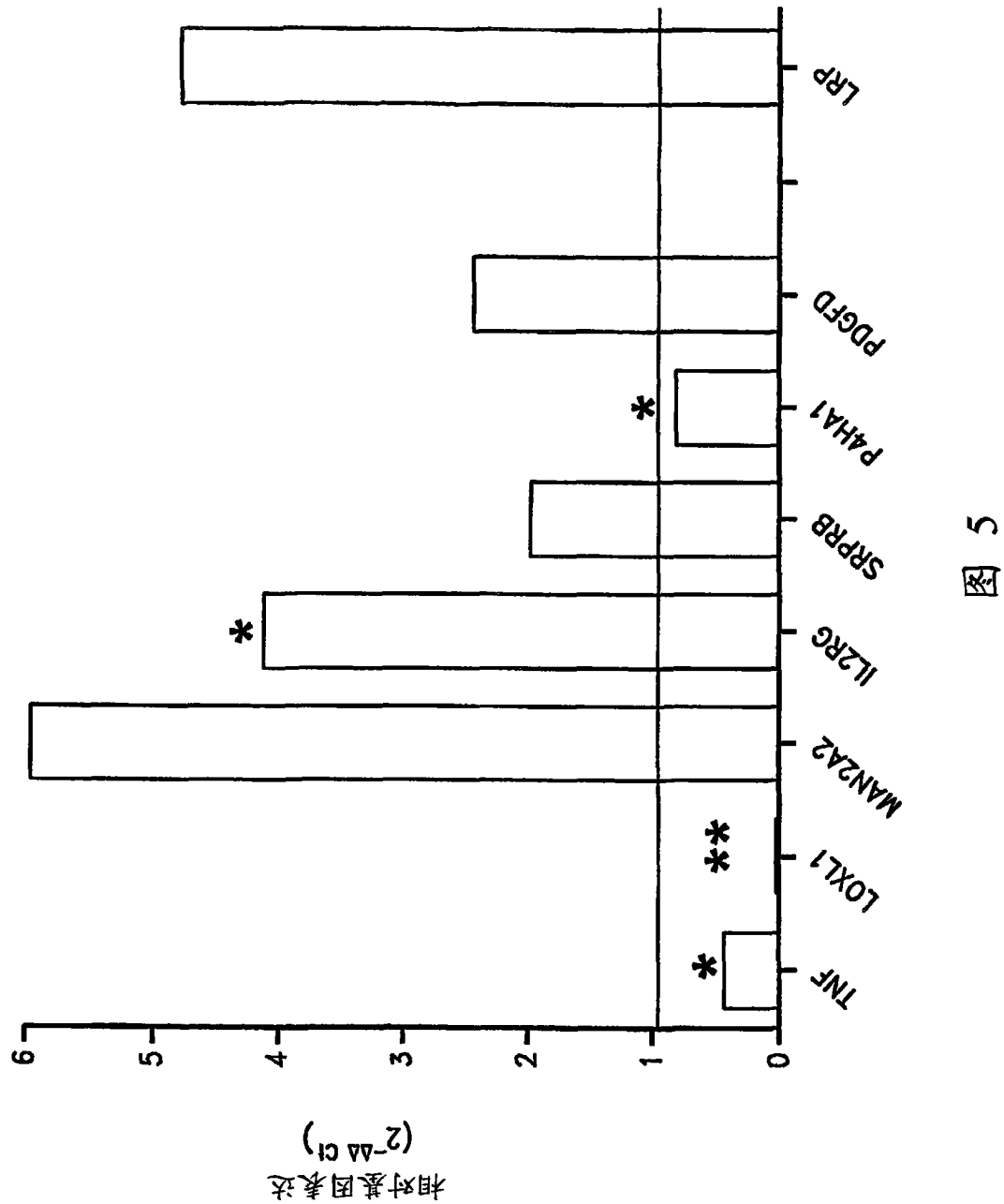


图 4G

图 4H



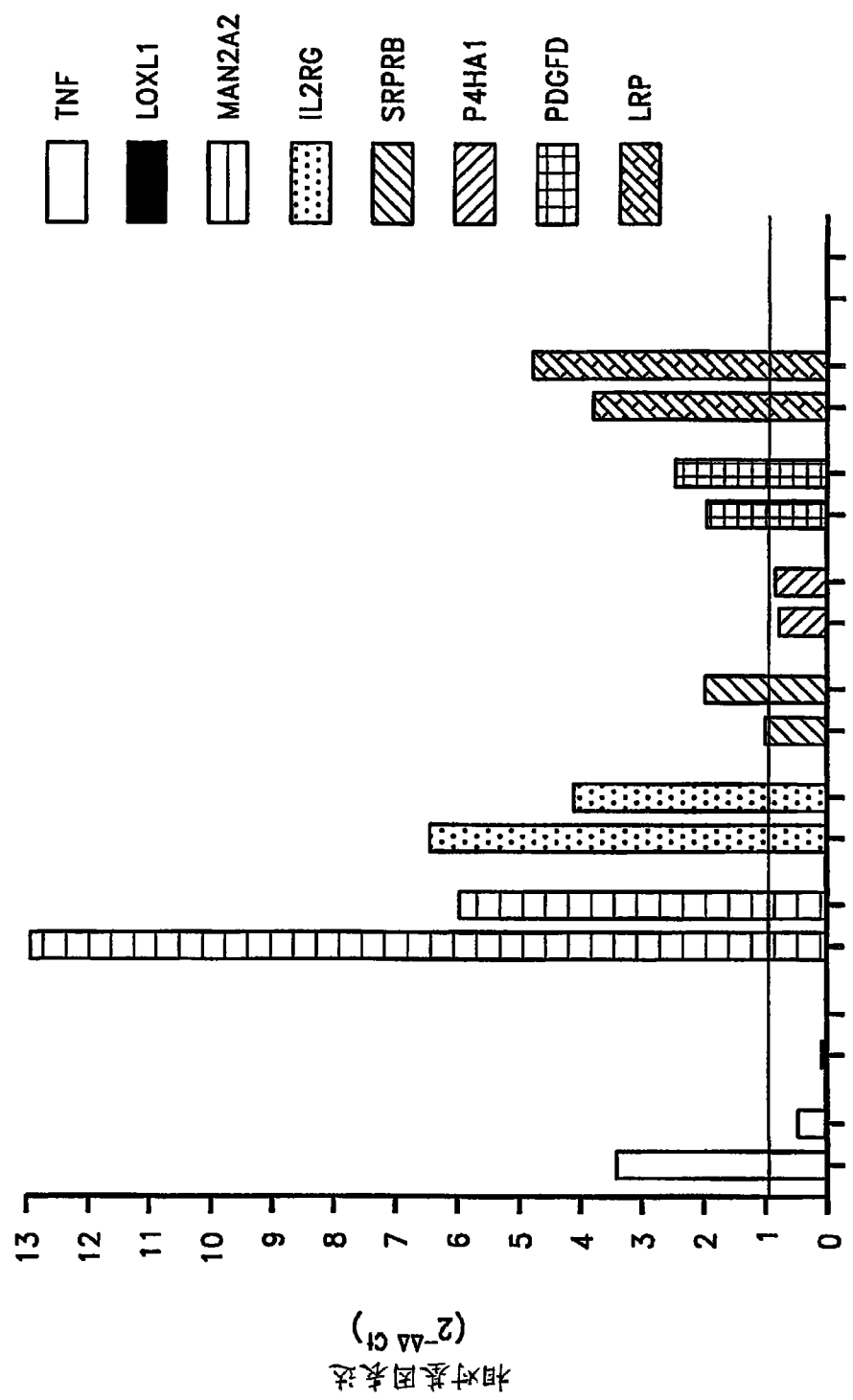


图 6

