

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12Q 1/37

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98805312.8

[43]公开日 2000 年 6 月 21 日

[11]公开号 CN 1257550A

[22]申请日 1998.3.20 [21]申请号 98805312.8

[30]优先权

[32]1997.3.20 [33]AU [31]PO5736

[86]国际申请 PCT/AU98/00189 1998.3.20

[87]国际公布 WO98/42865 英 1998.10.1

[85]进入国家阶段日期 1999.11.19

[71]申请人 默尔本大学

地址 澳大利亚维多利亚

共同申请人 普利斯·亨利医学研究院

[72]发明人 亚历山大·罗帕塔

洛伊丝·A·萨拉蒙森

迈克尔·A·奎因

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图页数 16 页

[54]发明名称 子宫内膜癌的检测

[57]摘要

本发明涉及分析是否患子宫内膜癌和/或是否存在子宫内膜癌风险的方法,该方法通过测量子宫洗液中基质金属蛋白酶-2 和/或基质金属蛋白酶-9 的水平实现。本方法可以定性或定量,并适用于大规模筛分和临床病例。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1. 检测子宫内膜癌存在和/或风险的方法，包括以下步骤：从子宫内膜癌高危受试者或怀疑患有子宫内膜癌的受试者体内获得子宫洗液样品，测量洗液中基质金属蛋白酶(MMP)的水平。
2. 按照权利要求1的方法，其中对洗液中的总明胶分解酶进行测定。
3. 按照权利要求1的方法，其中对MMP-2和/或MMP-9的活性水平进行测定。
4. 按照权利要求1或3的方法，其中用酶谱，任选地与光密度测量法结合检测MMP活性。
5. 按照权利要求1或2的方法，其中总酶水平通过ELISA、荧光分析法、化学发光分析法、或放射免疫分析法测定。
6. 按照权利要求5的方法，其中MMP水平通过ELISA或化学发光分析法测定。
7. 按照权利要求6的方法，其中MMP水平通过ELISA测定。
8. 按照权利要求1-7任意之一的方法，其中还测定金属蛋白酶的组织抑制剂的水平。
9. 按照权利要求1-8任意之一的方法，其中在获取子宫洗液同时收集子宫内膜表面细胞样品，子宫内膜细胞用于细胞学检查，以便确定倍性和核的形态测定，而MMP的水平与DNA倍性相关在存在子宫内膜癌时其作为子宫内膜癌预后的指标。
10. 评价子宫内膜癌预后的方法，包括以下步骤：测量接受子宫内膜癌手术的患者实施手术前得到的子宫洗液中的MMP活性；从所述患者体内获得子宫内膜细胞样品；获得子宫内膜肿瘤样品和附近正常的子宫内膜样品，用于组织学检查；联系MMP活性、DNA倍性和肿瘤的级别和类型，作为预后的指标。
11. 检测因原发性子宫内膜癌接受保守性治疗的患者子宫内膜癌复发的方法，包括以下步骤：从患者体内获取子宫洗液样品；测定洗液中的MMP水平。
12. 监测子宫内膜癌推测治疗效果的方法，包括以下步骤：从患者体内获取子宫洗液样品；测定洗液中的MMP水平，由此检测是否子宫内膜癌已复发。

13. 按照权利要求 11 或 12 的方法，其中对子宫洗液中总明胶水解活性进行测定。

14. 按照权利要求 11 或 12 的方法，其中对 MMP-2 和/或 MMP-9 的活性水平进行测定。

5 15. 按照权利要求 11 或 12 的方法，其中通过酶谱，任选地与光密度测量法结合检测 MMP 活性。

16. 按照权利要求 11 或 12 的方法，其中用 ELISA、荧光分析法、化学发光分析法、或放射免疫分析法测定酶水平。

10 17. 按照权利要求 16 的方法，其中用 ELISA 或化学发光分析法测定 MMP 水平。

18. 按照权利要求 17 的方法，其中用 ELISA 测定 MMP 水平。

19. 按照权利要求 14 的方法，其中通过定量光密度计量酶谱或 ELISA 测定 MMP-2 和 MMP-9 的水平。

20. 检测子宫内膜癌存在和/或风险的试剂盒，包括：

15 (a) 冲洗子宫腔的合适溶液，
(b) 输送、回收和收集子宫洗液的装置。

21. 按照权利要求 20 的试剂盒，进一步含有：

(c) 测定所述洗液中 MMP 水平的试剂。

22. 按照权利要求 20 或 21 的试剂盒，进一步含有一个或多个：

20 (d) 获取子宫内膜上皮细胞样品的装置，
(e) 一个或多个显微镜载玻片，
(f) 装有组织固定液的容器。

23. 按照权利要求 20 到 22 任意之一的试剂盒，包括：

25 (a) 用于冲洗子宫腔的无菌生理可接受溶液，
(b) 无菌注射器，
(c) 无菌输液管或导液管，
(d) 用于装子宫洗液的容器，以及任选地
(e) 子宫刷，和/或
(f) 一个或多个显微镜载玻片。

30 24. 按照权利要求 23 的试剂盒，另外还包括装有组织固定液的容器。

25. 按照权利要求 23 或 24 的试剂盒，其中固定液是 4% 的多聚甲醛。

说明书

子宫内膜癌的检测

本发明涉及癌症的检测方法，尤其是子宫内膜癌的检测方法。本发明的方法适用于大规模筛分，例如在子宫内膜癌风险不断增加的妇女中进行筛分。

发明背景

目前已经很清楚地知道在一些恶性肿瘤中，肿瘤的侵占性和肿瘤细胞蛋白酶表达之间具有很高的相关性。例如，最近七年中，已经积累了令人信服的证据表明，肿瘤侵染和转移过程与基质金属蛋白酶家族的成员直接相关。

临床医生长期以来一直认为需要研制一种客观标准用于癌症的早期检测，以及当治疗患有恶性肿瘤的病人时，用于评价预后因素。通常判断子宫内膜癌的阶段、侵入子宫肌层的深度、肿瘤的组织学级别和类型以及侵入淋巴管空间的程度对于疾病的侵占性具有某种程度的预测价值。然而，这些因素均不精确，它们均依赖主观判断。例如，通过组织学检查确定肿瘤的类型和级别时，曾报道这种评价在不同病理学家之间可能导致不同数值的几率高达 85%(Baak 和 Oort, 1991)。因此目前没有预测个体病人预后的方法。

越来越清楚地了解到子宫内膜癌进程的准确预测，和各种类型治疗后生存的可能性，也都依赖恶性肿瘤细胞的本质特征和它们与宿主的相互作用(Baak, 1991)。因此该领域的主要研究目标就在于发现恶性肿瘤细胞的生物学特征，从而确定肿瘤的侵染和转移潜力。

从其它类型癌症的研究中可以知道，涉及肿瘤细胞生物学，例如 DNA 倍性(Iversen, 1986; van der Putten 等, 1989; Berchuck 等, 1992; Podratz 等, 1993; Lukes 等, 1994)、介导细胞-细胞粘附的 E-钙粘蛋白的表达(Sakuragi 等, 1994)、以及涉及细胞侵入的基质金属蛋白酶(MMP)的分泌(Liotta 等, 1986; Stetler-Sevenson 等, 1993)均能够通过提供涉及肿瘤细胞行为的可重现的客观测量方法，提高预后评价和生存预测的准确性。已经表明细胞中 DNA 含量(倍性)的改变与卵巢、乳房、结肠、肺、前列腺癌(Seckinger 等, 1989)的生物学行为，以及子宫恶性肿瘤的生物学行为有关(Moberger 等, 1985; van der Putten 等, 1989)。通常，具有正常二倍体 DNA 的癌细胞比具有异常、非整倍体或多倍体

DNA 的癌细胞的预后更好。因此,确定子宫内膜癌和其它癌症中 DNA 的倍性,成为评价与疾病再发生有关的预后和生存可能性的有力工具,而且也是比分子或基因标识更有效的预测方式(Lukes 等, 1994)。

目前已经了解到在一些恶性肿瘤中,肿瘤的侵占性和肿瘤组织中蛋白酶的表达之间具有很高的相关性。例如,最近七年中,不断积累的令人信服的证据表明肿瘤侵染和转移过程与基质金属蛋白酶(MMP)家族成员和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP)直接有关(Stetler-Stevenson 等综述, 1993)。曾有报道检测生物体液中的 MMP,特别是检测 MMP 与 TIMP 的复合物,可以用于测定转移性癌(美国专利 No 5324634, Zucker)这些酶在生理组织再造(月经)和侵入(胚培植)过程中也可以由正常细胞合成和分泌(Salamonsen, 1995, 1996)。MMP 可以以完全活化型或者以酶活性得以表现之前需要激活的潜伏型存在于组织中。

最近我们已经证明在长尾猴卵巢周期和怀孕早期, MMP 释放到子宫腔中(我们尚未公开的结果)。而且,曾报道在一些肿瘤细胞中发现这些酶过量表达,例如,结肠直肠和鳞状细胞癌中的这类酶。

最近,论证卵巢癌细胞,而非正常卵巢上皮细胞,超水平分泌类似于 MMP-2 和 MMP-9 的基质金属蛋白酶,该酶直接降解基底膜蛋白质(Moser 等, 1994; Salamonsen, 1996)。这种蛋白质水解能力与子宫恶性肿瘤的侵入潜力有关。而且,应用单克隆抗体的免疫组织化学已经用于将 MMP-2 定位于各种瘤细胞(包括子宫内膜癌)的细胞质和原生质膜,同时 TIMP-2 主要定位于这些组织的基质(Hoyhtya 等, 1994)。除此之外,关于 MMP 和 TIMP 在子宫内膜癌中的表达知道的很少。这类信息对于研究控制子宫内膜癌和其它类型恶性肿瘤的生物学行为的方法是至关重要的。

现在我们出乎意料地发现,从子宫内膜癌患者的子宫洗液中可以检测到基质金属蛋白酶,但对照妇女的子宫洗液没有检测到。这一发现可能实现以最小的侵入进行灵敏的诊断试验,以及可以用于筛分风险人群或普通人群的筛查试验,或者用于推测治疗(putative treatment)的临床试验。该试验也适用于监测治疗效能和检测癌的复发。

发明概述

本发明一方面提供一种分析子宫内膜癌存在和/或风险的方法,包括以下步骤:从子宫内膜癌的高风险受试者或怀疑患子宫内膜癌的受试者体内获取子

宫洗液样品；测定洗液中基质金属蛋白酶(MMP)的水平。

为了本说明书的目的，“子宫内膜癌的检测”这种表示方法应当广义地理解，它包括对癌症可能存在还是不存在的检测，或者对癌前期状态下的细胞或癌症发展早期时的细胞的检测。因此本发明不仅包括活化子宫内膜癌的检测，还包括发展成为该活化癌的风险的检测。

可以使用任何合适的溶液输入子宫腔，然后回收和收集该溶液，得到子宫洗液，用于检测。上述合适的溶液对本领域技术人员是显而易见的，包括任何不干扰 MMP 检测的无菌无毒溶液。合适溶液的一个例子是无菌盐水。输送和回收洗液可以使用任何方法，作为例子常规使用注射器和导管。洗液可以以回收的方式收集，或者转移到另一个容器中。输送、回收和收集的方法通常选择对病人和临床医生都能提供舒适和方便的方法。

本发明的方法中可以使用任何合适的方法测定洗液中的 MMP 水平。例如，合适的方法包括基于测定酶活性的方法、和/或基于测定酶的存在或存在水平的方法。可以测定总 MMP，包括潜伏的、活化的、和 TIMP-结合的 MMP。本领域技术人员将很容易就能够确定一种方法是否合适，如果必要可以使用阳性和阴性对照样品。例如，明胶酶谱分析法适用于检测 MMP-2 和 MMP-9 的所有形式。任选地，酶谱分析法可以与光密度分析法联合，以便提供各种酶类型和形式(即潜伏或活化)酶的半-定量评价方法。也可以用基于底物的活性分析法分析活化酶。

可以测量子宫洗液存在的总明胶分解活性；虽然这种方法不能分辨存在的 MMP 的不同类型，但它的确提供了一种快速评价总 MMP 活性的方法。然而，优选测定 MMP-2 和/或 MMP-9 的活性水平。

或者，可以用例如 ELISA、荧光分析法、化学发光分析法、或放射免疫分析法测定总酶水平。特别优选 ELISA 或化学发光分析法，因为它们快速、灵敏、专属性强，并且在用于大规模分析时容易自动化。这些方法也可以进行定量测定。Barrett(1995)详细描述了很多测定这类酶的适当方法。

任选地，也可以测定洗液中的组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP)的水平，例如通过反相酶谱分析法或 ELISA。

在本发明的另外一个实施方案中，在获取子宫洗液的同时，还收集了子宫内膜表层细胞样品，例如，将一个子宫刷插入子宫腔，子宫内膜细胞用于细胞

学检查，确定倍性和细胞核形态测量，上述确定的 MMP 水平与 DNA 倍性相关，当存在子宫内膜癌时，将它作为子宫内膜癌预后的一个指标。

可以使用标准图象细胞记数法和自动设备确定倍性和细胞核形态。

第二方面，本发明提供了一种评价子宫内膜癌预后的方法，包括以下步骤：对接受子宫内膜癌手术的病人进行手术前，获取子宫洗液测定其中的 MMP 活性；获取所述病人的子宫内膜细胞样品；获取肿瘤细胞样品和临近的正常子宫内膜样品，进行组织学检查；关联 MMP 活性、DNA 倍性和肿瘤级别和类型，作为预后的指标。

如果因为某种原因，不能手术切除子宫，子宫内膜癌的初步治疗方法可以使用放疗、化疗、子宫内膜部分切除(例如，使用光动态疗法、或刮除术，而不是子宫切除术)的保守疗法；某些情况下，刮除术与其它方法联合使用。对接受上述保守治疗的病人进行癌症复发的追踪和检测特别重要。

第三方面，本发明提供了一种监测子宫内膜癌治疗效能的方法，包括以下步骤：从接受这种治疗的病人体内获取子宫洗液样品；测定洗液中的 MMP 水平。这种方法也适用于监测推测治疗的效能。

第四方面，本发明提供了一种对接受保守治疗的原发子宫内膜癌患者检测其子宫内膜癌复发的方法。包括以下步骤：从上述患者体内获取子宫洗液样品；测定洗液中的 MMP 水平。

优选使用上述定量光密度酶谱分析法或 ELISA 测定 MMP-2 和 MMP-9 的活性。

本发明的方法适用于筛分无症状或健康妇女，或者风险人群，例如糖尿病妇女或接受绝经期后激素替代治疗的妇女。

第五方面，本发明提供了一种试剂盒，用于分析子宫内膜癌的存在和/或风险，含有：

(a) 一种冲洗子宫腔的合适溶液，和

(b) 输送、回收和收集子宫洗液的装置，

优选的试剂盒还包括：

(c) 测定所述洗液中 MMP 水平的试剂，

试剂盒还可以进一步任选包括一种或多种：

(d) 获取子宫内膜上皮细胞样品的装置，

(e) 一个或多个显微镜载玻片，

(f) 装有组织固定剂的容器。

在一个优选实施方案中，试剂盒含有：

(a) 冲洗子宫腔的无菌生理可接受溶液，

(b) 无菌注射器，

(c) 无菌输液管或导液管，

(d) 装子宫洗液的容器，和任选地

(e) 子宫刷，和/或

(f) 一个或多个显微镜载玻片。

另外，试剂盒还优选含有一个装有组织固定液的容器；更优选固定液是4%的多聚甲醛。

为了本说明书的目的，应当清楚地理解“包含”这个词意味着“包括但不限于”，并应理解“含有”也具有相应的意思。

附图简述

图1表示子宫内膜癌患者的子宫洗液样品进行连续稀释后的酶谱结果。

图2比较了子宫内膜癌患者的一系列子宫洗液样品得到的结果，其中在特异性MMP活性抑制剂缺乏(凝胶的左半边)或存在(凝胶的右半边)情况下进行酶谱分析。

图3比较了子宫内膜癌患者的子宫洗液样品(图3a)和对照受试者样品(图3b)得到的酶谱结果。对照样品以四倍于癌症患者样品的浓度装载。

图4比较了子宫内膜癌患者子宫洗液样品(第3道)和各种对照受试者样品的酶谱结果。第5道和第7道，第6道和第8道分别来自同样的受试者；然而第7道和第8道的样品浓度是第5道和第6道样品浓度的四倍。

图5和图6各自表示来自子宫内膜癌患者的一系列不同样品，以同样的浓度跑凝胶，以便在各样品间进行直接比较。

图7表示MMP-9的ELISA分析结果，所示为微滴培养板各孔的光密度。

图8显示了代表微滴培养板中颜色反应的灰度。

发明详述

患者

下面将以仅参考下列非限制性实施例和附图的方式详细描述本发明。

研究组包括几乎所有在皇家妇女医院接受外科治疗的子宫内膜癌患者(表 1)。

对照组包括因为其它疾病接受外科治疗或诊断的妇女,并且她们同意接受子宫冲洗。

为了更迅速地积累研究人群的数目,在 Mercy 医院接受子宫癌治疗的患者也包括在内。

第一组研究人群包括正在接受子宫出血调查的绝经期后期和绝经期前后的妇女。对这些患者进行诊断性子宫镜检以及进行子宫扩张术和刮除术之前,先进行子宫腔的真空冲洗。

第二组研究人群包括正在接受子宫内膜癌手术治疗的妇女。该组中,开始手术的时候首先冲洗子宫腔。

第三组人群包括无症状妇女,她们于上述研究组在同样的年龄范围内,她们作为对照将接受子宫冲洗和子宫内膜上皮的细胞学检查。

对所有癌症患者收集下列样品用于进行下文描述的研究:

(1) 子宫洗液的无细胞上清液,用于通过酶谱分析其中的分泌酶(MMP)和其抑制物(TIMF)。目前为止已经利用明胶酶谱(表 1)、ELISA、和免疫印记对 MMP-2 和 MMP-9 进行了检查。我们用酪蛋白酶谱进行的 MMP-1 和 MMP-3 的测定表明这些酶不分泌到子宫中,或者分泌水平非常低。

(2) 用于测定 DNA 倍性的子宫内膜细胞:每个病人的这种细胞得自于子宫洗液的细胞沉淀;子宫刷获取到的子宫内膜上皮细胞;和恶性肿瘤或显微镜载玻片的接触印痕。每种方式制得的细胞都用于倍性分析,应用上述三种方式得出一致的结果。倍性测定已有报道,其中提供了评价癌症患者预后的客观和可重现的参数。

(3) 肿瘤块和附近正常子宫内膜在 Carnoy 固定液和多聚甲醛中固定。利用免疫组织化学法研究这些组织的组织切片是否存在 MMP,利用原位杂交研究这些酶(MMP)和其抑制物的基因转录。也对部分病人的肿瘤和附近正常组织的样品进行冷冻,用于后续深入研究,例如,对组织中的 MMP 进行直接分析。

子宫液和子宫细胞的收集

装有 5 ml 盐水的注射器与输液管连接。输液管通过子宫颈插入子宫,冲洗子宫腔,收集回注射器的液体转移到一支试验管中。另将一个子宫刷插入子

宫腔，收集子宫内膜表层细胞用于细胞学分析。

子宫液以 3000 rpm 离心 10 分钟。收集上清液部分，并于 -80 °C 贮藏用于后续 MMP/TIMP 分析。子宫内膜细胞沉淀和使用子宫刷得到的子宫内膜细胞样品在 2% 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(AAS)涂布的载玻片上制片。在 4% 多聚甲醛中固定这些细胞载玻片，然后用 Feulgen 染色，利用成像细胞记数法评价 DNA 倍性。

子宫内容物的处理

对于癌症和对照研究组，立即以 3000 rpm 离心子宫洗液 10 分钟，以沉淀细胞，然后冷冻上清液用于后续 MMP 和 TIMP 研究。用下述的成像细胞记数法测定两组细胞沉淀的 DNA 倍性。对接受子宫内膜癌手术切除的患者，制备下列样品。在打开切除的子宫后，至少接触肿瘤表面两次获取样品，用与细胞沉淀同样的方法进行 DNA 倍性测定。另外，在处理剩余的子宫进行组织病理学检查之前，首先切下恶性肿瘤组织样品，特别是侵入区的恶性肿瘤组织样品，以及与正常子宫内膜组织相邻的肿瘤组织样品，用于免疫组织化学和原位杂交研究。后者包括侵入子宫肌层深度的评价，以及肿瘤级别和类型的评价。另外还确定有否淋巴结和附件转移。

DNA 倍性研究

将从子宫洗液中得到的脱落的上皮细胞沉淀分散、用培养基清洗、重悬浮，然后用 60 μ m 的尼龙网滤器过滤。通过细胞旋转离心分离作用将细胞悬浮液固定到聚赖氨酸涂布的载玻片上。一种装备了计算机的光学成像分析系统用于对这些制片和子宫肿瘤的接触印痕片进行定量 Feulgen DNA 染色。该设备用已知 DNA 量的细胞(鼠肝细胞)校准，该已知 DNA 量的细胞与试验样品一起分别在载玻片的一端染色。选择分析 200-300 个细胞。分别扫描每一个细胞核，制备每个细胞中 DNA 含量的直方图，在这些直方图的基础上，根据主峰和次级峰的定位，确定 DNA 倍性(二倍体 DNA 的指数 1.0 ± 0.1)。

子宫洗液中 MMP 和 TIMP 的分析

通过明胶酶谱(MMP-2 、 MMP-9)或酪蛋白酶谱(MMP-1 、 MMP-3 、 MMP-7)分析子宫洗液中的酶活性。样品在含明胶或酪蛋白(各 1 mg/ml)的 10% 丙烯酰胺凝胶上，在非还原条件下，进行 SDS-PAGE 。凝胶在含 50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl₂, NaN₃, 0.02% (w/v; pH 7.5)和 1% Triton X-100 的缓冲

液中冲洗后，在无 Triton 的同样缓冲液中 37 °C 保温 2-24 小时，然后用考马斯亮蓝染色。明胶酶或酪蛋白酶的活性通过凝胶的阴性染色显示出来。潜伏 MMP 和活化 MMP 都可以通过这种方法检测出来，因为 SDS 可以激活潜伏 MMP。保温期间(5 mmol/L EDTA 和 2.5 mmol/L 对-菲咯啉)，可以将 MMP 抑制物加入适当的地方。定量检测时，为了补偿个体间子宫洗液中蛋白质含量的较大差异，装载的体积应当与子宫洗液的总体积相关，由此可以评价每个个体子宫内腔中 MMP 的相对浓度。利用适应凝胶描记要求的 HP 桌面扫描仪，应用 Deskscan 软件和 NIH 成像程序 1.54 版，对上述凝胶进行光密度分析，所述分析是通过测量目标酶或者个体样品由泳道图谱描记出来的峰下面积进行的。在一块凝胶上或一套凝胶上平行进样和电泳，进行定量比较研究。每块凝胶至少含有两种稀释度的标准品，每套凝胶含四种稀释度的上述标准品。目标酶活性非常高的泳道，进一步稀释样品重新电泳。作为定量技术的酶谱的应用已有报道(Kleiner 和 Stetler-Stevenson, 1994, 其中列出了参考文献)。该技术非常灵敏，检测限比例如 ELISA(检测限为每种样品 ng 范围)等方法低很多，对于 MMP-2 和 MMP-9 其检测限均为每种样品 2 pg 的数量级(1nM)。

明胶酶活性分析

该分析涉及样品与 ^{14}C -标记的胶原底物共同保温。底物从荷兰猪的皮肤中获取出来，然后透析、用 ^{14}C 标记，使用之前，60 °C 加热 20 分钟变性，从而转化成为可以被 MMP-2 和 MMP-9 消化的 ^{14}C -明胶的形式。

通过底物与 100 $\mu\text{g/ml}$ 的胰蛋白酶共同保温，测定总明胶分解活性。样品或者不经处理，或者预先与氨基苯酚乙酸汞保温，以便激活潜伏的 MMP。分析样品在 37 °C 保温 4-24 小时，加入 30%三氯乙酸/1%鞣酸停止反应。所有未消化的底物形成沉淀。通过对消化的并释放到上清液中的标记底物的量进行记数测定所有的酶活性。通过这种分析系统，计算各样品的特异性活性成为可能；一单位的活性定义为在 37 °C 每分钟能够降解 1 μg 底物的酶量。该分析方法不仅对定义样品中已经激活的酶活性有用，而且对定义潜伏酶激活后具有的潜在活性有用；在生理学领域，它代表样品中的酶降解胞外基质成分的速度。该分析方法仅测量总明胶酶活性；它不能分辨明胶酶例如 MMP-2 和 MMP-9 活性之间的差异。特异性 MMP 可以由酶谱分辨出来。

免疫组织化学和原位杂交

分析 MMP 和 TIMP 的专属试剂和方法已有文献描述(例如, Rawdanowicz 等, 1994 ; Jeziorska 等, 1996 ; Salamonsen 和 Woolley,1996)。目前, 抗血清已有商业提供(例如 Biogenesis Ltd, U.K., Triple Point Biologics, Oregon U.S.A., The Binding Site, U.K.), 纯化酶和 TIMP 也有提供(Calbiochem, Cambridge MA, U.S.A.)。已经克隆了所有相关基因, 公开了其序列, 并是公众可得到的。

利用上述抗血清和碱式磷酸酶/抗-碱式磷酸酶(APAAP)检测系统(Serotec)(Salamonsen 等, 1991 ; Salamonsen 等, 1993 ; Rawdanowicz 等, 1994)对 Carnoy's 固定的或多聚甲醛、蜡包封的组织进行免疫组织化学分析。多聚甲醛固定通常更为常规, 能够使小样品得出较好的结果。原位杂交使用异羟洋地黄毒苷-标记的 DNA 或 RNA 探针。

实施例 1 MMP 释放到接受子宫内膜癌研究的患者的子宫腔中

对从 52 位子宫内膜癌患者和 40 位接受子宫出血或其它妇科疾病诊断程序的对照病人中得到的样品, 用酶谱检查其中的 MMP-2 和 MMP-9, 并用图象细胞记数检查子宫内膜表层细胞的 DNA 倍性。对于发现患有子宫内膜癌的患者, 评价其恶性肿瘤的级别。MMP-2 和 MMP-9 进一步分为下列假设的分析类型: 潜伏 MMP-2、活化 MMP-2、二聚体 MMP-9、糖基化前 MMP-9 和活化 MMP-9。潜伏和活化 MMP-2 和 MMP-9 的鉴别按照后面实施例的描述, 随后确定。

结果在表 1 和表 2 中概述。另外, 用酪蛋白酶谱对 MMP-1、MMP-3 和 MMP-7 进行了测定, 但无论是对照中还是子宫内膜癌患者的子宫洗液都没有发现可以检测到的水平。

表 1 概述了从各种级别的子宫内膜癌患者得出的酶谱结果, 与改组其它临床和病理指标的关系。明胶酶酶谱分为两种分子形式的 MMP-2 和三种分子形式的 MMP-9。到目前为止, 在子宫内膜癌患者的子宫洗液中发现可检测到的最弱的明胶裂解活性是代号为 J.O. 的患者体内的一种形式的 MMP-2(赋予+)和两种形式的 MMP-9(均赋予+)。如果三个加号的总数, 即所有 MMP 部分水平总和的积分, 作为诊断子宫内膜癌阳性所需要的最低水平, 表 2 所列出的对照中, 没有一个可以诊断为假阳性。到目前为止, 子宫内膜癌组也没有遇到假阴性结果(缺乏所有的 MMP 活性)。对于个体癌症患者的子宫洗液, 观察到明胶裂解活性水平在 3-22 个加号之间。

表 1：子宫内膜癌患者各参数比较的最新结果摘要

患者姓名	年龄	级别	DNA 倍性状况	恶性级别	淋巴结	血管侵入状况	子宫肌层侵入深度	潜伏	MMP 表现型*			
									活化 MMP-2	推测的二聚体 MMP-9	前 MMP-9	活化 MMP-9
B.F.	58	1	多倍体	0.93	无	无	>1/3(通常 2mm)	++	++	+++	++++	++++
M.R.	50	1	二倍体	0.34	无	有	表层(5/27)	+++	+	++++	++++	++++
S.H.	57	1	二倍体	0.03	无	有	<1/3	+	-	+	+++	+
B.M.	59	1	二倍体	0.26	无	无	表层(1/10)	++	+	++++	+++++	+++
W.B.	72	1	多倍体	1.39	无	无	距浆膜 2.8mm	+++++	+++	++++	+++++	+++
V.Q.	58	1	二倍体	0.17	无	有	表层	++++	+++	+++	++++	+
A.K.	58	1	二倍体	0.48	无	有	7/8	+++	++	+	++++	+
C.H.	54	1	二倍体	0.16	无	无	4/13(内侧第三层)	++	+	++++	++++	+++
J.E.	62	1	二倍体	0.29	无	无	5/15	+	+	++	+++	+
A.K.	65	1	二倍体	0.13	无	无	内侧一半	+++	+	+++	+++++	++++
C.M.	67	1	二倍体	0.34	无	有	2/3	+++++	+++	+++++	+++++	+++
J.Q.	57	1	二倍体	0.21	有	有	8/22	++++	-	++	++++	+
N.K.	73	1	二倍体	0.05	无	无	1/32	++	-	+	++	-
Z.K.	53	1	二倍体	0.07	无	无	1/11	++	+	+	+	+
S.S.	49	1	二倍体	0.09	有	无	5/32	+++	+	+	++	-

D.R.	67	1	多倍体	0.53	无	无	表层(2/3)	+	++	+++	++	++
M.T.	73	1	多倍体	3.00	无	无	表层	+	+	-	++	-
G.M.	67	1	二倍体	0.16	无	无	距邻近的子宫肌层 1mm	+	+++	+	++	-
T.O'	84	1	多倍体	0.48	无	有	12/15	+++	-	+	+++++	+
T												
R.F.	64	1	二倍体	0.02	-	无	7/26	++	+	+++++	+++++	+++
L.H.	62	1	-	-	-	无	0	+++++	+++	+++++	+++++	
二								+++++				
C.T.	73	1	二倍体	0.08	-	无	4/18	-	-	+	++	+
L.C.	53	2	多倍体	1.72	无	无	<内侧第三层	+++	-	++	+++++	+
J.O.	55	2	多倍体	0.54	无	无	0	+	-	+	+	-
V.D.	60	2	二倍体	0.16	无	无	5/13	++	-	++	+++	++
D.S.	55	2	二倍体	0.13	无	有	表层	++	-	+++	+++	+
P.T.	65	2	多倍体	0.58	有	有	距浆膜 2.8mm	+++	+	+++++	+++++	+
A.B.	60	2	二倍体	0.17	无	有	全部厚度	++	+	++	+++	+
J.B.	72	2	多倍体	1.55	有	无	>2/3	+++++	++	+++	+++++	++
B.R.	55	2	二倍体	0.05	无	无	<1/3	+++	++	++	+++++	+++++
D.W.	63	-	多倍体	1.57	无	无	2/13	+++	++	++	+++	+

11

I.F.	68	2	多倍体	0.77	无	无	11/27	++	+++	-	++	-
D.M.	54	2	多倍体	2.31	-	有	8/24	++	+++	+	+++	+
E.H.	75	2	-	-	有	无	浆膜内 5mm	+++	++	+++++	+++++	+++
C.C.	51	2	二倍体	0.72	无	无	9/19	++	++	-	+	-
M.S.	73	2	多倍体	>3	无	无	5/13	+	++++	+	++++	-
D.S.	63	2	-	-	无	无	1/21	+++	-	+	+++	+
D.K.	57	2	多倍体	>3	有	有	>内层 2/3	++	+	++++	++++	+++
E.L.	61	2	二倍体	0.03	有	有	12/21	++	-	+++++	+++++	+++
L.R.	62				刮除时为 2 级			++	-	+++	+++	+
C.G.	63	2	二倍体	0.28	有	有	17/16	++++	+++	++++	++++	+++
C.S.	60	2	多倍体	2.07	-	有	表层(2/11)	++	-	++	++	++++
K.K.	64				刮除时为 3 级			-	++	-	+	-
C.S.	68	3	二倍体	0.03	无	无	>内层 1/3(最小)	-	++	-	+	-
R.B.	76	3	多倍体	2.44	无	无	2/12	+	+++	-	++	-
L.D.	63	3	二倍体	0.36	无	有	10/17	++	-	-	+++	+
T.B.	94	子宫刮片显示原位鳞状细胞瘤,偶尔有碎片显示侵入性鳞状细胞瘤,考虑到患者的年龄和整体健康没有进行 TAH.						++	++	+	++	-
O.L.	79	-	多倍体	0.4		多倍体横纹肌肉瘤		++	-	-	+++	+
A.J.	58	3	多倍体	>3	无	无	表层(4/17)	+++	+	+++	+++++	+

L.S.	79	3	二倍体	0.53	无	无	内层一半	+++	+	+++++	+++++	+++++
I.F.	54	3	二倍体	0.25	无	有	内层一半	+	-	+	++	+
H.M.	68	3	二倍体	0.35	-	有	0/15	+++++	+	-	+++	-

* 所有子宫洗液样品均稀释 1:40;

酶谱结果基于与酶带的大小和密度有关的打分系统：无(-)，非常低(+)，低(++)，中等(+++)，高(++++)，非常高(+++++)。

恶性肿瘤级别代表 0.01-3.0 范围内的一个分值。涉及低恶性级别(在 0.01-1.0 之间)的肿瘤与高存活率有关，恶性级别在 1.1-1.9 之间的肿瘤具有中等存活率，而高恶性级别(2.0-3.0 之间)的肿瘤具有较短的平均存活时间。Bocking A 等，DNA-细胞光密度诊断和恶性肿瘤分级的计算规则。定量分析细胞学(Anal. Quant. Cytol.), 6(1):1-8, 1984。

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

表 2 概述从对照患者(无临床可检测的子宫内膜癌)得到酶谱结果, 以及该组的其它临床和病理学参数。明胶酶谱显示 5 个患者存在非常低水平的潜伏 MMP-2, 一个患者存在非常低水平的 120 kDa 明胶酶(推测是 MMP-9)。迄今为止在稀释用于酶谱分析的子宫洗液中没有检测到其它形式的 MMP。大多数对照病人的子宫洗液中缺乏可检测到的明胶分解活性, 或者单分子形式的 MMP 活性非常低, 打分最大值为一个加号, 表明当子宫洗液中检测到几种 MMP 部分时, 可以特异和灵敏地诊断为子宫内膜癌。

K.F.	26	二倍体	实施扩张术和刮除术	-	-	-	-	-
A.V.	36	二倍体	^CINIII 斑块；活检时未观察到发育异常	-	-	-	-	-
M.D.	43	二倍体	^CINI 斑块；椎状、扩张、切除术	-	-	-	-	-
D.W.	25	-	扩张和切除，子宫镜检	-	-	-	-	-
M.B.	48	-	NIDDM；月经过多；扩张和切除术，子宫镜检	+	-	-	-	-
S.D.		-	月经周期不规则；诊断为 II 型糖尿病(NIDDM)	-	-	-	-	-
J.F.	34	-	^CINIII 斑块；椎状活检	-	-	-	-	-
J.O.	26	-	原位子宫颈瘤；椎状活检	-	-	-	-	-
L.M.	32	-	^CINI；发育不良程度较低；停止避孕	-	-	-	-	-
J.K.	23	-	扩张和切除术；子宫切开，肾盂检查	-	-	-	-	-
A.O.	48	-	^CINIII 和月经周期不规则；椎状活检	-	-	-	-	-
C.A.	47	-	原位子宫颈腺癌；椎状活检	-	-	-	-	-
A.K.	70	-	服用他莫昔芬；绝经后出血；子宫内膜增厚；复杂的盆腔肿块；实施全腹子宫切除(TAH)……良性、萎缩性、固着的息肉。	-	-	-	-	-
C.Di.	71	-	绝经后出血；涂片正常；因子宫内息肉实施 TAH	-	-	-	-	-
G.L.	62	-	绝经后出血；刮除术表明部分再生，无非典型表现	+	-	-	-	-
G.M.	67	-	子宫内膜显示与他莫昔芬处理一致的特征	-	-	-	-	-
N.L.	54	-	刮除术表明无异常组织；椎状活检表明高级别的异常状况	+	-	-	-	-

具有单一病灶

P.A.	48	-	-	-	-	-	-
椎状活检，原位癌							
D.R.	61	-	-	-	-	-	-
子宫内膜息肉，使用他莫昔芬							
S.N.	31	-	-	-	-	-	-
刮除术表明无增生或恶性的迹象							
L.R.	61	-	-	-	-	-	-
使用他莫昔芬；良性子宫内膜息肉							
L.G.	46	-	-	-	-	-	-
实施扩张术和刮除术，子宫切开							
N.K.	47	-	-	-	-	-	-
起初：复合型增生；刮除后：增生性子宫内膜；无增生或							

发育异常

B.M.	-	-	-	-	-	-	-
椎状活检							
A.I.	73	二倍体	绝经后出血，子宫镜检查表明复合型增生；TAH后的病理	-	-	-	-

诊断发现良性子宫内膜息肉

*所有子宫冲洗样品以 1 : 40 的比例稀释；

酶谱结果基于涉及酶带的大小和密度的打分系统：无(-)，非常低(+)，低(++)，中等(+++)，高(++++)，非常高(+++)+)

^原位癌(CIN)

实施例 2 MMP-9 和 MMP-2 的 ELISA 分析

Biotrak™ MMP-9 ELISA 试剂盒(Calbiochem^R), 能够提供对子宫洗液样品中 MMP-9 的简单且专属的检测。该分析法的灵敏度为 0.6 ng/ml。该分析法使用定向抗 MMP-9 不同表位的两种抗体。样品或标准品中存在的所有 MMP-9 均结合到预先用抗-MMP-9 涂层的微滴培养板上。对后进行第二个保温步骤, 其中加入与辣根过氧化物酶结合检测抗体, 形成固定化复合物。向各孔中加入四甲基对二氨基联苯底物, 进行颜色反应检测每孔中的过氧化物酶复合物的量。产物的蓝颜色用微滴培养板分光光度计(Beckman)在 630 nm 处测定。用 630 nm 的平均光密度对标准品 ng/ml 作图, 制备标准曲线。从中通过曲线外推确定各样品的浓度(ng/ml)。一个微滴培养板(96 孔)允许构建一个标准曲线和测量 40 个未知样品一式二份。ELISA 方案能够在一天内得到结果。

制备 10 个癌症和 10 个对照患者的不稀释样品和以 1 : 4 的比例稀释的样品, 然后分析 MMP-9 的存在或缺乏。图 7 表示原始数据, 其中显示了微滴培养板各孔的光密度。图 8 表示微滴培养板中产物颜色反应的灰度; 按顺序, 它是子宫洗液样品中 MMP-9 存在量的最初表示。所有癌症样品都有一个明显高于对照的光密度值, 以至癌症样品的测量值超出了标准曲线。作为这项工作的延续, 将大量样品连续稀释, 用 ELISA 试验分析。这种滴定方法确立了检测子宫癌时 MMP-9 的定值或基本水平(ng/ml)。

用 Biotrak™ MMP-2 ELISA 试剂盒也可以该方法测定 MMP-2, 所述试剂盒同样购买自 Calbiochem^R。

实施例 3 细胞生物学研究

已确诊子宫癌的患者, 子宫切除作为部分治疗方法。切除子宫后, 如果可能, 从以下两个位置切除子宫内膜组织:

(a)相应于恶性损伤的位置,

(b)显微镜检查时, 子宫内膜看起来是正常的位置。

肿瘤组织和正常组织均在含 0.15 M NaCl、10 mM CaCl₂、和 0.05% Brij 35 的 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中, 于冰面上匀浆。离心得到上清液, 通过染料结合法, 用 BilRad 蛋白质分析试剂测定蛋白质的浓度。

用明胶酶谱检查组织匀浆中 MMP 的表型。上清液, 经校准使每道蛋白质的量相同, 如上述将明胶注入凝胶, 进行 SDS-PAGE。

酶谱表明所有组织样品都有 MMP-9 和 MMP-2 的释放。然而，显然正常子宫内膜区的组织样品比同一患者肿瘤组织样品释放明显较低水平的 MMP。因此，肿瘤组织中出现上调，尤其的 MMP-9 的水平上调。

5 这些研究表明前面部分描述的本发明的方法检测的 MMP-9 和 MMP-2 水平的升高，主要源于子宫中存在的癌组织的分泌，而不是源于非-人组织的分泌。

实施例 4 子宫内膜癌细胞的培养

如上述子宫切除后，将来源于肿瘤位点的子宫内膜组织从子宫上切下来。将该组织样品剪成小块，然后在含 10% FCS 的 α -最小基本培养基(MEM) 10 中冲洗。然后将肿瘤组织碎片置于不含 FCS 的胶原酶/MEM 溶液中在 37 °C 保温 40 分钟。无关细胞在 MEM+10% FCS 中冲洗掉，然后接种于 7 cm² 培养皿上。

生长旺盛的细胞在 3-4 天内铺满平皿，看起来包含形态均一的细胞群体。相比较而言，来源于子宫内膜正常区域的上皮细胞在同样的时间内不能 15 形成足够的单层细胞。当肿瘤细胞铺满后，培养基更换为无血清 MEM。细胞在无血清条件下培养 24 小时，然后收集培养基用酶谱确定分泌的 MMP 的状况。

在凝胶上均可以鉴定前-MMP-2 和前-MMP-9。该研究表明培养的癌症细胞分泌与子宫腔内的癌症细胞类似的酶谱。

20 实施例 5 免疫印记

子宫洗液样品用 10%凝胶进行 SDS-PAGE。样品在还原条件下电泳，然后将它们转移到二氟化聚乙二烯薄膜上。该薄膜在固定缓冲液中冲洗，然后用单克隆 MMP-2 抗体(IM33L, Calbiochem^R)作为探针测定。随后在 TBS(pH 7.4)中清洗 3 次，每次 10 分钟，将薄膜与辣根过氧化物酶结合的检测抗体一起 25 起保温。然后进行化学发光反应，以便检测固定化的 MMP-2 抗原。该反应中，辣根过氧化物酶催化光的发散，其来源于发光试剂的氧化。常使用增强剂增强光的发散。依赖于薄膜上抗原量的发散的光，捕获到自动射线照像胶片上，得到永久记录的结果。MMP-9 以同样的方式用特异性单克隆 MMP-9 抗体(IM37L, Caliochem^R)检测。

30 该技术清楚地定义为子宫内膜癌患者子宫洗液中检测到的酶的鉴定。免疫印记显示酶谱检测到的两种主要酶是 MMP-2 和 MMP-9。也对其余的带进

行了检测，但还没有鉴定这些明胶酶的分子特征。暂时认为它们是 MMP-2 和 MMP-9 的替换形式(例如，表 1 所示的 MMP-2 和 MMP-9 的推测形式)。

实施例 6 子宫超声和子宫流体 MMP 分析检测子宫内膜癌

这个预期试验的目的在于通过阴道超声扫描术评价子宫流体 MMP 分析的灵敏度和特异性，该分析用于检测因异常子宫出血接受检查的妇女是否患有子宫内膜癌。因为该检查涉及输入生理盐水的子宫超声扫描术，我们实验室对同意接受该实验的患者获取起始子宫洗液样品用于分析 MMP。接受检查的人群包括年龄在 45-65 岁，绝经过程中和绝经后的妇女。该研究期望发现具有患子宫内膜癌高风险女性人群比相应年龄的无症状妇女，子宫 MMP 水平升高的发生率。据估计高风险人群子宫内膜癌的发生率在 2-10%之间。

表 3 概述通过明胶酶谱研究 105 个患者的子宫洗液得到的结果，8 个患者(7.6%)MMP 水平升高。在阳性 MMP 实验的 8 个患者中，子宫内膜组织的组织病理学检查发现其中 5 个患有子宫癌。其它 3 个患者经组织学实验没有检测到异常症状。然而，由于子宫洗液中 MMP 水平的升高，应该保证对这类患者进行有规律的跟踪检查，特别是确定这种升高是否与子宫癌形成的风险增加有关。未得到假阴性结果。

表 3：通过盐水输入子宫超声扫描术因异常子宫出血检查的患者子宫液的 MMP 分析

MMP 酶谱的结果	组织学证明患有子宫内癌的患者		
	有	无	总和
升高的 MMP	5	3	8
基础 MMP	0	97	97
总和	5	100	105

基于到目前为止的总体研究，可以断定：

1. 实验的灵敏度为 100%(5 个检测到癌症的患者中 5 个 MMP 升高)。2. 实验的特异性为 97%(没有得癌症的 100 个患者中 97 个 MMP 水平为基础值)。

3. 实验的预测价值为 62.5%(MMP 升高的共 8 个患者中 5 个患癌症)。

我们发现本研究中所有患子宫内膜癌的妇女的子宫分泌物含有明显升高的 MMP-2 和 MMP-9 水平，相比较而言对照组的子宫分泌物中无 MMP-2 和 MMP-9 或 MMP-2 和 MMP-9 水平非常低。癌症组和对照组之间酶水平的

这种显著并且一致的差别强有力地说明, 分析子宫分泌物中的 MMP 作为对所有级别的子宫内膜癌的灵敏和可靠的诊断实验是有用的。

因为子宫灌洗是相对简单和非侵入性的方法，因此利用明胶酶谱分析子宫洗液样品，或其它分析 MMP 的方法，例如 ELISA，可以任选地与用于子宫颈疾病的糊状涂片结合，用作子宫内膜恶性肿瘤的常规筛分试验。初步统计学分析表明本发明试验的灵敏度为 100%。与常规糊状涂片通常观察到的 80% 的灵敏度相比，它非常令人满意。ELISA 或化学发光分析容易自动化，适于大规模筛分和临床病例应用。

另外,我们目前的结果有力地说明 MMP-2 和 MMP-9 涉及子宫内膜癌的生长,并且可能涉及肿瘤在子宫内扩散。它可以提供子宫癌的整体治疗过程中,特异性酶抑制剂与其它治疗性用药程式结合应用的原理。

各级别子宫内膜腺癌的患者数目太少,而不能得出任何关于 MMP-2 和 MMP-9 水平与组织学级别和侵入子宫肌层深度的关系的结论。然而,通常侵入最深的两个患者发现两个 MMP 的水平均最高。这些妇女也都发现有多倍体肿瘤细胞,评价的中度的恶性级别(表 1)。这说明 MMP-2 和 MMP-9 水平对以前已知的预后指标提供了有用的补充。

为了清楚和易于理解的目的更详细地描述本发明时，可以对实施例和本文描述的方法进行各种不偏离本说明书公开的本发明定义范围的修饰和改变，这对本领域的技术人员是显而易见的。

下一页列出本文引证的参考文件，它们引入本文作为参考。

参考文献

- Baak, J.P.A , 癌症诊断和预后中的定量病理学手册, 1991
- Barrett, A.J.,酶学方法,蛋白水解酶、天冬氨酸肽酶和金属肽酶, 1995 ,
248 : 413-528
- 5 Berchuck, A.等, 妇科肿瘤学, 1992 , 44 : 61-65
- Bocking A.等, 定量分析细胞学, 1984 , 6 : 1-8
- Iversen, O.E., 美国妇产科学杂志, 1986 , 155 : 770-776
- Jeziorska, M., Salamonsen, L.A.和 Woolley, D.E., 生殖和受精杂志,
1996 , 107 : 43-51
- 10 Kleiner K.E.和 Stetler-Stevenson,W.G., 生物化学分析, 1994 , 218 :
3235-3329
- Liotta, L.A.等, 生物化学年度综述, 1986 , 55 : 1037-1057
- Lukes, A.S.等, 癌症, 1994 , 73 : 2380-2385
- Moberger, B.等, 细胞计量学, 1985 , 5 : 430-436
- 15 Podratz, K.C.等, 美国妇产科学杂志, 1993 , 168 : 1206-1215
- Rawdanowica, T.J., Hampton, A.L., Nagase, H., Woolley, D.E. 和
Salamonsen, L.A., 临床内分泌代谢杂志, 1994 , 79 : 530-536
- Sakuragi, N.等, 妇科肿瘤学, 1994 , 53 : 183-189
- Salamonsen, L.A., 内分泌学发展趋势, 1996 , 7 : 28-34
- 20 Salamonsen, L.A., Nagase, H.和 Woolley, D.E., 细胞学杂志, 1991 ,
100 : 381-385
- Salamonsen, L.A., Nagase, H.和 Woolley, D.E., 生殖与受精杂志增刊,
1995 , 49 : 29-37
- Salamonsen, L.A., Nagase, H., Suzuki, R.和 Woolley, D.E., 生殖与受精杂
25 志, 1993 , 98 : 583-589
- Salamonsen, L.A.和 woolley, D.E., 人类生殖, 1996 , 11 , 增刊, 2 :
124-133
- Seckinger, D 等, 实验医学病理学文集(Arch. Pathol.Lab. Med.), 1989 ,
113 : 619-626
- 30 Stetler-Stevenson, W.G.等, 细胞生物学年度综述, 1993 , 9 : 541-573
- van der Puttten, H.W.H.M 等, 癌症, 1989 63 : 1378-1387

说明书附图

酶谱

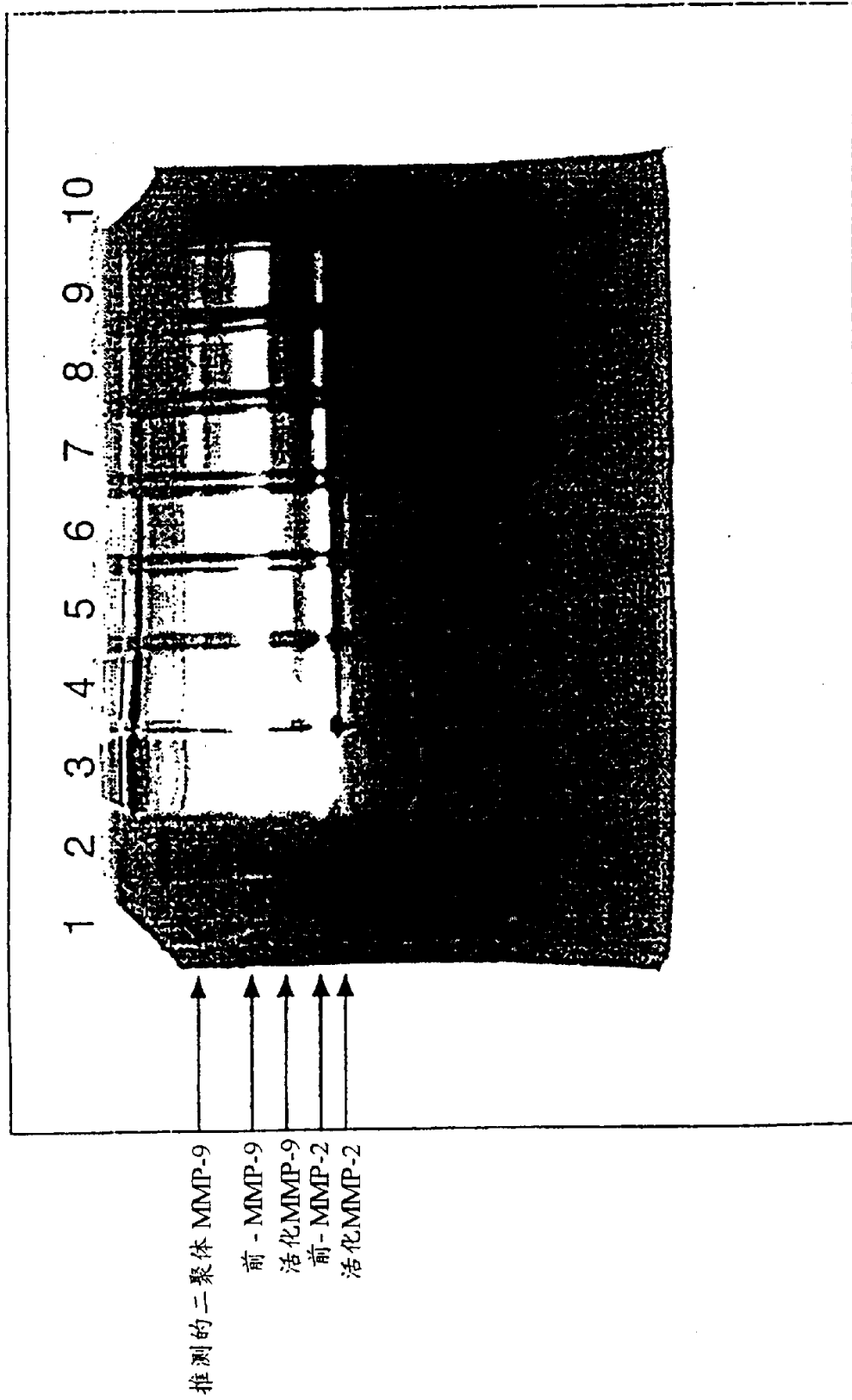


图 1

泳道	样品描述	样品稀释度
1.	-	-
2.	分子量标记物	1:0
3.	L.S. (子宫内膜癌)	净
4.	" "	1:2
5.	" "	1:5
6.	" "	1:10
7.	" "	1:20
8.	" "	1:50
9.	" "	1:100
10.	-	-

图 1 (续)

酶谱

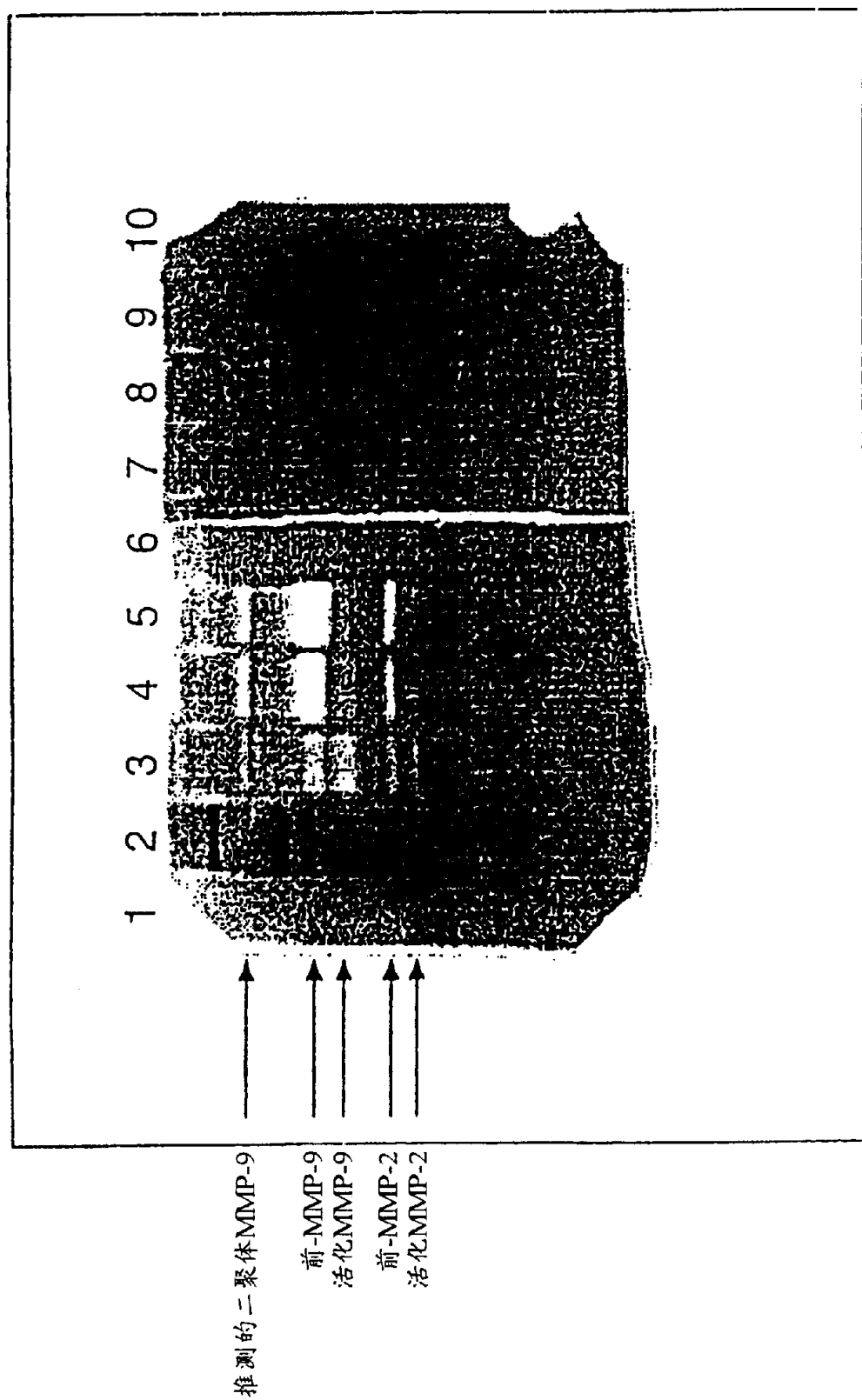


图 2

泳道	样品描述	样品稀释度
1.	-	-
2.	分子量标记物	1:0
3.	B.F. (子宫内膜癌)	1:75
4.	A.K. (子宫内膜癌)	1:75
5.	L.S. (子宫内膜癌)	1:75
6.	-	-
7.	B.F. (子宫内膜癌)	1:75
8.	A.K. (子宫内膜癌)	1:75
9.	L.S. (子宫内膜癌)	1:75
10.	-	-

* 凝胶在第6泳道切成两半

*1-5道用"正常"保湿缓冲液在37℃保湿

*7-10道用含MMP抑制剂 (5mM EDTA/2.5 mM菲咯啉) 的保湿缓冲液在37℃保湿

图 2 (续)

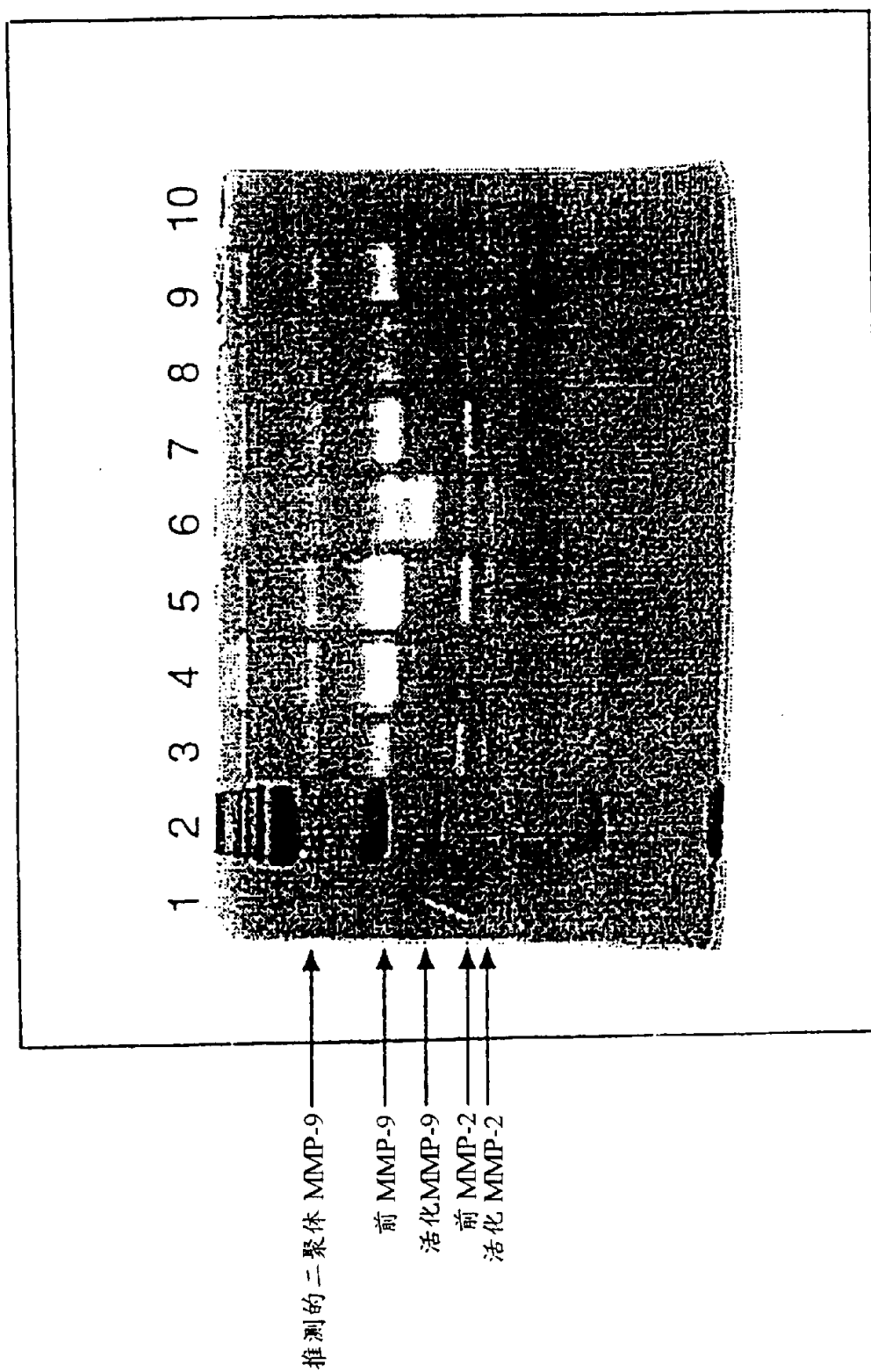


图 3a

泳道	样品描述	样品稀释度
1.	-	-
2.	分子量标记物	1:0
3.	V.Q. (子宫内膜癌)	1:40
4.	B.M. (子宫内膜癌)	1:40
5.	W.B. (子宫内膜癌)	1:40
6.	B.F. (子宫内膜癌)	1:40
7.	J.B. (子宫内膜癌)	1:40
8.	A.B. (子宫内膜癌)	1:40
9.	D.S. (子宫内膜癌)	1:40
10.	-	-

图 3a (续)

酶谱

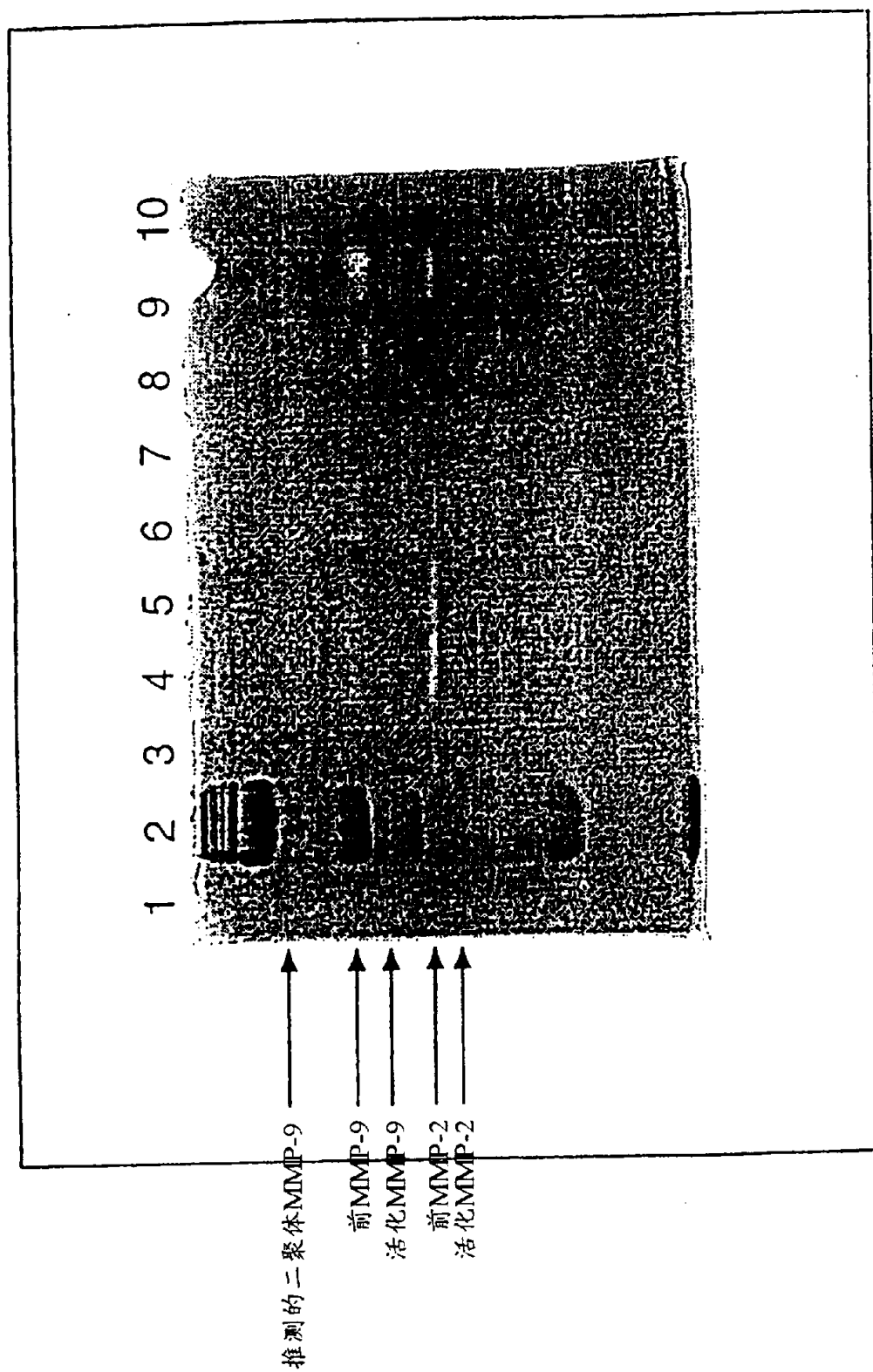


图 3b

泳道	样品描述	样品稀释度
1.	-	-
2.	分子量标记物	1:0
3.	F.S. (对照)	1:10
4.	F.O. (对照)	1:10
5.	D.R. (对照)	1:10
6.	D.E. (对照)	1:10
7.	S.S. (对照)	1:10
8.	N.A. (对照)	1:10
9.	J.F. (对照)	1:10
10.	-	-

图 3b (续)

酶谱

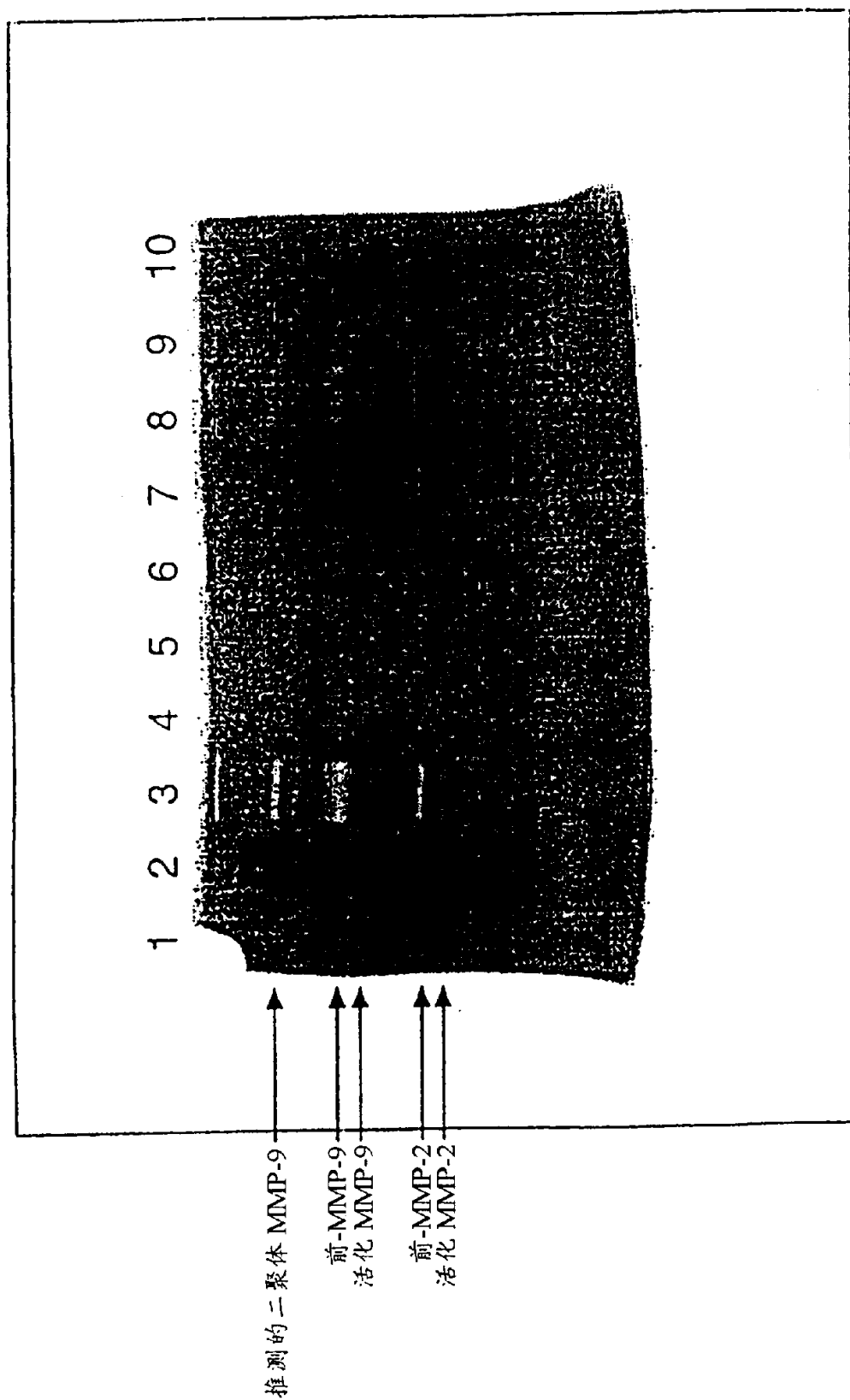


图 4

泳道	样品描述	样品稀释度
1.	-	-
2.	分子量标记物	1:0
3.	V.Q. (子宫内膜癌)	1:40
4.	J.S. (对照)	1:40
5.	C.N. (对照)	1:40
6.	N.T. (对照)	1:40
7.	C.N. (对照)	1:10
8.	N.T. (对照)	1:10
9.	-	-
10.	-	-

图 4 (续)

酶谱

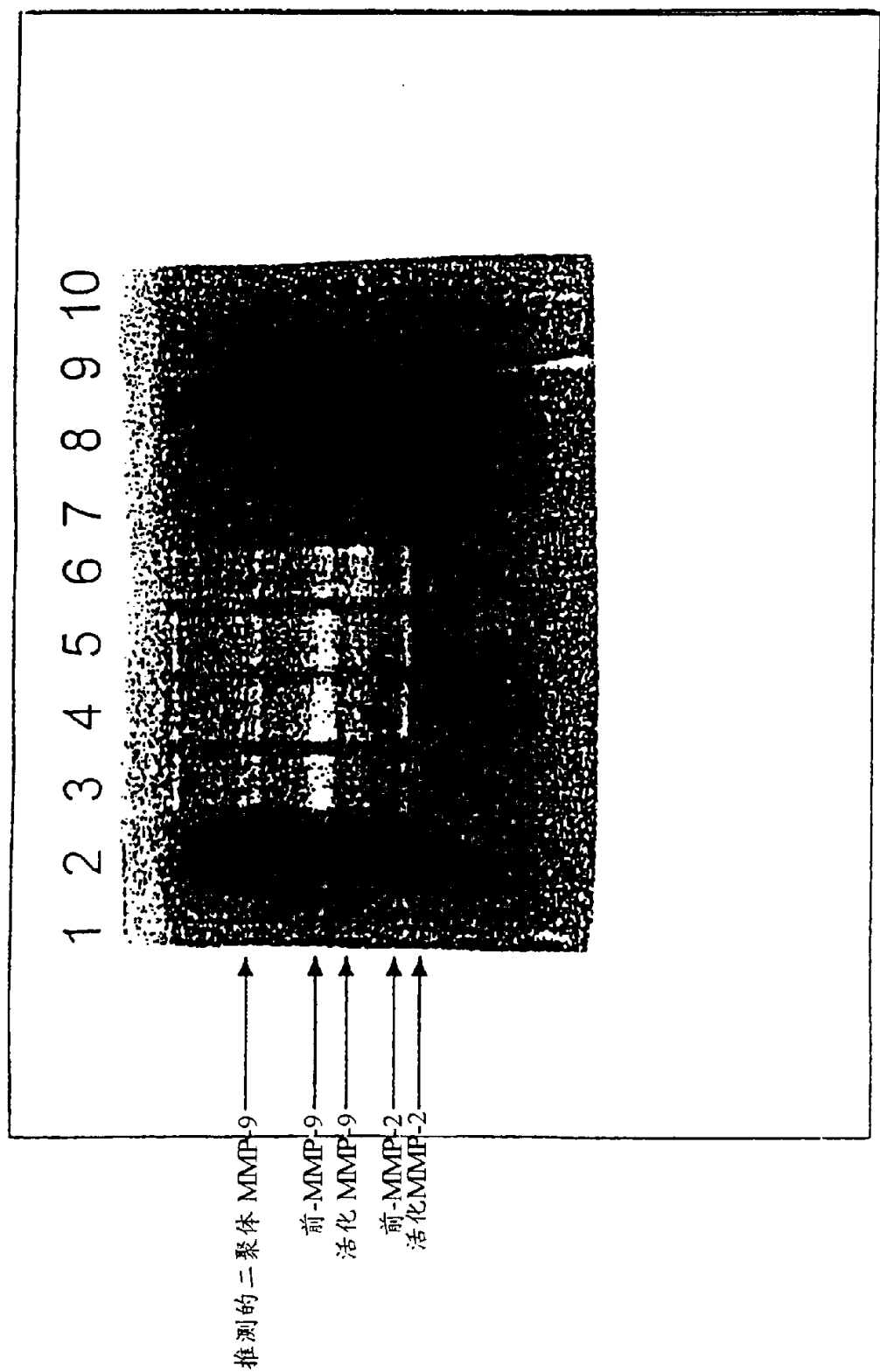


图 5

泳道	样品描述	样品稀释度
1.	-	-
2.	分子量标记物	1:0
3.	B. M.(子宫内膜癌)	1:40
4.	M. R.(子宫内膜癌)	1:40
5.	A. K.(子宫内膜癌)	1:40
6.	B. F.(子宫内膜癌)	1:40
7.	S. S.(对照)	1:40
8.	D. A.(对照)	1:40
9.	V. S.(对照)	1:40
10.	-	-

图 5 (续)

酶谱

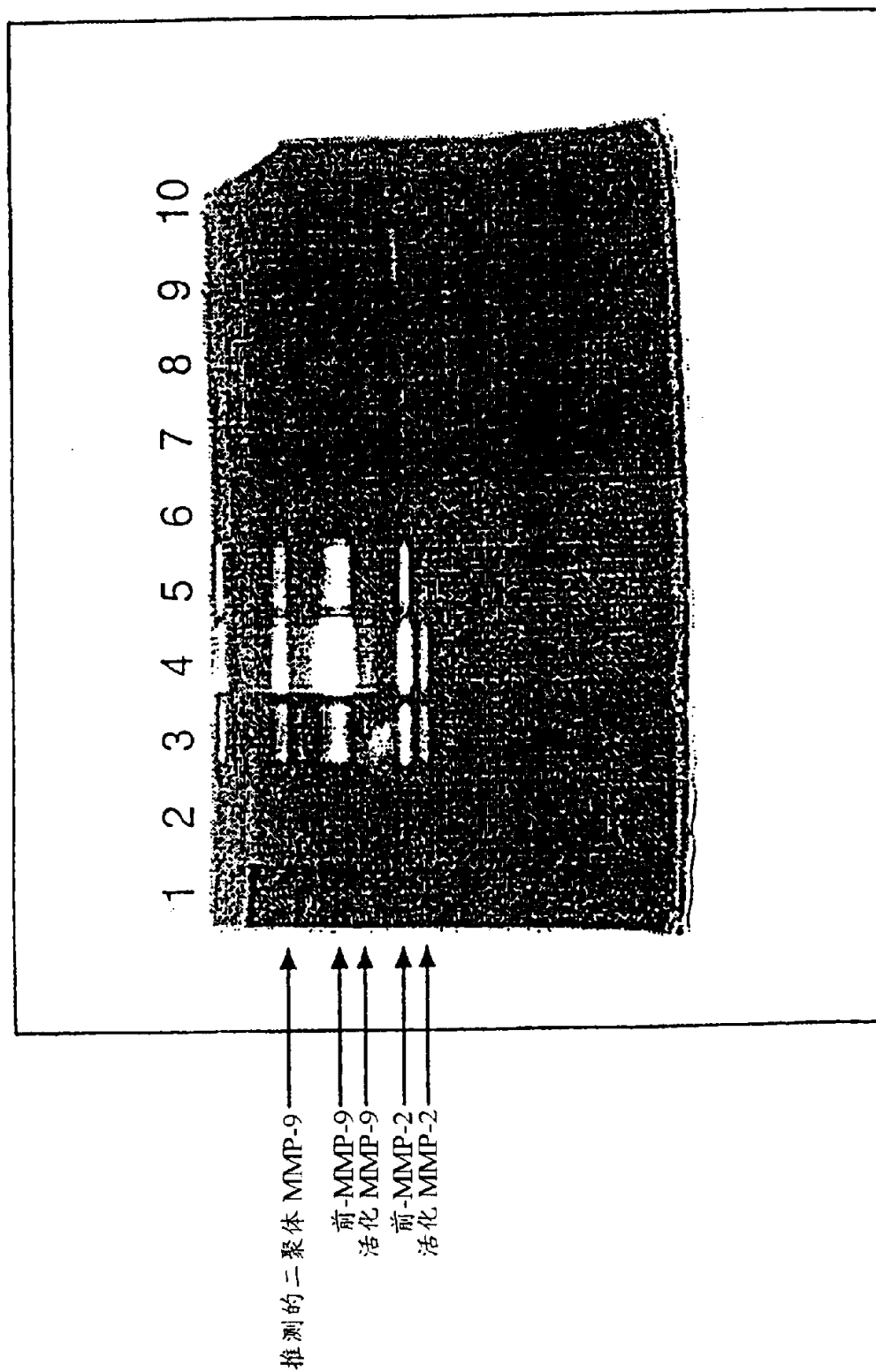


图 6

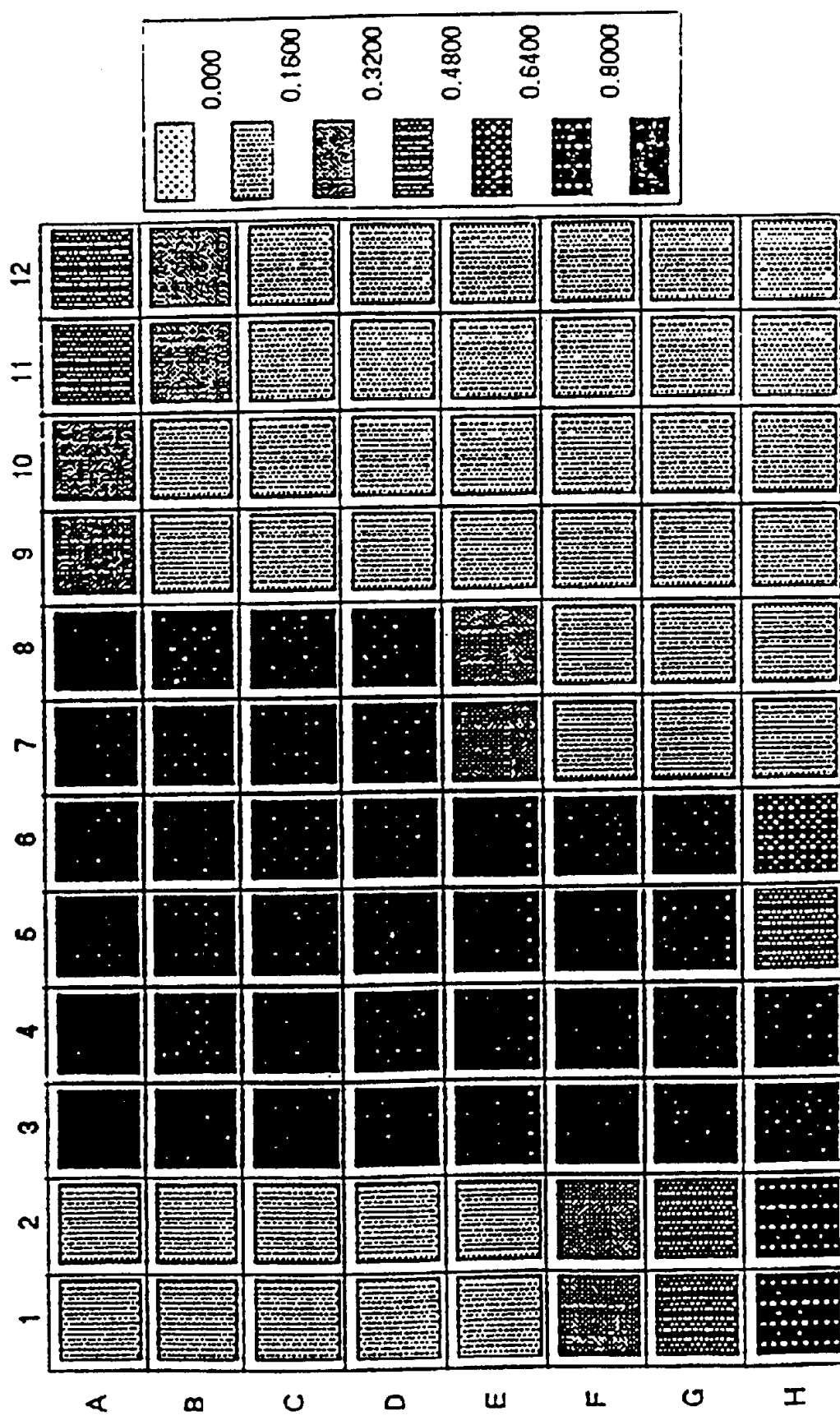
泳道	样品描述	样品稀释度
1.	分子量标记物	1:0
2.	-	-
3.	V.O. (子宫内膜癌)	1:40
4.	C.M. (子宫内膜癌)	1:40
5.	P.T. (子宫内膜癌)	1:40
6.	J.F. (对照)	1:40
7.	A.H. (对照)	1:40
8.	J.I. (对照)	1:40
9.	D.R. (对照)	1:40
10.	F.S. (对照)	1:40

图 6 (续)

光密度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.052 ₁	0.055	3.874	3.789	3.403	3.498	3.747	3.928	0.227	0.225	0.409	0.426
B	0.044 ₂	0.041	3.753	3.919	2.921	2.974	3.930	3.803	0.105	0.103	0.166	0.178
C	0.069 ₃	0.065	3.881	3.859	3.090	3.139	2.474	2.441	0.130	0.133	0.041	0.060
D	0.093 ₄	0.101	3.604	3.620	2.007	1.949	1.567	1.614	0.074	0.080	0.039	0.055
E	0.148 ₅	0.155	3.818	3.884	3.712	3.861	0.213	0.191	0.045	0.047	0.065	0.078
F	0.241 ₆	0.245	3.657	3.847	2.983	2.897	0.100	0.099	0.045	0.041	0.049	0.062
G	0.401 ₇	0.394	2.631	2.783	1.029	1.023	0.103	0.094	0.063	0.059	0.054	0.069
H	0.673 ₈	0.650	1.321	1.480	0.480	0.498	0.061	0.055	0.048	0.047	0.051	0.056

图 7



下限=0.0000 上限=0.800

图 8