



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106771248 B

(45)授权公告日 2018.05.15

(21)申请号 201611256833.X

(22)申请日 2016.12.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106771248 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(73)专利权人 山东大学齐鲁医院

地址 250014 山东省济南市文化西路107号

(72)发明人 孔北华 靳成娟 李英伟 王宇

邱春萍 徐莹 孙晓梅 张智伟

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司

公司 37221

代理人 王志坤

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件

US 2012231963 A1,2012.09.13,

CN 106093388 A,2016.11.09,

Katharina Auer, et.al..Role of the immune system in the peritoneal tumor spread of high grade serous ovarian cancer..《Oncotarget》.2016,第7卷(第38期),

Tat-San Lau, et.al..Cancer cell-derived lymphotoxin mediates reciprocal tumour-stromal interactions in human ovarian cancer by inducing CXCL11 in fibroblasts..《Journal of Pathology》.2014,第232卷

Lorenza Mittempergher.Genomic characterization of high-grade serous ovarian cancer: dissecting its molecular heterogeneity as a road toward effective therapeutic strategies..《Curr Oncol Rep》.2016,第18卷

审查员 毕秀华

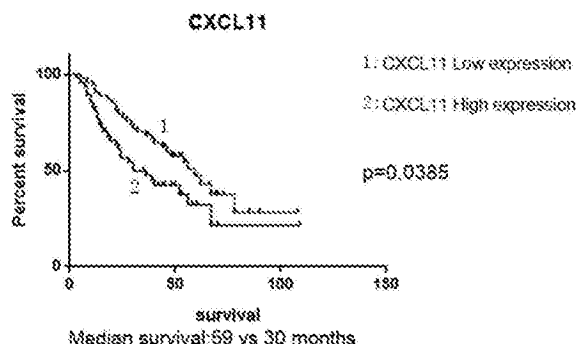
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断的标志物

(57)摘要

本发明公开了CXCL11作为高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断的标志物的应用,以及检测CXCL11的试剂在制备高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断的试剂盒中的应用。本发明以CXCL11作为标志物,通过免疫组织化学的方法诊断高级别浆液性卵巢癌,并判断高级别浆液性卵巢癌的预后。CXCL11在高级别浆液性卵巢癌中高表达,而在正常输卵管伞中低表达。CXCL11在高级别卵巢癌中的表达水平和病人的存活率有关,CXCL11表达高的患者预后不好,存活率低,尤其在晚期卵巢癌病人更明显。CXCL11的表达水平不但与病人的总生存期有关,也可以检测病人的2年及3年生存时间。CXCL11作为高级别浆液性卵巢癌的诊断和预后标志物,具有广阔的应用前景和巨大的潜在社会效益。



1. 检测CXCL11的试剂在制备高级别浆液性卵巢癌预后判断的试剂盒中的应用。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述高级别浆液性卵巢癌预后判断包括:高级别浆液性卵巢癌治疗药物、治疗方法、治疗疗效及预后的评估,以及相关人群高级别浆液性卵巢癌或卵巢癌组织转移患病风险的评估。
3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述检测CXCL11的试剂为CXCL11抗体。
4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述检测CXCL11的试剂中还包含:山羊血清、0.01M柠檬酸盐抗原修复液、3% H_2O_2 、生物素标记的羊抗鼠/兔IgG、链霉卵白素-过氧化物酶、DAB显色试剂、PBS溶液。

高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断的标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,具体涉及一种可用于高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断的标志物,以及用于检测该标志物的试剂、试剂盒或芯片。

背景技术

[0002] 卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤,病死率位居妇科恶性肿瘤之首,是妇产科临床面临的巨大挑战。虽然肿瘤细胞减灭术和铂类紫杉类联合化疗使患者5年生存率有所改善,但半个世纪以来卵巢癌临床诊治并无实质性进展。这主要由于缺乏临床实用的早期诊断手段和疗效持久的治疗方案,其根本原因在于对卵巢癌的早期诊断、发生发展、预后等的分子机制认识不清。

[0003] 高级别浆液性卵巢癌(HGSOC)是卵巢癌患者死亡的主要原因,所占比例较大,且死亡率居高不下。HGSOC预后很差,长期存活率低于20%。复发和远处转移是术后治疗失败的主要原因。目前临床实践中,临床病理分期是最重要、最可靠的预后指标,但是仍然需要更精确的标志物进一步将术后病人划分为高风险和低风险,进而采取更有效的治疗方法。

[0004] 肿瘤的发生是多因素、多基因异常所致的复杂过程,在病灶发生形态学变化之前,可能已经存在着许多分子生物学的改变。用分子水平异常作为卵巢癌的肿瘤标志物能更恰当地反映肿瘤生物学行为的异质性,进而为卵巢癌的早期诊断和预后判断提供更有价值的指导。

[0005] 目前发现的卵巢癌重要改变的分子标志物主要集中在核酸与蛋白方面,前者包括细胞遗传学改变、基因的扩增、缺失、突变、断裂与融合、mRNA及miRNA等,后者表现为蛋白表达水平、大小、亚细胞定位及蛋白翻译后修饰等改变。由于蛋白质是基因表达的最终产物,也是基因功能的执行者,蛋白质间的相互作用、相互协调是细胞进行一切代谢活动的基础,因此关注卵巢癌发生发展中蛋白水平的改变,寻找对卵巢癌进行早期诊断和预后判断的分子标志物显得尤为重要。

[0006] CXCL11是一种小分子量(约8-14KD)的趋化因子,主要通过7次跨膜蛋白、G蛋白偶联受体的亚群对各种类型白细胞运输进行调节。其编码的蛋白诱导活化T细胞的趋化反应,是CXCR3的主要配体。但迄今为止,CXCL11与高级别浆液性卵巢癌的诊断和预后的关系尚未见文献报道。

发明内容

[0007] 针对上述现有技术,本发明的目的在于研究CXCL11在高级别浆液性卵巢癌中的表达情况,并分析其与高级别浆液性卵巢癌临床病理参数和生物学行为的关系,进而发现CXCL11在高级别浆液性卵巢癌发生、发展、转移过程中所起的作用。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 本发明首先比较了CXCL11在输卵管伞和高级别浆液性卵巢癌中的表达,发现CXCL11在输卵管伞中低表达,在高级别浆液性卵巢癌中高表达,差异具有统计学意义。

[0010] 本发明还比较了不同分期的高级别浆液性卵巢癌的术后2年及3年存活情况,结果发现CXCL11高表达患者的术后2年及3年存活短于低表达患者,尤其III及IV期患者差异更明显。

[0011] 综合上述研究结果,本发明的第一方面,提供CXCL11作为高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断的标志物的应用。

[0012] 通过测定上述标志物的表达量,可以进行高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断,包括:高级别浆液性卵巢癌或卵巢癌组织转移的鉴别诊断和/或易感性分析,高级别浆液性卵巢癌治疗药物、治疗方法、治疗疗效及预后的评估,相关人群高级别浆液性卵巢癌或卵巢癌组织转移患病风险的评估等。

[0013] 测定上述标志物的表达量需要使用检测试剂、试剂盒或检测芯片等,因此,本发明进一步研究了上述标志物的检测试剂、试剂盒和检测芯片,以用于高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后。

[0014] 检测蛋白表达的方法有多种,包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA),例如竞争性ELISA、双抗夹心ELISA、免疫印迹、ELISA和免疫印迹的组合等。根据上述检测方法,能够检测CXCL11的试剂都可以制成乳腺癌诊断和预示试剂盒应用。本发明的第二方面,提供一种CXCL11的检测方法,步骤如下:

[0015] 将输卵管伞和高级别浆液性卵巢癌的蜡块制作成组织芯片(TMA),进行免疫组织化学染色、显微镜和成像设备扫描为电子图片,阅片并进行统计分析。

[0016] 本发明的第三方面,提供检测CXCL11的试剂在制备高级别浆液性卵巢癌诊断和/或预后判断的试剂盒中的应用。

[0017] 进一步的,所述检测CXCL11的试剂中还包含:山羊血清、0.01M柠檬酸盐抗原修复液、3% H_2O_2 、生物素标记的羊抗鼠/兔IgG、链霉卵白素-过氧化物酶、DAB显色试剂、PBS溶液。

[0018] 具体检测方法如下:

[0019] 将TMA组织切片经脱蜡至水、抗原修复、灭活内源性过氧化物酶和山羊血清封闭后,分别与一抗CXCL11在保湿盒内4℃孵育过夜,随后经PBS洗后分别与生物素标记的羊抗鼠/兔IgG、链霉卵白素-过氧化物酶孵育,DAB显色,苏木素复染;最后经酒精脱水和二甲苯透明后用中性树胶封片,利用显微镜和成像设备扫描为数码照片,并对每张免疫组化染色切片进行评分。

[0020] 对每张TMA的评分包括两部分,染色强度和染色面积,染色强度从低到高依次未为阴性(-),弱阳性(+),阳性(++),强阳性(+++),染色面积用百分率表示,即0%-100%。染色面积0%-10%记为0,11%-20%记为1,21%-50%记为2,51%-100%记为3,最终每个点的免疫组化得分为染色强度*染色面积。

[0021] CXCL11的免疫组化评分以6为cut-off值,小于6为阴性或弱阳性,大于等于6为阳性或强阳性。

[0022] 预后判断或风险预测的判断方法为,CXCL11蛋白表达阳性,则卵巢癌患者生存期短;CXCL11蛋白表达阴性,则卵巢癌患者生存期长。

[0023] 本发明的有益效果:

[0024] 本发明首次研究发现CXCL11在输卵管伞中表达是下调的,但在高级别浆液性卵巢癌中的表达是上调的,且CXCL11的表达与卵巢癌患者的预后紧密相关。本发明以CXCL11作

为标志物,通过免疫组织化学的方法诊断高级别浆液性卵巢癌,并判断高级别浆液性卵巢癌的预后。CXCL11在高级别浆液性卵巢癌中高表达,而在正常输卵管伞中低表达。CXCL11在高级别卵巢癌中的表达水平和病人的存活率有关,CXCL11表达高的患者预后不好,存活率低,尤其在晚期(III期和IV期)卵巢癌病人更明显。CXCL11的表达水平不但与病人的总生存期有关,也可以检测病人的2年及3年生存时间。CXCL11作为高级别浆液性卵巢癌的诊断和预后编织物,具有广阔的应用前景和巨大的潜在社会效益。

附图说明

[0025] 图1:输卵管伞和高级别浆液性卵巢癌(CXCL11)的表达情况;图中,A:输卵管伞,B:高级别浆液性卵巢癌;

[0026] 图2:CXCL11蛋白在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线($P=0.0385$);CXCL11低表达患者的中位生存时间为59个月,CXCL11高表达患者的中位生存时间为30个月。

具体实施方式

[0027] 结合实施例对本发明作进一步的说明,应该说明的是,下述实施例说明仅是为了解释本发明,并不对其内容进行限定。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法,均为常规的试验方法。

[0028] 实施例1:

[0029] 1. 试验方法:

[0030] 我们收集了2007-2013年48例输卵管伞和142例高级别浆液性卵巢癌患者的手术标本存档蜡块。利用半自动组织芯片打孔机制作成3个TMA组织芯片,保证免疫组织化学大样本、高通量、标准化。每个蜡块均包含输卵管伞和高级别浆液性卵巢癌。

[0031] 组织芯片(TMA)技术是将数十至数百个甚至更多的组织样本整齐的排列在一张载玻片上而制成的缩微阵列组织片。通过免疫组化、原位杂交显色等,在组织切片上实现了高通量获取基于形态学的基因组学和蛋白质组学的表达信息。组织芯片技术已经在肿瘤研究中广泛应用,用于研究肿瘤不同发展阶段的基因及蛋白质变化情况、预后的评价及分子标志物的评价、信号通路研究等。组织芯片具有大样本、高通量、标准化等优点,是实现蛋白质分子网络与临床信息的集成的关键技术。本实施例采用的是TMA组织芯片,每张芯片上面有将近200个点,可以同时进行免疫组化检测其表达情况。

[0032] 标本经连续切片、二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,用超敏型二步法检测目的蛋白的表达,具体方法如下:

[0033] (1) TMA切片经过65℃烤片,二甲脱蜡、梯度酒精水化。

[0034] (2) 切片经0.01M柠檬酸盐抗原修复液抗原修复、3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶、山羊血清封闭。

[0035] (3) CXCL11一抗湿盒4℃孵育过夜。

[0036] (4) 切片经组化用PBS洗三遍,试剂B(黄色液体)37℃孵育20min,PBS洗3遍,试剂C(橙色液体)37℃孵育15min,PBS洗3遍。

[0037] (5) 切片经DAB显色。

[0038] (6) 切片经苏木素复染核,梯度酒精脱水,二甲苯透明和中性树胶封片。

[0039] 所有的免疫染色切片经2位病理医师采用盲法独立评分。肿瘤细胞浆中出现棕黄色颗粒被认为是阳性信号。染色强度分4级:0,阴性;1,弱阳性;2,阳性;3,强阳性;阳性细胞百分数分4个等级:0,0~10%;1,11~20%;2:21~50%;3,51-100%。每个标本的总分数是由肿瘤细胞染色强度和肿瘤细胞阳性百分数两部分的乘积得出的,范围是0~9。为了方便统计,我们把免疫组织化学染色分为低表达和高表达2个组。(“低表达”即组化染色总分数小于3,“高表达”即组化染色总分数大于等于3)

[0040] 数据的统计学处理:使用SPSS 19.0统计软件处理数据。CXCL11蛋白的表达患者的年龄、TNM分期、血清CA125值、术后2及3年存活情况,输卵管伞和高级别浆液性卵巢癌中的表达差异等用卡方检验进行统计分析;CXCL11蛋白的表达与患者的生存时间的关系使用Kaplan-Meier生存分析; $P < 0.05$ 被认为有统计学显著性。

[0041] 2. 试验结果:

[0042] (1) CXCL11在输卵管伞和高级别浆液性卵巢癌中的表达情况:

[0043] 结果分别见图1和表1。

[0044] 表1: CXCL11在输卵管伞和高级别浆液性卵巢癌中的表达情况

	低表达	高表达	总数	P 值
[0045] 输卵管伞	28	18	46	0.045
高级别浆液性卵巢癌	64	78	142	

[0046] 由表1可以看出, CXCL11在输卵管伞中低表达,在高级别浆液性卵巢癌中高表达,差异具有统计学意义。

[0047] (2) 不同分期的高级别浆液性卵巢癌的术后2年及3年存活情况

[0048] 结果见表2。

[0049] 表2: 不同分期的高级别浆液性卵巢癌的术后2年及3年存活情况

术后2年及3年存活		低表达	高表达	总数	P 值
所有分期					
[0050] 存活时间 < 2年	14	54	68	0.059	
存活时间 ≥ 2年	24	47	71		
存活时间 < 3年	22	46	68	0.045	
存活时间 ≥ 3年	34	37	71		
仅 III 期和 IV 期					
存活时间 < 2年	11	44	55	0.008	
存活时间 ≥ 2年	23	30	53		
存活时间 < 3年	18	37	55	0.01	
存活时间 ≥ 3年	30	23	53		

[0051] 由表2可以看出, CXCL11高表达患者的术后2年及3年存活短于低表达患者,尤其 III 及 IV 期患者差异更明显。

[0052] CXCL11蛋白在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线($P = 0.0385$)如图2所示;由图2可以看出: CXCL11低表达患者的中位生存时间为59个月, CXCL11高表达患者的中位生存时间为30个月。

[0053] (3) 患者年龄、分期和血CA125与CXCL11的高、低表达的关系

[0054] 结果见表3。

[0055] 表3: 患者年龄、分期和血CA125与CXCL11的高、低表达的关系

年龄、分期及血 CA125		低表达	高表达	总数	P 值
年龄					
	小于 50 岁	16	26	42	0.242
	50~60 岁	31	27	58	
	大于 60 岁	20	17	37	
[0056]	血 CA125				
	小于 300	18	8	26	0.092
	300~1000	18	19	37	
	大于 1000	23	30	53	
	分期				
	I-II 期	13	18	31	0.221
	III-IV 期	55	51	106	

[0057] 由表3可以看出,CXCL11的高低表达与患者年龄、分期和血CA125之间无显著相关性。

[0058] 综上,CXCL11可以用来作为高级别浆液性卵巢癌的诊断和预后评价指标,尤其能评价患者术后2年及3年存活情况,为临床医师的治疗提供建议和参考。

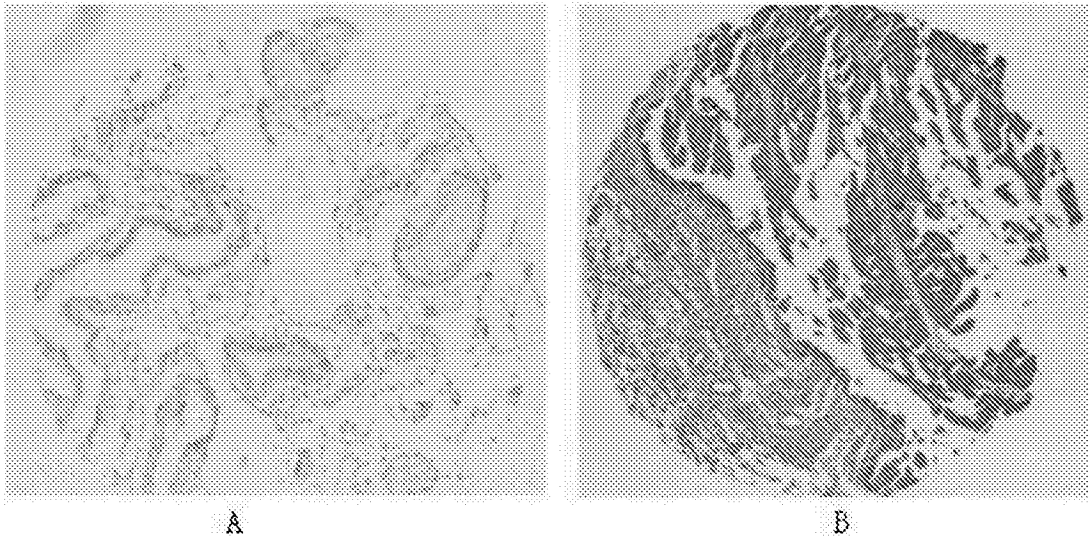


图1

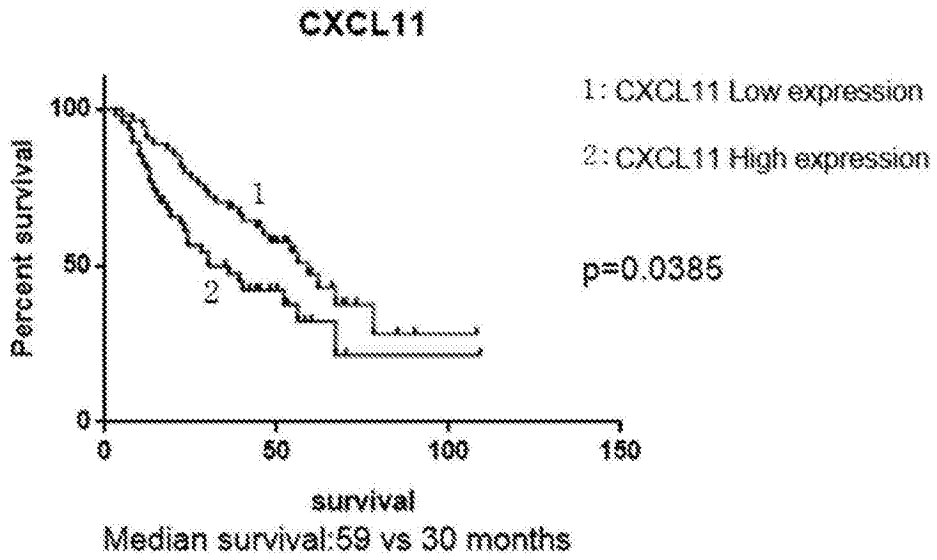


图2