



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102344956 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201010245211. 3

(22) 申请日 2010. 08. 04

(71) 申请人 上海交通大学医学院附属第九人民医院

地址 200011 上海市黄浦区制造局路 639 号

(72) 发明人 林晓曦 江成鸿 胡晓洁 陈辉
金云波 马刚 陈达 陈晓东
李伟 张莉

(74) 专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所
(普通合伙) 31218

代理人 翟羽

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

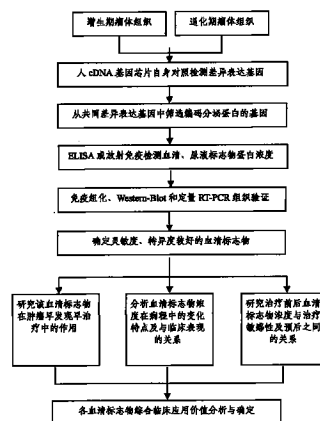
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 7 页

(54) 发明名称

应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法

(57) 摘要

本发明公开了应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法,包括以下步骤:(1) 以基因芯片检测增生期与退化期肿瘤组织的差异表达基因,从中筛选编码分泌蛋白的基因;(2) 分析所获基因编码的分泌蛋白,筛出可分泌入血中、具潜在血清标志物意义的蛋白;(3) 对潜在肿瘤血清标志物在肿瘤组织及血清中的表达进行检测验证,以获得肿瘤血清标志物。本发明从复杂的肿瘤组织差异表达基因中针对编码分泌蛋白的基因简捷有效地筛选肿瘤血清标志物,不但创新性实践了从肿瘤组织的差异表达基因中寻找血清标志物的捷径,而且克服了基因芯片结果筛选过程中工作量大,准确率低,所筛基因意义不明确的难题,对肿瘤血清标志物的寻找具重要参考价值。



1. 一种应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 以基因芯片检测增生期肿瘤组织与退化期肿瘤组织的差异表达基因,从共同差异表达基因中筛选编码分泌蛋白的基因;

(2) 分析步骤(1)所获基因编码的分泌蛋白,筛出可分泌入血中、具潜在血清标志物意义的蛋白,即为潜在肿瘤血清标志物;

(3) 对步骤(2)所获得的潜在肿瘤血清标志物在肿瘤组织及血清中的表达情况进行检测验证,以获得肿瘤血清标志物,所述检测方法包括 ELISA 检测、实时定量 RT-PCR、免疫组织化学及 Western blotting 法。

2. 根据权利要求1所述的应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法,其特征在于,所述肿瘤是指血管瘤。

3. 根据权利要求1所述的应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法,其特征在于,步骤(1)中所述差异表达基因是指差异表达2倍以上的基因。

4. 根据权利要求1所述的应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法,其特征在于,步骤(1)中所述基因芯片为人全基因组表达谱寡核苷酸基因芯片。

应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法

【技术领域】

【0001】 本发明涉及一种应用基因芯片筛查肿瘤血清标志物的方法。

【背景技术】

【0002】 肿瘤标志物 (tumor marker, TM) 是指在肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞的基因表达而合成、分泌的,或因机体对肿瘤反应而异常产生和(或)升高的反映肿瘤存在和生长的一类物质。肿瘤标志物可分为癌胚抗原类、酶类、激素类、糖蛋白类、癌基因类和细胞表面肿瘤抗原类等六大类,前四类为血清肿瘤标志物,后两类为细胞肿瘤标志物。这些物质可在肿瘤患者体液、排泄物或组织中检测出来。其中,较好的肿瘤血清标志物与病程及治疗预后相关,特异度、敏感度较强,可作为监测病程、评估疗效、预防复发的重要监测指标,对指导肿瘤的临床监测和治疗有重要意义。

【0003】 然而,目前寻找肿瘤血清标志物仍是富有挑战性的难题。(Radpour R, Barekati Z, Kohler C, et al. New trends in molecular biomarker discovery for breast cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009 ;13(5) :565-71.) 近年来,研究人员针对各种肿瘤的蛋白质及核酸进行高通量筛查分析。以肿瘤组织为研究对象,基因芯片为寻找肿瘤组织标志物提供可能,但这些组织标志物在血清中不一定存在,更不用说其血清浓度伴随肿瘤的发展而变化。以肿瘤患者血清为研究对象,蛋白组学研究有助于寻找到大量的血清异常指标,但目前因缺乏相配套的后继定量及验证体系,使研究陷入瓶颈状态。(Makawita S, Diamandis EP. The bottleneck in the cancer biomarker pipeline and protein quantification through mass spectrometry-based approaches: current strategies for candidate verification. *Clin Chem*. 2010 ;56(2) :212-22.) 因此,创建有效便捷的寻找肿瘤血清标志物的新方法意义重大。

【0004】 众所周知,肿瘤的发生、发展(包括肿瘤增殖、侵袭、转移及复发等)与肿瘤血管生成过程密切相关,监测其血管生成过程能在很大程度上监视肿瘤的发生发展。比如婴幼儿血管瘤具有与血管生成过程密切相关的独特的自然病程:它常于出生后数天出现,短期内迅速增生,进展极快,经历一年左右的增生期后,血管瘤逐渐稳定,进入数年的退化期,它已经被作为研究人类血管生成过程的独一无二的天然窗口 (Calicchio ML, Collins T, Kozakewich HP. Identification of signaling systems in proliferating and involuting phase infantile hemangiomas by genome-wide transcriptional profiling. *Am J Pathol*. 2009 ;174(5) :1638-1649. & Pramanik K, Chun CZ, Garnaas MK, et al. Dusp-5 and Snrk-1 coordinately function during vascular development and disease. *Blood*. 2009 ;113(5) :1184-1191.)。

【0005】 目前认为,在肿瘤发生、发展的复杂过程中,可能存在着一个相互协调的共表达的基因群体。研究这一基因群体的动态变化,有助于了解肿瘤发生发展过程中的分子机制,从而寻找到与病程密切相关的血清标志物。基因芯片(主要指 DNA 微阵列)的大规模、高通量系统筛查恰恰满足了这一要求,并能避免对已报道因子进行血清检测,消除指

标选择上的偏倚 (Scott CP, VanWye J, McDonald MD, et al. Technical analysis of cDNA microarrays. PLoS ONE. 2009, 4 :e4486.)。但它也带来两个关键性难题:1、基因芯片结果信息量巨大,存在较大个体差异,并伴有假阳性和假阴性结果,如何从纷繁复杂的基因芯片结果中便捷准确地筛选出有意义且易于成功验证的基因呢?这是基因芯片研究中普遍存在的信息挖掘问题 (Dong G, Loukinova E, Chen Z, et al. Molecular Profiling of Transformed and Metastatic Murine Squamous Carcinoma Cells by Differential Display and cDNA Microarray Reveals Altered Expression of Multiple Genes Related to Growth, Apoptosis, Angiogenesis, and the NF- κ B Signal Pathway. Cancer Research, 2001, 61 :4797-4808.)。2、近年来寻找肿瘤组织标志物成为肿瘤研究的重要热点,但如何从肿瘤组织基因芯片结果筛查出血清标志物,目前尚未见可靠的解决方法。(Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. Future Oncol. 2005, 1 :37-50. & Meuwis MA, Fillet M, Chapelle JP, et al. New biomarkers of Crohn's disease: serum biomarkers and development of diagnostic tools. Expert Rev Mol Diagn. 2008, 8 :327-37.)

【发明内容】

[0006] 本发明所要解决的技术问题是,建立一种寻找肿瘤血清标志物的有效便捷的新方法。

[0007] 为了解决上述问题,本发明提供了一种应用肿瘤组织基因芯片筛查肿瘤血清标志物的方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 以基因芯片检测增生期肿瘤组织与退化期肿瘤组织的差异表达基因,从共同差异表达基因中筛选编码分泌蛋白的基因;

[0009] (2) 分析步骤(1)所获基因编码的分泌蛋白,筛出可分泌入血中、具潜在血清标志物意义的蛋白,即为潜在肿瘤血清标志物;

[0010] (3) 对步骤(2)所获得的潜在肿瘤血清标志物在肿瘤组织及血清中的表达情况进行检测验证,以获得肿瘤血清标志物,所述检测方法包括 ELISA 检测、实时定量 RT-PCR、免疫组织化学及 Western blotting 法。

[0011] 所述肿瘤是指血管瘤。

[0012] 步骤(1)中所述差异表达基因优选差异表达 2 倍以上的基因;步骤(1)中所述基因芯片优选人全基因组表达谱寡核苷酸基因芯片。

[0013] 基因芯片 (Gene Chip) 的概念现已泛化到生物芯片 (biochip)、微阵列 (Microarray)、DNA 芯片 (DNA chip),甚至蛋白芯片。但一般说来,基因芯片通常指 DNA 芯片,即 DNA 微阵列芯片 (DNA microarray),其基本原理是将大量寡核苷酸分子固定于支持物上,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号的强弱进而判断样品中靶分子的数量。本发明中的“基因芯片”就是指 DNA 微阵列芯片。至今为止生物信号平行分析最成功的形式是以一种尼龙膜为基质的“cDNA 微阵列”,用于检测生物样品中基因表达谱的改变。该类基因芯片检测组织细胞中各基因在 mRNA 这一稳定的基因表达水平的数量,故也称为基因表达谱芯片。

[0014] 本发明的优点在于,改进基因芯片检测和分析方法以解决上述两大难题:一方面,

以同一患者同一肿瘤病灶的增生早期和消退前期组织标本进行自身对照,既减少样本量,又在一定程度上消除无意义的差异表达基因,提高结果的可信度。另一方面,针对其中编码分泌蛋白的基因进行筛查,分析这些基因的功能,进一步筛出可分泌入血中、具潜在血清标志物意义的基因,从而系统全面、有效便捷地筛出可能的血管瘤血清标志物。

[0015] 分泌蛋白是指在细胞内合成并分泌至细胞外发挥作用的一类蛋白质,如酶、抗体、细胞因子、神经肽、部分激素等。它仅占人体蛋白的十分之一 (KleinRD,Gu Q,Goddard A,et al.Selection for genes encoding secreted proteins andreceptors.Proc Natl Acad Sci U S A.1996,93 :7108-13.),是一类功能非常重要的蛋白,参与了细胞的生长发育、形态发生、信号传导、细胞分化凋亡、血管生成、肿瘤发生等多种过程。从肿瘤细胞内基因表达合成并分泌于血清的肿瘤标志物,均属分泌蛋白。更重要的是,该分泌型标志物蛋白的血清浓度与瘤体体积、其基因表达量及其蛋白分泌活跃程度等因素相关,这为后期分析该血清标志物与肿瘤临床表现、病程及治疗预后的相关性提供了理论基础,有望成为具临床意义的血清监测指标。

[0016] 本发明针对分泌蛋白筛选肿瘤血清标志物,创新性实践了从肿瘤组织的差异表达基因中寻找血清标志物的捷径:一方面分泌蛋白仅占人体蛋白的十分之一,将筛选范围缩小约 10 倍,大大减少了工作量;另一方面经进一步功能分析,筛选出少数几个潜在的血清标志物,将大大提高血清学验证的成功率,最终筛出有意义的肿瘤血清标志物。

[0017] 在以往肿瘤基因芯片研究中,从瘤体组织的基因检测结果中难以有效准确地筛选定位出潜在的血清标志物。本方法不但跨越了从组织到血清的障碍,而且克服了基因芯片结果筛选过程中工作量大,准确率低,所筛基因意义不明确的难题。依照本方法公开的基因筛查技术方案,能有效便捷地从成百上千个肿瘤组织差异表达基因中,较为准确地筛查定位出潜在的肿瘤血清标志物,并且易于实验验证,成功率较高。它适用于实体或非实体性肿瘤(只要能提取肿瘤基因进行基因芯片检测即适用),能系统全面、有效便捷地筛查肿瘤血清标志物,并能避开已报道因子,消除指标选择上的偏倚,从而筛选出 1 个或多个潜在的肿瘤血清标志物,进行进一步检测验证。

【附图说明】

[0018] 图 1 为微珠芯片检测自身对照组织的差异表达基因,其中一对标本的芯片扫描截图(上)和 4 例差异表达基因散点图(下)。

[0019] 图 2 为血管瘤增生退化期差异表达基因聚类图,图示新的血清标志物 ANG 筛选过程:(A)表示 68 个差异表达基因,(B)表示放大显示含 ANG 的部分差异表达基因,(C)表示筛出的 ANG 等 4 个编码分泌蛋白的基因。

[0020] 图 3 为各组血清 ANG 浓度均值比较:增生期组(PH, n = 46)高于退化期组(IH, n = 23),退化期组高于正常对照组(control, n = 31),增生期组和退化期组均高于静脉畸形组(VM, n = 20)。

[0021] 图 4 为 ROC 曲线分析显示增生组和其他各组的最佳 ANG 临界浓度及相应的敏感度和特异度:A.表示与正常对照组相比,B.表示与静脉畸形组相比,C.表示与退化组相比。

[0022] 图 5 为实时定量 RT-PCR 验证 ANG 在血管瘤组织中 mRNA 水平上的表达,实验结果显示增生期组(PH, n = 6)血管瘤组织中 mRNA 水平上 ANG 的表达高于退化期(IH, n = 5)

组和正常对照组 (control, $n = 5$) ($P < 0.001$)。

[0023] 图 6 为免疫组织化学染色验证 ANG 蛋白在血管瘤组织中的表达, 实验结果显示增生期组 (上行, $n = 26$) 血管瘤血管内皮细胞呈胞浆内强阳性表达 (胞浆内呈现棕黄色颗粒为免疫组化染色阳性), 退化期组 (中行, $n = 25$) 血管瘤血管内皮细胞呈胞浆内中等阳性表达, 正常对照组 (下行, $n = 15$) 呈阴性表达, 提示增生期血管瘤组织中蛋白水平上 ANG 的表达高于退化期组和正常对照组。图中左列放大 200 倍, 右列放大 400 倍。

[0024] 图 7 为 Western blotting 验证 ANG 蛋白在血管瘤组织中的表达, 实验结果显示增生期组 (PH, $n = 7$) 血管瘤组织中 ANG 蛋白定量高于退化期组 (IH, $n = 6$) 和正常对照组 (control, $n = 6$) ($P < 0.05$)。A. 显示三组蛋白印迹条带, B. 显示三组蛋白相对定量统计比较, 均以 β -actin 为内参。

[0025] 图 8 为本方法的技术路线图。

【具体实施方式】

[0026] 下面结合附图对本发明提供的具体实施方式做详细说明。

[0027] 实施例 1: 筛查血管瘤血清标志物

[0028] 依据图 8 所示的技术路线, 设计如下技术方案:

[0029] 选择中科院上海健康科学研究所基因芯片中心提供的人全基因组表达谱寡核苷酸基因芯片, 芯片型号为: illumina Human-6beadchip (微珠芯片), 共 48000 转录本, 特异性探针数量不少于一千万。基因信息来自于 NCBI RefSeqdatabase (Build 36.2, Release 22) 以及 Unigene database (Build 199), 所含基因涉及各个分类以及网上查询所得的热点基因, 并涵盖已报道的相关已知基因。

[0030] 经检测 4 对血管瘤增生、退化期自身对照标本, 筛得差异表达 2 倍以上的基因数目分别为 500、79、436、665 (图 1), 4 例自身对照结果中有 2 例以上同时出现的共同差异表达基因为 68 个 (剔除 4 例中同时出现上调和下调均达 2 倍以上的自相矛盾的基因) (图 2), 其中与退化期相比, 在增生期上调的有 62 个 ($\text{Diffscore} > 20$, $\text{Ratio} > 2$, $P < 0.01$), 下调的有 6 个 ($\text{Diffscore} < -20$, $0 < \text{Ratio} < 0.5$, $P < 0.01$)。

[0031] 之后通过 Genbank 数据库检索汇总这 68 个基因的功能信息和相关参考文献, 搜索与分泌蛋白相关联的关键词, 如 secrete (分泌)、paracrine (旁分泌)、blood (血液)、serum (血清) 等, 共筛查得 4 个有意义的编码分泌蛋白的基因, 包括 ANG、CXCL14、CCL19、PTGDS, 其中血管生长素 (angiogenin, ANG) 是一个关键的分泌型血管生成因子, 能在内皮细胞内合成, 可分泌入外周血中, 具潜在的血清标志物的意义, 已在同日递交的另一份发明专利申请“血管生长素作为血管瘤血清标志物的应用”中公开。

[0032] 经检测增生、退化期血管瘤、静脉畸形及正常对照 4 组血清 A 因子浓度, 发现增生期组血清 ANG 浓度高于退化期组 ($P < 0.01$), 退化期组高于正常对照组 ($P < 0.001$), 增生期组和退化期组均高于静脉畸形组 (P 值分别小于 0.001、0.01) (图 3)。ROC 曲线分析显示血清 ANG 浓度与血管瘤增生退化病程密切相关, 且特异性敏感性强 (表 1, 图 4)。

[0033] 表 1. ROC 曲线分析显示增生组和其他各组的最佳 ANG 临界浓度及相应的敏感度和特异度

[0034]

组别	临界浓度 (ng/ml)	敏感度 (%)	特异度 (%)	曲线下面积(95%可信区间)	P
对照组	113.13	87.0	90.3	0.94(0.88–0.99)	.000
静脉畸形组	116.25	84.8	80.0	0.87(0.75–0.98)	.000
退化组	133.07	69.6	65.2	0.70(0.56–0.84)	.007

[0035] 之后,以实时定量 RT-PCR(图 5)、免疫组织化学(图 6)及 Western blotting(图 7)验证 ANG 在血管瘤组织中的表达,实验结果显示增生期血管瘤组织的 mRNA 及蛋白水平上 A 因子的表达均高于退化期组和正常对照组。

[0036] 上述实验充分验证 ANG 为一种新型的血管瘤血清标志物,具监测血管瘤病程的临床价值,有助于临床上治疗时机、治疗方式及停药时间的决策,从而提高血管瘤综合治疗水平。以往血管瘤、血管畸形的研究中 ANG 从未见报道,属源头创新。这一新的血管瘤血清标志物的成功筛查及实验充分证明本发明所创建的寻找肿瘤血清标志物新方法的科学性和可行性。

[0037] 在寻找其他肿瘤血清标志物中,其应用原理与在血管瘤中的应用方法相同,具体实施方法可根据不同肿瘤的特点作相应调整。该方法关键流程是:首先以高通量基因芯片检测各种肿瘤自身发展变化过程中的众多重要差异表达基因,从中筛选编码分泌蛋白的基因,从而大大缩小筛选范围;之后分析这些基因的功能筛出可分泌入血中、具血清标志物意义的基因,从而大大提高临床验证的成功率;再进一步对所筛得的可能肿瘤血清标志物在肿瘤组织及患者血清中的表达情况进行检测验证;明确为某种肿瘤的血清标志物后,再作临床应用价值的检测验证,以应用于临床监测,辅助肿瘤的治疗。

[0038] 总之,本发明公开的寻找肿瘤血清标志物的新方法具有很强的可行性,对肿瘤性疾病的血清学筛查(早发现早诊断)、临床监测预后判断、辅助治疗方案的决策具有广泛而重大的意义。

[0039] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

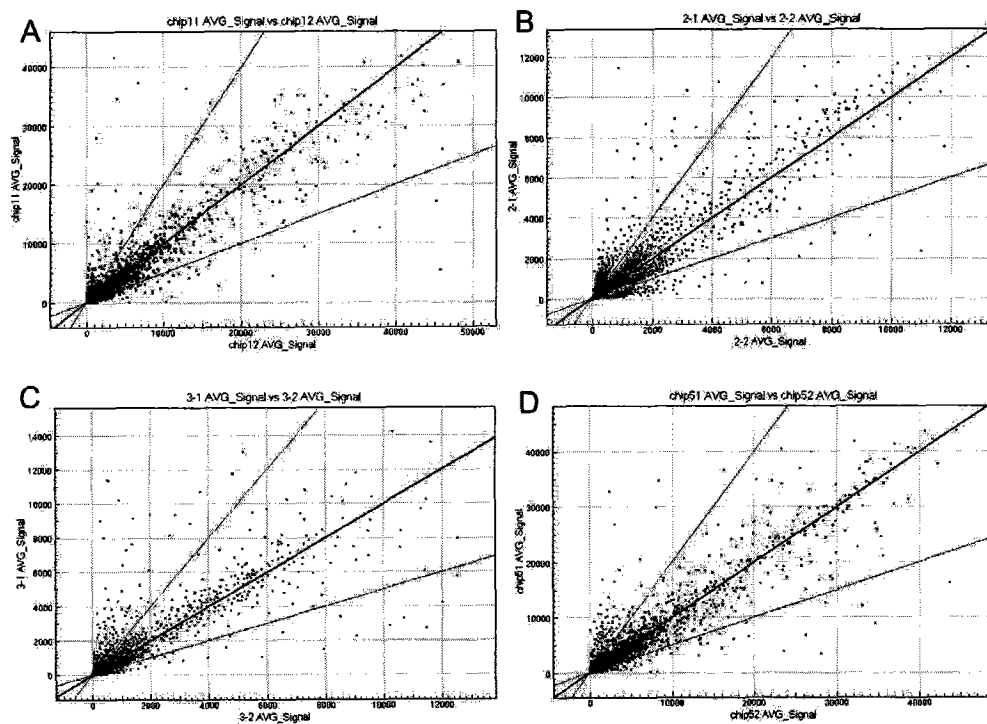


图 1

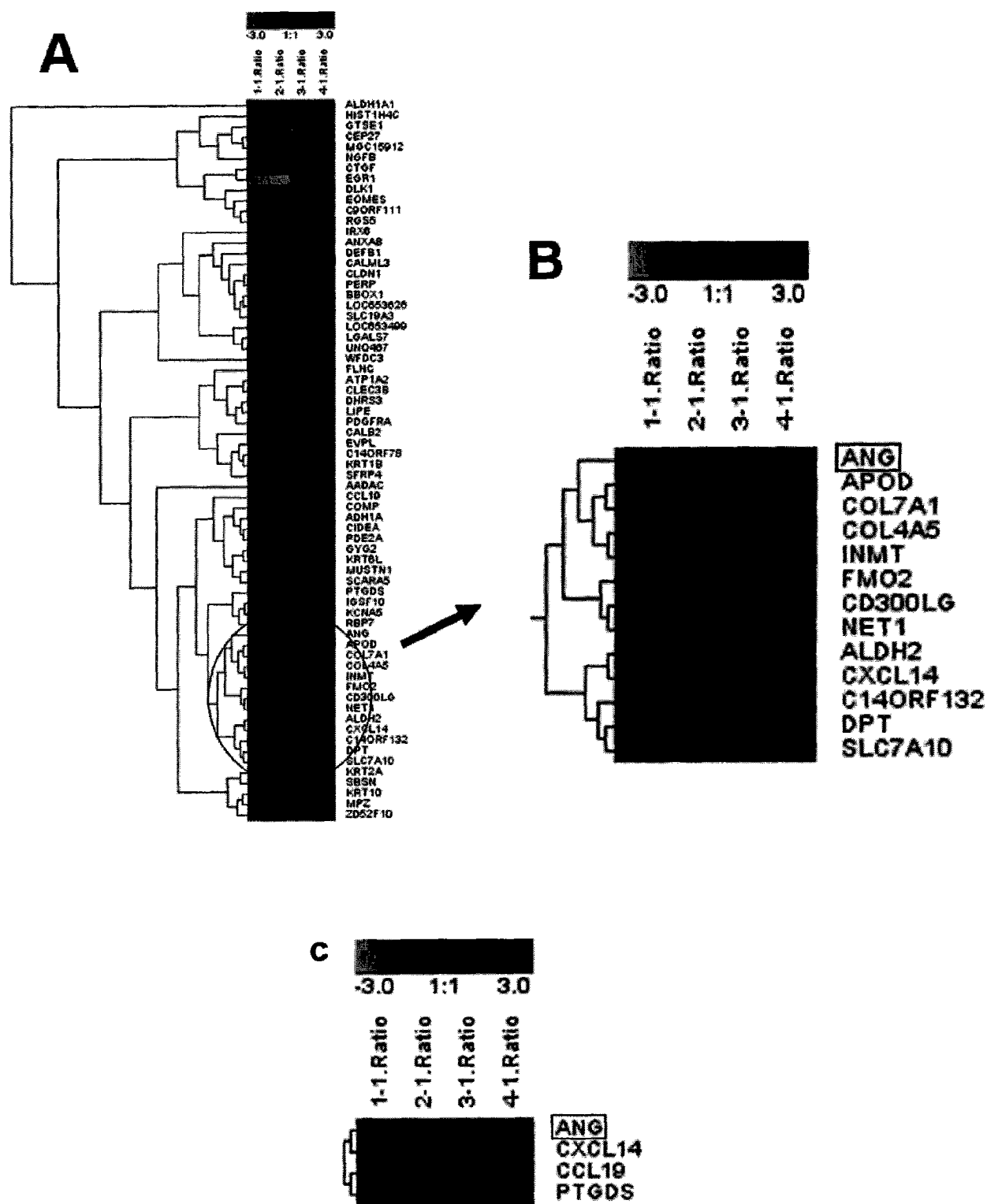


图 2

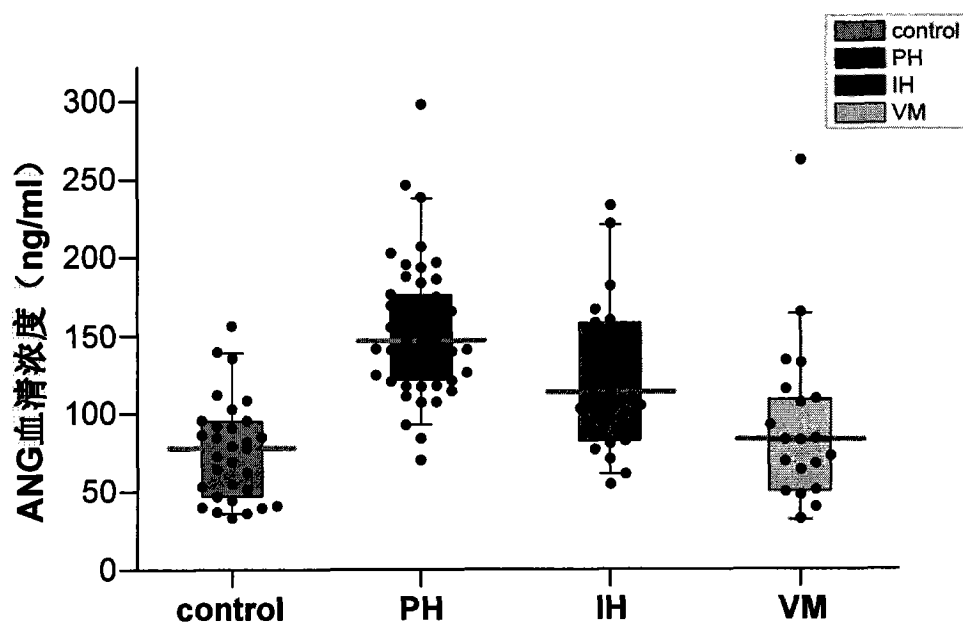


图 3

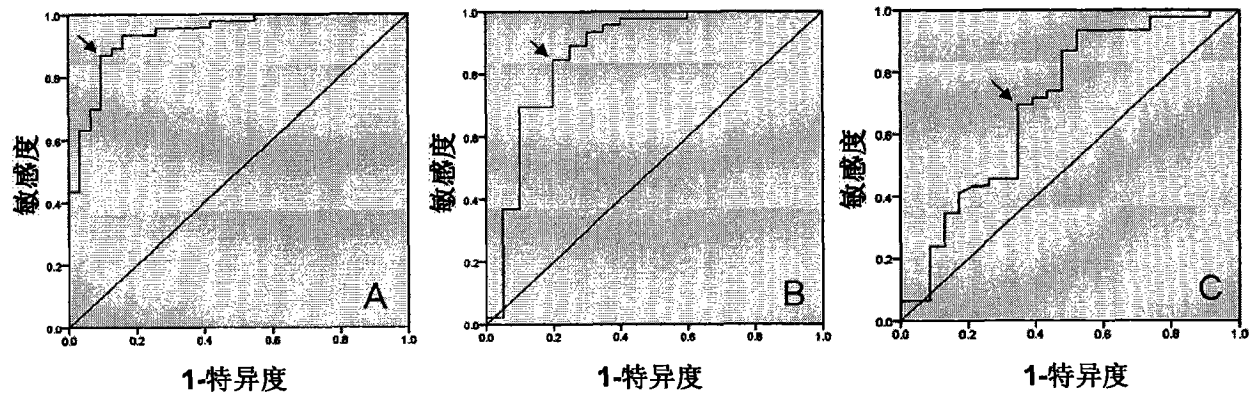


图 4

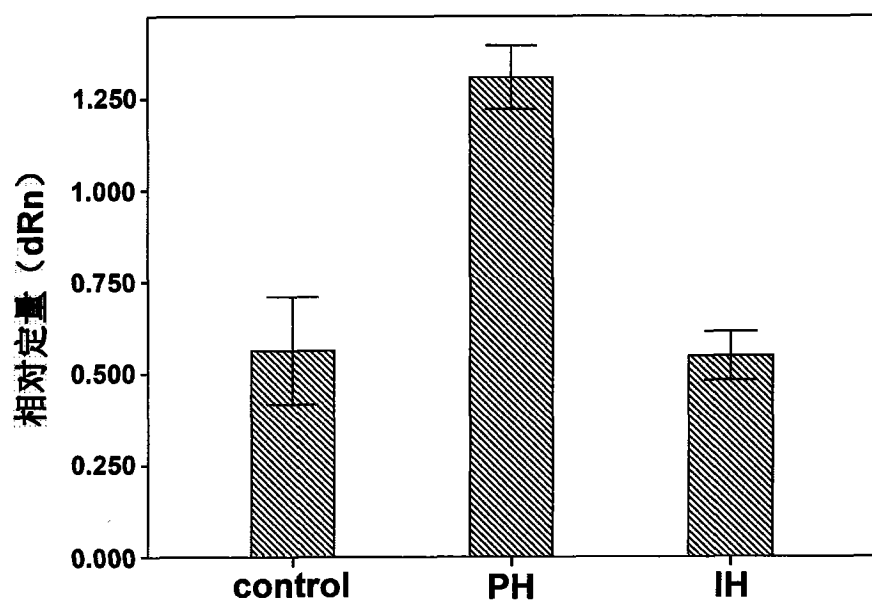


图 5

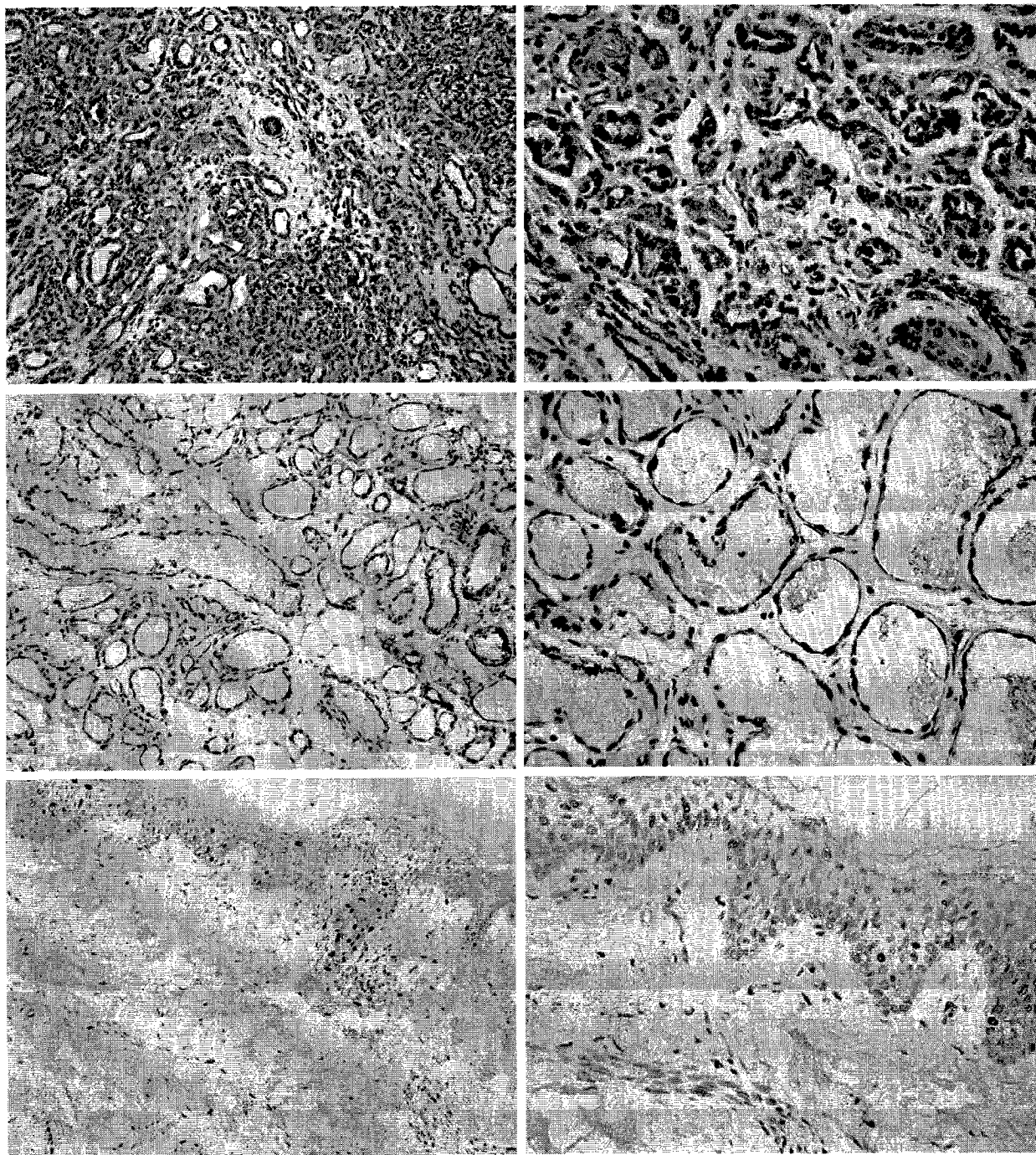


图 6

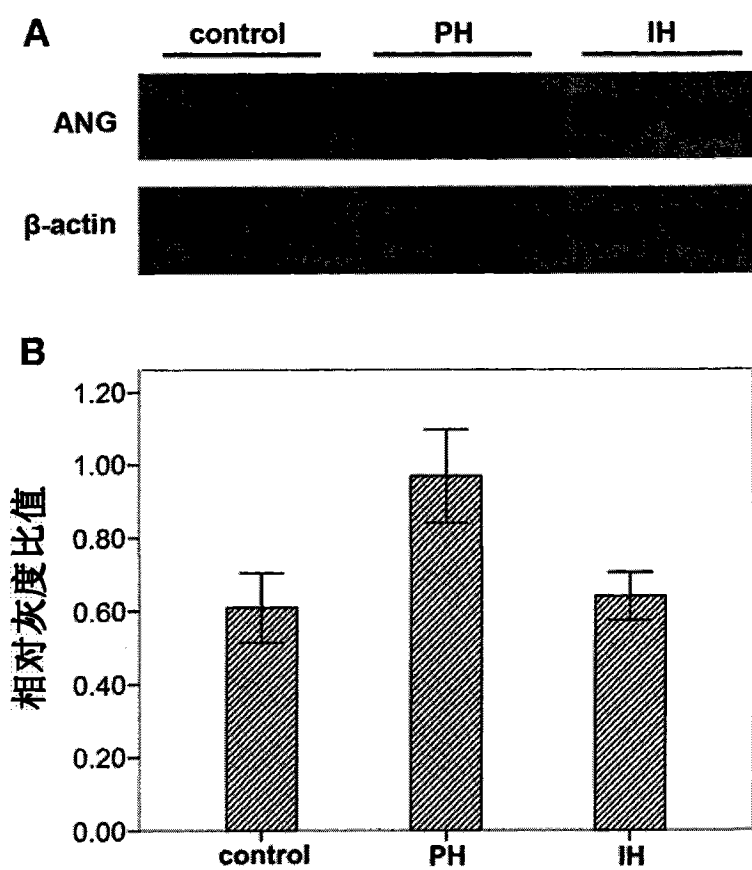


图 7

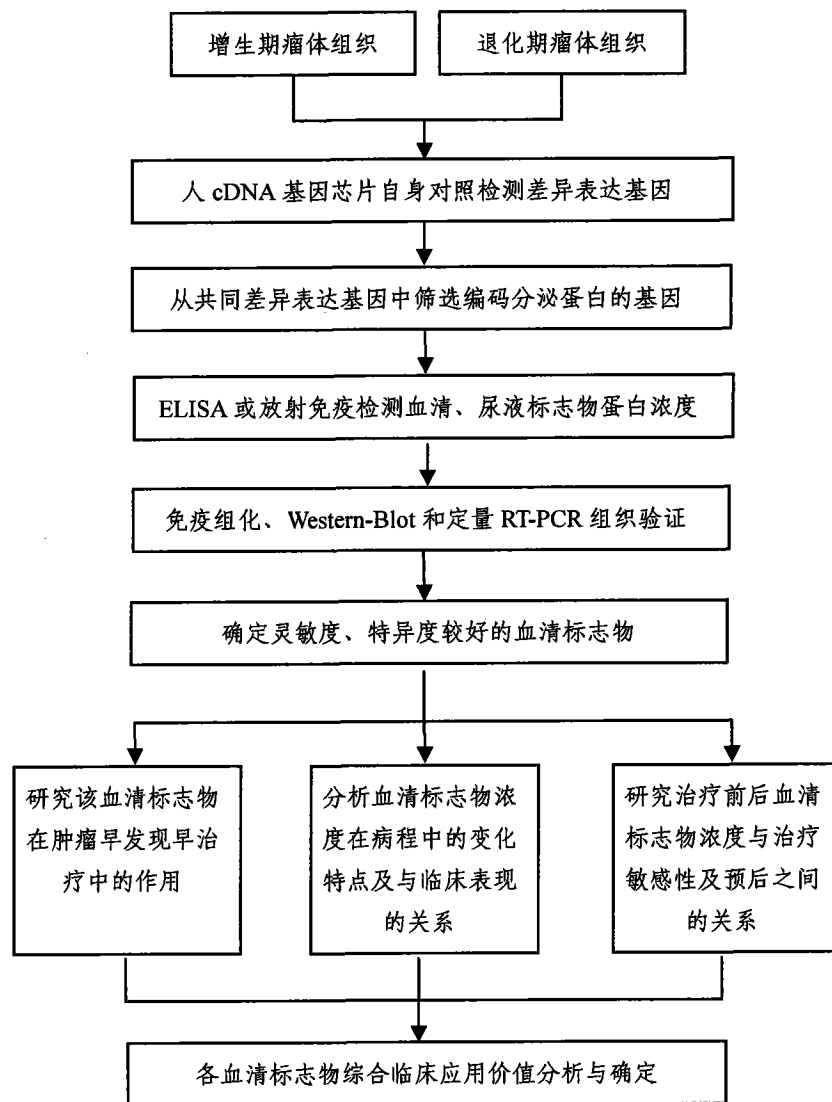


图 8

专利名称(译)	应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法		
公开(公告)号	CN102344956A	公开(公告)日	2012-02-08
申请号	CN201010245211.3	申请日	2010-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属第九人民医院		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属第九人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属第九人民医院		
[标]发明人	林晓曦 江成鸿 胡晓洁 陈辉 金云波 马刚 陈达 陈晓东 李伟 张莉		
发明人	林晓曦 江成鸿 胡晓洁 陈辉 金云波 马刚 陈达 陈晓东 李伟 张莉		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	翟羽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了应用基因芯片检测肿瘤组织筛查肿瘤血清标志物的方法，包括以下步骤：(1)以基因芯片检测增生期与退化期肿瘤组织的差异表达基因，从中筛选编码分泌蛋白的基因；(2)分析所获基因编码的分泌蛋白，筛出可分泌入血中、具潜在血清标志物意义的蛋白；(3)对潜在肿瘤血清标志物在肿瘤组织及血清中的表达进行检测验证，以获得肿瘤血清标志物。本发明从复杂的肿瘤组织差异表达基因中针对编码分泌蛋白的基因简捷有效地筛选肿瘤血清标志物，不但创新性实践了从肿瘤组织的差异表达基因中寻找血清标志物的捷径，而且克服了基因芯片结果筛选过程中工作量大，准确率低，所筛基因意义不明确的难题，对肿瘤血清标志物的寻找具重要参考价值。

