

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780040653.0

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月16日

[11] 公开号 CN 101535506A

[22] 申请日 2007.9.6

[21] 申请号 200780040653.0

[30] 优先权

[32] 2006.9.6 [33] US [31] 60/824, 678

[86] 国际申请 PCT/US2007/077781 2007.9.6

[87] 国际公布 WO2008/030979 英 2008.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.30

[71] 申请人 范德比尔特大学

地址 美国田纳西州

[72] 发明人 J·R·葛登林

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 张广育 刘文君

权利要求书 3 页 说明书 44 页 序列表 4 页
附图 11 页

[54] 发明名称

消化道癌症的筛查方法

[57] 摘要

提供了用于诊断受试者中上消化道(GI)癌症的方法,该方法是通过在来自所述受试者的生物样品中确定一种或多种生物标记物的量进行诊断。还提供了用于确定是否在受试者中开始或继续上GI癌症的预防或治疗的方法,该方法是通过确定所提供的一段时间内的一系列生物样品的每个样品中所述至少一种生物标记物的任何可测量的量变化来进行。

1. 一种用于诊断受试者中上消化道 (GI) 癌症的方法, 包括:
 - (a) 提供来自所述受试者的生物样品;
 - (b) 确定所述样品中选自以下的至少一种生物标记物的量: HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109; 以及
 - (c) 如果在所述样品中存在所述至少一种生物标记物, 则将其量与所述至少一种生物标记物的对照水平相比较, 其中如果所述样品中所述至少一种生物标记物的量与所述对照水平相比有可测量的差异, 那么将所述受试者诊断为患有一种上 GI 癌症。
2. 权利要求 1 的方法, 其中所述上 GI 癌症是一种选自胃癌、胰腺癌和食道癌的癌症。
3. 权利要求 1 的方法, 其中所述生物样品包括血液、血清、血浆、胃分泌物、上 GI 活检样品、来自上 GI 活检物的显微分离细胞、脱落至 GI 腔中的上 GI 细胞以及从大便回收的上 GI 细胞。
4. 权利要求 1 的方法, 其中所述至少一种生物标记物为 HE4。
5. 权利要求 1 的方法, 还包括确定所述样品中 TFF2 生物标记物的量。
6. 权利要求 1 的方法, 其中确定所述至少一种生物标记物的量包括选自以下的一种或多种技术:
 - (a) 使用 RNA 测定分析来测量所述生物样品中所述至少一种生物标记物的 mRNA 的量; 以及
 - (b) 使用蛋白测定分析来测量所述生物样品中所述至少一种生物标记物多肽的量。
7. 权利要求 6 的方法, 其中所述 RNA 测定分析包括 RNA 杂交探针的阵列或定量聚合酶链反应测定。
8. 权利要求 6 的方法, 其中所述蛋白测定分析包括质谱 (MS) 分析、免疫测定分析或者前述二者。
9. 权利要求 8 的方法, 其中所述免疫测定分析包括选择性结合至少一种生物标记物的一种或多种抗体。
10. 权利要求 1 的方法, 还包括基于所确定的所述至少一种生物标记物的量来为所述上 GI 癌症选择一种治疗法或调整一种治疗法。
11. 一种用于确定是否在受试者中开始或继续上消化道 (GI) 癌症的预防

- 或治疗的方法，包括：
- (a) 提供来自所述受试者的一段时间内的一系列生物样品；
 - (b) 分析所述系列的生物样品，以确定每个所述生物样品中选自以下的至少一种生物标记物的量：HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109；以及
 - (c) 确定每个所述生物样品中所述至少一种生物标记物的任何可测量的量变化，由此确定是否开始或继续所述上 GI 癌症的预防或治疗。
12. 权利要求 11 的方法，其中所述上 GI 癌症是一种选自胃癌、胰腺癌和食道癌的癌症。
13. 权利要求 11 的方法，其中所述生物样品包括血液、血清、血浆、胃分泌物、上 GI 活检样品、来自上 GI 活检物的显微分离细胞、脱落至 GI 腔中的上 GI 细胞以及从大便回收的上 GI 细胞。
14. 权利要求 11 的方法，其中所述至少一种生物标记物为 HE4。
15. 权利要求 11 的方法，还包括分析所述的系列生物样品以确定每个所述生物样品中 TFF2 生物标记物的量。
16. 权利要求 11 的方法，其中所述系列的生物样品包括一个在开始所述上 GI 癌症的预防或治疗前收集的第一生物样品，以及一个在开始所述预防或治疗后收集的第二生物样品。
17. 权利要求 11 的方法，其中分析所述系列的样品以确定每个所述样品中所述至少一种生物标记物的量包括选自以下的一种或多种技术：
- (a) 使用 RNA 测定分析来测量每个所述生物样品中所述至少一种生物标记物的 mRNA 的量；以及
 - (b) 使用蛋白测定分析来测量每个所述生物样品中所述至少一种生物标记物多肽的量。
18. 权利要求 17 的方法，其中所述 RNA 测定分析包括 RNA 杂交探针的阵列或定量聚合酶链式反应测定。
19. 权利要求 17 的方法，其中所述蛋白测定分析包括质谱 (MS) 分析、免疫测定分析或者前述二者。
20. 权利要求 19 的方法，其中所述免疫测定分析包括选择性结合所述至少一种生物标记物的一种或多种抗体。
21. 一种用于诊断受试者中上消化道 (GI) 癌症的试剂盒，该试剂盒包

含选择性结合选自以下的一种或多种生物标记物中的每一种的探针：
**HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、
EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109。**

22. 权利要求 21 的试剂盒，其中所述探针与一个基底结合。
23. 权利要求 21 的试剂盒，其中所述探针是被标记的，以使得可检测所述探针与所述一种或多种生物标记物的结合。
24. 权利要求 21 的试剂盒，其中所述探针是 RNA 杂交探针。
25. 权利要求 21 的试剂盒，其中所述探针是抗体。

消化道癌症的筛查方法

相关专利申请

本申请公开的主题要求以 2006 年 9 月 6 日提交的、流水号为 60/824,678 的美国临时专利申请作为优先权基础；该申请的公开内容以引用的方式全文纳入本文。

政府权益

本申请公开的主题是在授以基金编号 P50 CA95103 的美国政府的支持下完成，这项基金由国立卫生研究院（National Institute of Health）（NIH）通过国立癌症研究所杰出研究特殊项目（National Cancer Institute Specialized Programs of Research Excellence）（NCI SPORE）授予。因此，美国政府对本申请公开的主题享有一定的权利。

技术领域

本申请公开的主题涉及筛查受试者中癌症的风险或癌症的存在的方法。具体而言，本申请公开的主题涉及筛查受试者中上消化道癌症的风险或存在上消化道癌症的方法。

背景技术

上消化道（GI）癌症——包括胃癌、食道癌和胰腺癌——在全世界是恶性疾病和死亡的主要原因。实际上，胃癌是全世界的癌症相关死亡的最主要原因之一，并且是亚洲的癌症相关死亡的最主要原因。

胃癌发生的通路受胃谱系中整体变化的介导。过去 15 年的研究已证明，人胃癌的主要根本原因是特定的细菌亚类幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）的慢性感染。见 Blaser, M., and Parsonnet, J. 1994. Parasitism by the bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. J.Clin.Invest. 94:4-8；和 Parsonnet, J, Friedman, GD, Vandersteen, DP, Chang, Y, Vogelmann, JH, Orentreich, N,

and Sibley, RK, 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric cancer, N Engl J Med 325:1127-31。这些发现促使世界卫生组织 (World Health Organization) 将幽门螺杆菌指定为 I 类致癌原。

在存在慢性幽门螺杆菌感染的情况下促成胃癌发展的两个因素如下：
(1) 感染诱发整个胃粘膜的明显炎症反应；以及 (2) 慢性感染导致胃底 (gastric fundus) 丧失腺谱系细胞 (glandular lineage)，特别是分泌酸的壁细胞和分泌胃蛋白酶的主细胞。不论局灶的或总体的，泌酸萎缩 (oxyntic atrophy) 即壁细胞丧失都似乎可作为胃癌形成的素因。见 El-Zimaity, HMT, Ota, H, Graham, DY, Akamatsu, T, and Katsuyama, T, 2002. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma, Cancer 94: 1428-36。

壁细胞的丧失可导致易于发生肿瘤性转化的胃粘膜中出现化生的谱系。在泌酸萎缩后，受试者可能出现不同水平的胃小凹增生。这种表面细胞数目的增加可能是对以下事件的活性反应，该事件即继发于胃酸过少的胃泌素释放增加。泌酸萎缩还可导致粘液细胞化生。过去 10 年的研究已逐渐注意到前期的粘液细胞化生与食道、胰和胃中上消化道癌症的形成之间的关联。

食道癌形成与 Barrett 上皮化生紧密相关，胰腺癌可由离散的粘液细胞化生造成。见 Biankin, A.V., Kench, J.G., Dijkman, F.P., Biankin, S.A., and Henshall, S.M. 2003. Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. Pathology 35:14-24; 和 Cameron, A.J., Lomboy, C.T., Pera, M., and Carpenter, H.A. 1995. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. Gastroenterology. 109:1541-1546。

虽然癌症与细胞萎缩和炎症的关联现在已被认可，但是介导从萎缩发展成肿瘤的干预性细胞事件还不完全清楚。同时，虽然上 GI 型癌症与慢性幽门螺杆菌感染和泌酸萎缩的关联也已被认可，但是离散的化生和癌症之间的联系还很不清楚。进一步的研究可能会揭示这些细节。

关于上 GI 癌症相关的死亡率及发病率，由于通过筛查的早期诊断，两者都已经被降低。严格的上内窥镜监视被认为是现在最有效的筛查方法；然而，该过程是侵入性的、令人不适、耗时并且花费昂贵。因此，该领域中仍需要一种有效的筛查方法来鉴定受试者中上 GI 癌症风险，该方

法应克服现用的筛查方法相关的缺点。

发明内容

本节列出了本申请公开的主题的数个实施方案，并且在许多情况中列出了这些实施方案的调整方案及变化方案。本节纯粹是数目众多不同实施方案的示例。提及一个给定实施方案的一个或多个代表性特征时同样也是示例。这样的实施方案一般可以以具有或不具有所提及的一种或多种特征而存在；同样，这些特征可适用于本申请公开的主题的其他实施方案，而不管其是否在本节中列出。为了避免过度重复，本节不再列出或显示这些特征的所有可能的组合。

本申请公开的主题通过在一些实施方案中提供一种用于诊断受试者中上消化道（GI）癌症的方法解决了上述问题及其他问题，所述方法通过确定来自所述受试者的生物样品中的一种或多种生物标记物的量来实现。在一些实施方案中，本申请公开的主题还提供了一种用于确定是否在受试者中开始或继续上 GI 癌症的预防或治疗的方法，该方法通过在一段时间内提供的一系列生物样品的每个样品中的至少一种生物标记物的任何可测量的量变化来实现。

所述一种或多种生物标记物可以是但不限于以下的生物标记物：HE4（人附睾蛋白 4, WFDC2）；LGALS3（可溶性半乳糖苷结合凝集素 3 (lectin, galactose binding, soluble 3)）；IL1RN（白细胞介素 1 受体拮抗物）；TRIP13（甲状腺激素受体相互作用因子 13）；FIGNL1（fidgetin 样 1）；CRIP1（肠富含半胱氨酸蛋白 1）；S100A4（S100 钙结合蛋白 A4）；EXOSC8（外切酶体 (exosome) 成分 8）；EXPI（细胞外蛋白酶抑制剂，WDM1）；BRRN1（果蝇不孕同源物）；NELF（鼻胚 LHRH 因子）；EREG（表皮调节素）；TMEM40（跨膜蛋白 40）；及 TMEM109（跨膜蛋白 109）。在一些实施方案中，这些方法还包括确定所述样品中生物标记物 TFF2（三叶因子 2）的量。

在一些实施方案中，所述生物样品包括血液、血清、血浆、胃分泌物、上 GI 活检样品、来自上 GI 活检物的显微分离细胞 (microdissected cell)、脱落至 GI 腔中的上 GI 细胞以及从大便回收的上 GI 细胞。在一些实施方案中，所述受试者是人。

在一些实施方案中，对至少一种生物标记物的量的确定包括现有技术

中已知的一种或多种技术，包括 RNA 测定分析和蛋白测定分析。示例性的 RNA 测定分析包括 RNA 杂交探针微阵列和定量聚合酶链式反应 (PCR) 测定 (如定量实时 PCR)。示例性的蛋白测定分析包括质谱 (MS) 分析和免疫测定分析。

所述方法可用作侵入性更强的方法的替代方法，或者可将它们用于预筛查受试者，以确定对哪些受试者应进行其他步骤，即区分不需要接受其他步骤的受试者和可受益于其他的和/或更常见的步骤的受试者。

在一些实施方案中，本申请公开的主题还包括用于诊断受试者中上 GI 癌症的试剂盒。在一些实施方案中，该试剂盒包含用于选择性结合本文公开的一种或多种生物标记物中的每一种的探针。所述探针可以与一种基底结合。在一些实施方案中，所述探针可以是 RNA 杂交探针，其可以包含选择性结合所述一种或多种生物标记物中的每一种的多核苷酸。在其他实施方案中，所述探针是选择性结合所述生物标记物的抗体。在一些实施方案中，所述探针是被标记的，以使得可检测所述探针与所述一种或多种生物标记物的结合。例如，在一些实施方案中，使用一种酶联抗体检测探针与生物标记物的结合。

因此，本申请公开的主题的一个目标是用于筛查受试者中上 GI 癌症的方法。该目标可通过本申请公开的主题完全地或部分地实现。

本领域普通技术人员在研读以下的对本申请公开的主题的说明、附图和非限制性的实施例后，上文已陈述的本申请公开的主题的目标 (可通过本申请公开的主题完全地或部分地实现)、其他目标和优点对于他们来说将是显而易见的。

附图说明

图 1 是显示出用于筛查上 GI 癌症的示例性方法中所包括的步骤的流程图。

图 2 示出了在泌酸萎缩后表达解痉多肽的化生 (SPEM) 的形成的示意图。

图 3A 和 3B 是一系列显微照片。图 3A 的一系列显微照片显示，在以 DMP-777 处理 0 天、1 天、3 天或 7 天的胃泌素敲除小鼠中对 HE4 的免疫染色，这些照片显示出位于胃底腺底部的细胞中的表达上调。图 3B 的一系列显微照片显示，在正常胃底、SPEM 和杯形细胞肠化生中对

HE4 的免疫染色，这些照片显示出正常人的胃不显示 HE4 染色，而 SPEM 和肠化生显示 HE4 染色。

图 4A-4I 是显示出对新生 SPEM 的表征的一系列显微照片。图 4A 显示出来自未处理的胃泌素缺陷型小鼠的、用 Mist1 (绿色, 灰阶照片中的浅色) 和 TFF2 (红色, 灰阶照片中的深色) 双重免疫染色的胃底粘膜。Mist1 抗体染色位于胃底腺底部的成熟主细胞的核 (照片的下侧部分), 而 TFF2 在位于胃底腺颈部的颈粘液细胞中是阳性的 (照片的上侧部分)。没有观察到可辨别的多重染色细胞 (比例条: 50 μm)。图 4B 和 4C 显示, Mist1 和 TFF2 在以 DMP-777 处理 3 天的胃泌素缺陷型小鼠中的表达。位于腺底部的 Mist1 免疫反应细胞 (绿色, 灰阶照片中的浅色) 的数目有减少, 并且许多 Mist1 阳性细胞是 TFF2 (红色, 灰阶照片中的深色) 双重免疫反应的。(比例条: 4B, 50 μm ; 4C, 10 μm)。4C 中的高倍视图表明, 存在 Mist1 和 TFF2 双重标记的细胞 (箭头)。图 4D 显示出来自未处理的小鼠的、以 H/K-ATP 酶抗体 (蓝色, 灰阶照片中的中间色)、TFF2 抗体 (红色, 灰阶照片中的深色) 和内因子抗体 (绿色, 灰阶照片中的浅色) 染色的粘膜。可注意到在所述三个谱系的染色中没有重叠 (比例条: 20 μm)。图 4E 和 4F 显示, 来自以 DMP-777 处理 3 天的小鼠的以 H/K-ATP 酶抗体 (蓝色, 灰阶照片中的中间色)、TFF2 抗体 (红色, 灰阶照片中的深色) 和内因子抗体 (绿色, 灰阶照片中的浅色) 染色的粘膜。虽然壁细胞仅被 H/K-ATP 酶抗体染色, 但位于腺底的 SPEM 细胞是内因子 (绿色, 灰阶照片中的浅色) 和 TFF2 (红色, 灰阶照片中的深色) 两者均着色。图 4F 中高倍视图证明, 在 SPEM 细胞中存在两个分离的小泡群。(比例条: 4E, 10 μm ; 4F, 4 μm)。图 4G、4H 和 4I 示出来自未处理的小鼠的主细胞 (图 4G) 和来自 DMP-777 处理 3 天的小鼠的新生 SPEM 细胞 (图 4H 和 4I) 的电子显微照片。在图 4G 中, 主细胞显示出均一染色的酶原颗粒 (比例条: 2 μm)。如图 4H 和 4I 中所示, 位于以 DMP-777 处理 3 天的小鼠的胃底腺底部的 SPEM 细胞包含一组异质的颗粒形态。(比例条: 4G 和 4H, 2 μm ; 4I, 1 μm)。

图 5 的一系列图示显示出来自对 SPEM 出现过程中的转录物定量 PCR 分析的结果。使用定量 PCR 检测所选的上调转录物或下调转录物在显微分离谱系中的表达, 以验证基因微阵列研究的结果。结果表示为与未处理的主细胞相比的表达变化倍数 ($n=3$, +/- 平均值的标准误, SE)。经

曼-惠特尼 U 检验 (Mann-Whitney U) * $p < 0.05$ 。

图 6A-6E 的显微照片和图 6F 的图示显示出在急性泌酸萎缩过程中 MCM3 表达的结果。将来自未处理的小鼠 (图 6A) 或以 DMP-777 处理 1 天 (图 6B)、3 天 (图 6C)、7 天 (图 6D) 或 14 天 (图 6E) 的小鼠的切片用 MCM3 抗体 (绿色, 灰阶照片中的浅色) 和 Ki67 抗体 (红色, 灰阶照片中的深色) 双重染色。随着 DMP-777 处理量的增加, 在位于腺底部的细胞中观察到 MCM3 染色增加 (比例条: 40 μm)。如图 6F 中所示, 对 MCM3 染色和 Ki-67 染色的定量结果显示了在处理 3-14 天时 MCM3 染色的显著增加 (绿色线, 在灰阶图中显示为浅灰色的线; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。Ki-67 染色 (红色线, 在灰阶图中显示为黑色的线) 显示了小幅增加, 仅在处理 7 天时是显著的 (* $p < 0.05$)。

图 7A 和 7B 是示出未处理的小鼠中的 MCM3 阳性细胞为主细胞的显微照片。将来自未处理的小鼠的切片用 MCM3 抗体 (红色, 灰阶照片中的深色, 以箭头标出)、内因子抗体 (绿色, 灰阶照片中的浅色) 和 DAPI (蓝色, 灰阶照片中的中间色) 染色。图 7A 中, 位于胃底腺底部的细胞的图像显示 MCM3 和 DAPI 的双重染色, 但是图 7B 为三重图像。位于胃底腺底部的 MCM3 阳性细胞也是内因子染色的阳性细胞 (箭头), 这表明可将它们鉴定为主细胞 (比例条: 10 μm)。

图 8A-8C 的显微照片显示出, 在未处理的和 DMP-777 处理的胃泌素缺陷型小鼠中 TACC3 的免疫组织化学染色。将来自未处理的胃泌素缺陷型小鼠 (8A) 和以 DMP-777 处理 1 天 (8B) 或 3 天 (8C) 的小鼠的胃底粘膜的切片进行 TFF2 和 TACC3 的双重染色。双色叠加图像显示于最右边 (合并图)。在 DMP-777 处理仅 1 天后, TACC3 明显地在位于胃腺底部的细胞中表达, 并且在以 DMP-777 处理 3 天后, 这些细胞中的 TACC3 表达增加。

图 9A-9I 的显微照片显示出 HE4 在 SPEM 和杯形细胞肠化生两者中的上调。检验了来自小鼠 (9A-9C) 和人 (9D-9I) 的胃化生中的 HE4 表达。如图 9A 中所示, 在未处理的胃泌素缺陷型小鼠的正常胃粘膜中几乎检测不到 HE4 的免疫反应性。如图 9B 中所示, 在以 DMP-777 处理的胃泌素缺陷型小鼠的 SPEM 中可明显地看到 HE4 的染色。如图 9C 中所示, 在以猫胃螺杆菌 (*Helicobacter felis*) 感染 9 个月的 C57BL/6 小鼠的粘膜 SPEM 中观察到了 HE4 强着色。如图 9D 中所示, 在正常人胃的胃底粘

膜中没有观察到 HE4 染色。如图 9E 中所示，来自人受试者的 SPEM 为 HE4 强染色。如图 9F 中所示，在化生过渡区中 SPEM 和杯形细胞肠化生都是 HE4 着色。如图 9G 和 9H 中所示，在包含 SPEM 和肠化生两者的切片中，HE4 免疫反应性在两种化生中均存在。如图 9I 中所示，肠化生显示 HE4 的强阳性。

图 10A-10L 的显微照片显示出人胃腺癌中的 HE4 的免疫染色。通过使用碱性磷酸酶缀合的二抗和 Vector Red 色原 (chromogen) 的免疫组织化学检测，用 HE4 抗体来对胃腺癌的切片染色。图 10A-10D 为高分化至中分化的胃癌的显微照片。注意到 HE4 在肠型胃腺癌中明显表达。图 10E-10G 是低分化的胃癌的显微照片。虽然大多数低分化癌症或扩散性癌症不显示免疫反应性，但少数的肿瘤也确实显示出阳性。图 10H-10I 是印戒细胞型 (signet ring-cell type) 胃腺癌的显微照片。在印戒腺癌中观察到最强的 HE4 阳性。

图 11 为显示出患病的和正常的人胰中的 HE4 免疫染色的一系列显微照片。用 HE4 抗体对正常的人胰切片 (左上)、具有肿瘤前 PANIN 病变的人胰切片 (右上)，以及具有高分化胰腺癌 (左下) 或低分化胰腺癌 (右下) 的人胰切片染色。

序列表说明

- SEQ ID NO: 1 和 2 分别为 GAPDH 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 3 和 4 分别为 MCM3 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 5 和 6 分别为 MCM5 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 7 和 8 分别为 MCM7 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 9 和 10 分别为 ST3GAL6 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 11 和 12 分别为 ATF3 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 13 和 14 分别为 HE4 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 15 和 16 分别为 IL1RN 特异的正义和反义 PCR 引物。
- SEQ ID NO: 17 和 18 分别为 TFF2 特异的正义和反义 PCR 引物。

具体实施方式

在如下附随的说明中将详细地给出本申请公开的主题的一个或多个实施方案。通过该说明书、附图和权利要求书，本申请公开的主题的其他特征、目标和优点将是显而易见的。本文提及的所有出版物、专利申请、

专利和其他参考文献都通过引用的方式全文纳入本文。本文公开的一些多核苷酸序列和多肽序列与 GENBANK[®]的编号或其他公共数据库的编号是相互参照的。对于在 GENBANK[®]或其他公共数据库中相互参照的序列，以及存在于 GENBANK[®]或其他公共数据库中的等价序列及相关序列，明确地将它们通过引用的方式纳入本文。GENBANK[®]数据库中存在的与本文公开的序列相关的注释亦明确地通过引用的方式纳入本文。Goldenring 等人的美国专利 6,773,890、6,372,439 和 6,107,048 也通过这种引用纳入本文。在出现冲突的情况下，以本说明书（包括定义）为准。

除非另外定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有等同于本申请公开的主题所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。任何类似于或等价于本文所述的方法、设备和材料均可用于实施或测试本申请公开的主题，尽管在此只描述代表性的方法、设备和材料。

按照长期形成的专利法惯例，术语“a（一种）”、“an（一个）”和“the（该）”在用于本申请（包括权利要求书）中时是指“一个或多个”指代对象。因此，例如提到“a cell（一个细胞）”时，包括多个这样的细胞，以此类推。

除非另外指出，否则在本说明书和权利要求书中使用的表示分量、反应条件等的所有数字应被理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。因此，除非指出相反，否则在本说明书和附随的权利要求书中列出的数值参数是可依赖于本申请公开的主题意欲获得的所需性质而变化的近似值。

在提及质量、重量、时间、体积、浓度或百分率的值或量的时候，本文使用的术语“约”的意思是涵盖偏离所述指定量如下区间以内的变化范围，即在一些实施方案中为 $\pm 20\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 10\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 5\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 1\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 0.5\%$ ，以及在一些实施方案中为 $\pm 0.1\%$ ，只要这样的变化适合于实施本申请公开的方法。

上消化道（GI）癌症在全世界一直是癌症相关死亡的一个最主要原因。虽然癌发生的离散机制仍不清楚，但是这些癌症的病因学中的一个常量是所涉及细胞的系列的谱系变化。例如，胃癌部分地是由于胃底粘膜泌酸壁细胞丧失即泌酸萎缩而形成。丧失壁细胞会导致位于胃粘膜的细胞的改变，出现化生性粘液细胞谱系。在人类中，通过从正常到化生到肿瘤的

一系列谱系变化, 泌酸萎缩和胃癌的发生被紧密地联系起来(Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric cancer. *New Eng.J.Med.* 1991;325:1127-1131)。随着所述细胞谱系变化, 还会出现细胞蛋白生物标记物的表达的改变。

本文使用的术语“上 GI 癌症”是指出现于动物受试者上 GI 道中的肿瘤或恶性肿瘤, 该上 GI 道包括动物的口、咽、食管和胃, 以及涵盖胰和胆囊在内的相关器官。示例性的上 GI 癌症包括, 但不限于胃癌、胰腺癌和食道癌。

本申请公开的主题提供了受试者中可被测量的上 GI 癌症的生物标记物的鉴定方法, 以诊断上 GI 癌症。例如, 如在实施例 1 中详细公开的, 现在已经确定, WAP 域蛋白 HE4 在正常的小鼠胃中是不表达的, 但在小鼠的表达解痉多肽/TFF2 的化生 (SPEM) 中以及在人的 SPEM 和肠化生中是高度表达的。如本文中公开的, HE4 在所研究的绝大多数肠型胃腺癌和印戒胃腺癌中表达 (见实施例 1)。本文公开的结果表明, SPEM 发生于主细胞的转分化。再者, 该化生过渡与瘤形成前过程相关的其他重要分泌生物标记物的表达相关联, 所述生物标记物在本文中被公开并且可被用作本发明主题的诊断方法的部分。

由此, 在一些实施方案中, 本申请公开的主题提供了用于通过以下方式诊断受试者中上 GI 癌症的方法, 即通过确定所提供的来自所述受试者的生物样品中的与所述癌症相关的一种或多种生物标记物的量进行诊断。可用于本文公开的诊断方法中的与上 GI 癌症相关的示例性生物标记物包括但不限于: HE4 (人附睾蛋白 4, 也被称为 WFDC2)、LGALS3 (可溶性半乳糖苷结合凝集素 3)、IL1RN (白细胞介素 1 受体拮抗物)、TRIP13 (甲状腺激素受体相互作用因子 13)、FIGNL1 (fidgetin 样 1)、CRIP1 (肠富含半胱氨酸蛋白 1)、S100A4 (S100 钙结合蛋白 A4)、EXOSC8 (外切酶体成分 8)、EXPI (细胞外蛋白酶抑制剂, 也被称为 WDNM1)、BRRN1 (不孕同源物 1, 也被称为 NCAPH)、NELF (鼻胚 LHRH 因子)、EREG (表皮调节素 (epiregulin))、TMEM40 (跨膜蛋白 40) 及 TMEM109 (跨膜蛋白 109)。在一些实施方案中, 除了以上公开的一种或多种生物标记物外, 还可筛查生物标记物三叶因子 2 (TFF2) 以确定 TFF2 在所述生物样品中的量, TFF2 与 GI 道及相关器官的癌症相关联。

表 1 提供了对与上 GI 癌症相关的示例性的人生物标记物 (EXPI 例外, 其中公开的是小鼠生物标记物) 的进一步描述, 包括编码生物标记物多肽的基因座和 mRNA 的登记 ID 编号。然而, 所述示例性的人的生物标记物不被意欲将本发明主题局限于人生物标记物甚或仅 mRNA 生物标记物。更确切地说, 本发明主题涵盖上 GI 癌症相关的各动物物种的生物标记物。另外, 标准的基因/蛋白命名原则一般规定人基因名称缩写为斜体大写字母, 蛋白名称缩写为非斜体大写字母。而且, 标准的基因/蛋白命名原则一般规定小鼠、大鼠和鸡的基因名称缩写为斜体且仅首字母大写, 蛋白名称缩写为非斜体大写字母。相比之下, 本文使用的基因/蛋白命名在言及具体生物标记物时使用全大写字母的生物标记物缩写, 但被意欲包括各动物物种的基因 (包括 mRNA 和 cDNA) 和蛋白。

“生物标记物”是一种用作受试者中生物状态指示物的分子。根据本发明主题, 本文公开的生物标记物可以是呈现出表达变化或状态变化的多肽, 它们可以与受试者中上 GI 癌症的发生风险、存在或进展相关。另外, 本文公开的生物标记物包括编码所述生物标记物多肽的信使 RNA (mRNA), 这是因为 mRNA 表达变化的测量值可与该 mRNA 编码的多肽的表达变化相关联。由此, 确定生物样品中生物标记物的量包括确定多肽生物标记物的量, 以及/或者通过直接 mRNA 或间接 (例如, 通过测量从该 mRNA 合成的互补 DNA (cDNA)) 测量 mRNA 来确定编码该多肽生物标记物的 mRNA 的量。

表 1

生物标记物	人基因座	登记 ID 编号 (mRNA)
HE4 (WFDC2)	20q12-q13.2	X63187
LGALS3	14q22.3	NM_002306
IL1RN	2q14.2	M55646
TRIP13	5p15	L40384
FIGNL1	7p12.2	AK023142
CRIP-1	14q32.33	NM_001311
S100A4	1q12-q22	NM_002961

EXOSC8	13q13.1	NM_181503
EXPI (WDM1)	小鼠* (<i>Mus musculus</i>)	NM_007969
BRRN1 (NCAPH)	2q11.2	NM_015341
NELF	9q34.3	NM_015537
EREG	4q21.21	D30783
TMEM 40	3p25.2	NM_018306
TMEM 109	11q12.2	NM_024092

*提供了小鼠基因。人同源物未确定。

术语“多肽”、“蛋白”和“肽”在本文中可互换使用，是指 20 种蛋白氨基酸（包括被修饰的氨基酸（如磷酸化的、糖化的等））的聚合物，而不考虑大小或功能。虽然“蛋白”经常被用于言及相对较大的多肽，“肽”经常被用于言及较小的多肽，但是这些术语在本领域中的用法有重叠并且有变化。除非另外指出，否则本文使用的术语“肽”是指肽、多肽、蛋白和蛋白片段。本文中的术语“蛋白”、“多肽”和“肽”在提及基因产物及其片段时可互换使用。因此，示例性的多肽包括基因产物、天然存在的蛋白、前两者的同源物、直系同源物（ortholog）、旁系同源物（paralog）、片段以及其他等价物、变体和片段。

术语“多肽片段”或“片段”在用于言及多肽时是指这样的多肽，即其与全长的多肽本身相比有氨基酸残基缺失，但余下的氨基酸序列通常与该参照多肽的相应位置一致。这种缺失可出现于该参照多肽的氨基端或羧基端，或者两端。

片段可保持参照多肽的一种或多种生物活性。在一些实施方案中，片段可包含一个结构域或部分，并且任选地在该结构域或部分的一端或两端包含其他氨基酸，这些其他氨基酸可共计为 5、10、15、20、30、40、50 或最多至 100 个残基，或者更多残基。而且，片段可包括特定区域的亚片段，这种其他片段保留了派生它的区域的功能。当术语“肽”用于本文的时候，意欲包括全长肽以及肽片段。因此，鉴定出的肽片段（例如通过质谱或免疫测定）意欲涵盖该片段以及全长肽。由此，确定样品中生物标记物的量可包括确定全长生物标记物多肽、其修饰的变体和/或片段的量。

在本申请公开的主题的一些实施方案中，提供了用于诊断受试者中上 GI 癌症的方法。本文使用的术语“诊断”是这样的方法，即本领域技术人员通过这些方法可估计乃至确定一个受试者是否患有的一种给定的疾病或病症。本领域技术人员经常以一种或多种诊断指示物为基础进行诊断，所述指示物例如一种生物标记物，其量（包括存在或不存在）可指示所述病症的存在、严重性或不存在。

除了诊断，临床癌症的预后也是一个很受关注和注意的方面。为了设计最有效的治疗，知晓癌细胞的侵袭力及肿瘤复发的可能性很重要。如果可进行更加准确的预后甚或评估形成所述癌症的潜在风险，那么就可以为患者选择合适的治疗，以及在某些情况下更缓和的治疗。可将癌症生物标记物的测量可基于以下目的使用，即将具有良好预后和/或低癌症发生风险的、不需要治疗或需要有限治疗的受试者与那些更可能发生癌症或遭受癌症复发的、可能受益于更强烈治疗的受试者分离。

由此，本文使用的“进行诊断”或“诊断”还包括，基于对本文公开的诊断生物标记物的测量确定发生癌症的风险或确定预后，这些可提供对临床结果的预测（进行或未进行医学治疗）、对合适治疗的选择（或治疗是否有效）或者对现行治疗的监测及可能的治疗改变。而且，在本申请公开的主题的一些实施方案中，可以随时间多次进行对所述生物标记物的测定以有利于诊断和/或预后。所述生物标记物的时间性变化可用于预测临床结果、监测所述上 GI 癌症的进展和/或针对所述癌症的适当治疗的效果。在一个这样的示例性实施方案中可能会有以下预期，即生物样品中一种或多种本文公开的生物标记物（以及有可能的一种或多种其他生物标记物，包括但不限于 TFF2，条件是它（们）被监测）的量在有效治疗的过程中会随时间减少。

在一些实施方案中，本申请公开的主题还提供了一种用于确定是否在受试者中开始或继续一种癌症的预防或治疗的方法。在一些实施方案中，所述方法包括，提供来自所述受试者的一个时间段内的一系列生物样品；分析所述系列的生物样品以确定所述每个生物样品中的至少一种本文公开的生物标记物的量；并且比较每个生物样品中一种或多种生物标记物的量的任何可测量变化。在所述时间段内生物标记物的量的任何变化可用于预测发生癌症的风险，预测临床结果，确定是否开始或继续所述癌症的预防或治疗，以及现行治疗是否能有效地治疗所述癌症。例如，可以在开始

治疗之前选择一个第一时间点,并且在开始该治疗后的某个时间点选择一个第二时间点。可以测量取自不同时间点的每个样品中的生物标记物水平,并记录定性和/或定量差异。来自不同样品的生物标记物水平的量变化可与所述受试者中上 GI 癌症风险、预后、确定治疗效果和/或该癌症的进展相关联。

本文使用的术语“相关的”和“相关联”在言及本文公开的生物标记物的诊断用途和预后用途时,是指将受试者中生物标记物的存在或量与其在以下的受试者中的存在或量进行对比,即已知患有给定病症(如上 GI 癌症)或者已知处于该病症风险中的受试者,或者已知没有给定病症的受试者,即“正常受试者”或“对照受试者”。例如,可以将生物样品中一种或多种本文公开的生物标记物的水平与已确定与具体癌症类型相关的生物标记物水平进行对比。所述样品的生物标记物水平被认为已与诊断相关联;即本领域技术人员可使用所述生物标记物水平来确定所述受试者是否患有一种具体的癌症类型,并作出相应处理。或者,可将所述样品的生物标记物水平与已知与良好结果(如无癌症)相关的对照的生物标记物水平(例如正常受试者群中存在的平均水平)进行比较。

在某些实施方案中,用于诊断或预后的生物标记物仅通过其存在与否与病症或疾病相关联。在其他实施方案中,可确立一种用于诊断或预后的生物标记物的阈值水平,并可只将受试者样品中的该指示物水平与该阈值水平进行比较。

如所述的,在一些实施方案中,可多次进行一种或多种用于诊断或预后的生物标记物的测定,所述标记物的时间性变化可用于确定诊断或预后。例如,一种诊断标记物可在初始时间被测定,并在第二时间再次被测定。在这样的实施方案中,所述标记物从初始时间至第二时间内的增加是一种具体的癌症类型或癌症严重度的诊断指标,或者是一种给定的预后指标。同样,所述标记物从初始时间至第二时间内的降低是一种具体的癌症类型或癌症严重度的指标,或者一种给定的预后指标。再者,可以将一种或多种标记物的变化程度与所述癌症的严重度以及未来的不良事件相关联。

本领域技术人员应理解,虽然在某些实施方案中可以在多个时间点进行同一生物标记物的比较测量,但是也可以在一个时间点测量一种给定生物标记物并在另一时间点测量另一生物标记物,对这些标记物的比较可提

供诊断信息。

本文使用的短语“确定预后”是指这样的方法，即本领域技术人员通过该方法可预测受试者中一种病症的过程或结果的能力。术语“预后”不是指基于一种生物标记物的存在、不存在或水平以 100% 的准确性预测一种病症的过程或结果的能力，甚至也不是指基于一种生物标记物的存在、不存在或水平预测一种给定过程或结果更可能发生或更不可能发生的能力。相反，本领域技术人员应理解，术语“预后”是指某一过程或结果出现的可能性增加；即当与没有呈现一种给定病症的那些个体相比时，一种过程或结果更可能出现在呈现该病症的受试者中。例如，在不呈现该病症（例如不表达或者以降低的水平表达该生物标记物）的个体中，给定结果（例如患一种上 GI 癌症）出现的可能性可以很低（如 <1%）甚或没有。相反，在呈现该病症（例如表达或以大大高于对照的水平表达该生物标记物）的个体中，给定结果（例如患一种上 GI 癌症）出现的可能性可以较高。在某些实施方案中，预后是有约 5% 的可能性、约 7% 的可能性、约 10% 的可能性、约 12% 的可能性、约 15% 的可能性、约 20% 的可能性、约 25% 的可能性、约 30% 的可能性、约 40% 的可能性、约 50% 的可能性、约 60% 的可能性、约 75% 的可能性、约 90% 的可能性或约 95% 的可能性出现一种给定预期结果。

本领域技术人员应理解，将预后指示物与产生不良结果的素因进行关联是一项统计分析。例如，在一些实施方案中，高于对照水平的生物标记物水平（例如一个样品中的一种生物标记物的量）可预兆受试者比具有低于或等于所述对照水平的受试者更有可能患一种癌症，这由统计显著性水平来确定。另外，标记物浓度相对于基线水平的变化可以反映出受试者的预后情况，并且标记物水平变化的程度可以与不良事件的严重度相关联。统计显著性经常通过以下方式确定，即比较两个或多个群并确定置信区间及/或 p 值。例如，见 Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983, 该参考文献通过引用的方式全文纳入本文。本发明主题的示例性置信区间为 90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9% 和 99.99%，而示例性 p 值为 0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001 和 0.0001。

在其他实施方案中，可确立一个用于预后或诊断的本文公开的生物标记物的水平变化阈值度，并可只将生物样品中的该指示物的水平变化度与

该水平变化阈值度进行比较。本申请公开的主题的标记物的水平变化阈值优选为约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 50%、约 75%、约 100%和约 150%。在又一个实施方案中，可确立一种“诺模图 (nomogram)”，通过该图可以将预后的或诊断的指示物水平与一个给定结果的相关倾向进行直接关联。本领域技术人员知晓使用这种诺模图来关联两个数值，并同时理解由于所参照的是个体样品的测量值而非群体的平均值，因此该测量的不确定性与该标记物浓度的不确定性相同。

从样品确定的生物标记物的“量”是指所述生物标记物的定性测量值（例如在所述测量样品中存在或不存在）、定量测量值（例如存在多少）或者上述两种测量值。“对照水平”是指未患上 GI 癌症或至少未患被测目的上 GI 癌症的受试者中的可比较样品中存在的所述生物标记物的量（包括定性存在或不存在）或量区间。作为计算该对照水平的一个非限制性实例，可计算正常生物样品中存在的生物标记物的量并将其外推至全体受试者。

参照图 1，现公开了一种用于诊断受试者中上 GI 癌症的本发明主题的非限制的示例性方法。该示例性方法 100 包括：提供来自所述受试者的生物样品 102；确定所述生物样品中至少一种生物标记物的量，其中至少一种生物标记物选自：HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109 104；以及将所述样品中所述至少一种生物标记物（如果存在）的量与所述至少一种生物标记物的对照水平相比较 106。然后，如果所述样品中所述至少一种生物标记物的量与所述对照水平相比有可测量的差异，那么将该受试者诊断为患有一种上 GI 癌症。

关于提供来自所述受试者的生物样品这一步骤 102，可提供不同类型的生物样品，并将其用于示例性的方法 100 中。例如，可以提供血清样品、血浆样品或血液样品。又例如，可以提供胃分泌物。再又例如，可以提供以下的生物样品：上 GI 活检样品（如来自胃）；来自上 GI 活检物的显微分离的细胞；脱落至 GI 腔的上 GI 细胞；以及从大便回收的上 GI 细胞。从受试者中获得前述样品的方法在本领域中是普遍已知的。

现在来说确定所述生物样品中至少一种生物标记物的量这一步骤 104，本领域技术人员已知的多种方法可用于鉴定所提供的生物样品中的所述一种或多种生物标记物。在一些实施方案中，对所述至少一种生物标

记物的量的确定包括，使用 RNA 测定分析来测量所述样品中编码生物标记物多肽的 mRNA 以及/或者使用蛋白测定分析来测量所述样品中生物标记物多肽的量。

在本方法的某些实施方案中，生物标记物的量可通过以下方式进行确定，即使用本领域技术人员已知的任何 RNA 鉴定测定对所述样品中所述生物标记物的 mRNA 进行探测。简而言之，从所述样品提取 RNA，该 RNA 经扩增转化成 cRNA、被标记并与已知序列的探针例如固定于基底（如阵列或微阵列）上的已知 RNA 杂交探针（对编码生物标记物多肽的 mRNA 有选择性）进行杂交，或者经实时 PCR（例如定量实时 PCR，如可获自 Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, U.S.A.）进行定量。因为所述样品的核酸分子所结合的探针是已知的，所以可以鉴定所述样品中的所述分子。在这一点上，可以将 HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109 中的一个或多个的 DNA 探针固定于基底上，并提供用于实施一种根据本发明主题的方法。

关于确定样品中生物标记物多肽的量，可以使用质谱和/或免疫测定装置和方法，但是其他方法也是本领域技术人员所熟知的。例如，见例如美国专利 6,143,576、6,113,855、6,019,944、5,985,579、5,947,124、5,939,272、5,922,615、5,885,527、5,851,776、5,824,799、5,679,526、5,525,524 和 5,480,792，以上每件专利均通过引用的方式全文纳入本文。免疫测定装置和方法可以利用多种夹层的、竞争性的或非竞争性的测定形式的标记分子，以产生与目的分析物的存在或量有关的信号。另外，某些方法和装置（例如生物传感器和光学免疫测定）可用于确定分析物的存在或量，而不需要标记的分子。例如，见例如美国专利 5,631,171 和 5,955,377，以上每件专利均通过引用的方式全文纳入本文。

因此，在本申请公开的主题的某些实施方案中，使用一种免疫测定来分析生物标记物肽。本文公开的生物标记物肽的存在或量可通过以下方式进行确定，即使用对每个生物标记物多肽或其片段特异的抗体或其片段并检测特异性结合进行确定。例如，在一些实施方案中，所述抗体可特异性结合 HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 或 TMEM109，包括与全长肽或其片段结合的抗体。在一些实施方案中，所述抗体是单克

隆抗体。

可以利用任何合适的免疫测定，例如酶联免疫测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA)、竞争性结合测定等。可直接地或间接地检测所述抗体与所述标记物的特异性免疫学结合。直接的标签包括附着在所述抗体上的荧光标记或发光标记、金属、染料、放射性核素等。间接的标签包括本领域中所熟知的多种酶，例如碱性磷酸酶、辣根过氧化酶等。

本申请公开的主题还考虑使用对所述标记物特异的固定化抗体或其片段。所述抗体可被固定于多种固体支持物上，例如磁性颗粒或色谱基质颗粒 (chromatographic matrix particle)、测定板表面 (如微量滴定孔)、固体基底材料 (solid substrate material) (如塑料、尼龙、纸) 等。通过将所述抗体或多个抗体被覆在固体支持物上的阵列中可制备测定条 (assay strip)。然后，可将该测定条浸泡在所述测试生物样品中，然后迅速经过洗涤和检测步骤处理以产生可测量的信号，例如有色斑。

在一些实施方案中，质谱 (MS) 分析可被单独用于或与其他方法 (如免疫测定或 RNA 测定分析) 结合用于确定生物样品中一种或多种本文公开的生物标记物的存在及/或量。在一些实施方案中，MS 分析包括基质辅助激光解吸/电离 (MALDI) 飞行时间 (TOF) MS 分析，例如直接点 MALDI-TOF (direct-spot MALDI-TOF) 质谱分析或液相色谱 MALDI-TOF 质谱分析。在一些实施方案中，MS 分析包括电喷雾电离 (ESI) MS，例如液相色谱 (LC) ESI-MS。质量分析可使用市售的光谱仪来完成。利用 MS 分析 (包括 MALDI-TOF MS 和 ESI-MS) 来检测生物样品中生物标记物肽的存在和量的方法在现有技术中是已知的。进一步的指导见例如美国专利 6,925,389、6,989,100 和 6,890,763，以上每件专利均通过引用的方式纳入本文。

虽然该方法的某些实施方案仅用于定性地评估所述生物样品中存不存在所述一种或多种生物标记物，但是该方法的其他实施方案可用于定量地评估所述生物样品中所述一种或多种生物标记物的每一种的量。例如，可使用上文提及方法中的一种进行这类定量评估，这是本领域技术人员可理解的。

除了表 1 中列出的具体生物标记物之外，还可对用于诊断上 GI 癌症的其他生物标记物的量进行测量。例如，三叶因子 2 (TFF2) 免疫反应细胞的存在与胃癌相关。见 Schmidt, P.H., Lee, J.R., Joshi, V., Playford, R.J.,

Poulsom, R., Wright, N.A., and Goldenring, J.R. 1999. Identification of a metaplastic cell lineage associated with human gastric adenocarcinoma. Lab.Invest. 79:639-646 (“Schmidt, et al.”)。又例如, 胃蛋白酶原 I/II 的某些比值已发现与某些上 GI 癌症相关联。例如, 见 Oishi Y, Kiyohara Y, Kubo M, Tanaka K, Tanizaki Y, Ninomiya T, Doi Y, Shikata K, Yonemoto K, Shirota T, Matsumoto T, Iida M. 2006. The serum pepsinogen test as a predictor of gastric cancer: the Hisayama study. Am J Epidemiol. 163(7):629-37; 和 Dinis-Ribeiro M, da Costa-Pereira A, Lopes C, Barbosa J, Guilherme M, Moreira-Dias L, Lomba-Viana H, Silva R, Abreu N, Lomba-Viana R. 2004. Validity of serum pepsinogen I/II ratio for the diagnosis of gastric epithelial dysplasia and intestinal metaplasia during the follow-up of subjects at risk for intestinal-type gastric adenocarcinoma. Neoplasia. 6(5):449-56。由此, 可另外测量 TFF2 及/或胃蛋白酶原 I 和胃蛋白酶原 II (为了确定胃蛋白酶原 I/II 比值) 以形成诊断矩阵, 用于鉴定那些具有患上 GI 癌症风险或已经患有上 GI 癌症的患者。

在该方法的某些实施方案中, 可能需要包括与所述生物样品同时进行分析的对照样品, 使得可以将从所述生物样品得到的结果与从所述对照样品得到的结果进行比较。另外, 还考虑了提供标准曲线, 可将从所述生物样品得到的测定结果与之进行比较。这种标准曲线将生物标记物水平以测定单位 (在使用荧光标签时, 即荧光信号强度) 的函数形式显示。使用取自多种供体的样品, 可提供以下水平的标准曲线: 即正常组织中所述一种或多种生物标记物的对照水平的标准曲线, 以及取自有化生的供体或取自有上 GI 癌症的供体的组织中所述一种或多种生物标记物的“风险”水平的标准曲线。

在该方法的某些实施方案中, 在取自一个受试者的生物样品中鉴定到选自以下的一种或多种生物标记物时该受试者被鉴定为有化生: HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109。在该方法的其他实施方案中, 在取自所述受试者的生物样品中鉴定到一种或多种的这些生物标记物时该受试者被鉴定为患有癌症。

不管所述生物样本中的所述一个或多个生物标记物是通过测量生物

标记物基因表达（如 mRNA）鉴定还是通过直接测量所述蛋白生物标记物鉴定，都可考虑通过探测所述生物样品中的多个生物标记物来提高所述诊断方法的有效性、准确性、灵敏度和特异性。例如，在该方法的某些实施方案中，可在所述生物样品中探测 TFF2 和选自以下的生物标记物：HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109。又例如，可在所述生物样品中探测 2-5 种选自以下的生物标记物：HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109。又例如，可在所述生物样品中探测 6-10 种选自以下的生物标记物：HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109。

所述标记物分析可与一个测试样品中另外的标记物分别地或同时地进行。例如，可将多个标记物合并到一个测试中，用于对多个样品的有效处理，并且可能用于提供更高的诊断及/或预后准确度。另外，本领域技术人员会知道从同一受试者测试多个（例如在连续的时间点的）样品的好处。这种对连续样品进行测试使得可随时间鉴定标记物水平的变化。标记物水平的升高或降低，以及标记物水平没有变化可提供关于疾病状态的有用信息，所述信息包括但不限于鉴定从所述事件开始的大约时间，可补救组织的存在和量，药物治疗的适合程度，多种治疗的有效性，以及受试者的结果的鉴定（包括未来事件的风险）。

可以以多种物理形式进行生物标记物分析。例如，微量滴定板或自动装置的使用可被用于促进大量测试样品的处理。或者，可以开发单样品的形式以有利于即时地进行立即治疗及诊断，例如在救护车上或在急诊室中。

再次参照图 1，如果与对照水平相比时，所述样品中至少一种生物标记物的量有可测量的差异，那么该受试者被诊断为患有上 GI 癌症 106。相反，如果在所述生物样品中没有鉴定到所探测的生物标记物，那么可以将所述受试者鉴定为未患有上 GI 癌症、不处于该癌症的风险中或者具有较低的该癌症的风险。在这一点上，可将患有该癌症或具有其风险的受试者与具有低至基本上无癌症或其风险的受试者进行区分。可以对那些具有发生一种上 GI 癌症的风险的受试者进行更深入的和/或更常规的筛选流

程，包括上内窥镜监视。另一方面，那些具有低至基本上无风险的受试者可避免经受内窥镜检查，直至在以后的筛选（例如依照本发明主题进行的筛选）时表明在这些受试者中出现了上 GI 癌症的风险。

如上文提及的，依赖于本发明主题的方法的实施方案，对所述一种或多种生物标记物的鉴定可以是定性确定所述生物标记物的存在或不存在，或者可以是定量地确定所述生物标记物的浓度。在这一点上，在所述示例性方法中，诊断所述受试者患有上 GI 癌症或者具有发生上 GI 癌症的风险的步骤表明，可进行某些阈值的测量，即所述生物样品中所述一种或多种生物标记物的水平超过预设的对照水平 106。在该方法的某些实施方案中，所述对照水平是所述生物标记物的任何可检测的水平。在该方法的其他实施方案中，其中一个对照样品与所述生物样品同时测试，所述预设水平是在该对照样品中检测到的水平。在该方法的其他实施方案中，所述预设水平可基于标准曲线以及/或者用标准曲线进行鉴定。在该方法的其他实施方案中，所述预设水平是一个专门指出的浓度或浓度区间。由此，在对本领域技术人员来说显而易见的可接受的限度内，可部分地基于所实施的方法的实施方案以及所需的特异性等选择所述预设水平。

此外，关于本申请公开的主题的诊断方法，优选的受试者为脊椎动物受试者。优选的脊椎动物是温血动物；优选的温血脊椎动物是哺乳动物。优选的哺乳动物最优选人。如本文中使用的，术语“受试者”包括人受试者和动物受试者。因此，根据本申请公开的主题提供了兽医的治疗用途。

由此，本申请公开的主题提供了对哺乳动物的诊断，所述哺乳动物例如人以及那些由于濒临灭绝而重要的哺乳动物，例如东北虎（Siberian tiger）；具有重要经济学价值的哺乳动物，例如在农场中饲养用于人消费的动物；以及/或者在社会关系上对人来说重要的动物，例如作为宠物或在动物园中的动物。这些动物的实例包括但不限于：食肉动物例如猫和狗；猪类（swine），包括猪（pig）、阉猪（hog）和野猪（wild boar）；反刍动物及/或有蹄动物例如牛（cattle）、公牛（ox）、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼；以及马。因此，还提供了家畜的诊断和治疗方法，所述家畜包括但不限于家猪、反刍动物、有蹄动物、马（包括竞赛马）等。

本申请公开的主题还包括一个用于诊断受试者中一种上 GI 癌症的系统。例如，该系统可以以这样一种市售试剂盒提供，即该试剂盒可用于筛查所收集的生物样品所属的受试者中上 GI 癌症的风险或诊断所述受试者

中的上 GI 癌症。根据本发明主题提供的一个示例性系统包括这样的探针，即该探针用于选择性结合选自以下的一种或多种生物标记物中的每一种：**HE4、LGALS3、IL1RN、TRIP13、FIGNL1、CRIP1、S100A4、EXOSC8、EXPI、BRRN1、NELF、EREG、TMEM40 和 TMEM109**；并且所述示例性系统还包括用于检测所述探针与所述一种或多种生物标记物结合的组分。

在该系统的某些实施方案中，所述探针可以是 RNA 杂交探针，在这种情况下所述生物样品的 RNA 被分离、扩增、转化成 cDNA、标记并与所述探针一起孵育，以进行杂交。可使用所述探针的标签来检测所述探针与所述生物标记物的 cDNA 的结合，所述标签例如可以是荧光标签。

在该系统的其他实施方案中，所述探针可以是选择性结合所述蛋白生物标记物的抗体。例如，可以使用酶联抗体来检测所述抗体与所述生物标记物的结合。

该系统还可以包括用作对照的某些样品。该系统还可包括一条或多条标准曲线，该标准曲线以测定单位的函数形式提供生物标记物 mRNA 的水平或生物标记物蛋白的水平。该系统另外可包括 TFF2 的探针及/或胃蛋白酶原 I 和胃蛋白酶原 II 的探针（为了确定胃蛋白酶原 I/II 的比值）。

因此，在本申请公开的主题一些实施方案中，提供了一个用于分析生物标记物的试剂盒，该试剂盒包括对本文公开的一种或多种生物标记物有特异性的探针，包括例如对生物标记物多肽有选择性的抗体或可选择性结合 mRNA 生物标记物（或从其扩增的 cDNA）的 RNA 杂交探针。在一些实施方案中，所述探针可结合于一种基底。这样的试剂盒可包含用于分析至少一个测试样品的装置及试剂。该试剂盒还可包含关于使用该试剂盒及进行所述分析的说明书。所述试剂盒可任选地包含一种或多种试剂和装置，用于将标记物水平转换成受试者的诊断或预后指标。

除非另外指出，否则对本申请公开的主题的实施可应用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术，这些技术是在本领域技术人员能力范围内的。这些技术在文献中有全面的描述。例如，见 *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (1989), 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapters 16 and 17; 美国专利 No. 4,683,195; *DNA Cloning, Volumes I and II*, Glover, ed., 1985; *Oligonucleotide*

Synthesis, M. J. Gait, ed., 1984; Nucleic Acid Hybridization, D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984; Transcription and Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984; Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, 1986; Perbal (1984), A Practical Guide To Molecular Cloning; See Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1987; Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155, Wu et al., eds., Academic Press Inc., N.Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987; Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986.

实施例

引入以下的实施例来说明本申请公开的主题的各实施方式。考虑到本申请的公开内容及本领域中的一般技术水平，本领域技术人员应了解，以下的实施例仅被意欲作为示例，并且只要不偏离本申请公开的主题的范围可进行多种改变、修饰和修改。

实施例 1

人胃癌的发病机制

参照图 2，大多数西方的权威人士一般认为杯形细胞肠化生是胃癌起源的首要候选原因。见 Correa, P. 1988. A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res. 48:3554-3560; Smith, V.C., Genta, R.M. 2000. Role of *Helicobacter pylori* gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric neoplasia, Microsc Res Tech. 48: 313-20; 和 Filipe, M.I., Munoz, N., Matko, I., Kato, I., Pome-Kim, V., Juersek, A., Teuchmann, S., Benz, M., Prijon, T. 1994. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia, Int J Cancer. 57: 324-329。杯形细胞并不出现在正常胃中，因此具有杯形细胞形态的细胞的存在可代表明显的肠表型细胞的化生过程。

然而，很少有证据将肠化生与发育异常转化（dysplastic transformation）直接联系起来。见 Hattori, T. 1986. Development of

adenocarcinomas in the stomach. Cancer 57:1528-1534. 实际上, 肠化生不是癌症唯一可能的化生前体。大量的研究人员 (特别是在亚洲) 已经把目光聚焦于在胃底存在的化生腺, 该化生腺具有类似于窦腺 (antral gland) 或幽门腺的总体表型。见 Hattori, T. 1986. **Development of adenocarcinomas in the stomach. Cancer 57:1528-1534.** 这种胃底的表型胃窦化或假性幽门化生通常与肠型腺癌相关。再次参照图 2, 一种类似的化生过程已被描述为表达解痉多肽的化生即 SPEM, 其特征在于在胃底存在三叶因子 2 (TFF2 或解痉多肽) 免疫反应性细胞, 其具有类似于深窦腺细胞或 Brunner 腺细胞的形态特征。见 Schmidt, et al.

在美国、日本和冰岛进行的三项研究中, SPEM 与超过 90% 的切除胃癌相关。见 Schmidt, et al. 和 Halldorsdottir, et al. **Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) associated with gastric cancer in Iceland. Dig.Dis.Sci. 48:431-441.** 另外, 最近有报道称在来自韩国的受试者中有类似的研究发现, 且 TFF2 的表达与转移相关。见 Dhar, D.K., Wang, T.C., Maruyama, R., Udagawa, J., Kubota, H., Fuji, T., Tachibana, M., Ono, T., Otani, H., and Nagasue, N. 2003. **Expression of cytoplasmic TFF2 is a biomarker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. Lab Invest 83:1343-1352.** 在所有这些研究中, SPEM 经常与癌症相关或比杯形细胞肠化生更经常与癌症相关。虽然 TFF2 的免疫反应性在晚期癌症中不那么突出, 但在所述冰岛的研究中, 所观察到的 TFF2 的免疫反应性比早期胃癌中的要高出 50%。见 Halldorsdottir, et al. 所有这些对人的研究可证明 SPEM 和肠化生作为推定的人肿瘤前化生的重要性。

实施例 2

在急性泌酸萎缩后的 SPEM 诱导

口服有效的细胞渗透性嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂 DMP-777, 已经使得可检查在不存在严重的炎性浸润情况下的急性泌酸萎缩后的 SPEM 诱导。以口服高剂量的 DMP-777 (>200 mg/kg/d) 处理的小鼠或大鼠, 经给药 3 天即呈现出壁细胞的快速丧失。见 Goldenring, J.R., Ray, G.S., Coffey, R.J., Meunier, P.C., Haley, P.J.,

Barnes, T.B., and Car, B.D. 2000. Reversible drug-induced oxyntic atrophy in rats. Gastroenterology. 118:1080-1093 (“Goldenring, et al.”); 和 Nomura, S., Settle, S.H., Leys, C., Means, A.L., Peek, R.M., Jr., Leach, S.D., Wright, C.V.E., Coffey, R.J., and Goldenring, J.R. 2005. Evidence for repatterning of the gastric fundic epithelium associated with Menetrier’s disease and TGF α overexpression. Gastroenterology 128:1292-1305 (“Nomura, et al. (2005)”). 所述急性泌酸萎缩之后立即是明显的胃小凹增生, 然后在泌酸萎缩 7-10 天后, 在胃底形成 SPEM。这些研究已证明, 胃化生的诱导是壁细胞丧失的直接结果。这些结果与由壁细胞分泌的促分化生长因子 (prodifferentiative growth factor) 的丧失是一致的, 所述促分化生长因子可包括 EGF 受体配体 TGF- α 、双调蛋白 (amphiregulin) 和 HB-EGF, 以及音猬因子 (sonic hedgehog)。在该急性泌酸萎缩模型中, 胃泌素似乎是胃小凹增生的主要驱动力, 这是因为敲除胃泌素的小鼠对于 DMP-777 处理不形成表面细胞的增生。见 Nomura, et al. (2005)。然而, 胃泌素的缺乏似乎会促进 SPEM 的形成, 并且在 DMP-777 处理仅 1 天后就快速地诱导化生。

最近的研究已证明, 在携带亚效突变 (hypomorphic mutation) (该突变降低 EGF 受体酪氨酸激酶活性) 的 wave-2 小鼠中 EGF 受体信号传递的减少也可引起 DMP-777 处理后 SPEM 形成的加速。见 Ogawa, M., Nomura, S., Wang, T.C., and Goldenring, J.R. 2006. Altered metaplastic response of waved-2 EGF receptor mutant mice to acute oxyntic atrophy. Am J Physiol 290:G793-G804。这些研究已经证明, 内在的旁分泌调节因子和内分泌调节因子调制在壁细胞丧失后的化生出现。虽然该 DMP-777 处理模型使化生被快速诱导, 但需注意的是, 甚至在延长给药最长至 1 年后, 在小鼠或大鼠中也从未观察到发育异常病变, 尽管有深度的泌酸萎缩和 SPEM。上述结果似乎是由于在 DMP-777 处理的动物中没有显著的炎性浸润所致。不希望拘囿于理论, 浸润的缺乏可能由该药物作为嗜中性粒细胞弹性蛋白酶的细胞渗透抑制剂的主要作用所导致。这些研究已证明, SPEM 会针对壁细胞丧失而出现, 甚至在不存在炎性浸润的情况下也是这样。而且, 这些研究指出, 慢性炎症的存在是从化生发展为发育异常所需的。

在胃泌素敲除小鼠中，这些研究中的一个关键的观察结果与响应于 DMP-777 处理的 SPEM 快速诱导相关。与野生型 C57BL/6 需要 7-10 天相比，胃泌素缺陷型小鼠仅在 1 个剂量 DMP-777 后即形成 SPEM。见 Nomura, et al.(2005)。传统上认为，所有胃底的胃谱系都来自于位于腺的上颈部的祖细胞带。然而，在更近的小鼠研究已表明，主细胞由颈粘液细胞再分化产生，而不经中间的增殖祖细胞 (intermediated proliferating progenitor) 过程。

不管这是再分化还是转分化，这些结果都表明，各类胃细胞可以进行其转录组的改变，这种改变作为沿腺轴 (gland axis) 正常分化的一部分。虽然以前已表明 SPEM 可能发生自位于胃底腺底部的隐祖细胞 (cryptic progenitor cell)，但是这些结果表明 SPEM 是通过主细胞的转分化发生的。事实上，在腺底部存在的在不同颗粒中表达内因子 (小鼠中主细胞的生物标记物) 和 TFF2 两者的细胞已经被发现是对 SPEM 诱导的良好反映。以 DMP-777 处理的胃泌素缺陷型小鼠在处理仅 1 天后即有双重表达细胞的快速增加。除了双重表达细胞之外，已经观察到在胃底腺底部存在 BrdU 标记的 S 期细胞，这不同于位于腔附近的正常祖细胞带。见 Goldenring, et al.和 Nomura, et al.。

虽然在 DMP-777 处理的小鼠中观察到的增殖速率比 SPEM 在猫胃螺杆菌感染的小鼠中的增殖速率明显慢，但是对这种位于底部的增殖细胞的快速诱导表明一些转分化细胞可再次进入细胞周期。因此，SPEM 细胞最后可变成可自我更新的细胞，或者受炎症调节剂影响进而出现化生扩散或朝着发育异常转化。

实施例 3

主细胞转分化的基因微阵列分析

将急性泌酸萎缩的小鼠模型用来研究壁细胞丧失后的初期事件。以壁细胞质子载体 (protonophore) DMP-777 对啮齿类动物的处理在 1-3 天内会引起分泌酸的壁细胞的快速丧失。在野生型 C57BL/6 小鼠中，在药物处理 10-14 天后，随着壁细胞的丧失在深部胃底腺中出现 SPEM，这与 BrdU 标记的增殖细胞也在胃底腺底部出现是一致的。见 Nomura, S., Yamaguchi, H., Wang, T.C., Lee, J.R., and Goldenring, J.R. 2004. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy

in wild type and gastrin deficient mice. Amer.J.Physiol. 288:G362-G375.

在这些化生腺的深底部观察到了具有 TFF2 和内因子(啮齿动物中主细胞特异性生物标记物)双重免疫活性的细胞的存在。见 Ogawa, M., Nomura, S., Wang, T.C., and Goldenring, J.R. 2006. Altered metaplastic response of waved-2 EGF receptor mutant mice to acute oxyntic atrophy. Am J Physiol 290:G793-G804; Nomura, S., Baxter, S., Yamaguchi, T., Leys, C., Vartapetian, A.B., Fox, J.G., Lee, J.R., Wang, T.C., and Goldenring, J.R. 2004. Relationship of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) to pre-neoplasia in H. felis-infected mice. Gastroenterology 127:582-594; 和 Yamaguchi, H., Goldenring, J.R., Kaminishi, M., and Lee, J.R. 2002. Association of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) with carcinogen administration and oxyntic atrophy in rats. Lab. Invest. 82:1045-1052.

最近已发现,胃泌素敲除小鼠在单剂量的 DMP-777 后即形成 SPEM,并再次与 BrdU 阳性 S 期细胞在胃腺底部的存在相关。见 Nomura, S., Yamaguchi, H., Wang, T.C., Lee, J.R., and Goldenring, J.R. 2004. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild type and gastrin deficient mice. Amer.J.Physiol. 288:G362-G375.

由这些结果以及对双重免疫反应细胞的鉴定结果形成了这样一种假设,即 SPEM 最初产生于主细胞的转分化。为了更直接地检验该假设,从经未处理的胃泌素敲除小鼠的深底部显微分离主细胞,并在以 DMP-777 处理 1 天和 3 天后显微分离位于胃底腺底部的 SPEM 细胞。从分离自每组中 4 只不同小鼠的 10,000 个细胞制备总 RNA。对于 12 个样品的每一个,进行线性扩增并探测 Affymetrix 小鼠 2.0 基因微阵列(Affymetrix Mouse 2.0 gene microarray)。然后分析数据以确定表达上调或下调至少 2 倍的基因。从这些结果获得了如下发现。首先,在上调转录物组中没有检测到任何的促凋亡基因。第二,30 个基因被鉴定为参与 G1-S 周期界点转换(interface transition),包括 5 个 MCM 蛋白、BRCA1、RIS2、RAD51、TACC3 和连接酶 1。将免疫细胞化学用于确认 MCM3 以及 TACC3 在位于以 DMP-777 处理 1 天或 3 天的小鼠的胃底腺底部的 SPEM 细胞中的上调。所有这些变化与趋向增殖表型的改变是一致的。虽然以前已注意到,在以 DMP-777 处理的胃泌素敲除(KO)小鼠中,位于胃底腺底部的 BrdU 标

记的细胞会增加，但是标记的增加似乎不能说明会出现 SPEM 表型。见 Nomura, S., Yamaguchi, H., Wang, T.C., Lee, J.R., and Goldenring, J.R. 2004. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild type and gastrin deficient mice. Amer.J.Physiol. 288:G362-G375。因此，参与 G1/S 周期界点的蛋白的上调还与主细胞向 SPEM 的转分化是一致的，这是因为这类变化需要整个转录组、需要 DNA 的解旋的改变以及包括 DNA 甲基化改变在内的基因激活变化。

除指示转分化发生的生物标记物之外，该上调基因列表包含多种重要的推定生物标记物，它们是分泌蛋白或细胞表面蛋白（倍数增加以 2 的幂指数表示），如表 2 中所示。

表 2

基因名		第 1 天, 相对于对照的倍数增加	第 3 天, 相对于对照的倍数增加
LGALS3	可溶性半乳糖苷结合凝集素 3	5.5	7.3
IL1RN	白细胞介素 1 受体拮抗物	4.7	4.2
TRIP13	甲状腺激素受体相互作用因子 13	3.5	3.0
FIGNL1	fidgetin 样 1	3.3	2.7
CRIP1	肠富含半胱氨酸蛋白 1	3.2	5.4
S100A4	S100 钙结合蛋白 A4	2.8	2.5
EXOSC8	外切酶体成分 8	2.6	2.8
EXPI	细胞外蛋白酶抑制剂	2.4	8.4
BRRN1	果蝇不孕同源物	2.2	3.1
NELF	鼻胚 LHRH 因子	2.1	3.7
EREG	表皮调节素	1.8	4.8
TMEM40	跨膜蛋白 40	1.4	6.9
TMEM109	跨膜蛋白 109	2.5	3.6

这些蛋白代表了在泌酸萎缩后的主细胞向 SPEM 转分化过程中表达显著升高的一组蛋白。由此，这些蛋白可成为胃肿瘤发生前的化生的生物标记物。

除以上在表 2 中列出的生物标记物外，人附睾蛋白 4 (HE4) 也属于上调基因。见 Bingle, L., Singleton, V., and Bingle, C.D. 2002. The putative ovarian tumor biomarker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. Oncogene 21:2768-2773; Bouchard, D.,

Morisset, D., Bourbonnais, Y., and Tremblay, G.M. 2006. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. Lancet Oncol 7:167-174; Galgano, M.T., Hampton, G.M., and Frierson, H.F. 2006. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. Mod Pathol 19:847-853; Hellstrom, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J.A., Schummer, M., McIntosh, M., Drescher, C., Urban, N., and Hellstrom, K.E. 2003. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. Cancer Res 63:3695-3700。事实上，已观察到 HE4 基因表达的增加超过 16 倍。HE4 已经被鉴定为某些癌症例如卵巢癌的有用的生物标记物。例如，见编号为 2003/0108965 的美国专利申请公开文本。然而，将 HE4 鉴定为胃癌的有用的生物标记物是之前无法预料的，这是因为以前认为 HE4 不在胃中表达。见 Galgano, M.T., Hampton, G.M.; and Frierson Jr., H.F. 2006. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. Mod. Pathology. 19: 847-853。

参照图 3，在未处理的小鼠的胃底粘膜中几乎没有观察到或者说没有观察到 HE4 免疫反应性。然而，在处理仅 1 天后 SPEM 中的 HE4 免疫反应性即显著地升高。另外，虽然正常人胃底不表达 HE4，但是 SPEM 和肠化生都被发现高表达 HE4。

实施例 4-8 的材料和方法

基因微阵列分析

胃泌素缺陷型小鼠是通过通过对胃泌素基因进行靶向破坏而构建的，并保留 C57BL/6 背景 (Nomura S, Yamaguchi H, Wang TC, Lee JR, Goldenring JR. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild type and gastrin deficient mice. Amer.J.Physiol. 2004; 印刷中)。以口服管饲法给予 DMP-777(由 DuPont Pharmaceuticals 赠予)对小鼠处理 1 天或 3 天，其中用 0.5% 甲基纤维素配制 DMP-777(每天一次管饲口服给予，剂量为 350 mg/kg/天)。将未处理的小鼠用作对照。将小鼠处死并将胃切下，沿胃大弯侧切开并处理成冷冻切片，用于激光捕获显微分离。在所述未处理的胃泌素缺陷型小鼠中，从胃腺底显微分离主细胞。在口服给药 1 天或 3 天后，从 DMP-777 处理的胃泌素缺陷型小鼠的胃底腺底部显微分离出新生 SPEM 细胞。如以前所述进行细胞的收集

(10,000 个细胞) 和总 RNA 的提取 (Nomura S, Baxter S, Yamaguchi T, Leys C, Vartapetian AB, Fox JG, Lee JR, Wang TC, Goldenring JR. Relationship of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) to pre-neoplasia in *H. felis*-infected mice. *Gastroenterology* 2004;127:582-594)。

使用 Nugen Ovation 试剂盒, 对来自显微分离的细胞的总 RNA 进行反转录并通过两轮线性扩增进行扩增, 目的是扩增并标记 10-20 ng 的 RNA。通过与 Qiagen QIAQUICK® 柱结合并从该柱洗脱来将所形成的单链 cDNA 产物纯化。然后对 cDNA 产物定量, 使 2.2 µg 片段化的标记产物与 Affymetrix Mouse 430 2.0 微阵列杂交过夜, 第二天进行染色和扫描。对来自以下小鼠的显微分离的细胞进行基因分析: 4 只未处理的胃泌素缺陷型小鼠、4 只以 DMP-777 处理 1 天的小鼠和 4 只以 DMP-777 处理 3 天的小鼠。使用 R 语言的 Affy 函数 (见 Bioconductor 网站) 将原始基因表达数据 (.cel 文件) 转换成表达值。首先使用针对组间 (对照、处理 1 天和处理 3 天) 差异的总体置换 F-检验 (overall permutation F-test) 然后使用方差分析来比较组间的表达水平; 如果出现统计学上显著的总体差异, 那么使用置换 t-检验分析对照和处理 1 天组之间及对照和处理 3 天组之间的成对差异。然后, 我们通过以下条件进一步减少候选的探针列表, 该条件即在那些显示出统计学上显著的成对差异的处理组 (1 天和 3 天) 和对照之间要有至少 4 倍差异。使用 R 语言的 SAFE 软件包进行所有的表达数据分析。使用 WebGestalt 软件 (Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W741-8) 查询 (interrogate) 注释和通路。

定量聚合酶链式反应

将从收集自正常的和 DMP-777 处理 1 天和 DMP-777 处理 3 天的胃泌素缺陷型小鼠的胃的激光捕获显微分离细胞分离的总 RNA 通过定量 PCR 测定进行分析。在 42°C 下, 使用随机引物和 Quantiscript 逆转录酶 (Qiagen, Valencia, CA) 对每个总 RNA 样品进行 30 分钟的逆转录。使用 Bio-Rad iCycler iQ 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 以一种三步法进行定量实时 PCR。每个反应均在由 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) 和 1 µL 模板 cDNA

组成的 50 μ L 混合物中进行。所用引物的序列在表 3 中列出。定量实时 PCR 的 PCR 条件为：95 $^{\circ}$ C 10 分钟；45 个循环：94 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 30 秒。利用比较阈值循环 (C_T) 方法以 GAPDH 作为对照对每个样品中 cDNA 模板进行定量测定，如前所述 (Nomura S, Baxter S, Yamaguchi T, Leys C, Vartapetian AB, Fox JG, Lee JR, Wang TC, Goldenring JR. Relationship of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) to pre-neoplasia in *H. felis*-infected mice. *Gastroenterology* 2004;127:582-594)。使用曼-惠特尼 U 检验 (Mann-Whitney U Test) 确定组间平均 $\Delta\Delta C_T$ 的统计比较。

表 3

用于定量 PCR 的引物集合

人工产生的 GAPDH 特异的 PCR 正义引物序列

人工产生的 GAPDH 特异的 PCR 反义引物序列

GAPDH 正义 5'-TGA CGT GCC GCC TGG AGAAA-3'(SEQ ID NO:1)

反义 5'-CCG GCA TCG AAG GTG GAA GAG-3'(SEQ ID NO:2)

产物大小：160bp

MCM3 正义 5'-GCG CAG AGA GAC TAC TTG GAC-3'(SEQ ID NO:3)

反义 5'-TGC TTG GCG TAG GTG G-3'(SEQ ID NO:4)

产物大小：239bp

MCM5 正义 5'-GCG GCA TTA CAA CCT GGG TGA-3'(SEQ ID NO:5)

反义 5'-ACG GGC TGG CAT CTG ACT TGA-3'(SEQ ID NO:6)

产物大小：224bp

MCM7 正义 5'-CAC GCT CAA TGC CCG ATG CT-3'(SEQ ID NO:7)

反义 5'-TTG TCT CTG TCG GGC CGG TCT-3'(SEQ ID NO:8)

产物大小：159bp

ST3GAL6 正义 5'-CAT ATA TCA CCA GCG AAG CAG-3'(SEQ ID NO:9)

反义 5'-TGG CAT TCC CGT AGT AGT GT-3'(SEQ ID NO:10)

产物大小: 198bp

ATF3 正义 5'-GAT GCA ACG CGC TCC CAG-3'(SEQ ID NO:11)
反义 5'-GGC GGC CAG GGT CCA GAG AAC-3'(SEQ ID NO:12)
产物大小: 163bp

HE4 正义 5'-TGC CTG CCT GTC GCC TCT G-3'(SEQ ID NO:13)
反义 5'-TGT CCG CAC AGT CCT TGT CCA-3'(SEQ ID NO:14)
产物大小: 171bp

IL1RN 正义 5'-TTG GCC TAG GTG TCT TCT GCT-3'(SEQ ID NO:15)
反义 5'-TAT GTG ATG CCC TGG TGG TT-3'(SEQ ID NO:16)
产物大小: 243bp

TFF2 正义 5'-TGC TTT GAT CTT GGA TGC TG-3'(SEQ ID NO:17)
反义 5'-GGA AAA GCA GCA GTT TCG AC-3'(SEQ ID NO:18)
产物大小: 191bp

免疫组织化学

将包埋于石蜡中的切割自 DMP-777 处理的胃泌素缺陷型小鼠或未处理的对照的胃用于免疫组织化学分析。作为比较,还对来自 C57BL/6 野生型小鼠的胃以及猫胃螺杆菌感染的 C57BL/6 小鼠(感染 6 个月)的切片进行染色检验。对于免疫组织化学,除 Mist1 染色之外,使用靶修复溶液(Target Retrieval solution)(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)在 120°C 下预处理脱蜡切片 15 分钟进行抗原修复,然后使用冰水立即进行冷却。对于 Mist1 的免疫组织化学,在抗原修复过程中使用 Trilogy 抗原修复溶液(Cell Marque, Austin, TX)。切片经 2% 的封闭血清处理,然后在 4°C 下与一抗一起孵育过夜。用以下的一抗进行免疫染色:鼠抗三叶因子家族 2(TFF2, 由 SirCancer Research UK 的 Nicholas Wright 先生赠予; 1:1000)单克隆免疫球蛋白 M(IgM);兔抗 Mist1 抗体(1:2000);鼠抗 H/K-ATP 酶单克隆抗体(由 Medical University of South Carolina 的 Adam J. Smolka 博士赠予; 1:100,000);兔抗 HE4 抗体(1:2000);兔

抗内因子抗体（由 Washington University, St. Louis 的 David Alpers 博士赠予；1:2000）；山羊抗内因子抗体（1:2000）；兔抗 MCM3 抗体（1:2000）；大鼠抗 Ki67 单克隆抗体（TEC-3, DakoCytomation；1:200）。

对于免疫荧光分析，使用了 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgM 抗体、Cy5 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA）和 Alexa488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体（Invitrogen, Carlsbad, CA）。将含有 DAPI 的 PROLONG[®] Gold Antifade Reagent（Invitrogen）用于核复染并用作封固剂。

对于以二氨基联苯胺检测的免疫组织化学，将切片与生物素化的二抗孵育，然后与辣根过氧化酶缀合的链亲和素孵育。通过二氨基联苯胺（Biogenex, San Ramon, CA）形成色原。对于以碱性磷酸酶检测的免疫组织化学，将切片与生物素化的二抗孵育，然后与碱性磷酸酶缀合的亲合素-生物素复合体孵育。通过 VECTOR[®] 红色底物（VECTOR[®] Red Substrate）（Vector Laboratories, Burlingame, CA）形成色原。所有切片经 Gill 苏木精复染。

在装配有 AXIOVISION[®] 数字成像系统的 Zeiss AXIOPHOT[®] 显微镜（Zeiss）或 FLUOVIEW[®] FV1000 共聚焦显微镜系统（Olympus）上对切片进行观察并照相。

如前人所述（Leys CM, Nomura S, Rudzinski E, Kaminishi M, Montgomery E, Washington MK, Goldenring JR. Expression of Pdx-1 in human gastric metaplasia and gastric adenocarcinoma. Hum Pathol 2006;37:1162-8），将两个组织阵列用于人胃样品的染色。第一个组织阵列包含来自日本东京大学的 33 例胃切除的正常胃粘膜的样品以及 SPEM 和肠化生样品。第二个阵列包含来自在美国田纳西州纳什维尔的范德比尔特大学（Vanderbilt University）进行切除术的 44 名受试者的正常粘膜以及胃腺癌。

电子显微镜分析

将来自未处理的对照和 DMP-777 处理 3 天的胃泌素缺陷型小鼠胃底区的新鲜标本在冰上，使用 2.5% 戊二醛、0.1M 二甲砷酸盐缓冲剂的 PBS 溶液固定 2.5 小时。在 4℃ 下，将所述样品在 1% 四氧化锇（OsO₄）和 0.1M 二甲砷酸盐缓冲剂中固定过夜。接下来，所述样品经过一系列乙醇脱水步骤，并被包埋在 Spurr's 树脂中。切割 50-100 nm 的薄切片，并收集在 200

目的、聚乙烯醇缩甲醛 (formvar) 包被的铜网格上。在经过夜干燥后, 将该网格以 2% 的贫化的 (depleted) 乙酸双氧铀 (Uranyl Acetate) (UA) 对比染色, 然后用饱和柠檬酸铅染色。在 Philips CM12 电子显微镜上检查样品。

实施例 4

转分化的形态学证据

考虑到表明 SPEM 在胃泌素缺陷型小鼠中的快速演化的已有结果 (Nomura S, Yamaguchi H, Wang TC, Lee JR, Goldenring JR. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild type and gastrin deficient mice. *Amer.J.Physiol.* 2004), 已评估了表达 bHLH 转录因子 Mist1 的成熟主细胞是否能在 DMP-777 处理小鼠中引起 SPEM (Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development* 2007;134:211-22)。在未处理的胃泌素缺陷型小鼠中, Mist1 抗体染成熟主细胞的核, TFF2 抗体染颈粘液细胞 (图 4A)。相比而言, 在以 DMP-777 处理 3 天的小鼠中, 位于腺底部的 Mist1 免疫反应细胞数目减少, 并且许多 Mist1 阳性细胞是 TFF2 双重免疫反应的 (图 4, B-C)。在正常胃中, TFF2 和内因子分别在颈粘液细胞或主细胞的分泌颗粒中分别表达 (图 4D)。然而, 在以 DMP-777 处理 3 天的胃泌素缺陷型小鼠中, 在胃底腺底部存在表达两群分开的 TFF2 和内因子染色颗粒的 SPEM 细胞 (图 4, E-F)。这些结果表明, DMP-777 处理的小鼠中的壁细胞丧失诱导了主细胞的细胞表型的显著变化。

为了更精确地检验细胞谱系, 将来自未处理的胃泌素缺陷型小鼠的主细胞以及来自以 DMP-777 处理 3 天的胃泌素缺陷型小鼠的新生 SPEM 细胞进行电子显微术检查 (图 4, G-I)。在未处理的动物中, 观察到具有均一染色的酶原颗粒的正常主细胞 (图 4G)。然而, 在 DMP-777 处理的细胞中, 在位于胃底腺底部的 SPEM 细胞中出现了一组异质的颗粒形态 (图 4, H-I)。该 SPEM 细胞的确包含某些正常出现的酶原颗粒, 通常在核周区域, 但是它们还显示出具有电子致密物质和单电子透明环形外周夹杂物 (single electron lucent circular peripheral inclusion) 的较大颗粒, 这种

形态与粘液分泌颗粒更加一致。另外，在亚管腔区中观察到大量较小的电子透明颗粒。观察到主细胞颗粒形态的这些变化同时并未获得凋亡的形态学证据。这些结果表明，主细胞改变其颗粒内容物以使形态变得更加类似于粘液分泌细胞 (Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development* 2007;134:211-22)。

实施例 5

SPEM 出现的基因微阵列分析

为了分析伴随于 SPEM 出现的基因表达的变化，利用激光捕获显微分离从未处理的胃泌素缺陷型小鼠分离主细胞，以及从以 DMP-777 处理 1 天或 3 天的小鼠分离新生 SPEM 细胞。用从显微分离的细胞制备的 mRNA 探测 Affymetrix 基因微阵列。表 4 证明，DMP-777-处理在仅一个药物剂量后即导致大量转录物的快速上调。通路分析表明，最显著的转录物组参与细胞周期调节和核苷酸代谢 (表 4A)。具体而言，前 50 种上调转录物的探针中的 34 种检测到参与 G1/S 转换调控的蛋白的信使，所述蛋白包括 5 个 MCM 蛋白、ATF3、RIS2、RAD51、TACC3 和连接酶 1。在 DMP-777 处理 1 天和处理 3 天的上调基因转录物的组中没有检测到促凋亡基因。没有观察到明显的基因转录物下调的模式，但是注意到脂肪酶的转录物有明显减少，脂肪酶是主细胞的产物。除了 G1/S 调节因子的上调之外，我们还观察到了多种分泌调节因子表达的显著上调，所述分泌调节因子包括两个 WAP 域蛋白、WFDC2 (HE4) 和 WDNM1 (Expn)、白细胞介素-1 受体拮抗物 (IL1RN) 和表皮调节素 (表 4B)。

表 4

A. 与细胞周期相关的上调转录物

基因符号	DMP-777 1天 vs 对照	DMP-777 3天 vs 对照
Atf3	311.4	10.1
Uhif1	35.3	8.8
Cenph	25.7	10.7
Mcm6	25.1	36.4
Ris2*	21.5	41.3
Mcm5 *	18.1	36.2
Cdca5	17.3	36.1
Mcm5 *	13.9	18.2
Rad51	13.5	10.5
Rad51ap1 *	12.9	6.1
Mcm10 *	12.2	31.3
Cdc2a	11.7	7.0
Tk1	10.1	11.5
Clspn	9.5	8.5
Lig1	9.3	9.6
Cdca1	9.2	8.1
Sssca1	8.9	12.3
Dcc1	8.8	10.0
Rad51ap1 *	8.7	7.4
Gadd45b	8.6	5.0
Rfc4	8.5	8.4
Rrm1	8.4	8.4
Rfc3	8.1	6.1
Pole	7.5	11.3
Ncapg	7.5	3.2
Prc1	7.5	6.9
Top2a	7.3	6.4
Cdca8	7.3	8.7
Ris2 *	7.3	10.3
Prc1	7.0	7.4
Mcm10 *	6.7	10.1
Rad54b	6.7	6.6

B. 可溶性调节因子的上调转录物

基因符号	DMP-777 1天 vs 对照	DMP-777 3天 vs 对照
Lgals3	48.8	153.3
Il1rn	25.4	18.5
Trip13	10.3	8.6
Fignl1	10.2	6.6
Crip1	9.5	42.8
Wfdc2	8.9	67.5
Exosc8	6.2	6.7
WDMN1	5.2	345.9
Ereg	3.6	28.9

实施例 6

SPEM 出现的定量 PCR 分析

为了验证基因微阵列研究的结果，使用定量 PCR 评估了选定的显微分离谱系中上调或下调的转录物的表达。确认了 G1/S 相关的转录物的上调，包括 MCM3、MCM5、MCM7 和 ATF3 (图 5)。还确认了推定可溶性调节因子的转录物的上调，包括 HE4 和 IL1RN；确认了 ST3Gal6 的下调。以前已记录到 Affymetrix 基因阵列不能准确探测 TFF2 表达的变化 (Nomura S, Baxter S, Yamaguchi T, Leys C, Vartapetian AB, Fox JG, Lee JR, Wang TC, Goldenring JR. Relationship of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) to pre-neoplasia in *H. felis*-infected mice. *Gastroenterology* 2004;127:582-594)。然而，通过定量 PCR 测定，在 DMP-777 处理的动物中出现的 SPEM 中 TFF2 水平升高超过 7 倍 (图 5)。

实施例 7

在急性泌酸萎缩后 MCM3 和 TACC3 的表达升高

为了研究 G1/S 转换中涉及的转录物的上调, 用 MCM3 和 Ki67 (增殖细胞的一般生物标记物) 的抗体的双重染色检查了 DMP-777 处理的或未处理的胃泌素缺陷型小鼠的胃 (图 6)。在未处理的小鼠中, MCM3 主要位于定位在该腺颈部区域的正常祖细胞带中的细胞上 (图 6A)。然而, 在位于胃底腺底部的细胞中偶尔可观察到核 MCM3 染色 (图 6A)。在 DMP-777 处理的小鼠中, 除了在增殖性颈部区域的 MCM3 染色外, 还观察到在位于胃底腺底部的 SPEM 细胞中的显著核染色 (图 6, B-E)。与 Ki67 标记的细胞相比, 表达 MCM3 的细胞更广泛地分布于 SPEM 细胞中。虽然 Ki67 阳性细胞数目在 DMP-777 处理后仅显示出小幅增加, 但是 MCM3 阳性细胞的数目在 DMP-777 处理 1 天后增加 (图 6B), 并且在处理的 14 天中持续升高 (图 6, C-E)。这些结果表明, MCM3 在出现 SPEM 时的激活比进入细胞周期的活性更为突出 (图 6F)。

虽然这些结果表明从胃腺底部出现的 SPEM 细胞表达 MCM3, 但是还需要获悉在位于未处理的小鼠的腺底部的 MCM3 染色细胞的性质。该观察结果不是胃泌素缺陷型小鼠特异的, 因为在野生型 C57BL6 小鼠腺底部观察到了类似的表达 MCM3 的细胞 (数据未显示)。因此, 对切片进行了 MCM3 和内因子 (成熟主细胞的生物标记物) 的双重染色 (图 7)。在所有情况下, 位于腺底部的具有 MCM3 染色核的细胞也是内因子 (主细胞的指示物) 免疫反应性的 (图 7B)。

在 DMP-777 处理的小鼠的胃中还检测到了 TACC3 的表达, 这种蛋白与细胞周期的起始相关 (Aitola M, Sadek CM, Gustafsson JA, Pelto-Huikko M. *Aint/Tacc3 is highly expressed in proliferating mouse tissues during development, spermatogenesis, and oogenesis. J Histochem Cytochem* 2003;51:455-69)。虽然在未处理的小鼠的胃中几乎没有发现 TACC3 表达 (图 5), 但是在 DMP-777 处理 3 天后, TACC3 在位于胃底腺底部的 SPEM 细胞中的表达是强烈上调的 (图 8)。

实施例 8

在胃化生和癌症中的 HE4 上调

如上文所述, SPEM 的出现还与多种分泌因子的上调是一致的。因此,

在胃泌素缺陷型小鼠中进行了 WAP 域蛋白 HE4 的免疫染色。免疫染色表明，在胃泌素缺陷型（图 9A）或野生型 C57BL6 小鼠的正常胃粘膜中几乎没有可探测的 HE4。然而，在 DMP-777 处理的小鼠中，在位于胃底腺底部的 SPEM 细胞中观察到 HE4 表达的显著上调（图 9B）。在免疫荧光研究中，SPEM 细胞中，HE4 颗粒的染色不同于 TFF2 染色颗粒。为了评估 HE4 的上调是否是 SPEM 的共同特征，还评估了以猫胃螺杆菌感染 9 个月的 C57BL/6 小鼠的粘膜中的 HE4 染色。在猫胃螺杆菌感染的小鼠整个胃底粘膜的 SPEM 细胞中观察到显著的 HE4 染色（图 9C）。

因为小鼠的研究表明了 HE4 表达与胃化生的强相关性，所以评估了 HE4 在人胃中的表达。如以前的纪录（Bingle L, Singleton V, Bingle CD. *The putative ovarian tumour biomarker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. Oncogene 2002;21:2768-73*），在正常人胃底粘膜中没有探测到 HE4（图 9D）。已经意外地发现，HE4 在 SPEM 和杯形细胞肠化生中都是强表达的，并且还在过渡型化生的改变（transitional metaplastic change）中是强表达的（图 9, E-I）。此外，组织阵列分析表明，在所有化生的病变中都是 HE4 阳性，所述病变包括 SPEM（图 9E）、SPEM 和肠化生过渡型病变（图 9F）、SPEM 和肠化生共存病变（图 9, G-H）和肠化生（图 9I）。鉴于 HE4 在人胃化生中的强表达，还检测了 HE4 在人胃腺癌中的表达。与在胃癌中表现出总体丧失的 TFF2 不同，在 70% 的高分化的和中分化的肠型胃腺癌中观察到 HE4 的持续表达（图 10, A-D）。20% 的扩散性或低分化的肿瘤也显示出 HE4 染色（图 10, E-F）。HE4 染色在 80% 的印戒腺癌中特别强（图 10, G-I）。采用免疫荧光染色观察到了类似的结果，这支持了 HE4 的组织化学染色结果（图 10, J-L）。这些结果表明，HE4 是胃的肿瘤前过程和肿瘤过程的一种强生物标记物。

对实施例的讨论

壁细胞的丧失即泌酸萎缩与人胃癌确信相关。本发明实施例部分呈现的结果表明，胃泌素缺陷型小鼠中壁细胞的丧失会导致胃底主细胞转分化成粘液分泌性 SPEM 谱系。伴随于该转分化过程观察到这样的现象，即 G1/S 界点转换中涉及的基因的上调导致一群细胞再次进入细胞周期。该转分化过程还与多种通常不存在于正常胃粘膜中的推定的可溶性调节因

子的上调有关。具体而言，HE4 在小鼠和人的胃化生中都是上调的，并且其表达在胃腺癌中被维持。因此，对小鼠转分化过程的检验已经发现了大量与人肿瘤过程相关的关键性调节因子。

虽然大多数对胃粘膜的观察集中在来自胃的胃底腺颈部的正常祖细胞带的谱系产生，但是本研究将注意力聚焦在壁细胞丧失后诱导的位于胃底腺底部的潜在增殖性区室上 (Nomura S, Yamaguchi H, Wang TC, Lee JR, Goldenring JR. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild type and gastrin deficient mice. *Amer.J.Physiol.* 2004)。不希望拘囿于具体的理论，两种解释可用来说明该结果。首先，在胃底腺底部可能存在隐祖细胞群，该区域不同于颈部的正常祖细胞区，该细胞群会受壁细胞释放的粘膜分化因子的抑制。或者，SPEM 可能从主细胞的转分化形成。以前的研究已证明，急性泌酸萎缩可导致观察到表达 Mist 1 和内因子 (小鼠中的分化型主细胞的生物标记物) 的增殖细胞 (Nomura S, Yamaguchi H, Wang TC, Lee JR, Goldenring JR. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild type and gastrin deficient mice. *Amer.J.Physiol.* 2004) (Nam KT, Varro A, Coffey RJ, Goldenring JR. Potentiation of oxyntic atrophy-induced gastric metaplasia in amphiregulin-deficient mice. *Gastroenterology* 2007;132:1804-19)。然而，内因子在罕有的前酶原细胞 (pre-zymogenic cell) 中表达，Mist1 仅在成熟主细胞中表达 (Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development* 2007;134:211-22)。本文 Mist1 免疫反应性细胞还表达 TFF2 的观察结果支持主细胞转分化作为 SPEM 起源这个观点。而且，这些结果还支持与两种假设都相容的模型。在 G1/S 转换过程中 DNA 解旋所需的 MCM3 不仅在胃腺颈部的正常祖细胞中表达，而且在位于胃底腺底部的一小群内因子免疫反应性主细胞中表达。因此，主细胞的一个亚群可能具有转分化的潜力，实际上为隐祖细胞群。而且，位于 DMP-777 处理后的胃泌素缺陷型小鼠的胃腺底部的 SPEM 的快速出现说明，需要一个更广的转分化过程来解释在处理仅 1 天或 3 天后观察到的 SPEM 的量。

显微分离的 SPEM 细胞的基因微阵列研究也支持主细胞转分化的分

子表型。观察到与 G1/S 细胞周期转换起始相关的一组基因转录物在仅单剂量的 DMP-777 后即出现了快速上调。MCM 蛋白 (MCM2-7) 在 M/G1 时转录, 并装配成 DNA 解旋酶, 负责在 DNA 合成前使染色质解旋 (Braun KA, Breeden LL. Nascent transcription of MCM2-7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. *Mol Biol Cell* 2007;18:1447-56)。MCM3 在 G2/M 时被特异地泛素化, 随细胞退出有丝分裂而被降解。而且, 虽然 MCM 蛋白在位于 DMP-777 处理的小鼠的胃底腺底部的 SPEM 中被广泛地上调, 但是仅观察到了一个子集的细胞进入增殖周期。因此, 虽然某些细胞再次进入细胞周期, 但是 G1/S 转换中涉及的许多蛋白的上调这一结果还与另一个假设是一致的。转分化将需要细胞中表达的全体 (compendium) 转录物发生较大改变, 并且不必经历增殖周期。转录物的这种改变将需要 DNA 的解旋, 正如在 G1/S 细胞周期界点处那样。因此, 对于转分化的过程和增殖的激活, DNA 重塑 (DNA remodeling) 中涉及的蛋白的上调可能更能反映前者。MCM3 在 DMP-777 处理小鼠中的持续表达支持这样的观念——即在转分化过程中全体转录物发生改变, 且仅有限地经历细胞周期。

本文呈现的结果还表明, 转分化可导致粘液细胞化生特异的基因转录物的上调。酶原细胞向粘液化生的转分化可能是上消化道中肿瘤前转变的一个根本普遍机制。Means 等人已证明, TGF α 的过表达可导致胰脏酶原细胞 (zymogen cell) 向分泌粘液的化生细胞转分化 (Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey RJ, Jr., Wright CV, Stoffers DA, Leach SD. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* 2005;132:3767-76)。腺泡细胞转分化促使胰中的肿瘤前 PANIN 病变形形成 (Zhu L, Shi G, Schmidt CM, Hruban RH, Konieczny SF. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2007;171:263-73)。同样, 壁细胞丧失可诱发胃分泌酶原的主细胞的转分化。然而, 本结果还说明, 伴随于转分化过程, 粘液细胞化生可上调分泌的特异性粘液因子, 包括 HE4、WDM1、IL1RN 和表皮调节素。IL1RN 参与多种肿瘤过程 (Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, Amorim A, Seruca R, Caldas C, Cameiro F, Sobrinho-Simoes M. Interleukin 1B and

interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001;121:823-9)。类似地,表皮调节素(一种对 Erb4 具有亲和性的 EGF 受体配体家族成员)与更具侵袭性的癌症转移有关(Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massague J. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 2007;446:765-70)。HE4 在卵巢癌出现的早期是上调的,可以作为卵巢肿瘤的生物标记物(Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas, but has not previously been reported in upper GI cancers. *Cancer Res* 2005;65:2162-9)。HE4 不在正常人胃粘膜中表达。本文的数据出人意料地证明了 HE4 在肠化生和 SPEM 两者中的显著上调。重要的是,在绝大多数分化的胃腺癌中,HE4 都维持表达。因此,本文的实施例表明,在产生 SPEM 的转分化过程中被上调的因子还可以作为代表胃的肿瘤前及肿瘤的生物标记物替代物。

本文的数据还证明了在 PANIN 病变和胰腺癌中的 HE4 表达升高(图 11)。在正常外分泌胰腺中没有检测到 HE4。然而,在 PANIN 病变和胰腺癌中都观察了 HE4 的强染色(图 11)。

总之,虽然以前的观点已说明胃化生源自于正常粘膜祖细胞,但是本文实施例却表明胃的胃底粘膜中的壁细胞丧失会诱导主细胞转录谱的改变,这导致了细胞分泌表型的变化并转分化成粘液细胞化生。伴随于这些变化,诸如 HE4 和本文公开的其他生物标记物(表 1)的特定可溶性调节因子在化生中被上调,并且代表化生过程和肿瘤前过程的特征性推定生物标记物。

应理解,只要不偏离本申请公开的主题的范围,可以改变本申请公开的主题的各细节。并且,前文的描述仅是为了说明的目的,而不是为了进行限制。

参考文献

Aitola M, Sadek CM, Gustafsson JA, Pelto-Huikko M. Aint/Tacc3 is highly expressed in proliferating mouse tissues during development, spermatogenesis, and oogenesis. *J Histochem Cytochem* 2003;51:455-69.

Beauchamp RD, Barnard JA, McCutchen CM, Cherner JA, Coffey RJ, Jr. Localization of transforming growth factor alpha and its receptor in gastric mucosal cells. *J.Clin.Invest.* 1989;84:1017-1023.

Biankin, A.V., Kench, J.G., Dijkman, F.P., Biankin, S.A., and Henshall, S.M. Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology* 2003;35:14-24.

Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768-73.

Blaser, M., and Parsonnet, J. Parasitism by the bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J.Clin.Invest.* 1994;94:4-8.

Bouchard, D., Morisset, D., Bourbonnais, Y., and Tremblay, G.M. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.

Braun KA, Breeden LL. Nascent transcription of MCM2-7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. *Mol Biol Cell* 2007;18:1447-56.

Cameron, A.J., Lomboy, C.T., Pera, M., and Carpenter, H.A. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1995;109:1541-1546.

Correa, P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 1988;48:3554-3560.

Dhar, D.K., Wang, T.C., Maruyama, R., Udagawa, J., Kubota, H., Fuji, T., Tachibana, M., Ono, T., Otani, H., and Nagasue, N. Expression of cytoplasmic TFF2 is a biomarker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. *Lab Invest* 2003;83:1343-1352.

Dinis-Ribeiro M, da Costa-Pereira A, Lopes C, Barbosa J, Guilherme M, Moreira-Dias L, Lomba-Viana H, Silva R, Abreu N, Lomba-Viana R. Validity of serum pepsinogen I/II ratio for the diagnosis of gastric epithelial dysplasia and intestinal metaplasia during the follow-up of patients at risk for intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Neoplasia* 2004; 6(5):449-56.

El-Zimaity, HMT, Ota, H, Graham, DY, Akamatsu, T, and Katsuyama, T. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma, *Cancer* 2002;94: 1428-36.

Filipe, M.I., Munoz, N., Matko, I., Kato, I., Pome-Kim, V., Juersek, A., Teuchmann, S., Benz, M., Prijon, T. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia, *Int J Cancer.* 1994;57: 324-329.

Gait, M.J., ed., *Oligonucleotide Synthesis*, 1984.

Galgano, M.T., Hampton, G.M., and Frierson, H.F. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. Mod Pathol 2006;19:847-853

Glover, ed., DNA Cloning, Volumes I and II, 1985.

Goldenring JR, Ray GS, Coffey RJ, Meunier PC, Haley PJ, Barnes TB, Car BD. Reversible drug-induced oxyntic atrophy in rats. Gastroenterology. 2000;118:1080-1093.

Halldorsdottir, et al. Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) associated with gastric cancer in Iceland. Dig.Dis.Sci. 48:431-441.

Hames & Higgins, eds., Nucleic Acid Hybridization, 1984.

Hames & Higgins, eds., Transcription and Translation, 1984.

Hattori, T. Development of adenocarcinomas in the stomach. Cancer 1986;57:1528-1534.

Hellstrom, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J.A., Schummer, M., McIntosh, M., Drescher, C., Urban, N., and Hellstrom, K.E. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. Cancer Res 2003;63:3695-3700.

Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Carlson J, Li H, Rogers AB, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow derived cells. Science 2004;In Press.

Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. Anat.Rec. 1993;236:297-313.

Leys CM, Nomura S, Rudzinski E, Kaminishi M, Montgomery E, Washington MK, Goldenring JR. Expression of Pdx-1 in human gastric metaplasia and gastric adenocarcinoma. Hum Pathol 2006;37:1162-8.

Mayer and Walker, eds. Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Academic Press, London, 1987

Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey RJ, Jr., Wright CV, Stoffers DA, Leach SD. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. Development 2005;132:3767-76.

Miller and Calos, eds., Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, Cold Spring Harbor Laboratory, 1987.

Nam KT, Varro A, Coffey RJ, Goldenring JR. Potentiation of oxyntic atrophy-induced gastric metaplasia in amphiregulin-deficient mice. Gastroenterology 2007;132:1804-19.

Nomura S, Baxter S, Yamaguchi T, Leys C, Vartapetian AB, Fox JG, Lee JR, Wang TC, Goldenring JR. Relationship of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) to pre-neoplasia in *H. felis*-infected mice. Gastroenterology 2004;127:582-594.

Nomura, S., Settle, S.H., Leys, C., Means, A.L., Peek, R.M., Jr., Leach, S.D., Wright, C.V.E., Coffey, R.J., and Goldenring, J.R. Evidence for repatterning of the gastric fundic epithelium associated with Menetrier's disease and TGF α overexpression. *Gastroenterology* 2005;128:1292-1305.

Nomura, S., Yamaguchi, H., Wang, T.C., Lee, J.R., and Goldenring, J.R. Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild type and gastrin deficient mice. *Amer.J.Physiol.* 2004;288:G362-G375.

Ogawa, M., Nomura, S., Wang, T.C., and Goldenring, J.R. Altered metaplastic response of waved-2 EGF receptor mutant mice to acute oxyntic atrophy. *Am J Physiol* 2006;290:G793-G804.

Oishi Y, Kiyohara Y, Kubo M, Tanaka K, Tanizaki Y, Ninomiya T, Doi Y, Shikata K, Yonemoto K, Shiota T, Matsumoto T, Iida M. The serum pepsinogen test as a predictor of gastric cancer: the Hisayama study. *Am J Epidemiol.* 2006;163(7):629-37.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric cancer. *New Eng.J.Med.* 1991;325:1127-1131.

Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning; See Methods In Enzymology (1984, Academic Press, Inc., N.Y.).

Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72-81.

R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., Culture Of Animal Cells, 1987.

Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development* 2007;134:211-22.

Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (1989), 2nd Ed., ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapters 16 and 17.

Schmidt PH, Lee JR, Joshi V, Playford RJ, Poulson R, Wright NA, Goldenring JR. Identification of a metaplastic cell lineage associated with human gastric adenocarcinoma. *Lab.Invest.* 1999;79:639-646.

Smith, V.C., Genta, R.M. Role of *Helicobacter pylori* gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric neoplasia, *Microsc Res Tech.* 2000;48: 313-20.

Stepan V, Ramamoorthy S, Nitsche H, Zavros Y, Merchant JL, Todisco A. Regulation and function of the sonic hedgehog signal transduction pathway in isolated gastric parietal cells. *J Biol Chem* 2005;280:15700-8.

美国专利申请公布文本 No. 2003/0108965.

美国专利 No. 4,683,195.

美国专利 No. 5,480,792.

美国专利 No. 5,525,524.

美国专利 No. 5,631,171.

美国专利 No. 5,679,526.

美国专利 No. 5,824,799.

美国专利 No. 5,851,776.

美国专利 No. 5,885,527.

美国专利 No. 5,922,615.

美国专利 No. 5,939,272.

美国专利 No. 5,947,124.

美国专利 No. 5,955,377.

美国专利 No. 5,985,579.

美国专利 No. 6,019,944.

美国专利 No. 6,113,855.

美国专利 No. 6,143,576.

美国专利 No. 6,890,763.

美国专利 No. 6,925,389.

美国专利 No. 6,989,100.

Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000;118:36-47.

Weir and Blackwell, eds. *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, 1986.

Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155, Academic Press Inc., N.Y.

Yamaguchi, H., Goldenring, J.R., Kaminishi, M., and Lee, J.R. Association of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) with carcinogen administration and oxyntic atrophy in rats. *Lab. Invest.* 2002;82:1045-1052.

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W741-8.

Zhu L, Shi G, Schmidt CM, Hruban RH, Konieczny SF. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2007;171:263-73.

<110> 范德比尔特大学	
<120> 消化道癌症的筛查方法	
<130> 11672N/0702US	
<140> PCTUS077781	
<141> 2007-09-06	
<150> 60/824,678	
<151> 2006-09-06	
<160> 18	
<170> PatentIn version 3.4	
<210> 1	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的GAPDH特异性PCR正义引物序列	
<400> 1	
tgacgtgccg cctggagaaa	20
<210> 2	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的GAPDH特异性PCR反义引物序列	
<400> 2	
ccggcatcga aggtggaaga g	21
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的MCM3特异性PCR正义引物序列	
<400> 3	
gcgcagagag actacttga c	21
<210> 4	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的MCM3特异性PCR反义引物序列	
<400> 4	
tgcttggcgt aggtgg	16
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的MCM5特异性PCR正义引物序列	
<400> 5	
gcggcattac aacctgggtg a	21

<210> 6		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 人工产生的MCM5特异性PCR反义引物序列		
<400> 6		
acgggctggc atctgacttg a		21
<210> 7		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 人工产生的MCM7特异性PCR正义引物序列		
<400> 7		
cacgctcaat gcccgatgct		20
<210> 8		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 人工产生的MCM7特异性PCR反义引物序列		
<400> 8		
ttgtctctgt cgggccggtc t		21
<210> 9		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 人工产生的ST3Gal6特异性PCR正义引物序列		
<400> 9		
catatatcac cagcgaagca g		21
<210> 10		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 人工产生的ST3Gal6特异性PCR反义引物序列		
<400> 10		
tggcattccc gtagtagtgt		20
<210> 11		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 人工产生的ATF3特异性PCR正义引物序列		
<400> 11		
gatgcaacgc gctcccag		18
<210> 12		
<211> 21		

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的ATF3特异性PCR反义引物序列	
<400> 12	
ggcggccagg gtccagagaa c	21
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的HE4特异性PCR正义引物序列	
<400> 13	
tgctgcctg tcgcctctg	19
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的HE4特异性PCR反义引物序列	
<400> 14	
tgtccgcaca gtccttgcc a	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的IL1RN特异性PCR正义引物序列	
<400> 15	
ttggcctagg tgtcttctgc t	21
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的IL1RN特异性PCR反义引物序列	
<400> 16	
tatgtgatgc cctggtggtt	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工产生的TFF2特异性PCR正义引物序列	
<400> 17	
tgctttgatc ttggatgctg	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

<223> 人工产生的TFF2特异性PCR反义引物序列

<400> 18

ggaaaagcag cagtttcgac

20

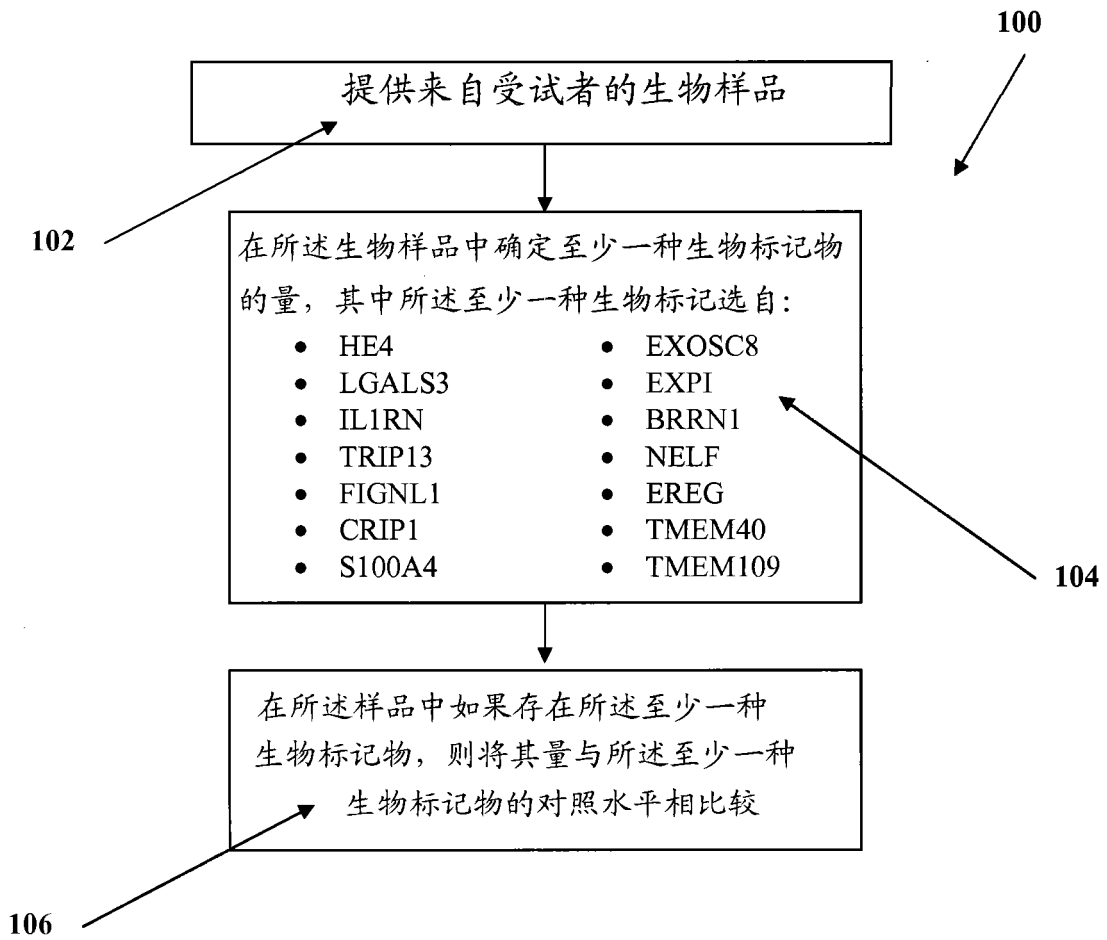


图 1

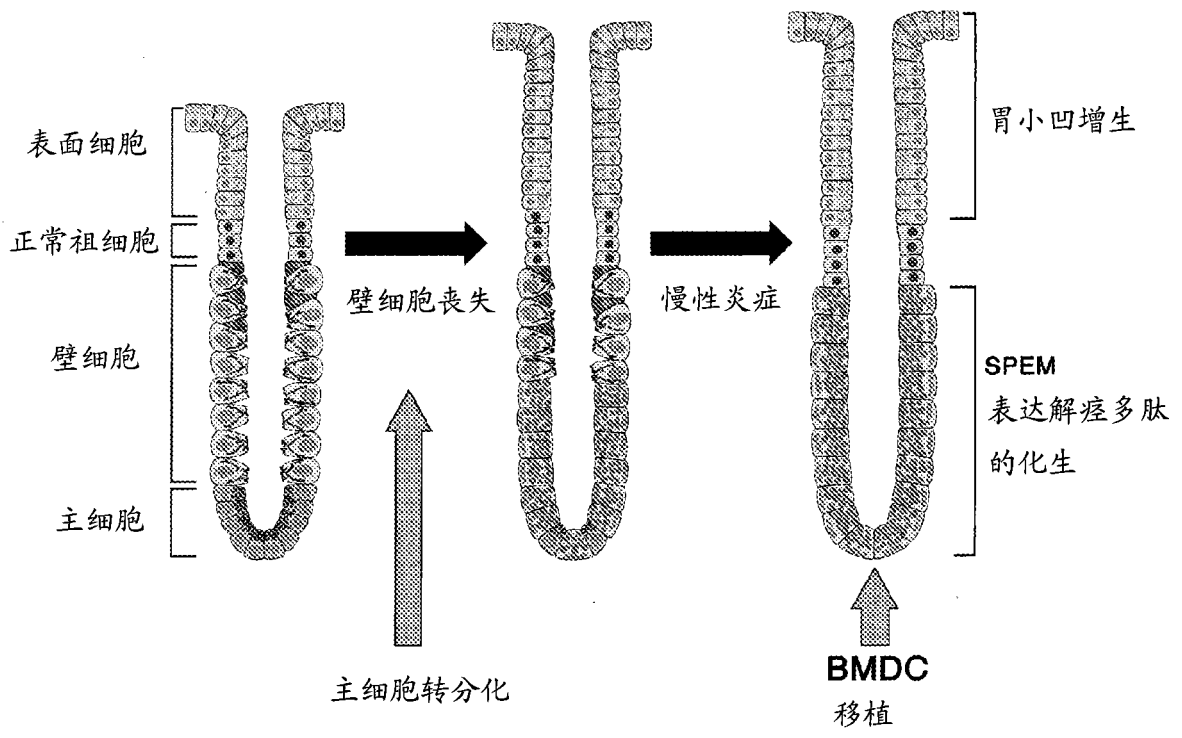


图 2

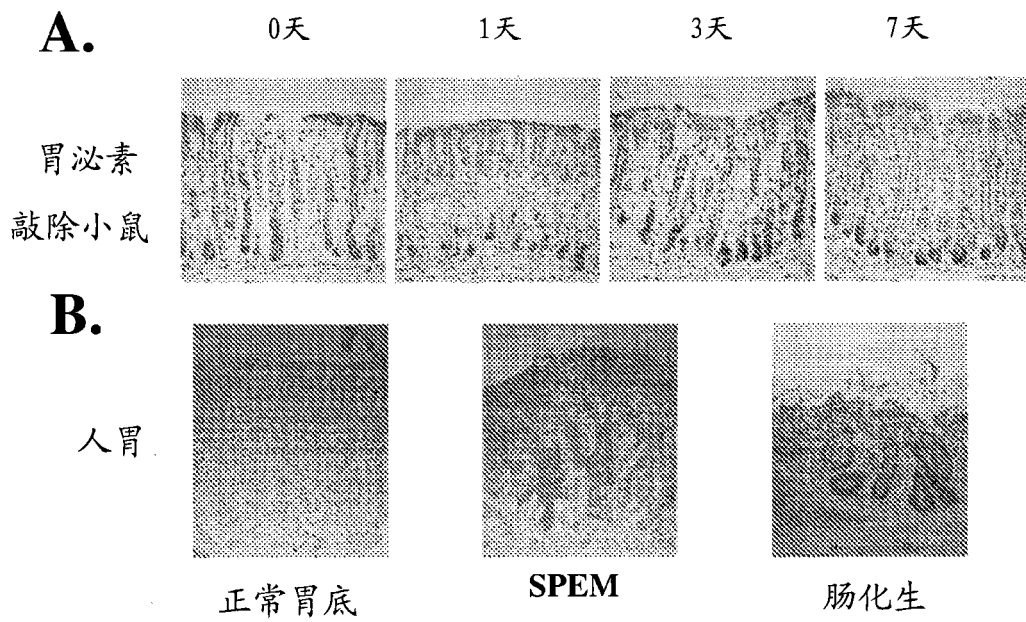


图 3

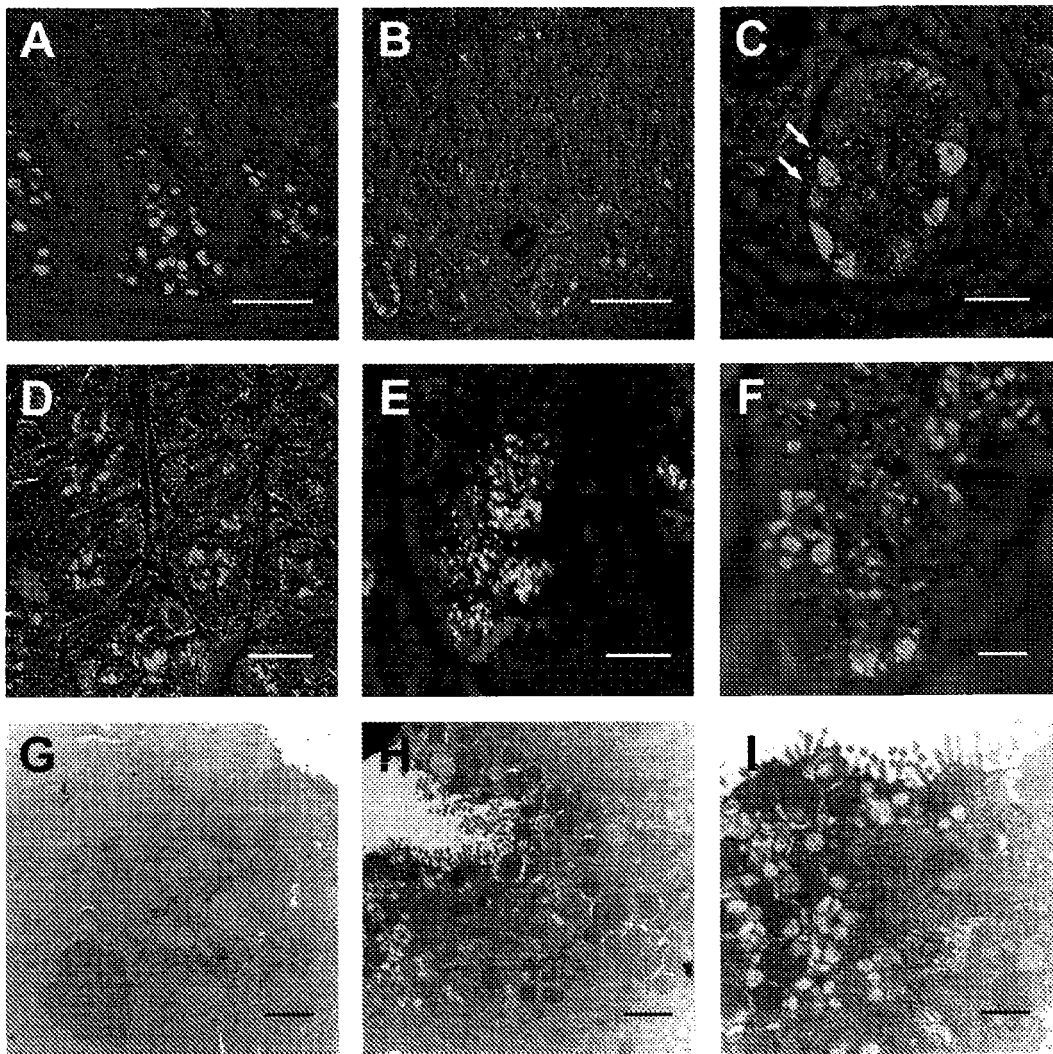


图 4

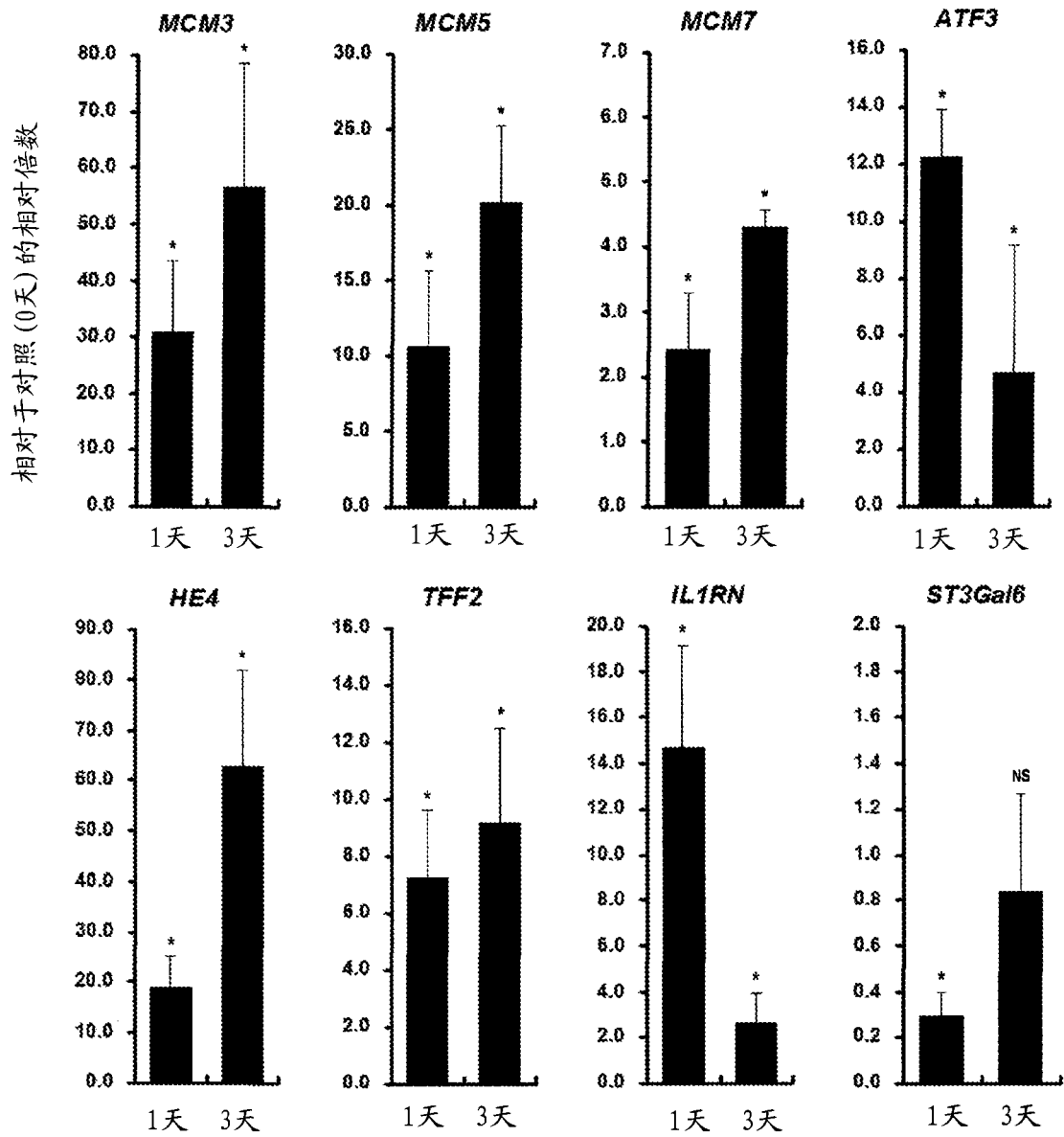


图 5

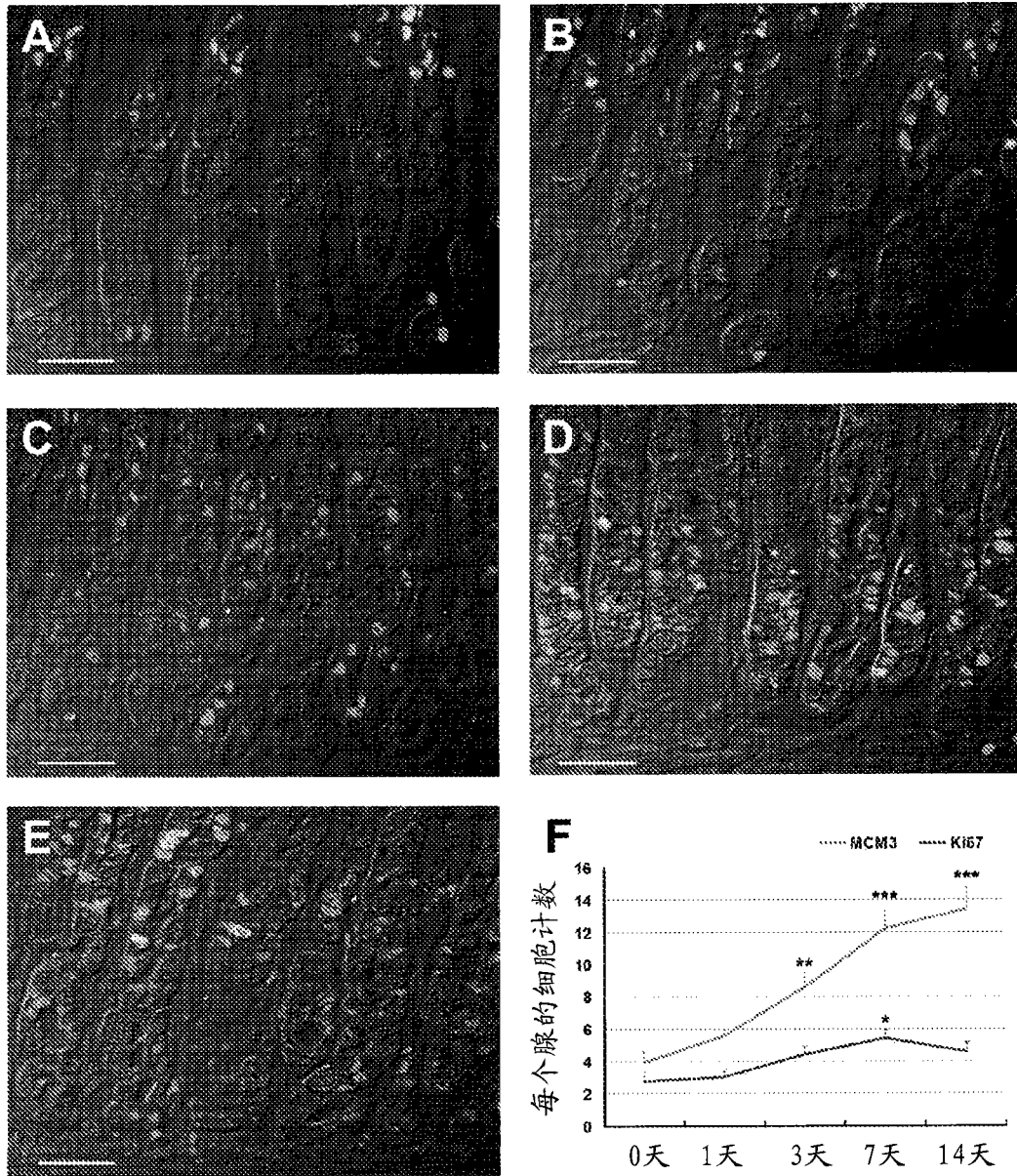


图 6

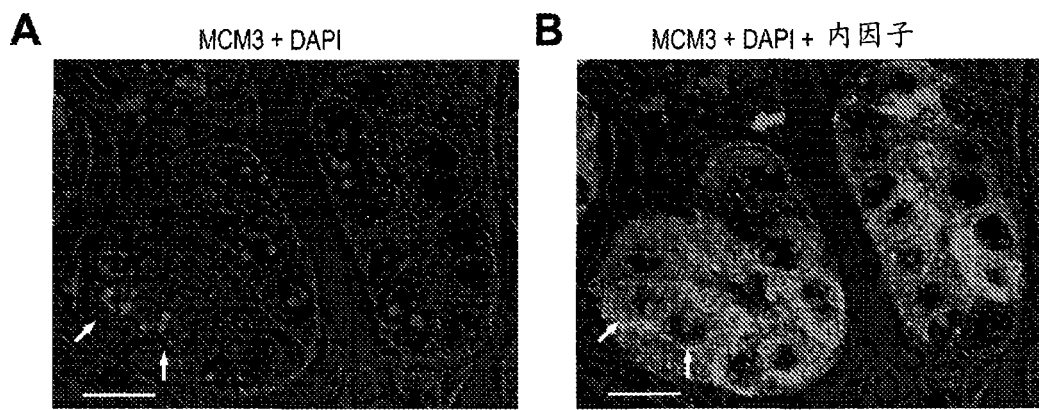


图 7

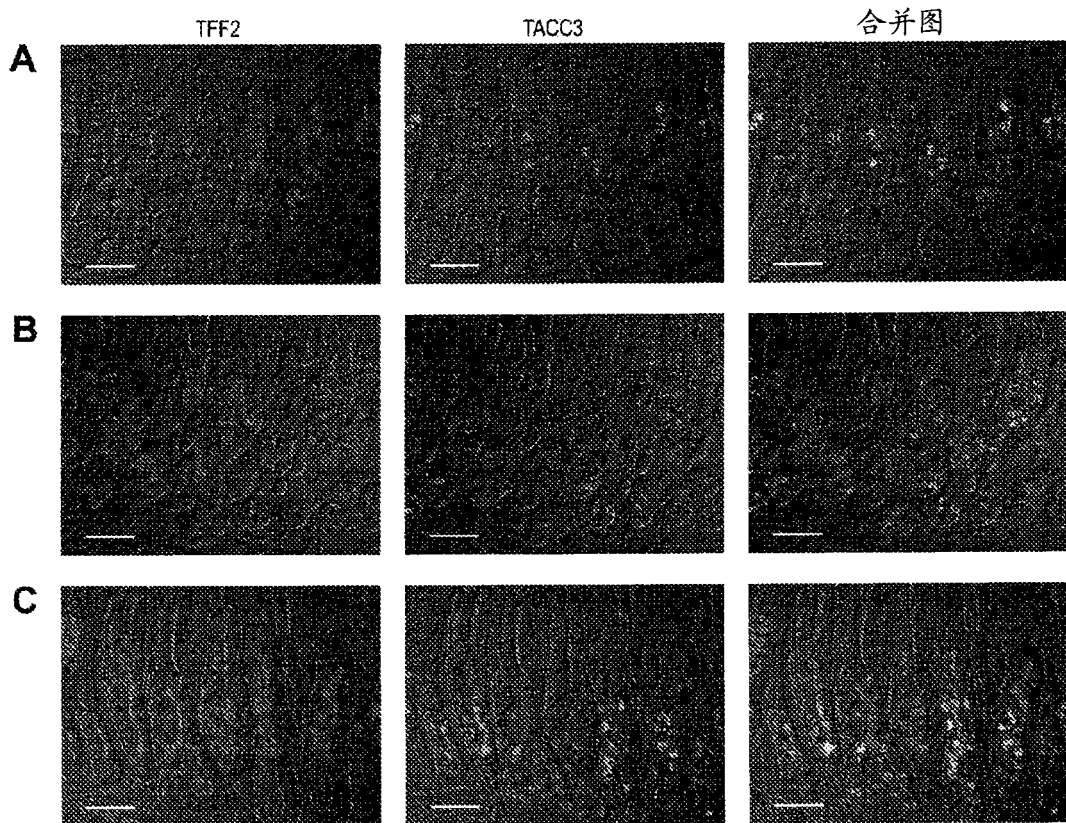


图 8

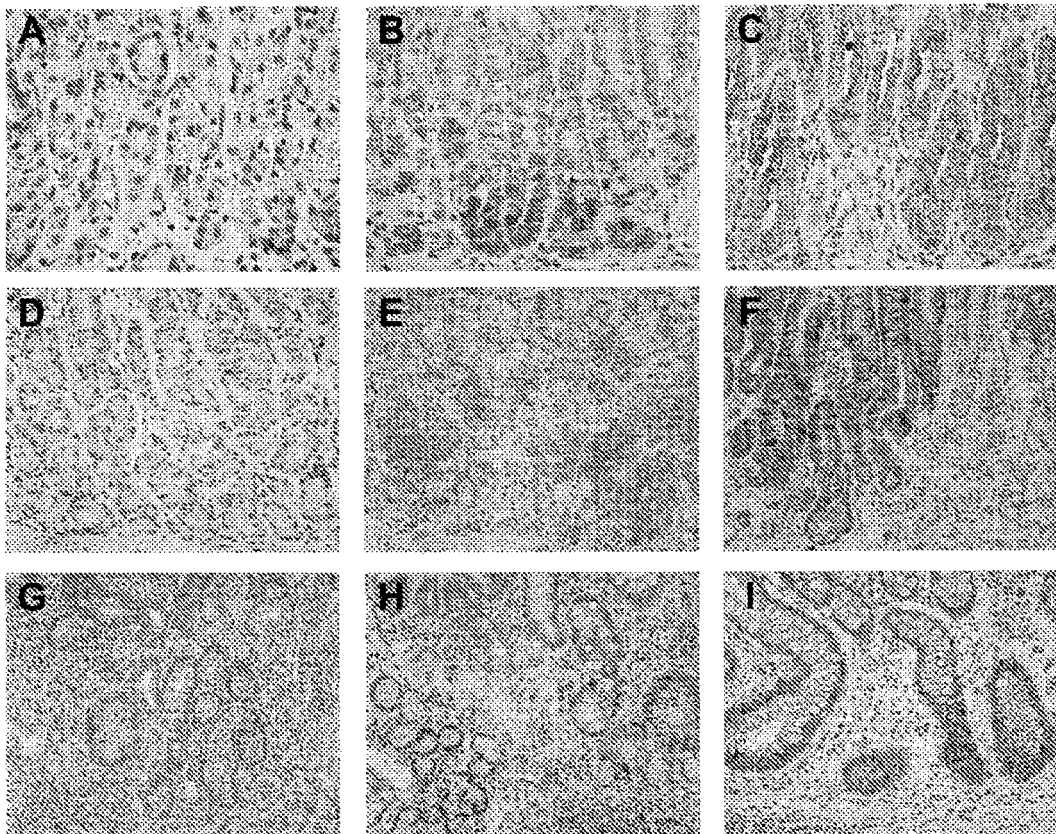


图 9

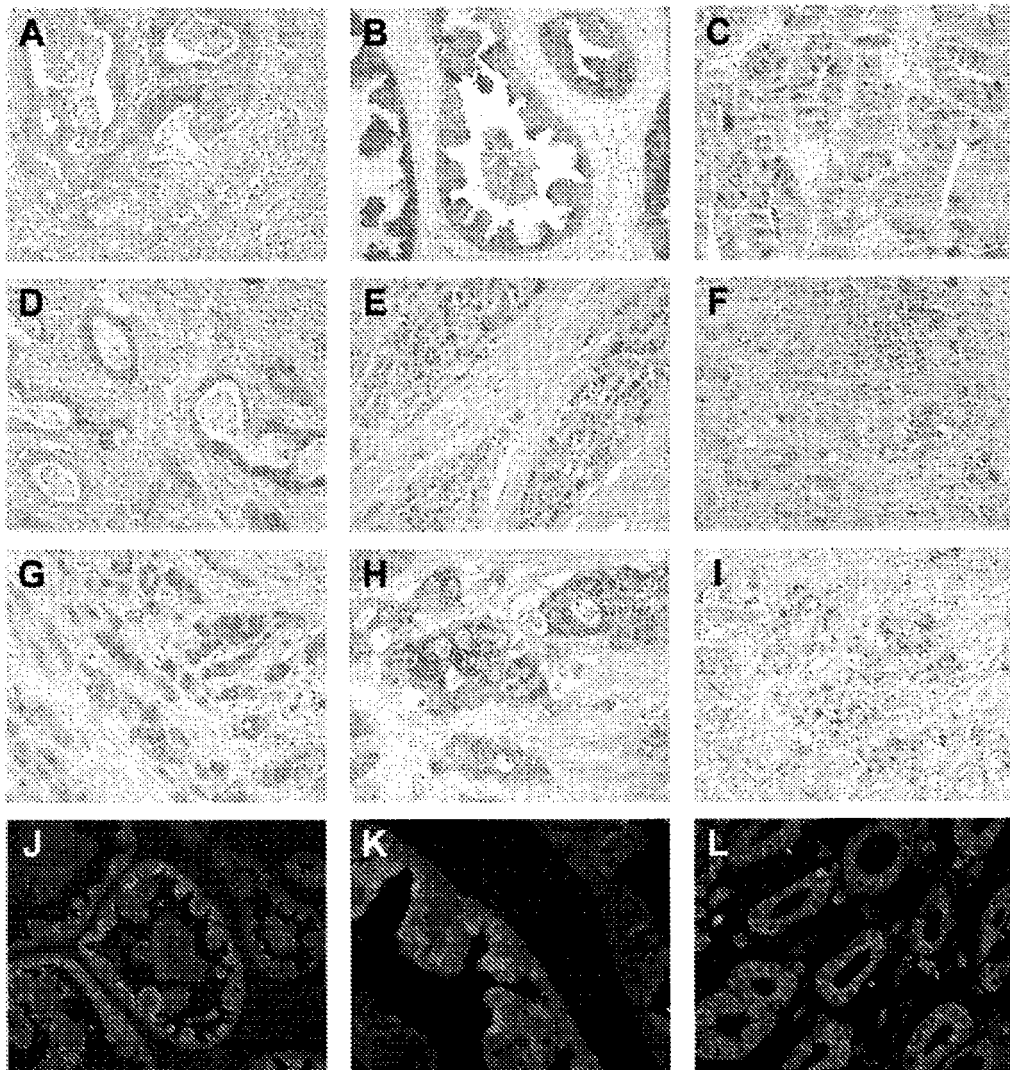


图 10

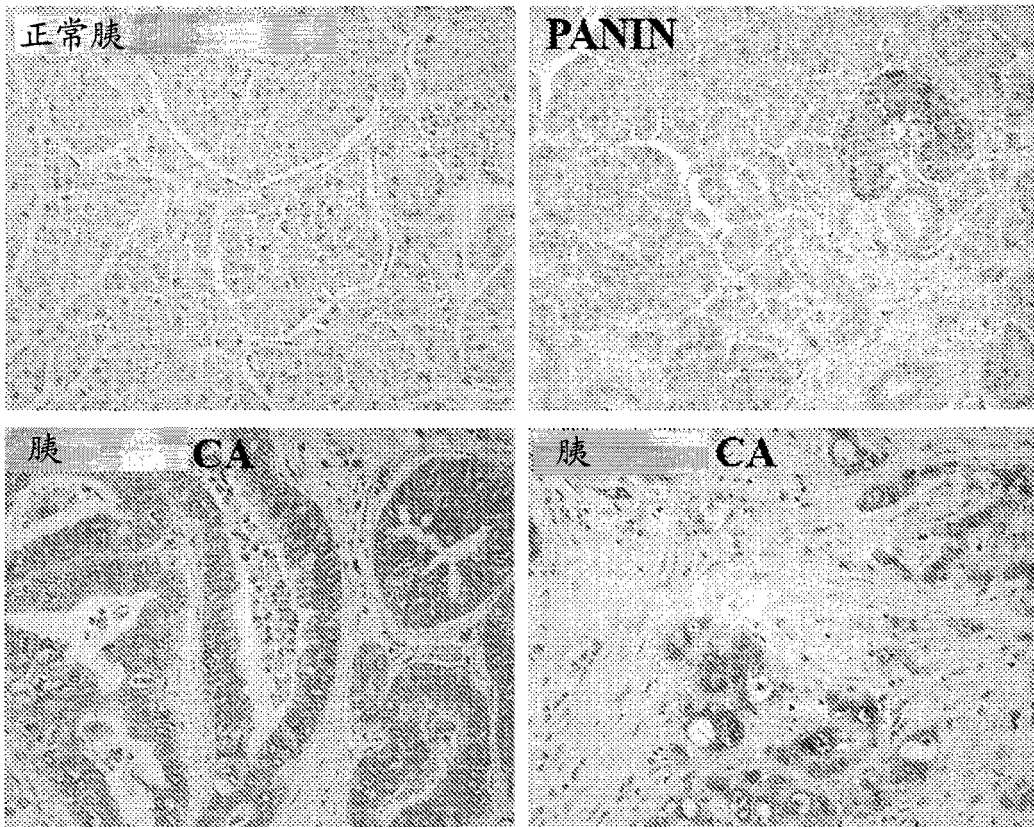


图 11

专利名称(译)	消化道癌症的筛查方法		
公开(公告)号	CN101535506A	公开(公告)日	2009-09-16
申请号	CN200780040653.0	申请日	2007-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	凡德比特大学		
申请(专利权)人(译)	范德比尔特大学		
当前申请(专利权)人(译)	范德比尔特大学		
[标]发明人	JR葛登林		
发明人	J·R·葛登林		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 C07K16/00 C07H21/04		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106		
代理人(译)	刘文君		
优先权	60/824678 2006-09-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了用于诊断受试者中上消化道(GI)癌症的方法，该方法是通过在来自所述受试者的生物样品中确定一种或多种生物标记物的量进行诊断。还提供了用于确定是否在受试者中开始或继续上GI癌症的预防或治疗的方法，该方法是通过确定所提供的一段时间内的一系列生物样品的每个样品中所述至少一种生物标记物的任何可测量的量变化来进行。

基因名		第1天, 相对于对照的倍数增加	第3天, 相对于对照的倍数增加
LGALS3	可溶性半乳糖苷结合凝集素 3	5.5	7.3
IL1RN	白细胞介素 1 受体拮抗物	4.7	4.2
TRIP13	甲状腺激素受体相互作用因子 13	3.5	3.0
FIGNL1	fidgetin 样 1	3.3	2.7
CRIP1	肠富含半胱氨酸蛋白 1	3.2	5.4
S100A4	S100 钙结合蛋白 A4	2.8	2.5
EXOSC8	外切酶体成分 8	2.6	2.8
EXPI	细胞外蛋白酶抑制剂	2.4	8.4
BRRN1	果蝇不孕同源物	2.2	3.1
NELF	鼻胚 LHRH 因子	2.1	3.7
EREG	表皮调节素	1.8	4.8
TMEM40	跨膜蛋白 40	1.4	6.9
TMEM109	跨膜蛋白 109	2.5	3.6