



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107782903 B

(45)授权公告日 2020.02.04

(21)申请号 201710971185.4

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2017.10.18

(56)对比文件

WO 2009/045443 A2, 2009.04.09,

CN 105063208 A, 2015.11.18,

王琪琳 等. Hedgehog 信号通路与肿瘤.《生命的化学》.2011, 第31卷(第1期), 第21-26页.

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107782903 A

审查员 赵晓明

(43)申请公布日 2018.03.09

(73)专利权人 江西省妇幼保健院  
地址 330006 江西省南昌市八一大道318号

(72)发明人 张子宇 邹阳 杨必成 刘发英  
罗勇

(74)专利代理机构 济南克雷姆专利代理事务所  
(普通合伙) 37279

代理人 张祥明

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

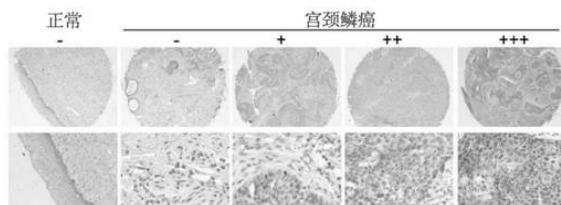
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法

(57)摘要

本发明公开了一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法,将宫颈鳞癌组织制成组织芯片,进行免疫组化实验、病理医生免疫评分,根据免疫评分进行分组,按照Sufu蛋白的着染情况将患者分为Sufu蛋白阳性表达组和阴性表达组,运用统计学方法分析两组病人的临床特征。临床数据统计结果显示Sufu蛋白阳性表达组的患者更容易出现脉管癌栓( $p=0.046$ )和间质浸润深度 $\geq 1/2$ ( $p=0.041$ ),且Sufu蛋白的高表达与患者临床分期( $p=0.008$ )增加明显相关。结果表明Sufu蛋白阳性表达的情况可以直接确定宫颈鳞癌恶性程度和临床特征,此评价方法简单,为评价宫颈鳞癌提供了新的方法和标志物。



1. Sufu蛋白作为标志物在制备评价宫颈鳞癌恶性程度的试剂中的用途。

## 一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种宫颈鳞癌恶性程度的评价方法,具体涉及一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法。属于宫颈鳞癌预后技术领域。

### 背景技术

[0002] 宫颈癌是目前最常见的妇科肿瘤之一,在全世界范围内,每年新增53万病例,并且有27.5万人死亡。在发展中国家,有效的筛查、评价和治疗手段能够极大的降低发病率和死亡率。从组织学角度而言,正常宫颈上皮进展成为宫颈鳞状细胞癌(CSCC)是需要经历一系列的癌前病变,包括由低级别的鳞状上皮内病变(LSILs)演变为高级别的鳞状上皮内病变(HSILs)。因此,对于诊治宫颈鳞癌最主要的一个问题就是区别LSILs和HSILs。目前,利用组织学手段来评价SIL的金标准已经被发现,但是,在不同的观察者之间却具有很大的差异。虽然一些分子标记物,如p16INK4a和Ki-67可以提供支持组织学评价CSCC的客观标准,但是它们的作用仍然有限。因此,评价CSCC亟需一些重要的临床特异性标志物。此外,不同评价结果对于临床预后也有极大的帮助;给与个性化治疗和提高诊疗手段的转化医学,针对不同病人病情的发展而寻找特异性的分子标志物,为判断宫颈鳞癌患者的预后变得极为重要。尽管一些潜在分子标志物已经能够预测宫颈鳞癌的生存率,但是目前还没有得到非常满意的结果。因此,寻找新的、特异性分子标志物作为宫颈鳞癌的评价标准和治疗靶点显得尤为迫切。

[0003] Hedgehog (Hh) 信号通路调控着一系列发育的过程和肿瘤的产生,Hh蛋白是12次跨膜蛋白受体Ptch1蛋白的配基,Ptch1能反向调节7次跨膜蛋白Smo。Hh配基与Ptch结合,导致Smo的激活。这将导致Smo转运至原纤毛中,Hh通路也得以正常转运。Smo的下游是Gli蛋白家族,它们属于锌指转录因子家族,在哺乳动物中具有三个同源蛋白,Gli1、Gli2和Gli3。Suppressor of fused (Sufu) 作为Gli蛋白的分子伴侣,能够与所有的Gli蛋白结合而形成复合物。最初人们认为Sufu基因外显子缺失突变导致它失去了铆钉Gli转录因子在细胞浆中的能力,导致Gli进入细胞核、促进下游基因转录而使得Shh通路激活,并最终导致肿瘤的产生。然而,目前对于Sufu蛋白在Shh通路的作用机制却众说纷纭,它既能通过两个位点与Gli蛋白结合、将Gli阻碍在细胞浆而不能进入细胞核内,也能通过招募转录抑制复合物而发挥其降低Gli转录活性的功能。因此Sufu蛋白一直被认为是Shh信号通路中的抑癌基因。但是,也有证据表明Sufu蛋白能够正向调节Shh信号通路,但是其中详实的机理并不清楚。近期有文章阐明Sufu蛋白可以作为分子伴侣同Gli进入细胞核内、发挥稳定Gli1蛋白的活性进而促进Shh信号通路的最大化激活,这一功能与信号通路另一成员Kif7的正反调节能力极为相似。

[0004] 目前的研究报道证实Hh信号通路的过度活化与宫颈鳞癌的产生密切相关,因此,Sufu蛋白作为Hh通路最大化激活的促进因子在宫颈鳞癌的发生起着至关重要的作用,并可能成为新的宫颈鳞癌的诊断和治疗的方法。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是为克服上述现有技术的不足,提供一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0007] 一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法,利用宫颈鳞癌组织制成组织芯片,进行免疫组化实验和病理医生免疫评分,按照组织内Sufu蛋白的着染情况对宫颈鳞癌恶性程度进行评价,包括以下步骤:

[0008] 1)组织芯片制作,包括:

[0009] (1)制作组织芯片石蜡块切片

[0010] 将获取的组织进行透化、石蜡包埋,得到组织石蜡块,从组织石蜡块中采集圆柱形小组织,将其整齐排放到另一个空白蜡块中制成组织芯片蜡块,对组织芯片蜡块进行切片,再将切片转移到载玻片上制成组织芯片;

[0011] (2)将制作好的组织芯片进行脱石蜡、水化处理;

[0012] (3)对步骤(2)中经脱石蜡、水化处理后的组织芯片进行免疫组化染色;

[0013] 2)结果评价

[0014] 依照各组织芯片的染色强度及染色细胞数进行综合分析评分,评价宫颈鳞癌的恶性程度。

[0015] 作为优选的技术方案之一,步骤(1)的具体方法为:

[0016] ①获取的组织在质量-体积浓度为4%的多聚甲醛中,4℃固定24小时后取出,用PBS洗3次,每次2~3分钟,将PBS倒掉,然后按乙醇浓度由低到高进行梯度脱水,最后利用二甲苯透化组织;

[0017] ②将已透明处理的组织放入溶化的65℃石蜡中浸泡3小时进行包埋;

[0018] ③利用芯片打孔机将蜡块中的癌灶打下,放于新的蜡块中,制作成组织芯片蜡块;

[0019] ④将组织芯片蜡块固定在石蜡切片机上,进行切片,切片放入40℃蒸馏水表面进行摊片;

[0020] ⑤用APES进行防脱片处理的载玻片捞片,放入55℃烤箱中过夜,得到组织芯片。

[0021] 作为优选的技术方案之一,步骤(2)的具体方法为:

[0022] ①二甲苯浸泡10分钟,更换新的二甲苯后,再浸泡10分钟,共重复三次;

[0023] ②纯乙醇浸泡1分钟;

[0024] ③体积浓度为95%乙醇浸泡1分钟;

[0025] ④体积浓度为85%乙醇浸泡1分钟;

[0026] ⑤体积浓度为75%乙醇浸泡1分钟;

[0027] ⑥体积浓度为50%乙醇浸泡1分钟;

[0028] ⑦蒸馏水洗两次,每次2分钟。

[0029] 作为优选的技术方案之一,步骤(3)的具体方法为:

[0030] ①利用pH=6.0的0.01mol/L柠檬酸盐抗原修复液进行抗原修复;

[0031] ②用TBS稀释的体积浓度为5%的正常山羊血清封闭组织1小时;

[0032] ③采用TBS冲洗3次,每次2分钟;

[0033] ④用ddH<sub>2</sub>O配置的体积浓度为3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育以阻断内源性过氧化物酶;

- [0034] ⑤用TBS冲洗3次,每次2分钟;
- [0035] ⑥加入Sufu蛋白的一抗,4℃孵育过夜,其中一抗使用抗体稀释液按照1:100的体积比配制;
- [0036] ⑦次日,用TBS冲洗3次,每次2分钟;
- [0037] ⑧室温孵育二抗200ul,二抗为兔超敏两步法免疫组化检测试剂盒内试剂1和2各200ul;
- [0038] ⑨采用DAB显色,经苏木素染液复染核、酒精梯度脱水、二甲苯透明后用中性树脂封片,使用光学显微镜观察。
- [0039] 作为优选的技术方案之一,步骤2)的评分标准为:
- [0040] (1) 染色强度分为:a.未着色-0分;b.淡棕黄色-1分;c.棕黄色-2分;d.棕褐色-3分;
- [0041] (2) 阳性细胞百分数分为:a.阳性数 $\leq 5\%$ -0分;b. $5\% < \text{阳性数} \leq 25\%$ -1分;c. $25\% < \text{阳性数} \leq 50\%$ -2分;d. $50\% < \text{阳性数} \leq 75\%$ -3分;e.阳性数 $> 75\%$ -4分;
- [0042] 将上述两项结果相乘,0~2分为阴性(-);3~4分为弱阳性(+);5~6分为阳性(++) ;7~8分为强阳性(+++),将阴性(-)和弱阳性(+)作为低表达,属于阴性表达,阳性(++)和强阳性(+++)作为高表达;
- [0043] 通过SPSS11.0软件对Sufu蛋白染色结果结合临床数据进行统计分析。
- [0044] 作为优选的技术方案之一,步骤(2)①的具体方法为:将足够覆盖所有切片的0.01mol/L柠檬酸盐抗原修复液在高压锅中加热至沸腾,将组织芯片放入抗原修复液中,盖上高压锅盖,扣上压力阀,继续加热至喷气,开始计时5分钟,关闭高压锅热源,待高压锅压力降至零时,打开锅盖,修复液自然降至室温后,TBS洗3次,每次2分钟。
- [0045] 本发明的有益效果:本发明提供的评价方法,是将宫颈鳞癌组织制成组织芯片,进行免疫组化实验、病理医生免疫评分,根据免疫评分进行分组,按照Sufu蛋白的着染情况将患者分为Sufu蛋白阳性表达组和阴性表达组,运用统计学方法分析两组病人的临床特征。临床数据统计结果显示Sufu蛋白阳性表达组的患者更容易出现脉管癌栓( $p=0.046$ )和间质浸润深度 $\geq 1/2$ ( $p=0.041$ ),且Sufu蛋白的高表达与患者临床分期( $p=0.008$ )增加明显相关。表明Sufu蛋白阳性表达的情况可以直接确定宫颈鳞癌恶性程度和临床特征,此评价方法简单易操作,为评价宫颈鳞癌提供了新的方法和标志物。

## 附图说明

- [0046] 图1是Sufu蛋白在正常宫颈上皮和宫颈鳞癌组织芯片中的表达情况。

## 具体实施方式

- [0047] 下面结合附图和实施例对本发明进行进一步的阐述,应该说明的是,下述说明仅是为了解释本发明,并不对其内容进行限定。

- [0048] 实施例中所用到的主要试剂和实验仪器如下:

- [0049] (1) 试剂:

- [0050] 石蜡(Sigma A6330,美国);

- [0051] 苏木素(Sigma,美国);

- [0052] 伊红 (Sigma, 美国)；
- [0053] 柠檬酸盐抗原修复液 (迈新, 中国)；
- [0054] 封闭用正常山羊血清 (中杉金桥, 中国)；
- [0055] 抗体稀释液 (Cell signaling Technology, 美国)；
- [0056] 兔超敏两步法免疫组化检测试剂盒 (中杉金桥, 中国)；
- [0057] 浓缩型DAB试剂盒 (中杉金桥, 中国)；
- [0058] 抗体: rabbit anti-Sufu IgG (Epitomics, 美国)。
- [0059] (2) 主要仪器:
- [0060] 石蜡切片机 (Leica, 德国)；
- [0061] IX-71型荧光倒置显微镜 (Olympus公司, 日本)
- [0062] (3) 通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法:
- [0063] 通过江西省妇幼保健院病理科随机收集的88个宫颈鳞癌和11个正常子宫切除的标本(2008年1月-2013年1月), 制作组织芯片, 标本也可取自人工培养标本。利用Sufu的抗体进行免疫组化检测, 免疫组化方法参见“Yun-Na Qin, De-Ming He, Zi-Yu Zhang, Xiao-Hong Yu: Aberrant expression of casein kinase 1 $\delta$  (CK1 $\delta$ ) in cervical squamous cell carcinoma. Int J Clin Exp Pathol, 2017; 10 (2) : 2018-2023.”, 所用作图软件为Photoshop cs5, 分析软件为Spss11.0。由于Sufu蛋白用普通微波炉修复不能正常显色, 因此我们采用高压修复法进行抗原修复。
- [0064] 具体步骤如下:
- [0065] I、组织芯片制作, 包括:
- [0066] 1) 制作组织芯片石蜡块切片
- [0067] 通过组织芯片制作机细针打孔的方法, 从88个宫颈鳞癌和11个正常子宫切除的标本的石蜡块中采集到圆柱形小组织, 并将其整齐排放到另一个空白蜡块中而制成组织芯片蜡块, 对组织芯片蜡块进行切片, 再将切片转移到载玻片上而制成组织芯片;
- [0068] 具体包括:
- [0069] (1) 组织在质量-体积浓度为4%的多聚甲醛中, 4℃固定24小时后取出, 用PBS洗3次, 每次2~3分钟, 将PBS倒掉, 然后按乙醇浓度由低到高进行梯度脱水, 最后利用二甲苯透化组织;
- [0070] (2) 将已透明处理的组织放入溶化的65℃石蜡中浸泡3小时, 每小时更换一次新的石蜡, 将组织按所需方位放入包埋磨具中央进行包埋, 磨具放在冷台上至石蜡完全凝固, 小心将包裹组织的蜡块从磨具中剥离, 包埋好的组织视其大小在距组织边缘约0.1~0.2cm处切去余蜡部分;
- [0071] (3) 利用芯片打孔机将修好的蜡块中的癌灶打下, 放于新的蜡块中, 制作成组织芯片蜡块;
- [0072] (4) 将组织芯片的蜡块固定在石蜡切片机上, 装好刀片, 按5um厚度进行切片。用眼科镊子小心镊起蜡带, 轻轻平铺在40℃蒸馏水表面, 借水的张力和温度将略皱的蜡带充分展平, 切勿过度展片, 在水面上的时间太长组织会散开;
- [0073] (5) 迅速将蜡片捞到载玻片的中段处, 倾去多余水分, 放于55℃烘箱中烤片过夜, 约12小时, 使组织更牢固的粘附在载玻片上;

[0074] 载玻片用APES进行防脱片处理,具体处理方法如下:载玻片泡酸处理后,仔细清洗干净残留的酸液,将洗干净的载玻片用70%酒精浸泡过夜,用大镊子夹出整齐插放于不锈钢玻片架中,自然晾干。将整架玻片浸没在稀释好的APES(用丙酮50倍稀释)中,停留15分钟,取出在室温稍微晾干(约2~3分钟),再用丙酮(不含APES)涮去未结合的APES,用丙酮洗三遍,在通风橱内晾干,收于切片盒中待用;

[0075] 2)将制作好的石蜡组织芯片进行脱石蜡、水化处理,具体操作方法如下:

[0076] (1)二甲苯浸泡10分钟,更换新的二甲苯后,再浸泡10分钟,共重复三次;

[0077] (2)纯乙醇浸泡1分钟;

[0078] (3)体积浓度为95%乙醇浸泡1分钟;

[0079] (4)体积浓度为85%乙醇浸泡1分钟;

[0080] (5)体积浓度为75%乙醇浸泡1分钟;

[0081] (6)体积浓度为50%乙醇浸泡1分钟;

[0082] (7)蒸馏水洗两次,每次2分钟;

[0083] 3)对步骤2)中经脱石蜡、水化处理后的组织芯片进行免疫组化染色,包括:

[0084] (1)利用pH=6.0的0.01mol/L柠檬酸盐抗原修复液进行抗原修复;具体步骤为:

[0085] 将足够覆盖所有切片的0.01mol/L柠檬酸盐抗原修复液在高压锅中加热至沸腾,将组织芯片放入抗原修复液中,盖上高压锅盖,扣上压力阀,继续加热至喷气,开始计时5分钟,关闭高压锅热源,待高压锅压力降至零时,打开锅盖,修复液自然降至室温后,TBS洗3次,每次2分钟;

[0086] (2)用TBS稀释的体积浓度为5%的正常山羊血清封闭组织1小时;

[0087] (3)采用TBS冲洗3次,每次2分钟;

[0088] (4)用ddH<sub>2</sub>O配置的体积浓度为3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育以阻断内源性过氧化物酶;

[0089] (5)用TBS冲洗3次,每次2分钟;

[0090] (6)将Sufu蛋白的一抗使用抗体稀释液按体积比1:100稀释,把组织芯片上多余的液体吸干,把稀释后的一抗200ul加到组织芯片上,4℃孵育过夜;

[0091] (7)次日,用TBS冲洗3次,每次2分钟;

[0092] (8)滴加试剂盒中试剂1(Polymer Helper)200ul,室温孵育10~20分钟,TBS冲洗3次,每次2分钟;

[0093] 滴加试剂2(poly-HRP anti-Rabbit IgG)200ul,室温孵育10~20分钟,TBS冲洗3次,每次2分钟;

[0094] (9)将DAB底物和DAB浓缩液按体积比20:1配成DAB工作液,滴加到组织上显色;自来水充分冲洗后,经苏木素染液染核,酒精梯度脱水、二甲苯透明后用中性树脂封片,使用光学显微镜观察;

[0095] II、评价

[0096] 组织芯片在Olympus光学显微镜下观察,选取正常组织和肿瘤中央位置进行拍摄,分别在40和200倍下进行观察,结果由两位资深病理科医生独立观察每张切片后综合判断,依照各自染色强度及染色细胞数进行综合分析评分。

[0097] 评分标准:1.染色强度分为:a.未着色-0分;b.淡棕黄色-1分;c.棕黄色-2分;d.棕褐色-3分。2.阳性细胞百分数分为:a.阳性数≤5%-0分;b.5%<阳性数≤25%-1

分;c.25%<阳性数≤50%—2分;d.50%<阳性数≤75%—3分;e.阳性数>75%—4分。将两项结果相乘,0~2分为阴性(-);3~4分为弱阳性(+);5~6分为阳性(++);7~8分为强阳性(+++)。将阴性(-)和弱阳性(+)作为低表达,属于阴性表达,阳性(++)和强阳性(+++)作为高表达。最后,通过SPSS11.0软件对Sufu染色结果结合临床数据进行统计分析。

[0098] 图1为Sufu蛋白在正常宫颈上皮和宫颈鳞癌组织芯片中的表达情况,图中显示的是人正常宫颈上皮和宫颈鳞癌组织芯片中Sufu蛋白的免疫组化染色结果,棕色颗粒表示Sufu蛋白的信号。图1中上排放大倍数为5 $\times$ ;下排放大倍数为20 $\times$ ;(-)和(+)代表性阴性染色;(+++)和(+++)代表性阳性染色。

[0099] 表1为Sufu蛋白在正常宫颈上皮和宫颈鳞癌组织芯片中表达的统计结果。

[0100] 表1Sufu蛋白在组织芯片中表达的统计的结果

	组织分类	总数	-	+	++	+++	阳性率%	P 值
[0101]	肿瘤	88	14	8	36	30	75	<0.0001
	正常	11	10	1	0	0	0	

[0102] 由图1和表1可以看出Sufu蛋白在正常组织的细胞里呈阴性表达;在部分肿瘤细胞呈阴性表达,在肿瘤细胞中的阳性表达率达到75%,P值<0.0001,具有显著统计学意义。

[0103] 最后,通过SPSS11.0软件对Sufu蛋白染色结果结合临床数据进行统计分析。结果见表2,由表中可以看出,Sufu蛋白阳性表达组的患者更容易出现脉管癌栓( $p=0.046$ )和间质浸润深度 $\geq 1/2$ ( $p=0.041$ ),而且Sufu蛋白的高表达与患者临床分期( $p=0.008$ )增加明显相关。

[0104] 表2宫颈鳞癌Sufu蛋白表达与临床数据之间的关系

[0105]	类别	参数	病人数量	Sufu 蛋白阳性人		Sufu 蛋白阳性率	P 值
				数	(%)		
[0106]	年龄 (岁)	<40	30	25	83.3	0.198	
		$\geq 40$	58	41	70.7		
[0106]	临床分期	1	16	8	50.0	0.08	
		2	69	55	79.7		
[0106]	间质浸润深度	3	3	3	100.0	0.041	
		$< 1/2$	37	22	59.5		
[0106]	脉管癌栓	$\geq 1/2$	51	44	86.3	0.046	
		否	52	35	67.3		
[0106]	淋巴结转移	是	36	31	86.1	0.358	
		否	77	55	71.4		
		是	11	11	100.0		

[0107] 由上所述,Sufu蛋白阳性表达情况可以作为宫颈鳞癌恶性程度的评价标准物,为宫颈鳞癌恶性程度的评价提供了新方法。

[0108] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范

围的限制,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

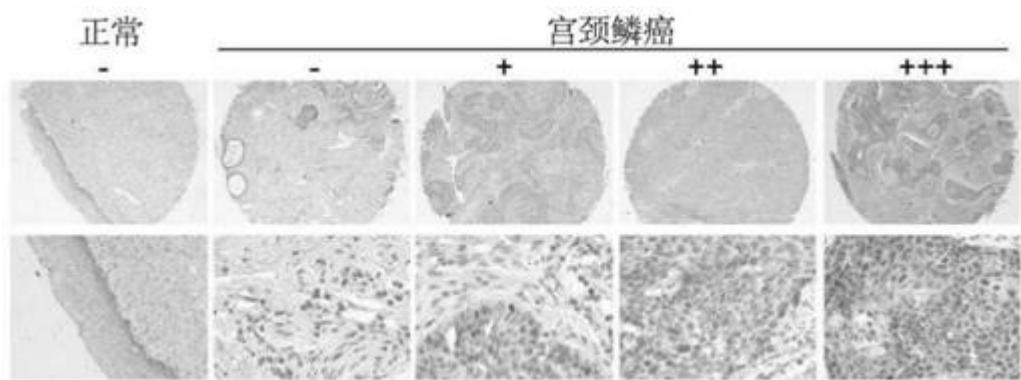


图1

专利名称(译)	一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107782903B</a>	公开(公告)日	2020-02-04
申请号	CN201710971185.4	申请日	2017-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	江西省妇幼保健院		
申请(专利权)人(译)	江西省妇幼保健院		
当前申请(专利权)人(译)	江西省妇幼保健院		
[标]发明人	张子宇 邹阳 杨必成 刘发英 罗勇		
发明人	张子宇 邹阳 杨必成 刘发英 罗勇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/57411 G01N33/57484 G01N33/6893		
代理人(译)	张祥明		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN107782903A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了一种通过Sufu蛋白阳性表达情况对宫颈鳞癌恶性程度的评价方法，将宫颈鳞癌组织制成组织芯片，进行免疫组化实验、病理医生免疫评分，根据免疫评分进行分组，按照Sufu蛋白的着染情况将患者分为Sufu蛋白阳性表达组和阴性表达组，运用统计学方法分析两组病人的临床特征。临床数据统计结果显示Sufu蛋白阳性表达组的患者更容易出现脉管癌栓( $p = 0.046$ )和间质浸润深度 $\geq 1/2$ ( $p = 0.041$ )，且Sufu蛋白的高表达与患者临床分期( $p = 0.008$ )增加明显相关。结果表明Sufu蛋白阳性表达的情况可以直接确定宫颈鳞癌恶性程度和临床特征，此评价方法简单，为评价宫颈鳞癌提供了新的方法和标志物。

