



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 107219354 A

(43)申请公布日 2017. 09. 29

(21)申请号 201710375891.2

(22)申请日 2017.05.24

(71)申请人 中国人民解放军第二军医大学
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 丁劲 王红阳 夏明杨 李晓峰
向代民 孙文 程卓 周腾飞

(51)Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

CK19联合OV6在肝癌索拉菲尼精准治疗中的应用

(57)摘要

本发明涉及医药技术领域,本发明涉及肝前体细胞标志物CK19和OV6联合应用于制备肝癌分子分型试剂盒指导肝癌的索拉菲尼个体化治疗。本发明通过对肝癌组织连续切片进行CK19和OV6的免疫组织化学染色分析,发现来源于肝前体细胞CK19⁺OV6⁺肝癌病人预后更差。Sorafenib能显著抑制恶性转化的肝前体细胞的自我更新,并诱导其凋亡。CK19⁺OV6⁺肝癌病人术后给予Sorafenib治疗后,其复发及总体生存状况得到明显改善,提示肝前体细胞来源的CK19⁺OV6⁺肝癌更适用于Sorafenib的治疗。

1. CK19和OV6联用在制备肝癌分子分型试剂盒用于肝癌索拉菲尼个性化治疗。
2. 根据权利要求1所述, 肝癌分子分型试剂盒, 其特征在于, 所述的分子分型试剂盒是指用于鉴别CK19⁺OV6⁺肝癌和CK19⁻或OV6⁻肝癌的试剂盒。
3. 根据权利要求1所述, 肝癌索拉菲尼个性化治疗, 其特征在于, 所述的肝癌是指CK19⁺OV6⁺肝癌。
4. 根据权利要求3所述, 肝癌索拉菲尼个性化治疗, 其特征在于, 所述的个性化治疗是指CK19⁺OV6⁺肝癌应用索拉菲尼治疗。

CK19联合OV6在肝癌索拉菲尼精准治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及CK19和OV6蛋白的联合应用,具体涉及CK19和OV6蛋白组合在指导肝癌索拉菲尼精准治疗中的应用。本发明中基于CK19和OV6蛋白检测的试剂盒可以用于判定肝前体细胞来源的肝癌(即CK19⁺OV6⁺的肝癌),并可以用于指导临床医生对此类病人进行Sorafenib精准治疗。

背景技术

[0002] 原发性肝细胞癌(简称肝癌)是全球常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率长期居高不下。目前肝癌的治疗仍以手术治疗为主,但肝癌发病复杂,部分病人确诊时已是中晚期,错过最佳手术时间;在我国,很多肝癌病人长期经历肝硬化病程,身体状况差,不能接受手术治疗;另外,大量肝癌病人经手术治疗后出现复发,二次手术难度大、风险高。对于这类病人,有效的药物治疗是控制病情、缓解症状和延长生存时间的最佳途径。然而,肝癌对常规化疗药物不敏感,加之很多患者身体状况不佳,难以承受化疗药物带来的毒副作用,进而导致肝癌患者较差的预后。近年来针对肿瘤细胞异常信号通路的分子靶向抗肿瘤药物,因其较高的治疗指数和较低的毒副作用备受关注。其中Sorafenib是迄今唯一被美国FDA批准用于肝癌治疗的分子靶向药物;然而,已有多项研究证实Sorafenib治疗肝癌病人的总体疗效不高,中位生存时间为3个月,部分患者未显示出治疗效果,甚至出现严重不良反应。因此,寻找特异性分子标志物指导Sorafenib在临床中的用药显得尤为重要。

[0003] 相关研究表明,部分肝癌来源于肝前体细胞的恶性转化,肝前体细胞标志物CK19的表达与肝癌病人的不良预后相关;另外,有研究报道肝前体细胞表达某些特异性标志物,如OV6。我们通过对肝癌组织连续切片进行CK19和OV6的免疫组织化学染色分析,发现来源于肝前体细胞CK19⁺OV6⁺肝癌病人预后更差。Sorafenib能显著抑制恶性转化的肝前体细胞的自我更新,并诱导其凋亡。CK19⁺OV6⁺肝癌病人术后给予sorafenib治疗后,其复发及总体生存状况得到明显改善,提示肝前体细胞来源的CK19⁺OV6⁺肝癌更适用于Sorafenib的治疗。以上结果提示我们,CK19和OV6联用可以作为肝癌分子分型标志物并指导预后和个性化治疗。

[0004] 目前CK19和OV6联合作为肝癌分子分型标志物并指导预后和个性化治疗未见文献报道。

发明内容

[0005] 本发明目的是提供CK19和OV6蛋白的联合在制备肝癌分子分型试剂盒用于肝癌索拉菲尼个性化治疗的应用。

[0006] 本发明前期统计发现,本发明人所在的中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院手术切除的HCC中胆系标志物CK19阳性比例约为9%。由于肝前体细胞表达肝细胞和胆管细胞的标志物,因此其可能是CK19⁺HCC的主要来源。OV6是公认且常用的肝前体细胞标志物,通过对CK19⁺HCC进行OV6免疫组织化学染色,我们发现其中约65%呈OV6阳性,说

明这部分CK19⁺OV6⁺肝癌来源于肝前体细胞,提示CK19和OV6的联合应用可指导肝癌的分子分型。

[0007] 进一步地,本发明经实验发现Sorafenib能够显著抑制恶性转化的肝前体细胞的自我更新能力,并促进细胞凋亡,提示Sorafenib可能用于肝前体细胞来源的CK19⁺OV6⁺肝癌的个性化治疗。

[0008] 更进一步地,我们对CK19⁺OV6⁺肝癌患者的临床资料进行统计分析,筛选出给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺病人和未给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺病人,结果表明给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺肝癌病人的复发及总体生存状况均好于未给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺肝癌病人,进一步提示Sorafenib更适用于肝前体细胞来源的CK19⁺OV6⁺肝癌的个性化治疗。

[0009] 因此,本发明认为,CK19和OV6的联合应用具备作为肝癌分子分型标志物的可能性,并可指导肝癌预后和个性化治疗。

[0010] 本发明的第一方面,提供了CK19和OV6联用在制备肝癌分子分型标志物中的应用。

[0011] 本发明的第二方面,提供了上述用于检测肝癌组织中CK19和OV6试剂盒的检测方法,具体步骤如下:

[0012] 1.脱蜡至水

[0013] (1) 4μm厚石蜡切片,每个肿瘤组织2张连续切片,60℃烤箱烤1h;

[0014] (2) 二甲苯10minx3次;

[0015] (3) 依次经过100%乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇、双蒸水,各5min。

[0016] 2.抗原修复

[0017] (1) 3%H₂O₂甲醇液20min;

[0018] (2) 双蒸水洗5minx 3次;

[0019] (3) 抗原修复(高压修复):

[0020] 切片放入盛有EDTA碱性修复液(2mM EDTA、2mM Na₂HP0₄)的高压锅中,高压煮沸2min,自然冷却至室温。

[0021] 3.一抗孵育

[0022] (1) PBS洗5min;

[0023] (2) 50μl 1%BSA覆盖组织,37℃封闭30min;

[0024] (3) 吸去封闭液,2张连续切片分别滴加CK19、OV6一抗50μl,湿盒中4℃孵育过夜。

[0025] 4.二抗孵育

[0026] (1) 吸走一抗,PBS洗5minx 4次;

[0027] (2) 滴加50μl带HRP标记的二抗,37℃孵育30-45min;

[0028] 5.显色、反蓝

[0029] (1) PBS洗5minx 4次;

[0030] (2) DAB(1:50)显色3-10min,至出现砖红色沉淀,双蒸水终止显色;

[0031] (3) 苏木素复染10min,盐酸酒精分化后自来水冲洗反蓝20-30min。

[0032] 6.脱水封片

[0033] (1) 依次经过双蒸水、75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、石炭酸、二甲苯,各5min。滴加树脂封片。

[0034] 7. 分析

[0035] 显微镜下判读CK19和OV6的表达是否为阳性。

[0036] 本发明的第三方面,提供了检测肝癌组织中CK19和OV6表达的试剂盒在制备肝癌分子分型试剂盒中的应用。

[0037] 本发明提供了一种肝癌分子分型试剂盒,用于鉴别CK19⁺OV6⁺肝癌和CK19⁻或OV6⁻肝癌。

[0038] 所述的试剂盒通过免疫组织化学方法检测生物样品中CK19和OV6的表达情况。

[0039] 所述的试剂盒,包括:特异性识别人CK19的抗体、特异性识别人OV6的抗体、免疫组化实验试剂等。

[0040] 所述的生物样品,为病人肝癌的石蜡包埋组织。

[0041] 所述的肝癌,为原发性肝细胞癌。

[0042] 本发明的第五方面,提供了CK19和OV6联合在sorafenib治疗肝癌中的应用,所述的肝癌是指CK19⁺OV6⁺肝癌。

[0043] 本发明提出联合CK19和OV6作为肝癌分子分型标志物,为来源于前体肝细胞的CK19⁺OV6⁺肝癌预后评估及索拉菲尼个性化治疗提供了重要指导。

附图说明

[0044] 图1为肝癌组织连续切片CK19 (A) 和OV6 (B) 的免疫组化染色;

[0045] 图2为CK19⁺OV6⁺肝癌病人与对照病人的累积复发;

[0046] 图3为正常和恶性转化的肝前体细胞在Sorafenib作用下的成球实验;

[0047] 图4为正常和恶性转化的肝前体细胞在Sorafenib作用下的凋亡实验;

[0048] 图5为肝癌病人术后给予Sorafenib和未给予Sorafenib治疗下的总生存率;

[0049] 图6为CK19⁺OV6⁺肝癌病人术后给予Sorafenib和未给予Sorafenib治疗下的累积复发;

[0050] 图7为CK19⁺OV6⁺肝癌病人术后给予Sorafenib和未给予Sorafenib治疗下的总生存率。

具体实施方式

[0051] 现结合实施例和附图,对本发明作详细描述,但本发明的实施不仅限于此。

[0052] 实施例1:CK19阳性肝癌病人组织中OV6表达的检测

[0053] 我们通过检索东方肝胆外科医院手术切除的肝癌的病理信息,发现肝癌中胆系标志物CK19阳性比例约为9%。然后随机选取102例CK19⁺肝癌进行肝前体细胞标志物OV6的免疫组织化学染色,OV6抗体购自R&D公司,稀释比例为1:100,抗原修复条件为高压碱性修复。结果发现其中约65%为CK19⁺OV6⁺肝癌(见图1),这部分CK19⁺OV6⁺肝癌可能来源于肝前体细胞,提示CK19和OV6的联合应用可指导肝癌的分子分型。

[0054] 实施例2:CK19⁺OV6⁺肝癌与对照肝癌病人的预后分析

[0055] 我们对上述102例CK19⁺肝癌病人进行随访,记录病人复发时间(复发时间指从手术日至诊断肿瘤复发日)。根据免疫组织化学结果,CK19⁺肝癌被分为CK19⁺OV6⁺肝癌与CK19⁻或OV6⁻肝癌,采用Kaplan-Meier法对CK19⁺OV6⁺HCC与CK19⁻或OV6⁻肝癌病人的无瘤生存期进

行比较分析,发现CK19⁺OV6⁺肝癌病人无瘤生存期更短,预后更差(见图2)。这一结果提示CK19和OV6的联合应用可指导肝癌病人的预后判定。

[0056] 实施例3: Sorafenib对恶性转化的肝前体细胞的作用

[0057] 我们建立了恶性转化的肝前体细胞系WB-TNF(肝前体细胞系WB-F344经1ng/ml TNF- α 连续刺激20周后稳定成系),构建方法如下:

[0058] 1. 含0.5%胎牛血清的DMEM贴壁培养肝前体细胞系WB-F344,培养基中加入1ng/ml TNF- α ;

[0059] 2. 每两天进行胰酶消化、细胞传代,待细胞贴壁后继续向培养基中加入1ng/ml TNF- α ;

[0060] 3. 如1、2所述培养20周,建成恶性转化的肝前体细胞系WB-TNF。

[0061] 之后,我们采用Sorafenib(购自Bayer公司)处理WB-TNF及对照细胞,分别进行成球实验和凋亡实验,结果发现Sorafenib能显著抑制恶性转化的肝前体细胞的自我更新(见图3),并促进细胞凋亡(见图4),这些结果提示Sorafenib可能用于肝前体细胞恶性转化来的肝癌(CK19⁺OV6⁺)的个性化治疗。

[0062] 实施例4: Sorafenib对CK19⁺OV6⁺肝癌患者术后治疗的作用

[0063] 我们对66例术后给予Sorafenib治疗的肝癌病人及97例术后未给予Sorafenib治疗的肝癌病人进行随访,记录病人复发时间(复发时间指从手术日至诊断肿瘤复发日),采用Kaplan-Meier法对术后给予Sorafenib和未给予Sorafenib治疗的肝癌病人复发进行比较分析,发现两组肝癌病人累积复发无统计学差异(见图5)。这一结果提示给予Sorafenib治疗肝癌病人并未表现出明显的生存优势。

[0064] 进一步,我们对实施例1中CK19⁺OV6⁺肝癌患者的临床资料进行统计分析,筛选出给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺病人和未给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺病人,结果表明给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺HCC病人的复发及总体生存状况均好于未给予Sorafenib治疗的CK19⁺OV6⁺HCC病人(见图6、7),进一步提示Sorafenib更适用于肝前体细胞来源的CK19⁺OV6⁺HCC的个性化治疗。

[0065] 由以上实验结果可知,通过采用免疫组化的方法检测CK19和OV6蛋白表达能预测肝细胞癌患者术后的生存或死亡,并能够指导Sorafenib对肝癌病人的个体化治疗。当癌组织中CK19⁺OV6⁺时,给予Sorafenib治疗后,肝癌病人的复发及总体生存状况均得到明显改善。因此,以CK19联合OV6作为分子分型标志物对其表达进行检测能预测肝细胞癌手术后复发等事件,并指导Sorafenib在临床中的精准应用。相应的,特异性抗CK19和OV6的抗体,包括单克隆抗体和多克隆抗体,能用于制备肝癌分子分型的制剂或试剂盒,这对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0066] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

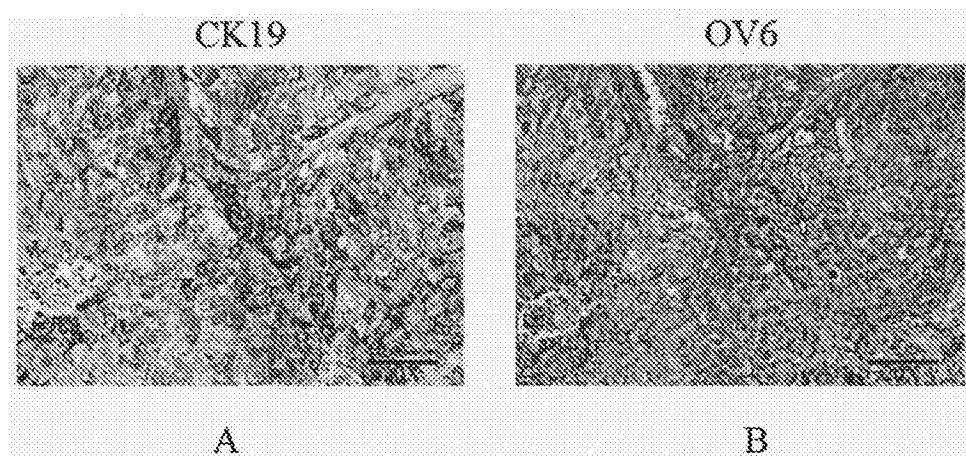


图1

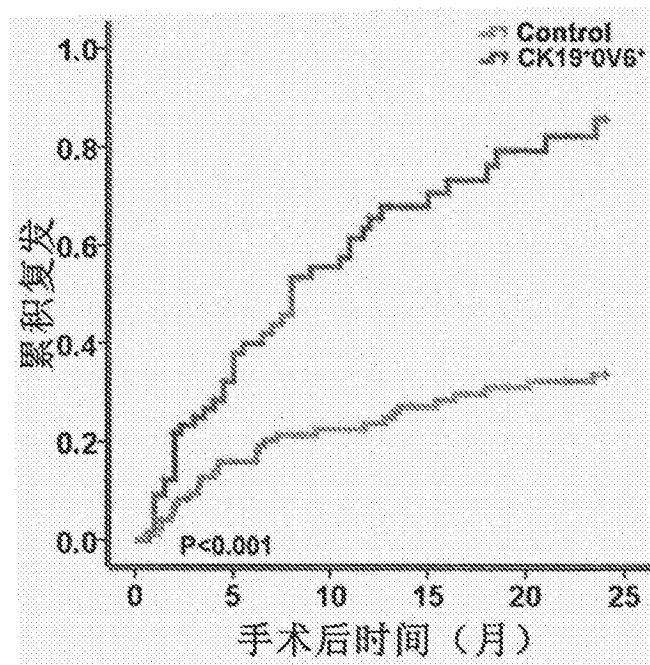


图2

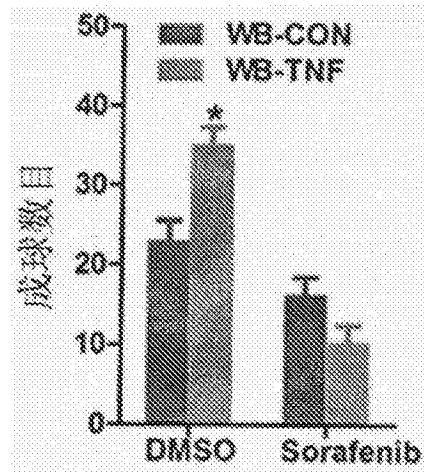


图3

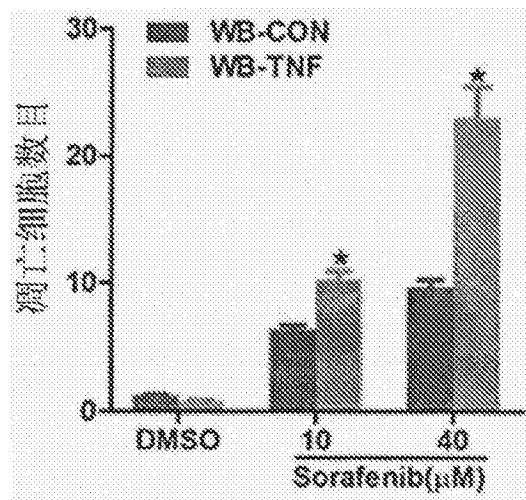


图4

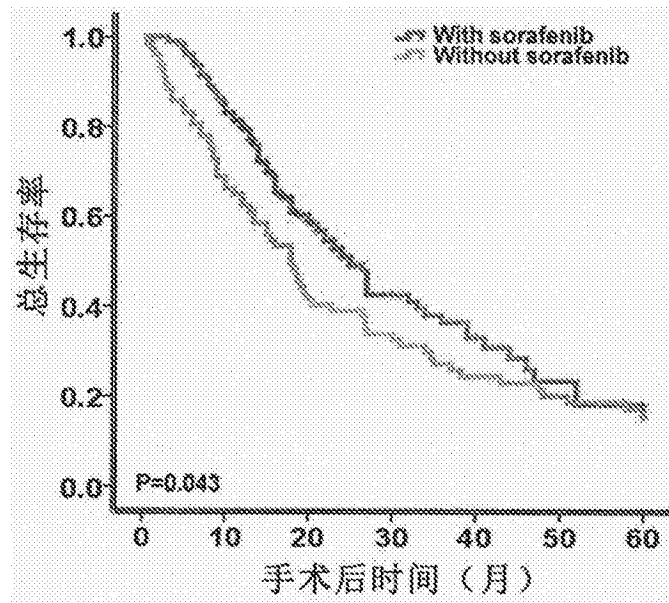


图5

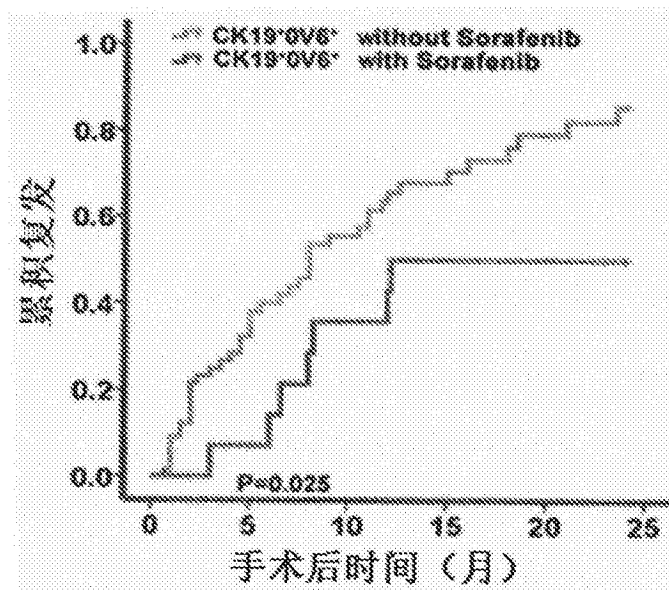


图6

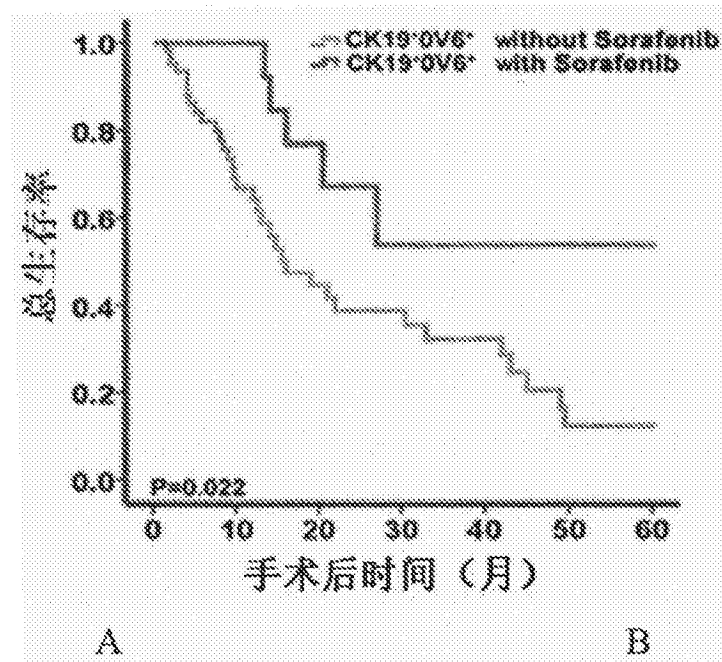


图7

专利名称(译)	CK19联合OV6在肝癌索拉菲尼精准治疗中的应用		
公开(公告)号	CN107219354A	公开(公告)日	2017-09-29
申请号	CN201710375891.2	申请日	2017-05-24
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	丁劲 王红阳 夏明杨 李晓峰 向代民 孙文 程卓 周腾飞		
发明人	丁劲 王红阳 夏明杨 李晓峰 向代民 孙文 程卓 周腾飞		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/57438		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医药技术领域，本发明涉及肝前体细胞标志物CK19和OV6联合应用于制备肝癌分子分型试剂盒指导肝癌的索拉菲尼个体化治疗。本发明通过对肝癌组织连续切片进行CK19和OV6的免疫组织化学染色分析，发现来源于肝前体细胞CK19+OV6+肝癌病人预后更差。Sorafenib能显著抑制恶性转化的肝前体细胞的自我更新，并诱导其凋亡。CK19+OV6+肝癌病人术后给予Sorafenib治疗后，其复发及总体生存状况得到明显改善，提示肝前体细胞来源的CK19+OV6+肝癌更适用于Sorafenib的治疗。

