



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107102141 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201610099982.3

(22)申请日 2016.02.23

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号
申请人 吉尔生物科技(北京)有限公司

(72)发明人 史桂芝 范克龙 张德玺 桑建彬
阎锡蕴

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 穆彬

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

分子标记物CD71及在子宫内膜癌诊断、分期及预后中的应用

(57)摘要

本发明涉及分子标记物CD71及在子宫内膜癌诊断、分期及预后中的应用,该分子标记物为人转铁蛋白受体1(CD71),属于分子生物学领域。本发明利用抗人转铁蛋白受体1(CD71)的抗体,发现人转铁蛋白受体1(CD71)在正常子宫内膜组织及癌前病变组织中不表达或极低表达,在人子宫内膜癌组织中特异性高表达,与子宫内膜癌分期及预后有关。基于此,CD71能够应用于子宫内膜癌组织的诊断、临床分期及预后。

1. CD71作为子宫内膜癌分子标记的用途。
2. CD71在制备用于诊断子宫内膜癌、和/或评估子宫内膜癌临床分期及预后的试剂盒中的用途。
3. 根据权利要求1或2的用途,所述子宫内膜癌为人子宫内膜癌。
4. 根据权利要求2所述的用途,所述用途通过制备特异识别CD71的抗体来实现。
5. 一种用于诊断子宫内膜癌、和/或评估子宫内膜癌临床分期及预后的试剂盒,所述试剂盒包含特异识别CD71的抗体。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,所述试剂盒还包含用于免疫检测的试剂。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,所述免疫检测包括免疫组化、免疫荧光、免疫沉淀,免疫流式细胞学及免疫杂交。
8. 根据权利要求4所述的用途或权利要求5所述的试剂盒,所述抗体包括单克隆抗体或多克隆抗体,优选为单克隆抗体。
9. 根据权利要求5所述的用途或试剂盒,所述单克隆抗体或多克隆抗体是针对人转铁蛋白受体的全部或部分氨基酸序列制备的。
10. 根据权利要求5所述的试剂盒,所述临床分期为FIGO分期。

分子标记物CD71及在子宫内膜癌诊断、分期及预后中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分子标记物,抗人转铁蛋白受体(transferrin receptor 1, TfR1,又名CD71)抗体在子宫内膜癌诊断、临床分期及预后评估中的应用,属于分子生物学领域。

背景技术

[0002] 子宫内膜癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一,约占女性癌症的7%,占女性生殖系统恶性肿瘤的20-30%。近年来,在世界范围内,子宫内膜癌的发病有上升趋势,并呈年轻化(Parkin DM,Bray F,Ferlay J,et al.Global cancer statistics,2002[J].CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108)。

[0003] 随着传统标记物研究的深入及新标记物的不断发现,免疫组化在子宫内膜癌的病理诊断与鉴别诊断中扮演越来越重要的角色(吴焕文,梁智勇,张卉,刘彤华.子宫内膜癌免疫组化标记物的研究进展.诊断病理学,2013,Vol.20,No.3:180-183)。子宫内膜癌诊断目前常用的免疫组化标记物包括激素受体ER,PR,CEA,P53,P16,PTEN等。目前这些肿瘤标记物在诊断方面存在灵敏性、广谱性及特异性方面的不足。如P53主要应用于II型子宫内膜癌的诊断或鉴别诊断,在I型中低分化内膜癌也存在部分高表达现象,部分病例呈完全阴性表达;P16主要用于宫颈癌的诊断,在子宫内膜癌中表达相对较低,主要用于子宫内膜癌与宫颈癌的鉴别诊断。PTEN缺失表达是I型子宫内膜癌发生的早期事件,此外,由于是缺失表达,实际应用中PTEN染色结果的有效判读限制了它的普及应用。CEA在宫颈癌中高表达,主要是用于子宫内膜癌的鉴别诊断。ER,PR的表达更多用于子宫内膜癌的激素治疗评估。迄今,尚未发现特异高效的分子标记物用于子宫内膜癌诊断,本项目中的CD71抗体在子宫内膜癌中的整体表达率高达约80%,认为能够作为辅助诊断子宫内膜癌分子标记物。目前的分子标记物用于临床预后预测上,有研究认为:除PR外,ER,PTEN,P53及Ki-67的表达情况对患者临床预后的预测意义较小(子宫内膜癌分子标记物与临床病理特征及预后的关系.北京大学学报(医学版)Vol.43No.50Oct.2011,743-748)。

[0004] 转铁蛋白受体(TfR1,CD71)在增殖分裂活跃的细胞中高表达,尤其是在需要大量铁的恶性肿瘤细胞及一些快速分裂的细胞表面过度表达,这些受体在正常组织中不表达或极低表达,研究表明,转铁蛋白受体(CD71)在多种恶性肿瘤中高表达,如肝癌,乳腺癌,脑恶性胶质瘤等,目前尚没有转铁蛋白受体(TfR1,CD71)在人子宫内膜癌组织中表达的研究报道,更没有将CD71用于临床预后预测的资料。

发明内容

[0005] 本发明人在研究转铁蛋白受体(TfR1,CD71)在人子宫内膜癌组织中表达的基础上,发现CD71不仅可以用来诊断子宫内膜癌,尚能够对子宫内膜癌的临床分期及预后进行分析。同时开发了针对CD71的抗体,所述抗体可以用于诊断子宫内膜癌,且能够对子宫内膜癌的临床分期及预后进行分析。另外,本发明还涉及一种用于诊断子宫内膜癌,且能够对子

子宫内膜癌的临床分期及预后进行分析的检测试剂盒。

[0006] 具体而言,本发明包括以下方面:

[0007] 一方面,本发明涉及CD71作为子宫内膜癌分子标记的用途。

[0008] 另一方面,本发明涉及CD71在制备用于诊断子宫内膜癌、和/或评估子宫内膜癌临床分期及预后的试剂盒中的用途。

[0009] 所述临床分期,是指根据肿瘤大小,位置,有无浸润及远处转移等情况,进行临床分期,期别越高,肿瘤恶性程度越高。其中国际妇产科协会(FIGO)分期是本领域中最常见的临床分期。具体的FIGO分期标准:0期:原位癌(浸润前的癌);1期:肿瘤局限于子宫体;2期:肿瘤浸润宫颈但没有超出子宫;3期:肿瘤局灶和/或区域扩散;4期:肿瘤累及膀胱黏膜和/或肠粘膜,肿瘤伴远处转移(不包括转移到阴道,盆腔浆膜或附件)。

[0010] 在优选的实施方案中,所述子宫内膜癌为人子宫内膜癌。

[0011] 在优选的实施方案中,所述制备试剂盒的用途通过制备特异识别CD71的抗体来实现。

[0012] 在本领域中,抗体的制备方法是已知的,最常见的包括杂交瘤方法、噬菌体展示方法等。本领域已知的抗体制备方法均可以用来制备用于本发明的抗体。另外,CD71可以通过以下途径获得:首先,从人肿瘤细胞系中提取RNA,然后,在反转录系统中反转录为cDNA文库。设计CD71 cDNA的引物,利用PCR的方法,将CD71 cDNA从cDNA文库中克隆出来。将CD71 cDNA构建到真核表达载体上,选择性的表达全长的CD71序列或者部分CD71序列,通过亲和层析的方法,实现CD71抗原的纯化制备。

[0013] 另一方面,本发明一种用于诊断子宫内膜癌、和/或评估子宫内膜癌临床分期及预后的试剂盒,所述试剂盒包含特异识别CD71的抗体。

[0014] 在优选的实施方案中,所述试剂盒还包含用于免疫检测的试剂。

[0015] 在优选的实施方案中,所述试剂盒还可以包含所述试剂盒的使用说明。

[0016] 在优选的实施方案中,所述免疫检测包括免疫组化、免疫荧光、免疫沉淀,免疫流式细胞学及免疫杂交。只要能够表明CD71的抗体与目标组织的结合及相应强度的免疫检测方法都可以用来实现本发明。

[0017] 在优选的实施方案中,所述抗体包括单克隆抗体或多克隆抗体。

[0018] 在优选的实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。

[0019] 在优选的实施方案中,所述单克隆抗体或多克隆抗体是针对人转铁蛋白受体的全部或部分氨基酸序列制备的。并且具有特异结合CD71的功能的抗体片段也包含在本发明的范围内。

[0020] 抗人转铁蛋白受体抗体主要与子宫内膜癌组织中的转铁蛋白受体结合。本发明中抗人转铁蛋白受体抗体根据人转铁蛋白受体的全部或部分氨基酸序列进行制备,能够与人子宫内膜癌组织中的转铁蛋白受体结合。本发明主要用于免疫组织化学检测,但是并不局限于免疫组化检测。

附图说明

[0021] 图1是正常周期子宫内膜的免疫组化图:其中左图(10×)、右图(20×);

[0022] 图2是单纯性增生子宫内膜的免疫组化图:其中左图(10×)、右图(20×);

[0023] 图3是子宫内膜癌组织的免疫组化图:其中左图(10×)、右图(20×);

[0024] 图4表示不同临床分期(FIGO分期)的子宫内膜癌组织与转铁蛋白受体(TfR1, CD71)表达强度的关系。根据FIGO临床分期将子宫内膜癌分成4组。卡方检验显示:*** $p < 0.001$, NS表示没有显著性差异。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明,本发明的实施方式并不局限于此,凡是根据本发明公开的内容或原理,实施的任何本领域的等同替换,均属于本发明的保护范围。

[0026] 实施例1

[0027] 免疫组化检测并比较正常子宫内膜组织、单纯性增生子宫内膜组织及子宫内膜癌组织中转铁蛋白受体表达的差异。

[0028] 1.实验材料

[0029] 组织芯片(TMA)购买自上海卓立生物科技有限公司,其中包含子宫内膜癌样本57例、正常子宫内膜样本23例,单纯性增生子宫内膜组织7例。免疫组化试剂:抗人转铁蛋白受体的抗体(EC-1)通过常规鼠杂交瘤方法制备(Edward A.Greenfield.Generating Monoclonal Antibodies.Antibodies:A Laboratory Manual,Second Edition,2014,Cold Spring Harbor Laboratory Press),具体可以参见,其内容通过引用并入本文。

[0030] 1.实验方法

[0031] 常规免疫组化SP法进行。(De Jong AS, Van Kessel-van Vark M, Raap AK.Histochem J.1985Oct;17(10):1119-30.Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry)对组织芯片(TMA)石蜡切片(5um厚)的处理如下:

[0032] 1)切片脱蜡水化。

[0033] 2)蒸馏水中5分钟;

[0034] 3)用蒸馏水或PBS配置新鲜的3% H_2O_2 室温封闭10分钟,用蒸馏水洗1次;

[0035] 4)常规抗原修复;

[0036] 5)PBS洗5分钟;

[0037] 6)滴加正常山羊血清封闭液(北京中杉金桥生物技术有限公司),室温30分钟;

[0038] 7)甩去多余液体滴加一抗(CD71的抗体,Abcam:ab49517),37℃1小时或者4℃过夜;

[0039] 8)PBS洗2次,每次各5分钟;

[0040] 9)滴加二抗(辣根酶标记鼠抗山羊IgG,北京康为世纪生物技术有限公司)孵育37℃45分钟;

[0041] 10)PBS洗2次,每次各5分钟;

[0042] 11)DAB显色5分钟;

[0043] 12)蒸馏水洗终止染色,苏木素复染,蒸馏水冲洗。

[0044] 15)加入中性树脂(北京中杉金桥生物技术有限公司),加盖玻片。2.实验结果

[0045] 免疫组化结果见图1-3。图1是正常周期子宫内膜的免疫组化图;图2是单纯性增生

子宫内膜的免疫组化图；图3是子宫内膜癌组织的免疫组化图。可以看出：转铁蛋白受体在子宫内膜癌组织中呈中-重度阳性表达，在正常周期子宫内膜及单纯性增生子宫内膜中几乎不表达。详细数据结果见下表1。

[0046] 表1. 转铁蛋白受体(TfR1, CD71)在子宫内膜癌与非癌组织中的表达情况

组织类型	总数	阴性	阳性
[0047] 正常子宫内膜	23	22 (95.7%)	1 (4.3%)
单纯性增生	7	7 (100%)	0 (0%)
子宫内膜癌	57	13 (22.8%)	44 (77.2%)
卡方检验	p<0.001		

[0048] 3. 结论

[0049] 转铁蛋白受体在子宫内膜癌中高表达，在正常周期子宫内膜及单纯性增生子宫内膜中不表达或极低表达。

[0050] 实施例2

[0051] 免疫组化检测不同临床分期子宫内膜癌组织中转铁蛋白受体的表达情况。

[0052] 1. 实验材料

[0053] 组织芯片(TMA)购自陕西艾丽娜生物科技有限公司，根据FIGO分期，其中FIGO 1期标本158例，2期标本32例，3期标本29例，4期标本4例。免疫组化试剂：抗人转铁蛋白受体抗体为EC-1如前所述。

[0054] 2. 实验方法：同实施例1。

[0055] 3. 实验结果：

[0056] 不同临床分期(FIGO分期)的子宫内膜癌组织与抗人转铁蛋白受体表达强弱有相关性。卡方检验显示： $p < 0.001$ ，提示不同临床分期间抗人转铁蛋白受体的表达有显著性差异。结果见后(说明书中附图4)

[0057] 4. 结论

[0058] 子宫内膜癌临床分期越高，预后越差，则抗人转铁蛋白受体表达越强。由此，可以根据抗人转铁蛋白受体表达的强度判断子宫内膜癌的临床分期，从而判断预后。

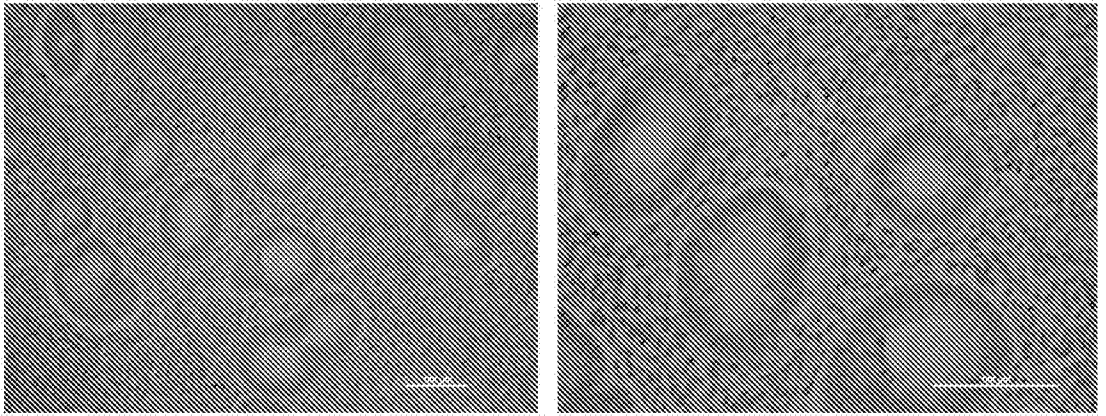


图1

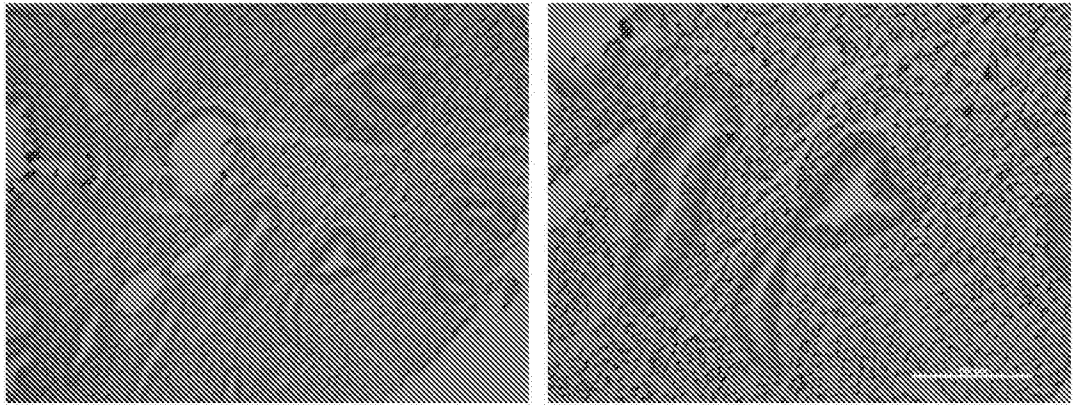


图2

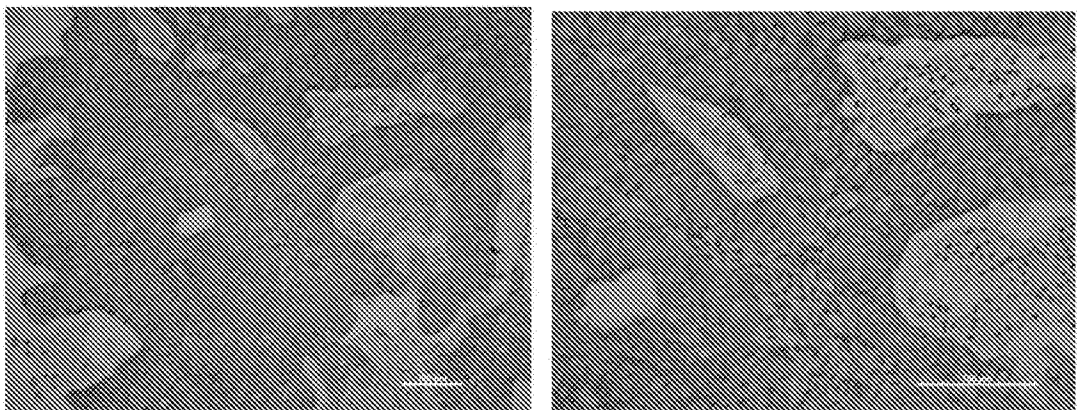


图3

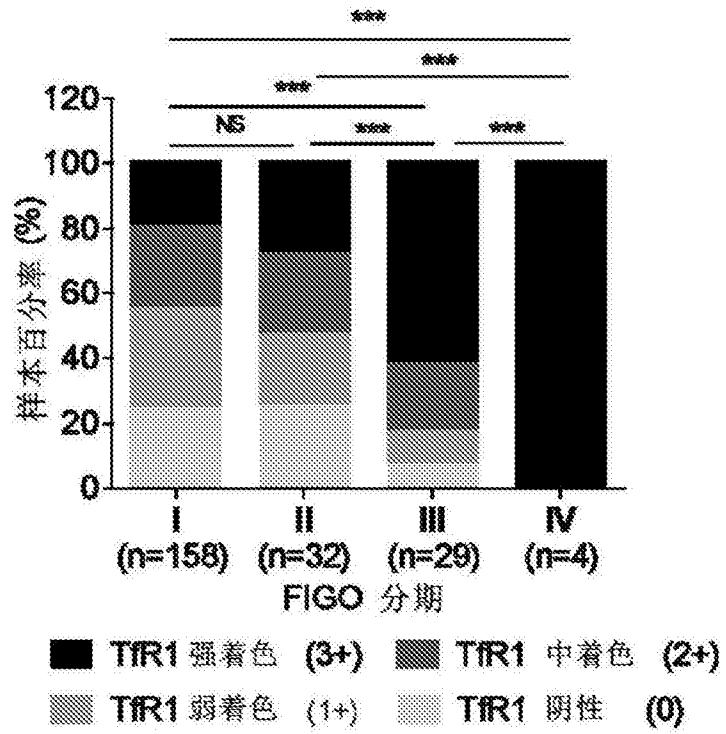


图4