



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113466447 B

(45) 授权公告日 2024.03.08

(21) 申请号 202110595131.9

G01N 1/36 (2006.01)

(22) 申请日 2021.05.28

G01N 1/31 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 1/34 (2006.01)

申请公布号 CN 113466447 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2021.10.01

CN 105137078 A, 2015.12.09

(73) 专利权人 天津市肿瘤医院(天津医科大学肿瘤医院)

CN 1890381 A, 2007.01.03

地址 300060 天津市河西区体院北环湖西路

KR 20210006650 A, 2021.01.19

Haisu Dai等.PUM1 knockdown prevents tumor progression by activating the PERK/eIF2/ ATF4 signaling pathway in pancreatic adenocarcinoma cells.《Cell Death and Disease》.2019,第10卷(第595期),第1-15页.

(72) 发明人 郝继辉 黄崇标 葛懿 李增勋

岳娟等.DUSP10 和 BZW1 在卵巢浆液性肿瘤中的表达及临床意义.《现代肿瘤医学》.2016,第24卷(第10期),第1625-1630页.

(74) 专利代理机构 北京中普鸿儒知识产权代理有限公司 11822

专利代理师 陈永秀

审查员 郭雅文

(51) Int. Cl.

G01N 33/541 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

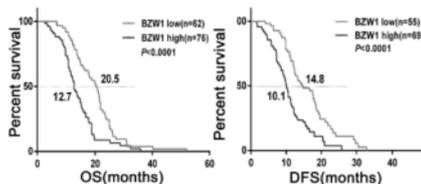
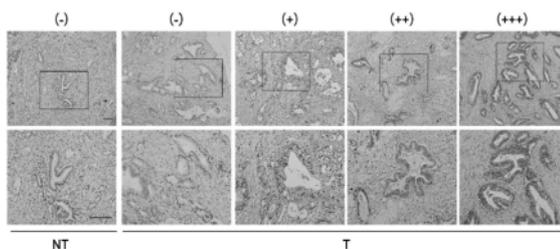
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

诊断胰腺癌预后的肿瘤标志物BZW1及检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了诊断胰腺癌预后的肿瘤标志物BZW1及检测试剂盒。本发明发现BZW1蛋白与胰腺癌细胞的生长凋亡密切相关,BZW1通过PERK-eIF2a通路行使促癌,因此将BZW1应用于判断胰腺癌病人预后,作为胰腺癌病人预后判断的重要指标。本发明进一步提供一种快速检测BZW1表达量的免疫组化试剂盒,包含:酶标一抗、二抗、抗体稀释液、显色液和磷酸盐缓冲液,其中,所述的酶标一抗是酶标BZW1抗体。通过采用该免疫组化试剂盒检测BZW1表达量,根据筛选出的BZW1表达量高的优势病人在临床治疗时联合PERK-eIF2α的抑制剂进行治疗能够取得更好的治疗效果。



1. BZW1作为肿瘤标志物在制备评估PERK-eIF2 α 抑制剂治疗胰腺导管腺癌的疗效或预后试剂中的用途。
2. 按照权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的PERK-eIF2 α 抑制剂是GSK2606414。
3. 按照权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤是胰腺癌。
4. 按照权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的胰腺癌是胰腺导管腺癌。

诊断胰腺癌预后的肿瘤标志物BZW1及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤疗效预测或预后的标志物,尤其涉及用于胰腺癌疗效预测或预后的肿瘤标志物,本发明进一步涉及用于胰腺癌疗效预测或预后的检测试剂盒,属于胰腺导管腺癌疗效预测或预后领域。

背景技术

[0002] 胰腺癌是最难治的恶性肿瘤之一,恶性程度极高,其五年生存率很低。近年来由于人类生活环境、饮食习惯等的改变,其发病率逐年升高,死亡率居于恶性肿瘤死亡率第4位。吉西他滨作为一线临床用药,其缓解率较低,易耐药。胰腺癌恶性程度如此之高主要是因为起病隐匿、早期诊断困难,而且具有高度转移性,许多病人在诊断时或者诊断后会出现远处转移,失去根治的机会,并且预后极差。胰腺癌的复发和转移是影响患者预后和困扰临床的难题。因此,需要准确诊断、精准治疗、高灵敏度的预后诊断指标。

[0003] 现有的肿瘤标志物如CA19-9特异性较差,对于胰腺癌病人早诊、预后判断不准确。胰腺癌病人手术标本可以进行许多标志物的检测,因此迫切需要一个能够简便,准确,特异判断胰腺癌病人预后的标志物,来判断胰腺癌病人的预后,同时也需要改进胰腺癌的治疗方案联用其他有效抑制剂,单抗等来提高患者生存率,生存质量。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供准确、特异判断胰腺癌预后的肿瘤标志物;

[0005] 本发明的目的之二提供检测BZW1蛋白表达量的检测试剂盒;

[0006] 本发明的目的之三是将根据所提供的肿瘤标志物筛选治疗胰腺癌的有效药物。

[0007] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的:

[0008] 本发明的一个方面是提供一种预估肿瘤疗效或预后的肿瘤标志物,所述的标志物是BZW1;其中,所述的肿瘤优选为胰腺癌。

[0009] BZW1蛋白(The basic leucine zipper and W2 domains1,BZW1),中文名称是碱性亮氨酸拉链和W2区域1,参与细胞的周期调控,蛋白翻译,也与许多癌种如肺癌,脱液囊腺癌病人的预后密切相关。早期研究发现其调控细胞周期,后续研究发现其可以调控细胞内某些关键蛋白的翻译从而应对细胞的应激状态。本发明通过试验发现BZW1蛋白与胰腺癌细胞的生长凋亡密切相关,BZW1可以通过PERK-eIF2a通路行使促癌,因此可将其应用于判断胰腺癌病人预后,可作为胰腺癌病人预后判断的重要指标,指导胰腺癌病人手术后的用药,提高生存质量。

[0010] 本发明的另一个方面是提供一种快速检测BZW1表达量的免疫组化试剂盒,包含:酶标一抗,二抗,抗体稀释液,显色液和磷酸盐缓冲液。其中,所述的酶标一抗是酶标BZW1抗体。

[0011] 作为本发明一种优选的具体实施方案,优选的,本发明免疫组化试剂盒中所述的二抗是羊抗小鼠IgG或兔IgG;所述显色液是HRP显色液。

[0012] 现有的胰腺癌治疗方法大部分为以吉西他滨为基础,联合其他药物如白蛋白紫杉醇等进行联合治疗,以及其他化疗方案如FOLFORINOX等。现有的治疗方案患者易产生耐药性,在几个周期过后疗效会明显降低,因此需要新的有效抑制剂来提升胰腺癌化疗疗效。PERK-eIF2 α 抑制剂在其他癌种中有所应用,效果显著,但在胰腺癌的效果尚未得到证实,其优势人群等尚未得到确定。通过其他指标来判断该抑制剂的应用范围,适用人群,从而提高该抑制剂的靶向性迫在眉睫。本发明人的前期实验发现BZW1高表达瘤块对于该抑制剂反应性较好,可以作为筛选优势人群的指标,因此结合BZW1表达量筛选出的优势病人对于联合PERK-eIF2 α 的抑制剂的治疗有显著效果:将试剂盒的检测结果通过免疫组化评分的方式进行评判,并与现有数据库中的标准值进行对比,得到病人BZW1表达量水平,并判断病人预后;后续可根据病人预后情况制定相应治疗方案。检测出的BZW1表达量相对较高(高于数据库统计平均值)的病人可应用抑制剂GSK2606414进行治疗。研究表明这部分病人对于抑制PERK-eIF2 α 通路的治疗反应较好,在后续的治疗中可适当联用抑制剂GSK2606414,可以取得相对较好的效果;由此,本发明的再一方面是将PERK-eIF2 α 抑制剂应用于治疗胰腺癌。

[0013] 本发明提供的胰腺癌疗效预测或预后的肿瘤标志物以及含有酶标的肿瘤标志物抗体的免疫组化试剂盒能够应用于胰腺癌疗效预测或预后,具有特异性强、灵敏度高和准确性高等优点;此外,通过本发明提供的免疫组化试剂盒快速检测BZW1表达量,通过评分快速评价BZW1表达量,并判断病人预后,将BZW1高表达的病人应用PERK-eIF2 α 抑制剂能够取得较好的临床治疗效果。

附图说明

[0014] 图1 BZW1在胰腺导管腺癌中与病人的预后相关性分析结果。

[0015] 图2 BZW1高表达的肿瘤对于PERK-eIF2 α 抑制剂的反应结果。

具体实施方式

[0016] 以下结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0017] 试验例1应用BZW1作为胰腺癌肿瘤标志物判断病人预后以及根据BZW1的表达量对于胰腺癌病人采取的治疗方案

[0018] 1.通过HRP偶连BZW1一抗快速检测BZW1表达量

[0019] 将手术标本做脱水切片处理后,通过免疫组化的方法,利用HRP偶连的BZW1一抗快速检测(2小时内即可得到结果)。提高检测精度,增加检测速度,简化检测手段,降低检测成本。

[0020] 检测试剂盒成分如下:一抗、即用型Max vision二抗羊抗小鼠IgG和兔IgG,(或普通生物素化二抗还有三抗);蒸馏水及0.01M(pH7.4)的磷酸盐缓冲(PBS),稀释抗体和洗片子用;二甲苯,无水乙醇(及可用无水乙醇配制的梯度酒精),盐酸,氨水,苏木染液;抗原修复液:枸橼酸缓冲液或柠檬酸缓冲液(pH6.0);H₂O₂,灭活内源性过氧化物酶;抗体稀释液;HRP显色液。

[0021] 具体方法如下:

[0022] 1. 石蜡包埋的组织块切片,切片厚度为4 μ m,置烤片机上烤2小时;

[0023] 2. 石蜡切片常规脱蜡至水(二甲苯1-2分别20min,无水乙醇1-2分别10min,梯度酒精95%、85%、75%、60%、蒸馏水各5min);

[0024] 3. 迅速将水化过的片子浸入盛有抗原修复液(枸橼酸或柠檬酸缓冲液)的不锈钢杯中,盖紧锅盖后加热至喷气,开始计时2min;

[0025] 4. 自然冷却至室温,切片放入盛有%过氧化氢浸片架盒中,室温下避光孵育10min,阻断内源性过氧化物酶活性;

[0026] 5. PBS浸洗片子3次,每次5min(还原PH环境);

[0027] 6. 用抗体稀释液稀释一抗(proteintech BZW1一抗),切片平行架于湿盒中,组织区域滴加一抗(抗体要覆盖过全部组织边缘1mm),4 $^{\circ}$ C过夜;

[0028] 7. 同一抗操作前,滴加即用型Max vision二抗工作液,湿盒放入37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min;

[0029] 8. 配制DAB染色,A、B、C按顺序各加一滴约50微升与850微升去离子水中混匀,组织区域滴加DAB染液(DAB染液要覆盖过全部组织边缘1mm),显微镜下观察至黄褐色出现,约3-10min;

[0030] 9. 显色后迅速蒸馏水浸洗,苏木素复染10min,复染完后自来水振洗,盐酸酒精分化(颜色变红即可)蒸馏水振洗,氨水返蓝(3min)蒸馏水振洗;

[0031] 10. 梯度酒精脱水(梯度酒精60%、75%、85%、95%、无水乙醇1-2分别20min、二甲苯1-2分别10min)。中性树胶封片(注意赶净气泡)。

[0032] 2. 通过评分快速评价BZW1表达量并判断病人预后

[0033] 将检测结果通过免疫组化评分的方式进行评判,并与现有数据库中的标准值进行对比,得到病人BZW1表达量水平,并判断病人预后。后续可根据病人预后情况制定相应治疗方案。

[0034] 具体方案如下:切片无杂染,以抗体正常着色部位出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞,在20X10倍光镜下随机选取4个视野对间质阳性着色部分进行观察评分。按照阳性细胞所占比例及分布情况进行评分1-5%=1分,5%-10%为2分,10%-20%=3分,>20%为4分;目的蛋白染色强度:弱阳性为1分,中度阳性为2分,高度阳性为3分,强阳性为4分。每个视野阳性细胞百分数得分和目的蛋白染色强度得分乘积并求总和。

[0035] 将胰腺导管腺癌病人的手术标本进行切片后IHC染色之后根据标本中BZW1的表达量将其分为(-),(+),(++),(+++),之后将其表达量与其OS,RFS作生存分析,发现BZW1表达量与胰腺癌病人的OS,RFS呈负相关(图1)。

[0036] 3. BZW1高表达的病人可应用PERK-eIF2a抑制剂GSK2606414

[0037] 检测出的BZW1表达量相对较高(高于数据库统计平均值)的病人可应用抑制剂GSK2606414进行治疗。研究表明这部分病人对于抑制PERK-eIF2a通路的治疗反应较好,在后续的治疗中可适当联用抑制剂GSK2606414,可以取得相对较好的效果。

[0038] 具体方案如下:在上述中筛选出的BZW1高表达病人,并根据其身体状况评估其适合的基础化疗方案,在此基础上根据其体表面积联用一定量的GSK2606414,并在4个周期后观察病人反应。若病人出现严重不良反应则应停用,否则可以继续应用4-6个周期。

[0039] 结果发现,BZW1高表达的肿瘤对于PERK-eIF2 α 抑制剂的反应明显;高表达BZW1的细胞移植进小鼠体内,在瘤块生长期间给与小鼠PERK-eIF2 α 抑制剂GSK2606414或ISRIB后其瘤块生长明显减缓,体积明显缩小(图2)。

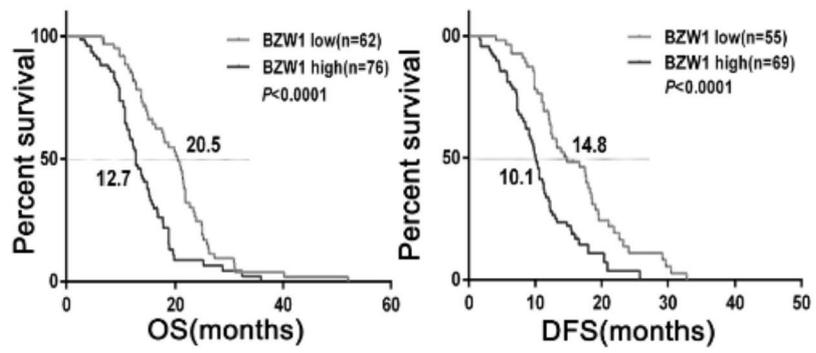
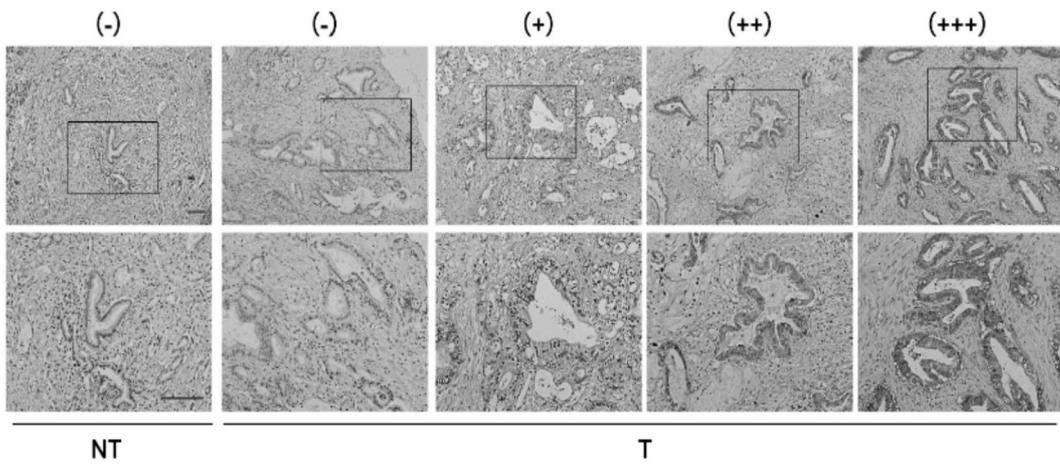


图1

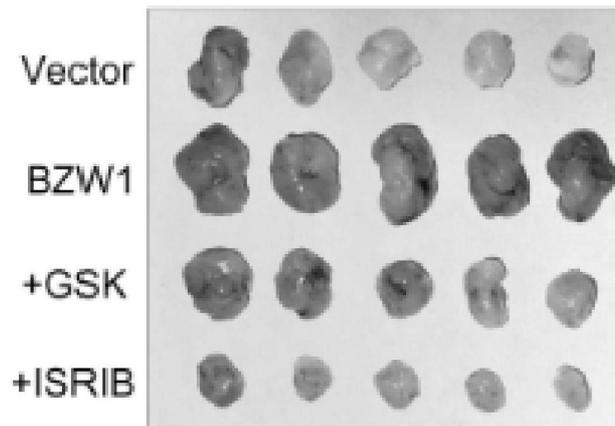


图2