



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103616519 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 05

(21) 申请号 201310612603. 2

(22) 申请日 2013. 11. 28

(71) 申请人 张伟

地址 100021 北京市西城区未央胡同 5 单元
101 号

(72) 发明人 张伟 王小兵 田海梅 李艳芬
李茉

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

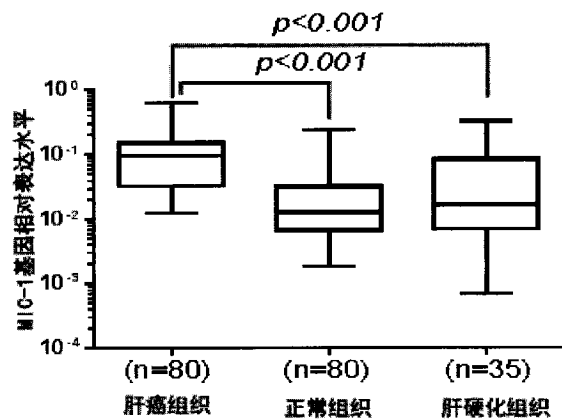
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

巨噬细胞抑制因子 1 在肝病中的应用

(57) 摘要

本发明涉及巨噬细胞抑制因子 1 在肝病中的应用。具体而言,本发明涉及巨噬细胞抑制因子 1 在制备诊断和 / 或监测受试者中肝病的试剂或试剂盒中的用途。本发明还涉及诊断和 / 或监测受试者中肝病的试剂或试剂盒,其包括本发明所述检测巨噬细胞抑制因子 1 的试剂。本发明的巨噬细胞抑制因子 1 和甲胎蛋白有很好的互补性,能够大幅提高肝癌的检出效率,具有良好的应用前景。



1. 巨噬细胞抑制因子 1 在制备诊断和 / 或监测受试者中肝病的试剂或试剂盒中的用途。
2. 权利要求 1 所述的用途, 其中所述肝病包括肝癌、肝脏良性肿瘤和慢性肝炎, 优选肝癌, 更优选为甲胎蛋白阴性肝癌。
3. 权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述巨噬细胞抑制因子 1 进一步与不同于巨噬细胞抑制因子 1 的其它肝病标志物联合使用, 所述其它肝病标志物可以是肝癌标志物如甲胎蛋白, 肝脏良性肿瘤标志物或慢性肝炎标志物。
4. 权利要求 3 所述的用途, 其中所述其它肝病标志物是甲胎蛋白, 所述肝病是肝癌。
5. 权利要求 1-4 任一项所述的用途, 其中所述肝癌为 I 期肝癌或 II 期肝癌。
6. 权利要求 1-5 中任一项所述的用途, 其中所述试剂或试剂盒用于检测和 / 或监测肝组织中巨噬细胞抑制因子 1 的表达。
7. 权利要求 1-6 中任一项所述的用途, 其中所述试剂或试剂盒用于检测和 / 或监测巨噬细胞抑制因子 1 的血清水平。
8. 权利要求 7 所述的用途, 其中所述巨噬细胞抑制因子 1 的血清水平的临界值设为 600pg/ml。
9. 权利要求 7 所述的用途, 其中所述巨噬细胞抑制因子 1 的血清水平的临界值设为 1000pg / ml。
10. 诊断和 / 或监测受试者中肝病的试剂或试剂盒, 其中所述试剂或试剂盒包括权利要求 1-9 中任一项中定义的试剂或试剂盒。

巨噬细胞抑制因子 1 在肝病中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及肝病诊断监测领域。具体而言,本发明涉及巨噬细胞抑制因子 1 在肝病诊断和监测中的应用。

背景技术

[0002] 肝病尤其是肝癌严重威胁人类健康,其中原发性肝癌是原发于肝脏的肝细胞或肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤,为死亡率极高、严重危害人类健康的恶性肿瘤之一。世界范围内肝癌发病率有逐年上升的趋势,在我国恶性肿瘤发病中排名第四,发病人数约占全球的半数以上,发病率约为 28.7 / 10 万。由于解剖特点发病早期常缺乏典型症状,易于被忽视而延误治疗,出现明显症状时患者已进入中晚期,丧失最佳治疗时机。早期诊断和手术治疗是提高肝癌病人生存率的关键。对于肝癌的高危人群,现在最常用的监测手段是定期检测血浆中甲胎蛋白水平和影像学检查如超声等。然而,甲胎蛋白的敏感性和特异性都不令人满意,敏感度可达 60 ~ 70%,特异性约 90%左右。也有报道称 CEA、AFP、CA199 的联合检查可提高诊断的阳性率(司序,谭桂菊,吉林医学 2008 年 8 月第 29 卷第 16 期)。另外,使用甲胎蛋白作为标志物,还有 30% -40% 的肝癌病例不能早期检出(即 AFP 阴性患者)。在 AFP 阴性肝癌(58 例)的研究表明,4 种肿瘤标志物单项检测阳性率分别为 AFU64%、CEA28%、CA19922%、TSGF66%(现代中西医结合杂志,2011 年 2 月,20(6),660-662)。因此探索新的具有更高敏感性、特异性和准确性并可能具有早期诊断价值的肝癌肿瘤标志物对于提高我国肝癌临床诊断水平乃至提高疗效具有重要意义和必要性。

[0003] 巨噬细胞抑制因子 1(MIC1),也被称为生长分化因子 15(GDF15),是 TGF- β 超家族中的一个重要成员。MIC1 广泛参与细胞凋亡、侵袭及转移等生物学过程。正常人血清中的成熟 MIC-1 蛋白呈低水平稳定表达,在病理状态下如肿瘤、急性损伤及炎症其表达水平可一过性显著升高。尽管 MIC1 的具体生物学功能尚未阐明,但是大量研究提示 MIC1 涉及炎症、凋亡和肿瘤的发生。但截止目前,MIC1 在肝癌中的功能尚不明确,国际上也未见 MIC-1 与肝癌的诊断和治疗监测的相关研究。

发明内容

[0004] 本发明的研究表明,巨噬细胞抑制因子 1(MIC-1) 能够作为肝病尤其是肝癌的标志物用于肝病诊断和 / 或监测中。本发明的研究还发现 MIC-1 与 AFP 联合可以大幅提高肝癌的检出效率。因此,MIC-1 单独或与 AFP 联合可用于诊断和 / 或监测受试者中的肝病,包括用于制备诊断和 / 或监测受试者中肝病的试剂或试剂盒。

[0005] 因此,本发明一方面涉及巨噬细胞抑制因子 1 在诊断和 / 或监测受试者中肝病的用途。

[0006] 在本发明的一个实施方案中,所述肝病包括肝癌、肝脏良性肿瘤和慢性肝炎,优选肝癌。本发明的分析检测结果发现,MIC-1 与 AFP 有较好的互补性,在 AFP 阴性患者当中,令人吃惊的发现高达 73% 的患者呈现 MIC-1 血清阳性。因此在本发明的一个实施方案中,

所述肝病是甲胎蛋白阴性肝癌。

[0007] 在本发明的另一个方案中,本发明的巨噬细胞抑制因子 1 可以进一步与不同于巨噬细胞抑制因子 1 的其它肝病标志物联合使用,从而有利于提高特异性,这样的肝病标志物可以是本领域已知的任何肝病标志物 (TSG、IAP、GGT、IAP、PHC、CEA、CA199)。本领域有大量文献公开了这样的标志物。在一个实施方案中,不同于巨噬细胞抑制因子 1 的其它肝病标志物可以是已知的肝癌标志物如甲胎蛋白,已知的肝脏良性肿瘤标志物或已知的慢性肝炎标志物。在本发明的一个实施方案中,例如在肿瘤如肝癌筛查中,鉴于 MIC-1 与 AFP 有较好的互补性,本发明的巨噬细胞抑制因子 1 进一步与甲胎蛋白联合使用,从而提高可以大幅提高肝癌的检出效率。

[0008] 本发明的研究表明与本发明的 MIC-1 在肝癌的早期显诊断方面显著高于 AFP。因此,在本发明的一个实施方案中,本发明的 MIC-1 用于早期诊断 I 期肝癌或 II 期肝癌。

[0009] 在本发明的一个实施方案中,本发明的试剂或试剂盒可用于组织原位检测和 / 或监测巨噬细胞抑制因子 1 的表达 (例如 mRNA 水平),或者用于检测和 / 或监测巨噬细胞抑制因子 1 的血清水平。

[0010] 在本发明的一个实施方案中,所述巨噬细胞抑制因子 1 的血清水平的临界值设为 600pg / ml,从而可以提高灵敏度,有利地用于肝癌的筛查,特别是 I 或 II 期肝癌的诊断。

[0011] 在本发明的一个实施方案中,所述巨噬细胞抑制因子 1 的血清水平的临界值设为 1000pg / ml,从而提高诊断和 / 或监测特异性。

[0012] 本发明另一方方面涉及诊断和 / 或监测受试者中肝病的试剂或试剂盒,其中包括上文描述的试剂或试剂盒。在本发明发现 MIC-1 可用于肝病的检测或监测后,这样的试剂和 / 或试剂盒可通过本领域常规技术容易地制备。例如所述试剂和 / 或试剂盒可以包括检测 MIC-1 和 / 或 AFP 的抗体,优选单克隆抗体,或者用于检测 MIC-1 和 / 或 AFP 表达的引物和 / 或探针等。所述试剂或试剂盒还可以包括常规的进行 PCR 反应的缓冲液、聚合酶、dNTPs 混合物等。本发明的试剂盒还可以包括使用说明书等。

附图说明

[0013] 图 1. 肿瘤组织中 MIC-1 的表达水平显著高于癌旁正常组织和肝硬化组织。

[0014] 图 2. 免疫组化显示 MIC-1 在肿瘤组织中的该表达和分布。

[0015] 图 3. 肿瘤组织和癌旁 MIC-1 水平的 western blot 分析。

[0016] 图 4. 肿瘤标志物 MIC-1 诊断肝癌的 ROC 曲线。

具体实施方式

[0017] 为评估肝细胞癌中 MIC1 中的作用,我们首先研究了 80 组配对肝癌组织和对应患者治疗前血清样本中的 MIC1 表达。通过对 80 组肝癌组织和邻近配对组织的 mRNA 进行分析,我们发现 70% (56 / 80) 的肝细胞癌中 MIC1 存在高表达,显著高于癌旁肝组织 ($P < 0.001$) 和无癌肝硬化组织 ($P < 0.001$) (图 1),免疫组化结果显示肝癌组织中 MIC1 弥散性分布于肝细胞的细胞质中 (图 2)。对 4 份代表性的患者组织样本提取总蛋白进行 Westernblot 分析 (图 3),结果进一步证实肝癌组织中 MIC1 的表达显著高于癌旁组织和无癌肝硬化组织;结果提示 MIC-1 在肝癌的发生发展中可能具有重要作用。此外,研究发现

肿瘤组织中的 MIC-1 表达与血清样品成显著正相关 ($r=0.551, P<0.001$), 组织中 MIC-1 表达阳性的患者血清 MIC-1 中位值 ($N=56$) 显著高于阴性组 ($N=24$) ($P<0.001$)。研究提示血清中 MIC-1 水平的显著升高与肝癌组织 MIC-1 的过表达存在显著相关, 对血清中的 MIC-1 血清进行检测, 可以反应患者肿瘤组织中 MIC-1 的表达改变, MIC-1 能够作为肝癌肿瘤标志物在肝癌的诊断和治疗监测中发挥重要作用。

[0018] 为探索 MIC-1 在肝病中的应用价值, 我们分别检测 440 肝癌、30 肝脏良性肿瘤、30 慢性肝炎和 500 正常对照组血清 MIC-1 浓度, 结果恶性肿瘤组 MIC-1 浓度显著高于良性肿瘤 ($P<0.001$)、慢性炎症 ($P<0.001$) 和正常对照组 ($P<0.001$); 慢性肝炎组 MIC-1 水平显著高于良性肿瘤 ($P<0.001$) 和正常对照组 ($P<0.001$); 良性肿瘤组 MIC-1 水平显著高于正常对照组 ($P<0.001$), 结果见表 1。

[0019] 表 1: 肝癌、肝脏良性疾病、慢性炎症和正常对照组中的 MIC-1 血清浓度比较

[0020]

组别	例数	中位数 (pg/ml)	浓度均数 (pg/ml)	标准差 (pg/ml)	P_a	P_b	P_c
肝脏恶性肿瘤	440	2503.12	2764.82	1721.01	<0.001	<0.001	<0.001
慢性肝炎	30	1333.62	1567.52	918.34	<0.001	<0.001	
肝脏良性肿瘤	30	761.29	759.11	449.01	<0.001		
正常对照	500	419.22	397.9	314.15			

[0021] a: 各组与正常对照组比较所得 P 值; b: 恶性肿瘤组、慢性肝炎组与良性肿瘤组比较所得 P 值; c: 恶性肿瘤组与慢性肝炎组比较所得 P 值

[0022] 检测上述各组血清 MIC-1 和 AFP 的水平, 并以恶性肿瘤组和正常对照组的 MIC-1 和 AFP 浓度绘制 ROC 曲线, MIC-1 诊断肝癌的曲线下面积为 0.911, 显著高于 AFP ($P<0.001$) (图 4)。我们综合考虑了 ROC 曲线和正常人群的 MIC-1 水平, 根据正常人 MIC-1 均值 ± 2 倍标准差, 设 MIC-1 的临界值为 1000pg/ml。MIC-1 和 AFP 诊断肝癌的特异性均为 97%, MIC-1 敏感性优于 AFP (77.0% vs 61.4%), 结果见表 2。

[0023] 表 2: MIC-1 和 AFP 对肝癌的诊断价值 (不含良性疾病组)

[0024]

肿瘤	标志物	AUC	Cut-Off 值	特异性 (%,n/n)	敏感性 (%,n/n)
肝癌	MIC-1	0.911	1000 pg/ml	97 (485/500)	77.0 (339/440)
	AFP	0.741	25ug/ml	97 (485/500)	61.4 (270/440)

[0025] 为探索 MIC-1 对良恶性疾病的鉴别能力, 本研究对将良性肿瘤组、慢性肝炎组和正常对照组合为非恶性组, 以恶性肿瘤组和非恶性肿瘤组的 MIC-1 和 AFP 浓度绘制 ROC 曲线; MIC-1 诊断肝癌的特异性从 97% 下降至 89.8%, 通过对病例进行分析, 30 例慢性肝炎病例中分别有 21 例 MIC-1、4 例 AFP 水平高于临界值, 30 例良性肿瘤中分别有 6 例 MIC-1、7 例 AFP 高出临界值, 结果说明 MIC-1 在区别诊断慢性肝炎上劣于 AFP, 但在鉴别良性肿瘤上与

AFP 相当。

[0026] 与 AFP 相比, MIC-1 在肝癌的早期显诊断方面显示出较好的应用价值, MIC-1 诊断 I 期和 II 期肝癌的灵敏度为 77.9% (53 / 68), 显著高于 AFP 的 51.5% ($P < 0.01$)。如果用于肝癌的筛查, 可以考虑降低特异性提高灵敏度, 根据 ROC 曲线设定临界值为 600pg/mL 时, 本研究中的灵敏度可提高至 91.2%, 而特异性降至 80.6%, 相应的 I-II 期肝癌的诊断灵敏度可提高至 89.7% (61 / 68) (表 3)。

[0027] 表 3 : MIC-1 和 AFP 在不同分期肝癌中的敏感性

[0028]

分期	例数	Cutoff=1000pg/ml MIC-1 阳性率 (%)	Cutoff=600pg/ml MIC-1 阳性率 (%)	CA199 阳性率 (%)
I	20	14 (70.0%)	17 (85.5%)	7 (35.0%)
II	48	39 (81.3%)	44 (91.6%)	28 (58.3%)
III	159	122 (76.7%)	144 (90.6%)	91 (57.2%)
IV	213	164 (77.0%)	196 (92.0%)	144 (67.6%)

[0029] 肿瘤标志物的联合诊断能显著提高诊断的敏感性, 本实验选取了 MIC-1 与肝癌检测标志物 AFP 联合诊断, 结果表明 MIC-1 与 AFP 联合诊断可获得较好的敏感性, 尤其是在早期肝癌中, MIC-1+AFP 的诊断敏感性可达到 85.7%。分析检测结果发现, MIC-1 与 AFP 有较好的互补性, 在 AFP 阴性患者当中, 73% (124 / 170) 的患者呈现 MIC-1 血清阳性 (表 4)。

[0030] 表 4 : 不同 AFP 水平患者中 MIC-1 水平的结果分布

[0031]

	MIC-1 阳性	MIC-1 阴性	总计
AFP 阳性	215	55	270
APF 阴性	124	46	170
总计	339	101	440

[0032] 因而 MIC-1 尤其适合用于检测和 / 或监测 AFP 阴性肝癌患者, 同时联合 MIC-1 与 AFP 可以大幅提高肝癌的检出效率。MIC-1+AFP 在肝癌血清检测中有很好的互补性, 具有良好的应用前景。

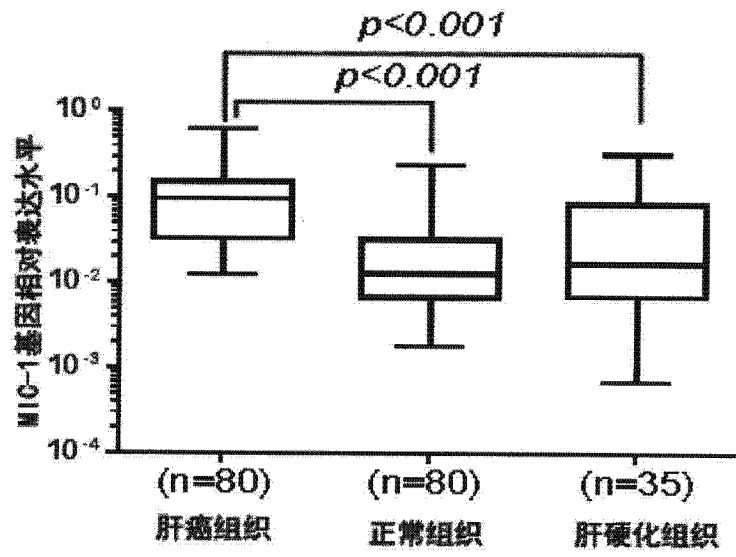


图 1



图 2

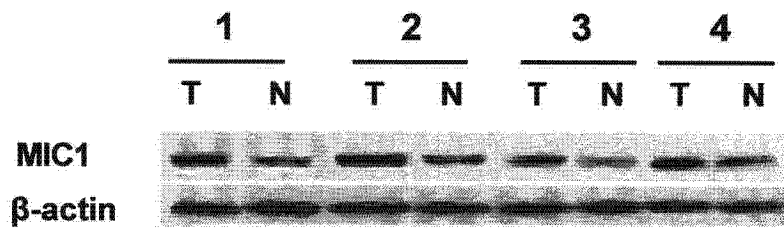


图 3

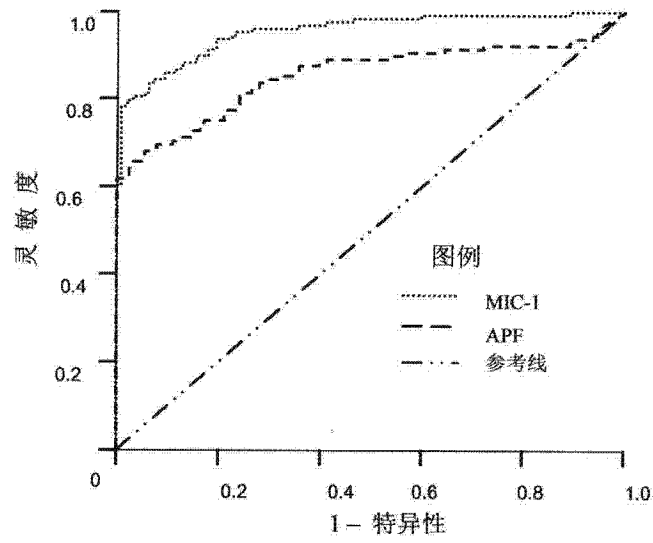


图 4