



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104407151 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201410693622.7

(22) 申请日 2014.11.19

(73) 专利权人 汕头大学医学院

地址 515041 广东省汕头市金平区新陵路
22号

(72) 发明人 许丽艳 曹卉慧 许秀娥 吴健谊
李恩民

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

审查员 黄晓丽

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

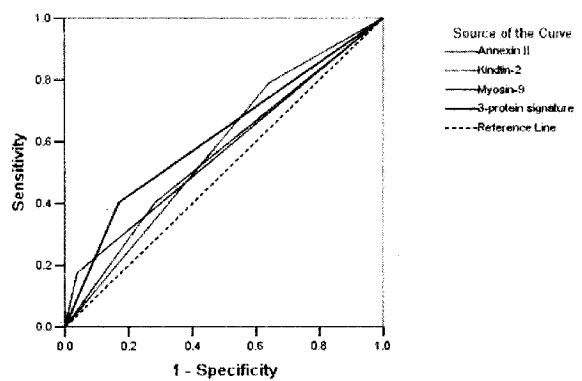
(54) 发明名称

Kindlin-2, Myosin-9 和 Annexin II 三蛋白
联合预测食管鳞癌患者预后试剂盒

(57) 摘要

本发明所要解决的技术问题是提供一种检测石蜡包埋组织中目的蛋白表达情况的试剂。本发明解决该技术问题的技术方案是提供了一种评价食管鳞癌患者预后信息的检测试剂盒。该试剂盒包括3种目的蛋白的抗体-Annexin II、Kindlin-2 和 Myosin-9 抗体,还包括山羊血清、0.01M 柠檬酸盐修复液、3% H₂O₂、Polymer 增强剂、Polymer 聚合物、DAB 显色试剂、PBS 溶液。使用该试剂盒可评价食管鳞癌患者的预后,比国际 TNM 分期简单、易行,且敏感性及特异性均比较高,以及更适用于国人的食管鳞癌预后评估。

ROC for OS



1. 一种预测食管鳞癌患者预后的试剂盒,其特征在于试剂盒中包含3种蛋白抗体与检测试剂,其中3种蛋白抗体是抗Annexin II蛋白抗体、抗Kindlin-2蛋白抗体和抗Myosin-9蛋白抗体;其中检测试剂分别是山羊血清,0.01M柠檬酸盐修复液,3% H_2O_2 ,Polymer增强剂,Polymer聚合物,DAB显色试剂与PBS溶液。

2. 权利要求1所述的试剂盒在制备联合预测食管鳞癌患者预后试剂盒中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于使用试剂盒所检测的标本为中性福尔马林固定和石蜡包埋的组织蜡块。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于所使用的检测方法为免疫组织化学超敏型二步法,具体步骤如下:对中性福尔马林固定和石蜡包埋的组织蜡块进行切片,切片经脱蜡至水、抗原修复、灭活内源性过氧化物酶和山羊血清封闭后,分别与抗Annexin II蛋白抗体、抗Kindlin-2蛋白抗体和抗Myosin-9蛋白抗体在保湿盒内孵育过夜;随后分别与Polymer增强剂和Polymer聚合物孵育后,经DAB显色和苏木素复染细胞核;最后经酒精脱水和二甲苯透明后用中性树胶封片,并对每张染色切片进行评分。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:每种蛋白表达高低的cut-off值由X-tile软件确定,其中Annexin II的cut-off值是3分,Kindlin-2的cut-off值是7分,Myosin-9的cut-off值是8分。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于:每例标本在应用3种蛋白抗体分别检测后,其3种蛋白联合表达的计算公式为 $Y = \beta_1 \times A + \beta_2 \times B + \beta_3 \times C$,其中 β_n 为系数,可以通过Cox回归得出,故该公式转换为 $Y = 0.808 \times A + 0.522 \times B + 0.829 \times C$;A、B、C分别为该例标本中Annexin II蛋白、Kindlin-2蛋白与Myosin-9蛋白的表达状态,0代表低表达,1代表高表达;在计算出每例标本的Y值后按照从小到大的顺序排列,其中位于中间位置的标本所对应的Y值为cut-off值,即0.808,那么低于该值的病例为低危组,高于该值的病例为高危组。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:评价个体食管鳞癌患者预后的信息时,只需把该患者3个蛋白的表达评分所对应的表达状态代入公式中,就可以得出Y值,然后与我们确定的cut-off值0.808比较,小于该值的患者属于低危组,其5年生存率为53.5%,而大于该值的患者属于高危组,其5年生存率为21.0%。

Kindlin-2, Myosin-9和Annexin II三蛋白联合预测食管鳞癌患者预后试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及联合多个蛋白抗体,并利用免疫组织化学超敏型二步法,去检测食管鳞癌患者标本的表达情况,进而预测患者预后的试剂盒。

背景技术

[0002] 食管鳞状细胞癌(Esophageal Squamous Cell Carcinoma,ESCC),简称食管鳞癌,在我国是一种常见的上消化道恶性肿瘤,在国人的恶性肿瘤死亡率中位居第四位。全世界每年40余万的新发食管鳞癌病例中,一半以上发生在我国,我国也是世界上公认的食管鳞癌第一高发国。上世纪70年代,在全国范围内实施了恶性肿瘤普查,确立河北磁县、河南林县、山西阳泉、四川盐亭、广东潮汕和江苏淮安等地区为中国食管鳞癌六大高发区。

[0003] 准确预测食管鳞癌患者的预后对于临床进一步的治疗和随访具有重要意义。然而,目前除了国际TNM分期外,还没有一种简便有效的方法可以更加准确地预测食管鳞癌患者的预后。然而,TNM分期预测患者的预后比较繁琐,需要准确地评价肿瘤的浸润深度、转移淋巴结的个数、肿瘤有无远处转移等,况且国际TNM分期的制定缺少大量国人食管鳞癌的病例资料,因此在评价我国患者的预后时适用性比较差,而本发明所采用的3个指标联合预测患者预后的试剂盒比单个指标检测具有更高的预测效果,并且本发明所基于的免疫组织化学超敏型二步法是一种成熟可靠、可在基层医院广泛使用的方法。本试剂盒中3种蛋白抗体的背景介绍如下:

[0004] Annexin II是钙调结合蛋白,参与细胞的生长和信号转导通路。最近许多研究表明,Annexins表达易位与肿瘤发生发展有关,分化程度不同Annexins表达也不同。由于其作用广泛,包括细胞与细胞之间的连接、细胞膜与细胞骨架的连接、细胞运动和内吞作用、几乎肿瘤病理状态所有进程,Annexins会是一个很好的肿瘤发生发展的诊断或预后指标。研究发现,Annexin II在前列腺癌是下调表达的,但在前列腺癌细胞系中是上调表达的;在肝细胞癌、肠癌、乳腺癌和食管鳞癌等等也是上调表达的。我们的实验结果同Zhang X和Feng JG等人,在食管鳞癌中呈过表达。

[0005] Kindlin-2是粘着斑蛋白,参与整合素的激活。关于Kindlin-2的研究比较少,目前一些研究表明,Kindlin-1与Kindlin-3的基因缺失可导致某些遗传性疾病,而Kindlin-2不存在基因缺陷相关疾病。Kindlin-2在乳腺癌细胞系和组织中、胃癌细胞系呈过表达;而在子宫平滑肌瘤细胞系和大肠癌细胞系中呈下调表达,并抑制细胞的侵袭;而在前列腺癌细胞系中表达不一,但是在前列腺癌对顺铂敏感起到重要的作用,针对Kindlin-2药物靶点可改善疗效和减少药物剂量。然而,在国人恶性肿瘤死亡率居第四位的食管鳞癌中,Kindlin-2的表达情况如何及其与患者预后的关系尚不清楚。本发明的前期研究发现Kindlin-2在食管鳞癌组织中高表达并与患者的不良预后密切相关。

[0006] Myosin-9属于非肌肉组织肌球蛋白家族,也叫Myosin IIA重链,与胞质分裂、细胞运动和维持细胞形态有关。许多研究表明,MYH9基因易位、突变或融合均可导致严重遗传性

疾病。Myosin IIA在肺腺癌、食管鳞癌中呈过表达,与不良预后有关;在乳腺癌细胞系MCF-7中是其细胞转移的关键蛋白,并表明是抗侵袭治疗的候选靶点;胃癌中通过直接靶向作用MYH9抑制癌细胞侵袭转移。我们的实验结果与Xia ZK等人一致。

[0007] 虽然上述每种蛋白均具有预测食管鳞癌患者预后的能力,但把3种蛋白联合起来预测食管鳞癌患者的预后则具有更强的判断效能。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题是提供一种基于免疫组织化学方法的3个蛋白抗体联合预测食管鳞癌患者预后的试剂盒。

[0009] 其中,上述的免疫组织化学方法主要是检测中性福尔马林固定和石蜡包埋的标本。

[0010] 其中,上述试剂盒主要包括3种蛋白抗体,分别是Annexin II、Kindlin-2和Myosin-9抗体。

[0011] 其中,上述试剂盒还包括:山羊血清,0.01M柠檬酸盐修复液,3% H_2O_2 ,Polymer增强剂,Polymer聚合物,DAB显色试剂,PBS溶液。

附图说明

[0012] 图1是Annexin II蛋白在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线($P=0.0014$)。图2是Kindlin-2蛋白在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线($P=0.053$)。图3是Myosin-9蛋白在不同表达人群的Kaplan-Meier生存曲线($P=0.015$)。图4是3种蛋白联合后,判断该人群的Kaplan-Meier生存曲线($P=0.000$)。图5是ROC曲线(注:3种蛋白联合后形成的曲线下面积为0.617)。

具体实施方式

[0013] 我们收集了110例2000-2006年的食管鳞癌患者的手术标本存档蜡块。下面结合附图实施例作进一步详细描述。

[0014] 免疫组织化学超敏型二步法步骤如下:

[0015] 标本经连续切片、二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,用超敏型二步法检测目的蛋白的表达。

[0016] 具体方法如下:

[0017] (1)切片经0.01M柠檬酸盐修复液抗原修复、3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶、山羊血清封闭后,分别与Annexin II、Kindlin-2和Myosin-9抗体4℃孵育过夜;

[0018] (2)切片与Polymer增强剂和Polymer聚合物分别孵育后经DAB显色;

[0019] (3)切片经苏木素复染核,梯度酒精脱水,二甲苯透明和中性树胶封片;

[0020] (4)切片在完成上述每步后均经PBS溶液洗涤。

[0021] 所有的免疫染色切片经2位病理医师采用盲法独立评分。肿瘤细胞浆中出现棕黄色颗粒被认为是阳性信号。染色强度分为4级:0,阴性;1,弱染色;2,中度染色;3,强染色。阳性细胞百分数分为5级:0,0~5%;1,6~25%;2,26~50%;3,51~75%;4,≥76%。每个标本的总分数是由肿瘤细胞染色强度和肿瘤细胞阳性百分数两部分的乘积得出的,范围是0

~12。为了方便统计,我们把所有病例分为低表达和高表达2组,0代表低表达组,1代表高表达组,其cut-off值根据X-tile软件确定。Annexin II:0~2.5分为低表达组,3~12分为高表达组;Kindlin-2:0~6分为低表达组,7~12分为高表达组;Myosin-9:0~7分为低表达组,8~12分为高表达组。

[0022] 3个指标联合起来判断食管鳞癌患者预后的方程式如下:

[0023] $Y = \beta_1 \times A + \beta_2 \times B + \beta_3 \times C$,其中 β_n 为系数,通过单变量Cox回归可以得出数值, $Y = 0.808 \times A + 0.522 \times B + 0.829 \times C$;A、B、C分别为该例标本中Annexin II、Kindlin-2、Myosin-9蛋白的表达状态,0代表低表达,1代表高表达。计算出每例标本的Y值后按照从小到大的顺序排列,其中位于中间位置的病例对应的Y值为cut-off值,即0.808。小于等于该值的病例为低危组,高于该值的病例为高危组,这样分成2组后再进行单因素统计分析。此外,也可以通过绘制ROC曲线去比较每个蛋白形成的曲线下面积(AUC)的大小。

[0024] 数据的统计学处理:

[0025] 使用SPSS 13.0统计软件处理数据。各蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤位置、肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移状态、TNM分期、治疗之间的关系使用theKendall's tau-b检验;各蛋白的表达与患者的生存时间的关系使用Kaplan-Meier生存分析;预测影响患者预后的独立危险因素使用Cox比例风险回归模型;每种蛋白预测食管鳞癌患者预后的效能使用ROC曲线; $P < 0.05$ 被认为有统计学显著性。

[0026] 结果显示:

[0027] 3个蛋白的表达都与食管鳞癌患者的不良预后密切相关。各临床指标与各蛋白的Cox风险回归模型预测患者的独立危险因素如下:

[0028] 3个蛋白联合后可作为判断食管鳞癌预后的独立预后因子。

[0029]

Variables	HR (95%CI)	P-value
Univariate analyses		
Age (>58 vs ≤58)	1.22(0.72 to 2.05)	0.454
Gender (Female vs Male)	0.83(0.46 to 1.50)	0.543
Location		0.806
Upper vs Middle	0.98(0.35 to 2.73)	0.967
Lower vs Middle	0.79(0.38 to 1.61)	0.512
Length of tumor		0.541
3-5cm vs ≤3cm	1.37(0.73 to 2.59)	0.329
>5cm vs ≤3cm	1.54(0.60 to 3.98)	0.373
T-stage (T3+T4 vs T1+T2)	2.09(0.51 to 8.58)	0.305
Differentiation		0.758
G2 vs G1	0.84(0.47 to 1.48)	0.540
G3 vs G1	0.71(0.24 to 2.11)	0.542
N-stage (N1+N2+N3 vs N0)	2.69(1.56 to 4.63)	0.000
pTNM-stage (III+IV vs I+II)	2.79(1.62 to 4.78)	0.000
Therapy (Comprehensive Therapy vs Only Surgery)	1.28(0.57 to 2.86)	0.549
Annexin II (high vs low)	2.24(1.16 to 4.35)	0.017
Kindlin-2 (high vs low)	1.69(0.99 to 2.88)	0.056
Myosin-9 (high vs low)	2.29(1.15 to 4.56)	0.018
3-protein signature (high vs low)	2.74(1.60 to 4.70)	0.000
Multivariate analysis		
N-stage (N1+N2+N3 vs N0)	2.36(1.36 to 4.11)	0.002
3-protein signature (high vs low)	2.34(1.35 to 4.05)	0.002

[0030] 3个蛋白联合后形成的曲线下面积(AUC)是最大的,同时也具有较高的敏感性和特异性。

[0031]

	AUC	Sensitivity	Specificity
Annexin II	0.574	78.9%	35.8%
Kindlin-2	0.560	40.4%	71.7%
Myosin-9	0.569	17.5%	96.3%
3-protein signature	0.617	40.3%	83.0%

[0032] 综上,Annexin II、Kindlin-2、Myosin-9联合后的危险比值是2.74,高于它们单独评价患者时相应的危险比值(分别为2.24,1.69,2.29),甚至高于淋巴结转移状态所对应的危险比值(为2.69),同时3个蛋白的联合还是独立评价食管鳞癌患者预后的危险因素(P=0.002)。

[0033] 3个蛋白联合后得出的Kaplan-Meier生存曲线比每个蛋白单独评价得出的Kaplan-Meier曲线差别更明显,且P值是最小的(P=0.000)。

[0034] 3个蛋白联合后得到的ROC曲线下面积是0.617,均大于每个蛋白单独评价时所形成的ROC曲线下面积,同时3个蛋白联合后预测食管鳞癌患者的预后也具有较高的敏感性和特异性(分别为40.3%和83.0%)。因此说Annexin II、Kindlin-2、Myosin-9联合后评价食管鳞癌患者的预后具有更高的预测价值,并且具备好操作及适用性强。

[0035] 评价临床上个体食管鳞癌患者的预后信息时,只需把所得到的该患者3个蛋白表达的免疫组化分数对应的表达状态数值(0代表低表达,1代表高表达)套入公式 $Y=0.808 \times A+0.522 \times B+0.829 \times C$ 中,就可以得出Y值,然后与我们确定的cut-off值0.808比较,小于该值的患者属于低危组(5年生存率为53.5%),大于该值的患者属于高危组(5年生存率为21.0%)。

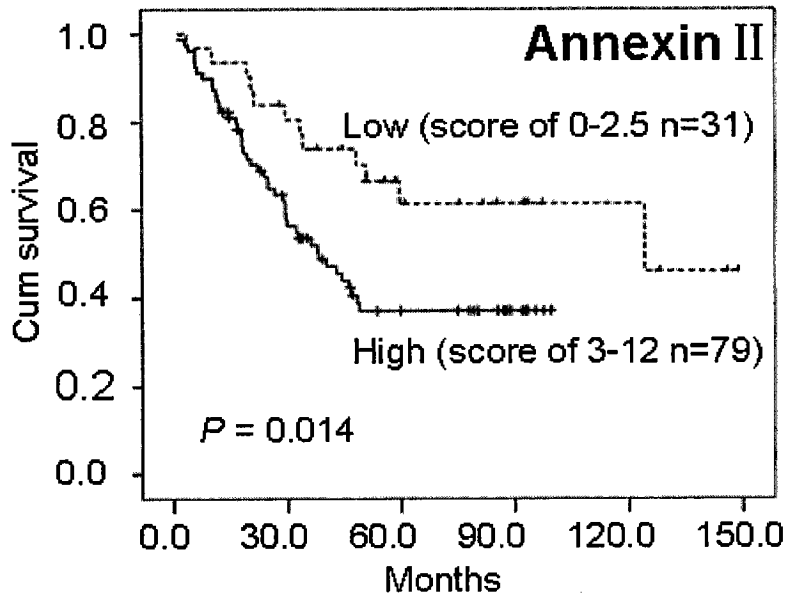


图1

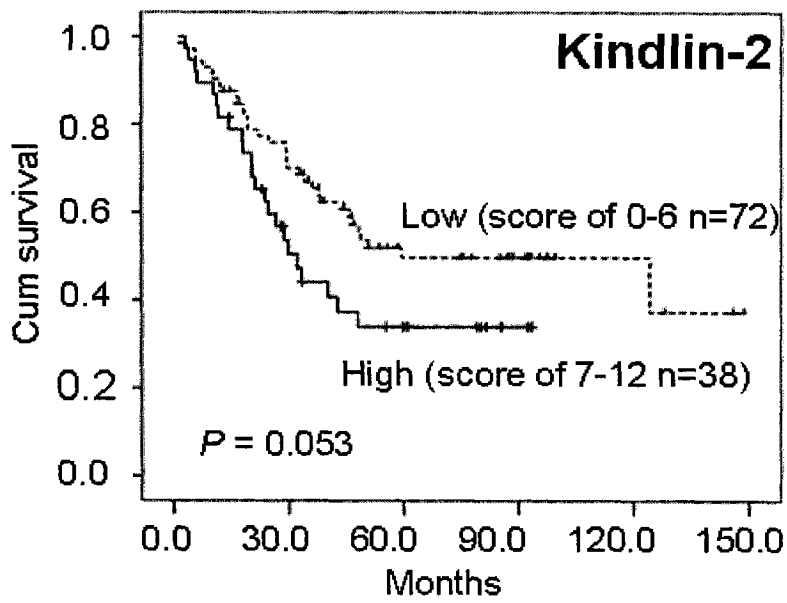


图2

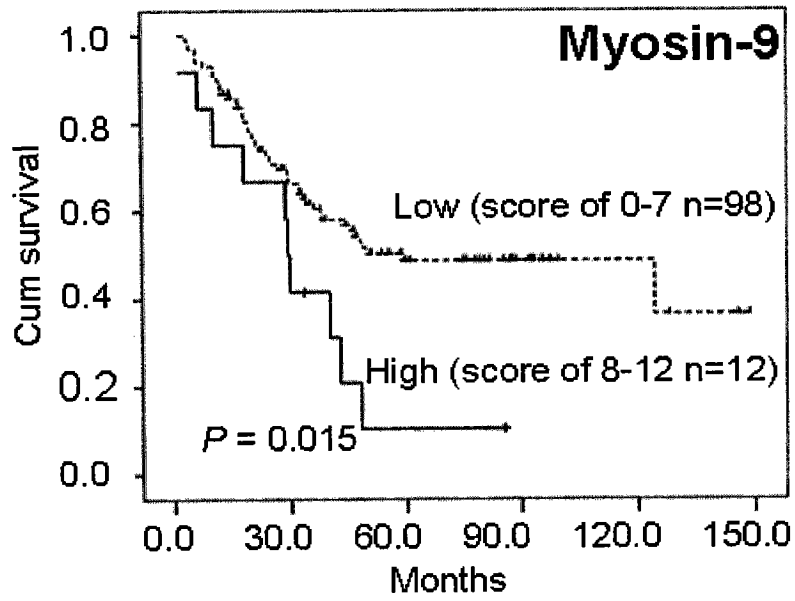


图3

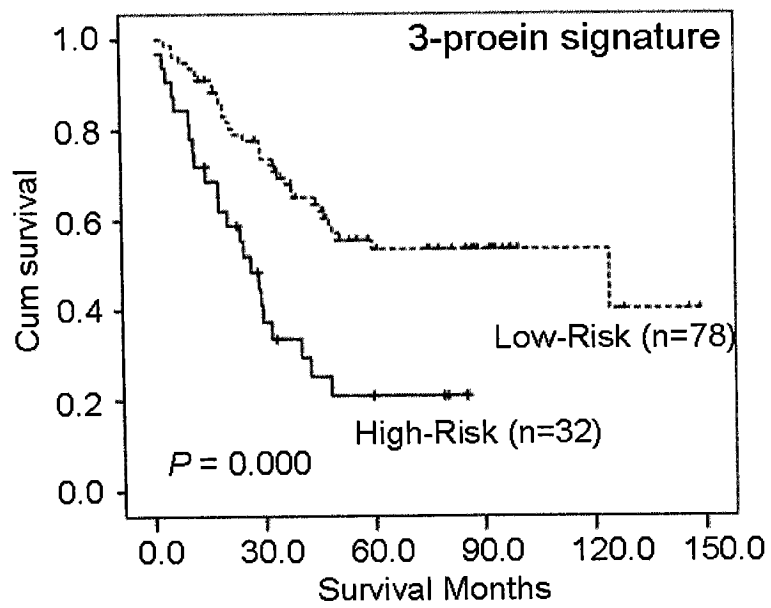


图4

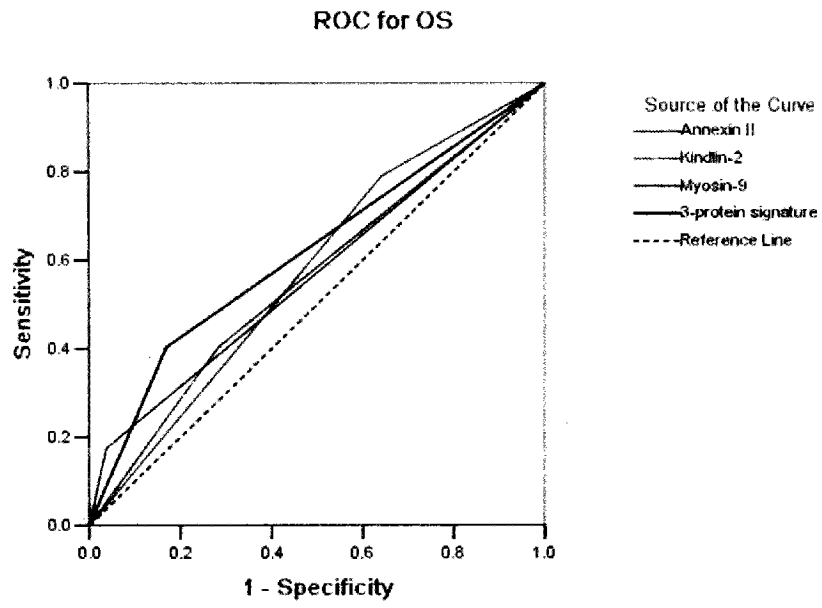


图5