



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109116024 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201810611732.2

EP 1137943 A1,2001.10.04

(22) 申请日 2018.06.14

CN 106680503 B,2018.05.04

(65) 同一申请的已公布的文献号

姚毅冰.肿瘤自身抗体在肺癌早期诊断中的作用.《中国肺癌杂志》.2010,第13卷(第9期),全文.

申请公布号 CN 109116024 A

(43) 申请公布日 2019.01.01

付志强,丁耀东,谭立明,等..小细胞肺癌患者检测自身抗体结果分析.《江西医药》.2017,第51卷(第12期),全文.

(73) 专利权人 郑州大学第一附属医院

地址 450052 河南省郑州市二七区建设东路50号

杜江,李文雅,张林.ARPC5在非小细胞肺癌细胞和组织中的表达及预后意义.《解剖科学进展》.2015,第21卷(第3期),全文.

(72) 发明人 代丽萍 周志刚 王猛 齐宇

欧阳松云 裴露 王婷婷 谢伟

Cadinu D , Hooda J , Alam M M , et al..omparative proteomic analysis reveals characteristic molecular changes accompanying the transformation of nonmalignant to cancer lung cells.《 EuPA Open Proteomics》.2014,第3卷(第1期),全文.

(74) 专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

Yibing,Yao,Zhihao,Wu,Qinghua,Zhou.Autoantibodies as the early diagnostic biomarkers for lung cancer.《Chinese journal of lung cancer》.2010,第13卷(第9期),全文.

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

审查员 李若琳

(56) 对比文件

CN 1277260 A,2000.12.20

CN 106053812 A,2016.10.26

CN 107864654 A,2018.03.30

US 2005164272 A1,2005.07.28

AU 2014324080 A1,2016.04.14

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

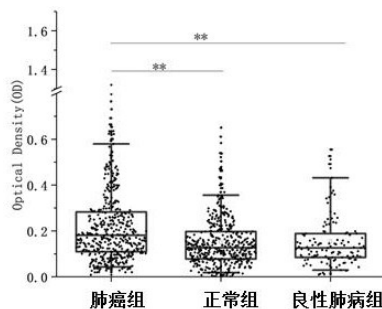
(54) 发明名称

一种肺癌标志物抗-ACR3自身抗体及其应用

以用于肺癌的早期检测。在此背景下提供此方便、快捷、有效的检测肺癌患者的标志物及该标志物在制备用于肺癌检测的试剂盒,可用于临床的肺癌早期诊断。

(57) 摘要

本发明属于生物学检测技术领域,具体涉及一种肺癌标志物抗-ACR3自身抗体及其应用,本发明公开了一种肺癌标志物,所述肺癌标志物为抗-ACR3自身抗体。本发明还提供了上述肺癌标志物在制备用于肺癌检测试剂盒中的应用。本发明提供一种操作简单、成本低、准确性高、无创伤的应用于临床的肺癌检测的血清生物标志物。本发明研究发现应用ELISA方法进行血清抗-ACR3自身抗体的检测,可以较准确地将肺癌患者和正常人,以及良性肺病患者鉴别开来,并可



CN 109116024 B

1. 一种肺癌标志物,其特征在于,所述肺癌标志物为抗-ACTR3自身抗体。
2. 一种如权利要求1所述的肺癌标志物抗-ACTR3自身抗体在制备用于肺癌血清学检测的试剂或试剂盒中的应用。
3. 根据权利要求2所述的用于肺癌血清学检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒是基于酶联免疫吸附试验的检测体系。
4. 根据权利要求3所述的用于肺癌血清学检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有检测抗-ACTR3自身抗体的ACTR3重组纯化蛋白。
5. 根据权利要求3所述的用于肺癌血清学检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还含有ELISA包被缓冲液、HRP-Rec-A二抗、封闭缓冲液、ELISA通用抗体稀释液、ELISA-ABTS显色试剂、PBST和终止液。
6. 一种如权利要求1所述的肺癌标志物抗-ACTR3自身抗体与传统肿瘤标志物CEA、CA125或CYFRA21-1联合使用在制备用于肺癌评价试剂盒中的应用。

## 一种肺癌标志物抗-ACTR3自身抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检测技术领域,具体涉及一种肺癌标志物抗-ACTR3自身抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 肺癌是中国,以及全球发病率及死亡率第一的恶性肿瘤。肺癌的临床表现复杂多样,早期肺癌表现隐匿且多样化,临床特征及体征不明显,仅表现为咳嗽、咯痰、胸痛、发热、体力下降等非特异性症状,导致大部分肺癌患者发现时已经处于晚期。有临床数据显示,有近60%的患者就诊时已经处于肺癌晚期。肺癌晚期的5年生存率仅为16%左右,而肺癌早期(I期)的5年生存率可以高达70%。可见肺癌的早期发现、早期诊断是降低肺癌发病率和死亡率的关键环节。

[0003] 目前临床上有多种用于肺癌的检测手段,主要包括无创检查(CT,X线胸片等)和一些有创检查(纤维支气管镜、脱落细胞学检查、经CT定位穿刺活检等)。美国国家肺癌筛查试验的随机对照研究结果显示,通过采用低剂量螺旋CT(LDCT)对肺癌高危人群进行筛查,可使肺癌病死率下降20%,提高12%早期肺癌的检出率。国际早期肺癌行动计划I期肺癌的检出率达85%,预期10年生存率可以达到88%。虽然LDCT在一些地区进行的筛查研究取得了一定的研究进展,但有一定的不足之处。首先,LDCT能在25%的高危人群中发现结节,经过进一步的检查和追踪,其中只有4%最终被诊断为肺癌。另一方面,所有的肺癌患者中只有30%符合LDCT的高危人群筛查标准,说明大部分肺癌患者也无法通过LDCT筛查被发现。近年来,血清生物学标志物由于创伤性小,操作简单,筛查范围广,检测效率高等优点而受到关注。目前临床上用的血清生物学标志物有糖链抗原(CA125、CA199),细胞角蛋白19片段抗原(CYFRA21-1),癌胚抗原(CEA)等,但是尚未发现一种灵敏度及特异度均很高的肿瘤标志物。

[0004] 肿瘤的发生可归结为一系列肿瘤相关基因结构或者功能的异常,肿瘤抗原(tumor-associated antigens,TAAs)就是这些异常基因所表达的一些在质或者量上异常的蛋白质或者多肽,其产生的抗体称为抗TAA自身抗体。抗-TAAs自身抗体在正常人和非肿瘤患者血清中不存在或滴度很低,患者血清中自身抗体水平的升高往往早于肿瘤症状的出现,并且它能够在血清中持续稳定存在,而其它的标志物包括TAA本身,在其被肿瘤细胞释放后被快速降解或者在其进入血液循环后的很短时间内就能够被机体清除。因此检测抗-TAAs的自身抗体可以作为早期肿瘤诊断的血清标志物。

[0005] ACTR3,即肌动蛋白相关蛋白3,它编码的蛋白质是Arp 2/3复合物的主要组成部分。Arp 2/3复合物主要包括肌动蛋白相关蛋白Arp2和Arp3亚基,以及ARPC1、ARPC2、ARPC3、ARPC4、ARPC5五个附属亚基。这种复合物位于细胞表面,通过层间肌动蛋白组装和突起,对细胞的形状和运动起到至关重要的作用,主要参与细胞的迁移和侵袭。本发明对抗-ACTR3自身抗体是否可以作为诊断肺癌特异性指标进行了大样本量的血清学验证。

[0006] 综上所述,为了最终实现降低肺癌的死亡率,提高生存率,本领域迫切需要筛选和鉴定更加敏感、特异血清学自身抗体标志物,并开发操作简单、成本低、适用范围广泛的检

测肺癌自身抗体的试剂盒。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服肺癌现有肿瘤标志物不理想的问题,旨在提供抗-ACTR3自身抗体的新用途,在于提高肺癌早期诊断的灵敏度、特异度和准确性。利用一种特异性高、敏感度强的诊断标志物制备稳定性好、检测方便的用于肺癌早期诊断的试剂盒。本发明具体提供一种肺癌血清诊断标志物,具体涉及一种能区分肺癌和正常人的抗-ACTR3(Actin Related Protein 3)自身抗体。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 第一方面,本发明提供了一种肺癌标记物,所述肺癌标志物为抗-ACTR3自身抗体。

[0010] 第二方面,本发明提供了第一方面所述的抗-ACTR3自身抗体在制备用于肺癌血清学检测的试剂或试剂盒中的应用。

[0011] 优选的,所述试剂盒是基于酶联免疫吸附试验(ELISA)的检测体系。

[0012] 优选的,所述试剂或试剂盒含有检测抗-ACTR3自身抗体的ACTR3重组纯化蛋白。

[0013] 优选的,所述试剂盒还含有ELISA包被缓冲液(20×)、HRP-Rec-A二抗、封闭缓冲液(BSA)、ELISA通用抗体稀释液、ELISA-ABTS显色试剂、PBST(吐温20-磷酸盐缓冲液)、终止液。

[0014] 第三方面,本发明提供了第一方面所述的肺癌标志物抗-ACTR3自身抗体与传统肿瘤标志物CEA、CA125或CYFRA21-1联合使用在制备用于肺癌评价试剂盒中的应用。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0016] 本发明提供一种操作简单、成本低、准确性高、无创伤的应用于临床的肺癌检测的血清生物标志物。本发明研究发现应用ELISA方法进行血清抗-ACTR3自身抗体的检测,可以较准确地将肺癌患者和正常人,以及肺部慢性病患者鉴别开来,并可以用于肺癌的早期检测。在此背景下提供此方便、快捷、有效的检测肺癌患者的标志物及该标志物在制备用于肺癌检测的试剂盒,可用于临床的肺癌早期诊断。

### 附图说明

[0017] 图1为测试组中抗-ACTR3自身抗体在肺癌组和正常对照组中的分布及ROC曲线分析(其中,A图为自身抗体的分布,B图为ROC曲线分析,\*\* $P < 0.001$ );

[0018] 图2为验证组中抗-ACTR3自身抗体在肺癌组、正常对照组和良性肺病组中水平的分布(\*\* $P < 0.001$ );

[0019] 图3为ROC曲线分析验证组中抗-ACTR3自身抗体对肺癌的检测效能(LC:肺癌组;B:良性肺病组;N:正常对照组);

[0020] 图4为ROC曲线分析验证组中抗-ACTR3自身抗体在早晚期肺癌中的检测效能(N:正常对照组)。

### 具体实施方式

[0021] 本发明利用Oncomine数据库的三个独立队列研究对ACTR3基因表达进行分析,并应用ELISA方法检测肺癌患者血清中抗-ACTR3自身抗体水平。

[0022] 1) 利用Oncomine数据库的三个独立队列研究(包括375例非小细胞肺癌和134例正常组织)进行挖掘,分析ACTR3在肺癌和正常组织中mRNA的表达。

[0023] 2) 为了检测抗-ACTR3自身抗体能否作为肺癌诊断标志物,应用ELISA检测方法,对184例肺癌患者血清以及184例正常人血清进行抗-ACTR3自身抗体水平的检测,其步骤包括:用抗原包被液将购买的ACTR3重组纯化蛋白稀释至0.25ug/ml,包被96孔板,通用抗体稀释液将血清样本1:100稀释,与抗原作用后,与辣根过氧化物酶标记的重组蛋白A(HRP-rec-Protein A)抗体反应,最终加入ABTS底物液进行显色,在酶标仪(405nm吸光度)下读取OD值,以反应血清中抗-ACTR3自身抗体的水平。结果显示,抗-ACTR3自身抗体在肺癌患者血清中的表达水平高于正常人血清,具有统计学意义( $P < 0.001$ ,如图1所示)。为了进一步验证抗-ACTR3自身抗体是否可以用于肺癌的诊断标志物,在446例肺癌、446例正常对照和119例良性肺病中进行ELISA检测,结果显示抗-ACTR3自身抗体在肺癌患者血清中表达水平大于正常对照组和良性肺病组( $P < 0.001$ ,如图2所示)。

[0024] 3) 为了检测抗-ACTR3自身抗体对于肺癌患者的鉴别能力,本发明通过对肺癌组与正常对照组,肺癌组与良性肺病组以及肺癌组与正常对照组+良性肺病组进行ROC曲线分析,结果显示,肺癌组与正常对照组的曲线下面积为0.642 (95%CI:0.609-0.673),肺癌组与良性肺病组的曲线下面积为0.639 (95%CI:0.598-0.679),肺癌组与非肺癌组(正常对照组+良性肺病组)的曲线下面积为0.641 (95%CI:0.611-0.671)(如图3所示)。抗-ACTR3自身抗体可以将肺癌与非肺癌区分开。

[0025] 4) 为进一步了解抗-ACTR3自身抗体在肺癌早期诊断中的应用价值,本发明对抗-ACTR3自身抗体在22例早期(I/II)和138例晚期(III/IV)肺癌患者血清中进行阳性率分析,结果显示抗-ACTR3自身抗体在早期肺癌中的阳性率为36.4%,在晚期肺癌中的阳性率为15.2%,在早期肺癌中的阳性率明显高于晚期肺癌( $P < 0.05$ )。与446例正常对照组进行ROC分析,结果显示早期肺癌与正常对照组的AUC值0.699 (95%CI:0.656-0.741),晚期肺癌与正常对照组的AUC值0.580 (95%CI:0.539-0.620)(如图4所示)。

[0026] 5) 抗-ACTR3自身抗体与传统肿瘤标志物结合是否可以提高肺癌早期的检出率,117例CA125(I/II期20例,III/IV期97例),132例CEA(I/II期21例,III/IV期111例),115例CYFRA21-1(I/II期17例,III/IV期98例)。CA125、CEA和CYFRA21-1在早期肺癌中的阳性率分别为20%、28.6%和23.5%。当抗-ACTR3自身抗体与CA125、CEA和CYFRA21-1分别结合时可明显提高早期的检出率。抗-ACTR3自身抗体与CA125,抗-ACTR3自身抗体与CEA,抗-ACTR3自身抗体与CYFRA21-1联合检测在早期肺癌中的阳性率分别为50%,57.1%和47.1%,其中抗-ACTR3自身抗体与CEA联合检测的阳性率最高。结果表明,本发明提供的抗-ACTR3自身抗体可作为早期肺癌的诊断标志物。

[0027] 下面通过具体实施例对本发明作进一步说明。

[0028] 实施例1

[0029] 1、血清标本收集

[0030] 本研究共纳入研究对象1379例,分为测试组和验证组。测试组纳入的184例肺癌患者血清来自于2016-2017郑州大学第一附属医院的肺癌患者。验证组纳入的446例肺癌患者血清来自于2013年-2014年就诊于郑州大学第一附属医院的肺癌患者。所有病例均经过组织病理学确诊,未经过任何手术和放化疗。测试组184例正常对照与验证组446例正常对照

均来自于郑州大学第一附属医院健康体检者,按照年龄性别与病例进行匹配,并且均未患肿瘤相关疾病和呼吸系统疾病。119例良性肺病血清来自于2016-2017郑州大学第一附属医院,包括慢性阻塞性肺气肿患者和慢性肺炎患者。所有研究对象均排除自身免疫性疾病及急慢性感染等影响蛋白表达的疾。

[0031] 所有研究对象采血5ml,静止30min后,3000rpm5min离心后取上清液至Eppendorf管中留样,分别给予编号后纳入标本库,短期使用分装后保存于-20℃冰箱,长期保存的分装后冻存于-80℃冰箱备用,避免反复冻融。

[0032] 2、Oncomine数据库对ACTR3进行mRNA表达分析

[0033] 利用Oncomine数据库对ACTR3 mRNA的表达水平进行分析。在本发明中,选择3个不同的数据集Hou Lung Dataset(45例肺癌组织和65例正常组织),Okayama Lung Dataset(226例肺癌组织和20例正常组织),Landi Lung Dataset(58例肺癌组织和49例正常组织)。比较ACTR3在非小细胞肺癌与正常组织的差异表达。在Oncomine数据库中设定检索条件1、Gene:ACTR3;2、Analysis Type:Cancer vs.Normal Analysis;3、Cancer Type:Non-small Cell Lung Cancer;4、Sample Type:Clinical Specimen;5、Data Type:mRNA。临界值设定条件为校正后P-value(0.05/基因数): Hou Lung Dataset $\leq 2.55E-6$ , Okayama Lung $\leq 2.55E-6$ ;Landi Lung $\leq 3.96E-6$ 。研究结果显示ACTR3在三个研究中均显示高表达,结果分别是P=1.41E-6,FC=1.324;P=1.00E-10,FC=1.279;P=1.69E-7,FC=1.279。

[0034] 3. ELISA法检测抗-ACTR3自身抗体的血清表达水平

[0035] 3.1 所需试剂

[0036] 通用抗体稀释液、包被缓冲液(20x)、封闭缓冲液、ABTS-显色试剂盒均购于上海生物工程技术有限公司。

[0037] 通用抗体稀释液:成分为BSA(牛血清白蛋白)和PBS缓冲液。

[0038] 包被缓冲液(20x):成分为碳酸盐缓冲液,使用时用去离子水按1:20稀释。

[0039] 10×ELISA PBST洗液(1L):称取NaCl 81.8g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 28.8g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3.1g,Tween20 5ml,硫柳汞钠0.1g,加去离子水至1L。

[0040] 1×ELISA PBST洗液(1L):取10×ELISA PBST洗液 100ml,加去离子水至1L。

[0041] 3.2抗-ACTR3自身抗体检测方法

[0042] (1) 包被抗原蛋白:从生物公司购买的ACTR3重组纯化蛋白,用抗原蛋白包被缓冲液稀释至0.25ug/ml终浓度,包被于96孔板,加样50μl/孔,保鲜膜封闭防止挥发,置于4℃冰箱包被过夜。

[0043] (2) 封闭:弃去孔中包被液,于96孔酶标板中每孔加入100μl的含有2%BSA的封闭缓冲液,置于37℃恒温水浴锅封闭2h,充分甩出封闭缓冲液。将酶标板置于自动洗板机中,按照所设定的程序(200μl洗涤缓冲液/孔,20s/次,重复3次)洗涤,拍干。

[0044] (3) 一抗血清孵育:使用含有1%BSA的PBST血清稀释液对待测血清进行稀释,稀释的比例为1:100,于封闭后的96孔酶标板分别加入50μl 稀释后的待测血清以及稀释后的阴阳对照血清,空白对照孔只加入血清稀释液,置于37℃水浴锅孵育1h,充分甩出孔中液体,置于洗板机中进行洗涤,洗涤结束后拍干。

[0045] (4) 二抗孵育:将辣根过氧化物酶标记的重组蛋白A(HRP-rec-Protein A)作为二抗,使用含有1%BSA按照1:3000比例稀释充分混匀后,分别加入96孔酶标板,每孔50μl,置

于37℃水浴锅孵育1h,后弃去孔中液体,PBST洗液洗板3次,拍干。

[0046] (5)显色:每个反应孔加入50 $\mu$ l混合反应液,置于37℃水浴锅避光显色30min至绿色产物出现。

[0047] (6)终止反应:终止液每孔25 $\mu$ l,然后使用酶标仪测定其吸光度值OD<sub>405nm</sub>处,以空白对照孔调零后测各孔OD值。

[0048] 4. 统计分析方法

[0049] 本发明使用Mann-Whitney U检验用于分析测试组两组间自身抗体含量水平的差异。采用非参数检验(Kruskal-Wallis)比较验证组中三组自身抗体含量水平的差异。以特异度高于90%时,灵敏度最高作为截断值,高于此值判定为阳性,低于此值判定为阴性。采用两个或者多个独立样本卡方检验对不同年龄组、肿瘤分期、有无转移、病理分型、肿瘤家族史等进行自身抗体阳性率比较。使用MedCalc12.0 软件进行ROC 曲线分析,根据曲线下面积(AUC)判断抗体对肺癌的鉴别能力。肿瘤标志物的参考范围分别为CEA(0-3.0ng/mL)、CA125(0.1-35U/mL)、CFYRA21-1(0-3.3ng/mL)。超过正常值上限判断为阳性。所有统计分析使用SPSS20.0软件进行, $P<0.05$ 为统计判断标准。

[0050] 5. 检测抗-ACR3自身抗体在肺癌诊断中的应用

[0051] (1)抗-ACR3自身抗体在肺癌中的诊断价值

[0052] 本发明用ELISA检测方法对测试组中184例肺癌患者血清和184例正常人血清进行抗-ACR3自身抗体水平的检测,结果显示,肺癌组抗-ACR3自身抗体水平显著高于正常对照组( $P<0.001$ ,如图1A所示)。通过对自身抗体阳性率的比较,肺癌组阳性率(31.5%)明显高于正常对照组(9.8%),两组间差异有统计学意义( $P<0.001$ )。抗-ACR3自身抗体肺癌对于正常人的AUC及95%可信区间为0.787 (0.742-0.828)(如图1B所示),灵敏度和特异度分别为31.5%和90.2%。

[0053] (2)抗-ACR3自身抗体对肺癌组与非肺癌组(正常对照组+良性肺病组)的鉴别能力

[0054] 验证组中抗-ACR3自身抗体水平含量在肺癌组高于正常对照组和良性肺病组,组间差异有统计学意义( $P<0.001$ ,如图2所示)。肺癌组对于正常对照组的AUC及95%可信区间为0.642(0.609-0.673),肺癌组对于良性肺病组的AUC及95%可信区间为0.639(0.598-0.679),肺癌组对于非肺癌组(正常对照组+良性肺病组)的AUC及95%可信区间为0.641(0.611-0.671)(如图3所示)。本发明提示,抗-ACR3自身抗体可以很好地将肺癌组与非肺癌组(正常对照组+良性肺病组)区别开来。

[0055] (3)抗-ACR3自身抗体对早期肺癌诊断价值

[0056] 通过对抗-ACR3自身抗体所有临床资料(年龄、性别、分期、病理类型、转移情况、肿瘤家族史、吸烟、饮酒)的阳性率进行分析,结果显示抗-ACR3自身抗体在早期肺癌(I期和II期)中的阳性率(36.4%)明显高于晚期肺癌(III期和IV)中的阳性率(15.2%),两组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。其他结果显示在不同临床特征的自身抗体阳性率差异无统计学意义。抗-ACR3自身抗体在不同分期中的ROC结果显示,早期肺癌对正常人的曲线下面积AUC及95%可信区间是0.699 (0.656-0.741),晚期肺癌对正常人的曲线下面积AUC及可信区间是0.580(0.539-0.620)(如图4所示)。通过Medcalc软件比较两组间的AUC,结果显示两组间差异无统计学意义。

[0057] (4) 抗-ACTR3自身抗体联合传统肿瘤标志物对早期肺癌的检测价值

[0058] 本发明对早期肺癌患者血清中CYFRA21-1、CEA和CA125的阳性率及三种标志物分别与抗-ACTR3自身抗体联合检测的阳性率进行分析,选取117例CA125(I/II期20例,III/IV期97例),132例CEA(I/II期21例,III/IV期111例),115例CYFRA21-1(I/II期17例,III/IV期98例)。CA125、CEA和CYFRA21-1在早期肺癌中的阳性率分别为20%、28.6%和23.5%。当抗-ACTR3自身抗体与CA125、CEA和CYFRA21-1分别结合时可明显提高早期的检出率。抗-ACTR3自身抗体与CA125,抗-ACTR3自身抗体与CEA,抗-ACTR3自身抗体与CYFRA21-1联合检测在早期肺癌中的阳性率分别为50%,57.1%和47.1%,其中抗-ACTR3自身抗体与CEA联合检测的阳性率最高。

[0059] 本发明结果提示,抗-ACTR3自身抗体可以作为早期肺癌的诊断生物标志物,及其在制备用于肺癌血清学检测的试剂或试剂盒中的应用。

[0060] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。



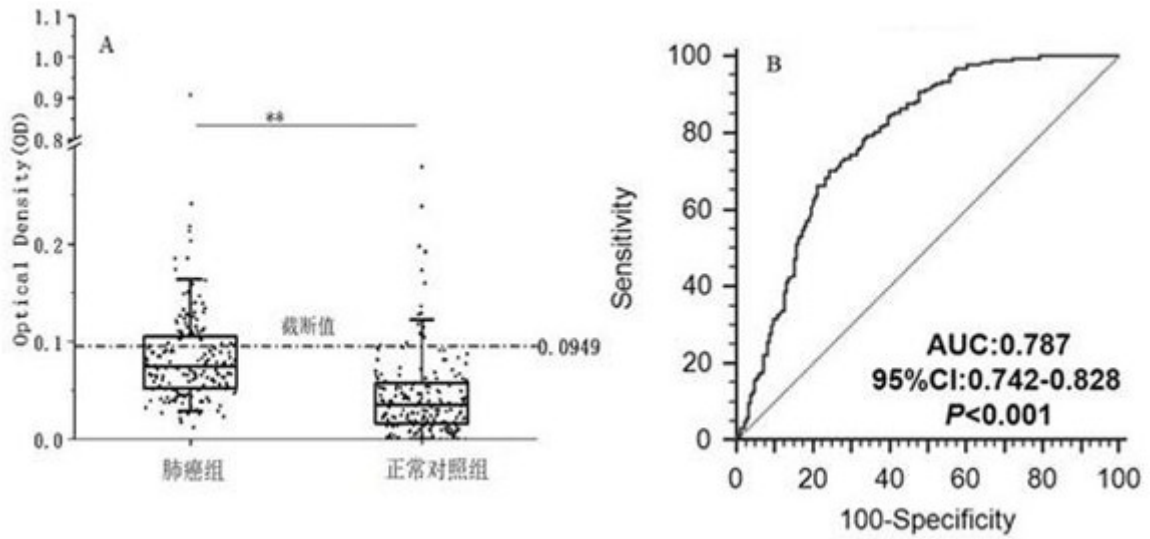


图1

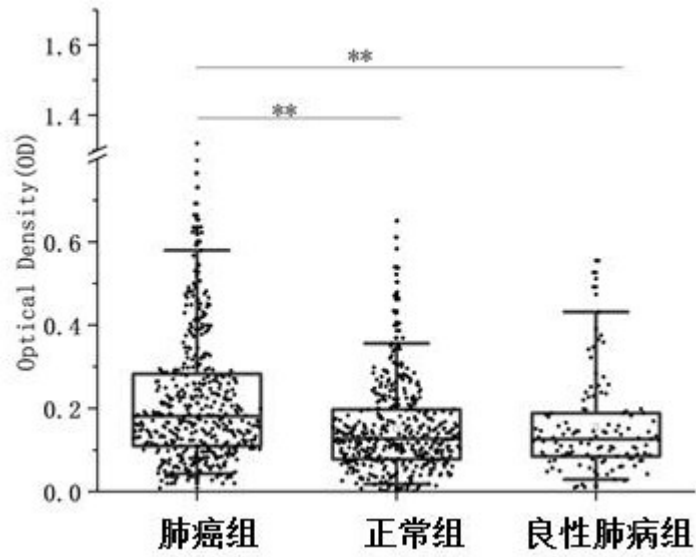


图2

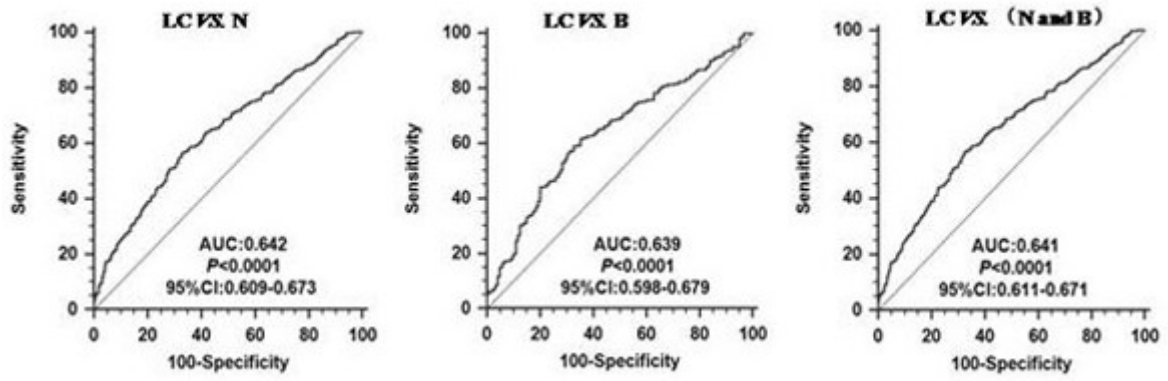


图3

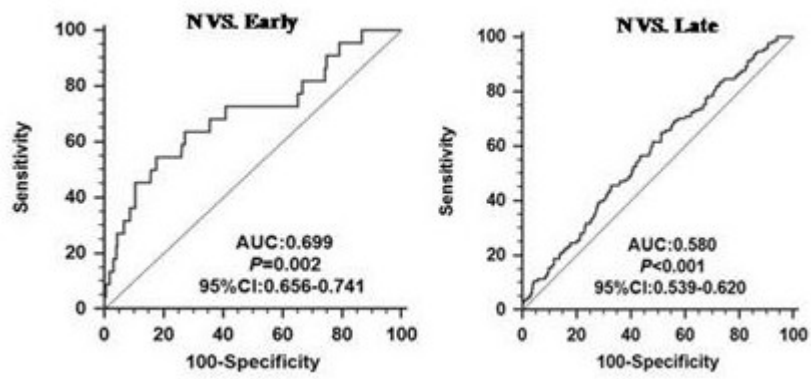


图4