



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I399541B1

(45) 公告日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 21 日

(21) 申請案號：098117727

(22) 申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 27 日

(51) Int. Cl. : G01N33/574 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(71) 申請人：國立台灣大學 (中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)

臺北市大安區羅斯福路 4 段 1 號

(72) 發明人：阮雪芬 JUAN, HSUEH FEN (TW) ; 陳炯年 CHEN, CHIUNG NIEN (TW) ; 曾建偉 TSENG, CHIEN WEI (TW) ; 張金堅 CHANG, KING JEN (TW)

(74) 代理人：洪堯順

(56) 參考文獻：

JP 10-90262A

US 20050009094A1

US 20060194211A1

Chia-Hsin Chan et al, "Subcellular and Functional Proteomic Analysis of the Cellular Responses Induced by Helicobacter pylori", Molecular & Cellular Proteomics, 2006, volume 5, pages 702-713.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：30 共 0 頁

(54) 名稱

檢測一胃癌預後程度的方法

METHOD FOR PROGNOSIS OF GASTRIC CANCER

(57) 摘要

由於習知胃癌腫瘤標記在胃癌診斷上的敏感度及專一性都不高，本發明提供一種檢測一胃癌預後程度的方法，其步驟包括：提供一生物樣品；檢測該生物樣品中 14-3-3 β 含量；其中，該生物樣品中 14-3-3 β 含量高於正常個體取得樣品之測定量，代表該胃癌之預後狀況不良。由於 14-3-3 β 作為腫瘤標記具有較高的敏感度及準確性，因此更適於作為胃癌診斷上的工具。

The 14-3-3 β protein is used herein as a tumor marker for prognosis in gastric cancer. The method comprises steps of providing a biological sample, qualifying the 14-3-3 β level in the sample, and comparing the 14-3-3 β level in the sample with a normal sample. Upon the 14-3-3 β level in the biological sample is higher than in the normal sample, which represents the patient providing the sample has a poor prognosis. Having the higher sensitivity and specificity, 14-3-3 β can be used as a tumor marker for prognosis of gastric cancer.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種偵測預後程度的方法，特別是關於一種檢測一胃癌預後程度的方法。

【先前技術】

根據世界衛生組織（WHO）估計，胃癌是全世界排名第四個最普遍被診斷的癌症，而且是所有癌症死亡率排名第二高，被視為國際間重要的健康危機。胃癌的分類可分為早期胃癌(early gastric cancer)及進行性胃癌(advanced gastric cancer)，臨床表現症狀則是模糊且不具特異性。在過去，約有 80%罹患胃癌的病人常在診斷出胃癌時，已處於進行性胃癌的情況，且可能在手術後再度遭遇腫瘤復發的情況。過去研究發現，晚期與末期的病患之五年存活率不到 35%。因此，胃癌早期偵測以延長病人的存活率是非常重要的。其中，血清學上的腫瘤標記(tumor marker)則是一種簡便、節省成本的檢測方法，非常適用於早期無徵狀患者的胃癌檢測方面。

目前來說，胃癌診斷上有一些腫瘤標記陸續被發現，例如癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、CA19-9(carbohydrate antigen)、CA72-4(carbohydrate antigen 72-4)，但許多研究指出此些腫瘤標記對胃癌診斷上的敏感度(sensitivity)及專一性(specificity)都不高，往往造成診斷上的誤判及困難。因此，具有高敏感度及專一性的生物標記，對於加強胃癌病患的早期偵測及診斷都具有極大的價值。

14-3-3 是一種酸性蛋白，大小約 25-30kDa，主要存在於腦部和神經系統中，也在心、肝、腎、小腸和睪丸等組織中表達，也有少數存在於細胞膜、細胞核以及高爾基體、線粒體、葉綠體等細胞器中。在哺乳類動物中具有至少七種亞型，分別

是 β 、 γ 、 ε 、 σ 、 ζ 、 τ 、 η ，而其中 β 及 γ 的磷酸型則分別被命名為 α 、 δ 亞型。14-3-3 β 的功能廣泛，包含代謝，細胞週期的控制，訊息傳導，細胞凋亡，蛋白運送，轉錄，壓力反應及惡性轉型等。目前已知它和超過兩百種的受質結合，涵蓋細胞內幾乎所有的反應。根據目前研究，雖然已知 14-3-3 β 與數種疾病如阿茲海默症(Alzheimer's disease)、巴金森氏症(Parkinson's disease)有關，但與人類癌症較為相關的主要僅有 14-3-3 σ ，與乳癌、胃癌等各種上皮癌症(epithelial cancer)的發生有關。

【發明內容】

然而，習知胃癌偵測之相關生物標記對胃癌診斷上的敏感度及專一性都不高，往往造成診斷上的誤判及困難。因此，極需一種具有高敏感度及專一性的生物標記，以應用於檢測胃癌病患的胃癌預後程度。

緣此，本發明之一目的即是提供一種檢測一胃癌預後程度的方法。

本發明之另一目的即是提供一種化合物抑制生物樣品表現 14-3-3 β 之有效性的方法。

本發明之又一目的即是提供一種檢測套組，係包含一有效量之 14-3-3 β 抗體，用於檢測胃癌有發展為腫瘤侵入或遠處轉移之危險性。

本發明為解決習知技術之問題所採用之技術手段係為利用 14-3-3 β 蛋白質作為腫瘤標記以偵測胃癌的方法，其步驟包括：提供一生物樣品；檢測該生物樣品中 14-3-3 β 含量；其中，該生物樣品中 14-3-3 β 含量高於正常個體取得樣品之測定量，代表該胃癌之預後狀況不良。

本發明所採用之技術手段更包括一種檢測化合物抑制生

物樣品表現 14-3-3 β 之有效性的方法，其步驟包括：使一化合物與一表現 14-3-3 β 之生物樣品接觸；檢測 14-3-3 β 在該生物樣品的表現量；其中，當接觸後該生物樣品之 14-3-3 β 表現量低於未接觸前的表現量，則顯示該化合物對於抑制生物樣品表現 14-3-3 β 是有效。

另外，基於上述方法可發展出一種檢測套組，包含一有效量之 14-3-3 β 抗體，用於檢測胃癌有發展為腫瘤侵入或遠處轉移之危險性。

經由本發明所採用之技術手段，證實了 14-3-3 β 不僅是與胃癌相關的一個重要腫瘤基因，在胃癌診斷上相較於 CEA(敏感度=33%)，14-3-3 β 具有更高的敏感度(敏感度=83%)，且 14-3-3 β 在預後存活率分析上也具有較佳的準確性，故 14-3-3 β 比 CEA 更適於作為胃癌診斷上的工具。同時，以 14-3-3 β 作為血清學上的腫瘤標記，具有簡便、節省成本的優點，也適用於早期無徵狀患者的胃癌檢測，以及手術後之預後情況分析。

本發明所檢測抑制 14-3-3 β 的化合物，可以用數種已熟知的組合資料庫方法獲得。這些資料庫包含胜肽、類胜肽(peptoid)肽模擬物(peptidomimetics)、核酸，對 14-3-3 β 表現具抑制效果之小分子或其他藥物。當在活體外實行本發明之方法，胃癌細胞可衍生自胃癌細胞系。適合的胃癌細胞系之實例包括 AGS 細胞株、KATO III 細胞株、TSGH 細胞株、SC-M1 細胞株、及 N87 細胞株。個體體內之 14-3-3 β 表現量可在活體內或活體外測定，例如，14-3-3 β 量可在體外藉得自個體之生物樣本而測定，如投藥化合物前及後之腫瘤固體組織樣本、排泄物、血液或消化液。測定個體中 14-3-3 β 表現量之其它方法係描述於此中。化合物治療胃癌的能力可在活體內藉投藥化合物至罹患胃癌之動物並測定此化合物對腫瘤大小，生長或轉移潛力之影響而確認。

本發明所採用的具體實施例，將藉由以下之實施例及附呈圖式作進一步之說明。

【實施方式】

定義

發明所使用的「腫瘤標記」，係指與惡性腫瘤細胞相關之特殊蛋白質，由癌症細胞本身釋放到血液中或為癌症細胞誘發其他細胞釋放出的特殊蛋白質，在癌症發生時逐漸地在人體血液中升高。

本發明所使用的「預後」，係指預測疾病的可能病程和結局。其既包括判斷疾病的特定後果(如康復、某種症狀、體徵和併發症等其它異常的出現或消失及死亡)。

本發明所使用的「胃癌」，係指由人體胃部的黏膜細胞不正常的繁殖與增生所形成，例如胃腺癌(adenocarcinoma)即是最常見的胃部惡性腫瘤。

本發明所使用的「早期胃癌(Early gastric cancer)」，係侷限於胃黏膜層或黏膜下層侵潤的胃腺癌。

本發明所使用的「進行性胃癌(Advanced gastric cancer)」，係指癌細胞侵犯已超過黏膜下層，侵入胃壁肌肉層、或穿出胃壁肌肉層(固有肌肉層)，甚至侵犯到胃周圍的局部淋巴結。

本發明所使用的「腫瘤浸潤」，是指惡性腫瘤細胞在質和量方面異常地分佈於組織間隙的現象，如腫瘤細胞粘連、酶降解、移動、基質內增殖等一系列過程的表現。

本發明所使用的「腫瘤遠處轉移」，係指腫瘤細胞從原始發生的部位經由侵入循環系統，轉移到身體其他部位繼續生長的過程，也稱作惡性轉移。

本發明所使用的「血管侵犯」，係只有當腫瘤細胞及紅血球同時發現在平滑肌層中的血管中皮層覆蓋的空間。

本發明所使用的「器官侵犯」，係當腫瘤直接侵入至少一個周邊結構例如十二指腸、食管、肝臟、結腸系膜或橫隔膜。

本發明所使用的「切除手術」，係指以外科手術進行胃部腫瘤組織切除，切除之範圍是根據腫瘤發生之位置、大小、肉眼觀型態及無殘留癌細胞為目的

本發明所使用的「化學治療」，係指用化學抗癌藥物抑制癌細胞的生長，作為治療癌症的方式。

本發明所使用的「放射線治療」，係指使用放射線對抗快速生長分裂的癌細胞，作為直接或輔助治療癌症的方式。

本發明所使用的「分期」，係指依據胃癌之原始腫瘤大小(T)，局部淋巴腺轉移的有無(N)，以及遠處轉移的與否(M)，分為0(原位癌)、I(又可分成 IA、IB)、II、III(又可分成 IIIA、IIIB)、IV 五個等級。

本發明所使用的「癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)」是只存在胚胎時期的胚胎抗原，可溶於酸性的醣蛋白其醣質含量 40%~60%，正常參考值為 <5.0 ng/ml。大部分是由惡性腫瘤所分泌，為癌症存在的標記，如大腸癌、直腸、胃癌、乳癌、胰臟癌、肺癌，在臨床上可作為大腸直腸癌的診斷、鑑別、治療或復發的工具。

本發明所使用的「分離的」，係指多肽或蛋白質，是基本上從其自然環境成分中分離出。較佳分離的多肽或蛋白質是一種與其天然環境成分相比至少百分之九十五重量以上的相同的多肽或蛋白質構成，最佳是該分離的多肽或蛋白質為同質組合物，通過基於分子量和等電點的二維電泳常規分離，其能夠被分辨成單個的點。通過常規的二維電泳分離對本發明所屬技術領域中通常知識者是習知的。

本發明所使用的「正常樣品」或「正常組織」，是代表無疾病或正常的細胞、組織、血液或血清，將患者樣品的測量值與其對照，以確定 14-3-3 β 蛋白質含量是否少量，或者在患者樣品中的含量是否過量。正常樣品的來源可以由患者本身腫瘤處鄰近的正常組織中取得。較佳地，正常樣品中關於 14-3-3 β 蛋白質含量是與患者樣品中相應值，基本上相同的實驗條件

下獲得。正常樣品可以來自與患者樣品同種組織，或不同組織類型，獲得該正常樣品的健康個體可以選擇與患者具有相符合的特徵，例如年齡、性別、種族等。基本上，在本發明的測定中，將患者樣品中 14-3-3 β 蛋白質含量與正常樣品中相應的值比較，該正常樣品預先製成表格並提供平均範圍、平均值和標準偏差，或類似表達方式。

本發明所使用的「組織樣品」或「生物樣品」或「患者樣品」或「患者細胞或組織」，皆是指從患者的組織中獲得相似的細胞集合。組織樣品的來源可以是新鮮、冷凍及/或保存的器官或組織樣品；血液或任何血液成分；體液如腹水或組織液。

實施例 1

比較人類胃癌細胞株 SC-M1 細胞在以抗癌藥物 5-FU(5-fluorouracil)處理後之蛋白質表現差異

本發明係利用蛋白質體學方法鑑定出胃癌細胞株 SC-M1 在以抗癌藥物 5-FU(5-fluorouracil)處理 48 小時後 14-3-3 β 之表現量變化，參閱第 1a~1d 圖

細胞培養

本實施例所使用之人類胃癌細胞 SC-M1，係以 RPMI-1640 培養基加上 10% 胎牛血清(FBS，購自 Invitrogen Carlsbad, California, U.S.A.)及 100 U/ml 青黴素(penicillin)、100 μ g/ml 鏈黴素(streptomycin)及 2.5 μ g/ml amphotericin (購自 Hyclone, Logan, Utah, U.S.A)，在 37 $^{\circ}$ C、二氧化碳濃度為 5%之環境下培養，每 2-3 天進行繼代培養。

二維電泳(2-DE)及影像分析

為了比較在抗癌藥物 5-FU 處理後，胃癌細胞 SC-M1 內蛋白質表現量的差異，將 5-FU 處理過的實驗組胃癌細胞 SC-M1 細胞及未處理的控制組細胞，以二維電泳進行分析。在進行二維電泳時，將 500 μ g 之實驗組與控制組蛋白質樣品加入 65mM 的二硫赤鮮醇(DTE)以及 0.5% (v/v) IPG 緩衝液，於室溫下處理 1 小時，再以 14000g 離心 30 分鐘。蛋白質點以二維電泳分

離時，先進行等電點沉澱(IEF)，以 18cm 膠條(pH 4-7)於 20°C、8000V 條件下，以 IPGphor (購自 Amersham Pharmacia Biotech) 共進行 91.2KVhr。接著將膠條轉至 12.5% 無梯度 SDS-PAGE 進行二維分離。所得影像利用 ImageMaster software version 6.0 (購自 Amersham Pharmacia Biotech) 進行蛋白質偵測及定性。每個蛋白質點的強度係以膠體中蛋白質點總量進行標準化校正，以相對蛋白質點體積(%V)表示。

膠體內水解及質譜儀分析

將蛋白質由膠體中切下經由質譜儀分析。蛋白質係利用 MASCOT 資料庫(<http://www.matrixscience.com/>) 進行確認。對於經確認的蛋白質，各蛋白質的 $[-10\log(P)]$ 之得分必須超過閾值($p < 0.05$)。

在實驗組胃癌細胞 SC-M1 細胞以抗癌藥物 5-FU 處理後，利用 Alamar Blue assay 計算細胞的增生及存活率，發現實驗組胃癌細胞 SC-M1 之細胞存活率在加入 5-FU 後明顯降低。以 5-FU 處理之組別(第 1a 右圖)及其控制組(第 1a 左圖)之二維電泳影像在經過軟體分析後(Mascot searching)，確認有 18 個表現顯著具有差異之蛋白質點，各個蛋白質點所對應之功能性列出如下列表 1 所示。

表 1

蛋白質點	編號	蛋白質名稱	計分	分子量 (Da)	等電點 (PI)	相符查詢	範圍 (%)	分子功能	倍數 (T/C)
負調控									
1	P14625	內質網素[前驅物]	229	92411	4.76	5	9	抗細胞凋亡	0.997
2	P08865	40S 核糖體蛋白 SA	252	32702	4.79	4	16	細胞貼附	0.262
3	Q07021	補體成分 1, Q 次成分結合蛋白 Mit	155	31343	4.74	2	12	免疫反應	0.613
4	P08758	鈣依賴性磷脂結合蛋白 Annexin A5	203	35783	4.94	4	14	抗細胞凋亡、信號傳遞	0.211

5	P62258	14-3-3 蛋白質 epsilon	106	29155	4.63	3	11	細胞內信號 級聯	0.044
6	P31946	14-3-3 蛋白質 beta/alpha	63	27934	4.76	1	5	Ras 蛋白信 號傳遞	N/A
7	P61978	異質性核糖核 蛋白 K	61	50944	5.39	1	2	mRNA 剪 接、信號傳 遞	0.543
8	P05783	角蛋白第 I 型、細胞骨架 18	56	47897	5.34	2	5	細胞凋亡負 調控	N/A
9	P05783	角蛋白第 I 型、細胞骨架 18	53	47897	5.34	2	5	細胞凋亡負 調控	N/A
10	P47756	肌動蛋白加帽 蛋白 beta 次 單元	109	31200	5.36	2	5	細胞移動	0.340
11	P04792	熱休克蛋白 beta-1(HSP 27)	151	22768	5.98	2	13	細胞移動	N/A
12	P09211	穀胱甘肽 S- 轉移酶 P	290	23210	5.44	4	31	抗細胞凋亡	0.543
正調控									
13	P35908	角蛋白第 II 型、細胞骨架 -2	69	65825	8.07	1	2	角質細胞活 化、移動、 增生	1.002
14	P52565	Rho GDP-解 離抑制蛋白-1	167	23193	5.02	4	27	細胞移動、 負調控細胞 貼附	15
15	P11142	熱休克同源蛋 白 71	272	70854	5.37	4	10	蛋白質結合	1.167
16	P08107	熱休克蛋白 70-1	254	70009	5.48	5	9	抗細胞凋亡	N/A
17	P15311	埃茲蛋白 (Ezrin)	174	69239	5.95	5	7	形成肌動蛋 白束	N/A
18	P04406	甘油醛 3-磷酸 去氫酶	216	35899	8.58	4	16	糖解作用	1.665

從表 1 可發現該些蛋白質主要相關功能為抗細胞凋亡、細胞遷徙、信號傳遞、細胞骨架、細胞貼附及 Ras 蛋白信號傳遞，此些功能皆與腫瘤形成有關。其中 14-3-3 β 在抗癌藥物 5-FU 處理之實驗組胃癌細胞 SC-M1 細胞中，其表現量明顯受到抑制

(參閱第 1b、1c 圖，14-3-3 β 為箭頭所指處，而右方為 5-FU 處理之實驗組，左方為其控制組)。

蛋白質萃取

為了進一步確認 14-3-3 β 在抗癌藥物 5-FU 處理之實驗組胃癌細胞 SC-M1 細胞中，其表現量明顯受到抑制，萃取實驗組蛋白質樣品，以西方墨點法進行確認。

將實驗組及控制組細胞樣品溶於含有 7M 的尿素、4M 的 CHAPS 界面活性劑及 2M 的硫脲中，並以超音波震盪。以 13200g 離心 30 分鐘，以蛋白質檢測套組(購自 Bio-Rad, Hercules, CA)測量其蛋白質濃度。

西方墨點法

以 SDS 膠體電泳(*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)將蛋白質樣品進行分離，並轉移至 PVDF 膜(*polyvinylidene difluoride membrane*，購自 Millipore Corp, Bedford, MA)上。在 PBS 中以 5% 脫脂牛奶進行阻斷步驟，將抗 14-3-3 β 的一級鼠單株抗體(購自 Abcam, Cambridge, U.K.)，以 1:1000 濃度在 4°C 下隔夜處理。再以羊抗鼠 HRP 連結 IgG 的二級抗體(購自 Sigma)，以 1:8000 的濃度處理。最後以 ECL 偵測套組(購自 Pierce, Boston Technology, Woburn, MA)進行顯色，並以 X 光底片進行曝光。

經由西方墨點法確認，其表現量之倍數關係如第 1d 圖所示。由圖中可看到在無抗癌藥物處理以及經過抗癌藥物 5-FU 處理之實驗組胃癌細胞 SC-M1 細胞中 14-3-3 β 表現量差異為 2.55 倍(2.55 ± 0.27 , $p=0.05$)。可確認 14-3-3 β 表現量在胃癌細胞 SC-M1 細胞加入抗癌藥物 5-FU 後明顯受到抑制，因此，選擇 14-3-3 β 蛋白質作為檢測標的。

實施例 2

比較胃腫瘤與正常組織之 14-3-3 β 表現量差異

本實施例中所使用的胃組織係以 40 對腫瘤及正常組織作

為對照。

組織及血液樣品

本發明所有人類組織樣品及血清樣品皆經由人體試驗委員會(IRB)所核准。本實施例中使用之 40 對腫瘤及正常組織的樣品皆是在手術後 30 分鐘取得後即保存於液態氮中。黏膜樣品係取自至少遠離腫瘤之邊界 3 公分處。

蛋白質萃取及西方墨點法分析

組織樣品在取下後立即以液態氮冷凍保存。所有組織樣品於 -50°C 以空氣乾燥，在液態氮中磨碎均質化。萃取其蛋白質，超音波震盪、離心及量測其蛋白質濃度。將該 40 對樣品之蛋白質經萃取後以前述之西方墨點法進行分析。

結果參閱第 2a、2e 圖所示，其中第 2e 圖係顯示 40 組腫瘤組織(T)及正常組織(N)中 14-3-3 β 之西方墨點法結果；第 2a 圖係將顯示第 2e 圖中的電泳結果定量並經過 β -actin校正後之統計結果。結果顯示出胃癌組織的 14-3-3 β 表現量明顯地較正常組織更高($p=0.03$)。

免疫組織染色

將玻片上的石蠟包埋組織再水化，並以 3%過氧化氫阻斷內生性過氧化酶之活性。將樣品於馬血清中以 1:20 濃度比，室溫下進行阻斷 20 分鐘。將樣品以鼠抗人之 14-3-3 β 單株抗體(購自 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)，以 1:100 之濃度於 4°C 下隔夜處理。將樣品以 PBS 清洗三次後，加入驢抗鼠 IgG HRP 標記二級抗體(購自 Santa Cruz Biotechnology)於室溫下處理 30 分鐘。將切片以二氨基聯苯胺染色，清洗後以蘇木素複染，清洗後脫水，再以二甲苯處理並固定。

參閱第 2b~2d 圖，係分別顯示正常組織(第 2b 圖)、腸道形腫瘤組織(第 2c 圖)及混合型腫瘤組織(第 2d 圖)之免疫組織染色結果(放大 200 倍)。在腫瘤組織中，14-3-3 β 係在癌細胞之細胞核及細胞質中呈現陽性染色。由第 2b 圖中可看到正常胃部組織中表現出微量的 14-3-3 β ，第 2c、2d 圖中的腸道形

腫瘤組織及混合型腫瘤組織之 14-3-3 β 表現量明顯高於正常胃部組織。故可從免疫組織染色實驗中再次確認腫瘤組織中 14-3-3 β 表現量高於正常組織的結果。

實施例 3

胃癌患者與正常人血液中 14-3-3 β 的含量測定

血液樣品

本實施例所使用之血液樣品係經過病患之同意。血液樣品係在手術前取自 145 位胃癌病患、63 位控制組人員(38 位男性及 25 位女性，平均年齡在 46.2 歲)，包括 19 位經內視鏡診斷為胃炎患者，19 位非胃炎性消化不良者，及 25 位無胃部異常的自願者。本實施例所使用之血清樣品係保存於 -20°C 。其中該 145 位胃部癌病患係在 2001 年 7 月至 2006 年 3 月間進行根治性胃切除術(其人口統計學結果參表 2 所示)。

表 2

表.2 胃癌患者之人口統計學結果		
	患者數目	%
年齡、歲數		
中位數	67	
範圍	29-89	
性別		
男性	89	61
女性	56	39
分期		
I 及 II	60	41
III 及 IV	85	59
腫瘤侵入深度		
T1	17	12
T2	42	29
T3	80	55
T4	6	4
淋巴結轉移		
N0	42	29
N1	63	43
N2	30	21

N3	10	7
遠端轉移		
M0	120	83
M1	25	17
勞倫分類(Lauren classification)		
瀰漫型	75	52
腸胃道型	68	48
器官侵入		
陰性	106	73
陽性	39	27
血液侵入		
陰性	30	23
陽性	100	77
腹膜侵入		
陰性	124	86
陽性	21	14

在此主要根據 TNM 系統進行分期，進行切除的標準包括完整原生性胃腫瘤的切除，局部淋巴結切除的 D2 切除手術，且無巨觀腫瘤的存在，且該此些病患在手術時並未觀察到肝、肺及遠端器官之遠端轉移；未表現有其他先前的或共伴的腫瘤，而在手術進行前也未接受過化學治療或放射線治療。臨床病理因素包括年齡、性別、腫瘤種類(Borrmann 分類)、腫瘤組織學分類(Lauren 分類)、腫瘤侵入深度、淋巴結轉移情形、血液侵入及腫瘤大小(腫瘤的長 x 寬)，參考其組織學發現並紀錄於病患資料庫。手術後對病患持續追蹤 3 到 46 個月。追蹤期間係以手術後存活期作為計算。將血液中 14-3-3 β 含量與前述臨床結果進行評估。

酵素免疫分析法(ELISA)

為量測血清中 14-3-3 β 含量，在此利用酵素免疫分析法。以抗 14-3-3 β 的單株抗體(4 μ g/ml, Abcam, Cambridge, U.K.)置於結合有卵白素(streptavidin)之 96 孔盤 4 $^{\circ}$ C 下隔夜處理。將 96 孔盤清洗後以 5%濃度的脫脂奶粉於 PBS 中處理 2 小時進行阻抗。阻抗完成後，將 14-3-3 β 標準抗原及所有血清樣品(1:400)

置於盤中處理 3 小時。將 96 孔盤清洗後再以抗 14-3-3 β 之多株抗體(0.08 $\mu\text{g/ml}$, Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) 處理 2 小時。為偵測抗原-抗體複合體，加入 100 μl 之羊抗兔 HRP 連結 IgG 多株抗體(0.04 $\mu\text{g/ml}$)處理 1 小時。將 96 孔盤清洗後加入四甲基聯苯胺 (TMB, Bionova Biotechnology, Dartmouth, NS, Canada)處理 30 分鐘。直到加入 2M 硫酸中止反應。14-3-3 β 及未知樣品之蛋白質濃度可利用 ELISA 讀取器量測 450 及 570 nm 吸光值得到。

CEA 血清分析

血清中癌胚抗原 (CEA) 含量可利用放射免疫檢定套組 ELSA2-CEA (CIS bio international, France) 測得。在此係利用一種固相雙位放射免疫檢定法，以單株抗體辨認 CEA 分子距離較遠的抗原部位：一株結合於 ELSA 固相上，另一株則標記以碘 125 以用於追蹤。CEA 濃度在控制組中為 0.4-0.64 ng/ml。

參閱第 3a、3c 圖，其中第 3a 圖顯示以 ELISA 方法分析 145 個胃癌患者(第 I~IV 期)及 63 個正常人血液中 14-3-3 β 含量之結果，而第 3c 圖係顯示其 CEA 含量之結果。如圖所示，第 I 期胃癌病患之血液中 14-3-3 β 含量之平均值為 506 ng/ml，而其中位數為 424 ng/ml (n=23)。與 CEA 結果(n=23)作比較，第 I 期胃癌病患之血液中 14-3-3 β 含量明顯高於正常人 (p=0.05)，而此時血液中 CEA 含量則無顯著差異(p=0.297)。

同時參閱第 3b 圖，其顯示胃癌患者具有較高及較低 14-3-3 β 表現量與存活率之關係。將第 I 期胃癌病患分為兩組，以平均值(521 ng/ml)作為截斷值(n=28)。如圖所示，血液中 14-3-3 β 含量高於 521 ng/ml 者(實線表示)相較於血液中 14-3-3 β 含量低於 521 ng/ml 者(虛線表示)，14-3-3 β 含量較高者具有較低的存活率(p=0.039)。

實施例 4

各分期胃癌患者與正常人之 14-3-3 β 及癌胚抗原(CEA)間的關

連性

為分析 14-3-3 β 及臨床結果間的關連性，在此將病患根據臨床及病理參數，分為不同組別。學生 T 檢定(Student's t test)用以比較兩獨立母群的差異性。P 值小於 0.05 時具有統計上意義。在多個群組間比較時，係利用 one-way ANOVA(SAS 9.1 software)。數值變量的關聯性係利用 MedCalc software version 9.0，並以 p 值表現其關聯係數。

接收器操作特徵曲線 (receiver operating characteristic curve, 簡稱 ROC 曲線)，是目前廣為用來評估診斷工具準確性的統計方法，要了解一個診斷工具是否優於另一工具，只要比較兩者的 ROC 曲線下的面積(area under the curve, AUC)，AUC 值(大於 0，小於 1)代表強迫二選一(two-alternative-forced-choice)的情形下，診斷工具猜對有病者、無病者的機率。本實施例中用以作為 14-3-3 β 及癌胚抗原(CEA)的質體量之診斷工具，利用敏感度(sensitivity)對專一性(1-specificity)作圖以偵測不同分期之胃癌(第 I~IV 期)及正常人，並計算 ROC 曲線下的面積。

結果參閱第 4a~4e 圖，其中第 4a 圖為第 I 期胃癌患者的 14-3-3 β (第 4a 圖)及 CEA(第 4a 圖)之 ROC 曲線，第 4a 圖係顯示第 I 期胃癌病患 14-3-3 β 之 AUC 值為 0.75。而當以血清中 14-3-3 β 含量之決定最佳診斷的截斷點 cut-off point 為 329 ng/ml 作為胃癌之早期偵測指標時，其敏感度為 82%，而專一性為 65%。顯示出 14-3-3 β 適於作為胃癌之早期偵測指標。而四個不同時期的胃癌中，14-3-3 β 之 AUC 值皆高於癌胚抗原(CEA)，顯示出 14-3-3 β 測定胃癌比癌胚抗原(CEA)更準確，更適於作為診斷指標。

參閱第 4f~4h 圖，其分別顯示出胃癌患者在手術前血清中 14-3-3 β 含量與淋巴結轉移數目(第 4f 圖)、腫瘤大小(第 4g 圖)、腫瘤組織中 14-3-3 β 表現量(第 4h 圖)之關連性。如第 4f、4g 圖所示，其顯示出 14-3-3 β 與淋巴結轉移數目($r = 0.166$, $p = 0.045$)及腫瘤大小($r = 0.452$, $p < 0.001$)呈現高度關連性。並

且，手術前血清中 14-3-3 β 含量與腫瘤組織中 14-3-3 β 表現量呈現正相關性($r = 0.385, p = 0.033$)。另外，如表 3 之資料所示，血清中 14-3-3 β 含量與後期之胃癌($p=0.002$)、腫瘤侵入深度($p=0.008$)、腹膜侵入($p=0.045$)呈現較高的關連性。相較之下，與勞倫分類(Lauren classification) ($p=0.831$)、器官侵入($p=0.157$)及血液侵入($p=0.137$)之關連性較低。此些結果皆說明了 14-3-3 β 可能在胃癌腫瘤的侵入機轉扮演一重要角色。

表 3

	14-3-3 β			癌胚抗原 CEA		
	平均值	中位數	p	平均值	中位數	p
分期			0.002*			0.206
I 及 II (N = 48)	545.95	460.22		4.95	2.02	
III 及 IV (N = 70)	736.09	628.00		27.14	1.56	
腫瘤侵入深度			0.008*			0.767
T1 (N = 14)	468.47	434.39		4.41	2.88	
T2 (N = 35)	607.20	460.50		4.73	1.56	
T3 (N = 66)	736.56	651.33		28.54	1.53	
T4 (N = 3)	453.65	447.17		8.95	4.25	
淋巴結轉移			0.406			0.744
N0 (N = 33)	591.53	474.39		3.45	2.14	
N1 (N = 51)	650.25	532.17		38.25	1.95	
N2 (N = 25)	678.08	588.28		2.15	1.40	
N3 (N = 9)	899.61	853.28		2.19	1.06	
勞倫分類(Lauren classification)			0.831			0.129
瀰漫型(N = 60)	655.80	532.72		2.33	1.34	
腸胃道型(N = 57)	669.27	554.39		35.04	2.53	
器官侵入			0.157			0.429
陰性(N = 87)	629.19	517.17		10.74	1.73	
陽性(N = 31)	741.69	631.61		38.81	1.90	
血液侵入			0.137			0.182
陰性(N = 24)	596.36	481.89		4.32	2.80	
陽性(N = 81)	710.37	588.28		24.55	1.54	
腹膜侵入			0.045*			0.125
陰性(N=101)	623.13	517.17		20.81	1.90	
陽性(N = 17)	870.31	865.5		2.11	1.40	

實施例 5

14-3-3 β 與癌胚抗原(CEA)在胃癌患者存活率之關連性

利用建構 Kaplan-Meier 無復發存活及總體存活曲線以求得血清中 14-3-3 β 表現量及病患存活率。P 值小於 0.05 時具有統計上意義。成對學生 T 檢定(Paired Student's t test)係用以比較病患在手術前及手術後血清中 14-3-3 β 含量之變化。

參閱第 5a~5c 圖，係顯示出胃癌患者之 14-3-3 β 含量與存活率之關係。如第 5a~5b 圖所示，分別表示出將胃癌患者測定 14-3-3 β 含量，以具有較高敏感度(86%)及專一性(67%)之 14-3-3 β 含量(349 ng/ml)決定作為最佳診斷的截斷點，區分為較高(實線表示)及較低(虛線表示)兩群組後，比較其總體存活率(overall survival)及無復發存活率(recurrence-free survival)之關係。由圖中結果可看出，具有較高 14-3-3 β 含量之胃癌患者，無論在第 5a 圖的總體存活率(p=0.038)及第 5b 圖的無復發存活率(p=0.037)方面，表現都比較差。

另一方面，第 5c 圖顯示出胃癌病人手術前與手術後血液中 14-3-3 β 含量。如圖所示，胃癌病人在手術前 14-3-3 β 含量較高(平均值=579 ng/ml，中位數=515 ng/ml)，而在手術後胃癌病人之 14-3-3 β 含量則降低(平均值=427 ng/ml，中位數=378 ng/ml)，且明顯較手術前之 14-3-3 β 含量更低。

參閱第 5d~5e 圖，其顯示出胃癌患者癌胚抗原(CEA)含量與胃癌患者總體存活率及無復發存活率之關係。相對而言，患者之癌胚抗原(CEA)含量高於 3 ng/ml 者，與其總體存活率及無復發存活率並無明顯之關連性。顯示出 14-3-3 β 比癌胚抗原(CEA)更適於作為胃癌診斷之腫瘤標記。

實施例 6

在細胞中過度表現 14-3-3 β 與腫瘤侵入、轉移及生長之關係

將人類胃癌細胞 TSGH、SC-M1、N87、AGS 及 KATO III，以前述之方法步驟進行細胞培養以及西方墨點法分析。結果如

第 6a 圖所示，其顯示出各種不同胃癌細胞之內生性 14-3-3 β 表現量，其中 TSGH 細胞具有最高的 14-3-3 β 表現量。

構築 14-3-3 β 質體

自 TSGH 細胞中萃取出 RNA，並據以得到 cDNA，並以反轉錄聚合酶鏈結反應進行增殖，分別使用正向引子 5'-GGTACGTAAGCTTGCCACCATGACAATGGATAAAAAGT-3' 以及反向引子 5'-AGTCGAGAATTCTTAGTTCTCTCCCTCCCC-3'。將產物片段插入 pcDNA 載體(Invitrogen Inc.)中，將此 pcDNA/14-3-3 β 載體進行人類胃癌細胞之瞬時及永久性轉染。

質體轉染

將 6×10^5 個 AGS 細胞培養在 6 孔培養皿(37°C, 24 小時)。再以 14-3-3 β 載體及控制組載體以 Opti-MEM 轉染試劑(購自 Gibco)對 AGS 細胞進行轉染。8 μ g 的質體 DNA(pcDNA3/14-3-3 β 或 pcDNA3)與 10 μ l 的 lipofactamine 2000 試劑混合，並依照使用說明進行轉染步驟。

結果如第 6b 圖所示，其顯示出以空白載體 pcDNA3 及 pcDNA3/14-3-3 β 表現載體轉染後之 14-3-3 β 的表現量，由結果可看出經由 pcDNA3/14-3-3 β 表現載體轉染後，細胞中 14-3-3 β 表現量明顯較高(大約 2 倍)。

以 Boyden Chamber Assays 進行侵入及轉移測試

分別評估人類 14-3-3 β 表現量及控制組空白載體轉染至 AGS 細胞之 14-3-3 β 表現量。轉移測試係以修正的 Boyden chamber 以及 PVDF 聚碳酸濾膜(孔徑=8 μ m)，而侵入測試係以塗佈基質膠(35 μ g, BD Biosciences)進行。轉移測試首先加入約 2.5×10^4 個細胞至 100 μ l 之培養基於上層室並使細胞貼附、染色，並以光學顯微鏡(購自 Olympus)在 48 小時後觀察及計數。

將結果整理如第 6c、6d 圖所示，可看出在以 14-3-3 β 表現載體進行轉染之細胞在 14-3-3 β 過度表現時，同時促進了胃

癌細胞的侵入能力(invasion)及轉移能力(migration)。

以 MTT Assay 測定細胞增殖作用

MTT 分析法是一種常見用於分析細胞增生(cell proliferation)、存活率(percent of viable cells)以及細胞毒性(cytotoxicity)的分析方法。其中，MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide)為一黃色染劑，它可被活細胞吸收並被粒腺體中的琥珀酸四唑還原酶(succinate tetrazolium reductase)還原成不溶性且呈藍紫色的甲臍(formazan)，因此藉由甲臍(formazan)形成與否，即可判斷並分析細胞之增生。

將細胞(5×10^4 個)培養於 24 孔盤中 24 小時，並以 14-3-3 β 表現載體及控制組空白載體(3 μg)進行轉染 24 及 48 小時。在培養時每 1 ml 加入 100 μg 之 MTT 試劑。置於 37°C 下 4 小時之後，加入 DMSO(500 $\mu\text{l/well}$)以溶解所形成的甲臍(formazan)沉澱物，靜置 10 分鐘。以 ELISA 讀取儀量測波長為 570 nm 之光學密度(OD)值，並在各實驗組分別進行四次。

將結果整理如第 6e 圖所示，可看出在當以 14-3-3 β 表現載體進行細胞轉染時，胃癌細胞的增殖能力(cell growth)較佳，可推知 14-3-3 β 的過度表現可促進胃癌細胞的增殖能力(cell growth)。

經由上述實施例所揭露之內容，可知 14-3-3 β 的表現量在胃癌組織樣品比正常組織樣品更高，同時在血液樣品中也得到相似的結果。在比較胃癌病人與正常人的 14-3-3 β 表現量結果來看，可觀察到胃癌病人血液中 14-3-3 β 含量比正常人更高，並且其 14-3-3 β 含量增加的程度也隨著胃癌分期而增加。而從胃癌的預後來看，也觀察到在手術後 14-3-3 β 含量較高的胃癌患者，具有較差的預後情形，也就是具有較低的存活率。此些結果顯示出 14-3-3 β 不但是是一個與胃癌高度相關的蛋白質，同時也是一個可應用於胃癌早期偵測及預後的腫瘤標記。同時，基於上述方法，發展出一種包含一有效量之 14-3-3 β 抗體之檢

測套組，可用於檢測胃癌有發展為腫瘤侵入或遠處轉移之危險性。

雖然，本發明已藉由參考前述較佳實施例而揭露，熟悉本發明技術領域者可輕易的據此做些許的改變或修飾，但此將不脫離本發明申請專利範圍所界定之範疇。

【圖式簡單說明】

第 1a~1d 圖係顯示出利用蛋白質體學方法鑑定出胃癌細胞株 SC-M1 在以抗癌藥物 5-FU 處理 48 小時後 14-3-3 β 之表現量變化；

第 2a~2e 圖係顯示出以組織染色法及西方墨點法分析腫瘤組織(T)及正常組織(N)中 14-3-3 β 之表現量；

第 3a 圖係顯示以 ELISA 方法分析胃癌患者(第 I~IV 期)及正常人血液中 14-3-3 β 之含量；

第 3b 圖係顯示第一期胃癌患者具有較高及較低 14-3-3 β 表現量與存活率之關係；

第 3c 圖係顯示胃癌患者(第 I~IV 期)及正常人血液中 CEA 之含量；

第 4a~4e 圖係顯示不同分期之胃癌患者(第 I~IV 期)與正常人之 14-3-3 β 之 ROC 曲線及 CEA 之 ROC 曲線；

第 4f~4h 圖係顯示胃癌患者在手術前血清中 14-3-3 β 含量與淋巴結轉移數目、腫瘤大小、腫瘤組織中 14-3-3 β 表現量之關連性；

第 5a~5c 圖係顯示胃癌患者 14-3-3 β 含量與胃癌患者總體存活率、無復發存活率及手術前後之關係；

第 5d~5e 圖係顯示胃癌患者 CEA 含量與胃癌患者總體存活率及無復發存活率之關係；

第 6a~6e 圖係顯示在細胞中過度表現 14-3-3 β 與腫瘤侵入、轉移及生長之關係。

【主要元件符號說明】

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：098117727

※申請日：98 5 27 ※IPC 分類：

G01N³³/₅₇₄(2006.01)G01N³³/₆₈ 2006.01

一、發明名稱：(中文/英文)

檢測一胃癌預後程度的方法/

METHOD FOR PROGNOSIS OF GASTRIC CANCER

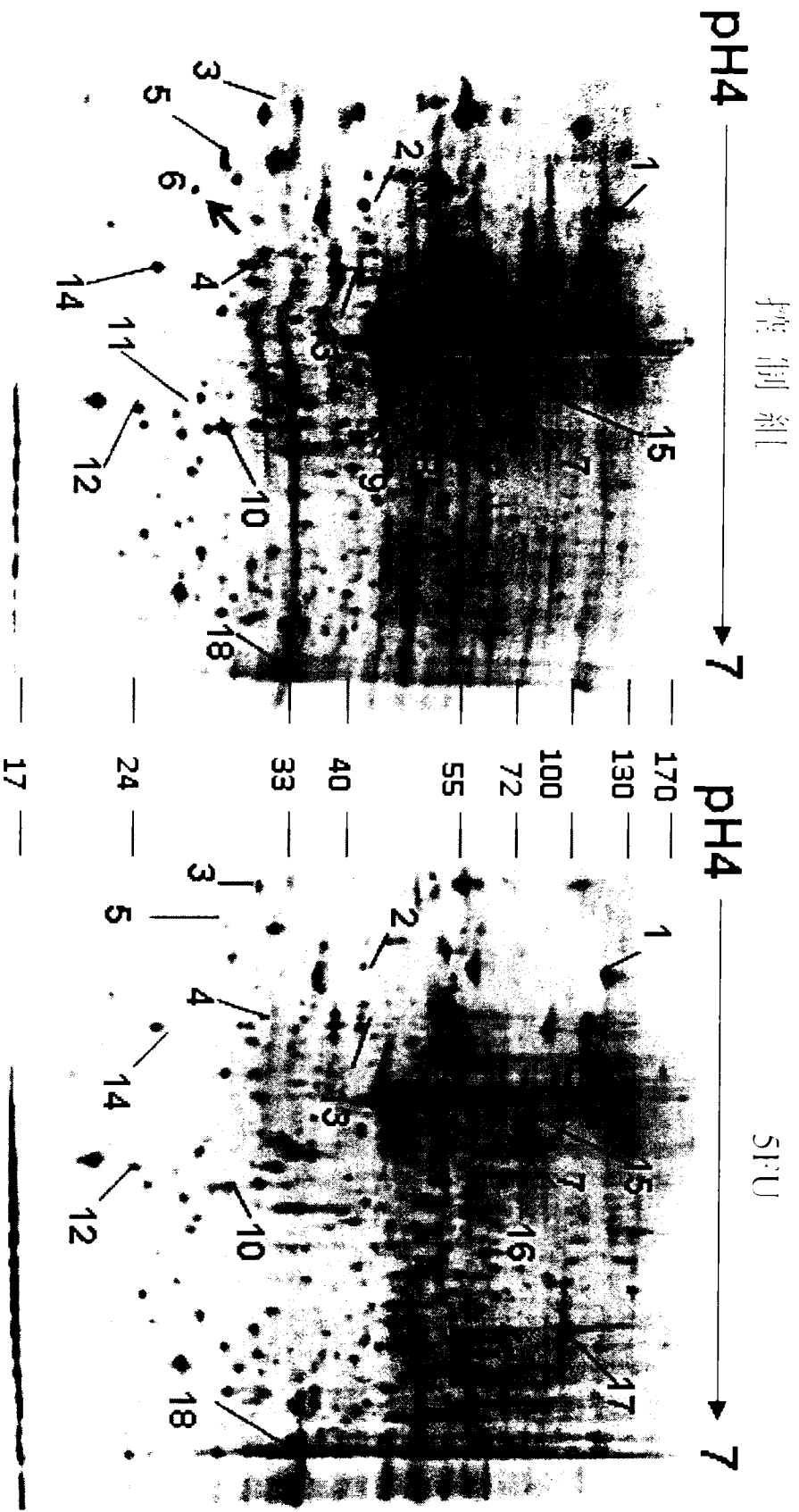
二、中文發明摘要：

由於習知胃癌腫瘤標記在胃癌診斷上的敏感度及專一性都不高，本發明提供一種檢測一胃癌預後程度的方法，其步驟包括：提供一生物樣品；檢測該生物樣品中 14-3-3 β 含量；其中，該生物樣品中 14-3-3 β 含量高於正常個體取得樣品之測定量，代表該胃癌之預後狀況不良。由於 14-3-3 β 作為腫瘤標記具有較高的敏感度及準確性，因此更適於作為胃癌診斷上的工具。

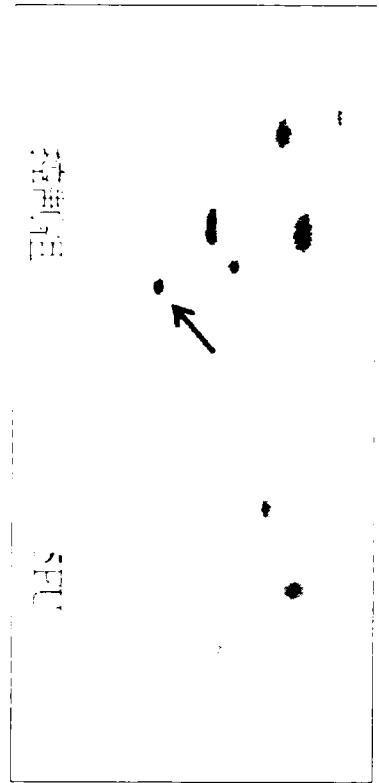
三、英文發明摘要：

The 14-3-3 β protein is used herein as a tumor marker for prognosis in gastric cancer. The method comprises steps of providing a biological sample, qualifying the 14-3-3 β level in the sample, and comparing the 14-3-3 β level in the sample with a normal sample. Upon the 14-3-3 β level in the biological sample is higher than in the normal sample, which represents the patient providing the sample has a poor prognosis. Having the higher sensitivity and specificity, 14-3-3 β can be used as a tumor marker for prognosis of gastric cancer.

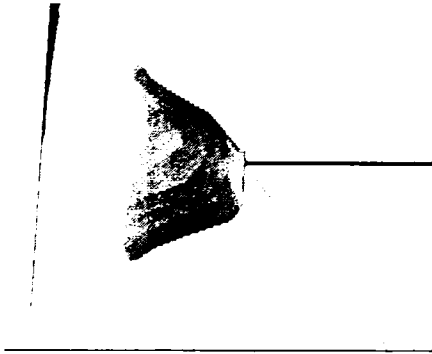
八、圖式：



第 1a 圖



第 1b 圖



第 1c 圖

14-3-3β 表現 (14-3-3β / β-actin)

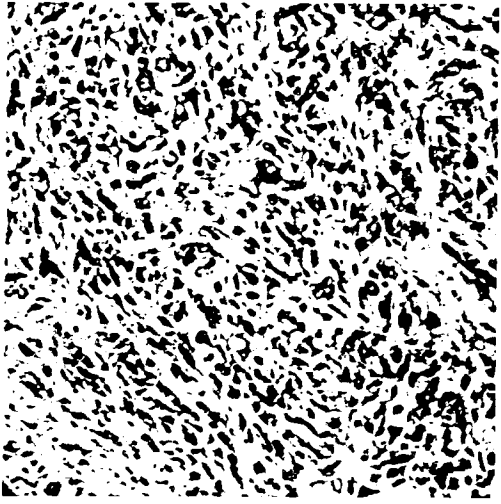
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0



第 1d 圖



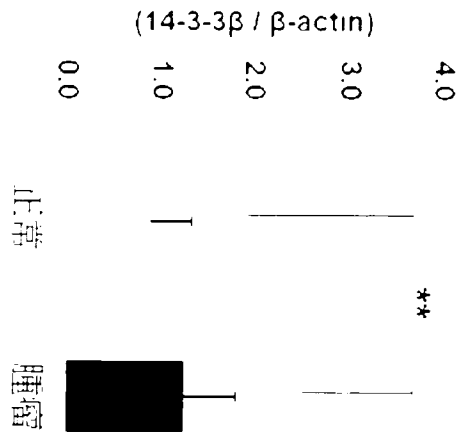
第 2c 圖



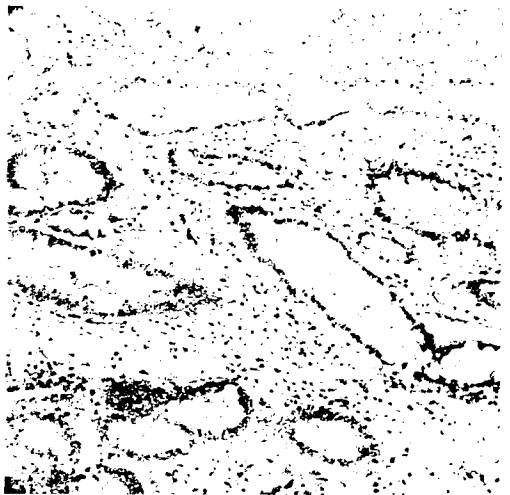
第 2d 圖

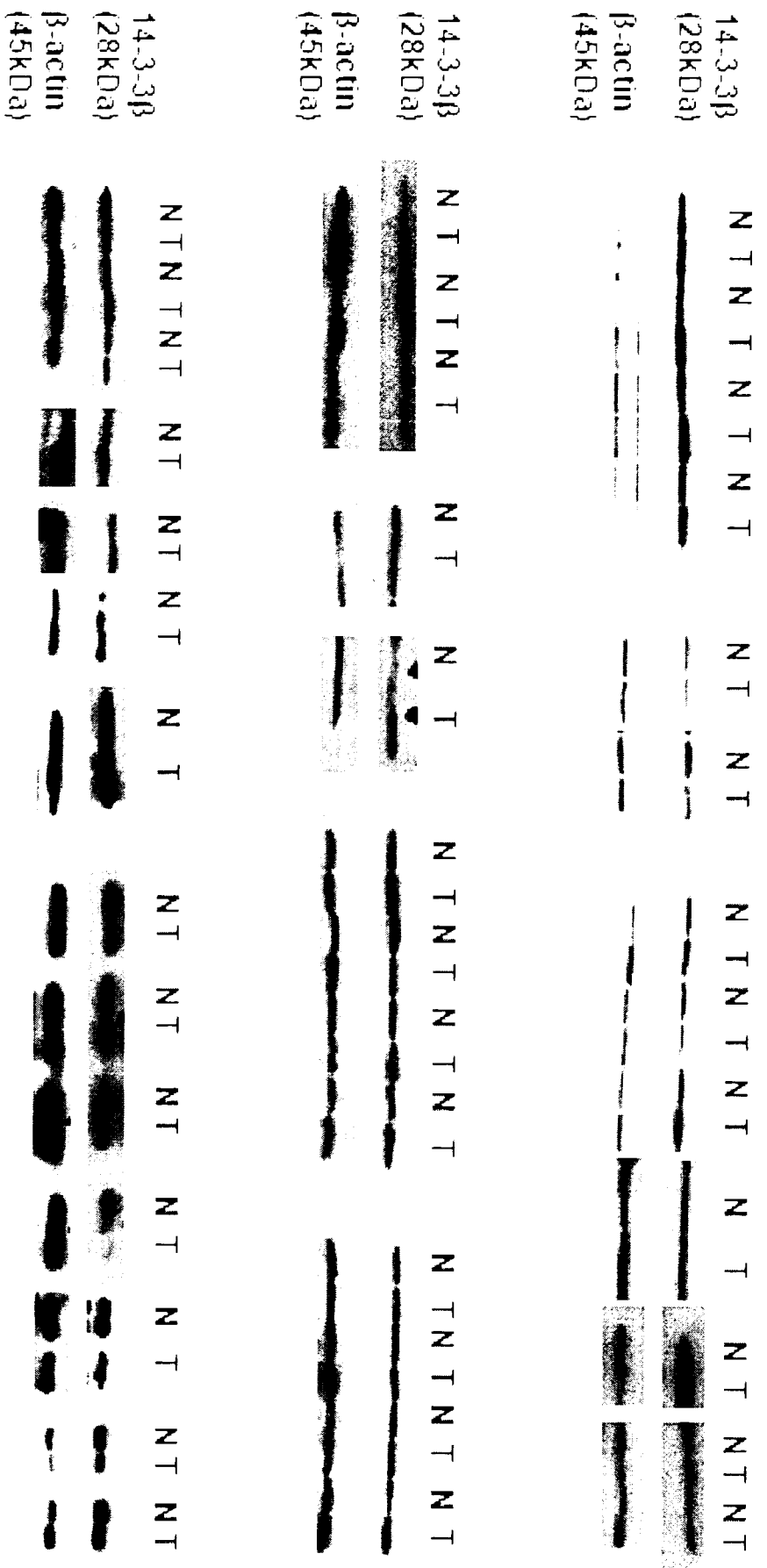


第 2a 圖

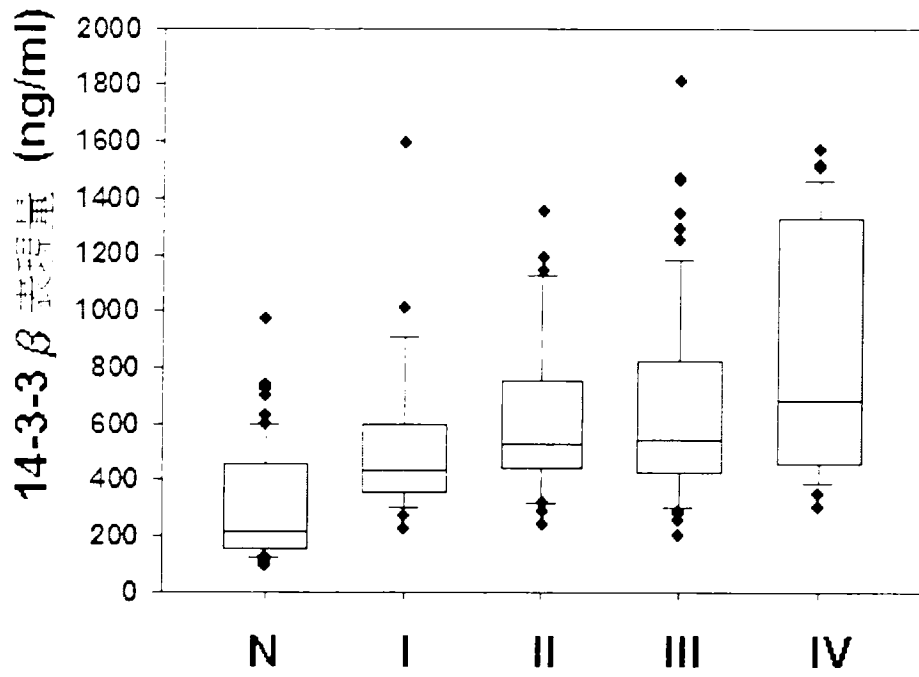


第 2b 圖

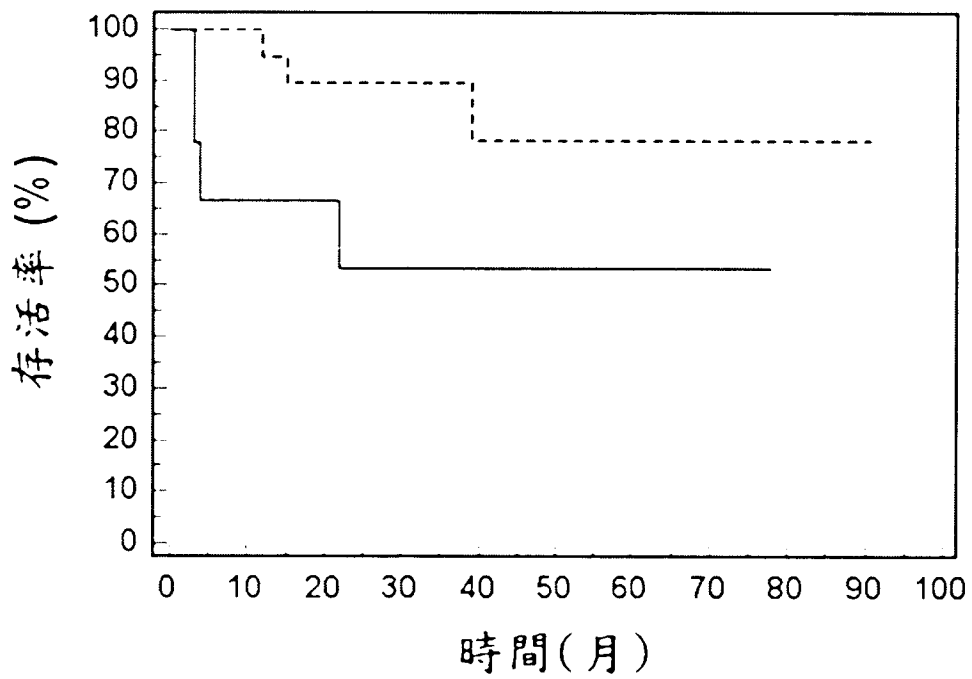




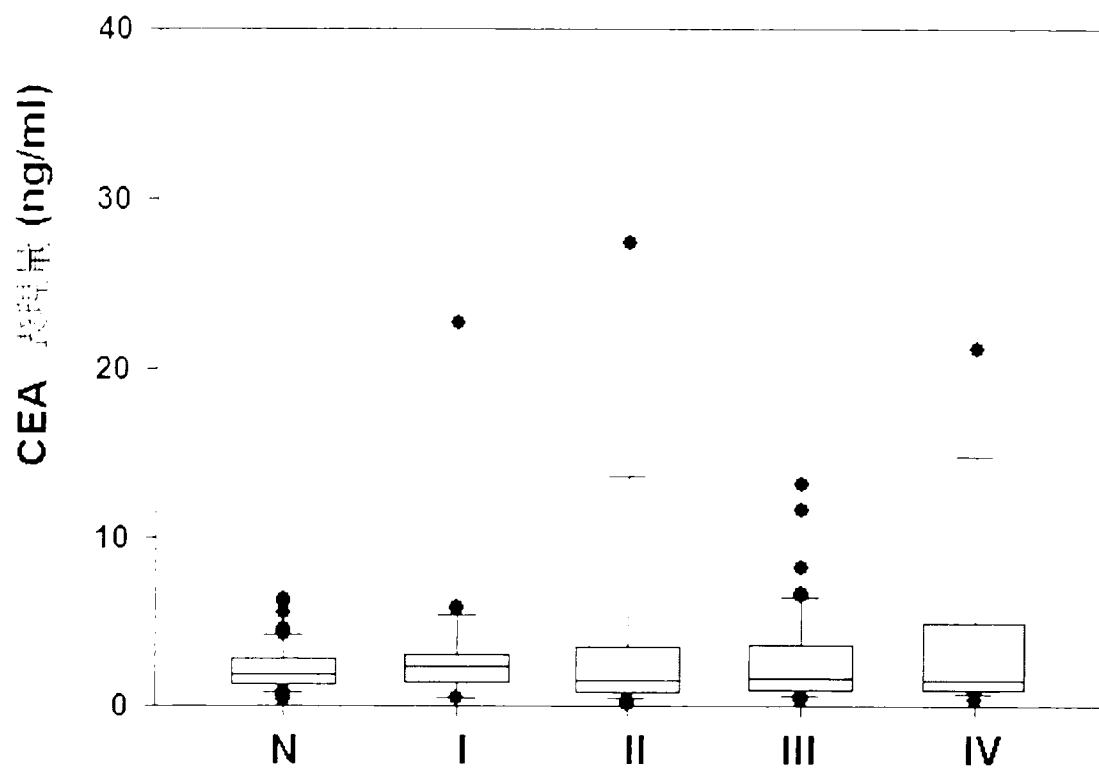
第 2c 图



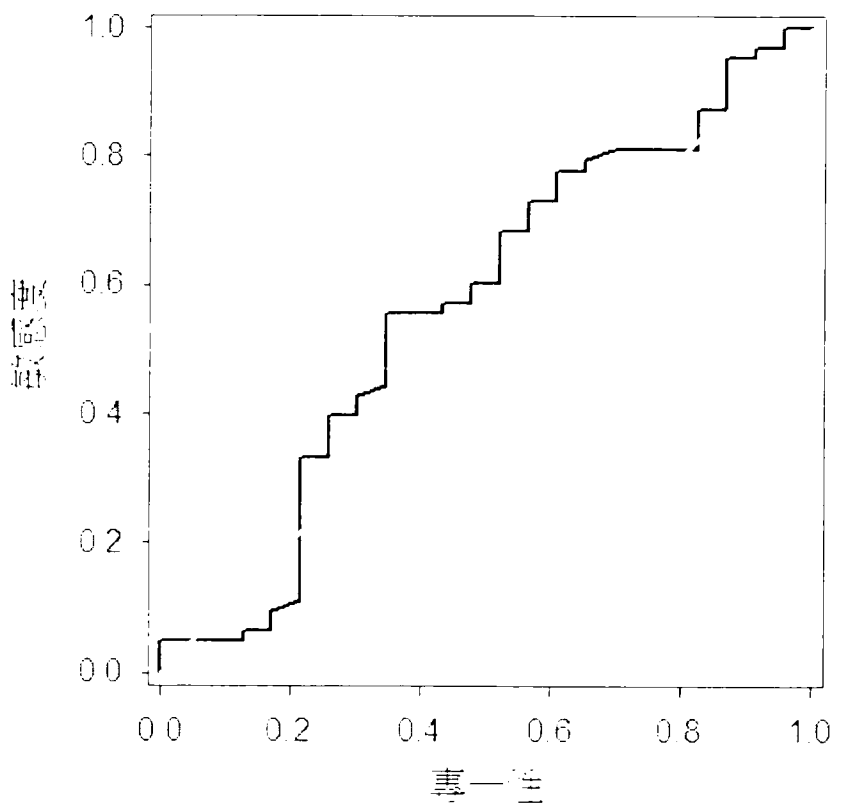
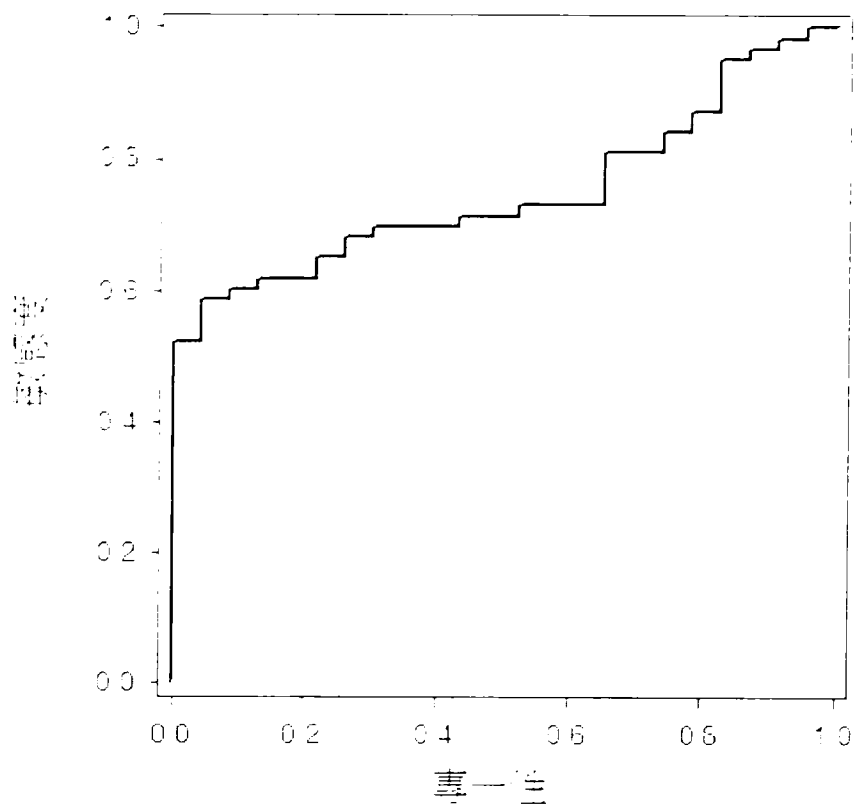
第 3a 圖



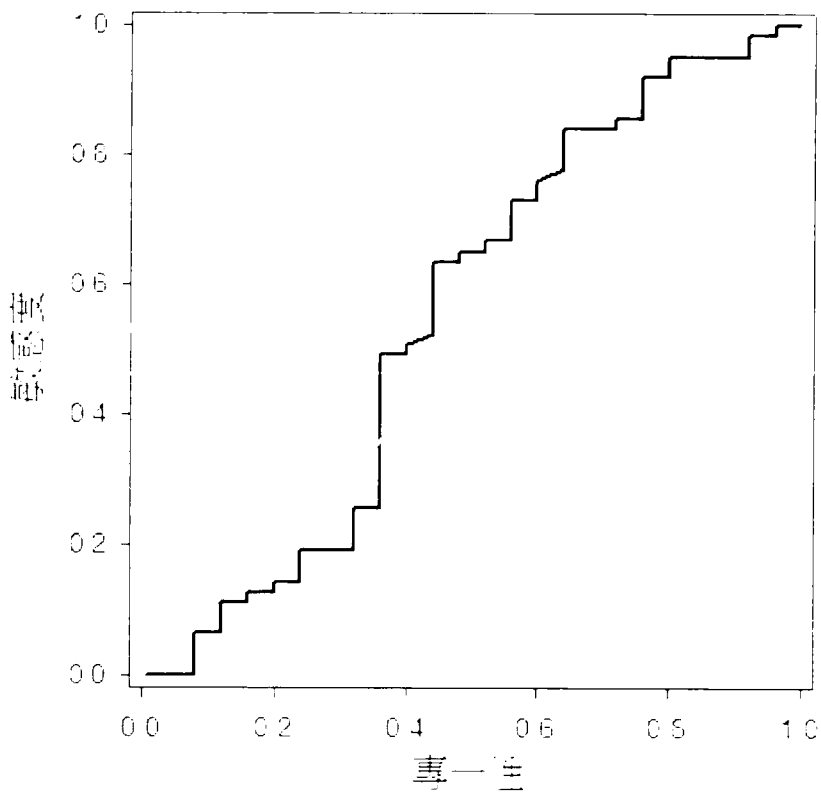
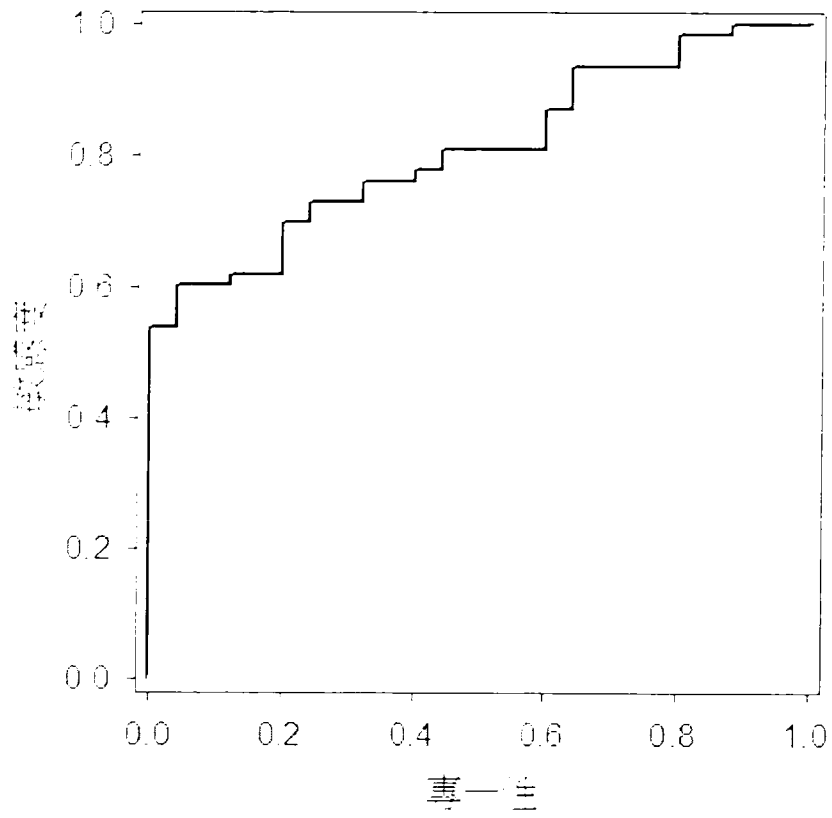
第 3b 圖



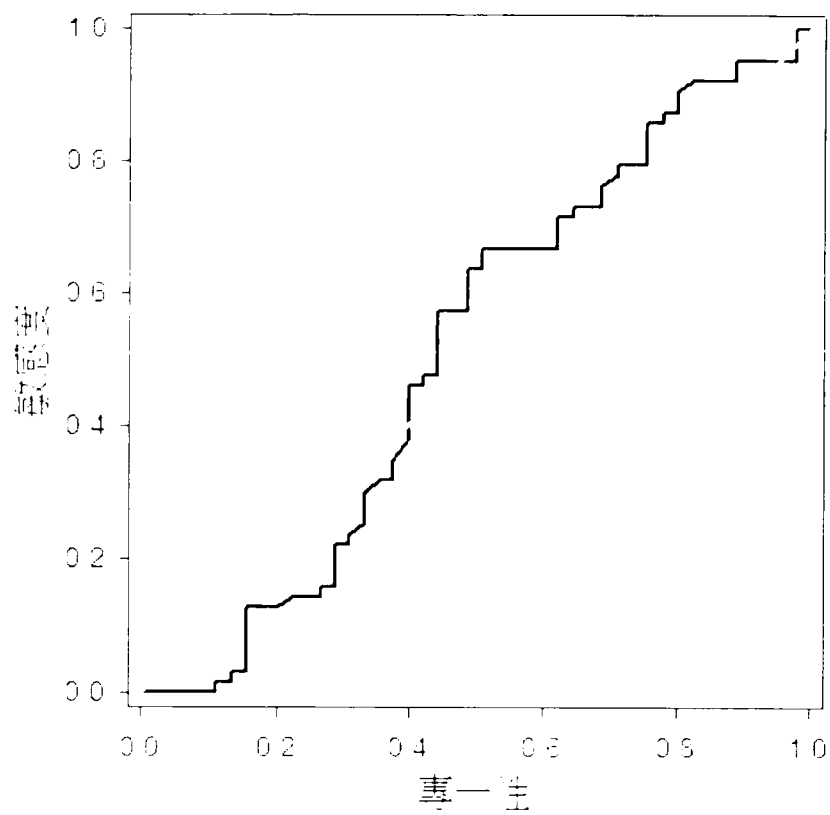
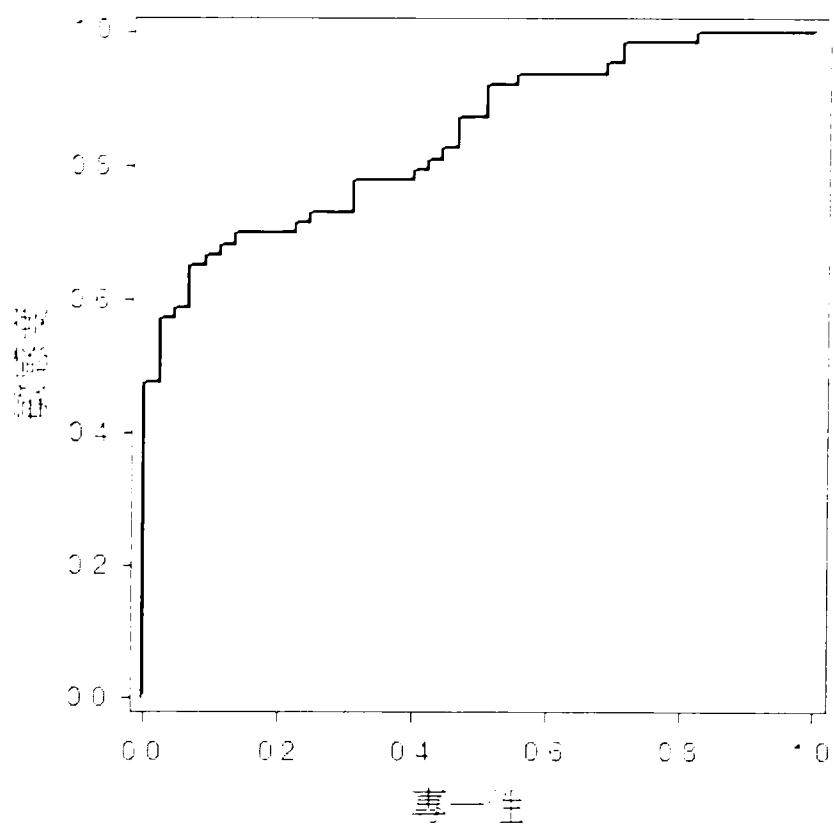
第3c圖



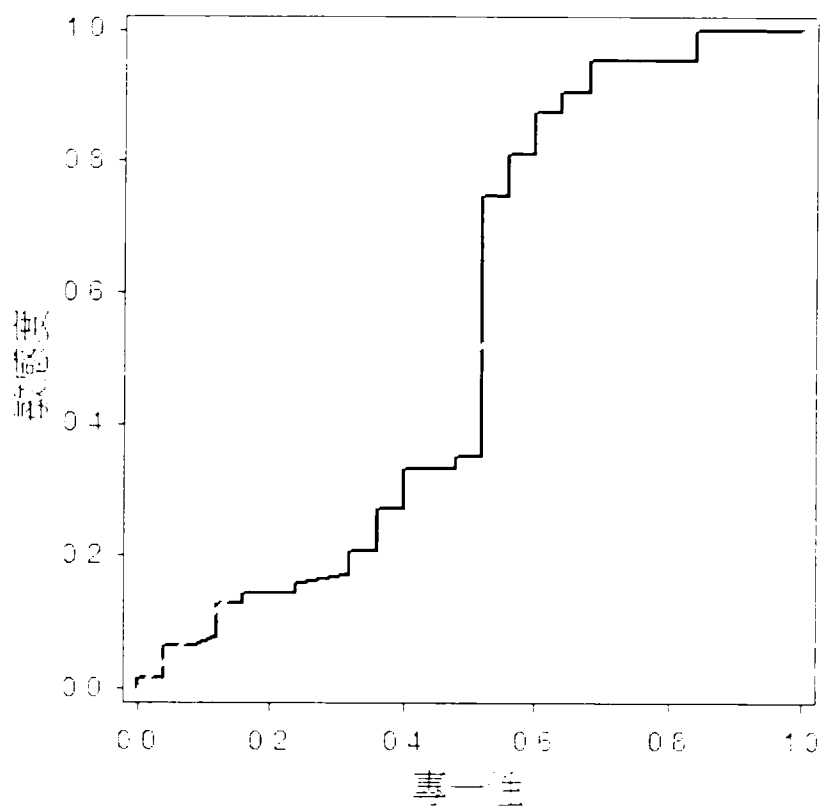
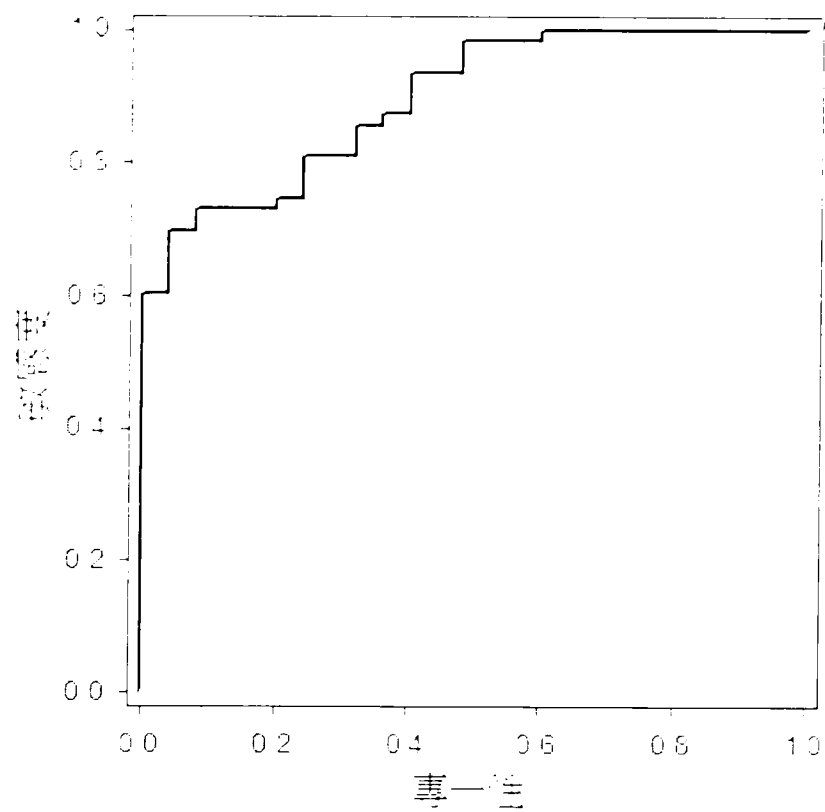
第4a圖



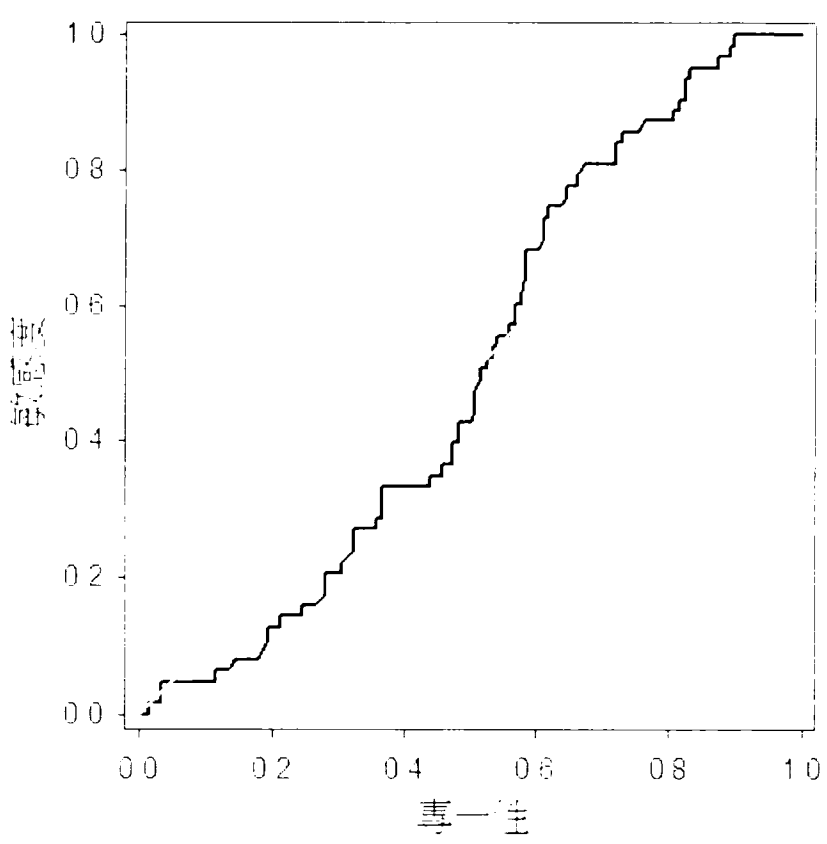
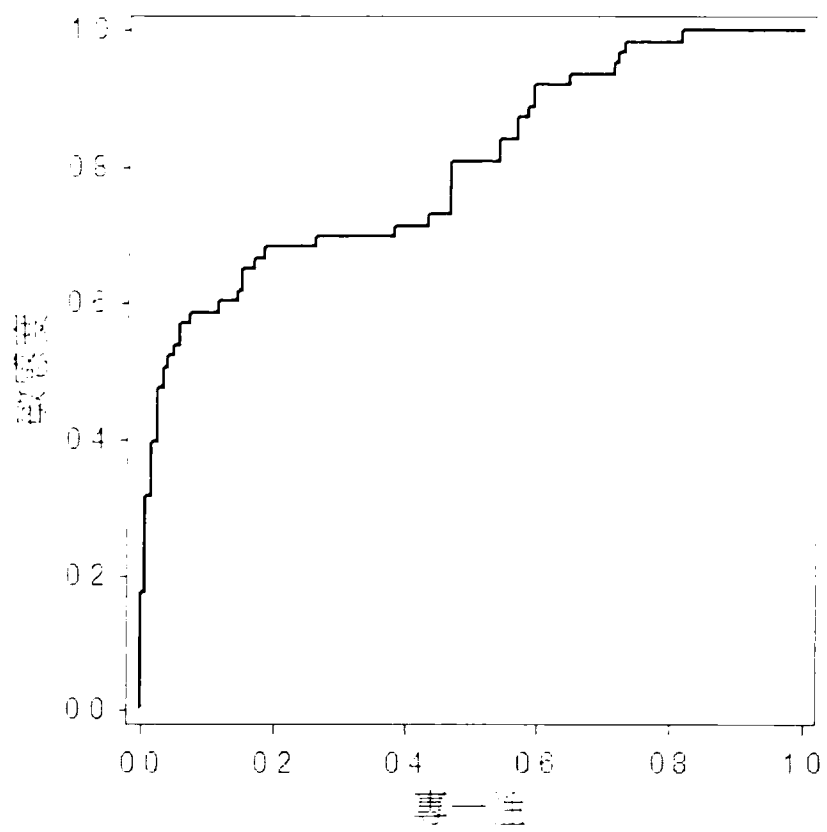
第 4b 圖



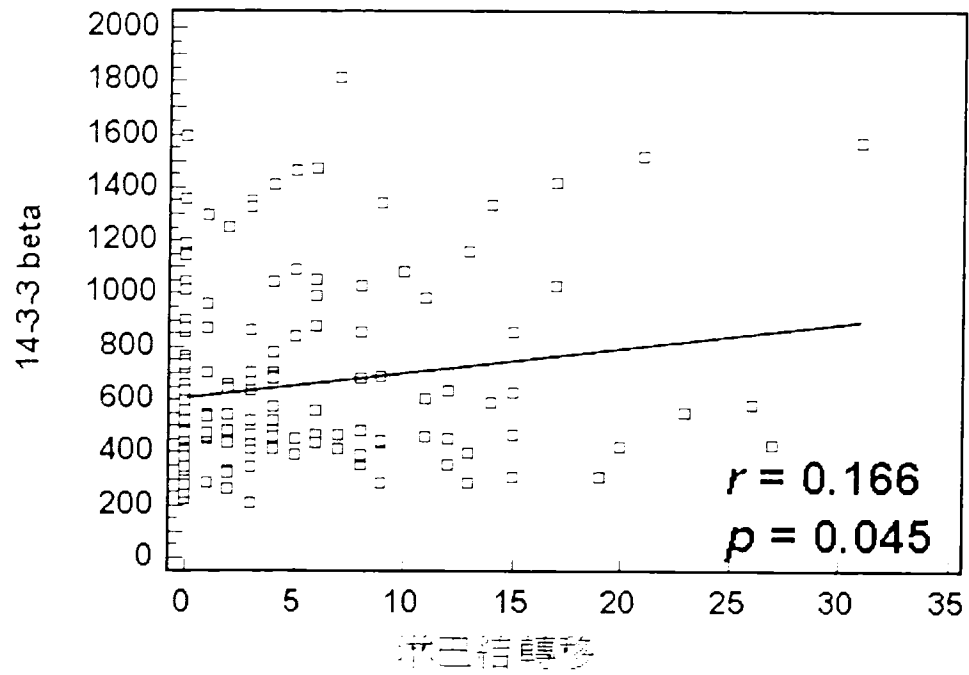
第4c圖



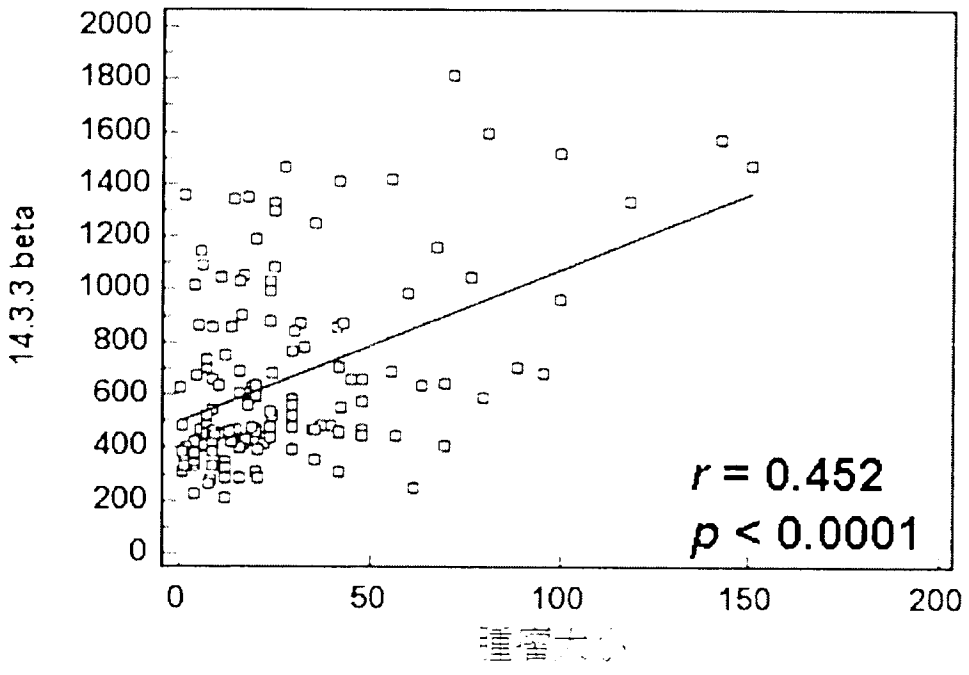
第4d圖



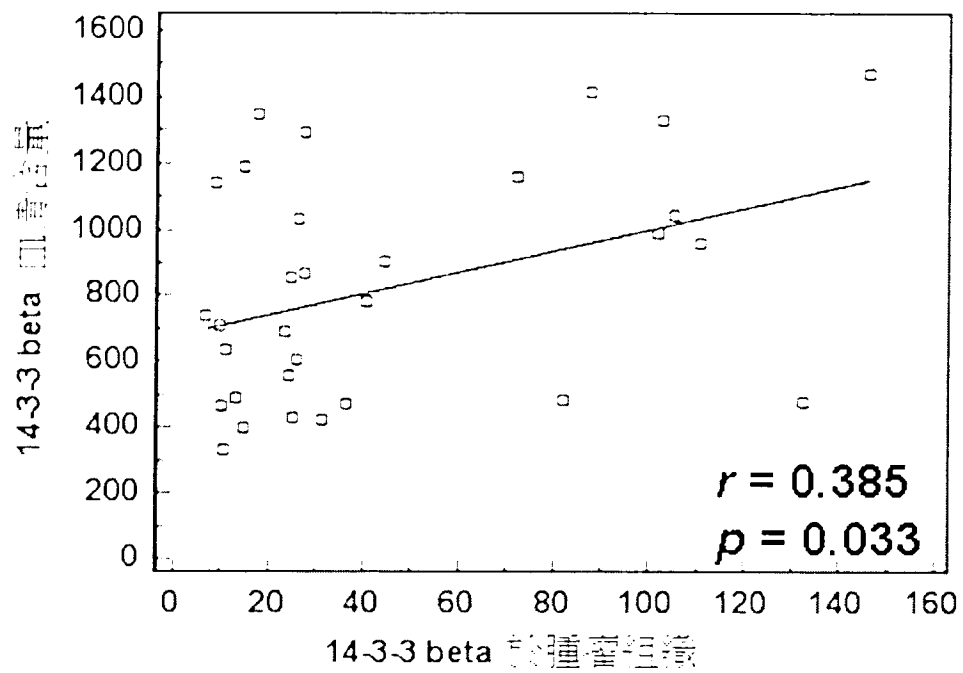
第4e圖



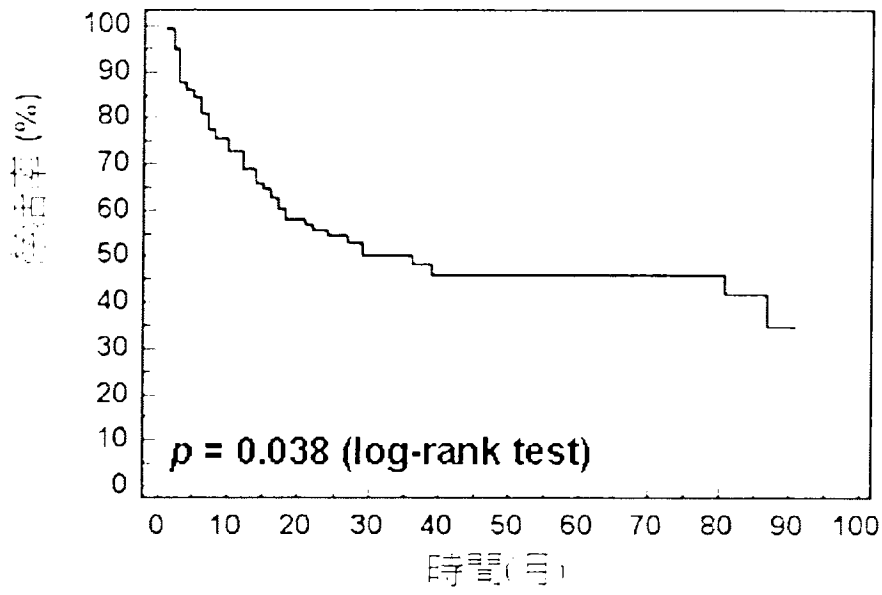
第 4f 圖



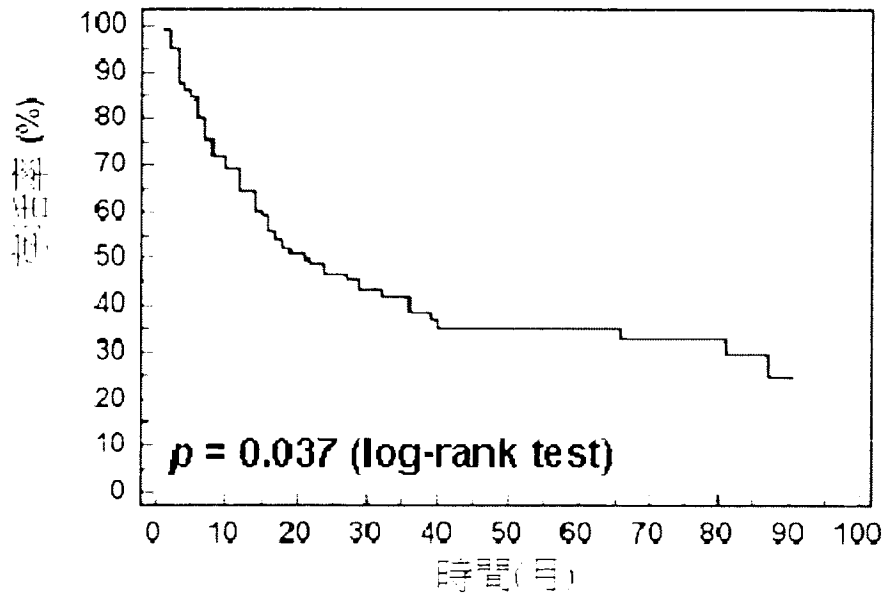
第 4g 圖



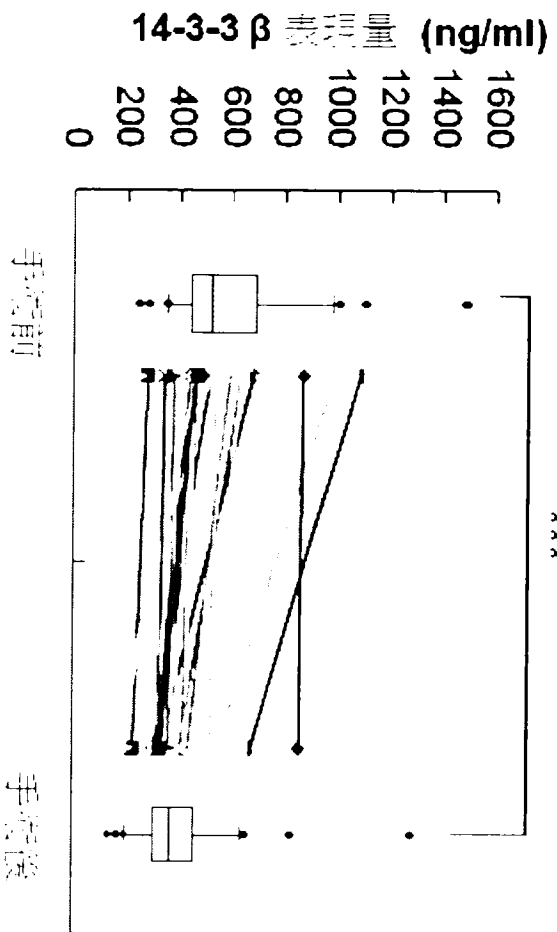
第 4h 圖



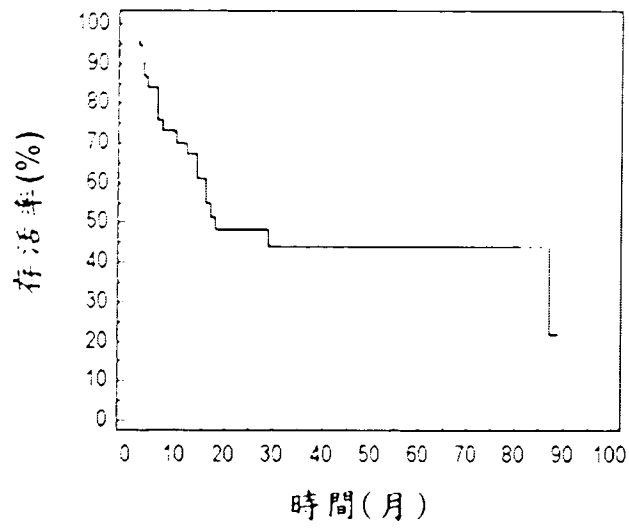
第 5a 圖



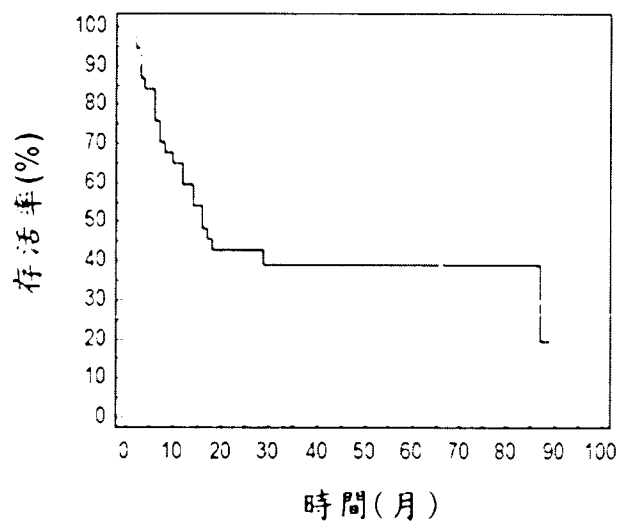
第 5b 圖



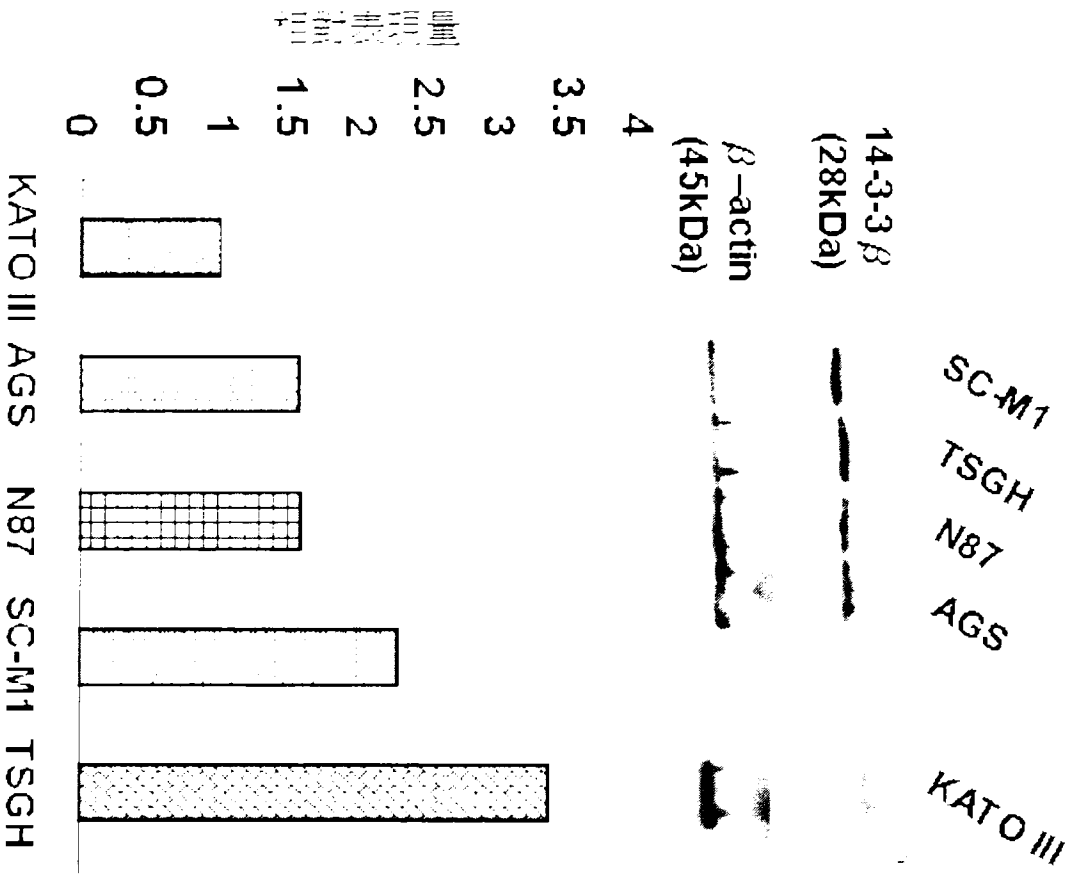
第 5c 圖



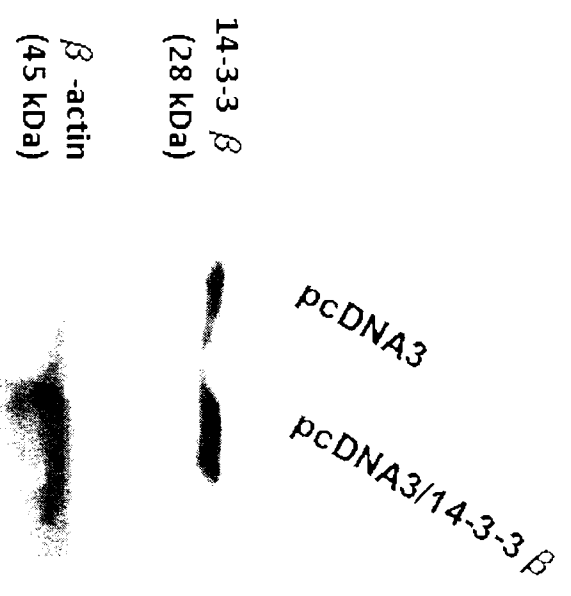
第 5d 圖



第 5e 圖



第 6a 图



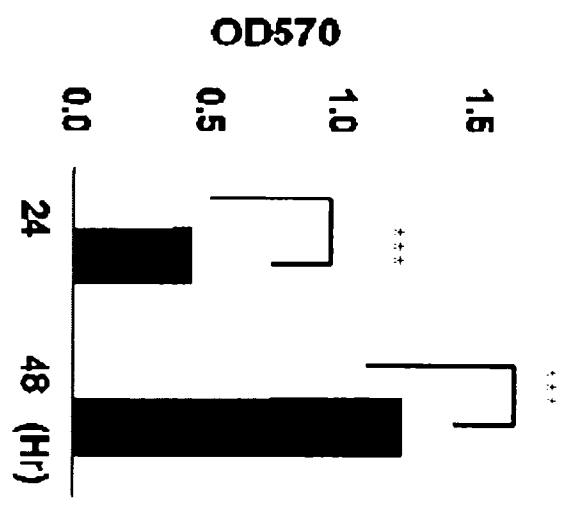
第 6b 图



第 6c 图



第 6d 图



第 6e 图

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

七、申請專利範圍：

1. 一種檢測一胃腺癌個體預後程度的方法，其係由以下步驟組成：
提供一血清樣品；
檢測該血清樣品中 14-3-3 β 含量；以及
比較該血清樣品中 14-3-3 β 含量是否低於 349 ng/ml；
其中預後良好是指血清中 14-3-3 β 含量低於 349 ng/ml，該胃腺癌個體之五年總體存活率至少 70%及五年無復發存活率至少 60%。
2. 如申請範圍第 1 項所述之方法，其中檢測該血清樣品中 14-3-3 β 含量是使用專一結合至 14-3-3 β 抗體而測定。
3. 如申請範圍第 1 項所述之方法，其中檢測該血清樣品中 14-3-3 β 含量是使用蛋白質分析方法，係為一西方墨點法。
4. 如申請範圍第 1 項所述之方法，其中該血清樣品係取自一經過胃腺癌治療之患者。
5. 如申請範圍第 4 項所述之方法，其中該胃腺癌治療係為一外科切除手術。
6. 如申請範圍第 4 項所述之方法，其中該胃腺癌治療係為一放射線治療。
7. 如申請範圍第 4 項所述之方法，其中該胃腺癌治療係為一化學治療。
8. 一種對於胃腺癌個體預後之血清檢測套組，係包含一有效量之 14-3-3 β 抗體，其中若血清中 14-3-3 β 含量低於 349 ng/ml，則代表該胃腺癌個體之五年總體存活率至少 70%及五年無復發存活率至少 60%。