

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810200481.5

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101684489A

[22] 申请日 2008.9.25

[21] 申请号 200810200481.5

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路 320 号

[72] 发明人 谢 东 陈萍萍 李晶晶

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称

肺癌的一种诊断标志物

[57] 摘要

本发明涉及肺癌的一种诊断标志物，公开了一种特异性识别 Atrogin - 1 基因或蛋白的试剂的用途，用于制备检测肺癌的试剂盒。本发明还公开了一种检测肺癌的试剂盒。本发明的研究表明 Atrogin - 1 在肺癌的肿瘤发生和发展过程中起到较为重要的作用，Atrogin - 1 可以作为肺癌的一种诊断标志物，有助于肺癌的易感性分析、预后诊断和治疗。

1. 一种特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂的用途，用于制备检测肺癌的试剂盒。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂选自：

特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物；
特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的探针；或
特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体或配体。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物是引物对，所述引物对具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的序列。

4. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体是兔抗人的 Atrogin-1 抗体。

5. 一种检测肺癌的试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒中含有特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂。

6. 如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述的特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂选自：

特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物；
特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的探针；或
特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体或配体。

7. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于，所述的特异性扩增特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的引物是引物对，所述引物对具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的序列。

8. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于，所述的特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体是兔抗人的 Atrogin-1 抗体。

9. 如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒中还含有：
DNA 提取试剂；或
聚合酶链反应试剂；或
免疫结合试剂；或
酶联免疫检测试剂。

10. 一种 Atrogin-1 基因或蛋白的用途，用于制备检测肺癌的试剂。

肺癌的一种诊断标志物

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地说，本发明涉及 Atrogin-1 在制备肺癌诊断试剂中的应用。

背景技术

肺癌是世界上癌症相关死亡的首要原因。每年大概有 120 万患者被诊断出肺癌，同时，110 万人死于该症。

虽然在过去的数十年中对于肺癌进行了大量的研究，肺癌患者的五年存活率依然很低。肿瘤结节转移(TNM)分期系统在国际上广为认可，用于对非小细胞肺癌(NSCLC)的预后预测。尽管如此，早期的患者显示出变化范围较大的生存率，这就使得寻找能更好的预测结果的有效预后标志物成为必需。因此，人们在鉴定可改善 NSCLC 诊断的分子标志物方面做了大量的工作。合适的标志物不仅能提供预后信息，而且，也有助于预测患者是否可受惠于新的治疗策略或者额外的治疗措施。

因此，找寻对于肺癌易感性分析或肺癌预后诊断有用的诊断标记物，提高肺癌患者的生存率，改善肺癌患者的生活质量，已成为肺癌治疗的当务之急。

发明内容

本发明的目的在于提供一种Atrogin-1基因或蛋白的用途，用于制备检测肺癌的试剂。

本发明的另一目的在于提供一种特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂的用途，用于制备检测肺癌的试剂盒。

本发明的另一目的在于提供一种检测肺癌的试剂盒。

在本发明的第一方面，提供一种特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂的用途，用于制备检测肺癌的试剂盒。

在另一优选例中，所述的特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂选自：
特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物；
特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的探针；或
特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体或配体。

在另一优选例中，所述的特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物是引物对，所述引物对具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的序列。

在另一优选例中，所述的特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体是兔抗人的 Atrogin-1 抗体。

在本发明的第二方面，提供一种检测肺癌的试剂盒，所述的试剂盒中含有特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂。

在另一优选例中，所述的特异性识别 Atrogin-1 基因或蛋白的试剂选自：
特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物；
特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的探针；或
特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体或配体。

在另一优选例中，所述的特异性扩增特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的引物是引物对，所述引物对具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的序列。

在另一优选例中，所述的特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体是兔抗人的 Atrogin-1 抗体。

在另一优选例中，所述的试剂盒中还含有：
DNA 提取试剂；或
聚合酶链反应 (PCR) 试剂；或
免疫结合 (如抗原抗体结合) 试剂；或
酶联免疫检测 (如 ELISA) 试剂。

在本发明的第三方面，提供一种 Atrogin-1 基因或蛋白的用途，用于制备检测肺癌的试剂。

在另一优选例中，基于所述的 Atrogin-1 基因序列，制备特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物或特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的探针，从而作为检测肺癌的试剂。

在另一优选例中，基于所述的 Atrogin-1 蛋白，制备特异性结合 Atrogin-1

蛋白的抗体或配体，从而作为检测肺癌的试剂。

在本发明的第四方面，提供一种体外（非治疗性地）检测待测样品中 Atrogin-1 基因表达情况的方法，所述的方法包括：

(1) 利用特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物对待测样品进行 PCR 扩增，获得扩增产物；其中，所述引物对具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的序列；

(2) 分析 (1) 获得的扩增产物中 Atrogin-1 基因或转录本的量，如在统计学上（如高 2 倍以上；较佳地高 3 倍以上）高于正常肺组织样品在相同扩增条件下获得的 Atrogin-1 基因或转录本的量，则表明待测样品中 Atrogin-1 基因为高表达。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图 1. 免疫组化染色显示 Atrogin-1 蛋白在肺癌组织和正常肺组织的表达情况。其中，A 是正常肺组织的 Atrogin-1 蛋白表达情况；B 是肺癌组织的 Atrogin-1 蛋白表达情况。

图 2. 具有不同 Atrogin-1 表达情况的患者的生存时间和生存概率的统计分析。

具体实施方式

本发明人经过广泛的研究，首次发现 Atrogin-1 基因在肺癌患者的肺癌组织中高表达，从而提示 Atrogin-1 在肺癌的肿瘤发生和发展过程中起到较为重要的作用。Atrogin-1 可以作为肺癌的一种诊断标志物，有助于肺癌的易感性分析、预后诊断和治疗。

Atrogin-1 及其用途

Atrogin-1 是一个 F-box 蛋白，为 SCF E3 泛素-蛋白连接酶的一个组分。以往发现，它在肌肉萎缩症中高度表达，而这一基因缺陷的动物表现出对肌肉萎

缩的抗性。很多研究提示 Atrogin-1/MAFbx 是一个 E3 连接酶，在肌肉萎缩的发生或发展中起着重要的作用。在现有技术中，还没有 Atrogin-1 的表达与肿瘤相关性的报道。

本发明人使用了 Real-Time PCR 和免疫组化的方法，分别检测了在肺癌及其配对的正常肺组织中 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达水平，发现 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达水平之间良好的一致性。分析 Atrogin-1 的表达和患者的临床特征之间的相关性表明，Atrogin-1 参与了肺癌的肿瘤发生和发展过程。

在本发明人分析的肺癌病例中，71.7%的患者肺癌组织中 Atrogin-1 的 mRNA 水平高于相对应的正常肺组织。类似的，66.7%的患者肺癌组织中的 Atrogin-1 的蛋白水平高于配对的正常肺组织。Kappa 分析显示了 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达之间良好的一致性。在对临床和病理特征进行控制(性别，年龄，转移，吸烟，家族史，肺结核，肿瘤分期，肿瘤大小，肿瘤位置，体重下降和血清白蛋白)后，Multivariate 生存分析(Cox 回归)表明 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达，转移，吸烟，肿瘤分期，体重下降和血清白蛋白是显著的独立危险因素。这些结果提示 Atrogin-1 在肺癌的发生和发展过程中扮演着重要的角色，而它可以作为肺癌的一个预后标志物以及新的治疗靶标。

如本文所用，所述的高表达是指：在 mRNA 水平上，与正常的肺组织中 Atrogin-1 mRNA 水平相比，提高 2 倍以上，较佳地提高 3 倍以上。在蛋白水平上，与正常的肺组织中 Atrogin-1 蛋白表达量相比，发现显著性差异。

基于本发明人的上述新发现，可以将 Atrogin-1 作为诊断肺癌的标志物：(i) 作为肺癌的分型、鉴别诊断、和/或易感性分析的标志；(ii) 评估相关人群的肺癌治疗药物、药物疗效、患者预后，以及选择合适的治疗方法；(iii) 评估相关人群肺癌患病风险，监测并进行早期防治。比如，可分离出由 Atrogin-1 基因表达异常而易患肺癌的人群，从而可进行更有针对性地防治。

因此，本发明提供了 Atrogin-1 基因或蛋白的用途，用于制备诊断(或检测)肺癌的试剂或试剂盒。

检测试剂

可采用各种本领域已知的技术来检测 Atrogin-1 基因的存在与否以及表达

情况，这些技术均包含在本发明中。例如可用已有的技术如Southern印迹法、Western印迹法、DNA序列分析、PCR等，这些方法可结合使用。

本发明还提供了用于在分析物中检测Atrogin-1基因的存在与否以及表达情况的试剂。优选的，当进行基因水平的检测时，可以采用特异性扩增Atrogin-1的引物；或特异性识别Atrogin-1的探针来确定Atrogin-1基因的存在与否；当进行蛋白水平的检测时，可以采用特异性结合Atrogin-1编码的蛋白的抗体或配体来确定Atrogin-1蛋白的表达情况。

作为本发明的优选方式，所述的试剂是引物，其可特异性扩增出Atrogin-1基因或基因片段。更优选的，所述的引物具有SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2所示的序列。该引物扩增获得的扩增产物具有合适的长度，且特异性高，对于复杂体系的扩增也具有良好的特异性，扩增结果稳定可靠。

针对Atrogin-1基因的特异性探针的设计是本领域人员熟知的技术，例如，制备一种探针，其可与Atrogin-1基因上特定位点发生特异性结合，而不与Atrogin-1基因以外的其它基因特异性结合，且所述探针带有可检测信号。

利用特异性结合Atrogin-1蛋白的抗体来检测分析物中Atrogin-1蛋白表达情况的方法也是本领域人员熟知的技术。

可以通过本领域内技术人员已知的各种技术制备特异性结合Atrogin-1蛋白的抗体，也可采用商业化的抗体。例如，纯化的Atrogin-1基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达Atrogin-1蛋白或其具有抗原性的片段的细胞用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备（见 Kohler等人，Nature 256: 495, 1975; Kohler等人，Eur.J.Immunol. 6: 511, 1976; Kohler等人，Eur.J.Immunol. 6: 292, 1976; Hammerling等人，In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981）。

多克隆抗体的生产可用Atrogin-1蛋白免疫动物，如家兔，小鼠，大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应，包括但不限于弗氏佐剂等。

在单克隆抗体或多克隆抗体上标记特性的可检测信号也是本领域人员已知的技术，例如可将辣根过氧化物酶偶联于所述的特异性结合Atrogin-1的抗体，从而可通过显色反应来得知抗原抗体结合反应的发生与否。

一种检测待测样品中是否存在Atrogin-1蛋白的方法是利用Atrogin-1蛋白

的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与Atrogin-1蛋白特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在Atrogin-1蛋白。

检测试剂盒

本发明还提供了用于在分析物中检测 Atrogin-1 基因的存在与否以及表达情况的试剂盒，该试剂盒包括：特异性扩增 Atrogin-1 基因或转录本的引物；特异性识别 Atrogin-1 基因或转录本的探针；或特异性结合 Atrogin-1 蛋白的抗体或配体。

此外，所述的试剂盒中还可包括聚合酶链反应 (PCR) 试剂、免疫结合 (如抗原抗体结合) 试剂或酶联免疫检测 (如ELISA) 试剂等；以及用于提取DNA、杂交、显色等所需的各种试剂，包括但不限于：抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗涤液等。

此外，所述的试剂盒中还可包括使用说明书和/或核酸序列分析软件等。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室指南 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

I. 材料和方法

病人和样品

肿瘤和配对正常组织取自于 2002~2006 年间在郑州大学第一附属医院接受治疗的 60 例肺癌患者，均征得患者同意。肿瘤样品取自近期未经过辅助治疗的患者，对应的正常组织取自离肿瘤组织至少 5cm 之外的区域。

所有的标本均分为两部分：一部分进行切片，并做常规的 H&E 染色及组化检测，另一部分在手术后 1 小时内用液氮速冻，再转至-80℃保存，用于以后的分析。

RNA 抽提和 cDNA 合成

总 RNA 从新鲜冰冻的肺癌标本和对应的正常肺组织中使用 TRIzol 试剂(购

自 Life Technologies, Inc.), 按厂商提供的说明抽提出。通过琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色, 在紫外射线下观察 18S 和 28S RNA 条带, 确定 RNA 样品的质量。按说明使用 Superscript II 试剂盒 (Life Technologies, Inc) 将 2 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA。

Real-Time PCR

以循环中 PCR 产物的扩增被首次检测到作为 Real-Time PCR 的特征描述, 而并非固定数目循环后所得到的 PCR 产物的量。参数 Ct 被定义为当扩增反应产生的荧光超过一个固定的基线的循环数。样品中靶基因的表达水平表示为 2^{Ct} , 以 β -actin 的表达水平作为内参。每一个样品中靶基因的表达水平都基于 β -actin 的含量进行校正, 公式为:

$$\text{校正后的靶基因表达水平} = \text{靶基因表达水平} / (\beta\text{-actin})\text{表达水平} = 2^{Ct(\text{target})/2^{Ct(\beta\text{-actin})}} = 2^{Ct(\text{target})-Ct(\beta\text{-actin})} = 2^{\Delta Ct}。$$

另外, 肿瘤组织相对于配对正常组织的靶基因表达水平的计算公式为:

$$\text{靶基因相对水平} = \text{靶基因校正后水平(肿瘤)} / \text{靶基因校正后水平(配对正常组织)} = 2^{\Delta Ct(\text{cancer})} / 2^{\Delta Ct(\text{normal})} = 2^{[\Delta Ct(\text{cancer}) - \Delta Ct(\text{normal})]} = 2^{\Delta \Delta Ct}。$$

因为校正后的靶基因表达水平和靶基因相对表达水平都以 2^{Ct} 表示, 因此, 本发明人分别使用 ΔCt 和 $\Delta \Delta Ct$ 代表校正后的靶基因表达水平和肿瘤相对于正常组织的靶基因表达水平, 用于临床统计学分析。

Real-Time PCR 中, 所用的引物如下所示:

Atrogin-1:

F: 5'-GACTTCTCAACTGCCATTC-3' (SEQ ID NO: 1);

R: 5'-CTCCATCCGATACACCC-3' (SEQ ID NO: 2)。

β -actin:

F: 5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3' (SEQ ID NO: 3);

R: 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3' (SEQ ID NO: 4)。

这些引物都使用 PRIMER3 软件进行设计, 并进行了针对 dbEST 和 nr 的

BLAST 搜索，以确认选作引物的核苷酸序列的基因特异性，确保不存在 DNA 多态性。

反应体系为 20 μ l，包括：LightCycler-DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics Ltd., Applied Science, Penzberg, Germany), F、R 引物各 10 pmol, 2~5 mM MgCl₂, 每种 dNTP 各 200 μ M, 0.5 U Taq DNA 聚合酶, 以及 1 \times 缓冲液。

所有的反应均为一式三份，在 iCycler iQ system (Bio-Rad, Hercules, CA) 上进行。反应程序为：起始变性 95 $^{\circ}$ C, 3 分钟；接下去 40 个循环，每一个循环：95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 或 58 $^{\circ}$ C 退火 20 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒；最后一个延伸步骤为 72 $^{\circ}$ C 7 分钟。为了确保扩增特异性，每一对引物所对应的 PCR 产物都经过了融链曲线和琼脂糖凝胶电泳检测。

免疫组化

60 对肿瘤和对应的正常组织样品冷冻，然后进行切片并将切片收集至载玻片上。切片在冰冷的丙酮中固定 30 分钟，用 0.01M PBS 洗三次，每次 5 分钟，然后，用含有 0.3% Triton X-100 和 5% 正常血清的 0.01M 的 PBS 封闭 1 小时，接着，用兔抗人的 Atrogin-1 一抗 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, 1:300) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天，用 0.01M PBS 简单清洗数遍后，与含有辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG (Chemicon, Temecula, CA, USA, 1:500) 的 0.01M PBS 在室温下孵育 2 小时，使用含有 0.003% H₂O₂ 和 0.03% DAB 的 0.05M Tris-HCl (pH 7.6) 进行显色。所有切片都使用苏木精进行复染。

切片制好后，由不知病人临床参数的三位病理专家独立的进行镜检。所有的染色切片都在 10 \times 40 的放大倍数视野内进行检测，每个视野至少包含 300 个细胞。表达靶蛋白的细胞的百分数由阳性染色细胞数目/视野中细胞总数目来表示。

统计学分析

Fisher's Exact Test 和 Paired-Sample T Test 用于分析 60 对配对的肺癌和正常肺组织中 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达。

Kappa 分析用于检测 mRNA 和蛋白表达水平之间的相关性。

χ^2 /t-test 用于评估 Atrogin-1 的表达和临床病理特征 (家族史, 转移, 肿瘤

分期, 组化, 性别, 肿瘤大小和患者年龄等) 之间的相关性。

使用 Kaplan–Meier 进行单变量生存分析(Univariate survival analysis), 通过 Log Rank Test 或者 Log Rank Test for Trend 检测其显著性。

运用了 Cox proportional hazards regression model 的多变量分析 (Multivariable analyses) 衡量临床特征和基因表达对于生存率的影响。

所有的统计学分析均使用 Program SPSS12.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL)。

II. 实施例

实施例 1. 肺癌和配对正常肺组织中 Atrogin-1 的表达

为了检测肺癌中 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达模式, 本发明人使用了 Real-Time PCR 测定组织中 mRNA 水平, 并通过免疫组化检测了 Atrogin-1 蛋白在 60 对肺癌和配对的正常肺组织中的分布。为了校正 mRNA 的量的不一致, Atrogin-1 mRNA 的水平表示为它和内参基因 β -actin 的比值。

在 60 例病例中, 有 43 例 Atrogin-1 mRNA 水平在肿瘤中较配对正常组织升高, 即升高的病例占总病例的 71.7%。配对样品 t-test 显示 Atrogin-1 在肿瘤组织中的 mRNA 水平 (10.39 ± 4.35) 与正常肺组织 (8.15 ± 3.94) 相比, 显著升高 ($t=3.873$, $P=0.000$)。

Atrogin-1 蛋白可在 60 例中的 40 例 (占总病例的 66.7%) 的肺癌组织中检测到, 但在配对的正常肺组织中, 几乎检测不到, 见图 1。

Paired-samples t-test 显示在肿瘤组织中免疫染色阳性的细胞百分比 (19.37 ± 7.58)% 显著高于在配对正常组织中的 (2.17 ± 0.59)% ($t= -17.419$, $P=0.000$)。

Kappa 分析结果获得的肺癌和配对正常肺组织 (60 对) 中 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达水平见表 1。Kappa 分析表明, mRNA 和蛋白表达水平间具有良好的一致性 ($kappa=0.754$, $P=0.000$)。

表 1

Atrogin-1	数量	肺癌组织	配对正常肺组织	N-C/ C/N ^a	<i>t</i>	<i>P</i>
mRNA	60	10.39 ± 4.35	8.15 ± 3.94^a	2.24 ± 3.92	3.873	0.000**
蛋白	60	19.37 ± 7.58^b	2.17 ± 0.59	8.93 ± 2.65	-17.419	0.000**

^a 肺癌和配对正常肺组织中 Atrogin-1 基因的表达水平；

^b 在肺癌和配对正常肺组织中免疫染色阳性细胞所占百分比；

** $P < 0.01$ 被设为差异非常显著。

实施例 2. 肺癌中 Atrogin-1 的 mRNA 水平和患者临床病理特征之间的关系

Univariate 分析揭示了 Atrogin-1 的 mRNA 水平和肺结核, 转移, 肿瘤大小, 肿瘤分期, 体重下降和血清白蛋白之间的显著相关性。肺癌中 Atrogin-1 的 mRNA 水平和个体临床病理特征之间的关系见表 2。

表 2

临床病理参数	Atrogin-1 的 mRNA 表达阳性	Atrogin-1 的 mRNA 表达阴性	χ^2	P
性别			0.027	1.000
男	32	13		
女	11	4		
年龄			1.398	0.497
≤ 50	8	3		
50-65	26	8		
≥ 65	9	6		
吸烟			0.093	0.500
是	26	11		
否	17	6		
肺结核			4.186	0.038*
是	9	0		
否	34	17		
转移			7.520	0.009**
是	27	4		
否	16	13		
家族史			0.082	1.000
是	9	3		
否	34	14		

病理学			2.906	0.406
SC	19	6		
AC	11	4		
ASC	8	2		
其它	5	5		
肿瘤大小 [#]			6.580	0.037*
I	13	11		
II	14	4		
III	16	2		
肿瘤分期			10.173	0.006**
I	10	7		
II	15	10		
III	18	0		
体重下降(%)			5.844	0.035*
≤0	14	10		
>10	29	7		
血清白蛋白			5.454	0.023*
≤5g/L	27	5		
>35g/L	16	12		

[#] I ≤100cm³, II 100-300 cm³, III ≥300 cm³;

*P<0.05 和**P<0.01 被分别设为差异显著和差异非常显著。

患有肺结核的病人其 Atrogin-1 的表达显著高于未患结核病的病人 ($P=0.038$)。就转移而言, 转移组织中 Atrogin-1 的 mRNA 水平远高于未转移组织中的 ($P=0.009$)。Atrogin-1 的表达随肿瘤的增大($P=0.037$)以及肿瘤分期的进程($P=0.006$)而升高。体重下降超过 10% 的患者其 Atrogin-1 的 mRNA 水平远高于那些体重下降小于 10% 的患者 ($P=0.035$)。血清白蛋白水平较低 ($\leq 5\text{g/L}$) 的患者其 Atrogin-1 的 mRNA 水平较血清白蛋白水平高 ($> 35\text{g/L}$) 的患者高 ($P=0.023$)。

然而, 包括性别、年龄、吸烟、家族史和病理都和 Atrogin-1 的 mRNA 水平没有相关性。

实施例 3. 肺癌中 Atrogin-1 的蛋白水平和患者临床病理特征之间的关系

统计学分析揭示了 Atrogin-1 的蛋白表达和一些临床病理特征显著相关，包括转移，家族史，肿瘤大小，肿瘤分期，体重下降以及血清白蛋白。肺癌中 Atrogin-1 的蛋白水平和个体临床病理特征之间的关系见表 3。

表 3

临床病理参数	N	C/N ^a	F/t	P
性别			<i>t</i> =0.161	0.873
男	45	9.74±4.99 ^b		
女	15	9.50±4.63		
年龄			<i>F</i> =0.21	0.811
≤0	11	9.20±3.96		
50-65	34	10.04±5.39		
≥65	15	9.21±4.37		
吸烟			<i>t</i> =-0.710	0.480
是	37	10.03±5.17		
否	23	9.11±4.38		
肺结核			<i>t</i> =1.188	0.240
是	9	9.98±4.89		
否	51	7.91±4.58		
转移			<i>t</i> =-4.958	0.000**
是	31	11.43±4.29		
否	29	7.81±3.31		
家族史			<i>t</i> =-2.245	0.029*
是	12	12.40±3.67		
否	48	8.99±4.91		
病理学			<i>F</i> =0.738	0.534
SC	25	10.61±5.37		
AC	15	9.42±4.29		
ASC	10	9.43±4.86		
其它	10	7.96±4.45		

大小 ^c				0.000**
I	24	6.97±3.24	<i>F</i> =11.893	
II	18	10.36±5.57		
III	18	13.31±3.59		
I-II				0.010*
I-III				0.000**
II-III				0.043*
分期			<i>F</i> =11.554	0.000*
I	17	6.61±3.59		
II	25	9.15±4.80		
III	18	13.30±3.71		
I-II				0.058
I-III				0.000**
II-III				0.002**
体重下降 (%)			<i>t</i> =-2.862	0.005**
≤0	24	11.12±4.72		
>10	36	8.72±3.41		
血清白蛋白			<i>t</i> =-3.181	0.002**
≤5g/L	28	11.82±4.72		
>35g/L	32	7.81±3.41		

^a C/N: 肺癌样品(C)中免疫染色阳性的细胞百分比例/配对正常组织(N)中免疫染色阳性的细胞百分比例;

^b 值表示为 Mean ± SD;

^c I ≤100cm³, II 100-300 cm³, III ≥300 cm³;

P*<0.05 和*P*<0.01 被分别设为差异显著和差异非常显著。

根据表 3 结果, 转移组织中 Atrogin-1 的蛋白表达显著高于未转移组织中的 (*P*=0.000)。具有家族患病史的患者与没有家族史的患者相比, 显示出更高的 Atrogin-1 的蛋白水平(*P*=0.029)。Atrogin-1 的蛋白表达在大的肿瘤(*P*=0.000)中远高于在小肿瘤中的。Atrogin-1 的蛋白水平随着肿瘤进程(*P*= 0.000)显著升高, 尤其体现在第一期和第三期 (*P*=0.000)以及第二期和第三期 (*P*=0.002)之间。不过, 在第一期和第二期之间并没有显著差异(*P*=0.058)。体重下降超过 10%

的患者，其 Atrogin-1 的 mRNA 水平远高于那些体重下降小于 10% 的患者 ($P=0.005$)。血清白蛋白水平低 ($\leq 35\text{g/L}$) 的患者其 Atrogin-1 的 mRNA 水平较血清白蛋白水平高 ($> 35\text{g/L}$) 的患者高 ($P=0.002$)。

性别、年龄、吸烟、肺结核以及病理都未显示出和 Atrogin-1 蛋白水平之间具有统计学意义的显著相关性。

实施例 4. 肺癌中 Atrogin-1 的表达和临床后果

肺癌中 Atrogin-1 的表达和患者临床病理特征的单变量生存分析见表 4。分析表明 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达，转移，吸烟，家族史，肿瘤分期，体重下降和血清白蛋白都和患者的生存率显著相关。

表 4

临床病理参数	病例	死亡例数	中位生存期 (月)	SE	Log-Rank	P
性别					0.17	0.6799
男	45	24	24.40	2.04		
女	15	6	26.42	5.03		
年龄					0.53	0.7653
≤ 50	11	4	29.86	5.63		
50-65	34	20	24.53	2.30		
≥ 65	15	6	21.31	5.27		
转移					4.97	0.0259*
是	31	22	21.84	2.24		
否	29	8	31.39	3.83		
吸烟					3.99	0.0457*
是	37	21	29.08	2.36		
否	23	9	19.98	3.41		
家族史					3.89	0.0489*
是	12	8	19.17	3.85		
否	48	22	26.68	2.36		
肺结核					0.78	0.3773
是	9	4	19.98	3.99		
否	51	26	25.68	2.18		

肿瘤大小 [#]					2.37	0.3060
1	26	9	29.82	3.59		
2	18	10	22.90	3.43		
3	16	11	23.18	3.48		
肿瘤分期					6.94	0.0311*
I	17	5	32.41	4.54		
II	25	9	28.23	3.61		
III	18	16	19.73	2.58		
体重大小(%)					7.420	0.006**
≤0	24	10	27.32	3.54		
>10	26	20	18.91	2.75		
血清白蛋白						
≤5g/L	28	18	19.42	2.87	10.95	0.000**
>35g/L	32	12	26.88	3.58		
Atrogin-1(R*)					12.94	0.0003*
						*
阴性	17	1	42.47	2.77		
阳性	43	29	19.99	1.91		
Atrogin-1(P*)						
阴性	20	4	36.68	3.76	9.82	0.0017*
						*
阳性	40	26	21	1.98		

R*= mRNA, P*=蛋白;

[#] I ≤100cm³, II 100-300 cm³, III ≥300 cm³;

*P<0.05 和**P<0.01 被分别设为差异显著和差异非常显著。

Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白水平较高的患者其中位生存时间显著降低 (mRNA $P=0.0003$, 蛋白 $P=0.0017$), 如表 4 和图 2。发生转移的患者与没有发生转移的患者相比, 中位生存时间亦显著降低。吸烟患者的中位生存时间相比于不吸烟患者的显著增加 ($P=0.0457$)。家族史也与降低的生存率相伴随 ($P=0.0489$)。同时, 肿瘤分期越晚, 体重下降越多的患者, 其中位生存时间越少 (分别为 $P=0.0311$, $P=0.006$)。此外, 血清白蛋白水平低 ($\leq 5\text{g/L}$) 的患者其生

存率较血清白蛋白水平高(>35g/L)的患者低($P=0.000$)。

除上述因素外,在性别、年龄、肺结核、肿瘤大小和生存率之间,并未显示出相关性。

Atrogin-1 在肺癌中的 mRNA 和蛋白水平以及患者临床病理特征的 Cox Regression Analysis 见表 5。

表 5

参数	相对危险度 (RR)	95%CI	Wald 值	P
性别	0.482	0.113~2.061	0.969	0.325
年龄	1.783	0.736~4.320	1.643	0.200
转移	2.266	1.160~4.428	5.730	0.017*
吸烟	0.339	0.114~1.010	3.773	0.049*
家族史	1.694	0.582~4.934	0.935	0.334
肺结核	0.820	0.212~3.170	0.082	0.774
肿瘤大小	0.790	0.402~1.555	0.465	0.495
肿瘤分期	1.906	1.057~3.437	4.592	0.032*
体重下降	3.543	0.205~2.547	5.879	0.014*
血清白蛋白	2.887	1.152~3.236	4.439	0.039*
Atrogin-1(R*)	46.698	3.007~125.236	7.544	0.006**
Atrogin-1(P*)	6.254	1.892~20.670	9.032	0.003**

R*= mRNA, P*=蛋白;

* $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$ 被分别设为差异显著和差异非常显著。

在对临床和病理特征进行控制(性别、年龄、转移、吸烟、家族史、肺结核、肿瘤分期、肿瘤大小、肿瘤位置、体重下降和血清白蛋白)后, Multivariate 生存分析(Cox 回归)表明 Atrogin-1 的 mRNA 和蛋白表达,转移,吸烟,肿瘤分期,体重下降和血清白蛋白是显著的独立危险因素,相对危险度分别是 46.698(CI 3.007~125.236), 6.254(CI 1.892~20.670), 2.266 (CI 1.160~4.428), 0.339 (CI 0.114~1.010), 1.906 (CI 1.057~3.437), 3.543 (CI 0.205~2.547) 及 2.887 (CI 1.152~3.236)。

此外,性别,年龄,家族患病史,肺结核,肿瘤大小和生存率之间没有相

关性。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 肺癌的一种诊断标志物

<130> 086126

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 1

gacttctcaa ctgccattc

19

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 2

ctccatccga tacaccc

17

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 3

gatcattgct cctcctgagc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 4

actcctgctt gctgatccac

20

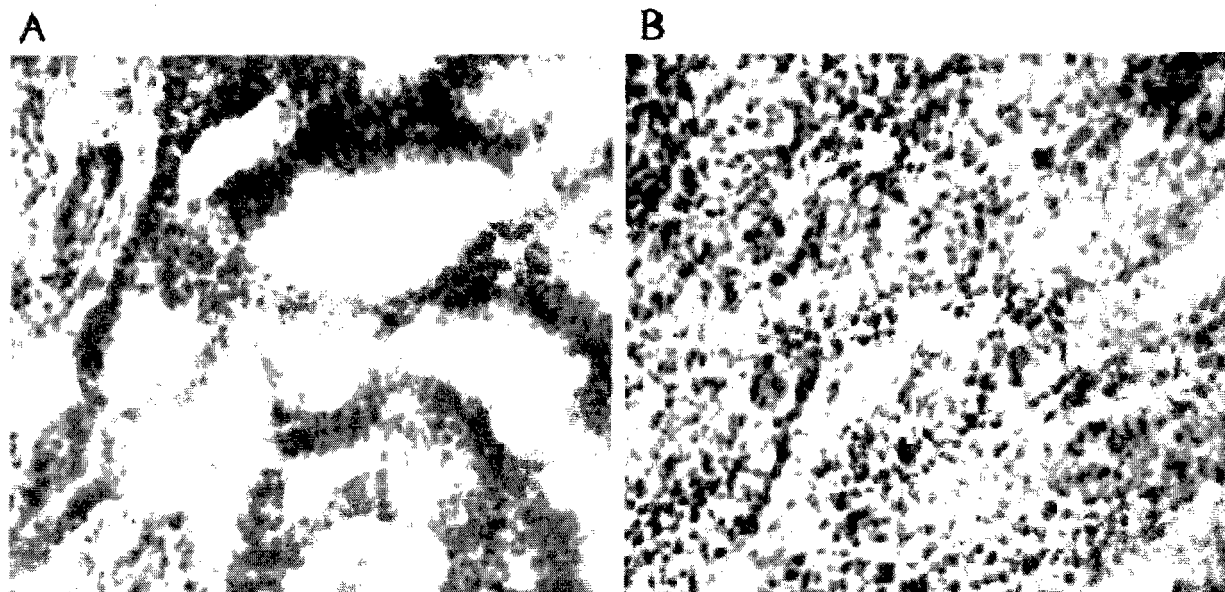


图 1

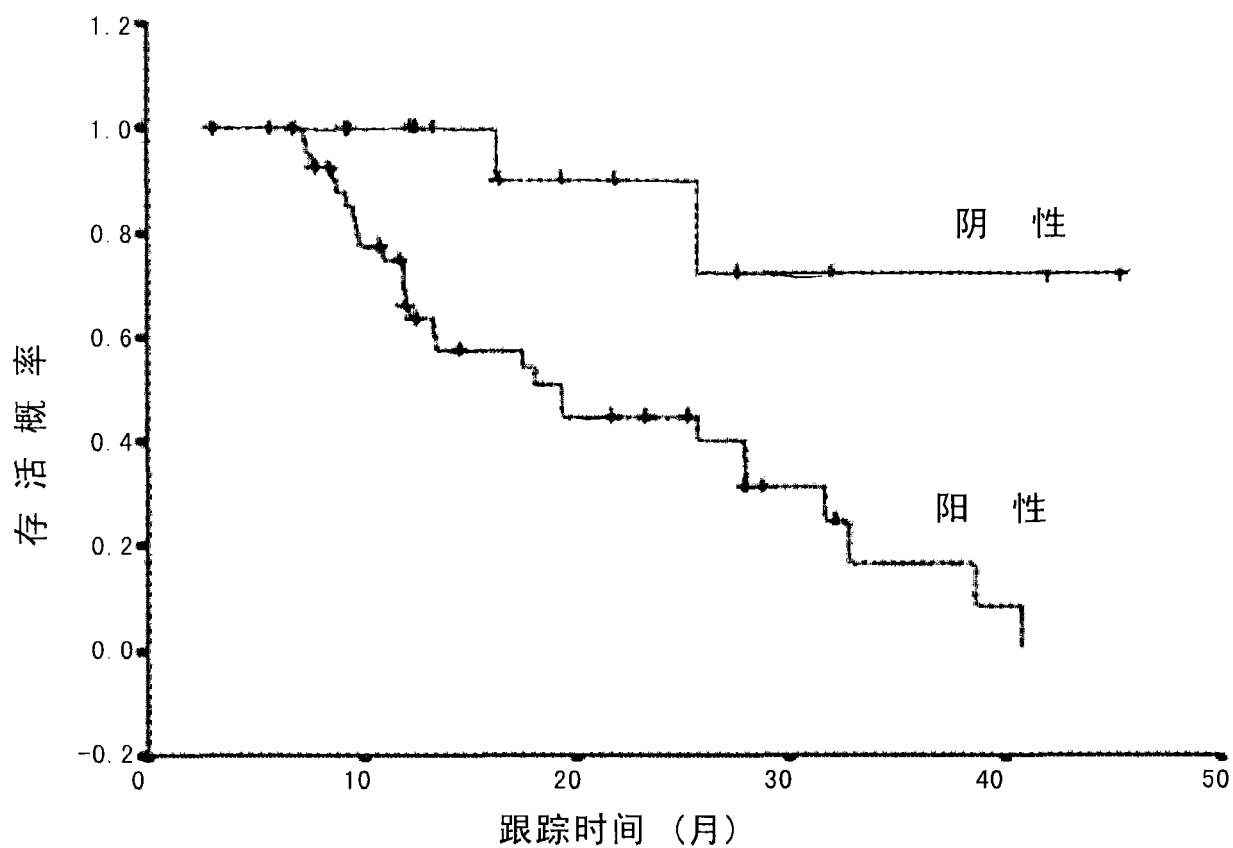


图 2

专利名称(译)	肺癌的一种诊断标志物		
公开(公告)号	CN101684489A	公开(公告)日	2010-03-31
申请号	CN200810200481.5	申请日	2008-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	谢东 陈萍萍 李晶晶		
发明人	谢东 陈萍萍 李晶晶		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	范征		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及肺癌的一种诊断标志物，公开了一种特异性识别Atrogin - 1基因或蛋白的试剂的用途，用于制备检测肺癌的试剂盒。本发明还公开了一种检测肺癌的试剂盒。本发明的研究表明Atrogin - 1在肺癌的肿瘤发生和发展过程中起到较为重要的作用，Atrogin - 1可以作为肺癌的一种诊断标志物，有助于肺癌的易感性分析、预后诊断和治疗。

