

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510025340.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月25日

[11] 公开号 CN 1851461A

[22] 申请日 2005.4.22

[21] 申请号 200510025340.0

[71] 申请人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市医学院路 136 号

[72] 发明人 刘银坤 冯钜涛 崔杰锋 宋海燕
汤钊猷 杨芑原

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 包兆宜

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

[54] 发明名称

热休克蛋白 27 在制备血清学判别、诊断肝癌
药物中的用途

[57] 摘要

本发明属生物技术领域，涉及一种热休克蛋白 27 的医用用途，本发明应用蛋白质组学的方法，对动物模型实验，结果表明 HSP27 高表达；免疫组织化学检测结果显示 HSP27 定位于肝细胞胞浆内，验证了其表达水平的高低与肝癌转移潜能相关；血清蛋白质组学研究发现，在差异性蛋白质中，HSP27 为肝癌特有；血清的 Western Blot 鉴定结果显示 HCC 病人血清有较强的 HSP27 (100%，20/20)；血清双盲法验证，正常人血清不显示 HSP27 (0/10)，HCC 患者阳性率为 100% (30/30)。结果证实，血清 HSP27 蛋白可成为有应用价值的测定肝癌及其转移的标志物蛋白。可用于制备包括 AFP 阴性 HCC 及其转移的预测和诊断药物。

1. 热休克蛋白 27 在制备血清学判别肝癌药物中的用途。
2. 热休克蛋白 27 在制备血清学诊断肝癌药物中的用途。
3. 热休克蛋白 27 在制备血清学预测肝癌转移药物中的用途。
4. 热休克蛋白 27 在制备血清学诊断 AFP 阴性肝癌药物中的用途。
5. 热休克蛋白 27 在制备血清学诊断 AFP 阴性肝癌转移药物中的用途。

热休克蛋白 27 在制备血清学判别、诊断肝癌药物中的用途

技术领域

本发明属生物技术领域，涉及一种热休克蛋白 27 的医用用途，具体涉及热休克蛋白 27 在制备血清学判别、诊断肝癌药物中的用途。

背景技术

恶性肿瘤是一种多基因参与的复杂疾病。其基因表达分析涉及转录组及蛋白质组学方法。由于蛋白质的表达或功能从转录到翻译间有多点调控，转录的 mRNA 丰度与翻译的蛋白质数量间相关不明显，因此用蛋白质组学方法从整体上研究肿瘤地发病机制，寻找肿瘤诊断和预后地特异性标记以及药物治疗的靶标已成为近期研究的热点（Lancet Oncol, 2001,2 (11):698-704；BMJ. 2000,320:424-7）。

肿瘤标志物通常是指肿瘤组织自身特有的可反映肿瘤存在和生长的物质，可在肿瘤患者组织、体液和排泄物中检出。现已发现的肿瘤标志物包括肿瘤特异性抗原及相关抗原、激素类受体、酶类、癌基因、抗癌基因及其产物等。理想的肿瘤标志物应具备 1) 唯肿瘤细胞所特有，不存在于正常或非癌组织中；2) 与肿瘤的大小、分期及治疗预后和转归有关；3) 可采用高灵敏的方法可定性或定量地检测。

肝癌已成为目前我国癌症病人死亡第二位的原因，全世界 45% 的原发性肝癌发生在我国。目前仍以外科手术为首选和主要治疗方案。术后总体 5 年生存率只有 62.9%，大肝癌术后 5 年生存率仅为 34.6%。目前临床主要依靠定期复查 AFP、异常凝血酶原、岩藻糖基转移酶和 B 超，加上 CT 等高分辨的影像学诊断。由于 AFP 的诊断阳性率仅为 56%，故 AFP 异质体、血清 AFP mRNA、异常凝血酶原、岩藻糖基转移酶均用于肝癌诊断的补充，同时涉及胃肠道肿瘤的相关抗原，如 CEA、CA199 的辅助诊断。近来的研究显示，血清 CK19、ICAM、E-selectin, VAGF 等亦可用于 AFP 阴性病人的鉴别诊断。发现具有预测、诊断价值的新型原发性肝癌标志物的研究十分必要。

HCC 常表现为早期的血管侵犯,包膜侵犯和肝内、肝外的转移。尽管采取了免疫治疗、预防性 TAE、中药治疗等手段来预防肝癌切除术后的转移复发,但总体术后 5 年复发率仍高达 61.5%,即使是小肝癌术后 5 年复发率也高达 45.5%。目前临床主要依靠定期复查 AFP、异常凝血酶原、岩藻糖基转移酶和 B 超来发现术后的转移复发,但应用于肝癌复发转移的预测和判断仍有相当的困难。判断肿瘤转移复发的危险性和早期诊断转移的发生,并采取有效的手段预防肿瘤转移的发生,诱发肿瘤转移休眠状态或延迟转移的发生,成为当前肝癌研究的主要课题之一。

蛋白质组学研究涉及蛋白质表达模式研究和进一步的功能研究,目前以前者研究较为集中。高通量的蛋白质表达研究技术主要有蛋白质的分离、鉴定技术和生物信息学。蛋白质的鉴定技术主要为质谱法(MS),即利用样品离子化后,离子间的质荷比(m/z)的差异来分析确定样品的分子质量。常用的有两种,即电喷雾质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。生物技术的发展对新的肿瘤标志物的发现起了非常的作用,2D 电泳结合 MS、高压液相分析(HPLC)、表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS),LC-MS-MS 等技术使人们可以从蛋白质水平分析潜在的肿瘤标志物,从而使新标志物的发现提升到一个更高的水平(DDT 2003, 8(10) 4411-44316; Lancet, 2002, 359(16): 572-577; . Proteomics, 2001,1,1205-1215)

发明内容:

本发明的目的是提供一种热休克蛋白 27 的医用用途,具体涉及热休克蛋白 27 在制备血清学判别、诊断肝癌药物中的用途。

本发明涉及的热休克蛋白 27 (Heat shock protein 27) 简称 HSP27 (王万银. HSP27 研究现状. 国外医学生理病理科学与临床分册. 2001, 21: 467-469; King KL, Li AF, Chau GY, et al. Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival. Cancer, 2000, 88(11):2464-2470) .。

本发明应用蛋白质组学的方法,对动物模型实验,比较研究了不同转移潜能的人肝癌裸鼠模型 LCID20 和 LCID35 的全蛋白表达谱,结果表明 HSP27 高表达;免疫组织化学检测有转移的和未发生转移的 HCC 组织蛋白,结果显示 HSP27

定位于肝细胞胞浆内,验证了其表达水平的高低与肝癌转移潜能相关;血清蛋白质组学研究发现,在存在的差异性蛋白质中,HSP27为肝癌特有;血清的 Western Blot 鉴定结果显示 HCC 病人血清有较强的 HSP27 (100%, 20/20); 血清双盲法验证,正常人血清不显示 HSP27 (0/10), HCC 患者阳性率为 100% (30/30)。

结果证实,血清 HSP27 蛋白可以成为一种潜在的、有应用价值的测定肝癌及其转移的标志物蛋白。可用于制备包括 AFP 阴性 HCC 及其转移的预测和诊断药物。

附图说明

图 1 是非转移和转移 HCC 组织 2-DE 银染图,其中, N 非转移 HCC 组织; M 转移 HCC 组织 (以下同)。

图 2 是 HSP27 在 6 对 N、M 组织中的表达差异,

图 3 是 HSP27 在非转移和转移 HCC 组织中的免疫组织化学检测结果 (SP×400), 细胞核染成蓝色, N2 和 N3 胞浆呈现淡棕黄色, M2 和 M3 为棕褐色。

图 4 是 Western blot 分析检测 HSP27 的表达差异。

图 5 是 RT-PCR 检测 HSP27 在非转移和转移 HCC 组织中的表达,其中 A: 6 对 N、M 组织 HSP27 的 RT-PCR 结果, L, 100bp DNA ladder; HSP27 片段长 576bp, GAPDH 长 251bp; B: 以 GAPDH 为内参, 6 对 N、M 组织的 HSP27 相对表达量比较。

图6是血清蛋白质的2DE图谱 (A: 血清 B: 去白蛋白和球蛋白的血清)。

图 7 是部分差异蛋白质的 2DE 局部放大图。

图 8 是差异性蛋白质在正常血清、HBV 患者和 HCC 患者血清中相对含量, 其中*: $p<0.05$ #: $p<0.01$ 。

图 9 是 60 例血清的 Western Blot 鉴定结果 (显示 HSP27), 其中, A、B 行: 正常人血清, 未显示 HSP27; C、D 行: HBV 患者血清 (仅 1 例显示 HSP27) E、F 行: HCC 患者血清 (全部显示 HSP27)。

具体实施方式

实施例 1

采用本领域常规方法，比较研究了不同转移潜能的人肝癌裸鼠模型 LCID20 和 LCID35 的全蛋白表达谱：2D 电泳图谱显示的蛋白质数目高达 2500—3000 个，进行了差异蛋白的分析和验证。发现 HSP27 高表达。

实施例 2

应用双向凝胶电泳 (2-DE) 对 6 例临床和病理上均有转移的 HCC 组织和 6 例未发生转移的 HCC 组织蛋白进行分离，用 Image Master 软件匹配分析两组 2-DE 图谱间异同性，寻找在 3 对及 3 对以上存在的差异蛋白点，应用 MALDI-TOF-MS 和数据库搜索鉴定出差异显著的 16 个蛋白点。结果显示这些蛋白为 S100 钙结合蛋白 (S100)、27KDa 热休克蛋白(HSP27)、角蛋白 18 (CK18) 等，分别与细胞运动，信号转导，能量代谢等有关。对在 6 例转移性 HCC 组织中表达均显著高于 6 例非转移 HCC 组织的 HSP27，应用 western blotting 分析进一步验证了 2-DE 结果，RT-PCR 检测的两组间 mRNA 水平也存在差异，但不显著，免疫组织化学检测显示 HSP27 定位于肝细胞胞浆内 (图 1、2、3)。验证了 HSP27 的表达增高主要在蛋白质表达水平，而并非 mRNA 转录水平。其表达水平的高低与肝癌转移潜能相关 (图 4、图 5)

实施例 3

进行血清蛋白质组学研究，在清除了高丰度的白蛋白和球蛋白后的血清蛋白的 2DE 图谱上，采用二维电泳结合 Maldi-TOF-MS 方法比较研究正常人、HBV 病人和肝癌病人的蛋白质的差异性表达，发现至少 8 种差异性蛋白质，Transferrin (转铁蛋白, TF), Transthyretin (TTR), α 1-antitrypsin(抗胰蛋白酶 α 1), Clusterin (CLU), Haptoglobin chain(肝球蛋白 α 2 链, HP), Ceruloplasmin (CP), Heat shock protein 27 (热休克蛋白 27, HSP27), alpha-fetoprotein (甲胎蛋白); 半定量发现 HSP27 为肝癌特有。

对 60 例血清的 Western Blot 鉴定结果发现正常人血清未发现 HSP27(0/20), HBV 患者中仅 1 例发现 HSP27(95%, 1/20); 20 例 HCC 病人血清全部有较强的 HSP27 (100%, 20/20)。提示 HSP27 可用于 HCC 的诊断。

对 80 例血清进行双盲法验证，结果显示，正常人血清不显示 HSP27 (0/10)，

HBV 患者为 95% 不显示 (38/40)，假阳性率为 5% (2/40)；HCC 患者阳性率为 100% (30/30)。

表1 是差异蛋白质的质谱鉴定数据。

表 1

Area	Protein name	SWISS-PROT accession No.	Protein score	Sequence coverage (%)	Experimental kDa/ pI
1	Transferrin (转铁蛋白, TF)	P02787	86	23	76.9/6.81
2	Transthyretin (TTR)	P02766	87	63	15.8/5.52
3	α 1-antitrypsin (抗胰蛋白酶 α 1)	P01009	269	29	46.7/5.37
4	Clusterin (CLU)	P10909	154	33	37.2/4.89
5	Haptoglobinchain (肝球蛋白 α 2链, HP)	P00738	88	13	45.2/6.13
6	Ceruloplasmin (CP)	P00450	101	24	157.2/5.27
7	Heat shock protein 27 (热休克蛋白27, HSP27)	P04792	134	42	22.8/5.98
8	alpha-fetoprotein (甲胎蛋白)	P02771	263	30	47.3/5.97

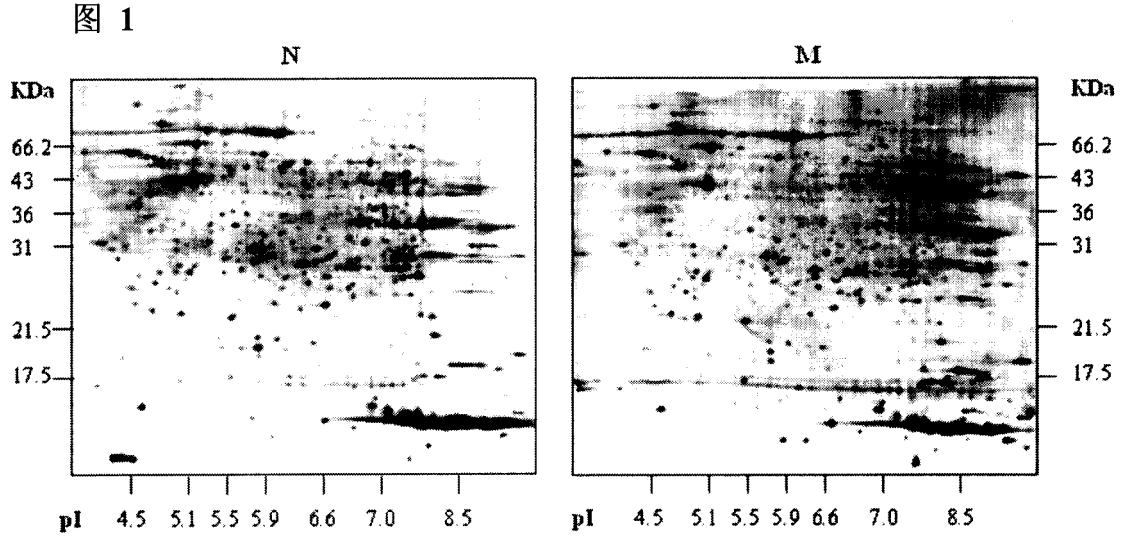
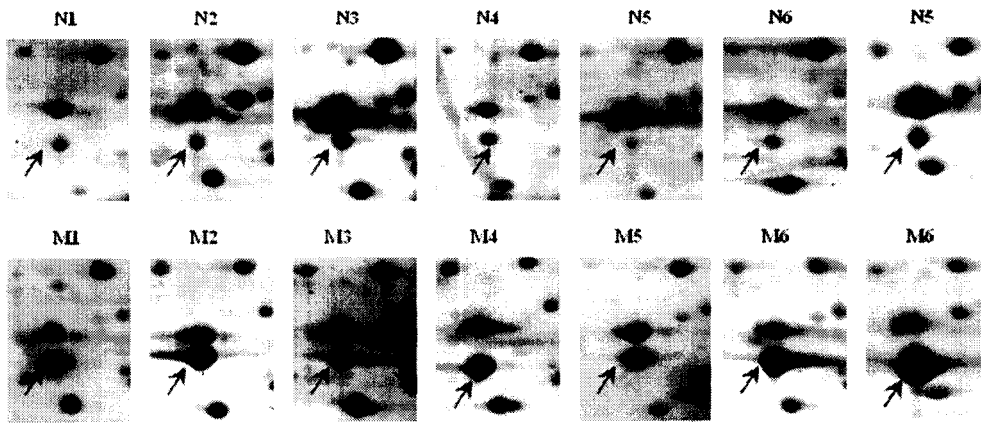


图.2



.HSP27 在 6 对 N、M 组织中的表达差异。

图 3

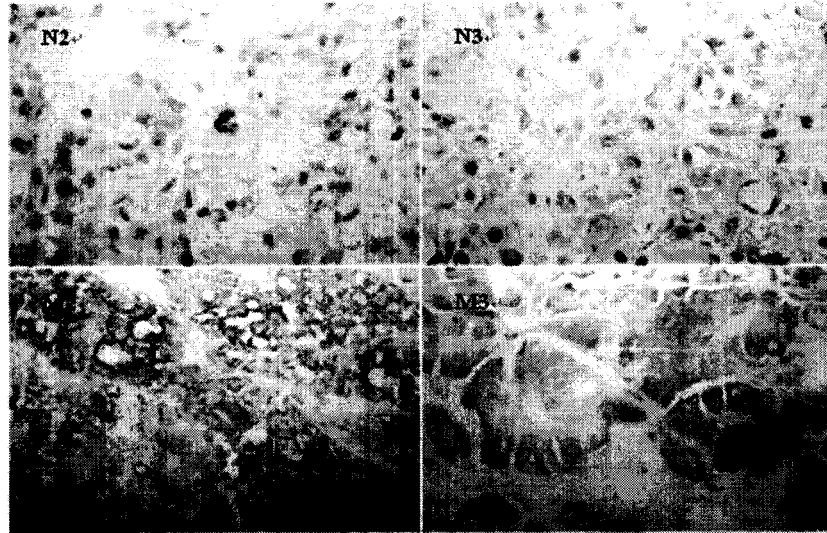


图 4

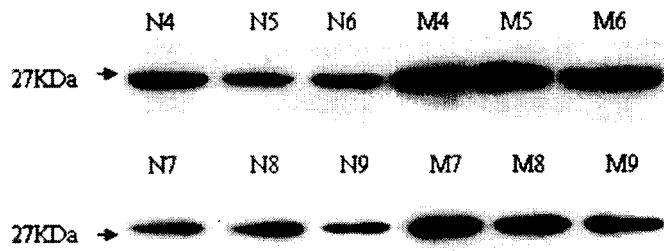


图 5 A

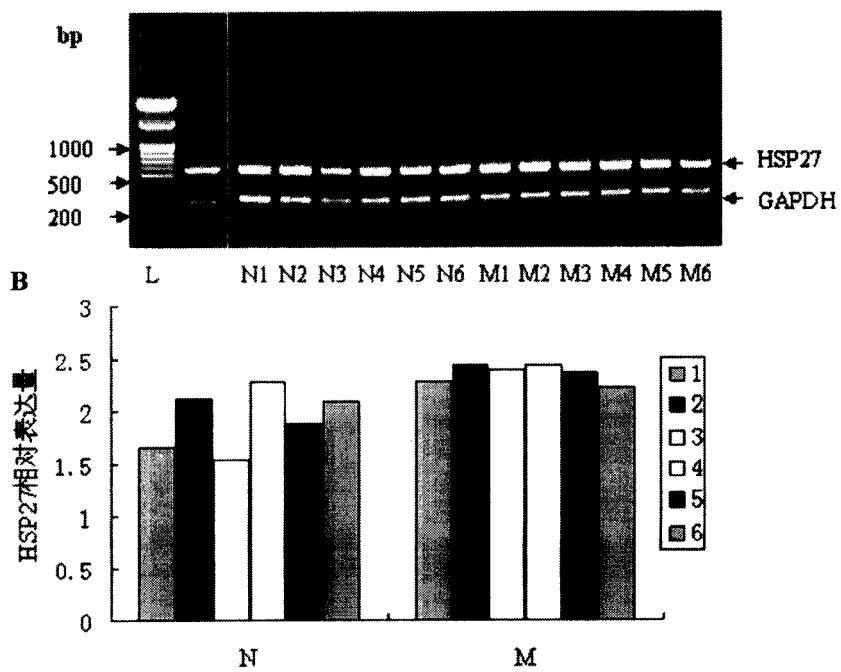


图 6.

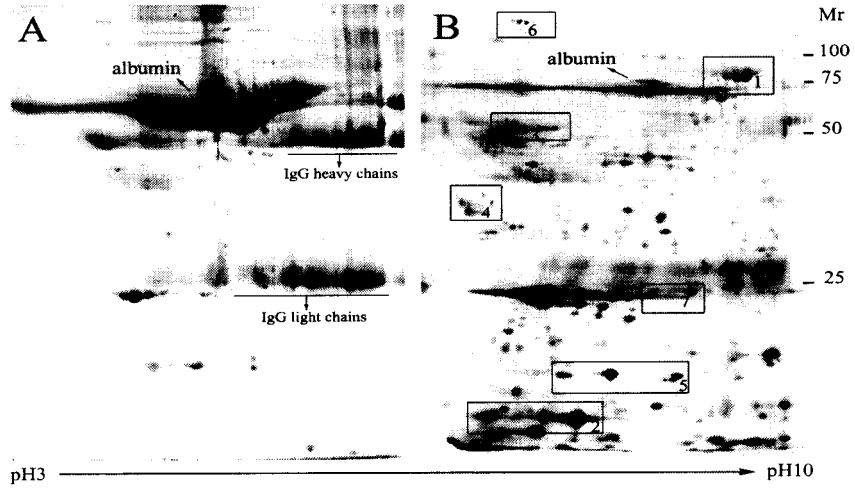


图7

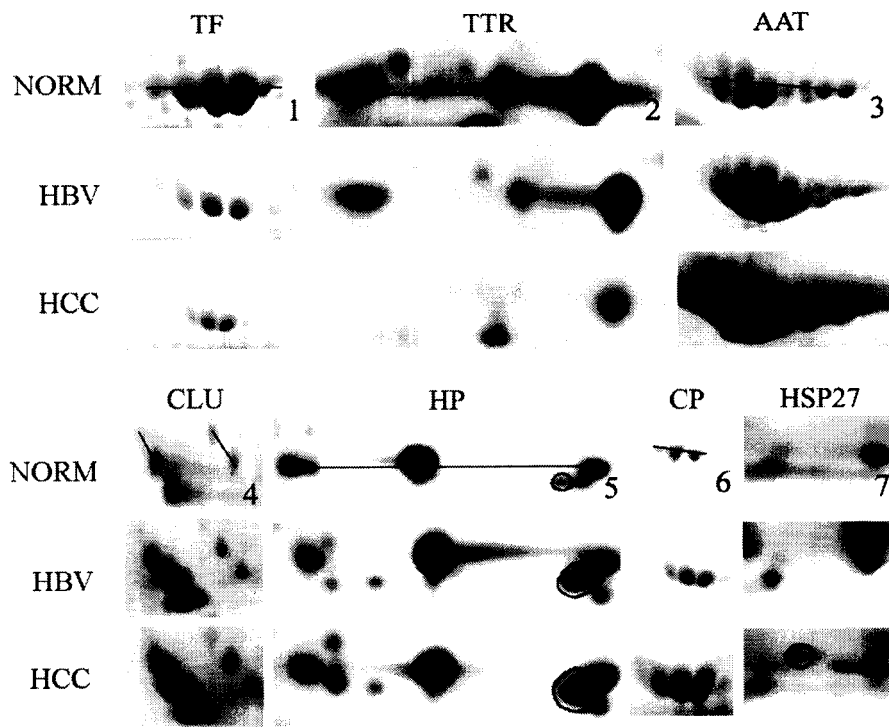


图 8

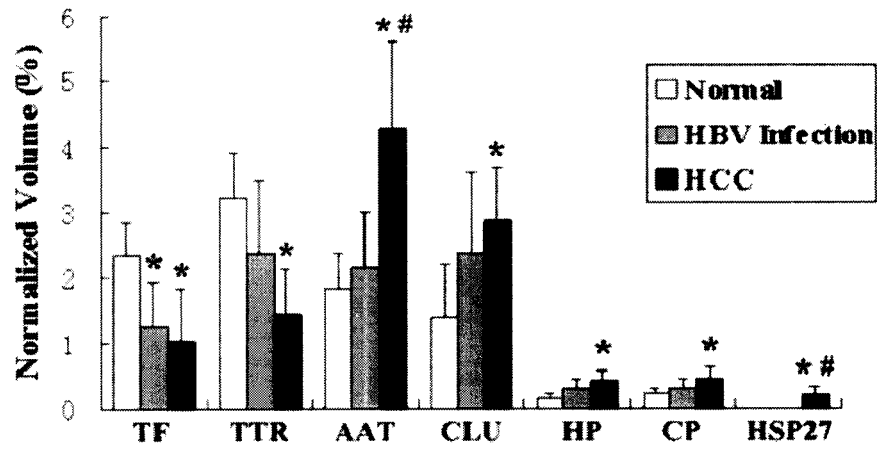
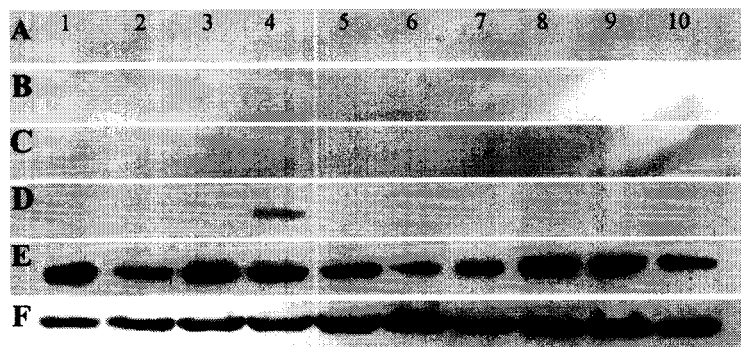


图 9



专利名称(译)	热休克蛋白27在制备血清学判别、诊断肝癌药物中的用途		
公开(公告)号	CN1851461A	公开(公告)日	2006-10-25
申请号	CN200510025340.0	申请日	2005-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
[标]发明人	刘银坤 冯钜涛 崔杰锋 宋海燕 汤钊猷 杨芑原		
发明人	刘银坤 冯钜涛 崔杰锋 宋海燕 汤钊猷 杨芑原		
IPC分类号	G01N33/531 A61K39/00 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物技术领域，涉及一种热休克蛋白27的医用用途，本发明应用蛋白质组学的方法，对动物模型实验，结果表明HSP27高表达；免疫组织化学检测结果显示HSP27定位于肝细胞胞浆内，验证了其表达水平的高低与肝癌转移潜能相关；血清蛋白质组学研究发现，在差异性蛋白质中，HSP27为肝癌特有；血清的Western Blot鉴定结果显示HCC病人血清有较强的HSP27(100%，20/20)；血清双盲法验证，正常人血清不显示HSP27(0/10)，HCC患者阳性率为100%(30/30)。结果证实，血清HSP27蛋白可成为有应用价值的测定肝癌及其转移的标志物蛋白。可用于制备包括AFP阴性HCC及其转移的预测和诊断药物。

