(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107130028 B
(45)授权公告日 2018.03.30

(21)申请号 201710340823.2

(22)申请日 2017.05.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107130028 A

(43)申请公布日 2017.09.05

(73)专利权人 新疆医科大学第四附属医院
地址 830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市沙依巴克区黄河路116号
专利权人 西南医科大学附属中医医院
乌鲁木齐市中医医院

(72)发明人 何文婷 节阳华 张彤 付晓乐 帕提玛·阿布力米提 陈卫东 巩璇 张洪亮

(74)专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理有限公司 11279
代理人 李红伟 朱萍

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2018.01)
G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件

节阳华等.白头翁汤治疗晚期结直肠癌的药效基因组学研究.《中国医药》.2015,第10卷(第6期),第865-868页.

周小军等.大肠癌湿热蕴结证患者蛋白质差异性表达的研究.《中华肿瘤防治杂志》.2010,第17卷(第22期),第1831-1834页.

审查员 宋如生

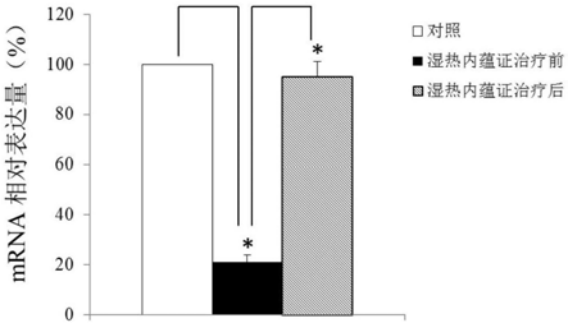
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

SYCE3在结直肠癌诊断和治疗效果评价中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价的工具-SYCE3基因。本发明通过检测受试者血液中的SYCE3基因表达产物的含量可以判断受试者是否患有湿热内蕴型晚期结直肠癌患者或者评价湿热内蕴型晚期结直肠癌患者的药物干预效果。基于本发明的研究成果,本发明还公开了一种用于湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价的试剂盒,该试剂盒可用于血液样品的检测,属于无创检测,检测效果灵敏,快速,利于在临床上推广使用。



CN 107130028 B

1.检测SYCE3基因表达量的产品在制备湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价工具中的应用。

2.根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述检测SYCE3基因表达量的产品包括能够定量样品中SYCE3基因mRNA的产品,和/或能够定量样品中SYCE3蛋白的产品。

3.根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述能够定量样品中SYCE3基因mRNA的试剂包括实时定量PCR中使用的特异扩增SYCE3基因的引物,所述引物序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示;所述能够定量样品中SYCE3蛋白的试剂包括特异性结合SYCE3蛋白的抗体。

4.根据权利要求2或3所述的应用,其特征在于,所述样品来源于血液。

5.一种用于湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价的工具,其特征在于,所述工具包括能够检测样品中SYCE3的工具;所述检测样品中SYCE3的工具包括能够检测样品中SYCE3基因表达量的工具;所述能够检测样品中SYCE3基因表达量的工具包括能够定量样品中SYCE3基因mRNA的试剂,和/或能够定量样品中SYCE3蛋白的试剂;所述能够定量样品中SYCE3基因mRNA的试剂是实时定量PCR中使用的特异扩增SYCE3基因的引物,所述引物序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示;所述能够定量样品中SYCE3蛋白的试剂包括特异性结合SYCE3蛋白的抗体。

6.根据权利要求5所述的工具,其特征在于,所述样品来源于血液。

SYCE3在结直肠癌诊断和治疗效果评价中的应用

技术领域

[0001] 本申请属于肿瘤治疗领域,涉及一种用于结直肠癌诊断和治疗效果评价的分子标志物。

背景技术

[0002] 结直肠属中医学“肠积”、“积聚”、“症瘕”、“肠覃”、“肠风’等病的范畴。中医在晚期结直肠癌的综合治疗中占据着不可替代的位置,而辨证论治这一独特优势却存在较多的主观性,导致其准确性与临床医师的临床经验直接相关;若辨证失当则会降低疗效,甚至造成严重的不良后果。因而证的客观化是广大中医研究者必须面对的一个重要研究方向。

[0003] 湿热内蕴证是结直肠癌最常见的单纯实证,是指由于湿热侵犯肠道,传导失职,表现为以泄泻下痢为主的证候。在三焦辨证中属下焦病证,多因夏秋之季,感受暑湿热邪,侵犯肠道,或饮食不洁,致使湿热秽浊之邪蕴结肠道而成。临床表现为:脘胀腹痛,下痢脓血,里急后重,或暴注下泻,色黄而秽臭,肛门灼热,身热,口渴,小便短黄,舌质红,苔黄腻,脉滑数。

[0004] 中医“证”是机体在疾病发展过程中某一阶段病因病机的高度概括,反应该阶段病理变化的本质。既然同一个“证”,具有共同的临床表现和病理基础,那考虑其有共同的物质基础,而这种物质基础很有可能反映在基因水平上。基因表达水平的变化反映了机体特定阶段的生命特征,对疾病的诊断和临床分型等有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种用于结直肠癌诊断或治疗效果评价的分子标志物,所述分子标志物是SYCE3基因及其表达产物。该分子标志物的来源是血液,通过检测血液中的SYCE3来进行结直肠癌诊断或治疗效果评价具有以下优势:无创、快速、灵敏。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0007] 本发明提供了检测SYCE3的产品在制备湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价工具中的应用。

[0008] 进一步,所述检测SYCE3的产品包括检测样品中SYCE3基因表达量的产品。

[0009] 更进一步,所述检测SYCE3的产品包括能够定量样品中SYCE3基因mRNA的产品,和/或能够定量样品中SYCE3蛋白的产品。

[0010] 本发明的定量样品中SYCE3基因mRNA的产品可基于使用核酸分子的已知方法来发挥其功能:如PCR、如Southern杂交、Northern杂交、点杂交、荧光原位杂交(FISH)、DNA微阵列、ASO法、高通量测序平台等。使用该产品可以定性地、定量地、或半定量地实施分析。

[0011] 包含在上述产品中的核酸可以通过化学合成来获得,或通过从生物材料制备含有期望核酸的基因,然后使用设计用于扩增期望核酸的引物扩增它来获得。

[0012] 进一步,所述PCR方法为已知方法,例如,ARMS(Amplification Refractory Mutation System,扩增不应突变系统)法、RT-PCR(逆转录酶-PCR)法、嵌套PCR法等等。扩增

的核酸可以通过使用点印迹杂交法、表面等离子共振法(SPR法)、PCR-RFLP法、原位RT-PCR法、PCR-SSO(序列特异性寡核苷酸)法、PCR-SSP法、AMPFLP(可扩增片段长度多态性)法、MVR-PCR法、和PCR-SSCP(单链构象多态性)法来检测。

[0013] 在本发明的具体实施方案中,所述能够定量样品中SYCE3基因mRNA的试剂包括实时定量PCR中使用的特异扩增SYCE3基因的引物,所述引物序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

[0014] 产品中包括的引物可以通过化学合成来制备,通过使用本领域技术人员知道的方法参考已知信息来适当地设计,并通过化学合成来制备。

[0015] 上面所述的核酸还可包括探针,所述探针可以通过化学合成来制备,通过使用本领域技术人员知道的方法参考已知信息来恰当设计,并通过化学合成来制备,或者可以通过从生物材料制备含有期望核酸序列的基因,并使用设计用于扩增期望核酸序列的引物扩增它来制备。

[0016] 本发明的定量样品中SYCE3蛋白的产品可基于使用抗体的已知方法来发挥其功能:例如,可以包括ELISA、放射免疫测定法、免疫组织化学法、Western印迹等。

[0017] 本发明的定量样品中SYCE3蛋白的产品包括特异性结合SYCE3蛋白的抗体或其片段。可以使用任何结构、尺寸、免疫球蛋白类别、起源等的抗体或其片段,只要它结合靶蛋白质即可。本发明的检测产品中包括的抗体或其片段可以是单克隆的或多克隆的。抗体片段指保留抗体对抗原的结合活性的抗体一部分(部分片段)或含有抗体一部分的肽。抗体片段可以包括F(ab′)$_2$、Fab′、Fab、单链Fv(scFv)、二硫化物键合的Fv(dsFv)或其聚合物、二聚化V区(双抗体)、或含有CDR的肽。本发明的定量样品中SYCE3蛋白的产品可以包括编码抗体或编码抗体片段的氨基酸序列的分离的核酸,包含该核酸的载体,和携带该载体的细胞。

[0018] 抗体可以通过本领域技术人员公知的方法来获得。标记物与抗体或其片段的结合可以通过本领域普遍知道的方法来实施。

[0019] 作为依照本发明的检测产品的样品,可以使用例如自活检患者获得的组织样品或流体。样品不受特别限制,只要它适于本发明的测定;例如,它可以包括组织、血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、浆膜腔液、脊髓液、滑液、房水、泪液、唾液、或其级分或经过处理的材料。

[0020] 在本发明的具体实施方案中,所述样品来源于血液。

[0021] 进一步,所述定量SYCE3基因或SYCE3蛋白的产品可以是检测SYCE3基因或SYCE3蛋白的试剂、也可以是包含所述试剂的试剂盒、芯片、试纸等,也可以是使用所述试剂的高通量测序平台。

[0022] 本发明还提供了一种用于湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价的工具,所述工具包括能够检测样品中SYCE3的工具。

[0023] 进一步,所述工具包括能够检测样品中SYCE3基因表达量的工具。

[0024] 更进一步,所述工具包括包括能够定量样品中SYCE3基因mRNA的试剂,和/或能够定量样品中SYCE3蛋白的试剂。

[0025] 在本发明的具体实施方案中,所述能够定量样品中SYCE3基因mRNA的试剂是实时定量PCR中使用的特异扩增SYCE3基因的引物,所述引物序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示;所述能够定量样品中SYCE3蛋白的试剂包括特异性结合SYCE3蛋白的抗体。

[0026] 进一步,所述用于湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价的工具包括

但不限于芯片、试剂盒、试纸、或高通量测序平台;高通量测序平台是一种特殊的工具,随着高通量测序技术的发展,对一个人的基因表达谱的构建将成为十分便捷的工作。通过对比疾病患者和对照人群的基因表达谱,容易分析出哪个基因的异常与疾病相关。因此,在高通量测序中获知SYCE3基因的异常与湿热内蕴型晚期结直肠癌相关也属于SYCE3的用途,同样在本发明的保护范围之内。

[0027] 作为依照本发明的检测工具的样品,可以使用例如自活检患者获得的组织样品或流体。样品不受特别限制,只要它适于本发明的测定;例如,它可以包括组织、血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、浆膜腔液、脊髓液、滑液、房水、泪液、唾液、或其级分或经过处理的材料。

[0028] 在本发明的具体实施方案中,所述样品来源于血液。

[0029] 本发明提供了一种湿热内蕴型晚期结直肠癌患者诊断或治疗效果评价的方法,所述方法包括检测患者血液中SYCE3基因的表达量。

[0030] 本发明的分子标志物用于诊断时,当检测到晚期结直肠癌患者血液中SYCE3基因的表达量显著低于非湿热内蕴型晚期结直肠癌患者时,表明该晚期结直肠癌患者是湿热内蕴型晚期结直肠癌患者。

[0031] 本发明的分子标志物用于治疗效果评价时,给予湿热内蕴证治疗药物干预后,当检测到湿热内蕴型晚期结直肠癌患者血液中SYCE3基因的表达量显著低于非湿热内蕴型晚期结直肠癌患者时,表明该晚期结直肠癌患者药物治疗效果缓慢,还需继续药物干预治疗,直到湿热内蕴型晚期结直肠癌患者血液中SYCE3基因的表达量基本与非湿热内蕴型晚期结直肠癌患者持平,则可以判断该晚期结直肠癌患者的湿热内蕴证消除,患者可以停止服用药物。从另外一个角度来说,治疗效果的评价还可以表示成治疗周期或者治疗终止的判断,当湿热内蕴型晚期结直肠癌患者血液中SYCE3基因的表达量基本与非湿热内蕴型晚期结直肠癌患者持平时,患者治疗才可以终止。

[0032] 在本发明的具体实施方案中,用于湿热内蕴证的治疗药物是白头翁颗粒。

附图说明

[0033] 图1显示利用QPCR在mRNA水平上检测SYCE3基因差异表达情况的统计图。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring HarborLaboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0035] 实施例1差异表达基因筛选

[0036] 1、病例收集

[0037] 收集医院肿瘤科经病理明确诊断的I I I-IV期结直肠癌患者;选择湿热内蕴证5例作为实验组,非湿热内蕴证5例作为对照组;仅接受纯中医治疗。

[0038] 1.1结直肠癌的诊断及分期标准

[0039] 参照中华人民共和国卫生部医政司2010年10月编著的《结直肠癌诊疗规范》,2011NCCN肿瘤临床实践指南(中国版)第一版TNM分期标准。

[0040] 1.2诸证的诊断标准

[0041] 参照《中医诊断学》及《中药新药临床研究指导原则》制定。

[0042] 湿热内蕴证主证:脘胀腹痛,暴注下泄,下痢脓血、里急后重,腹泻不畅、粘腻腥臭、肛门灼热;次证:身热,口渴,小便短黄,舌红苔黄腻,脉滑数。诊断:具备主证1项,次证3项;或主证2项,次证2项可诊断。

[0043] 1.3纳入、排除标准

[0044] 纳入标准:(1)汉族III-IV期结直肠癌患者,有病理诊断,仅接受纯中医治疗;(2)KPS评分≥60;(3)年龄18-75岁之间(包含18岁和75岁);(4)预计生存期在3个月以上;(5)依从性好,签署知情同意书自愿参与实验。

[0045] 排除标准:(1)合并有严重的或需要治疗的心脑血管、肝、肾和造血系统疾病;(2)孕妇、哺乳期及精神病患者;(3)有明显的复合证患者。

[0046] 2、治疗方法

[0047] 湿热内蕴证5例使用白头翁颗粒(江阴天江药业有限公司生产)进行干预,方法为每次1袋,水冲服,2次/d,治疗时间为21d,期间患者不接受其他中医药治疗。

[0048] 3、总mRNA提取

[0049] 对照患者,疗前和治疗后患者清晨空腹采集外周静脉血5ml,以红细胞裂解液分离出白细胞,加入细胞20倍体积的Trizol,用移液器进行反复抽打细胞直至无成团细胞块,使之充分溶解于Trizol中形成清亮不黏稠的液体,置-80℃冰箱中保存。Trizol一步法抽提总mRNA。总mRNA纯度及完整性分析:采用分光光度计在260nm和280nm处分别测定吸光度(A)值,A_{260}/A_{280}比值1.8-2.0为较纯的mRNA;经琼脂糖凝胶电泳检测:28S条带亮度约是18S条带的2倍表明所提取RNA完整性较好,可用于芯片检测。

[0050] 4、Agilent表达谱芯片杂交

[0051] RNA质检合格后,参照芯片标准流程进行样本标记、芯片杂交以及洗脱。首先,总RNA反转录成双链cDNA,再进一步合成以Cyanine-3-CTP(Cy3)标记的cRNA。将标记好的cRNA和芯片杂交,洗脱后利用Agilent Scanner G2505C(美国安捷伦科技有限公司)扫描得到原始图像。

[0052] 5、数据处理

[0053] 采用Feature Extraction软件(version10.7.1.1,Agilent Technologies)处理原始图像提取原始数据。接着利用Genespring软件(version 12.5:Agilent Technologies)进行quantile标准化和后续处理。标准化后的数据进行过滤,在用于比较的每组样本中至少有一组100%标记为Detected的探针留下进行后续分析。利用t检验得到的差异显著性P值和标准化信号值的差异倍数Fold change值进行差异基因筛选,筛选的标准为上调或者下调倍数变化值≥2.0且$P<0.05$。

[0054] 6、结果

[0055] 结果显示,湿热内蕴证与对照组相比共筛选出168条差异表达基因,其中上调的75条,下调的93条。

[0056] 经白头翁颗粒干预后与干预前相比,筛选出159条差异表达基因,其中表达上调有38条,下调有121条。

[0057] 实施例2差异表达基因的验证

[0058] 根据实施例1的结果,选择差异表达的SYCE3基因进行大样本验证。

[0059] 1、病例收集

[0060] 按照实施例1的方法收集湿热内蕴型晚期结直肠癌患者50例、非湿热内蕴证晚期结直肠癌患者50例作为对照。

[0061] 2、治疗方法同实施例1。

[0062] 3、在mRNA水平上进行验证

[0063] 3.1提取血液总RNA

[0064] 步骤同实施例1。

[0065] 3.2逆转录

[0066] 反转录使用Primescript 1st strand cDNA synthesis kit试剂盒,操作步骤如下进行:

[0067] (1)在微量离心管中加入以下反应液体,如表1所示:

[0068] 表1反应液体

[0069]

试剂	剂量
RNA	2.0μg
dNTP	1.0μl
Oligo(dT)	2.0μl
Rnase free dH_2O	加至10.0μl

[0070] (2)70℃孵育5min,迅速冷却至4℃;

[0071] 在微量离心管内加入以下反应试剂,制成反应体系:

[0072] 表2反应体系的配制

[0073]

试剂	剂量
5x1st Strand Synthesis Buffer	4.0μl
PrimeScript RTase	1.0μl
RNase Inhibitor	1.0μl
Rnase free dH_2O	4.0μl

[0074] 轻轻震荡,快速离心后,42℃反应1h,70℃10min终止反应,4℃冷却,-20℃保存。

[0075] 采用SYBP Premix Ex Tap™ II试剂盒,在Eppendorf Real-time PCR分析仪进行,具体操作如下:

[0076] (1)在冰上配制以下PCR反应液:

[0077] 表3 PCR反应液的配制

[0078]

试剂	剂量
SYBR	10.0μl
正向引物	1.0μl
反向引物	1.0μl
cDNA	2.0μl

ddH_2O	6.0μl
总量	20.0μl

[0079] 引物序列设计如下：

[0080] SYCE3基因：

[0081] 5’-ATCTGAATAAGGACTTGGAA-3’(SEQ ID NO.1)；

[0082] 5’-ATCACCACCATGTCATAG-3’(SEQ ID NO.2)

[0083] β-actin：

[0084] 5’-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3’(SEQ ID NO.3)；

[0085] 5’-CTCCTTAATGTCACGCACGATTT-3’(SEQ ID NO.4)

[0086] (2)上机，执行下述程序：95℃预变性3min；95℃变性15s，60℃退火，15s，72℃延伸20s，共40个循环。

[0087] 结果采用相对定量法，运用公式$2^{-\triangle\triangle ct}$计算。实验重复3次。

[0088] △ct＝ct(A)-ct(β-actin)

[0089] △△ct＝△ct(实验组)-△ct(对照组)

[0090] 结果如图1所示，湿热内蕴型晚期结直肠癌患者与对照组相比，SYCE3基因mRNA量显著降低，差异具有统计学意义(P<0.05)。

[0091] 湿热内蕴型晚期结直肠癌患者经白头翁颗粒干预后与干预前相比，SYCE3基因mRNA量显著升高，差异具有统计学意义(P<0.05)，基本与对照组持平。

[0092] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 新疆医科大学第四附属医院;西南医科大学附属中医医院;乌鲁木齐市中医医院

[0003] <120> SYCE3在结直肠癌诊断和治疗效果评价中的应用

[0004] <160> 4

[0005] <170> PatentIn version 3.5

[0006] <210> 1

[0007] <211> 20

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 人工序列

[0010] <400> 1

[0011] atctgaataa ggacttggaa 20

[0012] <210> 2

[0013] <211> 18

[0014] <212> DNA

[0015] <213> 人工序列

[0016] <400> 2

[0017] atcaccacca tgtcatag 18

[0018] <210> 3

[0019] <211> 20

[0020] <212> DNA

[0021] <213> 人工序列

[0022] <400> 3

[0023] gtggggcgcc ccaggcacca 20

[0024] <210> 4

[0025] <211> 23

[0026] <212> DNA

[0027] <213> 人工序列

[0028] <400> 4

[0029] ctccttaatg tcacgcacga ttt 23

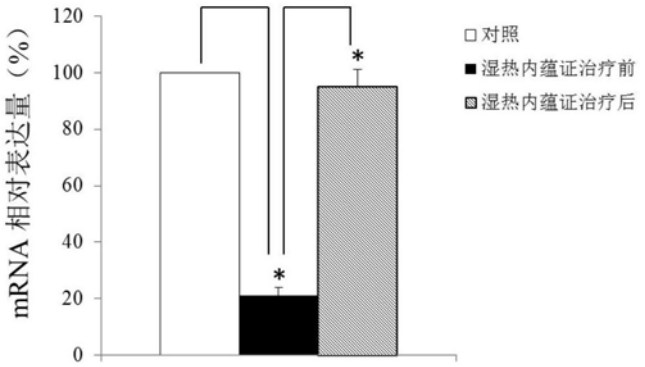


图1