



(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 I429910 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：100137548

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 17 日

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

G01N33/566 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：吳明蒼 WU, MING TSANG (TW)；吳登強 WU, DENG CHYANG (TW)；蘇弘儒 SU, HUNG JU (TW)；周世華 CHOU, CHAH HWA (TW)；黃偕倫 HUANG, JIE LEN (TW)；陳玉桂 CHEN, YU KUEI (TW)；吳俊杰 WU, CHUN CHIEH (TW)

(56)參考文獻：

US 2010/0120788A1

Chattopadhyay I et al., "Molecular profiling to identify molecular mechanism in esophageal cancer with familial clustering", *Oncology Reports*, vol.21, p.1135-1146, 2009Zinovyeva MV et al., "Identification of some human genes oppositely regulated during esophageal squamous cell carcinoma formation and human embryonic esophagus development", *Diseases of the Esophagus*, vol.23, p.260-270, 2009/08/28Wang Z et al., "A Genome-Wide Expression Analysis in Blood Identifies Pre-Elafin as a Biomarker in ARDS", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol.38, p.724-732, 2008/01/18

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：4 共 0 頁

(54)名稱

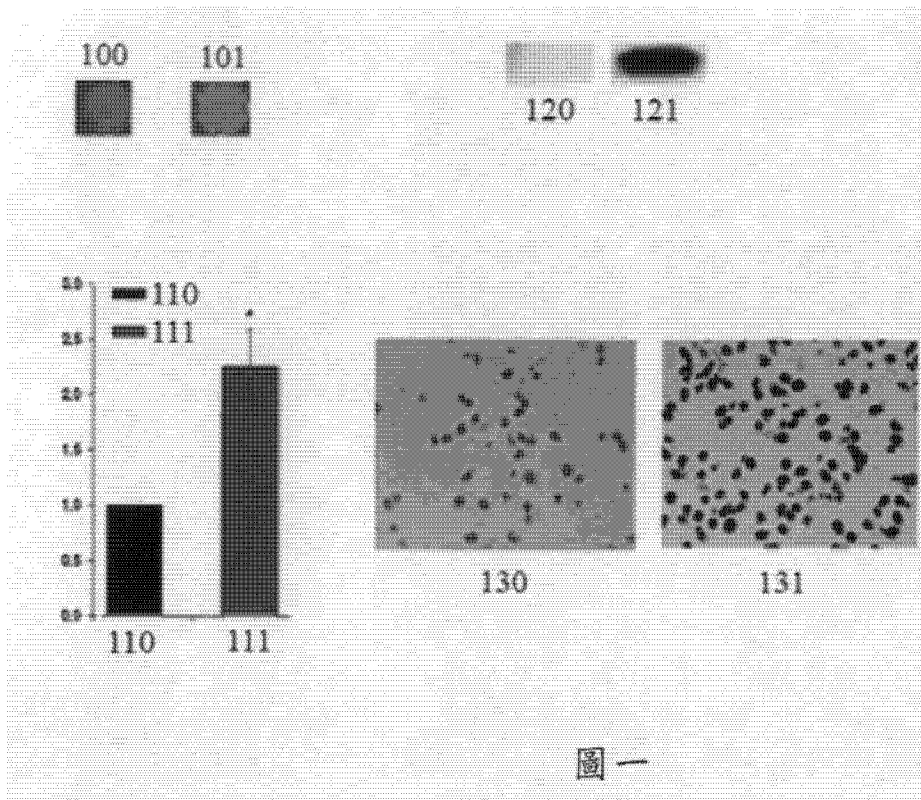
預測食道癌存活及癒後狀態之方法及其套組及微陣列晶片

METHOD FOR PREDICTING THE SURVIVAL STATUS AND PROGNOSIS OF ESOPHAGEAL CANCER AND KIT AND MICROARRAY CHIP THEREOF

(57)摘要

本發明提供一種預測食道癌病患之癒後及存活機率之方法及其套組及微陣列晶片，其特徵在於檢測食道癌檢體中之 PI3(peptidase inhibitor 3)或 CD14 基因表現量，並對照組為其他患有食道癌病患之檢體之該特定基因平均表現量以判斷食道癌病患之癒後及存活機率。

The present invention provides a method for predicting the survival status and prognosis of esophageal cancer and kit and microarray chip thereof, which is characterized in examining the expression of a specific gene, peptidase inhibitor 3 (PI3) or CD14 antigen (CD14), in a sample, and then comparing to the average expression of said specific gene in other patients' sample to determine the survival status and prognosis of esophageal cancer.



圖一

100 . . . PI3 的 RNA 表現訊號(使用全基因微陣晶片檢測 CE81T2 細胞株)

101 . . . PI3 的 RNA 表現訊號(使用全基因微陣晶片檢測 CE81T2-4 細胞株)

110 . . . PI3 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2 細胞株)

111 . . . PI3 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2-4 細胞株)

120 . . . PI3 蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2 細胞株)

121 . . . PI3 蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2-4 細胞株)

130 . . . PI3 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2 細胞株)

131 . . . PI3 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2-4 細胞株)

發明專利說明書

※ 申請案號：100/37588

GoIN 33/574 (2006.01)

※ 申請日：100.10.17

※ IPC 分類：

GoIN 33/566 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

預測食道癌存活及癒後狀態之方法及其套組及微陣列晶片/

METHOD FOR PREDICTING THE SURVIVAL STATUS AND PROGNOSIS  
OF ESOPHAGEAL CANCER AND KIT AND MICROARRAY CHIP  
THEREOF

## 二、中文發明摘要：

本發明提供一種預測食道癌病患之癒後及存活機率之方法及其套組及微陣列晶片，其特徵在於檢測食道癌檢體中之 PI3(peptidase inhibitor 3)或 CD14 基因表現量，並對照組為其他患有食道癌病患之檢體之該特定基因平均表現量以判斷食道癌病患之癒後及存活機率。

## 三、英文發明摘要：

The present invention provides a method for predicting the survival status and prognosis of esophageal cancer and kit and microarray chip thereof, which is characterized in examining the expression of a specific gene, peptidase inhibitor 3 (PI3) or CD14 antigen (CD14), in a sample, and then comparing to the average expression of said specific gene in other patients' sample to determine the survival status and prognosis of esophageal cancer.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

100 PI3 的 RNA 表現訊號(使用全基因微陣晶片檢測 CE81T2 細胞株)

101 PI3 的 RNA 表現訊號(使用全基因微陣晶片檢測 CE81T2-4 細胞株)

110 PI3 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2 細胞株)

111 PI3 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2-4 細胞株)

120 PI3 蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2 細胞株)

121 PI3 蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2-4 細胞株)

130 PI3 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2 細胞株)

131 PI3 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2-4 細胞株)

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。

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

一種檢測食道癌之方法及檢測組合物，目的在於檢測早期食道癌中特定基因表現量並預測食道癌病患之癒後及存活機率。

### 【先前技術】

食道癌為一高侵略性之癌症，其5年存活率小於15%，現今已成為癌症致死率第六名，且每年全世界之食道癌發病率有漸漸升高的趨勢，食道癌存在許多亞型，食道的腫瘤長會導致吞嚥困難（Dysphagia），疼痛和不舒服，並需要靠活組織切片檢查做診斷，小的且沒有轉移的腫瘤可靠外科手術治療，但侵犯性強的腫瘤則須靠化學療法、放射線療法或合併使用治療，此病的癒後要看病症不同的程度而定。吞嚥困難是大多數食道癌患者的第一個症狀，吞嚥疼痛也可能會發生。液體和軟性食物通常可接受，而較硬的固體食物（如麵包或肉類）就會困難許多。體重下降可能同時是營養不足合併癌症活動的一個表現。常見症狀為疼痛，特別是灼燒樣痛，可為劇痛、伴隨吞嚥加重，或為陣痛，再者，癌腫可能擾亂正常的胃蠕動，導致噁心、嘔吐和食物逆流。由此還會導致咳嗽和發生吸入型肺炎的危險。腫瘤表面可能易破易出血，臨床表現為嘔血。晚期食道癌因癌腫壓迫局部組織，還可能引發上腔靜脈症候群等症狀。另一個併發症是食道和氣管之間發生瘻管。異物經瘻管入肺導致的肺炎常表現為咳嗽、發熱或肺吸入。又，

已經遠端轉移的食道癌還會在轉移部位引起其他症狀，例如肝臟轉移導致黃疸、腹水，肺轉移導致呼吸困難、胸膜積液等。

找尋有潛力之基因能夠預測食道癌尤其在早期階段之癒合及存活機率是非常迫切的。現今之預測食道癌為藉由使用抗體或探針去檢測檢體之特定序列或廣泛與食道癌相關之蛋白質，亦或藉由檢測病人之單核苷酸多態性以預測該病人之食道癌細胞是否可被化療之方式治癒。然而先前技術中因對於較不明確之標的物進行檢測以預測食道扁平上皮細胞癌患者癒合存活率，有失其準確性，且程序也較為複雜。另外在美國專利案案號 2009/0208514 A1 中揭露檢測 DKK1 來診斷食道癌外，也可預測食道癌之癒後情形。然而若僅以觀測 DKK1 基因之表現量判斷食道癌癒後情形，不免懷疑其準確性。

然，本發明提供一有別於上述專利之檢測方法，針對檢測食道癌進一步提供二明確檢測標的物，藉由判斷此二檢測標的物之表現量可準確預測食道癌患者之癒後及存活機率，提升以往檢測食道扁平上皮細胞癌以評估病人癒後之準確性。

### 【發明內容】

本發明提供一種用以判斷食道癌患者癒後或存活機率之方法，其包含：

- a. 取得一檢體；
- b. 檢測該檢體之特定基因在 RNA、細胞層次蛋白質或活體組織內蛋白質之表現量；及

c. 將該特定基因之表現量與一對照組進行比對；

其中該特定基因為 CD14 抗原(CD14)或 PI3 (peptidase inhibitor 3)、該對照組為其他患有食道癌病患之檢體之該特定基因平均表現量；其中該檢體之 CD14 表現量高於該對照組，則判斷為癒後或存活機率良好；其中，當該檢體之 PI3 之表現量高於該對照組，則判斷為癒後或存活機率不佳。

本發明所提供之方法可為使用即時 PCR、微陣列晶片、免疫組織化學染色法或西方墨點法以檢測該檢體及該對照組之該特定基因之 RNA、蛋白質或活體內組織之蛋白質表現量。

為使本發明所提供之方法順利實施，本發明另外提供一種用以檢測食道癌患者癒後及存活機率之檢測套組，其包含：一即時 PCR 運作裝置，用以檢測一檢體之特定基因之 RNA 表現量；及一組引子，用以輔助該 PCR 運作裝置複製特定基因；其中該特定基因為 CD14 或 PI3。同時本發明也提供一種用以判斷食道癌患者癒後或存活機率之微陣列晶片，其包含：一微陣列晶片；及一可辨認特定基因之抗體或核苷酸序列；其中該特定基因為 CD14 或 PI3。

本發明另外提供兩組引子，其分別包含 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2，與 SEQ ID NO:3 及 SEQ ID NO:4 之核苷酸序列，其可應用於本發明提供之檢測套組及微陣列晶片，用以複製或辨認 CD14 或 PI3 之核苷酸。

### 【實施方式】

本發明使用一株臺灣食道扁皮上皮細胞癌(ESCC, CE81T/VGH)，利用

Transwell invasion chamber assay, 觀察及挑選出侵襲到下層空間之不同侵襲能力之惡性子代細胞。本發明之後使用全基因微陣列晶片比對親代細胞(CE81T1/CE81T1-1)與最有侵襲能力之子代細胞(CE81T2/CE81T2-4), 根據(1)由基因集分析(enrichment analysis)支持參予細胞黏附、細胞骨架重構或細胞外膜重建, 或者由文獻支持與腫瘤與癌症的形成和/或進展相關; (2)在原始數據中顯示中至高表現強度; 以及(3)基因產物被分泌或位於細胞外、細胞膜或細胞質, 最後鑑定出 13 個潛在的候選基因於表一, 其中 5 個基因表現量為增加, 8 個基因表現量呈現減少之趨勢, 以此對此 13 個基因進行體外研究, 且發現 PI3(peptidase inhibitor 3)與 CD14 抗原(CD14)和食道癌癒後及存活機率有高度相關。本發明所使用細胞株為 CE81T2 以及 CE81T2-4 來觀測此二基因之 RNA 表現量與蛋白質表現量以進行研究, 其中 CE81T2-4 較於 CE81T2 惡性, 實驗結果發現 PI3(peptide inhibitor 3)和 CD14 抗原(CD14)之 RNA 表現量(由即時 PCR 或 DNA 晶片測定)及蛋白質表現量(由西方墨點法或免疫染色測定)結果一致顯示於圖一與圖二。

表一 利用人類膜蛋白/分泌蛋白之寡核酸晶片自 ESCC 細胞株及其子代篩選出之 13 個候選基因

	基因簡稱	基因名稱	表現位置	可做為癒後參考之前案
正向調控				
1	PI3	Peptidase inhibitor 3	細胞外	無
2	CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	細胞外	無
3	GJA1	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa	細胞膜	無
4	MMP1	Matrix metalloproteinase 1	細胞外	Gu et al., 2005
5	NTS	Neurotensin	細胞外	無
負向調控				



1	CD14	CD14 antigen	細胞膜	無
2	MMP9	Matrix metalloproteinase 9	細胞外	Gu et al., 2005
3	FN1	Fibronectin 1	細胞外	無
4	SCNN1A	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	細胞膜	無
5	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	細胞外	Kita et al., 2006; Ito et al., 2006
6	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	細胞膜	無
7	MUC1	Mucin 1, transmembrane	細胞膜	Sagara et al., 1999 Song et al. 2003
8	MUC4	Mucin 4, transmembrane	細胞膜	無

### 實施方式一 即時 PCR 檢測

由圖一所示，PI3 此基因在進行全基因微陣列晶片中在 CE81T2-4 此細胞株中有顯示訊號 100 但 PI3 在 CE81T2 中 101 則無，而圖二 A-1 可得知 CD14 在 CE81T2 表現 200 是高於在 CE81T2-4 的表現量 201。在使用即時 PCR 對此二細胞株檢測其 PI3 及 CD14 之 RNA 表現量，實驗方法為抽取細胞株之全部的 RNA，藉由反轉錄成 cDNA，再取出 300ng 的 cDNA 加入 1X SYBR Green Master Mix (Roche Cat ; NO.03 531 295 001) 以及 10mM 之引子(引子序列如表二及 SEQ ID NO.1~4 所示)以放大 PI3、CD14 及甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (GADPH) 的 RNA 量藉此觀察細胞株表現 PI3 和 CD14 之表現情形。其後進行 40 個溫度循環：初期變性溫度 95°C 進行 10 分鐘，接著變性溫度 94°C 15 秒和結合溫度 60°C 1 分鐘，其放大之訊號由 ABI 一步驟即時 PCR 系統 (Applied Biosystems) 檢測，藉此觀測 CE81T2 以及 CE81T2-4 中 PI3 及 CD14 的表現量，檢測結果於圖一 B 及圖二 A-2 與 B。於圖一 B 中其 CE81T2-4 之 PI3 RNA 表現量 111 約為在 CE81T2 的表現量 110 的兩倍；而由圖二 A-2

可以得知 CD14 的 RNA 表現在 CE81T2 細胞株 202 內高於在 CE81T2-4 的表現 203，且可由圖二 B 得知 CE81T2-4 的 CD14 表現量 211 為 CD14 在 CE81T2 表現量 210 約 0.4 倍。

表二 引子序列

基因	引子序列	產物大小 (bp)
PI3	Forward : 5'-GGC AGC TGT CAC GGG AGT T-3' Reverse : 5'-CCT GGG CAG TCA GTA TCT TTC AA-3'	237
CD14	Forward: 5'-GGG TTC ACA GAG GAG GGAAC -3' Reverse: 5'-CGC GCT CCA TGG TCG ATA-3'	91
GAPDH	Forward:5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3' Reverse:5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3'	142

### 實施方式二 西方墨點法檢測

再者，以進行西方墨點法檢測細胞株中所含有的 PI3 及 CD14 蛋白質的表現量，實驗方法為將欲檢測之 CD14 蛋白質的細胞株中加入溶緩衝溶液中 (150 mmol/l 氯化鈉, 0.1% 十二烷基硫酸鈉, 10 mmol/l 乙二胺四乙酸 (EDTA), 和 1% NP40, 1×蛋白脢抑制劑(Roche)) 和 50 mmol/l 三氨基甲烷鹽酸鹽(Tris-HCl)(pH 7.5)以此取得其全部的蛋白質；而檢測 PI3 蛋白質之細胞株則是利用 TCA 沉澱法取其細胞株中全部的蛋白質。細胞株胞溶之緩衝溶液中所含有全部的蛋白質的濃度為使用 BCA 蛋白質測定法(Pierce)測定，之後加入顯色劑(Invitrogen)到細胞株胞溶之緩衝溶液中加熱到 70°C 持續十分鐘。再加入 40μg 的蛋白質進 4-12% 梯度濃度丙烯醯胺膠 (acrylamide gel)(Invitrogen)的每個跑道中進行跑膠。跑完後轉移至 PVDF 膜(Pall)上，使用 5% 的牛奶-TBST 進行阻塞，然後放入加有一抗包含抗 CD14 之兔子多源抗體(sc-58954, SantaCruz)及抗 PI3 之兔子多源抗體(sc-20637, SantaCruz)

進行培養，然後再加入 1:5000 帶有山葵過氧化氫酶(HRP)之二抗(Pierce)辨認其一抗，再用化學冷光偵測系統(Millipore)進行偵測，最後再將此 PVDF 膜沖洗後曝露在底片中。另外再使用抗 GADPH 之多源抗體(Ab Frontier)辨認此內部控制組蛋白，來比對細胞株所含有之 PI3 及 CD14 的蛋白含量。實驗結果於圖一 C 及圖二 C，由圖一 C 發現 PI3 在 CE81T2-4 中有高表現量 121，反之在 CE81T2 中 120 觀測不到 PI3 蛋白質表現；圖二 C 則觀測到 CD14 蛋白質表現量在 CE81T2 中 220 較於在 CE81T2-4 的表現 221 來的高。

### 實施方式三 免疫組織染色

本發明也在對於 CE81T2 及 CE81T2-4 細胞株進行免疫染色的實驗中也發現相同的實驗結果於圖一 D 和圖二 D。免疫染色實驗所用之抗體與上述西方墨點法相同，皆為抗 CD14 之兔子多源抗體(sc-58954, SantaCruz)及抗 PI3 之兔子多源抗體(sc-20637, SantaCruz)，於圖一 D 所示，PI3 在於 CE81T2-4 有高表現量 131；而圖二 D 顯示 CD14 蛋白質在 CE81T2 表現量 230 較高。總結圖一 D 及圖二 D 顯示之實驗結果，在 CE81T2-4 中，PI3 的表現量較高而 CD14 則較低；反之，在 CE81T2 中，PI3 的表現量則是較低而 CD14 則較高，而因 CE81T2-4 較於 CE81T2 惡性，因此 CE81T2-4 偏向屬於低癒合存活率而 CE81T2 則為較高癒合存活率之代表。

本發明之發明人在兩群組之食道扁平上皮細胞癌病人中隨機選擇其福馬林進行固定且用石蠟包埋(FFPE)癌症組織，然後進行切片，而群組分類係根據其存活月數及分期 IIA(AJCC, 2010)。每群組有 3 位男性病人，以癒後較好(平均存活約 25 個月)及癒後較差(平均存活約 7 個月)來分類。根據圖三

食道癌病患所取之組織免疫組織染色的評分標準，藉以判斷食道扁平上皮細胞癌中 PI3 及 CD14 蛋白質的表現情形，群組分類係由同一位病理醫師在不知道病人存活狀態下針對病理切片進行辨別。於圖四 A 所示一組織陣列 400，在每一組織晶片中有 10 位病人，而每位病人有 3 個癌症組織且每 2 位病人位於一排，左上 1 個黑點 401 作為標記。免疫組織染色之實驗結果於圖四 B，可以看到 PI3 此蛋白在低存活率之群組表現 411 較高，而在高存活率之群組 412 較低；CD14 蛋白則是大量表現於高存活率之群組 422，而在低存活率之群組 421 中表現較少。由病理醫師使用圖三免疫染色對照表對於圖四 B 之結果進行比較，結果顯示於表三，得知在高存活及癒合率之食道癌病患的癌症組織中 PI3 表現量較少而 CD14 較高；在低存活及癒合率之食道癌病患的癌症組織表現較大量之 PI3 而較少的 CD14。由上得知，藉此以檢測 PI3 及 CD14 在食道癌癌症組織之表現量模式可以推估病患的食道癌癒後狀態及存活率。

表三 食道癌患者抽樣調查表，其中 T2 為腫瘤已侵犯固有肌肉層(tumor invades muscularis propria)T3 為腫瘤已侵犯外膜層(tumor invades adventitia)，M0 為無明顯轉移(no distant metastasis)。

編號	年齡	腫瘤位置	T	N	M	階段	細胞分化能力	合併化學與放射治療	手術	存活時間	基因表現強度	
											PI3	CD14
癒後良好組												
20521	65	Middle1/3	2	0	0	IIA	高	有	有	23	+	++
20971	66	Upper1/3	3	0	0	IIA	低	有	有	29	+	+++
21411	45	Middle1/3	2	0	0	IIA	低	無	有	25	-	+++
癒後不佳組												
20591	66	Middle1/3	2	0	0	IIA	中	有	有	10	+++	+
21201	67	Middle1/3	3	0	0	IIA	中	無	有	5	+++	+
21621	60	Low1/3	3	0	0	IIA	中	無	有	7	++	+

### 【圖式簡單說明】

圖一顯示 peptidase inhibitor 3 (PI3)於細胞株 CE81T2 與 CE81T2-4 中之功能性表現。A、PI3 在全基因微陣列(Human Whole Genome One Array)中訊號之強度，B、由即時 PCR 測定 PI3 之 mRNA 表現量，其 p 值小於 0.05，C、由 Western blotting 測定 PI3 蛋白質表現量，其中加入的蛋白質總量為 40  $\mu$ g，D、由 IHC 染色(箭頭)測定石蠟包埋細胞塊中之 PI3 蛋白質表現量(4  $\mu$ m 厚)。

圖二顯示 CD14 抗原(CD14)於細胞株 CE81T2 與 CE81T2-4 中之功能性表現。A-1、CD14 在全基因微陣列(Human Whole Genome One Array)中之訊號強度，A-2、由即時 PCR 測定 CD14 mRNA 表現量，B、由即時 PCR 測定 CD14 mRNA 表現量，其 p 值小於 0.05，C、由西方墨點法測定 CD14 及 GADPH 蛋白質表現量，進而比較兩種細胞株的 CD14 表現量差異，D、由免疫組織染色(箭頭)測定石蠟包埋細胞塊中之 CD14 蛋白質表現量(4  $\mu$ m 厚)。

圖三顯示食道癌免疫組織染色中 PI3 及 CD14 表現量和分布情形之評分標準，

組織來源為食道癌病人。

圖四顯示於同一微陣列晶片中，PI3 及 CD14 於癒後佳之 ESCC 病人及癒後佳之 ESCC 病人兩個代表組別中的染色強度表現。A、組織晶片設計。每一晶片有 10 位病人。每位病人有 3 個癌症組織與、每排 2 位病人，左上部份有 1 個黑點作為「標記」，B、PI3 與 CD14 之功能性表現(放大 200 倍)。

#### 【主要元件符號說明】

100 PI3 的 RNA 表現訊號(使用全基因微矩陣晶片檢測 CE81T2 細胞株)

101 PI3 的 RNA 表現訊號(使用全基因微矩陣晶片檢測 CE81T2-4 細胞株)

110 PI3 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2 細胞株)

111 PI3 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2-4 細胞株)

120 PI3 蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2 細胞株)

121 PI3 蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2-4 細胞株)

- 130 PI3 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2 細胞株)
- 131 PI3 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2-4 細胞株)
- 200 CD14 的 RNA 表現訊號(使用全基因微陣晶片檢測 CE81T2 細胞株)
- 201 CD14 的 RNA 表現訊號(使用全基因微陣晶片檢測 CE81T2-4 細胞株)
- 202 CD14 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2 細胞株)
- 203 CD14 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2-4 細胞株)
- 204 GADPH 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2 細胞株)
- 205 GADPH 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2 細胞株)
- 210 CD14 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2 細胞株)
- 211 CD14 的 RNA 表現量(使用即時 PCR 檢測 CE81T2-4 細胞株)
- 220 CD14 的蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2 細胞株)
- 221 CD14 的蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2-4 細胞株)
- 222 GADPH 的蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2 細胞株)
- 223 GADPH 的蛋白質表現量(使用西方墨點法檢測 CE81T2-4 細胞株)
- 230 CD14 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2 細胞株)

231 CD14 的蛋白質表現量(使用免疫組織染色檢測 CE81T2-4 細胞株)

300 結果對照表(針對 PI3 蛋白質使用食道癌患者組織切片進行免疫染色)

301 結果對照表(針對 CD14 蛋白質使用食道癌患者組織切片進行免疫染色)

400 癌症組織晶片設計示意圖

401 組織晶片之標記(其寬度為 2mm)

410 針對 PI3 蛋白質使用免疫組織染色食道癌患者組織之結果

411 為低癒合存活率之食道癌患者組織 PI3 蛋白質表現及分布情形

412 為高癒合存活率之食道癌患者組織 PI3 蛋白質表現及分布情形

420 針對 CD14 蛋白質使用免疫組織染色食道癌患者組織之結果

421 為低癒合存活率之食道癌患者組織 CD14 蛋白質表現及分布情形

422 為高癒合存活率之食道癌患者組織 CD14 蛋白質表現及分布情形



102年11月25日修(更)正本

102年11月25日替換頁

## 【序列表】

<110> 高雄醫學大學

<120> 預測食道癌存活及癒後狀態之方法及其套組及微陣列晶片

<130> 1582-KMU-TW

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P13 Forward Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(19)

<400> 1

ggcagctgtc acgggagtt

19

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P13 Reverse Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(23)

<400> 2

cctgggcagt cagtatcttt caa

23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD14 Forward Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(20)

<400> 3

gggttcacag aggaggaac

20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD14 Reverse Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(18)

<400> 4

cgcgctccat ggtcgata

102年11月25日修(更)正

102年11月25日替換頁

公告本

## 七、申請專利範圍：

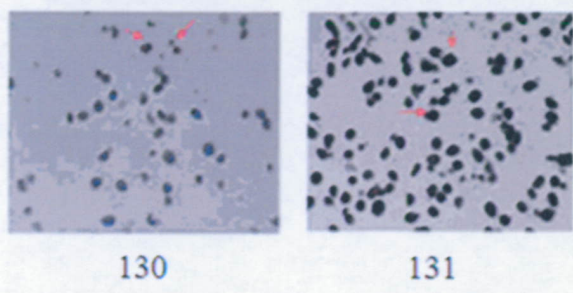
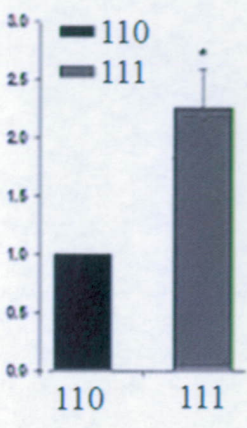
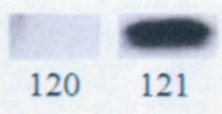
1. 一種用以判斷食道癌患者癒後或存活機率之方法，其包含：
  - a. 取得一檢體；
  - b. 檢測該檢體之特定基因在 RNA、細胞層次蛋白質或活體組織內蛋白質之表現量；及
  - c. 將該特定基因之表現量與一對照組進行比對；其中該特定基因為 PI3 (peptidase inhibitor 3)、該對照組為其他患有食道癌病患之檢體之該特定基因平均表現量；其中，當該檢體之 PI3 之表現量高於該對照組，則判斷為癒後或存活機率不佳，當該檢體之 PI3 之表現量低於該對照組，則判斷為癒後或存活機率良好。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，該方法為使用即時 PCR 以檢測該檢體及該對照組之該特定基因之 RNA 表現量。
3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，該方法為使用微陣列晶片以檢測該檢體及該對照組之該特定基因之蛋白質表現量。
4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，該方法為使用西方墨點法檢測該檢體及該對照組之該特定基因之蛋白質表現量。
5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，該方法為使用免疫組織化學染色法檢測檢體及該對照組之活體內組織該特定基因之蛋白質表現量。
6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該特定基因進一步包含 CD14(CD14 抗原)，當該檢體之 CD14 表現量高於該對照組，則判斷為癒後或存活機率良好，當該檢體之 CD14 表現量低於該對照組，則判斷為癒後或存活機率不佳。
7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 PI3 基因之一組 DNA 引子為包含 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 之核苷酸序列。
8. 請專利範圍第 6 項之方法，其中該 CD14 基因之一組 DNA 引子為包含 SEQ

ID NO:3 及 SEQ ID NO:4 之核苷酸序列。

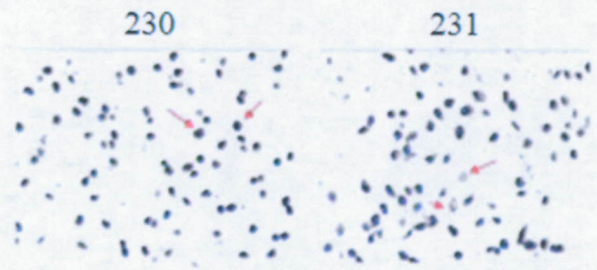
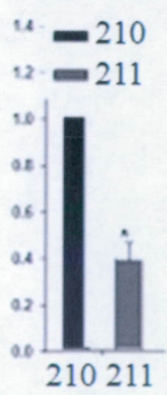
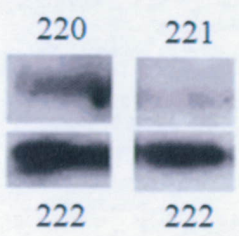
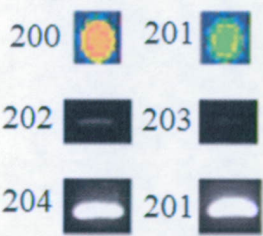
(02年11月25日修(✖)正✖)

公告本

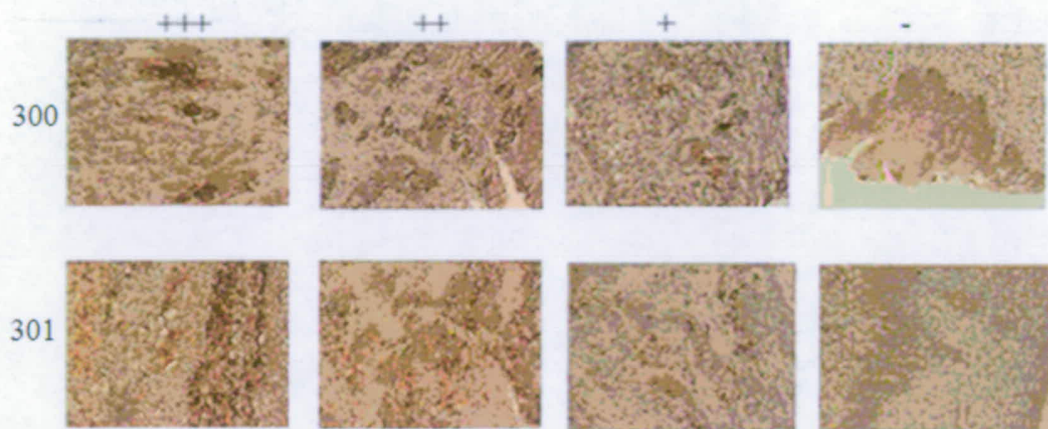
八、圖式



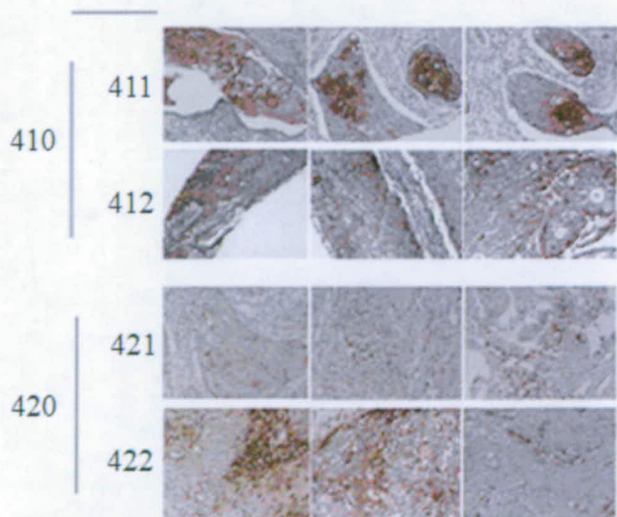
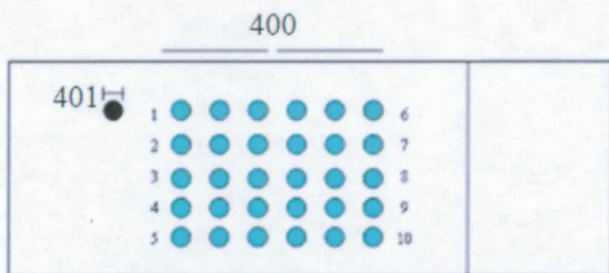
圖一



圖二



圖三



圖四