

[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 200480029686.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月22日

[11] 公开号 CN 1867671A

[22] 申请日 2004.8.13

[21] 申请号 200480029686.1

[30] 优先权

[32] 2003.8.13 [33] US [31] 60/494,981

[32] 2003.9.4 [33] US [31] 60/500,844

[86] 国际申请 PCT/CN2004/000948 2004.8.13

[87] 国际公布 WO2005/017150 英 2005.2.24

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.10

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 范上达 张兆恬

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 王景朝

权利要求书 4 页 说明书 54 页 序列表 2 页
附图 10 页

[54] 发明名称

用于肝癌的预后和治疗的组合物和方法

[57] 摘要

本发明提供包含下列多核苷酸探针的组合物:

IL7R (AA485865)、 NDRG1 (AA486403)、 EST1 (H50345)、 TRPC1 (AA017132)、 GFRA1 (AA512935)、 EST2 (AA454543)、 CLDNIO (R54559)、 DNALI1 (R93087)、 RBP5 (AA453198)、 EST3 (AA621761)、 EST4 (N63706)、 PCOLCE (AA670200)、 TD02 (T72398)、 EST5 (T47454)、 HIST1H2BD (N33927)、 PXMP2 (N70714)、 ACAS2 (AA455146)、 ANAPC7 (T68445)、 EST6 (AA576580)、 RBP5 (N92148)、 ANXA1 (H63077)、 CKB (AA894557)、 ITGBL1 (N52533)、 KPNA2 (AA676460)、 EST7 (W90740) 和 MEG3 (W85841)。

本发明还提供确定肝细胞癌 (HCC) 在罹患 HCC 的患者中复发的可能性、确定罹患 HCC 的患者死亡的可能性或确定是否给予辅助治疗的方法。

1. 一种组合物，它包含下列多核苷酸探针：IL7R (AA485865)、
NDRG1 (AA486403)、EST1 (H50345)、TRPC1 (AA017132)、GFRA1
5 (AA512935)、EST2 (AA454543)、CLDN10 (R54559)、DNALI1
(R93087)、RBP5 (AA453198)、EST3 (AA621761)、EST4 (N63706)、
PCOLCE (AA670200)、TDO2 (T72398)、EST5 (T47454)、HIST1H2BD
(N33927)、PXMP2 (N70714)、ACAS2 (AA455146)、ANAPC7 (T68445)、
EST6 (AA576580)、RBP5 (N92148)、ANXA1 (H63077)、CKB
10 (AA894557)、ITGBL1 (N52533)、KPNA2 (AA676460)、EST7 (W90740)
和 MEG3 (W85841)，或其任何组合。

2. 依照权利要求 1 的组合物，其中所述多核苷酸探针为互补
DNAs。

3. 依照权利要求 1 的组合物，其中所述多核苷酸探针为克隆
15 cDNAs。

4. 依照权利要求 1 的组合物，其中所述多核苷酸探针固定在底物
上。

5. 依照权利要求 4 的组合物，其中所述多核苷酸探针为可杂交的
阵列元件。

20 6. 一种组合物，它包含下列多核苷酸探针：IL7R (AA485865)、
NDRG1 (AA486403)、EST1 (H50345)、TRPC1 (AA017132)、GFRA1
(AA512935)、EST2 (AA454543)、CLDN10 (R54559)、DNALI1
(R93087)、RBP5 (AA453198)、EST3 (AA621761)、EST4 (N63706)和
PCOLCE (AA670200)。

25 7. 依照权利要求 6 的组合物，它还包含一种或多种下列多核苷酸
探针：TDO2 (T72398)、EST5 (T47454)、HIST1H2BD (N33927)、PXMP2
(N70714)、ACAS2 (AA455146)、ANAPC7 (T68445)、EST6
(AA576580)、RBP5 (N92148)、ANXA1 (H63077)、CKB (AA894557)、

ITGBL1 (N52533)、KPNA2 (AA676460)、EST7 (W90740)和 MEG3 (W85841)。

8. 依照权利要求 6 的组合物, 其中所述多核苷酸探针为互补 DNAs。

5 9. 依照权利要求 6 的组合物, 其中所述多核苷酸探针为克隆 cDNAs。

10. 依照权利要求 6 的组合物, 其中所述多核苷酸探针固定在底物上。

10 11. 依照权利要求 4 的组合物, 其中所述多核苷酸探针为可杂交的阵列元件。

12. 一种在罹患肝细胞癌(HCC)的患者中确定 HCC 复发的可能性的方法, 所述方法包括:

(a) 从患者中获取肿瘤样本;

(b) 确定在肿瘤样本中的权利要求 6 的组合物基因表达模式;

15 (c) 计算基因表达模式的预后性基因评分; 和

(d) 将预后性基因评分与 HCC 复发相关的预后性基因评分比较, 由此确定在患者中 HCC 复发的可能性。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述基因表达模式用微阵列确定。

14. 权利要求 12 的方法, 其中所述基因表达模式用 RT-PCR 确定。

20 15. 权利要求 12 的方法, 其中小于 0.416 的预后性基因评分表明 HCC 复发的概率低。

16. 权利要求 12 的方法, 其中等于或大于 0.416 的预后性基因评分表明 HCC 复发的概率高。

25 17. 一种确定肝细胞癌(HCC)引起罹患 HCC 患者死亡的可能性的方法, 所述方法包括:

(a) 从患者中获取肿瘤样本;

(b) 确定在肿瘤样本中的权利要求 6 的组合物基因表达模式;

(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分; 和

(d) 将预后性基因评分与由 HCC 所致死亡相关的预后性基因评分比较, 由此确定患者的与 HCC 相关死亡的可能性。

18. 权利要求 17 的方法, 其中小于 0.600 的预后性基因评分表明与 HCC 相关的死亡的概率低。

5 19. 权利要求 12 的方法, 其中等于或大于 0.600 的预后性基因评分表明与 HCC 相关的死亡的概率高。

20. 一种确定是否给予罹患肝癌(HCC)患者辅助治疗的方法, 所述方法包括:

(a) 从患者中获取肿瘤样本;

10 (b) 确定在肿瘤样本中的权利要求 6 的组合物的基因表达模式;
和

(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分; 以及

(d) 将预后性基因评分与 HCC 复发相关的预后性基因评分比较, 由此确定是否给予辅助治疗。

15 21. 权利要求 20 的方法, 其中等于或大于 0.416 的预后性基因评分表明应该给予辅助治疗。

22. 权利要求 20 的方法, 其中小于 0.416 的预后性基因评分表明不应该给予辅助治疗。

20 23. 一种确定罹患肝癌(HCC)患者的预后的方法, 所述方法包
括:

(a) 从患者中获取肿瘤样本;

(b) 确定在肿瘤样本中的权利要求 6 的组合物的基因表达模式;

(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分, 其中小于 0.416 的预后性基因评分表明预后良好, 等于或大于 0.416 而小于 0.600 的预后性基因评分表明预后中等, 等于或大于 0.600 的预后性基因评分表明预后不良。
25

24. 一种确定罹患肝癌(HCC)患者的预后的方法, 所述方法包括:

- (a) 从患者中获取肿瘤样本;
- (b) 确定在肿瘤样本中的 CLDN10 核酸转录物的水平;
- (c) 将得自步骤(b)的 CLDN10 核酸转录物的水平与正常组织样本中的 CLDN10 核酸转录物的水平比较, 而步骤(b)的较高水平的
- 5 CLDN10 核酸转录物表明预后不良。
25. 一种确定罹患肝细胞癌(HCC)患者的预后的方法, 所述方法包括:
- (a) 从患者中获取肿瘤样本;
- (b) 确定在肿瘤样本中的 AA454543 核酸转录物的水平;
- 10 (c) 将得自步骤(b)的 AA454543 核酸转录物的水平与正常组织样本中的 AA454543 核酸转录物的水平比较, 而步骤(b)的较高水平的 AA454543 核酸转录物表明预后不良。
26. 一种确定罹患肝细胞癌(HCC)患者的预后的方法, 所述方法包括:
- 15 (a) 从患者中获取肿瘤样本;
- (b) 确定在肿瘤样本中的 DNALI1 核酸转录物的水平;
- (c) 将得自步骤(b)的 DNALI1 核酸转录物的水平与正常组织样本中的 DNALI1 核酸转录物的水平比较, 而步骤(b)的较高水平的 DNALI1 核酸转录物表明预后不良。
- 20 27. 一种在罹患肝细胞癌(HCC)的患者中确定 HCC 复发的可能性的方法, 所述方法包括:
- (a) 从患者中获取血清样本;
- (b) 检测 DNALI1 核酸转录物的存在; 和
- (b) 确定在步骤(c)的 DNALI1 核酸转录物的密码子 65 的核苷酸
- 25 194 存在的多态性, 以确定哪个等位基因存在, 而 T-等位基因的存在表明 HCC 复发的概率高。

用于肝癌的预后和治疗的组合物和方法

5 本申请要求 2003 年 8 月 13 日提交的美国临时申请序号 60/495,081 和 2003 年 9 月 4 日提交的美国临时申请序号为 60/500,844 的优先权，以上两个临时申请的内容均通过引用结合于本文中。

 在本申请全文中，引用了不同的出版物。对这些出版物的全部的引用可在权利要求书之前找得。为了更加全面地描述到在此描述的
10 和权利要求的本发明的申请日为止的现有技术的状况，这些出版物的公开在此通过引用结合于本申请中。

发明背景

 肝细胞癌(HCC)是常见的致死性恶性肿瘤并且为全球前五位癌症
15 死亡病因。在美国、英国和日本，其发病率正在上升。在中国，肝癌是第二大癌症致死病因。流行病学研究已经显示乙型和丙型肝炎(B型和 C 型肝炎)感染、酒精所致的肝损伤以及黄曲霉毒素的摄入与肝癌有着密切的关联。为更加理解临床病理学特征，以改善对 HCC 患
20 者的临床处理，已经进行了广泛的研究。然而，常规的临床病理学参数限制了预测能力，并且处于相同疾病阶段的患者可能有不同的疾病结局。微阵列技术提供了生物学方法以在无偏颇的基础上收集大量的基因表达数据。由肿瘤基因表达模式所回顾的分子肖像，已经被用于确定不同的癌症类型包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌和脑瘤的预后的新的分子标准。

25 使用 cDNA 微阵列方法，肝癌细胞系和人样本的表达谱已有报道。甲胎蛋白(AFP)的表达使 HCC 细胞系的分子亚型突显出来。已经观察到细胞周期调节剂和新陈代谢相关基因的反常，且表达谱与肿瘤分化状态相关。针对由基因表达引起的 HCC 早期复发的预测的

新近研究仅报道在一小组患者 1 年内的肝内复发并且使用 6000 个基因的基因芯片。在本研究中，在 48 例 HCCs 上使用 Cox 回归和 Kaplan-Meier 分析，以鉴定从印记有 23000 个克隆的微阵列中的一组 26 个的基因。然后此预后性基因集(prognostic gene set)还被描绘为包含前排的 12 个基因，其预测肝切除术后 3 年内疾病的复发和死亡的准确率分别为 97.8 %和 89.3 %。由此产生的基因表达谱，与基于临床和组织学标准的标准系统相比较，可提供更为准确的预后以预测疾病的复发和死亡。这个结果还提供选择预后不良的患者以作积极的辅助治疗的方法。

10

发明简述

本发明提供包含下列多核苷酸探针的组合物：IL7R (AA485865)、NDRG1 (AA486403)、EST1 (H50345)、TRPC1 (AA017132)、GFRA1 (AA512935)、EST2 (AA454543)、CLDN10 (R54559)、DNALI1 (R93087)、RBP5 (AA453198)、EST3 (AA621761)、EST4 (N63706)、PCOLCE (AA670200)、TDO2 (T72398)、EST5 (T47454)、HIST1H2BD (N33927)、PXMP2 (N70714)、ACAS2 (AA455146)、ANAPC7 (T68445)、EST6 (AA576580)、RBP5 (N92148)、ANXA1 (H63077)、CKB (AA894557)、ITGBL1 (N52533)、KPNA2 (AA676460)、EST7 (W90740)和 MEG3 (W85841)，或其任何的联合。

20

本发明还提供包括下列多核苷酸探针的组合物：IL7R (AA485865)、NDRG1 (AA486403)、EST1 (H50345)、TRPC1 (AA017132)、GFRA1 (AA512935)、EST2 (AA454543)、CLDN10 (R54559)、DNALI1 (R93087)、RBP5 (AA453198)、EST3 (AA621761)、EST4 (N63706)和 PCOLCE (AA670200)。

25

本发明提供确定肝细胞癌(HCC)在罹患 HCC 的患者中复发的可能性的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的一组预后性基因的基因表达模式；(c) 计算基因表达

模式的预后性基因评分；和(d) 将预后性基因评分与 HCC 复发相关的预后性基因评分作比较，由此确定在患者中 HCC 复发的可能性。

5 本发明提供确定肝细胞癌(HCC)引起受累患者死亡的可能性的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的一组预后性基因的基因表达模式(pattern)；(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分；和(d) 将预后性基因评分与 HCC 相关死亡相关的预后性基因评分作比较，由此确定患者死亡的可能性。

10 本发明也提供确定是否给予罹患肝细胞癌(HCC)的患者辅助治疗的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的一组预后性基因的基因表达模式；和(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分；以及(d) 将预后性基因评分与 HCC 复发相关的预后性基因评分作比较，由此确定是否给予辅助治疗。

15 本发明还提供确定罹患肝细胞癌(HCC)的患者预后的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的 CLDN10 核酸转录物的水平；(c) 将从步骤(b)所得的 CLDN10 核酸转录物的水平与正常组织样本中的 CLDN10 核酸转录物的水平比较，由此，从步骤(b)所得的较高水平的 CLDN10 核酸转录物表明预后不良。

20 本发明还提供确定罹患肝细胞癌(HCC)的患者预后的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的 AA454543 核酸转录物的水平；(c) 将从步骤(b)所得的 AA454543 核酸转录物的水平与正常组织样本中的 AA454543 核酸转录物的水平比较，由此，从步骤(b)所得的较高水平的 AA454543 核酸转录物表明预后不良。

25 本发明还提供确定罹患肝细胞癌(HCC)的患者预后的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的 DNALI1 核酸转录物的水平；(c) 将从步骤(b)所得的 DNALI1 核酸转录物的水平与正常组织样本中的 DNALI1 核酸转录物的水平比较，

由此，从步骤(b)所得的较高水平的 DNALI1 核酸转录物表明预后不良。

最后，本发明提供确定在罹患肝细胞癌(HCC)的患者中 HCC 复发的可能性的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取血清样本；(b) 检测 DNALI1 核酸转录物的存在；和(c) 确定步骤(b)的 DNALI1 核酸转录物的密码子 65 的核苷酸 194 多态性的存在，以确定哪个等位基因存在，由此，T-等位基因的存在表明 HCC 复发的概率较高。

图的简述

10 图 1

基因表达和患者预后。(A) 针对 48 例 HCCs 的全局表达数据矩阵。在样本中有 1404 个显著性表达差异的 cDNA 克隆。每一列代表一种肿瘤而每一行代表一种单个基因。基于用分级聚类算法 (hierarchical clustering algorithm) 在样本上测量的其表达模式上的相似性将基因聚类。同样地，基于其在基因表达模式上的相似性将样本聚类(clustered)。(B) 最佳基因集确定：以最大标准效应对所使用的基因的数量作图，以纳入预后性基因评分中。(C) 用于 48 例 HCCs 的 12 个预后性基因的表达数据矩阵。将基因名称标记在每一行的右边末尾。所有“好”基因，即相对风险低于 1 并且在与更长的无病期相关的高水平表达的基因，在上方的面板(upper panel)上聚类为一个分支。“坏”基因，即相对风险大于 1 并且在与更短的无病期相关的高水平表达的基因，在下方的面板(lower panel)上都聚类为另一个分支。同样地，HCCs 基于其在这些基因表达水平的相似性上聚类，且分开 (segregated) 为两个主要的组群。在图左边的 HCCs 显示好的基因的向上调节和坏的基因的向下调节，并且认为它们证实了“良好的预后标记”。在图右边的 HCCs 显示坏的基因的向上调节和好的基因的向下调节，并且认为它们显示了“坏的预后标记”。在数据矩阵底部的黑盒

子显示复发事件。实线为基因预后分类线(classifier)，虚线为患者预后分类线。

图 2

5 在独立样本集上的 CLDN10 基因表达的验证分析。由定量 RT-PCR 所产生的 CLDN10 表达水平的散点图。每个样本的表达水平是相对于样本集的表达的中值而言的。CLDN10 表达水平高于中值的患者被标识在图的上部，伴有大于 1 的相对倍数变化。基因表达低于中值的患者被标识在图的下部，伴有小于 1 的相对的倍数变化。

图 3

10 基因表达的预测。(A) 基于 12 个顶端排位基因(top-ranked genes)的预后性基因评分。如同 Youden (尤登)指数所确定的，用于预测疾病复发和死亡的最优的截止值(cut-off value)分别是 0.416 (虚线)和 0.600 (实线)。(B) 用于预测复发的接受器工作特征(ROC)曲线。(C) 用于预测死亡的 ROC 曲线。

图 4

15 将预后性基因评分与 pTNM 系统作比较。依据在(A)和(C)中的预后性基因评分，以及在(B)和(D)中的 pTNM 分段系统的，用于 HCC 患者的 Kaplan-Meier 无病生存曲线和总体生存曲线。在每个案例中，用对数秩检验(log rank test)计算 p 值。

图 5

20 Kaplan-Meier 无病生存图。(A) 将所有患者分成低或高封闭蛋白-10 (claudin-10)表达组。(B) 早期(I 期和 II 期)患者依据封闭蛋白-10 表达水平被进一步细分。(C) 晚期(III 期和 IVa 期)患者依据封闭蛋白-10 表达水平被进一步细分。

图 6

25 用于总体生存预测的准确率由在接受器工作特征曲线下的面积测量而得。以“敏感性”(真阳性分数(true positive fraction))对“1-特异

性”(假阳性分数(false positive fraction))作图, 分别用于转录物 AA454543 表达水平(范围 0-11.50)和 pTNM 分期(I、II、III 和 IVa)。

图 7

Kaplan-Meier 总体生存图。(A) 将所有患者分成低或高转录物 AA454543 表达组。(B) 早期(I 期和 II 期)患者依据转录物 AA454543 表达水平被进一步细分。(C) 晚期(III 期和 IVa 期)患者依据转录物 AA454543 表达水平被进一步细分。

图 8

在人肝样本中的转录物 AA454543 表达, 以及由实时 RT-PCR 定量的转录物水平。

图 9

使用定量 RT-PCR 在独立样本集中的 DNALI1 基因表达的验证分析。在无病生存上的 DNALI1 水平的预后重要性在伴有高和低肿瘤 DNALI1 水平的患者之间评价, 用 75 %作为截止值进行分层。

图 10

在肿瘤中的 DNALI1 表达水平是通过实时 RT-PCR 定量的。在核苷酸 194(nt194)的多态性由血液 DNA 直接测序检测。箱形图显示在伴有 T-等位基因的患者中比伴有 C-等位基因的患者有显著高的 DNALI1 水平。

发明详述

定义

在本申请中使用的下列每个术语, 除非在此另有明确所指, 将有以下给出的含义。

在此使用的“患者”意指任何动物, 诸如灵长类动物、小鼠、大鼠、豚鼠或兔子。在优选的实施方案中, 该患者是人。

在此使用的“组合物”意指一组预后性基因。

在此使用的“可杂交的阵列元件(array element)”意指任何可通过碱基配对与互补的核酸链结合的核酸链。

在此使用的“基因表达模式”意指代表一组预后性基因的核酸水平的一组值。

- 5 在此使用的“预后性基因评分”是评价基因表达模式统计学的意义。预后性基因评分是在证明与不良的预后相关的表达水平的基因集里的基因的比例基础上产生的。因为高水平表达的基因与不良的预后(坏的基因, 相对风险大于 1)相关, 表达水平高于平均表达值被赋值 1 个点(表达水平低于平均值, 得到 0 点的分值)。因为高水平表达的基因与良好的预后(好的基因, 相对风险小于 1)相关, 表达水平低于平均表达值被赋值 1 个点(表达水平高于平均值, 得到 0 点的分值)。因此适于每个个体的预后性基因评分为所有基因的平均评分(全部所得的点/全部被研究的基因的数量)。为 1 的预后性基因评分, 对于所有坏的基因是高水平表达而对于所有好的基因是低水平表达, 提示为预后不良。同样地, 预后性基因评分为 0 表明预后良好。
- 10
- 15

本发明的实施方案

本发明提供包含下列多核苷酸探针的组合物: IL7R

- (AA485865)、NDRG1 (AA486403)、EST1 (H50345)、TRPC1
- 20 (AA017132)、GFRA1 (AA512935)、EST2 (AA454543)、CLDN10 (R54559)、DNALI1 (R93087)、RBP5 (AA453198)、EST3 (AA621761)、EST4 (N63706)、PCOLCE (AA670200)、TDO2 (T72398)、EST5 (T47454)、HIST1H2BD (N33927)、PXMP2 (N70714)、ACAS2 (AA455146)、ANAPC7 (T68445)、EST6 (AA576580)、RBP5 (N92148)、
- 25 ANXA1 (H63077)、CKB (AA894557)、ITGBL1 (N52533)、KPNA2 (AA676460)、EST7 (W90740)和 MEG3 (W85841), 或其任何的组合。

在一个实施方案中，所述多核苷酸探针是互补的 DNAs。在另一个实施方案中，所述多核苷酸探针是克隆的 cDNAs。多核苷酸探针可固定于底物上且可以是可杂交的阵列元件。

本发明提供包含下列多核苷酸探针的组合物：IL7R

5 (AA485865)、NDRG1 (AA486403)、EST1 (H50345)、TRPC1 (AA017132)、GFRA1 (AA512935)、EST2 (AA454543)、CLDN10 (R54559)、DNALI1 (R93087)、RBP5 (AA453198)、EST3 (AA621761)、EST4 (N63706)和 PCOLCE (AA670200)。

在优选的实施方案中，本发明还提供包含下列多核苷酸探针的组合物：IL7R (AA485865)、NDRG1 (AA486403)、EST1 (H50345)、
10 TRPC1 (AA017132)、GFRA1 (AA512935)、EST2 (AA454543)、CLDN10 (R54559)、DNALI1 (R93087)、RBP5 (AA453198)、EST3 (AA621761)、EST4 (N63706)、PCOLCE (AA670200)和一个或多个下列多核苷酸探针：TDO2 (T72398)、EST5 (T47454)、HIST1H2BD (N33927)、PXMP2
15 (N70714)、ACAS2 (AA455146)、ANAPC7 (T68445)、EST6 (AA576580)、RBP5 (N92148)、ANXA1 (H63077)、CKB (AA894557)、ITGBL1 (N52533)、KPNA2 (AA676460)、EST7 (W90740)和 MEG3 (W85841)。

在一个实施方案中，所述多核苷酸探针是互补的 DNAs。在另一个
20 实施方案中，所述多核苷酸探针是克隆的 cDNAs。多核苷酸探针可固定于底物上和可以是可杂交的阵列元件。

本发明还提供用于确定罹患 HCC 的患者中肝细胞癌(HCC)复发的可能性的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的一组预后性基因的基因表达模式；(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分；和(d) 将预后性基因评分和与 HCC 复发
25 相关的预后性基因评分作比较，由此确定在患者中 HCC 复发的可能性。

在本方法的优选的实施方案中，基因表达模式由微阵列方法确定。在另一个实施方案中，基因表达模式由 RT-PCR 确定。

在本方法的优选的实施方案中，小于 0.416 的预后性基因评分表明 HCC 复发的可能性低，而等于或大于 0.416 的预后性基因评分表明 HCC 复发的可能性高。

本发明还提供确定肝细胞癌(HCC)引起罹患此病的患者死亡的可能性的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的一组预后性基因的基因表达模式；(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分；和(d) 将预后性基因评分与由 HCC 所致死亡相关的预后性基因评分作比较，由此确定患者与 HCC 相关的死亡的可能性。

在本方法的优选的实施方案中，低于 0.600 的预后性基因评分表明与 HCC 相关的死亡的可能性低，而等于或大于 0.600 的预后性基因评分表明与 HCC 相关的死亡的可能性高。

本发明还提供确定是否给予罹患肝细胞癌(HCC)的患者辅助治疗的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的一组预后性基因的基因表达模式；和(c) 计算基因表达模式的预后性基因评分；以及(d) 将预后性基因评分与 HCC 复发相关的预后性基因评分作比较，由此确定是否给予辅助治疗。

在本方法的优选的实施方案中，低于 0.416 的预后性基因评分表明 HCC 复发的可能性低，而等于或大于 0.416 的预后性基因评分表明 HCC 复发的可能性高。

本发明还提供确定罹患肝细胞癌(HCC)的患者预后的方法，所述方法包括：(a) 从患者中获取肿瘤样本；(b) 确定在肿瘤样本中的 CLDN10 核酸转录物的水平；(c) 将从步骤(b)所得的 CLDN10 核酸转录物的水平与正常组织样本中的 CLDN10 核酸转录物的水平比较，由此，从步骤(b)所得的较高水平的 CLDN10 核酸转录物表明预后不良。

本发明还提供确定罹患肝细胞癌(HCC)的患者预后的方法,所述方法包括:(a)从患者中获取肿瘤样本;(b)确定在肿瘤样本中的AA454543 核酸转录物的水平;(c)将从步骤(b)所得的AA454543 核酸转录物的水平与正常组织样本中的AA454543 核酸转录物的水平比较,由此,从步骤(b)所得的较高水平的AA454543 核酸转录物表明预后不良。

本发明还提供确定罹患肝细胞癌(HCC)的患者预后的方法,所述方法包括:(a)从患者中获取肿瘤样本;(b)确定在肿瘤样本中的DNALI1 核酸转录物的水平;(c)将从步骤(b)所得的DNALI1 核酸转录物的水平与正常组织样本中的DNALI1 核酸转录物的水平比较,由此,从步骤(b)所得的较高水平的DNALI1 核酸转录物表明预后不良。

最后,本发明提供确定在罹患肝细胞癌(HCC)的患者中HCC复发的可能性的方法,所述方法包括:(a)从患者中获取血清样本;(b)检测DNALI1 核酸转录物的存在;和(c)确定步骤(b)的DNALI1 核酸转录物的密码子65的核苷酸194多态性的存在,以确定哪个等位基因存在,由此,T-等位基因的存在表明HCC复发的概率较高。

实施例 I

20 概要

处于相同疾病分期的肝细胞癌(HCC)患者在疾病结局上可具有明显的差异。用Cox回归和Kaplan-Meier分析评价本研究的微阵列基因表达谱,并确定可提供比常规的临床病理学体系更准确的预后的一组12个基因。每个患者的预后性基因评分是基于在已证明与不良的预后相关的表达水平的最佳基因集里的基因的比例而产生的。具有良好的和不良的预后性基因评分的患者差异显著,并且预后性基因评分是与pTNM分期比较来预测疾病复发的独立因素。预后性基因集可帮助选择预后不良的患者以作积极的辅助治疗。

材料与amp;方法

患者与样本

在本研究中，包括从 48 例经历对 HCC 有效的部分肝切除术的患者中获得的基因表达谱，用于对患者预后的分析。如果被切除的标本的病理学检查显示阳性切除边缘(positive resection margin)或其它肿瘤细胞类型(如胆管细胞癌)的混合物、如果他们在切除术之前或之后接受了化疗、接受了肝移植而不是部分肝切除术，该切除术针对复发或该切除术引起医院内死亡，则患者被从本疾病结局分析中排除出去。复发的诊断是基于在对比增强 CT 扫描典型的成像中的结果和增高的血清 AFP 水平。在不确定的情况下，进行肝动脉造影术和碘油后 CT 扫描，如果需要，使用细针穿刺细胞学方法以确诊。截止到分析的日期(2003 年 5 月)，27 例患者发生复发且中位无病期为 4.5 个月(范围为 0.9-32.7 个月)，他们中的 17 人死于疾病，他们的中位生存期为 12.4 个月(范围为 4.5-34.1 个月)。对于那些没有复发的 21 例患者，中位随访期为 40.9 个月(范围为 29.8-48.8 个月)。另外 47 例 HCCs 随后用定量 RT-PCR 进行独立检验。在此第二批样本中，患者中的 26 个发生复发且中位无病期为 5.5 个月(范围为 2.2-19.3 个月)；对于 21 个无病的患者，中位随访期为 23.3 个月(范围为 11.5-31.1 个月)。

20

微阵列表达研究

cDNA 微阵列晶片被印记约 23,000 个 cDNA 克隆。已经建立样本和 RNA 制备以及杂交方案。选择从至少 2 个样本的平均值起到至少四倍的不同表达水平的总数 1404 个 cDNA 克隆用于下一步分析。使用皮尔森(Pearson)相关系数作为相似性量度标准，既将分级聚类算法应用于基因又应用于阵列。结果用 TreeView (Eisen; <http://rana.lbl.gov>)作进一步分析。

25

定量 RT-PCR

实施定量 RT-PCR。使用人 18s rRNA 引物和探针试剂(Pre-Developed TaqMan Assay Reagents, 应用生物系统(Applied Biosystems), Foster City, CA)作为用于随后的倍增反应的标准化对照。对每个样
5 本的转录物按一式三份进行量化。使用 ABI Prism 7700 序列检测系统(Applied Biosystems, 应用生物系统)实施定量。用于 CLDN10 的引物和探针是 CLDN10-F、5'-CTGTGGAAGGCGTGCGTTA-3'; CLDN10-R、5'-CAAAGAAGCCCAGGCTGACA-3'; 和 CLDN10-P、5'-6FAM CCTCCATGCTGGCGC MGBNFQ-3'。

10

预后性基因评分

针对每个患者的预后性基因评分是基于在已证明的表达水平与不良的预后相关的基因集里的基因的比例而产生的。因为高水平表达的基因与不良的预后相关(坏的基因, 相对风险大于 1), 表达水平
15 高于平均表达值被赋值 1 个点(表达水平低于平均值, 得到 0 点的分值)。因为高水平表达的基因与良好的预后相关(好的基因, 相对风险小于 1), 表达水平低于平均表达值被赋值 1 个点(表达水平高于平均值的分值为 0 点)。因此, 针对每个个体的预后性基因评分是所有基因的平均分值(全部所得的点/全部被研究的基因的数量)。为 1 的预后
20 性基因评分, 对于所有坏的基因是高水平表达, 而对于所有好的基因是低水平表达, 提示为预后不良。同样地, 预后性基因评分为 0 表明预后良好。

统计方法

25 为了确定用于预测疾病复发的基因集, 使用 Cox 回归分析对在 1404 个克隆的每个上的表达水平对复发的影响进行检查。选择 P 值小于 0.05 的基因。第二步, 当用 Kaplan-Meier 对数秩检验时, 通过包含那些 P 值小于 0.05 的基因进一步描绘基因集。为了进行该检验,

针对每组基因数据将患者分为两组。分组是依据在平均表达值这个截止点的基因表达水平进行的。第三步，使用“逐步减少(step-down)”法以确定可提供最好的复发预测的具有最少数量基因的最佳基因集。在某一时间，在基因集里的一个基因被临时性去除，并对所得的基因评分进行 Cox 回归分析。当基因的去除具有最大的标准化效应(即对数相对风险/标准误)时，基因被从集里去除。该过程一直持续直到一个基因留在集里。取在所得最高的标准化效应的相应的基因评分时的基因的数量作为最佳值。通过使用在 Statistical Analysis System (统计分析系统, SAS) Version 8.2 (版本 8.2)中的宏语言将该分析编入程序。通过接受器工作特性(ROC)曲线下的面积测量应用针对复发预测的基因评分的准确率。分析用于 3 年的预测能力。在预测研究中，无病但少于 3 年随访的患者被排除在外，分析其中的 27 个发生复发的 45 例患者。与生存预测相似的，分析其中 17 个死亡的 44 例患者。Youden 指数，即敏感性和(1-特异性)的总和，被用于确定最佳的截止点。SAS 被用于该分析。用带有由 SPSS 版本 11.0 软件包(SPSS 有限公司,芝加哥,伊利诺伊州)辅助的向前逐步选取法(forward stepwise selection procedure)的 Cox 比例危险模型回归法检查临床病理学参数与患者预后的相关性。

表 1. 对 26 基因的无病生存单变量分析

基因名称	登记名目	相对风险	P	基因排序 ^a
IL7R	AA485865	0.6 (0.4-0.9)	0.011	1
NDRG1	AA486403	1.5 (1.1-2.0)	0.006	2
EST1	H50345	1.7 (1.1-2.6)	0.011	3
TRPC1	AA017132	0.6 (0.4-0.9)	0.016	4
GFRA1	AA512935	0.5 (0.3-0.9)	0.014	5
EST2	AA454543	1.7 (1.2-2.6)	0.008	6
CLDN10	R54559	1.7 (1.1-2.7)	0.014	7
DNALI1	R93087	1.9 (1.2-3.0)	0.006	8
RBP5	AA453198	1.4 (1.0-2.0)	0.033	9
EST3	AA621761	1.7 (1.0-3.0)	0.049	10
EST4	N63706	1.8 (1.1-2.9)	0.020	11
PCOLCE	AA670200	0.7 (0.5-0.9)	0.010	12
TDO2	T72398	0.8 (0.6-1.0)	0.038	13
EST5	T47454	0.7 (0.5-1.0)	0.040	14
HIST1H2BD	N33927	1.7 (1.1-2.5)	0.012	15
PXMP2	N70714	1.7 (1.1-2.6)	0.031	16
ACAS2	AA455146	1.8 (1.2-2.6)	0.004	17
ANAPC7	T68445	0.7 (0.5-1.0)	0.024	18
EST6	AA576580	1.9 (1.1-3.2)	0.021	19
RBP5	N92148	1.4 (1.0-1.9)	0.049	20
ANXA1	H63077	0.5 (0.3-0.9)	0.020	21
CKB	AA894557	1.3 (1.1-1.7)	0.010	22
ITGBL1	N52533	0.7 (0.4-1.0)	0.048	23
KPNA2	AA676460	1.6 (1.0-2.6)	0.048	24
EST7	W90740	0.6 (0.4-0.9)	0.012	25
MEG3	W85841	1.2 (1.0-1.5)	0.038	26

^a用逐步减少法将用于预测复发的基因的相对重要性排序 (ranked)。

结果

基因表达谱

将扫描成像的荧光强度量化、规格化和校正，以得到富含基因的转录物，以样本池(sample pool)的平均值作为强度比。总数 1404 个 cDNA 克隆在两个样本中具有至少 4 倍差异的 48 例 HCC 样本的组之间被显著地调节。使用分级聚类算法，48 例 HCCs 基于它们在 1404 个重要克隆的相似性被聚类(clustered)。将 HCC 样本分开为截然不同的两个分支(分别为 25 和 23 例 HCCs)并与临床病理学参数，诸如血清 AFP 水平、肿瘤的大小、静脉浸润的出现、pTNM 分期和复发相关。26 例患者发生复发且中位无病期为 4.5 个月(范围为 0.9-32.7 个月)。至于 22 个没有复发的患者，随访的中位持续时间为 37.2 个月(范围为 26.1-45.4 个月)。然而，这些临床病理学参数与综合表达特征(global expression signatures)无相互关系。结果期望的是 HCC 的综合基因表达谱与肿瘤的增殖和代谢率、肿瘤细胞的去分化状态相关。

然后，具体地调查在 48 例患者中 1404 个克隆与肿瘤复发的相关。评估对基因表达水平与疾病复发之间相关的 Cox 回归分析，发现 54 个基因与肿瘤复发之间有显著相关($P < 0.05$, 1404 个中有 3.8% 为重要克隆)。在第二步中，为了进一步将用于复发预测的基因数量减到最少，通过 Kaplan-Meier 分析检查 54 个基因。通过对数秩检验确定 26 个基因，P 值小于 0.05 (表 1)。

如在方法部分所述产生每个单个患者的预后性基因评分。评分是以在已证明的表达水平与不良的预后相关的基因集里的基因的比例为基础的。采用逐步减少法以确定可提供具有最佳预测复发的预后基因评分的最小集的基因。将对于复发的预测相对重要的基因排序，且按去除秩序的最后的基因是预测复发最重要的基因(表 1)。以标准效应对被考虑的基因的数量绘曲线图(图 1B)。当基因的数量被最优化至预测复发的最高排序前 12 个基因时，达到最大标准效应。

图 1C 显示 48 例 HCC 样本中的 12 个基因的表达模式(图 1C)。基因根据它们在样本上被用分级聚类算法测量到的相似性而被聚类。在基因树状图中显示了截然不同的两组基因。明显地，顶部面板含有经 Cox 分析相对风险(RR)小于 1 的“好的”基因。通过 Kaplan-Meier 分析，这些“好的”基因的高水平的表达与更长的无病期相关。在底部面板的基因是相对风险(RR)大于 1 的“坏的”基因，其高水平的表达与更短的无病期相关。同样，基于他们在此 12 个预后性基因上测量的相似性，HCCs 被划分为在数据矩阵的底部指明的复发事件的两组。在左边聚类的 HCCs 显示伴有好的基因向上调节和坏的基因向下调节的好的基因表达特征。相反，在右边聚类的 HCCs 表现为伴有坏的基因向上调节和好的基因向下调节的坏的基因表达特征。与在有好的预后特征的患者中复发的低发生率(3/20, 15 %)相比，有坏的预后特征的大多数患者发生复发(24/28, 85.7 %); Fisher's 精确检验, $P < 0.001$ 。

15

确认使用独立集的 HCCs。

为了验证用于预后的基因，使用原发性 HCCs 的附加独立集 (independent set)，从 12 个基因的集中任意地选择基因以检验微阵列表达数据。不同的实验方法，定量 RT-PCR，被用于检查封闭蛋白 10 (CLDN10) 的表达水平。通过使用他们的中位表达值作为截止点将患者分成两组。具有高水平的 CLDN10 表达的患者，18 例患者中的 14 个(77.8 %)发生复发; 而 29 个具有低水平表达的患者中的 12 个(41.4 %)发生复发(Fisher's 精确检验, $P = 0.015$) (图 2)。高水平的 CLDN10 表达与增加的疾病复发风险相关; RR 为 3 倍(95 %置信区间(CI), 1.4-6.6; $P = 0.006$)。用 Kaplan-Meier 分析，在具有高 CLDN10 水平的患者中的中位无病生存期为 5.5 个月，与在具有低水平表达的患者中的 > 17.5 个月比较(对数秩检验, $P = 0.004$)。这样，在确认样本集中，微阵列和 RT-PCR 在 CLDN10 上显示可比较的结果。

25

基因表达和临床病理学特征

对基于最佳集的 12 个基因的预后性基因评分排序并且与患者预后作比较(图 3A)。由预后性基因评分的患者结果预测的准确率通过接受器工作特性(ROC)曲线下的面积测量。3 年内的复发预测准确率为 97.8 % (CI 95 %, 94.8-100 %) (图 3B)。用 Youden 指数测定的用于复发预测的最佳截止值为 0.416。3 年内的复发预测的特异性和敏感性分别为 94.4 % (95 % CI, 72.7-99.9 %)和 92.6 % (95 % CI, 75.7-99.1 %)。对 3 年内的复发的发生的预估 RR 为 57.7 倍。通过 ROC 曲线对于死于疾病的患者的预测准确率为 89.3 % (CI 95 %, 79.4-99.2 %) (图 3C)。通过 Youden 指数用于生存预测的最佳截止值为 0.600。3 年内的死亡预测的特异性和敏感性分别为 88.9 % (95 % CI, 70.8-97.7 %)和 82.4 % (95 % CI, 56.6-96.2 %)。对 3 年内死亡的预估 RR 为 16.9 倍。

已经分析临床病理学特征与 HCC 复发之间的相互关系(表 2)。静脉入侵的存在、肿瘤尺寸大于 5 cm 和晚期的 pTNM 分期均与疾病复发显著相关。此 3 个特征和微陪静脉(microsatellite)结节的存在均与疾病死亡显著相关。性别、年龄、HBV 感染史、血清 AFP 水平、肝硬化、肿瘤包囊形成(encapsulation)和 Edmondson 分级既不与复发显著相关又不与死亡显著相关。如由 RR 所提示的, 预后性基因评分胜过(outperformed)所有临床病理学参数。

表 2. 对于基因评分和临床病理学参数的无病生存和总体生存单变量分析

变量 ^a	无病生存		总体生存	
	相对风险	P	相对风险	P
5		<		<
因评分	57.7 (7.6-435.9)	0.001	16.9 (4.8-60.2)	0.001
静脉浸润	2.2 (1.0-4.8)	0.039	2.9 (1.1-7.9)	0.035
肿瘤大小	2.7 (1.2-6.0)	0.013	6.9 (2.0-24.2)	0.002
pTNM 分期	2.4 (1.1-5.4)	0.032	5.4 (1.5-18.7)	0.008
10 微陪静脉		0.285	2.8 (1.0-7.7)	0.043

^a对于每个变量，患者被分类为两组。肿瘤大小的截止点为 5 cm。P > 0.05 的非显著性变量，包括性别、年龄(截止点在 60 岁)、HBV 感染史、血清 AFP 水平(截止点在 20 ng/ml)、肝硬化、肿瘤包囊形成和 Edmondson 分级没有列入此表。

15

通过基因评分和 pTNM 分期的预后。

适于复发和死亡预测的最佳截止值是不同的。因此，对于全部患者的结果的估价，我们推荐使用预后性基因评分将患者分类为 3 组：具有良好预后的基因评分 A (<0.416) 的患者，其大多数为无病的并在 3 年内存活，有 1/21 (4.8%) 的复发和死亡；具有中等的预后的基因评分 B (0.416-0.600) 的患者，其大多数发展为晚期复发，但仍在 3 年内存活，有 9/10 (90%) 的复发(中位无病期为 16.1 个月)和 2/10 (20%) 的死亡；具有不良预后的基因评分 C (>0.600) 的患者，其大多数发展为早期复发并和在 3 年内死亡，有 17/17 (100%) 的复发(中位无病期为 2.5 个月)和 14/17 (82.4%) 的死亡(中位总体生存期为 13.7 个月)。

25

通过此两个因素的向前逐步选择(forward stepwise selection procedure)程序的 Cox 回归分析，将预后性基因评分(3 类：评分 A、

B 和 C)和 pTNM 分期(4 期: I、II、III 和 Iva)作比较。预后性基因评分和 pTNM 分期两者都为不良预后的独立指标。用于预后性基因评分和 pTNM 分期的针对无病生存的相对风险分别为 5.7 (95 % CI 3.2-10.4, $P < 0.001$)和 1.7 (95 % CI 1.0-2.8, $P = 0.036$)。用于预后性基因评分和 pTNM 分期的针对总体生存的相对风险分别为 5.4 (95 % CI 2.1-14.0, $P < 0.001$)和 2.0 (95 % CI 1.1-3.4, $P = 0.020$)。

用 Kaplan-Meier 分析对预后性基因评分和 pTNM 分期作进一步研究(图 4)。具有不同预后性基因评分的患者在无病生存和总体生存上显著差异(对数秩检验 $P < 0.05$)。在评分 A 和 B 的患者之间的总体生存分析中, 他们中的大多数仍然存活, 此 2 组间没有观察到显著性差异; 不过, 评分 B 的患者的大多数在 3 年内发生复发, 在较长时间的随访中, 总体生存结局将预期比评分 A 的患者差。然而, 具有不同 pTNM 分期的患者在无病生存和总体生存上没有显著差异。将 I 期和 II 期对比, 或 II 期与 III 期对比, 没有观察到显著性差异。仅 III 期的患者与 IVa 期的患者有显著性差异。因此, 预后性基因评分可提供比 pTNM 分期系统更准确的预后分隔(segregation)。

讨论

这些结果表明对 HCC 患者的预后可源自原发性肿瘤的基因表达谱。预测复发的最佳基因集被描绘为与复发有显著性相关的 26 个基因中排序中的前 12 个基因。尽管预后性基因集由复发事件相关性确定, 此结果还可应用于总体生存预测。因此产生预后性基因评分针对预测 3 年内的复发和死亡分别有 97.8 %和 89.3 %的准确率。如由相对风险所提示的, 预后性基因评分的预测能力胜过所有临床病理学参数。多变量分析表明由基因评分的预后独立于 pTNM 分期。因此, 与临床和病理学数据一起的基因表达数据将明确地提供对于疾病预后更加准确的预测。

5 这是第一次报道基因表达谱用于在肝切除术后的 HCC 患者中无病生存和总体生存的预测。近来的研究解释了 3 年内肝内和肝外的复发，如在肝脏之外复发对于疾病的诊治也是重要的并且更长的随访期将包括根治性手术后的复发的多数。在临床终点考虑中的根本的差异可说明两个报告之间的预后性基因列表差异。然而，差异也可由于用于两个中心的不同的微阵列，包括在基因芯片中不同的基因集引起。此外，在 Iizuka 等的研究中，患者主要是与 HCV 相关的，而我们的大多数患者是与 HBV 相关的，因此疾病的预后实际上可涉及不同的基因。

10 基因的功能注解提供对导致快速复发的潜在的生物学机制的进一步了解。可能涉及细胞入侵和转移的基因是在不良预后组中显著地向上调节的。例如，CLDN10 家族成员已经显示促进入侵和迁移；动力蛋白、轴索、轻中间型多肽 1 (DNALI1) 是一种动力蛋白并且可调节细胞的迁移/运动性。

15 近期的综述表明对于根治性手术后的局部的 HCC 的新辅助治疗和辅助治疗在总体生存或无病生存上已经有了适度的改进。挫折是预料之中的，因为即使是没有辅助治疗，约半数患者将不发生疾病复发(图 4A)。这些预后良好的患者可不受益于辅助治疗，但是可能死于辅助治疗的副作用。因此，预后性基因评分可帮助选择那些将
20 受益于辅助治疗的高风险的患者，并且显著地减少根本不需要治疗的患者的数量。此外，在具有不良预后的肿瘤中解除调节(deregulated)的基因是可能的新的抗癌药物合理开发的标靶以及治疗对象。在本研究中，RBP5 在 HCC 患者的子集中是向下调节的(图 1C)并且因此它们可以是由视黄酸(retinoic acid)进行化学预防的候选者。显示高
25 水平的 RBP5 的患者可意味着对视黄酸无应答，或为了治疗而将 RBP5 水平拉低所必须采取的措施。这些标靶的确认也可改进研究治疗其它肿瘤的效率。

这些结果表明基于 12 个基因的表达模式的预后性基因评分可准确地预测根治性手术后的 HCC 患者的疾病复发和生存，并且意味着入侵和转移行为是在原发性肿瘤中启动的生物学本性。

5 实施例 II

概要

具有相同临床病理学特征的肝细胞癌(HCC)的患者在根治性肝切除后可能有明显不同的疾病结局。为了处理这一问题，评价 HCCs 的 cDNA 微阵列基因表达谱并确定封闭蛋白-10 表达水平与疾病复发相关。本研究的目的是通过可适用于常规操作的备选的研究方法验证以上微阵列数据。使用定量 RT-PCR 以验证在封闭蛋白-10 表达水平上的微阵列数据。该化验在单独的 HCC 样本集上重复该试验，以证实封闭蛋白-10 的预后的意义。通过定量 RT-PCR 和微阵列测量法所得的封闭蛋白-10 表达水平显示高度一致($r = 0.602, P < 0.001$)。在单独的 HCC 样本集上重复定量 RT-PCR 并且封闭蛋白-10 表达与复发的相关性被再次证实(风险比 1.2, 95 % CI 1.0-1.4, $P = 0.011$)。通过多变量 Cox 回归分析，封闭蛋白-10 表达和 pTNM 分期为独立的预测疾病复发的因素。因此，HCC 的封闭蛋白-10 表达可被用作对根治性肝切除术后疾病复发的分子标记。

20

材料与方法

患者与样本

从在 1999 年 3 月至 2000 年 4 月期间于香港玛丽女王医院(Queen Mary Hospital, Hong Kong)做了根治性部分肝切除术的 48 例 HCC 患者得来的基因表达谱被纳入用于患者预后分析。如果被切除的标本的病理学检查显示阳性切除边缘(切除外缘有残癌)或其它肿瘤细胞类型(如胆管细胞癌)的混合物；如果他们在切除术之前或之后接受了化疗；如果他们接受了肝移植而不是部分肝切除术；如果该切除术是

25

为了复发或减轻的意图；或如果该切除术引起医院内死亡，则患者被从本疾病预后分析中排除出去。在相同的研究机构中，将在2000年4月至2002年3月期间动过手术的、使用相同的排除标准的其它53例HCCs补充进来用于验证研究。为标本收集，已经取得备告知者的同意。研究方案经香港大学伦理规范委员会核准。

HCC复发的诊断基于在计算机X线断层摄影增强扫描术中的典型的成像结果和增加的血清AFP水平。在不确定的情况下，进行肝动脉造影术和碘油计算机X线断层摄影扫描术，且如果需要，使用细针穿刺(抽吸)细胞学确认。直至分析的那天，总数101例患者中有59人发生复发且中位无病期为5.7个月(范围为0.9-32.7个月)。对剩余的42个无病的患者，中位随访期为34.0个月(范围为14.9-48.8个月)。患者年龄范围为从13岁至79岁，年龄中位数为52岁。有81个男性和20个女性。92例患者的血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)为阳性(91.1%)。肿瘤依据UICC pTNM肿瘤分类1997版分期(18)，因为2002版没有依生存率明确地将患者划分为不同的期(19)。临床病理学特征将前瞻性地收录HCC临床数据库中。

微阵列表达研究。

cDNA微阵列载玻片印记有包含17,400个基因的约23,000个cDNA克隆。样本、RNA制备物和杂交方案已确定并且在此之前已详细描述(14, 20)。数据存放入斯坦福微阵列数据库(<http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/SMD/>) (21)。通过对每个阵列用平均数中间值(mean-centering)处理基因使荧光信号标准化，然后通过所有阵列用平均数中间值处理每个基因。在至少50%的试验样本中，或者为Cy5-标记的样本或者为Cy3-标记的参照物，只有经过良好检测的基因才被纳入下一步的分析中，并定义为具有信号强度对背景噪音的比率大于1.5倍且比背景大50单位的净信号强度的基因。选择

总共 1,404 个 cDNA 克隆用于 Cox 回归的进一步分析, 这些克隆具有 4 倍于至少两个样本的平均数的不同表达水平。

定量 RT-PCR。

5 对 RT-PCR 进行定量。使用人 18s rRNA 引物和探针试剂(Pre-Developed TaqMan Assay Reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA)作为后续的倍增反应的标准化对照物。相对数量的封闭蛋白-10 (其已被适于 RNA 数量变异的对照物 18s 和适于板与板间变异的校准器(calibrator 标准化)作为以 2 为底的对数的相对倍数变化存在。转录物量化)按每一个样本至少一式三份进行。使用 ABI Prism 7700 测序系统(Applied Biosystems)进行量化。适于封闭蛋白-10 的引物和探针为 CLDN10-F、5'-CTGTG GAAGG CGTGC GTTA-3' CLDN10-R、5'-CAAAG AAGCC CAGGC TGACA-3'; 和 CLDN10-P、5'-6FAM CCTCC ATGCT GGCGC MGBNFQ-3'。

15

统计方法。

有基因表达数据作为连续变量的 Cox 回归分析用计算机计算检验与根治性切除术后疾病复发相关的基因表达。使用适于验证的定量 RT-PCR 处理微阵列数据重现性的技术性问题。微阵列的表达数据和定量 RT-PCR 数据为由 Pearson's 相关系数(r)估算的连续变量。封闭蛋白-10 表达与无病生存的相关性在另一个独立的样本集中被验证, 我们使用定量 RT-PCR 作为差异分析技术用于独立样本集中的转录物定量。

20

封闭蛋白-10 表达数据仅在 Kaplan-Meier 分析中被模拟为分类变量。使用 Youden 指数(敏感性+特异性-1) (23)以确定用于 3 年无病生存预测的封闭蛋白-10 表达的最佳截止点。包括均值、中位数和第 75 个百分点的其它截止值也被考虑和检查, 它们均能以临床含义划分患者。使用 Youden 指数同时使预测的敏感性和特异性达最高。

25

用逐步选取法结合多变量 Cox 比例危险模型回归, 研究基因表达和临床病理学参数与患者预后的关联。封闭蛋白-10 表达数据被模拟为连续变量, 并且所有的临床病理学参数在 Cox 回归分析中被模拟为分类变量。适当时, 用斯皮尔曼(Spearman)相关和 Mann-Whitney U 检验评估封闭蛋白-10 表达水平与临床病理学特征的关联。当 P 值小于 0.05 时, 差异是相当显著的。统计分析由 SPSS 版本 11.0 软件包(SPSS 有限公司, 芝加哥, 伊利诺伊州)辅助进行。

额外的微阵列信息。

微阵列研究按照由微阵列基因表达数据集团(Microarray Gene Expression Data Group)发行的 MIAME 指导原则进行(24)。可利用 Stanford Microarray Database (<http://genome-www5.stanford.edu>)中的原始数据。还可利用向作者索取的信息。

结果:

封闭蛋白-10 表达与复发。

用连续变量模拟的基因表达的 Cox 回归分析被计算以确定预测根治性切除术后的疾病复发的基因表达(HCCs n = 48)。封闭蛋白-10 在预后预测中排序很高并且是具有潜在治疗价值的膜结合蛋白。

封闭蛋白-10 编码其中封闭蛋白为整联膜蛋白(integral membrane proteins)和紧密连接链(tight junction strands)的成分的封闭蛋白家族的成员。由 cDNA 微阵列的封闭蛋白-10 水平与复发有显著的关联(风险比[HR] 1.7, 95 %置信区间[CI] 1.1-2.6, P = 0.014)。为了核实在 cDNA 微阵列重现性上的技术顾虑, 在相同的 HCC 样本集上进行定量 RT-PCR。源自两个研究方法的结果被证明是高度一致的(Pearson 相关系数, $r = 0.602$, $P < 0.001$)。

为了提供独立检验封闭蛋白-10 表达与疾病复发之间的关联, 使用第二个集的原发性 HCCs (n = 53)。应用定量 RT-PCR 以检测封闭

蛋白-10 转录物的丰量。将封闭蛋白-10 水平当作连续变量，并使用 Cox 回归分析以检查转录物水平与根治性 HCC 手术后的患者的疾病复发之间的关系。结果表明封闭蛋白-10 的转录物水平与复发显著关联(HR 1.2, 95 % CI 1.0-1.4, P = 0.011)。这样，经不同技术检验的两个样本集都表明在 HCC 中封闭蛋白-10 的较高表达水平与根治性手术后的疾病复发相关。由封闭蛋白-10 表达和临床病理学特征评估预后。所有在这两个样本集中的 101 例患者被包括在疾病复发分析中。封闭蛋白-10 表达数据是基于定量 RT-PCR，并且在分析中被模拟作为连续变量。根据临床病理学参数，相应地对患者进行对分研究 (dichotomized) (表 3)。

表 3. 针对无病生存的基因表达和临床病理学参数的 Cox 回归分析

变量 ^a	n	单变量分析		多变量分析		
		风险比(95 % CI)	P	调整过的风险比(95 %	P	
pTNM 分期						
I 期和 II 期	43	1		1		
III 期和	58	3.0	(1.7-5.4)	<0.001	2.6 (1.4-	0.002
肿瘤大小						
≤ 5 cm	39	1		1		
> 5 cm	62	2.2	(1.2-3.8)	0.006	2.7 (1.5-	0.001
静脉的						
不存在	48	1				
存在	53	2.6	(1.5-4.5)	0.001	- -	-
肿瘤结节						
单个	77	1				
多个	24	1.9	(1.1-3.3)	0.025	- -	-
微陪静脉						
不存在	52	1				
存在	49	1.7	(1.0-2.9)	0.037	- -	-
血清 AFP 水平						
≤ 20 ng/ml	34	1			1	
> 20 ng/ml	67	1.6	(0.9-2.8)	0.112	2.2 (1.2-	0.010
封闭蛋白-10 ^b	101	1.2	(1.1-1.3)	0.002	1.2 (1.1-1.3)	<0.001

^a $P > 0.05$ 的无显著意义的变量没有列于此表中, 这些变量包括性别(男性与女性比较)、年龄(≤ 60 岁、 > 60 岁)、与乙型肝炎病毒的关联(不存在与存在血清乙型肝炎表面抗原比较)、慢性肝病(正常和肝炎与肝残留部分硬化)、肿瘤包囊形成(不存在与存在肿瘤包囊比较)、

5 Edmondson-Steiner 病理学分级(1 级和 2 级与 3 级和 4 级比较)。

^b 在本分析中由定量 RT-PCR 检验的封闭蛋白-10 表达水平(为以 2 为底的对数的相对倍数变化)被模拟为连续变量。

通过单变量 Cox 回归分析, 封闭蛋白-10 表达(HR 1.2, 95 % CI 1.1-1.3, $P = 0.002$)、晚期 pTNM 分期(HR 3.0, 95 % CI 1.7-5.4, $P < 0.001$)、静脉侵害(HR 2.6, 95 % CI 1.5-4.5, $P < 0.001$)、大肿瘤尺寸(HR 2.2, 95 % CI 1.2-3.8, $P = 0.006$)、多肿瘤结节(HR 1.9, 95 % CI 1.1-3.3, $P = 0.025$)、以及微陪静脉结节(HR 1.7, 95 % CI 1.0-2.9, $P = 0.037$)均显著性地与疾病复发相关。性别、年龄、HBV 关联、血清 AFP 水平、剩余肝的硬化、肿瘤包囊组织形成, 以及 Edmondson-Steiner 组织学分期均与复发无显著性相关。

15 通过多变量 Cox 回归分析, 封闭蛋白-10 表达(HR 1.2, 95 % CI 1.1-1.3, $P < 0.001$)、晚期 pTNM 分期(HR 2.6, 95 % CI 1.4-4.7, $P = 0.002$)、大肿瘤尺寸(HR 2.7, 95 % CI 1.5-4.9, $P = 0.001$)和高血清 AFP 水平(HR 2.2, 95 % CI 1.2-4.0, $P = 0.010$)为疾病复发的独立的预后因素。其它的临床病理学特征不增加独立的预后信息。

25 应用 Kaplan-Meier 图进一步检查由单独使用封闭蛋白-10 表达水平或与 pTNM 分期系统一起使用的预测能力, 因为这两个因素为适于 Cox 回归分析的独立预后指标。用 Youden 指数, 封闭蛋白-10 表达的最佳截止值为 1.23 (为以 2 为底的对数的相对倍数变化), 以将患者划分为低或高封闭蛋白-10 表达组。使用这个截止值, 有 60 例患者在低封闭蛋白-10 表达组(范围 0-1.15)和 41 例患者在高封闭蛋白-10 表达组(范围 1.30-11.21)。单独使用封闭蛋白-10 因素划分患者, 低和高封闭蛋白-10 水平的患者的 3 年累计无病生存, 分别为 53.3 % (32/60)

和 24.4 % (10/41), (对数秩检验, $P < 0.001$) (图 1)。基于患者的封闭蛋白-10 水平与 pTNM 期重复该分析。对于具有低封闭蛋白-10 水平的早期(I 期和 II 期)患者, 3 年累计无病生存为 75 % (21/28), 对于具有高封闭蛋白-10 的早期患者则为 40.0 % (6/15), 对于具有低封闭蛋白-10 的晚期(III 期和 IVa 期)患者, 3 年累计无病生存为 34.4 % (11/32), 而对于具有高封闭蛋白-10 的晚期患者则为 15.4 % (4/26) (对数秩检验, $P < 0.001$)。

减少的封闭蛋白-10 表达与年长的患者、肿瘤包囊的出现和未硬化的肝相关联。

为了更好地理解封闭蛋白-10 表达的重要性, 分析了封闭蛋白-10 表达水平与 HCC 患者的临床病理学参数的关联。肿瘤中的封闭蛋白-10 表达的向下调节与老年患者($r = -0.223$, $P = 0.025$)、肿瘤包囊的出现($P = 0.011$)和剩余部分的未硬化的肝(non-cirrhotic liver)($r = 0.257$, $P = 0.009$)显著地相关。在肿瘤中的封闭蛋白-10 表达水平与 pTNM 分期、静脉浸润、肿瘤大小、多肿瘤结节、微陪静脉结节、性别、HBV 相关性、血清 AFP 水平或 Edmondson-Steiner 组织学分级显著地不相关。

20 讨论

在本研究中, 显示了封闭蛋白-10 表达水平及其作为用于 HBV 相关的 HCC 的新的分子标记的预后价值。封闭蛋白-10 基因由 Ensembl 自动化分析管线(<http://www.ensembl.org>)注释(annotated)。封闭蛋白-10 基因定位于含有 5 个外显子的 25.51 Kb 的染色体 13q31-q34 区域, 且预测蛋白含 4 个电位跨膜结构域。此基因编码其中封闭蛋白为整联膜蛋白和紧密连接链的成分的封闭蛋白家族的成员(参见参考文献 16 的综述)。紧密连接链起物理屏障的作用, 以防止溶质和水自由地通过上皮细胞层和内皮细胞层之间的细胞旁空隙(paracellular space)。

封闭蛋白-10 的确切功能还不清楚，其在癌症发生和进展的作用还是一个谜。有趣的是，封闭蛋白家族成员已经显示促进细胞侵袭和迁移(16)。已报道两个编码不同的异构体可变剪切转录物变体用于封闭蛋白-10 基因(NM_006984 和 NM_182848)。此两个转录物在 C-末端是相同的并且同样编码 155 个氨基酸。在数据库(GenAtlas, GeneCard, 5 和 SwissProt)中，封闭蛋白-10 主要涉及封闭蛋白-10b 或封闭蛋白-10 转录物变体 2 (NM_006984, 编码 228 个氨基酸)，还有报道该转录物在肺癌细胞系中被过度表达(17)。不过，封闭蛋白-10 变体涉及封闭蛋白-10a 或封闭蛋白-10 转录物变体 1 (NM_182848, 编码 226 个氨基酸)。在本报告中，封闭蛋白-10 (NM_006984)以其临床的重要性为特点，因为其为在多种组织器官(NCBI GenBank)和肝脏(未出版的资料)中观测到的主要的同工型。10

对有不同的疾病复发风险的患者的确认对患者的利益变得尤其重要。这里，在另一个独立的样本集中微阵列数据得到验证，应用定量 RT-PCR 以对在独立的样本集中的转录物定量。由不同分析技术检验的两组数据集证明封闭蛋白-10 表达的向下调节与根治手术后的延长的无病期相关联。我们的结果表明 HCC 患者的预后可源自于原发性肿瘤的基因表达。应用定量 RT-PCR 以评估封闭蛋白-10 水平是特别可行的临床标度，因为该检验是敏感的并且对于实际应用而言，15 检验设备在常规实验室中是普通易得的。Cox 回归多变量分析指出在预测预后中，封闭蛋白-10 表达是独立于 pTNM 分期的，且所用的基因表达数据与 pTNM 分期一起可形成协力，以提供对疾病预后的更加准确的预测(图 5)。

这是有关封闭蛋白-10 表达与在肝切除术后的 HCC 患者中的无病生存相关的首次报告。已经有关于用微阵列方法的 HCCs 表达谱的报告(14, 20, 25-30)，尽管很少有报告是关于基因表达与 HCC 患者预后相关的。值得注意的是，由 Iizuka 及其同事所作的近期的报告证明基因表达与肝切除术后 1 年内早期肝内复发相关(31)。在那个报告25

中，封闭蛋白-10 没有显示预后重要性。此偏差可归于许多原因。首先，在 Iizuka 等的研究中，患者主要是 HCV-相关的(22/33, 66.7 %)，而我们的大多数患者是 HBV-相关的(92/101, 91.1 %)。不同的 HCC 病因学实际上可涉及不同的基因，因而在 HBV-相关的 HCC 中和在 HCV-相关的 HCC 中与复发相关联的基因可能是不同的。再者，在临床终点考虑因素中的根本的差异(在 Iizuka 等的报告中仅报告了在手术后第一年内肝内复发；在我们的报告中报告了 3 年内肝内复发和/或肝外复发)可解释这种差异，因为不同的基因可能是造成早期复发(第一年内)或晚期复发(第一年后)的原因。此外，我们认为 3 年内肝内和肝外复发都是临床终点的评估，因为在肝脏之外的复发对于疾病的治疗也是重要的，并且较长的随访期将包括根治性手术后复发的多数。因此，重要的是评价封闭蛋白-10 表达水平是否能够预测在 HCV 相关的 HCCs 中 3 年疾病复发。

基因的功能的注释提供了对导致癌症复发潜在的生物学机理的进一步了解。封闭蛋白-10 的生物学功能不清楚。特别地，封闭蛋白家族成员已经显示与细胞侵袭和迁移相关(16)。封闭蛋白-2 的过度表达使在上皮细胞中的“紧密的”紧密连接转换为“疏漏的(leaky)”紧密连接(32)。封闭蛋白-11 的过度表达在少突胶质细胞细胞系引起增殖以及促进迁移。虽然如此，在人癌症中的封闭蛋白的作用仍然存在有争议。已经报告在胰腺癌(34, 35)、结肠直肠癌(36)和卵巢癌(37)中封闭蛋白-4/-3 的过度表达。值得注意的是，封闭蛋白-4 表达降低胰腺癌细胞侵袭和转移的潜力(38)。另外，已经报告在头和颈部鳞状上皮细胞癌(39)和乳腺癌(40, 41)的封闭蛋白-7/-1 的向下调节。封闭蛋白-10 尚未被充分地进行特征鉴定(16)。尤其是，封闭蛋白-10 被报告在肺癌细胞系中高度表达(17)。在 HCC 中低的封闭蛋白-10 表达与包括老年患者、肿瘤包囊的出现和剩余部分未硬化的肝的更有利的特征相关。在年轻的患者观察到更晚期的 HCCs (9, 42)。缺乏肿瘤包囊是有侵袭性的 HCC 的特征并且与早期复发相关(7, 10)。在肝硬化的患者

中手术死亡率较高，其与肝功能储备有关(11, 43)。降低的封闭蛋白-10 水平的生物学作用对有利于 HCC 预后的作用尚不清楚。对于封闭蛋白-10 的细胞起源的初步免疫组织化学分析表明，在具有高水平封闭蛋白-10 转录物的 HCCs 中，在肝细胞肿瘤中观察到强的膜信号和颗粒细胞质着色。但是，需要进一步的研究以阐释预后性基因封闭蛋白-10 在癌变发生中的作用，以便描述导致疾病复发的确切的分子路径。这些结果表明封闭蛋白-10 表达可预测根治手术后的疾病复发。

实施例 III

10 概要

在显示预后意义与邻近的非肿瘤肝组织相比的肿瘤中过度表达的基因中，转录物 AA454543 有潜在的实际用途。本研究的目的是用备选的研究方法并在 HCC 患者的分开的组别中验证转录物 AA454543 的预后意义。得自于接受了根治性部分肝切除术(组 1)的 48 例患者的微阵列分析的转录物 AA454543 的数据，由定量 RT-PCR 验证($r = 0.618$, $p < 0.001$)。对得自于 53 例患者(组 2)的分开的 HCCs 样本集检查，AA454543 表达水平与总体生存的关联再次得到验证($p = 0.027$)。用 Cox 回归分析，转录物 AA454543 (风险比 3.0, $p = 0.017$)和 pTNM 分期(风险比 3.3, $p = 0.010$)为用于总体生存的独立的预后性因素。对 3 年总体生存预测的准确度，对于转录物 AA454543 (74.2 %, $p = 0.001$)和 pTNM 分期(76.4 %, $p = 0.001$)而言，可由在接受器工作特征曲线下测量得的面积进行比较。转录物 AA454543 是对于用于 HCC 的根治性部分肝切除术后的总体生存的潜在有用的分子预后性标记。

25 材料与方法:

患者与样本

于 1999 年 3 月至 2000 年 4 月在香港玛丽女王医院接受了根治性部分肝切除术的 48 例患者被选择用于起初的研究(组 1)。应用 cDNA

微阵列研究了这 48 例患者的基因表达谱[10]。为了验证从 cDNA 微阵列得来的数据，在本研究中，在本组的 HCCs 中针对 AA454543 表达实施定量 RT-PCR。将在 2000 年 4 月至 2002 年 3 月期间在相同的研究机构进行手术的另外的 53 个 HCC 患者(组 2)，采用相同的入选标准补充进来，用于通过 RT-PCR 对转录物 AA454543 的进一步验证研究。这个独立的患者群(组 2)被用于确认预后性标记工作如常进行，不仅是在数据来源的患者的组(组 1)中[11]。切除的标本的病理学检查显示清晰的切除边缘的患者被包括在本研究中。如果病理学检查显示其它肿瘤细胞类型(如胆管细胞癌)的混合物；如果他们在切除术之前或之后接受了化疗；如果他们接受了肝移植而不是部分肝切除术；如果该切除术是针对复发或减轻的意图；或如果该切除术引起医院内死亡，则患者不被选择。2 组患者的临床病理学数据列于表 4。患者的年龄范围从 13 至 79，中位年龄为 52 岁。有 81 个男性和 20 个女性。在 92 例患者(91.1%)中，血清乙型肝炎表面抗原为阳性。依据国际抗癌协会(the International Union Against Cancer)的病理学肿瘤淋巴结转移(pTNM)肿瘤分类 1997 版[12]将肿瘤分期，因为 2002 版没有明显地将我们的晚期的患者的生存分级[13]。针对 HCC 的复发，患者被预期随访。复发的诊断是基于在对比增强计算机断层扫描典型的成像结果和增高的血清 AFP 水平。在不确定的情况下，进行肝动脉造影术和碘油后计算机断层扫描，如果需要，使用细针穿刺细胞学方法以确诊。截止到分析的日期，总数 101 例患者中有 31 例死于疾病，中位生存期为 12.5 个月(范围为 4.5-34.1 个月)。对于余下的 70 例患者，中位随访期为 33.4 个月(范围为 14.9-48.8 个月)。

表 4. HCCs 的临床病理学特征。

HCC 特征	组 1	组 2	小计
	n = 48	n = 53	n = 101
年龄			
中位数	51	53	52
(范围)	(13-73)	(16-79)	(13-79)
性别			
男性	36	45	81
女性	12	8	20
pTNM 分期			
I 期和 II 期	22	21	43
III 期和	26	32	58
肿瘤大小			
≤ 5 cm	24	15	39
> 5 cm	24	38	62
静脉浸润			
不存在	27	21	48
存在	21	32	53
微陪静脉			
不存在	26	25	51
存在	22	28	50
Edmondson-Steiner			
1 和 2 级	20	23	43
3 和 4 级	28	30	58
血清 AFP 水平			
≤ 20 ng/ml	15	19	34
> 20 ng/ml	33	34	67
HBsAg			
阳性	43	49	92
阴性	5	4	9
疾病死亡率			
死亡	17	14	31
存活	31	39	70

为了对转录物 AA454543 进行 cDNA 微阵列研究和定量 RT-PCR 分析, 收集于 2000 年 4 月至 2001 年 12 月在相同的研究机构实施移植手术中来自 30 位器官捐赠者(8 具尸体捐赠者和 22 个活体捐赠者)的正常肝脏标本。这些器官捐赠者没有罹患肝脏疾病并且乙肝血清学为阴性。在剖腹手术中立即获取肝脏标本, 为的是将作为生理学变化或物理处理结果的 DNA/RNA 变化的机会减至最低。标本的收集已取得被告之者的同意。研究方案经香港大学伦理委员会核准。

微阵列表达研究

cDNA 微阵列载玻片印记有包含 17,400 个基因的约 23,000 个 cDNA 克隆。样本、RNA 制备和杂交方案已确定并且在此之前已详细描述[10, 14]。数据存放入斯坦福微阵列数据库(the Stanford Microarray Database)(<http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/SMD/>) [15]。通过对每个阵列用平均数中间值处理基因使荧光信号标准化, 然后对所有阵列的每个基因用平均数中间值处理。只有经过良好检测的基因才被纳入下一步的分析中, 并定义为具有信号强度对背景噪音的比率大于 1.5 倍且比背景大 50 单位的净信号强度的基因, 在至少 50 % 的试验样本中, 用于或者 Cy5-标记的样本或者 Cy3-标记的参照物。具有表达水平差异至少 4 倍于至少两个样本的平均数的总数为 1,404 个 cDNA 克隆, 被选择用于通过 Cox 回归的进一步分析。

用于转录物 AA454543 的定量 RT-PCR

如参考文献[16]中所述进行定量 RT-PCR。简言之, 使用 High Capacity cDNA Archive 试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA), 依照生产厂商的说明书, 从 0.5 μ g 的总 RNA 合成第一条 cDNA。每个 25 μ l PCR 反应包含 1xPCR 缓冲液 II, 5.5 mM $MgCl_2$ 、每份 dATP、dCTP 和 dGTP 各 0.2 mM、0.4 mM dUTP、0.625 单位 AmpliTaq Gold 和 5 μ l 第一条 cDNA。使用适于 18s rRNA 的引物和探针试剂(Pre-

Developed TaqMan Assay Reagents, Applied Biosystems)作为内标对照物。适于转录物 AA454543 的引物和探针为 AA454543-F (5'-ACC CAC ACA CAG CGC TCA C-3')、AA454543-R (5'-CAA GCC GTA AAA CTT CTG CAT G-3')和 AA454543-P (5'-6FAM AGT CAC TCT CAG CGG CCA TCG CCC A-3')。使用 ABI Prism 7700 测序系统(Applied Biosystems)进行定量。转录物定量在针对每个样本按至少一式三份进行。针对 RNA 数量差异用对照物 18s 和针对于板与板间变异的校准器进行标准化后的转录物 AA454543 的相对量, 被用对数进行转换(以 2 为底)并表现为与基于微阵列的数据相似的相对倍数变化。

10

统计方法

用计算机计算连同作为连续变量的基因表达数据的 Cox 回归分析, 以检验与根治性切除术后总体生存相关的基因表达。为了验证, 使用定量 RT-PCR 处理微阵列数据重现性的技术性问题。用 Spearman 相关检验评估由微阵列的表达数据和定量 RT-PCR 数据的相关性。在组 2 的患者中, 用定量 RT-PCR 验证转录物 AA454543 表达与总体生存之间的相关。

15

使用转录物 AA454543 表达水平用于预后预测的总准确率通过对接受器工作特征曲线下的面积测量而得, 因为在计量(gauging)预后标记的性能时使用风险比可存在局限性[17]。对于 3 年的预测能力进行了分析。存活但少于 3 年随访的患者被排除出该预测研究。这样, 59 例患者(其中 31 例死于疾病)被包括在这一部分的分析中。使用 Youden 指数(敏感性+ 特异性-1) [18]以确定用于 3 年总体生存预测的转录物 AA454543 表达的最佳截止点。使用 Youden 指数使预测的敏感性(真阳性分数)和特异性(1-假阳性分数)同时达至最高。

20

25

应用带有向前逐步选取法的单变量和多变量 Cox 比例危险模型回归对基因表达和 pTNM 分期与患者预后的相关性进行检验。pTNM 分期信息为分类数据。为易于解释, 为了将风险比理解为比直接与

pTNM分期更加能判断的范围，将基因表达数据模拟为只在多变量Cox回归中的分类变量。转录物AA454543表达数据也被模拟为在Kaplan-Meier分析中的分类变量。

5 适当由 Spearman 相关分析和 Mann-Whitney U 检验评估转录物 AA454543 表达水平与临床病理学特征的相关性。当 P 值小于 0.05 时，差异被认为是有显著意义的。应用 SPSS 版本 11.0 软件包 (SPSS 有限公司, 芝加哥, 伊利诺伊州, 美国) 辅助统计分析。

额外的微阵列信息

10 按照由微阵列基因表达数据团体 (Microarray Gene Expression Data Group) [19] 发行的 MIAME 指导原则进行微阵列研究。可利用在 Stanford Microarray Database (<http://genome-www5.stanford.edu>) 中的原始数据。还可利用因向作者索取所获得的信息。

15 结果:

转录物 AA454543 表达和总体生存

20 在 cDNA 微阵列数据中，转录物 AA454543 在预后预测和表达水平中的高排序与非肿瘤相关。通过 cDNA 微阵列的较高的转录物 AA454543 水平与较短的总体生存显著相关 (风险比 [HR] 1.8, 95 % 置信区间 [CI] 1.1-3.1, $p = 0.024$) (表 5)。定量 RT-PCR 在组 1 患者的 HCC 样本上进行，以验证 cDNA 微阵列数据。此两种研究方法证明高度一致 (Spearman 相关, $r = 0.618$, $p < 0.001$)。在组 2 的患者中，如由定量 RT-PCR 所测的转录物 AA454543 表达水平显示与总体生存显著的相关性 (HR 1.4, 95 % CI 1.0-2.0, $p = 0.027$) (表 5)。

25 由两种不同的技术检验的两个独立样本集都表明，在 HCC 中转录物 AA454543 较高表达水平表达与根治性手术后的差的总体生存相关。然后将此两个样本集纳入使用基于定量 RT-PCR 数据的转录物 AA454543 表达水平的 Cox 回归分析中。在合并的数据中，转录物

AA454543 水平与总体生存显著相关(HR 1.3, 95 % CI 1.1-1.6, $p=0.008$) (表 5)。

表 5. 用于基于转录物 AA454543 表达的总体生存的 Cox 回归分析。^a

患者	n	单变量分析		
		风险比	(95 % CI)	P
组 1	48	1.8	(1.1-3.1)	0.024
组 2	53	1.4	(1.0-2.0)	0.027
组 1 和 2	101	1.3	(1.1-1.6)	0.008

^a 转录物 AA454543 表达数据被模拟为连续变量。表达数据是基于组 1 患者的微阵列数据，以及组 2 患者和合并组的患者中的定量 RT-PCR。

由转录物 AA454543 表达和 pTNM 分期的预后

将两组中所有的患者纳入总体生存分析中。转录物 AA454543 表达数据是基于定量 RT-PCR 方法，且将对总体生存的预测能力与 pTNM 分期相比较。通过接受器工作特征曲线下面积测量的、使用转录物 AA454543 表达预测 3 年总体生存率的准确率为 74.2 % (95 % CI 61.2-87.2 %, $p=0.001$) (图 6)。为比较，使用 pTNM 分期对生存预测的准确率为 76.4 % (95 % CI 64.2-88.5 %, $p=0.001$)。使用 Youden 指数，将患者划分为低或高转录物 AA454543 表达组的转录物 AA454543 表达的最佳截止值为 7.05 (为以 2 为底的对数的相对倍数变化)。用通过转录物 AA454543 表达的这个截止值预测患者的预后，其敏感性和特异性分别为 80.6 % 和 67.9 %。当将患者二分为早期(I 期和 II 期)或晚期(III 期和 IVa 期)组时，由 pTNM 分期所作预后预测的敏感性和特异性分别为 80.6 % 和 57.1 %。

在总共 101 例患者中，使用 Kaplan-Meier 曲线图进一步检验由单独应用转录物 AA454543 表达水平或与 pTNM 分期系统一起应用

时的预测能力。用 Youden 指数作为截止点, 有 43 例患者在低转录物 AA454543 表达组(范围为 0-7.02), 以及 58 例患者在高转录物 AA454543 表达组(范围为 7.08-11.50)。通过单独使用转录物 AA454543 水平来划分患者, 对于具有低或高转录物 AA454543 水平的患者的累计 3 年的总体生存分别为 86.0 % (37/43)和 56.9 % (33/58)(对数秩检验, $p = 0.001$) (图 7)。基于患者的转录物 AA454543 水平和 pTNM 分期重复该分析。对于具有低转录物 AA454543 水平的早期(I 期和 II 期)患者, 其累计 3 年总体生存为 96 % (24/25), 对于具有高转录物 AA454543 水平的早期患者, 其累计 3 年总体生存为 72.2 % (13/18), 对于具有低转录物 AA454543 的晚期(III 期和 IVa 期)患者, 其累计 3 年总体生存为 72.2 % (13/18), 以及对于具有高转录物 AA454543 的晚期患者, 其累计 3 年总体生存为 50.0 % (20/40) (对数秩检验, $p = 0.014$)。

通过 Cox 回归分析, 模拟为连续变量的转录物 AA454543 表达数据与总体生存显著相关(表 5)。然而, 在其自然范围表达的风险比仅说明了在与在表达范围上的 1 个单位变化相关的疾病相关死亡率的风险中的变化, 此变化太小以致于在早期不被知道。为有助于说明, 将基因表达数据模拟为分类变量以将风险比纳入更加可说明的范围(表 6)。与 Kaplan-Meier 分析相同, 将患者划分为低或高转录物 AA454543 表达组, 用 Youden 指数确定最佳截止值。通过单变量 Cox 回归分析, 转录物 AA454543 表达(HR 3.9, 95 % CI 1.6-9.6, $p = 0.003$)和晚期 pTNM 分期(HR 4.2, 95 % CI 1.7-10.3, $p = 0.002$)与总体生存显著相关。通过多变量 Cox 回归分析, 转录物 AA454543 表达(HR 3.0, 95 % CI 1.2-7.5, $p = 0.017$)和晚期 pTNM 分期(HR 3.3, 95 % CI 1.3-8.2, $p = 0.010$)为用于总体生存的独立预后性因素。

表 6. 总体生存对转录物 AA454543 表达和 pTNM 分期的 Cox 回归分析。

变量	n	单变量分析		多变量分析	
		风险比 (95 % CI)	P	调整过的 风险比(95 %	P
转录物 AA454543 ^a					
低水平(0-	43	1		1	
高水平(7.08-	58	3.9 (1.6-9.6)	0.003	3.0 (1.2-7.5)	0.017
pTNM 分期 ^b					
早期(I	43	1		1	
晚期(III 和 IVa)	58	4.2 (1.7-10.3)	0.002	3.3 (1.3-8.2)	0.010

^a 转录物 AA454543 表达数据被模拟为分类变量。用 7.05 的 Youden 指数确定将患者划分为低或高转录物 AA454543 表达组的最佳截止值。

^b pTNM 分期被模拟为分类变量。

在肝组织中的转录物 AA454543 水平

在基于 cDNA 微阵列方法的较早的观察中，HCC 组织中的转录物 AA454543 表达比在 HCCs 临近的非肿瘤肝组织中的高。为了验证该观察，我们用实时定量 RT-PCR 随机检查了 93 例(从总数 101 例中)临近 HCCs 的肝组织，以检测转录物水平。结果表明与临近 HCCs 的肝组织比较(中位数为 5.54,范围 1.26-10.13)，HCCs 显示出显著较高的转录物 AA454543 水平(中位数为 7.21,范围 0-11.50) ($p < 0.001$)。

在 HCCs 中比在临近 HCCs 的肝组织中较高的表达水平可以解释为或者在 HCCs 中转录物 AA454543 向上调节，或者在临近 HCCs 肝组织中转录物 AA454543 向下调节。为了区别这两种情形，检验了 30 例正常肝组织。在正常肝中，发现转录物 AA454543 转录物以低水平

表达(中位数 5.31,范围 0-7.36), 显著低于 HCCs ($p < 0.001$), 但与临近 HCCs 的肝组织没有显著差异($p = 0.382$) (图 8)。

转录物 AA454543 表达与临床病理学特征

5 为了更好地理解转录物 AA454543 表达的重要意义, 我们分析转录物 AA454543 表达水平与 HCC 患者的临床病理学参数的相关性。在肿瘤中转录物 AA454543 表达的向上调节显著地与晚期 pTNM 分期($r = 0.299$, $p = 0.002$)、静脉浸润($p < 0.001$)、微陪静脉结节($p = 0.016$)以及高 Edmondson-Steiner 组织学分级($r = 0.276$, $p = 0.005$)相关联。

10 在肿瘤中转录物 AA454543 表达水平与肿瘤大小、性别、年龄、HBsAg 阳性或血清 AFP 水平没有显著的相关性。

讨论:

15 转录物 AA454543 序列(克隆 ID IMAGE: 838048; UniGene Cluster Hs. 437039; 登录号(accession) BC043195)是具有部分密码子的 1703 bp mRNA 并从人脑的视丘下部最初克隆。通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information (NCBI)) BLAST 进行序列同源物 homologue 检索, 转录物 AA454543 与得自对染色体 1p31.3-32.2 的克隆 RP4-758N20 的人 DNA 序列的 AL035705 在 1686 bp

20 上显示 95 %的一致性。与小鼠基因组比较, 转录物 AA454543 与在小鼠染色体 4 上的 DNA 序列的 AL929466 在 327 bp 上显示 85 %的一致性。在人、小鼠和有机体模型基因组中没有已知的基因显示出与转录物 AA454543 序列的高的序列同源性。

25 在为了患者利益的疾病的诊治中, 对根治性处理后的具有不同风险的患者鉴定将越来越重要。常规的 pTNM 分期系统已被证明是为确认具有不同预后的患者提供信息的, 并且最近的研究证明 HCC 的分子特征能够进一步增强预测的能力。就此而言, 我们评价基于我们的早期微阵列数据的分析而选择的转录物 AA454543 的预后重要

性。另外，它在肿瘤中的转录物水平显著高于临近肿瘤的肝组织，这将是对于临床应用的重要考虑因素并且因此被选择作为分子预后性标记用于后续验证。本研究的目的是用定量 RT-PCR 的分析方法提高预后性基因的重要意义，这种方法在常规的实验室技术上易于用到的适于实际应用。在最近的研究中，我们报告转录物 AA454543 的预后的重要意义，转录物 AA454543 的表达水平可预测根治性肝切除术后 HCC 患者的生存。对于由多变量 Cox 回归分析所作的总体生存，转录物 AA454543 表达和 pTNM 分期为独立的预后性因素。如在 Kaplan-Meier 分析中阐明的(图 7)，基因表达数据与 pTNM 分期一起可帮助提供更加准确的总体生存预测。值得注意的是，转录物 AA454543 表达(单基因数据)和 pTNM 分期在预后预测上有相似的准确性(分别为 74.2 %和 76.4 %)。我们的最终目标是招募更多的基因以提高预后预测的准确性。

α -胎甲球蛋白(AFP)的表达、细胞周期的调节、与代谢相关的基因以及肿瘤反分化情形与 HCCs 的分子亚型相关[10,14, 20-25]。可是，几乎没有关于基因表达与患者预后相关的 HCC 报告。值得注意的是，Iizuka 等报告基因表达谱与早期肝内复发相关[26]。本研究与 Iizuka 等的报告之间存在的根本差异是，在 Iizuka's 的研究中的大多数患者是 HCV 相关的(22/33, 66.7 %)，而在本研究中患者大多数是 HBV 相关的(92/101, 本群体中的 91.1 %)。不同的病原因子可涉及不同的癌变路径，导致不同的分子组成和行为。此外，我们使用 3 年总体生存作为终点而 Iizuka 等使用在第 1 年的肝内复发作为临床终点用于预后预测。用于疾病复发和总体生存的预后的预后性基因可以是不同的。尽管如此，我们已经探究了由 Iizuka 等的原始数据集 (<http://surgery2.med.yamaguchi-u.ac.jp/research/DNAchip/>)且转录物 AA454543 不在探针集列表中。因此，重要的是评估转录物 AA454543 表达水平是否能够预测在 HCV 相关的 HCCs 中的总体生存。

转录物 AA454543 没有被充分地进行特征鉴定且其生物学功能尚不清楚。在临床样本中，在 HCCs 中的转录物 AA454543 水平显著高于临近 HCCs 的以及正常肝的平行的肝组织。转录物 AA454543 水平提供信息以区分肝组织是否是肿瘤组织，另外还提供预后性信息。

5 对于转录物 AA454543 的细胞起源的初步的原位杂交分析表明，在 HCC 组织的肿瘤肝细胞中观察到细胞质的信号。值得注意的是，在 HCC 中较高的转录物 AA454543 表达与包括晚期 pTNM 分期、静脉浸润、微陪静脉结节和高 Edmondson-Steiner 分级在内的不良预后特征相关。转录物 AA454543 水平与临床病理学特征之间的相关性研究
10 实际上在探索，并且需要进一步的实验以检验它们的因果关系，例如，增高的转录物 AA454543 水平是否会导致肿瘤细胞入侵能力的增加，导致静脉浸润和微陪静脉结节的形成。在分级聚类分析中，发现转录物 AA454543 聚类接近于增殖聚类，紧密靠近 G 蛋白-偶联受体和锌指蛋白，这些蛋白在协调细胞循环过程中起重要作用。这些
15 与转录物 AA454543 共同表达的基因将有助于提供转录物 AA454543 功能的线索。

本研究表明转录物 AA454543 表达水平可预测根治性部分肝切除术患者的总体生存。最近的方法证明表达谱确定预后性标记的能力对于临床应用切实可行。此事还展现了顾及未知基因的前景，并且
20 不仅专注于在癌发生作用上有公认的生物学作用的熟知基因。此分子标记提供普遍的预后性信息(两群独立的患者)并且该预测是独立于分析方法(微阵列或定量 RT-PCR)的。通过定量 RT-PCR，这个基因可用于常规的实验室分析。与 pTNM 分期一起，将有助于改善预后预测以及对患者有利的疾病的诊治。

实施例 IV

概要:

如在我们的通过 cDNA 微阵列方法对肝细胞癌症(HCC)的早期的基因组-广泛表达研究中显示的,发现动力蛋白、轴索、轻中间型多肽 1 (DNALI1)表达与疾病复发显著相关(风险比[HR] 1.7, 95 % 置信区间[CI] 1.1-2.6, P = 0.014)。该研究在独立样本集(n = 50)上进行并且使用定量 RT-PCR 以检测 DNALI1 转录水平。较高 DNALI1 表达水平与早期疾病复发的相关性被再次证实。我们的初步的测序研究表明 DNALI1 在核苷 194 (密码子 65)具有多态性,其携带或者 C-等位基因(GCA, 丙氨酸)或者 T-等位基因(GTA, 缬氨酸)。然后,针对核苷 194 多态性我们还检查了患者的血液样本(n = 50, HCCs 有定量 RT-PCR 数据的平行样本)。与有 C-等位基因的患者比较,在有 T-等位基因患者中,肿瘤 DNALI1 转录水平明显较高(中位数分别为 67.2 和 27.6; P = 0.029)。对临床样本的研究证实 DNALI1 表达水平与疾病早期复发相关,并且具有在核苷 194 上有 T-等位基因的患者的 DNALI1 水平较高。

实施例 I 的参考文献

1. Pisani, P., Parkin, D.M., Bray, F.和 Ferlay, J. "Estimates of the Worldwide Mortality from 25 Cancers in 1990", Int. J. Cancer **83**, 18-29 (1999)。
2. El-Serag, H.B.和 Mason, A.C., "Rising Incidence of Hepatocellular Carcinoma in the United States", N. Engl. J. Med. **340**, 745-750 (1999)。
3. Taylor-Robinson, S.D., Foster, G.R., Arora, S., Hargreaves, S.和 Thomas, H.C., "Increase in Primary Liver Cancer in the UK, 1979-94", Lancet **350**: 1142-1143 (1997)。
4. Okuda, K., Fujimoto, I., Hanai, A.和 Urano, Y., "Changing Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Japan," Cancer Res. **47**, 4967-4972 (1987)。

5. Tang, Z.Y., "Hepatocellular Carcinoma", J. Gastroenterol. Hepatol. **15** 卷增刊, G1-7 (2000).
6. Ng, I.O., Lai, E.C., Fan, S.T., Ng, M.M.和 So, M.K., "Prognostic Significance of Pathologic Features of Hepatocellular Carcinoma. A Multivariate Analysis of 278 Patients", Cancer **76**, 2443-2448 (1995).
7. Ng, I.O., Poon, R.T., Shek, T.W.和 Fan, S.T., "Clinicopathologic and Prognostic Significance of the Histologic Activity of Noncancerous Liver Tissue in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma", Am. J. Clin. Pathol. **117**, 411-418 (2002).
8. Poon, R.T.等, "Different Risk Factors and Prognosis for Early and Late Intrahepatic Recurrence After Resection of Hepatocellular Carcinoma", Cancer **89**, 500-507 (2000).
9. Poon, R.T.等, "Improving Survival Results After Resection of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study of 377 Patients over 10 Years", Ann. Surg. **234**, 63-70 (2001).
10. Poon, R.T.等, "Clinicopathologic Features of Long-Term Survivors and Disease-Free Survivors After Resection of Hepatocellular Carcinoma: A Study of a Prospective Cohort", J. Clin. Oncol. **19**, 3037-3044 (2001).
11. Vauthey, J.N.等, "Simplified Staging for Hepatocellular Carcinoma", J. Clin. Oncol. **20**, 1527-1536 (2002).
12. Villa, E.等, "Estrogen Receptor Classification for Hepatocellular Carcinoma: Comparison With Clinical Staging Systems", J. Clin. Oncol. **21**, 441-446 (2003).
13. Yeatman, T.J., "The Future of Cancer Management: Translating the Genome, Transcriptome, and Proteome", Ann. Surg. Oncol. **10**, 7-14 (2003).
14. Beer, D.G.等, "Gene-Expression Profiles Predict Survival of Patients with Lung Adenocarcinoma, " Nat. Med. **8**, 816-824 (2002).

15. Dhanasekaran, S.M.等, "Delineation of Prognostic Biomarkers in Prostate Cancer", Nature **412**, 822-826 (2001).
16. Garber, M.E.等, "Diversity of Gene Expression in Adenocarcinoma of the Lung", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 13784-13789 (2001).
- 5 17. Pomeroy, S.L.等, "Prediction of Central Nervous System Embryonal Tumour Outcome Based on Gene Expression", Nature **415**, 436-442 (2002).
18. Singh, D.等, "Gene Expression Correlates of Clinical Prostate Cancer Behavior", Cancer Cell **1**, 203-209 (2002).
- 10 19. Sorlie, T.等, "Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 10869-10874 (2001).
20. van de Vijver, M.J.等, "A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer", N. Engl. J. Med. **347**, 1999-2009 (2002).
- 15 21. van't Veer, L.J.等, "Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer", Nature **415**, 530- 536 (2002).
22. Kawai, H.F., Kaneko, S., Honda, M., Shirota, Y.和 Kobayashi, K., "Alpha-Fetoprotein-Producing Hepatoma Cell Lines Share Common Expression Profiles of Genes in Various Categories Demonstrated by cDNA Microarray Analysis", Hepatology **33**, 676-691 (2001).
- 20 23. Lee, J.和 Thorgeirsson, S.S., "Functional and Genomic Implications of Global Gene Expression Profiles in Cell Lines from Human Hepatocellular Cancer", Hepatology **35**, 1134-1143 (2002).
24. Okabe, H.等, "Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Human Hepatocellular Carcinomas Using cDNA Microarray: Identification of Genes Involved in Viral Carcinogenesis and Tumor Progression", Cancer Res. **61**, 2129- 2137 (2001).
- 25

25. Shirota, Y., Kaneko, S., Honda, M., Kawai, H.F.和 Kobayashi, K., "Identification of Differentially Expressed Genes in Hepatocellular Carcinoma with cDNA Microarrays", Hepatology **33**, 832-840 (2001).
26. Xu, X.R.等, "Insight into Hepatocellular Carcinogenesis at
5 Transcriptome Level by Comparing Gene Expression Profiles of Hepatocellular Carcinoma with Those of Corresponding Noncancerous Liver" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 15089-15094 (2001).
27. Chen, X.等, "Gene Expression Profiles in Human Liver Cancers", Mol. Biol. Cell **13**, 1929-1939 (2002).
- 10 28. Cheung, S.T.等, "Identify Metastasis-Associated Genes in Hepatocellular Carcinoma Through Clonality Delineation for Multi-Nodular Tumor", Cancer Res. **62**, 4711- 4721 (2002).
29. Iizuka, N.等, "Oligonucleotide Microarray for Prediction of Early
15 Intrahepatic Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Curative Resection", Lancet **361**, 923-929 (2003).
30. Sobin, L.H.和 Whitekind, C., "In TNM Classification of Malignant Tumours", John Wiley, 纽约, 第五版 1997)。
31. Youden, W.J., "Index for Rating Diagnostic Tests", Cancer **3**, 32-35 (1950).
- 20 32. Edmondson, H.A.和 Steiner, P.E., "Primary Carcinoma of the Liver: A Study of 100 Cases Among 48,900 Necropsies", Cancer **7**, 462-503 (1954).
33. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P.和 Jaramillo, B.E., "Tight Junction Proteins", Prog. Biophys. Mol. Biol. **81**, 1-44 (2003).
- 25 34. Kastury, K.等, "Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning and Characterization of a Putative Human Axonemal Dynein Light Chain Gene", J. Clin. Endocrinol. Metab. **82**, 3047-3053 (1997).

35. Schwartz, J.D., Schwartz, M., Mandeli, J.和 Sung, M., "Neoadjuvant and Adjuvant Therapy for Resectable Hepatocellular Carcinoma: Review of the Randomised Clinical Trials", Lancet Oncol. **3**, 593-603 (2002).
36. Poon, R.T., Fan, S.T.和 Wong, J., "Risk Factors, Prevention, and
5 Management of Postoperative Recurrence After Resection of Hepatocellular Carcinoma", Ann. Surg. **232**, 10-24 (2000).
37. Muto, Y.等, "Prevention of Second Primary Tumors by an Acyclic Retinoid, Polyprenoic Acid, in Patients with Hepatocellular Carcinoma", N. Engl. J. Med. **334**, 1561-1567 (1996).
- 10 38. Marill, J., Idres, N., Capron, C.C., Nguyen, E.和 Chabot, G.G., "Retinoic Acid Metabolism and Mechanism of Action: A Review" Curr. Drug Metab. **4**, 1-10 (2003).
39. DeRisi, J.等, "Use of a cDNA Microarray to Analyse Gene Expression Patterns in Human Cancer", Nat. Genet. **14**, 457-460 (1996).
- 15 40. Perou, C.M.等, "Molecular Portraits of Human Breast Tumours", Nature **406**, 747-752 (2000).
41. Sherlock, G.等, "The Stanford Microarray Database", Nucleic Acids Res. **29**, 152-155 (2001).
42. Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O.和 Botstein, D., "Cluster
20 Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 14863-14868 (1998).
43. Bustin, S.A., "Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays", J. Mol. Endocrinol. **25**, 169-193 (2000).
- 25 44. SAS Institute Inc., "In SAS Macro Language: Reference", 第一版。SAS 研究所有限公司, 第一版 1997)。
45. Brazma, A.等, "Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) -Toward Standards for Microarray Data", Nat. Genet. **29**, 365-371 (2001).

实施例 II 的参考文献

1. Pisani, P., Parkin, D.M., Bray, F.,和 Ferlay, J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83: 18-29, 1999.
- 5 2. El-Serag, H.B.,和 Mason, A.C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N. Engl. J. Med.* 340: 745-750, 1999.
3. Taylor-Robinson, S.D., Foster, G.R., Arora, S., Hargreaves, S.,和 Thomas, H.C. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94. *Lancet*, 350: 1142-1143, 1997.
- 10 4. Okuda, K., Fujimoto, I., Hanai, A.,和 Urano, Y. Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res.*, 47: 4967-4972, 1987.
5. Tang ZY. Hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15 卷增刊: G1-G7, 2000.
6. Ng, I.O., Lai, E.C., Fan, S.T., Ng, M.M.,和 So, M.K. Prognostic
15 significance of pathologic features of hepatocellular carcinoma. A multivariate analysis of 278 patients. *Cancer*, 76: 2443-2448, 1995.
7. Poon, R.T., Fan, S.T., Ng, I.O., Lo, C.M., Liu, C.L.,和 Wong, J. Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 89: 500-
20 507, 2000.
8. Poon, R.T., Ng, I.O., Fan, S.T.,等. Clinicopathologic features of long-term survivors and disease-free survivors after resection of hepatocellular carcinoma: a study of a prospective cohort. *J. Clin. Oncol.*, 19: 3037-3044, 2001.
- 25 9. Ng, I.O., Ng, M.M., Lai, E.C.,和 Fan, S.T. Pathologic features and patient survival in hepatocellular carcinoma in relation to age. *J. Surg. Oncol.*, 61: 134-137, 1996.

10. Ng, I.O., Lai, E.C., Ng, M.M.,和 Fan, S.T. Tumor encapsulation in hepatocellular carcinoma. A pathologic study of 189 cases. *Cancer*, 70: 45-49, 1992.
11. Fan, S.T. Methods and related drawbacks in the estimation of surgical risks in cirrhotic patients undergoing hepatectomy. *Hepatogastroenterology*, 49: 17-20, 2002.
12. Vauthey, J.N., Lauwers, G.Y., Esnaola, N.F.,等. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 20: 1527-1536, 2002.
13. Villa, E., Colantoni, A., Camma, C.,等. Estrogen receptor classification for hepatocellular carcinoma: comparison with clinical staging systems. *J. Clin. Oncol.*, 21: 441-446, 2003.
14. Chen, X., Cheung, S.T., So, S.,等. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol. Biol. Cell*, 13: 1929-1939, 2002.
15. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K,等. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 14-18.
16. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P.,和 Jaramillo, B.E. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 81: 1-44, 2003.
17. Sugita M, Geraci M, Gao B, Powell RL, Hirsch FR, Johnson G, Lapadat R, Gabrielson E, Bremnes R, Bunn PA, Franklin WA. Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62 (14): 3971-3979.
18. Sobin, L.H.,和 Whitekind, C. TNM classification of malignant tumours. 第五版, 纽约, John Wiley, 1997.
19. Poon, R.T.,和 Fan, S.T. Evaluation of the new AJCC/UICC staging system for hepatocellular carcinoma after hepatic resection in Chinese patients. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 12: 35-50, 2003.

20. Cheung, S.T., Chen, X., Guan, X.Y.,等. Identify metastasis-associated genes in hepatocellular carcinoma through clonality delineation for multi-nodular tumor. *Cancer Res.*, 62: 4711-4721, 2002.
21. Sherlock, G., Hernandez-Boussard, T., Kasarskis, A.,等. The Stanford
5 Microarray Database. *Nucleic Acids Res.*, 29: 152-155, 2001.
22. Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real- time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, 25: 169-193, 2000.
23. Youden, W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3: 32-35, 1950.
- 10 24. Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J.,等 Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.*, 29: 365-371, 2001.
25. Kawai, H.F., Kaneko, S., Honda, M., Shirota, Y.,和 Kobayashi, K. Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common
15 expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. *Hepatology*, 33: 676-691, 2001.
26. Lee, J.,和 Thorgeirsson, S.S. Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer. *Hepatology*, 35: 1134-1143, 2002.
- 20 27. Neo SY, Leow CK, Vega VB, Long PM, Islam AF, Lai PB, Liu ET,等. Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach. *Hepatology* 2004; 39: 944-953.
28. Okabe, H., Satoh, S., Kato, T.,等. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray:
25 identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.*, 61: 2129-2137, 2001.
29. Shirota, Y., Kaneko, S., Honda, M., Kawai, H.F.,和 Kobayashi, K. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology*, 33: 832-840, 2001.

30. Xu, X.R., Huang, J., Xu, Z.G.,等. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 15089-15094, 2001.
31. Iizuka, N., Oka, M., Yamada-Okabe, H.,等. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet*, 361: 923-929, 2003.
32. Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H.,等. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 115: 4969-4976, 2003.
33. Tiwari-Woodruff, S.K., Buznikov, A.G., Vu, T.Q.,等. OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin superfamily and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J. Cell Biol.*, 153: 295-305, 2001.
34. Nichols, L.S., Ashfaq, R.,和 Iacobuzio-Donahue, C.A. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *Am. J. Clin. Pathol.*, 121: 226-230, 2004.
35. Michl, P., Buchholz, M., Rolke, M.,等. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology*, 121: 678-684, 2001.
36. Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., Furukawa, Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res.* 12: 469-476, 2000.
37. Rangel, L.B., Agarwal, R., D'Souza, T.,等. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin. Cancer Res.*, 9: 2567-2575, 2003.

38. Michl, P., Barth, C., Buchholz, M.,等. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res.*, *63*: 6265-6271, 2003。
39. Al Moustafa, A.E., Alaoui-Jamali, M.A., Batist, G.,等. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA
5 microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene*, *21*: 2634-2640, 2002。
40. Kominsky, S.L., Argani, P., Korz, D.,等. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal
10 carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*, *22*: 2021-2033, 2003。
41. Kramer, F., White, K., Kubbies, M., Swisshelm, K.,和 Weber, B.H. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum. Genet.*, *107*: 249-256, 2000。
42. Furuta, T., Kanematsu, T., Matsumata, T.,等. Clinicopathologic features of hepatocellular carcinoma in young patients. *Cancer* *66*: 2395-2398, 1990。
43. Vauthey, J.N., Klimstra, D., Franceschi, D.,等. Factors affecting long-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Am. J. Surg.*, *169*: 28-34, 1995。
20

实施例 III 的参考文献

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F 和 Ferlay J (1999). Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* **83**, 18-29。
- 25 2. Bruix J, Boix L, Sala M 和 Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma (2004). *Cancer Cell* **5**, 215-219。
3. Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C 和 Wong J (1999). Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: toward zero hospital deaths. *Ann Surg* **229**, 322-330。

4. Fong Y, Sun RL, Jarnagin W 和 Blumgart LH (1999). An analysis of 412 cases of hepatocellular carcinoma at a Western center. *Ann Surg* **229**, 790-799.
5. Neuhaus P, Jonas S 和 Bechstein WO (2000). Hepatoma of the liver--resection or transplantation? *Langenbecks Arch Surg* **385**, 171-178.
6. Poon RT, Fan ST, Lo CM, Ng IO, Liu CL, Lam CM 和 Wong J (2001). Improving survival results after resection of hepatocellular carcinoma : a prospective study of 377 patients over 10 years. *Ann Surg* **234**, 63-70.
10. Nagasue N, Kohno H, Chang YC, Taniura H, Yamanoi A, Uchida M, Kimoto T, Takemoto Y, Nakamura T 和 Yukaya H (1993). Liver resection for hepatocellular carcinoma. Results of 229 consecutive patients during 11 years. *Ann Surg* **217**, 375-384.
15. Lise M, Bacchetti S, Da Pian P, Nitti D, Pilati PL 和 Pigato P (1998). Prognostic factors affecting long term outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma: results in a series of 100 Italian patients. *Cancer* **82**, 1028- 1036.
9. Vauthey JN, Klimstra D, Franceschi D, Tao Y, Fortner J, Blumgart L 和 Brennan M (1995). Factors affecting long-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* **169**, 28-35.
20. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO,等(2002). Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* **13**, 1929-1939.
11. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K 和 McShane LM (2003). Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* **95**, 14-18.
25. Sobin LH 和 Whitekind C (1997). TNM classification of malignant tumours.第五版,John Wiley,纽约,美国。

13. Poon RT 和 Fan ST (2003). Evaluation of the new AJCC/UICC staging system for hepatocellular carcinoma after hepatic resection in Chinese patients. *Surg Oncol Clin N Am* **12**, 35-50.
14. Cheung ST, Chen X, Guan XY, Wong SY, Tai LS, Ng IO, So S 和 Fan ST (2002). Identify metastasis-associated genes in hepatocellular carcinoma through clonality delineation for multi-nodular tumor. *Cancer Res* **62**, 4711-4721.
15. Sherlock G, Hernandez-Boussard T, Kasarskis A, Binkley G, Matese JC, Dwight SS, Kaloper M, Weng S, Jin H, Ball CA 等(2001). The Stanford Microarray Database. *Nucleic Acids Res* **29**, 152-155.
16. Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-193.
17. Pepe MS, Janes H, Longton G, Leisenring W 和 Newcomb P (2004). Limitations of the odds ratio in gauging the performance of a diagnostic, prognostic, or screening marker. *Am J Epidemiol* **159**, 882-890.
18. Youden WJ (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**, 32-35.
19. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC 等(2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME) -toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**, 365-37.
20. Kawai HF, Kaneko S, Honda M, Shirota Y 和 Kobayashi K (2001). Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. *Hepatology* **33**, 676- 691.
21. Lee J 和 Thorgeirsson SS (2002). Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer. *Hepatology* **35**, 1134-1143.

22. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y 和 Nakamura Y (2001). Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* **61**, 2129-2137.
- 5
23. Shiota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF 和 Kobayashi K (2001). Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* **33**, 832-840.
24. Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J,等(2001). Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 15089-15094.
- 10
25. Neo SY, Leow CK, Vega VB, Long PM, Islam AF, Lai PB, Liu ET 和 Ren EC (2004). Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach. *Hepatology* **39**, 944-953.
- 15
26. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, Takao T, Tamesa T, Tangoku A, Tabuchi H,等(2003). Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* **361**, 923-929.
- 20
27. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS;和 US National Human Genome Research (2003). A vision for the future of genomics research. *Nature* **422**, 835-847.
- 25
28. Mattick JS (2003). The human genome and the future of medicine. *Med J Aust* **179**, 212-216.
29. Ayoubi P, Jin X, Leite S, Liu X, Martajaja J, Abduraham A, Wan Q, Yan W, Misawa E, Prade RA (2002). PipeOnline 2.0 : automated EST processing and functional data sorting. *Nucleic Acids Res* **30**, 4761-4769.
- 30

	<110> Cheung, Siu Tim	
5	<120> 用于肝癌的预后和治疗的组合物和方法	
	<130> 69399-A/RDK	
	<140> 10/917, 195	
10	<141> 2004-08-12	
	<160> 6	
	<170> PatentIn version 3.2	
15	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
20	<220>	
	<223> PCR引物	
	<400> 1	
25	ctgtggaagg cgtgcgtta	19
	<210> 2	
	<211> 20	
30	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR引物	
35	<400> 2	
	caaagaagcc caggctgaca	20
40	<210> 3	
	<211> 15	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
5	<400> 3 cctccatget ggcgc	15
10	<210> 4 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
15	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 4 accacacac agcgctcac	19
20	<210> 5 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
25	<220>	
	<223> PCR 引物	
30	<400> 5 caagccgtaa aacttctgca tg	22
35	<210> 6 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
40	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 6 agtcactctc agggccatc gccca	25

图 1

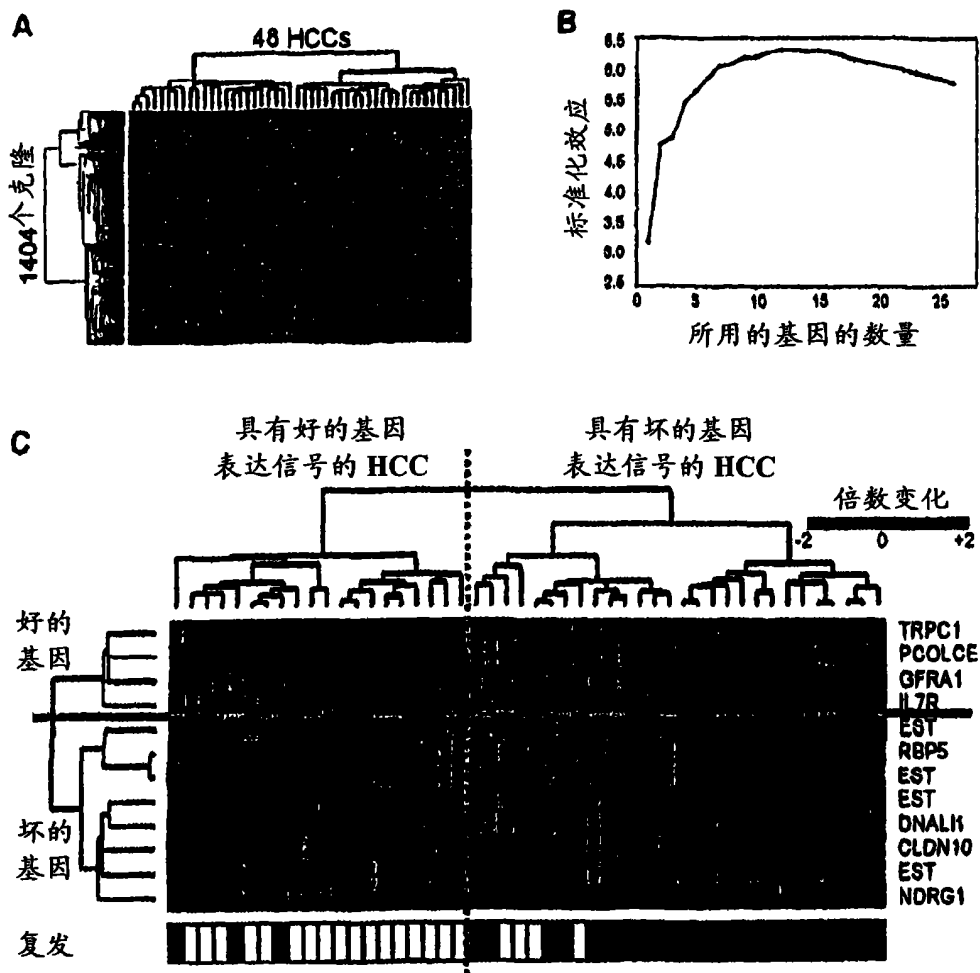


图 2

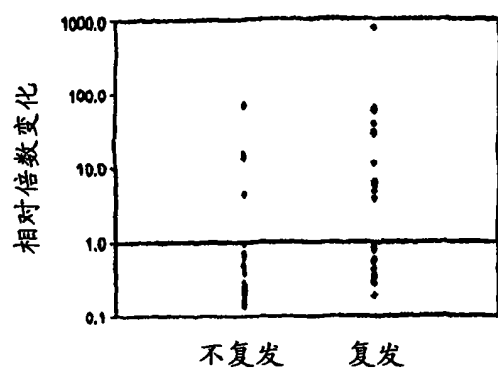


图 4

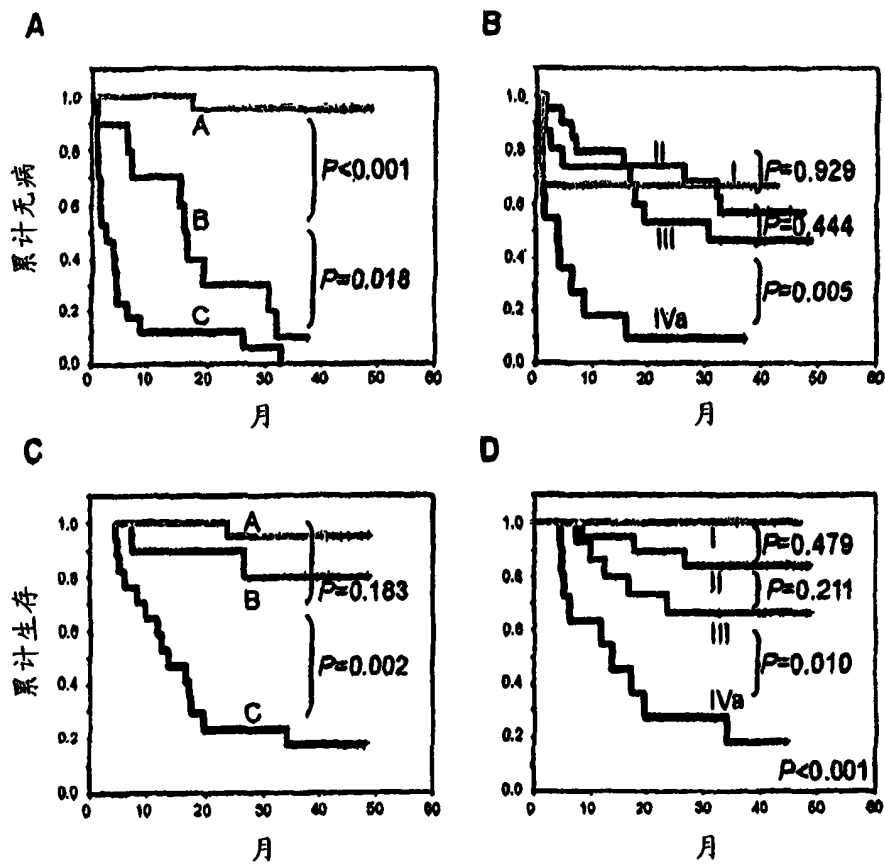
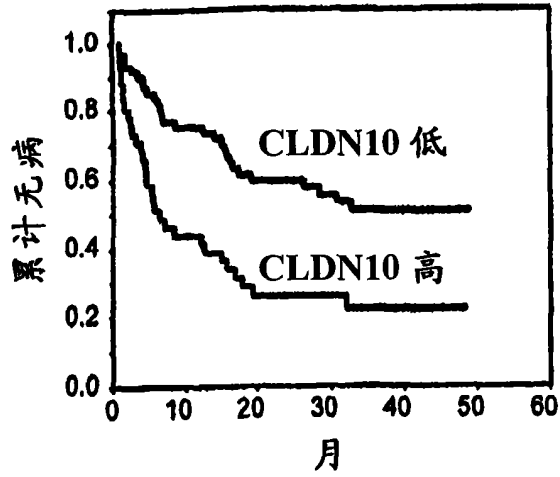
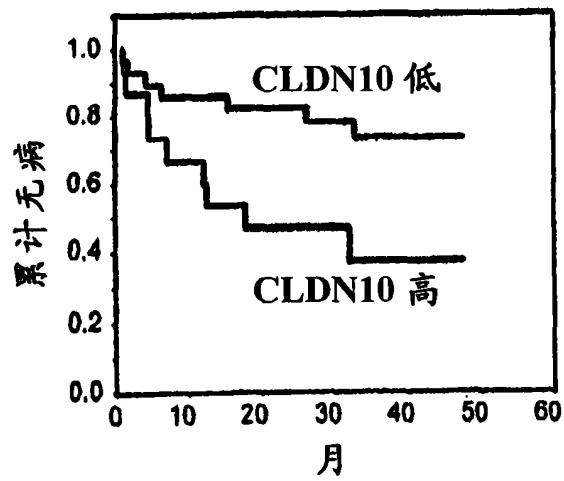


图 5

A 所有患者



B 早期患者



C 晚期患者

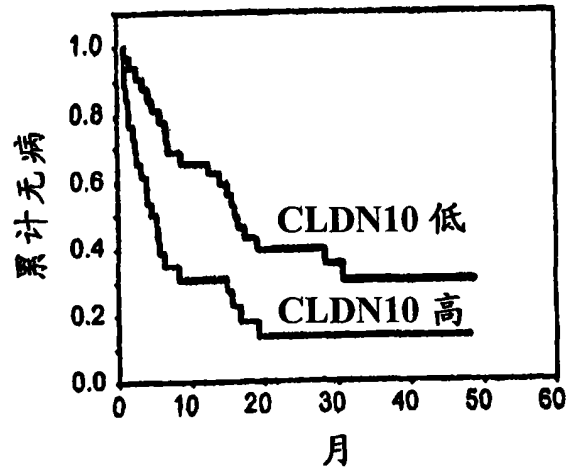


图 6

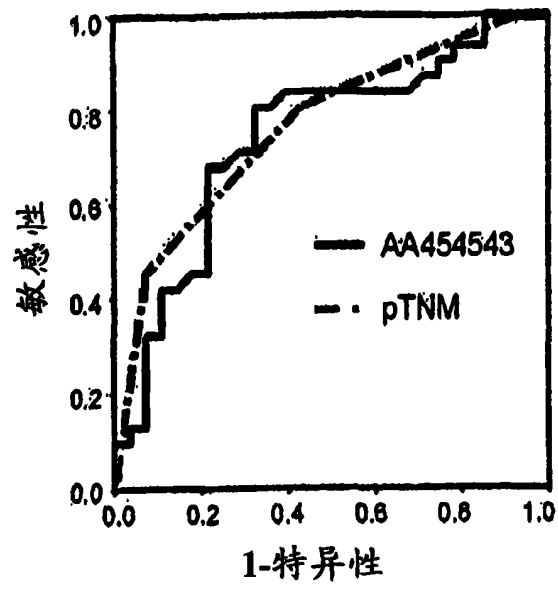
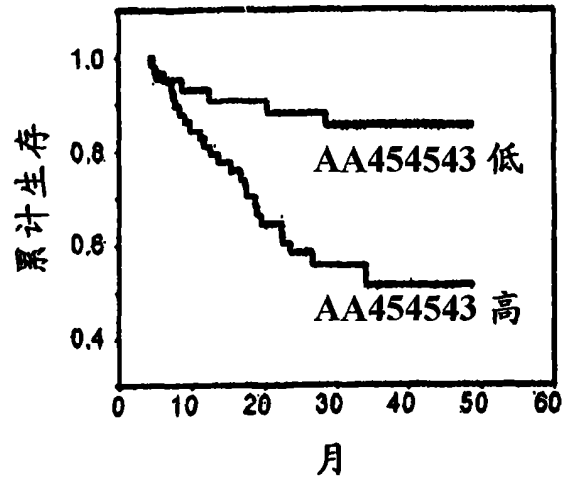
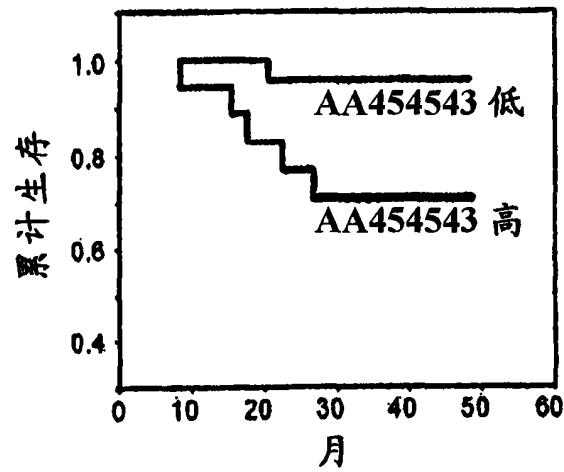


图 7

A 所有患者



B 早期患者



C 晚期患者

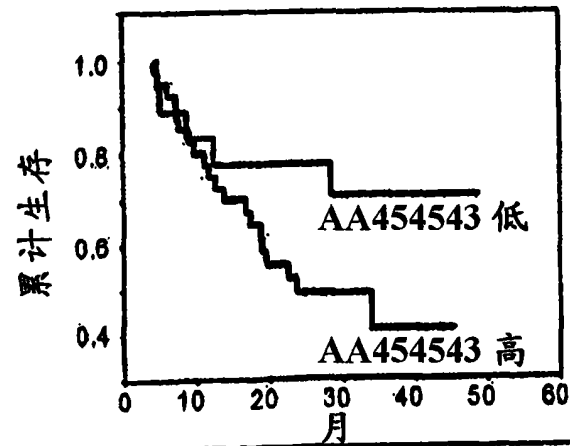


图 8

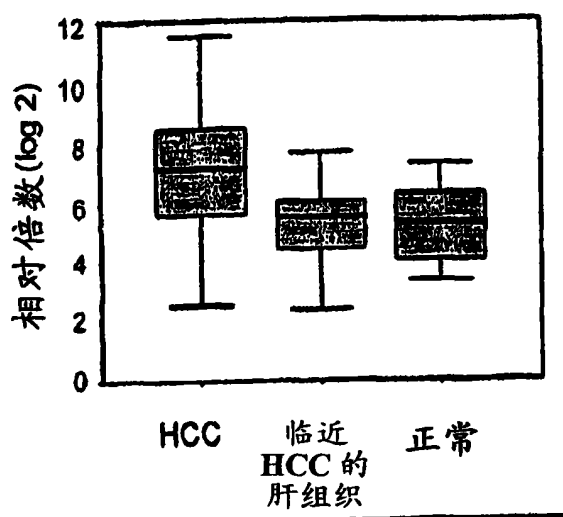


图 9

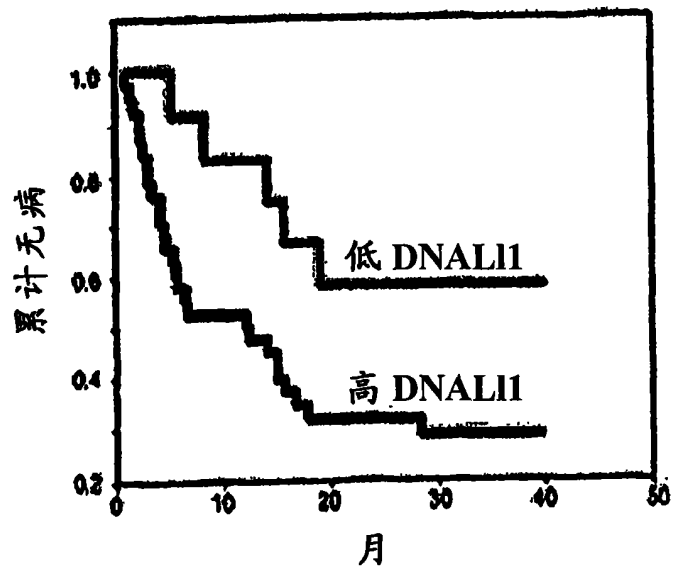


图 10

