

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580013799.7

[51] Int. Cl.

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*C07K 14/00 (2006.01)*

*G01N 33/574 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2007 年 4 月 18 日

[11] 公开号 CN 1950521A

[22] 申请日 2005.4.20

[21] 申请号 200580013799.7

[30] 优先权

[32] 2004.4.29 [33] US [31] 10/836,390

[86] 国际申请 PCT/CN2005/000539 2005.4.20

[87] 国际公布 WO2005/106019 英 2005.11.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.30

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 张兆恬 范上达

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 刘健 梁谋

权利要求书 4 页 说明书 25 页 附图 4 页

[54] 发明名称

作为诊断、预后和治疗肝细胞癌(HCC)的目标的颗粒体蛋白-内皮素前体(GEP)超表达

[57] 摘要

本发明进一步提供了测定试剂是否导致细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体(GEP)蛋白活性降低的方法。本发明还提供了降低细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体(GEP)蛋白表达的方法。本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌(HCC)折磨的方法。本发明进一步提供了治疗受肝细胞癌(HCC)折磨的个体的方法,包括将治疗有效量的特异性干扰个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体(GEP)蛋白表达的试剂给药于个体。

1. 测定试剂是否导致细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白表达降低的方法, 包括以下步骤:

(a) 在当试剂不存在时容许 GEP 蛋白表达的条件下, 将细胞接触试剂;

(b) 合适的时间段后, 测定细胞中 GEP 蛋白的表达量; 和

(c) 将步骤 (b) 中测定的表达量与试剂不存在下产生的表达量相比较, 借此试剂存在下降低的表达量表明试剂导致 GEP 蛋白表达的降低。

2. 权利要求 1 的方法, 其中细胞存在于细胞培养物中。

3. 权利要求 1 的方法, 其中细胞是肿瘤细胞。

4. 权利要求 1 的方法, 其中通过测定细胞中 GEP 蛋白编码 mRNA 的量来进行表达量的测定。

5. 权利要求 1 的方法, 其中通过测定细胞中的 GEP 蛋白量来进行表达量的测定。

6. 权利要求 5 的方法, 其中使用 GEP 蛋白特异性抗体来进行细胞中 GEP 蛋白量的测定。

7. 测定试剂是否导致细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白活性降低的方法, 包括以下步骤:

(a) 在当试剂不存在时容许 GEP 蛋白活性的条件下, 将细胞接触试剂;

(b) 合适的时间段后, 测定细胞中 GEP 蛋白的活性量; 和

(c) 将步骤 (b) 中测定的活性量与试剂不存在下产生的活性量相比较, 借此试剂存在下降低的活性量表明试剂导致 GEP 蛋白活性的降低。

8. 权利要求 7 的方法, 其中细胞存在于细胞培养物中。

9. 权利要求 7 的方法, 其中细胞是肿瘤细胞。

10. 降低细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白表达的方法, 包括将特异性干扰细胞中 GEP 蛋白表达的试剂引入细胞中。

11. 权利要求 10 的方法, 其中细胞存在于细胞培养物中。

12. 权利要求 10 的方法, 其中细胞是肿瘤细胞。

13. 权利要求 10 的方法, 其中试剂是核酸。

14. 权利要求 13 的方法，其中核酸是小的干扰 RNA、核酶、DNA 酶或反义分子。

15. 权利要求 14 的方法，其中反义分子包括 SEQ ID NO: 5 中所示的核酸序列。

16. 测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括以下步骤：

(a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；

(b) 测定个体正常肝细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；和

(c) 将步骤 (a) 中测定的表达水平和步骤 (b) 中测定的表达水平相比较，其中步骤 (a) 中较高的表达水平表明个体受到 HCC 的折磨。

17. 权利要求 16 的方法，其中通过免疫组织化学或蛋白质印迹分析来测定 GEP 蛋白的表达水平。

18. 测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括以下步骤：

(a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；和

(b) 将步骤 (a) 中测定的表达水平与健康者正常肝细胞中的 GEP 蛋白表达水平相比较，其中步骤 (a) 中较高的表达水平表明个体受到 HCC 的折磨。

19. 权利要求 18 的方法，其中通过免疫组织化学或蛋白质印迹分析来测定 GEP 蛋白的表达水平。

20. 测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括以下步骤：

(a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量；

(b) 测定个体正常肝细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量；和

(c) 将步骤 (a) 中测定的 mRNA 量和步骤 (b) 中测定的 mRNA 量相比较，其中步骤 (a) 中较大的 mRNA 量表明个体受到 HCC 的

折磨。

21. 权利要求 20 的方法，其中使用正向引物、反向引物和探针通过定量实时聚合酶链式反应来测定 mRNA 的量。

22. 权利要求 21 的方法，其中正向引物包括 SEQ ID NO: 2 中所示的核酸序列。

23. 权利要求 21 的方法，其中反向引物包括 SEQ ID NO: 3 中所示的核酸序列。

24. 权利要求 21 的方法，其中探针包括 SEQ ID NO: 4 中所示的核酸序列。

25. 测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括以下步骤：

(a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量；和

(b) 将步骤 (a) 中测定的 mRNA 量和健康者正常肝细胞中发现的 GEP 编码 mRNA 的量相比较，其中步骤 (a) 中较大的 mRNA 量表明个体受到 HCC 的折磨。

26. 权利要求 25 的方法，其中使用正向引物、反向引物和探针通过定量实时聚合酶链式反应来测定 mRNA 的量。

27. 权利要求 26 的方法，其中正向引物包括 SEQ ID NO: 2 中所示的核酸序列。

28. 权利要求 26 的方法，其中反向引物包括 SEQ ID NO: 3 中所示的核酸序列。

29. 权利要求 26 的方法，其中探针包括 SEQ ID NO: 4 中所示的核酸序列。

30. 治疗受肝细胞癌 (HCC) 折磨的个体的方法，包括将治疗有效量的特异性干扰个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白表达的试剂给药于个体。

31. 权利要求 30 的方法，其中试剂是核酸。

32. 权利要求 31 的方法，其中核酸是小的干扰 RNA、核酶、DNA 酶或反义分子。

33. 权利要求 32 的方法，其中反义分子包括 SEQ ID NO: 5 中所示的核酸序列。

**34. 权利要求 30 的方法，其中个体是人。**

## 作为诊断、预后和治疗肝细胞癌 (HCC) 的 目标的颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 超表达

贯穿该申请，参考了特定的出版物。这些出版物的全部引用，以及另外的参考文献，就在权利要求之前可以找到。为了更全面地描述在此所述和所要求的本发明申请时为止的技术状况，在此将这些出版物的公开内容引入该申请中作为参考。

### 发明背景

肝细胞癌 (HCC) 是世界上第五大最常见的癌症，每年约有五十万新病例和几乎同样多的死亡<sup>1-3</sup>。更好地理解发病因素和疾病的分子基础是疾病预防和控制的关键。流行病学研究已经表明乙肝和丙肝病毒感染，乙醇诱导的肝损伤和食用黄曲霉毒素与 HCC 密切相关。然而，关于肝癌产生和进展的分子基础知道得很少。认为 p53 肿瘤抑制基因作为“细胞看门人”起着主要作用，而  $\beta$ -连锁蛋白致癌基因反常最近已经证明了肿瘤转变潜能<sup>2-4</sup>。然而，肝致癌作用中的主要生长因子基本上是未知的。

最近已经鉴定了 HCC 和邻接 HCC 肝组织之间不同表达的基因<sup>5</sup>。颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 是 HCC 中高度表达基因之一，具有 17q21.32 的基因座。GEP 蛋白是能够刺激细胞增殖的分泌蛋白<sup>6</sup>，且其降低的表达与致癌潜能的抑制相关<sup>7,8</sup>。在 30-60% 的肝癌中检测到 17q 的染色体增大<sup>9,10</sup>，强烈表明该染色体臂上生长因子/原-致癌基因的存在。没有研究报道过 HCC 中的 GEP 表达模式及其生物作用。该研究中，测定了 HCC，邻接 HCC 的肝组织，和正常肝组织中的 RNA 水平和蛋白质中的 GEP 定位。

### 发明概述

本发明提供了测定试剂是否导致细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白表达降低的方法，包括步骤 (a) 在试剂不存时容许 GEP 蛋白表达的条件下，将细胞接触试剂；(b) 合适的时间段后，测定细胞中 GEP 蛋白的表达量；和 (c) 将步骤 (b) 中测定的表达量和试

剂不存在下产生的表达量相比较，借此试剂存在下降低的表达量表明试剂导致 GEP 蛋白表达的降低。

本发明进一步提供了测定试剂是否导致细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 活性降低的方法，包括步骤 (a) 在试剂不存时容许 GEP 蛋白活性的条件下，将细胞接触试剂；(b) 测定细胞中 GEP 蛋白的活性量；和 (c) 将步骤 (b) 中测定的活性量和试剂不存在下产生的活性量相比较，借此试剂存在下降低的活性量表明试剂导致 GEP 蛋白活性的降低。

本发明还提供了降低细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 表达的方法，包括将特异性干扰细胞中 GEP 蛋白表达的试剂引入细胞中。

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括步骤 (a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；(b) 测定个体正常肝细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；和 (c) 将步骤 (a) 中测定的表达水平和步骤 (b) 中测定的表达水平相比较，其中步骤 (a) 中较高的表达水平表明个体受到 HCC 的折磨。

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括步骤 (a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；和 (b) 将步骤 (a) 中测定的表达水平与健康者正常肝细胞中的 GEP 蛋白表达水平相比较，其中步骤 (a) 中较高的表达水平表明个体受到 HCC 的折磨。

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括以下步骤：(a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量；(b) 测定个体正常肝细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量；和 (c) 将步骤 (a) 中测定的 mRNA 量和步骤 (b) 中测定的 mRNA 量相比较，其中步骤 (a) 中较高的量表明个体受到 HCC 的折磨。

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 的折磨，包括步骤 (a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量；和 (b) 将步骤 (a) 中测定的 mRNA 量与健康者正常肝细胞中发现的 GEP 编码 mRNA 的量，其中步骤 (a) 中较大的 mRNA 量表明个体受到 HCC 的折磨。

本发明进一步提供了治疗受肝细胞癌 (HCC) 折磨的个体的方法, 包括将治疗有效量的特异性干扰个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白表达的试剂给药于个体。

#### 附图简述

##### 图 1A-D

人肝脏样品中的 GEP 表达。(A) 通过实时 RT-PCR 的 RNA 定量。框顶部和底部的水平线各自表示第 25 个和第 75 个百分位。框内的线表示中值。顶部和底部水平条表示内四分位数范围 1.5 倍内的数据。(B-D) GEP 的免疫组织化学染色。具有蛋白质信号值 3 的 HCC (B), 具有蛋白质分值 0 的邻接于 HCC 的肝脏 (C), 和具有蛋白质分值 0 的正常肝组织 (D)。

##### 图 2A-D

HCC 中 GEP 和 p53 蛋白质的定位。(A) GEP 蛋白染色。由箭头表示 ( $\times 40$  放大倍数) 具有强烈 GEP 表达的肿瘤部位。(B) p53 蛋白染色。由箭头来表示具有 p53 核表达的肿瘤部位 ( $\times 40$ )。(C) 框内部分扩大放大倍数的 GEP 蛋白染色 ( $\times 200$ )。(D) 框内部分扩大放大倍数的 p53 蛋白染色 ( $\times 200$ )。将蛋白信号染成棕色, 用苏木精将剖面反染色。

##### 图 3A-C

降低的 GEP 水平降低了细胞增殖速率和细胞活性。在含有血清或血清限制的条件下检测 Hep3B 和 Huh7 细胞的转染子:  $\Delta$ 载体对照 (V),  $\pi$ 反义 (AS),  $\blacksquare$ 全长 (FL),  $\square$ 正义对照 (S), 和  $\blacklozenge$ 亲本细胞系。(A) GEP 蛋白水平。(B) 细胞生长曲线。(C) 通过 MTT 测试的细胞活性。

##### 图 4A-C

降低的 GEP 水平降低了肿瘤的入侵能力, 集落形成能力和致瘤潜力。(A) 通过 Matrigel 入侵室来测定细胞的入侵能力。(B) 软琼脂上的集落形成能力。(C) 在无胸腺裸鼠中的致瘤潜力。



## 发明详述

### 定义

如本申请中所用的，除了在此另外明确地规定，以下每个术语具有以下所示的意思。

如在此所用的，可以使用本领域那些技术人员已知的各种方法和传送系统中的任一种来实现或进行“给药”试剂。例如可以静脉内，通过脑脊髓液，口服，通过鼻，通过植入，经粘膜，经皮，肌内和皮下来进行给药。

如在此所用的，“试剂”意思是任何化学物质，包括而无限制，蛋白质，抗体，核酸，小分子及其任意的混合物。

如在此所用的，“抗体”包括，例如，天然产生的和非天然产生的抗体。特别地，该术语包括多克隆和单克隆抗体，及其抗原结合片段。此外，该术语包括嵌合抗体（例如人化抗体）和完全合成的抗体，及其抗原结合片段。

如在此所用的，“反义分子”意思是任何核酸，将该核酸引入细胞时（直接或通过另一直接引入细胞的核酸的表达），特异性地与细胞中编码表达受到抑制的蛋白质（即目标蛋白）的 mRNA 的至少一部分杂交，因此抑制目标蛋白的表达。

如在此所用的，“DNA 酶（DNAzyme）”意思是其是 DNA 或其催化部分是 DNA 的催化核酸，其特异性地识别并分裂特殊的目标核酸序列，其可以是 DNA 或 RNA。每个 DNA 酶具有催化部分（也称为“催化结构域”）和由两个结合结构域构成的目标序列结合部分，催化结构域的每个侧面上一个。

如在此所用的，“药物学上可接受的载体”意思是本领域那些技术人员已知的各种载体中的任一种。

以下的传送系统，其使用各种常用的药物载体，只是预想的用于给药本发明组合物的许多实施方案的表示。

可注射的药物传送系统包括溶液，悬浮液，凝胶，微球体和聚合的可注射物，并可以包括赋形剂，如改变溶解度的试剂（例如乙醇、丙二醇和蔗糖）和聚合物（例如聚辛基丙酮和 PLGA's）。可植入系统包括棒和盘，并可以含有赋形剂，如 PLGA 和聚辛基丙酮。

口服传送系统包括片剂和胶囊。这些可以含有赋形剂，如粘合剂（例如，羟丙基甲基纤维素，聚丙烯吡咯烷酮，其他纤维素物质和淀粉），稀释剂（例如，乳糖和其他糖，淀粉，磷酸氢钙和纤维素物质），崩解剂（例如，淀粉聚合物和纤维素物质）和润滑剂（例如硬脂酸盐和滑石）。

经粘膜的传送系统包括药膏，片剂，栓剂，阴道栓，凝胶和霜剂，并可以含有赋形剂，如增溶剂和促进剂（例如，聚丙二醇，胆汁盐和氨基酸），和其他载体（例如，聚乙二醇，脂肪酸酯和衍生物，以及亲水性聚合物，如羟丙基甲基纤维素和透明质酸）。

皮肤传送系统包括，例如，水和非水凝胶，霜剂，多重乳浊液，微乳浊液，脂质体，膏剂，水和非水溶液，洗剂，气溶胶，烃基和粉末，并可以含有赋形剂，如稳定剂，渗透增强剂（例如，脂肪酸，脂肪酸酯，脂肪醇和氨基酸），和亲水性聚合物（例如聚卡波糖和聚乙烯吡咯烷酮）。一实施方案中，药物学上可接受的载体是脂质体或透皮增强剂。

用于重建传送系统的溶液，悬浮液和粉末包括载体，如悬浮剂（例如，树脂，zanthan，纤维素和糖），湿润剂（例如，山梨糖醇），稳定剂（例如，乙醇，水，PEG 和聚丙二醇），表面活性剂（例如，十二烷基磺酸钠，司盘，吐温和十六烷基吡啶），防腐剂和抗氧化剂（例如，对羟基苯甲酸酯，维生素 E 和 C，以及抗坏血酸），抗结块剂，涂层剂和螯合剂（例如，EDTA）。

如在此所用的，“核酸”意思是任何核酸分子，包括但不限于，DNA，RNA 及其杂交体。形成核酸分子的核酸碱基可以是碱基 A，C，G，T 和 U，及其衍生物。这些碱基的衍生物是本领域公知的并在 PCR Systems, Reagents and Consumables (PCR 系统，反应物和消耗品) (Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, USA) 中有举例说明。

如在此所用的，“核酶 (ribozyme)”意思是其是 RNA 或其催化部分是 RNA 的催化核酸分子，其特异性地识别和分裂特殊的目标核酸序列，其可以是 DNA 或 RNA。每个核酶具有催化部分（也称为“催化结构域”）和由两个结合结构域构成的目标序列结合部分，催化结构域的每个侧面上一个。

如在此所用的，“小的干扰 RNA”（也称为 siRNA 或 RNAi）包括但无限制，与目标基因（或其片段）相同或同源的多核苷酸序列，该目标基因（或其片段）直接或间接地连接与目标基因（或其片段）序列互补的多核苷酸序列。siRNA 任意地包括足够长度的多核苷酸连接物序列以允许两个多核苷酸序列折叠并相互杂交。设计连接物序列来分隔 siRNA 的反义和正义链，足以限制位阻的影响并允许 dsRNA 分子的形成，不与 dsRNA 分子杂交部分内的序列杂交。例如，在 U.S. 专利 No.6,544,783 中论述了 siRNA。

如在此所用的，“个体”意思是任何动物，如人，非人灵长类，小鼠，大鼠，豚鼠或兔子。

如在此所用的，“合适的时间段”意思是对于本方法，足以允许试剂效果的时间量。

如在此所用的，“治疗有效量”意思是足以治疗受肝细胞癌（HCC）折磨个体的量。

如在此所用的，“治疗”肝细胞癌（HCC）意思是减缓，停止或逆转疾病的进程。

### 发明的实施方案

本发明提供了测定试剂是否导致细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体（GEP）蛋白表达降低的方法，包括步骤（a）在试剂不存时容许 GEP 蛋白表达的条件下，将细胞接触试剂；（b）合适的时间段后，测定细胞中 GEP 蛋白的表达量；和（c）将步骤（b）中测定的表达量和试剂不存在下产生的表达量相比较，借此试剂存在下降低的表达量表明试剂导致 GEP 蛋白表达的降低。一实施方案中，细胞存在于细胞培养物中。另一实施方案中，细胞是肿瘤细胞。

再一实施方案中，通过测定细胞中 GEP 蛋白编码 mRNA 的量来进行表达量的测定。另一实施方案中，通过测定细胞中的 GEP 蛋白量来测定表达量。使用 GEP 蛋白特异性抗体来进行细胞中 GEP 蛋白量的测定。

本发明进一步提供了测定试剂是否导致细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体（GEP）蛋白活性降低的方法，包括步骤（a）在试剂不存时容许 GEP 蛋白活性的条件下，将细胞接触试剂；（b）测定细胞中 GEP

蛋白的活性量；和 (c) 将步骤 (b) 中测定的活性量与试剂不存在下产生的活性量相比较，借此试剂存在下降低的活性量表明该试剂导致 GEP 蛋白的活性降低。一实施方案中，细胞存在于细胞培养物中。另一实施方案中，细胞是肿瘤细胞。

本发明还提供了降低细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白表达的方法，包括将特异性干预细胞中 GEP 蛋白表达的试剂引入细胞中。一实施方案中，细胞存在于细胞培养物中或是肿瘤细胞。另一实施方案中，试剂是核酸。核酸可以是，但不限于，小的干扰 RNA，核酶，DNA 酶或反义分子。反义分子可以包括如 SEQ ID NO: 5 中所示的核酸序列

GAAGGGGCAG

CAACTGGAAG TCCCTGAGAC GGTAAGATG CAGGAGTGGC CGGCAGAGCA  
GTGGGCATCA ACCTGGCAGG GGCCACCCAG ATGCCTGCTC AGTGTGTGG  
GCCATTTGTC CAGAAGGGGA CGGCAGCAGC TGTAGCTGGC TCCTCCGGGG  
TCCAGGCAGC AGGCCACAGG GCAGAACTGA CCATCTGGGC ACCGCGTTCC  
AGCCACCAGC CCTGCTGTTA AGGCCACCCA GCTCACCAGG GTCCACATGG  
TCTGCCTGCG TCCGACTCCG CGGTCCTTG.

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括步骤 (a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；(b) 测定个体正常肝细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；和 (c) 将步骤 (a) 中测定的表达水平与步骤 (b) 中测定的表达水平相比较，其中步骤 (a) 中较高的表达水平表明个体受到 HCC 的折磨。一实施方案中，通过免疫组织化学来测定 GEP 蛋白的表达水平。另一实施方案中，通过蛋白质印迹分析来测定 GEP 蛋白的表达水平。

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法，包括步骤 (a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白的表达水平；和 (b) 将步骤 (a) 中测定的表达水平与健康者正常肝细胞中 GEP 蛋白的表达水平相比较，其中步骤 (a) 中的较高表达水平表明个体受到 HCC 的折磨。一实施方案中，通过免疫组织化学来测定 GEP 蛋白的表达水平。另一实施方案中，通过蛋白质印迹分析来测定 GEP 蛋白的表达水平。

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法, 包括以下步骤: (a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量; (b) 测定个体正常肝细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量; (c) 将步骤 (a) 中测定的 mRNA 量和步骤 (b) 中测定的 mRNA 量相比较, 其中步骤 (a) 中较高的 mRNA 量表明个体受到 HCC 的折磨。一实施方案中, 使用正向引物, 反向引物和探针通过定量实时聚合酶链式反应来测定 mRNA 的量。正向引物包括, 但不限于, SEQ ID NO: 2 中所示的核酸序列 5'-CAA ATG GCC CAC AAC ACT GA-3'。反向引物包括, 但不限于, SEQ ID NO: 3 中所示的核酸序列 5'-CCC TGA GAC GGT AAA GAT GCA-3'。探针包括, 但不限于, SEQ ID NO: 4 中所示的序列 5'-6FAMCCA CTG CTC TGC CGG CCA CTCMGBNFQ-3'。

本发明还提供了测定个体是否受到肝细胞癌 (HCC) 折磨的方法, 包括步骤 (a) 测定个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 编码 mRNA 的量; (b) 将步骤 (a) 中测定的 mRNA 量与健康者正常肝细胞中发现的 GEP 编码 mRNA 的量相比较, 其中 (a) 中较高的 mRNA 量表明个体受到 HCC 的折磨。一实施方案中, 使用正向引物, 反向引物和探针通过定量实时聚合酶链式反应来测定 mRNA 的量。正向引物包括, 但不限于, SEQ ID NO: 2 中所示的核酸序列 5'-CAA ATG GCC CAC AAC ACT GA-3'。反向引物包括, 但不限于, SEQ ID NO: 3 中所示的核酸序列 5'-CCC TGA GAC GGT AAA GAT GCA-3'。探针包括, 但不限于, SEQ ID NO: 4 中所示的序列 5'-6FAMCCA CTG CTC TGC CGG CCA CTCMGBNFQ-3'。

本发明进一步提供了治疗受肝细胞癌 (HCC) 折磨的个体的方法, 包括将治疗有效量的特异性干预个体肿瘤细胞中颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 蛋白表达的试剂给药于个体。一实施方案中, 试剂是核酸。核酸可以是, 但不限于, 小的干预 RNA, 核酶, DNA 酶或反义分子。反义分子可以包括 SEQ ID NO: 5 所示的核酸序列  
 GAAGGGGCAG CAACTGGAAG TCCCTGAGAC GGTAAGATG CAGGAGTGGC  
 CGGCAGAGCA GTGGGCATCA ACCTGGCAGG GGCCACCCAG ATGCCTGCTC  
 AGTGTGTGG GCCATTTGTC CAGAAGGGGA CGGCAGCAGC TGTAGCTGGC  
 TCCTCCGGGG TCCAGGCAGC AGGCCACAGG GCAGAACTGA CCATCTGGGC

ACCGCGTTCC AGCCACCAGC CCTGCTGTTA AGGCCACCCA GCTCACCAGG  
GTCCACATGG TCTGCCTGCG TCCGACTCCG CGGTCCTTG .

优选的实施方案中，个体是人。

以下的实验详述部分具体说明了本发明。提出该部分是为了帮助理解本发明但不是用来，也不应当解释为以任何方式来限制此后权利要求中所示的本发明。

### 实验详述

与 HCC 个体正常肝组织周围以及健康个体的正常肝组织相比较，颗粒体蛋白-内皮素前体 (GEP) 在肝细胞癌 (HCC) 中大量而普遍地表达。两个不同的 HCC 细胞系 (Hep3B 和 Huh7) 中的功能研究证明了 GEP 下调导致降低的增殖，肿瘤入侵性，和集落形成能力。使用 Balb/c 无胸腺小鼠的体内实验证明 GEP 下调导致降低的增殖，和降低的致瘤性。

110 对 HCC 和邻近正常肝组织的检测表明 HCC 中的 RNA 水平显著高于邻近正常肝中的 (图 1A)。使用完全正常的肝组织用于标准化，还表明了致瘤组织中 GEP RNA 的高水平是 GEP 超表达的结果 (图 1A)。

HCC 组织中的 GEP RNA 的高水平与通过定量实时 PCR 和显象密度计扫描的半定量蛋白质印迹所显示的 GEP 蛋白表达水平正相关 (图 1)。大多数 HCC 组织显示出强至中等的 GEP 蛋白表达水平，而大部分邻近的肝组织和完全正常的肝组织显示出弱至零的 GEP 蛋白表达水平。

**表 1. 人肝脏样品中的 GEP 蛋白表达**

| GEP 蛋白表达分值 | HCC 个体       |                     | 正常        |
|------------|--------------|---------------------|-----------|
|            | HCC<br>n=110 | 邻近 HCC 的肝脏<br>n=110 | n=22      |
| 0 (负信号)    | 25 (22.7%)   | 72 (65.5%)          | 22 (100%) |
| 1 (弱信号)    | 17 (15.5%)   | 37 (33.6%)          | 0         |
| 2 (中等信号)   | 22 (20.0%)   | 1 (0.9%)            | 0         |
| 3 (强信号)    | 46 (41.8%)   | 0                   | 0         |

缩写: GEP, 颗粒体蛋白-内皮素前体; HCC, 肝细胞癌

根据临床病理学显著性来进一步分析 HCC 中的 GEP 超表达。通过免疫组织化学来评价 GEP 蛋白的表达水平, 并分成“弱表达 (分值  $\leq$  中值)”和“强表达 (分值  $>$  中值)”的类别。本发明者证明强 GEP 蛋白表达与大的肿瘤 ( $>5\text{cm}$ ), 静脉渗透以及头一年的肝内复发显著相关 (表 2)。相反, GEP 表达水平与血清  $\alpha$ -胎蛋白 (AEP) 水平, 肿瘤被膜, 肿瘤结节的数量, 微卫星结节, 性别, 个体年龄, HBV 相关性 (通过血清 HBsAg 来测定), 或 pTNM 阶段没有显著相关性。

**表 2. 关于 GEP 表达的 HCC 临床病理学特征**

| 临床病理学参数                     | GEP 表达 |    | P      |
|-----------------------------|--------|----|--------|
|                             | 0-2    | 3  |        |
| <b>肿瘤大小</b>                 |        |    |        |
| 小 ( $\leq 5\text{cm}$ )     | 30     | 13 | 0.048* |
| 大 ( $> 5\text{cm}$ )        | 34     | 33 |        |
| <b>静脉渗透</b>                 |        |    |        |
| 不存在                         | 37     | 13 | 0.002* |
| 存在                          | 27     | 33 |        |
| <b>头一年的肝内复发</b>             |        |    |        |
| 是                           | 14     | 18 | 0.049* |
| 否                           | 50     | 28 |        |
| <b>血清 AFP 水平</b>            |        |    |        |
| 低 ( $\leq 20\text{ng/ml}$ ) | 26     | 12 | 0.114  |
| 高 ( $> 20\text{ng/ml}$ )    | 38     | 34 |        |
| <b>肿瘤被膜</b>                 |        |    |        |
| 不存在                         | 42     | 38 | 0.050  |
| 存在                          | 20     | 7  |        |
| <b>肿瘤结节</b>                 |        |    |        |
| 单个                          | 49     | 35 | 0.954  |
| 多个                          | 15     | 11 |        |
| <b>微卫星结节</b>                |        |    |        |
| 不存在                         | 31     | 20 | 0.502  |
| 存在                          | 31     | 26 |        |
| <b>性别</b>                   |        |    |        |
| 男性                          | 55     | 34 | 0.113  |
| 女性                          | 9      | 12 |        |
| <b>年龄</b>                   |        |    |        |
| 青年 ( $\leq$ 中值, 52)         | 34     | 27 | 0.300  |
| 老年 ( $>$ 中值, 52)            | 30     | 19 |        |
| <b>HBV 相关性</b>              |        |    |        |
| HBsAg 阳性                    | 6      | 4  | 1.000  |
| HBsAg 阴性                    | 58     | 42 |        |
| <b>pTNM 阶段</b>              |        |    |        |
| 早期 (I-II)                   | 28     | 14 | 0.105  |
| 晚期 (III-IV)                 | 33     | 32 |        |

缩写: HCC, 肝细胞癌; GEP, 颗粒体蛋白-内皮素前体; AFP,  $\alpha$ -胎蛋白; HBsAg: 乙肝表面抗原。



### GEP 互补的反义寡核苷酸的效果

使用亲本 Hep3B 和 Huh7 HCC 细胞系作为体外模型，通过定量 RT-PCR 来显示 GEP 表达的高水平。用不同构建体来转染细胞系用于测定 GEP 表达抑制。证明了通过转染的反义片段降低了 GEP 表达和蛋白质水平（图 3）。此外，还检测了含血清和血清限制条件下的细胞增殖率。反义转染子显示出细胞增殖的显著降低。

表 3. HCC 转染子中 GEP 水平\*和细胞增殖#的相关性

|    | Hep3B |             | Huh7 |             | Hep3B |             | Huh7 |             |
|----|-------|-------------|------|-------------|-------|-------------|------|-------------|
|    | 10%血清 |             | 0%血清 |             | 10%血清 |             | 2%血清 |             |
|    | GEP   | 细胞倍增时间 (hr) | GEP  | 细胞倍增时间 (hr) | GEP   | 细胞倍增时间 (hr) | GEP  | 细胞倍增时间 (hr) |
| 反义 | 0.3   | 40.3        | 0.2  | 62.6        | 0.4   | 42.5        | 0.3  | 49.5        |
| 全长 | 2.5   | 22.8        | 1.2  | 39.7        | N.D.  | N.D.        | N.D. | N.D.        |
| 正义 | 0.9   | 25.3        | 1.1  | 34.3        | 1.1   | 29.1        | 1.0  | 31.3        |
| 对照 |       |             |      |             |       |             |      |             |
| 载体 | 0.9   | 23.2        | 1.1  | 40.4        | 1.1   | 32.8        | 1.0  | 31.0        |
| 对照 |       |             |      |             |       |             |      |             |

GEP, 颗粒体蛋白-内皮素前体; HCC, 肝细胞癌

\*涉及亲本细胞相对倍数差异的转染子 GEP 水平

#在第 3 至第 5 天中测定的细胞倍增时间, 因为该阶段是细胞增殖的对数期。

将通过测量线粒体活性的 MTT 测试用于测定细胞活性。反义转染子证明了在含血清和血清限制条件下细胞活性的显著降低, 而全长转染子证明了两种条件下与各自亲本细胞系相似的细胞活性。

在两种 HCC 细胞系中使用 Matrigel 细胞入侵室来研究细胞入侵能力。进行 48 小时的孵育时间段, 使 50,000 个细胞迁移并从无血清培养基侵入由 BD Matrigel 基底膜基质 (BD Biosciences) 隔开的含血

清培养基中。在 Hep3B 中，反义转染子表明与空载体对照相比较，细胞迁移降低 5.2 倍。相似地，反义 Huh7 转染子表明与空载体对照相比较（图 4A），细胞迁移降低 2.2 倍。这些发现清楚地证明了 GEP 表达的抑制将导致细胞迁移降低，并随后导致 HCC 细胞入侵性的降低。

在非贴壁依赖性条件下测定转染子的集落形成能力，其中使 50,000 个转染的细胞在 4 周内克隆。使用显微镜，计数至少三个重复两次进行的独立实验中所形成集落中的细胞数。与空载体对照相比较，Hep3B 和 Huh7 反义转染子集落的总细胞量各自显著降低 2.2 和 1.3 倍（图 4B）。该发现清楚地证明了 GEP 对于肿瘤集落形成的功能效果。

在 4 周龄的 Balb/c 无胸腺小鼠中测定转染子的致癌潜力。进行动物背部躯干部分 5 百万个细胞的皮下接种。每周进行肿瘤大小和体重的两项测量来观察肿瘤的发展。Hep3B 反义转染子在所检测 5 只小鼠中的 3 只中产生了肿瘤，而空载体转染子在全部 5 只小鼠中产生了较大的肿瘤。所有实验动物在第 60 天终止，外科手术取出肿瘤用于净重测定。与载体对照组相比较，反义组的肿瘤重显著降低 7.7 倍。

这些研究证明 GEP 正向调节了细胞增殖速率，细胞活性，细胞入侵，集落形成，以及致癌潜力。功能数据进一步证实了强 GEP 表达通常与大的 HCC 大小和静脉渗透的存在相关的临床研究。因此证明了 GEP 在致肝癌中起主要作用，引起不同的肿瘤阶段，从增殖至随后的入侵和转移。

### 个体和样品收集

在手术过程中获得肝肿瘤，邻近肿瘤的非肿瘤肝组织，非癌个体的肝硬化肝脏和正常肝脏的组织样品。表 1 中列出了 pTNM 阶段的分布和其他临床病理学参数。在移植手术中收集正常的肝样本。器官捐献者没有基础的肝病且对于乙肝血清学是阴性的。将每个组织样本， $0.5-1\text{cm}^3$ ，分成 3 等份。将一部分福尔马林固定和石蜡包埋，用于组织学或免疫组织化学研究。将两个部分在液氮中急冻并存储在  $-70^\circ\text{C}$  直至使用。

### 从肿瘤样品中提取 RNA

根据制造商的实验方案使用 TRIZOL 试剂 (Invitrogen, USA) 来提取总 RNA。简而言之, 将冷冻组织样品放入 10ml TRIZOL 试剂中并立即均质。将均质过的样品通过注射器来剪切基因组 DNA 并使其在室温放置 5 分钟。然后, 将匀浆在 4000rpm 4°C 离心 30 分钟。将澄清的匀浆溶液转移至干净的管子中并加入 2ml 氯仿。充分混合后, 将混合物在 4500rpm 4°C 离心 30 分钟来分离含有 RNA 的水相。将水相转移至干净的管子中并加入 5ml 异丙醇从样品中沉淀出 RNA。通过离心来收集沉淀的 RNA 并用 75% 乙醇洗涤两次。在程序结束时, 将 RNA 溶解于 DEPC-水中用于随后的实验。

### 第一链 cDNA 合成

根据制造商的说明使用高容量 cDNA 获得 (High Capacity cDNA Achive) 试剂盒 (Applied Biosystems, USA) 从 0.5 $\mu$ g 的样品总 RNA 来合成第一链 cDNA。首先用 1 单位的 DNA 酶 I 在室温将总 RNA 样品处理 15 分钟。然后通过加入 EDTA 溶液并在 70°C 加热 10 分钟来停止反应。将 DNA 酶 I 处理过的总 RNA 样品加入含有 1 $\times$ RT 缓冲液, 4mM dNTP 混合物, 1 $\times$ 随机引物, 125 单位 MultiScribe RT 的逆转录反应混合物中。将混合物在 25°C 孵育 10 分钟, 并在 37°C 孵育 2 小时来合成第一链 cDNA。

### 免疫组织化学染色

按照制造商的说明使用 Dako Envision Plus 系统 (Dako, Carpinteria, CA) 并进行改进来进行免疫组织化学。简而言之, 用浸在柠檬酸盐缓冲液中的部分通过微波来进行抗原恢复。内源过氧化物酶阻断后, 使用第一抗体。通过辣根过氧化物酶缀合的第二抗体来检测信号并使用二氨基联苯胺作为色原来产生颜色。然后用苏木精将组织部分反染色。对于 GEP, 使用 2 $\mu$ g/ml 的多克隆抗体 GEP (AGI, Sunnyvale, CA)。对于  $\alpha$ -胎蛋白 (AFP), 使用 1:50 稀释度的多克隆抗体 (Dako)。对于 p53 检测, 使用 1:50 稀释度的单克隆抗体 DO-7 (Dako)。

### 蛋白质印迹分析

在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中分离 30 $\mu$ g 的总蛋白并转移至聚乙烯二氟化物膜上 (Millipore, Bedford, MA)。用 10% 无脂奶粉阻断斑点, 探测对抗多克隆 GEP 抗体, 接着缀合辣根过氧化物酶的抗兔 IgG (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)。根据制造商的说明使用增强的化学荧光蛋白质印迹检测试剂盒 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) 来观察条带, 并暴露于 Hyperfilm™ (Amersham Biosciences)。通过所暴露膜的密度扫描来定量蛋白质的相对水平, 使用凝胶成像系统和 UVP GelWorks ID Intermediate 版本 3.01 (Ultra Violet Products Ltd., Cambridge, UK)。

### 定量实时 PCR

使用 ABI PRISM 7700 测序系统 (Applied Biosystems, USA) 来进行实时定量多重 RT-PCR。GEP 基因表达的测试中使用五微升 1:60 倍稀释的第一联 cDNA。来自 Pre-Developed TaqMan Assay Reagents 的 18s rRNA 的引物和探针用作所有 PCR 中所有样品的内源对照。每 25 $\mu$ l PCR 反应中, 含有 1 $\times$ PCR 缓冲液 II, 5.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dATP, dCTP, dGTP, 0.4mM dUTP, 0.625 单位 AmpliTaq Gold。目标基因的最佳引物和探针浓度和基因表达测试的最佳 18s rRNA 对照稀释度如下:

#### SEQ ID NO:1

```

1   GTAGTCTGAG CGCTACCCGG TTGCTGCTGC CCAAGGACCG CGGAGTCGGA CGCAGGCAGA
61  CCATGTGGAC CCTGGTGAGC TGGGTGGCCT TAACAGCAGG GCTGGTGGCT GGAACGCGGT
121 GCCCAGATGG TCAGTTCTGC CCTGTGGCCT GCTGCCTGGA CCCCAGAGGA GCCAGCTACA
181 GCTGCTGCCG TCCCCTTCTG GACAAATGGC CCACAACACT GAGCAGGCAT CTGGGTGGCC
241 CCTGCCAGGT TGATGCCAC TGCTCTGCCG GCCACTCCTG CATCTTTACC GTCTCAGGGA
301 CTTCCAGTTG CTGCCCTTC CCAGAGGCCG TGGCATGCCG GGATGGCCAT CACTGCTGCC
361 CACGGGGCTT CCACTGCAGT GCAGACGGGC GATCCTGCTT CCAAAGATCA GGTAACAAC

```

421 CCGTGGGTGC CATCCAGTGC CCTGATAGTC AGTTCGAATG CCCGGACTTC TCCACGTGCT  
481 GTGTTATGGT CGATGGCTCC TGGGGGTGCT GCCCATGCC CCAGGCTTCC TGCTGTGAAG  
541 ACAGGGTGCA CTGCTGTCCG CACGGTGCCT TCTGGGACCT GGTTCACACC CGCTGCATCA  
601 CACCCACGGG CACCCACCCC CTGGCAAAGA AGCTCCCTGC CCAGAGGACT AACAGGGCAG  
661 TGGCCTTGTG CAGCTCGGTC ATGTGTCCGG ACGCACGGTC CCGGTGCCCT GATGGTTCTA  
721 CCTGCTGTGA GCTGCCCAGT GGGAAAGTATG GCTGCTGCCC AATGCCCAAC GCCACCTGCT  
781 GCTCOGATCA CCTGCACTGC TGCCCCAAG ACACTGTGTG TGACCTGATC CAGAGTAAGT  
841 GCCTCTCAA GGAGAACGCT ACCACGGACC TCCTACTAA GCTGCCTGCG CACACAGTGG  
901 GGGATGTGAA ATGTGACATG GAGGTGAGCT GCCCAGATGG CTATACCTGC TGCCGTCTAC  
961 AGTCGGGGGC CTGGGGCTGC TGCCCTTTTA CCCAGGCTGT GTGCTGTGAG GACCACATAC  
1021 ACTGCTGTCC CGCGGGGTTT ACGTGTGACA CGCAGAAGGG TACCTGTGAA CAGGGGCCCC  
1081 ACCAGGTGCC CTGGATGGAG AAGGCCCCAG CTCACCTCAG CCTGCCAGAC CCACAAGCCT  
1141 TGAAGAGAGA TGTCCCCTGT GATAATGTCA GCAGCTGTCC CTCCTCGGAT ACCTGCTGCC  
1201 AACTCACGTC TGGGGAGTGG GGCTGCTGTC CAATCCAGA GGCTGTCTGC TGCTCGGACC  
1281 ACCAGCACTG CTGCCCCCAG GGCTACACGT GTGTAGCTGA GGGGCAGTGT CAGCGAGGAA  
1321 GCGAGATCGT GGCTGGACTG GAGAAGATGC CTGCCCGCCG GCCTTCCTTA TCCCACCCCA  
1381 GAGACATCGG CTGTGACCAG CACACCAGCT GCCCGGTGGG GCAGACCTGC TGCCCGAGCC  
1441 TGGGTGGGAG CTGGGCCTGC TGCCAGTTGC CCCATGCTGT GTGCTGCGAG GATCGCCAGC  
1501 ACTGCTGCCC GGCTGGCTAC ACCTGCAACG TGAAGGCTCG ATCCTGCGAG AAGGAAGTGG  
1561 TCTCTGCCCA GCCTGCCACC TTCCTGGCCC GTAGCCCTCA CGTGGGTGTG AAGGACGTGG  
1621 AGTGTGGGGA AGGACACTTC TGCCATGATA ACCAGACCTG CTGCCGAGAC AACCGACAGG  
1681 GCTGGGCCTG CTGTCCCTAC CGCCAGGGCG TCTGTTGTGC TGATCGGCGC CACTGCTGTC  
1741 CTGCTGGCTT CCGCTGCGCA GCCAGGGGTA CCAAGTGTTC GCGCAGGGAG GCCCCGGCT  
1801 GGGACGCCCC TTTGAGGGAC CCAGCCTTGA GACAGCTGCT GTGAGGGACA GACTGAAGA  
1861 CTCTGCAGCC CTCGGGACCC CACTCGGAGG GTGCCCTCTG CTCAGGCCTC CCTAGCACCT  
1921 CCCCCTAACC AAATTCTCCC TGGACCCCAT TCTGAGCTCC CCATCACCAT GGGAGGTGG  
1981 GCCTCAATCT AAGGCCITCC CTGTCAGAAG GGGGTTGTGG CAAAAGCCAC ATTACAAGCT  
2041 GCCATCCCCT CCCCCTTCA GTGGACCTG TGGCCAGGTG CTTTTCCCTA TCCACAGGGG  
2101 TGTTTGTGTG TGTGCGCGTG TGCCTTCAA TAAAGTTTGT ACACTTTC

**SEQ ID NO: 1 的备注**

**446 的多态性: T 或 C**

**1922 的多态性: T 或 C**

**SEQ ID NO:2****5'-CAA ATG GCC CAC AAC ACT GA-3' (0.2  $\mu$ M)****SEQ ID NO:3****5'-CCC TGA GAC GGT AAA GAT GCA-3' (0.2  $\mu$ M)****SEQ ID NO:4****5'-6FAMCCA CTG CTC TGC CGG CCA CTCMGBNFQ-3' (0.2  $\mu$ M)****18s 对照: 1 $\times$** 

定量实时 PCR 的条件如下: 95°C10 分钟, 95°C15 秒和 60°C1 分钟的 40 个循环。将通过软件[Applied Biosystems]产生的 PCR 反应的扩增曲线用于测定极限循环 ( $C_T$ )。  $C_T$  值表示在其可以首先检测到报告荧光超过基础信号增加的 PCR 循环。

**细胞培养和反义 GEP cDNA 的转染**

将 pCMV6-XL5 (OriGene Technolgis Inc., Rockville, MD) 中克隆的全长 GEP cDNA 用作模板, 用于将不同的 GEP 构建体装配至 pcDNA3.1(+)中 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。使用 Not1 和 XbaI 限制位点来亚克隆全长 GEP。通过聚合酶链式反应来产生 N-端片段 (290bp 大小, 对应于位置-31 至 258bp)<sup>7,8</sup>, 在反义和正义方向亚克隆来产生各自的构建体。使用两种人 HCC 细胞系, Hep3B (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD) 和 Huh7 (Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan)。Hep3B 是 p53-缺陷的, 而 Huh7 含有 p53 蛋白超表达的突变 p53。将这两种细胞系用于测试是否 GEP 功能是 p53 依赖性的。使用含血清的 DMEM(补充 10%FBS, 50U/ml 青霉素 G 和 50 $\mu$ g/ml 链霉素) 在标准培养条件下培养细胞。根据制造商的说明用 LipofectAMINE (Invitrogen) 来转染细胞: 1, 反义片段用于降低 GEP 水平; 2, 全长用于 GEP 的超表达; 3, 正义片段作为反义实验的对照, 4, 空载体作为所有转染实验的对照。通

过 G418 来选择稳定的克隆。在含血清(10%), 血清限制(对于 Hep3B, 0%血清, 对于 Huh7, 2%血清, 因为 0%血清中的细胞增殖是可忽略的) 条件下测定 GEP 蛋白水平和增殖。

#### SEQ ID NO:5

GAAGGGGCAG CAACTGGAAG TCCCTGAGAC GGTAAGATG CAGGAGTGGC CGGCAGAGCA  
GTGGGCATCA ACCTGGCAGG GGCCACCCAG ATGCCTGCTC AGTGTTGTGG GCCATTTGTC  
CAGAAGGGGA CGGCAGCAGC TG TAGCTGGC TCCTCCGGGG TCCAGGCAGC AGGCCACAGG  
GCAGAACTGA CCATCTGGGC ACCGCGTTCC AGCCACCAGC CCTGCTGTTA AGGCCACCCA  
GCTCACCAGG GTCCACATGG TCTGCCTGCG TCCGACTCCG CGGTCCTTG

#### GEP 转染的 HCC 细胞的体外功能分析

通过将五万个细胞接种于 6-孔平板中来测定细胞增殖。连续 5 天每天收集细胞, 并通过锥虫蓝排除来计数存活的细胞。通过 MTT 测试进行的线粒体脱氢酶活性来测量细胞活性<sup>18, 19</sup>, 其中将五千个细胞接种于 96-孔平板中, 并连续 5 天测试。使用 BioCoat Matrigel 入侵室 (BD Biosciences, Bedford, MA) 来测定细胞入侵能力, 其中室膜滤器 (8 $\mu$ m 孔径) 涂覆 BD Matrigel<sup>TM</sup> 基底膜基质 (BD Biosciences)。上部室装载 2ml 无血清培养基中的五万个细胞, 而下部室装满 2ml 含血清的培养基。标准孵育 48 小时后, 用棉签除去膜上表面上的非入侵细胞。将膜下表面的入侵细胞洗入 PBS 中, 固定于 Carnoy's 溶液中, 并用苏木精和曙红染色。在显微镜下计数每个膜滤器 10 个随机选择区域的入侵细胞 ( $\times 100$  放大倍数)。通过软琼脂上的集落形成能力来测定非贴壁依赖性生长<sup>20</sup>。通过混合等量的 1.6% 低熔点琼脂 (USB) 和补充 20% FBS 的 2 $\times$ DMEM 来形成 6-孔平板中的 1.5ml 琼脂基。将五千个细胞悬浮于 1.5ml 软琼脂中 (含有补充 20% FBS 的 2 $\times$ DMEM, 和 0.8% 低熔点琼脂的混合物) 并覆盖于琼脂基上。4 周后, 在显微镜下计数每孔 10 个区域中超过 15 个细胞的集落。体外实验的每个数据点表示至少三个重复两次进行的独立实验的结果。

#### GEP-转染的 HCC 细胞的体内功能分析

将 4 周大的 Balb/c 无胸腺裸鼠用于测试转染子的体内致癌潜力

<sup>21</sup>. 研究实验方案得到香港大学教学和研究活动物使用协会的批准。在每只动物的背部躯干部分接种五百万个细胞。每周两次测量肿瘤大小和体重。在第 60 天终止小鼠，收集肿瘤用于进一步的测定。每个实验组包括 5 只小鼠。



### 参考文献

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. (1990年25种癌症的全世界死亡率评估) *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29.
2. Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. (TP53和致癌作用) *Hum Mutat* 2003; 21: 201-216.
3. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. (人肝细胞癌的分子致病机理) *Nat Genet* 2002; 31: 339-346.
4. Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. (肝细胞癌的遗传学) *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 185-200.
5. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene expression patterns in human liver cancers. (人肝癌中的基因表达模式) *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1929-1939.
6. Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. (与高度致癌细胞系小鼠内皮素前体同源的自分泌生长因子的纯化) *J Biol Chem* 1993; 268: 10863-10869.
7. Zhang H, Serrero G. Inhibition of tumorigenicity of the teratoma PC cell line by transfection with antisense cDNA for PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor). (通过用源自PC-细胞的生长因子(PCDGF, 内皮素/颗粒体蛋白前体)的反义cDNA转染来抑制畸胎瘤PC细胞系的致癌性) *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14202-14207.
8. Lu R, Serrero G. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. (通过反义PCDGF cDNA转染抑制源自PC细胞的生长因子(PCDGF, 内皮素/颗粒体蛋白前体)

的表达来抑制人乳癌细胞系 MDA-MB-468 的致瘤性) *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3993-3998.

9. Chen YJ, Yeh SH, Chen JT, Wu CC, Hsu MT, Tsai SF, Chen PJ, Lin CH. Chromosomal changes and clonality relationship between primary and recurrent hepatocellular carcinoma. (原发性和复发性肝细胞癌之间的染色体改变和克隆性相关性) *Gastroenterology* 2000; 119: 431-440.

10. Kato A, Kubo K, Kurokawa F, Okita K, Oga A, Murakami T. Numerical aberrations of chromosomes 16, 17, and 18 in hepatocellular carcinoma: a FISH and FCM analysis of 20 cases. (肝细胞癌中染色体 16, 17 和 18 的数值异常: 20 个病例的 FISH 和 FCM 分析) *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1-7.

11. Sobin LH, Whitekind C. TNM classification of malignant tumours. (恶性肿瘤的 TNM 分类) 第 6 版, New York: John Wiley, 2002.

12. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. (使用实时逆转录聚合酶链式反应测试来绝对定量 mRNA) *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193.

13. Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. (作为入侵和非入侵人黑素瘤细胞亚群中 mRNA 水平定量比较的内标, 核糖体 18S RNA 胜于 3-磷酸甘油醛脱氢酶和  $\beta$ -肌动蛋白基因) *Anal Biochem* 2001; 295: 17-21.

14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. (使用实时定量 PCR 和  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  方法来分析相对基因表达数据) *Methods* 2001; 25: 402-408.

15. Ng IO, Chung LP, Tsang SW, Lam CL, Lai EC, Fan ST, Ng M. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese. (中国香港肝细胞癌的 p53 基因突变型谱) *Oncogene*

1994; 9: 985-990.

16. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. (人癌症的 p53 突变) Science 1991; 253: 49-53.

17. Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modali RV, Ullrich S, Romano JW, Appella E, Testa JR, Gerwin BI, Harris CC. p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. (人肺癌细胞系中 p53 突变, ras 突变, 和 p53 热休克 70 蛋白复合体) Cancer Res 1991; 51: 4090-4096.

18. Bank U, Reinhold D, Ansorge S. Measurement of cellular activity with the MTT test. (使用 MTT 测试来测量细胞活性) Optimization of the method. (方法的最佳化) Allerg Immunol (Leipz) 1991; 37: 119-123.

19. Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. (用于增殖和抗增殖测试中细胞计数的 MTT 染色测试确认) Biochem Int 1992; 27: 501-510.

20. Sapi E, Flick MB, Rodov S, Gilmore-Hebert M, Kelley M, Rockwell S, Kacinski BM. Independent regulation of invasion and anchorage-independent growth by different autophosphorylation sites of the macrophage colony-stimulating factor 1 receptor. (通过巨噬细胞集落刺激因子 1 受体的不同自体磷酸化位点来独立调节入侵和非贴壁依赖性生长) Cancer Res 1996; 56: 5704-5712.

21. Cheung ST, Huang DP, Hui AB, Lo KW, Ko CW, Tsang YS, Wong N, Whitney BM, Lee JC. Nasopharyngeal carcinoma cell line(C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus. (鼻咽癌细胞系 (C666-1) 一贯地固着于 EB 病毒) Int J Cancer 1999; 83: 121-126.

22. Hirohashi S, Bulm HE, Ishak KG, Deugnier Y, Kojiro M, Laurent Pulg P, Wanless IR, Fischer HP, Theise ND, Sakamoto M, Tsukuma H. Hepatocellular carcinoma. (肝细胞癌) 在: Hamilton SR 和 Aaltonen LA, 编辑, World Health Organization Classification of

- Tumours. (肿瘤的世界卫生组织分类) Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. (消化系统肿瘤的病理学和遗传学) Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2000: 158-172.**
- 23. Harada T, Shigemura T, Kodama S, Higuchi T, Ikeda S, Okazaki M. Hepatic resection is not enough for hepatocellular carcinoma. A follow-up study of 92 patients. (肝切除对于肝细胞癌是不够的. 92 名个体的跟踪研究) J Clin Gastroenterol 1992; 14: 245-250.**
- 24. Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J. Intrahepatic recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma: long-term results of treatment and prognostic factors. (肝细胞癌医疗切除后的肝内复发: 治疗和预测因素的长期结果) Ann Surg 1999; 229: 216-222.**
- 25. Ng 10, Lai EC, Fan ST, Ng MM, So MK. Prognostic significance of pathologic features of hepatocellular carcinoma. A multivariate analysis of 278 patients. (肝细胞癌病理特征的预测意义. 278 名个体的多元分析). Cancer 1995; 76: 2443-2448.**
- 26. Tsai TJ, Chau GY, Lui WY, Tsay SH, King KL, Loong CC, Hsia CY, Wu CW. Clinical significance of microscopic tumor venous invasion in patients with resectable hepatocellular carcinoma. (可切除肝细胞癌个体中显微肿瘤静脉入侵的临床意义) Surgery 2000; 127: 603-608.**
- 27. Poon RT, Fan ST, Ng 10, Lo CM, Liu CL, Wong J. Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. (肝细胞癌切除后早期和晚期肝内复发的不同风险因素和预后) Cancer 2000; 89: 500-507.**
- 28. Poon RT, Ng 10, Fan ST, Lai EC, Lo CM, Liu CL, Wong J. Clinicopathologic features of long-term survivors and disease-free survivors after resection of hepatocellular carcinoma: a study of a prospective cohort. (肝细胞癌切除后长期存活者和无疾病存活者的临床病理学特征: 预期追踪调查的研究) J Clin Oncol 2001; 19: 3037-3044.**
- 29. Jones MB, Michener CM, Blanchette JO, Kuznetsov VA, Raffeld**

**M, Serrero G, Emmert-Buck MR, Petricoin EF, Krizman DB, Liotta LA, Kohn EC. The granulin- epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer. (颗粒体蛋白-内皮素前体/源自 PC 细胞的生长因子是上皮卵巢癌的生长因子) Clin Cancer Res 2003; 9: 44-51.**

**30. Donald CD, Laddu A, Chandham P, Lim SD, Cohen C, Amin M, Gerton GL, Marshall FF, Petros JA. Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. ( progranulin 和 内皮素/颗粒体蛋白前体 acrogranin 的表达与肾上皮细胞中的瘤状态相关 ) 888Anticancer Res 2001; 21: 3739-3742.**

**31. He Z, Bateman A. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. ( progranulin 基因表达调节上皮细胞生长并促进体内肿瘤生长 ) Cancer Res 1999; 59: 3222-3229.**

**32. He Z, Ismail A, Kriazhev L, Sadvakassova G, Bateman A. Progranulin (PC-cell- derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. ( progranulin ( 源自 PC 细胞的生长因子/ acrogranin ) 调节入侵和细胞存活 Cancer Res 2002; 62: 5590-5596.**

**33. He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. ( progranulin 是伤口应答的介质 ) Nat Med 2003; 9: 225-229.**

**34. Daniel R, Daniels E, He Z, Bateman A. Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. ( progranulin ( acrogranin /源自 PC 细胞的生长因子/颗粒体蛋白-内皮素前体 ) 在小鼠发育过程中在胎盘, 表皮, 微脉管和脑中的表达 ) Dev Dyn 2003; 227: 593- 599.**

**35. Bourdon JC, D'Errico A, Paterlini P, Grigioni W, May E, Debuire B. p53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 gene mutation.( 欧洲人肝细胞癌中的 p53 蛋白累积不总是依赖于 p53 基因突变 ) Gastroenterology 1995; 108:**

1176-1182.

36. Serrero G. Autocrine growth factor revisited: PC-cell-derived growth factor (progranulin), a critical player in breast cancer tumorigenesis. (源自 PC 细胞的生长因子 (progranulin), 乳癌致瘤性中的关键参与者) *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 409-413.

37. Lu R, Serrero G. Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor). (源自 PC 细胞的生长因子 (PCDGF/颗粒体蛋白前体) 介导人乳癌 MCF-7 细胞中的雌激素促有丝分裂作用) *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 142-147.

38. Ong CH, Bateman A. Progranulin (Granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, Acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. (增殖和致瘤性中的 progranulin (颗粒体蛋白-内皮素前体, 源自 PC 细胞的生长因子, Acrogranin) *Histol Histopathol* 2003; 18: 1275-1288.

39. Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentini B, He ZH, Baserga R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. (颗粒体蛋白/内皮素前体的生物活性和信号途径) *Cancer Res* 1999; 59: 5331-5340.

40. Fang L, Li G, Liu G, Lee SW, Aaronson SA. p53 induction of heparin-binding EGF-like growth factor counteracts p53 growth suppression through activation of MAPK and P13K/Akt signaling cascades. (结合肝素的 EGF-样生长因子的 p53 诱导通过激活 MAPK 和 P13K/Akt 信号级联来抵抗 p53 生长抑制) *EMBO J* 2001; 20: 1931-1939.

41. Huynh HT, Nguyen TT, Chow PK, Tan PH, Soo KC, Tran E. Over-expression of MEK-MAPK in hepatocellular carcinoma: Its role in tumor progression and apoptosis. (肝细胞癌中的 MEK-MAPK 超表达: 它在肿瘤进程和凋亡中的作用) *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 19

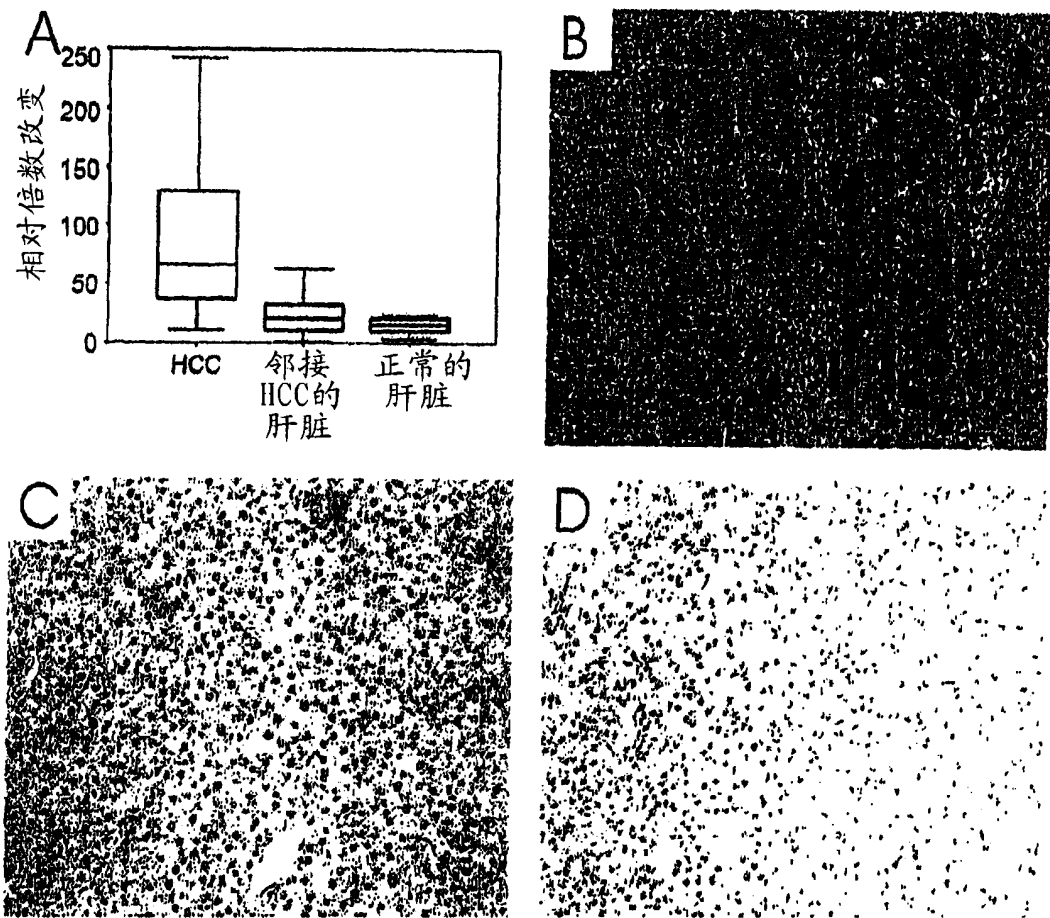


图 1

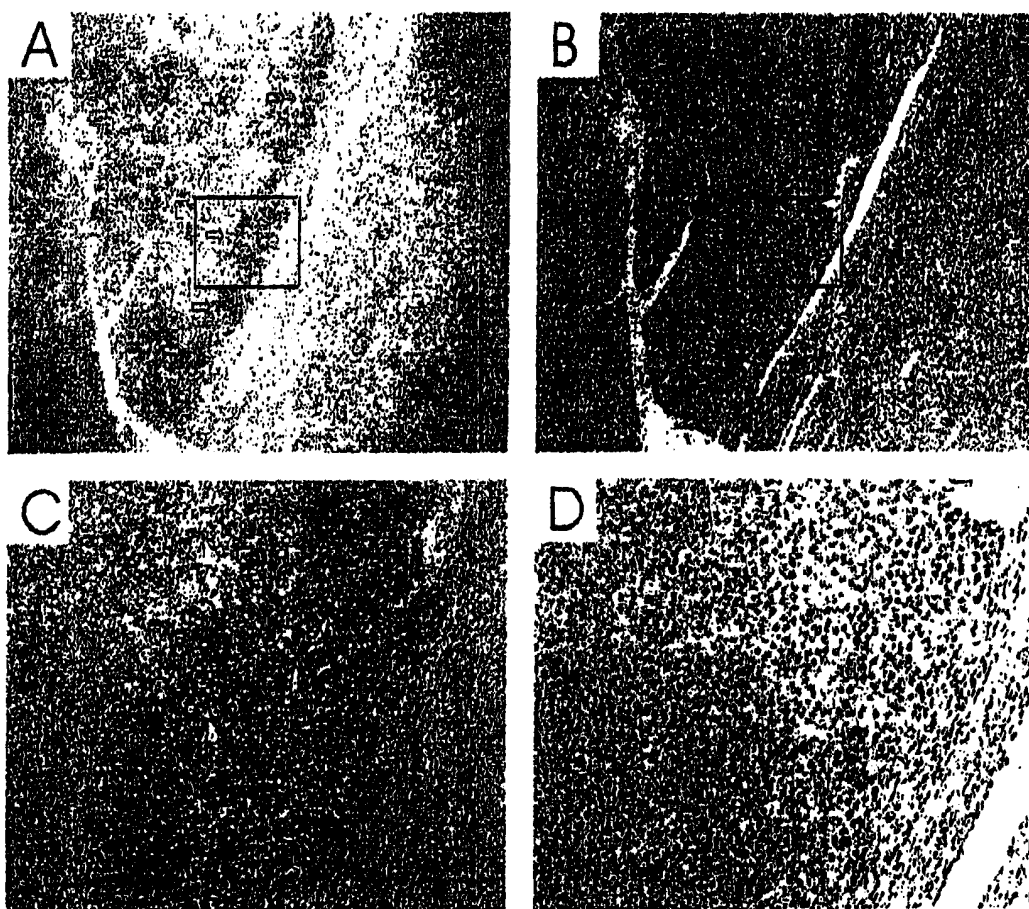


图 2



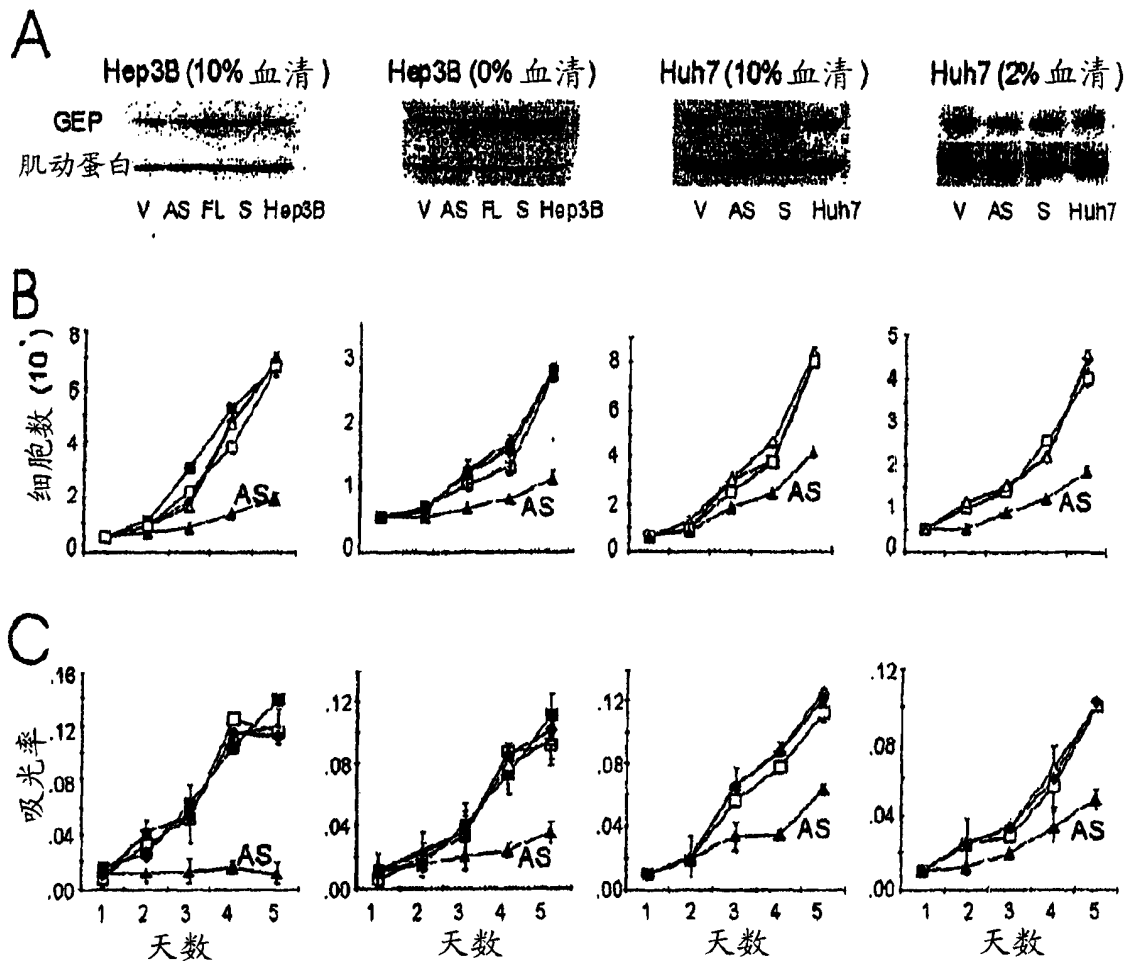


图 3

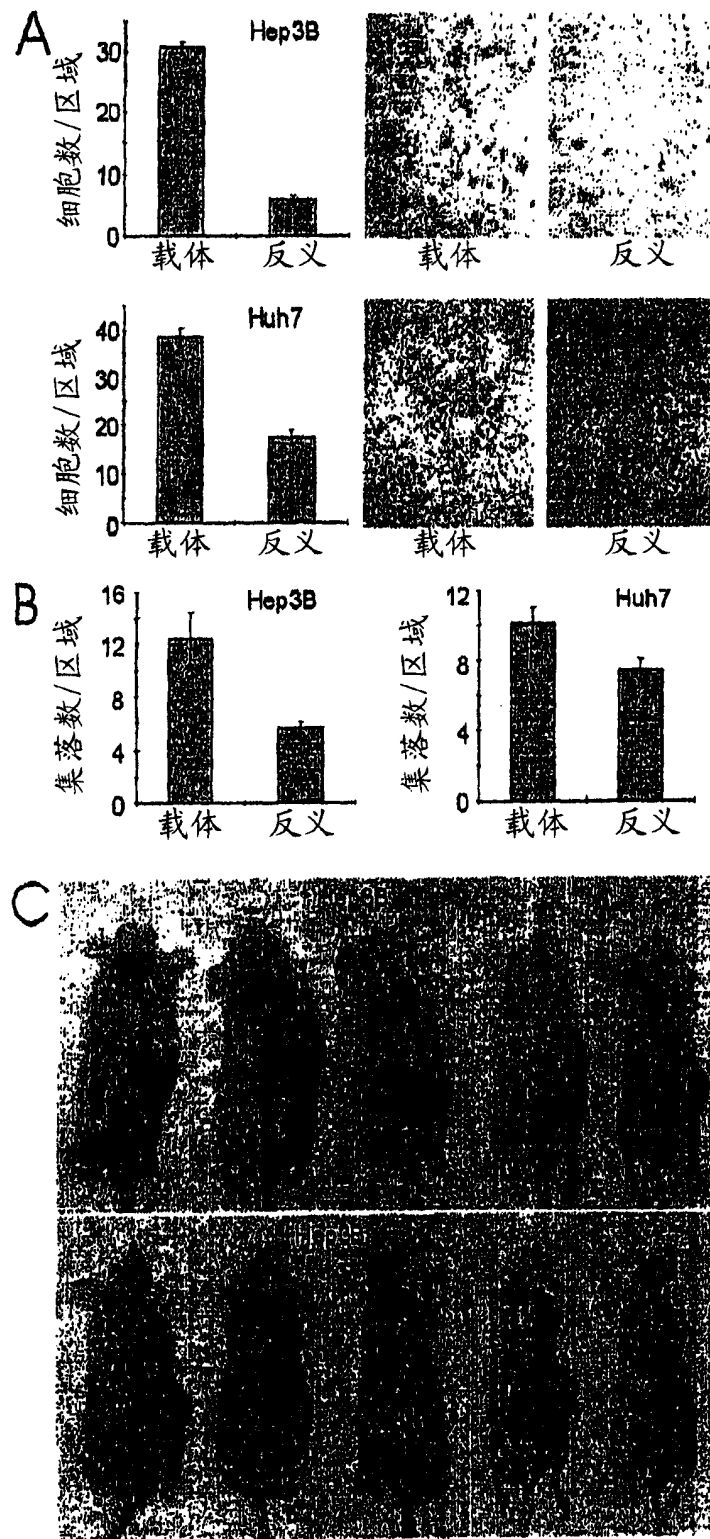


图 4