

[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 200510029154.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月28日

[11] 公开号 CN 1920564A

[22] 申请日 2005.8.26

[21] 申请号 200510029154.4

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路320号

[72] 发明人 曾嵘 李荣霞 周晓 袁新雨

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 缪利明

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

细胞转录因子 ILF-1 的应用

[57] 摘要

本发明通过筛选在肝细胞癌的癌组织和癌旁组织中存在差异表达的蛋白，找到了一种在肝细胞癌的癌组织中高表达的蛋白，免疫印迹实验进一步证实了细胞转录因子 ILF-1 的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达。鉴于细胞转录因子 ILF-1 与肝细胞癌的这种相关性，该蛋白可以用作检测肝细胞癌的蛋白质分子标记。

- 1、一种细胞转录因子 ILF-1 的应用，其特征在于，用作检测肝癌的蛋白质分子标记。
- 2、如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述用作检测肝癌的蛋白质分子标记是检测该蛋白在肝细胞组织中的表达量。
- 3、如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述检测该蛋白在肝细胞组织中的表达量是检测该蛋白在肝细胞组织中是否存在上调表达。
- 4、一种抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体的应用，其特征在于，用于制备检测肝癌的制剂。
- 5、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述抗 FK506 结合蛋白 4 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。
- 6、一种抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体的应用，其特征在于，用于制备检测肝癌的试剂盒。
- 7、如权利要求 6 所述的应用，其特征在于，所述抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。
- 8、一种体外检测肝细胞组织中细胞转录因子 ILF-1 的表达是否异常的方法，其特征在于包括以下步骤：
 - A、用特异性抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体检测待测肝细胞中细胞转录因子 ILF-1 的数量；
 - B、将步骤 A 测得的细胞转录因子 ILF-1 的数量与正常肝组织中的细胞转录因子 ILF-1 的数量进行比较，如测得的蛋白数量高于正常值，则表示被检测肝组织中细胞转录因子 ILF-1 的表达异常。
- 9、如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

细胞转录因子 ILF-1 的应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地说，本发明涉及一种细胞转录因子 ILF-1 用作检测肝癌的蛋白质分子标记的应用。

背景技术

肝癌是一种严重危害人类的疾病。西方发达国家肝癌的发病率较低，国际上对肝癌的基础研究仍较为薄弱，而我国是肝癌高发国家，发病率和死亡率呈现上升趋势，且发病年龄构成年轻化，每年用于肝癌治疗的医疗支出大为增加，肝癌成了严重危害我国人民生命财产安全的头号敌人，并且是影响社会经济发展的一个重要因素，加大力度进行我国肝癌的基础研究具有战略意义，而分离和鉴定新的肝癌相关基因是目前肝癌基础研究中的前沿课题。

到目前为止，已有不下 20 种的基因异常表达被确定与肝癌的发生发展有关，但已确定的肝癌相关基因在肝癌中的异常表达率并不高，肝癌的发病机制至今仍未阐明，肝癌的早期诊断率仍有待提高。此外，传统的肝癌手术加化疗以及近年来配合使用的多种基因治疗方法仍没有明显提高肝癌患者的生存率，因而寻找新的肝癌相关基因尤其是肝癌高表达基因对于探讨肝癌的发病机制具有重要意义。

因此，为治疗和诊断目的研究和开发在肝癌中高表达的基因和/或蛋白具有重要意义。本领域迫切需要新的在肝癌中高表达的基因和/或蛋白。

细胞转录因子 ILF-1 (Cellular transcription factor ILF-1; Interleukin enhancer-binding factor 1; Forkhead box protein K2; ILF) 的 Genbank 登录号为 gi|3183529, NCBI 的登录号为 NP_852059, Swissprot 登录号为 Q01167, IPI 号为: IPI00006029.1。细胞转录因子 ILF-1 从其名字可以看出是一类转录因子。该转录因子与 HIV-1 LTR 以及 IL-2 的启动子序列结合，另外它的一个结合序列的特点就是嘌呤碱基丰富的序列。它同时在淋巴组织和非淋巴组织中表达，它的 mRNA 有两种剪切体形式，它的基因位点位于染色体 17q25，细胞转录因子 ILF-1 还可能在病毒的转录中发挥着作用，在不同的条件下，该蛋白既可以作为转录因子或是转录抑制因子 (Genomics. 1992 Jul; 13(3): 665-71)。

自从发现该转录因子的基因后，就很少有文献报道该蛋白的结构与功能，到目前为止，现有技术中也未见有关于细胞转录因子 ILF-1 与肝细胞癌的相关性的报道。

发明内容

通过筛选在肝细胞癌组织以及肝细胞癌旁组织中差异表达的蛋白质，本申请的发明人找到了一种在肝细胞癌的癌组织和癌旁组织中存在差异表达的蛋白质（在癌组织中上调表达），经质谱鉴定为细胞转录因子 ILF-1。进一步的免疫印迹实验证实，细胞转录因子 ILF-1 的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达（在癌组织中上调表达）。

基于细胞转录因子 ILF-1 与肝细胞癌的这种相关性，以该蛋白作为一个蛋白质分子标记对其表达量进行检测可以用于检测肝癌。

因此，本发明的首要目的即在于提供一种细胞转录因子 ILF-1 用作检测肝癌的蛋白质分子标记的应用。

本发明的另一个目的在于提供一种抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体，包括单克隆抗体和多克隆抗体，用于制备检测肝癌的制剂的应用。

本发明的再一个目的还在于提供一种抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体，包括单克隆抗体和多克隆抗体，用于制备检测肝癌的试剂盒的应用。

本发明的又一个目的在于提供一种体外检测肝细胞组织中细胞转录因子 ILF-1 的表达是否异常的方法，该方法包括以下步骤：

A、用特异性抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体检测待测肝细胞中细胞转录因子 ILF-1 的数量；

B、将步骤 A 测得的细胞转录因子 ILF-1 的数量与正常肝组织中的细胞转录因子 ILF-1 的数量进行比较，如测得的蛋白数量高于正常值，则表示被检测肝组织中细胞转录因子 ILF-1 的表达异常。

本发明的细胞转录因子 ILF-1 与肝癌的相关性的这一发现将为肝细胞癌的诊断和/或治疗提供一条全新的途径。

附图说明

图 1 为细胞转录因子 ILF-1 的免疫印迹分析结果示意图。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册（New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

本申请的发明人用肝正常细胞系 L-02 和肝癌细胞系 BEL-7404 培养后制备蛋白质样品，然后以稳定同位素氨基酸技术（Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture SILAC）筛选差异表达蛋白并进行质谱鉴定，结果发现细胞转录因子 ILF-1 在肝癌细胞系中高表达；随后又用非酶解样品制备法（nonenzymatic sample preparation, NESP）制备的肝细胞癌的癌组织与癌旁组织蛋白质样品进行免疫印迹实验，结果进一步证实了细胞转录因子 ILF-1 的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达。

因此，以细胞转录因子 ILF-1 作为一个蛋白质分子标记对其表达量进行检测可以用于检测肝癌，也即细胞转录因子 ILF-1 可以用作检测肝癌的蛋白质分子标记。

实施例 1、肝细胞癌癌组织及癌旁组织蛋白质样品的制备

本实施例中所使用的尿素、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-1-丙磺酸（CHAPS）、苯甲基磺酰氟（PMSF）、二硫苏糖醇（DTT）均购自 Sigma 公司。

本实施例以非酶解样品制备法（nonenzymatic sample preparation, NESP）制备肝细胞癌的癌组织及癌旁组织蛋白质样品，具体如下：

手术切除的新鲜组织块迅速置于冰上，快速切成几个肉眼可见、无坏死区域的小块。用预冷的不含谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基（5%胎牛血清，0.2mM PMSF，1mM EDTA，苯甲异噁唑青霉素 25mg/mL，庆大霉素 50mg/mL，青霉素 100 U/mL，链霉素 100 mg/mL，两性霉素 B 0.25 mg/mL，制霉菌素 50 U/mL）洗涤组织小块数次后，在液氮中快速研磨成细胞沉淀，细胞沉淀分别溶于适量裂解液（8mol/L 尿素、4% CHAPS、40mmol/L Tris 和 65mmol/L DTT）中，超声细胞破碎仪（Soniprep 150，英国，MSE）冰浴间歇超声 2min，15000 r/min、4℃离心 1h。取上清，以改良的 Bradford 法（见 Bio-Rad 公司产品说明书）进行总蛋白质定量，制备好的肝细胞癌癌组织及相应癌旁组织的蛋白质样品分装，-80℃保存备用。

以上述方法制备 10 对肝细胞癌癌组织及癌旁组织蛋白质样品。10 例肝细胞癌标本均来自东方肝胆外科医院，由 2 个病理科医生明确为肝细胞癌。均为男性，平均年龄 48.9 岁（31~65 岁），血清检测 hepatitis B 病毒感染阳性，10 例（100%）属临床分级（TNM 分级）III 级。其中，甲胎蛋白（AFP）高于 25 μg/L 的 9 例（90.0%）；9 例肿瘤大于 5cm。10 例肝细胞癌标本的病理资料详见表 1。

表 1、10 例肝细胞癌标本的病理资料

No.	性别	年龄	HBV	HCV	等级	AFP	尺寸
3 27	男性	44	+	-	III	>1000	8×8×7
4 15	男性	40	+	-	III	>1000	10×8×6
4 18	男性	31	+	-	III	3.7	8×5×8
4 22	男性	57	+	-	III	>1000	3.5×4
3 17	男性	58	+	-	III	>1000	5.2×6.4
4 2	男性	45	+	-	III	>1000	7.7×5.4
4 5	男性	51	+	-	III	>1000	5.5×4.0
4 8	男性	55	+	-	III	>1000	4×3
4 9	男性	43	+	-	III	>1000	12×12
4 24	男性	65	+	-	III	>1000	11.5×6.5

本实施例所用癌组织及癌旁组织样品均为取自同一肝细胞癌患者的成对样品，所有 10 例肝细胞癌病例有极相似的病例诊断指标：均为男性，平均年龄 48.9 岁（31~65 岁），血清检测 hepatitis B 病毒感染阳性，10 例（100%）属 TNM 分级 III 级。其中，AFP 高于 25 $\mu\text{g/L}$ 的 9 例（90.0%）；9 例肿瘤大于 5cm。这种取样方法有利于降低个体间差别对实验分析工作的影响。

实施例 2、肝正常细胞与肝癌细胞中差异表达蛋白的筛选

本实施例中使用的尿素、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-1-丙磺酸（CHAPS）、L-谷氨酰氨、 C^{12}L -亮氨酸、 C^{13}L -亮氨酸、L-赖氨酸等购自 Sigma 公司。

氯化钙、碳酸氢钠等购自上海生工生物工程有限公司；氯化镁、硫化镁等购自上海振欣试剂厂。

透析小牛血清等购自 GIBCO 公司；碘乙酰胺（IAA）购自 Fluka 公司；胰酶购自 Promage 公司。

三羟甲基氨基甲烷（TRIS）、PDQuest 软件等为 Bio-Rad 产品。

LTQTM Deca XP system 和 ProteomeXTM Workstation 购自 Thermo Finnigan 公司。

肝正常细胞系 L-02 和肝癌细胞系 BEL-7404 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

所使用的含有正常亮氨酸 (C^{12} -Leu) 的培养基及含有碳 13 标记的亮氨酸 (C^{13} -Leu) 的培养基的配方如下:

1、含有正常亮氨酸 (C^{12} -Leu) 的培养基: D9785 细胞培养粉末 14.8g/L, 氯化钙 0.1545 g/L, L-谷氨酰胺 0.365 g/L, C^{12} L-亮氨酸 0.05905 g/L, L-赖氨酸 0.09125 g/L, 氯化镁 0.0612 g/L, 硫化镁 0.04484 g/L, L-甲硫氨酸 0.0172 g/L, 碳酸氢钠 1.2 g/L, 透析小牛血清 100ml/L;

2、含有碳 13 标记的亮氨酸 (C^{13} -Leu) 的培养基: D9785 细胞培养粉末 14.8g/L, 氯化钙 0.1545 g/L, L-谷氨酰胺 0.365 g/L, C^{13} L-亮氨酸 0.05905 g/L, L-赖氨酸 0.09125 g/L, 氯化镁 0.0612 g/L, 硫化镁 0.04484 g/L, L-甲硫氨酸 0.0172 g/L, 碳酸氢钠 1.2 g/L, 透析小牛血清 100ml/L。

首先采用稳定同位素氨基酸技术 (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture SILAC) 对肝正常细胞系 L-02 (C^{12} -Leu) 和肝癌细胞系 BEL-7404 (C^{13} -Leu) 的差异表达蛋白进行筛选, 具体过程如下:

分别用含有正常亮氨酸 (C^{12} -Leu) 的培养基培养正常肝细胞系 L-02, 用含有碳 13 标记的亮氨酸的培养基培养肝癌细胞系 BEL-7404 (C^{13} -Leu), 分别传代六代以上, 然后制备蛋白质样品。

取出前一个晚上新换过液的细胞, 放在冰片上, 吸去培养液, 用预冷 (4°C) 的 PBS 清洗 3~5 次, 按每个 10cm 培养皿加 1000 μl 裂解液 (尿素 8M, CHAPS 4% (v/v), Tris 40 mM), 裂解 5min, 用细胞刮刀刮取, 转入 Ep 管中, 进行温和超声 (4°C), 25000g (15000rpm)、 4°C 离心 1h, 取上清, 样品定量 (Bradford 检测法, Bio-Rad 公司产品说明书) 后, 根据上样量分装后 -80°C 保存。

将两个样品 (肝正常细胞系 L-02 蛋白质样品和肝癌细胞系 BEL-7404 蛋白质样品) 等量混合, 取 10mg 混合样品, 用 bufferA (50mM NaH_2PO_4 , 4M 尿素, 5%乙腈) 溶解样品到终体积 1ml, 用多维色谱 (ABI, VisionTM WORKSTATION) 进行蛋白质混合物分级 (阳离子交换色谱和反向色谱串联), 得到的 10 个组分, 冻干。将冻干的样品用 200 μl DTT 溶液 (6M 尿素, 100mM Tris-HCl PH=8.5, 10mM DTT) 37°C 处理 2.5 小时, 之后用 200 μl IAA 溶液室温避光处理 40 分钟, 然后进行超滤, 最终用 200 μl 100mM 碳酸氢氨溶液溶解样品。在所得到的 200 μl 样品中加入 30 μl 胰酶, 进行溶液内酶解, 37°C , 酶解 16 个小时, 然后用 LTQTM ProteomeXTM Workstation 进行质谱鉴定。Bioworks 软件 (Thermo finnigan 公司) 进行数据库搜索并用 relex 软件 (Scripps Research Institute, USA) 进行数值计算。

运用 SILAC 技术, 我们共鉴定到 1221 种有定量关系的蛋白质。其中两倍以上量变的蛋白质共 778 种, 肝癌细胞系 BEL-7404 高表达的有 62 种蛋白质; 正常肝细胞系 L-02 高表达的有 716 种蛋白质。

用 LTQ-MS/MS 质谱鉴定、数据库搜索及比值计算得 1 个含 Leu 的肽段被总共鉴定到 1 次, 与细胞转录因子 ILF-1 (Cellular transcription factor ILF-1; Interleukin enhancer-binding factor 1; Forkhead box protein K2; ILF) 相符, 氨基酸覆盖率为 2.90%。relex 软件计算结果显示该含 Leu 的肽段在肝癌细胞系 BEL-7404 中高表达, 肝癌细胞系 BEL-7404/正常肝细胞系 L-02 的比值为 2.538 (SD=0), 详细的鉴定情况及肽段打分结果见以下表 2。

表 2、SILAC 中 1 个含 Leu 的肽段的详细鉴定结果

鉴定到的肽段 (1 段共 1 次)	质量数 (MH+)	电荷数	X corr 值	Delta Cn 值
K. PPYSYAQLIVQAITMAPDK. Q	2107.46	2	2.431	0.1211

实施例 3、细胞转录因子 ILF-1 差异表达蛋白的免疫印迹验证

为确认细胞转录因子 ILF-1 的差异表达, 取 10 位肝细胞癌患者的癌组织及相应癌旁组织蛋白质样品 (实施例 1 中 NESP 法制备), 用购买的抗细胞转录因子 ILF-1 抗体进行免疫印迹分析, 具体过程简述如下:

每个样品取 20 μ g 蛋白质样品用 12% SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜 (购自 Amersham Biosciences 公司) 上, 一抗使用山羊抗人细胞转录因子 ILF-1 单抗 (购自 Abcam Ltd 公司, 1:250), 室温孵育 2 小时, 用 TBST (每升含 Tris 2.42 g, 氯化钠 8 g, Tween 20 ml, 用 HCl 调节 pH 到 7.6) 洗涤三次, 每次 5 分钟, 二抗为抗山羊抗体 (购自 Santa Cruz 公司, 1:10000) 室温孵育 1 小时, 再用 TBST 洗涤三次, 每次 10 分钟, 最后用 ECL plus 试剂 (Amersham Biosciences) 反应 5 分钟后, 以 X-光片曝光检测, 检测结果如图 1 所示。

图 1 的免疫印迹结果显示, 10 对癌组织与癌旁组织中除一对 (3 17) 不甚明显外, 其余各对均呈现癌组织中细胞转录因子 ILF-1 的杂交条带的浓度都明显高于相应的癌旁组织的现象; 可见细胞转录因子 ILF-1 在肝细胞癌的癌组织中存在高表达, 该结果与质谱检测结果一致。

综上所述, 细胞转录因子 ILF-1 在肝细胞癌的癌组织及癌旁组织中存在差异表达, 显然与肝细胞癌的发生发展有着密切的相关性, 因此, 以细胞转录因子 ILF-1 作为一个蛋白质分子标记对其表达量进行检测可以用于检测肝细胞癌。相应的, 特异性抗细胞转录因子 ILF-1 的抗体, 包括各种抗细胞转录因子 ILF-1 的单克隆抗体和多克隆抗体, 由于其能够用于检测细胞转录因子 ILF-1 的表达量, 因而可以用于检测肝癌, 或者用于制备检测肝癌肝癌易感性的制剂或试剂盒等, 这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

虽然有关细胞转录因子 ILF-1 动态的生物学功能及肿瘤相关机制还有待进一步研究，但是将其作为检测肝癌的标记物却是肯定的。细胞转录因子 ILF-1 可作为肝细胞癌的潜在标志，而其在胞内的生物学功能提示细胞转录因子 ILF-1 可能作为肝癌的预后分子标记和临床治疗的靶分子。

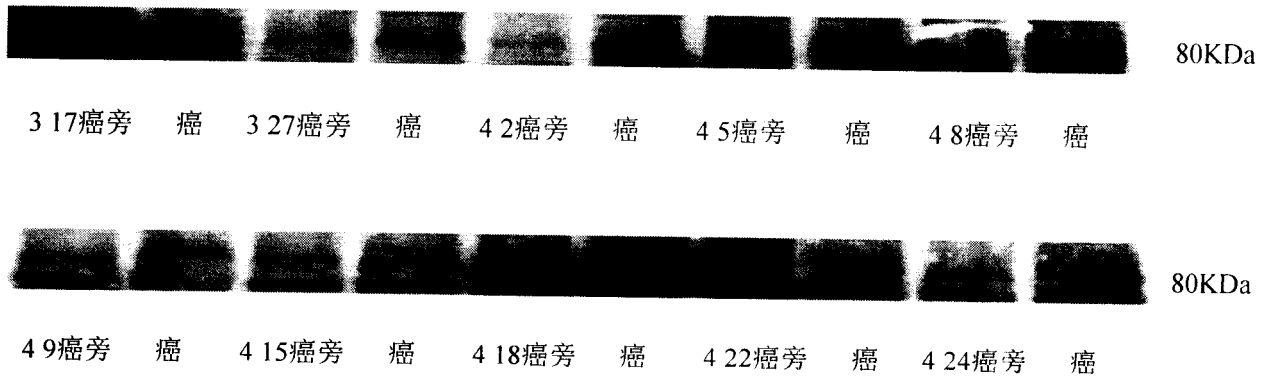


图 1

专利名称(译)	细胞转录因子ILF - 1的应用		
公开(公告)号	CN1920564A	公开(公告)日	2007-02-28
申请号	CN200510029154.4	申请日	2005-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	曾嵘 李荣霞 周晓 袁新雨		
发明人	曾嵘 李荣霞 周晓 袁新雨		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N33/68		
代理人(译)	缪利明		
其他公开文献	CN1920564B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明通过筛选在肝细胞癌的癌组织和癌旁组织中存在差异表达的蛋白，找到了一种在肝细胞癌的癌组织中高表达的蛋白，免疫印迹实验进一步证实了细胞转录因子ILF - 1的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达。鉴于细胞转录因子ILF - 1与肝细胞癌的这种相关性，该蛋白可以用作检测肝细胞癌的蛋白质分子标记。

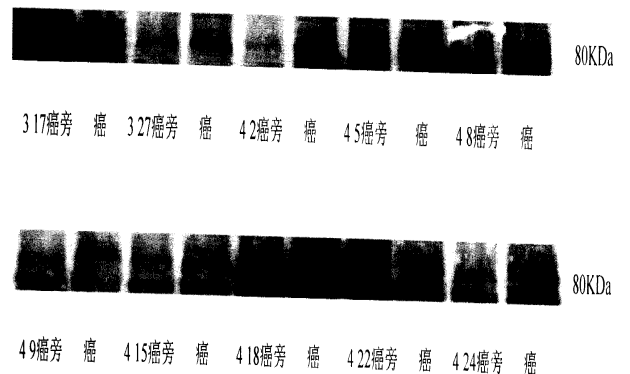


图1