

[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 200510029155.9

[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 1920565A

[22] 申请日 2005.8.26

[21] 申请号 200510029155.9

[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 李辰 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

CD59 糖蛋白的应用

[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 CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白的应用，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 CD59 糖蛋白的抗体的应用，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 CD59 糖蛋白的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

6、一种抗 CD59 糖蛋白的抗体的应用，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 CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白的抗体检测待测肝细胞中 CD59 糖蛋白的数量；

B、将步骤 A 测得的 CD59 糖蛋白的数量与正常肝组织中的 CD59 糖蛋白的数量进行比较，如测得的蛋白数量高于正常值，则表示被检测肝组织中 CD59 糖蛋白的表达异常。

9、如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述所述抗 CD59 糖蛋白的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

CD59 糖蛋白的应用

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 CD59 糖蛋白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。

CD59 糖蛋白 (CD59 glycoprotein; Membrane attack complex inhibition factor; MACIF; MAC-inhibitory protein; MAC-IP; Protectin; MEM43 antigen; Membrane inhibitor of reactive lysis; MIRL; 20 kDa homologous restriction factor; HRF-20; HRF20; 1F5 antigen; P18) 的 Genbank 登录号为 gi|10835165, NCBI 的登录号为 NP_000602, Swissprot 登录号为 P13987, IPI 号为: IPI00011302.1。CD59 的 cDNA 已经克隆，并确定 CD59 的基因定位于人的第 11 号染色体短臂，其核苷酸序列与氨基酸序列相对应，并与小鼠的 CD59 有同源性。

CD59 是近年 (1989) 才发现的一种分子量只有 18~20kDa 的膜性调节蛋白。由 Sugita 等 (1988 年) 首先描述，曾有不同的名称，如同种限制因子 20 (homologous restriction

factor-20), 保护素 (protectin) 及膜反应性溶破抑制物 (membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL) 等。CD59 由 103 个氨基酸残基组成, 含有单一的 N 端糖基化位点, 其 C 端借 GPI (2.3 糖基磷脂酰肌醇) 锚固定于细胞表面。CD59 分布甚广泛, 已证明皮肤、肝、肾、胰、肺、唾腺、神经系统、胎盘以及各种血细胞 (红细胞、淋巴细胞、中性粒细胞及血小板) 和精子上均有表达。C59 的主要生理功能是, 防止 MAC (膜攻击复合物) 对同种或自身细胞的溶解破坏, 即同种限制作用 (homologous species restriction, HSR)。作用机理为: 通过其与 C7、C8 或 C9 的结合而阻止 MAC 组装。当其与 C5b~7 复合物结合后, 可阻止其再与 C8 结合; 当其与 C8 结合后, 则可阻碍结合至 MAC 上的第 1 个 C9 分子的铺展, 从而阻止后继 C9 的结合; 而当其与 MAC 中的 C9 结合后, 又可阻止 C9 进一步分子的聚合。这样, 在有 CD59 存在的情况下, 在同种或自身细胞的表面便不能顺利地完 MAC 的全部组装, 或不能组装成 C5b~(9) n 复合物, 从而限制了对同种或自身细胞的溶解作用。Rooney 等的报道表明, CD59 的这种同种限制作用的机理对保护子宫内的胎儿不被 MAC 的攻击也有作用 (大众医药网: www.windrug.com/pic/30/11/20/067.htm)。此外, CD59 还促进 T 细胞粘附与激活, 维持精子在女性生殖道内的稳定性与活性, 以及参与 PNH 发病机理的作用。

2000 年有文献报导, 在细胞因子的介导下, 肝细胞能够高表达 CD55 和 CD59, 从而保护其免受补体的攻击 (Clinical & Experimental Immunology. Volume 121 Issue 2 Page 234 - August 2000)。

最近的一些文献也报导了癌细胞通过调节, 高表达一些补体调节蛋白, 如: CD46、CD55、CD59 等, 来逃避免疫系统或补体系统的攻击 (Eur. J. Immunol. 2005 Jul; 35(7): 2175-83)。

但是到目前为止, 现有技术中未见有 CD59 糖蛋白与肝细胞癌的直接相关性及其作用机理的相关报导。

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 CD59 糖蛋白。进一步的免疫印迹实验证实, CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白与肝细胞癌的这种相关性, 以该蛋白可以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 CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白的抗体,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 CD59 糖蛋白的抗体,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 CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白的抗体检测待测肝细胞中 CD59 糖蛋白的数量;

B、将步骤 A 测得的 CD59 糖蛋白的数量与正常肝组织中的 CD59 糖蛋白的数量进行比较,如测得的蛋白数量高于正常值,则表示被检测肝组织中 CD59 糖蛋白的表达异常。

本发明的 CD59 糖蛋白与肝细胞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 CD59 糖蛋白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。

本申请的发明人用非酶解样品制备法(nonenzymatic sample preparation, NESP)制备了肝细胞癌的癌组织与癌旁组织蛋白质样品,以同位素亲和标签与凝胶增强的液质联用技术(gel-enhanced liquid chromatography-mass spectrometry coupled with isotope-coded affinity tag, GeLC-MS-ICAT)对其中的蛋白进行鉴定并比较其表达量,结果发现 CD59 糖蛋白在肝细胞癌组织中高表达。免疫印迹实验进一步证实 CD59 糖蛋白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 CD59 糖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,也即 CD59 糖蛋白可以用作检测肝癌的蛋白质分子标记。

实施例 1、肝细胞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 11 对肝细胞癌组织及癌旁组织蛋白质样品。11 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 48.5 岁 (31~65 岁), 血清检测 hepatitis B 病毒感染阳性, 11 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 10 例 (90.9%); 9 例肿瘤大于 5cm。11 例肝细胞癌标本的病理资料详见表 1。

表 1、11 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
4 29	男性	44	+	-	III	>1000	7.2×6
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 11 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 48.5 岁（31~65 岁），血清检测 hepatitis B 病毒感染阳性，11 例（100%）属 TNM 分级 III 级。其中，AFP 高于 25 $\mu\text{g/L}$ 的 10 例（93.75%）；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、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）、十二烷基磺酸钠（SDS）、二硫苏糖醇（DTT）购自 Sigma 公司；碘乙酰胺（IAA）、丙烯酰胺、N, N-甲叉双丙烯酰胺等购自 Fluka 公司；cleavable ICAT 试剂购自 Applied Biosystems Framingham, MA 公司。

过硫酸胺（AP）、TEMED、Tri-n-butylphosphat（TBP）、PDQuest 软件等为 Bio-Rad 产品。

Avidin 亲和柱购自 Applied Biosystems, Framingham, MA 公司。

LCQ™ Deca XP system 和 ProteomeX™ Workstation 购自 Thermo Finnigan 公司。

所使用的上样缓冲液的组成为：1mol/L Tris-HCl (pH6.8) 0.6ml, 50%甘油 5ml, 10% SDS 2ml, 巯基乙醇 0.5ml, 蒸馏水 1.9ml, 少量六溴酚蓝。

首先采用同位素亲和标签与凝胶增强的液质联用技术（gel-enhanced liquid chromatography-mass spectrometry coupled with isotope-coded affinity tag, GeLC-MS-ICAT）对实施例1得到的11对蛋白质样品中的其中一对（病例编号为4 29）肝细胞癌的癌组织及癌旁组织中的差异表达蛋白进行筛选鉴定，方法参照2003年Steven P. Gygi发表在MCP上的文献（Jiaxu Li. et al. *Mol Cell Proteomics*. 2003 Nov; 2(11): 1198-204. Epub. 2003 Sep 23），具体过程如下：

NESP 法制备的一对肝细胞癌癌组织与相应癌旁组织蛋白质样品（病例编号为 4 29），分别取 100 μg ，先用 TBP 还原蛋白质，而后分别用 cleavable ICAT 试剂（ C_{12} 和 C_{13} ）标记（其中 C_{12} 与 C_{13} 分别对应癌组织与相应癌旁组织，标记方法参照产品说明书）。混合后加入适量上样缓冲液，跑 5%浓缩胶（上层胶）和 7.5%~17.5%分离胶（下层胶），电泳条件为 15mA/胶 30min，然后 30mA/胶，保持至溴酚蓝前沿入浓缩胶 8cm 左右。

考染出条带后，将整个上样条带平均切为 8 份，每份再分别切成 1mm³ 的小块，在 100mM NH_4HCO_3 ，30%ACN 中脱色，真空冷冻干燥，100 μl 50mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.3, 蛋白质: 胰蛋白酶 = 1: 5, w/w) 中 4 $^\circ\text{C}$ 放置 2 hr, 加入 50 μl 50mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.3), 37 $^\circ\text{C}$ 酶解过夜。

抽提蛋白(60% ACN、0.1% TFA),真空冷冻干燥。酶解后的每份肽段混合物经 Avidin 亲和柱纯化出已标记肽段后,再用 LCQTM ProteomeXTM Workstation 进行液相串联(LC-MS/MS)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 NESP 法和 GeLC-MS-ICAT 技术,我们共鉴定到 426 种有定量关系的蛋白质。其中两倍以上量变的蛋白质共 201 种,肝细胞癌组织高表达的有 155 种蛋白质;肝细胞癌旁组织高表达的有 46 种蛋白质。

用 LC-MS/MS 质谱鉴定、数据库搜索及比值计算得 1 个含 Cys 的肽段被总共鉴定到 2 次,与 CD59 糖蛋白(CD59 glycoprotein; Membrane attack complex inhibition factor; MACIF; MAC-inhibitory protein; MAC-IP; Protectin; MEM43 antigen; Membrane inhibitor of reactive lysis; MIRL; 20 kDa homologous restriction factor; HRF-20; HRF20; 1F5 antigen; P18)相符,氨基酸覆盖率为 9.38%。relex 软件计算结果显示 CD59 糖蛋白在肝细胞癌组织中高表达,癌组织/癌旁组织的比值为 4.585 (SD=0),详细的鉴定情况及肽段打分结果见表格 2 (表格中 C*代表 C₁₃ 标记的 Cys)。

表 2、GeLC-MS-ICAT 中 1 个含 Cys 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. FEHC*NFNDVTTR. L	1719.85	2	2.9229	0.428
K. FEHC*NFNDVTTR. L	1719.85	2	3.4069	0.4297

实施例 3、CD59 糖蛋白差异表达的免疫印迹验证

为确认 CD59 糖蛋白的差异表达,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(NESP 法制备,表 1 中除 4 29 例以外的其它 10 例),用购买的抗 CD59 糖蛋白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,一抗使用鼠抗人 CD59 糖蛋白单抗(购自 Serotec Ltd 公司,1:1000),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,二抗为抗鼠抗体(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两对(4 2, 4 22)不甚明显外,其余各对均呈现癌组织中 CD59 糖蛋白的杂交条带的浓度明显高于相应的癌旁组织的现象;可见 CD59 糖蛋白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，CD59 糖蛋白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 CD59 糖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细胞癌。相应的，特异性抗 CD59 糖蛋白的抗体，包括各种抗 CD59 糖蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体，由于其能够用于检测 CD59 糖蛋白的表达量，因而可以用于检测肝癌，或者用于制备检测肝癌的制剂或试剂盒等，这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

虽然有关 CD59 糖蛋白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。CD59 糖蛋白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 CD59 糖蛋白可能作为肝癌的预后分子标记和临床治疗的靶分子。

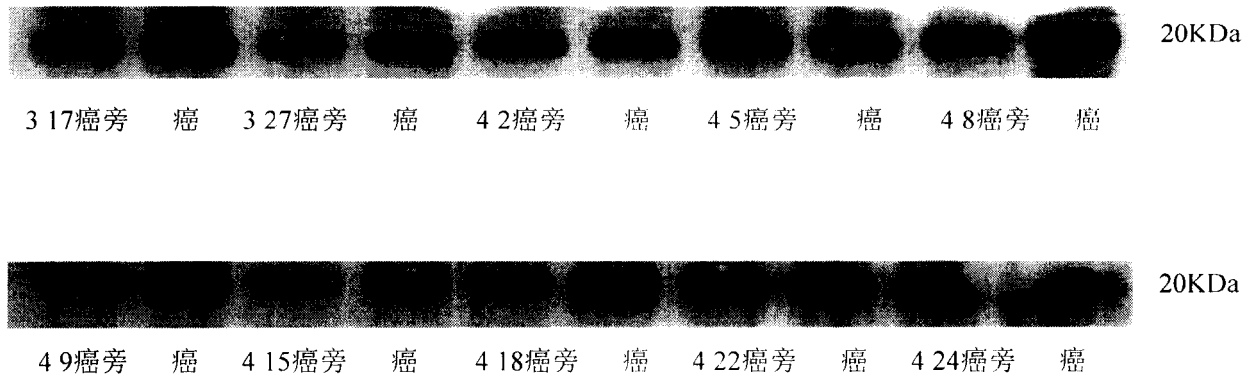


图 1

专利名称(译)	CD59糖蛋白的应用		
公开(公告)号	CN1920565A	公开(公告)日	2007-02-28
申请号	CN200510029155.9	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 李辰 周晓 袁新雨		
发明人	曾嵘 李辰 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	CN1920565B		
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CD59糖蛋白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CD59糖蛋白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。

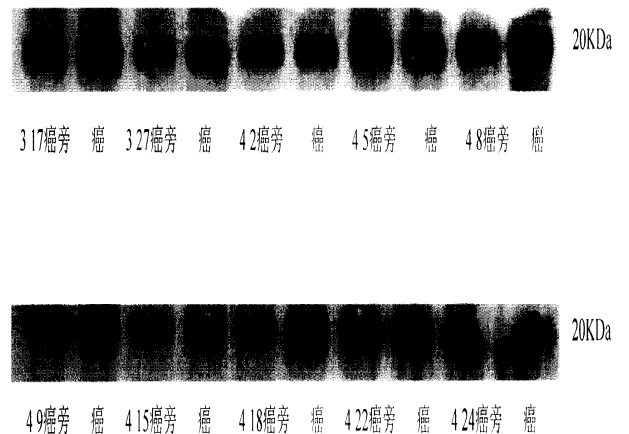


图1