



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104062432 B

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201310095817.7

CN 101905024 A, 2010.12.08, 全文.

(22) 申请日 2013.03.22

Ding T et al. Endothelium-coated tumor clusters are associated with poor prognosis and micrometastasis of hepatocellular carcinoma after resection. 《Cancer》.2011, 第 117 卷 4878-4889.

(73) 专利权人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路 135 号

(72) 发明人 庄诗美 方坚鸿 周慧超 郑利民 许静 丁童

彭林等. 携带促血管生成素基因的肝癌细胞对血管内皮细胞的趋化作用. 《中国普外基础与临床杂志》. 2006, 第 13 卷 (第 2 期), 154-157.

(74) 专利代理机构 广州新诺专利商标事务有限公司 44100

Maisonpierre PC et al. Angiopoietin-2: a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.. 《Science》.2002, 第 277 卷 (第 6 期), 55.

代理人 华辉

彭林等. 促血管生成素在肝癌组织中的表达与肝癌新生血管形成及转移的关系. 《中华普通外科杂志》. 2003, 第 18 卷 (第 7 期), 430-432.

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

焦辉等. 血管生成素-2/受体-2 在肝癌血管新生中的作用. 《中国肿瘤临床》. 2008, 第 35 卷 (第 11 期), 644-647.

(56) 对比文件

CN 101903777 A, 2010.12.01, 权利要求 1, 25, 说明书第 0066 段.

审查员 李宏悦

WO 02/089772 A1, 2002.11.14, 全文.

US 2004/0248174 A1, 2004.12.09, 全文.

WO 03/068165 A2, 2003.08.21, 全文.

CN 101998964 A, 2011.03.30, 全文.

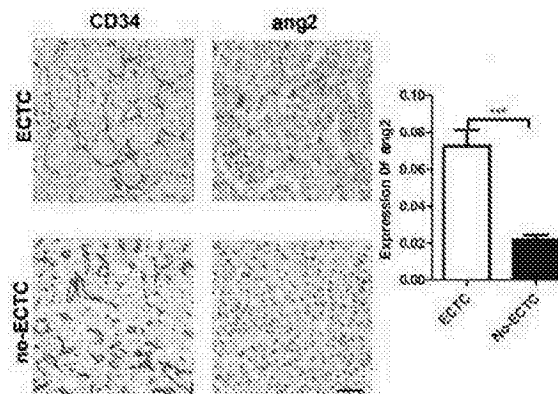
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

ang2 在制备 ECTC 血管类型肝癌诊断试剂及治疗药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供一种蛋白编码基因 ang2 及其应用。本发明进行了人肝癌标本组织免疫组化和血液标本 Elisa 检测, 表明肝癌病人组织或血液标本中 ang2 的表达可以指示病人组织血管类型; 另外, 小鼠成瘤实验的结果表明体内敲低 ang2 的表达可显著抑制肝癌细胞的体内成瘤能力和 ECTC 类型血管的生成能力。因此, ang2 可用于制备 ECTC 血管类型肝癌的指示剂以及治疗 ECTC 血管类型肝癌的药物。



1. ang2 在制备用于 ECTC 血管类型肝癌诊断预测及预后的试剂中的应用。
2. 检测 ang2 表达水平的试剂在制备用于 ECTC 血管类型肝癌诊断预测及预后的试剂中的应用。
3. 抑制 ang 2 表达的试剂在制备治疗 ECTC 血管类型肝癌的药物中的应用。
4. 根据权利要求 3 的应用,其中所述抑制 ang 2 表达的试剂包括抗 ang 2 抗体、siRNA 和 / 或 sh RNA。
5. 根据权利要求 4 的应用,其中所述 siRNA 为 si-ang2,其 RNA 序列从 5' 端到 3' 端为 : 5' -GATGATAGAAATAGGGACAAAdTdT-3'。
6. 根据权利要求 4 的应用,其中所述 sh RNA 为 sh-mAng2,其引物序列如下,
shmAng2#1 正向引物 :5' -CATGGATCCTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA-3',反向引物 :5' -CATCTC GAGGCGGCCGCCCGGGCTATCCGTAAAGAAGAGCAACTCGAGTTGCTCTTCTTTACGGATAGCTTTTTGGAATTCCG CGTCCTTTCCACAAG-3' ;
shmAng2#2 正向引物 :5' -CATGGATCCTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA 3',反向引物 :5' -CATCT CGAGGCGGCCGCCCGGGCTGCTTAAGATCCAGCTGAACTCGAGTTCAGCTGGATCTTAAGCACGTTTTTGGGAATTCC GCGTCCTTTCCACAAG-3'。

ang2 在制备 ECTC 血管类型肝癌诊断试剂及治疗药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,具体涉及 ang2 及其在制备 ECTC 血管类型肝癌诊断试剂及治疗药物中的应用。

背景技术

[0002] 原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一,其发生率和死亡率均高居各种恶性肿瘤前列。众所周知,癌症难以根治的主要原因是局部复发和远处转移。一般认为,肝脏丰富的血管系统以及肝癌活跃的血管生成,是肝癌患者易于发生血行转移,尤其是早期肝内播散的重要因素。但是,肝癌中微血管的数量与肝癌复发转移的相关性尚存争议。而我们发现:肝癌中存在 ECTC (endothelium-coated tumor cell clusters, 内皮细胞包绕肿瘤团块) 和非 ECTC (non-ECTC) 两种血管结构,前者的血管呈网络状连接,将肿瘤块包绕分割;后者的血管则为分散的管状结构。更为重要的是,与 non-ECTC 肝癌相比,ECTC 肝癌组织中镜下微小转移灶更多,行根治性切除术后复发率更高、生存时间更短。这提示:ECTC 血管结构很可能为癌细胞生长及转移提供了更强大的便利条件,因此制备 ECTC 血管类型肝癌诊断试剂及治疗药物具有重要的应用价值。

[0003] Sugino 等最早报道了肿瘤中类似 ECTC 的血管结构的存在。他们将低侵袭高转移的鼠乳腺癌细胞株接种小鼠乳房脂肪垫成瘤后,观察到肿瘤中血管发展成融合的血窦样结构,并包绕肿瘤团块;而且,该细胞株虽然促血管生成能力强,但分泌 MMP 和侵袭能力弱。此后,该课题组在人肝癌、肾癌和甲状腺癌中都观察到癌栓被内皮细胞包绕的现象。我们之前的报道首次证明了 ECTC 结构与肿瘤的转移复发密切相关,是独立的预后不良预测因素。至今,关于 ECTC 形成的潜在机制研究只有两篇报道,他们发现:过表达 VEGF-A 或分泌型白细胞蛋白酶抑制因子(SLPI) 可促进肿瘤细胞株成瘤组织中 ECTC 结构血管的形成。

[0004] Angiopoietin/Tie 介导了血管的成熟,是血管生成尤其是肿瘤血管生成的重要调控通路。Angiopoietin (血管生成素) 家族主要包括 Ang1, ang2 和 ang4, 其受体 tie 家族主要包括 tie-1 和 tie-2。ang1 是 tie-2 的激活剂,而 ang2 则作为 ang1 的拮抗剂,可与 ang1 竞争性的结合 tie-2。ang4 目前报道不多,其功能可能与 ang1 相似。而 tie-1 的配体尚未鉴定, tie-1 可能作为 tie-2 的负调节因子存在。Ang1/tie-2 信号激活可以维持内皮细胞处在静息状态,同时 ang1 还可以刺激壁细胞(血管平滑肌细胞和周细胞)覆盖到内皮细胞表面以及基底膜的沉积,使血管连接更加紧密,表现出成熟血管的特征。肿瘤中,ang1 可以促进内皮细胞存活和血管成熟帮助肿瘤生长,但同时促进血管的成熟抑制肿瘤细胞侵袭血管。而 ang2 可拮抗 ang1,使内皮细胞由静息态变为激活状态,开始增殖和出芽,生成新的血管。同时 ang2 还可以降低壁细胞的覆盖,使血管通透性增加,并表现出不成熟的特征。由此可见,ang1 在肿瘤发展中起到双面作用。而目前多数研究认为 ang2 主要起到促肿瘤的作用,是抗血管药物潜在的靶分子。

[0005] 国内外文献中至今未见有关 ang2 与 ECTC 血管类型的相关性研究报道。因此,进

一步研究 ang2 在 ECTC 类型血管生成中的作用及其在肝癌诊治中的应用,对于制备高效的抗肿瘤血管生成药物以及肿瘤个体化治疗意义重大。

发明内容

[0006] 为了解决以上技术问题,本发明的一个目的是提供肝癌患者肝组织中的 ang2 表达水平作为 ECTC 血管类型肝癌的标记的应用。

[0007] 本发明的另一个目的是提供肝癌患者血液标本中 ang2 的表达水平作为 ECTC 血管类型肝癌的标记的应用。

[0008] 本发明的再一个目的是提供 ang2 在制备用于 ECTC 血管类型肝癌诊断及预后的试剂中的应用。其中患者肝癌组织或血液标本中 ang2 的高表达指示 ECTC 血管类型的可能性更高,从而预测患者更容易转移和复发。本发明还提供了检测 ang2 表达水平的试剂在制备用于 ECTC 血管类型肝癌诊断预测及预后的试剂中的应用。

[0009] 此外,本发明还提供了检测 ECTC 血管类型肝癌的试剂盒,其包含用于检测肝癌组织或血液标本中 ang2 的表达水平的试剂。优选地,所述检测肝癌组织或血液标本中 ang2 表达水平的试剂,包括 ang2 特异抗体。

[0010] 本发明的另一目的在于提供 ang2 在制备治疗 ECTC 血管类型肝癌的药物中的应用。

[0011] 为证实 ang2 的表达水平在作为 ECTC 血管类型肝癌的标记中的应用,设置了 A、B 两个实验,具体如下:

[0012] 实验 A:免疫组化检测肝癌病人组织中 CD34 (血管内皮细胞标记分子)、ang2 的表达。

[0013] 实验 B:Elisa 法检测肝癌病人血液标本中 ang2 的表达。

[0014] 对实验结果进行对比分析及相关性统计表明:实验 A 的 140 份肝癌病人组织中,经过 CD34 标记血管内皮细胞,以及软件得到的 ang2 阳性信号值,我们发现,在 ECTC 组织中 ang2 表达水平显著更高;实验 B 中的 69 份肝癌病人血液标本中,肝癌病人血液标本中的 ang2 的表达在组织血管类型为 ECTC 的标本中显著更高。以上结果均表明,ang2 在肝癌病人肝组织中的表达或是血液标本的表达水平可以指示组织血管类型,从而预测肝癌病人的预后。

[0015] 本发明通过小鼠成瘤实验研究 ang2 在体内表达对肝癌细胞生长和 ECTC 类型血管的影响。上述小鼠成瘤实验设置阴性对照组和实验组。阴性对照组的肿瘤细胞株中转染 NC 或感染 control 病毒,实验组的肿瘤细胞株中转染 si-ang2 或感染表达 sh-mAng2 的病毒。上述小鼠成瘤实验所采用的肿瘤细胞株为人原代肝癌细胞 66#T 和小鼠肝癌细胞株 Hepal-6。

[0016] 对实验结果进行对比分析及相关性统计表明:与阴性对照组形成 ECTC 类型血管不同,实验组的肿瘤的血管形态转变为更多的 no-ECTC 血管,统计学分析具有显著差异。

[0017] 小鼠成瘤实验结果表明,体内抑制 ang2 表达可以显著抑制肝癌细胞形成 ECTC 类型血管的能力,降低转移复发率,从而改善肝癌患者的预后。

[0018] 因此,本发明还提供了抑制 ang2 表达的试剂在制备治疗 ECTC 血管类型肝癌的药物中的应用。优选的,所述抑制 ang2 表达的试剂包含抗 ang2 抗体、siRNA

和 / 或 sh RNA。更优选地,所述 siRNA 为 si-ang2,其 RNA 序列从 5' 端到 3' 端为: 5' -GATGATAGAAATAGGGACAAAdTdT-3'。或者,所述 sh RNA 为 sh-mAng2,其引物序列如下,

[0019] shmAng2#1 正向引物 :5' -CATGGATCCTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA-3' ;

[0020] 反向引物 :

[0021] 5' -CATCTCGAGGCGGCCGCCCGGGCTATCCGTAAAGAAGAGCAACTCGAGTTGCTCTTCTTTACGGAT AGCTTTTTGGAATTCCGCGTCCTTTCCACAAG-3' ;

[0022] shmAng2#2 正向引物 :5' -CATGGATCCTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA-3' ;

[0023] 反向引物 :

[0024] 5' -CATCTCGAGGCGGCCGCCCGGGCTGCTTAAGATCCAGCTGAACTCGAGTTCAGCTGGATCTTAAGC ACGTTTTGGAATTCCGCGTCCTTTCCACAAG-3'。

附图说明

[0025] 图 1 为免疫组化检测血管内皮细胞标记 CD34 和 ang2 表达代表图及统计图。图 1 是实施例 1 中的实验 A 的实验结果。

[0026] 图 2 为 Elisa 检测肝癌病人血液标本 ang2 表达的统计图。图 1 是实施例 1 中的实验 B 的实验结果。

[0027] 图 3 为 66#T 小鼠成瘤实验结果图。图 3A 为转染 si-ang2 后,66#Tang2 表达检测图 ;图 3B 为血管类型及统计图。图 3 是实施例 2 的实验结果。

[0028] 图 4 为 Hepa1-6 小鼠成瘤实验结果图。其中,图 4A 为免疫组化标记的小鼠肿瘤表达 ang2 的代表图和统计图 ;图 4B 免疫组化标记的小鼠肿瘤血管内皮细胞染色代表图和血管类型的统计图。图 4 是实施例 2 的实验结果。

具体实施方式

[0029] 以下结合具体实施例,进一步说明本发明的技术方案。应理解,以下实施例只用于说明本发明而不以任何形式限制本发明。

[0030] ang2 (Angiopoietin2)基因的序列如 NCBI 数据库所收录 (NCBI. Annotation:Chromosome8, NC_000008. 10)。

[0031] 本发明所采用的 ang2 免疫组化特异抗体由 Abcam 公司(美国)购得 ;CD34 免疫组化抗体由北京中衫公司(中国)购得 ;血液标本中 ang2 的 Elisa 检测试剂盒由 R&D 公司(美国)购得。

[0032] 本发明所采用的 si-ang2 序列从 NCBI 数据库获得,其 RNA 序列从 5' 端到 3' 端为: 5' -GATGATAGAAATAGGGACAAAdTdT-3',由上海吉玛公司合成。阴性对照组的阴性对照 RNA 序列(也称 NC)为上海吉玛公司合成的用于 siRNA 实验的标准阴性对照序列,其 RNA 序列从 5' 端到 3' 端为 :5' -UUCUCCGAACGUGUCACGUDTdT-3'。

[0033] 本发明所采用的 sh-mAng2 序列从 NCBI 数据库获得,引物序列如下,

[0034] shmAng2#1 正向引物 :5' -CATGGATCCTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA-3' ;

[0035] 反向引物 :

[0036] 5' -CATCTCGAGGCGGCCGCCCGGGCTATCCGTAAAGAAGAGCAACTCGAGTTGCTCTTCTTTACGGAT AGCTTTTTGGAATTCCGCGTCCTTTCCACAAG-3' ;

[0037] shmAng2#2 正向引物 :5' -CATGGATCCTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA-3' ;

[0038] 反向引物 :

[0039] 5' -CATCTCGAGGCGGCCGCCCGCGTGCTTAAGATCCAGCTGAACTCGAGTTCAGCTGGATCTTAAGC ACGTTTTTGAATTCCGCGTCCTTTCCACAAG-3'。由上海英俊公司合成,通过 pCDH 慢病毒表达系统合成表达病毒。

[0040] 实施例 1 :人组织标本 ang2 表达指示肝癌组织血管类型

[0041] 1.1 免疫组化检测

[0042] 人肝癌组织的切片由中山大学附属肿瘤医院标本库提供。制成石蜡切片 4℃ 保存。后续检测步骤为 :

[0043] (1) 预处理 :取出 55℃ 烤片 1h, 放于二甲苯中脱蜡两次, 每次 10min ;依次用 100%、95%、90%、80%、70% 的乙醇洗一次, 每步 3min, 后用双蒸水洗 3min ;0.3% 的双氧水处理 10min, 双蒸水再洗 3 次, 每次 3min ;浸泡于修复液中, 用微波炉进行热修复, 室温冷却半小时 ;用 1×PBS 洗三次, 每次 3min ;

[0044] (2) 杂交染色 :用 CD34 或 ang2 抗体进行孵育, 4℃ 过夜 ;恢复室温, 弃去抗体液, 用 1×PBS 洗三次, 每次 5min ;加入二抗, 37℃ 半小时 ;用 1×PBS 洗三次, 每次 5min ;加入 DAB 显色液进行显色, 然后用苏木精复染。

[0045] (3) 计数 :CD34 染色判断血管类型 ;ang2 染色后 400 倍镜下随机拍 10 个视野, 通过 Imagine Pro Plus 软件计数 ang2 阳性面积。

[0046] 1.2 Elisa 检测

[0047] 人肝癌病人的血液标本由中山大学附属肿瘤医院提供, 相关实验获得中山大学伦理委员会的批准。-80℃ 保存。后续检测步骤为试剂盒提供, 具体如下

[0048] (1) 加样 :加一定稀释的待检样品 0.1ml 于上述已包被之反应孔中, 置 37℃ 孵育 1 小时。然后洗涤。

[0049] 空白对照组 :空白孔, 仅加入显色液 ;

[0050] 阴性对照组 :样品为样品稀释液 ;

[0051] 实验组 :经样品稀释液稀释的样品检测液 ;

[0052] (2) 加酶标抗体 :于各反应孔中, 加入新鲜稀释的一抗 0.1ml。37℃ 孵育 2 小时, 洗涤。加入二抗工作液 0.1ml。37℃ 孵育 1 小时, 洗涤。

[0053] (3) 加底物液显色 :于各反应孔中加入新鲜配制的 TMB 底物溶液 0.1ml, 室温 15-30 分钟。

[0054] (4) 结果判定 :在 ELISA 检测仪上, 于 450nm 处测定各个样品孔的 OD 值。

[0055] 1.3 结果分析

[0056] 实验 A, 如图 1 所示, 我们共检测了 140 份肝癌组织标本, 通过 CD34 染色血管内皮细胞, 根据血管形成分型, 发现所检测的肝癌组织中有 53 份 (38%) 为 ECTC 血管类型, 87 (62%) 为 no-ECTC 血管类型。通过 Imagine Pro Plus 软件计数 ang2 阳性值, 与血管类型进行相关性分析, 我们发现形成 ECTC 类型血管的肝癌组织 ang2 的平均表达值 0.073, 而形成 no-ECTC 类型血管的肝癌组织其平均表达值为 0.022, ECTC 类型组织显著高表达 ang2 ($P < 0.001$, T 检验)。

[0057] 实验 B, 如图 2 所示, 我们通过 Elisa 共检测了 69 份肝癌病人的血液标本, 在所检

测血液标本对应的肝癌组织中,通过 CD34 染色血管内皮细胞,进行血管形态分型。发现所检测血液标本对应的肝癌组织中有 32 份(46%)为 ECTC 血管类型,37(54%)为 no-ECTC 血管类型。通过酶标仪读取 ang2 的光密度值,与血管类型进行相关性分析,我们发现形成 ECTC 类型血管的肝癌组织对应的血液标本中 ang2 的平均光密度值为 0.22,而形成 no-ECTC 类型血管的肝癌组织对应的血液标本中,ang2 平均光密度值为 0.14,ECTC 类型的肝癌病人的血液标本中显著高表达 ang2 ($P < 0.01$, T 检验)。

[0058] 上述结果显示,肝癌病人组织或血液标本中 ang2 的表达水平可以作为 ECTC 血管类型肝癌的指示分子。

[0059] 实施例 2:小鼠成瘤实验

[0060] 2.1 细胞转染或感染

[0061] 将目的 RNA 或病毒导入细胞。具体实验步骤为:

[0062] (1) 转染:取胰蛋白酶消化细胞重悬于含有 10% FBS 的无双抗 DMEM 培养基(购自 Invitrogen 公司)中,使得细胞密度为 3×10^4 个细胞/ml;将 30p mol 目的 RNA 稀释于 100 μ l opti-MEM (购自 Invitrogen 公司)中,轻敲管壁混匀;每管加入 1 μ l Lipofectamine RNAi MAX,轻敲管壁混匀,室温放置 15min;得到 RNAi MAX/siRNA 稀释液;每孔加入 100 μ l RNAi MAX/siRNA 稀释液,再加入 500 μ l 细胞稀释液,该细胞稀释液可使细胞密度在转染 24h 后大约为 30-50% 汇合。上述目的 RNA 可为 si-ang2、阴性对照 RNA (也称 NC)。48h 后,选取部分细胞进行 RT-PCR 检测敲低效率。

[0063] 上述实施例为 24 孔板,其他孔板可根据孔的大小按比例放大或者缩小试剂用量。

[0064] (2) 感染:包括病毒包装和感染靶细胞两个步骤。

[0065] A. 包装:以 24 孔板为例,加入 0.3 μ g 包装混合质粒和 0.3 μ g 表达质粒以及 50 μ l 的 opti-MEM,轻柔混匀,室温孵育 5min。取 1 μ l Lipofectamine2000(购自 Invitrogen 公司)溶于 50 μ l opti-MEM 中。轻柔混匀,室温孵育 5min。将上述两管试剂混合,轻柔混匀,放置 15min 后加入预先贴好的 293T 包装细胞中。转染后 48-72h 收获含病毒的上清。0.45um 孔径的滤器过滤获得病毒上清,于 -80° C 贮存。

[0066] B. 感染靶细胞:在 24 孔板中种植适当密度的靶细胞,加入病毒感染,24h 后更换培养基,换入新鲜的培养基。48h 后使用含有抗生素的新鲜培养基进行阳性细胞的筛选或是通过流式分选 GFP 阳性的细胞。筛选到阳性细胞后进行 RT-PCR 检测敲低效率。

[0067] 2.2 小鼠成瘤

[0068] 选用 5 只 5 周龄的 BALB/c 裸鼠,在其两只后腿分别皮下注射 1×10^6 的表达 si-ang2 或 NC 的 66#T 细胞。或是选用 5 只 5 周龄的 C57 小鼠,在其后腿分别皮下注射 1×10^6 表达 sh-mAng2 或 control 的 hepa1-6 细胞。指定时间后,完整剥离肿瘤组织,以备后续实验。

[0069] 2.3 免疫组化

[0070] 小鼠的肿瘤组织取自步骤 2.2,制成石蜡切片 4° C 保存。两者后续检测步骤为:

[0071] (1) 预处理:取出 55° C 烤片 1h,放于二甲苯中脱蜡两次,每次 10min;依次用 100%、95%、90%、80%、70% 的乙醇洗一次,每步 3min,后用双蒸水洗 3min;0.3% 的双氧水处理 10min,双蒸水再洗 3 次,每次 3min;浸泡于修复液中,用微波炉进行热修复,室温冷却半小时;用 $1 \times$ PBS 洗三次,每次 3min;

[0072] (2) 杂交染色 :用鼠特异性的 CD34 抗体和 ang2 抗体进行孵育,4℃过夜 ;恢复室温,弃去抗液体,用 1×PBS 洗三次,每次 5min ;加入二抗,37℃半小时 ;用 1×PBS 洗三次,每次 5min ;加入 DAB 显色液进行显色,然后用苏木精复染。

[0073] (3) 计数 :CD34 染色判断血管类型,并计数形成血管内皮细胞包绕肿瘤细胞团的 ECTC 血管个数 ;ang2 染色后 400 倍镜下随机拍 5 个视野,通过 Imagine Pro Plus 软件计数 ang2 阳性面积。

[0074] 2.4 结果分析

[0075] 如图 3 所示, A 图显示我们所设计合成的 si-ang2 能够显著地敲低人原代肝癌细胞 66#T 的 ang2 表达。而如 B 图所示,敲低 ang2 表达的人肝癌原代细胞 66#T 在小鼠体内形成的肿瘤,其组织血管类型发生了显著的改变,通过计数 ECTC 类型血管的数量,我们发现敲低 ang2 的肝癌细胞肿瘤形成 ECTC 血管的能力显著减弱(NC vs. Si-ang2=11.14vs. 4.22;p<0.01)。

[0076] 如图 4 所示,利用 shRNA 敲低 ang2 表达的鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 在小鼠体内形成的肿瘤,其 ang2 的表达显著降低(平均表达值为 control :sh-mAng2#1 :sh-mAng2#2=0.15:0.06:0.06, p<0.05),而且计数 ECTC 类型血管的数量,敲低 ang2 表达的小鼠肝癌细胞肿瘤形成 ECTC 血管的能力显著减弱(平均 ECTC 个数为 control :sh-mAng2#1 :sh-mAng2#2=11.7:1.4:2.3, p<0.05)。

[0077] 综上所述,敲低内源 ang2 表达可以显著抑制人或鼠肝癌细胞于小鼠体内形成 ECTC 类型血管的能力。这表明降低 Ang2 的表达以及抑制 ang2 表达的试剂可以用于制备治疗 ECTC 血管类型肝癌的药物。

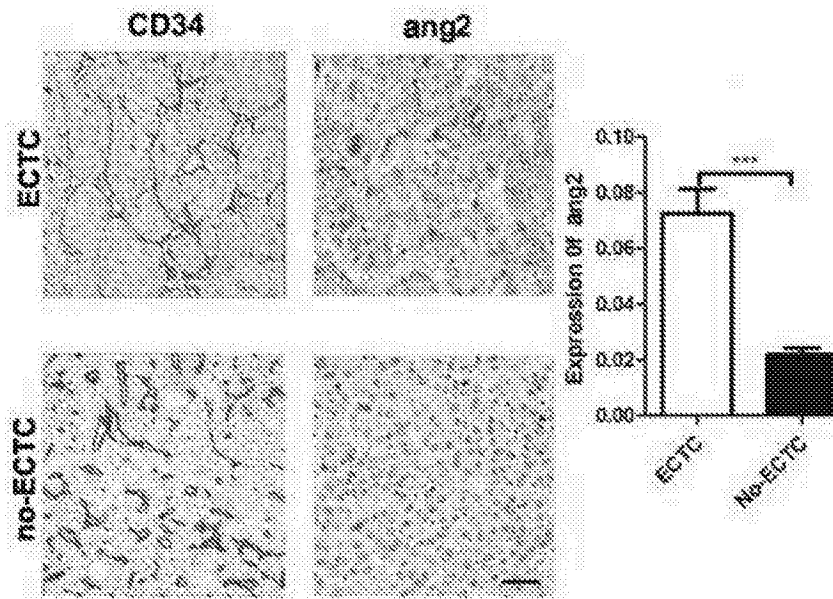


图 1

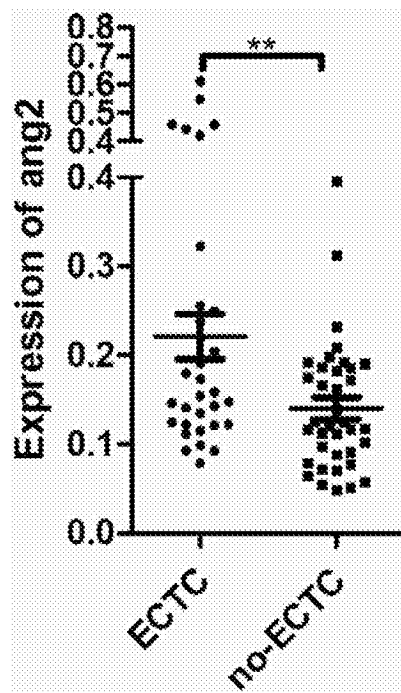


图 2

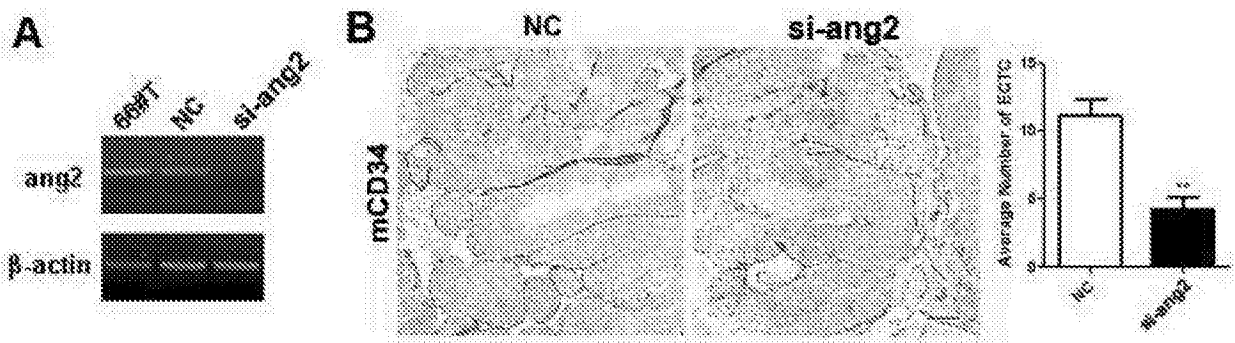


图 3

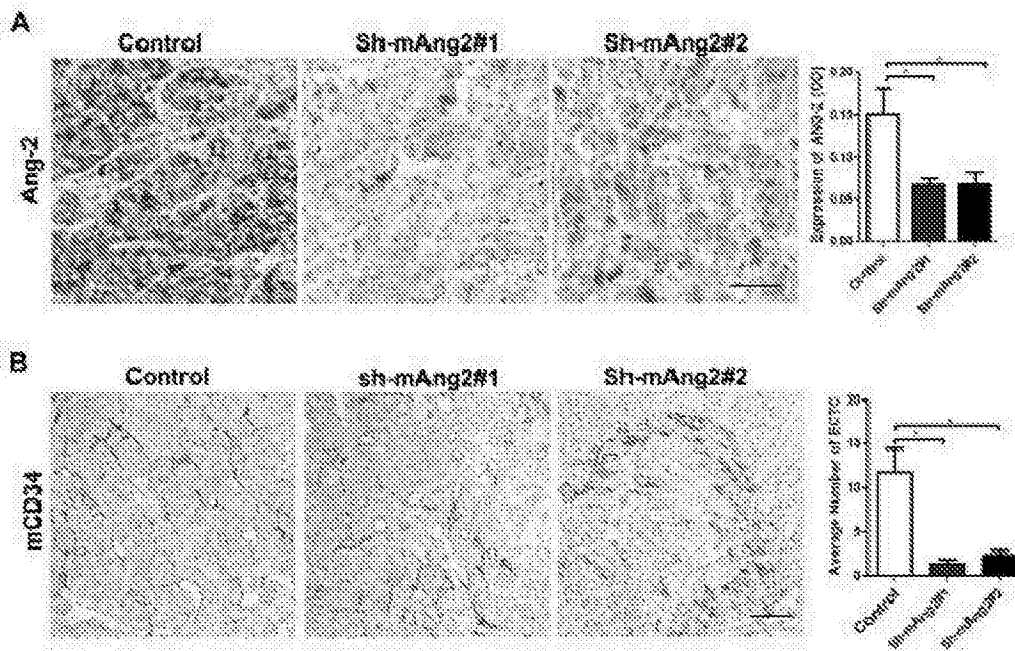


图 4

专利名称(译)	ang2在制备ECTC血管类型肝癌诊断试剂及治疗药物中的应用		
公开(公告)号	CN104062432B	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201310095817.7	申请日	2013-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	庄诗美 方坚鸿 周慧超 郑利民 许静 丁童		
发明人	庄诗美 方坚鸿 周慧超 郑利民 许静 丁童		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 A61K48/00 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	A61K39/3955 A61K48/005 G01N33/57438 G01N2333/515		
代理人(译)	华辉		
其他公开文献	CN104062432A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种蛋白编码基因ang2及其应用。本发明进行了人肝癌标本组织免疫组化和血液标本Elisa检测，表明肝癌病人组织或血液标本中ang2的表达可以指示病人组织血管类型；另外，小鼠成瘤实验的结果表明体内敲低ang2的表达可显著抑制肝癌细胞的体内成瘤能力和ECTC类型血管的生成能力。因此，ang2可用于制备ECTC血管类型肝癌的指示剂以及治疗ECTC血管类型肝癌的药物。

