



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104225575 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201310226123. 2

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 07

C12Q 1/68 (2006. 01)

(71) 申请人 北京大学人民医院

C12N 15/85 (2006. 01)

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11 号

C12N 15/861 (2006. 01)

申请人 北京大学

(72) 发明人 许克新 胡浩 张石英 裴晓磊
宋泉声 王应

(74) 专利代理机构 北京攀腾专利代理事务所
(普通合伙) 11374

代理人 彭蓉

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书15页
序列表5页 附图9页

(54) 发明名称

一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种新的肿瘤抑制基因或蛋白及其在膀胱癌和肾癌中的临床和实验室研究的应用,特别是涉及 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,CMTM8 或 / 和 CMTM8-v2 或 / 和它们的免疫性片段在诱导膀胱肿瘤和肾肿瘤细胞凋亡中的应用、在制备治疗和 / 或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中的应用、包含 CMTM8 或 / 和 CMTM8-v2 的载体或药物组合物,以及应用于临床和实验室研究的检测 CMTM8 或 / 和 CMTM8-v2 或 / 和它们的免疫性片段的表达的试剂在膀胱肿瘤和肾肿瘤预后诊断和治疗方案确定中的应用。

1. 一种蛋白或其免疫性片段在肿瘤诊断和治疗中的应用，其中所述蛋白选自：
 - (a) 由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白；
 - (b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与 (a) 具有相同功能的由 (a) 衍生的蛋白，
 - (c) 由 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列组成的蛋白；或
 - (d) 由 (c) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与 (c) 具有相同功能的由 (c) 衍生的蛋白；其中所述肿瘤包括肾肿瘤或膀胱肿瘤。
2. 编码权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段的多核苷酸序列在肿瘤诊断和治疗中的应用，其中：

所述多核苷酸序列为 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列、SEQ ID NO:1 的核苷酸 295-813 所示的多核苷酸序列或 SEQ ID NO:3 的核苷酸 1 — 345 所示的多核苷酸序列；

所述免疫性片段为 SEQ ID NO:2 的氨基酸 157-173 所示的序列、SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-21 所示的序列、SEQ ID NO:2 的氨基酸 22-42 所示的序列或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 127-143 所示的序列；

其中所述肿瘤包括肾肿瘤或膀胱肿瘤。
3. 根据权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段或根据权利要求 2 所述的多核苷酸序列在诱导肿瘤细胞凋亡中的应用，其中所述肿瘤包括肾肿瘤或膀胱肿瘤。
4. 根据权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段在制备治疗和 / 或抑制肿瘤的药物中的应用，其中所述肿瘤包括肾肿瘤或膀胱肿瘤。
5. 根据权利要求 2 所述的多核苷酸序列在制备治疗和 / 或抑制肿瘤的药物中的应用，其中所述肿瘤包括肾肿瘤或膀胱肿瘤。
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的应用，其中所述蛋白或其免疫性片段或所述多核苷酸序列包含于载体中；所述载体为质粒或病毒；所述病毒为腺病毒。
7. 一种载体，其包含权利要求 2 所述的多核苷酸序列；所述载体为质粒或病毒；所述病毒为腺病毒。
8. 一种用于治疗 and / 或抑制肿瘤的药物组合物，其含有权利要求 1 所述的蛋白或其免疫片段或权利要求 2 所述的多核苷酸序列或权利要求 7 所述的载体，和一种或多种药用赋形剂或药用载体，其中所述肿瘤包括肾肿瘤或膀胱肿瘤。
9. 一种试剂在制备用于检测肿瘤的组合物中的应用，其中所述试剂用于检测权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段或权利要求 2 所述的多核苷酸序列的表达，所述肿瘤包括肾肿瘤或膀胱肿瘤。
10. 根据权利要求 9 所述的应用，其中所述试剂为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA。

一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肿瘤抑制基因或蛋白在肿瘤中的表达及其应用,具体地涉及 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在肾肿瘤及膀胱肿瘤中的表达及其应用。

背景技术

[0002] 众所周知,凋亡在所有动物的发育和稳态中起十分重要的作用,决定一个细胞是否处于凋亡状态的主要标志包括典型的细胞形态的改变以及一些生化和分子标志的改变。就形态而言,凋亡细胞变圆、皱缩、脱落,染色体凝集并分布于核边缘。凋亡发生的主要生化标志有:线粒体失去跨膜电位,质膜磷脂酰丝氨酸外翻,胱冬酶(caspase)的活化,蛋白质如 IAPs 和聚 ADP 核糖聚合酶(PARP, Poly (ADP-ribose) polymerase)的酶切,基因组 DNA 的片断化和线粒体质量以及 f-肌动蛋白成分的改变等。

[0003] 在哺乳类动物中,胱冬酶是一组与细胞凋亡有关的蛋白酶。胱冬酶激活的一个主要途径是细胞色素 c 从线粒体的释放,胞浆中的细胞色素 c 可与 Apaf-1 形成复合物,此复合物可识别并酶切胱冬酶原-9,活化后的胱冬酶-9 酶切并激活胱冬酶-3,从而引起细胞进行一系列凋亡的形态改变。

[0004] 膀胱肿瘤和肾肿瘤对人类健康和生命构成重大威胁,肾肿瘤占成年人肿瘤发生率的 3-4%,据估计,2010 年美国将约有 58240 例肾肿瘤新发病例,并将有 13040 例患者将死于肾肿瘤。在过去 30 年里,肾肿瘤的发病率以每年 3% 的速度递增。

[0005] 膀胱肿瘤在世界范围内的发病率居恶性肿瘤的第九位,在男性排名第六位,女性排在第十位之后。在我国,男性膀胱癌发病率位居全身肿瘤的第八位,女性排在第十二位以后,发病率低于西方国家,但近年来,我国部分城市肿瘤发病率报告显示膀胱癌发病率有增高趋势。

[0006] 膀胱癌和肾癌的治疗均首选手术治疗。但根据肿瘤的生物学特性,治疗方法有所不同。

[0007] 目前用于膀胱癌治疗的方法是首选手术治疗,包括经尿道膀胱肿瘤切除术、经尿道激光手术和光动力治疗。TUR-BT 术后有 10%~67% 的患者会在 12 个月内复发,术后 5 年内有 24%-84% 的患者复发。因此,所有非肌层浸润性膀胱癌患者术后均进行辅助性膀胱灌注治疗。膀胱灌注化疗常用药物包括表柔比星、丝裂霉素、吡柔比星、阿霉素、羟基喜树碱等。但是这些治疗方法的效果往往都不是很满意,患者应从性较差,并且复发率很高。术后 3 年内复发率高达 70%,而且复发者中约有三分之一的病例向更高级别和期别进展。

[0008] 肿瘤的治疗中,一个非常重要的问题是如何判断肿瘤的生物学特性。目前还没有合适的生物学指标可以准确的预测膀胱癌的发展和预后。因此寻找具有早期诊断、有判断预后价值的肿瘤标记物,并根据其生物学特点采取及时合理的治疗方法,提高膀胱癌患者的总体生存率,一直是泌尿外科学者研究的重要课题。目前对膀胱癌预后因子的研究开发虽已取得进展,但除了个别指标,对于多数指标的预后价值仍存在争议。

[0009] 随着现代生物技术特别是分子免疫学和分子生物学的发展以及对肿瘤发病机制从细胞、分子水平的进一步认识,膀胱癌的分子生物学研究日益受到国内外学者的重视,并且已有部分研究针对膀胱癌的分子治疗进行研究,包括免疫治疗,靶向治疗和基因治疗等。

[0010] 近年来,越来越多的证据显示,肿瘤的复发和进展与多种癌基因过度表达,以及肿瘤抑制基因失活密切相关。目前对这些抑癌基因的研究还处于探索阶段,还需在膀胱癌大样本中进行验证及在临床试验中进行有效性评估,以期寻找到更有利于膀胱癌早期诊断及实现个体化治疗的抑癌基因,总之,进一步研究抑癌基因将有助于推进肿瘤研究,为临床诊断和治疗提供新的方向和思路。

[0011] 目前用于肾癌治疗的方法是首选手术治疗。约 30% 的肾癌诊断时即发现远处转移。术后患者约 30%~40% 发生远处转移。转移性肾癌对放化疗等治疗不敏感。预后较差。中位生存期约 13 个月。尽管医疗技术、分子生物学水平的不断提高,使得肾癌的早期诊断、治疗有了很大进展,但晚期肾癌的五年生存率仍未见明显改善。NCCN《肾癌临床实践指南》认为肾癌术后目前尚无可推荐的标准辅助治疗方案。因此,开发针对肾癌的新的治疗方法尤为迫切。

[0012] 近二十余年,基于免疫治疗的细胞因子、肿瘤抗原、树突突细胞的疫苗生物免疫治疗在肾癌治疗中取得了许多进展。近年许多研究报道:包括干扰素、白细胞介素-2 以及疫苗、树突状细胞等进行了大量的临床试验,表现出很高的安全性和效果。尽管在这些试验中取得了抗肿瘤免疫反应和显著临床成效,但回应率仍然偏低,仅仅少数患者表现出长期的临床改善。

[0013] 人类基因组计划的研究成果给分子肿瘤学带来了巨大的影响,肿瘤的分子治疗已开始进入临床。分子靶向治疗是指在肿瘤分子生物学的基础上,将与肿瘤相关的特异分子作为靶点,再用针对靶分子特异制剂或药物进行治疗的手段。这种方法在取得明显疗效的同时,又避免对正常细胞的损伤,具有高效、低毒的优点。

[0014] 分子靶向药物治疗使肾癌治疗变得更有针对性,有希望成为转移性肾癌的标准化治疗,并可能用于早期肾癌的治疗,但同时面临着很多问题和挑战。如患者的适当选择,最理想剂量和给药时间的确定,与免疫治疗等系统治疗联合应用的前景,能否作为局限型肾癌术后标准辅助治疗方案,能否与传统抗体抗原等生物治疗及靶向基因治疗有效结合。

[0015] 故寻找能更好预测靶向治疗疗效的生物学标记物和影像学技术来指导个性化治疗显得尤为迫切。毫无疑问肾癌治疗已进入了一个新时代,研究者需更加深入地研究肾癌发生发展的分子通路,进行更为广泛的基础和临床研究,为肾癌治疗带来新的曙光。

[0016] 大型测序工作揭示了越来越多的驱动基因,影响肿瘤的发生和发展,为肿瘤的治疗提供了更多的新靶点。可以预见,通过整合各种高通量平台,在不久的将来 RCC 病人肿瘤的个体化治疗将会变成现实。基因疗法将会成为最有潜力的治疗手段。

[0017] 综上所述,对于膀胱肿瘤和肾肿瘤的治疗和诊断,成为现代医学需要解决的重要课题。细胞凋亡异常是肿瘤发生、发展的重要因素,因此通过诱导肿瘤细胞凋亡来清除肿瘤已成为当前肿瘤治疗的一个新的重要策略。

[0018] CMTM8 (CKLF-Like MARVEL Transmembrane Domain Containing8) 的表达产物为四次跨膜蛋白,具有 MARVEL 结构域(MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link)。CMTM8 功能研究证明 CMTM8 加速转铁蛋白受体、EGFR、c-MET 的内化,

加速配体诱导的 EGFR、c-MET 从细胞表面的清除,抑制 EGFR、c-MET 活化信号及细胞增殖、迁移、ERK 磷酸化,并且超表达 CMTM8 可诱导肿瘤细胞凋亡。CMTM8-v2 为 CMTM8 缺失 exon2 的可变剪接体。CMTM8-v2 诱导肿瘤细胞凋亡的功能与其全长分子类似。超表达 CMTM8 和 CMTM8-v2 表达质粒过表达 HeLa (宫颈癌细胞系,ATCC CCL2)和 PC3 细胞(前列腺癌细胞系,ATCC CRL-1435)可抑制其细胞生长并诱导细胞凋亡,并可使磷酸化的 ERK1/2、磷酸化 Akt 及其下游的磷酸化 Bad 明显降低。

[0019] 目前,CMTM8 及其变异体 CMTM8-v2 表达与泌尿系统肿瘤发生发展的相关性和在膀胱肿瘤、肾肿瘤发生发展中的作用及机制研究尚无任何报道。

发明内容

[0020] 本发明在一方面是提供 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的蛋白或由它们衍生的蛋白或上述蛋白的免疫性片段在肾肿瘤及膀胱肿瘤中的表达及其应用。

[0021] 本发明在另一方面是提供编码 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的蛋白或由它们衍生的蛋白或上述蛋白的免疫性片段的多核苷酸序列在肾肿瘤及膀胱肿瘤中的表达及其应用。

[0022] 本发明在另一方面是提供 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在诱导肾肿瘤或膀胱肿瘤细胞凋亡中的应用。

[0023] 本发明在另一方面是提供 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在诊断和治疗肾肿瘤或膀胱肿瘤中的应用,以及在制备治疗和 / 或抑制肾肿瘤或膀胱肿瘤的药物中的应用。

[0024] 本发明在另一方面是提供一种包含 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的载体及其在诊断和治疗肾肿瘤或膀胱肿瘤以及制备相应药物中的应用。

[0025] 本发明在另一方面是提供一种用于治疗 and / 或抑制肾肿瘤或膀胱肿瘤的药物组合物。

[0026] 本发明在另一方面是提供一种试剂及其用于临床检测 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因和蛋白或它们的免疫性片段的表达以及在制备用于检测膀胱肿瘤和肾肿瘤的组合物中的应用。

附图说明

[0027] 图 1. 免疫组化研究 CMTM8 及 CMTM8-v2 在人膀胱癌组织中的表达情况。随机选取了 34 例人膀胱组织标本,其中正常膀胱粘膜组织 8 例,不同分期的肿瘤组织 26 例。从实验结果中可以看到,CMTM8 及 CMTM8-v2 在正常膀胱粘膜组织中表达呈强阳性(图片 1),而在肿瘤组织中,CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达水平明显下降,呈弱阳性或阴性,且随着肿瘤出现肌层浸润,或肿瘤分级增加,CMTM8 的表达水平下降(图片 2, 3, 4)。

[0028] 图 2A-2B. 统计分析 CMTM8 及 CMTM8-v2 在人膀胱癌组织中的表达情况。利用统计学分析免疫组化结果,显示 CMTM8 及 CMTM8-v2 在膀胱癌肿瘤组织中呈低表达,在正常组织中高表达,差异具有显著性($p < 0.05$);在高级别低分化或肌层浸润性膀胱癌中低表达,在低级别高分化或非肌层浸润性膀胱癌中相对高表达,差异具有显著性($p < 0.05$)。

[0029] 图 3A-3B. CMTM8 及 CMTM8-v2 表达与患者生存率之间的关系。通过病案查询和电

话随访收集到从 2004 年到 2010 年的 84 例膀胱癌患者的资料和病理组织蜡块(图 3A 中表 2)。进行免疫组化实验后,Kaplan-Meier 生存分析显示患者生存率与 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平呈明显相关(log-rank test, $P=0.011$) (图 3B)。为进一步验证实验结果,采用 COX 多因素分析对实验结果进行检验,结果证实 CMTM8 及 CMTM8-v2 是膀胱癌患者生存率的独立影响因素(HR, 0.539; 95%CI, 0.296-0.982; $P=0.043$)。

[0030] 图 4. CMTM8 及 CMTM8-v2 在膀胱癌细胞系中的表达。在体外实验中选取了两种细胞系—MGH-U1 和 RT112, MGH-U1 来源于高级别低分化尿路上皮癌,而 RT112 来源于低级别高分化尿路上皮癌,通过细胞免疫化学检测了两种细胞的 CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达后发现, MGH-U1 的 CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达明显低于 RT112。

[0031] 图 5. Western blotting 检测 CMTM8 及 CMTM8-v2 在膀胱癌细胞系中的表达。MGH-U1 的 CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达明显低于 RT112。

[0032] 图 6. 实时定量 PCR 检测 CMTM8 及 CMTM8-v2 在膀胱癌细胞系中的表达。RT112 细胞系 CMTM8 及 CMTM8-v2 的 mRNA 表达量是 MGH-U1 表达量的 4.344 倍,进一步证实了两种不同级别膀胱癌细胞系 CMTM8 表达的差异性。

[0033] 图 7. 构建 CMTM8 上调的膀胱癌细胞系。通过腺病毒感染构建 CMTM8 上调的 T24 膀胱癌细胞系。并利用 Western blotting 实验检验转染后的 CMTM8 表达水平。上调后的 T24 细胞 CMTM8 表达水平明显高于野生型 T24 细胞。

[0034] 图 8 和图 9. CMTM8 腺病毒感染的 T24 细胞系的细胞迁移能力明显降低。Boyden Chamber 趋化小室检测 CMTM8 腺病毒感染的 T24 细胞的细胞迁移能力。空载体腺病毒感染的 T24 细胞作为对照(Nu11)。37℃ 条件下趋化 6 小时后对迁移至趋化膜向下一面的细胞进行染色(图 8)和计数(图 9)。图中标尺代表 100 μm 。CMTM8 腺病毒明显抑制 T24 细胞对于由 SDF-1 或者 EGF 诱导的迁移。

[0035] 图 10. CMTM8 腺病毒感染的 T24 细胞系的增值能力明显降低。MTT 实验检测上调 CMTM8 后的 T24 细胞增殖情况。将 CMTM8 腺病毒感染的 T24 细胞和感染空载体腺病毒的 T24 细胞(作为对照 Nu11)计数后分别平铺于 96 孔板中,分别在 1 天,2 天,3 天,4 天,5 天,加入 MTT 溶液,4 小时后用酶标仪检测 OD 值。实验结果证实,CMTM8 腺病毒能够明显抑制 T24 细胞的增殖。

[0036] 图 11. CMTM8 腺病毒与化疗药物表柔比星联合应用具有协同抗肿瘤作用。Annexin V 实验检测 CMTM8 腺病毒与化疗药物表柔比星的协同作用。实验结果证实,一定剂量单纯的 CMTM8 腺病毒和单纯应用化疗药物表柔比星均无明显的致膀胱癌细胞凋亡效果。而这一剂量 CMTM8 腺病毒与表柔比星合用则可显著提高膀胱癌细胞的凋亡率。因此 CMTM8 腺病毒与表柔比星联合应用具有协同抗肿瘤作用。

[0037] 图 12. Western blot 实验检测 CMTM8 及 CMTM8-v2 在癌旁组织中的表达水平明显高于肿瘤组织。随机选取了 4 例因患肾癌而行根治性肾切除术的病例,手术采集新鲜组织标本后进行 western blot 实验检测 CMTM8 及 CMTM8-v2 的蛋白表达情况。结果显示 CMTM8 及 CMTM8-v2 在癌旁组织中的表达水平明显高于肿瘤组织。“N”代表癌旁组织,“Ca”代表肿瘤组织。

[0038] 图 13A. 免疫组化检测 CMTM8 及 CMTM8-v2 和 E-cadherin 在人原发性和转移性肾透明细胞癌中的表达。44 例人肾透明细胞癌病理组织标本,进行 CMTM8 及 CMTM8-v2 和

E-cadherin 免疫组化检测。

[0039] 图 13B-13C. 统计分析 CMTM8 及 CMTM8-v2 在人肾透明细胞癌组织中的表达情况。对 44 例人肾透明细胞癌病理组织标本的 CMTM8 及 CMTM8-v2 和 E-cadherin 免疫组化检测进行了统计分析。从分析结果中可以看到, CMTM8 及 CMTM8-v2 在高度恶性肾癌组织中表达多呈弱阳性或阴性表达, 而随着肿瘤恶性程度的降低, CMTM8 及 CMTM8-v2 在肿瘤组织中的表达水平呈较强阳。正上肾小管 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平呈强阳性。

[0040] 图 14A-14C. CMTM8 及 CMTM8-v2 在人肾癌组织中的表达与生存相关性的统计分析。进行免疫组化实验后, 采用 Kaplan-Meier 生存分析, 结果显示患者生存率与 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平呈明显相关(log-rank test, $P=0.011$)(图 14C, 图 14A 中表 5)。为进一步验证实验结果, 采用 COX 多因素分析对实验结果进行检验, 结果证实 CMTM8 及 CMTM8-v2 是膀胱癌患者生存率的独立影响因素(HR, 0.463; 95%CI, 0.271-0.789; $P=0.005$)(图 14B 中表 6)。

具体实施方式

[0041] 以下针对前述的发明内容就不同的实施方式并结合附图进行较为详细的描述。应当理解, 这些描述以及后面所列的具体实施例只是用来进一步说明本发明的技术内容, 而不是用来限制本发明的保护范围。

[0042] 根据本发明的一种实施方式, 本发明提供了一种选自如下 (a)、(b)、(c) 或 (d) 所示的蛋白或其免疫性片段在膀胱癌和肾癌中的应用:

[0043] (a) 由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白;

[0044] (b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与 (a) 具有相同功能的由 (a) 衍生的蛋白;

[0045] (c) 由 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列组成的蛋白; 或

[0046] (d) 在 (c) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与 (c) 具有相同功能的由 (c) 衍生的蛋白。

[0047] 如 SEQ ID NO:2 所述的氨基酸序列为本发明的 CMTM8 蛋白序列, 共 173 个氨基酸。CMTM8 基因为编码本发明的 SEQ ID NO:2 的多核苷酸序列, 其可以为 SEQ ID NO:2 所示氨基酸的编码序列, 除了上述氨基酸序列的编码序列之外, 还可以包括非编码序列, 例如内含子、编码序列 5' 或 3' 端的非编码序列等在膀胱癌和肾癌中的应用。所述多核苷酸序列可以是 DNA 或 RNA, 其中 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 以及合成的 DNA。其中优选的基因为 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列, 该序列全长 1185 个核苷酸, 其包含编码 CMTM8 蛋白的序列(例如编码序列(CDS:核苷酸 295-813)和 5' 非编码区(核苷酸 1-294)及 3' 非编码区(核苷酸 814-1185)。或者, 更优选一种分离的核苷酸序列在膀胱癌和肾癌中的应用, 其只包含 CMTM8 蛋白的编码序列, 例如 SEQ ID NO:1 所示的编码序列:核苷酸 295-813。CMTM8-v2 蛋白为如 SEQ ID NO:4 所述的氨基酸序列, 其编码 115 个氨基酸。CMTM8-v2 为 CMTM8 的可变剪切体, 其中剪切掉了第二个外显子, 即 CMTM8-v2 (SEQ ID NO:4)缺少 CMTM8 (SEQ ID NO:2)的氨基酸残基 50-107。所述 CMTM8-v2 编码基因优选为 SEQ ID NO:4 所示氨基酸的编码序列, 例如本发明 SEQ ID NO:3 所示的多核苷酸序列, 其相当于 SEQ ID NO:1 的核苷酸 295-441 加 616-813, 即缺少 SEQ ID NO:1 的编码序列(CDS:核苷酸 295-813)中的核

苷酸 442 — 615。

[0048] 本领域普通技术人员已知,本发明 CMTM8 的核苷酸序列可以完全相同于如 SEQ ID NO:1 所示的编码序列, CMTM8-v2 的核苷酸序列可以完全相同于如 SEQ ID NO:3 所示的编码序列,也可以由于遗传密码的简并性,不完全等同于上述核苷酸的编码序列。例如,根据每个具体的原核宿主或者真核宿主所使用的密码子的频率不同,可以选择相应的密码子,从而提高所述的多核苷酸在相应的宿主中表达效率。也可以为了获得比天然的核苷酸序列具有更好性能的多核苷酸(如更长的半衰期)而转换密码子。本发明的 CMTM8 基因或蛋白的免疫性片段包括本发明的 CMTM8 蛋白的免疫性片段或本发明的 CMTM8 基因的免疫性片段。本发明的 CMTM8 蛋白的免疫性片段可以为 CMTM8 蛋白的任何具有免疫原性的片段,例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 157-173 所示的序列、SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-21 所示的序列、SEQ ID NO:2 的氨基酸 22-42 所示的序列或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 127-143 所示的序列。本发明的 CMTM8 基因的免疫性片段可以为编码所述 CMTM8 蛋白的免疫性片段的核苷酸序列。

[0049] 本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的多核苷酸序列或其免疫性片段可以依据标准的 PCR 扩增技术将 cDNA、mRNA 或者基因组 DNA 作为模板,并选取合适的寡核苷酸引物扩增得到。这样得到核苷酸可以克隆进合适的载体中,然后利用在所述载体中的复制得到。也可以通过标准 DNA 合成技术得到,例如,使用可以按本领域熟知的固相亚磷酸酰胺三酯法在 DNA 合成仪上合成。

[0050] 本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的蛋白或其免疫性片段可以通过常规方法获得,例如通过用 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或其免疫性片段转化宿主细胞并在被转化的宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用适当的方法(如温度变动或化学特质诱导)诱导启动子,然后继续培养。培养完成后,可用离心法收集细胞,并用任何已知的方法,如冻融法、超声处理法、溶菌酶溶解法或机械破碎法破碎细胞。可以用各种已知的方法从宿主细胞培养物中回收和纯化本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的蛋白或其免疫性片段,这些方法包括硫酸铵或乙醇沉淀法、酸萃取法、超滤法、离子交换层析法、磷酸纤维素层析法、疏水相互作用层析法、凝胶过滤法、亲和层析法及高压液柱层析法。

[0051] 根据本发明的另外一种实施方式,本发明提供了 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在诱导膀胱癌和肾癌细胞凋亡中的应用。细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是一种在特定时空主动发生的、受基因严密调控的细胞逐渐死亡的现象。细胞凋亡在肿瘤发生、肿瘤治疗、胚胎发育、免疫反应、神经系统发育、组织代谢过程中有重要的作用。由于本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段能够诱导膀胱肿瘤细胞和肾肿瘤细胞凋亡,所以本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段可以广泛用于临床膀胱肿瘤和肾肿瘤的治疗。

[0052] 细胞凋亡异常是肿瘤发生、发展的重要因素,因此通过诱导肿瘤细胞凋亡来清除肿瘤已成为当前膀胱癌和肾癌肿瘤治疗的一个新的重要策略。在本发明的一个实施例中,证明了本发明的 CMTM8 在膀胱癌肿瘤细胞中的表达能够诱导肿瘤细胞的凋亡,从而本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 或其免疫性片段可用于治疗和 / 或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤。

[0053] 根据本发明的其他一种实施方式,本发明提供了 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在制备治疗和 / 或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中的

应用。本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在膀胱肿瘤和肾肿瘤细胞的表达可以抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞的凋亡,而且 CMTM8 及 CMTM8-v2 在膀胱癌和肾癌组织中的表达水平显著低于正常膀胱组织和肾组织。因此,本发明的 CMTM8 及 CMTM8-v2 基因为新的肿瘤抑制基因。从而,本发明的 CMTM8 及 CMTM8-v2 基因或蛋白或它们的免疫性片段可用于制备治疗和 / 或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物。本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因和蛋白可以以基因和蛋白的形式直接包含在用于治疗和 / 或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中利用其瞬时表达产物进行治疗,也可以以包含在表达载体中的形式包含在用于治疗和 / 或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中利用瞬时和稳定的表达产物进行治疗。

[0054] 本发明还提供一种用于治疗和 / 或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物组合物,该药物组合物含有 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,和一种或多种药用赋形剂或药用载体。药用赋形剂或药用载体指无毒固态、半固态或液态填充剂、稀释剂、包囊材料或其他制剂辅料。所述药物组合物适于胃肠外、舌下、脑池内、阴道内、腹膜内、直肠内、颊内、肿瘤内或表皮给药。胃肠外给药包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下、关节内注射和输注。适于胃肠外给药的药物组合物包括无菌水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液,以及用于在临使用前在无菌可注射溶液或分散液中配制的粉末。适宜的水性或非水性载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、羧甲基纤维素、植物油和可注射的有机酯如油酸乙酯。这些组合物还可以含有防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂等辅料。加入等渗剂如糖类、氯化钠等可能是有利的。表皮给药包括在皮肤、黏膜上、以及在肺和眼的表面给药。这样的药物组合物包括粉剂、软膏、滴剂、透皮贴剂、离子电渗疗法装置以及吸入剂等。直肠或阴道给药的组合物优选为栓剂,它可以通过将本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 序列或其免疫性片段或含有 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 多核苷酸序列或其免疫性片段的载体与适宜的非刺激性药用赋形剂或药用载体如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合制备,所述药用赋形剂或药用载体在室温为固态,在体温下为液态,因此在直肠或阴道腔内熔化并释放出活性化合物。

[0055] 当以上述或其他方式进行治疗时,治疗有效量的本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 可以是本发明 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫片段的纯净形式、药用盐形式,或选择性与药用赋形剂组合。对膀胱肿瘤和肾肿瘤患者的具体治疗有效剂量取决于许多因素,包括所治疗的疾病和其严重程度;所用具体化合物的活性;所用的特定组合物;患者的年龄、体重、性别、饮食和一般健康状况;给药时间;给药途径;具体化合物的排泄速度;治疗的持续时间联合或同时服用的其他药物等,对于本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 来说,其治疗有效量一般为 $0.1 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{人}/\text{天}$ 。

[0056] 本发明还提供检测 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫片段的表达的试剂在制备用于检测膀胱肿瘤和肾肿瘤的组合中的应用。所述试剂可以为蛋白、核酸、碳水化合物等,优选为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA (siRNA)。

[0057] 本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 的基因或蛋白或它们的免疫片段可以作为膀胱肿瘤和肾肿瘤诊断指标。因此,可以利用限制性片段长度多态性分析(RFLP)、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、荧光原位杂交法(FISH)等方法或它们的组合,检测体内因本发明的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 表达不足或过量所致的病理状态。同样,也可以

使用本发明 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 蛋白的抗体,通过放射性免疫分析、竞争性结合法、Western 印迹分析法或酶联免疫吸附法(ELISA)达到相同的目的。

[0058] 实施例

[0059] 下面的实施例用来针对本发明的实施进行说明。应理解,本发明的范围不受这些具体实施例的限制。除非另有说明,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。

[0060] 实施例 1 膀胱癌手术蜡块 CMTM8 及 CMTM8-v2 免疫组织化学检测及统计学分析

[0061] 一、方法:

[0062] 将收集的病理组织蜡块进行切片,石蜡切片的厚度为 $4\mu\text{m}$,然后脱蜡。脱蜡:组织芯片置于二甲苯中浸泡 20 分钟,换新鲜二甲苯重复一次;水化:将脱蜡后的组织切片于 100%乙醇中浸泡 5 分钟 x2 次,95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各浸泡 3 分钟 x1 次;抗原修复:抗原修复液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,将抗原修复液微波高火加热至沸腾,将切片放入,再用微波高火加热 5 分钟,补加蒸馏水恢复体积后再用微波高火加热 5 分钟,自然冷却至室温;去除内源性过氧化物酶:新鲜配置 3% H_2O_2 ,滴片,室温下避光孵育 10 分钟;PBS 洗 5 分钟 x3 次,不时晃动;封闭:用 10% 正常羊血清 PBS 封闭液室温封闭 20 分钟;一抗反应:滴片,加 1:100 的 CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 兔多抗(以封闭液稀释), 4°C 过夜反应,以同样稀释度的正常兔 IgG 作为阴性对照;PBS 洗 5 分钟 x3 次,不时晃动;二抗反应:HRP-抗兔 IgG 抗体 1:1000 PBS 稀释, 37°C 反应 30 分钟;PBS 洗 5 分钟 x3 次,不时晃动;DAB 显色,滴片,镜下观察反应结果,苏木精复染细胞核后,中性树胶封片。由两位病理科大夫分别评定染色阳性程度,如有评级不一致的,由两位病理科大夫协商后评定。

[0063] 所有数据均采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。正常膀胱组与膀胱癌组,高级别膀胱癌与低级别膀胱癌,不同临床 TNM 分期之间均采用卡方检验进行统计学分析。采用 Kaplan-Meier 生存分析检验患者生存与 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平之间的相关性,COX 多因素回归分析检验 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平是否是膀胱癌患者生存的独立影响因素。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0064] 二、结果:

[0065] 如图 1 所示, CMTM8 及 CMTM8-v2 的抗体对不同分化程度的膀胱癌组织着色不同,包括癌旁组织,提示不同分化程度的膀胱癌表达不同水平的 CMTM8 及 CMTM8-v2。从切片中可以看出大致趋势:癌旁组织表达 CMTM8 及 CMTM8-v2 水平最高,随着膀胱癌恶性程度增高, CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达量越低。通过对几十例膀胱癌患者的膀胱组织石蜡切片进行统计,结果如图 2A 中表 1 所示,膀胱癌组织中 CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达水平明显低于膀胱癌旁组织,并且如图 2B 所示,恶性程度越高,分化水平越低, CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平越低。通过对膀胱癌切片来源的患者进行生存率统计,结果如图 3A 中表 2 和图 3B 所示, CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达跟患者的生存率呈正相关关系,其中在 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达 ++ 与 - 和 + 比,生存率存在显著差异。

[0066] 实施例 2 膀胱癌细胞系 MGHU-1 和 RT112 免疫细胞化学

[0067] 一、方法:

[0068] 将培养的 MGHU-1 和 RT112 细胞用胰酶消化,制成细胞悬液,注入铺有小玻片的六

孔板中, 37℃ 5%CO₂ 孵育箱中过夜培养。4% 多聚甲醛固定 30 分钟。PBS 洗两次各 5 分钟。3%H₂O₂ 室温封闭 30 分钟, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。滴加正常山羊血清封闭液, 室温 30 分钟。甩去多余液体。滴加 CMTM8 抗体, 浓度 1:600, 4℃ 过夜。PBS 洗三次, 每次 5 分钟。滴加羊抗兔来源二抗, 室温 30 分钟。PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。滴加试剂 SABC, 室温 30 分钟。PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。DAB 显色。蒸馏水洗终止显色。苏木素复染细胞核 2 分钟、盐酸酒精分化。脱水、透明、封片、镜检。

[0069] 二、结果:

[0070] 如图 4 所示, MGHU-1 中 CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达比在 RT112 中低, 且已知 MGHU-1 细胞系的恶性程度高于 RT112 细胞系, 说明, CMTM8 及 CMTM8-v2 在恶性程度较高的细胞系中表达水平较低。

[0071] 实施例 3 CMTM8 及 CMTM8-v2 在膀胱癌细胞系 MGHU-1 和 RT112 中 mRNA 表达水平检测

[0072] 一、方法:

[0073] 应用 RT-PCR 的方法检测膀胱癌细胞系 MGHU-1 和 RT112 的内源性 CMTM8 及 CMTM8-v2。首先, 用 TRIzol™ 试剂提取细胞总 RNA。具体方法如下: 收获对数生长期的细胞, 在 35mm 培养皿中加入 1ml TRIzol™ 试剂, 反复吹打破碎细胞, 并将其转移到 1.5ml 无 RNA 酶的离心管中, 于室温静置 5 分钟, 加入 0.2ml 氯仿, 猛烈振荡 15 秒, 在 4℃ 于不大于 12000g 离心 15 分钟, 收集上层水相, 加入 500 μl 异丙醇来沉淀 RNA, 用 70% 乙醇洗一遍, 于室温干燥后, 将沉淀得到的 RNA 复悬于 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理的 H₂O 中, 通过分光光度计定量后将所得 RNA 溶液用于逆转录。其次, 通过逆转录合成单链 cDNA, 并进行 PCR 扩增, 具体方法如下: 利用 Invitrogen 公司的 SuperScriptII 试剂盒, 用 2 μg 总 RNA 合成单链 cDNA。PCR 反应所用引物序列如表 7 所示, 反应条件如表 8 所示, GAPDH 作为系统内参(对照)。

[0074] 表 7. PCR 反应所用的引物序列

[0075]

	上游引物(从 5'到 3')	SEQ ID NO	下游引物(从 5'到 3')	SEQ ID NO
CMTM8	TGCTGGAAGTCTGAGTAC TTCCG	SEQ ID NO:5	AGAGAGGTACAAGACG AAGGC	SEQ ID NO: 6
GAPDH	tgaaggctcggagtcacggatttggt	SEQ ID NO:7	catgtgggccatgaggtccaccac	SEQ ID NO: 8

[0076] 表 8. PCR 反应条件

[0077]

	预变性	变性	退火	延伸	循环数	进一步延伸
CMTM8	94℃ 4min	94℃ 30s	59℃ 30s	72℃ 40s	30	72℃ 10min
GAPDH	94℃ 4min	94℃ 20s	58℃ 20s	72℃ 30s	25	72℃ 10min

[0078] 二、结果：

[0079] RT-PCR 结果如图 6 所示, MGHU-1 细胞系中的 mRNA 水平的 CMTM8 及 CMTM8-v2 明显低于 RT112 细胞系, 与免疫细胞化学结果一致。

[0080] 实施例 4 CMTM8 及 CMTM8-v2 在膀胱癌细胞系 MGHU-1 和 RT112 蛋白表达水平检测

[0081] 一、方法：

[0082] 将处于对数生长期的 MGHU-1 和 RT112 细胞弃去培养液, 并用冷的 PBS 洗细胞三次, 用裂解液(50mM Tris-HCL, pH7.4, 150mM NaCl, 1%Nonidet P-40, 0.25%脱氧胆酸钠, 1mM EDTA, 2mM Na3VO4, 1mM NaF and Protease Inhibitor Cocktail Tablets)4℃裂解细胞 30 分钟。收获细胞蛋白, 细胞裂解液 18,000g, 20 分钟离心, 上清即为所需总蛋白的裂解液, 以牛血清白蛋白作为标准品, 用 BCA 蛋白测定试剂盒(Pierce, USA)定量总蛋白的浓度。总蛋白上样量 80ug, 用 7.5%SDS-PAGE 胶分离, 并用湿式法将蛋白转到尼龙膜(HybondTM, ECLTM, Amersham Pharmacia, UK)上。已转有蛋白条带的尼龙膜用 5%BSA (用含 0.05%Tween-20 的 TBS-T 配制)室温封闭 1 小时, 用 TBS-T 室温洗膜两遍, 加入用 TBS-T 配制的一抗, 4℃过夜孵育, 次日用 TBS-T 洗膜三次, 10 分钟/次, 加入 Alexa Fluor780 标记的 IgG 二抗, 室温孵育 1.5 小时。用 TBS-T 洗膜三次之后用 LI-COR Infrared Imaging System (Odyssey, Lincoln, NE)扫描成像。

[0083] 二、结果：

[0084] 结果如图 5 所示, MGHU-1 细胞系中 CMTM8 在蛋白水平上表达多于 RT112 细胞系, 结果与 RT-PCR 和免疫细胞化学结果一致。

[0085] 实施例 5 Western blot 检测 CMTM8 腺病毒感染后膀胱癌细胞系 T24 细胞 CMTM8 表达水平

[0086] 一、方法

[0087] 复制缺陷 5 型腺病毒 Ad5-CMTM8、及对照病毒 Ad5-GFP 委托本元正阳公司重组、包装、纯化获得。使用空斑法测定病毒滴度。Ad5-CMTM8 腺病毒表达的蛋白为全基因编码产物。

[0088] 将 T24 细胞培养液中加入 Ad5-CMTM8 或 Ad5-GFP 腺病毒, 37℃孵育箱过夜, 进行细胞裂解。并用冷的 PBS 洗细胞三次, 用裂解液(50mM Tris-HCL, pH7.4, 150mM NaCl, 1%Nonidet P-40, 0.25%脱氧胆酸钠, 1mM EDTA, 2mM Na3VO4, 1mM NaF and Protease Inhibitor Cocktail Tablets)4℃裂解细胞 30 分钟。收获细胞蛋白, 细胞裂解液 18,000xg, 20 分钟离心, 上清即为所需总蛋白的裂解液, 以牛血清白蛋白作为标准品, 用 BCA 蛋白测定试剂盒(Pierce, USA)定量总蛋白的浓度。总蛋白上样量 30ug, 用 8%SDS-PAGE 胶分离, 并用湿式法将蛋白转到尼龙膜(HybondTM, ECLTM, Amersham Pharmacia, UK)上。已转有蛋白条带的尼龙膜用 5%BSA (用含 0.05%Tween-20 的 TBS-T 配制)室温封闭 1 小时, 用 TBS-T 室温洗膜两遍, 加入用 TBS-T 配制的一抗, 4℃过夜孵育, 次日用 TBS-T 洗膜三次, 10 分钟/次, 加入 Alexa Fluor780 标记的 IgG 二抗, 室温孵育 1.5 小时。用 TBS-T 洗膜三次之后用 LI-COR Infrared Imaging System (Odyssey, Lincoln, NE)扫描成像。

[0089] 二、结果：

[0090] 结果如图 7 所示, Ad5-CMTM8 感染 T24 细胞系后能成功上调 CMTM8 的表达。

[0091] 实施例 6 Boyden Chamber 小室趋化实验检测 CMTM8 腺病毒感染的膀胱癌细胞系

T24 细胞的迁移能力

[0092] 一、方法：

[0093] 待 T24 细胞生长铺满培养皿后，在 T24 细胞培养液中加入实施例 5 中制备的 Ad5-CMTM8 腺病毒，以 Ad5 空载体腺病毒感染野生型 T24 细胞作为对照组(Nu11)，培养于 10cm 培养皿，细胞培养 48 小时后，将细胞刮下，大体积 RPMI1640 培养基洗 2 遍，将细胞用 0.1%BSA 的 RPMI1640 重悬至密度为 1×10^6 个细胞/ml。Boyden Chamber 趋化膜孔径为 $10 \mu\text{m}$ ，预包被鼠尾胶原。趋化物 SDF-1 和 EGF 均用 0.1%BSA 的 RPMI1640 稀释至 100ng/ml。将稀释好的趋化物 $25 \mu\text{l}$ 加入趋化小室的下孔，细胞悬液 $50 \mu\text{l}$ 加入趋化小室的上孔。正常细胞培养条件下趋化 5 小时，将迁移至趋化膜趋化物面的细胞染色计数。

[0094] 二、结果：

[0095] 结果如图 8 和图 9 所示，CMTM8 腺病毒感染的 T24 细胞迁移能力明显降低。

[0096] 实施例 7MTT 实验检测 CMTM8 腺病毒感染的膀胱癌细胞系 T24 细胞增殖能力

[0097] 一、方法：

[0098] 将 T24 细胞采用胰酶消化后制成单细胞悬液，以每孔 10000 个细胞的浓度接种到 96 孔板，每孔液体体积为 100ul，平均分成两组，一组加入 Ad5-CMTM8 腺病毒，另外一组加入 Ad5 空载腺病毒(Nu11)作为对照组。置于 37℃ 孵育箱中培养，分别在培养 1 天、2 天、3 天、4 天和 5 天时每组各取一孔加入 MTT 溶液(5mg/ml 用 PBS 配制，pH=7.4)20ul，继续孵育 4h 后，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液。每孔加 100ul 裂解液，振荡 10 分钟，使结晶物充分融解，进行比色。选择 570nm 波长，在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值，记录结果，以小时数做为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

[0099] 二、结果：

[0100] 结果如图 10 所示，在 T24 细胞系中感染 CMTM8 腺病毒可明显抑制 T24 细胞的增值能力。

[0101] 实施例 8CMTM8 腺病毒与化疗药物表柔比星具有协同抗肿瘤作用

[0102] 一、方法：

[0103] 将处于对数生长期的 T24 细胞分为四组：野生型阴性对照 T24 细胞组(Nu11)，CMTM8 腺病毒感染的 T24 细胞组，加入化疗药物表柔比星(Epirubicin)的野生型 T24 细胞组，CMTM8 腺病毒感染的 T24 细胞加化疗药物表柔比星组。表柔比星的浓度为 $0.25 \mu\text{g/ml}$ ，作用时间为 48h。所有实验组均在细胞计数后同时铺板，待加入化疗药物 48h 后同时提取细胞悬液。然后在细胞悬液加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC，轻轻混匀后于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 15 分钟。并加入 $10 \mu\text{l}$ PI 后轻轻混匀于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 5 分钟后进行流式细胞仪分析。

[0104] 二、结果：

[0105] 结果如图 11 所示，单独加入表柔比星可使 T24 细胞系出现部分凋亡，单独感染 CMTM8 腺病毒的 T24 细胞无明显凋亡，如果同时加入表柔比星和感染 CMTM8 腺病毒可以显著增加 T24 细胞系凋亡的数量。

[0106] 实施例 9Western blot 实验检测新鲜肾癌组织标本及癌旁正常肾组织 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平

[0107] 一、方法：

[0108] 手术室收集因肾癌行根治性切除患者手术标本。每例均采集新鲜肿瘤组织和癌旁正常组织。距肿瘤组织边缘大于 5 厘米,病理检测是正常肾组织。所有手术标本均在离体 30 分钟之内采集,并置于液氮中保存。

[0109] 将所有组织标本包括肿瘤组织和癌旁组织,在冰冷的生理盐水中漂洗,出去血液,滤纸拭干,称重,各取 100mg。用眼科剪在冰上剪碎,然后采用匀浆机 12000rpm/min 进行组织匀浆,3 分钟。用裂解液(50mM Tris-HCL, pH7.4, 150mM NaCl, 1%Nonidet P-40, 0.25%脱氧胆酸钠, 1mM EDTA, 2mM Na₃VO₄, 1mM NaF and Protease Inhibitor Cocktail Tablets) 4℃裂解 30 分钟。收获组织蛋白,组织裂解液 18,000xg, 20 分钟离心,上清即为所需总蛋白的裂解液,以牛血清白蛋白作为标准品,用 BCA 蛋白测定试剂盒(Pierce, USA) 定量总蛋白的浓度。总蛋白上样量 30 μg,用 8%SDS-PAGE 胶分离,并用湿式法将蛋白转到尼龙膜(HybondTM, ECLTM, Amersham Pharmacia, UK)上。已转有蛋白条带的尼龙膜用 5%BSA (用含 0.05%Tween-20 的 TBS-T 配制) 室温封闭 1 小时,用 TBS-T 室温洗膜两遍,加入用 TBS-T 配制的一抗,4℃过夜孵育,次日用 TBS-T 洗膜三次,10 分钟/次,加入 Alexa Fluor780 标记的 IgG 二抗,室温孵育 1.5 小时。用 TBS-T 洗膜三次之后用 LI-COR Infrared Imaging System (Odyssey, Lincoln, NE) 扫描成像。

[0110] 二、结果:

[0111] Western blot 结果如图 12 所示,在 4 例患者的标本中,肾癌旁组织(N)中 CMTM8 及 CMTM8-v2 的表达水平明显高于肾癌组织(Ca)。

[0112] 实施例 10CMTM8 及 CMTM8-v2 和 E-cadherin 在正常肾组织、肾透明细胞癌和转移性肾透明细胞癌组织中表达的免疫组织化学检测及统计学分析

[0113] 一、方法:

[0114] 首先将收集的病理组织蜡块进行切片,石蜡切片的厚度为 4 μm,然后脱蜡。脱蜡:组织芯片置于二甲苯中浸泡 20 分钟,换新鲜二甲苯重复一次;再水化:将脱蜡后的组织切片于 100%乙醇中浸泡 5 分钟 x2 次,95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各浸泡 3 分钟 x1 次;抗原修复:抗原修复液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,将抗原修复液微波高火加热至沸腾,将切片放入,再用微波高火加热 5 分钟,补加蒸馏水恢复体积后再用微波高火加热 5 分钟,自然冷却至室温;去除内源性过氧化物酶:新鲜配置 3%H₂O₂,滴片,室温下避光孵育 10 分钟;PBS 洗 5 分钟 x3 次,不时晃动;封闭:用 10% 正常羊血清 PBS 封闭液室温封闭 20 分钟;一抗反应:滴片,加入一抗(CMTM8 及 CMTM8-v2 兔多抗 1:500, E-cadherin1:200) (以封闭液稀释),4℃过夜反应,以同样稀释度的正常兔 IgG 作为阴性对照;PBS 洗 5 分钟 x3 次,不时晃动;二抗反应:HRP-抗兔 IgG 抗体 1:1000PBS 稀释,37℃反应 30 分钟;PBS 洗 5 分钟 x3 次,不时晃动;DAB 显色,滴片,镜下观察反应结果,苏木精复染细胞核后,中性树胶封片。由两位病理科大夫分别评定染色阳性程度,如有评级不一致的,由两位病理科大夫协商后评定。

[0115] 由病理科医生遵循以下 CMTM8 及 CMTM8-v2 和 E-cadherin 的染色评价标准进行染色评价。图片在 200 倍显微镜下采集,CMTM8 和 E-cadherin 的配对图片均来自同一蜡块的连续切片。

[0116] 根据 CMTM8 在肾组织的表达方式和强度,将染色结果分为 4 个级别:3 级为细胞膜完整连续的强阳性染色;2 级为细胞膜完整连续的弱阳性染色,细胞浆染色阴性;1 级为细

胞膜非连续的弱阳性染色,细胞浆染色阳性;0级为仅有细胞浆染色阳性。

[0117] 根据 E-cadherin 在肾组织的表达方式和强度,将染色结果分为 4 个级别:3 级为细胞膜完整连续的强阳性染色;2 级为细胞膜完整连续的弱阳性染色,细胞浆染色阴性;1 级为细胞膜非连续的弱阳性染色,细胞浆染色阳性;0 级为细胞膜和细胞浆染色均为阴性。

[0118] 统计分析:所有数据都采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。通过 Fisher 确切概率法评价组间差异性;通过 Spearman 相关性分析评价相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0119] 二、结果:

[0120] CMTM8 及 CMTM8-v2 和 E-cadherin 在正常肾小管上皮细胞的细胞膜上呈强阳性表达(3 级)。而在肾透明细胞癌组织中,CMTM8 及 CMTM8-v2 和 E-cadherin 在细胞膜表达水平明显降低(2 级或 1 级,图 13A,图 13B 中表 3, $p < 0.001$)。CMTM8 及 CMTM8-v2 表达在高级别和低级别的肾透明细胞癌中也存在明显的差异(图 13B 中表 3, $P=0.024$)。

[0121] 在肾癌肺转移标本中,统计结果显示,CMTM8 及 CMTM8-v2 在原发性肾癌和转移性肾癌中的表达存在显著性差异,具有统计学意义(图 13C 中表 4, $P=0.003$);而且,CMTM8 及 CMTM8-v2 在肾癌肺转移和骨转移标本中的表达差异,也具有统计学意义(图 13B 中表 4, $P=0.020$)。

[0122] 然后通过 Spearman 相关性分析计算相关系数。结果显示,CMTM8 及 CMTM8-v2 和 E-cadherin 均与肾组织分级有显著负相关性(r 值分别为 -0.841 和 -0.732 , $p < 0.001$),而且 CMTM8 及 CMTM8-v2 与 E-cadherin 也具有显著的相关性(r 值为 0.694 , $p < 0.001$)。实施例 11 肾癌手术标本蜡块 CMTM8 及 CMTM8-v2 的免疫组织化学检测及其表达与生存相关性统计学分析

[0123] 一、方法:

[0124] CMTM8 及 CMTM8-v2 的免疫组化检测方法同实施例 10。

[0125] 所有数据均采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。采用 Kaplan-Meier 生存分析检验患者生存与 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平之间的相关性,COX 多因素回归分析检验 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平是否是肾癌患者生存的独立影响因素。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0126] 二、结果:

[0127] Kaplan-Meier 生存分析检验结果显示肾癌组织中 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达呈高水平的患者在生存率方面与肾癌组织中 CMTM8 及 CMTM8-v2 低表达的患者的生存率存在显著性的差异($P=0.011$)(图 14A 中表 5、图 14C)。COX 多因素回归分析结果显示,CMTM8 及 CMTM8-v2 表达水平是肾癌患者生存期的独立影响因素(HR, 0.463 ;95%CI, $0.271-0.789$; $P=0.005$)(图 14B 中表 6)。

[0128] 实施例 12 抗 CMTM8 及 CMTM8-v2 蛋白的兔多抗制备及其特异性

[0129] 一、方法:

[0130] 由杭州中肽公司按照标准方法化学合成 CMTM8 及 CMTM8-v2 的四段肽段各 10mg,其中 5mgKLH 偶联,5mg 裸肽。肽的纯度都达到了 70% 以上,四段肽段的序列分别如表 9 所示:

[0131] 表 9

[0132]

肽段 1	Ala-Gly-Asn-Thr-Tyr-Phe-Ser-Phe-Ile-Ala-Trp-Arg-Ser-Arg-Thr-Ile-Gln-Cys	SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列 157~173 (SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 99~115), 末尾加上 Cys
肽段 2	Met-Glu-Glu-Pro-Gln-Arg-Ala-Arg-Ser-His-Thr-Val-Thr-Thr-Thr-Ala-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-Cys	SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 1~21, 末尾加上 Cys
肽段 3	Asn-Phe-Ser-Thr-Ser-Ser-Ser-Ser-Phe-Ala-Tyr-Asp-Arg-Glu-Phe-Leu-Arg-Thr-Leu-Pro-Gly-Cys	SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 22~42, 末尾加上 Cys
肽段 4	Ala-Ser-Ser-Val-Ser-Pro-Glu-Arg-Asp-Ser-His-Asn-Phe-Asn-Ser-Trp-Ala-Cys	SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列 127~143 (SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 69~85), 末尾加上 Cys

[0133] 进行免疫前,将四条 KLH 偶联的肽段用 5ml 双蒸水稀释成浓度为 1mg/ml,分装, -70℃ 保存备用。本发明利用混合免疫的方法制备多抗,免疫的具体过程如下:①选择雄性兔子两只;②四条肽各 100 μg 混合,共 400 μg,将这 400 μg 混合肽与弗氏完全佐剂以 1:1 的比例混匀,多点注射兔子的足蹠部和背部皮下;③两周后加强免疫,四条肽各 100 μg 混合,共 400 μg,将这 400 μg 混合肽与弗氏不完全佐剂以 1:1 混匀,仅背部皮下多点注射。10-14 天后可以试血,用 ELISA 检测抗体效价。要是抗体效价不够高的话,两周后可以再次加强免疫,具体方法同第一次加强免疫。

[0134] 本发明采用直接 ELISA 的方法检测抗体的效价,具体方法如下:

[0135] (1) 抗原包被:①四条裸肽用双蒸水分别稀释至 10mg/ml,分装冻存备用;②混合四条裸肽,用包被液 (Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加双蒸水至 1000ml, pH9.6) 将混合裸肽稀释至 1μg/ml;③每孔 100ul (相当于每孔 100ng), 37℃ 包被 4 个小时;④用 PBS-T (0.5% Tween-20) 洗包被好的酶标板三次;⑤ 1%BSA 37℃ 封闭 4 小时,拍干, -20℃ 备用。

[0136] (2) 检测:①用抗体稀释液 (PBS-T+0.3%BSA) 将抗血清按照不同的滴度稀释 (如 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ……), 每孔 100ul, 37℃ 反应 2 小时;② PBS-T 洗三遍;③加 50 μl / 孔 HRP 偶联的抗兔二抗 (抗体稀释液, 1:5000), 37℃ 反应 1 小时;④ PBS-T 洗三遍;⑤每孔 50 μl 显色液 (5ml 显色缓冲液, 1 μl H_2O_2 , 0.5 μg OPD 粉末) 显色。显色缓冲液的配方是: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.84g; 柠檬酸, 0.51g; 加双蒸水至 100ml;⑥用酶标仪 490nm 读数。

[0137] 二、结果:

[0138] 因抗体制备免疫的肽段为 CMTM8 及 CMTM8-v2 共有的序列,因此获得抗体既能识别 CMTM8 也能识别 CMTM8-v2。ELISA 检测结果显示, CMTM8 或其可变剪切体 CMTM8-v2 多肽免疫产生的多抗效价都达到了 1×10^6 以上。进一步,将 CMTM8 及 CMTM8-v2 兔多抗血清,经实施例 11 所示 4 条肽段各 2mg 偶联溴化氰活化的 Sepharose 4B 的亲和层析柱纯化后用于

Western 印迹检测和免疫组织化学分析。

[0139] 本文通过一些实施方式和具体的实施例对本发明进行了说明,而且还针对许多细节进行了描述。对于本领域技术人员而言,本发明可以通过采用一些其它的具体实施方式来实现,也可以在不偏离本发明主旨的情况下针对所披露的内容进行调整和变化。本发明的内容应当包括针对本文所披露内容的调整或变化,或者说应当包括由所附权利要求书所定义的以及与之等同的范围。

[0001]

序 列 表

110 北京大学

120 一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用

130 P131356CN1

160 15

170 PatentIn version 3.1

210 1

211 1185

212 DNA

213 智人(Homo sapiens)

220

221 CDS

222 (295)..(813)

400 1

ggcctccacc gccttccccg getgcccggc agcctcccct cgetegetct cctcttcctc 60

tagggcccca gcgcagctcg ggagcccgcg caccgaggcg ctaggggcac cgcgcactag 120

agggacaccc gccgcgctg gacagccccc ggcgggcgcc cccctcgac ctcctgcccc 180

gcgcggggcg cgtcccccct ccccgccct gtgtccccag ggcgagggc cgcgcgtcca 240

gccccagacc cgcgggggtc cctggggaag cgcagcccg gcagtggctc gacg atg 297
Met
1gag gag cag cag cgc gcc cgc tcg cac aca gtc acc acc acc gcc agc 345
Glu Glu Pro Gln Arg Ala Arg Ser His Thr Val Thr Thr Thr Ala Ser
5 10 15tcc ttc gca gag aac ttc tcc acc agc agc agc agc ttc gcc tac gac 393
Ser Phe Ala Glu Asn Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ala Tyr Asp
20 25 30cgg gag ttc ctc cgc acc ctg ccc gcc ttc ctc atc gtg gcc gag atc 441
Arg Glu Phe Leu Arg Thr Leu Pro Gly Phe Leu Ile Val Ala Glu Ile
35 40 45gtt ctg ggg ctg ctg gta tgg acg ctt att gct gga act gag tac ttc 489
Val Leu Gly Leu Leu Val Trp Thr Leu Ile Ala Gly Thr Glu Tyr Phe
50 55 60 65cgg gtc ccc gca ttt gcc tgg gtc atg ttt gta gct gta ttt tac tgg 537
Arg Val Pro Ala Phe Gly Trp Val Met Phe Val Ala Val Phe Tyr Trp
70 75 80gtc ctc acc gtc ttc ttc ctc att atc tac ata aca atg acc tac acc 585
Val Leu Thr Val Phe Phe Leu Ile Ile Tyr Ile Thr Met Thr Tyr Thr
85 90 95

[0002]

agg att ccc cag gtg ccc tgg aca aca gtg ggc ctg tgc ttt aac ggc Arg Ile Pro Gln Val Pro Trp Thr Thr Val Gly Leu Cys Phe Asn Gly 100 105 110	633
agt gcc ttc gtc ttg tac ctc tet gcc get gtt gta gat gca tct tcc Ser Ala Phe Val Leu Tyr Leu Ser Ala Ala Val Val Asp Ala Ser Ser 115 120 125	681
gtc tcc cct gag agg gac agt cac aac ttc aac agc tgg gcg gcc tca Val Ser Pro Glu Arg Asp Ser His Asn Phe Asn Ser Trp Ala Ala Ser 130 135 140 145	729
tcg ttc ttt gcc ttc ctg gtc acc atc tgc tac gct gga aat aca tat Ser Phe Phe Ala Phe Leu Val Thr Ile Cys Tyr Ala Gly Asn Thr Tyr 150 155 160	777
ttc agt ttt ata gca tgg aga tcc agg acc ata cag tgatttacca Phe Ser Phe Ile Ala Trp Arg Ser Arg Thr Ile Gln 165 170	823
ttttgataat taaaaggaaa aaaaaaggaa gactctcact gtaaaacag ctgtaggtat	883
aatgtatatt ccagagaat tgtatttaac taattaatgt tttttatatt cttaaatattg	943
ctcacaaatt gtggtttgtt acaattaaac tggatactta ttgcaaagt gttgtagctt	1003
ataatgaact cttaagtatc ttattaatgt attaatgtct tcatagatca tatittctta	1063
gacaatgttt aatagataa attgctaata ttgagaatgt gtcaagtttg taaacctaac	1123
ttttaagatg ccagattctt ttttgattaa atgttgcaaa atccccaaaa aaaaaaaaaa	1183
aa	1185
210 2	
211 173	
212 PRT	
213 智人	
400 2	
Met Glu Glu Pro Gln Arg Ala Arg Ser His Thr Val Thr Thr Thr Ala 1 5 10 15	
Ser Ser Phe Ala Glu Asn Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ala Tyr 20 25 30	
Asp Arg Glu Phe Leu Arg Thr Leu Pro Gly Phe Leu Ile Val Ala Glu 35 40 45	
Ile Val Leu Gly Leu Leu Val Trp Thr Leu Ile Ala Gly Thr Glu Tyr 50 55 60	
Phe Arg Val Pro Ala Phe Gly Trp Val Met Phe Val Ala Val Phe Tyr 65 70 75 80	
Trp Val Leu Thr Val Phe Phe Leu Ile Ile Tyr Ile Thr Met Thr Tyr 85 90 95	

[0003]

Thr Arg Ile Pro Gln Val Pro Trp Thr Thr Val Gly Leu Cys Phe Asn
 100 105 110
 Gly Ser Ala Phe Val Leu Tyr Leu Ser Ala Ala Val Val Asp Ala Ser
 115 120 125
 Ser Val Ser Pro Glu Arg Asp Ser His Asn Phe Asn Ser Trp Ala Ala
 130 135 140
 Ser Ser Phe Phe Ala Phe Leu Val Thr Ile Cys Tyr Ala Gly Asn Thr
 145 150 155 160
 Tyr Phe Ser Phe Ile Ala Trp Arg Ser Arg Thr Ile Gln
 165 170

210 3
 211 348
 212 DNA
 213 智人

220
 221 CDS
 222 (1).. (348)

400 3
 atg gag gag ccg cag cgc gcc cgc tcg cac aca gtc acc acc acc gcc 48
 Met Glu Glu Pro Gln Arg Ala Arg Ser His Thr Val Thr Thr Thr Ala
 1 5 10 15
 agc tcc ttc gca gag aac ttc tcc acc agc agc agc agc ttc gcc tac 96
 Ser Ser Phe Ala Glu Asn Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ala Tyr
 20 25 30
 gac cgg gag ttc ctc cgc acc ctg ccc ggc ttc ctc atc gtg gcc gag 144
 Asp Arg Glu Phe Leu Arg Thr Leu Pro Gly Phe Leu Ile Val Ala Glu
 35 40 45
 atc ggc ctg tgc ttt aac ggc agt gcc ttc gtc ttg tac ctc tct gcc 192
 Ile Gly Leu Cys Phe Asn Gly Ser Ala Phe Val Leu Tyr Leu Ser Ala
 50 55 60
 gct gtt gta gat gca tct tcc gtc tcc cct gag agg gac agt cac aac 240
 Ala Val Val Asp Ala Ser Ser Val Ser Pro Glu Arg Asp Ser His Asn
 65 70 75 80
 ttc aac agc tgg gcg gcc tca tcg ttc ttt gcc ttc ctg gtc acc atc 288
 Phe Asn Ser Trp Ala Ala Ser Ser Phe Phe Ala Phe Leu Val Thr Ile
 85 90 95
 tgc tac gct gga aat aca tat ttc agt ttt ata gca tgg aga tcc agg 336
 Cys Tyr Ala Gly Asn Thr Tyr Phe Ser Phe Ile Ala Trp Arg Ser Arg
 100 105 110
 acc ata cag tga 348
 Thr Ile Gln
 115

[0004]

210 4
 211 115
 212 PRT
 213 智人

400 4

Met Glu Glu Pro Gln Arg Ala Arg Ser His Thr Val Thr Thr Thr Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Phe Ala Glu Asn Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ala Tyr
 20 25 30

Asp Arg Glu Phe Leu Arg Thr Leu Pro Gly Phe Leu Ile Val Ala Glu
 35 40 45

Ile Gly Leu Cys Phe Asn Gly Ser Ala Phe Val Leu Tyr Leu Ser Ala
 50 55 60

Ala Val Val Asp Ala Ser Ser Val Ser Pro Glu Arg Asp Ser His Asn
 65 70 75 80

Phe Asn Ser Trp Ala Ala Ser Ser Phe Phe Ala Phe Leu Val Thr Ile
 85 90 95

Cys Tyr Ala Gly Asn Thr Tyr Phe Ser Phe Ile Ala Trp Arg Ser Arg
 100 105 110

Thr Ile Gln
 115

210 5
 211 21
 212 DNA
 213 人工序列

220
 223 引物

400 5
 tgctggaact gagtacttcc g

21

210 6
 211 21
 212 DNA
 213 人工序列

220
 223 引物

400 6
 agagaggtac aagacgaagg c

21

210 7
 211 26

[0005]

212	DNA	
213	人工序列	
220		
223	引物	
400	7	
tgaaggtcgg agtcaacgga tttggt		26
210	8	
211	24	
212	DNA	
213	人工序列	
220		
223	引物	
400	8	
catgtgggcc atgaggtcca ccac		24

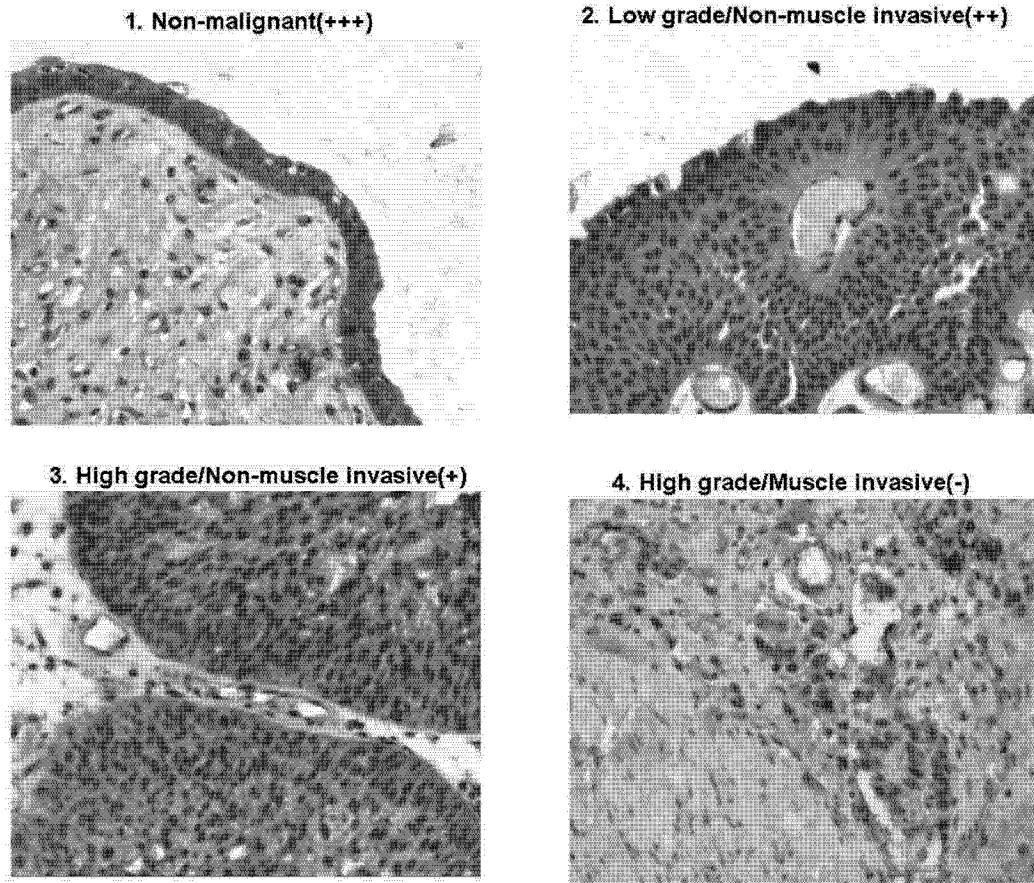


图 1

表 1. CMTM8 及 CMTM8-v2 在人膀胱癌组织中表达的统计分析

		Staining Intensity				p value
		-	+	++	+++	
CMTM8	Non-malignant	0	1	3	4	0.008
	Malignant	7	12	5	2	
	Ta/T1	0	7	5	1	0.043 vs normal
	T2/T3	7	5	0	1	0.001 vs normal 0.001 vs Ta/T1
	Low-grade	0	6	2	2	0.099 vs normal
	High-grade	7	6	3	0	0.001vs normal 0.01 vs low grade

图 2A

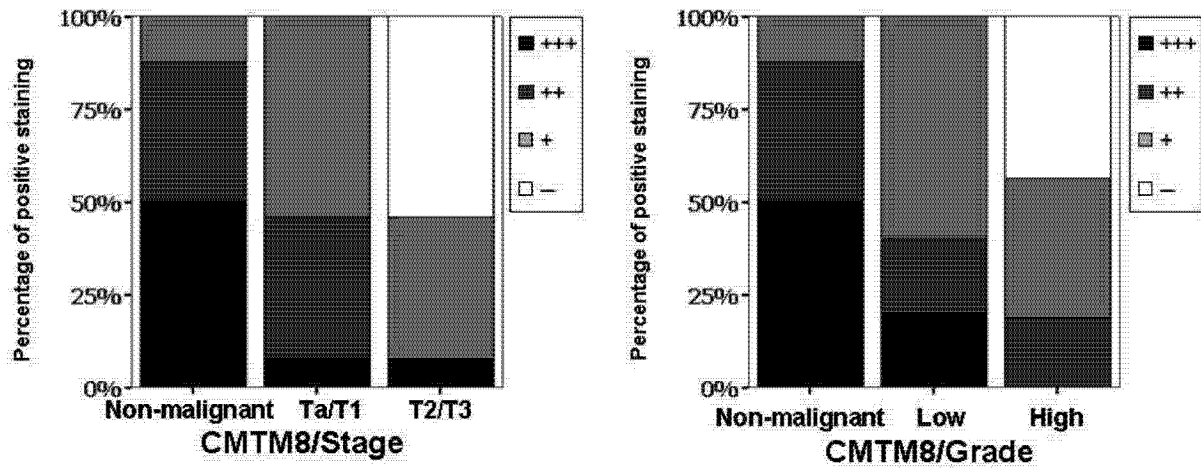


图 2B

表 2. 用于 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达与患者生存率之间的关系统计的病例特征

Criteria	n (%)
Sex	
Men	65 (76.20%)
Women	20 (23.80%)
Surgical	
TURBt	59 (70.24%)
partial cystectomy	11 (13.10%)
radical cystectomy	14 (16.67%)
Recurrence	
Yes	19 (22.62%)
No	65 (77.38%)
Multiplicity	
Single	33 (39.29%)
Multiple	51 (60.71%)
TNM	
Ta	2 (2.38%)
T1	49 (58.33%)
T2	21 (25.00%)
T3	9 (10.71%)
T4	3 (3.57%)
CMTM8	
-	22 (26.19%)
+	37 (44.05%)
++	22 (26.19%)
+++	3 (3.57%)

图 3A

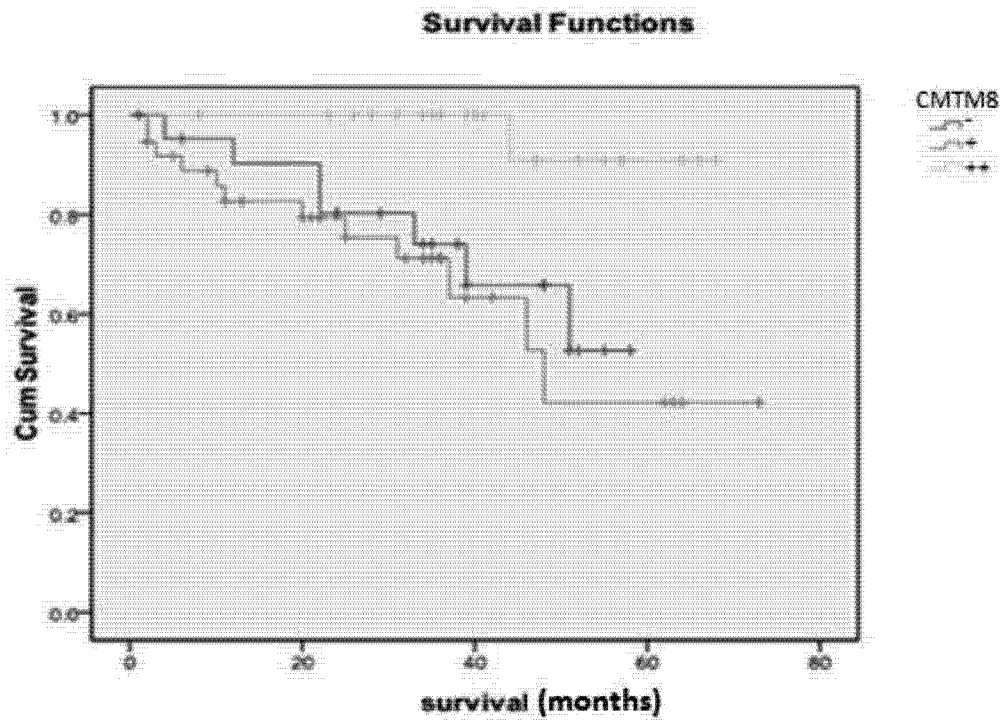
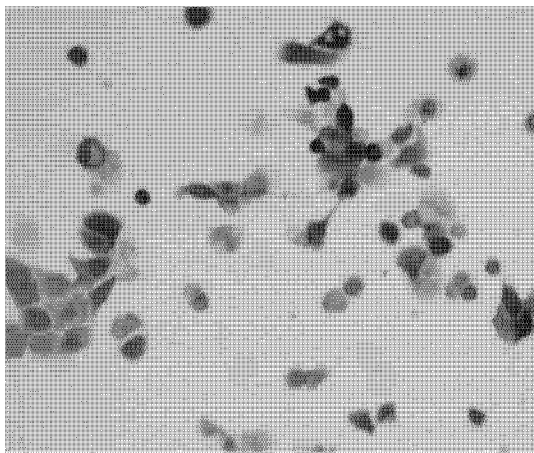
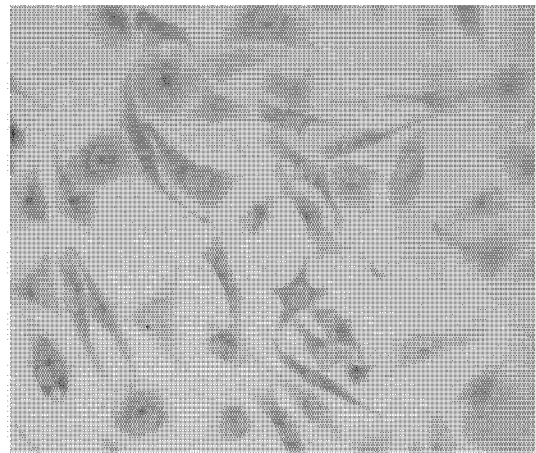


图 3B



RT112



MGH-U1

图 4

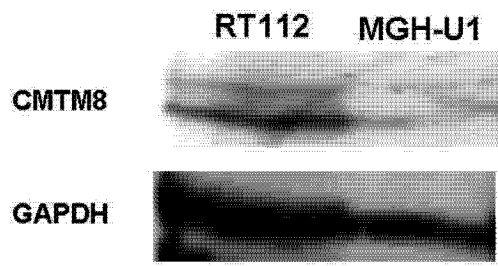


图 5

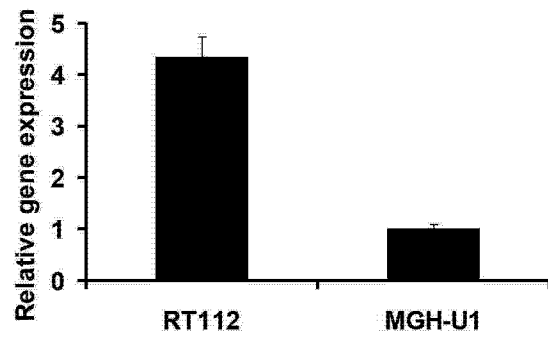


图 6

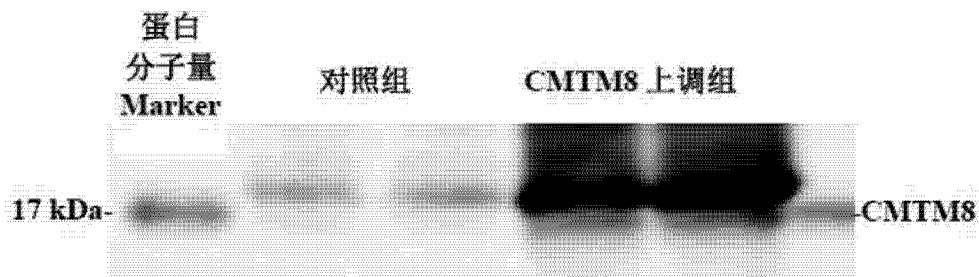


图 7

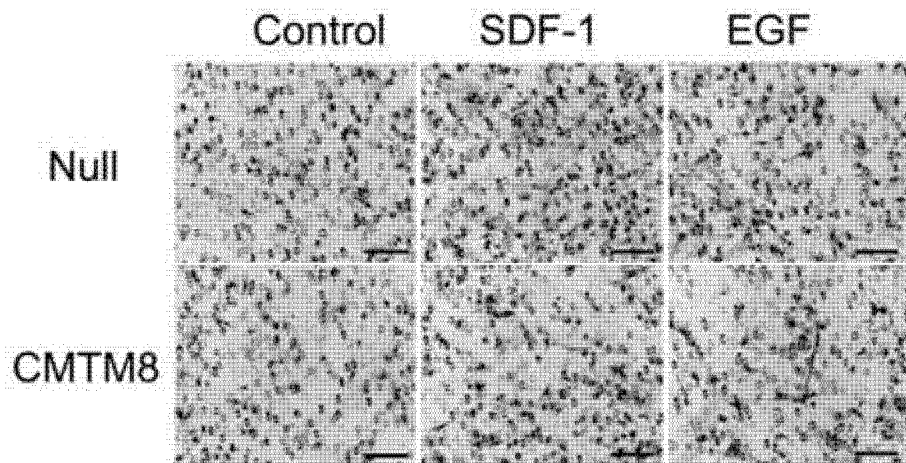


图 8

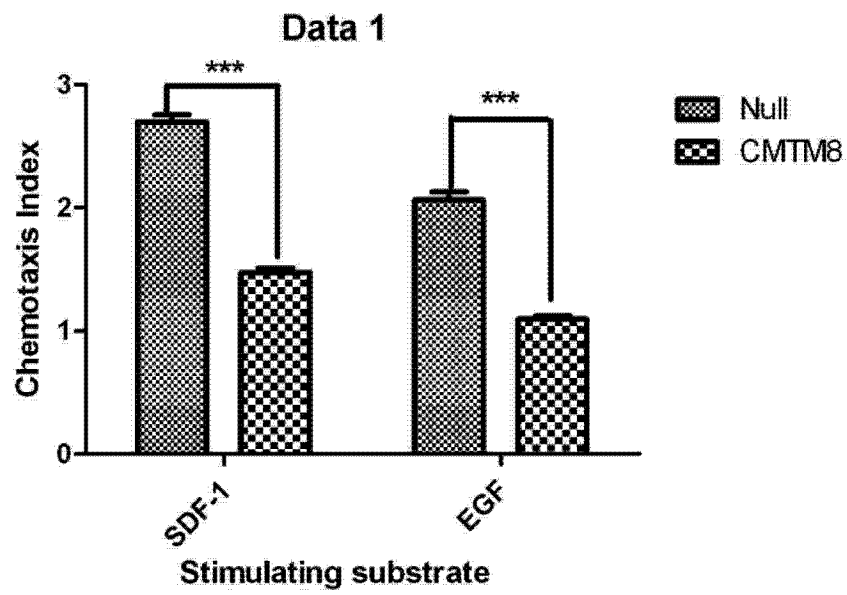


图 9

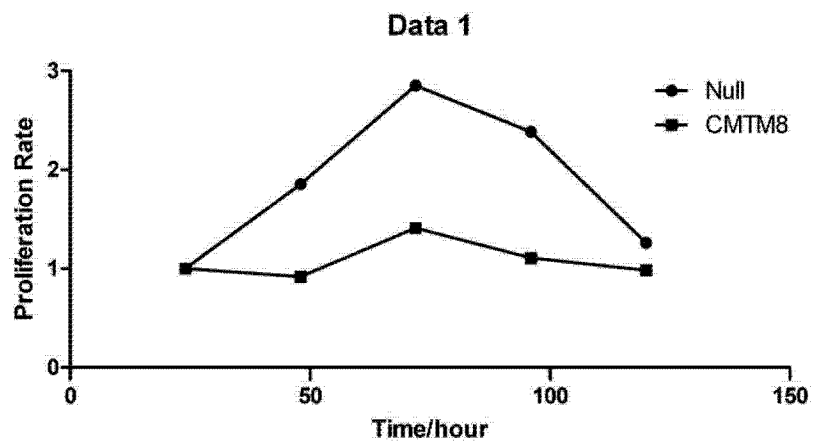


图 10

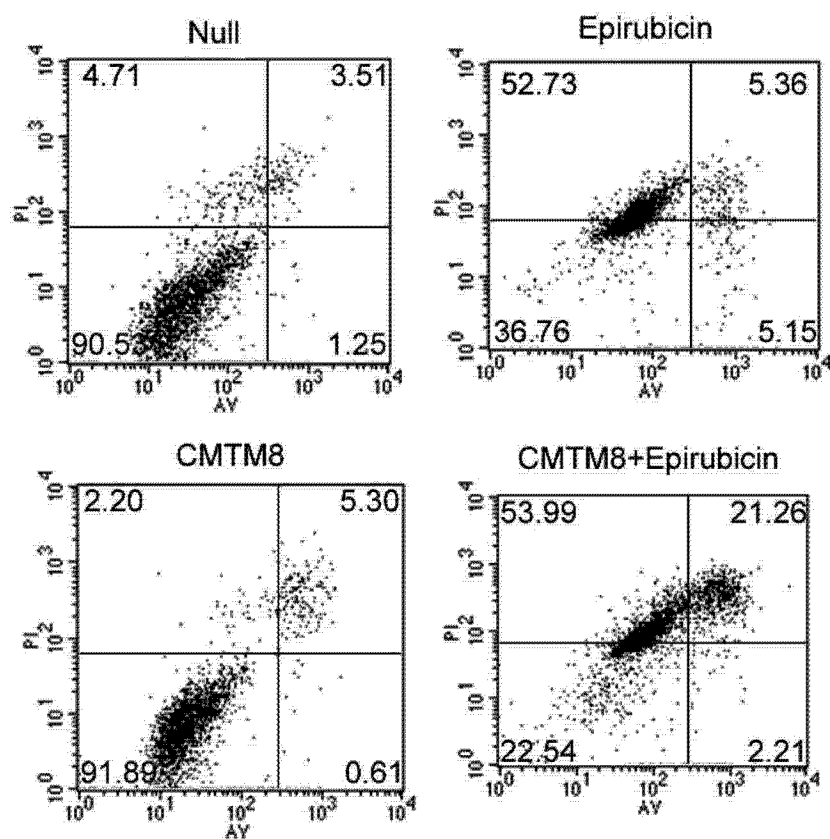


图 11

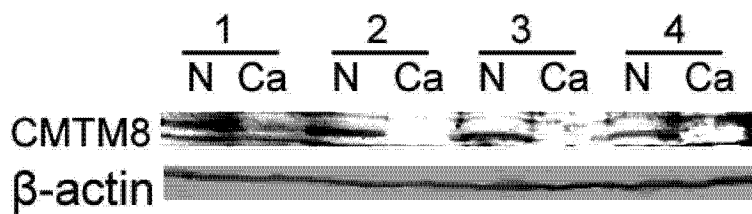


图 12

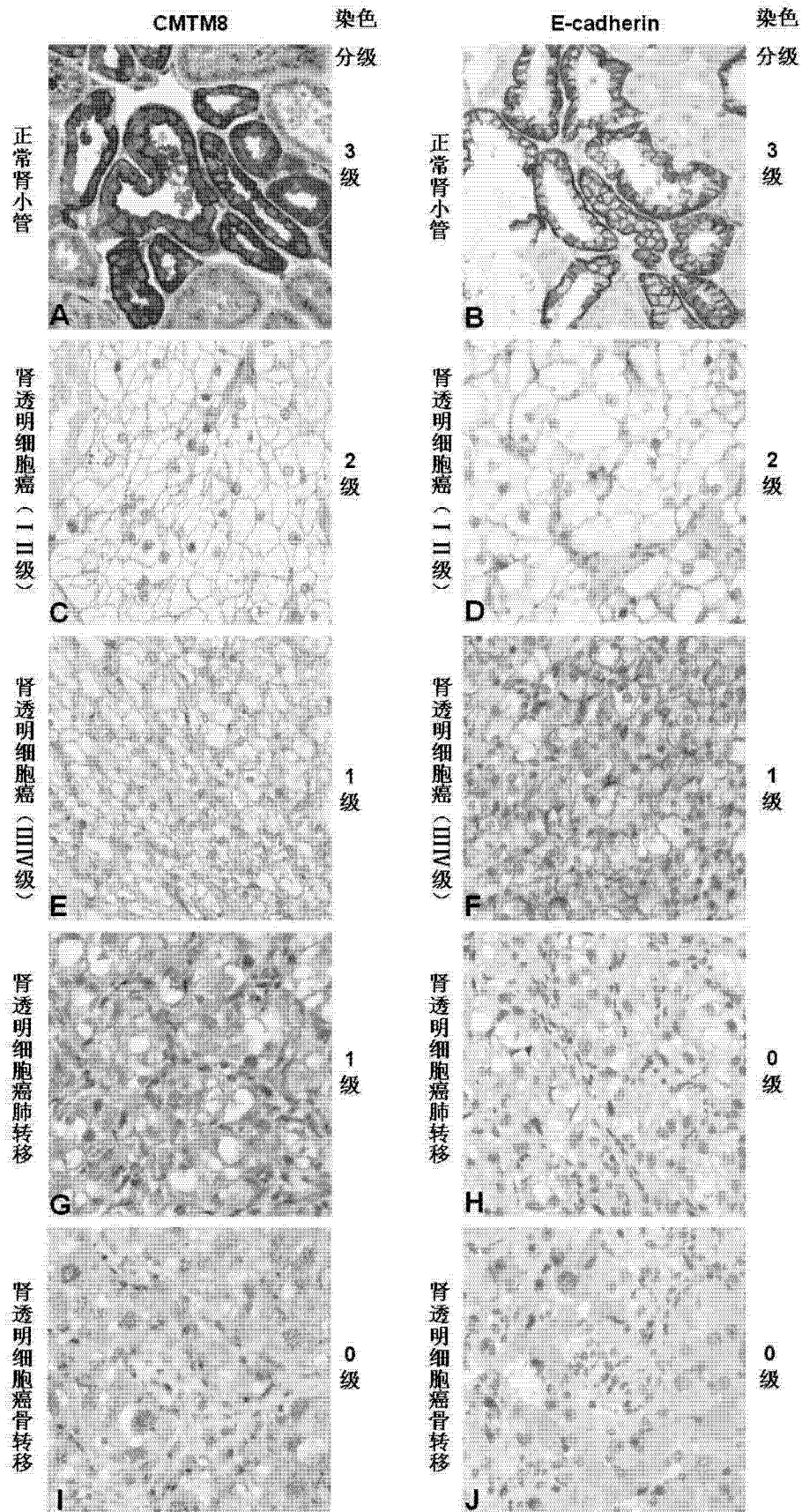


图 13A

表3. CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在正常肾组织和肾透明细胞癌组织中的表达

		染色分级				p值
		0级	1级	2级	3级	
CMTM8	正常肾小管	0	0	0	8	p<0.001*
	原发性肾癌	2	8	7	0	
	肾癌 I -II 级	0	2	6	0	P=0.024*
	肾癌III-IV级	2	6	1	0	
E-cadherin	正常肾小管	0	0	0	8	p<0.001*
	原发性肾癌	0	7	8	2	
	肾癌 I -II 级	0	2	6	0	P=0.081
	肾癌III-IV级	0	5	2	2	

*p<0.05, 有统计学意义。

图 13B

表4. CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在原发性和转移性肾透明细胞癌组织中的表达

		染色分级				p值
		0级	1级	2级	3级	
CMTM8	原发性肾癌	2	8	7	0	p=0.003*
	转移性肾癌	8	11	0	0	
	肾癌肺转移	1	8	0	0	p=0.020*
	肾癌骨转移	7	3	0	0	
E-cadherin	原发性肾癌	0	7	8	2	p=0.018*
	转移性肾癌	6	9	4	0	
	肾癌肺转移	2	5	2	0	p=0.836
	肾癌骨转移	4	4	2	0	

*p<0.05, 有统计学意义。

图 13C

表 5. Kaplan-Meier 生存分析

整体比较			
	卡方	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	11.045	3	.011

图 14A

表 6. COX 多因素分析

方程中的变量								
		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI 用于 Exp(B)
								下部 上部
步骤 1	positive	-.770	.272	8.010	1	.005	.463	.271 .789

图 14B

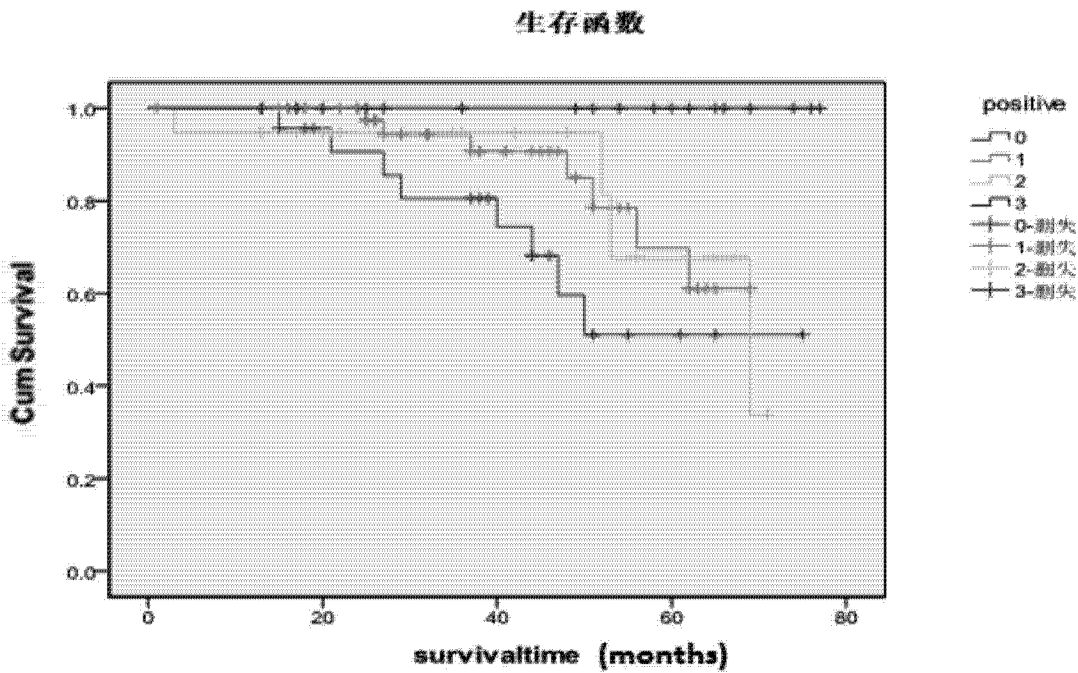


图 14C

专利名称(译)	一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN104225575A	公开(公告)日	2014-12-24
申请号	CN201310226123.2	申请日	2013-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院 北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院 北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院 北京大学		
[标]发明人	许克新 胡浩 张石英 裴晓磊 宋泉声 王应		
发明人	许克新 胡浩 张石英 裴晓磊 宋泉声 王应		
IPC分类号	A61K38/17 A61K48/00 A61P35/00 G01N33/68 G01N33/531 C12Q1/68 C12N15/85 C12N15/861		
代理人(译)	彭蓉		
其他公开文献	CN104225575B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种新的肿瘤抑制基因或蛋白及其在膀胱癌和肾癌中的临床和实验室研究的应用，特别是涉及CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段，CMTM8或/和CMTM8-v2或/和它们的免疫性片段在诱导膀胱肿瘤和肾肿瘤细胞凋亡中的应用、在制备治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中的应用、包含CMTM8或/和CMTM8-v2的载体或药物组合物，以及应用于临床和实验室研究的检测CMTM8或/和CMTM8-v2或/和它们的免疫性片段的表达的试剂在膀胱肿瘤和肾肿瘤预后诊断和治疗方案确定中的应用。

