

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816955. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年2月22日

[11] 公开号 CN 1739030A

[22] 申请日 2003.7.17 [21] 申请号 03816955. X

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 17 [33] EP [31] 02015944. 8

[86] 国际申请 PCT/EP2003/007786 2003. 7. 17

[87] 国际公布 WO2004/008147 英 2004. 1. 22

[85] 进入国家阶段日期 2005. 1. 17

[71] 申请人 马普科技促进协会

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 A·尤尔里奇 P·克尼亚泽夫

T·克尼亚泽瓦 Y·切伯金

P·瓦杰科斯基

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 赵艳华

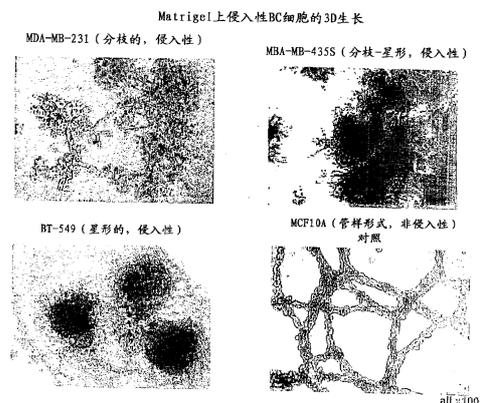
权利要求书4页 说明书41页 附图16页

[54] 发明名称

癌症细胞侵入的诊断和预防

[57] 摘要

本发明涉及恶性病症领域中的诊断和治疗方法。尤其是，本发明提供了测定恶性病症的侵入力的方法和包括阻止或治疗肿瘤细胞侵入的减小恶性病症的侵入力的方法。



1. 一种确定恶性病症侵入力的方法，包括测量选自由下列基因构成的组中的至少一种基因的表达：AXL、GAS、MMP14、ADAM12、ADAM17、MT3MMP、FGF2、FGF5、FYN、LYN、DDR2、TIMP1、HB-EGF、SGF、S6KII、MAP4K4、SIRP $\alpha$ 、Annexin2、Stat5b 和 EDG2，这些基因的高表达与高侵入性相关。

2. 根据权利要求 1 的方法，包括测量选自所述组的至少两种基因的表达。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其包括测至少量 AXL 基因的表达。

4. 根据权利要求 1-3 中任意一个的方法，其中恶性病症是癌症，尤其是选自乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肺癌、结肠癌、恶性胶质瘤和其它癌症。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中癌症是恶性胶质瘤。

6. 根据权利要求 1-5 中任意一个的方法，其中在 mRNA 水平对表达进行测定。

7. 根据权利要求 6 的方法，其中在核酸阵列上测定所述表达。

8. 根据权利要求 1-5 中任意一个的方法，其中在蛋白质水平对表达进行测定。

9 根据权利要求 8 的方法，其中通过免疫检测测定表达。

10. 一种降低恶性病症侵入力的方法,包括抑制 AXL 基因表达和/或 AXL 配体基因表达和/或蛋白质功能和/或蛋白质配体功能。

11. 根据权利要求 10 的方法,其中 AXL 蛋白质配体是 GAS6。

12. 根据权利要求 10 的方法,其包括抑制 AXL 蛋白的受体酪氨酸激酶活性。

13. 根据权利要求 10 的方法,其包括抑制 AXL 基因的表达。

14. 根据权利要求 10 的方法,其包括抑制 AXL 蛋白与其配体之间的相互作用。

15. 根据权利要求 10-14 中任意一个的方法,其包括以能有效降低恶性病症的侵入力的量对有所需要的受试者施用 AXL 基因、AXL 配体基因、AXL 蛋白质和/或 AXL 蛋白质配体的抑制剂。

16. 根据权利要求 15 的方法,其中恶性病症是癌症,尤其是选自乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肺癌、结肠癌、恶性胶质瘤和其它癌症。

17. 根据权利要求 16 的方法,其中所述癌症是恶性胶质瘤。

18. 根据权利要求 15-17 中任意一个的方法,其中所述受试者是哺乳动物,尤其是人类。

19. 根据权利要求 15-18 中任意一个的方法,其中所述抑制剂是针对 AXL 蛋白的抗体。

20. 根据权利要求 15-18 中任意一个的方法,其中所述抑制剂是

反义核酸、核酶或针对 AXL 基因或其转录物的 RNA 干扰分子。

21. 根据权利要求 15-18 中任意一个的方法，其中所述抑制剂是 AXL 基因显性失活突变体。

22. 药物组合物，其包含作为活性剂的 AXL 基因、AXL 配体基因、AXL 蛋白质和/或 AXL 蛋白质配体的抑制剂和药理活性稀释剂、载体和/或佐剂。

23. 根据权利要求 22 的组合物，其中所述抑制剂是针对 AXL 蛋白的抗体。

24. 根据权利要求 22 的组合物，其中所述抑制剂是反义核酸、核酶或针对 AXL 基因或其转录物的 RNA 干扰分子。

25. 根据权利要求 22 的组合物，其中所述抑制剂是 AXL 基因显性失活突变体。

26. 根据权利要求 22-25 中任意一个的组合物，其用于降低恶性病症的侵入力。

27. 根据权利要求 22-26 中任意一个的组合物，其用于降低恶性病症中的转移形成。

28. 根据权利要求 26 或 27 的组合物，其中所述恶性病症是恶性胶质瘤。

29. 根据权利要求 22-26 中任意一个的组合物，其包含至少一种其它活性剂。

30. 根据权利要求 29 的组合物,其中所述其它活性剂是一种细胞毒素剂或细胞生长抑制剂。

31. 鉴定和/或表征恶性病症侵入力的抑制剂的方法,其包括测定测试化合物是否能够抑制 AXL 基因、AXL 配体基因、AXL 蛋白质和/或 AXL 蛋白质配体。

32. 根据权利要求 31 的方法,其包括测定测试化合物是否能够结合 AXL 蛋白和/或降低 AXL 基因表达。

33. 根据权利要求 31 或 32 的方法,其中使用了一种基于细胞的检测系统。

34. 根据权利要求 31 或 32 的方法,其中使用了一种无细胞的检测系统。

## 癌症细胞侵入的诊断和预防

本发明涉及恶性病症 (disorder) 领域中的诊断和治疗方法。特别是, 本发明提供了恶性病症 (disorder) 的侵入力的测定方法和包括预防和治疗癌症细胞侵入的降低恶性病症的侵入力 (invasivity) 的方法。

近年来, 显示出受体酪氨酸激酶 (RTK) 的过表达在许多实例中都与恶性病症的发生有关, 尤其是包括人类在内的哺乳动物的癌症。例如, 受体酪氨酸激酶 AXL/UFO (参考文献. 1, 2; Genbank 登陆号. M 76125) 的过表达已经被指出与人血液恶性肿瘤的发生有关。此外, 最近的数据显示出 AXL 以及其配体 GAS6 的信号传输与血管发生, 癌症细胞的粘连和存活有关 (参考文献 3, 4, 5, 6, 7, 8)。在 Breast Cancer Research and Treatment (1997 年 10 月, Vol. 46, No. 1, pp. 91, Attar, E. C. 等) 中公开了关于人类乳腺癌中的 AXL 受体酪氨酸激酶表达的研究。Dodge Zantek N. 等人已经提出将 MCF-10A-NeoST 作为一种研究乳腺癌中细胞与 ECM 间和细胞与细胞间相互作用的新型细胞系统 (参考文献 34)。其暗示 AXL 对于乳腺癌的侵入力和治疗乳腺癌的进展因子的潜在作用。然而, 还没有数据能够证明 AXL 的过表达与其他恶性病症中的侵入力和/或转移形成相关。

本研究的一个目的是建立特别选自恶性病症尤其是乳腺癌和脑癌中的蛋白激酶、磷酸酶和其它信号基因的基因的表达特征 (profile), 从而能够鉴别侵入力和/或侵占性的新标记。使用一种 cDNA 杂交阵列分析 7 种高侵入性、14 种弱侵入性乳腺癌细胞系和三种正常乳腺上皮细胞系的基因表达特征。鉴定了高侵入性与弱侵入性乳腺癌细胞系基因表达的差别, 这可以明确与乳腺癌细胞系的侵入性相关的基因簇。通过使用这种基因簇或来自这基因簇的基因的组合, 使得将高侵入性乳腺癌细胞系与弱侵入性乳腺癌细胞系和普通乳腺上皮细胞系区别开

来成为可能。

此外，为了鉴别参与恶性神经胶质瘤生物学相关的新的受体酪氨酸激酶(RTK)，已经通过一种 cDNA 微阵列技术确定了人类神经胶质瘤细胞系中的 RTK 表达特征。除了 EGFR 和 PDGFR- $\alpha$  之外，受体 UFO/AXL 也是最显著的被表达的 RTK 之一。在经检测的 7/9 人类神经胶质瘤细胞系中，UFO/AXL mRNA 的表达水平高于 EGFR 的 mRNA 表达水平(表 4)。与过表达 UFO/AXL 野生型的细胞相比，通过一种 UFO/AXL 的截短的显性失活突变体型的过表达实现的 UFO/AXL 信号传递的抑制，抑制了肿瘤的进展并延长了小鼠的存活。为了研究 UFO/AXL 信号机制以及其在神经胶质瘤生长中的作用，在体外对肿瘤细胞形态学和关于增殖、聚集和迁移的肿瘤细胞行为进行了评估。此外，还通过活体内多-荧光显微术在体内对肿瘤细胞行为、肿瘤血管生成和肿瘤灌注进行了分析。该研究表明了 UFO/AXL 的一种新作用，即介导神经胶质瘤细胞-细胞间相互作用，神经胶质瘤细胞迁移以及神经胶质瘤的侵入。UFO/AXL 是第一种被用于介导恶性脑瘤的扩散性-渗透性，局部转移性生长的 RTK。

因此，本发明的第一个方面涉及一种确定恶性病症的侵入力的方法，其包括确定选自 AXL (Genbank M 76125)、 GAS 6 (Genbank L 13720)、 MMP14 (Genbank NM 004995)、 ADAM 12 (Genbank AF023476)、 ADAM17 (Genbank U69611)、 MT3MMP (Genbank NM 005961)、 FGF2 (Genbank NM 002006)、 FGF5 (Genbank NM 004464)、 FYN (Genbank M 14333)、 LYN (Genbank M 16038)、 DDR2 (Genbank X 74764)、 TIMP1 (Genbank NM 003254)、 HB-EGF (Genbank NM001945)、 SGK (Genbank Y 10032)、 RPS6RB1 (Genbank M 60724)、 MAP4K4 (Genbank XM 038748)、 SIRP $\alpha$  (Genbank Y 10375) 和 Annexin A2 (Genbank D 00017) 中的至少一种基因的表达。此外，任选除测定一种或多种上述基因的表达之外，基因 Stat 5b (Acc. NM\_012448) 或 EDG2 (Acc. NM\_057159) 的表达也被测定作为恶性病症的侵入力的指示。据发现，至少一种上述基因的高表达与高侵入力相关。

此外，在本研究中发现高侵入力与至少两种上述基因的高表达相关，尤其是 AXL 和一种或多种其它基因。一种或多种其它基因可以选自上面所列基因或选自现已知作为侵入性标记的基因。

因此，这种方法优选包括确定几种上述基因的表达，例如确定至少二、三、四、五、六、七或八种基因的表达。更优选的是，这种方法包括测定至少 AXL/UFO 基因 (Genbank M 76125) 的表达。此外，这种方法可以包括确定至少一种其它已知作为侵入性标记的基因的表达，例如 CD44 (Genbank X 66733)、 vimentin (Genbank X 56134)、 CAV1 (Genbank Z 18951)、 CAV2 (Genbank、AF 03572)、 MMP 1 (Genbank M 13509)、 MMP 2 (Genbank NM 004530) MMP9 (Genbank MM 004994)、 M-CSF (Genbank M 37435) 和 EPHA2 (GenbankM59371)。

上述基因簇和尤其是 AXL 基因的表达与侵入力之间的相关性被发现存在于几种恶性病症中，例如乳腺癌（尤其是原发性乳腺癌）前列腺癌、肾癌和恶性胶质瘤或其它上皮来源的癌症。特别令人关注的是发现在一种或更多种上述标记基因尤其是 AXL 基因与恶性胶质瘤的侵入力之间存在相关性。

此外，发现 AXL 基因的显性失活突变体的稳定的过度表达能够强烈地抑制细胞侵入和迁移，这表明 AXL 功能的抑制可以阻碍和缺失高侵入性的恶性病症的转移形成，例如乳腺癌或脑癌，如恶性胶质瘤。此外，一种针对 AXL 的胞外域部分的多克隆抗体对于癌症细胞如乳腺癌或前列腺细胞系的侵入和转移具有强抑制活性。而且，野生型 AXL 在弱侵入性乳腺癌、前列腺癌细胞系和神经胶质瘤细胞中的过表达显著提高它们的侵入力。

这些数据显示 AXL 基因和蛋白是用于预防或治疗恶性病症，尤其是抑制恶性病症中肿瘤侵入力和/或转移形成的一种具有前景的新靶子。

因此，本发明的另一方面涉及一种减少恶性病症侵入力的方法，包括抑制 AXL 基因、AXL 配体基因或蛋白、或其配体。该方法的包括 (i) 抑制 AXL 蛋白的受体酪氨酸激酶活性，(ii) 抑制 AXL 基因的表达，

(iii)抑制 AXL 蛋白与其配体尤其是 GAS6 之间的相互作用和/或 (iv)抑制 AXL 与下游信号转换因子之间的相互作用。

至于 AXL 蛋白配体,特别是 GAS6 (GAS6-LG)的层粘连蛋白 G-样结构域已经被发现参与与 AXL 蛋白的相互作用,例如 AXL 的结合和激活(参考文献 36)。尤其是,GAS-LG2 结构域的残基,例如 Leu<sup>620</sup>、Tyr<sup>660</sup> 和 Phe<sup>487</sup>,影响 AXL 的结合和/或激活。根据本发明的一个特别的实施方案,这种降低恶性病症的侵入力的方法包括抑制 GAS-LG 一个或多个残基,优选 Leu<sup>620</sup>、Tyr<sup>660</sup> 和/或 Phe<sup>487</sup>。

本发明涉及恶性病症的诊断或预防和/或治疗,尤其是恶性病症中的肿瘤侵入力和/或转移形成。恶性病症的优选例子是乳腺癌,前列腺癌,肾癌,结肠癌,肺癌和恶性胶质瘤。更优选的是,所述恶性病症是乳腺癌或恶性胶质瘤。

本发明的诊断实施方案中,定性和/或定量测定侵入力相关基因的表达。确定含有恶性细胞的样品(例如来自人肿瘤患者)中的所述表达。该样品可以取自组织切片、组织活检样品等等,或取自体液。待测样品中的基因表达可以与在对照样品中的基因表达进行对比,例如源于“正常”细胞或弱侵入力恶性细胞的阴性对照样品和/或例如源于强侵入性恶性细胞的阳性对照样品。

基因表达可以根据本领域公知的技术测定,例如在 mRNA 水平或转录水平和/或蛋白质水平上。基因表达在 mRNA 水平的测定可以包括反转录和/或扩增反应例如 PCR。优选的是,在一个核酸阵列上对基因表达进行测定,其中源于待测样品的待测核酸如 RNA 或 cDNA 杂交到固定有特异于待测核酸的探针的阵列上。PCT/EP 02/01073 中描述了一种合适的核酸阵列的优选例子。另外一种选择是,基因表达可以通过其它方法测定,例如 Northern 印迹杂交。

在蛋白水平的基因表达可以通过采用针对由与侵入力相关基因编码的蛋白质的抗体的免疫学方法进行测定。这些抗体可以用已知标记基团如放射性、荧光、化学发光或酶基团例如本领域中已知的酶基团直接或间接进行标记。

本发明的一个治疗实施方案涉及一种包括对有此需求的受试者以能有效降低恶性病症的侵入力的量施用 AXL 基因、AXL 配体基因、AXL 蛋白质或其配体的抑制剂的方法。所述受试者优选是一种哺乳动物，更优选是人类。AXL 蛋白质的配体优选 GAS6，尤其是如上定义的 GAS6-LG 的残基。

AXL 基因、AXL 配体基因、AXL 蛋白质或其配体 GAS6 的抑制剂如可以是抗体、生物活性核酸或低分子量化合物，例如肽或非肽有机化合物。

在一个优选实施方案中，所述抑制剂是针对 AXL 蛋白质或其配体如 GAS6 的抗体。术语“抗体”涉及多克隆抗体和单克隆抗体，特别是嵌合抗体或人源化抗体或人抗体。此外，该术语包括抗体片段，例如蛋白水解片段如 Fab、Fab' 或 F(ab)<sub>2</sub> 片段或重组片段如单链抗体片段，如 scFv 片段。生产上述抗体或抗体片段的方法是本领域已知的。

在进一步优选的实施方案中，所述抑制剂是生物活性核酸，例如 DNA、RNA 或合成的核酸类似物。生物活性核酸优选的例子是反义核酸、核酶或针对 AXL 基因或 AXL 配体基因或其转录物的 RNA 干扰分子。生物活性核酸的进一步优选的例子是 AXL 基因的显性失活突变体。生物活性核酸可以通过公知方法例如使用病毒或非病毒基因转移载体被递送。

在一个更优选的实施方案中，所述抑制剂是肽化合物，例如具有 4-25 个氨基酸长度的肽、环肽、肽衍生物或衍生自这种肽的肽类似物。或者所述低分子量抑制剂可以是一种肽性有机化合物，例如 AXL 激酶活性抑制剂。低分子量抑制剂可以通过采用下文将要详细描述的方法从合适的化合物文库中筛选获得。

本发明的另一方面涉及一种药物组合物包含作为活性剂的 AXL 基因、AXL 配体基因、AXL 蛋白质或其配体（例如 GAS6，特别如上文定义的 GAS6-LG 的残基）的抑制剂以及药物活性稀释剂、载体和/或助剂。该组合物尤其适于降低恶性病症的侵入力或降低恶性病症中的转移形成。根据所使用的作为活性剂的抑制剂的类型的不同，所述药物

组合物可以是液体、固体（例如粉末、片剂等等）、乳剂或悬浮液。该组合物可以通过注射、口服、局部、直肠、鼻内或其它合适的方式施用。该组合物中的活性剂的有效量可以由本领域技术人员无需任何不适当负担的情况下，根据化合物和待治疗的疾病的类型确定。

该组合物可以包含至少一种其它活性剂。这种至少一种活性剂可以与 AXL 抑制剂配制在单一组合物中或配制为与 AXL 抑制剂组分共同施用的分离组合物。这种其它活性剂可以是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂例如阿霉素、顺铂、卡铂、抗肿瘤抗体或它们的任意组合。

本发明的另一方面涉及一种鉴别和/或表征一种恶性病症侵入力的抑制剂的方法，包括确定是否至少一种测试化合物能够抑制 AXL 基因、AXL 配体基因、AXL 蛋白质或其配体（例如如上文定义的 GAS6）或蛋白质。更具体地，该方法包括测定是否一种测试化合物能够结合 AXL 蛋白质和/或减少 AXL 基因表达。该测试化合物可以源于化合物文库，例如经过 AXL 抑制活性筛选的肽或非肽文库。该筛选方法可以包括使用基于细胞的测试系统，例如一种使用能够过表达 AXL 基因的细胞的系统。除此之外或作为另一种选择，该方法可以包括使用无细胞测试系统，其中测试化合物与充分纯化的 AXL 蛋白质或其片段接触以测定该测试化合物与所述蛋白质或其片段的结合。

此外，将通过下文的附图和实施例对本发明进行更详细的说明。

图 1. 在 matrigel-matrix (3D 生长晕 (outgrowth)) 上培养时正常和乳腺癌 (EC) 细胞系的形态学。

在 Matrigel 层上培养细胞 7-14 天。A，表示对于所指的 BC 细胞系三个基本形态的照片。MDA-MB-231、MDA-MB-435S、BT549 和 MCF10A 的放大率是 x100。如前所述进行生长在 Matrigel 上的细胞的形态学的鉴定 (10, 11, 12)。简而言之，重悬于 50  $\mu$ l 培养基中的细胞 (96-孔板上 5000 细胞/孔) 被接种在预先制备的在 RPMA 基础培养基盐中稀释至 6mg/ml 的 70  $\mu$ l Matrigel (Becton Dickinson) 构成的 Matrigel 涂层上。在顶端的聚合作用后，加入 50  $\mu$ l Matrigel (1.0mg/ml)。集落生长晕在整个试验过程中被监控并在 7-14 天时使用

装备有 OpenLab (UK) 数码相机的 Zeiss Axiovert 35 显微镜进行拍摄。每一细胞系的名字被指明。

图 2. 通过已知激酶和磷酸酶的基因表达特征对乳腺癌细胞系的分类。一般基因在弱侵入性 BC 细胞系中与在强侵入性 BC 细胞系的表达的变化 (AXL 簇)。

如“原料和方法”中所述, 通过源于每一指定的细胞系的 RNA (双份制剂) 的 cDNA 阵列杂交对基因表达进行测定。这 22 个选出的基因在至少 75% 弱侵入性 BC 细胞系、强侵入性 BC 细胞系 (依次为红、绿条) 或二者中以高于 2 倍的中值倍数变化差异表达。相对于 MCF10A 的基因表达水平通过颜色和指定的位于簇底部的图解的阴影表示出来。每一种颜色的阴影包括跨越刻度下数字范围的所有值。同时还提供了 GenBank 登陆号 (参见表 3) 和每一种基因的说明以及在自制阵列膜上的点的位置 (分别参见表 2 和 3 的基因)。通过 Northern (AXL 和 GAS6) 或采用与阵列中同样的 RNA 制剂的 RT-PCR (用于 HER2 表达和扩增的 Roche 系统, 未显示) 分析进行证实研究。除非另有说明, 所述阵列与其他已知方法之间的一致性在 2 倍内, 与试样的绝大多数相关; 通过其它方法得到的与低估倍数改变的阵列的定性的一致性至少 10 倍。侵入性和弱侵入性细胞系的位置通过颜色条依次被指明。

图 3A, B. 通过已知激酶和磷酸酶的基因表达特征进行对原发性乳腺癌及其细胞系的分类。

如“原料和方法”所述, 通过源于每一指定细胞系和原发肿瘤的 RNA (双份制剂) 的 cDNA 阵列杂交对基因表达进行测定。这 26 个选出的基因在至少 75% 的弱侵入性 BC 细胞系、强侵入性 BC 细胞系 (依次为红、绿条) 或二者中以倍数变化中值高于 2 倍差异表达。相对于正常乳腺组织 (两种混合) 的基因表达水平通过颜色和位于簇底部的指定的阴影的图解表示出来。每一种颜色的阴影包括跨越刻度下数字范围的所有值。同时还提供了 GenBank 登陆号 (参见表 3) 和每一种基因的说明以及在自制阵列膜上的点的位置。通过 Northern (AXL 和 GAS6, 未显示原发性肿瘤) 或采用与阵列中同样的 RNA 制剂的 RT-PCR (仅用于

HER2 表达和扩增的 Roche 系统, 未显示) 分析进行证实研究。除非另有说明, 所述阵列与其他已知方法之间的一致性在 2 倍内, 与试样的绝大多数相关; 与通过其它方法低估倍数的改变的阵列性质的一致性至少 10 倍。

A. 正常乳腺组织、原发性肿瘤、正常乳腺和癌症细胞系的未受监控 (supervised) 的阵列分析。AXL 簇包括 18 种基因 (表达的相关度是 0, 51 或者显著), 乳腺癌细胞系中鉴定了大部分基因 (参见附图 2)。

B. 使用单一共有序列 (census) 侵入力的基因进行原发性肿瘤和乳腺癌细胞系的分类。所有原发性肿瘤和 BC 细胞系被应用于采用 26 个基因 (属于 AXL 簇) 的聚类分析。

原发性肿瘤和乳腺癌细胞系被识别, 并且大多数强侵入 (HI) 性 BC 细胞系属于同一家族 (除了 DA-MB-231 和一种原发性肿瘤 BC151, 经红色条标出)。

#### 图 4. 选出的差异表达的 AXL/GAS 基因的 Northern 印迹分析

通过与对应于置于 cDNA 阵列上片段的探针杂交分析分离自各指定细胞系的 mRNA (15  $\mu$ g/泳道) 指定基因的表达。相对于 Ac745 (正常的乳腺上皮细胞) 的每一 mRNA 表达水平记录在每一条带的下方。对应于主要的特定带的大小 (右侧) 与现有技术中报道的每一 mRNA 的大小一致。同样的滤膜被探查和重新探查以做此分析。图中: A-AXL 表达, B-GAS 和 C- $\beta$ -肌动蛋白 mRNA。对于典型滤膜,  $\beta$ -肌动蛋白的表达水平被表示出来作为等量的样品载荷的对照。mRNA 由两组独立生长的细胞培养物中制备而来, 并被测试指定基因的表达水平。

图 5A 和 B. 当培养于 Matrigel 中时 BC 细胞系 MDA-MB-435S、BT549 和 MDA-MB-231 (模拟 (mock)) 的形态或稳定表达 dnAXL。

在 Matrigel 层上培养细胞 7-14 天。

A 显示了反映指定的 BC 细胞系三个基本形态的照片。B, 显示了

MDA-MB-435S 模拟和 dnAXL 突变克隆 2 的创伤测试。所处位置和处理都在图中示出。放大率是 x100。

图 6A, B 和 C. BC 细胞系 MDA-MB-435S, 模拟, 稳定表达 dnAXL 或用抗-Ex-AL 抗体处理之后的 3D 生长晕、迁移和侵入行为。

A. 细胞被培养在 Matrigel 层上 7-14 天 (参见附图 1 的图例)。这些细胞经所示抗体处理或不经处理。

B. 根据“原料和方法”描述的步骤, 在 Boyden 室中通过计数在 20-36 小时内转移到包被 Matrigel (3-4 mg/ml) 的滤膜的细胞的数量测试指定 BC 细胞系的侵入力。结果取至少两个含有三个点的独立试验的平均值 (Error bars)。

C. 在平行 transwell 室中使用没有 Matrigel 的滤膜在与侵入性测试同样的条件下进行迁移能力测试。结果取至少两个含有三个点 (error bars) 的独立试验的平均值。同样, 在没有 Matrigel 阻碍的 Boyden 室中对细胞迁移进行评估。正如所预期的, 细胞系 MDA231, MDA435S 和 BT549 与弱侵入性细胞系 MCF7 (未显示) 相比具有相当强的运动能力。

图 7. AXL wt 的转染对 MCF7 乳腺癌细胞的影响。

A. AXL wt 的感染和强制过表达的形态学影响。AXL wt 在 MCF7 细胞中的过表达导致紧凑的鹅卵石状细胞变为无规则形状且具有多突出延伸的细胞。

B. 如上文所述 (参见材料和方法) 在 Boyden 室中对 AXL wt 的感染对细胞侵入性的影响进行测试。克隆 MCF7-AXL wt 的侵入力高于空载体感染的细胞 30 倍。共有 20, 000 个细胞被接种在 Boyden 室中 36-48 个小时 (具有 8  $\mu$ m 孔的滤膜, 其涂布着浓度为 3-4mg/ml 的 matrigel 基质)。感染 AXL wt 的细胞比感染空载体对照或 dnAXL 突变型侵入得更快些。

## 图 8

A. 表达对照载体 (SF126-模拟), UFO/AXL 野生型 (SF126-Ufo-WT) 和 UFO/AXL 的截短的显性失活突变体型 (SF126Ufo-DN) 的 SF126 神经胶质瘤细胞克隆的 Western 印迹分析。血清耗尽细胞不经处理 (-) 或经  $200 \mu\text{g/ml}$  Gas6 (+) 处理。溶解产物与抗磷酸酪氨酸血清 (上图) 或针对人 UFO/AXL (下图) 的细胞外区域的抗体印迹。与 SF126-模拟细胞相比, 该分析证实 Gas6/UFO/AXL 介导的信号传输在 SF126-UFO-WT 和 SF126-UFO-DN 细胞中分别升高 (大约 30%) 和消失。B-D. 与 SF126-模拟和 SF126-UFO-WT 细胞 (B 和 C) 相比, UFO/AXL 截短的显性失活突变体型在 SF126 细胞 (B) 中的表达改变它们的形态。

## 图 9.

A. SF126 细胞克隆的肿瘤体积的分析。肿瘤细胞被皮下植入到裸鼠 ( $n=4$  个动物每组) 中并持续 14 天。显示了平均值  $\pm$  SEM。\*  $p < 0.05$  vs SF126-模拟细胞。B. 在 SF126 细胞克隆植入裸鼠的背部皮肤褶皱腔后的肿瘤面积 (左侧) 和功能性血管的密度 (右侧) 的定量分析, 该分析通过活体内多-荧光视频显微镜 ( $n=4$  个动物每组) 测试。显示了平均值  $\pm$  SD。通过 ANOVA 进行统计学分析, 然后进行合适的组间的个体比较的 post hoc 测试; \*  $p < 0.05$  vs. SF126-Ufo-DN 细胞。C 和 D. 显示出肿瘤体积的不同的 SF126-UFO-WT 肿瘤 (C) 和 SF126-UFO-DN 肿瘤 (D) 的组织形态学图像。条代表 1mm。H & E 染色。E 和 F. 显示出肿瘤侵入性的不同的 SF126-UFO-WT 肿瘤 (E) 和 SF126-UFO-DN 肿瘤 (F) 的组织形态学图像。SF126-UFO-WT 肿瘤大量渗入到邻近的皮肤肌肉和皮下组织中 (E) (箭头表示被损坏的肌肉层的残留), SF126-UFO-DN 肿瘤细胞侵入性几乎被完全抑制了 (F)。注意 (F) 中保留的肌肉层结构。条代表  $100 \mu\text{m}$ 。H & E 染色。H 和 I. 仅用荧光显微镜 (G) 与结合相差 (H) 确定没有 SF126-UFO-DN 肿瘤细胞侵入到邻近的组织层。组织细胞在植入前被标记上 Dil。条代表  $100 \mu\text{m}$ 。所有样品是在植入裸鼠背部皮肤褶皱腔 21 天后被切离的。t, 肿瘤块; m, 小鼠肌肉

层；sc，皮下组织。SF126-模拟，对照；SF126-Ufo-WT，表达野生型 UFO/AXL 的细胞；SF126-Ufo-DN，表达截短的显性失活突变型 UFO/AXL 的细胞。

图 10.

A. SF126 细胞克隆的 MTT 增殖测试。存在 Gas6 (200g/ml) 或不存在 Gas6。细胞经 200  $\mu$ g/ml Gas6 (+Gas6) 处理或不经处理 (-Gas6)。在培养 48 小时后进行分析。相对于未受刺激的 SF126-模拟细胞表示生长率。平均值被表示出来。B 和 C. SF126-Ufo-WT 和 SF126-Ufo-DN 细胞克隆的多细胞聚集的形成证实抑制 UFO/AXL 功能之后聚集能力未改变的。D. SF126 细胞在 7 天的观察期内的迁移。通过图像分析系统对迁移的区域进行面积法的分析。显示了平均值  $\pm$  SD。通过使用 ANOVA 进行统计学分析，然后进行不成对 Student t-检验。\*  $p < 0.05$  vs. SF126-模拟。E 和 F. 通过 48 小时将 SF126-UFO-WT 肿瘤细胞球 (E) 或 SF126-UFO-DN 肿瘤细胞球 (F) 与大鼠胎儿脑细胞聚集物接触对肿瘤细胞侵入性进行分析。SF126-UFO-DN 肿瘤细胞球与脑细胞聚集物的清晰的边缘表明抑制 UFO/AXL 功能后缺乏侵入性。B, 大脑细胞聚集物；S, 肿瘤球。SF126-模拟，对照；SF126UFO-WT，表达野生型 UFO/AXL 的细胞；SF126-UFO-DN，表达截短显性失活型 UFO/AXL 的细胞。

图 11.

A. 将 SF126-Ufo-WT 细胞和 SF126-Ufo-DN 细胞定向植入脑 (n=4 个动物每组) 后，成年裸鼠的存活曲线。当动物生长到神经缺陷或损失  $> 30\%$  它们的原始体重时处死。B-E. 在植入脑后的 SF126-Ufo-WT 肿瘤组织形态学显示肿瘤细胞扩散渗入到邻近的脑组织 (B)。肿瘤细胞经由血管周隙 (C)，沿着白质束 (D)，并沿着心室系统壁 (E) 渗透。H & E 染色。条代表 100  $\mu$ m。

## 实施例

## A. 乳腺癌和前列腺癌的研究

### 1. 材料和方法

#### 1.1. 肿瘤样品和细胞系

为了避免选择乳腺癌 (BC) 和其它肿瘤的类型和大小的任何偏见, 待测 RNAs 由未选择的样品制备。原生侵入性乳腺癌样品取自 72 名接受手术的患者。在外科切除后, 这些肿瘤被整个切下: 取切片用于病理学家的诊断, 邻近的一块被迅速冷冻在液氮中以用于 mRNA 提取。进行诊断时患者的平均年龄在 55 岁 (范围在 29-81), 并且他们中的大多数是处于绝经期后。根据乳腺肿瘤的 WHO 组织学类型将肿瘤分类: 导管癌, 小叶癌, 导管-小叶混合癌和髓样癌。源自正常乳腺的混合的“正常”cDNA 作为对照组并用于标准化。上述“正常”cDNA 中的蛋白激酶 (PK) 和磷酸酶 (PP) 的表达特征被分别鉴定。在这项研究中, 我们也研究了包括 21 个 BC 和 3 个正常乳腺上皮细胞系。乳腺癌细胞系的来源是: 由美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Rockville, MD) 获得的 BT-20, BT-474, BT-483, BT-459, Du-4475, MDA-MB-134、-157、-175、-361、-436、-453、-468, SK-BR-3, 和 ZR-75-1, T-47D, MDA-MB-231, ZR-75-30。MCF-7 克隆和 BC 细胞系 DAL 由 SUGEN (Redwood City, CA) 提供。HBL-100 细胞系由 ATCC 提供。该细胞系来源于正常的组织但含有串联整合的 SV-40 序列 (9)。培养物在补充了 6 mM 谷氨酰胺, 10  $\mu$ g/ml 人胰岛素和 10% 胎牛血清 (FCS) (CSL, Parkville, Australia) 的 RPMI 1640 培养基中维持在指数生长期。正常乳腺上皮细胞株 MCF10A、MCF10 T-24 和 MCF10 neo 由 B. Gilles 博士 (Arizona Cancer center) 提供。Ac745 由 M. Stampfer 博士提供, 其生长在补充有 Hs578Bst、胰岛素、氢化可的松、EGF、霍乱毒素、维生素和抗生素的条件培养基的 DMEM F12 培养基中。

细胞无支原体污染。

#### 1.2. RNA 和 DNA 的分离和分级

从同样的细胞沉淀中通过在异硫氰酸胍溶液 (GTS 缓冲液: 4 M 异

硫氰酸胍, 25 mM 柠檬酸钠 pH 7.0, 0.5% Sarkosyl 和 0.1 M  $\beta$ -巯基乙醇) 中裂解之后进行酚-氯仿萃取分离总 RNA 和基因组 DNA。通过经修饰的标准方法 (Sambrook 等, [1989]) 分离完整 RNA。用等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25 : 24 : 1) 收集萃取 DNA 两次。在至少三个不同时间从各细胞系中分离 RNA 和 DNA。

总 RNA 和 mRNA 的完整性和 cDNA 的复杂性由琼脂糖凝胶电泳和采用特异探针的 Northern 印迹控制。一些 mRNA 的提取通过使用 OligoTex mRNA 分离试剂盒 (Quagen, Biotech, Germany) 进行。细胞沉淀重悬于溶胞/结合缓冲液中, 短暂涡旋混合, 流经三次 21 G 针, 并被施用到自旋溶解产物柱 (spin lysate column) 上并以 13, 000g 离心三分钟。然后溶解产物与 Oligo-dT 纤维素 (Stratagene Inc.) 轻轻混合, 并被施用于预湿的 Oligotex 分子生物柱 (Quagen Biotech) 上。该柱被溶胞/结合缓冲液冲洗三次, 用清洗缓冲液冲洗四次, 然后用预热 (65°C) 的洗脱缓冲液洗脱 mRNA。使用 OD260 测量 mRNA 的量。

### 1.3. cDNA 阵列的制备

通过用放射性靶物质 (cDNA) 于尼龙滤膜阵列上的杂交分析 PK 和 PP 基因的表达。该阵列含有 645 个编码激酶, 磷酸酶和其它信号蛋白: 配体、连接体、转录因子、金属蛋白酶/ADAMs、细胞凋亡相关基因和 11 个管家基因 (所列在 <http://www.biochem.mpg.de/oullrich@biochem.mpg.de> 上可得) 的基因。它们的身份通过对 DNA 质粒的测序并与 GenBank 序列信息进行对比确证。所有点在尼龙滤膜上的克隆的 PK 和 PP 的特征是一致的或一式两份。为了标准化的目的, 将 GFP 基因以及基因组 DNA 和载体 DNA 点样两次。使用质粒纯化试剂盒 (Qiagen, Germany) 对质粒进行纯化。

### 1.4. cDNA 阵列杂交

起先, 滤膜在 0.5% SDS 中预清洗 5 分钟, 边清洗边搅动。10ml 的预杂交溶液中含有酵母 tRNA。在杂交步骤中使用人 Cot-1 DNA

(BRL/Life technologies), 这一步在 65℃ 下置于滚轴烤箱里的 Roller bottle (Hybaid Inc.) 中进行 16 小时。标记探针在 100℃ 下变性 10 分钟, 然后被立刻置于杂交混合物中, 该混合物在 65℃ 下再温育 18 小时。18 小时后, 去除所述杂交混合物, 然后 42℃ 下在温育箱中连续旋转下用 2 氯化钠: 柠檬酸钠 (SSC) 缓冲液, 0.2% SDS 清洗所述阵列两遍。第三次清洗是 65℃ 下在水平振动的塑料盒中用 0.2xSSC, 0.1% SDS 清洗 15-60 分钟。在第三次清洗后, 滤膜被置于一张浸湿的 Whatman 纸上并盖上 Saran wrap。然后将所述阵列置于装备有 Phosphorimager storage screen (Fuji, Japan) 的显像暗盒中, 并被曝光两天。

### 1.5. 图像获取和分析

经曝光的 phospho-imager storage screens 在 Phosphorimager Scanner (Fuji) 中以 50 微米的分辨率被扫描一次, 并通过 MacBAS 2000 (Fuji) 显像。图像被输入到 ArrayVision V (Canada) 中通过软件分析。采用代表整个基因组对照 DNA、GFP 和载体的总共 4 项对照因子通过比对基于软件的矩阵上图像对不同的元素相对内部参考数据库作图。通过将每一数据元素的原始强度乘以一个标准因子实现标准化, 该标准因子等于所有载体元素的平均原始强度除以 100 (这个值是所有因子的原始强度平均数, 其源于大量不同的由阵列进行的杂交反应)。将标准化图像与由取自源于如上文指出的正常乳腺 RNA, 永生化 (肿瘤发生前) 乳腺上皮细胞系的混合“正常”cDNA 的经标记的 cDNA 的图像进行以软件为基础的 pair-wise 比较。用标准化强度对表达水平的改变进行计算, 并得出比值 (正比值表示转录水平的升高, 负比值表示转录水平的降低), 表达水平的改变通过 Scatter-blot 制图法和 TreeView 程序 (13-16) 体现。

### 1.6. 阵列数据分析

在分析结果之前, 试验的再现性通过比较双传点或与在两个独立

阵列上相同的 cDNA 杂交或两个独立的与由相同 RNA 制备而来的 cDNA 杂交反应而被证实。在每一个例子中，结果显示出良好的重现性，其相关系数依次为 0.96, 0.98 和 0.98 (数据未显示)。这种重现性足以认为 2 倍表达差异属于显著差异。接下来的分析采用 Excel 和统计学软件完成。与肿瘤参数相关的基因表达水平的检索在几个连续步骤中完成。首先，通过比较根据所需参数不同而不同的肿瘤两组亚群中的中值表达水平检测基因。我们使用中值而不是平均值因为许多基因的表达水平的差异性高，这导致接近或高于平均值的标准差表达水平，并使得无法与平均值进行比较。其次，通过制图法对这些被检测的基因进行直观的检验。最后，对那些试图证实相关性的基因应用适当的统计学分析。通过 Mann-Witney 检验证实 HER2 的表达在 ER-阳性肿瘤与 ER-阴性肿瘤之间的比较。相关系数被用于比较基因表达水平与所含腋淋巴结数目。

### 1.7. 聚类分析

本研究中获得数据被分析并被如所述方式(13-16)列出。简而言之，一种分等级的聚类算法产生表格的结果，其中阵列的元素/cDNAs(代表特定基因)根据其基因表达模式的相似性被分到一组。试验样品(例如细胞系和肿瘤)应用同样的算法根据其基因表达的整个模式的相似性进行分群。这样排列好的数据表格以彩色图象图形表示。纵轴方向，被分析的基因按照聚类算法排列，这样具有最大表达模式相似性的基因就可以一个挨着一个。沿着横轴，试验样品以类似排列，以使得所有基因中具有最大表达模式相似性的可以彼此相邻排列。在这个表图的每一个单元格/正方形的颜色代表经检测每个所研究基因的表达的比。颜色的饱和度也与经检测基因表达率成正比，最亮红色正方形具有最高 T/N 比(例如，> 8 倍差异)，最亮绿色正方形具有最低 T/N 比，黑色正方形表示比值大约为 1，灰色正方形表明数据质量不足。

### 1.8. Northern-印迹进行 RNA 分析

我们使用 Northern-印迹分析标准规程来检测 AXL 和 GAS6 在一些乳腺癌和所有乳腺癌细胞系制剂中的表达。通过与具有人  $\beta$ -肌动蛋白探针的滤膜的再杂交验证加载的 RNA 样品。

### 1.9. 化学侵入测试和迁移测试

以 Albini 等的方法 (10) 的修饰方法进行化学侵入测试。在胰蛋白酶消化后, 细胞 (20,000) 被接种在 Boyden 室 (Biocoat Matrigel Invasion Chamber, Becton Dickinson, Bedford, MA 或 Nunc 10mm 组织培养插入板, Naperville, IL) 中 Matrigel-包被的 (4.0 mg/ml, 150  $\mu$ l) 的 8  $\mu$ m 聚丙烯滤膜插件 (insert) 上。该底部室含有按 Albini 等描述方法制备的 0.55 ml NIH3T3-条件培养基用于培养一些细胞系的或正常生长培养基。

由 ATCC 获得的 BC 细胞系被胰蛋白酶消化, 离心并以  $4 \times 10^5$  细胞/ml 重悬于含有 10%FBS 的 RPMI 中。剩下的细胞系被重悬于一般的生长培养基中。

在 20-36 小时后, 将残留在该插件上的细胞用棉签转移, 用不同的方法计数过滤膜底部的细胞数: 在 Diff-quick (American Scientific Products, McGraw Park, IL) 中固定, 用 RNase A (37  $^{\circ}$ C, 50  $\mu$ g/ml 处理 20 分钟) 处理, 然后在室温 (RT) 下用碘化丙锭 (propidium iodine) (10  $\mu$ g/ml 的 PBS 液) 染色一分钟。干燥的滤膜被移除并被置于有 Cytoseal 60 封片培养基 (Stephens Scientific, Kalamazoo, MI) 的载玻片上。对滤膜上各个碘化丙锭染色的核计数。大部分结果通过胰蛋白酶作用和细胞计数获得。每一个实验中三份样品被计数。从平均侵入力的计算中删除无关 (outlying) 值。

为了进行抗体存在时的侵入性测试, 细胞被接种在 Matrigel 上, 当附着时, 所示抗体被加入到培养基中。该抗体在整个测试过程中都在室的上层; 在测试结束时, 室上层的细胞的存活力通过台盼蓝评估。

根据用于侵入性测定的方法进行迁移力测定，除了细胞被接种于 Boyden 室中的未包被的 8- $\mu\text{m}$  孔聚丙烯滤膜上。

#### 1.10. Matrigel 生长晕 (outgrowth)

用以前描述的方法 (10) 对生长在 Matrigel 上的细胞进行形态学鉴定。简而言之，重悬于 50  $\mu\text{l}$  培养基的细胞 (96-孔板上，5000 细胞/孔) 被接种于预定的 Matrigel 涂层顶部，该涂层含有在 RPMI 基础培养基盐中稀释至 6.0 mg/ml 的 70  $\mu\text{l}$  Matrigel (Becton Dickinson)。在顶部的聚合反应后，添加稀释的 50  $\mu\text{l}$  Matrigel (1.0 mg/ml)。集落生长晕在整个试验过程中被监控，并在 7-14 天时用配备有 OpenLab (UK) 数码相机的 Zeiss AxioVert 35 荧光显微镜进行拍摄。

#### 1.11 创伤测试 (wound assay)

饥饿过夜后，用一塑料尖端对汇合细胞的单层制造创伤。在拍照(相差)之前，用培养基 (10% FCS) 和含 GAS6 (200ng/ml) 的培养基处理 MDA-MB-345S-模拟和 MDA-MB-435- dnAXL，克隆 2 细胞 12、24 和 48 小时。为了定量细胞迁移，以 40X 的放大率拍摄创伤的三个随机选择的区域 (1 mm 长)；20  $\mu\text{m}$  平均伤口的宽度，计算创伤闭合的平均比例。每个测定样品检验三个独立的创伤，计算出创伤闭合的平均比例。

#### 1.12. 用抗体处理细胞

用 Ex-AXL 多克隆抗体 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 处理乳腺癌细胞 (5000 用于 3D 生长晕检测，且 20000 用于 Boyden chamber 中的侵入性检测)，其中使用 50  $\mu\text{l}$  抗体和 500  $\mu\text{l}$  细胞悬液。室温下将细胞与抗体一起培养 60 分钟，然后在室温下用 PBS 清洗。用相同浓度 Ex-AXL 抗体进行细胞的接种和随后 24 小时的处理。

#### 1.13. 用重组逆转录病毒感染 BC 细胞

根据经修饰的标准方法 (31) 获得病毒的 AXLwt 和 dn-AXL 突变型。

简而言之,依次通过 EcoRI/BamHI 和 NotI/XbaI 位点克隆 pLXSN-AXLwt 和 pLXSN-dnAXL。

使用磷酸钙用这些载体转染包装细胞系 Phoenix A。收集转染 Phoenix A 细胞的上清液,经 0.45- $\mu\text{m}$  的滤膜过滤。为了感染人癌症细胞系,细胞与病毒上清液一起培养 24 小时。48 小时后,培养基被替换为含有 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G148 的培养基。为了进一步筛选,细胞与 G148 一起培养 14 天。通过有限稀释获得多克隆和单克隆抗体细胞系。AXL 的表达由 Western 印迹和阵列分析测定。选择具有类似 AXL 和 dnAXL 表达水平的多克隆和 3 个单克隆细胞系用于进一步实验。

#### 1.4. 抗体

用含有氨基酸残基 1-410 (AXL-Ex) 的重组 GST-AXL 胞外域融合蛋白免疫兔获得了 AXL/UFO-特异性抗体。该重组 GST-AXL-Ex 蛋白质是由经转染的 HEK293 细胞 (载体 pCDNA3-GST) 稳定分泌的。收集培养基,用标准 GST-标记方法 (Pharmacia, Sweden) 纯化 GST-AXL-Ex 蛋白质, AXL-Ex 多克隆抗体在 GST-琼脂糖亲和柱上被部分纯化。

#### 结果

本研究的目的是建立乳腺癌细胞中的蛋白激酶,磷酸酶和信号基因的表达特征,同时鉴别乳腺癌侵占性的新标记。cDNA 杂交阵列被用于分析 14 个弱侵入性、7 个强侵入性乳腺癌细胞系和 3 个正常乳腺上皮细胞系的基因表达特征 (表 1, 图 1, 侵入性 BC 细胞系和对照组的 3D 生长)。

表 1 用于产生侵入共有序列的乳腺癌细胞系的表征

细胞系	样本来源 <i>a</i>			致肿瘤性 <i>b</i>	Matrigel 形态 <i>c</i>
	ER-	E-cad	Vim		
<u>弱侵入性</u>					
ZR-75-1					
T47D	渗透性导管癌 ; PE			+e	溶合的
+	+	-			
ZR75-1	渗透性导管癌; ascites			+e	溶合的
+	+	-			
MCF7	乳腺癌 ; PE			+e	溶合的
+	+	-			
MDA361	乳腺癌 ; brain met			+e	溶合的
+	+	-			
BT474	侵入性导管癌; PT			+e	溶合的
+	+	-			
BT20	乳腺癌 ; PT			+	溶合的-
ND	-				
MDA468	转移性腺癌; PE			+	溶合的-
-	-				
SKBR3	乳腺癌; PE			+	球形
-	-				
MDA453	转移性乳腺癌; PE			-	球形
-	-				
BT483					
MDA175					
Du44-75					
DAL					
ZR-75-30					

HBL-100

强侵入性

MDA435S	转移性导管乳腺癌		+, met	星状
-	-	+		
BT549	乳突状侵入性导管癌; PT		-	星状
-	-	+		
Hs578T	导管癌; PT		+, met	星状
-	-	+		
MDA231	乳腺癌; PE		+, met	星状
-	-	+		
MDA436 进展中				星状
MDA415 进展中				星状
MDA157 进展中				星状

注:

a) 样本来源和病理鉴定信息是由 ATCC 目录获得的。PT, 原发性肿瘤; PE, 脑腔积液; Ca 癌。

b) 致肿瘤性数据在 ATCC 目录或在参考文献 17 中有报道。

+, 在无胸腺裸鼠或 SCID 小鼠中移植产生的可触摸的肿瘤

-, 不致肿瘤性; met, 如参考文献 18 和 19 报道的迁移细胞系。

c) 培养在 Matrigel 中的细胞的形态学以及它们在 Boyden 室侵入测试中的活性的描述取自参考文献 10。

含有 650 个基因的 cDNA 微阵列膜被用于这些研究中。基因表达在弱侵入性和强侵入性 BC 细胞之间的差异被鉴别, 可以定义每一侵入性表型的“侵入性共有序列” (图 2, 簇 AXL, 相关性 > 0.71)。强侵入性 BC 细胞系 (BT549, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-415, Hs578T, MDA-MB-157 和 MDA-MB-435S) 过表达 AXL 并显示确定的基因表达特征, 这使得它们区别于弱侵入性 BC 细胞和“正常”乳腺上皮细

胞。这些簇包括已知作为侵入性标记的基因 (CD44, VIM, CAV1, CAV 2 和 MMPs (参考文献 20-27))。这些基因中一些只是已经被认为与癌症细胞侵入力相关 (M-CSF 和 EPHA2 (参考文献 28-30) 和表 2)。该簇的其它基因首次被鉴定为与癌症细胞侵入性有关: AXL, GAS, MMP14, Adam12, Adam17, MT3S1MP, FGF2 和 FGF 5, Fyn, Lyn, DDR2, TIMP1, HB-EGF, SGK, S6KII, MAP4K4, SIRP $\alpha$  和 Annexin 2。

引人注目的是, 这些 BC 细胞系都不表达雌激素受体 (参见图 3, 如所示的 BC 细胞系的特征)。共表达基因的 AXL 簇在原发 BC (图 3) 和其它肿瘤和癌症细胞系 (肾、前列腺和恶性胶质瘤) 中也被鉴定 (数据未显示)。AXL 和 GAS 基因在侵入性 BC 细胞系中的表达通过 Northern-印迹杂交 (图 4) 确定。

在强侵入性 BC 细胞系中稳定过度表达的 AXL 基因 (dnAXL) 的显性失活突变体型强烈地抑制了几种 BC 细胞系的侵入力、迁移性和存活: MDA-MB-435S、BT549 和部分 MDA-MB-231 (图 5A 和 B)。所有能稳定表达 dn-AXL 的克隆在 Matrigel 基质上具有如非侵入性或弱侵入性乳腺癌细胞系例如 MCF7 的 3D-生长。dn-AXL 的表达明显抑制了 GAS6 信号传递, 导致了 AXL 对 GAS 处理的磷酸化的减少或缺失。这些细胞中的 ERK2 的信号表达也被阻断。

一种针对 AXL 胞外部分的多克隆抗体 (含有氨基酸残基 1-410, Ex-AXL) 改变了细胞的形态 (图 6A), 并对 MDA-MB-435S 和 BT549 BC 细胞系 (图 6B 和 C) 的迁移性和侵入性具有强烈的抑制活性。在前列腺细胞系 PPC1 中也获得了相似的结果。此外, 野生型 (wt) AXL 在弱侵入性 BC 细胞系 MCF7 和前列腺细胞系 LNCaP 中的过表达使得它们转化为高侵入性表型。

## B. 恶性胶质瘤的研究

### 1. 材料和方法

#### 1.1 人神经胶质瘤细胞

本研究使用下列人神经胶质瘤细胞系: U-118, U-1242, SF126,

A-172, U-373, U-1240, T-98G, SF763, 和 SF767。所有的细胞在 5% CO<sub>2</sub> 潮湿的培养箱中 37℃ 下的 10% 胎牛血清 (PAA GmbH, Linz, Austria) 中生长, 并用 Hoechst 33258 染色常规检测支原体污染。生长培养基 (所有都来自 Gibco, Karlsruhe, Germany) 以以下方式使用: U-118, T-98G 和 SF763 用 DMEM; U-1242 用 MEM, 非必需氨基酸 (1 : 100 原液稀释液; Gibco), 1mM 丙酮酸钠; SF-126, A-172 和 U373 用加入 4, 5g/L 葡萄糖的 DMEM 以及 U-1240 和 SF767 用 MEM。在肿瘤植入到背部皮肤褶皱室之前, 以前述方法 (参考文献 35) 用 Di1 对细胞染色。

## 1.2 cDNA 阵列杂交

cDNA 阵列的内容和其杂交技术已经在现有技术 (参考文献 31) 中有详细的描述。该阵列包含 125 个 cDNA 片段, 对应于 84 个 RTK 和 30 个蛋白酪氨酸磷酸酶, 加上对照 cDNA。以其它地方已经描述的方法 (参考文献 31) 制备总 RNA, Poly (A) + RNA 和 cDNA 探针。在 50  $\mu$ Ci 的 [<sup>32</sup>-P] dATP 存在下用 Megaprime 试剂盒 (Amersham) 对 3-5  $\mu$ l cDNA 进行标记。预杂交溶液被替换为含有 5x SSC, 0.5% (v/v) SDS, 100  $\mu$ g/ml 面包酵母 tRNA (Roche) 的杂交溶液和标记的 cDNA 探针 (2-5  $\times$  10<sup>6</sup> cpm/ml) 并在 68℃ 下温育 16 小时。在严谨条件下洗膜。使用 phosphorimager 系统 (Fuji BAS 1000; Fuji) 定量杂交信号。用下列公式对每个位点 (slot) 的平均值进行计算:  $A = (AB - B) \times 100 / B$ ; [A, 终体积; AB, 每一位点信号的强度 (象素/mm<sup>2</sup>); B, 背景 (象素/mm<sup>2</sup>)]。必须要以前述 RT-PCR 方法 (参考文献 31) 对 cDNA 阵列的结果进行证实。

## 1.3 表达构建体和稳定细胞系的产生

编码 AXL 的 2.7 kbp cDNA 序列被克隆到逆转录病毒载体 pLXSN 的 EcoR I / BamH I 限制性位点上。通过将 1.5 kbp EcoR I / Fsp I 片段亚克隆到同一载体上得到显性失活突变体。用磷酸钙共沉淀法将表达质粒和空载体转染到 Phoenix-Ampho 细胞中。在转染 28 小时后收集含

有重组逆转录病毒的上清液,以  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  的终浓度与 Polybrene 混合,然后施用于亚汇合 (subconfluent) SF126 细胞 3 小时。用同样的生产细胞的新鲜的上清液重复进行两次感染。被感染细胞在一天后被传代,并用  $1\text{mg}/\text{ml}$  G418 筛选 1 星期。通过 western 印迹分析监控从单克隆细胞系中筛选出 AXL 的高表达。

#### 1.4. 免疫沉淀反应和 Western 印迹

细胞在补充有  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  抑肽酶、 $1 \text{mM}$  PMSF、 $2 \text{mM}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $10 \text{mM}$  NaF 的  $50 \text{mM}$  Hepes (pH 7.5,  $150 \text{mM}$  NaCl,  $1 \text{mM}$  EDTA, 10% 甘油, 1% Triton X-100,  $10 \text{mM}$   $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) 中被裂解。用微 BCA 蛋白质测定 (PIERCE, Rockford, Illinois) 测定蛋白质浓度。用  $30 \mu\text{l}$  蛋白质 A 琼脂糖悬液 (CL-4B, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) 和  $3 \mu\text{l}$  抗 AXL 多克隆 (参考文献 36) 兔血清  $4^\circ\text{C}$  下过夜从  $1.8 \text{mg}$  的总细胞蛋白质中沉降 AXL。用 HNTG 缓冲液 ( $20 \text{mM}$  Hepes pH 7.5,  $150 \text{mM}$  NaCl, 10% 甘油, 0.1% Triton X-100) 清洗沉淀物三次。每泳道中沉淀物或  $200 \mu\text{g}$  总细胞蛋白质与还原样品缓冲液混合,用 7.5% SDS-PAGE 分离,然后转移到硝化纤维膜 (Protran; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 上。用在  $150 \text{mM}$  NaCl、 $750 \text{mM}$  Tris-HCl (pH 7.5)、 $5 \text{mM}$  EDTA、0.05% Triton X-100 中的 0.25% 明胶封闭这些膜,然后与在同样的缓冲液中以 1:5000 稀释的抗磷酸酪氨酸单克隆抗体 4G10 一起在  $4^\circ\text{C}$  下温育过夜。第二抗体山羊抗小鼠 HRP (1:10000, BioRad) 在室温下被施用 60 分钟。所述硝化纤维膜在  $55^\circ\text{C}$  下被剥离 90 分钟,然后用抗 AXL (多克隆兔血清, 1:1000) 和蛋白 A-HRP (BioRad, 1:40000) 再次探查。用 Western Lightning 试剂进行检测 (Perkin Elmer Life Sciences, Boston)。

#### 1.5 小鼠

在一种特殊的无病原体微生物环境中繁殖并维持无胸腺裸鼠 (nu/nu; 雄性/雌性), 并使用 6-10 周龄的裸鼠。根据获批准的

Institutional Animal Care and Use Committee 的制度规程和指导方案进行试验。为了进行外科手术，用克他命 (Ketamin) / 甲苯噻嗪 s.c 注射小鼠使其麻醉。

### 1.6 皮下和同位异种移植

在向裸鼠的左胁区域注射  $1 \times 10^6$  C6 细胞 (参考文献 44) 后，神经胶质瘤异种移植物在皮下生长。在植入 14 天后用游标卡尺对肿瘤的生长进行测量。用 (长  $\times$  宽  $\times$  高) / 2 计算肿瘤体积。为了进行大脑内肿瘤细胞移植，裸鼠的脑被固定在啮齿类动物定向固定器上。通过向右侧纹状体中注射  $5 \times 10^5$  个细胞进行移植。为了比较肿瘤的生长，当一个试验组中的动物生长到神经缺陷或缺失  $>30\%$  其体重时，它们就会被处死。

### 1.7 背部皮肤褶腔模型

将两个对称的钛框架置于动物的背部皮肤褶两侧使得将延展的皮肤双层夹在其中从而构建起由一层有条纹的肌肉和皮下组织和表皮组成的背部皮肤褶腔。覆盖有玻璃盖玻片的观察窗被允许用于对生长在腔内的肿瘤的微血管系统进行重复的活体内显微观察。在制备腔两天后，背部皮肤褶腔上的盖玻片被临时移除以植入肿瘤细胞。这些动物对皮肤褶腔耐受良好并且它们的睡眠和摄食行为未显示出不适或改变。

### 1.8 活体内多荧光显微术

在植入 21 天后进行活体内 epi-荧光可视显微术 (参考文献 37, 38, 39)。神经胶质瘤细胞的 Dil 标记使得能够精确描述肿瘤与邻近的宿主组织，也能使用绿色光 (520-570nm) 对各肿瘤细胞进行识别。用缀合 FITC 的葡聚糖 (MW = 150,000 ; 0.1 ml i. v) 增强对比度，通过蓝色 epi-光 (450-490nm) 对每个血管进行显像。通过对覆盖荧光标记的肿瘤块的组织面积检测对肿瘤的生长进行评价。对宿主和肿瘤

微血管系统的分析包括血管密度和血管直径(参考文献 37)。

### 1.9 组织学

为了完成试验,含有神经胶质瘤的背部皮肤褶腔制备物和脑被切开,并被冷冻于液氮中以备组织形态学分析。切片被置于 stubs 上,然后被包埋在 Tissue-Tek (Miles Laboratories Inc., Naperville, IL) 中,并在经液氮冷藏的 2-甲基丁烷 (E. Merck, Darmstadt, Germany) 中冷冻。切下一些轴切片 ( $5\ \mu\text{m}$ ) 并置于在预先包被有明胶的载玻片上 (Sigma)。根据标准方法用 Harris 苏木精和曙红 G (Merck) 对这些切片染色。

### 1.10 增殖测定

在 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯溴化四唑 (MTT) 测试 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 中对神经胶质瘤细胞系的增殖进行检测。细胞以 3000 细胞/孔的浓度被接种于 96 孔组织培养板上,并在有 Gas6 ( $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或没有 Gas6 条件下被培养 48 小时。然后检测细胞将 MTT 染料还原至有色甲臜产物的能力,作为细胞增殖能力的指标。

### 1.11 迁移性测定

在底部包被有 1.0% Noble 琼脂 (DIFCO, Detroit, MI.) 的  $75\text{-cm}^2$  培养瓶中将  $5 \times 10^6$  细胞接种在培养基中,制备神经胶质瘤细胞球。培养 7-10 天后,直径低于  $300\text{-}\mu\text{m}$  的小球被挑选出来以进行迁移性和侵入性研究。

神经胶质瘤小球被置于 24 孔平板的中间。由从球形外植体迁移出去的肿瘤细胞覆盖的区域被用作细胞迁移的指标。在 7 天期间用相差显微镜每天测量每个外植体区域的互相垂直的两条直径,计算出由肿瘤细胞覆盖的平均面积。迁移性测试一式四份进行。

### 1.12 侵入性测试

根据标准化的步骤生产出胎儿大鼠脑细胞聚集体,该方法已经被描述过了(参考文献 40)。简而言之,用剖腹产术取出 18 天龄的 BD IX 大鼠胎儿。小心切下大脑,将其切碎并连续胰蛋白酶消化。在离心后,将  $1 \times 10^7$  细胞(重悬在培养基中)个细胞接种在 24 孔板的琼脂包被的孔中。在两天的再次聚集后,小球被转移到新鲜的孔中(5-7 聚集体/孔),在这些孔中小球成熟 18-21 天。此时,成熟的脑聚集体已经形成。胎儿大鼠脑聚集体和神经胶质瘤小球表示类似原位脑和神经胶质瘤组织的标准化、原发性无血管的脑和肿瘤块,因而提供了一种合适的在体外研究神经胶质瘤细胞迁移和血管非依赖性侵入性的模型。为进行侵入性测定,单一成熟的脑聚集体(直径=250-300  $\mu\text{m}$ )被置于琼脂包被的 96 孔板上。相近大小的单一神经胶质瘤小球被转移到孔中并与脑聚集体接触。这种接触被依次培养 24 和 48 小时,这之后,收集它们,将其在低聚甲醛中固定,然后包埋在塑料树脂中以制备半薄(semithin)切片(2  $\mu\text{m}$ )。用 Toluidine 蓝染色这些切片。对于保持完整的大鼠脑聚集体的数量检测神经胶质瘤细胞的侵入性的过程。侵入性试验一式四份进行。

### 1.13 统计学

为了分析组间差异,进行用于组间的个体比较的单因素方差分析(ANOVA),之后为合适的 post hoc 检验。 $p < 0.05$  的结果被认为是显著的。

## 1. 结果

### 2.1

为了研究在神经胶质瘤细胞生物学中的 UFO/AXL 相关性,将一种缺少细胞内含 RTK 区域的人 UFO/AXL 的截短的显性失活突变体型通过逆转录表达系统转入到 SF126 神经胶质瘤细胞(SF126-Ufo-DN)中。转染空载体的细胞(SF126-模拟)或转染野生型人 UFO/AXL 的细胞

(SF126-UfoWT)作为对照。用针对人 UFO/AXL 胞外域的抗体进行的 Western 印迹证实了 SF126-Ufo-DN 细胞克隆中的野生型和截短型受体的高表达水平 (图 8A 下图)。为了确定截短型受体的表达是否能阻断 UFO/AXL 信号传导, 用其配体 Gas6 刺激之后鉴定 UFO/AXL 受体磷酸化 (图 8A 首行)。在 SF126-模拟细胞中, 观察到一种适度的基限信号, 其随着 Gas6 的刺激而增强。相反, 在 SF126-Ufo-DN 细胞中, 基线磷酸化作用和 Gas6 诱导的磷酸化作用都基本上被完全抑制了。

在常规培养条件下以及在其配体不存在下, UFO/AXL 信号表达的抑制对神经胶质瘤细胞形态有着深远的影响。由于 SF126-模拟和 SF126-UFO-WT 细胞 (图 8B 和 C) 呈现出多个细胞-细胞接触的伸长的纺锤状的形态, SF126-UFO-DN 细胞的特征是圆形和减少的细胞-细胞接触 (图 8D)。SF126-UFO- DN 细胞也呈现出已经丧失贴壁到塑料的能力。

## 2.2

为了研究 UFO/AXL 对于肿瘤生长的相关性, 每克隆的  $1 \times 10^6$  个细胞被皮下植入到成年裸鼠的侧肋处。当与 SF126-模拟细胞比较时, 发现 SF126- Ufo-DN 细胞的致肿瘤性被极大的削弱了, 这导致肿瘤的生长减少 97% (图 9A)。相反, 在 SF126-Ufo-WT 细胞中的肿瘤生长稍有增加 (图 9A)。为了更详细地理解 UFO/AXL 在体内神经胶质瘤细胞生物学中的作用, SF126-Ufo-WT 细胞和 SF126-Ufo-DN 细胞被植入到成年裸鼠的背部皮肤褶透明腔模型中。在肿瘤细胞的荧光标记和荧光原生质 (plasma) 标记的系统施药之后, 该模型可以用活体多荧光视频显微术对肿瘤生长、肿瘤细胞行为、肿瘤血管发生和肿瘤灌注进行可重复的非侵入性的检测。通过这种方法, 能够确定 UFO/AXL 信号对于肿瘤生长的的重要性。

与 SF126-Ufo-WT 肿瘤相比, SF126-Ufo-DN 肿瘤的表达被极大的抑制了 (图 9B)。UFO/AXL 可能影响肿瘤生长和膨胀的一种机制是其对血管功能和对肿瘤的营养血液的供应的调节。这种假设由最近的研究

所支持,该项研究表明 Gas6/UFO/AXL 调节的信号传输可能干扰凝血级膜以及血管形成和成熟(参考文献 41,42)。为了验证这一点,对作为肿瘤血管发生和肿瘤灌注标志的肿瘤的功能性血管的密度和微血管直径进行了定量分析。然而,如图 9B 所示,这些分析没有能支持对于 SF126-Ufo-DN 肿瘤生长的强烈抑制的血管解释(例如抗-血管生成,由于肿瘤血管血栓形成引起的灌注失败)。

对肿瘤样品的组织形态学分析进一步增强了 UFO/AXL 信号传输对于神经胶质瘤细胞生物学有重要作用的假说。如图 9C 和 E 所证实, SF126-Ufo-WT 肿瘤的特征为一个大的固体肿瘤块和个体肿瘤细胞对邻近的宿主组织(例如肌肉和皮下组织)的大的侵入导致的破坏。相反, SF126-Ufo-DN 肿瘤小得多并且不能侵入到周围宿主组织中(图 9 D 和 F)。通过冰冻切片的荧光和相差显微术进一步证实了缺少 SF126-Ufo-DN 肿瘤侵入性组织,该切片证实在邻近组织中缺少 Dil 标记的 SF126Ufo-DN 细胞(图 9 G 和 H)。

### 2.3

为了进一步揭示通过阻断 UFO/AXL 功能抑制肿瘤生长的机理,分析了神经胶质瘤细胞的体外行为。当与 SF126-模拟和 SF126-Ufo-WT 细胞比较, MTT 测试证实在正常培养条件下的 SF126-UfoDN 细胞的增殖分别减少了 50%和 30%(图 10A)。值得注意的是,这个结果与 UFO/AXL 配体 Gas6 的刺激无关,这证实了以前关于 Gas6/Ufo/AXL 信号传输不能发挥致有丝分裂活性的假设。由于表明 UFO/AXL 调节细胞与细胞间粘连(参考文献 43),细胞的形成多细胞聚集体的能力也被研究。SF126-模拟和 SF126-Ufo-WT 细胞容易形成球形(图 10B)。在 SF126-Ufo-DN 细胞(图 10C)中,它们聚集的能力不被削弱,这证明细胞的聚集性仅仅由 UFO/AXL 的胞外域调节,与酪氨酸激酶结构域无关。接着,通过接种肿瘤小球和测量经过一段时间肿瘤细胞由起始的小球迁移的距离鉴定神经胶质瘤细胞的迁移。SF126-模拟和 SF126-Ufo-WT 细胞迁移相当的距离,而 SF126-Ufo-DN 细胞中的肿瘤细胞迁移被大大

的削弱了(图 10D)。由于细胞迁移是肿瘤侵入性的先决条件, SF126 细胞克隆的侵入力最终通过用胎儿大鼠脑细胞聚集物接触肿瘤小球被测定。在共培养 48 小时后, SF126-模拟和 SF126-Ufo-WT 细胞都已经广泛地侵入了脑聚集物(图 10E)。相反, 在同样的时间后, 可以观察到在 SF126-Ufo-DN 肿瘤小球和脑细胞聚集物之间有一条清晰的界限, 这表明这些细胞不能侵入到正常脑组织中(图 10F)。

总的说来, 肿瘤异种移植体的组织形态学和所述的体内结果清楚证明 UFO/AXL 极大地调节神经胶质瘤细胞的生长, 迁移和侵入并且 UFO/AXL 信号传递的抑制通过阻碍肿瘤细胞生长和侵入到邻近组织中抑制住了肿瘤的增大。为了检验 UFO/AXL 作为治疗恶性神经胶质瘤的新靶点的能力, SF126-Ufo-WT 细胞和 SF126-Ufo-DN 细胞被植入到成年裸鼠的脑中, 然后检测它们的存活情况。当动物发育到神经缺陷或丧失 > 30% 其原始体重时处死。SF126-Ufo-WT 肿瘤的特征是迅速的临床发病过程, 在此过程中由于迅速的临床恶化造成所有的动物在 8 天内都被处死(图 11A)。相反, 在相同的观察期内有 SF126-Ufo-DN 肿瘤的动物无症状无体重损失(体重 0 天 =  $29 \pm 2$  g 相对于体重 8 天 =  $28 \pm 1$  g) (图 11 A) 地存活下来。该组织形态学分析表明 SF126-Ufo-WT 细胞已经广泛渗入到脑实质中, 而实体肿瘤块所占空间的影响只是温和的(图 11 B)。这里, 观察到人肿瘤细胞侵入的典型方式: 沿着血管周隙(图 11 C), 沿着白质束(图 11 D), 沿着心室系统壁(图 11 E)。相反, 不能在任何动物中鉴定到 SF126-Ufo-DN 肿瘤形成。

## 2.4 总结

总而言之, 本发明分析的结果表明 RTK UFO/AXL 在恶性脑肿瘤的生物化学中的一种新的重要作用。该发现指出 UFO/AXL 由大量人神经胶质瘤细胞系过表达至与 EGFR 或 PDGFR- $\alpha$  相当的程度, 其调节神经胶质瘤的生长和神经胶质瘤的侵入性。至今为止, UFO/AXL 是第一种被报道的参与神经胶质瘤侵入的 RTK, 因此其表示一种用于干扰这些至今仍然难治的高侵占性肿瘤的新的治疗靶点。本发明的结果已经支持

了这一点，该结果证明在同位植入后，UFO/AXL 信号传输的阻断抑制住神经胶质瘤的生长并延长了生存。

为了研究 UFO/AXL 的生物学功能，详细分析了人神经胶质瘤细胞互相使用以及与基质的相互使用复杂能力。结果证明通过表达截短的显性失活受体突变体对 UFO/AXL 功能的抑制几乎完全抑制住了细胞迁移和侵入到健康脑组织中的能力。应该注意的是本试验中使用的 UFO/AXL 的突变型缺少胞内域，其胞外域仍然功能完好。因此，UFO/AXL 不是简单通过所述受体与基质的相互作用调节肿瘤细胞侵入，而是通过参与所述受体下游的复杂的信号级联调节。此外，本发明的结果也表明 UFO/AXL 参与肿瘤细胞扩增，也可能通过调节细胞与细胞和细胞与胞间质之间的相互作用。

中枢神经系统的特征是 UFO/AXL 其配体 Gas6 和相关 RTK 如 Tyro 3 或 Mer 的显著表达。本研究的发现现在表明 Gas6/UFO/AXL 的信号传输可能是分子系统组织迁移的一部分和神经和神经胶质细胞的引导。此外，UFO/AXL 和其配体 Gas6 通过宿主和肿瘤组织的显著表达可以提供对于脑内起源的肿瘤的独特的侵入能力的更好的理解的提示。

### C. 讨论

在试验系统中作为单个基因的 RTK AXL 足以促进肿瘤转移的事实是惊人的，因为其与现代的转移表型的获得是一种包含几个基因事件和后生事件的多级过程观点截然不同。

良性和恶性肿瘤均以无法控制的方式生长。但是仅仅恶性肿瘤的细胞侵入到周围组织中并传播到远处的器官中(转移)。对于该侵占性的分子基础的理解所能产生阻碍肿瘤由良性转化到恶性并使得局部病情得以控制的治疗方法。我们已经鉴定了称为 AXL 和 GAS 的蛋白质，作为分子检查点上的一种受体-配体对，其不仅调节侵入力也调节肿瘤细胞的存活和移动-转移所需的三特征。dn-AXL/GAS6 复合体也抑制肿瘤细胞抗细胞程序死亡能力。

本发明数据显示在血清中对 BT-549 细胞的 GAS 处理 (dn-AXL 的稳

定表达)不能引起 ERK1/2 MAPK 的活化作用。因此,这种信号传递途径有效地阻断 AXL 抑制。

总而言之,本发明数据已经显示 AXL/GAS 通过影响肿瘤细胞侵入在人癌症中具有重要作用。AXL 蛋白是一种用于癌症诊断和治疗(抗侵入性)的新靶点。例如, dnAXL 在癌症细胞中的表达可以阻止它们的侵入和转移发展。此外, AXL-簇的基因(列在表 2 中)能用作检测原发性肿瘤尤其是原发乳腺癌、前列腺癌、肾癌和成胶质细胞瘤中侵入前阶段发生的诊断工具。

#### D. 总结

1. 使用 BC 细胞系、原发性肿瘤和成胶质细胞瘤细胞的 cDNA 阵列分析,已经识别了一种“侵入共有序列”(AXL 簇)。这种含有 32 个基因的侵入共有序列可被用于预测癌症细胞和原发性肿瘤的侵袭性。

2. AXL (dn-AXL)显性失活突变体强烈地抑制了强侵入性乳腺癌细胞系的侵入性并提高了它们对于取消血清的敏感度(细胞凋亡)。针对 AXL 胞外域(含有氨基酸残基 1-410, Ex-AXL)的多克隆抗体能够抑制经处理过的癌症细胞的侵袭性。

3. 作为一种单个基因的 RTK AXL 足以诱导试验系统中的乳腺癌细胞的侵入力(参见 2 和模型系统 BC-MCF7-wt AXL 和前列腺癌症细胞系 LNCaP-wt AXL 所得数据)。该结果与现在关于转移表型的获得是一种包含几个基因事件和后生事件的多级过程的观点相反。

4. RTK AXL 是“信号转导治疗”治疗方法的好的候选方法,该方法靶向引起癌症侵入性和转移的用于具有极度活性细胞信号传导的关键途径。由 dn-AXL 突变体或由抑制性抗体处理引起的 AXL 信号转导功能的抑制作用不能通过平行的或补偿性途径避免。

5. 在肿瘤治疗中 AXL 基因表达的抑制可以通过基因水平或转录水平抑制 AXL 例如通过突变体的基因转移、反义分子、核酶、siRNA、RNAi 或 AXL 基因表达抑制因子或者蛋白质水平抑制 AXL 例如通过低分子量 AXL 激酶抑制因子、AXL 类似物(如 Ex-AXL 融合蛋白)实现, Ex-AXL 融合蛋白例如融合了 JgG1 Fc 片段(参考文献 32)或抑制性抗体的 Ex-AXL 融合体。此外, AXL 基因水平的抑制可以被 AXL 信号抑制因子影响,例如下游抑制因子。

表 2 侵入性的共有序列

乳腺癌细胞系和对照	
No	已知的功能和关联
1	增殖、粘附、抗凋亡功能、与侵入无关
2	肝素结合 EGF
3	参与乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、恶性胶质瘤的血管化
4	STK、核糖体 S6 激酶 2、与侵入无关
5	STK、糖皮质激素 - 调节激酶、抗凋亡功能, 参与细胞存活
6	参与 TNF $\alpha$ 受体的释放 (shedding) 的 TACE
7	SRC 家族激酶
8	STK、活化 JNK (但不活化 p38 和 ERK)、可能参与 TNF $\alpha$ 信号传导, 类似 SLK
9	癌症细胞侵入的标记
10	与整合素相互作用, 与膜边缘的 SRC 和 GRB 共存, 参与介由 SH3 的信号传导的 cytopl 结构域
11	在信号传导中的重要作用, 与细胞转化有关, 促进细胞侵入
12	CSF-R1 的配体, 血管形成, 侵入性乳腺癌细胞的组成性表达
13	内皮细胞的 unic 表达, 特异于 CD44 的释放
14	与细胞转化有关, 促进细胞转移和侵入, 癌症细胞的上皮 - 间充质细胞转变的标志
15	粘附、信号传导、转移、参与侵入未知

表 3

	点标记 (HUGO 分类)	登录号	GenBank/Link	出版物
1	AXL(AXL 受体酪氨酸激酶)	M76125	<a href="#">M76125</a>	Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5016-5031 (1991)
2	ADAM12(disintegrin 和金属蛋白酶结构域 12=meltrin $\alpha$ )	AF023476	<a href="#">AF023476</a>	J. Biol. Chem. 273 (1), 157-166 (1998)
3	ADAM17(disintegrin 和金属蛋白酶结构域 17=TACE)	U69611	<a href="#">U69611</a>	Nature 385 (6618), 729-733 (1997)
4	ANXA2(膜联蛋白 A2, p35 src - 结合)	D00017	<a href="#">D00017</a>	Cell 46 (2), 191-199 (1986)
5	CAV1(小窝蛋白 1, 小窝蛋白, 22kD)	Z18951	<a href="#">Z18951</a>	FEBS Lett. 314 (1), 45-48 (1992)
6	CAV2(小窝蛋白 2)	AF035752	<a href="#">AF035752</a>	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1), 131-135 (1996)
7	CD44(抗原 = 参与基质粘附)	X66733	<a href="#">X66733</a>	J. Invest. Dermatol. 99, 381-385 (1992)
8	DDR2(discoidin 结构域受体家族, 成员 2)	X74764	<a href="#">X74764</a>	Oncogene 8 (12), 3433-3440 (1993)
9	FGF2(成纤维生长因子 2 (碱性))	NM002006	<a href="#">NM_002006</a>	EMBO J. 5 (10), 2523-2528 (1986)
10	FGF5(成纤维生长因子 5)	NM004464	<a href="#">NM_004464</a>	Mol. Cell. Biol. 8 (8), 3487-3495 (1988)
11	DPHA2(EphA2=ephrin 型-a 受体 A2)	M59371	<a href="#">M59371</a>	Mol. Cell. Biol. 10 (12), 6316-6324 (1990)
12	GAS6(AXL 配体, 生长抑制 - 特异 6)	L13720	<a href="#">L13720</a>	Mol. Cell. Biol. 13 (8), 4976-4985 (1993)
13	FPK(fyn 相关激酶)	U00803	<a href="#">U00803</a>	Gene 138, 247-251 (1994)
14	(HB-EGF)DTR(肝素结合表皮生长因子样生长因子)	NM001945	<a href="#">NM_001945</a>	Science 251, 936-939 (1991)
15	LYN(酪氨酸蛋白激酶)	M16038	<a href="#">M16038</a>	Mol. Cell. Biol. 7 (1), 237-243 (1987)
16	PTPNS1(PTP, 非受体型底物 1)	Y10375	<a href="#">Y10375</a>	Nature 386 (6621), 181-186 (1997)
17	MMP1(基质金属蛋白酶 1 = 间质胶原酶)	M13509	<a href="#">M13509</a>	J. Biol. Chem. 261, 6600-6605 (1986)
18	MMP14(基质金属蛋白酶 14 (膜插入))	NM004995	<a href="#">NM_004995</a>	Nature 370 (6484), 61-65 (1994)
19	MMP2(基质金属蛋白酶 2, 明胶酶 A)	NM004530	<a href="#">NM_004530</a>	J. Biol. Chem. 263, 6579-6587 (1988)
20	MMP9(基质金属蛋白酶 9 = 明胶酶 B)	NM004894	<a href="#">NM_004894</a>	J. Biol. Chem. 264 (29), 17213-17221 (1989)
21	MAP4K4(促分裂原 - 活化蛋白激酶激酶激酶 4)	XM038748	<a href="#">NT_022171</a>	Direct Submission
22	MT3MMP, 或 MMP16(基质金属蛋白酶 16 (膜插入))	NM005941	<a href="#">XM_042409</a>	J. Biol. Chem. 270 (39), 23013-23020 (1995)
23	TIMP1(金属蛋白酶 1 的组织抑制剂)	NM003254	<a href="#">NM_003254</a>	Nature 315 (6022), 768-771 (1985)
24	VIM(维生素)	X56134	<a href="#">X56134</a>	Nucleic Acids Res. 18 (22), 6692 (1990)
25	SGK(血清/皮质激素调节激酶)	Y10032	<a href="#">Y10032</a>	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94(9), 4440-4445 (1997)
26	RPS6KB1(核糖体蛋白 S6 激酶, 70KD, 多肽 1)	M60724	<a href="#">M60724</a>	Mol. Cell. Biol. 11, 5541-5550 (1991)
27	FYN(原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (syn))	M14333	<a href="#">M14333</a>	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5459-5463 (1986)

表 4 由酪氨酸激酶 cDNA 阵列测定的 EGFR 和 UFO/Ax1 在人神经胶质瘤细胞中的表达

细胞系	EGFR	UFO/Ax1	UFO/Ax1: EGFR
U-118	169	1793	10.6
U-1242	324	1793	5.5
SF126	296	1612	5.4
A-172	438	1935	4.4
U-373	56	190	3.4
U-1240	139	262	1.9
T-98G	540	800	1.5
SF763	5526	39	0.0
SF767	1039	—	0.0

## 参考文献

1. J.W. Janssen, A.S. Schulz, A.C. Steenvoorden et al., A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6 (1991), pp. 2113-2120.
2. J. O'Bryan, R.A. Frye, P.C. Cogswell et al., AXL, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991), pp. 5016-5031.
3. Healy, A. M., Schwartz, J. J., Zhu, X., Herrick, B. E., Varnum, B., Farber, H. W. (2001). Gas 6 promotes AXL-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 280: 1273L-1281
4. A. Neubauer, A. Fiebeler, D.K. Graham et al., Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 84 (1994), pp. 1931-1941.
5. P. McCloskey, J. Pierce, R.A. Koski, B. Varnum and E.T. Liu , Activation of the AXL receptor tyrosine kinase induces mitogenesis and transformation in 32D cells. *Cell Growth Differ.* 5 (1994), pp. 1105-1117.
6. P. Bellosta, Q. Zhang, S.P. Goff and C. Basilico , Signalling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene* 15 (1997), pp. 2387-2397.

7. S. Goruppi, E. Ruaro and C. Schneider , *Gas6*, the ligand of AXL tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 12 (1996), pp. 471-480.
8. P. McCloskey, Y.W. Fridell, E. Attar et al., *GAS6* mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase AXL. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), pp. 23285-3291.
9. Caron de Fromental C., Nardeux P. C., Soussi T., Lavielle C., Estrade S., Carloni G., Chandrasekaran K., Cassingena R. Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbors SV40 genetic information. *Exp. Cell Res.*, (1985), 160: 83-94.
10. Albin A., Iwamoto Y., Kleinman H. K., Martin G. R., Aaronson S. A., Kozlowski J. M., McEwan R. N. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, 47: 3239-3245, 1987.
11. Thompson E. W., Paik S., Brunner N., Sommers C. L., Zugmaier G., Clarke R., Shima T. B., Torri J., Donahue S., Lippman M. E., et al Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*, 150: 534-544, 1992.
12. Terranova V. P., Hujanen E. S., Martin G. R. Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 77: 311-316, 1986.

13. Perou C. M., Jeffrey S. S., van de Rijn M., Rees C. A., Eisen M. B., Ross D. T., Pergamenschikov A., Williams C. F., Zhu S. X., Lee J. C., Lashkari D., Shalon D., Brown P. O., Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9212-9217, 1999.
14. Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Aksten L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature (Lond.)*, 406: 747-752, 2000.
15. Johnston M. Gene chips: array of hope for understanding gene regulation. *Curr. Biol.*, 8: R171-174, 1998.
16. Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.*, 21: 10-14, 1999.
17. Price J. E., Polyzos A., Zhang R. D., Daniels L. M. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res.*, 50: 717-721, 1990.
18. Sommers C. L., Byers S. W., Thompson E. W., Torri J. A., Gelmann E. P. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat*, 31: 325-335, 1994.
19. Deborah A. Zajchowski, Marty F. Bartholdi, Yan Gong, Lynn Webster, Hsiao-Lai Liu, Alexander Munishkin, Catherine Beauheim, Susan Harvey, Stephen P. Ethier and Paul H. Johnson. Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 61, 5168-5178, July 1, 2001.

20. A. Wimmel, M. Schilli, U. Kaiser et al., Preferential histiotypic expression of CD44-isoforms in human lung cancer. *Lung Cancer* 16 (1997), pp. 151-172.
21. Subburaj Ilangumaran, Anne Briol, and Daniel C. Hoessli. CD44 Selectively Associates With Active Src Family Protein Tyrosine Kinases Lck and Fyn in Glycosphingolipid-Rich Plasma Membrane Domains of Human Peripheral Blood Lymphocytes . *Blood*, Vol. 91 No. 10 (May 15), 1998: pp. 3901-3908
22. Domagala W., Lasota J., Bartowiak J., Weber K., Osborn M. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am. J. Pathol.*, 136: 219-227, 1990.
23. Domagala W., Wozniak L., Lasota J., Weber K., Osborn M. Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary but not in lobular breast carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 137: 1059-1064, 1990.
24. Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 2001 Mar 15;61(6):2361-4.
25. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998 Aug;4(8):1873-80.

26. Bachmeier BE, Nerlich AG, Lichtinghagen R, Sommerhoff CP. Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res* 2001 Nov-Dec;21(6A):3821-8.
27. Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Frankenne F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM, Noel A. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* 2002 Apr;16(6):555-64.
28. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001 Mar 19;193(6):727-40.
29. Pederson L, Winding B, Foged NT, Spelsberg TC, Oursler MJ. Identification of breast cancer cell line-derived paracrine factors that stimulate osteoclast activity. *Cancer Res* 1999 Nov 15;59(22):5849-55.
30. Kelly Carles-Kinch, Katherine E. Kilpatrick, Jane C. Stewart and Michael S. Kinch . Antibody Targeting of the EphA2 Tyrosine Kinase Inhibits Malignant Cell Behavior. *Cancer Research* 62, 2840-2847, May 15, 2002.
31. Bange J., Prechtel D., Cheburkin Y., Specht K., Harbeck N., Schmitt M., Knyazeva T., Muller S., Gartner S., Sures I., Wang H., Imyanitov E., Haring HU, Knyazev P., Iacobelli S., Hofler H., Ullrich A. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res.* 2002, Feb. 1, 62(3), 840-7.

32. Yanagita M., Arai H., Ishii K., Nakano T., Ohashi K., Mizuno K., Varnum B., Fukatsu A., Doi T., Kita T. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through AXL in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Pathol*, 2001 Apr., 158(4), 1423-32.
33. Attar E.C, Fridell Y.C, Xu L., Jin Y., Maia D.M., Schell M.J., and Liu E.T. AXL receptor tyrosine kinase expression in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, (Oct., 1997) Vol. 46, No. 1, pp. 91.
34. Dodge Zantek N., Walker-Daniels J., Stewart J., Hansen R. , Robinson D., Miao H., Wang B., Kung H-J., Bissell M. J. and Kinch M. MCF-10A-neoSt: A New Cell System for Studying Cell-ECM and Cell-Cell Interactions in Breast Cancer. *Clinical Research*, Vol. 7, 3640-3548, November 2001.
35. Vajkoczy, P., Goldbrunner, R., Farhadi, M., Vince, G., Schilling, L., Tonn, J. C., Schmiedek, P., and Menger, M. D. Glioma cell migration is associated with glioma-induced angiogenesis in vivo, *Int J Dev Neurosci*. 17: 557-63, 1999.
36. Sasaki, T., Knyazev, P. G., Cheburkin, Y., Gohring, W., Tisi, D., Ullrich, A., Timpl, R., and Ho-henester, E. Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains, *J Biol Chem*. 277: 44164-70., 2002.
37. Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P., and Menger, M. D. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multfluorescence micro-scopic approach in the athymic nude mouse, *J Cereb Blood Flow Metab*. 18: 510-520, 1998.

38. Vajkoczy, P., Farhadi, M., Gaumann, A., Heidenreich, R., Erber, R., Wunder, A., Tonn, J. C., Menger, M. D., and Breier, G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2, *J Clin Invest.* 109: 777-85., 2002.
39. Read, T. A., Farhadi, M., Bjerkvig, R., Olsen, B. R., Rokstad, A. M., Huszthy, P. C., and Vajkoczy, P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells, *Cancer Res.* 61: 6830-7., 2001.
40. Bjerkvig, R., Laerum, O. D., and Mella, O. Glioma cell interactions with fetal rat brain aggregates in vitro and with brain tissue in vivo, *Cancer Res.* 46: 4071-9., 1986.
41. Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., and et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases, *Cell.* 80: 661-70., 1995.
42. Fridell, Y. W., Villa, J., Jr., Attar, E. C., and Liu, E. T. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem.* 273: 7123-6., 1998.
43. Bellosta, P., Costa, M., Lin, D. A., and Basilico, C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding, *Mol Cell Biol.* 15: 614-25., 1995.
44. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature (Lond.)* 367: 576-579.

Matrigel上侵入性BC细胞的3D生长

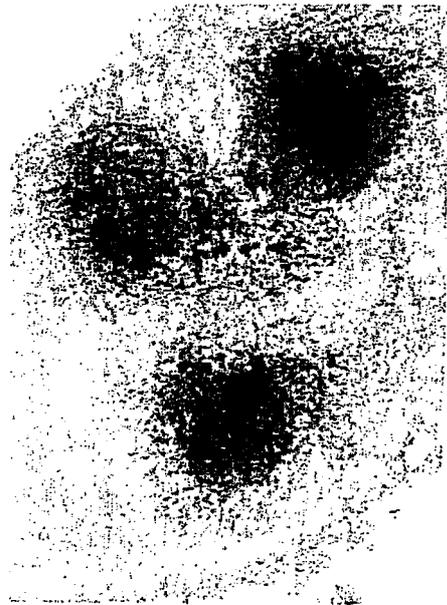
MDA-MB-231 (分枝的, 侵入性)



MBA-MB-435S (分枝-星形, 侵入性)



BT-549 (星形的, 侵入性)



MCF10A (管样形式, 非侵入性)  
对照

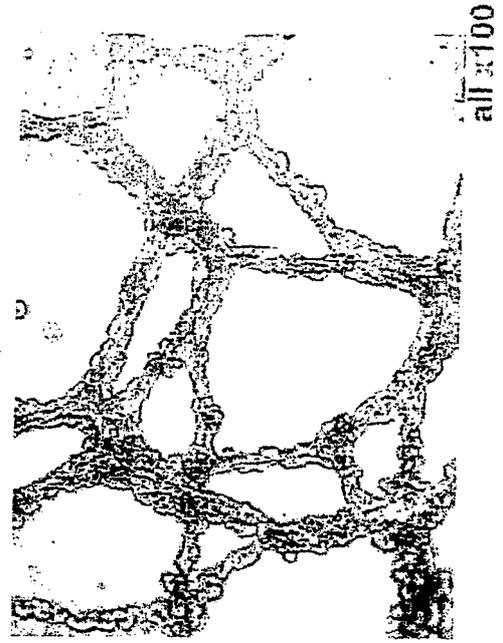


图1

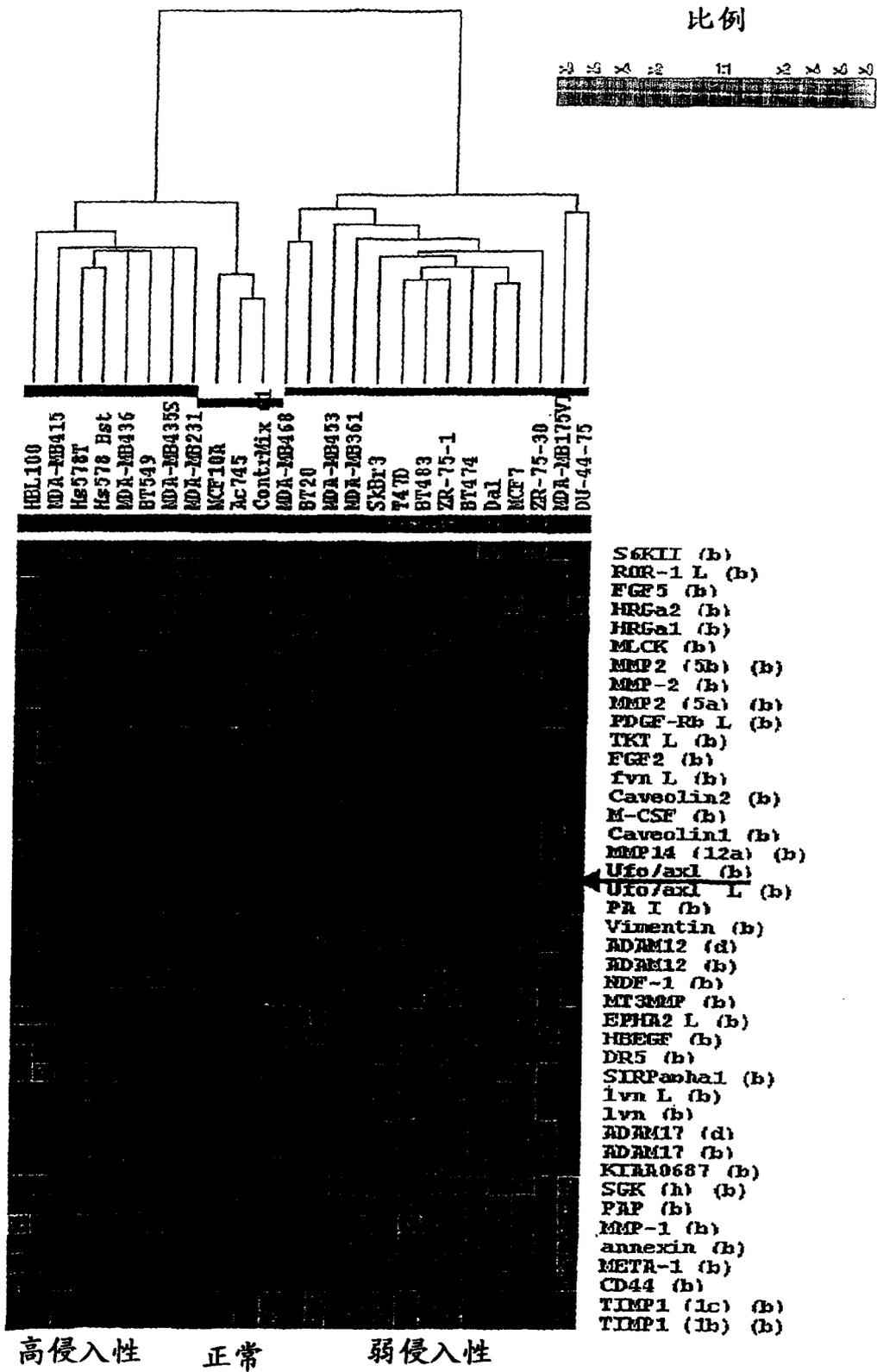


图2





通过Northern印迹对RTK AXL和GAS表达的分析

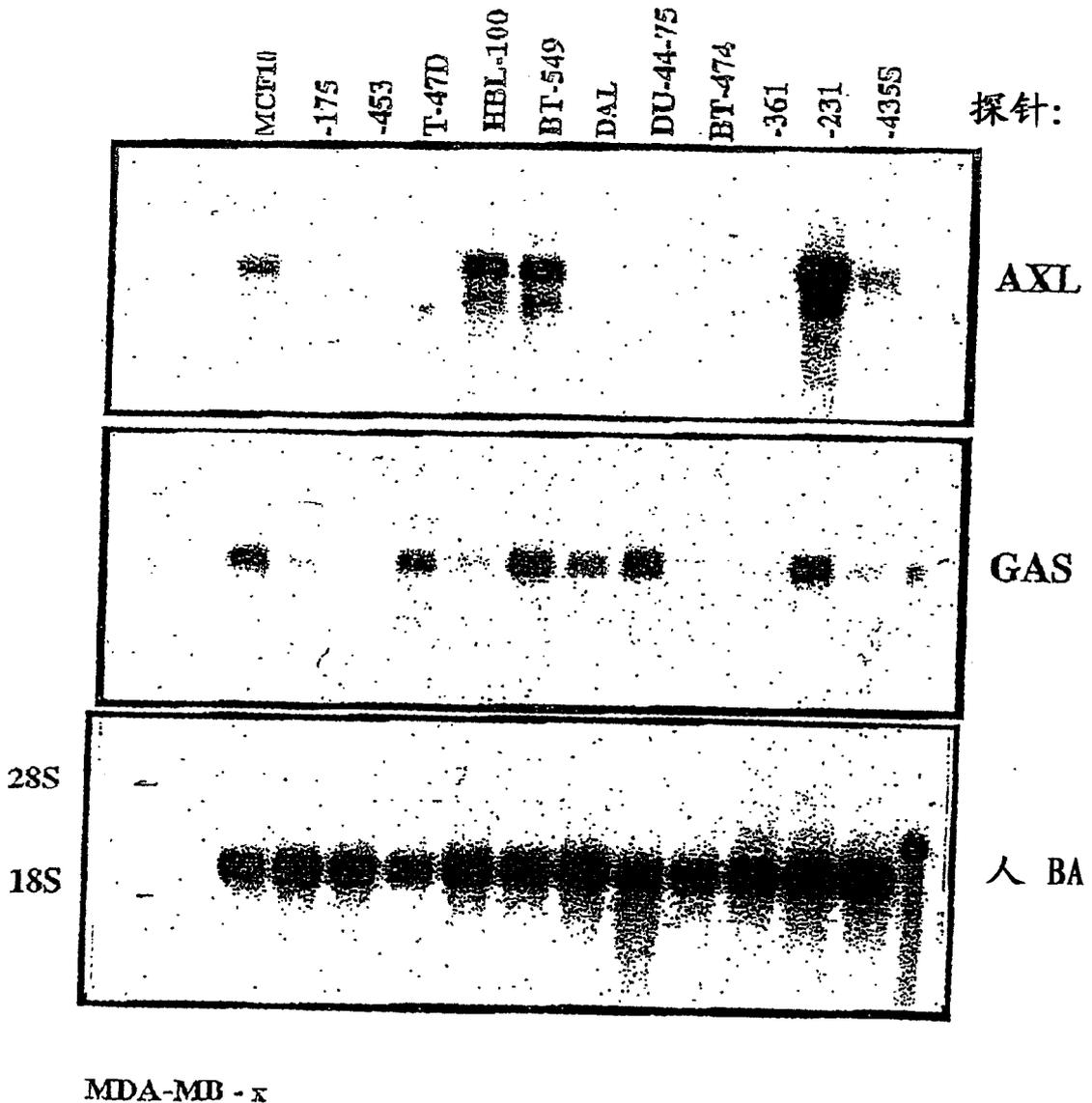


图4

Matrigel基质上不同侵入性乳腺癌细胞系的3D生长晕 (14天)

MDA-MB-435S, 模拟物



BT549, 模拟物



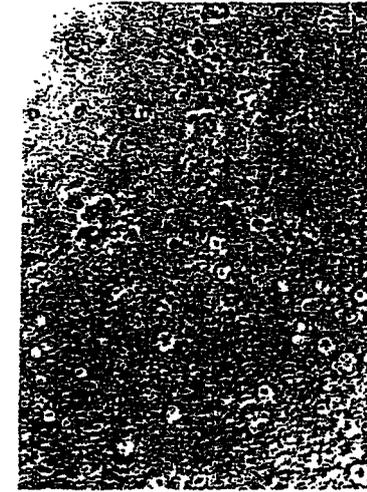
MDA-MB-231, 模拟物



-dnAXL, 克隆2



-dnAXL, 克隆7



-dnAXL, 克隆8



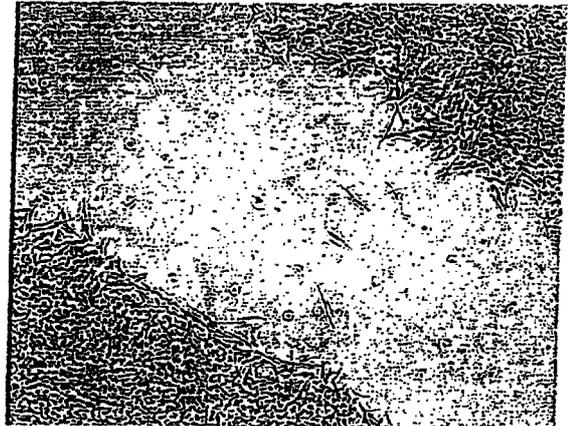
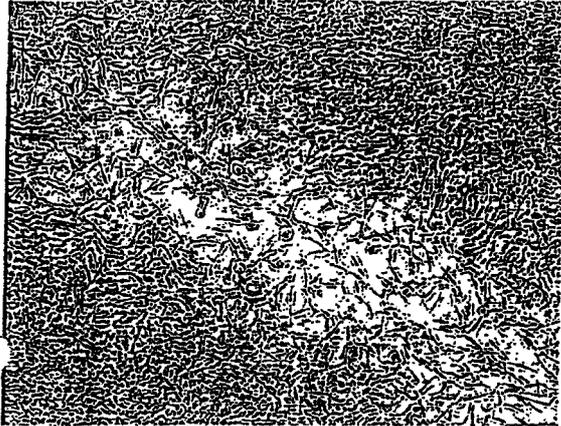
所有-dn-AXL克隆生长为非侵入性、假腺泡-融合癌细胞

图 5A

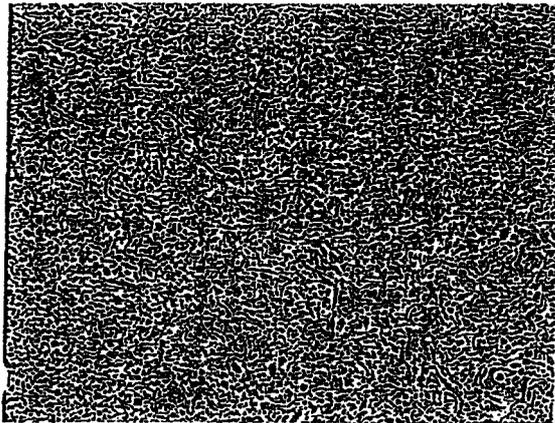
### 创伤测定

MDA-MB-435S, 模拟0%FCS

MDA-MB435S-dnAXL, c1. 2



FCS+GAS6



饥饿72小时



图 5B

MDA-MD-435S, Ex-AXL抗体处理的模拟物 (ab): MM上的3D生长14天



无ab处理



+ 抗-GAS ab



+ 免疫前血清 (RI)

(MDA-MB435S-dnAXL c12, MM上14天



图6A

-Ex-AXL ab的处理: 融合的生长晕



(假腺泡或融合的)

×100 aII

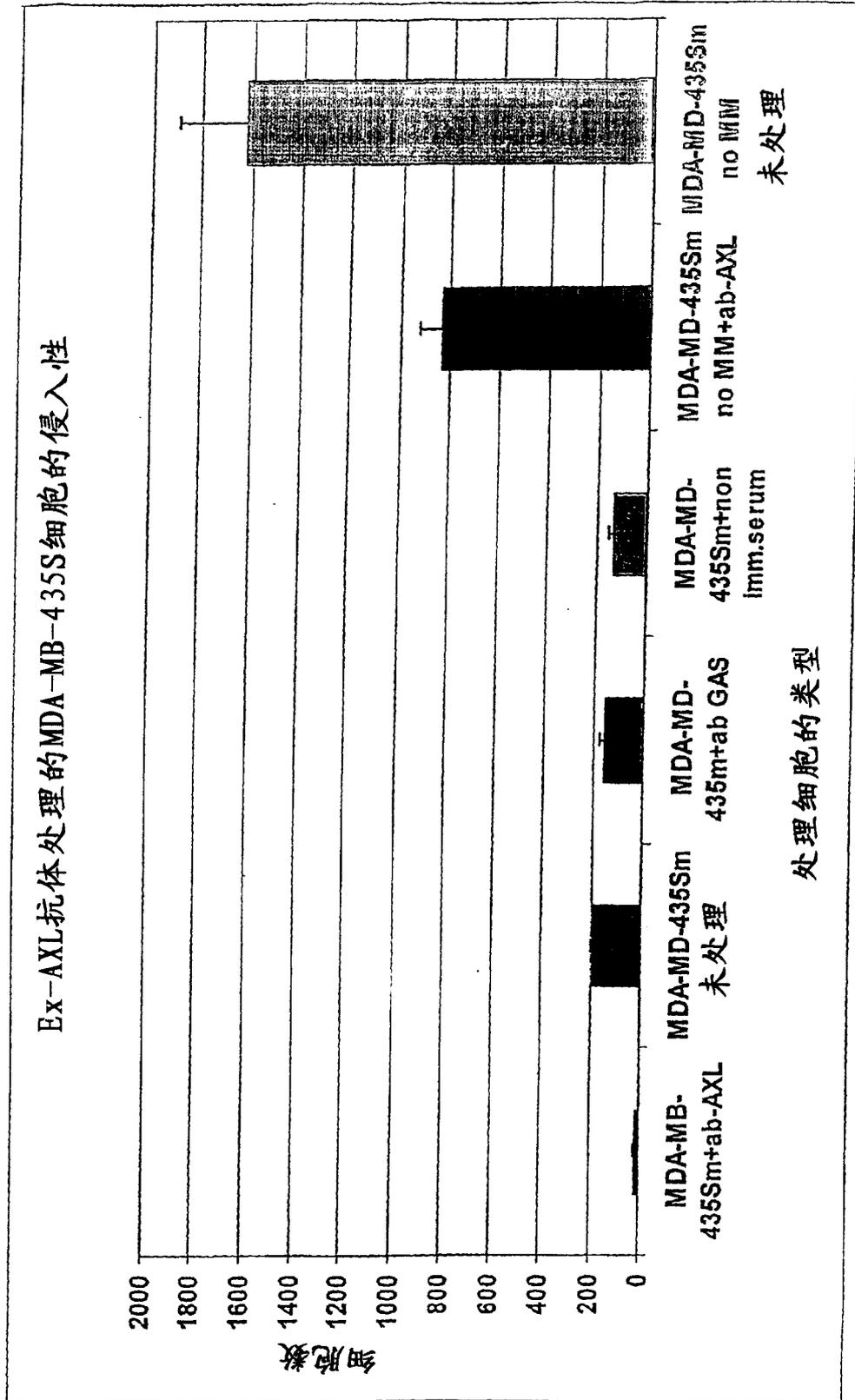


图 6B

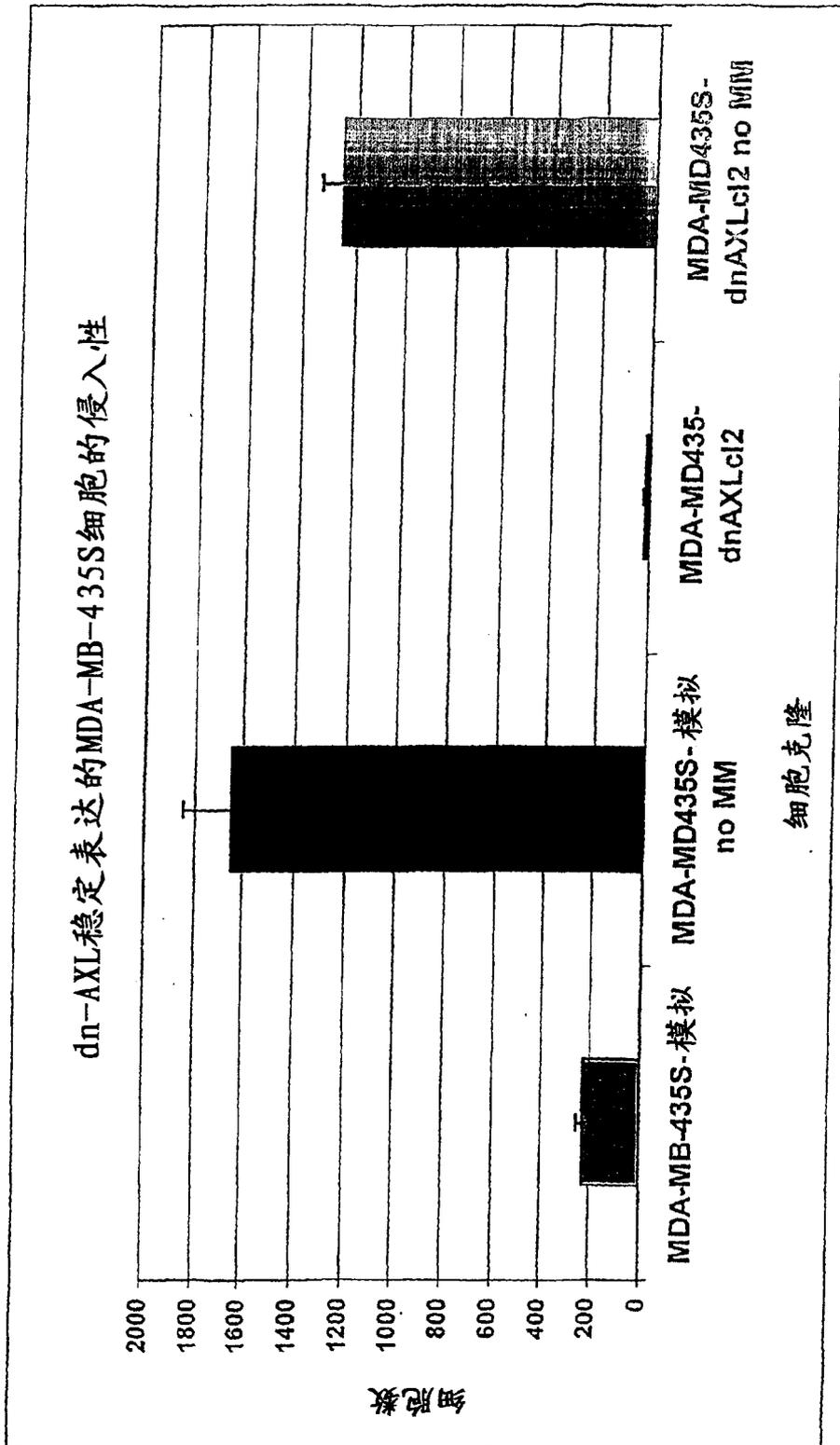


图6C



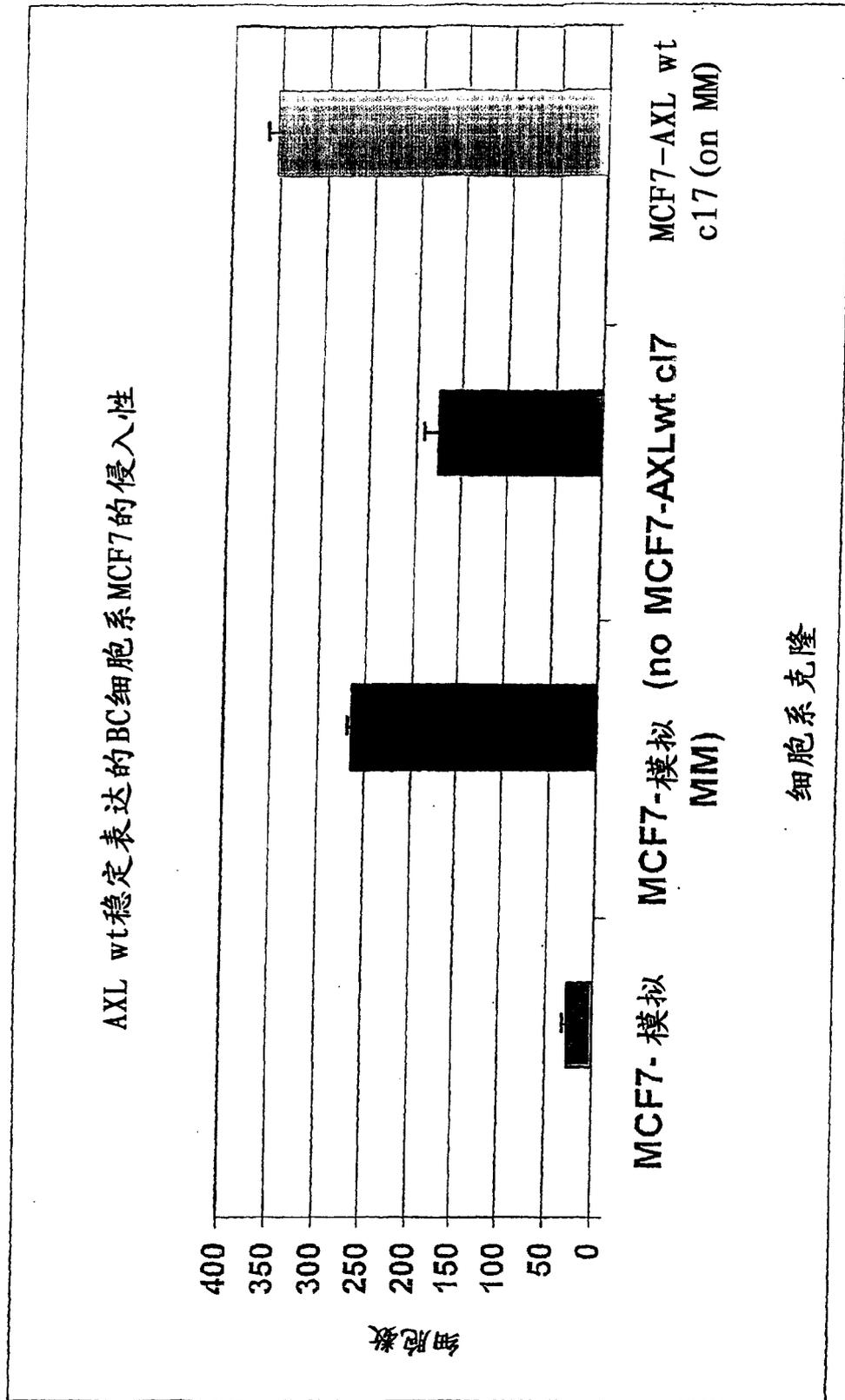


图7B

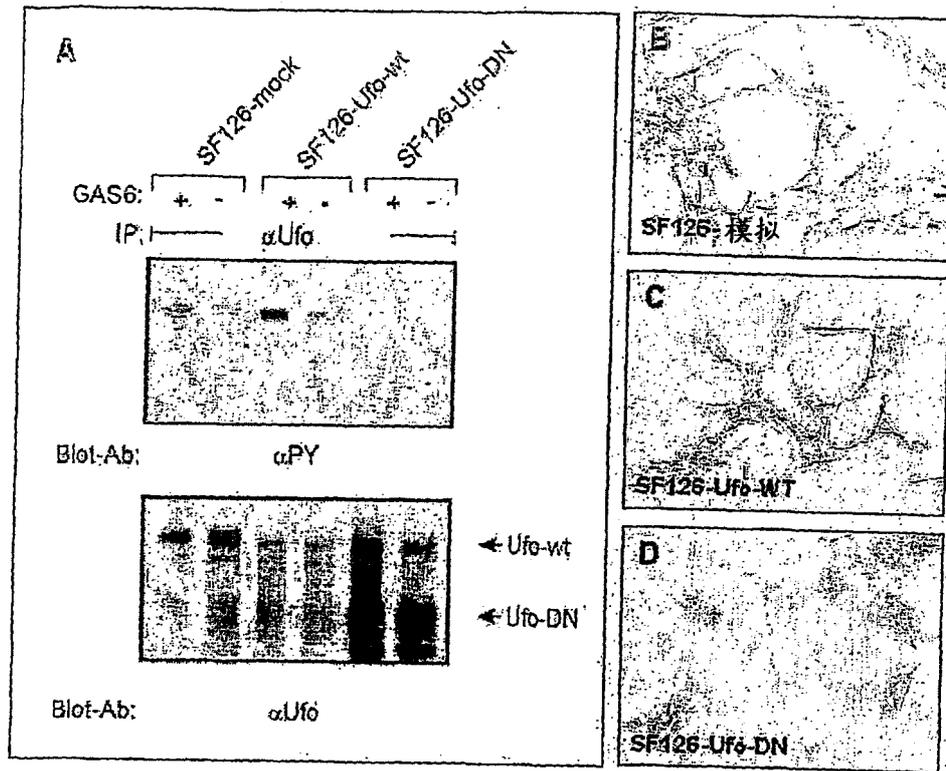


图 8

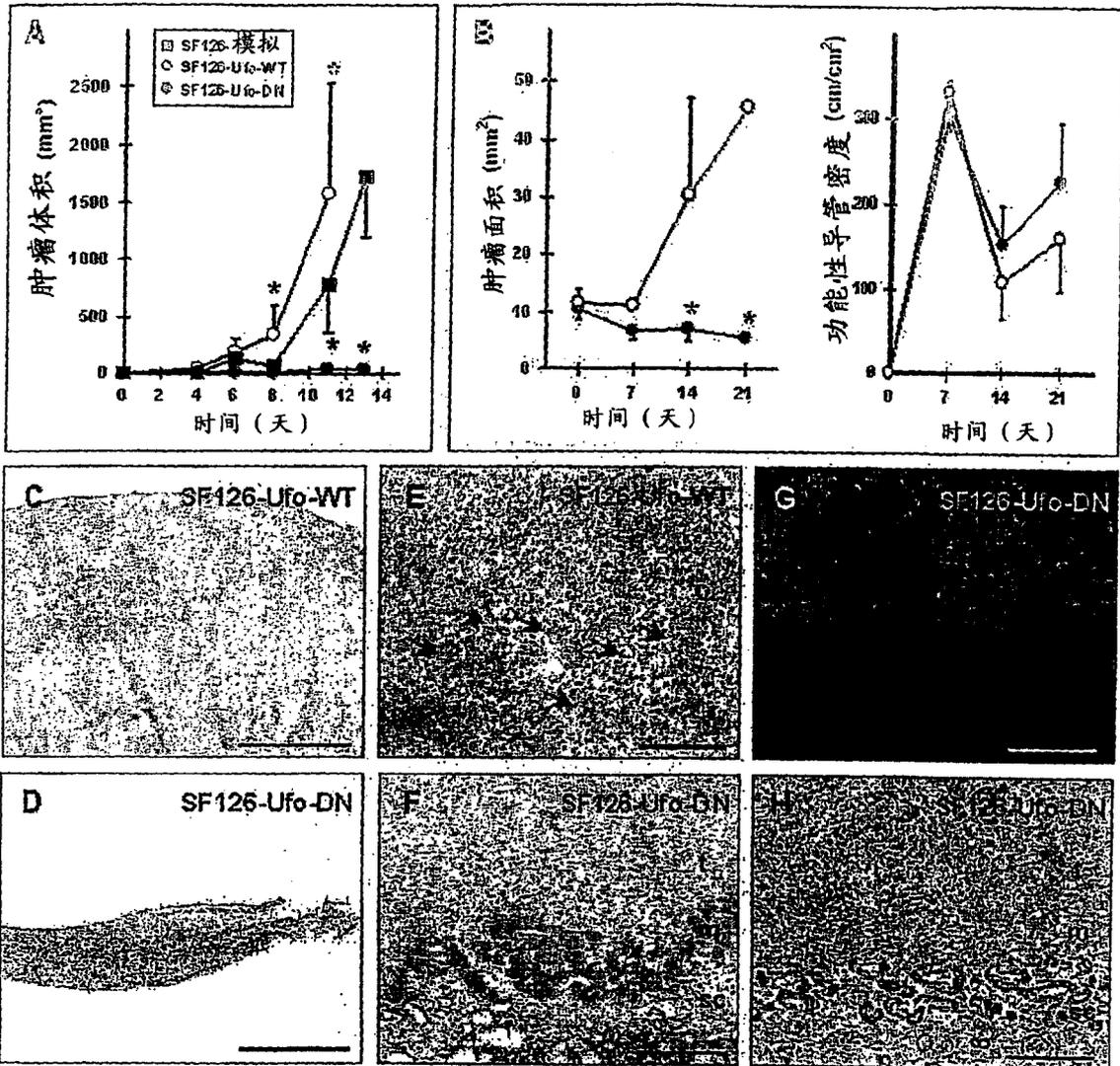


图9

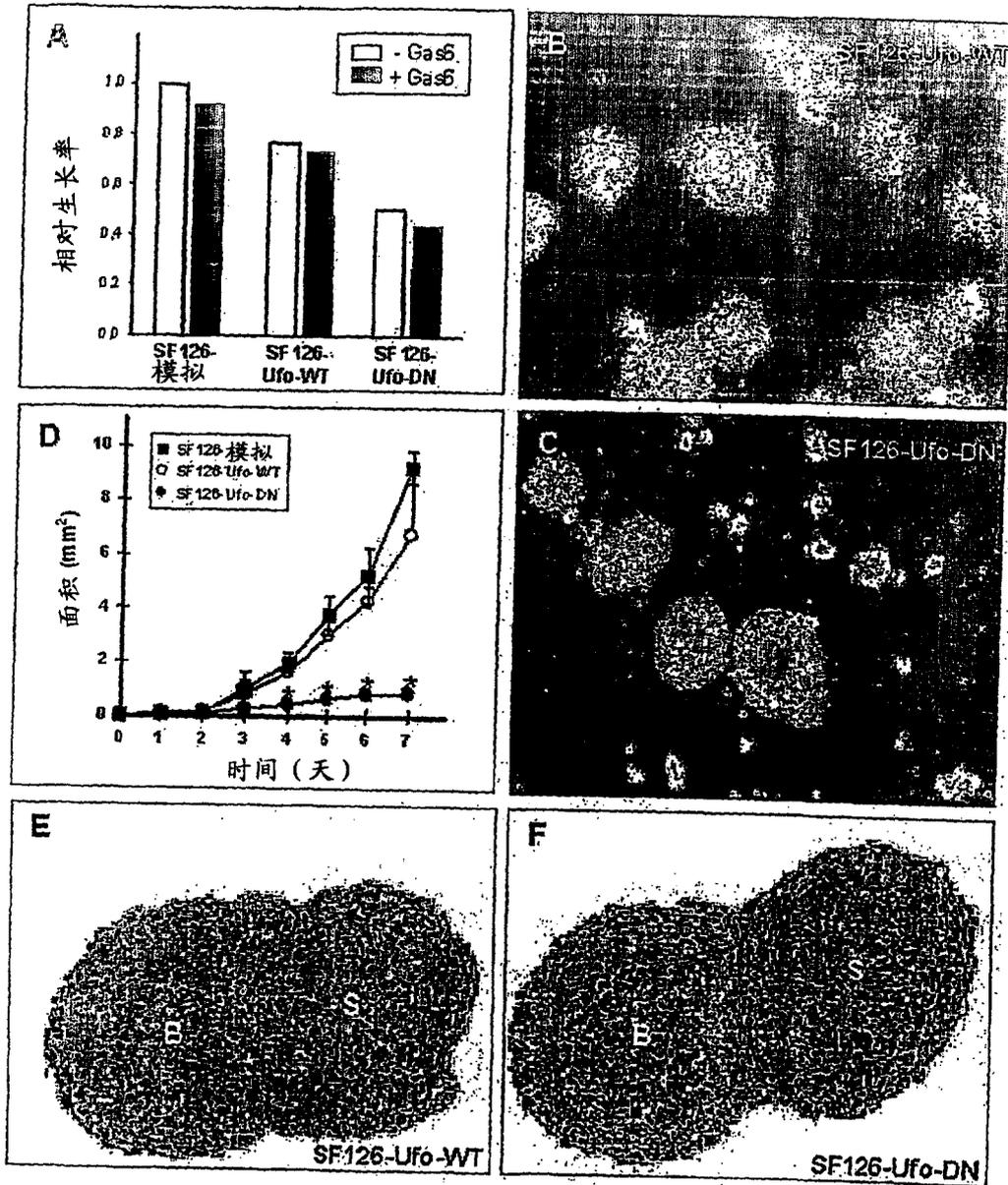


图 10

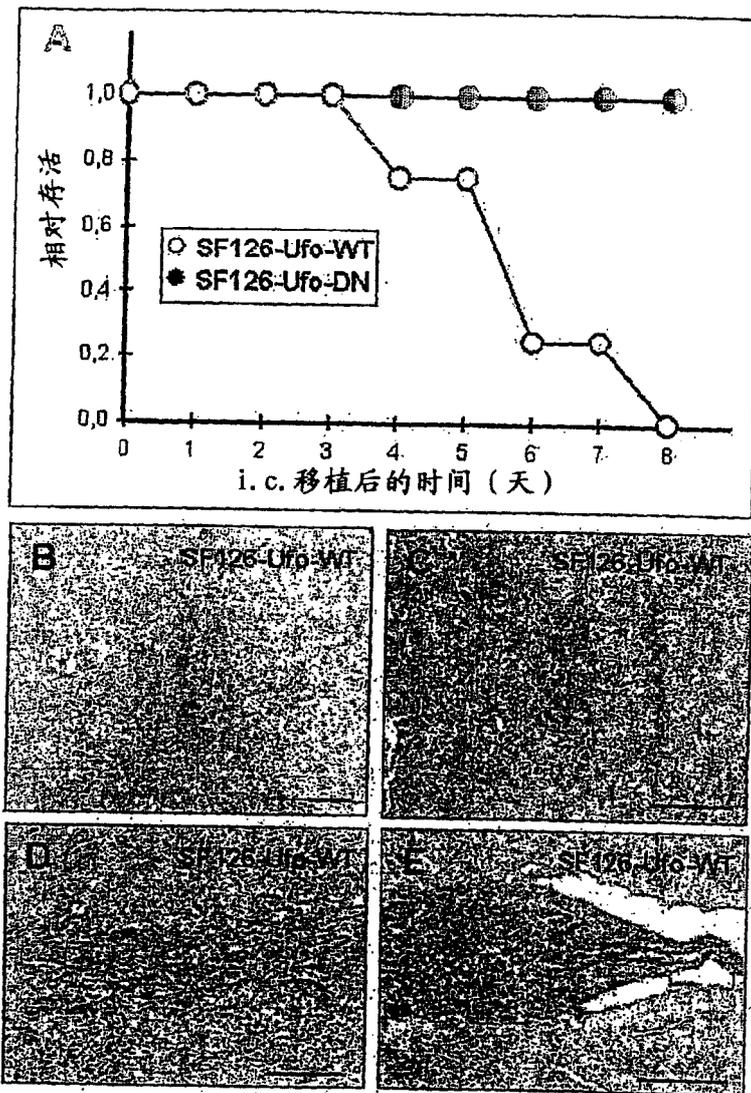


图11

专利名称(译)	癌症细胞侵入的诊断和预防		
公开(公告)号	<a href="#">CN1739030A</a>	公开(公告)日	2006-02-22
申请号	CN03816955.X	申请日	2003-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	马普科技促进协会		
申请(专利权)人(译)	马普科技促进协会		
当前申请(专利权)人(译)	马普科技促进协会		
[标]发明人	A尤尔里奇 P 克尼亚泽夫 T 克尼亚泽瓦 Y 切伯金 P 瓦杰科斯基		
发明人	A·尤尔里奇 P·克尼亚泽夫 T·克尼亚泽瓦 Y·切伯金 P·瓦杰科斯基		
IPC分类号	G01N33/574 A61P35/04 A61P35/00 G01N33/53 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C07K16/2863 C12Q1/6886 A61K39/3955 A61K2039/505 C12Q2600/136		
代理人(译)	赵艳华		
优先权	2002015944 2002-07-17 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及恶性病症领域中的诊断和治疗方法。尤其是，本发明提供了测定恶性病症的侵入力的方法和包括阻止或治疗肿瘤细胞侵入的减小恶性病症的侵入力的方法。

