

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510011707.3

[43] 公开日 2006年11月15日

[11] 公开号 CN 1862258A

[22] 申请日 2005.5.12

[21] 申请号 200510011707.3

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市 100084 - 82 信箱

共同申请人 北京普罗吉生物科技发展有限公司

[72] 发明人 罗永章 石虎兵 张卓兵

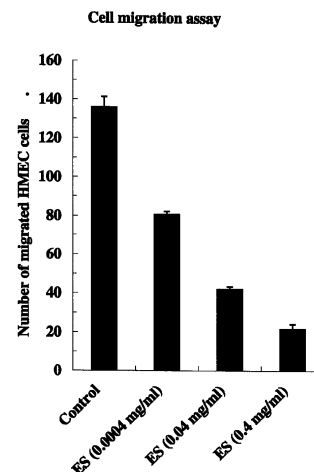
权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图 22 页

[54] 发明名称

核仁素辅助的癌症诊断与治疗方法

[57] 摘要

本发明提供了一种设计试剂盒，用于检测和筛选那些适于使用 ES 和其他新生血管生成抑制剂类药物治疗的癌症种类或癌症个体。本发明同时提供了筛选新生血管生成抑制剂的方法，特别是作用与 ES 相似的抑制剂。此外本发明提供了通过导入外源性 NL 至目标内皮细胞使它们更易被新生血管生成抑制剂（例如 ES）杀死，从而增加内皮细胞对于新生血管生成抑制剂（例如 ES）的敏感度的方法。



1. 一种评估是否使用 ES 进行癌症治疗的诊断试剂盒；包括：
 - a. 一种对 NL 进行标记的标签；以及
 - b. 提供一种通过对样本进行上述的标记后，来测定样本中 NL 含量的使用指导。
2. 要求 1 中提到的诊断试剂盒适用于哺乳动物。
3. 要求 1 中提到的诊断试剂盒适用于人类。
4. 要求 1 中提到的诊断试剂盒标记的是细胞膜表面的 NL。
5. 要求 1 中提到的诊断试剂盒标记的是全细胞中的 NL。
6. 要求 1 中提到的诊断试剂盒使用的标记物是抗体。
7. 要求 6 中提到的诊断试剂盒所使用的标记抗体是单克隆抗体。
8. 要求 6 中提到的诊断试剂盒所使用的标记抗体是多克隆抗体。
9. 要求 1 中提到的诊断试剂盒标记的是一种核酸分子。
10. 要求 9 中提到核酸分子是脱氧核糖核酸分子。
11. 要求 9 中提到核酸分子是核糖核酸分子。
12. 一种和上述方法类似的方法用于评估是否使用 ES 进行癌症治疗的科目；包括：
 - a. 根据上述方法，通过对 NL 表达的水平进行检测筛选出样本；并且
 - b. 通过上述的方法对 NL 表达量进行检测，从而决定是否使用 ES 进行癌症治疗。
13. 一种获得以 NL 为特异性靶点的有效的新生血管生成抑制剂的方法；包括：
 - a. 对待筛选的分子使用合适的结合实验，从而得到一些 NL 特异性结合的分子；
 - b. 利用抗新生血管生成试验检验上步骤得到的各种分子抑制新生血管生成的效果；并且
 - c. 挑选出能在抗新生血管试验中有效抑制新生血管生成的 NL 特异性分子。
14. 要求 13 中的方法提到的 NL 特异性新生血管生成抑制剂是蛋白质或肽。
15. 要求 13 中的方法提到的 NL 特异性新生血管生成抑制剂是小分子。
16. 要求 13 中的方法提到的 NL 特异性新生血管生成抑制剂用来治疗新生血管生成依赖性疾病。
17. 要求 16 中的方法提到的新生血管生成依赖性疾病是癌症。
18. 要求 16 中的方法提到的新生血管生成依赖性疾病是内皮细胞疾病。

19. 一种选择具有体外抑制内皮细胞增殖效果的新生血管生成抑制剂的方法包括如此步骤：
 - a. 使用制药学上可接受的方法去发现与 NL 有特异性相互作用的分子；
 - b. 检测 a 步骤中得到的分子抑制内皮细胞增殖的效果；并且
 - c. 确定所得到的能有效抑制内皮细胞增殖的是何种分子，同时对比该分子与 ES 的抗新生血管生成的功能。
20. 要求 19 中的方法提到的 NL 特异性新生血管生成抑制剂是蛋白质或肽。
21. 要求 19 中的方法提到的 NL 特异性新生血管生成抑制剂是小分子。
22. 一种提高靶细胞对新生血管生成抑制剂的响应能力的方法包括：
 - a. 导入外源性 NL 至靶细胞，从而使修饰后的靶细胞表达更多的 NL；
 - b. 检验 ES 对这些修饰过的癌细胞的杀伤率。
23. 要求 22 中的方法提到的靶细胞是癌细胞。
24. 要求 22 中的方法提到的靶细胞是内皮细胞。
25. 要求 22 中的方法提到的新生血管生成抑制剂是 ES。
26. 要求 22 中的方法提到的将外源 NL 导入靶细胞是通过病毒载体。
27. 一种增强新生血管生成抑制剂对目标内皮细胞的效果的方法包括：
 - a. 导入靶细胞制药学上有效剂量的外源 NL，上述 NL 能够在靶细胞中得到表达；以及
 - b. 将上述靶细胞与上述新生血管生成抑制剂共孵育，从而获得对上述靶细胞生长的抑制。
28. 要求 27 中的方法提到的新生血管生成抑制剂是 ES。
29. 要求 27 中的方法提到的目标内皮细胞是癌细胞。
30. 一种检验个体靶细胞对于新生血管生成抑制剂敏感度的诊断试剂盒包括：
 - a. 特异性结合 NL 的分子；以及
 - b. 一种制药学上可接受的载体。
31. 要求 30 中的诊断试剂盒提到的新生血管生成抑制剂是 ES。
32. 要求 30 中的诊断试剂盒提到的靶细胞是癌细胞。
33. 一种确定对新生血管生成抑制剂治疗敏感的目标肿瘤新生脉管内皮细胞的诊断试剂盒包括：
 - a. 一种 NL 的抗体；以及
 - b. 一种制药学上可以接受的载体。

34. 要求 33 中的方法提到的 NL 的抗体是多克隆抗体。
35. 要求 33 中的方法提到的 NL 的抗体是单克隆抗体。
36. 一种确定癌症患者对 ES 治疗敏感程度的方法；包括：取患者的一个样本，用 NL 抗体处理，检测样本中 NL 与其抗体形成的复合物，复合物的量越多患者对 ES 治疗越敏感。
37. 一种提高新生血管生成抑制剂控制病人携带的肿瘤生长的效果的方法包括：
 - a. 用合适的方法确定上述病人肿瘤样品中存在的内源性 NL 水平；并且
 - b. 利用上述病人 NL 表达水平确定新生血管生成抑制剂对上述病人有抑瘤效果的可能性，较高水平的 NL 说明使用新生血管生成抑制剂治疗更容易成功。
38. 要求 37 中的方法提到的新生血管生成抑制剂是 ES 或其拟似物。
39. 要求 37 中的方法提到的检验病人肿瘤样品中 NL 表达水平是通过 NL 的抗体与 NL 的免疫沉淀来进行的。
40. 一种确定对新生血管生成抑制剂治疗敏感的肿瘤新生血管内皮细胞的方法包括：
 - a. 制备一种抗 NL 的抗体；
 - b. 使用上述抗体从上述目标肿瘤细胞样本中筛选；并且
 - c. 根据抗 NL 抗体与目标癌细胞之间的特异性相互作用确定目标癌细胞对新生血管生成抑制剂治疗的敏感程度，相互作用越强目标癌细胞对新生血管生成抑制剂治疗越敏感。
41. 要求 40 中的方法提到的 NL 的抗体是多克隆抗体。
42. 要求 40 中的方法提到的 NL 的抗体是单克隆抗体。
43. 要求 40 中的方法提到的新生血管生成抑制剂是 ES。

核仁素辅助的癌症诊断与治疗方法

技术领域

本项发明提出了一种新方法，可以用来寻找适于接受抗新生血管生成癌症疗法的癌症主体，特别是人类患者。本发明还提出一种能够搜索并筛选新生血管生成抑制剂的方法。新生血管生成抑制剂可以有效抑制细胞恶性增殖，尤其对新生血管生成依赖型的癌症效果更为显著。本项发明建立了用 Nucleolin（以下简称“NL”）筛选新生血管生成抑制剂的方法。特别指出的是，该方法可以筛选出与 Endostatin（血管内皮抑制素，以下简称“ES”）作用机理相似的新生血管生成抑制剂。本项发明基于下列事实：NL 是 ES 的特异性受体，并参与 ES 抑制新生血管生成活性相关的信号传导途径。

背景技术

对于不同的患者来说，癌症疗法的效果差异很大，这取决于一系列内在或外在因素。外在因素包括实施治疗时癌症的发展阶段，越早发现越有利于治疗和恢复，以及疗法相对强度，例如手术，化疗或放疗。内在因素包括病人免疫系统的健康程度，强健的免疫系统可以支撑时间长和强度大的疗法，从而帮助病人快速康复。在癌症疗法中，甚至整个医学界中，正在被探讨的一个关键问题是个体化用药。不同个体可能对同样的癌症药物有不同的忍耐度和敏感度，上述认识促使人们去努力寻找提高特定癌症疗法效果的方法。因此，由于个体差异，对某一个病人有效的药物未必对另外一个病人也有效。

在癌症疗法领域中，人们试图通过病人的基因型来了解某一特定的药物是否对具有特定遗传特征的病人有效。一种新近发现的癌症疗法是通过 ES 来抑制肿瘤新生血管生成，阻断肿瘤供血从而达到抑制肿瘤生长的目的。为了实现 ES 疗法的个体化应用，最近有人试图通过基因芯片技术获得基因表达谱来研究 ES 为什么能够抑制内皮细胞新生血管生成，参考 M. Mazzanti, et al., *Genome Research*, 14:1585–1593 (2004)。

ES 被认为是一种有效的癌症治疗药物，因为 ES 通过抑制新生血管生成来杀死肿瘤。肿瘤细胞需要通过新生血管进行扩散。肿瘤细胞群体的每一次增长都必须是汇集在肿瘤处的新毛细血管生成之后方可发生。这一现象几乎是普遍的：多数人类的固体肿瘤或者血癌都是新生血管生成依赖型的。抗新生血管生成疗法还有其他的优势，包括低毒性，极小的耐药性，以及反复使用该疗法后可能会有较长时期的肿瘤休眠，在此期间便不需要继续治疗，参考 Boehm et al., *Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature* (1997) 390: 404–407。然而，ES 的作用机理至今仍不明确。因此，ES 疗法被同样地用在每一个癌症病人身上，而并未考虑到个体对该疗法的敏感性。人们进行了很多

临床实验以期望找到有效的抗新生血管生成药物。如果能够以客观的标准选择出适合接受 ES 疗法的病人，那将是一个显著的进步。本项发明提出的一些方法和诊断试剂盒正是为了达到这一目标。

发明内容

本项发明提供了一种可以确定癌症主体对 ES 癌症疗法敏感度的试剂盒，包括可以标记 NL 的试剂以及使用说明。该试剂盒可以通过标记从主体身上采集的样品中的 NL 来检测样品中 NL 的含量。合适的主体应当是哺乳动物，更理想的选择是人类。在本发明的具体实现中，被标记的 NL 是细胞表面 NL。一种情况下，用来标记 NL 的试剂是抗体，可以是多克隆抗体，若是单克隆抗体则更为理想。另外一种情况下，标记 NL 的试剂是核酸探针，可以是 DNA 探针，若是 RNA 探针则更为理想。

本发明进一步提供了一种方法，可以用来确定对主体实行 ES 癌症疗法成功的可能性，包括检测从该主体采集的样品中 NL 的表达水平。确定该主体是否对 ES 癌症疗法敏感主要是依据上述检测到的 NL 的表达水平。

本项发明提供了筛选血管生成抑制剂的方法，尤其是筛选那些与 ES 作用机理相似的分子。本项发明是以 NL 作为靶分子，运用传统的方法学，鉴定出可以和 NL 特异性结合的分子，同时该分子有抗新生血管生成的活性。基于 NL 是 ES 在细胞表面的受体这一事实，用上述方法发现的分子应该具有与 ES 相似的作用机理。

本项发明还提出了可以增加内皮细胞对 ES 的敏感度的方法。该方法是将外源的 NL 引入靶向内皮细胞，使得 NL 在内皮细胞中相对于野生型过量表达，理想的靶向细胞应当是在正常情况下没有高水平的内源 NL 表达。该方法进一步提出，向靶向细胞中引入 NL，可以使这些细胞对 ES 的抗新生血管生成活性更敏感而被 ES 有效杀伤。本项发明还提出可以用 NL 的抗体去检测细胞表面表达大量 NL 的靶向癌细胞（或内皮细胞），这种癌症适宜用 ES 去治疗。

一个具体体现是，本项发明提供了一种得到有效的特异性针对 NL 的新生血管生成抑制剂的方法，包括如下步骤：运用合适的结合试验在候选的分子库中筛出一系列能与 NL 特异性结合的分子；用抑制新生血管生成的分析方法去验证这些分子对于抑制新生血管生成的有效性；最后，根据活性试验的结果在这些能与 NL 特异性结合的分子中筛选出能有效抑制新生血管生成的分子。

另一个具体体现是，本项发明提供了一个筛选可以在体外抑制内皮细胞增殖的新生血管生成抑制剂的方法，包括如下步骤：运用药学手段去发现特异性以 NL 作为靶向的分子；验

证上一步获得的分子在抑制内皮细胞增殖中的有效性；确定上述步骤获得的能够抑制内皮细胞增殖的分子，并与 ES 比较它们在抑制新生血管生成中的效果。

更进一步的体现是，本项发明提供一种可以增强靶细胞对新生血管生成抑制剂敏感度的方法，包括如下步骤：将外源的 NL 导入靶细胞，从而获得一些能够表达外源 NL 的改造过的细胞，并且检测 ES 对这些细胞的致死率。

另外一个体现是，本项发明提供了一种增强新生血管生成抑制剂针对内皮靶细胞的抗新生血管生成效果的方法，包括如下步骤：将有效剂量的外源 NL 基因导入上述的靶细胞，NL 就可以在细胞中表达，同时将上述新生血管生成抑制剂与经转化的靶细胞一起孵育，就可以抑制靶细胞的生长。

一个具体体现是，本项发明提供一种方法可以提高新生血管生成抑制剂控制病人肿瘤生长的效果，包括如下步骤：用可行的手段，检测癌症病人内源 NL 的表达水平；根据该病人的 NL 表达水平来评价新生血管生成抑制剂对其有效程度，NL 表达水平越高表明新生血管生成抑制剂疗法越有可能取得成功的治疗效果。该新生血管生成抑制剂的理想选择是 ES。

另一个具体体现是，本项发明提供一种诊断试剂盒，可以确定对新生血管生成抑制剂疗法敏感的靶向癌细胞，试剂盒包括 NL 的抗体和制药学上有效的载体。

还有一个具体体现是，本项发明提供了一种诊断试剂盒，可以确定对新生血管生成抑制剂疗法敏感的癌症主体，包括可以结合并显示 NL 的标记物以及说明书，可以用来测试从癌症主体收集的样品中 NL 的水平。

附图说明

图 1 显示 Human Microvascular Endothelial Cell (人微血管内皮细胞，以下简称“HMEC”) 是一株迁移和增殖对 ES 敏感的细胞系。**a**, 在标示浓度的 ES 的处理下，进行 HMEC 迁移试验，PBS 作为对照。**b**, 在标示浓度的 ES 的处理下，进行 HMEC 增殖试验，PBS 作为对照。细胞的数目用 MTT 法进行分析。结果的误差 \pm s.e.m., $n = 3$ (**a**), 以及 $n = 5$ (**b**)。

图 2 ES 结合细胞表面的 NL。**a**, 从 HMEC 表面中分离出来的 ES 结合蛋白经鉴定为 NL 和它的片段。如方法部分描述的那样，ES 结合蛋白用预载有 ES 的 Ni-NTA 亲和柱从 HMEC 细胞膜中分离出来。用含 500 mM 氯化钠的 PBS 缓冲液洗脱下来的组分进行 SDS-PAGE 分析 (左) 并用 NL 的单克隆抗体做免疫印迹 (右)。**b**, 在体外 ES 特异性地结合 NL。用重组 NL 和 ES 做免疫共沉淀。**c**, 肝素干扰 ES-NL 的复合物形成，在体外加入或不加肝素 (200 nM) 的情况下，用重组 NL 和 ES 进行免疫共沉淀。**d**, ES 通过细胞表面 NL 特异性结合 HMEC。HMEC 与 ES，以及不同浓度的 NL 抗体在室温下孵育 30 分钟，然后用 PBS 缓冲液

洗三遍。将细胞进行 SDS-PAGE 分析并用 ES 的抗体做免疫印迹。β-actin 作为对照。e, 将 HEMC 与 ES (60 μg/ml) 在 37 °C 和 5% CO₂ 下孵育不同长短的时间。用新鲜培养基冲洗后, 分别用 NL 和 ES 的抗体做免疫共沉淀和免疫印迹。β-actin 作为对照。i-k, 在 HMEC 细胞表面 NL 和 ES 共定位。完整的 HEMC 用鼠抗 NL, 兔抗 ES 染色, 并用激光共聚焦显微镜检测间接免疫荧光。标尺, 20 μm。

图 3 显示 NL 是 ES 的受体。a, 在 Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (人脐带血管内皮细胞, 以下简称“HUVEC”) 迁移试验中, 用标示浓度的重组 NL 解除 ES 的抑制活性, PBS 作为对照。b, 重组 NL 本身对细胞的迁移没有作用。在 HUVEC 的迁移试验中分别加入标示浓度的 ES、NL 和两者的混合物。PBS 作为对照。c, 在 HUVEC 的增殖试验中分别加入标示浓度的 ES、NL 和 NL 的抗体, PBS 作为对照。用 MTT 法分析细胞数目。d, 用 NL 缺陷型和对照组 HMEC 做细胞粘附试验。用 pBS/U6/1356 质粒介导的 RNA 干扰的方法抑制 NL 的表达来获得 NL 缺陷型细胞。空白的 pBS/U6 质粒转染的细胞作为对照。结果误差 ± s.e.m., n = 4 (a, d), n = 5 (b, c)。e, 用 NL 的抗体进行免疫印迹以验证 RNA 干扰质粒对 NL 表达的抑制作用。BS/U6/1356 可以抑制 NL 的表达, 而 BS/U6/263 却没有作用, myosin 的免疫印迹作为上样对照。f, 用 NL 缺陷型和对照组 HMEC 做细胞增殖试验。用 pBS/U6/1356 质粒介导的 RNA 干扰的方法抑制 NL 的表达来获得 NL 缺陷型细胞。空白的 pBS/U6 质粒转染的细胞作为对照。ES 的加入浓度如图中所示。细胞的数目用 MTT 法进行分析。

图 4 显示 NL 介导 ES 的信号网络。a-f, ES 被 HMEC 内吞。HMEC 加入或不加入(a) 10 μg/ml 生物素标记的 ES 分别孵育 0.5 小时(b), 1 小时(c), 2 小时(d), 3 小时(e), 和 7 小时(f)。内吞的 ES 用 TRITC 标记的抗生物素蛋白染色。g, 把细胞和 NL 的抗体一起孵育可以阻断 ES 的内吞。标尺, 25 μm。h, 在核中, ES 可以抑制 casein kinase-2 (酪蛋白激酶, 以下简称“CK2”) 介导的 NL 磷酸化。磷酸化分析按照方法部分所进行的描述。磷酸化的 NL 用 SDS-PAGE 和放射性自显影检测。NL 的免疫印迹作为上样对照。i-k, 在 HMEC 细胞表面 NL 和 integrin β1 共定位。完整的 HEMC 用鼠抗 NL, 兔抗 integrin β1 染色, 并用激光共聚焦显微镜检测间接免疫荧光。标尺, 10 μm。

图 5 显示细胞表面的 NL 分布依赖于细胞的生长状态。a-h, HEMC 细胞表面 NL 的分布。增殖细胞和静止细胞表面的 NL 用兔抗 NL 进行间接免疫荧光检测。DAPI 标明视野中细胞核的位置。标尺, 20 μm。增殖细胞所处的细胞周期(g)和静止细胞(h)的分别用流式细胞仪检测, 相对静止期的细胞通过血清饥饿 24 小时获得。i-l, 在荷瘤裸鼠中细胞表面 NL 的分布。

按方法部分所描述的进行免疫组化染色。心脏(i)、肾脏(j)、肺(k)、和肿瘤(l)的血管用箭头指示。表达细胞表面 NL 的内皮细胞被染成棕色。标尺, 50 μm 。

图 6 显示由 NL 介导的 ES 信号网络的模式图。一个包含细胞表面 NL, integrin (例如 integrin $\alpha 5\beta 1$) 和其它蛋白的大复合物参与到 ES 的信号网络中。NL 结合 myosin, 并通过它与 actin 纤维相连。与之相似, integrin 就是通过一些胞内锚定蛋白 talin, α -actinin, filamin, 和 vinculin 与 actin 纤维束相连。没有发现 NL 和 integrin 有直接的相互作用。ES 可以与细胞外基质竞争结合这个复合物, 以此来抑制细胞的粘附和迁移。这种结合还可以触发 integrin 介导的信号传导。另一方面, 这个复合物可以介导 ES 的内吞, 在这个过程中 myosin 起到转运的作用。然后, ES 可能在胞浆中释放出来, 并抑制胞内 NL 稳定化 Bcl-2 的 mRNA 的作用。剩下的 ES 被转运到核内, 并在其中抑制 CK2 介导的 NL 磷酸化以及一些下游事件。

图 7 显示体内 ES 和 NL 的共定位。标记有生物素的 ES 和 NL 的兔多克隆抗体分别先后被静脉注射到荷有黑色素瘤 B16/F10 的小鼠体内。对照组注射标记有生物素的 ES 和纯化的兔多克隆抗体。在心脏 (a-c)、肝脏 (d-f)、肾脏 (g-i)、肿瘤 (j-l) 及其对照组 (m-o) 中, 标记有生物素的 ES 和 NL 的兔多克隆抗体通过 TRITC 标记的抗生物素蛋白和 FITC 标记的二抗检测。标尺 50 μm 。

图 8 如图中所示的 ES 与 NL 的浓度, 测定二者的结合动力学曲线。ES 与 NL 的解离常数由这些曲线计算得出。

具体实施方式

本项发明部分来源于如下发现: NL 是 ES 的特异性受体并介导 ES 的抑制新生血管生成功能。

NL 是一个广泛存在的非组蛋白, 最初是从核仁中分离出来的。NL 的量受 Granzyme A 和自我切割能力的调控, 有趣的是, 它还和细胞的增殖有关系。NL 也可以自切, 它的自切割随细胞进入增殖速度的加快而减少, 与此同时, 它还被细胞毒淋巴细胞释放的一种酯酶 Granzyme A 切割 (Chen et al., J. Biol. Chem., 1991, 266, 7754-7758; Fang and Yeh, Exp. Cell. Res., 1993, 208, 48-53; Pasternack et al., J. Biol. Chem., 1991, 266, 14703-14708)。这些切割以及相伴的降解构成了 NL 的翻译后调控。

作为一个多功能蛋白, NL 在细胞增殖中起关键且基础的作用, 包括: 核仁染色质的排列, pre-RNA 的包装, rDNA 的转录以及核糖体的组装。NL 的这些活性被某些蛋白激酶如

CK2 和 cdc2 所调控，而后者又受到其它细胞周期蛋白的严格调控。此外，NL 还可以在细胞表面、细胞浆、细胞核中穿梭，并且具有细胞表面受体的功能。作为很多病毒和细胞因子的受体，当配体结合它时，NL 可以触发配体的内吞。

Orrick et al (1973)曾经报道 NL 分子量大约 100-110 kDa，主要存在于增殖细胞的细胞核中，NL 可以自降解，并在免疫印迹中呈现 70 和 50 kDa 的两条带。NL 被高度的磷酸化及甲基化，并且可以被二磷酸腺苷核糖基化。由于 NL 的合成与细胞分裂速度的增加正相关，肿瘤细胞以及旺盛分裂的细胞中含有更大量的 NL。NL 的序列早先由 Srivastava, et al. 在 Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. FEBS Lett. 250 (1), 99-105 (1989)中报道。

NL (亦称作 P92 或 C23) 是活跃生长的细胞核仁内最丰富的磷酸化蛋白 (Srivastava et al., FEBS Lett., 1989, 250, 99-105; Srivastava et al., J. Biol. Chem., 1990, 265, 14922-14931)。数个研究小组报导过 NL 主要参与核糖体的生物合成 (Ghisolfi et al., Mol. Biol. Rep., 1990, 14, 113-114; Sipos and Olson, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, 177, 673-678)。NL 通过自身的核糖核酸蛋白共有序列与核糖体前体短暂结合，从而参与了核糖体的合成 (Bugler et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 10922-10925; Ghisolfi-Nieto et al., J. Mol. Biol., 1996, 260, 34-53; Sapp et al., Eur. J. Biochem., 1989, 179, 541-548)。NL 可以占总核仁蛋白的 5% (Lapeyre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84, 1472-1476; Sapp et al., Eur. J. Biochem., 1989, 179, 541-548)。然后，有证据显示 NL 还参与了胞浆运动，核的形成，细胞增殖和生长，转录抑制，DNA 复制，信号传导和染色质去压缩化，可参考综述 (Tuteja and Tuteja, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1998, 33, 407-436)。

上述 NL 的多功能的性质来源于它若干结构和功能上独立的结构域 (Creancier et al., Mol. Biol. Cell., 1993, 4, 1239-1250; Sapp et al., Eur. J. Biochem., 1989, 179, 541-548)。NL 的三个结构域已经被报导：N 端结构域，中间结构域以及 C 端结构域。N 端结构域中包含与 HMG 蛋白同源的序列，可以与染色质相互作用 (Erard et al., Eur. J. Biochem., 1988, 175, 525-530)。中间结构域含有四个可以识别 RNA 的折叠子，可以特异性结合 18S 和 28S 核糖体 RNA 的短茎环结构 (Bugler et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 10922-10925)。C 端结构域含有可以结合 RNA 内非堆积碱基的区域 (Ghisolfi et al., Mol. Biol. Rep., 1990, 14, 113-114; Ghisolfi-Nieto et al., J. Mol. Biol., 1996, 260, 34-53)。NL 含有两处核定位序列，分布于蛋白 N 端以及中部。该序列帮助 NL 定位到核内。NL 通过和其他蛋白相互作用在核内积累 (Schmidt-Zachmann and Nigg, J. Cell Sci., 1993, 105, 799-806)。

人们根据 NL 的结构域组成特点将其归类为 Ag-NOR 蛋白（即定位于核仁组织区域的活跃核糖体基因），也称为活跃核糖体基因的标志（Roussel et al., *Exp. Cell. Res.*, 1992, 203, 259-269）。有证据表明核糖体基因的转录需要 Ag-NOR 蛋白，Ag-NOR 蛋白的表达也被用来预测肿瘤生长的速率。

NL 曾经作为基质附属区域（MAR）结合蛋白从人红白血病细胞中被纯化出来。研究发现，NL 参与了将染色质环状结构锚定到核基质的过程（Dickinson and Kohwi-Shigematsu, *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 456-465）。

NL 可以被高度磷酸化，研究表明它是酪蛋白激酶 II（以下简称 CK2）的底物（Csermely et al., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 9747-9752; Schneider and Issinger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 156, 1390-1397），蛋白激酶 C- α （Zhou et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 31130-31137），以及 cdc2（Belenguer et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 10, 3607-3618）。此外，研究表明 NL 的磷酸化状态调控 NL 的亚细胞定位。

NL 可以自切割或者被细胞毒淋巴细胞分泌的酯酶，Granzyme A 切割，并且当细胞进入旺盛增殖阶段时自切活性降低（Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 7754-7758; Fang and Yeh, *Exp. Cell. Res.*, 1993, 208, 48-53; Pasternack et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 14703-14708）。上述切割过程以及随之而来的降解构成了 NL 的翻译后调控。

抗 NL 的抗体可以在患有系统性结缔组织疾病，包括红斑狼疮（SLE），的病人血清中发现（Minota et al., *J. Immunol.*, 1990, 144, 1263-1269; Minota et al., *J. Immunol.*, 1991, 146, 2249-2252），此外还包括硬皮病状慢性移植抗宿主疾病（Bell et al., *Br. J. Dermatol.*, 1996, 134, 848-854）。因此，对 NL 的表达进行药理学调控可能是病理状态下合适的治疗手段。

目前尚未有有效抑制 NL 合成的药物，而对抑制 NL 功能药物的需求由来已久。

NL 的表达量被认为与细胞增殖速度有关，NL 的含量在肿瘤细胞中最高，其次是在旺盛分裂的细胞中。NL 可以在研究不同肿瘤细胞系中作为一个有用细胞增殖的标志物。因为 NL 在肿瘤细胞的增殖中起关键作用，本项发明提供了一种通过抑制 NL 表达来抑制肿瘤细胞增殖的策略。

ES 是胶原蛋白 XVIII 的 C 端球状结构域，分子量 20 kDa。最初它是从鼠内皮瘤细胞培养基上清中分离出来的，因为它可以抑制毛细血管内皮细胞的增殖。在动物实验中，反复使用 ES 可以促使肿瘤消亡并且不产生抗药性。此外，在动物实验和临床中都显示 ES 毒性很低。ES 有显著的抑制内皮细胞增殖、迁移、黏附、生存的能力并且可以诱导细胞凋亡。虽然 integrins, tropomyosin, glypicans, 和 E-selectin 被猜测作为 ES 的受体调控细胞的迁移， β -catenin 和 Shb 则与 ES 诱导的 G1 期捕获和凋亡相关，但是对于 ES 的确切分子机理仍然存

在很大的争论，ES 在动物实验和临床治疗中表现出来低毒型的具体原因还不清楚。另一方面，在动物实验及临床中必须使用高浓度的 ES 才能有抑瘤效果，对这一事实在还缺少充分的解释。

本项发明提出的新发现，即 NL 作为 ES 的受体介导 ES 作为新生血管生成抑制剂，为下一步筛选出更多的有抑制新生血管生成活性的小分子提供了基础，它们还可能具有一些新的性质，使得它们成为比 ES 更理想的选择。

研究发现要让 ES 有效地发挥其新生血管生成抑制剂的功能而达到预期的抗癌效果，必须制备大量的 ES 并注射给患癌症的哺乳动物或人类。由于该过程中需要高剂量的 ES，其价格可能会昂贵得让患者承受不起。因而，迫切需要找出其它方法以发现新的血管生成抑制剂，可以经济、有效地用于治疗肿瘤。

此外，为了使肿瘤细胞对 ES 更加敏感，本项发明提出了一种方法：将外源 NL 基因导入靶细胞，从而使其能够表达超过正常水平的细胞表面 NL。这些改造过的细胞由于 NL 水平的升高，会对 ES 的攻击变得更敏感。

本项发明的另一方面是，用 NL 的抗体去筛选具有大量表面 NL 表达的肿瘤细胞或内皮细胞。找到这样一组病人对于有效施行新生血管生成相关的癌症疗法是有益的，因为具有高水平表达细胞表面 NL 的病人是接受 ES 抑瘤疗法的理想对象。

为了研究 ES 的作用机理，我们用固定化的 ES 从 HMEC 膜中分离能够结合 ES 的蛋白。NL 就是这些蛋白中很有趣的一个，随后即被证明是 ES 信号网络中的一个关键的成员。NL 是一个广泛存在的非组蛋白，最初是从核仁中分离出来的。在指数增长期的真核细胞中，NL 主要是一个核仁蛋白。NL 的量受 Granzyme A 和自我切割能力的调控，有趣的是，它还和细胞的增殖有关系。作为一个多功能蛋白，NL 在细胞增殖中起关键且基础的作用，包括：核仁染色质的排列，pre-RNA 的包装，rRNA 的转录以及核糖体的组装。NL 的这些活性被蛋白激酶如 CK2 和 cdc2 所调控，而后者又受到其它细胞周期蛋白的严格调控。此外，NL 还可以在细胞表面、细胞浆、细胞核中穿梭，并且具有细胞表面受体的功能。作为很多病毒和细胞因子的受体，当配体结合它时，NL 可以触发配体的内吞。NL 的这些功能提供了一种可以从细胞外调节细胞核活动的机制。我们这里报道 NL 也作为 ES 的受体并介导其在抑制新生血管生成方面的活性。

在这里，名词“endostatin”指一个在非还原或还原电泳中分子量分别表现为 18 到 20 kDa 的蛋白；“endostatin”还包括这个 18 到 20 kDa 蛋白的前体形式，片断形式，以及修饰后的蛋白或多肽形式，只要是具有充分类似的氨基酸序列，并具有抑制内皮细胞生长的功能均包括在“endostatin”的含义范围之内。例如，文献中经常报道的氨基酸序列的保守突变，

即把原来的氨基酸用一个结构、化学性质相似的氨基酸替换，但是这种替换对原来蛋白的结构，构象和活性没有明显的改变。此类保守突变也在我们附加的权利要求之内。

“endostatin”这个词还包括在原来蛋白的两端或者内部缺失一个或多个氨基酸而得到缩短的蛋白或者多肽，但是仍然保留了原来蛋白抑制内皮细胞增殖的活性。“endostatin”的含义还包括在原来蛋白的两端或者内部增加了一个或多个氨基酸而得到的增长的蛋白或多肽，但是仍然保留了原来蛋白抑制内皮细胞增殖的活性。这些分子可以用来进行标记实验，例如在第一位增加一个酪氨酸残基并进行¹²⁵I标记。用其它的放射性同位素标记还可以提供一个分子工具来杀死具有ES受体的靶细胞。

类似的，名词“nucleolin”也包括了前体形式，片断形式，以及修饰后的蛋白或多肽形式，只要是具有充分类似的氨基酸序列，并具有抑制内皮细胞生长的功能均包括在“endostatin”的含义范围之内。例如，文献中经常报道的氨基酸序列的保守突变，即把原来的氨基酸用一个结构、化学性质相似的氨基酸替换，但是这种替换对原来蛋白的结构，构象和活性没有明显的改变。这些分子可以用来进行标记实验，例如在第一位增加一个酪氨酸残基并进行¹²⁵I标记。此类保守突变也在我们附加的权利要求之内。

名词“NL-特异性”指NL结合新生血管生成抑制剂并介导该抑制剂抑制活性的能力。

名词“新生血管生成依赖型”指那些生长或迁移需要新生血管生成的肿瘤，包括那些体积或质量（或二者兼有）的增加需要供血的血管的数量和密度的增加的肿瘤。

此处所说的“主体”指任何动物，例如哺乳动物，包括但是不限于人，非人灵长类，啮齿动物，猪，兔之类。主体接受特定的治疗，或者接受某种特定的处理，例如检测某种分子的存在水平。

此处所说的“样品”是一个最广泛的概念，包括但是不限于生物样品和环境样品。一种情形下，它指由生物或环境来源获得的标本或者培养物。生物样品可从动物（包括人）处获得，包括液体，固体，组织和气体。生物样品包括血产品，例如血浆，血清之类。环境样品包括环境物质，例如表面物质，土壤，水，矿物质，晶体或者工业样品。上述所列样品并不意味着限定本发明所包括的样品范围。

此处所说的“标记”包括了化学的或者生物分子，它们可以通过与目标分子相互作用而显示目标分子的存在以及数量。此类标记分子包括但是不限于，核酸探针，例如DNA探针或RNA探针，抗体，放射性同位素，荧光染料之类。

此处所说的“使用说明”包括了试剂盒的使用说明，用来指导对样品中目标分子，例如NL的检测。对于在美国使用的试剂盒，美国食品药品监督管理局（FDA）要求具有包括使用目

的使用说明。FDA 将体外诊断归类为医疗设备并要求其必须经过 510(k) 程序许可。申请 510(k) 需要的信息包括：1. 体外诊断产品名称，包括商业名或专利商品名，通用名或俗名，以及该设备的分类名；2. 该产品的使用目的；3. 如果可行的话，所有者或经营者提交 510(k) 申请的注册号；根据《食品，药品和化妆品法案》的第 513 部分体外诊断产品所属于的类别，并且如果已知的话，所属于的板块，或者，如果所有者或经营者认为该设备不属于任何已有的分类，则提交一份关于为何该产品未被归类的声明；4. 建议的标志和广告，足以用来描述该体外诊断试剂盒，它的使用目的以及使用方法。如果可行，照片或工程绘图应当被提供；5. 一份说明该设备与已经在美国商业化的同类产品相似或不同点的声明，且需要相关数据支持该声明；6. 一份关于安全以及有效性的 510(k) 总结，基于此总结 FDA 将作出实质性的等价决定；或者一份声明，指出支持 FDA 决定的关于上述安全及有效性的信息将在 30 天内到达任何提出要求的人；7. 提交者认为在其所知范围内，所有提交的数据和信息是真实和准确的，并且无实质性事实被忽略；8. 任何 FDA 要求的额外的关于该诊断试剂盒的信息以使 FDA 作出实质性的等价决定。附加的信息可以在 FDA 的网页上找到。

如本发明中所用，合适的筛选特异性 NL 相关新生血管生成抑制剂的实验方法包括高压液相色谱，免疫沉淀，荧光结合检测，毛细管电泳等等。

如本发明中所用，抗新生血管生成试验是指通过筛选一系列候选分子以发现它们抑制新生血管生成的有效程度。为了验证某个分子是否具有抑制新生血管生长的性质，有多种方法可供使用。例如，不同来源包括天然的或者人工（手动或自动）合成的蛋白或者多肽，可以通过牛毛细血管内皮细胞增殖试验等测活方法来方便、快捷地检验其抑制内皮细胞增殖的活性。其他的生物检测包括鸡胚尿囊膜，小鼠角膜新生血管生长抑制试验，以及检测分离的或者合成的蛋白对移植肿瘤的抑制作用。鸡胚尿囊膜最早由 O'Reilly 等在 "Angiogenic Regulation of Metastatic Growth" *Cell*, vol. 79 (2), Oct. 21, 1994, pp. 315-328 中报道，我们在这里引用了他的实验方法。更多的用来筛选新生血管生成抑制剂的抗新生血管生成试验可以在 Yu, et al., *PNAS*, Vol. 101, No. 21, pp 8005-8010 (2004) 中找到，该文献也被完整引用。

NL 分子可以用来制备多克隆和单克隆的抗体，然后用来定性甚至定量检测特定靶细胞中的 NL。适当标记的 NL，例如放射性同位素或者荧光标记，可以用来探测体液和组织中的 ES。该方法可以应用于以新生血管生成相关疾病如癌症的诊断和预后。本发明还包括一些方法，可以通过提高 ES 对新生血管生成依赖型肿瘤效果来治疗或者预防新生血管生成相关的疾病或者过程，包括但是不限于关节炎、肿瘤等。

在本发明的一些体现中，诸如流式细胞术和 ELISA 之类的方法被用来定量 NL。

对 NL 相关的核酸分子的检测可以利用标准的分子生物学手段，例如 DNA 探针杂交，PCR 等。此处描述的各类 PCR 和克隆步骤可以参考《分子克隆实验指南》（Sambrook et al., eds. Cold Spring Harbor Lab Publ. 1989, latest edition）。对 NL RNA 的检测可以利用 Northern 印迹。Northern 印迹包括 RNA 的分离以及互补探针的杂交。在一些具体体现中，RNA（或相应的 cDNA）由寡聚核苷酸探针杂交检测。一系列运用不同杂交和检测手段的试验都是可行的。例如，某些体现中使用了 TaqMan 试验（PE Biosystems, Foster City, Calif.; See e.g., U.S. Pat. Nos. 5,962,233 以及 5,538,848, 均被收录于参考文献）。此试验是在 PCR 过程中进行的。TaqMan 试验利用了 AMPLITAQ GOLD DNA 聚合酶的 5'-3' 外切酶活性。一个带有 5' 报告染料（例如一种荧光染料）以及一个 3' 淬灭染料的寡聚核苷酸探针被引入 PCR 体系。在 PCR 过程中，如果探针与目标序列结合，AMPLITAQ GOLD DNA 聚合酶的 5'-3' 便发挥其 5'-3' 外切酶活性将报告染料与淬灭染料之间的序列降解。报告染料与淬灭染料的分离使得荧光信号增强。随着每轮 PCR 的进行，荧光信号逐渐累积并可以通过荧光计进行监测。

在某些其他的体现中，反转录 PCR（RT-PCR）也被用来检测 RNA 的表达。在 RT-PCR 中，RNA 由反转录酶转化为互补的 DNA，或“cDNA”。该 cDNA 即作为 PCR 的模板。PCR 产物可以用任何合适的方法检测，包括但不限于凝胶电泳以及 DNA 特异性染色或者标记探针杂交。在一些体现中也使用了定量 RT-PCR，此方法引入了标准化混合的竞争性模板，并在 U.S. Pat. Nos. 5,639,606, 5,643,765, 以及 5,876,978 中有描述（均列入参考文献）。

NL 蛋白分子的试验可通过普遍采用的方法进行，例如放射性免疫试验，ELISA，夹心法免疫试验，免疫辐射度试验，凝胶扩散沉淀反应，免疫扩散试验，原位免疫试验（例如利用胶体金，酶或放射性同位素标记），Western 印迹，沉淀反应，凝集反应，免疫荧光试验，蛋白 A 试验以及免疫电泳试验等。

例如，抗体的结合通过检测一抗上的标记进行。在另外一个体现中，通过检测可以结合一抗的二抗或其他试剂来间接检测一抗。更进一步的体现中，二抗本身是标记的。很多检测结合作用的免疫试验已经被广泛采用并被包括在本发明的范围之内。

某些情形下，可以利用自动化的检测手段。这些自动化的方法在 U.S. Pat. Nos. 5,885,530, 4,981,785, 6,159,750, 以及 5,358,691（均被列入参考文献）中有描述。在一些体现中，结果的分析及呈现也是自动化的。例如，一些体现中使用了基于某些癌症标记蛋白存在与否来判断疾病可能的后果的软件。

被动的抗体疗法通过 NL 特异性抗体来调节内皮细胞依赖性的过程如繁殖、发育、愈伤和组织修复等。另外，NL 的抗体还可以用来筛选含有丰富内源性 NL 分子的细胞使其成为 ES 疗法中的理想靶标。

NL 或 NL 类似物的特异性抗体采用已经广泛报道的技术方法制备，可以是多克隆也可以是单克隆抗体。该抗体可以用来进行一些成熟的实验，例如竞争性、非竞争性的免疫分析包括 ELISA，夹心法免疫分析以及放射性免疫分析等来判定体液中是否有本发明中提到的内皮细胞增殖抑制因子。体液样品包括但是不限于血液、血清、腹水、胸腔液、脑脊液、尿液、唾液和其他粘液。

本发明提供了分离好的抗体，可以用于检测 NL 的试剂盒。在理想的体现中，本发明提供能够特异性结合 NL 的单克隆抗体。

本发明中抗 NL 的抗体可以是任何单克隆或者多克隆抗体，只要它能识别 NL。抗体可由 NL 或其类似物作为抗原经常规手段制备。

本发明预期同时使用单克隆和多克隆抗体。任何合适的方法都可以用来制备本发明中需要使用的抗体，包括但不限于下面所描述的方法。例如，为制备单克隆抗体，将目标蛋白，或连同适当的载体或稀释剂，在允许产生抗体的条件下注射入动物（例如哺乳动物）。为了提高动物产生抗体的能力，可以使用完全或不完全弗氏佐剂。通常，目标蛋白每二到六周注射一次，共注射二到十次。适于本方法的动物包括但不限于灵长类，兔子，狗，猪，小鼠，大鼠，绵羊，山羊等。

为了制备产生单克隆抗体的细胞，选定已经确定了所产生抗体滴度的动物（例如小鼠），最后一次免疫后二至五天，取其脾脏或淋巴结，其中产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合从而得到能够产生抗体的杂交瘤细胞。测量抗血清中抗体的滴度可以采用如下方法：将抗血清与标记的目标蛋白反应，进而测量与抗体结合的标记试剂的活性。细胞融合可以根据已知的方法进行，例如，由 Koehler 和 Milstein 所描述的方法（Nature 256:495 [1975]）。仙台病毒（HVJ），或更理想的聚乙二醇（PEG）可以作为融合的促进剂。

多克隆抗体可由任何已知的方法或经修改的方法，包括从病人身上获得，来制备。例如，制备载体蛋白与免疫原的复合物并用来免疫动物，方法与上面描述的单克隆抗体的制备过程中的相关部分相同。从被免疫动物体内获得含有抗体的部分，并将抗体从中分离纯化出来。

本发明还提供了用于癌症诊断的 NL 检测与鉴定试剂盒。某些体现中，试剂盒除了用于检测的试剂和缓冲液之外，还包括 NL 的特异性的抗体。其他体现中，试剂盒包括特异性探测 NL mRNA 或者 cDNA 的试剂（例如寡聚核苷酸探针或引物）。理想的体现中，试剂盒包括了进行检测试验的所有部分，包括对照，试验指导，以及必要的分析及呈现结果的软件。

本发明还包括了如下试剂盒：该试剂盒包含了可以检测 NL 的标记的 NL 抗体。配制好的含 NL 抗体溶液可以从血浆、尿液、组织液以及细胞培养基里检测 NL 及其肽段。这些试

剂盒使用的技术包括但是不限于竞争性、非竞争性分析，放射性免疫分析，生物及化学发光分析，荧光分析，点杂交，酶联免疫分析例如 ELISA，微量滴定技术，抗体包被的量油计（dipstick）或快速检测尿样和血样的量油计（dipstick），免疫细胞化学技术等。每种试剂盒的检测范围，灵敏性，清晰度，可靠性，专一性和重现性均按照为一般熟练程度的技术人员所熟悉及遵照的行业要求被确定下来。

类似的，本发明中提出的一个试剂盒也可以被用来定位组织和细胞中的 ES。该 NL 免疫组化试剂盒包括使用说明，由荧光分子如荧光素或其他方式标记的 NL 分子。免疫组织化学是专业人士所熟知的技术。该试剂盒可以利用光学和电子显微镜来对组织或细胞中的 ES 进行定位。它既可以用于科研也可以应用于临床。例如，通过检测活体组织肿瘤切片来确定 ES 生成的位点。这一信息对于肿瘤临床诊断和治疗有很重要的意义。

本发明通过以下的实例进一步进行阐述。本发明的应用并不局限于这些实例。正相反，必须清楚地说明本发明的实现手段可以有不同的体现方式，修饰形式以及多种等价形式。通过阅读以下的描述，专业人士可以更好地理解这些实例，但并不背离本发明的主题以及/或者超出后面权利要求的内容。

实例一

NL 是一个 ES 结合蛋白

方法学：

研究 NL 和 ES 相互作用的方法均为已经广泛报道的成熟方法。这些方法的详细描述如下：

细胞迁移试验

HMEC 或者 HUVEC（每孔 2×10^4 个细胞）接种到 TranswellTM 板（8 μm 孔径，Costar）的上层含 0.5% 胎牛血清以及 10 ng/ml VEGF（PeproTech EC）的 DMEM 培养基中。同时在板的上层和下层加入一定浓度的 ES（Protgen 公司提供）和其它试剂（NL 和 NL 抗体）。在 37 °C 和 5% CO₂ 中继续培养 6 小时使细胞进行迁移。用乙醇固定和曙红染色后，每个孔随机选取 5 个高倍放大（400 倍）视野，计算其中完全穿过膜迁移到板下层的细胞数并取平均值，每一组重复三个孔。

细胞增殖试验

接种内皮细胞，如 HMEC 或者 HUVEC（每孔 1×10^3 个细胞）到 96 孔板，其中有含有 0.5% 胎牛血清和 10 ng/ml 的 bFGF 的 DMEM 培养基。在试验之初向每个孔中添加不同浓度的 ES 和其他试剂至终体积 200 微升。内皮细胞在 37 °C 和 5% CO₂ 中增殖 48 小时。然后用 100 微升不含酚红和含有 0.5 mg/ml MTT 的 DMEM 培养基替换原有培养基。继续在 37 °C

和 5% CO₂ 中培养 4 小时后，用含有 0.05 M 盐酸的异丙醇裂解细胞并检测在 570 nm 下的光吸收。

利用 MALDI-TOF 鉴定所分离的蛋白

收集从结合有 ES 的 Ni-NTA 亲和柱洗脱下的组分并用 12% SDS-PAGE 电泳分析，主带用测序级的经过修饰的猪胰蛋白酶酶切（Promega）后，得到的肽段用MALTI-TOF 进行分析，所用仪器为 Bruker Biflex 线性飞行时间质谱（Bruker Franzen），装有多探针 SCOUT 源，超氮激光（337 nm）以及双微通道盘检测器。质谱数据在 Swiss-Prot 蛋白数据库中进行比对分析以鉴定蛋白。

间接免疫荧光

HMEC 与 ES（20 μg/ml）一起于 37 °C 和 5% CO₂ 孵育 1 个小时。细胞不经过通透化即用一抗处理，然后分别加入 FITC 标记的羊抗鼠二抗和 TRITC 标记的羊抗兔的二抗处理。在 Olympus Fluoview 激光扫描共聚焦成像系统（Olympus Inc.）上观察并照相。图像用由 Fluoview 2.0 软件（Olympus）调节的多重光电倍增管捕获。

重组 NL 的制备

我们使总 RNA 分离以及反转录系统（Promega）从 HMEC 中得到 NL 的 cDNA。NL 的序列与多聚组氨酸 (His)₆ 融合后，克隆到甲醇酵母表达载体 pPIC9K 中（Invitrogen）。该重组质粒经限制性内切酶 Sal I（Promega）线性化后电转化至甲醇酵母菌株 GS115。经 G418 筛选得到的稳定转化子并按 Invitrogen 公司的手册中描述的方法于 30 °C，BMMY 培养基中摇瓶培养 3 天。培养基上清经 Ni-NTA 亲和柱（Qiagen）纯化得到 NL。

NL 多克隆抗体的制备

用上述甲醇酵母表达系统制备的 NL 50 微克免疫新西兰大白兔。初次免疫混合弗氏完全佐剂皮下注射，14 天后，肌肉注射含有 50 微克 NL 的弗氏不完全佐剂作为加强针。此后，分别在第 4，10，22 周皮下注射加强针。最后一次免疫 1 周后，取血清，用蛋白 A 柱（Amersham Biosciences）纯化抗体。用甘氨酸-盐酸缓冲液（0.15 M, pH 2.5）洗脱，立即用 0.15 M Tris 调 pH 到 6.8-7.2。合并的组分用 0.2 微米孔径的滤膜过滤除菌，分装储存在 -80 °C。

细胞粘附试验

待检测的细胞采用血清饥饿法处理 30 分钟后，接种到用 ES (20 $\mu\text{g/ml}$) 和多聚赖氨酸 (50 $\mu\text{g/ml}$) 包被的 96 孔板上。在 37 °C 和 5% CO_2 中培养 1 个小时后，用新鲜培养基小心洗掉没有粘附的细胞。剩下的细胞用结晶紫 (0.1% 溶于双蒸水) 室温染色 25 分钟。用干净的水洗，剩下的结晶紫用 0.5% 的 Triton X-100 溶解，检测 570 nm 的光吸收。

作为多种新生血管生成抑制因子的靶标，内皮细胞成为体外研究新生血管生成抑制作用的模型。然而结果往往变化很大且重复性较差，原因可能是检测方法不完善或者细胞株不稳定。有鉴于此，我们选用了 HMEC，此细胞株符合作为一个良好的抗新生血管生成试验模型。细胞迁移试验中，ES 能够剂量依赖型地抑制 VEGF 诱导的 HMEC 迁移，其半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 4 $\mu\text{g/ml}$ (图 1a)，甚至浓度低至 (4 ng/ml) 的 ES 都可以对 HMEC 有 15% 的抑制率。在用 bFGF 刺激的 HMEC 增殖试验中也可以得到类似的结果 (图 1b)。细胞增殖和迁移实验的结果表明 HMEC 是一株对 ES 敏感的细胞株，利用它进行的实验结果可靠且重复性好。

HMEC 对 ES 的敏感性提示我们，在这株细胞上可能存在 ES 潜在的受体。进一步的实验表明，ES 可以在生理条件下结合 HMEC (见图 2d)。因此我们选择从 HMEC 上分离 ES 受体。重组 ES 用其自带的组氨酸标签预先结合在镍柱上，制备成 ES 亲和柱。粗提的 HMEC 细胞质膜组分按照 Marshak 等人的报道用 1% Triton X-100 处理以释放膜蛋白。处理后的膜蛋白样品通过制备好的 ES 亲和柱，不结合 ES 的蛋白用 PBS 缓冲液从柱上洗下，结合 ES 的蛋白挂在 ES 亲和柱上。收集每一组分并进行还原 SDS-PAGE 分析。对照组的实验平行进行，唯一的区别是使用未载有 ES 的镍柱。表观分子量为 110 kDa 和 80 kDa 的两个蛋白特异性地结合 ES 亲和柱 (图 2a)，并随后用 MALDI-TOF 结合肽段指纹图谱鉴定为 NL (110 kDa) 和它降解的片段 (80 kDa)，此结果又通过 NL 的单克隆抗体的免疫印迹得到进一步确证。为了验证 ES 和 NL 的相互作用，我们进行了如下研究。体外免疫沉淀结果显示 ES 和重组 NL 的相互作用具有特异性 (图 2b)，并且二者形成一个复合物，该过程可以被 200 mM 肝素所干扰 (图 2c)。ES 还可以通过 NL 结合 HMEC，因为 NL 的多克隆抗体可以阻断此结合 (图 2d)。用经 ES 预孵育的 HMEC 进行的免疫沉淀的结果进一步证实了上述结论 (图 2e)。结果显示 ES 与总内源性 NL (细胞表面，细胞质和细胞核) 在活细胞内形成复合物。此外，我们还利用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察到了 ES 和 NL 在 HMEC 表面的共定位 (图 2f-I)。总而言之，ES 在体外或体内均特异性地结合 NL，说明 NL 是 ES 的一个潜在受体。

例二

NL 是 ES 的一个新受体

如果 NL 是 ES 的受体，它应该能够介导 ES 在抗新生血管生成方面的活性，例如抑制内皮细胞的迁移、增殖和粘附。为了鉴定 NL 在介导 ES 发挥活性过程中的作用，我们分别使用 ES，重组 NL，以及 NL 的多克隆抗体进行了竞争性细胞迁移和增殖试验。由于 NL 是从 HMEC 中分离出来的 ES 受体，它是否在其他被广泛接受的内皮细胞上具有类似的作用还需要证明。有鉴于此，我们还在从脐带静脉中直接分离的人 HUVEC 进行了竞争性细胞迁移和增殖试验。这种细胞可以在 VEGF 的刺激下穿过一种孔径 8 μm 的膜，而 ES 抑制这种迁移。重组 NL 可以以剂量依赖性的方式消除 ES 的抑制作用（图. 3a），显示了重组 NL 与 ES 的抗新生血管活性有关。如图 3b 所示重组 NL 本身对细胞迁移没有作用，这就排除了 NL 本身可以刺激内皮细胞的迁移的可能。HUVEC 增殖试验也得到了类似的结果（图 3c）。正如所预期的，NL 的多克隆抗体可以拮抗 ES 对细胞增殖的抑制作用（图 3c）。这些研究结果强有力的证明了 NL 是 ES 抗新生血管生成过程中的受体。

为了进一步确定 NL 是 ES 的受体，我们使用 RNA 干扰（RNAi）对 NL 的表达进行了抑制，随后检测了这种表达变化对 ES 在抗新生血管生成方面的一个重要活性——细胞粘附的影响。结果表明，当 NL 的表达被以基于 DNA 载体的 RNA 干扰抑制时，HMEC 在固定化 ES 和多聚赖氨酸（一种人工合成的细胞外基质）上的粘附显著降低（图 3d），尽管这种抑制是不完全的（图 3e）。Rehn 等人报道，内皮细胞在固定化 ES 上的粘附对 ES 的活性例如粘着斑的形成和 FAK 的磷酸化是关键，而这种粘附的丧失意味着 ES 在内皮细胞上的功能的丧失。通过这一系列的研究，我们的结果证明了 NL 是 ES 发挥活性和内皮细胞对细胞外基质（ECM）粘附所必需的。此外，我们还检测了当 NL 的表达被以基于 DNA 载体的 RNA 干扰抑制后，HMEC 对 ES 在抗新生血管生成方面的另一重要活性——细胞增殖的影响。当 HMEC 细胞中的 NL 的表达被抑制后，HMEC 细胞的增殖不能被 ES 抑制，而 NL 的表达没有被抑制的 HMEC 细胞的增殖可以被 ES 抑制（图 3f）。总之，我们得到的结论是 NL 是 ES 的一个新受体，并在 ES 的信号传导通路中发挥了重要的作用。

例三

NL 介导 ES 的信号传导通路

为了揭示 NL 在 ES 的信号传导通路中的确切地位，我们研究了其下游事件。注意到当 ES 与 HMEC 孵育时，ES-NL 复合物的量随时间变化，且在 2 小时左右达到最大值（图 2e），ES 可能通过细胞表面 NL 被内吞，如 HMEC，随后一些内吞的 ES 被细胞降解。似乎存在一个 ES 内吞与降解之间的平衡（图 2e）。

为证实 ES 的内吞是通过细胞表面 NL 进行的，我们利用生物素标记的 ES 进行免疫荧光定位。HMEC 与生物素标记的 ES 孵育不同时间后，生物素标记的 ES 被 TRITC 标记的抗生物素蛋白（Pierce）染色，进而用荧光显微镜观察 ES 的内吞过程（图 4a-f）。孵育 30 分钟时，多数内吞的 ES 分布在胞质内且量较少（图 4b）。孵育 1 小时，内吞的 ES 量增加并且开始在核内积累（图 4c）。内吞的 ES 的量在孵育 2 小时左右达到最大值（图 4d）。3 小时的时候，积累在核内的 ES 开始消失（图 4e）。7 小时的时候，核内几乎看不到 ES（图 4f）。相比于免疫共沉淀的结果，荧光实验中，内吞的 ES 的量到达最大值的时间有一个延迟，可能是因为生物素标记的 ES 降解速率较慢。重要的是，当 HMEC 预先与 NL 的多克隆抗体孵育后，内吞的生物素标记 ES 的量显著减少，说明 ES 是通过细胞表面 NL 被内吞的（图 4d, g）。此外，荧光显微镜下还可观察到细胞内一些小的亮点，可能意味着 ES 的内吞是通过膜泡进行的。这些现象与 Wickstrom 和 Christian 等人先前的报道是一致的。

为解释 NL 如何介导 ES 的内吞，我们分别进行了交联和免疫共沉淀实验。首先，我们希望通过交联试剂从活的 HMEC 中分离到 ES，NL，以及其它蛋白质的复合物。利用 BS3（PIERCE 有限公司的一种交联试剂）我们得到了分子量远远大于 300 kDa 的巨大复合物（数据未显示）。尽管该复合物可以被 ES 或者 NL 的抗体染色，但是其组成部分却无法鉴定。另外一种方法是用 NL 的多克隆抗体在 HMEC 裂解液中进行免疫共沉淀以分离与 NL 相互作用的蛋白。如此我们找到了一个分子量 200 kDa 左右的蛋白，并经 MALDI-TOF 鉴定为非肌肉 myosin。Myosin 组成一个很大的超家族，参与到膜动力学过程以及膜下区域内肌动蛋白的组织，由此影响细胞迁移，吸附以及内吞。在这个超家族中，拥有两个“头”结构域的第五类 myosin 可以沿肌动蛋白纤维运送膜泡，细胞器和 mRNA 颗粒。我们还发现细胞表面 NL 可以结合 ES 并将 ES 运输到细胞核（图 4a-f）。因为 myosin 是细胞内蛋白，它必然要与细胞表面 NL 的细胞内结构域结合。我们推测这个 NL-myosin 复合物在 ES 的内吞过程中起到了运载体的作用。Shibata 等人报道过相似的过程：一种神经细胞的生长因子，midkine，也可以经 NL 被内吞并定位于细胞核。有趣的是，NL 的 N 端抗体可以经细胞表面 NL 被内吞到 Hep-2 细胞内。因此，内吞似乎是一种普遍现象而且当配体结合细胞表面 NL 后变得不可避免。区别在于 ES 可以抑制细胞增殖而 NL 的抗体则不能（图 3c）。

上述现象说明了尽管很多配体可以特异性结合到细胞表面 NL 并且引发它们的内吞，它们后续的命运却是不同。我们随后考察了 ES 被运送到细胞核后的功能。Bouche 等人报道了 NL 可以促进一些对于细胞生存和增殖很重要的事件，例如 DNA 的转录以及核内核糖体的生成，只要其 N 端的丝氨酸残基在 bFGF 刺激下被某些激酶，例如 CK2 所磷酸化。Folkman 和他的同事们也报道了 bFGF 所刺激的内皮细胞的迁移可以被 ES 所抑制。根据 Bouche 等人的研究，bFGF 刺激的 NL 的磷酸化是由 CK2 介导而非其它激酶，例如封闭的核内的 cdc2。因此，我们推测 ES 通过抑制 bFGF 刺激的 CK2 介导的 NL 磷酸化来抑制细胞增殖。为了证实这个猜想，我们分离出处于静止状态的 HMEC 的核并在 ES 存在或不存在的条件下进行了磷酸化实验。结果显示当 ES 与 HMEC 核预先孵育后，NL 的磷酸化被抑制（图 4h）。此外，bFGF 而非 VEGF 可以刺激 NL 的磷酸化（图 4h），这可能可以解释以前的报道中 bFGF 可以刺激内皮细胞的增殖而 VEGF 可以刺激内皮细胞的迁移。我们观察到的现象表明 ES 可以抑制 bFGF 刺激的 CK2 所介导的 NL 磷酸化，结果抑制了细胞的生存和增殖。

例四

ES 通过 NL-myosin 复合物影响细胞迁移和粘附

到目前为止，我们已经证明了 NL 是 ES 的一个新受体，并介导 ES 对细胞迁移、增殖和粘附的抑制作用。由于 integrin 也被报道是 ES 的受体，因此我们很感兴趣 NL 和 integrin 之间是否存在相互作用。在 integrin 家族中，Rehn 和 Sudhakar 等人报道 integrin $\alpha 5\beta 1$ 是 ES 的受体，因此，我们使用 integrin $\beta 1$ 的鼠抗和 NL 的兔抗来做间接免疫荧光试验来研究细胞表面的 NL 和 integrin $\alpha 5\beta 1$ 是否定位在一起。通过激光扫描共聚焦显微镜，我们观察到了细胞表面 NL 和 integrin $\beta 1$ 在特定部位的共定位（图 4 i-k），暗示 NL 和 integrin $\beta 1$ 在细胞表面有某种相互作用。由此，我们尝试引入免疫共沉淀的方法，使用 NL 的多克隆抗体来捕捉 NL 和 integrin $\beta 1$ 的复合物。但不幸的是在沉淀中没有检测到 integrin $\beta 1$ ，这暗示 NL 和 integrin $\beta 1$ 之间的相互作用是间接的。过去的研究结果证明，myosin 参与膜的运动和肌动蛋白在细胞皮层的组织装配，进而影响到细胞迁移、粘附和内吞。同时，我们还证明了 NL 和非肌肉 myosin 在细胞皮层形成一个复合物，并且这种复合物对于内皮细胞的运动性和粘附起着关键的作用。因此，我们推测 ES 可能通过 NL-myosin 复合物干扰细胞的运动性和粘附。有可能的是，细胞表面的 NL 和 integrin $\alpha 5\beta 1$ 连同其他蛋白如 myosin 一起形成一个大的复合物来作为 ES 的受体（见图 6）。

例五

NL 的分布为 ES 的低毒性提供了基础

ES 特异性地抑制新生血管生成和肿瘤生长，并且我们观察到 ES 在动物实验中没有毒性，在临床试验中仅显示低毒性。但这种现象背后的具体分子机理却还不清楚。我们的结论是 NL 介导 ES 在抗新生血管生成中的特异性的活性，这似乎与过去所报道的 NL 是细胞中的一种普遍存在的蛋白相矛盾。为了解释这一矛盾，我们考察了不同生长状态下 HMEC 表面 NL 的丰度。正如我们所预料的，结果显示在旺盛增殖的细胞表面 NL 的丰度要远远高于在相对静止的细胞表面（图 5 a-f）。相对静止的细胞是通过血清饥饿 24 小时得到的，它们所处的细胞周期通过流式细胞仪进行了检测（图 5 g-h）。流式细胞仪的检测结果显示血清饥饿后处于 G1 期的细胞比例增加了 24%，S 期的减少了 30%（图 5 g-h）。尽管细胞没有完全处于 G1 期，细胞表面的 NL 的量在血清饥饿 24 小时后显著减少。我们推测这种细胞膜表面 NL 丰度的不同导致了内皮细胞对 ES 敏感度的不同。

为了研究是否类似的细胞学现象也会在动物体内的研究中发现，我们检测了肿瘤组织和正常器官细胞表面 NL 的丰度。首先，我们在接种了 Hela 肿瘤的裸鼠的背部皮下注射了 NL 的多克隆抗体，注射部位远离接种的肿瘤，然后使用免疫组织化学的手段去观察这些抗体的分布（图 5 i-l）。结果显示 NL 的抗体只在肿瘤诱生的内皮细胞上积累，而在正常组织例如心脏、肾和肺中没有发现（图 5 i-l）。这些发现与 Folkman 的抗新生血管生成理论非常的一致：在成年人中，除非血管内皮细胞被一些内源性的血管生成刺激因子所上调，否则它们会处于一种静止的状态而几乎不进行增殖；而正在增殖中的内皮细胞出现在某些生理或病理的血管生成过程中如肿瘤生长和转移。总之，NL，也就是 ES 的受体在内皮细胞表面的不同丰度为 ES 在动物和临床试验中的低毒性提供了一种解释。因为在肿瘤诱生的血管内皮细胞膜表面的 NL 比正常组织的丰富的多，因此 ES 特异性的结合 NL 从而选择性的在肿瘤组织上发挥其抗新生血管生成的活性；另一方面，ES 很少与正常器官结合，因为正常器官细胞表面 NL 较少，这反过来也使得在用 ES 治疗肿瘤时不会带来毒性。

例六

重组 NL 在细胞迁移实验中调节 ES 的功能

我们使用 SV 总 RNA 分离以及反转录系统（Promega）按照制造商建议的操作规程从 HMEC 中得到 NL 的 cDNA。PCR 得到 NL 与多聚组氨酸 (His)₆ 的融合序列后，继而亚克隆

到表达载体 pPIC9K (Invitrogen)。按照制造商手册上的建议, 该载体经限制性内切酶 Sal I (Promega) 线性化后电转化甲醇酵母菌株 GS115。经 G418 筛选得到的稳定转化子于 30 °C, BMMY 培养基 (10 g/L 酵母粉; 20 g/L 蛋白胨; 100 mmol/L 磷酸钾, pH 6.0; 13.4 g/L 酵母基础氮源; 40 mg/L 生物素以及每日补加至终浓度 0.5% 的甲醇) 中摇瓶培养 3 天。培养基上清经镍离子亲和柱 (Qiagen) 纯化得到 NL。我们将 1 L 培养基上清 pH 调到 8.0 后上 6 ml Ni-NTA 柱并按照制造商的建议进行洗涤和洗脱。最终可从每升培养基获得约 3mg NL。我们利用该方法得到的 NL 制备了 NL 的多克隆抗体。

HUVEC (2×10^4 每孔) 接种到含有 DMEM 培养基, 0.5% 胎牛血清, 以及 10 ng/ml bFGF (PeproTech EC) 的 Transwell 滤膜 (8 μ m 孔, Costar) 的上室中。ES (5 μ g/ml, Protgen) 以及重组 NL (20 μ g/ml), 或 NL 的抗体 (20 μ g/ml) 于迁移实验开始时添加。PBS 亦作为对照加入此迁移实验系统。同样的 DMEM 培养基与其它试剂也加在下室中。内皮细胞在 37 °C, 5% CO₂ 的条件下迁移 6 h。经乙醇和曙红固定染色后, 在光学显微镜下选择五个不同的视野对完全迁移过滤膜的细胞进行计数并取其平均值。结果显示重组人 NL 以剂量依赖的方式削弱 ES 对细胞迁移的抑制作用, 说明重组 NL 与 ES 的抗新生血管生成活性相关。类似地, NL 的多克隆抗体阻断了 ES 对细胞增殖的抑制作用。

例七

癌细胞表面 NL 被其抗体封闭后生长加速

我们使用 SV 总 RNA 分离以及反转录系统 (Promega) 按照制造商建议的操作规程从 HMEC 中得到 NL 的 cDNA。PCR 得到 NL 与多聚组氨酸 (His)₆ 的融合序列后, 继而亚克隆到表达载体 pPIC9K (Invitrogen)。按照制造商的建议, 该载体经限制性内切酶 Sal I (Promega) 线性化后电转化甲醇酵母菌株 GS115。经 G418 筛选得到的稳定转化子于 30 °C, BMMY 培养基 (10 g/L 酵母粉; 20 g/L 蛋白胨; 100 mmol/L 磷酸钾, pH 6.0; 13.4 g/L 酵母基础氮源; 40 mg/L 生物素以及每日补加至终浓度 0.5% 的甲醇) 中摇瓶培养 3 天。培养基上清经镍离子亲和柱 (Qiagen) 纯化得到 NL。我们将 1 L 培养基上清 pH 调到 8.0 后上 6 ml Ni-NTA 柱并按照制造商的建议进行洗涤和洗脱。最终可从每升培养基获得约 3mg NL。我们利用该方法得到的 NL 制备了 NL 的多克隆抗体。

Hela 细胞接种至裸鼠皮下。从次日起, NL 的抗体每三天一次缓慢注射到远离肿瘤接种部位的鼠背部皮下。第七次注射后, 裸鼠被处死, 称重肿瘤并测量三次其大小。这些动物实验的结果显示当细胞表面 NL 被抗体封闭后肿瘤生长显著加快, 说明 NL 在调节肿瘤生长和新生血管生成中扮演重要角色。

例八

利用 ES-Ni-NTA 亲和层析柱筛选 NL-特异性新生血管生成抑制剂

我们使用 SV 总 RNA 分离以及反转录系统 (Promega) 按照制造商建议的操作规程从 HMEC 中得到 NL 的 cDNA。PCR 得到 NL 与多聚组氨酸 (His)₆ 的融合序列后, 继而亚克隆到表达载体 pPIC9K (Invitrogen)。按照制造商的建议, 该载体经限制性内切酶 Sal I

(Promega) 线性化后电转化甲醇酵母菌株 GS115。经 G418 筛选得到的稳定转化子于 30 °C, BMMY 培养基 (10 g/L 酵母粉; 20 g/L 蛋白胨; 100 mmol/L 磷酸钾, pH 6.0; 13.4 g/L 酵母基础氮源; 40 mg/L 生物素以及每日补加至终浓度 0.5% 的甲醇) 中摇瓶培养 3 天。培养基上清经镍离子亲和柱 (Qiagen) 纯化得到 NL。我们将 1 L 培养基上清 pH 调到 8.0 后上 6 ml Ni-NTA 柱并按照制造商的建议进行洗涤和洗脱。最终可从每升培养基获得约 3 mg NL。NL 经其 N 端融合的组氨酸标签固定在 Ni-NTA 镍离子亲和柱上。此柱料可以用来高通量筛选与 NL 结合的蛋白。所得到的 NL 结合蛋白可以利用 MALDI-TOF 结合肽段指纹图谱鉴定。它们在抗新生血管生成过程中的生物活性可由细胞实验, 例如上面描述的细胞迁移与增殖实验, 来检测。

例九

ES 与 NL 的体内共定位

SPR (Surface plasmon resonance)

ES 与 NL 的结合动力学通过 SPR 方法测定, 仪器是 Amersham 生物技术公司的 BIAcore 2000™ 生物传感系统。纯化后的 ES 用 20 mM 醋酸钠缓冲液 (pH 6.5) 稀释成 100 µg/ml, 并按照使用手册上的方法, 通过使用氨基偶联试剂盒(1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide, (N-hydroxysuccinimide) 共价固定在研究用 CM5 传感芯片上。100 µg/ml 的 ES (20 mM 醋酸钠缓冲液, pH 6.5) 注射到活化的研究用 CM5 传感芯片上, 直到在 SPR 仪器上响应值达到 9000 个单位。没有反应的芯片表面用 pH 8.5 的乙醇氨封闭 (Amersham 生物技术公司)。ES 与 NL 的结合动力学 SPR 在 25 °C 进行, 溶解在流动相 HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, and 0.005% surfactant P20, pH 7.4) 中的 NL 以 10 µl/min 的流速注射进 SPR 20 µl。ES 与 NL 的结合动力学曲线就是在流动相中 NL 的浓度随时间变化的值。原始数据通过 Amersham 生物技术公司的分析软件 BIAevaluation

3.1 分析。ES 与 NL 的结合率常数 k_a , 解离率常数 k_b 和解离平衡常数 K_D 通过 Langmuir 结合模型计算（化学计量比 1:1）。

实时 SPR 是一种快速灵敏的测定两个分子间相互作用的实验方法。我们用它来测定 ES 与 NL 之间的亲和力。通过对这些 ES 与 NL 的结合动力学曲线的分析, 我们计算出 ES 与 NL 的解离常数 $K_D = 2.32 \times 10^{-8} \text{ M}$ 。

ES 与 NL 的体内共定位

我们将旺盛增殖期的小鼠黑色素瘤细胞 B16/F10 (2×10^6 cells in 200 μl of PBS) 种植在 2 个月大的 Balb/c 小鼠的皮下。八天后, 进行 ES 与 NL 在小鼠体内的共定位实验。标记有生物素的 ES 和 NL 的兔多克隆抗体分别先后被静脉注射到荷瘤小鼠体内。对照组注射标记有生物素的 ES 和纯化的兔多克隆抗体。一小时后, 小鼠被麻醉, 用 20 ml PBS 从心脏灌注, 然后处死。小鼠的一些正常组织和肿瘤被取出、固定、切片。切片同时用 TRITC 标记的抗生物素蛋白 (Pierce) 和 FITC 标记的二抗检测, 在 Olympus Fluoview 激光扫描共聚焦成像系统下进行观察 (Olympus Inc.)。

在体内我们也观测到了 ES 和 NL 的共定位。标记有生物素的 ES 和 NL 的兔多克隆抗体分别先后被静脉注射到荷瘤小鼠体内。对照组注射标记有生物素的 ES 和纯化的兔多克隆抗体。一小时后, 小鼠的一些正常组织和肿瘤用于免疫荧光检测。标记有生物素的 ES 和 NL 的兔多克隆抗体选择性地在肿瘤地血管表面聚集 (图 7j-l)。在心脏 (图 7a-c)、肝脏 (图 7d-f)、肾脏 (图 7g-i) 的血管壁上并没有发现标记有生物素的 ES 和 NL 的兔多克隆抗体。在小鼠地肿瘤组织中, 标记有生物素的 ES 和 NL 的兔多克隆抗体很好地重叠在了一起。在对照肿瘤组织中, 并没有发现对照的 NL 的兔多克隆抗体 (图 7m-o)。这些结果表明, ES 和 NL 只在肿瘤血管表面共定位, 在正常组织内没有共定位。

所有上述提到的论文, 著作, 专利, 专利申请, 网站以及其它印刷的文档, 都被包括在但不仅限于以下的参考文献列表中。

参考文献

1. O'Reilly, M. S. et al. ES: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285 (1997).

2. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. & O'Reilly, M. S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-407 (1997).
3. Herbst, R. S. et al. Phase I Study of Recombinant Human ES in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* 20, 3792-3803 (2002).
4. Eder, J. P. Jr. et al. Phase I Clinical Trial of Recombinant Human ES Administered as a Short Intravenous Infusion Repeated Daily. *J. Clin. Oncol.* 20, 3772-3784 (2002).
5. Dhanabal, M. et al. ES: Yeast Production, Mutants, and Antitumor Effect in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 59, 189-197 (1999).
6. Yamaguchi, N. et al. ES inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.* 18, 4414-4423 (1999).
7. Rehn, M. et al. Interaction of ES with integrins implicated in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1024-1029 (2001).
8. Dixelius, J. et al. ES-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 95, 3403-3411 (2000).
9. MacDonald, N. J. et al. ES Binds Tropomyosin. A potential modulateor of the antitumor activity of ES. *J. Biol. Chem.* 276, 25190-25196 (2001).
10. Karumanchi, S. A. et al. Cell surface glypicans are low-affinity ES receptors. *Mol. Cell.* 7, 811-822 (2001).
11. Yu, Y. et al. E-selectin is required for the antiangiogenic activity of ES. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8005-8010 (2004).
12. Hanai, J.-i. et al. ES Causes G1 Arrest of Endothelial Cells through Inhibition of Cyclin D1. *J. Biol. Chem.* 277, 16464-16469 (2002).
13. Orrick, L. R., Olson, M. O. J. & Busch, H. Comparison of Nucleolar Proteins of Normal Rat Liver and Novikoff Hepatoma Ascites Cells by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1316-1320 (1973).
14. Lapeyre, B., Bourbon, H. & Amalric, F. NL, the Major Nucleolar Protein of Growing Eukaryotic Cells: An Unusual Protein Structure Revealed by the Nucleotide Sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1472-1476 (1987).
15. Pasternack, M., Bleier, K. & McInerney, T. Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves NL in vitro. *J. Biol. Chem.* 266, 14703-14708 (1991).

16. Chen, C., Chiang, S. & Yeh, N. Increased stability of NL in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity. *J. Biol. Chem.* 266, 7754-7758 (1991).
17. Fang, S.-H. & Yeh, N.-H. The Self-Cleaving Activity of NL Determines Its Molecular Dynamics in Relation to Cell Proliferation. *Exp. Cell Res.* 208, 48-53 (1993).
18. Srivastava, M. & Pollard, H. B. Molecular dissection of NL's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13, 1911-1922 (1999).
19. Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. & Bouvet, P. Structure and functions of NL. *J. Cell Sci.* 112, 761-772 (1999).
20. Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M. & Nigg, E. A. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390 (1989).
21. Callebaut, C. et al. Identification of V3 Loop-binding Proteins as Potential Receptors Implicated in the Binding of HIV Particles to CD4+ Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 21988-21997 (1998).
22. Shibata, Y. et al. Nuclear Targeting by the Growth Factor Midkine. *Mol. Cell Biol.* 22, 6788-6796 (2002).
23. de Verdugo, U. et al. Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J. Virol.* 69, 6751-6757 (1995).
24. Folkman, J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab. Invest.* 51, 601-604 (1984).
25. Marshak, D. R., Kadonaga, J. T., Burgess, R. R. & Knuth, M. W. Strategies for protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1996).
26. Wickstrom, S. A., Alitalo, K. & Keski-Oja, J. ES Associates with Lipid Rafts and Induces Reorganization of the Actin Cytoskeleton via Down-regulation of RhoA Activity. *J. Biol. Chem.* 278, 37895-37901 (2003).
27. Christian, S. et al. NL expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.* 163, 871-878 (2003).
28. Gillespie, G. Y., Soroceanu, L., Manning, T. J. Jr., Gladson, C. L. & Rosenfeld, S. S. Glioma Migration Can Be Blocked by Nontoxic Inhibitors of Myosin II. *Cancer Res.* 59, 2076-2082 (1999).
29. Chavier, P. May the force be with you: Myosin-X in phagocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4, E169-71 (2002).

30. Wylie, S. R. & Chantler, P. D. Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth. *Nat. Cell Biol.* 3, 88-92 (2001).
31. Mehta, A. Myosin learns to walk. *J. Cell Sci.* 114, 1981-1998 (2001).
32. Deng, J. S., Ballou, B. & Hofmeister, J. K. Internalization of anti-NL antibody into viable HEp-2 cells. *Mol. Biol. Rep.* 23, 191-195 (1996).
33. Bouche, G., Baldin, V., Belenguer, P., Prats, H. & Amalric, F. Activation of rDNA transcription by FGF-2: key role of protein kinase CKII. *Cell Mol. Biol. Res.* 40, 547-554 (1994).
34. Bonnet, H. et al. Fibroblast Growth Factor-2 Binds to the Regulatory beta Subunit of CK2 and Directly Stimulates CK2 Activity toward NL. *J. Biol. Chem.* 271, 24781-24787 (1996).
35. Bouche, G. et al. Basic Fibroblast Growth Factor Enters the Nucleolus and Stimulates the Transcription of Ribosomal Genes in ABAE Cells Undergoing G0→G1 Transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6770-6774 (1987).
36. Sudhakar, A. et al. Human tumstatin and human ES exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha vbeta 3 and alpha 5beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4766-4771 (2003).
37. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27-31 (1995).
38. Sasaki, T., Hohenester, E. & Timpl, R. Structure and function of collagen-derived ES inhibitors of angiogenesis. *IUBMB Life* 53, 77-84 (2002).
39. Sasaki, T. et al. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor ES. *EMBO J.* 18, 6240-6248 (1999).
40. Kreuger, J. et al. Role of heparan sulfate domain organization in ES inhibition of endothelial cell function. *EMBO J.* 21, 6303-6311 (2002).
41. Li, B., Wu, X., Zhou, H., Chen, Q. & Luo, Y. Acid-induced unfolding mechanism of recombinant human ES. *Biochemistry* 43, 2550-2557 (2004).
42. Wu, X., Huang, J., Chang, G. & Luo, Y. Detection and characterization of an acid-induced folding intermediate of ES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 973-978 (2004).
43. Meredith J. E. Jr., Fazeli, B. & Schwartz M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* 4, 953-61 (1993).
44. Dhanabal, M. et al. ES Induces Endothelial Cell Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 11721-11726 (1999).

-
45. Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D. J. & Spicer, E. K. Identification of NL as an AU-rich Element Binding Protein Involved in bcl-2 mRNA Stabilization. *J. Biol. Chem.* 279, 10855-10863 (2004).
 46. Maeshima, Y., Colorado, P. C. & Kalluri, R. Two RGD-independent alpha vbeta 3 Integrin Binding Sites on Tumstatin Regulate Distinct Anti-tumor Properties. *J. Biol. Chem.* 275, 23745-23750 (2000).
 47. Sui, G. et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5515-5520 (2002).
 48. Sastry, S. K. & Burridge, K. Focal Adhesions: A Nexus for Intracellular Signaling and Cytoskeletal Dynamics. *Exp. Cell Res.* 261, 25-36 (2000).

a

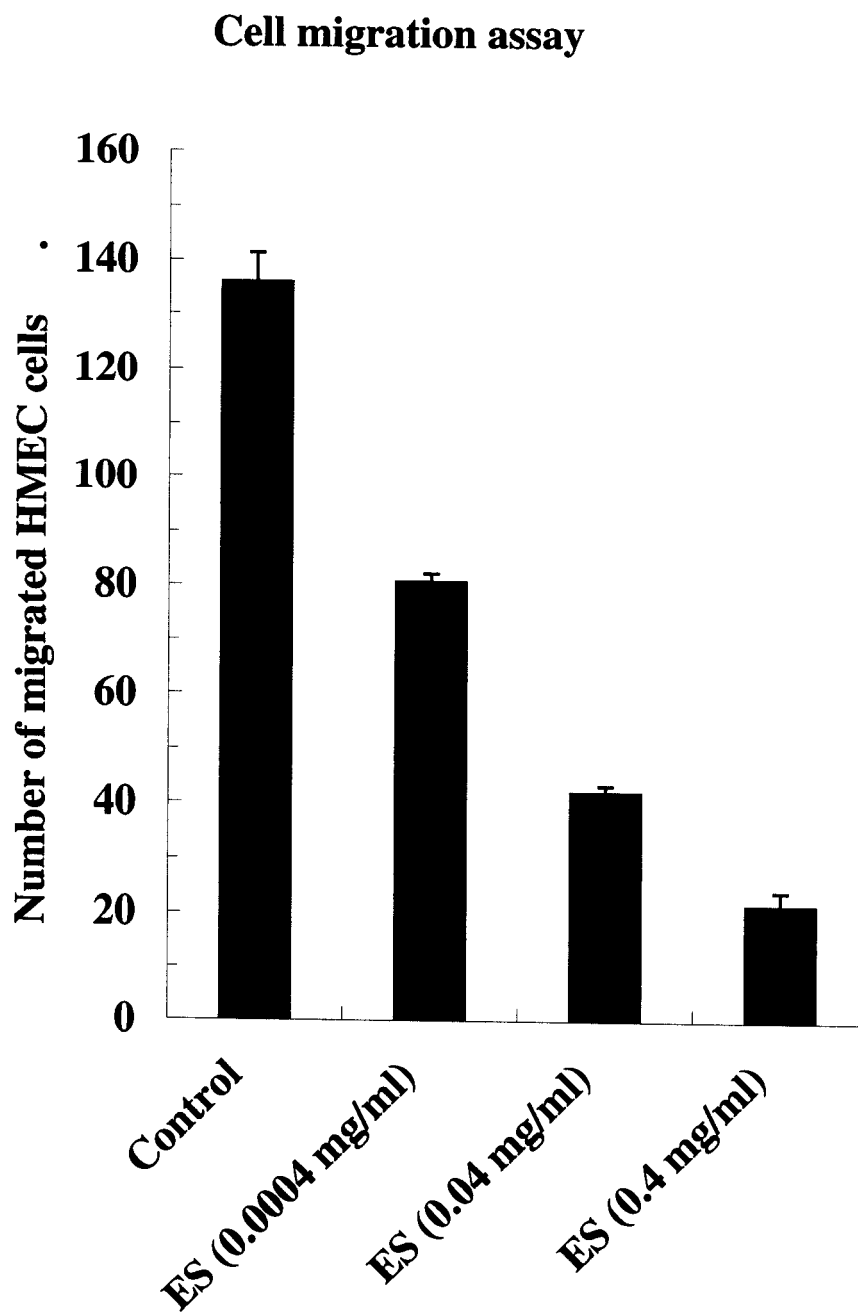


图 1a

b

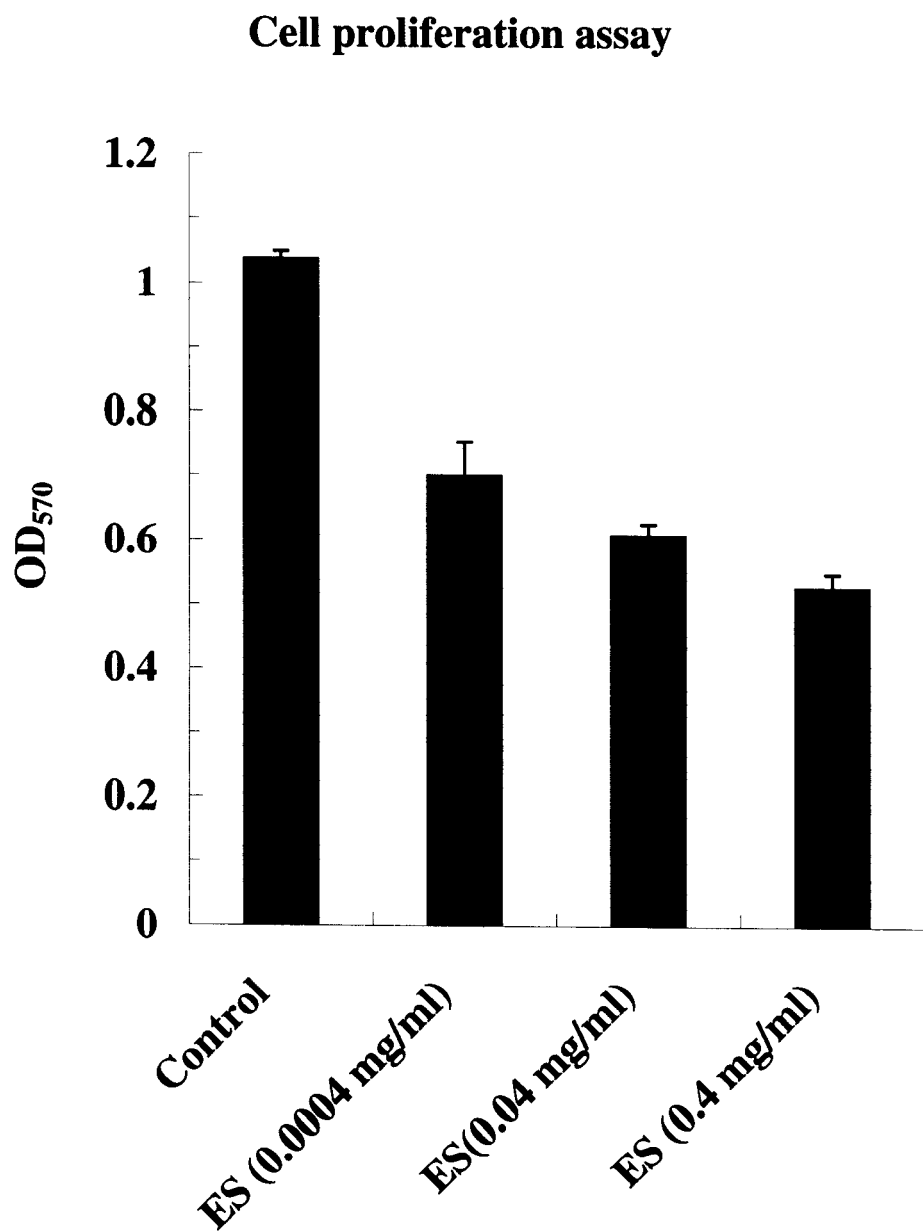


图 1b

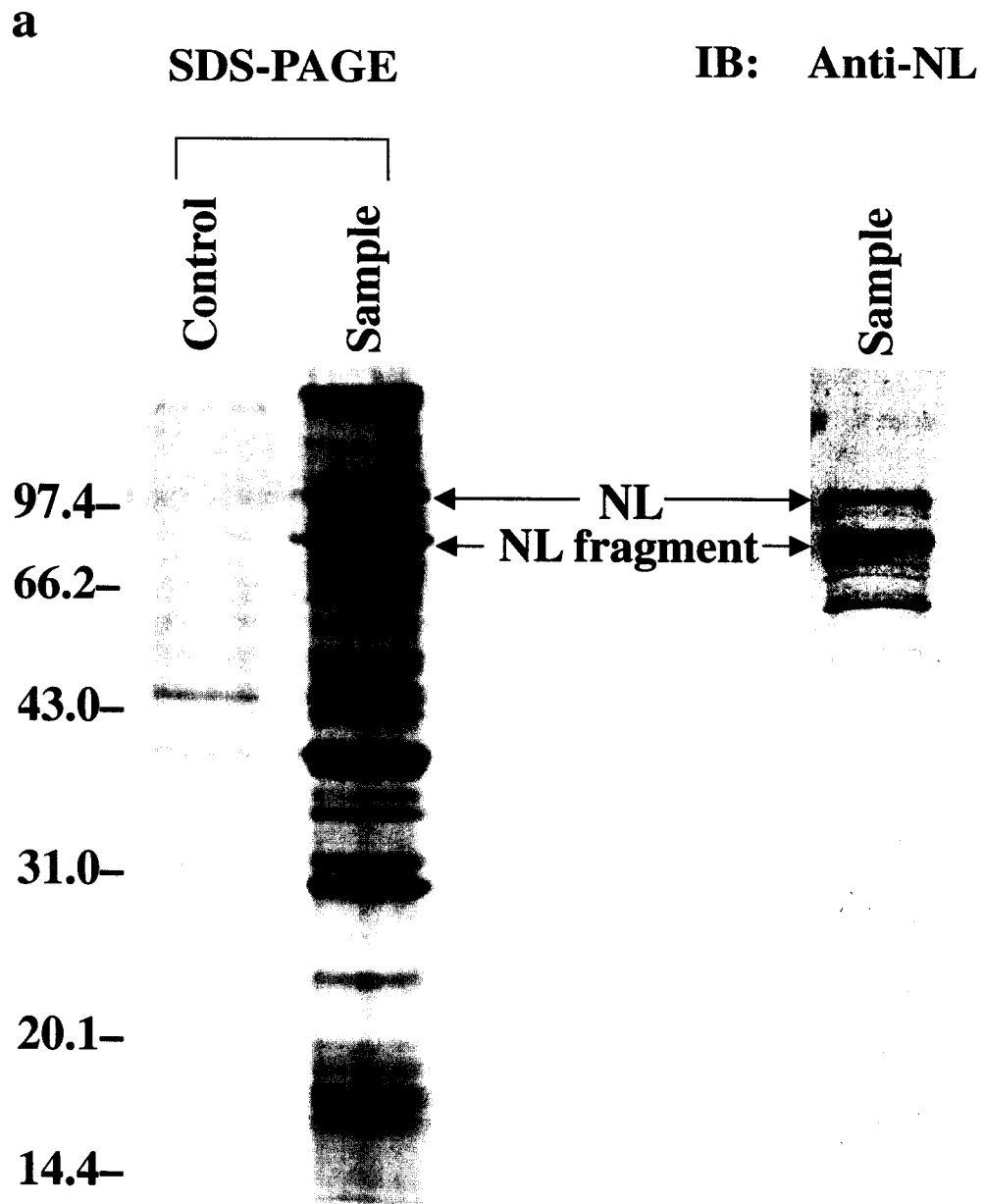


图 2a

b

IP: NL

IB: ES

ES:	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM
NL:	0 nM	2 nM	5 nM	20 nM

20.1 kDa--

←ES



图 2b

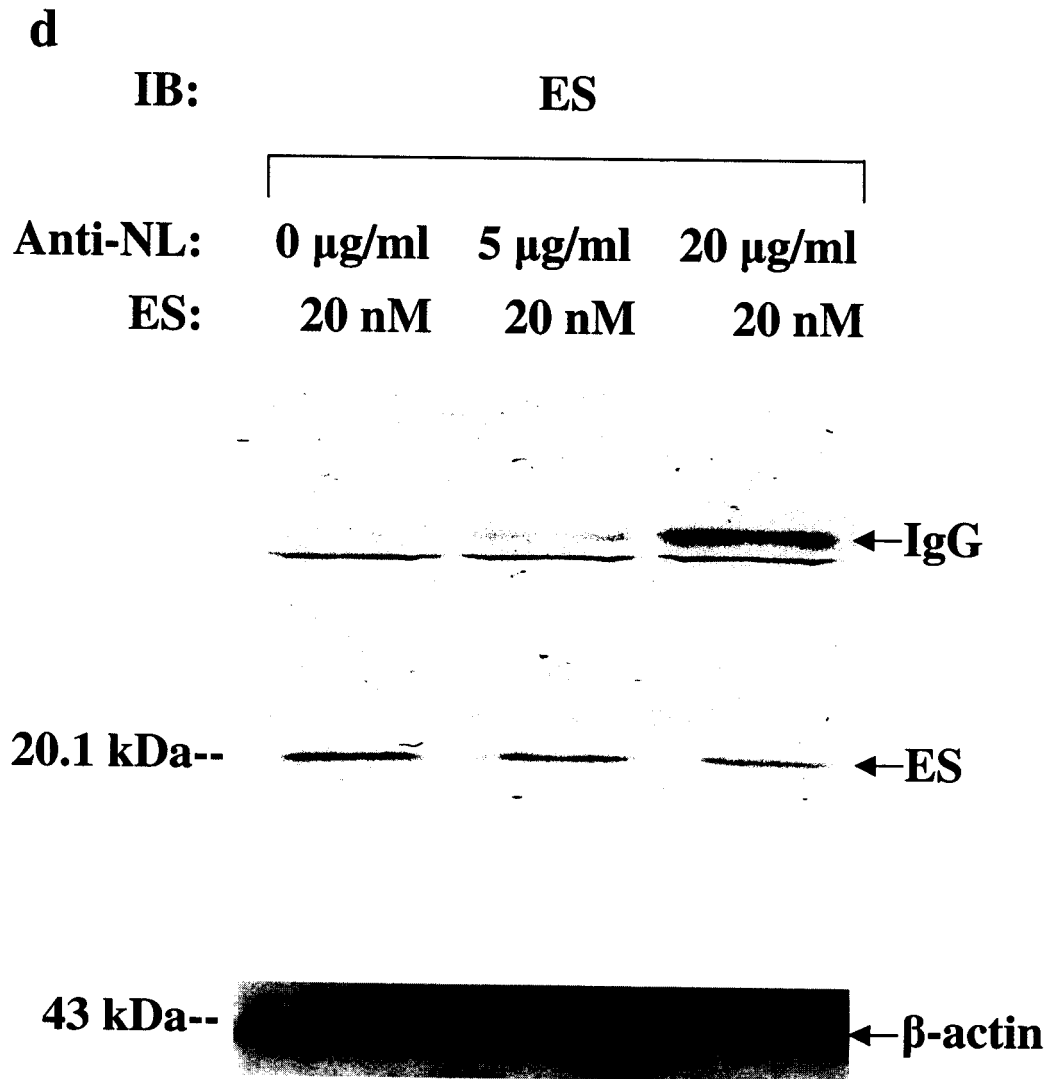


图 2d

e

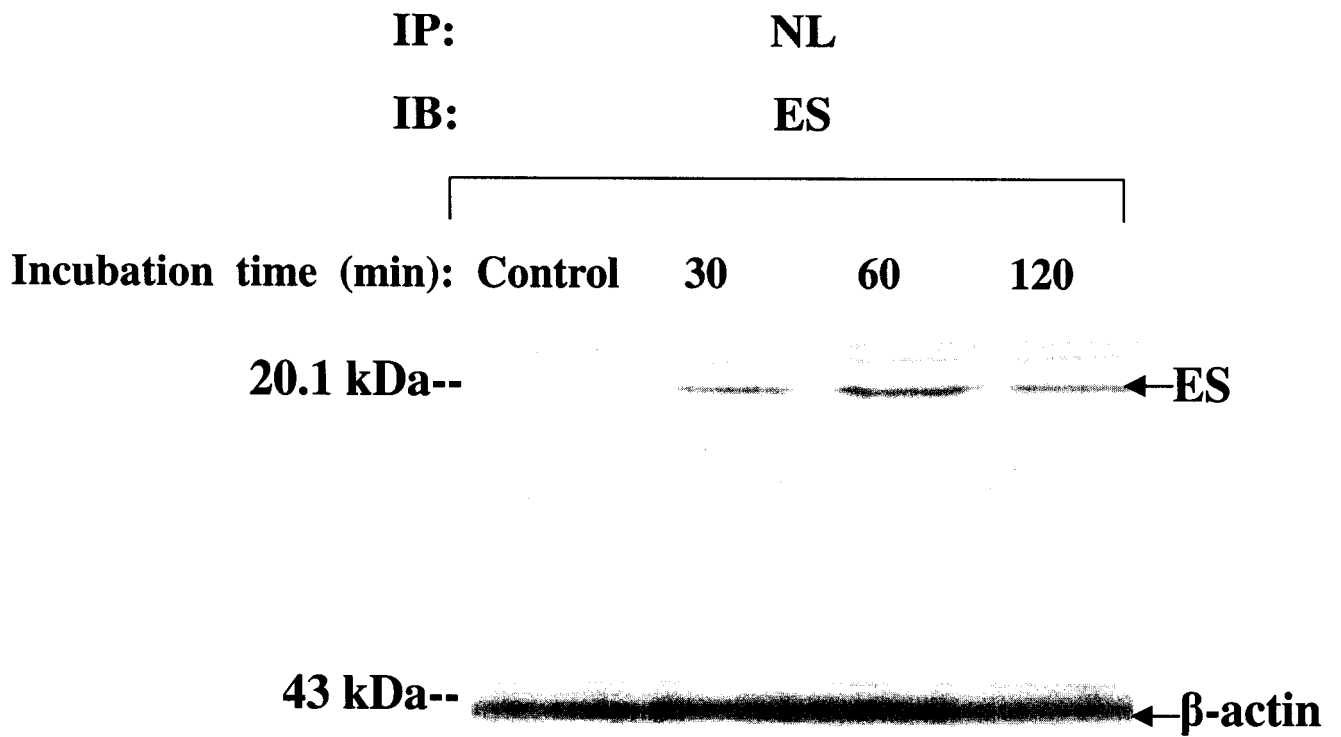


图 2e

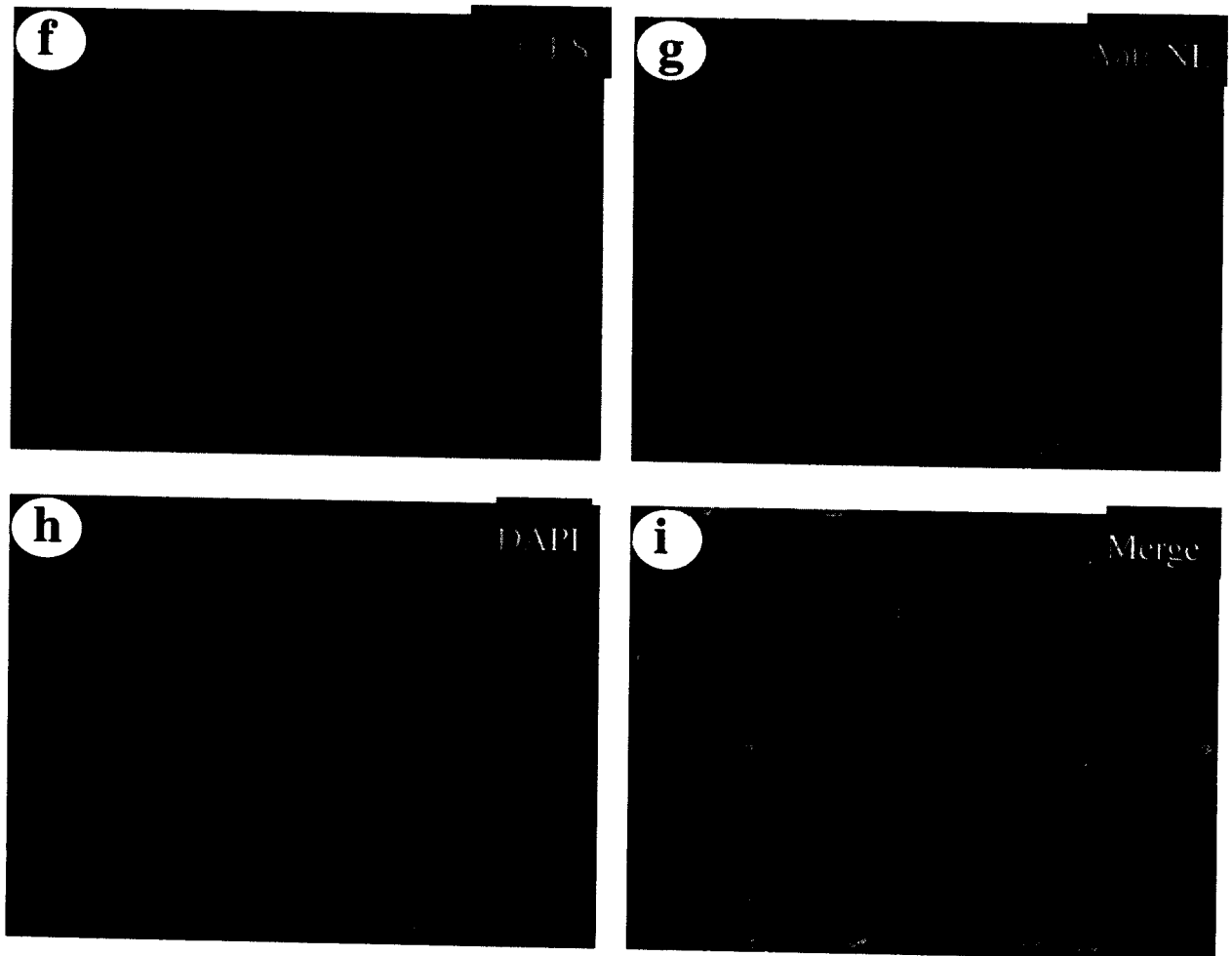


图 2f

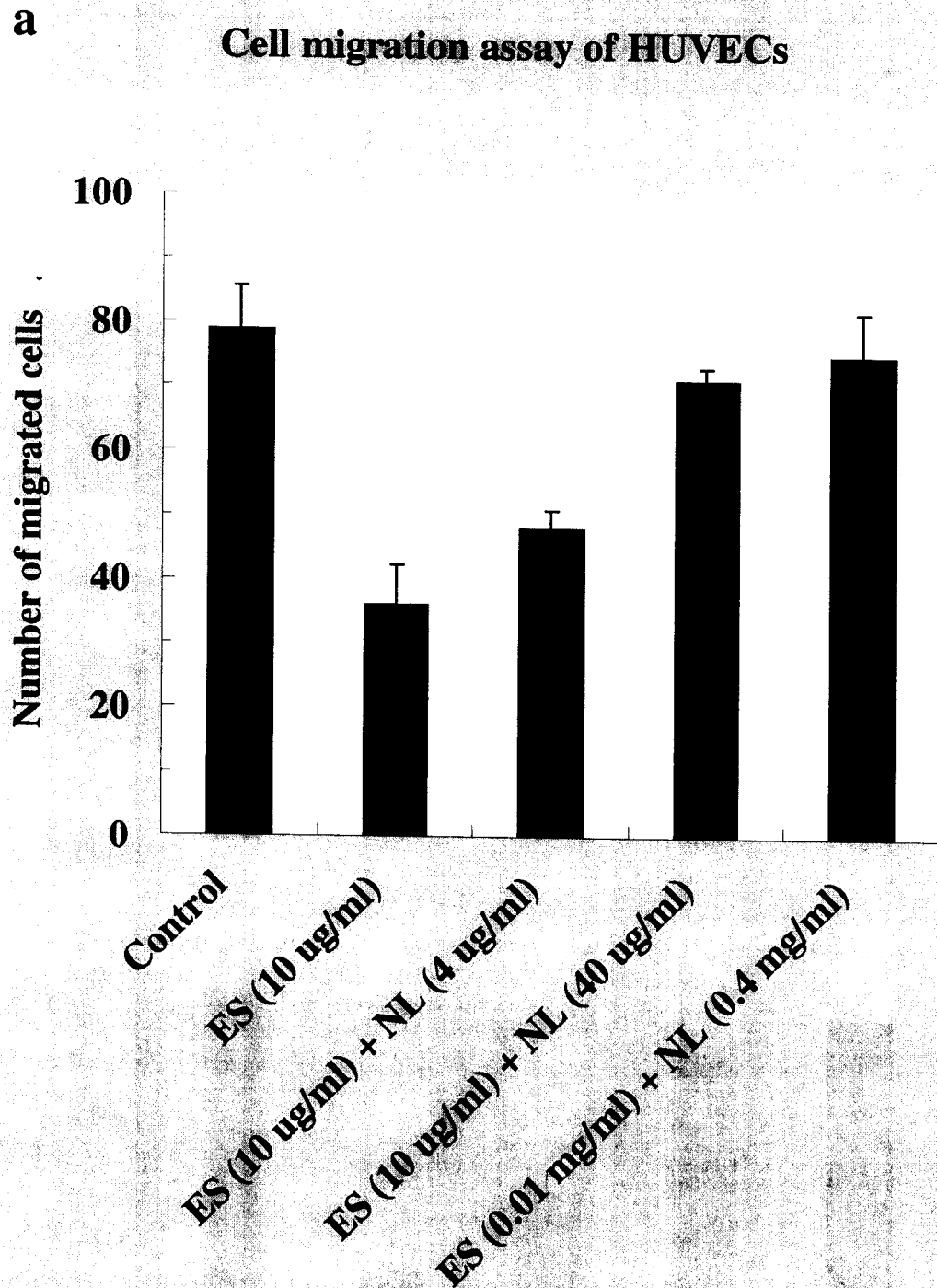


图 3a

b

Cell migration assay

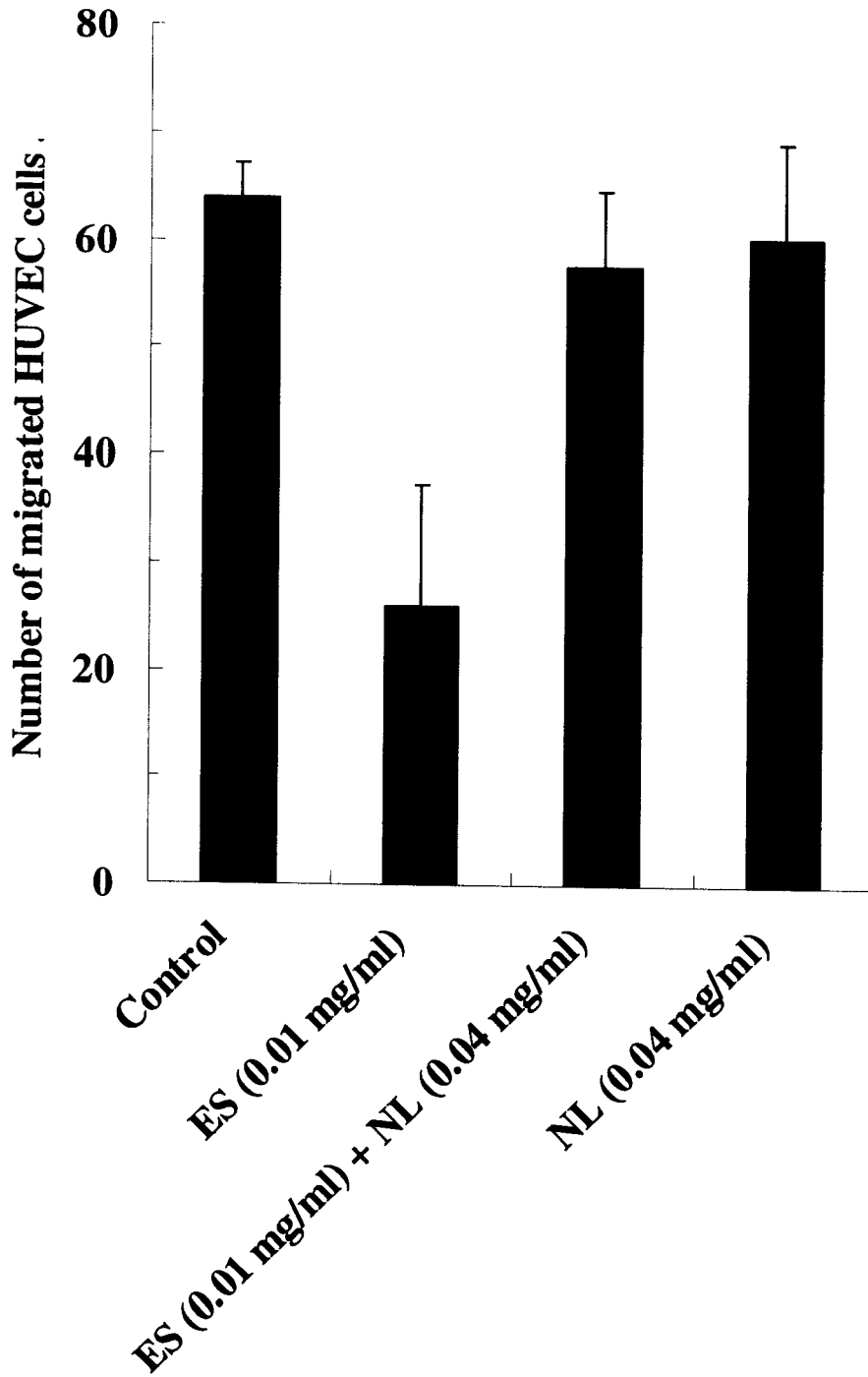


图 3b

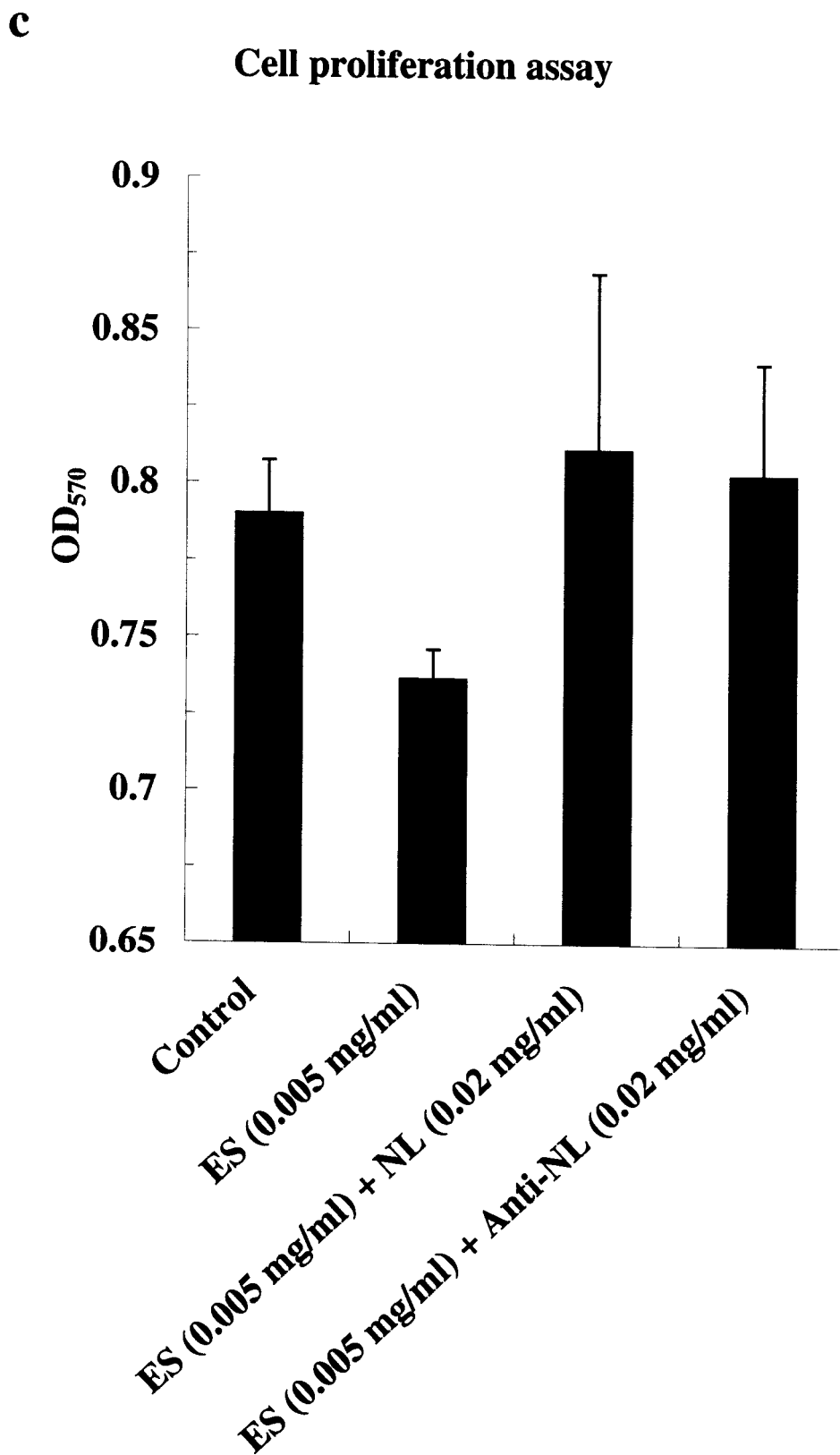


图 3c

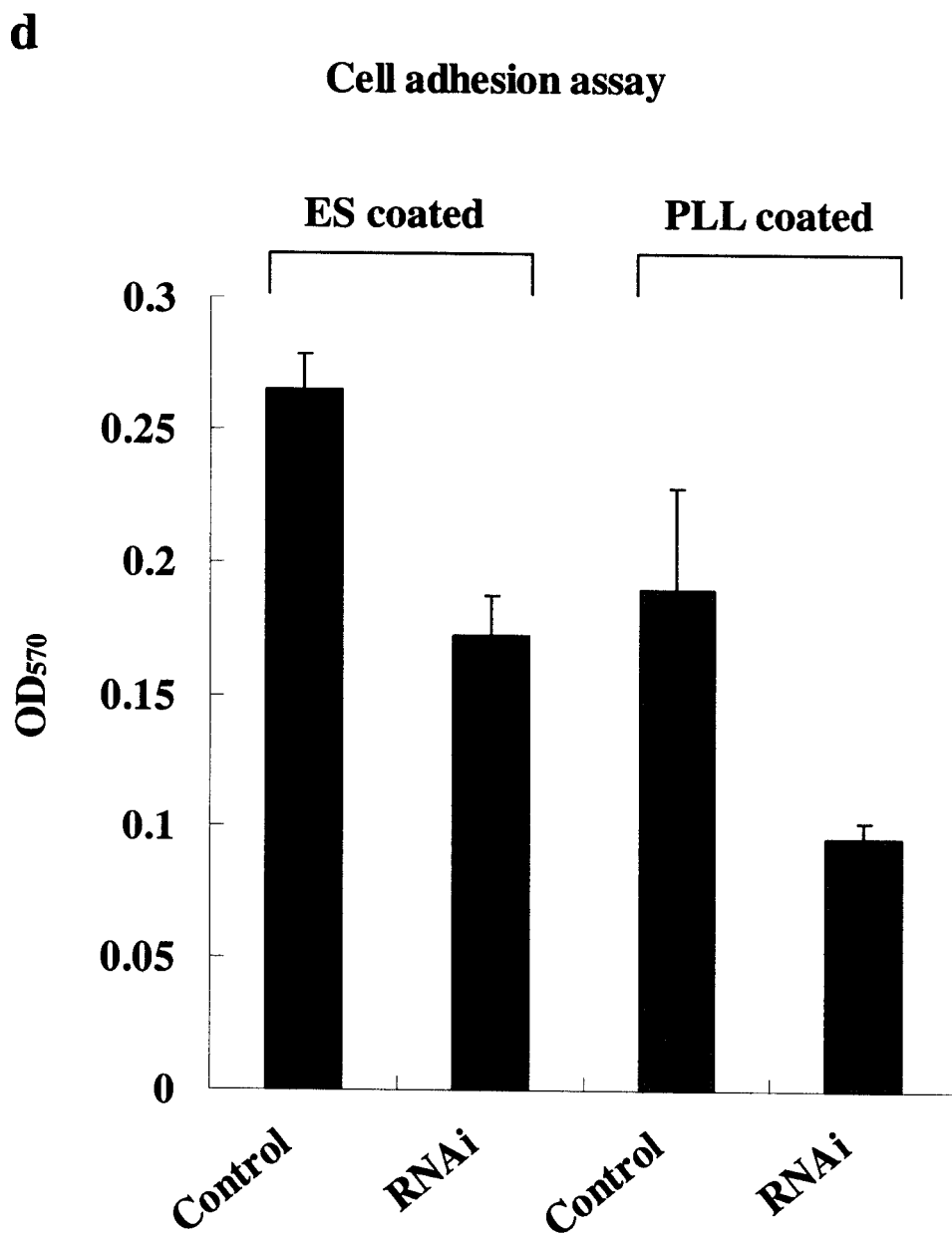


图 3d

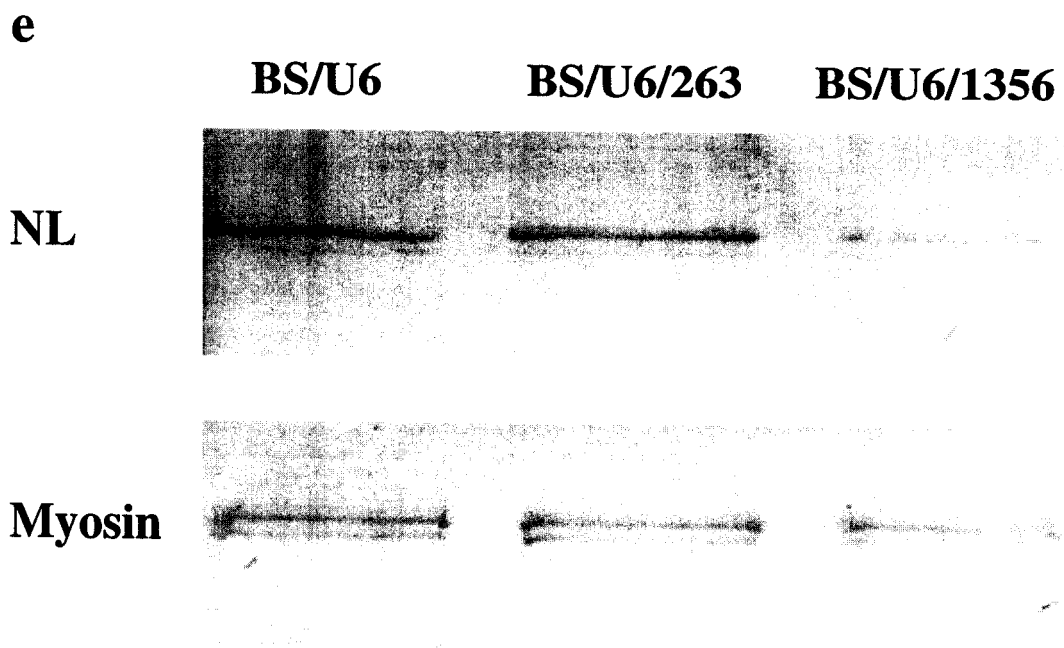


图 3e

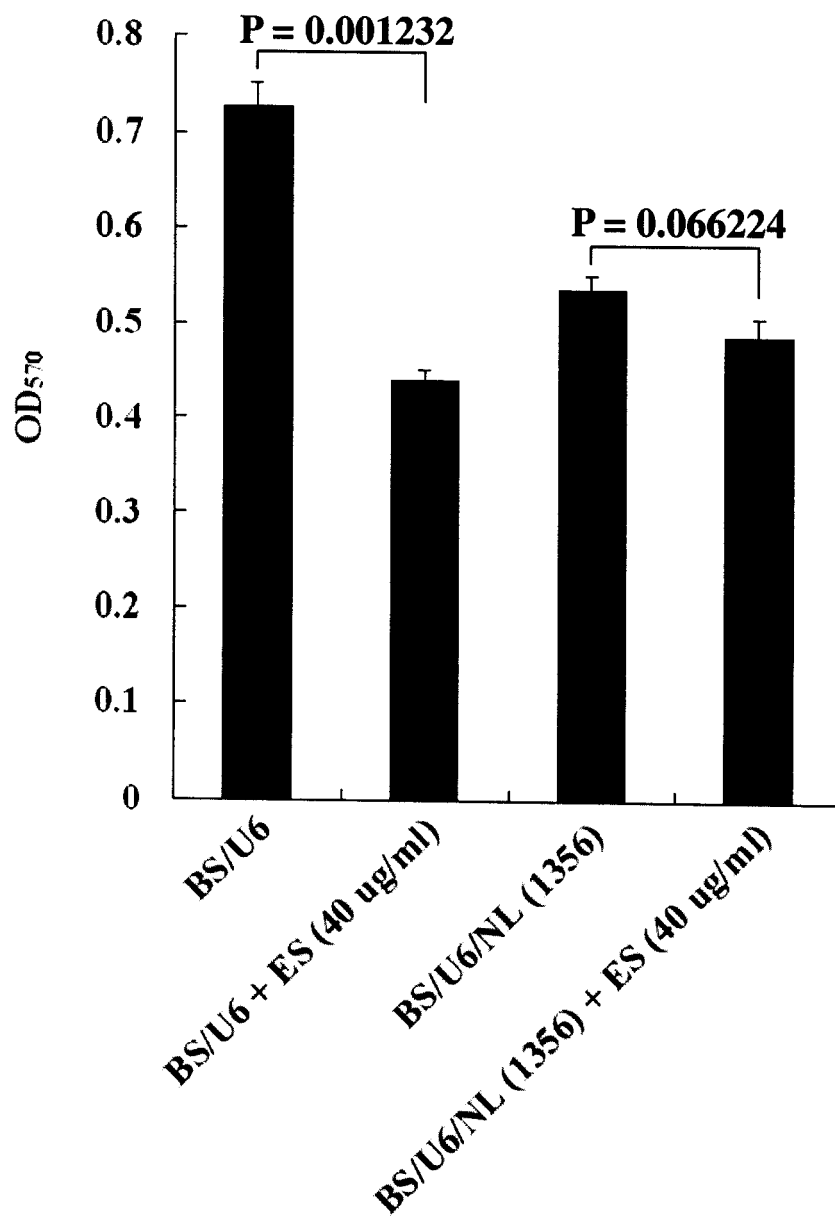
f**Cell proliferation assay of nucleolin-deficient HMECs**

图 3f

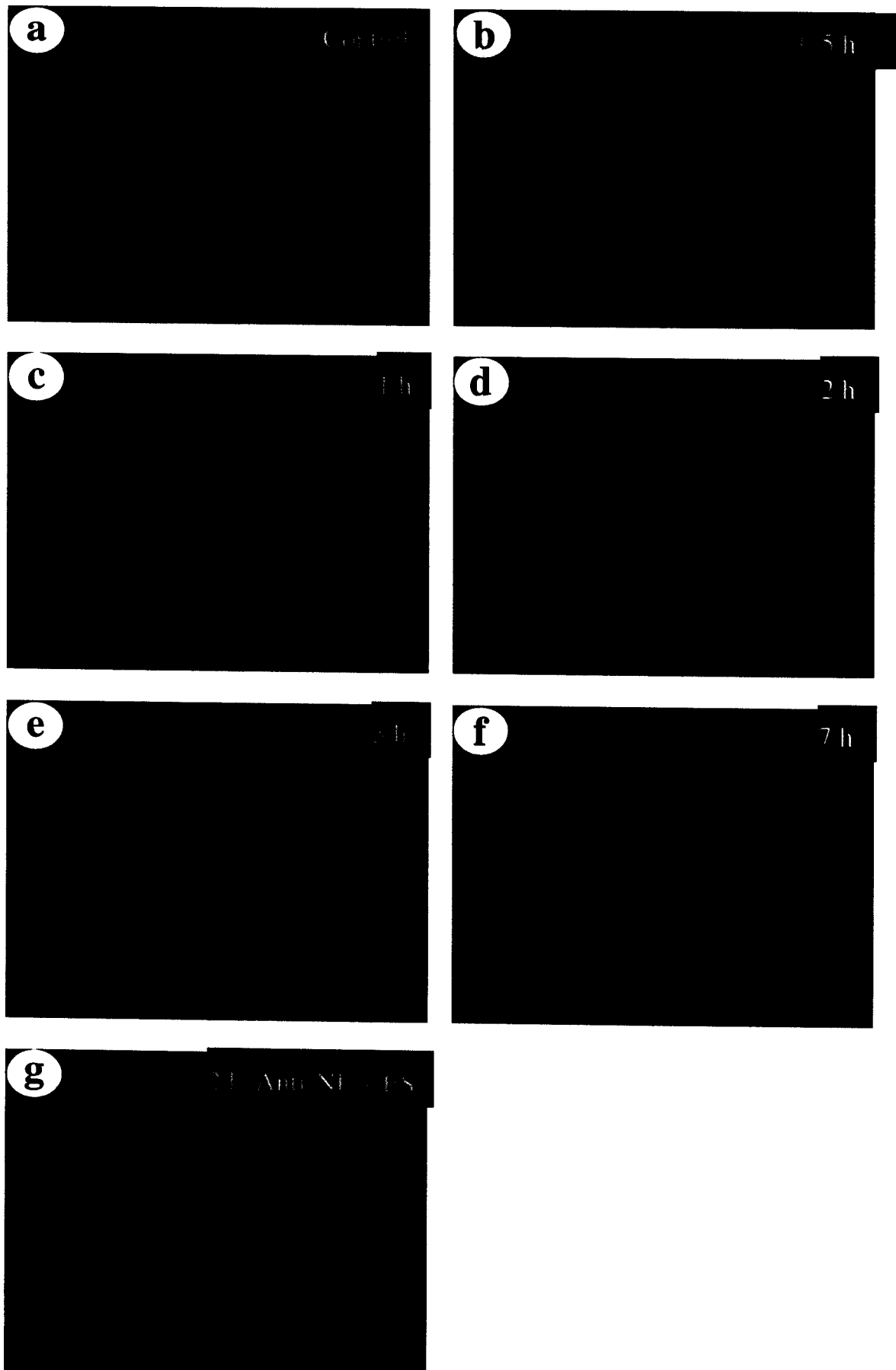


图 4a-g

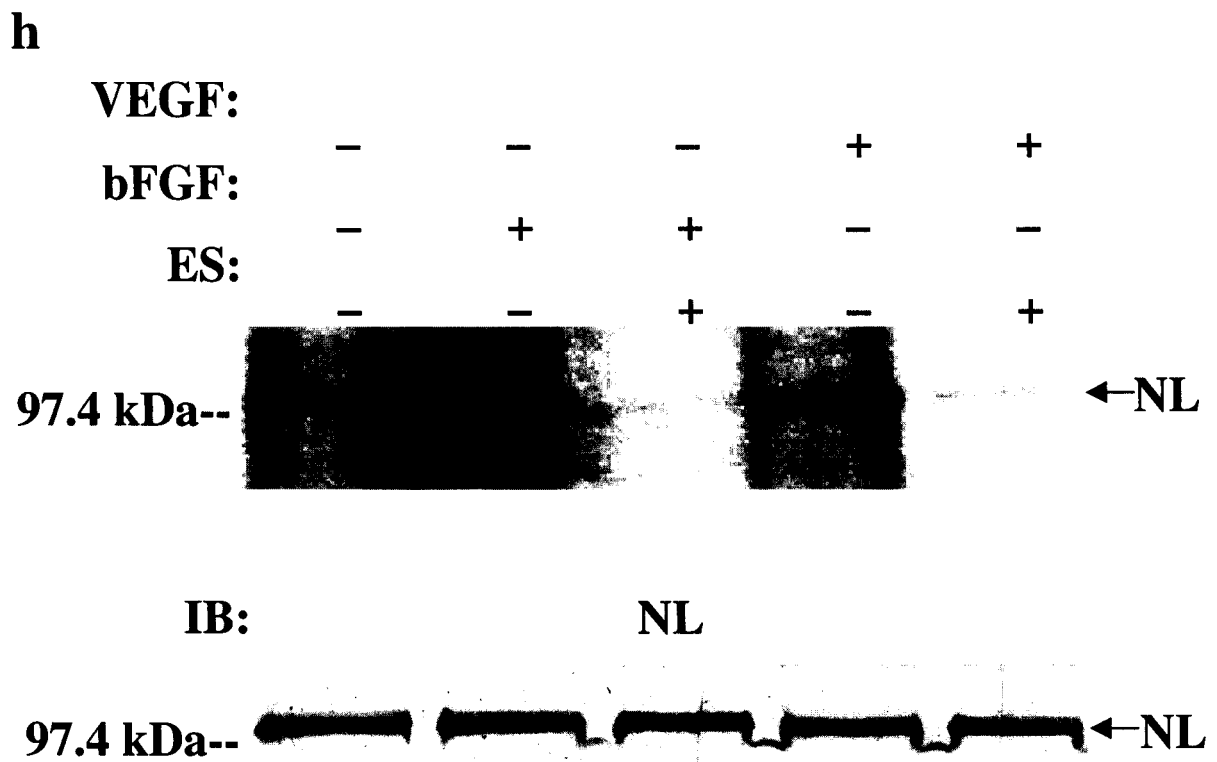


图 4h

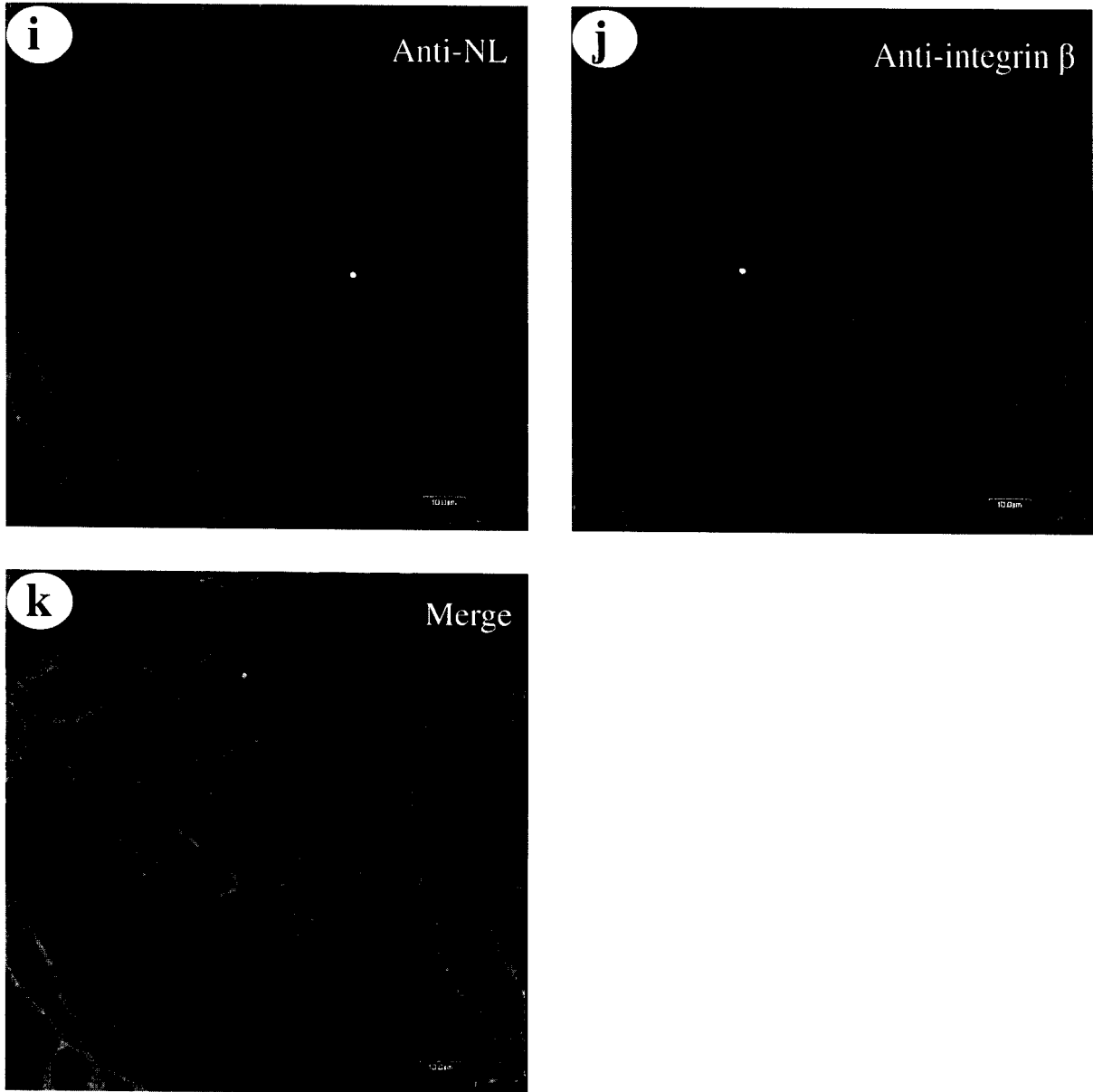


图 4i-k

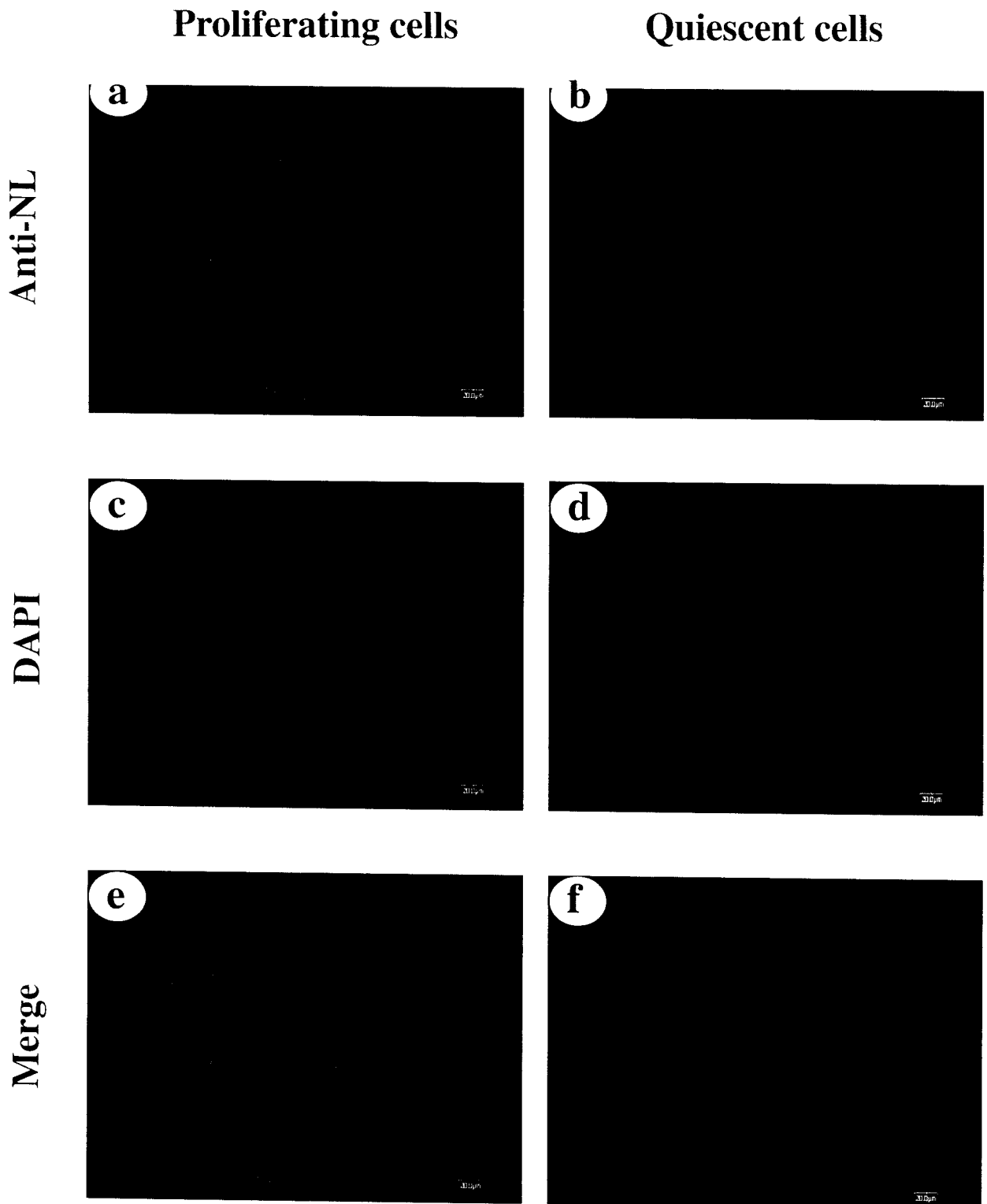


图 5a-f

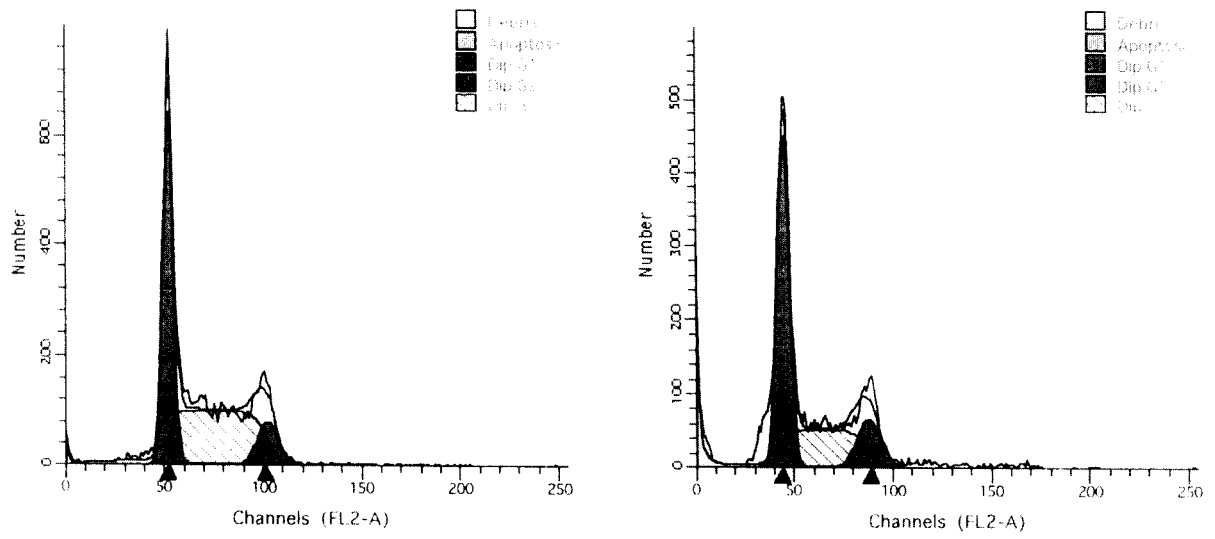


图 5g-h

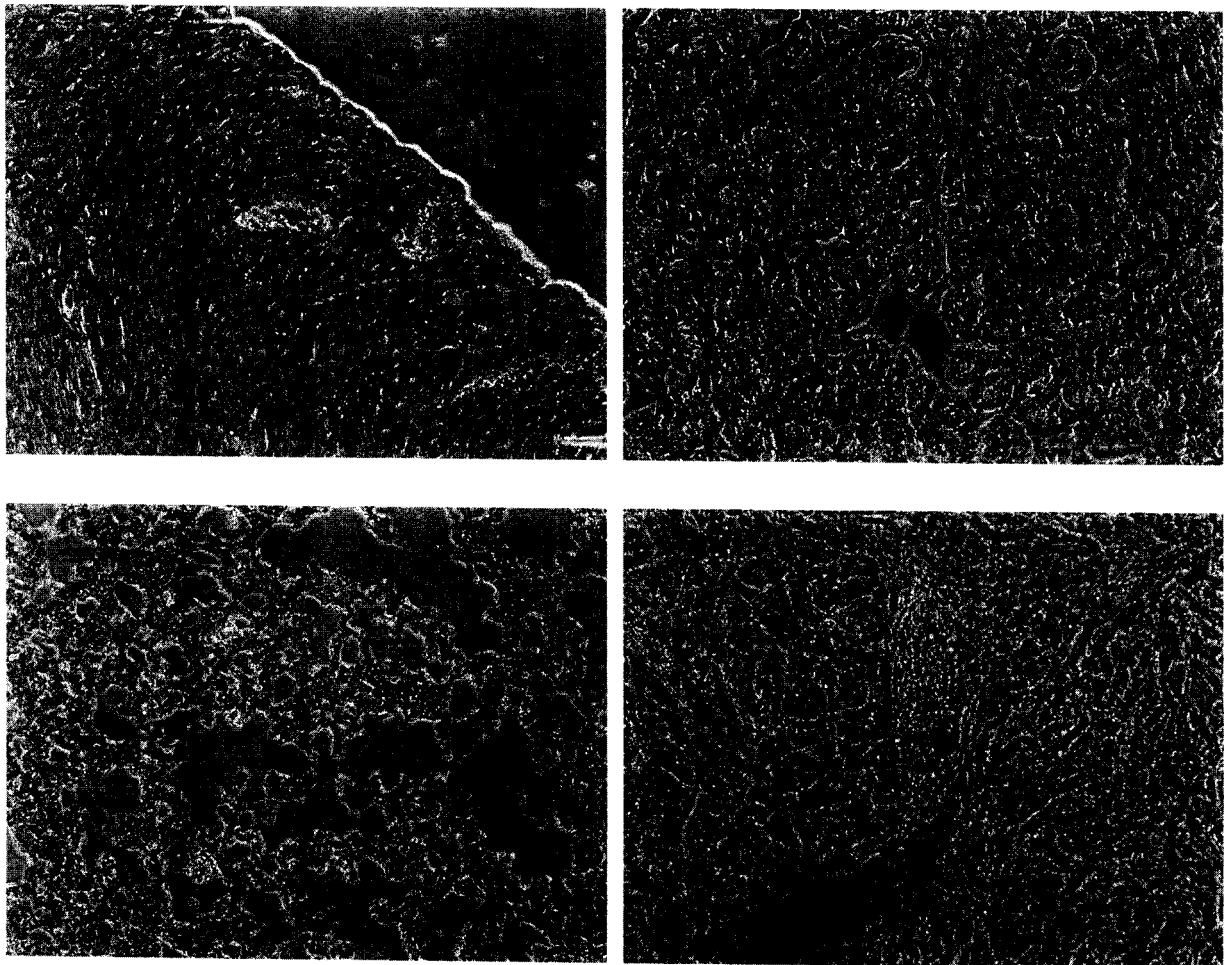


图 5i-l

血管内皮抑素抑制内皮细胞增殖并诱导细胞凋亡

血管内皮抑素抑制细胞黏附及迁移

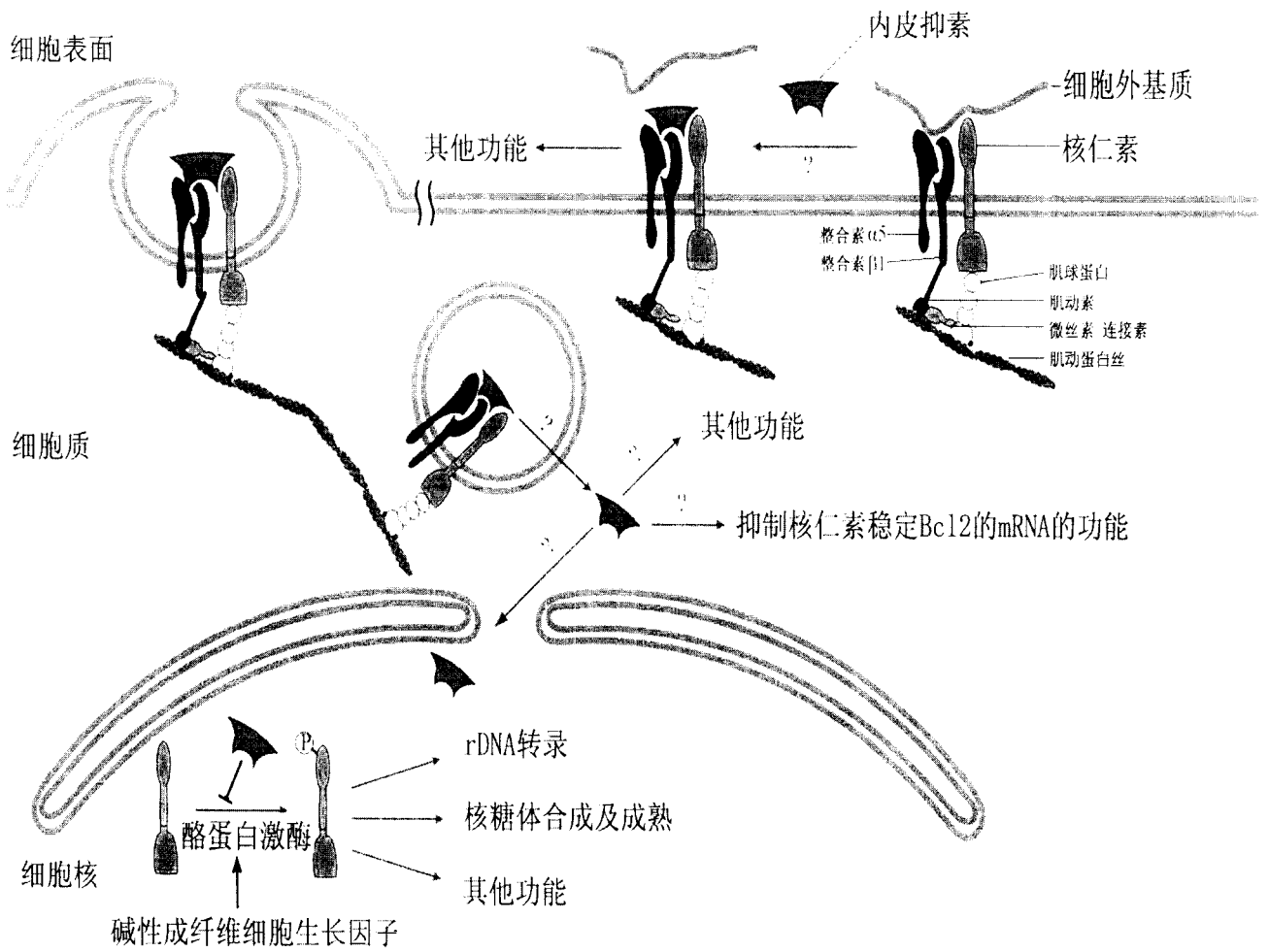


图 6

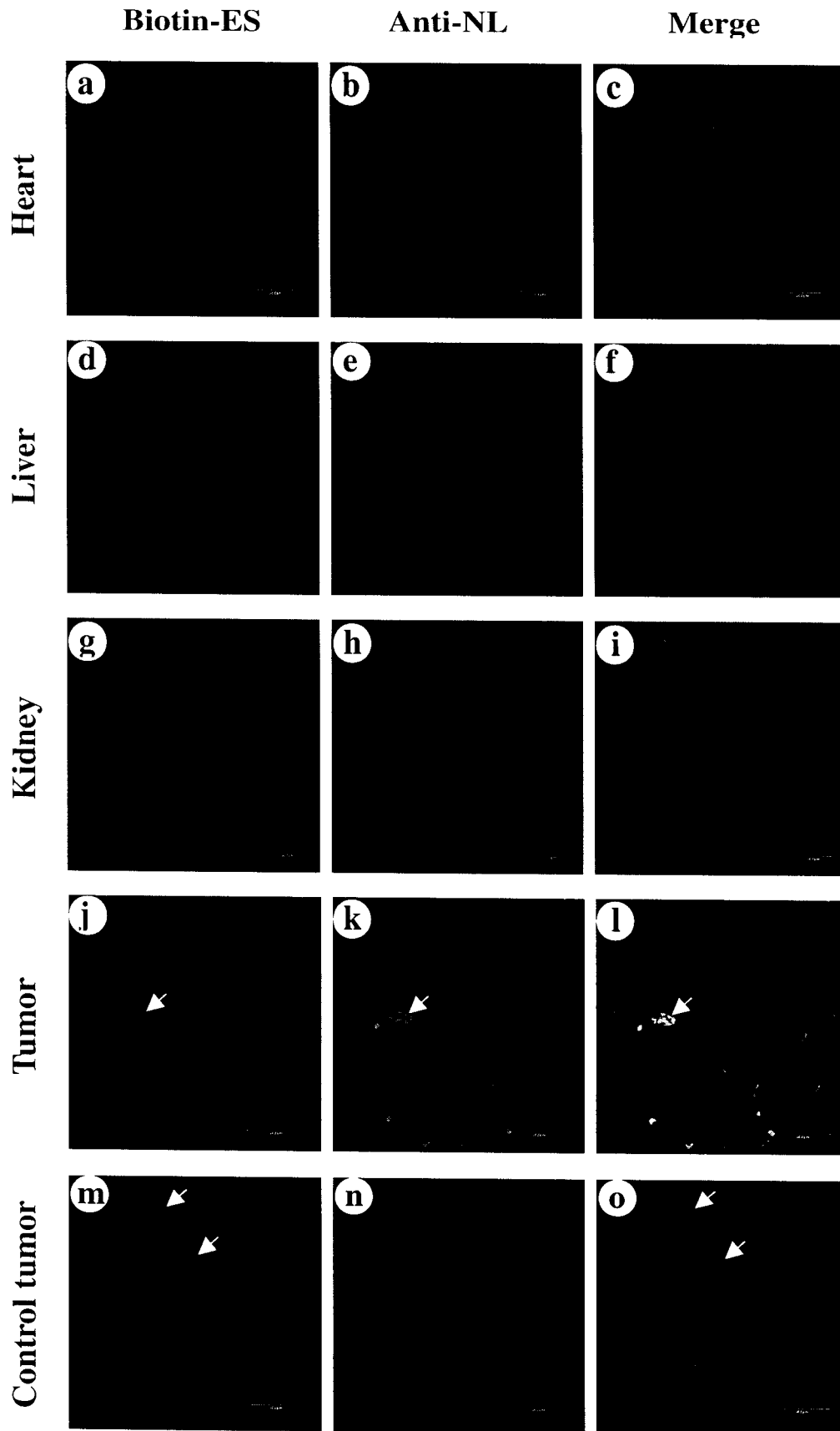


图 7a-o

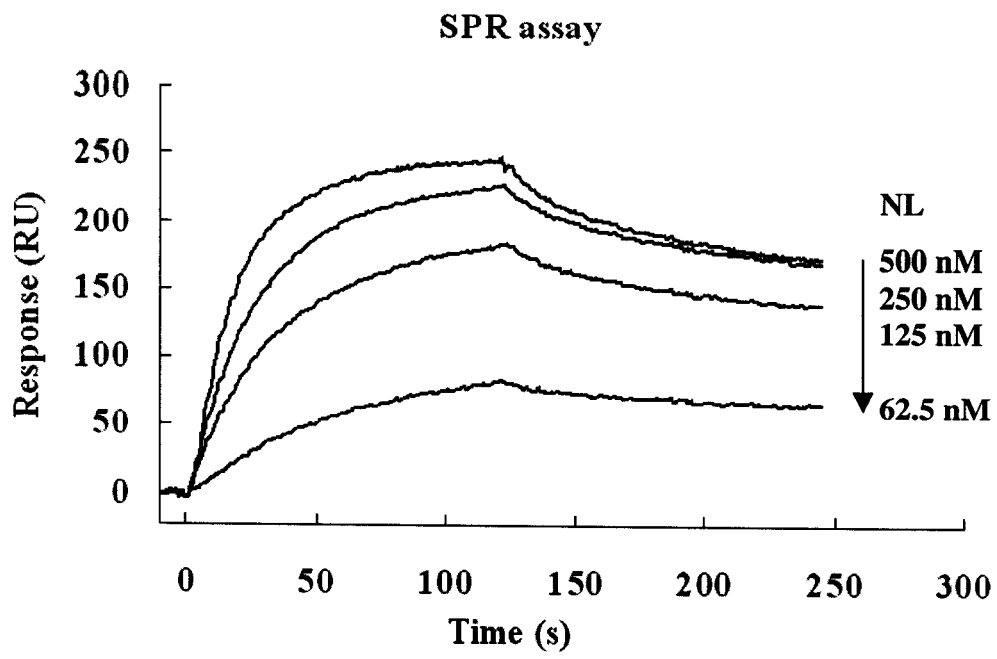


图 8

专利名称(译)	核仁素辅助的癌症诊断与治疗方法		
公开(公告)号	CN1862258A	公开(公告)日	2006-11-15
申请号	CN200510011707.3	申请日	2005-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学 北京普罗吉生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	清华大学 北京普罗吉生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学 北京普罗吉生物科技发展有限公司		
[标]发明人	罗永章 石虎兵 张卓兵		
发明人	罗永章 石虎兵 张卓兵		
IPC分类号	G01N33/50 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/28 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/77 G01N33/57492		
其他公开文献	CN1862258B		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明提供了一种设计试剂盒，用于检测和筛选那些适于使用ES和其他新生血管生成抑制剂类药物治疗的癌症种类或癌症个体。本发明同时提供了筛选新生血管生成抑制剂的方法，特别是作用与ES相似的抑制剂。此外本发明提供了通过导入外源性NL至目标内皮细胞使它们更易被新生血管生成抑制剂(例如ES)杀死，从而增加内皮细胞对于新生血管生成抑制剂(例如ES)的敏感度的方法。

