



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116457662 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 18

(21) 申请号 202180070407.X

(22) 申请日 2021.08.13

(30) 优先权数据

2012760.1 2020.08.14 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/052110 2021.08.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/034343 EN 2022.02.17

(71) 申请人 牛津布鲁克斯大学

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 瑞安·平克 苏珊·布鲁克斯

大卫·卡特 埃利·比曼

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

专利代理师 李杰

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页 附图25页

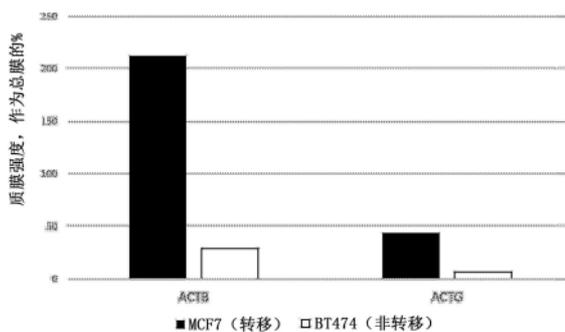
(54) 发明名称

转移性生物标志物

(57) 摘要

本发明涉及一种确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生或可能已经发生转移的方法,其中该方法包括检测从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平。本发明还涉及对癌症,特别是转移性癌症进行诊断、预后、监测和/或分期的方法和标志物。

背景调整的来自细胞质膜的β和γ肌动蛋白探测的斑点印迹强度,作为总膜信号的百分比



1. 一种确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生或可能已经发生转移的方法,其中,所述方法包括检测从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

其中,当在所述样本中检测到膜结合肌动蛋白时,确定所述受试者可能发生或可能已经发生转移。

2. 一种诊断患有转移性癌症的受试者的方法,其中,所述方法包括检测从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,其中,当在所述样本中检测到膜结合肌动蛋白时,确定所述受试者具有癌症转移。

3. 一种确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生或可能已经发生转移的方法,其中,所述方法包括:

a. 测量从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

b. 比较在从所述受试者获得的样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,以及

c. 如果从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于所述参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,则确定所述受试者可能发生转移或可能已经发生转移。

4. 一种诊断患有转移性癌症的受试者的方法,其中,所述方法包括:

a. 测量从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

b. 比较在从所述受试者获得的样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,以及

c. 当从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于所述参考样本中的膜结合肌动蛋白水平时,诊断所述受试者患有转移性癌症。

5. 一种对已被诊断患有癌症的受试者进行预后的方法,其中,所述方法包括:

a. 测量从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

b. 比较在所述样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,

c. 当从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于所述参考样本中的膜结合肌动蛋白水平时,确定患者具有不良预后。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,不良预后与发生转移的可能性增加和/或生存机会减少有关。

7. 一种鉴别已被诊断患有癌症、可能受益于用转移性癌症的已知疗法治疗的患者的方法,其中,所述方法包括:

a. 测量从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

b. 比较在所述样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,

c. 如果从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于所述参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,则确定患者可能受益于用转移性癌症的已知疗法治疗。

8. 根据权利要求3-7中任一项所述的方法,其中,当从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平比所述参考样本中的膜结合肌动蛋白水平大至少约50%、75%、100%、150%、200%、300%、500%、1000%、5000%或10000%时,确定从所述受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平高于所述参考样本中的膜结合肌动蛋白水平。

9. 根据权利要求3-8中任一项所述的方法,其中,所述参考样本是等效样本,所述等效样本来自未被诊断患有癌症的健康患者;或是等效样本,所述等效样本已知是转移性的。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述方法是离体或体外方法。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,所述样本是组织活检和/或血液样本和/或唾液样本。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述组织活检是乳腺组织活检。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,通过流式细胞术、免疫组织化学、免疫细胞化学、蛋白质印迹和/或ELISA来进行检测或测量膜结合肌动蛋白水平。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中,如果:

- a. 确定所述受试者可能发生或可能已经发生转移,或
- b. 所述受试者被诊断患有转移性癌症,或
- c. 所述受试者被给予不良预后,或
- d. 确定所述受试者可能受益于用于转移性癌症的疗法,则向所述受试者施用用于转移性癌症的治疗剂。

15. 一种试剂盒,用于(a) 确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生或可能已经发生转移,或(b) 对被诊断患有癌症的受试者进行预后,或(c) 诊断患有转移性癌症的受试者,

其中,所述试剂盒包含用于检测膜结合肌动蛋白的工具,并且任选地还包含以下中的一种或多种:

- i. 用于鉴别感兴趣的细胞类型的工具,和/或
- ii. 用于分离细胞外囊泡的试剂。

16. 根据权利要求15所述的试剂盒,其中,所述用于检测膜结合肌动蛋白的工具是肌动蛋白结合多肽。

17. 根据权利要求15或16所述的试剂盒,其中,所述感兴趣的细胞类型是上皮细胞并且用于鉴别所述上皮细胞的工具是EpCAM结合多肽。

18. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法或根据权利要求15-17中任一项所述的试剂盒,其中,在细胞的膜和/或细胞外囊泡的膜中检测所述膜结合肌动蛋白。

19. 根据权利要求18所述的方法或试剂盒,其中,所述细胞是上皮细胞或循环肿瘤细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法或试剂盒,其中,所述上皮细胞来自乳腺组织。

21. 根据权利要求1-14或17-20中任一项所述的方法,或根据权利要求15-20中任一项所述的试剂盒,其中,所述癌症是上皮细胞癌。

22. 根据权利要求21所述的方法或试剂盒,其中,所述上皮细胞癌是乳腺癌。

23. 根据权利要求1-14或17-22中任一项所述的方法,或根据权利要求15-22中任一项所述的试剂盒,其中,所述肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

## 转移性生物标志物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物标志物及其用途。特别地，它在预测癌症转移的可能性，或在诊断和/或监测癌症转移中的用途。

### 背景技术

[0002] 上皮细胞癌，称为癌 (carcinomas)，占有癌症病例的80至90百分比。一种此类癌，即乳腺癌，是世界上第二常见的癌症类型，占有癌症的超过10%。乳腺癌是女性最常见的癌症，每年有超过两百万女性被确诊，并且每年有超过500,000名患者死于该病。

[0003] 原发性肿瘤的转移扩散是癌症相关死亡的主要原因，占实体瘤癌症死亡的至高达90%。此外，被诊断患有已转移的肿瘤的患者5年生存率仅为22%。当癌细胞获得迁移性上皮-间质转化 (EMT) 表型时，就会发生转移，该表型起源于从原发性肿瘤扩散的细胞群。此类细胞的侵袭性表型是基本特性，这与它们在转移的早期阶段侵入内皮血管层有关。

[0004] 评估癌症的阶段对于做出任何预后和分配合适的治疗方案至关重要。目前的预后通常依赖于评估淋巴结状态，这涉及侵入性程序，如淋巴结活检，这可以导致严重的副作用，如淋巴水肿。

[0005] 因此，本领域需要开发新的和改进的方法和标志物来诊断、预后、监测和/或分期癌症。本发明满足了这些需要并进一步提供了其他相关的优点。

### 发明内容

[0006] 在第一方面，本发明提供了一种确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生 (develop, 发展) 或可能已经发生转移的方法，其中该方法包括检测从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白 (membrane-bound actin)，其中当在样本中检测到膜结合肌动蛋白时，确定受试者可能发生或可能已经发生转移。检测到的肌动蛋白可以是 $\alpha$ 、 $\beta$ 和/或 $\gamma$ 肌动蛋白中的一种或多种。在一个实施方式中，膜结合肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

[0007] 在第二方面，提供了一种诊断患有转移性癌症 (metastatic cancer, 转移性癌) 的受试者的方法，其中该方法包括检测从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白，并且任选地，其中当在样本中检测到膜结合肌动蛋白时，确定受试者患有转移性癌症。在一个实施方式中，膜结合肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

[0008] 在第一或第二方面中的任一个方面，检测从受试者获得的样本中任何水平的膜结合肌动蛋白都可以允许进行该方法。

[0009] 在第三方面，提供了一种确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生或可能已经发生转移的方法，其中该方法包括：

[0010] a. 测量从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平，

[0011] b. 比较从受试者获得的样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平，和

[0012] c. 如果从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于参考样本中

的膜结合肌动蛋白水平,则确定受试者可能发生转移或可能已经发生转移。

[0013] 在一个实施方式中,膜结合肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

[0014] 在第四方面,提供了一种诊断患有转移性癌症的受试者的方法,其中该方法包括:

[0015] a. 测量从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

[0016] b. 比较从受试者获得的样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,和

[0017] c. 当从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于参考样本中的膜结合肌动蛋白水平时,诊断受试者患有转移性癌症。

[0018] 在一个实施方式中,膜结合肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

[0019] 在第五方面,提供了一种对已被诊断患有癌症的受试者进行预后的方法,其中该方法包括

[0020] a. 测量从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

[0021] b. 比较样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,

[0022] c. 当从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于参考样本中的膜结合肌动蛋白水平时,确定患者预后不良。

[0023] 在一个实施方式中,膜结合肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

[0024] 不良预后可以指受试者发生转移的可能性增加和/或生存机会减少。

[0025] 在第六方面,提供了一种鉴别(identify, 鉴定)已被诊断患有癌症、可能受益于用转移性癌症的已知疗法治疗的患者的方法,其中该方法包括:

[0026] a. 测量从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,

[0027] b. 比较样本中测量的膜结合肌动蛋白水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,

[0028] c. 如果从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平约等于或高于参考样本中的膜结合肌动蛋白水平,则确定患者可能受益于用转移性癌症的已知疗法治疗。

[0029] 在一个实施方式中,膜结合肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

[0030] 技术人员将能够鉴别用于转移性癌症的合适的已知疗法以及将理解用于转移性癌症的已知疗法将根据转移性疾病可能的广泛程度和进展程度以及癌症的分子特征而变化。例如,合适的疗法可以是辅助化疗,其中具体疗法和/或方案取决于受试者特定肿瘤的特征。

[0031] 例如,用于转移性癌症的已知疗法可以是已知用于治疗转移性乳腺癌的疗法,如Herceptin<sup>TM</sup>或另一种Her2阻断性单克隆抗体疗法。

[0032] 在任何方面,膜结合肌动蛋白可以在细胞(如上皮癌细胞)的膜中检测或测量。膜结合肌动蛋白可以在细胞外囊泡(EV)的膜中检测或测量。膜结合肌动蛋白可以在细胞膜和细胞外囊泡膜中检测。

[0033] 在任何方面,EV可以包括但不限于外泌体(exosome)、外泌颗粒(exomere)、微囊泡和凋亡小体。

[0034] 从受试者获得的或用作参考的样本在任何方面都可以是生物流体样本,如血液样本、唾液样本、尿液样本,或者该样本可以是组织活检样本(如乳腺组织活检样本)。

[0035] 在任何方面,膜结合肌动蛋白可以从受试者获得的实体乳腺组织活检的乳腺癌上皮细胞的质膜检测或测量。

[0036] 在任何方面,膜结合肌动蛋白可以从受试者获得的血液样本中分离的细胞外囊泡膜检测或测量。

[0037] 在第三至第六方面的任一个方面,参考样本可以是阳性参考样本。

[0038] 在第三至第六方面的任一个方面,参考样本可以是阴性参考样本。

[0039] 在任何方面,膜结合肌动蛋白可以是 $\beta$ -肌动蛋白。在任何方面,膜结合肌动蛋白可以是 $\alpha$ -肌动蛋白。在任何方面,膜结合肌动蛋白可以是 $\gamma$ -肌动蛋白。在任何方面,膜结合肌动蛋白可以是 $\alpha$ -肌动蛋白、 $\beta$ -肌动蛋白和 $\gamma$ -肌动蛋白中的一种或多种或全部。

[0040] 当参考样本是阳性参考样本时,当在该样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平等于或高于参考样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平时,进行本发明第三至第六方面中任一个方面的步骤c中的确定。

[0041] 当参考样本是阴性参考样本时,当在该样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平高于在参考样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平时,进行本发明的第三至第六方面中任一个方面的步骤c中的确定。差异的大小可以取决于从受试者获得的样本与参考样本之间的关系,以及每个样本的特征。例如,当从受试者获得的样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平比参考样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平大至少约5%、大至少约10%、大至少约20%、大至少约50%、大至少约100%、大至少约200%、大至少约300%、大至少约400%、大至少约500%、大至少约1000%、大至少约2000%、大至少约5000%、大至少约10,000%、大至少约20,000%、大至少约50,000%、大至少约100,000%、大至少约500,000%、大至少约1,000,000%时,可以进行确定。可替代地或另外地,当从受试者获得的样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平比参考样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平高至少约1倍或更多、至少约2倍或更多、至少约3倍或更多、至少约4倍或更多、至少约5倍或更多、至少约10倍或更多、至少约20倍或更多、至少约50倍或更多、至少约100倍或更多、至少约250倍或更多、至少约500倍或更多、至少约1000倍或更多、至少约5000倍或更多、至少约10,000倍或更多、至少约20,000倍或更多、至少约50,000倍或更多、至少约100,000倍或更多、至少约500,000倍或更多时,可以进行确定。

[0042] 在任何方面的实施方式中,从受试者获得的样本可以包含上皮细胞和/或EV和/或循环肿瘤细胞。循环肿瘤细胞可以是上皮细胞。

[0043] 如果样本包含上皮细胞,则可以在这些细胞上进行膜结合肌动蛋白的检测,如果需要,可以首先将这些细胞与剩余样本分离、鉴别或分开。

[0044] 如果样本包含EV,则可以在这些EV上进行膜结合肌动蛋白的检测或测量,如果需要,可以将这些EV与剩余样本分离、鉴别或分开。

[0045] 如果样本包含循环肿瘤细胞,则可以在这些细胞上进行膜结合肌动蛋白的检测或测量,如果需要,可以将这些细胞与剩余样本分离、鉴别或分开。

[0046] 如果要从剩余样本中分离、鉴别或分开细胞和/或EV,则可以使用一种或多种合适的生物标志物。

[0047] 例如,为了从样本中分离、鉴别或分开上皮细胞,上皮抗-EpCAM抗体可用于技术人员认为合适的任何方法中,例如FACS。

[0048] 为了从样本中分离或分开EV,抗-CD9、抗-CD63和/或抗-CD81抗体中的一种或多种可用于技术人员认为合适的任何方法中,例如FACS。相似地,抗-EpCAM抗体可以与一种或多

种EV特异性生物标志物组合使用,以将源自上皮细胞的EV与剩余样本分离、鉴别或分开。

[0049] 为了从样本中分离、鉴别或分开循环肿瘤细胞,可以使用抗-EpCAM抗体或结合EpCAM的DNA或RNA。这是因为上皮细胞通常不会在循环中被发现,并且它们的存在将意味着循环肿瘤细胞。为了从样本中分离、鉴别或分开循环肿瘤细胞,可以使用检测ER、PR、EGFR、HER2、TOP2A中的一种或多种的工具(means,手段)(Nadal et al. Breast Cancer Research 2012, 14: R71)。该工具可以是特异性结合ER、PR、EGFR、HER2或TOP2A的抗体、DNA或RNA分子。

[0050] 在另一个方面,提供了一种监测受试者对用于转移性癌症的疗法的响应的方法,包括测量从受试者获得的样本中膜结合肌动蛋白水平,其中当样本中测量的膜结合肌动蛋白水平低于从受试者获得的先前相应样本中的膜结合肌动蛋白水平时,确定受试者对转移性癌症的疗法响应。可替代地,当样本中测得的膜结合肌动蛋白水平等于或高于从受试者中获得的先前相应样本中的膜结合肌动蛋白水平时,确定受试者对转移性癌症的疗法不响应。先前相应样本可以在对受试者施加治疗之前或同时获得。优选地,将先前相应样本中的膜结合肌动蛋白水平与施用治疗后获得的一个或多个样本中的水平进行比较,这些样本可以在施用治疗后的一个或多个时间点获得。通过在治疗期间和/或治疗后监测膜结合肌动蛋白水平,可以确定受试者对治疗的响应。应当理解,熟练的医生可以使用在治疗期间在样本中观察到的膜结合肌动蛋白水平来根据需要调整治疗。

[0051] 在另一个方面,提供了一种监测被诊断患有转移性癌症的受试者的疾病进展的方法,包括测量从受试者获得的样本中膜结合肌动蛋白水平,其中当样本中测量的膜结合肌动蛋白水平低于从受试者获得的先前相应样本中的膜结合肌动蛋白水平时,确定转移性癌症没有进展。可替代地,当样本中测量的膜结合肌动蛋白水平等于或高于从受试者获得的先前相应样本中的膜结合肌动蛋白水平时,确定转移性癌症正在进展。

[0052] 在另一个方面,提供了一种监测已成功治疗的转移性癌症的受试者中转移性癌症的复发的方法,包括测量从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白水平,其中当样本中测量的膜结合肌动蛋白水平低于从受试者获得的先前相应样本中测量的膜结合肌动蛋白水平时,确定转移性癌症没有复发。可替代地,当样本中测量的膜结合肌动蛋白水平等于或高于从受试者获得的先前相应样本中测量的膜结合肌动蛋白水平时,可以确定转移性癌症已经复发。相应样本可以在确定治疗成功时或在其的一周、两周或四周内采集。

[0053] 本文中提及的“相应样本”可以指采集自同一受试者的相同类型的样本,例如相同的组织类型。样本优选地在较早的时间点采集。

[0054] 本发明的任何方面的方法可以在体内、离体或体外进行。优选地,该方法是体外方法。

[0055] 在其他方面,提供了一种用于以下的试剂盒:(a) 确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生或可能已经发生转移,(b) 对被诊断患有癌症的受试者提供预后,(c) 诊断患有转移性癌症的受试者,(d) 监测受试者对用于转移性癌症的疗法的响应,或(e) 监测被诊断患有转移性癌症的受试者的疾病进展,

[0056] 其中试剂盒包含用于检测膜结合肌动蛋白的工具,并且任选地还包含以下的一种或多种:

[0057] i. 用于鉴别感兴趣的细胞类型的工具,和/或

[0058] ii.用于分离EV的试剂。

[0059] 在一个实施方式中,膜结合肌动蛋白是 $\beta$ -肌动蛋白。

[0060] 用于检测膜结合肌动蛋白的工具可以是肌动蛋白结合多肽,如抗体。例如,用于检测膜结合肌动蛋白的工具可以是抗肌动蛋白抗体,如抗 $\beta$ -肌动蛋白抗体。用于检测膜结合肌动蛋白的工具可以是能够结合肌动蛋白的DNA或RNA分子,如适配体。

[0061] 感兴趣的细胞类型可以是上皮细胞或循环肿瘤细胞。循环肿瘤细胞可以是上皮肿瘤细胞。

[0062] 用于鉴别感兴趣的细胞类型的工具可以是EpCAM结合多肽,如抗体。用于鉴别感兴趣的细胞类型的工具可以是能够结合EpCAM的RNA或DNA分子,如适配体。

[0063] 在一个实施方式中,试剂盒还可以包含用于从样本中分离EV的试剂。技术人员将能够选择本领域可用的任何试剂组以从样本中分离EV。所选择的确切试剂可以取决于样本的性质,例如可以选择与血液样本特别相容的特定试剂。

[0064] 在一个实施方式中,试剂盒还可以包含一组说明书。

[0065] 在某个非限制性实施方式中,用于检测膜结合肌动蛋白的工具和/或用于鉴别感兴趣的细胞类型的工具可以结合到固体支持物(如柱基质、微量滴定板的阵列或孔)上提供。可替代地,支持物可以作为试剂盒的单独元件提供。

[0066] 如本文所用,术语“肌动蛋白结合多肽”和“EpCAM结合多肽”可以指分别结合肌动蛋白或EpCAM的任何多肽。此类多肽可以是T细胞受体或其抗体或抗原结合片段,包括但不限于Fv、Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段,以及单域抗体(如骆驼单域抗体)。多克隆和单克隆、对肌动蛋白(如 $\beta$ -肌动蛋白)特异和/或对EpCAM特异的抗体或抗原结合片段,可以使用本领域技术人员通常已知的常规免疫技术来制备。

[0067] 用于鉴别感兴趣的细胞类型的工具还可以包含能够结合EpCAM的DNA或RNA分子,如适配体。

[0068] 本文中提及的抗体、多肽或DNA或RNA分子可以包含与给定抗体、多肽或DNA或RNA分子联合或连接的可检测标记。此类可检测标记包括,例如,化学发光或荧光分子(例如罗丹明、荧光素、绿色荧光蛋白、荧光素酶、Cy3、Cy5或ROX)、放射性标记(例如<sup>3</sup>H、<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>131</sup>I)、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)或肽/氨基酸序列(例如His标签(His-Tag)、FLAG、Myc)。

[0069] 在任何方面或实施方式中,癌症可以是或可以源自上皮细胞癌,如乳腺癌、结直肠癌、肺癌或胰腺癌。

[0070] 转移性癌症可以是转移性乳腺癌、转移性结直肠癌、转移性肺癌或转移性胰腺癌。

[0071] HPA或罗马蜗牛凝集素(Helix pomatia agglutinin)是一种源自罗马蜗牛的凝集素(lectin),可用于检测具有末端N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的聚糖。如本文所用,“HPA阳性的”和“HPA阳性”是指细胞或EV在其表面显示显著水平的GalNAc,并因此被高水平的HPA识别并结合。HPA阴性细胞或EV被定义为在其表面不显示或显示低水平的GalNAc的细胞,并因此不被HPA识别,也不与HPA结合或仅结合低水平的HPA。

[0072] 如果样本中超过约50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%的细胞和/或EV是HPA阳性,则样本中包含该细胞和/或EV的样本可被鉴别为HPA阳性。

[0073] 如果样本中超过约50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%的细胞和/或EV

是HPA阴性,则样本中包含该细胞和/或EV的样本可被鉴别为HPA阴性。

[0074] 在任何方面,本发明还可以包含检测或测量细胞和/或EV的HPA阳性的水平。

[0075] 在任何方面,除检测或测量肌动蛋白或作为检测或测量肌动蛋白的替代之外,本发明还可以或替代地包括检测或测量HPA阳性的水平。HPA阳性可以在EV上确定。例如,在确定已被诊断患有癌症的受试者是否可能发生或可能已经发生转移的方法中,该方法可以包括:

[0076] a. 测量从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白和/或HPA阳性的水平,

[0077] b. 比较从受试者获得的样本中测量的膜结合肌动蛋白和/或HPA阳性的水平与参考样本中的膜结合肌动蛋白和/或HPA阳性的水平,和

[0078] c. 如果从受试者获得的样本中的膜结合肌动蛋白和/或HPA阳性的水平约等于或高于参考样本中膜结合肌动蛋白和/或HPA阳性的水平,则确定受试者可能发生转移或可能已经发生转移。在这种方法中,如果需要,EV可以与剩余样本分离、鉴别或分开。

[0079] 详细说明

[0080] 本发明部分基于上皮癌细胞和/或源自其的细胞外囊泡的表面上的膜结合肌动蛋白的存在和/或水平与这些癌细胞的转移潜能之间呈正相关的发现。

[0081] 因此,确定在细胞表面或细胞外囊泡的膜中肌动蛋白的存在或水平升高,可以让临床医生准确地鉴别癌细胞的转移潜能,并对癌症进行分期(stage,分阶段)和/或预后。这将允许鉴别晚期乳腺癌患者或可能发生或已经发生转移的那些,使得他们可以接受更快且更合适的治疗。该方法还可以用于监测患者对治疗的响应和/或监测疾病进展。

[0082] 另外,本发明可以允许患者避免不必要的淋巴结活检。例如,本发明可以在源自原发性肿瘤或原发性肿瘤周围的组织的细胞上进行,所述组织如来自用于诊断乳腺癌的初始活检的乳腺组织;或在疗法期间去除乳腺组织后进行。另外或替代地,当检测或确定细胞外囊泡的膜中肌动蛋白的水平时,本发明可以在不需要活检的情况下对容易获得的生物流体进行。本发明可以允许确定转移潜能、癌症分期、诊断、预后和/或鉴别需要快速、较少或无创地和/或在手术干预之前进行特定治疗的患者。

[0083] 技术人员将理解本领域的许多方法或技术可用于检测或测量膜结合肌动蛋白水平。合适的技术包括免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术、ELISA、侧流分析(lateral flow assay)、生化或机械分开(separation)/分离(isolation)膜后的蛋白质印迹法、斑点印迹、狭缝印迹和质谱法。在任何方面,肌动蛋白的检测可以是直接的或间接的,例如使用检测肌动蛋白的一级检测试剂(primary detection reagent)和特异性检测一级检测试剂的二级检测试剂(secondary detection reagent)。二级检测试剂可以被标记。因此,本发明可以在全球许多医院或实验室广泛采用,而无需高度专业化的设备或培训。

[0084] 在一个实施方式中,可以通过肌动蛋白与检测剂形成复合物,然后检测肌动蛋白/检测剂复合物来检测肌动蛋白水平。

[0085] 技术人员将理解,本领域的许多方法或技术可用于从样本中分离EV(参见Konoshenko et al., 2018, BioMed. Res. Intl.)。

[0086] 本文中所指的肌动蛋白是对宿主物种内源性的蛋白。例如,在人类中,肌动蛋白可以指 $\beta$ -肌动蛋白,它是由ACTB基因编码的蛋白。肌动蛋白可以指 $\alpha$ -肌动蛋白,它是由ACTA1或ACTA2基因编码的蛋白。肌动蛋白可以指 $\gamma$ -肌动蛋白,它是由ACTG1或ACTG2基因编码的

蛋白。

[0087] 如本文所用,“膜结合肌动蛋白”是指肌动蛋白(如 $\beta$ -肌动蛋白),它在细胞表面上存在或可检测到,优选地在细胞的质膜中/上,或它在细胞外囊泡的表面上存在或可检测到。肌动蛋白可以具有翻译后修饰,如糖基化标记。无需化学或机械破坏细胞和/或EV就可以检测到肌动蛋白。肌动蛋白可以在已经被机械和/或化学破坏的细胞和/或EV的膜部分中检测到,其中所述部分仅包含细胞或EV的质膜的膜。检测或测量的肌动蛋白可以是整合膜蛋白或可与整合膜蛋白相互作用的外周膜蛋白。

[0088] 如本文所用,“可能发生或可能已经发生转移”是指与不具有在本发明的方面和/或实施方式中列出的所需特征的受试者相比,发生或已经发生转移的可能性增加。

[0089] 如本文所用,术语“更高”可以指比参考样本中膜结合肌动蛋白水平高至少约5%或更多、至少约10%或更多、至少约20%或更多、至少约50%或更多、至少约100%或更多、至少约200%或更多、至少约300%或更多、至少约400%或更多、至少约500%或更多、至少约1000%或更多、至少约2000%或更多、至少约5000%或更多、至少约10000%或更多、至少约20000%或更多、至少约50000%或更多、至少约100000%或更多、至少约500000%或更多、至少约1000000%或更多的数量。替代地,术语“更高”可以指比参考样本中膜结合肌动蛋白水平高至少约1倍或更多、至少约2倍或更多、至少约3倍或更多、至少约4倍或更多、至少约5倍或更多、至少约10倍或更多、至少约20倍或更多、至少约50倍或更多、至少约100倍或更多、至少约250倍或更多、至少约500倍或更多、至少约1000倍或更多、至少约5000倍或更多、至少约10000倍或更多、至少约20,000倍或更多、至少约50,000倍或更多、至少约100000倍或更多、至少约500000倍或更多的数量。

[0090] 如本文所用,术语“肌动蛋白结合多肽”和“EpCAM结合多肽”可以指分别结合肌动蛋白或EpCAM的任何多肽。此类多肽可以是T细胞受体或其抗体或抗原结合片段,包括但不限于Fv、Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段。

[0091] 如本文所用,术语“从受试者获得的样本”是指从受试者(如人类受试者)获得的生物材料的样本,包括组织、组织样本、活检、细胞样本、肿瘤样本、粪便样本和生物体液(例如血浆、血清、血液、尿液、淋巴液、腹水、唾液)的样本。在一个实施方式中,样本是组织样本,例如来自受试者的乳腺组织的活检的组织样本。在一个实施方式中,样本是从受试者获得的血液样本。

[0092] 本文可互换使用的术语“患者”或“受试者”是指任何哺乳动物,例如人类。非人类哺乳动物的非限制性实例包括非人类灵长类动物、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、家禽、猪、马、牛、山羊、绵羊等。

[0093] 在本公开中,被描述为“活检”的样本可以通过常规方法,使用相关医学技术领域的技术人员公知的方法获得。获得活检样本的方法包括将肿瘤分成大块或显微切割或本领域已知的其他细胞分离方法。肿瘤细胞还可以通过细胞学方法通过用小号针抽吸获得。为了简化样本保存和处理,可以将样本固定在福尔马林中并浸泡在石蜡中,或者先冷冻然后浸泡在组织冷冻介质中,例如通过浸入可快速冷冻的高度低温介质的OCT化合物。保存和/或处理样本的其他方法是本领域技术人员已知的。

[0094] 可以对样本进行操作以分离感兴趣的细胞类型或分离EV。例如,组织样本或活检中感兴趣的细胞类型的标记可以用于分离或分开此类细胞。一个实例是在检测膜结合肌动

蛋白(如 $\beta$ -肌动蛋白)或确定其水平之前,使用EpCAM结合多肽以从活检获取的组织中鉴别和/或分开上皮细胞。另一个实例是使用EpCAM结合多肽以将源自上皮细胞的EV与样本中的其他EV和/或生物材料鉴别和/或分开。

[0095] 参考样本可以指等效样本,例如与从该受试者或其他受试者,或者与从受试者中获得的样本类型紧密相似的细胞系中获得的样本相同的组织和/或细胞类型。

[0096] “阴性参考样本”可以指非癌性或癌性/永生化但已知已未发生或未发生转移的参考样本。例如,阴性参考样本可以是来自受试者肿瘤周围区域的相应样本(如活检样本),或来自一名或多名健康受试者的相应组织。阴性参考样本也可以是已知在本质上是非转移性的并且与针对受试者获得的样本具有相同或相似性质的细胞系,例如已知是低侵袭性的乳腺上皮细胞系,如BT474细胞(Lasfargues et al.,1978,J.Nat.Cancer Institute,61(4):967-978),它作为从受试者获得的乳腺组织样本的阴性参考样本,或者HMT3522人类乳腺上皮细胞,它从良性纤维囊性乳腺组织中分离(Briand et al,1987,In Vitro Cell and Dev.Biol.,23(3):181-188)。

[0097] 当要在EV中检测或测量膜结合肌动蛋白的存在或水平,阴性参考样本可以指从一名或多名未患癌症或患有/患癌症但未或没有发生转移的受试者中,或者从已知是低侵袭性的比较细胞系中分离的EV,如上所述。

[0098] 因此,在这种阴性参考样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平作为阴性对照。

[0099] “阳性参考样本”可以指癌性的、已知是侵袭性的,和/或已知已发生或可能发生转移的参考样本。例如,阳性参考样本可以是来自一名或多名已知已发生转移的受试者的相应样本(如活检样本)。阳性参考样本也可以是已知在本质上是侵袭性的和/或转移性的并且与针对受试者获得的样本具有相同或相似性质的细胞系,例如已知是高侵袭性的乳腺上皮细胞系,如MCF7细胞(Soule et al.,1973,J.Nat.Cancer Institute,51(5):1409-14-16),它作为从受试者中获得的乳腺组织样本的阳性参考样本。

[0100] 当要在EV中检测或测量膜结合肌动蛋白的存在或水平时,阳性参考样本可以指从一名或多名患有/患癌症并且发生转移的受试者中或者从已知是高侵袭性的比较细胞系中分离的EV,如上所述。

[0101] 因此,在这种阳性参考样本中检测或测量的膜结合肌动蛋白水平作为阳性对照。

[0102] 来自已被诊断患有癌症的受试者、其中测量到的膜结合 $\beta$ -肌动蛋白水平高于上述参考样本的那些中的样本可以被鉴别为更可能发生或已经发生转移或者被诊断患有转移性癌症。然后可以鉴别合适的治疗方案并将其提供给患者。

[0103] 技术人员可以查阅数据库,其中已经记录了在来自确认转移或未记录转移的受试者或者来自已知本质上是转移性或非转移性的细胞系的给定的样本类型中的膜结合肌动蛋白水平。在适当的情况下,技术人员能够容易地鉴别此类转移性或非转移性的细胞系。

[0104] 技术人员将理解,本发明的任何一个实施方式和/或方面的优选特征可以应用于本发明的所有其他实施方式和/或方面。

## 附图说明

[0105] 图1-显示了使用1D蛋白质印迹法的GalNAc与内皮细胞中的多种蛋白结合。A.提取总内皮细胞蛋白并在SDS-PAGE上运行,然后进行蛋白质印迹法。左侧的膜用GalNAc-BSA-生

物素探测并且显示出几个条带。作为阴性对照,右侧的膜用BSA-生物素标记并且未观察到条带。

[0106] 图2-显示了为通过质谱法分析而切除的条带。1D SDS-PAGE和印迹表明为质谱法分析而切除的凝胶片段的位置,分析了5个片段。

[0107] 图3-显示了使用2D PAGE的GalNAc与内皮细胞中的多种蛋白结合。2D SDS-PAGE和印迹表明为质谱法而切除的凝胶片段的位置,总共13个片段。

[0108] 图4-显示了EV可以增加细胞粘附。在静态粘附试验之前,从乳腺癌细胞中分离EV,并与乳腺癌细胞、内皮细胞或两者一起孵育。在EV的存在下,乳腺癌细胞对内皮细胞的粘附显著增加。当用EV预处理乳腺癌细胞和内皮细胞时,看到了最大的增加。来自三次重复的数据,误差条是平均值的标准误差(SEM),并且执行的统计检验是单向方差分析(one-way ANOVA)和Tukey检验。星号表示与未处理的对照相比具有统计学意义。

[0109] 图5-显示了网蛋白的敲低减少了乳腺癌细胞对内皮细胞的粘附。MCF7和/或HUVEC细胞用靶向网蛋白的阴性乱序siRNA(negative scrambles siRNA)或siRNA处理。当任一细胞系或两种细胞系中的网蛋白被敲低时,细胞粘附会显著降低。来自三次重复的数据,误差条是平均值的标准误差,并且执行的数据统计检验是单向方差分析和Tukey检验。星号表示与未处理的对照相比具有统计学意义。

[0110] 图6-显示了用重组网蛋白处理的乳腺癌细胞减少了细胞对内皮细胞的粘附。在进行静态粘附试验之前,MCF7细胞未处理或用0.1 $\mu$ g/ml重组网蛋白处理。用重组网蛋白处理的MCF7细胞可显著降低细胞对内皮细胞的粘附。来自三次重复的数据,误差条是平均值的标准误差,并且执行的统计检验是单向方差分析和Tukey检验。

[0111] 图7-表明了网蛋白被敲低的癌细胞中,细胞粘附可以用来自“野生型”癌细胞的EV部分恢复。在MCF7细胞(第二列)中使用siRNA敲低网蛋白,显示了对内皮细胞的粘附减少。用来自野生型MCF7细胞的EV处理的网蛋白被敲低的MCF7细胞显示了对内皮细胞的粘附的部分恢复。来自三次重复的数据,误差条是平均值的标准误差,并且执行的统计检验是单向方差分析和Tukey检验。

[0112] 图8-显示了MCF7细胞比BT474细胞具有更多的HPA结合蛋白。来自两种乳腺癌细胞系的裂解物在SDS-PAGE上运行,然后使用生物素标记-HPA作为探针并使用抗GAPDH抗体作为上样对照进行蛋白质印迹法。MCF7裂解物含有比BT474细胞裂解物更多数量的HPA结合条带,BT474细胞裂解物只有一条72kDa的HPA结合条带。

[0113] 图9-显示了细胞中的HPA结合能力与这些细胞产生的EV的HPA结合能力之间呈正相关。MCF7和BT474细胞以及这些细胞产生的EV的Nanoview分析。用荧光偶联抗体(第一列=CD81,第二列=CD9,第三列=HPA)标记HPA阴性BC细胞系(BT474,左)和HPA阳性BC细胞系(MCF7,右)的EV。发现BT474 EV为HPA阴性,而MCF7 EV为HPA阳性。MigG是指阴性对照,以显示非特异性结合水平。

[0114] 图10-表明了阻断细胞表面 $\beta$ -肌动蛋白减少了乳腺癌细胞对内皮细胞的粘附。MCF7细胞未处理或用抗 $\beta$ -肌动蛋白或GAPDH抗体处理。GAPDH用作对照。与未处理的MCF7 BC细胞相比,用抗 $\beta$ -肌动蛋白抗体孵育的细胞对内皮细胞的粘附显著较少。来自三次重复的数据,误差条是SEM。

[0115] 图11-显示了细胞表面 $\beta$ -肌动蛋白水平与HPA结合能力/转移潜能相关。流式细胞

术用于检测表面肌动蛋白。(A) :显示了在高转移性且HPA阳性的MCF7 BC细胞的表面上的 $\beta$ -肌动蛋白的表达高于在非转移性且弱HPA阳性的BT474细胞,以及高于中度侵袭性和中度HPA阳性的ZR751BC细胞上。在高度转移性且HPA阳性的MCF7 BC细胞的表面上的 $\beta$ -肌动蛋白表达与侵袭性且高度HPA阳性的T47D BC细胞相当。(B)显示了在MCF7和BT474细胞上表面 $\beta$ -肌动蛋白的表达远高于在HPA阴性的正常乳腺细胞HME上。

[0116] 图12-显示了转移性乳腺癌细胞(MCF7)在其表面上具有比非转移性乳腺癌细胞(BT474)更多的肌动蛋白。通过流式细胞术收集数据。Pa是指靶向泛肌动蛋白的肌动蛋白抗体。IgG是指阴性对照,以显示非特异性结合的水平。无抗是指不添加抗体以显示背景自体荧光。

[0117] 图13-显示了转移性癌细胞在其表面上具有比非转移性癌细胞更多的HPA。对于成对的乳腺癌(MCF7是转移性的,BT-474是非转移性的)、结直肠癌(SW480是转移性的,HT-29是非转移性的)和肺癌(A539是转移性的,NCI-H322是非转移性的)的转移性和非转移性的细胞类型,通过流式细胞术收集数据。

[0118] 图14-显示了转移性细胞质膜比非转移性细胞具有更多的肌动蛋白。数据是通过斑点印迹(dot blot,斑点杂交)从细胞系的探测膜提取物中获得的。ACTB是识别肌动蛋白 $\beta$ 的抗体,ACTG是识别肌动蛋白 $\gamma$ 的抗体。结果被描述为调整至背景并归一化至来自总膜(total membrane)的信号强度。

[0119] 图15-显示了肺转移性癌的微囊泡比来自非转移性细胞的那些具有更多的肌动蛋白。数据通过斑点印迹获得。数据显示了各种不同抗体与来自转移性肺癌(A549)或非转移性肺癌(NCI-H322)的微囊泡的结合水平。对于每种癌症类型,柱1、5和6分别是对照:IgG、Gm130和无抗体,柱2、3和4代表三种不同的 $\beta$ 肌动蛋白抗体的克隆。呈现的结果清楚地表明在从转移性肺癌细胞获得的微囊泡上存在更多的膜结合肌动蛋白。结果被描述为调整至背景并归一化至无一抗(no primary antibody)的信号强度。

[0120] 图16-显示了胰腺转移性癌的微囊泡比非转移性细胞具有更多的肌动蛋白。数据通过斑点印迹获得。图16A-数据显示了各种不同抗体与来自转移性胰腺癌(MIAPaCa2)或非转移性胰腺癌(BXPC-3)的微囊泡的结合水平。对于每种癌症类型,柱1、5和6分别是对照-IgG、Gm130和无抗体,柱2、3和4代表三种不同的 $\beta$ 肌动蛋白抗体。呈现的结果清楚地表明在从转移性胰腺癌细胞获得的微囊泡上存在更多的膜结合肌动蛋白。

[0121] 图16B-数据显示了各种不同抗体与来自转移性胰腺癌(MIAPaCa2)或非转移性胰腺癌(BXPC-3)的微囊泡的结合水平。对于每种癌症类型,柱1、3和4分别是对照-IgG、Gm130和无抗体,柱2是 $\gamma$ 肌动蛋白抗体。呈现的结果清楚地表明在从转移性胰腺癌细胞获得的微囊泡上存在更多的膜结合 $\gamma$ 肌动蛋白。结果被描述为调整至背景并归一化至无一抗的信号强度。

[0122] 图17-显示了乳腺转移性癌的微囊泡比非转移性细胞具有更多的肌动蛋白。数据通过斑点印迹获得。图17A -数据显示了各种不同抗体与来自转移性乳腺癌(MCF7)或非转移性乳腺癌(BT474)的微囊泡的结合水平。对于每种癌症类型,柱1、5和6分别是对照-IgG、Gm130和无抗体,柱2、3和4代表三种不同的 $\beta$ 肌动蛋白抗体。呈现的结果清楚地表明在从转移性肺癌细胞获得的微囊泡上存在更多的膜结合肌动蛋白。

[0123] 图17B-数据显示了各种不同抗体与来自转移性乳腺癌或非转移性乳腺癌的微囊

泡的结合水平。对于每种癌症类型,柱1、3和4分别是对照-IgG、Gm130和无抗体,柱2是 $\gamma$ 肌动蛋白抗体。呈现的结果清楚地表明存在更多的膜结合。结果被描述为调整至背景并归一化至无一抗的信号强度。

[0124] 图18-显示了源自转移性乳腺癌细胞的外泌体比源自非转移性乳腺癌细胞的外泌体具有更多的肌动蛋白。数据通过斑点印迹获得。结果被描述为归一化至IgG对照的信号强度。

[0125] 图19-显示了与源自非转移性乳腺癌细胞的外泌体相比,更大百分比的源自转移性乳腺癌细胞的外泌体是肌动蛋白阳性的。数据通过NanoFCM获得。这是一种允许直接的种群百分比比较的单粒子检测方法,支持了总信号的斑点印迹平均值。样本用泛肌动蛋白抗体探测。

[0126] 图20-显示了与源自非转移性结直肠癌细胞的外泌体相比,更大百分比的源自转移性结直肠癌细胞的外泌体是肌动蛋白阳性的。数据通过NanoFCM获得。这是一种允许直接的种群百分比比较的单粒子检测方法,支持了总信号的斑点印迹平均值。样本用泛肌动蛋白抗体探测。阳性EV的转移百分比表示为相对于非转移百分比的倍数变化。

[0127] 图21-显示了与源自非转移性结直肠癌细胞的外泌体相比,更大百分比的源自转移性结直肠癌细胞的外泌体是HPA阳性的。数据通过NanoFCM获得,作为Nanoview的独立单粒子分析方法,支持了在不同组织类型中的图9的发现。

[0128] 图22-显示了与源自等效非转移性癌细胞的外泌体相比,更大百分比的(A)源自转移性乳腺细胞的外泌体和(B)源自转移性结直肠癌细胞的外泌体是 $\gamma$ 肌动蛋白阳性。数据通过NanoFCM获得。

## 具体实施方式

[0129] 材料和方法

[0130] 表1-细胞培养

[0131] 在以下条件下,将细胞维持在37°C和5%CO<sub>2</sub>气氛中。

[0132]

细胞系	基础培养基	补充物
MCF7	DMEM:F-12 (Lonza)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 热灭活胎牛血清 (FCS) 10% v/v (Gibco™)</li> <li>• L-谷氨酰胺 2 mM (Gibco™)</li> </ul>
T47D	DMEM:F-12 (Lonza)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 热灭活胎牛血清 (FCS) 10% v/v (Gibco™)</li> <li>• L-谷氨酰胺 2 mM (Gibco™)</li> </ul>
ZR751	RPMI-1640 (Gibco™)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 热灭活 FCS 10% v/v (Gibco™)</li> <li>• L-谷氨酰胺 2 mM (Gibco™)</li> <li>• 丙酮酸钠 1 mM (Sigma-Aldrich®)</li> </ul>
BT474	RPMI-1640 (Gibco™)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 热灭活 FCS 10% v/v (Gibco™)</li> <li>• L-谷氨酰胺 2 mM (Gibco™)</li> <li>• 胰岛素 0.1% v/v (Sigma-Aldrich®)</li> </ul>
HME	DMEM:F-12 (Lonza)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 热灭活 FCS 10% v/v (Gibco™)</li> <li>• L-谷氨酰胺 2 mM (Gibco™)</li> <li>• 胰岛素 0.1% v/v (Sigma-Aldrich®)</li> <li>• EGF 0.02% v/v (Peprotech)</li> <li>• 氢化可的松 0.4% v/v (Sigma-Aldrich)</li> </ul>
HUVEC	EBM-2 (Lonza)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 氢化可的松 0.4% v/v (Lonza)</li> <li>• 人成纤维细胞衍生生长因子-B (hFGF-B) 0.1% v/v (Lonza)</li> <li>• 血管内皮生长因子 (VEGF) 0.1% v/v (Lonza)</li> <li>• R3-胰岛素衍生生长因子-1 (R3-IGF-1) 0.1% v/v (Lonza)</li> <li>• 抗坏血酸 0.1% v/v (Lonza)</li> <li>• 人表皮生长因子 (hEGF) 0.1% v/v (Lonza)</li> <li>• 胎牛血清 2% v/v (Lonza)</li> <li>• 庆大霉素和两性霉素 (GA-1000) 0.1% v/v (Lonza)</li> </ul>

[0133] 表2-细胞系形成

[0134]

细胞源	衍生, 致瘤性	HPA 标记	提出者
BT 474	源自侵袭性导管癌, 在裸鼠中致瘤性差。非转移性。ER+、PR+/-、HER2+。代表非转移性原发性乳腺癌 (Valentiner et al., 2005, Iorns et al., 2012)	+ (Brooks et al., 2001)	Lasfargues et al. (1978)
MCF-7	源自侵袭性原发性导管乳腺癌的转移性恶性胸腔积液。在动物模型中高致瘤性。ER+、PR+/-、HER2-。代表转移性乳腺癌。(Schumacher 和 Adam, 1997; Valentiner et al., 2005)	++++ (Brooks et al., 2001)	Soule et al. (1973)
SW480	源自结肠原发性腺癌, 在裸鼠中致瘤性差。弱转移性。代表非转移性结直肠癌。(Hewitt et al., 2000)	-(Schnegelsberg et al., 2011)	Leibovitz et al. (1976)
HT29	源自结肠原发性腺癌, 在动物模型中高致瘤性。代表转移性结直肠癌 (Schumacher et al., 1997)	++++ (Lescar et al., 2007)	Fogh et al. (1975)
NCI-H322	源自肺原发性细支气管肺泡癌, 在裸鼠中弱致瘤性。非转移性。代表非转移性非小细胞肺癌 (Mase et al., 2002)	-(Lescar et al., 2007)	Gazdar et al. (1990)
A549	源自肺癌组织的外植体培养物, 在小鼠模型中高致瘤性。转移性。代表转移性非小细胞肺癌 (Mase et al., 2002)	+/- (Lescar et al., 2007)	Giard et al., 1973
BxPc-3	源自胰腺的原发性腺癌。在动物模型中弱致瘤性。弱转移性。代表非转移性胰腺癌。(Suemizu et al., 2007)	+/- (McCater et al., 2013)	Tan et al. (1986)
MIA PaCa-2	源自胰腺的未分化癌。在小鼠模型中高致瘤性。代表转移性胰腺癌 (Suemizu et al., 2007)	++ (McCarter et al., 2013)	Yunis et al. (1977)

[0135] 内皮细胞的蛋白提取和定量

[0136] HUVEC细胞在T175烧瓶中生长至汇合, 然后在37C加湿气氛中用完全生长培养基中的10ug/ml TNF $\alpha$ 处理2小时。用冰冷的PBS洗涤细胞。通过短暂离心沉淀细胞, 弃去上清液, 并将沉淀重悬于添加了10ul/ml蛋白酶抑制剂混合物的1x RIPA缓冲液中, 并在4C下置于倒置混合器中30分钟。这段时间之后, 将管在4°C下以13,000RPM离心20分钟。将上清液转移到新的1.5ml管中并弃去沉淀物。使用BCA测定法对提取的蛋白进行定量。

[0137] SDS-PAGE和蛋白质印迹法

[0138] 10ug蛋白样本与3ul的Laemmli样本缓冲液和1ul的1M DTT用于SDS-PAGE。将其混合并加热至100C持续10分钟, 然后置于冰上。样本在装有Precision Plus蛋白双色标准品的1xTGS缓冲液中的mini-PROTEAN TGX免染预制凝胶(12%)上运行。凝胶在100伏特下运行2小时。使用Trans-Blot Turbo Midi PVDF转移包转移蛋白。将凝胶置于膜上并夹在层之间, 然后置于高MW设置的Transblot Turbo机器中。在振荡平台上在TBST(0.05%吐温)中洗涤膜5分钟, 进行3次。然后通过振荡平台上与5%BSA/TBST室温孵育2小时来封闭膜。封闭的膜在5%BSA/TBST中的10ml的1ug/ml GalNAc-BSA-生物素或5%BSA/TBST中的10ml的1ug/ml BSA-生物素中在4°C下孵育过夜。将膜用5%BSA/TBST洗涤5分钟, 进行3次, 然后将膜在5%BSA-TBST中的10ml的5ug/ml链霉亲和素-HRP中室温孵育1小时。将膜用5%BSA-TBST洗涤5分钟, 进行两次, 然后洗涤15分钟, 进行一次。以1:1的比例制备并混合HRP底物(澄明度+澄明度最大印迹ECL (Clarity+Clarity Max Western ECL) 底物, BioRad, 170-5060)。将其添加到膜中并在Chemidoc®透照仪上成像。

**[0139] 2D PAGE**

[0140] 根据制造商的说明 (80-6484-51), 通过使用GE Healthcare的2D纯化试剂盒 (2D Clean-up kit), 在添加蛋白酶抑制剂的1x RIPA缓冲液中, 将浓度为1 $\mu$ g/ $\mu$ l的活化总HUVEC蛋白纯化以用于2D PAGE。根据制造商的说明 (163-2105), 使用BioRad的ReadyPrep 2-D启动试剂盒为2DPAGE制备样本。这允许样本被11cm IPG胶条吸收, 然后随后在Ettan IPGphor 3中通过等电聚焦分离16小时。IPG胶条经过清洗和再水化, 然后置于Criterion™ XT Bis-Tris预制凝胶中, 将12%凝胶装入罐中, 加入标准品并用琼脂糖密封凝胶。在用1x MOPS缓冲液填充罐之前允许琼脂糖凝固。每块凝胶添加250 $\mu$ l的NuPage抗氧化剂 (Thermo, NP0005)。凝胶在200伏特下运行70分钟。将待印迹的凝胶从其盒中取出并在dH<sub>2</sub>O中洗涤两次。其余程序在室温下进行。将凝胶置于Invitrogen™ Novex™ SimplyBlue™ SafeStain (Thermo, LC6065) 中并置于振荡平台上1小时。然后在振荡平台上在dH<sub>2</sub>O中将凝胶脱色过夜。使用iBlot™ 2干式印迹系统对凝胶进行印迹。膜在dH<sub>2</sub>O中短暂洗涤, 然后在摇摆平台上用5%的Marvel/TBST封闭1小时。将膜与5%BSA/TBST中的1 $\mu$ g/ml GalNAc-BSA-生物素在摇摆平台上孵育2小时, 然后在摇摆平台上用TBST洗涤3次, 每次10分钟。将膜与5%BSA/TBST中的5 $\mu$ g/ml链霉亲和素-过氧化物酶在摇摆平台上孵育1小时, 然后在摇摆平台上用TBST洗涤3次, 每次10分钟。制备ECL HRP底物并将其添加到膜中, 然后使用Chemidoc®透照仪成像。

**[0141] 用于质谱法的凝胶的制备**

[0142] 1D凝胶用考马斯(Coomassie)蓝染色, 且2D凝胶用银染料染色, 然后使用印迹作为参考从1D和2D凝胶中切下感兴趣的条带和点。然后将凝胶送往Porton Biopharma Ltd进行质谱法分析。

**[0143] 从癌细胞中提取EV**

[0144] 癌细胞在T175烧瓶中生长至70%汇合度, 并用25ml/烧瓶的EV清除培养基 (含有10%FBS的DMEM培养基, 其中FBS已预先以120,000g离心16小时以清除现有EV) 培养, 并保持48小时。移除培养基并在4℃下以300x g离心5分钟, 然后以16,000x g离心20分钟。将培养基从烧瓶移至“普通”50ml管 (Greiner Bio-One, 227285) 并以300x g离心5分钟。对于微囊泡, 将上清液转移到高速 (绿色或橙色顶部) 的50ml管 (Alpha Laboratories, CT1120) 中, 弃去沉淀物, 并以16000g离心20分钟。将上清液转移到普通的50ml管中-这是EV部分。沉淀含有微囊泡, 将其汇集并重悬于20ml PBS中。然后再次以16000g离心20分钟。将上清液倒出管, 并且将沉淀重悬于剩余~300 $\mu$ l的PBS体积中。使用PBS中的0.1%BSA (Sigma, A7906-100G) 溶液 (40 $\mu$ l 10%BSA在40ml PBS中) 封闭0.22微米 (Fisher, fdr-050-071n) 过滤器并通过该过滤器过滤培养基。将培养基添加到Vivaspin 20的100kDa浓缩器 (Fisher, 10774797)。通过以3000g (摆桶转子-25分钟) 或5000g (定角转子-20分钟) 离心步骤来浓缩培养基。

[0145] 对于外泌体, 上清液通过已用0.1%BSA封闭的0.22 $\mu$ m过滤器过滤。使用Vivaspin 20的100kDa浓缩器将上清液浓缩至500 $\mu$ l。通过添加14ml琼脂糖和10ml PBS来制备SEC柱 (BioRad, 7321010), 使其沉降2小时, 然后添加柱载体 (column support) 并且使PBS流过。然后用10ml PBS洗涤柱子三次。将500 $\mu$ l样本添加到柱载体并且使其被吸收, 然后添加10ml PBS。收集并丢弃2.5ml流出物, 然后收集2ml流出物 (包含EV)。使用Particlematrix™粒子分

析仪对EV进行定量。然后将EV存放在冰箱中以供短期使用。

[0146] 有或没有EV的内皮静态粘附试验

[0147] 如上所述制备具有活化内皮细胞的盖玻片。MCF7乳腺癌细胞在T75烧瓶中生长至70%汇合度,并在37°C、5%CO<sub>2</sub>下在完全培养基中用10mg/ml 8-羟基芘三磺酸(HTPS)处理2小时。这段时间后,除去HTPS,并用10ml PBS洗涤细胞5次,直至洗液变清澈。刮下细胞并计数。制备了20,000个细胞/ml。MCF7细胞用500ul EV或500ul PBS处理,并在室温下混合10分钟。在37°C、5%CO<sub>2</sub>下,用500ul EV或500ul PBS处理HUVEC细胞30分钟。从细胞中除去EV或PBS,每孔添加20,000个细胞/ml的MCF7细胞并孵育10分钟,除去细胞并用温热的PBS轻轻洗涤孔以除去任何未结合的细胞。然后在室温下将孔用4%PFA固定10分钟。除去固定剂并用PBS洗涤孔3次,然后使用fluoromount™封盖玻片。计数每个盖玻片的总粘附细胞。

[0148] 如上所述制备具有活化内皮细胞的盖玻片。MCF7乳腺癌细胞在T75烧瓶中生长至70%汇合度,并在37°C、5%CO<sub>2</sub>下在完全培养基中用10mg/ml HTPS处理2小时。除去HTPS并用10ml PBS洗涤细胞5次,直至洗液变清澈。刮下细胞并计数。制备了20,000个细胞/ml。MCF7细胞在室温下用在PBS中0.1ug/ml重组网蛋白(2b Scientific SKU RPC754Hu01(人网蛋白Uniprot ID Q15149的残基Asp 175-Pro 400,对应于肌动蛋白结合域)或用PBS处理10分钟。从细胞中除去重组的网蛋白或PBS,每孔添加20,000个细胞/ml的MCF7细胞并孵育10分钟,除去细胞并用温热的PBS轻轻洗涤孔以除去任何未结合的细胞。然后在室温下将孔用4%PFA固定10分钟。除去固定剂,并用PBS洗涤孔3次,然后使用fluoromount封盖玻片。计数每个盖玻片的总粘附细胞。

[0149] 有或没有网蛋白沉默和EV救援(EV rescue)的内皮静态粘附试验

[0150] MCF7和HUVEC细胞在24孔细胞培养板中生长至70%汇合度,细胞用Dharmafect™转染试剂和5uM网蛋白siRNA或乱序阴性对照处理24小时。一些HUVEC和MCF7细胞未处理。HUVEC细胞在37°C、5%CO<sub>2</sub>下在完全培养基中通过用10ug/ml TNFa处理2小时来活化。MCF7乳腺癌细胞在T75烧瓶中生长至70%汇合度,并在37°C、5%CO<sub>2</sub>下在完全培养基中用10mg/ml HTPS处理2小时。除去HTPS并用10ml PBS洗涤细胞5次,直至洗液变清澈。刮下细胞并计数。制备了20,000个细胞/ml。在室温下使用上述提取方法分离的500ul EV或500ul PBS处理MCF7细胞10分钟。除去EV或PBS,并将1ml MCF7细胞添加到HUVEC细胞中,并在37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育10分钟,然后除去细胞并用温热的PBS轻轻洗涤孔以除去任何未结合的细胞。然后将孔用4%PFA在室温下固定10分钟。除去固定剂,并用PBS洗涤孔3次,然后使用fluoromount封盖玻片。计数每个盖玻片的总粘附细胞。

[0151] 斑点印迹试验

[0152] 使用质膜蛋白提取试剂盒(Abcam, ab56400)进行膜分离,外泌体/MV如所附方案所示。使用窄口移液器吸头,将2ul样本或缓冲液点到硝酸纤维素膜上。缓慢施加,使溶液渗透的区域最小化(通常为3-4mm)。让膜干燥~30分钟。将每个膜放在6孔板内。将膜浸泡在5%marvel的TBS-T或在含0.1%吐温20的dH<sub>2</sub>O中稀释的用于HPA的Carbo-free封闭溶液(2BScientific, SP-5040-125)中进行封闭(1小时,室温)。用在Carbo-Block-T中的10ug/ml生物素标记-HPA或者对于所有抗体在5%marvel的TBS-T中以1:1,000的比例在37°C孵育2小时或在4°C孵育过夜。用TBS-T(3x5分钟)洗涤膜三次。在5%marvel TBST中用生物素标记的抗-Ms(Vector Labs, BA-2000-1.5)或生物素标记的抗-Rb(Vector Labs, BA-1000-1.5)

在37°C下孵育1小时。用TBS-T洗涤膜三次(3x 5分钟)。用在5%marvel TBS-T中1ug/ml链霉亲和素-过氧化物酶或用于HPA的Carbo-Block-T进行孵育。用TBS洗涤三次(3x 10分钟)。结合ECL底物A和B(BioRad Clarity试剂盒)。用ECL试剂孵育每个膜1分钟,从表面去除多余的溶液,并成像为化学高灵敏度印迹。

[0153] MCF7和BT474乳腺癌细胞的蛋白质印迹法后HPA探测

[0154] MCF7和BT474细胞系在T75烧瓶中生长至70%汇合度,并且它们的蛋白被提取、定量、在SDS-PAGE上运行,然后如前所述进行印迹。使用生物素标记-HPA或抗-GAPDH抗体探测膜。

[0155] Nanoview

[0156] 遵循R100标准方案并通过Nanoviewer分析。使用SEC(如前所述)从MCF7和BT474乳腺癌细胞中提取EV,并用荧光偶联抗体(CD81和CD9)以及HPA凝集素进行标记。

[0157] 在盖玻片上制备活化的内皮细胞

[0158] 将灭菌的13mm D玻璃盖玻片置于24孔板的孔中,并接种100,000个HUVEC细胞。细胞在37°C、5%CO<sub>2</sub>气氛下孵育,直至细胞变成单层。HUVEC细胞在37°C、5%CO<sub>2</sub>下在完全培养基中通过用10ug/ml TNF $\alpha$ 处理2小时来活化。

[0159] 有或没有肌动蛋白抗体抑制的内皮粘附试验

[0160] 如上所述制备具有活化内皮细胞的盖玻片。MCF7乳腺癌细胞在T75烧瓶中生长至70%汇合度,并在37°C、5%CO<sub>2</sub>下在完全培养基中用10mg/ml HTPS处理2小时。这段时间后,除去HTPS,并用10ml PBS洗涤细胞5次,直至洗液变清澈。刮下细胞并计数。制备了20,000个细胞/ml。MCF7细胞在室温下用1:1,000肌动蛋白IgG(Abcam ab8227)、1:1,000GAPDH IgG或PBS处理30分钟。从细胞中除去抗体或PBS,每孔添加20,000个细胞/ml的MCF7细胞并孵育10分钟,除去细胞并用温热的PBS轻轻洗涤孔以除去任何未结合的细胞。然后将孔用4%PFA在室温下固定10分钟。除去固定剂并用PBS洗涤孔3次,然后使用fluoromount封盖玻片。计数每个盖玻片的总粘附细胞。

[0161] 流式细胞术

[0162] 对于活细胞研究,培养的细胞在约70%汇合度收获,并使用Accutase从烧瓶底部分离。通过离心(1400rpm,5分钟)收集细胞。使用浓度为0.5x10<sup>6</sup>/ml的细胞进行分析。用PBS洗涤细胞,并在3%BSA/TBS中与HPA抗体(7.5ug/ml)室温避光孵育10分钟,以检测细胞表面上HPA GalNAc表位或1/50肌动蛋白(克隆SP124)。用碘化丙啶(10ug/ml)处理细胞以对活细胞群进行门控(gate)。使用配备375nm、405nm、488nm和638nm激光并使用CytExpert软件操作的13色4激光CytoFLEX SN-V-B-R流式细胞仪在APC-A通道上定量记录647种缀合物的波长。

[0163] 每个样本一式三份进行分析,并根据来自APC检测器的荧光信号的平均值确定所分析细胞表面上的GalNAc表位水平。门控:1)FSC-H与FSC-A-为了双重区分,已聚集的细胞将具有双倍的面积和高度。2)Pi生存能力门控-为了区分活细胞和死细胞。死细胞变得透化,因此PI将与细胞核结合,因此将有更多的荧光(我还附上了我未染色的Pi对照以显示差异)。3)感兴趣的抗体/凝集素通道,以确定不同条件之间的峰值变化。

[0164] 对于固定细胞,收集细胞并重悬于冷PBS中。将细胞与抗肌动蛋白Ab在4°C下孵育1小时(Proteintech目录:60008-1-Ig)。然后在流式细胞术之前洗涤细胞并重悬于PBS中。

[0165] NanoFCM

[0166] NanoFCM是一种40纳米至1微米的流式细胞仪,专注于外泌体分析,如单独在<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jev2.12044>和<https://doi.org/10.1002/jev2.12079>中综述的。所有这些结果均由位于英国诺丁汉的公司运行。如前所述提取外泌体。机器设置如下:SN-N30E、V1.11软件、样本压力-1Kpa、激光-10/50mW 488@20/100mW 640、SS衰减-10%和最小宽度-0.3ms。用二氧化硅纳米粒子校准并定量EV浓度。进行了PBS、抗体对照和EV未染色和染色优化。对于肌动蛋白抗体,大约 $2 \times 10^8$ 至 $2 \times 10^{10}$ 个粒子,与抗体/染料以 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^5$ 在室温下孵育30分钟,然后在PBS中稀释为 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^5$ 。对于HPA,将大约 $2 \times 10^8$ 个粒子与抗体/染料以 $1 \times 10^5$ 在室温下孵育30分钟,然后在PBS中稀释为 $1 \times 10^2$ 至 $1 \times 10^5$ 。如果背景高,则以 $110 \times g$ 超速离心1小时并重悬至 $50 \mu l$ 。除去上清液并将样本重悬于 $50 \mu l$  PBS中。将大约40-199nm之间门控的事件记录1分钟,并记录为具有阳性信号的外泌体数量占以该尺寸门控的总外泌体的百分比。

[0167] 表3-使用的抗体

抗体名	使用原因	制造商	项目代码	宿主种类	在下述下用于 WB 用途
<u>EpCAM</u>	细胞表面特异性标记	Abcam	ab71916	Rb	1ug/ml
<u>GAPDH</u>	细胞溶质特异性标记	Abcam	ab128915	Rb	1/10,000 – 1/50,000
<u>IgG</u>	用于检查抗体特异性的同种型对照	Abcam	ab172730	Rb	-
<u>ACTB 1</u>		Proteintech	66009-1-IG	Ms	1/5,000 – 1/50,000
<u>ACTB 2</u>		Abcam	ab8227	Rb	1/1,000 – 1/5,000
<u>ACTB 3</u>		Abcam	ab8226	Ms	1ug/ml
<u>ACTB 4</u>		Invitrogen	MA1-140	Ms	1/5,000-1/20,000
<u>ACTG 1</u>		BioRad	VMA00049	Ms	1/1,000
<u>ACTG 2</u>		Sigma	A8481	Ms	0.25-0.5ug/ml
[0168] <u>ACTBF1</u>	用于流式的抗体，以检查工作	Abcam	ab206277	Rb	-
<u>ACTBF2</u>	用于流式的抗体	Abcam	ab267562	Rb	-
<u>ACTBFITC</u>	用于 NanoFCM 的抗体	Abcam	ab6277	Ms	-
<u>ACTGFITC</u>	用于 NanoFCM 的抗体	Santa Cruz Biotechnology	sc-65638 FITC	Ms	-
<u>HPA</u>		Sigma	L6512-1MG	-	-
<u>CD81*</u>	阳性 EV 对照	Abcam	ab79559	Ms	2ug/ml
<u>TSG101*</u>	阳性 EV 对照	Abcam	ab30871	Rb	1ug/ml
<u>Hsp70*</u>	阳性 EV 对照 (?)	Abcam	ab5439	Ms	1/1,000
<u>GM130*</u>	阴性 EV 对照	Abcam	ab52649	Rb	1/1,000 – 1/10,000
<u>CD9*</u>	阳性 EV 对照	Cambridge Bioscience	EXOAB-CD9A-1	Rb	-
[0169] <u>CD63*</u>	阳性 EV 对照	Novus Biologicals	NBP2-42225	Ms	2ug/ml
<u>细胞色素 C ( Cytochrome C ) *</u>	阴性 EV 对照	Abcam	ab150422	Rb	1/1,000 – 1/10,000

[0170] 实施例

[0171] 实施例1-鉴别膜结合肌动蛋白作为转移潜能的生物标志物

[0172] 罗马蜗牛凝集素(HPA) (一种来自罗马蜗牛的凝集素) 与乳腺癌(BC) 和其他上皮癌的结合与转移能力和患者预后不良有关(Brooks S., 2000, *Histology and Histopathology*, 15(1): 143-158)。HPA具体结合什么是未知的, 但是, 已经表明HPA结合一系列具有末端 $\alpha$ -GalNAc (然后HPA具有最高亲和力的单糖) 的糖蛋白。这些糖蛋白之一是癌症相关的Tn抗原(Ser/Thr-GalNAc), 它是O-连接糖基化(通常总是进一步详细说明) 的初始结构, 但在癌症中很常见(Brooks S.A. & Leathem A.J.C., 1995, *British J. Cancer*, 71: 1033-1038)。

[0173] 在静态粘附试验中, 与弱HPA阳性或HPA阴性的BC细胞相比, 高HPA阳性的BC细胞对内皮细胞的粘附显著更多。该试验模拟狭窄毛细血管中的转移性癌细胞停滞。为了使癌细胞成功转移, 它们必须与血管结合并从血管中渗出。已经表明结合是通过这种糖基化标记介导的, 因为用HPA或BSA-GalNAc孵育细胞会抑制细胞结合。

[0174] 鉴别介导HPA阳性细胞粘附的内皮细胞上的受体

[0175] 为了鉴别识别BC细胞上HPA结合聚糖的内皮细胞上的推定受体, 从使用TNF $\alpha$  (一种已知可上调内皮受体的炎性细胞因子) 激活的内皮细胞中提取总蛋白。蛋白在SDS-PAGE上运行, 然后印迹。GalNAc-BSA-生物素(GalNAc是HPA对其具有最大标称特异性的糖) 用作探针以鉴别感兴趣的内皮蛋白。作为阴性对照, BSA-生物素也用于探测膜。如图1所示, 当用GalNAc-BSA-生物素探测膜时, 观察到几个条带, 而当用BSA-生物素探测膜时没有观察到条带。

[0176] 使用GalNAc-BSA-生物素作为探针始终鉴别出几个条带, 从中选择并切除五个凝胶片段用于质谱法(图2)。在1D凝胶的印迹中观察到的条带可能代表大量蛋白, 因为分离仅在于尺寸。为了更好地解析条带, 使用2D-PAGE在尺寸和pH上分离蛋白。用GalNAc-BSA-生物素对2D凝胶进行印迹和探测。十三个点被鉴别为感兴趣并从2D PAGE凝胶中切除(图3)。

[0177] 质谱法数据揭示了来自1D和2D-PAGE的凝胶片段中的几种蛋白, 其中一些在两者中重叠。在这些鉴别出的蛋白中, 有网蛋白, 它通常是细胞内支架蛋白。然而, Shin et al. (2013) 证明网蛋白可以通过外泌体分泌定位到细胞膜。为了研究这一点, EV从BC细胞中分离出来, 并在静态粘附试验之前与BC细胞、内皮细胞或两者一起孵育。发现了当与未处理的、仅BC细胞或仅内皮细胞处理的相比, 将BC细胞和内皮细胞与EV一起孵育显著增加BC细胞对内皮细胞的结合(图4)。该发现表明, EV可以在帮助BC细胞对内皮细胞的粘附方面发挥积极作用。

[0178] 为了进一步研究这一点, 使用siRNA在BC细胞、内皮细胞或两者中敲低网蛋白。在所有情况下, 当与未处理的细胞和乱序siRNA处理的细胞(在图中称为阴性) 的阴性对照细胞相比, BC细胞与内皮细胞的结合显著减少, 因此表明BC细胞需要网蛋白才能与内皮细胞结合(图5)。

[0179] 确认内皮细胞上的受体对BC细胞上的糖基化标记具有特异性并介导细胞结合

[0180] 为了确认内皮细胞上的受体对BC细胞上的糖基化标记具有特异性, 重组的网蛋白片段(含有网蛋白的肌动蛋白结合域, 它可以结合所有肌动蛋白同种型(Fontao et al., 2001, *J. Cell. Sci.*, 114: 2065-2076)) 通过在添加内皮细胞之前孵育10分钟, 用于阻断BC细胞。当与未处理的对照细胞相比, 细胞对内皮细胞的粘附显著减少(图6)。据推测, 当用重组

网蛋白孵育BC细胞时观察到的结合减少是网蛋白与HPA阳性糖基化标记结合的结果,从而“覆盖”它们并阻止与内皮细胞的结合。

[0181] 来自BC细胞的EV如何增加对内皮细胞的粘附的研究

[0182] BC细胞中网蛋白的敲低的发现,结合来自BC细胞的EV可以增加BC细胞对内皮细胞的粘附的观察,导致了该假设,即EV可以将来自BC细胞的网蛋白携带到内皮细胞表面,然后增加了BC细胞结合的有效“着陆平台”。为了开始检验该假设,进行了“挽救”实验。当BC细胞中的网蛋白被敲低时,BC细胞与内皮细胞的结合减少(图7)。有趣的是,当用来自对照BC细胞的EV处理内皮细胞时,这种减少的结合被部分挽救。这与来自正常细胞(具有网蛋白)的EV正在提供“着陆平台”以允许结合发生的假设是一致的。

[0183] 在模型系统中,使用了两种之前已经报道为高HPA阳性(MCF7)和弱HPA阳性(BT474)的BC细胞系来验证上述假设。从两种细胞系中提取蛋白并在SDS-PAGE上运行,然后印迹并用HPA探测。HPA阳性的BC细胞系(MCF7)比仅具有一个75kDa的条带的弱HPA阳性的BC细胞系(BT474)具有更大范围的HPA阳性糖蛋白,从而确认了该模型系统的使用(图8)。

[0184] 使用NanoView,表明HPA结合阳性细胞产生HPA结合阳性EV,并且同样地,HPA结合阴性细胞产生HPA结合阴性EV。为此,从两种BC细胞系中分离出EV,一种是HPA结合阴性,另一种是HPA结合阳性,通过用对两种常用EV标记物和HPA特异的荧光偶联抗体标记这两个EV群,可以定量EV具有“HPA结合阳性”的数量。来自HPA结合阴性的BC细胞(BT474左侧,图9)的EV被发现是HPA结合阴性,来自HPA结合阳性的BC细胞(MCF7右侧,图9)的EV是HPA结合阳性。特别是,HPA主要与囊泡上的CD9共定位-与13%CD81阳性和9%CD63阳性的囊泡相比,最多45%CD9阳性的囊泡是HPA阳性。由于与APC发射光谱重叠,本实验不包括荧光偶联抗-CD63。

[0185] 鉴别BC细胞上介导与内皮细胞上受体结合的糖蛋白

[0186] 细胞骨架网蛋白有许多与其肌动蛋白结合域(ABD)相互作用的结合伴侣,包括 $\beta$ -肌动蛋白。为了研究糖基化 $\beta$ -肌动蛋白是否是细胞表面网蛋白的潜在结合伴侣,进行了阻断实验,其中在与内皮细胞孵育之前使用抗 $\beta$ -肌动蛋白IgG(Abcam ab8227)将 $\beta$ -肌动蛋白掩蔽30分钟。与未处理的对照细胞相比,当 $\beta$ -肌动蛋白被阻断时,细胞粘附显著减少,因此表明 $\beta$ -肌动蛋白是网蛋白的结合伴侣,并且这种相互作用有助于BC细胞与内皮细胞的结合(图10)。

[0187] 不同细胞系的表面肌动蛋白水平

[0188] 一系列具有已知侵袭性和HPA结合特征的细胞被用于通过流式细胞术确定不同细胞类型的表面肌动蛋白水平。这些范围从正常/HPA阴性到非转移性/弱HPA阳性到高转移性/高HPA阳性(图11)。HME细胞是正常乳腺细胞并且是HPA阴性;BT474源自原发性侵袭性导管癌,没有转移的证据(Lasfargues et al.1978,J.Nat.Cancer Institute,61(4):967-978)并且用HPA弱标记;ZR 751源自侵袭性原发性导管乳腺癌的恶性腹水-即来自已经转移的细胞(Engel et al.1978,Canc.Res.,38,3352-3364)并用HPA适度标记;T47D源自侵袭性原发性导管乳腺癌的恶性胸腔积液-即来自已经转移的细胞(Keydar et al 1979,Eur J Cancer,15(5):659-70)并用HPA高度标记;MCF7源自侵袭性原发性导管乳腺癌的恶性胸腔积液-即来自已经转移的细胞(Soule et al.1973,J.Nat.Cancer Institute,51(5):1409-14-16)并用HPA高度标记。肌动蛋白标记似乎遵循与HPA标记相似的趋势,因为在更多侵袭性/转移性细胞中测量到增加的表面肌动蛋白。

[0189] 图12使用流式细胞术进一步证明,转移性乳腺癌细胞(MCF7)表面的肌动蛋白水平高于非转移性乳腺癌细胞(BT474)。该数据是使用能够检测 $\beta$ 和 $\gamma$ 肌动蛋白的抗体生成的。图13进一步证明转移性癌,包括乳腺癌MCF7、结直肠癌HT-29和肺癌A539,也在它们表面显示出升高的HPA水平。这些结果进一步表明,转移性癌细胞中肌动蛋白和HPA的表面水平升高,从而证明了它们的诊断潜力。

[0190] 图14进一步支持转移性癌细胞上表面肌动蛋白水平升高,该数据比较了非转移性和转移性乳腺癌,并使用针对 $\beta$ 肌动蛋白或 $\gamma$ 肌动蛋白的抗体,这两种抗体均显示转移性癌细胞上肌动蛋白水平升高。

[0191] 从不同细胞系获得的微囊泡上的表面肌动蛋白水平

[0192] 图15至图17比较了从转移性和非转移性乳腺癌、肺癌和胰腺癌细胞获得的微囊泡表面上的肌动蛋白水平。结果清楚地显示从转移性细胞获得的微囊泡上肌动蛋白水平升高。

[0193] 从不同细胞系获得的外泌体的表面肌动蛋白水平

[0194] 图18至图20比较了从转移性和非转移性乳腺癌和结直肠癌细胞获得的外泌体表面上的肌动蛋白水平。结果清楚地表明,当与非转移性细胞相比,从转移性细胞获得的外泌体上的肌动蛋白水平升高。图21进一步证明从转移性癌,特别是结直肠HT-29癌细胞获得的外泌体,也在它们表面显示出HPA的水平升高。图22显示转移性乳腺癌和结直肠癌细胞在它们表面显示出 $\gamma$ 肌动蛋白的水平升高。

[0195] 讨论

[0196] 总之,本文提供的数据表明,上皮癌细胞表面(膜结合)和/或源自其的细胞外囊泡的表面上的肌动蛋白可以用作癌细胞转移潜能的诊断或预后标志物。肌动蛋白水平也可用于监测对特定癌症治疗的响应、监测疾病进展和/或监测疾病复发,HPA水平也可单独或与肌动蛋白水平组合用作生物标志物。

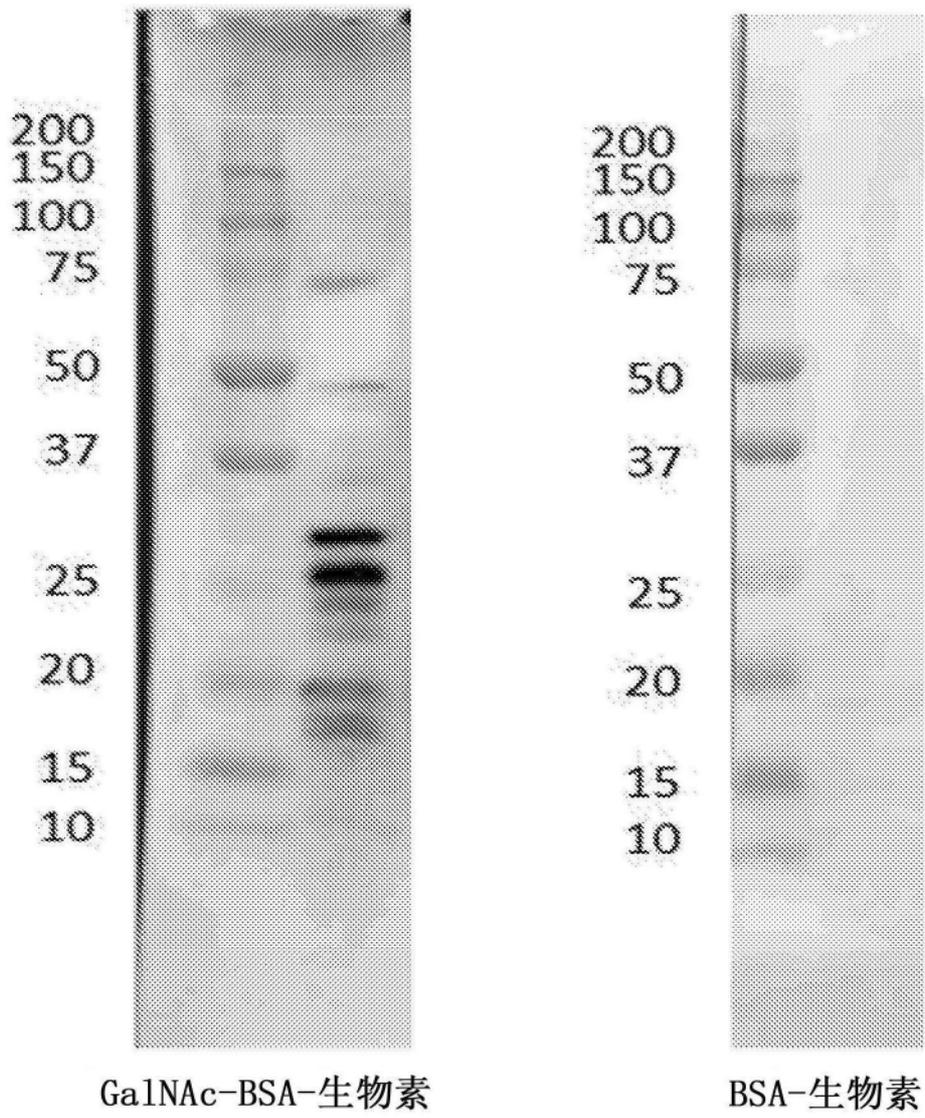


图1

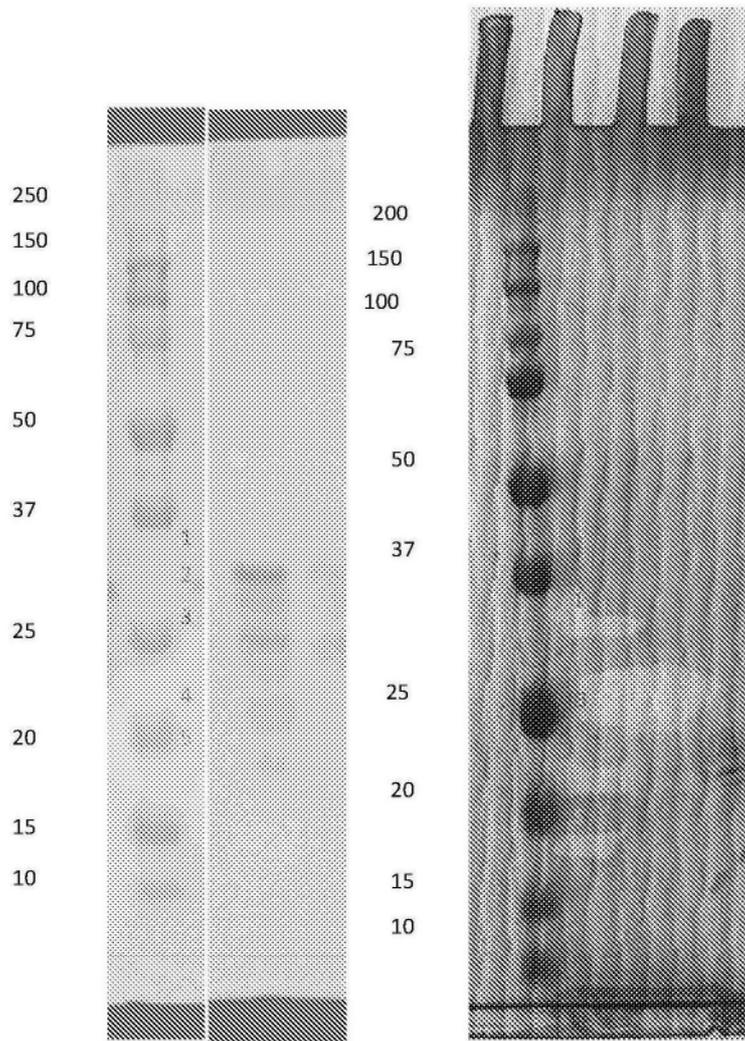


图2

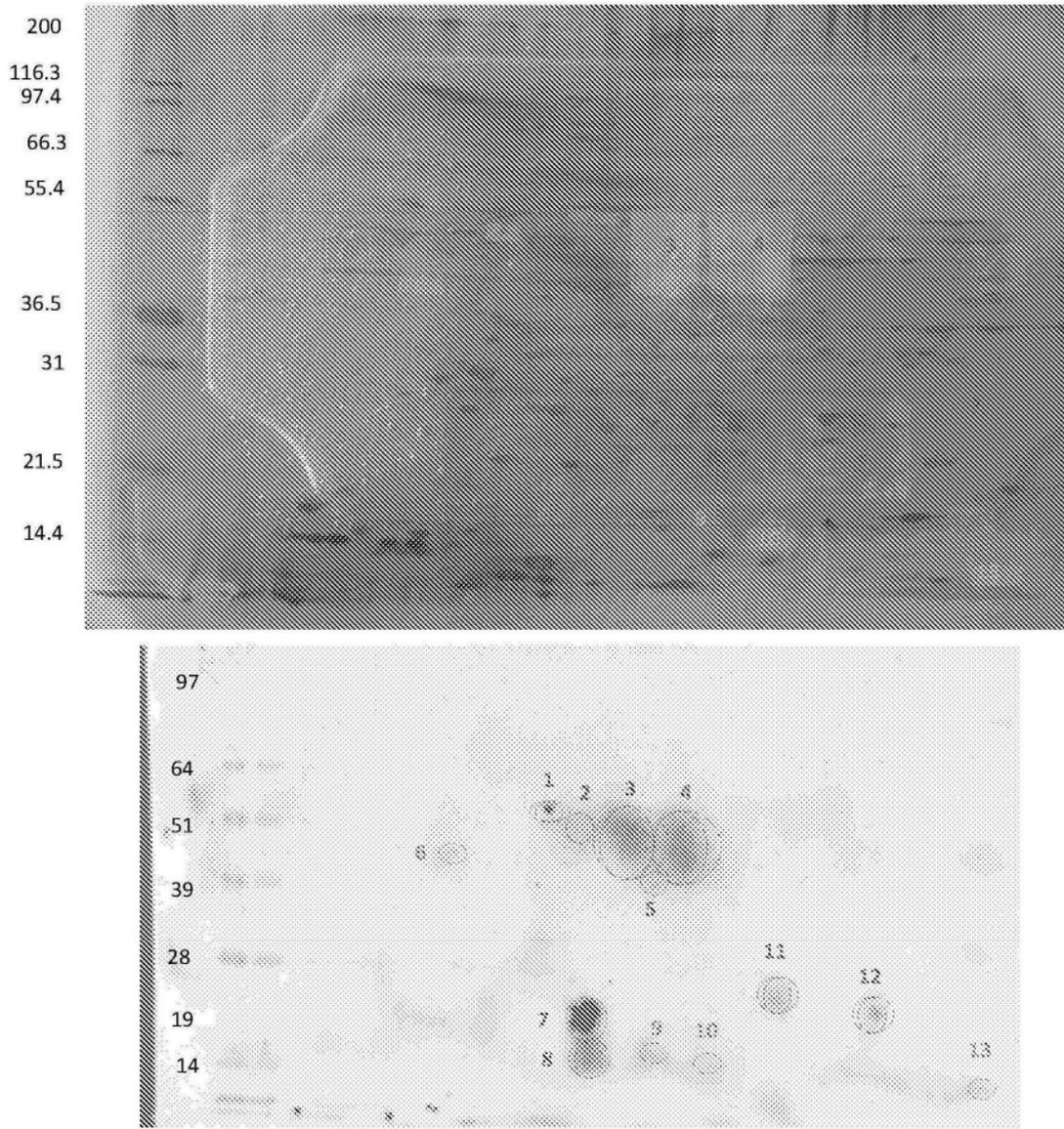


图3

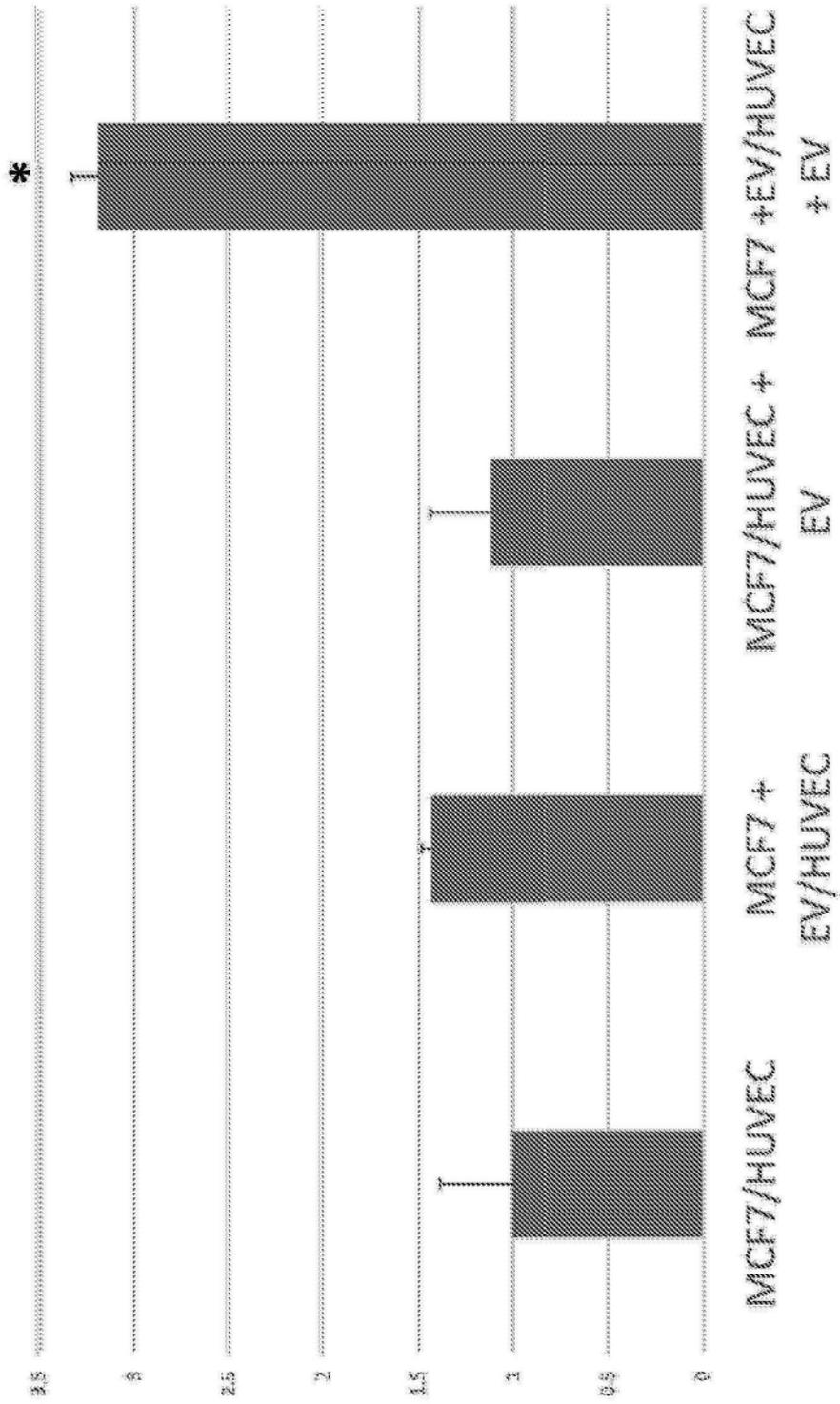


图4

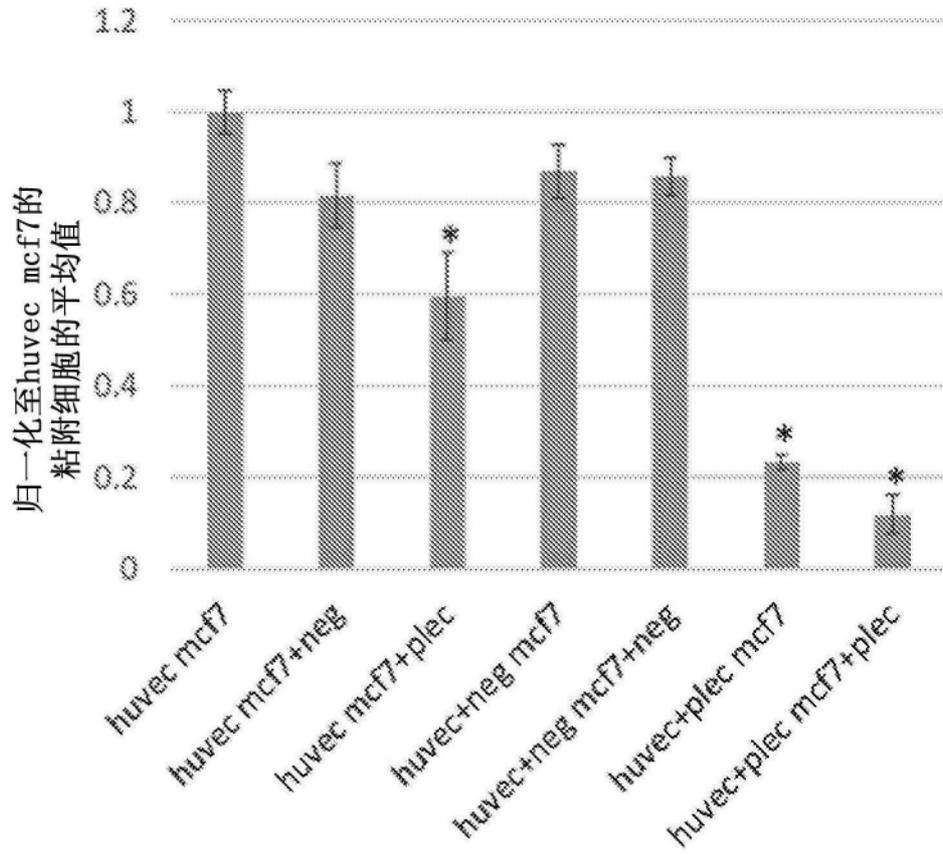


图5

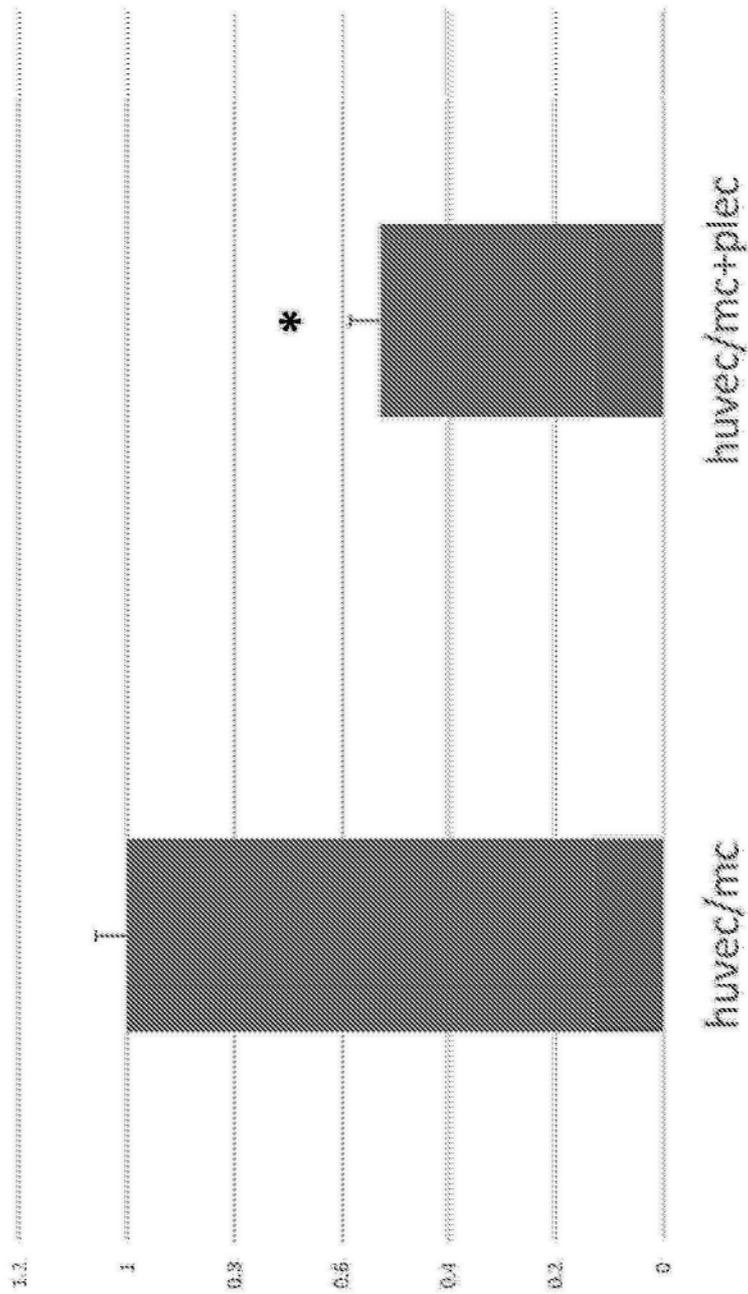


图6

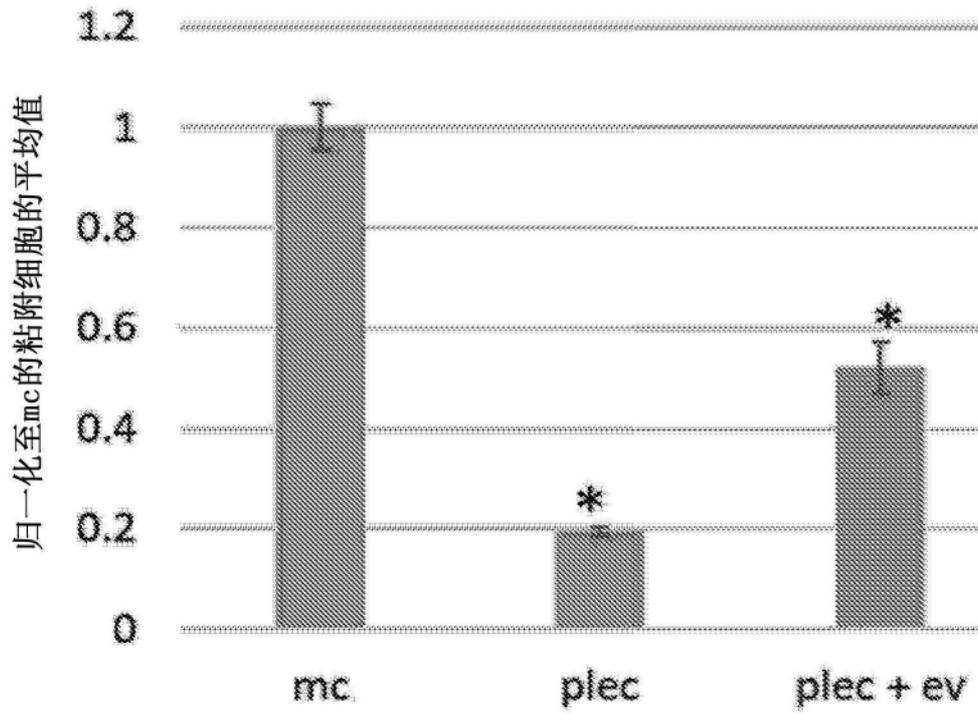


图7

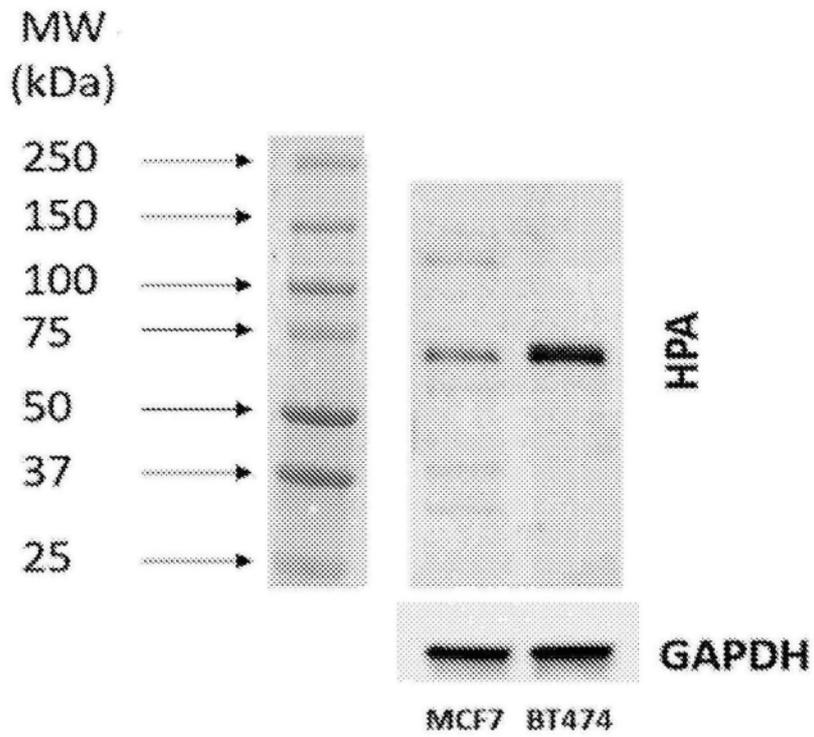


图8

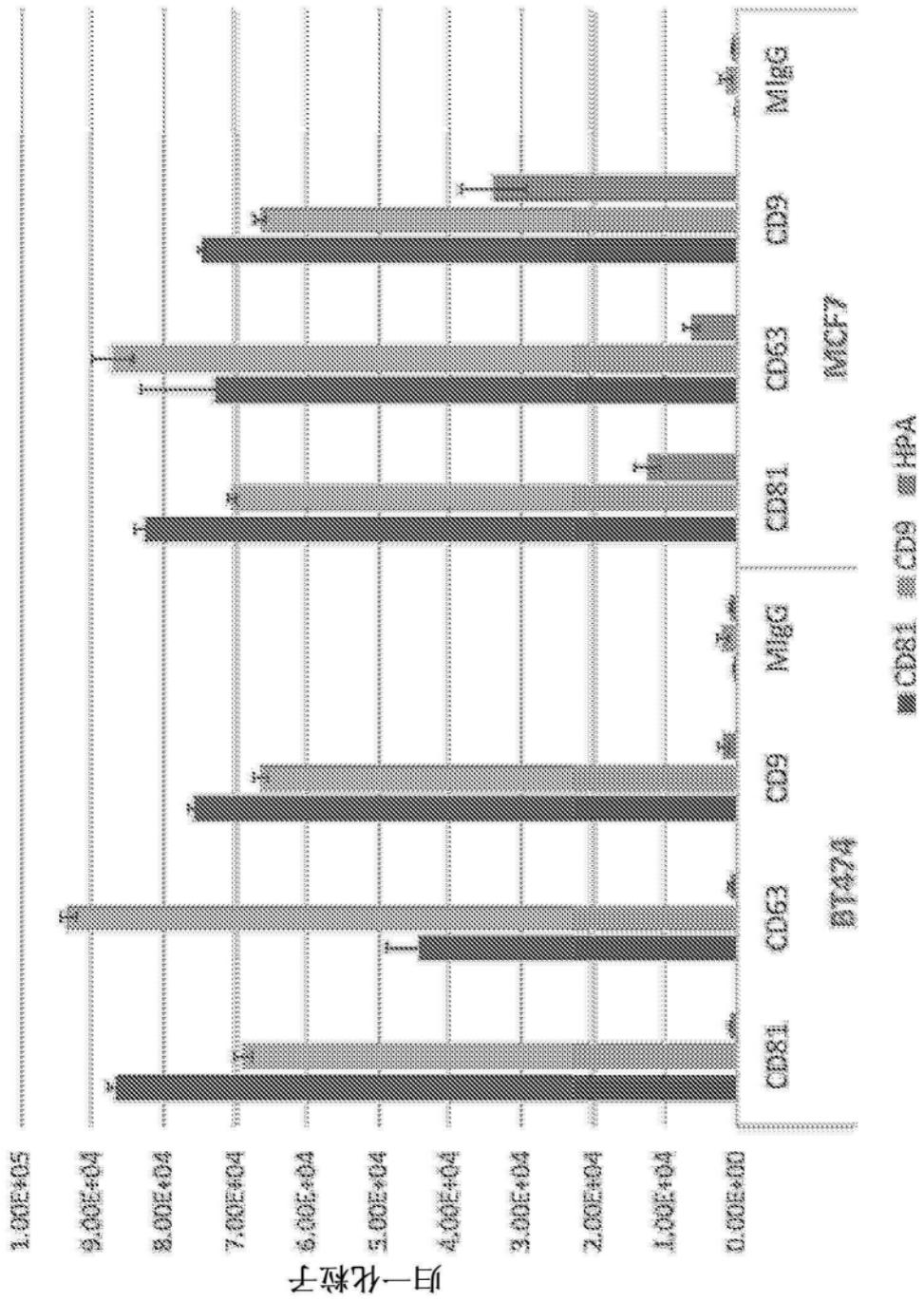


图9

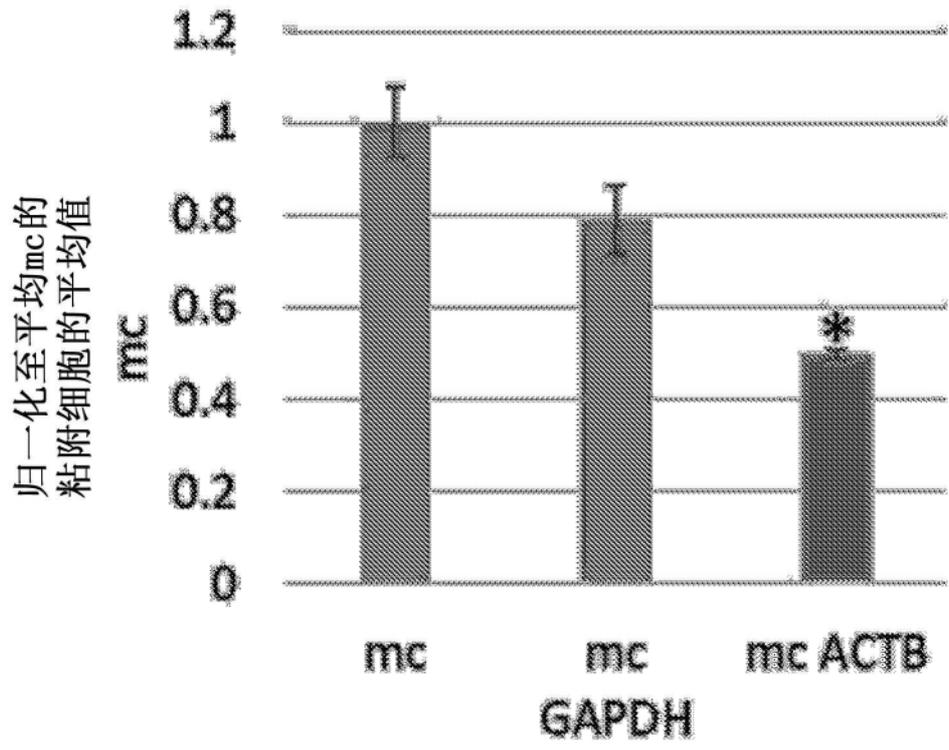


图10

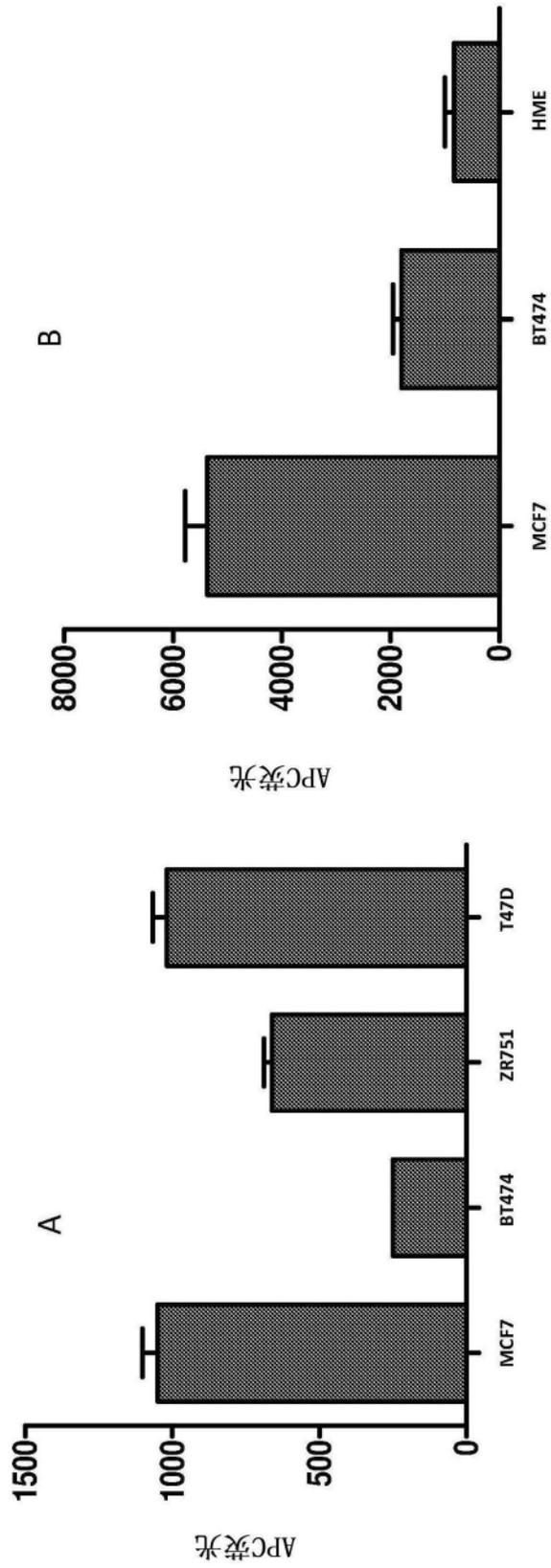


图11

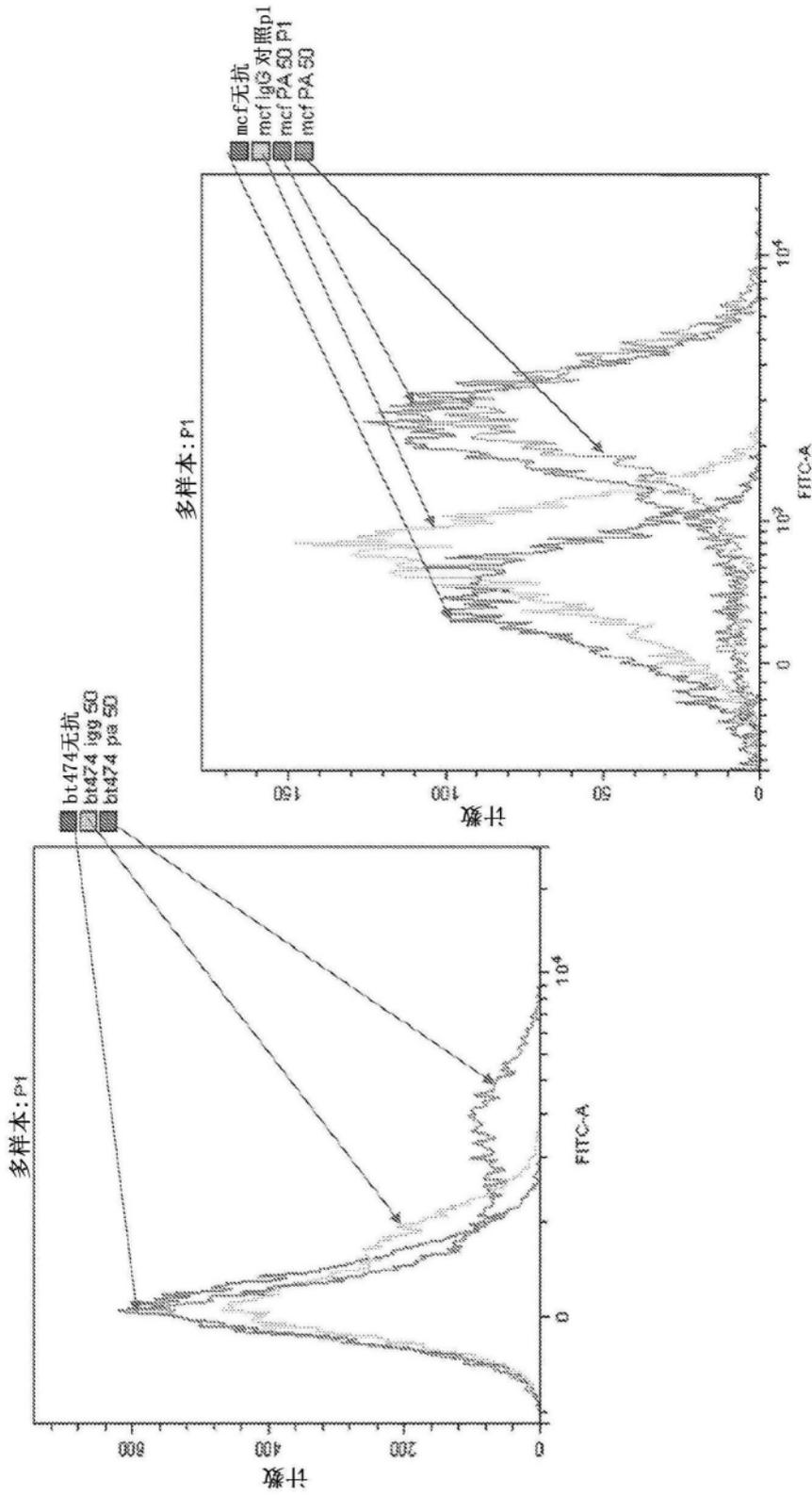


图12

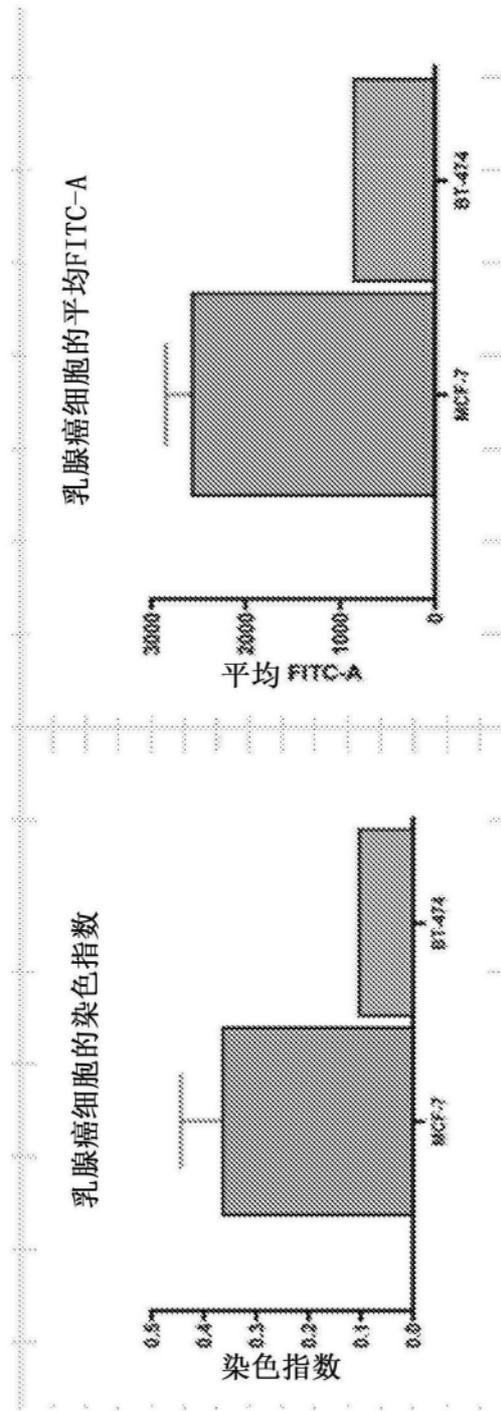


图12续

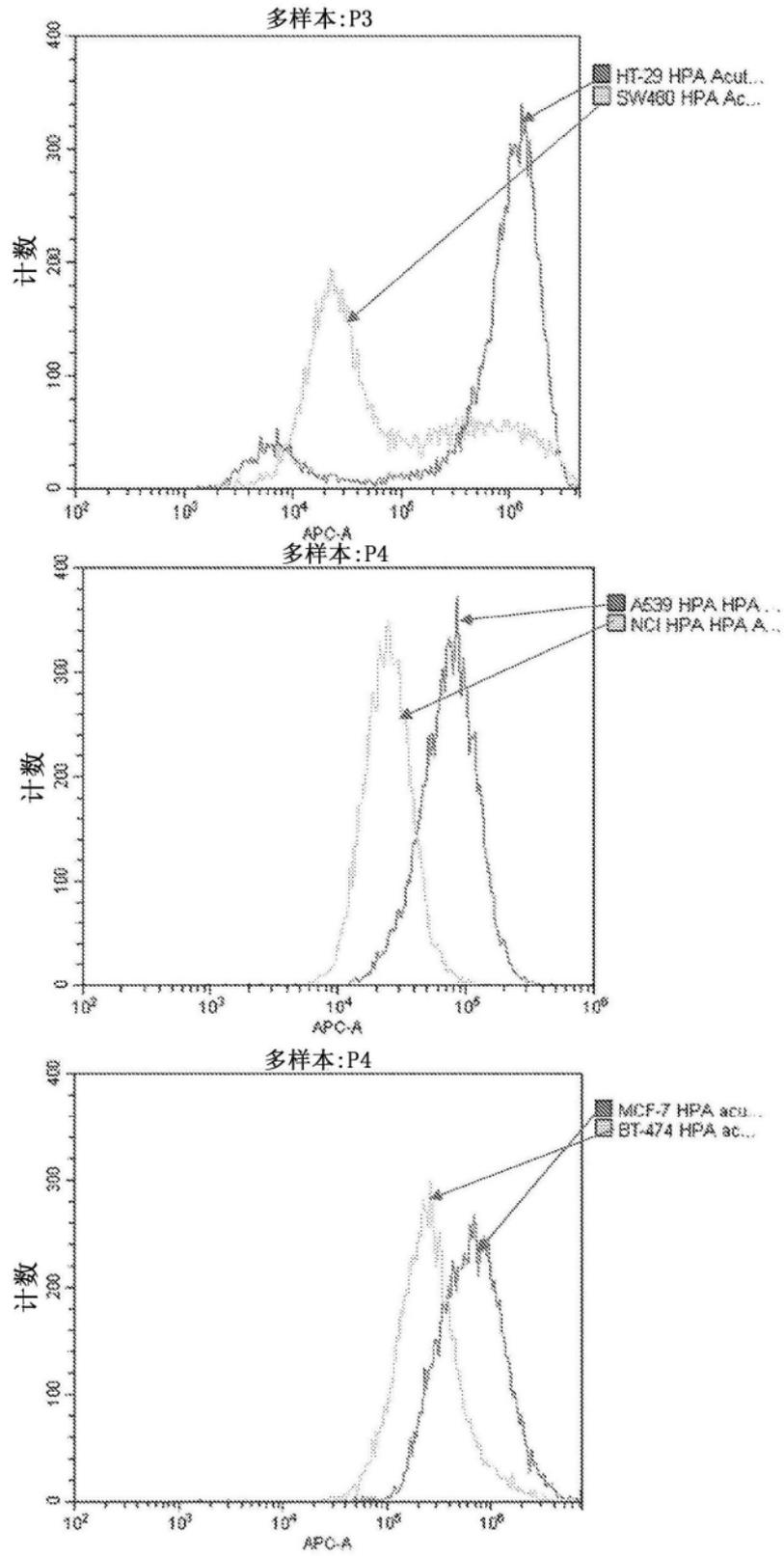


图13

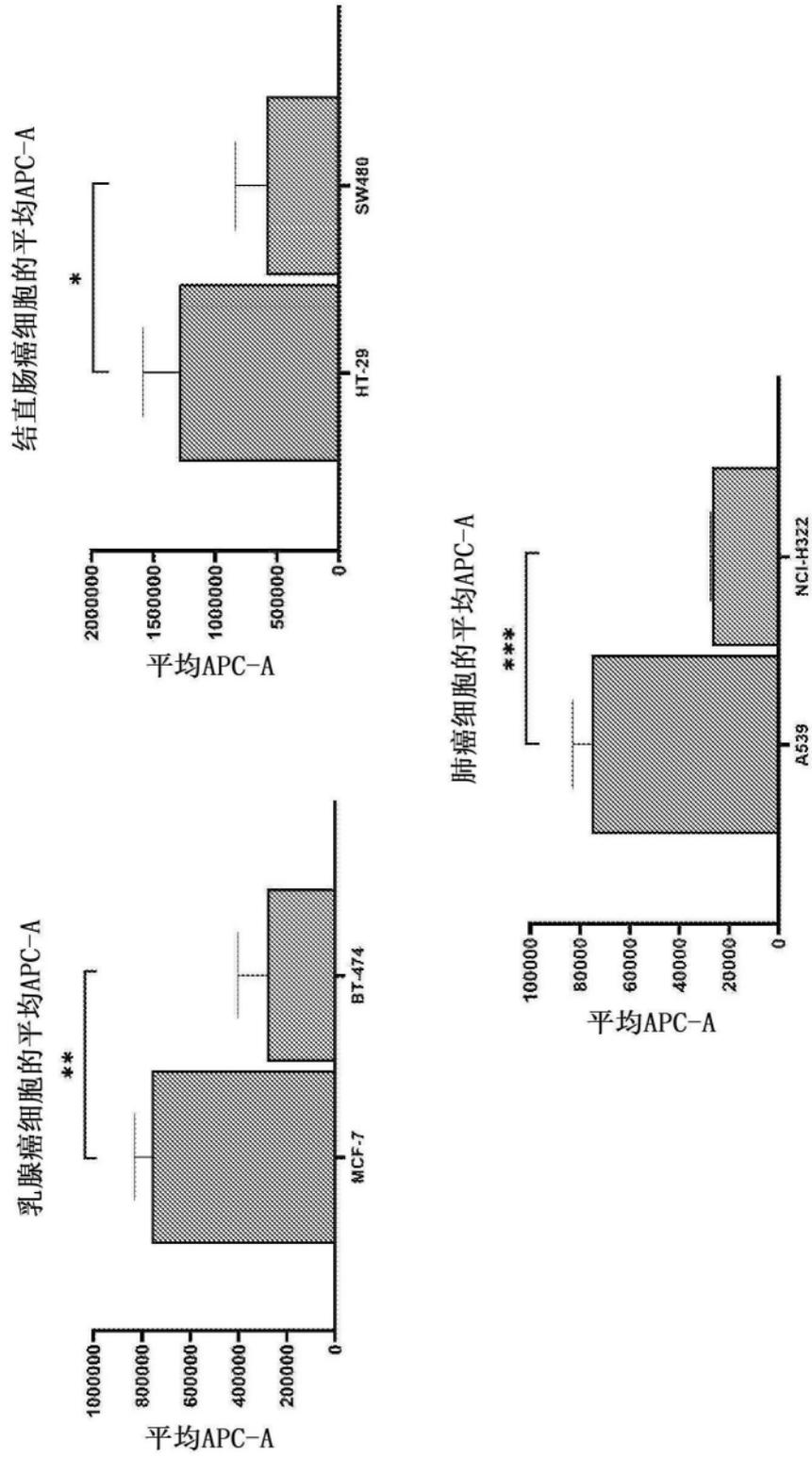


图13续

背景调整的用来自细胞质膜的  $\beta$  和  $\gamma$  肌动蛋白  
探测的斑点印迹强度，作为总膜信号的百分比

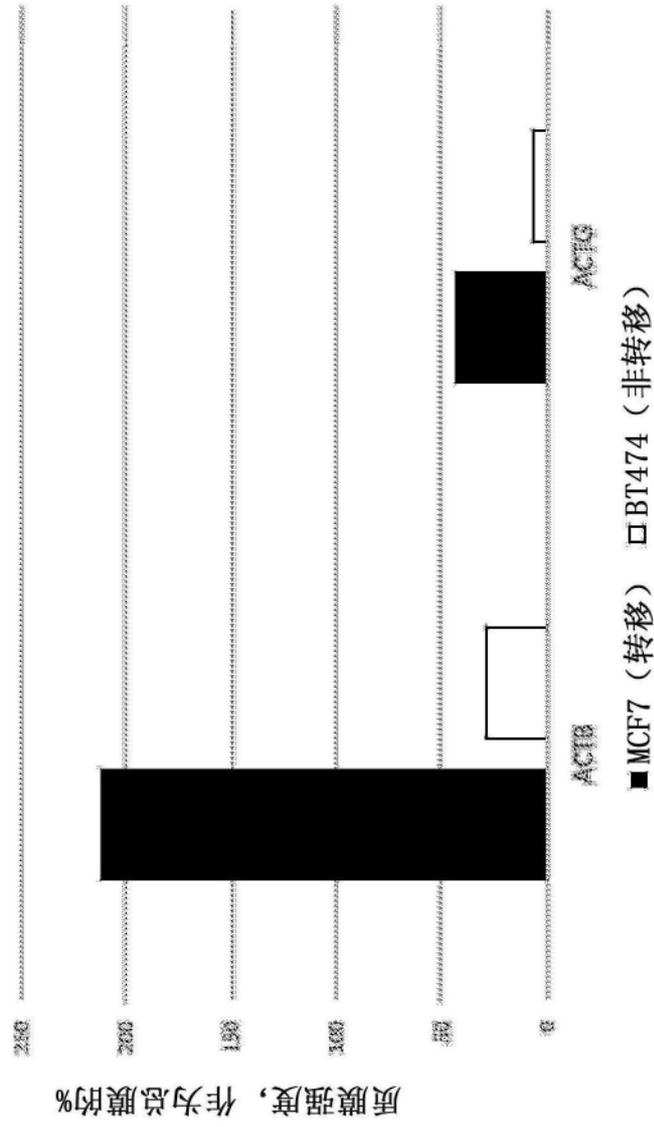


图14

对于多种肌动蛋白抗体探测的来自肺癌的微囊泡的斑点印迹

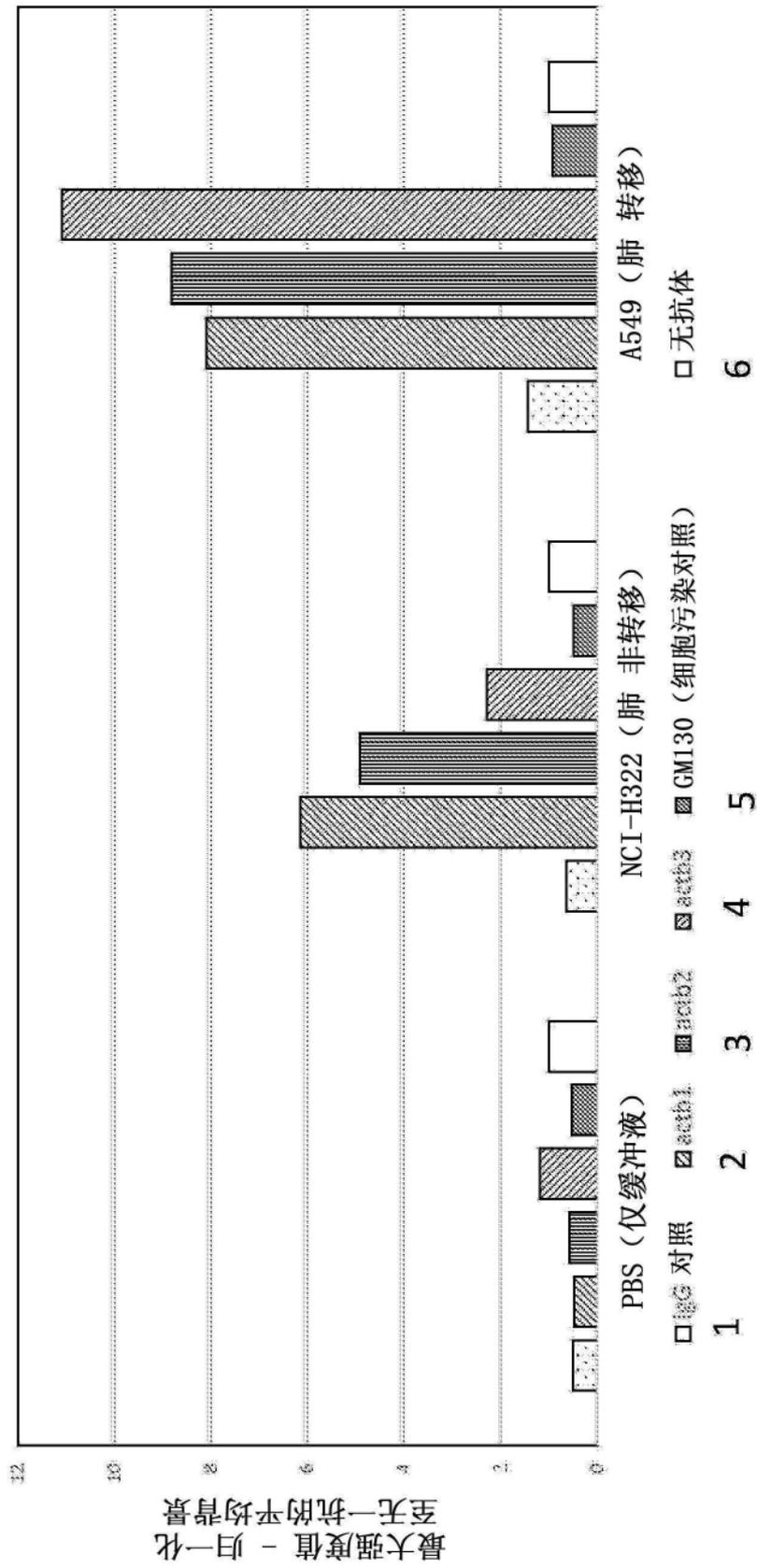


图15

**A**  
 对于多种  $\beta$ -肌动蛋白抗体探测的来自胰腺癌的微囊泡的斑点印迹

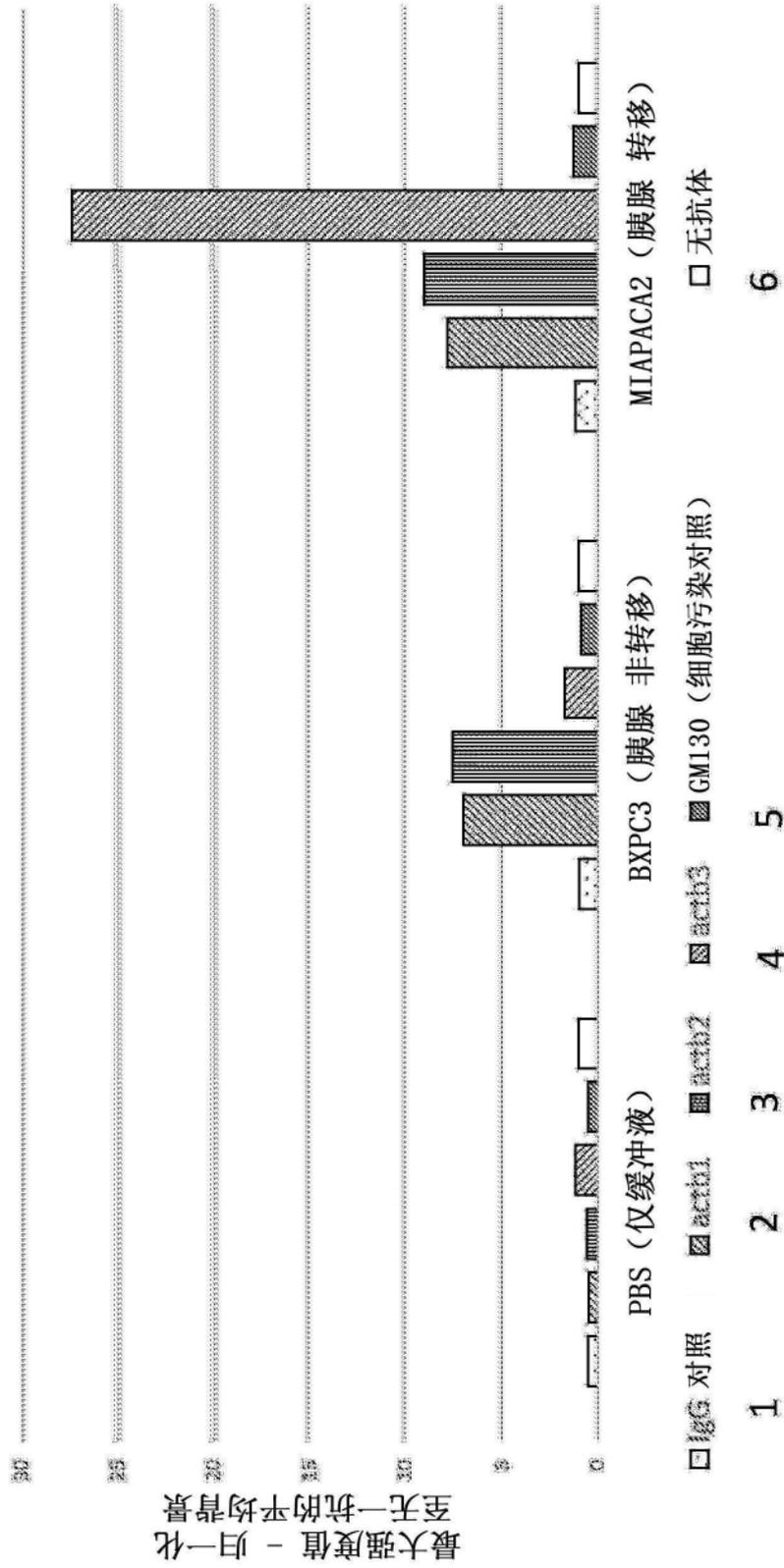


图16

B

对于  $\gamma$ -肌动蛋白抗体探测的来自胰腺癌的微囊泡的斑点印迹

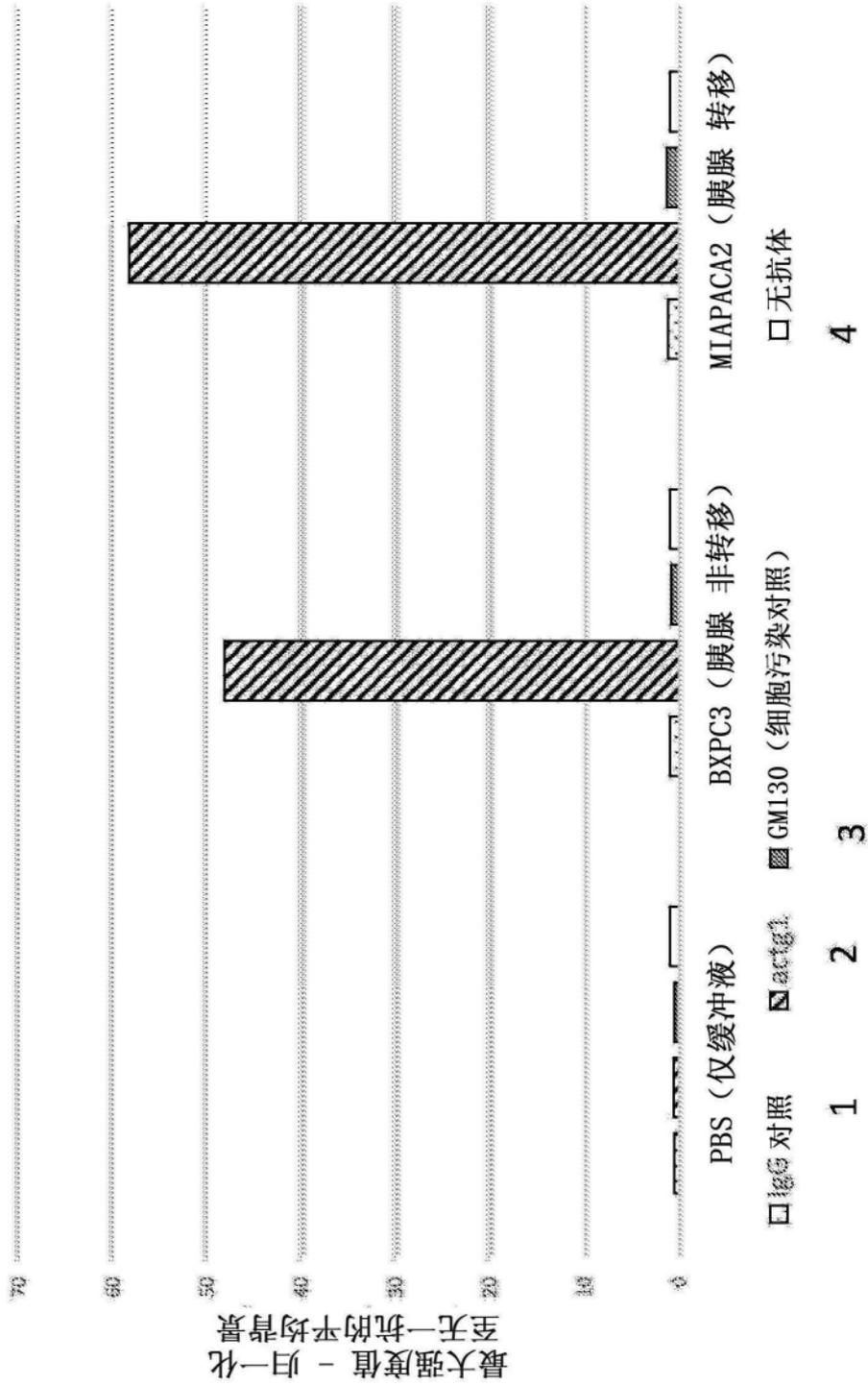


图16续

A

对于  $\beta$ -肌动蛋白抗体探测的来自乳腺癌的微囊泡的斑点印迹

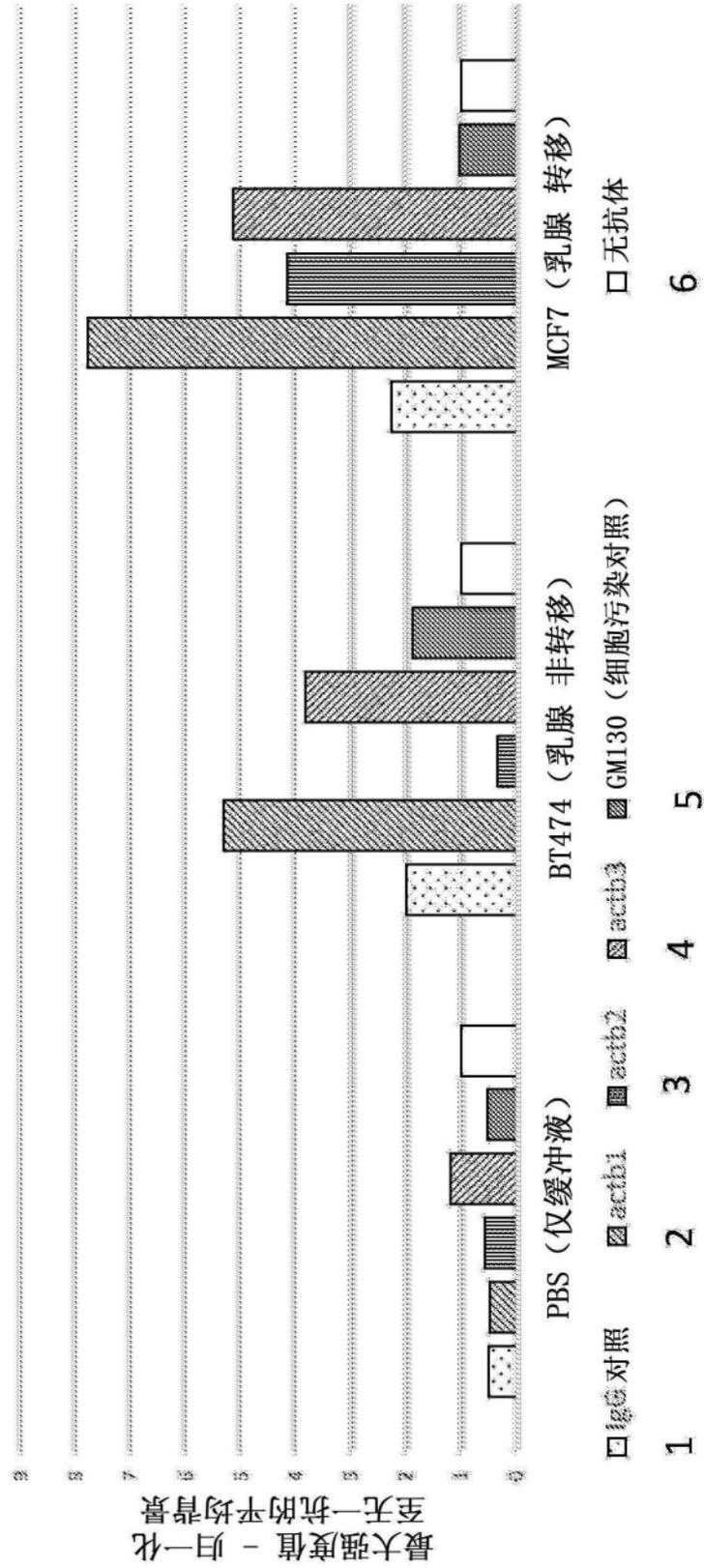


图17

B

对于  $\gamma$ -肌动蛋白抗体探测的来自乳腺癌的微囊泡的斑点印迹

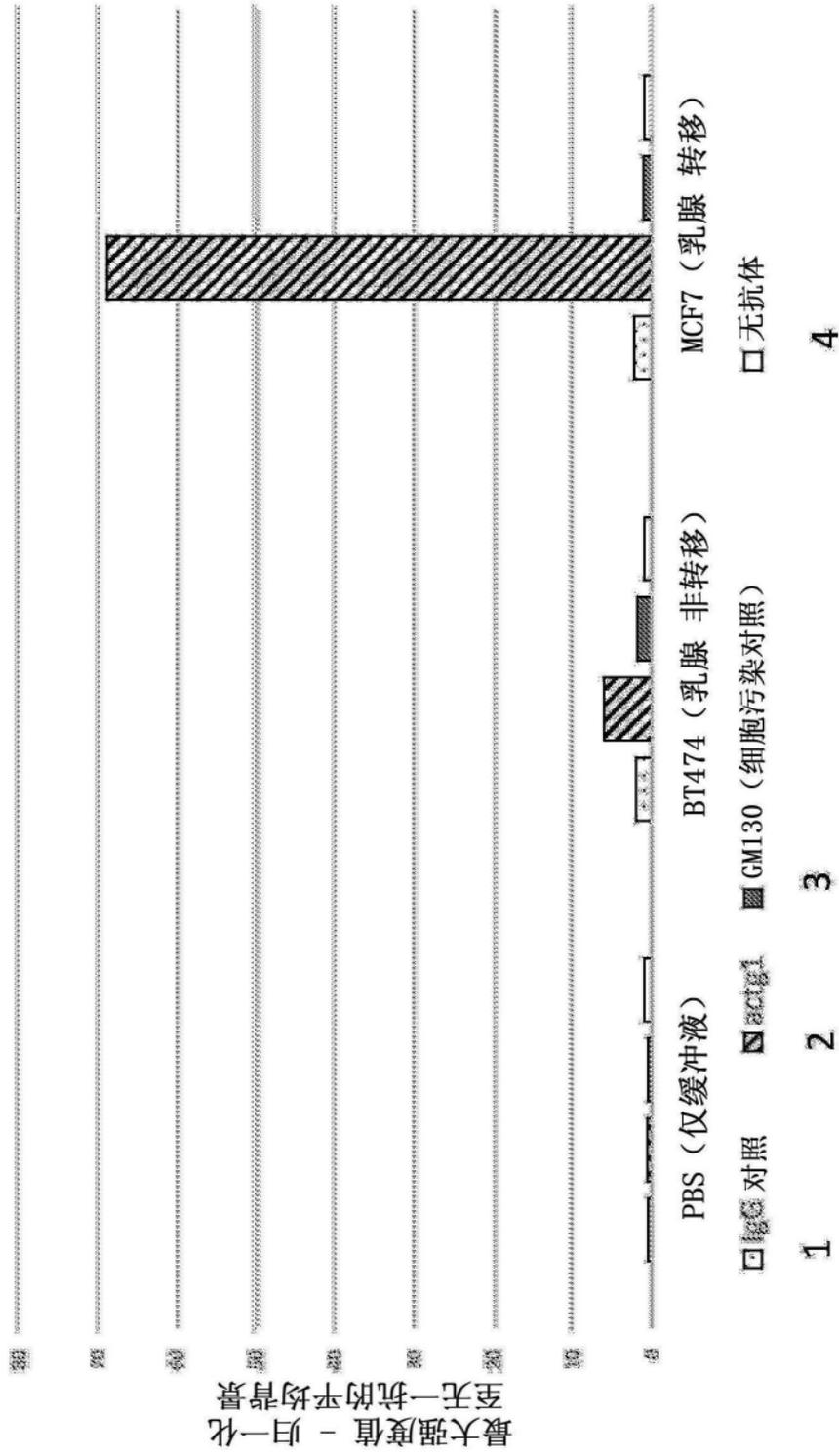


图17续

在斑点印迹中成斑点并且对于肌动蛋白探测的乳腺癌外泌体以调整至背景强度的%给出，作为IgG对照的%

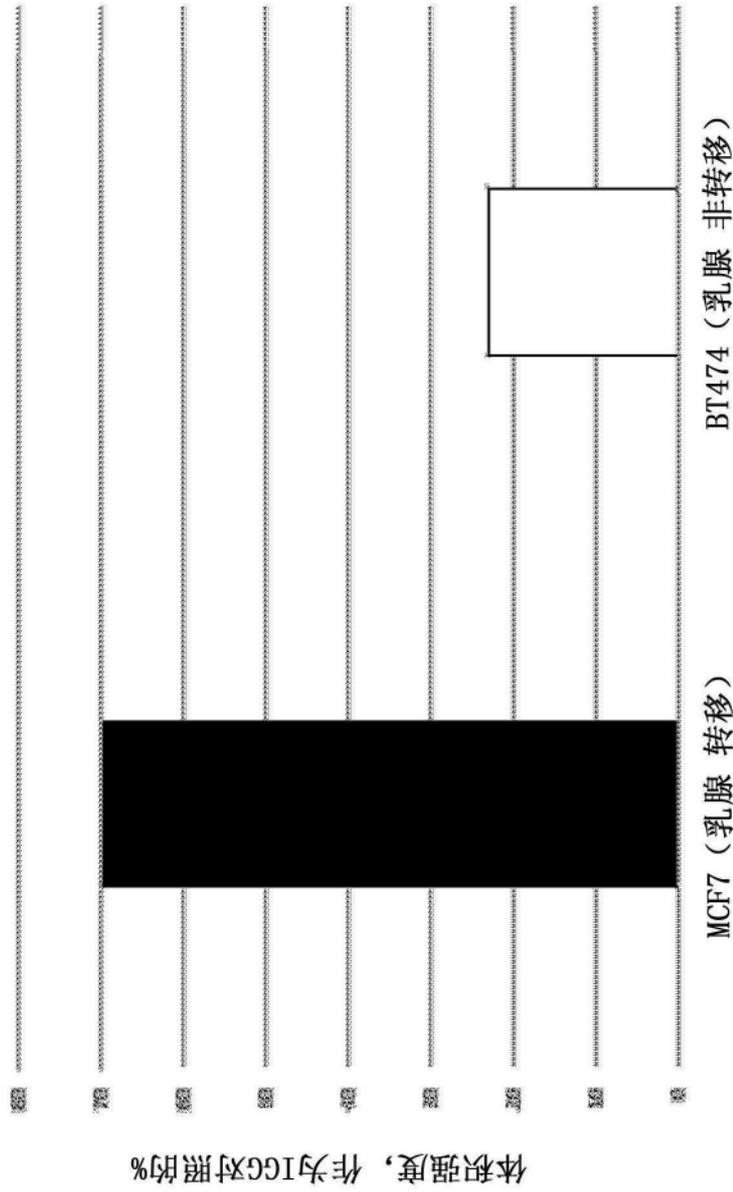


图18



通过NanoFCM，与非转移细胞相比，来自转移细胞的肌动蛋白阳性  
外泌体的成倍增加，来自总阳性外泌体作为总外泌体的百分比

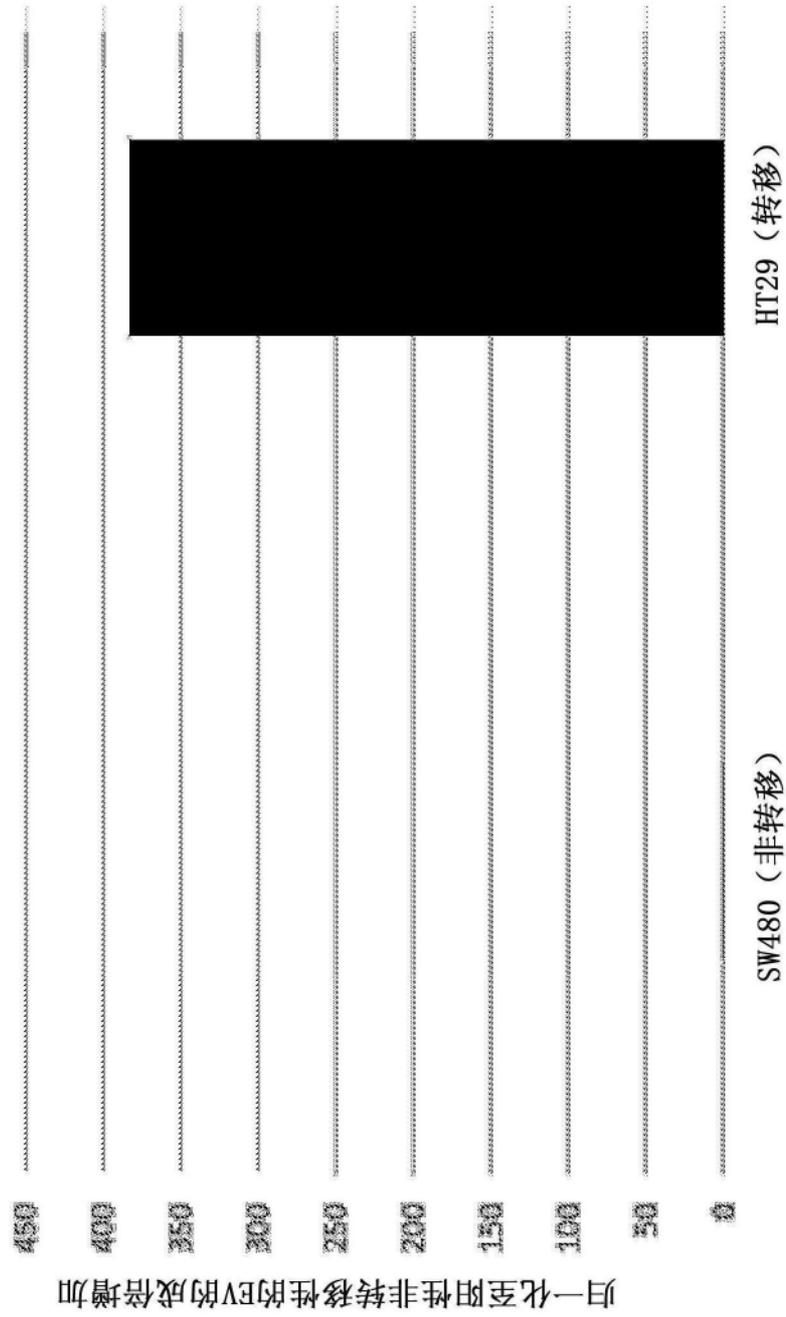


图20

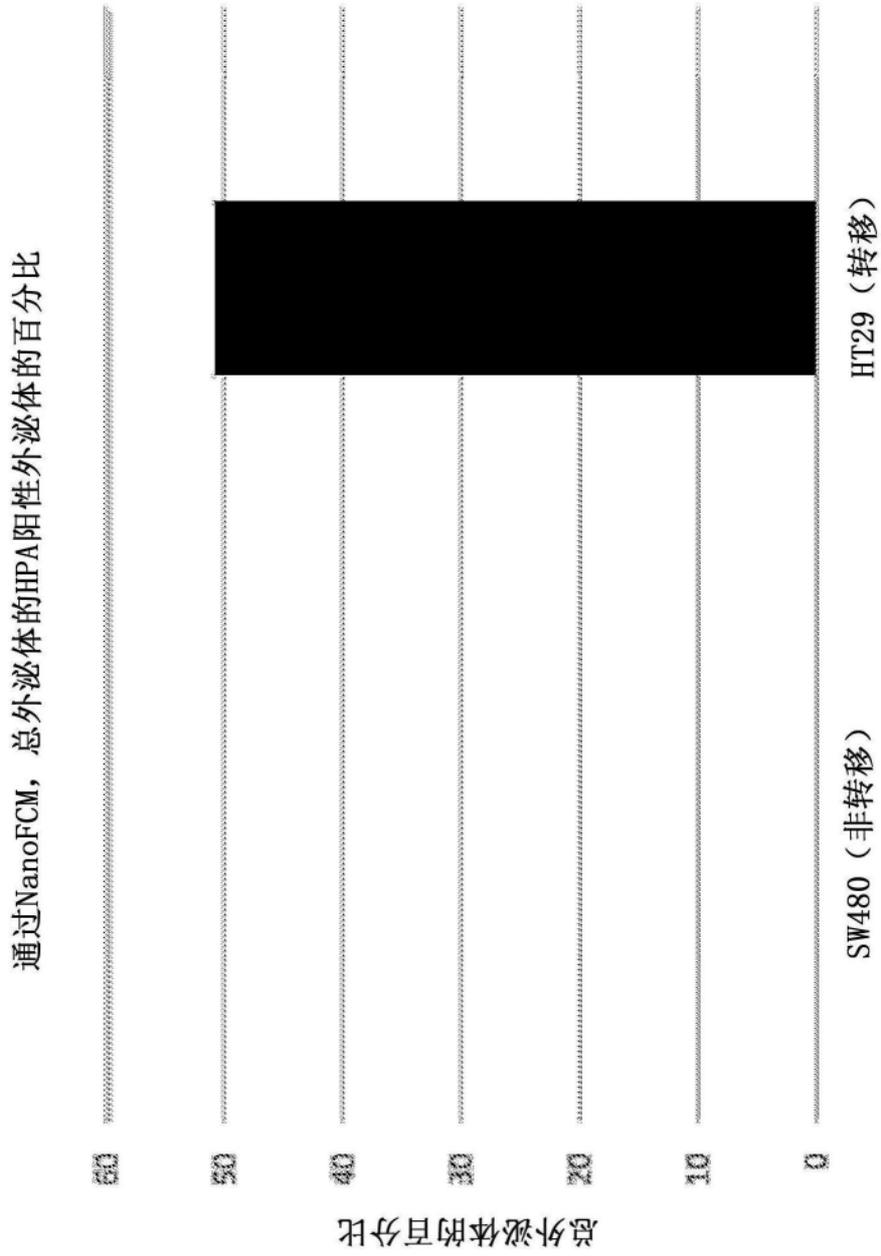


图21

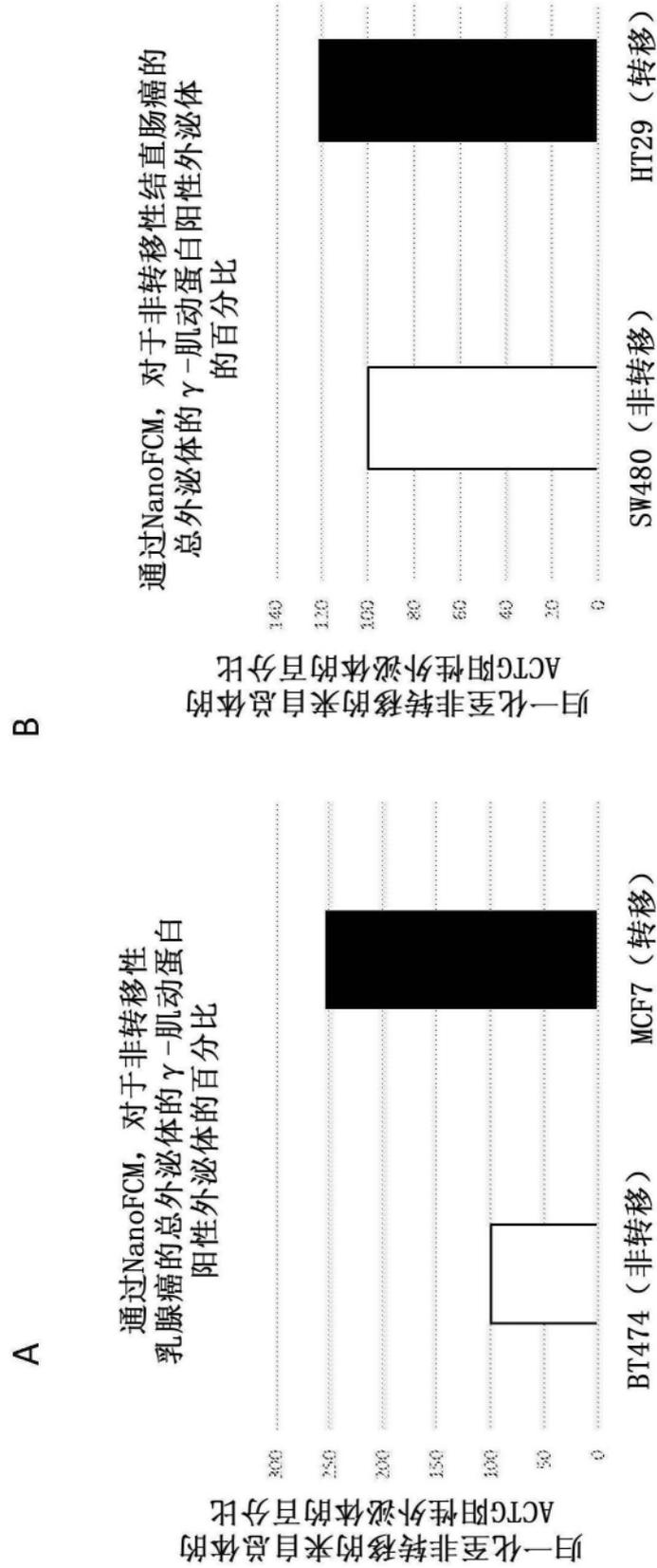


图22