

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 5/08 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780029201.2

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101501187A

[22] 申请日 2007.6.5

[21] 申请号 200780029201.2

[30] 优先权

[32] 2006.6.6 [33] US [31] 60/811,095

[86] 国际申请 PCT/US2007/013167 2007.6.5

[87] 国际公布 WO2007/145901 英 2007.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.6

[71] 申请人 田纳西大学研究基金会

地址 美国田纳西

[72] 发明人 C·丁奇 V·屈克考夫

T·伊甘托娃

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

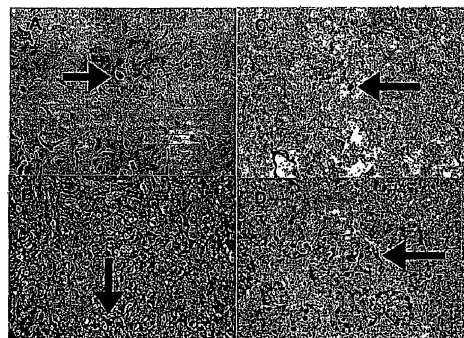
权利要求书 3 页 说明书 33 页 附图 7 页

### [54] 发明名称

富含增生干细胞的组合物及包含其的方法

### [57] 摘要

本发明描述了根据 OCT4 转录因子的表达被富集的增生干细胞群及其鉴别、分离和富集方法。所述 OCT4 - 富集的增生干细胞群进一步用于在动物中诱导和分析癌症。另外,本发明进一步提供了通过抑制 OCT4 而预防、消除或者抑制癌症、肿瘤生长和转移的方法。



1. 根据 OCT4 表达被富集的分离的赘生干细胞群。
2. 权利要求 1 的细胞群，其中所述细胞群特征在于 OCT4<sup>hi</sup> 表达。
3. 包含权利要求 1 的细胞群的组合物。
4. 权利要求 3 的组合物，其进一步包含细胞培养基，大约 50% 的所述培养基衍生自人原代包皮成纤维细胞培养基培养物。
5. 权利要求 4 的组合物，其中所述培养基包含最多直至大约 15% 的血清。
6. 权利要求 4 的组合物，其中所述培养基被消耗了 EGF、FGF2、胰岛素或者其组合。
7. 鉴别赘生干细胞的方法，包括如下步骤：
  - (a) 将赘生性细胞群与和 OCT4 特异性相互作用的物质接触；及
  - (b) 鉴别与所述物质特异性相互作用的细胞；从而鉴别赘生干细胞。
8. 分离赘生干细胞的方法，包括如下步骤：
  - (a) 将赘生性细胞群与和 OCT4 特异性相互作用的物质接触；及
  - (b) 分离与所述物质特异性相互作用的细胞；从而分离赘生干细胞。
9. 权利要求 7 或 8 的方法，其中所述物质包含核酸。
10. 权利要求 7 或 8 的方法，其中所述物质是 OCT4 抗体。
11. 权利要求 7 或 8 的方法，其中所述鉴别进一步包括使用荧光显微镜或者荧光激活细胞分选仪(FACS)。
12. 权利要求 7 或 8 的方法，其中所述赘生性细胞得自实体肿瘤。

13. 权利要求 7 或 8 的方法，其中所述赘生性细胞是转移细胞。

14. 对赘生干细胞富集赘生性细胞群的方法，包括如下步骤：

- (a) 将包含多种癌细胞的混合细胞群与载体接触，所述载体包含与 Oct4 启动子可操纵地连接的抗生素抗性基因；及
- (b) 在存在所述抗生素的条件下培养所述细胞；  
从而对赘生干细胞富集赘生性细胞群。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述培养是在细胞培养基中进行，其中 50%的所述培养基衍生自人包皮成纤维细胞的原代培养基。

16. 权利要求 14 的方法，其中所述混合细胞群衍生自细胞系。

17. 权利要求 14 的方法，其中所述混合细胞群是衍生自肿瘤的原代细胞培养物。

18. 一种诱导癌症的方法，其包括如下步骤：

将根据 OCT4 表达被富集的赘生干细胞群导入哺乳动物中；从而诱导癌症。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述赘生干细胞群在体内诱发原位肿瘤。

20. 权利要求 18 的方法，其中所述赘生干细胞群在体内诱发异位肿瘤。

21. 权利要求 18 的方法，其中所述赘生干细胞在体内诱发转移。

22. 一种体内分析癌症进展和/或发病机制的方法，包括如下步骤：

- (a) 将 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞移植进动物体内；及
- (b) 分析所述动物中的癌症进展和/或发病机制；  
从而体内分析癌症进展和/或发病机制。

23. 权利要求 22 的方法，进一步包括标记所述 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞的步骤。

24. 权利要求 22 的方法，其中分析癌症进展包括确定细胞转移。

25. 权利要求 22 的方法，其中分析癌症进展包括确定肿瘤进展。

26. 权利要求 22 的方法，进一步包括给予感兴趣的物质的步骤。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述物质是治疗剂。

28. 抑制赘生性细胞中 OCT4 表达的物质在制备治疗、消除或抑制癌症的药物组合物中的应用。

29. 抑制赘生性细胞中 OCT4 功能的物质在制备治疗、消除或抑制癌症的药物组合物中的应用。

30. 权利要求 28 或 29 的应用，其中所述癌症包括肿瘤生长。

31. 权利要求 28 或 29 的应用，其中所述癌症包括细胞转移。

32. 权利要求 28 或 29 的应用，其中所述物质包括核酸。

33. 权利要求 28 或 29 的应用，其中所述物质是 OCT4 抗体。

## 富含赘生干细胞的组合物及包含其的方法

### 发明背景

迄今为止，赘生性细胞的分析方法对于研究目的而言既不足够有效也不足够统一。通过各种分级分离程序分离自组织样品中的赘生干细胞(neoplastic stem cell)由混合类型的细胞组成。赘生干细胞的有效分离能提供探索癌细胞生物学和疾病的基本机制的手段。本领域非常需要特异性并有效地分离和增殖细胞亚群以提供大的赘生干细胞群以在体外和体内进行研究的方法。

赘生性细胞中干细胞标记的鉴别为多种临床和基础研究应用提供颇有价值的信息。从特定的肿瘤或转移瘤中鉴别和随后分离赘生干细胞(NSC)可例如用于诊断疾病和/或开发针对发展中的病症的合理治疗措施。在一些情况中，NSC的分离和/或富集可进一步用于探索生理学和分子机制的体外研究，在其它情况中，这些细胞可用于接种实验动物以进一步研究癌症的进展或治疗。

可以使用如FACS(图10)或抗生素选择测定法等技术淘选NSC，这些技术不能基于生物学活性和/或生理学功能区分细胞亚群。另外，所述测定不包括天然的非抗生素表达或处理的干细胞的回收。其它细胞鉴别及随后的分离和/或富集方法如凝胶电泳方法不能探查纯细胞群，受污染干扰和/或损害细胞存活性。

### 发明概述

在一个实施方案中，本发明涉及根据OCT4表达被富集的赘生干细胞群。

在另一个实施方案中，本发明提供了鉴别赘生干细胞的方法，包括如下步骤：(i)将赘生性细胞与和OCT4特异性相互作用的物质接触；及(ii)鉴

别所述物质与之特异性相互作用的细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了分离赘生干细胞的方法，包括如下步骤：(i)将赘生性细胞与和 OCT4 特异性相互作用的物质接触；及(ii)分离所述物质与之特异性相互作用的细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了从赘生性细胞群中富集赘生干细胞的方法，包括如下步骤：(i) 将包含多种癌细胞的混合细胞群与包含和 Oct4 启动子可操纵地连接的抗生素抗性基因的载体接触；及(ii)在存在抗生素的条件下培养所述混合细胞群。

在另一个实施方案中，本发明提供了诱导癌症的方法，包括将根据 OCT4 表达被富集的赘生干细胞群导入哺乳动物中。

在另一个实施方案中，本发明提供了体内分析癌症进展和/或发病机制的方法，包括如下步骤：(i)将 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞移植进动物中；及(ii)分析动物体内癌症进展和/或发病机制。

在另一个实施方案中，本发明提供了消除或抑制癌症的方法，包括如下步骤：将赘生性细胞与抑制 OCT4 在所述赘生性细胞中表达或功能的物质接触。

在另一个实施方案中，本发明提供了预防、消除或抑制肿瘤生长的方法，包括如下步骤：将赘生性细胞与抑制 OCT4 在肿瘤中表达或功能的物质接触。

在另一个实施方案中，本发明提供了预防、消除或抑制细胞转移的方法，包括如下步骤：将赘生性细胞与抑制 OCT4 在所述赘生性细胞中表达或功能的物质接触。

### 附图简述

本发明的主题在本说明书总结部分中特别指出并明确要求保护。然而，通过如下详细描述和附图可以对本发明的构成和实施方式以及本发明的目的、特征和优势有更好的理解。

图 1 示出了用多克隆抗 OCT4 抗体探查的实体肿瘤的一系列切片和对照切片的光学显微镜图。图 1A 是软骨肉瘤的横切面；图 1B 是骨肉瘤的横切

面；图 1C 是多形性胶质母细胞瘤(GBM)的横切面；图 1D 是用作阳性对照的人胎儿睾丸的横切面。箭头表示 OCT4 阳性细胞核。

图 2A 证实了探查 OCT4、STAT3 和 Nanog mRNA 表达的半定量 RT-PCR 的结果，其中  $\beta$ -微管蛋白和 GFAP 在代表性胶质母细胞瘤原代培养物(MT917、MT926、MT928、MT1231)和细胞系(LN18、LN229、LN428、U251)中作为归一化对照。图 2B 证实了 OCT4、STAT3 和 Nanog 蛋白质表达的 Western 印迹分析结果，其中  $\beta$ -微管蛋白和 GFAP 在细胞系(LN18、LN229、LN319、LN428、D247、U251、U373、T98G)中作为归一化对照。用抗-OCT4、抗-磷酸-STAT3 和抗-Nanog 探查印迹。

图 3 示出了在贴壁细胞培养物和漂浮的源于骨肉瘤的球体中探查 OCT4 和 nanog 基因表达的 2-D 定量 PCR 结果。基质附着的培养物示出 OCT4 和 Nanog 显著较低的表达( $p < 0.05$ )。肉球(sarcosphere)中的 OCT4 (X 轴)与 Nanog(Y 轴)表达的相关性显著高于在基质附着的培养物中的相关性( $p < 0.05$ )。

图 4 举例说明了 OCT4 siRNA 阻抑的源自瘤胶质母细胞瘤的细胞的克隆形成潜力。图 4A 证实 Western 印迹分析结果，其中转染细胞培养物中外源 OCT4 蛋白的阻抑通过用包含 DNA 序列 TTGATCCTCGGACCTGGCTAA 的特异性 OCT4 siRNA 处理而实现。图 4B 示出选择的胶质母细胞瘤细胞(MT317、LN-229、MT-917)的克隆形成频率。细胞用 eGFP (绿色荧光蛋白)和 OCT4 siRNA 共转染。一式三份进行实验，条杆表示标准误差。

图 5A 是源自 MCF-7R 乳腺癌细胞系并在甲基纤维素中培养的悬浮的乳腺球(mammasphere)的光学显微镜图像( $\times 200$ )。图 5B 是从甲基纤维素中转移出、附着于基质上并且针对 OCT4 (白色)和广谱细胞角蛋白(pancytokeratine) (灰色)表达进行免疫染色的乳腺球的荧光显微照片( $\times 200$ )。

图 6 示出针对 OCT4 表达进行探查的经免疫组织化学染色的乳腺癌肿瘤的光学显微镜照片( $\times 200$ )。黑点处表示 OCT4 阳性细胞核。图 6A 是导

管癌肿瘤的横切面,图 6B 是乳腺癌转移至脑的肿瘤横切面。箭头表示 OCT4 阳性细胞核。

图 7 是在甲基纤维素中培养的第一次分裂后的 OCT4-EGFP 转染的胶质母细胞瘤细胞的荧光显微镜图像( $\times 200$ ) (图 7A)。在几轮分裂后 OCT-EGFP 转染的细胞的胶质母细胞瘤漂浮神经球 (neurosphere) (克隆)示于图 7B。

图 8 是通过 OCT4 应答启动子表达 EGFP 的培养的乳腺癌细胞(A)、骨肉瘤(B)和胶质母细胞瘤多形细胞(C)的荧光显微镜图像( $\times 200$ )。

图 9 是通过 Nanog 应答启动子表达 EGFP 的培养的胶质母细胞瘤细胞系 Ln428 ( $\times 200$ ) (A)和骨肉瘤 OS521 ( $\times 100$ ) (B)的荧光显微镜图像。

图 10 举例说明了培养的胶质母细胞瘤细胞系 Ln428 中表达 OCT4 的肿瘤细胞亚群的 FACS 流式分离图。M2 门表示 OCT4 阳性细胞。图 10A 表示对混合的克隆 OCT4 细胞群的 OCT4 阳性细胞进行的初始 FACS 淘选。图 10B 表示对经过两代后(大约 2 周)进行 FACS 分析(B)以确定其纯度的分离的 OCT4 阳性细胞。发现这个细胞群对于 OCT4 蛋白表达是 96.16 % 纯的。

图 11 是举例说明用 OCT4-EGFR 转染的 OCT4 阳性和 OCT4 阴性 MDA MB 231 乳腺癌细胞的肿瘤形成潜力的图示。

图 12 是从任何肿瘤组织中获得 OCT4 富集的肿瘤干细胞以进行癌症相关研究包括药物开发研究的示意图。阶段 A: 细胞的制备: 1)手术切除肿瘤, 2)切碎并配制以产生单细胞悬浮液。阶段 B: 用 OCT4 应答启动子稳定标记肿瘤干细胞: 1)以单细胞悬浮液形式的肿瘤干细胞培养物用于在合适条件下扩增和选择肿瘤干细胞, 2)用包含在 OCT4 应答启动子(阶段 C)控制下的 EGFP 基因的质粒转染。阶段 C: 产生高纯度肿瘤干细胞培养物: 通过 FACS 进一步选择 EGFP 表达细胞并再次培养扩增, 获得大量培养物。阶段 D: D1, 使用严格的细胞和分子生物学技术进一步研究肿瘤干细胞。D2, 将肿瘤干细胞暴露于多种药物。阶段 E: 将分离的肿瘤干细胞接种于免疫缺陷小鼠以产生异种移植肿瘤模型, 随后进行基本效力、安全性(或无毒性)和结果研究, 产生最终药物表。

图 13 是源自 MDA-MB-435 黑素瘤细胞系的乳腺球培养物的显微镜图



像( $\times 200$ ), 经生物学标记存在表达 Oct-3/4 的 NSC。图 13A 是在甲基纤维素中培养的悬浮的源自肿瘤的球形体的光学显微镜照片。图 13B 是图 13A 示出的悬浮的源自肿瘤的球形体的荧光显微镜照片。图 13C 是在附着于基质后的肿瘤球形体的光学显微镜照片。图 13D 是图 13C 示出的附着的肿瘤球形体的荧光显微镜照片。

应意识到为了简便和明了地举例说明本发明, 图中示出的元件非必需是按比例绘制的。例如, 为了清晰起见, 一些元件的尺度相对于其它元件而过大。再者, 在认为合适的情况中, 参考数字在图中可重复出现以表示相应或类似元件。

### 发明详述

在如下的详细描述中, 阐述了许多特定细节以深入理解本发明。然而, 本领域技术人员理解可以不利用这些特定细节实施本发明。换句话说, 熟知的方法、程序和成分未被详细描述, 以使得本发明不晦涩。

虽然本文举例说明和描述了本发明的某些特征, 但是本领域技术人员可以对本发明进行一些修改、取代、改变和等价改变。因此, 应理解所附权利要求书是用于覆盖在本发明真正精神范围内的这种修改和改变。

在一个实施方案中, 本发明包含根据 OCT4、Nanog、STAT3 表达或其组合被富集的赘生干细胞(NSC)群。在另一个实施方案中, NSC 代表包含赘生性细胞的群中的细胞亚群, 其在较长的时间内能起始和维持癌症。在另一个实施方案中, NSC 驱动肿瘤形成和生长(图 11)。在另一个实施方案中, 如本文所用术语“驱动”是指引导(guide)、控制(control)、指导(direct)、起始(initiate)、经历(go through)、渗透(penetrate)等其组合。

在另一个实施方案中, NSC 包含如长寿命、自我更新和静止状态等性质。在另一个实施方案中, NSC 包含增强的浸润能力。在另一个实施方案中, NSC 是多能的、自我更新的且能从肉瘤中产生增殖性肉球、从脑瘤中产生神经球及从乳腺癌中产生乳腺球(图 5)。在另一个实施方案中, NSC 在体外培养 1-100 代期间能保持其自我更新潜力。在另一个实施方案中, NSC 在体外培养 1-90 代期间能保持其自我更新潜力。在另一个实施方案中, NSC

在体外培养 20-60 代期间能保持其自我更新潜力。在另一个实施方案中，NSC 表达参与 NSC 的特异性功能和/或自我更新的基因，如 OCT4、Nanog、STAT3 或其组合。

在另一个实施方案中，本发明提供了实体肿瘤代表源自共同的生成细胞或 NSC 的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了肿瘤代表源自共同的生成细胞或 NSC 的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 表型与正常干细胞表型在许多方面相似。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 表型与正常干细胞表型完全不同，导致异常发育谱的不规则性。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 表型与正常干细胞表型完全不同，导致与缺少关键增殖控制有关的不规则性。

在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 群包含真 NSC 或亲代 NSC 与源自 NSC 的祖先赘生性细胞的混合物。在另一个实施方案中，本发明提供了源自 NSC 的祖细胞在关键方面与亲代 NSC 不同。在另一个实施方案中，本发明提供了关键方面的不同包括高增殖动力学。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 典型以相对于总癌细胞群非常低的百分比存在，其与环境的“不友善 (hostility)”大致相关(即天然环境如原发乳腺组织位置中的乳腺 NSC 相对于位于转移的和/或外部位置如脑中的乳腺 NSC)。

在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 0.001-1%的亲代原发癌细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 0.005-1%的亲代原发癌细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 0.01-0.1%的亲代原发癌细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 0.05-0.1%的亲代原发癌细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 0.005-0.01%的亲代原发癌细胞群。

在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 1-80%的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 1-10%的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 7-14%的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 15-25%的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 10-30%的永久癌细胞系亲

代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 30-50% 的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 20-40% 的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 50-80% 的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 1-5% 的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 5-10% 的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 3-8% 的永久癌细胞系亲代的细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 7-10% 的永久癌细胞系亲代的细胞群。

在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 1-100% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 1-10% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 10-30% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 30-50% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 50-75% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 75-100% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 30-80% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 20-90% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 10-100% 的亲代转移癌细胞群细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 包含大约 20-40% 的亲代转移癌细胞群细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了大块癌细胞(BCC)包含来自原发实体肿瘤的大部分癌细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 BCC 包含来自衍生自癌症的永久培养细胞系的大部分癌细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了 BCC 群缺乏干细胞特征。在另一个实施方案中，本发明提供了 BCC 群缺乏 OCT-4 表达。

在另一个实施方案中，本发明的方法提供了从癌组织活检样品和永久癌细胞系中分离 NSC，其通过选择被预先处理并被生物标记以进行检测的 NSC 进行。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了用 DNA 载体稳定转染 NSC，所述 DNA 载体表达由 Oct-4 应答启动子调节的荧光或发光蛋白(图 12)。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了使用荧光生物标记的 FACS 淘选从总癌细胞群中分离 NSC，由此获得高纯度培养物。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了使用对表达由 Oct4 启动子驱动的 GFP(绿

色荧光蛋白)的那些细胞进行 FACS 淘选以从总癌细胞群中分离 NSC, 由此获得高纯度培养物(图 9)。

在另一个实施方案中, 本发明的 Oct-4 CDNA 序列包含序列:  
 tccttcgcaagccctcattcaccaggccccggcttggggcgccttctcccatggcgggacacctggcttcggattcgcctct  
 cggccccctccaggtggtggaggtgatggccagggggccggagccgggctgggtgatcctcggacctggctaagctccaagg  
 ccctcctggaggccaggaatcgggccgggggtggccaggctctgaggtgtggggattccccatgccccccgcgatgagt  
 tctgtgggggatggcgtactgtggcccccaggtggagtggggctagtgcaccaaggcggctggagacctctcagctgagggc  
 gaagcaggagtcggggtggagagcaactccgatggggcctccccggagccctgcaccgtcaccctggtgccgtgaagctggag  
 aaggagaagctggagcaaaaccggaggagtcccaggacatcaaagctctgcagaaagaactcgagcaattgccagctcctga  
 agcagaagaggatcacctgggatatacacaggccgatgtggggctcacctgggggttctatttgggaaggtattcagccaaacga  
 ccatctgccgtttgaggctctgcagcttagcttcaagaacatgtgtaagctcggcccttctgcagaagtgggtggaggaagctgac  
 aacaatgaaaatcttcaggagatatgcaaagcagaaccctcgtgcaggcccgaagagaaagcgaaccagtatcgagaaccgagt  
 gagaggcaacctggagaattgtcctgcagtcccgaaccacactgcagcagatcagccacatgccagcagcttgggctcga  
 gaaggatgtggtccgagtggttctgtaaccggcgcagaaaggcaagcagatcaagcagcagactatgcacaacgagaggattttg  
 aggctgctgggtctcctttctcagggggaccagtgtccttctcttggccccagggccccatttggtagccagctatgggagccctc  
 acttcaactgactgtactcctcggctccctttccctgagggggaagcctttccccctgtctccgtcaccactctgggctcctccatgcattca  
 aactgaggtgcctgcccttctaggaatgggggacagggggaggggaggagctagggaaagaaaacctggagttgtccaggggtt  
 ttgggattaagttcttctcactaaggaaggaattgggaacacaaagggtggggcaggggagttggggcaactggttggagggga  
 aggtgaagttcaatgatgctcttgatttaatcccacatcatgtatcactttttctaaataaagaagcctgggacacagtaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ. ID NO: 1)。在另一个实施方案中, 本发明的 Oct-4  
 CDNA 包含与 SEQ. ID. NO: 1 同源的核酸序列。在另一个实施方案中, 所  
 述 Oct-4 CDNA 序列是人(Homo sapiens)Oct-4 CDNA 序列。在另一个实施  
 方案中, 所述 Oct-4 CDNA 序列来自非人物种。每种可能性均代表本发明的  
 单独实施方案。

在另一个实施方案中, 本发明的 Oct-4 CDNA 序列包含序列:  
 gtagtcctttgttacatgatgagtcagtgaaacagggaaatgggtgaatgacatttgggttaggtatttctagaagttaggtgggcagctt  
 ggaaggcagaggcacttctacagactattccttggggccacacgtaggttcttgaatcccgaatggaaaggggagattgataactggt  
 gtgttatgttctacaagtcttctgccttttaaatccagctccaggacatcaaagctctgcagaaagaactcgagcaattgccagctc  
 ctgaagcagaagaggatcacctgggatatacacaggccgatgtggggctcacctgggggttctatttgggaaggtattcagccaa  
 acgaccatctgccgtttgaggctctgcagcttagcttcaagaacatgtgtaagctcggcccttctgcagaagtgggtggaggaag  
 ctgacaacaatgaaaatcttcaggagatatgcaaagcagaaccctcgtgcaggcccgaagagaaagcgaaccagtatcgagaac  
 cgagtgagaggcaacctggagaattgtcctgcagtcccgaaccacactgcagcagatcagccacatgccagcagcttgg  
 gctcgagaaggatgtggtccgagtggttctgtaaccggcgcagaaaggcaagcagatcaagcagcagactatgcacaacgagag

gattttgaggctgctgggtctcctttctcagggggaccagtgtcctttcctctggccccagggccccattttggtaccccaggctatggga  
gccctcacttcactgcactgtactcctcggtcctttccctgagggggaagcctttccccctgtctccgtcaccactctgggtctccat  
gcattcaaactgaggtgcctgcccttctaggaatgggggacagggggaggggaggagctagggaaagaaaacctggagtttgcc  
agggttttgggattaagtcttcattcactaaggaaggaattgggaacacaaaggggtgggggcaggggagtttggggcaactggtg  
gaggggaaggtgaagttcaatgatgctcttgatttaatcccacatcatgtatcactttttctaaataaagaagcctgggacacagtaaaa  
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ. ID NO: 2)。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 CDNA 包含与 SEQ. ID. NO: 2 同源的核酸序列。在另一个实施方案中，所述 Oct-4 CDNA 序列是人 Oct-4 CDNA 序列。在另一个实施方案中，所述 Oct-4 CDNA 序列来自非人物种。每种可能性均代表本发明的单独实施方案。

在另一个实施方案中，本发明的 OCT-4 蛋白的序列包含序列：  
MAGHLASDFAFSPPPGGGGDGPGGPEPGWVDPRTWLSFQPPGGPGIGPGVGPSEV  
WGIPPCPPPYEFCGGMAYCGPQVGVGLVPQGGLETSQPEGEAGVGVESNSDGASPEP  
CTVTPGAVKLEKEKLEQNPEESQDIKALQKELEQFAKLLKQKRITLGYTQADVGLTL  
GVLFGKVFSQTTICRFEALQLSFKNMCKLRPLLQKWVEEADNNENLQEICKAETLVQ  
ARKRKRTSIENRVRGNLENLFLQCPKPTLQQISHIAQQLGLEKDVVRVWFCNRRQKG  
KRSSSDYAQREDFEAAGSPFSGGPVSFPLAPGPHFGTPGYGSPHFTALYSSVPFPEGEA  
FPPVSVTTLGSPMHSN (SEQ. ID NO: 3)。在另一个实施方案中，本发明的 OCT-4 蛋白包含与 SEQ. ID. NO: 3 同源的氨基酸序列。在另一个实施方案中，所述 OCT-4 蛋白是人 OCT-4 蛋白。在另一个实施方案中，所述 OCT-4 蛋白来自非人物种。每种可能性均代表本发明的单独实施方案。

在另一个实施方案中，本发明的 OCT-4 蛋白的序列包含序列：  
MCKLRPLLQKWVEEADNNENLQEICKAETLVQARKRKRTSIENRVRGNLENLFLQC  
PKPTLQQISHIAQQLGLEKDVVRVWFCNRRQKGKRSSSDYAQREDFEAAGSPFSGGP  
VSFPLAPGPHFGTPGYGSPHFTALYSSVPFPEGEAFPPVSVTTLGSPMHSN (SEQ. ID  
NO: 4)。在另一个实施方案中，本发明的 OCT-4 蛋白包含与 SEQ. ID. NO: 4 同源的氨基酸序列。在另一个实施方案中，所述 OCT-4 蛋白是人 OCT-4 蛋白。在另一个实施方案中，所述 OCT-4 蛋白来自非人物种。每种可能性均代表本发明的单独实施方案。

在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 应答启动子序列包含 caccaggggcccggggccagaggtcaaggctagagggtggg (SEQ. ID NO: 5)。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 应答启动子包含与 SEQ. ID. NO: 5 同源的核酸序列。在另一个实施方案中，所述 Oct-4 应答启动子序列是鼠 Oct-4 应答启动子序

列。在另一个实施方案中，所述 Oct-4 应答启动子序列来自人。在另一个实施方案中，所述 Oct-4 应答启动子序列来自非人物种。每种可能性均代表本发明的单独实施方案。

在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 1-2 任一序列至少 60%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 1-2 任一序列至少 70%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 1-2 任一序列至少 80%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 1-2 任一序列至少 90%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 1-2 任一序列至少 95%同源。

在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 应答启动子 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 5 至少 60%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 应答启动子 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 5 至少 70%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 应答启动子 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 5 至少 80%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 应答启动子 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 5 至少 90%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 应答启动子 DNA 序列与 SEQ. ID NO: 5 至少 95%同源。

在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 蛋白序列与 SEQ. ID NO: 3-4 任一序列至少 60%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 蛋白序列与 SEQ. ID NO: 3-4 任一序列至少 70%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 蛋白序列与 SEQ. ID NO: 3-4 任一序列至少 80%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 蛋白序列与 SEQ. ID NO: 3-4 任一序列至少 90%同源。在另一个实施方案中，本发明的 Oct-4 蛋白序列与 SEQ. ID NO: 3-4 任一序列至少 95%同源。

在另一个实施方案中，本发明的方法提供了高纯的生物标记的 NSC 群。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了通过利用高纯的生物标记的 NSC 群的荧光性质对其进行多方面研究(图 7-9)。

在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 5 代而

不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 8 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 10 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 15 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 20 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 25 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 30 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 35 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 40 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 45 代而不丧失其 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 50 代而不丧失其 NSC 表型。

在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 5 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 10 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 15 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 20 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 25 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 30 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 35 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 40 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 45 代且保留 Oct-4 表达。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 可以传代至少 50 代且保留 Oct-4 表达。

在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 群在延长的时间期间被扩增为大体积大量培养物而不丧失其希望的纯 NSC 表型。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了 NSC 群在延长的时间期间被扩增为大体积大

量培养物而不丧失其 Oct-4 表达。

在另一个实施方案中，针对干细胞标记富集 NSC。在另一个实施方案中，所述干细胞标记是 OCT4、Nanog、STAT3 或其组合。在另一个实施方案中，所述干细胞标记是转录因子如 OCT4。在另一个实施方案中，OCT4 在 NSC 中差异表达。在另一个实施方案中，使用基于与表面抗原的亲亲和性的富集 OCT4 表达细胞的免疫学方法。在另一个实施方案中，通过基于免疫磁性的细胞分离技术富集 NSC。在另一个实施方案中，通过基于与特异于表面抗原的抗体保温而电泳迁移率降低的电泳细胞分离技术富集 NSC。在另一个实施方案中，通过与表面抗原特异性抗体保温而降低电泳迁移率是在非加帽(non-capping)条件下进行的。在另一个实施方案中，通过荧光激活细胞分选仪(FACS)、免疫磁性珠或者磁性激活细胞分选仪(MACS)进一步富集 NSC。

在另一个实施方案中，混合的癌细胞群在非贴壁细胞培养条件下生长，其中 NSC 形成球形细胞簇(球体)，从中可以富集 OCT4 阳性 NSC。在另一个实施方案中，源自游离漂浮球体的细胞与等价的贴壁细胞培养物相比表达更高水平的 OCT4 和 Nanog mRNA，如图 3 示出。在另一个实施方案中，包含所述球体的细胞是游离漂浮的。在另一个实施方案中，在体外从乳腺癌样品富集 NSC 是使用非贴壁乳腺球细胞培养系统进行的。在另一个实施方案中，在体外从骨肉瘤细胞富集 NSC 是使用非贴壁肉球细胞培养系统进行的。在另一个实施方案中，在体外从脑瘤细胞富集 NSC 是使用非贴壁神经球细胞培养系统进行的。在另一个实施方案中，在体外从脑瘤细胞富集 NSC 是使用游离漂浮球体进行的。

在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 60%是 OCT4 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 70%是 OCT4 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 80%是 OCT4 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 80%是 Nanog 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 80%是 STAT3 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚



群至少 80%是 OCT4、STAT 3、Nanog 表达或其组合是阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 90%是 OCT4 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 90%是 Nanog 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 90%是 STAT3 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 90%是 OCT4、STAT 3、Nanog 表达或其组合是阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 95%是 OCT4 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 95%是 Nanog 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 95%是 STAT3 表达阳性的。在另一个实施方案中，富含 NSC 的癌细胞亚群至少 95%是 OCT4、STAT 3、Nanog 表达或其组合是阳性的。

在另一个实施方案中，本发明提供了通过 FACS 分析(图 10)、原位杂交、免疫组织化学或其组合确定富含 NSC 的癌细胞亚群的水平，所述方法在材料与方法章节中描述。

在另一个实施方案中，所述富含 NSC 的细胞群的特征在于 OCT4<sup>hi</sup> 表达。在另一个实施方案中，OCT4<sup>hi</sup> 表达是  $\beta$ -肌动蛋白表达的至少两倍。在另一个实施方案中，OCT4<sup>hi</sup> 表达是  $\beta$ -肌动蛋白表达的至少四倍。在另一个实施方案中，富含 NSC 的细胞群的特征进一步在于 Nanog、STAT3 的高表达或其组合。

在另一个实施方案中，OCT4、Nanog 或 STAT3 的表达水平通过 mRNA 转录水平确定。在另一个实施方案中，转录水平通过定量或半定量 PCR 或 RT-PCR 方法确定，所述方法如图 2A 所示及在材料与方法章节中描述。在另一个实施方案中，OCT4、Nanog 或 STAT3 的表达水平通过蛋白质表达水平确定。在另一个实施方案中，蛋白质表达水平通过 western 印迹分析确定，所述分析方法如图 2B 所示及在材料与方法章节中描述。在另一个实施方案中，蛋白质表达水平通过使用报道基因间接确定。在另一个实施方案中，所述报道基因包括 EGFP 构建体。在另一个实施方案中，OCT4-EGFP 转染的胶质母细胞瘤细胞培养物(图 7 和 8)中 OCT4 表达水平如在材料与方

法章节中描述确定。

在另一个实施方案中，NSC 亚群是从“软”或“硬”肿瘤中富集。在另一个实施方案中，“硬”肿瘤包括除了白血病、淋巴瘤、黑素瘤和多发性骨髓瘤之外的所有肿瘤，除外的这些肿瘤在另一个实施方案中被分类为“软”肿瘤。在另一个实施方案中，NSC 亚群从分离的转移瘤细胞中富集。在另一个实施方案中，NSC 亚群从包含源自肿瘤细胞系的细胞的组织培养物中富集。

在另一个实施方案中，本发明包含一种组合物，其包含根据 OCT4 表达被富集的 NSC 群。在另一个实施方案中，本发明包含根据 OCT4<sup>hi</sup> 表达富集的 NSC 群。在另一个实施方案中，所述组合物进一步包含如本文所述的 NSC 可以被诱导增殖并产生 NSC 子代的那些合适环境。在另一个实施方案中，NSC 子代被置于其中的所述“环境”是指影响 NSC 生长和发育的外部或外在的物理和/或化学条件的组合。在另一个实施方案中，所述环境可以是离体 (ex vivo) 或体内环境。在另一个实施方案中，循环系统(血液和淋巴系统)可以作为诱导 NSC 产生子代的体内环境。在另一个实施方案中，所述环境是离体环境，包括 NSC 置于培养箱中的细胞培养基中。

在另一个实施方案中，所述环境进一步包括包含 DMEM/F12 的细胞培养基。在另一个实施方案中，所述细胞培养基进一步包含终浓度低于 3%、更优选低于 1.5%的甲基纤维素。在另一个实施方案中，所述培养基补加了 8-20%胎牛血清(FBS)、30-70%源自人原代包皮成纤维细胞的培养基或其组合。在另一个实施方案中，所述培养基进一步包含结合 OCT4 的筛选剂。在另一个实施方案中，所述培养基进一步包含与 OCT4 应答元件相互作用的筛选剂。

在另一个实施方案中，所述培养基进一步补加了 5-50nM 孕酮、5-500 $\mu$ M 腐胺、2-100ng/ml 重组 EGF、20-40nM 亚硒酸钠、10-40 $\mu$ g/ml 运铁蛋白(transferring)、5-50 $\mu$ g/ml 胰岛素、2-100ng/ml 重组 FGF2 或其组合。在另一个实施方案中，所述培养基补加了 8-20%胎牛血清(FBS)、30-70%源自人原代包皮成纤维细胞培养物的培养基或其组合。在另一个实施方案中，

所述培养基包含核酸。在另一个实施方案中，所述培养基包含质粒 DNA。在另一个实施方案中，所述质粒 DNA 包含 OCT4 应答启动子。在另一个实施方案中，所述 OCT4 应答启动子与报道基因连接(图 8)。在另一个实施方案中，所述 OCT4 应答启动子与抗生素抗性基因连接。在另一个实施方案中，所述培养基包含 siRNA。在另一个实施方案中，所述 siRNA 反义编码抗-OCT4、抗-Nanog、抗-STAT3 或其组合。在另一个实施方案中，抗-OCT4 siRNA 通过抑制 OCT4 蛋白的从头产生(图 4A)而抑制克隆形成(图 4B)。

在另一个实施方案中，所述细胞铺板于超低附着平板中。在另一个实施方案中，所述细胞保持在 36-42°C 的温度的培养箱中。在另一个实施方案中，所述培养箱进一步保持 4-8% CO<sub>2</sub>。在另一个实施方案中，所述培养箱保持 90-100%湿度。在另一个实施方案中，细胞以 1x10<sup>2</sup>-1x10<sup>6</sup> 个细胞/cm<sup>2</sup> 终密度铺板。

在另一个实施方案中，本发明的 NSC 源自细胞系。在另一个实施方案中，本发明的 NSC 源自原代细胞培养物。在另一个实施方案中，包含 NSC 的原代细胞培养物源自肿瘤或细胞转移瘤。在另一个实施方案中，本发明包含具有 NSC 的肿瘤和细胞转移瘤。在另一个实施方案中，肿瘤和细胞转移瘤源自但非限于：肾上腺皮质癌、直肠癌症、膀胱癌、脑癌、脑干神经胶质瘤、脑瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原发神经外胚层肿瘤、松果体瘤、下丘脑神经胶质瘤、乳腺癌、类癌瘤、癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、肝外胆管癌、ewings 肿瘤家族(pnet)、颅外生殖细胞瘤、眼癌、眼内黑色素瘤、胆囊癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、性腺外妊娠滋养细胞肿瘤、头颈癌、下咽癌、胰岛细胞癌、喉癌、白血病、急性淋巴母细胞白血病、口腔癌、肝癌、肺癌、小细胞癌、淋巴瘤、AIDS-相关淋巴瘤，中枢神经系统(原发性)淋巴瘤、皮肤 T-细胞淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金病，恶性间皮瘤、黑素瘤、merkel 细胞癌、转移鳞状癌、多发性骨髓瘤、浆细胞赘生物、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生病、鼻咽癌、神经细胞瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度潜在恶性肿瘤、胰腺癌、外分泌性胰腺癌、

胰岛细胞癌、鼻旁窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体癌，浆细胞赘生物、前列腺癌、横纹肌肉瘤、直肠癌、肾细胞癌、唾液腺癌、sezary 综合征、皮肤癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、皮肤癌、kaposi's 肉瘤、皮肤癌、黑素瘤、小肠癌、软组织肉瘤、软组织肉瘤、睾丸癌、胸腺瘤、恶性甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、肉瘤、儿童异常癌(unusual cancer of childhood)、阴道癌、外阴癌、或肾母细胞瘤。

在另一个实施方案中，本发明提供了鉴别 NSC 的方法，包括将赘生性细胞与和 OCT4 特异性相互作用的物质接触，将所述物质应用于包含原代细胞培养物的细胞培养物或细胞系培养物中进行。在另一个实施方案中，NSC 亚群在“软或硬”肿瘤中鉴别。在另一个实施方案中，“硬”肿瘤包括除了白血病、淋巴瘤、黑素瘤和多发性骨髓瘤之外的所有肿瘤，除外的这些肿瘤被分类为“软”肿瘤。在另一个实施方案中，NSC 在转移瘤细胞中鉴别。

在另一个实施方案中，本发明提供了鉴别 NSC 的方法，包括将赘生性细胞与和 OCT4 特异性相互作用的物质接触，并鉴别与所述物质特异性相互作用的细胞，如本文所述。在另一个实施方案中，鉴别 OCT4 的物质与细胞膜相互作用。在另一个实施方案中，所述物质与编码 OCT4 的 POU5F1 基因或其片段相互作用。在另一个实施方案中，所述物质与编码 OCT4 的 mRNA 或其片段相互作用。在另一个实施方案中，所述物质与 OCT4 蛋白或其片段相互作用。在另一个实施方案中，所述物质与 OCT4 的特异翻译后形式相互作用，例如但非限于磷酸化的 OCT4 蛋白。

在另一个实施方案中，本发明提供了使用 DNA 探针鉴别 NSC 的方法，所述 DNA 探针与 DNA-RNA 异源双链体中 OCT4 mRNA 特异性相互作用。在另一个实施方案中，鉴别 NSC 的方法利用 RNA 探针，所述 RNA 探针与 RNA-RNA 同源双链体中的 OCT4 mRNA 特异性相互作用。在另一个实施方案中，鉴别 NSC 的方法利用肽核酸(PNA)探针，所述探针与 PNA-RNA 异源双链体中的 OCT4 mRNA 特异性相互作用。在另一个实施方案中，所述核酸或 PNA 探针进一步包含可易于鉴别的标记。在另一个实施方案中，

所述方法利用包含核酸的特异性探针,所述核酸使得可以选择性鉴别 OCT4 表达细胞。

在另一个实施方案中,本发明提供了鉴别包含与 OCT4 蛋白或其片段特异性相互作用的配体的 NSC 的方法。在另一个实施方案中,本发明提供了鉴别包含与 OCT4 蛋白或其片段特异性相互作用的配体的 NSC 的方法。在另一个实施方案中,利用单克隆或多克隆抗-OCT4 抗体检测 OCT4。

在另一个实施方案中,本发明提供了检测 OCT4 表达细胞的方法。在另一个实施方案中,所述检测方法是直接检测法,其中使用放射性标记,在另一个实施方案中包含放射性化合物如  $^{32}\text{P}$  或  $^{125}\text{I}$ 。在另一个实施方案中,直接标记包含荧光标记、化学发光标记或金标记。在另一个实施方案中,所述检测方法是间接检测法,包含与本领域技术人员已知的免疫组织化学探针相似的核酸探针。在另一个实施方案中,探针可以用半抗原或生物素标记以携带在杂交位点产生可检测事件(例如化学发光、生色或荧光)的酶。在另一个实施方案中,在需要扩大检测信号的情况中,利用特异性鉴别初级抗体的二级标记抗体。在另一个实施方案中,所述方法利用包含使得可以选择性鉴别 OCT4 表达细胞的抗体的特异探针。

在另一个实施方案中,将表达 OCT4 的异质细胞群用包含控制可鉴别报道基因产物表达的 OCT4 应答启动子的质粒转染。在另一个实施方案中,所述可鉴别基因产物包含绿色荧光蛋白例如但非限于: GFP、Emerald、Azami Green 或 ZsGreen1; 蓝色荧光蛋白例如但非限于: EBF1P 或 Sapphire; 蓝绿色荧光蛋白例如但非限于: Cerulean、ECFP、AmCyan1 或 Midoriishi-Cyan; 黄色荧光蛋白例如但非限于: ZsYellow1、PhiYFP、Citrine 或 Venus; 橙色荧光蛋白例如但非限于: Kusabira-Orange 或 mOrange; 红色荧光蛋白例如但非限于: DsRed、HcRed、mPlum、mRaspberry、mTomato、mStrawberry 或者绿色-红色荧光 Dendra。在另一个实施方案中,所述可鉴别基因产物作为表达 OCT4 与不表达 OCT4 的细胞之间的可区别标记(图 8)。

在另一个实施方案中,本发明提供了鉴别表达 OCT4 的 NSC 的方法,

包括观测探查的 NSC。在另一个实施方案中，表达 OCT4 的 NSC 的观测是通过将标记样品暴露于胶片进行。在另一个实施方案中，表达 OCT4 的 NSC 的观测可以用荧光显微镜进行。在另一个实施方案中，表达 OCT4 的 NSC 的观测可以用共焦显微镜进行。在另一个实施方案中，表达 OCT4 的 NSC 的观测可以用电子显微镜进行。在另一个实施方案中，光学显微镜用于观测表达 OCT4 的 NSC，而在另一个实施方案中，通过肉眼即可检测到信号。在另一个实施方案中，上述观测方法的结果可以在 CCD 照相机上进一步记录和/或观测。

在另一个实施方案中，本发明提供了分离赘生干细胞的方法，包括将赘生性细胞与和 OCT4 特异性相互作用的物质接触的步骤。在另一个实施方案中，应用包含原代细胞培养物的细胞培养物或细胞系培养物。

在另一个实施方案中，本发明提供了细胞分开方法，包括细胞分离方法。在另一个实施方案中，在细胞分开方法之前利用组织解离技术。在另一个实施方案中，应用如释放酶（liberase）、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、分散酶、胶原酶或其组合等酶以进行有效的组织解离。在另一个实施方案中，需要用移液管头进一步捣碎以破坏细胞聚集。

在另一个实施方案中，本发明提供了分离赘生干细胞的方法，包括将赘生性细胞与和 OCT4 特异性相互作用的物质接触，及分离与所述物质特异性相互作用的细胞，如所述。在另一个实施方案中，先前描述的鉴别赘生干细胞的方法、特别是将赘生性细胞与和 OCT4 蛋白或 mRNA 特异性相互作用的物质接触的步骤也用于分离 NSC。

在另一个实施方案中，本发明提供了用质粒转染的异质细胞群，所述质粒包含控制可鉴别和/或可选择的基因产物表达的 Oct4 应答启动子(图 8)。在另一个实施方案中，先前描述的包括使用各种可鉴别荧光蛋白序列鉴别赘生干细胞的方法也用于细胞分开方法中。在另一个实施方案中，所述可鉴别基因产物选择性用于分离 OCT4 表达细胞，产生一致的表达 OCT4 的 NSC。

在另一个实施方案中，表达 OCT4 的 NSC 在层析柱中分离，其中附着

于柱的特异于 OCT4 的抗体结合表达 OCT4 的 NSC，从而将其分开。在另一个实施方案中，与磁性颗粒共价结合且与 OCT4 特异性相互作用的物质用于在磁场中保留表达 OCT4 的 NSC。在另一个实施方案中，通过 FACS 淘选用包含荧光标记的抗体标记的表达 OCT4 的 NSC 用于从异质细胞群中分开 NSC，如图 10 所示。在另一个实施方案中，本文所述分开方法产生分离的表达 OCT4 的细胞群。

在另一个实施方案中，本发明提供了富集表达 OCT4 的 NSC 的方法。在另一个实施方案中，针对原代细胞培养物富集表达 OCT4 的细胞。在另一个实施方案中，对其应用富集表达 OCT4 的 NSC 的方法的原代细胞培养物源自软肿瘤、硬肿瘤，或者转移瘤细胞群。在另一个实施方案中，表达 OCT4 的 NSC 亚群从包含源自细胞系的细胞的组织培养物中富集。

在另一个实施方案中，本发明提供了富集表达 OCT4 的 NSC 的方法，包括用质粒转染异质细胞群，所述质粒包含控制可选择的基因产物表达的 Oct4 应答启动子(图 8)。在另一个实施方案中，所述可选择的基因编码抗生素抗性蛋白。在另一个实施方案中，所述细胞富集方法进一步包含选择剂。在另一个实施方案中，所述选择剂是抗生素，其选择性根除非 OCT4 表达细胞，产生富集的 OCT4 表达 NSC 细胞群。

在另一个实施方案中，本发明提供了诱导癌症的方法，包括将根据 OCT4 表达被富集的赘生干细胞群导入哺乳动物中。在另一个实施方案中，所述诱导癌症的方法包括导致癌症的促进细胞生长。在另一个实施方案中，诱导癌症的方法包括提供诱导癌症的转移瘤细胞。

在另一个实施方案中，分离自乳腺球、肉球或神经球的本发明 NSC 用作癌症诱导剂。在另一个实施方案中，用 NSC 接种动物。在另一个实施方案中，NSC 经静脉内注射。在另一个实施方案中，将 NSC 注射进骨中。在另一个实施方案中，NSC 经皮内、肌内或腹膜内注射进动物中。在另一个实施方案中，NSC 被直接注射至模型动物的乳腺中。在另一个实施方案中，接种包括将 NSC 注射进模型动物的脂肪垫中。

在另一个实施方案中，本发明提供了诱导癌症的方法。在另一个实施

方案中,所述诱导癌症的方法在免疫缺陷啮齿动物中进行。在另一个实施方案中,所述免疫缺陷啮齿动物是裸小鼠或大鼠。在另一个实施方案中,所述免疫缺陷啮齿动物是 SCID 小鼠。在另一个实施方案中,所述免疫缺陷啮齿动物是 NIH-III 小鼠。

在另一个实施方案中,本发明提供了诱导肿瘤或转移瘤的方法,包括将根据 OCT4 表达富集的赘生干细胞群导入哺乳动物中。在另一个实施方案中,诱导原位或异位肿瘤(图 11)。在另一个实施方案中,转移通过淋巴系统、血流、扩散机体空间或者通过植入发生。

在另一个实施方案中,本发明提供了在体内分析癌症进展和/或发病机制的方法,包括将 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞移植至动物体内,分析动物体内的癌症进展和/或发病机制。在另一个实施方案中,癌症包括癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。

在另一个实施方案中,本发明的 NSC 通过用荧光蛋白转染 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞而标记。在另一个实施方案中,可鉴别的基因产物包含如上述的多种荧光蛋白。在另一个实施方案中,所述可鉴别的基因产物包含发光蛋白。在另一个实施方案中,所述发光蛋白是荧光素酶。在另一个实施方案中,同位素用于在动物模型中追踪移植的 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞。在另一个实施方案中,所述同位素包含 <sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>109</sup>Cd、<sup>51</sup>Cr、<sup>67</sup>Cu、<sup>179</sup>Ta、<sup>111</sup>In、<sup>18</sup>F 或其组合。在另一个实施方案中,使用磁性标记进行细胞检测。

在另一个实施方案中,本发明的移植的标记的细胞用单光子发射计算机断层摄影(SPECT)扫描仪、正电子发射断层扫描仪(PET)或者单光子发射计算机断层摄影术追踪。在另一个实施方案中,在细胞是经磁性标记的情况下,使用 MRI 进行检测。在另一个实施方案中,使用背照式冷却电荷耦合器件(CCD)照相机进行发光检测。在另一个实施方案中,使用具有激发滤波片和发射滤波片的 LED 闪光灯检测荧光标记的细胞。在另一个实施方案中,使用具有大约 490nm 光纤灯的灯箱及置于该灯箱顶部的滤光片对较大的肿瘤成像。在另一个实施方案中,使用荧光解剖显微镜观测较小的肿瘤和转移



瘤，所述显微镜具有光源和在大约 490nm 的激发滤波片。在另一个实施方案中，使用彩色 CCD 摄像机以及双光子激光仪对荧光蛋白表达进行超高分辨率体内成像。

在另一个实施方案中，本发明提供了在体内分析癌症进展和/或发病机制包括确定细胞转移的方法。在另一个实施方案中，细胞转移的分析包括确定细胞在与原发肿瘤不连续的部位的发展性生长情况。在另一个实施方案中，细胞转移部位的分析包括肿瘤传播的途径。在一些实施方案中，细胞可以通过血管系统、淋巴系统、机体内腔或其组合扩散。在另一个实施方案中，细胞转移分析根据细胞迁移、传播、渗出、增殖或其组合进行。

在另一个实施方案中，本发明提供了在体内分析癌症进展和/或发病机制的方法。在另一个实施方案中，在体内癌症进展和/或发病机制的分析包括确定肿瘤进展的程度。在另一个实施方案中，所述分析包括肿瘤的鉴别(图 11)。在另一个实施方案中，肿瘤进展的分析对原始肿瘤或者“原发肿瘤”进行。在另一个实施方案中，所述分析依赖于本领域技术人员已知的癌症类型随着时间而进行(图 11)。在另一个实施方案中，在体内进一步分析源自原发肿瘤的转移细胞的继发肿瘤。在另一个实施方案中，分析了继发肿瘤的大小和形状。在一些实施方案中，进行进一步的离体分析。在另一个实施方案中，如图 1 所示评估软骨肉瘤或骨肉瘤中 OCT4 表达细胞的频率。

在另一个实施方案中，术语评估、筛选、评价和分析可互换应用。

在另一个实施方案中，如本领域技术人员所已知，在特定时间点评估转移瘤或肿瘤的病理学样品。在另一个实施方案中，进一步应用定量或定性方法评价肿瘤阻抑基因、癌基因、凋亡基因、信号转导基因、受体、转录因子、配体或其组合，所述方法包括 PCR、western-印迹、northern-印迹、southern-印迹、免疫组织化学或者原位杂交分析。

在另一个实施方案中，从病理学样品中分离肿瘤或转移瘤细胞以进行进一步分析。在另一个实施方案中，从病理学样品中分离肿瘤或转移瘤细胞并且培养生长。在另一个实施方案中，评价原发肿瘤细胞培养物的细胞

增殖潜力。在另一个实施方案中，根据上述方法从包含肿瘤或转移瘤细胞的病理学样品中分离和/或富集 OCT4 阳性细胞。在另一个实施方案中，对分离自肿瘤的 OCT4 阳性细胞进一步分析。在一些实施方案中，对所述肿瘤或转移瘤原代细胞培养物进一步应用各种物质。在另一个实施方案中，所述物质是致癌物质。在另一个实施方案中，所述物质是促凋亡剂或者分化剂。

在另一个实施方案中，本发明提供了评价致癌物质对于原代细胞培养物的作用的方法。在另一个实施方案中，所述致癌物质包括但不限于 International Agency for Research on Cancer (IARC) 的目录 1-3 中列出的致癌物质。

在另一个实施方案中，本发明提供了评价治疗剂对于源自肿瘤或转移瘤的原代细胞培养物的作用的方法。在另一个实施方案中，针对源自肿瘤或转移瘤的原代细胞培养物离体筛选治疗剂。在另一个实施方案中，所述治疗剂包含干扰素、白细胞介素、集落刺激因子、烷化剂、亚硝基脲、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、植物(长春花)碱、类固醇激素或其组合。在另一个实施方案中，所述治疗剂是化疗剂。在另一个实施方案中，所述化疗剂是非特异性的且因此在细胞周期任何阶段均可以杀死癌细胞。在另一个实施方案中，所述化疗剂是特异性的且因此在细胞周期特定阶段能杀死癌细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了源自临床肿瘤样品(无论是原发还是转移的)或者源自永久肿瘤细胞系的异质癌细胞群可以被操作以使得可以分离和增殖其各自的癌干细胞群。在另一个实施方案中，本发明提供了基于维持由 Oct3/4 转录因子的启动子驱动的荧光(或发光)蛋白表达的能力而鉴别、淘选和稳定维持 NSC 培养物亚组的方法。在另一个实施方案中，本发明提供了与 SOX-2、Nanog 和 STAT3 相一致的 Oct3/4 转录因子是胚胎发育包括自我更新过程中正常干细胞表型的调节物。

在另一个实施方案中，本发明提供了在癌症中，NSC 不具有适当的增殖控制作用，使得自我更新过程未经核查而导致在增殖部位产生发育异常组织块。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了由上述分子机制平行

调节的生物标记的应用。在另一个实施方案中，这些调节的生物标记监测给定癌细胞的“干性(stemness)”。

在另一个实施方案中，本发明可以监测 NSC 群的相对生存力和“干性”。

在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 是造成转移至全身器官的原因。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 是转移至全身器官所必需的。在另一个实施方案中，本发明提供了 NSC 是造成在治疗(即手术、放疗和化疗)后在原发部位再发癌症生长的原因。在另一个实施方案中，本发明的方法提供了可以鉴别靶向那些具有转移潜力的 NSC 的药物的平台。

在另一个实施方案中，本发明的方法使用小型化形式培养的细胞进行。在另一个实施方案中，本发明的小型化形式培养的细胞包括多孔平板。在另一个实施方案中，本发明的多孔平板包括 96 孔平板。在另一个实施方案中，本发明的多孔平板包括 384 孔平板(实施例 2)。在另一个实施方案中，本发明的多孔平板包括 1536 孔平板。在另一个实施方案中，本发明的多孔平板包括 2-5000 孔平板。在另一个实施方案中，本发明的多孔平板包括 20-3000 孔平板。在另一个实施方案中，本发明的多孔平板包括 96-2000 孔平板。

在另一个实施方案中，本发明提供了评估光动力疗法(PDT)对于肿瘤原代细胞培养物的作用的方法。在另一个实施方案中，进一步评价了单独的放疗或射频切除术或者与任何其它形式治疗剂组合对于肿瘤原代细胞培养物的作用。在另一个实施方案中，分析了化疗栓塞对于肿瘤原代细胞培养物的作用。在另一个实施方案中，分析了局部高温对于肿瘤原代细胞培养物的作用。在一些实施方案中，多种物质和条件的体内作用是希望的。

在另一个实施方案中，本发明提供了将感兴趣的物质进一步在体内给予已经移植了表达 OCT4 的 NSC 的动物的方法。在另一个实施方案中，表达 OCT4 的 NSC 表达 OCT4<sup>hi</sup>。在另一个实施方案中，物质的给予是根据本领域技术人员已知的程序进行。在另一个实施方案中，如本领域技术人员所已知，需要单次或多次给予一或多种物质。在另一个实施方案中，正如本领域技术人员所已知，所述一或多种物质是在几天至几周或者几个月至

几年的时间内给予，根据癌症的进展和/或衰退情况而定。在另一个实施方案中，所述物质是致癌物质，在另一个实施方案中其是 International Agency for Research on Cancer (IARC)的目录 1-3 中列出的致癌物质。在另一个实施方案中，所述物质是治疗剂。

在另一个实施方案中，本发明提供了研究治疗剂对于癌症进展的作用的手段(图 12)。在另一个实施方案中，评估了治疗剂对于细胞转移潜力的作用。在另一个实施方案中，评估了治疗剂对于软肿瘤的作用。在另一个实施方案中，评估了治疗剂对于硬肿瘤的作用。在另一个实施方案中，评估了治疗剂对于原发和/或继发肿瘤生长的作用。

在另一个实施方案中，在体内给予移植了 OCT4 或 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞(图 12)的动物的治疗剂包括：干扰素、白细胞介素、集落刺激因子、烷化剂、亚硝基脲、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、植物(长春花)碱、类固醇激素或其组合。在另一个实施方案中，所述治疗剂是化疗剂。在另一个实施方案中，所述化疗剂是非特异性的且因此在细胞周期任何阶段均具有杀死癌细胞的潜力。在另一个实施方案中，所述化疗剂是特异性的，因此能在特定细胞周期阶段杀死癌细胞。

在另一个实施方案中，评估了 PDT 对于移植了 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞的动物的体内作用。在另一个实施方案中，进一步评价了单独的放疗或射频切除术或者组合任何其它形式的体内治疗剂的体内作用。在另一个实施方案中，评估了化学栓塞或者局部高温对于癌症进展和/或衰退的体内作用。

在另一个实施方案中，分析了生物学疗法对于移植了源自肿瘤或原代细胞培养物的 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞的动物的体内作用。在另一个实施方案中，生物学疗法包括免疫治疗。在另一个实施方案中，免疫治疗包括使用包含衍生自 Nanog、STAT3、OCT4 或其组合的免疫原性片段的疫苗，如本文所述。在另一个实施方案中，评价了非特异性免疫调节剂的作用。在另一个实施方案中，所述非特异性免疫调节剂是卡介苗(BCG)或左旋咪唑。

在另一个实施方案中，在移植了 OCT4<sup>hi</sup> 赘生干细胞的动物中在体内针对癌症进展或衰退筛选 OCT4 修饰剂(图 12)。在另一个实施方案中，在体

内筛选 OCT4 单克隆抗体。在另一个实施方案中，在体内筛选特异于 OCT4 蛋白的胞内抗体。在另一个实施方案中，如图 4 所示进一步在体内评估 PNA、适体或者反义 siRNA。

在另一个实施方案中，本发明提供了预防、治疗、消除或者抑制癌症、肿瘤生长、细胞转移或其组合的方法，包括将赘生性细胞与抑制 OCT4 表达或功能的物质接触的步骤。在另一个实施方案中，OCT4 被瞬时抑制。在其它实施方案中，OCT4 被组成型抑制。

在另一个实施方案中，本发明提供了抑制 OCT4 的方法，包括在 DNA 水平靶向 OCT4 表达并因此抑制或消除 OCT4 转录。在另一个实施方案中，在 DNA 水平抑制 OCT4 是通过 DNA 三链结构的形成而实现。在另一个实施方案中，所述三螺旋抑制复合物称作 OCT4 基因特异性寡核苷酸，并因此抑制 OCT4 转录。

在另一个实施方案中，本发明提供了抑制 OCT4 的方法，包括在 RNA 水平靶向 OCT4 表达并因此抑制 OCT4 表达。在另一个实施方案中，RNA 是 mRNA。在另一个实施方案中，基于反义的治疗用于抑制 OCT4。在另一个实施方案中，设计与特异性 OCT4 mRNA 序列互补并因此抑制 OCT4 表达的合成寡核苷酸。

在另一个实施方案中，本发明提供了人工构建为与 OCT4 mRNA 序列杂交并因此抑制 OCT4 表达的肽核酸(PNA)。在另一个实施方案中，所述结合剂是特异性工程化的核酶，其切割 OCT4 mRNA 转录物，随之抑制 OCT4 表达。

在另一个实施方案中，抑制 OCT4 功能的方法包括靶向 OCT4 蛋白。在另一个实施方案中，OCT4 功能的抑制通过抗体与 OCT4 蛋白的特异性结合并因此抑制或消除 OCT4 蛋白与 OCT4 应答 DNA 元件的结合而实现。在另一个实施方案中，在 OCT4 免疫治疗之后产生的胞内抗体或抗体抑制或消除 OCT4 功能。

在另一个实施方案中，本发明提供了特异于 OCT4 蛋白的胞内抗体。在另一个实施方案中，胞内抗体包含通过肽接头结合在一起的重链可变结

构域与轻链可变结构域的单链，用于干扰 OCT4 蛋白与 OCT4 DNA 应答元件的结合。在另一个实施方案中，胞内抗体靶向细胞核，在此其抑制或消除 OCT4 蛋白与 OCT4 DNA 应答元件的结合。在另一个实施方案中，所述胞内抗体靶向 OCT4 蛋白上的 OCT4 蛋白 DNA 结合结构域，并因此抑制或消除 OCT4 蛋白与 OCT4 DNA 应答元件的结合。

在另一个实施方案中，本发明提供了包含 OCT4 肽的疫苗。在另一个实施方案中，所述 OCT4 肽增强 OCT4 特异性抗体。在另一个实施方案中，所述肽由全长 OCT4 基因组成。在另一个实施方案中，所述肽是 OCT4 的突变形式。在另一个实施方案中，使用 4-18 个氨基酸长度的 OCT4 肽。在另一个实施方案中，所述疫苗包含相同长度和序列的 OCT4 肽。在另一个实施方案中，所述疫苗包含长度和序列不同的 OCT4 肽的混合物。

在另一个实施方案中，使用寡核苷酸适体结合特异性 OCT4 蛋白序列，并因此抑制或消除 OCT4 蛋白结合 OCT4 DNA 应答元件。

在另一个实施方案中，本发明提供了突变的 OCT4 蛋白。在另一个实施方案中，所述突变的 OCT4 蛋白用于阻断下游 OCT4 应答基因的转录。在另一个实施方案中，所述突变的 OCT4 蛋白用于抑制或消除 OCT4 应答基因表达，野生型 OCT4 蛋白对于 OCT4 DNA 应答元件具有相似的亲和性。在另一个实施方案中，用于抑制或消除 OCT4 应答基因表达的突变的 OCT4 蛋白与野生型 OCT4 蛋白相比对于 OCT4 DNA 应答元件具有更高的亲和性。

## 材料和方法

### 组织中 OCT4、STAT3 或 Nanog 阳性细胞的免疫组织化学鉴别

如下所述对人和小鼠肿瘤活检组织进行 OCT4、STAT3 或 Nanog 免疫组织化学染色分析：将福尔马林固定的石蜡包埋组织切片(5 $\mu$ m)相继脱蜡、再水化及阻断内源过氧化物酶活性，随后在 Trilogy unmasking 溶液(Cell Marque, Hot Springs AR)中在 95 $^{\circ}$ C 进行 25 分钟抗原恢复。使用山羊 ABC Elite 试剂盒(Vector Labs, Burlingame, CA)对载玻片进行生物素封闭、血清封闭和免疫染色。在室温应用 1 小时 1:50 稀释的 OCT 3/4、STAT3 和 Nanog

的抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN)。阳性染色用 DAB (3,3'-二氨基联苯胺)检测, 亮绿 SF(淡黄)或者苏木精 (Sigma, St. Louis, MO)用作复染。或者, 收集原发乳腺癌病灶及脑和肺, 通过低温恒温器切片。将组织在低温恒温器上切成 16 $\mu$ m 切片, 分成轴面(乳腺和肺)和冠状面(脑)组。对一组进行苏木精-伊红(H&E)染色, 另一组进行免疫组织化学染色。使用如下程序进行免疫组织化学。将冷冻的乳腺、肺和脑切片进行如下处理: (1)在于 PBS 中 2% 脱脂乳和 0.3% Triton-X 中保温 1 小时; (2) 在室温在于 3% 驴血清和 0.1% Triton-X 中的 OCT4、STAT3 或 Nanog 抗体中保温过夜; (3)用 PBS 洗涤 3 次; (4)在室温于黑暗处与二级抗体保温 4 小时; (5)用 PBS 洗涤 3 次; 及(6)通过分等级乙醇脱水, 用二甲苯澄清, 及用 DPX 封片剂(44581, Fluka Biochemika)覆盖盖玻片。使用 Bio-Rad 共焦显微镜观测免疫反应性并将图像收集在计算机上以进行后续分析。

#### OCT4、STAT3 或 Nanog 阳性细胞培养物的免疫细胞化学鉴别

进行免疫组织化学染色以在人和小鼠的肿瘤活检组织原代培养物中鉴别 OCT4、STAT3 或 Nanog 阳性细胞, 通过将样品在 DMEM/F12 培养基中用 300 U/ml 的 II 型胶原酶(Gibco BRL Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA)消化 3-6 小时切成小颗粒并通过 70 $\mu$ m Cell Strainer (Becton Dickinson Lab Ware, Franklin Lakes, NJ USA)过滤以制备单细胞悬浮液。细胞然后用 PBS 漂洗除去所有培养基, 悬浮于培养基中并铺板。在细胞贴壁之后, 应用含有新鲜的 4%甲醛溶液和 0.1% Triton X-100 的固定溶液。经生物素封闭、血清封闭而封闭细胞的内源过氧化物酶活性和使用山羊 ABC Elite 试剂盒(Vector Labs, Burlingame, CA)免疫染色。在室温应用 30 分钟 1:200 稀释的 OCT 3/4、STAT3 和 Nanog 的抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN)。阳性染色用 DAB (3,3'-二氨基联苯胺)检测, 苏木精(Sigma, St. Louis, MO)用作复染。

#### OCT4-EGFP 和 Nanog- EGFP 构建体

使用先前描述的策略和技术(Gerrard et al., 2005)对 OCT4-EGFP 和 Nanog-EGFP 构建体进行工程化。使用含有 EGFP 报道基因(pEGFP1, BD

Biosciences)及在 OCT4 和 Nanog 启动子控制下的选择标记 G418 的质粒。人 OCT4 的启动子片段跨越 OCT4 基因的-3917 碱基至+55 碱基(hOCT4pr, 人 DNA 序列中第 67539 至第 71490)且含有驱动发育特异性 EGFP 表达的两个合适的调节元件。人 Nanog 的启动子片段跨越-132 碱基至+300 碱基(人染色体 12 的基因组 DNA 序列中第 697969 位至第 701269 位)。

#### 用于产生生物标记的细胞的表达载体

使用人 Oct-4 应答启动子(Oct4hP, 登记号为 AP000509 的人 DNA 序列的第 67539 至第 71490 位)构建 Oct4hP-eGFP 质粒, 利用引物 Oct4hP-F (5'-TTCCC ATG TCA AGT AAG TGG GGT GG-3')和 Oct4hP-R (5'-CGA GAA GGC AAA ATC TGA AGC CAG G-3')、使用人基因组 DNA (Promega G3041) 作为模板通过聚合酶链反应扩增。将片段克隆进 TOPO 载体(Invitrogen)中, DNA 序列的精确度通过双向 DNA 测序证实。然后通过插入在 eGFP 上游的 HindIII 和 BamHI 位点中(图 12A)将 Oct4hP 克隆进表达载体 pEGFP1 (Clontech Cat # 6086-1, Genbank Accession # U55761)中。

#### 用于从胶质母细胞瘤、骨肉瘤和乳腺癌分离以及分析 NSC 的神经球培养系统的修饰

通过在半固体甲基纤维素(MC)中采用多效生长因子-EGF、FGF2 和胰岛素抑制细胞的基质附着潜力来对由 Weiss and Reynolds (1992)提出的神经球培养系统进行修饰。在这个实验中, NSC 用如图 7 所示具有在人 OCT4 启动子控制下的 EGFP 和 G418 基因的 EGFP 报道质粒转染。

#### 病变区 (lesion) 和病灶解剖

从其各自的组织部位切下病变区和病灶, 使用具有 GFP3 滤波片(针对荧光能力)的 Leica MZ16FA 解剖显微镜和具有 RGB 滤波片的 Q-成像 Retiga EXi 单色数码相机进行体外研究和分子分析。通过使用不同的测定法进一步研究这个肿瘤材料。

#### RNA 分离与靶 cDNA 扩增

使用 RNeasy Mini 试剂盒分离总 RNA 并用 RNAase-Free DNase Set (Qiagen Sciences, MD, USA)处理, 用 DNase 处理。使用 SuperScript II



RNase H<sup>+</sup>逆转录酶第一链合成系统(InVitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)通过用 Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)引发从 1.5μg 总 RNA 中合成 cDNA。靶 cDNA 通过使用 Platinum TaqDNA 聚合酶 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)和 37 次 PCR 循环进行扩增。人 β 微管蛋白 III 引物扩增了从 Hbeta4 基因的非翻译 3' UTR 区中转录的 1356-1497bp 产物, 如 Kavallaris et al., 1997 所述。人 OCT3/4 (Accession # Z11898)、Nanog (NM 024865)、Stat3 (NM 139276)、Gata-4 (NM 002052)、Gata-6 (NM 005257)、AFP (NM 001134)、Runx 1 (NM 001754)的引物最初通过使用 Oligo5.1 程序产生。表 1 中示出了所有引物。

表 1: 用于基因表达分析的 RT PCR 引物

基因	正向引物	反向引物	产物长度 (bp)
GATA4	GCCCAAGAACCTGAATAAATCTAAG	AGACATCGCACTGACTGAGAACGTC	208
GATA6	TTCCCCACAACACAACCTACAG	GTAGAGCCCATCTTGACCCGAATAC	118
AFP	GGTGTAGCGCTGCAAACGATG	AATTTAAACTCCCAAAGCAGCACGA	210
STAT3	GGGTGGAGAAGGACATCAGCGTAA	GCCGACAATACTTTCCGAATGC	198
RUNX1	CTCAGGTTTGTCCGTCGAAGTGGAA	CCGCAGCTGCTCCAGTTCAC	216
Nanog	GCTGAGATGCCTCACACGGAG	TCTGTTTCTTGACTGGGACCTTGTC	163
OCT 3A/4	TGGAGAAGGAGAAGCTGGAGCAAAA	GGCAGATGGTCGTTTGGCTGAATA	186

巢蛋白	CAGCTGGCGCACCTCAAGATG	AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG	209
β-III 微管蛋白	CTGCTCGCAGCTGGAGTGAG	CATAAATACTGCAGGAGGGC	141
GFAP	GCTCGATCAACTCACCGCCAACA	GACCTGACAGACGCTGCTGCC	207

### Western 印迹分析

将细胞在冰上在裂解缓冲液中溶解至少 1 小时, 所述缓冲液中含有 50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1mM EDTA、1% NP40、0.1% SDS、1% 脱氧胆酸钠、1mM 钒酸钠和蛋白酶抑制剂: 5μg/ml 胃蛋白酶抑制剂、1mM 苯甲磺酰氟、10μg/ml 亮肽素、1mM NaF(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。在离心(4°C, 12000g, 10 分钟)之后, 上清的蛋白质浓度通过 BCA

Protein Assay 试剂盒(Pierce, Rockford, IL)使用 Benchmark Microplate Reader (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA USA)进行测量。将裂解物与 Laemmli 缓冲液(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)混合(1:1)。8-16%或 10-20% Tris-HCl Ready Gels (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) 的每条泳道上样 15 $\mu$ g 蛋白质并通过电泳分离。将具有转移的蛋白质的硝基纤维素膜(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)根据厂商推荐的方案封闭, 与针对 STAT3 (R&D Systems)、磷酸-Tyr705 Stat3 (Cell Signaling Technology, IL)、 $\beta$ -III 微管蛋白(BAbCO, Berkeley,CA)、 $\beta$ -肌动蛋白(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、 $\alpha$ 胎蛋白(Santa Cruz Biotech, CA)、OCT-3/4 (Santa Cruz Biotech., CA, Nanog from (R&D systems)的相应一级抗体在 4 $^{\circ}$ C 振荡保温过夜, 所述抗体在含有 5%牛白蛋白(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)的 Tris-缓冲盐水 (TBS)和 0.1% Tween-20 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA)的溶液中稀释。在具有 0.1% Tween-20 的 TBS 中洗涤后, 将印迹与小鼠或兔 IgG 的二级过氧化物酶缀合的山羊抗体(Cell Signaling Technology, IL)或者山羊 IgG 的兔抗体(Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA)保温。免疫反应条带用 ECL+ Western 印迹检测试剂(Amersham Biosciences,UK)检测 60 秒或更长时间并且曝光于 X 线胶片。

#### 转染前和转染后细胞培养基

将细胞在补加了 10% (体积/体积)胎牛血清(FBS) (HyClone, Logan, Utah USAUSA)的 DMEM/F12 培养基中在 37 $^{\circ}$ C、7.0% CO<sub>2</sub> 条件下培养。所有细胞均通过用 Gibco Cell Porator 脉冲仪电穿孔转染。细胞悬浮液中补加 10 $\mu$ g 质粒 DNA, 根据本领域技术人员已知的方案转染(图 11C)。在电穿孔之后, 将全部的悬浮液以 60000 个细胞/2ml/孔的密度铺板于具有 0.8% MC 的 DMEM/F12 中, 所述培养基中补加了孕酮(20nM)、腐胺(100 $\mu$ M)、亚硒酸钠(30nM)、运铁蛋白(25 $\mu$ g/ml)、胰岛素(20 $\mu$ g/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO USA)和生长因子 EGF (10ng/ml)及重组 FGF2 (10ng/ml)。

#### 转染的 EGFP-乳腺球克隆的选择

为了选择转染的 EGFP-乳腺球克隆, 在培养 3 天后加入 G418

(200mg/ml)。在具有 G418 的平板中，仅产生绿色 EGFP-阳性克隆，收集进行进一步处理。产生的 EGFP-阳性乳腺球用于建立具有稳定整合 EGFP 的 EGFP-亚群。表达在 Oct4 启动子控制下的 EGFP 的绿色乳腺球生长为未附着的悬浮乳腺球(图 7B)。在荧光显微镜下直接分离 EGFP 细胞(图 11D)。

### **实施例 1:**

#### **肿瘤中 OCT4 表达细胞的频率**

为了更好地研究肿瘤中表达 OCT4 的细胞的频率，对源自如下肿瘤的一系列切片进行免疫组织化学分析：骨肉瘤、胶质母细胞瘤和导管癌。图 1 所示结果表明 OCT4 阳性细胞核存在于骨肉瘤和胶质母细胞瘤中；另外，图 6A-B 所示结果表明 OCT4 阳性细胞核也分别存在于导管癌和乳腺癌转移至脑中。尽管在导管癌和乳腺癌转移中均观测到 OCT4 阳性细胞，但是与局限在导管癌的原发乳腺癌相比(图 6A)，在乳腺癌转移至脑中出现更频繁的 OCT4 阳性细胞核(图 6B)。肿瘤和转移瘤均包含 OCT4 阳性细胞，因此本发明所述的方法表明了这些 OCT4-阳性细胞在癌症治疗中是有效靶位。

### **实施例 2:**

#### **OCT4、Nanog 和 STAT3 在胶质母细胞瘤临床样品和细胞系中一致表达**

为了确定 OCT4、Nanog 和 STAT3 在胶质母细胞瘤临床样品及在细胞系 LN18、LN229、LN428 和 U251 中是否共表达，进行半定量 RT-PCR 分析及随后 western 印迹分析。图 2A 示出的结果表明 OCT4、Nanog 和 STAT3 的中等至高水平 mRNA 表达。所述蛋白质表达水平与如图 2B 示出的 mRNA 表达水平相关联，图 2B 中显现出 OCT4、Nanog 和 STAT3 的中等至高蛋白质表达水平。

### **实施例 3:**

#### **在基质附着或未附着生长的肿瘤细胞中的 OCT4 表达**

为了检验细胞-基质附着对于肿瘤细胞中 OCT4 表达的影响，使得骨肉瘤和乳腺肿瘤细胞分别作为肉球或乳腺球以基质附着或未附着形式生长。图 3 示出的结果表明 hi OCT4 和 Nanog 表达依赖于细胞附着，因此以肉球和乳腺球形式未附着生长的肿瘤细胞高水平表达 OCT4 和 Nanog，与其在

基质附着的肿瘤细胞中的抑制作用相反，在后者情况中 Nanog 和 OCT4 的表达相对较低。

#### **实施例 4:**

#### **OCT4 在培养于神经球系统中的源自神经胶质瘤的肿瘤干细胞的克隆生成中的作用**

为了检测 OCT4 基因在模型培养系统中维持自我更新的功能作用，评价 POU5F1/OCT4 基因的 siRNA 沉默(图 4)。为此，将源自三种代表性胶质母细胞瘤的肿瘤细胞(包括两个细胞系和分离自患者的肿瘤原代培养物)用 EGFP 和 OCT4 siRNA 共转染，铺板于神经球培养系统中。在平行的对照实验中，细胞用 EGFP 和混杂的对照 siRNA 共转染。在铺板后第 7 天，用 EGFP 和 siRNA 转染的克隆开始显现(图 4A)。当与对照相比时，由用 OCT4-siRNA 转染的细胞形成的具有可检测的 EGFP 的克隆的比例下降 60%以上(图 4B)。这些发现证实在处于神经球培养系统的生长抑制条件下的铺板的源自肿瘤细胞中，siRNA 对内源 OCT4 的下调导致源自肿瘤的含有 EGFP 的细胞的克隆形成显著降低。

#### **实施例 5:**

#### **用 EGFP 标记 MDA MB 231 乳腺癌细胞系评价 NSC 参与原位肿瘤形成**

通过 NSC 参与裸鼠中的原位肿瘤形成评价源自 Oct4 启动子控制下稳定表达 EGFP 的乳腺癌细胞系 MDA MB 231 的赘生干细胞的潜力。这个测定基于 EGFP 表达与内源 OCT4 基因表达相关联的假说。将用 OCT4-EGFR 构建体转染且经过 FACS 淘选的 OCT4 阳性和 OCT4 阴性 MDA MB 231 乳腺癌细胞接种于 12 只裸鼠的脂肪垫中，所述裸鼠分成 4 组，每组 3 只动物：1 组接种 5000 个 OCT4 阳性细胞/动物，2 组接种 50000 个 OCT4 阳性细胞/动物，3 组接种 500000 个 OCT4 阳性细胞/动物，4 组接种 500000 个 OCT4 阴性细胞/动物。图 11 示出用 OCT4 阳性细胞接种的动物在接种后第 37 天开始显现肿瘤；然而用 OCT4-阴性细胞接种的动物在第 50 天开始显现肿瘤。结果还表明分离的 EGFP-阳性细胞表达 OCT4、EGFP、CD44、AC133 和 ES 细胞标记 SSEA4，如表 2 所示。

**表2：在MDA-MB 231乳腺癌细胞和对照阳性干细胞中对于干细胞标记的  
FACS分析(结果以百分比表示)**

细胞 \ 标记	Oct3/4	CD44	AC133	SSEA-4
MB 231	89.67	97.02	20.04	64.80
对照干细胞	91.05	30.31	25.13	77.70

### **实施例 6**

由 Oct3/4 启动子驱动的荧光生物标记对于癌症干细胞是强的且特异性的

乳腺球培养物源自 MDA-MB-435 黑素瘤细胞系，并针对表达 Oct-3/4 的癌症干细胞的存在进行生物标记。将 MDA-MB-435 细胞用 Oct4hP-eGFP 和 CMV-mRFP 稳定转染。然后通过 FACS 淘选表达 GFP 的细胞，产生高纯的癌症干细胞群以进行进一步分析。图 13B 示出的悬浮的源于肿瘤的球体的荧光显微照片证实由 Oct3/4 启动子驱动的荧光生物标记对于癌症干细胞是强的且特异性的。另外，(图 13D) 示出的附着的肿瘤球体的荧光显微照片呈现相似的现象。这些发现证实由 Oct3/4 启动子驱动的荧光对于被生物标记以在多种系统中作为治疗靶位进行研究的癌症干细胞是强的且特异性的。

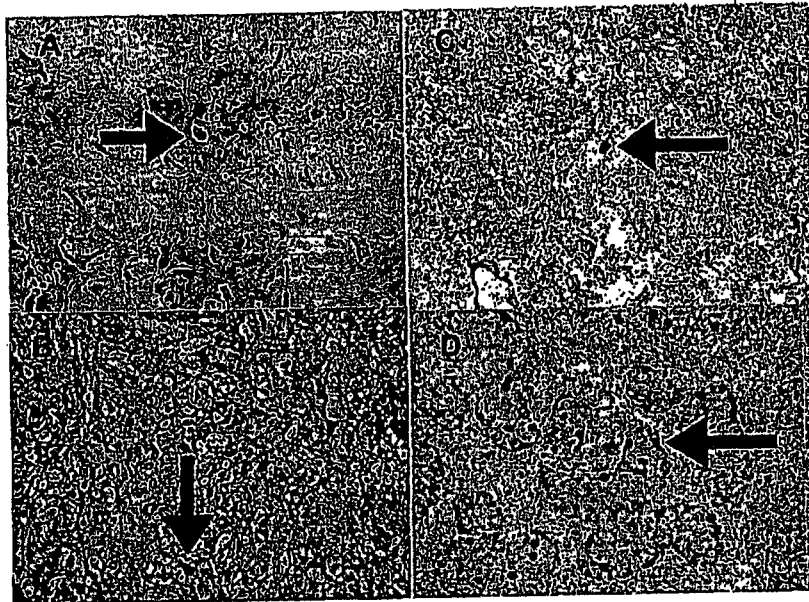


图1

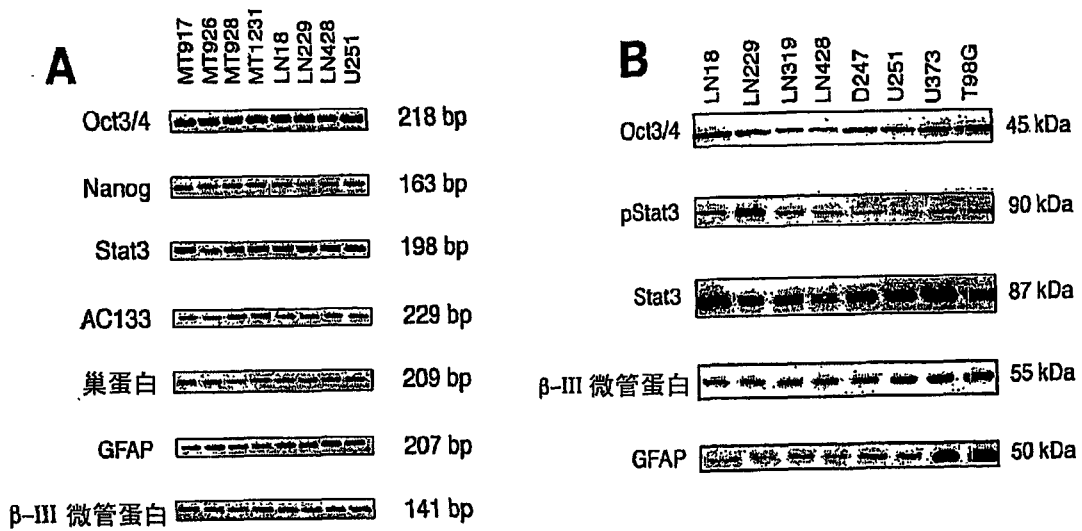


图2

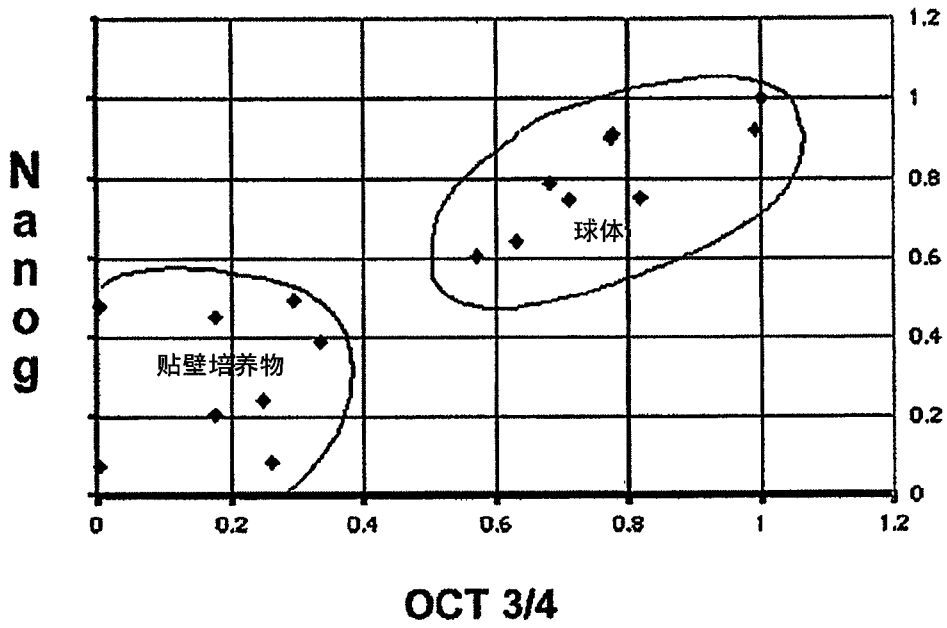


图3

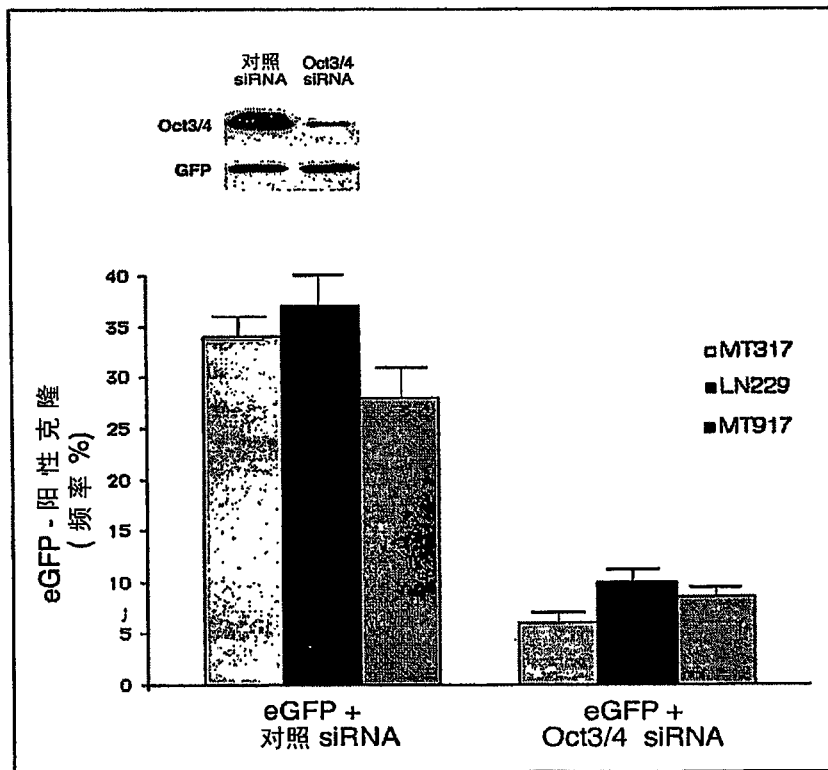


图4

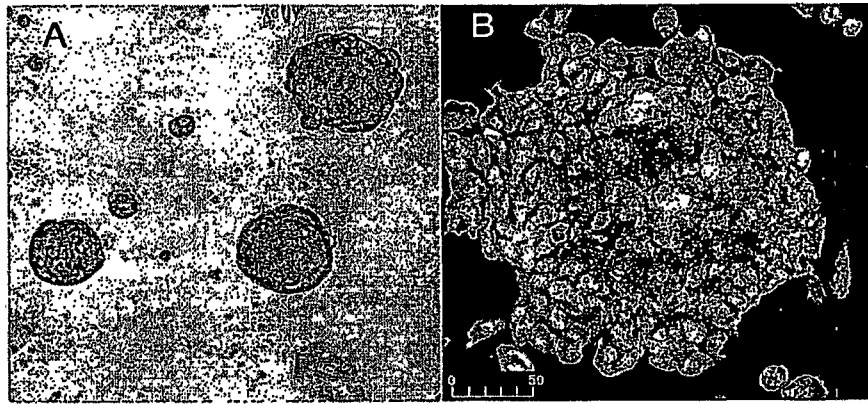


图5



图6

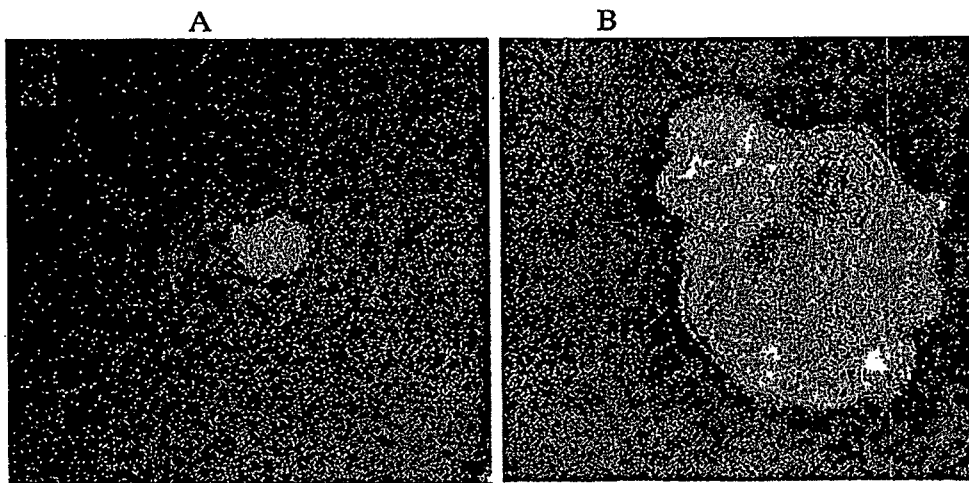


图7



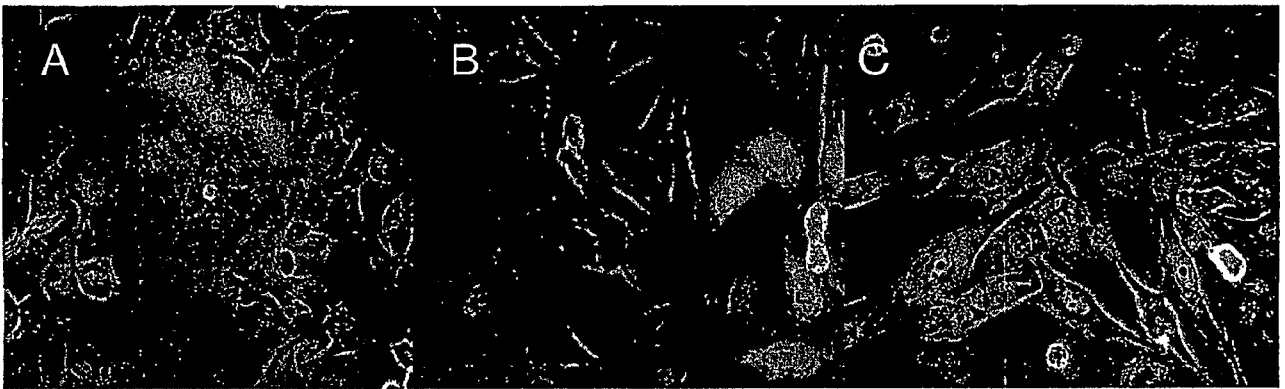


图8

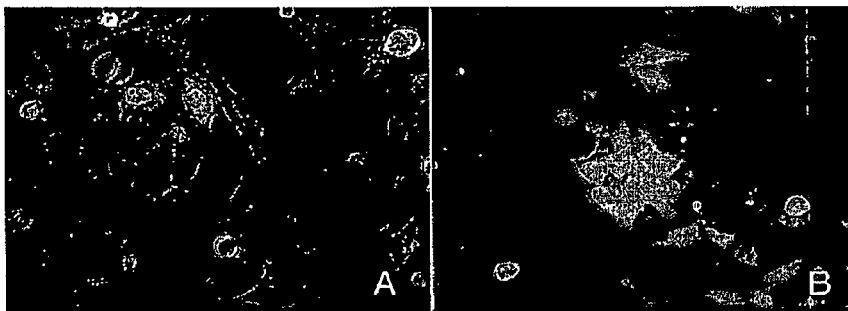
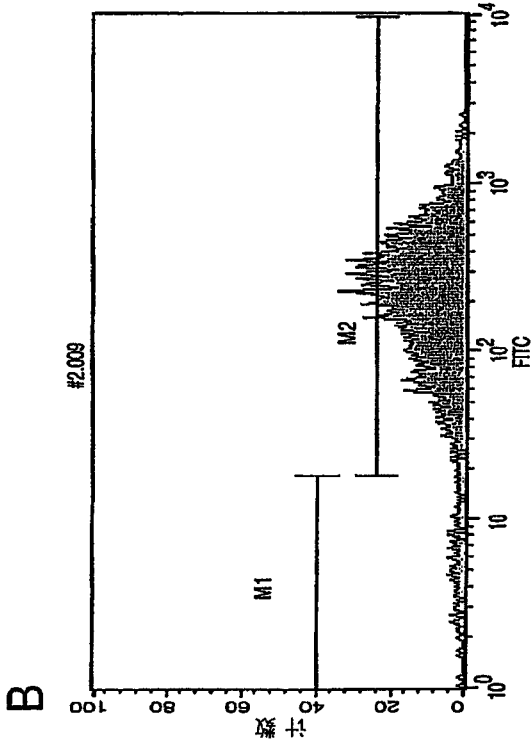


图9

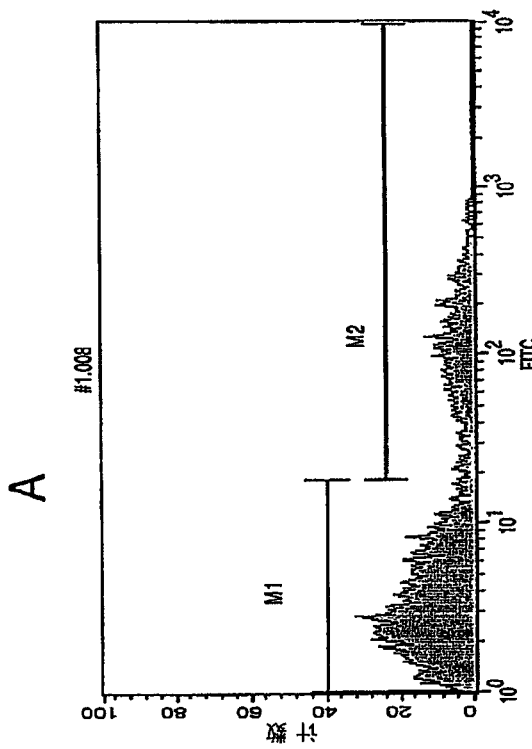


柱状图统计

File: #1.008 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: #1 Patient ID:  
 Tube: Panel:  
 Acquisition Date: 15-Mar-06 Gate: G1  
 Gated Events: 5012 Total Events: 5314  
 X Parameter: FL1-HFITC (Log)

标记左, 右	事件	% 门控	总	平均	
所有	1, 9810	5012	100.00	94.32	31.11
M1	1, 18	3915	78.11	73.67	4.08
M2	18, 9647	1097	21.89	20.64	127.55

A



柱状图统计

File: #2.009 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID: #2 Patient ID:  
 Tube: Panel:  
 Acquisition Date: 15-Mar-06 Gate: G1  
 Gated Events: 5006 Total Events:  
 X Parameter: FL1-HFITC (Log)

标记左, 右	事件	% 门控	总	平均	
所有	1, 9910	5006	100.00	95.35	280.92
M1	1, 18	192	3.84	3.66	6.87
M2	18, 9647	4814	96.16	91.70	291.84

B



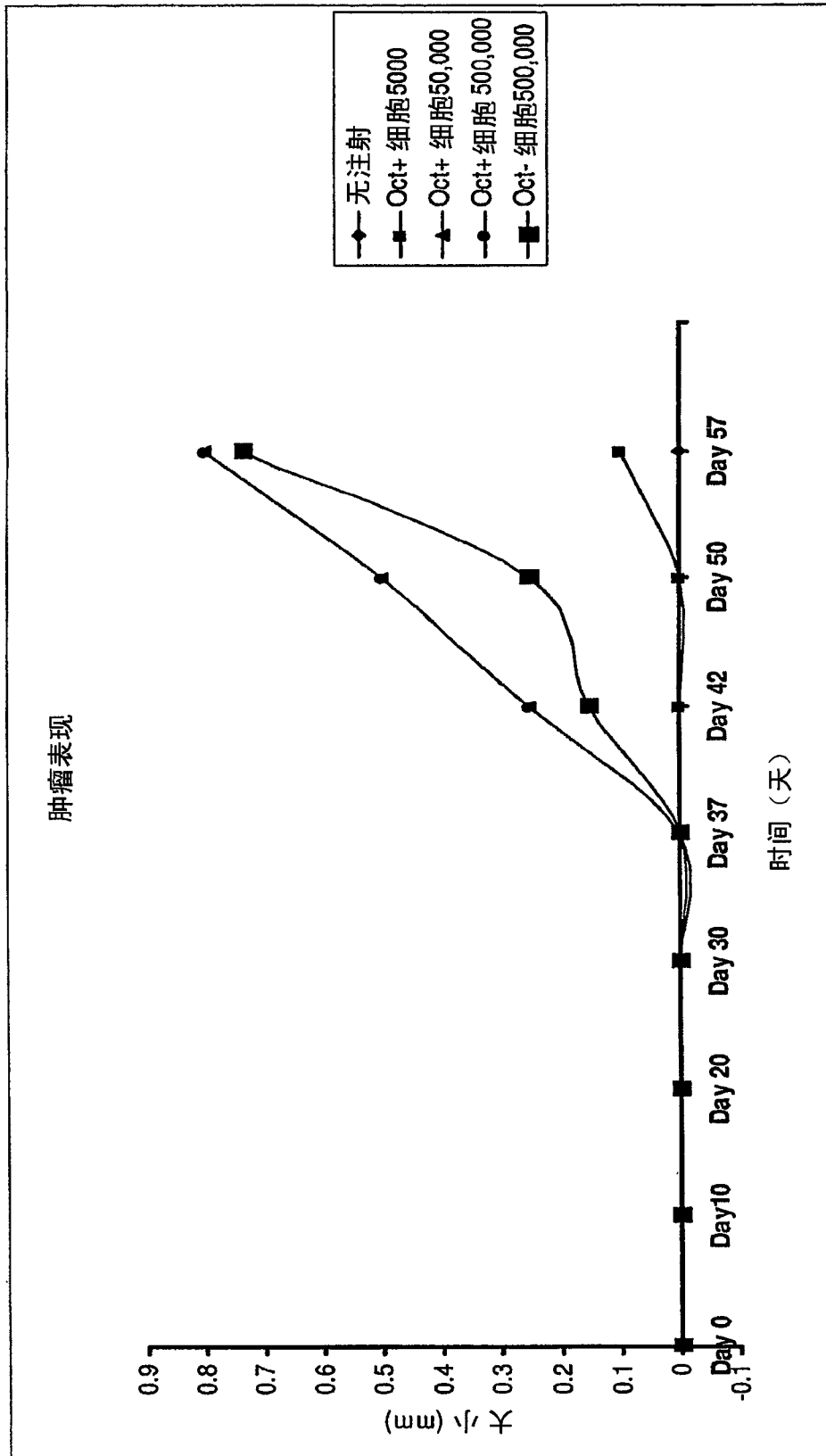


图11

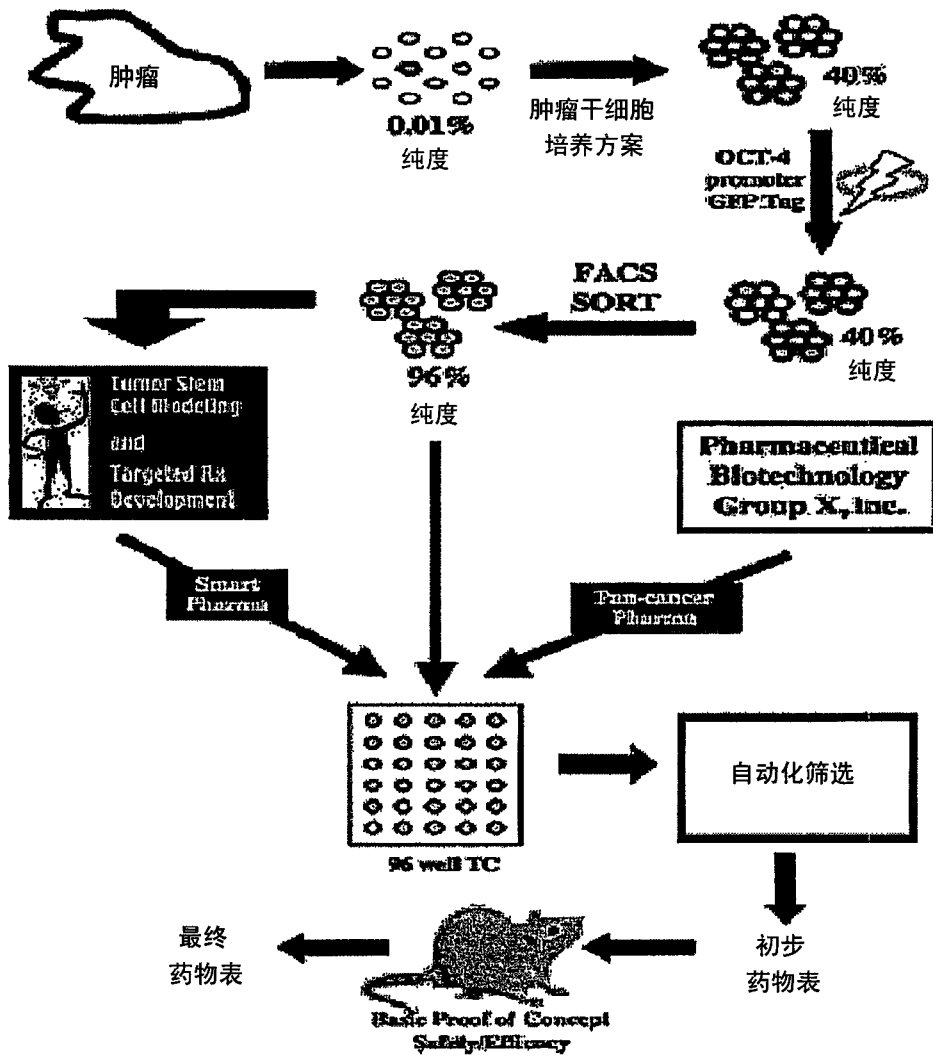


图12

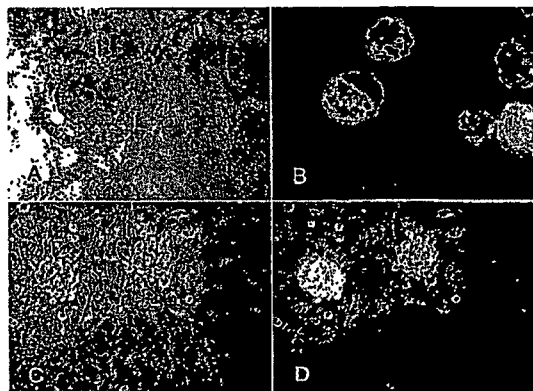


图13