



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107929732 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201711142970.5

(22)申请日 2011.12.12

(62)分案原申请数据

201110412778.X 2011.12.12

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 阎锡蕴 曾启群 吴真真 卢迪

段红霞 罗永挺 杨东玲 冯静

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表5页 附图7页

(54)发明名称

CD146及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用

(57)摘要

本发明涉及CD146及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用。本发明首次提出CD146是三阴性乳腺癌的新靶标,抗CD146抗体可能成为治疗这类疾病的新型靶向药物。因此,本发明提供CD146或抗CD146的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和/或治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。CD146分子在三阴性乳腺癌组织中特异性高表达,并诱导肿瘤细胞发生上皮细胞向间质细胞转化,促进肿瘤侵袭迁移。因此,CD146抗体治疗三阴性乳腺癌的作用机理主要是抑制三阴性乳腺癌细胞的间质细胞特征,降低其转移侵袭能力。与常规化疗药物相比,抗CD146抗体的副作用小,靶标明确,不会引起全身范围的副作用。



乳腺癌类型	CD146表达
三阴性	39/44 (88.6%)
非三阴性	4/46 (8.7%)

} P<0.001

1. CD146或抗CD146的抗体或该抗体的功能形式在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用,其中所述肿瘤是转移性三阴性乳腺癌,其中所述抗CD146的抗体是单克隆抗体AA98。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中所述抗CD146的抗体的功能形式包括抗CD146的基因工程抗体和人源化抗体。

3. 根据权利要求1-2中任意一项所述的应用,其中所述抗CD146的抗体的功能形式是抗CD146的抗体的功能耦合物,其中与抗体结合的物质是药物、毒素、放射活性剂、酶、细胞因子或另一种抗体。

4. 抗CD146的抗体或该抗体的功能形式在制备用于抑制转移性三阴性乳腺癌的转移的药物中的应用,其中所述抗CD146的抗体是单克隆抗体AA98。

5. 根据权利要求4所述的应用,其中所述抗CD146的抗体的功能形式包括抗CD146的基因工程抗体和人源化抗体。

## CD146及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用

[0001] 本申请为申请号201110412778.X、发明名称“CD146及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用”的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明属于免疫诊断和生物治疗领域。具体地说,本发明涉及CD146分子及其抗体在诊断和治疗乳腺癌的应用。更具体地,本发明涉及的CD146单克隆抗体AA4可以诊断三阴性乳腺癌,而CD146单克隆抗体AA98及其功能形式的功能在于抑制三阴性乳腺癌细胞间质细胞特征及恶性特征,从而抑制肿瘤转移侵袭。

### 背景技术

[0003] 乳腺癌是女性中最常见且致死率最高的恶性肿瘤。全球每年有将近130万女性患上乳腺癌,并且有超过40万女性因为乳腺癌的转移复发而死亡。乳腺癌中恶性程度最高的一种亚型,称为三阴性乳腺癌,以雌激素受体(ER)阴性/黄体激素受体(PR)阴性/表皮生长因子受体(HER2)阴性为特征。三阴性乳腺癌的发病率约占乳腺癌中的17%~25%,由于缺乏抗雌激素和抗HER2靶向治疗的靶标,以及极高的概率发生转移复发,是预后最差的一种乳腺癌类型。

[0004] 目前,在临床上治疗三阴性乳腺癌主要是化疗药物,例如顺铂及蒽环类药物,主要发挥预防肿瘤转移的功能。这类药物没有靶向性,对全身正常的组织器官也将造成损害,具有很强的毒副作用。另外,尽管三阴性乳腺癌在化疗早期对化疗药物比较敏感,但是预后依旧很糟糕。因此,探索三阴性乳腺癌的发病机理,并从中发掘新靶标,是三阴性乳腺癌治疗的新方向。

[0005] 大量文献报道,上皮细胞向间质细胞转化的机制(epithelial to mesenchymal transition, EMT)在三阴性乳腺癌的转移复发中发挥重要作用。EMT赋予肿瘤细胞侵袭转移能力,耐药性以及干细胞特征。从基因分型来说,三阴性乳腺癌属于基底样乳腺癌的类型,其肿瘤细胞更倾向于表达间质细胞的标记分子,被认为是一类已经发生EMT的乳腺癌类型,并通过EMT的机制发生远端迁移至脑部、肺部等重要脏器。由于三阴性乳腺癌细胞的间质细胞性质特征在一定程度上解释了肿瘤的恶性转移程度,抑制其间质细胞特征并发掘新的相关靶标分子将成为三阴性乳腺癌细胞治疗的潜在方向。由于很多重要的生长因子受体相关的酪氨酸激酶活化、TGF- $\beta$ 相关信号通路,以及整合素等细胞黏附分子相关的信号通路在诱导上皮来源的肿瘤细胞发生EMT的过程中发挥重要作用,以这些信号通路为靶标的抗体药物、小分子抑制剂以及拮抗剂被大量证明通过抑制EMT而达到治疗肿瘤转移侵袭的效果(Targeted therapies in control of EMT in carcinoma and fibrosis. Kian-Ngiap Chua, Jing Ma, Jean-Paul Thiery. DOI:10.1016/j.ddmec.2008.06.002)。例如, cystatin C, 一种丝氨酸抑制剂,在乳腺癌细胞中被发现可以作为TGF- $\beta$ 受体的拮抗剂,进而抑制TGF- $\beta$ 与其受体的结合及激活下游诱导EMT发生的信号通路。因此, cystatin C可以作为潜在的药物用于受TGF- $\beta$ 调节的乳腺癌治疗中。

## 发明内容

[0006] 本发明首次提出CD146是三阴性乳腺癌的新靶标,抗CD146抗体是治疗这类疾病的新型靶向药物。与传统的化疗药物相比,抗CD146抗体的副作用小,不会引起全身范围的组织器官损伤。CD146及其抗体在三阴性乳腺癌诊断和治疗中的应用是基于以下重要的科学发现:(1) CD146分子在三阴性乳腺癌病理组织中特异性高表达;(2) CD146在上皮性质乳腺癌细胞MCF-7细胞中过表达之后,诱导细胞发生EMT,赋予细胞侵袭转移能力;(3) 在原位乳腺癌老鼠模型(Orthotopic Breast Cancer Mouse Model)中CD146分子的过表达促进乳腺肿瘤的形成,降低肿瘤的分化程度,以及促进肿瘤的原位侵袭及远端迁移;(4) 在三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231中使用siRNA下调CD146分子的表达或使用CD146的功能性抗体AA98,可以抑制其间质细胞性质特征,降低细胞转移侵袭能力。

[0007] 综上所述,CD146的过表达可以诱导上皮性质的肿瘤细胞发生EMT,这对三阴性乳腺癌的发生及进展具有重要作用。同时,CD146分子对维持三阴性乳腺癌的间质细胞特征及恶性程度有重要功能。我们自主研制的抗CD146功能性抗体AA98可以在体外抑制三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231的迁移及侵袭能力。因此,我们提出CD146可以作为三阴性乳腺癌的靶标分子,其功能性抗体AA98可以通过结合细胞膜表面的CD146分子,通过抑制其下游信号通路,从而阻断其诱导EMT的功能,或者抑制恶性肿瘤细胞的间质性质特征。同时,该种抗体的特异性较好,不会引起全身范围的免疫功能性的损伤。

[0008] 因此,本发明一方面涉及CD146在制备用于诊断和/或治疗三阴性乳腺癌药物中的应用。本领域技术人员可以通过现有技术中公开的各种方法生产针对CD146或其信号通路的抑制剂(例如抗体、siRNA等)进而制备用于诊断和/或治疗三阴性乳腺癌的药物。在诊断乳腺癌时,本发明这一方面包括用于检测CD146表达量的各种方法,例如可检测该分子在乳腺癌细胞中的RNA水平或蛋白质水平,进而辅助诊断三阴性乳腺癌。

[0009] 本发明再一方面涉及抗CD146的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和/或治疗三阴性乳腺癌药物中的应用。

[0010] 在本发明中,抗CD146的抗体或该抗体的功能形式可包括抗CD146的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。此类抗体可根据本领域大量公开的文献容易地制备。

[0011] 在本发明中,抗CD146的抗体或该抗体的功能形式是抗CD146的抗体的功能耦合物,其中与抗体结合的物质可以是药物、毒素、放射活性剂、酶、细胞因子或另一种抗体。

[0012] 在本发明中,抗CD146的抗体优选地是单克隆抗体AA98和AA4。

[0013] 本发明又一方面涉及CD146或抗CD146的抗体或该抗体的功能形式在制备诊断三阴性乳腺癌药物中的应用,其特征在于检测受试者肿瘤组织病理切片中CD146的水平。在本发明的这一方面,药物可制备成试剂盒的形式。

[0014] 本发明又一方面涉及抗CD146的抗体或该抗体的功能形式在制备用于三阴性靶向性治疗的药物中的应用。优选地,所述抗CD146的抗体或该抗体的功能形式包括抗CD146的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。更优选地,所述抗CD146的抗体是单克隆抗体AA98和AA4。

[0015] 本说明书中使用的抗体AA98、AA4、AA1等可根据中国专利申请号99107586.2、中国专利申请号200810057260.7的描述获得。

[0016] 为了更全面地理解和应用本发明,提供下列实施例。

### 附图说明

[0017] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0018] 图1.A:临床标本:CD146在三阴性乳腺癌病人肿瘤组织病理切片中特异性高表达; B:三阴性乳腺癌vs.非三阴性乳腺癌:88.9%vs.8.7%, $p<0.0001$ 。

[0019] 图2.CD146在MCF-7细胞中过表达,筛选出稳定克隆。其中Mock为对照,转入空载; B10和A5是CD146表达株,B10中等表达CD146,A5为高表达CD146。

[0020] 图3.CD146的过表达诱导细胞发生EMT。A-B,Mock、B10和A5依次发生EMT相关的细胞形态及信号分子变化;C,Mock、B10和A5细胞迁移能力依次增强;D,Mock、B10和A5侵袭细胞数。

[0021] 图4.在体内水平,CD146过表达导致增加乳腺癌肿瘤生成(A),并减低肿瘤分化程度(B),以及肿瘤的原位迁移(C);

[0022] 图5.在体内水平,CD146过表达促进乳腺癌远端迁移(A-D);

[0023] 图6.在三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231中下调CD146表达逆转其间质细胞特征。(A)Western Blot鉴定乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231以及Hs78T细胞EMT相关标记分子(B)CD146表达下调导致EMT相关标记分子的变化;(C)CD146表达下调导致细胞形态的逆转;(D-E)CD146表达下调导致细胞迁移及侵袭能力的下降;

[0024] 图7.抗CD146功能性抗体AA98抑制三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231的间质细胞特征(A-D)。

[0025] 图8.Sigma公司真核表达质粒p3XFLAG-HA-cmv-14图谱。

### 具体实施方式

[0026] 实施例一:CD146在三阴性乳腺癌病人肿瘤组织病理切片中特异性高表达;

[0027] 细胞黏附分子在乳腺癌发生发挥过程中发挥重要作用。CD146分子是一个有关血管新生及肿瘤转移的重要细胞黏附分子。为了研究CD146在乳腺癌中的作用,我们对90例乳腺癌组织病理切片进行免疫组化分析,发现CD146分子在三阴性乳腺癌中特异性高表达。

[0028] 主要材料:乳腺癌病人肿瘤组织石蜡切片,包括44例三阴性乳腺癌及46例非三阴性乳腺癌组织,均来源于天津肿瘤医院;

[0029] 主要试剂:4%多聚甲醛,二甲苯,无水乙醇,无水甲醇,过氧化氢,PBS,小鼠抗CD146单克隆抗体AA4;本说明书中使用的抗体AA98、AA4、AA1等可根据中国专利申请号99107586.2、中国专利申请号200810057260.7的描述获得。

[0030] 主要方法:石蜡切片制作:用4%多聚甲醛固定新鲜组织24小时后,石蜡包埋,以下为石蜡切片的免疫组化过程:

[0031] 1)取出片子,入二甲苯溶液37℃脱蜡两次,每次30分钟;

[0032] 2)入无水乙醇 $\times 2-95\%-80\%-70\%-50\%-30\%$ 和蒸馏水中水化,室温每次5分钟;

[0033] 3)0.3%过氧化氢/甲醇溶液37℃避光处理30分钟,消除内源性过氧化物酶的活性,PBS洗三次;

- [0034] 4) pH6.0柠檬酸修复液100℃水浴30分钟抗原热修复,自然冷却;
- [0035] 5) 5%的正常羊血清37℃封闭1小时;
- [0036] 6) 加入PBS稀释的一抗(兔抗CD146多抗或AA4),4℃孵育过夜;
- [0037] 7) PBS洗三次;山羊抗-兔-生物素或山羊-抗-小鼠-生物素二抗(购自中衫金桥)(1:1000)在37℃孵育1小时,PBS洗三次;
- [0038] 8) 亲和素-HRP(1:1000)在37℃孵育45分钟;
- [0039] 9) 用现配的DAB避光显色2-7分钟,再进行苏木素复染。
- [0040] 10) 逐级脱水:50-70-80-90-100-100%乙醇-二甲苯,晾干,中性树脂封片。
- [0041] 11) 显微成像系统中拍片。
- [0042] 结果显示,如图1所示,相比于非三阴性乳腺癌组织,CD146分子在三阴性乳腺癌组织中特异性高表达。CD146表达在肿瘤细胞的细胞膜,并更倾向于表达在肿瘤迁移的边缘。
- [0043] 实施例二:CD146过表达诱导上皮性质乳腺癌细胞MCF-7发生EMT;
- [0044] 我们选择了CD146阴性的细胞系MCF-7细胞(购自上海细胞库,目录号为TCHu74)作为了细胞模型,发现CD146在恶性的三阴性乳腺癌组织中高表达具有重要意义。MCF-7是一个上皮性质的乳腺癌肿瘤细胞系,恶性程度低,分化程度高,细胞迁移能力极弱。我们在MCF-7中过表达CD146分子,构建获得了2个稳定表达株,B10和A5,其中B10中等表达CD146,A5为高表达CD146。同时,我们也在MCF-7细胞中转入空载体,构建了对照稳定株Mock。具体过程如下详述。
- [0045] 主要试剂:CD146cDNA(SEQ ID NO:7)最初为法国慕尼黑大学Judith P.Johnson教授馈赠,目前在国内也可以通过武汉三鹰生物技术有限公司购买获得(编号:BC056418,载体质粒为pCMV-SPORT6),所编码的蛋白质序列见SEQ ID NO:8。我们选择了真核表达质粒p3XFLAG-HA-cmv-14(购买于Sigma公司,编号E4901)构建CD146真核表达质粒,原始质粒图谱见图8。CD146cDNA通过EcoRI与BamHI两个酶切位点插入p3XFLAF-HA-cmv-14,构建后所得的目的质粒由本实验室长期保存。其中从含有CD146cDNA的载体质粒上PCR出5'及3'端分别带有EcoRI与BamHI的CD146cDNA片段运用的引物为:正向5'-CGG AAT TCA ATG GGG CTT CCC AGG CTG-3'(SEQ ID NO:1);反向5'-GCG GAT TCA TGC CTC AGA TCG ATG TA-3'(SEQ ID NO:2)。转染试剂为罗氏Fugene HD.G418试剂购买于Sigma。Transwell技术使用的96孔板(8m)购买于美国康宁(Coring)。本说明书中使用的抗体AA98、AA4、AA1等可根据中国专利申请号99107586.2、中国专利申请号200810057260.7的描述获得。抗E-cadherin抗体、抗cytokeratin抗体、抗Fibronectin抗体、抗GAPDH抗体购买于Abcam,抗Vimentin抗体购买于Sigma。胰酶购买于Gibco。Matrigel购于BD biosciences公司。
- [0046] 主要方法:采用脂质体转染试剂转染真核细胞,并采用G418抗性筛选出单克隆,再运用Western Blot、流式细胞仪、Transwell技术等鉴定所得细胞的特性。
- [0047] (1) 将MCF-7细胞种在2个35mm的细胞培养皿中,使第二天转染时细胞密度达到80%左右。
- [0048] (2) 根据罗氏Fugen HD转染试剂的说明,分别对两个25mm培养皿中的MCF-7细胞转染p3XFlag质粒或p3XFlag-CD146质粒,48h后分别加入G418(0.5g/ml)进行筛选;
- [0049] (3) 1周后,等存活的细胞长满后,胰酶消化细胞后,用新鲜培养基稀释细胞密度至 $1 \times 10^4$ 个/ml,种于96孔板,对多克隆进行单克隆化。

[0050] (4) 96孔板的细胞长满后,扩大到35mm培养皿进行培养,并采用流式分析的方法对CD146的表达量进行检测,挑选不同表达量的CD146克隆。

[0051] (5) 对挑选出的克隆继续在G418存在的情况下培养约2-3月,待克隆稳定后即可进行后续细胞形态观察、细胞迁移侵袭测试等实验。对于细胞迁徙实验,5X10<sup>3</sup>个细胞种于Tranwell板中的上孔,培养在501无血清的MEM培养基中,下孔中为含2001 10%血清的MEM培养基作为诱导,14-18h后,上孔中的培养基被吸干,覆盖于膜上的细胞被蘸了70%的酒精的棉球棒擦干净,膜被揭下并倒扣在玻片上。迁移过来的细胞用4%的PFA固定并结晶紫染色,显微镜拍照并计数。每个细胞需要设计3个平行对照孔。对于细胞侵袭实验,膜上需预先覆盖2.5mg/ml的Matrigel胶,1X10<sup>4</sup>个细胞将用于该实验。接下步骤与上同。

[0052] 如图3所示,在MCF-7稳定克隆株Mock、B10和A5这一系列中,我们观察到有关EMT的相关变化。首先,Mock细胞维持母本MCF-7细胞的典型的上皮性质细胞的形态,细胞成片生长,呈铺路石状,其紧密连接。然而,高表达CD146分子的A5细胞形态发生极大变化,细胞分散生长成梭性。中等表达CD146分子的B10细胞形态处于两种的中间状态。其次,Western Blot实验表明Mock细胞表达典型的上皮细胞的标记分子,例如E-cadherin和Cytokeratin。而A5细胞表达典型的间质细胞的标记分子,例如Vimentin和Fibronectin。(Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease, Jean Paul Thiery, Hervé Acloque, Ruby Y. J. Huang and M. Angela Nieto. Cell 139, November 25, 2009)。最重要的是,应用Transwell技术(Leukocyte transmigration through vascular endothelium. An in vitro method. Allavena P, Del Maschio A. Methods Mol Biol. 1999; 96:171-6),我们能发现CD146在A5细胞中的高表达显著地增强了细胞迁徙及侵袭能力。

[0053] 实施例三:在原位乳腺癌老鼠模型中CD146过表达促进乳腺肿瘤的形成,降低肿瘤的分化程度,并促进肿瘤的原位侵袭及远端迁移;

[0054] 我们利用SCID/Beige构建了原位移植的乳腺癌小鼠模型,发现在体内水平CD146的高表达对乳腺癌的发生发展具有重要作用。

[0055] 实验方法:选择20只4周大小雌性的SCID/Beige(购于维通利华)小鼠,随机分为2组。分别在乳腺脂肪组织垫注射1×10<sup>6</sup>个MCF-7细胞来源的克隆Mock或A5细胞重悬在50ul PBS,与50ul 2.5mg/ml的Matrigel混合。每周观察1次,测量长、宽及高,以便计算肿瘤体积。10周后,当有荷瘤鼠变得虚弱后,脱颈法处死所有小鼠,剥离肿瘤和重要脏器,4%PFA固定24小时后,石蜡包埋,切片并做免疫组化分析。

[0056] 结果如图4、图5所示,Mock细胞在SCID/Beige小鼠上成瘤性差,10只小鼠中只有3只成瘤,且肿瘤体积偏小,肿瘤组织结构完整,表明分化程度高,且没有发生原位侵袭及远端迁移。而形成鲜明对比的是,CD146高表达的A5细胞成瘤容易,10只小鼠中只有8只成瘤,且肿瘤体积普遍偏大,肿瘤组织结构混乱,表明分化程度低。更重要的是,A5形成的肿瘤显著地侵袭到邻近的正常组织,例如皮肤,乳腺,肋骨等,且转移到了肺部及肝脏。

[0057] 实施例四:在三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231下调CD146或抗CD146功能性抗体AA98表达抑制其间质细胞特征。

[0058] 主要试剂:靶向CD146的siRNA序列:正向5'-CCA GCU CCG CGU CUA CAA AdTdT-3'(SEQ ID NO:3),反向5'-UUU GUA GAC GCG GAG CUG GdTdT-3'(SEQ ID NO:4);靶向GFP的siRNA序列:正向5'-CUU CAG CCU CAG CUU GCC GdTdT-3\_(SEQ ID NO:5),反向5'-CGG CAA

GCU GAC CCU GAA GdTdT-3' (SEQ ID NO:6).Lipofectin 2000转染试剂购于Invitrogen公司。

[0059] 主要方法：(1)MDA-MB-231细胞分于2个35mm细胞培养皿中,以使第二天转染siRNA时密度达到70%左右。根据Lipofectin 2000的转染要求,分别对两个35mm培养皿的MDA-MB-231细胞转染siRNA-GFP或者siRNA-CD146,48h后使用RIP1裂解缓冲液裂解细胞,做总蛋白定量之后跑SDS-PAGE,并进行Western Blot进行相关分子的检测。确认CD146在MDA-MB-231细胞中表达下调的效果后,进一步进行细胞形态变化观察、细胞侵袭迁移能力等测试。

[0060] (2)MDA-MB-231细胞分于2个35mm细胞培养皿后,立即加入mIgG及AA98 (50mg/ml)进行刺激,48h后进行各种检测,与上同。

[0061] 我们进一步选择三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231 (购自ATCC,编号HTB-26™)为研究模型,使用靶向CD146分子的siRNA (于Invitrogen合成)下调CD146的表达或抗CD146功能性抗体AA98,发现CD146对维持间质细胞特征的肿瘤细胞的恶性程度具有重要功能。

[0062] 结果如图6、图7所示,靶向CD146分子的siRNA将MDA-MB-231细胞中CD146蛋白水平下调到原来的三分之一。我们观察到梭形的细胞开始部分回圆。与此同时,间质细胞的标记分子vimentin及Fibronectin表达下调,上皮细胞的标记分子E-cadherin表达上调。更重要的是,细胞迁移及侵袭能力受到了抑制。同时,抗CD146功能性抗体AA98也可以显著抑制MDA-MB-231细胞间质细胞标记分子Slug表达,上调上皮细胞标记分子E-cadherin的表达,并抑制细胞迁移能力。



## 序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> CD146及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用

<130> SPI175981-44

<141> 2011-12-12

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 1

cggaattcaa tggggettcc caggetg 27

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 2

gcgattcat gcctcagatc gatgta 26

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 3

ccagcuccgc gucuacaaat t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 4

uuuguagacg cggagcuggt t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 5

cuucagccuc agcuugccgt t 21

<210> 6

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列()  
 <400> 6  
 cggcaagcug acccugaagt t 21  
 <210> 7  
 <211> 1941  
 <212> DNA  
 <213> 人()  
 <400> 7  
 atggggcttc ccaggetggt ctgcgcttc ttgctegccg cctgctgctg ctgtcctcgc 60  
 gtcgcgggtg tgccccgaga ggetgagcag cctgcgctg agctggtgga ggtggaagtg 120  
 ggcagcacag cccttctgaa gtgcggctc tcccagtecc aaggcaacct cagccatgtc 180  
 gactggtttt ctgtccacaa ggagaagcgg acgctcatct tccgtgtgcg ccagggccag 240  
 ggccagagcg aacctgggga gtacgagcag cggctcagcc tccaggacag aggggctact 300  
 ctggccctga ctcaagtcac cccccaagac gagecctatct tcttgtgcca gggcaagcgc 360  
 cctcggctcc aggagtaccg catccagctc cgcgtctaca aagctccgga ggagccaaac 420  
 atccaggtea accccctggg catccctgtg aacagtaagg agcctgagga ggtcgtctacc 480  
 tgtttaggga ggaacgggta cccattctct caagctatct ggtacaagaa tggccggcct 540  
 ctgaaggagg agaagaaccg ggtccacatt cagtcgtccc agactgtgga gtcgagtggg 600  
 ttgtacacct tgcagagtat tctgaaggca cagctgggta aagaagacaa agatgcccag 660  
 ttttactgtg agctcaacta ccggctgccc agtgggaacc acatgaagga gtccagggaa 720  
 gtcaccgtcc ctgttttcta cccgacagaa aaagtgtggc tggaaagtgga gcccggtggga 780  
 atgctgaagg aaggggaccg cgtggaaatc aggtgtttgg ctgatggcaa ccctccacca 840  
 cacttcagca tcagcaagca gaacccagc accagggagg cagaggaaga gacaaccaac 900  
 gacaacgggg tcctggtgct ggagcctgcc cggaaggaac acagtgggcg ctatgaatgt 960  
 cagggcctgg acttgacac catgatctc ctgctgagtg aaccacagga actactggtg 1020  
 aactatgtgt ctgacgtccg agtgagtccc gcagcccctg agagacagga aggcagcagc 1080  
 ctcaccctga cctgtgaggc agagagtagc caggacctcg agttccagtg gctgagagaa 1140  
 gagacaggcc aggtgctgga aagggggcct gtgcttcagt tgcattgacct gaaacgggag 1200  
 gcaggaggcg gctatcgtg cgtggcgtct gtgcccagca taccggcct gaaccgcaca 1260  
 cagctggtca acgtggccat ttttggeccc cttggatgg cattcaagga gaggaaggtg 1320  
 tgggtgaaaag agaatatggt gttgaatctg tcttgtgaag cgtcagggca cccccggccc 1380  
 accatctcct ggaacgtaaa cggcacggca agtgaacaag accaagatcc acagcgagtc 1440  
 ctgagcacc tgaatgtcct cgtgacccc gagctgttgg agacaggtgt tgaatgcacg 1500  
 gcctccaacg acctgggcaa aaacaccagc atcctcttc tggagctggt caatttaacc 1560  
 accctcacac cagactccaa cacaaccact ggctcagca ctccactgc cagtctctat 1620  
 accagagcca acagcacctc cacagagaga aagctgccgg agccggagag ccggggcgtg 1680  
 gtcattcgtg ctgtgattgt gtgcatcctg gtcttgccgg tgctgggcgc tgtcctctat 1740

ttcctctata agaaggcaaa gctgcccgtgc aggcgctcag ggaagcagga gatcacgctg 1800  
 cccccgtctc gtaagagcga acttgtagtt gaagttaagt cagataagct cccagaagag 1860  
 atgggcctcc tgcagggcag cagcgggtgac aagagggctc cgggagacca gggagagaaa 1920  
 tacatcgatc tgaggcatta g 1941

<210> 8

<211> 646

<212> PRT

<213> 人()

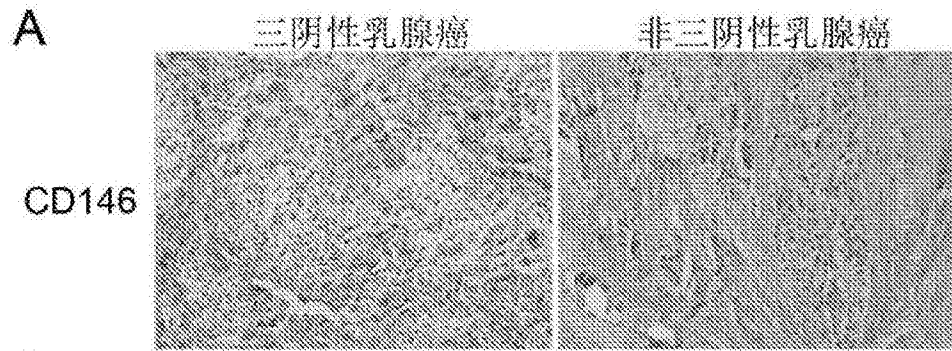
<400> 8

Met	Gly	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Cys	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ala	Cys	Cys	1	5	10	15
Cys	Cys	Pro	Arg	Val	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Glu	Ala	Glu	Gln	Pro	Ala	20	25	30	
Pro	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Glu	Val	Gly	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Cys	35	40	45	
Gly	Leu	Ser	Gln	Ser	Gln	Gly	Asn	Leu	Ser	His	Val	Asp	Trp	Phe	Ser	50	55	60	
Val	His	Lys	Glu	Lys	Arg	Thr	Leu	Ile	Phe	Arg	Val	Arg	Gln	Gly	Gln	65	70	75	80
Gly	Gln	Ser	Glu	Pro	Gly	Glu	Tyr	Glu	Gln	Arg	Leu	Ser	Leu	Gln	Asp	85	90	95	
Arg	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Thr	Gln	Val	Thr	Pro	Gln	Asp	Glu	Arg	100	105	110	
Ile	Phe	Leu	Cys	Gln	Gly	Lys	Arg	Pro	Arg	Ser	Gln	Glu	Tyr	Arg	Ile	115	120	125	
Gln	Leu	Arg	Val	Tyr	Lys	Ala	Pro	Glu	Glu	Pro	Asn	Ile	Gln	Val	Asn	130	135	140	
Pro	Leu	Gly	Ile	Pro	Val	Asn	Ser	Lys	Glu	Pro	Glu	Glu	Val	Ala	Thr	145	150	155	160
Cys	Val	Gly	Arg	Asn	Gly	Tyr	Pro	Ile	Pro	Gln	Val	Ile	Trp	Tyr	Lys	165	170	175	
Asn	Gly	Arg	Pro	Leu	Lys	Glu	Glu	Lys	Asn	Arg	Val	His	Ile	Gln	Ser	180	185	190	
Ser	Gln	Thr	Val	Glu	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Leu	Gln	Ser	Ile	Leu	195	200	205	
Lys	Ala	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala	Gln	Phe	Tyr	Cys	Glu	210	215	220	
Leu	Asn	Tyr	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Asn	His	Met	Lys	Glu	Ser	Arg	Glu	225	230	235	240

Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val	245	250	255
Glu Pro Val Gly Met Leu Lys Glu Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys	260	265	270
Leu Ala Asp Gly Asn Pro Pro Pro His Phe Ser Ile Ser Lys Gln Asn	275	280	285
Pro Ser Thr Arg Glu Ala Glu Glu Glu Thr Thr Asn Asp Asn Gly Val	290	295	300
Leu Val Leu Glu Pro Ala Arg Lys Glu His Ser Gly Arg Tyr Glu Cys	305	310	315
Gln Gly Leu Asp Leu Asp Thr Met Ile Ser Leu Leu Ser Glu Pro Gln	325	330	335
Glu Leu Leu Val Asn Tyr Val Ser Asp Val Arg Val Ser Pro Ala Ala	340	345	350
Pro Glu Arg Gln Glu Gly Ser Ser Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala Glu	355	360	365
Ser Ser Gln Asp Leu Glu Phe Gln Trp Leu Arg Glu Glu Thr Gly Gln	370	375	380
Val Leu Glu Arg Gly Pro Val Leu Gln Leu His Asp Leu Lys Arg Glu	385	390	395
Ala Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Val Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Gly	405	410	415
Leu Asn Arg Thr Gln Leu Val Asn Val Ala Ile Phe Gly Pro Pro Trp	420	425	430
Met Ala Phe Lys Glu Arg Lys Val Trp Val Lys Glu Asn Met Val Leu	435	440	445
Asn Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Thr Ile Ser Trp	450	455	460
Asn Val Asn Gly Thr Ala Ser Glu Gln Asp Gln Asp Pro Gln Arg Val	465	470	475
Leu Ser Thr Leu Asn Val Leu Val Thr Pro Glu Leu Leu Glu Thr Gly	485	490	495
Val Glu Cys Thr Ala Ser Asn Asp Leu Gly Lys Asn Thr Ser Ile Leu	500	505	510
Phe Leu Glu Leu Val Asn Leu Thr Thr Leu Thr Pro Asp Ser Asn Thr	515	520	525
Thr Thr Gly Leu Ser Thr Ser Thr Ala Ser Pro His Thr Arg Ala Asn	530	535	540
Ser Thr Ser Thr Glu Arg Lys Leu Pro Glu Pro Glu Ser Arg Gly Val			

---

545	550	555	560
Val Ile Val Ala Val Ile Val Cys Ile Leu Val Leu Ala Val Leu Gly			
	565	570	575
Ala Val Leu Tyr Phe Leu Tyr Lys Lys Gly Lys Leu Pro Cys Arg Arg			
	580	585	590
Ser Gly Lys Gln Glu Ile Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Ser Glu Leu			
	595	600	605
Val Val Glu Val Lys Ser Asp Lys Leu Pro Glu Glu Met Gly Leu Leu			
	610	615	620
Gln Gly Ser Ser Gly Asp Lys Arg Ala Pro Gly Asp Gln Gly Glu Lys			
625	630	635	640
Tyr Ile Asp Leu Arg His			
	645		



**B**

乳腺癌类型	CD146表达
三阴性	39/44 (88.6%)
非三阴性	4/46 (8.7%)

}  $P < 0.001$

图1

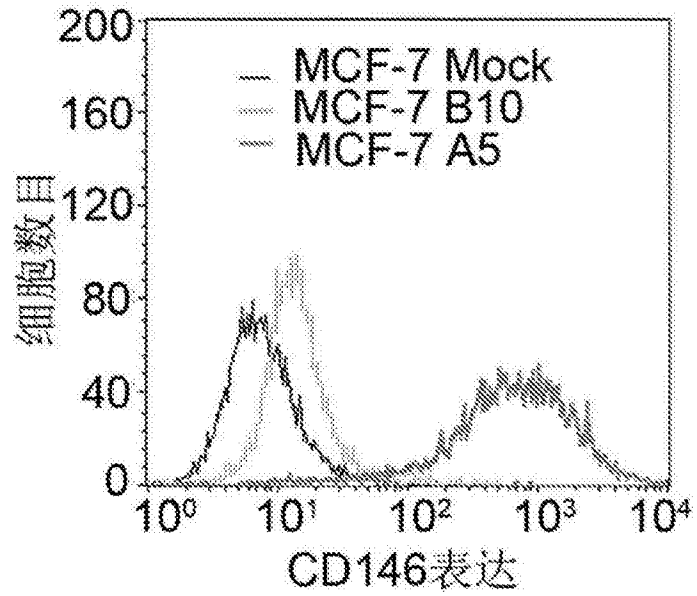


图2

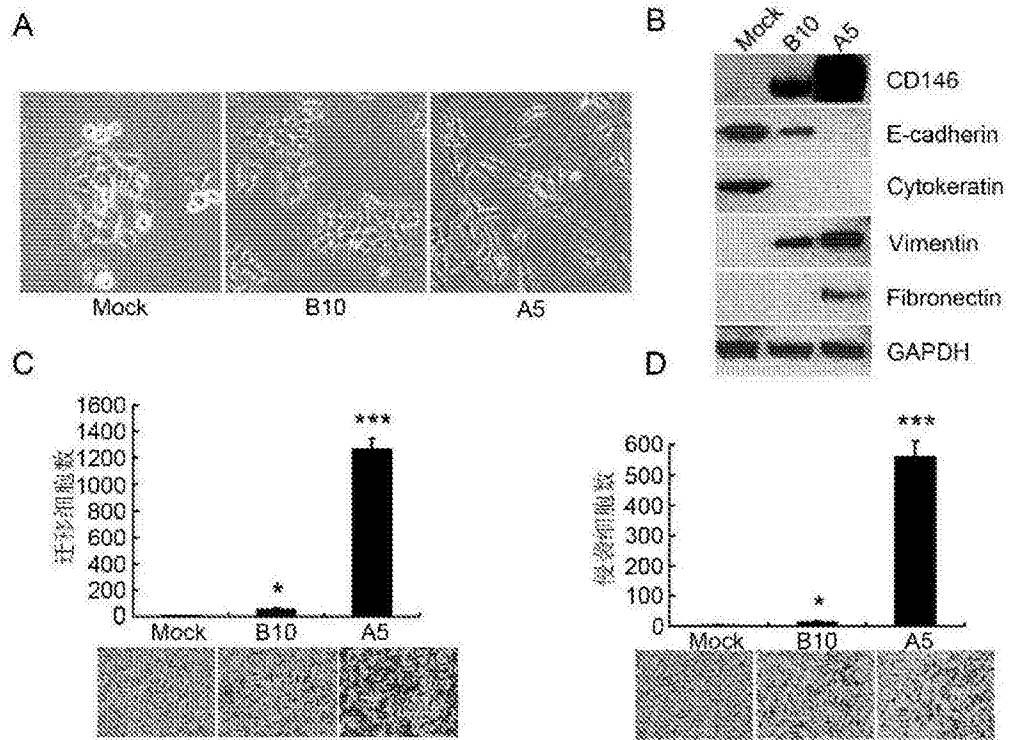


图3

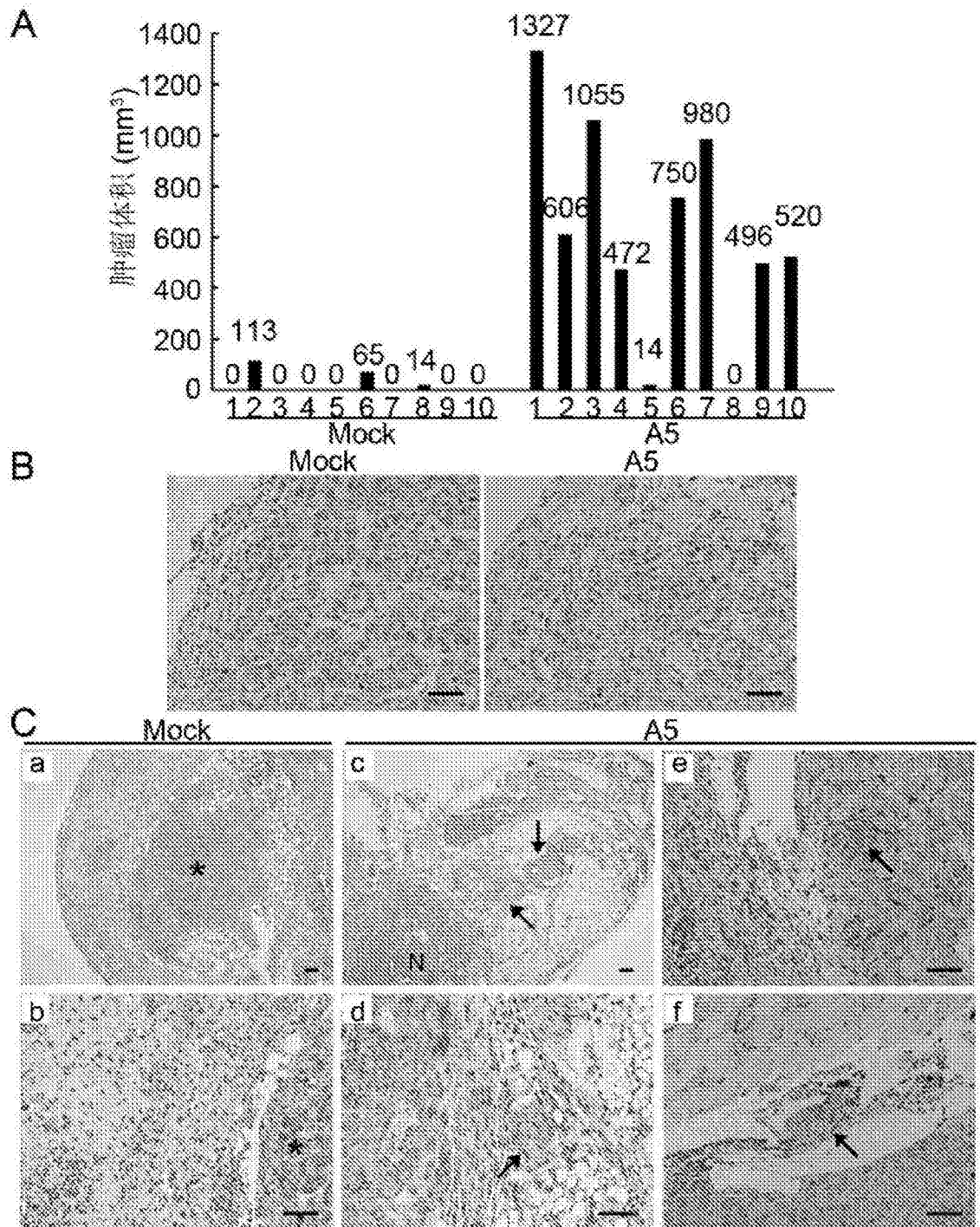


图4



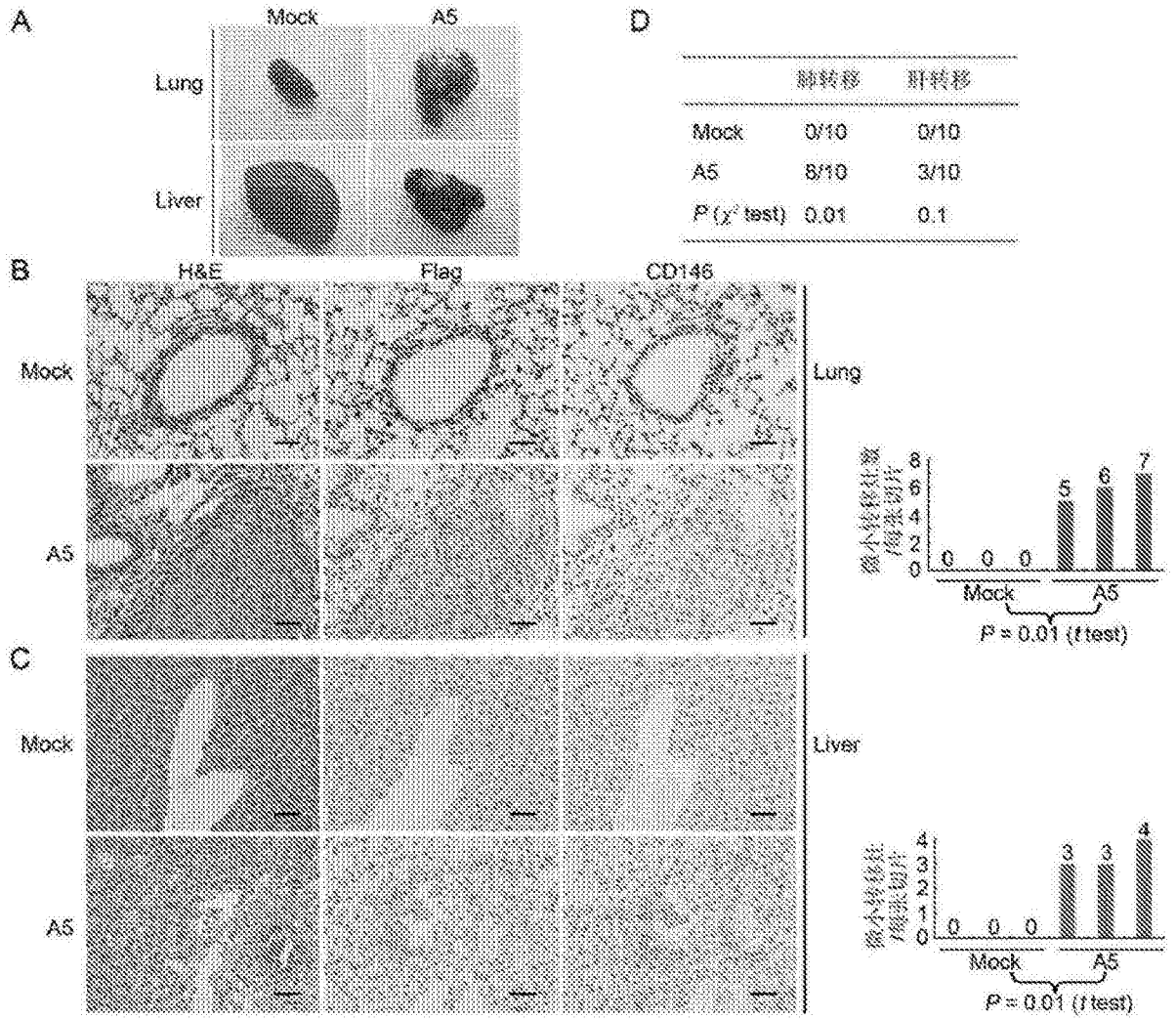


图5

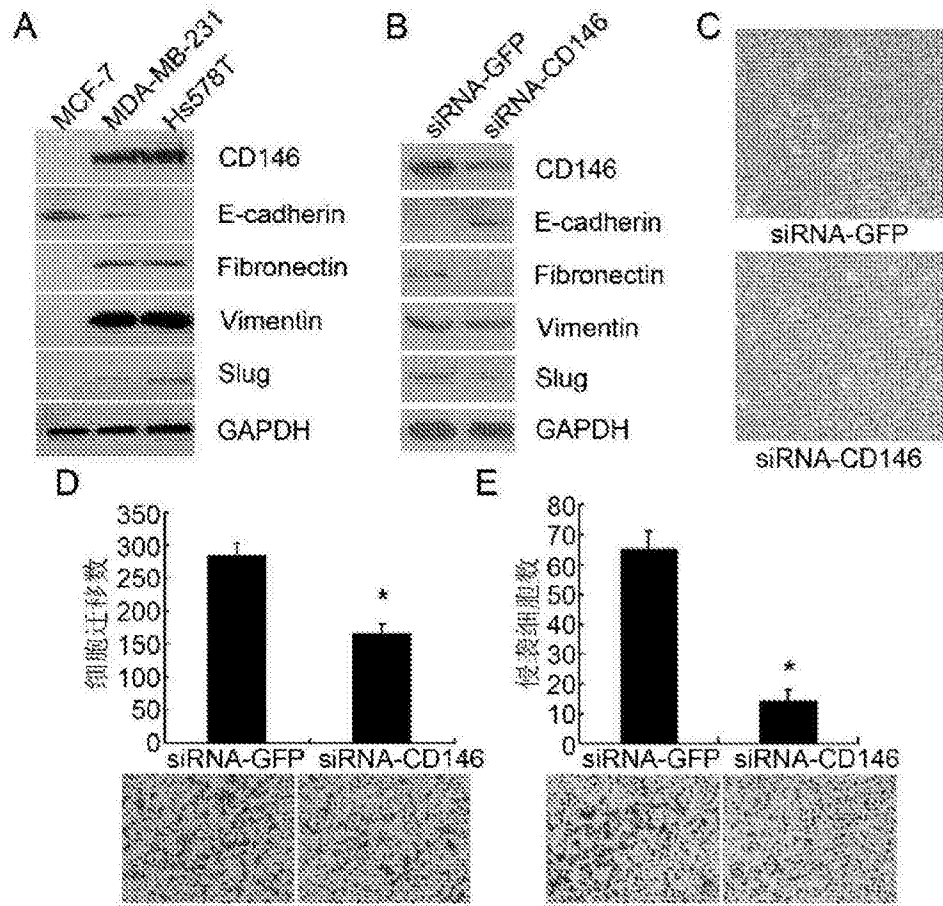


图6

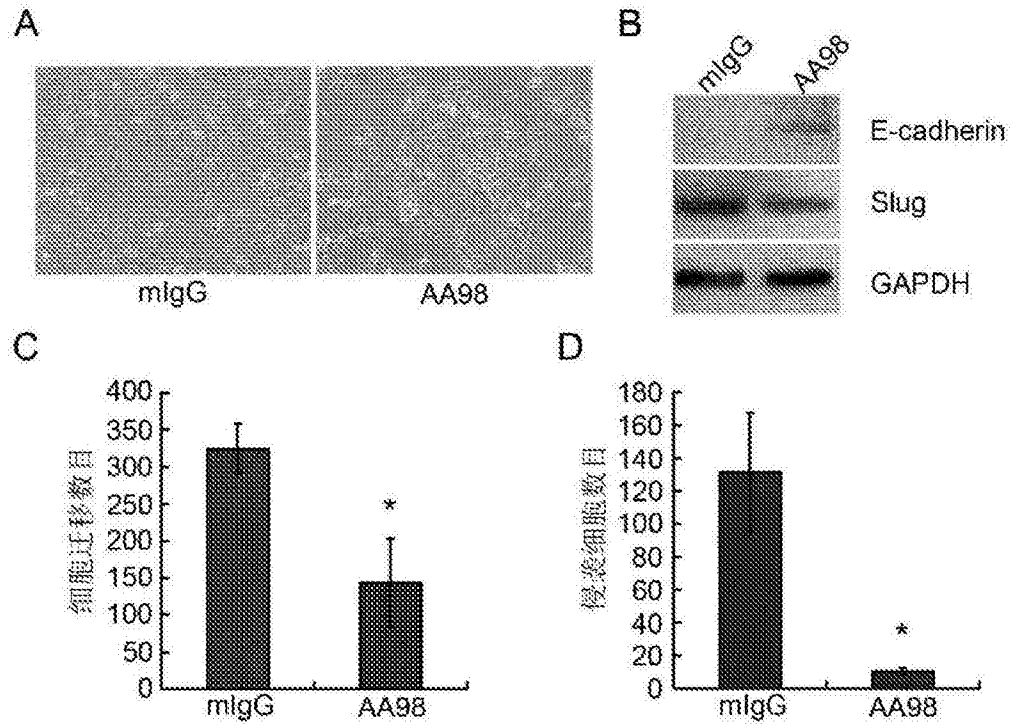


图7

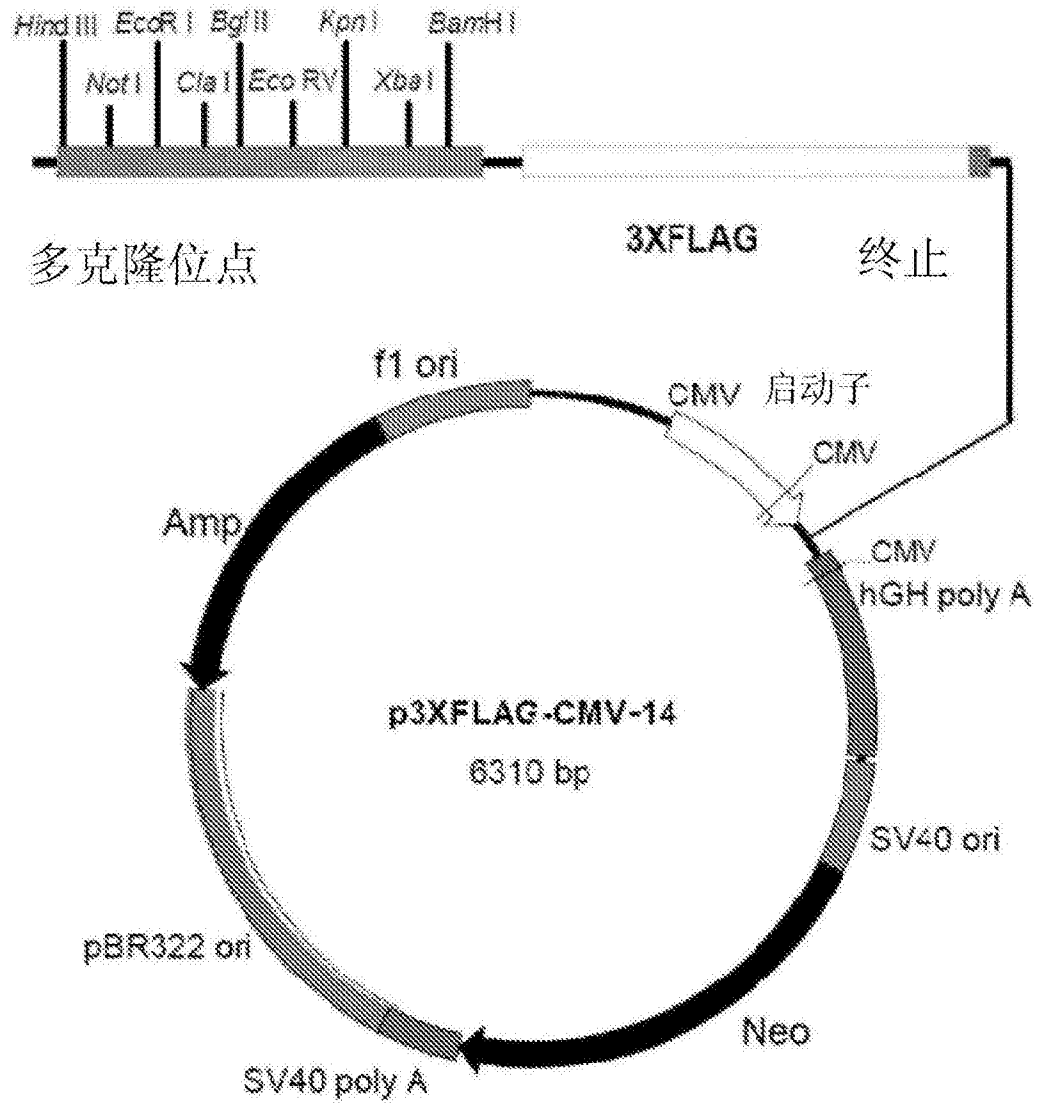


图8