



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103743902 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201310601573. 5

(22) 申请日 2013. 11. 25

(71) 申请人 南通大学附属医院  
地址 226001 江苏省南通市西寺路 20 号

(72) 发明人 姚登福 陈洁 姚敏 王理

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400  
代理人 高之波 邬玥

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

C12N 15/85(2006. 01)

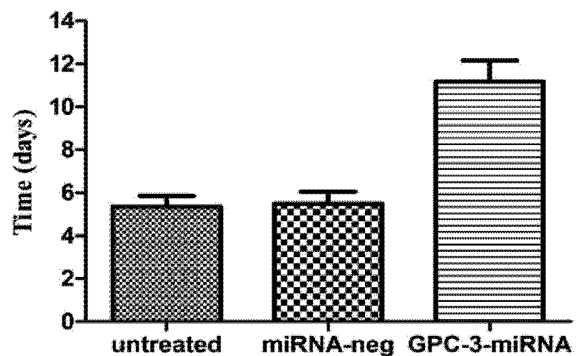
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法。通过 1) 针对靶基因共有序列设计并合成 4 对 miRNA 寡聚单链 DNA, 再合成相应 dsDNA, 将 dsDNA 插入载体构建 4 种重组质粒, 并通过荧光定量 PCR 挑选出干扰效率最高的一种重组质粒; 2) 将上述干扰效率最高的重组质粒转染至 HepG2 细胞中构建转染 HepG2 细胞, 并对其进行筛选, 得到稳定转染 HepG2 细胞; 3) 将上述稳定转染 HepG2 细胞接种裸鼠皮下构建人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型; 4) 而后测定上述稳定转染 HepG2 细胞在人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型中生长情况。通过以上方法来检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力, 可以用于 GPC-3 对移植瘤的研究。



1. 检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,该方法包括如下步骤:

1) 针对靶基因 human GPC3, Gene ID:2719 的 4 个转录本的共有序列设计并合成 4 对 miRNA 寡聚单链 DNA,再合成相应 dsDNA,将 dsDNA 插入载体构建 4 种 GPC-3-miRNA 重组质粒,并通过荧光定量 PCR 挑选出干扰效率最高的一种 GPC-3-miRNA 重组质粒;

2) 将上述干扰效率最高的重组质粒转染至 HepG2 细胞中构建转染 HepG2 细胞,并对其筛选,得到稳定转染 HepG2 细胞;

3) 将上述稳定转染 HepG2 细胞接种裸鼠皮下构建人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型;

4) 而后测定上述稳定转染 HepG2 细胞在人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型中生长情况。

2. 根据权利要求 1 所述一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,4 种所述 GPC-3-miRNA 重组质粒分别为:

p-CMV-GPC-3-miRNA-1、p-CMV-GPC-3-miRNA-2、p-CMV-GPC-3-miRNA-3 和 p-CMV-GPC-3-miRNA-4;

p-CMV-GPC-3-miRNA-1 插入序列正、反义链(5' -3')分别为

F:5-TGCTGTGAATTAGTTCCCTTCTTCGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCGAAGAAGAACTAATTCA-3

R:5-CCTGTGAATTAGTTCTTCTTCGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCGAAGAAGGGAAGAACTAATTAC-3

p-CMV-GPC-3-miRNA-2 插入序列正、反义链(5' -3')分别为

F:5-TGCTGTAATTTGACTGACCACTGGCTGTTTTGGCCACTGACTGACAGCCAGTGCAGTCAAATTA-3

R:5-CCTGTAATTTGACTGCACTGGCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGCCAGTGGTTCAGTCAAATTAC-3

p-CMV-GPC-3-miRNA-3 插入序列正、反义链(5' -3')分别为

F:5-TGCTGTTCATTAGCTGGGTATAGATGGTTTTGGCCACTGACTGACCATCTATACAGCTAATGAA-3

R:5-CCTGTTCATTAGCTGTATAGATGGTTCAGTCAGTGGCCAAAACCATCTATACCCAGCTAATGAAC-3

p-CMV-GPC-3-miRNA-4 插入序列正、反义链(5' -3')分别为

F:5-TGCTGAATACTTTTCAGGTCACGTCTTGTGTTTTGGCCACTGACTGACAAGACGTGCTGAAAGTATT-3

R:5-CCTGAATACTTTTCAGCACGTCTTGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAAGACGTGACCTGAAAGTATTTC-3。

3. 根据权利要求 2 所述一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,所述干扰效率最高的 GPC-3-miRNA 重组质粒为 p-CMV-GPC-3-miRNA-1。

4. 根据权利要求 1 所述一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,所述载体为 pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR。

5. 根据权利要求 1 所述一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,

所述干扰效率最高的重组质粒转染至 HepG2 细胞中构建转染 HepG2 细胞中使用 Genjet<sup>TM</sup> 转染试剂,所述得到稳定转染 HepG2 细胞使用的筛选试剂为杀稻瘟菌素。

6. 根据权利要求 1 所述一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,所述步骤(3)中转染 HepG2 细胞接种裸鼠皮下构建人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型的方法为:收集对数生长期的转染 HepG2 细胞,以  $2 \times 10^7$  / (0.2ml · 只) 接种于裸鼠右肩胛部皮下,形成直径 4mm 左右的皮下隆起。

7. 根据权利要求 2 所述一种基于沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤的方法,所述测定转染 HepG2 细胞生长情况的方法为测肿瘤生长曲线和免疫组织化学分析。

8. 根据权利要求 7 所述一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方

法,

所述测肿瘤生长曲线方法为:

接种后,每天观察裸鼠的生存状况、注射部位有无感染和破溃、肿瘤生长后有无自然消退并记录每组肿瘤长出时间;待肿瘤出现后,每周用游标卡尺测量肿瘤长、短径,根据公式:肿瘤体积  $V(\text{mm}^3)=0.5 \times a \times b^2$  ( $a$ =长径, $b$ =短径),计算肿瘤体积,并根据体积的均数值绘制肿瘤生长曲线;于接种后 35 天用颈椎脱臼法处死裸鼠,大体观察移植瘤的生长状况及周围脏器受累情况;剥离肿瘤用生理盐水冲洗、擦干,拍照;将标本浸入 4% 多聚甲醛内固定 24h,备用;

所述免疫组织化学分析方法为:

将上述固定过的标本脱蜡,水化,双氧水阻断内源性过氧化物酶,高压加热法修复抗原,正常动物血清封闭非特异性结合;分别滴加 GPC-3、 $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$  及 cyclinD1 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 漂洗;滴加生物素标记的第二抗体,室温孵育 10min,PBS 漂洗;滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶,室温孵育 10min,PBS 冲洗;滴加新鲜配制的四盐酸二氨基联苯胺溶液,室温显色,蒸馏水洗涤,苏木素复染,无水乙醇脱水透明、封片;光学显微镜观察、摄像;以 0.01 mol/L PBS (pH=7.5) 替代第一抗体、第二抗体作阴性对照。

9. 根据权利要求 1 所述一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,针对 4 种所述的 GPC-3-miRNA 重组质粒设计 p-CMV-Neg-miRNA 质粒作为对照;

p-CMV-Neg-miRNA 插入序列正、反义链(5' -3') 分别为:

F:5-tgctgAAATGTACTGCGGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT-3

R:5-cctgAAATGTACTGCGGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTTc-3。

## 检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及 GPC-3 相关基因技术,特别涉及一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法。

### 背景技术

[0002] 磷脂酰肌醇蛋白多糖 -3(glypican-3, GPC-3) 作为一种细胞表面蛋白,在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中特异性高表达,被认为是肝癌早期诊断及特异性治疗的潜在靶点。磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 (GPC-3) 属于糖基磷脂酰肌醇锚定的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族。GPC-3 基因定位于人染色体 X26. 10, 因为该分子的突变或者异常表达常与疾病相关,所以受到广泛关注。现有技术当中,基于沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤研究没有简单高效的手段,沉默 GPC-3 基因转录对肝癌裸鼠移植瘤的能力的验证不够简便。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于,提供一种检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法,方法包括如下步骤:

[0004] 1) 针对靶基因 human GPC3, Gene ID: 2719 的 4 个转录本的共有序列设计并合成 4 对 miRNA 寡聚单链 DNA, 再合成相应 dsDNA, 将 dsDNA 插入载体构建 4 种 GPC-3-miRNA 重组质粒, 并通过荧光定量 PCR 挑选出干扰效率最高的一种 GPC-3-miRNA 重组质粒;

[0005] 2) 将上述干扰效率最高的重组质粒转染至 HepG2 细胞中构建转染 HepG2 细胞, 并对其进行筛选, 得到稳定转染 HepG2 细胞;

[0006] 3) 将上述稳定转染 HepG2 细胞接种裸鼠皮下构建人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型;

[0007] 4) 而后测定上述稳定转染 HepG2 细胞在人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型中生长情况。

[0008] 在一些实施方式中, 4 种的 GPC-3-miRNA 重组质粒分别为:

[0009] p-CMV-GPC-3-miRNA-1;

[0010] p-CMV-GPC-3-miRNA-2;

[0011] p-CMV-GPC-3-miRNA-3;

[0012] p-CMV-GPC-3-miRNA-4;

[0013] p-CMV-GPC-3-miRNA-1 插入序列正、反义链(5' -3') 分别为

[0014] F: 5-TGCTGTGAATTAGTTCCTTCTTCGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCGAAGAAGAACTAATTCA-3

[0015] R: 5-CCTGTGAATTAGTTCCTTCTTCGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCGAAGAAGGGAAGAACTAATTAC-3

[0016] p-CMV-GPC-3-miRNA-2 插入序列正、反义链(5' -3') 分别为

[0017] F: 5-TGCTGTAATTTGACTGACCACTGGCTGTTTTGGCCACTGACTGACAGCCAGTGCAGTCAAATTA-3

[0018] R: 5-CCTGTAATTTGACTGCACTGGCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGCCAGTGGTCAAGTCAAATTAC-3

[0019] p-CMV-GPC-3-miRNA-3 插入序列正、反义链(5' -3') 分别为

[0020] F: 5-TGCTGTTCATTAGCTGGGTATAGATGGTTTTGGCCACTGACTGACCATCTATACAGCTAATGAA-3

[0021] R:5-CCTGTTTCATTAGCTGTATAGATGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCATCTATACCCAGCTAATGAAC-3

[0022] p-CMV-GPC-3-miRNA-4 插入序列正、反义链(5' -3') 分别为

[0023] F:5-TGCTGAATACTTTCAGGTCACGTCTTGTGTTTGGCCACTGACTGACAAGACGTGCTGAAAGTATT-3

[0024] R:5-CCTGAATACTTTCAGCACGTCTTGTTCAGTCAGTGGCCAAAACAAGACGTGACCTGAAAGTATTC-3

[0025] 在一些实施方式中,干扰效率最高的重组质粒为:

[0026] p-CMV-GPC-3-miRNA-1。

[0027] 在一些实施方式中,载体为 pcDNA<sup>TM</sup>6. 2-GW/EmGFP-miR。

[0028] 在一些实施方式中,干扰效率最高的重组质粒转染至 HepG2 细胞中构建转染 HepG2 细胞中使用 Genjet<sup>TM</sup> 转染试剂,得到稳定转染 HepG2 细胞使用的筛选试剂为杀稻瘟菌素。

[0029] 在一些实施方式中,步骤(3)中转染 HepG2 细胞接种裸鼠皮下构建人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型的方法为:收集对数生长期的转染 HepG2 细胞,以  $2 \times 10^7 / (0.2\text{ml} \cdot \text{只})$  接种于裸鼠右肩胛部皮下,形成直径 4mm 左右的皮下隆起。

[0030] 在一些实施方式中,测定转染 HepG2 细胞生长情况的方法为为测肿瘤生长曲线和免疫组织化学分析。

[0031] 在一些实施方式中,测肿瘤生长曲线方法为:

[0032] 接种后,每天观察裸鼠的生存状况、注射部位有无感染和破溃、肿瘤生长后有无自然消退并记录每组肿瘤长出时间;待肿瘤出现后,每周用游标卡尺测量肿瘤长、短径,根据公式:肿瘤体积  $V(\text{mm}^3) = 0.5 \times a \times b^2$  ( $a =$  长径,  $b =$  短径),计算肿瘤体积,并根据体积的均数值绘制肿瘤生长曲线。于接种后 35 天用颈椎脱臼法处死裸鼠,大体观察移植瘤的生长状况及周围脏器受累情况;剥离肿瘤用生理盐水冲洗、擦干,拍照;将标本浸入 4% 多聚甲醛内固定 24h,备用;

[0033] 免疫组织化学分析方法为:

[0034] 将上述测肿瘤生长曲线方法中备用的标本脱蜡,水化,双氧水阻断内源性过氧化物酶,高压加热法修复抗原,正常动物血清封闭非特异性结合;分别滴加 GPC-3、 $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$  及 cyclinD1 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,PBS 漂洗;滴加生物素标记的第二抗体,室温孵育 10min, PBS 漂洗;滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶,室温孵育 10min, PBS 冲洗;滴加新鲜配制的四盐酸二氨基联苯胺溶液,室温显色,蒸馏水洗涤,苏木素复染,无水乙醇脱水透明、封片;光学显微镜观察、摄像;以 0.01 mol/L PBS (pH=7.5) 替代第一抗体、第二抗体作阴性对照。

[0035] 在一些实施方式中,针对 4 种 GPC-3-miRNA 重组质粒设计 p-CMV-Neg-miRNA 质粒作为对照;

[0036] p-CMV-Neg-miRNA 插入序列正、反义链(5' -3') 分别为:

[0037] F;5-tgctgAAATGTACTGCGGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT-3

[0038] R:5-cctgAAATGTACTGCGGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCCTCCACGCAGTACATTTc-3

[0039] 本发明专利申请的方法可以用于沉默 GPC-3 对移植瘤的研究。

[0040] 本发明专利申请的方法能够检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力。

[0041] 可以得出如下结果:

[0042] 沉默 GPC-3 基因转录延长人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型潜伏期。

- [0043] 沉默 GPC-3 基因转录延缓肝癌裸鼠移植瘤生长速度。
- [0044] 沉默 GPC-3 基因转录明显肝癌裸鼠移植瘤。
- [0045] 沉默 GPC-3 基因转录使肝癌裸鼠移植瘤中 GPC-3、 $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$ 、cyclinD1 表达水平低于空白对照组。
- [0046] 并且本发明专利申请的方法简单高效,明确的表明了沉默 GPC-3 基因转录对抑制肝癌裸鼠移植瘤有着明显能力。

#### 附图说明

- [0047] 图 1 为本发明一实施方式的测定人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型潜伏期的比较图；
- [0048] 图 2 为本发明一实施方式的测定皮下移植瘤生长曲线；
- [0049] 图 3 为本发明一实施方式的检测肝癌移植瘤抑制效果比较图；
- [0050] 图 4 为本发明一实施方式的免疫组化检测瘤组织 Wnt 信号通路相关蛋白表达图。

#### 具体实施方式

##### [0051] 实施例

##### [0052] 1.1 材料的准备：

[0053] 人 HepG2 细胞株购自中科院上海细胞所；胎牛血清、胰蛋白酶溶液及磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自美国 Invitrogen 公司；二甲基亚砜及杀稻瘟菌素购自美国 Sigma 公司；GenJet™ DNA In Vitro Transfection Reagent 购自美国 SignaGen 公司；鼠抗人 GPC-3 抗体购自美国 Abcam 公司； $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$ 、cyclinD1 及  $\beta$ -actin 兔抗人抗体购自美国 CST 公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及羊抗鼠 IgG 抗体购自英国 Everest Biotech 公司。

##### [0054] 1.2 实验动物的准备：

[0055] 18 只 BALB/c 裸鼠由 (南通大学实验动物中心提供), 鼠龄 4 ~ 6 周, 体重 18 ~ 20g, 雌雄各半, 随机分对照组 (untreated 组)、miRNA 阴性组 (miRNA-neg 组) 和 miRNA 干扰组 (GPC-3-miRNA 组), 每组 6 只, 于 SPF 条件下饲养。

##### [0056] 1.3 HepG2 细胞的培养

[0057] 人肝癌细胞株 HepG2 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中贴壁培养, 待细胞融合度 > 80% 时传代。

[0058] 在前期准备完成的条件下, 具体采用以下步骤检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力：

##### [0059] 2.1 四种 GPC-3-miRNA 重组质粒设计与合成

[0060] 针对靶基因 human GPC3, Gene ID:2719 的 4 个转录本的共有序列, 利用 Invitrogen miRNA 设计系统软件设计 4 对 miRNA 寡聚单链 DNA 及阴性对照序列寡聚单链 DNA, 序列见表 1。

[0061] 将 4 对 miRNA 寡聚单链 DNA 及阴性对照序列寡聚单链 DNA 分别用双蒸水溶解成 100  $\mu$  M, 互补单链各取 5  $\mu$  L 混合, 10 $\times$  退火缓冲液 2  $\mu$  L, 双蒸水补齐至 20  $\mu$  L, 95°C 加热 5min, 室温冷却 20min, 形成相应 dsDNA。

[0062] 将相应退火的 dsDNA 继续稀释成 10nM, 取 4  $\mu$  L, 载体 pcDNA™6.2-GW/

EmGFP-miR2  $\mu$  L,  $5\times$  连接缓冲液  $4\mu$  L, T4DNA 连接酶  $1\mu$  L, 双蒸水补齐至  $20\mu$  L, 室温连接 30min, 获得 5 种连接产物。

[0063] 分别取  $10\mu$  l 连接产物转化  $100\mu$  l 感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 后接种到 LB/ 壮观霉素平板培养基上,  $37^\circ\text{C}$  孵箱中培养过夜, 长出的菌落即为阳性菌落, 挑出菌落扩增, 提取重组质粒, 测序鉴定。四种 GPC-3-miRNA 重组质粒分别为: p-CMV-GPC-3-miRNA-1、p-CMV-GPC-3-miRNA-2、p-CMV-GPC-3-miRNA-3 和 p-CMV-GPC-3-miRNA-4, GPC-3-miRNA 重组质粒的阴性对照为 p-CMV-Neg-miRNA, 序列见表 1。

[0064] 将构建的 4 种重组质粒, 通过荧光定量 PCR 筛选干扰效率最好的一对, 即 p-CMV-GPC-3-miRNA-1。

[0065] 表 1 GPC-3-miRNA 载体质粒名称及序列

名称	正、反义链 (5'-3')
	F:5-TGCTGTGAATTAGTTCCCTTCTTCGGGTTTTGGCCACTGA
p-CMV-GPC-3-miRNA-1	CTGACCCGAAGAAGAAGAACTAATTCA-3
	R:5-CCTGTGAATTAGTTCTTCTTCGGGTCAGTCAGTGGCCAA
	AACCCGAAGAAGGGAAGAACTAATTCAC-3
	F:5-TGCTGTAATTTGACTGACCACTGGCTGTTTTGGCCACTGA
p-CMV-GPC-3-miRNA-2	CTGACAGCCAGTGCAGTCAAATTA-3
	R:5-CCTGTAATTTGACTGCACTGGCTGTCAGTCAGTGGCCAA
	AACAGCCAGTGGTCAGTCAAATTAC-3
	F:5-TGCTGTTCATTAGCTGGGTATAGATGGTTTTGGCCACTGA
p-CMV-GPC-3-miRNA-3	CTGACCATCTATACAGCTAATGAA-3
	R:5-CCTGTTCATTAGCTGTATAGATGGTCAGTCAGTGGCCAA
	AACCATCTATACCCAGCTAATGAAC-3
	F:5-TGCTGAATACTTTCAGGTCACGTCTTGTTTTGGCCACTGA
p-CMV-GPC-3-miRNA-4	CTGACAAGACGTGCTGAAAGTATT-3
	R:5-CCTGAATACTTTCAGCACGTCTTGTCAGTCAGTGGCCAA
	AACAAGACGTGACCTGAAAGTATTC-3

[0066]

F;5-tgctgAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGAC

p-CMV-Neg-miR TGACGTCTCCACGCAGTACATTT-3

[0067] NA R:5-cctgAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAA

ACGTCTCCACGCAGTACATTTc-3

---

## [0068] 2.2 细胞转染及筛选

[0069] 将两组 HepG2 细胞(miRNA-neg 及 GPC-3-miRNA 组)种板 24h,肉眼观细胞密度达到 70% 左右时,利用 Genjet™ 转染试剂将 p-CMV-Neg-miRNA、p-CMV-GPC-3-miRNA-1 分别转染至 miRNA-neg 及 GPC-3-miRNA 组 HepG2 细胞中,利用杀稻瘟菌素对转染后的 HepG2 细胞筛选,得到上述稳定转染 HepG2 细胞克隆,扩增培养。

## [0070] 2.3 移植瘤裸鼠模型建立

[0071] 分别收集对数生长期 miRNA-neg 组稳定转染 HepG2 细胞、GPC-3-miRNA 组稳定转染 HepG2 细胞和 untreated 组(原始 HepG2)细胞,以  $2 \times 10^7 / (0.2\text{ml} \cdot \text{只})$  接种于裸鼠右肩胛部皮下,形成直径 4mm 左右的皮下隆起。

## [0072] 2.4 测定转染 HepG2 生长情况:

### [0073] 2.4.1 肿瘤生长曲线

[0074] 接种后,每天观察裸鼠的生存状况、注射部位有无感染和破溃、肿瘤生长后有无自然消退并记录每组肿瘤长出时间。待肿瘤出现后,每周用游标卡尺测量肿瘤长、短径,根据公式:肿瘤体积  $V(\text{mm}^3) = 0.5 \times a \times b^2$  ( $a =$  长径,  $b =$  短径),计算肿瘤体积,并根据体积的均数值绘制肿瘤生长曲线。于接种后 35 天用颈椎脱臼法处死裸鼠,大体观察移植瘤的生长状况及周围脏器受累情况。剥离肿瘤用生理盐水冲洗、擦干,拍照。将标本浸入 4% 多聚甲醛内固定 24h,备用。

### [0075] 2.4.2 免疫组织化学分析

[0076] 将上步骤的标本常规脱蜡,水化,双氧水阻断内源性过氧化物酶,高压加热法修复抗原,正常动物血清封闭非特异性结合。分别滴加 GPC-3、 $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$  及 cyclinD1 抗体,4℃ 过夜, PBS 漂洗;滴加生物素标记的第二抗体,室温孵育 10min, PBS 漂洗;滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶,室温孵育 10min, PBS 冲洗;滴加新鲜配制的四盐酸二氨基联苯胺溶液,室温显色,蒸馏水洗涤,苏木素复染,无水乙醇脱水透明、封片。日本 Olympus 公司 BX50 光学显微镜观察、摄像;以 0.01 mol/L PBS (pH=7.5) 替代第一抗体、第二抗体作阴性对照。

### [0077] 2.4.3 统计学处理

[0078] 利用 SPSS18.0 软件进行单向方差分析 (One-way ANOVA)。测定值以均数  $\pm$  标准差表示,阳性细胞所占百分比的比较采用  $\chi^2$  检验,肿瘤平均体积采用 t 检验。P<0.05 认为差异具有统计学意义。

## [0079] 实施效果

### [0080] 3.1HepG2 人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型潜伏期

[0081] 实验组(GPC-3-miRNA 组)裸鼠皮下肿瘤形成与对照组(untreated 和 miRNA-neg 组)相比潜伏期延长,平均为  $11.17 \pm 0.98$  天,miRNA-neg 和 untreated 组肿瘤形成的潜伏

期分别为  $5.5 \pm 0.55$  天、 $5.33 \pm 0.52$  天, 实验组肿瘤形成明显延迟,  $P < 0.01$ 。miRNA-neg 组和 untreated 组相比未见统计学明显差异,  $P > 0.05$ 。见图 1。显示将沉默 GPC-3 的 HepG2 稳定株给予裸鼠皮下注射, GPC-3-miRNA 阻断 GPC-3 表达后, HepG2 细胞移植瘤在裸鼠皮下生长受到了显著抑制。

[0082] 3.2 人肝癌 HepG2 细胞荷瘤生长曲线取 0.2ml HepG2 细胞悬液在裸鼠右肩胛部皮下注射, 形成直径 4mm 左右的皮下隆起, 第二日后隆起逐渐被吸收; 对照组第 5 天左右, 接种部位出现扁平结节, 并逐渐长大。实验组裸鼠皮下肿瘤生长速度明显慢于对照组, 实验结束时差异最为明显。实验结束时, GPC-3-miRNA 组瘤体积为  $65.48 \pm 13.66 \text{mm}^3$  明显小于对照组, 对照组分别为  $404.83 \pm 52.63 \text{mm}^3$ ,  $365.67 \pm 14.47 \text{mm}^3$ , 实验组和对照组相比  $P < 0.01$ , 表明沉默 GPC-3 具有一定的抑制肿瘤生长的作用。对照组相比未见统计学明显差异,  $P > 0.05$ 。实验过程中全部动物均无自然死亡。见图 2。HepG2 细胞在裸鼠中的成瘤能力明显降低, 提示抑制 GPC-3 的表达在一定程度上能抑制 HepG2 细胞的增殖能力。

[0083] 3.3 肝癌移植瘤抑制效果移植瘤外观呈粉红色, 表面凹凸不平, 无破溃, 肿瘤组织表面纤维包膜完整易分离, 瘤组织质中, 呈结节状或分叶状。其他组织和器官未见转移的癌肿病灶见图 3。

[0084] 3.4 免疫组化检测 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路关键分子表达免疫组织化学法分别检测瘤组织内 GPC-3、 $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$ 、cyclinD1 蛋白的表达情况。GPC-3-miRNA 组中 GPC-3、 $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$ 、cyclinD1 表达水平低于对照组。见图 4。为了研究 GPC-3 以何种机制影响肿瘤细胞的增殖, 利用免疫组化检测了 Wnt 信号通路关键分子 p-GSK3 $\beta$  及其下游信号分子  $\beta$ -catenin 和 cyclinD1 的表达, 结果显示阻断 GPC-3 后,  $\beta$ -catenin、p-GSK3 $\beta$  及 cyclinD1 表达同样减少。本方法显示阻断 GPC-3 使细胞中  $\beta$ -catenin 和 cyclinD1 的表达水平降低, 导致细胞周期 G1 期阻滞, 细胞增殖受抑。

[0085] 本检测沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法, 可以用于 GPC-3 对移植瘤的研究, 显示沉默 GPC-3 基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤的作用, 对肝癌的研究有着良好的支持作用。

[0086] 以上所述的仅是本发明的一些实施方式。对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明创造构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都属于本发明的保护范围。

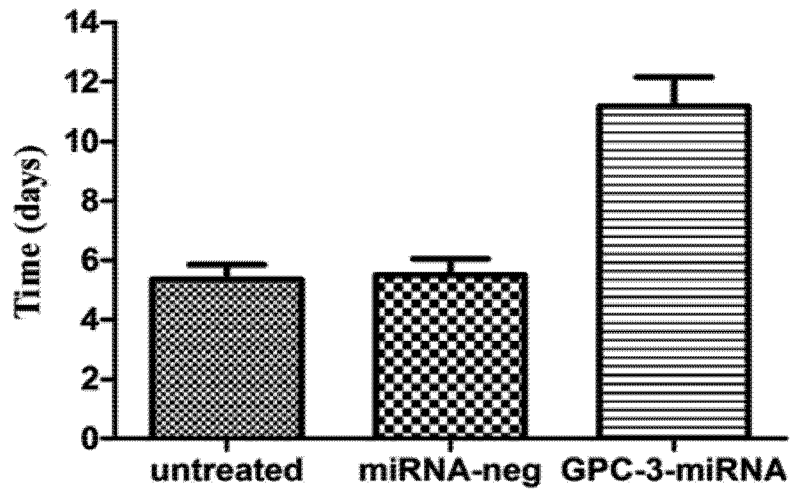


图 1

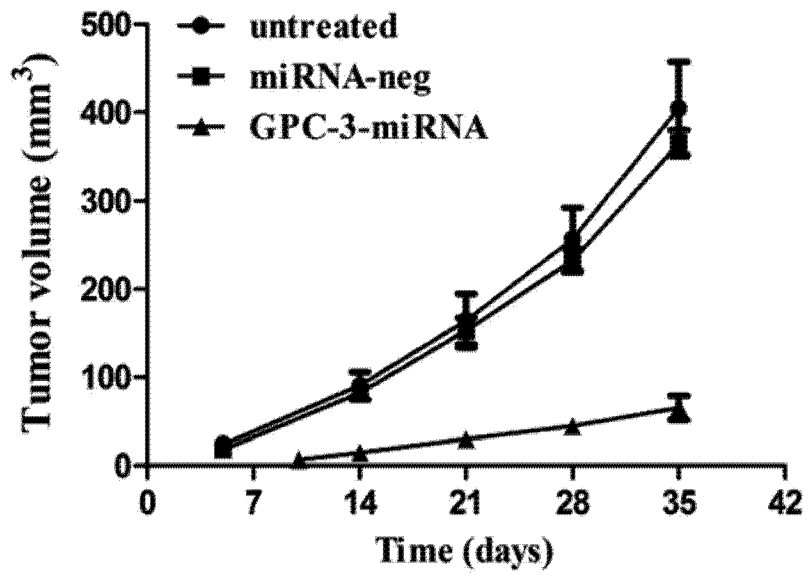


图 2

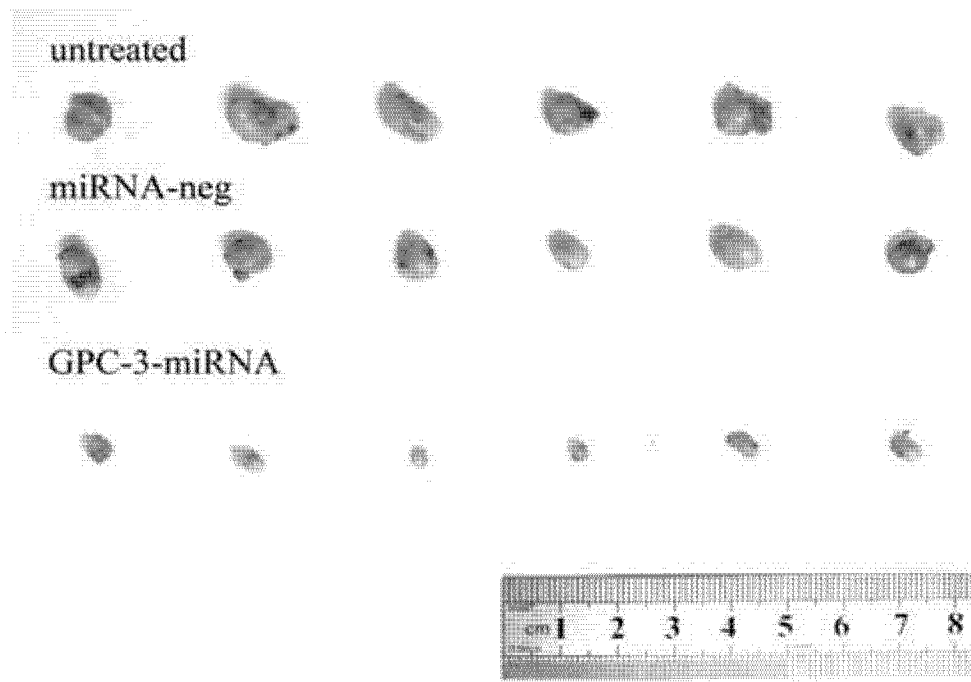


图 3

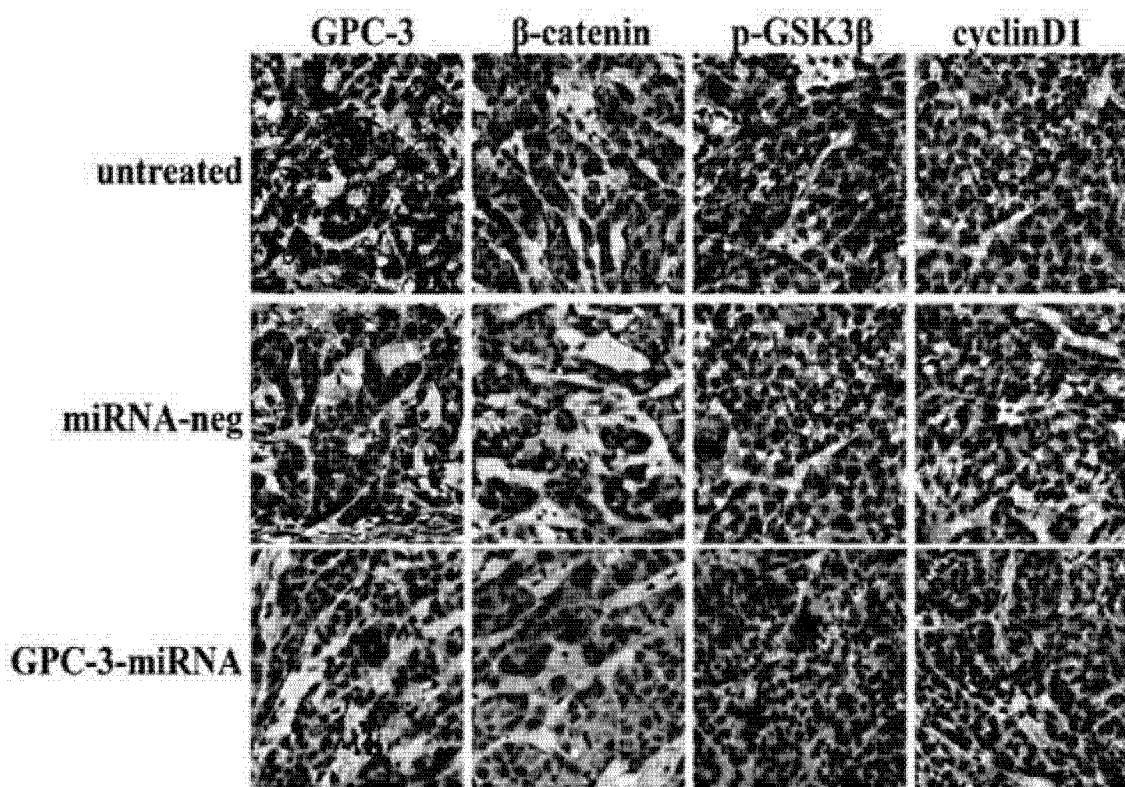


图 4

专利名称(译)	检测沉默GPC-3基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103743902A</a>	公开(公告)日	2014-04-23
申请号	CN201310601573.5	申请日	2013-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
[标]发明人	姚登福 陈洁 姚敏 王理		
发明人	姚登福 陈洁 姚敏 王理		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/535 C12N15/85		
CPC分类号	G01N33/5011 C12N15/85		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测沉默GPC-3基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力的方法。通过1) 针对靶基因共有序列设计并合成4对miRNA寡聚单链DNA, 再合成相应dsDNA, 将dsDNA插入载体构建4种重组质粒, 并通过荧光定量PCR挑选出干扰效率最高的一种重组质粒; 2) 将上述干扰效率最高的重组质粒转染至HepG2细胞中构建转染HepG2细胞, 并对其筛选, 得到稳定转染HepG2细胞; 3) 将上述稳定转染HepG2细胞接种裸鼠皮下构建人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型; 4) 而后测定上述稳定转染HepG2细胞在人肝癌细胞荷瘤裸鼠模型中生长情况。通过以上方法来检测沉默GPC-3基因转录抑制肝癌裸鼠移植瘤能力, 可以用于GPC-3对移植瘤的研究。

