

## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101726577 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200810199074.7

(22) 申请日 2008.10.13

(71) 申请人 中山大学

地址 510080 广东省广州市中山二路 74 号  
中山大学北校区

(72) 发明人 项鹏 杨旭辉 夏添

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司  
44202

代理人 刘宇峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

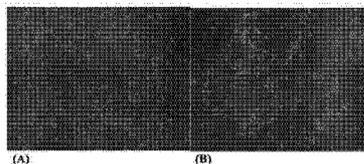
权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 5 页

### (54) 发明名称

通过干扰巢蛋白表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法。本发明所述的方法包括以下步骤:A. 提供肿瘤的特异性细胞株和培养条件;B. 鉴定上述肿瘤细胞株表达巢蛋白的表达;C. 加入待筛选的药物;以及D. 培养 48 小时或更长的时间,检测巢蛋白的表达,检测结果与 B 步骤的结果进行比较,如果出现巢蛋白表达下调的情形,该待选药物成为抑制肿瘤增殖和/或促进细胞凋亡的先导药物。本发明获得巢蛋白与肿瘤细胞生长,增殖,凋亡和迁移等生命活动关系的直接证据,证实了建立通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法是可行的,本发明首次提出了这种筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法。



1. 一种通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- A. 提供肿瘤的特异性细胞株和培养条件;
- B. 鉴定上述肿瘤细胞株表达巢蛋白的表达;
- C. 加入待筛选的药物;以及

D. 培养 48 小时或更长的时间,检测巢蛋白的表达,检测结果与 B 步骤的结果进行比较,如果出现巢蛋白表达下调的情形,该待选药物成为抑制肿瘤增殖和 / 或促进细胞凋亡的先导药物。

2. 根据权利要求 1 所述的通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,其特征在于:所述步骤 A 中,所述的肿瘤细胞株是小鼠黑色素瘤 B16 细胞株或人黑色素瘤 UACC903 细胞株,所述培养基是通用的哺乳类动物细胞培养液,培养条件是 5% CO<sub>2</sub>、37°C。

3. 根据权利要求 1 所述的通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,其特征在于:所述步骤 B 中,所述鉴定方法是用免疫荧光细胞化学和 RT-PCR 方法鉴定巢蛋白的表达。

4. 根据权利要求 1 所述的通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,其特征在于:所述步骤 C 中,所述待筛选的药物是 SiRNA 序列。

5. 根据权利要求 1 所述的通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,其特征在于:所述步骤 D 中,所述检测巢蛋白的表达的方法是免疫荧光细胞化学和 RT-PCR 检测方法。

## 通过干扰巢蛋白表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,涉及一种筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,尤其是涉及一种通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法。

### 背景技术

[0002] 细胞骨架蛋白在细胞运动、分裂、信息传递、能量转换、代谢调控以及纤维细胞形态方面具有重要作用。细胞骨架,按纤维直径的大小又可将其分为微管、微丝、中间纤维或称中间丝以及微梁格。中间纤维的分布具有严格的组织特异性。这一点已被应用于肿瘤临床鉴别诊断,以鉴别肿瘤细胞的组织来源。巢蛋白(巢蛋白)是第 VI 中间丝蛋白。在哺乳动物中,巢蛋白最早发现表达在发育中的神经系统和成年神经系统的神经前体细胞表面,随后在神经系统以外的其他部位如肝脏、血管内皮、骨骼肌、表皮基底层、毛囊、肾脏足细胞等也发现了巢蛋白的表达,而当这些组织细胞发育成熟以后,巢蛋白就停止表达,当成熟的细胞又发生再生(如缺血、坏死、新生瘤样变)时,巢蛋白又呈现返祖性表达。在恶性黑色素细胞瘤中,随着肿瘤侵袭性增强,巢蛋白的表达也增强。这些已发现的现象可能表明:巢蛋白与细胞的增殖和恶性度是有一定关系的。

[0003] 目前尚没有任何关于巢蛋白对肿瘤细胞增殖、凋亡以及还未被人所知的功能的研究报道。这种中间丝蛋白参与什么样的信号通路,影响细胞什么方面的生物学功能,进而影响机体的功能,这些都是值得研究和探讨的方面。研究巢蛋白对于细胞的生长,增殖,凋亡,迁移,分化方面是否有影响,巢蛋白影响细胞的哪一些信号通路,也有助于应用在细胞治疗一些疾病,如癌症,细胞增殖性疾病,等等。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种新的筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,具体是通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法。

[0005] 本发明所述的一种通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,包括以下步骤:A. 提供肿瘤的特定细胞株和培养条件;B. 鉴定上述肿瘤细胞株表达巢蛋白的表达;C. 加入待筛选的药物;以及 D. 培养 48 小时或更长的时间,检测巢蛋白的表达,检测结果与 B 步骤的结果进行比较,如果出现巢蛋白表达下调的情形,该待选药物成为抑制肿瘤增殖和/或促进细胞凋亡的先导药物。

[0006] 优选地,所述步骤 A 中,所述的肿瘤细胞株是小鼠黑色素瘤 B16 细胞株或人黑色素瘤 UACC903 细胞株,所述培养基是通用的哺乳类动物细胞培养液,培养条件是 5% CO<sub>2</sub>、37°C。

[0007] 优选地,所述步骤 B 中,所述鉴定方法是用免疫荧光细胞化学和 RT-PCR 方法鉴定巢蛋白的表达。

[0008] 优选地,所述步骤 C 中,所述待筛选的药物是 SiRNA 序列。

[0009] 优选地,所述步骤 D 中,所述检测巢蛋白的表达的方法是免疫荧光细胞化学和 RT-PCR 检测方法。

[0010] 本发明首先通过对巢蛋白巢蛋白在不同肿瘤组织中的表达的研究,证实了巢蛋白在血管肉瘤和胃肠道间质肿瘤中的表达和恶性度成正相关。首次发现巢蛋白在胰腺腺癌,肝内胆管细胞癌,肺鳞癌和肺腺癌、急慢性粒细胞性白血病,血管肉瘤的肿瘤细胞中也有表达,目前均未见报道。

[0011] 本发明以小鼠黑色素细胞瘤 B16 和人黑色素瘤 UACC903 为例,通过实验研究巢蛋白短暂表达下调对小鼠黑色素细胞瘤 B16 增殖的影响,以及利用慢病毒实验研究巢蛋白长期表达下调对小鼠黑色素细胞瘤 B16 增殖的影响。

[0012] 本发明以 SiRNA 序列作为药物筛选的示例,验证了上述方法的可行性,通过建立长期干扰巢蛋白表达的小鼠黑色素瘤细胞系 B16F10 和人黑色素瘤细胞系 UACC903,获得巢蛋白与肿瘤细胞生长,增殖,凋亡和迁移等生命活动关系的直接证据。首次发现干扰 B16F10 巢蛋白基因表达与对照组细胞相比倍增时间延长,细胞增殖减慢,更易于凋亡。首次发现干扰人黑色素瘤细胞 UACC903 的巢蛋白基因表达,降低 UACC903 迁移,使细胞增殖减慢,更易于凋亡。从功能上证明了巢蛋白在肿瘤细胞增殖发育上的重要作用。

[0013] 因此,建立通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法是可行的,也是非常有应用前景的。本发明首次提出了这种筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法。

[0014] 本发明在实验过程中已经完成了对三种设计的 SiRNA 序列的筛选,表明其中有两种 SiRNA 序列有效地干扰小鼠 B16 细胞株巢蛋白表达,从而抑制小鼠黑色素细胞瘤 B16 的增殖和促进肿瘤细胞凋亡。基于同样的原理和操作,我们也可以对其他潜在的抗癌药物进行筛选。

[0015] 本发明同时构建一个能够长期干扰 B16 细胞巢蛋白表达的慢病毒载体质粒,装入经筛选的 SiRNA 序列后,应用在体内肿瘤模型,瘤体内直接注射巢蛋白表达下调的 lentivirus 直接研究巢蛋白对在体肿瘤增殖凋亡的影响,为肿瘤的临床治疗提供一定的实验依据。

[0016] 由此,本发明所述的通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法,也可用于除干扰 RNA 以外其他潜在的抗肿瘤药物的筛选。

#### 附图说明

[0017] 图 1 是干扰小鼠巢蛋白表达对照组和干扰组干扰小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞 48 小时后光镜检查的结果图,左边的 (A) 图是对照组,右边的 (B) 图是干扰组。

[0018] 图 2 是 SiRNA 00380nM 干扰小鼠 B16 48 小时后 10mM(+)-Sodium L-ascorbate 促凋亡不同时间段光镜图 (200X)。

[0019] 图 3 是 SiRNA 00380nM 干扰小鼠 B16 48 小时后 10mM(+)-Sodium L-ascorbate 促凋亡 6、12、24 小时 caspase 3 和 heochst 染色图 (200X)。

[0020] 图 4 是干扰小鼠巢蛋白表达对照组和干扰组干扰小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞 48 小时后光镜检查的结果图,左边的 (A) 图是 SiRNA80nM 干扰组,右边的 (B) 图是对照组。

[0021] 图 5 的 A、B 是 80nM 对照、80nM SiRNA 1 转染 UACC903 细胞 48 小时后光镜结果图, A 为对照组, B 为干扰组 (100X, bar = 200); C、D 分别是 80nM 对照、80nM SiRNA 1 转染 UACC903 细胞 48 小时后 Ki-67 染色结果 (red), 干扰组细胞增殖明显下降 (200X, bar = 100)。

[0022] 图 6 为分别用对照或干扰序列转染人 UACC903 48 小时后用 8 $\mu$ m 孔径的 Transwell 做体外迁移实验, A 图是对照序列转染细胞的迁移结果, B 图是巢蛋白表达下调细胞的迁移结果, 与对照组相比, 干扰组细胞迁移明显减少。(200X, bar = 100)

[0023] 图 7 为慢病毒载体质粒 PLL3.7 的图谱。HpaI 和 XhoI 是酶切位点, 新合成片段即插入在位于 U6 启动子下游的 HpaI 和 XhoI 的酶切位点中。

[0024] 图 8 是干扰小鼠巢蛋白表达的慢病毒与乱序对照组慢病毒感染 B16 细胞 72 小时后荧光图, A. 干扰巢蛋白表达的慢病毒, 绿色是 GFP, B. 红色是巢蛋白; C. 乱序对照组的慢病毒, 绿色是 GFP, D. 红色是巢蛋白。

[0025] 图 9 为 A-C 有效干扰巢蛋白表达的 UACC903 细胞株荧光染色。A. UACC903 细胞株表达绿色荧光。B. 巢蛋白 (Red) 的免疫组化染色几乎没有表达。C. 对应的 Hoechst (blue) 核染色。D-E 对照组的 UACC903 细胞株荧光染色。D. UACC903 细胞株表达绿色荧光。E. 巢蛋白 (Red) 的免疫组化染色可以看见荧光表达。F. 对应的 Hoechst (blue) 核染色。(200X, bar = 100)

[0026] 图 10 为长期干扰巢蛋白表达的人黑色素瘤 UACC903 细胞的不同时间段细胞表面和形态的观察图。A. 对照组病毒感染第 3 天, (200X, bar = 100)。B. 对照组病毒感染第 8 天, (200X, bar = 100)。C. 干扰组病毒感染第 3 天, (200X, bar = 100)。D. 干扰组病毒感染第 8 天, 出现成团生长和凋亡。(400X, bar = 50)

## 具体实施方式

[0027] 实施例一: 免疫组化检测巢蛋白在不同恶性度肿瘤中的表达

[0028] 本实验采用的病理组织切片主要来源于中山大学第一附属医院病理科和中山大学肿瘤防治中心病理科, 包括: 高, 低分化胃肠道间质肿瘤; 高, 低分化血管肉瘤, 海绵状血管瘤; 高分化, 中分化和低分化胰腺腺癌; 高分化, 中分化和低分化肝细胞性肝癌; 高、低分化肝内胆管细胞癌; 胚胎性横纹肌肉瘤, 腺泡型横纹肌肉瘤, 多型性横纹肌肉瘤, 恶性黑色素细胞瘤, 睾丸间质细胞瘤, 视网膜母细胞瘤, 良性和恶性胰岛细胞瘤, 高分化, 中分化, 低分化皮肤鳞癌; 造血系统肿瘤如急慢性淋巴细胞性白血病, 急慢性非淋巴细胞性白血病, MDS。

[0029] 巢蛋白在不同肿瘤组织切片上的表达:

[0030] 巢蛋白在血管肉瘤和海绵状血管瘤的表达: 在本实验所取的 15 例高分化血管肉瘤和 6 例低分化血管肉瘤中我们可以看到巢蛋白的表达, 但是在良性海绵状血管瘤中没有巢蛋白的表达, 只有在肿瘤的新生血管内皮细胞中表达巢蛋白。在低分化血管肉瘤中大约有 80% 的肿瘤细胞表达巢蛋白, 比较集中强度中等偏上。而在高分化血管肉瘤中只有大约 30% 肿瘤细胞表达巢蛋白, 两者巢蛋白组化指数有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

[0031] 巢蛋白在胃肠道间质肿瘤 (GIST) 中的表达: 在本实验所取的 14 例高度恶性和 14 例低度恶性 GIST 中, 都可以看到大约 70-80% 巢蛋白表达, 其中高度恶性 GIST 有大约 80%

表达巢蛋白,低度恶性 GIST 大约有 50% 表达巢蛋白。统计学分析两者的组化指数有统计学意义 ( $P = 0.003$ )。

[0032] 巢蛋白在胰腺腺癌的表达:本实验所取的 14 例高度恶性胰腺腺癌 (7/14) 和 6 例低度恶性胰腺腺癌 (3/8) 中可以看到巢蛋白的表达,表达强度中等,比较均一,其统计学上没有差异。

[0033] 巢蛋白在黑色素细胞瘤,横纹肌肉瘤的表达:巢蛋白在恶性黑色素瘤细胞的表达,而且表达很强,但是在良性黑色素细胞痣表面不表达;巢蛋白在腺泡形横纹肌肉瘤,胚胎性横纹肌肉瘤,多型性横纹肌肉瘤细胞表面都表达,而且在肿瘤组织中的一些正常的横纹肌表面也可以看到微量表达。

[0034] 巢蛋白在造血系统肿瘤中的表达:巢蛋白在 AML 骨髓涂片中表达,主要表达在一些圆形,卵圆形细胞表面;巢蛋白在 CML 骨髓涂片中也少量表达,主要也是表达在圆形细胞表面;巢蛋白在 MDS 骨髓涂片有中量表达,主要也是表达在圆形细胞表面。但是在 ALL 和 CLL 骨髓涂片表面不表达。

[0035] 巢蛋白在肝细胞性肝癌,肝内胆管细胞癌的表达:巢蛋白在肝细胞性肝癌表面不表达,仅仅表达在癌旁的新生血管内皮细胞上,在肝内胆管细胞癌表面有中等强度的表达。

[0036] 附:组化指数的计算与统计分析方法

[0037] 先规定一些指数:染色强阳性是“3”,中度阳性是“2”,弱阳性是“1”,在免疫组织化学切片上的肿瘤区随机取 7-12 个视野,在 200 倍镜下数每一个视野的肿瘤细胞数,同时数不同染色强度的肿瘤细胞数,然后将 7-12 个视野的肿瘤细胞总数相加,不同染色强度肿瘤细胞数也分别相加,最后除以肿瘤细胞总数得到不同染色强度肿瘤细胞所占的百分比,再乘以各自的染色强度指数,最后相加,得到的就是组化指数。比如:如果强阳性的肿瘤细胞占 20%,中阳性肿瘤细胞占 10%,弱阳性占 70%,最后的结果就是: $20\% \times 3 + 10\% \times 2 + 70\% \times 1 = 1.5$ ,即这个肿瘤切片的巢蛋白染色组化指数是 1.5。

[0038] 同一种组织类型肿瘤的高分化和低分化类型切片组化指数用均数  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm S.E.M$ ) 表示。统计学软件采用 SPSS10.0,用独立样本 T 检验对所有高、低分化的血管肉瘤,胃肠道间质肿瘤,胰腺腺癌进行统计,用双尾概率 P 值来表示, $P < 0.05$  表示有统计学差异, $P < 0.01$  表示有显著性差异。

[0039] 本实施例说明巢蛋白在不同类型的肿瘤中均有表达,且在血管肉瘤和胃肠道间质肿瘤中的表达和恶性度成正相关。这为本发明将巢蛋白应用于筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物奠定了基础。

[0040] 实施例二:小鼠黑色素细胞瘤 B16 的培养和对巢蛋白表达的监测方法的确立

[0041] 本实验所用的动物是清洁级 C57BL/6 小鼠,6-8 周龄,雌雄不限,购自中山大学医学实验动物中心。

[0042] 主要试剂

[0043] 荧光免疫化学试剂:

[0044] 一抗:小鼠抗大鼠 / 小鼠巢蛋白抗体 (巢蛋白),Chemicon 公司

[0045] 小鼠抗 BrdU 抗体,DSHB 公司

[0046] 小鼠抗小鼠 PCNA 抗体,Cell Signaling Technology 公司

[0047] 兔抗小鼠 Ki67 抗体,Abcam 公司

- [0048] 二抗 :Cy3 偶联的山羊抗小鼠 IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch 公司
- [0049] R-PE 偶联的山羊抗兔 IgG (H+L), SouthernBiotech 公司
- [0050] 血清 :山羊血清封闭液 (即用型), 武汉博士德生物工程公司
- [0051] S-P 免疫组化试剂盒 (Immunohistochemical Kit), 迈新公司
- [0052] 培养细胞试剂 :
- [0053] 高糖 DMEM 培养基, Gibco 公司
- [0054] 胎牛血清 (FBS), HycloneGonsi 公司
- [0055] 双抗生素 (Penicillin and streptomycin, Sigma, USA)
- [0056] 胰酶 /EDTA (Trypsin/EDTA, Gibco)
- [0057] DMSO (Sigma, USA)
- [0058] RT-PCR 试剂
- [0059] Trizol and RT-PCR kit 试剂盒 (Invitrogen)
- [0060] 小鼠  $\beta$ -actin 引物 (上海生工)
- [0061] 小鼠巢蛋白引物 (上海生工)
- [0062] 小鼠 B16 细胞原代培养与传代
- [0063] 给 6-8 周龄 C57BL/6J 小鼠背部皮下注射小鼠黑色素细胞瘤 B16 传代细胞  $1 \times 10^5$ 。一周以后小鼠背部长出肿瘤, 就可以实施原代取材。
- [0064] 75% 的酒精消毒背部皮肤两次, 断颈, 沿肿瘤边缘剪开背部皮肤, 剥离肿瘤外部包膜, 暴露黑色素细胞瘤, 选取没有组织筋膜, 没有血管和结缔组织的肿瘤区域, 轻轻剪下一块放入小培养皿中, 用眼科剪反复剪碎, 加入 0.25% /0.02% 的胰酶 /EDTA 1ml 于离心管中, 后将组织放入胰酶中消化, 反复吹打, 室温 5 分钟。用细吸管吸出吹打成单细胞的悬液, 并且用完全高糖培养基中和, 剩下的未消化组织继续加入 1ml 胰酶, 吹打消化 5 分钟。吸出, 中和, 反复直到所有的组织被消化成单细胞悬液。然后 1100rpm, 4 分钟离心, 弃上清, 以  $1-4 \times 10^5$  个 /mL 细胞密度种于 25mL 培养瓶中, 每瓶 4mL 培养液, 5%  $\text{CO}_2$ 、37°C 条件下培养。24 小时换液即可见到细胞成梭形贴壁, 3 天可以传代。
- [0065] 根据细胞的接种密度 2 天传代一次。吸去培养基, 0.01M PBS 清洗瓶底, 弃去 PBS, 加入 0.25% 胰酶 /EDTA, 37°C 消化 2-5 分钟。完全培养基中和胰酶, 把细胞转入离心管中, 1100rpm 离心 5 分钟。吸弃培养液, 用吸管吹打成单细胞悬液, 加入新鲜培养液, 以 1 : 3 细胞密度接种。
- [0066] 小鼠 B16 细胞株巢蛋白基因表达鉴定
- [0067] 免疫荧光细胞化学
- [0068] 细胞用 PBS 洗 2 次, 4% 的多聚甲醛固定 20 分钟, 用 0.01M PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。用免疫组化笔在盖玻片周围画圈, 二抗宿主血清封闭 60 分钟。吸弃血清后, 一抗室温孵育 4C 过夜。0.01M PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。二抗室温孵育 0.5-1 小时。0.01MPBS 洗 3 次, 每次 5-10 分钟。1g/ml Hoechst33344 衬染细胞核。荧光显微镜照相系统下观察拍照。
- [0069] RT-PCR 鉴定巢蛋白表达
- [0070] 提取总 RNA :预先将 P4 代小鼠 B16 细胞传入六孔板中, 培养两天待细胞融合至 80%, PBS 洗 2 遍, 每孔加入 trizol 1ml, 用 Tip 头吹打 4 分钟, 静置 4 分钟, 裂解细胞。8 分钟后将已裂解的细胞移入无 RNA 酶的 1.5ml 的 EP 管中, 然后加入 0.2ml 氯仿, 振荡 15 秒,

室温放置 5 分钟,12000g 4℃离心 15 分钟。将上层水相转移到一个新的离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,室温放置 20 分钟。12000g 4℃离心 10 分钟。弃去上清,加 1ml 无水乙醇洗涤 RNA 沉淀,7500g4℃离心 5 分钟。弃去上清,空气干燥 RNA 沉淀 5 分钟,用 DEPC 处理过的水 20ul 溶解 RNA,取出 1ul 加入 199ul 无 RNA 酶的水测定 OD260 和 OD280 的结果后计算 OD260/OD280,比值应该在 1.6-2.0 之间,同时再取出 2ulRNA 跑电泳,电泳胶用 1.2%。其余的 -80℃保存。

[0071] 合成 cDNA: 采用 Fermentas RT 试剂盒,在 20 $\mu$ l 体系加入 1 $\mu$ l Deoxyribonuclease,1ul Deoxyribonuclease buffer 和 1 $\mu$ g RNA,37℃孵育 30min 后,加入 25mM EDTA 1ul 65℃孵育 10min 以除 DNA 污染。处理后的 RNA 作为合成 cDNA 的模板,条件为:

[0072] 1 $\mu$ gRNA

[0073] Primer oligo(dT)180.5 $\mu$ g/ $\mu$ l $\times$ 1 $\mu$ l

[0074] DEPC-treated 水 to 11 $\mu$ l

[0075] 70℃孵育 5min,迅速置于冰上

[0076] 按顺序加入:

[0077] M-MLV 5 $\times$ reaction buffer 4 $\mu$ l

[0078] 10mM 4dNTP mix 2 $\mu$ l

[0079] Ribonuclease inhibitor 20U 1ul

[0080] 去离子水 (nuclease free)to 19 $\mu$ l

[0081] 37℃孵育 5min,加入 200units Rvert Aid M-MLV Reverse transcriptase,42℃孵育 60min 后再 70℃孵育 10min。迅速置于冰上。合成的 cDNA 作为下一步 PCR 的模板。

[0082] 聚合酶链反应 (PCR)

[0083] 按下列组份配制 PCR 反应液 (20ul 体系):

[0084] cDNA 0.8 $\mu$ l

[0085] 引物 1 (10uM) 1 $\mu$ l

[0086] 引物 2 (10uM) 1 $\mu$ l

[0087] Mg<sup>2+</sup>1.34ul

[0088] 10 $\times$ buffer without Mg<sup>2+</sup>2 $\mu$ l

[0089] dNTP (mixed) 2 $\mu$ l

[0090] Tag 0.68 $\mu$ l

[0091] 灭菌去离子水 11.2 $\mu$ l

[0092] 反应条件 (小鼠巢蛋白):预变性 95℃ 4 分钟,变性 95℃ 30 秒,退火 60℃ 1 分钟,延伸 72℃ 1 分钟。35 个循环扩增。

[0093] 反应条件 (小鼠  $\beta$ -actin):预变性 95℃ 4 分钟,变性 95℃ 30 秒,退火 58℃ 1 分钟,延伸 72℃ 1 分钟,30 个循环扩增。

[0094] 小鼠  $\beta$ -actin 引物序列采用:5' -agaagatctggcaccacacc-3'

[0095] 5' -tagcaccagaggcatacagg-3' 小鼠巢蛋白引物序列采用:5' -ggagagtcgcttagaggtgc-3'

[0096] 5' -gtcaggaaagccaagagaag-3'

- [0097] PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 凝胶成像仪照相。
- [0098] 实施例三: 巢蛋白表达短期下调对小鼠黑色素细胞瘤 B16 增殖和凋亡的影响
- [0099] 设计了三个 SiRNA 序列, 如下:
- [0100] siNM\_016701\_001
- [0101] 靶序列: AAAGGAGAATTGCAATTCA
- [0102] 正义链 (5' -3') : AAAGGAGAAUUGCAAUUCA dTdT
- [0103] 反义链 (3' -5') : dTdT UUUCUCUUAACGUUAAGU
- [0104] siNM\_016701\_002
- [0105] 靶序列: CAAAGCCTCTTAGAAATGA
- [0106] 正义链 (5' -3') : CAAAGCCUCUUAGAAAUGA dTdT
- [0107] 反义链 (3' -5') : dTdT GUUUCGGAGAAUCUUUACU
- [0108] siNM\_016701\_003
- [0109] 靶序列: GTGAGACTCTGGAATGCAA
- [0110] 正义链 (5' -3') : GUGAGACUCUGGAAUGCAA dTdT
- [0111] 反义链 (3' -5') : dTdT CACUCUGAGACCUUACGUU
- [0112] 阴性对照
- [0113] 靶序列: TTCTCCGAACGTGTCACGT
- [0114] 正义链 (5' -3') : UUCUCCGAACGUGUCACGU dTdT
- [0115] 反义链 (3' -5') : dTdT AAGAGGCUUGCACAGUGCA
- [0116] 实验方法: 消化 p5 小鼠黑色素细胞瘤 B16, 以  $2 \times 10^4$  / 孔接种在 24 孔板中, 24 小时后开始干扰, 选取 SiRNA 001、002、003 序列, 分别选用 30nM、50nM、80nM、100nM 的终浓度, 每一孔总体积 500ul, 各用 1ul lipofectmin 2000 和不同浓度的 SiRNA 重悬在 opti-MEM1500ul 中; 对照组用无关序列的 SiRNA 代替; 阴性对照组用 opti-MEM1 代替 SiRNA; 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 8 小时后换成完全培养基, 继续孵育 48 小时后分别用免疫荧光细胞化学和 RT-PCR 来检测巢蛋白的表达。检测方法依照实施例二所确定的方法进行。
- [0117] 结果显示: 001SiRNA 和 003SiRNA 干扰 48 小时不同浓度 RT-PCR 的结果, 002 序列没有干扰效果。001SiRNA 和 003SiRNA 片断 50nM, 80nM, 100nM 均可以不同程度干扰小鼠 B16 细胞巢蛋白的表达。
- [0118] 001SiRNA 和 003SiRNA  $\beta$ -actin 和巢蛋白灰度比见下表。
- [0119] 表一:
- [0120]

	50nM	80nM	100nM	对照
003. $\beta$ -actin	0.9741	0.8165	1.0047	1
003. 巢蛋白	0.4211	0.3556	0.3651	0.5054
巢蛋白 / $\beta$ -actin	0.4323	0.4355	0.3634	0.5054
001. $\beta$ -actin	1.1499	——	1.3553	1.1738
001. 巢蛋白	0.6717	——	0.5618	0.7631
巢蛋白 / $\beta$ -actin	0.5842	——	0.4145	0.6501

[0121] RNA 干扰巢蛋白表达后对小鼠恶性黑色素瘤 B16 增殖的影响

[0122] 光镜检查:干扰小鼠巢蛋白表达对照组和干扰组干扰 48 小时后光镜检查,如图 1 所示,可以看到细胞密度的差异性。图 1 中,A 是对照组,B 是干扰组。

[0123] 下面通过用 (+)-Sodium L-ascorbate(维生素 C 钠盐)促进 B16 细胞凋亡,进一步研究巢蛋白的表达缺失对小鼠 B16 凋亡的影响。

[0124] (+)-Sodium L-ascorbate 促凋亡对 SiRNA 003 干扰小鼠 B1648 小时后细胞的影响

[0125] 光镜及荧光显微镜观察

[0126] 按  $8 \times 10^4$ /孔接种 P5 小鼠 B16 在 6 孔板中,共接种 6 个孔。24 小时后用 SiRNA 00380nM 浓度干扰,乱序对照组用无关序列代替 SiRNA003,阴性对照组用 lipofectamin 2000 代替,每一组都设一个复孔。8 小时后换完全培养基,再过 48 小时,弃去完全培养基,每一孔加入 2ml 完全培养基,内含 100ul 0.2M(+)-Sodium L-ascorbate,终浓度 10mM,促凋亡 6 小时,光镜拍片。

[0127] SiRNA003,80nM 干扰小鼠 B1648 小时后,用 10mM Sodium L-ascorbate 促凋亡分别 3,6,24 小时,普通光学显微镜下观察细胞凋亡状态和染 heochst 观察细胞核的状态。结果促凋亡 3 个小时开始可以看到 SiRNA 003,80nM 干扰小鼠 B1648 小时后,用 10mM SodiumL-ascorbate 促凋亡 3 小时细胞开始少量凋亡,6 小时有大约 40-50% 细胞凋亡,24 小时大约有 80-90% 细胞凋亡。对照 SiRNA,80nM 组和 lipofectamin 2000 组干扰小鼠 B1648 小时后,用 10mM Sodium L-ascorbate 促凋亡 3 小时细胞几乎没有凋亡,6 小时有大约 10% 细胞凋亡,24 小时大约有 10-15% 细胞凋亡。见图 2。

[0128] 图 2 是 SiRNA 00380nM 干扰小鼠 B1648 小时后 10mM(+)-Sodium L-ascorbate 促凋亡不同时间段光镜图。10mM(+)-Sodium L-ascorbate 促凋亡 3 个小时可以看到:(A)SiRNA00380nM 干扰组开始有大量贴壁细胞凋亡(200X);(B)对照 80nM 组和(C) lipofectamin2000 阴性对照组几乎没有细胞凋亡(200X)。10mM(+)-Sodium L-ascorbate 促凋亡 6 个小时可以看到:(D)SiRNA 00380nM 干扰组有 40% 贴壁细胞凋亡(200X);(E)对照 80nM 组和(F) lipofectamin 2000 阴性对照组有不到 10% 的细胞凋亡(200X)。10mM(+)-SodiumL-ascorbate 促凋亡 24 个小时可以看到:(J)SiRNA 00380nM 干扰组有 80-90% 贴壁细胞凋亡(200X);(H)对照 80nM 组和(I) lipofectamin 2000 阴性对照组有 10-15% 的细胞凋亡(200X)。

[0129] 流式细胞仪检测 Annex-in V-FITC/PI(Ca<sup>+</sup> 依赖的磷脂结合蛋白 /PI)

[0130] 细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面,目前早期识别仍有困难。这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内转移到细胞膜外,使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂,正常主要存在于细胞膜的内面,在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 是一种 Ca<sup>+</sup> 依赖的磷脂结合蛋白,最初发现是一种具有很强的抗凝血特性的血管蛋白,Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性。对 PS 有高度的亲和性。因此,该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。

[0131] 将上述培养物,用 0.25% 的胰酶消化每一组细胞,收集包括上清液中的全部细胞,完全培养基中和,1100rpm 离心 4 分钟,0.01MPBS 清洗一次,用 1ml PBS 重悬送流式检测。

[0132] 10mM(+)-Sodium L-ascorbate 促凋亡 6 小时,光镜下可以看见 SiRNA 00380nM 干

扰组细胞在六孔板中间 100%脱落,边缘大约 50%脱落,控制序列组边缘和中央只有大约 10%脱落;阴性对照组有一孔几乎没有脱落细胞,复孔脱落细胞大约 50%。

#### [0133] MTT 检测

[0134] 按  $2 \times 10^4$ /孔接种 P5 小鼠 B16 在 24 孔板中,共接种 15 个孔。24 小时后用 SiRNA 00380nM 浓度干扰,乱序对照组用无关序列代替 SiRNA 003,阴性对照组用 lipofectamin 2000 代替,每一组都设一个复孔。8 小时后换完全培养基,再过 48 小时,弃去完全培养基,每一孔加入 1ml 完全培养基,内含 50ul 0.2M(+)-Sodium L-ascorbate,终浓度 10mM,促凋亡 24 小时,检测 MTT。在到达时间点的时候,吸去各孔培养基,避光加入 0.5mg/ml MTT 1ml/孔,避光在 37°C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 3 小时,取出避光吸去每一孔的 MTT,加入 1ml DMSO/孔,避光充分振荡 7 分钟,将每一孔的 DMSO 移入 1.5ml Eppendorf 管中,12000rpm 离心 5 分钟,上清在 570nm 处测定 OD 值。

[0135] 检测 3 小时各孔 MTT 的变化,可以看到 3 个小时不同组别以 003SiRNA 80nM 组最低,和 lipofectamin 2000 组比较有显著性差异。

#### [0136] caspase3 检测

[0137] 同上法 SiRNA 003,80nM 干扰小鼠 B1648 小时后,用 10mM Sodium L-ascorbate 促凋亡分别 3 小时,6 小时,24 小时,开始做 caspase 3 的免疫荧光细胞化学。细胞用 PBS 洗 2 次,4%的多聚甲醛固定 20 分钟,用含有 0.2%的 Triton X100 的 0.01M PBS 洗 3 次,每次 10 分钟。正常山羊血清封闭 60 分钟。吸弃血清后,一抗 caspase 3(1 : 200)4°C 过夜,室温复温 30 分钟。0.01M PBS 洗 3 次,每次 10 分钟。二抗(山羊抗小鼠 Cy3,1 : 150)室温孵育 45 分钟。0.01M PBS 洗 3 次,每次 5 分钟。1g/ml Hoechst33344 衬染细胞核。荧光显微镜照相系统下观察拍照。

[0138] 结果:可以看到促凋亡 6 小时有少量的 caspase 3 阳性细胞;促凋亡 12 小时有大约 20%的 caspase 3 阳性细胞;促凋亡 24 小时有大约 30%的阳性细胞,见图 3。

[0139] 本实施例揭示了巢蛋白短期表达下调对小鼠黑色素细胞瘤 B16 增殖和凋亡的影响,从而可以将巢蛋白表达下调(短期或长期)作为筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的一个重要指标之一。

[0140] 本实施例在实验过程中已经完成了对三种设计的 SiRNA 序列的筛选,表明其中有两种 SiRNA 序列有效地干扰小鼠 B16 细胞株巢蛋白表达,从而抑制小鼠黑色素细胞瘤 B16 的增殖和促进肿瘤细胞凋亡。基于同样的原理和操作,我们也可以对其他潜在的抗癌药物进行筛选。

#### [0141] 实施例四:巢蛋白表达短期下调对人黑色素细胞瘤 UACC903 增殖和凋亡的影响

##### [0142] 短期干扰的鉴定

[0143] 实验方法:消化 p5 人 UACC903 细胞,以  $2 \times 10^4$ /孔接种在 24 孔板中,24 小时后开始干扰,选取 SiRNA 001,002,003 片断,分别选用 30nM,50nM,80nM,100nM 的终浓度,每一孔总体积 500ul,各用 1ul lipofectmin 2000 和不同浓度的 SiRNA 重悬在 opti-MEMI500ul 中;乱序对照组用无关序列的 SiRNA 代替;阴性对照组用 opti-MEMI 代替 SiRNA;37 度,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 8 小时后换成完全培养基,继续孵育 48 小时后分别用免疫荧光细胞化学和 RT-PCR 来检测。

[0144] 结果见图 4。图 4 是干扰小鼠巢蛋白表达对照组和干扰组干扰小鼠恶性黑色素瘤

B16 细胞 48 小时后光镜检查的结果图,左边的 (A) 图是 SiRNA80nM 干扰组,右边的 (B) 图是对照组。显示:干扰人 UACC90348 小时后的巢蛋白染色(红色),与对照组相比干扰组巢蛋白染色明显下调。(200X, bar = 100)

[0145] 短期干扰对细胞增殖的影响

[0146] 实验方法:Ki67 的检测

[0147] 干扰 48 小时以后,细胞用 PBS 洗 2 次,4%的多聚甲醛固定 20 分钟,用含有 0.2%的 Triton X100 的 0.01M PBS 洗 3 次,每次 10 分钟。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 30 分钟,0.01MPBS 洗三次,一次 5 分钟。正常山羊血清封闭 15 分钟。吸弃血清后,一抗 PCNA(1 : 1000) 和 Ki67(1 : 100)4℃过夜,室温复温 30 分钟。0.01M PBS 洗 3 次,每次 10 分钟。生物素化二抗室温孵育 10 分钟。0.01M PBS 洗 3 次,每次 5 分钟。三抗室温孵育 10 分钟,0.01MPBS 洗 3 次,一次 10 分钟,DAB 显色 3 分钟,PBS 冲洗,苏木素复染 1 分钟,1%盐酸酒精分化 20 秒,自来水洗,正置显微镜照相系统下观察拍照。

[0148] 光镜观察

[0149] 取在 24 孔板中接种,80nM 干扰 24,48,72 小时的 p5UACC903 细胞,200 倍光镜下观察拍照。

[0150] 结果见图 5。图 5 的 A、B 是 80nM 对照、80nM SiRNA 1 转染 UACC903 细胞 48 小时后光镜结果图,A 为对照组,B 为干扰组 (100X, bar = 200);C、D 分别是 80nM 对照、80nM SiRNA 1 转染 UACC903 细胞 48 小时后 Ki-67 染色结果 (red),干扰组细胞增殖明显下降 (200X, bar = 100)。

[0151] 表二:

	组别	Ki67 平均组化指数	P (2-tailed)
[0152]	对照组	1.9291±0.5195**	0.000
[0153]	干扰组	0.8718±0.4810	

[0154] 上表可见,Ki67 表达的组化指数在干扰组和对照组之间有显著性差异,证明干扰巢蛋白表达影响了细胞增殖。

[0155] 流式细胞仪检测细胞周期

[0156] 取在六孔板中接种,80nM 干扰 48 小时的 p5UACC903 细胞,用胰酶消化成单个细胞,PBS 洗两次,1100rpm 离心 4 分钟,2mlPBS 重悬细胞,加入 70%冰乙醇 500u1 固定送流式测定细胞周期。

[0157] 流式细胞术检测细胞周期结果:从检测结果可以看到,对照组 S 期占细胞总数:53.77%,G0-G1 期 39.62%,G2-M 期 6.61%,G2/G1.91。在 004 干扰组 S 期占细胞总数:27.52%,G0-G1 期 60.70%,G2-M 期 11.78%,G2/G1.86。可以看出,对照组 DNA 合成期的细胞比例远远高于干扰组,处于 G0-G1 期的细胞比例低于干扰组,暗示干扰组细胞大多数处于 G0-G1 期。

	细胞类型	空白 (射门细胞总数%)	004.80 (射门细胞总数%)
[0158]	死亡细胞	1.48	3.53
	损伤细胞	1.26	1.87
	活细胞	72.10	85.21
	凋亡细胞	25.16	9.40

[0159] 短期干扰细胞凋亡的实验：

[0160] 实验方法：3.1.4.3.1 流式细胞仪检测 PI/ANNEX：

[0161] 按  $8 \times 10^4$ /孔接种 P5UACC903 在 6 孔板中，共接种 6 个孔。24 小时后用 SiRNA00480nM 浓度干扰，对照组用无关序列代替 SiRNA 004，对照组用 lipofectamin 2000 代替，每一组都设一个复孔。8 小时后换完全培养基，再过 48 小时，弃去完全培养基，同时 0.25% 的胰酶消化每一组细胞，收集包括上清液中的全部细胞，完全培养基中和，1100rpm 离心 4 分钟，0.01MPBS 清洗一次，用 1ml PBS 重悬送流式检测。

[0162] 流式细胞术检测细胞 Annexin-V-FITC/PI 结果：可见 80nM SiRNA 1 转染 UACC903 细胞 48 小时后收集细胞检测 Annexin-V-FITC/PI 的结果细胞有自发凋亡现象；对照组是 80nM 对照转染 UACC903 细胞 48 小时后收集细胞检测 Annexin-V-FITC/PI 的结果。

[0163] 人短期干扰细胞迁移的实验：

[0164] 实验方法：按  $8 \times 10^4$ /孔接种 P5UACC903 在 6 孔板中，共接种 6 个孔。24 小时后用 SiRNA 00480nM 浓度干扰，对照组用无关序列代替 SiRNA 004，对照组用 lipofectamin 2000 代替，每一组都设一个复孔。8 小时后换完全培养基，再过 48 小时，消化细胞用无血清的高糖培养基 600ul 重悬，对照组和干扰组等数目接种到 Transwell 的两个孔里，下层用 1ml 含 10% 胎牛血清的高糖培养基重悬，37 度培养 24 小时后取出 Transwell 小室，用棉签擦去小室内侧的细胞，4% 多聚甲醛固定 20 分钟室温，heochst 染核，荧光显微镜下观察，并随机取 10 个视野拍照，计数，比较对照组和干扰组之间的差别。

[0165] 图 6. 分别用对照或干扰序列转染人 UACC903 48 小时后用 8um 孔径的 Transwell 做体外迁移实验，A 图是对照序列转染细胞的迁移结果，B 图是巢蛋白表达下调细胞的迁移结果，与对照组相比，干扰组细胞迁移明显减少。(200X, bar = 100)

[0166] 表三：

[0167]

组别	200 倍视野个数 n	迁移的平均细胞数	P (2-tailed)
对照组	10	6.0000±3.1269**	0.013
干扰组	13	3.0769±2.0191	

[0168] 上表可见，与对照组相比，干扰组细胞迁移数量明显减少，统计学上有显著性差异。细胞迁移计算如下：8um Transwell 上层接种等数目对照组或干扰组细胞，24 小时后擦去小室上层细胞 heochst 染核计算小室下层细胞，随机计数 10 个视野细胞总数统计不同组

别的差别。

[0169] 实施例五：巢蛋白表达长期下调对小鼠恶性黑色素瘤 B16 与人黑色素细胞瘤 UACC903 增殖和凋亡的影响

[0170] 干扰小鼠或人巢蛋白表达的慢病毒载体的构建

[0171] SiRNA, lipofectamin 2000 共转染 B16F10, UACC903, 48 小时后, 免疫组化和 RT-PCR 鉴定有效干扰的序列。

[0172] 小鼠有效序列为：

[0173] ss oligo1：

[0174] 5' TGTGAGACTCTGGAATGCAATTC AAGAGATTGCATTCCAGAGTCTCACTTTTTTC 3'

[0175] ss oligo2：

[0176] 5' TCGAGAAAAAAGTGAGACTCTGGAATGCAATCTCTTGAATTGCATTCCAGAGTCTCACAA3'

[0177] 人有效序列为：

[0178] ss oligo1:5' TGGA CAA GAG AAC CTG GAAA TTC AAG AGA TTTC CAG GTT CTCTTG TC C TTTTTT C 3'

[0179] ss oligo2:5' TCGA GAAA AAA G GA CAA GAG AAC CTG GAAA TCT CTT GAATTC CAG GTT CTC TTG TC CA 3'

[0180] 慢病毒对照序列如下（人和小鼠共用）：

[0181] ss oligo1：

[0182] 5' TTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTTTC 3'

[0183] ss oligo2：

[0184] 5' TCGAGAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAACGTGACACGTTCCGGAGAAA 3'

[0185] 100℃ 4min 退火, -20℃ 保存。用 HpaI (平性末端) 和 Xho I (黏性末端) 双酶切慢病毒载体 P113.7 后切胶回收, 将双链 DNA 片断插入 HpaI 和 Xho I 的酶切位点, 室温连接 3 小时, 连接产物用 DH5 $\alpha$  转化, 挑克隆抽质粒, Hpa I 和 XhoI 双酶切初步鉴定 (在构建质粒的过程中没有加入 Hpa I 平性末端的酶切位点, 只加入了 Xho I 黏性末端的酶切位点, 故双酶切只有 Xho I 可以切开, Hpa I 不能切开), 6 个克隆 Xho I 可以切开, 但是 HpaI 不能切开, 初步证实构建有效。测序进一步鉴定。

[0186] 慢病毒包装, 收集: 接种 P6293ft 细胞在 0.1% 明胶预包被的细胞培养皿中, 待细胞融合至 95% 时, 开始包装病毒: 细胞预先加 5ml H-DMEM 完全培养基, 挑取序列正确的细菌克隆, 摇菌抽质粒, 用无菌水溶解 (1 $\mu$ g/ $\mu$ l), 吸取 3 $\mu$ g 质粒和 9 $\mu$ l mix (1 $\mu$ g/ $\mu$ l), 用 1.5ml opti-memI 溶解, 室温 5 分钟; 36 $\mu$ l lipo-fectamin2000 用 1.5ml opti-mem I 溶解, 室温 5 分钟; 混合质粒和 lipofectamin 2000, 室温 20 分钟后加入细胞表面。37℃ 孵育 24 小时, 换 10ml 完全培养基, 48 小时后 5000G 4℃ 离心 120 分钟收集病毒 (超高速离心浓缩病毒), 100 $\mu$ l PBS 重悬分装, -80℃ 保存。

[0187] 图 7 为慢病毒载体质粒 PLL3.7 的图谱。HpaI 和 XhoI 是酶切位点, 新合成片断即插入在位于 U6 启动子下游的 HpaI 和 XhoI 的酶切位点中。

[0188] 巢蛋白表达长期下调对小鼠恶性黑色素瘤 B16 增殖和凋亡的影响

[0189] 感染普通 B16 细胞: 将 B16 传入 6 孔板中, 24 小时密度到达 60% 时, 加入 1ml 有效干扰巢蛋白表达的慢病毒或者对照慢病毒, 在 37℃ 培养箱中孵育 24 小时后换完全培养基,

48 小时后荧光下观察绿色荧光。

[0190] 免疫组化筛选 :将分别感染了干扰巢蛋白病毒的细胞和对照序列病毒的细胞取出一孔做免疫组化初步筛选有效的克隆 :吸去培养基,0.01MPBS 冲洗两次,一次 5 分钟,再加入 4% PFA 室温固定 20 分钟,含有 0.2% triton X100 的 0.01MPBS 洗三次,一次 10 分钟。用免疫组化笔在盖玻片周围画圈,正常山羊血清室温孵育 45 分钟,吸弃血清后,滴加一抗(小鼠抗小鼠的巢蛋白 1 : 150)4℃ 过夜,室温复温 30 分钟。吸去一抗,0.01M PBS 洗 3 次,每次 10 分钟。山羊抗小鼠 CY3(1 : 150) 室温孵育 40 分钟。0.01M PBS 洗 3 次,每次 10 分钟。Heochst 染色 5 分钟,荧光显微镜照相系统下观察拍照。

[0191] 结果 :感染 B16 细胞 72 小时后荧光显微镜下可以看到绿色荧光表达,免疫组化检测结果对比对照组,巢蛋白干扰组绿色荧光蛋白表达极微量的巢蛋白。见图 8。

[0192] 图 8 是干扰小鼠巢蛋白表达的慢病毒与乱序对照组慢病毒感染 B16 细胞 72 小时后荧光图,A. 干扰巢蛋白表达的慢病毒,绿色是 GFP,B. 红色是巢蛋白 ;C. 乱序对照组的慢病毒,绿色是 GFP,D. 红色是巢蛋白。

[0193] 克隆分析 :用胰酶消化两种病毒细胞,分别在 10 毫升培养基中重悬 150 个细胞,按照每一个孔滴加 2 滴 (100ul) 加入 96 孔板中,两天换液一次,在荧光显微镜下观察一次。

[0194] 消化干扰 mouse 巢蛋白表达的慢病毒细胞和含有乱序序列的慢病毒细胞,分别计数,分别用 150 个细胞重悬在 10 毫升新鲜含有 10% 胎牛血清的高糖培养基中,接种在 96 孔板中,一个孔接种 100ul 培养基。然后放在 37 度培养箱中孵育,两天换液一次,观察一次实验结果。荧光显微镜拍照。

[0195] 结果 :对照组平均每两天倍增一次,而巢蛋白干扰组平均每 4 天倍增一次,倍增时间有显著性差异。

[0196] 结论 :长期下调巢蛋白表达的小鼠黑色素瘤细胞的群体倍增时间是正常小鼠黑色素瘤细胞的倍增时间的两倍左右。

[0197] 巢蛋白表达长期下调对人恶性黑色素瘤 UACC903 增殖和凋亡的影响

[0198] 采用上述干扰人巢蛋白表达的慢病毒感染人恶性黑色素瘤 UACC903 细胞株后,48 小时后荧光下观察绿色荧光。

[0199] 图 9 为 A-C 有效干扰巢蛋白表达的 UACC903 细胞株荧光染色。A. UACC903 细胞株表达绿色荧光。B. 巢蛋白 (Red) 的免疫组化染色几乎没有表达。C. 对应的 Hoechst (blue) 核染色。D-E 对照组的 UACC903 细胞株荧光染色。D. UACC903 细胞株表达绿色荧光。E. 巢蛋白 (Red) 的免疫组化染色可以看见荧光表达。F. 对应的 Hoechst (blue) 核染色。(200X, bar = 100)

[0200] 不同时间段细胞表形和形态的观察 :

[0201] 长期培养稳定转染的干扰人巢蛋白表达的 UACC903 细胞株和对照组细胞株发现 :接种第 2 天荧光显微镜观察两组细胞生长良好,第 5 天荧光显微镜观察对照组细胞生长良好,干扰组细胞出现了成团生长和细胞凋亡。

[0202] 图 10 为长期干扰巢蛋白表达的人黑色素瘤 UACC903 细胞的不同时间段细胞表形和形态的观察图。A. 对照组病毒感染第 3 天,(200X, bar = 100)。B. 对照组病毒感染第 8 天,(200X, bar = 100)。C. 干扰组病毒感染第 3 天,(200X, bar = 100)。D. 干扰组病毒感染第 8 天,出现成团生长和凋亡。(400X, bar = 50)

- [0203] SEQUENCE LISTING( 序列表 )
- [0204] <110> 中山大学
- [0205] <120> 通过干扰巢蛋白表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法
- [0206] <130>
- [0207] <140>200810199074.7
- [0208] <141>2008-10-13
- [0209] <160>18
- [0210] <170>PatentIn version 3.4
- [0211] <210>1
- [0212] <211>20
- [0213] <212>DNA
- [0214] <213> 人工序列
- [0215] <400>1
- [0216] agaagatctg gcaccacacc 20
- [0217] <210>2
- [0218] <211>20
- [0219] <212>DNA
- [0220] <213> 人工序列
- [0221] <400>2
- [0222] tacgaccaga ggcatacagg 20
- [0223] <210>3
- [0224] <211>20
- [0225] <212>DNA
- [0226] <213> 人工序列
- [0227] <400>3
- [0228] ggagagtcgc ttagaggtgc 20
- [0229] <210>4
- [0230] <211>20
- [0231] <212>DNA
- [0232] <213> 人工序列
- [0233] <400>4
- [0234] gtcaggaaag ccaagagaag 20
- [0235] <210>5
- [0236] <211>19
- [0237] <212>RNA
- [0238] <213> 人工序列
- [0239] <400>5
- [0240] aaaggagaau ugcauuca 19
- [0241] <210>6

- [0242] <211>19  
[0243] <212>RNA  
[0244] <213> 人工序列  
[0245] <400>6  
[0246] uuuccucuua acguuaagu 19  
[0247] <210>7  
[0248] <211>19  
[0249] <212>RNA  
[0250] <213> 人工序列  
[0251] <400>7  
[0252] caaagccucu uagaaauga 19  
[0253] <210>8  
[0254] <211>19  
[0255] <212>RNA  
[0256] <213> 人工序列  
[0257] <400>8  
[0258] guuucggaga aucuuuacu 19  
[0259] <210>9  
[0260] <211>19  
[0261] <212>RNA  
[0262] <213> 人工序列  
[0263] <400>9  
[0264] gugagacucu ggaaugcaa 19  
[0265] <210>10  
[0266] <211>19  
[0267] <212>RNA  
[0268] <213> 人工序列  
[0269] <400>10  
[0270] cacucugaga ccuuacguu 19  
[0271] <210>11  
[0272] <211>19  
[0273] <212>RNA  
[0274] <213> 人工序列  
[0275] <400>11  
[0276] uucuccgaac gugucacgu 19  
[0277] <210>12  
[0278] <211>19  
[0279] <212>RNA  
[0280] <213> 人工序列

- [0281] <400>12
- [0282] aagaggcuug cacagugca 19
- [0283] <210>13
- [0284] <211>55
- [0285] <212>DNA
- [0286] <213> 人工序列
- [0287] <400>13
- [0288] tgtgagactc tggaatgcaa ttcaagagat tgcattccag agtctcactt ttttc 55
- [0289] <210>14
- [0290] <211>59
- [0291] <212>DNA
- [0292] <213> 人工序列
- [0293] <400>14
- [0294] tcgagaaaaa agtgagactc tggaatgcaa tctcttgaat tgcattccag agtctcaca 59
- [0295] <210>15
- [0296] <211>55
- [0297] <212>DNA
- [0298] <213> 人工序列
- [0299] <400>15
- [0300] tggacaagag aacctggaaa ttcaagagat ttccaggttc tcttgcctt ttttc 55
- [0301] <210>16
- [0302] <211>59
- [0303] <212>DNA
- [0304] <213> 人工序列
- [0305] <400>16
- [0306] tcgagaaaaa aggacaagag aacctggaaa tctcttgaat ttccaggttc tcttgtcca 59
- [0307] <210>17
- [0308] <211>55
- [0309] <212>DNA
- [0310] <213> 人工序列
- [0311] <400>17
- [0312] tttctccgaa cgtgtcacgt ttcaagagaa cgtgacacgt tcggagaatt ttttc 55
- [0313] <210>18
- [0314] <211>59
- [0315] <212>DNA
- [0316] <213> 人工序列
- [0317] <400>18
- [0318] tcgagaaaaa attctccgaa cgtgtcacgt tctcttgaaa cgtgacacgt tcggagaaa 59

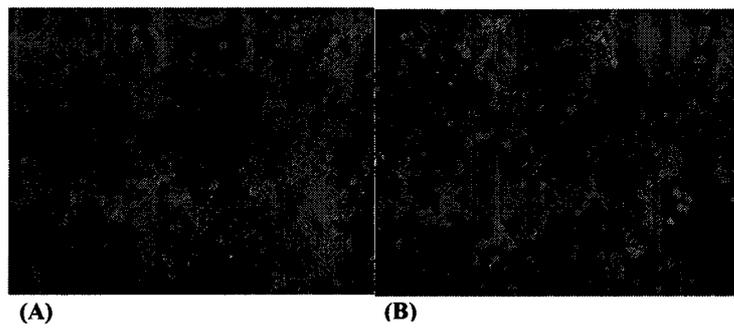


图 1

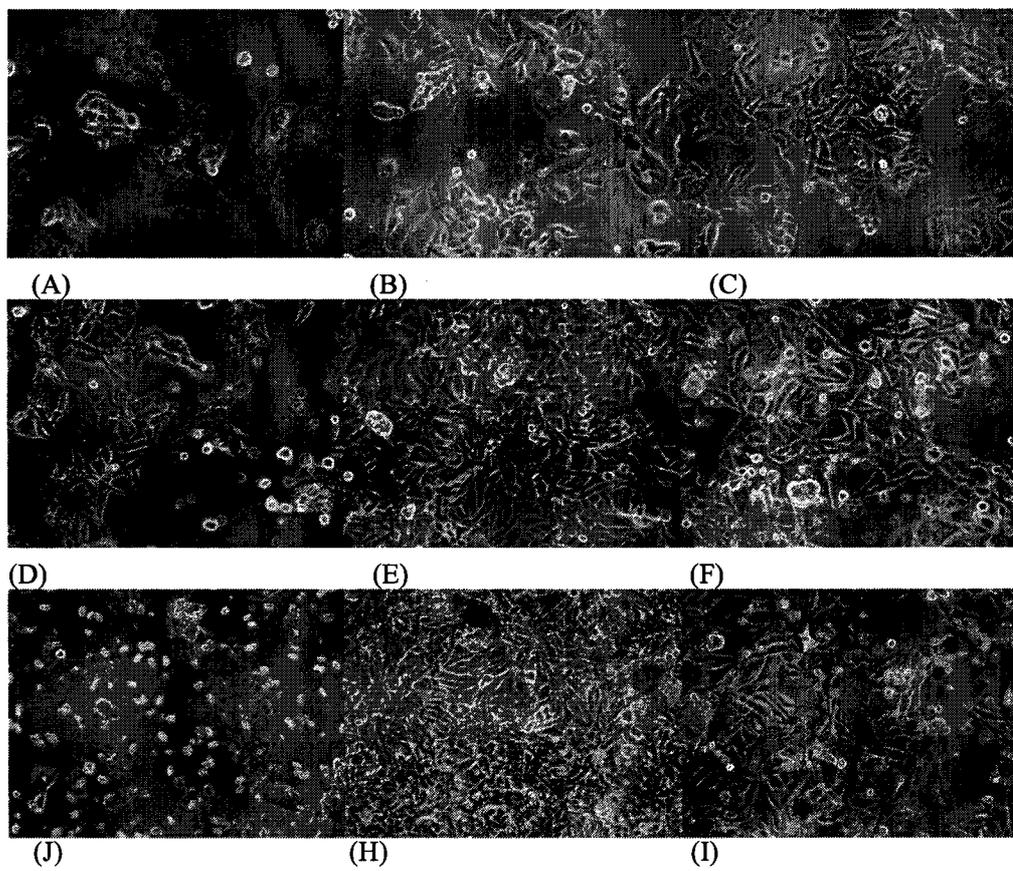


图 2

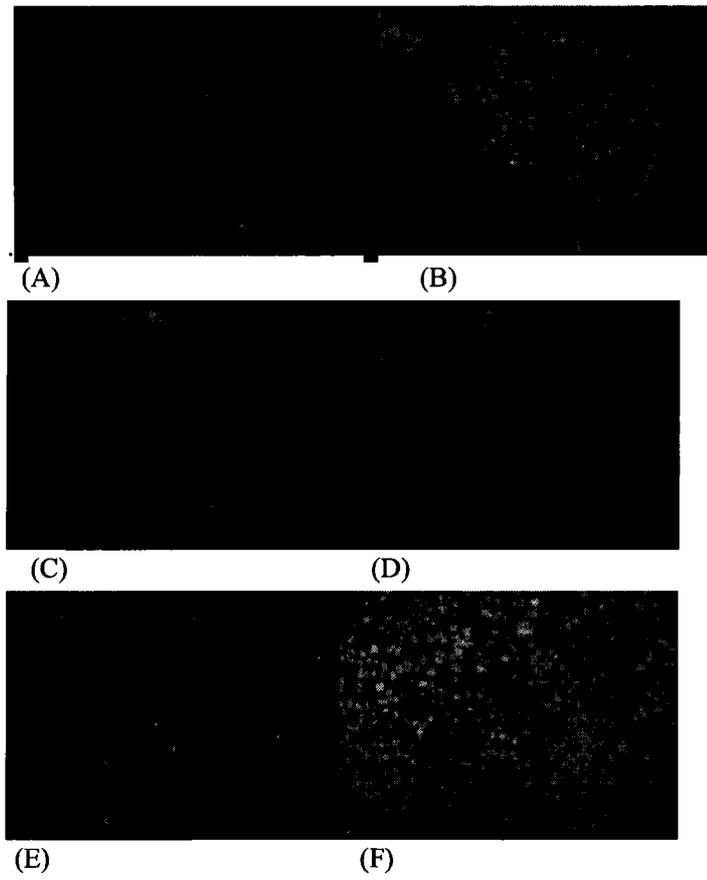


图 3

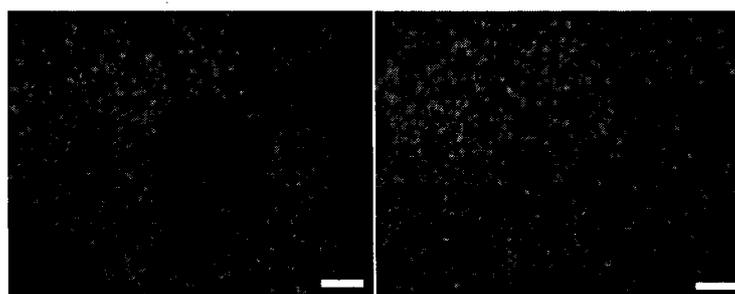


图 4

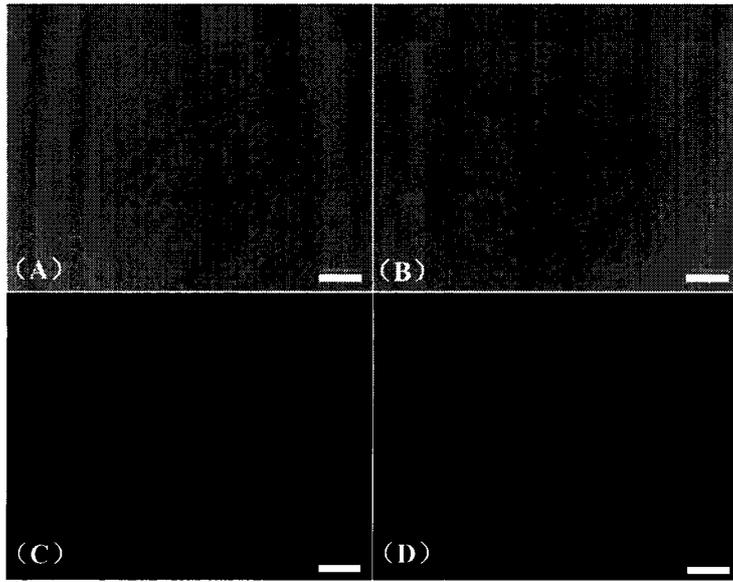


图 5

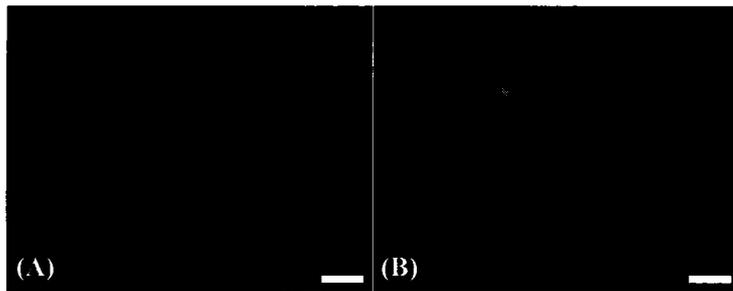


图 6

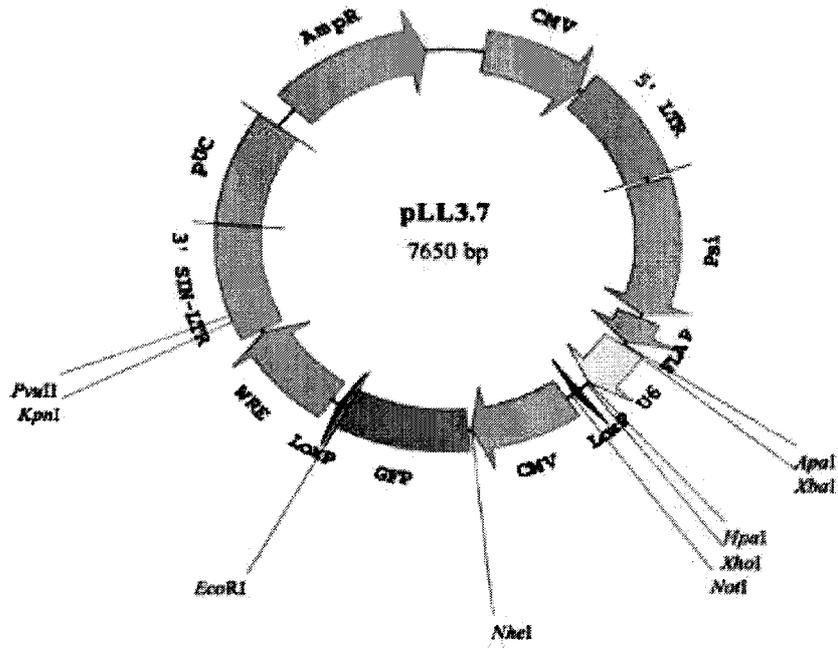


图 7

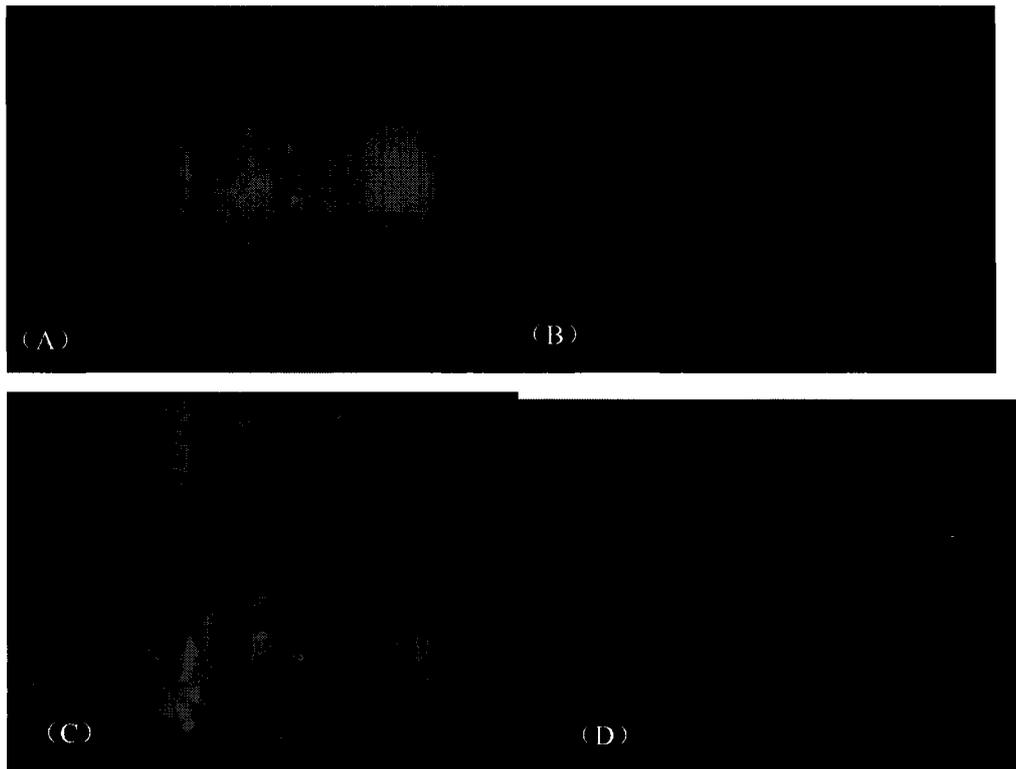


图 8

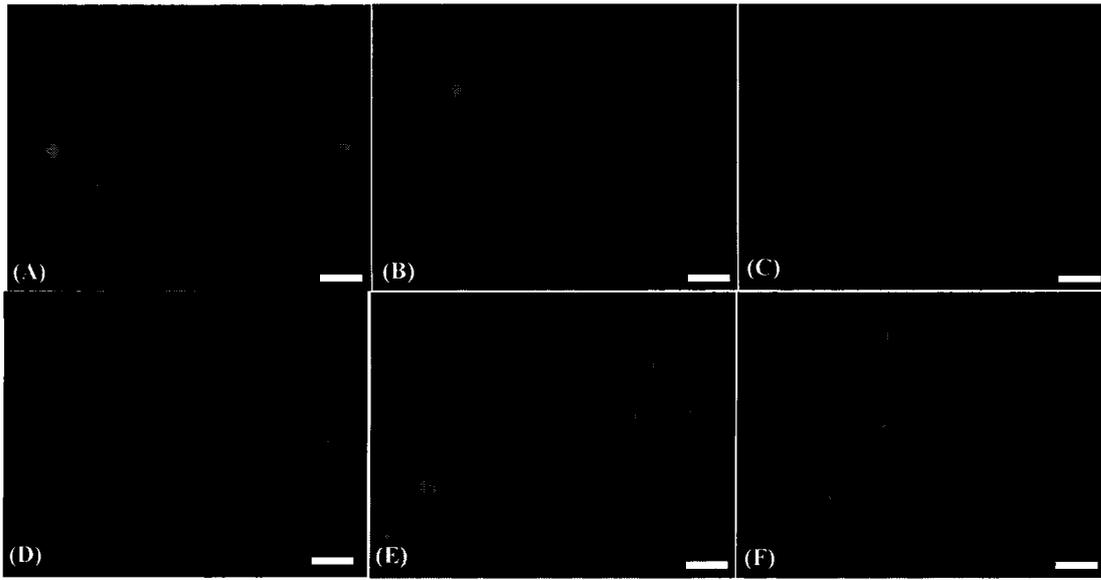


图 9

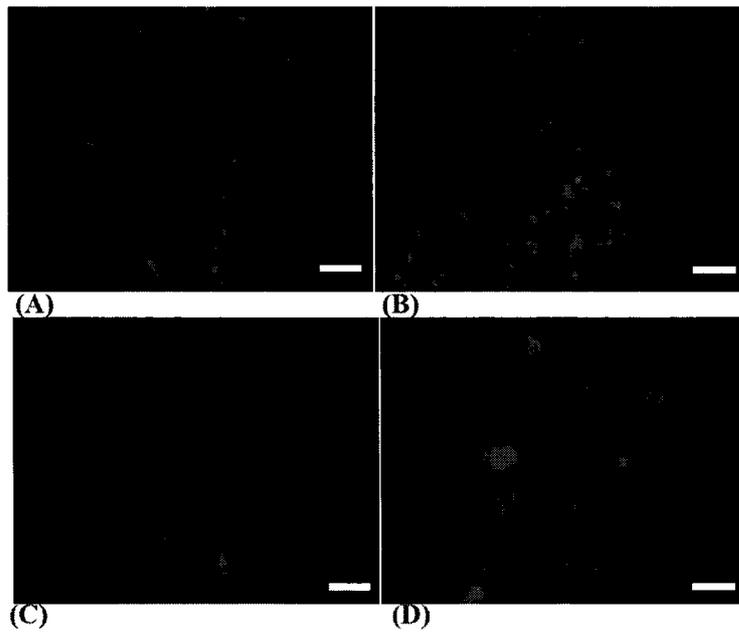


图 10

专利名称(译)	通过干扰巢蛋白表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101726577A</a>	公开(公告)日	2010-06-09
申请号	CN200810199074.7	申请日	2008-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	项鹏 杨旭辉 夏添		
发明人	项鹏 杨旭辉 夏添		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/02		
代理人(译)	刘宇峰		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法。本发明所述的方法包括以下步骤：A.提供肿瘤的特异细胞株和培养条件；B.鉴定上述肿瘤细胞株表达巢蛋白的表达；C.加入待筛选的药物；以及D.培养48小时或更长的时间，检测巢蛋白的表达，检测结果与B步骤的结果进行比较，如果出现巢蛋白表达下调的情形，该待选药物成为抑制肿瘤增殖和/或促进细胞凋亡的先导药物。本发明获得巢蛋白与肿瘤细胞生长，增殖，凋亡和迁移等生命活动关系的直接证据，证实了建立通过干扰巢蛋白的表达来筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法是可行的，本发明首次提出了这种筛选抑制肿瘤增殖和促进细胞凋亡的药物的方法。

