



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109364249 B

(45) 授权公告日 2021.09.24

(21) 申请号 201811306752.5

(22) 申请日 2018.11.05

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109364249 A

(43) 申请公布日 2019.02.22

(73) 专利权人 安徽医科大学  
地址 230032 安徽省合肥市梅山路81号

(72) 发明人 沈玉先 李红 张晓节 吴正升

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245  
代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106645725 A, 2017.05.10

CN 1659287 A, 2005.08.24

陈露. “MANF对肝癌细胞恶性生物学行为的抑制作用”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2016, (第08期), 第E072-340页.

陈露. “MANF对肝癌细胞恶性生物学行为的抑制作用”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2016, (第08期), 第E072-340页.

潘高峰等. “MANF蛋白表达水平与肝纤维化程度的相关性研究”.《安徽医科大学学报》.2015, 第50卷 (第1期), 第78-82页.

审查员 王斯慧

权利要求书1页 说明书10页  
序列表1页 附图7页

(54) 发明名称

以MANF为靶点的物质在制备治疗肝内胆管癌产品中的应用

(57) 摘要

本发明公开了以MANF为靶点的物质在制备治疗肝内胆管癌产品中的应用。实验证明抑制细胞中MANF表达的物质或抑制细胞中MANF活性的物质能有效抑制胆管癌细胞的增殖、迁移和/或侵袭,抑制胆管癌肿瘤的生长,可用于治疗肝内胆管癌或/和预防肝内胆管癌。

1. 抑制细胞中MANF基因表达的物质在制备治疗肝内胆管癌的产品中的应用;所述抑制细胞中MANF基因表达的物质为下述1) -6) 中任一种生物材料:

- 1) 生成siRNA的shRNA,
- 2) 表达1) 所述的shRNA的表达载体,
- 3) 表达1) 所述的shRNA的重组微生物,
- 4) 由1) 所述shRNA生成的siRNA,
- 5) 表达4) 所述siRNA的表达载体,
- 6) 表达5) 所述siRNA的重组微生物,

所述siRNA的一条链序列为SEQ ID No.3,另一条链的序列为SEQ ID No.4。

2. 抑制细胞中MANF活性的物质在制备治疗肝内胆管癌的产品中的应用;所述抑制细胞中MANF活性的物质为下述1) -6) 中任一种生物材料:

- 1) 生成siRNA的shRNA,
- 2) 表达1) 所述的shRNA的表达载体,
- 3) 表达1) 所述的shRNA的重组微生物,
- 4) 由1) 所述shRNA生成的siRNA,
- 5) 表达4) 所述siRNA的表达载体,
- 6) 表达5) 所述siRNA的重组微生物,

所述siRNA的一条链序列为SEQ ID No.3,另一条链的序列为SEQ ID No.4。

## 以MANF为靶点的物质在制备治疗肝内胆管癌产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及以MANF为靶点的物质在制备治疗肝内胆管癌产品中的应用。

### 背景技术

[0002] 肝内胆管癌(Intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)是起源于肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤,为仅次于肝细胞癌的第二大肝脏常见恶性肿瘤,约占原发性肝癌的10%-15%,且近年来在全球范围内发病率呈上升趋势。它的5年生存率5%-15%左右,不手术生存期平均只有9个月。造成ICC预后差的原因主要有两个:(一) ICC的临床特征不明显,早期诊断困难,易发生淋巴结和远端转移,诊断后患者可能已经失去最佳手术时机,导致根治性切除率比较低且不稳定;(二) ICC的发病机制不清楚,缺乏有效的靶向治疗药物。因此研究ICC发生发展的机制,研发更有效的诊断治疗的方法是延长病人生存期的关键因素之一。

[0003] 中脑星形胶质细胞来源神经营养因子(Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic Factor, MANF),在早期又被称为ARMET,是一个可被内质网应激所诱导的,分子量约为20KD的分泌性蛋白。MANF基因是沈玉先等通过微阵列技术从30000个基因中筛选出来的对内质网应激最敏感的基因。该基因最初发现时被认为与肿瘤的发生有关,但后来的研究发现,MANF基因的这种突变属于正常基因的多态性,而非肿瘤所特有。研究发现MANF蛋白广泛存在于哺乳动物组织内,正常情况下组织细胞内MANF含量很低,当细胞遭受应激刺激时,细胞内MANF表达显著升高。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的一个技术问题是如何抑制肝内胆管癌细胞的增殖、迁移和/或侵袭,本发明所要解决的另一个技术问题是如何抑制肝内胆管癌肿瘤的生长。

[0005] 为了解决以上技术问题,本发明提供了抑制细胞中MANF表达的物质和抑制细胞中MANF活性的物质的下述任一种用途:

[0006] 1. 抑制细胞中MANF基因表达的物质在制备治疗肝内胆管癌或/和预防肝内胆管癌的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用;

[0007] 2. 抑制细胞中MANF活性的物质在制备治疗肝内胆管癌或/和预防肝内胆管癌的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用;

[0008] 3. 抑制细胞中MANF基因表达的物质在制备抑制肝内胆管癌细胞增殖和/或迁移的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用;

[0009] 4. 抑制细胞中MANF活性的物质在制备抑制肝内胆管癌细胞增殖和/或迁移的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用;

[0010] 5. 抑制细胞中MANF基因表达的物质在制备抑制肝内胆管癌细胞侵袭的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用;

[0011] 6. 抑制细胞中MANF活性的物质在制备抑制肝内胆管癌细胞侵袭的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用。

[0012] 上述应用中,所述抑制细胞中MANF基因表达的物质和所述抑制细胞中MANF活性的物质均可如下述1)-6)中任一种生物材料:

[0013] 1) 生成siRNA的shRNA或所述shRNA的化学修饰物;

[0014] 2) 表达1)所述shRNA的表达载体;

[0015] 3) 表达1)所述shRNA的重组微生物;

[0016] 4) 由1)所述shRNA生成的siRNA或所述siRNA的化学修饰物;

[0017] 5) 表达4)所述siRNA的表达载体;

[0018] 6) 表达5)所述siRNA的重组微生物。

[0019] 上述应用中,所述shRNA的化学修饰物是对所述shRNA进行化学修饰得到的物质。所述化学修饰可包括选自核糖修饰、碱基修饰和磷酸骨架修饰中的一种或几种的组合。

[0020] 所述siRNA的化学修饰物是对所述siRNA进行化学修饰得到的物质。所述化学修饰可包括选自核糖修饰、碱基修饰和磷酸骨架修饰中的一种或几种的组合。

[0021] 上述应用中,所述siRNA的一条链序列可为SEQ ID No.3,另一条链的序列可为SEQ ID No.4。

[0022] 上述应用中,所述的shRNA(名称为MANF-shRNA)的茎序列可为SEQ ID No.2的第1-21位核苷酸和第SEQ ID No.2的第28-48位核苷酸。所述shRNA的环序列可为SEQ ID No.2的第22-27位核苷酸。所述shRNA具体可为SEQ ID No.2所示的shRNA。

[0023] 上述应用中,所述重组微生物可为表达所述shRNA或siRNA的重组慢病毒。

[0024] 上述应用中,所述细胞可为哺乳动物细胞,如人。

[0025] 上述应用中,所述MANF可为哺乳动物细胞的MANF,如人MANF。

[0026] 上述应用中,所述肝内胆管癌为MANF阳性的肝内胆管癌,所述肝内胆管癌细胞为MANF阳性的肝内胆管癌细胞。

[0027] 上述应用中,所述治疗肝内胆管癌或/和预防肝内胆管癌的产品、所述抑制肝内胆管癌细胞增殖和/或迁移的产品和所述抑制肝内胆管癌细胞侵袭的产品的活性成分可为抑制细胞中MANF基因表达的物质,所述产品的活性成分还可含有其它成分,所述产品的其它活性成分本领域技术人员可根据抗肝内胆管癌细胞效果确定。

[0028] 所述治疗肝内胆管癌或/和预防肝内胆管癌的产品、所述抑制肝内胆管癌细胞增殖和/或迁移的产品和所述抑制肝内胆管癌细胞侵袭的产品中,所述产品还可含有药学上可接受的载体。本文所用的“药学上可接受的载体”应当与本发明药物中的RNA分子相容。所述“药学上可接受的载体”是指体内转染试剂,如聚乙烯亚胺(PEI),线性聚乙烯亚胺(jetPEI),脂质体,转铁蛋白,叶酸、纳米乳、纳米粒等。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的其他例子是冻干保护剂糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和土豆淀粉;西黄蓍胶粉末;麦芽;明胶;滑石;固体润滑剂,如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇,如甘油、甘露糖醇;海藻酸;乳化剂,如Tween;磷脂,如卵磷脂,大豆磷脂,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰甘油,磷脂酰肌醇,磷脂酰丝氨酸,硬脂酰胺;胆固醇;大分子高聚物,如聚乙烯亚胺,壳聚糖,透明质酸;润湿剂,如月桂基硫酸钠;着色剂;调味剂;压片剂;稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等渗盐溶液;和磷酸盐缓冲液等;生理盐水、甘油和磷酸盐缓冲液。

[0029] 所述治疗肝内胆管癌或/和预防肝内胆管癌的产品、所述抑制肝内胆管癌细胞增

殖和/或迁移的产品和所述抑制肝内胆管癌细胞侵袭的产品也属于本发明的保护范围。

[0030] 实验表明,以人MANF为靶点的干扰人MANF基因表达的物质(如shRNA)能有效抑制胆管癌细胞的增殖、迁移和/或侵袭,抑制胆管癌肿瘤的生长,可用于治疗肝内胆管癌或/和预防肝内胆管癌。

### 附图说明

[0031] 图1为人MANF在人ICC中表达上调。

[0032] 图2为人MANF在三种胆管癌细胞系中的表达。上图的一抗为MANF抗体,下图的一抗为Tubulin抗体。

[0033] 图3为pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro图谱。

[0034] 图4为干扰载体在HCCC-9810细胞中的转染与表达。

[0035] A为荧光显微镜下观察细胞的形态(明场)及转染效率。B为免疫印迹方法检测MANF-shRNA的敲低效果;上图的一抗为MANF抗体,下图的一抗为Tubulin抗体,从左至右的三个泳道依次为HCCC9810、HCCC9810+vector和HCCC9810+MANF-shRNA。

[0036] 图5为干扰载体在HUCCT1细胞中的转染与表达。

[0037] A为荧光显微镜下观察细胞的形态(明场)及转染效率。B为免疫印迹方法检测MANF-shRNA的敲低效果;上图的一抗为MANF抗体,下图的一抗为Tubulin抗体。

[0038] 图6为划痕实验检测MANF-shRNA对HCCC9810增殖与迁移能力的影响。

[0039] 图7为划痕实验检测MANF-shRNA对HUCCT1增殖与迁移能力的影响。

[0040] 图8为transwell法检测MANF-shRNA对HCCC9810迁移能力的影响。

[0041] 图9为transwell法检测MANF-shRNA对HUCCT1迁移能力的影响。

[0042] 图10为transwell法检测MANF-shRNA对HCCC9810侵袭能力的影响。

[0043] 图11为transwell法检测MANF-shRNA对HUCCT1侵袭能力的影响。

[0044] 图12为MANF-shRNA抑制体内种植瘤的生长。

[0045] 图13为移植瘤组织的HE染色及人MANF表达的检测。

[0046] 图14为MANF-shRNA抑制体内移植瘤组织中的Ki67的表达。

### 具体实施方式

[0047] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0048] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0049] 1、三种人肝内胆管癌细胞系HUCCT1、RBE和HCCC-9810(HCCC9810)均用Gibico的DMEM高糖培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养,培养箱湿度为70%-80%。

[0050] 2、免疫组化检测:组织切片,福尔马林固定,石蜡包埋,然后分别与抗MANF抗体(抗MANF抗体即为ARME1的单克隆抗体,按照如下文献的方法制备:王法财、王海萍、李琪、方圣云、沈玉先.ARME1的原核表达及其单克隆抗体的制备.安徽医科大学学报,2009,44(6):665-669)在4℃过夜。使用中杉金桥ABC试剂盒(SP-9000)可视化免疫反应性。在每个实验中

均设阴性对照,通过省略第一抗体获得阴性对照。

[0051] 3、免疫印迹法(western-blot assay)检测MANF在三种胆管癌细胞系中的表达:

[0052] 1) 蛋白样品的制备:

[0053] 培养的细胞系弃去培养上清,用预冷的1×PBS溶液吹打、收集细胞并洗涤3次,弃去PBS,加入适当体积的含蛋白酶抑制剂的1×RIPA裂解液,充分吹打混匀后冰上放置30min,4℃离心12000rpm×10min。上清液转移到新的EP管中,备用。

[0054] 2) 蛋白样品电泳前的处理:

[0055] 在蛋白裂解液中加入1/4体积的4×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,100℃煮沸5~10min,冷却至室温后上样。

[0056] 3) 制备12%SDS-PAGE凝胶,加样、电泳、转膜、孵一抗和二抗、曝光成像。其中,一抗为兔抗MANF的多克隆抗体(美国Abcam公司,ab23621),二抗为鼠二抗(proteintech公司产品)。以抗Tubulin抗体(Abcam公司产品)作为对照。

[0057] 实施例1、以人MANF为靶点的干扰人MANF基因表达的shRNA抑制胆管癌细胞的增殖、迁移和/或侵袭,抑制胆管癌肿瘤的生长

[0058] 1. MANF在ICC中高表达

[0059] 本申请的发明人通过免疫组化不但检测了人MANF在人肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织及其癌旁组织的表达水平,还检测了人MANF在人ICC组织及其癌旁组织的表达水平。结果表明人MANF在人肝细胞肝癌组织中水平与癌旁对照比较明显降低。而在人肝内胆管癌组织中,免疫组化检测人MANF的表达,结果发现人MANF的水平显著高于癌旁组织(图1)。发明人对收集的75例人肝内胆管癌样本中MANF的表达进行统计学分析,结果发现90.6% ICC组织MANF呈阳性,56% ICC组织MANF呈现强阳性。该结果提示人MANF的高表达可能与人ICC的发生发展有关。

[0060] 2. MANF在三种胆管癌细胞系中的表达

[0061] 通过免疫印迹法检测三种肝内胆管癌细胞系HUCCT1、RBE和HCCC-9810中人MANF的表达水平,结果表明三种肝内胆管癌细胞系HUCCT1、RBE和HCCC-9810中,人MANF在HUCCT1和HCCC-9810细胞内表达较强,而在RBE细胞中表达弱(图2),于是选用HUCCT1和HCCC-9810这两种细胞系用于MANF敲低的研究。

[0062] 3. 慢病毒携带的MANF-shRNA在HUCCT1和HCCC-9810细胞中的表达

[0063] 为了探明MANF的高表达与ICC的关系,采用慢病毒携带的MANF干扰性小RNA以敲低胆管癌细胞内的MANF,然后观察胆管癌细胞的恶性生物学行为。

[0064] 设计针对人MANF的shRNA干扰片段。通过分子生物学手段将该干扰片段构建入慢病毒载体(pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro)的U6启动子下游,该载体可以实现在干扰目的基因的同时表达绿色荧光蛋白EGFP和puromycin抗性基因,前者便于观察载体工作状态,后者方便筛选目的基因干扰的稳定细胞株。除了可以直接瞬时转染细胞用于目的基因的干扰,该载体更可以包装慢病毒,用于稳定株的筛选以及在动物水平干扰目的基因的表达。

[0065] 所选用的干扰载体pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro图谱如图3。用Age I和EcoR I酶切去U6启动子下游的ccdB毒性基因,插入待构建的shRNA的编码基因序列。根据人MANF基因的转录本设计siRNA靶点,安排引物合成。将单链的引物退火成双链oligo序列,

连接入双酶切线性化的RNA干扰载体,替换掉原来的ccdB毒性基因。菌落PCR筛选转化子,筛选的阳性克隆进行测序验证。测序验证正确的克隆,进行高纯度质粒抽提。具体方法如下:

[0066] 3.1干扰靶点设计和引物合成

[0067] 根据shRNA设计的一般原则以及和元生物的丰富经验,设计siRNA靶点,安排引物合成。人MANF基因的siRNA靶点序列为5'-CTGAAGAAGCTCCGAGTTAAA-3'。用于制备产生该siRNA的shRNA的编码基因的引物为Y2025-1和Y2025-2:

[0068] Y2025-1:

[0069] 5'-CcgGCTGAAGAAGCTCCGAGTTAACTCGAGTTAACTCGGAGCTTCTTCAGTTTTTTg-3',

[0070] Y2025-2:

[0071] 5'-aattcaaaaaCTGAAGAAGCTCCGAGTTAACTCGAGTTAACTCGGAGCTTCTTCAG-3'。

[0072] 作为对照的siRNA靶点序列为TTCTCCGAACGTGTCACGT。用于制备产生该siRNA的shRNA的编码基因的引物为Y007-1和Y007-2:

[0073] Y007-1:5'-CcgGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTg-3', Y007-2:5'-aattcaaaaaTTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGAGAA-3'。

[0074] 3.2引物退火形成带粘性末端的双链片段

[0075] 引物Y2025-1和Y2025-2退火形成带粘性末端的双链片段,将其命名为Y2025。引物Y007-1和Y007-2退火形成带粘性末端的双链片段,将其命名为Y007。

[0076] 3.3干扰载体的构建

[0077] 用Age I和EcoR I对pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro(和元公司)进行双酶切得到312bp的ccdB基因和8.2kb的载体片段,回收8.2kb的载体片段。将Y2025与8.2kb的载体片段连接得到Y2025连接产物;将Y007与8.2kb的载体片段连接得到Y007连接产物。将连接产物分别转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞,通过菌落PCR鉴定阳性转化子,菌落鉴定得到的阳性克隆,送测序公司进行测序验证。用Vector NTI软件比对测序结果,对测序结果进行分析。将测序结果表明是将pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro的Age I和EcoR I识别位点间的片段(小片段)替换为SEQ ID No.1(5'-CTGAAGAAGCTCCGAGTTAACTCGAGTTAACTCGGAGCTTCTTCAGTTTTTT-3')的DNA分子,保持pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro的其它序列不变得到的重组表达载体命名为pLenti-MANF-shRNA(干扰载体)。SEQ ID No.1所示的DNA分子编码以人MANF基因为靶点的shRNA,将该shRNA命名为MANF-shRNA,MANF-shRNA的序列为SEQ ID No.2(5'-CUGAAGAAGCUCCGAGUUAACUCGAGUUAACUCGGAGCUUCUUCAG-3')。MANF-shRNA的茎序列为SEQ ID No.2的第1-21位核苷酸和第SEQ ID No.2的第28-48位核苷酸,MANF-shRNA的环序列为SEQ ID No.2的第22-27位核苷酸。MANF-shRNA产生干扰人MANF基因的siRNA,将该siRNA命名为MANF-siRNA,MANF-siRNA的一条链序列为5'-CUGAAGAAGCUCCGAGUUA-3'(SEQ ID No.3),另一条链的序列为5'-UUAACUCGGAGCUUCUUCAG-3'(SEQ ID No.4)。

[0078] 将测序结果表明是,将pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro的Age I和EcoR I识别位点间的片段(小片段)替换为核苷酸序列是5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTT-3'的DNA分子,保持pLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-T2A-Puro的其它序列不变得到的重组表达载体命名为pLenti-NC-shRNA(干扰载体)。该DNA分子编码无靶点的shRNA,将该shRNA命名为NC-shRNA。

### [0079] 3.4重组慢病毒的制备及感染细胞

[0080] 将pLenti-MANF-shRNA与其包装质粒共同转染293T细胞,转染6小时后完全培养基培养48小时,收集上清,并通过超离心浓缩,得到表达干扰人MANF基因的shRNA的重组慢病毒,将其命名为表达MANF-shRNA的重组慢病毒。将pLenti-NC-shRNA与其包装质粒共同转染293T细胞,转染6小时后完全培养基培养48小时,收集上清,并通过超离心浓缩,得到名称为表达NC-shRNA的重组慢病毒,将其命名为NC-shRNA重组慢病毒。

#### [0081] 3.4.1 HUCCT1细胞慢病毒感染实验(MOI100,重复感染)

[0082] 实验设两个空白对照组(不做转染)、两个载体对照组(转染表达NC-shRNA的重组慢病毒)和两个MANF敲低组(转染表达MANF-shRNA的重组慢病毒)。具体实验方法如下:将HUCCT1细胞按 $2 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>的密度接种于6孔板中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养,待细胞达到80%融合时,加入重组慢病毒液(MOI=100),并加入polybrene(工作浓度为8μg/mL),24小时后换液,重复感染一次。细胞长满后移至培养皿,一周后开始筛选。筛选用嘌呤霉素(sigma公司产品),浓度维持在1ml/μl,得到表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞(记为HUCCT1+MANF-shRNA),表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞(记为HUCCT1+vector)。用嘌呤霉素筛选一周后,空白对照组细胞死完,此时用荧光显微镜观察慢病毒感染的细胞,并用免疫印迹法检测MANF的表达。

#### [0083] 3.4.2 HCCC-9810细胞慢病毒感染实验(MOI=30)

[0084] 除将细胞替换为HCCC-9810和重组慢病毒液感染剂量为MOI=30外,其它实验方法同3.3.1。得到表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞(记为HCCC9810+MANF-shRNA),表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞(记为HCCC9810+vector)。用嘌呤霉素筛选一周后,空白对照组细胞死完,此时用荧光显微镜观察慢病毒感染的细胞,并用免疫印迹法检测MANF的表达。

### [0085] 3.5实验结果

[0086] 荧光显微镜观察结果表明表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞(图4中记为HCCC9810+MANF-shRNA)及表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞(图4中记为HCCC9810+vector)中均可见大量绿色荧光(图4中A),提示HCCC-9810细胞慢病毒感染率较高。免疫印迹检测结果表明表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞中MANF的水平显著低于表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞和未被慢病毒感染的HCCC-9810细胞。说明MANF-shRNA能显著降低HCCC-9810细胞中人MANF的水平(图4中B)。

[0087] 同样,荧光显微镜观察结果表明表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞(图5中记为HUCCT1+MANF-shRNA)及表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞(图5中记为HUCCT1+vector)中均可见大量绿色荧光(图5中A),提示HUCCT1细胞慢病毒感染率较高。免疫印迹检测结果表明表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞中MANF的水平显著低于表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞和未被慢病毒感染的HUCCT1细胞。说明MANF-shRNA能显著降低HUCCT1细胞中人MANF的水平(图5中B)。

### [0088] 4.MANF-shRNA抑制胆管癌细胞的增殖与迁移(划痕实验)

[0089] 采用划痕实验检测3.4的HUCCT1+MANF-shRNA(表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞)和HCCC9810+MANF-shRNA(表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810

细胞)这两种表达MANF-shRNA的胆管癌细胞、HUCCT1+vector(表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞)和HCCC9810+vector(表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞)这两种表达NC-shRNA的胆管癌细胞以及未被慢病毒感染的HUCCT1细胞和HCCC9810这两种受体胆管癌细胞的增殖和迁移能力,结果发现转染了MANF-shRNA的细胞增殖和迁移能力显著减弱(图6和图7),说明MANF-shRNA显著抑制了HUCCT1细胞和HCCC9810这两种胆管癌细胞的增殖和迁移。具体方法和结果如下:

[0090] 1)先在6孔板背后用直尺比着,用记号笔均匀地划横线,横穿过孔,每隔0.5-1cm划一道,每孔至少穿过5条线。

[0091] 2)每孔中加入约 $5 \times 10^5$ 个细胞,具体细胞数量因细胞种类不同而异,最终是让孔中的细胞过夜能铺满。

[0092] 3)于第二天用枪头比着直尺(垂直于背后的横线)划痕,注意枪头要垂直,不能倾斜。

[0093] 4)用PBS洗细胞3次,去除划掉的细胞,加入无血清培养基,继续在 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养。按0、24、48小时取样,拍照。

[0094] 5)使用Image J软件打开图片后,随机划取6至8条水平线,计算细胞间距离的均值,得出细胞划痕间伤口愈合距离百分比。

[0095] 6)实验设三次重复。用SPSS19.0统计软件分析数据。结果用(平均值 $\pm$ 标准差)表示,两两之间的比较采用单因素方差分析及LSD进行检验。

[0096] 结果表明24小时,HUCCT1+MANF-shRNA、HUCCT1+vector和HUCCT1的细胞划痕间伤口愈合距离百分比分别是16.88%、36.08%和33.25%,说明MANF-shRNA对HUCCT1的增殖与迁移抑制率是49.23%;48小时,HUCCT1+MANF-shRNA、HUCCT1+vector和HUCCT1的细胞划痕间伤口愈合距离百分比分别是33.68%、100%和100%,说明MANF-shRNA对HUCCT1的增殖与迁移抑制率为66.32%。24小时,HCCC9810+MANF-shRNA、HCCC9810+vector和HCCC9810的细胞划痕间伤口愈合距离百分比分别是13.65%、29.97%和24.44%,说明MANF-shRNA对HCCC9810的增殖与迁移抑制率为44.15%;48小时,HCCC9810+MANF-shRNA、HCCC9810+vector和HCCC9810的细胞划痕间伤口愈合距离百分比分别是33.15%、100%和100%,说明MANF-shRNA对HUCCT1的增殖与迁移抑制率为66.85%。MANF-shRNA显著抑制了胆管癌细胞的复制和迁移。

[0097] 5. MANF-shRNA抑制胆管癌细胞的迁移(transwell法)

[0098] 采用transwell法检测3.4的HUCCT1+MANF-shRNA(表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞)和HCCC9810+MANF-shRNA(表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞)这两种表达MANF-shRNA的胆管癌细胞、HUCCT1+vector(表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞)和HCCC9810+vector(表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC-9810细胞)这两种表达NC-shRNA的胆管癌细胞以及未被慢病毒感染的HUCCT1细胞和HCCC9810这两种受体胆管癌细胞(对照组细胞)的迁移能力,结果发现转染了MANF-shRNA的细胞迁移能力降低(图8和9),说明MANF-shRNA显著抑制了HUCCT1细胞和HCCC9810这两种胆管癌细胞的迁移,该结果与划痕实验的结果一致。具体方法和结果如下:

[0099] 1)将6孔板里的细胞培养贴壁后,换成无血清培养液,继续培养12小时后用无血清培养液重悬备用。

[0100] 2) 准备好Transwell小室,将上述细胞种入小室,小室接种细胞数为 $1 \times 10^6$ 个细胞为宜,下室放置500 $\mu$ l含10%FBS的培养基,注意消除气泡。

[0101] 3) 24小时后将下室中培养液吸净弃去,用棉签轻轻擦去小室内未穿过的细胞,加入500 $\mu$ l的0.5mg/ml的0.1%的结晶紫染色。

[0102] 4) 20分钟后,将上层小室流水冲洗5-10min,注意不要对膜冲洗。

[0103] 5) 在显微镜下观察、拍照。200倍光镜下选择上下左右中5个不同视野的穿过膜的细胞数,求平均值,按下式计算MANF-shRNA对肿瘤细胞的迁移抑制能力。

[0104] 迁移抑制率 =  $(1 - \text{实验组平均迁移细胞数} / \text{对照组平均迁移细胞数}) \times 100\%$ 。

[0105] 6) 实验设三次重复。用SPSS19.0统计软件分析数据。结果用(平均值 $\pm$ 标准差)表示,两两之间的比较采用单因素方差分析及LSD进行检验。

[0106] 结果表明,HUCCT1+MANF-shRNA和HUCCT1+vector的迁移抑制率分别是37.4%和1.1%。HCCC9810+MANF-shRNA和HCCC9810+vector的迁移抑制率分别是65.4%和2.1%。说明MANF-shRNA显著抑制了胆管癌细胞的迁移。

[0107] 6. MANF-shRNA抑制胆管癌细胞的侵袭(transwell法)

[0108] 采用transwell法检测3.4的HUCCT1+MANF-shRNA(表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞)和HCCC9810+MANF-shRNA(表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC9810细胞)这两种表达MANF-shRNA的胆管癌细胞、HUCCT1+vector(表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞)和HCCC9810+vector(表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HCCC9810细胞)这两种表达NC-shRNA的胆管癌细胞以及未被慢病毒感染的HUCCT1细胞和HCCC9810这两种受体胆管癌细胞(对照组细胞)的侵袭能力,结果表明转染了MANF-shRNA的细胞侵袭能力降低(图10-11)。具体方法和结果如下:

[0109] 1) Matrigel胶(BD公司产品)储存在-20 $^{\circ}$ C,使用前12-24小时转移至4 $^{\circ}$ C冻融。使用时,用无血清DMEM培养液稀释(Matrigel胶与无血清培养液按1:2或1:3稀释),此步冰上操作,枪头最好也做预冷处理,混合均匀,尽量避免产生气泡产生。吸取20ml上述配制的Matrigel胶均匀滴在膜上(可适当调整体积),在37 $^{\circ}$ C放30min后,在紫外下照30min即可。

[0110] 2) 在重悬细胞之前,要使细胞饥饿处理12小时,将细胞用胰酶消化,用无血清DMEM或含5%FBS的DMEM重悬。计数吸取 $(1-1.5) \times 10^5$ 个细胞(体积不能超过200 $\mu$ l),加入Transwell上室中。下室中加入500 $\mu$ l含10%FBS的DMEM。

[0111] 3. 将上室放到下室中,在DMEM与上室膜交界的地方,注意有无气泡产生,气泡会影响实验进行。

[0112] 4. 24小时后,将上室从下室中拿出,把膜上的细胞用棉签轻轻擦去,略微风干,将其放入结晶紫中染色,时间要控制,染10-15min,观察着色情况,不行再延长染色时间。用流水轻轻冲洗,拍照。在高倍镜下( $\times 200$ )随机取5个视野计数,取平均数。按下式计算MANF-shRNA对肿瘤细胞的侵袭抑制能力。

[0113] 侵袭抑制率 =  $(1 - \text{实验组平均穿膜细胞数} / \text{对照组平均穿膜细胞数}) \times 100\%$ 。

[0114] 6) 实验设三次重复。用SPSS19.0统计软件分析数据。结果用(平均值 $\pm$ 标准差)表示,两两之间的比较采用单因素方差分析及LSD进行检验。

[0115] 结果表明,HUCCT1+MANF-shRNA和HUCCT1+vector的侵袭抑制率分别是66%和1.2%。HCCC9810+MANF-shRNA和HCCC9810+vector的侵袭抑制率分别是61.2%和5%。说明

MANF-shRNA显著抑制了胆管癌细胞的侵袭。

[0116] 7. MANF-shRNA抑制体外移植瘤的生长

[0117] 将稳定敲低MANF的HUCCT1细胞种植到裸鼠皮下,同时种植相同数量的空载体对照的HUCCT1细胞。结果发现,与接种空载体对照的HUCCT1细胞组比较,MANF敲低组肿瘤明显减小(图12)。具体方法和结果如下:

[0118] 购买14只3-4周龄BALB/c(南京模式动物中心购买)裸鼠,放入中国科学技术大学动物中心饲养一周后皮下种植胆管癌细胞。14只裸鼠分为空载体对照组(7只)和MANF敲低组(7只)。将培养的细胞经胰蛋白酶消化、计数后,用PBS稀释,同时加等量的magiel胶,每只鼠皮下注射 $7.3 \times 10^6$ 个细胞,注射体积为100 $\mu$ l。MANF敲低组接种3.4的HUCCT1+MANF-shRNA(表达MANF-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞);空载体对照组接种3.4的HUCCT1+vector(表达NC-shRNA的重组慢病毒感染的HUCCT1细胞)。接种后每周记录肿瘤生长的情况,9周后肿瘤生长到合适大小,处死荷瘤鼠,剥出肿瘤,称重拍照,一部分组织固定、包埋,用于形态学观察;另一部分组织冻存。用SPSS19.0统计软件分析数据。结果用(平均值 $\pm$ 标准差)表示,两两之间的比较采用单因素方差分析及LSD进行检验。结果表明MANF敲低组的肿瘤质量为 $0.18 \pm 0.19$ g/个,空载体对照组的肿瘤质量为 $0.613 \pm 0.28$ g/个,MANF敲低组与空载体对照组比较具有极限值差异( $P < 0.01$ )。说明MANF-shRNA对胆管癌肿瘤的抑制率为70.63%。

[0119] 8. 肿瘤组织中MANF敲低效果的验证

[0120] 用免疫组织化学方法检测步骤7中MANF敲低组和空载体对照组的肿瘤组织中MANF的表达。结果发现,MANF敲低组肿瘤组织中MANF几乎不表达,而空载体对照组的肿瘤组织中MANF高表达,在对应的HE染色中肿瘤细胞大量增生(图13)。该结果说明本发明的MANF-shRNA能有效地敲低肿瘤细胞中的MANF,且MANF敲低可有效地抑制肿瘤的生长。

[0121] 9. MANF-shRNA抑制体外移植瘤中肿瘤细胞的增殖

[0122] Ki67是细胞增殖的一个重要指标,采用免疫组织化学方法检测步骤7中MANF敲低组和空载体对照组的肿瘤组织中Ki67的表达。结果发现,空载体对照组的肿瘤组织中Ki67强阳性细胞较MANF敲低组明显增多。该结果说明MANF敲低能有效地抑制Ki67的表达及胆管癌细胞的增殖(图14)。

[0123] 其中,免疫组织化学方法验证肿瘤组织中MANF的敲低效果及细胞增殖(Ki67表达)的方法如下:

[0124] 1) 肿瘤组织常规脱水、包埋、切片。

[0125] 2) 石蜡切片常规脱蜡至水,PBS浸洗3次,每次3min。

[0126] 3) 微波修复:枸橼酸钠修复液微波炉中高火10min,冷却5min,再修复5min,自然冷却30min至室温。附枸橼酸钠修复液的配制:10.5g柠檬酸定容至100ml,14.7g柠檬酸三钠定容至100ml。分别取9ml柠檬酸溶液和41ml柠檬酸三钠溶液混合加水至500ml。

[0127] 4) 微波修复后用PBS浸洗3次,每次3min。

[0128] 5) 3% $H_2O_2$ 室温孵育10min,PBS浸洗2次,每次3min。

[0129] 6) 10%山羊血清(A液)37 $^{\circ}$ C封闭30min。

[0130] 7) 甩去血清,加一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜(一抗包括鼠抗MANF的单克隆抗体(该单克隆抗体即为ARMET的单克隆抗体,按照如下文献的方法制备:王法财、王海萍、李琪、方圣云、沈玉

先.ARMET的原核表达及其单克隆抗体的制备.安徽医科大学学报,2009,44(6):665-669)和鼠抗Ki67单克隆抗体(Abcam公司产品)。若4℃孵育过夜则次日,37℃复温30min。

[0131] 8) PBS浸洗3次,每次3min。

[0132] 9) 加生物素化二抗(B液) 37℃孵育30min,再用PBS浸洗3次,每次3min。

[0133] 10) 加辣根酶标记的链霉卵白素工作液(C液) 37℃孵育30min,再用PBS浸洗5次,每次5min。

[0134] 11) DAB液显色,镜下观察着色深浅。用蒸馏水充分浸洗终止反应。

[0135] 12) 苏木素复染5min,流水冲洗15min。

[0136] 13) 酒精脱水,二甲苯透明约40min,中性树脂封片,烘干,镜下观察。

[0137] 10. 结论

[0138] 人MANF在人肝内胆管癌肿瘤组织中表达升高,人胆管癌细胞中人MANF敲低抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力,从而抑制肿瘤的生长。说明人ICC中人MANF的高表达可促进肿瘤的发生和发展,抑制人MANF的表达可以抑制胆管癌的发展。

[0139] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

- [0001] <110> 安徽医科大学
- [0002] <120> 以MANF为靶点的物质在制备治疗肝内胆管癌产品中的应用
- [0003] <130> GNCFH182029
- [0004] <160> 4
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 54
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] ctgaagaagc tccgagttaa actcgagttt aactcggagc ttcttcagtt tttt 54
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 48
- [0014] <212> RNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] cugaagaagc uccgaguuaa acucgaguuu aacucggagc uucuucag 48
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 21
- [0020] <212> RNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] cugaagaagc uccgaguuaa a 21
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 21
- [0026] <212> RNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] uuuuacucgg agcuucuca g 21

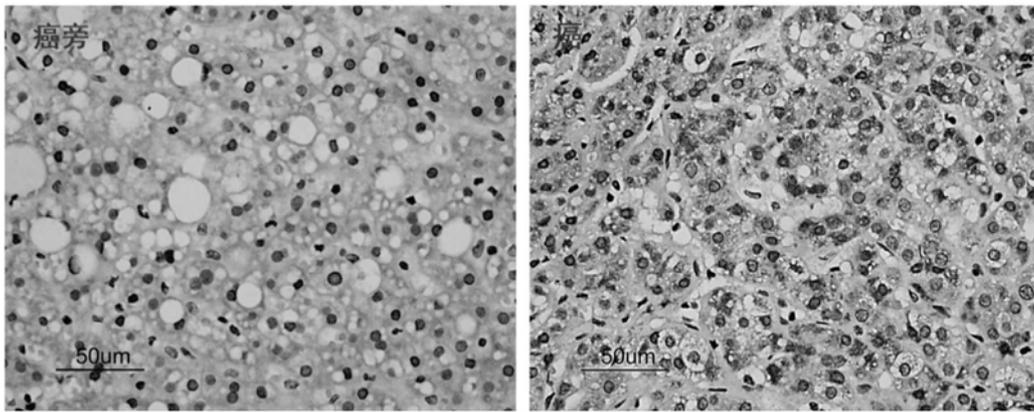


图1

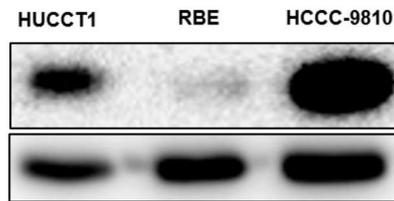


图2

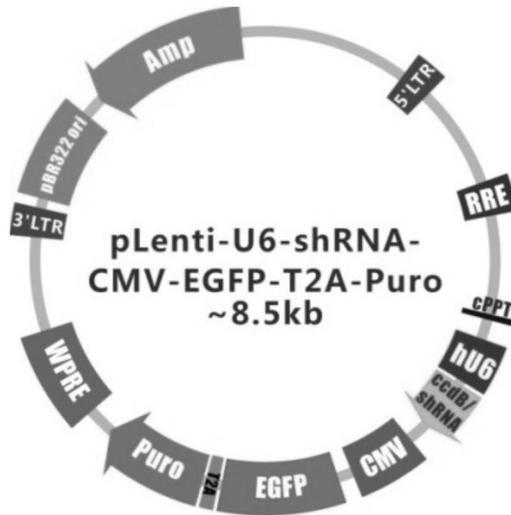


图3

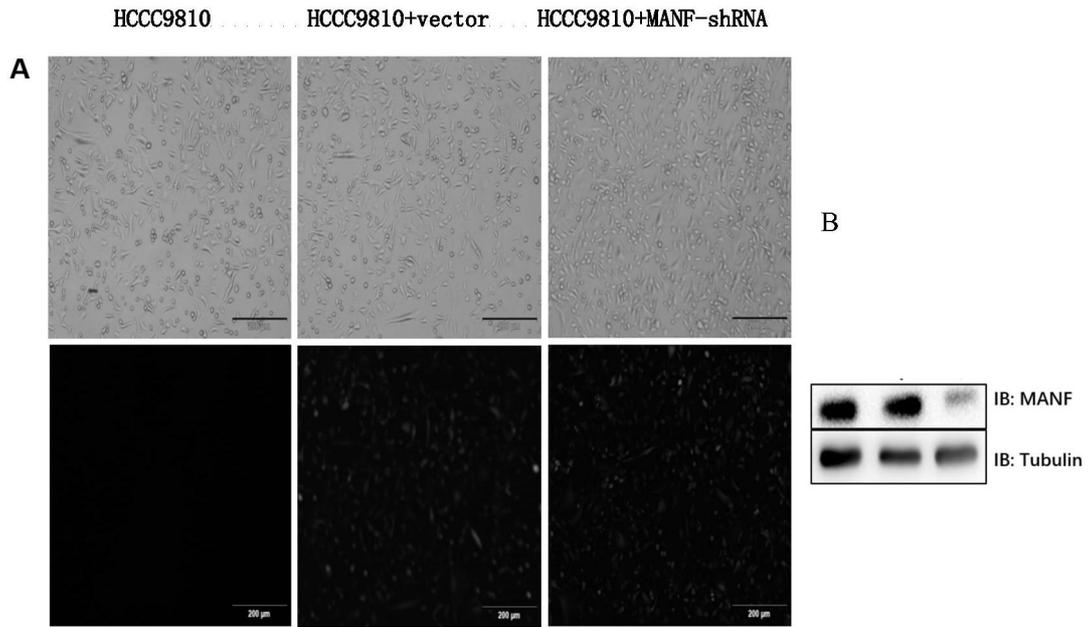


图4

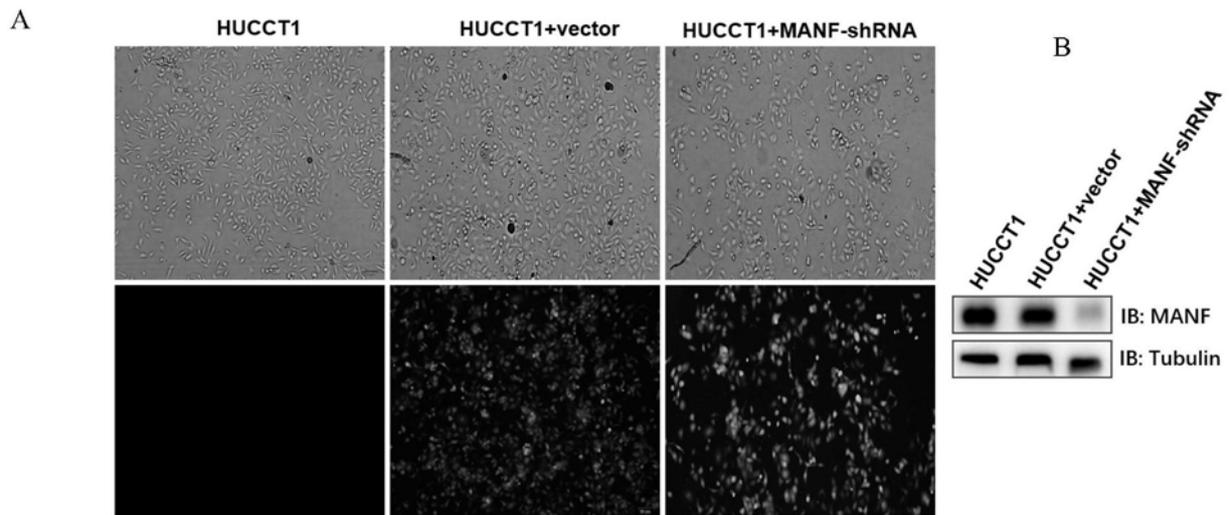


图5

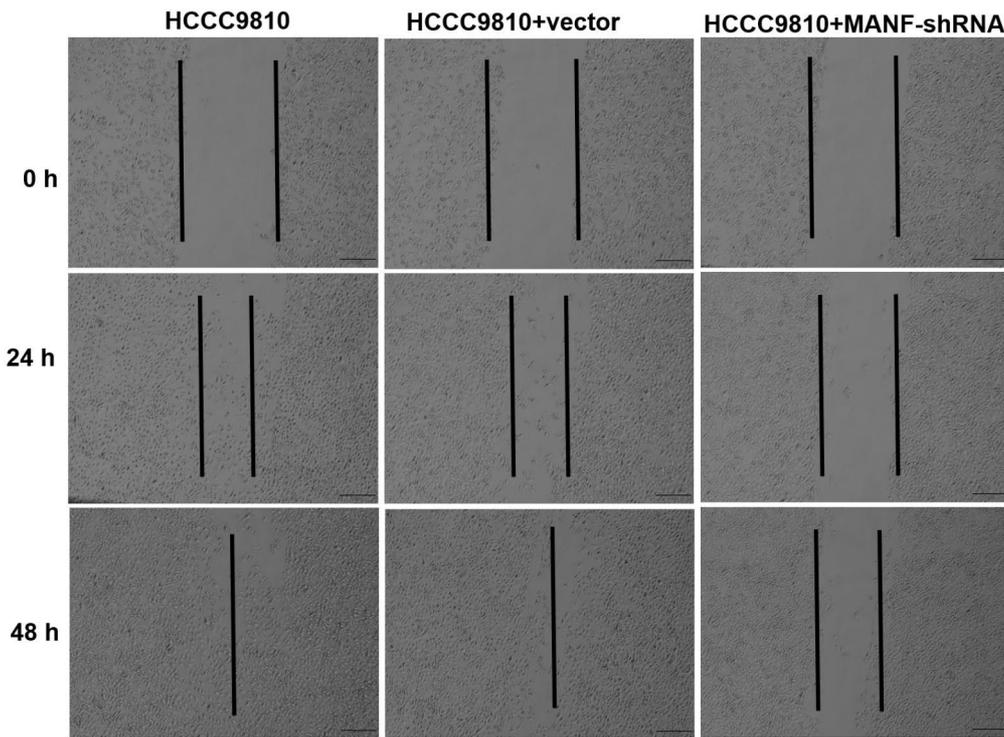


图6

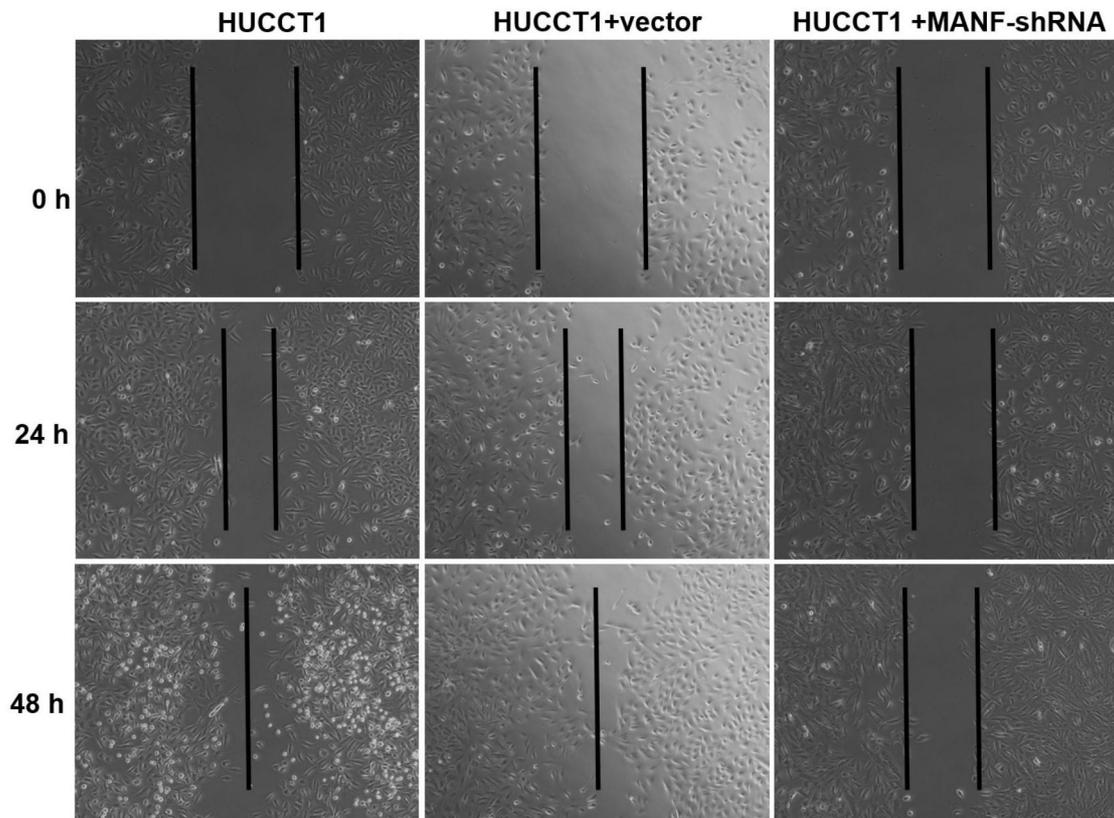


图7

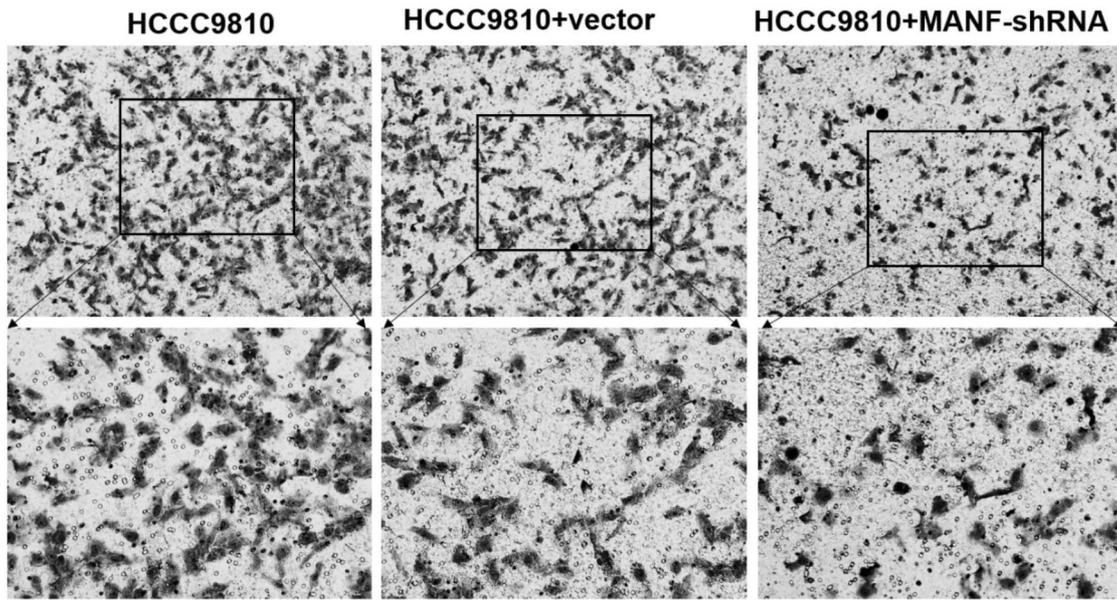


图8

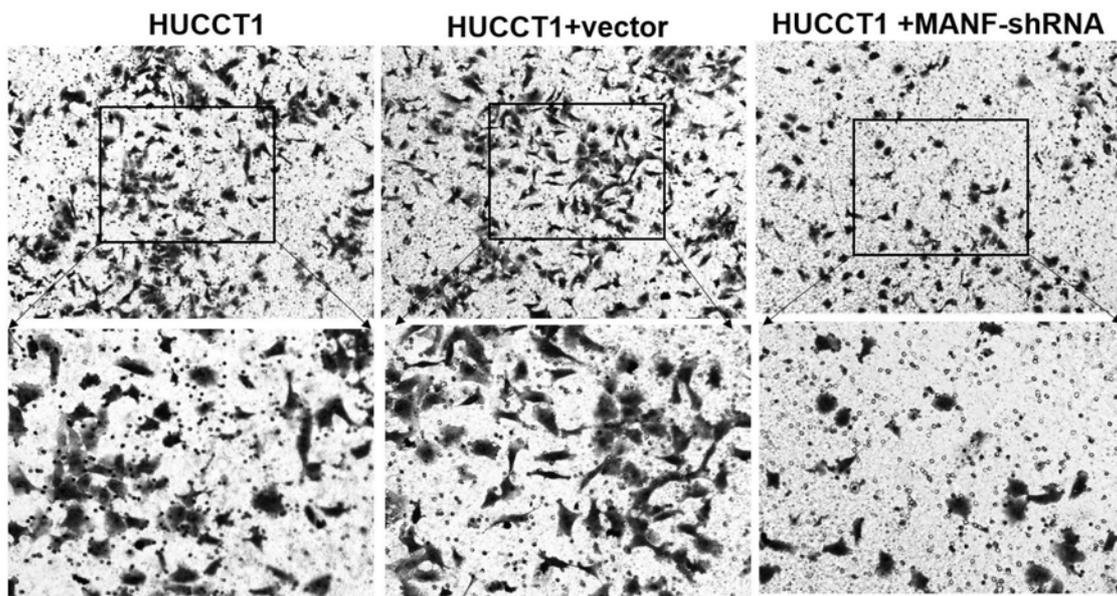


图9

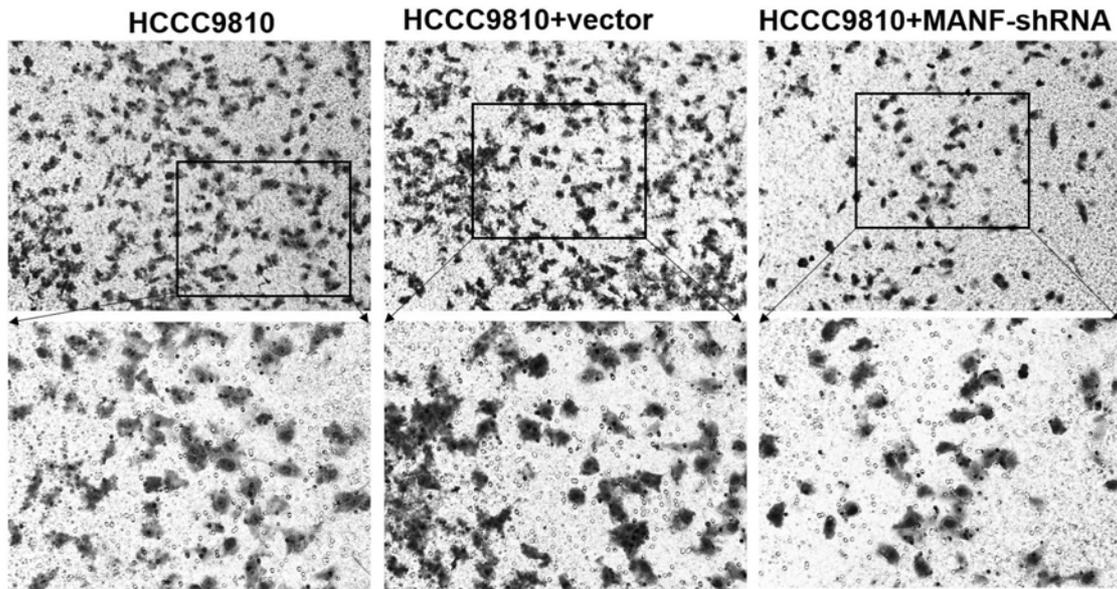


图10

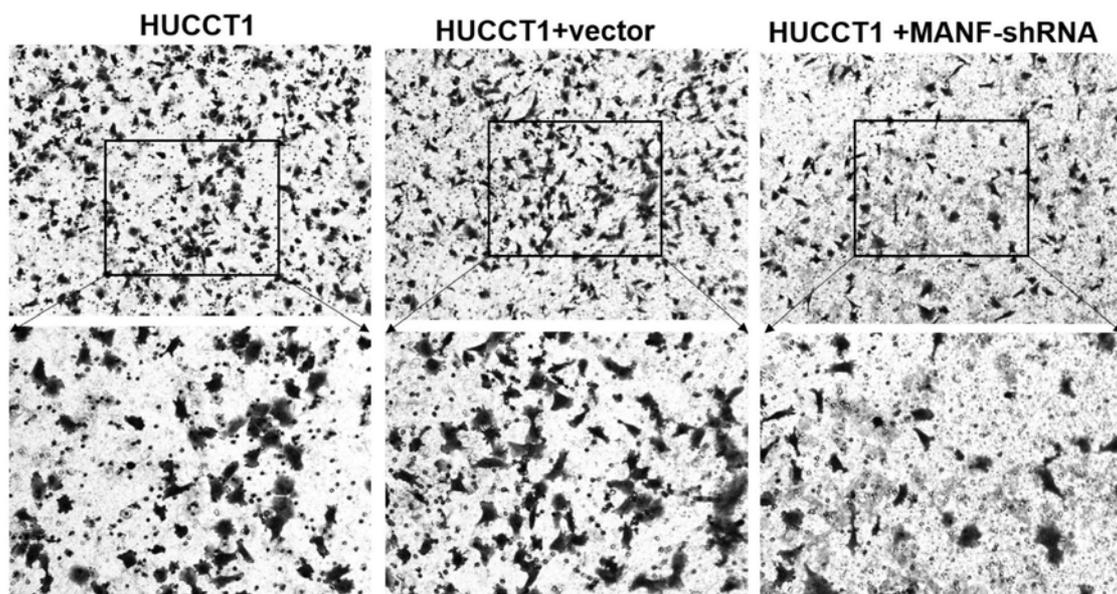


图11

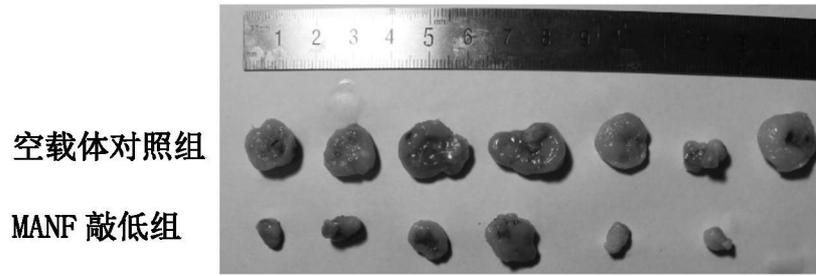


图12

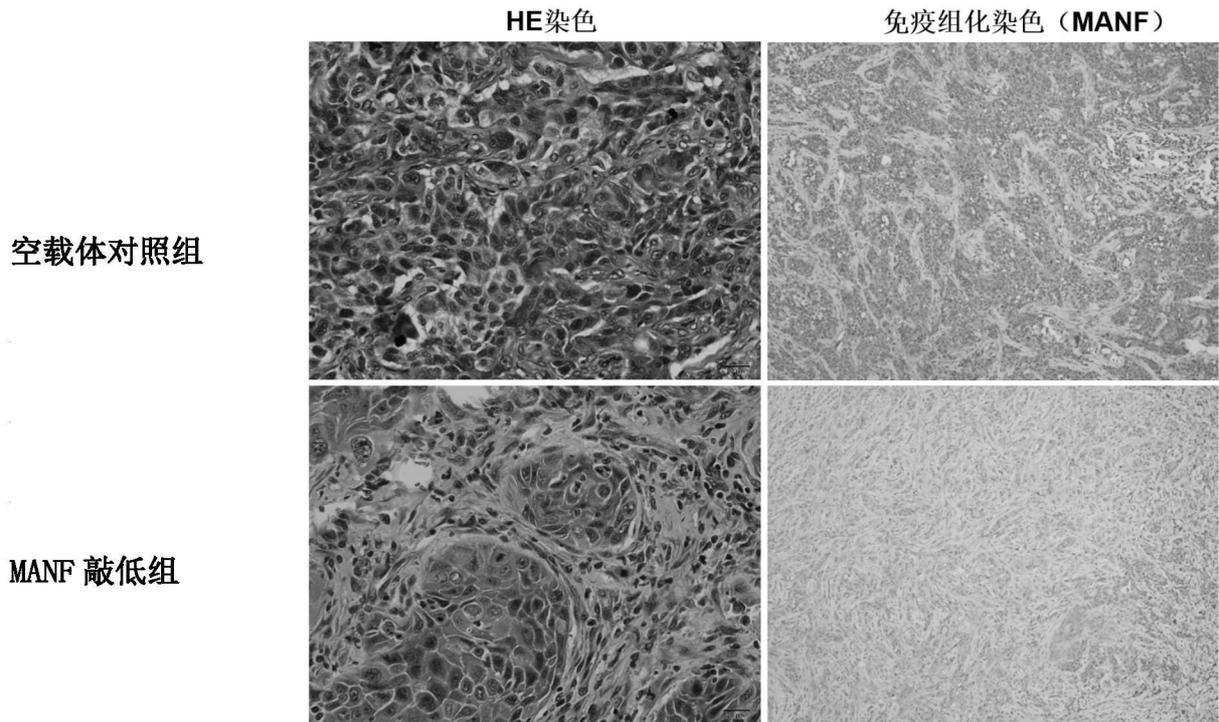
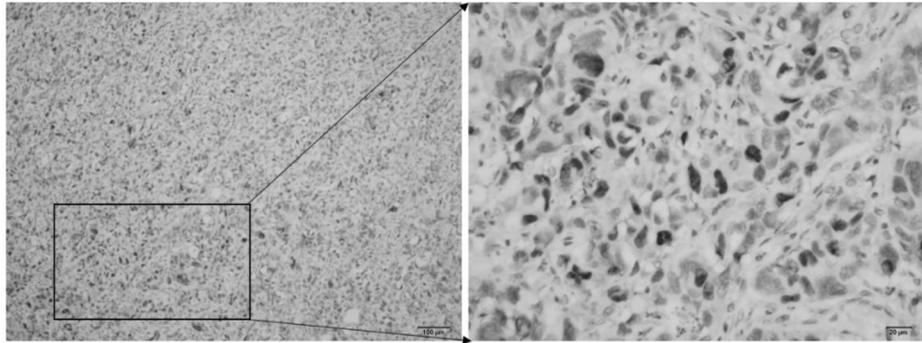


图13

空载体对照组



MANF 敲低组

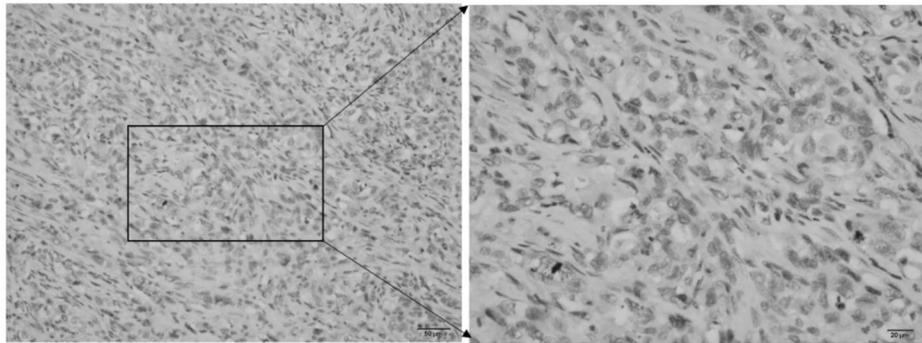


图14