



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108220434 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201711331671.6

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2017.12.13

(71)申请人 南京医科大学第二附属医院  
地址 210011 江苏省南京市鼓楼区姜家园  
121号

(72)发明人 缪林 于洋 季国忠 李全朋  
葛贤秀 王飞 张秀华

(74)专利代理机构 北京市诚辉律师事务所  
11430

代理人 郎坚

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

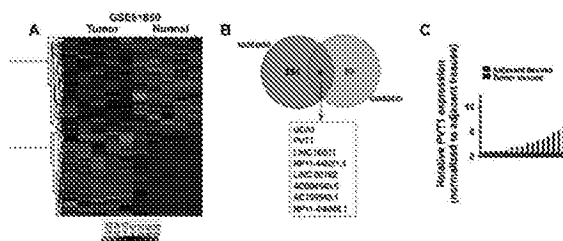
权利要求书1页 说明书9页  
序列表6页 附图7页

## (54)发明名称

一种长链非编码RNA及其组合物在诊断/治疗胆管癌中的应用

## (57)摘要

本发明属于基因工程领域,特别涉及一种长链非编码RNA, PVT1及其组合物,在制备诊断胆管癌及靶点药物治疗中的应用。同时,本发明还涉及其引物,在制备诊断直肠癌试剂中的应用。通过研究该长链非编码RNA细胞水平的表达,揭示了其与胆管癌发病机理的关系。



1. 一种长链非编码RNA, PVT1, 其特征在于, 长度为1957bp, 其序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 检测权利要求1所述长链非编码RNA的试剂在制备诊断胆管癌试剂中的应用。
3. 一种药物组合物, 包括检测权利要求1所述长链非编码RNA的检测试剂。
4. 权利要求3所述的药物组合物在制备治疗胆管癌药物中的应用。
5. 两组检测权利要求1所述长链非编码RNA的引物, 其序列分别如SEQ ID NO:2、3和4、5所示, 即:

SEQ ID NO:2 PVT1 F TGAGAACTGTCCTTACGTGACC,

SEQ ID NO:3 PVT1 R AGAGCACCAAGACTGGCTCT,

SEQ ID NO:4F AGCCACATCGCTCAGACAC,

SEQ ID NO:5R GCCCAATACGACCAAATCC。

6. 权利要求5中任意一组引物在制备诊断胆管癌试剂中的应用。
7. 一种试剂盒, 包括权利要求5所述任意一种检测PVT1的引物; 优选的, 所述试剂盒中引物的浓度为0.01~0.1mol/L。
8. 一种治疗胆管癌的药物组合物, 其特征在于, 包括PVT1的抑制剂。
9. 根据权利要求8所述的药物组合物, 其特征在于, 所述PVT1的抑制剂为PVT1的siRNA, 其序列如SEQ ID NO:6、7所示, 即:

si-PVT1 1#:

GCUUGGAGGCUGAGGAGUUTT

AACUCCUCAGCCUCCAAGCTT

或如SEQ ID NO:8、9所示, 即:

si-PVT1 2#:

CCCAACAGGAGGACAGCUUTT

AAGCUGUCCUCCUGUUGGGTT。

## 一种长链非编码RNA及其组合物在诊断/治疗胆管癌中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,特别涉及一种长链非编码RNA,PVT及其组合物,在制备诊断胆管癌及靶点药物治疗中的应用。同时,本发明还涉及其引物,在制备诊断胆管癌试剂中的应用。通过研究该长链非编码RNA细胞水平的表达,揭示了其与胆管癌发病机理的关系。

### 背景技术

[0002] 肿瘤是严重威胁人类健康的一大主要元凶,对肿瘤恶性进展的分子机制研究一直是学界关注的焦点与难点。已有研究报道,肿瘤细胞在生长过程中具有促进增殖和侵袭转移,持续血管生成,免疫耐受及免疫逃逸等细胞表型特征。研究表明,肿瘤细胞的生长是一个复杂的多基因调控和多步骤、多阶段发展的过程,包括p53、p21等抑癌基因的失活和Bcl1、Myc 等原癌基因的激活。迄今为止,恶性肿瘤的发生机制仍未完全清楚,需要进一步探索。

[0003] 研究显示:除这些已被广泛研究的编码基因外,长非编码RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)的异常表达也参与肿瘤恶性进展。lncRNAs是一类转录本长度超过200nt的RNA 分子,有别于其他小分子非编码RNA,其可以顺式(in cis)或反式(in trans)作用的方式调节RNA代谢、蛋白质功能活性、组蛋白修饰及染色质重塑,在表观遗传学、转录以及转录后水平广泛参与细胞生物学过程。越来越多的研究证实,lncRNAs不仅在维持机体的正常生理功能及发育过程中发挥重要的调控作用,其异常表达与疾病的发生发展尤其是肿瘤的恶性进展有着密切的联系。

[0004] 胆管癌(cholangiocarcinoma,CCA)是起源于胆管上皮细胞的高度侵袭性的恶性肿瘤,其全球发生率,尤其是在亚洲国家中呈逐年上升趋势,5年生存率不足5%。胆管癌早期发病隐匿,常无明显的临床表现,明确诊断时已至中晚期。尽管目前已有手术、放疗、化疗等临床治疗手段,但是胆管癌患者的预后仍很差。已有研究表明,lncRNAs的异常表达介导胆管癌恶性进展。上调的H19和HULC可通过ceRNA机制促进胆管癌细胞的迁移和侵袭。lncRNA CPS1intronic transcript 1(CPS1-IT1)可促进胆管癌细胞的增殖及抑制凋亡,且影响病人的肝功能及预后。进一步文献检索结果显示:lncRNAs可以通过发挥原癌基因的作用,参与胆管癌细胞增殖、凋亡和侵袭转移等生物学过程,提示更多胆管癌恶性进展相关lncRNAs的功能和机制具有进一步研究的必要性。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种长链非编码RNA在诊断胆管癌以及在制备治疗胆管癌药物中的应用。本发明采用以下技术方案:

[0006] 本发明提供一种长链非编码RNA,PVT1,其特征在于,长度为1957bp,其序列如SEQ ID NO:1所示,即:

[0007]

```

ctccgggacag agcgcgtgtg gcggccgagc acatgggccc gggggccggg cgggctcggggcggccggga
cgaggagggg cgacgacgag ctgcgagcaa agatgtgccc cgggacccccggcaccttcc agtggatttc
cttgccgaaa ggatgttggc ggtccctgtg acctgtggagacacggccag atctgccctc cagcctgatc
ttttggccag aaggagatta aaaagatgcccctcaagatg getgtgectg tcagctgcat ggagcttcgt
tcaagtatth tctgagcctgatggatttac agtgatcttc agtggctctgg ggaataaacc tgggtggaacc
atgcactggaatgacacacg cccggcacat ttcaggatac taaaagtggg ttttaagggag
gctgtggctgaatgctcat ggattcttac agcttggatg tccatggggg acgaaggact
gcagctggctgagagggttg agatctctgt ttacttagat ctctgccaac ttcctttggg
tctccctatggaatgtaaga ccccgactct tctgtgtgaa gcatctgatg cacgttccat
ccggcgctcagctgggcttg agctgacctat actccctgga gccttctccc gaggtgcccg
ggtagacctggcacatacag ccatcatgat ggtactttaa gtggaggctg aatcatctcc
cctttgagctgcttggcaag tggtccctt ggtgttcccc ttttactgce aggacactga
gatttgagagagtctcact ctgtggtcca ggctgaagta cagtggcatg atcccaggtc
actgcaacccccacctccc gggtcaagtg atcctctctc ctcagcctcc cgagtagetg
gtattacaggcgtgtgccac aaagcctggc taagttttgt atttttagta gagacggggg
ttcaccatgttggccaggtt ggtctcgaac tctgacctc aagtgatcca ctcactttgg
cctttcaacgtgctgggatt acaggcgaga gtcaccgca cgggacgact ctgacatttt
tgaagagtccagaatcctgt tacacctggg atttaggcac tttcaatctg aaaaaataca
tatectttcagcactctgga cggacttgag aactgtcctt acgtgaccta aagctggagt
atthtgagattggagaatta agagccagtc ttggtgctct gtgttcacct ggttcactg
aggagctgcatctacctgc ccatgccata gatcctgccc tgtttgcttc tctgttgcct
gctagtggacatgagaagga cagaataacg ggctcccaga ttcacaagcc ccaccaagag
gatcaccaccaggaacgcttg gaggtgagg agttcactga ggctactgca tcttgagact
caggatgaagaccagcttg gggctgtcaa agaggcctga agaggcagaa cccccagag
gagcctggggccaccaccca gcatcactgt gggaaaacgg cagcaggaaa tgtcctctcg
cctgctgctccacctcggg ccacgccttc cctcctctg gaagccttg ctagccactg
gcctgccccttctatgggaa tcaactactga ccttgcaget tattatagac ttatatgttt
tttgcattgtctgacacccat gactccacct ggaccttatg gctccacca gaagcaatcc
agcccaacaggaggacagct tcaaccatt acgatttcat ctctgcccc accactcagc
agcaagcacctgttacctgt ccaacccac ccctcccc aaactgcctt tgaaaaatcc
ctaacctatgagctttgaat aagatgagta cgaacttcat cgeccacgtg gcgtggccgg
cctcgtgtctatthaaattct ttttctaata aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

[0008] 检测上述长链非编码RNA的试剂在制备诊断胆管癌试剂中的应用

[0009] 进一步的,本发明还提供一种药物组合物,包括诊断上述长链非编码RNA的检测试剂。

[0010] 进一步的,所述的药物组合物在制备治疗胆管癌药物中的应用。

[0011] 另一方面,本发明还提供两组检测PVT1的引物组,其序列分别如SEQ ID NO:2、3和4、5所示,即:SEQ ID NO:2PVT1FTGAGAACTGTCCTTACGTGACC,SEQ ID NO:3PVT1RAGAGCACCAAGACTGGCTCT,SEQ ID NO:4FAGCCACATCGCTCAGACAC,SEQ ID NO:5RGCCCAATACGACCAAATCC。

[0012] 进一步的,本发明请求保护上述任意一种引物在制备诊断胆管癌试剂中的应用。

[0013] 另外,本发明还提供一种试剂盒,包括上述任意一种检测PVT1的引物;优选的,所述试剂盒中引物的浓度为0.01~0.1mol/L。

[0014] 另一方面,本发明提供一种治疗胆管癌的药物组合物,其中包括PVT1的抑制剂。

[0015] 进一步的,所述PVT1的抑制剂为PVT1的siRNA,其特征在于,其序列如SEQ ID NO: 6,7 及SEQ ID NO:8,9所示,即:

[0016] si-PVT1 1#:

[0017] GCUUGGAGGCUGAGGAGUUTT SEQ ID NO:6

[0018] AACUCCUCAGCCUCCAAGCTT SEQ ID NO:7

[0019] si-PVT1 2#:

[0020] CCCAACAGGAGGACAGCUUTT SEQ ID NO:8

[0021] AAGCUGUCCUCCUGUUGGGTTSEQ ID NO:9

[0022] 技术路线

[0023] 一、实验对象

[0024] 我们收集了17对2015年至2016年在南京医科大学第二附属医院生物治疗中心接受诊断和治疗的胆管癌患者以及不含有该疾病的健康志愿者的组织。组织样本收集的均为第一时间液氮或储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ ,直至RNA提取。该研究经过南京医科大学伦理委员会批准。获得所有病人的书面知情同意。

[0025] 二、实验设备和试剂

[0026] 本发明所使用的实验方法和研究技术:如总RNA和蛋白质的提取、克隆技术、细胞转染、ChIP试验、RIP试验、Western blot、荧光实时定量PCR、生物信息学数据库的使用等;所需要的实验材料如抗体、试剂盒等均可商购。

[0027] 本发明团队依托南京医科大学,所需各设备,如荧光定量PCR仪、流式细胞仪、酶标仪、 $\text{CO}_2$ 孵箱、低温高速离心机、荧光倒置显微镜、激光共聚焦显微镜等,以及实验动物,均可直接使用。

[0028] 三、实验步骤及结果

[0029] 1.实验路线示意图,依据本发明的发明构思,其实验路线示意图见附图8。

[0030] 2.PVT1在胆管癌中显著性高表达:检测胆管癌组织标本中PVT1表达水平并分析其相关性进行生物信息学分析,查找基因表达综合数据库(即GEO数据库)中的胆管癌-癌旁的芯片数据,将归一化数据下载并进行差异表达数据分析;最终获得在癌-癌旁差异表达的lncRNAs。确定PVT1是在数据中显著性上调( $P$ 值 $<0.001$ , $FDR < 0.05$ )的一条lncRNA。实验结果显示在图1中,PVT1在在癌-癌旁的差异表达情况:(A) GEO数据库的胆管癌表达谱数据显示:相对于癌旁或正常组织,PVT1在癌中高表达,纵坐标为标准化分数 $z$ 值;(B) 韦恩图显示GEO数据库的胆管癌表达谱数据GSE61850和GSE63420中共同上调的lincRNA;收集胆管癌组织样本,采用荧光实时定量PCR(qRT-PCR)技术在17对胆管癌组织及其癌旁组织中进行了验证,结果显示PVT1平均上调约5倍,结果显示在图1C中。

[0031] 3.PVT1促进胆管癌细胞恶性进展的研究

[0032] 1) 合成PVT1干扰序列(siRNA)和过表达质粒,转染胆管癌细胞系;

[0033] 干扰序列如SEQ ID NO:6,7及SEQ ID NO:8,9所示,即:

[0034] si-PVT1 1#:

[0035] GCUUGGAGGCUGAGGAGUUTT

[0036] AACUCCUCAGCCUCCAAGCTT

[0037] si-PVT1 2#:

[0038] CCCAACAGGAGGACAGCUUTT

[0039] AAGCUGUCCUCCUGUUGGGTT。

[0040] 2) qRT-PCR检测抑制和过表达效率,cck8、克隆形成、Transwell、流式细胞技术检测封闭及过表达PVT1后对胆管癌增殖、凋亡及侵袭转移细胞功能的影响。进一步评价PVT1在胆管癌细胞中的生物学功能,明确其癌基因功能。

[0041] 实验结果显示在图2中:(A) PVT1在胆管癌上皮细胞(HuCCT1细胞)中的干扰效率最高可达90%;在人胆管癌细胞(RBE细胞)中的干扰效率可达75%。(B) 克隆形成实验结果显示:干扰PVT1抑制HuCCT1细胞及RBE细胞的增殖;(C) CCK8实验结果显示:干扰 PVT1后抑制HuCCT1细胞及RBE细胞的增殖;(D) Transwell实验结果显示:干扰PVT1 抑制HuCCT1细胞及RBE细胞的侵袭转移;(E) 流式细胞仪检测结果显示:干扰PVT1后, HuCCT1及RBE细胞的凋亡明显增多;(F) 流式细胞仪检测结果显示:干扰PVT1后,RBE 细胞细胞周期主要被阻滞在G1期。

[0042] 4. PVT1提高胆管癌细胞在体内的肿瘤形成能力

[0043] 1) 构建PVT1干扰和过表达的慢病毒载体,包装成病毒,转染HuCCT1细胞,筛选阳性稳转细胞株。

[0044] 2) 两种细胞分组注射入免疫缺陷小鼠(BALB/C裸鼠),以构建皮下成瘤模型。待瘤体形成后,每2天测一次瘤体体积,4周后处死小鼠,取瘤体,测量重量;定量PCR检测PVT1 的表达水平,石蜡包埋标本,HE染色,免疫组化检测增殖标记物ki-67变化。进一步评价PVT1对胆管癌细胞增殖能力的影响。

[0045] 实验结果显示在图3中:(A-B) 裸鼠皮下成瘤实验,观察并记录小鼠瘤体大小,待瘤体形成16天后处死小鼠,取出瘤体,拍照记录;同时量取瘤体的大小并称其重量;(C):瘤体检测,敲低sh-PVT1 2#组小鼠瘤体的平均重量显著低于对照组瘤体的重量。

[0046] 5. 高通量测序PVT1调节下游靶基因表达

[0047] 利用转录组测序初步确定PVT1所调控的靶基因:在HuCCT1细胞系中利用siRNA敲低 PVT1,利用转录组测序技术高通量筛选PVT1所调控的重要靶基因,并运用qRT-PCR对测序结果进行验证。

[0048] 实验结果显示在图4中:(A) 干扰PVT1后,转录组高通量测序所得PVT1下游影响的差异表达基因,颜色表示z分数;(B) Go分析显示PVT1与细胞血管形成显著相关;(C-D) qPCR及western blot实验验证在胆管癌细胞株HuCCT1及RBE中干扰PVT1后下游靶基因显著上调。

[0049] 6. PVT1绑定EZH2表观抑制下游靶基因

[0050] 1) 核质分离实验确定PVT1在胆管癌细胞株中亚细胞定位:核质分离实验确定PVT1的细胞定位,在胆管癌细胞中通过RIP技术以鉴定PVT1与EZH2蛋白结合。

[0051] 2) PVT1表观调控胆管癌细胞恶性表型的机制:

[0052] a. 胆管癌细胞中分别封闭及过表达PVT1,qRT-PCR、western blot方法分别检测ANGPTL4 的mRNA、蛋白的表达水平。

[0053] b. 胆管癌细胞中封闭EZH2后,采用qRT-PCR、western blot方法分别检测ANGPTL4 的 mRNA、蛋白的表达水平。

[0054] c. 为鉴定在胆管癌细胞中PVT1是否与EZH2特异结合,进行了RNA免疫共沉淀(RNA

immunoprecipitation, RIP) 实验对PVT1与EZH2在胆管癌细胞中的绑定进行了进一步验证(实验结果见图4B), 结果提示在胆管癌细胞中PVT1可与EZH2特异结合。

[0055] EZH2是构成PRC2复合物中唯一具有酶活性的亚基, PRC2是一个作用于组蛋白H3赖氨酸位点K27的高度保守的组蛋白甲基转移酶, 其生物功能是对分化基因的转录沉默。目前已知通过全基因组研究, 在多种生物体中PRC2的常作用靶点是转录因子和信号通路的关键位点。研究表明, EZH2可与长链非编码RNA介导组蛋白甲基化从而抑制下游靶基因的表达。且研究表明, 敲低EZH2后也可引起ANGPTL4基因上调。已有文献报道, 肝癌组织中 ANGPTL4的表达量显著低于癌旁组织, 且其肿瘤组织中ANGPTL4启动子区CpG岛的甲基化程度高于癌旁组织, 证实ANGPTL4启动子区CpG岛的高度甲基化引起其在肿瘤组织中低表达。且既往的研究表明组蛋白甲基化和DNA甲基化可以协同作用抑制基因表达。提示我们: PVT1可绑定EZH2介导组蛋白甲基化从而引起ANGPTL4基因的抑制表达。

[0056] d. PVT1可能通过绑定EZH2表观抑制ANGPTL4基因等抑癌基因的表达, 从而促进胆管癌细胞恶性表型进展。

[0057] ChIP实验证实敲减PVT1后, EZH2与ANGPTL4基因启动子区的绑定丰度降低

[0058] 上述实验的结果显示在图5中, (A) 核质分离实验结果表明: PVT1的转录本主要定位于细胞核中; (B) RIP实验证实: PVT1能够和EZH2蛋白绑定; (C) qPCR及western blot 实验验证在胆管癌细胞株HuCCT1及RBE中成功干扰EZH2基因。(D) qPCR验证在HuCCT1 细胞中干扰EZH2后, 下游靶基因显著上调。

[0059] 图6, (A-C) GSE26566数据库中显示胆管癌中ANGPTL4基因(A), SPRY4基因(B), GDF15(C) 基因的表达情况。(D-F) GSE26566数据库中显示EZH2与ANGPTL4基因呈明显负相关(D), 而EZH2与SPRY4基因(E) 及GDF15基因(F) 的表达无明显负相关关系。(G) 在17对胆管癌和癌旁组织qPCR验证: ANGPTL4在胆管癌组织中显著下调。(H) ChIP 实验证实敲减PVT1后, EZH2与ANGPTL4基因启动子区的绑定丰度降低; (I) ChIP实验证实敲减PVT1后, ANGPTL4基因启动子区H3K27me3的丰度降低。

[0060] 有益效果

[0061] 本发明从临床组织标本、细胞、模式动物三个层面研究PVT1调控胆管癌细胞恶性进程的作用机制, 运用qPCR、RIP分子生物学技术手段对PVT1与靶基因之间的关系作进一步验证。本发明具有显著的科学意义: PVT1在胆管癌中异常高表达并参与表观遗传介导的增殖侵袭机制; 生物信息学分析、转录组高通量测序、RIP、RNA-pulldown、质谱等方法的运用保证了结果的准确性和系统性; 本研究的成功实施将丰富lncRNAs调控胆管癌发生发展的分子机制, 揭示了PVT1可作为胆管癌诊断、预后的标志物, 为临床早期胆管癌临床诊治提供实验和理论依据。

## 附图说明

[0062] 图1 PVT1在癌变组织-癌旁组织的差异表达情况

[0063] 图2 PVT1对HuCCT1细胞和RBE细胞增殖以及细胞周期的影响

[0064] 图3 PVT1对肿瘤细胞形成大小的影响

[0065] 图4高通量测序PVT1调节下游靶基因表达

[0066] 图5 PVT1绑定EZH2表观抑制下游靶基因

- [0067] 图6 PVT1绑定EZH2表观抑制ANGPTL4基因的表达
- [0068] 图7 PVT1绑定EZH2表观抑制ANGPTL4基因的表达从而促进胆管癌恶性进展的机制图
- [0069] 图8本发明实验路线示意图

### 具体实施方式

[0070] 下面用实施例来进一步说明本发明,但本发明并不受其限制。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0071] 1. 生物信息学方法筛选并确定胆管癌中高表达PVT1

[0072] (1) 入选标准进入GEO数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>), 查询“cholangiocarcinoma”和“cancer of biliary duct”, 限制过滤条件“Entry type: Series”、“Organism: Homo sapiens”、“Study type: Expression profiling by array”和“Attribute name: tissue”, 获关于胆管癌芯片研究查询结果, 挑选符合下列要求的研究项目: 胆管癌、同时含病例-对照(或癌-癌旁)、主流芯片平台(Affy、Agilent和Illumina)、单通道芯片。

[0073] (2) 芯片数据分析

[0074] 下载已有归一化数据或使用RMA Express对原始数据进行归一化; 计算差异表达倍数(FC); 对归一化数据进行z分值变换; 之后依据样本情况进行配对t检验或成组t检验, 并计算FDR(错误发现率)值, 将P值<0.001, FDR<0.05定义为显著性差异。

[0075] (3) lncRNAs探针注释

[0076] 利用探针序列BLAST和Biomart查询的方式对芯片平台的探针集进行lncRNAs注释, 最终获得显著性差异lncRNAs。结果发现PVT1是在数据中显著性上调的一条lncRNAs。

[0077] 2. 检测胆管癌组织标本中PVT1表达水平并分析其相关性

[0078] 进一步收集胆管癌及癌旁组织标本, 及其临床资料的整理。Trizol法提取组织的总RNA, 取1 $\mu$ g的RNA逆转录为cDNA模板(TAKARA)。采用qPCR在17对胆管癌组织及其癌旁组织中进行了验证, 结果显示PVT1平均上调约5倍。定量PCR应用ABI公司的7500型定量PCR仪(Applied Biosystem, Foster City, CA), 结果采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 值进行分析。并分析其与临床病理资料(TNM分期、病理特征、预后等)的相关性, 以验证PVT1是否可作为胆管癌诊断、预后的标志物, 其表达上调可能是胆管癌发生、发展的关键靶分子。

[0079] 所用引物序列如下:

[0080] PVT1F: 5' -TGAGAACTGTCCTTACGTGACC-3'

[0081] PVT1R: 5' -AGAGCACCAAGACTGGCTCT-3'

[0082] GAPDH F: 5' -AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

[0083] GAPDH R: 5' -GCCCAATACGACCAAATCC-3'

[0084] 3. PVT1在胆管癌细胞的功能研究

[0085] (1) 设计合成特异性的针对PVT1的siRNA分子及过表达质粒(invitrogene公司)转染胆管癌细胞, 以未转染干扰序列为对照; 设计合成特异性PVT1过表达质粒载体转染胆管癌细胞, 以空载体转染组为对照; 48小时后收集细胞的总RNA, qRT-PCR分别检测转染效率。

[0086] (2) 胆管癌细胞系分别封闭或过表达PVT1后, cck8、克隆形成、Transwell实验、流



式细胞技术检测封闭PVT1后对胆管癌细胞增殖、细胞侵袭转移及细胞周期、凋亡等功能的影响。以明确PVT1在胆管癌细胞中的生物学功能。

[0087] 4. PVT1在模式动物中的功能验证

[0088] PVT1的干扰及过表达慢病毒载体构建:合成PVT1的序列及特异性干扰序列,以GAPDH(磷酸甘油醛脱氢酶)基因的序列作为对照。上述片段均由英潍捷基TM公司合成,并将其插入慢病毒载体中;包装入慢病毒载体感染RBE和HuCCT1细胞,G418筛选阳性细胞;收集阳性稳转细胞的总RNA,qRT-PCR检测PVT1的表达。用其及相应的对照组细胞分别皮下注射BALB/C裸鼠,构建皮下成瘤模型;待瘤体形成后,每2天测一次瘤体体积,4周后处死小鼠,取瘤体,测量重量;采用定量PCR检测PVT1的表达水平,石蜡包埋标本,HE染色,免疫组化检测增殖标记物ki-67变化。

[0089] 5. PVT1调控胆管癌细胞增殖的分子机制研究

[0090] (1) 利用转录组测序初步确定PVT1所调控的靶基因

[0091] a. 总RNA的提取(Trizol法)

[0092] 在HuCCT1细胞中敲低PVT1 48h后,分别在对照组和干扰组细胞中加入500u1 Trizol,放置10min;加入100μL氯仿,剧烈震动15s,室温静置5min;离心,4℃、12,000g、10min,将上清转移到一新的1.5ml离心管中。加入等体积的异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20℃放置30min,离心,4℃、12,000g、20min,弃除上清。加入1ml预冷的75%乙醇,洗涤沉淀,离心,4℃、12,000g、5min,弃除上清,室温干燥10min。加入30-50μl RNase-Free水,溶解RNA,-80℃保存。

[0093] b. RNA的质检

[0094] 打开Agilent 2200机器,打开软件;装入相应的R6K Agilent ScreenTape,排枪装入16个 Loading枪头;取出一个8联管,按顺序分别加入4μL R6K Sample Buffer与1μLRNA样品;混匀后离心收集混合液,72℃3min,冰上2min;离心以收集管壁溶液,然后放入Agilent 2200 样品板上;点击Start开始质检。

[0095] c. 文库构建

[0096] 转录组RNA片段化:poly(A)RNA的获取;RNA片段化;片段RNA纯化构建文库:RNA加接头;反转录;cDNA纯化;cDNA扩增;扩增产物纯化。文库质检:打开Agilent 2200 机器,打开软件;装入相应的D6K Agilent ScreenTape,排枪装入16个Loading枪头;取出一个8联管,在第一管中加入3μLD1K Ladder,在剩余的管中分别加入3μLD1K Sample Buffer 和1μL cDNA样品,涡旋混匀5s;离心收集管壁溶液,然后放入Agilent 2200样品板上;点击Start开始质检。

[0097] d. 测序模板准备文库的稀释;乳滴PCR;珠子的清洗;阳性珠子的富集

[0098] e. 上机测序

[0099] 清洗测序仪;测序仪初始化;上样。

[0100] (2) 核质分离实验确定PVT1在胆管癌细胞株中亚细胞定位

[0101] a. 核质分离,亚细胞定位:采用life公司试剂盒分别分离胆管癌细胞质及细胞核RNA,确定PVT1在细胞质及细胞核分布情况,具体步骤如下:冰上PBS清洗细胞2次;胰酶消化细胞,离心收集细胞,PBS清洗细胞一次。离心细胞,加入细胞裂解液,吹打混匀,冰上孵育10min,离心,4℃、500g、5min。吸取上清加入等体积binding buffer,吹打混匀,加入等体积

无水乙醇,吹打均匀;用细胞裂解液清洗细胞核沉淀一次去除细胞质RNA污染,离心,4℃、500g、5min,去上清加入细胞核裂解液,冰上孵育5-10分钟,加入等体积binding buffer,吹打混匀,加入等体积的无水乙醇。混匀好的反应液加入收集柱中,离心,4℃、12000g、1min,直至所有反应液穿过收集柱。清洗缓冲液清洗收集柱2次,离心,4℃、12000g、1min,弃清洗液。将Elutionbuffer加热到95-100摄氏度加入搜集柱中,离心,4℃、12000g、1min,得到所需RNA;进行下一步逆转录,qRT-PCR检测。

[0102] b. RIP:对RBE细胞及HuCCT1细胞用EZH2抗体免疫沉淀RNP复合物。

[0103] 将沉淀的总RNA的抽提。无RNA酶的DNAase1处理提取的总RNA。对提取的RNA进行逆转录并qRT-PCR检测。

[0104] c. RNA-pulldown联合SDS-PAGE-银染-质谱技术:构建PVT1过表达质粒,运用特异限制性内切酶切开质粒,利用体外转录试剂盒转译得到PVT1RNA,再以生物素末端标记试剂盒对PVT1末端标记,与细胞内蛋白运用磁珠孵育结合,高效富集RNA结合蛋白,特异地获得与PVT1结合的蛋白,再联合SDS-PAGE-银染-质谱技术,鉴定与PVT1结合的蛋白。

[0105] (3) PVT1在胆管癌细胞中绑定EZH2调控靶基因的表达

[0106] a. 设计特异性的PVT1干扰或过表达载体,用脂质体2000(英潍捷基™)转染试剂将PVT1干扰或过表达载体瞬时转染胆管癌细胞,转染48小时后,收集细胞总RNA和蛋白用于qRT-PCR及western blot分别检测靶基因mRNA和蛋白表达(以GAPDH作为对照)。b. 设计特异性的EZH2的干扰序列,干扰序列如SEQ ID NO:7所示,即si-EZH2: GAGGUUCAGACGAGCUGAUUU;AUCAGCUCGUCUGAACCUCUU。用脂质体2000(英潍捷基™)转染试剂将瞬时转染胆管癌细胞,转染48小时后,收集细胞总RNA和蛋白用于qRT-PCR及western blot分别检测EZH2及靶基因ANGPTL4的mRNA和蛋白表达(以GAPDH作为对照)。

[0107] c. 分别封闭和过表达PVT1后,ChIP检测EZH2与靶基因ANGPTL4启动子区的结合能力。

[0108] 所用引物序列如下:

[0109] EZH2 F:5' -TGCACATCCTGACTTCTGTG-3'

[0110] EZH2 R:5' -AAGGGCATTCACTCAACTCC-3'

[0111] ANGPTL4 F:5' -GTCCACCGACCTCCCGTTA-3'

[0112] ANGPTL4 R:5' -CCTCATGGTCTAGGTGCTTGT-3'

[0113] EREG F:5' -CGTGTGGCTCAAGTGTCAAT-3'

[0114] EREG R:5' -AAGGTTGGTGGACGGTTAAA-3'

[0115] ENC1 F:5' -CTGGAGATTCAAAGCCCAAC-3'

[0116] ENC1 R:5' -TGCAGGCATCGAACAATAAAA-3'

[0117] ETV5 F:5' -CCTCCTCTGAGCTGTCGTCT-3'

[0118] ETV5 R:5' -ATTCTGATGGGTGGGTGAGA-3'

[0119] GDF15 F:5' -GAGGTGCAAGTGACCATGTG-3'

[0120] GDF15 R:5' -CAGTGGCAGTCTTTGGCTAAC-3'

[0121] SPRY4 F:5' -CCAGGATGTCACCCACCATTG-3'

[0122] SPRY4 R:5' -TGTGCTGCTGCTGCTC-3'

[0123] U1 F:5' -GGGAGATACCATGATCACAAGGT-3'

[0124] U1 R:5' -CCACAAATTATGCAGTCGAGTTTCCC-3'

[0125] GAPDH F:5' -AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

[0126] GAPDH R:5' -GCCCAATACGACCAAATCC-3'

[0127] ANGPTL4 CHIP primers F:5' -ATTTCACTAGAGGCGGGC-3'

[0128] ANGPTL4 CHIP primers R:5' -CAGGCCTTCCTCTACGAACC-3'

[0129] 6. 胆管癌组织标本中PVT1与靶基因之间的相关性研究。

[0130] 进一步收集胆管癌组织标本并整理详细病理资料和建立随访记录库。qRT-PCR技术检测胆管癌组织标本及配对正常标本中PVT1的表达水平,并分析其与胆管癌病人的病理资料(肿瘤TNM分期、病理特征、预后等)的相关性。qRT-PCR分析胆管癌组织标本及配对正常标本中相应靶基因ANGPTL4的表达水平;免疫组化检测靶基因ANGPTL4蛋白水平的表达量;分析胆管癌临床组织标本中PVT1与靶基因之间相关性。以进一步评价PVT1可作为胆管癌诊断、预后的标志物,其表达异常可能是促进胆管癌发生发展的关键靶点。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 南京医科大学第二附属医院

&lt;120&gt; 一种长链非编码RNA及其组合物在诊断/治疗胆管癌中的应用

&lt;130&gt; CP11704216C

&lt;160&gt; 29

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1957

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

```

ctccgggcag agcgcgtgtg gcggccgagc acatgggccc gcgggcccggg cgggctcggg 60
gcggccggga cgaggagggg cgacgacgag ctgcgagcaa agatgtgcc cgggaccccc 120
ggcaccttc agtggatttc cttgcggaaa ggatgttggc ggtccctgtg acctgtggag 180
acacggccag atctgccctc cagcctgate ttttgccag aaggagatta aaaagatgcc 240
cctcaagatg gctgtgectg tcagetgcat ggagcttcgt tcaagtattt tctgagcctg 300
atggatttac agtgatcttc agtggctctgg ggaataacgc tgggtgaacc atgcaactga 360
atgacacacg cccggcacat ttcaggatac taaaagtgg ttttaaggag gctgtggctg 420
aatgcctcat ggattcctac agcttggatg tccatggggg acgaaggact gcagctggct 480
gagagggttg agatctctgt ttacttagat ctctgccaac ttcctttggg tctccctatg 540
gaatgtaaga ccccgactct tctggtgaa gcatctgat cacgttccat ccggcgcctca 600
gctgggcttg agctgacat actccctgga gccttctccc gaggtgcgcg ggtgacctg 660
gcacatacag ccatcatgat ggtactttaa gtggaggetg aatcatctcc cttttgagct 720
gcttggcacg tggctccctt ggtgttcccc ttttactgcc aggacactga gatttggaga 780
gagtctcact ctgtggcca ggctgaagta cagtggcatg atcccaggtc actgcaacce 840
ccacctcccg ggttcaagtg atcctcctgc ctccagctcc cgagtagctg gtattacagg 900
cgtgtgccac aaagcctggc taagttttgt atttttagta gagacggggt ttcacatgt 960
tggccagggt ggtctcgaac tctgacctc aagtgateca ctcaacttgg cttttcaacg 1020
tgctgggatt acaggcgaga gtcaccgca cggacgact ctgacatttt tgaagagtcc 1080
agaatcctgt tacacctggg atttaggcac ttcaatctg aaaaaataca tctcctttca 1140
gcactctgga cggacttgag aactgtcctt acgtgacctc aagctggagt attttgagat 1200
tgagaaatta agagccagtc ttgggtgctt gtgttcaact ggttcatctg aggagctgca 1260
tctaccctgc ccatgccata gatcctgccc tgtttgctt tctgtttgct gctagtggac 1320
atgagaagga cagaataacg ggtcccaga ttcacaagcc ccaccaagag gatcacccca 1380
ggaacgcttg gagctgagg agttcaactg ggtactgca tcttgagact caggatgaag 1440
accagcttg gggtgtcaa agaggcctga agaggcagaa caccacagag gagcctgggg 1500
ccaccacca gcatcaactg gggaaaacgg cagcaggaaa tgtcctctcg cctgcgtgct 1560
ccacctcggg ccacgccttc cctccttctg gaagccttgc ctgaccactg gctgcccct 1620

```

tctatgggaa tcactactga ccttgcagct tattatagac ttatatgttt tttgcatgtc 1680  
tgacacccat gactccacct ggaccttatg gctccacca gaagcaattc agcccaacag 1740  
gaggacagct tcaaccatt acgatttcat ctctgcecca accactcagc agcaagcacc 1800  
tgttacctgt ccacccccac cccttcccc aaactgcctt tgaaaaatcc ctaacctatg 1860  
agctttgaat aagatgagta cgaacttcat cgcccagtg gcgtggccgg cctcgtgtct 1920  
attaaattct ttttctacta aaaaaaaaaa aaaaaaa 1957

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tgagaactgt ccttacgtga cc 22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

agagcaccaa gactggctct 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

agccacatcg ctcagacac 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gccaatacg accaaatcc 19

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

gcuuggagge ugaggaguut t 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列  
<400> 7  
aacuccucag ccuccaagct t 21  
<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 8  
cccaacagga ggacagecuut t 21  
<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 9  
aagcuguccu ccuguuggt t 21  
<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> EZH2 F  
<400> 10  
tgcacatcct gacttctgtg 20  
<210> 11  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> EZH2 R  
<400> 11  
aagggcattc accaactcc 19  
<210> 12  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> ANGPTL4 F  
<400> 12  
gtccaccgac ctcccgtta 19  
<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> ANGPTL4 R  
<400> 13  
cctcatggtc tagtgcttg t 21

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> EREG F  
<400> 14  
cgtgtggctc aagtgcaat 20  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> EREG R  
<400> 15  
aaggttgggtg gacggttaaa 20  
<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ENC1 F  
<400> 16  
ctggagattc aaagcccaac 20  
<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ENC1 R  
<400> 17  
tgcaggcatc gaacaataaa 20  
<210> 18  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ETV5 F  
<400> 18  
cctcctctga gctgtcgtct 20  
<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ETV5 R  
<400> 19  
attctgatgg gtgggtgaga 20  
<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA

<213> GDF15 F  
<400> 20  
gaggtgcaag tgaccatgtg 20  
<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> GDF15 R  
<400> 21  
cagtggcagt ctttggctaa c 21  
<210> 22  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> SPRY4 F  
<400> 22  
ccaggatgtc acccaccatt g 21  
<210> 23  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> SPRY4 R  
<400> 23  
tgtgctgctg ctgctc 16  
<210> 24  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> U1 F  
<400> 24  
gggagatacc atgatcacga aggt 24  
<210> 25  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> U1 R  
<400> 25  
ccacaaatta tgcagtcgag tttccc 26  
<210> 26  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> GAPDH F  
<400> 26  
agccacatcg ctcagacac 19



---

<210> 27  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> GAPDH R  
<400> 27  
gcccaatacg accaaatcc 19  
<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ANGPTL4 CHIP primers F  
<400> 28  
atttcacact agaggcgggc 20  
<210> 29  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ANGPTL4 CHIP primers R  
<400> 29  
caggccttcc tctacgaacc 20

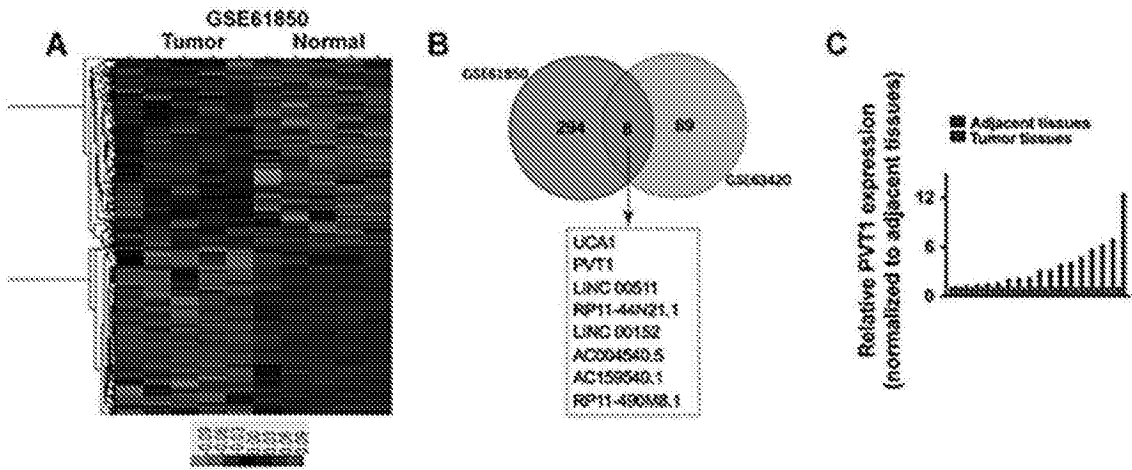


图1

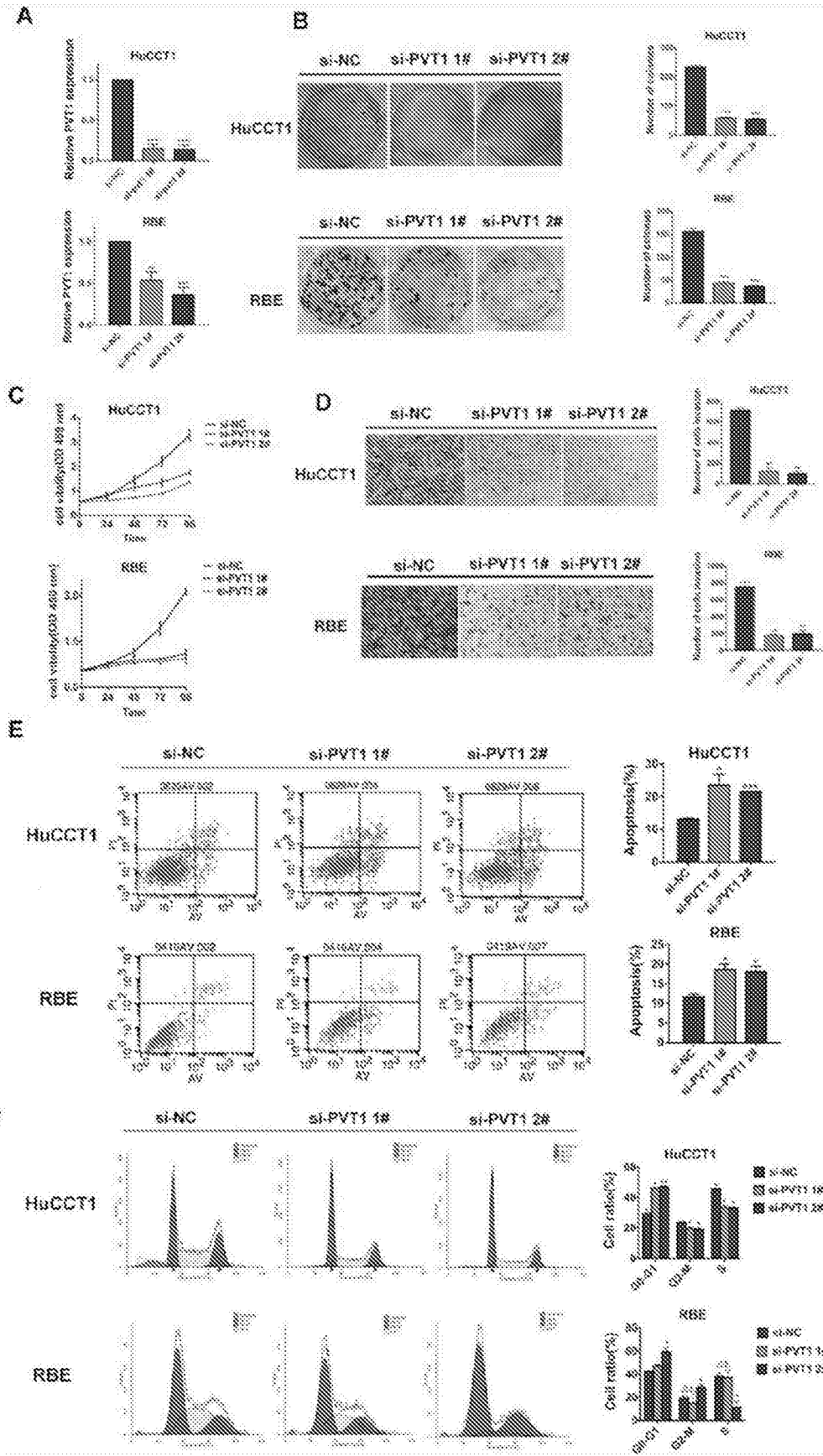


图2

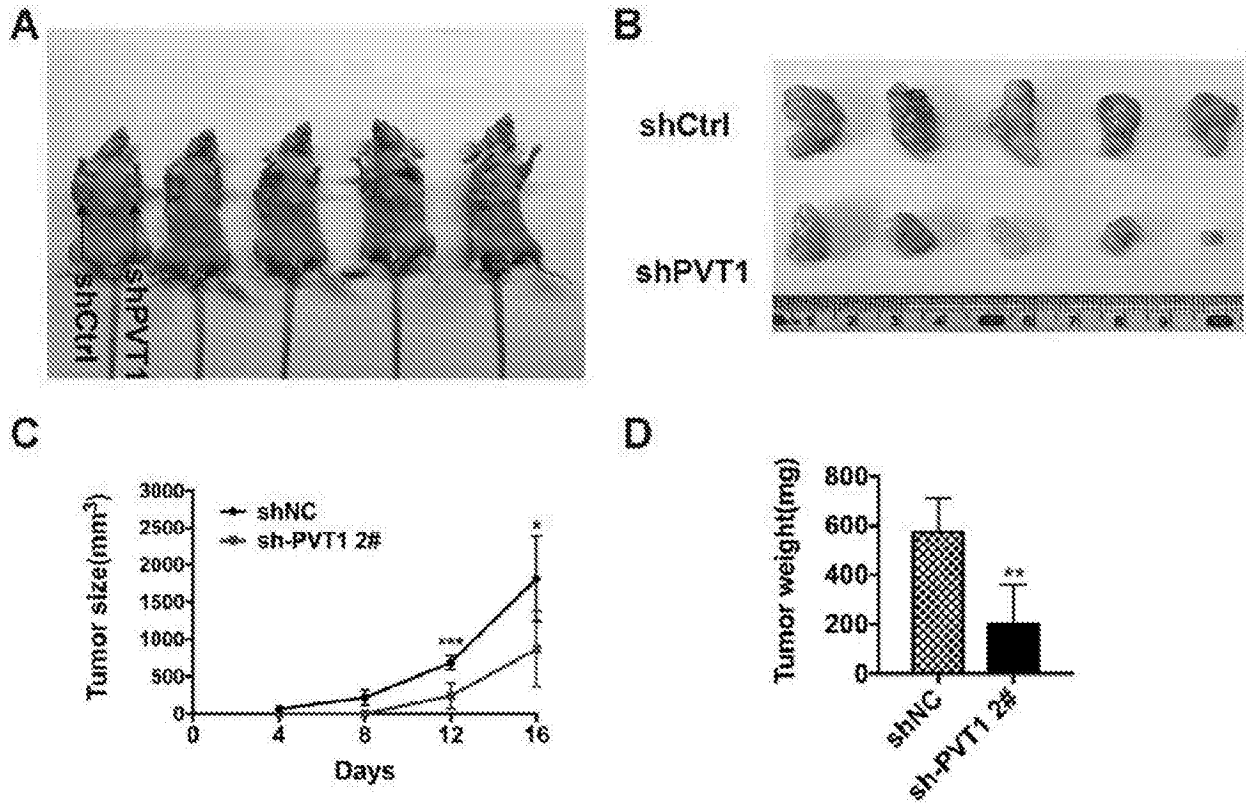


图3

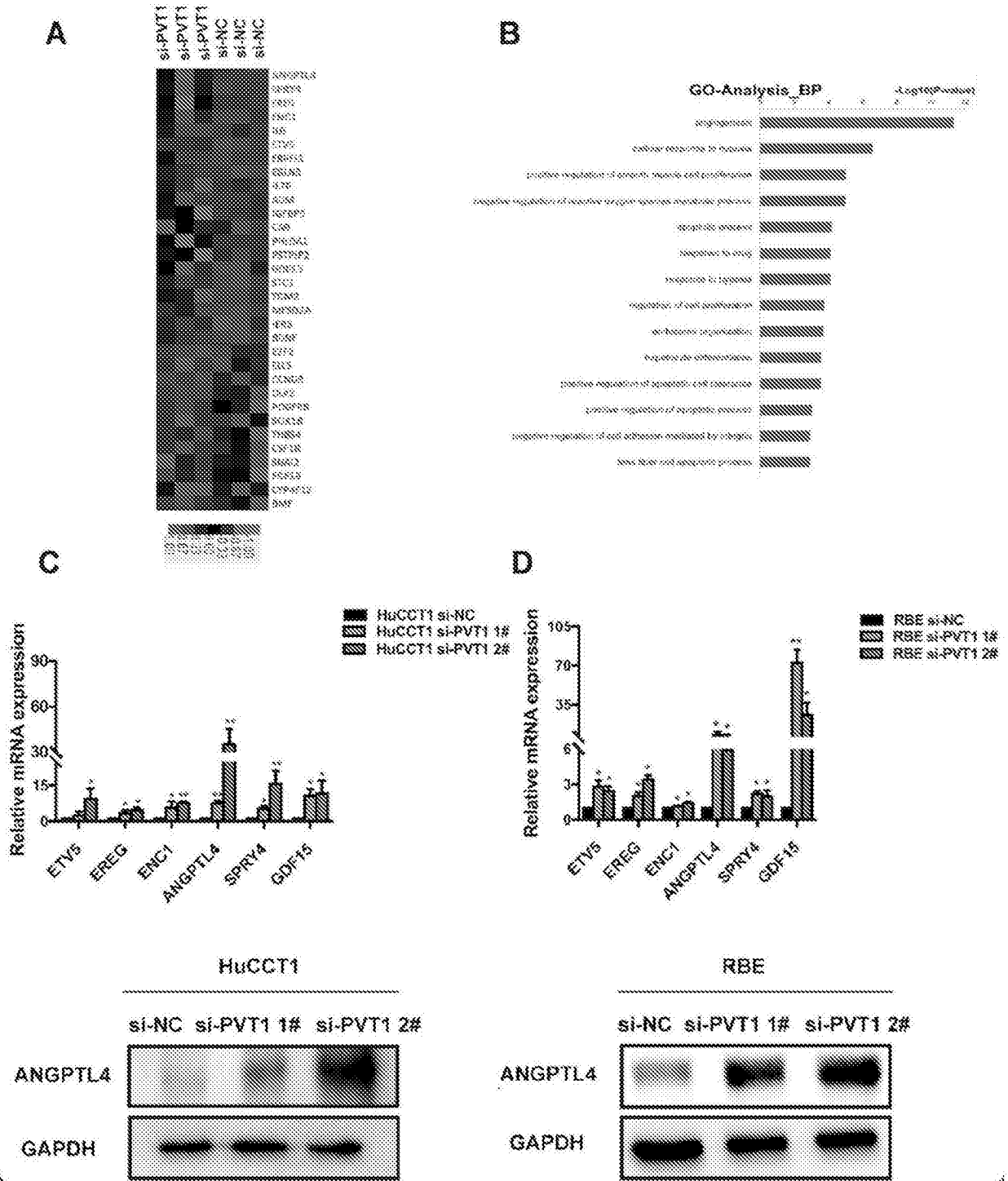


图4

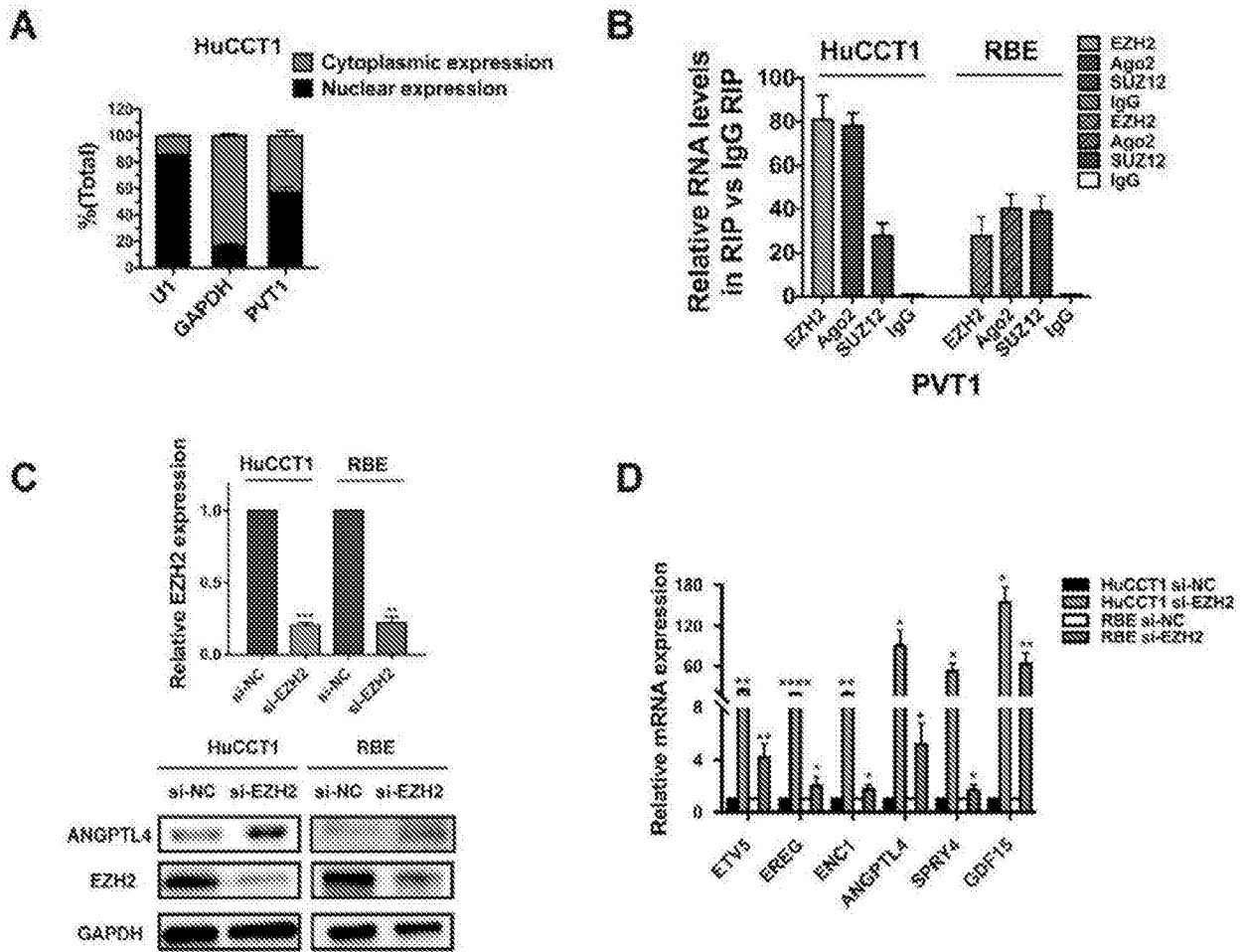


图5

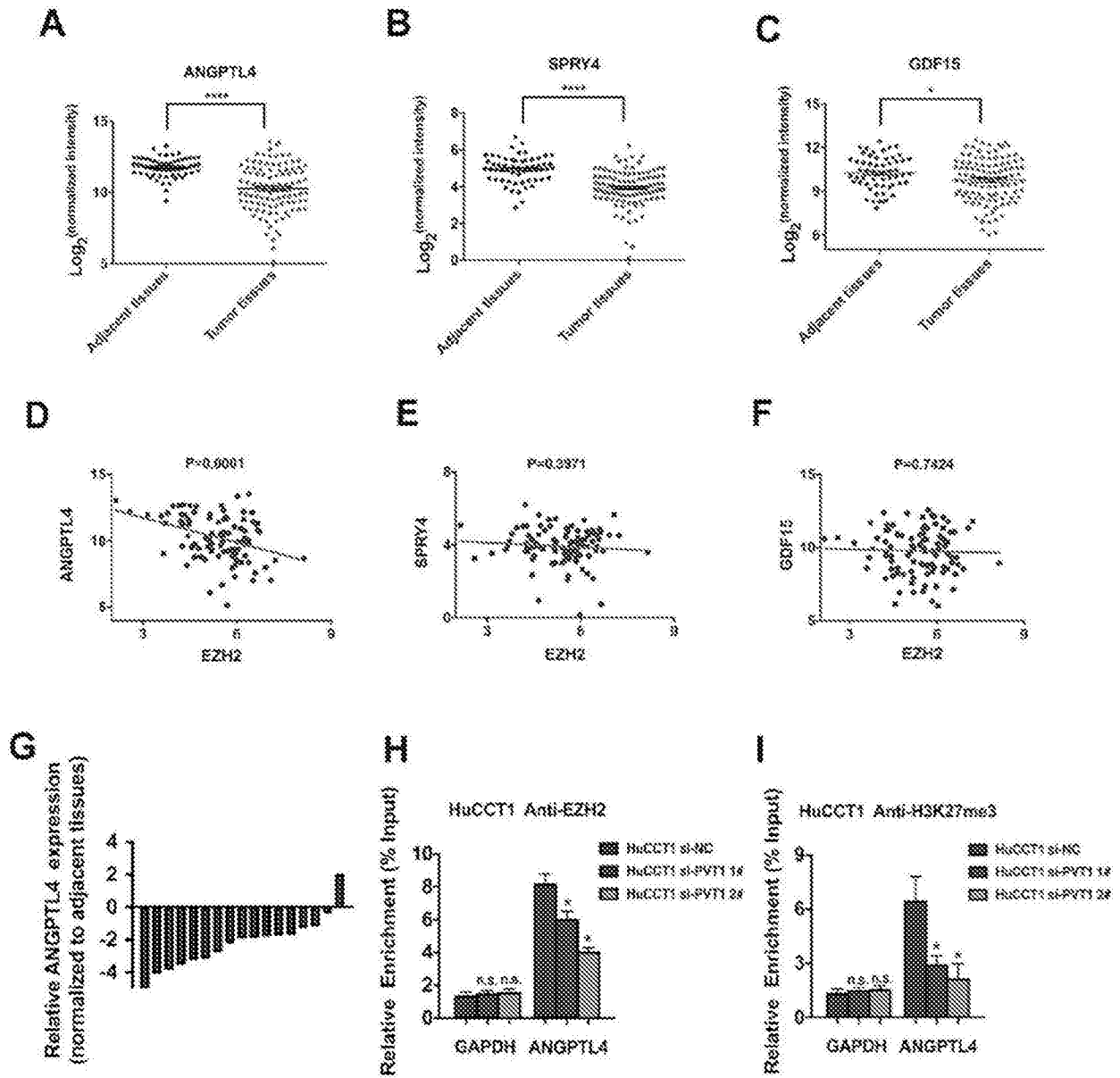


图6

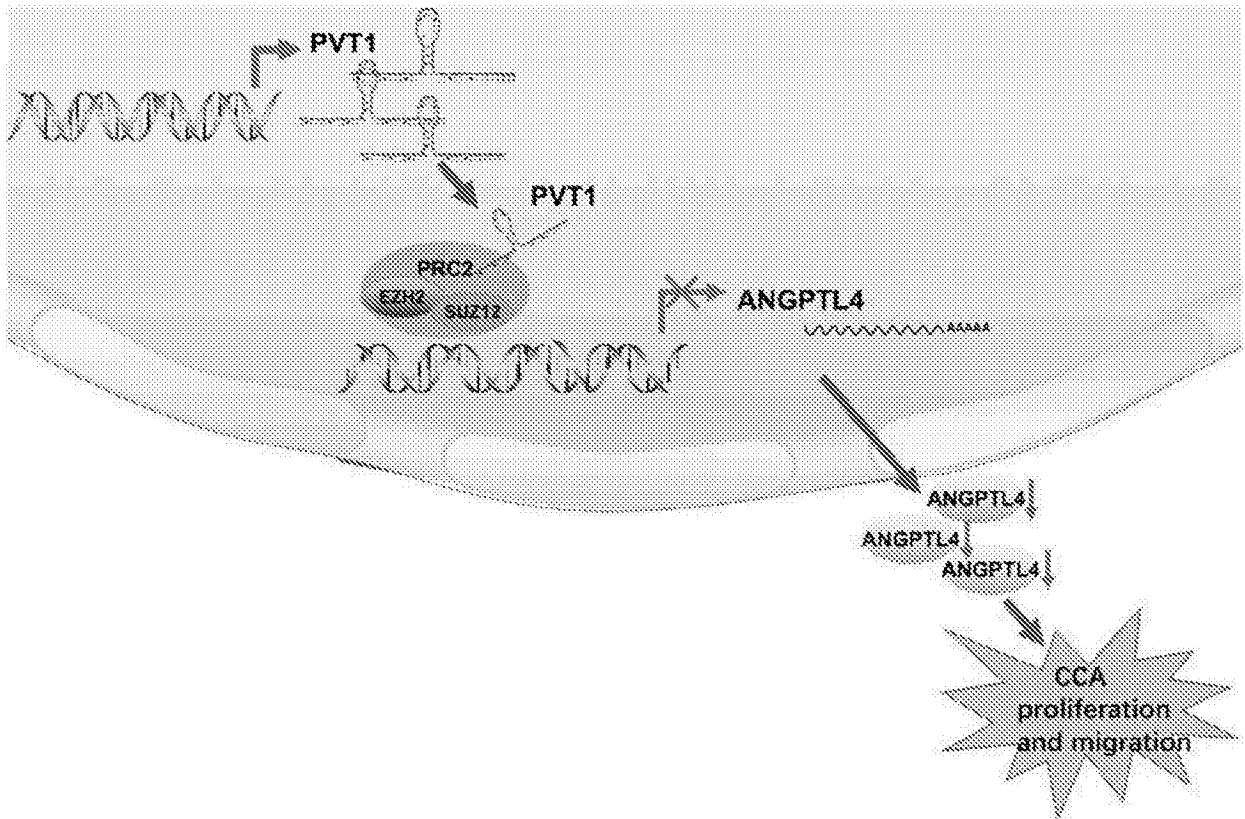


图7

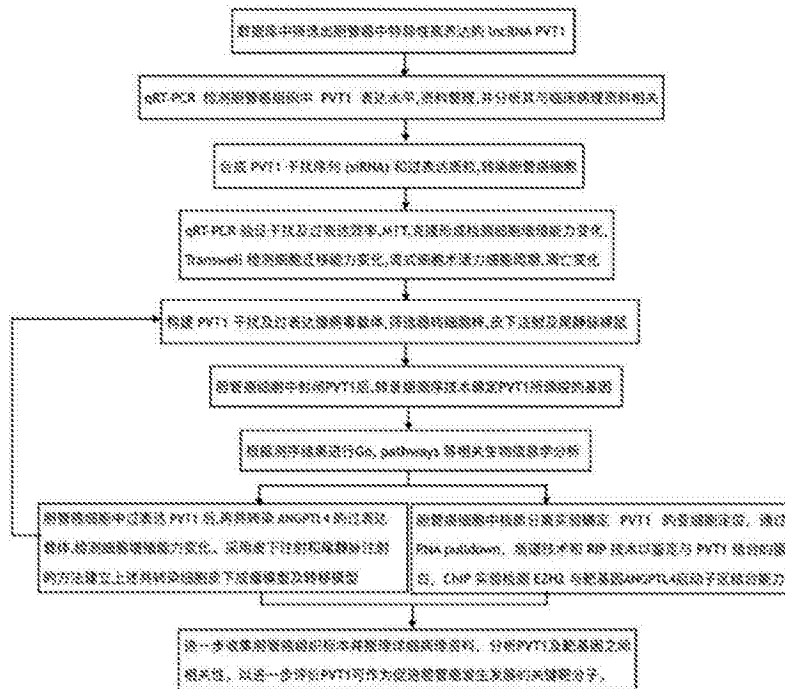


图8