



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105521482 B

(45)授权公告日 2020.07.14

(21)申请号 201510974601.7

(22)申请日 2015.12.22

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105521482 A

(43)申请公布日 2016.04.27

(73)专利权人 中国人民解放军第二军医大学  
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72)发明人 丁劲 王红阳 程卓 李恒宇  
宁北芳

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事  
务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101524529 A,2009.09.09,

CN 102465115 A,2012.05.23,

CN 102475893 A,2012.05.30,

Pengyu Huang等.Direct Reprogramming  
of Human Fibroblasts to Functional and  
Expandable Hepatocytes.《Cell Stem Cell》  
.2014,第14卷第370-384页.

Chuan Yin等.Differentiation Therapy  
of Hepatocellular Carcinoma in Mice with  
Recombinant Adenovirus Carrying  
Hepatocyte Nuclear Factor-4a Gene.

《HEPATOLOGY》.2008,第48卷(第5期),

李倩倩等.肝细胞核因子与肝细胞癌关系的  
研究进展.《胃肠病学》.2012,第17卷(第10期),  
第626-629页.

审查员 王瑶

权利要求书1页 说明书7页

序列表3页 附图8页

(54)发明名称

联合应用HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3诱导分化治  
疗肝细胞癌

(57)摘要

本发明涉及联合应用HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3  
诱导分化治疗肝细胞癌。具体地,本发明涉及利  
用肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3诱导人恶  
性肝细胞癌发生分化,从而应用于恶性实体肿瘤  
治疗的方法和用途。本发明的研究表明,通过向  
肝细胞癌细胞外源导入HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基  
因,可有效地诱导肝癌细胞分化,从而提供了一  
种肿瘤诱导分化治疗的新方法。

1. 三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基因和/或蛋白联用在制备诱导肝癌分化试剂或组合物中的应用,所述的应用是指诱导低分化的肝癌细胞向成熟表型分化,抑制肝癌细胞增殖和转移,促进其凋亡。

2. 根据权利要求1所述的三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基因和/或蛋白联用在制备诱导肝癌分化试剂或组合物中的应用,所述的试剂是提高HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 和FOXA3表达量的试剂。

3. 根据权利要求1所述的三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基因和/或蛋白联用在制备诱导肝癌分化试剂或组合物中的应用,所述的组合物是药物组合物,含有三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3的蛋白、编码序列或含所述编码序列的表达载体以及药学上可接受的载体或赋形剂。

4. 根据权利要求1所述的三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基因和/或蛋白联用在制备诱导肝癌分化试剂或组合物中的应用,所述的肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3是人类肝细胞核因子。

5. 一种联用药物在制备肝癌分化治疗药物中的应用,所述的应用是指诱导低分化的肝癌细胞向成熟表型分化,抑制肝癌细胞增殖和转移,促进其凋亡;所述联用药物的活性成份包括以下任一:

(a) HNF1 $\alpha$ 蛋白、HNF4 $\alpha$ 蛋白和FOXA3蛋白;

(b) HNF1 $\alpha$ 蛋白的编码序列、HNF4 $\alpha$ 蛋白的编码序列和FOXA3蛋白的编码序列;

(c) 含有HNF1 $\alpha$ 蛋白的编码序列、HNF4 $\alpha$ 蛋白的编码序列和FOXA3蛋白的编码序列的表达载体。

6. 根据权利要求5所述的联用药物在制备肝癌分化治疗药物中的应用,其特征在于,所述的表达载体包括腺病毒、慢病毒、逆转录病毒和腺相关病毒以及非病毒载体。

7. 根据权利要求5所述的联用药物在制备肝癌分化治疗药物中的应用,其特征在于,所述的联用药物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

8. 根据权利要求5所述的联用药物在制备肝癌分化治疗药物中的应用,其特征在于,所述的联用药物还包含化疗剂。

## 联合应用HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3诱导分化治疗肝细胞癌

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、细胞生物学以及医学领域。涉及利用肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3诱导人肝细胞癌分化,从而应用于肝细胞癌治疗的方法和用途。

### 背景技术

[0002] 肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,约有一半患者分布在中国。尽管近年来肝癌的诊疗技术不断进步,其早期诊断困难、复发转移率高、放化疗不敏感的现状没有根本改观。唯一被批准用于肝癌的靶向治疗药物索拉非尼,治疗效果非常不理想。因此,肝癌的治疗研究亟需调整思路,寻找更加有效的治疗手段。

[0003] 分化治疗是近些年兴起的一种治疗方法,通过诱导低分化的肿瘤细胞向成熟表型分化,抑制其增殖和转移,促进其凋亡,从而达到治疗肿瘤的目的。迄今分化治疗应用最好的是利用全反式维甲酸治疗急性早幼粒白血病,大量的病人获得了很好的治疗效果。血液肿瘤分化治疗的成功,也带动了实体肿瘤的分化治疗研究。相继出现了应用全反式维甲酸、二甲基亚砷和砷剂治疗乳腺癌、肺癌、结肠癌的研究,但肝癌的分化治疗研究目前还很少。

[0004] 肝细胞核因子(Hepatocyte nuclear factor,HNF)是一类在肝细胞中相对特异性高表达的转录因子,在肝脏的发育和肝细胞功能维持方面发挥重要作用,家族成员包括包括HNF1、HNF3、HNF4、HNF6以及CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)等,它们是一系列在肝脏中优势表达的转录因子(Schrem H,Liver-enriched transcription factors in liver function and development.Part I:the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression,Pharmacological Reviews,2002Mar;54(1):129-58)。前期本发明人所在研究团队已经报道了HNF4 $\alpha$ 和HNF1 $\alpha$ 在肝癌分化治疗方面的应用前景(Yin C,Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene,Hepatology,2008 Nov;48(5):1528-39)(Zeng X,Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice,Hepatology,2011Dec;54(6):2036-47)。但是肝癌异质性很强,在相当一部分肝癌组织中HNF4 $\alpha$ 或HNF1 $\alpha$ 的表达并不低,这也提示了单独应用HNF4 $\alpha$ 治疗肝癌具有很大的局限性。另外,理论上讲将多种肝细胞核因子联合导入肝癌细胞协同发挥作用,诱导肝癌细胞分化的效果可能更好。前期已有学者从肝细胞特异性的转录因子中,筛选能诱导人成纤维细胞向肝细胞转分化的转录因子,最终筛到了HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 和HNF3 $\gamma$ (FOXA3)。将这三种因子转入人成纤维细胞后,可获得人诱导型肝细胞(hiHeps,human induced hepatocytes),其形态类似正常肝细胞,且具有肝细胞的标志物和生物学功能(Huang P,Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes,Cell Stem Cell,2014Mar 6;14(3):370-84)。hiHeps的成功提示:既然这三种因子将成纤维细胞诱导成肝细胞,那它也很可能将肝癌细胞诱导为“带突变的正常功能肝细胞”(DNA突变仍然存在,但肝细胞功能已经恢复)。

[0005] 因此,本领域旨在开发联合应用多种肝细胞核因子来诱导肝癌细胞分化,为肝癌治疗提供一种新方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供联合应用多种肝细胞核因子来诱导肝癌细胞分化,为肝癌治疗提供一种新方法。本发明的另一目的也在于提供三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基因及其产物蛋白的新的医药用途。本发明的第三目的在于提供一种联用药物以及该联用药物可以作为肝癌分化治疗药物。

[0007] 本发明的第一方面,提供了三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基因和/或蛋白的用途,它们被用来诱导肝细胞癌分化。

[0008] 本发明提供了三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3基因和/或蛋白在制备诱导(恶性)肝细胞癌分化试剂或组合物中的应用。

[0009] 所述的应用是指三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3联合作用(联用)。

[0010] 本发明所述的肝癌分化治疗药物,是指通过诱导低分化的肝癌细胞向成熟表型分化,抑制肝癌细胞增殖和转移,促进其凋亡,从而达到治疗肝癌的目的。

[0011] 本发明所述的试剂,是提高HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3表达量的试剂。

[0012] 本发明所述的组合物,是药物组合物。

[0013] 本发明所述的药物组合物,含有三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3的蛋白、编码序列或含所述编码序列的表达载体以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0014] 本发明所述的药物组合物的剂型,优选为注射剂。

[0015] 本发明所述的肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3是人类肝细胞核因子。

[0016] HNF1 $\alpha$ 的GENBANK ID:NM\_001306179.1;

[0017] HNF4 $\alpha$ 的GENBANK ID:NM\_000457.4;

[0018] FOXA3的GENBANK ID:NM\_004497.2。

[0019] 本发明的第二方面,提供了一种联用药物,或称联合用药用,其活性成份包括以下任一:

[0020] (a) HNF1 $\alpha$ 蛋白、HNF4 $\alpha$ 蛋白和FOXA3蛋白;

[0021] (b) HNF1 $\alpha$ 蛋白的编码序列、HNF4 $\alpha$ 蛋白的编码序列和FOXA3蛋白的编码序列;

[0022] (c) 含有HNF1 $\alpha$ 蛋白的编码序列、HNF4 $\alpha$ 蛋白的编码序列和FOXA3蛋白的编码序列的表达载体。

[0023] 所述的表达载体可以同时,也可以分别表达这三种因子的编码序列。

[0024] 所述的表达载体,包括但不限于腺病毒、慢病毒、逆转录病毒和腺相关病毒等病毒载体以及非病毒载体。

[0025] 所述的联用药物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

[0026] 本发明还提供了所述的联用药物在制备肝癌治疗药物中的应用,具体是用于制备肝细胞癌分化治疗药物。

[0027] 本发明提供了HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3三因子联用,可用于体内抑制肝细胞肿瘤的形成。

[0028] 本发明所述的联用药物,还可以包含化疗剂。

[0029] 本发明所述的联用、联合用药物,包括同时或顺序的施用有效量的三种肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3的蛋白、编码序列或含所述编码序列的表达载体。

[0030] 本发明所述药学上可接受的载体或赋形剂,是指药学领域中常用的除活性成分以外添加物,例如稀释剂(淀粉类、糖类、纤维素类和无机盐类)、赋形剂等,填充剂如淀粉蔗糖、粘合剂如水、乙醇、纤维素衍生物、明胶和聚乙烯吡咯烷酮,崩解剂如干淀粉、羧甲基淀粉钠,增溶剂如聚山梨酯类和聚氧乙烯脂肪酸酯类等,吸收促进剂、表面活性剂如吐温、司盘,吸附载体、润滑剂如硬脂酸镁、微粉硅胶等。另外,还可以在组合中加入其它辅料如香味剂、甜味剂等。

[0031] 本发明所述的联合用药物,可以药物组合物的形式通过口服、鼻吸入、直肠、肠胃外或经皮给药的方式施用于需要这种治疗的患者。用于口服时,可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂、丸剂、缓释微丸、固体分散体、包合物等,制成的液体制剂如混悬剂、乳剂、熔胶剂、糖浆剂、合剂、溶液剂等,用于肠胃外给药时,可将其制成注射用的溶液、水或油性混悬剂、乳剂、脂质体、微囊、微球、毫微粒等,也可将其制成各种缓释、控释制剂。优先的形式是注射剂,特别优先特定部位靶向释放的注射剂。

[0032] 本发明所述的药物组合物、联用药物,还用于体内抑制实体瘤的形成。

[0033] 本发明的第三方面,提供了一种诱导或促进哺乳动物中肝细胞癌分化的方法,也即一种新的肝癌治疗方法。

[0034] 所述的方法包括步骤:联合应用肝细胞核因子HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3蛋白、它们的编码序列或所述编码序列的表达载体导入肝癌细胞内,抑制肝癌细胞增殖和转移,促进其凋亡。

[0035] 本发明所述的肝癌,优选是人原发性肝细胞癌。

[0036] 本发明为肝细胞核因子提供了新的医药用途。

[0037] 本发明也提供了一种多种肝细胞核因子联合导入肝癌细胞协同发挥作用,诱导肝癌细胞分化,继而治疗肝癌的新方法。

## 附图说明

[0038] 图1是Ad HNF1 $\alpha$ 、AdHNF4 $\alpha$ 、AdFOXA3三种腺病毒感染肝癌细胞系LM3, PLC, HepG2细胞2天后,Western blot检测三因子的蛋白表达情况。

[0039] 图2是Realtime-PCR检测三因子各种组合感染肝癌细胞2天后,肝细胞相关功能分子mRNA表达定量分析。其中A是LM3细胞系, B是PLC细胞系, C是HepG2细胞系, D是SMMC-7721细胞系。

[0040] 图3是三因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,细胞形态改变情况。其中A是LM3加GFP腺病毒细胞形态, B是LM3加三因子腺病毒细胞形态。

[0041] 图4是三因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,糖原合成情况。其中A是LM3加GFP腺病毒PAS(过碘酸雪夫染色)染色情况, B是LM3加三因子腺病毒PAS染色情况。

[0042] 图5是三因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,脂肪合成情况。其中A是LM3加GFP腺病毒油红染色情况, B是LM3加三因子腺病毒油红染色情况。

[0043] 图6是三因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,尿素分泌情况。

[0044] 图7是三因子腺病毒感染肝癌细胞LM3后,对肿瘤细胞生长抑制情况。

[0045] 图8是三因子腺病毒感染肝癌细胞LM3后,对肿瘤细胞迁移抑制情况。其中A是LM3加GFP腺病毒穿膜迁移情况,B是LM3加三因子腺病毒穿膜迁移情况,C是两者穿膜迁移情况的定量分析。

[0046] 图9是三因子腺病毒感染肝癌细胞后,流式分析EpCAM阳性比例。其中A是LM3加GFP腺病毒EpCAM阳性率,B是LM3加三因子腺病毒EpCAM阳性率。

[0047] 图10是瘤内注射三因子腺病毒治疗病人来源皮下荷瘤实验。

### 具体实施方式

[0048] 下面通过附图和实施例进一步说明本发明,本发明的实施例仅仅是用于说明本发明,而不是对本发明的限制,在本发明的构思前提下对本发明方法的简单改进都是属于本发明要求保护的范畴。

[0049] 本发明所用试剂和原料均市售可得或可按文献方法制备。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人《分子克隆:实验室指南》(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0050] 实施例1:构建表达HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3的三种腺病毒,并用蛋白印迹法(Western blot)检测三种因子腺病毒感染肝癌细胞系LM3,PLC,HepG2细胞的表达情况。

[0051] 以FOXA3包装为例,于35mm<sup>2</sup>盘中培养293A细胞至80%-90%的汇合度,准备骨架质粒pBHG11、载体质粒pAdTrack-CMV-FOXA3( )。将pBHG11质粒和pAdTrack-CMV-FOXA3质粒以2:1的比例混入100 $\mu$ l的PBS中,配成A液;将6 $\mu$ lPEI混入100 $\mu$ l的PBS中,配成B液;将A液与B液充分混匀后,室温静置20min后转染293A细胞。12h后,更换含5%胎牛血清的DMEM培养液。7到10天后,待形成明显的空斑后,吸取空斑的细胞加入接种过293A的24孔板中,扩增病毒克隆收获细胞,于-80 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C反复冻融3次,得腺病毒上清液。取5 $\mu$ l进行PCR扩增(PCR引物由试剂盒提供)鉴定。观察24孔板中的细胞,若全部漂浮则吸取所有细胞及培养基用以感染10cm培养板中汇合率为80%的293A细胞。36h后,收集细胞,反复冻融3次,收获病毒裂解液,用BD公司的腺病毒纯化试剂盒进行纯化。收集病毒颗粒,用BD公司的腺病毒滴度测定试剂盒测定腺病毒的滴度。HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 两种腺病毒制备方法同上。

[0052] 将Ad HNF1 $\alpha$ 、AdHNF4 $\alpha$ 、AdFOXA3混合后分别感染LM3,HepG2,PLC,4小时后换液,24小时后细胞裂解液收取全细胞蛋白,蛋白标准定量后,各取20 $\mu$ g于10%SDS-PAGE电泳分离蛋白,将下层滤纸、硝酸纤维素膜(NC膜)、电泳胶、上层滤纸依次叠加与转移缓冲液(Transferring Buffer)中平衡后,置于半干转电转仪中,15V,70min。用5%脱脂牛奶20ml室温封闭膜1h后,TBST洗涤3 $\times$ 5min后,用HNF1 $\alpha$ (购自Santa Cruz公司,sc-10791)、HNF4 $\alpha$ (购自Abcam公司,ab92378)、FOXA3(购自Santa Cruz公司,sc-74424)一抗抗体(1:1000)室温孵育1h,TBST洗涤3 $\times$ 5min后,用兔二抗(购自LI-COR公司,)(1:10000)室温孵育1h,TBST洗涤3 $\times$ 5min后,经Odyssey红外激光成像系统检测荧光并进行灰度扫描,同时孵育GAPDH(购自Abclonal公司)抗体作为内参。

[0053] 结果显示,三种因子腺病毒感染人肝癌细胞系后能明显提高HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3的表达(图1)。

[0054] 实施例2:三种因子腺病毒感染肝癌细胞,实时定量PCR检测肝细胞相关功能基因

的表达。

[0055] (1) 将LM3, PLC, HepG2, SMMC-7721种于6孔板中, 培养至密度50%-60%后将Ad HNF1 $\alpha$ 、AdHNF4 $\alpha$ 、AdFOXA3以MOI100感染细胞, 4小时候换10%胎牛血清的新鲜培养基; (2) 2天后加入TRIZOL 1ml, 室温静止3min; (3) 加入200 $\mu$ l氯仿剧烈振荡30sec, 室温静止3min; (4) 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm, 离心15min; (5) 吸取上层含有RNA的水相于新的1.5ml Ep管中, 加入500 $\mu$ l异丙醇沉淀RNA, 剧烈震荡30sec, 冰上静止10min; (6) 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm, 离心15min; (7) 弃上清, 加入0.5ml 75%的乙醇洗涤RNA沉淀, 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm, 离心5min; (8) 去除乙醇, 在吹风机下吹干RNA, 待出现透明状沉淀时用30 $\mu$ l DEPC水溶解RNA; (9) 用紫外分光光度计测定RNA的含量, -20 $^{\circ}$ C保存; (10) 逆转录合成cDNA第一链:

总 RNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l) 2 $\mu$ l

N6 随机引物(random primer)(50ng/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l

DEPC 水 12 $\mu$ l

---

Total Volume: 15 $\mu$ l

↓

70 $^{\circ}$ C 5min

↓

迅速插到冰上 2min

↓

[0056] dNTPs (10mmol/L) 1 $\mu$ l

5 $\times$ RT buffer 5 $\mu$ l

RNasin (40 U/ $\mu$ l) 1.25 $\mu$ l

DEPC 水 1.75 $\mu$ l

MMLV(200 U/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l

---

Total Volume: 10 $\mu$ l

↓

37 $^{\circ}$ C 60min

↓

-80 $^{\circ}$ C 备用

[0057] (11) 得到cDNA用于荧光定量PCR检测。目的基因的相对表达量经过内参标化后分析。

[0058] Real-Time PCR步骤

cDNA 0.5 $\mu$ l

Up-Primer (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l

Down-Primer (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l

[0059] 2 $\times$ TaqmanSYRB 12.5 $\mu$ l

MilliQ H<sub>2</sub>O 10 $\mu$ l

---

Total Volume: 25 $\mu$ l

[0060] (12) 混匀, 95 $^{\circ}$ C 预变性10min, 95 $^{\circ}$ C 变性30sec, 60 $^{\circ}$ C 退火30sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸40sec, 40

个循环,72℃终末延伸10min。用Applied Biosystems 7300/7900Fast Real-Time PCR System软件分析结果。

[0061] 表1人肝功引物序列

引物序列	基因
TGCACAGAATCCTTGGTGAA (SEQ ID NO:1)	Albumin-forward
TTCACGAGCTCAACAAGTGC (SEQ ID NO:2)	Albumin-reverse
CTGGCCTCTGCCATCTTCTG (SEQ ID NO:3)	CYP1 $\alpha$ 2-forward
TTAGCCTCCTTGCTCACATGC (SEQ ID NO:4)	CYP1 $\alpha$ 2-reverse
GTGTCCCTCTAGTCTATGAAGC (SEQ ID NO:5)	PEPCK-forward
ATTGACTTGATCCTCCAGATAC (SEQ ID NO:6)	PEPCK-reverse
[0062] GGCTCCATGACTGTGGGATC (SEQ ID NO:7)	G-6-P-forward
TTCAGCTGCACAGCCCAGAA (SEQ ID NO:8)	G-6-P-reverse
CCTGCTTGTATGCTGGAGTC (SEQ ID NO:9)	GS-forward
GAAAAGTCGTTGATGTTGGA (SEQ ID NO:10)	GS-reverse
TATGATGAAGCGTTTAGGC (SEQ ID NO:11)	AAT-forward
CAGTAATGGACAGTTTGGGT (SEQ ID NO:12)	AAT-reverse
AGCGTCCTCTGACACTCG (SEQ ID NO:13)	MRP2-forward
GGCATCTTGGCTTTGACT (SEQ ID NO:14)	MRP2-reverse

[0063] 白蛋白(albumin,ALB);细胞色素P450家族1 $\alpha$ 2(cytochrome P4501 $\alpha$ 2,CYP1 $\alpha$ 2);磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase,PEPCK);葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase,G-6-P);谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase,GS); $\alpha$ -抗胰蛋白酶( $\alpha$ 1-antitrypsin,AAT);多药耐药相关蛋白2(multidrugresistance-associated proteins 2,MRP2)。

[0064] 结果显示,三因子联合应用改善肝癌肝功能的综合作用显著优于HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3单因子及两两组合(1+4、1+F、4+F)的作用(图2)。

[0065] 实施例3:三种因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,细胞形态学观察

[0066] 将感染三因子和GFP腺病毒15天的LM3/GFP、LM3/3F细胞分别按2000个每孔种于6孔板中,7天后于倒置相差显微镜( $\times$ 200倍)观察活细胞形态,通过光镜可以观察到LM3/GFP细胞形态小而圆,排列紧密(如图3A所示),而LM3/3F细胞较大,形态扁平宽大(如图3B所示)。

[0067] 实施例4:三种因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,对糖原合成影响。

[0068] 将LM3/GFP、LM3/3F细胞分别种于12孔板中,贴壁一天后,去除培养基,PBS洗2次,加入10%中性甲醛固定10min,水流冲洗1min,1%过碘酸室温5min,蒸馏水洗5min,再加希夫氏液室温15min,蒸馏水5洗5min,光学显微镜下观察染色情况。

[0069] 结果显示,LM3/3F细胞较LM3/GFP细胞更红,糖原合成更多(图4)。

[0070] 实施例5:三种因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,对脂肪合成影响。

[0071] 将LM3/GFP、LM3/3F细胞分别种于12孔板中,贴壁一天后,去除培养基,PBS洗2次,加入10%中性甲醛固定30min,70%乙醇浸洗1min,由70%乙醇配制的油红染料染色15min,70%乙醇浸洗1min,苏木素染色90sec,水流反蓝15sec,光学显微镜下观察染色情况。



[0072] 结果显示,LM3/3F细胞较LM3/GFP细胞中脂滴含量更多(图5)。

[0073] 实施例6:三种因子腺病毒感染肝癌细胞LM315天后,对尿素分泌影响。

[0074] 将LM3/GFP、LM3/3F细胞按10000个细胞每孔终于96孔,每种细胞设3个复孔,贴壁后,每孔换成不含血清的培养基100 $\mu$ L培养,放置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h后吸取上清,按照QuantitChrom™ Urea Assay Kit(购自BioAssay Systems公司)的使用说明进行尿素测定;余下细胞每孔加100 $\mu$ L CCK8工作液,在培养箱中培养1小时后,放入酶标仪以450nm波长检测,读出每孔的OD值并计算平均值,以LM3/GFP细胞增殖情况为标准,标化LM3/3F相对增值情况,将所测尿素含量除以相对CCK8数值获得细胞相对尿素分泌数值。

[0075] 结果显示,LM3/3F细胞相对于LM3/GFP细胞可以有较多的尿素分泌(图6)。

[0076] 实施例7:三种因子腺病毒感染肝癌细胞LM3后,对肿瘤细胞生长抑制情况。

[0077] 取对数生长期的LM3细胞,种于2个6孔板,分别感染三因子和GFP腺病毒,4h后换液,24h后按每孔5000个细胞的密度接种入96孔板并设3个复孔,每孔再各加200 $\mu$ L培养基,放置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养0d,1d,2d,3d,4d,5d;于各时间点吸除培养基,每孔各加100 $\mu$ L CCK8工作液,在培养箱中培养1小时后,放入酶标仪以450nm波长检测,读出每孔的OD值并计算平均值,以时间为横坐标、OD值平均值为纵坐标,绘制成生长曲线。

[0078] 经过多天连续测两细胞生长曲线发现,三因子表达对肝癌细胞增值有明显抑制作用,对照组细胞随时间增殖明显,而三因子组细胞增殖平缓(图7)。

[0079] 实施例8:三种因子腺病毒感染肝癌细胞LM3后,对肿瘤细胞迁移抑制情况。

[0080] 取对数生长期的LM3细胞,种于2个6孔板,分别感染三因子和GFP腺病毒,4h后换液,24h后按每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的密度接种入transwell上层小室,每孔保持200 $\mu$ L培养基,置于24孔板内,于下层24孔板内注入含20%太牛血清的培养基,放置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养;20h后取出transwell,吸除上层小室培养基,PBS洗2次,用10%中性甲醛固定10min,PBS洗2次,0.1%结晶紫染色15min,PBS洗2次,用棉棒小心擦除上层小室内染色细胞,于倒置相差显微镜( $\times 100$ 倍)观察。

[0081] 结果显示,三因子组细胞能明显抑制肝癌细胞的迁移能力(图8)。

[0082] 实施例9:三种因子腺病毒感染肝癌细胞后,EpCAM表达情况。

[0083] 取对数生长期的LM3细胞,种于2个6孔板,分别感染三因子和GFP腺病毒,4h后换液,第2天收集细胞,PBS洗2次,EpCAM(购自BioLegend公司)作为一抗4 $^{\circ}$ C孵育30min,每5min弹拨一次使充分接触,经流式细胞仪检测EpCAM+细胞的比例。

[0084] 结果显示,三因子感染后的肝癌细胞中EpCAM+的细胞比例明显降低(图9)。EpCAM+是肿瘤干细胞的特异标志物,EpCAM+细胞比例降低,表明三因子能促进肿瘤干细胞分化。

[0085] 实施例10三因子腺病毒治疗病人来源皮下荷瘤。

[0086] 将病人来源肝癌组织,以大约0.5cm<sup>3</sup>体积接种于裸鼠腋下皮肤下,1个月后待肿瘤长到大小为500cm<sup>3</sup>后于瘤内注射总pfu(蚀斑形成单位)为 $1 \times 10^{10}$ 三因子腺病毒,对照组注射相同pfu(蚀斑形成单位)量GFP腺病毒,隔天注射并测量瘤体大小变化。

[0087] 结果显示,治疗两周后,实验组裸鼠肿瘤较对照组体积明显减少(图10)。

[0088] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

## 序列表

## SEQUENCE LISTING

	<110>	中国人民解放军第二军医大学	
	<120>	联合应用 HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$ 、FOXA3 诱导分化治疗肝细胞癌	
	<130>	说明书	
	<160>	14	
	<170>	PatentIn version 3.3	
	<210>	1	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	1	
		tgcacagaat ccttggtgaa	20
	<210>	2	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
[0001]	<213>	人工序列	
	<400>	2	
		ttcacgagct caacaagtgc	20
	<210>	3	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	3	
		ctggcctctg ccatcttctg	20
	<210>	4	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	4	
		ttagcctcct tgctcacatg c	21
	<210>	5	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	5	

	gtgtccctct agtctatgaa gc	22
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 6	
	attgacttga tcctccagat ac	22
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 7	
	ggctccatga ctgtgggatc	20
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 8	
[0002]	ttcagctgca cagcccagaa	20
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 9	
	cctgcttgta tgctggagtc	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 10	
	gaaaagtcgt tgatggttga	20
	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 11	
	tatgatgaag cgtttaggc	19
	<210> 12	

---

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 12	
	cagtaatgga cagtttgggt	20
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
[0003]	<213> 人工序列	
	<400> 13	
	agcgtcctct gacactcg	18
	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 14	
	ggcatccttg ctttgact	18

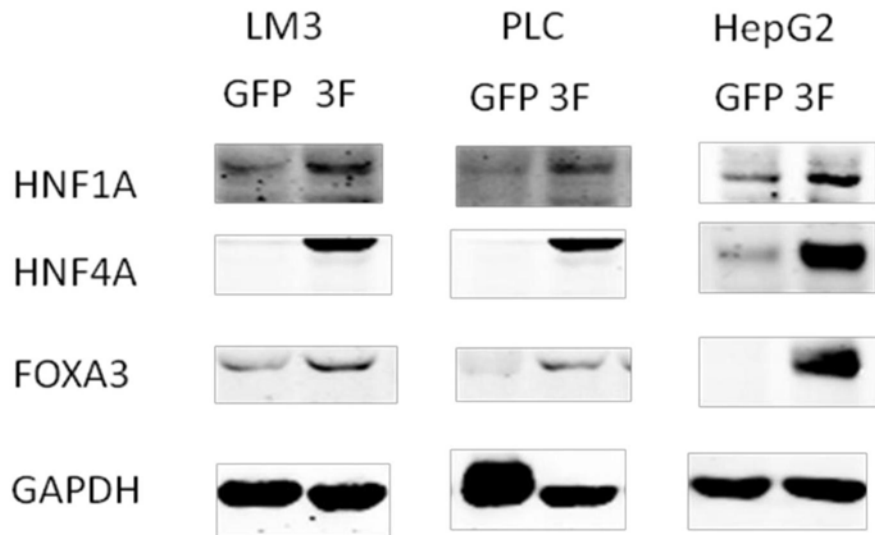
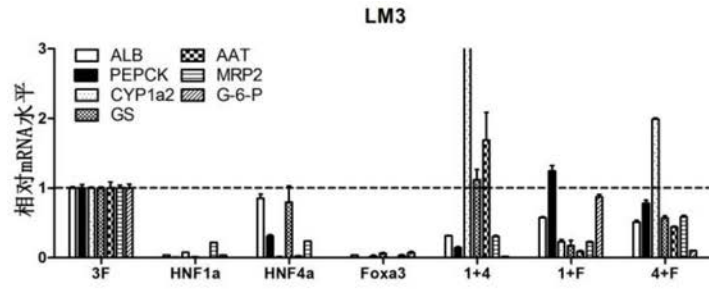
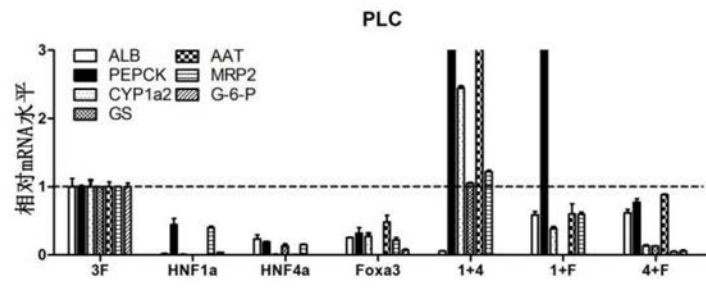


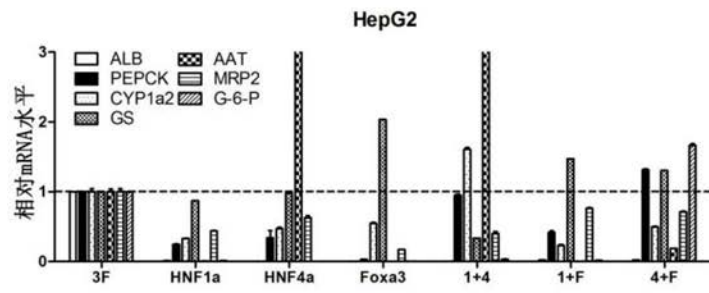
图1



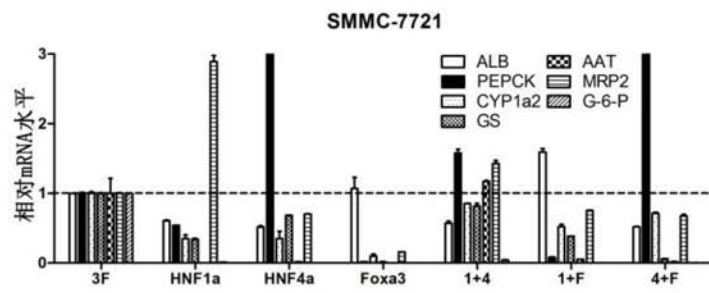
A



B



C



D

图2

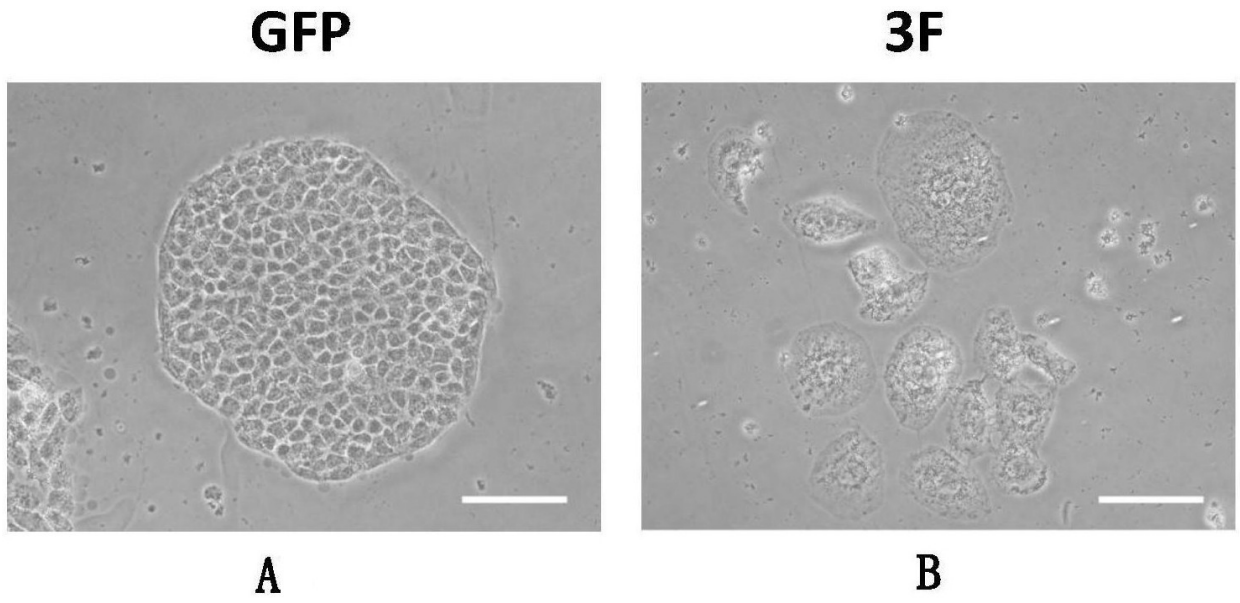


图3

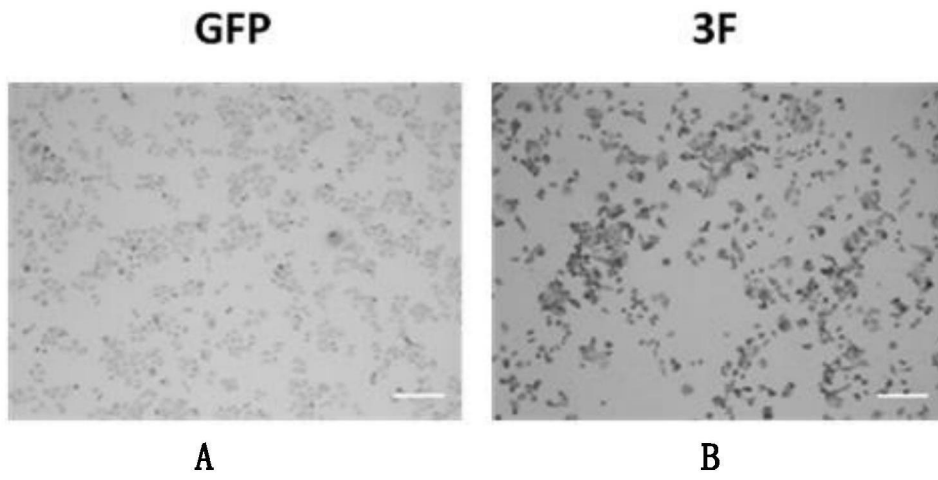


图4

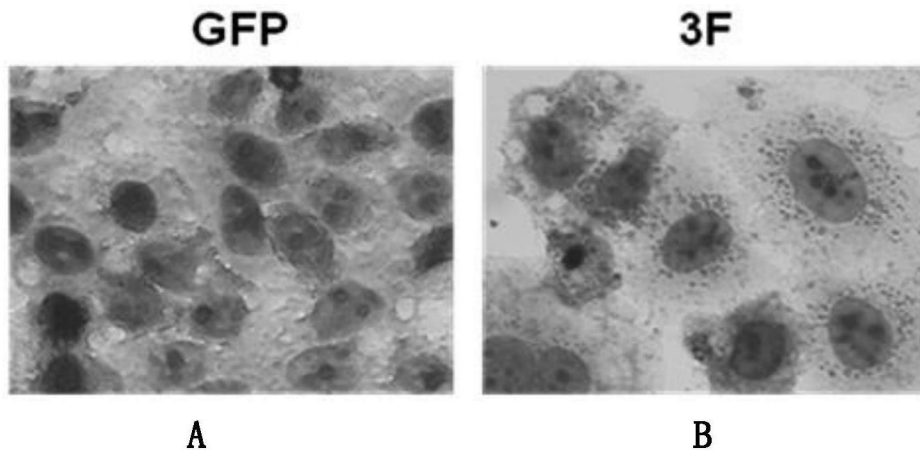


图5

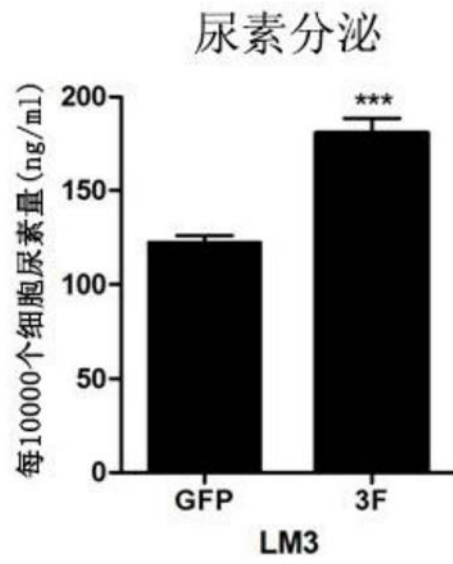


图6



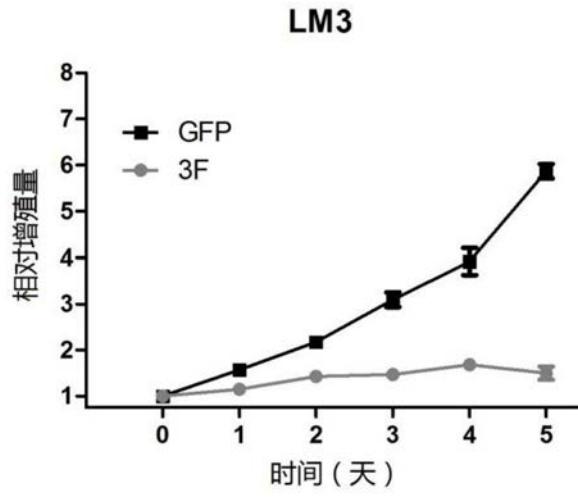
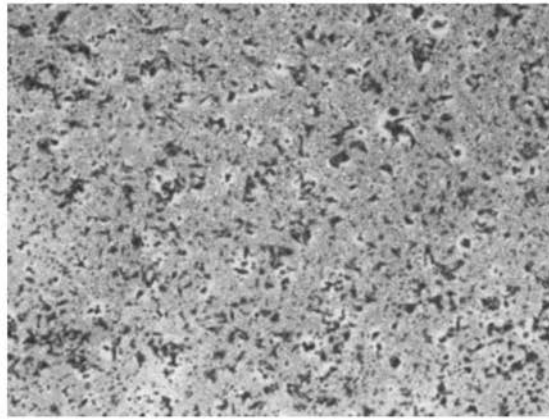


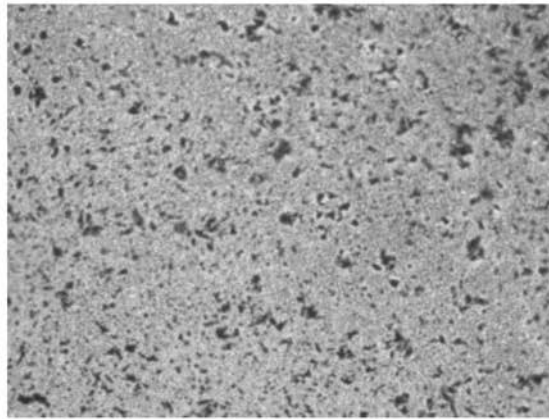
图7

**GFP**

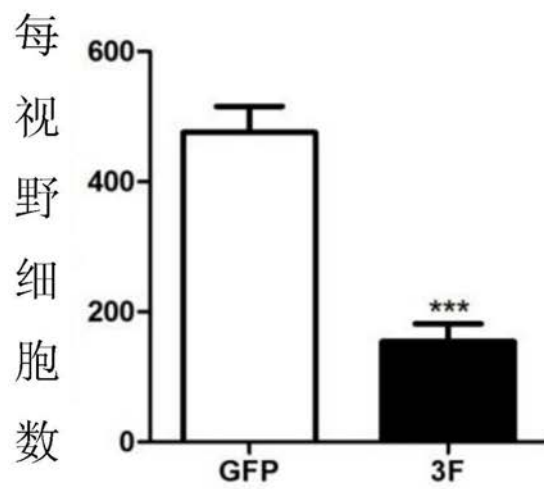


A

**3F**

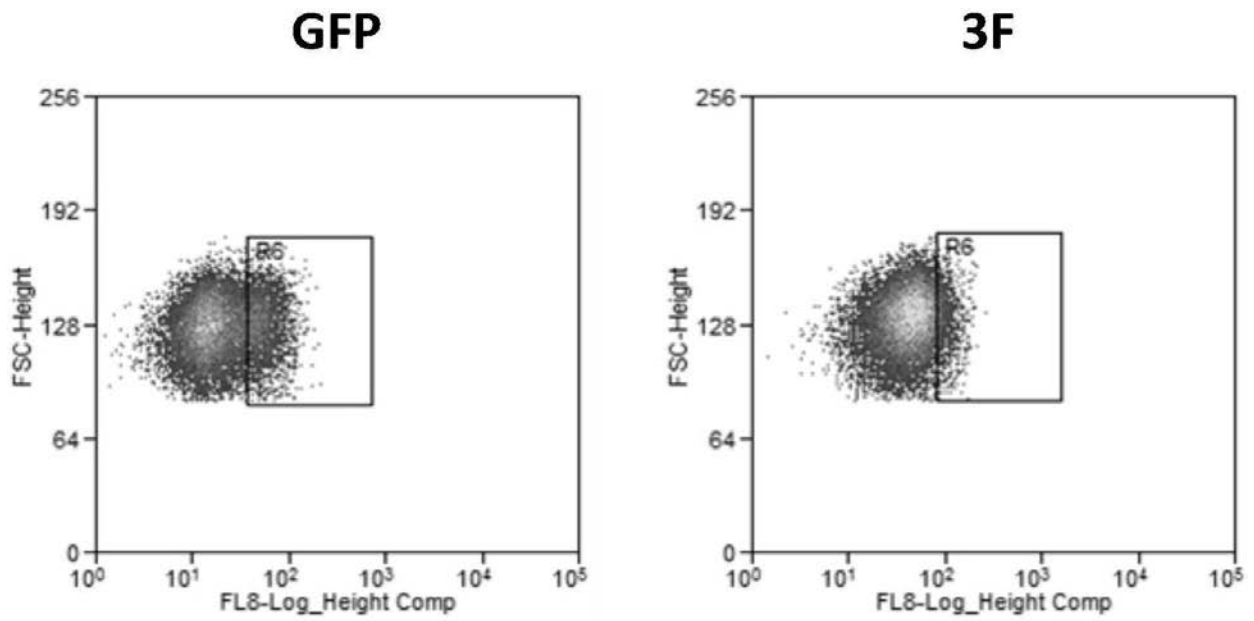


B



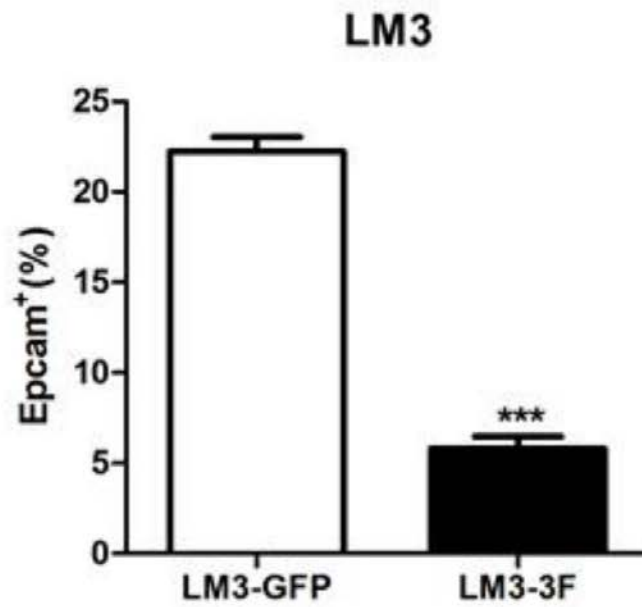
C

图8



**Epcam**

**A**



**B**

图9

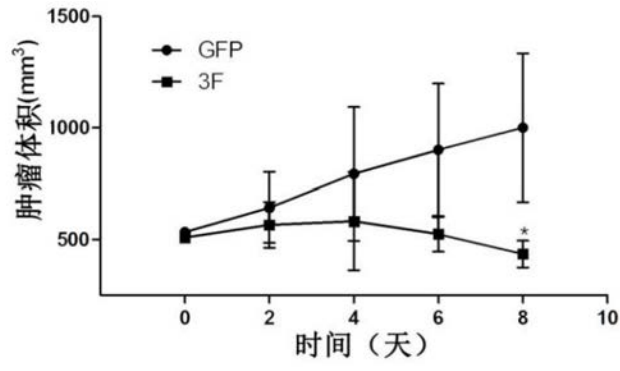


图10