



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114410780 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 29

(21) 申请号 202111651530.9

(22) 申请日 2021.12.30

(71) 申请人 武汉科技大学

地址 430000 湖北省武汉市和平大道947号

(72) 发明人 杨超 邓洋 黄优 孙丹丹

(74) 专利代理机构 武汉红观专利代理事务所

(普通合伙) 42247

代理人 徐春燕

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

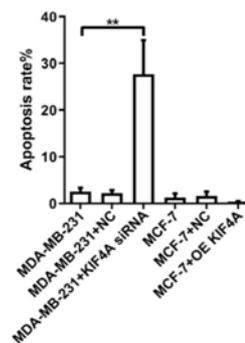
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

KIF4A在乳腺癌的诊断、预后及治疗中的应用

(57) 摘要

本发明提出了KIF4A在乳腺癌的诊断、预后及治疗中的应用。本发明的KIF4A在乳腺癌细胞中表达上调,对乳腺癌细胞表现出抑制增殖、促进凋亡和破坏有丝分裂过程的作用,且乳腺癌患者KIF4A表达表现出较高的免疫浸润水平,表明本发明对乳腺癌患者有良好的诊断、治疗和预后价值。



1. 检测KIF4A基因表达水平的试剂在制备乳腺癌诊断或预后的试剂盒中的应用。
2. 如权利要求1所述的检测KIF4A基因表达水平的试剂在制备乳腺癌诊断或预后的试剂盒中的应用,其特征在于,所述检测KIF4A基因表达水平的试剂选自引物、探针、芯片、抗体中的一种或多种组合。
3. KIF4A的抑制剂在制备预防和/或治疗乳腺癌的药物中的应用。
4. 如权利要求4所述KIF4A的抑制剂在制备预防和/或治疗乳腺癌的药物中的应用,其特征在于,所述KIF4A抑制剂为siRNA或shRNA。
5. 如权利要求4所述KIF4A的抑制剂在制备预防和/或治疗乳腺癌的药物中的应用,其特征在于,所述抑制剂选自以下物质中的一个或多个物质:能够全部或部分抑制KIF4A基因表达的物质,能够全部或部分抑制KIF4A蛋白发挥功能的物质。
6. 如权利要求5所述KIF4A的抑制剂在制备预防和/或治疗乳腺癌的药物中的应用,其特征在于,所述抑制剂选自:蛋白质、寡核苷酸、寡核苷酸表达载体和小分子化合物中的一种或多种组合。
7. 如权利要求5所述KIF4A的抑制剂在制备预防和/或治疗乳腺癌的药物中的应用,其特征在于,所述治疗乳腺癌的药物至少具有以下功能之一:能够破坏乳腺癌细胞的有丝分裂过程、抑制乳腺癌细胞的增殖、促进乳腺癌细胞凋亡和抑制乳腺癌细胞的恶化。
8. KIF4A的抑制剂在制备乳腺癌细胞有丝分裂扰乱剂的用途,所述KIF4A的抑制剂为siRNA或shRNA。

## KIF4A在乳腺癌的诊断、预后及治疗中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,尤其涉及KIF4A在乳腺癌的诊断、预后及治疗中的应用。

### 背景技术

[0002] 乳腺癌是女性发病率及死亡率排名前列的癌症,全世界每年约有521900例因乳腺癌死亡,并且发病年龄逐年降低。临床上,因乳腺癌的高度异质性,不同类型的乳腺癌具有不同的生物学特性,其治疗策略也完全不同。

[0003] KIF4A是染色体驱动蛋白超家族4的一员,在细胞间期定位于细胞核,主要参与有丝分裂过程中染色质的分离、纺锤体的形成和胞质分离等生物学过程,并在肺癌、卵巢癌和口腔鳞状细胞癌等多种肿瘤中异常表达。研究表明,KIF4A表达与乳腺癌化疗过程中的多柔比星、他莫昔芬耐药现象相关,但是目前缺乏针对KIF4A在乳腺癌诊断、预后及治疗中的应用的研究。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明为乳腺癌的诊断、预后及治疗提供新的标志物与治疗手段。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的:一方面,本发明提供了检测KIF4A基因表达水平的试剂在制备乳腺癌诊断或预后的试剂盒中的应用。

[0006] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述检测KIF4A基因表达水平的试剂选自引物、探针、芯片、抗体中的一种或多种组合。

[0007] 另一方面,本发明提供了KIF4A的抑制剂在制备预防和/或治疗乳腺癌的药物中的应用。

[0008] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述KIF4A抑制剂为siRNA或shRNA。

[0009] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述抑制剂选自以下物质中的一个或多个物质:能够全部或部分抑制KIF4A基因表达的物质,能够全部或部分抑制KIF4A蛋白发挥功能的物质。

[0010] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述抑制剂选自:蛋白质、寡核苷酸、寡核苷酸表达载体和小分子化合物中的一种或多种组合。

[0011] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述治疗乳腺癌的药物至少具有以下功能之一:能够破坏乳腺癌细胞的有丝分裂过程、抑制乳腺癌细胞的增殖、促进乳腺癌细胞凋亡和抑制乳腺癌细胞的恶化。

[0012] 第三方面,本发明还提供了KIF4A的抑制剂在制备乳腺癌细胞有丝分裂扰乱剂的用途,所述KIF4A的抑制剂为siRNA或shRNA。

[0013] 本发明的KIF4A在乳腺癌的诊断、预后及治疗中的应用相对于现有技术具有以下有益效果:

[0014] 本发明的KIF4A在乳腺癌细胞中表达上调,对乳腺癌细胞表现出抑制增殖、促进凋

亡和破坏有丝分裂过程的作用,且乳腺癌患者KIF4A表达表现出较高的免疫浸润水平,表明本发明对乳腺癌的诊断、治疗和预后提供了新的思路。

### 附图说明

[0015] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0016] 图1为各细胞系中KIF4A基因的表达量;

[0017] 图2为各细胞系中KIF4A蛋白的表达量;

[0018] 图3为RNA干扰质粒对MDA-MB-231细胞中KIF4A的mRNA的蛋白表达量;

[0019] 图4为培养24h时间时MDA-MB-231和MCF-7细胞系存活量;

[0020] 图5为培养48h时间时MDA-MB-231和MCF-7细胞系存活量;

[0021] 图6为培养72h时间时MDA-MB-231和MCF-7细胞系存活量;

[0022] 图7为KIF4A siRNA干扰质粒对MDA-MB-231和MCF-7细胞系增殖的影响图;

[0023] 图8为KIF4A siRNA干扰质粒对MDA-MB-231和MCF-7细胞系凋亡影响的流式细胞图;

[0024] 图9为KIF4A siRNA干扰质粒对MDA-MB-231和MCF-7细胞系凋亡率的影响图;

[0025] 图10为细胞分裂间期不同阶段敲除KIF4A表达时MDA-MB-231和MCF-7细胞系增殖情况的流式细胞图;

[0026] 图11为细胞分裂间期不同阶段敲除KIF4A表达时MDA-MB-231和MCF-7细胞系增值率的结果图。

### 具体实施方式

[0027] 下面将结合本发明实施方式,对本发明实施方式中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施方式仅仅是本发明一部分实施方式,而不是全部的实施方式。基于本发明中的实施方式,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式,都属于本发明保护的范围。

[0028] 发明人通过TIMER数据库比较KIF4A在多个正常组织和肿瘤组织中的表达模式,利用生物信息学和多种检测方法,经过长时间研究和筛选,发现KIF4A可应用于乳腺癌诊断、预后及治疗中。

[0029] 为此,本发明提出了检测KIF4A基因表达水平的试剂在制备乳腺癌诊断或预后的试剂盒中的应用。

[0030] 其中,检测KIF4A基因表达水平的试剂选自引物、探针、芯片、抗体中的一种或多种组合。

[0031] KIF4A的抑制剂在制备预防和/或治疗乳腺癌的药物中的应用。

[0032] 其中KIF4A抑制剂为siRNA或shRNA,选自:能够全部或部分抑制KIF4A基因表达的物质,能够全部或部分抑制KIF4A蛋白发挥功能的物质;选自:蛋白质、寡核苷酸、寡核苷酸表达载体和小分子化合物中的一种或多种组合。

[0033] 其中,治疗乳腺癌的药物至少具有以下功能之一:能够破坏乳腺癌细胞的有丝分裂过程、抑制乳腺癌细胞的增殖、促进乳腺癌细胞凋亡和抑制乳腺癌细胞的恶化。

[0034] KIF4A的抑制剂在制备乳腺癌细胞有丝分裂扰乱剂的用途。

[0035] 其中,KIF4A的抑制剂为siRNA或shRNA。

[0036] 下面结合具体实验,进一步阐述本发明思路,但本发明的保护范围但并不局限于此。下述实验例中所使用的实验方法或实验条件,如无特殊说明,均按常规方法或厂家说明书进行,下述实验例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0037] 一.RT-PCR检测目的基因表达变化

[0038] 1.1实验分组

[0039] ①:MCF-10A,非转移性乳腺癌细胞系;②:MCF-7,非转移性乳腺癌细胞系;③:MDA-MB-231,转移性乳腺癌细胞系;④:MDA-MB-468,转移性乳腺癌细胞系。

[0040] 1.2实验方法

[0041] (1)复苏细胞

[0042] S1,将冻存管放入提前加热的37℃水浴锅中快速解冻;

[0043] S2,吸取解冻的冻存液并加入2mL细胞所对应的完全培养基;

[0044] S3,1200rpm/min离心3min;

[0045] S4,离心完成后去掉上清,加入3mL细胞对应的培养基,接种于6cm皿中;

[0046] S5,放入37℃细胞培养箱中培养;

[0047] (2)细胞铺板

[0048] S21,待细胞长满后,用胰酶将细胞消化;

[0049] S22,用完全培养基将细胞重悬至 $1 \times 10^6$ /mL;

[0050] S23,加入500 $\mu$ L细胞悬液于24孔板中;

[0051] S24,放入细胞培养箱中过夜;

[0052] S25,加入1mL Trizol提取细胞RNA;

[0053] (3)总RNA抽提

[0054] 细胞总RNA的抽提采用Trizol提取试剂盒,具体步骤如下:

[0055] S31,收集细胞样品至1.5mL离心管。

[0056] S32,加入1mL Trizol充分裂解,室温静置5min。

[0057] S33,加入0.2mL氯仿,剧烈振荡15s,静置3min。

[0058] S34,4℃ 12000r/min离心10min,取上清。

[0059] S35,加入0.5mL异丙醇,混匀,冰上静置20-30min。

[0060] S36,4℃ 12000r/min离心10min,弃上清。

[0061] S37,加入1mL 75%乙醇,洗涤沉淀。4℃ 7500g离心5min,弃上清。

[0062] S38,室温放置晾干或超净台中吹干5min左右,加入适量的Rnase-free H<sub>2</sub>O溶解。

[0063] (4) cDNA合成

[0064] 采用第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA,具体步骤如下:

[0065] S41,逆转录反应体系,在0.2mL PCR管中加入以下试剂,见表1:

[0066] 表1逆转录反应体系

	试剂	体积 (□L)
	总 RNA	5.0
	Random Primer p(dN)6 (0.2 □g/□L)	1.0
	Rnase-free ddH <sub>2</sub> O	5.0
[0067]	5×Reaction Buffer	4.0
	dNTP Mix (10 mmol/L)	2.0
	Rnase inhibitor (20 U/□L)	1.0
	Reverse Transcriptase (10 U/□L)	2.0
	总体积	20.0

[0068] S42,混匀后37℃温浴5min,42℃温浴60min,70℃温浴10min,终止反应。

[0069] S43,将上述溶液-20℃保存。

[0070] (5) 聚合酶链式反应PCR

[0071] S51,引物合成

[0072] Real-time PCR所使用的引物由上海生工公司Primer Premier 5.0软件设计、合成,以管家基因GAPDH为内参。引物序列见表2。

[0073] 表2 Real-timePCR引物序列

Primer	Sequence (5' -3')
Gapdh (human) -F	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
Gapdh (human) -R	AGGGGCCATCCACAGTCTTC

[0075] S52,Real time-PCR反应体系

[0076] 根据Real time-PCR反应体系配制反应液。在PCR反应管中分别加入ddH<sub>2</sub>O、SybrGreen qPCR Master Mix、Forward primer、Reverse primer、cDNA模板,充分混匀。反应体系按照表3配制。

[0077] 表3 Real time-PCR反应体系

	Component	Volume(□L)
	ddH <sub>2</sub> O	7.0
	SybrGreen qPCR Master Mix (2×)	10.0
[0078]	Forward primer 10 □M	1.0
	Reverse primer 10 □M	1.0
	cDNA	1.0
	Total volume	20.0

[0079] S53,PCR扩增条件

[0080] 扩增条件:94℃ 10min,(94℃ 20s,5℃ 20s,72℃ 20s)40个循环。

[0081] S54,Real-Time PCR数据处理

[0082] PCR扩增后,实时荧光定量PCR仪自动分析结果,根据阴性对照调整阈值和基线以确定各个标本的Ct值,并根据熔解曲线确定该Ct值是否有效。将结果导出,采用2- $\Delta\Delta$ CT法分析目的基因在对照组和各实验组之间的表达差异,计算公式如下: $\Delta$ Ct=Ct目的基因-Ct内参,记为 $\Delta$ Ct对照,求得 $\Delta$ Ct对照平均,用各组的 $\Delta$ Ct分别减去 $\Delta$ Ct对照平均,求得 $\Delta$

$\Delta$ Ct值,再计算各组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值,即为各组中基因的相对表达量,结果见图1。

[0083] 1.3实验结果

[0084] 图1中RT-PCR结果显示:与非转移性乳腺癌细胞系相比,转移性乳腺癌细胞系中的KIF4A增多,其中MDA-MB-231细胞中KIF4A表达水平最高,其次是MDA-MB-468,表达量最低的MCF-7。

[0085] 二、Western Blot检测

[0086] 2.1检测方法

[0087] (1) 蛋白提取及定量

[0088] 样品准备:向组织样本中加入预冷的已加PMSF的RIPA裂解液,充分匀浆裂解后12000g离心10min,取上清,进行蛋白质定量后贮存于-80℃冰箱。

[0089] 蛋白定量:S1,标准曲线的绘制:取一块酶标板,按照下表加入试剂:

[0090] 表4标曲试剂

[0091]

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准溶液( $\mu$ L)	0	1	2	3	4	5	6	7
去离子水( $\mu$ L)	20	19	18	17	16	15	14	13
对应蛋白含量( $\mu$ g)	0	5	10	15	20	25	30	35

[0092] S2,根据样品数量,将BCA试剂A与试剂B按体积比为50:1配制适量BCA工作液,充分混匀;

[0093] S3,各孔加入200 $\mu$ L BCA工作液;

[0094] S4,把酶标板放在振荡器上振荡30s,37℃放置30min,然后在562nm下测定吸光度。以吸光值为纵坐标,蛋白浓度(mg/mL)为横坐标,绘标准曲线;

[0095] S5,在酶标板中加入2.5 $\mu$ L待测蛋白和17.5 $\mu$ L PBS(稀释8倍),加入200 $\mu$ L BCA工作液,把酶标板放在振荡器上振荡30s,37℃放置30min,然后在562nm下测定吸光度;

[0096] S6,根据所测样品的吸光值,在标准曲线上即可查得相应的蛋白浓度(mg/mL),根据样品浓度确定上样量。

[0097] (2) Western blot检测

[0098] S21,蛋白样品的制备:在提取的蛋白中加入5 $\times$ SDS上样缓冲液,混合均匀后,放入沸水中水浴5min,使蛋白变性,12000r/min离心5min,所得蛋白样品直接上样检测或置于-80℃保存。

[0099] S22,制备聚丙烯酰胺凝胶:根据待检测蛋白分析量大小确定分离胶浓度。将玻璃板清洗干净,晾干后将玻璃板对齐插入夹子中卡紧,将分离胶沿玻璃板缓慢注入,然后在较面上注入适量的水,待胶凝固后将水倒出,用滤纸将剩下的水吸净,沿玻璃板注入浓缩胶将剩余空间灌满,插入梳子,将凝胶连同模具一起放入4℃冰箱冷却,待胶凝固后将梳子拔出。

[0100] 表5分离胶和浓缩胶的配制

[0101]

试剂	浓缩胶5%	分离胶10%	分离胶12%
ddH <sub>2</sub> O	1.4mL	1.9mL	1.6mL
30%丙烯酰胺混合液	0.33mL	1.7mL	2.0mL
1.5M Tris-HCl(pH8.8)	—	1.3mL	1.3mL
1.0M Tris-HCl(pH6.8)	0.25mL	—	—

10%SDS	0.02mL	0.05mL	0.05mL
10%过硫酸铵	0.02mL	0.05mL	0.05mL
TEMED	0.002mL	0.002mL	0.002mL
总体积	2mL	5mL	5mL

[0102] S23,上样:装好电泳装置,倒入电泳缓冲液,用移液器分别将marker和25 $\mu$ g蛋白注入样品孔。

[0103] S24,电泳:浓缩胶恒定电压80V,30min;分离胶恒定电压120V,60min,至溴酚蓝接近凝胶底部时停止电泳,进行转膜。

[0104] S25,切胶:将玻璃板轻轻撬开,取出凝胶,以marker为对照进行切胶。

[0105] S26,转膜:将滤纸、PVDF膜剪成与凝胶尺寸大小相同,用甲醇浸泡PVDF膜15s。使膜由白色变为半透明后放入超纯水中,静置2min,将处理好的PVDF膜放入转膜缓冲液中平衡15min。按海绵垫,滤纸,凝胶,PVDF膜,滤纸,海绵垫的顺序叠加在一起,用玻璃棒赶走各层之间的气泡,放入转膜槽中,倒入转移缓冲液。

[0106] S27,封闭:将膜用TBST漂洗3次,每次5min,然后用5%的脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C缓慢震荡2h。

[0107] S28,孵育一抗:根据说明书确定一抗稀释比例,用封闭液稀释抗体至合适浓度,4 $^{\circ}$ C过夜孵育。

[0108] S29,二抗孵育:待一抗孵育结束后,TBST冲洗3次,每次1min。将PVDF膜放入以1:5000稀释的HRP标记的兔二抗或者鼠二抗溶液中,37 $^{\circ}$ C缓慢振荡孵育1h。TBST冲洗3次,每次5min。

[0109] S30,显色:在膜上加入适量的ECL发光液,利用一体式化学发光仪拍摄照片,结果见图2。

## [0110] 2.2实验结果

[0111] 图2中WB结果显示:四株细胞中,MDA-MB-231细胞中KIF4A表达水平最高,其次是MDA-MB-468,表达量最低的是MCF-7。结果同RT-PCR。

## [0112] 三.RT-PCR筛选最佳靶序列

[0113] 3.1实验分组:①MDA-MB-231,②MDA-MB-231+siRNANC,③MDA-MB-231+KIF4A siRNA1,④MDA-MB-231+KIF4A siRNA2,⑤MDA-MB-231+KIF4A siRNA3。

## [0114] 3.2实验方法

[0115] S1,培养MDA-MB-231细胞,待细胞长满后调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$  cells/mL,接种于24孔培养板,每孔500 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养24h,观察细胞80%粘连。

[0116] S2,制备转染复合物

[0117] S21,用50 $\mu$ L无血清培养基稀释SiRNA (siRNA用量为15pmol),轻轻混匀;

[0118] S22,Lipofectamine 2000使用前,轻轻混匀,用50 $\mu$ L无血清培养基稀释1.5 $\mu$ L Lipofectamine 2000,轻轻混匀,室温孵育5min;

[0119] S23,将上述液体加在一起,轻轻混匀,室温孵育20min,转染复合物形成。

[0120] S3,将24孔板中培养上清液吸掉,PBS清洗细胞。

[0121] S4,每孔分别加入400 $\mu$ L培养基,再分别加入100 $\mu$ L上述混合液,每孔终体积为500 $\mu$ L。其中SiRNA转染浓度为50nM,每组设置3个复孔。

[0122] S5, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养4-6h后,吸掉上清液,加入500μL的完全培养基,于培养箱内培养48h。

[0123] S6,收集RT样本。

[0124] 3.3总RNA抽提

[0125] 细胞总RNA的抽提采用Trizol提取试剂盒,具体步骤如下:

[0126] S1,收集细胞样品至1.5mL离心管。

[0127] S2,加入1mL Trizol充分裂解,室温静置5min。

[0128] S3,加入0.2mL氯仿,剧烈振荡15s,静置3min。

[0129] S4,4℃ 12000r/min离心10min,取上清。

[0130] S5,加入0.5mL异丙醇,混匀,冰上静置20-30min。

[0131] S6,4℃ 12000r/min离心10min,弃上清。

[0132] S7,加入1mL 75%乙醇,洗涤沉淀。4℃ 7500g离心5min,弃上清。

[0133] S8,室温放置晾干或超净台中吹干5min左右,加入适量的Rnase-free H<sub>2</sub>O溶解。

[0134] 3.4 cDNA合成

[0135] 采用第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA,具体步骤如下:

[0136] S1,配置逆转录反应体系,在0.2mL PCR管中加入以下试剂,见表6:

[0137] 表6逆转录反应体系

试剂	体积 (μL)
总 RNA	5.0
Random Primer p(dN) <sub>6</sub> (0.2 μg/μL)	1.0
Rnase-free ddH <sub>2</sub> O	5.0
5×Reaction Buffer	4.0
dNTP Mix (10 mmol/L)	2.0
Rnase inhibitor (20 U/μL)	1.0
Reverse Transcriptase (10 U/μL)	2.0
总体积	20.0

[0138] S2,混匀后37℃温浴5min,42℃温浴60min,70℃温浴10min,终止反应,将上述溶液-20℃保存。

[0140] 3.5聚合酶链式反应PCR

[0141] S1,引物合成

[0142] Real-time PCR所使用的引物由上海生工公司Primer Premier 5.0软件设计、合成,以管家基因GAPDH为内参。引物序列见表7。

[0143] 表7 Real-timePCR引物序列

Primer	Sequence (5' -3')
Gapdh (human) -F	AGAAGGCTGGGGCTCA
Gapdh (human) -R	AGGGGCCATCCACAGT

[0145] S2,Real time-PCR反应体系

[0146] 根据Real time-PCR反应体系配制反应液。在PCR反应管中分别加入ddH<sub>2</sub>O、SybrGreen qPCR Master Mix、Forward primer、Reverse primer、cDNA模板,充分混匀。反

应体系按照表8配制。

[0147] 表8 Real time-PCR反应体系

	Component	Volume( $\mu$ L)
	ddH <sub>2</sub> O	7.0
	SybrGreen qPCR Master Mix (2 $\times$ )	10.0
[0148]	Forward primer 10 $\mu$ M	1.0
	Reverse primer 10 $\mu$ M	1.0
	cDNA	1.0
	Total volume	20.0

[0149] S3,PCR扩增条件

[0150] 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 10min,(94 $^{\circ}$ C 20s,55 $^{\circ}$ C 20s,72 $^{\circ}$ C 20s)40个循环。

[0151] 3.6 Real-Time PCR数据处理

[0152] PCR扩增后,实时荧光定量PCR仪自动分析结果,根据阴性对照调整阈值和基线以确定各个标本的Ct值,并根据溶解曲线确定该Ct值是否有效。将结果导出,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因在对照组和各实验组之间的表达差异,计算公式如下: $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参}$ ,记为 $\Delta Ct_{对照}$ ,求得 $\Delta Ct_{对照}$ 平均,用各组的 $\Delta Ct$ 分别减去 $\Delta Ct_{对照}$ 平均,求得 $\Delta\Delta Ct$ 值,再计算各组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值,即为各组中基因的相对表达量,结果见图3。

[0153] 3.7实验结果

[0154] 图3中RT-PCR结果显示:相比Control组,KIF4A siRNA1组、KIF4A siRNA2组KIF4A siRNA3组的KIF4A表达水平显著降低( $p < 0.05$ )。其中KIF4A siRNA1组的表达水平最低。转染了RNA干扰质粒的MDA-MB-231细胞中的KIF4A基因的siRNA表达量显著下降。

[0155] 四.MTT实验检测细胞增殖

[0156] 4.1实验方法

[0157] (1)实验分组:①:MDA-MB-231,②:MDA-MB-231+NC,③:MDA-MB-231+KIF4A siRNA,④:MCF-7,⑤:MCF-7+NC,⑥:MCF-7+OEKIF4A。

[0158] (2)细胞培养及处理:

[0159] S1,细胞扩培。待细胞长满后调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$  cells/mL,接种于96孔培养板,每孔200 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱内,培养24h。

[0160] S2,按照上述组别制备转染复合物

[0161] S21,用25 $\mu$ L无血清培养基稀释OE KIF4A及空载,轻轻混匀;

[0162] S22,用25 $\mu$ L无血清培养基稀释KIF4A siRNA及NC,轻轻混匀;

[0163] S23,Lipofectamine 2000使用前,轻轻混匀,用25 $\mu$ L无血清培养基稀释2.5 $\mu$ L Lipofectamine 2000,轻轻混匀,室温孵育5min;

[0164] S24,将上述液体加在一起,轻轻混匀,室温孵育20min,转染复合物形成。

[0165] S3,将96孔板中培养上清液吸掉,PBS清洗细胞;

[0166] S4,每孔分别加入75 $\mu$ L上述混合液,再加入25 $\mu$ L培养基。其中KIF4A siRNA转染浓度为50nM,质粒浓度为500ng/孔,每组设置3个复孔;

[0167] S5,37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养4-6h后,吸掉上清液,加入100 $\mu$ L的完全培养基,于培养箱内培养48h后备用培养基(10%FBS)稀释血清后加入96孔板内,每个孔100 $\mu$ L。

- [0168] S6,将细胞放置于5%CO<sub>2</sub>培养箱,培养24h、48h、72h。
- [0169] S7,每孔加入10μL的MTT,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内避光孵育3-4h。
- [0170] S8,吸净孔内的液体,加入150μL的DMSO,于摇床室温震荡10min。
- [0171] S9,酶标仪492nm波长测出同一时间点OD值,用测得的OD值进行细胞活力的分析,结果见图4-7。

#### [0172] 4.2实验结果

[0173] 图4-7中MTT结果显示:KIF4A siRNA显著抑制MDA-MB-231细胞增殖,KIF4A过表达载体显著促进MCF-7细胞增殖。表明KIF4A siRNA抑制细胞生长,诱导KIF4A过表达则会增强乳腺癌细胞的侵袭性,提示高表达KIF4A可促进乳腺癌的发生、发展。

#### [0174] 五.流式检测细胞凋亡

##### [0175] 5.1实验方法

[0176] S1,收集各组细胞进行细胞凋亡检测:用不含EDTA的胰酶消化收集后(注:胰酶消化时间不宜过长,否则会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与Annexin V-FITC的结合),在室温中,1500rpm离心5min,收集细胞;

[0177] S2,细胞洗涤:用预冷1\*PBS(4℃)重悬细胞一次,1500rpm离心5min,洗涤细胞;

[0178] S3,加入300μL的1\*Binding Buffer悬浮细胞;

[0179] S4,Annexin V-FITC标记:加入5μL的Annexin V-FITC混匀后,避光,室温孵育15min;

[0180] S5,PI标记:再加入10μL的PI染色,轻轻混匀细胞,于避光条件下室温孵育10min;

[0181] S6,流式细胞仪检测,FlowJo 7.6软件分析,结果见图8-9。

##### [0182] 5.2实验结果

[0183] 图8-9中流式检测细胞凋亡实验结果显示:KIF4A siRNA显著增加MDA-MB-231细胞凋亡率,KIF4A过表达降低MCF-7细胞凋亡率。表明KIF4A siRNA促进MDA-MB-231细胞凋亡,诱导KIF4A过表达则会减缓MCF-7乳腺癌细胞的侵袭性,提示高表达KIF4A可减缓乳腺癌的发生、发展。

#### [0184] 六.流式检测细胞周期

##### [0185] 6.1检测方法

[0186] S1,胰酶消化收集各组细胞,1000r/min离心3min,弃去培养液;

[0187] S2,将细胞沉淀用2mL PBS洗涤1次;

[0188] S3,离心去PBS,加入冰预冷的70%的乙醇,4℃固定过夜;

[0189] S4,1000r/min离心3min弃去固定液,用PBS洗细胞,1000r/min,3min离心;

[0190] S5,加入500μL的PBS含100μg/mL RNaseA,37℃孵育30min;

[0191] S6,30min后加入PI使其浓度为50μg/mL。避光37℃孵育30min;

[0192] S7,冷PBS溶液洗涤细胞,1000r/min,3min离心;

[0193] S8,取200μL的单细胞悬液,流式上机检测,MFLT32软件分析,结果见图10-11。

##### [0194] 6.2实验结果

[0195] 图10-11流式检测细胞周期实验结果显示:相比MDA-MB-231,转染NC对细胞周期无显著影响,而敲降KIF4A表达会阻滞细胞周期于G0/G1,显著抑制细胞增殖,降低S期比例;相比MCF-7,转染NC对细胞周期无显著影响,而过表达KIF4A会显著降低G0/G1期比例,增加S期

比例,促进细胞增殖。由此表明,选择性的抑制KIF4A的活性,可以抑制细胞有丝分裂的过程。

[0196] 以上所述仅为本发明的较佳实施方式而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

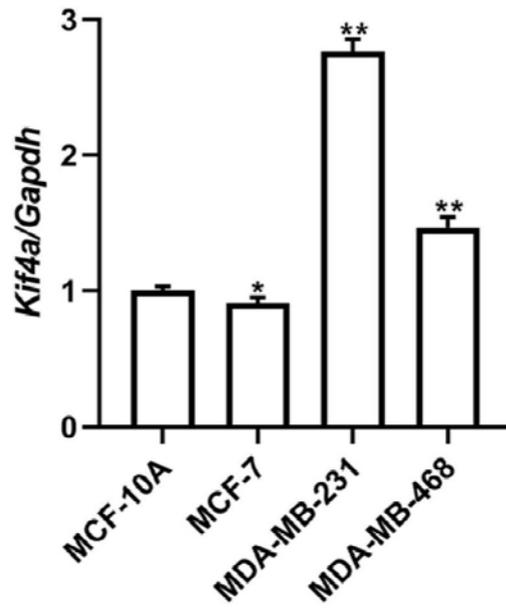


图1

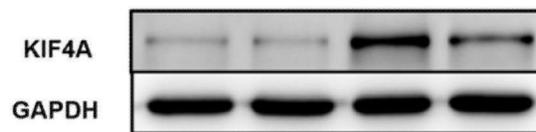


图2

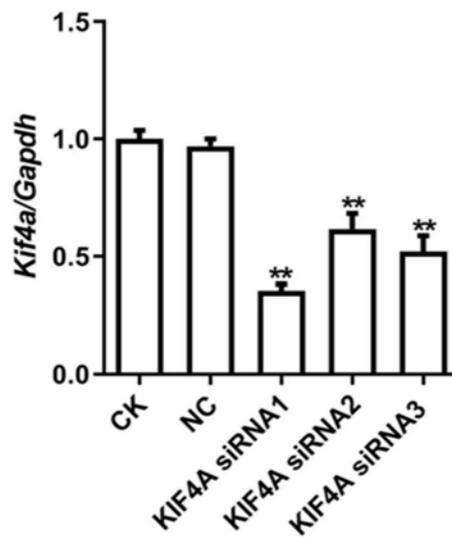


图3

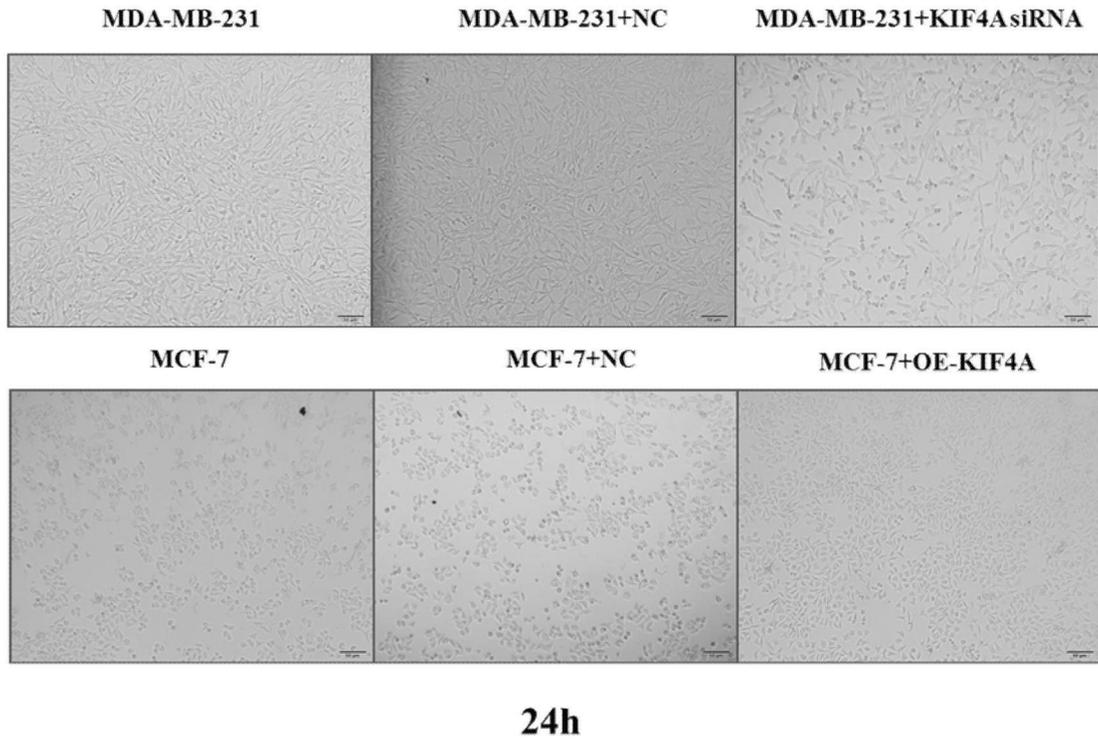


图4

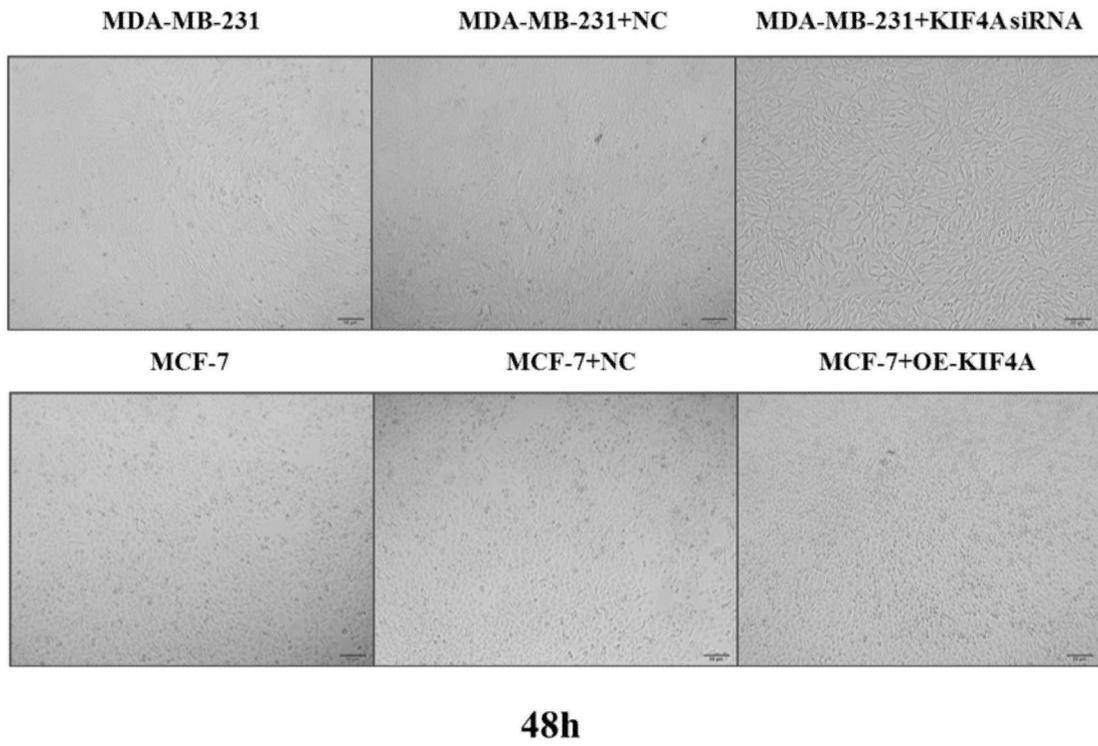
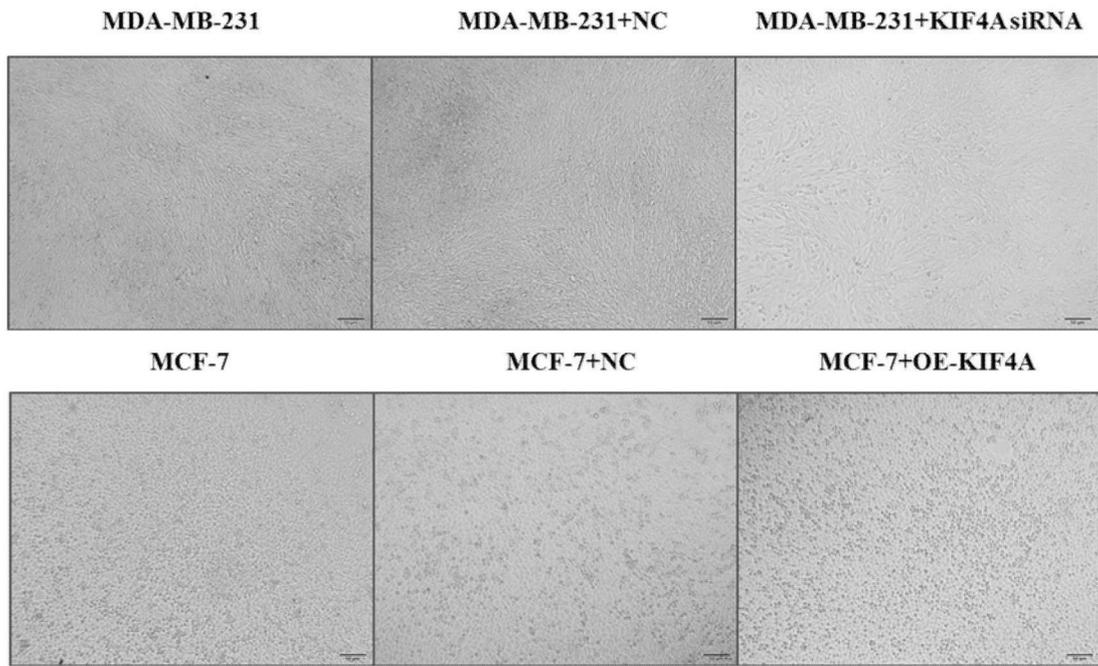


图5



72h

图6

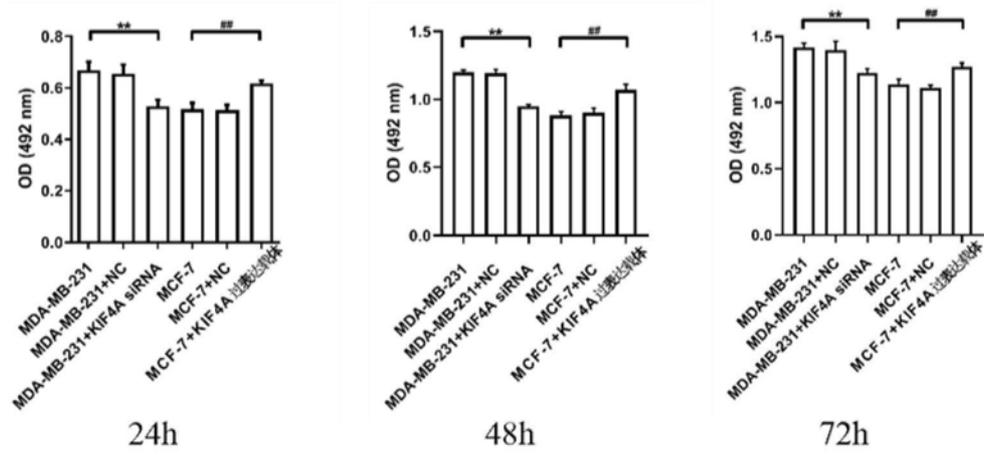


图7

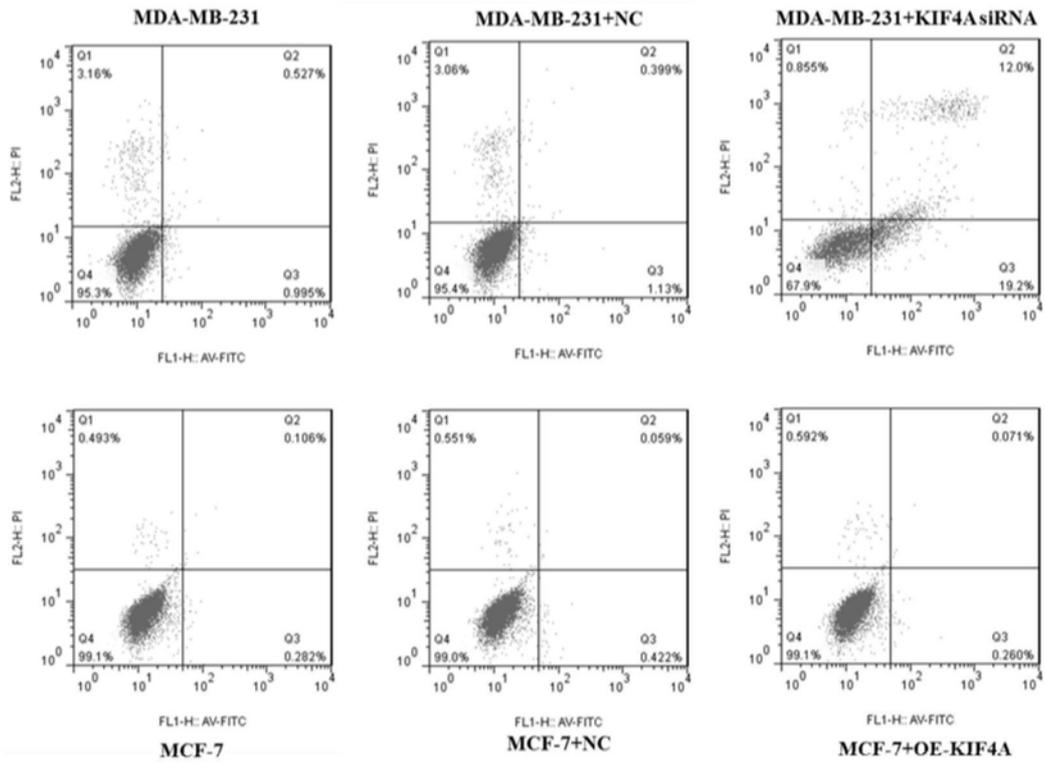


图8

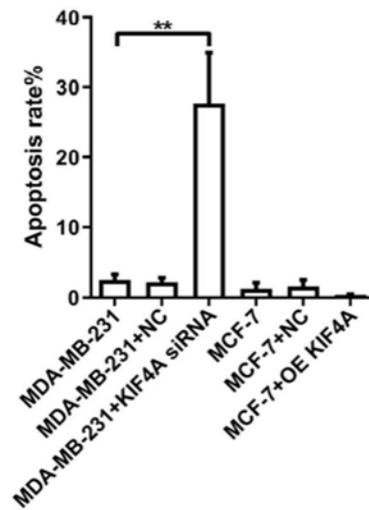


图9

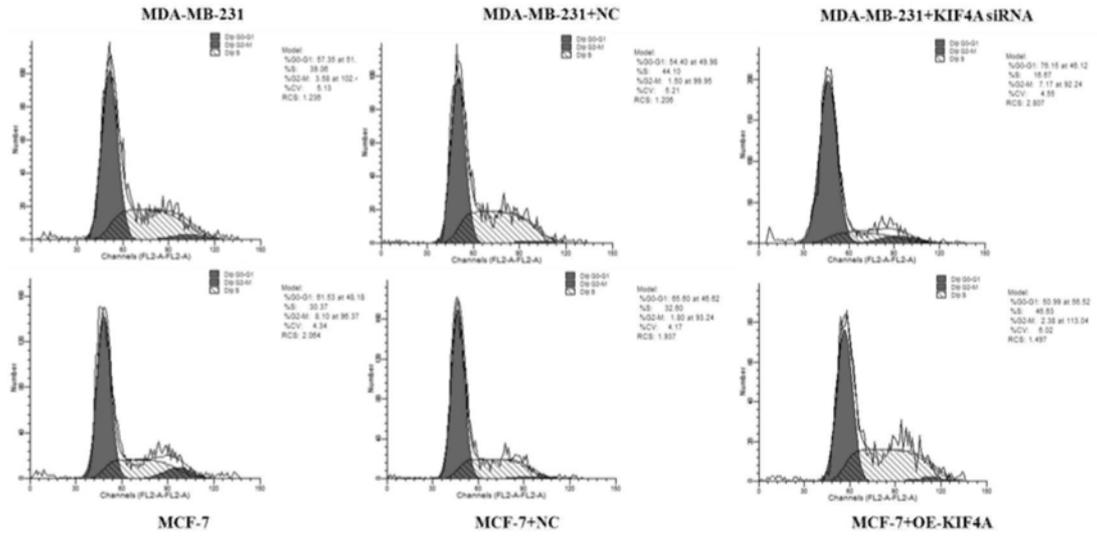


图10

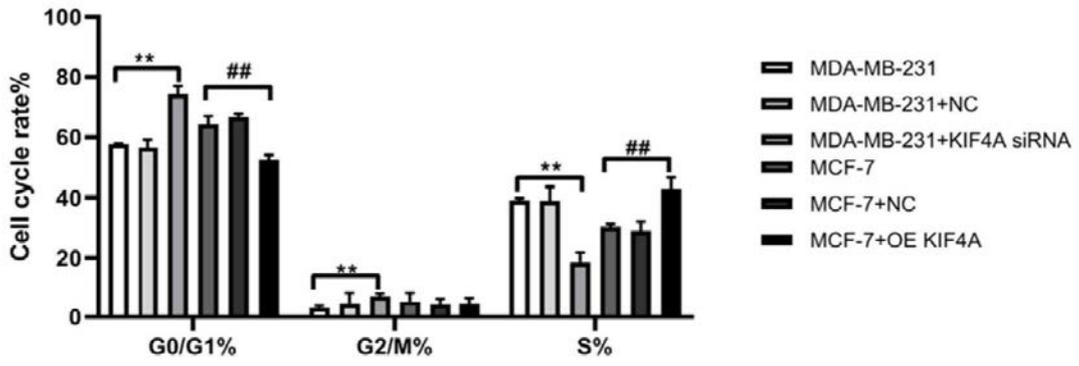


图11