



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104163871 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201410393625. 9

(22) 申请日 2014. 08. 12

(71) 申请人 大连医科大学

地址 116044 辽宁省大连市旅顺口区旅顺南路西段九号

(72) 发明人 汪洋 王泽峰 于静 张文静 陈丹

(74) 专利代理机构 大连非凡专利事务所 21220 代理人 闪红霞

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

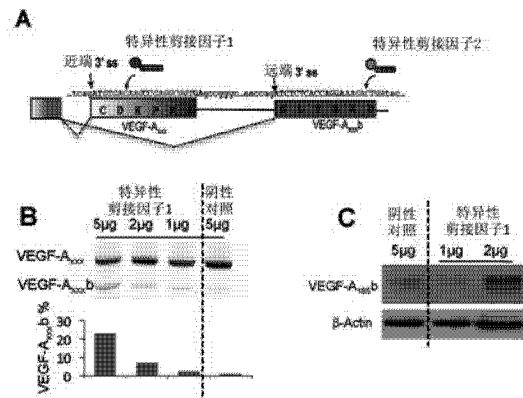
序列表4页 附图4页

(54) 发明名称

抗肿瘤的特异性剪接因子及制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种抗肿瘤的特异性剪接因子, 以人类细胞 cDNA 为模板, 以 SEQ. ID. No3 和 SEQ. ID. No. 4 所示序列为引物, 得到 PCR 产物 A ;以人类细胞 cDNA 为模板, SEQ. ID. No5 和 SEQ. ID. No. 6 所示序列为引物, 得到 PCR 产物 B ;以人类细胞 cDNA 为模板, 以 SEQ. ID. No7 和 SEQ. ID. No. 8 所示序列为引物进行, 得到 PCR 产物 C ;以人类细胞 cDNA 为模板, 以 SEQ. ID. No. 9 和 SEQ. ID. No. 10 所示序列为引物进行, 得到 PCR 产物 D ;PCR 产物 A 与 PCR 产物 B 融合得到如 SEQ. ID. No. 1 所示特异性剪接因子 I ;PCR 产物 C 与 PCR 产物 D 相融合得到、如 SEQ. ID. No. 2 所示特异性剪接因子 II 。



1. 一种抗肿瘤的特异性剪接因子,其特征在于:由特异性剪接因子 I 和特异性剪接因子 II 构成,所述特异性剪接因子 I 的序列如 SEQ. ID. No. 1 所示;所述特异性剪接因子 II 的序列如 SEQ. ID. No. 2 所示。

2. 一种如权利要求 1 所述的抗肿瘤的特异性剪接因子的制备方法,其特征在于按如下步骤进行:

a. 以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 3 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 4 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 A;以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 5 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 6 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 B;

b. 以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 7 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 8 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 C;以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 9 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 10 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 D;

c. 将所得到的 PCR 产物 A 与 PCR 产物 B 相融合,得到特异性剪接因子 I;将所得到的 PCR 产物 C 与 PCR 产物 D 相融合,得到特异性剪接因子 II。

抗肿瘤的特异性剪接因子及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗肿瘤药物及制备方法,尤其是一种可以用来控制肿瘤中血管内皮生长因子的异常选择性剪接,达到抑制肿瘤血管生成及进一步抑制肿瘤进展的抗肿瘤的特异性剪接因子及制备方法。

背景技术

[0002] 目前人们发现,肿瘤细胞除了基因组序列突变以外,还具有一个显著的生物学特征,即大量的基因被剪接成与正常功能相反的亚型(异常选择性剪接),这也是肿瘤表观遗传学改变导致细胞表型改变的关键环节。现有用来调控恶性肿瘤中基因的异常选择性剪接事件主要是通过反义核苷酸技术来实现的,即将反义核苷酸输送至人体内,抑制而非促进目的基因 mRNA 前体的选择性剪接,从而控制某些基因 mRNA 前体中发生的异常剪接事件,但其应用具有一定的局限性。

[0003] 肿瘤转移的一个重要基础是为肿瘤转移提供养分的肿瘤中远端血管的生成,是由肿瘤细胞分泌多种蛋白因子激活周围的一系列相关蛋白表达,促进新生血管生成,而血管内皮生长因子(VEGF-A)是肿瘤细胞分泌的一种重要刺激血管生成因子。最近研究表明 VEGF-A 基因的不同剪接体在血管生成过程中具有相反功能,一种剪接体(VEGF-A_{xxx})促进血管生成,而另一种新鉴定的剪接体(VEGF-A_{xxx^b})却能够抑制血管发生。在正常人类组织中,除胎盘以外,VEGF-A 主要是以 VEGF-A_{xxx^b} 亚型存在,这样 VEGF-A 在成人组织中抑制血管生成。然而在肿瘤细胞中,VEGF-A 主要是以 VEGF-A_{xxx} 亚型存在,诱导血管生成,增加血管通透性,促进肿瘤发展,并形成远端的肿瘤转移灶,所以通过抑制 VEGF-A_{xxx} 亚型的生成能够提供一种阻遏血管生成的肿瘤治疗手段。

[0004] 然而,如果采用现有的反义核苷酸技术等抑制手段,就会不加区分地对促进血管生成和抑制血管生成的两种剪接体均进行抑制,而如 VEGF-A 的功能被全部抑制后,体内其他信号传导通路会发挥代偿功能而促进肿瘤进展。

[0005] 迄今为止,尚未见有利用特异性剪接因子通过靶向性调控 VEGF 两种剪接体,以实现抑制肿瘤血管生成并进一步阻遏恶性肿瘤进展的报道。

发明内容

[0006] 本发明是为了解决现有技术所存在的上述技术问题,提供一种可以用来控制肿瘤中血管内皮生长因子的异常选择性剪接,达到抑制肿瘤血管生成及进一步抑制肿瘤进展的抗肿瘤的特异性剪接因子及制备方法。

[0007] 本发明的技术解决方案是:一种抗肿瘤的特异性剪接因子,其特征在于:由特异性剪接因子 I 和特异性剪接因子 II 构成,所述特异性剪接因子 I 的序列如 SEQ. ID. No. 1 所示;所述特异性剪接因子 II 的序列如 SEQ. ID. No. 2 所示。

[0008] 一种上述抗肿瘤的特异性剪接因子的制备方法,其特征在于按如下步骤进行:

- a. 以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 3 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 4 所

示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 A;以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 5 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 6 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 B。

[0009] b. 以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 7 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 8 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 C;以人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 9 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 10 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 D。

[0010] c. 将所得到的 PCR 产物 A 与 PCR 产物 B 相融合,得到特异性剪接因子 I;将所得到的 PCR 产物 C 与 PCR 产物 D 相融合,得到特异性剪接因子 II。

[0011] 本发明提供的特异性剪接因子,包含可以结合 RNA 的特异性识别序列、能够抑制异常选择性剪接体 VEGF-A_{xxx} 的功能序列和促进选择性剪接体 VEGF-A_{xxx}b 的功能结构域序列,可以控制肿瘤中血管内皮生长因子的异常选择性剪接,促进选择性剪接体 VEGF-A_{xxx}b 的合成,从而达到抑制肿瘤血管生成及进一步抑制肿瘤进展的效果。

附图说明

[0012] 图 1 是特异性剪接因子 I 促进 VEGF-A_{xxx}b 剪接体合成的效果图。

[0013] 图 2 是特异性剪接因子 I 抑制体外培养肿瘤细胞生长的效果图。

[0014] 图 3 是特异性剪接因子 I 抑制体外培养肿瘤细胞克隆形成的效果图。

[0015] 图 4 是特异性剪接因子 I 抑制体外培养肿瘤细胞非锚式依赖性集落形成能力效果图。

[0016] 图 5 是特异性剪接因子 I 抑制肿瘤细胞迁移效果图。

[0017] 图 6 是特异性剪接因子 I 抑制体外血管内皮细胞微管形成效果图。

[0018] 图 7 是特异性剪接因子 I 对荷瘤裸鼠体内抑瘤效果图。

具体实施方式

[0019] 实施例 1:

a. 利用聚合酶链扩增反应(PCR),以从人类细胞中提取的 RNA 逆转录后得到的 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 3 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 4 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 A,即得到抑制 VEGF-A_{xxx} 剪接体合成的功能结构域序列;再以获得的人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 5 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 6 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 B,即得到特异性 RNA 识别结构域序列;

b. 以所得到的 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 7 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 8 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物 C,即得到促进 VEGF-A_{xxx}b 剪接体合成的功能结构域序列;再以获得的人类细胞 cDNA 为模板,以 SEQ. ID. No. 9 所示序列为上游引物,以 SEQ. ID. No. 10 所示序列为下游引物进行 PCR 反应,得到 PCR 产物,即得到特异性 RNA 识别结构域序列;

c. 将所得到的 PCR 产物 A 与 PCR 产物 B 相融合,得到特异性剪接因子 I,序列如 SEQ. ID. No. 1 所示;将所得到的 PCR 产物 C 与 PCR 产物 D 相融合,得到特异性剪接因子 II,序列如 SEQ. ID. No. 2 所示。

[0020] 实验:

实验例 1 本发明实施例的特异性剪接因子 I 对血管内皮生长因子 VEGF-A 的剪接调控实验

作用原理如图 1A 所示:特异性剪接因子 I 可以通过抑制使用近端 3' 剪接位点来促进 VEGF-A_{xxx}b 剪接体的合成;特异性剪接因子 II 则是通过促进远端 3' 剪接位点的使用来增加 VEGF-A_{xxx}b 剪接体的生成。

[0021] 利用人肺腺癌细胞系 A549 来建立特异性剪接因子瞬时表达的细胞系,并进一步检测特异性剪接因子 I 对肿瘤细胞中血管内皮生长因子的选择性剪接调控。

[0022] 将肺癌细胞按 1.2×10^5 /well 接种于 24 孔板,培养 12hr 后,用不同浓度 (1ug, 2ug, 5ug) 本发明实施例的特异性剪接因子 I,与 lipofectamine 2000 相混合并瞬时转染细胞;然后继续培养 48hr,收集细胞,并分为两份。其中一份利用 TRizol 试剂来提取总 RNA,并利用逆转录试剂盒 (RTIII, Invitrogen) 获得 cDNA,之后以 2ul cDNA 作为模板扩增 VEGF-A 的两种功能完全相反的剪接体 (VEGF-A_{xxx} 和 VEGF-A_{xxx}b),最后通过 Typhoon 机器进行扫描分析并对两种剪接体的含量进行定量。结果如图 1B 所示,VEGF-A_{xxx}b 剪接体的含量明显大于阴性对照组,尤其是浓度为 5ug 时,VEGF-A_{xxx}b 剪接体的含量可达阴性对照组的 10 倍。另外一部分细胞则利用蛋白质裂解液来提取总蛋白,之后利用 Western Blot 来检测血管内皮生长因子抑制血管生成剪接体 VEGF-A_{xxx}b 的含量,结果如图 1C 所示:含本发明特异性剪接因子 I 的实验组中 VEGF-A_{165b} 的含量明显大于阴性对照组。

[0023] 阴性对照组与实验组一样,是以人肺腺癌细胞系 A549 来建立特异性剪接因子瞬时表达的细胞系。所用特异性剪接因子也由两部分组成,其中一部分为与实验组的特异性剪接因子 I 具有识别不同序列的 RNA 结合结构域,另外一个结构域则是与特异性剪接因子 I 的功能结构域相一致的序列。该阴性对照组所用特异性剪接因子序列如 SEQ. ID. No. 11 所示。

[0024] 结果显示:虽然该阴性对照也具有调控剪接的功能结构域,但是其 RNA 识别结构域却不能结合 VEGF 基因,因而不具有功能。

[0025] 特异性剪接因子 I 是通过特异性结合来发挥功能的,具有很好的靶向性,能显著性地促进 VEGF-A_{xxx}b 剪接体的合生成。

[0026] 实验例 2:特异性剪接因子 I 抑制体外培养肿瘤细胞生长的实验

将分别稳定表达特异性剪接因子 I 和阴性对照的乳腺癌细胞 (10^5) 分别种于 10cm 细胞培养皿中,每两天收集细胞并计数,至第 9 天,之后根据相对于接种细胞当天 (第 0 天) 的细胞数倍数变化进行绘制生长曲线,如图 2 所示。结果显示特异性剪接因子 I 能够显著性地抑制乳腺癌肿瘤细胞生长。

[0027] 实验例 3:特异性剪接因子 I 抑制体外培养肿瘤细胞克隆形成的实验

将分别稳定表达特异性剪接因子 I 和阴性对照的肺癌细胞 (5000 个) 分别种于 10cm 细胞培养皿中,在 37°C 孵育 2 周后,将形成的细胞克隆利用甲醛固定,并利用结晶紫染色。结果如图 3 所示:与阴性对照相比较,特异性剪接因子 I 能够明显地抑制肺癌细胞的克隆形成能力。

[0028] 实验例 4:特异性剪接因子 I 抑制体外培养肿瘤细胞非锚式依赖性集落形成能力实验

等体积的 1.2% 琼脂和 2x DMEM 混匀后平铺在 6 孔板里形成 0.6% 的底层琼脂。将分别

稳定表达特异性剪接因子 I 和阴性对照的乳腺癌细胞与琼脂混匀形成终浓度为 0.3% 的细胞琼脂混合液,之后种在底层琼脂之上,将该 6 孔板置于 37°C 的潮湿孵箱中,培养 3 周之后利用甲醛固定细胞,并用结晶紫染色后计数,如图 4 所示;结果显示,特异性剪接因子 I 能够显著性地抑制乳腺癌细胞的非锚式依赖性集落形成能力。

[0029] 实验例 5:特异性剪接因子 I 抑制肿瘤细胞迁移的实验

分别将稳定表达特异性剪接因子 I 和阴性对照的乳腺癌细胞种于 6 孔板中,当细胞密度达到 90% 时,利用无菌枪头在细胞培养皿的底端划一条线,并分别于划线后的 0h 和 16h 照像来分析肿瘤细胞的迁移能力,如图 5 所示。结果表明特异性剪接因子 I 可以抑制乳腺癌细胞的远处迁移能力。

[0030] 实验例 6:特异性剪接因子 I 抑制体外血管内皮细胞微管形成的实验

分别将稳定表达特异性剪接因子 I 和阴性对照的肺癌细胞产生的培养基收集,将该培养基过滤后加入到人脐带血管内皮细胞(HUVEC)中,检测条件培养基对血管内皮细胞在体外形成微管的能力,如图 6 所示。结果显示与阴性对照相比,稳定表达特异性剪接因子 I 的肺癌细胞产生的条件培养基能够显著性抑制血管内皮细胞的微管形成能力。

[0031] 以上结果表明,特异性剪接因子 I 的应用能够真正地通过调控血管内皮生长因子的选择性剪接来促进抑制血管生成剪接体的合成,进而阻遏肿瘤的进展。

[0032] 实施例 7:特异性剪接因子 I 对荷瘤裸鼠体内抑瘤实验

取 6 只雌性 Nu/Nu (Charles River Laboratories:NU-Foxn1nu) 裸鼠,合格证号:SCXK(京)2007-0001,4 周龄,体重为 13 ~ 15g, 每只裸鼠左侧下肢皮下注射体积为 200 μ l 的如实验例 1 经特异性剪接因子 I 处理过的人肺癌 A549 细胞悬液(含 1×10^7 个细胞),而在每只裸鼠右侧下肢皮下注射体积为 200 μ l 的如实验例 1 经阴性对照处理过的人肺癌 A549 细胞悬液(含 1×10^7 个细胞),在注射后每天观察一次裸鼠成瘤情况;到第 5 天有 2 只明显成瘤,到第 8 天有 6 只成瘤;当至 21 天时,处死裸鼠,取出它们的瘤块,检测裸鼠体内所形成肿瘤的大小,结果如图 7 所示,表明特异性剪接因子 I 能够显著性地抑制裸鼠体内肿瘤的形成。

[0033] 体内抑瘤实验结果显示,整个实验过程中,各个裸鼠体重间没有差异, $P > 0.05$, 可认为特异性剪接因子 I 对裸鼠生长没有明显影响,也说明其没有明显毒副作用;特异性剪接因子 I 能明显延缓荷瘤裸鼠的肿瘤生长,与对照组比较,裸鼠平均瘤体积从第 8 天差异均有显著性, $P < 0.05$;第 21 天处死裸鼠测瘤重也得到与瘤体积同样的结果,这与前面的体外实验结果相一致。

[0034] 本发明实验组 2~7 所述阴性对照的建立方式均与实验例 1 相同。

序列表

<110> 大连医科大学

<120> 抗肿瘤的特异性剪接因子及制备方法

<160> 11

<210> 1

<211> 532

<212> RNA

<213> 特异性剪接因子

<400> MDYKDDDDK gsqrgrgggs gnfmgrrgnf ggggnfgrg gnfggrggyg ggggsrgsy
 gggdgyngf ggdgnyggg pgyssrggyg gggpygnqg ggygggggyd gyneggnfgg gnygggnyn
 dfgnysgqqq snygpmkgs fgrrssgsy ggygsgggs ggygsrrf PGILPPKKRKRKVS RSRLLDFR
 NNRYPNLQLR EIAGHIMEFS QDQHGSRFIE LKLERATPAE RQLVFNEILQ AAYQLMVDVF GCRVIQKFFE
 FGSLEQKLAL AERIRGHVLS LALQMYGCRV IQKALEFIPS DQQNEMVREL DGHVLCVKD QNGNHVVQKC
 IECVQPQSLQ FIIDAFKGQV FALSTHPYGC RVIQRILEHC LPDQTLPILE ELHQHTEQLV QDQYGSYVIE
 HVLEHGRPED KSKIVAEIRG NVLVLSQHKF ANNVVQKCVT HASRTERAVL IDEVCTMNDG PHSALYTMK
 DQYASYVVEK MIDVAEPGQR KIVMHKIRPH IATLRKYTYG KHILAKLEKY Y 532

<210> 2

<211> 480

<212> RNA

<213> 特异性剪接因子

<400> MDYKDDDDK srrrrsrs rsrshsrsrg rryrsrsrs rgrrrsasp rrsrsislr
 srsaslrrsr sgsikgsryf qspsrsrsrs rsisrprssr sksrspspkr srspgsprr saspermd
 PGILPPKKRKRKVS RSRLLDFR NNRYPNLQLR EIAGHIMEFS QDQHGCRFIQ LKLERATPAE
 RQLVFNEILQ AAYQLMVDVF GSYVIEKFFE FGSLEQKLAL AERIRGHVLS LALQMYGNRV IQKALEFIPS
 DQQNEMVREL DGHVLCVKD QNGNHVVQKC IECVQPQSLQ FIIDAFKGQV FALSTHPYGC RVIQRILEHC
 LPDQTLPILE ELHQHTEQLV QDQYGSYVIE HVLEHGRPED KSKIVAEIRG NVLVLSQHKF ACNVVQKCVT
 HASRTERAVL IDEVCTMNDG PHSALYTMK DQYACYVVQK MIDVAEPGQR KIVMHKIRPH IATLRKYTYG
 KHILAKLEKY Y 480

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<230>PCR 引物

<400> CACCTCGAGGGATCACAGAGAGGTCGTGGAG 31

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<230>PCR 引物

<400> CACGGATCCCGAACCTTCTGCTACCATATCCACC 34

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<230>PCR 引物

<400> CAAGACCAGCATGGGtctTACttcattGagCTGAAACTGGAGCGT 45

<210> 6

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<230>PCR 引物

<400> AAGGACCAGTATGCCTCctatgtggtcGagAAGATGATTGACGTG 45

<210> 7

- <211> 29
<212> DNA
<213> 人工合成
- <220>
<230>PCR 引物
- <400> CACCTCGAGAGCCGGCGAAGAAGAAGCAG 29
- <210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工合成
- <220>
<230>PCR 引物
- <400> CACGGATCCCGTCCATTCTTTCAGGACTTG 30
- <210> 9
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工合成
- <220>
<230>PCR 引物
- <400> CAAGACCAGCATGGGtGtagattcattcagCTGAAACTGGAGCGT 45
- <210> 10
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工合成
- <220>
<230>PCR 引物
- <400> AAGGACCAGTATGCCTGcCGtgtggtccagAAGATGATTGACGTG 45

- <210> 11
- <211> 532
- <212> DNA
- <213> 特异性剪接因子

<400> MDYKDDDDK gsqrgrgggs gnfmgrrgnf ggggnfgrg gnfggrggyg ggggsrgsy
gggdggyngf ggdggnnygg pgysrrggyg gggpgygnqg ggygggggyd gyneggnfgg gnygggnyn
dfgnysgqqq snygpmkggs fgrrssgsy ggygsgggs ggygsrrf PGILPPKKRKVSR GRSRLLEDFR
NNRYPNLQLR EIAGHIMEFS QDQHGSRFIQ LKLERATPAE RQLVFNEILQ AAYQLMVDVF GNYVIQKFFE
FGSLEQKLAL AERIRGHVLS LALQMYGSRV IEKALEFIPS DQQNEMVREL DGHVLKCVKD QNGNHVVQKC
IECVQPQLQ FIIDAFKGQV FALSTHPYGC RVIQRILEHC LPDQTLPILE ELHQHTEQLV QDQYGNVVIQ
HVLEHGRPED KSKIVAEIRG NVLVLSQHKF ASNVVEKCVT HASRTERAVL IDEVCTMNDG PHSALYTMMK
DQYANYVVQK MIDVAEPGQR KIVMHKIRPH IATLRKYTYG KHILAKLEKY Y 532

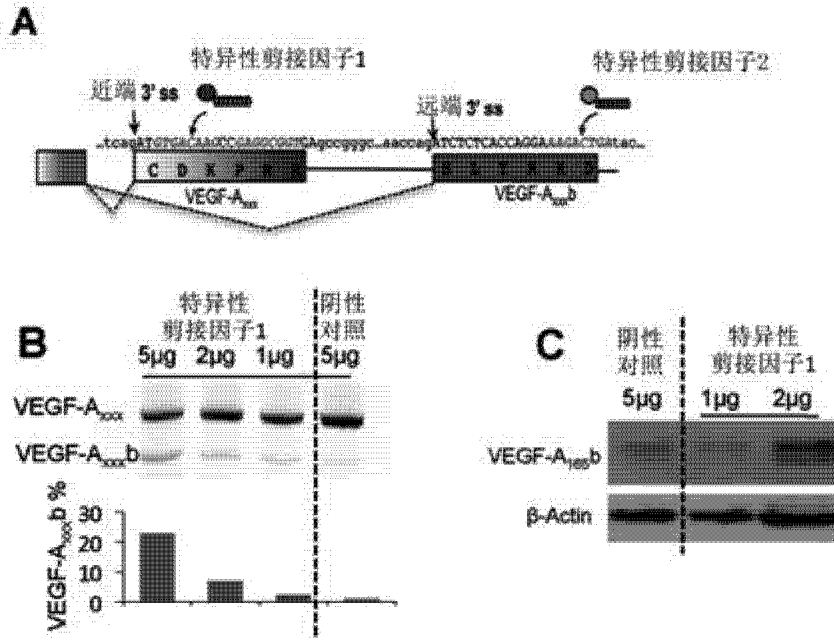


图 1

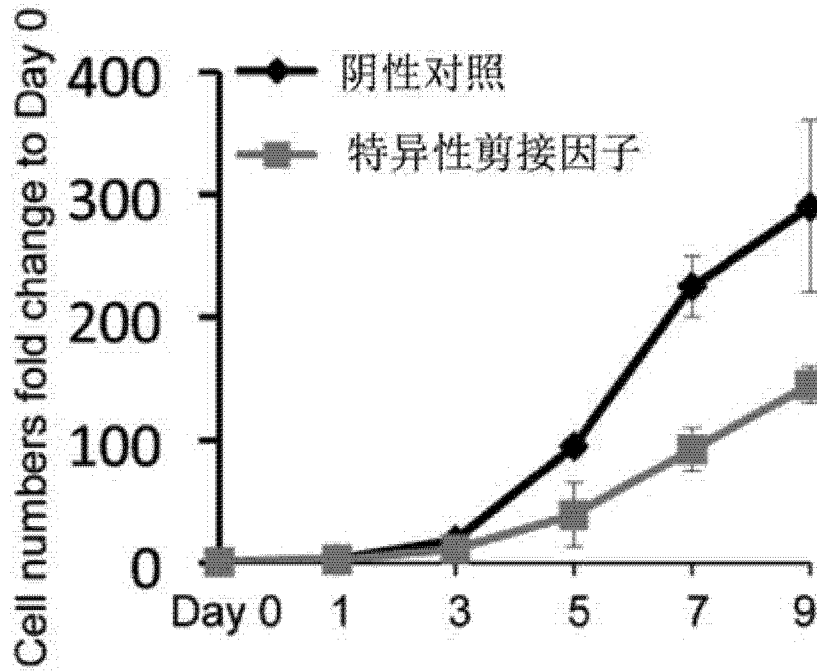


图 2

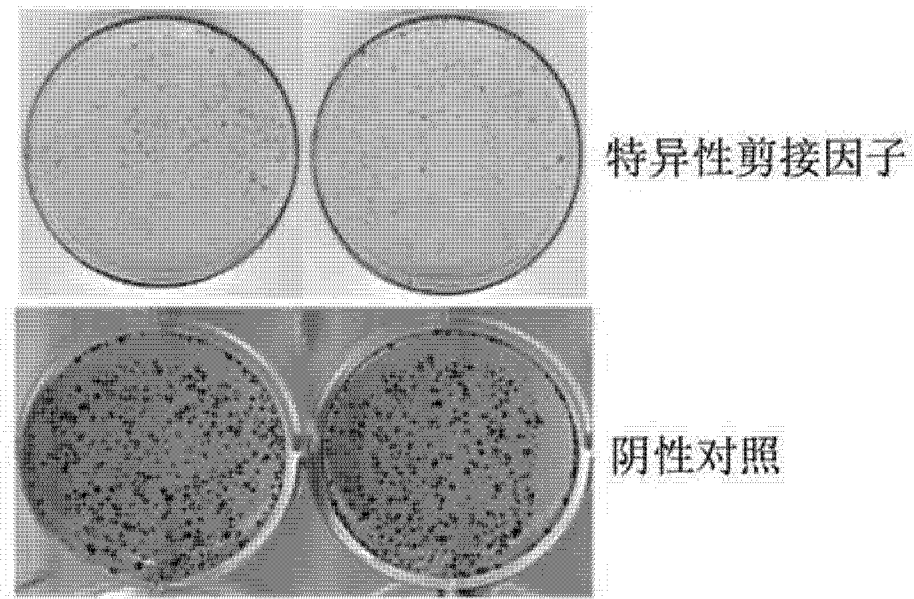


图 3

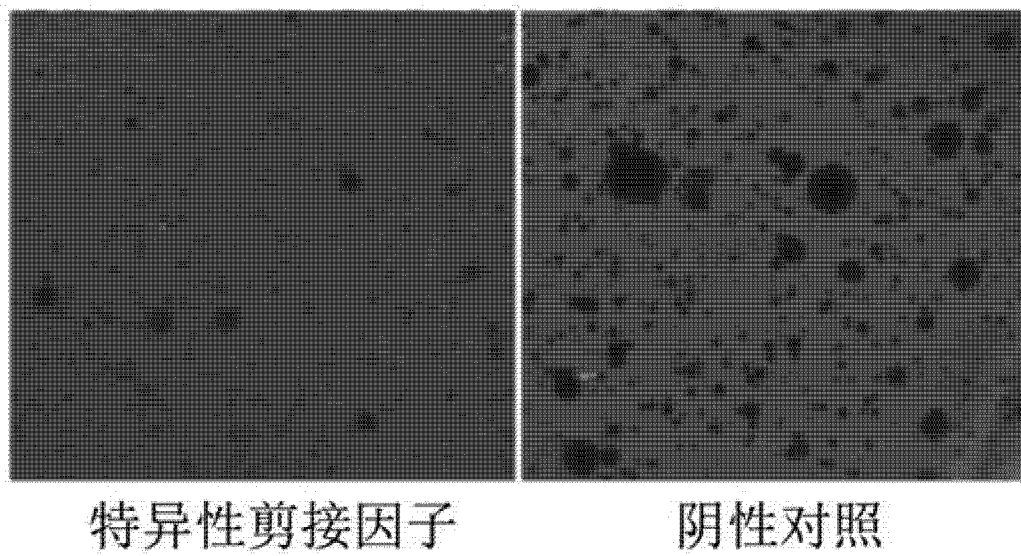


图 4

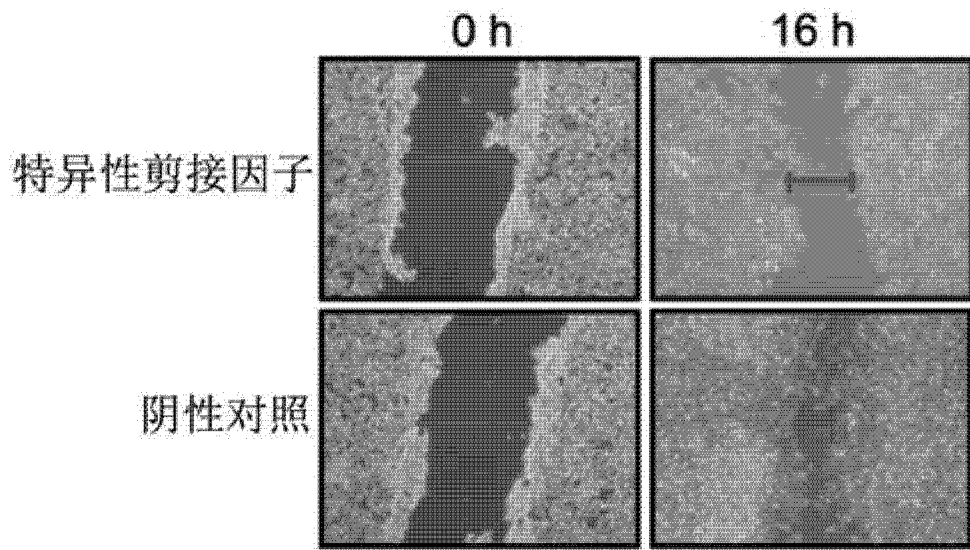


图 5

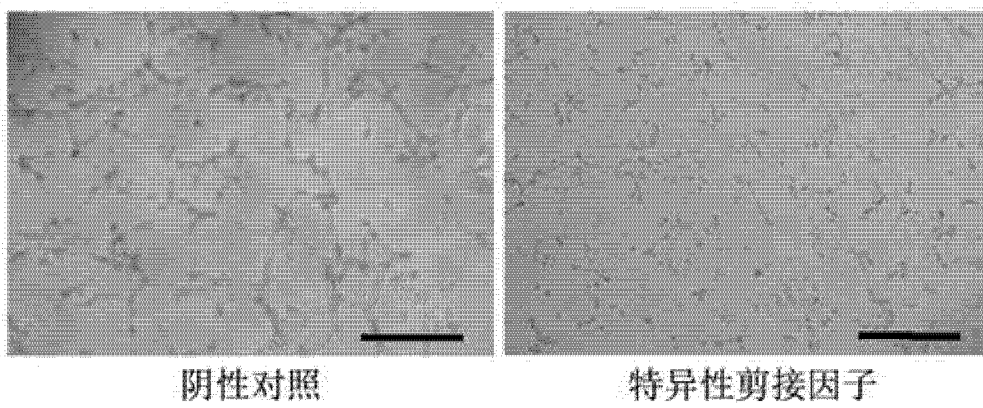


图 6

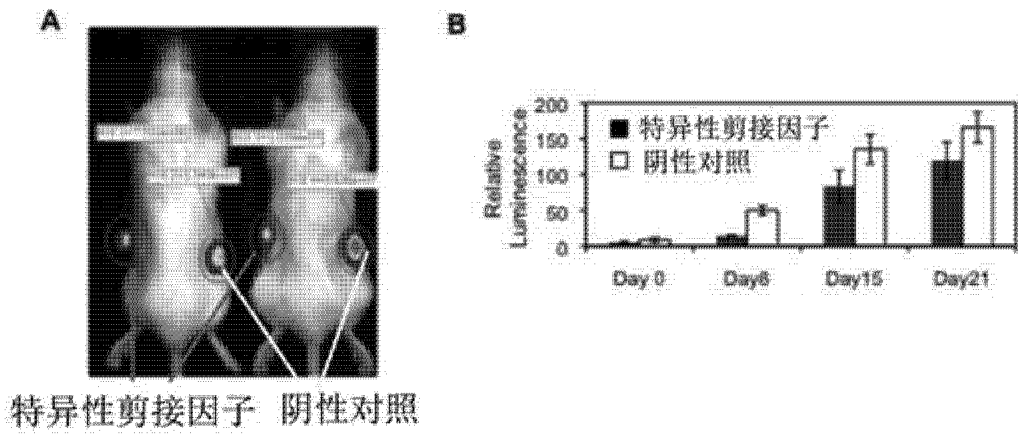


图 7