



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115851725 B

(45) 授权公告日 2024.06.11

(21) 申请号 202211334013.3

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.28

A61P 25/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115851725 A

(56) 对比文件

CN 112055749 A, 2020.12.08

US 2022031730 A1, 2022.02.03

(43) 申请公布日 2023.03.28

Jiang Ping等.FUBP1 promotes

(73) 专利权人 珠海市人民医院
地址 519000 广东省珠海市香洲区康宁路
79号

neuroblastoma proliferation via enhancing glycolysis—a new possible marker of malignancy for neuroblastoma. J Exp Clin Cancer Res. 2019, 第38卷(第1期), 摘要, 第3页左栏第2段, 图2-3, 第5页右栏第2段.

(72) 发明人 黄茂 尹浩帆 黄志坚

洪杨; 尚超; 薛一雪; 刘云会. FUBP1与c-myc在脑胶质瘤中的表达及调控关系. 现代肿瘤医学. 2013, (第07期), 第1444页第1.2.2节.

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

专利代理师 姜磊

审查员 王小玉

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

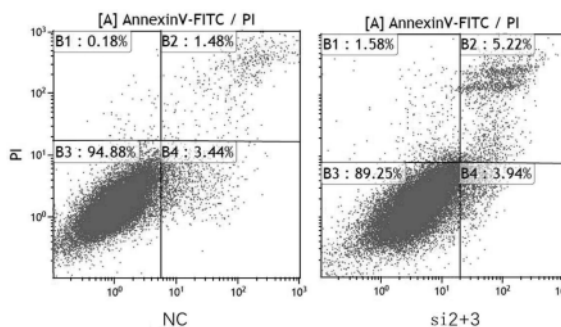
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA及其
应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,公开了一种抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA及其应用。所述siRNA,包括siRNA-2和/或siRNA-3;所述siRNA-2中正义链与反义链的核苷酸序列如SEQ ID NO:3-4所示;所述siRNA-3中正义链与反义链的核苷酸序列如SEQ ID NO:5-6所示。所述siRNA具备干扰和抑制解螺旋酶V基因表达的性能,能够抑制至少如神经母细胞瘤等神经源性肿瘤细胞的增值,并促进其细胞凋亡。所述siRNA可应用于制备解螺旋酶V基因表达抑制剂、促进肿瘤细胞凋亡药物和抑制肿瘤细胞克隆形成药物。



1. 一种抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA在制备促进肿瘤细胞凋亡的药物中的应用,其特征在于,所述siRNA由siRNA-2和siRNA-3组成;

所述siRNA-2中正义链序列如SEQ ID NO:3所示,反义链为与SEQ ID NO:3反向互补的序列;

所述siRNA-3中正义链序列如SEQ ID NO:5所示,反义链为与SEQ ID NO:5反向互补的序列;

所述肿瘤为神经母细胞瘤。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述siRNA-2或siRNA-3中的至少一种具有化学修饰。

3. 一种抑制解螺旋酶V基因表达的干扰剂,其特征在于,包括权利要求1或2中所述的siRNA。

4. 权利要求1或2中所述的siRNA在制备解螺旋酶V基因表达的抑制剂中的应用。

5. 权利要求1或2中所述的siRNA在制备抗肿瘤的药物治疗中的应用;所述肿瘤为神经母细胞瘤。

6. 权利要求1或2中所述的siRNA在制备抑制肿瘤细胞克隆形成的药物中的应用;所述肿瘤为神经母细胞瘤。

7. 一种抗肿瘤的药物治疗组合物,包括权利要求1或2中所述的siRNA,还包括药学上可接受的辅料;所述肿瘤为神经母细胞瘤。

8. 一种含有权利要求1或2中所述的siRNA的重组载体。

一种抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,尤其涉及一种抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA及其应用。

背景技术

[0002] 神经母细胞瘤(NB)属于神经源性肿瘤的一种,起源于交感神经系统的神经脊,是儿童最常见的恶性颅外实体瘤,占儿童恶性肿瘤发生率的10%,儿童肿瘤死亡人数的15%。根据INRG(International Neuroblastoma Risk Group)分类系统,NB可分为高危、中危、低危、极低危组;其中极低危组,如部分M-S(INRG分期)/IV-S期(INSS分期)患者,无需治疗肿瘤可自我消退。而对于高危组,即使给予高强的综合治疗,包括化疗、手术、放疗、自体干细胞移植及免疫治疗,高危组神经母细胞瘤(NB)的2年生存率也仅为19%。由此可见,神经母细胞瘤(NB)是一类临床和生物学异质性非常显著的疾病,临床肿瘤外科工作者一直致力于对其防治的研究,希望找到NB精确有效的治疗靶点。NB在组织学分类上,又可分为ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma intermixed, ganglioneuroblastoma nodular和neuroblastoma等四类。

[0003] 核酸干扰(RNA干扰、RNAi)是一种序列特异性的RNA降解过程,其理论上可为任何基因的敲低或者沉默提供了一个相对容易和直接的方式。在自然发生的RNA干扰中,双链RNA会经核糖核酸酶III/解旋酶-Dicer酶的作用而裂解为小干扰RNA(siRNA)分子,这种小siRNA分子是一种具有19-23个核苷酸(nt)的双链RNA(dsRNA),其在3'末端有两个核苷酸突出。这些siRNA整合到名为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的多组分核糖核酸酶中,siRNA的一条链仍然连着RISC,这条链能指引复合物到达与RISC中的引导单链siRNA(ss-siRNA)序列互补的同源RNA。这种siRNA引导的核酸内切酶能消化同源的RNA,从而使其失活。有研究已经揭示,化学合成的21-25个核苷酸的siRNA在哺乳动物细胞中显示出非常明显的RNAi效应,siRNA杂交(在末端或者中间)的热力学稳定性对决定分子的功能起到重要作用,核酸干扰技术具有广阔的应用前景。

[0004] 因此,采用RNAi技术对癌症相关基因的表达进行干扰,从而对肿瘤细胞进行抑制,是一种极具潜力的肿瘤治疗策略,本发明希望就神经母细胞瘤基因表达情况展开研究,开发出一种能够抑制和治疗上述肿瘤中至少一种的siRNA干扰试剂。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出一种抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA及其应用,所述siRNA具备干扰和抑制解螺旋酶V基因表达的作用,能够抑制至少如神经母细胞瘤等神经源性肿瘤细胞的增值,并促进如神经母细胞瘤等神经源性肿瘤细胞的凋亡。

[0006] 在前期研究中已发现,解螺旋酶V(FUBP1)基因在神经母细胞瘤(NB)肿瘤组织与细胞株中高度表达,而在通过对FUBP1进行抑制后可以抑制神经母细胞瘤细胞的增殖,促进

其凋亡,两者具有高度相关性。

[0007] 由此,本发明针对靶向解螺旋酶V基因的siRNA进行筛选,从众多候选siRNA序列挑选出具有RNAi活性的siRNA。通过在哺乳细胞培养物中测试以确定候选siRNA序列是否发生预期的干扰作用,再通过进一步的筛选和优化,最终得到了最佳的两个小分子干扰片段siRNA-2和siRNA-3。

[0008] 本发明提供一种抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA,包括siRNA-2和/或siRNA-3;

[0009] 所述siRNA-2中正义链与反义链的核苷酸序列如SEQ ID NO:3-4所示;

[0010] 所述siRNA-3中正义链与反义链的核苷酸序列如SEQ ID NO:5-6所示。

[0011] siRNA-2的核苷酸序列为:

[0012] 正义链:5' -UCAACCAGAUGCUAAGAAA-3' (SEQ ID NO:3);

[0013] 反义链:5' -AGUUGGUCUACGAUUCUUU-3' (SEQ ID NO:4)。

[0014] siRNA-3的核苷酸序列为:

[0015] 正义链:5' -CAACUACAACUCAACUAA-3' (SEQ ID NO:5);

[0016] 反义链:5' -GUUGAUGUUGAGUUUGAUU-3' (SEQ ID NO:6)。

[0017] 由上述序列可知,干扰片段siRNA-2和siRNA-3均为具有19个核苷酸(nt)的小分子双链RNA(dsRNA)。在某些特定方面,所述siRNA可缺乏化学修饰或具备化学修饰。

[0018] 进一步的,所述siRNA-2或siRNA-3中的至少一种具有化学修饰。采用化学修饰的方法可使siRNA的稳定性增加,提高其在体内抵抗核糖酶的水解的能力,降低免疫刺激反应,并延长siRNA干扰基因表达下调的作用时间,使其作用具有高效性、特异性。

[0019] 所述化学修饰可位于引导链和/或过客链上、位于3'或5'端的一个或多个核苷酸上和/或位于构成内部骨架的一个或多个核苷酸上。

[0020] 更进一步的,当所述化学修饰发生在核苷酸的核糖、碱基或磷酸上的至少一种时,所述化学修饰包括但不限于:用2'-O-甲基RNA(2' OMe)、2'-O'-甲氧基乙基(2' MOE)、2'-氟(2F)或2'-氟-β-阿拉伯糖核苷酸(FANA)基团中的其中至少一种对核糖的2'-OH基团取代至少一次,将2'-氧烷基转化成氨基乙基-、胍基乙基-、氰基乙基-或烯丙基,用硫代磷酸酯代替磷酸二酯基团,将siRNA的一个或多个核苷酸的烷基化或硫醇化,用脱氧核糖核苷酸取代核糖核苷酸,或用锁核酸(LNA)取代核苷酸。

[0021] 本发明的试验结果表明,如siRNA-2、siRNA-3等双链siRNA均能对解螺旋酶V基因的表达起到干扰和抑制的作用,使得解螺旋酶V基因表达量下降。其中每条双链siRNA只能做到对解螺旋酶V基因的敲低状态,但出乎预料的是,siRNA-2与siRNA-3所组成的干扰片段复合物却能达到对解螺旋酶V基因近乎完全敲除的状态,表明所述siRNA-2与siRNA-3所组成的复合物所产生的干扰效果相比于siRNA-2、siRNA-3等单条双链siRNA更为理想,更具备实验室和临床应用价值。

[0022] 基于此,本发明提供了一种抑制解螺旋酶V基因表达的干扰剂,包括所述siRNA。

[0023] 进一步的,所述siRNA为siRNA-2和siRNA-3。siRNA的独特优势使其可采用多个siRNA双链联合来靶向疾病诱导基因,所述干扰剂中通过将siRNA-2和siRNA-3组成复合物,大大提高了对解螺旋酶V基因敲除的能力,提高了其功效。

[0024] 本发明还提供了所述siRNA在制备解螺旋酶V基因表达的抑制剂中的应用。在现有报道中,尚未公开有解螺旋酶V基因的表达抑制物,因此所述siRNA可用于制备解螺旋酶

V 基因表达抑制剂,从而在生物和医学相关研究和治疗中得到重要应用。

[0025] 本发明还提供了所述siRNA在制备抗肿瘤的藥物中的应用。

[0026] 前期实验证实,解螺旋酶 V 基因 (FUBP1) 是另一个独立于N-Myc的重要癌基因,癌症患者中解螺旋酶 V 基因的表达上调与不良的临床生存率显著相关。解螺旋酶V还会在包括肝癌,鳞状细胞癌,肾细胞癌,乳腺癌,前列腺癌,膀胱癌和非小肺癌等在内的各种肿瘤组织和细胞系中调节基因表达,促进上述肿瘤细胞的增殖,细胞周期,侵袭和肿瘤细胞转移。

[0027] 同时,解螺旋酶 V 基因 (FUBP1) 还作为调控HIF1 α 表达的转录因子,可以通过增强肿瘤细胞中的糖酵解和ATP生成来增殖和抑制凋亡。基于所述siRNA具有良好抑制解螺旋酶 V 基因表达的功能,因此所述siRNA能够产生抗肿瘤效应可被应用于抗肿瘤药物的制备。

[0028] 进一步的,所述肿瘤为神经源性肿瘤。

[0029] 更进一步的,所述神经源性肿瘤为神经母细胞瘤。

[0030] 本发明将所述siRNA的抗肿瘤效果在人的肿瘤细胞(人神经母细胞瘤细胞)中进行验证,结果表明所述siRNA可使人神经母细胞瘤细胞的增殖明显得到抑制,并促进了肿瘤细胞的凋亡。

[0031] 在临床使用中,可以将本发明所述siRNA溶于不含RNA酶的无菌水中,轻轻混匀后,再与小分子干扰RNA转染试剂RNAi-Mate混合,在室温下温育30分钟,以形成复合物,再对生物体进行给药。

[0032] 本发明还提供了所述siRNA在制备促进肿瘤细胞凋亡的藥物中的应用。本发明通过实验进行验证,结果表明在加入所述siRNA后,肿瘤细胞的凋亡数量明显增多。

[0033] 本发明还提供了所述siRNA在抑制肿瘤细胞克隆形成的藥物中的应用。本发明通过细胞平板克隆实验进行验证,结果表明在加入所述siRNA后,肿瘤细胞增殖明显被抑制。

[0034] 本发明还提供了一种抗肿瘤的藥物组合物,包括所述siRNA,还包括药学上可接受的辅料。

[0035] 进一步的,所述药学上可接受的辅料包括溶剂、填充剂、润滑剂、崩解剂、缓冲剂、助溶剂、抗氧剂、抑菌剂、乳化剂、粘合剂或助悬剂中的至少一种。

[0036] 更进一步的,所述缓冲剂为酸性pH的缓冲溶液。所述酸性pH的缓冲溶液特别是柠檬酸盐或组氨酸缓冲液并且添加或不添加有无机或有机盐,所述盐选自阳离子为多胺的盐,所述多胺特别是选自精胺,亚精胺或腐胺,或者所述盐选自阳离子为金属阳离子的盐,特别是选自锌,钴,铜,锰,钙,镁或铁的盐,尤其是锰,锌,镁的单独或两种或三种组合的盐。

[0037] 本发明还提供了一种含有所述siRNA的重组载体。所述重组载体转染肿瘤细胞后,可抑制肿瘤细胞中解螺旋酶 V 基因中的高表达,从而抑制肿瘤细胞生长。

[0038] 所述重组载体的构建方法,具体包括以下步骤:将特异性地抑制解螺旋酶 V 基因表达的siRNA序列设计成能够插入载体中的发夹siRNA插入片段,然后与pGPU6/GFP/Neo质粒载体进行连接,得到用于抗肿瘤生物学行为的干扰小分子片段。

[0039] 相对于现有技术,本发明的有益效果如下:

[0040] (1) 本发明设计了一种干扰解螺旋酶 V 基因表达的双链siRNA,包括siRNA-2和/或siRNA-3,其中siRNA-2与siRNA-3均具有一定的干扰效率,而siRNA-2与siRNA-3所组成的复合物的干扰效果更为理想,可有效降低细胞中解螺旋酶 V 基因的表达水平,为研究解螺旋

酶V基因的功能和信号转导通路提供了基础;

[0041] (2) 本发明的研究表明,通过RNA干扰沉默解螺旋酶V,可以明显抑制肿瘤形成、促进凋亡、抑制增殖、抑制细胞克隆形成、抑制细胞迁移和/或细胞侵袭,可用来制备预防和/或治疗肿瘤产品;

[0042] (3) 本发明所提供的siRNA能够特异性、高效地抑制解螺旋酶V基因的mRNA和蛋白表达,减少细胞增殖,增加细胞凋亡,降低细胞迁移和侵袭能力。将其应用于肿瘤发病机制研究和肿瘤治疗中,具有重要意义。

附图说明

[0043] 图1表示实施例4中经不同干扰片段处理后SK-N-BE2细胞中FUBP1的mRNA表达量;

[0044] 图2表示实施例4中经对照片段NC,或siRNA-2与siRNA-3所组成的复合物处理的SK-N-BE2细胞中mRNA表达含量;

[0045] 图3表示实施例4中经不同干扰片段处理后SK-N-BE2细胞中FUBP1的蛋白表达量;

[0046] 图4表示实施例4中经对照片段NC,或siRNA-2与siRNA-3所组成的复合物处理的SK-N-BE2细胞中FUBP1的蛋白表达含量;

[0047] 图5表示实施例4中经对照片段NC,或siRNA-2与siRNA-3所组成的复合物处理的SK-N-BE2细胞的平板克隆实验结果;

[0048] 图6表示实施例4中经对照片段NC,或siRNA-2与siRNA-3所组成复合物处理的SK-N-BE2细胞经流式细胞仪检测的细胞凋亡结果。

具体实施方式

[0049] 为了让本领域技术人员更加清楚明白本发明所述技术方案,现列举以下实施例进行说明。需要指出的是,以下实施例仅为本发明的优选实施例,对本发明要求的保护范围不构成限制作用,任何未违背本发明的精神实质和原理下所做出的修改、替代、组合,均包含在本发明的保护范围内。

[0050] 以下实施例中所用的原料、试剂或装置如无特殊说明,均可从常规商业途径得到,或者可以通过现有已知方法得到。

[0051] 实施例1:siRNA的设计与合成

[0052] 本发明针对靶向解螺旋酶V基因的siRNA进行筛选和设计,得到如表1所示的三条平末端siRNA双链序列,分别命名为siRNA-1(si1)、siRNA-2(si2)和siRNA-3(si3),siRNA序列设计完成后送广州锐博生物技术有限公司进行合成。

[0053] 表1siRNA双链序列

序列	正义链	反义链
[0054] siRNA-1	5' , -GCAGGAUUAGUCAUUGGAA-3'	5' , -CGUCCUAAUCAGUAACCUU-3'
siRNA-2	5' , -UCAACCAGAUGC UAAGAAA-3'	5' , -AGUUGGUCUACGAUUCUUU-3'
siRNA-3	5' , -CAACUACAACUCAAAACUAA-3'	5' , -GUUGAUGUUGAGUUUGAUU-3'

[0055] 在上述核苷酸序列中,siRNA-1(si1)中正义链和反义链序列分别表示为SEQ ID

NO:1-2, siRNA-2(si2) 中正义链和反义链序列分别表示为SEQ ID NO:3-4, siRNA-3(si3) 中正义链和反义链序列分别表示为SEQ ID NO:5-6。

[0056] siRNA的化学合成方法是用乙腈将5种核苷酸单体(A,U,C,G,dT)配制成0.2mol/L溶液,分别将5种核苷酸单体、乙腈、二氯乙酸、四唑安装到合成仪相应位置,其中核苷酸单体、乙腈、四唑应加入适当分子筛,其具体合成步骤为:

[0057] (1) 利用二氯乙酸处理结合于固相载体的核苷酸或寡核苷酸,脱去其5' 羟基官能团上的二甲氧基三苯甲基(DMT)保护基团,露出反应性的5' 端;

[0058] (2) 偶联反应:由四唑催化完成,形成3' →5' 磷酸酯链;

[0059] (3) 封闭反应:将未反应的5' 羟基在N2甲基咪唑催化下由乙酸酐来完成。

[0060] 采用RNA合成仪按照设计好的程序合成出所需的siRNA。

[0061] 实施例2:siRNA的化学修饰

[0062] 对于实施例1所合成的siRNA,可采用化学修饰的方法使siRNA的稳定性增加,提高其在体内抵抗核糖酶的水解的能力,降低免疫刺激反应,延长siRNA干扰基因表达下调的作用时间,使其作用具有高效性、特异性。

[0063] 化学修饰的位点可位于引导链和/或过客链上、位于3' 或5' 端的一个或多个核苷酸上和/或位于构成内部骨架的一个或多个核苷酸上。

[0064] 当化学修饰发生在核苷酸的核糖、碱基或磷酸上的至少一种时,该化学修饰包括但不限于:用2' -O-甲基RNA(2' OMe)、2' -O'-甲氧基乙基(2' MOE)、2' -氟(2F)或2' -氟-β-阿拉伯糖核苷酸(FANA)基团中的其中至少一种对核糖的2' -OH基团取代至少一次,将2' -氧烷基转化成氨基乙基-、胍基乙基-、氰基乙基-或烯丙基,用硫代磷酸酯代替磷酸二酯基团,将siRNA的一个或多个核苷酸的烷基化或硫醇化,用脱氧核糖核苷酸取代核糖核苷酸,或用锁核酸(LNA)取代核苷酸。

[0065] 实施例3:siRNA转染细胞

[0066] 由于目前还不能很有把握的预测在靶向疾病基因的mRNA序列的候选siRNA序列中,哪一个才是最具RNAi活性的siRNA,因此需要在哺乳细胞培养物中测试以确定是否发生预期的干扰作用,通常的检测方法为:

[0067] 将哺乳细胞传代到6孔板中,待细胞长至约50%的密度即进行干扰实验。每孔取10 μL转染试剂Hiperfect(赛默飞公司)加入至100μL OPTI-MEN中,再取5μL实施例1所合成的siRNA(终浓度为100nM)加入至100μL OPTI-MEN中,分别静置5min后,将两者混匀,再混合静置15min。均匀地将所得混合液滴加入6孔板培养皿中(总培养液为2mL),继续培养48小时,提取总RNA,接着用荧光定量PCR和western blot(蛋白免疫印迹)的方法分别验证靶标mRNA和蛋白水平。

[0068] 提取总RNA

[0069] 收集细胞株至1.5mL RNA-free离心管中,加入1mL Trizol,充分混匀,室温静置5min。加入0.2mL氯仿(三氯甲烷),剧烈振荡15s,室温静置2min。4°C离心,12000r/min×15min,吸取上清(注意不要吸到下层)至另一个1.5mL离心管中。加入与上清等量的异丙醇,轻轻混匀,室温静置10min。4°C离心,12000r/min×10min,弃上清。加入1mL预冷的75%乙醇(用DEPC水配),轻轻洗涤沉淀,4°C离心,7500r/min×5min,弃上清。晾干,溶于20μL DEPC水中(65°C促溶10-15min)。紫外分光光度仪测定提取RNA的浓度(单位:μg/μL)和纯度,当

OD260/OD280在1.8-2.0之间,表明提取的RNA纯度好。

[0070] 将总RNA逆转录得到cDNA

[0071] 在提取上述细胞中的总RNA后,吸取2 μ L上述提取的总RNA,测定RNA浓度(Nanodrop分光光度计),然后按照表2中的反应体系进行逆转录(试剂PrimeScript® RT reagent Kit),得到cDNA。

[0072] 表2逆转录反应体系

试剂	剂量
总RNA	500ng
5 \times PrimeScript Buffer	2 μ L
H ₂ O	补至总体积10 μ L

[0074] 其中反转录条件为:水浴37 $^{\circ}$ C15min,85 $^{\circ}$ C5s,产物于-80 $^{\circ}$ C保存。

[0075] 实时荧光定量PCR

[0076] 以上述逆转录所得到的cDNA为模板,自行设计PCR引物,对解螺旋酶V基因扩增,扩增产物片段产物为70-150bp,其中扩增解螺旋酶V基因和内参基因 β -actin的引物序列如表3所示。

[0077] 表3荧光定量PCR引物序列

基因	上游引物序列	下游引物序列
FUBP1	5' -GCGTCTAAAGGTTCCGCGA-3'	5' -ACCAGCAATGCCATAGAGGTG-3'
β -actin	5' -GCACTCTTCCAGCTTCCTT-3'	5' -GTTGGCGTACAGGTCTTTGC-3'

[0079] 在上述引物序列中,将扩增解螺旋酶V基因(FUBP1)的上游引物和下游引物序列分别表示为SEQ ID NO:7-8,将扩增内参基因 β -actin的上游引物和下游引物序列分别表示为SEQ ID NO:9-10。

[0080] 在引物设计完成后,按照如表4所示的反应体系进行实时定量PCR检测。

[0081] 表4荧光定量PCR反应体系

试剂	剂量
2 \times SYBR® Premix Ex	10 μ L
PCR 上游引物(10 μ mol/L)	0.4 μ L
PCR 下游引物(10 μ mol/L)	0.4 μ L
cDNA 模板	2 μ L
RNase Free H ₂ O	7.2 μ L
总体积	20 μ L

[0084] 设置荧光定量PCR的反应条件为:变性(95 $^{\circ}$ C30s,1cycle);退火/延伸(95 $^{\circ}$ C5s,60 $^{\circ}$ C30s,40cycles)。分析结果时,以对照组样本作为校正样本(Calibrator),其余标本根据校正样本的比率进行比较。

[0085] 蛋白免疫印迹(western blot)检测

[0086] 1. Western Blot相关溶液配制:

[0087] ①2×样品裂解缓冲液:将10% SDS 4mL,甘油2mL,0.5mol/L Tris-HCl (pH6.8) 2.5ml,去离子水0.5ml混匀,得到总体积9mL裂解缓冲液,室温保存备用。

[0088] ②10×蛋白变性缓冲液:将0.4%溴酚蓝1mL和β-巯基乙醇1mL混匀,得到2mL变性缓冲液,室温保存备用。

[0089] ③SDS电泳缓冲液:取3.02g Tris、1.0g SDS和18.8g甘氨酸,加入900mL双蒸水搅拌至完全溶解,然后定容至1L,室温保存。

[0090] ④电转缓冲液 (pH=8.3):将甘氨酸14.41g和Tris 3.03g溶于700mL双蒸水中,搅拌至完全溶解,然后加入甲醇200mL,定容至1L,4℃保存。

[0091] ⑤TBST缓冲液:将2.42g Tris和8g NaCl加入至900mL双蒸水中,搅拌至完全溶解,调pH值至7.6,定容至1L,室温保存。

[0092] ⑥封闭液:7-10%实验用脱脂奶粉,溶于TBST缓冲液中。

[0093] 2. Western Blot具体操作步骤:

[0094] (1) 取接种有细胞的6孔板,待细胞处于对数生长期时,用磷酸盐缓冲溶液 (PBS溶液) 或生理盐水清洗3次后,每孔加入100μL细胞裂解液 (含1%的PMSF及磷酸酶抑制剂),然后用细胞刮刀将裂解液收集到0.5mL的EP管中,100℃下煮30min;

[0095] (2) 用BCA试剂盒 (凯基公司) 对收集的裂解液进行蛋白定量;

[0096] (3) 紫外分光光度仪检测提取蛋白的浓度,并按照蛋白体积:SDS-PAGE蛋白上样缓冲液体积=4:1的比例,加入蛋白上样缓冲液 (10×;β-巯基乙醇,0.4%溴酚蓝),100℃煮10min,分装,于-80℃冰箱保存备用;

[0097] (4) 配聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE凝胶):按不同目的蛋白分子量大小制备对应浓度的SDS-PAGE凝胶。将用于配胶的玻璃板洗净干燥后,对齐后放入夹中卡紧,垂直卡在架子上,准备灌胶 (用力夹紧,防止漏胶)。先加分离胶,先快后慢,防止气泡产生,一般加至距上端1.5cm处时加去离子水密封,静置40min后弃去离子水,加浓缩胶至顶端,插入梳子,准备上样。每孔加入样品50μg,每孔上样约15-20μL,80V电泳浓缩30min之后,待溴酚蓝进入分离胶后,将电压调至120V,当溴酚蓝接近分离胶底部时停止电泳、

[0098] (5) 转膜:先将合适大小的PVDF膜至于甲醇中活化10min,在再把PVDF膜覆盖在电泳后的凝胶上,PVDF膜和凝胶的非接触面均覆盖滤纸和海绵,置于电转槽中电转,恒流电转300mA×180min。将凝胶上的蛋白转移至浸泡过甲醇的PVDF膜 (保持低温),根据分子量大小可以适当增加或者缩小电转时间;

[0099] (6) 电转后,取出PVDF膜,放入现配制的封闭液 (含7-10%脱脂牛奶的TBST缓冲液) 中,室温封闭1h,注意膜正面向上;

[0100] (7) 孵一抗:封闭结束后,取出,放入含有适量1×TBST中洗膜5min×3次;配制含5%脱脂奶粉1×TBST稀释的相应一抗;将洗好的膜放在平板上,膜的正面向上,稀释好的抗体均匀滴加在膜上;室温孵育约2h,再放入4℃过夜。

[0101] (8) 孵二抗:取出PVDF膜,1×TBST液洗3遍,每次10min,边洗边摇。配含5%脱脂奶粉的1×TBST稀释的相应二抗;将稀释好的二抗均匀滴加在膜上,室温孵育1h或4℃孵育4h;

[0102] (9) TBST洗膜3次后,按化学发光试剂盒说明书将ECL发光液的A、B液等比例混合 (使用前配制);将洗好的膜用滤纸贴角吸干;将膜正面向上放在塑料薄膜上,在膜上滴加A、

B混合液;凝胶成像系统拍照、保存,进行结果分析。

[0103] 实施例4:肿瘤细胞验证试验

[0104] 实验细胞材料:SK-N-BE2细胞(人神经母细胞瘤细胞,采用DMEM培养基和10%胎牛血清培养),细胞在37°C、5%的二氧化碳浓度条件下培养。

[0105] 实时荧光定量PCR检测

[0106] 将上述人神经母细胞瘤细胞SK-N-BE2传代到6孔板中,培养至60%密度,按实施例3中siRNA转染细胞的方法,将干扰解螺旋酶V基因(FUBP1)表达的siRNA(siRNA-1、siRNA-2和siRNA-3)和对照片段NC(正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUGUCACGUTT-3'(SEQ ID NO:11);反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(SEQ ID NO:12))加入SK-N-BE2细胞中,继续培养48h后提取mRNA,采用实时荧光定量PCR检测方法检测SK-N-BE2细胞内解螺旋酶V基因的mRNA的表达含量。

[0107] 如图1所示,相比于对照片段NC和siRNA-1(si1),单条干扰片段siRNA-2(si2)与siRNA-3(si3)均起到干扰和敲除效果,使得解螺旋酶V基因的mRNA表达量下降,即为有效片段。而从图2可知,在同时加入两个有效片段siRNA-2(si2)和siRNA-3(si3)(即为si2+3)时,两者所组成的复合物具备更好干扰能力,可使解螺旋酶V基因mRNA的表达近乎完全敲除。

[0108] 蛋白免疫印迹(western blot)检测

[0109] 将上述人神经母细胞瘤细胞SK-N-BE2传代到6孔板中,培养至60%密度,按实施例3中siRNA转染细胞的方法,将干扰解螺旋酶V基因(FUBP1)表达的siRNA(siRNA-1、siRNA-2和siRNA-3)和对照片段NC(正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUGUCACGUTT-3'(SEQ IDNO:11);反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(SEQ ID NO:12))加入SK-N-BE2细胞中,继续培养48h后收蛋白,采用蛋白免疫印迹(western blot)方法检测SK-N-BE2细胞内解螺旋酶V基因的蛋白表达含量。

[0110] 如图3所示,相比于对照片段NC和siRNA-1(si1),单条干扰片段siRNA-2(si2)与siRNA-3(si3)均起到干扰和敲除效果,使得解螺旋酶V基因的表达量下降,即为有效片段。而从图4可知,在同时加入两个有效片段siRNA-2(si2)和siRNA-3(si3)(即为si2+3)时,两者所组成的复合物具备更好干扰能力,可使解螺旋酶V基因的表达近乎完全敲除。

[0111] 细胞平板克隆实验

[0112] 细胞克隆形成率即细胞接种存活率,表示接种细胞后贴壁的细胞成活并形成克隆的数量。贴壁后的细胞不一定每个都能增殖和形成克隆,而形成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞,因此克隆形成率能够真实反映细胞群体依赖性和增殖能力。

[0113] 细胞平板克隆实验的具体实验步骤为:

[0114] (1)取对数生长期的各组细胞,分别用0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,并把细胞悬浮在10%胎牛血清的DMEM培养液中备用。

[0115] (2)将细胞悬液作梯度倍数稀释,每组细胞分别以每皿50个细胞的梯度密度分别接种含2mL 37°C预温培养液的皿中,并轻轻转动,使细胞分散均匀。置于37°C,5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养2-3周。

[0116] (3)经常观察,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用PBS小心浸洗2次。加4%多聚甲醛固定细胞5mL固定15分钟。然后去固定液,加适量结晶紫染色

10-30min,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。

[0117] (4)将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,用肉眼直接计数克隆,或在显微镜(低倍镜)计数大于10个细胞的克隆数。

[0118] 采用经对照片段NC,或siRNA-2(si2)和siRNA-3(si3)所组成的复合物处理过的SK-N-BE2细胞为材料,进行细胞平板克隆实验。实验结果如图5所示,相比于经对照片段NC处理过的SK-N-BE2细胞,采用siRNA-2(si2)和siRNA-3(si3)所组成的复合物所处理SK-N-BE2细胞的克隆形成率显著更低,表明在加入有效干扰片段(siRNA-2和siRNA-3所组成的复合物)之后,肿瘤细胞SK-N-BE2的增殖明显被抑制。

[0119] AnnexinV-FITC/PI双染流式细胞仪测细胞凋亡

[0120] AnnexinV是一种Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,其分子量为35至36KDa。在细胞凋亡时,细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)会翻转到膜外,细胞膜中的磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧成为细胞早期凋亡的一个标志,而AnnexinV与磷脂酰丝氨酸(PS)具有特异性的高亲和力。因此,利用流式细胞仪,以标记了FITC(异硫氰酸荧光素)的AnnexinV作为荧光探针可检测细胞的早期凋亡。碘化丙啶(Propidium Iodide,PI)是一种不能透过完整的细胞膜的核酸染料。当细胞处于凋亡晚期或已经死亡的状态下,细胞膜完整性被破坏,细胞膜通透性增强。PI能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此用PI染色可检测凋亡晚期的细胞或死细胞。用AnnexinV与PI对细胞进行双标记,就可以区分开处于不同凋亡时期的细胞。

[0121] 采用对照片段NC,或siRNA-2(si2)和siRNA-3(si3)所组成的复合物对SK-N-BE2

[0122] 细胞进行处理,待细胞处理结束后,用胰酶(不含EDTA)消化收集细胞;用PBS洗涤细胞三次,然后2000rpm离心5min收集10万至50万个细胞;按1:100的比例将5 μ L AnnexinV-FITC和5 μ L Propidium Iodide加到500 μ l的Binding Buffer中,然后用配制好的染液重悬细胞;室温、避光反应15min,并在1小时内上流式细胞仪进行检测。统计学处理统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS统计学软件进行分析,数据两两比较采用配对资料t检验,多组之间比较用ANOVA进行。

[0123] 流式细胞仪分析:用事先准备好的正常培养组、AnnexinV-FITC单染组、PI单染组、阳性AnnexinV-FITC/PI双染组(25 μ M秋水仙素处理)进行十字门的设定和荧光补偿的调节。十字门各象限代表的意义:左上象限—坏死细胞(AnnexinV-FITC染色阴性,PI染色阳性);右上象限—晚期凋亡细胞(AnnexinV-FITC染色阳性,PI染色阳性);左下象限—正常的活细胞(Annexin V-FITC染色阴性,PI染色阴性);右下象限—早期凋亡细胞(AnnexinV-FITC染色阳性,PI染色阴性)。

[0124] 流式细胞术检测的结果如图6所示,相比于经对照片段NC处理过的SK-N-BE2细胞,采用siRNA-2(si2)和siRNA-3(si3)所组成的复合物处理的SK-N-BE2细胞处于晚期凋亡阶段的细胞数量明显增多,从原先的1.48%上升为5.22%,表明在加入有效干扰片段(siRNA-2和siRNA-3所组成的复合物)之后,肿瘤细胞SK-N-BE2的细胞凋亡进程明显加快。表明减少解螺旋酶V基因(FUBP1)的表达后可促进肿瘤细胞的凋亡,与Western Blot检测结果是一致的。

[0125] 实施例5:siRNA重组载体的构建

[0126] 本实施例提供一种siRNA重组载体,其构建方法包括以下步骤:将特异性地抑制解螺旋酶V基因表达的siRNA序列(实施例1中的siRNA-2和siRNA-3)设计成能够插入载体中

的发夹siRNA插入片段,然后与pGPU6/GFP/Neo质粒载体进行连接,得到用于抗肿瘤生物学行为的干扰小分子片段。该重组载体转染肿瘤细胞后,可抑制肿瘤细胞中解螺旋酶V基因中的高表达,从而抑制肿瘤细胞生长。

[0127] 实施例6:抗肿瘤的药物组合物

[0128] 本实施例提供一种抗肿瘤的药物组合物,包括实施例1中的siRNA-2和siRNA-3,还包括有柠檬酸盐的缓冲溶液。该抗肿瘤的药物组合物可用于抑制至少如神经母细胞瘤等神经源性肿瘤细胞的增殖,并促进肿瘤细胞的凋亡。

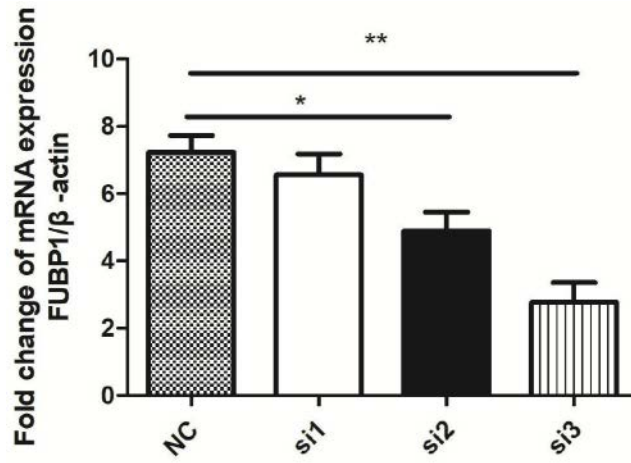


图1

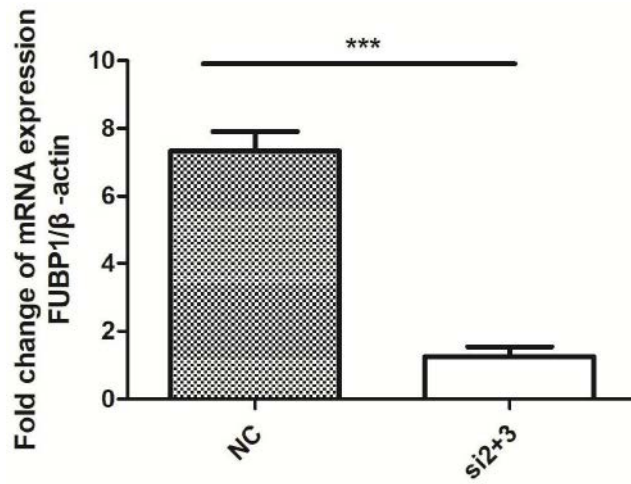


图2

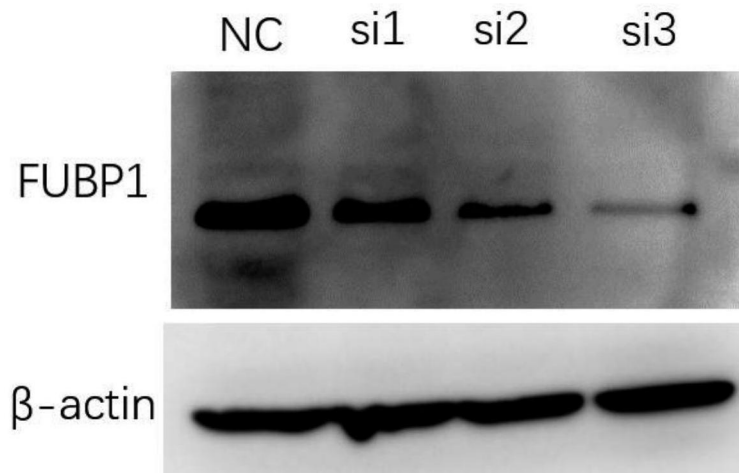


图3

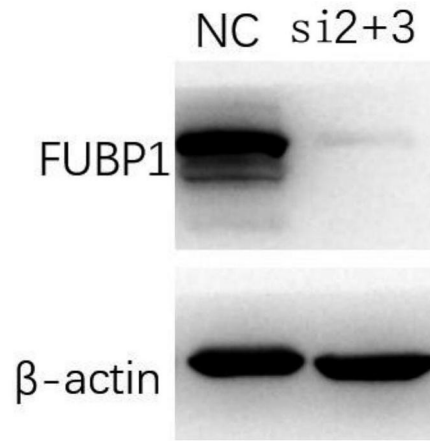


图4

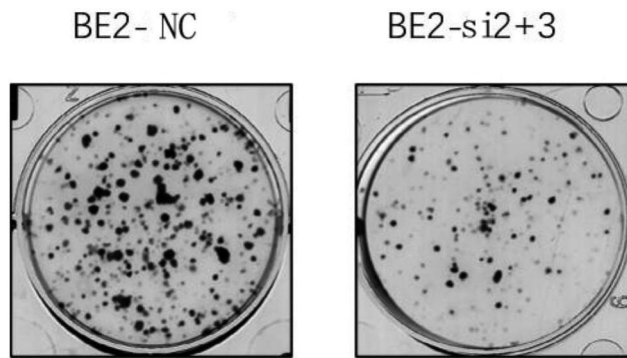


图5

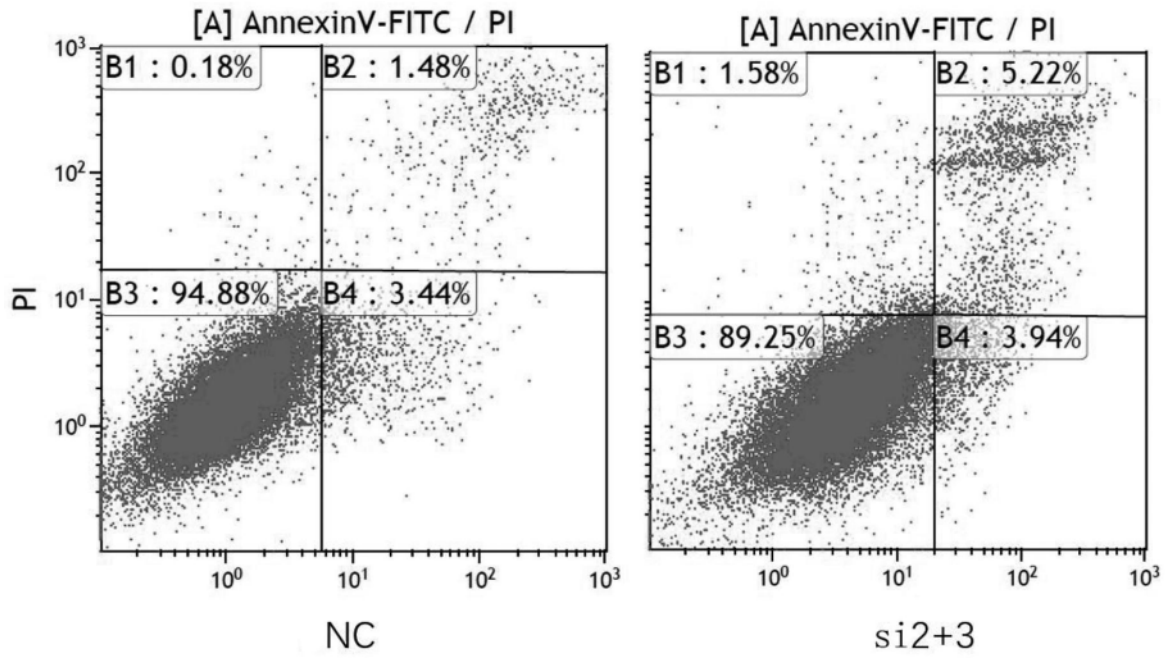


图6