



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112656805 A

(43)申请公布日 2021.04.16

(21)申请号 201910981163.5

(22)申请日 2019.10.15

(71)申请人 中国医学科学院基础医学研究所
地址 100010 北京市东城区东单三条5号

(72)发明人 余佳 王芳 皮静楠

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 白凤莹

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12Q 1/6886(2018.01)

权利要求书1页 说明书14页
序列表2页 附图9页

(54)发明名称

抑制YTHDF1活性的物质在制备预防或治疗胃癌产品中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种抑制YTHDF1活性的物质在制备预防或治疗胃癌产品中的应用。本发明首先公开了抑制细胞中YTHDF1表达的物质或抑制细胞中YTHDF1活性的物质在制备预防和/或治疗胃癌的产品中的应用。本发明进一步公开了预防和/或治疗胃癌的产品。本发明以YTHDF1为靶点的干扰YTHDF1基因表达的物质(如shRNA)能有效抑制胃癌细胞的增殖、迁移和/或侵袭,抑制胃癌肿瘤的生长,可用于治疗胃癌或/和预防胃癌。且通过检测YTHDF1基因表达量能区分胃癌组织、评估胃癌患者pTNM病理分期及鉴定胃癌患者是否发生了神经侵袭或静脉侵袭,可辅助诊断胃癌。

1. 抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质在制备预防和/或治疗胃癌的产品中的应用。
2. 抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质如下任一所述的应用：
 - A1) 在制备抑制胃癌细胞增殖的产品中的应用；
 - A2) 在制备抑制胃癌细胞迁移的产品中的应用；
 - A3) 在制备抑制肝胃癌细胞侵袭的产品中的应用。
3. 抑制细胞中YTHDF1活性的物质在制备预防和/或治疗胃癌的产品中的应用。
4. 抑制细胞中YTHDF1活性的物质如下任一所述的应用：
 - B1) 在制备抑制胃癌细胞增殖的产品中的应用；
 - B2) 在制备抑制胃癌细胞迁移的产品中的应用；
 - B3) 在制备抑制肝胃癌细胞侵袭的产品中的应用。
5. 根据权利要求1-4中任一所述的应用,其特征在于:所述抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质和所述抑制细胞中YTHDF1活性的物质均为下述1)-6)中任一种生物材料:
 - 1) 生成siRNA的shRNA或所述shRNA的化学修饰物;所述siRNA为干扰YTHDF1基因表达的小干扰RNA;
 - 2) 表达1)所述的shRNA的表达载体;
 - 3) 表达1)所述的shRNA的重组微生物;
 - 4) 由1)所述shRNA生成的siRNA或所述siRNA的化学修饰物;
 - 5) 表达4)所述siRNA的表达载体;
 - 6) 表达5)所述siRNA的重组微生物。
6. 预防和/或治疗胃癌的产品,或,抑制胃癌细胞增殖和/或迁移和/或侵袭的产品,其特征在于,所述产品含有下述1)-6)中任一种生物材料:
 - 1) 生成siRNA的shRNA或所述shRNA的化学修饰物;所述siRNA为干扰YTHDF1基因表达的小干扰RNA;
 - 2) 表达1)所述的shRNA的表达载体;
 - 3) 表达1)所述的shRNA的重组微生物;
 - 4) 由1)所述shRNA生成的siRNA或所述siRNA的化学修饰物;
 - 5) 表达4)所述siRNA的表达载体;
 - 6) 表达5)所述siRNA的重组微生物。
7. 检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质在制备鉴定或辅助鉴定肿瘤组织的产品中的应用。
8. 检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质在制备评估或辅助评估胃癌患者pTNM病理分期的产品中的应用。
9. 检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质在制备鉴定或辅助鉴定胃癌患者是否发生了神经侵袭或静脉侵袭的产品中的应用。
10. 根据权利要求7-9任一所述的应用,其特征在于:检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质为利用定量PCR检测所述YTHDF1基因表达量或相对表达量的系统。

抑制YTHDF1活性的物质在制备预防或治疗胃癌产品中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及抑制YTHDF1活性的物质在制备预防或治疗胃癌产品中的应用。

背景技术

[0002] 胃癌(GC)在全球癌症的发病和死亡中位于前列,这是一种受环境因素和个体遗传因素共同制约的复杂疾病。尽管近些年胃癌的发病率稳步下降,但胃癌仍然导致每年超过723,000例患者死亡。造成胃癌高死亡率的主要根源是由于该病早期症状不显著使患者不易察觉,晚期临床表现错综复杂,并在分子层面具有潜在的生物学和遗传异质性,表现出显著的个体差异,预后极差。尤其对于晚期患者,已失去最佳手术治疗机会,化疗仍然是不可缺少的治疗手段,因此,深入了解胃癌发生发展的分子机制,找到胃癌发生的分子marker从而找到药物治疗的最佳途径,已成为胃癌治疗刻不容缓的任务。

[0003] YTHDF1(YTH结构域N6-甲基腺嘌呤(m6A)RNA结合蛋白1,Ensembl:ENSG00000149658MIM:616529),其能选择性地与N6-甲基腺嘌呤修饰的RNA分子结合,调控RNA的命运。目前,还没有关于YTHDF1与胃癌相关的报道。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的一个技术问题是如何抑制胃癌细胞的增殖、迁移和/或侵袭和胃癌肿瘤的生长,及如何鉴定或辅助鉴定肿瘤组织、鉴别或辅助评估胃癌患者pTNM病理分期及是否发生了神经侵袭或静脉侵袭。

[0005] 为解决上述问题,本发明首先提供了抑制细胞中YTHDF1表达的物质或抑制细胞中YTHDF1活性的物质的应用。

[0006] 上述应用为如下任一所述:

[0007] A1.抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质在制备预防和/或治疗胃癌的产品中的应用;

[0008] A2.抑制细胞中YTHDF1活性的物质在制备预防和/或治疗胃癌的产品中的应用;

[0009] A3.抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质在制备抑制胃癌细胞增殖的产品中的应用;

[0010] A4.抑制细胞中YTHDF1活性的物质在制备抑制胃癌细胞增殖的产品中的应用;

[0011] A5.抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质在制备抑制胃癌细胞迁移的产品中的应用;

[0012] A6.抑制细胞中YTHDF1活性的物质在制备抑制胃癌细胞迁移的产品中的应用;

[0013] A7.抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质在制备抑制胃癌细胞迁移的产品中的应用;

[0014] A8.抑制细胞中YTHDF1活性的物质在制备抑制肝胃癌细胞侵袭的产品中的应用。

[0015] 上述应用中,所述产品可以为药物、疫苗、保健品和/或食品。

[0016] 上述应用中,所述抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质和所述抑制细胞中YTHDF1活性的物质均可为下述1)-6)中任一种生物材料:

[0017] 1) 生成siRNA的shRNA或所述shRNA的化学修饰物;所述siRNA为干扰YTHDF1基因表达的小干扰RNA;

[0018] 2) 表达1)所述shRNA的表达载体;

[0019] 3) 表达1)所述shRNA的重组微生物;

[0020] 4) 由1)所述shRNA生成的siRNA或所述siRNA的化学修饰物;

[0021] 5) 表达4)所述siRNA的表达载体;

[0022] 6) 表达5)所述siRNA的重组微生物。

[0023] 上述应用中,所述shRNA的化学修饰物是对所述shRNA进行化学修饰得到的物质。所述化学修饰可包括选自核糖修饰、碱基修饰和磷酸骨架修饰中的一种或几种的组合。

[0024] 所述siRNA的化学修饰物是对所述siRNA进行化学修饰得到的物质。所述化学修饰可包括选自核糖修饰、碱基修饰和磷酸骨架修饰中的一种或几种的组合。

[0025] 上述应用中,所述siRNA的靶序列分别为序列1所示和序列2所示。

[0026] 上述应用中,所述siRNA的靶序列为序列1所示对应所述shRNA的茎序列可为序列5的第1-20位核苷酸和序列5的第33-52位核苷酸,环序列为序列5的第21-32位核苷酸;具体的,所述shRNA的序列如序列5所示。所述siRNA的靶序列为序列2所示对应所述shRNA的茎序列可为序列6的第1-20位核苷酸和序列6的第33-52位核苷酸,环序列为序列6的第21-32位核苷酸;具体的,所述的shRNA的序列如序列6所示。

[0027] 上述应用中,所述重组微生物可为表达所述shRNA或siRNA的重组慢病毒。

[0028] 上述应用中,所述细胞可为哺乳动物细胞,如人,具体为人胃癌细胞系,本发明中所用到的人胃癌细胞系为人胃癌细胞系MGC-803或人胃癌细胞系HGC-27。

[0029] 上述应用中,所述预防和/或治疗胃癌的产品、所述抑制胃癌细胞增殖的产品和所述抑制胃癌细胞迁移的产品和所述抑制胃癌细胞的产品活性成分可为抑制细胞中YTHDF1基因表达的物质,所述产品的活性成分还可含有其它成分,所述产品的其它活性成分本领域技术人员可根据抗胃癌细胞效果确定。

[0030] 所述预防和/或治疗胃癌的产品、所述抑制胃癌细胞增殖的产品和所述抑制胃癌细胞迁移的产品和所述抑制胃癌细胞的产品中,所述产品还可含有药学上可接受的载体。本文所用的“药学上可接受的载体”应当与本发明药物中的RNA分子相容。所述“药学上可接受的载体”是指体内转染试剂,如聚乙烯亚胺(PEI),线性聚乙烯亚胺(jetPEI),脂质体,转铁蛋白,叶酸、纳米乳、纳米粒等。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的其他例子是冻干保护剂糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和土豆淀粉;西黄蓍胶粉末;麦芽;明胶;滑石;固体润滑剂,如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇,如甘油、甘露糖醇;海藻酸;乳化剂,如Tween;磷脂,如卵磷脂,大豆磷脂,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰甘油,磷脂酰肌醇,磷脂酰丝氨酸,硬脂酰胺;胆固醇;大分子高聚物,如聚乙烯亚胺,壳聚糖,透明质酸;润湿剂,如月桂基硫酸钠;着色剂;调味剂;压片剂;稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等渗盐溶液;和磷酸盐缓冲液等;生理盐水、甘油和磷酸盐缓冲液。

[0031] 所述预防和/或治疗胃癌的产品、所述抑制胃癌细胞增殖的产品和所述抑制胃癌

细胞迁移的产品和所述抑制胃癌细胞的产品也属于本发明的保护范围。

[0032] 本发明进一步提供了检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质的应用。

[0033] 上述应用为如下任一所述：

[0034] B1) 检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质在制备鉴定或辅助鉴定肿瘤组织的产品中的应用；

[0035] B2) 检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质在制备评估或辅助评估胃癌患者pTNM病理分期的产品中的应用；

[0036] B3) 检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质在制备鉴定或辅助鉴定胃癌患者是否发生了神经侵袭或静脉侵袭的产品中的应用。

[0037] 上述应用中，所述产品可以为药物、疫苗、保健品和/或食品。

[0038] 上述应用中，所述检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质利用定量PCR检测所述YTHDF1基因表达量或相对表达量的系统；

[0039] 所述定量PCR检测所述YTHDF1基因的表达量或相对表达量的系统包括引物、探针、试剂盒和/或进行定量PCR所需的其他试剂和/或仪器。

[0040] 具体的，通过定量PCR检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的系统可以为：

[0041] 1) 用于扩增YTHDF1基因的引物；

[0042] 2) 包含1)的定量PCR所需的试剂；

[0043] 3) 包含1)或2)的试剂盒；

[0044] 4) 定量PCR所需的仪器。

[0045] 其中，所述用于扩增YTHDF1基因的引物可为序列4所示的单链DNA分子。所述用于扩增YTHDF1基因的引物和进行定量PCR反应所需要的其它试剂均可独立包装。

[0046] 本发明中，所述YTHDF1基因的相对表达量为YTHDF1基因相对于GAPDH的表达量。

[0047] 上述应用中，所述检测YTHDF1基因的表达量或相对表达量的物质还包括数据处理装置，所述数据处理装置用于将来自待测对象的所述YTHDF1基因表达量或相对表达量转换为所述待测对象的诊断结果。

[0048] 具体的，所述数据处理装置包括数据输入模块、数据比较模块和结论输出模块；其中，所述数据输入模块用于将待测对象的所述YTHDF1基因表达量或相对表达量输入，所述数据比较模块用于将待测对象的所述YTHDF1基因的表达量或相对表达量进行比较，结论输出模块用于输出所述待测对象的诊断结果。

[0049] 针对鉴定或辅助鉴定肿瘤组织时，检测来自待鉴定组织的YTHDF1基因的表达量或相对表达量：所述待鉴定组织的YTHDF1基因的表达量或相对表达量越高，所述待鉴定组织为或候选为肿瘤组织风险越大；所述待鉴定组织的YTHDF1基因的表达量或相对表达量越低，所述待鉴定组织为或候选为肿瘤组织的风险越小。

[0050] 针对评估或辅助评估胃癌患者pTNM病理分期时，检测待测胃癌患者的YTHDF1基因的表达量或相对表达量：待测患者的YTHDF1基因的表达量或相对表达量越高，则胃癌患者在pTNM病理分期的III和/或IV期可能性越大；待测患者的YTHDF1基因的表达量或相对表达量越低，则胃癌患者在pTNM病理分期的I期和/或II期可能性越大。

[0051] 针对鉴定或辅助鉴定胃癌患者是否发生了神经侵袭或静脉侵袭时，检测待测胃癌患者的YTHDF1基因的表达量或相对表达量：所述待测胃癌患者的YTHDF1基因的表达量或相

对表达量越高,所述待测胃癌患者发生神经侵袭和/或静脉侵袭风险越大;所述待测胃癌患者的YTHDF1基因的表达式或相对表达式越低,所述待测胃癌患者发生神经侵袭和/或静脉侵袭风险越小。

[0052] 实验表明,以YTHDF1为靶点的干扰YTHDF1基因表达的物质(如shRNA)能有效抑制胃癌细胞的增殖、迁移和/或侵袭,抑制胃癌肿瘤的生长,可用于治疗胃癌或/和预防胃癌。且通过检测YTHDF1基因表达量能区分胃癌组织、评估胃癌患者pTNM病理分期及鉴定胃癌患者是否发生了神经侵袭或静脉侵袭,可辅助诊断胃癌。

附图说明

[0053] 图1为根据cBioPortal数据库,胃癌中m⁶A相关基因前10位的突变率(n=630)。YTHDF1基因不同突变类型的分布情况如右侧饼图所示。

[0054] 图2为YTHDF1启动子DNA甲基化水平与其表达源于RNA测序结果的相关性(n=338)。

[0055] 图3为根据TCGA包括24种癌症类型的数据库,YTHDF1在肿瘤组织中与正常组织相比其相对表达量的变化。

[0056] 图4为YTHDF1在正常、良、恶性胃组织中的小提琴样图(n=32例正常,n=164例良性,n=188例恶性;***p<0.001,用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析。

[0057] 图5为在kmpplot.com计算GSE29272数据,YTHDF1高表达患者(n=215)与YTHDF1低表达患者(n=58)的总生存率。

[0058] 图6为113对胃癌组织及其邻近正常组织中YTHDF1的相对表达(two tailed t test)(n=113)。

[0059] 图7为YTHDF1在2例胃癌组织及邻近癌旁组织中的免疫组化图像。标尺,50μm。

[0060] 图8为YTHDF1表达与胃癌患者神经侵袭、pTNM病理分期、静脉侵袭的关系(two-tailed t test)(n=113)。

[0061] 图9为Kaplan-Meier生存分析显示胃癌患者YTHDF1表达(低表达,n=19,高表达,n=72)与总生存率(log-rank with Mantel-Cox test)存在相关性。数据用均数±标准差表示。

[0062] 图10为Western blot分析在MGC-803和HGC-27细胞中靶向于YTHDF1的shRNAs的敲低情况。

[0063] 图11为在MGC-803和HGC-27细胞中敲低YTHDF1基因的增殖实验分析。其中,n=3;*p<0.05,**p<0.01,用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析;标尺,100μm。

[0064] 图12为在MGC-803和HGC-27细胞中敲低YTHDF1基因的迁移和侵袭实验分析。其中,n=3;***p<0.01,***p<0.001,用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析。

[0065] 图13为YTHDF1在MGC-803细胞敲低后接种小鼠的成瘤实验(day 28)(n=8)。

[0066] 图14为在MGC-803细胞中敲低YTHDF1以及对照组裸鼠皮下肿瘤体积;其中,n=8;***p<0.001,用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析。

[0067] 图15为在MGC-803细胞中敲低YTHDF1以及对照组裸鼠皮下肿瘤重量。其中,n=8;***p<0.001,用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析。

[0068] 图16为异种移植瘤的Ki-67和Caspase-3在免疫组化中阳性染色的统计结果。其

中, $n=8$; $***p<0.001$, 用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析; 标尺, $20\mu\text{m}$ 。

[0069] 图17为小鼠肺转移模型的解剖结果和转移结节统计结果。其中, $n=4$; $***p<0.001$, 用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析。箭头代表转移结节。

[0070] 图18为肺转移模型的组织学结果。标尺, $200\mu\text{m}$ 。

[0071] 图19为敲低YTHDF1后的MGC-803注射到腹腔转移模型实验和异种移植瘤个数的统计结果。其中, $n=4$; $***p<0.001$, 用Newman-Keuls事后检验进行单向ANOVA分析。箭头代表肿瘤。

具体实施方式

[0072] 以下的实施例便于更好地理解本发明, 但并不限定本发明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

[0073] 下述实施例中用到的实验方法如下:

[0074] 一、蛋白免疫印迹实验(western blot)

[0075] 1、细胞或组织总蛋白的提取及蛋白浓度测定

[0076] (1) 总蛋白提取: 提取细胞的总蛋白, 可直接离心收集细胞, PBS洗涤两遍, 离心沉淀, 去上清, 加入适量的含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液, 置冰上反应30min, 4°C , $10000\text{rpm}\times 15\text{min}$ 离心, 取上清。对于组织总蛋白的提取, 首先用剪刀剪碎组织, 加入适量的含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液, 匀浆机匀浆至组织完全粉碎, 置冰上反应30min, 4°C , $10000\text{rpm}\times 15\text{min}$ 离心, 取上清。如果组织未完全破碎, 则重复上述步骤。蛋白裂解液配制及整个裂解过程均在冰上进行;

[0077] (2) 蛋白浓度测定: 使用威格拉斯生物公司的BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白样品的浓度。首先根据标准品浓度及吸光值绘制标准曲线, 并计算出函数关系式, 然后根据待测样品的吸光值标定待测样品浓度即可。

[0078] 2、电泳蛋白样品的制备

[0079] 按照各蛋白样品浓度和体积按比例加入 $5\times$ loading buffer和ddH₂O混和均匀, 同批次上样的样品最好保持终浓度一致。沸水中煮10min后, 在 4°C 将样品瞬时离心, 分装。分装的蛋白样品可于 -80°C 冻存储用。

[0080] 3、SDS-PAGE电泳

[0081] 首先配制好合适浓度的分离胶和浓缩胶, 室温静置至完全凝固。取 $10\sim 40\mu\text{g}$ 总蛋白样品上样。 80V 恒定电压电泳, 当样品进入分离胶时, 调节电压至 120V 。当溴酚蓝离底部 0.5cm 时结束电泳, 小心取下凝胶。

[0082] 4、蛋白转膜

[0083] (1) 配制电转缓冲液, 提前预冷。

[0084] (2) PVDF膜甲醇浸润30s, 然后连同转膜所用的海绵和滤纸一放入电转缓冲液中浸泡10min。

[0085] (3) 放置转膜材料, 顺序为: 电转仪塑料支架、海绵、两层滤纸、凝胶、PVDF膜、两层滤纸、海绵、电转仪塑料支架; 放置时注意避免凝胶和PVDF膜之间存有气泡, 放置完毕后将塑料支架夹紧。

[0086] (4) 按照PVDF膜在正极方向凝胶在负极方向放入电转槽,将电泳槽置于冰浴环境下,恒定电流200mA转膜1h。

[0087] (5) 电转完毕后取出PVDF膜,标记上样顺序的。

[0088] 5、杂交及显影

[0089] (1) 电转完毕的PVDF膜在TBST (20mM (pH 7.6-8.0), 100mM NaCl, 0.1% Tween-20) 溶液中洗涤5min/次×3次。

[0090] (2) 放于含有5%脱脂奶粉的封闭液中室温封闭1h。

[0091] (3) 用封闭液稀释一抗至合适浓度,4℃孵育PVDF膜过夜。

[0092] (4) 1×TBST洗膜3次,每次10min。

[0093] (5) 用封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的二抗至合适浓度,室温孵育PVDF膜1~2h。

[0094] (6) 1×TBST洗膜3次,每次10min。

[0095] (7) ECL法显影:在暗室中用X光片进行显影,吸去膜上多余水分,蛋白面向上放在保鲜膜上。ECL反应液均匀滴加于PVDF膜表面避光反应1min后,小心将膜包裹,在暗室中用X光片进行显影。

[0096] 二、Real-time PCR

[0097] 1、Trizol法提取细胞和组织中总RNA

[0098] 1) 取MGC-803细胞为贴壁细胞,不需要胰酶消化,去除培养基后可直接用Trizol吹打、消化、裂解;通常按照培养皿的面积来决定Trizol的用量,一般为1mL/10cm²。

[0099] 胃癌组织/癌旁正常组织按每50~100mg加1mL Trizol,使样积尽量不超过Trizol体积的10%,充分匀浆1~2min;

[0100] 2) 将加入Trizol的细胞悬液移至1.5mL EP管中,温静置混合物5min,使细胞充分裂解,此时也可放入-80℃冰箱长期保存;

[0101] 3) 每1mL Trizol加氯仿0.2mL,剧烈振荡10~15s后,室温放置2~3min;

[0102] 4) 4℃, 12,000rpm,离心15min,将上层水相移至一新1.5mLEP管中,每1mLTrizol加异丙醇0.5mL,混合均匀,室温放置5~10min;

[0103] 5) 4℃, 12,000rpm,离心10min,此时RNA可见于EP管底,弃掉上清,每1mLTrizol加75%乙醇1mL洗涤细胞,轻轻振荡使沉淀悬浮。此时可放于-80℃过夜;

[0104] 6) 4℃, 7,500rpm,离心5min,尽量吸干上清,室温干燥5~10min,不能完全凉干,以避免影响RNA的溶解;

[0105] 7) 将RNA溶于适当体积的DEPC H₂O、TE buffer或0.5%SDS中,保存于-80℃冰箱备用。

[0106] 2、RNA质量的检测

[0107] RNA样品的质量由OD280、OD260和OD230值衡量,通常以OD260/OD280,OD260/OD230判断RNA样品中是否有其它有机溶剂和蛋白质污染。良好的RNA质量为OD260/OD280=1.8~2.1;OD260/OD230>1.8。

[0108] 3、逆转录

[0109] (1) M-MLV逆转录cDNA第一链:在无RNase的灭菌离心管中加入以下成分:

	总 RNA	5.0 μg
[0110]	oligo (dT) (500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1.0 μL
	dNTP Mix (10 mM each)	1.0 μL
	DEPC H ₂ O	Total 12 μL

[0111] (2) 将上述溶液混匀后,置于65℃水浴温育5min后,立即置于冰上冷却,加入以下成份:

	5 × First-Strand Buffer	4.0 μL
[0112]	DTT (0.1 M)	2.0 μL
	RNase inhibitor (40 U/ μL)	1.0 μL

[0113] (3) 将上述溶液混匀,轻离心后置于37℃水浴5min,加入1.0 $\mu\text{LM-MLV}$ (200U/ μL)。

[0114] (4) 混匀溶液后,37℃水浴反应60min,移至70℃水浴15min终止反应,-20℃冻存储用,获得cDNA。

[0115] (5) PCR扩增GAPDH,检测逆转录cDNA质量。

[0116] 2.2.2.3PCR检测YTHDF1水平

[0117] (1) 以GAPDH为相对定量的内参,每个样品做3个重复,充分混匀时注意避免产生气泡,避免荧光干扰。PCR反应体系如下:

	2 × SYBRmix	10.0 μL
	4 μM Primer F (YTHDF1-F 或 GAPDH-F)	1.0 μL
[0118]	4 μM Primer R (YTHDF1-R 或 GAPDH-R)	1.0 μL
	cDNA	1.0 μL
	dd H ₂ O	6.6 μL

[0119] YTHDF1引物:

[0120] YTHDF1-F:TCAGGCTGGAGAATAACGA

[0121] YTHDF 1-R:GGTTGTGTGCTTGTAGGAACT

[0122] GAPDH引物:

[0123] GAPDH-F:TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCT

[0124] GAPDH-R:GGTGGTCCAGGGTCTTACT

[0125] (2) 在PCR仪上选择样品类型、编号及样品重复的序号,设置“引物/探针”,PCR反应条件:

[0126]	预变性	3 min	94 °C	35 个循环
	变性	20 s	94 °C	
	退火	30 s	59 °C	
	延伸	30 s	69 °C	
	延伸	5 min	69 °C	
	保存	forever	4 °C	

[0127] (3) 点击“Stat”，PCR仪开始自动运行，并采集产物荧光值。

[0128] (4) 设定阈值，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算YTHDF1基因的相对表达量。

[0129] 三、H&E染色

[0130] (1) 取材、固定：配制10%福尔马林作为固定液，取出胃癌组织后，迅速放入福尔马林中固定。防止细胞自溶及降解，使蛋白快速变性，保持组织本来的形态结构。

[0131] (2) 脱水：梯度酒精(50%，75%，85%，95%，无水乙醇)对组织进行脱水，防止组织变形。二甲苯置换组织内脱水剂，透明组织块，有利于光线透过，为下一步浸蜡起到桥梁作用。

[0132] (3) 浸蜡：透明好的组织块放入60℃恒温蜡箱中浸蜡，置换组织中的透明剂，为包埋做准备。

[0133] (4) 包埋：在包埋框中倒入融化好的石蜡液，然后用无齿镊子夹取组织块放入其中，置好方向，室温下冷却凝固后，去掉包埋框，取出蜡块。

[0134] (5) 切片：包埋好蜡块用刀片修成规整四棱台，夹在蜡块钳内，使蜡块切面与切片刀刃平行，使用Leica切片机制片，厚度4~7微米。将蜡片展平后附着在涂有粘附剂的载玻片上，45℃温箱中烘干切片。

[0135] (6) 脱蜡：切片60℃温箱烘烤20min，二甲苯I(20min,60℃)，二甲苯II 2min，梯度酒精(100%，95%，80%，70%)各2min，蒸馏水冲洗5min。

[0136] (7) 染色：苏木素5min，蒸馏水冲洗3s，1%盐酸酒精10s，蒸馏水稍冲，饱和碳酸锂2min，70%乙醇2min，80%乙醇2min，100%乙醇2min，0.5%伊红3min。

[0137] (8) 脱水：无水乙醇2min，二甲苯I 2min，二甲苯II 2min。

[0138] (9) 吹干切片，中性树脂封片。此步骤中切片必须彻底脱水透明，才能用中性树脂封盖。如果脱水不彻底，会导致封片后呈白色雾状，不利于观察，且片子容易褪色。

[0139] 四、免疫组化(IHC)

[0140] 取材、固定、脱水、浸蜡、包埋、切片步骤与H&E染色步骤(1)-(5)相同。

[0141] (6) 抗原修复：高压锅敞口加热0.01M枸橼酸钠缓冲液，待沸腾后，将放有切片的片架放入高压锅中，压紧锅盖，继续加热。待蒸汽阀冒气开始计时，2min后关闭加热源，压力降下后，打开锅盖，切片继续浸泡在枸橼酸缓冲液中，待其自然降至室温。(由于组织中的抗原经过甲醛或多聚甲醛固定后，蛋白之间的交联和醛基的封闭作用使其失去抗原表位，通过抗原修复，组织细胞内的抗原决定簇重新暴露，提高抗原抗体识别的可能性)

[0142] (7) 去离子水3min×3次，PBS 3min×3次。

- [0143] (8) 3% H₂O₂室温孵育15min,去离子水3min×3次,PBS 3min×3次。
- [0144] (9) 山羊血清室温封闭1h。
- [0145] (10) 倾去血清,勿洗,滴加PBS稀释后的一抗,4℃湿盒中过夜孵育。
- [0146] (11) 次日取出后37℃复温60min(防止温度变化造成脱片,防止非特异性染色),去离子水3min×3次,PBS 3min×3次。
- [0147] (12) 滴加反应增强液,室温孵育20min。去离子水3min×3次,PBS 3min×3次。
- [0148] (13) 滴加酶标记的抗小鼠/兔IgG聚合物,室温孵育30min,PBS 3min×3次。
- [0149] (14) DAB显色:将稳定型DAB缓冲液、稳定型DAB底物、稳定型DAB色原按比例配制成DAB显色液,置于冰上备用。擦去片子上PBS,滴加DAB显色液,镜下观察至有黄色颗粒物生成时,去离子水冲洗切片以终止反应,PBS 3min×3次。
- [0150] (15) 复染:擦去PBS,滴加苏木素染色10s~30s,蒸馏水冲洗终止反应。盐酸酒精5s,蒸馏水冲洗,饱和碳酸锂处理,返蓝2min,蒸馏水冲洗。
- [0151] (16) 梯度酒精(70%,80%,90%,95%,100%)脱水,2min/梯度,二甲苯I,II各2min,风机吹干后,中性树脂封片镜检。
- [0152] 实施例1 YTHDF1在胃癌中高表达
- [0153] 一、cBioPortal数据库和TCGA数据库中YTHDF1在胃癌中高表达
- [0154] 本发明分析了630例原发性胃腺癌的cBioPortal(cBio Cancer Genomics Portal)数据库,研究在胃腺癌发展中RNA甲基化修饰(m⁶A)相关基因的遗传改变,结果如图1所示,在该数据库中YTH家族readers(除了YTHDF2)的突变率相对于writers(YTHDF1、WTAP、METTL14)和erasers(ALKBH5、FTO)更高,且YTH家族readers中YTHDF1的突变率最高,达到了约7%。分析YTHDF1的突变类型,发现65%的突变是基因扩增,而基因扩增会导致基因产物的过度表达,表明YTHDF1在胃癌中存在高表达现象。
- [0155] 进一步分析了在TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库中338例胃癌病例的YTHDF1起始子的DNA甲基化水平,发现338例胃癌病例的YTHDF1起始子的DNA甲基化水平较低(β 值<0.1)(图2),表明YTHDF1在胃癌中处于活跃的转录状态。随后分析了包括24种不同癌症类型的TCGA数据库,发现YTHDF1在胃癌患者中表达明显高于正常组织,且在大多数肿瘤中观察到YTHDF1上调,表明YTHDF1在肿瘤发展中具有普遍的致癌作用(图3)。生信分析表明YTHDF1高表达与胃癌进展(图4)和总生存率较低(图5)明显相关,在初始期和进展期YTHDF1的表达水平较正常组织明显升高,而进展期的数据偏差值更紧密(图5)。
- [0156] 二、YTHDF1在胃癌患者中高表达
- [0157] 为进一步明确YTHDF1与胃癌发生的相关性,并验证TCGA数据的准确性,收集了来自山西肿瘤医院、中国人民解放军301医院以及中国医学科学院肿瘤医院在内的、通过手术治疗切除肿瘤的共计113位新发胃癌病人,分别对同一病人的胃癌组织和癌旁组织采样,并对患者的临床资料进行统计分析。通过上述“三、Real-time PCR”方法验证113对胃癌病例中胃癌组织和癌旁组织中YTHDF1的表达,结果如图6所示,与癌旁组织相比,YTHDF1的mRNA水平在胃癌组织中显著升高($p=0.0005$),表明YTHDF1的表达与胃癌患者的发病正相关。通过上述“五、免疫组化(IHC)”分析,结果如图7所示,在胃癌组织(2例胃癌患者)中YTHDF1蛋白质水平表达上调与RNA水平相一致。
- [0158] 对YTHDF1在胃癌组织中的异常高表达与不良的临床病理特征相关性进行分析,如

神经侵袭、pTNM病理分期(III、IV期vs I、II期)和脉管侵袭,结果如图8所示,YTHDF1在pTNM病理分期的III、IV期整体呈现高表达趋势,而在pTNM病理分期的I期和II期呈现低表达趋势,表明高表达的YTHDF1加剧了胃癌的病理进程。将113对病例中依据是否发生侵袭分为侵袭组(positive)和非侵袭组(negative),结果如图8所示,与非侵袭组相比,YTHDF1在神经侵袭组和脉管侵袭组均表现出显著上调的趋势,表明YTHDF1促进了胃癌细胞的转移。结果表明YTHDF1的表达与神经侵袭、pTNM病理分期(III、IV期vs I、II期)和脉管侵袭显著正相关。

[0159] 进行Kaplan-Meier生存分析,结果如图9所示,YTHDF1高表达胃癌患者4年总生存率较差(Log-rank (Mantel-Cox) $p=0.0075$)。

[0160] 通过以上分析都表明了YTHDF1在胃癌中具有致癌作用。

[0161] 实施例2YTHDF1敲低后可抑制胃癌的进展和转移

[0162] 一、构建shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl

[0163] 1、根据shRNA设计的一般原则,设计siRNA靶点。YTHDF1基因的两个siRNA靶点序列分别为5'-GATACAGTTCATGACAATGA-3'(序列1)和5'-GAAACGTCCAGCCTAATTCT-3'(序列2)。

[0164] 用于制备产生两个siRNA的shRNA的编码基因的引物分别为YTHDF1-1F:5'-CCGGGATACAGTTCATGACAATGACTTCCTGTCAGATCATTGTCATGAACTGTATCTTTTTG-3'

[0165] YTHDF1-1R:5'-AATTCAAAAAGATACAGTTCATGACAATGATCTGACAGGAAGTCATTGTCATGAACTGTATC-3'

[0166] YTHDF1-2F:5'-CCGGGAAACGTCCAGCCTAATTCTCTTCTGTCAGAAAGAATTAGGCTGGACGTTCTTTTTG-3'

[0167] YTHDF1-2R:5'-AATTCAAAAAGAAACGTCCAGCCTAATTCTTCTGACAGGAAGAGAATTAGGCTGGACGTTTC-3'

[0168] 2、引物退火形成带粘性末端的双链片段

[0169] 引物YTHDF1-1F和YTHDF1-1R退火形成带粘性末端的双链片段,将其命名为shYTHDF1-1:

[0170] 引物YTHDF1-2F和YTHDF1-2R退火形成带粘性末端的双链片段,将其命名为shYTHDF1-2:

[0171] 其中,退火体系如下:

YTHDF1-1F /YTHDF1-2F (10M) 10 μ l

YTHDF1-1R/YTHDF1-2R (10M) 10 μ l

[0172]

NEB buffer 2 5 μ l

H₂O 25 μ l

[0173] 退火程序为:95 $^{\circ}$ C,3min;每60s下降1 $^{\circ}$ C,缓慢退火,直到25 $^{\circ}$ C;3.4 $^{\circ}$ C,保存。

[0174] 3、干扰载体的构建

[0175] 用EcoR I和Age I对载体pLK0.1-puro(公司Addgene,货号10878)进行双酶切得到载体片段,回收并纯化载体片段。将YTHDF1-1和YTHDF1-2分别与载体片段连接得到YTHDF1-1和YTHDF1-2连接产物。将YTHDF1-1和YTHDF1-2连接产物分别转化感受态大肠杆菌JM109,待长出菌落后,挑单菌落于5ml含相应抗生素的LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C振荡培养8~12h;用PCR

法检测挑取的克隆;琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果;选取PCR扩增阳性克隆送测序,以进一步鉴定克隆基因编码区核酸序列的正确性,并核对确定读框是否正确.测序正确的质粒,进行质粒大提,获得质粒,进行后续实验。

[0176] 将测序结果为将载体pLK0.1-puro的Age I和EcoR I识别位点间的片段(小片段)替换为序列3(5'-GATACAGTTCATGACAATGACTTCCTGTCAGATCATTGTCATGAAGTGTATCTTTTT-3')的DNA分子,保持载体pLK0.1-puro的其它序列不变得到的重组表达载体命名为shYTHDF1-1(干扰载体)。序列3所示的DNA分子编码以YTHDF1基因为靶点的shRNA,将该shRNA命名为YTHDF1-1-shRNA,YTHDF1-1-shRNA的序列为序列5(5'-GAUACAGUUCAUGACAAUGACUCCUGUCA GAUCAUUGUCAUGAACUGU AUCUUUUU-3')。YTHDF1-1-shRNA的茎序列为序列5的第1-20位核苷酸和序列5的第33-52位核苷酸,YTHDF1-1-shRNA的环序列为序列5的第21-32位核苷酸。YTHDF1-1-shRNA产生干扰YTHDF1基因的siRNA,将该siRNA命名为YTHDF1-1-siRNA,YTHDF1-1-siRNA的靶序列为5'-GATACAGTTCATGACAATGA-3'(序列1)。

[0177] 将测序结果为将载体pLK0.1-puro的Age I和EcoR I识别位点间的片段(小片段)替换为序列4(5'-GAAACGTCCAGCCTAATTCTCTTCCTGTCAGAAGAATTAGGCTGGACGTTTCTTTTT-3')的DNA分子,保持载体pLK0.1-puro的其它序列不变得到的重组表达载体命名为shYTHDF1-2(干扰载体)。序列4所示的DNA分子编码以YTHDF1基因为靶点的shRNA,将该shRNA命名为YTHDF1-2-shRNA,YTHDF1-2-shRNA的序列为序列6(5'-GAAACGUCCAGCCUAAUUCUCUCCUGUCA GAAGAAUUAGGCUGGACGU UUCUUUUU-3')。YTHDF1-2-shRNA的茎序列为序列6的第1-20位核苷酸和序列6的第33-52位核苷酸,YTHDF1-2-shRNA的环序列为序列6的第21-32位核苷酸。YTHDF1-2-shRNA产生干扰YTHDF1基因的siRNA,将该siRNA命名为YTHDF1-2-siRNA,YTHDF1-2-siRNA的靶序列为5'-GAAACGTCCAGCCTAATTCT-3'(序列2)。

[0178] 三、胃癌细胞系转染实验

[0179] 转染前一天,适合密度传代胃癌细胞系(即MGC-803和HGC-27),使人胃癌细胞系在转染时处于对数生长期。用无血清培养基洗涤细胞一次,然后以 $1\sim 2\times 10^6$ cells/孔的密度将细胞重悬于不含抗生素的完全培养基中,1600 μ l/孔,转入6孔板中培养(贴壁细胞需提前一天铺板,细胞密度在50%~70%,24h之内转染,保证细胞处于对数生长期)。在3 μ g的shYTHDF1-1、3 μ g shYTHDF1-2和3 μ g shControl(未改造的载体pLK0.1-puro,公司Addgene,货号10878)分别加入200 μ l无血清培养基中混匀,分别得到含shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl的无血清溶液,室温静置5min;取三份3 μ l脂质体lipofectamine2000也分别加入200 μ l无血清培养基中,得到含脂质体lipofectamine2000的无血清溶液,室温静置5min,然后将上述含shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl的无血清溶液分别于三份含脂质体lipofectamine2000的无血清溶液混匀,得到三份混合物,室温静置20min。将混合物直接加入6孔板的人胃癌细胞系(即MGC-803和HGC-27),并轻轻摇晃使其混匀,于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养4~6h后,可将培养基换为有血清和抗生素的培养基,继续培养24~48h。转染24h后可检测RNA水平的变化,转染48h后检测蛋白的变化。

[0180] 利用“一、蛋白免疫印迹实验(western blot)”方法分别检测胃癌细胞系(即MGC-803和HGC-27)中shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl的表达水平,结果表明在MGC-803和HGC-27中均能稳定表达shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl(图10)。因此,选用胃癌细胞系MGC-803和HGC-27作为转染细胞系,研究敲低YTHDF1后在胃癌中的作用。

[0181] 通过上述胃癌细胞系转染实验的方法利用shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl分别转染胃癌细胞系MGC-803和HGC-27,分别得到转染后的shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组胃癌细胞MGC-803和HGC-27,进行下述试验,具体步骤如下:

[0182] 1、细胞增殖试验

[0183] 胰酶消化转染8小时后的胃癌细胞系MGC-803和HGC-27并以800rpm×5min离心收集细胞,新鲜的完全培养基重悬,按 1×10^3 细胞/孔铺于96孔板中,设置3个重复,待细胞贴壁后(约6小时),每孔加入10 μ l CCK8试剂,37 $^{\circ}$ C孵育2小时后利用酶标仪测定波长450nm的吸光值,作为0小时细胞活性,然后以相同方法每隔24h检测一次细胞活性。

[0184] 结果显示,与对照组(图中以“shControl”表示)相比,YTHDF1敲低后(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)可以抑制胃癌细胞增殖(图11)。

[0185] 2、细胞侵袭实验

[0186] (1) 威格拉斯Matrigel从-80 $^{\circ}$ C中取出后,4 $^{\circ}$ C过夜溶胶,chamber、枪头、1.5mlEP管,24孔板置于-20 $^{\circ}$ C过夜预冷,稀释Matrigel用无血清培养基4 $^{\circ}$ C过夜预冷,防止在稀释凝胶及吸取凝胶的过程中因温度太高而造成基质胶凝固。

[0187] (2) 冰上操作步骤:使用预冷无血清培养基将Matrigel稀释至终浓度1mg/ml,混合均匀,置于冰上备用,防止基质胶凝固。

[0188] (3) 取出预冷好的chamber及24孔板,将chamber放入24孔板中。取预冷过的枪头,在chamber中央靠下方垂直加入100 μ l稀释好的Matrigel,注意枪头不要触碰chamber底部的膜,防止枪头扎穿或划伤底模。37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育3h,使基质胶完全凝固。

[0189] (4) 取出凝固好的chamber,无血清培养基轻洗一次,用枪头贴chamber侧壁吸去培养基,放入24孔板中备用。

[0190] (5) 胰酶消化转染8h后的胃癌细胞系MGC-803和HGC-27,收集后用无血清培养基洗2次(去除细胞表面残留血清对细胞生长的影响),无血清培养基重悬细胞沉淀。计数后调整细胞数量至 2×10^5 /ml,按150 μ l/chamber加入细胞悬液至chamber上室,下室加入800 μ l含20%FCS的培养基,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养24h。

[0191] (6) 取出chamber,小心弃去上室中培养基,放入新的24孔板中,在下室加入1ml甲醇,室温固定30min。

[0192] (7) 弃去甲醇,在下室中每孔加入600 μ l结晶紫染液,室温染色30min。

[0193] (8) ddH₂O轻轻浸泡chamber数次,洗去结晶紫,取出chamber,用棉签轻轻擦去基质胶和膜表面的细胞,将chamber倒扣晾干。

[0194] (9) 用镊子小心揭下chamber底部膜,放在载玻片上固定好,中性树脂封片后镜检细胞。每组取10个视野进行细胞计数,统计结果。

[0195] 结果显示,与对照组(图中以“shControl”表示)相比,敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)能够明显抑制胃癌细胞的侵袭能力(图12)。

[0196] 3、细胞迁移实验

[0197] 胰酶消化转染24h后的胃癌细胞系MGC-803和HGC-27,并900rpm×5min离心收集细胞,用无血清培养基清洗三次后用无血清的培养基悬浮细胞并计数,调整浓度为 2×10^5 /ml。transwell小室上室中加400 μ l细胞悬液,下室中加入600 μ l含20%血清的细胞完全培养基,37 $^{\circ}$ C孵育24h。取出小室,弃培养基,用PBS清洗两次,棉签擦去上室内表面的非侵袭细

胞,将小室倒置并在背面滴加一滴血清,室温自然风干。加入1ml甲醇或4%甲醛固定十分钟,弃固定液,室温自然风干。加入1ml0.1%结晶紫染色液,室温染色10min,自来水中轻轻漂洗至适宜深浅的颜色后,将小室倒扣,室温自然风干。用手术刀片小心剥离小室底膜,固定于载玻片上,中性树脂封片后镜检细胞并拍照计数。

[0198] 结果显示,与对照组(图中以“shControl”表示)相比,敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)能够明显抑制胃癌细胞的迁移能力(图12)。

[0199] 实施例3YTHDF1对裸鼠皮下成瘤的影响

[0200] 通过裸鼠皮下成瘤实验,在动物体内研究YTHDF1对胃癌发生发展的调控作用以及其潜在的治疗价值。检验敲低YTHDF1后裸鼠皮下成瘤情况。

[0201] 1、瘤块的大小的检测

[0202] 以实施例2的胃癌细胞系转染实验的方法利用shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl分别转染MGC-803细胞,获得处于 5×10^6 对数生长期的shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组等量的胃癌细胞MGC-803,利用0.1ml磷酸缓冲盐水(PBS)中混悬,得到shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组胃癌细胞MGC-803的悬浊液。

[0203] 购买5~6周龄的雌性裸鼠,随机分为三组,在动物房适应2~3天后,每组雌性裸鼠后侧皮下注射上述胃癌细胞MGC-803的悬浊液(3×10^6 细胞/只),实时观察瘤块的生长的大小。

[0204] 对瘤块的大小进行统计,结果显示,在MGC-803敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)小鼠,瘤块的大小明显比对照组(图中以“shControl”表示)小(图13)

[0205] 对瘤块的体积进行统计,结果显示,在MGC-803敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)小鼠,瘤块的体积明显低于对照组(图中以“shControl”表示)(图14)。

[0206] 对瘤块的重量进行统计,结果显示,在MGC-803敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)裸鼠,瘤块的重量明显低于对照组(图中以“shControl”表示)(图15)。

[0207] 二、在获得瘤块后,取一部分做H&E染色及免疫组化实验。

[0208] 通过“三、H&E染色”方法对瘤块组织进行染色,分别对增殖抗原Ki-67和凋亡蛋白Caspase3进行定性定量。相较于对照组(图中以“shControl”表示),敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)裸鼠,瘤组织表现为Ki-67低表达和Caspase 3高表达(图16)。

[0209] 通过“四、免疫组化(IHC)”对Ki-67和Caspase 3的免疫组化定量,结果显示:相较于对照组(图中以“shControl”表示),在MGC-803中敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)裸鼠,瘤组织表现为Ki-67低表达和Caspase 3高表达(图16)。

[0210] 进一步表明了YTHDF1的促癌功能。

[0211] 实施例4体内验证敲低YTHDF1对胃癌细胞转移的影响

[0212] 检测小鼠体内实验-裸鼠皮下成瘤实验去检验敲低YTHDF1后是否可以同样抑制胃癌细胞的增殖。

[0213] 一、建立胃癌小鼠模型,具体方法如下:

[0214] 以实施例2的胃癌细胞系转染实验的方法利用shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl分别转染MGC-803细胞,获得处于 5×10^6 对数生长期的shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组等量的胃癌细胞MGC-803,利用0.1ml磷酸缓冲盐水(PBS)中混悬,得到

shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组胃癌细胞MGC-803的悬浊液。

[0215] 购买5~6周龄的雌性NOD/SCID小鼠,随机分为3组,在动物房适应2~3天后,将小鼠进行亚致死剂量X射线照射(250cGy),照射当天分别通过尾静脉注射上述shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组胃癌细胞MGC-803的悬浊液,培养大概三十天后,解剖小鼠表现明显的肿瘤转移症状(恶病质),证明胃癌小鼠模型构建成功。计数裸鼠的肺结节数量。

[0216] 结果显示,相较于对照组(图中以“shControl”表示),在MGC-803中敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)可极大的降低肺结节的形成(图17、18)。

[0217] 二、裸鼠腹腔转移模型,具体方法如下:

[0218] 以实施例2的胃癌细胞系转染实验的方法利用shYTHDF1-1、shYTHDF1-2和shControl分别转染MGC-803细胞,获得处于 5×10^6 对数生长期的shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组等量的胃癌细胞MGC-803,利用0.1ml磷酸缓冲盐水(PBS)中混悬,得到shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组胃癌细胞MGC-803的悬浊液。

[0219] 购买5~6周龄的雌性NOD/SCID小鼠,随机分为三组,在动物房适应2~3天后,将上述shYTHDF1-1组、shYTHDF1-2组和shControl组胃癌细胞MGC-803的悬浊液分别注入裸鼠的腹腔,4周后处死小鼠,打开腹腔,计数肠结节数量。

[0220] 结果显示,相较于对照组(图中以“shControl”表示),在MGC-803中敲低YTHDF1(图中以“shYTHDF1-1”、“shYTHDF1-2”表示)可明显的降低肠结节的形成(图19)。

[0221] 综上,结果表明YTHDF1在胃癌中作为癌基因调控肿瘤的增殖和转移。

[0222] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国医学科学院基础医学研究所

<120> 抑制YTHDF1活性的物质在制备预防或治疗胃癌产品中的应用

<130> GNCFY191528

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

gatacagttc atgacaatga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gaaacgtcca gcctaattct 20

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gatacagttc atgacaatga cttcctgtca gatcattgtc atgaactgta tcttttt 57

<210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gaaacgtcca gcctaattct cttcctgtca gaagaattag gctggacgtt tcttttt 57

<210> 5

<211> 57

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gauacaguuc augacaauga cuuccuguca gaucauguc augaacugua uuuuuuu 57

<210> 6

<211> 57

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

gaaacgucca gccuaauucu cuuccuguca gaagaauag gcuggacguu uuuuuu 57

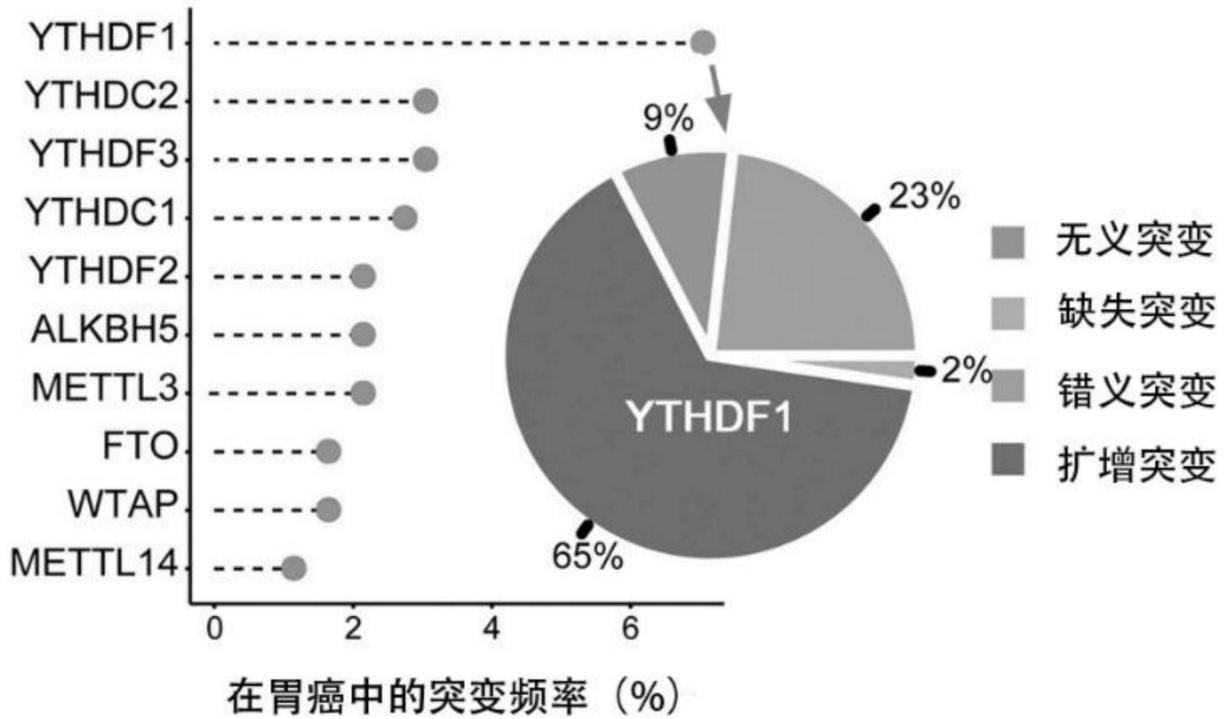


图1

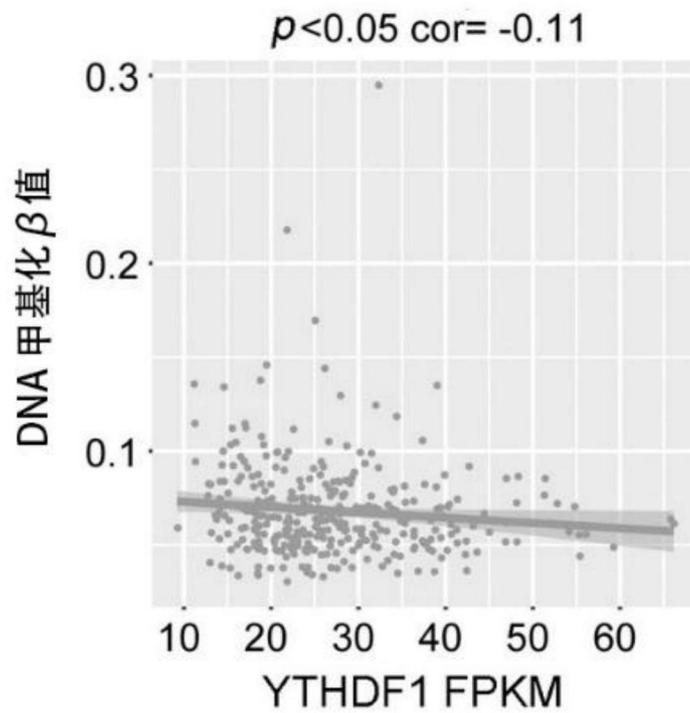


图2

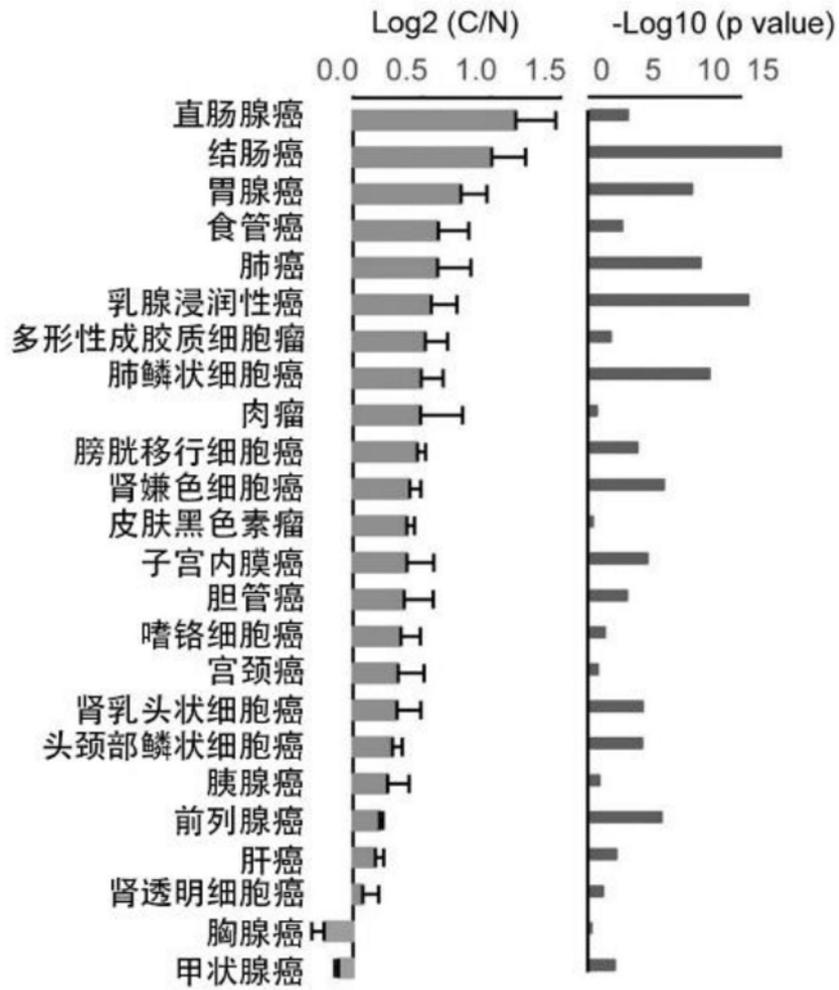


图3

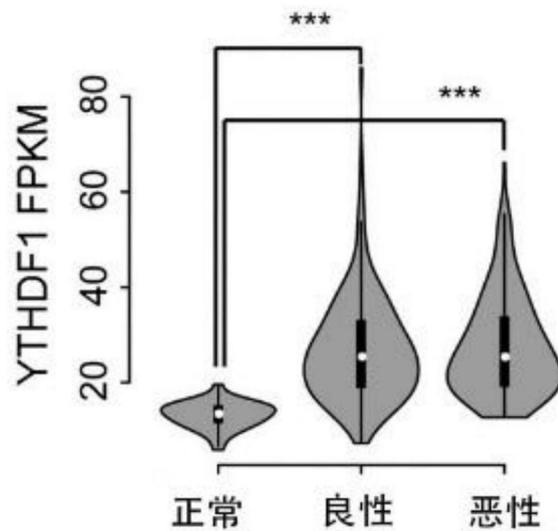


图4

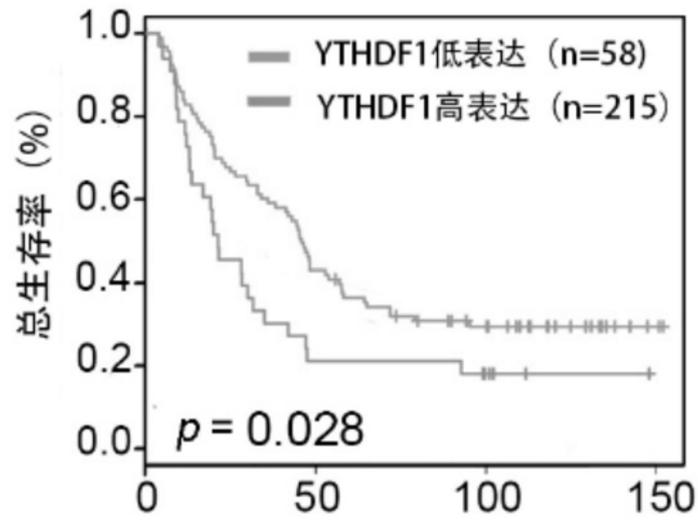


图5

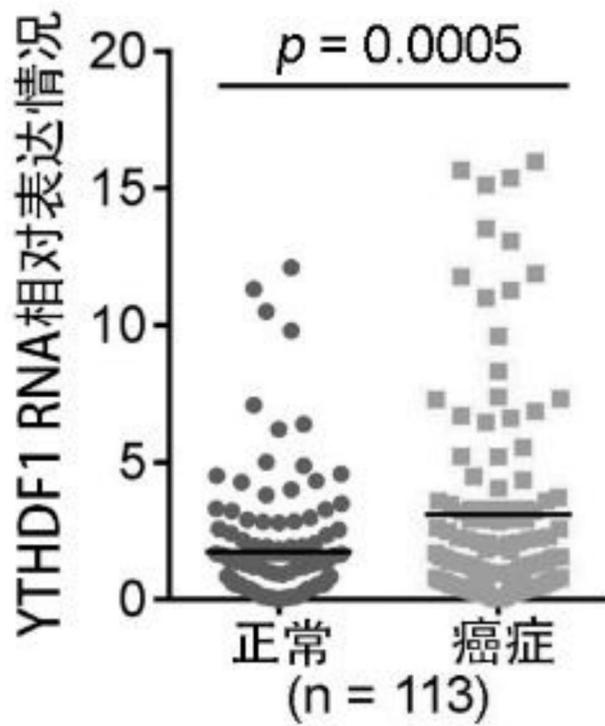


图6

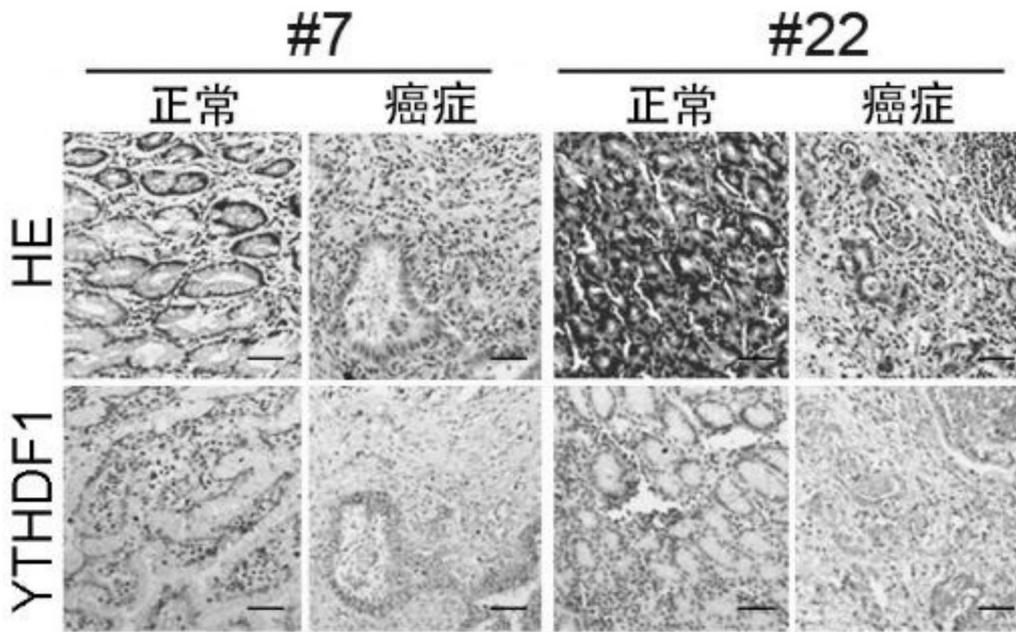


图7

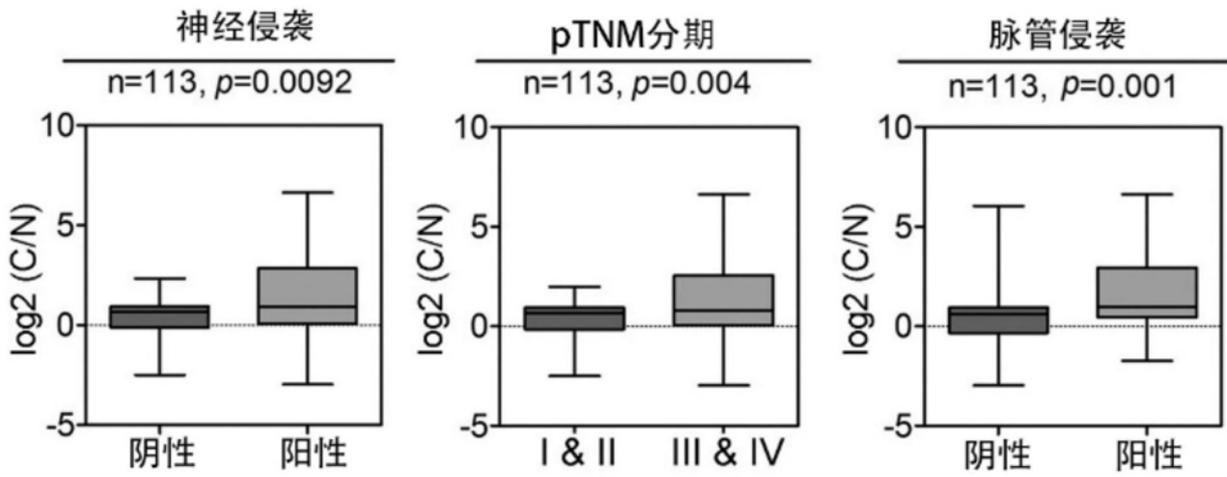


图8

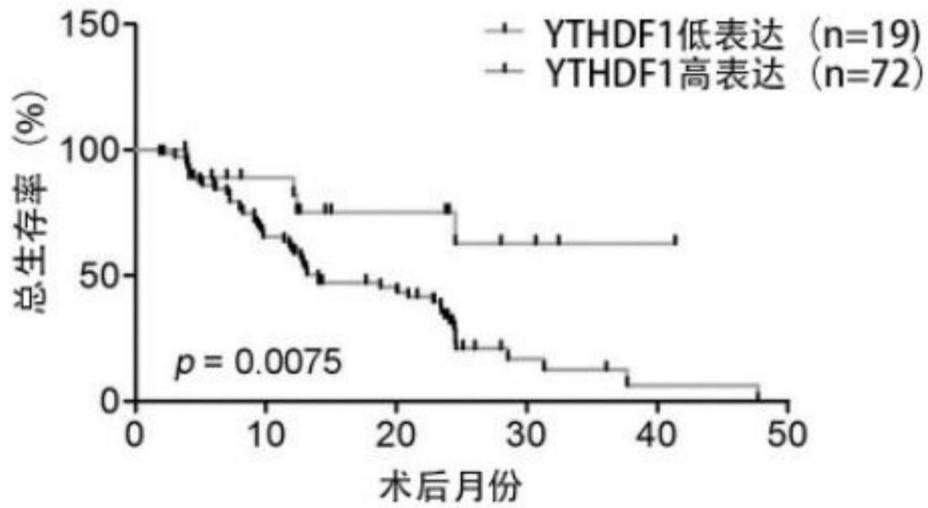


图9



图10

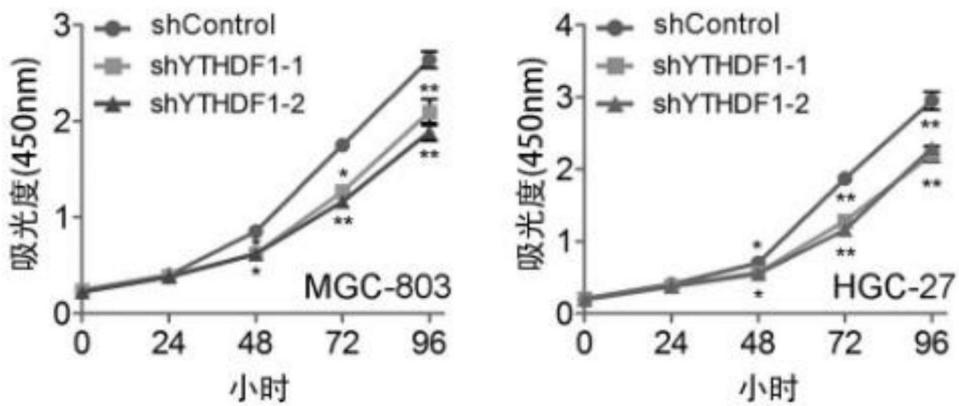


图11

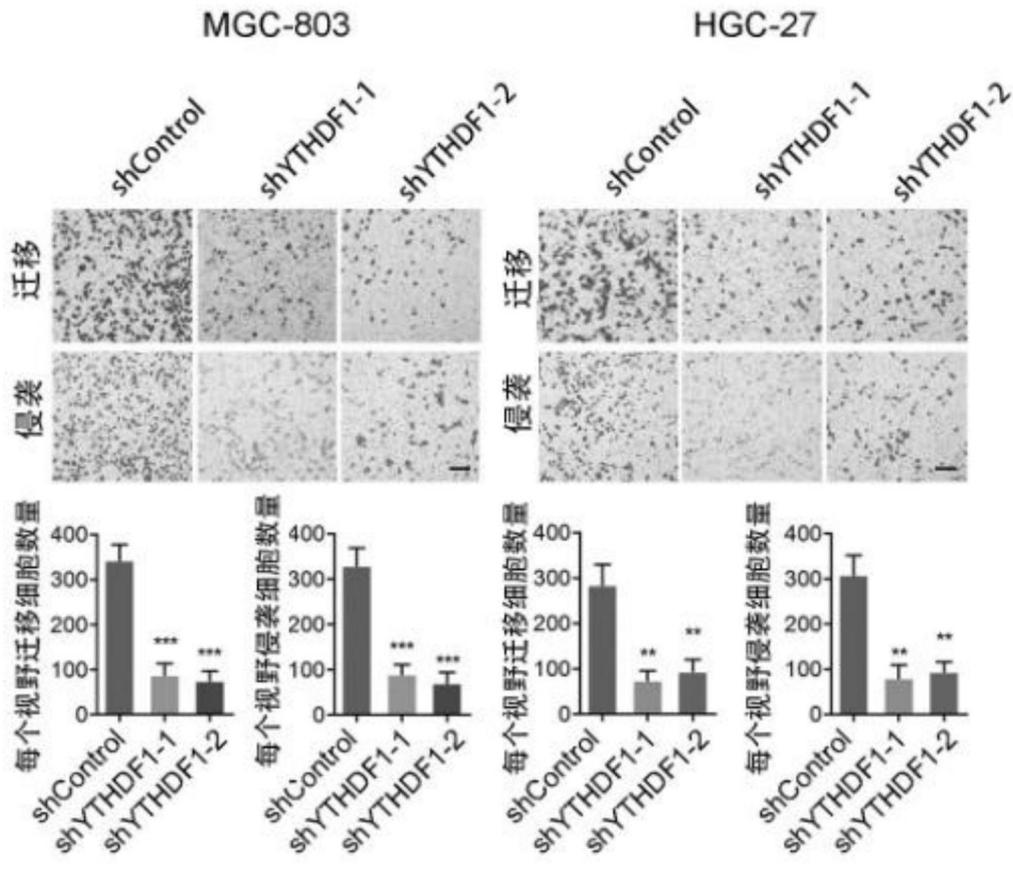


图12

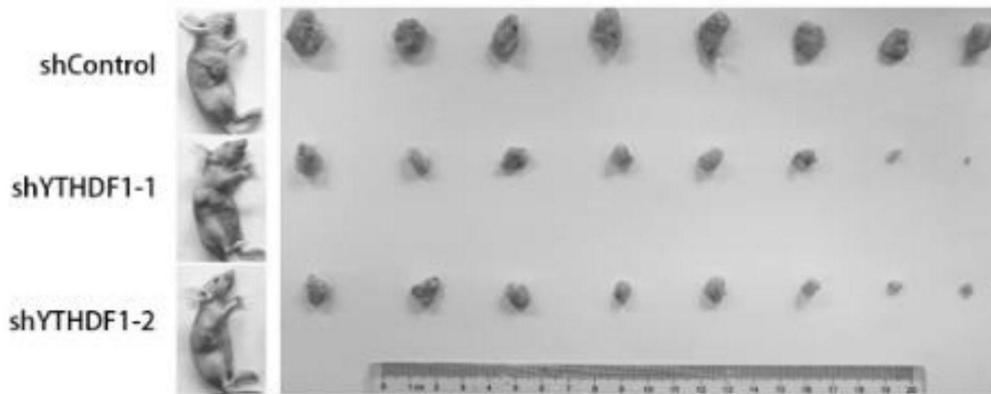


图13

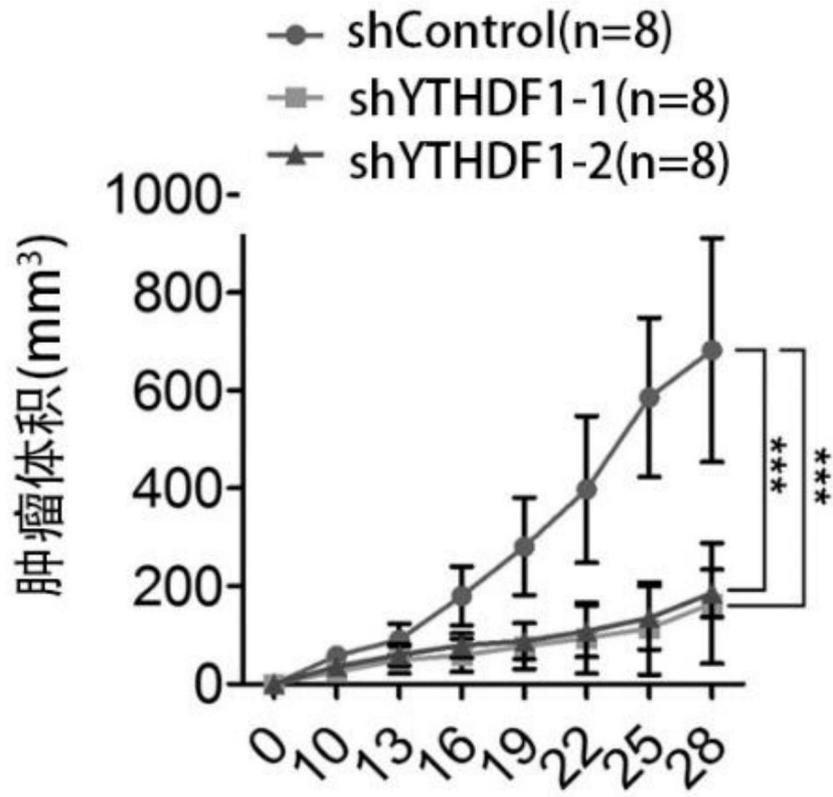


图14

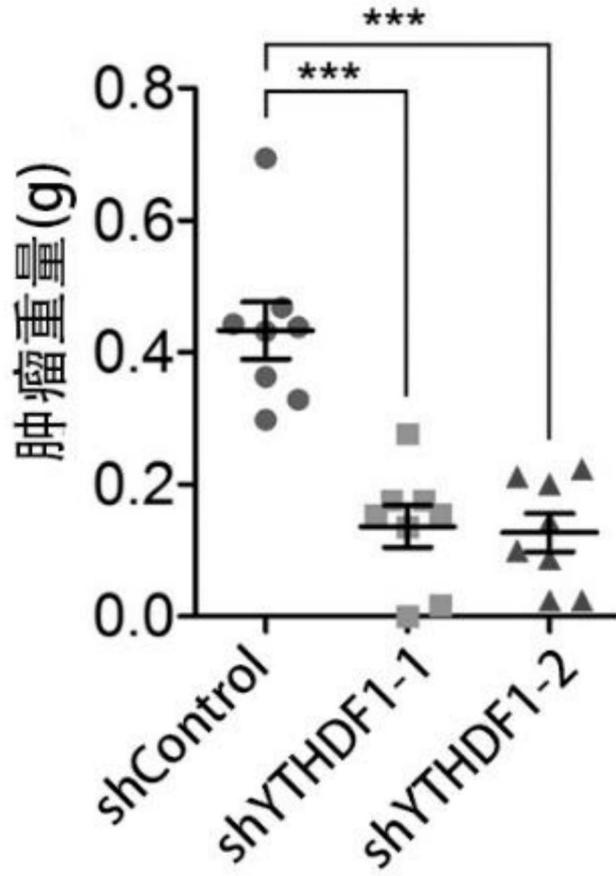


图15

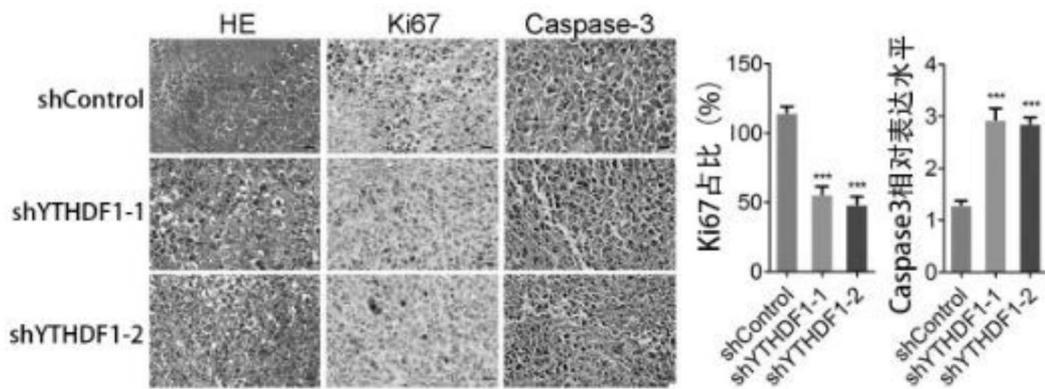


图16

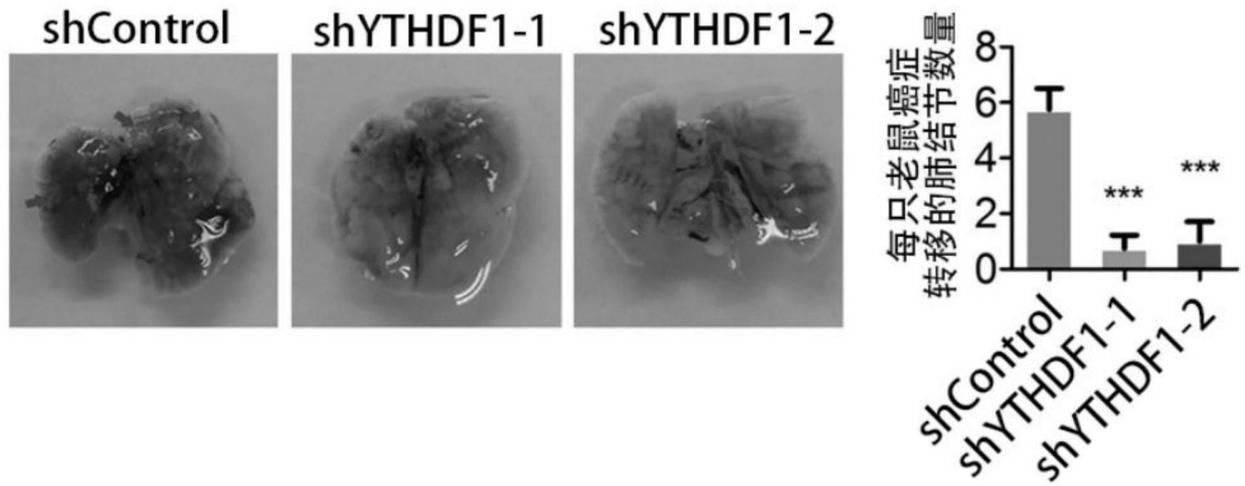


图17

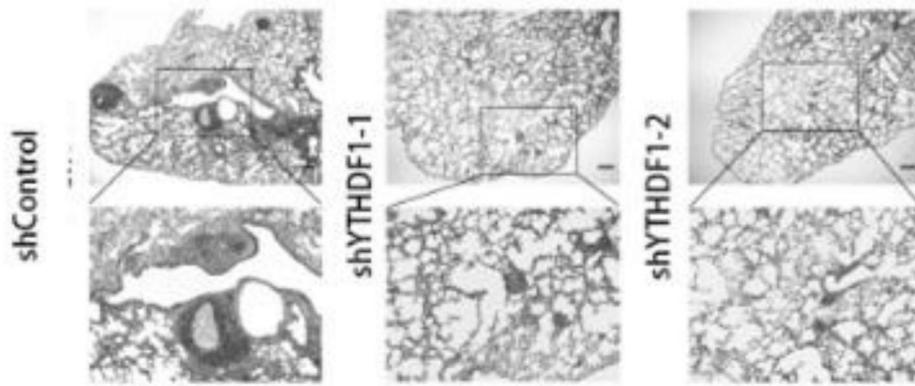


图18

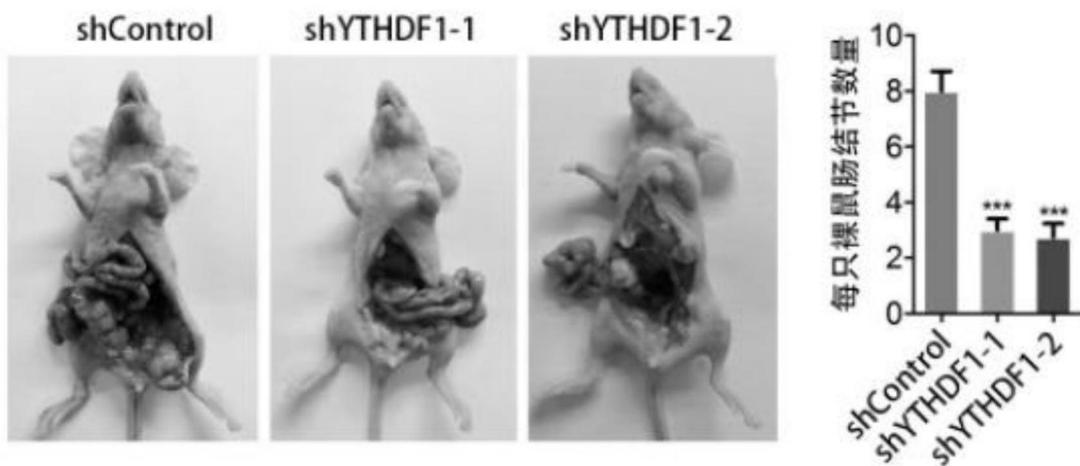


图19