



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114002431 B

(45) 授权公告日 2023.06.16

(21) 申请号 202111406361.2

审查员 李倩

(22) 申请日 2021.11.24

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114002431 A

(43) 申请公布日 2022.02.01

(73) 专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山  
武汉大学

(72) 发明人 章晓联 曲浩然

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务  
所(特殊普通合伙) 42222

专利代理师 江慧

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

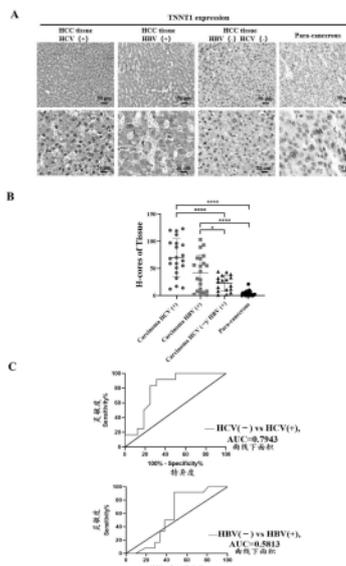
权利要求书1页 说明书11页  
序列表3页 附图7页

(54) 发明名称

TNNT1在制备病毒型肝炎细胞癌诊断试剂盒及  
制备或筛选抗肝癌药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了TNNT1在制备病毒型肝炎细胞癌  
诊断试剂盒及制备或筛选抗肝癌药物中的应用,  
还提供一种TNNT1分子标志物的检测引物的序列  
如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。所述病毒型  
肝细胞癌诊断试剂盒包括所述的检测引物。还提  
供一种抗肝癌药物,包括抑制TNNT1表达的  
药物。本发明筛选得到的细胞浆蛋白标志物TNNT1  
在肝炎病毒阳性的肝癌细胞浆中表达高于肝  
炎病毒阴性的肝癌组织和癌旁组织,可作为肝  
炎病毒诱导肝癌发展及其癌症转移的潜在标志  
物,也可为肝癌的治疗提供新的潜在药物靶点。



1. TNNT1的检测引物在制备病毒型肝炎细胞癌诊断试剂盒中的应用,其特征在于,所述的引物的序列如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示,所述TNNT1作为分子标志物用于区分肝炎病毒阳性肝癌患者和肝炎病毒阴性肝癌患者,所述肝炎包括乙型肝炎和/或丙型肝炎。

## TNNT1在制备病毒型肝炎细胞癌诊断试剂盒及制备或筛选抗肝癌药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,特别涉及TNNT1在制备病毒型肝炎细胞癌诊断试剂盒及制备或筛选抗肝癌药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 乙肝和丙肝病毒(HBV,HCV)导致的病毒性肝炎是常见的传染病。HBV和HCV感染引起肝硬化、肝癌及其并发症。丙型肝炎病毒(HCV)是一种有包膜的单股正链RNA病毒。多种因素已被证实是肝癌发病的危险因素,主要包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、酒精和黄曲霉毒素等。全球肝癌病因主要来自乙型肝炎病毒感染、丙型肝炎病毒感染引起的慢性疾病,其次是长期酗酒及非酒精性脂肪肝引起的。在肝癌发病率变化趋势上,研究指出,全球范围内,由丙型肝炎病毒导致的肝癌发病率增速最快,而由酒精导致的肝癌处于平稳水平。

[0003] 目前HCV缺乏有效的疫苗;HBV缺乏有效的治疗药物。虽然目前高效直接作用的抗病毒药物DAA(direct-acting antivirals)已经问世,在最好的临床条件下,其治愈率超过95%。但是这些药物价格昂贵且因为HCV具有高度变异性,在治疗过程中可能会产生抗性突变毒株。即使在成功治疗后,患者仍有较高的肝癌风险。

[0004] 因此,深入探索HBV感染的新靶点和策略,开发两种病毒引起的肝癌的新的肿瘤标志物和治疗药物,对于HCC的诊断和治疗具有重要意义。

### 发明内容

[0005] 本发明目的是提供TNNT1作为分子标志物在制备病毒型肝炎细胞癌诊断试剂盒中的应用以及TNNT1作为靶标在制备或筛选抗肝癌药物中的应用,利用肝癌诊断试剂盒可检测患者细胞浆蛋白TNNT1的表达水平,单独检测细胞浆蛋白TNNT1的表达水平区分丙肝阳性的肝癌患者和丙肝阴性的肝癌患者,灵敏度达到91%,特异度达到68%;区分乙肝阳性的肝癌患者和乙肝阴性的肝癌患者,灵敏度达到91%,特异度达到52%。

[0006] 在本发明的第一方面,提供了TNNT1作为分子标志物在制备病毒型肝炎细胞癌诊断试剂盒中的应用。

[0007] 进一步地,所述TNNT1作为分子标志物用于区分肝炎病毒阳性肝癌患者和肝炎病毒阴性肝癌患者,所述肝炎包括乙型肝炎和丙型肝炎。

[0008] 在本发明的第二方面,提供了一种TNNT1分子标志物的检测引物,所述的引物的序列如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。

[0009] 在本发明的第三方面,提供了一种病毒型肝炎细胞癌诊断试剂盒,包括所述的检测引物。

[0010] 在本发明的第四方面,提供了TNNT1作为靶标在制备或筛选抗肝癌药物中的应用。

[0011] 在本发明的第五方面,提供了一种抗肝癌药物,该抗肝癌药物包括抑制TNNT1表达的药物。

[0012] 进一步地,所述抗肝癌药物包括抑制TNNT1表达的shRNA,所述shRNA的序列如SEQ ID NO:5-NO:6所示。

[0013] 进一步地,所述抗肝癌药物还包括可诱导所述shRNA在体内表达的诱导剂。

[0014] 进一步地,所述抗肝癌药物包括含有干扰TNNT1基因的抗肝癌的慢病毒载体。

[0015] 本发明实施例中的一个或多个技术方案,至少具有如下技术效果或优点:

[0016] 1、本发明筛选得到的细胞浆蛋白标志物TNNT1在丙肝-HCV阳性的肝癌细胞浆中表达均高于丙肝阴性的肝癌组织和癌旁组织,可作为病毒型肝炎诊断或者预后的标志物,也可为肝癌的治疗提供新的潜在药物靶点;TNNT1在乙肝-HBV阳性的肝癌细胞中表达上升。

[0017] 2、利用肝细胞癌诊断试剂盒可检测患者细胞浆蛋白TNNT1的表达水平,单独检测细胞浆蛋白TNNT1的表达水平区分丙肝阳性的肝细胞癌患者和丙肝阴性的肝细胞癌患者,灵敏度达到91%,特异度达到68%;区分乙肝阳性的肝细胞癌患者和乙肝阴性的肝细胞癌患者,灵敏度达到91%,特异度达到52%。

[0018] 3、将TNNT1作为新的靶标,本发明的TNNT1基因的shRNA、及其慢病毒能够抑制TNNT1的表达,因此可以作为抗肝癌药物。

## 附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图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它的附图。

[0020] 图1为TNNT1在肝癌组织及癌旁组织中表达量的检测;其中,图1A和图1B分别为TNNT1在丙肝病毒阳性肝癌组织、丙肝病毒阴性肝癌组织及配对癌旁组织细胞内的染色强度和采用unpaired t检验进行显著性分析;图1C为单独检测TNNT1区分丙肝病毒阳性肝细胞癌患者和癌旁对照者以及乙肝病毒阳性肝细胞癌患者和癌旁对照者的接收者操作特征(ROC)曲线;

[0021] 图2为TNNT1在丙肝病毒感染下肝癌细胞中的表达量的检测结果;其中,图2A为实时荧光定量多聚酶链式反应(qRT-PCR)和免疫印迹(Western blot)验证在丙肝病毒的感染下,TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1中的mRNA变化水平和表达水平;图2B为共聚焦实验验证在HCV的感染下,TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1中的表达水平;图2C为qRT-PCR实验验证TNNT1在丙肝病毒阳性和丙肝病毒阴性的肝炎病人血清外周血单个核细胞(PBMC)中的mRNA变化水平;

[0022] 图3为TNNT1在乙肝病毒-HBV感染下的表达量的检测;其中,图3A为Western blot验证TNNT1人肝癌细胞HepG2和稳转乙肝病毒的HepG2细胞(HepG2.215)中的蛋白表达水平;图3B为qRT-PCR验证TNNT1在转染稳定表达丙肝病毒core基因、乙肝病毒全长基因和乙肝病毒X基因的真核表达质粒后,在人肝癌细胞Huh7.5.1中的mRNA变化水平;

[0023] 图4为TNNT1在不同肝癌细胞中表达量的检测结果;其中,图4A为Western blot实验和qRT-PCR实验验证TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1与人肝癌细胞HepG2、低转移肝癌细胞MHCC97L及高转移肝癌细胞HCCLM3总细胞蛋白中的表达水平和mRNA变化水平;图4B为共聚焦实验验证共聚焦实验验证TNNT1与上皮间充质转化进程相关蛋白E-钙黏着蛋白(E-

cadherin) 和波形纤维蛋白 (Vimentin) 在人肝癌细胞Huh7.5.1与高转移肝癌细胞HCCLM3中细胞浆内的表达水平;

[0024] 图5为TNNT1敲除与敲低及过表达细胞系的构建结果;其中图5A为Western blot验证TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1敲除与敲低的效率,图5B为Western blot验证TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1过表达的效率;

[0025] 图6为细胞计数试剂盒-8 (CCK8) 实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1增殖能力的影响;

[0026] 图7为细胞流式实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1细胞周期的影响;

[0027] 图8为转移小室(Transwell)实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1迁移和侵袭能力的影响。

[0028] 图9为细胞迁移实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1迁移能力的影响。

### 具体实施方式

[0029] 下文将结合具体实施方式和实施例,具体阐述本发明,本发明的优点和各种效果将由此更加清楚地呈现。本领域技术人员应理解,这些具体实施方式和实施例是用于说明本发明,而非限制本发明。

[0030] 在整个说明书中,除非另有特别说明,本文使用的术语应理解为如本领域中通常所使用的含义。因此,除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员的一般理解相同的含义。若存在矛盾,本说明书优先。

[0031] 除非另有特别说明,本发明中用到的各种原材料、试剂、仪器和设备等,均可通过市场购买获得或者可通过现有方法获得。

[0032] 本申请实施例的技术方案为解决上述技术问题,总体思路如下:

[0033] 本发明通过免疫组化技术发现TNNT1在肝炎病毒阳性的肝癌组织中表达相较于肝炎病毒阴性肝癌组织以及癌旁组织都显著上调且TNNT1可将肝炎病毒阳性与阴性肝癌患者显著区分开来。所述TNNT1的mRNA核酸序列如SEQ ID NO.1所示;TNNT1的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0034] 再通过western blot、qRT-PCR及共聚焦实验发现相较于人肝癌细胞系Huh7.5.1, TNNT1在人肝癌细胞HepG2、低转移肝癌细胞MHCC97L及高转移肝癌细胞HCCLM3中表达上升,这与其转移能力成正比。

[0035] 此外,本发明还提供抑制TNNT1表达的shRNA、慢病毒载体等抗肝癌药物;含有治疗有效量的所述shRNA或者所述TNNT1基因干扰慢病毒,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组成的药物组合物也在本发明的保护范围之内。

[0036] 下面将结合实施例及实验数据对本申请的TNNT1作为分子标志物在制备丙肝病毒阳性肝细胞癌诊断试剂盒中的应用以及TNNT1作为靶标在制备或筛选抗肝癌药物中的应用进行详细说明。

[0037] 实施例1、比较丙肝病毒感染下的肝癌组织及配对癌旁组织中TNNT1的表达差异

[0038] 一、实验对象

[0039] 通过在上海芯超生物科技有限公司及武汉市皮诺飞生物科技有限公司购买的肝癌组织芯片获取了16例丙肝病毒阳性、21例乙肝病毒阳性、及12例丙肝乙肝病毒双阴性肝

癌病人的组织及配对17例癌旁组织样本的石蜡包埋切片及临床信息。

## [0040] 二、实验方法

[0041] 1. 将石蜡组织放置于65℃烤箱中进行烘片1h;

[0042] 2. 接着用100%二甲苯脱蜡两次,每次10min,至完全脱蜡干净;

[0043] 3. 依次放置于100%、95%、85%、75%的梯度酒精中各2min进行水化,最后放在双蒸水中浸泡5min;

[0044] 4. 将处理好的切片置于切片架,放入含有0.05%Tween 20的500mL柠檬酸钠抗原修复液中,100℃加热30min,自然冷却至室温,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗2次,每次3min;

[0045] 5. 将每张切片滴加100μL 3%过氧化氢酶溶液,室温孵育10min,孵育结束后PBS冲洗2次,每次3min;

[0046] 6. 加入一抗兔抗TNNT1(1:100稀释),4℃过夜孵育,用PBS代替一抗作阴性对照;

[0047] 7. 一抗孵育结束后用PBS冲洗2次,每次3min;每张切片滴加100μL羊抗兔IgG二抗(1:500),37℃孵育30min;

[0048] 8. 二抗孵育结束后用PBS冲洗2次,每次3min;每张切片滴加100μL新鲜配制的DAB显色液,待切片呈现棕黄色立刻用流水冲洗停止反应;

[0049] 9. 随后用苏木素复染2min,加入盐酸酒精分色,2-3s后立即用自来水冲洗返蓝;

[0050] 10. 依次放置于75%、85%、95%、100%的梯度酒精中脱水2min,放入二甲苯10min进行透明,过夜吹干后滴加中性树胶室温保存。

[0051] 11. 用扫描显微镜检测TNNT1的染色强度。

## [0052] 三、实验结果

[0053] 如图1可知,TNNT1在肝炎病毒阳性和肝炎病毒阴性的肝癌组织及配对癌旁组织细胞浆中的染色强度采用unpaired t检验进行显著性分析存在显著性。利用免疫组化实验对21例丙肝病毒阳性、20例乙肝病毒阳性和20例丙肝病毒乙肝病毒双阴性肝癌病人的组织及配对21例癌旁组织进行TNNT1表达量的验证,结果表明TNNT1在肝癌组织中表达明显上调且TNNT1可将肝炎(包括乙肝和/或丙肝)病毒阳性肝癌患者与肝炎(包括乙肝和/或丙肝)病毒阴性肝癌患者显著区分开来。

[0054] 实施例2、验证肝炎病毒对TNNT1表达的影响并比较人肝癌细胞Huh7.5.1与具有不同转移潜力的肝癌细胞系中TNNT1的表达差异

[0055] 1、western blot:每种细胞收集约 $1 \times 10^7$ 的细胞量,用 $2 \times$ SDS loading buffer溶解后高温使蛋白变性为线性。用总蛋白进行10%SDS-PAGE凝胶分离实验,转移至PVDF膜后用5%脱脂奶粉封闭2h,接着用一抗TNNT1(1:1000稀释)4℃孵育过夜,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:10000稀释)作为内参蛋白。一抗孵育结束后,用Tris-盐酸缓冲液+Tween(TBST)洗膜4次,每次10min。后加入二抗HRP-羊抗兔IgG(1:10000),37℃孵育45min。二抗孵育结束后,TBST洗膜6次,每次5min。将显影液A液与B液按照1:1的体积比避光配制显色液,加入到PVDF膜上,进行ECL显色。

[0056] 2、逆转录(PrimeScriptTMRT试剂盒—日本Toyobo公司):

[0057] (1)RNA提取:收集六孔板细胞,每孔加入1mLTrizol,冰上孵育3-5min,后转移至去RNase酶的1.5mL EP管中。继续向EP管中加200μL氯仿,来回剧烈震荡管体15s,室温静置2-3min。12000rpm,4℃离心15min,此时管中液体分为上层无机水相、中间层以及下层有机酚

氯仿相,将上层水相转移到新的无RNase酶EP管中。接着加入等体积的异丙醇,上下颠倒使其充分混匀,室温静置5min,12000rpm,4℃离心15min。加入1mL预冷的75%的乙醇洗涤白色沉淀,12000rpm离心5min,后重复1次。洗涤结束后吸弃上清,将白色沉淀置于通风橱进行吹干直至底部沉淀变为半透明。加入20μL提前65℃预热的DEPC-ddH<sub>2</sub>O溶解沉淀,再用微量分光光度计测定RNA浓度。

[0058] (2) 逆转录反应:向上述反应液中加入2μL 5×的RT Master Mix II(冰上操作),混匀后瞬离10-15s,在普通PCR仪上运行如下程序37℃15min,98℃5min,4℃∞,运行完成后立即置于冰上冷却;此时RNA已逆转录为cDNA,可直接使用或置于-20℃保存。

[0059] 3、qRT-PCR检测TNNT1的表达效果。

[0060] (1) 引物设计如表1所示。

[0061] 表1-qRT-PCR所用引物

基因	前引物 (5'-3')	后引物 (5'-3')
[0062] TNNT1	GAGCGTAAGAAGCCTCTGG	GCTACCGATGGGACAAAC
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 4)
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 8)

[0063] (2) 反应体系:qPCR所用试剂盒为Vazyme公司的SYBR-Green I Premix Ex Taq,反应体系按照9:1的比例进行加样(即试剂加18μL,cDNA模板加2μL)。对于每个样本,内参GAPDH和目的TNNT1同时检测,且均做3个复孔。实验所用的仪器为ABI Q6,具体反应体系如下表2:

[0064] 表2

成分	用量
SYBR-Green I Premix Ex Taq	10μL
Forward primer (2μM)	1μL
Reverse primer (2μM)	1μL
RNase-free water	6μL
cDNA	2μL

[0066] (3) qRT-PCR:注意全程在冰上操作,且避免外源DNA的污染。样品加样完成后离心10-15s,在qPCR仪上运行如下程序95℃1min,95℃15sec,55℃20sec,72℃45sec,除第一步外,其余共计40个循环。运行完成后,通过观察溶解曲线,判断是否有引物二聚体形成以及非特异性扩增。Ct值是指反应管中的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数,反映了样本所含的起始拷贝数。起始拷贝数越少,Ct越大,反之则越小。对于每个样品来说,TNNT1的实际Ct值为三个复孔Ct的平均值,GAPDH的实际Ct值为其三个复孔Ct的平均值,通过计算Ct TNNT1-Ct GAPDH,得出ΔCt。qPCR运行完成后的8联管可置于4℃保存。

[0067] 4、免疫荧光检测TNNT1在细胞内的表达:2×10<sup>5</sup>个Huh7.5.1细胞均匀铺于confocal小皿,向上清中加入HCVcc 200μl使其感染,感染24h后,去细胞培养上清,PBS洗涤细胞1次,4%多聚甲醛室温固定细胞10min,PBS洗涤细胞3次,0.5% Triton X-100透化10min;5%BSA封闭细胞,37℃孵育1小时;anti-TNNT1 mAb(1:1000)和FITC-羊抗鼠二抗染

TNNT1;对于检测上皮间充质转化进程(EMT)相关蛋白,利用anti-E-cadherin mAb(1:1000) FITC-羊抗鼠二抗染E-钙黏着蛋白(E-cadherin),以anti-Vimentin pAb和Cy5羊抗兔二抗染波形纤维蛋白(Vimentin);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染细胞核5min,PBS洗两次后共聚焦显微镜下观察TNNT1蛋白的表达变化。

#### [0068] 5、实验结果

[0069] 由图2A-C可知,Western blot和共聚焦实验验证HCV可以提高TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1中的蛋白和mRNA的表达水平;

[0070] 由图3A可知,Western blot验证TNNT1在人肝癌细胞HepG2中的蛋白表达水平低于在稳转乙肝病毒的人肝癌细胞HepG2细胞(HepG2.215)中的水平;

[0071] 由图3B可知,qRT-PCR验证在人肝癌细胞Huh7.5.1中转染乙肝病毒全长基因和乙肝病毒X基因的真核表达质粒后,TNNT1的mRNA表达水平上升;

[0072] 由图4A可知,Western blot和qRT-PCR验证TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1与人肝癌细胞HepG2、低转移肝癌细胞MHCC97L及高转移肝癌细胞HCCLM3总细胞蛋白中的表达水平和mRNA变化水平,相比于人肝癌细胞Huh7.5.1,TNNT1在人肝癌细胞HepG2、低转移肝癌细胞MHCC97L及高转移肝癌细胞HCCLM3表达上升;

[0073] 由图4B可知,共聚焦实验验证共聚焦实验验证TNNT1与上皮间充质转化进程相关蛋白E-钙黏着蛋白(E-cadherin)和波形纤维蛋白(Vimentin)在人肝癌细胞Huh7.5.1与高转移肝癌细胞HCCLM3中细胞浆内的表达水平;相比于人肝癌细胞Huh7.5.1,TNNT1和Vimentin在敲低和敲除TNNT1的人肝癌细胞Huh7.5.1和敲低TNNT1的高转移肝癌细胞HCCLM3中表达下降,E-cadherin表达上升。

[0074] 综上可知,利用Western blot、qRT-PCR、共聚焦实验对感染HCV的人肝癌细胞Huh7.5.1细胞进行TNNT1表达量的验证,结果表明HCV可以促进TNNT1在肝癌细胞中的表达;利用Western blot、qRT-PCR实验对人肝癌细胞HepG2和稳转HBV病毒的HepG2.215细胞蛋白进行TNNT1表达量的验证,同时转染乙肝病毒全长基因和乙肝病毒X基因的真核表达质粒后,对人肝癌细胞Huh7.5.1中的TNNT1的mRNA表达量进行验证,结果表明HBV可以促进TNNT1在肝癌细胞中的表达;利用Western blot、qRT-PCR、共聚焦实验对人肝癌细胞Huh7.5.1细胞、人肝癌细胞HepG2、低转移肝癌细胞MHCC97L及高转移肝癌细胞HCCLM3的细胞蛋白进行TNNT1表达量的验证,结果表明相较Huh7.5.1细胞,TNNT1在其他肝癌细胞总蛋白中表达量上升,且随着肝癌转移程度的增加,TNNT1在总蛋白中的表达量呈现进行性上升。

#### [0075] 6、肝细胞癌诊断试剂盒

[0076] 包括:TNNT1分子标志物的检测引物,所述的引物的序列如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。

[0077] 所述试剂盒为实时荧光定量PCR试剂盒,包括所述的检测引物,还包括:用于均一化的内参引物(如表1所示)和qPCR反应常规试剂。

[0078] 同时用GAPDH作为均一化参照引物对逆转录合成待检测样本cDNA进行qPCR扩增,获得Ct GAPDH;

[0079] 通过计算Ct TNNT1-Ct GAPDH,得出 $\Delta Ct$ ,对 $\Delta Ct$ 进行分析判断原则为:

[0080] 将待测样本的 $\Delta Ct$ 值与健康对照者样本的 $\Delta Ct$ 值进行比较,并进行统计学分析获得P值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0081] 若 $P < 0.05$ ,待测样本诊断为肝细胞癌;

[0082] 若 $P \geq 0.05$ ,待测样本不诊断为肝细胞癌;

[0083] 采用上述方法进行检测,结果如下:

[0084] (1) 利用肝细胞癌诊断试剂盒可检测患者细胞浆蛋白TNNT1的表达水平,单独检测细胞浆蛋白TNNT1的表达水平区分丙肝阳性的肝细胞癌患者和丙肝阴性的肝细胞癌患者,灵敏度达到91%,特异度达到68%;

[0085] (2) 区分乙肝阳性的肝细胞癌患者和乙肝阴性的肝细胞癌患者,灵敏度达到91%,特异度达到52%。

[0086] 实施例3、验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1增殖能力、细胞周期及迁移能力的影响

[0087] 1、TNNT1敲除及敲低细胞系与过表达细胞系的构建

[0088] (1) TNNT1敲除细胞系的构建(由江苏吉锐生物有限公司制作):具体方法如下,有公司操作:以黄色枪头蘸取TNNT1-gRNA菌液转入含有600 $\mu$ L LB培养基的1.5mL离心管中,具体序列见表3,并进行大量提取。转染前1天,将生长状态良好的Cas9 KO Huh7.5.1细胞以 $1 \times 10^6$ 个/mL的浓度接种到6孔板中,每孔2mL,37 $^{\circ}$ C细胞培养箱过夜,使细胞汇聚率达到90%左右。使用Neofect<sup>TM</sup>转染试剂,按照说明书转染质粒gTNNT1-1及gTNNT1-2并以不转染质粒的孔作为空白对照组。转染后6h更换新鲜的完全培养基。转染48h后,在倒置荧光显微镜下观察蓝色荧光的表达量。将每孔细胞传代至12孔板中,在培养基中加入终浓度为2 $\mu$ g/mL的嘌呤霉素进行筛选,2-3后肉眼可见细胞变圆死亡开始漂浮,空白组细胞全部死亡,对照组细胞大部分死亡,只剩小部分呈单克隆形态的细胞处于贴壁状态。之后每天更换新鲜完全培养基,用PBS洗去漂浮的细胞并加入终浓度为1 $\mu$ g/mL的嘌呤霉素维持抗性。2-3星期以后,待孔中的细胞密度达到90%以后,将细胞进行传代,并每天加入原来一半浓度的嘌呤霉素以维持细胞抗性,传至3-4代后运用western blot检测基因敲除效率并将细胞冻存

[0089] (2) TNNT1敲低细胞系的构建:在Life Technologies网站:<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>针对TNNT1设计两条shRNA序列,具体序列见表3。

[0090] 表3-shRNA序列

基因	序列 5'-3'
TNNT1-shRNA-ol igo 1	GCTGCAGACACTCATCGATGTTTCAAGCTTACATCGATGAGTGTCTGCAGCTTTT (SEQ ID NO: 5)
TNNT1-shRNA-ol igo 2	AATTAAAAAGCTGCAGACACTCATCGATGTAAGCTTGAAACATCGATGAGTGTCTG CAGCGGCC (SEQ ID NO: 6)

[0092] 将pLKO.1-EGFP质粒进行酶切,37 $^{\circ}$ C,水浴3h,具体体系如下(50 $\mu$ L体系):

[0093] 表4

pLKO.1-EGFP 质粒	3 $\mu$ g (in 3 $\mu$ L)
<i>Eco</i> RI	2 $\mu$ L
<i>Age</i> I	2 $\mu$ L
10 $\times$ NEB TM Buffer	5 $\mu$ L
BSA	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	37 $\mu$ L

[0094]

[0095]	总体积	50 $\mu$ L
--------	-----	------------

[0096] 将合成的引物用灭菌的ddH<sub>2</sub>O溶解并稀释到100 $\mu$ M,进行退火,体系如下:

[0097] 表5

[0098]	Oligo1	10 $\mu$ L
	Oligo2	10 $\mu$ L
	总体积	20 $\mu$ L

[0099] PCR仪缓慢退火,自然冷却至室温(95 $^{\circ}$ C,5min),随后将退火产物与pLK0.1-EGFP双酶切片段连接,反应程序如下,连接条件为16 $^{\circ}$ C、30min:

[0100] 表6

[0101]	Oligo1及Oligo2退火产物	8 $\mu$ L
	pLK0.1-EGFP质粒双酶切片段	2 $\mu$ L
	Ligationhigh	5 $\mu$ L
	总体积	15 $\mu$ L

[0102] 随后将连接产物进行转化,并提取质粒。并转染到293T细胞中进行慢病毒包装。随后将Huh7.5.1细胞以 $2 \times 10^5$ 个/mL的浓度接种到6孔板中,37 $^{\circ}$ C培养过夜,待细胞长至密度60%-70%时进行感染。将分装好的病毒滴加到细胞中,每孔500 $\mu$ L病毒液加上2mL含10% Gbico血清的完全DMEM培养基,按照1:1000的比例加入聚凝胺使其终浓度为10 $\mu$ g/mL。感染过夜后对细胞进行换液,感染48h后在荧光显微镜下观察GFP的表达效率,随后加入含嘌呤霉素2 $\mu$ g/mL的10%完全DMEM培养基对细胞进行培养。每2天更换含嘌呤霉素的DMEM完全培养基一次,待阳性单克隆长满整个视野后进行传代,并加入1 $\mu$ g/mL嘌呤霉素以维持抗性,传代3-4次后运用westernblot检测基因敲低效率,冻存稳转细胞株。

[0103] (3) TNNT1过表达细胞系的构建:针对TNNT1设计两端引物序列,并进行PCR扩增,具体序列见表7。

[0104] 表7-TNNT1引物序列

	基因	方向	引物 (5'-3')	酶切位点
[0105]	TNNT1 (756bp)	Forward	TAGAATTCTA ATGTCGGACACCGAGGA (SEQ ID NO: 9)	<i>EcoR</i> I
[0106]		Reverse	TAAAGCTTCTCCAGCGCCTCCAA (SEQ ID NO: 10)	<i>Hind</i> III

[0107] 具体PCR体系及流程如下:

[0108] 表8

[0109]	F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
	R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
	Huh7.5.1cDNA	1 $\mu$ L
	dNTP	2 $\mu$ L
	2 $\times$ PhantaMix	25 $\mu$ L
	polymerase	2 $\mu$ L

灭菌ddH <sub>2</sub> O	18μL
总体积	50μL

[0110] 表9

95°C	4min
95°C	15s
65°C	15s
72°C	30s
72°C	4min
总体系	30cycle

[0112] 将PCR扩增产物及pcDNA3.1质粒进行酶切,37°C,水浴3h,具体体系如下(30μL体系):

[0113] 表10

pcDNA3.1 载体质粒/PCR 扩增产物	4 μL/9 μL
ddH <sub>2</sub> O	12.5 μL
10×Buffer E	2 μL

[0114]

<i>EcoR</i> I	1 μL
<i>Hind</i> III	1 μL
BSA	0.5 μL
总体积	30 μL

[0115]

[0116] 将酶切完成的PCR扩增产物及pcDNA3.1质粒进行割胶回收后并连接,连接体系如下:

[0117] 表11

pcDNA3.1酶切载体	2μL
基因PCR产物酶切片段	8μL
LigationHigh	5μL
总体积	15μL

[0119] 将酶连产物进行转化并质粒提取,测序成功后转到Huh7.5.1细胞中运用western blot检测基因敲低效率。

[0120] 2、CCK8实验:Huh7.5.1TNNT1 KO及Huh7.5.1细胞以 $2 \times 10^5$ 个/mL的浓度接种到12孔板中,每孔1mL;37°C培养过夜后,使细胞汇聚率达到70%左右。使用Neofect™转染试剂,按照说明书转染pcDNA3.1空载及pcDNA3.1-TNNT1,以上均以不转染的细胞作为空白对照;转染后48h,将上述各组细胞以 $1 \times 10^4$ 个/孔的浓度接种到96孔板中,每孔100μL;37°C培养并按不同时间点进行CCK8检测;提前按照1:100比例将CCK8试剂与DMEM完全培养基混合均匀,液体换为新鲜培养基后每孔避光加入100μL混合物,37°C培养箱内孵育1h,酶标仪测定450nm的吸光度。

[0121] 3、流式细胞实验:Huh7.5.1TNNT1 KO及Huh7.5.1细胞以 $2 \times 10^5$ 个/mL的浓度接种到12孔板中,每孔2mL;37℃培养过夜,使得细胞汇聚率达到70%左右。使用Neofect™转染试剂,按照说明书转染pcDNA3.1-TNNT1,以上均以不转染的细胞作为空白对照;转染后48h,收集细胞沉淀,用预冷的PBS洗涤细胞3次,加1mLPBS重悬,同时缓慢滴加3mL预冷无水乙醇使其最终浓度为75%, $-20^\circ\text{C}$ 固定过夜。PBS洗3次,加500 $\mu\text{L}$  PI染料室温避光孵育30min,200目滤网过滤后上机检测。

[0122] 4.Transwell实验:Huh7.5.1细胞以 $1 \times 10^6$ 个/mL的浓度接种到6孔板中,每孔2mL;37℃培养过夜,使得细胞汇聚率达到70%左右;使用Neofect™转染试剂,按照说明书转染pcDNA3.1-TNNT1,以上均以不转染的细胞作为空白对照;转染24h后继续血清饥饿24h,收集上述各组细胞Huh7.5.1TNNT1 KO细胞系细胞沉淀,并以1mL无血清DMEM培养基重悬,细胞计数后以 $5 \times 10^4$ 个/mL的浓度吸取250 $\mu\text{L}$ 到transwell上室内,下室加入500 $\mu\text{L}$ 含有20%FBS的DMEM完全培养基;24h后弃培养基,PBS清洗3次,加入500 $\mu\text{L}$  4%多聚甲醛室温固定15min;PBS清洗3次,加入500 $\mu\text{L}$  0.1%结晶紫溶液室温染色20min;PBS清洗3次,用棉棒轻轻将上室细胞擦拭干净,显微镜下观察染色情况并计数。

[0123] 5、细胞划痕实验:Huh7.5.1和Huh7.5.1TNNT1 KO细胞以 $1 \times 10^6$ 个/mL的浓度接种到6孔板中,每孔2mL;用marker笔在6孔板背后,用直尺比着,均匀划横线,大约每隔0.5~1cm一道,横穿过孔;第二天用枪头比着直尺,尽量垂至于背后的横线划痕,枪头要垂直,不能倾斜;用PBS洗细胞3次,去处划下的细胞,加入无血清培养基;放入37度5%CO<sub>2</sub>培养箱,继续培养。按0,24,48小时取样,拍照。

### [0124] 三、实验结果

[0125] 由图5A可知,Western blot验证TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1中的敲除及敲低效率,相比于未转染细胞及转染空载组,TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1表达得到了明显的抑制;由图5B可知,Western blot验证TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1中的过表达效率,相比于未转染细胞及空载组,TNNT1在人肝癌细胞Huh7.5.1表达得到了明显的提高。

[0126] 由图6可知,CCK8实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1增殖的影响;相比于未转染组及空载组,48h时过表达TNNT1能明显促进Huh7.5.1细胞的增殖能力,TNNT1被敲除后Huh7.5.1细胞的增殖能力得到明显的抑制。回补TNNT1表达后表型得到回升。

[0127] 由图7可知,流式细胞实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1细胞周期的影响;相比于未转染组,过表达TNNT1能促进Huh7.5.1细胞进入S期,而TNNT1被敲除后S期细胞数目则减少,G0/G1期细胞数目增多,回补TNNT1表达后表型得到回升。

[0128] 由图8可知,Transwell实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1迁移能力的影响;相比于未转染组及空载组,过表达TNNT1能促进Huh7.5.1细胞迁移数量显著增加,而TNNT1被敲除后迁移数量则显著减少,回补TNNT1表达后表型得到回升。

[0129] 由图9可知,细胞划痕实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1迁移能力的影响;相比于正常Huh7.5.1细胞,TNNT1被敲除后细胞迁移能力下降,划痕宽度变化缓慢,回补TNNT1表达后表型得到回升。

[0130] 综上可知,利用CCK8实验、流式细胞实验、Transwell实验及细胞划痕实验验证TNNT1对人肝癌细胞Huh7.5.1增殖及迁移能力与细胞周期的影响,结果表明TNNT1能促进Huh7.5.1细胞的增殖及迁移能力,并促使Huh7.5.1细胞进入S期。

[0131] 综上所述表明TNNT1可为肝癌的治疗提供新的潜在药物靶点,将TNNT1作为新的靶标,本发明的TNNT1基因的shRNA、及其慢病毒能够抑制TNNT1的表达,因此可以作为抗肝癌药物。

[0132] 最后,还需要说明的是,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。

[0133] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

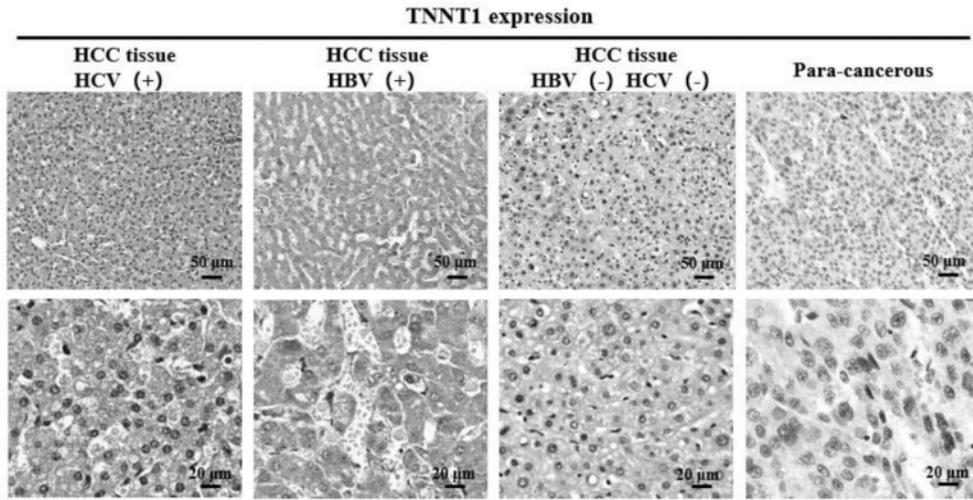
[0134] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。



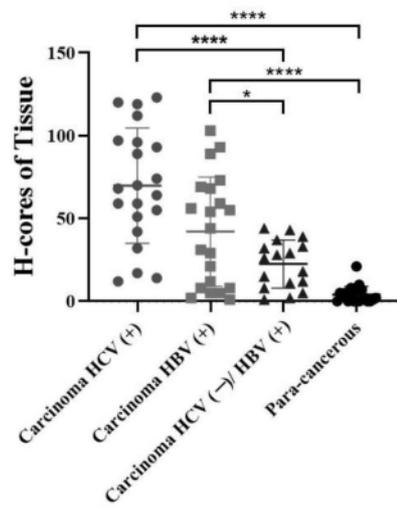
[0038]	65	70	75	80	
[0039]	Leu Ile Asp Val His Phe Glu Gln Arg Lys Lys Glu Glu Glu Glu Leu				
[0040]		85	90	95	
[0041]	Val Ala Leu Lys Glu Arg Ile Glu Arg Arg Arg Ser Glu Arg Ala Glu				
[0042]		100	105	110	
[0043]	Gln Gln Arg Phe Arg Thr Glu Lys Glu Arg Glu Arg Gln Ala Lys Leu				
[0044]		115	120	125	
[0045]	Ala Glu Glu Lys Met Arg Lys Glu Glu Glu Glu Ala Lys Lys Arg Ala				
[0046]		130	135	140	
[0047]	Glu Asp Asp Ala Lys Lys Lys Lys Val Leu Ser Asn Met Gly Ala His				
[0048]		145	150	155	160
[0049]	Phe Gly Gly Tyr Leu Val Lys Ala Glu Gln Lys Arg Gly Lys Arg Gln				
[0050]		165	170	175	
[0051]	Thr Gly Arg Glu Met Lys Val Arg Ile Leu Ser Glu Arg Lys Lys Pro				
[0052]		180	185	190	
[0053]	Leu Asp Ile Asp Tyr Met Gly Glu Glu Gln Leu Arg Glu Lys Ala Gln				
[0054]		195	200	205	
[0055]	Glu Leu Ser Asp Trp Ile His Gln Leu Glu Ser Glu Lys Phe Asp Leu				
[0056]		210	215	220	
[0057]	Met Ala Lys Leu Lys Gln Gln Lys Tyr Glu Ile Asn Val Leu Tyr Asn				
[0058]		225	230	235	240
[0059]	Arg Ile Ser His Ala Gln Lys Phe Arg Lys Gly Ala Gly Lys Gly Arg				
[0060]		245	250	255	
[0061]	Val Gly Gly Arg Trp Lys				
[0062]		260			
[0063]	<210>	3			
[0064]	<211>	19			
[0065]	<212>	DNA			
[0066]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)			
[0067]	<400>	3			
[0068]	gagcgtaga agcctctgg				19
[0069]	<210>	4			
[0070]	<211>	18			
[0071]	<212>	DNA			
[0072]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)			
[0073]	<400>	4			
[0074]	gctaccgatg ggacaaac				18
[0075]	<210>	5			
[0076]	<211>	56			

[0077]	<212>	DNA	
[0078]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0079]	<400>	5	
[0080]		gctgcagaca ctcatcgatg tttcaagctt acatcgatga gtgtctgcag cttttt	56
[0081]	<210>	6	
[0082]	<211>	64	
[0083]	<212>	DNA	
[0084]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0085]	<400>	6	
[0086]		aattaaag ctgcagacac tcatcgatgt aagcttgaaa catcgatgag tgtctgcagc	60
[0087]		ggcc	64
[0088]	<210>	7	
[0089]	<211>	19	
[0090]	<212>	DNA	
[0091]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0092]	<400>	7	
[0093]		gaaggtgaag gtcggagtc	19
[0094]	<210>	8	
[0095]	<211>	20	
[0096]	<212>	DNA	
[0097]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0098]	<400>	8	
[0099]		gaagatggtg atgggatttc	20
[0100]	<210>	9	
[0101]	<211>	27	
[0102]	<212>	DNA	
[0103]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0104]	<400>	9	
[0105]		tagaattcta atgtcggaca ccgagga	27
[0106]	<210>	10	
[0107]	<211>	25	
[0108]	<212>	DNA	
[0109]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0110]	<400>	10	
[0111]		taaagcttct tccagcggcc tccaa	25

A



B



C

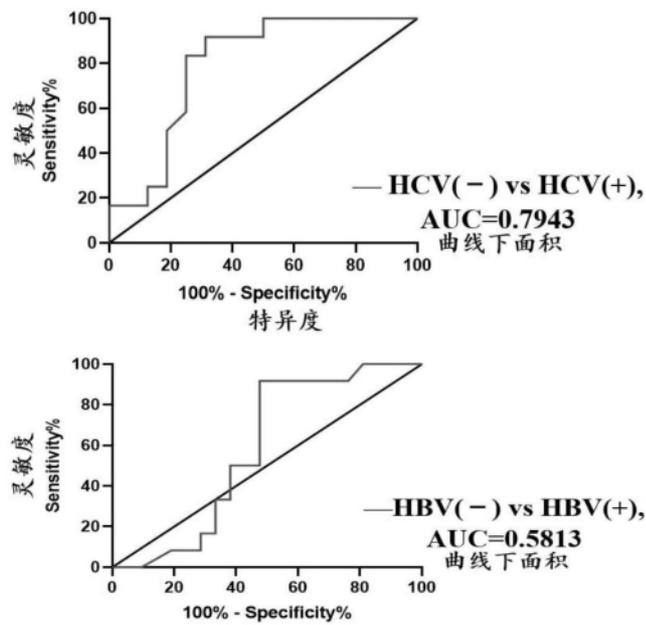


图1

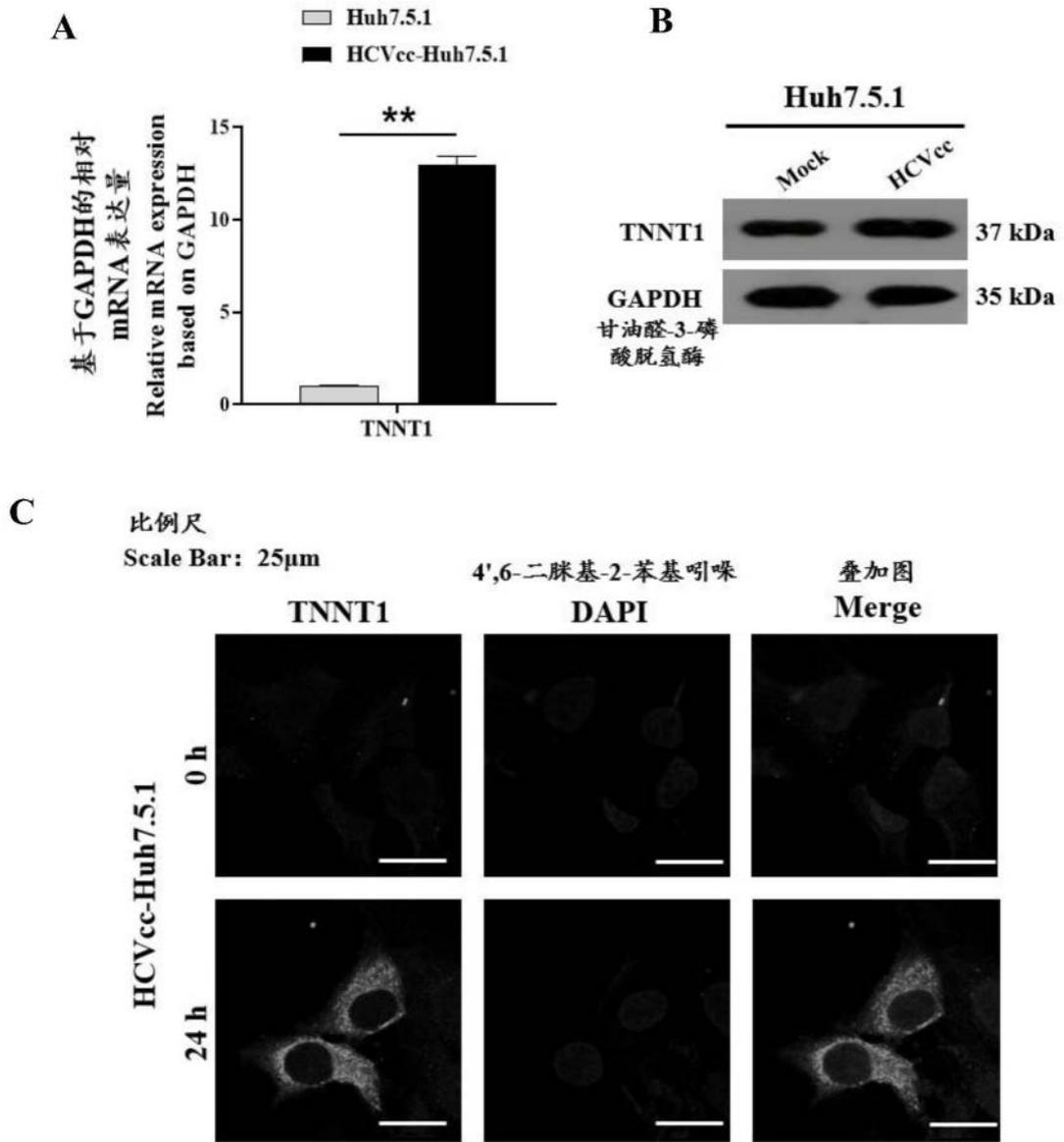
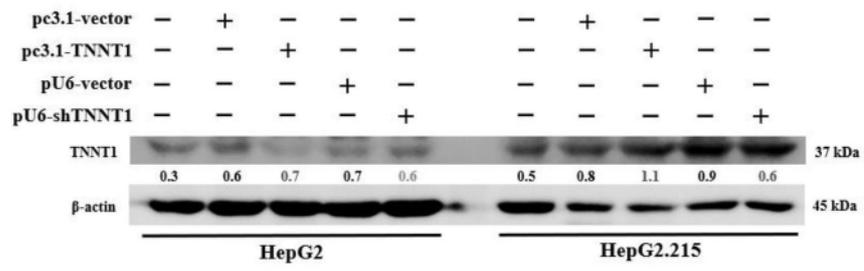


图2

**A**



**B**

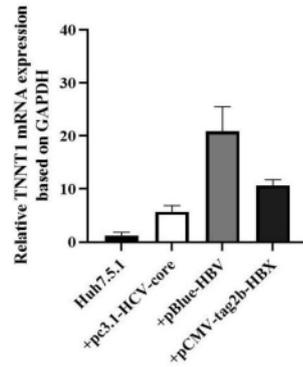


图3

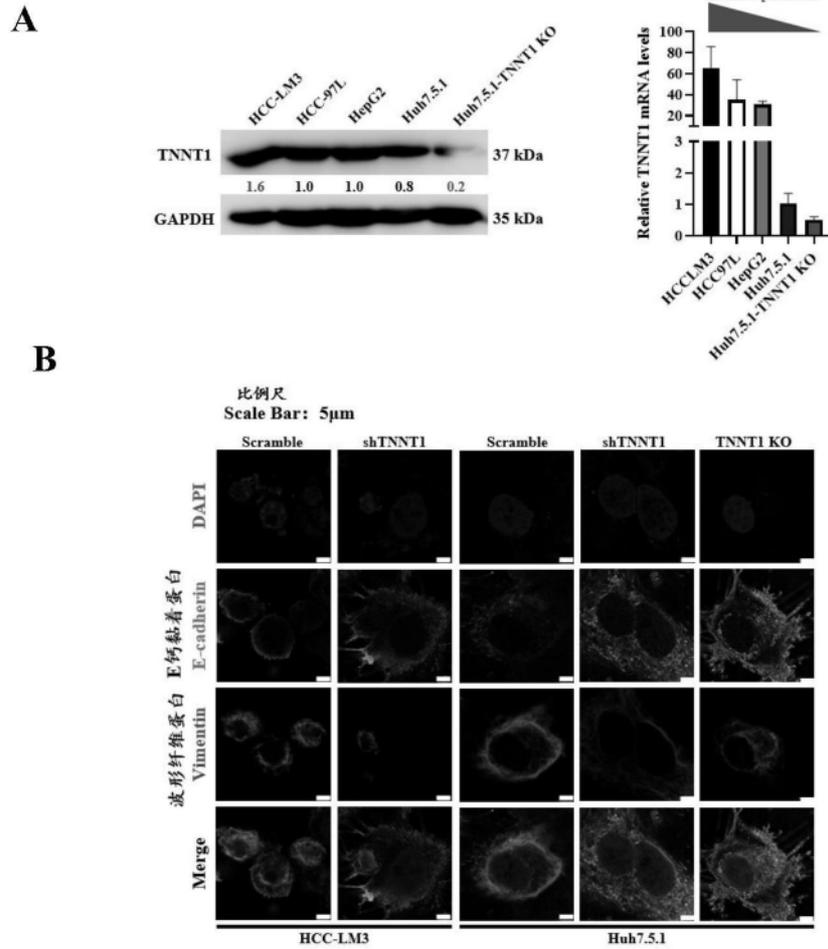


图4

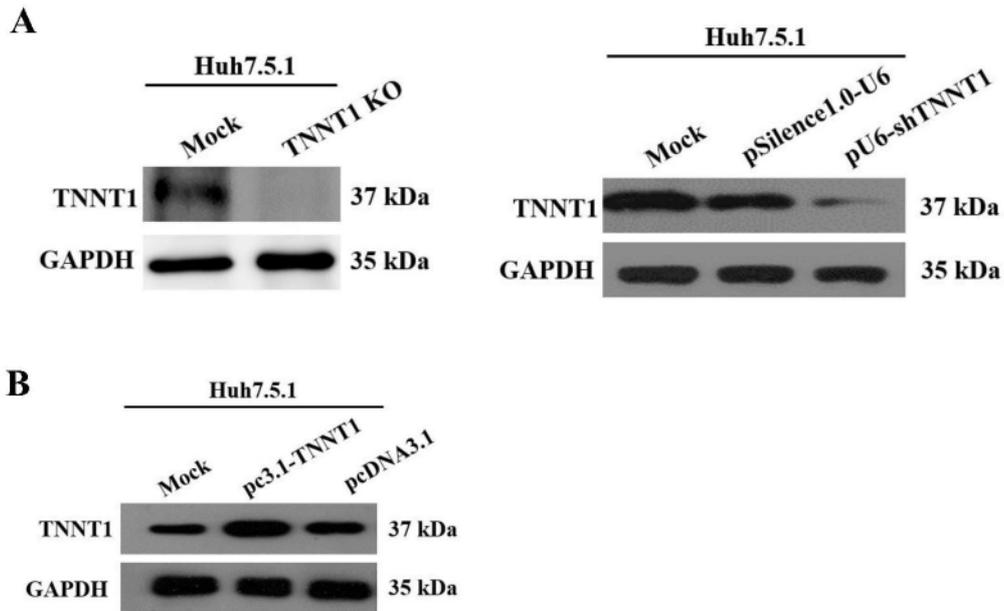


图5

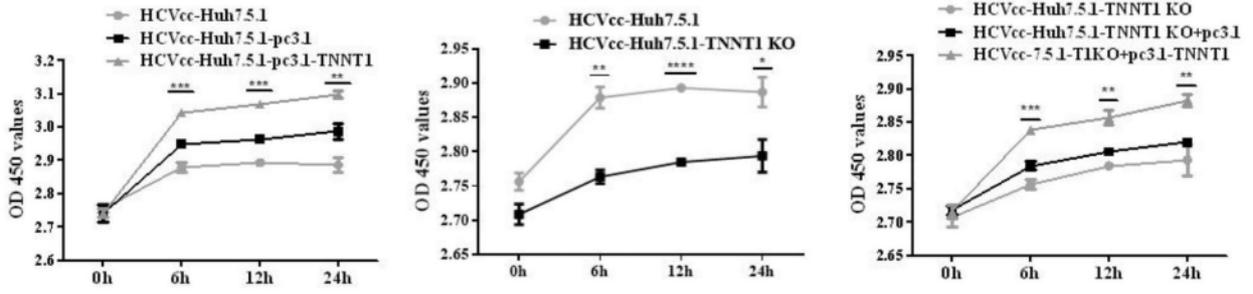


图6

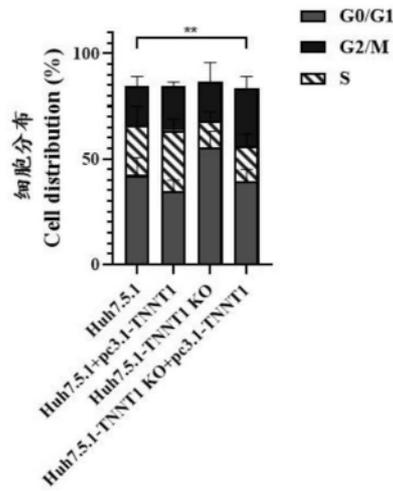
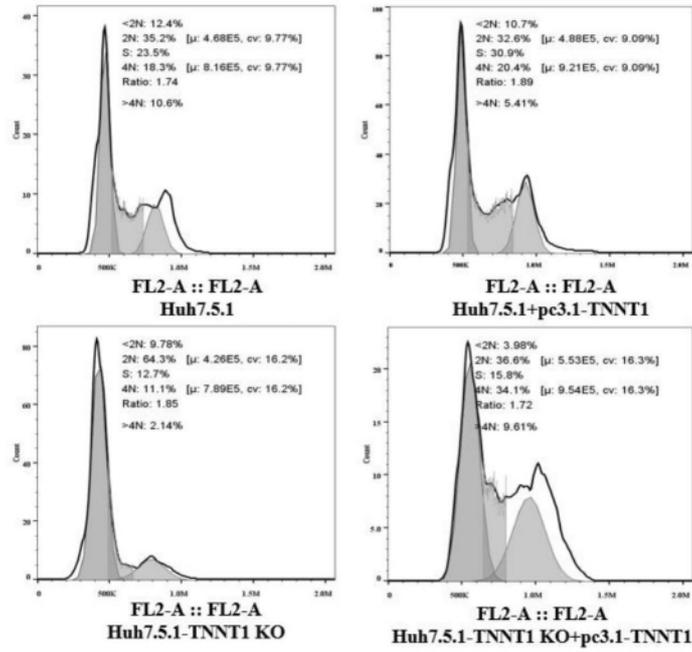


图7

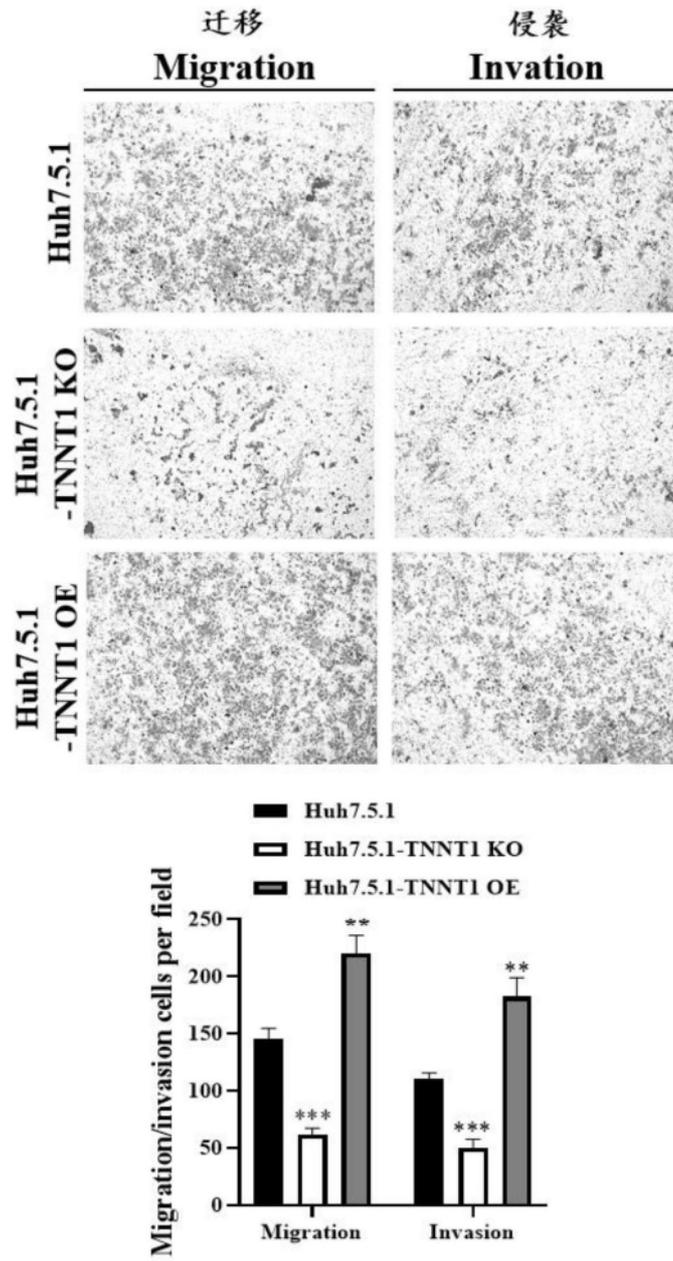


图8

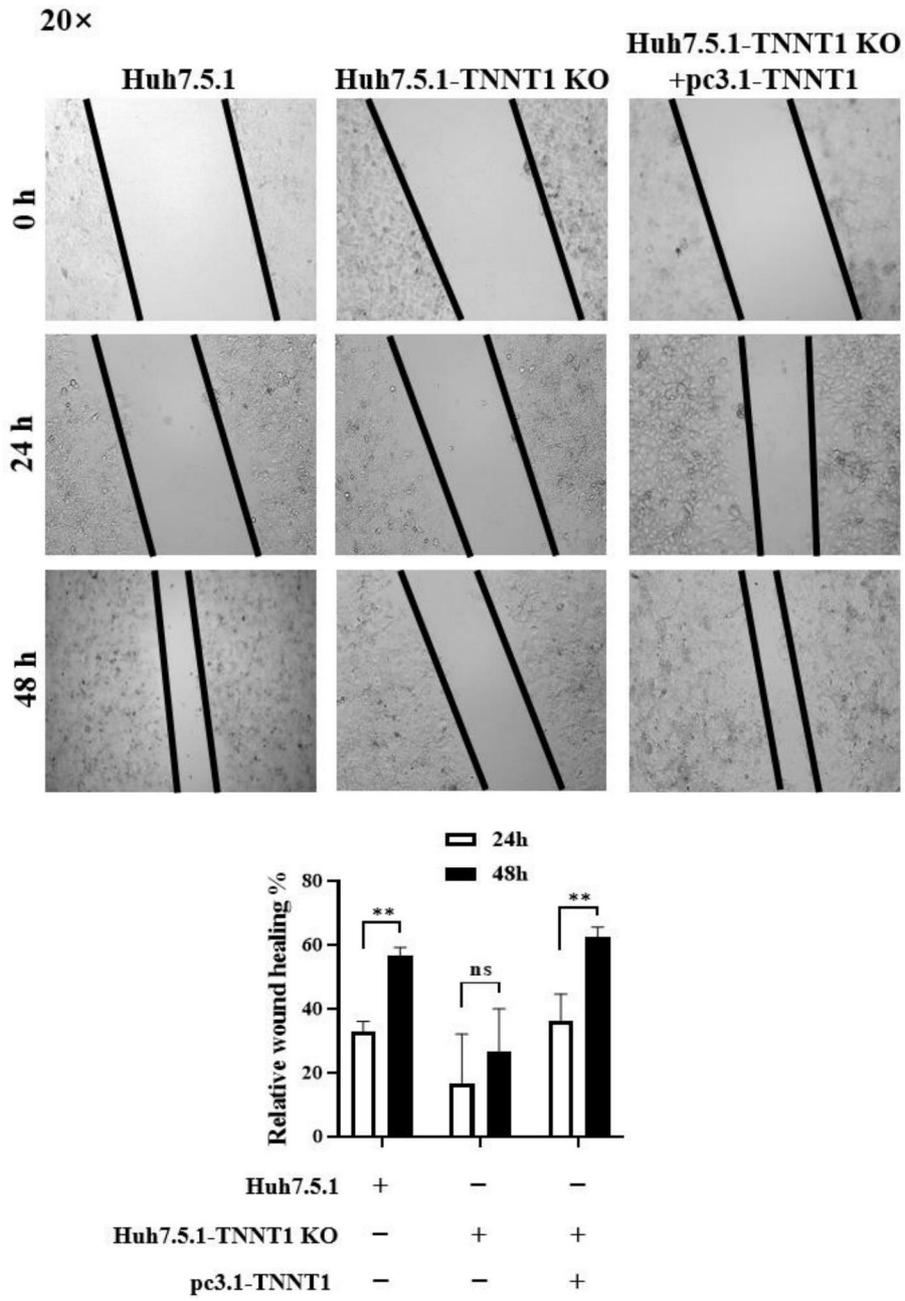


图9