



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113679735 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 23

(21) 申请号 202110967726.2

(22) 申请日 2021.08.23

(71) 申请人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市徐汇区医学院路136号

(72) 发明人 刘嵘 束敏峰 韩红 范卓阳

高洋 张巍 杨国威 王建华

颜志平

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

31001

代理人 翁若莹

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

权利要求书1页 说明书9页

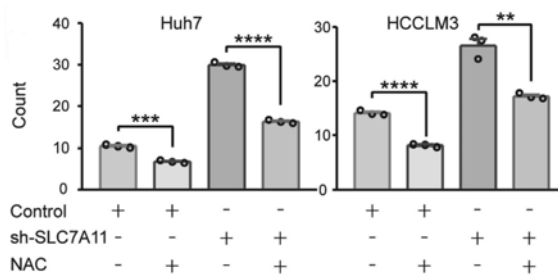
序列表3页 附图19页

(54) 发明名称

SLC7A11基因在肝细胞癌介入栓塞术后中的应用

(57) 摘要

本发明公开了SLC7A11基因在肝细胞癌介入栓塞术后中的应用。本发明基于分子生物学实验验证了SLC7A11为铁死亡信号通路的关键成员，并针对SLC7A11及相关信号分子通路，发现和设计相关的小分子抑制剂，干预肝癌细胞增殖凋亡；本发明通过动物模型实验验证了小分子抑制剂(SLC7A11的shRNA)敲低SLC7A11能够抑制HCC细胞的增殖和迁移，而SLC7A11的过表达可以显著挽救METTL14在HCC缺氧条件下诱导的肿瘤抑制作用，为临床上肝癌介入栓塞术后抑制HCC的复发转移提供了新的分子靶标。



1. SLC7A11基因在肝细胞癌介入栓塞术后中的应用,其特征在于,包括将SLC7A11抑制剂用于制备肝细胞癌介入栓塞术后抑制HCC细胞的增殖和转移的药物中的应用。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物包括医学上可接受的载体和有效量的活性成分,所述活性成分为SLC7A11抑制剂。

3. 如权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述的SLC7A11抑制剂包括SLC7A11基因特异性的RNAi、SLC7A11基因特异性的microRNA、SLC7A11基因的shRNA或SLC7A11基因的siRNA。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述的SLC7A11抑制剂为SLC7A11基因的shRNA,所述shRNA的序列为TTCTCCGAACGTGTCA CGTTTC。

SLC7A11基因在肝细胞癌介入栓塞术后中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及SLC7A11基因在肝细胞癌介入栓塞术后中的应用,属于分子生物技术领域。

背景技术

[0002] 肝细胞癌(HCC)是最常见的原发性肝癌,其典型特征是快速增殖和转移较早。巴塞罗那临床肝癌(BCLC)标准和中国原发性肝癌诊治指南(2017版)都推荐了不同阶段HCC的治疗方法。然而,临床上仍需要更多治疗方法,因为该疾病通常在中晚期被诊断出来,并且HCC患者的五年生存率仍不理想。

[0003] 介入治疗已广泛应用于不可切除的HCC患者。然而,介入栓塞引起的缺氧状态可能促进HCC细胞的增殖和转移,其内在机制尚不清楚。因此,探索缺氧与HCC发展的分子机制对于推进未来的治疗至关重要。值得注意的是,异常的表现遗传变化会导致基因表达的严重破坏,从而促进HCC的发生和发展。

[0004] N6-甲基腺苷(m6A) RNA修饰已成为表观遗传调控机制的一个新维度,可在翻译前控制mRNA表达。在至少三分之一的哺乳动物mRNA中发现了 m6A。据估计,一个mRNA中平均有3-5个m6A修饰。值得注意的是,许多 m6A位点在小鼠和人类之间在进化上是保守的。多组分m6A甲基转移酶复合物(MTC)在mRNA修饰中执行m6A的沉积,其由异二聚体、甲基转移酶样3(METTL3)/甲基转移酶样14(METTL14)复合物、主要酶复合物和其他参与因素包括KIAA1429、WTAP和RBM15。就该复合体而言,METTL3是与甲基供体S-腺苷甲硫氨酸(SAM)结合并催化甲基基团转移的催化亚基,而METTL14通过稳定METTL3构象和识别底物RNA来负责m6A沉积。m6A修饰位点经常在3'非翻译区(3'UTR)和编码序列(CDS)中富集,在终止密码子区域周围富集特别高,其中包含经典的共有序列DRACH(D=G、A或U;R=G或A;H=A、C或U)。这种可逆的催化过程由m6A橡皮擦脂肪量和肥胖相关蛋白(FTO)和alkB同源物5(ALKBH5)进行。m6A修饰的RNA可以通过m6A阅读器蛋白进行识别,包括YT521-B同源(YTH)域家族蛋白(YTHDF1-YTHDF3、YTHDC1和YTHDC2)。其中,YTHDF2是第一个经过鉴定和充分研究的m6A阅读器蛋白,它通过其C端YTD结构域靶向 m6A,N端结构域负责将mRNA推向加工体以进一步降解。

[0005] 最近的研究表明m6A参与了多种生理过程。作为MTC的另一个不可或缺的组成部分,METTL14已被证明在各种类型的癌症中上调。Weng等人报道,敲除METTL14可以显著抑制白血病干/起始细胞(LSCs/LICs)的自我更新。进一步的机制研究表明,其靶标mRNAMYB和MYC上m6A丰度的降低导致 mRNA稳定性和翻译的降低。据报道,METTL14还可以驱动EBV介导的肿瘤发生。然而,Chen等人发现METTL14通过靶向miR-37528抑制结直肠癌(CRC)进展;Ma等人认为METTL14通过靶向pri-miR-12629抑制HCC转移。然而,METTL14在肝癌介入栓塞术后的肿瘤复发转移中的具体功能仍然难以捉摸。

[0006] 铁死亡是以一种以脂质过氧化产物(MDA)和/或致死活性氧(ROS)增多、铁依赖性为主要特征的非凋亡性细胞死亡方式,在癌症治疗中显示出巨大的前景。由SLC7A11和

SLC3A2组成的xc-系统的功能是输入胞外氧化形式的半胱氨酸、胱氨酸,输出胞内谷氨酸以保持氧化还原平衡。在一些癌症患者中检测到更高水平的SLC7A11,抑制SLC7A11会使肿瘤细胞对铁死亡敏感。Ungard等人发现乳腺癌细胞中SLC7A11的沉默延迟了癌症诱导的骨痛发作;Li等人预测SLC7A11的过表达与口腔鳞状细胞癌患者的复发呈正相关。所有这些结果表明xc-系统抑制剂可能作为潜在应用前景的抗癌剂。然而,我们对HCC中铁死亡调节的确切机制的了解仍不清楚,尤其是在缺氧条件下。m6A机制的破坏是否会导致铁死亡细胞死亡并促进HCC发病机制仍需要探索。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是:肝细胞癌介入栓塞术后由引起的缺氧状态可能促进HCC细胞的增殖和转移等问题。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明公开了SLC7A11基因在肝细胞癌介入栓塞术后中的应用,包括将SLC7A11抑制剂用于制备肝细胞癌介入栓塞术后抑制 HCC细胞的增殖和转移的药物中的应用。

[0009] 优选地,所述药物包括医学上可接受的载体和有效量的活性成分,所述活性成分为SLC7A11抑制剂。

[0010] 优选地,所述的SLC7A11抑制剂包括SLC7A11基因特异性的RNAi、SLC7A11基因特异性的microRNA、SLC7A11基因的shRNA或SLC7A11基因的siRNA。

[0011] 优选地,所述的SLC7A11抑制剂为SLC7A11基因的shRNA,所述shRNA 的序列为TTCTCCGAACGTGTCA CGTTTC。

[0012] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0013] 1.本发明基于分子生物学实验验证了SLC7A11为铁死亡信号通路的关键成员,并针对SLC7A11及相关信号分子通路,发现和设计相关的小分子抑制剂,干预肝癌细胞增殖凋亡;

[0014] 2.本发明通过动物模型实验验证了小分子抑制剂(SLC7A11的shRNA)敲低SLC7A11能够抑制HCC细胞的增殖和迁移,而SLC7A11的过表达可以显著挽救METTL14在HCC缺氧条件下诱导的肿瘤抑制作用,为临床上肝癌介入栓塞术后抑制HCC的复发转移提供了新的分子靶标。

附图说明

[0015] 图1A:表示缺氧下调Huh7和HCCLM3细胞中的METTL14;

[0016] 图1B:表示HIF-1 α 敲低对缺氧(Hypoxia)诱导的METTL14抑制的影响;

[0017] 图1C:表示通过流式细胞术检测到的HIF-1 α 敲低对缺氧诱导的ROS积累的影响以及量化结果;

[0018] 图1D:表示HIF-1 α 敲低对缺氧诱导的MDA积累的影响;

[0019] 图1E:表示电子显微镜检测线粒体形态变化,其中,白色箭头指的是典型的线粒体;

[0020] 图2A:表示Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/main.html>) 分析的“Guichard Liver”和“Guichard Liver 2”数据库和OncoLnc (<http://www.oncolnc.org>)

分析的TCGA数据库的生物信息学分析/)关键字为“METTL14”,“肝细胞癌与正常分析”;

[0021] 图2B:表示在Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/main.html>) 使用关键词“SLC7A11”、“肝细胞癌”分析了来自“Wurmbach Liver”、“Roessler Liver”和“Roessler Liver 2”数据库的生物信息学分析对比正态分析;

[0022] 图2C:表示METTL14在七种HCC细胞系(Huh7、HepG2、7721、HCCLM3、MHCC97H、PLC/PRF/5、Be1-7402)中的蛋白表达模式,与通过蛋白质印迹检测的正常肝细胞系L02进行比较(下图),相对METTL14蛋白质水平被量化(上图);

[0023] 图2D:表示与正常肝细胞系L02进行比较,分别通过qPCR和蛋白质印迹检测的七种HCC细胞系(Huh7、HepG2、SMC-7721、HCCLM3、MHCC97H、PLC/PRF/5、Be1-7402)中SLC7A11的mRNA和蛋白水平;

[0024] 图2E:表示METTL14对缺氧条件下Huh7和HCCLM3细胞SLC7A11表达的影响,分别通过RT-qPCR和蛋白质印迹检测SLC7A11 mRNA和蛋白质水平;

[0025] 图3A:表示SLC7A11 mRNA的示意图和5'UTR预测的“m6A”位点(图中圈出的碱基A)，“DRACH”中间的碱基A被T替换,以制备用于荧光素酶报告基因检测的突变质粒;

[0026] 图3B:表示METTL14和METTL14-R298P突变体对HCCLM3细胞中SLC7A11表达的影响,分别通过qPCR和Western印迹检测SLC7A11的mRNA 和蛋白质水平;

[0027] 图3C:表示DOT BLOT显示稳定表达宽型METTL14和 METTL14-R298P突变体的总m6A水平;

[0028] 图3D:表示SLC7A11荧光素酶报告基因示意图;

[0029] 图3E:表示确定了基于pGL3基本质粒的WT或MUT荧光素酶报告基因在METTL14转染的HCCLM3细胞中的相对活性(标准化为载体对照组);

[0030] 图3F:表示应用MeRIP分析和qRT-PCR来评估HCCLM3表达的宽型 METTL14或METTL14-R298P突变体中SLC7A11的m6A修饰,通过 m6A-IP/input和IgG-IP/input计算各组m6A的富集度;

[0031] 图3G:表示宽型METTL14和METTL14-R298P突变体对HCC肿瘤生长的影响,裸鼠皮下注射稳定表达METTL14、METTL14-R298P或对照载体的 HCCLM3细胞,每周计算两次肿瘤生长;

[0032] 图3H:表示在异种移植模型中过表达HCCLM3细胞(或阴性对照)的稳定宽型METTL14或METTL14-R298P突变体的肿瘤生长曲线;

[0033] 图3I:表示通过蛋白质印迹检测异种移植物中COX2、SLC7A11和 METTL14的表达模式;

[0034] 图3J:表示种移植物中METTL14分别和COX2、SLC7A11之间的相关性;

[0035] 图3K:表示三种异种移植物的H&E染色切片;

[0036] 图3L:表示免疫组织化学检测的异种移植物中COX2、SLC7A11和 METTL14的表达模式;

[0037] 图4A:表示在用放线菌素D(标准化为0小时)处理后,在Huh7和 HCCLM3细胞中测定了mRNA衰减率;

[0038] 图4B:表示RT-qPCR和蛋白质印迹显示沉默YTHDF2对Huh7和 HCCLM3中SLC7A11 mRNA和蛋白质水平的影响;

- [0039] 图4C:表示转染了siYTHDF2的Huh7和HCCLM3细胞中WT或 MUT荧光素酶报告基因的相对活性(标准化为载体对照组)的测定结果;
- [0040] 图5A:表示根据制造商的说明通过流式细胞术进行ROS检测的定量分析结果;其中,Huh7和HCCLM3细胞用或不用10mM浓度的NAC处理36小时;
- [0041] 图5B:表示通过蛋白质印迹和qPCR分别检测Huh7和HCCLM3细胞中EMT 相关E-cadherin、N-cadherin和Vimentin的蛋白和mRNA水平,其中,细胞用或不用10mM浓度的NAC处理36小时;
- [0042] 图5C:表示通过电子显微镜检测HCCLM3细胞中用/不用NAC或 shSLC7A11处理的线粒体的形态学改变,其中,白色箭头指的是典型的线粒体;
- [0043] 图5D:表示SLC7A11敲低对肿瘤生长的影响以及在5周的时间过程中检测的肿瘤体积生长曲线;
- [0044] 图5E:表示肿瘤切片的H&E染色图,显示为肿瘤结构;
- [0045] 图5F:表示免疫组织化学分析显示shSLC7A11组具有更高的COX2表达;
- [0046] 图6A:表示蛋白质印迹显示了Huh7和HCCLM3细胞中METTL14和 SLC7A11的表达模式,其中,稳定表达宽型METTL14或R298P突变体的细胞用SLC7A11过表达(转染);
- [0047] 图6B:表示伤口愈合显示METTL14对照、METTL14过表达和 METTL14-R298P以及SLC7A11分别对缺氧条件下Huh7和HCCLM3细胞的迁移率的影响;
- [0048] 图6C:表示CCK-8测定说明了METTL14对照、METTL14过表达和 METTL14-R298P,加上SLC7A11在缺氧条件下Huh7和HCCLM3细胞的增殖趋势;
- [0049] 以上各图中,“NS”:表示不具有显著性差异(not significant);*:表示 $p < 0.05$;**:表示 $p < 0.01$;***:表示 $p < 0.001$;****:表示 $p < 0.0001$ 。

具体实施方式

- [0050] 为使本发明更明显易懂,兹以优选实施例,并配合附图作详细说明如下。
- [0051] 以下实施例中,所用到的具体实验方法如下所示:
- [0052] (1) 细胞培养及处理
- [0053] 七株人肝癌细胞系(Huh7、HepG2、7721、HCCLM3、MHCC97H、PLC/PRF/5 和Bel-7402)和一株正常人肝细胞株L02来自中山医院张士哲博士和甘伟博士,复旦大学(中国上海)。所有细胞系均在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM,Gibco,Grand Island,NY,USA)中培养。DMEM的额外混合物是10%胎牛血清(FBS)、抗生素(青霉素(100U/ml)/链霉素(0.1mg/ml))。培养细胞需要5%CO₂、37℃的湿润环境。培养基每周更新两次。N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)购自Apexbio(美国休斯顿)。
- [0054] (2) 转染和稳定细胞株
- [0055] Lipofectamine 2000试剂(Life Technology,Thermo Fisher Scientific,DE,USA)用于进行瞬时转染。pcDNA3.1-METTL14、pcDNA3.1-YTHDF2、pLK0.1-SLC7A11和pcDNA3.1-SLC7A11-His(+)购自Genechem(中国上海)。空载体用作阴性对照。根据制造商的说明使用Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen)进行转染测定。本实验共使用 5×10^5 个细胞。转染48小时后,通过RT-qPCR分析或蛋白质印迹验证转染效率。
- [0056] (3) 实时荧光定量PCR

[0057] 根据制造商的说明,通过RNA纯化试剂盒(EZbioscience,USA)提取总 RNA。然后,使用4×Reverse Transcription Master Mix (EZbioscience)进行RT-PCR,使用无DNAase和RNAase的尖端(YueYiBioTech,上海,中国)。SYBR Green PCR试剂盒(Yeasen,中国)用于qPCR。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,将每个基因的表达水平标准化为GAPDH的表达水平,作为内部对照。METTL14、YTHDF2、SLC7A11、E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、波形蛋白和GAPDH的引物(Sunya,中国)如下:

[0058] METTL14 (F:5'-CATCAGGCTAAAGGATGAGTT-3'(SEQ ID NO:1);R:5'-CTAACTTCATAATATCATCC-3'(SEQ ID NO:2));

[0059] YTHDF2 (F:5'-AGCCCCACTTCCTACCAGATG-3'(SEQ ID NO:3);R:5'-TGAGAACTGTTATTTCCCATGC-3'(SEQ ID NO:4));

[0060] SLC7A11 (F:5'-GTCTGGAGAAACAGCCAAGG-3'(SEQ ID NO:5);R:5'-CGGAGTTCCTCGAATAGCTG-3'(SEQ ID NO:6));

[0061] E-cadherin (F:5'-CGAGAGCTACACGTTACGG-3'(SEQ ID NO:7);R:5'-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3'(SEQ ID NO:8));

[0062] N-cadherin (F:5'-CTGACAATGACCCACAGC-3'(SEQ ID NO:9);R:5'-TCCTGCTCACCACCACT ACTT-3'(SEQ ID NO:10));

[0063] Vimentin (F:5'-TCTACGAGGAGGAGATGCGG-3';(SEQ ID NO:11)R:5'-GGTCAAGACGTGCCAG AGAC-3'(SEQ ID NO:12));

[0064] GAPDH (F:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'(SEQ ID NO:13);R:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'(SEQ ID NO:14))。

[0065] (4) 细胞增殖实验

[0066] 根据制造商的方案,通过Cell Counting Kit-8测定(Yeason,Shanghai,China)检测细胞增殖。根据制造商的方案,在每个孔中种植10000个细胞24小时或12小时。检查点结束时,用10 μ l CCK8溶液检测每孔的OD值。在450nm和600nm处用分光光度法测量溶液。

[0067] (5) 蛋白免疫印迹

[0068] RIPA收集细胞,每组取总蛋白20 μ g进行电泳。将膜与5%脱脂牛奶在22℃下孵育2小时,然后与一抗孵育。主要抗体如下:Actin(13E5,CST),METTL14(D8K8W,CST),YTHDF2(ab220163,abcam),SLC7A11(ab175186,abcam),E-cadherin(24E10,CST),N-cadherin(D4R1H)CST)、波形蛋白(D21H3,CST)和肌动蛋白(13E5,CST)在4℃下过夜。随后,在22℃温度下使用抗兔二抗2小时。使用化学发光ECL试剂盒(Tanon,上海,中国)观察蛋白质条带。

[0069] (6) 划痕实验

[0070] 为了评估细胞的迁移能力,进行了伤口愈合试验。如果需要,将NAC和/或pcDNA3.1-SLC7A11-His(+)(2 μ g)添加到孔中。细胞在37℃和5%CO₂条件下培养。用20-200 μ l移液器吸头进行划痕,随后用PBS洗涤板并更换为新鲜培养基。使用相差显微镜(佳能,日本)在划伤后0和48小时拍摄伤口愈合图像。

[0071] (7) 活性氧ROS检测

[0072] 为了评估细胞的迁移能力,进行了伤口愈合试验。如果需要,将NAC和/或pcDNA3.1-SLC7A11-His(+)(2 μ g)添加到孔中。细胞在37℃和5%CO₂条件下培养。用20-200 μ l移液器吸头进行划痕,随后用PBS洗涤板并更换为新鲜培养基。使用相差显微镜(佳能,日

本)在划伤后0和48小时拍摄伤口愈合图像。

[0073] (8) 荧光报告基因实验

[0074] 根据制造商的说明(11402ES60, Yeasen)收集RNA。Huh7或HCCLM3 细胞接种在6孔板中,并用宽型SLC7A11响应荧光素酶报告构建体 (SLC7A11-WT)、突变体SLC7A11响应荧光素酶报告构建体 (SLC7A11-MUT)、宽型或METTL14质粒转染, siYTHDF2, 相应地。在转染后24h,将细胞裂解物与10 μ g/ml的萤火虫和TK分别孵育10分钟。通过双荧光素酶报告基因检测系统(Promega, Madison, WI, USA)和微孔板光度计(Promega)测量荧光素酶活性。萤火虫荧光素酶活性被相应的海肾荧光素酶活性校正。

[0075] (9) 甲基化RNA免疫沉淀(MeRIP)

[0076] MeRIP遵循制造商的说明(PierceTM Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit, Cat.No.20164)。简而言之,分离出200 μ g的总RNA用于polyA+RNA (Promega)并进行定量。PolyA+RNA被分成大约100nt长的片段。在进行 m6A-IP之前,使用生物分析仪确保RNA片段化。之后,首先进行第一链cDNA 合成。qPCR如所述进行。

[0077] (10) RNA稳定性实验

[0078] 如前所述进行RNA衰变测定。简而言之,将Huh7和HCCLM3细胞以 60%的汇合度接种在6厘米的平板中。24小时后,将每个6厘米的平板重新播种到三个6厘米的平板中。48小时后,在收集前的8小时、4小时、2小时和0小时加入放线菌素D至3mg/ml。通过柱上DNase-I消化步骤纯化总 RNA。RNA量由RT-qPCR确定。

[0079] (11) MDA实验

[0080] 为了测试脂质过氧化,我们使用脂质过氧化(MDA)检测试剂盒(货号 MAK085, Sigma-Aldrich, 美国)。该程序遵循制造商的说明。

[0081] (12) 电镜拍照

[0082] 为了获得线粒体在细胞中的位置,对不同干预的HCC细胞进行电子显微镜摄影。为了成像,如下制备细胞。样品在4 $^{\circ}$ C下用1%锇酸固定1小时。之后,使用ddH₂O清洗样品。然后,样品用醋酸铀染色过夜。使用不同浓度的酒精使样品脱水。样品经EMBED 812 EMBEDDING KIT包埋,最后聚合成像。

[0083] (13) 动物模型

[0084] 使用不同的慢病毒感染野生型HCCLM3细胞株,具体使用的慢病毒种类有: SLC7A11-Control(无义序列)、SLC7A11-Knockdown(shRNA的序列为: TTCTCCGAACGTGTCA CGTTTC)(SEQ ID NO:15);METTL14-Vector(无义序列)、METTL14-Overexpression、METTL14-R298P共五种慢病毒。根据说明书,准备好5 \times 10⁵个HCCLM3细胞,使用额定MOI(滴度单位)的对应病毒感染细胞,并于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 90%以上湿度的条件下培养。18小时后,使用嘌呤霉素进行稳转株的筛选(载体均带有表达GFP及嘌呤抗性的片段)。3天后在荧光显微镜下使用约488nm处的单个激发峰,发射峰波长为509nm的荧光观察稳转株的建立。确认几乎所有细胞均带有绿色荧光后,再次予以细胞扩增。

[0085] 成功建立稳转株后,进行皮下瘤种植。本研究主要分为两个动物实验,分别有二组和三组不同类别的皮下瘤移植瘤模型。(1):METTL14-Vector、METTL14-Overexpression、METTL14-R298P三种移植瘤观察METTL14的m6A 功能对肿瘤生长的作用;(2) SLC7A11-Control、SLC7A11-Knockdown两种移植瘤观察SLC7A11对肿瘤生长的作用。

[0086] 具体种植过程为:消化每种细胞,以 3.5×10^7 个细胞溶解于100 μ l的PBS 中,并注射于裸鼠背侧靠右后皮下;7天后观察成瘤情况并进行下一步实验;约 5周后处死裸鼠,最终根据定期(每3天)测量结果对移植瘤进行计算并绘制肿瘤生长图。

[0087] (14) H&E染色和免疫组织化学

[0088] 异种移植样品在4%多聚甲醛(Sigma-Aldrich,DK-2860,丹麦)中固定过夜,并在切割6 μ m切片之前嵌入石蜡中。抗原修复在100 $^{\circ}$ C的柠檬酸盐缓冲液中进行25分钟。将0.1% Tween20和2.5%BSA(Sigma-Aldrich)混合到样品中。一抗如下:METTL14(ab220030,Abcam, U.K.)、SLC7A11(ab37185,Abcam, U.K.)和COX2(ab179800,Abcam,U.K.)。应用适当的辣根过氧化物酶偶联二抗进行开发(ab205718,Abcam,英国)。

[0089] 实施例1

[0090] 缺氧在体外以HIF-1 α 依赖性方式抑制METTL14诱导的铁死亡:

[0091] 为了确定缺氧条件下METTL14和RNA m6A修饰的作用,首先检测了 METTL14在含1%O₂(缺氧条件,Hypoxia)的Huh7和HCCLM3细胞系中的表达。结果表明,与对照组(常氧, Normoxia)相比,缺氧有效地降低了 METTL14并增加了两种HCC细胞系中的HIF-1 α 表达,如图1A所示。然后,采用shRNA敲低HIF-1 α ,结果表明对HIF-1 α 的抑制强烈阻止了缺氧诱导的METTL14下调,如图1B所示,这表明缺氧引发的METTL14抑制是HIF-1 α 依赖性的。铁死亡是一种受调节的细胞死亡形式,已被证明具有肿瘤抑制功能,可用于癌症治疗。ROS和MDA是铁死亡的公认指标。为了探讨缺氧对铁死亡的影响,通过流式细胞术测定ROS(活性氧)。结果显示抑制HIF-1 α 增强了 Huh7和HCCLM3细胞系中ROS的积累($p < 0.0001$),如图1C所示。此外,MDA(脂质过氧化)测定显示,与对照组相比,HIF-1 α 敲低组的MDA含量更高($p < 0.01$),如图1D所示。此外,众所周知,铁死亡可以诱导典型的形态变化,其特征是线粒体浓缩和破坏。一致地,与对照组相比,在实验中观察到敲低 HIF-1 α 显著诱导更小、更密集的线粒体膜受损,如图1E所示。以上实验结果表明缺氧以HIF-1 α 依赖性方式下调METTL14,并通过敲低HIF-1 α 可诱导 HCC细胞中的铁死亡。

[0092] 实施例2

[0093] METTL14在HCC中负调节SLC7A11的表达:

[0094] 为了探索METTL14调节铁死亡的潜在机制,使用多个数据库分析了 METTL14和SLC7A11的表达模式,该系统是介导铁死亡的系统xc-的核心成员。首先,在癌症基因组图谱(TCGA)和Oncomine数据库中分析了METTL14 在HCC患者与健康患者中的表达模式。与正常肝脏相比,METTL14在HCC 患者中的表达水平分别下调1.052倍($p = 7.32 \times 10^{-9}$)、1.059倍($p = 4.86 \times 10^{-4}$);另一方面,METTL14表达较低的HCC患者的总生存期短于METTL14表达较高的患者,如图2A所示。此外,在Oncomine数据库“Wurmbach Liver”、“Roessler Liver”和“Roessler Liver 2”中进一步分析了SLC7A11在HCC患者和健康受试者中的表达。与健康受试者相比,HCC患者的SLC7A11的表达上调至 3.343倍($p = 6.18 \times 10^{-6}$)、1.943倍($p = 1.58 \times 10^{-4}$)、1.494倍($p = 1.47 \times 10^{-18}$),如图2B所示。

[0095] 在7种HCC细胞系中进一步分析了METTL14表达。与正常肝细胞系 L02相比,除HepG2外,Huh7、7721、HCCLM3、MHCC97H、PLC/PRF/5和 Be1-7402细胞系中METTL14蛋白降低,如图2C所示。

[0096] 另外,除了HepG2和MHCC97H外,大多数检测到的HCC细胞系中SLC7A11的mRNA和蛋

白质水平均显著上调,如图2D所示,表明METTL4 可能与SLC7A11表达呈负相关。重要的是,缺氧条件下过表达的METTL14可以在mRNA和蛋白质水平上显著下调SLC7A11的表达,如图2E所示。以上结果表明,METTL14负调节SLC7A11表达。

[0097] 实施例3

[0098] METTL14在HCC中SLC7A11 mRNA的5'UTR处触发m6A甲基化:

[0099] 为了验证SLC7A11和METTL14之间的具体关系,首先检查了RNA Base v2.0 (<http://www.sysu.edu.cn>),发现SLC7A11 mRNA的5'UTR内有几个潜在的 m6A位点,如图3A所示,这表明SLC7A11可能以依赖于m6A的方式由 METTL14调节。已经证明R298P突变大大降低了METTL14甲基化活性。因此建立了稳定的METTL14-R298P表达Huh7和HCCLM3细胞系,如图3B 所示。为了确定SLC7A11的m6A修饰是否由METTL14介导,首先通过 m6A斑点印迹法检测了阴性对照组和稳定的METTL14过表达组以及 METTL14-R298P组中的总m6A水平。正如预期的那样,m6A水平随着 METTL14的过表达而显著增加,但在两个HCC细胞系中因R298P突变而降低,如图3C所示。

[0100] 为了探索SLC7A11上m6A修饰的本质,使用野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 质粒进行荧光素酶报告基因检测,如图3D所示。对于突变报告基因,胞嘧啶碱基 (C) 被设计为在几个预测的m6A位点替换腺苷碱基 (A) 以阻断 m6A甲基化的影响,而野生型报告基因包含完整的m6A位点。正如预期所见, METTL14过表达适度降低了宽型组的荧光素酶活性,但对突变对应物几乎没有影响,如图3E所示,表明SLC7A11调节受METTL14引导的m6A修饰的控制。

[0101] 此外,通过MeRIP-qPCR测定检测到SLC7A11中m6A的富集。与IgG 对照组相比,在m6A特异性抗体处理组中检测到SLC7A11转录物的显著富集。此外,METTL14-R298P突变表达后由m6A修饰的SLC7A11水平显著降低,如图3F所示。因此,METTL14可能会影响m6A的整体水平,特别是 SLC7A11。

[0102] 为了证实METTL14在体内的作用,通过将具有宽型METTL14或 METTL14-R298P突变体稳定过表达的HCC细胞 (HCCLM3) 皮下注射到裸鼠中来构建肿瘤异种移植模型。结果发现宽型METTL14过表达抑制了肿瘤发生,与对照组相比,肿瘤体积显著降低。同时,METTL14-R298P突变体的强制表达在异种移植小鼠中失去了肿瘤抑制作用,如图3G,3H所示。一致地,与对照和METTL14-R298P突变组相比,METTL14过表达组表现出较低水平的 SLC7A11和较高水平的COX2,这是异种移植物中铁死亡的金指标,如图3I 所示。并且还显示了异种移植物中METTL14和SLC7A11之间呈负相关, METTL14和COX2之间呈正相关,如图3J所示。此外,肿瘤切片的H&E染色表示为肿瘤结构,如图3K所示。通过免疫组织化学进一步研究了异种移植肿瘤切片中METTL14、SLC7A11和COX2的表达。与其他两组相比,METTL14 过表达组表现出较低的SLC7A11表达和较高的COX2表达,如图3L所示。

[0103] 因此,以上结果表明METTL14通过在HCC中以m6A依赖性方式靶向 SLC7A11来发挥肿瘤抑制功能。

[0104] 实施例4

[0105] METTL14诱导的SLC7A11 mRNA衰减依赖于m6A-YTHDF2:

[0106] 找出SLC7A11的阅读器至关重要,因为m6A修饰的mRNA转录物依赖于阅读器蛋白在功能上参与生物过程。在实施例2中的结果表明METTL14过表达显著下调了Huh7和HCCLM3细胞系中的SLC7A11 mRNA (图2E)。接下来测试了m6A修饰是否影响SLC7A11的mRNA稳定性。

qPCR表明,在放线菌素D存在下,METTL14的过表达显著增强了SLC7A11 mRNA的降解,如图4A所示。

[0107] YTHDF2 (YTH域家族2) 是一种公认的m6A阅读器蛋白,已被证明可以调节mRNA的稳定性。通过敲低YTHDF2的表达在mRNA和蛋白质水平上显著增加了SLC7A11的表达,如图4B所示,这表明YTHDF2在SLC7A11 调节中的潜在作用。此外,如前所述,荧光素酶报告基因检测是用含有野生型 (WT) 或突变体 (MUT) SLC7A11的质粒进行的。正如预期的那样,YTHDF2的敲低显著增加了宽型组的荧光素酶活性,但对突变组几乎没有影响,如图4C所示。

[0108] 因此,以上实验结果表明m6A-YTHDF2进行METTL14诱导的 SLC7A11 mRNA降解。

[0109] 实施例5

[0110] SLC7A11的敲低刺激铁死亡并在HCC中表现出抗肿瘤作用:

[0111] 为了验证SLC7A11抑制是否可以模拟METTL14的肿瘤抑制功能,首先构建了慢病毒敲低SLC7A11的HCCLM3细胞 (shRNA的序列为: TTCTCCGAACGTGTCA CGTTTC (SEQ ID NO: 15)), 并检测了SLC7A11敲低对铁死亡诱导的影响,如图5A所示,shSLC7A11强烈刺激了ROS的产生,而ROS清除剂N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 在Huh7和Huh7中显著阻断了 HCCLM3细胞中shSLC7A11诱导的ROS积累以及EMT逆转,如图5B所示。此外,NAC治疗有效地消除了电子显微镜检测到的shSLC7A11诱导的线粒体收缩。与shSLC7A11组相比,shSLC7A11+NAC组的线粒体表现出相对更完整的膜和更大的尺寸,如图5C所示。此外,在裸鼠体内观察到同样的趋势。与对照组相比,SLC7A11的下调显著抑制了肿瘤生长,如图5D所示。肿瘤切片的H&E染色表示为肿瘤结构,如图5E所示。此外,免疫组织化学分析显示shSLC7A11组具有更高的COX2表达,如图5F所示。因此,通过抑制HCC细胞中的SLC7A11验证了抗肿瘤作用。

[0112] 实施例6

[0113] 外源性表达的SLC7A11消除了METTL14在HCC缺氧条件下诱导的肿瘤抑制作用:

[0114] 通过进一步的实验检查了SLC7A11的抑制是否有助于METTL14的抗肿瘤作用。如图6A所示,在缺氧环境下,宽型METTL14而不是METTL14-R298P 突变体强烈抑制SLC7A11表达,而SLC7A11的过表达有效地消除了 METTL14在两种HCC细胞系中诱导的SLC7A11下调。正如预期的那样,由此产生的SLC7A11过表达明显消除了METTL14诱导的细胞迁移抑制,如图6B所示。此外,SLC7A11过表达还显著阻止了METTL14在Huh7和HCCLM3细胞中诱导的生长抑制,如图6C所示。以上实验结果表明SLC7A11 有效地参与了METTL14调节的生长和迁移。

[0115] 上述实施例仅为本发明的优选实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

序列表

- <110> 复旦大学附属中山医院
- <120> SLC7A11基因在肝细胞癌介入栓塞术后中的应用
- <160> 15
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA/RNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 1
- catcaggcta aaggatgagt t 21
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA/RNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 2
- ctaacttcat aatatcatcc 20
- <210> 3
- <211> 21
- <212> DNA/RNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 3
- agccccactt cctaccagat g 21
- <210> 4
- <211> 23
- <212> DNA/RNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 4
- tgagaactgt tatttcccca tgc 23
- <210> 5
- <211> 20
- <212> DNA/RNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 5
- gtctggagaa acagccaagg 20
- <210> 6
- <211> 20
- <212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
cggagttcct cgaatagctg 20
<210> 7
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
cgagagctac acgttcacgg 20
<210> 8
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
gggtgtcgag ggaaaaatag g 21
<210> 9
<211> 19
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
ctgacaatga cccacagc 19
<210> 10
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
tcctgctcac caccactact t 21
<210> 11
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
tctacgagga ggagatgcgg 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
ggtcaagacg tgccagagac 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 13
gcaccgtcaa ggctgagaac 20
<210> 14
<211> 19
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 14
tggatgaagac gccagtgga 19
<210> 15
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 15
ttctccgaac gtgtcacggt tc 22

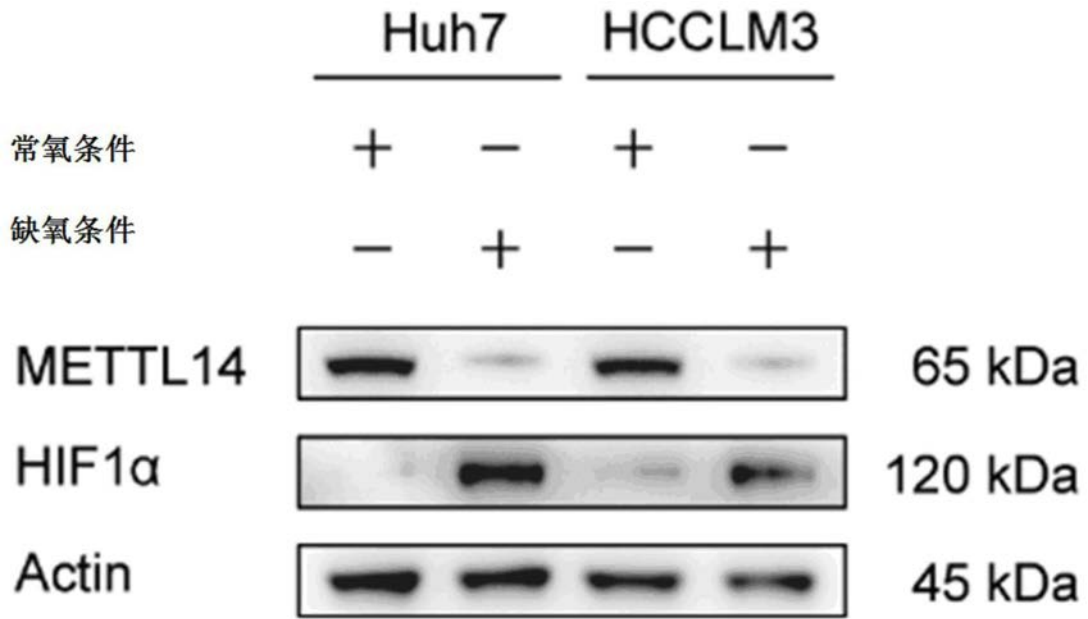


图1A

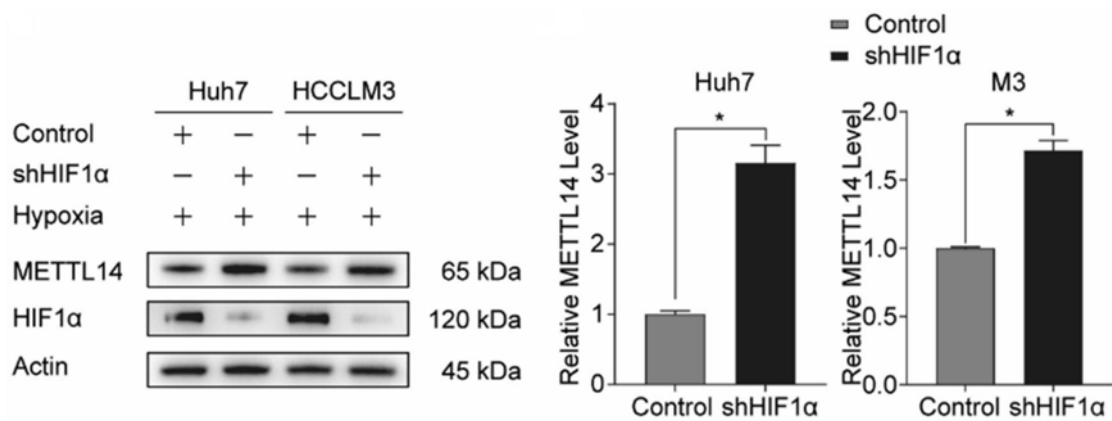


图1B

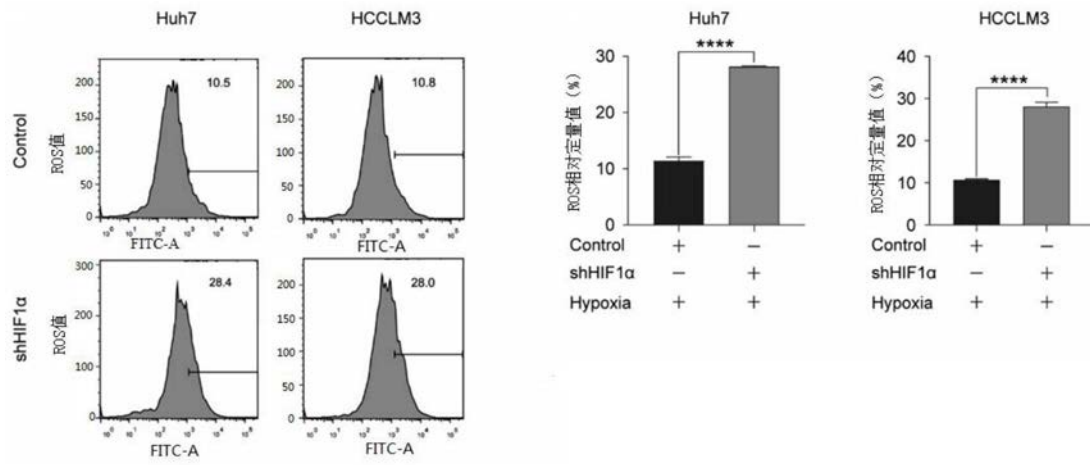


图1C

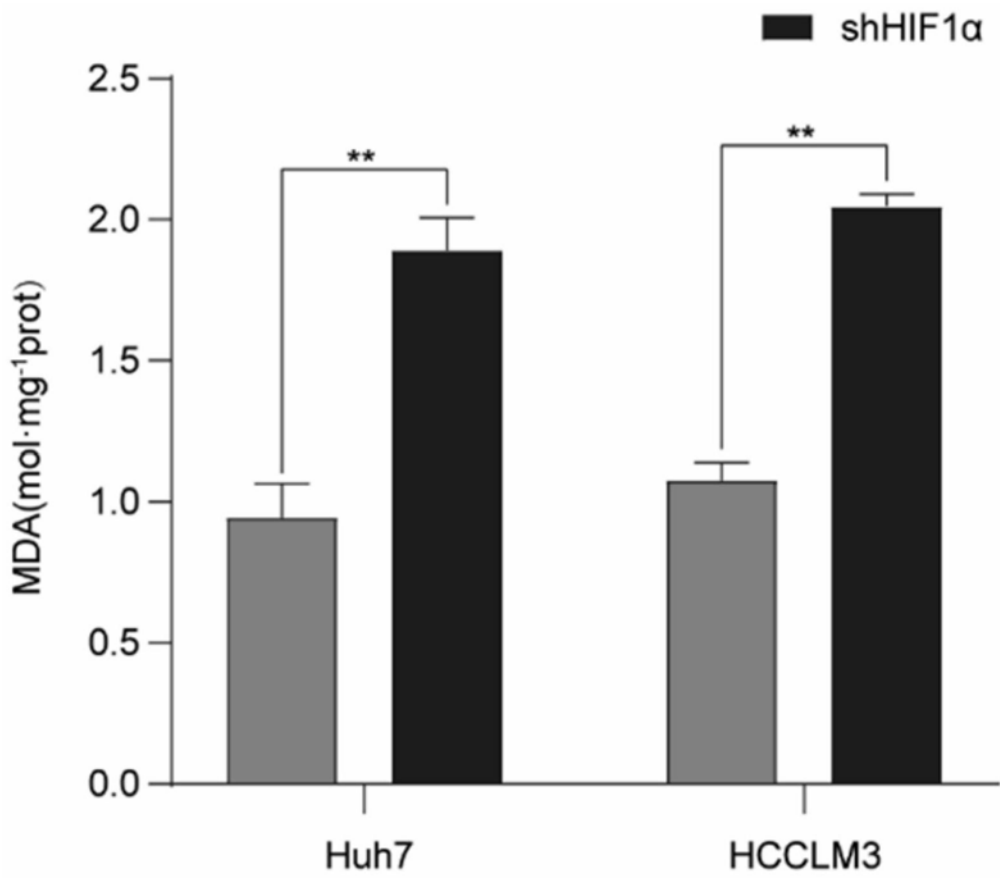


图1D

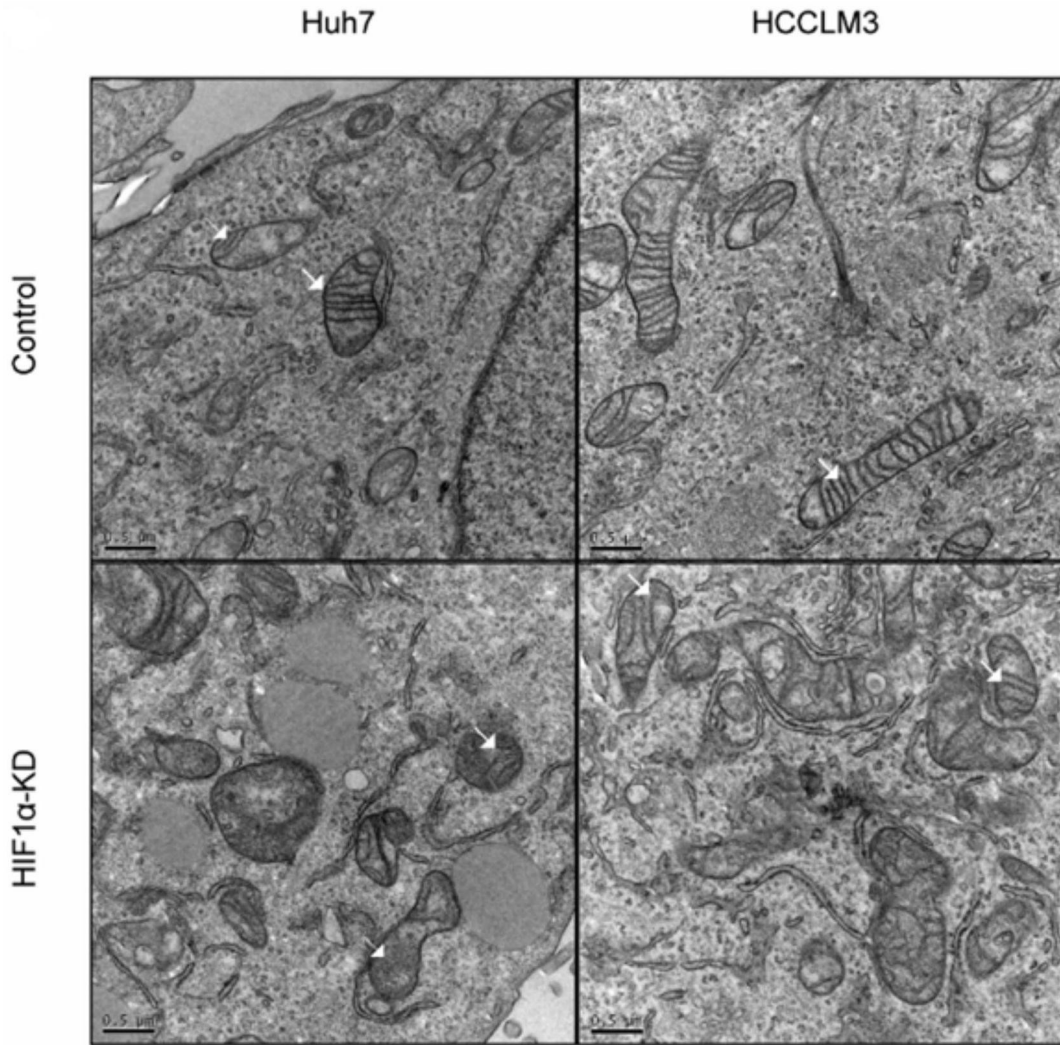


图1E

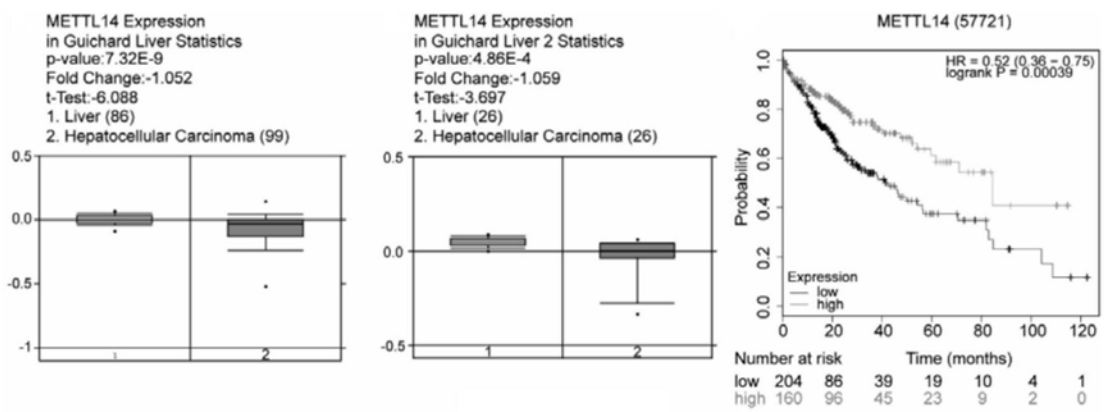


图2A

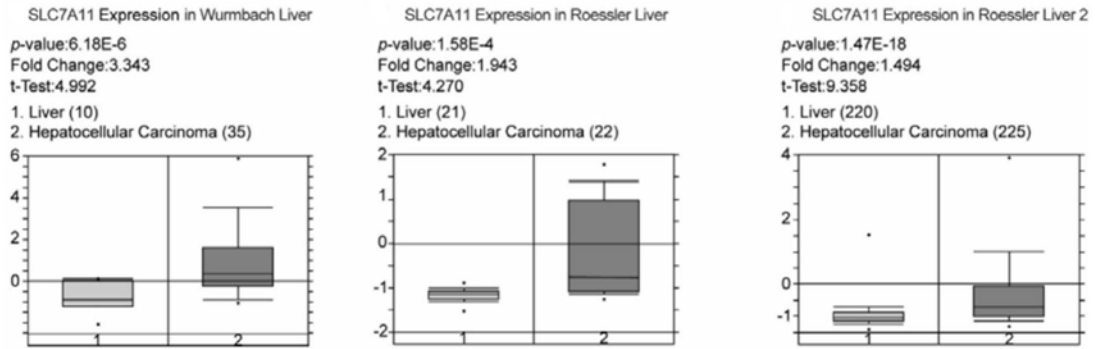


图2B

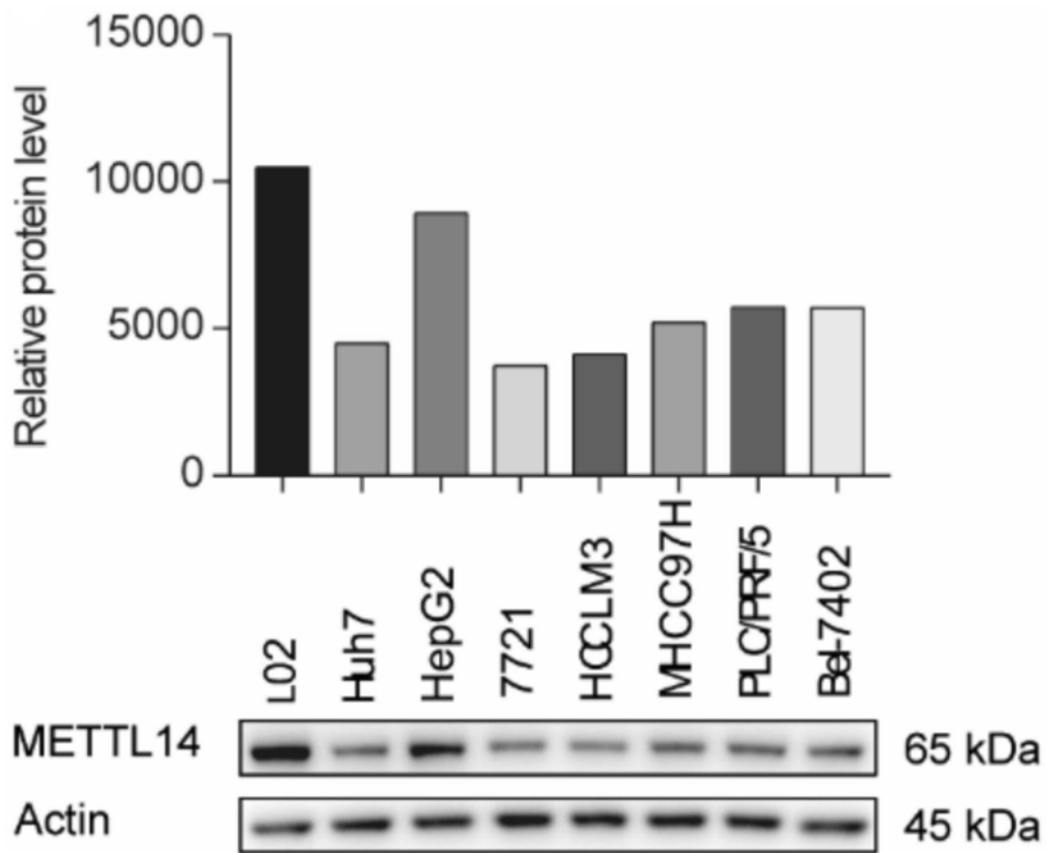


图2C

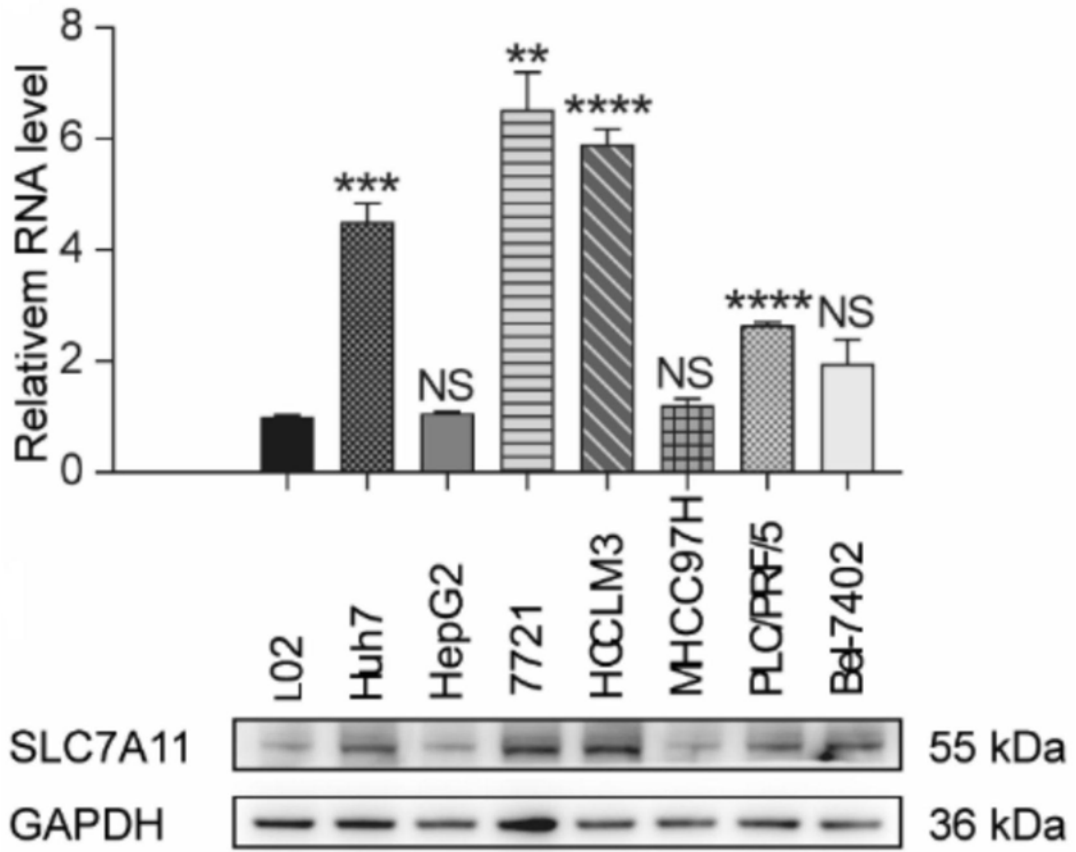


图2D

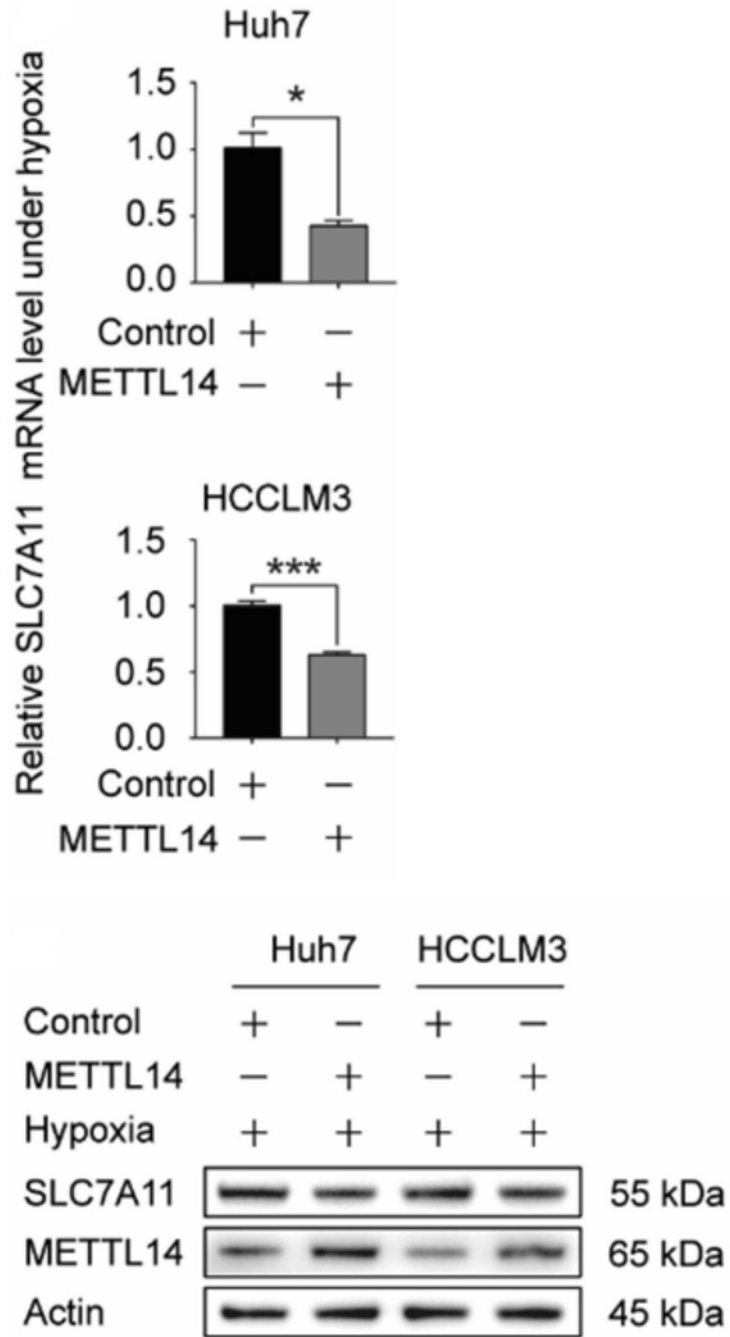


图2E



图3A

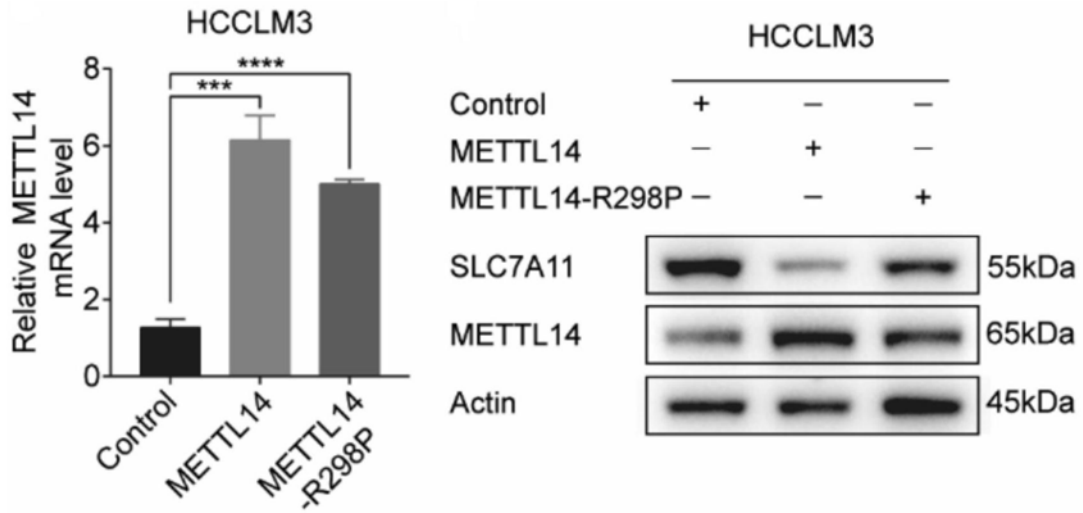


图3B

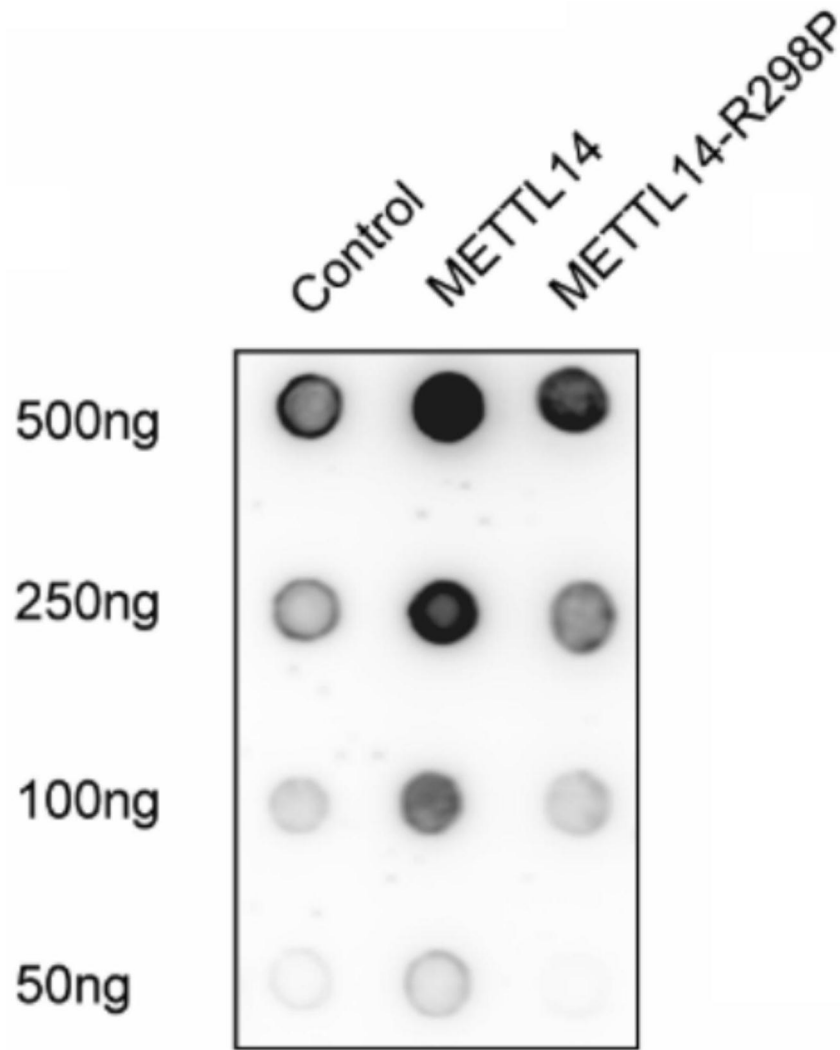


图3C

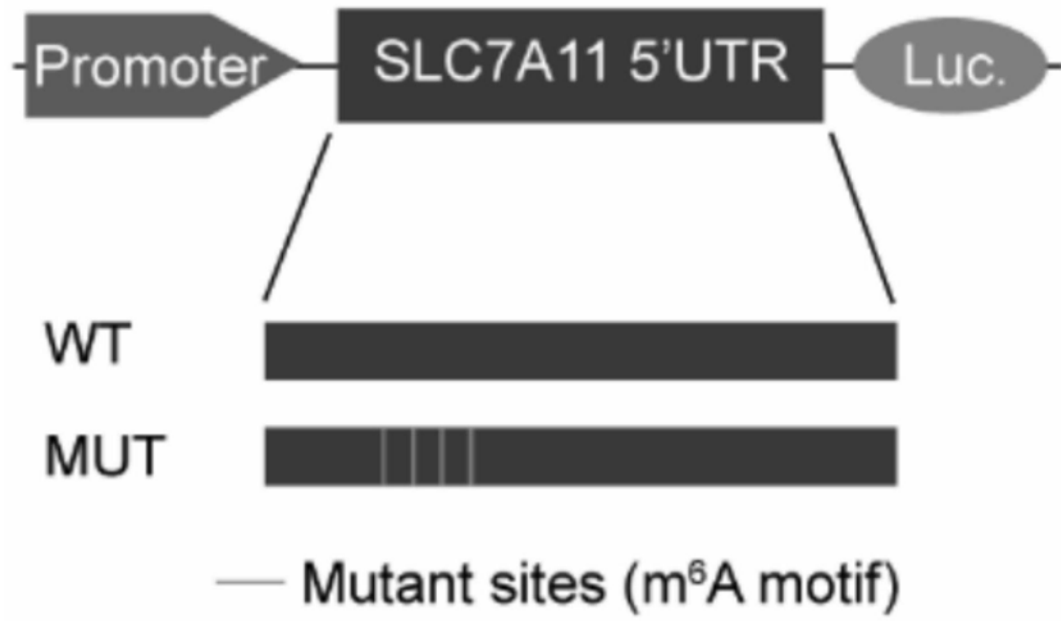


图3D

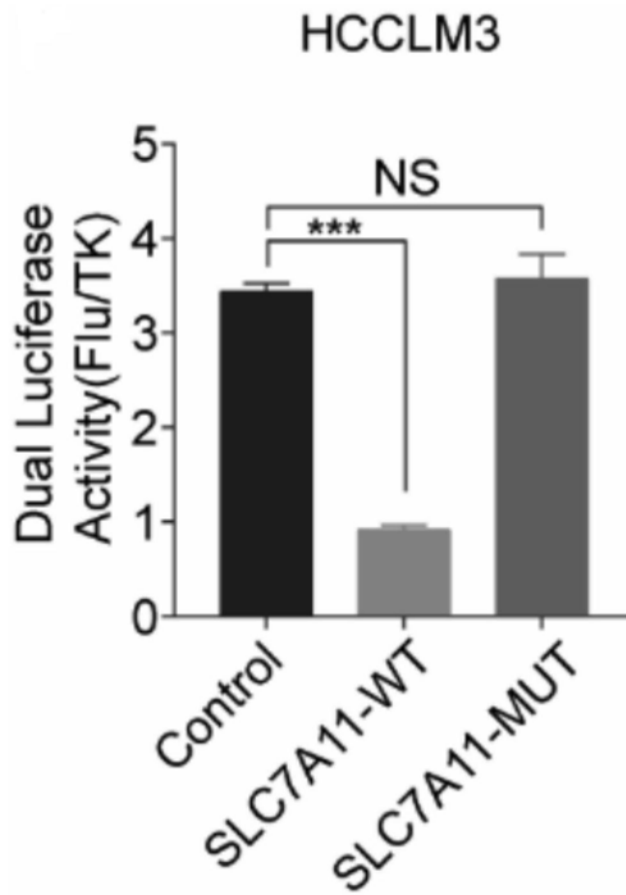


图3E

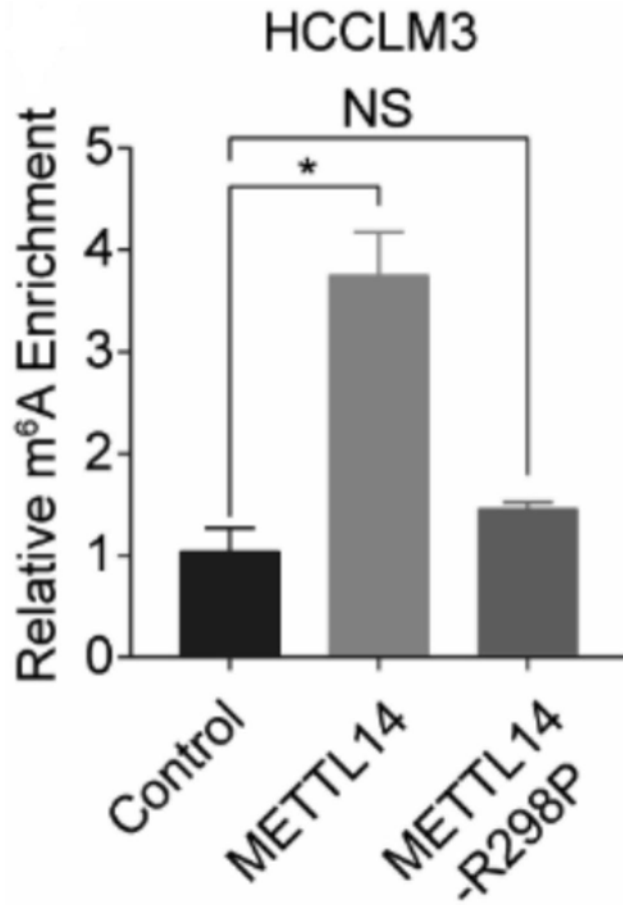


图3F

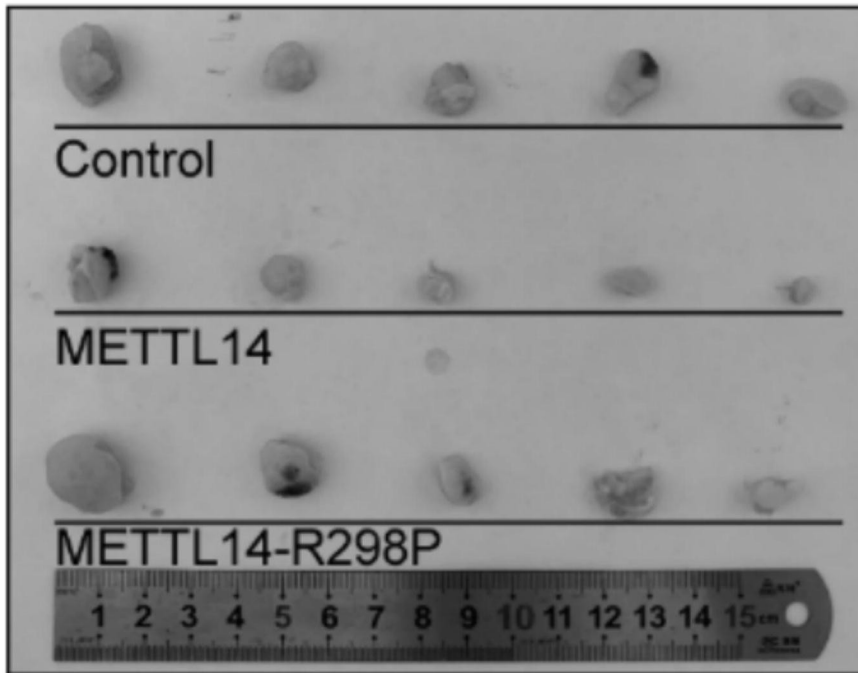


图3G

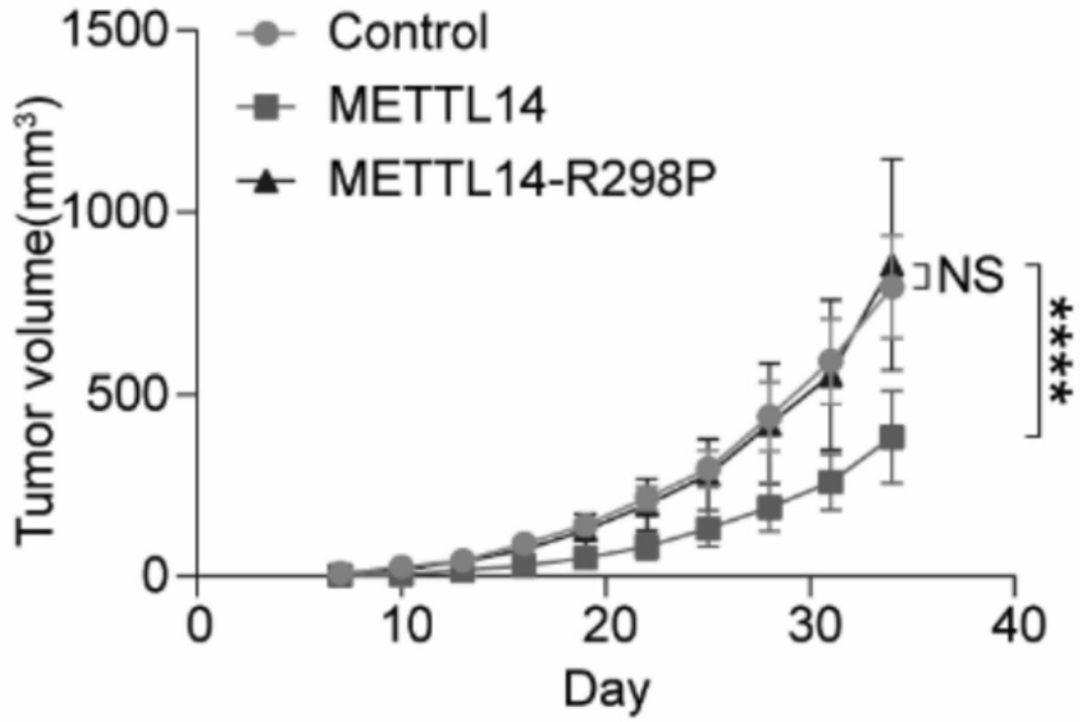


图3H

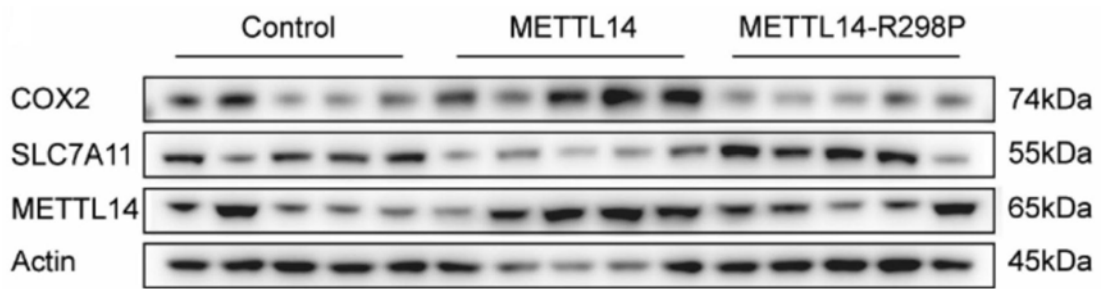


图3I

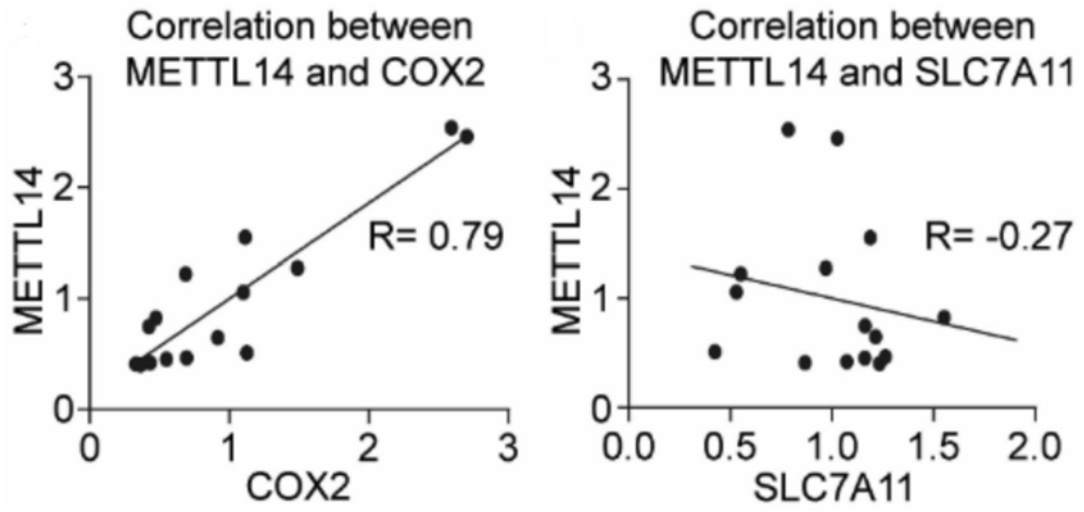


图3J

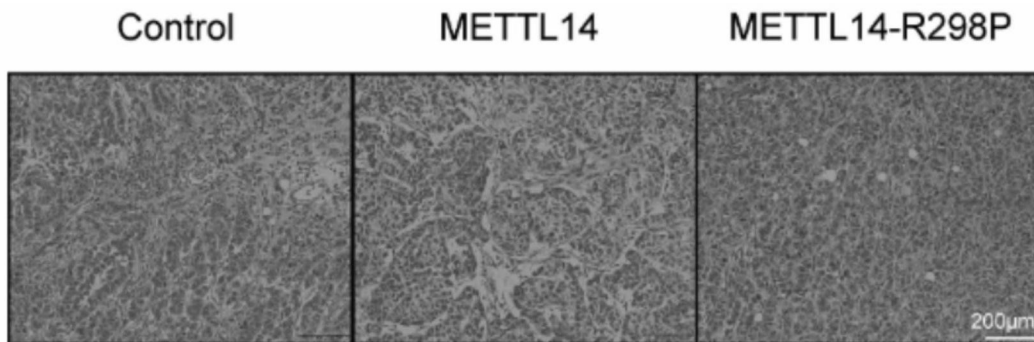


图3K

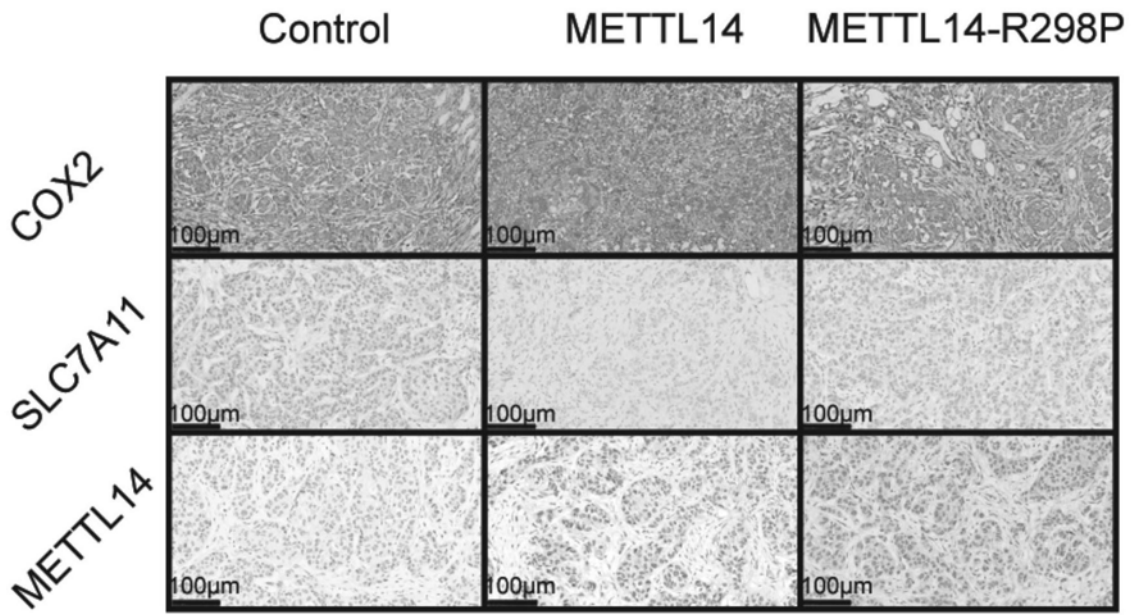


图3L

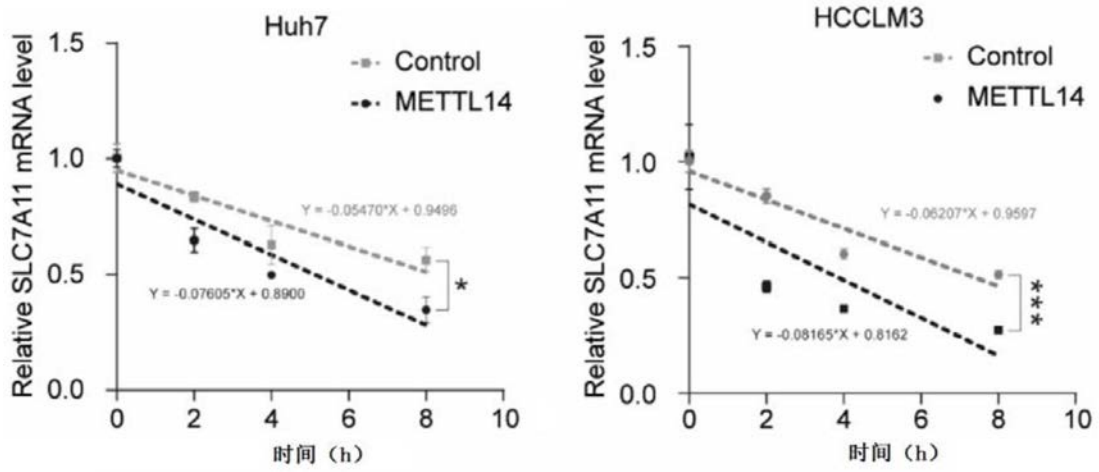


图4A

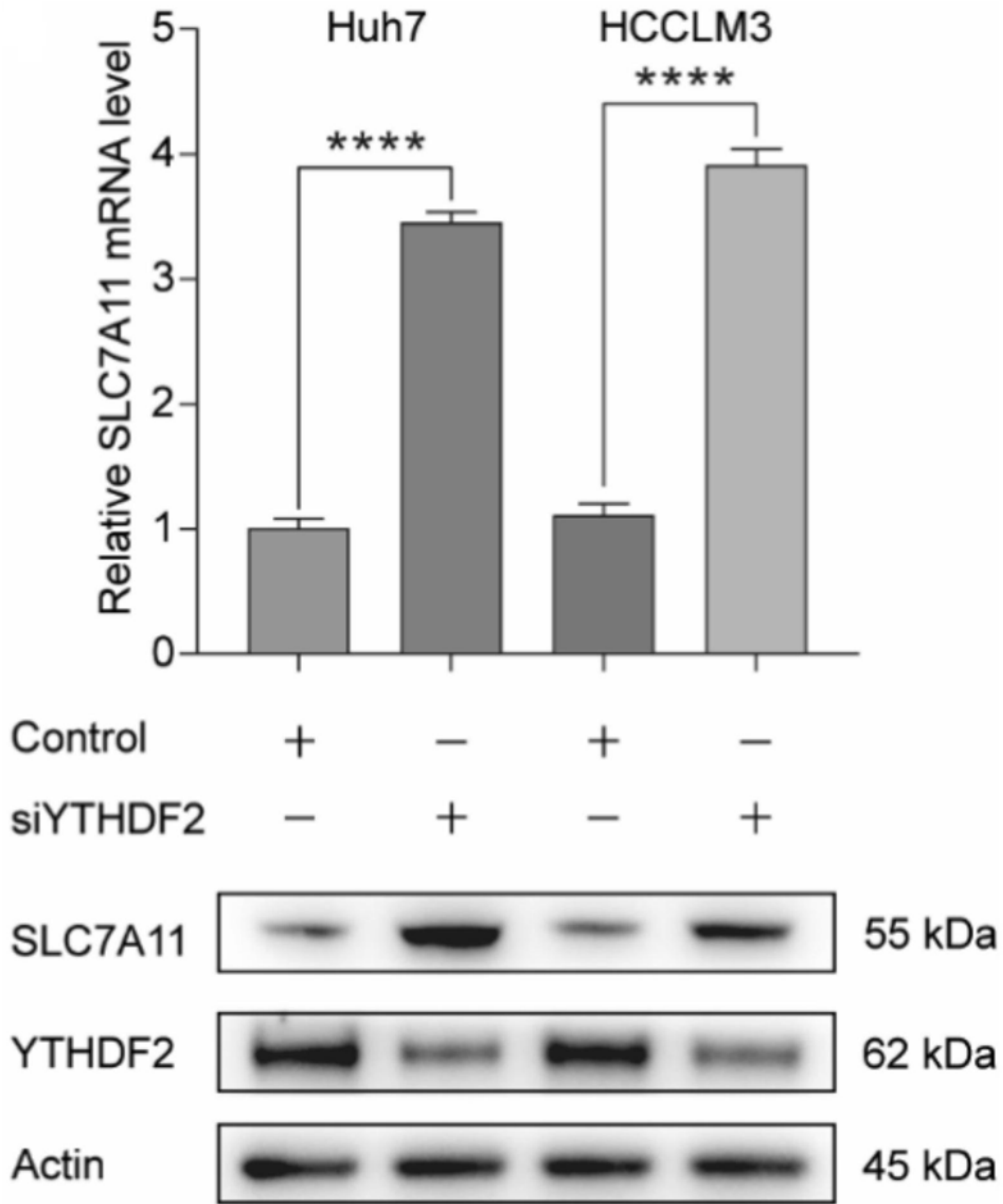


图4B

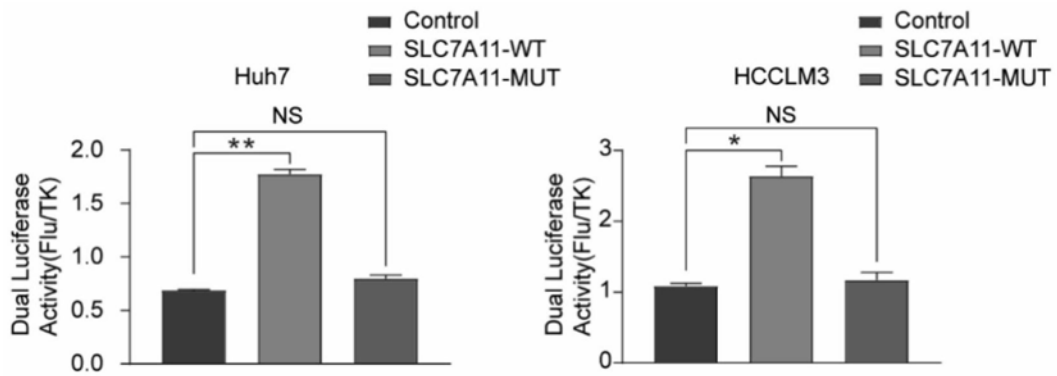


图4C

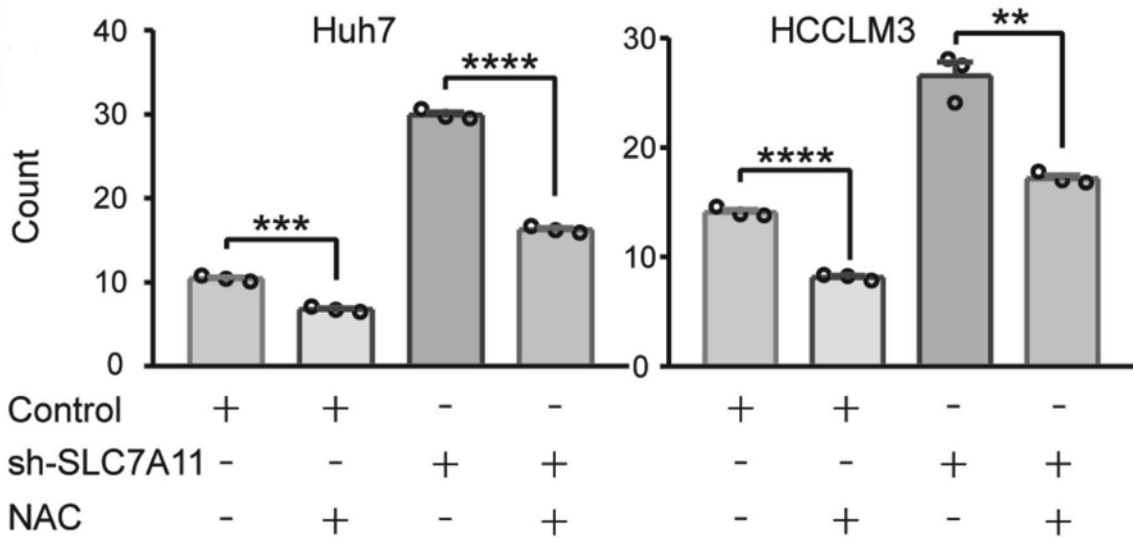


图5A

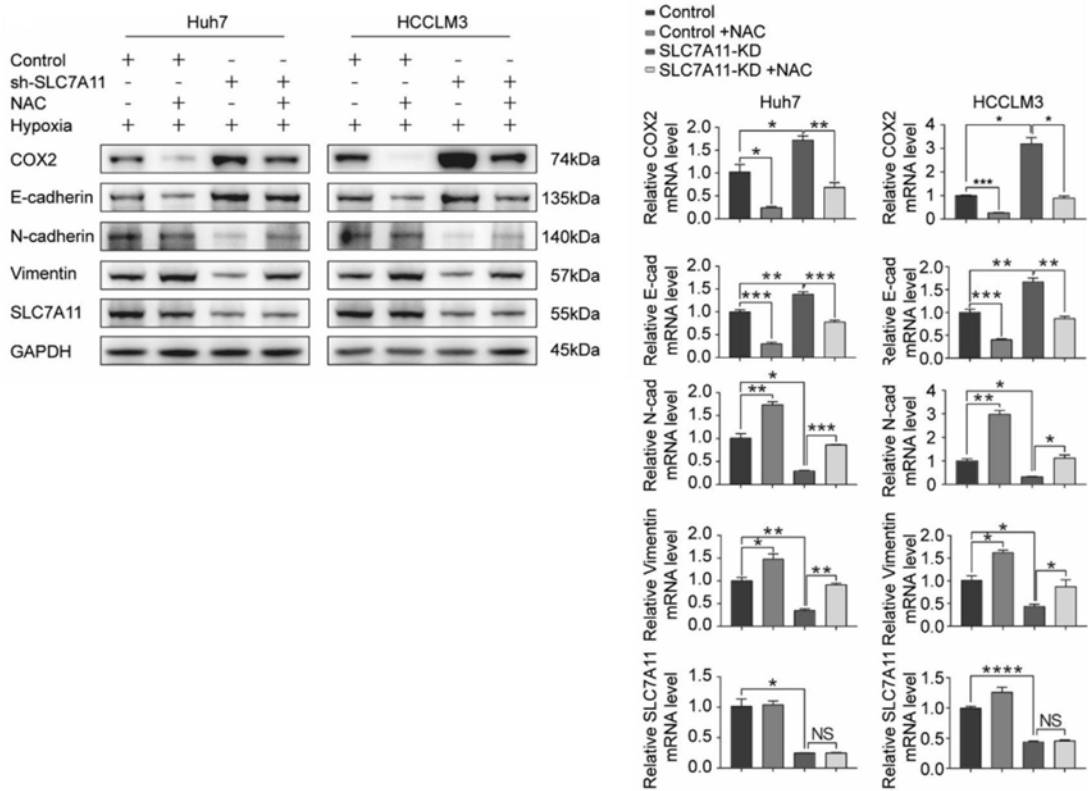


图5B

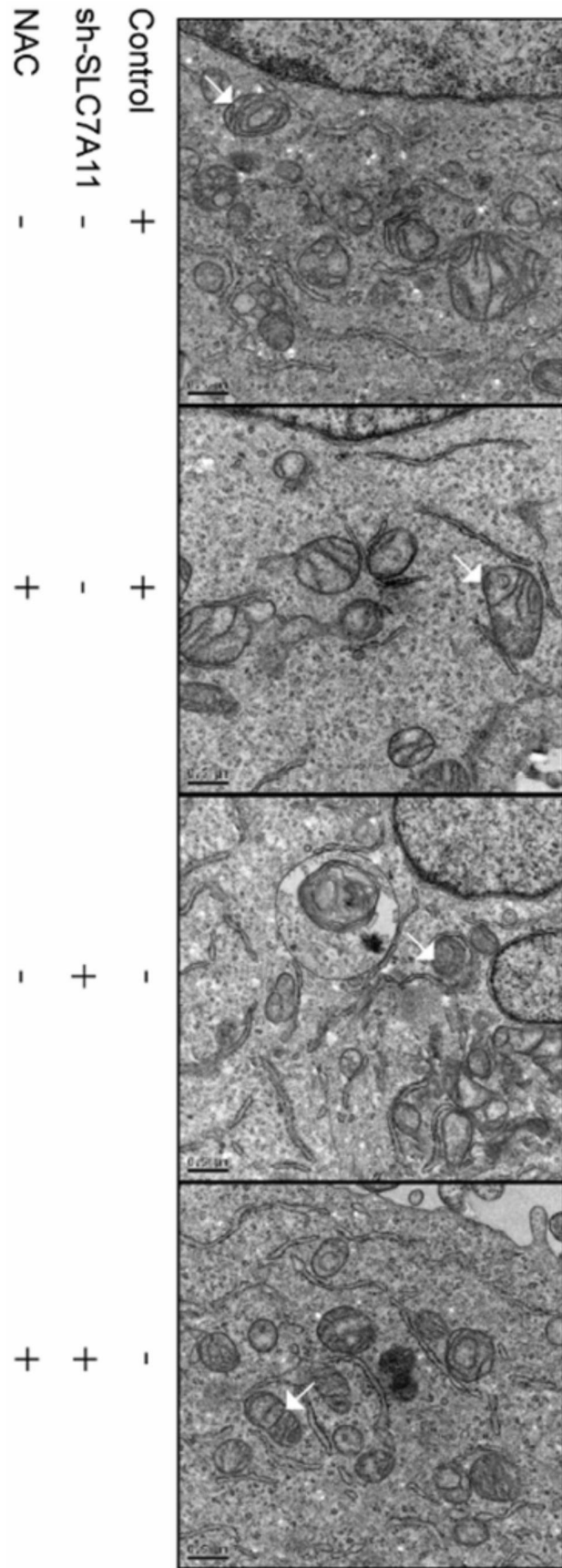


图5C

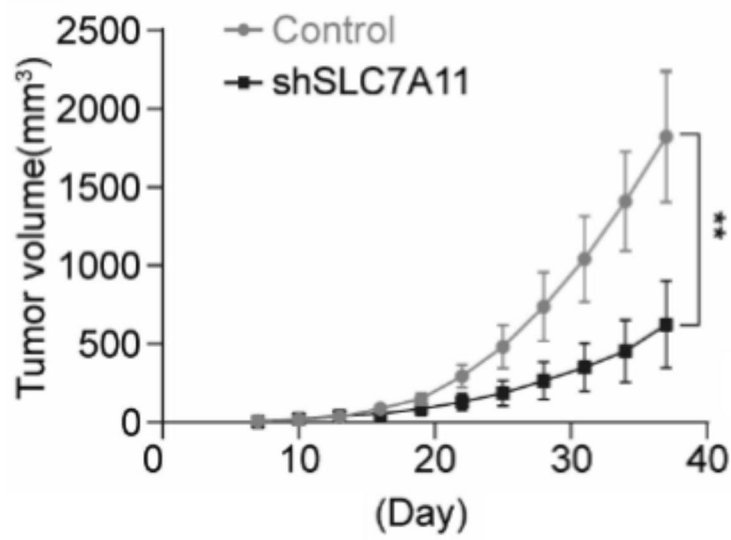
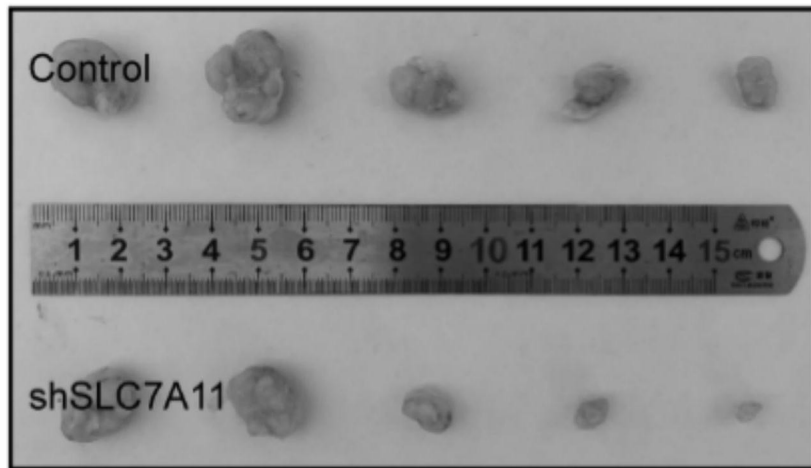


图5D

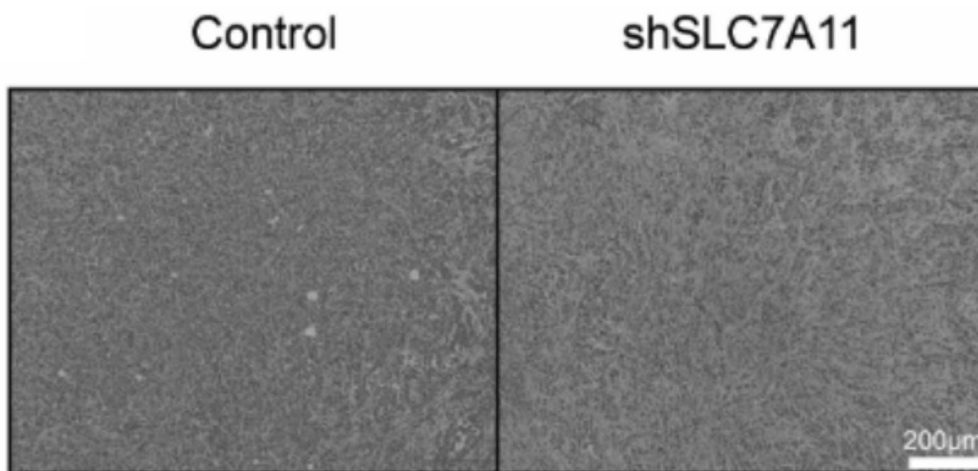


图5E

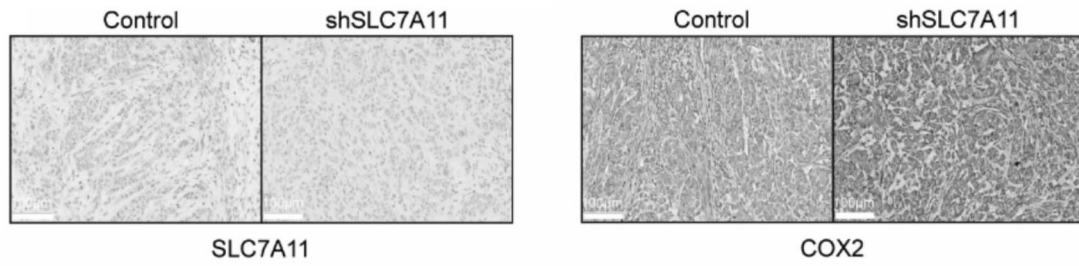


图5F

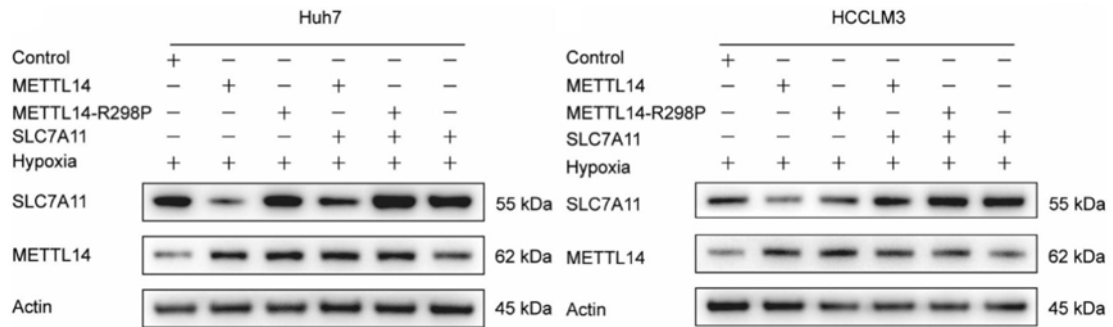


图6A

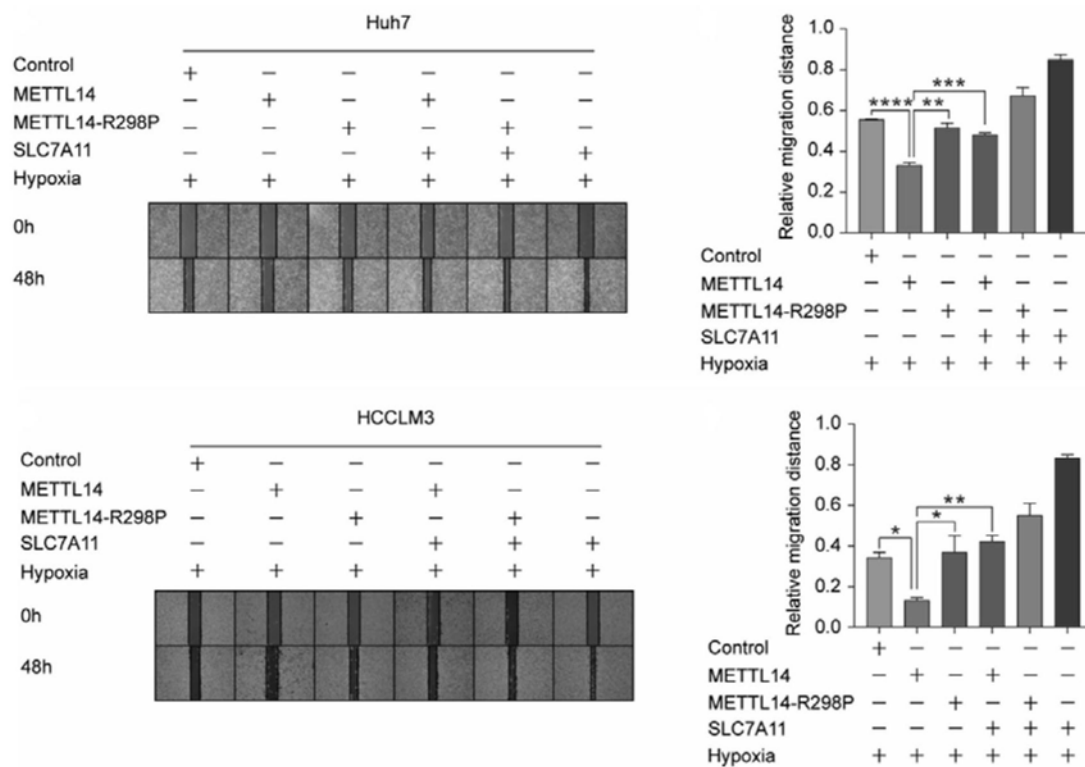


图6B

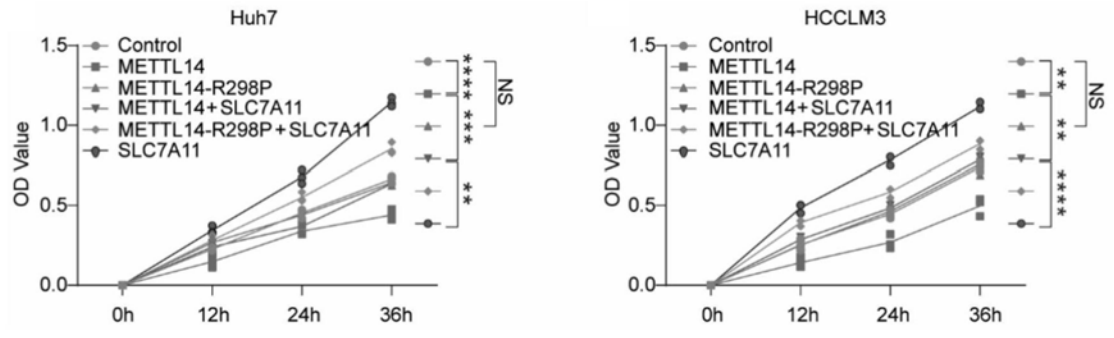


图6C