



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108103194 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201711442769.9

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2017.12.27

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108103194 A

Divya Khatter等.The small GTPase Arl8b regulates assembly of the mammalian HOPS complex on lysosomes.《JOURNAL OF CELL SCIENCE》.2015,第128卷(第9期),

(43) 申请公布日 2018.06.01

Salil Garg.Lysosomal trafficking, antigen presentation, and microbial killing are controlled by the Arf-like GTPase Arl8b.《Immunity》.2011,第35卷(第2期),

(73) 专利权人 中国医学科学院药用植物研究所  
地址 100193 北京市海淀区西北旺兴隆庄

(72) 发明人 谢勇 赵京凤 赵晓宏 成钟  
王楠 王洋 蔡大勇

(74) 专利代理机构 太原晋科知识产权代理事务  
所(特殊普通合伙) 14110

审查员 吴梦琦

代理人 郑晋周

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

A61K 45/00 (2006.01)

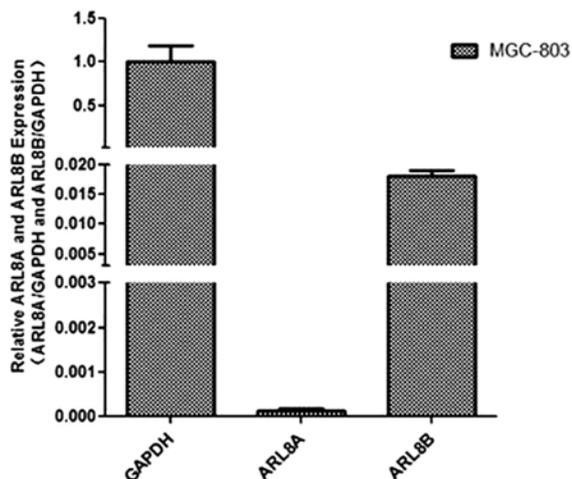
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点及其应用

(57) 摘要

本发明属生物医药技术领域,提供一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点,ARL8B基因和/或其参与的自噬途径。ARL8B基因和/或其参与的自噬途径的抑制剂包括:抗ARL8B的抗体、针对ARL8B编码序列的RNA干扰分子或反义寡核苷酸、ARL8B介导的自噬途径抑制剂。RNA干扰分子为定向干扰MGC-803细胞中ARL8B基因表达的siRNA分子。可以靶向干扰MGC-803中ARL8B基因的表达,抑制胃癌细胞生长,促进细胞自噬水平。对开发新的抗肿瘤药物具有重要指导作用,用于开发制备抗肿瘤药物,对胃癌的治疗有重大应用前景。



1. 一种抑制ARL8B基因表达的siRNA分子在制备促进胃癌细胞MGC-803自噬的药物中的应用,其特征在于:所述siRNA分子正义链序列为:5'-CCACCUUCGUCAACGUGAUTT-3',反义链序列为5'-AUCACGUUGACGAAGGUGGTT-3'。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于:所述siRNA分子可定向干扰MGC-803细胞中ARL8B基因表达,所述定向干扰包括以下步骤:

(1) 将MGC-803细胞接种到细胞培养板中,1640完全培养基,37℃,5%的CO<sub>2</sub>培养箱培养24小时后备用;

(2) 用Opti-MEM 稀释所述的siRNA分子和Lipofectamine™ 2000,室温下静置5分钟后,将两者混合,混匀并在室温下孵育20分钟;

(3) 将步骤(1)中培养细胞的1640完全培养基去掉,换成1640基本培养基,在37℃,5%的CO<sub>2</sub>培养箱孵育20分钟;

(4) 将步骤(2)所得的混合物加入步骤(3)的培养细胞中,在37℃,5%的CO<sub>2</sub>培养箱孵育5小时后,去掉培养基,换成1640完全培养基继续培养24小时-48小时;

(5) 将步骤(4)所得细胞提蛋白,做Western Blot检测。

## 一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点及其应用,抑制ARL8B基因的表达,诱导抑制MGC-803的增殖。

### 背景技术

[0002] ARL8B(全称ADP-ribosylation factor like protein 8B;也被命名为ARL10C或Gie1)是与溶酶体结合来调控细胞自噬的小G蛋白,和另一个小G蛋白ARL8A(全称ADP-ribosylation factor like protein 8A;也被命名为ARL10B或Gie2)的结构高度相似,正常生理条件下,在全身各器官内这两个蛋白都有表达,在已知的大多数肿瘤细胞内这两个蛋白质也都有表达。2011年《*Nature Cell Biology*》杂志报道了Hela细胞内ARL8A和ARL8B的功能,当细胞处于营养充足的环境中,二者呈现一定的表达水平,促使溶酶体迁移到细胞外周,细胞处于低自噬状态。当Hela细胞处于营养缺乏的培养环境中,二者的表达量显著降低,此时溶酶体迁移到细胞中央发挥自噬功能,细胞处于高自噬水平。这篇文献证明了ARL8A和ARL8B是Hela细胞抵抗饥饿诱导自噬过程中调控溶酶体迁移的关键酶,二者的功能相同。2016年《*Oncotarget*》杂志报道在前列腺癌细胞内ARL8A几乎无表达,可认为是ARL8B单独表达型,降低ARL8B表达量会促进大鼠前列腺癌细胞凋亡,证明ARL8B是一个抗肿瘤药物靶点。从已知的ARL8A和ARL8B的表达量差异来看,肿瘤细胞应该可以分为ARL8B单独表达型、ARL8A单独表达型和二者共有型,也可能存在两种蛋白都没有表达的肿瘤细胞。迄今为止尚无ARL8A单独表达或二者都没有表达的肿瘤细胞被报道。为了寻找ARL8B单独表达的其它肿瘤细胞,我们利用了荧光定量PCR法测定了一些肿瘤细胞内ARL8A和ARL8B的相对表达量,发现了另一株ARL8B单独表达的肿瘤细胞株:胃癌细胞(MGC-803)。

[0003] 胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,在我国发病率很高,其死亡率占恶性肿瘤的第一位,吸烟、饮食等不良生活习惯,以及幽门螺杆菌的持续感染等是造成胃癌高发的主要原因。胃癌的治疗主要有手术,放射治疗、化疗和中医药真情散治疗。人胃癌细胞MGC-803是从一位53岁男性原发性胃低分化粘液样腺癌患者建立的,该细胞贴壁生长,呈上皮细胞样,是研究胃癌的常用细胞株。

[0004] RNA干扰(RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。由于使用RNAi技术可以特异性干扰特定基因的表达,所以该技术被广泛用于探索基因功能及肿瘤基因的治疗领域。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的之一是提供了一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点,所述靶点为ARL8B基因和/或其参与的自噬途径。

[0006] 本发明的另一目的是提供了一种ARL8B基因和/或其参与的自噬途径的抑制剂在降低和/或消除胃癌细胞MGC-803药物中的应用。

[0007] 作为优选方案,所述ARL8B基因和/或其参与的自噬途径的抑制剂包括:抗ARL8B的

抗体、针对ARL8B编码序列的RNA干扰分子或反义寡核苷酸、ARL8B介导的自噬途径抑制剂。

[0008] 作为另一优选方案,所述的针对ARL8B编码序列的RNA干扰分子为定向干扰MGC-803细胞中ARL8B基因表达的siRNA分子。

[0009] 所述siRNA分子正义链序列为SEQ ID NO.1,反义链序列为:SEQ ID NO.2所示,为:

[0010] 正义链5'-CCACCUUCGUCAACGUGAUTT-3',

[0011] 反义链5'-AUCACGUUGACGAAGGUGGTT-3'。

[0012] 所述siRNA分子定向干扰MGC-803细胞中ARL8B基因表达的方法包括以下步骤:

[0013] (1)将MGC-803细胞接种到细胞培养板中,37°C,5%的CO<sub>2</sub>培养箱培养至细胞的混浊度达到60%-70%时备用;

[0014] (2)用Opti-MEM 稀释所述的siRNA分子和Lipofectamine™ 2000,室温下静置5分钟后,将两者混合,混匀并在室温下孵育20分钟;

[0015] (3)将步骤(1)中培养细胞的DMEM完全培养基去掉,换成DMEM基本培养基,在37°C,5%的CO<sub>2</sub>培养箱孵育20min;

[0016] (4)将步骤(2)所得的混合物加入步骤(3)的培养细胞中,在37°C,5%的CO<sub>2</sub>培养箱孵育5h后,去掉培养基,换成DMEM完全培养基继续培养24h-48h;

[0017] (5)将步骤(4)所得细胞提蛋白,做Western Blot检测。

[0018] 本发明利用荧光定量PCR法发现胃癌细胞内ARL8B基因单独表达,根据该靶点设计合成具有靶向专一性的siRNA作用于胃癌细胞MGC-803后特异性降解ARL8B的mRNA,干扰转录后的翻译过程,从而降低ARL8B蛋白的表达量,促进胃癌细胞MGC-803的自噬水平,诱导胃癌细胞凋亡,达到抑制肿瘤的作用。由此可见针对ARL8B基因和/或其参与的自噬途径的抑制剂可作为治疗胃癌细胞的药物应用,该抑制剂包括:抗ARL8B的抗体,针对ARL8B编码序列的RNA干扰分子如:siRNA定向干扰,shRNA定向干扰等,这些方法如果应用在降低ARL8B基因表达来促进肿瘤自噬作用,达到治疗肿瘤的目的。以此为药物作用机制实施抗肿瘤药物开发,均属于本发明的保护范围。

[0019] ARL8B可以被认为是一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点,本发明提供的定向干扰MGC-803细胞中ARL8B基因表达的siRNA分子转染MGC-803细胞后,siRNA能特异性的与ARL8B基因的mRNA结合,降解mRNA,从而干扰转录后的翻译过程,诱导胃癌细胞凋亡,达到抑制肿瘤生长的作用。本发明所述的siRNA采用人工化学合成方法制备,对于开发新的抗肿瘤基因药物和肿瘤药物的治疗效果具有重要指导作用,可用于开发抗胃癌的临床用药,因此该ARL8B作为抑制胃癌细胞MGC-803的靶点极其降低其表达量的方法用于研发抗胃癌药物的用途是本项发明要求保护的利益。

[0020] 本项发明中我们利用定量PCR法发现胃癌细胞内ARL8B基因单独表达,而后设计合成靶向干扰胃癌细胞MGC-803中ARL8B基因的表达,促进细胞自噬水平,该结果对临床治疗胃癌提供良好的指导意义。

## 附图说明

[0021] 图1为荧光定量PCR检测ARL8A和ARL8B基因在MGC-803细胞中的表达情况图,以β-actin为内参,横坐标表示不同基因,纵坐标表示ARL8A和ARL8B相对于GAPDH的表达量;图2为Western Blotting 检测siRNA转染MGC-803细胞后的ARL8A蛋白的表达量,包括对照组和

干扰组;图3A为光镜下观察到的siRNA不同转染时间内胃癌细胞MGC-803对照组和干扰组的细胞状态图;图3B为光镜下观察到的siRNA不同转染时间内正常肝上皮纤维细胞HL7702的细胞状态图;图4为siRNA不同干扰时间对MGC-803和HL7702细胞的致死率;图5A为检测干扰前后的蛋白表达量的Western blotting图;图5B为Western blotting检测干扰前后的蛋白表达量统计柱状图,图5C为siRNA干扰前后LC3II/LC3I统计图。

### 具体实施方式

[0022] 为使本发明更容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。这些实施例只用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0023] 若未特别指明,实施例中所用的化学试剂均为常规市售试剂,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0024] 实施例1:ARL8B基因单独表达型(或优势表达型)肿瘤细胞的筛选

[0025] 仪器:细胞培养箱(Thermo)、灭菌锅、干式恒温器、低温离心机、微量紫外分光光度计(Thermo)、CFX96 Real-Time System(Bio-Rad)等。

[0026] 试剂和材料:细胞株MGC-803来自国家实验细胞资源共享平台。1640培养基(HyClone)、0.25%胰蛋白酶(1×)溶液(HyClone)、胎牛血清(北京博奥龙免疫技术有限公司)、TRIGene总RNA提取试剂(GenStar)、PBS、氯仿、异丙醇、无水乙醇、DEPC、EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(TRANS)、TransStart Top Green qPCR SuperMix(TRANS)、PCR STRIP CAPS(Corning)、25cm<sup>2</sup> Cell Culture Flash Canted Neck(NEST)、6孔细胞培养板(NEST)等。

[0027] PCR引物(北京擎科新业生物技术有限公司合成):

[0028] ARL8A forward 5'-GATCGCTTTGTTCAACAAGC-3'

[0029] ARL8A reverse 5'-GTCCCAGAGCTTGATAGTCACA-3'

[0030] ARL8B forward 5'-GCTGGCGCTCATCTCC-3'

[0031] ARL8B reverse 5'-GCTTCGAAATCGGGGTT-3'

[0032] GAPDH forward 5'-GTCCACTGGCGTCTTCAC-3'

[0033] GAPDH reverse 5'-AGGCATTGCTGATGATCTTGA-3'

[0034] β-actin forward 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'

[0035] β-actin reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

[0036] 细胞培养:MGC-803在含10%FBS、1%青链霉素的1640培养基中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。当细胞融合度达80%-90%时,收集细胞,提取总RNA,反转录合成cDNA,然后应用SYBR Green染料进行Real-time PCR反应。

[0037] RNA提取:

[0038] (1) 细胞样本处理:贴壁细胞数量达90%时,吸尽培养基,每10cm<sup>2</sup>培养面积(6孔板或35mm平皿)加入1ml TRIGene,用加样器吹打数次,以确保细胞完全裂解,然后转移至离心管中。

[0039] (2) 裂解产物于室温(15~30℃)放置5min,使核酸-蛋白复合物完全分离。

[0040] (3) 每1ml TRIGene加入0.2ml氯仿,盖紧管盖,剧烈振荡15秒钟,室温放置2~3min。

[0041] (4) 4℃≤12000g离心15min,样品会分成三层:橘黄色的下层有机相,中间层和无

色的上层水相。

[0042] (5) 吸取含总RNA的上层水相至一新的离心管中,水相的体积约为所用TRIgene试剂的60%。

[0043] (6) 每1ml TRIgene的最初使用量加入0.5ml异丙醇,颠倒数次混匀,室温放置10min。

[0044] (7)  $4^{\circ}\text{C} \leq 12000\text{g}$ 离心10min,弃除上清,可见胶状的RNA沉淀。

[0045] (8) 每1ml TRIgene的最初使用量加入1ml 75%乙醇,颠倒数次混匀,洗涤沉淀。

[0046] (9)  $4^{\circ}\text{C} \leq 7500\text{g}$ 离心5min,弃除上清。

[0047] (10) 室温倒置5~10min晾干,加入适量DEPC-ddH<sub>2</sub>O,用加样器吹打数次溶解RNA。

[0048] (11) 通过紫外分光光度计检测,确定RNA的浓度、纯度。

[0049] 反转录获得第一链cDNA:采用全式金公司的反转录试剂盒(EasyScript® First-Strand cDNA Synthesis Supermix)在逆转录酶EasyScript® RT/RI的作用下高效合成得到第一链cDNA。

[0050] 对于第一链cDNA合成反应,将以下溶液于冰上化冻,并按相应的体积加入到在无菌的RNase-free 0.5ml的EP管中:Total RNA 1 $\mu\text{g}$ ;Anchored Oligo (dT) 18 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 1 $\mu\text{l}$ ;补RNase-Free Water 至9 $\mu\text{l}$ ,混匀后 $65^{\circ}\text{C}$ 孵育5min,打开RNA的二级结构,再冰浴2min,避免RNA的二级结构重新形成。

[0051] 在冰上加入10 $\mu\text{l}$  2 $\times$ ES Reaction Mix和1 $\mu\text{l}$  EasyScript® RT/RI Enzyme Mix,总体积20 $\mu\text{l}$ 。轻轻混匀 $42^{\circ}\text{C}$ 反应15min,随后 $85^{\circ}\text{C}$ 加热5s失活EasyScript® RT/RI。

[0052] 引物设计:根据NCBI上公布的相关基因的序列,进行设计引物。设计好的引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成,具体序列如下:

[0053] Primer Sequence 5' -3' T<sub>m</sub>

[0054] ARL8A forward GATCGCTTTGTTCAACAAGC  $56.98^{\circ}\text{C}$

[0055] ARL8A reverse GTCCCAGAGCTTGATAGTCACA  $57.85^{\circ}\text{C}$

[0056] ARL8B forward GCTGGCGCTCATCTCC  $57.29^{\circ}\text{C}$

[0057] ARL8B reverse GCTTCGAAATCGGGGTT  $56.99^{\circ}\text{C}$

[0058] GAPDH forward GTCCACTGGCGTCTTCAC  $57.9^{\circ}\text{C}$

[0059] GAPDH reverse AGGCATTGCTGATGATCTTGA  $55.4^{\circ}\text{C}$

[0060]  $\beta$ -actin forward GGACTTCGAGCAAGAGATGG  $51.9^{\circ}\text{C}$

[0061]  $\beta$ -actin reverse AGCACTGTGTTGGCGTACAG  $51.9^{\circ}\text{C}$

[0062] Real-time PCR反应:采用Trans基于SYBR Green染料的荧光实时定量PCR技术检测基因表达情况,反应条件按照说明书操作。所有实验都在Bio-RadCFX96系统上进行。每个正向引物和反向引物的浓度为10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。实验步骤如下:

[0063] (1) 在冰上按照顺序加入以下的试剂:cDNA (50ng) 1  $\mu\text{l}$ ; 2  $\times$  TransStart Top Green qPCR SuperMix 10  $\mu\text{l}$ ; Forward Primer (10  $\mu\text{M}$ ) 0.4  $\mu\text{l}$ ; Reverse Primer (10  $\mu\text{M}$ ) 0.4  $\mu\text{l}$ ; ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu\text{l}$ ,总体积为20  $\mu\text{l}$ 。

[0064] (2) 实时荧光定量PCR:采用三步法进行扩增,具体反应的条件如下:首先,将样本进行预变性, $94^{\circ}\text{C}$ ,30s;随后进行PCR反应, $94^{\circ}\text{C}$ ,5s, $52^{\circ}\text{C}$ ,30s, $72^{\circ}\text{C}$ ,10s,进行40个循环。每个样本重复3次;

[0065] (3) 在PCR扩增反应完成后,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析样本间的表达情况,具体分析方法为:每对基因在每个模板中做3个重复管,得到的Ct值取平均值;每个目的基因的Ct平均值减去对应模板内参基因( $\beta$ -actin)的Ct平均值,得到 $\Delta Ct$ 。实验组(ARL8A和ARL8B)的 $\Delta Ct$ 减去对照组(GAPDH)的 $\Delta Ct$ ,得到 $\Delta\Delta Ct$ 值,对照组和实验组的待测基因的倍数关系用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。每种细胞做3次生物重复,计算偏差值。

[0066] 实验结果:用实时定量PCR数据处理方法 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法来分析实验结果,ARL8A和ARL8B相对GAPDH的表达量如图1所示: $\beta$ -actin为内参,MGC-803细胞内ARL8B/GAPDH数值约为0.02,ARL8A/GAPDH低于0.0001,可以认为MGC-803细胞是ARL8B单独表达的肿瘤细胞株。

[0067] 实施例2:Western blotting 验证siRNA干扰ARL8B蛋白表达量的变化

[0068] 仪器:细胞培养箱(Thermo)、灭菌锅、干式恒温器、电泳仪(BIO-RAD)、Mini-PROTEAN Tetra System(BIO-RAD)、高速台式冷冻离心机(湘仪)、化学发光成像系统(Chemi)等。

[0069] 试剂和材料:MGC-803细胞、1640培养基(HyClone)、0.25%胰蛋白酶(1 $\times$ )溶液(HyClone)、胎牛血清(北京博奥龙免疫技术有限公司)、Lipofectamine<sup>TM</sup>2000(Invitrogen)、蛋白定量试剂盒(北京博奥龙免疫技术有限公司)、PageRuler Prestained Protein Ladder、脱脂奶粉(BD)、SIGMAFAST<sup>TM</sup> Protein Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free(SIGMA)、细胞裂解液(北京博奥龙免疫技术有限公司)、PMSF、PVDF Transfer Membranes(Immobilon-P)、抗体、6孔细胞培养板(NEST)等。

[0070] siRNA的序列设计与化学合成(上海吉玛制药技术有限公司):用于降低ARL8B表达的siRNA由上海吉玛制药技术有限公司设计及合成,合成方法依据化学合成寡聚RNA方法实行,合成产物用HPLC纯化,纯度大于99%。提供的siRNA序列如下:正义链5'-CCACCUUCGUCAACGUGAUTT-3',反义链5'-AUCACGUUGACGAAGGUGGTT-3'。

[0071] siRNA瞬时转染:

[0072] (1) 转染的前一天,将MGC-803细胞接种到6孔细胞培养板中,在37 $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>培养箱培养,保证在转染时候细胞的混浊度达到70%-80%。

[0073] (2) 用250  $\mu$ l Opti-MEM I分别稀释15  $\mu$ l siRNA分子和15  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup>2000,室温下静置5分钟后,将两者混合,轻轻混匀并在室温下孵育20分钟。

[0074] (3) 将第(1)步培养细胞的1640完全培养基去掉,换成1640基本培养基,在37 $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>培养箱孵育20min。

[0075] (4) 将第(2)步所获得的混合物加入第(3)步培养细胞中,在37 $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>培养箱孵育5h后,去掉培养基,换成1640完全培养基继续培养48h。

[0076] Western Blotting检测siRNA干扰后ARL8B蛋白的表达水平:取转染后48h的细胞,吸除培养基,用PBS洗两遍,加入100  $\mu$ l细胞裂解液,在冰浴裂解10min,用细胞刮棒将细胞刮下,转移至1.5ml离心管中,15000rpm离心15min后,取上清液,测定蛋白浓度,并制成蛋白样品。每组取40  $\mu$ g蛋白进行SDS-PAGE,电泳完成后转移至PVDF膜上,封闭后进行ARL8B、 $\beta$ -actin一抗及羊抗兔二抗处理,然后进行发光反应,显影。

[0077] 实验结果:如图2所示,siRNA作用于MGC803细胞48h时,MGC-803细胞的ARL8B蛋白的表达量明显下降,Western Blotting检测不到ARL8B的表达量。另一方面,由于使用的ARL8B抗体也能检测ARL8A的表达量,ARL8A和ARL8B的都含有186个氨基酸残基,如果有

ARL8A存在,在ARL8B信号出现的位置也应该有光信号出现,实验结果显示siRNA作用于MGC803细胞48h后ARL8B和ARL8A的信号都没有出现,不仅证明了本专利所述的siRNA能有效沉默ARL8B基因,也给出了在胃癌细胞MGC-803内ARL8A无表达的证据。

[0078] 实施例3:ARL8B基因沉默对MGC-803和HL7702细胞增殖的影响及其机制验证

[0079] 仪器:细胞培养箱(Thermo)、灭菌锅、干式恒温器、电泳仪(BIO-RAD)、Mini-PROTEAN Tetra System(BIO-RAD)、高速台式冷冻离心机(湘仪)、化学发光成像系统(Chemi)等。

[0080] 试剂和材料:MGC-803细胞、HL7702细胞、1640培养基(HyClone)、0.25%胰蛋白酶(1×)溶液(HyClone)、胎牛血清(北京博奥龙免疫技术有限公司)、Lipofectamine<sup>TM</sup>2000(Invitrogen)、CCK8试剂盒、96孔细胞培养板(NEST)、酶标仪、蛋白定量试剂盒(北京博奥龙免疫技术有限公司)、PageRuler Prestained Protein Ladder、脱脂奶粉(BD)、SIGMAFAST<sup>TM</sup> Protein Inhibitor Cocktail Tablets,EDTA-Free(SIGMA)、细胞裂解液(北京博奥龙免疫技术有限公司)、PMSF、PVDF Transfer Membranes(Immobilon-P)、抗体、6孔细胞培养板(NEST)等。

[0081] CCK8法检测siRNA干扰ARL8B基因后对MGC-803和HL7702细胞增殖的影响:

[0082] (1)在96孔板中接种细胞悬液(100ml/孔),每孔约10000个细胞,培养24 h后进行siRNA转染操作。

[0083] (2)转染ARL8B-siRNA后,将培养板放在37℃、5%的CO<sub>2</sub>的培养箱培养,24h、36h、48h后分别取样检测;检测时,向每孔加入10 μl的CCK-8溶液,将培养板在培养箱内孵育30min,用酶标仪测定在450nm处的吸光度。

[0084] 实验结果如图3所示。图3A为光镜下观察到的不同转染时间内胃癌细胞MGC-803的生长状况,图3B为不同转染时间内正常肝上皮纤维细胞HL7702的生长状况,由细胞状态图可知,随siRNA干扰ARL8B时间的延长,胃癌细胞MGC-803的生长状况越来越差,48h时大部分细胞分解死亡;而siRNA干扰对正常肝上皮纤维细胞HL7702的影响较小。图4为siRNA不同干扰时间对MGC-803和HL7702细胞的致死率统计。图3说明ARL8B-siRNA对胃癌MGC-803的促凋亡效果极其明显,而对HL7702的促凋亡效果相对较弱。由此我们可以得出结论:本专利所述的定向干扰ARL8B基因的siRNA对胃癌MGC-803的生长有明显的抑制作用,对正常肝上皮纤维细胞HL7702的影响较小,原因是这种细胞内ARL8B和ARL8A都存在,单独敲除ARL8B后,ARL8A能继续发挥ARL8B的功能,因此观测到的细胞凋亡速度明显低于胃癌细胞MGC-803。

[0085] Western Blotting检测KIF2A的表达量变化,S6K的磷酸化以及LC3II/LC3I的相对表达量,因为这些蛋白质相对表达量大小或磷酸化水平的改变是判断细胞自噬水平高低的参数:取转染后48h的细胞,吸除培养基,用PBS洗两遍,加入100ul细胞裂解液,在冰浴裂解10min,用细胞刮棒将细胞刮下,转移至1.5ml离心管中,15000rpm离心15min后,取上清液,测定蛋白浓度,并制成蛋白样品。每组取40ug蛋白进行SDS-PAGE,电泳完成后转移至PVDF膜上,封闭后进行ARL8B、LC3、β-actin等一抗及羊抗兔二抗处理,然后进行发光反应,显影。

[0086] 实验结果:结果见图5,在MGC-803细胞中,随着siRNA导致细胞内ARL8B消失后,Western Blotting显示表征细胞自噬水平升高的一些蛋白质的量变化和文献报道结果一致,即ARL8B表达量降低时,KIF2A的表达量降低,S6K的磷酸化水平也降低,LC3II的增加尤为显著(A,B)。LC3II/LC3I比值越高表明细胞自噬水平越高,如(C)所示在实施siRNA干扰

后,LC3II/LC3I数值相对于干扰前的约13.5倍。这些结果证明ARL8B表达量降低能显著提高细胞自噬水平,细胞处于长时间的高自噬状态最终导致死亡,所以本发明所述的siRNA对于胃癌的治疗具有重大应用前景。

[0087] 综上所述,ARL8B可以被认为是一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点,本发明提供的定向干扰MGC-803细胞中ARL8B基因表达的siRNA分子转染MGC-803细胞后,siRNA能特异性的与ARL8B基因的mRNA结合,降解mRNA,从而干扰转录后的翻译过程,诱导胃癌细胞凋亡,达到抑制肿瘤生长的作用。本发明所述的siRNA采用人工化学合成方法制备,对于开发新的抗肿瘤基因药物和肿瘤药物的治疗效果具有重要指导作用,可用于开发抗胃癌的临床用药,因此该ARL8B作为抑制胃癌细胞MGC-803的靶点极其降低其表达量的方法用于研发抗胃癌药物的用途是本项发明要求保护的利益。

[0088] 本项发明中我们利用定量PCR法发现胃癌细胞内ARL8B基因单独表达,而后设计合成靶向干扰胃癌细胞MGC-803中ARL8B基因的表达,促进细胞自噬水平,该结果对临床治疗胃癌提供良好的指导意义。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国医学科学院药用植物研究所
- [0003] <120> 一种抑制胃癌细胞MGC-803的靶点及其应用
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 19
- [0008] <212> RNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] ccaccuucgu caacgugau 19
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 19
- [0014] <212> RNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] aucacguuga cgaaggugg 19

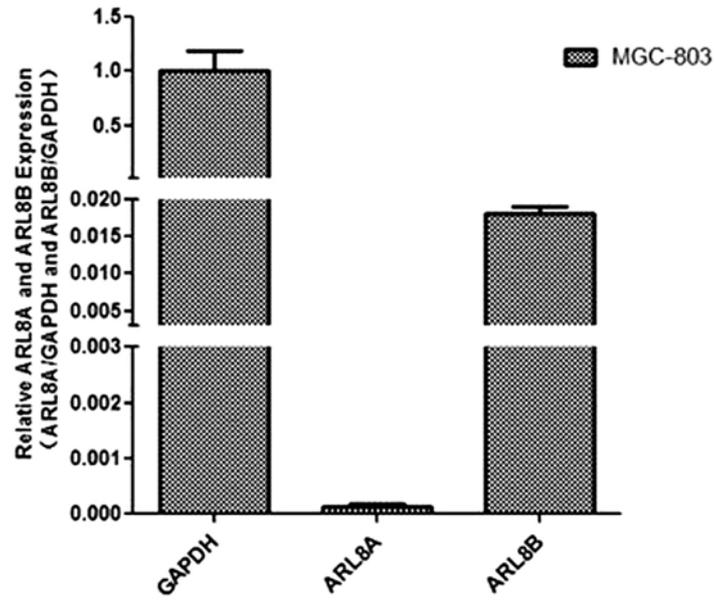


图1

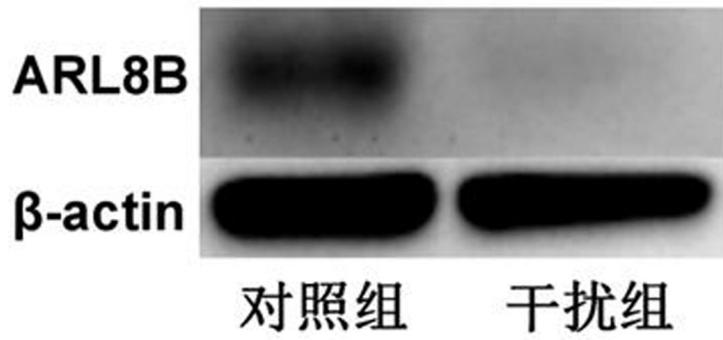


图2

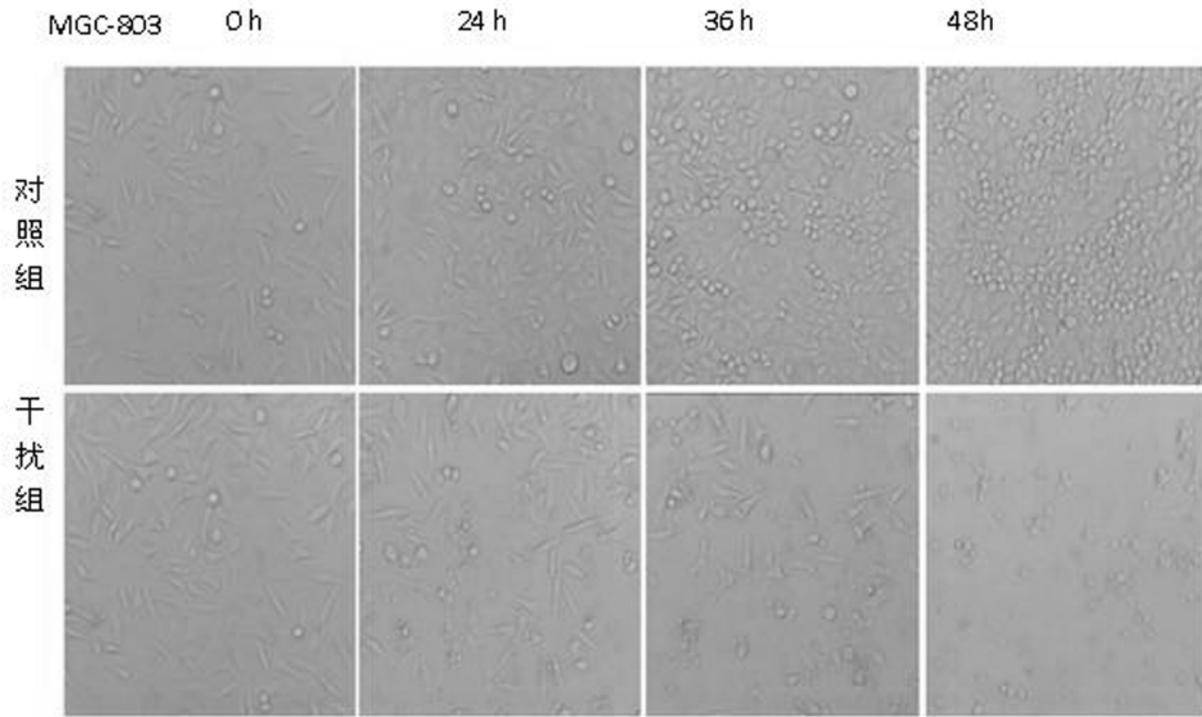


图3A

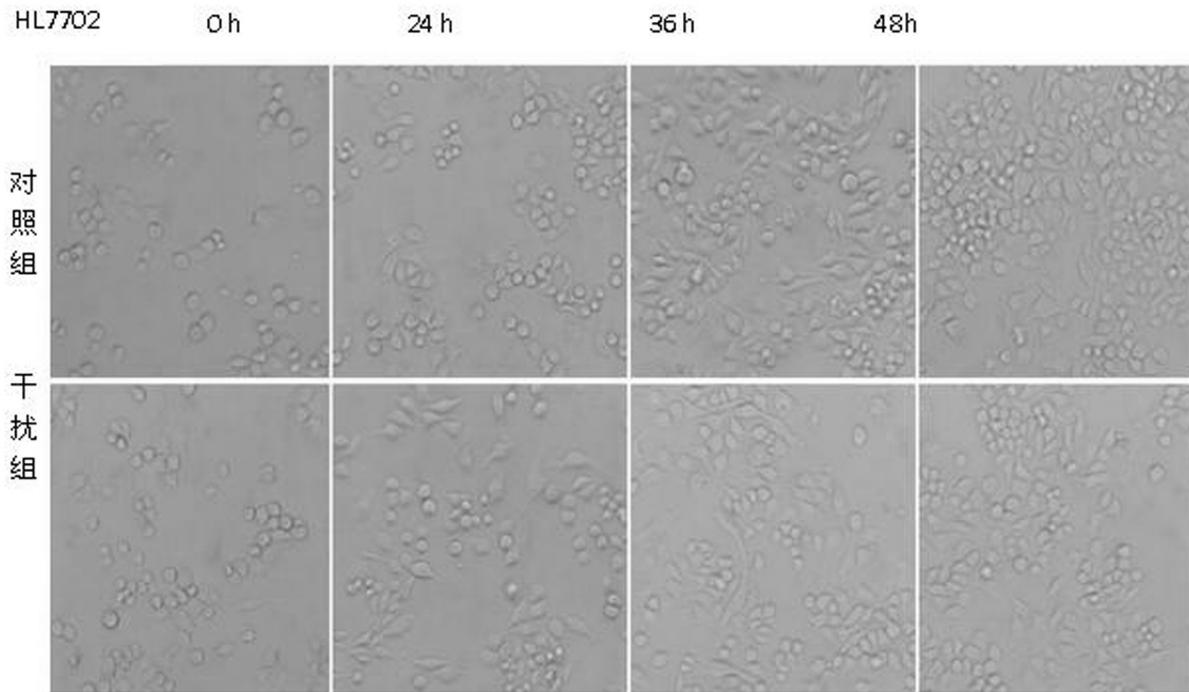


图3B

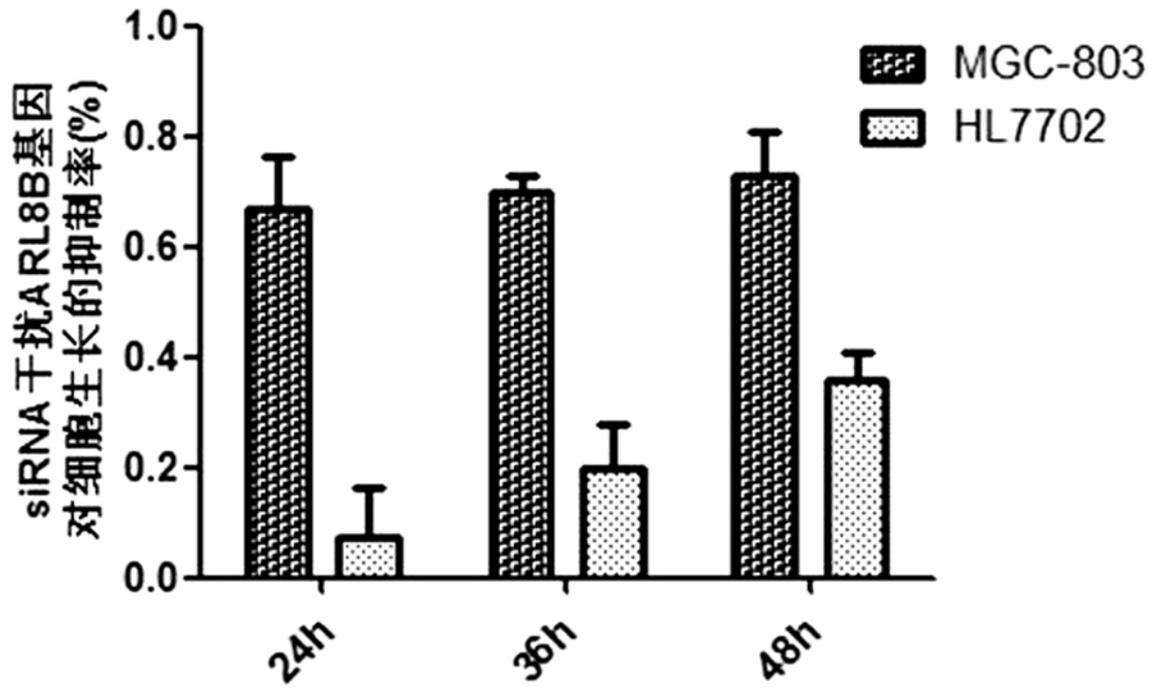


图4

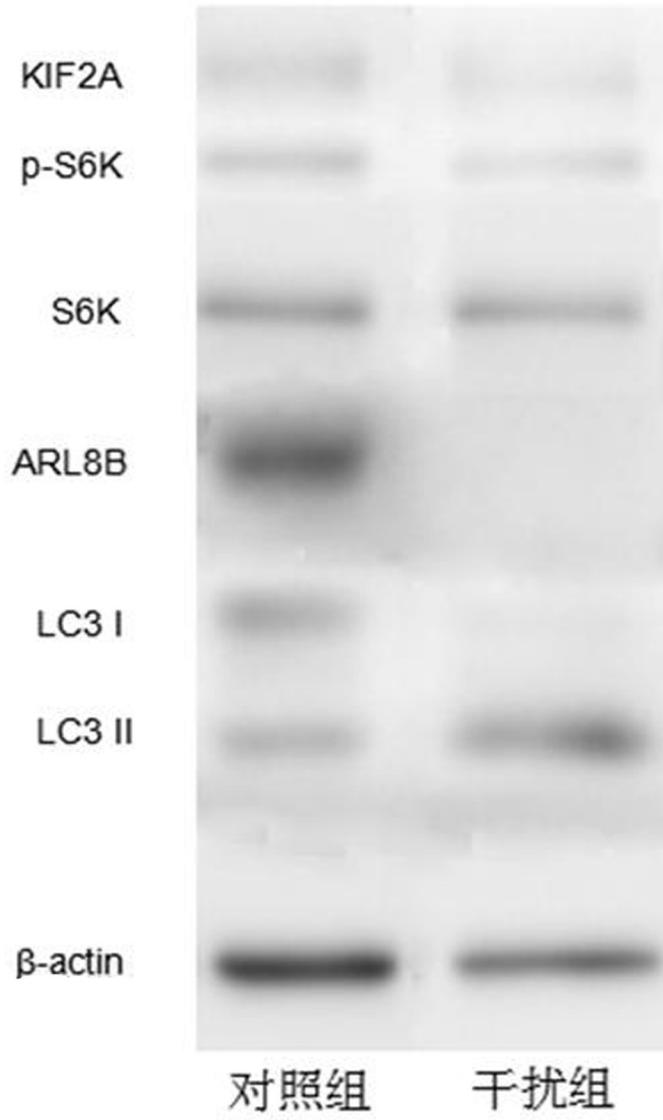


图5A

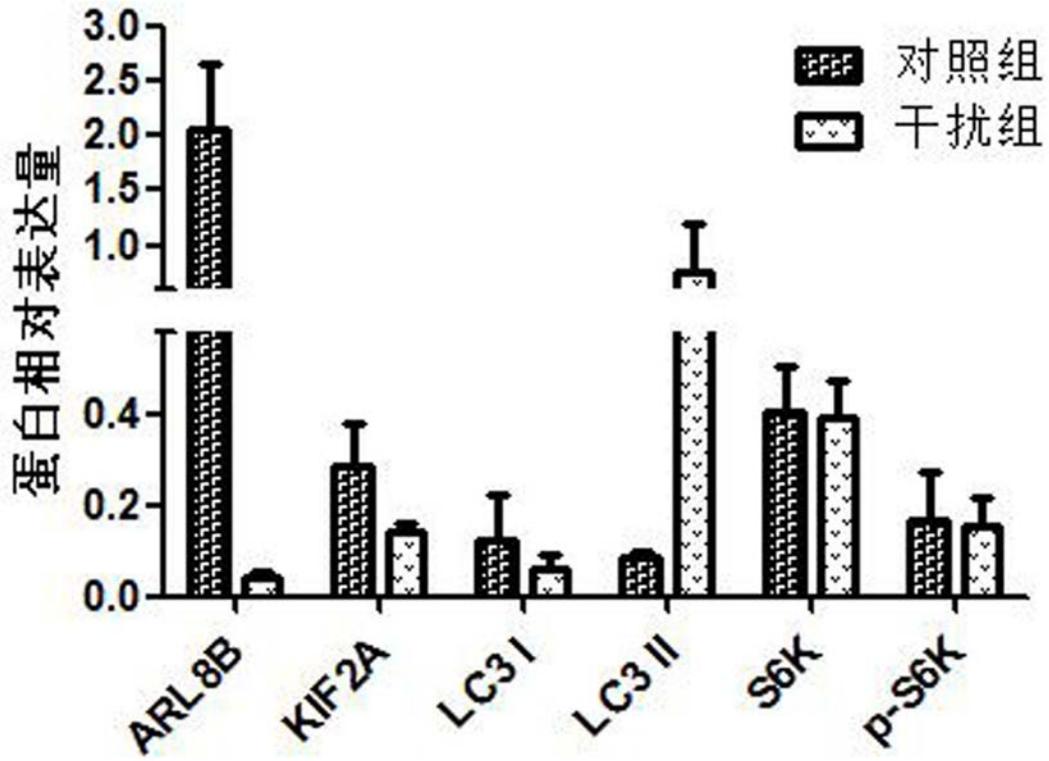


图5B

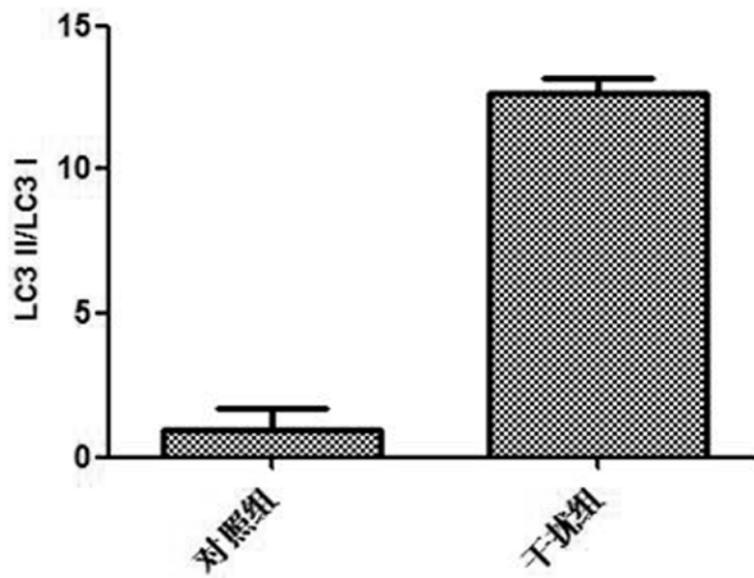


图5C