



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103525941 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310524633. 8

*G01N 33/574* (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 10. 29

*A61K 48/00* (2006. 01)

(71) 申请人 上海市奉贤区中心医院

*A61K 39/00* (2006. 01)

地址 201400 上海市奉贤区南桥镇南奉公路  
6600 号

*A61K 38/00* (2006. 01)

*A61P 35/00* (2006. 01)

(72) 发明人 张蓉 张学利 朱琳艳 陆欢  
汪景灏 宋维伟

(74) 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司  
31213

代理人 王巍

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/68* (2006. 01)

*G01N 33/68* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

CTHRC1 基因在制备检测 / 治疗宫颈癌药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了 CTHRC1 基因(Collagen Triple Helix Repeat Containing1, 中文名三螺旋重复胶原蛋白 I) 在制备检测、治疗宫颈癌药物中的应用。本发明人利用 Real-time PCR 方法检测了宫颈癌组织和正常对照组织中 CTHRC1 的 mRNA 表达情况, 并利用组织微阵列技术构建了包含 102 例宫颈鳞癌, 30 例宫颈腺癌, 31 例正常宫颈组织标本的组织芯片, 并利用免疫组织化学技术检测 CTHRC1 在其中的表达情况, 发现 CTHRC1 在宫颈正常组织中阳性表达率远低于在宫颈癌中阳性表达率, 且 CTHRC1 表达强度与宫颈癌肌层侵袭深度和宫颈癌肿瘤分级呈正相关。因此, CTHRC1 基因可用于制备检测或治疗宫颈癌药物。CTHRC1 无论是在细胞水平还是蛋白水平上都能够显著区分肿瘤与非肿瘤、高危肿瘤与低危肿瘤, 结果的重复性好, 具有良好的临床应用前景, 有较大的应用价值和社会效益。

1. CTHRC1 基因在制备检测 / 治疗宫颈癌药物中的应用, 其特征在于, 所述 CTHRC1 基因序列为 SEQ ID NO. 1。
2. CTHRC1 基因在制备检测宫颈癌药物中的应用, 其特征在于, 所述 CTHRC1 基因序列为 SEQ ID NO. 1。
3. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 所述检测宫颈癌药物为用 RT-PCR、PCR、免疫检测、原位杂交或基因芯片检测宫颈癌的药物或试剂盒。
4. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述检测用 RT-PCR 检测宫颈癌的药物至少包括一对特异性扩增 CTHRC1 基因的引物。
5. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述检测用 PCR 检测宫颈癌的药物至少包括一对特异性扩增 CTHRC1 基因的引物。
6. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述检测用免疫检测宫颈癌的药物包括与 CTHRC1 蛋白特异性结合的抗体、多克隆抗体或单克隆抗体。
7. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述检测用原位杂交检测宫颈癌的药物包括与 CTHRC1 核酸序列杂交的探针。
8. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述检测用于检测宫颈癌的试剂盒包含用于 RNA 分离、扩增细胞中 RNA 的纯化的试剂或标记的 CTHRC1 基因。
9. CTHRC1 基因在制备治疗宫颈癌药物中的应用, 其特征在于, 所述 CTHRC1 基因序列为 SEQ ID NO. 1。
10. 根据权利要求 9 所述的应用, 其特征在于, 所述治疗宫颈癌药物包括通过 RNA 干扰抑制 CTHRC1 基因表达的双链核糖核酸或基于 CTHRC1 抗原蛋白的肿瘤疫苗或抑制 CTHRC1 蛋白活性的蛋白质。

## CTHRC1 基因在制备检测 / 治疗宫颈癌药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物,具体涉及生物药,尤其涉及 CTHRC1 基因在制备检测 / 治疗宫颈癌药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 宫颈癌已经被公认为是一个感染性癌,是世界范围内常见的妇科癌症,亦是妇科恶性肿瘤死亡的主要原因,占全球女性因肿瘤致死病因的第四位。据国际癌症研究所(IARC)最新统计资料显示,2008 年全球有 52.98 万宫颈癌新发病例,27.51 万死亡病例,平均 2 分钟就有 1 名女性死于宫颈癌 [Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011, 61(2):69-90. ]。2010 年美国宫颈癌预测新发病例数为 12,170, 预计死亡病例 4,220 例 [Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010, 60(5):277-300. ]。宫颈癌的发生与 HPV 的感染密切相关,持续的 HPV 感染促进了癌前病变到宫颈癌的发展 [Hutchinson DJ, Klein KC (2008). Human papillomavirus disease and vaccines. American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists 65:2105 - 2112. ]。CTHRC1 (collagen triple helix containing 1, 三螺旋重复胶原蛋白 I) 基因是 2005 年发现的一个新基因,最先是在对正常大鼠动脉和球状损伤动脉的差异表达序列筛选中发现的。它瞬时表达于损伤血管部位,通过抑制胶原基质的沉积和促进细胞迁移参与了血管的损伤修复过程。(Pyagay, P. et al. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. Circ. Res., 2005. 96, 261 - 268. )。在血管细胞中表达的 CTHRC1, 通过调控转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 的响应,从而抑制 TGF- $\beta$  的靶基因和胶原蛋白的表达 (LeClair, R. et al. The role of collagen triple helix repeat containing 1 in injured arteries, collagen expression, and transforming growth factor beta signaling. Trends Cardiovasc. Med., 2007. 17. 202 - 205 ; LeClair RJ, Durmus T, Wang Q, Pyagay P, Terzic A, Lindner V. Cthrc1 is a novel inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  signaling and neointimal lesion formation. Circ Res 2007; 100:826-33)。CTHRC1 在胚胎期的许多器官中有强烈的表达,特别是在增长的板状软骨和骨基质中,在那里它通过调节 Smad2/3 和 TGF 信号控制胶原沉积 (LeClair RJ, Durmus T, Wang Q, Pyagay P, Terzic A, Lindner V. Cthrc1 is a novel inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  signaling and neointimal lesion formation. Circ Res 2007; 100:826-33 ; Durmus T, LeClair RJ, Park KS, Terzic A, Yoon JK, Lindner V. Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 (Cthrc1). Gene Expr Patterns 2006; 6:935 - 40)。在正常成人组织中 CTHRC1 表示很低,但在病理状态下会出现激增如损伤的动脉或皮肤伤口 (Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, Nishita M, Minami Y, Yonemura S, et al. Cthrc1

selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell*2008;15:23 - 36)。CTHRC1 蛋白通过促进 Wnt 配体和 Frizzled 受体复合物的形成积极调节 PCP-Wnt 信号通路(Li YW, Dudley AT. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development*2009;136:1083 - 92)。通过 PCP-Wnt 信号途径, CTHRC1 调节胚胎发育时的细胞运动。在骨骼组织的发展中, PCP-Wnt 信号通路能调节软骨细胞的成熟和软骨形成。通路内的基因的改变随着会出现软骨生成, 胶原沉积的失调, 和软骨形态变化的(Li YW, Dudley AT. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development*2009;136:1083 - 92 ;Ahrens MJ, Li Y, Jiang H, Dudley AT. Convergent extension movements in growth plate chondrocytes require gpi-anchored cell surface proteins. *Development*2009;136:3463 - 74)。CTHRC1 转基因小鼠表现出成骨细胞的骨形成增加, 分化加剧和骨原细胞的钙化(Kimura, H. et al. *Cthrc1* is a positive regulator of osteoblastic bone formation. *PLoS ONE*, 2008, 3, e3174)。通过与 Wnt5a 相互作用, CTHRC1 还参与了激活平面细胞极性通路, 这暗示 CTHRC1 在细胞发生过程中有调控形态的作用。在成年人, CTHRC1 调节肿瘤细胞迁移和侵袭。一项人类肿瘤互补的 DNA 阵列分析表明, CTHRC1 基因在大多数人类的实体癌有表达。CTHRC1 在浸润原发性和转移性黑色素瘤中有表达, 但在良性痣或非侵入性样本中无表达。抑制 CTHRC1 表达能减少黑色素瘤细胞的体外迁移(Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y. Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing lin human solid cancers. *Clin Cancer Res*2006;12:3716 - 22)。在大多数隆凸性皮肤纤维肉瘤(一种局部侵袭性的频繁转移的肿瘤)中有 CTHRC1 表达, 但在多数良性的纤维组织细胞瘤无表达<sup>14</sup>。Wang, L. et al. Collagen triple helix repeat containing-lin the differential diagnosis of dermatofibrosarcoma protuberans and dermatofibroma. *Br. J. Dermatol.*, 2011, 164, 135 - 140)。乳腺癌中 CTHRC1 的表达显著高于正常组织或癌前期病变组织, 而且与骨转移的风险有关联(Kharaishvili, G. et al. Collagen triple helix repeat containing lprotein, periostin and versican in primary and metastatic breast cancer: an immunohistochemical study. *J. Clin. Pathol.* 2011, 64, 977 - 982. )。CTHRC1 在胰腺癌中有高表达, 通过调节胰腺癌细胞的活力和粘附性从而在肿瘤进展和转移中发挥作用(Park EH, Kim S, Jo JY, et al. Collagen triple helix repeat containing-lpromotes pancreatic cancer progression by regulating migration and adhesion of tumor cells. *Carcinogenesis*. 2013Mar;34(3):694-702. )。此外, 在肝癌中 CTHRC1 过表达往往与巨大肿瘤大和晚期肿瘤先关。多因素分析表明 CTHRC1 是肝癌的一个独立预后因素。在肝癌中 CTHRC1 通过提高肿瘤细胞的黏附和迁移能力从而促进肿瘤的侵袭和转移(Chen YL, Wang TH, Hsu HC, et al. Overexpression of CTHRC1 in Hepatocellular Carcinoma Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor Prognosis. *PLoS One*. 2013Jul29;8(7):e70324. )。然而, 至今未见 CTHRC1 与治疗其他癌症相关的报道。

## 发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题在于研究设计 CTHRC1 的新适应症, 用于制备诊断治

疗宫颈癌药物。

[0004] 本发明提供了 CTHRC1 在制备检测 / 治疗宫颈癌药物中的应用。

[0005] 基因名称 :CTHRC1

[0006] 中文名 :三螺旋重复胶原蛋白 I

[0007] 英文名 :Collagen Triple Helix Repeat Containing 1

[0008] 序列 :见序列表 1 (SEQ ID NO.1)。

[0009] 具体地,本发明提供了 CTHRC1 基因在制备检测 / 治疗宫颈癌药物中的应用。

[0010] 本发明所指的 CTHRC1 基因包括其完整的 DNA 编码序列,其 RNA 序列及其突变体,以及其功能上活性的片段。需理解的是,当编码相同的氨基酸时,密码子中的核苷酸的取代是可接受的。另外需理解的是,由核苷酸取代而产生的保守的氨基酸取代时,核苷酸的变换也是可被接受的。在得到了 CTHRC1 的核酸片段的情况下,可根据核苷酸序列来设计特异性探针。

[0011] 核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次 PCR 扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0012] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0013] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,衍生物)的 DNA 序列。然后将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。

[0014] 本发明中,CTHRC1 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。总之,只要能在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

[0015] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含 CTHRC1 的 DNA 序列和合适的转录 / 翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导 mRNA 合成。转化载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

[0016] 此外,表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP),或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0017] 包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0018] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属的细菌细胞;真菌细胞如酵母;植物细胞;昆虫细胞;动物细胞等。

[0019] 在获得了核酸序列后,可根据核酸序列设计特异性核酸探针。设计探针的方法是本领域常规的,可见 Sambrook 等人,分子克隆实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述。检测生物样品中是否存在 CTHRC1 蛋白或核酸的示范性方法包括获得测试受试者的生物样品,使该生物样品接触能与 CTHRC1mRNA 或基因组 DNA 杂交的标记的核酸探针。用于本发明诊断试验的其它探针如本文所述。

[0020] 核酸探针与扩增的标记序列接触。该探针优选连接到一种发色团,但可被放射标记。在另一个实施例中,探针连接到一种结合伴侣上,如抗体或生物素,或另一种携带可检测结构域的结合伴侣上。

[0021] 在传统的方法中,检测可通过 Southern 印迹以及与标记的探针杂交来进行。Southern 印迹所涉及的技术是本领域技术人员所熟知的(参见 Sambrook 等, 1989)。常规的检测还有生物芯片、荧光显影技术、细胞流式计数等。

[0022] 另一方面,本发明还包括对 CTHRC1DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体,尤其是单克隆抗体。这里,“特异性”是指抗体能结合于 CTHRC1 基因产物或片段。“较佳地”指那些能与 CTHRC1 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。

[0023] 抗 CTHRC1 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中,检测活检标本中的 CTHRC1 蛋白,还可以作为用于预防宫颈癌、卵巢癌转移和侵袭的特异性治疗剂。

[0024] 血样或尿液中的 CTHRC1 的直接测定可以作为肿瘤的辅助诊断和预后的观察指标,也可作为肿瘤早期诊断的依据。

[0025] 抗体可以通过 ELISA、Western 印迹分析,或者与检测基团偶联,通过化学发光、同位素示踪等方法来检测。

[0026] 本发明也包括试剂盒,以进行这里描述的任何方法。在一个非限制的实例中,所述试剂盒将以适当的容器形式包含这些试剂中的一种或多种。所述试剂盒也可包含用于 RNA 分离、扩增细胞中 RNA 的纯化的试剂、标记等。

[0027] 本发明所述检测或治疗宫颈癌药物包括用 RT-PCR、PCR、免疫检测、原位杂交、基因芯片检测或治疗宫颈癌的药物或试剂盒。

[0028] 所述用 RT-PCR 检测宫颈癌的药物至少包括一对特异性扩增 CTHRC1 基因的引物。

[0029] 所述用 PCR 检测宫颈癌的药物至少包括一对特异性扩增 CTHRC1 基因的引物。

[0030] 所述用免疫检测检测宫颈癌的药物包括与 CTHRC1 蛋白特异性结合的抗体、多克隆抗体和单克隆抗体。

[0031] 所述用原位杂交检测宫颈癌的药物包括与 CTHRC1 核酸序列杂交的探针。

[0032] 所述用基因芯片检测宫颈癌的药物包括与 CTHRC1 核酸序列杂交的探针。

[0033] 所述用于检测宫颈癌的试剂盒包含用于 RNA 分离、扩增细胞中 RNA 的纯化的试剂、标记等。

[0034] 试剂盒的组分可以以水介质的形式或以冻干的形式来包装。试剂盒中适当的容器通常至少包括一种小瓶、试管、长颈瓶、宝特瓶、针筒或其它容器,其中可放置一种组分,并且优选地,可进行适当地等分。在试剂盒中存在多于一种的组分时,试剂盒中通常也将包含第二、第三或其它附加的容器,其中分离地放置附加的组分。然而,不同组合的组分可被包含在一个小瓶中。本发明的试剂盒通常也将包括一种用于容纳反应物的容器,密封以用于

商业销售。这种容器可包括注模或吹模的塑料容器,其中可保留所需的小瓶。

[0035] 本发明的又一目的是提供了 CTHRC1 基因在制备检测 / 治疗宫颈癌药物中的应用。

[0036] 本发明所述治疗药物包括:通过 RNA 干扰抑制 CTHRC1 基因表达的双链核糖核酸、基于 CTHRC1 抗原蛋白的肿瘤疫苗或抑制 CTHRC1 蛋白活性的蛋白质。

[0037] 本发明所述检测 / 治疗宫颈癌药物可以通过口服、皮肤或肠胃外方式给药。

[0038] 本发明所述检测 / 治疗宫颈癌药物可以通过本领域常规技术制成口服、吸入、注射或栓剂等剂型。

[0039] 本发明人通过下列试验:

[0040] A. 选取 2011 年 3 月 8 日 -5 月 30 日期间在知情同意并自愿接受宫颈 HPV 核酸检测的上海市奉贤区妇女医院就诊人群进行宫颈脱落细胞采样筛查及流行病学问卷调查。对自愿进行进一步检查者再做液基薄层细胞学检测(TCT)和阴道镜检查,宫颈活检组织部分送病理常规切片,部分放置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存,同时抽取其血清放置  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存。在上述人群中选取 HPV16 和 18 感染的宫颈组织(宫颈炎, CIN 和宫颈癌) 30 例,匹配年龄无差异的 HPV 阴性的患者 30 例,我们用 RT-PCR 和的方法检测其 CTHRC1 表达情况,比较其表达差异;同时进一步用 ELISA 法检测其血清中 CTHRC1 的表达情况。

[0041] B. 利用组织微阵列技术构建了 102 例宫颈鳞癌, 30 例宫颈腺癌, 31 例正常宫颈组织标本的组织芯片,并利用免疫组织化学技术检测 CTHRC1 在这些标本中的表达情况,发现 CTHRC1 在子宫内膜正常组织中阳性表达率远低于在宫颈癌中阳性表达率(16.68%vs73.25%),且 CTHRC1 表达强度与宫颈癌肌层侵袭深度( $p < 0.0001$ )和宫颈癌肿瘤分级( $p=0.0167$ )呈正相关。

[0042] 根据上述实验结果尤其是大样本量的临床资料分析,本发明人已经证实了 CTHRC1 基因与宫颈癌的生物学特性及宫颈癌患者预后存在必然联系。该基因的蛋白编码产物 CTHRC1 蛋白作为一种分泌型糖蛋白,可以在血清中得到检测,为宫颈癌等疾病的早期诊断和预后判断提供一种新的手段。因此,CTHRC1 基因可以用于制备检测 / 治疗宫颈癌药物。

[0043] 本发明在宫颈癌研究和临床引用领域首次提出利用基于血清 / 组织中 CTHRC1 基因及其产物的检测来达到早期诊断宫颈癌或对接受手术治疗的宫颈癌患者进行预后判断。本发明的实验建立在基因水平上的实时定量 PCR 验证和蛋白水平上的大样本临床样本验证,结果可靠,且根据实验结果,CTHRC1 无论是在细胞水平还是蛋白水平上都能够显著区分肿瘤与非肿瘤、高危肿瘤与低危肿瘤,结果的重复性好,具有成为良好的临床可操作的生物标志物的潜质以及良好的临床应用前景,有较大的应用价值和社会效益。

#### 附图说明

[0044] 图 1 HPV(-) 宫颈组织与 HPV (+) 宫颈组织中 CTHRC1 的 mRNA 表达情况

[0045] 图 2 正常宫颈组织与宫颈癌组织中 CTHRC1 的 mRNA 表达差异情况

[0046] 图 3 宫颈癌组织免疫组化染色结果(肿瘤组织,强阳性)

[0047] 图 4 正常宫颈组织免疫组化染色结果(对照,阴性)

[0048] 图 5 为 5 株内膜癌细胞中 CTHRC1 的 mRNA 表达量水平,纵坐标代表细胞系中 CTHRC1 的 mRNA 表达水平,横坐标从左到右依次表示宫颈癌细胞系 HeLa, SiHa, HeLa229, MS751, Caski, C-33A

- [0049] 图 6 为干扰 CTHRC1 后宫颈癌细胞 MS751 细胞的细胞侵袭实验结果
- [0050] 图 7 为干扰 CTHRC1 后宫颈癌细胞 MS751 细胞的细胞迁移实验结果
- [0051] 图 8 为过表达 CTHRC1 后宫颈癌细胞 HeLa 细胞侵袭实验结果
- [0052] 图 9 为过表达 CTHRC1 后宫颈癌细胞 HeLa 细胞迁移实验结果

## 具体实施方式

- [0053] 实施例 1、CTHRC1 在宫颈癌病人组织中的表达情况
- [0054] 主要试剂
- [0055] CTHRC1 单克隆抗体由杭州华安抗体公司生产,辣根过氧化物酶标记二抗(购自 Abmart 公司;HRP-二抗)、二氨基联苯胺(Diaminobenzidine,DAB)显色底物进行免疫染色宫颈癌组织芯片阵列的构建。
- [0056] 1.1 免疫组织化学染色
- [0057] 1.4 染色前将石蜡切片置于 80℃烘箱中烘烤 20 分钟,然后按二甲苯 10min,1/2 二甲苯 10min,100%酒精 10min,95%酒精 10min,85%酒精 10min,75%酒精 10min 流程脱蜡。将脱蜡完毕的切片按如下流程染色:自来水冲洗 5-10min,抗原修复 10min 待自然冷却至后于 37℃ 0.3% $H_2O_2$  中 3min 用 1×PBS 清洗后 10%BSA 室温封闭 1 小时再孵育一抗 4℃过夜,第二天用 1×PBS 洗 3 遍 HRP 二抗室温孵育 1-2h 1×PBS 清洗后 DAB 发色 10s 然后流水冲洗 15min 用苏木精染色 30-45s,自来水冲洗 5min。之后按 75%酒精 5min,85%酒精 5min,95%酒精 5min,100%酒精 5min 1/2 二甲苯 5min,二甲苯 5min 流程进行脱水,脱水后用中性树脂封片,镜下观察。
- [0058] 1.4 组织芯片结果判断
- [0059] 显微镜下观察宫颈癌组织样本中 CTHRC1 表达染色情况,宫颈癌组织标本表达量显著高于阴性对照组。(见图 3,4 中)
- [0060] 1.5 统计学分析
- [0061] 进一步统计学分析发现宫颈癌组织与阴性对照组相比具有显著的统计学差异。
- [0062] 实施例 2
- [0063] 利用慢病毒干扰载体干扰宫颈癌细胞系中 CTHRC1 基因并进行细胞功能实验研究
- [0064] CTHRC1 基因采用人 CTHRC1 cDNA 的完整编码区(开放阅读框)作为目的基因,完整编码区序列同发明内容中的 ORF 序列(NCBI Reference Sequence:NM\_001256099.1)1214bp,编码的蛋白请见序列表 1 (SEQID NO. 1)。
- [0065] 2.1 主要试剂
- [0066] 宫颈癌细胞株 HeLa, SiHa, MS751, Caski, C-33A 均购自中科院细胞库,细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司,CTHRC1 基因 RNA 干扰慢病毒表达载体购自上海吉玛制药技术有限公司。RNA 抽提试剂 RNAiso Plus 购自宝生物工程有限公司,逆转录试剂盒 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 购自 Invitrogen 公司,荧光定量 PCR 试剂盒 Power SYBR Green PCR Master Mix 购自 Invitrogen 公司。CTHRC1 基因和管家基因 18S 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。
- [0067] 2.2 应用实时荧光定量 PCR 方法检测五株宫颈癌细胞系中 CTHRC1 的表达量
- [0068] 2.2.1. 细胞培养:宫颈癌细胞株用含 10%的胎牛血清的 MEM 培养基于 37℃,5% $CO_2$



的培养箱中培养,待细胞长满提取细胞总 RNA。

[0069] 2.2.2. 细胞总 RNA 抽提:

[0070] 将匀浆液转移至离心管中,室温静置 5 分钟。12,000g4℃离心 5 分钟。小心吸取上清液,移入另外的离心管中。加入 RNAiso Plus 的 1/5 体积量的氯仿,剧烈振荡 15 秒,待溶液充分乳化后,再室温(20-25°)静置 5 分钟,12,000g4℃离心 15 分钟。吸取上清液转移至另一新的离心管中。向上清中加入等体积的异丙醇,上下颠倒离心管充分混匀后,在 15~30℃下静置 10 分钟。12,000g4℃离心 10 分钟。弃去上清,沿管壁加入 75%的乙醇 1ml,上下颠倒洗涤离心管管壁,12,000g4℃离心 5 分钟后弃去乙醇。室温(20-25°)干燥沉淀 2~5 分钟,加入适量(40-80ul)的 RNase-free 水溶解沉淀后用 Nanodrop2000 测定 RNA 浓度和纯度。

[0071] 2.2.3. 逆转录合成 cDNA

[0072] 2.2.4Real-time PCR

[0073] 按下列组份配制 PCR 反应液(反应液配制在冰上进行)。

[0074]

试剂	使用量 (ul)
SYBR® Premix Ex TaqTMII (2×)	5ul
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4
ROX Reference Dye or Dye II (50×) *3	0.2
RT反应液 (cDNA溶液1:40稀释)	3.8
dH2O (灭菌蒸馏水)	0.2
TOTAL	10ul

[0075] 两步法进行 PCR 反应,用 7300Real-Time PCR System,

[0076] PCR 检测所用引物为:

[0077] F:AGTTACCCCAACGCGAAG

[0078] R:CTCTTGGTCACAGGATGACAC

[0079] 导出数据,Realtime PCR 结果用 2- $\Delta\Delta$  CT 法进行分析。利用 Graphad Prism 软件绘制出 5 株宫颈癌细胞中 CTHRC1 表达水平的图表(实验结果如图 5 所示)。

[0080] 2.3CTHRC1 基因 RNA 干扰慢病毒载体转染 CTHRC1 高表达的宫颈癌细胞株 MS751,用 CTHRC1 过表达载体转染 CTHRC1 低表达的宫颈癌细胞株 HeLa 细胞株。

[0081] 利用 CTHRC1 基因 RNA 干扰 / 过表达慢病毒表达载体和三个包装质粒(GAG, REV, VSV)同时共转染 293T 细胞,在细胞中进行病毒的包装,包装好的假病毒颗粒分泌到细胞外的培养基中,离心过滤取得上清液后可用于宿主细胞的感染,目的基因进入到宿主细胞之后,经过反转录,整合到基因组,从而起到相关基因表达的功能。利用嘌呤霉素

筛选感染后的细胞,筛选后的细胞提取 RNA, 逆转录为 cDNA 利用荧光定量 PCR 检测 CTHRC1 干扰 / 过表达效率, 结果发现其中两个片段的干扰效率在 70% 以上, 过表达在 100 倍以上。

[0082] 2.4 干扰 / 过表达 CTHRC1 后进行细胞迁移和细胞侵袭实验

[0083] 细胞迁移实验: 将 6cm 皿中的宫颈癌细胞饥饿 24h; 用胰酶消化, 计数后稀释到  $20 \times 10^4/\text{ml}$ , 即  $4 \times 10^4/200\text{ul}$ ; 吹匀后上室垂直加入 200ul 的细胞悬液, 下室加入 600-800ul 培养基为用 2%FBS 稀释的纯化蛋白(浓度梯度分别为 0, 5, 50nmol/ml)。17-20h 后取出小室, 吸去上室的培液, PBS 浸洗 2-3 次, 每次 2min; 用棉签或镊子夹棉团轻轻擦净上室未侵袭细胞; 用 1% 戊二醛固定细胞 30min, PBS 洗一次, 晾干后用 1% 结晶紫染色细胞 30min, PBS 浸洗 3 次; 细胞面朝上, 放在载玻片上, 正置显微镜观察, 每孔随机选取 6 个视野拍片计数。

[0084] 细胞侵袭实验: matrigel $4^{\circ}\text{C}$  溶胶 0.5-1h, 融化成液态, 准备 24 孔板, transwell 小室; Matrigel 与无血清培养基以 1:4 比例稀释, 置于冰上; 取 100ul 稀释胶均匀涂布于 transwell 小室滤膜表面;  $37^{\circ}\text{C}$  5%CO<sub>2</sub> 饱和温度孵箱内孵育 2-4h。取对数生长期的细胞, 以无血清或 2% 血清培养细胞, 饥饿 24h; 取饥饿 24h 的细胞, 0.25% 胰酶消化, 终止消化后计数; 用无血清的培养液稀释细胞悬液, 使得细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ; 每组细胞悬液各取 100ul 加入上室, 使得每室细胞数为  $1 \times 10^5/\text{ml}$ , 每组细胞设 2-3 个复孔; 下室中加入 600-700ul 含 5%FBS 的培养液, 作为运动趋化剂, 种板时下层培养基和小室间不要有气泡。种板后继续培养 48h; 取出小室, 吸去上室的培液, PBS 浸洗 2-3 次, 每次 2min; 用棉签或镊子夹棉团轻轻擦净上室未侵袭细胞及擦净人工基质胶; 用 1% 戊二醛固定细胞 30min, PBS 洗一次, 晾干后准备染色; 1% 结晶紫染色细胞 30min, PBS 浸洗次; 用细胞面朝上, 放在载玻片上, 显微镜下观察并拍照。

[0085] (1) CTHRC1 干扰后宫颈癌细胞 MS751 后细胞侵袭实验结果(如图 6 所示)和细胞迁移实验结果(如图 7 所示)

[0086] 由上图实验结果可以看出宫颈癌细胞 MS751 干扰掉 CTHRC1 基因后细胞侵袭及迁移能力均下降。

[0087] (2) 过表达 CTHRC1 后宫颈癌细胞 HeLa 的侵袭实验结果(如图 8 所示)和迁移实验结果(如图 9 所示)。

[0088] 由上图实验结果可以看出过表达 CTHRC1 基因后宫颈癌细胞 HeLa 细胞侵袭及迁移能力均明显增强。

[0001]

## 序 列 表

1 (SEQ ID NO. 1)

&lt;110&gt; 上海市奉贤中心医院

&lt;120&gt; CTHRC1 基因在制备检测/治疗宫颈癌药物中的应用

&lt;130&gt; 2013

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 690

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 1

atgtggccgc caggtaggag catcacagtc aagctacggg agaaaacagt

ttccaggaaa 60

ctggaaatga acggcccag tgccttcag gggtcctct gtgggaagta

taatggaatg 120

tgcttacaag ggccagcagg agtgcttggc cgagacggga gccctgggge

caatggcatt 180

ccgggtacac ctgggatccc aggtcgggat ggattcaaag gagaaaagg

ggaatgtctg 240

agggaaagct ttgaggagtc ctggacaccc aactacaage agtggttcattg

gagttcattg 300

[0002]

aattatggca tagatcttgg gaaaattgcg gagtgtacat ttacaaagat  
gcgttcaaat 360

agtgcctctaa gagttttggt cagtggctca ctteggctaa aatgcagaaa  
tgcattgctgt 420

cagcgttggg atttcacatt caatggagct gaatgttcag gacctcttcc  
cattgaaget 480

ataatttatt tggaccaagg aagccctgaa atgaattcaa caattaatat  
tcatcgcaact 540

tcttctgtgg aaggactttg tgaaggaatt ggtgctggat tagtggatgt  
tgctatctgg 600

gttggactt gttcagatta cccaaaagga gatgcttcta ctggatggaa  
ttcagtttct 660

cgcattcatta ttgaagaact accaaaataa  
690

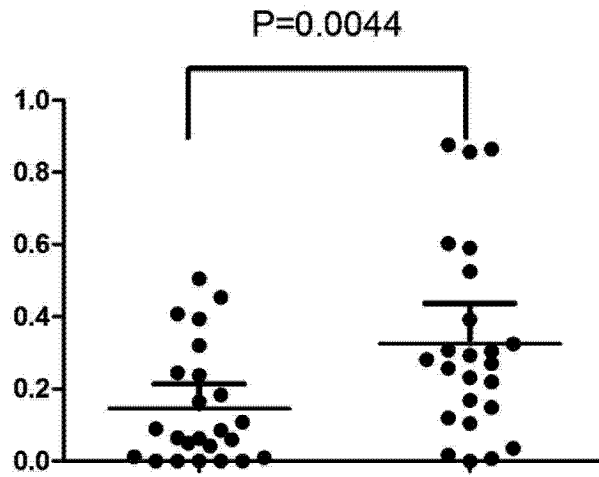


图 1

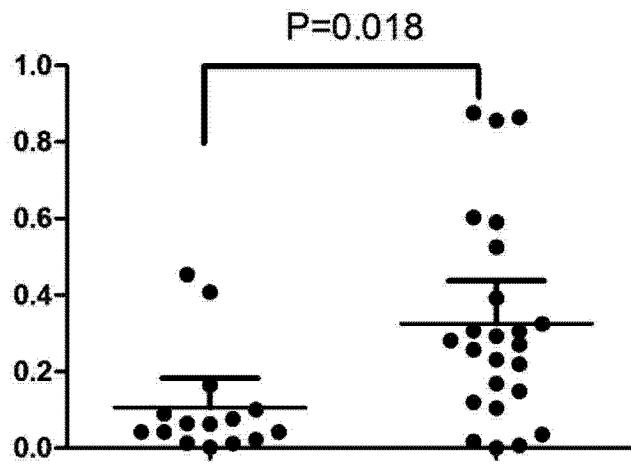


图 2

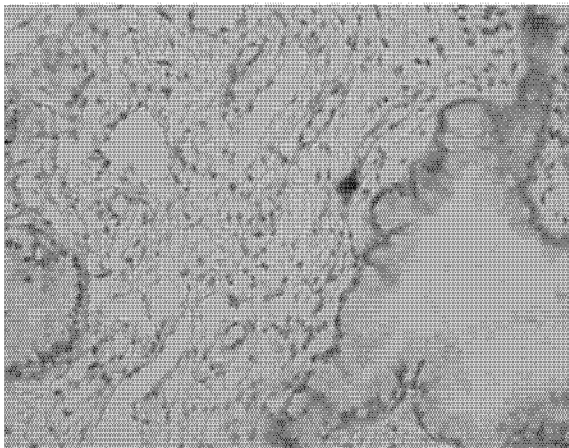


图 3

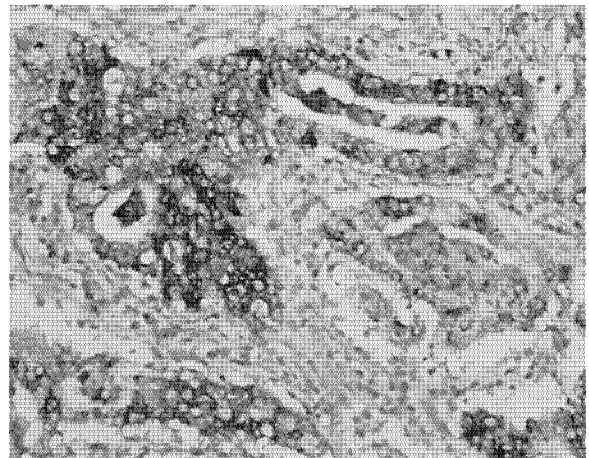


图 4

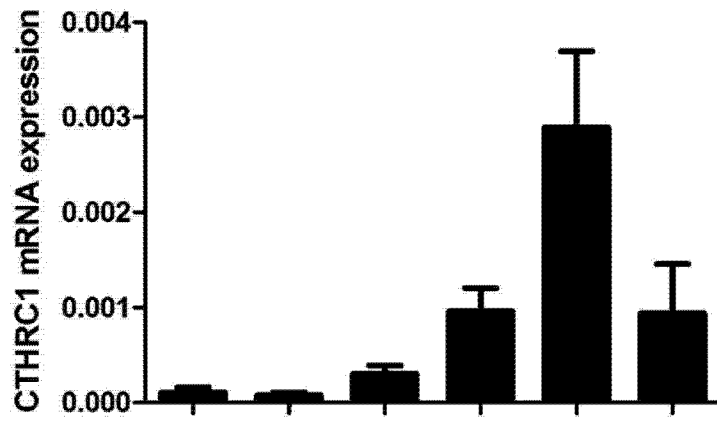


图 5

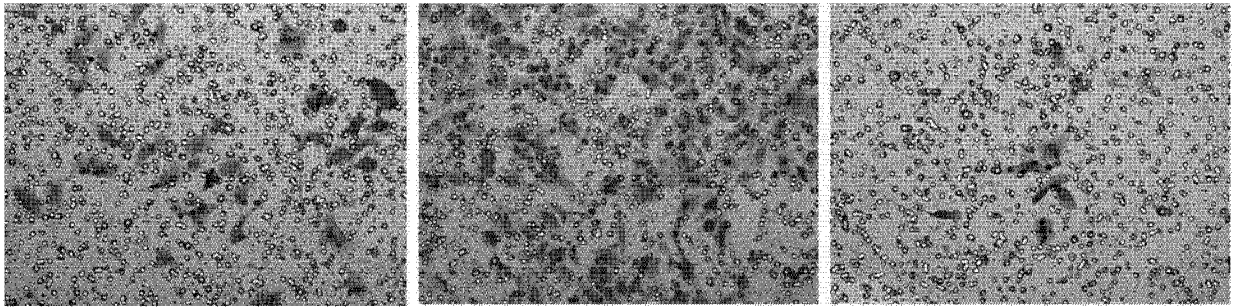


图 6

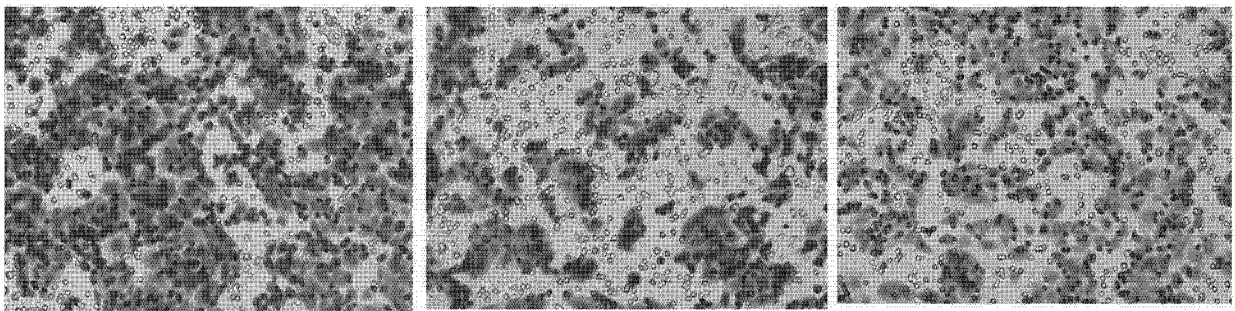


图 7

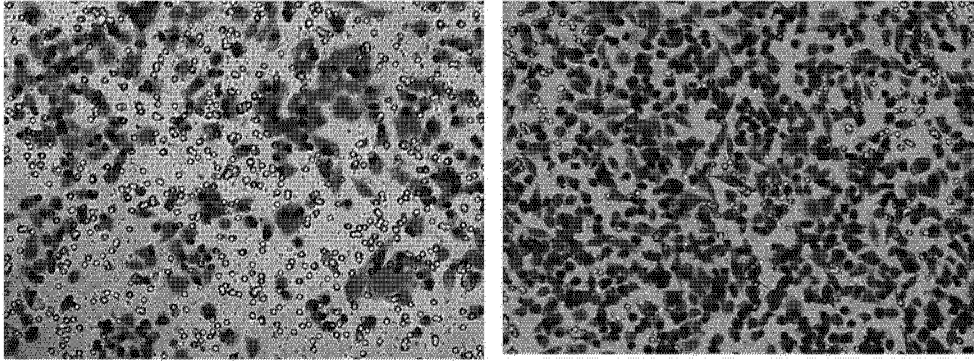


图 8

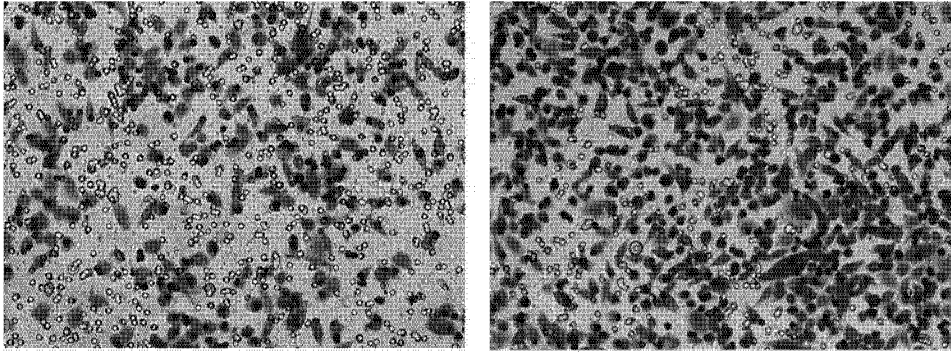


图 9