(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 116769916 B
(45)授权公告日 2025.03.07

(21)申请号 202310770107.3
(22)申请日 2023.06.27
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116769916 A
(43)申请公布日 2023.09.19
(73)专利权人 南通大学附属医院
地址 226001 江苏省南通市西寺路20号
(72)发明人 肖明兵 吴桐 樊兴娟 史加海 郑文杰 倪温慨 管程齐 陈子微
(74)专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理有限公司 11385
专利代理师 戴嵩玮
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2018.01)
G01N 33/574(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 116004810 A,2023.04.25
CN 115678995 A,2023.02.03
US 2014342946 A1,2014.11.20
CN 101541977 A,2009.09.23

审查员 黎舒婷

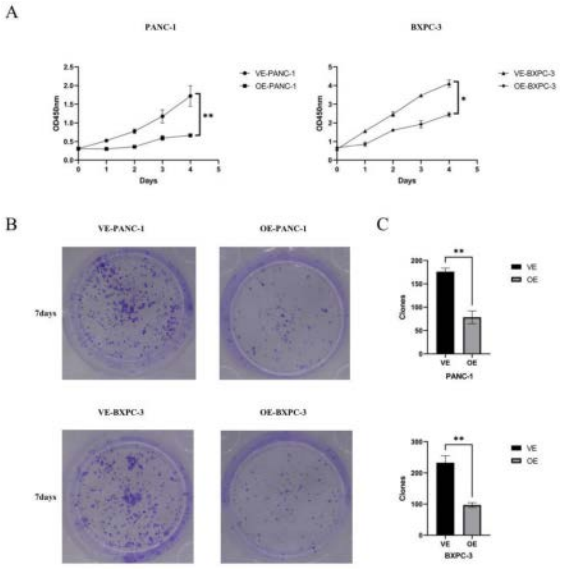
权利要求书1页 说明书9页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

TMED8基因在制备胰腺癌药物及其诊断试剂盒中的应用

(57)摘要

本发明公开了TMED8基因在制备胰腺癌药物及其诊断试剂盒中的应用,属于肿瘤精准医疗技术领域。本发明发现上调TMED8基因表达后,明显抑制了胰腺癌细胞的迁移和增殖能力,并促进了胰腺癌细胞的凋亡;本发明还发现TMED8基因与MAPK信号通路相关。因此TMED8可作为胰腺癌基因诊疗的有效靶点。本发明首次探索了TMED8在胰腺癌中的表达情况,与患者预后及生存的关系,以及对胰腺癌细胞生物行为学的影响,并探究了可能的作用机制与MAPK信号通路密切相关。TMED8有望作为胰腺癌诊断试剂盒和治疗药物,为胰腺癌的早期诊断和治疗提供有效的支持。



CN 116769916 B

1.一种提高TMED8表达量的试剂在制备治疗胰腺癌的产品中的应用,其特征在于,所述试剂为TMED8过表达质粒,所述TMED8过表达质粒的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示。

TMED8基因在制备胰腺癌药物及其诊断试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤精准医疗技术领域,具体涉及TMED8基因在制备胰腺癌药物及其诊断试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 胰腺癌(PC)是一种极为常见且恶性程度极高的肿瘤,具有早期诊断困难、易转移、进展迅速且预后极差,是全球癌症死亡的主要原因。胰腺癌发病率最高的地区包括北美、欧洲和澳大利亚,随着世界人口老龄化的加剧,吸烟、肥胖、糖尿病和饮酒等,在全球许多地区的流行,导致胰腺癌症的发病率急剧增加,但由于潜在流行率和预防策略的差异,这些风险因素的相对贡献在全球范围内有所不同。遗传性遗传因素虽然不能直接改变,但却是胰腺癌症风险的重要组成部分,包括遗传性癌症基因中的致病性变体、与遗传性胰腺炎相关的基因以及全基因组关联研究中确定的常见变体。确定癌症的基因变化不仅可以深入了解这种癌症的病因,还可以提供指导早期检测策略的机会。胰腺癌在早期并没有明显的症状,导致难以及时发现和诊断,目前临床普遍使用的肿瘤标志物如CA199和CEA等对于胰腺癌早期诊断的敏感性和特异性较差。一旦确诊,多数患者已处于中晚期,除根治性手术切除外,辅助放化疗等手段对预后的改善十分有限。因此,探索和发现敏感性和特异性更强的早期标志物和有效治疗靶点具有重要意义。

[0003] TMED家族(跨膜emp24结构域家族)由I型单通道跨膜蛋白组成,在所有真核生物中均有发现,在人类发育和疾病中的地位不容忽视。作为分泌途径中的重要转运蛋白,受其所控的蛋白质运输路径一旦异常,将会导致先天畸形、糖尿病以及癌症在内的多种疾病的发生。既往研究表明TMED蛋白的异常表达通常与肝脏疾病、胰腺疾病和免疫系统失调密切关联,可在疾病发生发展的过程中形成分泌环路,维持细胞及胞内各细胞器的正常形态,在细胞器间循环运输多种多样的重要货物成分,实现细胞器间的沟通,从而对疾病进程进行持续调节,尤其是在恶性肿瘤细胞的增殖与分化中发挥重要作用。

[0004] TMED8(NCBI Gene:283578)是该家族的重要成员之一,位于14号染色体的77,335,021-77,377,094碱基之间,分子量约为55kDa,在细胞核和细胞质内均有表达。目前尚未有任何TMED8与人类疾病和正常生理功能关系的文献报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供TMED8基因在制备胰腺癌药物及其诊断试剂盒中的应用,具体提供TMED8在制备用于疾病诊断的试剂盒中的应用,以及提供一种TMED8在制备用于治疗肿瘤药物中的应用。

[0006] 本发明提供了一种检测TMED8表达量的试剂在制备诊断疾病的产品中的应用。

[0007] 优选的,所述试剂包括检测TMED8的mRNA或蛋白质的表达量的试剂。

[0008] 优选的,所述检测TMED8表达量的方法包括以下至少一种:免疫组化、Western Blot和实时荧光定量PCR。

[0009] 优选的,所述疾病的类型包括肿瘤。

[0010] 本发明还提供了一种诊断肿瘤的试剂盒,包括以下试剂中的至少一种:免疫组化检测TMED8蛋白质表达量的试剂、Western Blot检测TMED8蛋白质表达量的试剂、实时荧光定量PCR检测TMED8基因和/或mRNA表达量的引物对。

[0011] 优选的,所述肿瘤包括胰腺癌。

[0012] 本发明还提供了一种提高TMED8表达量的试剂在制备治疗疾病的产品中的应用。

[0013] 优选的,所述试剂包括以下至少一种:TMED8的激动剂、TMED8的类似物、过表达TMED8的试剂。

[0014] 本发明还提供了一种治疗肿瘤的药物,包括提高内源TMED8表达量的试剂或外源TMED8。

[0015] 优选的,所述治疗包括以下至少一种:抑制肿瘤细胞迁移、抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制MAPK信号通路激活。

[0016] 有益效果:本发明通过制备胰腺癌组织芯片,利用免疫组化技术检测胰腺癌中TMED8的表达情况,结果提示TMED8在胰腺癌肿瘤组织中的表达水平明显高于癌旁组织。另外,通过建立过表达TMED8的胰腺癌稳转细胞系,利用qRT-PCR、Western Blot、细胞划痕、CCK8、Transwell、流式检测、裸鼠皮下成瘤等体内外实验,探究TMED8对胰腺癌细胞生物学行为的影响,发现上调TMED8基因表达后,明显抑制了胰腺癌细胞的迁移和增殖能力,并促进了胰腺癌细胞的凋亡;本发明还发现TMED8基因与MAPK信号通路相关。因此TMED8可作为胰腺癌基因诊疗的有效靶点,在制备精准医疗的胰腺癌诊断试剂盒和治疗药物中具有重要的应用意义。本发明首次探索了TMED8在胰腺癌中的表达情况,以及对胰腺癌细胞生物行为学的影响,并探究了可能的作用机制与MAPK信号通路密切相关。TMED8有望作为胰腺癌诊断试剂盒和治疗药物,为胰腺癌的早期诊断和治疗提供有效的支持。

附图说明

[0017] 图1为IHC检测TMED8在胰腺癌及癌旁组织芯片中的表达,选取代表性位点的展示图:a-b.低分化PC癌和癌旁组织染色结果;c-d.中分化PC癌和癌旁组织染色结果;e-f.高分化PC癌和癌旁组织染色结果;

[0018] 图2为TMED8表达情况、相应的WB及PCR验证结果图;

[0019] 图3为胰腺癌正常导管上皮细胞和肿瘤细胞系中TMED8的表达情况比较图;

[0020] 图4为胰腺癌稳转细胞系的TMED8过表达效率验证图;

[0021] 图5为细胞划痕和Transwell实验研究TMED8的过表达对胰腺癌细胞迁移能力的影响图;

[0022] 图6为CCK8和克隆形成实验研究TMED8的过表达对胰腺癌细胞增殖能力的影响图;

[0023] 图7为流式细胞术检测TMED8过表达对胰腺癌细胞凋亡能力的影响图;

[0024] 图8为TMED8过表达对胰腺癌细胞对裸鼠皮下成瘤的影响图;

[0025] 图9为增加TMED8表达对MAPK相关分子的影响图;

[0026] 图10为TMED8过表达质粒pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro的构建图谱。

具体实施方式

[0027] 本发明提供了一种检测TMED8表达量的试剂在制备诊断疾病的产品中的应用。

[0028] 本发明实施例中基于生物样本库制备胰腺癌组织芯片,利用免疫组化技术检测胰腺癌中TMED8的表达情况,结果显示TMED8在胰腺癌肿瘤组织中的表达水平明显高于癌旁组织,且经过统计TMED8高表达组患者的预后较好,由此将所述TMED8作为诊断胰腺癌的生物标志物。

[0029] 本发明所述试剂优选包括检测TMED8的mRNA或蛋白质的表达量的试剂,并且所述检测的方法优选包括以下至少一种:免疫组化、Western Blot和实时荧光定量PCR。本发明所述疾病的类型优选包括肿瘤,更优选为胰腺癌。

[0030] 本发明还提供了一种诊断肿瘤的试剂盒,包括以下试剂中的至少一种:免疫组化检测TMED8蛋白质表达量的试剂、Western Blot检测TMED8蛋白质表达量的试剂、实时荧光定量PCR检测TMED8基因的mRNA表达量的引物对。TMED8及内参18S的引物序列如表1所示。

[0031] 表1引物序列

[0032]

基因	序列	SEQ ID No.
TMED8	F:CCACCTCTGATGGCTCCT	1
	R:CTCACCACGCTTCACCAC	2
18S	F:GGAGCCTGCGGCTTAATTTG	3
	R:CCACCCACGGAATCGAGAAA	4

[0033] 本发明所述肿瘤优选包括胰腺癌。

[0034] 本发明还提供了一种提高TMED8表达量的试剂在制备治疗疾病的产品中的应用。

[0035] 本发明实施例中,通过建立过表达TMED8的胰腺癌稳转细胞系,利用qRT-PCR、Western Blot、细胞划痕、CCK8、Transwell、流式检测、裸鼠皮下成瘤等体内外实验,探究了TMED8对胰腺癌细胞生物学行为的影响;发现上调TMED8基因表达后,明显抑制了胰腺癌细胞的迁移和增殖能力,并促进了胰腺癌细胞的凋亡;本发明还发现TMED8基因与MAPK信号通路相关。因此TMED8可作为胰腺癌基因治疗的有效靶点。

[0036] 本发明所述试剂包括优选以下至少一种:TMED8的激动剂、TMED8的类似物、过表达TMED8的试剂。

[0037] 本发明所述过表达TMED8的方法优选包括构建TMED8过表达质粒pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro,质粒序列如SEQ IDNo.5所示。

[0038] 本发明还提供了一种治疗肿瘤的药物,包括提高内源TMED8表达量的试剂或外源TMED8。

[0039] 本发明所述提高内源TMED8表达量的试剂优选与上述过表达TMED8的试剂相同,在此不再赘述。本发明所述外源TMED8优选与上述的TMED8的激动剂、TMED8的类似物相同,在此不再赘述。本发明所述治疗优选包括以下至少一种:抑制肿瘤细胞迁移、抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制MAPK信号通路激活。

[0040] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的TMED8基因在制备胰腺癌药物及其诊断试剂盒中的应用进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0041] 本发明实施例中所用的试剂和仪器如非特殊说明,均为本领域的常见试剂盒仪

器,可购自试剂商店:

[0042] 1、本发明实施例中的主要试剂:

[0043] IHC检测试剂盒(Servicebio,中国);4%多聚甲醛固定溶液(Servicebio,中国);PBS缓冲液(Servicebio,中国);牛血清白蛋白BSA粉末(Solarbio Life Sciences,中国);TritonX-100(Solarbio Life Sciences,中国);二甲苯(国药集团,中国);苏木素染色液(Byotime,中国);苏木素分化液(Byotime,中国);无水乙醇(国药集团,中国);柠檬酸钠抗原修复液(Beyotime,中国);兔来源抗TMED8抗体(Invitrogen,美国);兔来源抗Ki67(Absin,中国);HRP标记山羊抗兔二抗(Abcam,美国);95%乙醇(国药集团,中国);DMEM基础培养基(Cytiva,中国);IMDM基础培养基(Cytiva,中国);RPMI基础培养基(Cytiva,中国);PBS基础缓冲液(Servicebio,中国);胎牛血清(Gibco,美国);无血清细胞冻存液(新赛美,中国);含EDTA的胰蛋白酶消化液(新赛美,中国);青霉素-链霉素溶液(新赛美,中国);盐酸四环素溶液(上海生工,中国);嘌呤霉素(Sangon,美国);细胞培养皿(Nest,中国);Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国);6孔板、96孔板、24孔板(Nest,中国);细胞培养小室8μm透明PET膜(BD Falcon,美国);1.5mL、4mL、10mL离心管、细胞冻存管(Biosharp,美国);Trizol(诺维赞,中国);细胞刮(Nest,中国);DEPC水(上海生工,中国);LC八联管(Roche,瑞士);无酶枪头、离心管(Biosharp,中国);无水乙醇(国药集团,中国);异丙醇(国药集团,中国);三氯甲烷/氯仿(国药集团,中国);(1)RIPA强效裂解液(Byotime,中国);蛋白酶抑制剂CM(Amresco,美国);磷酸酶抑制剂PI(Amresco,美国);BCA蛋白分析试剂盒(Byotime,中国);蛋白上样缓冲液4×Loading Buffer(诺维赞,中国);Marker标准蛋白(诺维赞,中国);PVDF膜(Sigma,美国);TEMED四甲基乙二胺(Sigma,美国);0×电泳液预制粉(Servicebio,武汉);10×转膜液预制粉(Servicebio,武汉);10×TBST预制粉(Servicebio,武汉);氯化钠(NaCl)(国药集团,中国);异丙醇(国药集团,中国);过硫酸铵(AP)(Sigma,美国);甘氨酸(Glycine)(国药集团,中国);十二烷基硫酸钠(SDS)(国药集团,中国);三羟甲基氨基甲烷(Tris)(国药集团,中国);甲醇(国药集团,中国);脱脂奶粉(伊利乳业,中国);超敏ECL化学发光试剂盒(新赛美,中国);30%聚丙烯酰胺溶液(Servicebio,中国);吐温(国药集团,中国);鼠抗人GAPDH抗体(Proteintech,中国);兔抗人TMED8抗体(Invitrogen,美国);兔抗人ERK1/2抗体(CST,美国);兔抗人ERK磷酸化抗体(CST,美国);兔抗人P38抗体(CST,美国);兔抗人P38磷酸化抗体(CST,美国);兔抗人JNK抗体(CST,美国);兔抗人JNK磷酸化抗体(CST,美国);兔抗人Casepase3抗体(Santa,日本);兔抗人CD63抗体(Abcam,美国);兔抗人CD81抗体(Abcam,美国);兔抗人CD9抗体(Abcam,美国);鼠抗人Ki-67抗体(武汉三鹰,中国);HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(Invitrogen,美国);HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体(Invitrogen,美国);CCK-8试剂盒(Byotime,中国);细胞周期分析试剂盒(福麦斯生物,中国);细胞凋亡检测试剂盒:AnnexinV-PE/7-AAD双染(凯基生物,中国);结晶紫染液(Byotime,中国)。

[0044] 2、本发明实施例中使用的主要仪器:

[0045] 组织芯片系统(UT06,韩国Unitma公司);倒置显微镜(Leica,德国);化学发光凝胶成像系统(伯乐,美国);全自动酶标仪(伯乐,美国);电泳系统(伯乐,美国);细胞培养箱(赛默飞,美国)。

[0046] 实施例1

[0047] 2020-2023年间,从南通大学附属医院临床生物库获得了79例福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的胰腺癌组织样本,包括癌和癌旁组织。没有癌症患者接受任何治疗,包括放射疗法,化学疗法或免疫疗法,临床病例资料详细完整。该研究方案已得到中国南通大学附属医院人类研究伦理委员会的批准。

[0048] 1、组织芯片的制作:

[0049] (1)根据HE切片的镜下观察结果,对蜡块中有代表性的癌巢区域进行标记。

[0050] (2)石蜡与蜂蜡1:1混合,制作成TMA空白受体蜡块。在蜡块上设计10×7点组织陈列,然后用组织芯片仪打孔制成TMA空白蜡块。

[0051] (3)将供体蜡块在标记的点上选取最有代表性的癌巢区域,采集直径2mm的组织块,每例各取1个芯。

[0052] (4)将取好的组织芯转移到受体蜡块的孔中,每个组织芯之间间隔一定的距离,并取相应癌旁组织做对照。

[0053] (5)组织阵列块放入55℃的温箱中加热融合10分钟,在蜡块快融化之前取出放至室温冷却,使受体蜡块与供体组织融为一体。

[0054] (6)切片前,将组织芯片置于4℃条件下预冷4小时左右,随后用全自动组织切片机对组织阵列块进行修正,速度为20mm/转,修到全部组织完整为止。

[0055] (7)用切片机对组织阵列块进行切片,将连续切片分别漂在凉水中,使其自然展开,再将切片转移至45℃的温水中展片2分钟左右,待展开后将其贴在经过防脱片处理的载玻片上晾干。

[0056] (8)将切片置于60℃的高温烘箱中中烤片3分钟,58℃继续烤片18h。

[0057] (9)将做好的组织芯片保存于切片盒,置于-20℃保存备用。

[0058] 2、免疫组化染色:

[0059] (1)首先将组织芯片放于60℃恒温烘箱中烘烤约40min至石蜡熔化;

[0060] (2)立即将芯片放入二甲苯I,二甲苯II,100%乙醇I和100%乙醇II中,各浸泡5分钟,接着再依次放入95%乙醇,90%乙醇,80%乙醇和70%乙醇中,各浸泡2分钟,再用清水冲洗;

[0061] (3)提前在免疫组化盒中放入抗原修复液,并通过水浴法,预热到95℃,然后将芯片放入容器中,接着95℃处理20分钟进行抗原修复,然后自然冷却至室温,再用PBS冲洗3次,每次5分钟;

[0062] (4)然后用免疫组化笔在芯片上的组织周围画上边界线,接着在圈内部滴满3%H_2O_2,孵育10min,然后用PBS洗3次,每次5分钟;

[0063] (5)滴加一抗(兔抗人TMED8抗体),4℃孵育过夜;

[0064] (6)在室温下复温1小时,去除一抗,PBS冲洗3次,每次5分钟,滴加聚合物增强剂,室温孵育20min;然后用PBS洗3次,每次5分钟;

[0065] (7)滴加二抗(酶标抗小鼠/兔IgG聚合物),室温孵育30min,然后用PBS洗3次,每次5分钟;

[0066] (8)滴加新鲜配置的DAB试剂,显色后将芯片放于自来水下冲洗5分钟终止显色;

[0067] (9)将芯片放于苏木素染色2分钟,并立即用流水缓慢冲洗,然后放入0.5%HCl乙醇溶液中,浸泡2分钟,最后流水冲洗15分钟;

[0068] (10)把芯片依次在80％乙醇,90％乙醇,95％乙醇,100％乙醇I,100％乙醇II,二甲苯中浸泡1分钟,并在通风橱中自然风干;

[0069] (11)最后用中性树胶封片。

[0070] 3、结果判断:

[0071] 根据组织内细胞的着色程度,可将阳性强度分为3级,无阳性着色则为0级(阴性),淡黄色为1级(弱阳性),棕黄色为2级(中阳性),棕褐色为3级(强阳性);细胞阳性比率＝阳性细胞数/细胞总数,可分为4级,0～4级的比率依次为为0～5％,6％～25％,26％～50％,51％～75％和>75％。芯片结果由3位病理科专家根据进行独立阅片给予评分后,按评分的四分位数分为“-,+,++,+++”四组进行统计与分析。

[0072] 79例胰腺癌肿瘤和癌旁组织切片标本行免疫组化染色后结果如图1所示,TMED8蛋白阳性主表达于癌组织的肿瘤细胞胞质和癌组织间质中,呈棕黄色,而大部分癌旁组织低表达或无表达。统计结果显示TMED8在胰腺癌组织芯片中确为高表达*P＜0.05。

[0073] 并选取8对胰腺癌患者的癌和癌旁组织进行WB验证,结果如图2所示,与上述一致。

[0074] 实施例2

[0075] 1、细胞转染:

[0076] (1)质粒的转化与抽提:取出于-20℃冰箱保存的TMED8过表达质粒pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro的质粒干粉,加入40μL的DEPC水进行溶解,同时将电热恒温水浴锅打开升至42℃,并将储存于-80℃超低温冰箱中的DH5α感受态,置于冰上融化,当感受态融化的即刻进行转化实验操作;

[0077] 将TMED8过表达质粒(图10)与融化的感受态按1:3的体积比混合,轻弹管壁轻吹2～3下混匀,冰上静置,计时25分钟后立即放入42℃水浴锅中精确计时45秒进行孵育,随即立刻转移至冰中冰浴3分钟,将转化好的质粒加入装有40μL无抗生素LB液培的摇菌管中,使用恒温摇床,在37℃条件下,以200rpm转速预摇1小时,预摇结束再添加4mL含50μg/mL浓度的氨苄霉素的液培,37℃条件下,以250rpm转速摇菌过夜,具体时间控制在14～16小时范围内,以免长出杂菌;用Axygen质粒抽提试剂盒,根据标准流程对菌液进行抽提,获取的质粒浓度进行测量和记录,可将剩余菌液与甘油混合保种,于-80℃条件下储存。

[0078] (2)建立稳转细胞株:将适量的野生型待转染细胞(PANC-1和BXPC-3胰腺癌细胞系)种于六孔板内,控制在6小时贴壁后密度达60％～70％为宜,将80μL不含血清和双抗的1640基础培养基与3μg质粒进行融合,轻弹管壁,混匀试剂,不可使用移液枪吹打,避免DNA断裂,室温静置5分钟后再加入3μL的Lipofectamine 2000转染试剂,室温静置20～30分钟后,加入6孔板的完全培养基中,用移液枪轻柔吹打混匀,放入37℃,5％二氧化碳条件的细胞培养箱中培养24～48小时,第一个24小时观察一次,之后每12小时观察一次细胞状态,一旦出现转染试剂毒性导致的细胞状态变差则即刻换液;待转染稳定后于荧光显微镜下,利用质粒自带的荧光标签观察细胞转染效率,转染成功后使用对应抗性,一般使用嘌呤霉素对未转染成功的野生型细胞进行筛杀,筛选出转染成功的细胞,建立稳转细胞株,传代保种后收取细胞总蛋白或总RNA进行WB或qRT-PCR实验,验证细胞的过表达效率,结果如图4所示。

[0079] 2、CCK-8细胞增殖活力检测

[0080] 使用中皿预培养待测的过表达稳转细胞及野生型对照细胞株,待皿内细胞融合度

达90％时消化重悬,注意皿内细胞量须控制得当,拥挤状态下生长的细胞可能触发其自身的凋亡,影响后续结果的准确性。对细胞进行计数,根据细胞生长特性,以每孔5000～10000个的数量种于96孔板中,每组均设置5～6个重复孔,以减少操作手法带来的实验误差;注意对照细胞和处理组细胞数量必须相等以达到控制变量的目的6～12小时细胞贴壁后开始细胞增殖活力的检测,因细胞增殖活力需要根据细胞倍增周期连续检测5天,所以应在每日同一时间点进行实验操作和结果检测。

[0081] CCK8试剂与对应细胞的基础培养基按1:9的体积比进行混合得到新鲜工作液,弃去原孔中的培养基,1×PBS缓冲液清洗后,按每孔100μL加入10％浓度的CCK8工作液,37℃培养箱中静置反应1～2小时后,使用酶标仪在460nm处对其进行吸光度的测量,记录数据,待全部检测完成后进行数据的处理和对比分析。

[0082] 结果如图6所示,过表达TMED8抑制了胰腺癌细胞的增殖能力。

[0083] 3、细胞划痕愈合实验

[0084] 将全新的无菌包装六孔板置于超净工作台中倒扣,用直尺和马克笔在孔板底部划九宫格坐标线,便于后期划痕实验显微镜下拍照的定位。将适量的野生型和过表达细胞株种于六孔板内,对照组和过表达组各设3个重复孔,根据其生长周期,使用新鲜的完全营养培养基培养至90％密度时,用酒精消杀过的直尺和1mL无菌蓝枪头进行细胞划痕,过程中注意手法垂直和力度均匀,各重复孔内划痕的大小应控制到基本相等,以减少操作带来的结果误差,更好的控制实验变量,每孔内也各划3条划痕线,确保实验结果的重复性;划痕完成后加入1×PBS缓冲液,将划出的漂浮细胞和细胞碎片清洗干净,力度应轻柔,以防划痕边界处细胞被冲走;更换低血清浓度的完全培养基,维持细胞生长的同时控制生长速度便于后续观察,记下时间点作为实验开始的0h,并拍照,每隔24h一次,镜下观察细胞划痕的愈合情况并拍照,72h后整合分析实验最终结果。

[0085] 结果如图5所示,过表达TMED8抑制了胰腺癌细胞的迁移能力。

[0086] 4、细胞集落形成实验

[0087] 使用含EDTA的胰蛋白酶将待测细胞消化成单个状态,收集细胞悬液,对细胞进行计数,按每孔500个的数量,将对照组和过表达组的细胞分别种于6孔板中,每组设3个重复孔,每孔均加入2mL新鲜完培培养,置于细胞培养箱中,37℃,5％二氧化碳条件下培养5～7天,因细胞初始数量较少,集落形成期间无需换液,5～7天后将培养板取出,镜下观察集落形成状态,用1×PBS洗净弃净后每孔加入1mL的4％多聚甲醛固定液固定2小时,PBS冲洗3次再加入结晶紫染液染色1小时,弃去工作液用双蒸水冲洗晾干后进行拍照,观察两组细胞间集落形成的差异。

[0088] 结果如图6所示,过表达TMED8抑制了胰腺癌细胞集落的形成,即抑制了胰腺癌细胞的增殖能力。

[0089] 5、Transwell细胞迁移实验

[0090] 对待测细胞进行消化重悬和计数,留旁待用;取出24孔细胞培养板和配套型号的带有8μm透明PET膜的小室,将小室置于24孔板培养孔中,小室槽外即培养孔内加入600μL含5％浓度胎牛血清的血清的完全营养培养基;计数并吸取30000个细胞,用200μL不含胎牛血清的基础营养培养基充分重悬,移液枪转移至小室内槽,根据细胞生长周期培养24～72小时不等,使细胞充分穿过生物膜,观察细胞的迁移能力;取出小室,吸弃内槽培养基,放在干

净的24孔板孔内,浸泡4%多聚甲醛固定液固定2小时后用双蒸水轻轻漂洗,再加入结晶紫染色液染色1小时,染色后双蒸水清洗,若染色过深影响结果观察,则可使用甲醇进行脱色漂洗,使膜空白处的结晶紫洗脱;染色完成后将小室倒扣,室温晾干,使用普通光学显微镜观察,并选取合适的视野进行拍照。

[0091] 结果如图5所示,过表达TMED8抑制了胰腺癌细胞的迁移能力。

[0092] 6、流式细胞术

[0093] 细胞凋亡的流式检测:选用PE荧光素标记的AnnexinV染料和7-AAD染料对待测细胞进行双染,检测细胞凋亡的情况;首先使用不含EDTA的胰酶将细胞消化并收集,用1×PBS细胞清洗液清洗2~3次,对细胞进行计数,每个样本一般控制在10000~50000个细胞为宜,无需固定,以防后续荧光的淬灭;将收集到的洁净细胞沉淀用100μL缓冲液进行重悬,每100μL悬液中分别加入1μL的AnnexinV染料和5μL的7-AAD染料,轻轻混匀后在避光和室温状态下进行赋予染色,反应5到10分钟后再加入400μL的缓冲液混匀,转移至流式专业试管中,在1小时内完成上机检测;PE为橙红色荧光,其激发波长Ex=488nm,发射波长Em=578nm,建议使用FL2通道;7-AAD染料为红色荧光,其激发波长为Ex=546nm;发射波长为Em=647nm,建议使用FL3通道进行检测,后续数据分析过程中需要进行荧光补偿调节。

[0094] 结果如图7所示,过表达TMED8促进了胰腺癌细胞的凋亡。

[0095] 7、裸鼠皮下成瘤

[0096] 选择4周龄的雄性BALB/c免疫缺陷裸鼠进行皮下成瘤实验,实验前对每只裸鼠进行称重和记录,将PANC-1对照细胞和过表达细胞分别用胰酶消化后进行细胞计数,每只裸鼠每种细胞需注射约2×10^7个为宜,用无菌的1×PBS溶液进行重悬,注意细胞悬液进行动物实验前须置于冰上以免细胞损伤死亡;在同一只裸鼠上肢左右腋下分别注射等量的过表达TMED8的PANC-1细胞和PANC-1对照细胞;此后每天都需要观察老鼠状态,待4~6周成瘤后对裸鼠进行处死和解剖,取出瘤体进行称重和体积测量后进行固定以供后续免疫组化实验使用;注意在同一裸鼠进行对照实验便于控制老鼠异质性带来的干扰因素,更直观的判断出TMED8对肿瘤体内生长的影响。

[0097] 结果如图8所示,TMED8抑制了胰腺癌细胞在裸鼠皮下的成瘤能力,即抑制了胰腺癌细胞在动物体内的增殖能力。

[0098] 8、WesternBlot

[0099] (1)细胞和组织总蛋白的提取:整个过程应将需要获取总蛋白的细胞样本置于冰上操作,弃去皿中培养基,并用1×PBS溶液清洗,加入0.2到0.4mL的RIPA强效裂解液,裂解约半小时后,用细胞刮辅助裂解刮取后,转移至1.5mL离心管,并放入4℃环境下的电动轮转仪上轮转过夜,使蛋白充分裂解后,以7500rpm转速离心15分钟,吸上清弃细胞碎片沉淀,加入上清总体积1/4量的样品缓冲液(Loading Buffer),煮沸至少30分钟,确保蛋白充分加热稳定变性,冷却至室温后分装至-20℃或-80℃冰箱中保存,以免蛋白反复冻融而降解。

[0100] (2)SDS-PAGE胶的制备:将胶板洗净晾干并置于配胶架上夹紧,加入双蒸水验漏,验漏通过后再竖直晾干,按不同浓度分离胶的成分比例进行配制(见表2),将制备好的分离胶平缓均匀的注入预先架好的胶板中,注意过程中避免气泡的产生,异丙醇压胶静置约40分钟,轻晃胶板,确认胶体凝固后到处异丙醇并用双蒸水轻轻冲洗晾干;再加入配置好的上层浓缩胶并迅速垂直插上梳子(见表3),此步骤尤其需要避免气泡的产生,否则易出现上样

孔变形和漏样。

[0101] 表2制备10mL不同浓度SDS-PAGE分离胶组分(mL)

[0102]

成分	6%	8%	10%	12%	15%
双蒸水	4.0	3.3	4.0	2.0	1.0
30%Acr-Bis	2.0	2.7	5.0	4.0	5.0
1.5M Tris，pH8.8	4.8	3.8	5.7	3.8	3.8
10%SDS	0.1	0.1	0.15	0.1	0.1
AP	0.1	0.1	0.15	0.1	0.1
TEMED	0.008	0.004	0.006	0.004	0.06

[0103] 表3制备8mL上层浓缩胶的配比方案

[0104]

成分	体积（mL）
双蒸水	5.5
30%Acr-Bis	1.3
1M Tris，pH6.8	1.0
10%SDS	0.08
AP	0.08
TEMED	0.008

[0105] 9、TMED8可能通过MAPK通路调节PAAD肿瘤细胞的生物功能从而对胰腺癌的发生发展产生影响

[0106] 选用PANC-1对照及过表达细胞系(每组均有3个重复样本)进行转录组测序,通过数据分析获取了248个差异基因,其中上调的103个,下调的145个,分别用热图和火山图进行可视化,并对它们进行了功能注释和KEGG富集分析,选取具有显著相关性的MAPK信号通路进行下一步研究,对关键分子ERK、JNK、P38及其磷酸化的表达水平进行WB验证。

[0107] 结果如图9所示,TMED8抑制了MAPK通路的活化。

[0108] 尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述,但它仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部实施例,人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例,这些实施例都属于本发明保护范围。

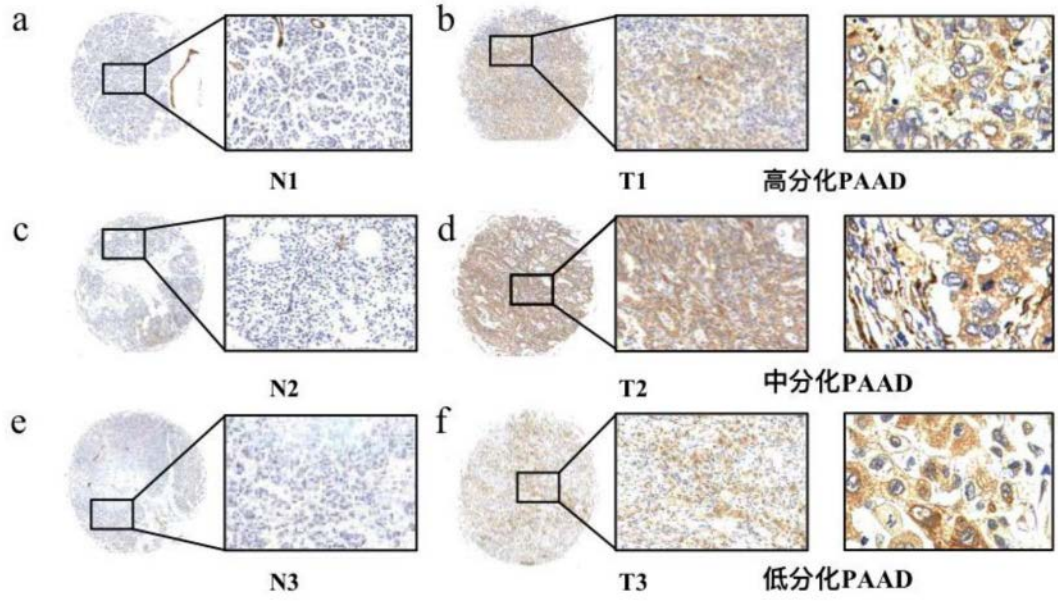

a
b
N1
T1
高分化PAAD
c
d
N2
T2
中分化PAAD
e
f
N3
T3
低分化PAAD

图1

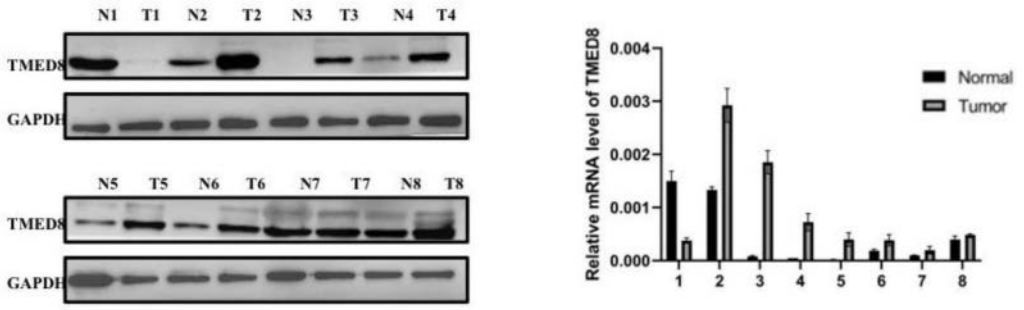

N1 T1 N2 T2 N3 T3 N4 T4
TMED8
GAPDH
N5 T5 N6 T6 N7 T7 N8 T8
TMED8
GAPDH
Relative mRNA level of TMED8
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
1 2 3 4 5 6 7 8
Normal
Tumor

图2

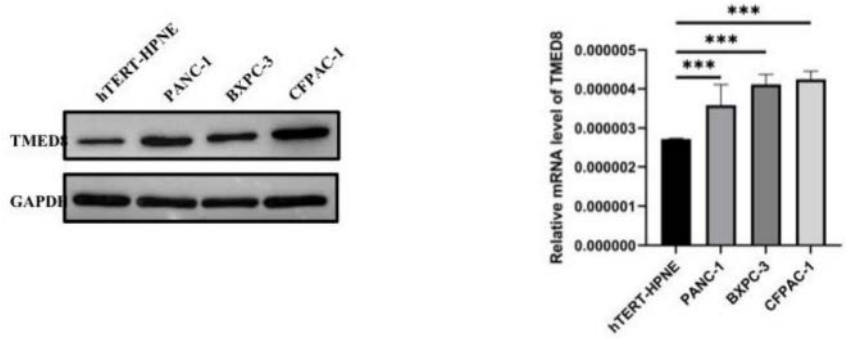

hTERT-HPNE
PANC-1
BXPC-3
CFPAC-1
TMED8
GAPDH
***
***
***
Relative mRNA level of TMED8
0.000005
0.000004
0.000003
0.000002
0.000001
0.000000
hTERT-HPNE
PANC-1
BXPC-3
CFPAC-1

图3

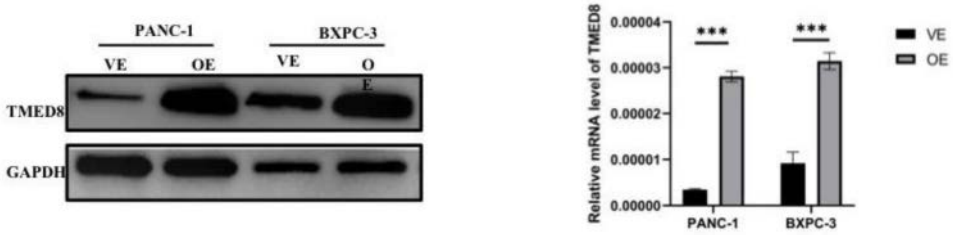
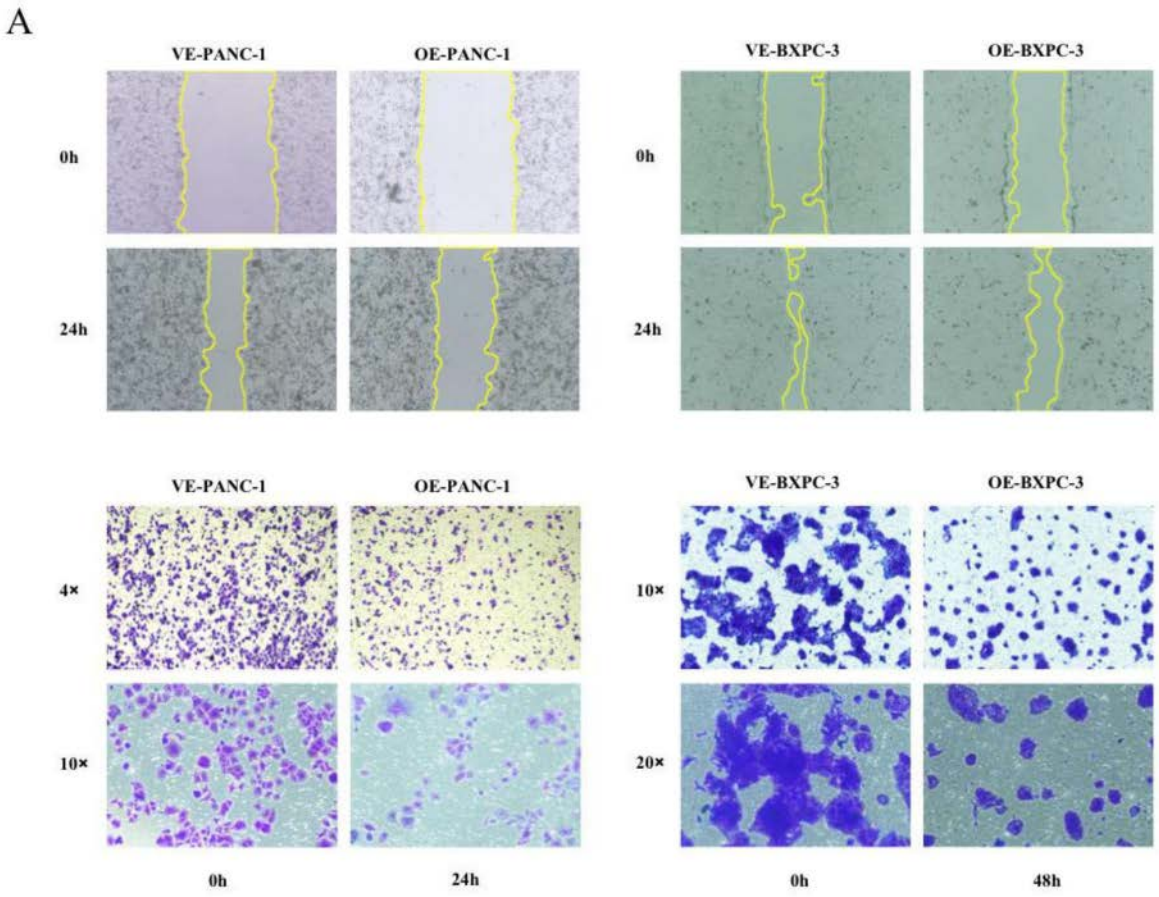

PANC-1
BXPC-3
VE
OE
VE
O
E
TMED8
GAPDH
Relative mRNA level of TMED8
0.00004
0.00003
0.00002
0.00001
0.00000
***
***
PANC-1
BXPC-3
VE
OE

图4


A
VE-PANC-1
OE-PANC-1
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3
0h
24h
4×
10×
20×
48h

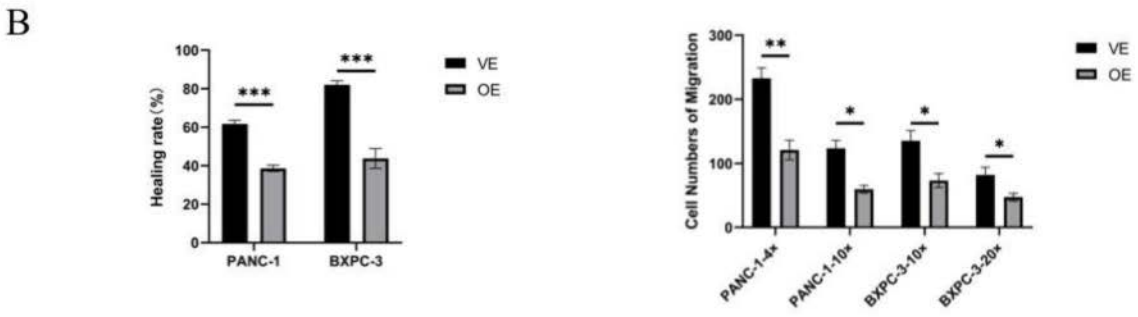

B
Healing rate (%)
100
80
60
40
20
0
***
***
PANC-1
BXPC-3
VE
OE
Cell Numbers of Migration
300
200
100
0
**
*
*
*
PANC-1-4×
PANC-1-10×
BXPC-3-10×
BXPC-3-20×
VE
OE

图5

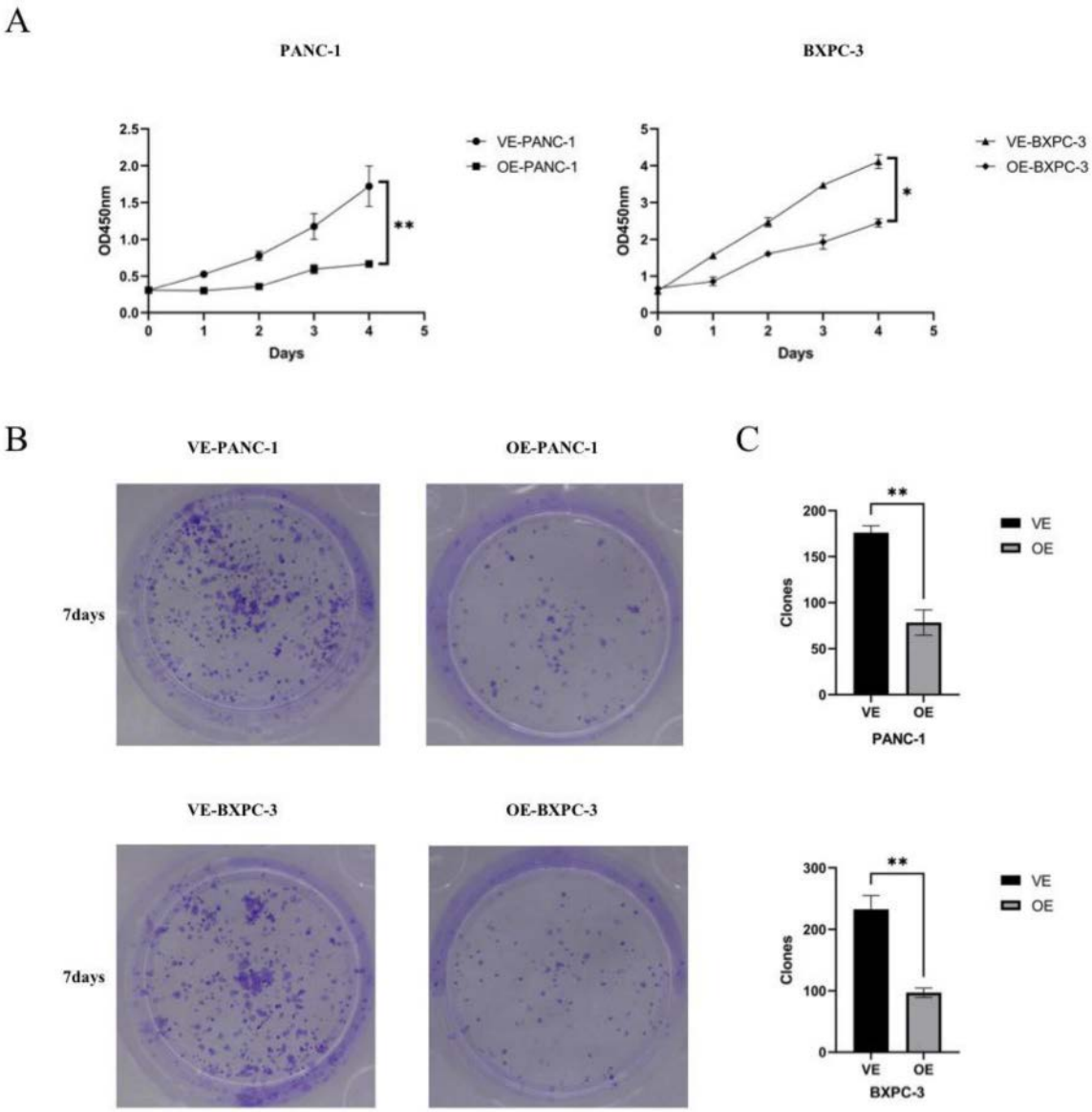

A
PANC-1
BXPC-3
OD450nm
Days
VE-PANC-1
OE-PANC-1
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3
**
*
B
VE-PANC-1
OE-PANC-1
7days
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3
7days
C
Clones
VE
OE
PANC-1
BXPC-3

图6

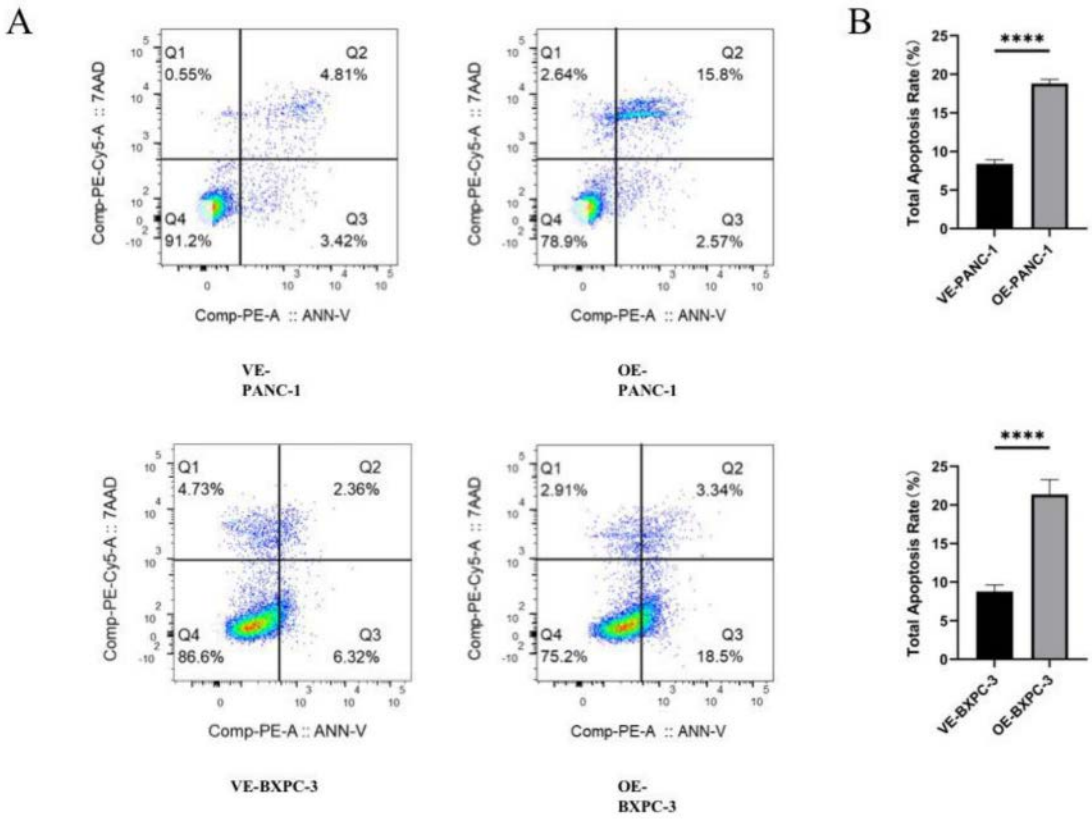

A
Q1
0.55%
Q2
4.81%
Q4
91.2%
Q3
3.42%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
VE-
PANC-1
Q1
2.64%
Q2
15.8%
Q4
78.9%
Q3
2.57%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
OE-
PANC-1
B
Total Apoptosis Rate (%)
****
VE-PANC-1
OE-PANC-1
Q1
4.73%
Q2
2.36%
Q4
86.6%
Q3
6.32%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
VE-BXPC-3
Q1
2.91%
Q2
3.34%
Q4
75.2%
Q3
18.5%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
OE-
BXPC-3
Total Apoptosis Rate (%)
****
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3

图7

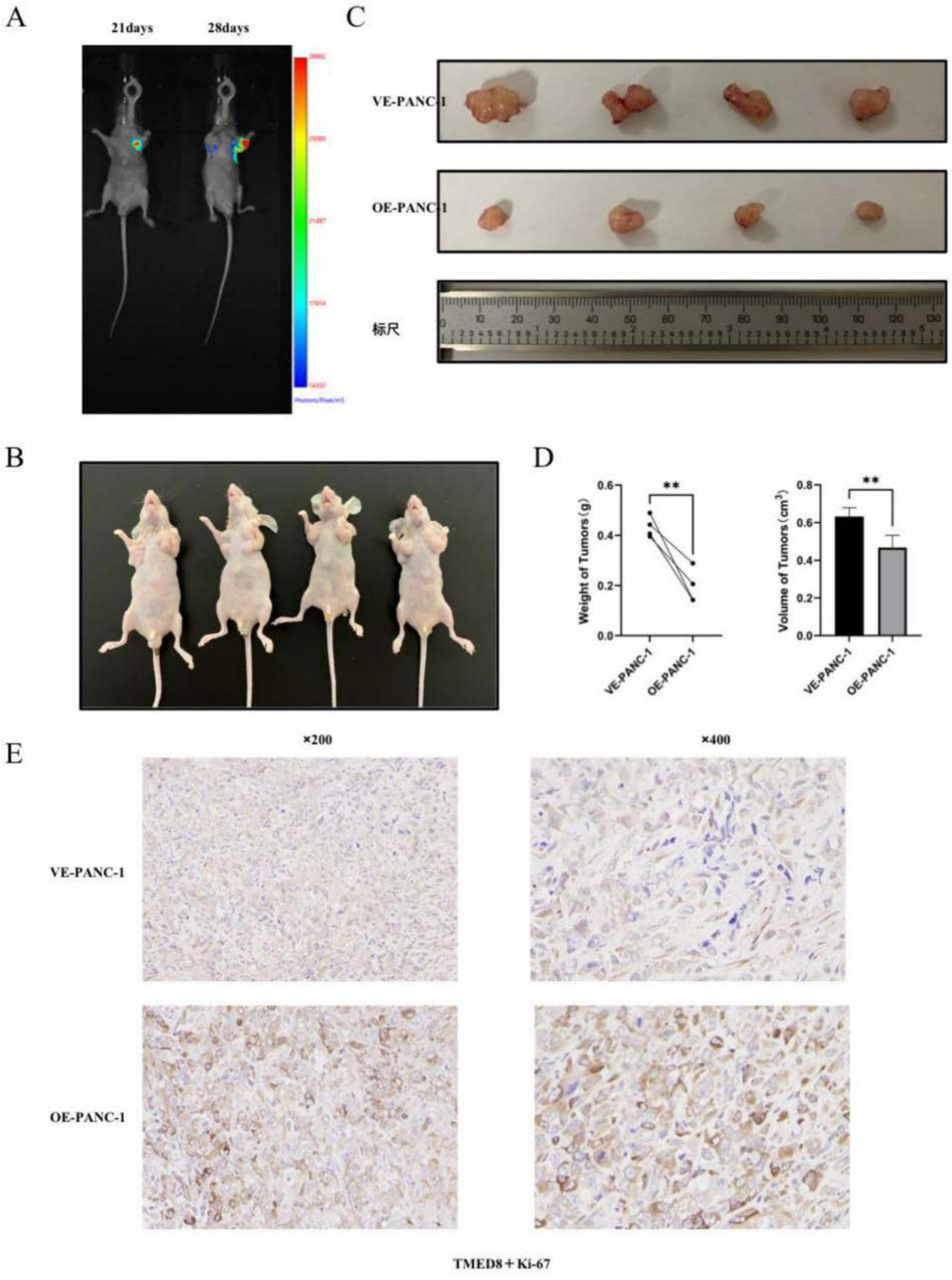

A
21days
28days
C
VE-PANC-1
OE-PANC-1
标尺
B
D
Weight of Tumors (g)
Volume of Tumors (cm3)
**
VE-PANC-1
OE-PANC-1
E
×200
×400
VE-PANC-1
OE-PANC-1
TMED8＋Ki-67

图8

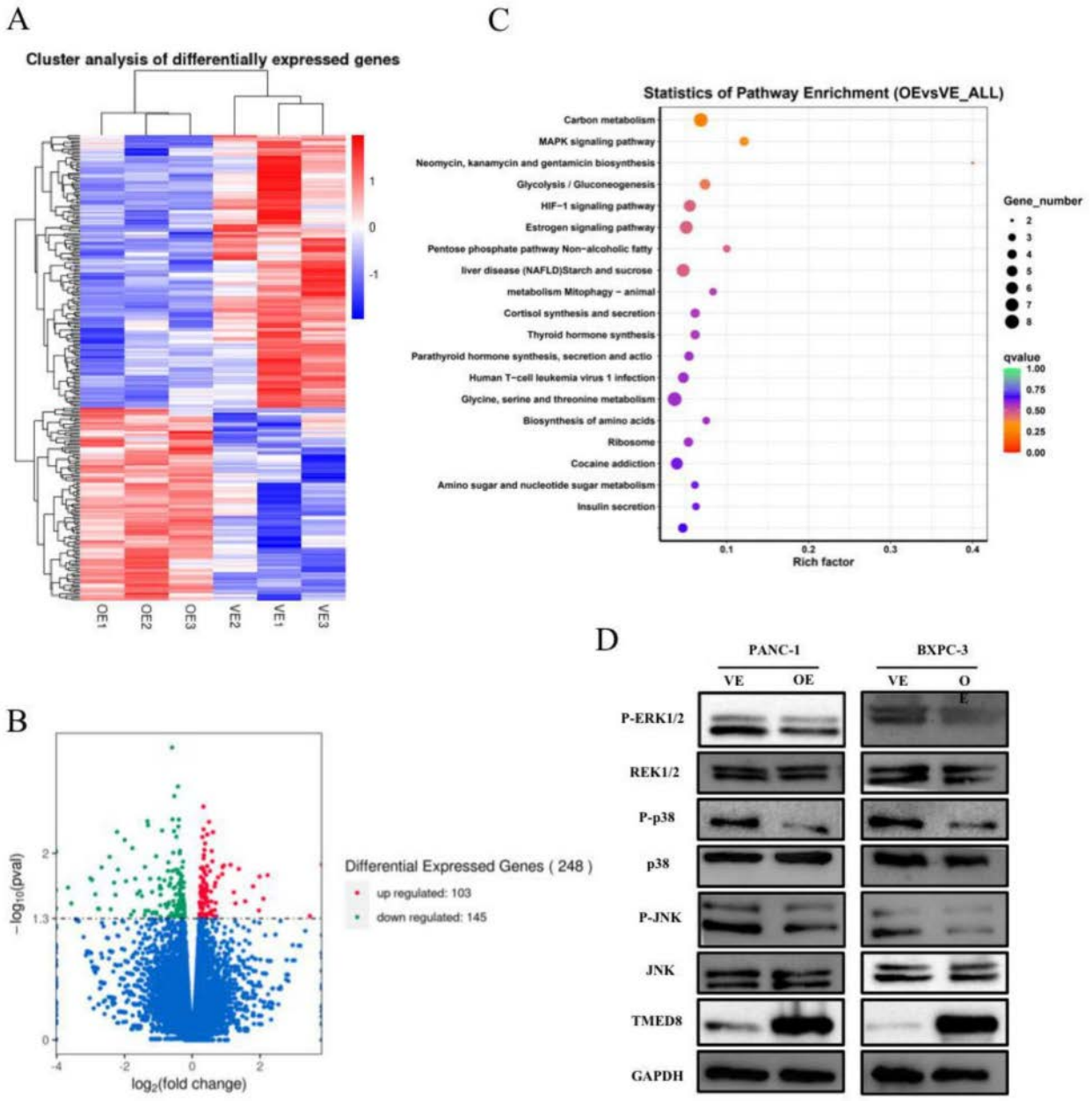

A
Cluster analysis of differentially expressed genes
OE1
OE2
OE3
VE2
VE1
VE3
C
Statistics of Pathway Enrichment (OEvsVE_ALL)
Carbon metabolism
MAPK signaling pathway
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis
Glycolysis / Gluconeogenesis
HIF-1 signaling pathway
Estrogen signaling pathway
Pentose phosphate pathway Non-alcoholic fatty
liver disease (NAFLD)Starch and sucrose
metabolism Mitophagy - animal
Cortisol synthesis and secretion
Thyroid hormone synthesis
Parathyroid hormone synthesis, secretion and actio
Human T-cell leukemia virus 1 infection
Glycine, serine and threonine metabolism
Biosynthesis of amino acids
Ribosome
Cocaine addiction
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
Insulin secretion
Rich factor
Gene_number
qvalue
B
Differential Expressed Genes (248)
up regulated: 103
down regulated: 145
log2(fold change)
D
PANC-1
BXPC-3
VE
OE
P-ERK1/2
REK1/2
P-p38
p38
P-JNK
JNK
TMED8
GAPDH

图9

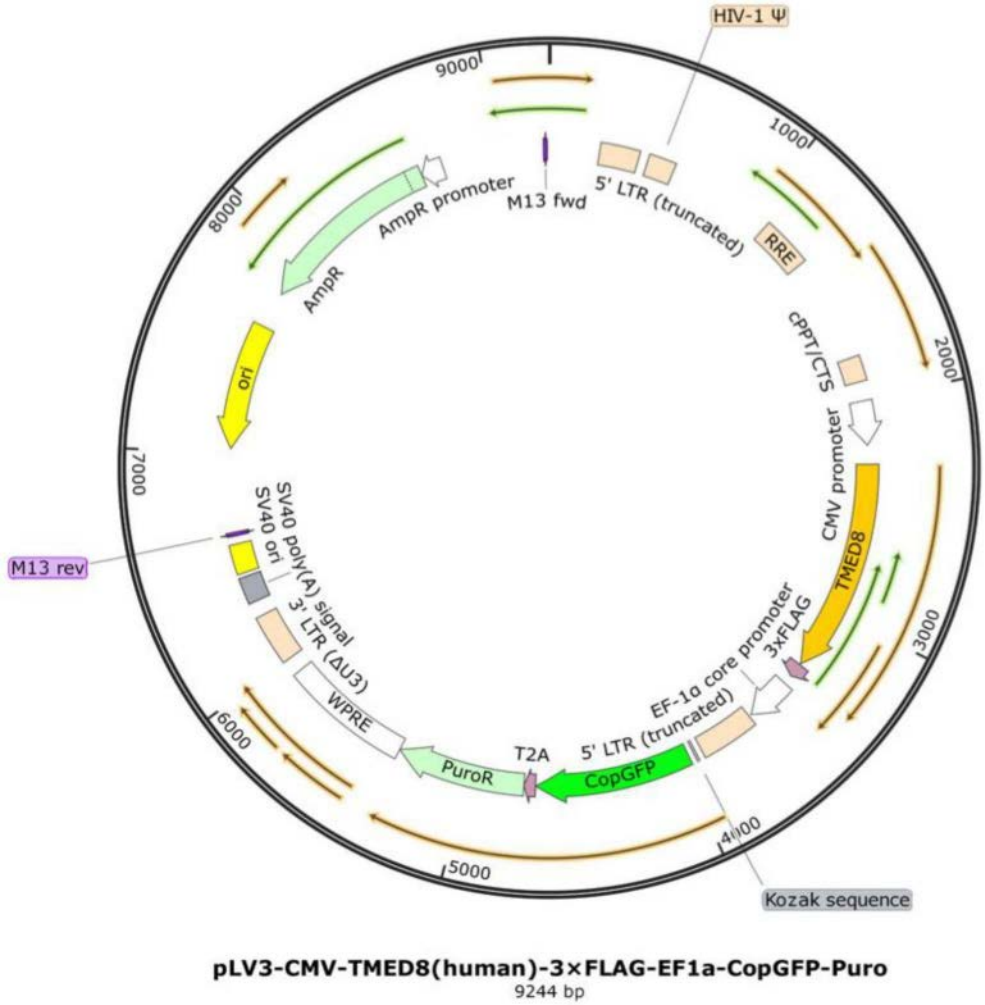

HIV-1 Ψ
9000
1000
8000
M13 fwd
5' LTR (truncated)
AmpR promoter
AmpR
RRE
cPPT/CTS
ori
2000
7000
CMV promoter
TMED8
M13 rev
SV40 poly(A) signal
SV40 ori
3' LTR (ΔU3)
3xFLAG
3000
EF-1α core promoter
WPRE
6000
T2A
5' LTR (truncated)
PuroR
CopGFP
4000
5000
Kozak sequence
pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro
9244 bp

图10