



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114058699 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 18

(21) 申请号 202010758902.7

(22) 申请日 2020.07.31

(71) 申请人 中国科学院上海营养与健康研究所

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路319号

(72) 发明人 李晶晶 倪谦枝 谢东 朱兵

郑茜文

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书19页

序列表4页 附图7页

(54) 发明名称

PPDPF在胰腺癌诊断及药物制备中的应用

(57) 摘要

本发明提供了胰腺祖细胞分化与增殖因子(PPDPF)在胰腺癌诊断及药物制备中的应用。本发明揭示了PPDPF在胰腺癌中高表达且促进胰腺癌的进展,其可以作为诊断或治疗的新型靶点。以其作为靶标,可开发抑制胰腺癌的药物,对胰腺癌或症状进行诊断、预后评估,以及进行治疗药物、诊断试剂的筛选。

1. 胰腺祖细胞分化与增殖因子的应用,用于:
作为抑制胰腺癌的靶标;
作为对胰腺癌进行诊断或预后的标志物;
制备胰腺癌诊断或预后的诊断试剂;或
作为筛选抑制胰腺癌的药物靶标。
2. 胰腺祖细胞分化与增殖因子的下调剂的应用,用于制备抑制胰腺癌的组合。
3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述组合还用于:
抑制胰腺癌细胞的非锚定依赖生长;
抑制胰腺癌细胞的成瘤能力;
抑制Erk和/或AKT308的磷酸化;和/或
抑制RAS的活化。
4. 如权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述胰腺祖细胞分化与增殖因子的下调剂包括:下调胰腺祖细胞分化与增殖因子活性的物质或下调胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达、稳定性或减少其有效作用时间的物质。
5. 如权利要求4所述的应用,其特征在于,所述下调剂包括选自:
敲除或沉默胰腺祖细胞分化与增殖因子的试剂;
特异性与胰腺祖细胞分化与增殖因子结合的结合分子;
针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的化学小分子拮抗剂或抑制剂;
抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的胰腺癌细胞的非锚定依赖生长或成瘤的试剂;
抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的Erk和/或AKT308的磷酸化的试剂;
抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的RAS活化的试剂;或
干扰胰腺祖细胞分化与增殖因子和效应分子相互作用的试剂。
6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述敲除或沉默胰腺祖细胞分化与增殖因子的试剂包括:针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的CRISPR基因编辑试剂,特异性干扰胰腺祖细胞分化与增殖因子的编码基因表达的干扰分子,针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的同源重组试剂或定点突变试剂,所述同源重组试剂或定点突变试剂将胰腺祖细胞分化与增殖因子进行功能丧失性突变。
7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的CRISPR基因编辑试剂为sgRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20所示。
8. 特异性识别或扩增胰腺祖细胞分化与增殖因子的试剂的用途,用于制备对胰腺癌进行诊断或预后的诊断试剂或试剂盒。
9. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,所述的试剂包括:特异性结合胰腺祖细胞分化与增殖因子蛋白的结合分子;特异性扩增胰腺祖细胞分化与增殖因子基因的引物;特异性识别胰腺祖细胞分化与增殖因子基因的探针;或,特异性识别胰腺祖细胞分化与增殖因子基因的芯片。
10. 一种用于抑制肿瘤的药物组合或药盒,包括:胰腺祖细胞分化与增殖因子的下调剂;较佳地,所述下调剂为用于针对胰腺祖细胞分化与增殖因子进行基因编辑的sgRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20所示。

11. 一种筛选抑制胰腺癌的潜在物质的方法,所述方法包括:

(1) 用候选物质处理一表达体系,该体系表达胰腺祖细胞分化与增殖因子;和

(2) 检测所述体系中胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性;若所述候选物质在统计学上下调胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性,则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

12. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述体系为胰腺癌细胞体系;步骤(2)还包括:检测所述体系中胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力或成克隆能力;若其非锚定依赖生长能力或成克隆能力下降,则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

13. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述体系还表达RAS及其下游信号通路分子Erk和AKT;步骤(2)还包括:检测所述体系中活化的GTP-Ras水平、和/或检测Erk和AKT的磷酸化水平,若活化的GTP-Ras水平显著下降、和/或Erk和AKT的磷酸化水平显著下降,则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

14. 如权利要求11~13任一所述的方法,其特征在于,步骤(1)包括:在测试组中,将候选物质加入到所述表达体系中;和/或

步骤(2)包括:检测所述体系中胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性、或检测胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力或成克隆能力、或检测所述体系中Erk和AKT的磷酸化水平;并与对照组比较,其中所述的对照组是不添加所述候选物质的表达体系;若所述候选物质在统计学上下调胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性、或使胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力或成克隆能力在统计学上下降、或使Ras-GTP水平和/或Erk和AKT的磷酸化水平下降,则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

PPDPF在胰腺癌诊断及药物制备中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和药物学领域,更具体地,本发明涉及PPDPF在胰腺癌诊断及药物制备中的应用。

背景技术

[0002] 胰腺癌是世界上最常见的癌症之一,被称为“癌症之王”。是一种恶性程度极高的肿瘤,其发病的隐蔽性高,中位生存期仅为3-6个月,5年生存率低于5%,为预后最差的肿瘤之一。胰腺导管腺癌(Pancreatic ductal adenocarcinoma,PDAC)是胰腺癌的最常见的病理类型,约占胰腺癌的90%。手术切除是唯一有可能治愈胰腺腺癌的方法。但是诊断对胰腺癌是一个重大的挑战,大多数患者被诊断出患胰腺癌时已经是晚期,即局部晚期或转移性肿瘤,这意味着80%-85%患者被诊断出胰腺癌时已经无法用手术切除了。若能发现胰腺癌新的诊断和治疗的靶标,对于改善胰腺癌的预后有着非常重要的意义。

[0003] 胰腺癌的传统治疗药物包括核苷类似物吉西他滨。厄洛替尼或白蛋白紫杉醇联合吉西他滨的疗法也显示出一定的治疗益处。尽管采取积极的治疗方案,但胰腺癌的中位生存期仍然仅在6个月左右。

[0004] 目前,有关调控胰腺癌细胞浸润和转移的分子机制和细胞生物学特性尚不清楚。近年来,有关胰腺癌的发病机制,尤其是转移机制方面的研究成为热点。

[0005] 本领域在研究的胰腺癌相关靶点包括:PI3激酶/Akt/mTOR通路、HER2信号通路、RAF/MEK/ERK通路、KRAS、表皮生长因子受体(EGFR)、JAK/STAT信号通路、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)、血管内皮生长因子受体通路(VEGF)、转化生长因子-β、血小板衍生的生长因子(PDGFs)、透明质酸、基质金属蛋白酶(MMPs)、Hh抑制剂、白蛋白结合性紫杉醇、PEP02(MM-398)、Endo TAG-1等。

[0006] 虽然胰腺癌的生物学特征已被充分地研究,但新的分子靶点的确定进展却仍然是极为缓慢的,潜在的候选药物非常少,这可能是由于胰腺癌的遗传复杂性所致。另外,由于疾病存活时间短,很难有机会测试任何可能的免疫疗法或其它疗法的有效性。

[0007] 因此,本领域迫切需要研究新的胰腺癌诊断或治疗靶点,从而为胰腺癌的疾病研究以及临床治疗提供新的途径。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供PPDPF在胰腺癌诊断及药物制备中的应用。

[0009] 在本发明的第一方面,提供胰腺祖细胞分化与增殖因子的应用,用于:作为抑制胰腺癌的靶标;作为对胰腺癌进行诊断或预后的标志物;制备胰腺癌诊断或预后的诊断试剂;或作为筛选抑制胰腺癌的药物靶标。

[0010] 在本发明的另一方面,提供胰腺祖细胞分化与增殖因子的下调剂的应用,用于制备抑制胰腺癌的组合物。

[0011] 在一个优选例中,所述的抑制胰腺癌包括:预防、缓解或治疗胰腺癌。

[0012] 在另一优选例中,所述的组合物还用于:抑制胰腺癌细胞的非锚定依赖生长;抑制胰腺癌细胞的成瘤能力;抑制Erk和/或AKT308的磷酸化;和/或抑制RAS的活化。

[0013] 在另一优选例中,所述胰腺祖细胞分化与增殖因子的下调剂包括(但不限于):下调胰腺祖细胞分化与增殖因子活性的物质或下调胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达、稳定性或减少其有效作用时间的物质。

[0014] 在另一优选例中,所述下调剂包括选自(但不限于):敲除或沉默胰腺祖细胞分化与增殖因子的试剂;特异性与胰腺祖细胞分化与增殖因子结合的结合分子(如抗体或配体);针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的化学小分子拮抗剂或抑制剂;抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的胰腺癌细胞的非锚定依赖生长或成瘤的试剂;抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的Erk和/或AKT308的磷酸化的试剂;抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的RAS活化的试剂;或干扰胰腺祖细胞分化与增殖因子和效应分子相互作用的试剂。

[0015] 在另一优选例中,所述敲除或沉默胰腺祖细胞分化与增殖因子的试剂包括(但不限于):针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的CRISPR基因编辑试剂,特异性干扰胰腺祖细胞分化与增殖因子的编码基因表达的干扰分子,针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的同源重组试剂或定点突变试剂,所述同源重组试剂或定点突变试剂将胰腺祖细胞分化与增殖因子进行功能丧失性突变。

[0016] 在另一优选例中,所述干扰分子包括siRNA、shRNA,miRNA,反义核酸等,或能形成所述siRNA、shRNA,miRNA,反义核酸等的构建体。

[0017] 在另一优选例中,所述针对胰腺祖细胞分化与增殖因子的CRISPR基因编辑试剂为sgRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20所示。

[0018] 在另一优选方式中,所述的PPDPF选自下组:(a)氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的多肽;(b)将(a)所示的氨基酸序列经过一个或多个(如1~20个,1-10个,1-5个,1-3个或1-2个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的具有(a)或(b)多肽功能的PPDPF衍生物,或其活性片段;(c)序列与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相比,同源性 $\geq 90\%$ (如同源性 $\geq 92\%$, $\geq 94\%$, $\geq 96\%$, $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$)的PPDPF衍生物,或其活性片段。

[0019] 在另一优选方式中,用于将sgRNA或干扰分子等下调剂引入细胞内的表达构建物(表达载体)包括:病毒载体,非病毒载体;较佳地,所述的表达载体包括:腺相关病毒载体,慢病毒载体,腺病毒载体。

[0020] 在另一优选方式中,所述的胰腺癌包括(但不限于):胰腺导管腺癌,胰腺上皮内瘤变。

[0021] 在本发明的另一方面,提供特异性识别或扩增胰腺祖细胞分化与增殖因子的试剂的用途,用于制备对胰腺癌进行诊断或预后的诊断试剂或试剂盒。

[0022] 在一个优选方式中,所述的试剂包括(但不限于):特异性结合胰腺祖细胞分化与增殖因子蛋白的结合分子(如抗体或配体);特异性扩增胰腺祖细胞分化与增殖因子基因的引物;特异性识别胰腺祖细胞分化与增殖因子基因的探针;或,特异性识别胰腺祖细胞分化与增殖因子基因的芯片。

[0023] 在本发明的另一方面,提供一种用于抑制肿瘤的药物组合物或药盒,包括:胰腺祖细胞分化与增殖因子的下调剂;较佳地,所述下调剂为用于针对胰腺祖细胞分化与增殖因子进行基因编辑的sgRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20所示。

[0024] 在本发明的另一方面,提供一种筛选抑制胰腺癌的潜在物质的方法,所述方法包括:(1)用候选物质处理一表达体系,该体系表达胰腺祖细胞分化与增殖因子;和,(2)检测所述体系中胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性;若所述候选物质在统计学上下调(显著下调,如下调10%以上,20%以上,50%以上,80%以上等,或使之不表达或没有活性)胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性,则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

[0025] 在一个优选方式中,步骤(1)所述体系为胰腺癌细胞(培养物)体系;步骤(2)还包括:检测所述体系中胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力或成克隆能力;若其非锚定依赖生长能力或成克隆能力下降(显著下降,如下降10%以上,20%以上,50%以上,80%以上等),则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

[0026] 在另一优选方式中,步骤(1)所述体系还表达RAS及其下游信号通路分子Erk和AKT;步骤(2)还包括:检测所述体系中活化的GTP-Ras水平、和/或检测Erk和AKT的磷酸化水平,若活化的GTP-Ras水平显著下降、和/或Erk和AKT的磷酸化水平显著下降(如下降10%以上,20%以上,50%以上,80%以上等),则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

[0027] 在另一优选方式中,步骤(1)包括:在测试组中,将候选物质加入到所述表达体系中;和/或,步骤(2)包括:检测所述体系中胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性、或检测胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力或成克隆能力、或检测所述体系中Erk和AKT的磷酸化水平;并与对照组比较,其中所述的对照组是不添加所述候选物质的表达体系;若所述候选物质在统计学上下调胰腺祖细胞分化与增殖因子的表达或活性、或使胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力或成克隆能力在统计学上下降、或使Erk和AKT的磷酸化水平下降,则该候选物质是降低胰腺癌的潜在物质。

[0028] 在另一优选方式中,所述的候选物质包括(但不限于):针对胰腺祖细胞发育与生长因子、其片段或变异体、其编码基因或其上下游分子或信号通路设计的调控分子或其构建体(如shRNA,siRNA,基因编辑实际,表达载体,重组的病毒或非病毒构建体等),化学小分子(如特异性抑制剂或拮抗剂),相互作用分子等。

[0029] 在另一优选例中,所述的体系选自:细胞体系(如表达胰腺祖细胞分化与增殖因子的细胞或细胞培养物)、亚细胞(培养物)体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

[0030] 在另一优选例中,所述的方法还包括:对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验,以从候选物质中进一步选择和确定对于抑制胰腺癌有用的物质。

[0031] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0032] 图1、胰腺癌组织中PPDPF的mRNA水平表达显著上调;应用RT-PCR方法检测39对胰腺癌标本(T)及配对的癌旁正常组织(N)中PPDPF mRNA的表达水平。

[0033] 图2、胰腺癌组织中PPDPF的蛋白表达水平显著上调;用免疫组化的方法检测胰腺癌患者配对的N(癌旁正常)、T(肿瘤)组织中的PPDPF蛋白水平。

[0034] 图3、芯片分析胰腺癌组织中PPDPF的表达水平;配对的胰腺癌组织中N(n=90)和T(n=90)中PPDPF蛋白的H-score值(p=0.0003)。

[0035] 图4、PPDPF的表达与胰腺癌患者预后差相关。PPDPF高表达和低表达患者的总生存

率(PPDPF高,n=47;PPDPF低,n=43;p=0.03)。

[0036] 图5、PPDPF过表达促进胰腺癌细胞的体外非锚定依赖生长能力。(A)通过Western blotting检测稳定转染的胰腺癌细胞中PPDPF的蛋白过表达效率。(B)通过软琼脂法检测过表达PPDPF对胰腺癌细胞非锚定生长的影响。以上统计结果均三次重复结果,用平均值±标准差表示。*代表 $P<0.05$;**代表 $P<0.01$;***代表 $P<0.001$ 。

[0037] 图6、内源PPDPF敲除显著抑制胰腺癌细胞的体外非锚定依赖生长能力。(A)通过Western blotting检测肝细胞癌细胞中的PPDPF蛋白表达水平。通过软琼脂糖法检测内源性PPDPF基因敲除对胰腺癌细胞HPAC (B) 和Miapaca2 (C) 的非锚定依赖生长能力的影响。以上统计结果均为三次重复结果,用平均值±标准差表示,*代表 $P<0.05$;**代表 $P<0.01$;***代表 $P<0.001$ 。

[0038] 图7、内源PPDPF敲除抑制胰腺癌细胞在裸鼠体内的成瘤能力。裸鼠成瘤实验中,裸鼠注射HPAC对照细胞或其内源PPDPF敲除细胞后(A)成瘤的裸鼠照片、(B)肿瘤照片、(C)肿瘤称重(g)和(D)肿瘤生长曲线(mm^3);以上统计结果用平均值±标准差表示。* $P<0.05$;** $P<0.01$;***, $P<0.001$ 。

[0039] 图8、过表达PPDPF显著促进胰腺癌细胞在裸鼠体内的成瘤能力。裸鼠成瘤实验中,裸鼠注射Miapaca2细胞对照细胞或过表达PPDPF的细胞的(A)成瘤裸鼠照片、(B)肿瘤照片、(C)肿瘤称重(g)和(D)肿瘤生长曲线(mm^3)。以上统计结果用平均值±标准差表示。* $P<0.05$;** $P<0.01$;***, $P<0.001$ 。

[0040] 图9、KRAS-G12D驱动的PDAC模型中,PPDPF在PanIN中的表达显著升高。分别对10月龄的对照小鼠(LSL-KRAS-G12D)和PDX-Cre;LSL-KRAS-G12D小鼠的胰腺组织进行了PPDPF的免疫组化染色。1,2,3代表每组各三只不同的小鼠。

[0041] 图10、胰腺导管腺癌小鼠的胰腺组织HE染色结果。(A)8月龄和(B)10月龄的胰腺导管腺癌模型小鼠(PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D)和PPDPF敲除小鼠(PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D;PPDPF loxP/loxP)的胰腺组织HE染色结果。

[0042] 图11、在不同胰腺癌细胞中,静息状态和EGF处理状态下,过表达PPDPF促进Erk和AKT的磷酸化激活。(A)HPAC、(B)Miapaca2和(C)Capan胰腺癌对照细胞和PPDPF过表达细胞在静息和EGF(10ng/ml)处理情况下,通过Western Blotting检测Erk和AKT的磷酸化水平。

[0043] 图12、在胰腺癌细胞中,静息状态和EGF处理状态下,敲除PPDPF抑制Erk和AKT的磷酸化水平的激活。HPAC胰腺癌对照细胞和PPDPF KO细胞在静息和EGF(10ng/ml)处理情况下,通过Western Blotting检测Erk和AKT的磷酸化水平。

[0044] 图13、在胰腺癌细胞中,静息状态和EGF处理状态下,过表达PPDPF促进RAS的活化。Capan胰腺癌细胞在静息和EGF(5ng/ml)处理情况下,通过GST-pulldown和Western Blotting检测RAS-GTP活性形式的量。

[0045] 图14、在Miapaca2胰腺细胞中,静息状态下,敲除PPDPF显著抑制RAS的活化。Miapaca2胰腺癌细胞在静息状态下,通过GST-pulldown和Western Blotting检测RAS-GTP活性形式的量。T-Ras,total Ras。

具体实施方式

[0046] 本发明人通过分析检测正常胰腺组织和胰腺癌组织之间的蛋白表达情况以及在

临床上分析蛋白与胰腺癌预后等信息之间的相关性,揭示了胰腺祖细胞分化与增殖因子(PPDPF)在胰腺癌中高表达且促进胰腺癌的进展,其可以作为诊断或治疗的新型靶点。以其作为靶标,可开发抑制(包括缓解或治疗)胰腺癌的药物,以及对胰腺癌或症状进行诊断、预后评估。

[0047] 发明人此外,通过体内和体外实验,探索PPDPF在体外和体内对胰腺癌细胞生长及成瘤能力的影响。在KRAS-G12D驱动的PDAC小鼠模型中,探索胰腺特异性PPDPF敲除对胰腺导管腺癌发生发展的影响及相关分子机制,从而为胰腺导管腺癌的潜在治疗靶点和生物标志物提供重要的见解。

[0048] PPDPF

[0049] PPDPF位于人类20号染色体上,其编码的蛋白质约为12KD,目前关于该基因的功能研究较少,其在哺乳动物中的功能还不清楚。人源PPDPF的氨基酸序列可以如SEQ ID NO:1所示或如Gene ID:79144;NP_077275.1所示;鼠源PPDPF的氨基酸序列可以如SEQ ID NO:2所示或如Gene ID:66496;NP_079874.1所示。本发明还包括来自其它物种的PPDPF同源物及其应用。

[0050] 本发明所述PPDPF可以是天然存在的,比如其可被分离或纯化自哺乳动物。此外,所述的PPDPF也可以是人工制备的,比如可以根据常规的基因工程重组技术来生产重组PPDPF,以应用于实验或临床。在应用时,可采用重组的PPDPF。所述的PPDPF包括全长的PPDPF或其生物活性片段。优选的,所述的PPDPF的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:1所示的序列基本上相同。根据PPDPF的氨基酸序列可以方便地得出其相应的核苷酸编码序列。

[0051] 经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的PPDPF的氨基酸序列也包括在本发明中。PPDPF或其生物活性片段包括一部分保守氨基酸的替代序列,所述经氨基酸替换的序列并不影响其活性或保留了其部分的活性。适当替换氨基酸是本领域公知的技术,所述技术可以很容易地被实施并且确保不改变所得分子的生物活性。这些技术使本领域人员认识到,一般来说,在一种多肽的非必要区域改变单个氨基酸基本上不会改变生物活性。见Watson等,Molecular Biology of The Gene,第四版,1987,The Benjamin/Cummings Pub.Co.P224。

[0052] 任何一种PPDPF的生物活性片段都可以应用到本发明中。在这里,PPDPF的生物活性片段的含义是指作为一种多肽,其仍然能保持全长的PPDPF的全部或部分功能。通常情况下,所述的生物活性片段至少保持50%的全长PPDPF的活性。在更优选的条件下,所述活性片段能够保持全长PPDPF的60%、70%、80%、90%、95%、99%、或100%的活性。

[0053] 本发明人深入研究临床数据后,确定了以PPDPF作为胰腺癌的研究靶点。围绕这一靶点,本发明人进行了深入的实验论证,所述实验论证包括细胞水平上以及动物水平上的论证,具体包括:

[0054] (1) 胰腺癌组织中PPDPF的表达明显升高;

[0055] (2) PPDPF的表达与胰腺癌患者的总生存期呈负相关;

[0056] (3) 在胰腺癌细胞中过表达PPDPF促进胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力;

[0057] (4) 敲除内源PPDPF的表达显著抑制胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力;

[0058] (5) PPDPF促进体内胰腺癌细胞的成瘤能力;

[0059] (6) 在转基因小鼠模型中,PPDPF敲除抑制胰腺癌的发生发展;

[0060] (7) 在胰腺癌细胞中过表达PPDPF促进p-Erk和p-AKT₃₀₈的激活;

[0061] (8) 在胰腺癌细胞中敲除PPDPF显著抑制p-Erk和p-AKT₃₀₈的激活;

[0062] (9) 在胰腺癌细胞中过表达PPDPF促进RAS的激活;

[0063] (10) 胰腺癌细胞Miapaca2敲除PPDPF显著抑制RAS的活化。

[0064] PPDPF下调剂及其应用

[0065] 基于本发明人的上述新发现,本发明提供了一种PPDPF或其编码基因的下调剂的用途,用于制备抑制胰腺癌的药物组合物。

[0066] 如本文所用,所述的PPDPF或其编码基因的下调剂包括了抑制剂、拮抗剂、阻滞剂、阻断剂等,这些术语可互换使用。

[0067] 所述的PPDPF或其编码基因的下调剂是指任何可降低PPDPF的活性、降低PPDPF或其编码基因的稳定性、下调PPDPF的表达、减少PPDPF有效作用时间、或抑制PPDPF基因的转录和翻译的物质,这些物质均可用于本发明,作为对于下调PPDPF有用的物质,从而可用于抑制胰腺癌。例如,所述的下调剂是:特异性干扰PPDPF基因表达的干扰RNA分子或反义核苷酸;是特异性与PPDPF基因编码的蛋白结合的抗体或配体;抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的胰腺癌细胞的非锚定依赖生长或成瘤的试剂;抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的Erk和/或AKT308的磷酸化的试剂;或抑制由胰腺祖细胞分化与增殖因子介导的RAS活化的试剂。等等。

[0068] 作为本发明的一种可选方式,所述的下调剂可以是针对PPDPF的小分子化合物。本领域技术人员可以采用本领域的常规筛选方法,来进行这类小分子化合物的筛选。例如,本发明的实施例中,结合本发明所揭示的调控机制,提供了几种可选的筛选方法。

[0069] 作为本发明的一种可选的方式,所述的下调剂可以是PPDPF特异性的干扰RNA分子(如siRNA、shRNA、miRNA等),本发明人可以理解到,根据本发明中提供的PPDPF序列信息,可以制备获得此类干扰RNA分子。对于干扰RNA分子的制备方法没有特别的限制,包括但不限于:化学合成法,体外转录法等。所述的干扰RNA可通过采用适当的转染试剂被输送到细胞内,或还可采用本领域已知的多种技术被输送到细胞内。

[0070] 作为本发明的一种优选的方式,可采用CRISPR/Cas(如Cas9)系统进行靶向的基因编辑,从而在靶向疾病的区域敲除PPDPF基因。常见的敲除PPDPF基因的方法包括:将sgRNA或能形成所述sgRNA的核酸、Cas9 mRNA或能形成所述Cas9mRNA的核酸共转到靶向区域或靶向细胞中。在确定了靶位点之后,可以采用已知的方法来使得sgRNA及Cas9被引入到细胞内。所述的能形成所述sgRNA的核酸为核酸构建体或表达载体,或所述的能形成所述Cas9 mRNA的核酸为核酸构建体或表达载体,将这些表达载体导入到细胞内,从而在细胞内形成有活性的sgRNA及Cas9 mRNA。作为本发明的特别优选的方式,所述的针对PPDPF的CRISPR基因编辑试剂为sgRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:19和/或SEQ ID NO:20所示。

[0071] 作为本发明的一种可选的方式,可采用同源重组的方法,特异性地靶向于PPDPF,使之发生表达缺陷或缺失表达。也可应用Cre和loxP方法使动物或细胞的基因组中相关基因选择性的敲除,表达降低或失活。

[0072] 本发明人发现,PPDPF促进胰腺癌细胞的成克隆能力、在胰腺癌细胞中敲除内源PPDPF的表达显著抑制胰腺癌细胞的体外成克隆能力。基于此,作为本发明的优选的方式,一些抑制由PPDPF介导的胰腺癌细胞的非锚定依赖生长或成瘤的试剂是可用的下调剂,对

于抑制胰腺癌具有作用。

[0073] 本发明人发现,PPDPF促进p-Erk和p-AKT₃₀₈的激活、在胰腺癌细胞中敲除PPDPF显著抑制p-Erk和p-AKT₃₀₈的激活。基于此,作为本发明的优选的方式,一些抑制由PPDPF介导的p-Erk和p-AKT₃₀₈激活的试剂是可用的下调剂,对于抑制胰腺癌具有作用。

[0074] 本发明人发现,PPDPF促进RAS的激活、在胰腺癌细胞中敲除PPDPF显著抑制RAS的活化。基于此,作为本发明的优选的方式,一些抑制由PPDPF介导的RAS激活的试剂是可用的下调剂,对于抑制胰腺癌具有作用。

[0075] 以上为一些代表性的下调PPDPF的方式,应理解,在本领域技术人员了解了本发明的总体方案后,还可以采取本领域已知的其它方法来对PPDPF进行调控,这些方法也包含在本发明中。

[0076] 诊断及预后评估相关的应用

[0077] 本发明中,揭示了对胰腺癌的发生和发展有着重要调控作用的靶标。基于本发明人的这一新发现,可以将PPDPF作为抑制胰腺癌、或筛选抑制胰腺癌的药物靶标(或标志物):(i)进行肿瘤的分型、鉴别诊断、和/或易感性分析;(ii)评估相关胰腺癌人群的治疗药物、药物疗效、预后,以及选择合适的治疗方法。比如,可分离出由PPDPF的基因表达异常的人群,从而可进行更有针对性的治疗。

[0078] 可以通过判断待评估样本中PPDPF的表达情况或活性情况,来预测提供该待评估样本的受试者的胰腺癌的预后情况,选择合适的药物实施治疗。通常,可以规定一个PPDPF的阈值,当PPDPF的表达情况高于所规定的阈值时,考虑采用抑制PPDPF的方案进行治疗。所述的阈值对于本领域技术人员而言是易于确定的,例如可以通过将正常人细胞或组织中的PPDPF的表达情况与患者细胞或组织中的PPDPF的表达情况进行比较后,获得PPDPF表达异常的阈值。根据测定参数、测定仪器等的不同,所述的阈值的具体数值可以是不同的。

[0079] 可采用各种本领域已知的技术来检测PPDPF的基因的存在与否以及表达情况,这些技术均包含在本发明中。例如可用已有的技术如Southern印迹法、Western印迹法、DNA序列分析、PCR等,这些方法可结合使用。

[0080] 本发明还提供了用于在分析物中检测PPDPF或其编码基因的存在与否以及表达情况的试剂。优选的,当进行基因水平的检测时,可以采用特异性扩增PPDPF的引物;或特异性识别PPDPF的探针来确定PPDPF基因的存在与否;当进行蛋白水平的检测时,可以采用特异性结合PPDPF编码的蛋白的抗体或配体来确定PPDPF的表达情况。

[0081] 针对PPDPF基因的特异性探针的设计是本领域人员熟知的技术,例如,制备一种探针,其可与PPDPF基因上特定位点发生特异性结合,而不与PPDPF基因以外的其它基因特异性结合,且所述探针带有可检测信号。

[0082] 利用特异性结合PPDPF的抗体来检测分析物中PPDPF表达情况的方法也是本领域人员熟知的技术。

[0083] 本发明还提供了用于在分析物中检测PPDPF基因的存在与否以及表达情况的试剂盒,该试剂盒包括:特异性扩增PPDPF基因的引物;特异性识别PPDPF基因的探针;或特异性结合PPDPF基因编码的蛋白的抗体或配体。

[0084] 此外,所述的试剂盒中还可包括用于提取DNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂,包括但不限于:抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗液等。

[0085] 此外,所述的试剂盒中还可包括使用说明书和/或核酸序列分析软件等。

[0086] 药物筛选

[0087] 在得知了PPDPF的高表达或高活性与胰腺癌的密切相关性后,可以基于该特征来筛选抑制PPDPF或其编码基因的表达或活性的物质。可从所述的物质中找到对于抑制胰腺癌真正有用的药物。

[0088] 因此,本发明提供一种筛选抑制胰腺癌的潜在物质(候选物质或候选药物)的方法,所述的方法包括:用候选物质处理表达PPDPF的体系;和检测所述体系中PPDPF的表达或活性;若所述候选物质可抑制PPDPF的表达或活性,则表明该候选物质是抑制胰腺癌的潜在物质。所述的表达PPDPF的体系较佳的是细胞(或细胞培养物)体系,所述的细胞可以是内源性表达PPDPF的细胞;或可以是重组表达PPDPF的细胞。此外,也可通过观测PPDPF与其上下游蛋白的相互作用情况,来评估所述潜在物质是否是有用的。

[0089] 结合本发明人的研究结果,作为本发明的筛选方式的优选方式,还可进一步通过分析胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力或成克隆能力,来确定所述潜在物质(候选物质或候选药物)的有效性。这通常可以通过培养表达PPDPF的胰腺癌细胞来进行分析。非锚定依赖生长能力或成克隆能力的可观测到的下降,预示这该潜在物质的有效性。

[0090] 结合本发明人的研究结果,作为本发明的筛选方式的优选方式,还可进一步通过检测所述体系中Erk和AKT的磷酸化水平(p-Erk和p-AKT),来确定所述潜在物质(候选物质或候选药物)的有效性。这通常可以通过培养表达PPDPF、且包含有RAS信号通路的胰腺癌细胞来进行分析。RAS下游信号通路分子Erk和AKT磷酸化水平的下降预示这RAS信号通路活性下降,预示这该潜在物质的有效性。蛋白磷酸化水平的测定可以通过本领域常规的技术进行。

[0091] 在本发明的优选方式中,在进行筛选时,为了更易于观察到PPDPF的表达或活性的改变,还可设置对照组(Control),所述的对照组可以是不添加所述候选物质的表达PPDPF的体系。所述的对照组包括但不限于:不加候选物质的空白对照、空质粒对照等。

[0092] 作为本发明的优选方式,所述的方法还包括:对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验,以进一步选择和确定对于抑制胰腺癌真正有用的物质。

[0093] 另一方面,本发明还提供了采用所述筛选方法获得的抑制胰腺癌的潜在物质。这些初步筛选出的物质可构成一个筛选库,以便于人们最终可以从中筛选出能够对于抑制PPDPF的表达和活性,进而抑制胰腺癌有用的物质。

[0094] 药物组合物

[0095] 本发明还提供了一种药物组合物,它含有有效量(如0.000001-50wt%;较佳的0.00001-20wt%;更佳的0.0001-10wt%)的所述的PPDPF或其编码基因的下调剂,以及药学上可接受的载体。

[0096] 作为本发明的一种优选方式,提供了一种用于抑制胰腺癌的组合物,所述的组合物含有有效量的PPDPF或其编码基因的下调剂,以及药学上可接受的载体。

[0097] 在本发明的优选方式中,所述的下调剂包括但不限于:敲除或沉默PPDPF的试剂,特异性与PPDPF结合的结合分子(如抗体或配体),针对PPDPF的化学小分子拮抗剂或抑制剂,等等。在更具体的方式中,所述的下调剂包括但不限于:针对PPDPF的CRISPR基因编辑试剂,特异性干扰PPDPF的编码基因表达的干扰分子,针对PPDPF的同源重组试剂或定点突变

试剂,所述同源重组试剂或定点突变试剂将PPDPF进行功能丧失性突变。

[0098] 如本文所用,所述“有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人或/或动物所接受的量。所述“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。该术语指这样一些药剂载体:它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在组合物中药学上可接受的载体可含有液体,如水、盐水、缓冲液。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如填充剂、润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。所述的载体中还可以含有细胞转染试剂。

[0099] 在得知了所述PPDPF或其编码基因的下调剂的用途后,可以采用本领域熟知的多种方法来将所述的下调剂或其编码基因、或其药物组合物给药于哺乳动物或人。

[0100] 优选的,可采用基因治疗的手段进行。比如,可直接将PPDPF的下调剂通过诸如注射等方法给药于受试者;或者,可通过一定的途径将携带PPDPF的下调剂的表达单位(比如表达载体或病毒等,或siRNA)递送到靶点上,并使之表达活性的PPDPF下调剂,具体情况需视所述的下调剂的类型而定,这些均是本领域技术人员所熟知的。

[0101] 本发明所述的PPDPF或其编码基因的下调剂的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:所述的PPDPF或其编码基因的下调剂的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。

[0102] 本发明的具体实施例中,给出了一些针对动物如鼠的给药方案。从动物如鼠的给药剂量换算为适用于人类的给药剂量是本领域技术人员易于作出的,例如可根据Meeh-Rubner公式来进行计算:Meeh-Rubner公式: $A=k \times (W^{2/3})/10,000$ 。式中A为体表面积,以 m^2 计算;W为体重,以g计算;K为常数,随动物种类而不同,一般而言,小鼠和大鼠9.1,豚鼠9.8,兔10.1,猫9.9,狗11.2,猴11.8,人10.6。应理解的是,根据药物以及临床情形的不同,根据有经验的药师的评估,给药剂量的换算是可以变化的。

[0103] 本发明还提供了含有所述的药物组合物或直接含有所述的PPDPF或其编码基因的下调剂的药盒。此外,所述的药盒中还可包括说明药盒中药物的使用方法的说明书。

[0104] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0105] 材料和方法

[0106] 1、胰腺癌样本采集、动物来源

[0107] 所有实施例中所使用胰腺癌临床样本均来自于复旦大学中山医院,临床样本的采集得到病人同意,临床样本的使用得到单位伦理委员会的批准。新鲜的胰腺癌样本和配对正常胰腺组织从中山医院手术取得,并迅速放入液氮,随后放入 -80°C 超低温冰箱保存。样本一部分被用于组织mRNA抽提,并逆转录成cDNA,并用于荧光定量PCR的检测;另一部分用于胰腺癌组织芯片的制作,经过免疫组化(IHC)染色,并进行病理信息分析。当统计结果为 $P < 0.05$ 时,则认为结果存在显著差异;而当 $P < 0.01$ 时,则认为结果存在极其显著差异。

[0108] 小鼠(LSL-KRAS-G12D)获自上海南方模式生物科技股份有限公司。

[0109] PDX-Cre获自上海南方模式生物科技股份有限公司,然后将之与LSL-KRAS-G12D小鼠交配即得PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D小鼠。

[0110] KRAS-G12D驱动的胰腺导管腺癌(PDAC)动物模型建立方法:只要这个突变存在,就会自发PDAC。带有突变的动物8-10个月时会出现明显的PanIN(pancreatic intraepithelial neoplasia,胰腺上皮内瘤变),在更晚时会进展为PDAC。

[0111] PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D;PPDPF loxP/loxP小鼠建立方法:将PPDPFloxP/LoxP小鼠和PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D杂交得到。

[0112] 2、质粒的构建和稳定细胞株的筛选

[0113] (1) 质粒的构建

[0114] PPDPF基因从胰腺癌细胞的cDNA中克隆所得,并将酶切好的克隆基因片段嵌入P23慢病毒核心载体(购自Addgene)中,酶切位点为KpnI和ClaI。将设计好的Cas9序列进行合成,将合成的引物稀释成100uM,随后95℃放置5分钟,再缓慢退火,连接lentiCRISPRv2慢病毒核心载体。PPDPF的克隆基因的引物和其Cas9序列如表1。

[0115] 表1

	基因	正向	反向
	PPDPF	cggggtaccatggcggccatcccctccagcggct (SEQ ID NO: 3)	ccatcgatcggacgggggccagcgcgtggct gtg (SEQ ID NO: 4)
[0116]	PPDPF-Cas9-1	caccgatggcggccatcccctccag (SEQ ID NO: 5)	aaacctggaggggatggccgccatc (SEQ ID NO: 6)
	PPDPF-Cas9-2	caccgcagcagtaccgagtgcctccg (SEQ ID NO: 7)	aaaccggggcactcgggtactgctgc (SEQ ID NO: 8)

[0117] (2) 病毒包装

[0118] 用磷酸钙转染法将带有目的片段的核心质粒与包装载体转入长到60~70%的293T细胞中(核心载体:PAX:PMD比例为4:3:1),并分别于24小时和48小时收集病毒上清。随后用0.45μm的滤膜将病毒上清中的细胞碎片去掉,将过滤后的病毒液转移到50ml离心管中,将5ml无菌蔗糖溶液(m/v为20%)小心的加入到离心管的底部(不能有气泡产生),并将样品进行重量平衡,再放入高速离心机4℃,20000rpm,2h。在生物安全柜内弃掉上清,每管中加入2ml无血清DMEM,然后放到4℃过夜进行沉淀溶解,第二天在生物安全柜内分装,并冻于-80℃冰箱待用。

[0119] (3) 筛选稳定细胞株

[0120] 提前一天将细胞铺在六孔板中,第二天六孔板中细胞长到20~30%,然后加入300μl浓缩好的病毒液,并加入一定量的DMEM培养基混匀,放37℃孵育。当天晚上去掉病毒液,并加入新鲜的DMEM生长培养基。当核心质粒为P23载体时,由于本载体含有绿色荧光蛋白,即GFP,所以待细胞扩增到10cm大皿中可以用流式细胞分选仪分选出带有GFP的细胞,随后将分选的细胞进行扩增培养,最后用Western Blotting进行检测,鉴定其表达效率。而病毒核心质粒为lentiCRISPRv2慢病毒核心载体,则将细胞扩增到大皿之后加入Puromycin(2μg/ml)进行筛选,每隔3天更换新的含有Puromycin的培养基,重复三次。将5μl筛选的细胞接种到新的10cm大皿中(细胞尽量保持单克隆状态)。待单克隆细胞长到一定数量,用200μl的

枪挑单克隆,并接种到48孔板中。最后用Western Blotting检测单克隆中PPDPF的敲除效率。

[0121] 3、Western blotting检测

[0122] 将培养皿中的上清丢弃,用预冷好的低温PBS清洗三遍,随后加入适量的RIPA裂解液(0.5%脱氧胆酸钠,1%NP-40,50mM Tris,0.1%SDS,pH7.4;含1:100比例的蛋白酶和磷酸酶抑制剂),放置于冰上裂解15分钟。然后将裂解好的液体转移到离心管中,并放置于4℃离心机,进行13000rpm离心15分钟,然后将上清转移到新的离心管中,冰上放置备用。取5μl样品用于测定蛋白浓度,通常将5μl样品稀释10倍和标准品一起加到96孔板中,每个样品三个复孔,随后加入200μl/孔Bradford。将准备好的样品放到酶标仪进行蛋白浓度检测。然后根据样品测定的蛋白浓度,分别加入相应的RIPA裂解液将样品浓度调整到同一浓度。然后加入6×上样缓冲液,放到金属浴中进行蛋白变性5分钟。蛋白变性结束后,将样品进行瞬时离心,随后把等量的蛋白样品加入到SDS-PAGE电泳胶孔中,先用低压(80V)运行20分钟,目的是使样品蛋白浓缩,接着用高压(140V)跑胶直到结束。跑完电泳后,将含有分开蛋白样品的凝胶和经过甲醇处理过的PVDF的膜夹在一起,并用湿转法将蛋白转移到PVDF膜上。然后将PVDF膜用封闭液(5%BSA的TBST)室温封闭1小时,倒掉封闭液(小心不要把PVDF膜倒出),加入稀释好的一抗溶液(5%BSA的TBST中加入相应浓度的一抗)。然后放到2~8℃冷库孵育过夜。随后第二天,将一抗回收,用TBST清洗三次,每次5分钟,之后加入二抗(稀释比例为1:2000),室温摇床上放置1小时。结束后,去掉二抗溶液,再用TBST洗涤三次,每次5分钟,最后用TBS清洗5分钟,然后加入底物在Western底物显影仪进行显色。

[0123] 4、Soft Agar实验

[0124] 通过软琼脂成克隆实验检测肿瘤细胞的非锚定依赖生长能力。提前准备1.25%和1%灭菌的琼脂各60ml,用锡箔纸密封,放到65℃孵箱备用。将去离子水用0.22μm滤膜过滤除菌之后备用。用除菌之后的去离子水润洗24孔板,并随后将去离子水吸走。吸取4ml 2×DMEM、4ml 1.25%琼脂糖和2ml胎牛血清混匀,并将混匀后的液体加入到24孔板中(1ml/孔),作为下层部分,放置自然冷却备用。同时将肿瘤细胞计数,并将细胞用1×DMEM稀释,细胞数定量到 1×10^4 /ml。随后将定量好的1ml细胞、1ml胎牛血清、1.5ml 1%琼脂糖和1.5ml 2×DMEM混匀。并将混匀后的液体加入到24孔板中(500μl/孔),作为上层部分。将上述24孔板放到37℃孵箱培养2周左右,且接种一周之后,需要隔天观察。当看到克隆大小和数目满足实验要求时,进行拍照并计数。每个样品做4个重复。

[0125] 5、GST-RBD蛋白的纯化

[0126] 将编码RBD蛋白的载体(PGEX4T-1)转化BL21菌株。第二天,将单克隆菌株加入250毫升LB培养基中,37℃,220rpm/min,摇床培养过夜。当培养菌液的OD在0.6~1时,加入适当浓度的IPTG诱导GST-PRC-RBD表达,30℃,220rpm/min,运行5小时。收集菌液进行离心,5000rpm/min,5min。离心结束,尽量去掉上清,并用预冷的PBS洗涤沉淀3次。用10ml含蛋白酶抑制剂的PBS重悬沉淀,吹打混匀。冰上进行超声破碎(400W,开3s,停2s,总时长为30min),至裂解液为清亮状态。超声结束后,将20%TritonX-100添加到裂解液中,终浓度为1%,室温摇床溶解30min。然后14000rpm/min,4℃,离心20分钟,收集上清。上清中加入500μl Glut4B beads,4℃孵育60分钟。然后用PBS清洗beads三次,最后用谷胱甘肽洗脱,将beads上结合的目的蛋白洗脱下来。最后用考马斯亮蓝方法检测目的蛋白的纯度。

[0127] 6、检测RAS-GTP的GST pull down实验

[0128] 为了检测RAS-GTP的活性,本发明人构建了GST pull down实验。首先将细胞用大皿培养,待细胞长到满足实验需求之后,弃掉细胞上清。然后用预冷的PBS清洗两次,并将1ml IP裂解缓冲液加入到大皿中。并用1ml枪头将细胞刮下,放置冰上裂解30分钟,每隔5分钟晃动一次,使其充分裂解。然后将裂解溶液转移到2mL的离心管中,并进行14000rpm,4℃,离心30分钟。离心结束,将上清转移到新的1.5ml离心管中。将离心管中的溶液加入纯化的GST蛋白,并放到冷库中的摩天轮上,孵育过夜。第二天,谷胱甘肽琼脂糖珠(glutathione sepharose)提前用IP裂解缓冲液清洗三遍,去掉珠中的乙醇,然后每个样品加入30μl谷胱甘肽琼脂糖珠,并放到4℃冷库孵育4小时。将孵育好的珠离心,500g,2分钟,然后去掉上清,加入1ml IP裂解缓冲液,放到摇床,孵育5min,再将样品进行离心,以上步骤重复三次。并将30μl 2×上样缓冲液加到珠中。然后将样品放到金属浴中,100℃,5分钟,重复两次,中间震荡样品1分钟。最后将样品用Western Blotting进行检测分析。

[0129] 7、鼠尾鉴定

[0130] 将获得的鼠尾放入1.5ml离心管中,然后每管中加入100μl缓冲液L和2μl蛋白酶,56℃1小时,随后放到金属浴95℃5分钟,最后放到4℃冰箱备用。小鼠PCR引物如表2。

[0131] 表2

	基因	正向	反向
[0132]	PPDPF	ggccttactcacttgtagctgtc(SEQ ID NO: 9)	gagaggatcatgagccagcttcg(SEQ ID NO: 10)
	PDX-CRE	aggtgtagagaaggcactcagc(SEQ ID NO: 11)	ctaatcgccatcttcagcagg(SEQ ID NO: 12)
	KRAS	ctagccaccatggcttgagt(SEQ ID NO: 13)	tccgaattcagtgactacagatg(SEQ ID NO: 14)

[0133] PPDPF、PDX-CRE、KRAS的PCR反应体系如表3。

[0134] 表3

	名称	体积(μl)
[0135]	2×Mix	5
	引物(2μm)	1
	ddH ₂ O	3
	样品	1

[0136] 小鼠PPDPF的PCR反应条件:95℃,5min;95℃,30s;60℃,30s;72℃,30s(第二步到第四步,40个循环);72℃,5min;4℃,hold。

[0137] 鉴定结果:野生型(Wild type)条带大小:335bp;PPDPF K0条带大小:~400bp;

[0138] 小鼠PDX-Cre的PCR反应条件:95℃,5min;95℃,30s;62℃,40s;72℃,40s(第二步到第四步,35个循环);72℃,5min;4℃,hold。

[0139] 鉴定结果:PDX-Cre条带大小:400bp;

[0140] 小鼠LSL-KRAS PCR反应条件:94℃,5min;94℃,50s;56℃,45s;72℃,45s(第二步到第四步,32个循环);72℃,8min;4℃,hold。

[0141] 鉴定结果:LSL-KRAS条带大小:350bp。

[0142] 8、cDNA的制备

[0143] (1) RNA提取

[0144] 来自复旦大学中山医院的胰腺癌样本用组织研磨仪碾成粉末,然后样本中加入500ul TRIzol (Invitrogen) 溶液,并放在冰上溶解2h,并晃动混匀。将溶液转移到1.5ml离心管,并加入200μl三氯甲烷,颠倒混匀,冰上放置5min,随后13000rpm,15min离心。吸取上清到另一个新管,加等体积异丙醇,然后摇匀,冰上放置10min,13000rpm离心15min。去掉上清,然后用DEPC水配制的75%乙醇(现配)洗涤沉淀两次。最后瞬时离心,吸干乙醇,室温放置晾干,直至酒精完全挥发,然后加入DEPC水溶解。然后用Nano-drop仪测定RNA的浓度和质量。

[0145] (2) RNA逆转录

[0146] 根据测定的RNA浓度,计算需要加入的样品量(总量2~3ug),使用Promega公司的逆转录试剂盒进行逆转录,组织中提取的mRNA,逆转录体系为50μl,逆转录体系如表4。

[0147] 表4

[0148]	退火	RNA 4ug+DEPC H₂O 共 18μl 随机引物 2μl	72℃放置 10min, 随后放冰上 2min 备用
	逆转录	5×buffer 10μl dNTP 10μl MMLV 逆转录酶 2μl Rnase 抑制剂 1.25μl DEPC H₂O 6.75μl	30μl 逆转录溶液加入到上面 20μl 退火体系, 37℃放置 1h

[0149] 9、荧光定量PCR

[0150] 将从临床样本获得的cDNA稀释10倍,用2×SYBR Mix进行荧光定量PCR。每个cDNA样品设三个复孔,反应程序设置如下:95℃解链3min;然后95℃,20秒,60℃退火30秒,循环40次;之后60℃,30秒;再20℃,进行10秒。反应体系如表5。

[0151] 表5

名称	体积(μl)
2×SYBR Mix	5
[0152] 引物(2μm)	1
ddH ₂ O	1
样品	3

[0153] 随后用荧光定量PCR仪进行扩增反应。并将GAPDH基因作为内参。实验中所检测基因相对应的引物均由Primerbank网站设计,所用引物如表6。

[0154] 表6

	基因	正向	反向
[0155]	PPDPF-RT	gcggtcttctctgcaaatggg(SEQ ID NO: 15)	tgcttttagcttgctggctgg(SEQ ID NO: 16)
	GAPDH-RT	atgacccttcattgacctca(SEQ ID NO: 17)	gagatgatgacccttttggt(SEQ ID NO: 18)

[0156] 10、组织石蜡的包埋及样品的切片

[0157] 将取得的新鲜组织置于7ml离心管中,用4%的多聚甲醛固定,并放到冷库过夜。次日更换成75%的乙醇脱水过夜。第三天,将甲醛固定的组织放入包埋框中,用80%的乙醇浸泡1小时,随后用95%的乙醇浸泡45分钟,重复两次;随后用无水乙醇浸泡25分钟,重复两次;再用正丁醇浸泡1小时,重复两次。将含有组织样品的包埋框放置在融化的石蜡中2小时(65℃),最后用石蜡包埋机进行样品的包埋。

[0158] 随后使用石蜡切片机对包埋的组织样品进行连续切片,厚度为5μm,并将切下来的样品放到42℃温水中展开。选取尽量展开的样品,并将其贴在载玻片上。然后干燥过夜(37℃),室温保存。

[0159] 11、HE染色

[0160] 将石蜡切片的样品置于65℃烘箱中放置45分钟,随后把样品转移到二甲苯中,浸泡两次,每次10分钟,然后浸泡于无水乙醇中两次,每次10分钟。接下来,分别浸泡于95%乙醇、75%乙醇和50%乙醇,均为10分钟/次。用蒸馏水清洗1分钟,接着用苏木精染色5~10分钟,自来水快速洗1~2秒。然后加入到含1%盐酸的乙醇中快速清洗3秒,接着用自来水冲洗10分钟以上。蒸馏水清洗2分钟,用0.5%的伊红染色液染色20秒,之后分别浸泡到75%乙醇一次,95%乙醇两次,100%乙醇两次,二甲苯两次,每次两分钟。用擦镜纸擦去样品周围残留的二甲苯,随后滴加适量溶有30%二甲苯的中性树脂进行封片。

[0161] 12、免疫组织化学染色

[0162] 将石蜡切片的样品放在二甲苯中进行脱蜡,重复两次,10分钟/次;浸泡于无水乙醇中,重复两次,10分钟/次。依次浸泡于95%乙醇,75%乙醇,50%乙醇中各一次,10分钟/次。随后用0.01M PBS漂洗切片三次,5分钟/次。预先将0.01M的柠檬酸钠缓冲液放入染色缸中,并放到水浴锅中一起加热至98℃,然后放入上述方法处理的切片,孵育30分钟。随后将样品取出,室温自然降温。待温度降到室温,用0.01M PBS漂洗切片三次,每次5分钟,然后用0.3%H₂O₂/甲醇溶液处理样品半个小时,目的是去除内源性的过氧化物酶。接着用0.01M PBS清洗三次,每次5分钟。预先在湿盒中加入吸水纸,并加入0.01M PBS以减少液体蒸发,随后加入上述处理过的样品,并且滴上一抗阻断液(100μl/样品),盖上擦镜纸,室温封闭2小时。去掉阻断液,在样品上加入一抗,盖上擦镜纸,并放到冷库孵育过夜。第二天,用0.01M PBS漂洗样品三次,每次五分钟。然后加入100μl二抗,放到37℃进行孵育1小时。随后0.01M PBS漂洗一次,时间为5分钟,0.05M Tris-HCl漂洗两次,5分钟/次。每个样品加入100μl显色液,室温放置显色。待显色稳定后,用自来水冲洗2分钟,并放入苏木精中染色5~8分钟。随后用自来水冲洗10分钟以上进行反蓝,接着放置于通风橱中干燥过夜。第三天,分别用75%、80%和95%乙醇中浸泡10分钟,接着放置于无水乙醇中浸泡两次,每次10分钟,然后用二甲苯浸泡两次,每次10分钟。实验最后用含有30%二甲苯的中性树脂进行封片,待中性树脂凝固之后,样品可用于显微镜下拍照。

[0163] 13、裸鼠皮下成瘤

[0164] 从上海西普尔必凯物实验动物有限公司购买的5周大小的雄性裸鼠,在标准的SPF级动物房中饲养。将构建的稳转HCC细胞株计数,用无血清培养基(DMEM)将肝癌细胞定量到 1×10^6 细胞/50 μ l,然后加入已经解冻的Matrigel凝胶,按体积比1:1的比例混匀,注射到裸鼠两侧皮下,注射体积为100 μ l。从一周开始测量肿瘤体积,然后每四天测量一次。最后处理老鼠,测量肿瘤重量,并用石蜡包埋样品,用于后续的检测实验。

[0165] 14、统计分析

[0166] 根据Kaplan-Meier法绘制生存曲线,用对数秩检验进行分析。用GraphPad-Prism 5和SPSS 22 (IBM) 软件进行统计分析。结果代表了至少三个独立实验,一式三份(以平均值 $\pm$ 标准偏差表示)。两组间的差异用student's t-test进行分析。当统计结果为 $p < 0.05$,表明结果为显著差异,用*表示;当结果为 $p < 0.01$ 时,表示极其显著差异,则用**表示;当结果为 $p < 0.005$,则用***表示。

[0167] 实施例1、胰腺癌组织中PPDPF的表达明显提高

[0168] 为了检测胰腺癌组织中PPDPF的表达水平,本发明人从39对配对的胰腺癌组织和癌旁正常组织中提取mRNA,采用RT-PCR方法检测了胰腺癌组织和正常胰腺组织中PPDPF的mRNA表达水平,并以GAPDH为内参,根据检测结果显示,64.1% (25/39) 的胰腺癌组织中PPDPF转录水平上调,而胰腺癌组织中PPDPF转录水平下调的只有14对(图1)。

[0169] 为了从蛋白水平验证上述结果,通过免疫组化检测PPDPF蛋白的表达。结果显示,与正常组织相比,胰腺癌组织中的PPDPF表达水平相较于正常组织的表达水平有明显升高(图2)。

[0170] 为进一步证实PPDPF在胰腺癌中的表达模式,本发明人将含有90对胰腺癌组织(T)和癌旁正常组织(N)的组织芯片进行免疫组化(IHC),检测肿瘤组织和正常组织中PPDPF的表达。结果显示,与正常组织相比,胰腺癌组织中PPDPF的表达水平显著升高(图3)。利用Vectra系统对免疫芯片的染色结果进行打分。肿瘤组织细胞的染色强度评分为0-3分,0分为无染色,1分为弱染色,2分为中等染色,3分为强染色。最终根据各自所占的比例,计算综合得分,得分值用H-score表示。根据统计得分显示,PPDPF的表达在胰腺癌组织显著高于癌旁正常组织($p = 0.0003$)。胰腺癌组织中PPDPF的表达模式与其在肝癌表达模式中相似。

[0171] 以上实验结果表明,在胰腺癌组织中,PPDPF的表达明显高于相对应的癌旁正常组织。

[0172] 实施例2、PPDPF的表达与总生存期负相关

[0173] 根据PPDPF表达水平,将胰腺癌患者分为PPDPF低(评分 < 80)和PPDPF高(评分 ≥ 80)两组。进一步分析90例胰腺癌组织中PPDPF的表达与临床病理特征的关系。其中高表达47例和低表达43例。随后对PPDPF表达和临床信息进行相关性分析。

[0174] 结果显示,高表达的PPDPF与胰腺癌患者总生存期密切负相关($p = 0.03$) (图4)。这是之前未曾报道过的。

[0175] 以上数据提示,PPDPF可作为胰腺癌的预后标志物,在胰腺癌的发生发展中可能起着促癌作用。

[0176] 实施例3、在胰腺癌细胞中过表达PPDPF促进胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力

[0177] 最近有研究报道Circ-FOXMI可以上调结肠癌相关转移因子1(MACC1)和PPDPF的表达水平,从而增强非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭,表明PPDPF可以促进肺癌细胞的增殖和

侵袭。因此,本发明人利用软琼脂糖法检测PPDPF对胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力的影响。根据实验室已有胰腺癌细胞系,先用钙转法构建慢病毒,然后利用P23空载体或PPDPF过表达载体的慢病毒感染SW1990胰腺癌细胞系,并利用细胞分选仪分选出带GFP绿色荧光的阳性克隆来研究PPDPF的功能。随后通过Western Blotting技术评估PPDPF过表达的效率,可以看到在对照P23空载体的胰腺癌细胞中没有带Flag标签的PPDPF表达,而PPDPF过表达的胰腺癌细胞则有显著的Flag-PPDPF表达(图5A)。实验结果显示,PPDPF基因的过表达促进了胰腺癌细胞系的非锚定依赖生长能力(图5B)。

[0178] 统计结果显示,相较于对照的胰腺癌细胞,PPDPF过表达SW1990胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力显著提高($p < 0.005$),说明PPDPF过表达提高了胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力。

[0179] 实施例4、敲除内源PPDPF的表达显著抑制胰腺癌细胞的体外非锚定依赖生长能力

[0180] 为了进一步证实PPDPF在胰腺癌细胞中的作用,本发明人利用CRISPR/Cas9技术,敲除人胰腺癌细胞系HPAC和Miapaca2中PPDPF的表达。首先,本发明人利用CRISPR/Cas9干扰技术,将设计好的两种干扰序列连接到CRISPR/Cas9lentiCRIPRv2载体上,随后将其作为核心质粒和两个包装质粒一起转入293T中,48小时的时候收集上清,并进行超滤浓缩。最后将所获得的病毒加到胰腺癌细胞中,并通过puro筛选阳性克隆。利用Western Blotting方法鉴定PPDPF的敲除效率。

[0181] 结果如图6A,本发明人看到在两种胰腺癌细胞中无法检测到PPDPF的表达,表明PPDPF的敲除成功。本发明人通过软琼脂糖法检测胰腺癌细胞系的非锚定依赖生长能力,统计结果显示,相较于正常表达PPDPF的HPAC和Miapaca2胰腺癌细胞,PPDPF敲除的胰腺癌细胞中的成克隆显著减少($p < 0.005$)(图6B和C)。

[0182] 以上体外实验结果表明,内源PPDPF基因敲除能有效抑制胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力。

[0183] 实施例5、PPDPF促进胰腺癌细胞的体内成瘤能力

[0184] 上述结果发现PPDPF能够促进体外胰腺癌细胞的生长,为了进一步阐明PPDPF是否能促进胰腺癌细胞在体内的增殖,本发明人设计了裸鼠皮下成瘤实验检测PPDPF在裸鼠体内对于胰腺癌细胞成瘤能力的影响。

[0185] 本发明人分别在裸鼠侧翼注射HPAC对照组和PPDPF敲除组细胞,定期监测肿瘤生长,最后测量肿瘤体积和重量。结果显示,PPDPF敲除的HPAC细胞所产生的肿瘤生长缓慢(图7D),且比HPAC对照细胞所产生的肿瘤小(图7A和B)。统计结果显示,相较于HPAC对照组,内源PPDPF敲除的HPAC细胞生成的肿瘤重量显著降低(图7C, $P < 0.001$),肿瘤体积也显著小于HPAC对照细胞产生的肿瘤体积(图7D, $P < 0.001$)。这些数据表明,PPDPF敲除在体内能够显著抑制胰腺癌细胞的肿瘤发生发展,这与体外实验的结果是一致的。

[0186] 为了验证上述结果,本发明人将构建的Miapaca2对照组和PPDPF过表达组细胞,分别注射到裸鼠侧翼,并监测肿瘤生长,最后测量肿瘤体积和重量。结果显示,注射Miapaca2对照组细胞的裸鼠均无肿瘤生长,而PPDPF过表达Miapaca2细胞的裸鼠均有明显的肿瘤形成(图8)。

[0187] 以上两个细胞系成瘤实验的数据表明,PPDPF的敲除显著抑制胰腺癌细胞的成瘤能力,而PPDPF过表达则显著促进胰腺癌细胞的体内成瘤能力,揭示了PPDPF在胰腺癌中的

促癌作用。

[0188] 实施例6、在KRAS-G12D驱动的PDAC动物模型中,PPDPF的表达随PDAC的进程而升高

[0189] 为了进一步阐述PPDPF对胰腺癌发生发展的影响,本发明人构建了由KRAS-G12D驱动的胰腺导管腺癌(PDAC)动物模型。本发明人检测了10月龄的对照小鼠(LSL-KRAS-G12D)和PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D小鼠的胰腺组织,并进行了PPDPF的免疫组化染色。发现对照小鼠的胰腺组织正常,而且基本没有检测到PPDPF的表达。而在KRAS-G12D小鼠中,有大量的PanIN出现,且PPDPF的表达显著上调(图9),揭示在KRAS-G12D驱动的PDAC小鼠模型中,PPDPF的表达随着PDAC的发生发展而升高,这与本发明人在临床上的观察是一致的。

[0190] 实施例7、在转基因小鼠模型中,PPDPF敲除抑制胰腺癌的发生发展

[0191] 本发明人在胰腺组织中特异性地敲除PPDPF基因的表达(PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D对照小鼠和PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D;PPDPF 1oxP/1oxP小鼠),从而在转基因小鼠水平观察PPDPF对胰腺癌的影响。已有文献报道,7~10月龄的小鼠(PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D小鼠)胰腺中存在PanIN(胰腺上皮内瘤变;pancreatic intraepithelial neoplasia),因此本发明人对8月龄的对照和PPDPF KO小鼠进行了胰腺组织的检测。实验结果显示,8月龄的对照组小鼠(PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D小鼠)胰腺中大部分都存在PanIN,但是PPDPF KO小鼠(PDX-CRE;LSL-KRAS-G12D;PPDPF 1oxP/1oxP小鼠)的胰腺组织中难以检测到PanIN(图10A)。为了进一步验证以上结果,待小鼠长到10月龄时,本发明人再次进行了同样的检测。结果显示,对照小鼠10月龄时,其PanIN数量比8个月时数量显著增加,而PPDPF KO显著抑制了PanIN的形成(图10B)。

[0192] 这一结果表明,在胰腺导管腺癌的小鼠模型中,敲除PPDPF的表达显著减少了胰腺导管腺癌前病变PanIN,进一步验证了PPDPF在胰腺癌中的促癌作用。

[0193] 实施例8、在胰腺癌细胞中过表达PPDPF促进p-Erk和p-AKT308的激活

[0194] 本发明人在转基因小鼠的胰腺导管腺癌模型中发现胰腺敲除PPDPF的小鼠PanIN的形成显著受到抑制,而该胰腺导管腺癌小鼠模型是由KRAS直接驱动的,所以本发明人推测PPDPF可能会影响KRAS的信号通路转导。因此,本发明人利用构建的过表达PPDPF稳定胰腺癌细胞株,在静息状态及EGF处理情况下,研究PPDPF过表达对RAS下游信号通路分子Erk和AKT磷酸化激活的影响。结果显示,在静息状态下,当胰腺癌细胞中过表达PPDPF时,Erk和AKT的磷酸化水平显著上升(图11)。在EGF(10ng/mL)处理下,PPDPF过表达可以显著提升HPAC细胞中AKT的磷酸化水平。PPDPF过表达细胞中本底的Erk磷酸化水平相比AKT的变化更为显著,虽然EGF刺激下Erk的磷酸化水平上升不明显(图11A)。在PPDPF过表达的Miapaca2(KRAS G12C)和Capan(KRAS WT)细胞中Erk和AKT的磷酸化水平均被更快的激活,而且磷酸化水平更高(图11B和C)。

[0195] 实施例9、在胰腺癌细胞中敲除PPDPF显著抑制p-Erk和p-AKT308的激活

[0196] 为了进一步验证上述结果,本发明人利用CRISPR/Cas9技术构建PPDPF敲除的单克隆株,然后分别在静息状态及EGF处理情况下,检测PPDPF敲除对KRAS下游信号通路Erk和AKT磷酸化激活的影响。结果显示,当胰腺癌细胞中敲除PPDPF后,在静息状态下,AKT的磷酸化水平显著受到抑制,即使在EGF处理状态下AKT的磷酸化水平也没有明显变化,而对照细胞的AKT磷酸化水平受到EGF刺激后显著上升(图12)。同时,PPDPF敲除后,当EGF处理时,Erk磷酸化水平的上升也弱于对照细胞(图12)。

[0197] 结合前述实施例8的结果,提示PPDPF调控了Kas下游的MAPK和PI3K信号通路的激活。

[0198] 实施例10、在胰腺癌细胞中过表达PPDPF促进RAS-GTP活性形式的激活

[0199] 基于上述结果,本发明人进一步探索PPDPF是否可以直接影响RAS的激活,从而影响RAS的信号通路。

[0200] 本发明人利用构建的过表达PPDPF稳定胰腺癌细胞株,在静息状态及EGF处理情况下,研究PPDPF过表达对RAS-GTP活性形式的影响。结果显示,在静息状态下,当胰腺癌细胞中过表达PPDPF时,RAS-GTP活性形式的水平显著上调。而当EGF (5ng/mL) 处理的状态下,PPDPF过表达的RAS-GTP水平上升更快,意味着过表达PPDPF促进了EGF对胰腺癌细胞中RAS的激活(图13)。

[0201] 这一结果揭示,过表达PPDPF可以显著提高胰腺癌细胞中活化RAS的水平。

[0202] 实施例11、在胰腺癌细胞Miapaca2中敲除PPDPF显著抑制RAS的活化

[0203] 鉴于过表达PPDPF可以显著促进RAS的活化,为了进一步验证这个结果,本发明人利用CRISPR/Cas9技术构建PPDPF敲除的胰腺癌Miapaca2单克隆株。本发明人利用构建好的PPDPF敲除细胞株,在静息状态下,检测PPDPF敲除对RAS-GTP活性形式的影响。

[0204] 其中,PPDPF敲除的胰腺癌Miapaca2单克隆株所运用的干扰序列为:

[0205] sgRNA1:5'-ATGGCGGCCATCCCCTCCAG-3' (SEQ ID NO:19);

[0206] sgRNA2:5'-CAGCAGTACCGAGTGCCCCG-3' (SEQ ID NO:20)。

[0207] 结果显示,当胰腺癌细胞中敲除PPDPF时,RAS-GTP活性形式的水平显著降低(图14)。

[0208] 实施例10和11的结果提示,PPDPF调控RAS的活化,从而促进胰腺导管腺癌的发生发展。

[0209] 实施例12、筛选方法

[0210] (1) 基于PPDPF表达或活性的筛选

[0211] 细胞:过表达PPDPF的胰腺癌细胞。

[0212] 测试组:培养所述过表达PPDPF的胰腺癌细胞,给予候选物质;

[0213] 对照组:培养所述过表达PPDPF的胰腺癌细胞,不给予候选物质。

[0214] 分别检测测试组和对照组中PPDPF的表达或活性情况,并进行比较。如果测试组中PPDPF的表达或活性在统计学上低于(如低30%或更低)对照组,就表明该候选物是抑制胰腺癌的潜在物质。

[0215] 所述的活性情况可通过观测以下情况来判断:活化的RAS信号通路,包括RAS-GTP的水平,下游ERK和AKT的磷酸化水平。若RAS信号通路活性显著下降,包括RAS-GTP的水平显著下降,下游ERK和AKT的磷酸化水平显著下降,那么就表明该候选物是抑制胰腺癌的潜在物质。

[0216] (2) 基于胰腺癌细胞培养物进行筛选

[0217] 细胞:过表达PPDPF的胰腺癌细胞。

[0218] 测试组:培养所述过表达PPDPF的胰腺癌细胞,给予候选物质;

[0219] 对照组:培养所述过表达PPDPF的胰腺癌细胞,不给予候选物质。

[0220] 分别检测测试组和对照组中胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力,并进行比较。如

果测试组中胰腺癌细胞的非锚定依赖生长能力显著低于(如低30%或更低)对照组,就表明该候选物是抑制胰腺癌的潜在物质。

[0221] 进一步地,还可通过体内成瘤实验来判断,若测试组的体内成瘤能力显著低于(如低30%或更低)对照组,则表明该候选物是抑制胰腺癌的潜在物质。

[0222] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海营养与健康研究所

<120> PPDPF在胰腺癌诊断及药物制备中的应用

<130> 204198

<160> 18

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ala Ala Ile Pro Ser Ser Gly Ser Leu Val Ala Thr His Asp Tyr
1           5           10           15
Tyr Arg Arg Arg Leu Gly Ser Thr Ser Ser Asn Ser Ser Cys Ser Ser
           20           25           30
Thr Glu Cys Pro Gly Glu Ala Ile Pro His Pro Pro Gly Leu Pro Lys
           35           40           45
Ala Asp Pro Gly His Trp Trp Ala Ser Phe Phe Phe Gly Lys Ser Thr
           50           55           60
Leu Pro Phe Met Ala Thr Val Leu Glu Ser Ala Glu His Ser Glu Pro
65           70           75           80
Pro Gln Ala Ser Ser Ser Met Thr Ala Cys Gly Leu Ala Arg Asp Ala
           85           90           95
Pro Arg Lys Gln Pro Gly Gly Gln Ser Ser Thr Ala Ser Ala Gly Pro
           100          105          110

```

Pro Ser

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 2

```

Met Ala Ala Ile Pro Ser Ser Gly Ser Leu Val Ala Thr His Asp Tyr
1           5           10           15
Tyr Arg Arg Arg Leu Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ser
           20           25           30
Ala Glu Tyr Pro Gly Asp Ala Val Leu Gln Ser Pro Gly Leu Pro Lys
           35           40           45
Ala Asp Pro Gly His Trp Trp Ala Ser Phe Phe Phe Gly Lys Ser Thr

```

50	55	60
Leu Pro Phe Met Thr Thr Val Leu Glu Ser Pro Glu Arg Ser Ala Glu		
65	70	75
Ser Pro Gln Val Ser Arg Ser Pro Met Thr Cys Gly Leu Thr Pro Glu		
85	90	95
Thr Met Lys Gln Gln Pro Val Ile His Ser Gly Gln Thr Asn Pro Arg		
100	105	110
Asp Leu Ser		
115		

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> 引物 (Primer)

<400> 3

cggggtacca tggcggccat cccctccagc ggct 34

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> 引物 (Primer)

<400> 4

ccatcgatcg gacgggggcc cagcgctggc tgtg 34

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 引物 (Primer)

<400> 5

caccgatggc ggccatcccc tccag 25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> 引物 (Primer)

<400> 6

aaacctggag gggatggccg ccatc 25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 引物 (Primer)

<400> 7

caccgcagca gtaccgagtg ccccg 25

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 8
aaaccggggc actcgggtact gctgc 25
<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 9
ggccttactc acttggtactg ctgtc 25
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 10
gagaggatca tgagccagct tcg 23
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 11
aggtgtagag aaggcactca gc 22
<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 12
ctaatacgcca tcttccagca gg 22
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 13
ctagccacca tggcttgagt 20
<210> 14
<211> 23
<212> DNA

<213> 引物 (Primer)
<400> 14
tccgaattca gtgactacag atg 23
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 15
gcggtcttct ctgcaaatgg g 21
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 16
tgcttttagct tgctggctgg 20
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 17
atgacccctt cattgacctc a 21
<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 引物 (Primer)
<400> 18
gagatgatga cccttttggc t 21

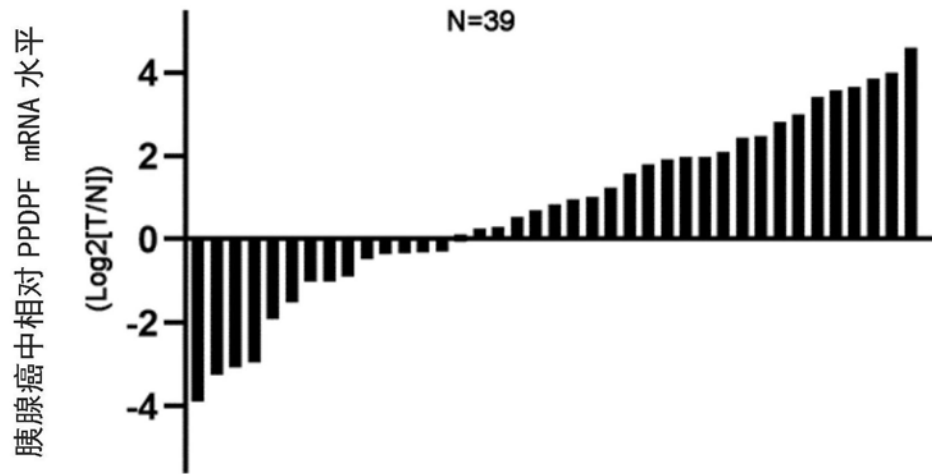


图1

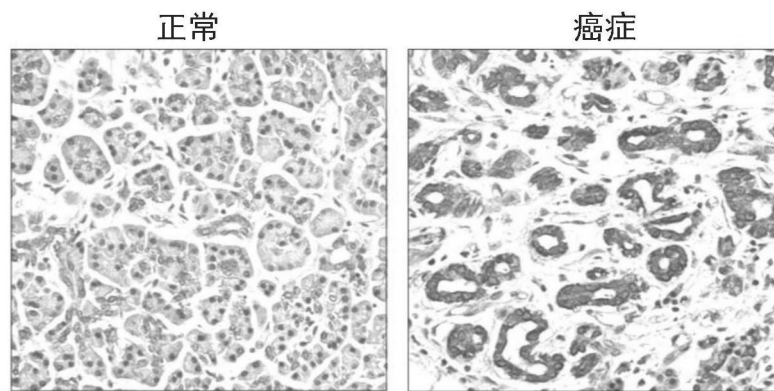


图2

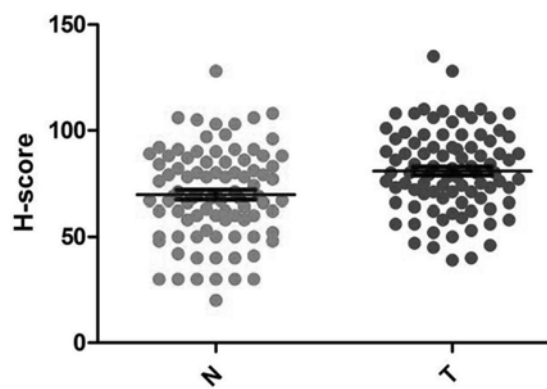


图3

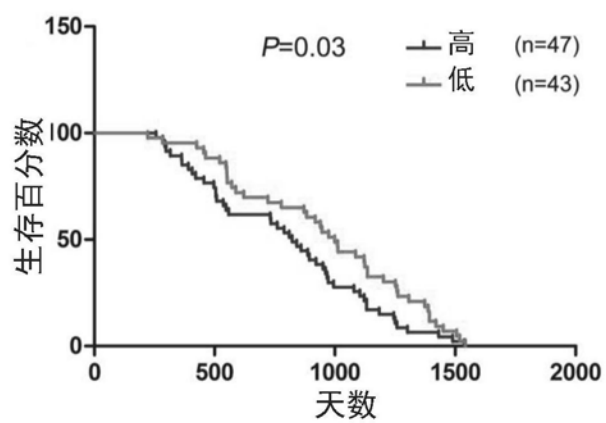


图4

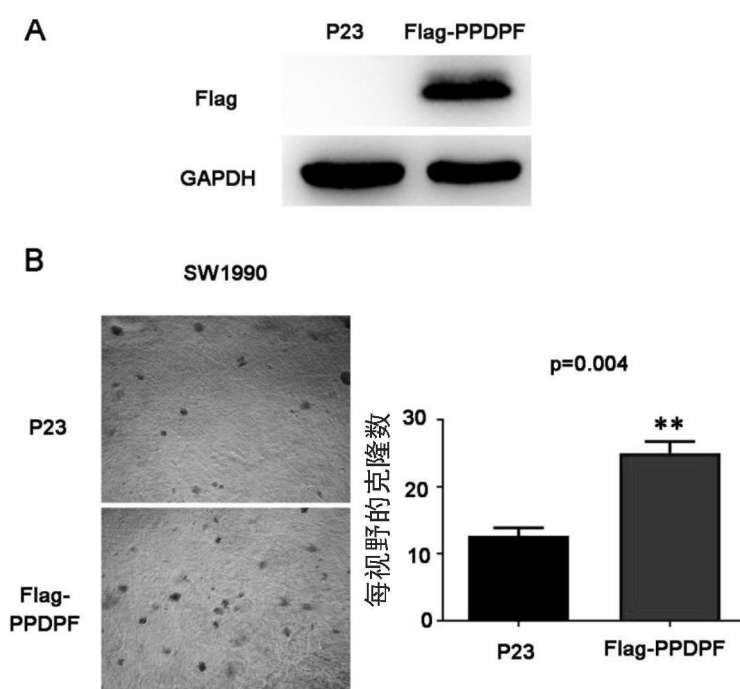


图5

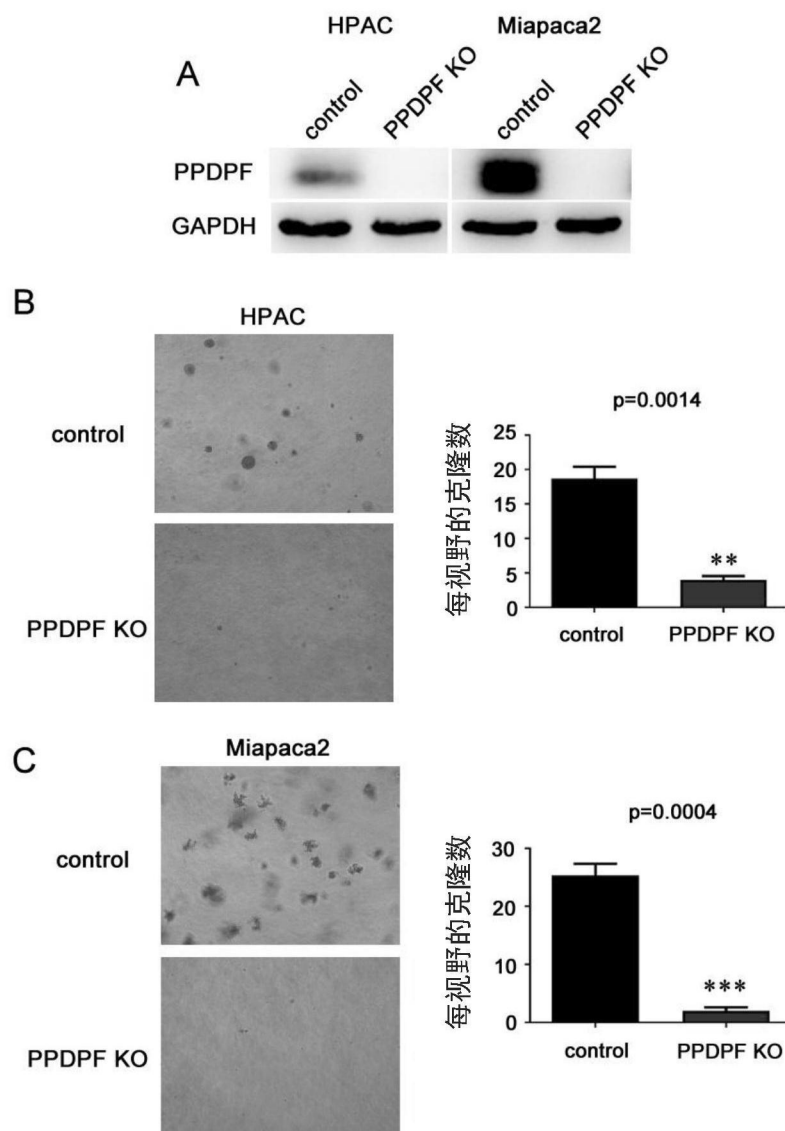


图6

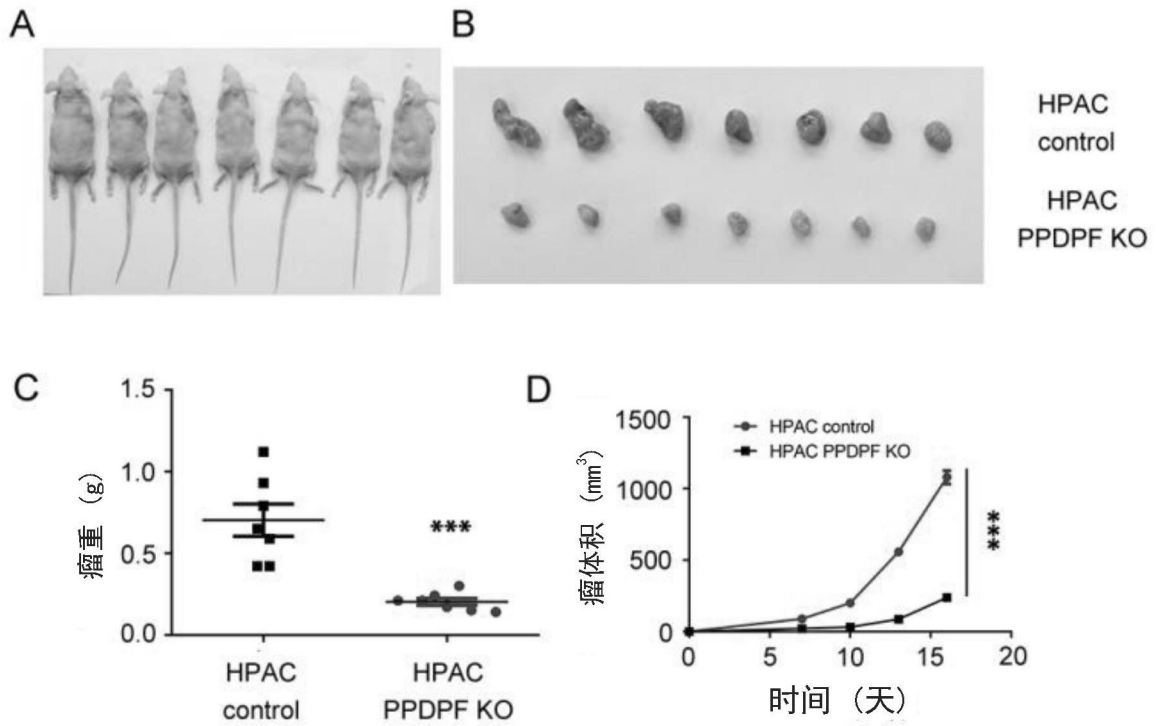


图7

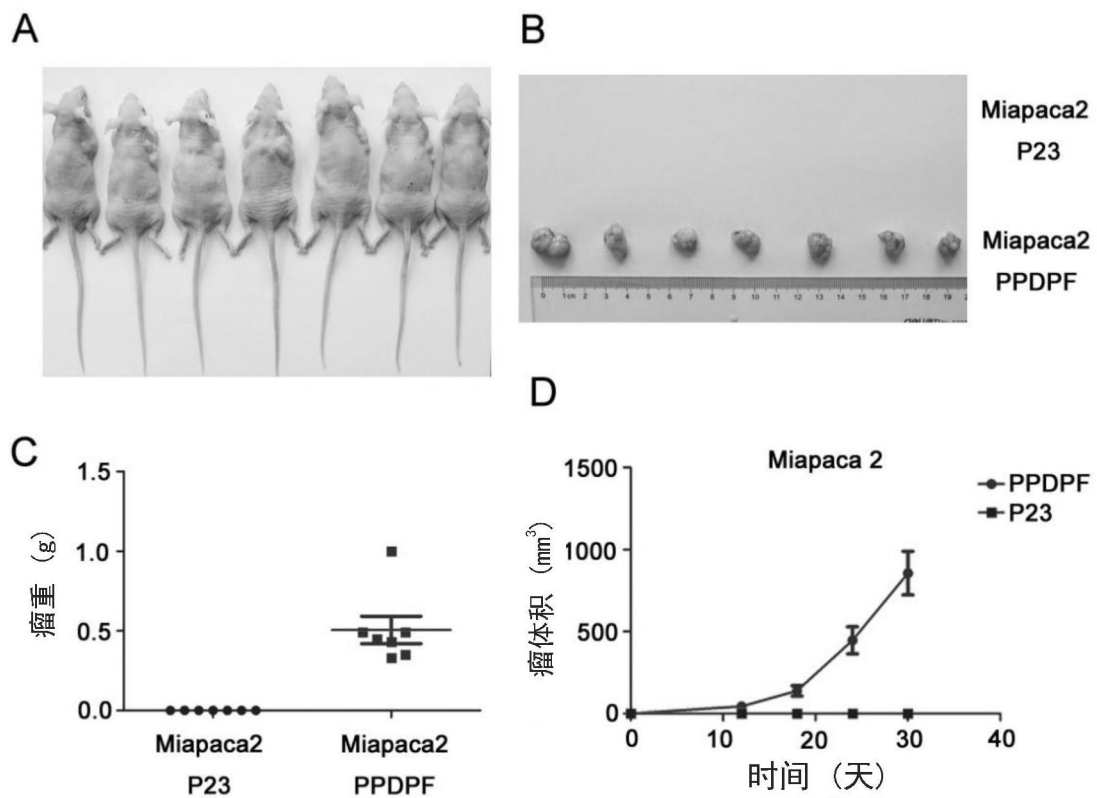


图8

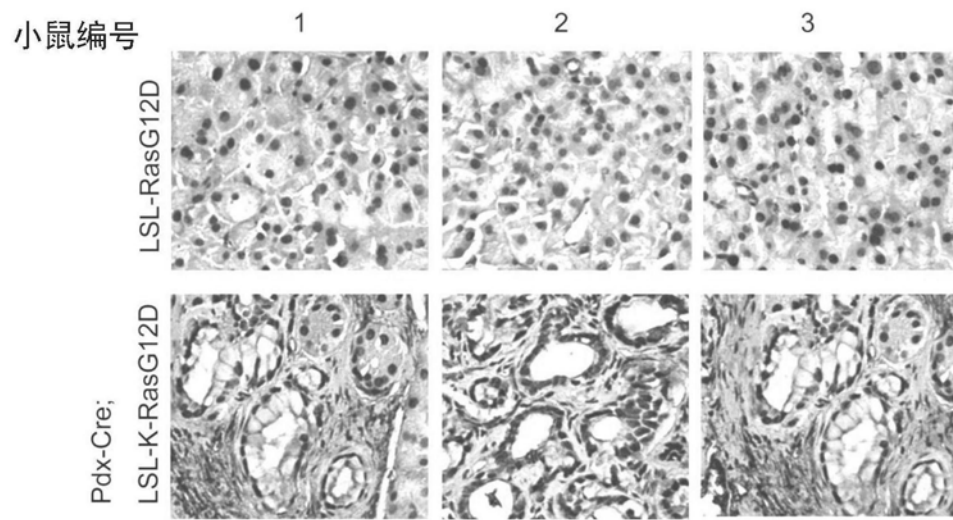


图9

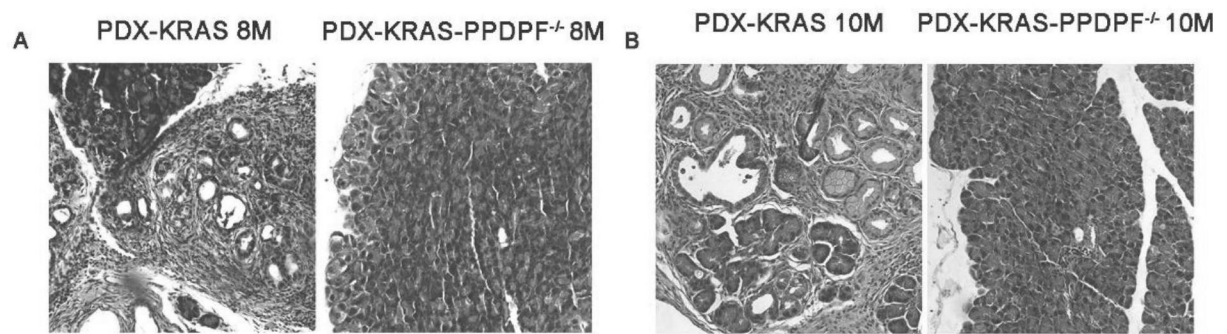


图10

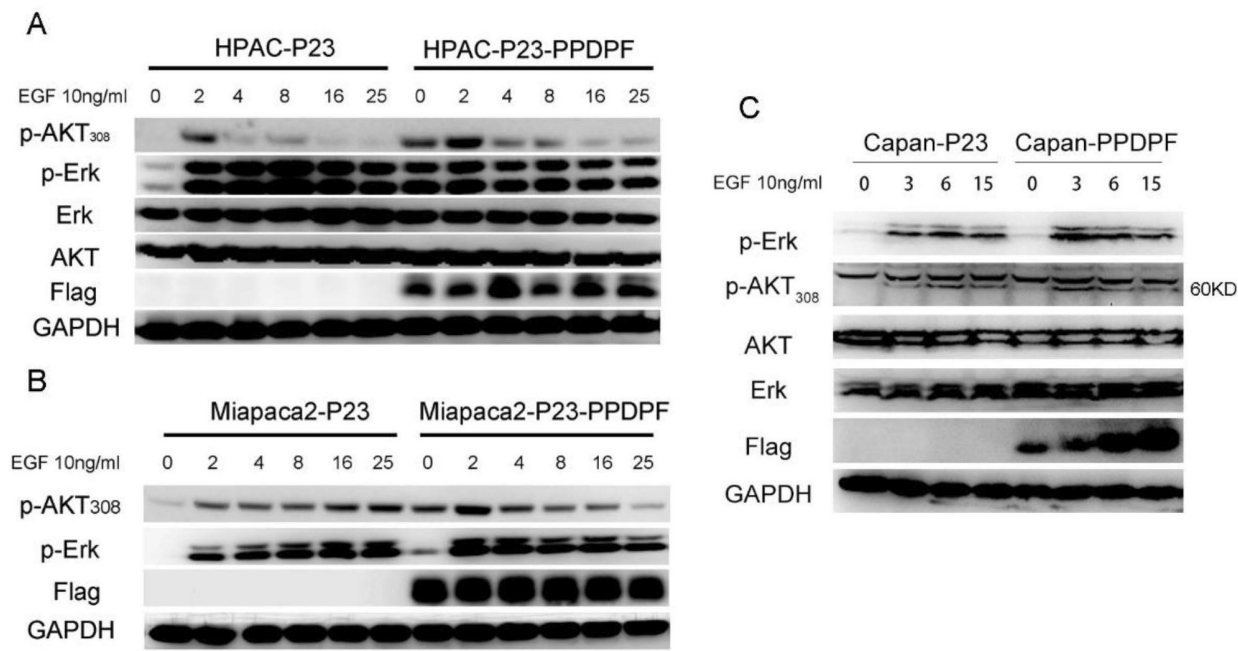


图11

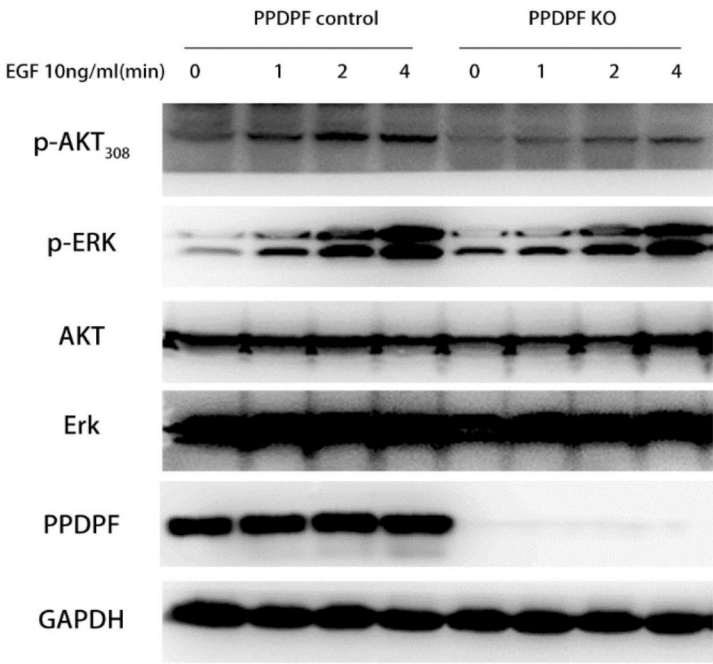


图12

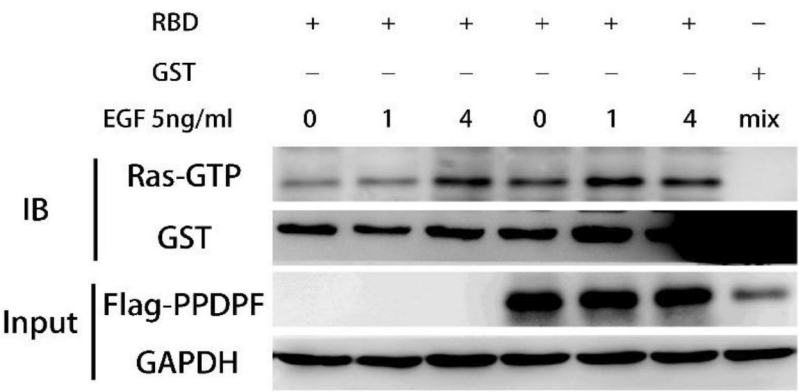


图13

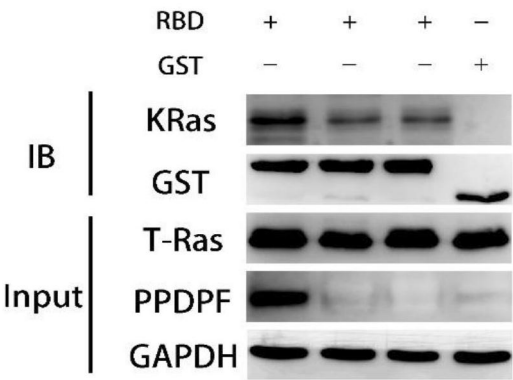


图14