



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106460049 B

(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201580023504.8

(22)申请日 2015.04.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106460049 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(30)优先权数据
10-2014-0051608 2014.04.29 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.11.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2015/004160 2015.04.27

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/167183 KO 2015.11.05

(73)专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72)发明人 高齐祥 安炯泰

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 刘培培

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

G01N 33/574(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102947446 A,2013.02.27,

CN 102947446 A,2013.02.27,

Yamamoto S et al..ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumour development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas.《Histopathology》.2012, 1073-1083.

Hara T et al..Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells.《Mol Cell Proteomics》.2006,479-491.

审查员 宋梦

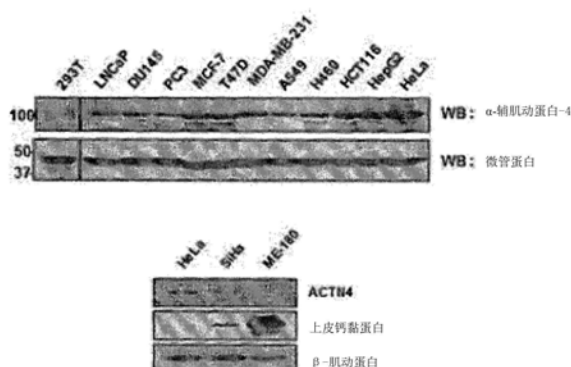
权利要求书1页 说明书15页 附图10页

(54)发明名称

参与诱导宫颈癌的辅肌动蛋白-4的制药用途

(57)摘要

本发明涉及参与宫颈癌诱导的辅肌动蛋白-4的制药用途,更具体地,本发明查明了具有宫颈癌诱导能力的作为标记蛋白质的辅肌动蛋白-4的特性,从而提供用于诊断、预防或治疗宫颈癌的辅肌动蛋白-4的制药用途。



1. 用于测定辅肌动蛋白-4基因的mRNA或其蛋白质水平的制剂在制备人乳头瘤病毒16型或18型阳性宫颈癌诊断用试剂盒上的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,用于测定所述基因的mRNA的制剂包含与所述基因的mRNA形成互补序列的寡核苷酸。

3. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,用于测定所述蛋白质水平的制剂包含所述蛋白质的特异性抗体。

4. 辅肌动蛋白-4抑制剂在制备用于治疗人乳头瘤病毒16型或18型阳性宫颈癌的药物中的用途。

5. 根据权利要求4所述的用途,其特征在於,所述辅肌动蛋白-4抑制剂选自反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA或抗体。

参与诱导宫颈癌的辅肌动蛋白-4的制药用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于诊断、预防或治疗宫颈癌(cervical cancer)的作为宫颈癌的标记蛋白的辅肌动蛋白-4(actinin-4)的制药用途。

背景技术

[0002] 上皮间质转化(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)是指,上皮细胞转化成间叶细胞的过程。亦即,该转化过程是上皮细胞转化成具有间叶细胞的特性的变化过程,已知这是在个体形成发育中的重要一环。此外,根据最近要就结果,发现该过程与癌细胞的进程(progression)、侵袭(invasion)、转移(metastasis)等有着联系。

[0003] 已知,作为细胞骨架蛋白(cytoskeletal protein)的辅肌动蛋白-4不仅在几种癌细胞中进行过度表达,还会参与对细胞的迁移和生长的诱导。然而,至今并未证明在宫颈癌中作为标记蛋白的辅肌动蛋白-4的作用。

[0004] 因此,本发明的发明人是通过查明多种癌细胞内的辅肌动蛋白-4的表达水平、在宫颈癌细胞中进行过度表达的辅肌动蛋白-4的AKT-Snail信号转导机制中所起的作用、细胞的增殖、迁移和侵袭以及肿瘤的形成,来完成了本发明。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明在于,通过查明作为标记蛋白的辅肌动蛋白-4的作用来提供用于诊断、预防或治疗宫颈癌的辅肌动蛋白-4的制药用途。

[0007] 技术方案

[0008] 为了实现上述目标,本发明提供宫颈癌诊断用组合物,该组合物包含用于测定辅肌动蛋白-4基因的mRNA或其蛋白质水平的制剂。

[0009] 此外,本发明提供包含辅肌动蛋白-4抑制剂的用于预防或治疗宫颈癌的药物组合物。

[0010] 此外,本发明提供辅肌动蛋白-4抑制剂在制备用于预防或治疗宫颈癌的药物组合物中的用途。

[0011] 此外,本发明提供一种治疗宫颈癌的方法,其包括:将制药有效剂量的包含辅肌动蛋白-4抑制剂的用于预防或治疗宫颈癌的药物组合物向宫颈癌患者进行给药步骤。

[0012] 此外,本发明用于预防或治疗宫颈癌的医学筛查方法,该方法包括:将辅肌动蛋白-4基因与候选物质在体外进行接触,然后判断所述候选物质促进或抑制所述基因的表达。

[0013] 此外,本发明提供用于预防或治疗宫颈癌的筛查方法,该方法包括:将辅肌动蛋白-4蛋白质与候选物质在体外进行接触,然后判断所述候选物质增强或抑制所述蛋白的功能或活性。

[0014] 有益效果

[0015] 本发明的效果在于,通过抑制表达于宫颈癌并参与细胞的增值、迁移和侵袭以及肿瘤的形成的辅肌动蛋白-4来抑制肿瘤的形成,从而通过辅肌动蛋白-4抑制剂来应用于宫颈癌的诊断、预防或治疗中。

附图说明

[0016] 图1展示了各种癌细胞(前列腺癌:LNCaP、DU145、PC3/乳腺癌:MCF-7、T47D、MDA-MB-231/肺癌:A549、H460/大肠癌:HCT116/肝癌:HepG2/宫颈癌:HeLa)中的辅肌动蛋白-4表达量的对比(A)和宫颈癌系HeLa、SiHa和ME-180细胞中的辅肌动蛋白-4和上皮钙黏蛋白的表达图谱(B)。

[0017] 图2展示了在宫颈癌细胞SiHa细胞中根据辅肌动蛋白-4过表达和表达抑制的AKT-Snail信号机制的确认结果(A)和根据Snail结合位点的存在与否的上皮钙黏蛋白启动子的转录活性(B和C)。

[0018] 图3展示了在宫颈癌细胞HeLa、SiHa细胞中辅肌动蛋白-4表达抑制细胞和ME-180过表达细胞的制备及其上皮钙黏蛋白、Snail表达或细胞表型的对比结果。

[0019] 图4展示了宫颈癌细胞HeLa和SiHa细胞中的根据辅肌动蛋白-4的过表达的细胞迁移性。图5展示了宫颈癌细胞HeLa和SiHa细胞中的辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞中的迁移性(A)和侵袭性(B)。

[0020] 图6为辅肌动蛋白-4表达抑制细胞培养基中的迁移性、侵袭性(A)和细胞增殖(B)的结果。

[0021] 图7为根据辅肌动蛋白-4的过表达的 β -连环蛋白的表达增加(A)和辅肌动蛋白-4的 β -连环蛋白分解抑制及稳定化(B和C)的确认结果。

[0022] 图8为根据辅肌动蛋白-4的过表达的 β -连环蛋白的蛋白酶体分解抑制(A)和 β -连环蛋白的靶细胞周期蛋白D1的转录活性增加(B)的确认结果。

[0023] 图9为根据辅肌动蛋白-4的表达抑制的集落形成减少(A和B)及根据过表达的集落形成增加(C)的确认结果。

[0024] 图10为比较根据辅肌动蛋白-4的表达抑制的细胞生长。

[0025] 图11为辅肌动蛋白-4表达抑制细胞中的通过PI染色分析的细胞增殖抑制的确认结果。

[0026] 图12为注射有辅肌动蛋白-4表达抑制细胞的小鼠中根据时间的肿瘤形成(A)和形成有癌的小鼠的照片(B)。

[0027] 图13为注射有辅肌动蛋白-4表达抑制细胞的小鼠中提取的癌(A)、癌大小和重量(B)及注射癌细胞后的小鼠体重(C)的对比结果。

具体实施方式

[0028] 下面,具体说明本发明的结构。

[0029] 本发明涉及用于诊断宫颈癌的组合物,该组合物包含用于测定辅肌动蛋白-4基因的mRNA及其蛋白质水平的制剂。

[0030] 根据本发明的一个具体实施例,辅肌动蛋白-4在作为宫颈癌细胞的HeLa细胞内进行表达(图1A),通过利用宫颈癌细胞系的HeLa、SiHa和ME-180细胞来比较辅肌动蛋白-4与

上皮钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达量,其结果,HeLa细胞中的辅肌动蛋白-4的表达量更多,而ME-180细胞中没有表达辅肌动蛋白-4。反之,辅肌动蛋白-4的表达较少的ME-180细胞中有表达很多的上皮钙黏蛋白(图1B)。

[0031] 此外,随着辅肌动蛋白-4的增加,显示出AKT活性化的增加和转录因子Snail的表达的增加,但抑制辅肌动蛋白-4的表达会带来AKT活性化的降低,且还降低Snail的表达(图2A)。经过确认,Snail是通过与上皮钙黏蛋白的启动子结合来抑制自身的表达,从而通过测定上皮钙黏蛋白启动子的转录活性,辅肌动蛋白-4会增加宫颈癌细胞内的Snail,进行调节上皮钙黏蛋白的表达(图2)。

[0032] 由于辅肌动蛋白-4是相继HeLa、SiHa、ME-180之后表达得少,通过在HeLa和SiHa细胞中设计辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞且在几乎没有辅肌动蛋白-4表达的ME-180细胞中设计过表达细胞进行实验,结果确认,作为辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞的HeLa和SiHa细胞内的Snail表达会降低,而上皮钙黏蛋白反而增加(图3)。对HeLa细胞而言,并不是能表达表达上皮钙黏蛋白的细胞,即使抑制辅肌动蛋白-4的表达,也不能使所述HeLa细胞增加。这相关于辅肌动蛋白-4通过Snail的表达来调整上皮钙黏蛋白的表达,可见通过细胞内其他各种因子能够抑制上皮钙黏蛋白的表达。此外,其中过表达有辅肌动蛋白-4的ME-180细胞内出现了上皮钙黏蛋白有减少的模式。经过确认这些细胞的细胞表型,其结果显示细胞形态从表达抑制细胞转化成EMT的相反表型,即MET表型,也就是说转化成细胞-细胞之间相结合的表型(图3的下部)。

[0033] 此外,经过确认通过辅肌动蛋白-4的表达的细胞迁移的增加,其结果显示,辅肌动蛋白-4的过表达能使宫颈癌细胞的转移增加(图4)。迁移和侵袭是癌细胞的转移中的极其重要的过程之一,因此为了确认辅肌动蛋白-4的表达是否参与癌细胞的迁移和侵袭而进行Trans-well迁移和基质胶侵袭,其结果显示对从表达抑制细胞中所获取的培养基而言相比于对照组培养基细胞迁移有减少(图6A)。为了确认这种迁移的减少是否由于细胞增殖所引起的,通过利用相同培养基进行MTT分析,结果显示各培养基内的细胞增殖没有出现变化(图6B)。由此可见,辅肌动蛋白-4的表达是通过AKT-Snail-MMP-9增加或AKT-snail-上皮钙黏蛋白抑制的机制来起到增加细胞的EMT和迁移的作用的重要的癌标记蛋白。

[0034] 此外,在作为辅肌动蛋白-4的过表达细胞的MDCK细胞中, β -连环蛋白的表达在增加,且作为 β -连环蛋白的靶蛋白的波形蛋白(Vimentine)也在增加(图7A)。 β -连环蛋白可以诱导细胞的增殖,其通过与参与细胞之间结合的上皮钙黏蛋白进行结合而存在,然而上皮钙黏蛋白的减少会导致 β -连环蛋白的减少。然而,在本发明的辅肌动蛋白-4的过表达细胞内,即使上皮钙黏蛋白的表达受到抑制而消失, β -连环蛋白的表达却有增加。由此判断,辅肌动蛋白-4的增加会影响 β -连环蛋白的稳定,经过确认当利用siRNA来减少上皮钙黏蛋白的表达时辅肌动蛋白-4是否能抑制 β -连环蛋白的分解,结果显示,通过辅肌动蛋白-4的过表达能抑制随着上皮钙黏蛋白的减少而减少的 β -连环蛋白(图7B)。此外,通过利用作为翻译抑制剂的环己酰亚胺(cycloheximide)进行处理,来抑制蛋白质的合成,经过确认辅肌动蛋白-4能否抑制 β -连环蛋白随着时间的分解,结果发现,当辅肌动蛋白-4进行过表达时,与对照组(mock)相比更会推迟 β -连环蛋白的分解,且作为 β -连环蛋白的靶蛋白的c-myc也能推迟减少(图7C)。细胞内的 β -连环蛋白的分解是因蛋白酶体(proteasome)而出现的现象,为了确认辅肌动蛋白-4是否能抑制通过蛋白酶体分解的 β -连环蛋白分解来诱导 β -连环蛋白的稳

定,通过处理作为蛋白酶体抑制剂的ALLN来确认发现,当辅肌动蛋白-4进行过表达时,通过抑制 β -连环蛋白的蛋白酶体分解来使 β -连环蛋白更佳稳定,进而增加 β -连环蛋白的量(图8A)。此外,经过确认作为 β -连环蛋白的靶蛋白的细胞周期蛋白(cyclin)D1的转录活性,结果显示所述转录活性会根据辅肌动蛋白-4的表达浓度而增加(图8B)。 β -连环蛋白及作为 β -连环蛋白的靶蛋白的细胞周期蛋白D1的增加可以诱导细胞增殖,从而判断辅肌动蛋白-4的表达会参与细胞增殖,进行通过利用集落(colony)形成分析来确认细胞增殖,结果显示作为辅肌动蛋白-4表达抑制细胞的HeLa细胞和SiHa细胞会抑制集落的形成(图9A和9B),与此相反,在有辅肌动蛋白-4的过表达的ME-180细胞内集落的形成有增加(图9C)。由此认为,辅肌动蛋白-4的过表达是通过增加细胞增殖来诱导癌的形成。在辅肌动蛋白-4表达抑制细胞内,通过集落形成分析来确认了细胞增殖在减少。为了确认细胞生长,通过MTT分析来确认辅肌动蛋白-4的少量表达是否影响细胞增殖,分析结果显示HeLa细胞和SiHa细胞的细胞生长均比对照组有减少(图10)。如图11所示,根据用于确认细胞生长或增殖的PI染色分析,HeLa细胞和SiHa细胞内的S期辅肌动蛋白-4过表达细胞的所占比例有降低。根据上述结果,可以判断辅肌动蛋白-4能起到促进被诱导为癌的细胞的生长的作用。这在动物实验中也得到了证明,即将辅肌动蛋白-4表达受到抑制的SiHa细胞注射到小鼠体内并确认肿瘤形成,结果显示,与对照组相比,在辅肌动蛋白-4表达抑制细胞内癌的形成有受到抑制(图12A),肿瘤大小也比对照组小(图12B)。此外,经过比较从注射有辅肌动蛋白-4表达抑制细胞的小鼠中摘除的肿瘤的结果发现,肿瘤大小比对照组要小(图13A),癌的大小和重量也明显减少(图13B)。

[0035] 因此,辅肌动蛋白-4可被用作用于诊断宫颈癌的生物标记。

[0036] 术语“诊断”是对病理状态的判断,根据本发明的目的,所述诊断是指通过确认等进行区分并诊断的物质。

[0037] 术语“诊断用标记(diagnosis marker)”是指,能将宫颈癌细胞与正常细胞加以区分并诊断的物质,包括如在宫颈癌细胞中比正常细胞显示增加或减少的多肽或核酸(如mRNA等)、脂质、糖脂、糖蛋白、糖(单糖、二糖、寡糖等)等的有机生物分子等。在本发明中所提供的宫颈癌诊断用标记是,比起正常细胞,在宫颈癌的细胞内的表达量有增加的辅肌动蛋白-4基因中所表达的蛋白质。

[0038] 本发明的用于诊断宫颈癌的组合物包含用于测定辅肌动蛋白-4基因的mRNA的表达水平或从所述基因表达的蛋白质的量的制剂,所述制剂为与辅肌动蛋白-4mRNA形成互补序列的寡核苷酸,包括如与辅肌动蛋白-4特异性结合的引物(primer)或核酸探针、或辅肌动蛋白-4特异性抗体。

[0039] 所述引物是指,在适当温度和适当缓冲液内,在适当的条件(4种不同的核苷三磷酸和聚合酶)下,可作为模板-指示DNA合成的起始点的单链寡核苷酸(oligonucleotide)。引物的适当长度可根据各种因素如温度、引物用途等而有所不同。此外,引物的序列无需具有与模板的部分序列完全互补的序列,只要在与模板杂交时能够发挥出引物固有的作用的范围内具有充分的互补性即可。因此,本发明的引物的序列无需与作为模板的基因的核苷酸序列完全互补,而是与所述基因杂交时能够发挥出引物固有的作用的范围内具有充分的互补性即可。此外,优选地,本发明的引物可用于基因扩增反应。所述扩增反应是指用于扩增核酸分子的反应,而这些基因的扩增反应已知晓于本领域的技术人员,例如,包括聚合酶

链式反应 (PCR)、反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)、连接酶链反应 (LCR)、转录介导扩增 (TMA)、核酸依赖性扩增 (NASBA) 等。

[0040] 所述核酸探针是指天然或经过变形的探针或链的线型寡聚体,包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸,与靶核苷酸序列进行特异性杂交,可以是存天然的或人工合成的。本发明的探针可以为单链,优选为寡脱氧核糖核苷酸。本发明的探针可包括天然dNMP (即dAMP、dGMP、dCMP和dTMP)、核苷酸类似物或衍生物。此外,本发明的探针可包括核糖核苷酸。例如,本发明的探针可包括:经骨架修饰的核苷酸,如肽核酸 (PNA)、硫代磷酸酯DNA、二硫代磷酸酯DNA、磷酸酰胺DNA、酰胺链接的DNA、MMI链接的DNA、2'-O-甲基RNA、 α -DNA和甲基磷酸酯DNA;经糖修饰的核苷酸,例如,2'-O-甲基RNA、2-氟基RNA、2'-氨基RNA、2'-O-烷基DNA、2'-O-烷基DNA、2'-O-烯丙基DNA、2'-O-炔基DNA、己糖DNA、pyranosylRNA和失水己糖醇DNA;和经碱基修饰的核苷酸,例如,C-5取代的嘧啶 (取代基包括氟基、溴基、氯基、碘仿基、甲基、乙基、乙烯基、甲酰基、丙醛基、炔基、噻唑基、咪唑基、吡啶基)、具有C-7取代基的7-脱氮嘌呤 (取代基包括氟基、溴基、氯基、碘仿基、甲基、乙基、乙烯基、甲酰基、炔基、烯基、噻唑基、咪唑基、吡啶基)、肌苷 (Inosine) 和二氨基嘌呤。

[0041] 所述辅肌动蛋白-4的特异性抗体可以使用多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体和人源化抗体。

[0042] 所述抗体片段的例子,包括:Fab, Fab', F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线型片段 (Zapata et al., Protein Eng. 8 (10):1057-1062 (1995));单链抗体分子;及由抗体片段所组成的多特异性抗体等。

[0043] 将抗体通过木瓜蛋白酶切断后可获得两个相同的抗原结合片段,也就是说,生成具有单价抗原结合位点的"Fab"片段和剩余的"Fc"片段。通过处理胃蛋白酶,可生成具有两个抗原结合位点并仍可与抗原进行交叉结合的F(ab')₂片段。Fv片段为包含完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。所述位点是由一个重链和一个轻链的可变区的二聚体组成并通过非共价键进行坚固的结合。

[0044] 本领域的技术人员已知晓多克隆抗体的制备方法。多克隆抗体可通过向哺乳动物注射一次或以上的免疫化剂来制备,根据需要,可通过与免疫增强剂一起注射进行制备。通常,免疫化剂和(或)免疫增强剂是向哺乳动物通过皮下注射或腹腔内注射来进行数次注射。免疫化剂可以为本发明的蛋白质或利用该蛋白质的融合蛋白。为了有效性,可向被免疫化的哺乳动物同时注射公知的具有免疫原性的蛋白质和所诉免疫化剂。

[0045] 根据本发明的,单克隆抗体是通过利用文献 (Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)) 中记载的杂交瘤方法来制备,或通过利用重组DNA重组方法 (例如,参考美国专利第4,816,576号)。此外,单克隆抗体是,例如,通过文献 (Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 和Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)) 中记载的技术来从噬菌体抗体库中分离出的。

[0046] 具体地,本发明的单克隆抗体包括,基于欲获得的活性的重链和(或)轻链的部分为源自特定种类的抗体,或与属于特定抗体类别或亚类别的抗体的相应序列相同或虽具有同源性、但链中的其他部分源自其他种类的抗体属于其他抗体类别或亚类别的抗体或与该抗体的片段相同或具有同源性的"嵌合 (chimeric)"抗体 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。

[0047] 非人(例如,如鼠的动物)抗体的“人源化”形态为,包含诱导自非人免疫球蛋白(Immunoglobulin)的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如,Fab、Fab’、F(ab’)2或抗体的其他抗原结合序列)。通常,人源化抗体包括由具有需要受体的互补决定区(CDR)的残基的特异性、亲和性和能力的小鼠、老鼠或兔子等除人之外的种类(供者抗体)的CDR残基所取代的人免疫球蛋白(受体抗体)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基会被相应的非人残基所取代。此外,人源化抗体包括受体抗体、或被导入的CDR或框架序列中未被发现的残基。通常,人源化抗体实质上包含一个或以上,一般为两个或以上的可变区,其中所有的或实质上所有的CDR区与非人免疫球蛋白区相对应,而所有的或实质上所有的FR区与人免疫球蛋白区相对应。此外,人源化抗体包括免疫球蛋白不变区(Fc)中的至少一部分,一般包括人免疫球蛋白区的部分(Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992))。

[0048] 本发明的宫颈癌诊断用组合物可被包含为套件形式。

[0049] 所述套件包括用于测定辅肌动蛋白-4基因的表达水平或蛋白质的量的引物、探针或抗体,且它们的定义为如上所述。

[0050] 当所述套件在PCR扩增过程中使用时可选择性地包含所述PCR扩增中所需要地试剂,例如,缓冲液、DNA聚合酶(例如,Thermus aquaticus(Taq),Thermus thermophilus(Tth),Thermusfiliformis,Thermis flavus,Thermococcus literalis或Pyrococcus furiosus(Pfu)中获得具有热稳定性的DNA聚合酶)、DNA聚合酶辅助因子和dNTPs,而当所述套件使用于免疫分析时,本发明的套件可选择性地包含二抗和标记的基质。进一步,本发明的套件可制备成包含所述试剂成分的多个另外的包装或隔间。

[0051] 此外,本发明的宫颈癌诊断用组合物可被包含为微阵列形式。

[0052] 根据本发明的微阵列,用于测定所述辅肌动蛋白-4蛋白质或对该蛋白质进行编码的基因的表达水平的引物、探针或抗体被用作杂交阵列元素(hybridizable array element)并固定于基质(substrate)上。优选地,所述基质作为具有适合的坚固性或半坚固性的支撑体,例如,包括膜、过滤器、载玻片、晶片,纤维、磁性珠或非磁性珠、凝胶、管、板、聚合物、微粒和毛细血管。所述杂交阵列元素被排列在所述基质上进行固定,而这种固定是通过化学结合法或如UV的共价键结合方法来进行的。例如,所述杂交阵列元素被结合在经过修饰的玻璃表面,以包含环氧化合物或醛基。此外,通过UV结合在聚赖氨酸涂层表面。此外,所述杂交阵列要素是通过接头(linker,如乙二醇低聚物和二胺)与基质结合。

[0053] 此外,当适用于本发明的微阵列的样本为核酸时可以进行标记,并与微阵列上的阵列要素进行杂交。杂交条件可以多种多样,杂交程度的检测和分析可根据标记物质而进行实施。

[0054] 此外,本发明通过所述辅肌动蛋白-4基因的表达水平或其所表达的蛋白质的水平的测定方法来诊断宫颈癌的方法,更具体地,所述方法包括:(1)从宫颈癌疑似患者的生物学样本中测定辅肌动蛋白-4基因的表达水平或其所表达的蛋白质的量的步骤;和(2)通过从正常对照组样本中测定所述基因的表达水平或其所表达的蛋白质的量来与所述(1)步骤中的测定结果进行比较的步骤。

[0055] 所述的基因的表达水平或蛋白的量的测定方法包括:通过利用公知技术,从生物学样本中分离mRNA或蛋白质的公知过程。

[0056] 所述生物学样本是指,从活体采集的根据宫颈癌的发生或进行程度的所述基因的表达水平或蛋白质的水平与正常的对照组不同的样本,例如,包括组织、细胞、血液、血清、唾液和尿液等,但不限于此。

[0057] 优选地,所述基因的表达水平的测定是测定mRNA的水平,且所述mRNA的水平的测定方法可以为反转录聚合酶链反应(RT-PCR)、实时RT-PCR、RNA酶保护测定法、Northern印迹和DNA芯片等,但不限于此。

[0058] 在测定所述蛋白质水平时可以利用抗体,此时,生物学样本内的所述辅肌动蛋白-4蛋白质及其特异性抗体可以形成结合物,即抗原-抗体复合物,所述抗原-抗体复合物的合成量可通过检测标签(detection label)的信号大小进行定量测定。所述检测标签可选自酶、荧光物质、配体、发光物质、微粒(microparticle)、氧化还原分子和放射性同位素,但不限于此。用于测定蛋白质水平的方法可以为Western印迹、ELISA、放射免疫分析、放射免疫扩散、免疫双扩散(Ouchterlony)、免疫火箭电泳、组织免疫染色、免疫沉淀分析、补体结合分析、FACS、蛋白质芯片等,但不限于此。

[0059] 因此,通过上述检测方法,本发明可确认作为对照组的mRNA表达量或蛋白质的量和宫颈癌患者或疑似宫颈癌患者的mRNA表达量或蛋白质的量,且通过将所述表达量的程度与对照组作比较,从而可以诊断宫颈癌的发病与否、发展阶段等。

[0060] 此外,通过上述检测方法,本发明可确认作为对照组的mRNA表达量或蛋白质的量和宫颈癌患者或疑似宫颈癌患者中的mRNA表达量或蛋白质的量,且通过将所述表达量的程度与对照组作比较,从而可以诊断宫颈癌的发病与否、发展阶段等。

[0061] 此外,根据本发明的宫颈癌的诊断方法,本发明的辅肌动蛋白-4基因的表达水平或其表达蛋白质的量比正常对照组样本增加时,可判断宫颈癌被诱发。

[0062] 此外,本发明涉及包含辅肌动蛋白-4抑制剂的用于预防或治疗宫颈癌的药物组合物。

[0063] 此外,本发明涉及辅肌动蛋白-4抑制剂在制备用于预防或治疗宫颈癌的药物组合物中的用途。

[0064] 根据本发明,如上所述,辅肌动蛋白-4是在宫颈癌细胞中进行过表达,辅肌动蛋白-4的表达会通过AKT-Snail-MMP-9增加或AKT-snail-上皮钙黏蛋白的抑制基质来增强细胞的EMT或迁移并抑制参与细胞增殖的 β -连环蛋白分解,从而推迟靶蛋白的c-myc减少,增加细胞周期蛋白D1的转录活性,增加细胞增殖,来诱导癌的形成,然而,通过抑制辅肌动蛋白-4的表达,会显示MET表型,即细胞-细胞结合的表型,从而降低细胞的迁移和侵袭,降低细胞增殖,抑制动物模型中的肿瘤形成,肿瘤大小也比对照组小。因此,辅肌动蛋白-4的抑制剂可以用于宫颈癌的治疗。

[0065] 因此,本发明的用于预防或治疗宫颈癌的组合物包含可减少辅肌动蛋白-4基因的mRNA表达或其蛋白质的表达、或降低蛋白质的功能或活性的制剂。

[0066] 所述辅肌动蛋白-4蛋白质的抑制剂可以为通过与辅肌动蛋白-4蛋白质结合来调节神经分化路径的信号的肽或化合物等。这种抑制剂可通过蛋白质结构分析等的如下所示的筛查方法来进行选取,是通过本领域公知方法可进行设计的。

[0067] 此外,所述蛋白质抑制剂可以使用辅肌动蛋白-4蛋白质的多克隆抗体、单克隆抗体,人抗体和人源化抗体,所述抗体的定义如上所述。

[0068] 通过利用所述抗体来抑制细胞内辅肌动蛋白-4的功能,从而预防或治疗宫颈癌。

[0069] 本发明的辅肌动蛋白-4蛋白质的功能或活性抑制剂可以通过脂质体、病毒、基因枪、聚合物、超声波,电击来进行传送,但不限于此。

[0070] 所述辅肌动蛋白-4基因可以为从编码所述基因的DNA或从其中转录的mRNA。因此,所述基因的抑制剂是一种通过与基因本身结合来阻碍转录或与从所述基因转录的mRNA结合来阻碍mRNA的翻译的抑制剂。

[0071] 因此,所述辅肌动蛋白-4的抑制剂包括用于抑制辅肌动蛋白-4基因的表达的所有抑制剂。例如,所述抑制剂可以为与所述基因集合的肽、核酸或化合物等。这种抑制剂是通过基于细胞的筛查等如下所述的筛查方法进行选取,且根据本领域公知的方法来进行设计。

[0072] 在一个具体实施例,所述抑制剂可以为辅肌动蛋白-4基因的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA或包含它们的载体。所述反义寡核苷酸、siRNA、miRNA或包含它们的载体是可通过本领域公知的方法进行制备。

[0073] 在本发明中,“siRNA”为通过切断靶基因的mRNA来诱导基因干扰现象的双链RNA,由具有如靶基因的mRNA等的序列的正义序列的RNA链和具有与之互补的序列的反义序列的RNA链构成。

[0074] 所述siRNA可包括,将试管内合成的siRNA本身或编码siRNA的碱基序列插入到表达载体中来进行表达的形态。

[0075] 在本发明中,所述“载体(vector)”是指,包含被插入于用于编码多肽的基因组内的外源DNA的基因结构。

[0076] 与本发明相关的载体是将用于抑制所述基因的核酸序列插入到基因组内的载体,例如有DNA载体、质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体、酵母载体或病毒载体。

[0077] 此外,所述反义可以具有与辅肌动蛋白-4基因或其片段中转录的mRNA序列整体或部分之间互补的序列,通过与所述mRNA结合来抑制所述辅肌动蛋白-4或其片段的表达。

[0078] 此外,所述shRNAi(short hairpin RNAi)是将人或小鼠的shRNA重复序列部位作为靶并根据常用方法进行制备。

[0079] 此外,本发明的药物组合物可进一步包含药学上可接受的载体。

[0080] 所述药学上可接受的载体包括在医药领域中通常使用的载体和赋形剂(vehicle),具体地包括离子交换树脂、镁、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如,人血清白蛋白)、还重物质(如各种磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物)、水、碱或电解质(如,硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠及锌盐)新、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮,纤维素基质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯乙二醇或羊毛蜡等,但不限于此。

[0081] 此外,本发明的组合物可除了上述成分之外还可以添加润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、或保存剂等。

[0082] 根据一个实施例,本发明的组合物可制成用于口服给药的水溶性溶液,优选地可以使用缓冲液,如Hank溶液、Ringer溶液或缓冲生理盐水。在水溶性注入缓冲液中可以添加如羧甲基纤维素、山梨醇或葡聚糖等能提高悬浮液粘度的基质。

[0083] 本发明的组合物可通过全身或局部进行给药,可通过利用公知技术制备是大昂的

剂型。例如,当口服给药时,通过与没有活性的稀释剂或使用载体进行混合,或通过封装于硬胶明胶胶囊或软明胶胶囊或制成片剂来进行给药。当口服给药时,活性化合物与赋形剂进行混合来制成摄取型片剂、颊部给药片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮剂、糖浆、薄片(wafer)等剂型。

[0084] 根据本领域的公知方法或通用方法制备注射剂型、局部给药剂型等的各种剂型。辅肌动蛋白-4可易溶解于生理盐水或缓冲液,因此保存在冷冻干燥状态后,将有效剂量的辅肌动蛋白-4适当地进行静脉注射、皮下注射、肌肉内注射、腹腔内注射、经皮注射等,在与生理盐水或缓冲液内投入之前先制成溶液再进行给药。

[0085] 本发明的药物组合物的活性成分的有效剂量是指,具有预防、抑制或缓解疾病的效果的量。

[0086] 因此,根据疾病的种类、严重性、包含在组合物中的活性成分剂其他成分的种类剂含量、剂型的种类和患者的年龄、体重、通常的健康状态、性别和饮食、给药时间、给药途径和组合物的分泌率、治疗时间、同时使用的药物等因素,进行调节。然而,例如,对于成年人,当给药剂量为一天1次至几次时,本发明的抑制剂可以一天给药1次至几次,化合物可以给药0.1ng/kg~10g/kg,多肽、蛋白质或抗体可以给药0.1ng/kg~10g/kg,反义寡核苷酸、siRNA、shRNAi、miRNA可以给药0.01ng/kg~10g/kg,但不限于此。

[0087] 此外,本发明提供用于治疗宫颈癌的方法,该方法包括:将药学有效剂量的包含辅肌动蛋白-4抑制剂的用于预防或治疗宫颈癌的药物组合物向宫颈癌受试者进行给药的步骤。

[0088] 所述宫颈癌的治疗方法中所使用的药物组合物和给药方法已在上面说明,为了避免重复叙述,省略了两者之间的共同内容。

[0089] 此外,用于预防或治疗宫颈癌的药物组合物的给药受试者可以包括所有的动物。例如,可以为狗、猫、小鼠等除了人之外的动物。

[0090] 此外,本发明提供用于预防或治疗宫颈癌的医药筛查方法,该方法包括:通过将辅肌动蛋白-4基因与候选物质在体外进行接触,来判断所述候选物质是否增强或抑制所述基因的表达。

[0091] 此外,本发明提供用于预防或治疗宫颈癌的医学筛查方法,该方法包括:通过将辅肌动蛋白-4蛋白质与候选物质在体外进行接触,来判断所述候选物质是否增强或抑制所述蛋白质的功能或活性。

[0092] 根据本发明的筛查方法,首先,将待分析的包含所述基因或蛋白质的宫颈癌细胞与候选物质进行接触。

[0093] 所述候选物质可以为,通过常用选取方式来在辅肌动蛋白-4基因碱基序列中促进或抑制向mRNA、蛋白质的转录、翻译的物质,或能增强或抑制辅肌动蛋白-4蛋白质的功能或活性的被推定为具有作为医药可能性的或随机选定的单独的核酸、蛋白质、肽、其他提取物或天然物质、化合物等。

[0094] 然后,经过处理候选物质的细胞内测定所述基因的表达量、蛋白质的量或蛋白质的活性,根据测定结果来测定所述基因的表达量、蛋白质的量或蛋白质的活性的增加或减少程度,从而判断所述候选物质是否为用于治疗或预防共计能改的物质。

[0095] 所述基因的表达量、蛋白质的量或蛋白质的活性的测定方法是根据本领域公知的

各种方法进行的,例如,逆转录酶-聚合酶链反应、实时聚合酶链反应、Western印迹法、Northern印迹法、ELISA、放射免疫测定、径向免疫扩散法和免疫沉淀测定法等,但不限于此。

[0096] 通过本发明的筛查方法获得的展示能抑制基因表达或用于抑制蛋白质功能的活性的候选物质可以为宫颈癌治疗剂的候选物质。

[0097] 所述宫颈癌治疗剂的候选物质可在日后的宫颈癌治疗剂研发过程中起到主导化合物的作用,这种主导化合物可通过结构修饰并最优化,以具有能促进或抑制辅肌动蛋白-4基因或从中表达的蛋白质的功能的效果,从而研发出新的宫颈癌治疗剂。

[0098] 在本发明中,为了清楚性,关于遗传工程技术相关的内容可参考文献[Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)]和文献[Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994)]中所公开的内容。

[0099] 下面,根据实施例,具体说明本发明的优势和特点、以及实现其优势和特点的方法。然而,本发明不限于以下公开的实施例内,可以进行各种变型。然而,本发明的实施例用于本发明的说明完整,以让本领域的技术人员进行完整的理解,本发明的范围限定于权利要求书内。

具体实施方式

[0100] 下面,用于实验的试剂、培养基等的出处为如下所述。

[0101] 从Invitrogen (Carlsbad, CA) 中购买获得DMEM培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素、链霉素、脂质体2000试剂 (Lipofectamine 2000 reagent)。

[0102] 抗-ACTN4抗体、抗-波形蛋白抗体、抗-N-钙粘蛋白抗体、抗-β-肌动蛋白抗体和抗-AKT1抗体是从Santa Cruz Biotechnology公司 (Santa Cruz, CA) 中购得,抗-p-GSK3β抗体、抗-snail抗体及抗-p-AKT (S473) 抗体是从Cell Signaling Technology中购得,抗-上皮钙黏蛋白、抗-β-连环蛋白抗体是从BD Biosciences中购得。单克隆抗体,即抗-Flag-M2抗体是从Aligent Technology中购得。

[0103] sh-ACTN4质粒是从Open-biosystem中购得。

[0104] Trypan blue和3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 是从Sigma (St, Louis, MO) 中购得。

[0105] **【实施例1】**各种癌细胞中的辅肌动蛋白-4表达及宫颈癌细胞中的表达的比较

[0106] 为了比较各种癌细胞中的辅肌动蛋白-4的表达量,通过利用Western印迹来比较蛋白质表达量。

[0107] 为此,对作为普通细胞的人胚肾细胞 (human embryonic kidney, HEK-293T), 各种癌细胞 (前列腺癌: LNCaP、DU145、PC3/乳腺癌: MCF-7、T47D、MDA-MB-231/肺癌: A549、H460/大肠癌: HCT116/肝癌: HepG2/宫颈癌: HeLa) 中的辅肌动蛋白-4的表达进行了对比。使用30μg的各细胞的蛋白质和10% SDS-PAGE凝胶。为了检测各蛋白质,在暗室内通过利用West Pico ECL (Thermo scientific, Rockford, IL) 进行确认。微管蛋白 (tubulin) 抗体 (SantaCruz) 作为对照组,可用于确认各细胞的蛋白质是否以相同量进行的对比,会以1:3000比例进行处理。

[0108] 如图1A所示,与其他癌细胞相比,在宫颈癌细胞HeLa细胞内表达了过量的辅肌动蛋白-4。

[0109] 基于上述结果,通过利用宫颈癌细胞系HeLa、SiHa和ME-180细胞来比较辅肌动蛋白-4的表达量,并确认根据表达量的上皮钙黏蛋白(E-cadherin)的表达。

[0110] 为此,从子宫癌细胞内包含的三种子宫癌细胞(HeLa, SiHa, ME-180)中获得的30 μ g蛋白质通过利用Western印迹来比较了上皮钙黏蛋白(BD Biosciences)的蛋白质表达量。使用1:5000比例的上皮钙黏蛋白抗体。

[0111] 如图1B所示,HeLa细胞内表达较多的辅肌动蛋白-4,而ME-180细胞内几乎没有表达辅肌动蛋白-4。反之,辅肌动蛋白-4表达较少的ME-180细胞内表达较多的上皮钙黏蛋白。

[0112] 上述结果是由根据辅肌动蛋白-4过表达的上皮钙黏蛋白的表达调节引起的。

[0113] **【实施例2】**在宫颈癌细胞内根据辅肌动蛋白-4表达的AKT-Snail信号机制及上皮钙黏蛋白的转录活性的研究

[0114] 在现有研究报告中,已确认MDCK细胞内根据辅肌动蛋白-4表达的AKT-Snail信号机制。因此,欲确认在宫颈癌细胞中是否也产生相同的机制。

[0115] 为此,通过利用脂质体2000(Invitrogen)来将flag-辅肌动蛋白-4DNA(1 μ g)或sh-辅肌动蛋白-4(1.5 μ g)转染到SiHa细胞。使用比例为1:2的DNA和脂质体2000,方法采用制造上的手册。从Open-biosystem购得sh-辅肌动蛋白-4并使用。在相应细胞中,通过利用RIPA裂解液(lysis buffer)来提取蛋白质后,再通过Western印迹分别使用抗体(FLAG:Aligent Technology, p-AKT:Cell Signaling Technology, AKT:Santa Cruz, p-GSK3 β , snail:Cell Signaling Technology和 β -肌动蛋白:Santa Cruz)来确认30 μ g蛋白质的表达,且各抗体的使用比列为1:3000。

[0116] 此外,在12孔板上接种HEK-293T细胞,每孔接种 2×10^5 个细胞,然后同时将0.5 μ g上皮钙黏蛋白启动子结构体(全长:-427~+53, Del-mutant:-78~+53)和Flag-ACTN4(0.5 μ g)或sh-ACTN4(0.5 μ g)进行转染。缺失突变体(Deletion mutant)是在全长启动子内通过对包含snail结合位点的除-207~-194部分的-78~+53进行克隆来制备的。对相应的细胞用冰冷PBS进行清洗并用reporter裂解液(Promega, Madison, WI)以每孔80 μ l来粉碎细胞,然后在4 $^{\circ}$ C下10,000 $\times$ g内进行离心分离10分钟,取上清,测定荧光素酶的活性。使用Luminometer20/20ⁿ(Turner Biosystems, Sunnyvale, CA)。为了标准化(Normalization),一起转染pSV40- β -半乳糖苷酶(galactosidase)。通过对收集的上清测量 β -半乳糖苷酶的活性并对该活性进行矫正,来展示活性值的图表。其中,使用 β -半乳糖苷酶的酶分析系统(Promega, Madison, WI),并通过利用DU530分光光度计(Beckman Instruments, Palo Alto, CA)进行分析。

[0117] 如图2A中所示,随着辅肌动蛋白-4的增加,显示AKT的活性化有增加且Snail表达也有增加,而辅肌动蛋白-4表达的抑制会降低AKT的活性化且Snail表达也有降低。

[0118] 转录因子Snail是与上皮钙黏蛋白启动子相结合来起抑制上皮钙黏蛋白表达的作用。因此,对包含Snail的结合位点或去除的两种上皮钙黏蛋白启动子的转录活性进行测定结果,发现包含Snail的结合位点的启动子中转录活性有降低,而对于去除Snail的结合位点而言,转录活性没有随辅肌动蛋白-4的存在与否而有变动(图2B)。此外,在抑制辅肌动蛋白-4的表达时,上皮钙黏蛋白的转录活性有增加(图2C)。

[0119] 由此结果可见,辅肌动蛋白-4是通过在宫颈癌细胞内增加Snail来调节上皮钙黏蛋白的表达。

[0120] 【实施例3】宫颈癌细胞系HeLa、SiHa和ME-180细胞中根据辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞及过表达细胞制备的Snail和上皮钙黏蛋白表达的图谱研究

[0121] 在实施例1中,辅肌动蛋白-4是按HeLa、SiHa和ME-180这一顺序其表达在减少。因此,HeLa和SiHa细胞中制备辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞,而在几乎不表达辅肌动蛋白-4的ME-180细胞中制备过表达细胞。

[0122] 为了制备辅肌动蛋白-4表达抑制稳定化细胞,将shACTN4质粒(1.5 μ g)转染到HeLa和SiHa细胞后,用嘌呤霉素(puromycin)(2 μ g/mL)进行选取2周。在相应细胞内提取蛋白质后,通过利用Western印迹,来确认辅肌动蛋白-4和Snail的蛋白质表达量。此外,为了在ME-180细胞内制备辅肌动蛋白-4的过表达稳定化细胞,转染Flag-ACTN4质粒后,通过处理G-418(400 μ g/mL;Sigma)两周,来进行选取。为了确认相应细胞的表型(细胞的表现形式),通过显微镜进行拍照(Zeiss Axiovert100;放大倍数 $\times 10$)。

[0123] 如图3所示,在作为辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞的HeLa和SiHa细胞内,Snail表达有减少,上皮钙黏蛋白反而有增加。HeLa细胞是不会表达上皮钙黏蛋白的细胞,即使抑制辅肌动蛋白-4的表达也不会有增加。想必这是因为,辅肌动蛋白-4会参与通过Snail表达的上皮钙黏蛋白的表达调节,细胞内其他各种因子的上皮钙黏蛋白的表达抑制也在发生。

[0124] 然后,有过表达辅肌动蛋白-4的ME-180细胞中显示了上皮钙黏蛋白有减少的图谱。在确认细胞表型的结果,确认了表达抑制细胞中表现形式转变为EMT的相反表型,即MET表型,也就是说转变成细胞-细胞间结合的表型(图3下部)。

[0125] 【实施例4】宫颈癌细胞中根据辅肌动蛋白-4的过表达的细胞迁移性的研究

[0126] 为了确认宫颈癌细胞内根据辅肌动蛋白-4的过表达的细胞迁移性,进行伤口愈合试验(wound healing assay)。

[0127] 为了进行伤口愈合试验,在6孔板上分别接种各 5×10^5 的HeLa和SiHa细胞,转染辅肌动蛋白-4(1 μ g),然后利用200p tip来直线刮取细胞,来比较向去除细胞的位置上各表面的细胞的迁移程度(HeLa 24h,SiHa 48h)。

[0128] 如图4所示,辅肌动蛋白-4的过表达会增加细胞的迁移性。

[0129] 迁移性和侵袭性对癌细胞的转移来说是极其重要的过程之一。因此,为了确认辅肌动蛋白-4的表达是否影响癌细胞的迁移性和侵袭性,辅肌动蛋白-4表达抑制细胞内进行Transwell迁移和基质胶侵袭试验(matrigel invasion assay)。

[0130] 为了测定细胞的迁移性,通过利用辅肌动蛋白-4表达抑制细胞(HeLa-KD,SiHa-KD)进行Transwell迁移。在具有直径为8 μ m的孔的Transwell小室(BD Biosciences)内用胶原I(20 μ g)涂层1小时。然后,将HeLa细胞(对照组和KD细胞: 3×10^5)和SiHa细胞(对照组和KD细胞: 5×10^5)细胞接种于小室内,待36小时后测定细胞从一面穿到另一面上的数量并用图表显示。

[0131] 如图5A显示,辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞的迁移比对照组细胞有减少。

[0132] 基质胶侵袭分析是一种为了显示癌组织的细胞迁移到其他活体器官时所需要的渗透至血管或组织的能力的实验。测量那些穿过基质胶而向膜的相反方向迁移的细胞数量。

[0133] 为此,在具有直径为8 μ m的孔的Transwell小室(BD Biosciences)内用基质胶(2mg/mL, BD Biosciences)涂层1小时。然后,将HeLa细胞(对照组和KD细胞: 5×10^5)和SiHa细胞(对照组和KD细胞: 5×10^5)接种于小室板上,待36小时后测定细胞从一面穿到另一面上的数量并用图表显示。

[0134] 如图5A显示,辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞的迁移比对照组细胞有减少。

[0135] 此外,

[0136] 辅肌动蛋白-4可通过Snail增加MMP-9的表达,从而认为从辅肌动蛋白-4表达抑制细胞获得的培养基也能抑制细胞的迁移性,因此通过利用从作为辅肌动蛋白-4表达抑制细胞的SiHa细胞获得的培养基来确认通过Transwell迁移的细胞迁移性。

[0137] 为此,用从辅肌动蛋白-4表达抑制细胞获得的调整培养基(conditioned medium; CM)处理HeLa和SiHa细胞,通过Transwell迁移法测试细胞的移动性(migration)。CM是如下获得的:将抑制辅肌动蛋白-4表达的SiHa细胞接种于6孔板上(每孔 5×10^5 个细胞)后,处理无血清DMEM48小时,然后收集其中的培养基,以 $500 \times g$ 离心分离5分钟,去除细胞并回收培养基。细胞迁移性实验方法与上述迁移性实验相同。

[0138] 此外,为了确认相应的培养基(CM)是否影响细胞的生长,将各 1×10^4 数量的HeLa和SiHa细胞接种于96孔板上,然后用从SiHa-辅肌动蛋白-4表达抑制细胞中获得的CM(对照组CM或ACTN4-KD CM)进行处理,测定根据时间变化(0-48h)的细胞数并用图表展示,分别重复测试3次。每个孔中用100 μ l的MTT溶液(5mg/mL, Sigma)处理6小时后,为了停止反应,添加100mL二甲基亚砷(DMSO)。通过利用ELISA测读仪(Bio-Rad Laboratories, Inc),在590nm波长下进行测量。

[0139] 如图6A所示,表达抑制细胞中获得的培养基的细胞迁移性比对照组培养基有减少。

[0140] 为了确认这种迁移性的减少是否由细胞增殖引起,通过利用相同的培养基进行MTT分析,结果显示,并没有根据各培养基的细胞增殖(图6B)。

[0141] 因此,可确认辅肌动蛋白-4的表达是一种能通过AKT-Snail-MMP-9增加或AKT-snail-上皮钙黏蛋白抑制的机制来增加细胞的EMT和迁移性的癌标记蛋白质。

[0142] 【实施例5】辅肌动蛋白-4的过表达细胞中 β -连环蛋白的表达的研究

[0143] 为了在作为辅肌动蛋白-4的过表达细胞的MDCK细胞中 β -连环蛋白的表达,MDCK细胞中制备辅肌动蛋白-4的过表达稳定化细胞。为此,待转染Flag-ACTN4质粒后,用G-418(400 μ g/mL; Sigma)处理2周,来进行选取。在相应细胞内通过利用RIPA裂解液提取蛋白质后,利用30 μ g蛋白质并通过Western印迹来确认 β -连环蛋白(BD Biosciences)及作为其靶基因的波形蛋白(Santa Cruz)的表达。各抗体是以1:3000的比例进行确认的。

[0144] 让人意外的是,作为辅肌动蛋白-4的过表达细胞的MDCK细胞中, β -连环蛋白的表达有增加,作为 β -连环蛋白的靶蛋白的波形蛋白也有增加(图7A)。

[0145] β -连环蛋白在细胞内的作用是用来诱导细胞的增殖, β -连环蛋白是通过与参与普通细胞间结合的上皮钙黏蛋白相结合而存在。然而,上皮钙黏蛋白的减少会引起 β -连环蛋白的减少。然而,在辅肌动蛋白-4的过表达细胞内,即使上皮钙黏蛋白的表达受到抑制而消失, β -连环蛋白的表达仍有增加。因此,由于认为辅肌动蛋白-4的增加会影响 β -连环蛋白的稳定化,确认了通过利用siRNA来减少上皮钙黏蛋白的表达时根据辅肌动蛋白-4而抑制 β -

连环蛋白的分解。

[0146] 为此,制备了si-上皮钙黏蛋白(寡核苷酸CAGACAAAGACCAGGACUA,Bioneer)。在SiHa细胞内转染si-上皮钙黏蛋白(100nM)和辅肌动蛋白-4(1 μ g)基因,当上皮钙黏蛋白的表达有被抑制时,通过Western印迹来确认 β -连环蛋白和波形蛋白的表达量。各相应抗体是以1:3000的比例进行使用。

[0147] 如图7B中所示,随着上皮钙黏蛋白的减少, β -连环蛋白会随着辅肌动蛋白-4的过表达而受到抑制。

[0148] 此外,为了确认根据辅肌动蛋白-4是否抑制 β -连环蛋白的分解,通过利用作为蛋白质合成抑制剂的放线菌酮(Cyclohexamide,CHX,40 μ g/mL)处理不同时间(0-36h)来确认根据辅肌动蛋白-4过表达所引起的变化。通过利用Western印迹,来确认 β -连环蛋白及其靶蛋白c-myc。各抗体是以1:3000的比例进行使用。

[0149] 其结果,当辅肌动蛋白-4过表达时,与对照组(mock)相比更能延迟分解, β -连环蛋白的靶蛋白c-myc也延迟减少(图7C)。

[0150] 在细胞内, β -连环蛋白的分解是由蛋白酶体所引起的现象。因此,为了确认辅肌动蛋白-4是否通过抑制根据蛋白酶体分解的分解来诱导 β -连环蛋白的稳定化,通过处理作为蛋白酶体抑制剂的ALLN(20 μ M/mL,Calbiocam)6小时,来通过Western印迹确认 β -连环蛋白的分解是否被辅肌动蛋白-4所抑制。

[0151] 此外,在HEK-293T细胞内,表达不同浓度(0,0.05,0.1,0.25及0.5 μ g)的辅肌动蛋白-4,然后测定细胞周期蛋白D1(0.5 μ g,CCND1)的启动子荧光素酶的活性。

[0152] 其结果,当辅肌动蛋白-4过表达时, β -连环蛋白的蛋白酶体分解受到抑制而变得更稳定,从而 β -连环蛋白的量会增加(图8A)。此外, β -连环蛋白的靶蛋白细胞周期蛋白D1(CCND1)的转录活性也根据辅肌动蛋白-4的表达浓度在增加(图8B)。

[0153] 【实施例6】辅肌动蛋白-4表达抑制细胞及过表达细胞的增殖的研究

[0154] β -连环蛋白及其靶蛋白的细胞周期蛋白D1的增加会诱导细胞的增殖,认为辅肌动蛋白-4的表达会影响细胞增殖,通过集落形成分析,来确认HeLa和SiHa的辅肌动蛋白-4表达抑制稳定化细胞(HeLa-KD,SiHa-KD)的增殖。在12孔板上分别接种 3×10^3 个细胞,保持5天后,确认集落形成的数量。此外,通过利用作为辅肌动蛋白-4的过表达稳定化细胞的ME-180-0V#3细胞并通过集落形成实验来确认细胞增殖程度。为此,在12孔板上分别接种 3×10^3 个细胞,保持5天后,确认集落形成的数量。通过利用0.05%结晶紫(crystal violet)对集落进行染色24小时,然后用蒸馏水(DW)进行清洗,而后利用Nikon COOLPIX P300数码相机(12.2Mega-pixel;Nikon Corp.,Tokyo,Japan)进行拍照。

[0155] 其结果,对辅肌动蛋白-4表达抑制细胞HeLa和SiHa而言,集落形成虽有被抑制(图9A和9B),反之在辅肌动蛋白-4有过表达的ME-180细胞中集落形成有增加(图9C)。因此,辅肌动蛋白-4的过表达是通过细胞的增殖会诱导癌的形成。

[0156] 如上所述,在辅肌动蛋白-4表达抑制细胞中,通过集落形成分析来减少细胞的增殖,为了在宫颈癌细胞HeLa和SiHa-辅肌动蛋白-4表达抑制稳定化细胞中确认辅肌动蛋白-4是否影响细胞增殖,而进行MTT分析。为此,在96孔板上分别接种 1×10^4 个的HeLa和SiHa表达抑制细胞,然后根据时间(12-36h)进行测定并用图表展示,各重复实验3次。在每个孔上处理100 μ L MTT溶液(5mg/mL,Sigma)6小时后,为了停止反应,添加100 μ L二甲基亚砜(DMSO)。

通过利用ELISA测读仪 (Bio-Rad Laboratories, Inc), 在590nm波长下进行测量。

[0157] 如图10所示, HeLa和SiHa细胞的生长均比对照组有减少。

[0158] 此外, 通过能确认细胞生长或增殖的实验来进行碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色分析。这是可以确认细胞的分化过程的实验, 是通过区分G0、G1、S、G2/M期的细胞来测定细胞数量的方法。根据如上结果, 实验原理在于, 当细胞的生长有增加, 反之增殖有减少时, S期的细胞数量会有减少。为此, 将HeLa和SiHa的对照组细胞 (对照组) 和表达抑制细胞 (KD) 在100mm盘上接种 2×10^6 个细胞, 然后在 -20°C 的70%乙醇内进行固定处理1小时, 以固定细胞。在固定的细胞内添加包含核糖核酸酶 (RNase) 的 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶 (Sigma) 后, 在 37°C 下孵化30分钟。待经过30分钟后, 通过利用FACSan (BD Biosciences, FACS Calibur) 来确认对相应细胞进行各细胞周期的细胞数 (%)。

[0159] 如图11所示, 对于HeLa和SiHa细胞的辅肌动蛋白-4表达抑制细胞而言, S期的比列有减少。

[0160] 由此判断, 辅肌动蛋白-4起到促进癌诱导细胞的生长的作用。

[0161] 【实施例7】对注射辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞的小鼠中的肿瘤形成的研究

[0162] 如实施例6中所示, 辅肌动蛋白-4的过表达会增强细胞的生长, 从而在小鼠模型中对效果进行实验。

[0163] 为此, 为了确认在实验裸鼠中是否有形成癌组织, 通过利用辅肌动蛋白-4表达抑制细胞和对照组细胞, 将SiHa-对照组或SiHa-KD (0.1mLPBS 中的 3×10^6 个细胞) 细胞进行皮下注射 (S.C.)。使用4周龄雄性BALB/c裸鼠 (Orient Bio Inc.), 每种细胞各使用五只小鼠 ($n=5$)。待注射癌细胞后, 在温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 下将小鼠维持在12小时明/12小时暗的状态。待注射后1-28天内, 通过使用数字卡尺, 每天测定所生成的癌大小, 将体积计算为 $V = 0.5 \times (\text{宽}^2 \times \text{长})$ 。

[0164] 此外, 待注射癌细胞28天后, 将SiHa-对照组和SiHa-表达抑制组的裸鼠中形成的癌大小进行拍照并比较。照片是利用Nikon COOLPIX P300digital camera (12.2Mega-pixel; Nikon Corp., Tokyo, Japan) 进行拍摄的。

[0165] 为了提取上述形成的各组的癌组织以比较, 通过利用Nikon COOLPIX P300digital camera (12.2Mega-pixel; Nikon Corp., Tokyo, Japan) 进行拍照。

[0166] 此外, 测定所形成的癌大小 (数字卡尺, $V = 0.5 \times (\text{宽}^2 \times \text{长})$) 和重量 (Adventurer™, OHAUS Corp. USA), 待注射癌细胞后, 根据日期比较各小鼠组的体重。

[0167] 将抑制辅肌动蛋白-4的表达的SiHa细胞注射到小鼠体内并确认根据时间的肿瘤形成, 其结果, 与对照组细胞相比, 在辅肌动蛋白-4表达抑制细胞中的癌形成有受抑制 (图12A)。此外, 待注射28天后, 在确认小鼠体内生成的肿瘤形成的结果, 与对照组相比, 其大小也较小 (图12B)。

[0168] 此外, 从注射有辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞的小鼠中切除的肿瘤与对照组进行比较时, 肿瘤大小比对照组要小 (图13A)。从小鼠中提取的癌进行比较, 结果显示, 辅肌动蛋白-4的表达抑制细胞的癌的大小和重量有明显减少 (图13B)。然而, 注射有癌细胞的小鼠的体重并没有变化 (图13C)。

[0169] 工业应用性

[0170] 本发明可用于宫颈癌诊断用的套件、预防或治疗剂上。

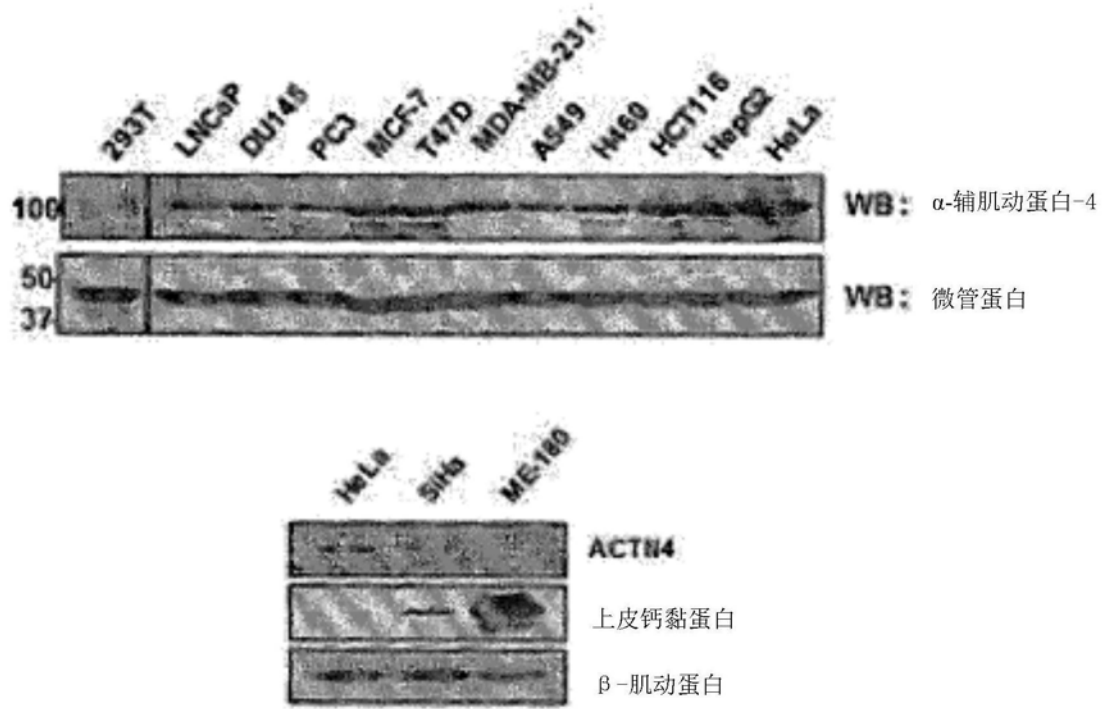


图1

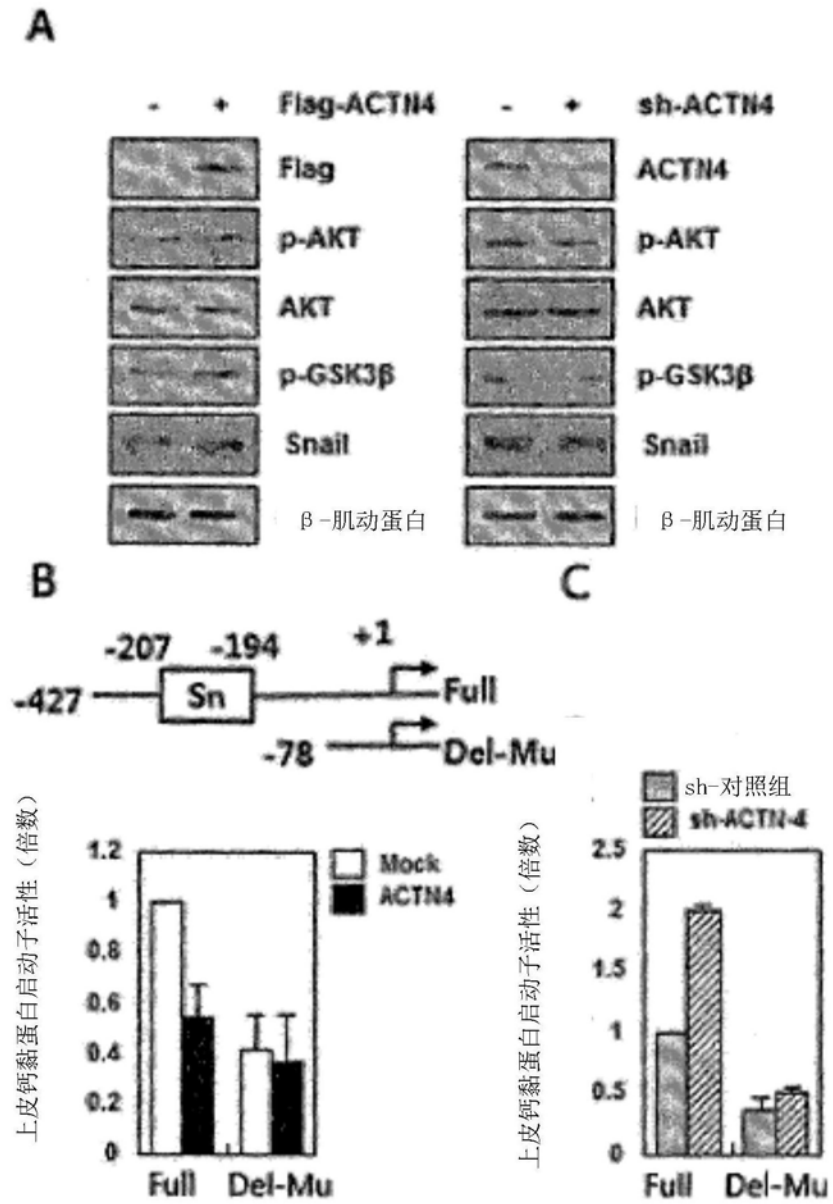


图2

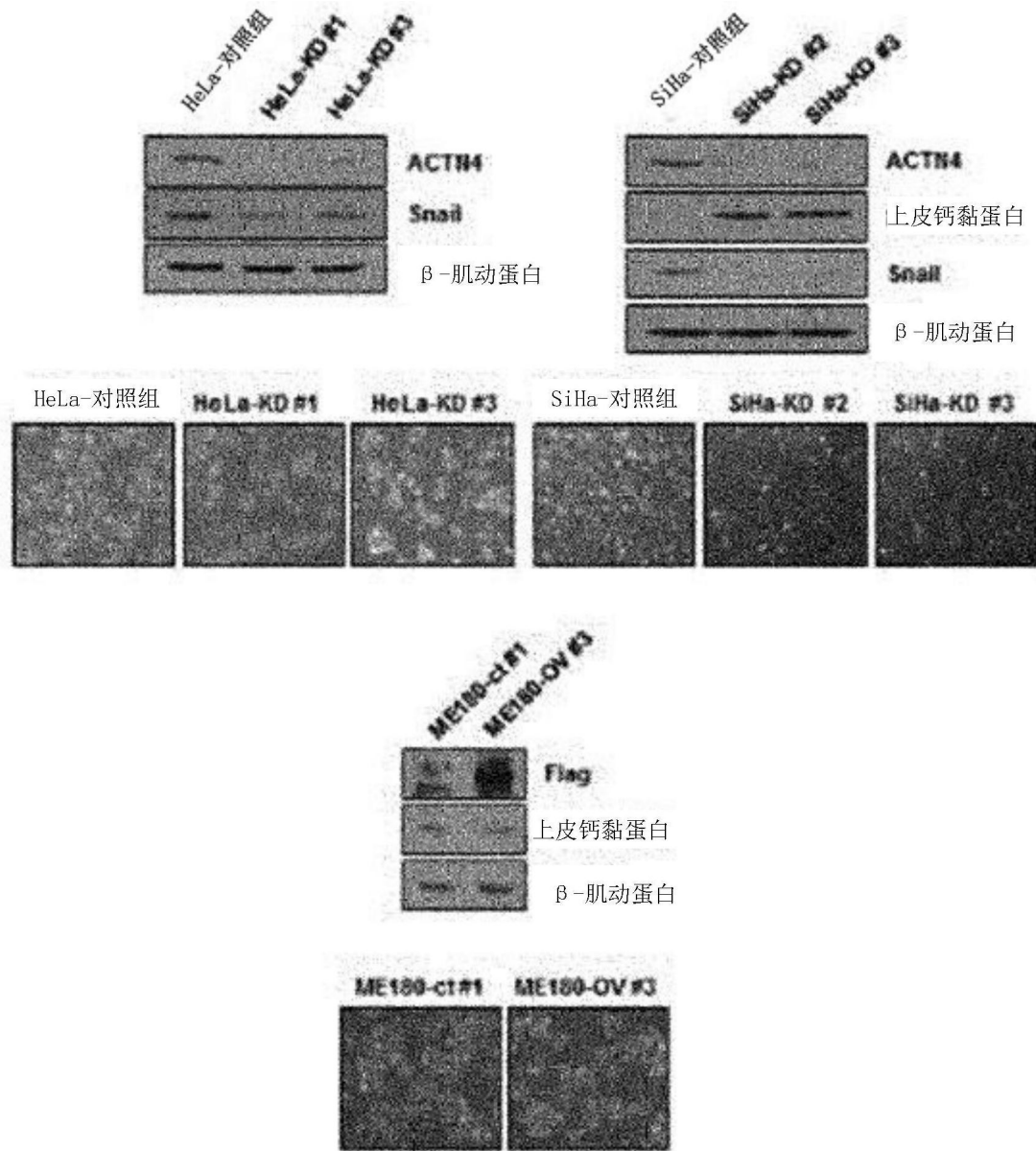


图3

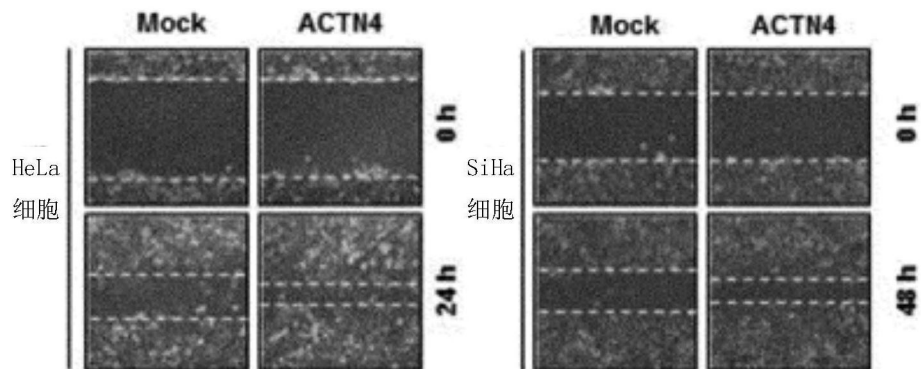


图4

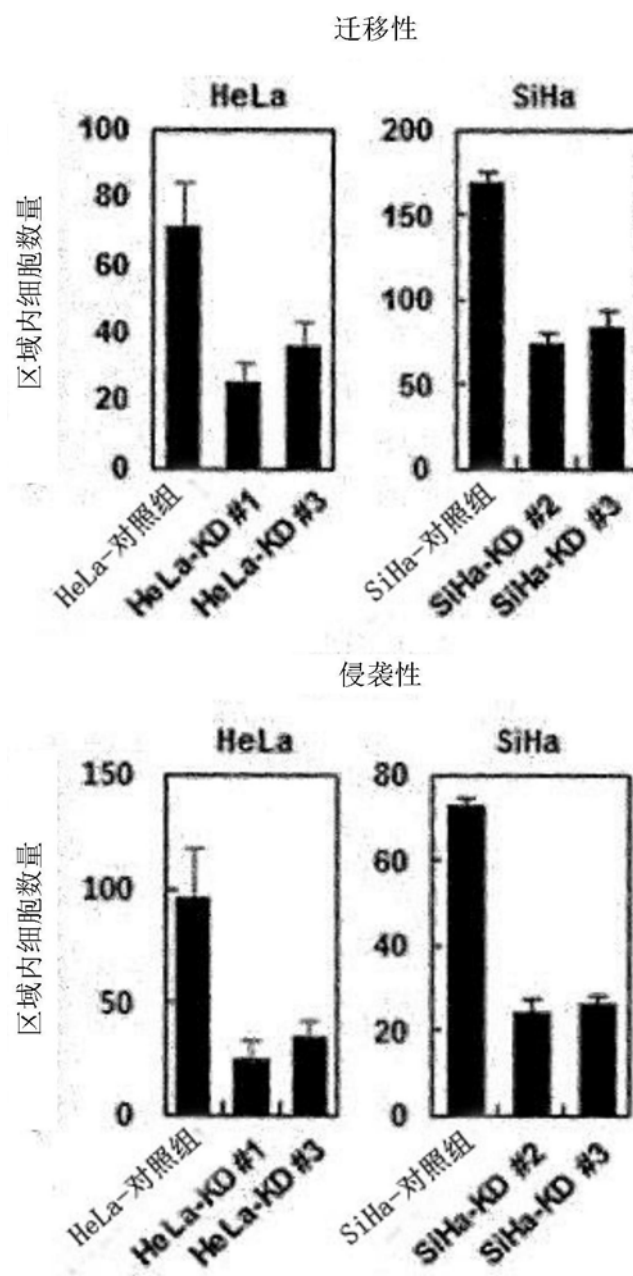


图5

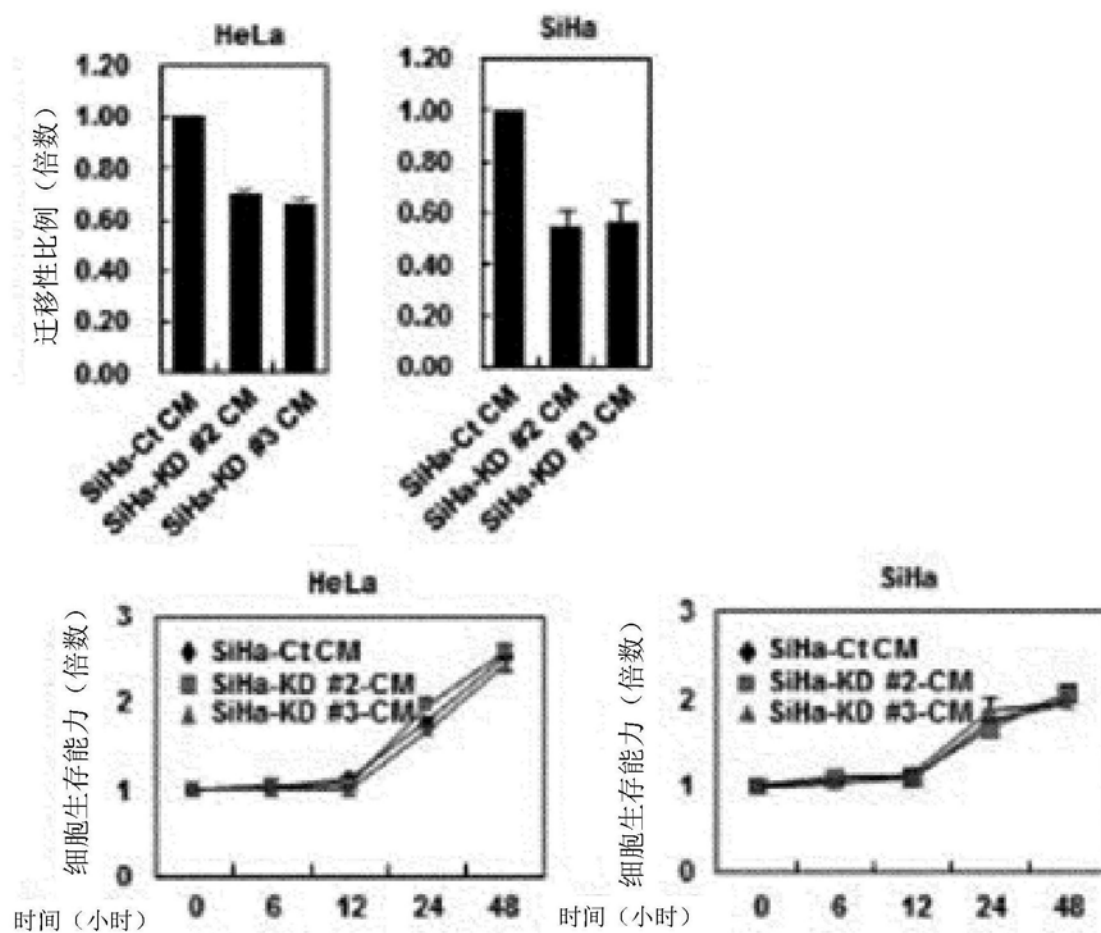


图6

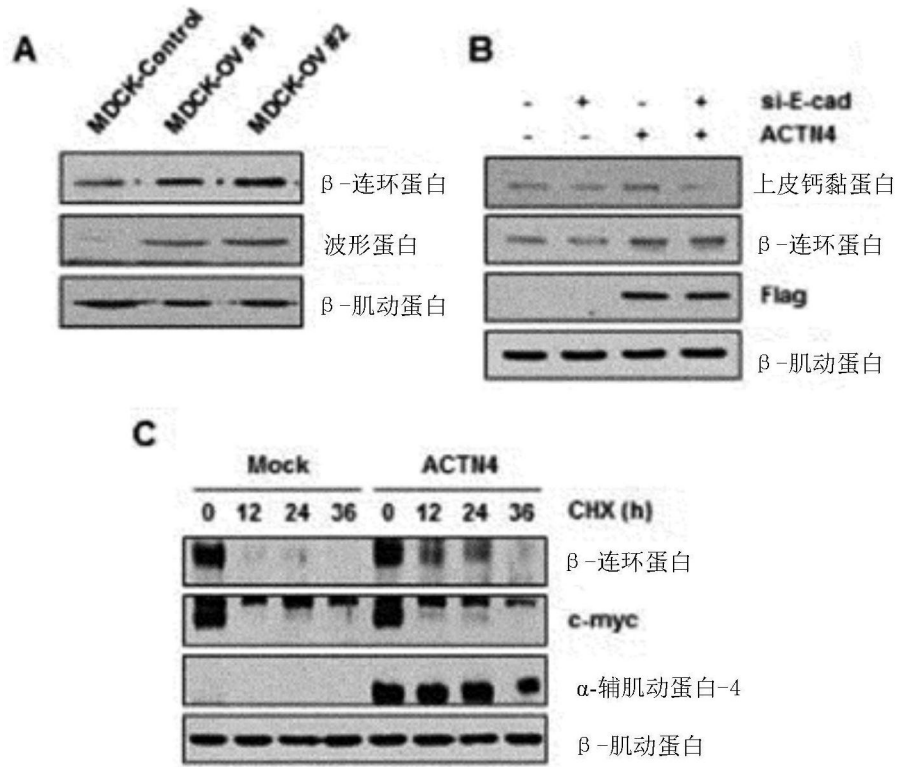


图7

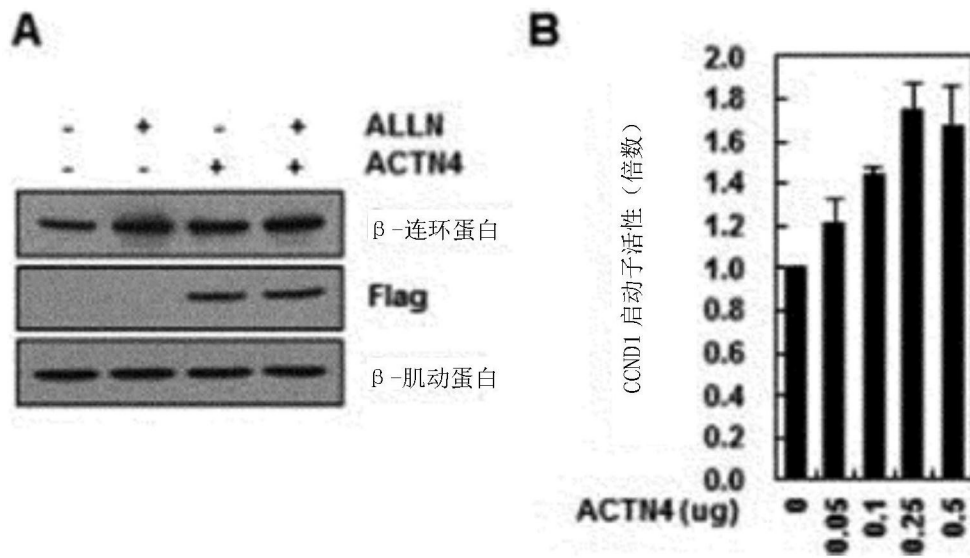


图8

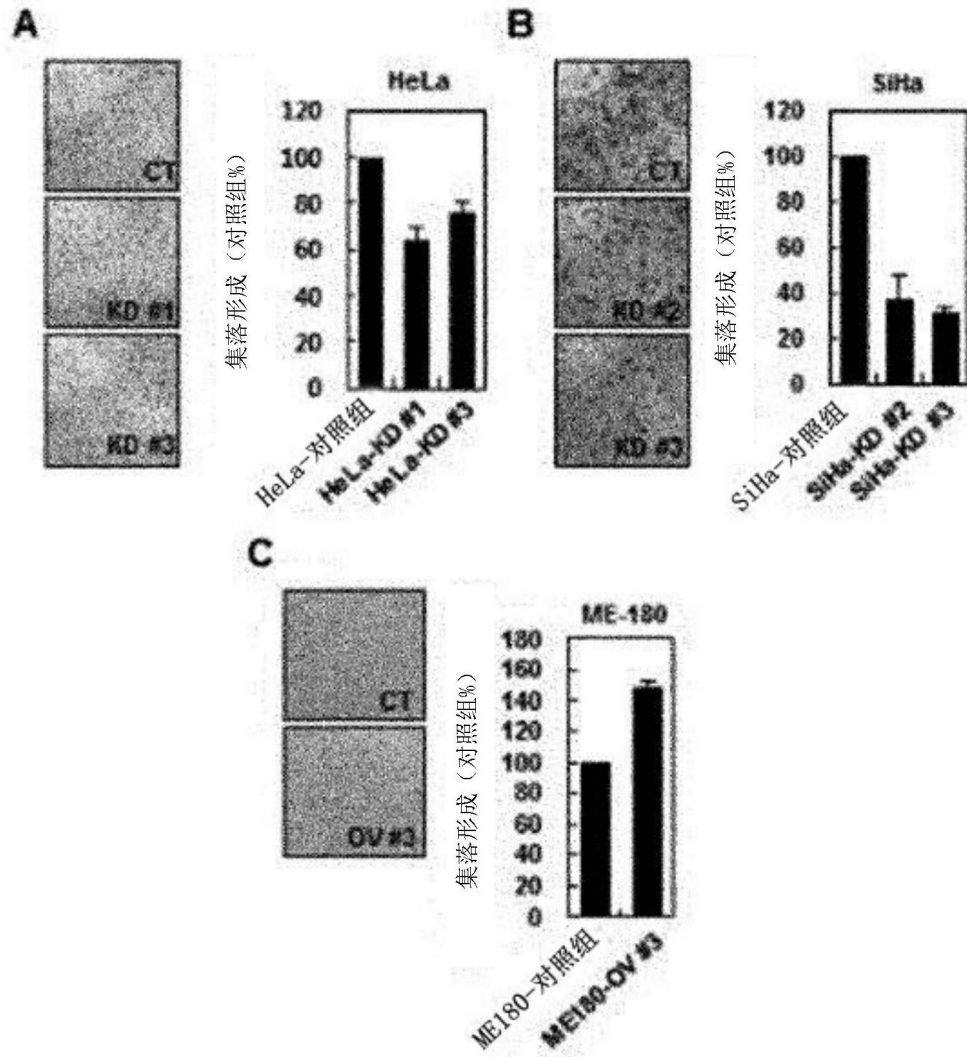


图9

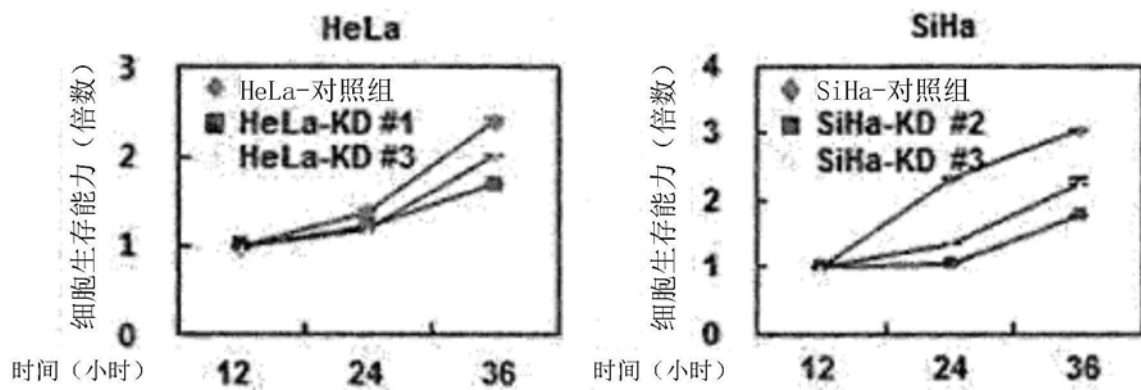


图10

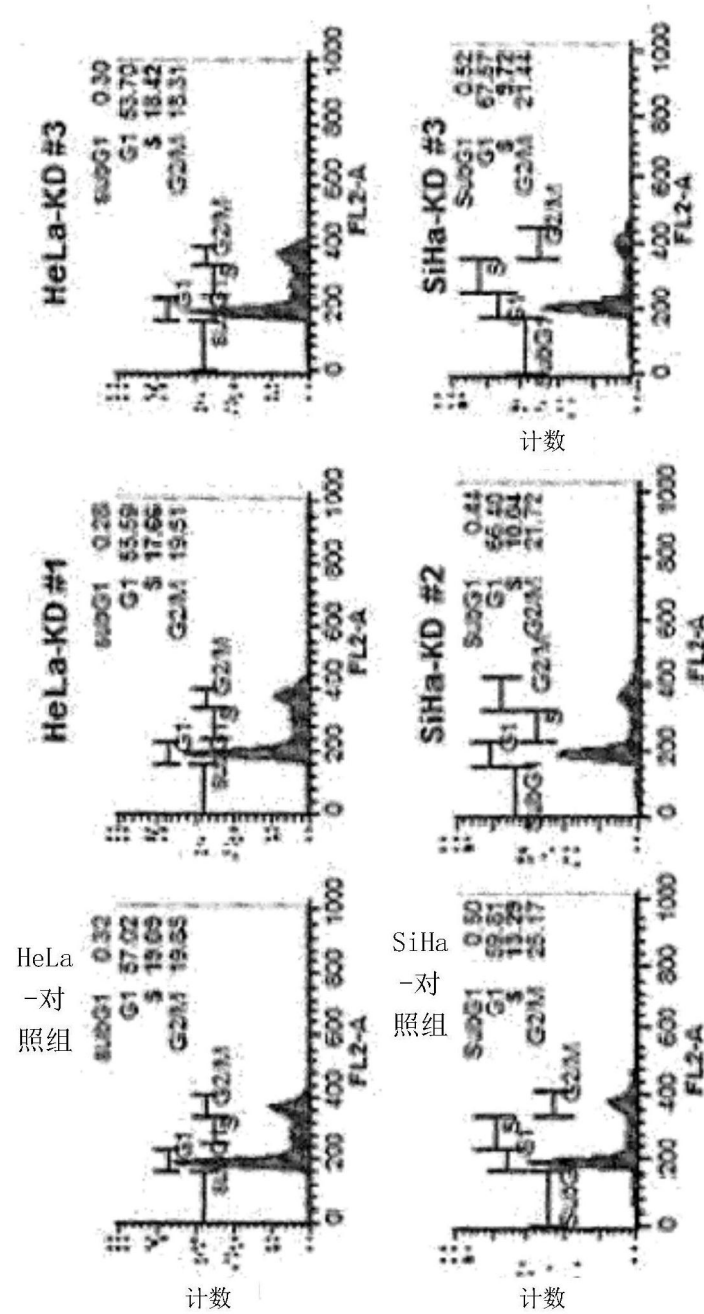


图11

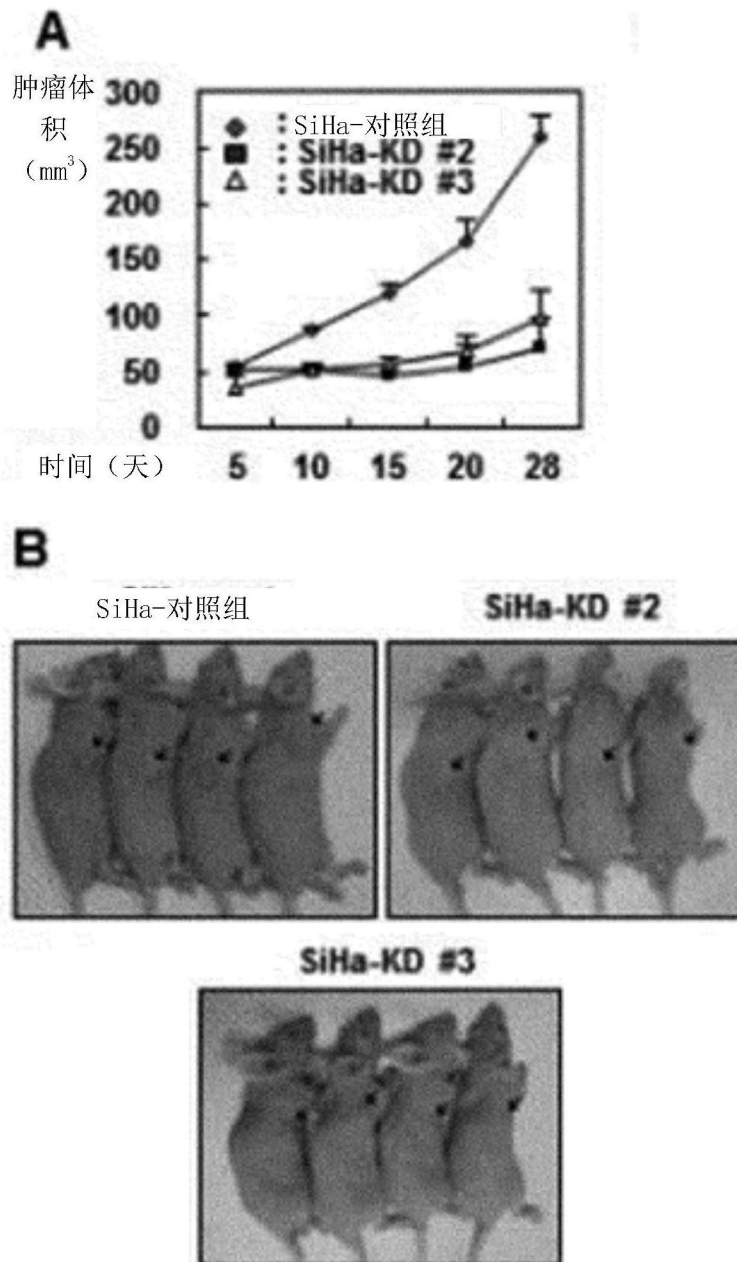


图12

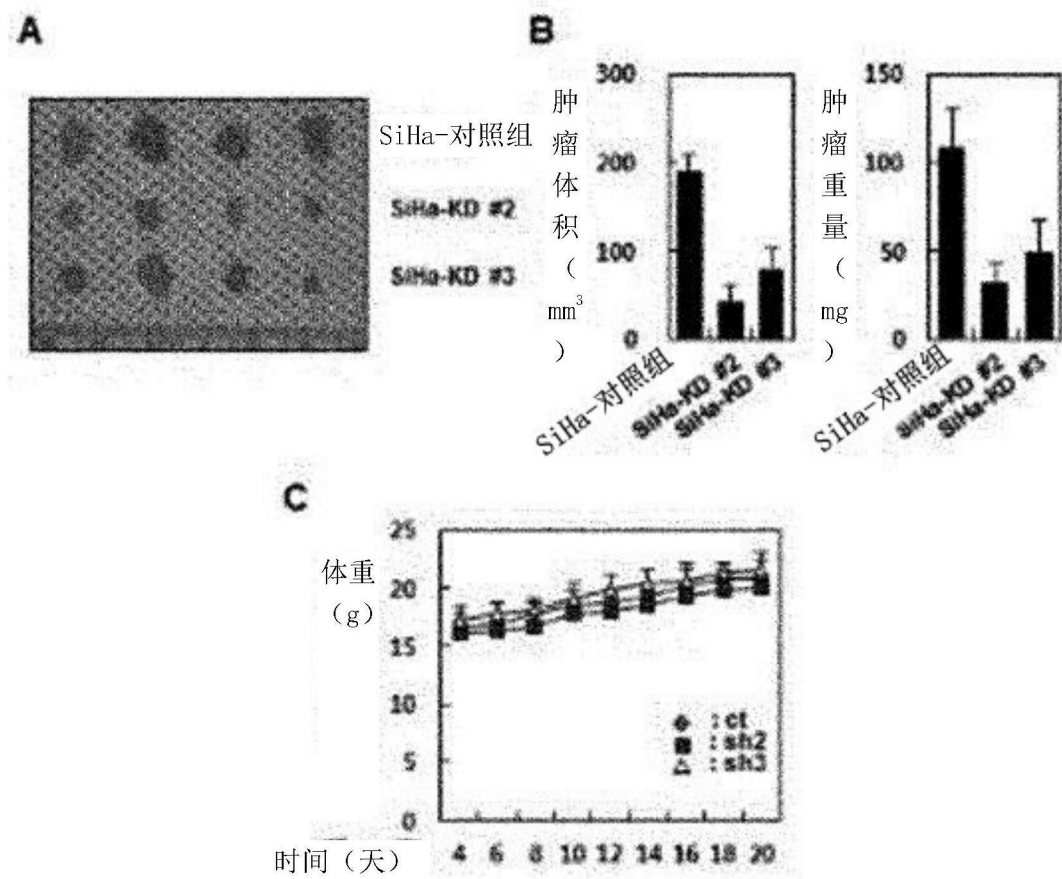


图13