



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109536498 B  
(45) 授权公告日 2021.06.29

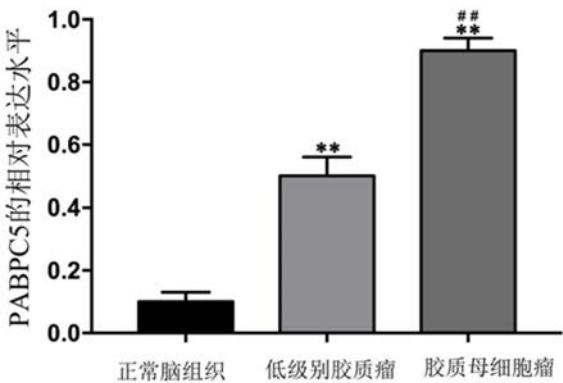
(21) 申请号 201811503752.4  
(22) 申请日 2018.12.10  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 109536498 A  
(43) 申请公布日 2019.03.29  
(73) 专利权人 中国医科大学  
    地址 110122 辽宁省沈阳市沈北新区蒲河  
        路77号  
(72) 发明人 薛一雪 刘云会 刘丽波 刘啸白  
        郑健 蔡恒 李振  
(74) 专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限公司 21107  
    代理人 史力伏  
(51) Int.Cl.  
    C12N 15/113 (2010.01)  
    A61K 31/711 (2006.01)  
    A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
    Lyons PA等.Homo sapiens poly (A)  
    binding protein cytoplasmic 5 (PABPC5),  
    mRNA,NM\_080832.3.《NCBI GenBank》.2018,  
    P Blanco等.A novel poly (A)-binding  
    protein gene (PABPC5) maps to an X-  
    specific subinterval in the Xq21.3/Yp11.2  
    homology block of the human sex  
    chromosomes.《Genomics》.2001,第74卷(第1  
    期),  
    Fangkun Jing等.The PABPC5/HCG15/  
    ZNF331 Feedback Loop Regulates  
    Vasculogenic Mimicry of Glioma via STAU1-  
    Mediated mRNA Decay.《Mol Ther  
    Oncolytics》.2020,第17卷  
    审查员 李峥

权利要求书1页 说明书5页  
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称  
    一种PABPC5基因抑制剂及其用途

(57) 摘要  
    本发明属于生物医药领域,具体涉及一种  
    PABPC5基因抑制剂及其在抗胶质瘤中的用途。所  
    述的PABPC5基因靶向抑制剂的基因序列为5'-  
    GGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3' (SEQ ID No.1),与  
    SEQ ID No.1所示的DNA序列具有90%同源性且具  
    具有相同或相近功能的DNA序列。PABPC5基因抑制  
    剂用于制备抗肿瘤药物中的用途,所述肿瘤为脑  
    胶质瘤。通过其在脑胶质瘤中的应用,可以抑制  
    胶质瘤细胞的迁移和侵袭,诱导胶质瘤细胞凋  
    亡,具有针对性的预防和提高胶质瘤治疗效果的  
    优点。



1. 一种 PABPC5基因的靶向抑制剂在制备抗脑胶质瘤药物中的用途,其特征在于,所述PABPC5基因的靶向抑制剂为能够抑制PABPC5基因表达的shRNA序列,所述shRNA序列针对的靶序列为5'-GGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3' (SEQ ID No.1)。

## 一种PABPC5基因抑制剂及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种PABPC5基因的抑制剂及其在抗胶质瘤中的用途。

### 背景技术

[0002] 胶质母细胞瘤是中枢系统最常见也是恶性度最高的恶性肿瘤。目前治疗手段主要以手术为主,放化疗为辅助治疗。但是,由于胶质母细胞瘤具有高侵袭性生长、血管生成旺盛等生物学特征,手术即使达到影像学和显微镜下全切,复发还是在所难免。经综合治疗后其中位生存期仍不超过15个月,5年生存率不超过15%。近年来,随着基因分子水平研究的不断深入,国内外医学界对胶质瘤的发病机制有了新的认识和理解,越来越多的与胶质瘤发生发展密切相关的特定基因被发现,大量临床研究表明,这些特定基因的表达与化疗药物的有效性密切相关。因此,确定胶质瘤的特异性基因,明确其表达状态,并针对该基因研制和开发药物制剂,能够有效的提高胶质瘤的治疗效率,减少药物的毒副作用,具有非常广阔的应用前景。

[0003] PABPC5 (Poly(A) binding protein cytoplasmic 5),是一种可与poly(A)尾结合的RNA结合蛋白。PABPC5位于Xq21.31,含有2个外显子。有研究报道在成年人的大脑中检测到PABPC5的表达,也有研究表明PABPC5与性染色体的形成密切相关。目前尚未发现PABPC5在恶性脑胶质瘤中的表达并参与胶质瘤细胞生物学行为的调控。前期,应用real-time PCR法检测了PABPC5的表达水平。结果显示,在脑胶质细胞中PABPC5的表达水平显著高于正常星型胶质细胞组,这一结果提示PABPC5可能参与对胶质瘤的发生与发展的功能调控。

[0004] RNA 干扰技术的原理是利用Dicer酶切割RNA分子,形成RNA沉默复合体,靶向结合目标RNA分子进而降解RNA分子的过程。本发明利用RNA干扰技术研制TSNAX基因的抑制剂,在胶质瘤基因治疗领域发挥作用。

[0005] 目前,PABPC5在胶质瘤发生发展中的作用以及相关机制还未见报道,关于PABPC5在胶质瘤基因治疗方面的应用目前还是一片空白。因此,研制一种PABPC5相关的药物成为目前亟待解决的问题。本发明的实施能够实现胶质瘤发病机制理论研究向临床应用的转化,解决胶质瘤复发以及治疗抵抗的问题,有效提高胶质瘤的治疗效果。

### 发明内容

[0006] 鉴于现有技术存在的缺陷,本发明提供一种在脑胶质瘤中高表达的特异性基因抑制剂,通过其在脑胶质瘤中的应用,可以抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭,诱导胶质瘤细胞凋亡,具有针对性的预防和提高胶质瘤治疗效果的优点。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案。

[0008] 一种PABPC5基因的靶向抑制剂,该靶向抑制剂的基因序列为5'-GGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3'(SEQ ID No.1),或者与SEQ ID No.1所示的DNA序列具有90%同

源性且具有相同或相近功能的DNA序列。

[0009] 所述的PABPC5基因的靶向抑制剂能够抑制PABPC5基因表达的shRNA序列,shRNA模板序列包括正义链和反义链,所述正义链和反义链分别为。

[0010] 正义链。

[0011] 5'-CACCGGAACATTCTGTCCTGCAAAGTTCAAGAGACTTTGCAGGACAGAATGTTTCCTTTTTTG-3'  
(SEQ ID No.2)。

[0012] 反义链。

[0013] 5'-GATCCAAAAAAGGAACATTCTGTCCTGCAAAGTCTCTTGAAGGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3'  
(SEQ ID No.3)。

[0014] 一种转录上述的shRNA 的转录产物,序列为。

[0015] 5'-GGAACATTCTGTCCTGCAAAGTTCAAGAGAGGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3' (SEQ ID No.4)。

[0016] 一种PABPC5基因的抑制剂用于制备抗肿瘤药物中的用途,所述肿瘤为脑胶质瘤。

[0017] 所述抗肿瘤药物为含有治疗量的PABPC5基因的抑制剂和药学上的载体或者赋形剂组成的药物组合物。

[0018] 所述抗肿瘤药物为药学上可接受的剂型,优选注射剂。

[0019] 与现有技术相比,本发明的有益效果。

[0020] 1)RNA结合蛋白能够维持肿瘤干细胞的干性,通过增强肿瘤相关RNA的稳定性参与肿瘤的发生、发展、转移和血管生成,从而导致化疗药物出现耐药。因此RNA结合蛋白能够通过多种机制发挥癌基因的作用,促进肿瘤发生发展,抑制治疗效果。PABPC5是脑胶质瘤特异性高表达的RNA结合蛋白,能够促进肿瘤的发生发展和诱发耐药。主要针对脑胶质瘤特异性高表达的PABPC5基因,达到靶向治疗,减少副作用。

[0021] 2)本发明抑制剂的特征为任何药物治疗学上可接受的的剂型,具有极大的临床应用价值。

[0022] 3)研发针对肿瘤细胞特异性高表达分子的抑制剂,是目前肿瘤治疗药物研发的主要目标,但由于药物研发周期长和治疗效果差等原因,制约了肿瘤靶向药物的发展。RNA 干扰技术具有安全可靠,通过细胞外和细胞内多种途径递送相关肿瘤治疗药物等特点,为肿瘤的治疗提供了相对快速且具有革命性的肿瘤药物研发途径。

[0023] 4)本发明应用RNA 干扰技术制备RNA结合蛋白PABPC5基因抑制剂,具有靶向治疗、安全有效、生产相对快速和长期有效的特点,填补了抗肿瘤药物研发中的不足。

## 附图说明

[0024] 图1是 Real-time PCR方法检测PABPC5在正常脑组织标本和胶质瘤组织标本中的表达情况。与正常脑组织标本相比,PABPC5在胶质瘤组织中表达显著增高,差异有有统计学意义( $n=5$ ,  $^{**}P<0.01$  vs. 正常脑组织);与低级别胶质瘤标本相比,PABPC5在胶质母细胞瘤组织中表达显著增高,差异有有统计学意义。 $(n=5, ^{##}P<0.01$  vs. 低级别胶质瘤)。

[0025] 图2是Real-time PCR方法检测应用PABPC5基因抑制剂后,PABPC5在人脑胶质瘤U87和U251细胞中的表达情况。与空白对照组相比,U87和U251细胞中,PABPC5在抑制剂组中表达显著下调,差异有统计学意义。 $(n=3, ^{**}P<0.01$  vs. 空白对照组)。

[0026] 图3是Transwell检测应用PABPC5基因抑制剂后,人脑胶质瘤U87、U251细胞迁移能力的变化。(n=3,\*\* $P<0.01$  vs.空白对照组)。

[0027] 图4是 Transwell检测应用PABPC5基因抑制剂后,人脑胶质瘤U87、U251细胞侵袭能力的变化。(n=3,\*\* $P<0.01$  vs.空白对照组)。

[0028] 图5是流式细胞仪检测应用PABPC5基因抑制剂后,人脑胶质瘤U87细胞凋亡能力的变化。

### 具体实施方式

[0029] 下面结合附图和实施例详细描述本发明抗肿瘤物质的制备方法。

[0030] 1.实时定量PCR检测PABPC5的表达。

[0031] 1.1 Trizol法提取组织和细胞中的总RNA。

[0032] 1.1.1 用冷PBS洗涤收集的细胞(液氮冻存组织应用组织匀浆机以5000rpm在0℃粉碎30秒),加入1 ml Trizol试剂吹打数次,镜下观察细胞成油滴状(充分裂解),后移入1.5 ml EP管中,静置5 分钟,使其充分裂解。

[0033] 1.1.2向样品中加入0.2 ml氯仿,手动剧烈震荡室温下静置3分钟。

[0034] 1.1.3于4℃ 12000g离心15分钟,取上层水相到新的EP管中,再加入0.5 ml异丙醇,上下颠倒混匀,室温下静置10分钟。

[0035] 1.1.4 4℃ 12000g离心15分钟后弃上清,加入1 ml 75%乙醇。

[0036] 1.1.5 4℃ 7500g离心5分钟,室温干燥15分钟后加入40  $\mu$ l DEPC水,样品可冻存于-80℃冰箱。

[0037] 1.2 一步染料法qRT-PCR检测PABPC5的表达。

[0038] 应用Trizol提取总RNA:将 Trizol 直接加在细胞上吹打。室温放置5分钟后,向管中加入 0.2 ml 氯仿,剧烈震荡15秒,室温下放置2-3分钟。4℃,12000g离心15分钟,取上层水相至另一新管中。加入0.5 ml异丙醇震荡,室温条件下放置5分钟。4℃,12000g离心10分钟,弃上清,管底白色沉淀以1 ml 75%乙醇洗涤,漩涡器振荡。4℃,7500g离心5分钟,弃上清液,倒置 EP 管于干净滤纸上,至可见乙醇完全挥发。加入适量 DEPC 水,稍加吹打至 RNA 完全溶解。总RNA用Nanodrop分光光度计测定RNA浓度,以及OD260/OD280比值,验证纯度(RNA纯度验证标准:当OD260/OD280在1.7-2.0,说明RNA纯度很高,当OD260/OD280<1.7时,表明有蛋白质或酚污染;当OD260/OD280>2.0时,表明可能有异硫氰酸残存)。

[0039] 应用One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa, 中国),根据说明书的操作进行扩增。主要步骤包括,将所合成的目的基因和 GAPDH 上下游引物用 0.1% DEPC 水溶解后,配置RT-PCR 反应体系 (20 $\mu$ l):One Step SYBR<sup>®</sup> buffer,10 $\mu$ l;TaKaRa Ex Taq HS Mix,1.2 $\mu$ l ;PrimeScript PLUS TRase Mix, 0.4 $\mu$ l ;PCR上游引物,0.8 $\mu$ l ;PCR下游引物,0.8 $\mu$ l ;ROX Reference Dye,0.4 $\mu$ l ;总RNA,2 $\mu$ l ;RNase Free dH<sub>2</sub>O,4.4 $\mu$ l 。将上述各成分混匀标注号码后放入基因扩增仪内。扩增的条件与参数为:42℃,5 min,95℃,10s; 95℃ 5s,60℃ 34s 共 40 个循环。测定CT值,以GAPDH为内参照,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示PABPC5的相对表达量。

[0040] 检测PABPC5基因在正常星形胶质细胞和胶质瘤细胞中的表达水平,如图1所示,与正常脑组织标本相比,PABPC5在胶质母细胞瘤组织中表达显著增高,而且表达水平随肿瘤

级别的升高而升高。

[0041] 2. PABPC5基因抑制剂的制备和应用。

[0042] 设计PABPC5基因的干扰序列,选定靶向人PABPC5基因并特异性抑制PABPC5 基因表达的靶基因序列如下。

[0043] 5'-GGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3' (SEQ ID No.1)。

[0044] 在NCBI 的同原序列比对分析nucleotide blast 中输入GGAACATTCTGTCCTGCAAAG 序列进行比对分析,结果表明该序列和人的其它mRNA 基因没有高度同源性,可作特异性干扰PABPC5基因的特异性序列。

[0045] 针对以上靶序列设计靶向人PABPC5基因而抑制PABPC5基因表达的shRNA序列如下,包括正义链和反义链,此shRNA 序列为。

[0046] 正义链。

[0047] 5'-CACCGGAACATTCTGTCCTGCAAAGTTCAAGAGACTTTGCAGGACAGAATGTTCTTTTTTG-3' (SEQ ID No.2)。

[0048] 反义链。

[0049] 5'-GATCCAAAAAAGGAACATTCTGTCCTGCAAAGTCTCTTGAAGGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3' (SEQ ID No.3)。

[0050] 转录上述的shRNA 的转录产物,序列为。

[0051] 5'-GGAACATTCTGTCCTGCAAAGTTCAAGAGAGGAACATTCTGTCCTGCAAAG-3' (SEQ ID No.4)。

[0052] 将以上序列信息设计并合成相应质粒,作为PABPC5基因抑制剂。PABPC5基因抑制剂转染:sh-NC、sh-PABPC5的质粒U6/GFP/Neo,使PABPC5表达沉默,不含有PABPC5序列或shRNA的空质粒为实验阴性对照;应用24孔培养板培养胶质瘤细胞,当细胞生长达到80%左右时进行转染;配置转染需要的质粒、Opti-MEM® I和LTX and Plus reagent (Life Technologies)转染试剂。A管:一个孔按照1μg质粒DNA溶解于50 μl Opti-MEM® I+1μl p3000,放置5 min,B管:孔按照1μl LTX and Plus溶解于50 μl Opti-MEM® I中;将A、B两管混匀后静置5 min;吸出培养液,每孔加入转染混合液100 μL,再加入EBM-2培养液400 μL;48 h后用含有浓度为0.4 mg/mL抗生素G418的培养基进行筛选,不断增加G418的浓度,大约4周后得到能够稳定沉默PABPC5的细胞系。在后续实验中分为3组,分别是:正常组,转染PABPC5沉默空质粒的空白对照组,转染PABPC5沉默质粒的抑制剂组。

[0053] 检测应用PABPC5基因抑制剂后,U87和U251胶质瘤细胞中PABPC5的表达情况。结果如图2所示,与空白对照组相比,PABPC5在抑制剂组中表达显著下调。

[0054] 3. 细胞Transwell迁移和侵袭实验。

[0055] 1) 在24孔细胞培养板内每孔加入500μl含有10%血清的DMEM高糖培养液,孔内放置孔径为8μm的transwell小室。

[0056] 2) 细胞计数后,将不同组细胞用不含有血清的DMEM高糖培养液将其吹成细胞悬液,分别均匀地铺在上室里面,每孔小室里加入100μl细胞悬液大约含10000个细胞。放入37℃恒温培养箱中培养24小时。

[0057] 3) 24 小时后取出小室,用棉棒将上室内面没有迁移过去的细胞擦净,按照甲醇:冰乙酸 = 3:1的比例配置固定液。

[0058] 4) 将小室放入固定液中,使小室底面的细胞固定30分钟。

[0059] 5) 用PBS清洗小室后晾干。配制吉姆萨染液,染液:工作液1:9。将吉姆萨染液滴与小室底面,染色1小时。

[0060] 6) 用PBS清洗两次,在倒置400×显微镜下观察细胞的迁移情况,随机取每组细胞的5个视野进行细胞个数的统计,以此代表细胞的迁移能力。

[0061] 4. 细胞Transwell侵袭实验。

[0062] 1) 在小室内面均匀铺上50μl浓度为500ng/μl的基质胶Matrigel,放入37℃恒温箱中4小时使其凝固。

[0063] 2) 然后再铺上细胞悬液,方法同迁移实验。

[0064] 实验结果如图3和图4所示,应用PABPC5基因抑制剂后,与空白对照组相比,抑制剂的胶质瘤U87、U251细胞迁移和侵袭能力均显著降低。

[0065] 5. 细胞凋亡实验。

[0066] 1) 用预冷的PBS清洗细胞两次。用不含EDTA的胰酶消化,将细胞轻轻吹打成细胞悬液后转移至1.5ml离心管中,1000rpm离心3分钟收集细胞。

[0067] 2) 用PBS继续清洗,1000rpm离心3分钟,离心后倒掉上清,重复两次。

[0068] 3) 将工作液10×binding buffer稀释十倍。每管加入100μl Binding Buffer,悬浮细胞。

[0069] 4) 每管相继加入5μl Annexin V-PI和5μl FITC混匀,室温避光15分钟。

[0070] 5) 上机前向每管加入400μl 1×binding buffer,吹打均匀后,上流式细胞仪(FACScan, BD公司,美国)检测细胞凋亡的变化。

[0071] 实验结果如图5所示,与空白对照组相比,PABPC5基因抑制剂能够显著诱导胶质瘤U87细胞的凋亡。

[0001] SEQUENCE LISTING  
[0002] <110> 中国医科大学  
[0003] <120> 一种PABPC5基因抑制剂及其用途  
[0004] <130> 4  
[0005] <160> 4  
[0006] <170> PatentIn version 3.3  
[0007] <210> 1  
[0008] <211> 21  
[0009] <212> DNA  
[0010] <213> 人工序列  
[0011] <400> 1  
[0012] ggaacattct gtcttgcaaa g 21  
[0013] <210> 2  
[0014] <211> 62  
[0015] <212> DNA  
[0016] <213> 人工序列  
[0017] <400> 2  
[0018] caccggaaca ttctgtcctg caaagttcaa gagactttgc aggacagaat gttccttttt 60  
[0019] tg 62  
[0020] <210> 3  
[0021] <211> 62  
[0022] <212> DNA  
[0023] <213> 人工序列  
[0024] <400> 3  
[0025] gatccaaaa aggaacattc tgtcctgcaa agtctcttga aggaacattc tgtcctgcaa 60  
[0026] ag 62  
[0027] <210> 4  
[0028] <211> 53  
[0029] <212> DNA  
[0030] <213> 人工序列  
[0031] <400> 4  
[0032] ggaacattct gtcttgcaaa gttcaagaga ggaacattct gtcttgcaaa g 51

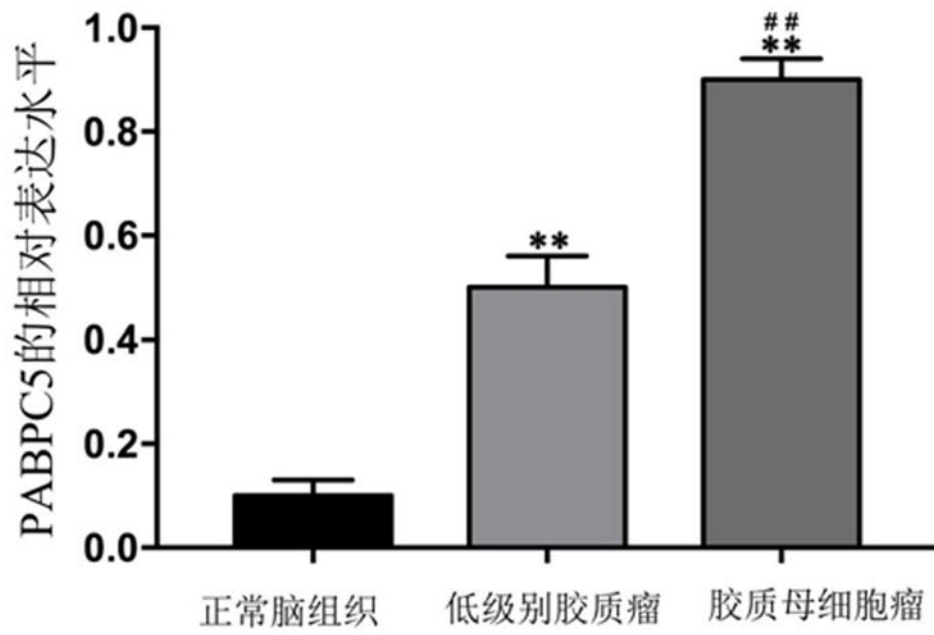


图1

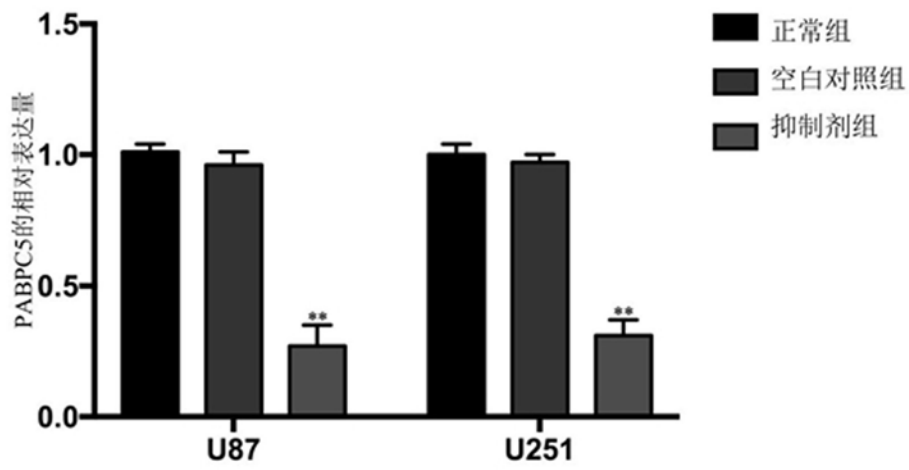


图2

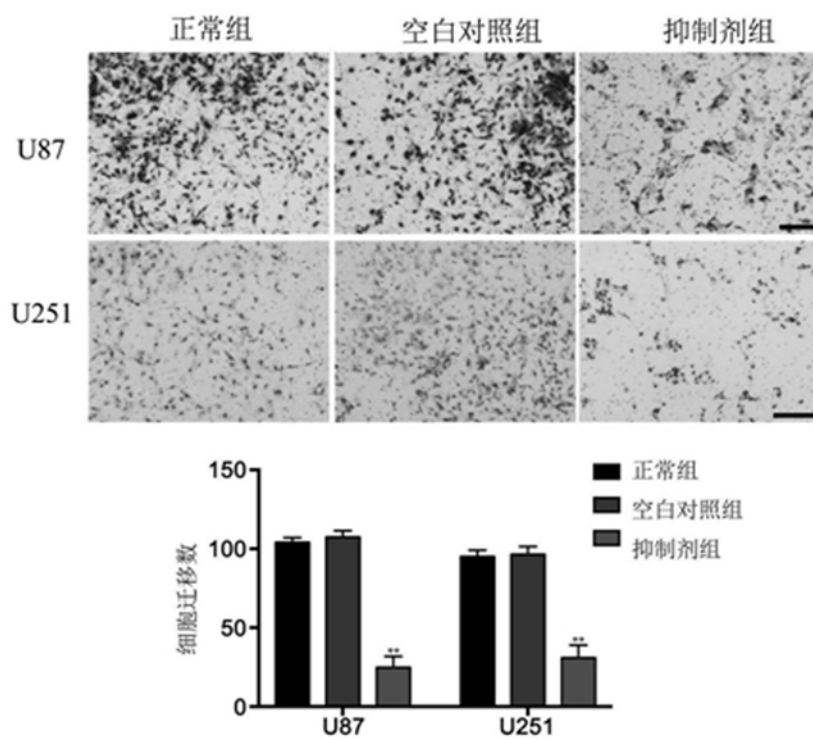


图3

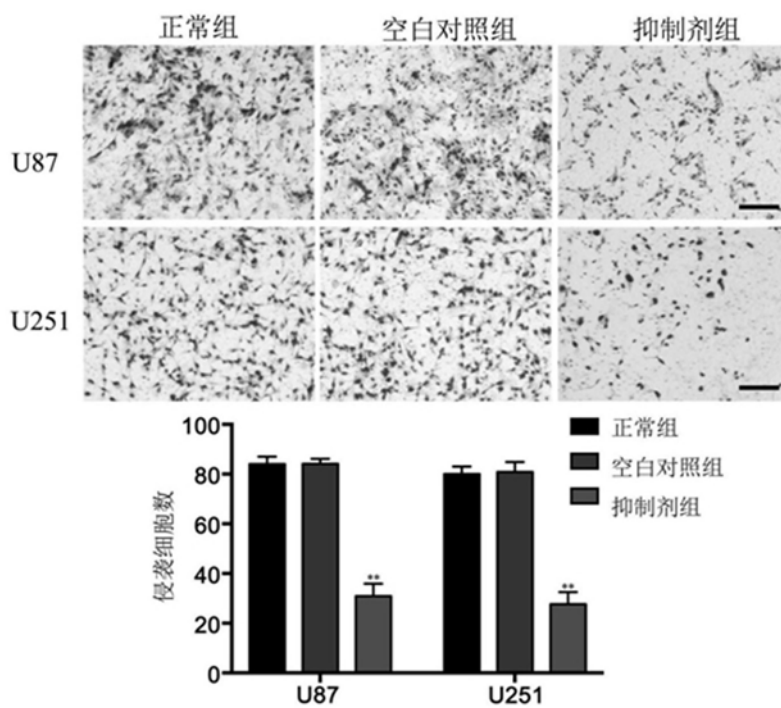


图4

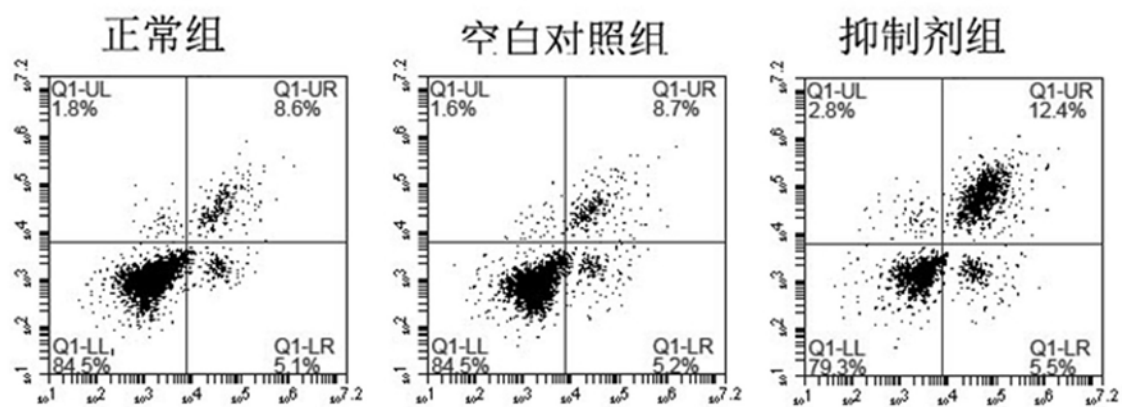


图5