



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116036275 A

(43) 申请公布日 2023.05.02

(21) 申请号 202111263968.X

(22) 申请日 2021.10.28

(71) 申请人 北京大学

地址 100191 北京市海淀区学院路38号

(72) 发明人 王韵 孔金阁 梅竹 张君

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

专利代理师 闫书宁

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

序列表1页 附图6页

(54) 发明名称

一种用于预防和/或治疗胶质瘤形成的产品

(57) 摘要

本发明公开了抑制CDYL活性和/或表达量的物质在制备预防和治疗胶质瘤的产品中的应用。实验证明,细胞水平上,敲低CDYL可抑制U87MG细胞增殖能力、迁移能力以及侵袭能力;在动物水平上,敲低U87MG细胞中CDYL显著抑制U87MG皮下移植或原位胶质瘤的生长;进一步通过瘤体内注射AAV-shCDYL干扰U87MG移植瘤中CDYL的表达,显著抑制移植瘤生长。本发明为胶质瘤的临床治疗提供了潜在新靶点,也为胶质瘤临床治疗中的联合治疗方案以及免疫治疗方法提供了新思路。本发明具有潜在的临床价值。

1. 抑制CDYL活性和/或表达量的物质在制备产品中的应用;所述产品的功能为如下C1)至C6)中的至少一种:C1) 预防胶质瘤;C2) 治疗胶质瘤;C3) 抑制胶质瘤的生长;C4) 抑制胶质瘤细胞的增殖;C5) 抑制胶质瘤细胞的迁移;C6) 降低胶质瘤细胞的侵袭能力。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于:所述抑制CDYL活性和/或表达量的物质为z1)或z2)或z3)或z4):

z1) 核酸分子甲;所述核酸分子甲的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

z2) 核酸分子乙;所述核酸分子乙的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示;

z3) 以所述核酸分子甲为靶点,由shRNA表达系统合成的shRNA;

z4) 以所述核酸分子乙为靶点,由shRNA表达系统合成的shRNA。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于:所述shRNA表达系统为慢病毒表达系统或腺相关病毒表达系统。

4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于:所述胶质瘤为星形胶质细胞瘤。

5. CDYL作为药物靶点在制备产品中的应用;所述产品的功能为如下C1)至C6)中的至少一种:C1) 预防胶质瘤;C2) 治疗胶质瘤;C3) 抑制胶质瘤的生长;C4) 抑制胶质瘤细胞的增殖;C5) 抑制胶质瘤细胞的迁移;C6) 降低胶质瘤细胞的侵袭能力。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于:所述CDYL作为药物靶点为核酸分子甲或核酸分子乙为靶点;

所述核酸分子甲的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

所述核酸分子乙的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

7. 一种产品,其含有权利要求1至3中任一所述抑制CDYL活性和/或表达量的物质;所述产品的功能为如下C1)至C6)中的至少一种:C1) 预防胶质瘤;C2) 治疗胶质瘤;C3) 抑制胶质瘤的生长;C4) 抑制胶质瘤细胞的增殖;C5) 抑制胶质瘤细胞的迁移;C6) 降低胶质瘤细胞的侵袭能力。

8. 如权利要求5所述的应用或权利要求7所述的产品,其特征在于:所述胶质瘤为星形胶质细胞瘤。

9. 权利要求1至3中任一所述抑制CDYL活性和/或表达量的物质。

10. 如权利要求1所述的应用、权利要求5所述的应用或权利要求7所述的产品,其特征在于:所述胶质瘤为皮下移植或原位胶质瘤。

一种用于预防和/或治疗胶质瘤形成的产品

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,具体涉及一种用于预防和/或治疗胶质瘤形成的产品。

背景技术

[0002] 胶质瘤(也被称为脑胶质瘤)是一种最常见的原发性恶性中枢神经系统肿瘤。胶质瘤呈浸润性生长,患者的复发率和死亡率较高。传统临床治疗方式以手术为主,放化疗为辅。近几年出现一些新的治疗手段,比如分子治疗和免疫治疗等,但是并未明显延长患者的生存期,而且个体间差异性大,有的甚至出现耐药性,其主要原因是胶质瘤的发病机制远未阐明,因此,寻找肿瘤发生发展中的关键因子或节点,为临床治疗提供新靶点和新措施是该领域一直努力的方向。近年来的研究发现,后天环境因素导致的表观遗传调控因素改变在胶质瘤的发生发展中更为常见,故研究胶质瘤的表观遗传调节机制具有重要意义。

[0003] 表观遗传因子CDYL(Chromo-domain Y-like)(Gene ID为9425)是一个重要的转录抑制因子,1999年首先被David C Page实验室克隆。从结构上看,CDYL主要包含N端的染色质结构域,负责与染色质结合,该结构域能够与PRC2(Polycomb repressive complex 2)的催化亚基EZH2区域结合,参与PRC2介导的组蛋白H3K27位点的三甲基化(H3K27me3)修饰,并与H3K27me3结合,形成异染色质,发挥转录抑制作用。其C端为辅酶A结构域,能够与C-端结合蛋白(C terminal binding protein,CtBP)以及组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase,HDAC)1/2结合,形成转录抑制复合物。此外,尚永丰课题组报道CDYL可通过酶活性作用将巴豆酰辅酶A转变成 β -羟丁酰辅酶A,负性调控组蛋白的巴豆酰化,进一步调控下游靶基因的转录,最终参与调控精子生成过程。CDYL不仅在睾丸中表达丰富,在其他组织比如大脑、淋巴结、肝脏和肾脏中也有丰富表达。近年来,CDYL在中枢神经系统中的功能越来越受到重视。CDYL可通过与PRC2的催化亚基EZH2(Enhancer of zeste homolog 2)结合,抑制脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor,BDNF)的转录,限制神经元树突的复杂程度,调节树突发育;另外,CDYL可以促进神经元的迁移。敲除CDYL的小鼠,神经元迁移能力减弱、皮层神经元兴奋性增高、癫痫的易感性增加。CDYL在胶质瘤发生发展中的作用及其机制尚不清楚。

发明内容

[0004] 本发明的目的是预防和/或治疗胶质瘤。

[0005] 本发明首先保护抑制CDYL(Gene ID为9425)活性和/或表达量的物质在制备产品中的应用。所述产品的功能可为如下C1)至C6)中的至少一种:C1)预防胶质瘤;C2)治疗胶质瘤;C3)抑制胶质瘤的生长;C4)抑制胶质瘤细胞的增殖;C5)抑制胶质瘤细胞的迁移;C6)降低胶质瘤细胞的侵袭能力。

[0006] 上述应用中,所述抑制CDYL活性和/或表达量的物质可为z1)或z2)或z3)或z4):

[0007] z1)核酸分子甲;所述核酸分子甲的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0008] z2)核酸分子乙;所述核酸分子乙的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示;

- [0009] z3) 以所述核酸分子甲为靶点,由shRNA表达系统合成的shRNA;
- [0010] z4) 以所述核酸分子乙为靶点,由shRNA表达系统合成的shRNA。
- [0011] 所述shRNA表达系统可为慢病毒表达系统或腺相关病毒表达系统。
- [0012] 所述z3) 具体可为实施例提及的CDYL shRNA 2#,即以核酸分子甲为靶点,以LV16 (U6/Luciferase17&Puro) 为载体,由上海吉玛制药技术有限公司构建的重组慢病毒。
- [0013] 所述z3) 具体可为实施例提及的AAV-shCDYL,即以核酸分子甲为靶点,以pAAV-Luciferase-shRNA为载体,由北京利科丽生物科技有限公司构建的重组腺相关病毒。
- [0014] 所述z4) 具体可为实施例提及的CDYL shRNA 3#,即以核酸分子乙为靶点,以LV16 (U6/Luciferase17&Puro) 为载体,由上海吉玛制药技术有限公司构建的重组慢病毒。
- [0015] 上述任一所述的应用中,所述胶质瘤可为星形胶质细胞瘤。
- [0016] 本发明还保护CDYL作为药物靶点在制备产品中的应用。所述产品的功能可为如下C1) 至C6) 中的至少一种:C1) 预防胶质瘤;C2) 治疗胶质瘤;C3) 抑制胶质瘤的生长;C4) 抑制胶质瘤细胞的增殖;C5) 抑制胶质瘤细胞的迁移;C6) 降低胶质瘤细胞的侵袭能力。
- [0017] 上述应用中,所述CDYL作为药物靶点可为核酸分子甲或核酸分子乙为靶点;
- [0018] 所述核酸分子甲的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;
- [0019] 所述核酸分子乙的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。
- [0020] 上述应用中,所述胶质瘤可为星形胶质细胞瘤。
- [0021] 本发明还保护一种产品,其含有上述任一所述抑制CDYL活性和/或表达量的物质;所述产品的功能为如下C1) 至C6) 中的至少一种:C1) 预防胶质瘤;C2) 治疗胶质瘤;C3) 抑制胶质瘤的生长;C4) 抑制胶质瘤细胞的增殖;C5) 抑制胶质瘤细胞的迁移;C6) 降低胶质瘤细胞的侵袭能力。
- [0022] 所述产品具体可由上述任一所述抑制CDYL活性和/或表达量的物质组成。
- [0023] 上述产品中,所述胶质瘤可为星形胶质细胞瘤。
- [0024] 上述任一所述抑制CDYL活性和/或表达量的物质也是本发明的保护范围。
- [0025] 上述任一所述胶质瘤可为皮下移植或原位胶质瘤。
- [0026] 上述任一所述的应用中,所述产品可为药物。
- [0027] 上述任一所述胶质瘤细胞可为人胶质瘤细胞系U87MG或人胶质瘤细胞系U251。
- [0028] 实验证明,胶质瘤患者肿瘤组织内CDYL表达高于瘤旁脑组织;细胞水平上,敲低CDYL可抑制U87MG细胞增殖能力、迁移能力以及侵袭能力;动物水平上,敲低U87MG细胞中CDYL显著抑制U87MG皮下移植瘤的生长;敲低CDYL在动物水平对胶质瘤生长的影响效果比离体细胞水平更显著;进一步通过瘤体内注射AAV-shCDYL干扰U87MG移植瘤中CDYL的表达,显著抑制移植瘤生长。本发明为胶质瘤的临床治疗提供了潜在新靶点,也为胶质瘤临床治疗中的联合治疗方案以及免疫治疗方法提供了新思路。本发明具有潜在的临床价值。

附图说明

- [0029] 图1为CDYL表达与恶性胶质瘤患者生存期的相关性分析。A为根据TCGA数据库的胶质瘤患者生存资料,进行CDYL mRNA水平与患者生存期的Kaplan-Meier生存分析; $P < 0.001$;蓝色曲线CDYL的FPKM值 > 6 ;红色曲线CDYL的FPKM值 ≤ 6 。B为根据CGGA数据库的胶质瘤患者生存资料,进行CDYL mRNA水平与患者生存期的Kaplan-Meier生存分析; $P < 0.001$;蓝色曲线

CDYL的FPKM值 >8 ;红色曲线CDYL的FPKM值 ≤ 8 。

[0030] 图2为星形胶质细胞瘤患者肿瘤组织内CDYL含量升高。其中,低倍镜下标尺为400 μm ;高倍镜下标尺为50 μm ;+代表根据细胞显色强度和阳性细胞数量进行综合评判得出定性半定量的着色强度结果,至少随机观察5-10个HPF,取其均值。

[0031] 图3为CDYL在人星形胶质细胞系NHA以及人胶质瘤细胞U251和U87MG的Western blot分析。左图为Western blot代表图,右图为对应的统计图, $n=4$ 次完全独立的实验。*代表与NHA相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,单因素方差分析。

[0032] 图4为敲低CDYL抑制U87MG细胞增殖、迁移以及侵袭能力。A为Western blot方法检测CDYL在对照组和敲低CDYL组U87MG细胞中的表达。B为CCK8实验检测对照组和敲低CDYL组U87MG细胞分别培养24、48、72、96、120、144h的增殖曲线情况,6h为细胞本底数量,相同处理有6个平行孔;此为3次独立实验的代表图,*** $P<0.001$,单因素方差分析。C为细胞迁移实验示意图。D为对照组和敲低CDYL组U87MG细胞分别培养18h的细胞迁移情况; $n=3$ 次完全独立的实验,* $P<0.05$,** $P<0.01$,单因素方差分析。E为细胞侵袭实验示意图。F为对照组和敲低CDYL组U87MG细胞分别培养18h的细胞侵袭情况; $n=3$ 次完全独立的实验,ns, no significance,*** $P<0.01$,单因素方差分析。以上统计图中,*代表与Control shRNA相比。

[0033] 图5为敲低CDYL显著抑制U87MG裸鼠皮下瘤的生长。其中A为将筛选的对照组和敲低CDYL组U87MG细胞以同等细胞数分别接种裸鼠右后背部皮下位置,在接种细胞后的2d、9d和23d,使用小动物活体成像系统观察裸鼠肿瘤部位的总荧光强度,用来代表肿瘤的大小。2d为细胞本底数量。此为两次独立实验的代表图。B为皮下移植瘤组织的荧光强度统计图。肿瘤细胞未成功接种至裸鼠皮下的小鼠不计入最后的统计。*代表与Control shRNA相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,双因素方差分析。C为U87MG细胞皮下接种35d后,进行成瘤组织取材和拍照。标尺为1cm。

[0034] 图6为U87MG皮下瘤瘤体内注射AAV-shCDYL可抑制肿瘤生长。A为实验流程的时间轴。B为U87MG细胞感染AAV-shCDYL的Western blot分析图。C为U87MG细胞皮下成瘤14d,多点注射AAV,每周监测肿瘤大小,28d后取材。标尺为1cm。D为U87MG细胞皮下瘤瘤体内多点注射AAV 7d和14d后,肿瘤体积大小统计图。 $n=7$,* $P<0.05$,双因素方差分析,肿瘤体积=(肿瘤的最长径 \times 肿瘤的最短径)/2。E为肿瘤重量统计图。 $n=7$,*代表与Control AAV相比,* $P<0.05$,非配对t检验。

[0035] 图7为将对照组或敲低CDYL组U87MG细胞注射到裸鼠颅内纹状体位置,分别在4d、7d、14d和21d监测原位胶质瘤的体积大小。A为对照组和实验组各选1只裸鼠作为代表,其颅内肿瘤在不同时间点的小动物核磁成像图。红色箭头所指为颅内肿瘤。B为核磁监测原位胶质瘤体积大小的统计图。 $n=6$,*** $P<0.001$,双因素方差分析。C为原位胶质瘤生长至25d,取材并进行HE染色的代表图。标尺为800 μm 。D为原位胶质瘤组织中CDYL的免疫组化分析。红色箭头所指为CDYL在肿瘤细胞中的表达。低倍镜下标尺为700 μm ;高倍镜下标尺为20 μm 。

[0036] 图8为U87MG裸鼠原位胶质瘤生长至25d,取材并进行石蜡包埋,进行免疫组化染色分析。A为Ki67在肿瘤组织中的表达情况,左图为组化染色代表图,右图为8个随机视野统计图。低倍镜下标尺为700 μm ;高倍镜下标尺为20 μm ;*** $P<0.001$,非配对t检验。B为CD34在肿瘤组织中的表达情况,左图为组化染色图,右图为两组染色的8个随机视野的统计图。低倍镜下标尺为50 μm ;高倍镜下标尺为20 μm ;*** $P<0.001$,非配对t检验。以上统计图中,*代表与

Control shRNA组相比。红色箭头所指为阳性表达细胞。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0038] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0039] 实施例、

[0040] 一、试验材料方法

[0041] 1、免疫组化法检测CDYL分子在脑星形胶质细胞瘤及脑组织组合芯片上的表达

[0042] 1.1、主要材料及试剂

[0043] 脑星形胶质细胞瘤及脑组织组合芯片:包含62例不同级别人星形胶质细胞瘤患者肿瘤组织样本和10例瘤旁脑组织样本,由西安艾丽娜生物科技有限公司提供。

[0044] 兔抗CDYL一抗:Sigma公司,产品编码HPA035578。

[0045] 即用型UltraSensitive TMS-P超敏试剂盒(鼠/兔):迈新生物技术有限公司,产品编号KIT-9720。试剂盒组成:试剂A:内源性过氧化物酶阻断剂;试剂B:动物非免疫血清(羊);试剂C:生物素标记的羊抗鼠/兔IgG;试剂D:链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶。

[0046] DAB显色系统:液体DAB酶底物显色试剂盒,迈新生物技术有限公司,产品编号DAB-0031/1031。

[0047] 1.2、组织芯片免疫组化

[0048] 1) 60℃烤片30min,常规脱蜡水化;

[0049] 2) 抗原修复:以0.01mol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0),高压2min修复抗原,冷却至室温,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline,PBS)洗5min×3次;

[0050] 3) 用3% H_2O_2 甲醇封闭内源性过氧化物酶,室温10min,PBS洗5min×3次;

[0051] 4) 滴加正常非免疫动物血清,室温10min;

[0052] 5) 除去血清,滴加一抗(1:300),4℃过夜;

[0053] 6) 用0.1%Tween-20 PBS洗5min×3次;

[0054] 7) 滴加生物素标记的羊抗兔IgG,室温孵育10min;

[0055] 8) 用0.1%Tween-20 PBS洗5min×3次;

[0056] 9) 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温孵育10min;

[0057] 10) DAB显色5min,蒸馏水洗终止显色;

[0058] 11) 苏木素复染、水洗、分化后,充分水洗返蓝;

[0059] 12) 常规脱水透明,中性树脂胶封片;

[0060] 13) 全片高清扫描,用于结果分析。

[0061] 1.3、阅片标准

[0062] 对芯片上逐点染色结果进行定位后根据细胞显色强度判为:不着色为阴性(-)、着浅棕色为弱阳性(+),着棕色为阳性(++),着棕褐色为强阳性(+++);依照阳性细胞数量可分

为：(-)指阳性细胞小于10%，(+)指阳性细胞数在10-25%，(++)指阳性细胞数在26%-49%之间，(+++)指阳性细胞数在50%以上。最后根据两者的结果进行综合评判得出定性半定量的着色强度结果，至少随机观察5-10个高倍镜下视野(High power field,HPF)，取其均值。

[0063] 注：无效组织或缺点在着色强度栏内用*表示。

[0064] 2、慢病毒(Control shRNA、CDYL shRNA 2#或CDYL shRNA 3#)和腺相关病毒(Control AAV和AAV-shCDYL)的制备

[0065] (1)慢病毒(Control shRNA、CDYL shRNA 2#或CDYL shRNA 3#)的制备

[0066] 以核酸分子甲：5'-GGCTGTTCTACCGTTATGT-3'(SEQ ID NO:1)为靶点，以LV16(U6/Luciferase17&Puro)为载体，由上海吉玛制药技术有限公司构建重组慢病毒，命名为CDYL shRNA 2#。

[0067] 以核酸分子乙：5'-GGGATGGACTCCATGTTAA-3'(SEQ ID NO:2)为靶点，以LV16(U6/Luciferase17&Puro)为载体，由上海吉玛制药技术有限公司构建重组慢病毒，命名为CDYL shRNA 3#。

[0068] 以核酸分子丙：5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'(SEQ ID NO:3)为靶点，以LV16(U6/Luciferase17&Puro)为载体，由上海吉玛制药技术有限公司构建重组慢病毒，命名为Control shRNA(即对照shRNA)。Control shRNA为通用对照，不敲减任何已知蛋白的表达。

[0069] (2)腺相关病毒(Control AAV和AAV-shCDYL)的制备

[0070] 以核酸分子甲：5'-GGCTGTTCTACCGTTATGT-3'(SEQ ID NO:1)为靶点，以pAAV-Luciferase-shRNA为载体，由北京利科丽生物科技有限公司构建重组腺相关病毒，命名为AAV-shCDYL。

[0071] 以核酸分子丁：5'-GATCCGCTCGCCTGTCTACTAATAATTCAAGAGATTAGTTAGTAGACAGGC GAGCTTTTTTA-3'(SEQ ID NO:4)为靶点，以pAAV-Luciferase-shRNA为载体，由北京利科丽生物科技有限公司构建重组腺相关病毒，命名为Control AAV。Control AAV为通用对照，不敲减任何已知蛋白的表达。

[0072] 3、细胞系的培养

[0073] 3.1、主要材料和试剂

[0074] 人胶质瘤细胞系U87MG和U251均由国家实验细胞资源共享平台提供。

[0075] 0.25%胰酶(含EDTA)：Gibco公司，产品编码25200056。

[0076] MEM培养基：Hyclone公司，产品编码SH30265.01。

[0077] 胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)：Hyclone公司，产品编码SH30084.03。

[0078] 非必需氨基酸(Non essential amino acids,NEAA)溶液：Gibco公司，产品编码11140050。

[0079] U87MG完全培养基：MEM培养基+10%FBS+1%NEAA。

[0080] U251完全培养基：MEM培养基+10%FBS。

[0081] 快速细胞冻存液(Quick Freezing)：北京博奥龙免疫技术有限公司。

[0082] 3.2、细胞的复苏

[0083] 从液氮罐中取出含有细胞的冻存管，迅速置42℃水浴中，轻轻摇晃，使其快速融化。900rpm，离心3min，小心弃去上清，得到细胞沉淀。用完全培养基轻轻吹打混匀，吸出细胞悬液，转入培养皿中，细胞培养箱中培养，24h后更换新鲜培养液。

[0084] 3.3、细胞系的培养及传代

[0085] 细胞使用完全培养基培养,置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。待细胞生长至80%左右融合度时,用0.05%胰酶(含EDTA)消化2-3min,吸除胰酶,加入完全培养基终止消化,并用枪头轻轻吹打使其成为细胞悬液,900rpm离心3min,弃上清,加入新鲜培养基,1:3-1:5分皿传代。细胞置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。

[0086] 3.4、细胞冻存

[0087] 将胰酶消化后的细胞悬液,900rpm离心3min,弃上清,用Quick Freezing重悬细胞,调整细胞密度大致 1×10^6 /ml。将细胞悬液转至冻存管,将冻存管直接放入-80℃,48h后转入液氮中长期保存。

[0088] 4、蛋白质免疫印迹(Western blot)实验

[0089] 4.1、主要材料和试剂

[0090] 30%丙烯酰胺(100ml):称取29g丙烯酰胺(Novon)和1g N,N' 甲双丙烯酰胺,溶解于80ml dd H₂O中,加热至37℃溶解,定容至100ml,三层滤纸过滤后,4℃冰箱中避光保存。

[0091] 10%过硫酸铵(Ammonium persulfate,APS):称取1g APS溶于10ml dd H₂O中,溶解后过滤,4℃冰箱中避光保存。

[0092] 10%十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate,SDS):称取10g SDS(Sigma)溶解于80ml dd H₂O中,溶解后定容至100ml,过滤后室温保存。

[0093] 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲溶液(Tris-HCl):

[0094] 1mol/L Tris(500ml,pH=6.8):60.55g Tris溶于400ml dd H₂O,用盐酸调pH值至6.8,定容至500ml。

[0095] 1.5mol/L Tris(1000ml,pH=8.8):181.65g Tris溶于900ml dd H₂O,用盐酸调pH值至8.8,定容至1000ml。

[0096] TEMED四甲基乙二胺:Genview公司,产品编码DH338-2。

[0097] 蛋白酶抑制剂EDTA-free Cocktail:Roche公司,产品编码4693132001,按说明书配制20×储存液,分装后-20℃冰箱保存。

[0098] 组织或细胞裂解液:加强型RIPA裂解液,北京普利莱公司,产品编码C1053+。

[0099] 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液(1L):称取Tris 15.1g,10%SDS 50ml,甘氨酸94g溶于1L dd H₂O。

[0100] 5×SDS-PAGE电泳上样缓冲液:北京普利莱公司,产品编码B1012。

[0101] 10×转膜液(1L):称取Tris 52.13g,甘氨酸29.295g,10%SDS 18.75μl溶解于1L dd H₂O。使用前按10×转膜液:无水甲醇:dd H₂O=1:2:7的比例稀释为1×转膜液。

[0102] 10×TBS(1L):称取NaCl 160g,KCl 4g,Tris 60g置于800ml dd H₂O中溶解,完全溶解后调pH至7.4,定容至1000ml。

[0103] 1×TBST:按Tween-20(鼎国):10×TBS:dd H₂O=1:200:1800的比例进行配置。

[0104] 封闭液:称取2.5g脱脂奶粉用1×TBST溶解至50ml。

[0105] 预染蛋白Marker(Fermentas,USA,产品编码26616):分别为170、130、100、70、55、40、35、25、15和10kDa。

[0106] SDS-PAGE聚丙烯酰胺分离胶和浓缩胶的配制见表1。

[0107] 表1

[0108]		分离胶 (10%) 10ml	浓缩胶 (5%) 5ml
	ddH ₂ O	4.0ml	3.4ml
	30% 丙烯酰胺	3.3ml	830μl
	1.5mol/L Tris (pH=8.8)	2.5ml	—
	1mol/L Tris (pH=6.8)	—	630μl
	10% SDS	100μl	50μl
	10% APS	100μl	50μl
	TEMED	4μl	5μl

[0109] 4.2、细胞总蛋白的提取

[0110] 1) 待细胞生长至一定的融合度 (除特殊标明, 一般情况下, 70-80%), 弃去培养基, PBS洗两遍;

[0111] 2) 加入200μl左右的RIPA裂解液, 冰上裂解30min, 然后移至1.5ml EP管;

[0112] 3) 超声破碎DNA, 然后放于冰上30min, 防止DNA复性;

[0113] 4) 4℃、12,000rpm离心20min, 吸取上清。

[0114] 4.3、组织总蛋白的提取

[0115] 1) 迅速分离得到动物的肿瘤组织, -80℃保存;

[0116] 2) 剪碎组织, 加入适量上述RIPA裂解液, 组织匀浆器 (Pellet pestle motor, Rontes) 磨, 研磨充分后分别补加至350μl裂解液, 4℃混悬1h;

[0117] 3) 4℃、12000rpm离心20min, 吸取上清。

[0118] 4.4、SDS-PAGE凝胶电泳

[0119] 1) 制胶: 根据待检测蛋白的分子量大小, 制备适宜相应浓度的SDS-PAGE分离胶和5%浓缩胶, 待浓缩胶凝固后, 小心拔出梳子, 将凝胶玻璃固定于电泳装置上, 加入电泳缓冲液, 排除凝胶底部的气泡;

[0120] 2) 上样: 取等量蛋白, 加入SDS-PAGE上样缓冲液 (含有β-巯基乙醇), 100℃加热5min, 使蛋白变性, 之后迅速放在冰上, 以免复性。每孔上样50μg等量总蛋白, 同一板胶上第一个孔中加入适量体积的预染蛋白分子量Marker, 准备电泳;

[0121] 3) 电泳: 70V电压至分离胶与浓缩胶交界时, 将电压调整为110V, 电泳至染料到达分离胶下沿, 注意目的蛋白不要跑出胶;

[0122] 4) 转膜:

[0123] 4-1) 裁剪与凝胶大小相同的3层滤纸和硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose filter membrane, NC膜);

[0124] 4-2) 分离胶在转膜缓冲液中浸泡15min, 滤纸用转移缓冲液浸湿后按从阳极到阴极的顺序依次加滤纸-NC膜-分离胶-滤纸, 200mA, 恒流转膜1.5~2h, 根据目的蛋白分子量大小, 决定转膜时间长短;

[0125] 5) 封闭: 转膜完毕后, 在丽春红的显色指示下, 裁剪所需要的条带, 先在TBST中润洗1min, 再用5%脱脂牛奶室温封闭1.5h;

[0126] 6) 敷一抗: 用5%脱脂牛奶稀释一抗至一定比例, 4℃孵育过夜;

[0127] 7) TBST摇床洗涤3次, 每次10min;

[0128] 8) 敷二抗: 用5%脱脂牛奶稀释二抗至一定比例, 室温孵育70min;

[0129] 9) TBST摇床洗涤3次,每次10min;

[0130] 10) 将ECL化学发光液试剂盒中的A液和B液等量混合,均匀地加在膜上,放置于化学发光成像系统上,采集图像。

[0131] 5、CCK8细胞增殖实验

[0132] 1) 取对数生长期的细胞,胰酶消化后,用含10%FBS的培养基收集并重悬细胞,调整细胞密度,以每孔3000-5000个细胞/200 μ l体积接种到96孔板中,每个孔板相同处理6个平行孔(根据实验目的及监测时间点确定具体孔板数量);

[0133] 2) 待细胞贴壁4-6h后,或者培养24h、48h、72h、96h、120h、144h后,每孔加入CCK8溶液10 μ l,继续在37 $^{\circ}$ C培养箱内培养;

[0134] 3) 1h后,用酶标仪测定在450nm处的吸光度值;

[0135] 4) 以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

[0136] 6、细胞迁移实验

[0137] 1) 以常规方法消化细胞,离心后得细胞沉淀,用无血清培养基制备单细胞悬液;

[0138] 2) 以全自动细胞计数仪进行细胞计数,用无血清培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/ml细胞。每组细胞各分为两部分,一部分作为本底直接贴壁培养,另一部分用于细胞迁移。

[0139] 3) 按照无菌技术原则,用镊子小心将transwell小室(Millipore,产品编码PI8P1250),放在24孔板中,下室加入500-600 μ l含10%FBS的培养基,小室与培养液之间需避免产生气泡,气泡的产生将会导致下层培养液对上层细胞的趋化能力减弱。

[0140] 4) 培养板上室加入100 μ l细胞悬液(含 1×10^4 个细胞)并加入无血清培养基200 μ l。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养18h。用湿棉签轻轻擦去聚碳酸酯膜上表面的细胞。

[0141] 5) 用无血清培养基稀释D-荧光素钠盐(翌圣生物,产品编码40901ES02),配成终浓度为150 μ g/ml的荧光素钠盐工作液。

[0142] 6) 向外表面擦好的小室中添加荧光素钠盐工作液,孵育15-20min。

[0143] 7) 将小室放于小动物活体成像系统IVIS Spectrum(PerkinElmer公司),进行成像和图像分析。

[0144] 7、细胞侵袭实验

[0145] 7.1、准备步骤

[0146] 1) Matrigel(BD Company,产品编码356234)在4 $^{\circ}$ C提前融化;

[0147] 2) 用4 $^{\circ}$ C预冷的无血清培养基稀释Matrigel,此处Matrigel:培养基=1:3最佳,冰上操作;

[0148] 3) 按照无菌技术原则,在Transwell小室的上室底部中央垂直加入100 μ l稀释后的Matrigel,37 $^{\circ}$ C温育1-2h,使Matrigel聚合成胶;

[0149] 4) 将已铺好Matrigel的Transwell小室置于37 $^{\circ}$ C,6h内用完,否则胶会缩小,导致效果不好。最好现配现用。

[0150] 7.2、实验步骤

[0151] 1) 以常规方法消化细胞,离心后得细胞沉淀,用无血清培养基制备单细胞悬液;

[0152] 2) 以全自动细胞计数仪进行计数,用无血清培养基调整细胞密度为 5×10^5 个/ml细胞,每组细胞各分为两部分,一部分作为本底直接贴壁培养,另一部分用于细胞侵袭实

验。

[0153] 3) 取出已经铺好Matrigel的Transwell小室的24孔板,下室加入500-600 μ l含10% FBS的培养基,小室与培养液之间一定要避免产生气泡,气泡的产生将会导致下层培养液对上层细胞的趋化能力减弱。

[0154] 4) 培养板上室加入100 μ l细胞悬液(含 5×10^4 个细胞)并加入无血清培养基200 μ l。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养18h。用湿棉签轻轻擦去Matrigel凝胶和聚碳酸酯膜上表面的细胞。

[0155] 5) 用无血清培养基稀释D-荧光素钠盐,配成终浓度为150 μ g/ml的荧光素钠盐工作液。

[0156] 6) 向外表面擦好的小室中添加荧光素钠盐工作液,孵育15-20min。

[0157] 7) 将小室放于小动物活体成像系统IVIS Spectrum,进行成像和图像分析。

[0158] 8、筛选稳定敲低CDYL的U87MG细胞株

[0159] 慢病毒(Control shRNA和CDYL shRNA)带有荧光素酶基因和嘌呤霉素抗性,为避免反复冻融,分装保存于-80 $^{\circ}$ C。

[0160] 1) 慢病毒转染前一天,将贴壁细胞种于24孔板中,转染时细胞融合度达50-60%,使细胞在慢病毒转染时的数量为 2×10^5 /孔左右。

[0161] 2) 加入聚凝胺(Polybrene)10 μ g/ml(聚凝胺为破膜剂,破坏细胞膜,病毒才能透过破损的膜,进入细胞内发挥作用),设置合适的病毒浓度梯度,对于24孔板,设置5个梯度,分别加入病毒量0、1、2、4、6、8 μ l,以无血清的培养基,37 $^{\circ}$ C培养。

[0162] 3) 4-6h后,更换为含血清的完全新鲜培养基,继续培养,48h后使用小动物活体成像系统观察荧光强度,选择最佳慢病毒转染的MOI值。

[0163] 4) 将贴壁细胞种于12孔板,以不同浓度嘌呤霉素加入到培养基中,培养7d,7d内全部杀死细胞的最低浓度即为最佳嘌呤霉素浓度。

[0164] 5) 根据上述筛选得到的最佳病毒量,按照之前的转染条件,进行转染。培养24h后,向培养基中加入上述最佳嘌呤霉素浓度进行培养(对照组为未转染慢病毒的细胞),培养7d,每24h更换新鲜培养基。当对照组细胞全部凋亡时,此时依然存活的筛选得到细胞为具有嘌呤霉素抗性且含有对照慢病毒或者敲低CDYL慢病毒的U87MG细胞。

[0165] 6) 用Western blot方法验证筛选得到的细胞是否有效敲低CDYL的表达。

[0166] 9、免疫缺陷动物体内成瘤模型

[0167] 9.1、实验动物

[0168] Nu/nu裸鼠、CB17 SCID小鼠和NOD SCID小鼠均为雌性4-5周龄,体重均匀,波动不超出2g范围,SPF级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于北京大学医学部实验动物中心屏障系统。所有实验动物的操作规则均遵守北京大学医学部实验动物委员会制定的实验动物伦理守则和操作规范。

[0169] 9.2、Nu/nu裸鼠皮下异位接种U87MG胶质瘤模型的建立及肿瘤监测

[0170] 1) 细胞准备

[0171] 将带有荧光素酶基因的处于对数生长期的三种稳定转染细胞包含对照组和敲低CDYL组,使用木瓜蛋白酶(翌圣生物,产品编码40506ES60)温和消化,收集细胞悬液,800rpm离心3min得细胞沉淀,用无血清MEM稀释沉淀并调整细胞密度至 5×10^6 /ml,根据每只动物皮下接种细胞数 1×10^6 /200 μ l无血清MEM,估算需要的细胞量,冰上保存,注意在3h内注入

动物体内。

[0172] 2) 动物准备

[0173] Nu/nu裸鼠, 雌性4-5周龄, 体重18-20g, SPF级, 随机分为三组, 每组3只。裸鼠无毛, 进行细胞接种前无需剃毛。

[0174] 3) 皮下注射细胞

[0175] 熟练抓握动物, 以75%酒精棉球于背侧近右后肢处进行消毒, 用1ml微量注射器抽取制备好的三种细胞悬液, 每只裸鼠行皮下注射 $1 \times 10^6/200\mu\text{l}$ 的U87MG细胞, 留针2min。放回笼中, 每周观察裸鼠和肿瘤生长情况。

[0176] 4) 小鼠活体成像分析(in vivo analysis in mice)

[0177] 配制15mg/ml的D-荧光素钠盐/DPBS溶液, 0.2 μm 滤膜过滤除菌, 分装后避光保存备用, 临用前融化。根据动物实验的监测时间安排, 腹腔注射荧光素酶底物D-荧光素钠盐溶液(注射体积按照每只小鼠 $10\mu\text{l/g}$ 计算, 注射量约为 $200\mu\text{l}$ /只)。注射10min后, 采用小动物活体成像系统IVIS Spectrum进行成像分析, 得到含有光子强度标尺的成像图片。本实验接种到免疫缺陷小鼠体内的胶质瘤细胞均为带有荧光素酶基因的肿瘤细胞。因此, 腹腔注射底物D-荧光素钠盐溶液后监测到的生物荧光光子强度可代表皮下肿瘤组织内的细胞数量, 用于估算肿瘤体积大小。

[0178] 5) 瘤体内注射AAV-shCDYL实验

[0179] 以每只动物接种 $1 \times 10^6/200\mu\text{l}$ 的细胞数, 裸鼠皮下接种U87MG细胞(注意此处接种的细胞不是前面建立的带有荧光标签稳定转染细胞系, 是未作任何处理的U87MG细胞), 14d后接种部位出现肉眼可见肿瘤组织, 皮下瘤建立, 随机分为两组, 每组7只, 分别多点注射Control AAV和AAV-shCDYL, 每只注射 $10\mu\text{l}$ AAV, 之后每周用游标卡尺监测皮下肿瘤的体积大小, 28d后, 处死裸鼠、取材、拍照和称重。计算肿瘤体积公式为: 体积 = (肿瘤最长径 \times 肿瘤最短径 $\times 2$)/2。

[0180] 9.3、Nu/nu裸鼠颅内原位U87MG胶质瘤模型的建立及肿瘤监测

[0181] 1) 细胞准备

[0182] 将处于对数生长期的两种稳定转染的U87MG细胞温和消化, 收集细胞悬液, 800rpm离心3min得细胞沉淀, 用无血清MEM重悬细胞沉淀, 根据每只动物颅内注射 5×10^5 的细胞数溶于 $5\mu\text{l}$ 体积的无血清MEM中, 估算需要的细胞量, 冰上保存, 注意在8h内注入动物体内。

[0183] 2) 动物准备

[0184] 选用4-5周龄、体重均匀(18-20g)的雌性nu/nu裸鼠, 随机分为两组: 对照组6只; 敲低CDYL组6只。配制0.5%戊巴比妥钠/生理盐水(w/v)溶液用于实验期间的麻醉, 每只裸鼠注射剂量按照每10g体重注射 $105\mu\text{l}$, 腹腔注射于裸鼠体内。

[0185] 3) 原位注射细胞

[0186] 将麻醉的裸鼠放在立体定位仪的手术台上, 以75%酒精进行头皮消毒, 沿正中线剪开头皮, 暴露出前囟和后囟, 用立体定位仪, 以前囟为原点, 定位出左侧纹状体的位置: AP 0.97mm; ML -1.8mm; DV -3.5mm; 统一参数定位后, 用微量注射泵micro4注射细胞 5×10^5 /只, 每只注射 $5\mu\text{l}$ 体积, 3min内完成, 注射完成后留针3min。拔出微量注射泵后, 缝合头皮。

[0187] 4) 小动物核磁成像监测颅内肿瘤生长情况

[0188] 裸鼠颅内原位接种U87MG胶质瘤细胞4d后, 进行第一轮小动物核磁成像。随后分别

在7d、14d和21d,利用小动物核磁成像系统成像,观察裸鼠颅内肿瘤的生长情况。具体操作如下:在核磁共振之前,先对裸鼠进行异氟烷气体麻醉,待小鼠麻醉后,将裸鼠连通气体麻醉通气管,一起放入20mm线圈内固定,3.0T西门子小动物核磁共振成像仪参数:20mm线圈;T2-weighted (TR 5960MS,TE 89ms);视野 (FOV) 6.4cm×3.9cm;矩阵256×100;层数15;层距0.9mm;采用弛豫增强快速采集技术对裸鼠矢状面和冠状面进行扫描。计算颅内肿瘤体积的方法为:体积=不同层面面积的总和×层距

[0189] 9.4、CB-17SCID和NOD SCID小鼠皮下异位接种U87MG胶质瘤模型的建立及肿瘤监测

[0190] 1) 细胞准备

[0191] 消化细胞及每只小鼠接种细胞数量与前面裸鼠皮下成瘤模型的方法和参数一致,不同之处在于本实验模型中只用了一种稳定转染敲低CDYL的U87MG细胞 (2#) 作为实验组。

[0192] 2) 动物准备

[0193] CB-17SCID小鼠,雌性4-5周龄,体重16-18g,SPF级,随机分2组,每组6只;NOD SCID小鼠,雌性4-5周龄,体重16-18g,SPF级,随机分2组,每组6只。以上两种小鼠有毛,进行细胞接种前需要剃毛。

[0194] 3) 皮下接种细胞和瘤体测量

[0195] 注射位置和注射方式与前述裸鼠皮下成瘤实验模型中的类似。接种细胞第14天为起始点,每周两次监测皮下瘤体大小和生长情况。采用游标卡尺测量计算肿瘤体积,公式同前。

[0196] 9.5、肿瘤组织取材

[0197] I) 皮下肿瘤组织取材

[0198] 按照实验动物伦理和操作要求,待裸鼠皮下肿瘤的瘤体最大直径接近2cm时,进行组织取材。以0.5%戊巴比妥钠/生理盐水 (w/v) 进行动物麻醉,每只裸鼠注射剂量按照每10g体重注射105 μ l,行腹腔注射。待所有动物处于麻醉状态,对动物进行拍照。取材之前,脱颈处死动物,然后进行皮肤消毒。用外科剪剪开皮肤后,将肿瘤组织取出,将瘤体按顺序拍照后,进行称重,并迅速将组织放入液氮中冷冻,保存在-80℃。

[0199] II) 颅内原位胶质瘤脑组织取材和石蜡切片的制作

[0200] 1) 颅内原位接种U87MG细胞25d后,进行肿瘤脑组织取材;

[0201] 2) 注射1%戊巴比妥钠注射液对小鼠进行深度麻醉,以止血钳夹持小鼠四肢无反应为麻醉合格的标准,用手术剪暴露小鼠心脏,剪破右心包,于左心室心尖处快速推注预冷的PBS 30ml,对小鼠进行全身灌流;

[0202] 3) 继续使用4%多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 固定液进行前固定;

[0203] 4) 即刻小心取出脑组织,转移至装有5ml固定液的12孔板,4℃冰箱中后固定24h;

[0204] 5) 弃固定液,先后换成20%和30%的蔗糖溶液进行脱水,在4℃条件下分别浸泡孵育24h,避免光照;

[0205] 6) 取出小鼠大脑,切除肿瘤前后部分多余的组织,并修平整,将修切好的组织放于编号标记明确的脱水盒内;

[0206] 7) 将脱水盒放进吊篮里,于脱水机内依次按照浓度梯度的酒精进行脱水;

[0207] 8) 将上述组织进行包埋;

- [0208] 9) 将修整并包埋好的蜡块置于石蜡切片机上切片,片厚3-4 μ m;
- [0209] 10) 用载玻片将组织捞起,并放进60 $^{\circ}$ C烘箱内烤片。干蜡烤化后取出,常温保存备用。
- [0210] 10、不同免疫细胞浸润情况的免疫组化染色
- [0211] 10.1、一抗准备
- [0212] CD11c抗体:Proteintech公司,产品编号17342-1-AP。
- [0213] CD20抗体:OriGene公司,产品编号TA800385。
- [0214] Ki67抗体:Proteintech公司,产品编号27309-1-AP。
- [0215] F4/80抗体:Proteintech公司,产品编号28463-1-AP。
- [0216] CD68抗体:Proteintech公司,产品编号28058-1-AP。
- [0217] CD34抗体:Abcam公司,产品编号ab81289。
- [0218] TMEM119抗体:Cell signalling公司,产品编号#90840。
- [0219] CD206抗体:Abcam公司,产品编号ab64693。
- [0220] 10.2、免疫组化染色
- [0221] 1) 脱蜡、水化:将组织切片置于60 $^{\circ}$ C恒温箱中烘烤20min,依次浸泡:二甲苯(10min) \rightarrow 二甲苯(10min) \rightarrow 无水乙醇(5min) \rightarrow 95%乙醇(5min) \rightarrow 75%乙醇(5min) \rightarrow 去离子水(2min) \rightarrow 去离子水(2min);
- [0222] 2) PBS洗3次,每次5min;
- [0223] 3) 3% H_2O_2 (用80%甲醇配制)滴加在组织上,室温静置10min,PBS洗3次,每次5min;
- [0224] 4) 抗原修复(EDTA热修复),冷却至室温;
- [0225] 5) PBS洗3次,每次5min;
- [0226] 6) 滴加正常山羊血清封闭液,室温20min,弃去多余液体;
- [0227] 7) 滴加一抗50 μ l,室温静置1h后4 $^{\circ}$ C过夜;
- [0228] 8) 37 $^{\circ}$ C孵育45min;
- [0229] 9) PBS洗3次,每次2min;
- [0230] 10) 滴加二抗50 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育1h;
- [0231] 11) PBS洗3次,每次5min;
- [0232] 12) DAB显色1-5min,显微镜下判断显色程度;
- [0233] 13) PBS或自来水冲洗10-15min;
- [0234] 14) 苏木精进行核复染2min,使用盐酸酒精分化;
- [0235] 15) 自来水冲洗10-15min;
- [0236] 16) 脱水、透明、封片;
- [0237] 17) 显微镜下观察,分别10倍和20倍镜下拍照。
- [0238] 11、TCGA和CGGA的生物信息学分析
- [0239] 来自肿瘤基因组图谱(The cancer genome atlas,TCGA)数据库的资料包含153例胶质瘤患者肿瘤组织样本,其CDYL转录水平和患者生存资料下载于以下网址:<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000153046-CDYL/pathology>
- [0240] 以天坛医院神经外科江涛教授为组长的研究团队建立了中国脑胶质瘤基因组图谱数据库(Chinese glioma genome atlas,CGGA),为胶质瘤基础研究带来了巨大便利。来

自CGGA数据库编号为mRNAseq_693的资料包含409例胶质瘤患者肿瘤组织样本。其CDYL转录水平和患者生存资料下载于以下网址:<http://www.cgga.org.cn/>

[0241] 对于以上的数据信息,应用Prism软件中的Kaplan-Meier生存分析方法进行CDYL mRNA水平与患者生存期的相关性分析。

[0242] 12、数据处理和统计学检验

[0243] 实验结果均采用Prism 7.0版软件进行统计分析,以平均值±标准误(Mean±SEM)表示。两样本均数的比较采用非配对t检验,多组均数比较用单因素方差分析,多个时间点的多组均数比较用双因素方差分析。

[0244] 所有统计以 $\alpha=0.05$ 作为在统计学上有显著性差异的标准。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 为差异有统计学意义;ns,no significance为无显著性差异。

[0245] 二、结果与分析

[0246] 1、CDYL在人源性胶质瘤肿瘤组织和细胞系中表达上调

[0247] (1) CDYL在胶质瘤中的含量高低与患者生存期存在相关性

[0248] 为了解胶质瘤肿瘤组织中CDYL含量与患者预后的关系,本发明的发明人查阅了肿瘤数据库TCGA和脑胶质瘤数据库CGGA。基于TCGA数据库的153例胶质瘤患者肿瘤组织样本和CGGA数据库的409例中国胶质瘤患者肿瘤组织样本的转录组学分析与患者生存资料信息,对CDYL表达与患者生存期进行生存分析统计。

[0249] TCGA数据库的结果显示,胶质瘤患者肿瘤组织中CDYL的mRNA水平越高,则患者的生存期越长, $P<0.001$,具有统计学意义(见图1中A)。CGGA数据库的结果显示,胶质瘤患者肿瘤组织中CDYL的mRNA水平越高,则患者的生存期越短, $P<0.001$,具有统计学意义(见图1中B)。以上结果提示,CDYL可能参与胶质瘤的发生发展,但具体作用尚待研究。

[0250] (2) 胶质瘤患者肿瘤组织内CDYL的含量升高

[0251] 胶质瘤根据组织细胞学类型分为星形胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤以及其他混合型胶质细胞瘤,其中以星形胶质细胞瘤最为常见。星形胶质细胞瘤分为四个等级,其中一级恶性度最低,四级的恶性度最高,四级星形胶质细胞瘤最常见的类型是胶质母细胞瘤(Glioblastoma,GBM)。

[0252] 为观察CDYL在胶质瘤肿瘤组织中的表达情况,本发明的发明人购买了肿瘤组织芯片。考虑到胶质瘤组织细胞类型的复杂性,只选用了星形胶质细胞瘤类型的胶质瘤患者样本,恶性度的分级以世界卫生组织的诊断标准为参考。对含有瘤旁脑组织($n=10$)和不同级别的星形胶质细胞瘤患者肿瘤组织($n=62$)组合芯片进行肿瘤组织芯片的CDYL免疫组化染色,根据细胞显色强度和阳性细胞数量对结果进行综合评判(具体见方法部分),从低到高依次为-、+、++和+++。对以上病例的组化染色结果进行卡方检验,观察CDYL表达是否与胶质瘤恶性程度成相关性。统计方法为Kruskal-wallis test, $P<0.001$,代表有统计学意义。

[0253] 免疫组织化学染色结果见图2。结果表明,胶质瘤患者肿瘤组织内CDYL表达高于瘤旁脑组织。

[0254] 对染色结果的显色强度判定并进行卡方检验分析。结果见表2。结果表明,CDYL表达与胶质瘤恶性程度相关。

[0255] 表2. 瘤旁脑组织及不同级别星形胶质细胞瘤患者肿瘤组织内CDYL表达统计分析

	CDYL level (-)	CDYL level (+)	CDYL level (++)	CDYL level (+++)	Total (n)	χ^2	<i>P</i>
[0256] 瘤旁脑组织	0	3	7	0	10	20.743	<0.001
二级星形胶质细胞瘤	1	4	17	15	37		
三级星形胶质细胞瘤	1	0	1	19	21		
四级胶质母细胞瘤	0	0	1	3	4		
Total	2	7	26	37	72		

[0257] (3) CDYL在人胶质瘤细胞系中的表达升高

[0258] Western blot检测CDYL在人星形胶质细胞系NHA和人胶质瘤细胞系U251和U87MG中的表达情况。

[0259] 检测结果见图3。CDYL在胶质瘤细胞系中的表达显著高于正常星形胶质细胞,具有统计学意义。

[0260] 2、敲低CDYL抑制胶质瘤U87MG细胞的增殖、迁移和侵袭能力

[0261] 胶质瘤的发生发展是一个复杂的多步骤过程,主要包括原位肿瘤细胞的增殖、迁移以及侵袭过程。本发明的发明人发现CDYL在胶质瘤患者肿瘤组织和细胞系中含量升高,为进一步明确CDYL在胶质瘤发生发展中的作用,在细胞水平观察CDYL对肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭能力的影响。

[0262] 在细胞系水平上,本发明的发明人观察到U251和U87MG细胞中CDYL含量均显著升高。考虑到U87MG细胞在免疫缺陷动物的移植瘤成瘤能力优于U251,为了便于系统研究CDYL的作用及其机制,后续的研究均选用胶质瘤细胞系U87MG,U87MG属于星形胶质细胞瘤类型,是一种低分化的、恶性度最高的胶质母细胞瘤细胞系,常用于胶质瘤的基础研究。

[0263] 应用CCK8细胞增殖实验检测肿瘤细胞增殖能力是一种非常灵敏、方便的实验方法。在实验中,通过慢病毒转染实验和嘌呤霉素的抗性筛选,分别建立了带有荧光素酶的稳定转染Control shRNA(简称为对照组)、CDYL shRNA 2#(简称为2#)及CDYL shRNA 3#(简称为3#)三种U87MG细胞,并进行Western blot验证(见图4中A)。将对照组和稳定转染CDYL shRNA的U87MG细胞系分别培养6h、24h、48h、72h、96h、120h和144h。结果显示,相较于对照组,2#U87MG细胞增殖能力减弱,3#U87MG细胞增殖能力无明显变化(图4中B)。利用Transwell小室可以检测肿瘤细胞的迁移能力,图4中C为示意图。在实验中,将对照组和稳定转染CDYL shRNA的U87MG细胞分别培养18h,然后以生物荧光强度半定量代表迁移细胞数。结果显示,相较于对照组,稳定转染CDYL shRNA的U87MG细胞迁移能力减弱(图4中D)。其中2#U87MG细胞迁移能力减弱52.5%, $P<0.01$;3#U87MG细胞迁移能力减弱36.9%, $P<0.05$ 。应用铺有一层基质胶的Transwell小室可以检测肿瘤细胞侵袭能力,图4中E为示意图。类似地,将对照组和稳定转染CDYL shRNA的U87MG细胞分别培养18h,同样以生物荧光强度半定量代表侵袭细胞数。结果显示,相较于对照组,2#U87MG细胞侵袭能力减弱(减弱44.1%; $P<0.001$),而3#U87MG细胞侵袭能力无明显变化(图4中F)。

[0264] 以上结果显示,稳定转染含2#号序列的慢病毒抑制U87MG细胞的增殖、迁移以及侵袭能力。稳定转染含3#号序列的慢病毒对U87MG细胞的增殖、迁移以及侵袭能力抑制效果不

明显。结果表明,敲低CDYL可在一定程度上抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。稳定转染含3#号序列的慢病毒对U87MG细胞的影响能力比较弱,可能是由于3#号序列敲低CDYL的效果不好导致。因此需要进一步在动物实验上观察CDYL对胶质瘤的影响。

[0265] 3、降低CDYL的表达可显著抑制U87MG皮下移植瘤的生长

[0266] (1)降低U87MG细胞中的CDYL表达可显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生长

[0267] 相较于细胞水平,整体动物水平更能模拟临床病人胶质瘤发生发展环境。为进一步明确CDYL对胶质瘤发生发展的影响,本发明的发明人在整体动物水平上采用裸鼠皮下移植瘤模型进行评估。将上述筛选得到的三种稳定转染的U87MG细胞即对照组和敲低CDYL组的2#和3#细胞以同等细胞数注射到nu/nu裸鼠皮下成瘤,使用小动物活体成像系统观察裸鼠肿瘤部位的总荧光强度。根据肿瘤组织总荧光强度进行半定量估算肿瘤体积。

[0268] 结果见图5。结果表明,敲低CDYL组的两种U87MG细胞的皮下移植瘤体积明显小于对照组。其中,2#组减少85.48%,* $P < 0.05$;3#组减少91.93%,** $P < 0.01$;均具有统计学意义。以上结果表明,敲低CDYL在整体动物水平上显著抑制U87MG移植瘤的生长。

[0269] 结合细胞水平实验,虽然敲低CDYL在离体细胞水平上对U87MG肿瘤细胞的影响作用不大,但本研究多批次动物实验证明,敲低CDYL能够显著抑制U87MG移植瘤的生长。考虑到临床上胶质瘤患者体内的CDYL也是在整体水平对胶质瘤的发生发展产生影响,因此整体动物水平上观察到的结果比离体细胞水平更接近于事实真相。

[0270] 上述结果表明,敲低CDYL可抑制胶质瘤的生长,提示胶质瘤中CDYL含量升高能够促进胶质瘤的发生发展。在上述实验中,先利用慢病毒干预U87MG细胞中的CDYL表达并建立稳定转染的U87MG细胞,然后接种到裸鼠皮下进行成瘤实验和瘤体评估,因此,严格意义上属于提前干预。

[0271] (2)瘤体内注射AAV-shCDYL可抑制U87MG皮下移植瘤的肿瘤生长

[0272] 为进一步明确CDYL是否可作为临床治疗的干预靶点,将AAV(Control AAV或AAV-shCDYL)注射到肿瘤组织内部并观察对肿瘤的影响。实验中,先将U87MG以同等细胞数接种于nu/nu裸鼠皮下进行成瘤,14d后多点注射AAV,之后每周监测裸鼠皮下移植瘤体积大小。

[0273] 检测结果见图6。结果显示,通过感染AAV-shCDYL来降低U87MG皮下移植瘤中CDYL的含量,可显著抑制肿瘤的生长速度。相较于对照组(Control AAV),敲低CDYL组(AAV-shCDYL)的肿瘤体积减少66.74%,* $P < 0.05$;肿瘤重量减少60.83%,* $P < 0.05$;均具有统计学意义。这表明,CDYL具有一定的靶点治疗意义,可作为胶质瘤患者临床治疗的潜在干预靶点。

[0274] 4、敲低CDYL抑制颅内原位胶质瘤的生长、细胞增殖及微血管的形成

[0275] (1)敲低CDYL抑制裸鼠颅内U87MG原位胶质瘤的生长

[0276] 为进一步明确CDYL对胶质瘤发生发展的影响,本发明的发明人在nu/nu裸鼠颅内构建U87MG原位胶质瘤模型并观察肿瘤生长。本实验中,将对照组和CDYL敲低组U87MG细胞分别接种至裸鼠颅内的纹状体(该处组织疏松、血管丰富,外来移植细胞易于存活)位置,利用小动物核磁成像系统,监测颅内肿瘤的生长情况。

[0277] 结果见图7。结果表明,敲低CDYL后,U87MG原位胶质瘤的生长明显受到抑制,肿瘤体积减少67.65%;*** $P < 0.001$,具有统计学意义(见图7中A-C)。对肿瘤组织进行CDYL组化染色作为质量控制,染色结果显示,敲低CDYL组U87MG细胞建立的原位胶质瘤中CDYL表达显

著低于对照组,表明进行颅内注射的敲低CDYL的U87MG细胞中确实抑制了CDYL的表达,观察到的差异是由CDYL含量降低所导致的(见图7中D)。

[0278] 为了进一步证实该结果,利用组织形态学染色方法检测肿瘤相关分子标志物,更直观的观察两组肿瘤组织内部的差异。

[0279] (2) 敲低CDYL抑制原位胶质瘤的肿瘤细胞增殖能力和微血管形成能力

[0280] 肿瘤细胞增殖能力和组织血管新生能力可以直观地反映肿瘤内部的进展情况。为了进一步明确CDYL对U87MG原位胶质瘤的影响,对原位胶质瘤组织进行免疫组织化学技术染色,以Ki67代表肿瘤细胞的增殖能力,以CD34代表肿瘤组织微血管新生能力。

[0281] 染色结果显示,CDYL敲低后,肿瘤组织中Ki67+的细胞数量显著减少(减少28.59%;*** $P < 0.001$;图8中A),微血管密度显著减少(减少59.19%;*** $P < 0.001$;图8中B)均具有统计学意义。

[0282] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

<110> 北京大学
<120> 一种用于预防和/或治疗胶质瘤形成的产品
<160> 4
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<400> 1
ggctgttcta ccgttatgt 19
<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<400> 2
gggatggact ccatgttaa 19
<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<400> 3
ttctccgaac gtgtcacgt 19
<210> 4
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<400> 4
gatccgctcg cctgtctact aactaattca agagattagt tagtagacag gcgagctttt 60
tta 63

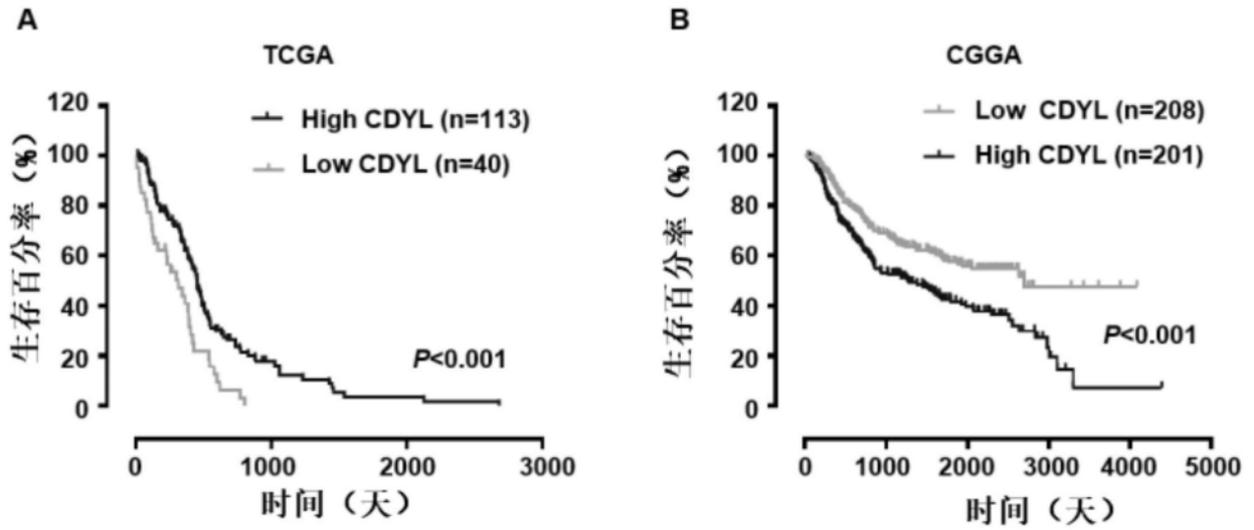


图1

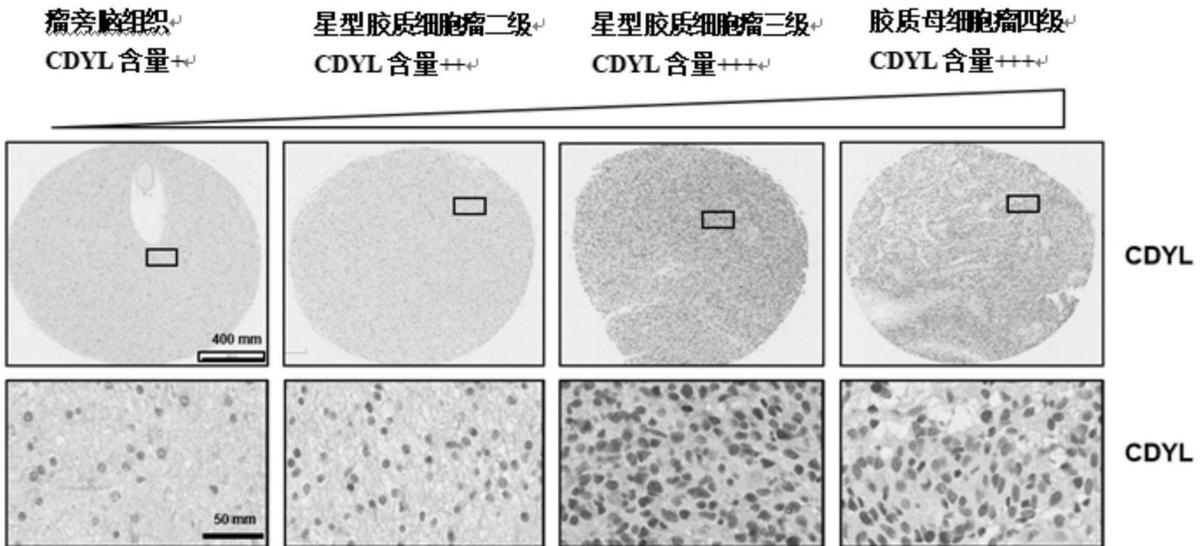


图2

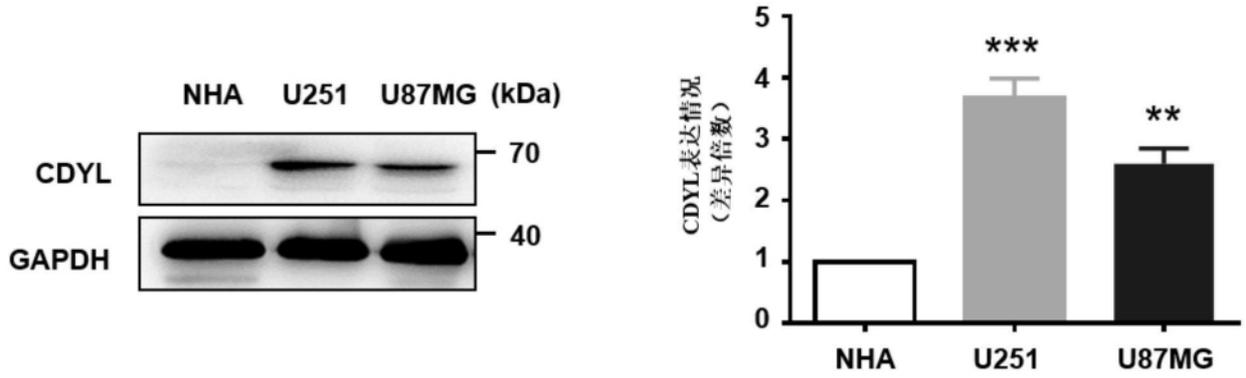


图3

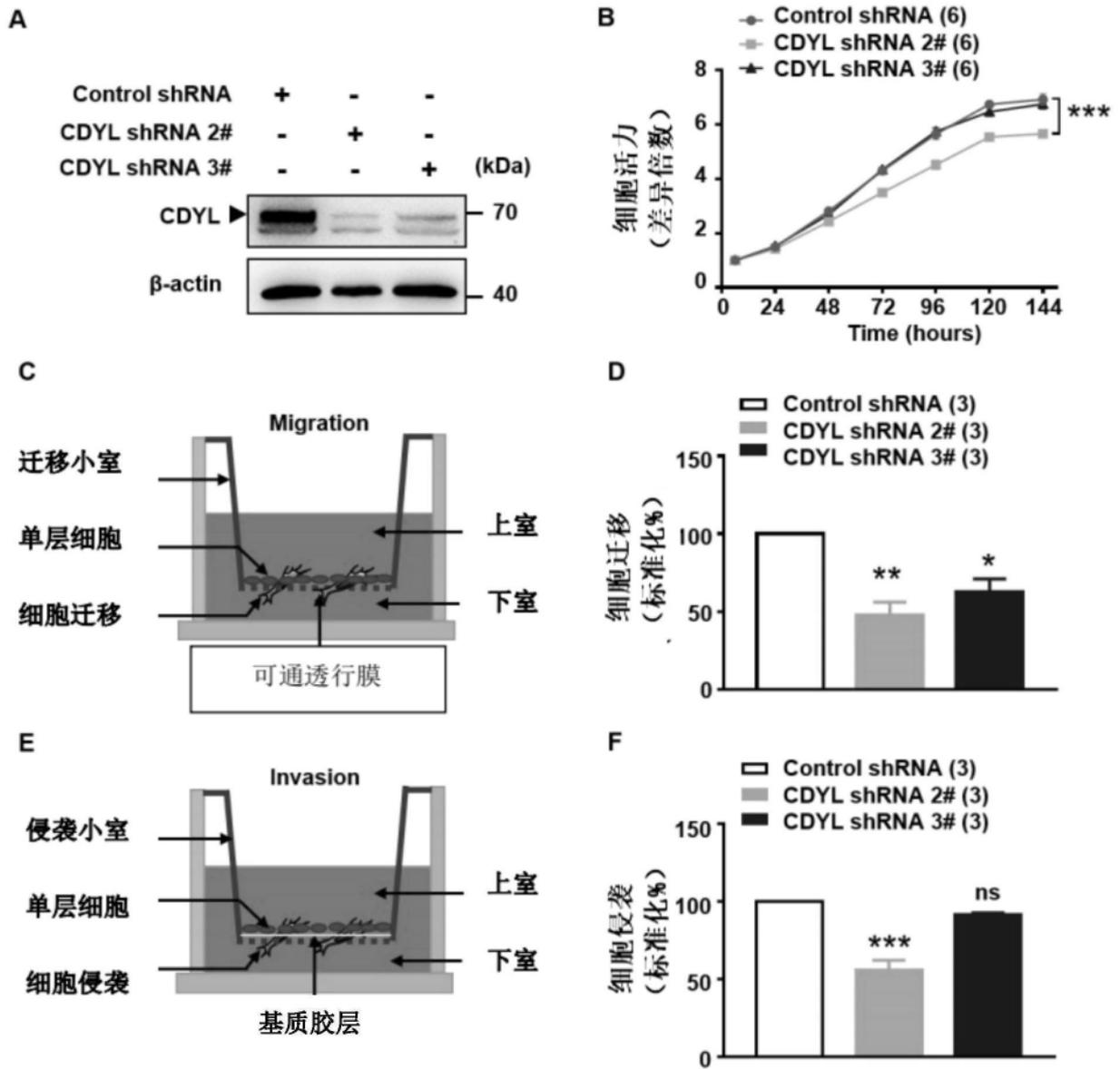


图4

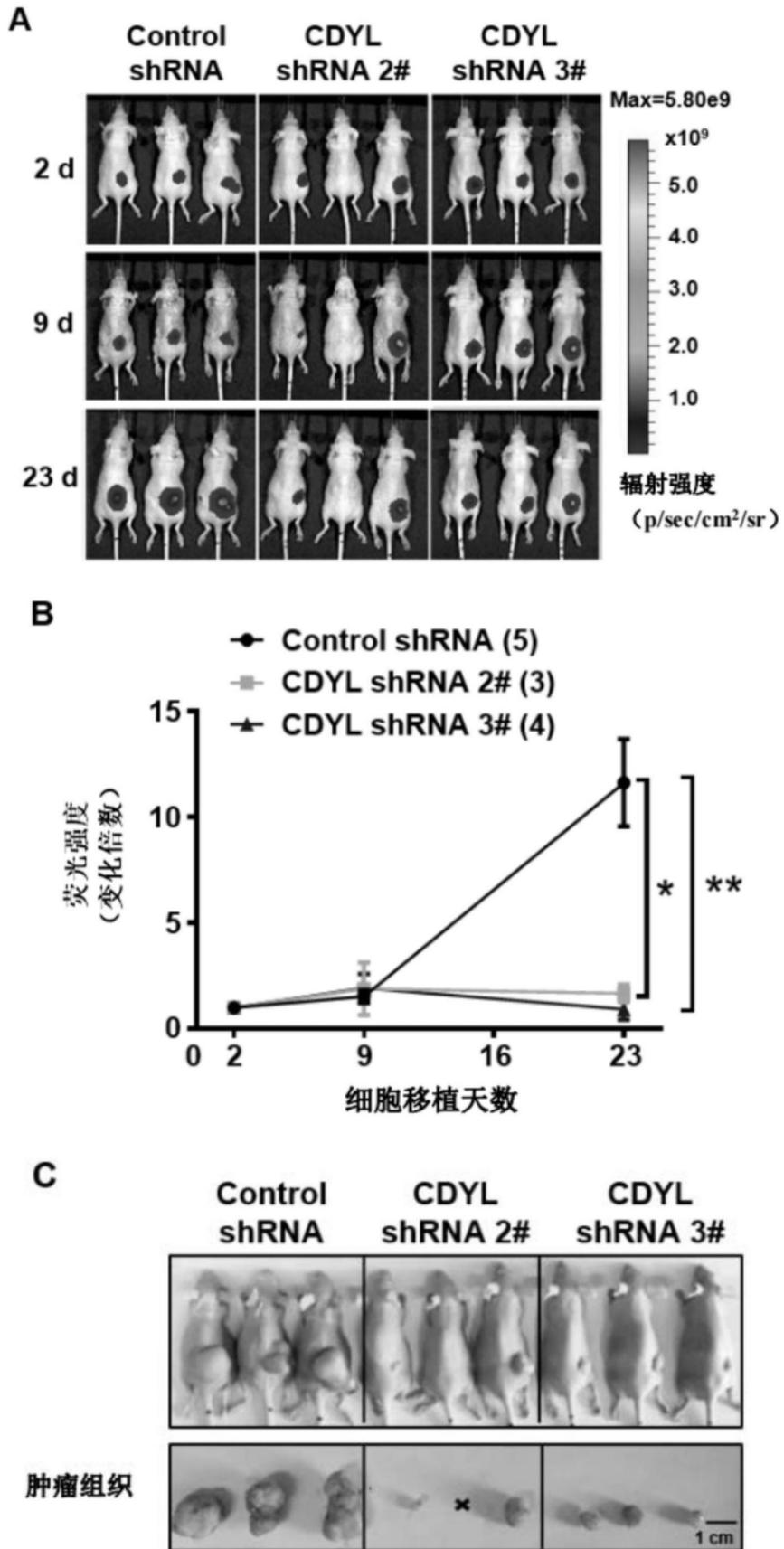


图5

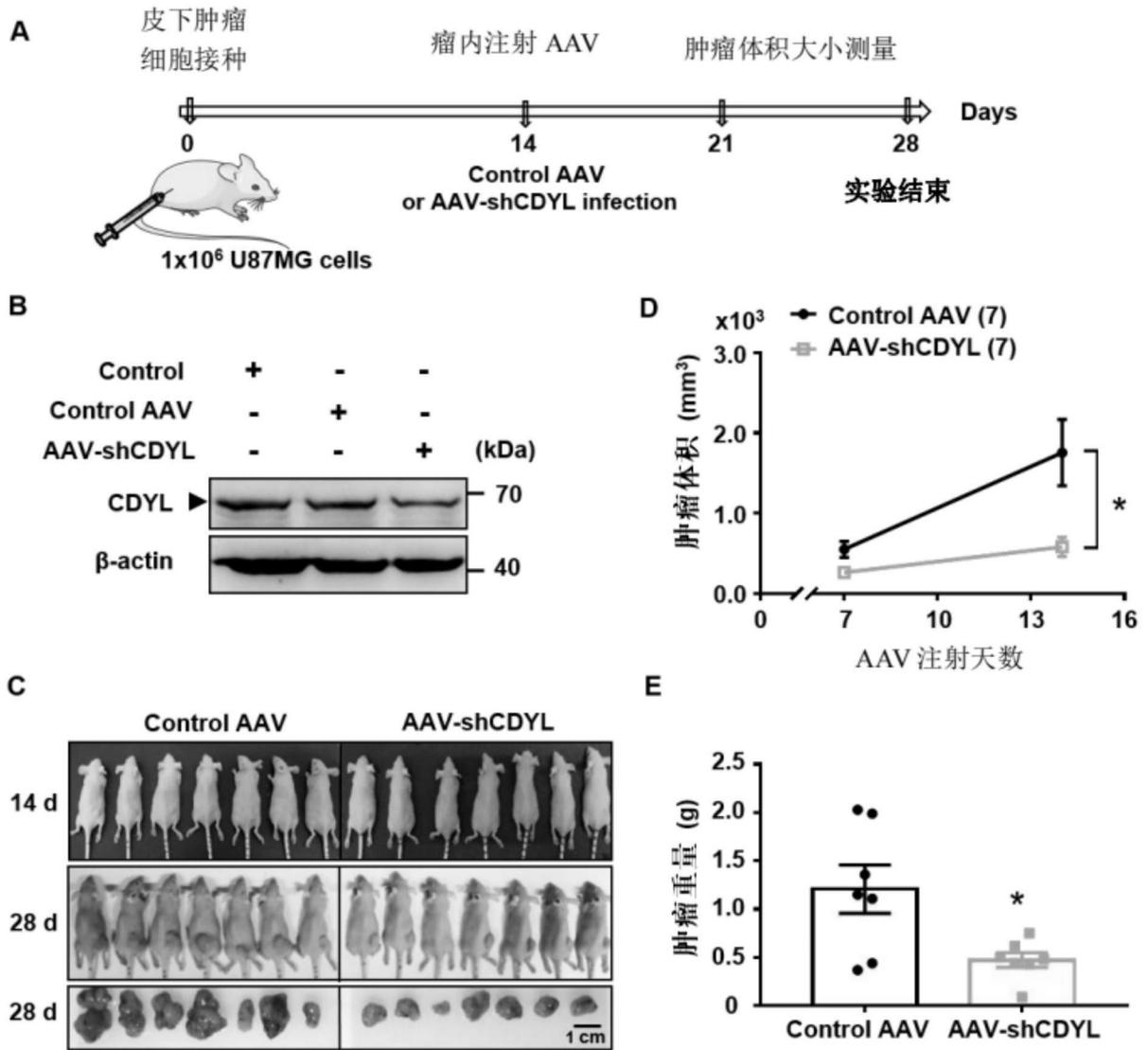


图6

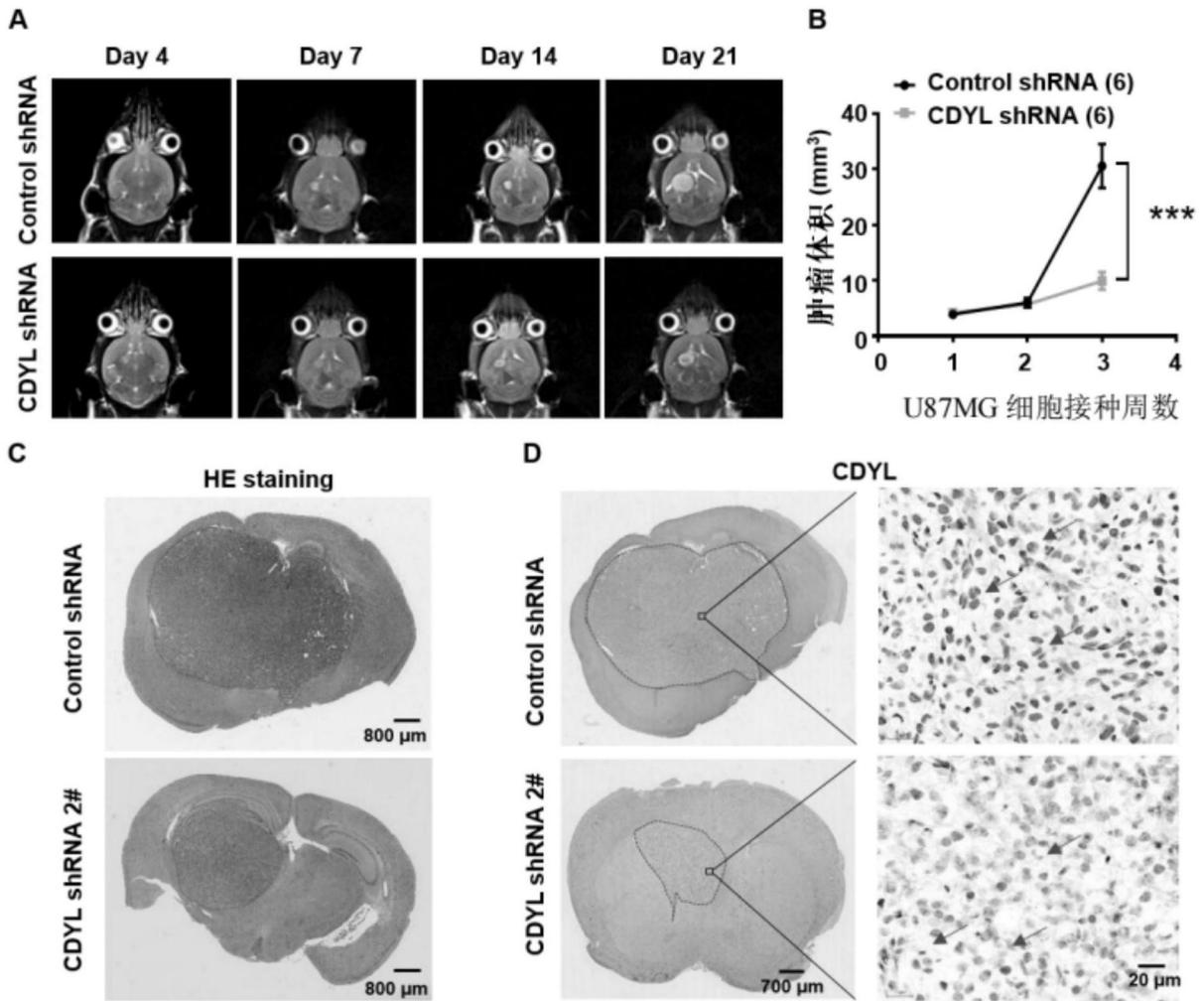


图7

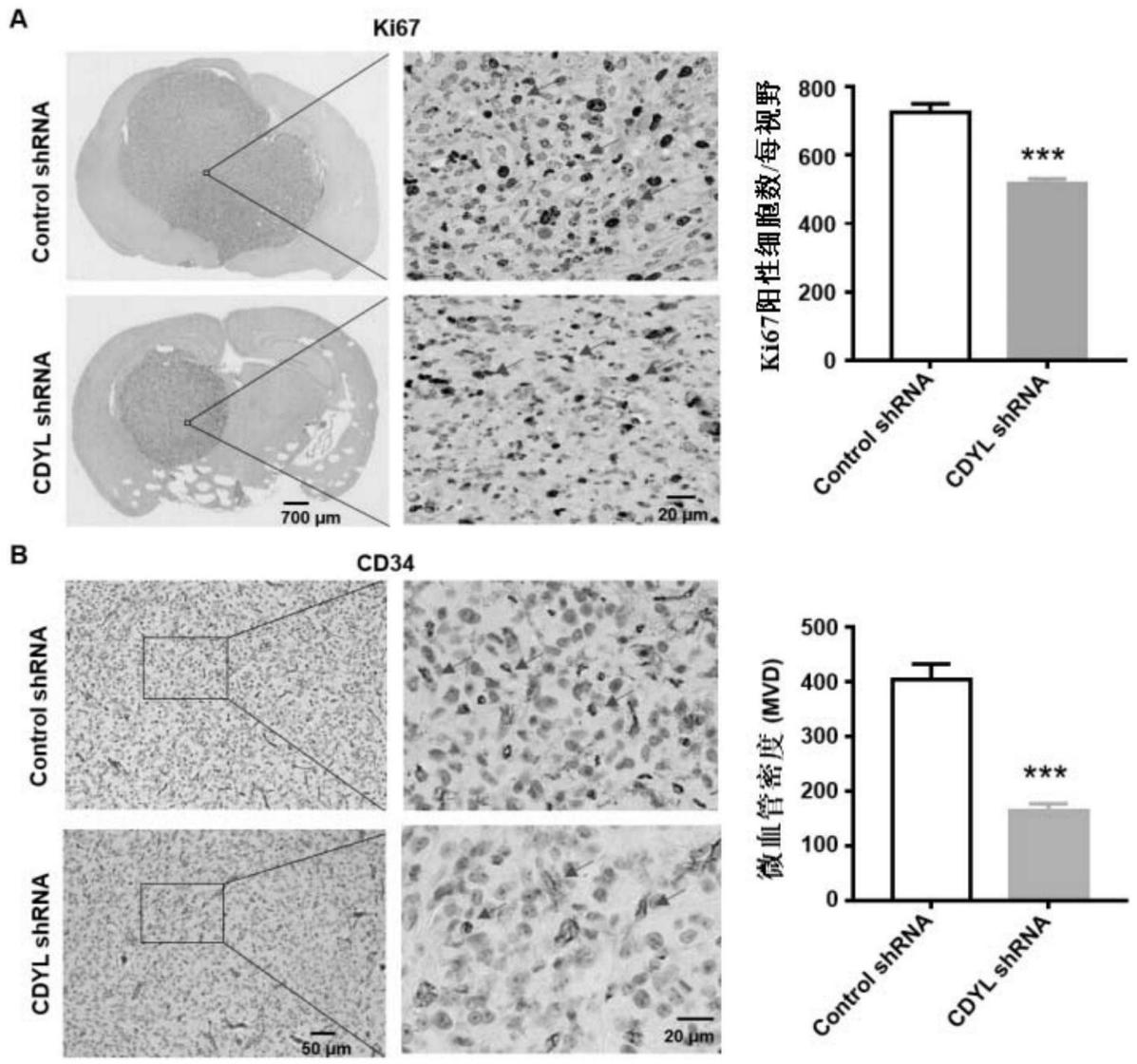


图8