



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108828217 A

(43)申请公布日 2018. 11. 16

(21)申请号 201810321705.1

(22)申请日 2018.04.11

(71)申请人 贵州医科大学附属医院

地址 550001 贵州省贵阳市云岩区贵医街
28号

(72)发明人 喻超 孙诚谊 邓亚竹 潘耀振
陈世裕 陈玲 罗俊 田舍 张宏
张浩 何志伟 朱昌毫 张乙凡

(74)专利代理机构 重庆市信立达专利代理事务
所(普通合伙) 50230

代理人 包晓静

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

G蛋白偶联受体87促进JAK/STAT3信号传导
的方法

(57)摘要

本发明属于医疗技术领域,公开了一种G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进JAK/STAT3信号传导的方法,采用细胞培养,组织标本,蛋白质印迹分析,微阵列数据处理和可视化,质粒产生,免疫沉淀,球体形成,流式细胞术分析,肿瘤异种植物,EMSA实验,统计分析进行实验。本发明表明在PDA中GPR87显著上调,并且与原发PDA中总体存活较短相关。发现GPR87被STAT3诱导并直接与JAK2结合,导致STAT3的超活化和CSC群体在PDA中的体外和体内增殖。同时通过与JAK2的相互作用将GPR87鉴定为促进PDA中持续STAT3激活的调节剂。这些发现支持了表观遗传事件在癌症进展中的功能和临床意义。



1. 一种G蛋白偶联受体87在胰腺中促进JAK/STAT3信号传导的方法,其特征在于,所述G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进JAK/STAT3信号传导的方法包括以下步骤:

步骤一,细胞培养;

步骤二,组织标本;

贵州医科大学附属医院提供了2000年至2006年期间收集的121个石蜡包埋的PDA封存标本;样品获自手术切除的肿瘤患者的临床和组织病理学诊断与PDA,并通过病理学检查证实;

步骤三,蛋白质印迹分析;

使用抗GPR87进行蛋白质印迹分析:抗-pSTAT3,抗STAT3,抗pJAK2,抗JAK2,抗pTyr-100;抗Flag和抗HA抗体;将膜剥离并用抗- α -肌动蛋白或抗GAPDH抗体重新检测上样对照;

步骤四,微阵列数据处理和可视化;

从GEO数据库下载微阵列数据;微阵列数据提取在MeV 4.6;GSEA使用GSEA2.0.9进行;

步骤五,质粒产生;

进行人类GPR87基因的PCR扩增,并将cDNA克隆到pSin EF2慢病毒载体中以表达重组FLAG-标记的GPR87;截短的JAK2片段也被克隆到pSin EF2中;将靶向GPR87和JAK2的shRNA克隆到pSuper Retro病毒载体中;为了产生萤光素酶报告基因,将3 $\times$ STAT3应答元件克隆到pTAL Luc载体中;所有在质粒构建中使用的寡核苷酸列于补充方法的寡核苷酸表中;

步骤六,免疫沉淀;

用含有150mM NaCl,10mM HEPES,pH7.4和1%NP-40的缓冲液裂解用指定质粒转染的总共3 $\times$ 10⁷个BXPC-3细胞;然后将裂解物与FLAG亲和琼脂糖在4 $^{\circ}$ C下温育过夜;用免疫沉淀洗涤缓冲液(150mM NaCl,10mM HEPES,pH 7.4,0.1%NP-40)洗涤含有亲和结合蛋白的珠子7次,用2 $\times$ 200 μ L1M甘氨酸(pH3.0)洗脱;样品变性,然后通过SDS-PAGE分辨;

步骤七,球体形成;

将5 $\times$ 10²个细胞接种在6孔超低簇板中,将10或20个细胞接种在24孔超低簇板中;将细胞在补充有2%B27 (Invitrogen),20ng/mL EGF,20ng/mL bFGF (PeproTech),0.4%BSA (Sigma-Aldrich)的DMEM/F12无血清培养基 (Invitrogen)中培养10天,和5 μ g/mL胰岛素用于球形成;

步骤八,流式细胞术分析;

将细胞用胰蛋白酶消化并以1 $\times$ 10⁶个细胞/mL的浓度重悬于含有2%FBS的DMEM中;然后将细胞在存在或不存在100 μ M维拉帕米 (Sigma-Aldrich)的条件下于37 $^{\circ}$ C预温育30分钟以抑制ABC转运蛋白;随后,将细胞与5 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)在37 $^{\circ}$ C孵育90分钟;随后在冰上孵育10分钟并在流式细胞术分析之前用冰冷的PBS洗涤;使用Summit 5.2软件 (Beckman Coulter)分析数据;

步骤九,肿瘤异种移植;

所有的实验程序均由中山大学的IACUC批准;将裸鼠随机分为六组(每组n=5);将指定数目的细胞皮下接种到裸鼠中;接种后31天处死小鼠,切除肿瘤并进行病理学检查;

步骤十,EMSA实验;

使用来自Pierce Biotechnology的LightShift化学发光EMSA试剂盒进行EMSA;使用含有特异性结合位点的以下DNA探针:STAT3:有义,5'-TCGACATTTCCCGTAAATC-3',反义,5'-

GATTTACGGGAAATGTCGA-3';和OCT-1:有义,5'-TGTCGAATGCAAATCACTAGAA-3',反义,5'-TTCTAGTGATTTGCATTCGACA-3';

步骤十一,统计分析。

2.如权利要求1所述的G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进JAK/STAT3信号传导的方法,其特征在于,所述细胞培养:

获自非恶性人胰腺细胞系hTERT-HPNE和胰腺癌细胞系Panc03.27,Capan-2,Capan-1,SW1990,HPAFII,Panc10.05,BXPC-3和CFPAC-1ATCC;细胞在补充有10%胎牛血清(HyClone;Thermo Scientific)的Dulbecco's Modified Eagle's培养基(DMEM;Invitrogen)中生长。

3.如权利要求1所述的G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进JAK/STAT3信号传导的方法,其特征在于,所述统计分析方法:使用SPSS 21.0(IBM)统计软件包进行除微阵列数据分析之外的所有统计分析;为了建立GPR87表达与PDA临床病理特征之间的相关性,采用Pearson's χ^2 检验;

绘制GPR87高和GPR87低患者的Kaplan-Meier曲线,并使用对数秩检验比较统计学差异;

使用Cox回归分析进行单变量和多变量生存分析;进行学生的t检验以进行2组之间的比较;通过Pearson相关系数计算研究变量之间的二元相关性,数据代表平均值 $\pm$ SD;P值小于0.05被认为是统计学显著的。

G蛋白偶联受体87促进JAK/STAT3信号传导的方法

技术领域

[0001] 本发明属于医疗技术领域,尤其涉及一种G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进JAK/STAT3信号传导的方法。

背景技术

[0002] 胰腺导管腺癌(PDA)是最致命的恶性肿瘤之一。PDA诊断后,约有25%的患者存活至1年,而5年生存率降至5%。不良临床结果是早期难以诊断PDA,侵袭性表型和缺乏有效治疗选择的结果。最近的进展表明,针对癌症干细胞(CSCs)的其他治疗策略可以提高传统疗法对实体瘤的效率。JAK/STAT3信号通路的过度激活与各种人类癌症预后不良有关。越来越多的证据表明JAK/STAT3信号在维持CSCs群体中起重要作用。据报道,JAK/STAT3途径的活化通过上调NANOG诱导肝CSCs的自我更新和肿瘤起始。在成胶质细胞瘤中维持肿瘤干细胞样表型需要JAK/STAT3途径的组成型激活。AGK过度表达维持了JAK/STAT3通路的激活,并导致食管鳞状细胞癌中CSC细胞群的增加。此外,已经证明STAT3有助于PDA发育不同阶段的肿瘤发生和发展。G蛋白偶联受体87(GPR87)属于G蛋白偶联受体(G蛋白偶联受体),GPCRs是一类被认为是治疗性干预的主要靶点,因为它们能够维持人类癌细胞的活力。GPR87的过度表达,调节CD133并促进CSC相关的肝癌迁移和侵袭。最近的一项研究显示,膀胱癌患者复发率较高与GPR87阳性肿瘤有关。然而,GPR87的临床意义及其参与肿瘤发生的分子机制仍不清楚。在此,本发明报道了GPR87在PDA中显着上调,并且与在原发性PDA中总体存活较短相关。此外,发现GPR87被STAT3诱导并直接与JAK2相互作用,导致STAT3的超活化和CSC群体在PDA中的体外和体内增殖。这些结果确定了导致在PDA中持续STAT3激活的调节机制,从而支持表观遗传事件在癌症进展中的功能和临床意义。

[0003] 综上所述,现有技术存在的问题是:癌症干细胞被认为有助于抵抗化疗和放疗,导致与胰腺癌相关的不良预后。尽管持续的JAK2/STAT3活化与癌症干细胞群体的维持有关,但对这一过程涉及的机制仍然不清,该发明提供了一种G蛋白偶联受体87在PDA中促进JAK/STAT3信号传导的方法,为PDA的诊断及有效治疗提供了理论依据。

发明内容

[0004] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进JAK/STAT3信号传导的方法。

[0005] 本发明是这样实现的,采用细胞培养,组织标本,蛋白质印迹分析,微阵列数据处理和可视化,质粒产生,免疫沉淀,球体形成,流式细胞术分析等实验方法,检测GPR87在PDA中的表达情况及其与PDA中总体存活率之间的关系、GPR87与JAK/STAT3信号传导通路之间调控关系,体内、外实验验证GPR87在PDA中的重要作用,选取两株胰腺导管腺癌细胞系进行后续实验。包括以下步骤:

[0006] 步骤一,细胞培养;

[0007] 步骤二,组织标本;

[0008] 贵州医科大学附属医院提供了2000年至2006年期间收集的121个石蜡包埋的PDA封存标本。样品获自手术切除的肿瘤患者的临床和组织病理学诊断与 PDA,并通过病理学检查证实。

[0009] 步骤三,蛋白质印迹分析;

[0010] 使用抗GPR87 (Abcam) 进行蛋白质印迹分析;抗-pSTAT3 (Tyr705), 抗 STAT3, 抗 pJAK2 (Tyr1007-1008), 抗JAK2, 抗pTyr-100 (Cell Signaling Technology); 抗Flag和抗HA抗体 (Sigma-Aldrich)。将膜剥离并用抗- α -肌动蛋白或抗GAPDH抗体重新检测上样对照 (Sigma-Aldrich)。

[0011] 步骤四,微阵列数据处理和可视化;

[0012] 从GEO数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载微阵列数据。微阵列数据提取在MeV 4.6 (<http://www.tm4.org/mev/>)。GSEA使用GSEA 2.0.9进行 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>)。

[0013] 步骤五,质粒产生;

[0014] 进行人类GPR87基因的PCR扩增,并将cDNA克隆到pSin EF2慢病毒载体中以表达重组FLAG-标记的GPR87。截短的JAK2片段也被克隆到pSin EF2 中。将靶向GPR87和JAK2的shRNA克隆到pSuper Retro病毒载体中。为了产生萤光素酶报告基因,将3 $\times$ STAT3应答元件克隆到pTAL Luc载体中。所有在质粒构建中使用的寡核苷酸列于“补充方法”的寡核苷酸表中。根据制造商的说明书使用Lipofectamine 2000试剂 (Invitrogen) 进行siRNA和质粒的转染。

[0015] 步骤六,免疫沉淀;

[0016] 用含有150mM NaCl, 10mM HEPES, pH7.4和1%NP-40的缓冲液裂解用指定质粒转染的总共3 $\times$ 10⁷个BXPC-3细胞。然后将裂解物与FLAG亲和琼脂糖 (Sigma-Aldrich) 在4℃下温育过夜。用免疫沉淀洗涤缓冲液 (150mM NaCl, 10mM HEPES, pH 7.4, 0.1%NP-40) 洗涤含有亲和结合蛋白的珠子7次,用2 $\times$ 200 μ L 1M甘氨酸 (pH3.0) 洗脱。样品变性,然后通过SDS-PAGE分辨。

[0017] 步骤七,球体形成;

[0018] 将5 $\times$ 10²个细胞接种在6孔超低簇板中,将10或20个细胞接种在24孔超低簇板中。将细胞在补充有2%B27 (Invitrogen), 20ng/mL EGF, 20ng/mL bFGF (PeproTech), 0.4%BSA (Sigma-Aldrich) 的DMEM/F12无血清培养基 (Invitrogen) 中培养10天,和5 μ g/mL胰岛素用于球形成。

[0019] 步骤八,流式细胞术分析;

[0020] 将细胞用胰蛋白酶消化并以1 $\times$ 10⁶个细胞/mL的浓度重悬于含有2%FBS 的DMEM中。然后将细胞在存在或不存在100 μ M维拉帕米 (Sigma-Aldrich) 的条件下于37℃预温育30分钟以抑制ABC转运蛋白。随后,将细胞与5 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) 在37℃孵育90分钟。随后在冰上孵育10分钟并在流式细胞术分析之前用冰冷的PBS洗涤。使用Summit 5.2软件 (Beckman Coulter) 分析数据。

[0021] 步骤九,肿瘤异种移植;

[0022] 所有的实验程序均由贵州医科大学的IACUC批准。将裸鼠随机分为六组 (每组n=5)。将指定数目的细胞 (1 $\times$ 10⁵, 1 $\times$ 10⁴或1 $\times$ 10³) 皮下接种到裸鼠中。接种后31天处死小

鼠,切除肿瘤并进行病理学检查。

[0023] 步骤十,EMSA实验;

[0024] 使用来自Pierce Biotechnology的LightShift化学发光EMSA试剂盒进行EMSA。使用含有特异性结合位点的以下DNA探针:STAT3:有义,5'-TCGACATTTCCTCGTAAATC-3',反义,5'-GATTTACGGGAAATGTCGA-3';和 OCT-1:有义,5'-TGTCGAATGCAAATCACTAGAA-3',反义,5'-TTCTAGTGATTTCATTTCGACA-3'。

[0025] 步骤十一,统计分析。

[0026] 进一步,所述细胞培养:

[0027] 获自非恶性人胰腺细胞系hTERT-HPNE和胰腺癌细胞系Panc03.27,Capan-2,Capan-1,SW1990,HPAFII,Panc10.05,BXPC-3和CFPAC-1ATCC (美国弗吉尼亚州马纳萨斯)。细胞在补充有10%胎牛血清(HyClone;Thermo Scientific)的Dulbecco's Modified Eagle's培养基(DMEM;Invitrogen)中生长。

[0028] 进一步,所述统计分析方法:

[0029] 使用SPSS 21.0 (IBM) 统计软件包进行除微阵列数据分析之外的所有统计分析。为了建立GPR87表达与PDA临床病理特征之间的相关性,采用Pearson's χ^2 检验。绘制GPR87高和GPR87低患者的Kaplan-Meier曲线,并使用对数秩检验比较统计学差异。使用Cox回归分析进行单变量和多变量生存分析。进行学生的t检验以进行2组之间的比较。通过Pearson相关系数计算研究变量之间的二元相关性。数据代表平均值 $\pm$ SD。P值小于0.05被认为是统计学显著的。

[0030] 本发明的优点及积极效果为:本发明表明在PDA中GPR87显着上调,并且与原发PDA中总体存活较短相关。此外,发现GPR87被STAT3诱导并直接与JAK2结合,导致STAT3的超活化和CSC群体在PDA中的体外和体内增殖。同时通过与JAK2的相互作用将GPR87鉴定为促进PDA中持续STAT3激活的调节剂。这些发现支持了表观遗传事件在癌症进展中的功能和临床意义。

附图说明

[0031] 图1是本发明实施提供的G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进 JAK/STAT3信号传导的方法流程图。

具体实施方式

[0032] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0033] 下面结合附图对本发明的应用原理作进一步描述。

[0034] 如图1所示,本发明提供一种G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进 JAK/STAT3信号传导的方法包括以下步骤:

[0035] 步骤S101,细胞培养;

[0036] 步骤S102,组织标本;

[0037] 提供了2000年至2006年期间收集的121个石蜡包埋的PDA封存标本。样品获自手术

切除的肿瘤患者的临床和组织病理学诊断与PDA,并通过病理学检查证实。

[0038] 步骤S103,蛋白质印迹分析;

[0039] 使用抗GPR87 (Abcam) 进行蛋白质印迹分析;抗-pSTAT3 (Tyr705), 抗 STAT3, 抗 pJAK2 (Tyr1007-1008), 抗JAK2, 抗pTyr-100 (Cell Signaling Technology); 抗Flag和抗HA 抗体 (Sigma-Aldrich)。将膜剥离并用抗- α -肌动蛋白或抗GAPDH抗体重新检测上样对照 (Sigma-Aldrich)。

[0040] 步骤S104,微阵列数据处理和可视化;

[0041] 从GEO数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载微阵列数据。微阵列数据提取在MeV 4.6 (<http://www.tm4.org/mev/>)。GSEA使用GSEA 2.0.9进行 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>)。

[0042] 步骤S105,质粒产生;

[0043] 进行人类GPR87基因的PCR扩增,并将cDNA克隆到pSin EF2慢病毒载体中以表达重组FLAG-标记的GPR87。截短的JAK2片段也被克隆到pSin EF2 中。将靶向GPR87和JAK2的 shRNA克隆到pSuper Retro病毒载体中。为了产生萤光素酶报告基因,将3 $\times$ STAT3应答元件克隆到pTAL Luc载体中。所有在质粒构建中使用的寡核苷酸列于“补充方法”的寡核苷酸表中。根据制造商的说明书使用Lipofectamine 2000试剂 (Invitrogen) 进行siRNA和质粒的转染。

[0044] 步骤S106,免疫沉淀;

[0045] 用含有150mM NaCl, 10mM HEPES, pH7.4和1%NP-40的缓冲液裂解用指定质粒转染的总共3 $\times$ 10⁷个BXPC-3细胞。然后将裂解物与FLAG亲和琼脂糖 (Sigma-Aldrich) 在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。用免疫沉淀洗涤缓冲液 (150mM NaCl, 10mM HEPES, pH 7.4, 0.1%NP-40) 洗涤含有亲和结合蛋白的珠子7次,用2 $\times$ 200 μ L1M甘氨酸 (pH3.0) 洗脱。样品变性,然后通过SDS-PAGE分辨。

[0046] 步骤S107,球体形成;

[0047] 将5 $\times$ 10²个细胞接种在6孔超低簇板中,将10或20个细胞接种在24孔超低簇板中。将细胞在补充有2%B27 (Invitrogen), 20ng/mL EGF, 20ng/mL bFGF (PeproTech), 0.4% BSA (Sigma-Aldrich) 的DMEM/F12无血清培养基 (Invitrogen) 中培养10天,和5 μ g/mL胰岛素用于球形成。

[0048] 步骤S108,流式细胞术分析;

[0049] 将细胞用胰蛋白酶消化并以1 $\times$ 10⁶个细胞/mL的浓度重悬于含有2%FBS 的DMEM中。然后将细胞在存在或不存在100 μ M维拉帕米 (Sigma-Aldrich) 的条件下于37 $^{\circ}$ C预温育30分钟以抑制ABC转运蛋白。随后,将细胞与5 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) 在37 $^{\circ}$ C孵育90分钟。随后在冰上孵育10分钟并在流式细胞术分析之前用冰冷的PBS洗涤。使用Summit 5.2软件 (Beckman Coulter) 分析数据。

[0050] 步骤S109,肿瘤异种移植;

[0051] 所有的实验程序均由中山大学的IACUC批准。将裸鼠随机分为六组 (每组 n=5)。将指定数目的细胞 (1 $\times$ 10⁵, 1 $\times$ 10⁴或1 $\times$ 10³) 皮下接种到裸鼠中。接种后31天处死小鼠,切除肿瘤并进行病理学检查。

[0052] 步骤S110,EMSA实验;

[0053] 使用来自Pierce Biotechnology的LightShift化学发光EMSA试剂盒进行 EMSA。使用含有特异性结合位点的以下DNA探针:STAT3:有义, 5'-TCGACATTTCCCGTAAATC-3',反义,5'-GATTTACGGGAAATGTCGA-3';和OCT-1:有义,5'-TGTCGAATGCAAATCACTAGAA-3',反义,5'-TTCTAGTGATTTGCATTTCGACA-3'。

[0054] 步骤S111,统计分析。

[0055] 本发明提供的步骤S101中细胞培养:

[0056] 获自非恶性人胰腺细胞系hTERT-HPNE和胰腺癌细胞系Panc03.27, Capan-2, Capan-1, SW1990, HPAFII, Panc10.05, BXPC-3和CFPAC-1ATCC (美国弗吉尼亚州马纳萨斯)。细胞在补充有10%胎牛血清 (HyClone; Thermo Scientific) 的Dulbecco's Modified Eagle's培养基 (DMEM; Invitrogen) 中生长。

[0057] 本发明提供的步骤S111中统计分析方法:

[0058] 使用SPSS 21.0 (IBM) 统计软件包进行除微阵列数据分析之外的所有统计分析。为了建立GPR87表达与PDA临床病理特征之间的相关性,采用Pearson's χ^2 检验。绘制GPR87高和GPR87低患者的Kaplan-Meier曲线,并使用对数秩检验比较统计学差异。使用Cox回归分析进行单变量和多变量生存分析。进行学生的t检验以进行2组之间的比较。通过Pearson相关系数计算研究变量之间的二元相关性。数据代表平均值 $\pm$ SD。P值小于0.05被认为是统计学意义的。

[0059] 1、结果

[0060] 1.1、GPR87上调与PDA的进展和不良预后相关;

[0061] 基于基于微阵列分析的高通量评估 ($n=191$; $P<0.001$; NCBI/GEO/ GSE71729), 发现GPR87在PDA中的表达被上调。值得注意的是,在PDA存活5年以上 ($n=58$; $P<0.05$; TCGA) 的患者中也发现GPR87mRNA水平下调,并且与PDA患者的总体存活 $n=63$; $P<0.05$; NCBI/GEO/ GSE57495)。此外,通过发表PDA患者表达谱的基因组富集分析 (GSEA) 分析GPR87表达和PDA相关基因标签,本发明发现GPR87mRNA水平与PDA发育基因标签正相关。此外,RT-PCR和Western印迹分析显示在包括Panc03.27, Capan-2, Capan-1, SW1990, HPAFII, Panc10.05, BXPC-3的所有八种分析的PDA细胞系中GPR87 的表达显着上调CFPAC-1与永生化的非恶性胰腺上皮HPNE细胞相比。

[0062] 为了进一步研究GPR87在PDA中的临床意义,使用免疫组织化学在121 例PDA中检测GPR87表达。GPR87在生活不到5年的患者中显着上调。此外,相关性研究显示GPR87表达与PDA患者的预后较差呈正相关 ($P<0.001$)。多因素生存分析表明,GPR87表达被认为是PDA患者总生存的独立预后因子。总之,这些数据表明高水平的GPR87表达与PDA的进展之间的潜在联系,并强调GPR87作为疾病预后的预测性生物标志物的潜在价值。

[0063] 1.2、STAT3诱导PDA中的GPR87表达;

[0064] 据报道,GPR87是野生型TP53的下游靶基因。然而,在PDA中经常观察到TP53的突变等位基因。因此,推测在GPR中可能存在与GPR87表达有关的其他调节机制是合理的。GSEA结果显示GPR87表达与PDA中STAT3调节的基因标签的表达相关。使用CONSISTE程序分析GPR87启动子区预测了三种典型的STAT3应答元件 (SRE)。ChIP分析显示内源性STAT3蛋白与GPR87启动子中的第一个SRE (SRE1) 结合。此外,为了验证GPR87基因中的SREs 是否对STAT3有反应,将SRE1片段克隆到pTAL-萤光素酶报道基因 (pTAL-luc) 中,观察到IL6处理后萤光素酶

活性的一致和剂量依赖性诱导。此外,用IL-6 激活STAT3后,GPR87的水平显着增加,而STAT3途径抑制剂AG490对STAT3。



图1

专利名称(译)	G蛋白偶联受体87促进JAK/STAT3信号传导的方法		
公开(公告)号	CN108828217A	公开(公告)日	2018-11-16
申请号	CN201810321705.1	申请日	2018-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	贵州医科大学附属医院		
申请(专利权)人(译)	贵州医科大学附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	贵州医科大学附属医院		
[标]发明人	喻超 孙诚谊 邓亚竹 潘耀振 陈世裕 陈玲 罗俊 田舍 张宏 张浩 何志伟 朱昌毫 张乙凡		
发明人	喻超 孙诚谊 邓亚竹 潘耀振 陈世裕 陈玲 罗俊 田舍 张宏 张浩 何志伟 朱昌毫 张乙凡		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N15/14		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N15/14 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于医疗技术领域，公开了一种G蛋白偶联受体87在胰腺导管腺癌中促进JAK/STAT3信号传导的方法，采用细胞培养，组织标本，蛋白质印迹分析，微阵列数据处理和可视化，质粒产生，免疫沉淀，球体形成，流式细胞术分析，肿瘤异种移植，EMSA实验，统计分析进行实验。本发明表明在PDA中GPR87显著上调，并且与原发性PDA中总体存活较短相关。发现GPR87被STAT3诱导并直接与JAK2结合，导致STAT3的超活化和CSC群体在PDA中的体外和体内增殖。同时通过与JAK2的相互作用将GPR87鉴定为促进PDA中持续STAT3激活的调节剂。这些发现支持了表观遗传事件在癌症进展中的功能和临床意义。

