

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810104272.0

[51] Int. Cl.

C12Q 1/48 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月21日

[11] 公开号 CN 101560546A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

[22] 申请日 2008.4.16

[21] 申请号 200810104272.0

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 陈 畅 李江美

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 王 旭

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 8 页

[54] 发明名称

肌醇磷脂 4 位激酶二型 α 亚型 PI4KII α 的应用

[57] 摘要

本发明公开了肌醇磷脂 4 位激酶 (Phosphatidylinositol 4 - kinase type II α , PI4KII α) 的新的生物学功能, 以及基于该新功能的应用。PI4KII α 在调控缺氧诱导因子 HIF - 1 α 及其下游促血管新生基因 VEGF 中起关键作用。选择性降低 PI4KII α 表达, 能显著抑制肿瘤生长和肿瘤血管新生。PI4KII α 可作为干预 HIF - 1 α 所调控基因相关的疾病、以及血管新生相关疾病的靶分子。此外, 利用该靶分子可以针对上述相关疾病进行药物筛选。

1. 一种筛选药物的方法,其中,该方法包括以 PI4K 为靶点,筛选抑制 PI4K 基因表达或抑制 PI4K 酶活的物质。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述药物的活性成分为 PI4K 基因的反义 RNA 片段、或 PI4K 的拮抗剂。
3. 权利要求 1 或 2 中的方法,其中所述 PI4K 为 PI4KII α 亚型。
4. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述药物可以用来治疗肿瘤,癌症,关节炎,糖尿病,或视网膜异常。
5. 一种筛选药物的方法,其中,该方法包括以 PI4K 为靶点,筛选增强 PI4K 基因表达或增强 PI4K 酶活的物质。
6. 权利要求 5 所述的方法,其中所述药物的活性成分为 PI4K 的激动剂。
7. 权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述 PI4K 为 PI4KII α 亚型。
8. 权利要求 5 或 6 所述的方法,其中所述药物可以用来促进伤口愈合或组织再生。
9. 一种药物,其包括能够抑制 PI4K 基因表达或抑制 PI4K 酶活的活性成分。
10. 权利要求 9 的药物,其中所述活性成分为 PI4K 基因的反义 RNA 片段、或 PI4K 的拮抗剂。
11. 权利要求 9 或 10 所述的药物,其中所述 PI4K 为 PI4KII α 亚型。
12. 权利要求 9 或 10 的药物,其中所述活性成分为小 RNA 序列:
正义链: UGAAGCAGAACCUCUCCUCATT(SEQ ID NO:1)
反义链: UCAGGAAGAGGUUCUGCUUCATT(SEQ ID NO:2)。
13. 权利要求 9 的药物,其中所述药物可以用来治疗肿瘤,癌症,关节炎,糖尿病,或视网膜异常。
14. 一种药物,其包括能够增强 PI4K 基因表达或增强 PI4K 酶活的活性成分。
15. 权利要求 14 的药物,其中所述活性成分为 PI4K 的激动剂。
16. 权利要求 14 或 15 的药物,其中所述 PI4K 为 PI4KII α 亚型。

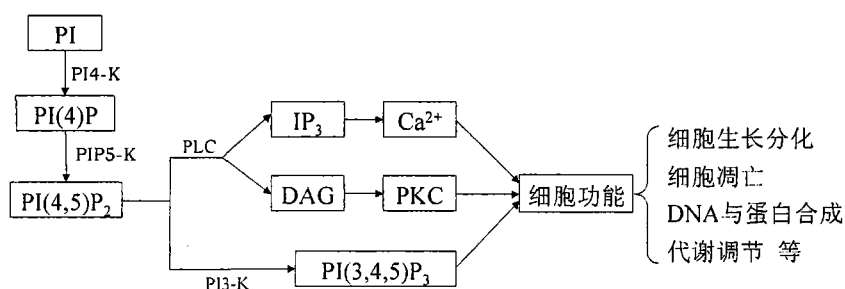
17. 权利要求 14 或 15 的药物，其中所述药物可以用来促进伤口愈合或组织再生。

肌醇磷脂 4 位激酶二型 α 亚型 PI4KII α 的应用

背景技术

肌醇磷脂 (PI) 信号通路在跨膜信号转导和多种生长因子和激素调节细胞生长的信号通路中起核心作用。肌醇磷脂4位激酶PI4K是PI 信号通路中第一个起重要作用的激酶, 在肌醇磷脂循环过程中PI4-K首先催化肌醇磷脂(PI)环上D4位磷酸化, 产生4-磷酸磷脂酰肌醇(4-phosphatidyl-inositide, PIP), 然后由PIP5-K激酶进一步催化合成(4,5-phosphatidyl-inositide diphosphate, PIP₂); PIP₂在磷脂酶C (Phospholipase C, PLC)的作用下水解为三磷酸肌醇(1,4,5-trisphosphoinositol, IP₃)和甘油二酯(Diacylglycerol, DAG), 作为第二信使, 引发胞内钙释放和激活蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC), 启动细胞内的双信使系统。另外, PIP₂也是PI3-K的底物, 因而PI4K影响PI3-K信号通路。近年研究发现PIP, PIP₂本身也具有重要生物学功能。因此, PI4K是PI信号通路中的关键分子, 关于PI4K的功能研究引起了人们越来越多的关注。

胞内PI4K相关的信号通路:



PI4K有二型和三型两种类型, 其中二型包括 α 和 β 两种亚型 (PI4KII α 和PI4KII β)。PI4KII α 的基因编码和蛋白序列分别见GenBank accession number: NM_018425(SEQ ID NO:10) 和 GenBank accession number: NP_060895(SEQ ID NO:9), 其主要功能与膜转运密切相关。此外, PI4KII

α 在神经递质释放、宿主细胞激活、调控内皮生长因子EGF方面有重要作用。但其生物学功能还远未得到阐明。其在肿瘤中的作用和机制在国内外均未见报道。

有文献报道癌症病人的PI激酶活力增高，细胞内PKC的量明显增高，说明肌醇磷脂信号通路可能与肿瘤相关。关于PI4KII α 也有一些间接证据表明其可能在肿瘤中起作用。如：PI4KII α 与调控细胞迁移的蛋白 valosincontaining protein (VCP)共定位，而VCP上调是癌症诊断的一个标志物。PI4KII α 能调控与肿瘤生长密切相关的表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达。大多数肌醇磷脂激酶在癌细胞中酶活上调，其中包括PI4K。但至今没有关于PI4K与肿瘤生长有关的直接证据及分子机制研究。

寻找特异信号通路的抗肿瘤靶点和抗血管新生是目前抗肿瘤策略的焦点。国际上以PI4K下游的信号分子PKC、PLC以及 PI3-K 为靶分子寻找新药的工作已有报导。我们研究发现PI4KII α 在缺氧诱导因子HIF-1 α 合成中起关键作用。由于受HIF-1 α 转录调控的下游基因——血管内皮生长因子VEGF通过调控内皮细胞的增殖、存活、转移控制血管生成，所以HIF-1 α 与肿瘤生长和血管新生直接相关，调控HIF-1 α 是重要的抗肿瘤的有效策略。PI4KII α 对HIF-1 α 的关键调控作用使其可能在肿瘤生长和血管新生过程中发挥重要作用。

发明内容

我们首次发现在人宫颈癌 HeLa 细胞和人肾上皮 HEK-293 细胞过表达 PI4KII α ，能显著上调缺氧诱导因子 HIF-1 α 的蛋白表达以及其下游促血管新生基因 VEGF 和一氧化氮合酶 NOS 的表达。深入分子机制研究表明：PI4KII α 对 HIF-1 α 的调控作用是 PI3K, MAPK 信号通路依赖的，并且是通过调控其合成实现的，而对其稳定性和转录水平没有影响。通过 RNA 干扰技术特异抑制 PI4KII α 表达，HIF-1 α 的表达也被显著抑制，即使外加缺氧诱导也不能使其升高。这是一个重要发现，也是我们该发明的重要理论基础：即：PI4KII α 是 HIF-1 α 合成所必需的，是调控 HIF-1 α 的关键，预示 PI4KII α 对 HIF-1 α 相关的功能都具有调控作用。基于 HIF-1 α

在肿瘤生长和血管新生中的重要作用，我们进一步研究了 PI4KII α 在肿瘤中的作用。研究发现，随着肿瘤的生长，PI4KII α 的蛋白表达也显著升高。通过 RNA 干扰技术特异降低肿瘤细胞中 PI4KII α 表达，能显著抑制肿瘤生长和肿瘤血管新生。并在乳腺癌、宫颈癌等多种类型肿瘤中都起显著作用。至此，我们首次揭示了 PI4KII α 在调控缺氧诱导因子 HIF-1 α 和肿瘤血管新生方面的新功能和作用的分子机制。研究结果预示肌醇磷脂 4 位激酶 PI4KII α 可能是抑制肿瘤生长和血管新生的关键靶点。

在一个方面，本发明提供一种治疗疾病的方法，该方法包括以 PI4K 为靶点，抑制 PI4K 的表达或 PI4K 的活性，其中所述抑制可以是直接的或间接的。

在一个实施方案中，其中通过 RNA 干扰来抑制 PI4K 的表达。

在一个实施方案中，其中实施所述 RNA 干扰的小 RNA 序列为：

正义链： UGAAGCAGAACCUCUUCCUCATT (SEQ ID NO:1)

反义链： UCAGGAAGAGGUUCUGCUUCATT (SEQ ID NO:2)。

在一个实施方案中，其中通过对 PI4K 基因进行基因敲除来抑制 PI4K 的表达。

在一个实施方案中，其中通过 PI4K 酶拮抗剂抑制 PI4KI 的活性。

在一个实施方案中，其中所述拮抗剂包括海洋活性物质海洋 1 号药—海洋 12 号药。

在一个实施方案中，所述海洋活性物质海洋 1 号药—海洋 12 号药来自海龙科和棘皮海生动物。

在一个实施方案中，其中所述疾病为肿瘤或癌症。

在一个实施方案中，其中所述肿瘤或癌症包括宫颈癌和乳腺癌。

在一个实施方案中，其中所述疾病为与血管新生相关的疾病。

在一个实施方案中，其中所述与血管新生相关的疾病包括肿瘤、关节炎，糖尿病或视网膜异常。

在上述实施方案中，所述 PI4K 酶为 PI4KII α 亚型。

在另一个方面，本发明提供一种治疗与血管新生相关的疾病的方法，该方法包括以 PI4K 为靶点，增强 PI4K 的表达或 PI4K 的活性，其中所述增强可以是直接的或间接的。

在一个实施方案中，其中通过过表达来增强 PI4K 的表达。

在一个实施方案中，其中通过激动剂来增强 PI4K 的活性。

在一个实施方案中，所述激动剂是海洋 13 号药—海洋 22 号药。

在一个实施方案中，所述海洋活性物质 13 号药—海洋 22 号药来自海龙科和棘皮海生动物。

在一个实施方案中，其中所述与血管新生相关的疾病包括伤口愈合或组织再生。

在前述实施方案中，所述 PI4K 酶为 PI4KII α 亚型。

在另一个方面中，本发明提供一种治疗与 HIF-1 α 所调控基因相关的疾病的方法，该方法包括以 PI4K 为靶点，相应地抑制或增强 PI4K 的表达或其活性，其中所述抑制或增强可以是直接的或间接的。

在一个实施方案中，所述 PI4K 是 PI4KII α 亚型。

在一个实施方案中，其中所述与 HIF-1 α 所调控基因相关的疾病包括糖尿病，肿瘤耐药或心脑血管疾病。

在另一个方面，本发明提供一种筛选药物的方法，其中，该方法包括以 PI4K 为靶点，筛选抑制 PI4K 基因表达或抑制 PI4K 酶活的物质。

在一个实施方案中，其中所述药物的活性成分为 PI4K 基因的反义 RNA 片段、或 PI4K 的拮抗剂。

在前述实施方案中，所述 PI4K 为 PI4KII α 亚型。

在一个实施方案中，其中所述药物可以用来治疗肿瘤，癌症，关节炎，糖尿病，或视网膜异常。

在另一个方面，本发明提供一种筛选药物的方法，其中，该方法包括以 PI4K 为靶点，筛选增强 PI4K 基因表达或增强 PI4K 酶活的物质。

在一个实施方案中，其中所述药物的活性成分为 PI4K 的激动剂。

在一个实施方案中，其中所述药物可以用来促进伤口愈合或组织再生。

在前述实施方案中，所述 PI4K 为 PI4KII α 亚型。

在另一个方面，本发明提供一种药物，其包括能够抑制 PI4K 基因表达或抑制 PI4K 酶活的活性成分。

在一个实施方案中，其中所述活性成分为 PI4K 基因的反义 RNA 片段、

或 PI4K 的拮抗剂。

在前述实施方案中，所述 PI4K 是 PI4KII α 亚型。

在一个实施方案中，其中所述活性成分为小 RNA 序列：

正义链： UGAAGCAGAACCUCUCCUCATT (SEQ ID NO:1)

反义链： UCAGGAAGAGGUUCUGCUUCATT (SEQ ID NO:2)。

在一个实施方案中，其中所述药物可以用来治疗肿瘤，癌症，关节炎，糖尿病，或视网膜异常。

在另一个方面，本发明提供一种药物，其包括能够增强 PI4K 基因表达或增强 PI4K 酶活的活性成分。

在一个实施方案中，其中所述活性成分为 PI4K 的激动剂。

在前述实施方案中，所述 PI4K 是 PI4KII α 亚型。

在一个实施方案中，其中所述药物可以用来促进伤口愈合或组织再生。

在一个实施方案中，其中所述活性成分还组合以常规抑制癌症药物。

本发明所述药物的配制方法，剂型，给药途径，其中包含的辅料和载体等以及有效剂量的确定是本领域技术人员公知的。例如，本发明的药物除了上述活性成分外，还可以包含药用载体。在本文中，药用的载体指无毒的填充剂、稀释剂、佐剂或其他制剂辅料。根据本领域的公知技术，可以根据治疗目的、给药途径的需要将所述药物制成各种剂型。

在本文中，给药药物还需要根据相应制剂的特性以及是否能在体内提供所述活性成分和给药的方便程度而从所属领域技术人员已知的给药方式中选取合适的方式。给药的有效量根据制剂形式和期望的作用时间以及治疗对象的情况而有所变化，实际治疗所需的量可以由医师根据实际情况（如，病人的重量、年龄、性别、健康状况、饮食、给药频率、给药方法、分泌排泄和疾病严重性等）而方便地确定。

以 PI4KII α 为靶点具有如下优势：

1. PI4KII α 是 PI 信号通路的上游信号分子，抑制肿瘤效率高；
2. 以 PI4K 的一个特异亚型作为靶分子，特异性好，副作用少；
3. 以 PI 特异信号通路的分子为靶分子，毒性小。

此外，该发明不仅在抗肿瘤方面具有重要意义和应用，而且在干预与

HIF-1 α 所调控基因相关的疾病方面也同样具有重要意义和应用, 例如: HIF-1 α 与糖尿病, 肿瘤耐药性, 心脑血管疾病都密切相关。同样, 本发明也在干预与血管新生相关疾病方面具有重要意义和应用, 例如: 关节炎, 糖尿病视网膜异常, 伤口愈合, 组织再生等都与血管新生密切相关。所以, 我们申请专利保护肌醇磷脂 4 位激酶二型 α 亚型 (PI4KII α) 的新生物学功能的发现和基于该新功能的应用。PI4KII α 是一个非常具有潜力的干预与 HIF-1 α 所调控基因相关的疾病、以及血管新生相关疾病的靶分子, 以 PI4KII α 作为靶分子可进行上述相关疾病的药物筛选和研发。

附图说明

图 1 表示过表达 PI4KII α 能显著提高人肾上皮 HEK-293 细胞中 HIF-1 α 的蛋白含量。A 是表示检测 PI4KII α 的过表达效率的图, 其中通过免疫印迹的方法用 PI4KII α 的抗体检测在人肾上皮 HEK-293 细胞中 GFP-PI4KII α 的过表达效率; B 是检测过表达 PI4KII α 对于 HIF-1 α 蛋白表达量的影响的图, 其中用 HIF-1 α 的抗体检测不同处理方式的 HEK-293 细胞中 HIF-1 α 的蛋白含量, 以 Actin 作为内参。H: 1%缺氧 24 小时, Co: 0.2 mM 氯化钴处理 6 小时, N: 正常培养对照细胞, GFP: 过表达 PEGFP-C1 质粒 48 小时的细胞, GFP-PI4KII α : 过表达 PEGFP-PI4KII α 质粒 48 小时的细胞。

图 2 表示 RNA 干扰 PI4KII α 能显著减少常氧或缺氧条件下多种细胞中 HIF-1 α 的蛋白含量。A 是对 PI4KII α 的干扰效率的鉴定的图, 其中用免疫印迹的方法检测三种不同细胞 (人肾上皮 HEK-293 细胞, 人宫颈癌 HeLa 细胞, 人乳腺癌 MCF-7 细胞) 中 PI4KII α 的基因干扰效率; B 是检测常氧条件下干扰 PI4KII α 对于人宫颈癌 HeLa 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞中 HIF-1 α 蛋白含量的影响的图, 其中用 HIF-1 α 的抗体检测常氧条件下两种不同癌细胞 (人宫颈癌 HeLa 细胞, 人乳腺癌 MCF-7 细胞) 中干扰掉 PI4KII α 对于细胞内 HIF-1 α 蛋白含量的影响。对照: 转染了非特异性小 RNA 的细胞, PI4KII α : 转染了 PI4KII α 特异性的小 RNA 的细胞, C 是检测常氧以及缺氧刺激条件下干扰 PI4KII α 对于人肾上皮 HEK-293 细胞中 HIF-1 α 蛋白含量的影响, 其中用免疫印迹的方法检测缺氧刺激或常

氧条件下干扰掉 PI4KII α 对于人肾上皮 HEK-293 细胞中 HIF-1 α 蛋白含量的影响。

图 3 显示 PI4KII α 能调控缺氧诱导因子 HIF-1 α 下游促进血管新生的基因: VEGF 和 iNOS。A 是显示过表达 PI4KII α 对细胞中 VEGF 的 mRNA 表达的影响的图, 其中采用 RT-PCR 的方法检测不同处理方式后人肾上皮 HEK-293 细胞中 VEGF 的 mRNA 表达水平, 以细胞中的 β -actin 的作为内参, H: 1%缺氧 24 小时, Co: 0.2 mM 氯化钴处理 6 小时, N: 正常培养对照细胞, GFP: 过表达 PEGFP-C1 质粒 48 小时的细胞, GFP-PI4KII α : 过表达 PEGFP-PI4KII α 质粒 48 小时的细胞; B 是显示过表达 PI4KII α 对细胞中 iNOS 的蛋白表达的影响的图, 其中用 iNOS 的抗体通过免疫印迹的方法检测不同处理方式后细胞中 iNOS 的蛋白含量, 各符号的意义同 A。

图 4 显示肿瘤中的 HIF-1 α 和 PI4KII α 的蛋白含量都随着肿瘤生长增加。A 是表示肿瘤生长不同天数的重量的图, 其中将鼠成纤维肿瘤 MCA205 细胞注射到 C57/BL6 小鼠体内, 注射后 7 天, 10 天, 14 天, 17 天后各取一只小鼠, 处死取出肿瘤称取重量; B 表示肿瘤生长不同时间时 PI4KII α 和 HIF-1 α 蛋白含量检测, 其中将 A 中的肿瘤裂解, 用免疫印迹的方法检测肿瘤中的 HIF-1 α 和 PI4KII α 的蛋白含量。

图 5 显示 RNA 干扰 PI4KII α 能通过抑制血管新生达到抑制人宫颈癌 HeLa 细胞诱导的肿瘤生长的目的。A 是表示干扰 PI4KII α 对人宫颈癌 HeLa 细胞在小鼠体内诱导的肿瘤的生长影响的图, 其中将转染了对照小 RNA 和 PI4KII α 特异性小 RNA 的 HeLa 细胞按照上文描述的方法注射到小鼠腹部, 每两天测量一次肿瘤的大小, 直到肿瘤注射的第 18 天; B 是干扰 PI4KII α 对人宫颈癌 HeLa 诱导肿瘤血红素含量的影响, 其中将 A 中生长到 18 天的肿瘤取出, 采用 Drabkin's 高铁血红蛋白方法测量肿瘤的血红素含量, 进行比较; C 是显示用抗 CD-31 的抗体通过免疫组化的手段检测干扰掉 PI4KII α 对人宫颈癌 HeLa 诱导肿瘤中血管生长情况的图, 其中将 A 中培养到 18 天的肿瘤取出切片, 采用抗 CD31 的抗体通过免疫组化的方法, 比较不同处理方式的肿瘤中的血管情况。

图 6 显示 RNA 干扰 PI4KII α 能明显抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肾上皮 HEK-293 细胞诱导的肿瘤生长。A 是显示干扰掉 PI4KII α 对人乳腺

癌 MCF-7 细胞诱导肿瘤生长的影响的图，其中将转染了对照小 RNA 和 PI4KII α 特异性小 RNA 的 MCF-7 细胞按照上文描述的方法注射到小鼠腹部，每两天测量一次肿瘤的大小，直到肿瘤注射的第 18 天；B 是显示干扰掉 PI4KII α 对人肾上皮 HEK-293 细胞诱导肿瘤生长的影响的图，其中将转染了对照小 RNA 和 PI4KII α 特异性小 RNA 的 HEK-293 细胞按照上文描述的方法注射到小鼠腹部，每两天测量一次肿瘤的大小，直到肿瘤注射的第 18 天，选择 4 天，8 天，12 天肿瘤生长情况进行比较。

图 7 显示经典的抑癌药物长春新碱 (VCR) 和长春瑞宾 (VNR) 对于 PI4K 的酶活都有抑制作用。A 是显示长春瑞宾和长春新碱对 PI4K 酶活的影响的图，其中用不同浓度的 VCR 和 VNR 处理 HeLa 细胞 1-3 小时后，按照上文所述方法检测 PI4K 的酶活，以溶剂处理组为对照，进行比较处理；B 是显示长春瑞宾和长春新碱对细胞中 HIF-1 α 的影响的图，其中采用免疫印迹的方法检测不同浓度的 VCR 和 VNR 处理 HeLa 细胞 1-3 小时后细胞中的 HIF-1 α 的蛋白含量。

图 8 显示在海洋活性提取物中筛选对 PI4KII α 有调控作用的分子。A 显示筛选得到的对 PI4K 酶活有抑制作用的海洋活性提取物，其中对数生长期的人宫颈癌 HeLa 细胞经过不同海洋提取物处理 1-3 小时后用相应裂解液裂解，采用上述 PI4K 酶活测定的方法进行其酶活检测，将对 PI4K 酶活有抑制作用的药物处理所得数据进行比较分析；B 显示筛选得到的对 PI4K 酶活有激活作用的海洋活性提取物，其中与 A 种样品同样处理，将对 PI4K 酶活有激活作用的药物处理所得数据进行比较分析。

下面通过实施例来更好说明和理解我们的发明，但我们的发明和应用不限于实施例的范围。如未特别指明之处，可根据本领域技术人员所熟悉的《生物化学与分子生物学实验技术》(高等教育出版社，杨安钢，毛积芳，药立波主编)；《蛋白质电泳技术》(科学出版社，郭尧君编著)；《蛋白质相互作用分子克隆手册》(清华大学出版社，Erica Golemis 编著)；《细胞实验指南》(科学出版社，D.L.斯佩克特等著，黄培堂等译)；《精编分子生物学实验指南》(科学出版社，F.奥斯伯 R.布伦特等著，颜子颖等译)等实验手册以及本文所引用的参考文献中所列的方法来实施。

具体实施方式

实施例 1：材料和方法

细胞培养

人宫颈癌 HeLa 细胞 (ATCC: CCL 2), 人乳腺癌 MCF-7 细胞 (ATCC: HTB-22) 和人肾上皮 HEK-293 (ATCC: CRL-1573) 细胞获自美国典型细胞培养中心 (ATCC)。细胞在 DMEM 营养混合物 (Kaighn' s 改进) 中培养, 该营养混合物含有 10%胎小牛血清 (Hycloe), 硫酸链霉素(100 μ g/ml), 和氨苄青霉素(100 单位/ml), 细胞放于细胞培养箱 37°C, 5%CO₂ 的条件下进行培养。按照制造商的使用说明, 通过使用阳离子型脂质: Lipofectamine 2000 (invitrogen), 在 6 孔或 6-cm 板中对所述细胞进行转染 (30%-60%汇合) (具体方法参见 invitrogen Lipofectamine 2000 产品说明书)。转染之后培养 6 小时细胞换液到含 10%胎牛血清和双抗的 DMEM 培养基中继续培养。

半定量 RT-PCR

根据制造商的使用说明, 用 TRIzol (invitrogen) 提取细胞中的总 RNA, 并经过紫外分光光度计 (德国 Eppendorf 生产, 型号为 603105430) 定量后取 2 μ g 进行反转录, 反转录具体实验方法如下: 2 μ g 的 RNA 与适量逆转录酶 (MMLTV-RT, Promega)、RNA 酶抑制剂(Promega)在 42°C 共同孵育 1 小时, 然后 72°C 孵育 10 分钟获得细胞总 cDNA。随后将 20 nM VEGF 的上游引物(CCATGAACTTTCTGCTGTCTT)(SEQ ID NO: 5), 20 nM VEGF 的下游引物(ATCGCATCAGGGGCACACAG) (SEQ ID NO: 6), 4 μ l cDNA, 12.5 μ l 预混聚合酶混合物 (takara) 以及无菌水混合至总体积 25 μ l, 进行 25 个循环的 PCR 实验: 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒。PCR 产物进行琼脂糖电泳并通过凝胶成像系统(BIO-PRINT 凝胶成像系统, 法国)进行半定量分析。以细胞内的肌动蛋白 (β -actin) 作为内参。

免疫印迹

细胞经过相应处理 (如瞬时转染, 缺氧处理等) 后, 用 0.25%胰酶消化细胞, 800g 离心 5 分钟后弃掉上清收集细胞, 然后用 PBS 清洗细胞 2

遍,用 RIPA 裂解液 Tris.HCl, 50 mmol/L, pH 7.5; NaCl, 150 mmol/L; NP-40, 1%; 脱氧胆酸钠, 0.5%; SDS, 0.1%; EDTA, 1 mmol/L; 1.2mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF),1 μ g/ml 亮抑酶肽 (leupeptin), 1 μ g/ml 抑肽酶 (aprotinin) 裂解 30 分钟,裂解产物 12000g 离心 15 分钟。取上清与 2 \times SDS 加样缓冲液 (0.1MTris-cl;4%SDS;0.2%溴芬兰, 20%甘油, 0.1MDTT) 混合, 100 $^{\circ}$ C 煮 10 分钟,离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后转膜(硝酸纤维膜, PALL),用含 5%脱脂奶粉的封闭液封闭 1.5 小时后,分别用相应蛋白的抗体(具体稀释浓度参见所用抗体的说明书)(如兔抗鼠抗 HIF-1 α 抗体, Santa curz; 羊抗兔抗 PI4KII α 抗体, Abgent; 兔抗羊抗 Actin 抗体, Santa curz; 羊抗兔抗 iNOS 抗体, Santa curz) 孵育 1.5 小时,用 TTBS (50mM Tris/HCl, 140mM NaCl, 0.05% Tween -20, PH 7.2) 洗所述膜 3 次,每次 15 分钟。相应二抗(根据一抗的情况确定二抗, BIOS) 孵育 1 个小时,再次洗膜 3 次,每次 15 分钟后,NC 膜上发光底物,进行曝光检测(具体方法参考精编分子生物学实验指南)。

PI4K 酶活检测

用裂解液 (100mM NaCl,300mM 蔗糖,3mM MgCl₂,1%Triton X-100,5mM CaCl₂,10mM Pipes, 1.2mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF),1 μ g/ml 亮抑酶肽 (leupeptin), 1 μ g/ml 抑肽酶 (aprotinin),10mM NaF 和 5 mM EDTA (PH6.8)) 裂解细胞 (10⁶ 细胞/ml 裂解液),冰上裂解 20 分钟,650g 离心 10min,去除细胞核及较大的细胞碎片,保留含有 PI4K 蛋白的上清。将提取的 PI-4K 蛋白溶液 10 μ l 加入 20 μ l 的检测缓冲液 (50mM Tris-HCl,2mM EGTA (乙二醇二乙醚二胺四乙酸), 2mM EDTA, 10mM Mg²⁺, 0.4% TritonX-100, 1.2mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF),1 μ g/ml 亮抑酶肽 (leupeptin), 1 μ g/ml 抑肽酶 (aprotinin))。每个 Eppendorf 管里加入 15 μ l 前述处理好的 PI4K 混合液,10 μ l 含 500 μ g/ml 的 PI 脂质体溶液, 2 μ Ci[γ -³²P]ATP 溶液。振荡均匀,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴,反应 5-10 min。取出 Eppendorf 管放置冰上,加入 100 μ l 的 1mol 盐酸溶液,再加入 300 μ l 的氯仿: 甲醇 (2:1, v/v) 混合液,终止反应。振荡两分钟,离心 1min。溶液分成两相,上相为水层,下相为有机层。将水层吸走,保留有机相。再用 1N HCl: CH₃OH (1:1,v/v),

洗两遍。收集有机相，真空蒸发。用氯仿溶解磷酸化产物 PI(4)P，用 TLC 薄板做展层实验。展层约 25min，将 TLC 薄板置于通风厨内凉干，将薄板放于碘缸内碘蒸汽染色 1min。PI4K 磷酸化产物 PI(4)P 在 TLC 薄板上的定位是根据标准 PI(4)P 在薄板上的位置来确定的。使用以磷屏存储技术 (Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G., and Yin, H.L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* 114, 299-310.) 为原理的 Storm 820 Imaging System (Amersham Pharmacia Biotech) 测量 ^{32}P -PI(4)P 条带的放射活性。根据获得的 ^{32}P -PI(4)P 放射活性来对裂解液中 PI4K 的酶活做一个相对的定量分析，所检测到的 ^{32}P -PI(4)P 放射活性与 PI4K 的酶活成正比。

动物研究

按照食品与药物管理局的非临床实验室研究的良好实验室规范 (GLP 条例) 和根据作为立法基础的德国动物保护法进行体内实验。

C57BL/6 小鼠和 BALB/C 裸鼠 (维通利华) 在 SPF 条件下保养 (层流气流设备, Scantainer, Scanbur), 分别用作 MCA205 小鼠肿瘤细胞 (MCA205 细胞从 C57BL/6 鼠分离, 分离方法参考文献 Shu, S. Y., S. A. Rosenberg. 1985. Adoptive immunotherapy of newly induced murine sarcomas. *Cancer Res.* 45: 1657-1662) 和人宫颈癌 HeLa 细胞, 人乳腺癌 MCF-7 细胞的受体。 $2 \times 10^5/0.2\text{ml}$ MCA205 细胞接种到 6-8 周的 C57/BL6 小鼠腹部两侧, 接种后 3 天, 7 天, 10 天, 17 天后将小鼠处死, 取出肿瘤采用上述免疫印迹的方法用于 HIF-1 α 和 PI4KII α 的蛋白含量检测。 $5 \times 10^6/0.2\text{ml}$ HeLa 细胞或者 MCF-7 细胞经过相应的基因操作 (瞬时转染 PI4KII α 特异性小 RNA 或非特异性对照小 RNA) 后, 经过过夜培养, 用 0.25% 胰酶消化后注射入小鼠的腹部两侧, 同只小鼠的两侧分别是实验组和对照组的细胞。经过 18 天的大小测量观测, 处死小鼠采用 Drabkin's 高铁血红蛋白方法 (Drabkin, D. (1949). The standardization of hemoglobin measurement. *Am. J. Med. Sci.* 217, 710-711.) 测量肿瘤的血红素含量以及用抗 CD-31 的抗体做免疫组化的方法检测肿瘤中血管生长情况 (A Giatromanolaki. (1997) Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31

immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, Vol 3, Issue 12 2485-2492)。

实施例 2: 过表达 PI4KII α 对肿瘤细胞中与肿瘤生长密切相关的缺氧诱导因子 HIF-1 α 的调控功能研究

人肾上皮 HEK293 细胞按照上述方法瞬时转染质粒 PEGFP-PI4KII α 或 PEGFP-C1 (PEGFP-C1 购买自 Promage, PEGFP-PI4KII α 根据《精编分子生物学实验指南》构建)。48 个小时后, 裂解细胞, 用上述免疫印迹的方法对细胞中的 PI4KII α 进行检测, 以确定转染效率。在检测到转染的 GFP-PI4KII α 表达的基础上, 检测过表达细胞中 HIF-1 α 的蛋白含量, 并以细胞中的持家蛋白肌动蛋白 (Actin) 作为比较的内参。为了保证实验的可靠性, 我们设计了阳性对照的实验, 我们采用 0.2mM 氯化钴处理细胞 6 小时 (Co), 1%氧气处理细胞 24 小时的 HEK-293 (H) 中的 HIF-1 α 蛋白含量与正常氧气培养下的细胞中该蛋白含量进行比较。

此结果证明过表达 PI4KII α 能像氯化钴或者缺氧一样能导致 HIF-1 α 蛋白在细胞体内含量的增加 (图 1)。

实施例 3 干扰 PI4KII α 对缺氧诱导因子 HIF-1 α 的调控功能研究

合成一段专门干扰 PI4KII α 的小 RNA 序列 (正义链: UGAAGCAGAACCUCUCCUCATT (SEQ ID NO:1); 反义链: UCAGGAAGAGGUUCUGCUUCATT (SEQ ID NO:2)) 和非特异性的对照小 RNA 序列(正义链: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT(SEQ ID NO:3); 反义链: ACGUGACACGUUCGGAGAATT(SEQ ID NO:4))。按照上述方法里的说明对 HeLa 细胞和 MCF-7 细胞进行转染后培养 72-96 个小时, 将细胞进行裂解并进行上述免疫印迹检测 PI4KII α 的蛋白含量以确定所述干扰序列的干扰效果, 在证明干扰小 RNA 的干扰效率很高的基础上检测干扰细胞与对照细胞中 HIF-1 α 的蛋白含量, 进行比较, 以细胞中的持家蛋白肌动蛋白 (Actin) 作为内参。为了确定在缺氧条件下, PI4KIIa 是否也对 HIF-1 α 有相应的调控作用, HEK-293 细胞在瞬时转染了干扰 PI4KIIa 特异性小 RNA 或非特异性的对照小 RNA 后 66 个小时加入氯化钴处理 6

个小时，然后对干扰效率和相应的 HIF-1 α 进行检测比较。

本结果证明，不管在常氧条件还是缺氧条件下，干扰掉 PI4KII α 都能显著的抑制细胞中 HIF-1 α 的蛋白含量（图 2）。

实施例 4. PI4KII α 对 HIF-1 α 下游促血管生成基因的调控功能研究

在人肾上皮 HEK293 细胞中过表达 GFP-PI4KII α 和 GFP，转染后 48 小时，按照本文上述方法进行 RT-PCR 实验检测过表达细胞与对照细胞中 VEGF 的 mRNA 水平并进行比较，持家基因肌动蛋白（ β -actin）做为比较的内参。使用 VEGF（引物序列见实施例 1）与肌动蛋白（ β -actin）的相应上下游引物（ β -actin 上游引物：TCCTGTGGCATCCACCAAAC（SEQ ID NO:7）； β -actin 下游引物：GAAGCATTTGCGGTGGACCA（SEQ ID NO:8））。为了验证实验方法的正确性，我们设立了阳性对照，即 0.2mM 氯化钴处理细胞 6 小时（Co），1%氧气处理细胞 24 小时的 HEK-293（H）中的 VEGF mRNA 含量与正常氧气培养下的细胞中该基因的 mRNA 含量进行比较。为了进一步验证 PI4KII α 对于 HIF-1 α 下游调控基因的影响，我们选择了在人宫颈癌细胞 HeLa 中检测另外一个受 HIF-1 α 调控且与血管新生有着密切联系的蛋白诱导型一氧化氮合酶（iNOS）。实验设计与方案与 VEGF 的检测相同。

本结果证明：过表达 PI4KII α 能显著上调与血管新生密切相关的缺氧诱导因子 HIF-1 α 的下游基因 VEGF 和 iNOS 的转录和表达（图 3）。

实施例 5. 检测肿瘤在不断长大的生长过程中 PI4KII α 和 HIF-1 α 的蛋白含量变化

生长对数期的小鼠成纤维瘤 MCA205 细胞（MCA205 细胞从 C57BL/6 鼠分离，分离方法参考文献 Shu, S. Y., S. A. Rosenberg. 1985. Adoptive immunotherapy of newly induced murine sarcomas. *Cancer Res.* 45: 1657-1662）用 0.25% 胰酶消化收集后用 PBS 洗 3 遍。通过细胞计数调节最终的细胞浓度为 1×10^6 /ml，然后注射到 C57/BL6 小鼠腹部两侧，每侧注射 0.2 ml 细胞悬液。肿瘤种植之后 3 天，7 天，10 天，17 天时分别取一只小鼠出来，处死后取出肿瘤，测量重量后用 RIPA 裂解液匀浆裂解 15 分钟，从裂解混合物中取 50 μ l 出来，12000g 离心 15 分钟后采用 BCA 方法（参考细胞实验

指南)来测裂解产物总蛋白浓度,剩下的裂解混合物加SDS加样缓冲液煮沸15分钟,用于按照实施例1中的免疫印迹方法检测PI4KII α , Actin和HIF-1 α 的蛋白含量。

实验结果证明,随着肿瘤的生长,肿瘤组织中的PI4KII α 和HIF-1 α 的蛋白含量都明显增加(图4)。

实施例6. PI4KII α 对人宫颈癌HeLa细胞诱导的肿瘤血管新生以及肿瘤生长的调控

人宫颈癌HeLa细胞瞬时转染前述序列(实施例3中所述序列)的PI4KII α 特异性干扰小RNA或非特异性对照小RNA后20小时,用0.25%胰酶消化收集后用PBS洗3遍。通过细胞计数调节最终的细胞浓度为 2.5×10^7 /ml,然后分别注射到BALB/C裸鼠小鼠腹部两侧,每侧注射0.2 ml 细胞悬液。细胞注射后每隔天用游标卡尺测量大小,在肿瘤生长到18天时,处死小鼠,取出肿瘤采用Drabkin's 高铁血红蛋白方法测量肿瘤的血红素含量以及用抗CD-31的抗体(购自BD公司)做免疫组化的方法(具体方法参照细胞实验指南)检测肿瘤中血管生长情况。

本结果表明:干扰掉PI4KII α 后能显著抑制人宫颈癌HeLa细胞诱导的肿瘤中血管的新生(图5B,C),并抑制肿瘤的生长(图5A)。

实施例7.PI4KII α 对乳腺癌MCF-7细胞以及人肾上皮HEK-293细胞诱导的肿瘤生长的调控

人乳腺癌MCF-7细胞以及人肾上皮HEK-293细胞均瞬时转染PI4KII α 特异性小RNA或非特异性小RNA(序列与实施例3中所述一致)后20小时,用0.25%胰酶消化收集后用PBS洗3遍。通过细胞计数调节最终的细胞浓度为 2.5×10^7 /ml,然后分别注射到BALB/C裸鼠小鼠腹部两侧,每侧注射0.2 ml 细胞悬液。细胞注射后每隔天用游标卡尺测量肿瘤大小,直到肿瘤生长到18天时。

该实验结果表明,干扰掉PI4KII α 后能明显抑制乳腺癌MCF-7细胞以及人肾上皮HEK-293细胞诱导的肿瘤生长(图6)。

实施例8. 经典抑癌药物长春新碱 (VCR) 和长春瑞宾 (VNR) 对PI4K和HIF-1 α 的调控

人宫颈癌HeLa细胞培养至对数生长期, 低血清 (1%血清) 预处理12小时后, 在原有培养基中加入不同浓度 (25nM, 50nM) VCR或者不同浓度 (15 μ M, 60 μ M) VNR与细胞共同孵育1-3小时, 0.25%胰酶消化后细胞按照实施例1中测定PI4K酶活的方法检测细胞裂解液中的PI4K的活力, 用于检测HIF-1 α 蛋白含量的细胞在相应药物处理后用RIPA裂解液裂解, 按照实施例1中描述的方法做免疫印迹实验。

此结果表明: 长春新碱和长春瑞宾这两种经典的抑癌药物对于PI4K的酶活有明显的抑制作用, 并有一定的剂量依赖性 (图7A), 同时这两种药物对于PI4KII α 所调控的转录因子HIF-1 α 的蛋白量也有抑制作用 (图7B)。

实施例9. 筛选对PI4K酶活有调控功能的药物

选取20余种海龙科和棘皮海生动物, 经过冻干研磨获得粗粉, 再经过95%和50%的乙醇两次提取后保留上清液, 再经过石油醚, 乙酸乙酯, 正丁醇以及水的分馏获得不同溶解性的各成分, 然后通过柱层析的技术获得众多的单体化合物, 用于检测在人宫颈癌HeLa细胞中对PI4K酶活的影响。具体检测方法如下: 人宫颈癌HeLa细胞培养至对数生长期, 低血清 (1%血清) 预处理12小时后, 在原有培养基中加入不同的海洋动物有效提取物与细胞在细胞培养箱中共同孵育1-3小时后采用上述PI4K酶活检测的方法检测各种不同药物对于PI4K的酶活影响。

此实验筛选过程中共筛选得到10种上调PI4K酶活的海洋活性物质, 12种下调PI4K酶活的海洋活性物质 (图8)。

参考文献:

Carter CA, Protein kinase C as a drug target: implications for drug or diet prevention and treatment of cancer. *Curr Drug Targets*, 2000, 1(2):163-183.

Dai,R.M., Chen,E., Longo,D.L., Gorbea,C.M., and Li,C.C. (1998). Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *J. Biol. Chem.* 273, 3562-3573.

Minogue,S., Waugh,M.G., De Matteis,M.A., Stephens,D.J., Berdichevski,F., and Hsuan,J.J. (2006). Phosphatidylinositol 4-kinase is required for endosomal trafficking and degradation of the EGF receptor. *J. Cell Sci.* 119, 571-581.

Weber,G., Shen,F., Prajda,N., Yeh,Y.A., Yang,H., Herenyiova,M., and Look,K.Y. (1996). Increased signal transduction activity and down-regulation in human cancer cells. *Anticancer Res.* 16, 3271-3282.

Yamamoto,S., Tomita,Y., Hoshida,Y., Toyosawa,S., Inohara,H., Kishino,M., Kogo,M., Nakazawa,M., Murakami,S., Iizuka,N., Kidogami,S., Monden,M., Kubo,T., Ijuhin,N., and Aozasa,K. (2004b). Expression level of valosin-containing protein (VCP) as a prognostic marker for gingival squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 15, 1432-1438.

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 肌醇磷脂4位激酶二型 α 亚型 PI4KII α 的应用

<130> IB083197

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 特异性干扰PI4KII α 的小RNA 序列正义链

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 1

ugaagcagaa ccucuuccuc att

23

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 特异性干扰PI4KII α 的小RNA 序列反义链

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 2

ucaggaagag guucugcuuc att

23

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 非特异性对照小RNA序列正义链

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 3

uucuccgaac gugucacg t

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 非特异性对照小RNA序列反义链

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 4

acgugacacg uucggagaat t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> VEGF上游引物

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 5

ccatgaactt tetgctgtct t

21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> VEGF下游引物

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 6

atcgcatcag gggcacacag

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> β -actin上游引物

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 7

tctgtggca tccaccaaac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> β -actin下游引物

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 8

gaagcatttg cggggacca

20

<210> 9

<211> 479

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> PI4KII α 的蛋白氨基酸序列

<222> (1)..(479)

<223>

<400> 9

Met Asp Glu Thr Ser Pro Leu Val Ser Pro Glu Arg Ala Gln Pro Pro
1 5 10 15Asp Tyr Thr Phe Pro Ser Gly Ser Gly Ala His Phe Pro Gln Val Pro
20 25 30Gly Gly Ala Val Arg Val Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Ser Pro
35 40 45Pro Gly Ser Pro Gly His Asp Arg Glu Arg Gln Pro Leu Leu Asp Arg
50 55 60Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Gly Gln Thr Gln Thr Val Ala Ala Gln
65 70 75 80Ala Gln Ala Leu Ala Ala Gln Ala Ala Ala Ala His Ala Ala Gln
85 90 95Ala His Arg Glu Arg Asn Glu Phe Pro Glu Asp Pro Glu Phe Glu Ala
100 105 110Val Val Arg Gln Ala Glu Leu Ala Ile Glu Arg Cys Ile Phe Pro Glu
115 120 125Arg Ile Tyr Gln Gly Ser Ser Gly Ser Tyr Phe Val Lys Asp Pro Gln
130 135 140Gly Arg Ile Ile Ala Val Phe Lys Pro Lys Asn Glu Glu Pro Tyr Gly
145 150 155 160His Leu Asn Pro Lys Trp Thr Lys Trp Leu Gln Lys Leu Cys Cys Pro
165 170 175Cys Cys Phe Gly Arg Asp Cys Leu Val Leu Asn Gln Gly Tyr Leu Ser
180 185 190Glu Ala Gly Ala Ser Leu Val Asp Gln Lys Leu Glu Leu Asn Ile Val
195 200 205Pro Arg Thr Lys Val Val Tyr Leu Ala Ser Glu Thr Phe Asn Tyr Ser
210 215 220Ala Ile Asp Arg Val Lys Ser Arg Gly Lys Arg Leu Ala Leu Glu Lys
225 230 235 240Val Pro Lys Val Gly Gln Arg Phe Asn Arg Ile Gly Leu Pro Pro Lys
245 250 255

Val Gly Ser Phe Gln Leu Phe Val Glu Gly Tyr Lys Asp Ala Asp Tyr
 260 265 270
 Trp Leu Arg Arg Phe Glu Ala Glu Pro Leu Pro Glu Asn Thr Asn Arg
 275 280 285
 Gln Leu Leu Leu Gln Phe Glu Arg Leu Val Val Leu Asp Tyr Ile Ile
 290 295 300
 Arg Asn Thr Asp Arg Gly Asn Asp Asn Trp Leu Ile Lys Tyr Asp Cys
 305 310 315 320
 Pro Met Asp Ser Ser Ser Ser Arg Asp Thr Asp Trp Val Val Val Lys
 325 330 335
 Glu Pro Val Ile Lys Val Ala Ala Ile Asp Asn Gly Leu Ala Phe Pro
 340 345 350
 Leu Lys His Pro Asp Ser Trp Arg Ala Tyr Pro Phe Tyr Trp Ala Trp
 355 360 365
 Leu Pro Gln Ala Lys Val Pro Phe Ser Gln Glu Ile Lys Asp Leu Ile
 370 375 380
 Leu Pro Lys Ile Ser Asp Pro Asn Phe Val Lys Asp Leu Glu Glu Asp
 385 390 395 400
 Leu Tyr Glu Leu Phe Lys Lys Asp Pro Gly Phe Asp Arg Gly Gln Phe
 405 410 415
 His Lys Gln Ile Ala Val Met Arg Gly Gln Ile Leu Asn Leu Thr Gln
 420 425 430
 Ala Leu Lys Asp Asn Lys Ser Pro Leu His Leu Val Gln Met Pro Pro
 435 440 445
 Val Ile Val Glu Thr Ala Arg Ser His Gln Arg Ser Ser Ser Glu Ser
 450 455 460
 Tyr Thr Gln Ser Phe Gln Ser Arg Lys Pro Phe Phe Ser Trp Trp
 465 470 475

<210> 10

<211> 4185

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> PI4KII α 的cDNA序列

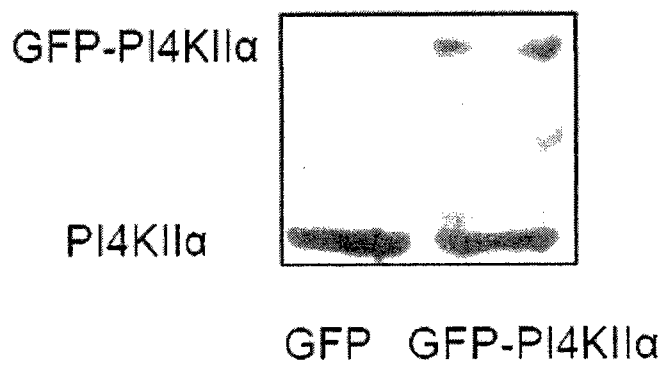
<222> (1)..(4185)

<223>

<400> 10
 cggccgcgag cgcagtggg tggagcgcgc cgggtcccgg agccggctgt ctgagggatg 60
 gacgagacga gcccactagt gtcccccgag cgggcccac ccccgacta caccttcccg 120
 tcgggctcgg gcgctcactt tccgcagggtg cccggggggcg cggctccagt ggccggcggcg 180
 gccggctcgg gccctctccc gccaggctcg cggggccacg acccgagcgg gcagccactg 240
 ttggatcggg cccggggcgc ggcggcccag ggccagacc aaaccgtggc ggccgagggc 300
 caggctctgg ccgctcaggc cgcggcggca gccacacccg ctccaggcca ccgcgagcgg 360
 aacgagtcc cggaggatcc tgagtccgag gcggtgggtc ggccaggcca gctggccatc 420
 gagcgtgca tctttccga gcgcatctac cagggtccca gcggaagcta ctctgtcaag 480
 gacctcagg ggaggatcat tgctgtcttc aaaccaaga atgaagacc ctatgggcat 540
 cttaatccta agtggaccaa gtggctcgag aagctgtgct gtccctgtcg ctttggcgt 600
 gactgccttg tccttaacca gggctatctc tcagaagcag gggccagcct ggtggaccaa 660
 aaactggaac tcaacattgt tccccgtaca aaggtagtat acctggccag tgagacctc 720
 aactatagtg ccattgaccg agtgaagtc aggggcaagc ggcttgact agagaaagt 780
 ccaaaagtg gacagcgggt taaccgcatc gggctaccac caaagggttg ttcatccag 840
 ctctttgtg aaggctacaa agatgcagac tattggctgc ggcgtttga agcagaacct 900
 ctctctgaga aactaaccg gcaactactg ctccagttg agcggttggg ggtgctggat 960
 tacatcatcc gcaacactga tcgaggcaat gacaactggc tgattaaata tgactgtcca 1020
 atggatagtt ctactctcg ggacacagac tgggtgggtg tgaaggagcc tgttatcaag 1080
 gtggctgcca tagacaatgg gctggccttc cactgaagc atcctgactc ctggagggca 1140
 tatcttttt actgggcctg gttgccccg gcgaaagtcc cattttctca ggagatcaaa 1200
 gatctgatcc ttccaaagat atcggaccct aacttcgta aggacttggg agaggacct 1260
 taigaacct tcaagaaaga tctgtgttc gacaggggccc agttccataa gcagattgct 1320
 gtcattcggg gccagatctt aaatcgacc caggccttga aagacaaca gagtcccctg 1380
 cacctcgtcc agatgccacc tgtgattgtc gagacggccc gttcccacca cgggtcttct 1440
 agcagtcct acacacagag ctctcagagc cggaagccct tctttctatg gtggtagctc 1500
 cagaggcagg cagaggaaat attgtcagag actggtggga ggaagcctgg ggagtgggt 1560
 gcagaaaaag ccagagaagc cgggtgagag cagcacctt aagagccctc tctctctgct 1620
 tgccaccctg ctccagactt tccaccaca gggagaagca caatcaggaa cagtgagtgc 1680
 tcctgcctt tctgatgtgg gggaggctgg agctccatgc acgtagtcca gatgcctggg 1740
 aaggaacatc tccctccag catctgctgg tagcaggctg ggacagtcct tcccttcct 1800
 gaaaccctgc tctattgcaa ttccctatta tattctgcat cagaaaaaca aacaaaaca 1860
 aaacaacttt aatgcttgt agcagaacc cgggtcatct catgtcagaa accttaate 1920
 caggcctaaa ttgcataga cctgacatc agctgccttg cagttgcttc ctccatgag 1980
 ccaagggtgt gtcagagggc aactggatga ctccagctac cacagactg ggacagacag 2040
 aagccacacc tttcttttgg gtttttcca agcctcctcc atctccatc agtgcctgtg 2100
 gctggctgca agcctcgaag cagttctctt ggaagggagg tttttgctt acccccgcca 2160

gcacttccgc acacaatcat agagaacctc tctgctctct gctggcctac agcttgtctg 2220
 tttctcaagc agaggcagga agagctagtc ttagcattta tattttaata ggaagttgac 2280
 tcccagcatg taaaagtgat ccacgcagcc ggagtgtatg ccgggagcta agtggcttat 2340
 gggatgaacat atccccacctt gcttctctgag tccttgggcc caatcttctc atttgttctt 2400
 ctctgtttta attttttccc cccaactctt ttgatgtaag agttcagttt gtcttcggga 2460
 gtgggtctct gcaagggtctc tgggatgagt ctgggttcc aagaggacag gctattaggt 2520
 tcttggactt tttctgtgc taccgctgct gcttgggtgga agtaacagga cgtggattct 2580
 gccataaagc tggcagtttc cttttctct ctgacttgc ctaggccgat ttctctatgg 2640
 ctccctgagc aaaggtgagg cccaaaggag agaggccttc aaactgtccc aggtctctgcg 2700
 cagctcagtg cgtatcttct tgcctccatg tgcctttcc cctgctgctt cactccccac 2760
 ccccacttgc caggtgtttg agccatttct acaccaaagc aaagtacggc ctccaggaggg 2820
 agtaaaaagg gtgccatctg tgtctggagg ggcagctgtg ttcattgcct gtgctactgg 2880
 acatttcaca attctggcac ctgtcgattg gtcagtcaac ctccagaaagc aactatcttg 2940
 aaggtttgaa aaacaacca aaaaaggagg taggactat ggctgcatgt cctctgcttg 3000
 cccggctgca gagcagagat gtgcagccct ctggctcagct ggtccaggct ggtccccgcc 3060
 ggtccccctc cagtccagcc accaagagtc cacttgtccc gggettccac ctggctgaca 3120
 ggaagaattt ctgagagctg gatgtgcatg cctgttggac gaaggtacag ctgcctgccc 3180
 tgcaccaatc ccagccccga caatcacatg cagctgactc ggacactggc cttgggaaca 3240
 atgttcgaga gaacacttgc cccttactg taggagccag aaggggaccc aggtgtgcat 3300
 agctctctgt agacattttt acccaaacct gttggtaaag tgcctatctg gtgctcaaga 3360
 gagcctgggg gtctaacagg gagcccggct gcctcacctg gccacagcct ccacaccaga 3420
 tctccacatt gtcttcatcc agaccagctc tgtgacaga aggaaattgg gtccagtgtg 3480
 ggagagagct ggtctctggc ctggcaggca agagtgtggg catcctttcc tggcctttct 3540
 ccactctccc tcaagcctgt gctcaggttg ccttgaatgt ggactctgga agagccaggg 3600
 gccagaatg ccgggggagg cttctgagtg gcactcatgg aacaccgtcc ctctgccagc 3660
 cataggccct gcctccagtg tcagggaatg gaggttgggc tgcgagagtg ttgtgcccc 3720
 ctgtgtcatt cttctaattc aatgtagaaa ttgtacgtaa tgtattttaa tcaacgcaaa 3780
 tgtatgaata acaataacag ttctgacctt tttgtccag tttctttggg ggaaggaaga 3840
 caaagaaggt aggaacggaa ttttgagggc aaagaaacct gtgtttccat ggaattgctg 3900
 agacgtggct cctggggcta ttctcccta ataaaggatg atccaggctc tcatttccaa 3960
 agtcccaatg ctctgaaaac caaaagtatt ttcataacc atttgaacc aaacctgacc 4020
 tgaacttaca ctgataggaa gctatgggta attatgatgt gttcctttta gtgtgattct 4080
 ttgttcaga aatgtcaata tattttatga catggttccc tactagggat tatacagtat 4140
 ttgtgacta cttcctaaga gccaaaaata aaaaatctga attcc 4185

A.



B.

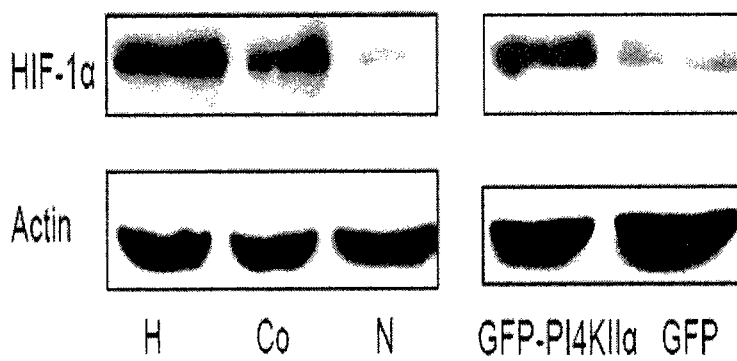
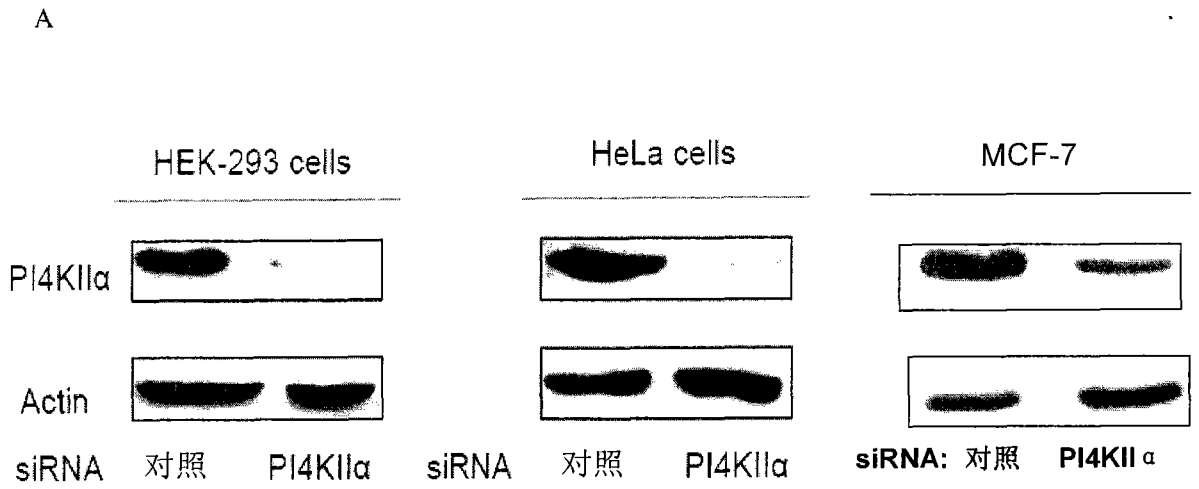
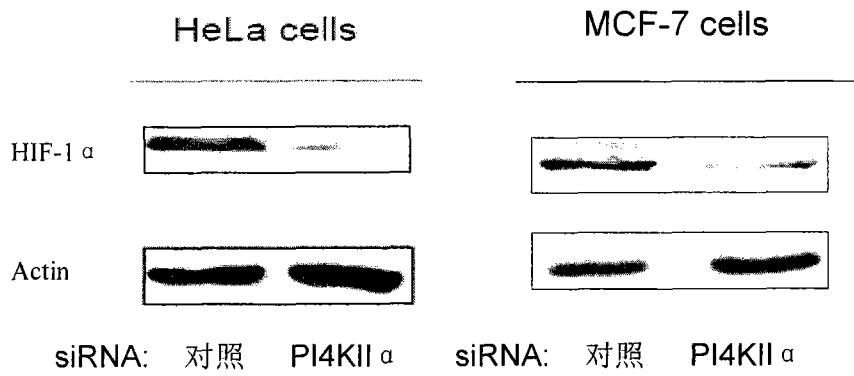


图 1



B.



C.

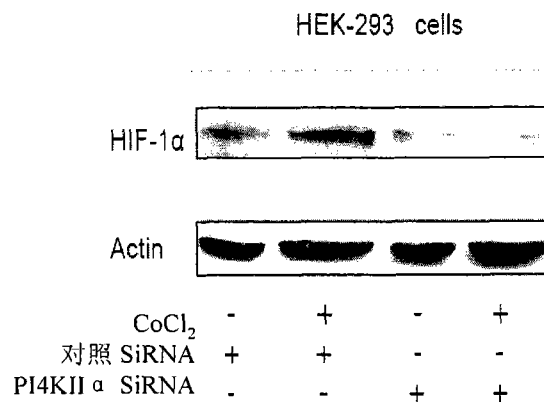
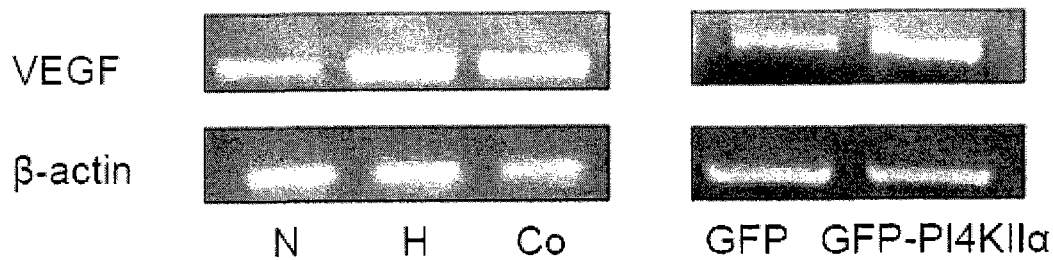


图 2

A.

RT-PCR

HEK-293 cells



B.

HeLa cells

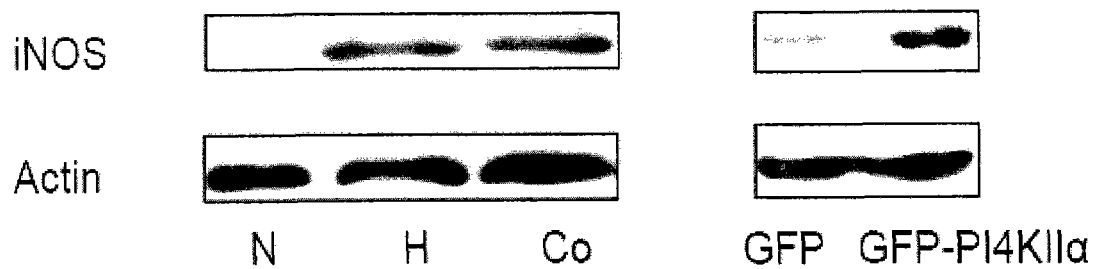
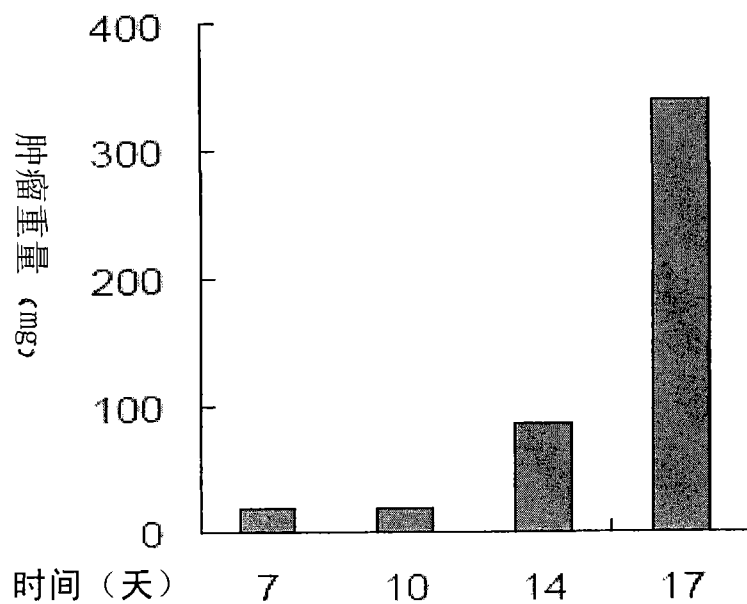


图 3

A.



B.

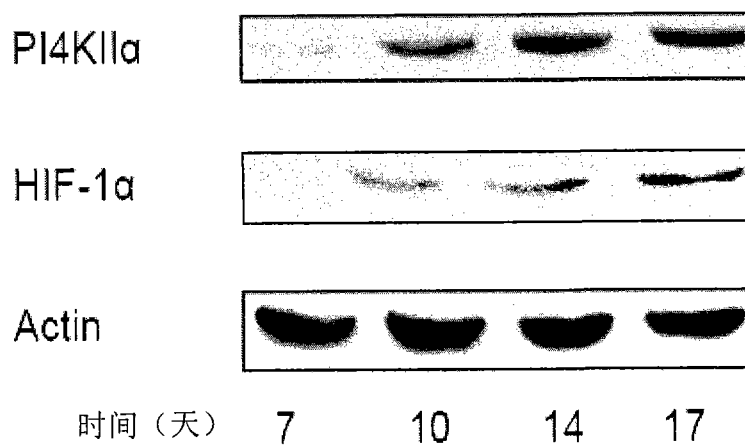
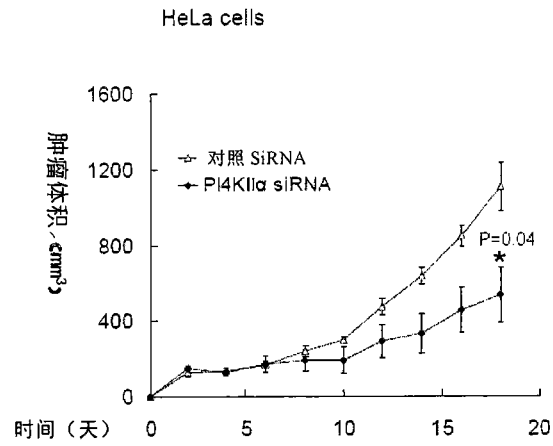
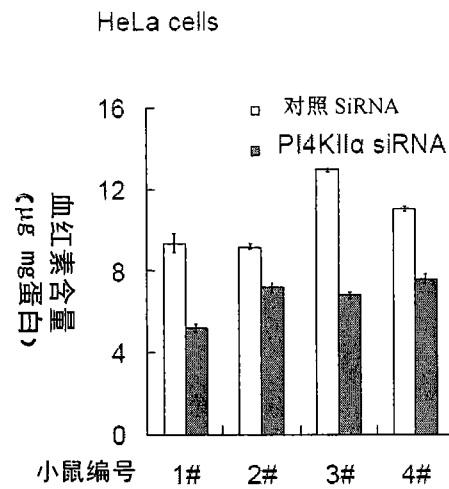


图 4

A.



B.



C.

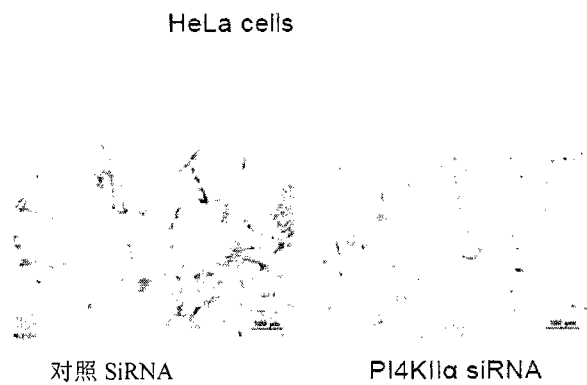
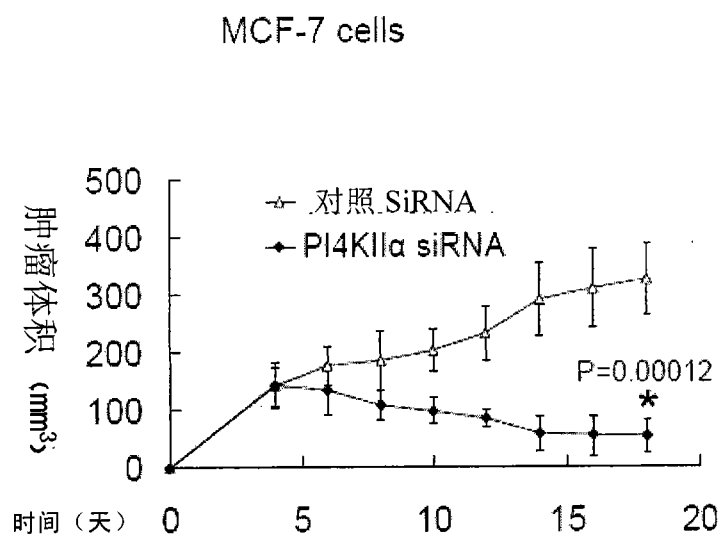


图 5

A.



B.

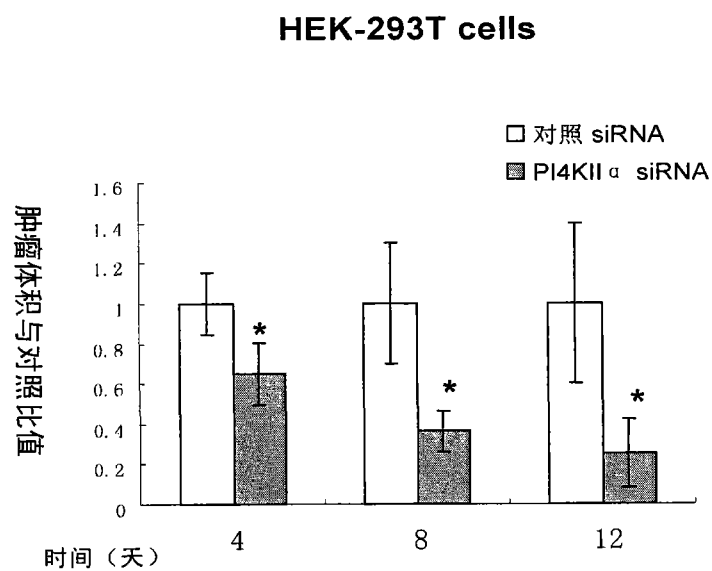
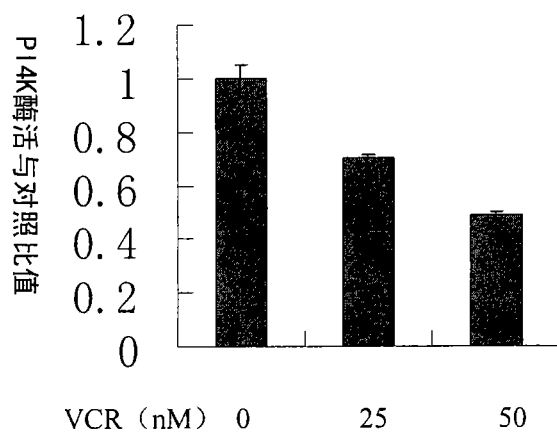
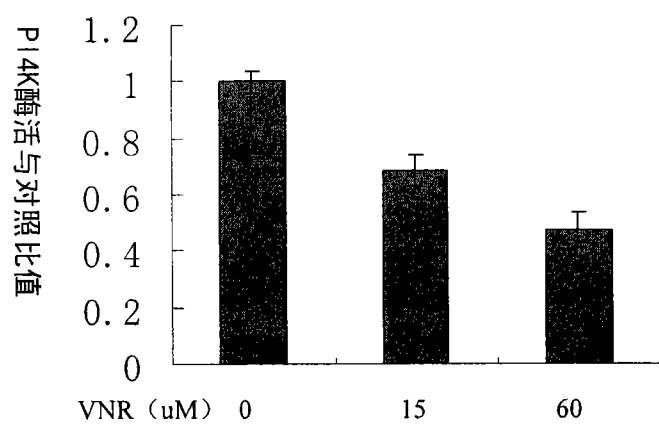


图 6

A.



B.



C.

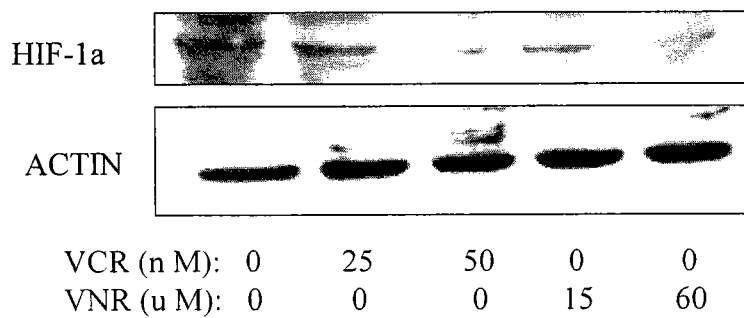
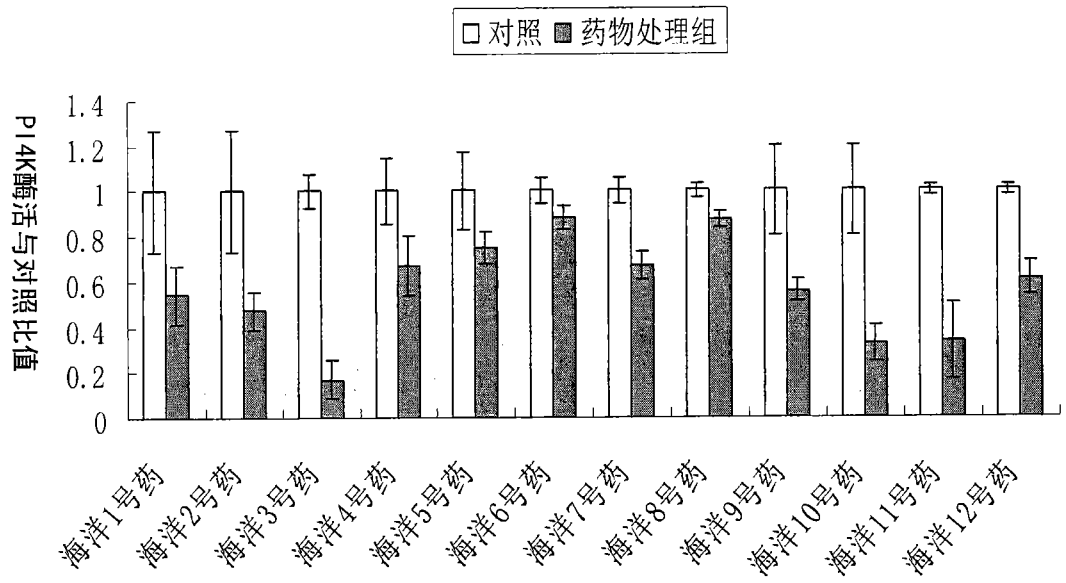


图 7

A.



B.

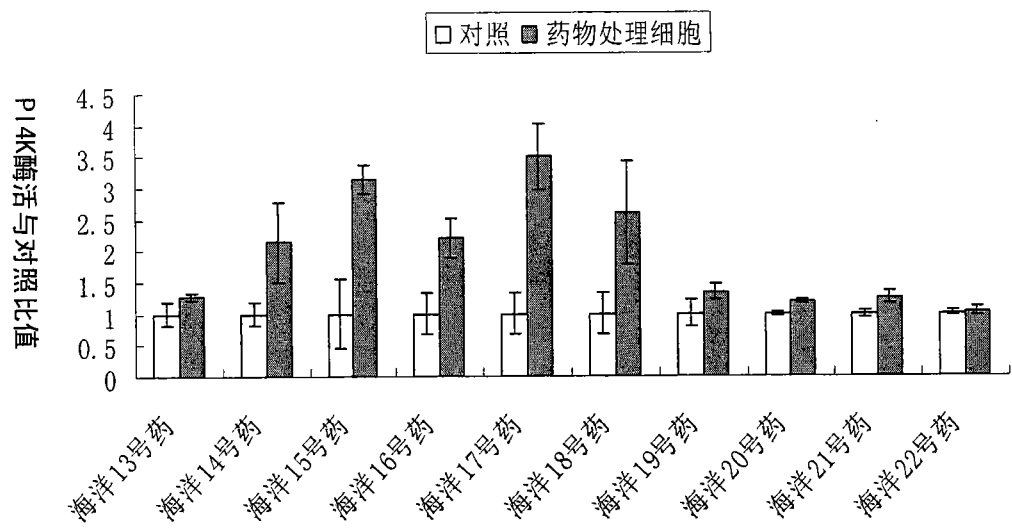


图 8