

说明书

发明名称: 一种微肽MIAC的应用

技术领域

[0001] 本申请属于生物医药技术领域，具体涉及一种微肽MIAC的应用。

背景技术

[0002] 开放阅读框(open reading frames, ORF)是一段潜在的可翻译序列，它由一串框内有义密码子组成，这些密码子以起始密码子开始，终止密码子结束。可翻译的ORF通常被标注为mRNA上的DNA编码序列(Coding DNA sequence, CDS)，这些序列负责蛋白质的翻译。

[0003] 长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一种长度大于200nt的非编码RNA，它们以组织和发育特异性的方式表达，并已被证明可直接调控多种功能。lncRNA中也包含短的开放阅读框(short open-reading frames, sORF)，这些sORF长度一般小于300nt，过去被认为不具备编码能力，而近年来研究表明，部分sORF具有编码能力，其编码产物被定义为微肽。

[0004] 从细菌到人类，在各种生物体中发现了越来越多的小于150个氨基酸的微肽，这些微肽的功能多样性以及用于鉴定它们的新方法的出现吸引了科学界的关注，所有这些研究表明，从sORF翻译而来的微肽在许多重要生理过程中起着重要的调节作用，例如肌肉发育，氨基酸代谢，免疫调控，肿瘤生长和细胞死亡等。

[0005] Maolei Zhang等人通过对胶质瘤细胞进行环状RNA测序(circRNAseq)和核糖体新生肽链复合物测序(RNC-seq)分析发现了一条lncRNA具有潜在编码能力。实验发现其第二外显子可形成环状RNA(circRNA)，并翻译为87个氨基酸的微肽，体内外实验表明该微肽可以抑制胶质瘤的增殖能力，并与聚合酶复合物相关因子PAF1相互作用抑制多个原癌基因的转录延伸。临床样本分析表明相比于癌旁组织，该微肽在乳腺癌，肝癌，胃癌中均显著低表达，提示其对恶性肿瘤诊断和治疗等方面的潜在作用(Zhang M, et al. A peptide encoded by circular form

of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. Nat Commun. 2018 Oct 26; 9(1):4475.)。

[0006] 在相关技术中，比如公开号为CN112442116A的中国发明专利记载了由lncRNA编码的微肽在头颈癌、甲状腺癌、肾癌等恶性肿瘤检测和治疗中的应用。

[0007] 然而，不同肿瘤组织具有遗传、表型和免疫异质性，同时微肽在包括肿瘤治疗方面的研究知之甚少，有必要探讨其在不同肿瘤治疗中的应用，为进一步扩充MIAC可能发挥作用的其他肿瘤谱，本发明通过尝试检测不同肿瘤细胞及对应正常细胞中的MIAC的表达情况，同时利用体内外实验系统评价微肽MIAC在不同肿瘤中的活性，为肿瘤治疗提供新的方案。

[0008] 发明内容

[0009] 1.发明目的

[0010] 本发明的目的在于提供一种微肽MIAC的应用，发明人经过长期探索和不断尝试，发现了具有如SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的微肽MIAC可以用于制备检测、预防或治疗如胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌等肿瘤的试剂或药物。

[0011] 2.技术方案

[0012] 为了解决上述问题，本申请所采用的技术方案如下：

[0013] 本申请提供了一种微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的用途，该微肽具有如SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列，SEQ ID NO: 1的氨基酸序列：MERAGVPGFSPRRSSVEAKMQSTSCSVRKSSVTAW PAVVLLLSWGQRRGG。

[0014] 进一步地，上述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。

[0015] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤的试剂或药物至少含有如SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的微肽MIAC及药学上可接受的载体。

[0016] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的生长、迁移和/或增殖。

- [0017] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的增殖。
- [0018] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞迁移。
- [0019] 进一步地，上述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的生长，特别是肿瘤细胞在体内的生长。
- [0020] 进一步地，上述抑制肿瘤细胞的增殖中的肿瘤细胞包括：
- [0021] 胰腺癌的癌细胞包括：MIP-PaCa-2、Aspc-1和PANC-1中的任意一种或组合；
- [0022] 所述肝癌的癌细胞包括：HepG2、SMMC-7721、HCCLM3、QGY-7701和Hep3B中的任意一种或组合；
- [0023] 所述结直肠癌的癌细胞包括：LOVO、SW480和HCT-116中的任意一种或组合；
- [0024] 所述卵巢癌的癌细胞包括：SKOV3和/或A2780；
- [0025] 所述宫颈癌的癌细胞包括：Hela和/或SIHA；
- [0026] 所述膀胱癌的癌细胞包括：T24和/或EJ；
- [0027] 所述黑色素瘤的癌细胞包括：A375、SK-mel-2和M14中的任意一种或组合；
- [0028] 所述胶质母细胞瘤的癌细胞包括：U87-MG；
- [0029] 所述神经母细胞瘤的癌细胞包括：SH-SY5Y；
- [0030] 所述胶质瘤的癌细胞包括：SHG-44；
- [0031] 所述骨肉瘤的癌细胞包括：MG-63、Saos-2和U-2OS中的任意一种或组合；
- [0032] 所述淋巴瘤的癌细胞包括：U937、Raji、U2932、WSU-DLCL2、OCI-LY10和JeKo-1中的任意一种或组合；
- [0033] 所述血液瘤的癌细胞包括：NB4、Reh、K562、Thp-1、JurKat和HL60的任意一种或组合；
- [0034] 所述骨髓瘤的癌细胞包括：NCI-H929、ARP-1和RPMI-8226中的任意或组合；
- [0035] 所述胆管癌的癌细胞包括：QBC939；
- [0036] 和/或，
- [0037] 所述前列腺癌的癌细胞包括：Du145细胞。

- [0038] 进一步地，上述抑制肿瘤细胞迁移中的肿瘤细胞包括：前列腺癌Du145细胞、宫颈癌Hela细胞、骨肉瘤MG-63细胞、卵巢癌SKOV3细胞、黑色素瘤A375细胞和/或肝癌Hep3B细胞。
- [0039] 进一步地，上述抑制肿瘤细胞的生长中的肿瘤细胞包括：肝癌Hep3B细胞。
- [0040] 本申请还提供了编码SEQ ID NO：1所示氨基酸序列的核苷酸在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的用途。
- [0041] 进一步地，上述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。
- [0042] 进一步地，上述核苷酸包含SEQ ID NO：2所示的核苷酸序列，SEQ ID NO：2所示的核苷酸序列为：atggagagagcaggggtgcccggttctctccgcgctcatcggtggaggcgaagatgcagagcaccagctgcagtgtcaggaagagctccacagtcaccgcctggccagccgtcgtgctgttgctgagctgggacagagaagaggcggatga。
- [0043] 本申请还提供了一种重组载体在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的肿瘤试剂或药物中的用途，所述重组载体编码SEQ ID NO：1所示氨基酸序列或包含SEQ ID NO：2所示核苷酸序列。
- [0044] 进一步地，上述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。
- [0045] 一种治疗肿瘤的药物组合物，该药物组合物至少含有上述微肽MIAC、上述核苷酸、或上述重组载体，及药学上可接受的载体，所述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。
- [0046] 本申请还提供了一种用于检测、预防或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用包含SEQ ID NO：1所示氨基酸序列的微肽MIAC，或包括所述微肽MIAC的药物组合物。
- [0047] 进一步地，上述受试者可以为人类、鼠、猴。

- [0048] 进一步地, 上述方法中, 向受试者施用0.1–50mg/kg、0.1–20mg/kg、0.1–10mg/kg、0.1–5mg/kg、5–20mg/kg、10–20mg/kg或5–15mg/kg的微肽MIAC。
- [0049] 3.有益效果
- [0050] 本申请与现有技术相比, 其有益效果在于:
- [0051] (1)本申请提供的微肽MIAC在人胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌细胞中的表达水平显著低于对应的正常细胞。
- [0052] (2)本申请提供的微肽MIAC的应用, 该微肽能够显著抑制胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌的肿瘤细胞的增殖作用, 以及抑制前列腺癌、宫颈癌、骨肉瘤、卵巢癌、黑色素瘤、肝癌的肿瘤细胞的迁移作用。
- [0053] (3)本申请提供的微肽MIAC的应用, 该微肽能够显著抑制肝癌, 特别是肝癌Hep3B细胞的肿瘤的体内生长。
- [0054] (4)本申请提供的微肽MIAC针对多种肿瘤细胞具有抑制增殖和迁移, 以及肝癌体内肿瘤生长的作用, 治疗谱广泛, 适用于多种肿瘤, 特别是恶性肿瘤的诊断、预防或治疗。

附图说明

- [0055] 图1是微肽MIAC在不同肿瘤细胞和正常细胞中的表达量分析结果;
- [0056] 图2A是微肽MIAC抑制前列腺癌Du145细胞迁移活性的统计结果;
- [0057] 图2B是微肽MIAC抑制前列腺癌Du145细胞迁移活性试验中空白组和各给药组的细胞染色图;
- [0058] 图3A是微肽MIAC抑制宫颈癌Hela细胞迁移活性的统计结果;
- [0059] 图3B是微肽MIAC抑制宫颈癌Hela细胞迁移活性试验中空白组和各给药组的细胞染色图;
- [0060] 图4A是微肽MIAC抑制骨肉瘤MG-63细胞迁移活性的统计结果;

- [0061] 图4B是微肽MIAC抑制骨肉瘤MG-63细胞迁移活性试验中空白组和各给药组的细胞染色图；
- [0062] 图5A是微肽MIAC抑制卵巢癌SKOV3细胞迁移活性的统计结果；
- [0063] 图5B是微肽MIAC抑制卵巢癌SKOV3细胞迁移活性试验中空白组和各给药组的细胞染色图；
- [0064] 图6A是微肽MIAC抑制恶性黑色素瘤A375细胞迁移活性的统计结果；
- [0065] 图6B是微肽MIAC抑制恶性黑色素瘤A375细胞迁移活性试验中空白组和各给药组的细胞染色图；
- [0066] 图7A是微肽MIAC抑制肝癌Hep3B细胞迁移活性的统计结果；
- [0067] 图7B是微肽MIAC抑制肝癌Hep3B细胞迁移活性试验中空白组和各给药组的细胞染色图；
- [0068] 图8是实施例4中MIAC抑制裸鼠肝癌Hep3B细胞皮下移植瘤体内生长曲线；
- [0069] 图9是实施例4中MIAC抑制裸鼠肝癌Hep3B细胞皮下移植第22天肿瘤体重统计图。

具体实施方式

- [0070] 下面结合具体实施例对本申请进一步进行描述。
- [0071] 需要说明的是，本说明书中所引用的如“上”、“下”、“左”、“右”、“中间”等用语，亦仅为便于叙述的明了，而非用以限定可实施的范围，其相对关系的改变或调整，在无实质变更技术内容下，当亦视为本申请可实施的范畴。
- [0072] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同；本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。
- [0073] 实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。
- [0074] 如本文所使用，术语“约”用于提供与给定术语、度量或值相关联的灵活性和不精确性。本领域技术人员可以容易地确定具体变量的灵活性程度。

- [0075] 如本文所使用，术语“.....中的至少一个”旨在与“.....中的一个或多个”同义。例如，“A、B和C中的至少一个”明确包括仅A、仅B、仅C以及它们各自的组合。
- [0076] 浓度、量和其他数值数据可以在本文中以范围格式呈现。应当理解，这样的范围格式仅是为了方便和简洁而使用，并且应当灵活地解释为不仅包括明确叙述为范围极限的数值，而且还包括涵盖在所述范围内的所有单独的数值或子范围，就如同每个数值和子范围都被明确叙述一样。例如，约1至约4.5的数值范围应当被解释为不仅包括明确叙述的1至约4.5的极限值，而且还包括单独的数字(诸如2、3、4)和子范围(诸如1至3、2至4等)。相同的原理适用于仅叙述一个数值的范围，诸如“小于约4.5”，应当将其解释为包括所有上述的值和范围。此外，无论所描述的范围或特征的广度如何，都应当适用这种解释。
- [0077] 微肽MIAC(Micropeptide Inhibiting Actin Cytoskeleton)为由非编码RNA(lncRNA)编码的具有51个氨基酸的人体内源性蛋白或多肽片段，所述微肽MIAC具有氨基酸序列：MERAGVPGFSPRRSSVEAKMQSTSCSVRKSSSTVTAWPAVVLLLSWGQRRGG(SEQ ID NO: 1)。
- [0078] 本申请提供了上述微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤疾病的试剂或药物中的用途。
- [0079] 在一些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤或血液瘤。
- [0080] 在一些实施方式中，所述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌和/或前列腺癌。
- [0081] 本申请提供的微肽MIAC具有抑制肿瘤细胞体内和/或体外生长、迁移和/或增殖的作用。
- [0082] 在一些实施方式中，所述微肽MIAC对包括以下多种肿瘤细胞具有抑制增殖的作用：
- [0083] 胰腺癌的癌细胞，包括：MIP-PaCa-2、Aspc-1和PANC-1中的任意一种或组合；

- [0084] 肝癌的癌细胞，包括：HepG2、SMMC-7721、HCCLM3、QGY-7701和Hep3B中的任意一种或组合；
- [0085] 结直肠癌的癌细胞，包括：LOVO、SW480和HCT-116中的任意一种或组合；
- [0086] 卵巢癌的癌细胞，包括：SKOV3和/或A2780；
- [0087] 宫颈癌的癌细胞，包括：Hela和/或SIHA；
- [0088] 膀胱癌的癌细胞，包括：T24和/或EJ；
- [0089] 黑色素瘤的癌细胞，包括：A375、SK-mel-2和M14中的任意一种或组合；
- [0090] 胶质母细胞瘤的癌细胞，包括：U87-MG；
- [0091] 神经母细胞瘤的，癌细胞包括：SH-SY5Y；
- [0092] 胶质瘤的癌细胞，包括：SHG-44；
- [0093] 骨肉瘤的癌细胞，包括：MG-63、Saos-2和U-2OS中的任意一种或组合；
- [0094] 淋巴瘤的癌细胞，包括：U937、Raji、U2932、WSU-DLCL2、OCI-LY10和JeKo-1中的任意一种或组合；
- [0095] 血液瘤的癌细胞，包括：NB4、Reh、K562、Thp-1、JurKat和HL60的任意一种或组合；
- [0096] 骨髓瘤的癌细胞，包括：NCI-H929、ARP-1和RPMI-8226中的任意一种或组合；
- [0097] 胆管癌的癌细胞，包括：QBC939；
- [0098] 前列腺癌的癌细胞，包括：Du145细胞。
- [0099] 本申请提供的微肽MIAC在50-200 μ M、10-200 μ M、50-100 μ M范围内具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。
- [0100] 在一些实施方式中，所述微肽MIAC还可以抑制肿瘤细胞的迁移，具体包括：人前列腺癌Du145细胞，人宫颈癌Hela细胞，人骨肉瘤MG-63细胞，人卵巢癌SKOV3细胞，人恶性黑色素瘤A375细胞和/或人肝癌Hep3B细胞。
- [0101] 可选地，所述微肽MIAC在0.78-50 μ M、0.78-25 μ M、1.56-50 μ M、3.125-50 μ M、6.25-50 μ M、25-50 μ M或12.5-50 μ M的范围内能抑制肿瘤细胞迁移。

- [0102] 本申请提供的微肽MIAC可以抑制肿瘤细胞的体内生长，可选地，MIAC能抑制人肝癌细胞的体内肿瘤生长。在一些实施方式中，微肽MIAC抑制肝癌Hep3B细胞的体内肿瘤生长。
- [0103] 因此，本申请还提供了一种用于检测、预防或治疗肿瘤疾病的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用包含或具有SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的微肽MIAC，或包括所述微肽MIAC的药物组合物。
- [0104] 所述受试者可选为人、鼠、猴、犬、猪。在一些实施方式中，所述受试者为人、猴、犬或鼠。
- [0105] 向受试者施用包括微肽MIAC的药物组合物时，所述药物组合物还包括至少一种药学可接受的辅料。
- [0106] 术语“药学可接受的载体”是指不会对受试者造成明显刺激并且不会消除所施用的抗间皮素抗体或其抗原结合片段和/或所述组合物中任何另外的治疗剂的生物活性和特性的辅料或载体。药学上可接受的载体可增强或稳定所述组合物，或可用于促进组合物的制备。
- [0107] 所述包含微肽MIAC的药物组合物可以根据药学可接受的载体的具体适用形式、理化特征等，选择合适的给予方式。在一些实施方式中，所述药物组合物可以以冷冻干燥制剂或液状制剂的形式形成制剂，所述制剂中可以含有本领域中适当的制剂添加物。例如，上述药物组合物中，代表性地，含有1种以上的药学辅料，例如灭菌的液体，如水及油(包含石油、动物、植物、或合成来源的油(例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等))。在静脉内给予上述药物组合物的情况下，水是更具有代表性的载体。另外，食盐水溶液、以及葡萄糖水溶液及甘油水溶液也可作为液体载体，尤其是可用于注射用溶液。适当药学赋形剂在该领域中是已知的。根据需要，组合物中还可以含有微量的润湿剂或乳化剂、或pH缓冲化剂。所述药物组合物通常选用肠胃外的给药方式，可以为皮内、肌肉内、腹腔内、静脉内或皮下注射，但不限于这些，例如可以利用输液或快速浓注(bolus injection)、颅内、鞘内或鼻内(例如吸入)、真皮内、皮下或透粘膜施用进行给予。

- [0108] 利用微肽MIAC在检测、预防或治疗肿瘤时，根据所治疗的特定病况、病况的严重程度、个体患者参数(包括年龄、身体状况、大小、性别和体重)、治疗持续时间、同时疗法(如果有的话)的性质、具体的施用途径、以及医生或兽医的知识等因素而变化，并逐渐增加剂量直至达到期望效果。在一些实施方式中，可以在已给予一次或多次微肽MIAC施用的个体中根据经验来确定活性成分的剂量。
- [0109] 在一些实施方式中，例如向受试者施用0.1–50mg/kg、0.1–20mg/kg、0.1–10mg/kg、0.1–5mg/kg、5–20mg/kg、10–20mg/kg或5–15mg/kg的微肽MIAC时，可以显著抑制肿瘤细胞成瘤性，特别地，抑制肿瘤细胞的体内成瘤性。
- [0110] 在一些实施方式中，向受试者施用的剂量可以进行物种之间剂量换算，例如人与小鼠之间剂量的换算。所述换算方法在本领域中是已知的，参见，例如，《药理实验方法学》徐叔云.药理实验方法学.2版[M].人民卫生出版社,1991，将其各自的内容特此通过引用并入本文。
- [0111] 下面将结合实施例以例证的方式更清楚、明确地阐述本发明的技术方案。应该理解的是，这些实施例仅用于例证的目的，绝不旨在限制本发明的保护范围。本发明的保护范围仅通过权利要求来限定。
- [0112] 实施例1
- [0113] 本实施例检测微肽MIAC在不同肿瘤细胞和正常细胞中的表达情况。
- [0114] (1)细胞培养及RNA提取
- [0115] 将人胰腺导管上皮细胞HPDE，胰腺癌细胞PANC-1、Aspc-1；人正常肝细胞L02，肝癌细胞HepG2、QGY-7701、Hep3B；人正常结肠细胞CCD-18Co，结直肠癌细胞SW480、HCT-116；人正常卵巢上皮细胞IOSE-80，卵巢癌细胞SKOV3、A2780；人宫颈上皮细胞HCerEpiC，宫颈癌细胞Hela、SIHA；人正常膀胱上皮细胞SV-HUC-1，膀胱癌细胞T24、EJ；人表皮角质形成细胞HEKa，黑色素细胞SK-mel-2、M14；人脑胶质细胞T98G，胶质瘤细胞SHG-44，神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y；人成骨细胞系hFOB1.19，骨肉瘤细胞MG-63、U-2OS；人T淋巴细胞H9，淋巴瘤细胞U2932、WSU-DLCL2、JeKo-1；人外周血单核细胞PBMC，血液瘤细胞K562、HL60、NCI-

H929、RPMI-8226；人肝内胆管上皮细胞HIBEpiC，胆管癌细胞QBC939；人前列腺上皮细胞HPEpiC和前列腺癌细胞Du145在37℃、5% CO₂的培养箱中培养至密度90%时，弃去上清，加入一定体积的Trizol(Life Invitrogen)，并按照说明书提取不同细胞中的总RNA。

- [0116] (2)引物设计
- [0117] 根据编码微肽MIAC的核苷酸序列信息设计引物，序列如下：
- [0118] 上游引物(SEQ ID NO.3)：ATGGAGAGAGCAGGGGTGCCCCG；
- [0119] 下游引物(SEQ ID NO.4)：CGCCTCTTCTCTGTCCCCAGCTC。
- [0120] (3)实时定量PCR检测微肽MIAC在不同肿瘤细胞和正常细胞中的表达。
- [0121] 将上述步骤中提取到的总RNA利用NanoDrop ND-1000核酸定量仪定量所提取的RNA的纯度和浓度，琼脂糖质检确保提取RNA的完整性。采用TaKaRa试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)对提取的总RNA反转录合成cDNA。采用TaKaRa试剂盒SYBR®Premix Ex Taq™II(Tli RNaseH Plus)进行qPCR反应。反应体系如表1所示，将上述组份混合均匀后按以下程序：95℃30s预变性，40个循环；95℃5s，60℃30s。

[0122] 表1 PCR反应体系

试剂	使用量 (μL)
SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	12.5
PCR Forward Primer (10 μM)	1
PCR Reverse Primer (10 μM)	1
DNA 模板 (<100 ng)	2
灭菌水	8.5
Total	25

- [0123] 根据熔解曲线判断反应的特异性，由公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算MIAC的相对表达量。结果见图1，与对应的正常细胞相比，在人的胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、血液瘤及胆管癌细胞中MIAC的表达水平均显著低于正常细胞，因此后续在上述肿瘤细胞考察MIAC的抗肿瘤效果。
- [0124] 实施例2
- [0125] 本实施例提供微肽MIAC对人肿瘤细胞增殖的抑制作用。
- [0126] 将人的胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、血液瘤

及胆管癌细胞，在37℃、5%CO₂的培养箱中培养至密度90%时，用胰蛋白酶消化收集，用培养液重悬细胞并在显微镜下计数，将细胞浓度调整至约为1.0×10⁵个/mL，将细胞悬液接种到96孔板中，每孔100 μL，并于37℃，5%CO₂培养箱中培养过夜。待细胞完全贴壁后，加入100 μL浓度分别为50 μM、100 μM、200 μM的微肽MIAC作为给药组；以不加任何药物的培养液作为阴性对照组。继续孵育72h后，向96孔板中每孔加入100 μL CCK8溶解。用酶标仪在检测波长为450nm处测定吸光值OD，并计算生长抑制率(proliferation inhibition, PI)，公式为：PI(%)=1-给药组/阴性对照组。试验独立重复3次，结果以Mean ± SD表示，并进行统计T检验，*P<0.05为显著性差异，**P<0.01为极显著性差异。结果见表2-表52。

[0127] 表2微肽MIAC对人胰腺癌细胞PANC-1的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291±0.002	—
阴性对照组		1.048±0.041	—
给药组	200 μM	0.427±0.02**	59.288±1.909**
	100 μM	0.708±0.043**	32.443±4.063**
	50 μM	1.027±0.073	2.036±6.961

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0128] 表3微肽MIAC对人胰腺癌细胞Aspc-1的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291±0.002	—
阴性对照组		0.948±0.003	—
给药组	200 μM	0.509±0.019**	46.273±2.035**
	100 μM	0.711±0.047**	24.965±4.971**
	50 μM	0.939±0.015	0.949±1.575

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0129] 表4微肽MIAC对人胰腺癌细胞MIP-PaCa-2的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.257±0.003	—
阴性对照组		1.033±0.014	—
给药组	200 μM	0.571±0.038**	44.739±3.716**
	100 μM	0.866±0.035**	16.107±3.372**
	50 μM	0.898±0.035	13.041±3.422

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0130] 表5微肽MIAC对人食管癌细胞Eca-109的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291±0.003	—
阴性对照组		1.064±0.023	—
给药组	200 μM	0.394±0.039**	63.001±3.636**
	100 μM	0.656±0.045**	38.315±4.205**
	50 μM	1.072±0.037	-0.752±3.493

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0131] 表6微肽MIAC对人食管癌细胞瘤细胞CaES-17的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.312±0.003	—
阴性对照组		1.217±0.030	—
给药组	200 μM	0.466±0.022**	61.692±1.819**
	100 μM	0.672±0.051**	44.770±4.194**
	50 μM	1.168±0.044	4.080±3.650

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0132] 表7微肽MIAC对人胃癌细胞BGC-803的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.247±0.004	—
阴性对照组		1.484±0.009	—
给药组	200 μM	0.715±0.015**	51.853±1.022**
	100 μM	0.960±0.059**	35.347±3.963**
	50 μM	1.379±0.025	7.074±1.656

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0133] 表8微肽MIAC对人胃癌细胞BGC-823的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291±0.002	—
阴性对照组		1.128±0.019	—
给药组	200 μM	0.327±0.025**	71.040±2.217**
	100 μM	0.556±0.029**	50.680±2.588**
	50 μM	0.950±0.045**	15.780±3.992**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0134] 表9微肽MIAC对人肝癌细胞HepG2的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.192±0.003	—
阴性对照组		0.832±0.006	—
给药组	200 μM	0.169±0.015**	79.696±1.770**
	100 μM	0.267±0.022**	67.962±2.687**
	50 μM	0.575±0.047**	30.877±5.587**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0135] 表10微肽MIAC对人肝癌细胞SMMC-7721的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.215±0.002	—
阴性对照组		1.407±0.004	—
给药组	200 μM	0.674±0.033**	52.132±2.309**
	100 μM	1.032±0.011**	26.670±0.749**
	50 μM	1.292±0.012	8.171±0.860

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0136] 表11微肽MIAC对人肝癌细胞HCCLM3的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.234±0.002	—
阴性对照组		1.470±0.025	—
给药组	200 μM	0.706±0.041**	51.962±2.795**
	100 μM	0.981±0.019**	33.273±1.308**
	50 μM	1.420±0.054	3.402±3.691

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0137] 表12微肽MIAC对人肝癌细胞QGY-7701的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.215±0.002	—
阴性对照组		1.398±0.009	—
给药组	200 μM	0.520±0.019**	62.837±1.374**

	100 μM	0.785±0.030**	43.862±2.111**
	50 μM	1.185±0.018**	15.232±1.260**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0138] 表13微肽MIAC对人结肠癌细胞LOVO的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.247±0.004	—
阴性对照组		1.339±0.014	—
给药组	200 μM	0.624±0.026**	53.373±1.965**
	100 μM	0.970±0.021**	27.558±1.574**
	50 μM	1.148±0.008**	14.289±0.608**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0139] 表14微肽MIAC对人结肠癌细胞SW480的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.192±0.003	—
阴性对照组		0.812±0.024	—
给药组	200 μM	0.147±0.016**	81.904±2.015**
	100 μM	0.283±0.007**	65.121±0.801**
	50 μM	0.640±0.032**	21.215±3.968**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0140] 表15微肽MIAC对人结肠癌细胞HCT-116的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.247±0.004	—
阴性对照组		1.441±0.013	—
给药组	200 μM	0.688±0.047**	52.255±3.273**
	100 μM	0.976±0.038**	32.269±2.653**
	50 μM	1.253±0.019**	13.046±1.340**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0141] 表16微肽MIAC对人乳腺癌细胞MX-1的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.257±0.003	—
阴性对照组		1.069±0.008	—
给药组	200 μM	0.630±0.051**	41.098±4.761**
	100 μM	0.808±0.102**	24.415±9.554**
	50 μM	1.020±0.028	4.584±2.574

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0142] 表17微肽MIAC对人乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.198±0.003	
阴性对照组		1.120±0.009	
给药组	200 μM	0.206±0.016**	81.602±1.437**
	100 μM	0.378±0.058**	66.270±5.216**
	50 μM	0.777±0.050**	30.604±4.508**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0143] 表18微肽MIAC对人乳腺癌细胞MCF-7的增殖抑制作用

组别	72 h	
	OD	生长抑制率 (%)

空白孔		0.234±0.002	
阴性对照组		1.635±0.013	
给药组	200 μM	0.814±0.047**	50.194±2.901**
	100 μM	0.973±0.027**	40.469±1.643**
	50 μM	1.281±0.040**	21.631±2.470**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0144] 表19微肽MIAC对人卵巢癌细胞SKOV3的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.205±0.002	
阴性对照组		1.674±0.017	—
给药组	200 μM	0.727±0.038**	56.600±2.243**
	100 μM	0.843±0.049**	49.652±2.934**
	50 μM	1.244±0.282**	25.702±16.864**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0145] 表20微肽MIAC对人卵巢癌细胞A2780的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.215±0.002	—
阴性对照组		1.195±0.008	
给药组	200 μM	0.441±0.018**	63.114±1.519**
	100 μM	0.791±0.067**	33.789±5.608**
	50 μM	0.985±0.046**	17.550±3.842**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0146] 表21微肽MIAC对人宫颈癌细胞Hela的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291±0.002	—
阴性对照组		1.181±0.018	—
给药组	200 μM	0.532±0.066**	54.941±5.616**
	100 μM	0.801±0.039**	32.185±3.281**
	50 μM	0.954±0.041**	19.170±3.432**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0147] 表22微肽MIAC对人宫颈癌细胞SIHA的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291±0.002	—
阴性对照组		1.030±0.022	—
给药组	200 μM	0.261±0.052**	74.693±5.023**
	100 μM	0.755±0.103**	26.667±10.000**
	50 μM	0.844±0.099**	18.026±9.582**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0148] 表23微肽MIAC对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291±0.002	—
阴性对照组		1.227±0.020	—
给药组	200 μM	0.467±0.012**	61.950±1.001**
	100 μM	0.754±0.06**	38.539±4.892**
	50 μM	1.090±0.022	11.162±1.793

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0149] 表24微肽MIAC对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1650的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.225±0.002	—
阴性对照组		1.208±0.016	—
给药组	200 μM	0.779±0.057**	35.559±4.721**
	100 μM	0.955±0.031**	20.938±2.565**
	50 μM	1.127±0.022	6.703±1.851

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0150] 表25微肽MIAC对人肺巨细胞癌细胞95-D的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.218±0.003	—
阴性对照组		1.226±0.010	—
给药组	200 μM	0.341±0.010**	72.151±0.817**
	100 μM	0.863±0.054**	29.589±4.418**
	50 μM	1.188±0.022	3.046±1.818

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0151] 表26微肽MIAC对人膀胱移行细胞癌细胞T24的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.312±0.003	—
阴性对照组		1.134±0.007	—
给药组	200 μM	0.364±0.043**	67.901±3.786**
	100 μM	0.730±0.085**	35.626±7.471**
	50 μM	1.125±0.010	0.794±0.869

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0152] 表27微肽MIAC对人膀胱癌细胞EJ的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.312±0.003	—
阴性对照组		1.123±0.007	—
给药组	200 μM	0.628±0.045**	44.125±3.964**
	100 μM	0.891±0.009**	20.682±0.761**
	50 μM	1.126±0.017	-0.208±1.490

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0153] 表28微肽MIAC对人恶性黑色素瘤细胞A375的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.304±0.003	—
阴性对照组		1.544±0.027	—
给药组	200 μM	0.911±0.071**	41.032±4.600**
	100 μM	1.194±0.043**	22.664±2.800**
	50 μM	1.310±0.069**	15.174±4.488**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0154] 表29微肽MIAC对人恶性黑色素瘤细胞SK-mel-2的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.234±0.002	—
阴性对照组		1.567±0.015	—
给药组	200 μM	0.570±0.011**	63.632±0.672**

	100 μ M	0.822 $\pm$ 0.060**	47.554 $\pm$ 3.816**
	50 μ M	1.302 $\pm$ 0.043**	16.908 $\pm$ 2.713**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0155] 表30微肽MIAC对人恶性黑色素瘤细胞M14的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.234 $\pm$ 0.002	—
阴性对照组		1.690 $\pm$ 0.029	—
给药组	200 μ M	0.639 $\pm$ 0.046**	62.162 $\pm$ 2.695**
	100 μ M	1.046 $\pm$ 0.060**	38.075 $\pm$ 3.523**
	50 μ M	1.585 $\pm$ 0.030	6.195 $\pm$ 1.791

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0156] 表31微肽MIAC对人脑星形胶质母细胞瘤细胞U87-MG的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.225 $\pm$ 0.002	—
阴性对照组		1.040 $\pm$ 0.038	—
给药组	200 μ M	0.656 $\pm$ 0.030**	36.955 $\pm$ 2.912**
	100 μ M	0.785 $\pm$ 0.029**	24.519 $\pm$ 2.802**
	50 μ M	0.951 $\pm$ 0.019	8.590 $\pm$ 1.860

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0157] 表32微肽MIAC对人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.225 $\pm$ 0.002	—
阴性对照组		1.170 $\pm$ 0.009	—
给药组	200 μ M	0.665 $\pm$ 0.011**	43.175 $\pm$ 0.922**
	100 μ M	0.822 $\pm$ 0.108**	29.752 $\pm$ 9.195**
	50 μ M	1.033 $\pm$ 0.022	11.656 $\pm$ 1.912

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0158] 表33微肽MIAC对人胶质瘤细胞SHG-44的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.218 $\pm$ 0.003	—
阴性对照组		1.276 $\pm$ 0.014	—
给药组	200 μ M	0.393 $\pm$ 0.021**	69.183 $\pm$ 1.606**
	100 μ M	0.838 $\pm$ 0.067**	34.369 $\pm$ 5.261**
	50 μ M	1.201 $\pm$ 0.026	5.876 $\pm$ 2.067

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0159] 表34微肽MIAC对人骨肉瘤细胞MG-63的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.198±0.003	—
阴性对照组		1.279±0.025	—
给药组	200 μM	0.365±0.009**	71.488±0.665**
	100 μM	0.691±0.033**	45.999±2.541**
	50 μM	1.049±0.011**	17.983±0.824**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0160] 表35微肽MIAC对人成骨肉瘤细胞Saos-2的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.312±0.003	—
阴性对照组		1.270±0.023	—
给药组	200 μM	0.627±0.052**	50.669±4.107**
	100 μM	0.946±0.016**	25.558±1.220**
	50 μM	1.198±0.067	5.694±5.302

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0161] 表36微肽MIAC对人骨肉瘤细胞U-2OS的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.323±0.002	—
阴性对照组		0.922±0.007	—
给药组	200 μM	0.350±0.013**	61.989±1.457**
	100 μM	0.596±0.061**	35.298±6.605**
	50 μM	0.887±0.024	3.761±2.606

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0162] 表37微肽MIAC对人组织细胞淋巴瘤细胞U937的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.257±0.003	—
阴性对照组		1.198±0.025	—
给药组	200 μM	0.684±0.046**	42.877±3.800**
	100 μM	0.821±0.047**	31.469±3.907**
	50 μM	1.069±0.028	10.740±2.338

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0163] 表38微肽MIAC对人淋巴瘤细胞Raji的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.323±0.002	—
阴性对照组		0.989±0.016	—
给药组	200 μM	0.421±0.029**	57.432±2.890**
	100 μM	0.687±0.019**	30.502±1.951**
	50 μM	0.964±0.037	2.494±3.724

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0164] 表39微肽MIAC对人弥漫大B淋巴瘤细胞U2932的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.183±0.002	—
阴性对照组		0.833±0.025	—
给药组	200 μM	0.167±0.025**	79.952±3.030**
	100 μM	0.275±0.038**	67.027±4.613**
	50 μM	0.426±0.019**	48.860±2.290**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0165] 表40微肽MIAC对人弥漫大B淋巴瘤细胞WSU-DLCL2的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.310±0.007	—
阴性对照组		0.989±0.005	—
给药组	200 μM	0.264±0.056**	73.306±5.703**
	100 μM	0.684±0.039**	30.839±3.947**
	50 μM	0.908±0.061	8.156±6.184

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0166] 表41微肽MIAC对人弥漫大B淋巴瘤细胞OCI-LY10的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.192±0.003	—
阴性对照组		0.826±0.030	—
给药组	200 μM	0.376±0.019**	54.421±2.289**
	100 μM	0.598±0.033**	27.574±4.002**
	50 μM	0.719±0.028**	12.959±3.388**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0167] 表42微肽MIAC对人套细胞淋巴瘤细胞JeKo-1的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.310±0.007	—
阴性对照组		1.273±0.041	—
给药组	200 μM	0.496±0.052**	61.021±4.051**
	100 μM	0.820±0.078**	35.602±6.132**
	50 μM	1.174±0.027	7.827±2.109

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0168] 表43微肽MIAC对人急性早幼粒细胞白血病细胞NB4的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.257±0.003	—
阴性对照组		1.364±0.016	—
给药组	200 μM	0.624±0.052**	54.217±3.817**
	100 μM	0.826±0.066**	39.404±4.803**
	50 μM	1.177±0.042**	13.689±3.103**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0169] 表44微肽MIAC对人急性非T非B淋巴细胞性白血病细胞Reh的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.323±0.002	—
阴性对照组		0.989±0.016	—
给药组	200 μM	0.421±0.029**	57.432±2.890**
	100 μM	0.687±0.019**	30.502±1.951**
	50 μM	0.964±0.037	2.494±3.724

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0170] 表45微肽MIAC对人慢性髓原白血病细胞K562的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.183±0.002	—
阴性对照组		1.206±0.004	—
给药组	200 μM	0.338±0.025**	71.993±2.074**
	100 μM	0.544±0.062**	54.907±5.168**
	50 μM	1.004±0.012**	16.699±0.990**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0171] 表46微肽MIAC对人单核细胞白血病细胞Thp-1的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.310±0.007	—
阴性对照组		1.335±0.012	—
给药组	200 μM	0.681±0.045**	49.014±3.359**

	100 μ M	0.841 $\pm$ 0.058**	36.979 $\pm$ 4.341**
	50 μ M	1.265 $\pm$ 0.059	5.243 $\pm$ 4.414

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0172] 表47微肽MIAC对人T淋巴瘤细胞白血病细胞JurKat的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.291 $\pm$ 0.002	—
阴性对照组		1.079 $\pm$ 0.029	—
给药组	200 μ M	0.559 $\pm$ 0.038**	48.146 $\pm$ 3.543**
	100 μ M	0.730 $\pm$ 0.032**	32.355 $\pm$ 2.996**
	50 μ M	0.984 $\pm$ 0.032	8.776 $\pm$ 3.008

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0173] 表48微肽MIAC对人髓细胞白血病细胞HL60的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.215 $\pm$ 0.002	—
阴性对照组		1.691 $\pm$ 0.018	—
给药组	200 μ M	0.549 $\pm$ 0.023**	67.560 $\pm$ 1.336**
	100 μ M	0.725 $\pm$ 0.027**	57.115 $\pm$ 1.600**
	50 μ M	1.378 $\pm$ 0.029**	18.506 $\pm$ 1.732**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0174] 表49微肽MIAC对人骨髓瘤细胞NCI-H929的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.183 $\pm$ 0.002	—
阴性对照组		1.089 $\pm$ 0.005	—
给药组	200 μ M	0.263 $\pm$ 0.026**	75.849 $\pm$ 2.402**
	100 μ M	0.427 $\pm$ 0.016**	60.759 $\pm$ 1.429**
	50 μ M	0.860 $\pm$ 0.012**	21.028 $\pm$ 1.128**

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0175] 表50微肽MIAC对人骨髓瘤细胞ARP-1的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.310 $\pm$ 0.007	—
阴性对照组		1.081 $\pm$ 0.013	—
给药组	200 μ M	0.433 $\pm$ 0.013**	59.914 $\pm$ 1.171**
	100 μ M	0.692 $\pm$ 0.047**	36.016 $\pm$ 4.355**
	50 μ M	0.985 $\pm$ 0.008	8.850 $\pm$ 0.719

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0176] 表51微肽MIAC对人多发性骨髓瘤外周血B淋巴细胞RPMI-8226的增殖抑制作用

组别		72 h	
		OD	生长抑制率 (%)
空白孔		0.205±0.002	—
阴性对照组		2.054±0.033	—
给药组	200 μM	0.522±0.028**	74.586±1.366**
	100 μM	1.001±0.027**	51.282±1.326**
	50 μM	2.008±0.023	2.256±1.100

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0177] 表52微肽MIAC对人胆管癌细胞QBC939的增殖抑制作用

组别	72 h	
	OD	生长抑制率 (%)

空白孔		0.218±0.003	—
阴性对照组		1.134±0.029	—
给药组	200 μM	0.468±0.045**	58.718±3.932**
	100 μM	0.757±0.028**	33.255±2.467**
	50 μM	1.13±0.053	0.294±4.643

注：与阴性对照组相比，*P<0.05，**P<0.01。

[0178] 由表2-52可知，与阴性对照相比，在50~200 μM剂量下，微肽MIAC能够不同程度的显著抑制人胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、以及胆管癌细胞的增殖，并且呈现剂量依赖关系。

[0179] 实施例3

[0180] 本实施例提供微肽MIAC对人肿瘤细胞迁移的抑制作用。

[0181] 将人的前列腺癌、宫颈癌、骨肉瘤、卵巢癌、黑色素瘤、肝癌细胞接种到transwell小室中，每孔100 μL，每个小室加入不同剂量的微肽MIAC 100 μL作为给药组，空白组不加药物。然后在transwell下室加入0.6mL含10% FBS的完全培养基刺激细胞迁移，于5% CO₂，37℃培养48h。弃去孔中培液，甲醇常温固定30min，0.1%结晶紫常温染色10min，清水漂净，用棉签擦掉上层未迁移细

胞，显微镜下观察并选择四个视野拍照计数。按照公式计算迁移抑制率(Invasion inhibition rate, MI):

$$MI(\%) = \left(1 - \frac{N_{test}}{N_{control}}\right) \times 100\%$$

[0182] 其中，N_{test}为给药组细胞迁移数，N_{control}为空白对照组细胞迁移数。

[0183] 结果见表53-58及图2-7。

[0184] 表53 MIAC对前列腺癌Du145细胞迁移活性的抑制作用

组别	药物	剂量(μmol/L)	细胞迁移数目	抑制率(%)
G1	MIAC	0	574.8±106.9	—
G2		3.125	349.3±98.5	39.23
G3		6.25	173.8±48.8	69.77
G4		12.5	100.5±11.8	82.51
G5		25	46.8±8.5	91.87
G6		50	31.3±8.4	94.56

[0185] 图2A对应表53中各组别统计图；图2B对应上述表53中各组细胞的染色图。

[0186] 表54 MIAC对宫颈癌Hela细胞迁移活性的抑制作用

组别	药物	剂量(μmol/L)	细胞迁移数目	抑制率(%)
G1	MIAC	0	544.5±132.8	—
G2		6.25	475.0±53.3	12.76
G3		12.5	296.8±45.0	39.23
G4		25	360.3±119.4	33.83
G5		50	210.5±66.6	61.30

[0187] 图3A对应表54中各组别统计图；图3B对应上述表54中各组细胞的染色图。

[0188] 表55 MIAC对骨肉瘤MG-63细胞迁移活性的抑制作用

组别	药物	剂量(μmol/L)	细胞迁移数目	抑制率(%)
G1	MIAC	0	360.3±123.0	—
G2		3.125	129.5±19.9	64.05
G3		6.25	60.5±26.7	83.21
G4		12.5	32.5±6.0	90.98
G5		25	24.8±9.6	93.13
G6		50	15.2±4.1	95.82

[0189] 图4A对应表55中各组别统计图；图4B对应上述表55中各组细胞的染色图。

[0190] 表56 MIAC对卵巢癌SKOV3细胞迁移活性的抑制作用

组别	药物	剂量($\mu\text{mol/L}$)	细胞迁移数目	抑制率(%)
G1	无	0	1095.3 $\pm$ 63.9	—
G2	MIAC	12.5	907.3 $\pm$ 46.5	17.17
G3		25	523.8 $\pm$ 35.3	52.28
G4		50	415.8 $\pm$ 21.7	62.04

[0191] 图5A对应表56中各组别统计图；图5B对应上述表56中各组细胞的染色图。

[0192] 表57 MIAC对恶性黑色素瘤A375细胞迁移活性的抑制作用

组别	药物	剂量($\mu\text{mol/L}$)	细胞迁移数目	抑制率(%)
G1	无	0	258.8 $\pm$ 26.3	—
G2	MIAC	12.5	139.3 $\pm$ 28.5	46.18
G3		25	164.3 $\pm$ 40.1	36.52
G4		50	132.8 $\pm$ 35.1	48.70

[0193] 图6A对应表57中各组别统计图；图6B对应上述表57中各组细胞的染色图。

[0194] 表58 MIAC对肝癌Hep3B细胞迁移活性的抑制作用

组别	药物	剂量($\mu\text{mol/L}$)	细胞迁移数目	抑制率(%)
G1	无	0	331.0 $\pm$ 18.2	—
G2	MIAC	12.5	110.8 $\pm$ 29.3	66.54
G3		25	114.8 $\pm$ 27.1	65.33
G4		50	116.0 $\pm$ 26.1	64.95

[0195] 图7A对应表58中各组别统计图；图7B对应上述表58中各组细胞的染色图。

[0196] 由表53–58和附图2–7可知，与空白对照相比，微肽MIAC在一定范围内对人前列腺癌Du145细胞、人骨肉瘤MG–63细胞、人卵巢癌SKOV3细胞、人肝癌Hep3B细胞、人黑色素瘤A375细胞、人宫颈癌Hela细胞的迁移有显著的抑制作用，且抑制率呈剂量依赖关系，说明微肽MIAC可以通过抑制上述恶性肿瘤细胞的迁移开发成抗肿瘤药物。

[0197] 实施例4

[0198] 本实施例提供微肽MIAC对人肿瘤细胞体内生长的抑制作用。

[0199] 大量培养人肝癌细胞Hep3B，采用0.25%胰酶溶液消化，终止消化后细胞悬液1000rpm，离心5min，用无血清的MEM培养基重悬细胞后计数，调整细胞浓度至 5×10^7 个/mL。每只BALB/c裸鼠(46周龄、体重在1416g的雌性，在SPF级动物饲养室适应性饲养1周)左侧腋下接种100 μ L细胞悬液，注射细胞量为 5×10^6 个。接种后密切观察裸鼠接种部位的肿瘤生长情况，接种后第7天，接种部位出现

白色结节，触摸后可于皮下活动，随肿瘤组织生长，接种部位逐渐形成坚硬瘤块，约14天肿瘤组织平均体积达到100mm³，将BALB/c裸鼠随机分至7组(生理盐水组为空白对照，微肽MIAC使用量为5mg/kg的为低剂量，微肽MIAC使用量为10mg/kg的为中剂量，微肽MIAC使用量为15mg/kg的为中高剂量，微肽MIAC使用量为20mg/kg的为高剂量，奥沙利铂15mg/kg和索拉非尼50mg/kg为阳性对照)，空白组10只，其余每组6只，开始给药时动物体重为20g左右。每隔两日测量并记录移植瘤体积，肿瘤体积(Tumor volume, TV)计算公式为：肿瘤体积 $=0.5 \times a \times b^2$ ，其中，a为移植瘤长度(mm)，b为移植瘤宽度(mm)。

[0200] 结果见图8和图9，与空白对照组相比，微肽MIAC能够在不同程度显著抑制人肝癌细胞Hep3B的体内肿瘤生长，并且呈现剂量依赖关系。在20mg/kg剂量时，对肿瘤的治疗效果与阳性药物相近，显示微肽MIAC具有很好的体内抗肿瘤作用。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述微肽MIAC具有如SEQ ID NO：1所示氨基酸序列；所述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的一种微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤的试剂或药物至少含有微肽MIAC及药学上可接受的载体。
- [权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的一种微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤包括抑制肿瘤细胞的生长、迁移和/或增殖。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的一种微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤包括：抑制肿瘤细胞的增殖，
所述胰腺癌的癌细胞包括：MIP-PaCa-2、Aspc-1和PANC-1中的任意一种或组合；
所述肝癌的癌细胞包括：HepG2、SMMC-7721、HCCLM3、QGY-7701和Hep3B中的任意一种或组合；
所述结直肠癌的癌细胞包括：LOVO、SW480和HCT-116中的任意一种或组合；
所述卵巢癌的癌细胞包括：SKOV3和/或A2780；
所述宫颈癌的癌细胞包括：Hela和/或SIHA；
所述膀胱癌的癌细胞包括：T24和/或EJ；
所述黑色素瘤的癌细胞包括：A375、SK-mel-2和M14中的任意一种或组合；
所述胶质母细胞瘤的癌细胞包括：U87-MG；

所述神经母细胞瘤的癌细胞包括：SH-SY5Y；
所述胶质瘤的癌细胞包括：SHG-44；
所述骨肉瘤的癌细胞包括：MG-63、Saos-2和U-2OS中的任意一种或组合；
所述淋巴瘤的癌细胞包括：U937、Raji、U2932、WSU-DL CL2、OCI-LY10和JeKo-1中的任意一种或组合；
所述血液瘤的癌细胞包括：NB4、Reh、K562、Thp-1、JurKat和HL60的任意一种或组合；
所述骨髓瘤的癌细胞包括：NCI-H929、ARP-1和RPMI-8226中的任意一种或组合；
所述胆管癌的癌细胞包括：QBC939；
和/或，
所述前列腺癌的癌细胞包括：Du145细胞。

[权利要求 5] 根据权利要求3所述的一种微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤包括：抑制前列腺癌Du145细胞、宫颈癌Hela细胞、骨肉瘤MG-63细胞、卵巢癌SKOV3细胞、黑色素瘤A375细胞和/或肝癌Hep3B细胞的迁移。

[权利要求 6] 根据权利要求3所述的一种微肽MIAC在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述预防或治疗肿瘤包括：抑制肝癌Hep3B细胞的生长。

[权利要求 7] 一种核苷酸在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述核苷酸编码SEQ ID NO：1所示氨基酸序列；所述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。

- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的一种核苷酸在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述核苷酸序列包含SEQ ID NO：2所示的核苷酸序列。
- [权利要求 9] 一种重组载体在制备用于检测、预防或治疗肿瘤的试剂或药物中的应用，其特征在于，所述重组载体编码SEQ ID NO：1所示氨基酸序列或包含SEQ ID NO：2所示核苷酸序列；所述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。
- [权利要求 10] 一种治疗肿瘤的药物组合物，其特征在于：所述药物组合物至少含有权利要求1所述的微肽MIAC、权利要求7或8所述的核苷酸、或权利要求9所述的重组载体，及药学上可接受的载体，所述肿瘤包括胰腺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、血液瘤、骨髓瘤、胆管癌、前列腺癌中的一种或多种。