



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111534515 A

(43)申请公布日 2020.08.14

(21)申请号 202010288812.6

(22)申请日 2020.04.15

(71)申请人 湖南省科域生物医药科技有限公司

地址 410000 湖南省长沙市高新开发区谷苑路229号海凭园生产厂房六1312室

(72)发明人 李丽丽 刘佳利 黄娅

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

A61K 31/7105(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

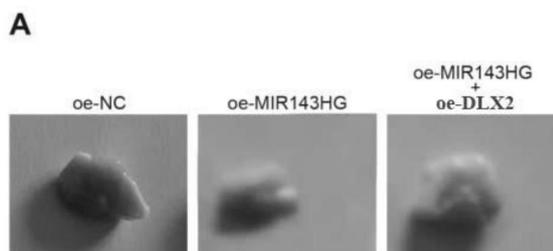
权利要求书1页 说明书9页
序列表2页 附图9页

(54)发明名称

MIR143HG作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途

(57)摘要

本发明公开了一种长链非编码RNA,所述长链非编码RNA为MIR143HG,所述的MIR143HG作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途。本发明还公开了一种启动子区域能与DNMT1/DNMT3(a/b)结合的DLX2,所述的DLX2的si-DLX2作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途。本发明的MIR143HG在前列腺癌中通过招募DNA甲基转移酶DNMT1/DNMT3(a/b)到DLX2启动子区域,下调DLX2表达;另外,本发明的si-DLX2通过沉默DLX2基因从而下调其表达。因此,本发明的MIR143HG和si-DLX2都能起到抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移。且本发明所公开的内容为前列腺癌患者的治疗提供了一种有前景的临床应用和支持。



1. 一种长链非编码RNA,所述长链非编码RNA为MIR143HG,其特征在于,所述的MIR143HG作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的MIR143HG的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

3. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的MIR143HG的靶基因为DLX2。

4. 根据权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的MIR143HG招募DNA甲基转移酶到DLX2启动子区域。

5. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述的DNA甲基转移酶结合DLX2启动子区域,抑制DLX2的基因表达。

6. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述的DNA甲基转移酶为DNMT1/DNMT3 (a/b)。

7. 一种启动子区域能与权利要求6所述的DNMT1/DNMT3 (a/b) 结合的DLX2,其特征在于,所述的DLX2的si-DLX2作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途。

8. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述的si-DLX2的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

MIR143HG作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种与前列腺癌相关的长链非编码RNA及其在前列腺癌中应用,具体所述的长链非编码RNA为MIR143HG,属于生物医药领域,具体属于分子生物学技术领域。

背景技术

[0002] 现代全基因组分析的进展已经发现了大量在人类基因组中转录的长链非编码rna (lncRNA),它是一种非蛋白编码RNA,长度为200到10000个核苷酸。长链非编码RNA不仅在正常发育过程中发挥重要作用,肿瘤发生过程中也受到其影响。如许多肿瘤的发生就是长链非编码RNA和环状RNA通过RNA-RNA竞争性相互作用导致。事实上,一系列研究报道了一些长链非编码RNA通过多种机制在前列腺癌的病理发展过程中起到作用。有文献报道,长链非编码RNAmiR143HG通过抑制肝细胞癌中丝裂原激活的蛋白激酶和Wnt信号通路,预测预后,抑制肿瘤增殖和转移。MicroRNAs (miRNAs) 是一类重要的普遍存在的基因,涉及多种生物学功能,尤其是在癌症中。其中miRNA-143已被研究作为几种癌症的生物标志物(包括前列腺癌)。前列腺癌中MIR143HG通过调控HOXB7启动子甲基化影响恶性进展此外,它们可以被癌细胞分泌到生物液体中,这表明它们有潜在的诊断应用价值。因此,肿瘤发生的分子机制可为今后新的治疗方法提供基础信息。

[0003] 目前,研究者们发现在多种恶性肿瘤,如食道癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、前列腺癌等中,miR-143为低表达状态。有文献表明,miR-143在前列腺癌等中低表达是因为PC-3、PC-3-m和LNCaP细胞中被反义寡核苷酸沉默。miR-143在前列腺癌转移中的作用通过伤口愈合和体外transwell检测以及体内生物发光成像来测定。生物信息学和荧光素酶报告分析被用来识别miR-143的靶点。Fan等人研究发现miR-143的下调在体外抑制了前列腺癌细胞的迁移和侵袭,在体内系统抑制了癌细胞的转移。而miR-143若在前列腺癌干细胞分化过程中表达上调,则会通过抑制FNDC3B表达促进前列腺癌转移。最新研究显示,miR-143可以通过靶向调节多种恶性肿瘤(如头颈部鳞状癌、肺癌、乳腺癌等)中的HK2(hexokinase2)基因而影响肿瘤细胞的生长、转移等;其还可通过调节PI3K/Akt和MAPK信号传导通路而影响膀胱癌增殖、凋亡等生物学行为。

[0004] 尽管研究者们通过高通量测序鉴定得到越来越多的长链非编码RNA(lncRNA)。miR143HG在膀胱癌组织(BCa)中的表达明显下调。miR143HG高表达与BCa患者的高生存率相关。功能增益分析显示,miR143HG过表达可抑制BCa细胞的增殖,抑制细胞周期的进展,减弱BCa细胞的迁移和侵袭。体内实验表明,miR143HG的异位表达抑制了BCa在体内的生长。

[0005] 研究表明,miR143HG表达在肝癌组织和细胞中显著下调;miR143HG通过抑制MAPK和Wnt信号通路在肝癌的发生和发展中起关键作用。此外,已显示在糖尿病患者的单核细胞中,MIR143HG(小鼠E33的人类同源物)的表达增加。

[0006] 使用逆转录定量聚合酶链反应,与相应的远端非肿瘤组织相比,进一步证实miR-143/145及其宿主基因MIR143HG在与HBV相关的HCC组织中被下调。miR-143和miR-145表达水平较低与肿瘤分化有关,因此可能会影响与HBV相关HCC患者的预后不良。研究表明,miR-

143/145簇及其宿主基因MIR143HG在HBV相关的HCC组织中表达降低与预后相关,并且这些miRNA均可以作为预测HBV相关的HCC肿瘤发生的有价值的诊断生物标志物。

发明内容

[0007] 为了研究与前列腺癌相关的长链非编码RNA在前列腺癌中的作用,从而筛选合适的可以作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途的长链非编码RNA。我们收集了前列腺癌组织及正常前列腺组织各47例,通过相关的技术手段,从中找到了可以作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移中的用途的MIR143HG。

[0008] 因此,本发明一方面提供了一种长链非编码RNA,所述长链非编码RNA为MIR143HG,所述的MIR143HG作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途。

[0009] 优选地,本发明所述的MIR143HG的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0010] 优选地,本发明所述的MIR143HG的靶基因为DLX2。

[0011] 优选地,本发明所述的MIR143HG招募DNA甲基转移酶到DLX2启动子区域。

[0012] 优选地,本发明所述的DNA甲基转移酶结合DLX2启动子区域,抑制DLX2的基因表达。

[0013] 优选地,本发明所述的DNA甲基转移酶为DNMT1/DNMT3 (a/b)。

[0014] 另一方面,本发明还提供了一种启动子区域能与DNMT1/DNMT3 (a/b) 结合的DLX2,所述的DLX2的si-DLX2作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途。

[0015] 优选地,本发明所述的si-DLX2的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0016] 本发明的MIR143HG在前列腺癌中通过招募DNA甲基转移酶DNMT1/DNMT3 (a/b) 到DLX2启动子区域,影响DLX2表达,从而抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移。另外,本发明的si-DLX2通过沉默DLX2的表达,从而抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移。本发明所公开的内容为前列腺癌患者的治疗提供了一种有前景的临床应用和支持。

附图说明

[0017] 其中*表示 $P < 0.05$,具有显著性差异。

[0018] 图1长链非编码RNA MIR143HG在前列腺癌中低表达(normal表示正常前列腺组织,tumor表示前列腺癌组织)。

[0019] 图1A:GSE3325芯片中MIR143HG在前列腺癌组织和正常前列腺组织的表达;

[0020] 图1B:GSE55945芯片中MIR143HG在前列腺癌组织和正常前列腺组织的表达;

[0021] 图1C:GEPIA数据库中MIR143HG在前列腺癌组织和正常前列腺组织的表达;

[0022] 图1D:qRT-PCR检测前列腺癌组织样本、正常前列腺组织样本中MIR143HG的表达情况;

[0023] 图1E:qRT-PCR检测前列腺癌细胞系和正常前列腺细胞中MIR143HG的表达情况;

[0024] 图1F:kaplan-meier分析生存曲线分析MIR143HG与前列腺癌的预后关系。

[0025] 图2过表达MIR143HG抑制前列腺癌细胞生长、增殖、转移,促进其凋亡(oe-NC组表示转染空载质粒对照组,oe-MIR143HG组表示转染MIR143HG高表达质粒组)。

[0026] 图2A:Edu增殖实验检测细胞增殖能力,其中oe-MIR143HG表示增殖的细胞,DAPI染细胞核,表示全部的活细胞,Merge表示EDU和DAPI重合的细胞;

- [0027] 图2B:划痕实验检测细胞迁移能力;
- [0028] 图2C:Transwell迁移实验检测细胞侵袭能力;
- [0029] 图2D:WB检测增殖因子Ki67、PCNA的表达水平;
- [0030] 图2E:WB检测干性相关因子CD133、CD44、Sox2、Nanog的表达水平;
- [0031] 图2F:流式细胞术检测细胞凋亡能力。
- [0032] 图3 MIR143HG与DLX2负相关,DLX2在前列腺癌中高表达(normal表示正常前列腺组织,tumor表示前列腺癌组织)。
- [0033] 图3A:MIR143HG和DLX2相关性分析;
- [0034] 图3B:DLX2基因在GSE3325芯片中的表达情况;
- [0035] 图3C:DLX2免疫组织化学染色结果;
- [0036] 图3D:WB检测DLX2的表达情况(sh-NC组表示转染空载质粒对照组;sh-MIR143HG组表示转染si-MIR143HG组,即转染干扰MIR143HG生成的质粒组;oe-NC组表示转染空载质粒对照组,oe-MIR143HG组表示转染MIR143HG高表达质粒组)。
- [0037] 图4沉默DLX2抑制前列腺癌细胞增殖、转移,促进其凋亡(sh-NC组表示转染空载质粒对照组;sh-DLX2组表示转染si-DLX2组,即转染干扰HOBX7生成的质粒组)。
- [0038] 图4A:Edu增殖实验检测转染后各组细胞增殖能力,其中EDU表示增殖的细胞,DAPI染细胞核,表示全部的活细胞,Merge表示EDU和DAPI重合的细胞;
- [0039] 图4B:划痕实验检测转染后各组细胞迁移能力;
- [0040] 图4C:Transwell侵袭实验检测转染后各组细胞侵袭能力;
- [0041] 图4D:WB检测转染后各组增殖因子Ki67、PCNA的表达情况;
- [0042] 图4E:WB检测转染后各组干性相关因子CD133、CD44、Sox2、Nanog的表达;
- [0043] 图4F:流式细胞术检测转染后各组肿瘤细胞凋亡能力。
- [0044] 图5 MIR143HG介导DLX2启动子甲基化(sh-NC组表示转染空载质粒对照组;sh-MIR143HG组表示转染si-MIR143HG组,即转染干扰MIR143HG生成的质粒组;oe-NC组表示转染空载质粒对照组,oe-MIR143HG组表示转染MIR143HG高表达质粒组)。
- [0045] 图5A:lncAtlas网站预测MIR143HG亚细胞定位,FISH验证MIR143HG亚细胞定位;
- [0046] 图5B:MethPrimer网站预测CpG岛情况,MSP实验检测启动子区域甲基化情况(Meth表示甲基化,Unmeth表示未甲基化);
- [0047] 图5C:RPiSeq数据库预测DNMT1/DNMT3(a/b)结合情况,RIP实验进行验证;
- [0048] 图5D:RNAPull down检测MIR143HG拉下DNMT1/DNMT3(a/b)情况(Bio-MIR143HG-mut表示突变型,Bio-MIR143HG-wt表示野生型);
- [0049] 图5E:Blast比对,CHIP检测DLX2启动子区域甲基化转移酶DNMT1/DNMT3(a/b)的富集情况;
- [0050] 图5F:WB检测DLX2表达情况。
- [0051] 图6裸鼠成瘤实验验证MIR143HG在体内抑制前列腺癌发展(oe-NC组表示转染空载质粒对照组,oe-MIR143HG组表示转染MIR143HG高表达质粒组,oe-MIR143HG+oe-DLX2组表示同时转染MIR143HG高表达质粒和DLX2高表达质粒组)。
- [0052] 图6A:各组转染细胞的裸鼠移植瘤大小;
- [0053] 图6B:各组裸鼠移植瘤生长曲线;

[0054] 图6C:各组裸鼠移植瘤质量比较直方图。

具体实施方式

[0055] 以下结合具体实施例进一步阐述本发明。下述实施例中所涉及各种原料,如无特别说明,均为市售。

[0056] 实验方法

[0057] 方法1:临床样本收集

[0058] 收集2015年3月-2018年6月我院手术切除的男性前列腺癌组织47例(正常前列腺组织作为对照),年龄45~81岁,平均年龄(53.06±8.52)岁。纳入标准:患者Gleason评分≥7,且经HE染色证实肿瘤标本中的肿瘤含量>80%,而正常组织标本不含肿瘤成分且具上皮含量≥60%。排除标准:已进行术前放疗等新辅助治疗的患者。所有患者术前均未作化疗或者放疗,未曾服用过激素类药物,所有病例资料完整,前列腺癌组织经病理检测确诊疾病,所有标本均采用10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋、4μm厚切片待用。所有患者均签署知情同意书,获得伦理学会的批准。

[0059] 方法2:免疫组化

[0060] 石蜡切片脱蜡至水,3%H₂O₂室温孵育10分钟,蒸馏水冲洗,PBS浸泡5分钟,正常山羊血清(SP0022,通用型SP Kit广谱免疫组化试剂盒,Thermo)封闭,室温孵育10分钟,甩干玻片上的液体。滴加一抗工作液:兔抗人DLX2(1:100,ab196007,Abcam,Cambridge,UK),4℃过夜。PBS冲洗3次,每次5分钟。滴加适量生物素标记抗兔二抗工作液及SABC工作液(SP0022,通用型SPKit广谱免疫组化试剂盒,Thermo),37℃孵育各20分钟。PBS冲洗3次,每次5分钟。DAB显色。自来水充分冲洗,苏木素复染,脱水,透明,封片。显微镜下观察。每次实验重复3次。

[0061] 方法3:细胞分组与培养

[0062] 前列腺癌细胞系DU-145、PC-3M、PC-3、LNCaP(购自ATCC细胞库)使用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素(上海碧云天生物公司)的1640培养基(美国Gibco公司)、培养DU-145、PC-3M、PC-3、LNCaP使用12%的胎牛血清,在37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱中。2-3天更换培养液,常规消化传代。细胞分组为:oe-NC组(转染oe-nc质粒),oe-MIR143HG(转染oe-MIR143HG质粒)、sh-nc(转染sh-nc质粒)、sh-DLX2质粒(转染sh-DLX2),质粒委托上海生工生物公司合成。

[0063] 方法4:qRT-PCR

[0064] 使用Trizol RNA(Invitrogen,Cal,SUA)提取液提取总RNA。琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,采用Primescript TMRT reagent Kit逆转录试剂盒(产品编号RR037A,TaKaRa,大连,中国)逆转录。荧光定量PCR仪(ABI 7500,Applied Biosystems,USA)扩增目的基因和内参基因。PCR反应体系为1μLPCRReverse Primer(10μM)、1μLDNA模板、7μL ddH₂O(灭菌蒸馏水)、1μLPCRForwardPrimer(10Uμ)、10μLSYBR®Premix Ex TaqII,总体积20μL。反应程序为:95℃5min;然后95℃,30s,60℃1min,共40个循环。所有反应均设三个复孔。以GAPDH为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式[PMID:11846609]计算表达水平。公式如下: $\Delta\Delta Ct = \Delta T_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内标}}$ 。实验重复3次。引物序列见下表。

[0065] 表1 q-PCR引物

	引物名称	序列(5'-3')	
[0066]	MIR143HG	F: TCTTTCTCACAGGCCGCATT	R: TGATTTCTCCACGGTCAGGC
	GAPDH	F:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	R:TGGTGAAGACGCCAGTGGA

[0067] 方法5:WB(Western blot)

[0068] 严格按照说明书采用高效RIPA裂解液(R0010,Solarbio)提取细胞总蛋白。采用BCA试剂盒(20201ES76,翊圣生物科技有限公司,上海)测定每个样品的蛋白浓度。根据不同浓度进行定量,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后采用湿转方法将蛋白转至PVDF膜上,5%BSA室温下封闭1h。滴加稀释的一抗:兔抗人DLX2(1:1000,ab196007,Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人Ki67(ab16667,1:1000;Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人PCNA(ab92552,1:1000,Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人Bax(ab32503,1:1000,Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人Bad(ab32445,1:2000,Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人CD133(ab19898,1:1000,Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人CD44(ab157107,1:2000,Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人Sox2(ab97959,1:1000,Abcam,Cambridge,UK)、兔抗人Nanog(ab109250,1:1000,Abcam,Cambridge,UK),4℃摇床孵育过夜。TBST洗膜5min×3次,加入HRP标记的山羊抗兔IgG(ab205718,1:20000,Abcam,Cambridge,UK)稀释液室温下1h。TBST洗膜5min×3次,加入显影液,显影。ImageJ 1.48u软件(National Institutes of Health)进行蛋白定量分析,以各蛋白的灰度值与内参GAPDH的灰度比值进行蛋白定量分析。每次实验重复三次。

[0069] 方法6:EDU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)

[0070] 将待测细胞接种于24孔板中,每组细胞做3个复孔,在培养液中加入Edu(C10341-1,广州锐博生物科技有限公司),使其浓度达10μmol/L,在培养箱中孵育2h。吸去培养基,用含4%多聚甲醛的PBS溶液室温固定15min,用含3%BSA的PBS洗两次,加入0.5%Triton-100的PBS室温孵育20min,再用含3%BSA的PBS洗两次,每孔加染色液100μL,室温下避光孵育30分钟,再用含3%BSA的PBS洗两次,加入DAPI染核5分钟,用PBS清洗3次,封面后在荧光显微镜(型号:FM-600,上海普丹光学仪器有限公司)下随机观察6-10个视野,并记录每个视野内阳性细胞数,EdU标记率(%)=阳性细胞数/(阳性细胞数+阴性细胞数)×100%。每次实验重复3次。

[0071] 方法7:划痕实验

[0072] 转染24h后进行划痕实验。用marker笔在每个6孔板背后,每隔0.5~1cm均匀地划一横线,横穿过孔。每孔至少穿过5条线。将转染后的细胞株制备单细胞悬液,按每孔 2×10^6 个细胞的密度均匀接种于6孔板,培养过夜。第二天用枪头垂直于横线划痕。用PBS洗细胞3次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。放入37℃,5%CO₂培养箱培养。按0h、24h取样,拍照。在倒置显微镜下拍照并测量划痕距离。实验重复3次。

[0073] 方法8:Transwell迁移实验

[0074] 将已预冷的无血清DMEM培养基稀释的Matrigel基质胶(40111ES08,上海翊圣生物科技有限公司,上海,中国)(Matrigel:DMEM=1:2)铺在Transwell培养小室(3413,北京优尼生物科技有限公司,北京,中国)上室中,放入37℃培养箱中,孵育4-5h待其凝固,用100μL无血清培养基稀释已转染细胞配成细胞悬液,浓度大约为 1×10^6 个/mL,接种,下室加入500μL含20%FBS的DMEM培养液,每组设3个复孔。37℃、5%CO₂条件下培养24h后,取出Transwell

小室用PBS洗2次,甲醇固定30min,加入0.1%结晶紫染色20min,用PBS冲洗2次,棉球擦去表面细胞,倒置荧光显微镜(TE2000,尼康,中国)下观察,随机读取5个视野进行拍照,取平均值为每组穿过小室细胞数。每次实验重复3次。

[0075] 方法9:流式细胞术

[0076] 选用对数生长期的细胞,制细胞悬液,接种于6孔板中,转染后于37℃、5%CO₂恒温孵育箱培养。48h后,吸弃培养液,适量PBS洗涤,制单细胞悬液。PBS洗涤后,加入5μl AnnexinV-FITC和5μl PI染色,室温避光15min,用200μl 1×Binding buffer将细胞重悬,上流式细胞仪检测细胞凋亡,收集数据并统计分析。

[0077] 方法10:FISH(RNA-fluorescence in situ hybridization)

[0078] 由锐博生物公司设计并合成MIR143HG荧光标记探针,并使用锐博生物的FISH试剂盒根据说明书的进行FISH实验。RiboTM lncRNA FISH probe Mix (Red) (C10920,锐博生物,中国),按照说明书操作,具体方法如下:在6孔培养板中放入盖玻片,取前列腺癌细胞按(细胞每孔10⁵)接种到其中,培养1天使细胞融合率在80%左右。取出玻片,PBS清洗后加入1mL4%多聚甲醛室温固定,经蛋白酶K(2μg/mL),甘氨酸,及乙酰化试剂处理后,加入250μL预杂交液,42℃孵育1h;吸除预杂交液,加入250μL含有探针(300ng/mL)的杂交液,42℃杂交过夜;PBST清洗3次后,加入用PBST稀释的DAPI(1:800)染液染核,加入到24孔培养板中,染色5min;PBST清洗3次,每次3min;用抗荧光猝灭剂封片,荧光显微镜(Olympus,Japan)下选取5个不同视野进行观察并拍照。

[0079] 方法11:甲基化特异性PCR(Methylation-specific PCR,MSP)

[0080] 采用DNAMethylation-GoldTM试剂盒(D5005,Zymo Research,Irvine,CA,USA)检测DLX2启动子区域甲基化水平,用于MSP扩增的甲基化反应引物序列为DLX2-MD(5'-TTGGGGTATTAAGAGAGATAGAGTC-3')和DLX2-MR(5'-ACAAACGCAAAAATTAATACACG-3')。用于未甲基化反应引物序列为DLX2-UD(5'-ACAAACGCAAAAATTAATACACG-3')和DLX2-UR(5'-ACAAACACAAAAATTAATACACACA-3')。将纯化的DNA加入CT转化试剂中,进行变性和硫酸氢盐转化,利用反应柱进行脱硫及净化,纯化后DNA可用于后续PCR反应。PCR反应条件:95℃预变性10min;95℃变性45s、56℃(甲基化)/45℃(非甲基化)45s、72℃退火45s,35次循环;最后72℃延伸10min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。每个实验重复3次。

[0081] 方法12:RIP(RNA-binding protein immunoprecipitation)

[0082] 实验按照Magna RIP RNA-Binding Protein Immunoprecipitation试剂盒(Millipore公司,美国)说明书进行操作,具体步骤如下:取细胞,用预冷的PBS清洗两次,加入100μL配制好的含有蛋白酶抑制剂和核糖核酸酶抑制剂的裂解液缓冲液,冰上裂解30min后4℃下12000rpm离心3min,取少量上清液作为Input对照,加入1μg相应的抗体:阴性对照抗体正常小鼠的IgG和目的蛋白特异性抗体DNMT1(ab13537,1:500,abcam,英国)、DNMT3a(ab2850,1:500,abcam,英国)DNMT3b(ab2851,1:500,abcam,英国)和50μLproteinA/G-beads于剩余上清液,4℃下旋转孵育过夜后4℃下3000rpm离心5min,吸弃上清;用1ml裂解液缓冲液洗涤proteinA/G-beads沉淀4次,每次洗涤后4℃下1000rpm离心1min,加入15μL的2×SDS加样缓冲液,沸水中加热10min,使用RNA提取方法从沉淀中分离纯化得到的相关RNA,并进行qRT-PCR测定MIR143HG表达。

[0083] 方法13:RNApull down

[0084] 通过NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)提取细胞核蛋白,然后将细胞核提取物(2 μ g)与预先设计好的Bio-MIR143HG探针(100pmol)混合,再将洗涤后的链霉-抗生物素蛋白琼脂糖珠加入到每个结合反应中,室温下进一步孵育1h,再将琼脂糖珠洗涤3次,并通过western blot技术检测回收的蛋白质。

[0085] 方法14:CHIP(Chromatin immunoprecipitation)

[0086] 4%甲醛(甲醛终浓度为1%)处理细胞后,将收集到的细胞超声破碎,加入兔抗DNMT1(ab13537, 1:500, abcam, 英国)、DNMT3a(ab2850, 1:500, abcam, 英国)DNMT3b(ab2851, 1:500, abcam, 英国),与DNMT1/DNMT3(a/b)-DLX2启动子相结合,加入Protein A Agarose/SaLmon Sperm DNA,结合抗体-DNMT1/DNMT3(a/b)-DLX2启动子复合物,并沉淀该复合物,对沉淀下来的复合物进行清洗,除去一些非特异性结合,洗脱后得到富集启动子复合物,对其进行解交联,纯化富集的DLX2启动子片段后进行PCR。每个实验重复3次。

[0087] 方法15:裸鼠实验

[0088] 选取5周龄的BALB/c雄性裸鼠(购自上海灵畅公司)45只,体重18-23g。实验前于我院动物实验中心SPF级环境中饲养。温度环境舒适,无菌饲料及饮水,昼夜交替各12h,适应性饲养7天。以上所有实验动物经过动物保护和使用委员会批准,本研究中所有动物实验均符合当地实验动物的管理和使用原则,并遵循美国国立卫生研究院颁布的《实验动物管理与使用指南》。将以上裸鼠分3组(每组15只),分组为:oe-NC、oe-MIR143HG、oe-MIR143HG-oe-DLX2。将细胞转染过程中获得的稳定转染细胞系制成 5×10^7 /mL细胞悬液,用注射器取0.2mL细胞悬液接种于BALB/c裸鼠左侧腋窝皮下,接种后将全部裸鼠在SPF级动物房中继续置于层流罩内饲养,接种后于第5、10、15、20、25天分别观察肿瘤生长情况并记录数据,用尺子记录肿瘤的短径(a)及长径(b),按 $\pi(a^2b)/6$ 公式计算肿瘤体积,用天平称量肿瘤质量,每组测量重复3次。第25天处死各组裸鼠。

[0089] 实施例1:长链非编码RNAMIR143HG在前列腺癌中低表达

[0090] 首先用R语言从GSE3325(图1A)和GSE55945(图1B)芯片并结合GEPiA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)(图1C)显示长链非编码RNA MIR143HG在前列腺癌中低表达。

[0091] 为了验证长链非编码RNA MIR143HG在前列腺癌中低表达,qRT-PCR检测前列腺癌组织样本中MIR143HG的表达情况,发现在前列腺癌组织样本中MIR143HG的表达明显低于正常前列腺组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图1D)。qRT-PCR检测4种前列腺癌细胞系及正常前列腺上皮细胞中MIR143HG的表达水平,结果显示:与正常前列腺上皮细胞相比,MIR143HG在前列腺癌细胞系DU-145、PC-3M、PC-3、LNCaP中表达水平显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图1E),其中PC-3细胞系中MIR143HG的表达水平最低,因此选择PC-3细胞系进行后续实验。Kaplan-meier分析生存曲线结果显示,与MIR143HG低表达组相比,MIR143HG高表达组前列腺癌预后更好,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图1F)。

[0092] 以上结果提示,长链非编码RNA MIR143HG在前列腺癌中低表达,且可能抑制前列腺癌的恶性进展。

[0093] 实施例2:过表达MIR143HG抑制前列腺癌细胞转移,促进其凋亡

[0094] Edu实验检测细胞增殖能力,结果如图2A所示,与oe-NC组相比,oe-MIR143HG组细胞增殖活力显著下降($P<0.05$),划痕实验结果如图2B所示,与oe-NC相比,oe-MIR143HG组细胞迁移能力显著下降($P<0.05$)。Transwell侵袭实验结果如图2C所示,与oe-NC相比,oe-MIR143HG组细胞侵袭能力显著下降($P<0.05$)。WB检测肿瘤细胞增殖因子Ki67、PCNA,干性相关因子CD133、CD44、Sox2、Nanog实验结果如图2D、2E所示,与oe-NC相比,oe-MIR143HG组细胞表达肿瘤细胞增殖因子Ki67、PCNA,干性相关因子CD133、CD44、Sox2、Nanog表达显著降低($P<0.05$)。流式细胞术检测细胞凋亡结果如图2F所示,与oe-NC相比,oe-MIR143HG组细胞凋亡显著增加($P<0.05$)。

[0095] 这些结果提示,过表达MIR143HG抑制前列腺癌细胞转移及干性,促进其凋亡。。

[0096] 实施例3:MIR143HG与DLX2负相关,DLX2在前列腺癌中高表达

[0097] 为了探究MIR143HG与DLX2(distal-less homeobox 2)之间的关系,对MIR143HG和DLX2进行相关性分析,发现MIR143HG与DLX2基因显著负相关($P<0.001$,图3A),TCGA前列腺癌数据表明个,DLX2在前列腺癌中显著高表达(图3B),进一步免疫组织化学染色结果如图3C所示,DLX2在前列腺癌组织中的表达明显高于正常前列腺组织;WB检测DLX2在前列腺癌细胞系中的表达情况,结果如图3D所示,与正常前列腺细胞相比,前列腺癌细胞中DLX2的表达水平明显增高,其中PC-3细胞系增高最显著;与sh-NC组相比,sh-MIR143HG组DLX2的表达水平显著升高;与oe-NC组相比,oe-MIR143HG组DLX2的表达水平显著降低($P<0.05$)。

[0098] 以上结果提示,MIR143HG与DLX2负相关,DLX2在前列腺癌中高表达。

[0099] 实施例4:沉默DLX2抑制前列腺癌细胞转移及干性,促进其凋亡

[0100] Edu实验结果如图4A所示,与sh-NC组相比,sh-DLX2组细胞增殖能力显著下降($p<0.05$),划痕实验如图4B所示,与sh-NC相比,sh-DLX2组细胞迁移能力显著下降, ($p<0.05$)。Transwell侵袭实验结果如图4C所示,与sh-NC相比,sh-DLX2组细胞侵袭能力显著下降($p<0.05$)。WB检测肿瘤细胞增殖因子Ki67、PCNA,干性相关因子CD133、CD44、Sox2、Nanog实验结果如图4D、4E所示,与sh-NC相比,sh-DLX2组增殖因子Ki67、PCNA,干性相关因子CD133、CD44、Sox2、Nanog表达显著降低($p<0.05$)。流式细胞术检测细胞凋亡结果如图4F所示,与sh-NC相比,sh-DLX2组细胞凋亡能力显著升高($p<0.05$)。

[0101] 这些结果提示,沉默DLX2促进前列腺癌细胞迁移、侵袭及干性,抑制其凋亡。

[0102] 实施例5:MIR143HG介导DLX2启动子甲基化

[0103] 我们利用lncATLAS网站(<http://lncatlas.org.eu/>)预测MIR143HG亚细胞定位,结果显示MIR143HG定位于细胞核,利用FISH对MIR143HG的定位进行验证,结果显示MIR143HG主要在细胞核中进行表达(图A),与lncATLAS网站预测结果一致。TCGA前列腺癌中DLX2甲基化水平检测发现,DLX2在前列腺癌中低甲基化(图B)。

[0104] 为了检测DLX2启动子甲基化水平,我们利用MethPrimer(<http://www.urogene.org>)网站对DLX2启动子区域CpG岛进行预测,并设计引物进行MSP实验,结果显示:oe-nc组特定位点未发生甲基化,oe-MIR143HG组特定位点发生甲基化,Blank组、5-aza-dc组特定位点未发生甲基化,M.SssI组特定位点发生甲基化(图C)。通过RPIseq数据库(<http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPIseq/>)分析发现MIR143HG与DNA甲基转移酶DNMT1、DNM3A和DNM3B序列存在结合关系,利用RIP实验检测MIR143HG结合DNMT1/DNMT3(a/b)情况,结果显示:沉默MIR143HG使DNMT1/DNMT3(a/b)富集显著降低,过表达MIR143HG使DNMT1/

DNMT3 (a/b) 富集显著增加(图C)。RNA pull down检测检测MIR143HG拉下DNMT1/DNMT3 (a/b) 情况,结果显示:Bio-MIR143HG-mut不能拉下DNMT1/DNMT3 (a/b) 蛋白,Bio-MIR143HG-wt可以拉下DNMT1/DNMT3 (a/b) 蛋白(图D)。Blast在线比对发现MIR143HG与DLX2启动子可能以RNA-DNA形式结合,ChIP检测DLX2启动子区域甲基化转移酶DNMT1/DNMT3 (a/b) 的富集情况,结果显示:沉默MIR143HG使DLX2启动子区域DNMT1/DNMT3 (a/b) 富集显著减少,过表达MIR143HG使DLX2启动子区域DNMT1/DNMT3 (a/b) 富集显著增加(图E),WB检测各组细胞中DLX2表达情况,结果显示:与sh-NC组相比,sh-MIR143HG组DLX2表达显著增加,与oe-NC组相比,oe-MIR143HG组DLX2表达显著减少(图F)。

[0105] 上述结果表明,前列腺癌中MIR143HG通过招募DNA甲基转移酶到DLX2启动子区域,影响DLX2表达。

[0106] 实施例6:裸鼠实验

[0107] 我们对裸鼠肿瘤体积的增长曲线和肿瘤质量进行分析发现,结果如图6所示,与oe-nc组比较,oe-MIR143HG组裸鼠肿瘤体积显著减小(均 $P < 0.05$),与oe-MIR143HG组相比,oe-MIR143HG+oe-DLX2组裸鼠肿瘤体积显著增加(图A-C)(均 $P < 0.05$)。

[0108] 实验结果提示,过表达MIR143HG抑制体内前列腺癌细胞发展。

[0109] 上述说明并非对发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在发明的实质范围内,做出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

<110>	湖南省科域生物医药科技有限公司	
<120>	MIR143HG作为抑制前列腺癌细胞增殖、侵袭与转移的用途	
<160>	5	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	456	
<212>	DNA	
<213>	MIR143HG	
<400>	1	
	agaagggtca ccagccagge taggtcaaac cgggttgggg ccacaacatg atagttaaac	60
	ccatcaaac agccttgatt cgateccage ttcacaactt cttagecgtg tgaccttagg	120
	taagtctgtt aacctcttcc agtcttggct ttgtggagtg gagtgaatag cagggcctgc	180
	ttcgtgagg tgttatcagg atggaggggg acaaagccta tgaaagtgtt tagcacagcg	240
	cctggcagat cgtgaccagt cactgagtgg aagctatcat gaccaaactt gatttctcca	300
	tgggcaggcc agccccgten nnagctgcct ggccctggc aatgtgggag tcagacccaa	360
	agatgagggt tctggggctt tggcatttac taccatttct acaaccccat gaaaagcctt	420
	agcaagagtt cagggaaagt tctaatttta tttttt	456
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	si-DLX2	
<400>	2	
	ccatataacg caaagtcac	19
<210>	3	
<211>	949	
<212>	DNA	
<213>	DLX2核苷酸序列	
<400>	3	
	cctgggcact gcgccgggtc accgtttgga caactgggca cttaccagta ccacagcagc	60
	gccacgagtt ctgtgccata taacgcaaag tcatacgacc tcggtttcaa ctcatcgtat	120
	ggtacatacg gttcttatgg ctccaactca tcgccaactc ccgcagacac aggtaggcga	180
	gctctcaagt tcgttttaga gcattttgca tgtattcagt ggctttgtct ttgaccaaaa	240
	cgcaactgcag aacatgtctg agttaatttg tatgcacagt atttgacaaa aatattatta	300
	tctgactaaa atgtattgat gctttatatt tcttgtatga atatgtaaca cgataaactg	360
	ttttatttat ttccaaagaa agagcctaca gatccacaaa gtggcctatt ttggcttttt	420
	gtattttttt ttagtagggc cttataaata tacataatth aatcaaatca ggtttaaggt	480
	atttggggta cacaaactg acaaacctaa agtgacaaca gtgcaaatac gcctagcagt	540
	tctgcaaac tgaaaaatgc ccaaaccctt cgtgcctaac gtgaattgca tttgaatggt	600

ccctcagaga	aagatgagag	cgagccagaa	atccggatgg	ttaatggaaa	accaaagaag	660
gtcaggaaac	ctcgaacat	ttactcaagc	ttccaactgg	ctgcacttca	acggaggttt	720
caaaagactc	agtatttggc	tctaccagaa	cgggccgagc	tggcagcgtc	gctgggcctt	780
acgcaaacac	aggtgggtag	tctgcatctg	tgggctcatg	cgctgtcaaa	tatccactgc	840
atgtctcagt	gtgaaaacaa	attaaaactg	acaagatgg	gatttaaggg	ggaaatatcg	900
cttataatcg	attttaagct	taaattagtt	tctttctttt	tttctcagg		949

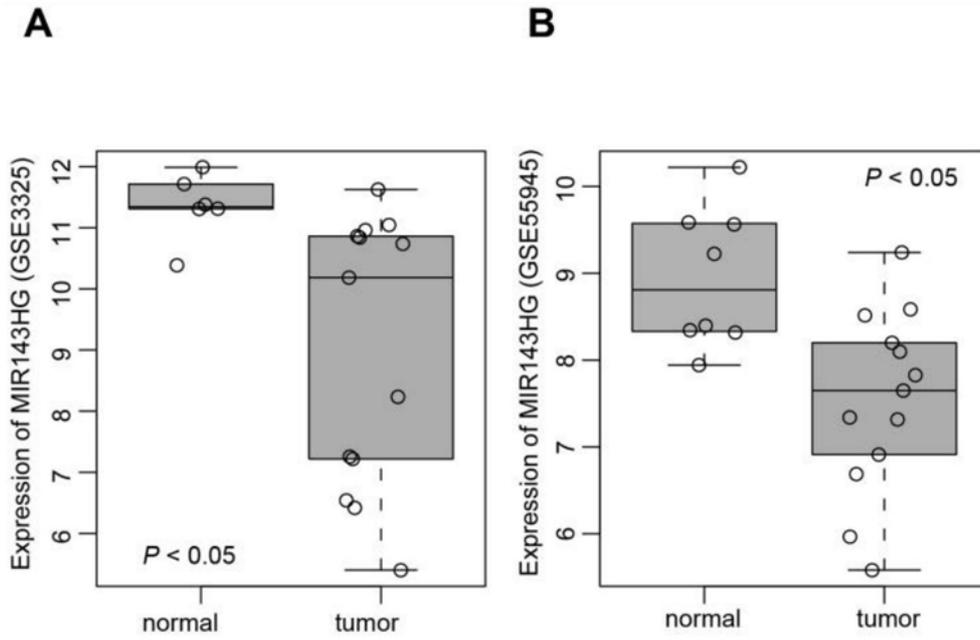


图1A、图1B

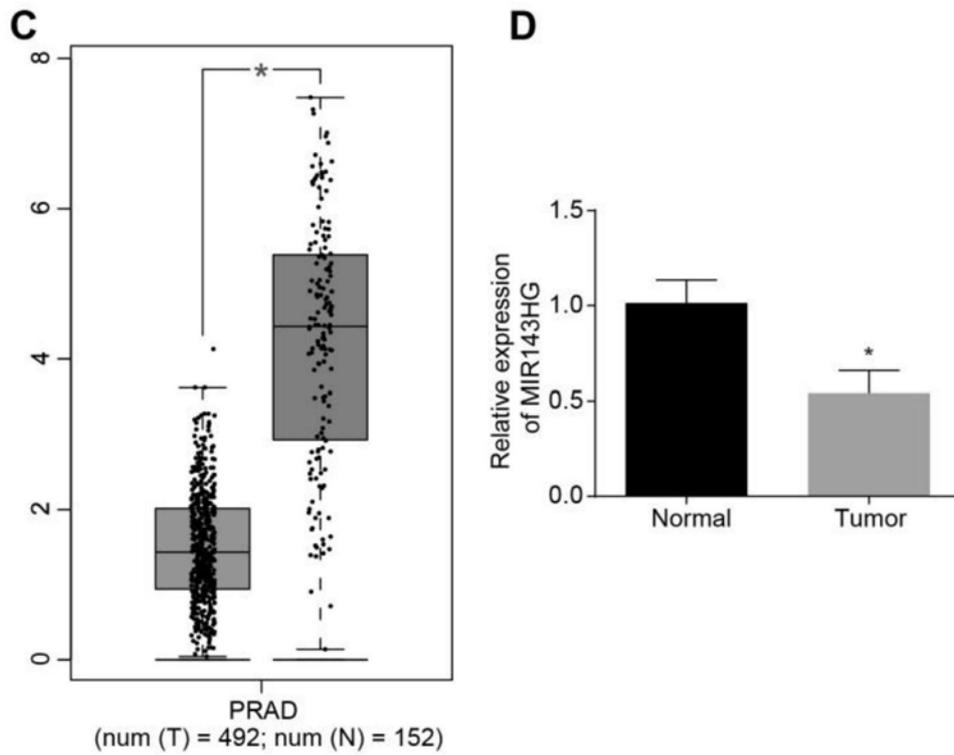


图1C、图1D

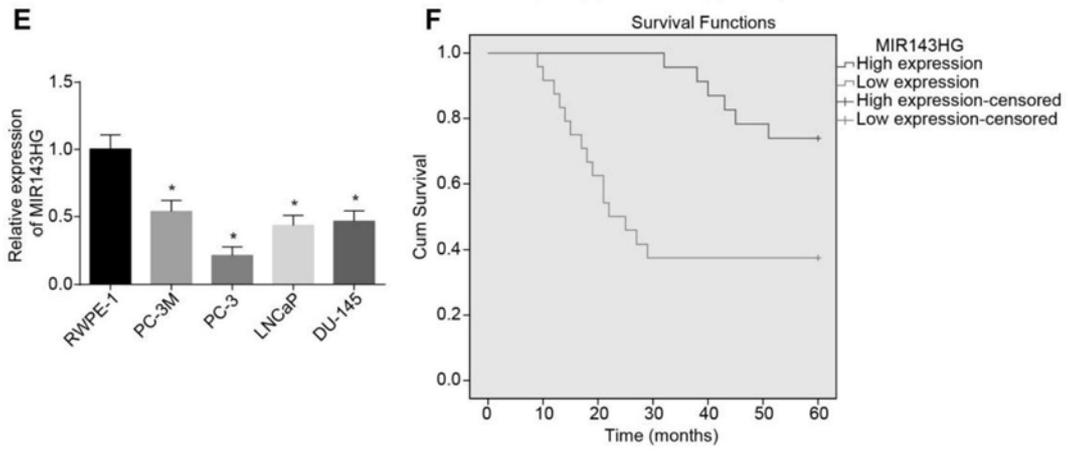


图1E、图1F

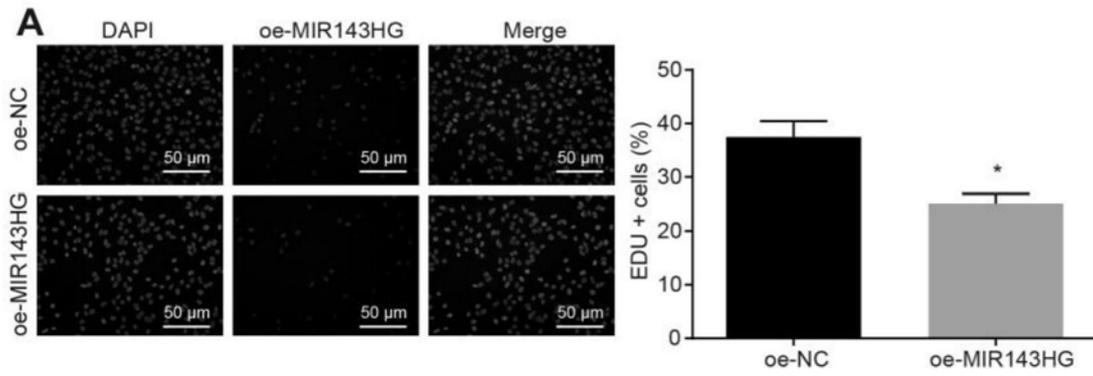


图2A

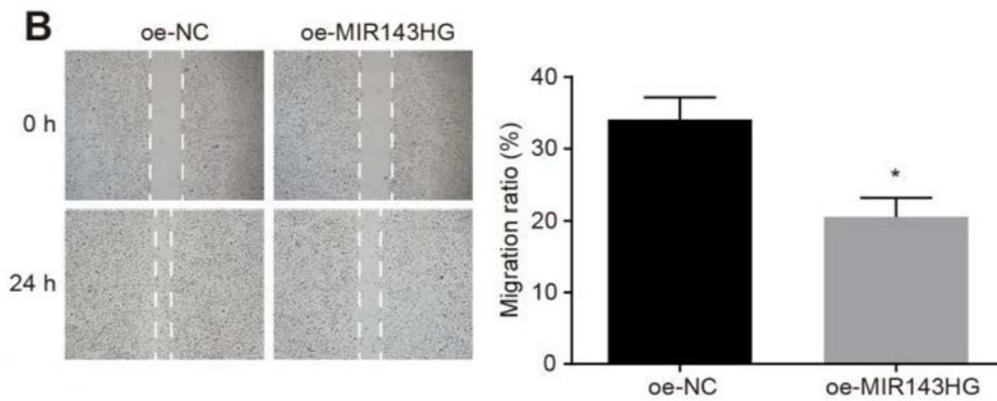


图2B

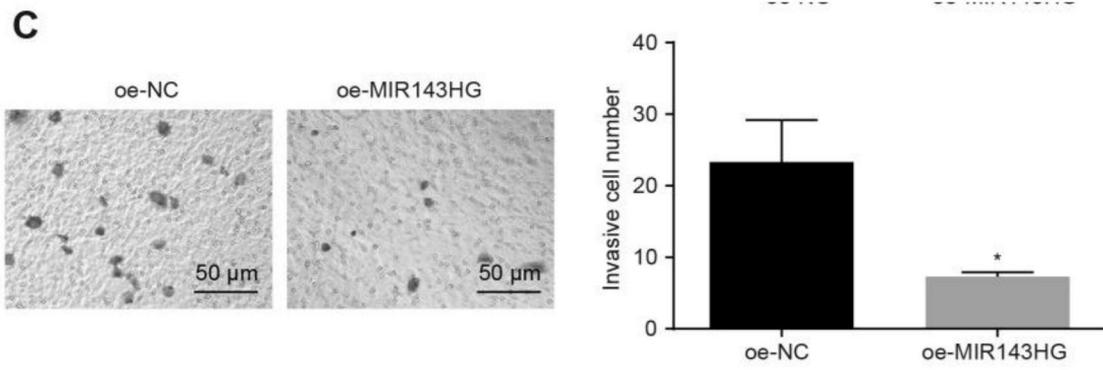


图2C

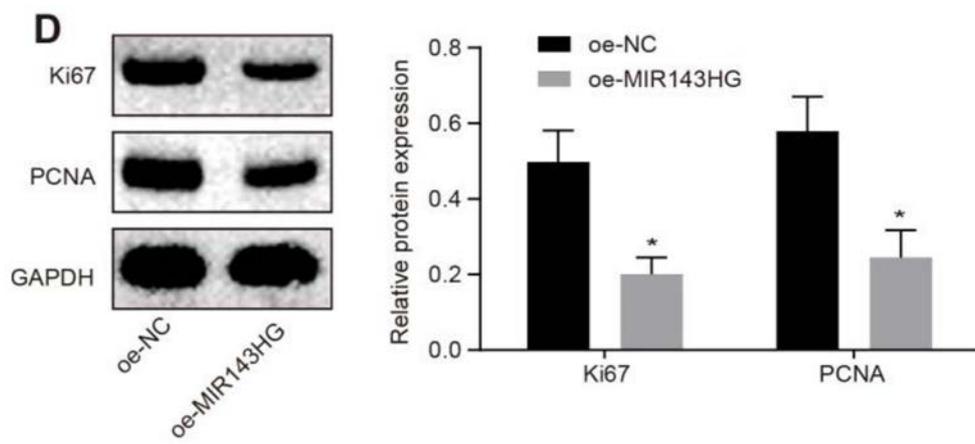


图2D

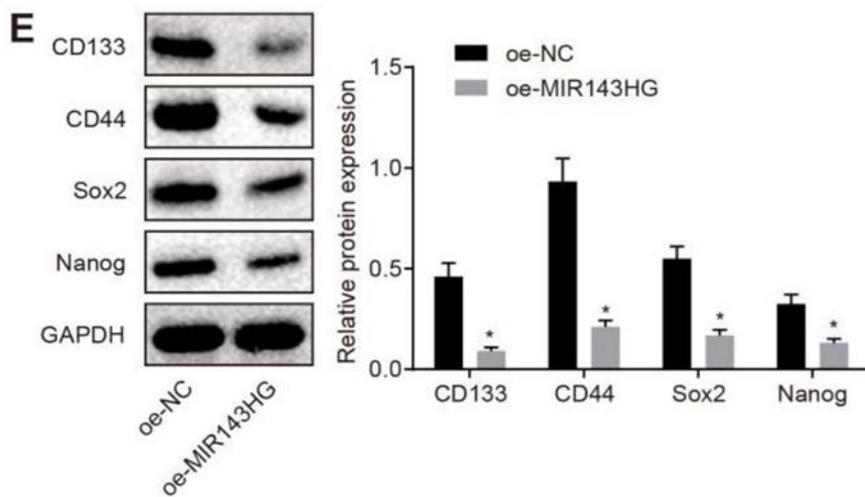


图2E

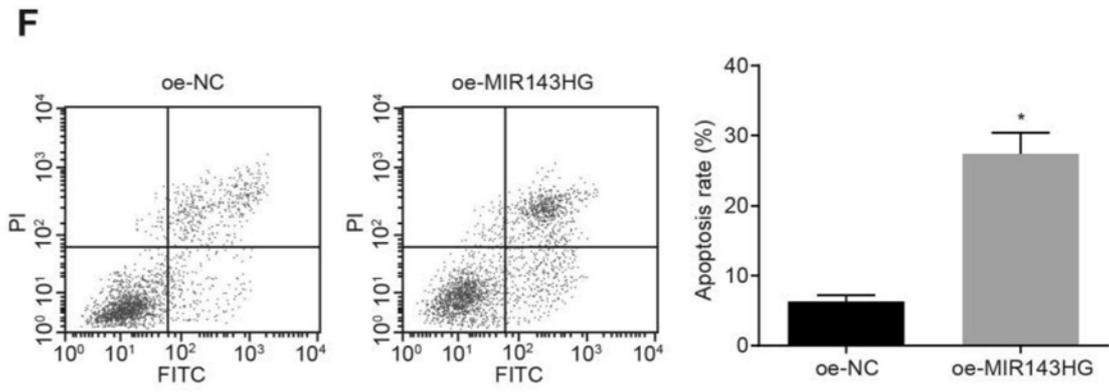


图2F

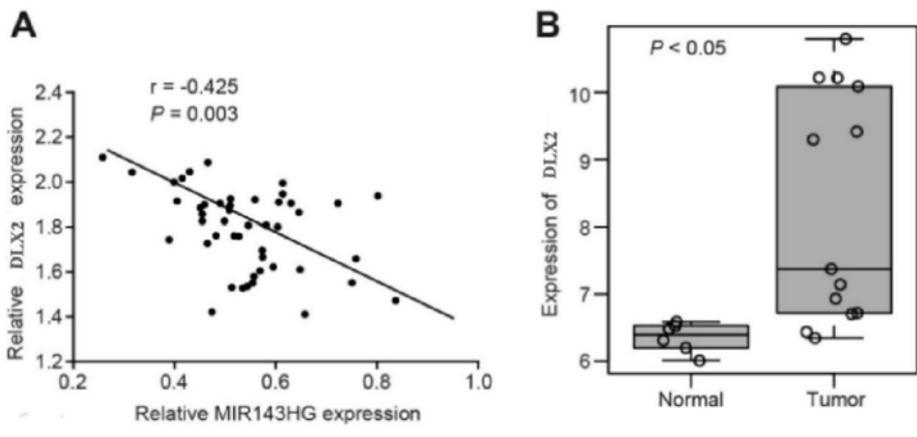


图3A、图3B

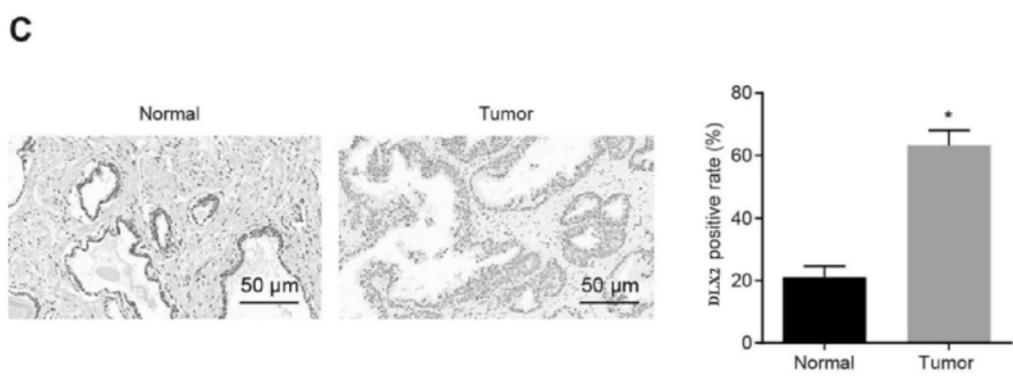


图3C

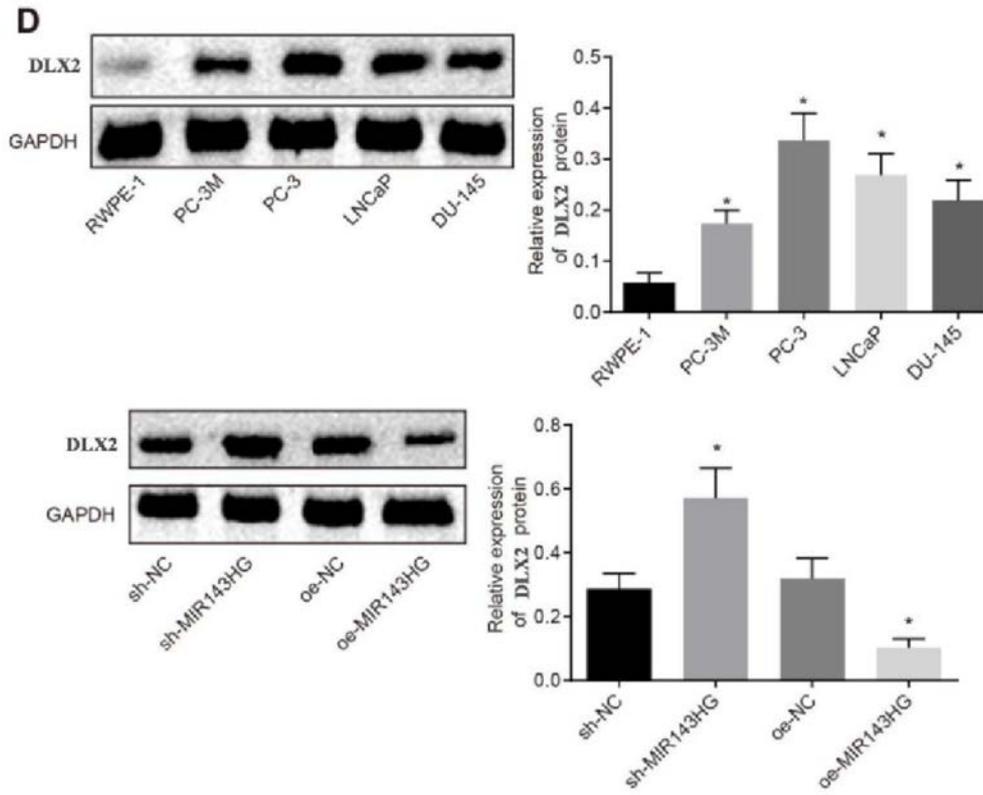


图3D

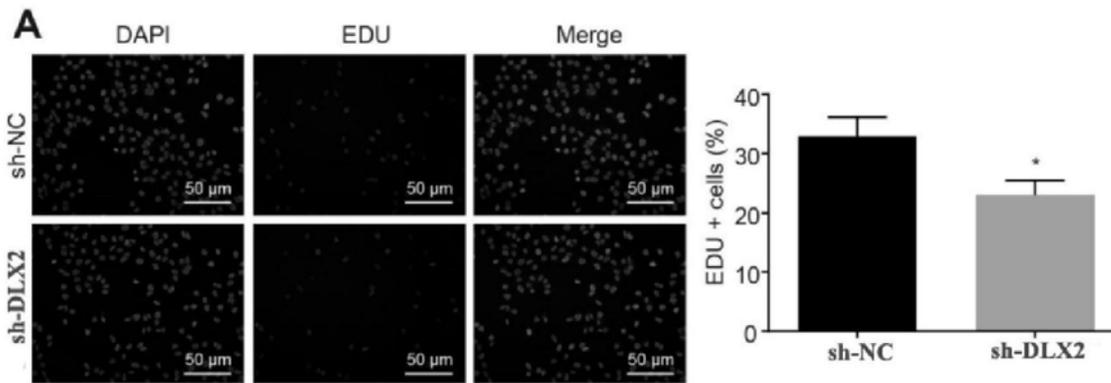


图4A

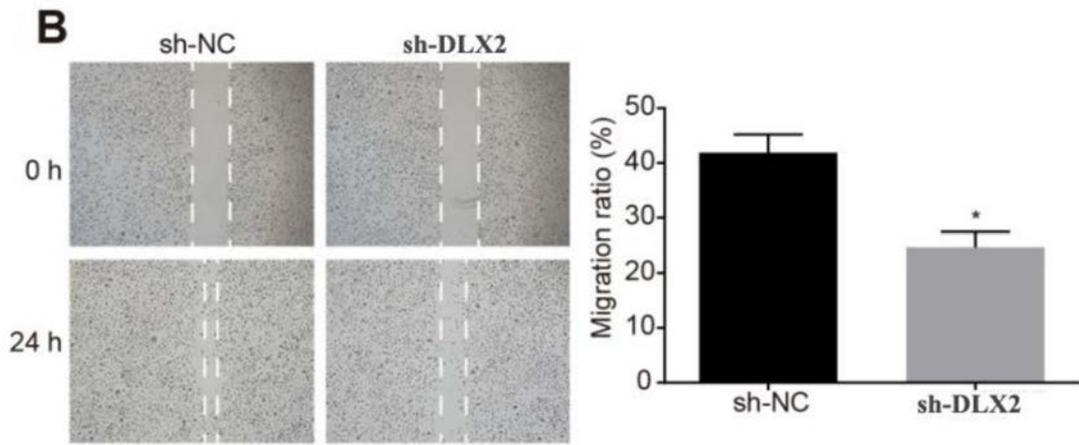


图4B

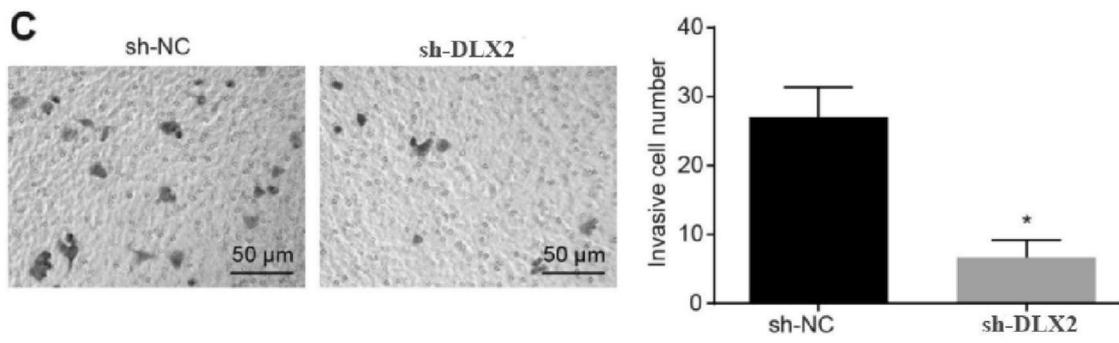


图4C

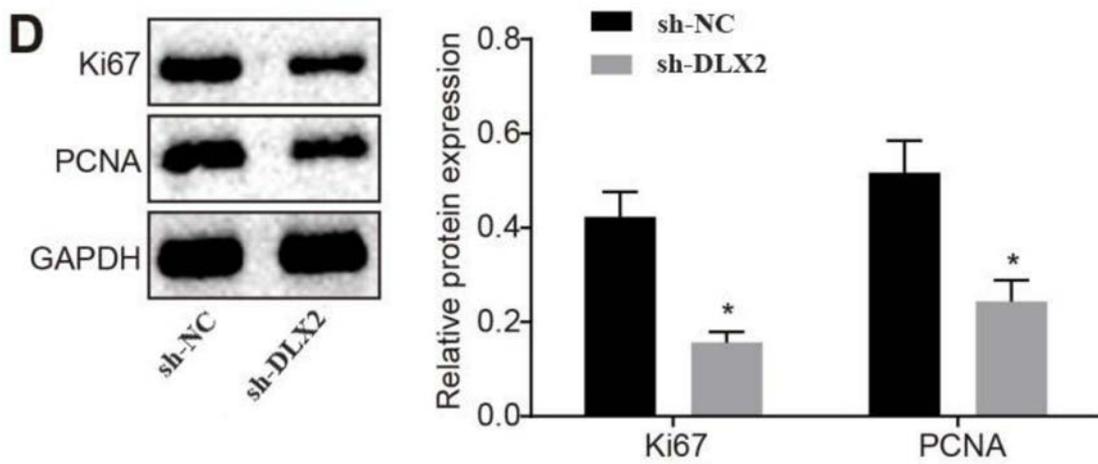


图4D

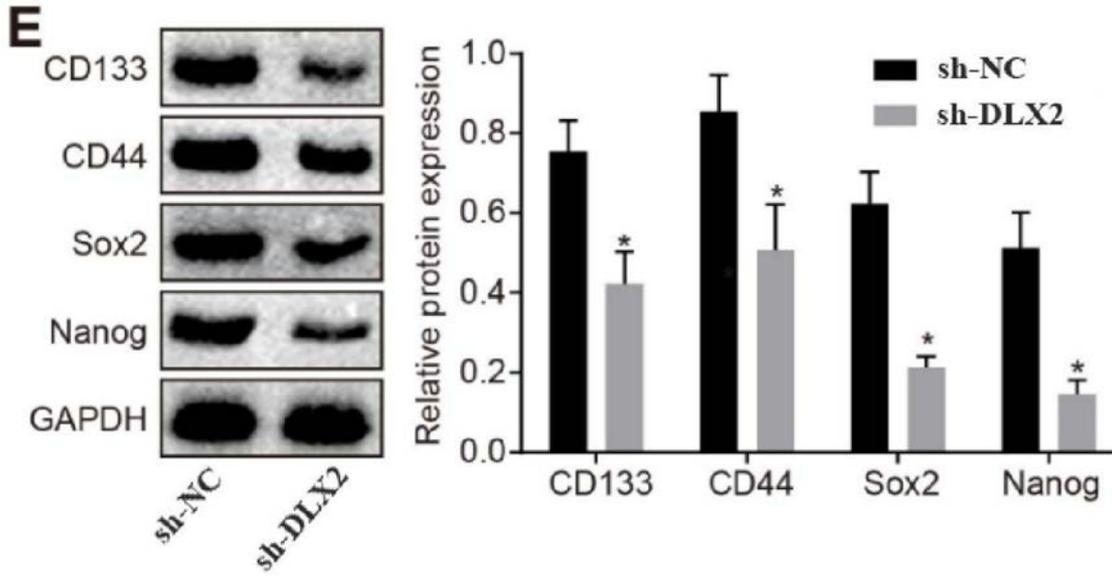


图4E

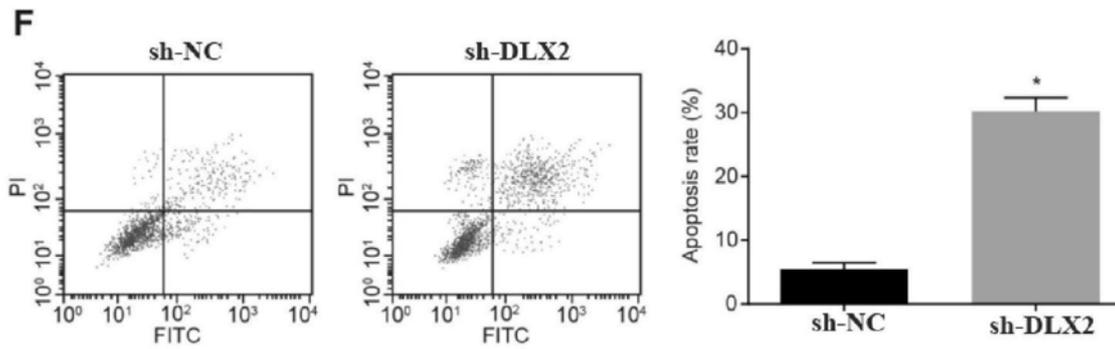


图4F

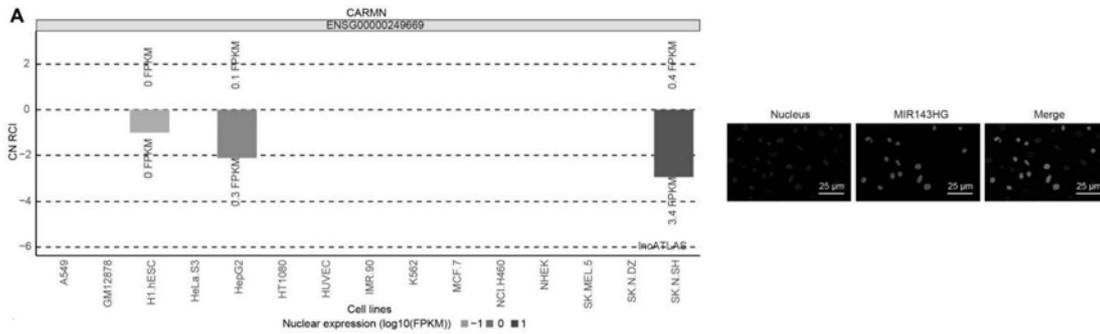


图5A

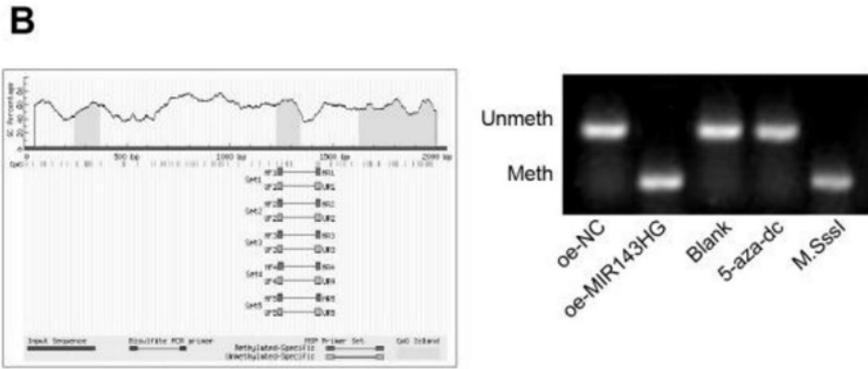


图5B

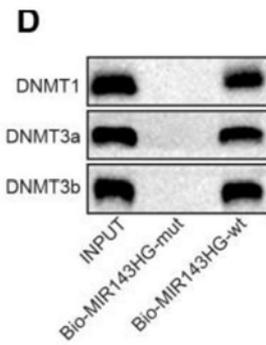
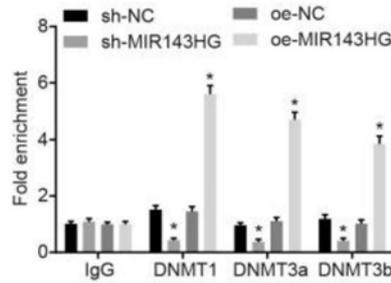
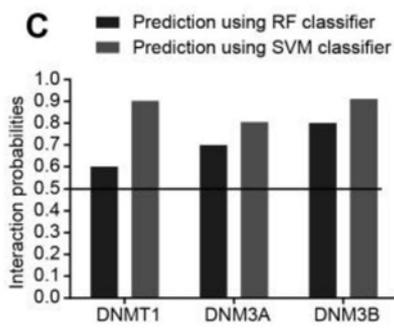


图5C、图5D

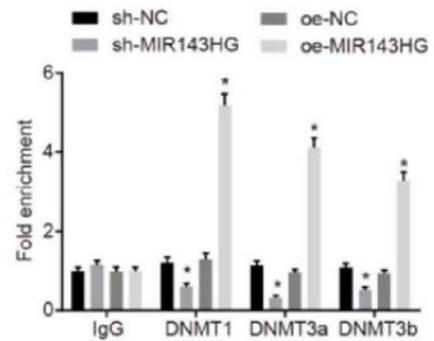
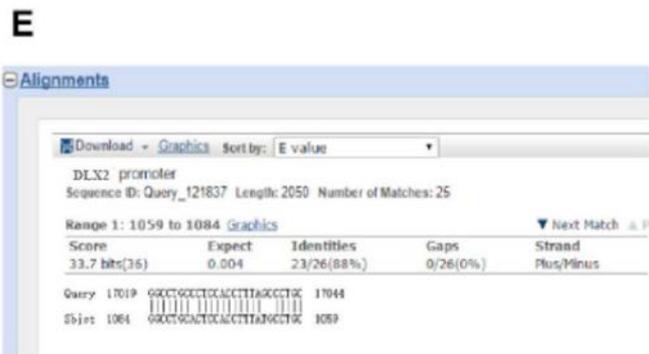


图5E

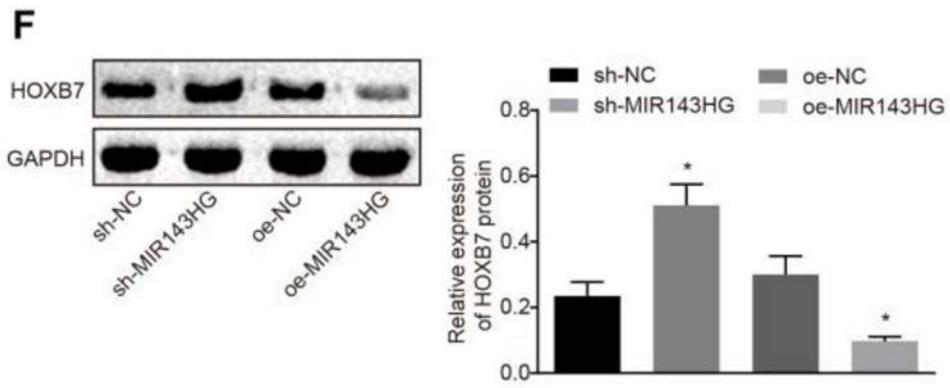


图5F

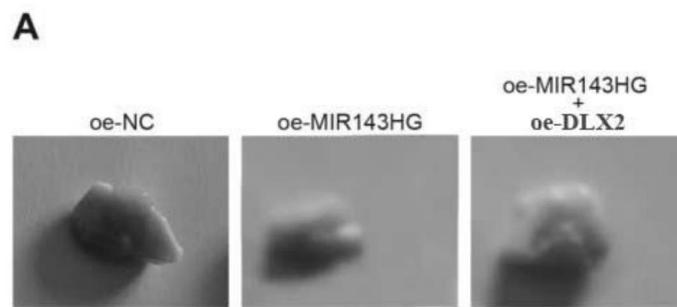


图6A

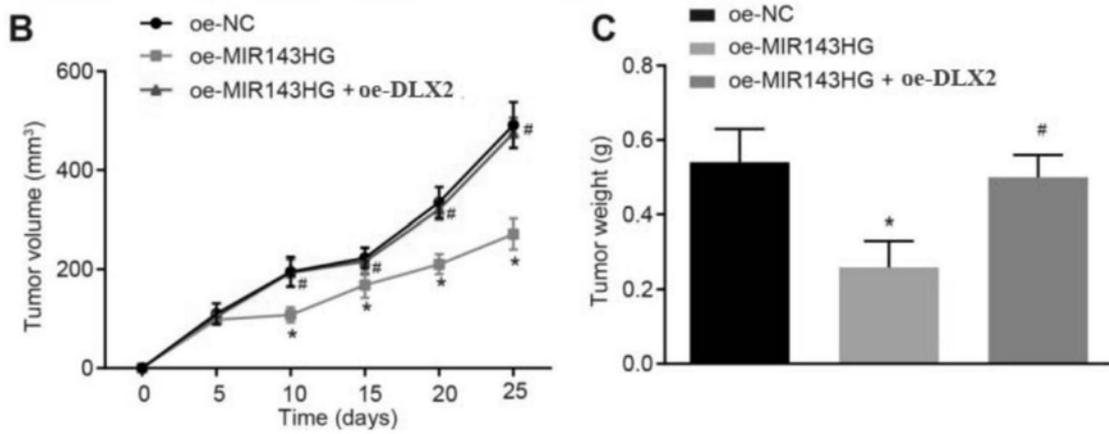


图6B、图6C