



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109266743 B

(45)授权公告日 2019.09.10

(21)申请号 201811069185.6

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2018.09.13

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109266743 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(73)专利权人 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

地址 215163 江苏省苏州市高新区科技城科灵路88号

(72)发明人 蒋思远 高山

(74)专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

代理人 李静

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

(56)对比文件

CN 1852974 A,2006.10.25,

CN 101273144 A,2008.09.24,

Yongliang Yang等.Putative molecular signatures for the imaging of prostate cancer.《Expert Rev. Mol. Diagn》.2010,第10卷(第1期),65-74.

审查员 邓雪霞

权利要求书1页 说明书18页

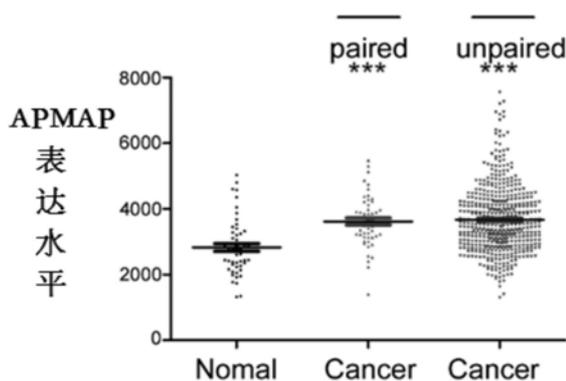
序列表2页 附图8页

(54)发明名称

一种癌症标志物及其用途

(57)摘要

本发明公开了癌症标志物,所述癌症为前列腺癌,所述癌症标志物为APMAP基因和/或APMAP基因的表达产物。APMAP基因在前列腺癌中显著高表达,能够用于前列腺癌的早期诊断,且具有特异性、灵敏度高的优势;高表达的APMAP基因与前列腺癌的不良预后、远处转移、淋巴结转移密切相关,提示APMAP基因能够作为预后标志物,为前列腺癌的转移诊断、预后评估、治疗效果监测提供有效信息。本发明公开了APMAP基因的表达抑制剂,包括siRNA和/或shRNA,对APMAP基因的表达具有良好的干扰效果好,具有临床基因治疗的应用潜力。本发明公开了稳定敲减APMAP基因的细胞株,有利于实现对基因功能的进一步研究。



1. APMAP基因、APMAP mRNA、APMAP蛋白中的至少一种在制备用于前列腺癌预后评估的产品中的用途。

2. APMAP基因的表达抑制剂在如下b₁-b₂至少一种中的用途：

b₁: 制备治疗癌症的药物；

b₂: 制备抑制EGFR表达水平的产品；

所述癌症为前列腺癌。

3. 根据权利要求2所述的用途，其特征在于，所述表达抑制剂包括基于所述APMAP基因设计的siRNA和/或shRNA。

4. 根据权利要求3所述的用途，其特征在于，所述siRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示；所述shRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示。

5. 根据权利要求2所述的用途，其特征在于，所述治疗癌症的药物和/或所述抑制EGFR表达水平的产品包括一种载体，所述载体含有核苷酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的shRNA。

6. 根据权利要求5所述的用途，其特征在于，所述的载体为重组细胞或慢病毒颗粒。

7. 一种稳定敲减APMAP基因的细胞株，其特征在于，所述细胞株是以前列腺癌细胞为目标细胞，通过权利要求6所述的慢病毒颗粒感染，获得的稳定敲减APMAP基因的前列腺癌细胞。

8. 一种构建权利要求7所述的稳定敲减APMAP基因的细胞株的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 将核苷酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示序列的shRNA片段连接至具有抗生素抗性的病毒载体，获得重组表达载体；

(2) 利用重组表达载体和病毒包装质粒共转染包装细胞株，培养转染后细胞，收集培养基上清，浓缩后获得含有慢病毒颗粒的病毒液；

(3) 利用病毒液感染前列腺癌细胞，然后利用抗生素进行药物筛选，获得稳定敲减APMAP基因的细胞株。

9. 根据权利要求8所述的构建方法，其特征在于，所述病毒载体为Plvx-sh-Puro，所述病毒包装质粒包括pLP1、pLP2和VSVG，所述抗生素为嘌呤霉素。

一种癌症标志物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤分子生物学领域,具体涉及一种癌症标志物、用途、APMAP基因的表达抑制剂、载体,以及稳定敲减APMAP基因的细胞株。

背景技术

[0002] 前列腺癌是男性泌尿系统最常见的恶性肿瘤,是男性癌症死亡的主要原因之一。我国前列腺癌发病率逐年上升,1994-2002年间发病率增长已高达13.4%。近十多年来,前列腺癌的发病在中国更呈现高发趋势,有效地预防和控制前列腺癌已经刻不容缓。前列腺癌的临床分期主要分为四种,I期病灶完全局限于前列腺内,一般预后较好;II期病灶局限于前列腺包膜内,无侵袭转移迹象,为发展过程中短暂时期;III期病变突破包膜,浸润膀胱、精囊和尿道等邻近组织,但尚未与原瘤灶分离,若不经治疗则可能病情加重或发生转移;IV期病变肿瘤细胞脱离原发部位,迁移至其他部位继续增殖生长,形成继发肿瘤,病人预后较差,大多数死于远处转移灶。大约70%的晚期前列腺癌患者出现骨转移,骨转移不可治愈,成为患者死亡的主要原因。前列腺癌发病缓慢,早期无明显症状,出现血尿和盆骨疼痛等侵袭转移症状则已经是晚期。通过早期的筛查控制可显著降低前列腺癌的死亡率。

[0003] 目前,前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen,PSA)是公认为用于诊断,监测和风险预测的前列腺癌生物标志物。由前列腺的解剖结构可知PSA通过前列腺导管进入血液和尿液中,一些病例或生理情况下PSA会进入血液中,如前列腺炎症、尿潴留、前列腺感染、前列腺增生和前列腺癌等,因此通过检测血清PSA水平来预测前列腺癌具有一定的假阳性率。特别是在PSA浓度处于4-10ng/mL灰区部分时,用PSA值来区分良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia,BPH)和前列腺癌是不可靠的,这时往往需要通过侵入性的穿刺活检进行确定,给患者带来极大痛苦及精神和经济负担。因此,PSA不具有作为前列腺癌诊断标志物的灵敏度和特异性,容易产生过度治疗等问题。

发明内容

[0004] 因此,本发明要解决的技术问题在于现有的用于诊断前列腺癌分子标志物存在灵敏度和特异性低、易产生过度治疗的缺陷,从而提供一种具有高特异性和灵敏度的前列腺癌相关的分子标志物。

[0005] 为此,本发明提供如下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种癌症标志物,所述癌症为前列腺癌,所述癌症标志物为APMAP基因和/或APMAP基因的表达产物。

[0007] 可选地,上述的癌症标志物,所述癌症还包括膀胱癌、乳腺癌、肝外胆管癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、乳头状肾细胞癌、肝癌、肺腺癌、肺鳞状上皮细胞癌、胃癌、甲状腺癌和子宫内膜癌中的任意一种。

[0008] 可选地,上述的癌症标志物,所述APMAP基因的表达产物包括APMAPmRNA和/或APMAP蛋白。

[0009] 本发明提供了如下a₁-a₃中的至少一种在如下b₁-b₅至少一种中的用途：

[0010] a₁,APMAP基因;a₂,APMAP mRNA;a₃,APMAP蛋白;

[0011] b₁,作为癌症的诊断标志物,或者制备用于癌症诊断的产品;

[0012] b₂,作为癌症的预后标志物,或者制备用于癌症预后评估的产品;

[0013] b₃,制备用于癌症疗效监测的产品;

[0014] b₄,制备治疗癌症的药物;

[0015] b₅,制备抑制EGFR表达水平的产品;

[0016] 所述癌症为前列腺癌。

[0017] 可选地,上述的用途,所述癌症还包括膀胱癌、乳腺癌、肝外胆管癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、乳头状肾细胞癌、肝癌、肺腺癌、肺鳞状上皮细胞癌、胃癌、甲状腺癌和子宫内膜癌中的任意一种。

[0018] 可选地,上述的用途,所述癌症诊断包括癌症早期诊断、癌症远处转移诊断和/或癌症淋巴结转移诊断。

[0019] 本发明提供了一种APMAP基因的表达抑制剂,所述表达抑制剂包括基于所述APMAP基因设计的siRNA和/或shRNA。

[0020] 可选地,上述的表达抑制剂,所述siRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示,

[0021] 所述shRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示。

[0022] 本发明提供了一种载体,所述载体包括核苷酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的shRNA。

[0023] 本发明提供了包含上述载体的重组细胞或慢病毒颗粒。

[0024] 本发明提供了上述的表达抑制剂、上述的载体、或者上述的重组细胞或慢病毒颗粒在制备治疗前列腺癌的药物中的用途。

[0025] 本发明提供了上述的表达抑制剂、上述的载体、或者上述的重组细胞或慢病毒颗粒作为抑制EGFR表达水平的产品。

[0026] 本发明提供了一种稳定敲减APMAP基因的细胞株,所述细胞株是以前列腺癌细胞为目标细胞,通过上述的慢病毒颗粒感染,获得的稳定敲减APMAP基因的前列腺癌细胞。

[0027] 本发明提供了一种构建上述的稳定敲减APMAP基因的细胞株的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0028] (1) 将核苷酸序列如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示序列的shRNA片段连接至具有抗生素抗性的病毒载体,获得重组表达载体;

[0029] (2) 利用重组表达载体和病毒包装质粒共转染包装细胞株,培养转染后细胞,收集培养基上清,浓缩后获得含有慢病毒颗粒的病毒液;

[0030] (3) 利用病毒液感染前列腺癌细胞,然后利用抗生素进行药物筛选,获得稳定敲减APMAP基因的细胞株。

[0031] 可选地,上述的构建方法,所述病毒载体为Plvx-sh-Puro,所述病毒包装质粒包括pLP1、pLP2和VSVG,所述抗生素为嘌呤霉素。

[0032] 除非有另外说明,本发明的权利要求书和说明书的术语具有下述含义:

[0033] 本发明权利要求书中的产品包括:通过RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂

交、芯片或高通量测序等检测APMAP基因表达的产品；其中RT-PCR和实时定量PCR的产品包括特异性扩增APMAP基因，检测APMAP mRNA水平的引物、探针；免疫检测的产品包括与APMAP蛋白特异性结合的抗体；原位杂交的产品包括与APMAP基因的核酸序列杂交的探针；芯片包括蛋白芯片和基因芯片，其中蛋白芯片包括与APMAP蛋白特异性结合的抗体，基因芯片包括与APMAP基因的核酸序列杂交的探针。

[0034] 本发明权利要求书中的药物包括：抑制APMAP基因表达、诱导转录后基因沉默、抑制APMAP蛋白活性或者降解APMAP基因、mRNA或蛋白的化合物、生物活性物质或基因治疗药物等。其中生物活性物质包括蛋白、多肽、脂类等等。基因治疗药物包括siRNA、miRNA、shRNA或者包括上述小分子的载体等等。

[0035] 本发明技术方案，具有如下优点：

[0036] 1、本发明提供的癌症标志物，所述癌症为前列腺癌，所述癌症标志物为APMAP基因和/或APMAP基因的表达产物。

[0037] 本发明通过研究发现APMAP基因 (Gene ID:57136) 在前列腺癌组织中的表达水平，显著高于在正常组织中的表达水平，说明APMAP基因的表达水平与前列腺癌的相关性显著。同时结合ROC曲线分析发现，APMAP基因应用于前列腺癌诊断的AUC值为0.752，显示其作为癌症诊断标志物具有高特异性和高灵敏度，诊断前列腺癌的准确性高。APMAP基因和/或APMAP基因的表达产物是前列腺癌早期分子诊断与患病风险筛查的理想靶点，有利于改善前列腺癌诊断的及时性，提高前列腺癌诊断的特异性。APMAP基因和/或APMAP基因的表达产物作为前列腺癌无创性筛查的诊断的指标，监测前列腺癌的临床治疗效果，为前列腺癌的预防、早发现、早治疗提供了重要的临床信息，有利于改善患者生存质量，提高患者生存率。

[0038] 本发明通过细胞学实验进一步验证了APMAP基因与前列腺癌细胞侵袭、转移的相关性，在过表达APMAP基因的前列腺癌细胞中，细胞的侵袭和转移能力增强，而用RNAi技术干扰APMAP基因的表达后，前列腺癌细胞的迁移和侵袭被抑制，说明APMAP基因影响前列腺癌细胞的侵袭、转移，参与前列腺癌的发生、发展，APMAP基因能够作为前列腺癌分子治疗靶点，为前列腺癌的临床靶向治疗以及个体化治疗提供依据。

[0039] 2、本发明提供的癌症标志物，通过癌症的临床数据分析发现，APMAP基因的表达水平与膀胱癌、乳腺癌、肝外胆管癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、乳头状肾细胞癌、肝癌、肺腺癌、肺鳞状上皮细胞癌、胃癌、甲状腺癌和子宫内膜癌的相关性显著 ($P < 0.05$)，通过检测APMAP基因的表达，能够为上述癌症的诊断或治疗提供重要的临床依据。

[0040] 3、本发明提供的APMAP基因、APMAP mRNA和APMAP蛋白中至少一种的用途，APMAP基因在不同N分期和M分期的癌症中具有显著的表达差异，提示APMAP基因作为前列腺癌分子诊断标志物能够用于癌症的淋巴结转移诊断以及远处转移诊断，Kaplan-Meier曲线分析APMAP基因高表达的前列腺癌患者，其生存期明显短于APMAP基因低表达的患者，说明APMAP基因的表达水平与前列腺癌患者的不良预后密切相关，APMAP基因和/或其表达产物能够作为前列腺癌的预后标志物，用于预测患者的预后情况。APMAP基因及其表达产物还能够作为前列腺癌的治疗靶点，用于制备治疗前列腺癌的药物，辅助前列腺癌的临床治疗，提高癌症治疗效果。

[0041] 另一方面,本发明证实了APMAP基因的表达与EGFR的相关性,在抑制APMAP基因表达后,EGFR的含量也相应降低,两者之间存在协同作用关系,在此基础上,以APMAP为靶点,有利于开发同时抑制APMAP基因表达的EGFR抑制剂。表皮生长因子受体(epidermal growth factorreceptor,EGFR)是受体酪氨酸激酶c-erbB家族中的一员,是一种重要的蛋白激酶,因其在控制细胞增殖、存活、代谢等方面的关键作用,使得EGFR成为理想的肿瘤靶向治疗分子靶标。目前,EGFR抑制剂的研发发展迅速,成为肿瘤临床靶向治疗的重要药物。

[0042] 4、本发明提供的APMAP基因的表达抑制剂,包括siRNA和/或shRNA,siRNA和/或shRNA用于基因抑制时,其干扰效果好,能够有效抑制APMAP基因的表达,抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。其中,shRNA由于脱靶效应低、在细胞中稳定性高,具有重要的基因治疗的应用前景。

[0043] 5、本发明提供的APMAP基因的表达抑制剂,同样地能够作为EGFR抑制剂,降低EGFR的含量,抑制EGFR功能,从而阻断肿瘤细胞内的信号转导,实现对癌症的靶向分子治疗。

[0044] 6、本发明提供的载体、重组细胞或慢病毒颗粒,由于包括上述的表达抑制剂,能够用于制备治疗前列腺癌的药物,或者作为抑制EGFR表达水平的产品,用于前列腺起的分子靶向治疗。

[0045] 7、本发明提供的稳定敲减APMAP基因的细胞株,通过包装连接有shRNA片段的慢病毒颗粒,并利用慢病毒颗粒感染前列腺癌细胞,使shRNA序列插入到前列腺癌细胞的基因组中,转录后得到干扰RNA序列,干扰RNA序列通过靶向降解APMAP的mRNA,抑制APMAP基因表达,得到稳定敲减APMAP基因的细胞株。利用上述的细胞株,能够实现APMAP基因功能的进一步研究,有利于揭示前列腺癌的发生、发展过程,为前列腺癌的针对性治疗提供更多的临床应用信息。

附图说明

[0046] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0047] 图1为本发明实施例1提供的前列腺癌组织(Tumor)和癌旁正常组织(Normal)中APMAP蛋白的免疫组化染色结果;

[0048] 图2为本发明实施例1提供的前列腺癌组织(Tumor)、癌旁正常组织(Normal),以及不同M、N分期的前列腺癌中APMAP蛋白水平的统计柱形图;

[0049] 图3为本发明实施例2提供的APMAP基因在前列腺癌组织(Tumor)于正常组织(Normal)的mRNA表达差异检测结果;

[0050] 图4为本发明实验例3提供的APMAP基因表达水平用于诊断前列腺癌的ROC曲线;

[0051] 图5为本发明实验例4提供的APMAP基因表达水平对前列腺癌生存期影响的生存分析曲线;

[0052] 图6为本发明实验例5提供的15种癌症类型的癌症组织样本(Cancer)和癌旁正常组织样本(Normal)中APMAP mRNA的表达差异检测结果;

[0053] 图7为本发明实验例1提供的稳定敲减APMAP基因的细胞株(shAPMAP1和shAPMAP2)

与对照细胞株 (shNC) 中APMAP蛋白表达检测结果;

[0054] 图8为本发明实验例1提供的稳定敲减APMAP基因的细胞株 (shAPMAP1、shAPMAP1) 与对照细胞株 (shNC) 的细胞迁移检测结果;

[0055] 图9为本发明实验例1提供的稳定敲减APMAP基因的细胞株 (shAPMAP1、shAPMAP1) 与对照细胞株 (shNC) 的细胞侵袭检测结果;

[0056] 图10为本发明实验例2提供的过表达APMAP的细胞株与对照细胞株中APMAP蛋白表达检测结果;

[0057] 图11为本发明实验例2提供的过表达APMAP的细胞株 (APMAP) 与对照细胞株 (NC) 的细胞迁移检测结果;

[0058] 图12为本发明实验例2提供的过表达APMAP的细胞株 (APMAP) 与对照细胞株 (NC) 的细胞侵袭检测结果;

[0059] 图13为本发明实验例3提供的稳定敲减APMAP的细胞株 (shAPMAP1) 和对照细胞株 (shNC) 中EGFR蛋白表达的荧光检测结果;

[0060] 图14为本发明实验例3提供的稳定敲减APMAP的细胞株 (shAPMAP1和shAPMAP2), 以及对照细胞株 (shNC) 中EGFR蛋白表达的蛋白免疫印迹检测结果;

[0061] 图15为本发明实验例3提供的过表达APMAP的细胞株 (APMAP) 与对照细胞株 (NC) 中EGFR蛋白表达的蛋白免疫印迹检测结果;

[0062] 图16为本发明实验例3提供的对照细胞株 (NC)、过表达APMAP的细胞株, 以及对过表达APMAP的细胞株用EGFR抑制剂 (Erlotinib和AZD3759) 处理后的细胞迁移检测结果;

[0063] 图17为本发明实验例3提供的对照细胞株 (NC)、过表达APMAP的细胞株, 以及对过表达APMAP的细胞株用EGFR抑制剂 (Erlotinib和AZD3759) 处理后的细胞侵袭检测结果。

具体实施方式

[0064] 以下通过具体实施例来说明本发明的实施方式, 除非另外说明, 本发明中所公开的实验方法均采用本技术领域常规技术, 所有引物合成以及测序工作由金唯智生物科技有限公司完成, 除非另有说明, 下述实施例中所用到的试剂和原料均可由市场购得。下述实施例中所有涉及的细胞均购于购自上海生命科学研究院细胞所。

[0065] 下述实施例中涉及的试剂如下所示:

[0066] APMAP抗体购自ORIGENE公司, Name: APMAP mouse monoclonal antibody. clone0TI1G8 (formerly1G8)。即用型UltraSensitiveTMS-P超敏试剂盒 (鼠/兔), 购自迈新生物技术有限公司, 说明书编号: 40398a, 产品编号: KIT-9720, 试剂盒组成: 试剂A: 内源性过氧化酶阻断剂; 试剂B: 动物非免疫血清 (羊); 试剂C: 生物素标记的羊抗鼠/兔IgG; 试剂D: 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶。DAB显色系统: 液体DAB酶底物显色试剂盒, 购自福州迈新生物技术有限公司, 其产品编号为DAB-0031/1031。

[0067] 实施例1

[0068] 本实施例提供一种检测APMAP基因在前列腺癌组织 (Tumor) 及正常组织 (Normal) 中的蛋白表达水平的方法, 具体内容如下所示:

[0069] 1、检测样本

[0070] 前列腺癌组织微阵列芯片 (购于西安艾丽娜生物科技有限公司), 含前列腺癌80

例,边缘正常前列腺组织及正常前列腺组织各8例,每例组织样本均选取2个检测点。

[0071] 2、采用免疫组化(IHC)的UltraSensitiveTMS-P法检测APMAP基因在前列腺癌组织(Tumor)和正常组织(Normal,包括边缘正常组织和正常前列腺组织)中的表达情况,IHC的实验步骤包括:

[0072] 1) 60℃烤片30分钟,常规脱蜡水化;

[0073] 2) 抗原修复:Tris-EDTA (PH8.0)微波修复抗原,冷却至室温,三羟甲基氨基甲烷(Tris)盐缓冲液,PBS洗5分钟×3次;

[0074] 3) 用3% H_2O_2 -甲醇封闭内源性过氧化物酶,室温10分钟,PBS洗5分钟×3次;

[0075] 4) 滴加正常非免疫动物血清,室温10分钟;

[0076] 5) 除去血清,滴加一抗APMAP(1:50),4℃冰箱过夜;

[0077] 6) 用0.1%Tween-20PBS洗5分钟×3次;

[0078] 7) 滴加生物素标记的羊抗鼠/兔IgG,室温孵育10分钟;

[0079] 8) 用0.1%Tween-20PBS洗5分钟×3次;

[0080] 9) 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶,室温孵育10分钟;

[0081] 10) DAB显色5分钟,蒸馏水洗终止显色;

[0082] 11) 苏木素复染、水洗、分化后充分水洗返蓝;

[0083] 12) 常规脱水透明,中性树胶封片。

[0084] IHC实验评判标准:对芯片上逐点染色结果进行定位后根据细胞显色强度判为:不着色为阴性(-)、着浅棕色为弱阳性(+),着棕色为阳性(++),着棕褐色为强阳性(+++);依照阳性细胞数量可分为:(+)指阳性细胞数在25%以下,(++)指阳性细胞数在25%-49%之间,(+++指阳性细胞数在50%以上。Log-Rank检验对得到的组织标本染色结果进行统计分析。

[0085] 实验结果:

[0086] 1、图1显示APMAP蛋白在前列腺癌组织(Cancer)及边缘正常组织(Normal)中的染色结果,其中,图1中竖向的B列是A列染色结果的局部放大图(4X)。由图1可知,在正常组织(Normal)中,APMAP蛋白染色为阴性结果,而在前列腺癌组织(Cancer)组织中,APMAP蛋白染色为阳性结果。

[0087] 2、表1显示具体TNM分期的前列腺癌组织和正常组织中APMAP染色情况:

[0088] 表1

[0089]

序号	年龄	性别	器官	病理诊断 (Gleason 分级)	TNM	着色强度	着色部位	着色细胞
01	76	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2AN0M0	-		
02	76	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2AN0M0	-		
03	71	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
04	71	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
05	66	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N1M1	+	胞浆	肿瘤细胞
06	66	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N1M1	+	胞浆	肿瘤细胞
07	74	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
08	74	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞

[0090]

09	78	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N1M0	+	胞浆	肿瘤细胞
10	78	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N1M0	+	胞浆	肿瘤细胞
11	65	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
12	65	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
13	67	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M1	+	胞膜	肿瘤细胞
14	67	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M1	+	胞膜	肿瘤细胞
15	64	男	前列腺	少许前列腺癌 3 级	T1N0M0	-		
16	64	男	前列腺	少许前列腺癌	T1N0M0	-		
17	75	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N1M1C	-		
18	75	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N1M1C	-		
19	73	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
20	73	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
21	60	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
22	60	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
23	76	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
24	76	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
25	72	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
26	72	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
27	57	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
28	57	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
29	69	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
30	69	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
31	70	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
32	70	男	前列腺	前列腺增生	T2N0M0	-		
33	85	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N0M0	+++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
34	85	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N0M0	+++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
35	73	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
36	73	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
37	60	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N1M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
38	60	男	前列腺	前列腺增生	T3N1M0	++	胞浆	上皮细胞
39	66	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
40	66	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
41	64	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M1	+	胞浆	肿瘤细胞
42	64	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M1	+	胞浆	肿瘤细胞
43	64	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
44	64	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
45	71	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
46	71	男	前列腺	缺	T2N0M0	*		
47	70	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
48	70	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
49	70	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
50	70	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
51	56	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		

[0091]

52	56	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		
53	51	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
54	51	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
55	64	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
56	64	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
57	73	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
58	73	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
59	61	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
60	61	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
61	65	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
62	65	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
63	71	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T1N0M0	-		
64	71	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T1N0M0	-		
65	75	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T4N1M1	+++	胞浆	肿瘤细胞
66	75	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T4N1M1	+++	胞浆	肿瘤细胞
67	69	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		
68	69	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		
69	69	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
70	69	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
71	72	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
72	72	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
73	82	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
74	82	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
75	80	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
76	80	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	++	胞浆	肿瘤细
77	68	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
78	68	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	-		
79	82	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N1M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
80	82	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N1M0	++	胞浆	肿瘤细胞
81	71	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T1N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
82	71	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T1N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
83	64	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
84	64	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
85	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
86	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
87	20	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
88	20	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	-		
89	64	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
90	64	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
91	60	男	前列腺	前列腺增生	T3AN0M0	++	胞浆、胞核	上皮细胞
92	60	男	前列腺	前列腺增生	T3AN0M0	++	胞浆、胞核	上皮细胞
93	72	男	前列腺	前列腺癌 2-3 级	T2bN0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞

[0092]

94	72	男	前列腺	前列腺癌 2-3 级	T2bN0M0	+++	胞浆	肿瘤细胞
95	64	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2AN0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
96	64	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2AN0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
97	66	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3AN0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
98	66	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3AN0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
99	60	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N1M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
100	60	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N1M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
101	75	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
102	75	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T3N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
103	58	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
104	58	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
105	76	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-		
106	76	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-		
107	78	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N1M1	+	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
108	78	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N1M1	+	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
109	70	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N1M1C	+	胞浆	肿瘤细胞
110	70	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N1M1C	+	胞浆	肿瘤细胞
111	76	男	前列腺	少许前列腺癌组织	T2BN0M0	-		
112	76	男	前列腺	少许前列腺癌组织	T2BN0M0	-		
113	62	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
114	62	男	前列腺	前列腺癌 3 级	T3N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
115	62	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
116	62	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
117	26	男	前列腺	前列腺增生	T2N0M0	-	-	-
118	26	男	前列腺	前列腺增生	T2N0M0	-	-	-
119	56	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-	-	-
120	56	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-	-	-
121	72	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M1	++	胞浆、胞核	肿瘤细胞
122	72	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M1	++	胞浆、胞核	肿瘤细胞
123	72	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2AN0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
124	72	男	前列腺	前列腺癌 4 级	T2AN0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
125	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N1M0	-		
126	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N1M0	-		
127	72	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N1M1	+	胞浆	肿瘤细胞
128	72	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N1M1	+	胞浆	肿瘤细胞
129	77	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		
130	77	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		
131	69	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N0M1	-		
132	69	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N0M1	-		
133	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2BN0M0	+	胞浆、胞核	肿瘤细胞
134	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2BN0M0	++	胞浆、胞核	肿瘤细胞
135	68	男	前列腺	前列腺组织	T1N0M0	+	胞浆	上皮细胞
136	68	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T1N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞

[0093]

137	68	男	前列腺	平滑肌组织	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
138	68	男	前列腺	平滑肌组织	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
139	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N1M1C	-		
140	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N1M1C	-		
141	63	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
142	63	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
143	65	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
144	65	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆、胞膜	肿瘤细胞
145	63	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N1M0	+	胞浆	肿瘤细胞
146	63	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N1M0	+	胞浆	肿瘤细胞
147	62	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
148	62	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	+	胞浆	肿瘤细胞
149	60	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		
150	60	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	-		
151	82	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
152	82	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
153	71	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-		
154	71	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-		
155	64	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
156	64	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T2N0M0	++	胞浆	肿瘤细
157	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
158	73	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T4N0M0	++	胞浆	肿瘤细胞
159	81	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-		
160	81	男	前列腺	前列腺癌 5 级	T3N0M0	-		
161	21	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞核	上皮细胞
162	21	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞核	上皮细胞
163	35	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞核	上皮细胞
164	35	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞核	上皮细胞
165	27	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞浆、胞核	上皮细胞
166	27	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞浆、胞核	上皮细胞
167	56	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞浆	上皮细胞
168	56	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞浆	上皮细胞
169	68	男	前列腺	前列腺组织	-	++	胞浆	上皮细胞
170	68	男	前列腺	前列腺组织	-	++	胞浆	上皮细胞
171	62	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
172	62	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
173	57	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
174	57	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
175	60	男	前列腺	少许前列腺组织	-	+	胞浆	上皮细胞
176	60	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
177	35	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞浆	上皮细胞
178	35	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞浆	上皮细胞
179	30	男	前列腺	前列腺组织	-	-		

[0094]

180	30	男	前列腺	少许前列腺组织	-	-		
181	40	男	前列腺	平滑肌组织	-	*		
182	40	男	前列腺	前列腺组织	-	+	胞浆	上皮细胞
183	42	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
184	42	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
185	29	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
186	29	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
187	34	男	前列腺	前列腺组织	-	++	胞浆	上皮细胞
188	34	男	前列腺	前列腺组织	-	++	胞浆	上皮细胞
189	31	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
190	31	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
191	22	男	前列腺	前列腺组织	-	-		
192	22	男	前列腺	前列腺组织	-	-		

[0095] 采用log-rank检验分析表1中前列腺癌 (Tumor) 与正常组织 (Normal) 中APMAP的表达差异水平,以及T、N、M分期对应的APMAP蛋白的表达水平。统计得到图2所示的柱形图。

[0096] 由表1和图2可知,在前列腺癌组织样本中,69%样本为阳性染色;而在正常组织样本中,75%样本为阴性染色。说明APMAP基因的表达水平在前列腺癌组织与正常组织中存在显著性差异,APMAP与前列腺癌的发生具有显著相关性,有望作为前列腺癌的癌症标志物用于癌症的诊断、预后、治疗。另一方面,不同M分期和N分期的前列腺癌组织中,APMAP基因的表达存在明显区别,其中,在M1和M0期的前列腺癌中,APMAP蛋白的差异表达水平为(80%VS 67%, $p<0.05$);在N1和N0期的前列腺癌中,APMAP蛋白的差异表达水平为(83%VS 67%, $p<0.05$);说明APMAP基因的表达水平与前列腺癌的远处转移和淋巴结转移具有明显相关性,通过检测APMAP基因的表达水平,能够为前列腺癌的远处诊断和淋巴结诊断提供指导信息,监测前列腺癌的临床治疗效果,用于提示癌症进展和临床分期。

[0097] 实施例2

[0098] 本实施例提供利用生物信息学分析,检测APMAP基因在前列腺癌组织 (Tumor) 及正常组织 (Normal) 中的mRNA表达水平的方法,具体内容如下所示:

[0099] 获取包括前列腺癌组织样本与癌旁正常组织中APMAP的mRNA表达情况,其中APMAP的表达数据和病人样本从TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>) 上下载,通过Wilcoxon rank sum test检测APMAP在正常组织和癌组织中表达量的差异。

[0100] 图3显示APMAP基因在前列腺癌组织 (Cancer) 于正常组织 (Normal) 的mRNA表达差异水平,由图3可知,无论在配对 (paired) 前列腺癌组织还是不配对 (unpaired) 前列腺癌组织中,APMAP基因的表达水平均显著高于正常组织 ($p<0.001$)。进一步验证了APMAP基因的表达与前列腺癌具有相关性,APMAP基因能够作为有效的前列腺癌的癌症标志物,用于癌症的诊断和治疗。

[0101] 实施例3

[0102] 本实施例提供一种APMAP基因表达水平用于前列腺癌诊断价值的评估方法,具体内容为:将实施例2中通过TCGA数据库获取的前列腺癌病人数据通过软件进行编辑,获得ROC (receiver operator characteristic curve) 曲线。

[0103] ROC曲线的绘制可以使用现有技术领域的软件或系统,比如=MedCalc9.2.0.1医学统计软件、SPSS 9.0、ROCPOWER.SAS、DESIGNROC.FOR、MULTIREADER_POWER.SAS、R-studio、CREATE-ROC.SAS>GB STATV10.0(Dynamic Microsystems,Inc.Silver Spring,MD,USA)等等。本实施例中绘制ROC曲线使用的软件为R-studio。

[0104] ROC曲线是反映真阳性率(灵敏度,又称敏感性,sensitivity)和假阳性率(特异性,specificity)连续变量的综合指标,是用构图法揭示灵敏度和特异性的相互关系。它通过设定一系列不同的分界值(阈值或临界值,cut-offvalue,是划分诊断试验结果正常与异常的界值)作为连续变量,从而计算出的一系列灵敏度和特异性,再以灵敏度为纵坐标、特异性为横坐标绘制的曲线,曲线下面积(AUC)越大,诊断准确性越高。

[0105] 图4显示APMAP基因表达水平用于诊断前列腺癌的ROC曲线,如图4所示,ROC曲线的曲线下面积(AUC)为0.752,APMAP基因的表达用于诊断前列腺癌的灵敏度为78.1%,特异性为65.4%,显示其作为癌症诊断标志物具有高特异性和高灵敏度,诊断前列腺癌的准确性高。APMAP基因的表达产物是前列腺癌早期分子诊断与患病风险筛查的理想靶点,有利于改善前列腺癌诊断的及时性,提高前列腺癌诊断的特异性。APMAP基因具有较高的诊断意义,能够为前列腺癌的预防、早期诊断和筛查提供有效信息,监测癌症治疗效果,有利于实现对前列腺癌早期患者的针对性治疗,从而改善患者生存质量,提高患者生存率。

[0106] 实施例4

[0107] 本实施例提供一种APMAP基因的表达与前列腺癌的癌症预后相关性的检测方法,具体如下:

[0108] 利用实施例2中通过TCGA数据库获取的前列腺癌组织中的APMAPmRNA信息和病人信息,采用Kaplan-Meier曲线和log-rank检验用于分析APMAP基因表达水平与患者总生存期的相关性,得到如图5所述的生存分析曲线。

[0109] 由图5可知,APMAP基因高表达的前列腺癌患者,在同一生存时间下的患者生存率明显低于APMAP基因低表达的前列腺癌患者($P<0.01$),APMAP基因的表达与前列腺癌的不良预后密切相关,提示APMAP基因的表达产物能够作为前列腺癌的预后标志物,通过检测APMAP基因表达,能够用于评估前列腺癌患者预后、提示患者生存时间,监测癌症治疗效果,及时对癌症的临床治疗策略进行调整,有利于进一步提高临床治疗效果,改善患者生存质量。

[0110] 实施例5

[0111] 本实施例提供利用生物信息学,对APMAP基因表达与15种癌症的相关性分析的方法,具体内容如下:

[0112] 获取包括癌症组织样本与癌旁正常组织中APMAP的mRNA表达情况,癌症类型具体地包括膀胱癌、乳腺癌、肝外胆管癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、乳头状肾细胞癌、肝癌、肺腺癌、肺鳞状上皮细胞癌、胃癌、甲状腺癌和子宫内膜癌。其中APMAP的表达数据从TCGA(<https://cancergenome.nih.gov/>)上下载,通过Wilcoxon rank sum test检测APMAP在正常组织和癌组织中表达量的差异。

[0113] 图6显示在15种癌症类型的癌症组织样本(Cancer)和癌旁正常组织样本(Normal)中APMAP mRNA的表达差异。由图6可知,APMAP的转录本在膀胱癌、乳腺癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、嫌色细胞癌、乳头状肾细胞癌、肺腺癌、肺鳞状上皮细胞癌、前列腺癌、胃癌、子宫内

膜癌的癌症组织中表达量高于在癌旁正常组织中的表达量；而在肝外胆管癌、肾透明细胞癌、肝癌、甲状腺癌的癌旁正常组织中的表达量高于在癌症组织中的表达量，且差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。由此可知，APMAP的表达与膀胱癌、乳腺癌、肝外胆管癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、乳头状肾细胞癌、肝癌、肺腺癌、肺鳞状上皮细胞癌、胃癌、甲状腺癌和子宫内膜癌的发生具有相关性，APMAP基因及其表达产物能够作为上述癌症的分子标志物用于癌症的诊断、治疗。

[0114] 实施例6

[0115] 本实施例提供一种稳定敲减APMAP基因的细胞株的构建方法，以人前列腺癌细胞DU145作为目标细胞，构建稳定敲减APMAP基因的细胞株；构建过程中使用的病毒载体P1vx-sh-Puro，和病毒包装质粒pLP1、pLP2及VSVG均由广州辉骏生物有限公司获取，构建方法包括以下步骤：

[0116] 1、设计合成shRNA

[0117] 以APMAP基因的2个转录本 (NM_020531.2、XM_005260763.3) 为分子靶标，设计能够同时靶向2个mRNA的shRNA序列。首先，设计siRNA靶点，siRNA靶点包括siRNA1、siRNA2，siRNA1的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示，siRNA2的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。根据上述的siRNA靶点序列得到shRNA1和shRNA2，shRNA1的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示，shRNA2的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0118] 2、构建慢病毒重组表达载体

[0119] (1) 根据步骤1设计的shRNA序列，设计合成shRNA双链片段的引物，引物序列具体如下表6所示：

[0120] 表6 shRNA合成引物

[0121]

引物	序列
shRNA1-F	其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示
shRNA1-R	其核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示
shRNA2-F	其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示
shRNA2-R	其核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示

[0122] 引物退火形成带粘性末端的双链片段，退火的反应体系为：10XBuffer, 2 μ l；Tris-Cl (pH7.5) 100mM；NaCl 1M；EDTA 10mM；shRNA-R/shRNA-F, 100 μ M/1 μ l；H₂O, 16 μ l。反应程序为：95 $^{\circ}$ C保持10min；75 $^{\circ}$ C保持10min；55 $^{\circ}$ C保持10min；35 $^{\circ}$ C保持10min；15 $^{\circ}$ C保持10min。双链片段5'端的粘性末端为BamHI酶切位点，3'端的粘性末端为EcoRI酶切位点。

[0123] (2) 使用限制性内切酶BamHI和EcoRI对慢病毒载体P1vx-sh-Puro进行酶切，然后连接慢病毒载体与步骤(1)中带有粘性末端的双链shRNA片段，分别得到连接有shRNA1和shRNA2的重组表达载体P1vx-shAPMAP1和P1vx-shAPMAP2。连接反应体系为：shRNA双链片段, 1 μ l；酶切后载体, 100-200ng；ligase buffer, 2 μ l；T4ligase, 1 μ l；H₂O, 补齐至20 μ l。连接条件为：16 $^{\circ}$ C过夜。

[0124] (3) 将连接shRNA片段后的载体转化DH5 α 感受态细菌，涂布37 $^{\circ}$ C的氨苄抗性的LB平板培养基，培养过夜。次日挑取单菌落接种于含5ml, 100 μ g/ml Ampicillin抗性的LB培养液中，250rpm, 37 $^{\circ}$ C恒温摇床培养14小时，用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒，并用BamHI和

EcoRI酶切鉴定,将酶切鉴定正确的重组克隆送测序验证,测序结果正确的质粒为构建成功的慢病毒重组表达载体。

[0125] 3、慢病毒包装

[0126] (1) 采用含10%胎牛血清(购自Invitrogen)的DMEM培养基(购自Invitrogen)培养293T细胞,细胞密度生长至约50%-60%汇合率时进行病毒的共转染。分别以重组表达载体Plvx-shAPMAP1和Plvx-shAPMAP2中的一种,共转染的质粒包括病毒包装质粒pLP1、pLP2及VSVG,转染使用jetprime转染试剂(购于达科为生物)。

[0127] (2) 转染后更换含10%胎牛血清FBS的新鲜完全培养基,如果在当天上午进行转染,转染后6h进行换液,如果当天下午进行转染,转染后第二天早上约转染后16h进行换液。

[0128] (3) 转染后48h和72h分别两次收集病毒上清液(48h收集后置换新鲜完全培养基)。在48h收毒时,将100mm培养皿中的培养基倒入50ml离心管中,注意培养皿壁不要接触离心管口,以防出现细菌污染,随后补入10ml含10%胎牛血清FBS的新鲜完全培养基,平稳置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中继续培养。在72h收毒时,直接将100mm培养皿中的培养基倒入50ml离心管中,同样注意培养皿壁不要接触离心管口,以防出现细菌污染。

[0129] 将50ml离心管中的病毒上清,4℃,3000rpm,10min,去除细胞碎片;然后收集病毒原液上清置于超速离心管中,4℃,25000rpm,离心120分钟,获得浓缩后的病毒液。

[0130] 3、感染目标细胞,得到稳定敲减APMAP基因的细胞株

[0131] (1) 采用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(购自Invitrogen)培养DU-145细胞,待细胞密度生长至约60%汇合率时进行细胞感染。采用步骤2得到的病毒液感染DU-145细胞,培养72h后,荧光显微镜下进行观察,可以观测到细胞内重组表达载体的绿色荧光蛋白GFP(ZsGreen)的表达。

[0132] 以未进行基因敲减的DU-145对照组细胞(shNC)作为对照,其中,未进行基因敲减的DU-145细胞是在与本实施例中上述步骤的相同实验条件下,以未连接shRNA片段的病毒载体DU-145进行包装、感染得到的对照细胞株。

[0133] (2) 用含有终浓度为1.5μg/ml嘌呤霉素的培养基传代筛选,得到能够稳定敲减APMAP基因的细胞株,-80℃冰箱冻存备用。

[0134] 实验例1

[0135] 本实验例对实施例6中以重组表达载体Plvx-shAPMAP1构建的稳定敲减APMAP基因的细胞株(shAPMAP1),和以重组表达载体Plvx-shAPMAP2构建的稳定敲减APMAP基因的细胞株(shAPMAP2)进行验证;并检测APMAP基因对前列腺癌细胞侵袭和迁移的影响,具体内容如下:

[0136] 1、基因敲减效果检测

[0137] 蛋白免疫印迹法分别检测稳定敲减APMAP基因的DU-145细胞株中APMAP基因的表达(图7),具体步骤为:

[0138] A、样品裂解:RIPA裂解前,用预冷的PBS清洗细胞3次以去除残留血清,按10μl/cm²细胞生长面积加入裂解液,细胞刮刮取,4℃离心后取上清,细胞裂解物使用Bradford法测定浓度。

[0139] B、蛋白变性:取30μl离心后上清物与5×PAGE电泳上样缓冲液、DTT混合,于99℃中加热5min,样品加至12%聚丙烯酰胺凝胶上样孔中。

- [0140] C、电泳:设定恒压100V,电泳120min。
- [0141] D、转膜:设定恒流250mA,转膜3h,将PAGE胶上的蛋白转印至0.45 μ m PVDF膜。
- [0142] E、封闭:5%脱脂奶粉-PBST溶液,室温摇床封闭1h。
- [0143] F、一抗(APMAP抗体)孵育:一抗于4 $^{\circ}$ C中孵育过夜。
- [0144] G、洗膜:用PBST洗膜3次,每次5min。
- [0145] H、二抗孵育:辣根过氧化物酶标记的二抗(1/5000稀释)于室温中孵育膜45min。
- [0146] I、洗膜:用PBST洗膜4次,每次5min。
- [0147] J、化学发光:按50 μ l/cm²膜面积加入化学发光液,X光胶片显影后冲洗得到蛋白条带。
- [0148] 2、细胞迁移实验
- [0149] A,第一天,在24孔板中放入培养插件,计数后分别加入步骤1中筛选好的稳定敲减APMAP基因的细胞株,使第二天细胞能刚好长满;
- [0150] B,第二天取出培养插件,插件位置处形成划痕,用PBS洗两次,加入500 μ l无血清的培养基。并分别在0、48h对划痕位置进行拍照;
- [0151] C,利用Image J统计划痕位置空白面积,0h面积与48h面积的差值即为细胞移动面积。
- [0152] 3、细胞侵袭实验
- [0153] A,实验前48h以 2×10^6 /皿将稳定敲减APMAP的细胞株接种于10cm培养皿。
- [0154] B,胰酶消化细胞,调整细胞浓度为 2×10^5 /ml。
- [0155] C, 4×10^4 和 8×10^4 个细胞(分别于200 μ l和400 μ l无血清RPMI-1640)接种于24孔小室进行侵袭实验,该小室底部为8 μ l孔径的膜,用以模仿基底膜上的孔隙,侵袭实验时膜上有预先包被的matrigel胶,用以模仿细胞外基质的胶原,小室下面为0.7ml含有10%FBS的RPMI-1640。
- [0156] D,细胞置于常规细胞培养条件中培养48h后,用甲醇固定5min,0.5%结晶紫染色1h,用自来水清洗后,用棉签去除没有迁移和侵袭的细胞。于室温晾干后,于光学显微镜下(200X)拍照观察细胞侵袭结果。
- [0157] 实验结果:
- [0158] 图7显示稳定敲减APMAP基因的细胞株(shAPMAP1和shAPMAP2)与对照细胞株(shNC)中APMAP蛋白表达情况,由图7可知,在对照细胞株组中能够检测到表达量高的APMAP蛋白条带,而在稳定敲减FXR1基因的细胞株中,未检测到明显的APMAP蛋白条带,说明实施例6中以P1vx-shAPMAP1构建的稳定敲减APMAP的细胞株(shAPMAP1)和以P1vx-shAPMAP2构建的稳定敲减APMAP的细胞株(shAPMAP2)中均成功敲减APMAP基因。
- [0159] 图8显示稳定敲减APMAP基因的细胞株(shAPMAP1、shAPMAP1)与对照细胞株(shNC)的细胞迁移检测结果。由图8可知,前列腺癌细胞在敲减APMAP基因后,细胞的迁移能力显著降低,说明前列腺癌细胞的迁移与APMAP基因表达显著相关。图9显示稳定敲减APMAP基因的细胞株(shAPMAP1、shAPMAP1)与对照细胞株(shNC)的细胞侵袭检测结果。由图9可知,前列腺癌细胞在敲减APMAP基因后,细胞的侵袭能力显著降低,说明前列腺癌细胞的侵袭与APMAP基因表达显著相关。由图8-9可知,APMAP基因的表达促进前列腺癌细胞的侵袭、转移,APMAP基因参与前列腺癌的进展,有潜力作为临床预测前列腺癌侵袭转移潜能的指标,通过

检测APMAP基因表达,能够用于监控前列腺癌的疾病进展,实现对前列腺癌的预后评估、治疗效果监测,为前列腺癌的诊断和靶向治疗提供有效信息,以实现癌症的个体化治疗,提高患者的生存率和生存质量。

[0160] 实验例2

[0161] 本实验例检测APMAP基因的表达对前列腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响,具体内容如下:

[0162] 1、构建APMAP过表达的载体

[0163] (1) 设计引物APMAP-F (5' -agactcgaggccacatgagcgaggcggacggg-3') 和APMAP-R (5' -gtcggatccgctgccgctgccgctaccaacagcctggaggctgag-3'),用于构建过表达载体;

[0164] (2) 提取前列腺癌细胞DU-145的RNA,逆转录得到cDNA,以cDNA为模板,利用步骤(1)中设计的引物APMAP-F和APMAP-R扩增APMAP片段,PCR扩增的反应体系为:APMAP-F,10 μ M,1 μ l;APMAP-R,10 μ M,1 μ l;PFU,1 μ l;PFU buffer (4 \times),5 μ l;dNTPs,4 μ l;ddH₂O,9 μ l;PCR扩增的反应条件为:95 $^{\circ}$ 保持3分钟,94 $^{\circ}$ 保持30秒,55 $^{\circ}$ 保持2分钟,72 $^{\circ}$ 保持20秒,30个循环,72 $^{\circ}$ 保持10分钟;

[0165] (3) 将步骤(2)中扩增的PCR产物纯化后使用XhoI和BamHI进行酶切,同时以XhoI和BamHI酶切载体pLVX-Puro-3Flag (购于广州辉骏生物有限公司),跑胶纯化后连接载体与PCR片段,连接体系如下:

[0166] pLVX-Puro-3Flag (XhoI/BamHI双酶切产物),50ng;

[0167] PCR产物 (XhoI/BamHI双酶切产物),50ng;

[0168] 10 \times T4ligase buffer,2 μ l,

[0169] T4ligase,1 μ l,

[0170] ddH₂O,补齐20 μ l。

[0171] 连接条件:4 $^{\circ}$ C过夜,将连接产物转化挑克隆送测序,测序结果正确的质粒为构建成功的过表达载体pLVX-Puro-3Flag-APMAP。

[0172] 2、构建过表达APMAP的前列腺癌细胞株

[0173] (1) 采用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(购自Invitrogen)培养DU-145细胞,待细胞密度生长至约60%汇合率时,转染步骤1中构建的过表达载体pLVX-Puro-3Flag-APMAP,以转染pLVX-Puro-3Flag载体的DU-145细胞作为对照;

[0174] (2) 转染后的细胞在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的恒温培养箱中继续培养,期间更换新鲜的含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,以保持细胞的正常生长;

[0175] (3) 细胞培养5天后,用含有终浓度为1.5 μ g/ml嘌呤霉素的培养基传代筛选,得到APMAP过表达的前列腺癌细胞株。

[0176] 以实验例1中提供的蛋白免疫印迹法对过表达APMAP的前列腺癌细胞株进行检测,以转染空载体pLVX-Puro-3Flag的细胞株作为对照,检测结果如图10所示:在过表达APMAP的DU-145细胞(MOCK+)中,能够检测到表达量高的Flag-APMAP的蛋白条带,而在对照细胞(MOCK-)中,未检测出明显的APMAP表达条带,说明过表达APMAP的前列腺癌细胞株构建成功。

[0177] 3、以实验例1提供的细胞侵袭和细胞迁移实验检测APMAP过表达后对前列腺癌细胞迁移和侵袭的能力的影响。

[0178] 图11显示过表达APMAP的细胞株 (APMAP) 与对照细胞株 (NC) 的细胞迁移检测结果。其中,图11A为0H和48H时显微镜下细胞迁移的观测结果,图11B为图11A细胞迁移结果的统计量化图。由图11A和图11B可知,过表达APMAP后,细胞迁移率明显提升,说明APMAP基因的表达对前列腺癌细胞迁移具有促进作用。图12显示过表达APMAP的细胞株 (APMAP) 与对照细胞株 (NC) 的细胞侵袭检测结果。其中,图12A为过表达APMAP的细胞株 (APMAP) 与对照细胞株 (NC) 中细胞侵袭的显微观测结果,图12B为图12A细胞侵袭结果的统计量化图。由图12A和图12B可知,过表达APMAP后,侵袭细胞的比例明显提升,说明APMAP基因的表达对前列腺癌细胞侵袭具有促进作用。图11-图12进一步验证了APMAP基因参与前列腺癌的发生、发展,对前列腺癌细胞的侵袭、转移有促进作用。APMAP基因是前列腺癌侵袭、转移和临床进展预测的理想分子标靶。

[0179] 实验例3

[0180] 本实验例检测APMAP基因表达对癌症细胞内EGFR蛋白的影响,具体内容如下:

[0181] 1、向实施例6中构建的稳定敲减APMAP基因的细胞株 (shAPMAP1) 和对照细胞株 (shNC) 中分别转染EGFR-RFP质粒(购自Sino Biological),细胞转染后继续培养24h,再荧光显微镜下观测两种细胞株内EGFR的蛋白表达情况(图13)。

[0182] 2、利用实验例1提供的蛋白免疫印迹法检测在稳定敲减APMAP基因的细胞株 (shAPMAP1和shAPMAP2) 以及对照细胞株 (shNC) 中转染EGFR-RFP质粒,继续培养24h后细胞中EGFR的蛋白含量(图14),其中,蛋白免疫印迹法中使用的一抗为EGFR抗体(购自cst公司)。

[0183] 3、以实验例2中转染空载体pLVX-Puro-3Flag的对照细胞株、转染过表达载体pLVX-Puro-3Flag-APMAP的过表达APMAP的细胞株为检测对象,检测其中EGFR的蛋白含量(图15)。

[0184] 4、以实验例2中转染空载体pLVX-Puro-3Flag的对照细胞株、转染过表达载体pLVX-Puro-3Flag-APMAP的过表达APMAP的细胞株、以及将过表达APMAP的细胞株分别使用EGFR的抑制剂(Erlotinib或AZD3759)处理48h后的细胞为检测对象,检测各类细胞在0H和48H时细胞迁移和细胞侵袭情况(图16、图17),细胞迁移和细胞侵袭的实验方法参照实验例1。

[0185] 实验结果:

[0186] 图13显示在稳定敲减APMAP的细胞株 (shAPMAP1) 和对照细胞株 (shNC) 中EGFR蛋白表达的荧光检测结果,图13第一竖列至第三竖列分别表示在两种细胞株中病毒载体上GFP的荧光表达检测视野 (shRNA-GFP)、EGFR的RFP荧光表达检测视野 (EGFR-RFP),以及两者的融合图 (Merged)。由图13可知,在未敲减APMAP的对照细胞株中,能够检测到EGFR的蛋白表达,而在APMAP敲减后的细胞株中,未检测到EGFR的蛋白表达;说明APMAP基因表达影响细胞内EGFR的正常表达,以EGFR基因作为靶点,有利于研发新的EGFR小分子抑制剂,用于阻隔癌细胞内的信号转导通路,实现对癌症的治疗效果。

[0187] 图14显示在稳定敲减APMAP的细胞株 (shAPMAP1和shAPMAP2),以及对照细胞株 (shNC) 中EGFR蛋白表达的蛋白免疫印迹检测结果,进一步说明了在敲减APMAP基因后,EGFR的表达同样被显著抑制,说明本发明提供的APMAP基因的表达抑制剂 (shRNA1、shRNA2,以及包括上述shRNA的载体、慢病毒颗粒等) 同样能够作为EGFR的表达抑制剂,实现对EGFR的抑

制效果。

[0188] 图15显示在过表达APMAP的细胞株 (APMAP) 和对照细胞株 (NC) 中EGFR蛋白的蛋白免疫印迹检测结果,由图15可知,在过表达APMAP后,EGFR的蛋白含量也显著上升,说明了APMAP基因表达与EGFR之间的相互影响,存在协同关系。

[0189] 图16显示对照细胞株 (NC)、过表达APMAP的细胞株,以及对过表达APMAP的细胞株用EGFR抑制剂 (Erlotinib和AZD3759) 处理后的细胞迁移检测结果,由图16可知,EGFR抑制剂能够抑制由APMAP基因表达诱导的细胞迁移,减弱细胞迁移能力。图17显示对照细胞株 (NC)、过表达APMAP的细胞株,以及对过表达APMAP的细胞株用EGFR抑制剂 (Erlotinib和AZD3759) 处理后的细胞侵袭检测结果,由图17可知,EGFR抑制剂能够抑制由APMAP基因表达诱导的细胞侵袭,减弱细胞侵袭能力。图16-图17进一步说明了APMAP基因与EGFR之间的相互影响关系,在此基础上,以APMAP为靶点,有利于开发同时抑制APMAP基因表达的EGFR抑制剂。

[0190] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所
- [0003] <120> 一种癌症标志物及其用途
- [0004] <130> SHA201800202
- [0005] <160> 6
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 21
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(siRNA1)
- [0011] <400> 1
- [0012] gggactat ttt gaagtaa atc c 21
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 21
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(siRNA2)
- [0017] <400> 2
- [0018] ggtgttctgc atccaaatac g 21
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 57
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(shRNA1)
- [0023] <400> 3
- [0024] caccgggact atttgaagta aatccttcaa gagagaggat ttacttcaaa tagtccc 57
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 57
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(shRNA2)
- [0029] <400> 4
- [0030] caccggtggt ctgcatccaa atacgttcaa gagagacgta tttggatgca gaacacc 57
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 57
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(shRNA1-R)
- [0035] <400> 5
- [0036] aaaagggact atttgaagta aatcctctct cttgaaggat ttacttcaaa tagtccc 57
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 57

-
- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列(shRNA2-R)
[0041] <400> 6
[0042] aaaaggtggt ctgcatccaa atacgtctct cttgaacgta tttggatgca gaacacc 57

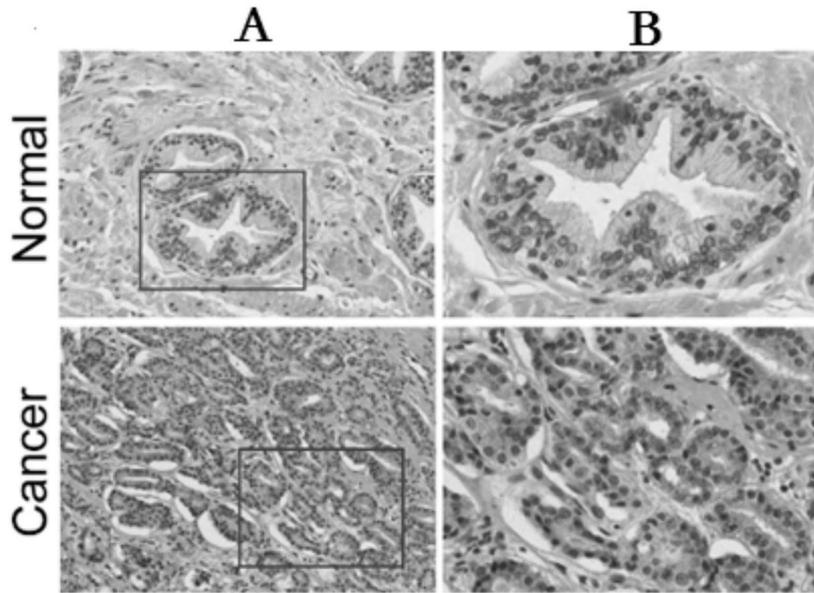


图1

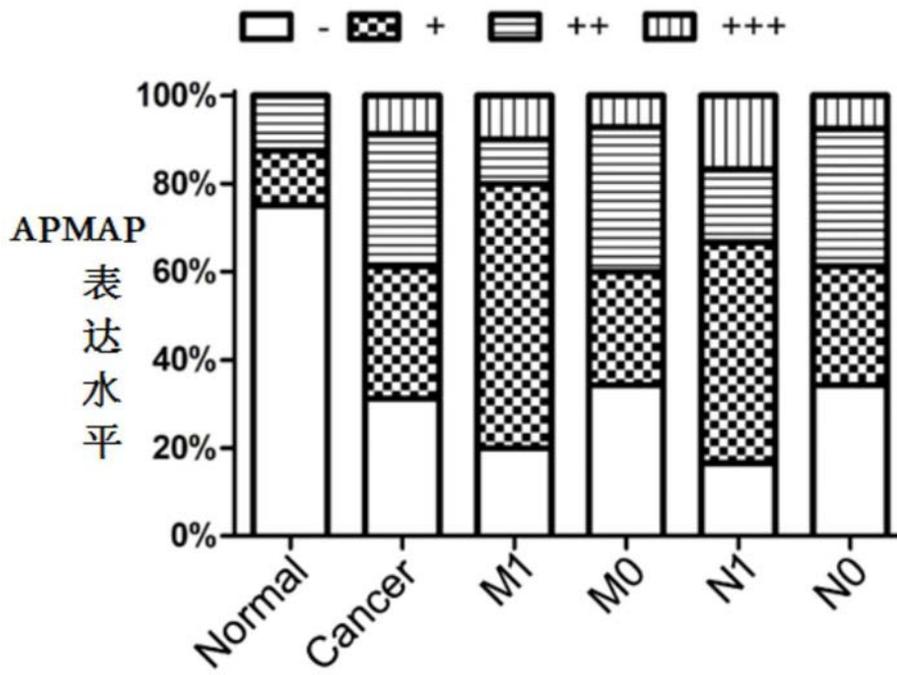


图2

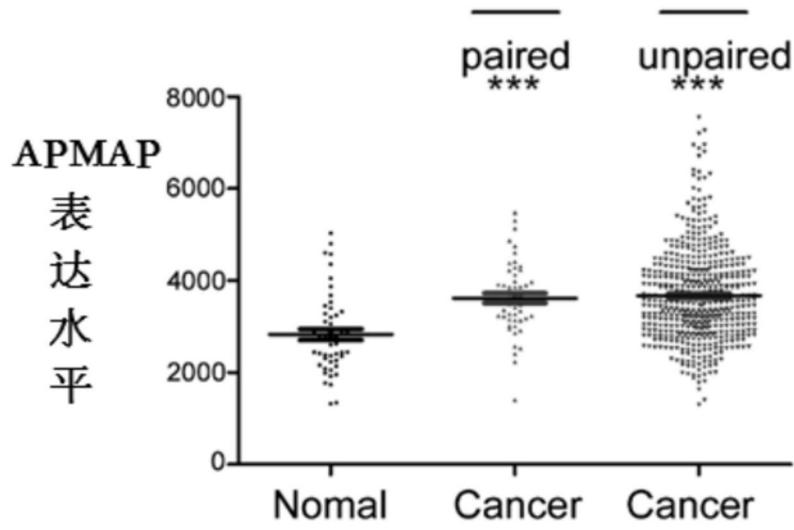


图3

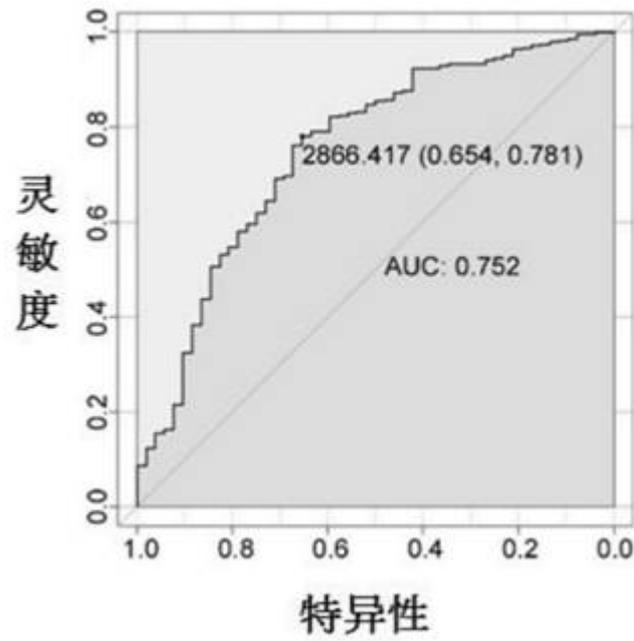


图4

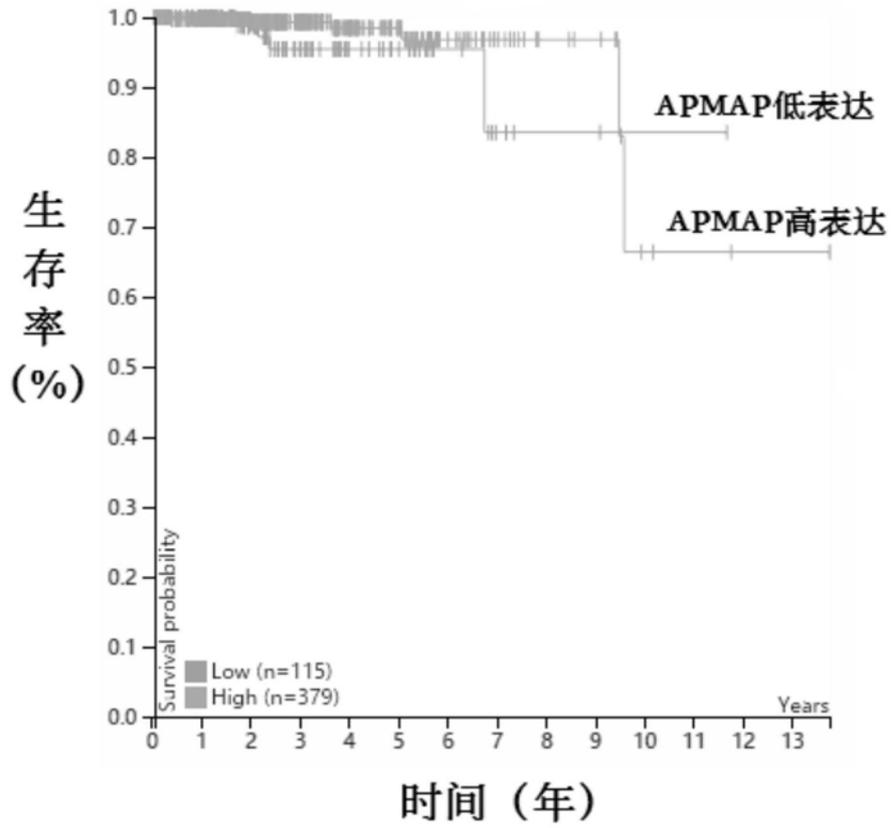


图5

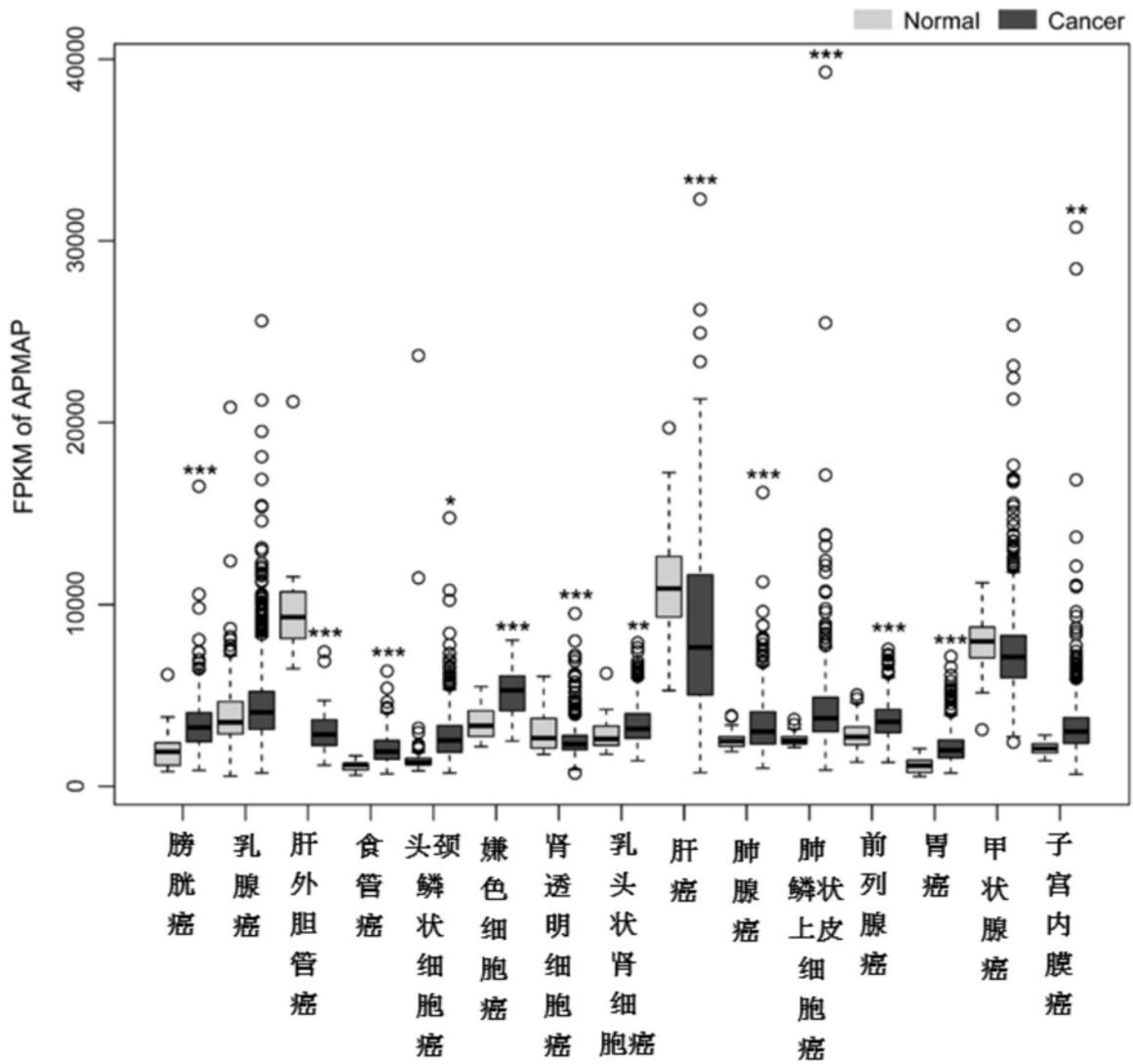


图6

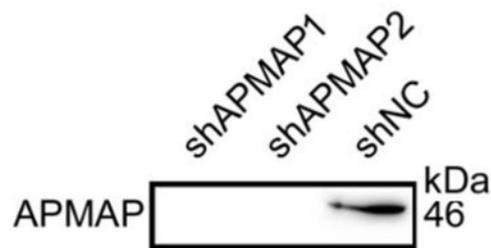


图7

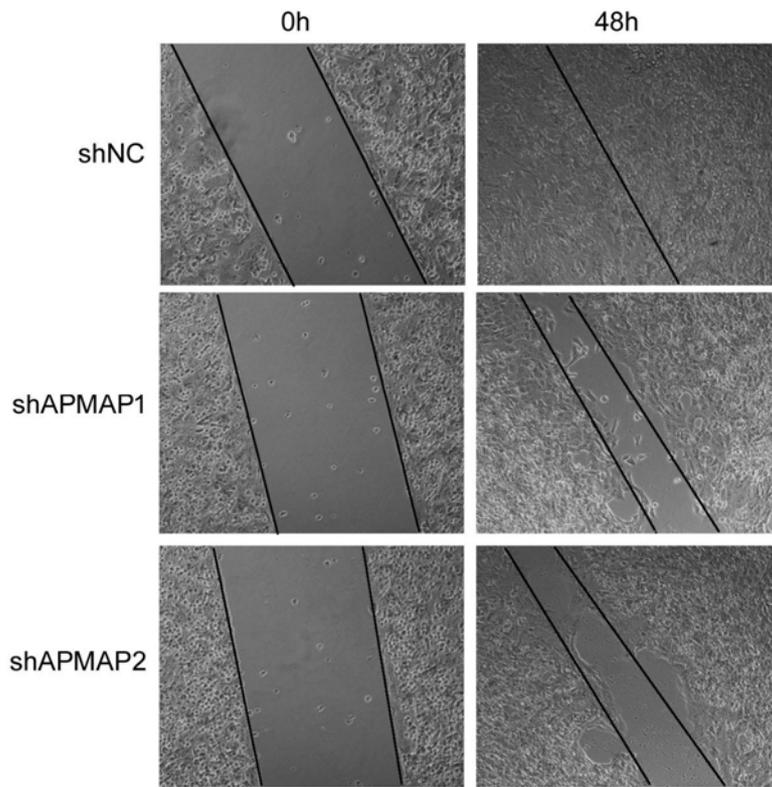


图8

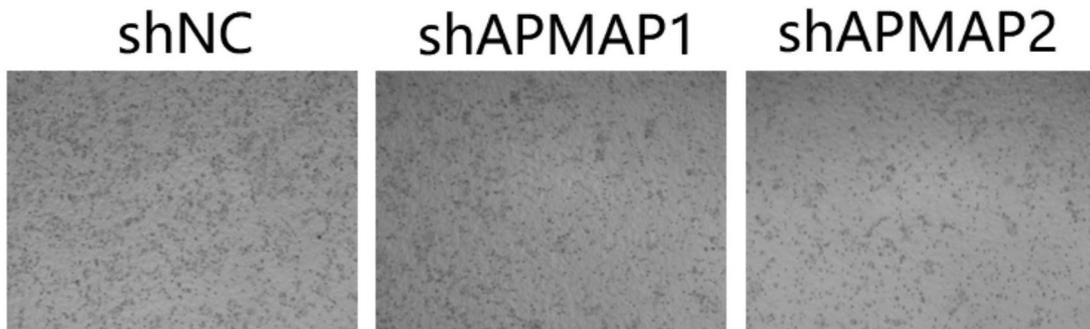


图9

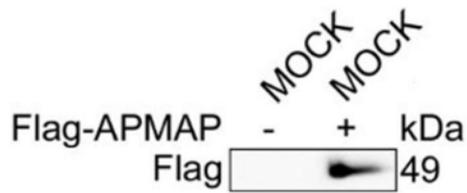


图10

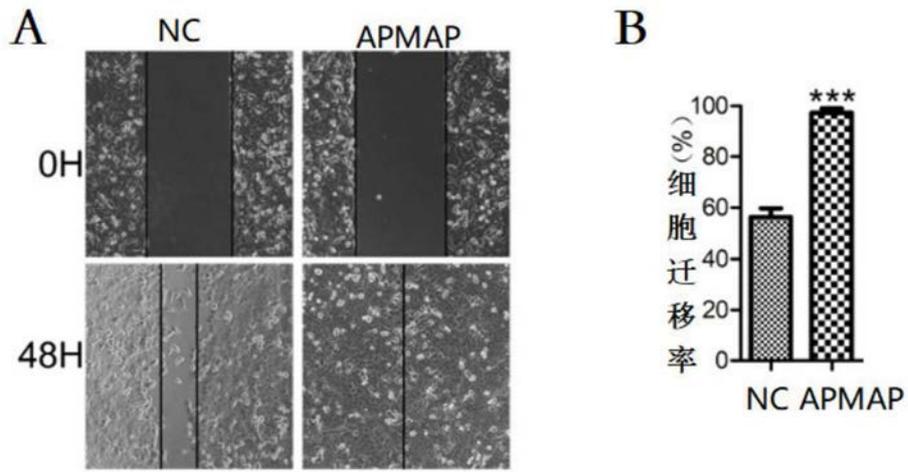


图11

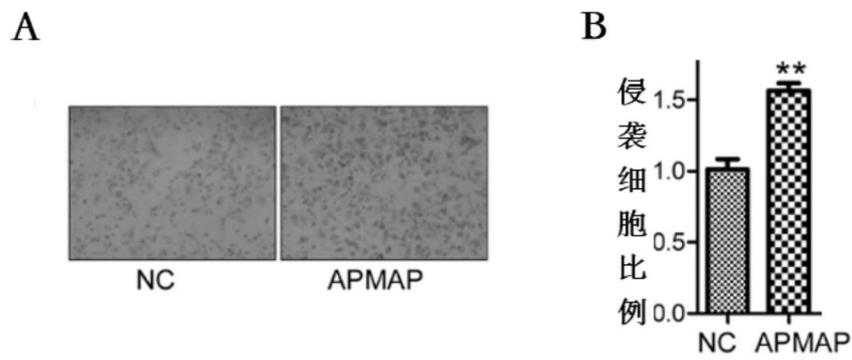


图12

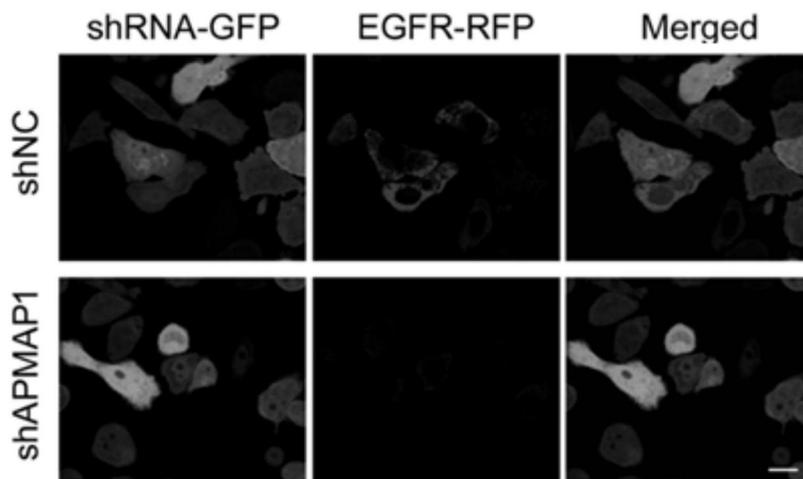


图13

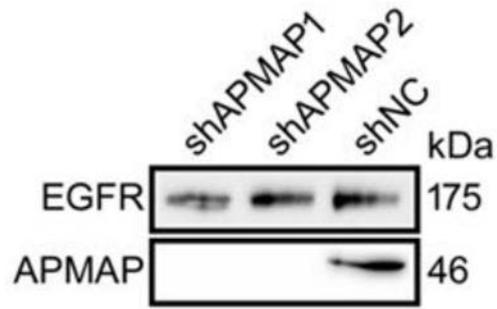


图14

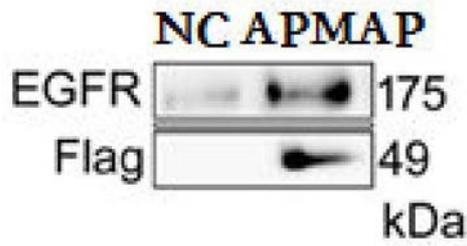


图15

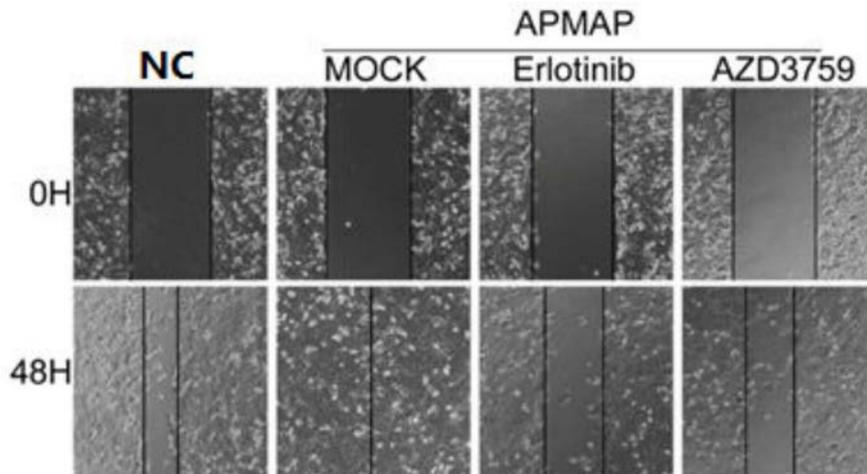


图16

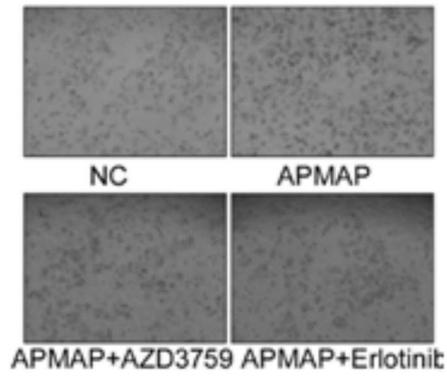


图17