



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116270710 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202310124261.3

(22) 申请日 2023.02.16

(71) 申请人 南方医科大学珠江医院
地址 510250 广东省广州市工业大道中253号

(72) 发明人 钟传帆 毛向明 卢剑铭 龙子宁

(74) 专利代理机构 广州艾维专利商标代理事务所(普通合伙) 44739
专利代理师 黄强

(51) Int. Cl.
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)

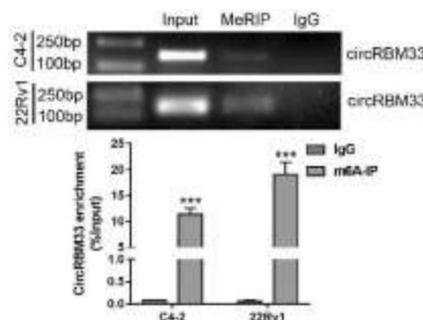
权利要求书1页 说明书11页 附图12页

(54) 发明名称

circRBM33作为靶点在前列腺癌诊断和治疗中的应用

(57) 摘要

本发明涉及circRBM33作为靶点在前列腺癌诊断和治疗中的应用。本发明充分揭示了circRBM33在癌症尤其是前列腺癌细胞中的作用及与其相关调控的靶基因,阐明了circRBM33调控前列腺癌的新机制,找到抑制前列腺癌的关键靶点。本发明对circRBM33在前列腺癌进展过程中的功能作用进行了深入研究,明确了circRBM33对前列腺癌细胞增殖及迁移能力的影响,同时明确了circRBM33对于雄激素受体通路抑制剂(ARSI)治疗的影响。本发明对于前列腺癌的进展机制进行了全新的阐明,对于后期相关药物开发以及临床诊断和治疗提供了全新的思路,具有极大的社会意义及市场前景。



1. circRBM33抑制剂在制备预防和/或治疗前列腺癌产品中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述circRBM33抑制剂选自基于circRBM33基因设计的shRNA。
3. 检测circRBM33表达水平的试剂在制备用于前列腺癌辅助诊断和/或预后评估的产品中的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述检测circRBM33表达水平的试剂包括用于检测circRBM33基因表达水平的引物对。
5. circRBM33抑制剂在制备促进雄激素受体信号通路抑制剂对癌症治疗敏感性的药物中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述癌症选自前列腺癌。
7. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述雄激素受体信号通路抑制剂选自恩扎卢胺,达洛鲁胺,阿帕他胺,阿比特龙中的一种或多种。
8. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述circRBM33抑制剂选自基于circRBM33基因设计的shRNA。
9. 一种用于预防和/或治疗前列腺癌的药物组合物,其特征在于,包括circRBM33抑制剂和FMR1抑制剂。
10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其特征在于,所述circRBM33抑制剂选自基于circRBM33基因设计的shRNA;所述FMR1抑制剂选自基于FMR1基因设计的siRNA。

circRBM33作为靶点在前列腺癌诊断和治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及circRBM33作为靶点在前列腺癌诊断和治疗中的应用。

背景技术

[0002] 前列腺癌(Prostate cancer,PCa)在全球男性恶性肿瘤中发病率排名第二,死亡率排名第五。通过手术或药物降低雄性激素水平的雄性激素阻断疗法(Androgen deprivation therapy,ADT)是目前用于治疗进展期前列腺癌的基石。然而,由于雄性激素受体信号通路异常再激活,所有前列腺癌在ADT治疗后18个月左右都不可避免地发展为去势抵抗性前列腺癌(castration resistant prostate cancer,CRPC)。幸运的是,包括雄激素合成抑制剂(Abiraterone等)和AR拮抗剂(Enzalutamide,Darolutamide,Apalutamide等)在内的一系列雄激素受体信号通路抑制剂(AR signaling inhibitor s,ARSI)已经应用于CRPC治疗,显著延长了患者的生存期限。然而即便如此,由于AR剪接变体或旁路激活,CRPC最终将对ARSI的治疗敏感性降低,逐渐产生耐药性。

[0003] N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine,m6A)是哺乳动物mRNA中最常见的修饰之一。它是一种可逆的表观遗传调控,包含三组催化酶,分别为甲基转移酶、去甲基化酶和m6A识别蛋白。METTL3是甲基转移酶复合物的核心催化单元,有报道称甲基转移酶复合物可调节多种癌症的增殖、转移、血管生成和代谢。FTO是第一个被证实的m6A去甲基化酶,最初被证明在白血病侵袭性中发挥重要作用,随后被证明在多种实体癌中发挥不同的作用。此外,m6A识别蛋白对其相应的结合RNA的稳定性、降解、翻译等过程具有广泛的影响作用,例如YTH DF1可以结合EIF3C mRNA的m6a修饰位点并增加其翻译,从而促进卵巢癌的发生和转移。

[0004] 除了修饰mRNA,m6A也在许多非编码RNA类型中被发现,如环状RNA(circular RNA,circRNA)。circRNA是一种后剪接的非编码RNA,以前被认为是错误加工的产物。然而迄今为止,越来越多的研究表明,circRNA通过不同的方式参与各种疾病的发生和发病,如作为miRNA海绵,与蛋白质相互作用,甚至可以翻译出新的肽段。据报道,m6A修饰不仅有助于环状RNA的合成和核质转运,而且促进了环状RNA与蛋白质的相互作用,甚至赋予了环状RNA翻译能力。相反,circRNA也可以调控m6A修饰,例如circ0008399与WTAP相互作用,促进m6A复合物的组装,增强膀胱癌的顺铂耐药性。因此,m6A修饰与circRNA之间的相互作用是复杂的,因此,迫切需要寻找新的治疗视角,筛选对前列腺癌密切相关的circRNA,并对其作用机制进行深入研究。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术中所存在的癌症尤其是前列腺癌增殖及转移的分子机制不够明确、缺乏有效的治疗手段的技术问题,从而对前列腺癌进展机制进行了研究,针对前列腺癌提供了一种新的预防、治疗及预后评估手段。

- [0006] 为了解决上述技术问题,本发明是通过如下技术方案得以实现的。
- [0007] 本发明第一方面提供了circRBM33抑制剂在制备预防和/或治疗前列腺癌产品中的应用。
- [0008] 作为优选地,所述circRBM33抑制剂选自基于circRBM33基因设计的shRNA。
- [0009] 作为优选地,所述基于circRBM33基因设计的shRNA选自sh-C1、sh-C2中的一种或多种,其中sh-C1序列为:ccggGATGAATTTACAATGA TGActcgagTCATCATTGTAAATTCATCtttttg, sh-C2序列为:ccggGAATTT ACAATGATGACTTctcgagAAGTCATCATTGTAAATTCtttttg。
- [0010] 本发明第二方面提供了检测circRBM33表达水平的试剂在制备用于前列腺癌辅助诊断和/或预后评估的产品中的应用。
- [0011] 作为优选地,所述检测circRBM33表达水平的试剂包括用于检测circRBM33基因表达水平的引物对。
- [0012] 作为优选地,所述引物对的正向引物序列为:GAATTGTATACTCAA GAGTACC,反向引物序列为:CTGGTCAAAGTCATCATTGTA。
- [0013] 应理解的是,在没有特别说明的情况下,在本发明上下文中,所述引物和/或引物对是指用于在PCR中合成circRBM33基因cDNA链的PCR引物,从而用于检测circRBM33基因的RNA表达水平。除本发明所列出的引物和/或引物对外,本领域技术人员完全有能力根据circRBM33的基因序列采用包括但不限于分子生物学等本领域的常规方法手段进行相应引物和/或引物对的设计,并通过常规实验手段对所设计的引物和/或引物对进行筛选,只要能够实现特异性检测circRBM33表达水平即可。
- [0014] 本发明第三方面提供了circRBM33抑制剂在制备促进雄激素受体信号通路抑制剂(ARSI)对癌症治疗敏感性的药物中的应用。
- [0015] 作为优选的,所述癌症选自前列腺癌。
- [0016] 作为优选地,所述雄激素受体信号通路抑制剂选自恩扎卢胺(Enzalutamide),达洛鲁胺(Darolutamide),阿帕他胺(Apalutamide),阿比特龙(Abiraterone)中的一种或多种。
- [0017] 作为优选地,所述circRBM33抑制剂选自基于circRBM33基因设计的shRNA。
- [0018] 作为优选地,所述基于circRBM33基因设计的shRNA选自sh-C1、sh-C2中的一种或多种,其中sh-C1序列为:ccggGATGAATTTACAATGA TGActcgagTCATCATTGTAAATTCATCtttttg, sh-C2序列为:ccggGAATTT ACAATGATGACTTctcgagAAGTCATCATTGTAAATTCtttttg。
- [0019] 本发明第四方面提供了一种用于预防和/或治疗前列腺癌的药物组合物,包括circRBM33抑制剂和FMR1抑制剂。
- [0020] 作为优选地,所述circRBM33抑制剂选自基于circRBM33基因设计的shRNA;所述FMR1抑制剂选自基于FMR1基因设计的siRNA。
- [0021] 作为优选地,所述基于circRBM33基因设计的shRNA选自sh-C1、sh-C2中的一种或多种,其中sh-C1序列为:ccggGATGAATTTACAATGA TGActcgagTCATCATTGTAAATTCATCtttttg, sh-C2序列为:ccggGAATTT ACAATGATGACTTctcgagAAGTCATCATTGTAAATTCtttttg;所述基于FMR1基因设计的siRNA选自si-1、si-2中的一种或多种,其中si-1序列为CCAGAAGACUUACGGCAAATT,si-2序列为GCAUCAAAUGCUUCUGAAATT。
- [0022] 本发明第五方面提供了上述药物组合物在制备预防和/或治疗前列腺癌的药物中

的应用。

[0023] 本发明的发明人通过研究发现,circRBM33在前列腺癌细胞中显著升高,且该升高与前列腺癌患者的不良预后相关;circRBM33表达较高的前列腺癌患者无生化复发(Biochemical recurrence-free,BCR-free)时间显著短于circRBM33表达较高的患者;同时抑制circRBM33后能够在体内外显著抑制前列腺癌细胞的增殖及迁移。临床样本检测表明,circRBM33表达水平与Gleason评分呈正相关,circRBM33高表达预示前列腺癌患者无BCR生存期较差。除此以外,本发明还明确了circRBM33表达水平对ARSI治疗效果具有显著影响,当通过抑制circRBM33的表达以降低细胞内circRBM33的水平时,则能够有效增加了PCa对ARSI治疗的敏感性。

[0024] 作为一种新的表观遗传修饰方式,RNA m6A广泛存在于各种类型的RNA中,且大量研究报道了m6A修饰参与了circRNA的生物发生和多种功能,例如METTL3介导circIGF2BP3的m6A修饰从而使其环状化等。在此,本发明重点研究了m6A修饰与circRNA之间的关系,并研究了它们在前列腺癌进展中的功能作用,证实了circRBM33被METTL3甲基化,然后以m6A方式与FMR1相互作用。而FMR1对circRNA的稳定性没有影响,而是与circRBM33形成二元复合物调控下游靶分子。大量研究表明FMR1蛋白缺失与脆性X染色体综合征(包括智力迟钝、行为异常等)密切相关。目前,越来越多的证据表明FMR1在肿瘤发生和转移中起着重要作用,本发明的结果也一致地表明,沉默FMR1也能抑制前列腺癌细胞的生长和迁移;临床样本检测也提示FMR1的高表达预示前列腺癌患者的无进展生存期更短。本发明的研究表明FMR1的蛋白表达水平与circRBM33的表达水平呈正相关,circRBM33通过m6A方式与FMR1相互作用形成二元复合物,再与PDHA1mRNA结合,增强其稳定性,增加翻译输出,从而加强线粒体呼吸,促进PCa生长和转移;而通过对circRBM33和/或FMR1进行抑制后,将能够有效抑制前列腺癌的进展。

[0025] 本发明相对于现有技术具有如下技术效果:

[0026] (1) 本发明对前列腺癌的发病、发展机制进行了深入研究,发现circRBM33的表达水平是一个与前列腺癌高度关联的因素;进而,通过对受试者体内circRBM33进行检测,获得其表达水平指标,从而可以有效对受试者罹患前列腺癌的几率进行合理预测,即circRBM33的表达水平可以作为临床辅助诊断前列腺癌疾病的生物标志物,当前列腺癌表达水平明显增高时,则可以明确受试者为前列腺癌患者或罹患罹患前列腺癌的高风险人群,有效防止疾病的迅速发展和恶化对患者造成不可逆的健康损害。

[0027] (2) 通过对前列腺癌患者体内circRBM33表达水平进行检测,可以判断对患者体内肿瘤分化程度进行合理预测,从而提供个性化的治疗方案,以改善临床治疗效果;也可对患者的预后进行合理评估,为治疗及康复提供合理有效的指导作用。同时,通过抑制circRBM33的表达,能够有效提高前列腺癌对ARSI治疗的敏感性。

[0028] (3) 本发明明确了通过抑制circRBM33表达能够对前列腺癌细胞产生显著的抑制作用,同时明确了circRBM33通过m6A方式与FMR1相互作用形成二元复合物,从而影响前列腺癌的进展;通过对circRBM33和/或FMR1进行抑制后,将能够有效抑制前列腺癌的进展。本发明为人类攻克前列腺癌提供了一个新的药物治疗靶点,为寻找新型前列腺癌诊断相关的肿瘤标记物或新的治疗策略,对于前列腺癌的控制提供新的方向,有助于为后续的药物研发、临床治疗等,具有重要的科学意义。

附图说明

- [0029] 图1为2种前列腺癌细胞系中circRBM33的MeRIP实验结果示意图。
- [0030] 图2为4种前列腺癌细胞系中开展的convergent及divergent引物扩增实验结果示意图。
- [0031] 图3为4种前列腺癌细胞系中开展的RNase R耐受实验结果示意图。
- [0032] 图4为2种前列腺癌细胞系中放线菌素D实验结果示意图。
- [0033] 图5为对前列腺癌患者体内circRBM33表达水平KM分析结果示意图。
- [0034] 图6为不同细胞系中circRBM33表达水平结果示意图。
- [0035] 图7为对细胞内circRBM33进行过表达或抑制结果示意图。
- [0036] 图8为抑制circRBM33对前列腺癌细胞增殖影响结果示意图。
- [0037] 图9为抑制circRBM33对前列腺癌细胞克隆形成影响结果示意图。
- [0038] 图10为抑制circRBM33对前列腺癌细胞迁移影响结果示意图。
- [0039] 图11为circRBM33过表达对前列腺癌细胞增殖影响结果示意图。
- [0040] 图12为circRBM33过表达对前列腺癌细胞克隆形成影响结果示意图。
- [0041] 图13为circRBM33过表达对前列腺癌细胞迁移影响结果示意图。
- [0042] 图14为circRBM33对小鼠皮下瘤生长影响结果示意图。
- [0043] 图15为抑制circRBM33对ARSI治疗活性影响结果示意图。
- [0044] 图16为抑制circRBM33联合Enzalutamide对小鼠皮下瘤生长影响结果示意图。
- [0045] 图17为抑制circRBM33联合Darolutamide对小鼠皮下瘤生长影响结果示意图。
- [0046] 图18为2种前列腺癌细胞系中circRBM33的FISH亚定位结果示意图。
- [0047] 图19为2种前列腺癌细胞系中circRBM33在胞核和胞质中表达结果示意图。
- [0048] 图20为circRBM33和FMR1共定位实验结果示意图。
- [0049] 图21为对circRBM33和FMR1的ChIRP分析结果示意图。
- [0050] 图22为对前列腺癌细胞内FMR1进行RIP分析结果示意图。
- [0051] 图23为通过MeRIP分析以证实METTL3在circRBM33的m6A修饰中的作用。
- [0052] 图24为通过FMR1-RIP实验证实circRBM33以m6A依赖性方式与FMR1相互作用。
- [0053] 图25为利用siRNA对FMR1进行抑制的WB结果示意图。
- [0054] 图26为抑制FMR1对前列腺癌细胞增殖影响结果示意图。
- [0055] 图27为抑制FMR1对前列腺癌细胞克隆形成影响结果示意图。
- [0056] 图28为抑制FMR1对前列腺癌细胞迁移影响结果示意图。
- [0057] 图29为对不同FMR1表达水平前列腺癌患者DFS分析结果示意图。
- [0058] 图30为不同Gleason评分的前列腺癌组织circRBM33表达水平结果示意图。
- [0059] 图31为不同Gleason评分的前列腺癌组织FMR1免疫组化分析结果示意图。
- [0060] 图32为不同circRBM33表达水平前列腺癌组织中FMR1评分差异情况结果示意图。
- [0061] 图33为利用卡方检验证实circRBM33与FMR1表达相关性结果示意图。
- [0062] 图34为FMR1敲低表达后对circRBM33过表达细胞中PDHA1的表达影响结果示意图。
- [0063] 图35为circRBM33和FMR1对前列腺癌细胞增殖影响结果示意图。
- [0064] 图36为circRBM33和FMR1对前列腺癌细胞克隆形成影响结果示意图。
- [0065] 图37为circRBM33和FMR1对前列腺癌细胞迁移影响结果示意图。

具体实施方式

[0066] 为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下参照实施例对本发明作进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0067] 在无特别说明的情况下,本发明上下文中所列出的包括PC-3、C4-2、DU145、22Rv1等前列腺癌细胞系从BeNa Culture Collection购入,其中C4-2和22Rv1在含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中培养;PC-3和DU145在含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中培养。RWPE-1从iCell Bioscience购入,培养于包含0.05mg/mL牛垂体提取物和5ng/mL人重组表皮生长因子的无角质细胞血清培养基(K-SFM)中。所有细胞系均通过中国典型培养物保藏中心(武汉)的短串联重复分析鉴定,并使用PCR检测试剂盒(上海Biothrive Sci)验证是否存在支原体污染,同时在液氮中冷冻保存并用于后续实验。本发明所使用的试剂中,均通过市售获得。对于临床标本的使用,均与患者签署了知情同意书,相关程序及方法符合医学伦理学要求以及药物临床试验质量管理规范,并经过南方医科大学珠江医院伦理委员会批准。本发明所使用的实验方法,例如生物信息学分析、核酸提取、转录组测序、引物设计、肿瘤细胞培养、PCR、慢病毒载体构建、细胞转染、Westernblot、分子克隆、小分子干扰技术、免疫组化、免疫荧光染色、细胞增殖实验、细胞迁移实验、细胞克隆形成实验、荧光原位杂交实验、甲基化RNA免疫沉淀实验、RIP实验等均为本领域的常规方法和技术,且动物实验的开展均经过了南方医科大学珠江医院动物保护委员会的批准。

[0068] 生物学实验重复中选择具有代表性的结果呈现在上下文附图中,数据按照图示中规定的以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 和 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 展示。所有实验至少重复三次。数据采用GraphPad Prism 9.0或SPSS 20.0软件进行分析。采用t检验、卡方检验、秩和检验、方差分析等常规医学统计学方法比较两组或两组以上的平均值差异。 $p < 0.05$ 被认为差异具有显著性。

[0069] 实施例1与前列腺癌相关靶点的筛选

[0070] 为了明确m6A相关的能够用于前列腺癌治疗及预后评估的circRNA种类,首先获得前列腺癌患者组织中所有circRNA的表达矩阵,筛选出具有高丰度特性的circRNA(FPKM < 0.5)。随后,在包含随访数据的circRNA数据中筛选出与前列腺癌生化复发有关的环状RNA,共计筛选到1382个符合标准的circRNA;接下来,采用前列腺癌细胞进行甲基化RNA免疫共沉淀测序(methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP)实验,以研究m6A相关的circRNA谱,具体步骤如下:

[0071] (1) 采用甲基化RNA免疫沉淀试剂盒(BersinBio, Bes5203)和RNA免疫沉淀试剂盒(BersinBio, Bes5101)进行MeRIP检测,其中总RNA用Trizol分离,用超声波细胞干扰器分离到约300bp。

[0072] (2) 将RNA片段在垂直旋转器中4°C下与抗N6-甲基腺苷抗体共免疫沉淀4h,与蛋白A/G珠孵育1h,55°C下蛋白酶K洗脱45min,得到m6a修饰的RNA。

[0073] (3) 将收集的细胞在冰上用裂解缓冲液裂解,并用DNase去除DNA。随后,用anti-m6A抗体在4°C下免疫沉淀4h,用蛋白A/G珠孵育1h,用蛋白酶K在55°C下洗脱45min,最后用转录组二代测序技术检测所得的RNA样本。

[0074] 通过上述MeRIP-seq共计获得355个与m6A相关的circRNA;最后,通过维恩图获得

了与m6A相关的具有预后评估价值的circRNA,即circRBM33(hsa_circ_0001771)。编码circRBM33的基因位于7号染色体上,转录本序列包含4个外显子(即2、3、4、5号外显子),由2号和5号外显子反向剪接而成。通过对MeRIP-seq数据进行motif分析,以明确可能的m6A结合位点,发现其中两个motif可能是潜在的靶点。

[0075] 随后,通过m6A-RNA免疫共沉淀(MeRIP)实验以明确circRBM33是否能够被m6A所修饰,结果如图1所示。结果显示,在2种前列腺癌细胞(22Rv1,C4-2)中,circRBM33片段均出现在m6a抗体泳道和Input泳道而非IgG泳道中,表明circRBM33能够被m6a修饰。为了进一步验证上述结果,在4种前列腺癌细胞系的cDNA和gDNA样本中采用convergent和divergent引物进行PCR扩增。结果发现,在4种前列腺癌细胞系中,circRBM33均只能在cDNA中扩增,而无法在gDNA中扩增(参见图2)。接着,通过开展RNase R耐受实验,以比较circRBM33和线性RBM33(linear RBM33)的稳定性,具体步骤如下:

[0076] (1)以2mg/mL放线菌素D(Sigma,USA)在0、6、12和24小时等梯度时间点分别处理4种前列腺癌细胞系。

[0077] (2)收集相应细胞样本的总RNA;加入RNase R(2U/ μ g RNA)在37°C条件下酶切30min。

[0078] (3)通过qPCR检测上述基因的表达水平。

[0079] 结果显示,经RNase R处理后,circRBM33比线性RBM33更稳定(参见图3)。另一方面,放线菌素D试验则同样显示,circRBM33相对于线性RBM33的稳定性更好(参见图4),结果与上述一致。

[0080] 在明确了circRBM33的基本性质之后,需要明确其在前列腺癌中是否能够发挥关键的预后评估作用。对此,在公共前列腺癌患者队列中使用Kaplan-Meier(KM)方法对circRBM33表达进行生存预后分析,根据circRBM33表达量中位数将PCa患者分为两个亚组:即circRBM33高表达组和circRBM33低表达组,结果如图5所示。结果显示,因此,circRBM33高表达组的BCR-Free生存率显著差于circRBM33低表达组的患者($p < 0.05$)。通过对circRBM33表达水平与前列腺癌的一些临床病理特征之间的关系的研究发现,circRBM33表达水平在一定程度上与Gleason评分以及肿瘤的进展呈正比(图中未示出)。综合上述研究可以明确,circRBM33能够被m6A所修饰,能够作为评估前列腺癌BCR预后的关键指标。

[0081] 实施例2 circRBM33在前列腺癌细胞中的表达情况研究

[0082] 为了确定circRBM33在体外和体内PCa中的潜在作用,首先通过qPCR实验检测了四种前列腺细胞系中circRBM33的表达水平。检测结果如图6所示。结果显示,circRBM33在正常前列腺组织细胞中低表达,而在前列腺癌细胞中明显高表达($**p < 0.01$, $***p < 0.0001$)。而在四种前列腺癌细胞系中,22Rv1和DU145细胞中展现出非常显著的circRBM33高表达水平,C4-2和PC-3细胞中则表达水平相对较低。对此,基于circRBM33序列设计shRNA,分别为shC1(序列为:ccggGATGAATTTACAATGATGActcgagTCATCATTGTAATTCATCtttttg)和shC2(序列为:ccggGAATTTACAATGATGACTTctcgagAAGTCATCATTGTA AATTCtttttg),将其分别转染至22Rv1和DU145细胞中对circRBM33进行表达沉默,使用sh-NC(空载体)作为阴性对照;同时利用慢病毒载体在C4-2和PC-3细胞中对circRBM33进行过表达,以cir5作为阴性对照。结果如图7所示,结果显示,sh-C1和sh-C2能够成功抑制circRBM33的表达,降低细胞内circRBM33的水平;慢病毒转染后的C4-2和PC-3细胞内circRBM33的表达水平则得到明

显提升。同时还发现,在转录水平上,慢病毒转染仅对circRBM33的表达水平具有调控作用,而对线性RBM33无任何影响(图中未示出)。

[0083] 实施例3circRBM33对体内外前列腺癌行为和功能的影响

[0084] 从前述实施例中可以预期,circRBM33对于前列腺癌的进展可能具有一定的促进作用,即circRBM33在前列腺癌疾病的进展过程中发挥着促癌因子的角色。为了验证该结论,通过一系列的体外实验来加以佐证。

[0085] 通过设计靶向circRBM33的shRNA,研究其对前列腺癌细胞增殖的影响,具体步骤如下:

[0086] (1)将靶向circRBM33的shRNA(sh-C1和sh-C2)分别转染至22Rv1和DU145细胞中;

[0087] (2)待细胞生长至对数期时,胰酶消化并计数,按各种细胞的倍增时间选择合适的细胞密度,接种到96孔板中(3个重复);

[0088] (3)于37℃培养箱中进行培养,并分别于24h、48h、72h以及96h按CCK-8:培养基(10 μL:90 μL)的比例加入含CCK-8的培养基,将培养板在培养箱内孵育2h,测定450nm吸光度,评估细胞的增殖状况。

[0089] 结果如图8所示。结果显示,在利用shRNA对circRBM33进行沉默后,前列腺癌细胞的增殖能力显著减弱,可显著抑制前列腺癌细胞生长,使得前列腺癌细胞的增殖活性明显降低,差异具有统计学意义(**p<0.01)。

[0090] 随后,通过靶向circRBM33的shRNA,研究其对前列腺癌细胞克隆形成的影响,具体步骤如下:

[0091] (1)将靶向circRBM33的shRNA(sh-C1和sh-C2)分别转染至22Rv1和DU145细胞中;

[0092] (2)待细胞生长至对数期时,胰酶消化并计数,按各种细胞的倍增时间选择合适的细胞密度,接种到含2mL 37℃预温培养液的六孔板中,并轻柔前后及左右晃动,使细胞分散均匀,置于37℃含5%CO₂的细胞培养箱中培养;

[0093] (3)当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去上清液,用PBS小心浸洗2次,每孔加入含0.5%结晶紫的甲醇1mL,染色30min;弃甲醇,用水清洗残留的甲醇;即可观察到细胞克隆;显微镜下观察,细胞数>50个才计为一个有效克隆。

[0094] 检测结果如图9所示。结果显示,相较于空白载体sh-NC组,在利用shRNA对circRBM33进行沉默后,前列腺癌细胞的克隆形成能力显著减弱,可显著抑制前列腺癌细胞克隆形成,差异具有统计学意义(**p<0.01,***p<0.001)。

[0095] 进一步地,通过靶向circRBM33的shRNA,研究其对前列腺癌细胞迁移的影响,具体步骤如下:

[0096] (1)待细胞生长至对数期时,胰酶消化并计数,按各种细胞的倍增时间选择合适的细胞密度,用无血清培养基稀释细胞,制成细胞悬液;

[0097] (2)按照每孔200 μL,将细胞悬液加入上室,同时在下室加入含10% FBS的培养基500 μL,放入37℃培养箱培养;

[0098] (3)24/48小时后取出,吸去上室多余液体,用PBS清洗两次,用棉棒在上室中轻轻转动,吸干水分并擦去膜内侧的细胞;

[0099] (4)在上室中加入0.5%结晶紫染液,染色20min,回收染液,用PBS缓缓冲去染液,再次用棉棒在上室中轻轻转动,吸干水分;

[0100] (5) 在正置显微镜上放置一块载玻片,将细胞小室倒置于载玻片上,在100倍视野下进行拍照,对膜的上下左右及中间计数。

[0101] 检测结果如图10所示。结果显示,无论是对于22Rv1细胞还是DU145细胞,相较于空白载体sh-NC组,在利用shRNA抑制细胞内circRBM33的表达水平后,均能够显著抑制前列腺癌细胞的迁移能力,该差异具有统计学意义(**p<0.01,***p<0.001)。

[0102] 随之,采用实施例2中的慢病毒转染的方式分别转染PC-3和C4-2细胞,重复上述细胞增殖、克隆形成和细胞迁移实验,结果分别如图11-13所示。结果显示,在经慢病毒转染后,PC-3和C4-2中circRBM33表达水平得到了显著提高,而circRBM33的过表达则显著增加了前列腺癌的增殖活力、克隆形成水平和迁移能力(**p<0.01,***p<0.001)。综合上述结果可以明确,circRBM33对于前列腺癌细胞的功能活性具有显著影响,通过抑制circRBM33的表达,则能够有效抑制前列腺癌的增殖、克隆和转移,而当circRBM33过表达时,则能够显著促进前列腺癌的增殖、克隆和转移。由此可知,circRBM33为一个与前列腺癌进展密切相关的靶点,通过对其进行干预,则能够有效抑制前列腺癌的进展等过程。

[0103] 为了研究circRBM33在体内对前列腺癌的作用,选择4周龄的BALB/c-nu小鼠进行体内实验,具体步骤如下:

[0104] 首先,在第7天后每3天测量一次肿瘤体积,到第28天结束时,处死所有小鼠进行解剖和肿瘤测量。

[0105] (1) 实验前一天,将已经分装好的Matrigel基质胶从-20℃提前放入4℃冰箱过夜,使其从固体状态融化为液体状态。

[0106] (2) 取20只4周龄BALB/c-nu小鼠,随机分为4组,记为组1-组4,分别于背部皮下注射混合有Matrigel基质胶的circRBM33上调或circRBM33沉默的前列腺癌细胞;其中组1小鼠皮下注射circRBM33过表达的PC-3细胞,组2小鼠皮下注射含3_cir5的PC-3作为阴性对照,组3小鼠皮下注射circRBM33表达抑制的22Rv1细胞,组4小鼠皮下注射含sh-NC的22Rv1细胞作为阴性对照。

[0107] (3) 每日观察小鼠生长及精神状况,在注射7天后每3天测量一次各组小鼠的肿瘤大小,计算肿瘤体积,其中肿瘤体积采用如下公式计算:Volume(mm³)=Length(mm)×Width²(mm²)/2。

[0108] (4) 第28天时处死小鼠,过量麻醉处死小鼠后剥离各组小鼠肿瘤并拍照和测量体积。

[0109] 实验结果如图14所示。结果显示,circRBM33的过表达显著上调促进了肿瘤体积和生长速率,而对circRBM33进行表达抑制则有效阻碍了肿瘤的进展。

[0110] 现有研究发现,去势抵抗性前列腺癌细胞具有更强的线粒体代谢能力,从而导致氧化磷酸化增加,使它们容易受到线粒体代谢治疗的影响。鉴于circRBM33对线粒体呼吸有间接影响,通过评估沉默circRBM33以研究是否会影响PCa细胞对ARSI的敏感性。为了评估PCa细胞对ARSI的反应,在细胞培养中使用了两种ARSI,即Enzalutamide和Darolutamide(参见图15)。随着给药浓度的增加,前列腺癌细胞的生长呈下降趋势,相比之下,在circRBM33表达抑制的细胞中,细胞生长受到抑制更为明显,即circRBM33能够有效增强ARSI对前列腺癌的治疗效果。

[0111] 随后,通过皮下注射circRBM33表达抑制细胞(sh-C1)和阴性对照细胞(sh-NC)到

BALB/c-nu小鼠皮下诱导异种移植瘤,待成瘤后将随机小鼠分为两个小组,分别采用Enzalutamide和DMSO进行灌胃给药处理,定期监测小鼠状态、测量小鼠肿瘤体积。一个月后处死小鼠,绘制小鼠肿瘤生长曲线,测量小鼠重量和体积。实验结果如图16所示,结果显示,与前述实验相一致,即与阴性对照组相比,下调circRBM33的表达能够有效抑制小鼠体内肿瘤的生长;同时,circRBM33表达抑制能够更加有效地增加Enzalutamide的抗肿瘤活性。采用Darolutamide重复上述实验,获得的结果与之相似(参加图17),由此证明通过抑制circRBM33确实能够提高ARSIs的治疗效果。

[0112] 实施例4 circRBM33的作用机制研究

[0113] 为了探寻circRBM33如何对前列腺癌产生影响,进而对其作用机制做了深入研究。首先,通过FISH(Fluorescence in Situ Hybridization, 荧光原位杂交)检测细胞中circRBM33的亚定位,其中Cy3标记的circRBM33和18S探针(细胞质指示剂)由GenePharm公司合成,实验所采用的试剂盒为RiboTM荧光原位杂交试剂盒(RIBOBI 0,C10910),具体实验步骤如下:

[0114] (1) 将前列腺癌细胞(PC-3、C4-2)用4%多聚甲醛固定,然后用1% Triton预冷穿孔。

[0115] (2) 预杂交缓冲液室温孵育30min,37℃混合20μM探针的杂交缓冲液孵育过夜。

[0116] (3) 依次采用4×SSC、0.1% Tween-20、2×SSC和1×SSC缓冲液洗涤细胞,并用含DAPI的抗荧光猝灭剂(P0131)染色。

[0117] 结果如图18所示。结果显示,circRBM33主要定位于前列腺癌细胞质中。此外,核质分离提取实验的结果与上述FISH结果一致:circRBM33主要定位于细胞质中(参见图19)。

[0118] 随后通过catRAPID和CircInteractome进行生物信息学分析发现,FMR1(也被称为FMRP(Fragile X Mental Retardation Protein))可能与circRBM33可能存在相互作用。对此,采用FISH实验对circRBM33和FMR1共定位实验,具体步骤如下:

[0119] (1) 将前列腺癌细胞(PC-3、C4-2)用4%多聚甲醛固定,然后用1% Triton预冷穿孔。

[0120] (2) 预杂交缓冲液室温孵育30min,37℃混合20μM探针的杂交缓冲液孵育过夜。

[0121] (3) 依次采用4×SSC、0.1% Tween-20、2×SSC和1×SSC缓冲液洗涤细胞,将细胞用1%牛血清白蛋白(BSA)溶液在室温下封闭30分钟,然后与anti-FMR1的一抗在4℃下孵育过夜。

[0122] (4) 用Coralite488标记的二抗(Proteintech,SA00013)孵育细胞,DAPI染色,使用共聚焦成像系统(ZEISS,LSM 900)进行共定位观察。结果显示,circRBM33与FMR1确实可能存在相互作用(参见图20)。

[0123] 为了验证FMR1是否是和circRBM33相互作用的分子之一,通过设计针对circRBM33的探针,用于ChIRP分析(BersinBio,Bes5104),以锁定与circRBM33相互作用的分子,具体步骤如下:

[0124] (1) 收集细胞用4%甲醛溶液交联,并在室温下用甘氨酸中和。

[0125] (2) 用含蛋白酶和RNase抑制剂的裂解缓冲液对细胞进行裂解。

[0126] (3) 将细胞裂解液通过超声进行破碎,并在4℃下用琼脂糖珠预清除。

[0127] (4) 将靶向circRBM33的探针和阴性对照探针与细胞裂解液杂交,并用链霉亲和素

磁珠孵育。

[0128] (5)将下拉的的RNA和蛋白质样品分别进行qRT-PCR和WB鉴定。

[0129] 检测结果如图21所示。结果显示,从ChIRP样本中分离出的RN A即为circRM33,且从ChIRP样本中分离出的蛋白经WB检测发现,FMR1为circRBM33的RBP之一。随后通过对anti-FMR1进行可RIP检测,明确了FMR1与circRBM33之间存在分子结合作用(参见图22)。

[0130] 由于METTL3是m6A修饰中最重要的调控因素之一,对此,通过采用sh-METTL3(序列为ccggGCTGCACTTCAGACGAATTATctcgagATAATT CGTCTGAAGTGCAGCtttttt)对METTL3进行沉默表达以研究circRBM33是否以m6A依赖的方式与FMR1相互作用。结果显示,当METTL3表达水平下调时,MeRIP样品中均无法检测出含circRBM33潜在结合位点序列的M1和M2,说明METTL3参与了circRBM33的m6A修饰(参见图23)。随后的FMR1-RIP实验结果显示,抑制METTL3的表达破坏了FMR1和circRBM33之间的结合(参见图24),由此可以明确MET TL3参与FMR1和circRBM33的相互作用,证明circRBM33以m6A依赖的方式与FMR1相互作用。

[0131] 实施例5

[0132] 前述实施案例中验证了circRBM33与FMR1存在相互作用,为了明确FMR1是否会影 响前列腺癌进展,对此在22Rv1和DU145细胞中通过siRNA (si-1,si-2,其中si-1序列为 CCAGAAGACUUACGGCAAAT T,si-2序列为GCAUCAAAUGCUUCUGAAATT,si-NC为空白对照)转染构 建了FMR1表达沉默的细胞(参见图25)。随后通过靶向FMR1的siRNA,研究其对前列腺癌细胞 增殖、克隆形成和迁移的影响,具体步骤参见实施例3。

[0133] 结果如图26-28所示。其中细胞增殖实验结果显示,在利用siR NA对FMR1进行沉默 后,前列腺癌细胞的增殖能力显著减弱,可显著抑制前列腺癌细胞生长,使得前列腺癌细胞的 增殖活性明显降低,差异具有统计学意义。克隆形成实验结果显示,相较于空白载体si- NC组,在利用siRNA对FMR1进行沉默后,前列腺癌细胞的克隆形成能力显著减弱,可显著抑 制前列腺癌细胞克隆形成,差异具有统计学意义(** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$)。细胞迁移 实验结果显示,无论是对于22Rv1细胞还是DU145细胞,相较于空白载体si-NC组,在利用 siRNA抑制细胞内FMR1的表达水平后,均能够显著抑制前列腺癌细胞的迁移能力,该差异具 有统计学意义(** $p < 0.01$,**** $p < 0.001$)。

[0134] 通过对临床样本的分析发现,体内FMR1表达水平低的患者比FM R1表达水平高的 患者拥有更好的DFS,这表明FMR1与前列腺癌的不良预后有关(参见图29)。而进一步的分析 发现,在前列腺癌患者肿瘤组织中circRBM33表达水平明显高于正常组织,且Gleason评分 越高,circRBM33表达量越高(参见图30)。免疫组化结果显示,肿瘤组织中FMR1水平显著高 于正常组织,且恶性程度越严重,FMR1表达量越高(参见图31)。此外,circRBM33低表达组和 circRBM33高表达组之间FMR1评分存在显著差异(参见图32)。circRBM33高表达组患者的肿 瘤组织比circRBM33低表达组患者的肿瘤组织相比具有更高的FMR1评分。对此,利用卡方检 验证实circRBM33与FMR1在前列腺癌中存在明显的正相关(参见图33)。由此可以假设, circR BM33可能通过与FMR1相互作用形成一个复合物,从而在PCa中共同发挥其促肿瘤作 用,而通过对circRBM33和/或FMR1进行抑制后,将能够有效抑制前列腺癌的进展。

[0135] 为了验证上述假设,通过在circRBM33过表达的前列腺癌细胞中使用siRNA敲除 FMR1,以研究FMR1在circRBM33介导的恶性表型中的作用,结果如图34所示,结果显示,FMR1 敲除后可以显著抑制circRBM33过表达细胞中PDHA1的表达。而一系列的细胞实验则证实

了,FMR1表达的降低可以有效抑制前列腺癌细胞的增殖、集落形成以及迁移能力,且对因circRBM33过表达导致的前列腺癌细胞功能变化有显著的逆转作用(参见图35-37)。

[0136] 综合上述结果,本发明充分揭示了circRBM33在癌症尤其是前列腺癌细胞中的作用及与其相关调控的靶基因,阐明了circRBM33调控前列腺癌的新机制,找到抑制前列腺癌的关键靶点。本发明对circRBM33在前列腺癌进展过程中的功能作用进行了深入研究,明确了circRBM33对前列腺癌细胞增殖及迁移能力的影响,同时明确了circRBM33对于ARSI治疗的影响。本发明对于前列腺癌的进展机制进行了全新的阐明,对于后期相关药物开发以及临床诊断和治疗提供了全新的思路,具有极大的社会意义及市场前景。

[0137] 以上具体实施方式部分对本发明所涉及的分析方法进行了具体的介绍。应当注意的是,上述介绍仅是为了帮助本领域技术人员更好地理解本发明的方法及思路,而不是对相关内容的限制。在不脱离本发明原理的情况下,本领域技术人员还可以对本发明进行适当的调整或修改,上述调整和修改也应当属于本发明的保护范围。

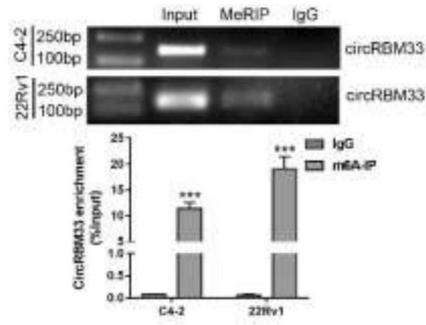


图1

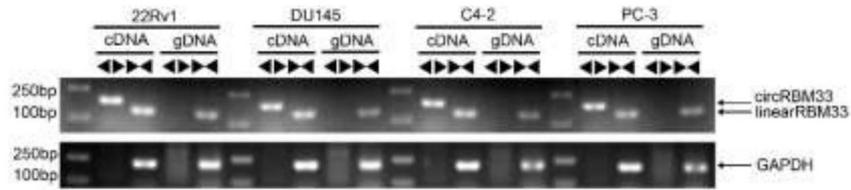


图2

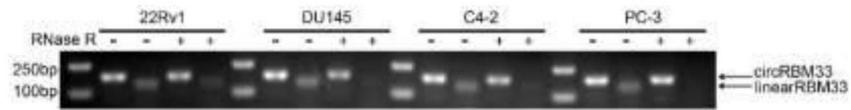


图3

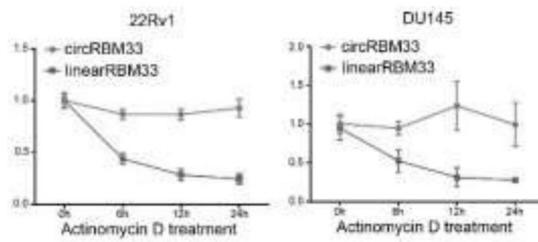


图4

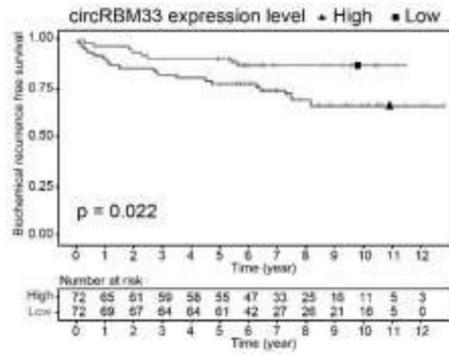


图5

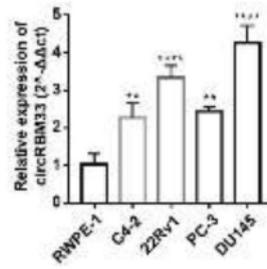


图6

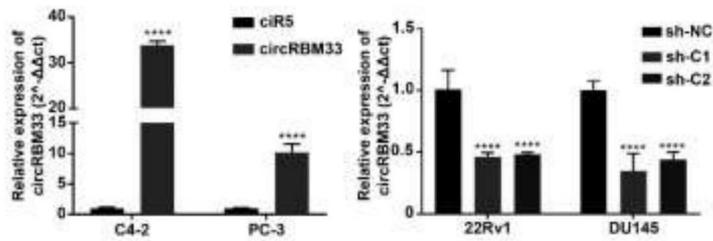


图7

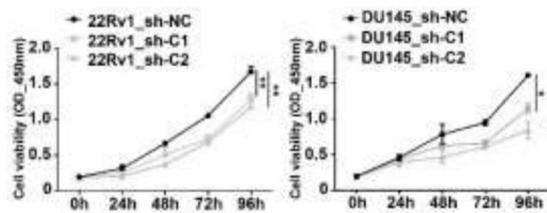


图8

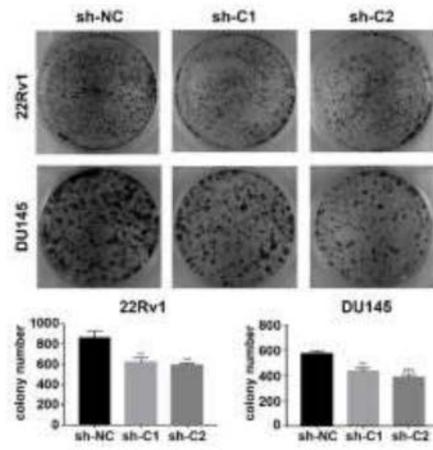


图9

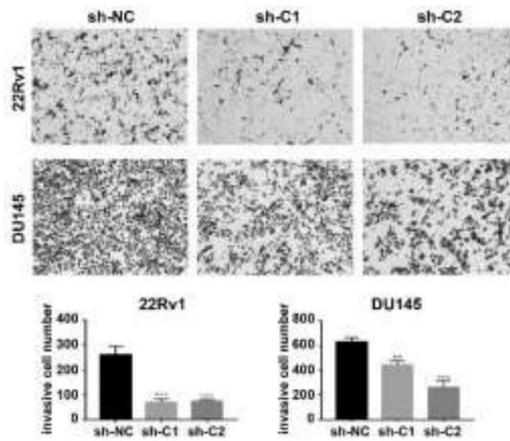


图10

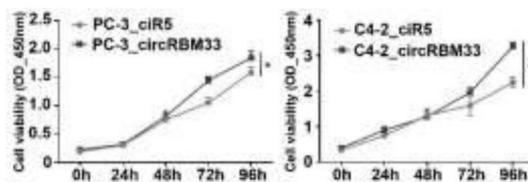


图11

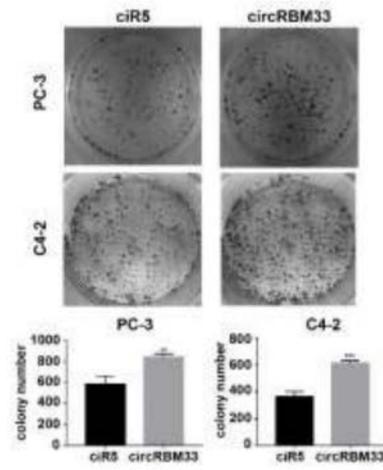


图12

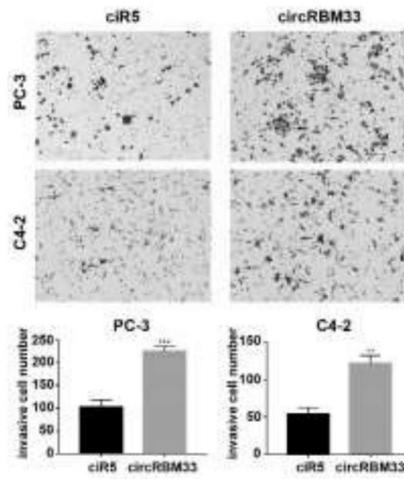


图13

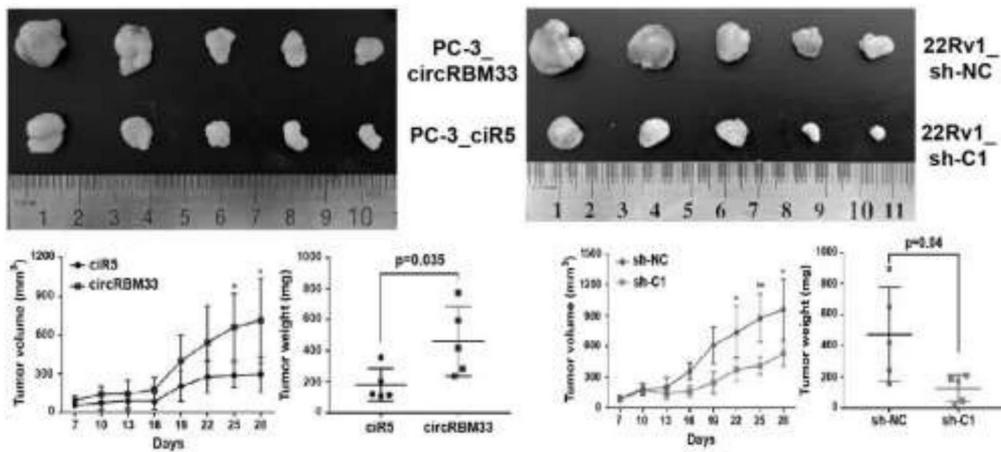


图14

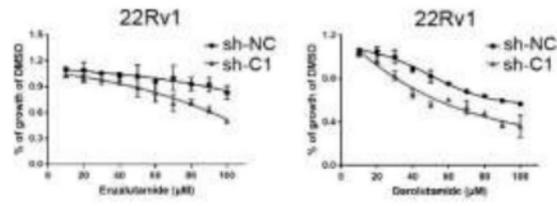


图15

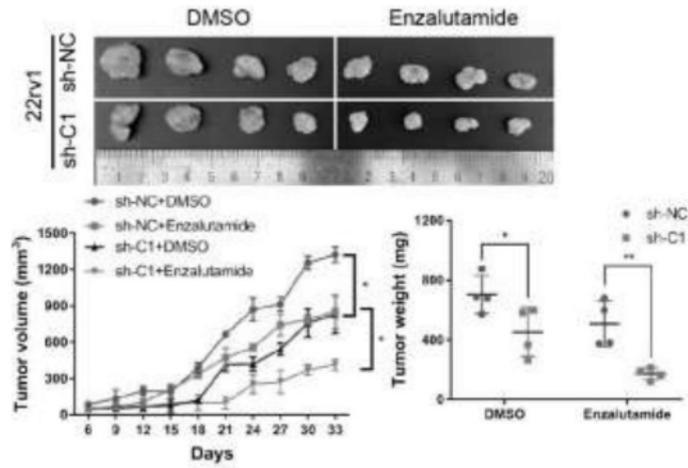


图16

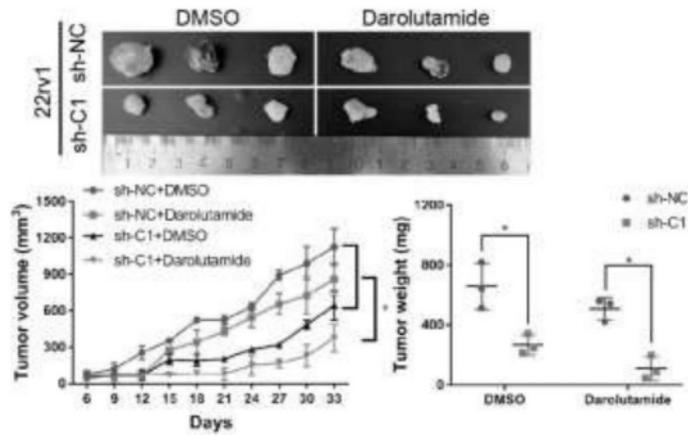


图17

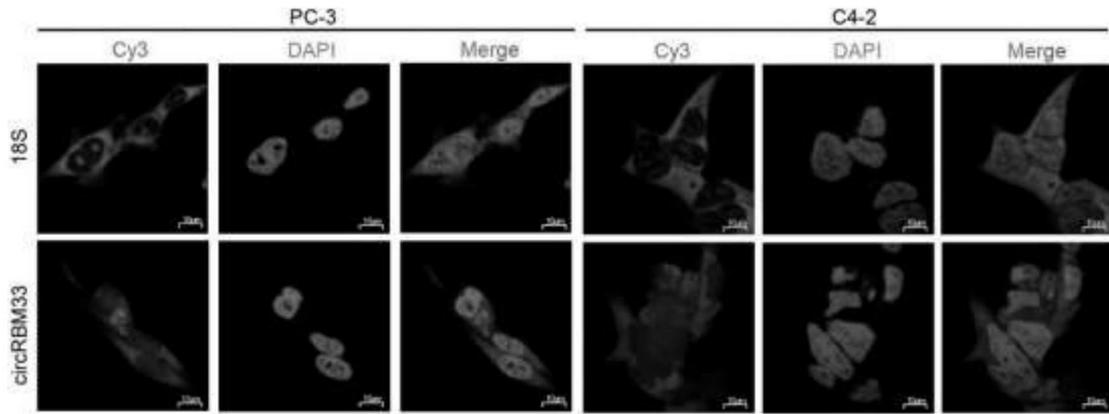


图18

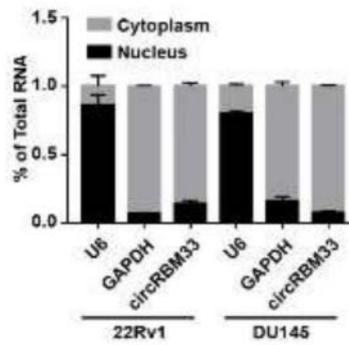


图19

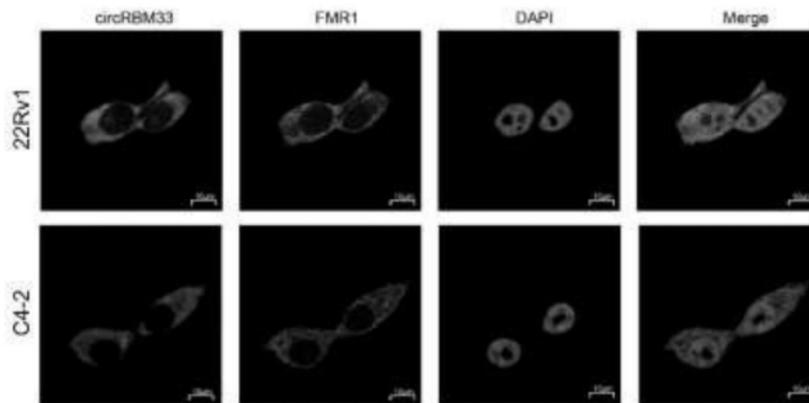


图20

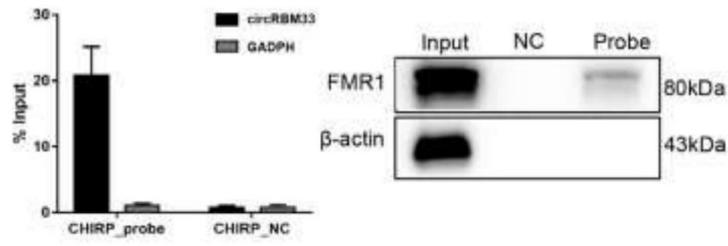


图21

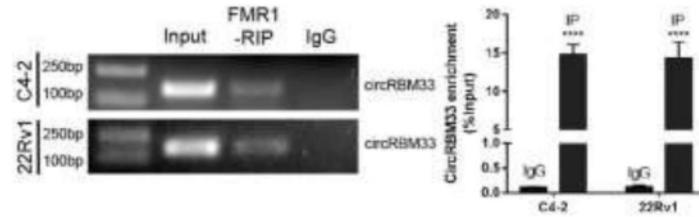


图22

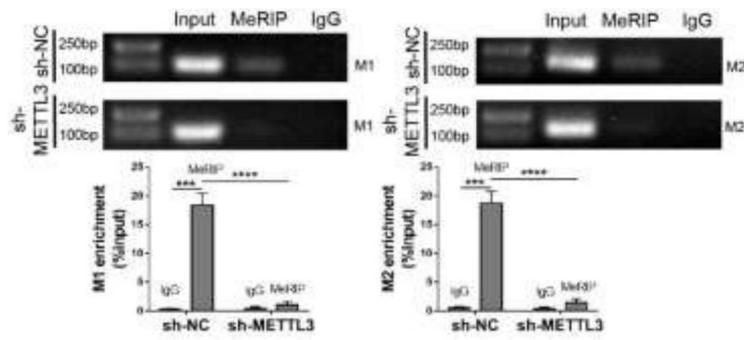


图23

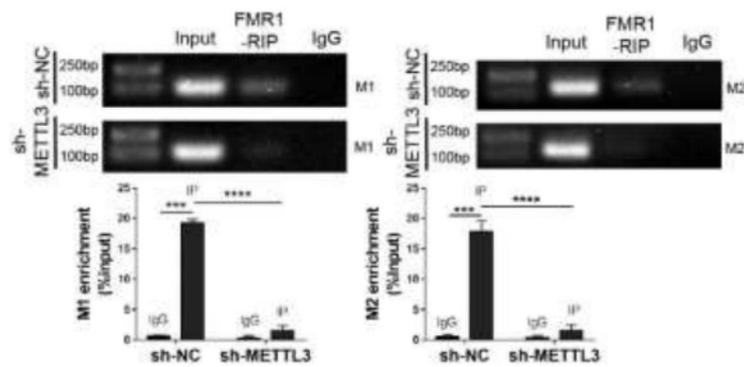


图24

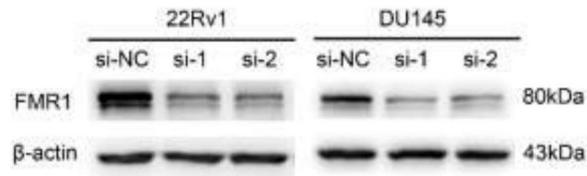


图25

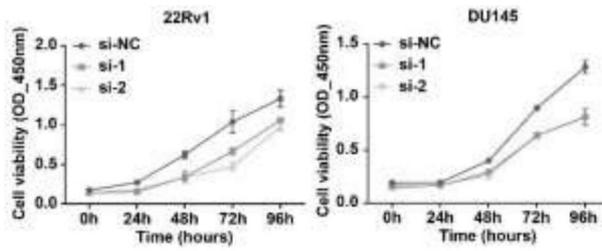


图26

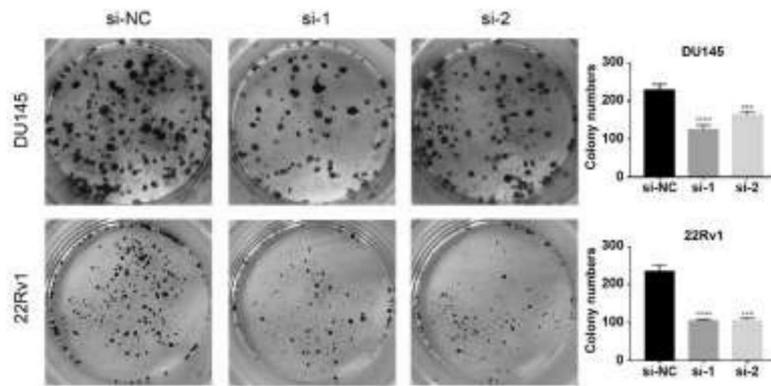


图27

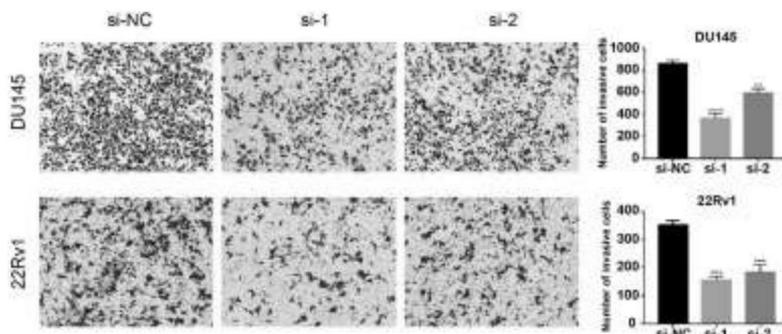


图28

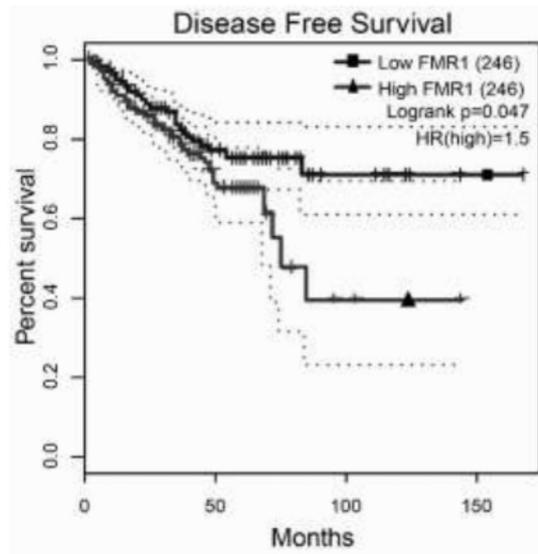


图29

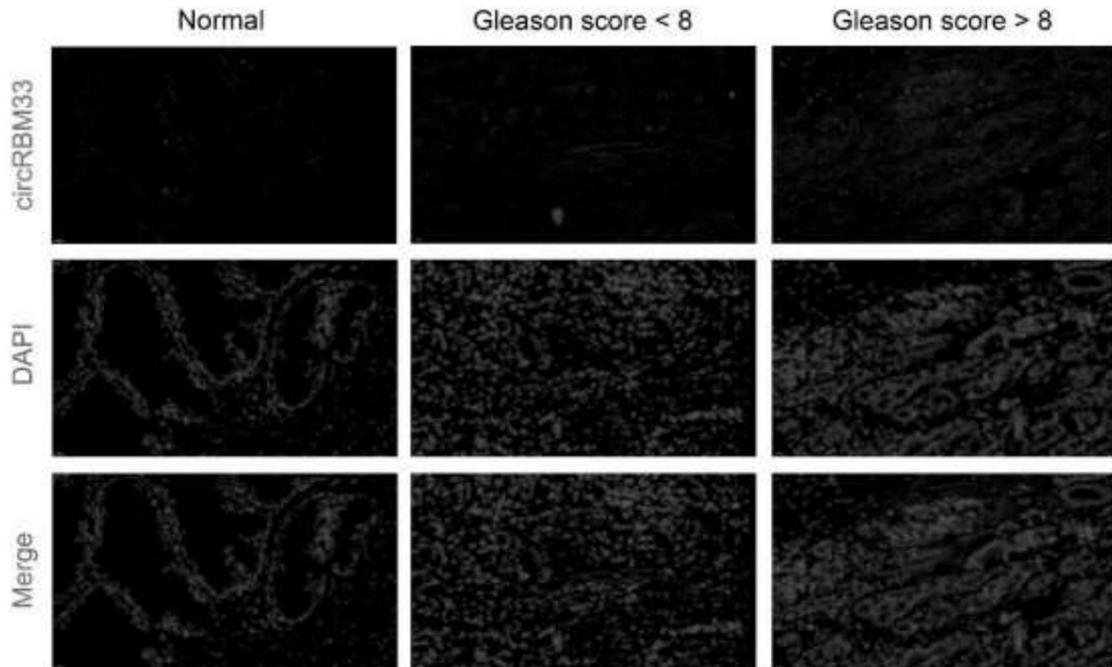


图30

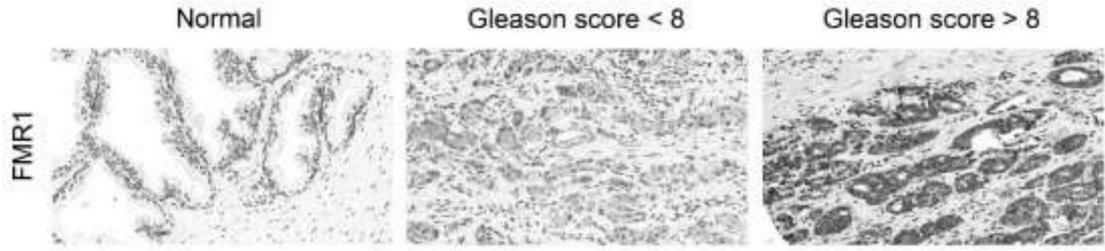


图31

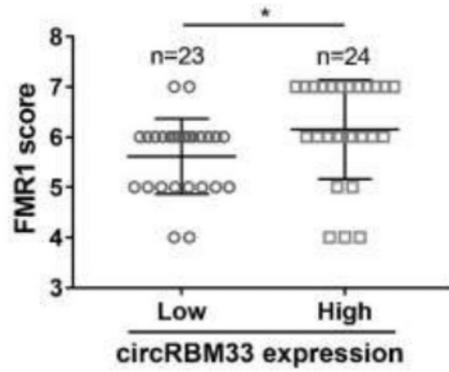


图32

	circRBM33 low expression	circRBM33 high expression
FMR1 low expression	21 (63.6%)	8 (36.4%)
FMR1 high expression	2 (14.3%)	12 (85.7%)

$p < 0.01$

图33

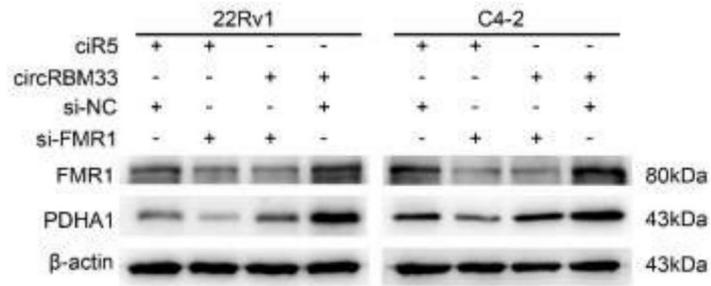


图34

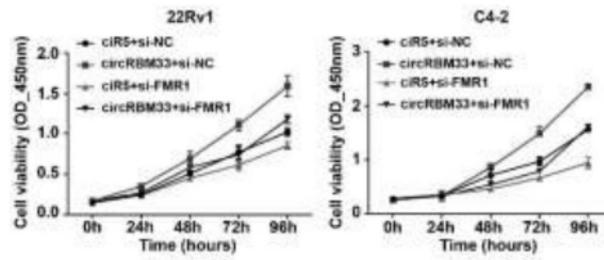


图35

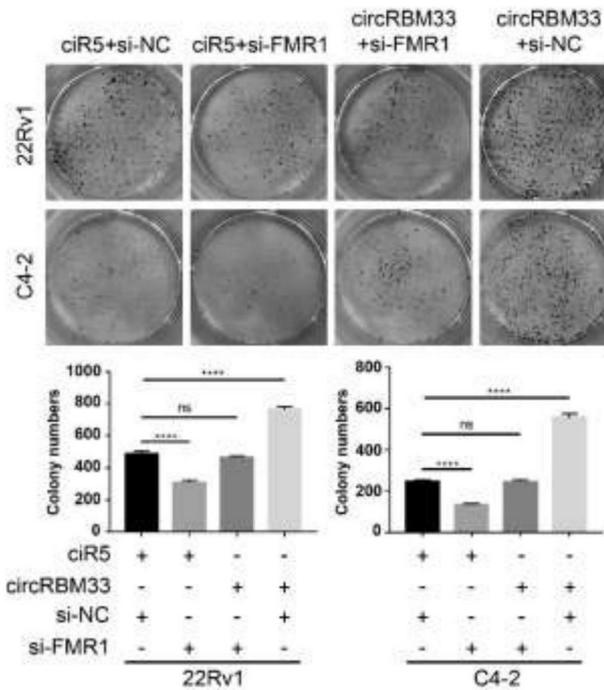


图36

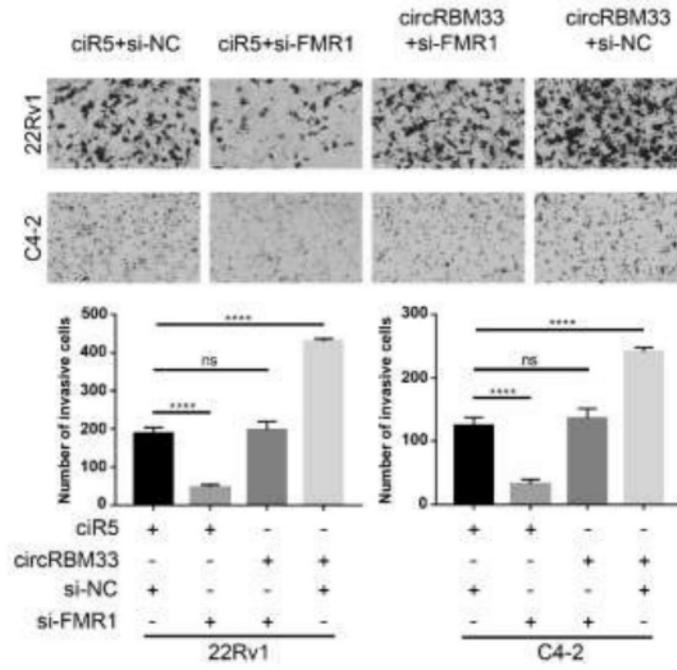


图37