



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116064767 A

(43) 申请公布日 2023.05.05

(21) 申请号 202211009871.0

(22) 申请日 2022.08.23

(71) 申请人 南京医科大学

地址 211166 江苏省南京市江宁区龙眠大道101号

(72) 发明人 陈璐璐 王婵 苗登顺 王懿涵

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218

专利代理师 傅婷婷 徐冬涛

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

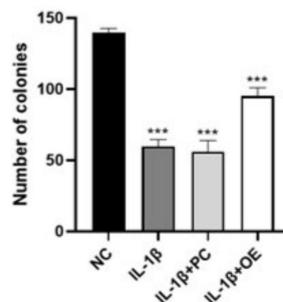
权利要求书1页 说明书10页
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

一种与骨关节炎相关的LncRNA标志物及其应用

(57) 摘要

本发明属于骨关节炎诊断、治疗和预后检测领域,具体公开了一种与骨关节炎相关的LncRNA标志物及其应用。所述LncRNA标志物HOXC-AS3的基因序列如SEQ NO.3所示,扩增所述LncRNA标志物HOXC-AS3的引物为HOXC-AS3-F:5'-GTGGAGTAACAGCGCCATCT-3';HOXC-AS3-R:5'-CGGGTTTTGTTGCGTCTTGT-3'。通过研究表明,LncRNA HOXC-AS3表达水平降低可以作为骨关节炎诊断、治疗和预后检测的生物标志物。



1. 检测HOXC-AS3的物质在制备骨关节炎辅助诊断或预后评估试剂中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於所述的检测HOXC-AS3的物质为HOXC-AS3的特异性引物、探针。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於所述的HOXC-AS3的特异性引物如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。
4. 一种骨关节炎辅助诊断或预后评估试剂,其特征在於包含检测HOXC-AS3的物质。
5. 根据权利要求4所述的骨关节炎辅助诊断或预后评估试剂,其特征在於所述的检测HOXC-AS3的物质为HOXC-AS3的特异性引物、探针。
6. 根据权利要求5所述的骨关节炎辅助诊断或预后评估试剂,其特征在於所述的HOXC-AS3的特异性引物如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。
7. HOXC-AS3或提高HOXC-AS3表达量的物质在制备骨关节炎治疗或辅助治疗药物中的应用。

一种与骨关节炎相关的LncRNA标志物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于骨关节炎诊断、治疗和预后检测领域,涉及一种骨关节炎LncRNA标志物及其应用。

背景技术

[0002] 骨关节炎(Osteoarthritis,OA)是活动关节的一种慢性进行性疾病,主要表现为关节软骨基质崩解、软骨细胞减少和活性降低等。中国骨关节炎诊治指南报道,骨关节炎在60岁以上的人群中患病率可达50%,75岁以上的人群中则达80%,致残率高达53%。因此,早期筛查诊断和防治骨关节炎对提高人们的生活质量具有重要意义。

[0003] LncRNAs是一类转录本长度超过200个核苷酸的RNA分子,由于缺乏有效的开放阅读框,它们并不编码蛋白,而是以RNA的形式在表观遗传水平、转录及转录后水平等多种层面上调控基因的表达,从而影响疾病的发生与发展。随着高通量测序技术的发展,越来越多的LncRNAs被注释。因此,我们旨在探寻有效的LncRNA作为骨关节炎临床诊断、治疗和预后检测的标记物,从而提高骨关节炎患者的生活质量。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种与骨关节炎相关的LncRNA标志物HOXC-AS3及其应用,通过研究证明在骨关节炎关节软骨细胞中LncRNA HOXC-AS3的表达明显低于正常关节软骨细胞。具体讲,LncRNA HOXC-AS3的表达水平降低可以作为诊断骨关节炎发生及预后的生物标志物。

[0005] 检测HOXC-AS3的物质在制备骨关节炎辅助诊断或预后评估试剂中的应用。作为本发明的一种优选,所述的检测HOXC-AS3的物质为HOXC-AS3的特异性引物、探针。

[0006] 作为本发明的进一步优选,所述的HOXC-AS3的特异性引物如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

[0007] 一种骨关节炎辅助诊断或预后评估试剂,包含检测HOXC-AS3的物质。

[0008] 作为本发明的一种优选,所述的检测HOXC-AS3的物质为HOXC-AS3的特异性引物、探针。

[0009] 作为本发明的进一步优选,所述的HOXC-AS3的特异性引物如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

[0010] HOXC-AS3或提高HOXC-AS3表达量的物质在制备骨关节炎治疗或辅助治疗药物中的应用。HOXC-AS3的核苷酸序列如SEQ NO.3所示。

[0011] 有益效果:本发明发现了一种与骨关节炎相关的LncRNA标志物HOXC-AS3,该分子标志物在骨关节炎关节软骨细胞中的表达明显低于相应的正常关节软骨细胞,可以作为骨关节炎早期筛查、辅助查诊断或预后评估指标。本发明在细胞模型中发现与对照组相比,HOXC-AS3表达水平在OA细胞模型中显著降低(图5),敲低HOXC-AS3后软骨细胞增殖能力下降(图7),Edu阳性软骨细胞表达显著下降(图8),软骨细胞被阻滞在G0/G1期(图9-10),软骨细胞克隆形成能力降低(图11-12);而过表达OXC-AS3后软骨细胞增殖能力(图14)和细胞克

隆形成能力(图15-16)均增加。可见,HOXC-AS3可以作为OA的分子标记物,并应用于制备OA的诊断试剂盒或者成为治疗OA的候选药物。

附图说明

- [0012] 图1为基因测序分析正常关节软骨细胞和OA软骨细胞差异表达的基因。
- [0013] 图2为RT-qPCR检测临床正常关节软骨细胞和OA患者软骨细胞中LncHOXC-AS3的表达情况。
- [0014] 图3为ROC曲线验证图。
- [0015] 图4为IL-1 β 构建OA细胞模型后,Western Blot检测正常对照和OA软骨细胞模型中各蛋白表达情况。
- [0016] 图5为IL-1 β 构建OA细胞模型后,RT-qPCR检测正常对照和OA软骨细胞模型中LncRNA HOXC-AS3的表达情况。
- [0017] 图6为人软骨细胞中用siRNA特异性敲低HOXC-AS3后mRNA水平的表达量。
- [0018] 图7为特异性敲低软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞增殖情况。
- [0019] 图8为特异性敲低软骨细胞中HOXC-AS3后的Edu阳性细胞表达情况。
- [0020] 图9为特异性敲低软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞周期检测流式检测图。
- [0021] 图10为特异性敲低软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞周期检测流式检测统计图。
- [0022] 图11为特异性敲低软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞克隆形成情况。
- [0023] 图12为特异性敲低软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞克隆数统计图。
- [0024] 图13为人软骨细胞过表达HOXC-AS3后mRNA水平的表达量。
- [0025] 图14为过表达软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞增殖情况。
- [0026] 图15为过表达软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞克隆形成情况。
- [0027] 图16为过表达软骨细胞中HOXC-AS3后的细胞克隆数统计图。

具体实施方式

- [0028] 实施例1临床样本分析
- [0029] 本发明所采用临床样本均来自南京市第一医院。本项目征求病人的同意并经南京医科大学伦理委员会批准。
- [0030] (1)组织标本来源及收集
- [0031] 软骨标本来自2019年至2021年南京市第一医院接受膝关节置换术或者髋关节置换术的患者。其中16例因股骨颈骨折行髋关节置换术的病患被纳入正常对照组。另外16例因严重膝关节骨性关节炎行膝关节置换术被纳入OA组。
- [0032] 手术中样本组织离体后,在无菌条件下置于无菌无酶的50mL离心管中,后立即放入液氮快速冷冻,再储存在-80 $^{\circ}$ C冰箱,后续用于基因测序或者。
- [0033] (2)基因测序及数据分析
- [0034] 我们将临床手术中收取的5对正常对照样本及OA样本送至上海天昊生物科技有限公司进行lncRNAs测序分析,并对差异表达的lncRNAs进行注释(结果见图1)。(3)Real-time PCR
- [0035] a) 软骨细胞总RNA提取:Trizol法提取正常对照软骨细胞和OA软骨细胞的总RNA。加入500 μ l Trizol。加入100 μ l氯仿,剧烈振摇,使上下两相充分混合,室温静置10min后,离

心12000xg,15min,4℃离心。小心吸取上层水相160u1于新的RNase free EP管中,加入等体积异丙醇(160u1),颠倒混匀,冰上放置20min后,12000xg,15min 4℃离心,离心后可见管内白色RNA沉淀。弃尽上清,使用预冷75%乙醇(DEPC水稀释)洗涤沉淀一次,7000g,5min 4℃离心。弃尽上清,室温放置晾干(10~15min),使得酒精挥发干净。之后加入15μl DEPC水溶解,测定浓度备用。

[0036] b) RNA逆转成cDNA:使用南京诺唯赞(vazyme)公司的逆转录试剂盒(去基因组DNA),按照试剂盒说明书进行RNA逆转录,逆转录体系如下:

试剂	用量
RNA	1μg
4×gDNA wiper Mix	4μl
RNase free ddH ₂ O	至16μl

[0038] 上述混合物混匀,PCR仪反应42℃2min,继续第二步逆转:

试剂	用量
上述混合物	16μl
5×HiScript II qRT SuperMix II	4μl

[0040] 混匀后,进行逆转录PCR,条件如下:50℃,15min;85℃,5s,得到的cDNA产物可用于Real-time PCR

[0041] c) Real-time PCR:将上一步的cDNA作为模板进行Real-time PCR,使用诺唯赞(vazyme)公司的SYBR Green Mix,按照试剂盒说明书进行。10μl体系:

试剂	用量
cDNA	1μ l
H ₂ O	3.6μ l
上游引物	0.2μ l
下游引物	0.2μ l
SYBR Green Mix	5μ l

[0043] 上述混合物混匀后,进行Real-time PCR,反应条件如下:95℃,5min;95℃,10s—60℃,30s;40个循环

[0044] 引物序列如下:

Primers	Sequence (5' -3')
β-actin-F	TCATGAAGTGTGACGTGGACAT
β-actin-R	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG
HOXC-AS3-F	GTGGAGTAACAGCGCCATCT
HOXC-AS3-R	CGGGTTTTGTTGCGTCTTGT

[0046] d) 结果:本发明利用Real-time PCR技术检测16对临床OA软骨及正常对照软骨细胞中HOXC-AS3的表达水平,发现HOXC-AS3表达水平在OA软骨细胞中显著降低(结果见图2)。

[0047] (4) ROC曲线验证

[0048] 利用pROC这一R包对5对OA组和对照组HOXC-AS3表达量差异进行ROC曲线验证。预测变量HOXC-AS3的cut-off值为5.568,阳性预测值、阴性预测值均为1,约登指数为1,对照组和OA组以HOXC-AS3预测结局的AUC为1,置信区间为1.000-1.000,结果证明所选指标在预测结局上有很高准确性(结果见图3)。

[0049] 实施例20A细胞模型实验

[0050] 人软骨细胞系C28/I2购自上海信裕生物科技有限公司。

[0051] (1)细胞培养

[0052] 使用含有10%的胎牛血清(Gibco)、1%三抗(即100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素和25μg/mL两性霉素B)(Gibco)的DMEM培养基(Gibco),在37℃、含5%CO₂的无菌培养箱中进行C28/I2细胞培养,每2-3天更换培养基,当细胞融合80%-90%时,胰酶消化以1:2或1:3的比例进行传代。

[0053] (2)构建OA细胞模型

[0054] 将C28/I2细胞培养于含有10ng/ml或20ng/ml IL-1β(Sigma)的DMEM培养基中培养24h,构建OA细胞模型,未处理的细胞用作对照组。

[0055] (3)Western Blot

[0056] a)细胞总蛋白提取

[0057] 对贴壁细胞,加入含10%PI、10%PMSF的RIPA 200μl,轻晃培养板使细胞充分接触液体,放在冰上摇晃5min,用洁净无菌的细胞刮刀将培养板中的细胞从板底面刮离转移至无菌无酶的1.5mL EP管中,将EP管斜置于冰上,摇晃孵育15-20min,使样品裂解完全,4℃,12000g,离心10min;吸上清到新的EP管中,冰上暂存;

[0058] 按照碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒说明,测定蛋白浓度,用ddH₂O将样本蛋白稀释到300μg/80μl,加入20μl 5*loading buffer,金属浴100℃,10min。

[0059] 室温冷却;

[0060] b)配制10%分离胶与浓缩胶

[0061]

试剂	分离胶(μl)	浓缩胶(μl)
ddH ₂ O	1900	680
30%AA液	1700	166
1MTris-HCl (pH=8.8)	1300	\
1M Tris-HCl (pH=6.8)	\	126
10%SDS	50	10
10%APS	50	10
TEMED	4	1

[0062] c)配制SDS-PAGE胶,先将配置好的分离胶灌入玻璃板,防治产生气泡,至距离玻璃板上沿1.5cm处,缓慢加入ddH₂O压胶隔绝空气,静置30min左右胶面与水相有明显分界面,即分离胶凝固,倒出上层液体,配制上层浓缩胶,加入玻璃板后立即插上梳子,静置待凝固;

[0063] d)将凝胶板安装在电泳槽,在内外槽倒入1*电泳液,上样枪加样后,恒压80V开始电泳,直到marker分离,调整电压至110V,直至电泳完成;

[0064] e)电泳完成后,取出凝胶放在ddH₂O中,将PVDF膜放在甲醇中激活30s,转到预冷的转膜液中;在转膜夹板中放好海绵及滤纸,再电流方向(从黑到红)放入凝胶和PVDF膜,凝胶

在黑色板甲一侧,轻压排出每一层之间的气泡,合上夹板,放入转膜槽中,凝胶面(黑色一侧)朝向转膜槽负极,PVDF膜朝向正极,倒入预冷转膜液,放一块冰盒,将转膜槽放入4℃冰箱,保持低温转膜,恒流0.28A转膜90min;

[0065] f) 转膜结束后,取出PVDF膜,ddH₂O清洗两次,放入丽春红进行染色,观察是否有蛋白条带,判断转膜是否成功。清洗丽春红后,用5%牛奶-TBST进行封闭,室温2h;

[0066] g) 封闭后的膜放入抗体孵育盒,加入按照1:10000比例用5%BSA/TBST稀释的一抗,4℃过夜;

[0067] h) 第二天,用TBST洗膜,摇床上洗3次,每次5min,;加入1:10000稀释好的二抗,室温孵育2h;

[0068] i) TBST洗膜三次,每次5min;

[0069] j) 配制ECL显影液,将膜放置与化学发光成像系统进行曝光成像,拍照存档;

[0070] 结果:Western Blot实验结果显示(结果见图4),我们使用10ng/ml或20ng/ml的IL-1β成功构建了OA软骨细胞模型。

[0071] (4)Real-time PCR

[0072] a) 细胞总RNA提取:Trizol法提取细胞RNA。加入500μl Trizol。加入100ul氯仿,剧烈振摇,使上下两相充分混合,冰上静置10min后,离心12000xg,15min 4℃离心。小心吸取上层水相160ul于新的RNase free EP管中,加入等体积异丙醇(160ul),颠倒混匀,室温放置10min后,12000xg,15min 4℃离心,离心后可见管内白色RNA沉淀。弃尽上清,使用预冷75%乙醇(DEPC水稀释)洗涤沉淀一次,7000g,5min 4℃离心。弃尽上清,室温放置晾干(10~15min),使得酒精挥发干净。之后加入15μl DEPC水溶解,测定浓度备用。

[0073] b) RNA逆转成cDNA:使用南京诺唯赞(vazyme)公司的逆转录试剂盒(去基因组DNA),按照试剂盒说明书进行RNA逆转录,逆转录体系如下:

试剂	用量
RNA	1μg
4×gDNA wiper Mix	4μl
RNase free ddH ₂ O	至16μl

[0075] 上述混合物混匀,PCR仪反应42℃2min,继续第二步逆转:

试剂	用量
上述混合物	16μl
5×HiScript II qRT SuperMix II	4μl

[0077] 混匀后,进行逆转录PCR,条件如下:50℃,15min;85℃,5s,得到的cDNA产物可用于Real-time PCR

[0078] c) Real-time PCR:将上一步的cDNA作为模板进行Real-time PCR,使用诺唯赞(vazyme)公司的SYBR Green Mix,按照试剂盒说明书进行。10μl体系:

试剂	用量
cDNA	1 μ l
H ₂ O	3.6 μ l
上游引物	0.2 μ l
下游引物	0.2 μ l
SYBR Green Mix	5 μ l

[0079] [0080] 上述混合物混匀后,进行Real-time PCR,反应条件如下:95 $^{\circ}$ C,5min;95 $^{\circ}$ C,10s-60 $^{\circ}$ C,30s;40个循环

[0081] 引物序列如下:

Primers	Sequence (5' -3')
β -actin-F	TCATGAAGTGTGACGTGGACAT
β -actin-R	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG
HOXC-AS3-F	GTGGAGTAACAGCGCCATCT
HOXC-AS3-R	CGGGTTTTGTTGCGTCTTGT

[0082] [0083] d) 结果:Real-time PCR结果显示,与对照组相比,HOXC-AS3表达水平在OA细胞模型中显著降低(结果见图5)。

[0084] 实施例3特异性敲低HOXC-AS3对软骨细胞增殖和克隆形成能力的影响

[0085] (1) 特异性敲低HOXC-AS3

[0086] 在人软骨细胞系C28/I2中用小干扰RNA(siRNA)敲低HOXC-AS3,检测敲低效率,具体步骤如下:

[0087] 委托广州RiboBio(锐博)公司设计合成小干扰RNA(siRNA)。序列如下:

名称	靶序列
si-HOXC-AS3 1#	CAGAGUGGAGU AACAGCGCCAUCUA
si-HOXC-AS3 2#	CGGUCAGUUUGGAGGAGUCACGUAU

[0088] [0089] 在六孔板中种 1×10^5 个细胞,贴壁后每孔用转染试剂Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 5 μ l+siRNA 100pmol的转染复合物进行转染,48h后收获细胞。

[0090] (2) Real-time PCR

[0091] a) 细胞总RNA提取:Trizol法提取RNA。收集约 1×10^6 个细胞,加入500 μ l Trizol。加入100 μ l氯仿,剧烈振摇,使上下两相充分混合,冰上静置10min后,离心12000xg,15min 4 $^{\circ}$ C离心。小心吸取上层水相160 μ l于新的RNase free EP管中,加入等体积异丙醇(160 μ l),颠倒混匀,室温放置10min后,12000xg,15min 4 $^{\circ}$ C离心,离心后可见管内白色RNA沉淀。弃尽上清,使用预冷75%乙醇(DEPC水稀释)洗涤沉淀一次,7000g,5min 4 $^{\circ}$ C离心。弃尽上清,室温放置晾干(10~15min),使得酒精挥发干净。之后加入15 μ l DEPC水溶解,测定浓度备用。

[0092] b) RNA逆转成cDNA:使用南京诺唯赞(vazyme)公司的逆转录试剂盒(去基因组DNA),按照试剂盒说明书进行RNA逆转录,逆转录体系如下:

试剂	用量

RNA	1 μ g
4 \times gDNA wiper Mix	4 μ l
RNase free ddH ₂ O	至16 μ l

[0094] 上述混合物混匀,PCR仪反应42 $^{\circ}$ C 2min,继续第二步逆转:

试剂	用量
上述混合物	16 μ l
5 \times HiScript II qRT SuperMix II	4 μ l

[0096] 混匀后,进行逆转录PCR,条件如下:50 $^{\circ}$ C,15min;85 $^{\circ}$ C,5s,得到的cDNA产物可用于Real-time PCR

[0097] c) Real-time PCR:将上一步的cDNA作为模板进行Real-time PCR,使用诺唯赞(vazyme)公司的SYBR Green Mix,按照试剂盒说明书进行。10 μ l体系:

试剂	用量
cDNA	1 μ l
H ₂ O	3.6 μ l
上游引物	0.2 μ l
下游引物	0.2 μ l
SYBR Green Mix	5 μ l

[0099] 上述混合物混匀后,进行Real-time PCR,反应条件如下:95 $^{\circ}$ C,5min;95 $^{\circ}$ C,10s—60 $^{\circ}$ C,30s;40个循环

[0100] 引物序列如下:

Primers	Sequence (5' - 3')
β -actin-F	TCATGAAGTGTGACGTGGACAT
β -actin-R	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG
HOXC-AS3-F	GTGGAGTAACAGCGCCATCT
HOXC-AS3-R	CGGGTTTTGTTGCGTCTTGT

[0102] d) 结果:Real-time PCR结果显示,使用小干扰RNA可以有效敲低人软骨细胞中HOXC-AS3的表达(结果见图6)。

[0103] (3) 细胞增殖能力检测---MTT

[0104] a) 按照3000个/孔细胞的数量将转染si-NC和si-HOXC-AS3的软骨细胞分别接种于96孔板中,放入细胞培养箱8小时以上至细胞贴壁;每孔加入20 μ L MTT试剂,培养箱继续培养4小时;用酶标仪检测490nm处吸光度,作为0h生长度,此后每隔24进行同样操作,直到96小时;通过与0h吸光度比较,增长倍数表示细胞增殖能力。

[0105] b) 结果:敲低HOXC-AS3后软骨细胞增殖能力下降(结果见图7)。

[0106] (4) 细胞增殖能力检测---Edu细胞免疫荧光

[0107] a) 细胞转染24h后计数,以 2×10^4 个细胞/每孔接种到含有细胞爬片的24孔板中;

[0108] b) 细胞融合达60%-70%时,移除培养基,按照1:1000配置50 μ M Edu培养基,每孔加入300 μ L的上述Edu培养基孵育3h,PBS清洗3次,每次5min;

[0109] c) 每孔加入500 μ L含4%多聚甲醛的PBS,室温孵育30min,吸除固定液;

- [0110] d) 每孔加入300 μ L甘氨酸(2mg/mL)摇床孵育5min,吸除甘氨酸溶液;
- [0111] e) 每孔加入500 μ L PBS,摇床清洗5min,弃掉;
- [0112] f) 每孔加入300 μ L 0.5%TritonX-100的PBS,摇床孵育10min,PBS清洗5min;
- [0113] g) 按照说明书配置1 \times Apollo染色反应液,每孔加入300 μ L上述Apollo染色液,避光室温孵育30min,吸除染色液;
- [0114] h) 每孔加入300 μ L 0.5%TritonX-100的PBS,摇床孵育3次,每次10min;
- [0115] i) 每孔加入300 μ L甲醇清洗3次,每次5min,PBS清洗5min;
- [0116] j) 用去离子水按照1:100配置1 \times Hoechst33342反应液,每孔加入300 μ L 1 \times Hoechst33342反应液,避光室温摇床孵育30min;
- [0117] k) 每孔加入500 μ L PBS,清洗3次;使用荧光显微镜进行拍照,计数阳性点比例。
- [0118] l) 结果:敲低HOXC-AS3后,Edu阳性软骨细胞表达显著下降(结果见图8)。
- [0119] (5) 细胞周期检测
- [0120] a) 收集细胞,用预冷的PBS清洗;
- [0121] b) 用预冷的75%乙醇在-20 $^{\circ}$ C下固定过夜;
- [0122] c) 在4 $^{\circ}$ C下以1500xg离心5min,弃掉上清,每个样品加入450 μ L PBS重新悬浮;d) 室温下用50 μ L PI避光染色细胞15min;
- [0123] e) FACS Calibur流式细胞仪(BD)进行细胞周期流式检测和分析;
- [0124] f) 结果:敲低HOXC-AS3后,软骨细胞被阻滞在G0/G1期(结果见图9-10)。
- [0125] (6) 克隆形成实验
- [0126] a) 将转染si-NC及si-HOXC-AS3 48h后的细胞消化后以500个细胞/孔的数量接种在六孔板中,轻晃培养板使细胞铺匀,放入培养箱中培养;
- [0127] b) 每3天观察,更换新的培养基,直到第10天可肉眼看到菌落形成;
- [0128] c) 弃去培养基,用PBS洗两遍,加入1ml多聚甲醛静置固定15min;
- [0129] d) 吸去多聚甲醛,加入ddH₂O洗3次,每次2min;
- [0130] e) 加入1ml 1 \times 结晶紫试剂,避光静置,染色15min,再用ddH₂O多次洗涤,直到洗净多余结晶紫,晾干;
- [0131] f) 相机拍照,统计克隆数目。
- [0132] g) 结果:敲低HOXC-AS3后,软骨细胞克隆形成能力降低(结果见图11-12)。
- [0133] 实施例4过表达HOXC-AS3对软骨细胞增殖和克隆形成能力的影响
- [0134] (1) 过表达HOXC-AS3
- [0135] 在人软骨细系胞C28/I2中转染质粒过表达HOXC-AS3,并检测过表达效率,具体步骤如下:在六孔板中种1 \times 10⁵个细胞,贴壁后每孔用转染试剂X-tremeGENE DNA Transfection Reagent 8 μ l+4 μ g质粒的转染复合物进行转染,48h后收获细胞,提取RNA。
- [0136] (2) Real-time PCR
- [0137] a) 细胞总RNA提取:Trizol法提取RNA。收集约1 \times 10⁶个细胞/组,加入500 μ l Trizol。加入100 μ l氯仿,剧烈振摇,使上下两相充分混合,冰上静置10min后,离心12000xg,15min 4 $^{\circ}$ C离心。小心吸取上层水相160 μ l于新的RNase free EP管中,加入等体积异丙醇(160 μ l),颠倒混匀,室温放置10min后,12000xg,15min 4 $^{\circ}$ C离心,离心后可见管内白色RNA沉淀。弃尽上清,使用预冷75%乙醇(DEPC水稀释)洗涤沉淀一次,7000g,5min 4 $^{\circ}$ C离心。弃

尽上清,室温放置晾干(10~15min),使得酒精挥发干净。之后加入15 μ l DEPC水溶解,测定浓度备用。

[0138] b) RNA逆转成cDNA:使用南京诺唯赞(vazyme)公司的逆转录试剂盒(去基因组DNA),按照试剂盒说明书进行RNA逆转录,逆转录体系如下:

[0139]	试剂	用量
	RNA	1 μ g
	4 \times gDNA wiper Mix	4 μ l
	RNase free ddH ₂ O	至16 μ l

[0140] 上述混合物混匀,PCR仪反应42 $^{\circ}$ C 2min,继续第二步逆转:

[0141]	试剂	用量
	上述混合物	16 μ l
	5 \times HiScript II qRT SuperMix II	4 μ l

[0142] 混匀后,进行逆转录PCR,条件如下:50 $^{\circ}$ C, 15min;85 $^{\circ}$ C, 5s,得到的cDNA产物可用于Real-time PCR

[0143] c) Real-time PCR:将上一步的cDNA作为模板进行Real-time PCR,使用诺唯赞(vazyme)公司的SYBR Green Mix,按照试剂盒说明书进行。10 μ l体系:

[0144]	试剂	用量
	cDNA	1 μ l
	H ₂ O	3.6 μ l
	上游引物	0.2 μ l
	下游引物	0.2 μ l
	SYBR Green Mix	5 μ l

[0145] 上述混合物混匀后,进行Real-time PCR,反应条件如下:95 $^{\circ}$ C, 5min;95 $^{\circ}$ C, 10s—60 $^{\circ}$ C, 30s;40个循环

[0146] 引物序列如下:

[0147]	Primers	Sequence (5' -3')
	β -actin-F	TCATGAAGTGTGACGTGGACAT
	β -actin-R	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG
	HOXC-AS3-F	GTGGAGTAACAGCGCCATCT
	HOXC-AS3-R	CGGGTTTTGTTGCGTCTTGT

[0148] d) 结果:Real-time PCR结果显示,人软骨细胞中HOXC-AS3的表达显著增加(结果见图13)。

[0149] (3) 细胞增殖能力检测---MTT

[0150] a) 按照3000个/孔细胞的数量将NC组、IL-1 β 组、IL-1 β +empty vector组和IL-1 β +HOXC-AS3组的软骨细胞分别接种于96孔板中,放入细胞培养箱8小时以上至细胞贴壁;每孔加入20 μ L MTT试剂,培养箱继续培养4小时;用酶标仪检测490nm处吸光度,作为0h生长度,此后每隔24进行同样操作,直到96小时;通过与0h吸光度比较,增长倍数表示细胞增殖能力。

- [0151] b) 结果:过表达HOXC-AS3后,软骨细胞增殖能力显著增加(结果见图14)。
- [0152] (4) 克隆形成实验
- [0153] a) 将NC组、IL-1 β 组、IL-1 β +empty vector组和IL-1 β +HOXC-AS3组的软骨细胞消化后以500个细胞/孔的数量接种在六孔板中,轻晃培养板使细胞铺匀,放入培养箱中培养;
- [0154] b) 每3天观察,更换新的培养基,直到第10天可肉眼看到菌落形成;
- [0155] c) 弃去培养基,用PBS洗两遍,加入1ml多聚甲醛静置固定15min;
- [0156] d) 吸去多聚甲醛,加入ddH₂O洗3次,每次2min;
- [0157] e) 加入1ml 1*结晶紫试剂,避光静置,染色15min,再用ddH₂O多次洗涤,直到洗净多余结晶紫,晾干;
- [0158] f) 相机拍照,统计克隆数目。
- [0159] g) 结果:过表达HOXC-AS3后,软骨细胞克隆形成能力增加(结果见图15-16)。
- [0160] 综合临床样本及体外细胞实验结果,可以发现在OA中HOXC-AS3的表达显著低于正常对照。敲低软骨细胞HOXC-AS3的表达可以抑制软骨细胞的增殖,降低软骨细胞的克隆形成能力;而过表达HOXC-AS3可以促进软骨细胞的增殖,增加软骨细胞的克隆形成能力。证明HOXC-AS3可以作为OA的分子标记物,并应用于制备OA的诊断试剂盒中。
- [0161] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

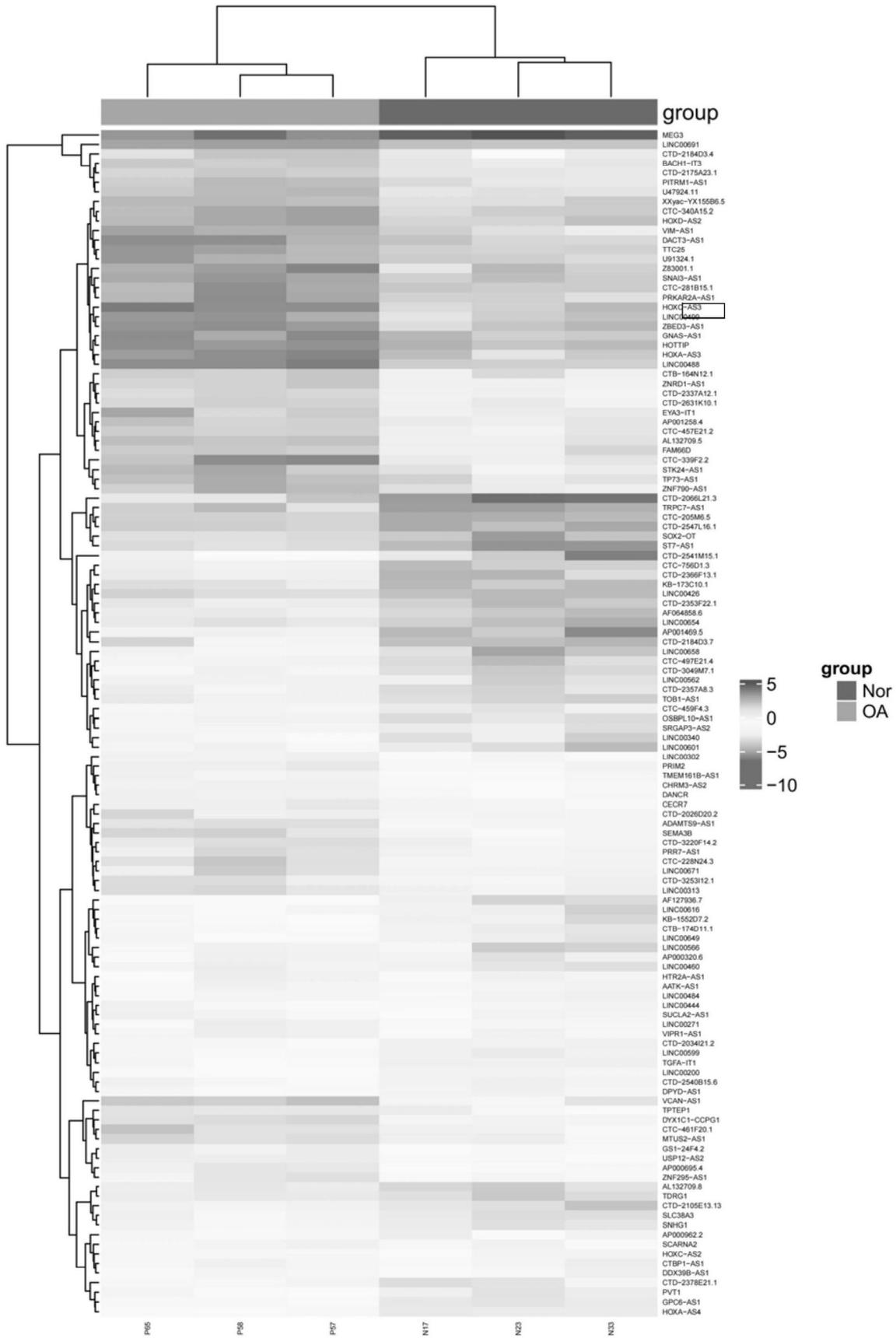


图1

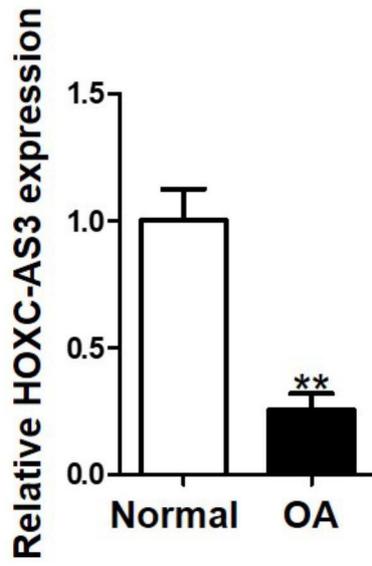


图2

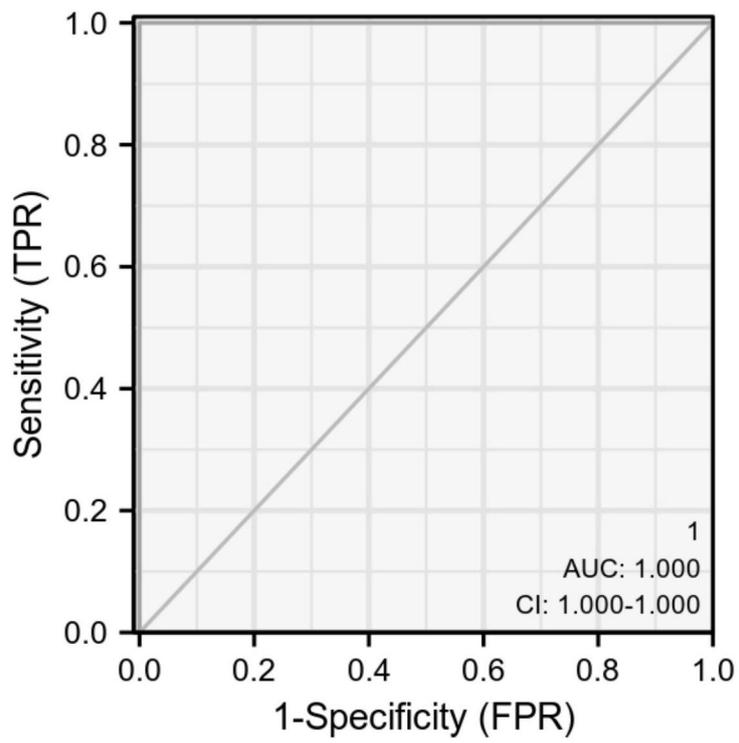


图3

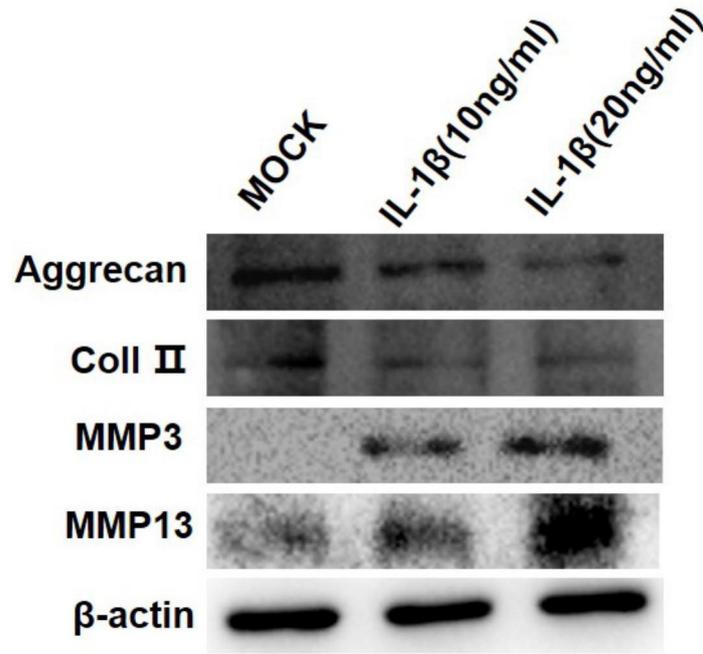


图4

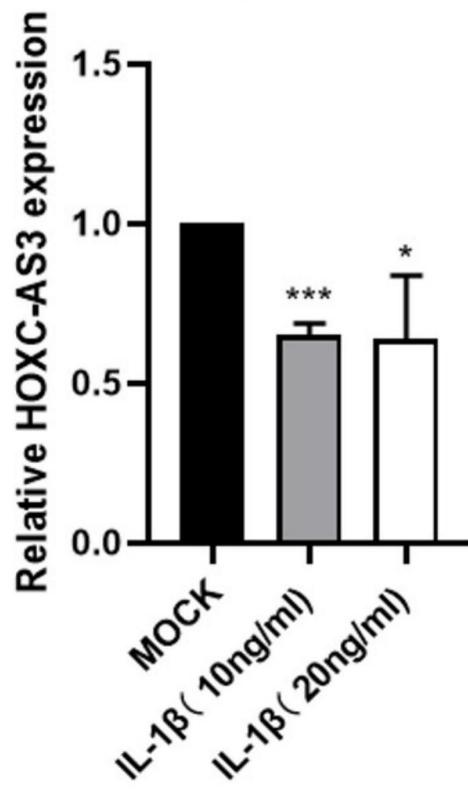


图5

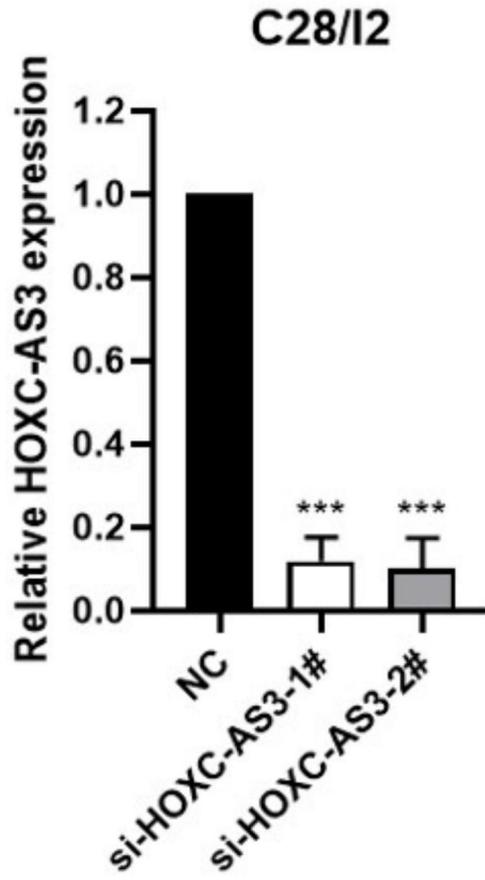


图6

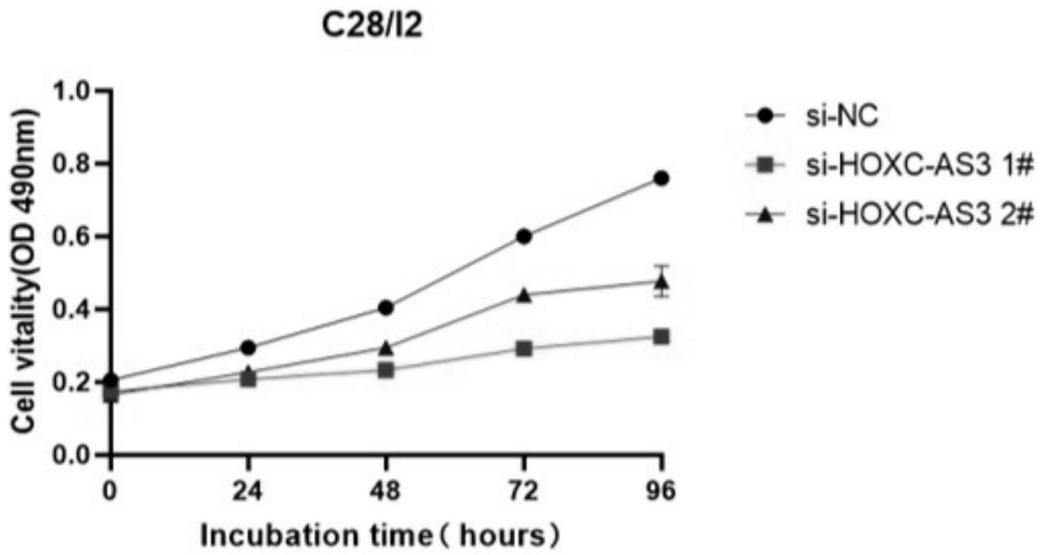


图7

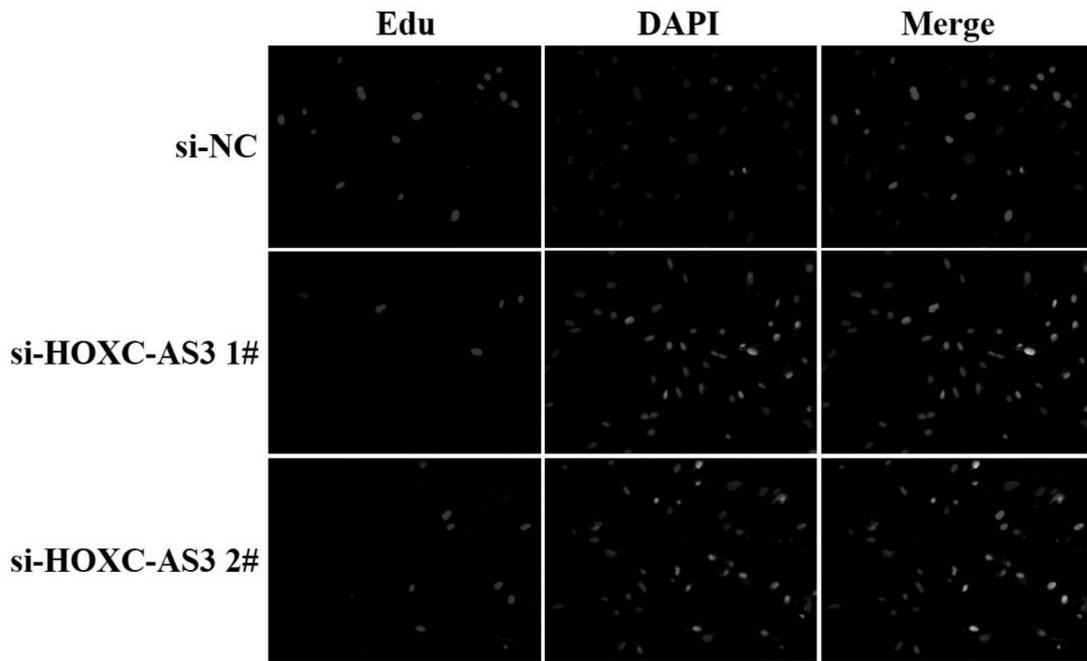


图8

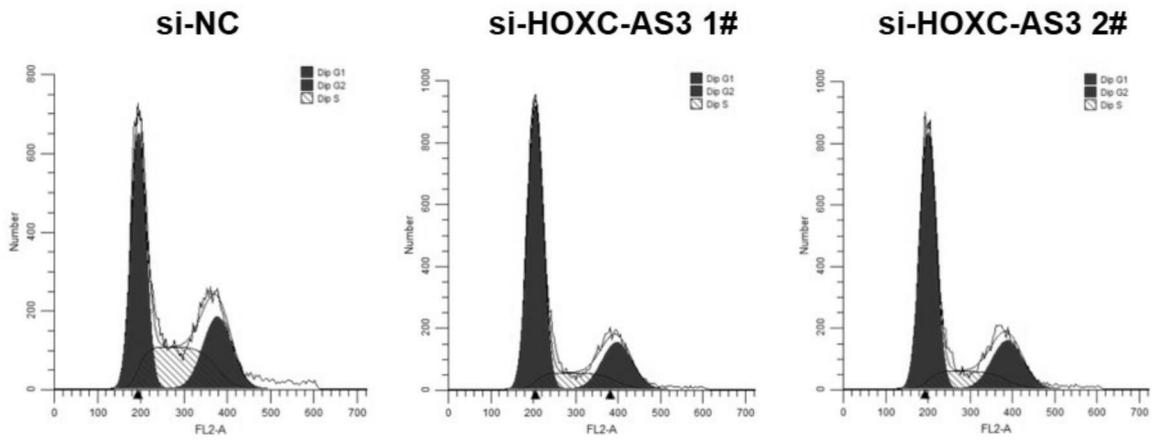


图9

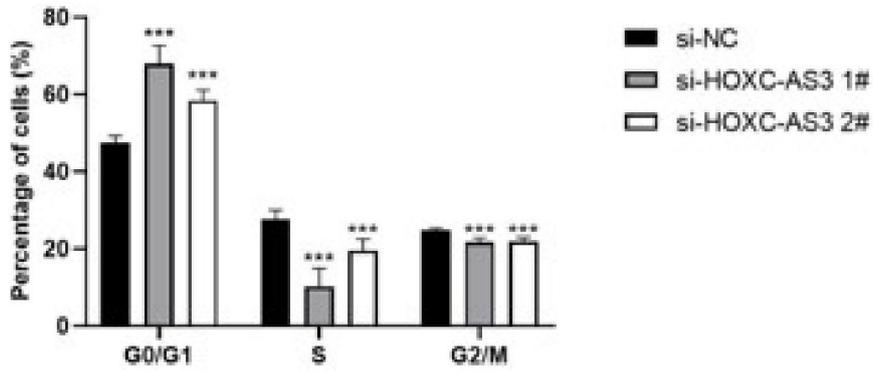


图10

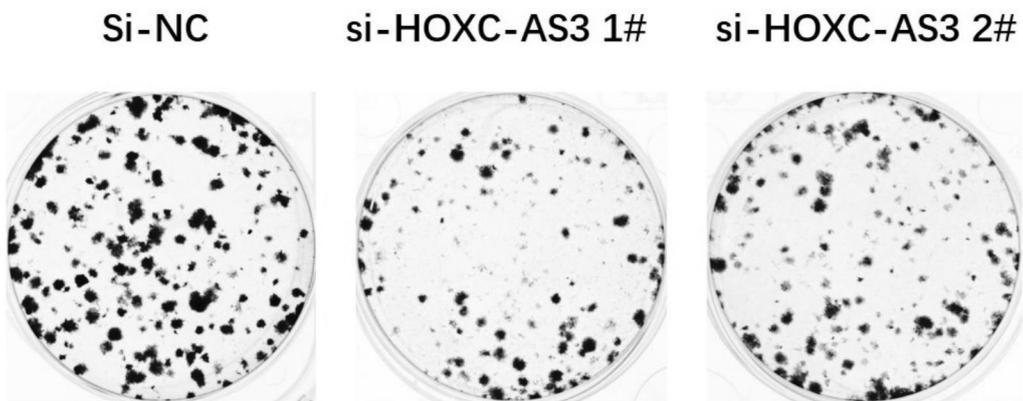


图11

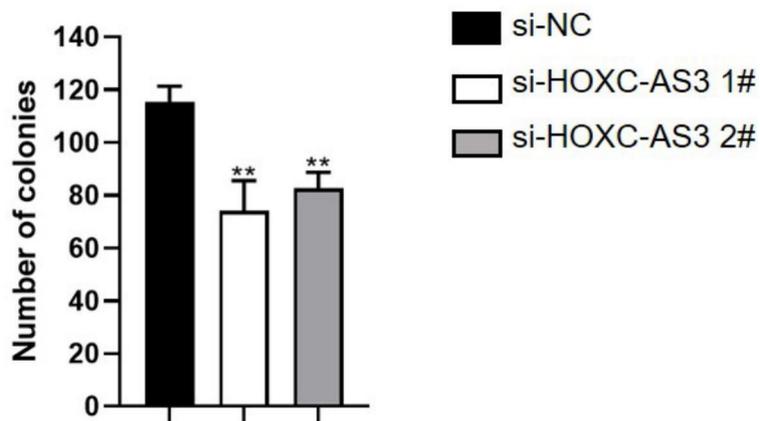


图12

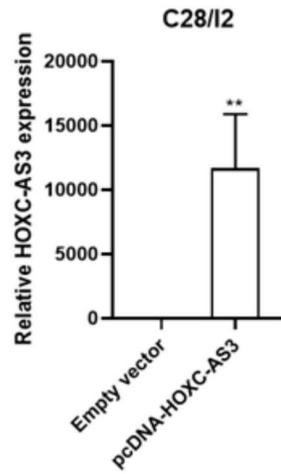


图13

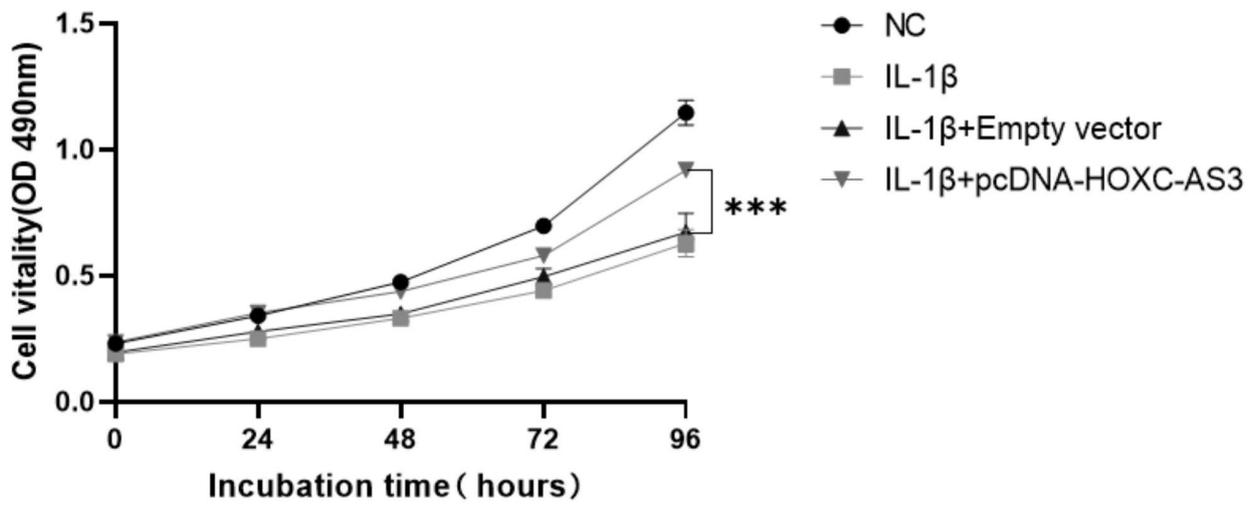


图14

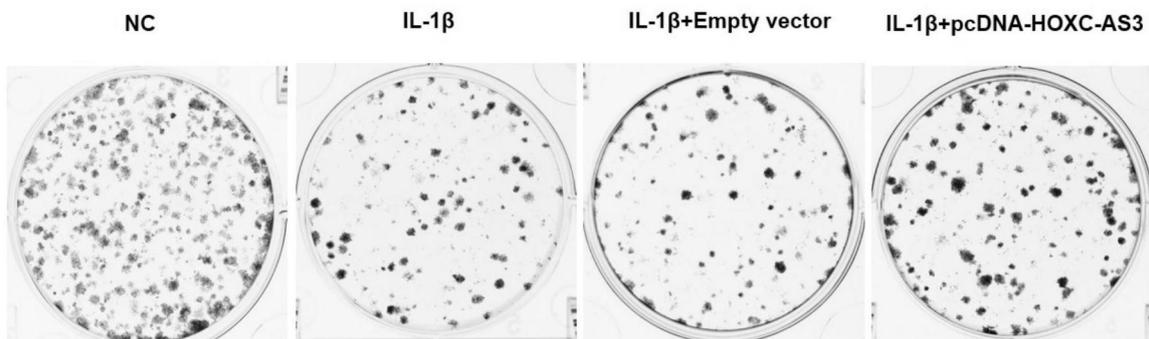


图15

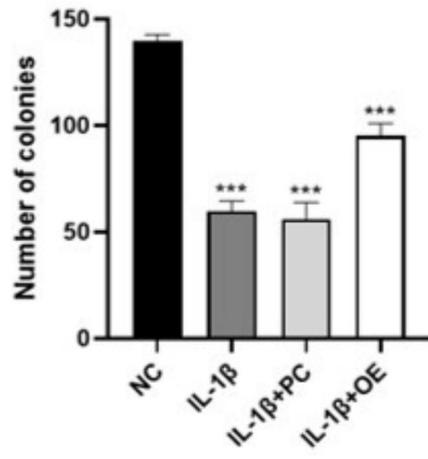


图16