



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114164270 B

(45) 授权公告日 2023.07.04

(21) 申请号 202111483844.2

(22) 申请日 2021.12.07

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114164270 A

(43) 申请公布日 2022.03.11

(73) 专利权人 河南省人民医院  
地址 450000 河南省郑州市金水区纬五路7号

(72) 发明人 刘莉娜 李梦园 张钧硕 万明会  
李祥 张晖 徐登飞 郭燕  
仓顺东

(74) 专利代理机构 郑州翊博专利代理事务所  
(普通合伙) 41155  
专利代理师 周玉青

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 113462780 A, 2021.10.01

审查员 梁欢

权利要求书1页 说明书11页  
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

CRIP2在检测前列腺癌对多西他赛耐药性及  
逆转前列腺癌对多西他赛耐药性中的应用

(57) 摘要

本发明属于医药生物技术领域,公开了一种可用于检测前列腺癌对多西他赛耐药性的分子标志物,所述分子标志物为CRIP2基因或CRIP2蛋白;CRIP2基因或CRIP2蛋白在DTX耐药前列腺癌细胞中的表达量明显高于正常前列腺癌细胞,差异具有统计学意义,因此,通过测定CRIP2基因或CRIP2蛋白的表达量可以作为判断用药者对DTX药物耐药性/敏感性的依据之一。而且,通过敲低DTX耐药前列腺癌细胞中CRIP2基因的表达水平,能提高DTX耐药前列腺癌细胞对DTX的敏感性,同时,干扰CRIP2基因后能够明显抑制DTX耐药前列腺癌细胞的增殖,因此,CRIP2基因可作为逆转前列腺癌DTX耐药的作用靶点,通过抑制CRIP2基因的表达和/或功能能够逆转肿瘤细胞对多西他赛耐药性,对前列腺癌治疗具有重要的意义。

1. CRIP2基因或其编码的蛋白的检测试剂在制备用于检测或辅助检测前列腺癌对多西他赛耐药性/敏感性的产品中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述产品通过实时定量PCR、原位杂交、Northern blotting、芯片、高通量测序平台、Western blot或酶联免疫吸附检测样本中CRIP2基因或其编码的蛋白的表达水平。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述产品中含有扩增CRIP2基因的特异性引物、与CRIP2基因核苷酸序列杂交的探针或与CRIP2蛋白特异性结合的抗体。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,扩增CRIP2基因的特异性引物序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

5. 抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质在制备逆转肿瘤细胞对多西他赛耐药性的产品中的应用,所述肿瘤细胞为前列腺癌细胞。

6. 抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质在制备用于抑制多西他赛耐药肿瘤细胞增殖的产品中的应用,所述肿瘤细胞为前列腺癌细胞。

7. 根据权利要求5或6所述的应用,其特征在於,所述抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质包括特异性靶向CRIP2基因的siRNA和/或shRNA。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在於,所述特异性靶向CRIP2基因的shRNA包括shRNA 1和shRNA 2,shRNA 1的序列如SEQ ID NO.3所示,shRNA 2的序列如SEQ ID NO.4所示。

## CRIP2在检测前列腺癌对多西他赛耐药性及逆转前列腺癌对多西他赛耐药性中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体涉及CRIP2基因在检测前列腺癌对多西他赛耐药性及逆转前列腺癌对多西他赛耐药性中的应用。

### 背景技术

[0002] 前列腺癌(prostate cancer,PC)是男性中最常见的恶性肿瘤,也是全世界男性癌症相关死亡的第2大主要原因。前列腺癌的早期阶段常无症状,且缺乏简单有效特异的筛查方式,导致前列腺癌难以早期诊断,多数患者确诊时已经处于中晚期,故而治疗较棘手。雄激素去势治疗仍是目前用于转移性前列腺癌、晚期原位癌、激素敏感性前列腺癌的基础治疗方法。近年来的研究发现,针对去势抵抗性前列腺癌患者,使用多西他赛(docetaxel, DTX)化疗可显著延长患者的总生存期。《中国泌尿外科疾病诊断治疗指南:2019版》中建议,将以多西他赛为基础的治疗作为去势抵抗型前列腺癌的标准治疗方案。

[0003] 多西他赛(docetaxel, DTX)是一种微管稳定剂,通过破坏微管与微管蛋白二聚体的动态平衡状态,破坏肿瘤细胞的有丝分裂过程,达到抗肿瘤的作用。雄激素受体(AR)不敏感的前列腺癌细胞的克隆可能参与去势抵抗的进展。在激素敏感性前列腺癌患者中,雄激素剥夺治疗(ADT)与多西他赛合用可抑制先前存在的雄激素受体不敏感细胞的克隆生长,从而使这些细胞在大量复制及形成多种逃逸机制之前死亡。新兴的临床前数据表明,多西他赛可以抑制雄激素受体信号通路。这些细胞毒性药物干扰微管的聚合,阻止雄激素受体传导的信号和诱导的基因表达,因此,多西他赛可与内分泌治疗协同作用,可以破坏雄激素受体的活性。

[0004] 多西他赛作为治疗去势抵抗性前列腺癌的一线化疗药物,具有较好的临床疗效。但经多西他赛治疗后,高达95%患者会出现多西他赛获得性耐药情况。化疗耐药在肿瘤治疗过程中是不可避免的,涉及多种机制,包括降低细胞的药物浓度、增加药物解毒蛋白的细胞代谢、激活生存信号通路、抑制凋亡等。寻找新的多西他赛耐药分子靶点及其可能机制对于逆转化疗耐药,提高化疗效率,改善患者预后具有重要意义。

[0005] 本发明以富含半胱氨酸肠蛋白2(CRIP2)为靶点进行干扰后发现,干扰 CRIP2使前列腺癌耐药细胞对多西他赛的耐药能力降低,逆转多西他赛耐药前列腺癌细胞的耐药情况,同时抑制了前列腺癌耐药细胞的增殖,为前列腺癌治疗提供新的靶点,为有效地对抗前列腺癌多西他赛耐药提供科学依据。

### 发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题和不足,本发明的目的之一旨在研究CRIP2基因在检测前列腺癌对多西他赛耐药性及逆转前列腺癌对多西他赛耐药性中的应用。

[0007] 为实现发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 本发明第一方面提供了一种可用于检测前列腺癌对多西他赛耐药性的分子标志

物,所述分子标志物为CRIP2基因或CRIP2蛋白(CRIP2蛋白为CRIP2基因编码的蛋白质)。CRIP2基因在NCBI中的基因ID为1397;CRIP2蛋白在NCBI中的蛋白序列号为:NP\_001303.1。

[0009] 本发明人在前期研究中利用人前列腺癌细胞系DU145构建了人前列腺癌细胞系DU145/DTX(多西他赛)耐药的细胞模型,发明人利用qRT-PCR检测DU145亲本及DU145/DTXR细胞中CRIP2基因扩增水平,发现DU145/DTXR细胞中CRIP2基因的扩增水平明显高于DU145亲本,差异具有统计学意义。而且,发明人采用Western Blot检测DU145亲本及DU145/DTXR细胞中CRIP2蛋白表达水平,发现DU145/DTXR细胞中CRIP2蛋白的表达水平明显高于DU145亲本,差异具有统计学意义。因此,CRIP2基因或CRIP2蛋白可用于检测前列腺癌对多西他赛耐药性或敏感性,通过测定CRIP2基因或CRIP2蛋白的表达量可以作为判断用药者对DTX药物耐药性/敏感性的依据之一。

[0010] 而且,本发明的发明人在DTX耐药前列腺癌细胞中发现稳定干扰CRIP2基因表达可提高DTX耐药前列腺癌细胞对DTX的敏感性,因此,CRIP2基因可作为逆转前列腺癌DTX耐药的作用靶点。

[0011] 本发明第二方面提供了CRIP2基因或其编码的蛋白的检测试剂在制备用于检测或辅助检测前列腺癌对多西他赛耐药性/敏感性的产品中的应用。

[0012] 根据上述的应用,优选地,所述产品通过实时定量PCR、原位杂交、Northern blotting、芯片、高通量测序平台、Western blot或酶联免疫吸附检测样本中CRIP2基因或其编码的蛋白的表达水平。

[0013] 根据上述的应用,优选地,所述产品中含有扩增CRIP2基因的特异性引物、与CRIP2基因核苷酸序列杂交的探针或与CRIP2蛋白特异性结合的抗体。

[0014] 根据上述的应用,优选地,扩增CRIP2基因的特异性引物序列例如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示;

[0015] SEQ ID NO.1:AATGCCCAAGTGCACAA;

[0016] SEQ ID NO.2:GCTTCTCGTAGATGTAGAGCC。

[0017] 根据上述的应用,优选地,所述产品为芯片、制剂或试剂盒。

[0018] 根据上述的应用,优选地,所述样本为组织、细胞或血清;更加优选地,所述样本为细胞,最优选地,所述细胞为前列腺癌细胞。

[0019] 本发明第三方面提供了抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质在制备逆转肿瘤细胞对多西他赛耐药性的产品中的应用

[0020] 根据上述的应用,优选地,所述肿瘤细胞为前列腺癌细胞。

[0021] 根据上述的应用,优选地,所述抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质包括特异性靶向CRIP2基因的siRNA和/或shRNA。

[0022] 根据上述的应用,优选地,所述特异性靶向CRIP2基因的shRNA包括shRNA 1和shRNA2,shRNA1的序列如SEQ ID NO.3所示,shRNA2的序列如SEQ ID NO.4所示;

[0023] SEQ ID NO.3:GCAAGCCAGGGCGAGTATTG;

[0024] SEQ ID NO.4:GGGCGTCCCATGATCCCTTCT。

[0025] 本发明第四方面提供了抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质在制备用于抑制多西他赛耐药肿瘤细胞增殖的产品中的应用或在抑制多西他赛耐药肿瘤细胞增殖中的应用。

[0026] 根据上述的应用,优选地,所述肿瘤细胞为前列腺癌细胞。

[0027] 根据上述的应用,优选地,所述抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质包括特异性靶向CRIP2基因的siRNA和/或shRNA。

[0028] 根据上述的应用,优选地,所述特异性靶向CRIP2基因的shRNA包括shRNA 1和shRNA 2,shRNA 1的序列如SEQ ID NO.3所示,shRNA 2的序列如SEQ ID NO.4所示。

[0029] 本发明第五方面提供了一种逆转前列腺癌对多西他赛耐药性的药物,所述药物中含有抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质。

[0030] 根据上述的药物,优选地,所述抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质包括特异性靶向CRIP2基因的siRNA和/或shRNA。

[0031] 根据上述的药物,优选地,所述特异性靶向CRIP2基因的shRNA包括shRNA 1和shRNA 2,shRNA 1的序列如SEQ ID NO.3所示,shRNA2的序列如SEQ ID NO.4所示。

[0032] 根据上述的药物,优选地,所述药物还包括与所述抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质配伍的其他药类以及药学上可接受的载体和/或辅料。

[0033] 进一步,所述载体/辅料包括(但并不限于):稀释剂、赋形剂如乳糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、淀粉、水等、填充剂如淀粉、蔗糖等;粘合剂如单糖浆、葡萄糖溶液、淀粉溶液、纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如干淀粉、海藻酸钠、海带多糖粉末、琼脂粉末、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂季铵化合物、十二烷基硫酸钠等;表面活性剂如聚氧化乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、十二烷基硫酸钠、硬脂酸单甘油酯、十六烷醇等;致湿剂如甘油、淀粉等;吸附载体如淀粉、乳糖、斑脱土、硅胶、高岭土和皂粘土等;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、聚乙二醇、硼酸粉末等。

[0034] 本发明第六方面提供了一种治疗前列腺癌的药物,所述药物中含有多西他赛和抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质。

[0035] 根据上述治疗前列腺癌的药物,优选地,所述抑制CRIP2基因表达和/或功能的物质包括特异性靶向CRIP2基因的siRNA和/或shRNA。

[0036] 根据上述治疗前列腺癌的药物,优选地,所述特异性靶向CRIP2基因的 shRNA包括shRNA 1和shRNA 2,shRNA 1的序列如SEQ ID NO.3所示,shRNA 2的序列如SEQ ID NO.4所示。

[0037] 根据上述治疗前列腺癌的药物,优选地,所述药物还包括与所述抑制CRIP2 基因表达和/或功能的物质配伍的其他药类以及药学上可接受的载体和/或辅料。进一步,所述载体/辅料包括(但并不限于):稀释剂、赋形剂如乳糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、淀粉、水等、填充剂如淀粉、蔗糖等;粘合剂如单糖浆、葡萄糖溶液、淀粉溶液、纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如干淀粉、海藻酸钠、海带多糖粉末、琼脂粉末、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂季铵化合物、十二烷基硫酸钠等;表面活性剂如聚氧化乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、十二烷基硫酸钠、硬脂酸单甘油酯、十六烷醇等;致湿剂如甘油、淀粉等;吸附载体如淀粉、乳糖、斑脱土、硅胶、高岭土和皂粘土等;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、聚乙二醇、硼酸粉末等。

[0038] 与现有技术相比,本发明取得的积极有益效果为:

[0039] (1) 本发明首次发现CRIP2基因/蛋白在DTX耐药的前列腺癌细胞中的表达量明显高于亲本前列腺癌细胞,因此,通过测定CRIP2基因或CRIP2蛋白的表达量可以作为判断用药者对DTX药物耐药性/敏感性。

[0040] (2) 本发明针对DTX耐药的前列腺癌肿瘤细胞,以CRIP2基因为靶点,干扰CRIP2基因表达,降低CRIP2基因表达量,可提高DTX耐药前列腺癌细胞对DTX的敏感性,从而逆转前列腺癌耐药;因此,通过抑制前列腺癌细胞中 CRIP2基因表达,能够逆转前列腺癌对DTX的耐药性,提高肿瘤治疗的效率。

[0041] (3) 本发明提供的特异靶向CRIP2基因的shRNA可以高效的抑制或敲低靶细胞中CRIP2基因的表达,从而抑制多西他赛耐药前列腺癌细胞增殖,进而抑制前列腺癌细胞的生长,因此,可以用于制备逆转肿瘤细胞对多西他赛耐药性的药物,在前列腺癌治疗中具有重要的意义。

## 附图说明

[0042] 图1为DU145亲本及DU145/DTXR细胞的细胞耐药性检测结果图;

[0043] 图2为CRIP2在DU145亲本及DU145/DTXR细胞中的表达水平结果图;其中,A为CRIP2基因在DU145亲本及DU145/DTXR细胞中的扩增结果图,B 为CRIP2蛋白在DU145亲本及DU145/DTXR细胞中的表达水平结果图;

[0044] 图3为稳定干扰DU145/DTXR细胞中CRIP2表达后基因扩增的结果图及 CRIP2蛋白的表达水平图;其中,A为CRIP2基因扩增结果图;B为CRIP2蛋白表达水平结果图;

[0045] 图4为DU145/DTXR细胞中稳定干扰CRIP2后细胞对DTX敏感性变化的结果图;

[0046] 图5为CCK-8实验检测稳定干扰CRIP2后DU145/DTXR细胞增殖能力的结果图;

[0047] 图6为克隆形成实验检测稳定干扰CRIP2后DU145/DTXR细胞增殖能力的结果图。

## 具体实施方式

[0048] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0049] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、部件和/或它们的组合。

[0050] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本发明的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本发明的技术方案。

[0051] 实施例一:CRIP2基因/蛋白在前列腺癌细胞及前列腺癌耐药细胞的表达情况研究

[0052] 1. 细胞培养:

[0053] 前列腺癌细胞系DU145购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DTX耐药前列腺癌细胞DU145(记作DU145/DTXR细胞)是由本实验室诱导建立(目前保存于本实验室,可向公众提供,公众可以通过购买的方式获得DU145/DTXR细胞)。前列腺癌细胞系DU145及DTX耐药前列腺癌细胞DU145均采用含10%胎牛血清的1640培养基在5%CO<sub>2</sub>、37℃恒温细胞培养箱中进行培养,其中,DTX耐药前列腺癌细胞培养基中添加相应浓度的DTX。

[0054] DTX耐药前列腺癌细胞DU145/DTXR的构建方法:

[0055] 本发明以多西他赛药物对人前列腺癌细胞DU145进行诱导,给药24h后换成不含药

物的培养基培养,直至细胞能够在该浓度下的培养基中稳定生长并传代;然后逐渐稳步递增多西他赛药物浓度并继续重复前述诱导培养步骤,直至获得耐受50nM多西他赛药物浓度的前列腺癌多西他赛耐药细胞系。起始药物浓度为1 nM,逐渐稳步递增的药物浓度依次分别为4nM、6nM、8nM、10nM、15nM、20nM、25nM、30nM、35nM、40nM、45nM、50nM。最终获得了能够在含有50nM多西他赛药物浓度的培养液中稳定生长和传代的前列腺癌细胞DU145 (即DU145/DTXR细胞)。

[0056] 2. 细胞耐药性分析:

[0057] 取对数生长期的DU145和DU145/DTXR细胞调整细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL 接种在96孔板中,贴壁36h后,加入多西他赛使其终浓度分别为0nM、0.78125 nM、1.5625nM、3.125nM、6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM、200nM,以上浓度梯度每组设置5个复孔,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中进行培养,48h后每孔加入10μL CCK8溶液,于培养箱中2h后测定450nm吸光度。

[0058] 耐药指数(RI) = 耐药细胞(DU145/DTXR) IC<sub>50</sub>/亲代细胞(DU145) IC<sub>50</sub>。人前列腺癌DU145细胞及其耐药细胞株DU145/DTXR对多西他赛的耐受性如图1所示。

[0059] 由图1可知,DU145细胞对低剂量多西他赛较为敏感,随着浓度增加,其生存率逐渐下降,DU145细胞的IC<sub>50</sub>为 $8.337 \pm 0.23$ nM,DU145/DTXR细胞的 IC<sub>50</sub>为 $61.39 \pm 0.29$ nM,其耐药指数(RI)为7.35,提示该耐药细胞DU145/DTXR 对多西他赛具有良好的耐受性。

[0060] 3. qRT-PCR检测CRIP2基因在DU145细胞及DU145/DTXR耐药细胞中的表达:

[0061] (1) 实验方法

[0062] 1) 总RNA抽提:

[0063] a) 取出对数生长期的DU145细胞及DU145/DTXR细胞,吸除培养基,用4℃预冷的PBS冲洗细胞2次后,吸净残余PBS。根据细胞数对应吸取适量的Trizol,在孔板或培养皿里快速裂解细胞,吹打后使细胞脱落,收集至1.5mL无酶EP 管中,室温静置5min。

[0064] b) 1mL Trizol对应加入200μL氯仿,剧烈手摇震荡混匀1min,室温静置 10min;静置完毕后转移至4℃离心机中,13000rpm,离心15min。

[0065] c) 离心完毕后可见明显的三个分层,用枪头轻轻收集最上面一层上清,宁愿少吸也不能吸到下面两层,这样可以避免污染,按上清:异丙醇为1:1的比例加入异丙醇,轻轻颠倒使其混匀,冰上静置20min后,4℃,13000rpm,离心8 min。

[0066] d) 离心完毕后,可见离心管底部有少许白色的沉淀,用枪头吸取弃去上清,避免把沉淀吸走,吸净上清后轻轻加入700μL DEPC水配制的75%乙醇,上下轻轻颠倒数下,室温静置2min后,4℃,7500rpm,离心5min。

[0067] e) 重复上一步的操作,用75%乙醇再洗涤一次。离心完毕后,同样的方法去上清,轻轻加入700μL 75%乙醇,上下轻轻颠倒数下,室温静置2min后,4℃,7500rpm,离心5min。

[0068] f) 用枪头吸取弃去乙醇,开大超净台鼓风进行晾干,晾干后加入适量的DEPC 水进行溶解,溶解后立刻放置于冰上。

[0069] g) 用测量仪测定RNA的浓度和纯度并做好标记,RNA尽量避免反复冻融,视情况进行分装,分装完后转移至-80℃冰箱保存。

[0070] 2) 逆转录合成cDNA:

[0071] a) 将抽提好的RNA置于冰上解冻,按浓度计算好不超过500ng的体积。

[0072] b) 将镊子在酒精灯上燃烧10s左右,冷却后从储存盒里取出RNase free的 0.2mL的PCR管。

[0073] c) 取出PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) kit中的5×gDNA Eraser Buffer、5×PrimeScript RT Master Mix,短暂离心,置于冰上。

[0074] d) 按表1中组份配制去除基因组DNA的反应液,在冰上进行:

[0075] 表1去除基因组DNA的反应液体系

试剂	使用量
5×gDNA Eraser Buffer	4μL
gDNA Eraser	1μL
Total RNA	*
RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 10μL

[0077] e) 上机反应条件:42°C 2min, 4°C ∞。

[0078] f) 按表2中组份配制RT反应液,在冰上进行:

[0079] 表2反转录反应体系

试剂	使用量
步骤 4) 的反应液	10 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix	1 μL
RT Primer Mix	1 μL
5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4 μL
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4 μL
Total	20 μL

[0082] g) 配置好的混合液轻柔混匀后,打开PCR仪,按下列循环设置好程序,将样品逐个放进仪器中,开始反转录反应,反转录反应程序为:37°C 15min, 85°C 5s, 4°C ∞,反转录反应完后即合成cDNA,做好标记,置于-20°C保存。合成的 cDNA, 1:3稀释用于qPCR反应 (RT反应液加入到下一步的Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) 反应体系时,其加入量不要超过qRT-PCR反应体积的1/10 (V/V) 量)。

[0083] 3) 荧光定量检测:

[0084] 以GAPDH为内参,通过qRT-PCR反应检测DU145亲本和DU145/DTXR 中CRIP2基因的扩增情况,测定二者之间的差异。

[0085] CRIP2的特异性扩增引物的核苷酸序列如下:

[0086] 上游引物:5'-AATGCCCAAGTGCACAA-3' (SEQ ID NO.1);

[0087] 下游引物:5'-GCTTCTCGTAGATGTAGGAGCC-3' (SEQ ID NO.2)。

[0088] GAPDH的特异性扩增引物的核苷酸序列如下:

[0089] 上游引物:5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3' ;

[0090] 下游引物:5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3' 。

[0091] 按表3的比例配置qRT-PCR反应体系(20μL体系)。

[0092] 表3 qRT-PCR反应体系

[0093]	名称	体积
	FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	10 $\mu$ L
	上游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
	下游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
	cDNA	1 $\mu$ L
	ddH <sub>2</sub> O	至20 $\mu$ L

[0094] 上机反应条件:1.预变性:95 $^{\circ}$ C 30s;2.PCR反应:95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s(荧光采集),40个循环;3.Dissociation:95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 30s,95 $^{\circ}$ C 15s。上机完后,拷贝数据,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析各样品中对应CRIP2的相对表达量。

[0095] (2)数据处理及分析

[0096] 实验都是按照重复3次来完成的,结果数据都是以平均值 $\pm$ 标准差的方式来表示,采用SPSS 18.0统计软件来进行统计分析的,两者之间的差异采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0097] (3)实验结果

[0098] qRT-PCR检测了DU145亲本细胞和DU145/DTXR细胞中CRIP2的基因扩增情况,其检测结果如图2中A所示。由图2中A可知,DU145/DTXR细胞中 CRIP2的基因扩增水平显著高于DU145亲本细胞,差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

[0099] 4.Western blot检测CRIP2蛋白在DU145亲本及DU145/DTXR细胞中的表达:

[0100] (1)实验方法:

[0101] 1)SDS-PAGE凝胶电泳:按甲叉双丙烯酰胺:丙烯酰胺=1:29的比例配置 30%凝胶储备液,并利用此储备液制作SDS-PAGE胶,根据目的蛋白的大小配制不同浓度分离胶。将蛋白样品混匀,瞬时离心后上样。配制电泳液(10 $\times$ 电泳液 100mL+10%SDS 10mL+去离子水定容至1000mL),先以80伏恒压进行电泳,跑 20min-30min至Marker条带分开,调整至100V-120V恒压电泳;观察条带的分离情况,直至目的条带分离开来后终止电泳,将对应的凝胶切割下来。

[0102] 2)转膜:将合适大小0.45 $\mu$ m的PVDF膜放入甲醇中浸泡15s活化后,按海绵-滤纸-凝胶-膜-滤纸-海绵依次由负极向正极放置,放入转膜装置前,用玻璃棒赶尽气泡。冰浴条件下250mA,转膜60min-90min。

[0103] 3)封闭:用TBST配制的5%脱脂奶粉进行封闭,室温条件下封闭2h。

[0104] 4)一抗孵育:用一抗稀释液按抗体说明书推荐的比例稀释一抗,将封闭好的 PVDF膜用一抗溶液浸泡后于4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育过夜。

[0105] 5)洗膜:将PVDF膜用TBST清洗3次,每次15min。

[0106] 6)二抗孵育:用含1%脱脂奶粉的TBST按1:5000的比例稀释HRP标记的山羊抗兔抗体,将膜浸泡在二抗溶液中,室温孵育2h。

[0107] 7)洗膜:将PVDF膜用TBST清洗3次,每次15min。

[0108] 8)曝光:C400曝光仪开机,将ECL显色液A液和B液按1:1等体积混合,将膜平放在曝光板上,将混合好的ECL显色液均匀的滴在膜上,放入曝光仪中,曝光并保存图片。

[0109] (2)数据处理及分析

[0110] 实验数据以平均值 $\pm$ 标准差的方式表示,采用SPSS 18.0统计软件来进行统计分

析,两者之间的差异采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0111] (3) 实验结果

[0112] Western Blot检测了DU145亲本细胞和DU145/DTXR细胞中CRIP2蛋白表达情况,其检测结果如图2中B所示。由图2中B可知,与DU145亲本细胞相比,CRIP2蛋白在DU145/DTXR细胞中的蛋白表达水平显著增加,暗示CRIP2 蛋白表达可能与前列腺癌多西他赛耐药性相关。

[0113] 由qRT-PCR和Western Blot的检测结果可知,CRIP2基因或CRIP2蛋白的表达量变化可以作为判断用药者对DTX药物耐药性/敏感性的依据之一。

[0114] 实施例二:在DU145/DTX耐药细胞中构建稳定干扰CRIP2的细胞系

[0115] 1. 细胞培养:

[0116] 细胞培养的具体操作与实施例一相同,在此不再赘述。

[0117] 2. shRNA设计

[0118] 选用北京擎科生物科技有限公司提供的病毒载体进行转染,CRIP2基因的shRNA慢病毒载体名称为:

[0119] 阴性对照shRNA(记作sh-NC)序列:GGGCAAGACGAGCGGGAAG;

[0120] shRNA 1的序列:GCAAGCCCAGGGCGAGTATTG(SEQ ID NO.3所示);

[0121] shRNA 2的序列:GGGCGTCCCATGATCCCTTCT(SEQ ID NO.4所示)。

[0122] 3. 细胞稳定转染:

[0123] 根据转染试剂Lipofectamine 3000 Reagent(Invitrogen)说明书转染细胞。具体步骤如下:

[0124] (1) 将293T细胞接种到T25培养瓶中,在 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中细胞培养 24h,使细胞融合度达到80%,转染前更换新鲜DMEM培养基3.8mL。

[0125] (2) 转染:提前将Lipofectamine 3000 Reagent(invitrogen)从 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出,将shRNA 1、shRNA 2、sh-NC从 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出,放在冰上溶解,每个标记好的EP 管中分别加入150 $\mu\text{L}$  Opti-MEM培养基。

[0126] a、将5 $\mu\text{g}$ 的shRNA与包装质粒PSPAX2和PMD2G按 shRNA:PSPAX2:PMD2G=5:4:1的比例(共10 $\mu\text{g}$ )共混,加入含有150 $\mu\text{L}$  Opti-MEM培养基的EP管中(A管);

[0127] b、将25 $\mu\text{L}$ 的Lipofectamine 3000Reagent(Invitrogen)加入含有100 $\mu\text{L}$  Opti-MEM培养基的EP管中(B管);

[0128] c、将A管中的液体用移液枪全部吸出,加入到B管中,室温孵育15min;

[0129] d、然后用移液枪B管中的液体全部吸出,均匀滴入6孔板中,摇晃混匀,将6孔板放回 $37^{\circ}\text{C}$ 温箱继续培养,8h后更换为新鲜的含10%FBS的DMEM培养基。培养72h后,用0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤,分装为1mL/管冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

[0130] (3) 病毒感染及稳转株筛选:

[0131] a、将DU145细胞按 $2.0 \times 10^5$ /孔接种到六孔细胞培养板中,在 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中细胞培养24h,待细胞汇合度达到50%进行病毒感染;

[0132] b、将DU145培养基更换为含2 $\mu\text{L}$ /孔polybrane的病毒液,在 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中细胞培养48h;

[0133] c、每个孔中加入5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素进行稳定筛选,连续换液培养,筛选出稳定转

染的细胞株。

[0134] 其中,稳定转染shRNA-NC的DU145/DTXR细胞(记作sh-NC)、稳定转染shRNA 1的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#1)和稳定转染shRNA 2的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#2)。

[0135] 4. qRT-PCR检测转染后的前列腺癌细胞中CRIP2的基因扩增水平:

[0136] (1) 实验方法

[0137] 1) 细胞RNA提取:

[0138] 细胞RNA提取的具体操作与实施例一相同,在此不再赘述。

[0139] 2) 逆转录合成cDNA:

[0140] 逆转录合成cDNA的具体操作步骤与实施例一相同,在此不再赘述。

[0141] 3) 荧光定量检测:

[0142] 荧光定量检测的具体操作步骤与实施例一相同,在此不再赘述。

[0143] (2) 实验结果

[0144] qRT-PCR检测结果如图3中A所示。由图3中A可知,与阴性对照组(sh-NC组)相比,稳定干扰CRIP2的sh-CRIP2#1、sh-CRIP2#2实验组的CRIP2基因扩增水平显著下调,表明通过慢病毒感染DU145/DTXR细胞成功获得了稳定干扰CRIP2的敲减细胞系。

[0145] 5. Western blot检测转染后的前列腺癌细胞CRIP2蛋白表达水平:

[0146] (1) 实验方法

[0147] 1) 蛋白质提取及浓度测定:

[0148] 蛋白质提取及浓度测定的具体操作与实施例一相同,在此不再赘述。

[0149] 2) Western blot:

[0150] Western blot的具体操作与实施例一相同,在此不再赘述。

[0151] (2) 实验结果

[0152] Western blot检测结果如图3中B所示。由图3中B可知,与阴性对照组(sh-NC组)相比,稳定干扰CRIP2的sh-CRIP2#1、sh-CRIP2#2实验组的CRIP2的蛋白表达水平显著下调;表明通过慢病毒感染DU145/DTXR细胞成功获得了稳定干扰CRIP2的敲减细胞系。。

[0153] 实施例三:稳定干扰CRIP2后DTX耐药前列腺癌细胞对DTX敏感性的变化

[0154] 采用CCK8法比较DTX对干扰CRIP2前后前列腺癌细胞的IC50值(半数致死浓度)。

[0155] 1. 细胞培养:

[0156] 本实验采用的细胞为稳定转染sh-NC的DU145/DTXR细胞(记作sh-NC)、稳定转染shRNA 1的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#1)和稳定转染shRNA 2的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#2)。

[0157] 细胞培养的具体操作与实施例一相同,在此不再赘述。

[0158] 2. 实验方法

[0159] (1) 实验分为3组,分别为阴性对照组(sh-NC组)、sh-CRIP2#1组、sh-CRIP2#2组,每组设置10个DTX浓度梯度,10个浓度梯度分别为200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.5625nM、0.78125nM、0nM,每个浓度梯度设置5个复孔。

[0160] (2) 稳定干扰CRIP2后的DU145 DTX细胞培养72h,用0.25%胰酶消化进行细胞计数,将细胞接种于96孔板中,DU145细胞浓度为 $1.0 \times 10^5$ /mL,每孔加100 $\mu$ L,接种完毕后放入

37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养36h。

[0161] (3) 36h后将96孔板取出,吸除培养基,按事先设计好的浓度梯度加入含对应浓度DTX的培养基,加完放入37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养48h。

[0162] (4) 培养48h后,在避光条件下,按培养基:CCK8试剂=10:1的比例配置反应溶液,将96孔板中的细胞换液后培养2h,测定450nm波长处OD值。

[0163] 3. 实验结果

[0164] CCK8检测并计算DTX对干扰CRIP2前后细胞的IC<sub>50</sub>值,每组实验重复三次,实验结果如图4所示。由图4可知,与阴性对照组(sh-NC组)相比,sh-CRIP2#1和sh-CRIP2#2的实验组细胞对DTX的IC<sub>50</sub>值显著降低(P<0.05)。由此说明,稳定干扰CRIP2后DU145 DTX细胞对DTX的敏感性增加。因此,CRIP2可以作为逆转前列腺癌细胞DTX耐药的潜在靶点。

[0165] 实施例四:稳定干扰CRIP2后对DTX耐药前列腺癌细胞的细胞增殖的影响

[0166] 1、CCK8检测细胞增殖实验

[0167] (1) 细胞培养:

[0168] 本实验采用的细胞为稳定转染sh-NC的DU145/DTXR细胞(记作sh-NC)、稳定转染shRNA 1的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#1)和稳定转染shRNA 2的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#2)。

[0169] 细胞培养的具体操作与实施例一相同,在此不再赘述。

[0170] (2) 实验方法

[0171] 1)、实验分为3组,分别为阴性对照组(sh-NC组)、sh-CRIP2#1组、sh-CRIP2#2组,每组均设4个复孔。

[0172] 2)、稳定干扰CRIP2后的DU145 DTX细胞培养72h,用0.25%胰酶消化进行细胞计数,将细胞接种于96孔板中,DU145细胞浓度为 $1.0 \times 10^5$ /mL,每孔加100μL;

[0173] 3)、避光条件下,按培养基:CCK8试剂=10:1的比例配置反应溶液,将96孔板中的细胞换液后培养2h,测定450nm波长处OD值。

[0174] (3) 实验结果

[0175] CCK8检测细胞增殖的实验结果如图5所示。由图5可知,与阴性对照组(sh-NC组)相比,sh-CRIP2#1和sh-CRIP2#2的实验组细胞增殖受到明显的抑制(P<0.05)。由此说明,稳定干扰CRIP2后对DU145/DTXR细胞增殖能力有明显的抑制作用。

[0176] 2、克隆形成实验

[0177] (1) 细胞培养:

[0178] 本实验采用的细胞为稳定转染shRNA-NC的DU145/DTXR细胞(记作sh-NC)、稳定转染shRNA 1的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#1)和稳定转染shRNA 2的DU145/DTXR细胞(记作sh-CRIP2#2)。

[0179] 细胞培养的具体操作与实施例一相同,在此不再赘述。

[0180] (2) 实验方法

[0181] 1)、实验分为3组,分别为阴性对照组(sh-NC组)、sh-CRIP2#1组、sh-CRIP2#2组,每组均设3个复孔。

[0182] 2)、稳定干扰CRIP2后的DU145/DTXR细胞培养72h,用0.25%胰酶消化进行细胞计数,将细胞接种于6孔板中,每孔铺1500个细胞,每组设置3个重复孔,每孔事先加入2mL完全

培养基,再根据计数浓度计算出每组需要的细胞量体积,对应加入相应孔中,混匀后放入37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,5天左右换一次液,10天左右形成了肉眼可见的细胞集落。

[0183] 3)、去除培养基,用PBS清洗一次,每孔加入1mL预冷4%多聚甲醛PBS 固定15min,固定完后,去除固定液,加入0.5%结晶紫染色20min以上,染色完后,去除结晶紫,用清水轻轻冲洗残余结晶紫,晾干后,置于明亮光线下用摄像机进行拍照。

[0184] (3) 实验结果

[0185] 实验结果如图6所示。其中,图6中A为克隆形成表型,由图6中A可知, sh-CRIP2#1和sh-CRIP2#2的实验组细胞克隆数明显少于阴性对照组 (sh-NC组);图6中B为不同敲低组形成细胞克隆数目的统计比较,由图6可知,与阴性对照组 (sh-NC组) 相比,sh-CRIP2#1和sh-CRIP2#2的实验组细胞增殖受到明显的抑制 ( $P < 0.05$ )。由此说明,稳定干扰CRIP2后对DU145/DTXR细胞增殖能力有明显的抑制作用。

[0186] 综上所述,DU145/DTXR耐药细胞中CRIP2蛋白的表达水平明显高于 DU145亲本,差异具有统计学意义,因此,CRIP2基因或CRIP2蛋白可用于检测前列腺癌对多西他赛耐药性或敏感性,通过测定CRIP2基因或CRIP2蛋白的表达量可以作为判断用药者对DTX药物耐药性/敏感性的依据之一。而且,本发明发现稳定干扰CRIP2基因表达可提高DTX耐药前列腺癌细胞对DTX的敏感性,同时,干扰CRIP2基因后能够明显抑制DTX耐药前列腺癌细胞的增殖能力,因此,CRIP2基因可作为逆转前列腺癌DTX耐药的潜在靶点,通过抑制CRIP2 基因的表达和/或功能能够逆转肿瘤细胞对多西他赛的耐药性,对前列腺癌的治疗具有重要的意义。

[0187] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,但不仅限于上述实例,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 河南省人民医院
- [0003] <120> CRIP2在检测前列腺癌对多西他赛耐药性及逆转前列腺癌对多西他赛耐药性中的应用
- [0004] <160> 4
- [0005] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 19
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] aatgccccaa gtgcgacaa 19
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 22
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] gcttctcgta gatgtaggag cc 22
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 21
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] gcaagcccag ggcgagtatt g 21
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 21
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] gggcgtccca tgatcccttc t 21

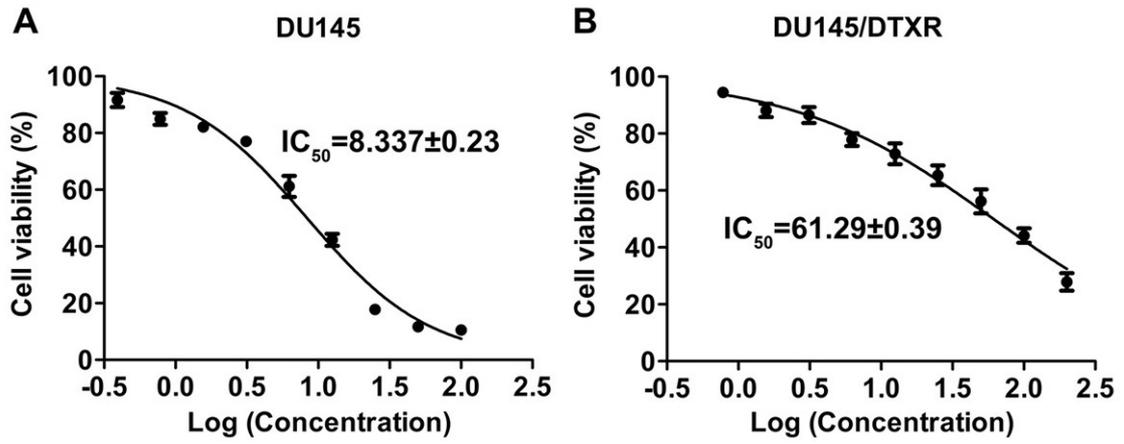


图1

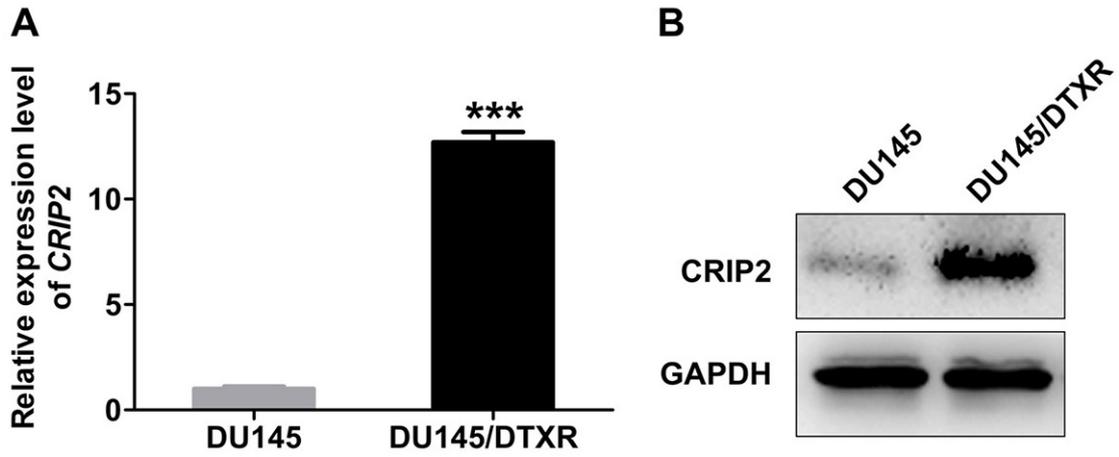


图2

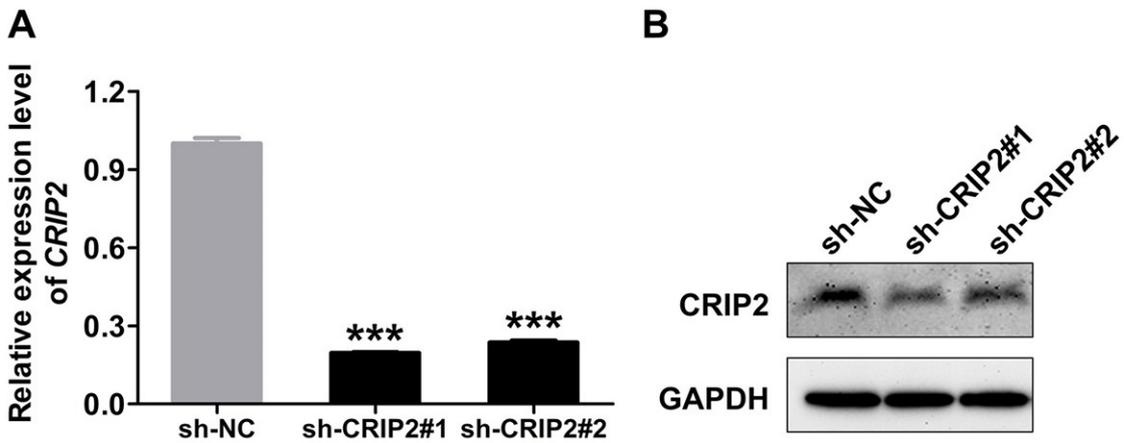


图3

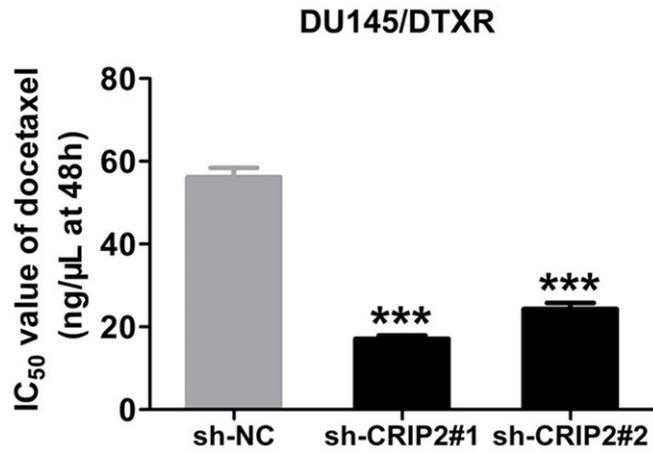


图4

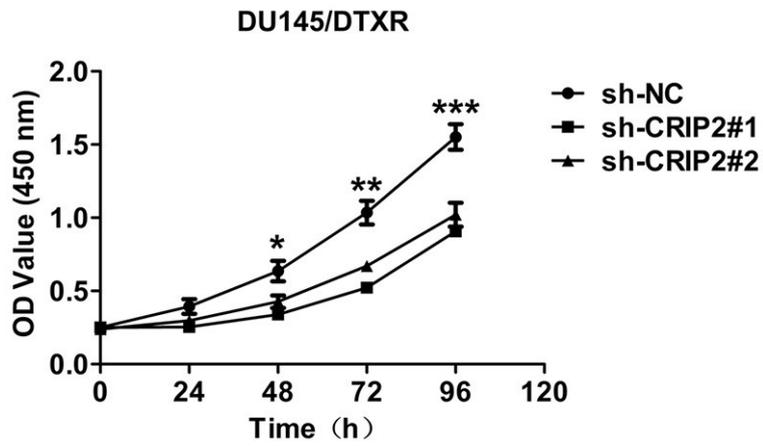


图5

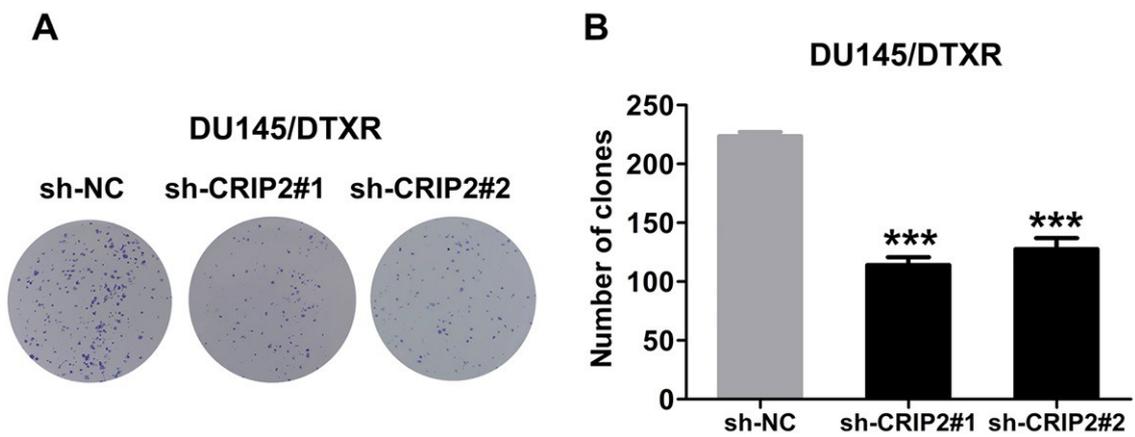


图6