



(21) 申请号 202211664856.X

(22) 申请日 2022.12.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115873955 A

(43) 申请公布日 2023.03.31

(73) 专利权人 复旦大学附属中山医院
地址 200032 上海市徐汇区医学院路136号

(72) 发明人 毕国澍 詹成 梁嘉琪 单光耀
卞赟艺

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司
31001
专利代理师 翁若莹

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6886 (2018.01)

(56) 对比文件

Qiu Tu等.RETSAT associates with DDX39B to promote fork restarting and resistance to gemcitabine based chemotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma.J Exp Clin Cancer Res.2022,第41卷274.

Guoshu Bi 等.Retinol Saturase Mediates Retinoid Metabolism to Impair a Ferroptosis Defense System in Cancer Cells.Cancer Research.2023,第83卷2387-2404.

审查员 夏向东

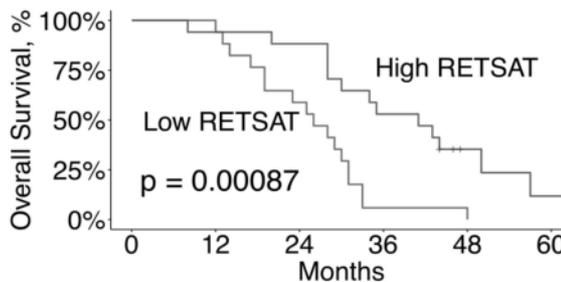
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于评估顺铂治疗肺腺癌敏感性的试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于评估顺铂治疗肺腺癌敏感性的试剂盒。本发明首先基于一系列细胞实验,结果发现基因RETSAT对铁死亡具有重要的介导作用,由此推断,RETSAT适合于作为预后指标判断肺腺癌患者对顺铂治疗的敏感性。随后采用qPCR的方法检测34例接受顺铂治疗的患者手术切除标本中RETSAT的表达情况,并分析其预后情况,发现RETSAT高表达的患者对顺铂治疗的反应较低表达患者更为敏感,预后较好。因此,RETSAT的表达水平可以用于预判肺腺癌患者对顺铂治疗是否敏感或耐药,利用现有的检测试剂即可方便地检测RETSAT的表达量,具有良好的临床应用价值和推广应用价值。



1. 检测RETSAT表达量的试剂在制备检测用于评估顺铂治疗肺腺癌敏感性的试剂盒中的应用。

一种用于评估顺铂治疗肺腺癌敏感性的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于评估顺铂治疗肺腺癌敏感性的试剂盒,属于生物医学技术领域。

背景技术

[0002] 肺癌作为最为常见、死亡率最高的肿瘤,发病率和死亡率均排名所有肿瘤第一位。其中肺腺癌是最常见的一种亚型。顺铂通过与肿瘤细胞DNA形成加合物,导致DNA损伤,从而发挥杀伤肿瘤细胞的作用。基于顺铂的联合化疗是肺腺癌的一线治疗方案,但有相当一部分患者因为耐药问题,并不能从中获益。因此,目前亟需一系列可靠的生物标记物,来辅助临床医生预判肺腺癌患者对顺铂化疗的敏感程度,对于提高患者的治疗效果有着极为重要的意义。

[0003] 目前已有报道提出一些可能的生物标志物(如胸苷酸合酶等)用于预判肺腺癌患者对顺铂联合化疗的敏感性,但由于成本高昂、流程繁琐、准确率低等原因,并未能广泛用于临床,仍可能有着具备更高敏感性、特异性和应用价值的标志物可以应用于肺腺癌患者个体化化疗方案的制定。

[0004] 铁死亡(Ferroptosis)最早由哥伦比亚大学Dr. Brent R. Stockwell在2012年提出,是一种铁依赖性的,区别于细胞凋亡、细胞坏死、细胞焦亡的一种新型程序性死亡方式。其主要机制是,外界刺激通过诱导细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)平衡失调,从而在二价铁所催化的芬顿反应(Fenton reaction)中,引起生物膜上的多不饱和脂肪酸(Poly-unsaturated fatty acid, PUFA)发生过氧化,从而引发磷脂双分子层结构改变、胞膜破裂,最后导致细胞死亡。铁死亡作为一种重要的细胞死亡方式,参与一系列病理生理过程。因此,近年来,铁死亡受到了研究者的广泛关注,关于铁死亡机制及其在疾病诊疗中应用的研究层出不穷。尤其是在肿瘤中,目前已经有研究报道称化疗会导致铁死亡——本课题组前期发表的一项研究显示,可以通过干预铁死亡相关基因以调控肿瘤的铁死亡水平,从而改善肿瘤对顺铂化疗的耐药现象。

发明内容

[0005] 本发明的目的是:针对目前用于评估肺腺癌患者对顺铂化疗的敏感程度的生物标志物存在的问题,本发明提出一种新的生物标志物RETSAT(Retinol saturase,视黄醇饱和酶),以判断肺腺癌患者对顺铂化疗所致肿瘤细胞铁死亡的敏感性,从而评估该患者使用顺铂治疗肺腺癌的适用性。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供了检测RETSAT表达量的试剂在制备检测用于评估顺铂治疗肺腺癌敏感性的试剂盒中的应用。

[0007] 优选地,所述试剂盒内还包括说明书,所述说明书记载了RETSAT表达量的评估截断值,所述评估截断值为8.809,如果检测样本中RETSAT表达量 $\Delta CT > 8.089$,则患者对顺铂化疗耐受;如果检测样本中RETSAT表达量 $\Delta CT \leq 8.089$,则患者对顺铂耐药。

[0008] 优选地,所述检测样本为肿瘤组织。

[0009] 本发明还提供了一种用于评估顺铂治疗肺腺癌敏感性的试剂盒,至少包括特异性检测RETSAT表达量的试剂。

[0010] 本发明首先采用全基因组CRISPR/Cas9敲除筛选技术,并在随后的细胞实验中证实:敲除RETSAT(全称为Retinol Saturase,视黄醇饱和酶,Ensembl:ENSG00000042445。)显著提升A549肺腺癌细胞对铁死亡诱导剂RSL3的耐受能力。考虑到顺铂同样有导致铁死亡的作用,在A549、H358两种肺腺癌细胞系中敲除或过表达RETSAT,并用顺铂处理,发现RETSAT敲除后,细胞对顺铂的耐药能力也显著升高,而过表达RETSAT则导致顺铂对肺腺癌细胞的杀伤能力显著增强。由此推断,RETSAT适合于作为预后指标判断肺腺癌患者对顺铂治疗的敏感性。随后采用qPCR的方法检测34例接受顺铂治疗的患者手术切除标本中RETSAT的表达情况,并分析其预后情况,发现RETSAT高表达的患者对顺铂治疗的反应较低表达患者更为敏感,预后较好。因此RETSAT的表达水平可以用于预判肺腺癌患者对顺铂治疗是否敏感或耐药。

[0011] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0012] 本发明基于一系列细胞实验及临床数据验证,发现基因RETSAT(Retinol saturase,视黄醇饱和酶)对铁死亡具有重要的介导作用,其表达水平与细胞对铁死亡诱导剂及顺铂联合处理的敏感性息息相关,因此可用于作为一种生物标志物来辅助预判肺腺癌患者对顺铂治疗的敏感性,利用现有的检测试剂即可方便地检测RETSAT的表达量,具有良好的临床应用价值和推广应用价值;且克服了现有的生物标志物(如胸苷酸合酶等)用于预判肺腺癌患者对顺铂联合化疗的敏感性,所存在的成本高昂、流程繁琐、准确率低、适用性低等问题。

附图说明

[0013] 图1为分别敲除或过表达RETSAT及对照的A549、H358肺腺癌细胞对不同浓度RSL3或顺铂(CDDP)的药物毒性曲线;

[0014] 图2为分别敲除或过表达RETSAT及对照的A549、H358肺腺癌细胞被RSL3或顺铂(CDDP)处理后的脂质过氧化水平;

[0015] 图3为肺腺癌组织内RETSAT表达水平的预后生存曲线。

具体实施方式

[0016] 为使本发明更明显易懂,兹以优选实施例,并结合附图作详细说明如下。

[0017] 实施例1

[0018] Crispr/Cas9全基因组高通量耐药基因筛选:

[0019] 首先根据已有的Crispr/Cas9敲除文库构建一系列sgRNA,将之转染入肺腺癌细胞A549中,通过采用合适的病毒用量,保证每个细胞仅转入一个sgRNA或者未转入sgRNA,随后使用嘌呤霉素处理杀死未转入sgRNA的细胞。由此得到的每个A549细胞中都会有随机的某个基因被敲除。随后,使用铁死亡诱导剂RSL3处理敲除后的细胞进行处理筛选,敏感细胞会受到抑制甚至死亡,而耐药细胞的正常增殖则不受影响。通过分别对处理前和处理后的细胞中sgRNA进行高通量测序分析,可以推断敲除每种基因后细胞活性情况的改变。经过

这一步骤,结果发现RETSAT敲除的细胞亚群在RSL3处理后较对照显著减少。实验数据如表1所示:

[0020] 表1

Gene	$\text{Log}(\text{Fc})_{\text{RSL3}}$	$\text{Log}(\text{Fc})_{\text{DMSO}}$	$\text{Log}(\text{Fc})_{\text{RSL3}} - \text{Log}(\text{Fc})_{\text{DMSO}}$
RETSAT	2.189	0.141	2.048

[0022] 此处, $\text{Log}(\text{Fc})_{\text{RSL3}}$ 表示某种sgRNA在细胞经过RSL3处理3天后与加药处理之前的表达值改变的倍数的对数值,而 $\text{Log}(\text{Fc})_{\text{DMSO}}$ 表示对照组,即同一种sgRNA在经过DMSO处理3天后与加药处理之前的表达值改变的对数值。由此可推断,RETSAT敲除后,肺腺癌细胞对RSL3耐受能力增强。

[0023] 实施例2

[0024] 肺腺癌细胞敲除或过表达RETSAT后对RSL3及顺铂耐药能力的改变:

[0025] 在A549和H358两种肺腺癌细胞中分别敲除或过表达RETSAT及相应对照,随后分别用RSL3和顺铂对转染后的细胞进行处理,待药效发挥后使用CCK8检测细胞活性。结果发现与对照相比,敲除RETSAT的细胞对RSL3和顺铂的耐受能力显著高于对照组,而过表达RETSAT则导致了细胞对这两种药物的敏感性上升(图1)。同时,BODIPY脂质过氧化实验显示,顺铂处理显著增加肺腺癌细胞脂质过氧化水平,提示顺铂导致铁死亡,而敲除RETSAT则显著缓解了这种作用(图2)。由此可推断,敲除RETSAT显著增强了肺腺癌细胞对顺铂所致铁死亡的耐受能力。

[0026] 实施例3

[0027] RETSAT在接受顺铂化疗的肺腺癌患者肿瘤组织中的表达情况与患者预后分析:

[0028] 采用qRT-PCR的方式,检测RETSAT在34例接受顺铂联合化疗的肺腺癌患者肿瘤组织中的表达情况。随后对患者进行长达5年以上的随访,比较该miRNA与患者预后的关联情况。具体步骤如下:

[0029] (1) 提取组织样本中的总RNA。

[0030] (2) 采用qRT-PCR检测RETSAT的表达:采用翊圣公司提供的Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix在Thermo Fisher公司所提供的QuantStudio 5荧光定量PCR仪上进行检测,引物序列为:RETSAT:Forward:TACTTGGGACTATTCTCTGGCA,Reverse:TACTTGGGACTATTCTCTGGCA;内参基因GAPDH:Forward:AGAAGGCTGGGCTCATTTG,Reverse:AGGGCCATCCACAGTCTTC。上述引物均由上海生工生物工程股份有限公司提供。

[0031] (3) 随访患者生存情况(>5年)。随访周期为每年一次,最长随访时间为10年。

[0032] (4) 生存曲线分析检测结果。取RETSAT相对内参GAPDH的 ΔCT 值中位数8.089为截断值,从而区分出高/低表达组,对应不同的生存情况,结果如图3所示,对于接受顺铂治疗的肺腺癌患者来说,肿瘤组织样本内RETSAT高表达,意味着更好的预后,提示该患者对顺铂反应良好。因此,RETSAT的表达水平可用于预判肺腺癌患者对顺铂治疗的敏感性。同时,RETSAT表达水平应用于cox比例风险回归模型而计算出的Harrell's c-index为0.681,提示预测敏感度、特异度良好。

[0033] 因此,本发明的结果表明:检测肺腺癌患者肿瘤样本中RETSAT的表达,如果样本中RETSAT表达低(即 $\Delta\text{CT} > 8.089$),则患者对顺铂化疗耐受;若RETSAT表达高(即 $\Delta\text{CT} \leq 8.089$),则患者对顺铂耐药。

[0034] 上述实施例仅为本发明的优选实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

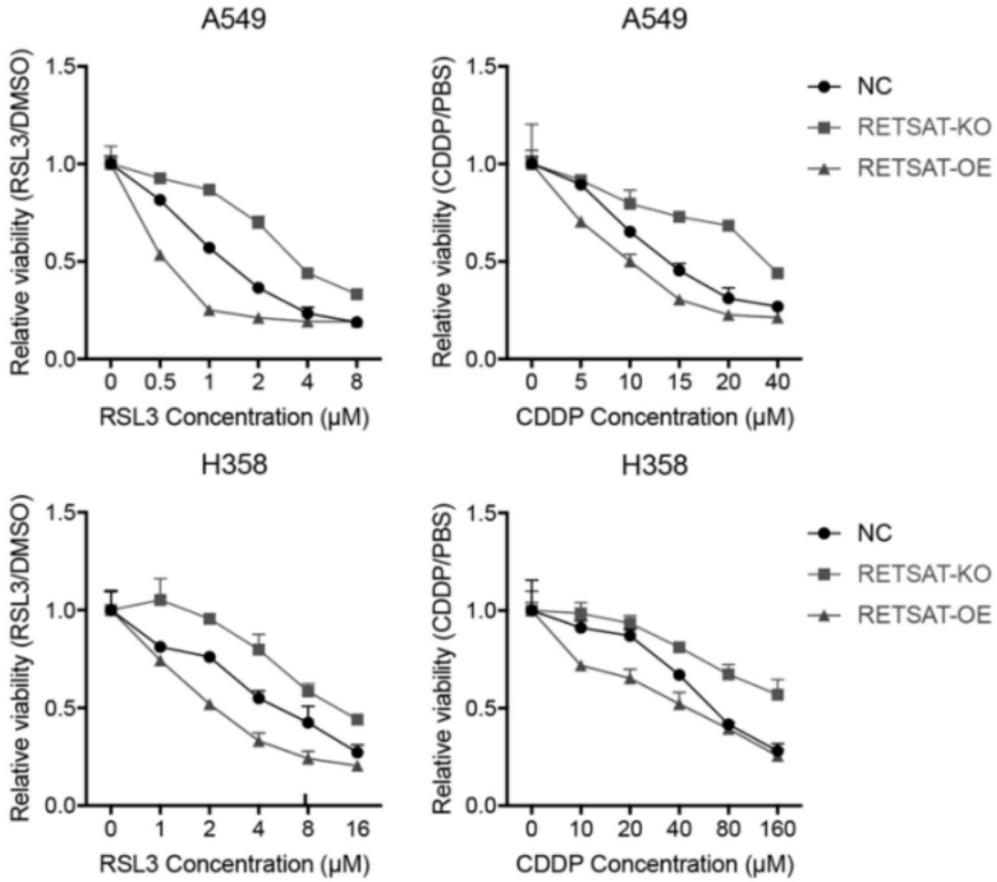


图1

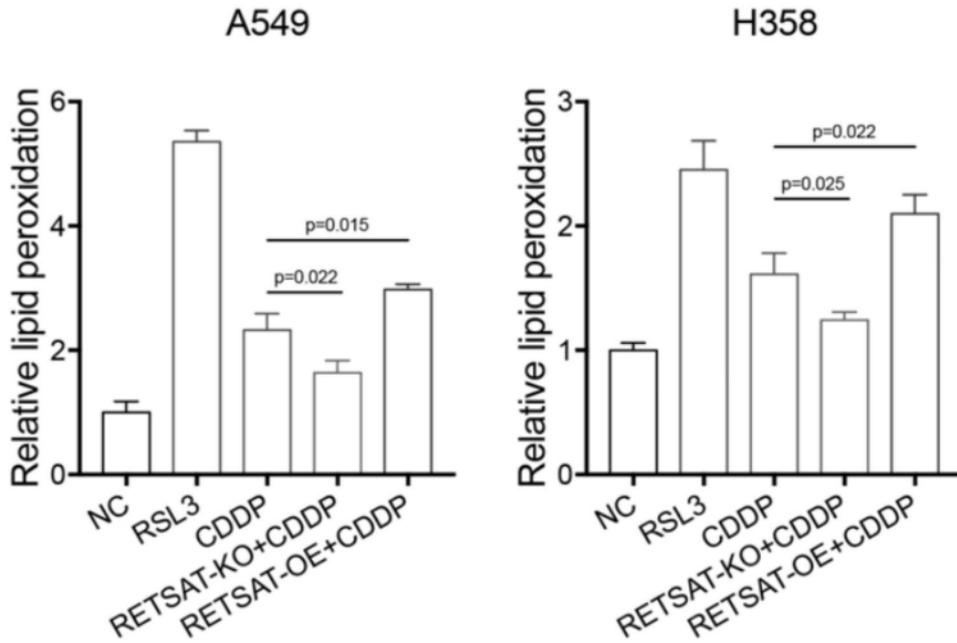


图2

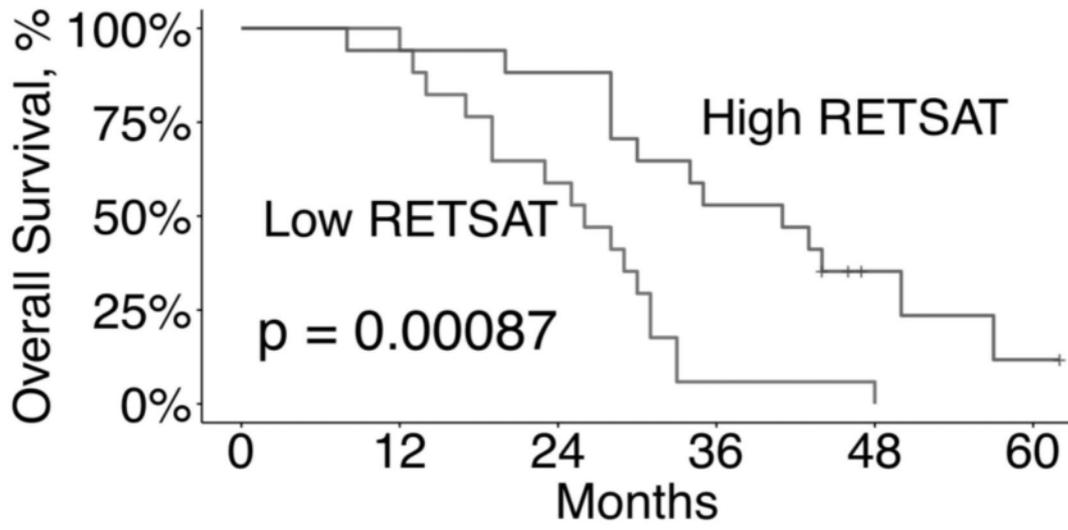


图3