



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119464476 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 18

(21) 申请号 202411601888.4

(22) 申请日 2024.11.11

(71) 申请人 南京医科大学

地址 211166 江苏省南京市鼓楼区汉中路
140号

(72) 发明人 顾爱华 陈秀 徐进 刘倩

(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 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

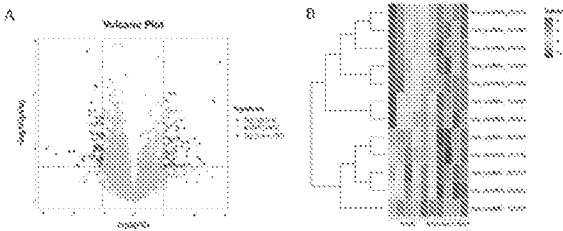
序列表 (电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种血浆circRNA生物标志物在颅缝早闭诊
断和治疗中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种血浆circRNA生物标志物在颅缝早闭诊断和治疗中的应用。本发明提供的标志物has_circ_0002572能够有效诊断颅缝早闭,同时可以通过颅缝早闭部位皮下注射过表达has_circ_0002572的AAV载体抑制颅缝过早闭合,达到早期治疗颅缝早闭的效果。本发明提供的血浆circRNA生物标志物为颅缝早闭的诊断和治疗靶点提供了新的思路,具有广阔的应用前景。



1. 一种用于颅缝早闭辅助诊断和/或治疗的血浆circRNA生物标志物,其特征在于,所述血浆circRNA生物标志物为hsa_circ_0002572;hsa_circ_0002572的核酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 检测权利要求1所述的血浆circRNA生物标志物表达量的试剂在制备颅缝早闭辅助诊断试剂中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述的检测权利要求1所述的血浆circRNA生物标志物表达量的试剂为所述hsa_circ_0002572的特异性检测引物。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述hsa_circ_0002572的特异性检测引物序列如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。

5. hsa_circ_0002572或过表达hsa_circ_0002572的物质在制备颅缝早闭治疗药物中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的过表达hsa_circ_0002572的物质为过表达hsa_circ_0002572的重组表达载体。

7. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的过表达hsa_circ_0002572的物质为过表达hsa_circ_0002572的病毒颗粒;所述病毒颗粒能够转导哺乳动物的细胞并在哺乳动物的细胞中表达hsa_circ_0002572;所述的病毒颗粒优选AAV颗粒。

8. 一种用于治疗颅缝早闭的药物组合物,其特征在于,包含过表达hsa_circ_0002572的病毒颗粒,优选包含过表达hsa_circ_0002572的AAV颗粒。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其特征在于,还包含将所述的过表达hsa_circ_0002572的病毒颗粒制备为药物制剂的常规药用辅料。

10. 一种颅缝早闭辅助诊断试剂盒,其特征在于,包含检测权利要求1所述的血浆circRNA生物标志物表达量的试剂,优选包含所述hsa_circ_0002572的特异性检测引物和检测内参基因的引物,进一步优选包含SEQ ID NO:2-5所示的引物。

一种血浆circRNA生物标志物在颅缝早闭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,涉及一种血浆circRNA生物标志物在颅缝早闭诊断和治疗中的应用。

背景技术

[0002] 颅缝早闭是第二常见的颅面异常。过早的颅骨闭合会导致颅骨形状的畸形并限制大脑的生长,严重的话,会导致颅骨生长异常、颅内压升高、大脑发育延迟,并损害认知功能。约有15-30%的病例伴有其他临床症状,可能包括手足畸形、骨骼和心脏缺陷等。目前颅缝早闭症的治疗方式主要为手术治疗,但手术创伤大风险高。因此,寻找无创、安全和更有效的治疗方法对颅缝早闭的早期诊治显得尤为重要。

[0003] 随着RNA高通量测序技术的发展和生物技术的进步,发现许多非编码RNA在人体内执行多种生物学功能,并参与多种疾病的发生和发展。circRNA是内源性长非编码RNA的一个神秘亚类,在转录或转录后水平调节基因。由于它们的闭环结构,环状RNA能够逃避核酸外切酶的降解,并且比线性RNA稳定得多。随着检测技术的进步,circRNAs的检测变得更加可行,这为它们在颅缝早闭的诊断和治疗中的应用提供了可能。研究表明,circRNAs具有多种功能,包括充当miRNA海绵,调节基因转录,吸附RNA结合蛋白,调节蛋白质翻译。因此,研究circRNAs在颅缝早闭中的作用机制,开发基于circRNAs的诊断和治疗工具,对于提高颅缝早闭的早期诊断及治疗能力具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是根据现有技术的上述不足,提供一种血浆circRNA生物标志物在颅缝早闭诊断和治疗中的应用。

[0005] 本发明的目的可通过以下技术方案实现:

[0006] 一种用于颅缝早闭辅助诊断和/或治疗的血浆circRNA生物标志物,所述血浆circRNA生物标志物为hsa_circ_0002572;hsa_circ_0002572的核酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 检测所述的血浆circRNA生物标志物表达量的试剂在制备颅缝早闭辅助诊断试剂中的应用。

[0008] 作为本发明的一种优选,所述的检测权利要求1所述的血浆circRNA生物标志物表达量的试剂为所述hsa_circ_0002572的特异性检测引物。

[0009] 作为本发明的进一步优选,所述hsa_circ_0002572的特异性检测引物序列如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。

[0010] hsa_circ_0002572或过表达hsa_circ_0002572的物质在制备颅缝早闭治疗药物中的应用。

[0011] 作为本发明的一种优选,所述的过表达hsa_circ_0002572的物质为过表达hsa_

circ_0002572的重组表达载体。

[0012] 作为本发明的一种优选,所述的过表达hsa_circ_0002572的物质为过表达hsa_circ_0002572的病毒颗粒,优选过表达hsa_circ_0002572的AAV颗粒;所述病毒颗粒尤其是AAV颗粒能够转导哺乳动物的细胞并在哺乳动物的细胞中表达hsa_circ_0002572。所述AAV颗粒包含插入一对AAV反向末端重复序列(ITR)之间的核酸,所述核酸编码hsa_circ_0002572。

[0013] 过表达hsa_circ_0002572的病毒颗粒可以利用本领域常规技术手段制备,也可以委托生物公司制备,只要能够在哺乳动物体内过表达hsa_circ_0002572即可。

[0014] 向有需要的哺乳动物颅缝早闭部位皮下给予多个所述的AAV颗粒以治疗颅缝早闭。

[0015] 一种用于治疗颅缝早闭的药物组合物,包含过表达hsa_circ_0002572的病毒颗粒,优选包含过表达hsa_circ_0002572的AAV颗粒。

[0016] 作为本发明的一种优选,还包含将所述的过表达hsa_circ_0002572的病毒颗粒制备为药物制剂的常规药用辅料。

[0017] 一种颅缝早闭辅助诊断试剂盒,包含检测所述的血浆circRNA生物标志物表达量的试剂,优选包含所述hsa_circ_0002572的特异性检测引物和检测内参基因的引物,进一步优选包含SEQ ID NO:2-5所示的引物。

[0018] 有益效果:

[0019] 本发明的优点和有益效果:

[0020] 本发明提供的血浆circRNA生物标志物能够有效诊断颅缝早闭,同时可以通过过表达hsa_circ_0002572抑制间充质干细胞向成骨细胞分化,抑制颅缝过早闭合,达到颅缝早闭早期诊治的效果。本发明提供的hsa_circ_0002572血标志物为颅缝早闭的诊断和治疗提供了新的思路,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0021] 图1是颅缝早闭症患者血浆中circRNA差异性表达。(A) 差异表达circRNA火山图;(B) 具有人鼠同源性的异常低表达circRNA表达谱。

[0022] 图2是间充质干细胞诱导成骨分化第1和7天过程中circRNA的动态表达。

[0023] 图3是has_circ_0002572和hsa_circ_0008616的siRNA对hMSCs成骨分化的影响。

[0024] 图4是颅缝早闭小鼠与野生型小鼠颅缝中has_circ_0002572表达情况。

[0025] 图5是人群中has_circ_0002572的诊断效能。(A) has_circ_0002572在不同处理组血浆中的浓度,其中CON:健康对照;CS:颅缝早闭患者。(B) has_circ_0002572的受试者工作曲线(ROC)分析结果。

[0026] 图6是体内过表达has_circ_0002572的AAV对颅缝早闭症小鼠进行治疗。(A) qRT-PCR实验证实该AAV确实在小鼠体内过表达has_circ_0002572。(B) 该AAV对颅缝早闭小鼠的治疗效果。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述。

[0028] 如无特别标注,实施过程中的条件和方法都按照常规方式进行。所使用的试验材料,如无特殊说明,均为市售普通产品。

[0029] 实施例1:筛选与颅缝早闭相关的circRNA

[0030] 1.1样本收集

[0031] 本研究在南京市儿童医院收集符合要求的颅缝早闭患儿和正常对照血液样本,通过对资料的整理,从中选择了符合要求的5例健康对照、5例颅缝早闭患儿作为实验对象。所有研究对象监护人均签署知情同意书。

[0032] 1.2血浆RNA的提取

[0033] 使用RNA提取试剂盒提取各血清本中的RNA,操作步骤按说明书进行。

[0034] 1.3circRNA表达谱的筛选

[0035] 委托上海康成生物工程有限公司,利用Arraystar公司Human circular RNA Array V2.0芯片建立circRNA的表达谱,筛选出具有差异的circRNA。显著差异被定义为 $|\log_2FC| > 1.5$ 和 $FDR \leq 0.05$ 。

[0036] 1.4实验结果

[0037] 如图1所示,共鉴定出134个失调的circRNA,其中74个circRNA上调,60个circRNA下调(图1A)。在60个circRNA下调中,有12个circRNA具有人鼠同源性(图1B)。

[0038] 实施例2:筛选与间充质干细胞成骨分化相关的circRNA

[0039] 2.1细胞培养

[0040] 人间充质干细胞(hMSCs)培养于含有10%胎牛血清(Gibco公司)和1%青霉素-链霉素(Gibco公司)的DMEM培养基(Gibco公司)中,培养条件为含有5%的CO₂的37℃细胞培养箱。将hMSCs接种于6孔板中,24小时后将培养基更换为成骨诱导培养基。诱导不同时间后,收集细胞。

[0041] 2.2qRT-PCR

[0042] 按照说明书,使用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA。用逆转录酶试剂盒将500ng总RNA的等分试样逆转录成cDNA。使用SYBR green混合物和LightCycler 480进行实时定量PCR。12个circRNA具有人鼠同源性circRNA的特异性转录物的引物如表1所示。

[0043] 表1

	引物名称	引物序列(5'-3')
[0044]	hsa_circ_0108457-F	GGGAAAAGGACATCCAAGCC
	hsa_circ_0108457-R	AGGCCCGTGTTCATAATGGAG

	hsa_circ_0001984-F	GTGGGGGATGGAAGAATGGG
	hsa_circ_0001984-R	TTTTGCATAGTGGGAGCGGT
	hsa_circ_0008616 -F	AGTGGAGCTCCCATCTTACCT
	hsa_circ_0008616-R	CTTGGCCGTGTCATTTGCAT
	hsa_circ_0089254-F	CCATCTTACCCCTGGTGCAG
	hsa_circ_0089254-R	TCCCTTCTTTGATGGCGTTCT
	hsa_circ_0005035-F	GGAGGAGAAGCCGATGTGTG
	hsa_circ_0005035-R	CTGCTGATAGTCGTTGCGGA
	hsa_circ_0089252-F	CTGGAAGGCGTGAAGTCAGA
	hsa_circ_0089252-R	CCCTTCTTTGATGGCGTTCTC
	hsa_circ_0061774-F	GTCATCTTCGACAGAGCCCA
	hsa_circ_0061774-R	GTGTCTATGTAGGAGTGCGGG
[0045]	hsa_circ_0001360-F	TTTCACACCCGCTACCACTG
	hsa_circ_0001360-R	GAAGCCTGGGAACGGCTTAT
	hsa_circ_0137646-F	CTTCACATTCCAGCACACCC
	hsa_circ_0137646-R	TGGGAAACTAGGTCATGCGG
	hsa_circ_0002561-F	AGTTACTTGTTTCAGTCCAGGTG
	hsa_circ_0002561-R	ATGGGTTGCTCAGTAGGCTG
	hsa_circ_0002572-F	TCTAACAAGAGGTCCCCAGC
	hsa_circ_0002572-R	CAGGAAAGGTGGCGTGAAGTA
	hsa_circ_0038822-F	ATCCGGAACAAGCTCTGCAA
	hsa_circ_0038822-R	CAATGCCCTGAGAGAGGCTT
	h-GAPDH F	CAATGACCCCTTCATTGACC
	h-GAPDH R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

[0046] 2.3实验结果

[0047] 如图2所示,在hMSCs诱导成骨分化不同时间,这12个具有人鼠同源性下调circRNA中,只有hsa_circ_0008616和hsa_circ_0002572随着成骨分化时间增加而降低。

[0048] 实施例3:has_circ_0002572在体外对hMSCs成骨分化能力的影响

[0049] 3.1细胞培养和转染

[0050] hMSCs培养于含有10%胎牛血清(Gibco公司)和1%青霉素-链霉素(Gibco公司)的DMEM培养基(Gibco公司)中,培养条件为含有5%的CO₂的37℃细胞培养箱。将hMSCs接种于6或12孔板中,待细胞融合度达到40%后,分别转染has_circ_0002572和hsa_circ_0008616的siRNA敲低。24小时后更换配置好的成骨诱导液进行诱导,置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养,每两天换液。培养7天后进行ALP染色,培养14天后进行茜素红染色,检测不同处

理对hMSCs成骨分化的影响。

[0051] 3.2实验结果

[0052] 如图3所示,发现敲低hsa_circ_0002572细胞矿化水平显著增加,细胞碱性磷酸酶活性增强。

[0053] 实施例4:颅缝早闭小鼠与野生型小鼠颅缝中has_circ_0002572表达情况。

[0054] 4.1收集样本

[0055] 从集萃药康(中国江苏)购买的6-8周龄雌性C57BL/6J小鼠和Twist+/-小鼠。WT小鼠与Twist+/-雄鼠交配,子代小鼠经基因型鉴定后,选择收集出生后9天的WT小鼠和Twist+/-小鼠进行后续实验。所有动物程序均按照南京医科大学动物保护和使用委员会批准的协议进行。

[0056] 4.2石蜡切片

[0057] 选取出生后9天的WT小鼠和Twist+/-小鼠颅骨各5个,将颅骨在4%多聚甲醛中固定48小时。骨组织脱钙后,制成8微米厚石蜡切片。

[0058] 4.3circRNA原位杂交

[0059] Cy3标记的has_circ_0002572探针由上海吉玛基因设计并合成。根据说明书,使用荧光原位杂交试剂盒检测探针信号。并使用尼康共聚焦显微镜获取图像并进行分析。

[0060] 4.4实验结果

[0061] 如图4所示,has_circ_0002572在野生型小鼠和Twist+/-颅缝早闭小鼠中的表达。与WT小鼠相比,has_circ_0002572在Twist+/-小鼠的冠状缝中显著下调。

[0062] 实施例5:人群中has_circ_0002572的诊断效能

[0063] 5.1收集样本

[0064] 本研究在南京市儿童医院收集符合要求的颅缝早闭患儿和正常对照血液样本,通过对资料的整理,从中选择了符合要求的81例健康对照、67例颅缝早闭患儿作为实验对象。所有研究对象监护人均签署知情同意书。

[0065] 5.2qRT-PCR

[0066] 按照说明书,使用RNA提取试剂盒提取各血清本中的RNA。用逆转录酶试剂盒将500ng总RNA的等分试样逆转录成cDNA。使用SYBR green混合物和LightCycler 480进行实时定量PCR。

[0067] hsa_circ_0002572的特异检测引物序列如下:

[0068] F:5'-TCTAACAAGAGGTCCCCAGC-3'(SEQ ID No.2)

[0069] R:5'-CAGGAAAGGTGGCGTGAAGTA-3'(SEQ ID No.3)

[0070] GAPDH内参引物序列如下:

[0071] F:5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'(SEQ ID No.4)

[0072] R:5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'(SEQ ID No.5)

[0073] 5.3统计分析

[0074] 使用R的pROC分析绘制ROC曲线并计算其AUC面积

[0075] 5.4实验结果

[0076] 如图5A所示,与健康对照相比,颅缝早闭患者血浆样本中hsa_circ_0002572的相助下调($P<0.001$)。以hsa_circ_0002572作为检测变量,绘制ROC曲线以及计算其AUC值,结

果如5B所示,显示AUC值为0.885,最佳临界值点的特异性为0.801,敏感性为0.851,提示将hsa_circ_0002572应用于颅缝早闭的诊断具有较好的诊断效能。

[0077] 实施例6:体内过表达has_circ_0002572的AAV,评估其对颅缝早闭症小鼠治疗作用。

[0078] 6.1收集样本

[0079] WT雌鼠与Twist^{+/+}-雄鼠交配,对子代小鼠经基因型鉴定后选择Twist^{+/+}-小鼠进行后续实验。所有动物程序均按照南京医科大学动物保护和使用委员会批准的协议进行。

[0080] 6.2皮下注射过表达has_circ_0002572的AAV

[0081] 靶向过表达has_circ_0002572的AAV购自上海吉玛制药技术有限公司。子代Twist^{+/+}-小鼠出生后的第1天和第5天通过微量注射器,将AAV-oe-circ0002572以及AAV-oe-Vector注射到Twist1^{+/+}-小鼠的冠状缝,观察冠状缝的发育情况。

[0082] 6.3micro-CT

[0083] 在用CO₂对小鼠实施安乐死后,将颅骨从皮肤上剥离并使用SkyScan 1176高分辨率显微CT成像系统进行评估。以18 μ m的分辨率分别扫描每个颅骨。使用NRecon重建图像。

[0084] 6.4HE染色

[0085] 收集术后12天的WT和Twist^{+/+}-小鼠颅骨,将颅骨在4%多聚甲醛中固定48小时。骨组织脱钙后,制成8微米厚石蜡切片。然后使用HE染色试剂盒(碧云天,C0105S)进行染色。使用病理切片扫描仪获取图像并进行分析。

[0086] 6.5qRT-PCR

[0087] 收集术后12天的AAV-oe-circ0002572以及AAV-oe-Vector治疗Twist^{+/+}-小鼠颅骨,按照说明书,使用TRIzol试剂从颅缝组织中提取总RNA。用逆转录酶试剂盒将500ng总RNA的等分试样逆转录成cDNA。使用SYBR green混合物和LightCycler 480进行实时定量PCR。circ_0002572和gapdh的特异性转录物的引物如表2所示。

[0088] 表2

	引物名称	引物序列 (5'-3')
	circ_0002572-F	TCTAACAAGAGGTCCCCAGC
[0089]	circ_0002572-R	CAGGAAAGGTGGCGTGAAGTA
	mus-gapdh F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	mus-gapdh R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

[0090] 6.6实验结果

[0091] 如图6所示,qRT-PCR实验证实该AAV确实小鼠体内过表达has_circ_0002572(图6A)。Micro-CT与组织学分析结果显示,与AAV-oe-Vector处理相比,AAV-oe-circ0002572处理能明显减轻Twist1^{+/+}小鼠冠状缝过早闭合(图6B)。以上结果提示将hsa_circ_0002572应用于颅缝早闭的早期治疗具有较好的治疗效果。

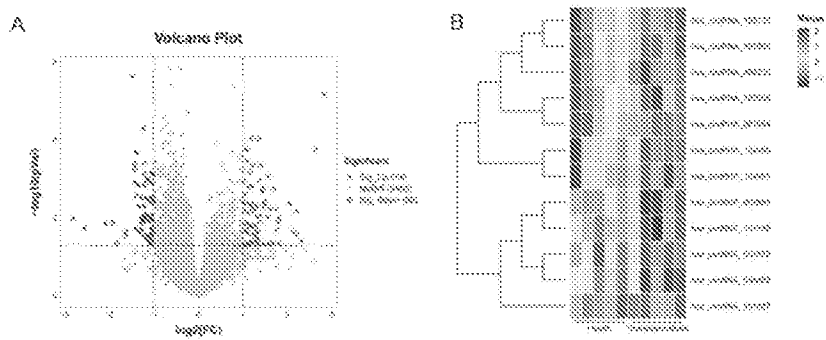


图1

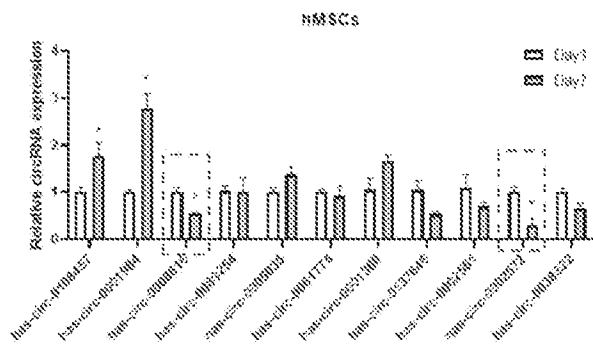


图2

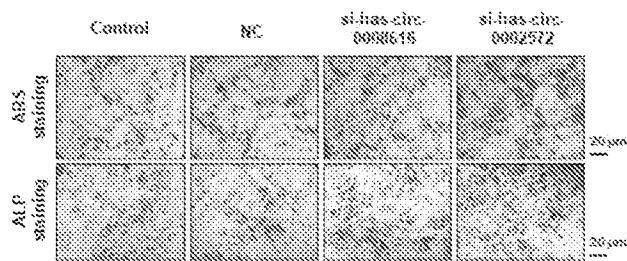


图3

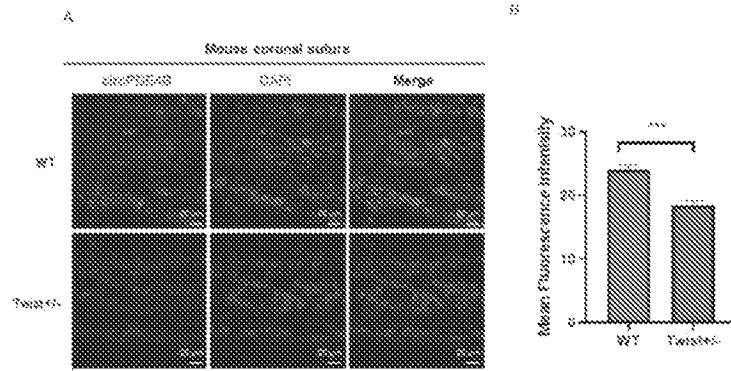


图4

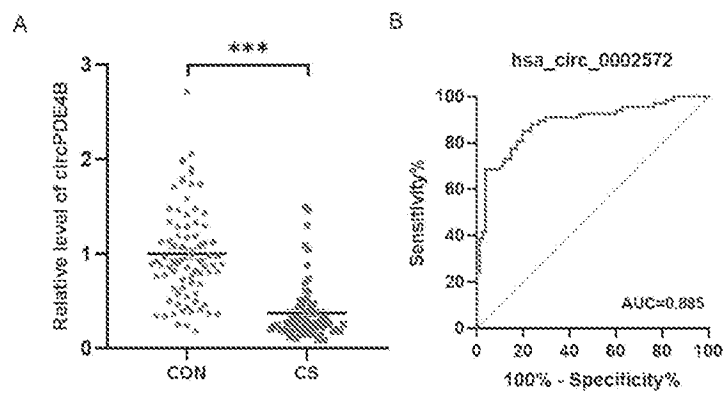
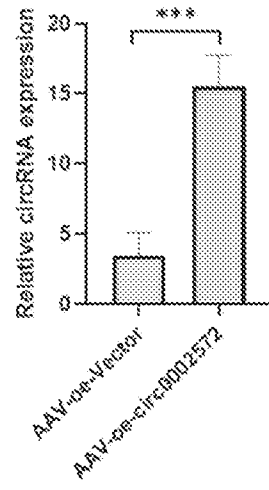
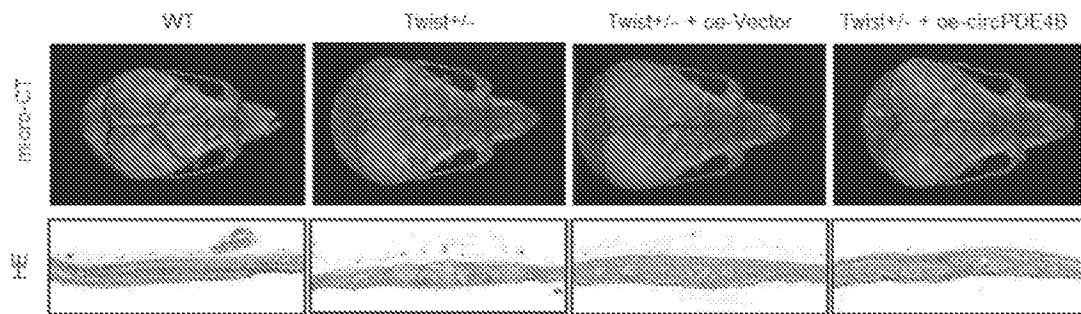


图5



A



B

图6