



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106995858 B

(45) 授权公告日 2021.03.02

(21) 申请号 201710404209.8

(22) 申请日 2017.06.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106995858 A

(43) 申请公布日 2017.08.01

(73) 专利权人 青岛洪深生物医药有限公司
地址 266000 山东省青岛市崂山区科苑纬
一路1号青岛国际创新园二期D2栋千
山大厦2503室

(72) 发明人 任静 马翠

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理
有限公司 11736
代理人 孟祥斌

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6886 (2018.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103146693 A, 2013.06.12
CN 104726570 A, 2015.06.24
ENSEMBL.Gene:CTD-2589H19.6
ENSG00000271781.《ENSEMBL》.2014, 参见注释.
Didier Meseure等.Long Noncoding RNAs
as New Architects in Cancer Epigenetics,
Prognostic Biomarkers, and Potential
Therapeutic Targets.《BioMed Research
International》.2015, 第2015卷第320214篇, 第
1-14页.
Jian Zhang等.Cancer Specific Long
Noncoding RNAs Show Differential
Expression Patterns and Competing
Endogenous RNA Potential in
Hepatocellular Carcinoma.《PLOS ONE》.2015,
第10卷(第10期), 第30141042篇, 第1-12页.

审查员 李洋

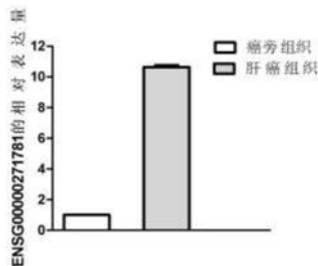
权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

一种与肝癌诊疗相关的lncRNA

(57) 摘要

本发明公开了一种与肝癌诊疗相关的lncRNA, 具体的所述lncRNA为ENSG00000271781。本发明首次发现ENSG00000271781基因在肝癌患者中表达上调, 使用QPCR和TCGA中的数据库进行交叉验证以及ROC曲线分析, 发现ENSG00000271781具有较高的AUC值, 提示ENSG00000271781作为肝癌的诊断标志物具有较高的准确性和特异性。本发明同时验证了改变ENSG00000271781的表达水平可以改变肝癌细胞的增殖、凋亡率以及迁移侵袭率, 提示可将ENSG00000271781用于治疗肝癌以及肝癌转移的药物。



1. 特异性检测ENSG00000271781表达水平的试剂在制备诊断肝癌的产品中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述试剂选自:
特异性识别ENSG00000271781的探针;或
特异性扩增ENSG00000271781的引物。
3. ENSG00000271781基因在筛选预防或治疗肝癌潜在物质中的应用。
4. 一种筛选治疗肝癌的潜在物质的方法,其特征在于,所述方法包括:
用候选物质处理表达或含有ENSG00000271781基因或的体系;和
检测所述体系中ENSG00000271781基因的表达;
其中,若所述候选物质可降低ENSG00000271781基因的表达水平,则表明该候选物质是
预防或治疗肝癌的潜在物质。
5. ENSG00000271781基因的抑制剂在制备治疗肝癌的药物组合物中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述药物组合物包括与所述抑制剂配伍的
其他药类以及药学上可接受的载体和/或辅料。

一种与肝癌诊疗相关的lncRNA

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种与肝癌诊疗相关的lncRNA,具体的涉及lncRNA ENSG00000271781。

背景技术

[0002] 原发性肝癌(primary liver cancer,PLC)是世界上常见的恶性肿瘤之一,90%以上为肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC),在男性中,其发病率占恶性肿瘤发病率的第二位,在女性中,其发病率占恶性肿瘤发病率的第六位;据最新统计,全球每年新发病例达到78万,因肝癌死亡的患者人数达到74万,病死率达到95%。我国肝癌发病人数占世界发病人数的50%,在恶性肿瘤死亡顺位中占第2位,在城市中仅次于肺癌,农村中仅次于胃癌,其已成为威胁我国人民健康和生命的一大杀手。

[0003] 快速增殖与转移是肝癌重要的生物学特点之一,肝癌的快速增殖与转移是导致许多肝癌患者预后较差,5年生存率低的重要因素之一。因此,研究导致肝癌快速增殖与转移的原因,揭示肝癌发病的分子机制对提高肝癌患者预后有着极其重要的作用。

[0004] 长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是广泛存在于真核生物中的一类本身不编码蛋白、转录本长度超过200nt的RNA分子,可以在多种层面上(表观遗传调控、转录调控及转录后调控等)调控基因的表达水平。按其与mRNA之间的位置关系大致分为五种类型:(1)正义长链非编码RNA;(2)反义长链非编码RNA;(3)双向长链非编码RNA;(4)内含子型长链非编码RNA;(5)基因间长链非编码RNA(即large intergenic noncoding RNA,lincRNA)。在整个基因组转录产物中,lncRNA所占的比例远远超过mRNA的比例。目前在肿瘤组织中发现的异常表达的lncRNA可涉及全身各个系统,分布较为广泛,对于lncRNA的鉴定使我们可以对整个功能性基因调控方式进行重新解读,通过研究lncRNA的生物学功能及其在疾病中的调控机制,能够更全面的理解疾病的发生机理,寻找新的疾病诊断标志物以及治疗靶点。

发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的之一,提供一种生物标志物,用于肝癌的早期诊断或者靶向治疗。

[0006] 本发明的目的之二,提供一种筛选治疗肝癌潜在药物的方法,通过调节生物标志物的表达水平来判断候选物是否是潜在的治疗肝癌的药物。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明提供了检测ENSG00000271781表达水平的试剂在制备诊断肝癌的产品中的应用,其中,ENSG00000271781在肝癌患者中表达水平上调。

[0009] 进一步,所述试剂选自:

[0010] 特异性识别ENSG00000271781的探针;或

[0011] 特异性扩增ENSG00000271781的引物。

[0012] 本发明提供了一种诊断肝癌的产品,所述产品包括检测样本中ENSG00000271781表达水平的试剂。本发明所述产品只要能够检测ENSG00000271781的表达水平即可,而不局限于常见的检测产品如芯片、核酸膜条、制剂或试剂盒等。所述“样本”包括细胞、组织、脏器、体液(血液、淋巴液等)、消化液、咳痰、肺泡支气管清洗液、尿、粪便等。优选的,所述样本为组织、血液。

[0013] 进一步,所述试剂包括特异性识别ENSG00000271781的探针,或特异性扩增ENSG00000271781的引物。

[0014] 在本发明的具体实施方式中,所述试剂包括特异性扩增ENSG00000271781的引物,所述特异性扩增ENSG00000271781的引物序列如SEQ ID NO.2~3所示。

[0015] 本发明提供了ENSG00000271781基因在筛选预防或治疗肝癌潜在物质中的应用。

[0016] 本发明提供了一种筛选预防或治疗肝癌的潜在物质的方法,所述方法包括:

[0017] 用候选物质处理表达或含有ENSG00000271781基因的体系;和

[0018] 检测所述体系中ENSG00000271781基因的表达;

[0019] 其中,若所述候选物质可降低ENSG00000271781基因的表达水平(优选显著降低,如低20%以上,较佳的低50%以上;更佳的低80%以上),则表明该候选物质是预防或治疗肝癌的潜在物质。所述体系选自:细胞体系、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

[0020] 所述候选物质包括(但不限于):针对ENSG00000271781基因或其上游或下游基因设计的干扰分子、核酸抑制物、小分子化合物等。

[0021] 本发明提供了ENSG00000271781在制备治疗肝癌的药物组合物中的应用。

[0022] 进一步,所述药物组合物包括ENSG00000271781功能性表达的抑制剂,所述抑制剂选自:以ENSG00000271781或其转录本为靶序列、且能够抑制ENSG00000271781基因表达或基因转录的干扰分子,包括:shRNA(小发夹RNA)、小干扰RNA(siRNA)、dsRNA、微小RNA、反义核酸,或能表达或形成所述shRNA、小干扰RNA、dsRNA、微小RNA、反义核酸的构建物。优选的,所述的抑制剂为siRNA。

[0023] 进一步,所述药物组合物还包括与所述抑制剂配伍的其他药类以及药学上可接受的载体和/或辅料。

[0024] 本发明提供了一种治疗肝癌的药物组合物,所述药物组合物包括:

[0025] ENSG00000271781功能性表达的抑制剂;和

[0026] 药学上可接受的载体。

[0027] 药学上可接受的载体包括(但不限于)缓冲剂、乳化剂、悬浮剂、稳定剂、防腐剂、生理食盐、赋形剂、填充剂、凝结剂与调和剂、表面活性剂、扩散剂、消泡剂。

附图说明

[0028] 图1是利用QPCR检测ENSG00000271781在肝癌患者中的表达情况图;

[0029] 图2是利用TCGA数据库交叉验证ENSG00000271781在肝癌患者中的差异表达图;

[0030] 图3是ENSG00000271781在肝癌患者中的ROC曲线图;

[0031] 图4是利用QPCR检测ENSG00000271781在肝癌细胞中的表达情况图;

[0032] 图5是检测转染siRNA对肝癌细胞中ENSG00000271781的表达影响图;

[0033] 图6是利用CCK8检测ENSG00000271781对细胞增殖的影响图；

[0034] 图7是检测ENSG00000271781对细胞的克隆形成集落的影响图；

[0035] 图8是检测ENSG00000271781对肝癌细胞凋亡的影响图；

[0036] 图9是Transwell小室检测ENSG00000271781基因对肝癌细胞迁移和侵袭的影响图；其中，图A是ENSG00000271781基因对肝癌细胞迁移的影响图，图B是ENSG00000271781基因对肝癌细胞迁移的影响图。

[0037] 具体的实施方式

[0038] 本发明经过广泛而深入的研究，通过高通量方法，采用目前覆盖数据库最广的lncRNA芯片，检测肝癌组织和癌旁组织中lncRNA的表达水平，发现其中具有明显表达差异的lncRNA片段，探讨其与肝癌的发生之间的关系，从而为肝癌的早期检测及靶向治疗寻找更好的途径和方法。通过筛选，本发明首次发现了肝癌中ENSG00000271781显著性上调。实验证明，siRNA干扰沉默ENSG00000271781，能够有效地抑制肝癌细胞的增殖，为肝癌的个性化治疗提供了新途径。

[0039] ENSG00000271781基因

[0040] ENSG00000271781基因位于5号染色体上，一种代表性的人ENSG00000271781基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明中的ENSG00000271781包括野生型、突变型或其片段。

[0041] 本领域技术人员将认识到，本发明的实用性并不局限于对本发明的靶标基因的任何特定变体的基因表达进行定量。如果当核酸或其片段与其它核酸(或其互补链)最佳比定时(具有适当的核苷酸插入或缺失)，在至少大约60%的核苷酸碱基、通常至少大约70%、更通常至少大约80%、优选至少大约90%、及更优选至少大约95-98%核苷酸碱基中存在核苷酸序列相同性，则这两个序列是“基本同源的”(或者基本相似的)。

[0042] 或者，当核酸或其片段与另一核酸(或其互补链)、一条链或其互补序列在选择性杂交条件下杂交时，则其间存在基本同源或(相同性)。当杂交比特异性整体丧失发生更具选择性时，存在杂交选择性。典型地，当在至少大约14个核苷酸的一段序列存在至少大约55%相同性、优选至少大约65%、更优选至少大约75%及最优选至少大约90%相同性时，发生选择性杂交。如本文所述，同源对比的长度可以是较长的序列节段，在某些实施方案中通常为至少大约20个核苷酸，更通常为至少大约24个核苷酸，典型为至少大约28个核苷酸，更典型为至少大约32个核苷酸，及优选至少大约36或更多个核苷酸。

[0043] 因此，本发明的多核苷酸与SEQ ID NO.1优选具有至少75%、更优选至少85%、更优选至少90%同源性。更优选地，存在至少95%、更优选至少98%同源性。

[0044] 本发明可以利用本领域内已知的任何方法测定基因表达。本领域技术人员应当理解，测定基因表达的手段不是本发明的重要方面。可以在转录水平上检测生物标志物的表达水平。

[0045] 检测技术

[0046] 本发明的lncRNA使用本领域普通技术人员已知的多种核酸技术进行检测，这些技术包括但不限于：核酸测序、核酸杂交和核酸扩增技术。

[0047] 核酸测序技术的示例性非限制性实例包括但不限于链终止子(Sanger)测序和染料终止子测序。本领域的普通技术人员将认识到，由于RNA在细胞中不太稳定并且在实验中

更易受到核酸酶攻击,因此在测序前通常将RNA逆转录成DNA。

[0048] 本发明可在检测前或与检测同时地对核酸(例如,ncRNA)进行扩增。核酸扩增技术的示例性非限制性实例包括但不限于:聚合酶链式反应(PCR)、逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、转录介导的扩增(TMA)、连接酶链式反应(LCR)、链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)。本领域的普通技术人员将认识到,某些扩增技术(例如,PCR)需要在扩增前将RNA逆转录成DNA(例如,RT-PCR),而其他扩增技术则直接扩增RNA(例如,TMA和NASBA)。

[0049] 通常称为PCR的聚合酶链式反应使用变性、引物对与相反链的退火以及引物延伸的多个循环,以指数方式增加靶核酸序列的拷贝数;TMA的转录介导的扩增(在基本上恒定的温度、离子强度和pH的条件下自身催化地合成靶核酸序列的多个拷贝,其中靶序列的多个RNA拷贝自身催化地生成另外的拷贝;LCR的连接酶链式反应使用与靶核酸的相邻区域杂交的两组互补DNA寡核苷酸;其他扩增方法包括例如:通常称为NASBA的基于核酸序列的扩增;使用RNA复制酶(通常称为QB复制酶)扩增探针分子本身的扩增;基于转录的扩增方法;以及自我维持的序列扩增。

[0050] 本发明中非扩增或扩增的核酸可通过任何常规的手段检测。

[0051] 芯片、核酸膜条、试剂盒

[0052] 在本发明中芯片包括:固相载体;以及有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针,所述的寡核苷酸探针特异性地对应于ENSG00000271781所示的部分或全部序列。

[0053] 所述固相载体包括无机载体和有机载体,所述无机载体包括但不限于有硅载体、玻璃载体、陶瓷载体等;所述有机载体包括聚丙烯薄膜、尼龙膜等。

[0054] “探针”指能与另一分子的特定序列或亚序列或其它部分结合的分子。除非另有指出,术语“探针”通常指能通过互补碱基配对与另一多核苷酸(往往称为“靶多核苷酸”)结合的多核苷酸探针。根据杂交条件的严谨性,探针能和与该探针缺乏完全序列互补性的靶多核苷酸结合。探针可作直接或间接的标记,其范围包括引物。杂交方式,包括,但不限于:溶液相、固相、混合相或原位杂交测定法。

[0055] 本发明中的示例性探针包括PCR引物以及基因特异性DNA寡核苷酸探针,例如固定于微阵列基底上的微阵列探针、定量核酸酶保护检验探针、与分子条形码连接的探针、以及固定于珠上的探针。

[0056] 这些探针具有与靶点基因的特定的碱基序列互补的碱基序列。这里,所谓“互补”,只要是杂交即可,可以不是完全互补。这些多核苷酸通常相对于该特定的碱基序列具有80%以上、优选90%以上、更优选95%以上、特别优选100%的同源性。这些探针可以是DNA,也可以是RNA,另外,可以为在其一部分或全部中核苷酸通过PNA(Polyamide nucleic acid,肽核酸)、LNA(注册商标,locked nucleic acid,Bridged Nucleic Acid,交联化核酸)、ENA(注册商标,2'-O,4'-C-Ethylene-bridged nucleic acids)、GNA(Glycerol nucleic acid,甘油核酸)、TNA(Threose nucleic acid,苏糖核酸)等人工核酸置换得到的多核苷酸。

[0057] 在本发明中,核酸膜条包括基底和固定于所述基底上的寡核苷酸探针;所述基底可以是任何适于固定寡核苷酸探针的基底,例如尼龙膜、硝酸纤维素膜、聚丙烯膜、玻璃片、硅胶晶片、微缩磁珠等。

[0058] 本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒可用于检测ENSG00000271781的表达水平。

在本发明的具体实施例中用于检测ENSG00000271781的表达水平的试剂包括特异性扩增ENSG00000271781的引物,所述引物序列序列如SEQ ID NO.2~3所示。所述的试剂盒中还含有用于标记RNA样品的标记物,以及与所述标记物相对应的底物。此外,所述的试剂盒中还可包括用于提取RNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂,包括但不限于:抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗液等。此外,所述的试剂盒中还包括使用说明书和/或芯片图像分析软件。

[0059] 本发明中基因检测试剂盒或基因芯片可用于检测包括ENSG00000271781基因在内的多个基因(例如,与肝癌相关的多个基因)的表达水平,将肝癌的多个标志物同时进行检测,可大大提高肝癌诊断的准确率。

[0060] 抑制剂和药物组合物

[0061] 基于发明人的发现,本发明提供了一种ENSG00000271781的抑制剂,所述抑制剂的性质对本发明来说并不重要,只要它抑制ENSG00000271781基因的功能性表达即可,这些抑制剂作为对于下调ENSG00000271781有用的物质,可用于预防或治疗肝癌。

[0062] 作为本发明的一种优选方式,所述ENSG00000271781的抑制剂是一种ENSG00000271781特异性的小干扰RNA分子。如本文所用,所述的“小干扰RNA”是指一种短片段双链RNA分子,能够以同源互补序列的mRNA为靶目标降解特定的mRNA,这个过程就是RNA干扰(RNA interference)过程。小干扰RNA可以制备成双链核酸的形式,它含有一个正义链和一个反义链,这两条链仅在杂交的条件下形成双链。一个双链RNA复合物可以由相互分离的正义链和反义链来制备。因此,举例来讲,互补的正义链和反义链是化学合成的,其后可通过退火杂交,产生合成的双链RNA复合物。

[0063] 在筛选有效的siRNA序列时,本发明人通过大量的比对分析,从而找出最佳的有效片段。本发明人设计合成了多种siRNA序列,并将它们分别通过转染试剂转染肝癌细胞系进行验证,选出干扰效果最佳的siRNA,进一步地在细胞水平实验,结果证明对于该siRNA在能有效的抑制细胞中ENSG00000271781基因的表达水平,以及肝癌细胞的增殖。

[0064] 本发明的核酸抑制物如siRNA可以化学合成,也可以通过一个重组核酸结构里的表达盒转录成单链RNA之后进行制备。siRNA等核酸抑制物,可通过采用适当的转染试剂被输送到细胞内,或还可采用本领域已知的多种技术被输送到细胞内。

[0065] 本发明还提供了一种药物组合物,它含有有效量的所述的ENSG00000271781的抑制剂,以及药学上可接受的载体。所述的组合物可用于抑制肝癌。任何前述的ENSG00000271781的抑制剂均可用于药物组合物的制备。

[0066] 在本发明中,药学上可接受的载体包括(但不限于)缓冲剂、乳化剂、悬浮剂、稳定剂、防腐剂、生理食盐、赋形剂、填充剂、凝结剂与调和剂、界面活性剂、扩散剂、消泡剂。

[0067] 如本文所用,所述“有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人或/或动物所接受的量。所述“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。该术语指这样一些药剂载体:它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在组合物中药学上可接受的载体可含有液体,如水、盐水、缓冲液。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如填充剂、润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。所述的载体中还可以含有细胞(宿主细胞)转染试剂。

[0068] 本发明可以采用用本领域熟知的多种方法来将所述的抑制剂或其编码基因、或其药物组合物给药于哺乳动物。包括但不限于：皮下注射、肌肉注射、经皮给予、局部给予、植入、缓释给予等；优选的，所述给药方式是非肠道给予的。

[0069] 优选的，可采用基因治疗的手段进行。比如，可直接将ENSG00000271781的抑制剂通过诸如注射等方法给药于受试者；或者，可通过一定的途径将携带ENSG00000271781的抑制剂的表达单位（比如表达载体或病毒等，或siRNA或shRNA）递送到靶点上，并使之表达活性的ENSG00000271781抑制剂，具体情况需视所述的抑制剂的类型而定，这些均是本领域技术人员所熟知的。

[0070] 本发明的药物组合物可以进一步包含一种或多种抗癌剂。在具体的实施方案中，药物组合物包含至少一种抑制ENSG00000271781基因表达的化合物和至少一种化疗剂。用于本发明的化疗剂，包括但不限于：微管激活剂、烷化剂、抗增生抗代谢物、铂类化合物、DNA-烷化剂，抗肿瘤抗生素剂，抗代谢剂，微管蛋白稳定剂，微管蛋白去稳定剂，激素拮抗剂，拓扑异构酶抑制剂，蛋白激酶抑制剂，HMG-COA抑制剂，CDK抑制剂，细胞周期蛋白抑制剂，胱天蛋白酶抑制剂，金属蛋白酶抑制剂，反义核酸，三链螺旋DNA，核酸适体，和分子修饰的病毒、细菌和外毒素试剂。

[0071] 可药用载体可包括但不限于：病毒、微囊、脂质体、纳米颗粒或聚合物及其任意组合。相关的递送载体可包括但不限于：脂质体、生物相容性聚合物（包括天然聚合物和合成聚合物）、脂蛋白、多肽、多糖、脂多糖、人工病毒包膜、无机（包括金属）颗粒、以及细菌或病毒（例如杆状病毒、腺病毒和逆转录病毒）、噬菌体、黏粒或质粒载体。

[0072] 本发明的药物组合物还可与其他治疗肝癌的药物联用，其他治疗性化合物可以与主要的活性成分同时给药，甚至在同一组合物中同时给药。

[0073] 本发明的药物组合物还可以以单独的组合物或与主要的活性成分不同的剂量形式单独给予其它治疗性化合物。主要成分的部分剂量可以与其它治疗性化合物同时给药，而其它剂量可以单独给药。在治疗过程中，可以根据症状的严重程度、复发的频率和治疗方案的生理应答，调整本发明药物组合物的剂量。

[0074] 统计学分析

[0075] 在本发明的具体实施例中，实验都是按照至少重复3次来完成的，结果数据都是以平均值±标准差的方式来表示，采用SPSS18.0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。

[0076] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册（New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0077] 实施例1筛选与肝癌相关的基因标志物

[0078] 1、样品收集

[0079] 各收集10例肝癌患者的癌组织以及癌旁组织，患者均知情同意，上述所有标本的取得均通过组织伦理委员会的同意。

[0080] 2、RNA样品的制备

[0081] 利用QIAGEN的组织RNA提取试剂盒进行组织RNA的提取，按说明书的具体步骤进行

操作。

[0082] 3、逆转录和标记

[0083] 用Low RNA Input Linear Amplification Kit将mRNA逆转录成cDNA,同时用Cy3分别标记实验组和对照组。

[0084] 4、杂交

[0085] 基因芯片采用康城生物-Human lncRNA Array,按芯片使用说明书的步骤进行杂交。

[0086] 5、数据处理

[0087] 杂交后芯片用Agilent扫描仪扫描,分辨率为5 μ m,扫描仪自动以100%和10%PMT各扫描1次,2次结果Agilent软件自动合并。扫描图像数据采用FeatureExtraction进行处理分析,得到的原始数据应用Bioconductor程序包进行后续数据处理。差异基因筛选标准:FDR<0.01,abs(log₂FC)>1.5。

[0088] 6、结果

[0089] 与癌旁组织相比,ENSG00000271781在肝癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织。

[0090] 实施例2 QPCR测序验证ENSG00000271781基因的差异表达

[0091] 1、对ENSG00000271781基因差异表达进行大样本QPCR验证。按照实施例1中的样本收集方式收集肝癌组织和癌旁组织样本各60例。

[0092] 2、RNA提取步骤同实施例1。

[0093] 3、逆转录:

[0094] 采用25 μ l反应体系,每个样品取1 μ g总RNA作为模板RNA,在PCR管中分别加入以下组分:DEPC水,5 \times 逆转录缓冲液,10mM dNTP,0.1mM DTT,30 μ M Oligo dT,200U/ μ l M-MLV,模板RNA。42 $^{\circ}$ C孵育1h,72 $^{\circ}$ C10min,短暂离心。

[0095] (3) QPCR扩增检验

[0096] 引物设计:

[0097] ENSG00000271781基因的引物序列为:

[0098] 正向引物:5' -GATGAAAGAGGTGATGAG-3' (SEQ ID NO.2)

[0099] 反向引物:5' -CTTTATTTTCGGTGGTTTG-3' (SEQ ID NO.3)

[0100] 管家基因GAPDH的引物序列为:

[0101] 正向引物:5' -CCGGGAAACTGTGGCGTGATGG-3' (SEQ ID NO.4)

[0102] 反向引物:5' -AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTT-3' (SEQ ID NO.5)

[0103] 配制25 μ l反应体系:SYBR Green聚合酶链式反应体系 12.5 μ l,正反向引物(5 μ M)各1 μ l,模板cDNA 2.0 μ l,无酶水8.5 μ l。各项操作均于冰上进行。每个样本设置3个平行管,所有扩增反应均重复三次以上以保证结果的可靠性。

[0104] 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C60s,(95 $^{\circ}$ C15s,60 $^{\circ}$ C15s,72 $^{\circ}$ C45s) \times 35个循环。

[0105] 以SYBR Green作为荧光标记物,在Light Cycler荧光实时定量PCR仪上进行PCR反应,通过融解曲线分析和电泳确定目的条带, $\Delta\Delta$ CT法进行相对定量。

[0106] 3、结果

[0107] 结果如图1所示,与癌旁组织相比,ENSG00000271781基因在肝癌组织中表达水平上调,差异具有统计学意义(P<0.05),同RNA-seq结果一致。

- [0108] 实施例3分析ENSG00000271781在TCGA数据库中的表达情况
- [0109] 1、数据收集
- [0110] 从TCGA数据库中收集200例肝癌组织和50例癌旁组织的lncRNA表达谱数据,分析ENSG00000271781在肝癌组织和癌旁组织中的表达水平;绘制箱形图。
- [0111] 2、ROC曲线分析
- [0112] 使用R语言中的pROC包分析ENSG00000271781的受试者工作特征,计算二项精确置信空间,绘制ROC曲线。
- [0113] 3、结果
- [0114] ENSG00000271781的表达水平如图2所示,相比对照组,ENSG00000271781在肝癌组织中表达显著上调。
- [0115] ENSG00000271781的ROC曲线如图3所示,ENSG00000271781的AUC值高达0.8897,且具有较高的特异性和敏感性,说明ENSG00000271781应用于肝癌的诊断具有较高的准确性。
- [0116] 实施例4 ENSG00000271781基因在肝癌细胞系中的差异表达
- [0117] 1、细胞培养
- [0118] 人肝癌细胞株HepG2、Huh7和正常肝细胞系HL-7702,,以含10%胎牛血清和1%P/S的培养基DMEM在37℃、5%CO₂、相对湿度为90%的培养箱中培养。2-3天换液1次,使用0.25%含EDTA的胰蛋白酶常规消化传代。
- [0119] 2、RNA的提取
- [0120] 1) 胰酶消化贴壁细胞,吹打获得的细胞经离心、重悬、清洗后,以含10%FBS的DMEM培养基重悬;
- [0121] 2) 将重悬的细胞转移至6孔板,添加培养基至2ml/孔,轻摇6孔板使细胞均匀重悬;
- [0122] 3) 细胞贴壁生长48h,去培养基;
- [0123] 4) 以1mlTrizol试剂裂解细胞,反复吹打6孔板壁,尽量使细胞完全裂解;
- [0124] 5) 转移细胞裂解液至1.5ml DEPC处理过的EP管中,置于冰上。加入0.2ml氯仿,剩余操作步骤同血液中RNA提取过程。
- [0125] 3、逆转录
- [0126] 具体步骤同实施例2.
- [0127] 4、结果
- [0128] 结果如图4所示,与正常肝细胞系相比,ENSG00000271781基因在肝癌细胞HepG2、Huh7中表达均上调,差异具有统计学意义(P<0.05),同RNA-seq结果一致。
- [0129] 实施例5 ENSG00000271781基因的沉默
- [0130] 1、细胞培养
- [0131] 人肝癌细胞株HepG2,以含10%胎牛血清和1%P/S的培养基DMEM在37℃、5%CO₂、相对湿度为90%的培养箱中培养。2-3天换液1次,使用0.25%含EDTA的胰蛋白酶常规消化传代。
- [0132] 2、siRNA设计
- [0133] 针对ENSG00000271781基因的siRNA序列:
- [0134] 阴性对照siRNA序列(siRNA-NC):
- [0135] 正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' (SEQ ID NO.6),

- [0136] 反义链:5' -ACGUGACACGUUCGGAGAA-3' (SEQ ID NO.7);
- [0137] siRNA1:
- [0138] 正义链:5' -AGAAAAGCCAUGAAACUGCUC-3' (SEQ ID NO.8),
- [0139] 反义链:5' -GCAGUUUCAUGGCUUUUCUGG-3' (SEQ ID NO.9);
- [0140] siRNA2:
- [0141] 正义链:5' -AAGUUAUGCCAGAAAAGCCAU-3' (SEQ ID NO.10),
- [0142] 反义链:5' -GGCUUUUCUGGCAUAACUUUC-3' (SEQ ID NO.11);
- [0143] siRNA3:
- [0144] 正义链为5' -UAUUUCAUCCUACAUGCCG-3' (SEQ ID NO.12),
- [0145] 反义链为5' -GCAAUGUAGGAAUGAAUACA-3' (SEQ ID NO.13)
- [0146] 将细胞按 2×10^5 /孔接种到六孔细胞培养板中,在37°C、5%CO₂培养箱中细胞培养24h;
- [0147] 在无双抗、含10%FBS的DMEM培养基中,转染按照脂质体转染试剂2000(购自于Invitrogen公司)的说明书转染。
- [0148] 实验分为空白对照组(HepG2)、阴性对照组(siRNA-NC)和实验组(20nM)(siRNA1、siRNA2、siRNA3),其中阴性对照组siRNA与ENSG00000271781基因的序列无同源性,浓度为20nM/孔,同时分别进行转染。
- [0149] 3、QPCR检测ENSG00000271781基因的表达水平
- [0150] 3.1细胞总RNA的提取
- [0151] 具体步骤同实施例4。
- [0152] 3.2逆转录步骤同实施例2。
- [0153] 3.3 QPCR扩增步骤同实施例2。
- [0154] 4、结果
- [0155] 结果如图5显示,相比HepG2、转染空载siRNA-NC、siRNA2、siRNA3组,siRNA1组能够显著降低ENSG00000271781的表达,差异具有统计学意义(P<0.05)。
- [0156] 实施例6 CCK8检测细胞增殖实验
- [0157] 1、细胞培养与转染步骤同实施例4
- [0158] 2、CCK8检测细胞增殖
- [0159] 1)将对数增殖期的HepG2细胞接种于96孔板,每孔 2×10^3 个细胞;
- [0160] 2)实验分三组,分别是空白对照组、转染siRNA-NC组和转染siRNA1,每组设6个复孔;
- [0161] 3)分别在转染0h、24h、48h、72h后加入10 μ l/孔CCK8试剂;
- [0162] 4)2h后使用酶标仪检测A450的吸光值。
- [0163] 3、结果
- [0164] 图6所示的结果显示:空白对照组同空载组无明显差异,而转染siRNA1组的细胞生长速度明显低对照组的细胞生长速度,差异具有统计学意义(P<0.05),上述结果表明ENSG00000271781的表达能够促进肝癌细胞的生长。
- [0165] 实施例7软琼脂克隆形成实验
- [0166] 1、用0.25%胰蛋白酶消化处于对数生长期的细胞,轻轻吹打使之成为单细胞悬

液,离心收集细胞沉淀。

[0167] 2、用含20%胎牛血清的DMEM完全培养基重悬,适当稀释后计数,调整细胞浓度为 5×10^3 个/ml。

[0168] 3、制备两个浓度分别为1.2%和0.7%的低熔点琼脂糖液,高压灭菌后,维持在40℃水浴中。

[0169] 4、1.2%的琼脂糖和2×DMEM培养基1:1混合,加入2×抗生素和20%的小牛血清,取3ml混合液注入直径6cm平皿中放置5min冷却凝固,作为底层琼脂置于CO₂温箱中备用。

[0170] 5、在无菌试管中1:1混合0.7%的琼脂糖和2×DMEM培养基,再向管中加入0.2ml浓度为 5×10^3 个/ml的稳定感染细胞悬液,充分混匀,注入上述平皿中,逐渐形成双琼脂层,每个实验组重复4个样本。

[0171] 6、待上层琼脂凝固后,置入37℃5%CO₂温箱中培养,每3天加培养基1.5ml。7、培养14天后取出培养皿,用1ml浓度为0.005%的龙胆紫染色90min。把平皿放置在倒置显微镜下观察,每组细胞随机选取10个低倍视野,镜下技术形成的细胞克隆数。

[0172] 8、结果

[0173] 结果如图7所示,与对照组相比,转染siRNA2-ENSG00000271781的细胞组单细胞克隆集落形成数显著降低。

[0174] 实施例8 ENSG00000271781基因对肝癌细胞凋亡的影响

[0175] 使用流式细胞仪检测ENSG00000271781基因对细胞凋亡的影响。

[0176] 1、细胞培养步骤同实施例4。

[0177] 2、细胞转染步骤同实施例5。

[0178] 3、步骤

[0179] 1) 将3ml 10×上样缓冲液用27ml蒸馏水稀释。

[0180] 2) 收集细胞样本并用预冷的PBS清洗。

[0181] 3) 将细胞加入1ml 1×上样缓冲液,300g离心10min,吸出缓冲液。

[0182] 4) 再次加入1ml 1×上样缓冲液,将细胞悬液中细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml。

[0183] 5) 将细胞悬液取出100μl,加入EP管中。

[0184] 6) 将5μl的Annexin V FITC加入EP管中,混匀EP管中的液体,在室温下避光孵育10min。

[0185] 7) 向EP管中加入5μlPI染液,在室温下避光5min。

[0186] 8) 在EP管中加入500μl的PBS溶液,轻轻混匀,1h内上流式细胞仪进行检测。

[0187] 4、结果:

[0188] 结果如图8所示,实验组与对照组相比,细胞凋亡率升高($P < 0.05$),该结果说明,ENSG00000271781的表达抑制肝癌细胞的凋亡。

[0189] 实施例9细胞迁移及侵袭实验

[0190] 1、Transwell小室制备

[0191] 无菌条件下Matrigel冰浴融化,用PBS进行20倍稀释,以50μl/孔的体积铺在Transwell小室的聚碳酸酯膜上。37℃放置4h,待Matrigel胶聚合成凝胶后取出,轻轻吸出上层析出液。每孔中加入50μl的含BSA的无血清培养液对基底膜进行水化处理,37℃放置30min。

[0192] 2、配置细胞悬液

[0193] 细胞撤血清饥饿处理12-24h,对细胞进行消化处理,终止消化后进行离心,去除上层培养液。用PBS对沉淀细胞进行清洗,加入含有BSA的无血清培养基对其进行重悬。调整细胞的密度至 5×10^5 个/ml。

[0194] 3、细胞接种

[0195] 取细胞悬液200 μ l(迁移实验为100 μ l,侵袭实验为200 μ l)加入到Transwell小室中。在24孔板下室加入500 μ l含FBS的1640培养基。把细胞放入细胞培养箱中培养24h。

[0196] 4、染色

[0197] 细胞在培养结束后使用DAPI染色。把小室细胞先用PBS漂洗2遍,放入DAPI工作液中室温染色5-20min。用PBS漂洗2遍,放入荧光显微镜下观察并计数。

[0198] 5、结果

[0199] 结果如图9所示,在肝癌细胞转染干扰RNA之后,与对照组相比,实验组的迁移及侵袭能力均有明显下降,结果说明ENSG00000271781能够促进肝癌细胞的迁移及侵袭。

[0200] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 北京泱深生物信息技术有限公司
- [0003] <120> 一种与肝癌诊疗相关的lncRNA
- [0004] <160> 13
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 791
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人源
- [0010] <400> 1
- [0011] caaggttgca tgactaccta cacagagggg ccagccacag cctcctctca caccggccag 60
- [0012] tggctgagcc catgaggaca ctgaggctgg gaagccacag aggaggttg cggggccact 120
- [0013] gggactggac agggtaagg atgagaccag ctgcacccg gggccctgga tggagcctcc 180
- [0014] cctccagctt ctctgggact gaggctggga gctgtcagga agacgaacag gactcgctgg 240
- [0015] ccctggttgc ctctgccgtc ccctagagct gggggagcct gcaaggcagt cagctggaga 300
- [0016] gagggtccgg gttcaggcat ctttctgagc agtttcatgg cttttctggc ataactttcc 360
- [0017] aaaccccaaa tgccctcgga tgcactcaga tgcgccgtac acaacaggaa gctcagcagg 420
- [0018] acacgcagtc taggaacatg cacgaccag gagacacca agaccaggg gatgtgtgac 480
- [0019] ccgggagaca catgtgacat cgccacggag cacagcagag acggaacagc tgcaaaggtc 540
- [0020] acggcgccca cccagagctg gtagatgggg cgctggcgcc gcagaggtgg gccccacagc 600
- [0021] cttccacaca ggggcatctg acccacggcc cggccccttg caaagccaag gccgcagagg 660
- [0022] gggaaggtgc aggagctctg agatgaaaga ggtgatgagt ttgcggcaat gtaggaatga 720
- [0023] aatacatcgg ccacaggagg acgcaggtgc aaaccaccga aataaagcca ttgccacaca 780
- [0024] ggcggacagg a 791
- [0025] <210> 2
- [0026] <211> 18
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <400> 2
- [0030] gatgaaagag gtgatgag 18
- [0031] <210> 3
- [0032] <211> 18
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <400> 3
- [0036] ctttatttcg gtggtttg 18
- [0037] <210> 4
- [0038] <211> 22

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列
[0041] <400> 4
[0042] ccgggaaact gtggcgtgat gg 22
[0043] <210> 5
[0044] <211> 25
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列
[0047] <400> 5
[0048] aggtggagga gtgggtgtcg ctggtt 25
[0049] <210> 6
[0050] <211> 19
[0051] <212> RNA
[0052] <213> 人工序列
[0053] <400> 6
[0054] uucuccgaac gugucacgu 19
[0055] <210> 7
[0056] <211> 19
[0057] <212> RNA
[0058] <213> 人工序列
[0059] <400> 7
[0060] acgugacacg uucggagaa 19
[0061] <210> 8
[0062] <211> 21
[0063] <212> RNA
[0064] <213> 人工序列
[0065] <400> 8
[0066] agaaaagcca ugaaacugcu c 21
[0067] <210> 9
[0068] <211> 21
[0069] <212> RNA
[0070] <213> 人工序列
[0071] <400> 9
[0072] gcaguuucau ggcuuuucug g 21
[0073] <210> 10
[0074] <211> 21
[0075] <212> RNA
[0076] <213> 人工序列
[0077] <400> 10

- [0078] aaguuugcc agaaaagcca u 21
[0079] <210> 11
[0080] <211> 21
[0081] <212> RNA
[0082] <213> 人工序列
[0083] <400> 11
[0084] ggcuuuucug gcauaacuuu c 21
[0085] <210> 12
[0086] <211> 21
[0087] <212> RNA
[0088] <213> 人工序列
[0089] <400> 12
[0090] uauuucauuc cuacauugcc g 21
[0091] <210> 13
[0092] <211> 21
[0093] <212> RNA
[0094] <213> 人工序列
[0095] <400> 13
[0096] gcaauguagg aaugaaauac a 21

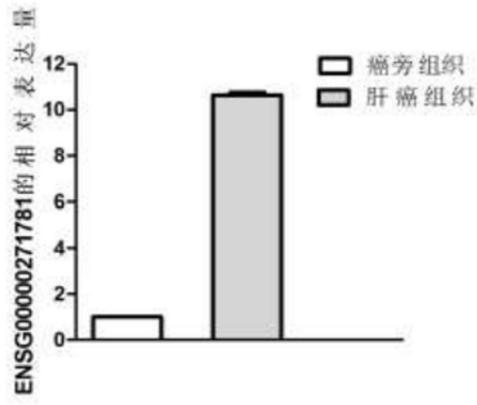


图1

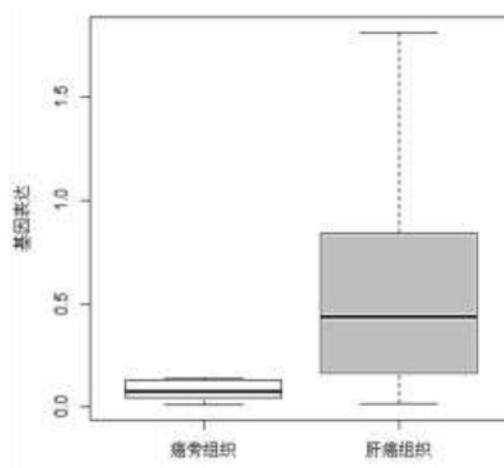


图2

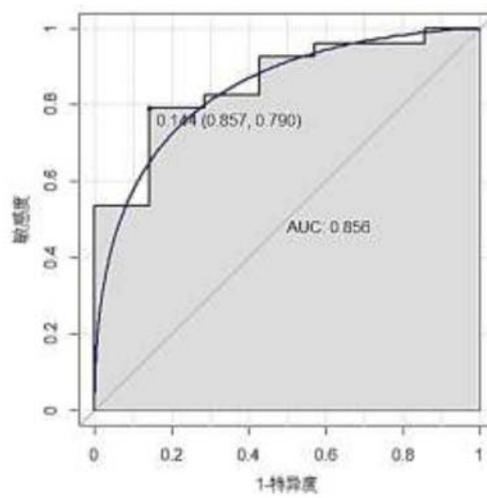


图3

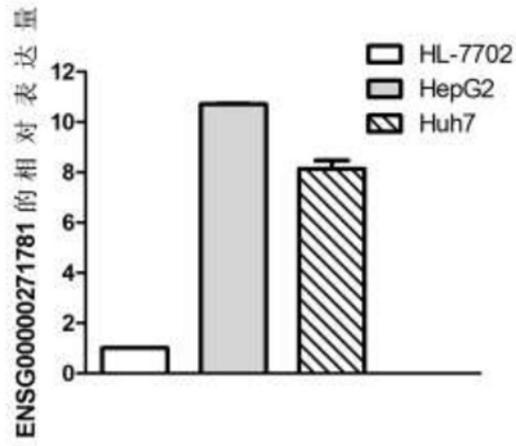


图4

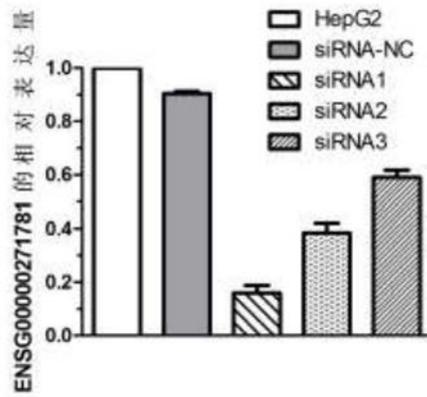


图5

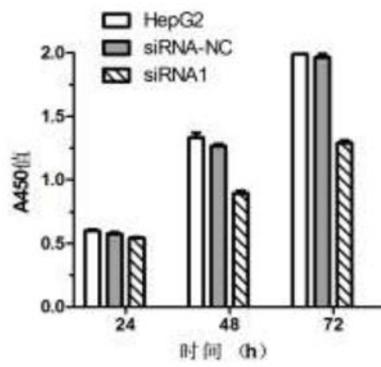


图6

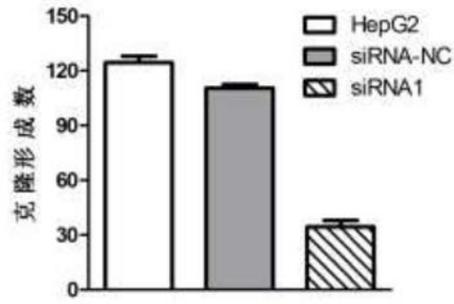


图7

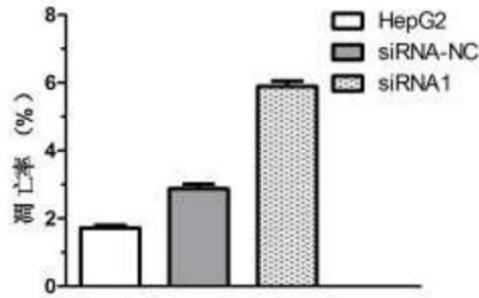


图8

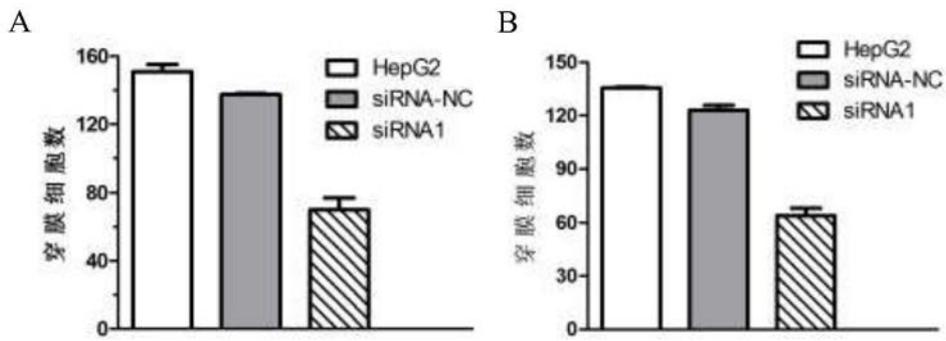


图9