



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108034725 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201810016343.5

A61K 45/00(2006.01)

(22)申请日 2018.01.08

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108034725 A

(56)对比文件  
CN 106319071 A,2017.01.11,

(43)申请公布日 2018.05.15

审查员 白艳林

(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 石小峰 孙锦云

(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)

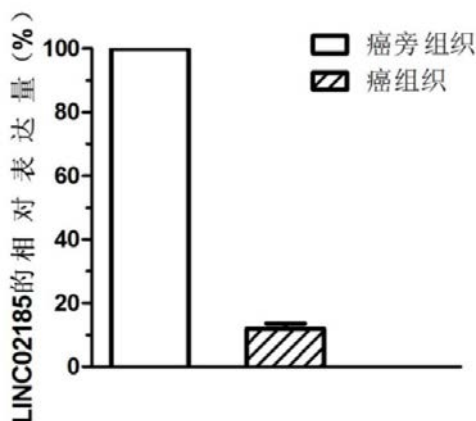
权利要求书1页 说明书9页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

LINC02185在乳腺癌诊断和治疗中的应用

(57)摘要

本发明公开了LINC02185在乳腺癌诊断和治疗中的应用,本发明首次发现了LINC02185在乳腺癌患者中的表达显著下调,并进一步做了QPCR验证以及ROC分析,结果提示LINC02185可作为生物标志物用于乳腺癌的诊断,本发明还公开了通过升高LINC02185的表达,可以有效的抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,提示LINC02185可作为药物靶点用于乳腺癌和/或乳腺癌转移的治疗。



1. 检测LINC02185基因表达的试剂在制备诊断乳腺癌的产品中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述产品包括通过测序技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术检测样本中LINC02185基因的表达水平的试剂。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述试剂选自:  
特异性识别LINC02185的探针;或  
特异性扩增LINC02185的引物。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,特异性扩增LINC02185的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。
5. LINC02185基因的促进剂在制备预防或治疗乳腺癌的药物组合物中的应用,其特征在於,所述促进剂促进LINC02185的表达水平。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,所述药物组合物还包括与所述促进剂配伍的其他药类以及药学上可接受的载体和/或辅料。
7. 检测LINC02185基因表达的试剂在筛选预防或治疗乳腺癌的潜在物质中的应用。

## LINC02185在乳腺癌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LINC02185在乳腺癌诊断和治疗中的应用。

### 背景技术

[0002] 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,占女性全部恶性肿瘤的18%,据全球范围内统计,每年有120万新发乳腺癌病例,而每年有50万女性因乳腺癌死亡(Benson JR, Jatoi I, Keiseh M, et al. Early breast cancer [J]. Lancet, 2009, 373 (9673): 1463-7)。与其他大多数国家一样,乳腺癌也成为了中国女性最常见的癌症;每年中国乳腺癌新发数量占全球的12.2%,死亡数量占全球的9.6%。90年代以来,中国的乳腺癌发病率增长速度是全球的两倍多,城市地区尤为显著。目前,乳腺癌是中国女性发病率最高的癌症,癌症死亡原因位居第六。乳腺癌本身具有高度异质性,发病因子、疾病演进、治疗反应和转移器官倾向等互异。治疗乳腺癌需要更深入地研究乳腺癌发生、发展相关的信号通路,寻找新的治疗靶点成为提供个体化治疗及改善预后的关键。

[0003] 长链非编码RNA (long-noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度大于200个核苷酸,因缺少有意义的开放阅读框,而不具有蛋白编码功能的一类非编码RNA分子。越来越多的实验数据表明长链非编码RNA在表观遗传学、转录调控、翻译过程、蛋白质翻译后修饰等多种过程中都能发挥重要作用;此外,许多长链非编码RNA含有较为保守的二级结构,其表达具有时空特异性,这些分子特征都暗示着了长链非编码RNA可能具有重要的生物学功能,在个体发育、生理和病理学上都可能会发挥关键作用(Wilusz J E, Sunwoo H, Spector D L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world [J]. Genes Dev, 2009, 23 (13): 1494-1504.)。

[0004] 随着基因检测技术的发展和应用,越来越多lncRNA被发现在癌组织异常表达。研究报道证实,lncRNA分子能够特异调控癌症发生和发展,具有癌症新型治疗靶点及生物标志物的潜力和应用前景,如专利201710522240.1、201710522694.9、201710522693.4中就报道了lncRNA ENSG00000259153、ENSG00000272993、ENSG00000260285的差异表达与肝癌的发生发展相关。目前越来越多的lncRNA分子被证实参与乳腺癌发生和发展的调控。深入研究lncRNA与乳腺癌发生发展的关系,寻找乳腺癌的特异性的生物标志物,对于乳腺癌的靶向治疗具有重要的意义,同时也有助于提高患者的生存和生活质量。

### 发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种与乳腺癌发生发展相关的分子标志物,所述标志物可以作为乳腺癌的特异性诊断标志物,应用于乳腺癌的早期发现;同时所述标志物可以作为乳腺癌的特异性分子靶标,应用于乳腺癌的个性化治疗。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明提供了检测LINC02185基因表达的试剂在制备诊断乳腺癌的产品中的应用。其中,所述产品包括(但不限于)芯片、制剂或试剂盒。

[0008] 进一步,所述产品包括通过测序技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术检测样本中LINC02185基因的表达式水平的试剂。

[0009] 进一步,所述核酸扩增技术选自聚合酶链式反应、逆转录聚合酶链式反应、转录介导的扩增、连接酶链式反应、链置换扩增和基于核酸序列的扩增。

[0010] 本发明提供了一种诊断乳腺癌的产品,所述产品包括检测LINC02185表达式水平的试剂。

[0011] 进一步,所述试剂选自:

[0012] 特异性识别LINC02185的探针;或

[0013] 特异性扩增LINC02185的引物。

[0014] 进一步,所述的特异性扩增LINC02185基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。

[0015] 本发明提供了LINC02185基因在制备预防或治疗乳腺癌的药物组合物中的应用。

[0016] 进一步,所述药物组合物包括LINC02185的促进剂。

[0017] 在本发明的具体实施方式中,所述的促进剂是一种含有LINC02185的表达式载体。所述表达式载体通常还含有启动子、复制起点和/或标记基因等。

[0018] 进一步,所述药物组合物还包括与所述促进剂相配伍的其他药类以及药学上可接受的载体和/或辅料。

[0019] 本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括LINC02185的促进剂。所述促进剂是指任何提高LINC02185基因或表达式稳定性、上调LINC02185的表达式、增加lncRNA LINC02185的有效作用时间或促进LINC02185基因的转录的物质,这些物质均可用于本发明。

[0020] 本发明提供了LINC02185基因在筛选预防或治疗乳腺癌的潜在物质中的应用。

[0021] 进一步,筛选预防或治疗乳腺癌的潜在物质的步骤包括:

[0022] 用待筛选物质处理表达式或含有LINC02185基因的体系;和

[0023] 检测所述体系中LINC02185基因的表达;

[0024] 其中,若所述候选物质可促进LINC02185基因的表达或活性,(优选显著降低,如高1以上,较佳的高2以上;更佳的高5倍以上),则表明该待筛选物质是预防或治疗乳腺癌的潜在物质。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。

## 附图说明

[0025] 图1是利用QPCR检测LINC02185基因在乳腺癌组织中的表达式情况图;

[0026] 图2是利用QPCR检测LINC02185基因在乳腺癌细胞系中的表达式情况图;

[0027] 图3是利用QPCR检测LINC02185在乳腺癌细胞中的转染情况图;

[0028] 图4是用CCK-8法检测LINC02185基因对乳腺癌细胞增殖的影响图;

[0029] 图5是利用Transwell小室检测LINC02185对乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响图;其中图A是LINC02185对乳腺癌细胞迁移的影响图;图B是LINC02185对乳腺癌细胞侵袭的影响图。

[0030] 具体的实施方式

[0031] 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,检测乳腺癌标本中lncRNA在肿瘤组织和癌旁组织的表达式,发现其中具有明显

表达差异的lncRNA,探讨其与乳腺癌的发生之间的关系,从而为乳腺癌的诊断及靶向治疗寻找更好的途径和方法。通过筛选,本发明首次发现了乳腺癌中LINC02185显著性下调。实验证明,LINC02185过表达能够有效地抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭,为乳腺癌及乳腺癌转移的个性化治疗提供了新途径。

[0032] 分子标志物

[0033] 在本发明中,“基因标志物”、“分子标志物”和“生物标志物”可以相互替代,是其在组织或细胞中的表达水平与正常或健康细胞或组织的表达水平相比发生改变的任何基因。

[0034] 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。

[0035] LINC02185基因

[0036] LINC02185是位于人16号染色短臂1区3带上,一种代表性的人LINC02185基因的核苷酸序列如目前国际公共核酸数据库GeneBank中LINC02185基因(NR\_110909.1)所示。本发明中的LINC02185包括野生型、突变型或其片段。

[0037] 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)最佳比对时(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同性,则这两个序列是“基本同源的”(或者基本相似的)。

[0038] 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(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%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%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。

[0039] 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。

[0040] 检测技术

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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)。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 芯片、试剂盒

[0047] 本发明提供了检测中LINC02185基因的表达水平的产品,所述产品包括(但不限于)制剂、芯片或试剂盒。其中芯片包括: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LINC02185所示的部分或全部序列。

[0048] 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。

[0049] 术语“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。根据杂交条件的严格性,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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒可用于检测LINC02185的表达。优选的,所述的制剂或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。

[0053] 药物组合物

[0054] 本发明还提供了一种药物组合物,它含有有效量的所述的LINC02185的促进剂,以及药学上可接受的载体。所述的组合物可用于抑制乳腺癌。任何前述的LINC02185的促进剂

均可用于组合物的制备。

[0055] 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和/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。

[0056] 本发明可以采用用本领域熟知的多种方法来将所述的促进剂或其编码基因、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。

[0057] 优选的,可采用基因治疗的手段进行。比如,可直接将LINC02185的促进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LINC02185的促进剂的表达单位(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LINC02185促进剂,具体情况需视所述的促进剂的类型而定,这些均是本领域技术人员所熟知的。

[0058] 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LINC02185基因表达的化合物和至少一种化疗剂。用于本发明的方法的化疗剂,包括但不限于,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。

[0059] 可药用载体可包括但不限于:病毒、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。

[0060] 本发明的药物组合物还可与其他治疗乳腺癌的药物联用,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。

[0061] 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。

[0062] 药物筛选

[0063] 本发明提供了一种筛选预防或治疗乳腺癌药物的方法,即:

[0064] 在实验组中,向细胞培养体系中加入待测化合物,并测定LINC02185的表达水平;在对照组中,向同样的培养体系中不加入待测化合物,并测定LINC02185的表达水平;其中,如果实验组中LINC02185的表达水平大于对照组,则说明该待选化合物为LINC02185的促进剂。

[0065] 在本发明中,所述的方法还包括:对上面步骤获得的候选化合物进一步测试其抑制乳腺癌的效果,若测试化合物对乳腺癌有显著的抑制效果,则说明该化合物为预防或

治疗乳腺癌的潜在物质。

[0066] 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适用于限制本发明的范围。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。

[0067] 实施例1筛选与乳腺癌相关的基因标志物

[0068] 1、样品收集

[0069] 收集病理明确诊断的8例乳腺癌患者的癌旁组织和乳腺癌组织样本,写明样本名称、组织类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况,患者均签知情同意书,上述所有标本的取得均通过组织伦理委员会的同意。

[0070] 2、RNA样品的制备(利用QIAGEN的组织RNA提取试剂盒进行操作)

[0071] 利用QIAGEN的组织RNA提取试剂盒提取RNA样品,具体操作详见说明书。

[0072] 3、逆转录和标记

[0073] 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。

[0074] 4、杂交

[0075] 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。

[0076] 5、数据分析

[0077] 利用Agilent GeneSpring软件对芯片结果进行分析,筛选表达量具有显著性差异(标准为该lncRNA在癌与癌旁的表达量相差2倍以上,而且 $p < 0.05$ )的lncRNA。

[0078] 6、结果

[0079] 结果显示,LINC02185在乳腺癌组织中的表达量显著低于癌旁组织中的表达量,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )

[0080] 实施例2 QPCR测序验证LINC02185基因的差异表达

[0081] 1、对LINC02185基因差异表达进行大样本QPCR验证。按照实施例1中的样本收集方式选择乳腺癌癌旁组织和乳腺癌组织各50例。

[0082] 2、RNA提取

[0083] 利用QIAGEN的组织RNA提取试剂盒提取RNA样品,具体操作详见说明书。

[0084] 3、QPCR

[0085] 1) 反应体系:

[0086] RNA模板 $1\mu\text{l}$ ,随机引物 $1\mu\text{l}$ ,双蒸水加至 $12\mu\text{l}$ ,混匀,低转速离心, $65^\circ\text{C}$  5min,然后放在冰上冷却;继续加入 $5\times$ 反应缓冲液 $4\mu\text{l}$ ,RNA酶抑制剂( $20\text{U}/\mu\text{l}$ )  $1\mu\text{l}$ , $10\text{mM}$  dNTP混合液 $2\mu\text{l}$ ,AMV反转录酶( $200\text{U}/\mu\text{l}$ )  $1\mu\text{l}$ ;充分混匀并进行离心处理;

[0087] 2) 逆转录反应条件

[0088]  $25^\circ\text{C}$  5min, $42^\circ\text{C}$  60min, $70^\circ\text{C}$  5min。

[0089] 3) 聚合酶链反应

[0090] 引物设计:

[0091] 根据Genebank中LINC02185基因和GAPDH基因的编码序列设计QPCR扩增引物,由博



迈德生物公司合成。具体引物序列SEQ ID NO.1~4所示,其中,LINC02185的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示;GAPDH的引物序列如SEQ ID NO.3~4所示。

[0092] 配制PCR反应体系:

[0093]  $2 \times$ qPCR混合液12.5 $\mu$ l,基因引物2.0 $\mu$ l,反转录产物2.5 $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 8.0 $\mu$ l。

[0094] PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C10min,(95 $^{\circ}$ C15s,60 $^{\circ}$ C60s) $\times$ 40个循环,60 $^{\circ}$ C5min延伸反应。75 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C,每20s升温1 $^{\circ}$ C,绘制溶解曲线。以SYBR Green作为荧光标记物,在Light Cycler荧光定量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。

[0095] 4、ROC曲线分析

[0096] 使用R语言中的pROC包分析LINC02185的受试者工作特征,计算二项精确置信空间,绘制ROC曲线。

[0097] 5、统计学方法

[0098] 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SPSS18.0统计软件来进行统计分析的,癌与癌旁组织的配对比较采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0099] 6、结果

[0100] QPCR结果如图1所示,与乳腺癌癌旁组织相比,LINC02185在乳腺癌组织中表达下调,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),同芯片检测结果一致;ROC分析结果显示,LINC02185具有较高的特异性和敏感性(特异性/敏感性:0.924/0.897;AUC值为0.973),提示LINC02185应用于乳腺癌的诊断具有较高的准确性和特异性。

[0101] 实施例3 LINC02185在乳腺癌细胞系中的表达情况

[0102] 1、细胞培养

[0103] 培养人乳腺癌细胞系MCF-7,SK-BR-3,MDA-MB-231和乳腺正常上皮细胞系MCF-10A,其中,MDA-MB-231培养于10%胎牛血清的L15培养基中,SKBR3培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,MCF-7和正常乳腺上皮细胞系MCF-10A培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中。培养液中加入1%P/S。在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、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。

[0104] 2、RNA的提取与浓度测定

[0105] 使用QIAGEN的细胞RNA提取试剂盒提取细胞中的总RNA,具体操作

[0106] 3、QPCR具体步骤同实施例2

[0107] 4、统计学分析

[0108] 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SPSS18.0统计软件来进行统计分析的,癌与癌旁组织的配对比较采用t检验,认为当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

[0109] 5、结果

[0110] 结果如图2所示,LINC02185在乳腺癌细胞中的表达显著低于正常细胞系,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

[0111] 实施例4 LINC02185基因的过表达

[0112] 1、细胞培养

[0113] 人乳腺癌细胞系MCF-7,以含10%FBS和1%P/S的培养基DMEM在37℃、5%CO<sub>2</sub>、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。

[0114] 将培养瓶中的细胞用胰酶进行消化并接种在6孔板中,保证细胞数为2-8×10<sup>5</sup>个/孔,加入细胞培养基。过夜,第二天观察细胞密度,细胞密度为70%以上可进行转染。

[0115] 2、基因过表达载体的构建

[0116] 根据LINC02185的cDNA序列合成特异的PCR扩增引物,在5'端引物和3'端引物分别添加HindIII和XhoI两个限制性酶切位点。以乳腺癌患者血液提取和反转录得到的cDNA作为扩增模板,上述cDNA序列经限制性内切酶HindIII和XhoI双酶切后插入到经HindIII和XhoI双酶切的真核细胞表达载体pcDNA3.1中,连接获得的重组载体pcDNA3.1-1用于后续实验。

[0117] 3、转染

[0118] 将实验分为三组:对照组(MCF-7)、阴性对照组(pcDNA3.1-NC)和实验组(pcDNA3.1-1),使用脂质体3000进行载体的转染,具体转染方法按照说明书的指示进行。

[0119] 4、QPCR检测LINC02185基因的水平

[0120] 1)细胞总RNA的提取

[0121] 利用QIAGEN细胞提取试剂盒提取细胞中的总RNA,具体操作详见说明书。

[0122] 2)QPCR扩增具体步骤同实施例2

[0123] 5、统计学方法

[0124] 实验都是按照重复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,LINC02185基因实验组与对照组之间的差异采用t检验,认为当P<0.05时具有统计学意义。

[0125] 6、结果

[0126] 结果如图3显示,与对照组相比,实验组中的LINC02185的表达水平显著增加,差异具有统计学意义(P<0.05)。

[0127] 实施例5 LINC02185基因对乳腺癌细胞增殖的影响

[0128] 采用CCK-8实验检测LINC02185基因对乳腺癌细胞增殖能力影响。

[0129] 1、细胞培养与转染步骤同实施例3,转染后6h换液,放置细胞培养箱过夜。

[0130] 2、胰酶消化细胞,加入细胞培养基混匀使细胞悬浮,进行细胞计数。

[0131] 3、96孔板中进行接种,3000个/孔,接种8个复孔。共铺4块96孔板分别用于24h、48h、72h和96h 4个检测时间点。。

[0132] 4、24h后,将第一块96孔板取出,每孔中加入10μl的CCK-8检测液,将96孔板继续放入细胞培养箱中孵育4h左右,用酶标仪检测各孔在450nm波长处的吸光度值并记录数据。

[0133] 5、在48h、72h、96h后分别重复步骤4中的操作,最后统计出各时间点的吸光度值,作出生长曲线图。

[0134] 6、统计学分析

[0135] 实验都是按照重复3次来完成的,采用SPSS18.0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。

[0136] 7、结果

[0137] 结果如图4所示,与对照相比,实验组在转染pcDNA3.1-1后,细胞的增殖明显受到

了抑制,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明LINC02185与乳腺癌的细胞增殖相关,LINC02185过表达可以抑制细胞的增殖。

[0138] 实施例6细胞迁移及侵袭实验

[0139] 1、Transwell小室制备

[0140] 无菌条件下Matrigel冰浴融化,用PBS进行20倍稀释,以50 $\mu$ l/孔的体积铺在Transwell小室的聚碳酸酯膜上。37 $^{\circ}$ C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50 $\mu$ l的含BSA的无血清培养液对基底膜进行水化处理,37 $^{\circ}$ C放置30min。

[0141] 2、配置细胞悬液

[0142] 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 $5 \times 10^5$ 个/ml。

[0143] 3、细胞接种

[0144] 取细胞悬液200 $\mu$ l加入到Transwell小室中,在24孔板下室加入500 $\mu$ l含FBS的DMEM培养基。把细胞放入细胞培养箱中培养24h。

[0145] 4、染色

[0146] 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。

[0147] 5、结果

[0148] 结果如图5所示,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LINC02185表达水平的增加能够抑制乳腺癌的迁移及侵袭,提示LINC02185可以作为分子靶标应用于乳腺癌以及乳腺癌侵袭和转移的治疗。

[0149] 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] 序列表
- [0002] <110> 北京泱深生物信息技术有限公司
- [0003] <120> LINC02185在乳腺癌诊断和治疗中的应用
- [0004] <160> 4
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 19
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] aacttcctca accagataa 19
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 18
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] ttctcttgcc tacttggt 18
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 21
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] aatcccatca ccatcttcca g 21
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 19
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] gagccccagc cttctccat 19

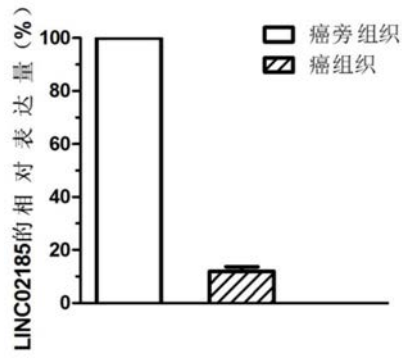


图1

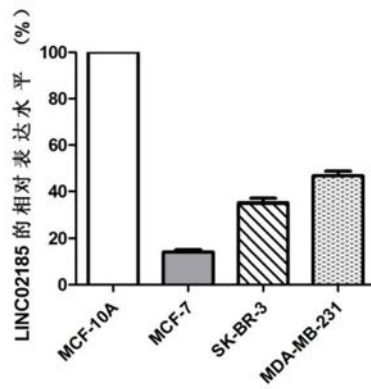


图2

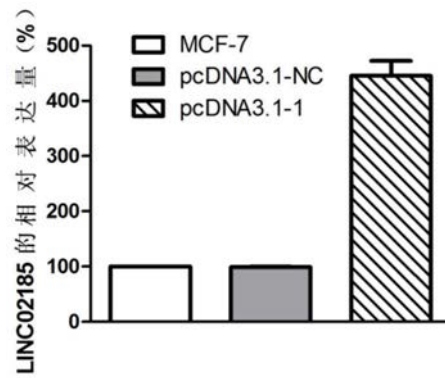


图3

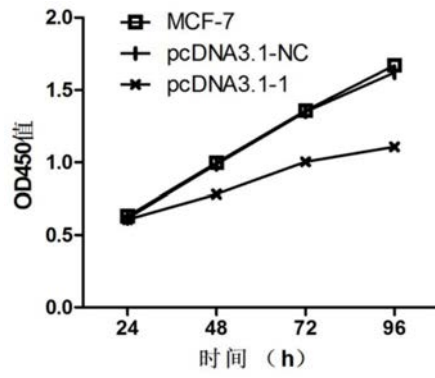


图4

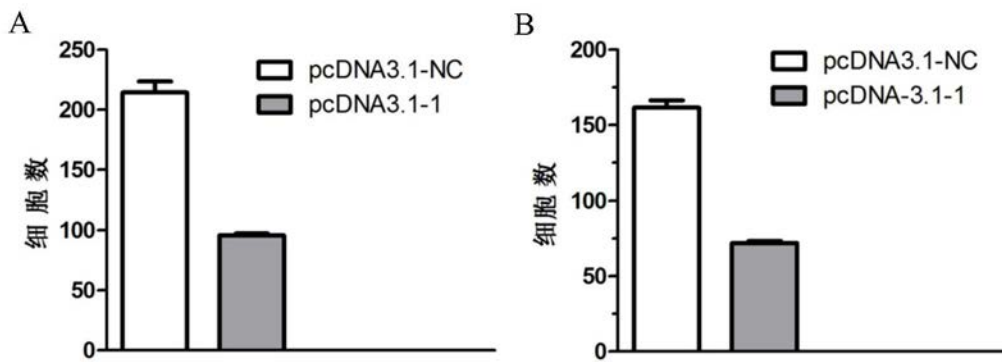


图5