



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108192977 B

(45)授权公告日 2020.05.19

(21)申请号 201810268744.X

A61K 31/7088(2006.01)

(22)申请日 2018.03.29

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108192977 A

(56)对比文件

CN 107213471 A,2017.09.29,

CN 106701986 A,2017.05.24,

(43)申请公布日 2018.06.22

Xinlong Yan等.Mesenchymal Stem Cells

(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

Promote Hepatocarcinogenesis via lncRNA-
MUF Interaction with ANXA2 and miR-34a.
《Cancer Res》.2017,

审查员 魏应亮

(72)发明人 石小峰 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.

权利要求书1页 说明书10页

C12Q 1/6886(2018.01)

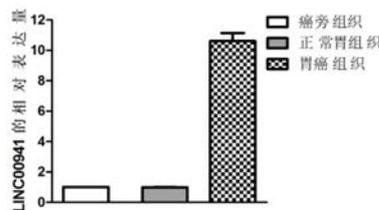
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种与胃癌发生发展相关的分子标志物

(57)摘要

本发明公开了一种与胃癌发生发展相关的分子标志物,本发明通过高通量测序技术与生物信息学相结合,筛选在胃癌组织中呈现差异表达的lncRNA,并进一步通过分子实验和细胞实验验证了该lncRNA作为分子标志物应用于胃癌的临床诊断和治疗的可行性。



1. 检测LINC00941水平的试剂在制备诊断胃癌的产品中的应用。
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LINC00941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,所述产品包括芯片、制剂、试剂盒或核酸膜条。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述试剂包括:
特异性识别LINC00941的探针;或
特异性扩增LINC00941的引物。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在於,特异性扩增LINC00941的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。
6. 药物组合物在制备治疗胃癌的产品中的应用,其特征在於,所述药物组合物包括有效量的LINC00941的抑制剂,所述抑制剂为siRNA。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,所述siRNA的序列如SEQ ID NO.7~8所示。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在於,所述胃癌包括原发性胃癌、转移性胃癌。
9. 一种非治疗目的的筛选治疗胃癌的候选物质的方法,其特征在於,所述方法包括:
用待筛选物质处理表达或含有LINC00941基因的体系;和
检测所述体系中LINC00941基因的表达;
其中,若所述待筛选的物质可以抑制LINC00941基因的水平,则表明该待筛选物质是治疗胃癌的候选物质。

一种与胃癌发生发展相关的分子标志物

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种与胃癌发生发展相关的分子标志物,具体的分子标志物为LINC00941。

背景技术

[0002] 胃癌(GC)是最常见的恶性肿瘤之一,同时肿瘤相关死亡率在全世界位于第三位(Arnold M,Moore SP,Hassler S,Ellison-Loschmann L,Forman D,Bray F.The burden of stomach cancer in indigenous populations:a systematic review and global assessment.Gut.2014;63:64-71.)。尽管随着医学的发展、手术方式的改进和医学诊疗技术的提高,许多的胃癌病人能得妥善和规范的治疗,并且已取得较好疗效,但胃癌的早期发现较难、进展期胃癌切除术后复发率和转移率高一直严重影响着胃癌病人的治疗效果与生存期。相对于其他肿瘤而言,胃癌的早期发现比例低,确诊时,进展期高达70-80%以上,进展期病人即使根治性切除后5年复发率较高(Vogiatzi P,Vindigni C,Roviello F, Renieri A,Giordano A.Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis.J Cell Physiol.2007;211:287-295.)。因此,在加强胃癌早期诊断研究的同时,阐述引起胃癌发生及转移的具体机制,建立新的早期胃癌或转移性胃癌的诊断标准,进而探索新的干预措施,防止胃癌的进一步复发及转移,提高胃癌术前术后的治疗效果,增加患者的生存率对疾病的治疗和预防具有重大的意义。

[0003] 胃癌的发生、发展与癌基因的异常表达和抑癌基因功能失活相关,胃癌发生及转移等涉及细胞功能紊乱,病毒介导的免疫微环境改变,基质破坏、血管生成等多个环节,包括多因素诱导,多基因参与的复杂病理过程(Nieman KM,Kenny HA,Penicka CV,et al.Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth.Nat Med.2011;17:1498-1503.)。因此,寻找有效的与胃癌发生或转移相关的基因表达谱及关键基因标志,预测胃癌的发生是保证临床治疗效果和提高生存率的重要步骤。

[0004] 近年来,随着生物技术的发展,一些研究表明在肿瘤中lncRNA的异常表达参与了肿瘤的形成及进展,这些异常表达的lncRNA可以作为恶性肿瘤的早期诊断或预后评估的潜在分子标志物(CN201710127268.5/CN201710112636.9/CN201710522694.9),lncRNA可作为引导分子、信号分子,诱饵分子和骨架分子等形式参与肿瘤相关基因、表观遗传学、信号通路和它们之间的crosstalk调控(Xing Z,Lin A,Li C,et al.lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals.Cell.2014;159:1110-1125.)。在肿瘤发生发展中起了关键作用。因此,寻找与胃癌发生发展相关的lncRNA,对于胃癌的早期诊断及靶向治疗具有重要的意义。

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胃癌发生发展相关的

lncRNA,从而为胃癌的诊断和治疗提供分子靶标,实现患者的个性化诊疗。

[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LINC00941水平的试剂在制备诊断胃癌的产品中的应用。

[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LINC00941基因的表达水平的试剂。

[0009] 本发明提供了一种诊断胃癌的产品,产品包括芯片、制剂、试剂盒或核酸膜条,产品包括检测样本中LINC00941水平的试剂。

[0010] 进一步,所述试剂选自:

[0011] 特异性识别LINC00941的探针;或

[0012] 特异性扩增LINC00941的引物。

[0013] 进一步,特异性扩增LINC00941基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示。

[0014] 本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括有效量的LINC00941的抑制剂。所述抑制剂选自:以LINC00941或其转录本为靶序列、且能够抑制LINC00941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。

[0015] 进一步,所述抑制剂为siRNA,优选的,siRNA的序列如SEQ ID NO.13~14所示。

[0016] 在本发明中,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;本发明的药物还可与其他治疗胃癌的药物联用,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。

[0017] 本发明提供了LINC00941的抑制剂在制备治疗胃癌的产品中的应用。

[0018] 进一步,所述所述抑制剂为siRNA,优选的,siRNA的序列如SEQ ID NO.13~14所示。

[0019] 进一步,所述胃癌包括原发性胃癌、转移性胃癌。

[0020] 本发明体用了一种筛选治疗胃癌的候选物质的方法,所述方法包括:

[0021] 用待筛选物质处理表达或含有LINC00941基因的体系;和

[0022] 检测所述体系中LINC00941基因的表达;

[0023] 其中,若所述待筛选的物质可以抑制LINC00941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治疗胃癌的候选物质。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。

[0024] 所述候选物质包括(但不限于):针对LINC00941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。

附图说明

[0025] 图1是利用QPCR检测LINC00941基因在胃癌组织中的表达情况图;

[0026] 图2是利用QPCR检测LINC00941基因在胃癌细胞系中的表达情况图;

[0027] 图3是利用QPCR检测LINC00941在胃癌细胞中的转染情况图;

[0028] 图4是MTS法检测LINC00941基因对胃癌细胞增殖的影响图;

[0029] 图5是利用Transwell小室检测LINC00941对胃癌细胞迁移和侵袭的影响图;其中

图A是LINC00941对胃癌细胞迁移的影响图;图B是LINC00941对胃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,检测胃癌标本中lncRNA在肿瘤组织和癌旁组织的表达,通过生物信息学分析,发现其中具有明显表达差异的lncRNA,探讨其与胃癌的发生发展之间的关系,从而为胃癌的诊断及靶向治疗寻找更好的途径和方法。通过筛选,本发明首次发现了胃癌中LINC00941显著性上调,并在大样本qPCR验证中进一步证实LINC00941在胃癌组织中的表达量显著高于癌旁组织。这一发现将进一步丰富胃癌发病机制的研究,也为胃癌的早期诊断及预后检测提供了新的肿瘤标志物和治疗靶点。

[0032] LINC00941基因

[0033] LINC00941是位于人12号染色短臂1区1带上,本发明中的LINC00941包括野生型、突变型或其片段。在本发明的实施例中,一种代表性的人LINC00941基因的核苷酸序列如目前国际公共核酸数据库GeneBank中LINC00941基因(NR_040245.1)所示。本发明的LINC00941核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。

[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] 检测技术

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 通常,PCR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;RT-PCR则将逆转录酶(RT)用于从mRNA制备互补的DNA(cDNA),然后将cDNA通过PCR扩增以产生DNA的多个拷贝;TMA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,TMA任选地包括使用阻断,部分、终止部分和其他修饰部分,以改善TMA过程的灵敏度和准确度;LCR使用与靶核酸的相邻区域杂交的两组互补DNA寡核苷酸。DNA寡核苷酸在热变性、杂交和连接的重复多个循环中通过DNA连接酶共价连接,以产生可检测的双链连接寡核苷酸产物;SDA使用以下步骤的多个循环:引物序列对与靶序列的相反链进行退火,在存在dNTPs下进行引物延伸以产生双链半硫代磷酸化的(hemiphosphorothioated)引物延伸产物,半修饰的限制性内切酶识别位点进行的核酸内切酶介导的切割,以及从切口3'端进行的聚合酶介导的引物延伸以置换现有链并产生供下一轮引物退火、切割和链置换的链,从而引起产物的几何扩增。

[0039] 本发明中的核酸杂交技术包括但不限于原位杂交(ISH)、微阵列和Southern或Northern印迹。原位杂交(ISH)是一种使用标记的互补DNA或RNA链作为探针以定位组织一部分或切片(原位)或者如果组织足够小则为整个组织(全组织包埋ISH)中的特异性DNA或

RNA 序列的杂交。DNA ISH可用于确定染色体的结构。RNA ISH用于测量和定位组织切片或全组织包埋内的mRNA和其他转录本(例如,ncRNA)。通常对样本细胞和组织进行处理以原位固定靶转录本,并增加探针的进入。探针在高温下与靶序列杂交,然后将多余的探针洗掉。分别使用放射自显影、荧光显微术或免疫组织化学,对组织中用放射、荧光或抗原标记的碱基标记的探针进行定位和定量。ISH也可使用两种或更多种通过放射性或其他非放射性标记物标记的探针,以同时检测两种或更多种转录本。

[0040] 将Southern和Northern印迹分别用于检测特异性DNA或RNA序列。使从样本中提取的DNA或RNA断裂,在基质凝胶上通过电泳分离,然后转移到膜过滤器上。使过滤器结合的DNA或RNA与和所关注的序列互补的标记探针杂交。检测结合到过滤器的杂交探针。该程序的一种变化形式是反向Northern印迹,其中固定到膜的底物核酸为分离的DNA片段的集合,而探针是从组织提取并进行了标记的RNA。

[0041] 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。

[0042] 芯片、制剂、核酸膜条、试剂盒

[0043] 本发明提供了检测中LINC00941基因的表达水平的产品,所述产品包括(但不限于)芯片芯片、制剂、核酸膜条或试剂盒。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LINC00941所示的部分或全部序列。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒可用于检测LINC00941的表达。所述试剂盒包括用于扩增LINC00941的特异性引物对;标准DNA模板;PCR反应液。在一个优选的实施方案中,所述特异性引物对包括上游引物和下游引物,序列如SEQ ID NO.1~2所示。

[0051] 作为更优选的实施方案,所述试剂盒为荧光定量PCR检测试剂盒,所述引物适用于SYBR Green、TaqMan探针、分子信标、双杂交探针、复合探针的检测。

[0052] 在一个更优选的实施方案中,所述试剂盒中的PCR反应液为荧光定量PCR反应液,并进一步包含荧光染料。

[0053] 在一个更优选的实施方案中,所述荧光定量PCR反应液包括dNTP、Mg²⁺、Taq酶及buffer缓冲液,所述荧光染料为SYBR Green II,Taq酶为热启动酶。

[0054] 抑制剂和药物组合物

[0055] 基于本发明的发现,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含LINC00941的抑制剂。

[0056] 所述的LINC00941的抑制剂是指任何可降低LINC00941基因水平的物质,这些物质均可用于本发明,作为对于下调LINC00941基因的表达有用的物质,从而可用于治疗胃癌。举例来说,本发明的抑制剂可以是以LINC00941基因为靶序列、且能够抑制LINC00941基因的干扰分子,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。

[0057] 作为本发明的一种优选方式,所述LINC00941的抑制剂是一种LINC00941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。

[0058] 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胃癌细胞系进行验证,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LINC00941基因的表达水平,以及胃癌细胞的增殖。

[0059] 作为本发明的一种可选方式,所述的SIGLEC10的抑制剂也可以是一种“小发夹RNA(Small hairpin RNA,shRNA)”,其是能够形成发夹结构的非编码小RNA分子,小发夹RNA能够通过RNA干扰途径来抑制基因的表达。如上述,shRNA可以由双链DNA模板来表达。双链DNA模板被插进一个载体,例如质粒或病毒载体,然后在体外或体内连接到一个启动子进行表达。shRNA在真核细胞内DICER酶的作用下,可被切割成小干扰RNA分子,从而进入RNAi途径。“shRNA表达载体”是指一些本领域常规用于构建shRNA结构的质粒,通常该质粒上存在“间隔序列”以及位于“间隔序列”两边的多克隆位点或供替换序列,从而人们可以将shRNA(或类似物)相应的DNA序列通过正向和反向的方式插入多克隆位点或替换其上的供替换序列,该DNA序列转录后的RNA可形成shRNA(Short Hairpin)结构。所述的“shRNA表达载体”目前

已经完全可以通过商购的途径购买获得,例如一些病毒载体。

[0060] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建本发明所需的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如卡拉霉素、庆大霉素、潮霉素、氨苄青霉素抗性。

[0061] 在本发明中,表达载体是本领域已知的各种载体,如市售的载体、包括质粒、粘粒、噬菌体、病毒等。表达载体向宿主细胞中的导入可以使用电穿孔法、磷酸钙法、脂质体法、DEAE葡聚糖法、显微注射、病毒感染、脂质体转染、与细胞膜透过性肽的结合等周知的方法。

[0062] 术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。较佳地,该宿主细胞是真核细胞,如CHO细胞、COS细胞等。

[0063] 药物组合物

[0064] 本发明中的药物组合物包括有效量的LINC00941的抑制剂、和/或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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 优选的,可采用基因治疗的手段进行。比如,可直接将LINC00941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LINC00941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LINC00941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。

[0068] 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LINC00941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。

[0069] 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。相关的递送载剂可包括但不限于: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。

[0070] 药物筛选

[0071] 本发明提供了一种筛选治疗胃癌药物的方法,即:

[0072] 在实验组中,向培养体系中加入待测化合物,并测定LINC00941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LINC00941的表达水平;其中,如果实验组中LINC00941的表达水平小于对照组,则说明该待筛选的物质为LINC00941的潜在物质。

[0073] 在本发明中,所述的方法还包括:对上面步骤获得的潜在物质进一步测试其抑制胃癌的效果,若测试化合物对胃癌有显著的抑制效果,则说明该化合物为治疗胃癌的潜在物质。

[0074] 所述培养体系包括(但不限于)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(如动物模型,优选非人哺乳动物的动物模型,如鼠、兔、羊、猴等)等。

[0075] 当将通过本发明的筛选方法分离的化合物作为药物施用于人或其它哺乳动物,其包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猫、犬、羊、猪、牛、猴子、狒狒、黑猩猩时,分离的化合物可以直接施用,或者可以利用已知的药物制备方法配制成各种剂型。例如,根据需要,所述药物可以作为糖衣片剂、胶囊剂、酏剂和微胶囊口服施用;或者用水或任何其它药物可接受的液体配制成无菌溶液或悬浮液,以注射剂的形式非口服施用。例如,可以将化合物以一般接受的药物施用方式所需的单位剂型(unit dose)、与药学可接受的载体或介质混合在一起,所述载体或介质包括但不限于无菌水、生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、调味剂、赋形剂(excipient)、媒介物(vehicle)、防腐剂、粘合剂等。根据这些制剂中有效成分的含量,可以获得在指定范围内的合适的给药量。

[0076] 统计学分析

[0077] 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。

[0078] 下面结合具体的实施例进一步说明本发明,本发明的实施例仅用于解释本发明,并不意味着限制本发明的保护范围。

[0079] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0080] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0081] 实施例1筛选与胃癌相关的基因标志物

[0082] 1、样品收集

[0083] 分别收集8例胃癌癌旁组织和胃癌组织样本,以正常的胃组织3例,全部病例在手术前均未接收化疗和放疗,所有的患者均已知情同意,并取得均通过组织伦理委员会的同意。

[0084] 2、RNA样品的制备

[0085] 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。

[0086] 3、总RNA定量与纯度分析

[0087] 使用Bio-Red紫外分光光度计测定总RNA在280nm和260nm处的光密度值,当 OD_{260}/OD_{280} 的值在1.8~2.0时认为总RNA的纯度是可靠的,用于下一步的实验。

- [0088] 4、lncRNA表达芯片分析
- [0089] 利用Arraystar公司的Arraystar Human lncRNA Array检测胃癌组织和癌旁组织中lncRNA表达谱的差异。
- [0090] 5、数据分析
- [0091] 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。
- [0092] 6、结果
- [0093] 结果显示,LINC00941在胃癌患者中呈现差异性表达,与癌旁组织以及正常胃组织相比,其在癌组织中的表达水平显著上调约10.5倍。
- [0094] 实施例2 QPCR测序验证LINC00941基因的差异表达
- [0095] 1、对LINC00941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胃癌癌旁组织和胃癌组织各50例以及正常胃部组织10例。
- [0096] 2、RNA提取
- [0097] 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。
- [0098] 3、QPCR
- [0099] 1) 反应体系:
- [0100] 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°C 5min,然后放在冰上冷却。加入 $5\times$ 反应缓冲液 $4\mu\text{l}$,RNA酶抑制剂($20\text{U}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$, 10mM 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;
- [0101] 2) 逆转录反应条件
- [0102] 25°C 5min, 42°C 60min, 70°C 5min。
- [0103] 3) 聚合酶链反应
- [0104] 引物设计:
- [0105] 根据Genebank中LINC00941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。具体引物序列如下:
- [0106] LINC00941基因:
- [0107] 正向引物为 $5' -\text{ATAGGCATACTGACAATA}-3'$ (SEQ ID NO.1);
- [0108] 反向引物为 $5' -\text{GCTCATTACATCATCAAT}-3'$ (SEQ ID NO.2)。
- [0109] GAPDH基因:
- [0110] 正向引物为 $5' -\text{AATCCCATCACCATCTTCCAG}-3'$ (SEQ ID NO.3);
- [0111] 反向引物为 $5' -\text{GAGCCCCAGCCTTCTCCAT}-3'$ (SEQ ID NO.4)。
- [0112] 配制PCR反应体系:
- [0113] $2\times$ qPCR混合液 $12.5\mu\text{l}$,基因引物 $2.0\mu\text{l}$,反转录产物 $2.5\mu\text{l}$,ddH₂O $8.0\mu\text{l}$ 。
- [0114] PCR反应条件: 95°C 10min, (95°C 15s, 60°C 60s) \times 40个循环, 60°C 5min延伸反应。 75°C 至 95°C ,每20s升温 1°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, $\Delta\Delta\text{CT}$ 法进行相对定量。
- [0115] 4、ROC曲线分析
- [0116] 使用R语言中的pROC包分析LINC00941的受试者工作特征,计算二项精确置信空

间,绘制ROC曲线。

[0117] 5、结果

[0118] QPCR结果如图1所示,与胃癌旁组织相比,LINC00941在胃癌组织中表达上调,差异具有统计学意义($P<0.05$);阳性检出率=上调表达例数/总检测例数 $\times 100\%=47/50=94\%$,提示LINC00941可应用于胃癌的诊断,而ROC曲线分析可知,AUC高达0.8923,提示LINC00941应用于胃癌的诊断具有较高的准确性。

[0119] 实施例3 LINC00941在胃癌细胞系中的表达情况

[0120] 1、细胞培养

[0121] 人永生胃粘膜上皮细胞系GES-1、人胃癌细胞系HGC-27、MGC-803、AGS(均购自广州莱德尔生物科技有限公司)在含10%胎牛血清和1%P/S的RPMI1640培养基于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,取处于对数生长期的细胞用于实验。

[0122] 2、RNA的提取与浓度测定

[0123] 使用QIAGEN的细胞RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,具体操作参照说明书。

[0124] 3、QPCR具体步骤同实施例2

[0125] 4、结果

[0126] 结果如图2所示,与胃粘膜上皮细胞相比,LINC00941基因在胃癌细胞HGC-27、MGC-803、AGS中表达显著上调,差异具有统计学意义($P<0.05$),选择HGC-27细胞进行后续的实验,研究LINC00941对胃癌细胞的作用。

[0127] 实施例4 LINC00941基因的沉默

[0128] 1、细胞培养步骤同实施例3

[0129] 2、siRNA的设计

[0130] 针对LINC00941基因的序列设计siRNA,阴性对照siRNA-NC的序列如SEQ ID NO.5~6所示;实验组siRNA1~4的序列如SEQ ID NO.7~14所示。

[0131] 3、转染

[0132] 将HGC-27细胞按 2×10^5 /孔接种到六孔细胞培养板中,在37℃、5%CO₂培养箱中细胞培养24h;在无双抗、含10%FBS的DMEM培养基中,转染按照脂质体转染试剂3000(购自于Invitrogen公司)的说明书转染。

[0133] 实验分为空白对照组(HGC-27)、阴性对照组(siRNA-NC)和实验组(siRNA1、siRNA2、siRNA3、siRNA4),其中阴性对照组siRNA与LINC00941基因的序列无同源性,浓度为20nM/孔,同时分别进行转染。

[0134] 4、QPCR检测LINC00941基因的转录水平

[0135] 4.1细胞总RNA的提取

[0136] 使用QIAGEN细胞RNA提取试剂盒提取细胞中的总RNA,具体步骤详见说明书。

[0137] 4.2逆转录步骤同实施例2。

[0138] 4.3QPCR扩增步骤同实施例2。

[0139] 5、结果

[0140] 结果如图3显示,与HGC-27和转染空载siRNA-NC组相比,实验组(siRNA1~4)能降低LINC00941的水平,其中siRNA4的效果最为显著,因此选择siRNA4进行后续实验。

- [0141] 实施例5 LINC00941基因对胃癌细胞增殖的影响
- [0142] 采用MTS实验检测LINC00941基因对胃癌细胞增殖能力影响。
- [0143] 1、细胞培养与转染步骤同实施例4。
- [0144] 2、各组处理的细胞经胰酶消化后重悬细胞、计数,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml按100 μ l/孔的密度接种于96孔板,即每孔细胞数为 1×10^4 个。
- [0145] 3、待细胞到达相应的检测时间点(0d、24h、48h、72h、96h)后,按10 μ L/孔加入CellTiter96AQ单溶液细胞增殖检测(MTS)试剂,微量振荡器振荡1~2min;置于5%CO₂、37℃的细胞培养箱中孵育4h。
- [0146] 4、酶标仪读板,在490nm波长测定其吸光度(A)值。
- [0147] 5、结果
- [0148] 结果如图4所示,与对照相比,实验组(siRNA4)的细胞生长速度明显低于对照组的细胞的生长速度,差异具有统计学意义(P<0.05),上述结果表明降低LINC00941的表达抑制胃癌细胞的增殖,提示LINC00941可作为分子靶点应用于胃癌的治疗。
- [0149] 实施例6细胞迁移及侵袭实验
- [0150] 1、Transwell小室制备
- [0151] 无菌条件下Matrigel冰浴融化,用PBS进行20倍稀释,以50 μ l/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50 μ l的含BSA的无血清培养液对基底膜进行水化处理,37℃放置30min。
- [0152] 2、配置细胞悬液
- [0153] 细胞饥饿处理12-24h,胰酶消化离心,使用无血清培养基进行重悬,调整细胞密度为 5×10^5 个/ml。
- [0154] 3、细胞接种
- [0155] 取细胞悬液200 μ l加入到Transwell小室中,在24孔板下室加入500 μ l含FBS的DMEM培养基。把细胞放入细胞培养箱中培养24h。
- [0156] 4、染色
- [0157] 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。
- [0158] 5、结果
- [0159] 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LINC00941水平的降低能够抑制胃癌的迁移及侵袭,提示LINC00941可作为靶标应用于胃癌转移以及侵袭的治疗。
- [0160] 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> 一种与胃癌发生发展相关的分子标志物
- [0004] <160> 14
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 18
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] ataggcatac tgacaata 18
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 18
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] gctcattaca tcatcaat 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
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 19
- [0032] <212> RNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] uucuccgaac gugucacgu 19
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 19
- [0038] <212> RNA

- [0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0040] <400> 6
[0041] acgugacacg uucggagaa 19
[0042] <210> 7
[0043] <211> 21
[0044] <212> RNA
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0046] <400> 7
[0047] uaucaacugu cucuuuuga c 21
[0048] <210> 8
[0049] <211> 21
[0050] <212> RNA
[0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0052] <400> 8
[0053] cuaaaggaga caguugauag c 21
[0054] <210> 9
[0055] <211> 21
[0056] <212> RNA
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0058] <400> 9
[0059] uuaguucaug aauauggagg c 21
[0060] <210> 10
[0061] <211> 21
[0062] <212> RNA
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0064] <400> 10
[0065] cuccauauuc augaacuaag u 21
[0066] <210> 11
[0067] <211> 21
[0068] <212> RNA
[0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0070] <400> 11
[0071] aauguucaag gcugaauggu c 21
[0072] <210> 12
[0073] <211> 21
[0074] <212> RNA
[0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0076] <400> 12
[0077] ccauucagcc uugaacauuc a 21

-
- [0078] <210> 13
[0079] <211> 21
[0080] <212> RNA
[0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082] <400> 13
[0083] acuacguuag aaggauuucg g 21
[0084] <210> 14
[0085] <211> 21
[0086] <212> RNA
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0088] <400> 14
[0089] gaaaucuuuc uaacguagug g 21

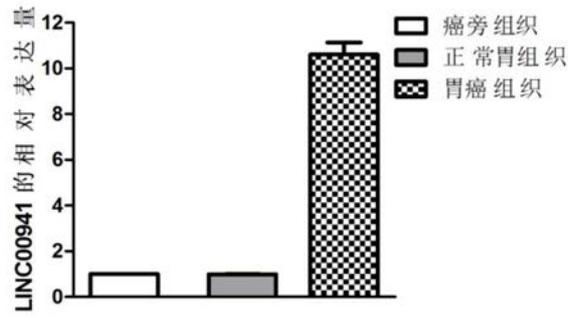


图1

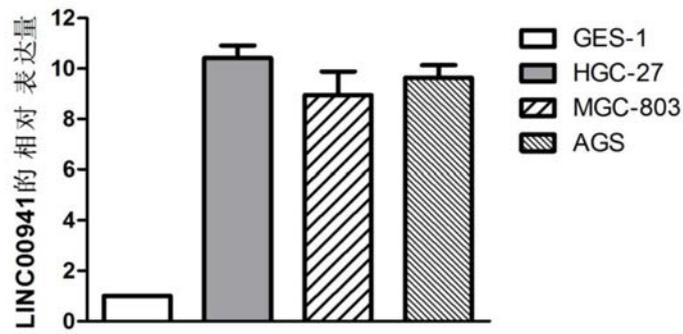


图2

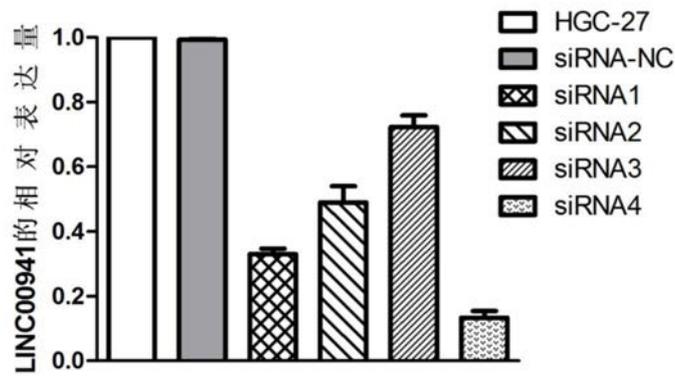


图3

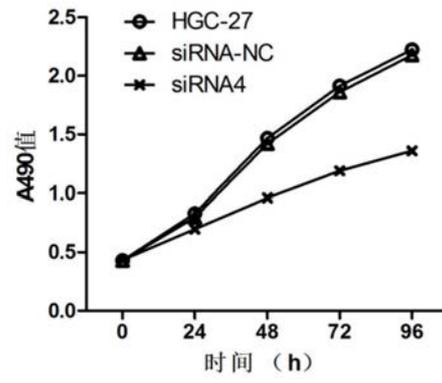


图4

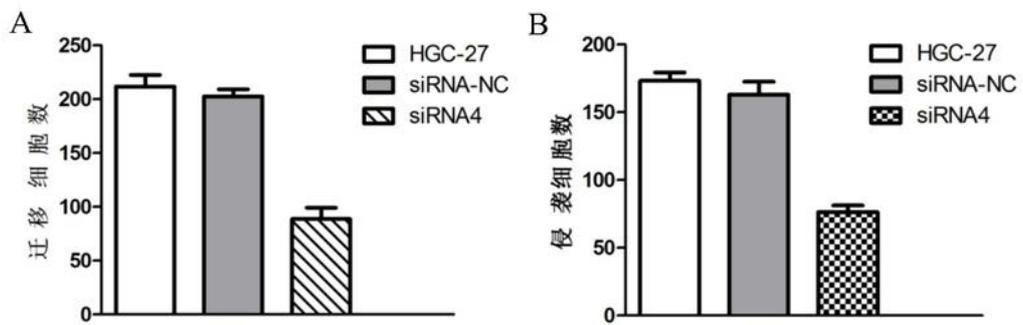


图5