



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105238863 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201510724797. 4

(22) 申请日 2015. 10. 29

(71) 申请人 中国科学院近代物理研究所

地址 730000 甘肃省兰州市城关区南昌路
509 号

(72) 发明人 丁楠 董峰 华君瑞 周光明

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

miR-197 在作为肝癌检测标志物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了 miR-197 在作为肝癌检测标志物中的应用。本发明以实时荧光定量 PCR 技术为基础,以肝癌患者的血清 miR-197 为检测对象,通过比对正常人、肝癌患者及其他几种国内常见癌症(肝癌、食道癌、胃癌、结肠癌、肺癌)病例患者血清中 miR-197 的水平,发现 miR-197 在肝癌患者血清中的特异性高表达,因此,将血清中稳定存在的 miR-197 作为肝癌的血清标志物和分子靶标应用于肝癌临床诊断,用于制备以血清检测为基础的肝癌诊断产品,该产品将对肿瘤的治疗具有重要意义,有广阔的应用前景。

1. 检测 miR-197 表达量的物质在制备诊断或辅助诊断待测患者是否为肝癌患者的产品中的应用；

所述 miR-197 的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。

2. 检测 miR-197 表达量的物质在制备检测或辅助检测肝癌的产品中的应用；

所述 miR-197 的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在於:所述检测 miR-197 表达量的物质为如下 a) 或 b) 或 c) :

a) 扩增所述 miR-197 的引物；

b) 含有所述 a) 的 PCR 试剂组；

c) 含有所述 a) 或所述 b) 的试剂盒。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的应用,其特征在於:所述引物由序列表中序列 2 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 3 所示的单链 DNA 分子组成。

5. 检测 miR-197 表达量的物质,为如下 1) 或 2) :

1) 诊断或辅助诊断待测患者是否为肝癌患者的产品；

2) 检测或辅助检测肝癌的产品；

所述 miR-197 的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。

6. 根据权利要求 5 所述的物质,其特征在於:所述检测 miR-197 表达量的物质为如下 a) 或 b) 或 c) :

a) 扩增所述 miR-197 的引物；

b) 含有所述 a) 的 PCR 试剂组；

c) 含有所述 a) 或所述 b) 的试剂盒。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的物质,其特征在於:所述引物由序列表中序列 2 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 3 所示的单链 DNA 分子组成。

8. 一种检测或辅助检测待测患者是否为肝癌患者的试剂盒,其包括权利要求 5-7 中任一所述的检测 miR-197 表达量的物质。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在於:所述试剂盒还包括记载有如下内容的诊断卡:

1) 若待测患者的 miR-197 的表达量高于健康人,且二者有显著差异,则待测患者为或候选为肝癌患者；

2) 若待测患者不满足上述步骤 1) 的条件,则待测患者不为或候选不为肝癌患者。

10. 权利要求 8 或 9 所述的试剂盒在制备诊断或辅助诊断待测患者是否为肝癌患者的产品中的应用；

或权利要求 8 或 9 所述的试剂盒在制备检测或辅助检测肝癌的产品中的应用。

miR-197 在作为肝癌检测标志物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及 miR-197 在作为肝癌检测标志物中的应用。

背景技术

[0002] 肝细胞性肝癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC, 以下简称肝癌) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度高、侵袭力强、预后差,死亡率位居世界肿瘤死亡第二位。中国是肝癌高发区,据统计每年发患者数占全球约 55%。肝癌发病比较隐匿,早期缺乏特异的临床表现,发现时往往已经属于中晚期。提高肝癌患者长期生存率的原则是早发现、早诊断、早治疗,其中的关键是早期诊断。

[0003] 目前,最常用的肝癌常规诊断方法有影像学检查、肝组织活检或细胞学检查以及肿瘤血清标志物检查。但是,影像学检查分辨率较差且存在难以检测的盲区,而肝穿刺活检取样过程复杂,易造成较大创伤且易产生假阴性结果,因此,目前最理想的肝癌诊断方法是非创性的肿瘤血清标志物检查。熟知的肝癌血清标志物比较多,如甲胎蛋白 (AFP)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (GPC-3)、 α -L 岩藻糖苷酶 (AFU) 等。但这些标志物在应用过程之中普遍存在敏感度或特异度不高、在高危人群筛查和复发监测中缺乏有效的预警作用等局限性。就当前临床现状来看,AFP 仍是应用非常广泛的肝癌检测标志物,其阳性率最高也仅为 66.7%。

[0004] 近年研究发现,血液中存在丰富而稳定的 miRNA,其表达谱具有明显的组织特异性,并且在不同疾病、不同肿瘤患者血清中也具有特异的表达谱,因此外周血 miRNA 作为潜在标志物在肿瘤诊断中具有明显优势 (PNAS, 2008, 105(30):10513-18),目前已经报道血清中的循环 miRNA 在多种肿瘤的诊断中具有较高的特异性和灵敏度 (Molecular Cancer, 2010, 9(306):1-9)。早在 2009 年就出现了有关肝癌的 miRNA 血清标志物研究,至今已报道的具备肝癌诊断潜在价值的 miRNA 就有 miR-21、miR-122、miR-210 等多种 (Biomarkers, 2009, 14(7):529-38; Mol Carcinog, 2011, 50(2):136-42; Eur J Cancer, 2013, 49(16):3442-9)。但是,上述研究普遍采用样本血清中原本就存在的核酸作为内源性参照,例如 RNU6B、RNU44、RNU48、miR-16 等。由于 miR-16 本身在肿瘤发生过程发挥功能,其表达水平并不稳定;而 RNU6B 等短序列 RNA 在血清中含量极低不易检测,必然无法避免病患间的个体差异以及实验过程造成的误差 (BMC Clinical Pathology, 2014, 14:27)。因此,如何选取血清 miRNA 实验的内源性参照物至今还存在很大争议 (J. Cancer, 2012, 3:432-448)。

[0005] Cel-miR-39 是最早被发现的一批线虫 miRNA 之一 (Science, 2001, 294:858-62)。由于线虫与哺乳动物在遗传上差距太大,cel-miR-39 序列在哺乳动物等高等动物基因组内不存在,其对哺乳动物生命过程也不产生影响。因而在哺乳动物 miRNA 检测过程中,外加人工合成的 cel-miR-39 作为外源参照是目前控制样本间实验误差的一种可靠做法。

[0006] 实时荧光定量 PCR 检测是一种通用的基因定量检测方法,它在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初

始量,而不需要取出 PCR 产物进行分离。实时定量 PCR 灵敏度高,通用性好,可重复性强,特别适用于大通量检测,已被广泛地应用于分子生物学研究的各个领域。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供检测 miR-197 表达量的物质的新用途。

[0008] 本发明提供了检测 miR-197 表达量的物质在制备诊断或辅助诊断待测患者是否为肝癌患者的产品中的应用。

[0009] 本发明还提供了检测 miR-197 表达量的物质在制备检测或辅助检测肝癌的产品中的应用。

[0010] 上述应用中,所述 miR-197 的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。

[0011] 上述应用中,所述检测 miR-197 表达量的物质为如下 a) 或 b) 或 c) :

[0012] a) 扩增所述 miR-197 的引物 ;

[0013] b) 含有所述 a) 的 PCR 试剂组 ;

[0014] c) 含有所述 a) 或所述 b) 的试剂盒。

[0015] 上述应用中,所述引物由序列表中序列 2 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 3 所示的单链 DNA 分子组成。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种检测 miR-197 表达量的物质。

[0017] 本发明提供的检测 miR-197 表达量的物质为如下 1) 或 2) :

[0018] 1) 诊断或辅助诊断待测患者是否为肝癌患者的产品 ;

[0019] 2) 检测或辅助检测肝癌的产品 ;

[0020] 所述 miR-197 的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。

[0021] 上述物质中,所述检测 miR-197 表达量的物质为如下 a) 或 b) 或 c) :

[0022] a) 扩增所述 miR-197 的引物 ;

[0023] b) 含有所述 a) 的 PCR 试剂组 ;

[0024] c) 含有所述 a) 或所述 b) 的试剂盒 ;

[0025] 所述引物由序列表中序列 2 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 3 所示的单链 DNA 分子组成。

[0026] 本发明还有一个目的是提供一种检测待测患者是否为肝癌患者的试剂盒。

[0027] 本发明提供的检测或辅助检测待测患者是否为肝癌患者的试剂盒包括上述检测 miR-197 表达量的物质。

[0028] 上述试剂盒中,所述试剂盒还包括记载有如下内容的诊断卡 :

[0029] 1) 若待测患者的 miR-197 的表达量高于健康人,且二者有显著差异,则待测患者为或候选为肝癌患者 ;2) 若待测患者不满足上述步骤 1) 的条件,则待测患者不为或候选不为肝癌患者。

[0030] 上述试剂盒中,所述待测患者的 miR-197 的表达量高于健康人,且二者有显著差异为待测患者血清中 miR-197 的表达量比健康人血清中 miR-197 的表达量高 18.8 倍。

[0031] 本发明的最后一个目的是提供上述试剂盒的新用途。

[0032] 本发明提供了上述试剂盒在制备诊断或辅助诊断待测患者是否为肝癌患者的产品中的应用。

[0033] 本发明还提供了上述试剂盒在制备检测或辅助检测肝癌的产品中的应用。

[0034] 上述 miR-197 表达量为血清中 miR-197 的表达量。

[0035] 本发明以实时荧光定量 PCR 技术为基础,以肝癌患者的血清 miR-197 为检测对象,采用线虫小 RNA cel-miR-39 为外源参照,通过比对正常人、肝癌患者及其他几种国内常见癌症(肝癌、食道癌、胃癌、结肠癌、肺癌)病例患者血清中 miR-197 的水平,发现 miR-197 在肝癌患者血清中的特异性高表达,因此,将血清中稳定存在的 miR-197 作为肝癌的血清标志物和分子靶标应用于肝癌临床诊断,用于制备以血清检测为基础的肝癌诊断产品,该产品将对肿瘤的治疗具有重要意义,有广阔的应用前景。

附图说明

[0036] 图 1 为实时荧光定量 PCR 检测血清 miRNA。图 1A 为 PCR 扩增曲线;图 1B 为扩增产物溶解曲线;图 1C 为扩增产物溶解峰。

[0037] 图 2 为各样本 miR-197 表达水平比较。

[0038] 图 3 为肝癌患者与正常人之间 miR-197 表达差异的 AUC 分析。

具体实施方式

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 实施例 1、miR-197 在作为检测肝癌标志物中的应用

[0042] 一、待测血清样本的获得及信息

[0043] 本发明所检测的血清样本均由甘肃省医学科学研究中心甘肃肿瘤血清资源库提供,每例病患血清均有对应的诊断记录及确切的病例信息。血清的取样经由事先通知并获得患者允许,符合社会伦理学相关标准。本发明共检测健康志愿者的血清样本 66 例,肝癌患者血清样本 70 例,食道癌患者血清样本 20 例,胃癌患者血清样本 22 例,结肠癌患者血清样本 20 例,肺癌患者血清样本 21 例。各癌症患者信息统计详见表 1。

[0044] 表 1、癌症患者信息汇总表

[0045]

患者年龄分段	肝癌		食道癌		胃癌		结肠癌		肺癌	
	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女
< 40	3	1	0	0	0	0	2	0	1	0
41-50	9	1	0	0	1	2	2	2	4	1
51-60	19	9	4	0	4	2	0	1	4	2
61-70	9	9	8	3	9	1	2	1	5	1
> 70	8	2	3	2	3	0	5	5	3	0
合计	70		20		22		20		21	

[0046] 二、实时荧光定量 PCR 测定 miR-197 的表达水平

[0047] 本发明以人工合成线虫 39miRNA(cel-miR-39) 为外参基因,对步骤一中的待测血清样本血清中 miR-197 的表达水平进行检测。miR-197 的成熟核苷酸序列为 CGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGG(序列 1)。

[0048] 1、血清 RNA 的提取

[0049] 参照文献“张晓娟等,南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(4):529-31”中的实验方案,采用 TRIzol 法对血清样本的全 RNA 进行提取。具体步骤如下:

[0050] (1) 将步骤一的各个待测血清样本在冰上融化,待完全溶解后使用 1000g 的离心力在 4℃ 下离心 10 分钟,去除血清中血细胞残片等杂质,收集上清。

[0051] (2) 每例血清样本取 400 μL 步骤 (1) 获得的上清,加入到 1mL 的 TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 中,同时加入 10μL 的浓度为 1mM 的人工合成的线虫 miRNA cel-39 类似物(广州复能基因有限公司,广州,广东,中国),充分混匀之后静置 5 分钟。

[0052] (3) 将步骤 (2) 获得的产物通过氯仿萃取和异丙醇沉淀后,得到 RNA,将其溶解到 20 μL 去除 RNA 酶的灭菌水中,得到待测血清的 RNA。

[0053] 2、RNA 反转录

[0054] 采用 RNA 的 3' 末端加 A(腺嘌呤)法开展 RNA 的反转录。将步骤 1 获得的 RNA 样本、POLY A 聚合酶、M-MLV 反转录酶及 5× 的聚合反应 Buffer 混匀,配置成反转录体系,在 37℃ 反应 60 分钟,得到反转录产物。反应体系中各组分含量及具体实施过程参照 miRNA qRT-PCR Detection Kit(广州复能基因有限公司,广州,广东,中国)说明书。

[0055] 3、实时荧光定量 PCR

[0056] 以上述步骤 2 获得的反转录产物为模板,分别采用 Hsa-miR-197 特异性扩增引物和 cel-miR-39 特异性扩增引物进行实时荧光定量 PCR,分别得到扩增产物,每个反应体系使用的模板的量保持一致。Hsa-miR-197 特异性扩增引物:

[0057] Sense :5' -CGGGUAGAGAGGGC-3' (序列 2);

[0058] antisense :5' -TTTTTTTTTTTTTTTT-3' (序列 3);

[0059] cel-miR-39 特异性扩增引物:

[0060] Sense :5' -TCACCGGGTGTAATC-3' ;

[0061] antisense :5' -TTTTTTTTTTTTTTTT-3'。

[0062] 各个待测样本的实时荧光定量 PCR 的扩增曲线如图 1A 所示,曲线与基线相交处为 PCR 反应的循环数 (Ct 值),此值可反映所检测 miRNA 的最初含量。各个待测样本的 PCR 产物的溶解曲线和溶解峰分别如图 1B 和图 1C 所示,从图中可以看出,溶解峰为单峰,说明荧光定量 PCR 反应为单一产物,PCR 测定可信度高。也说明常规试验方法 (TRIzol 法提取 RNA、实时荧光定量 PCR 进行 miRNA 检测) 可实现待测血清样本的 miRNA 的提取和定量检测。

[0063] 4、统计学分析判定 miRNA 相对表达量

[0064] 参照文献“Wang GK、Zhou J,European Heart Journal,2010,31:659-66; JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY,2011,29(36):4781-8”中的统计策略,以人工合成的 cel-miR-39 为外源参照,使用 cel-miR-39 的 Ct 值以去除样品间误差,以正常人 miRNA 表达变化倍数的均值为基准点,采用 $\Delta\Delta Ct$ 法计算各类癌症患者血清 miRNA 的相对表达变化倍数。计算公式如下:miRNA 相对表达变化倍数 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta\Delta Ct = \text{样本 } \Delta Ct - \text{正常人 } \Delta Ct$ 的均值;样本 $\Delta Ct = \text{样本 miRNA Ct 值} - \text{样本 cel-miR-39 Ct 值}$;正常人 ΔCt 的均值 = 所有正常人样本的 (miRNA Ct 值 - cel-miR-39 Ct 值) 的算术平均值。舍弃 Ct 值高于 40 的结果,按上述公式计算各个待测样本血清中的 miR-197 的相对表达变化倍数,采用

Z 检验判定数据间统计学差异,当 $p < 0.05$ 判定为差异具有显著性。并使用 SPSS 19.0 进行受试者工作特征曲线 (ROC, Receiver Operating Characteristic Curve) 分析,当 AUC 值 $> 90\%$, 则判定为准确性高。

[0065] 各个待测样本的 miR-197 的表达量的数据统计结果如表 2 和图 2 所示,从表 2 中的中位数来看,肝癌患者血清样本中 miR-197 表达量相对于正常人增高 18.8 倍,而食道癌、胃癌、结肠癌、肺癌等癌症患者样本血清中的 miR-197 的表达量同正常人相比没有显著性差异。从图 2 中的相对表达变化倍数来看,肝癌患者血清样本中 miR-197 的相对表达变化倍数显著高于正常人、食道癌、胃癌、结肠癌、肺癌等癌症患者。

[0066] 表 2、各样本 miR-197 表达水平的数据统计结果

[0067]

	正常人	肝癌	食道癌	胃癌	结肠癌	肺癌
样本量	66	70	20	22	20	21
最大值	23.699	562.471	22.559	24.167	15.687	18.706

[0068]

中位数	1.105	20.818	2.963	1.563	1.897	2.070
最小值	9.3e-5	3.152	0.318	0.123	0.326	0.333
平均值	2.808	61.194	6.204	7.601	3.379	4.478
Z 检验 1*	-	0.006	0.088	0.157	0.119	0.069
Z 检验 2#	0.006	-	1e-4	0.002	6.02e-5	0.008

[0069] *:Z 检验 1 的数据为各样本与正常人之间比对结果;#:Z 检验 2 的数据为各样本与肝癌之间比对结果。

[0070] 受试者工作特征曲线分析结果如图 3 所示,miR-197 的特征曲线表现出较高的特异性和敏感度,其 AUC 达到 0.946,大于 90%,说明本发明的检测结果准确性高。

[0071] 综上所述,本发明可确认肝癌患者血清 miR-197 较正常人有特异性高表达,可作为肝癌临床诊断标志物。因此,可通过检测待测患者的 miR-197 的表达量的方法来判断待测患者是否为肝癌患者,具体方法如下:

[0072] 1) 若待测患者的 miR-197 的表达量高于健康人,且二者有显著差异,则待测患者为或候选为肝癌患者;

[0073] 2) 若待测患者不满足上述步骤 1) 的条件,则待测患者不为或候选不为肝癌患者。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院近代物理研究所

<120> miR-197 在作为肝癌检测标志物中的应用

<160> 3

<210> 1

<211> 23bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

cggguagaga gggcaguggg agg

23

<210> 2

<211> 14bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

cggguagaga gggc

14

[0002]

<210> 3

<211> 16bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

tttttttttt tttttt

16

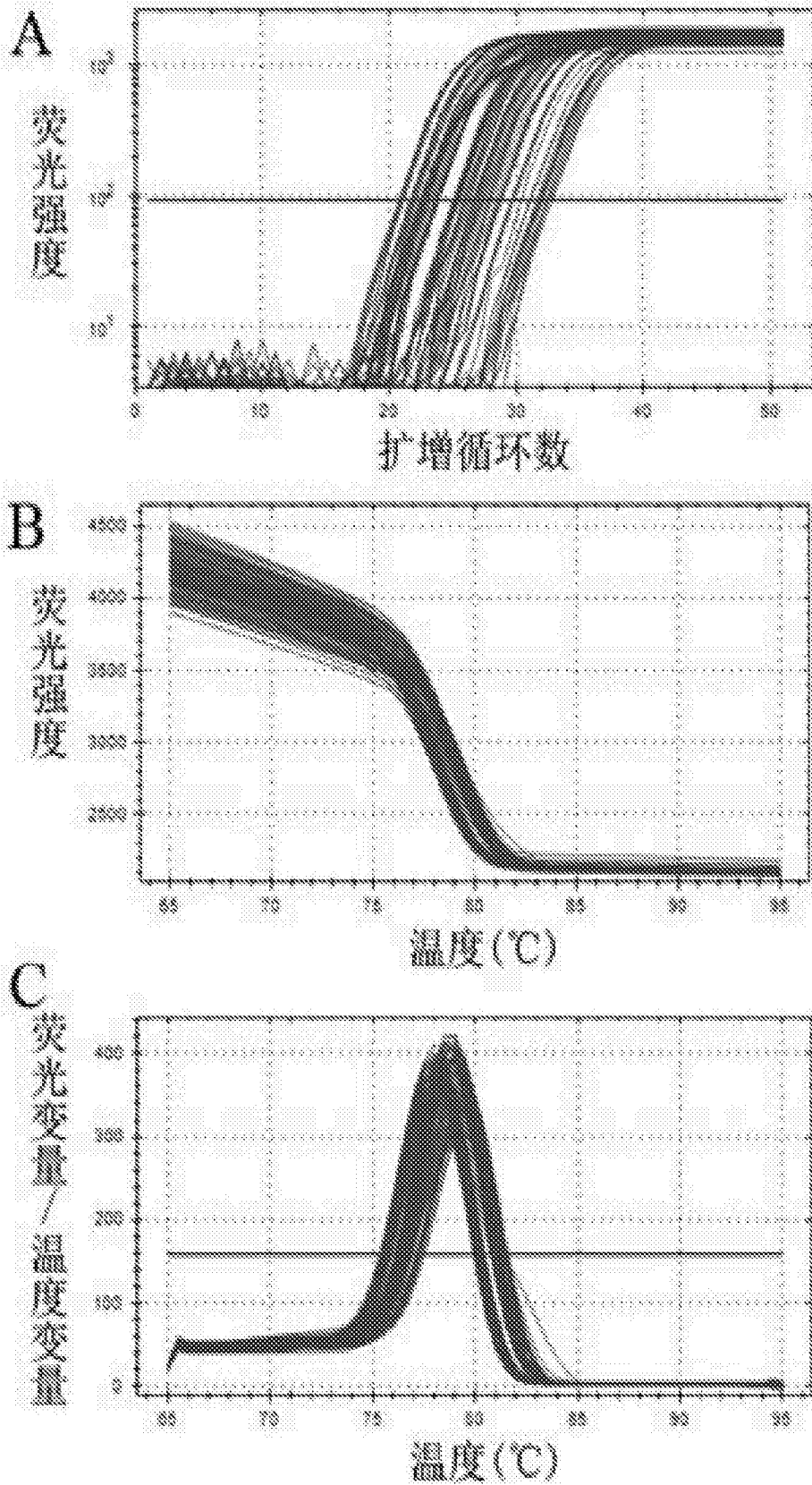


图 1

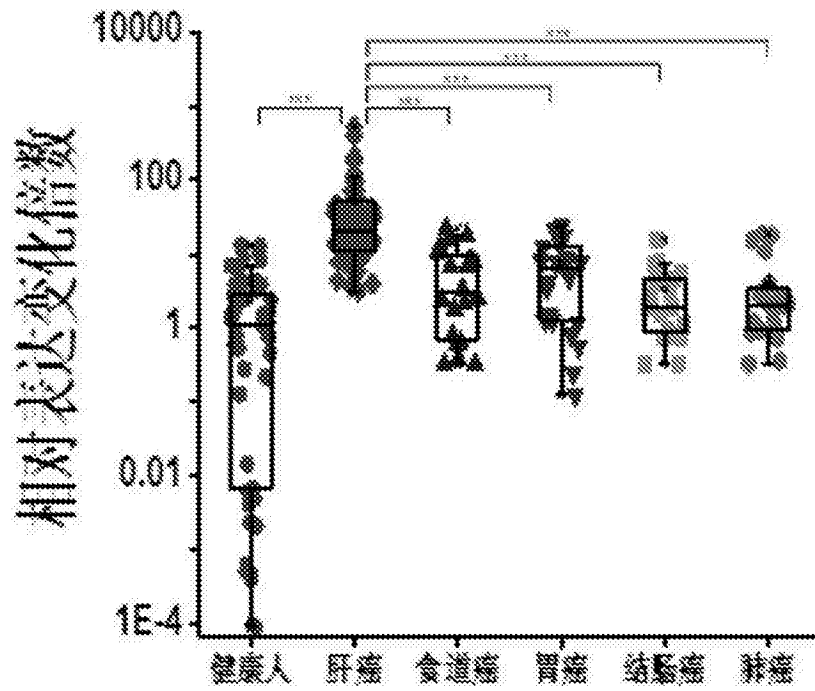


图 2

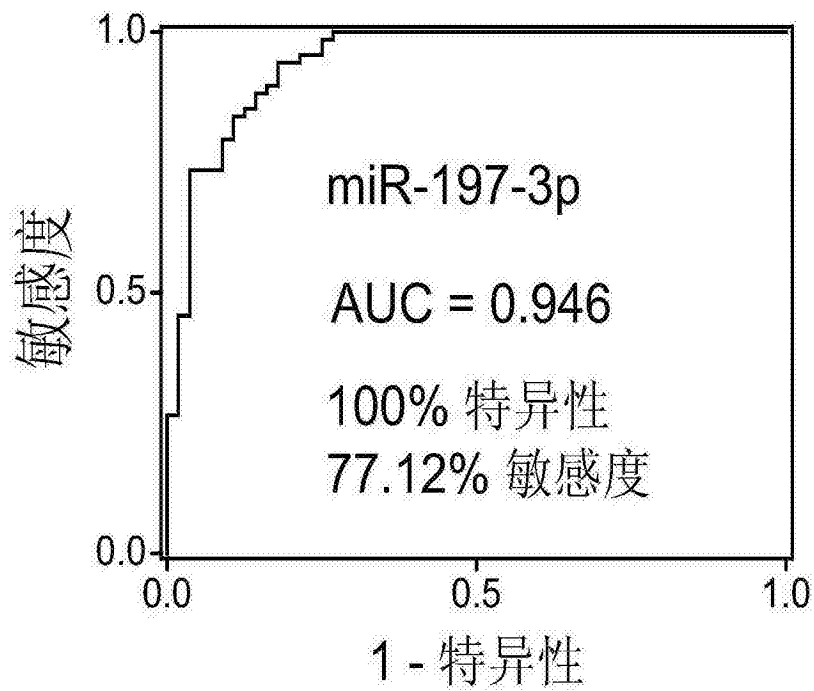


图 3