(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107130027 B
(45)授权公告日 2018.02.16

(21)申请号 201710339698.3

(22)申请日 2017.05.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107130027 A

(43)申请公布日 2017.09.05

(73)专利权人 新疆医科大学第四附属医院
地址 830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市沙依巴克区黄河路116号
专利权人 乌鲁木齐市中医医院
新疆生产建设兵团医院(石河子大学医学院第二附属医院)

(72)发明人 何文婷 节阳华 朱艳华 迟杰骏 付晓乐 杨晓蓓 曾凡业 周豫昆 张洪亮

(74)专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理有限公司 11279
代理人 李红伟 朱萍

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2018.01)
G01N 33/574(2006.01)

审查员 程珂

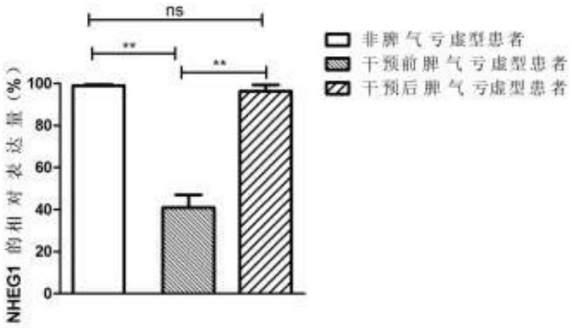
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

生物标志物在结直肠癌中的应用

(57)摘要

本发明公开了生物标志物在结直肠癌中的应用,具体地该生物标志物为NHEG1,本发明首次发现了NHEG1在脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中表达下调,提示检测NHEG1的表达水平可以成为判断晚期结直肠癌患者分型的依据。同时,本发明提供了NHEG1基因在制备脾气亏虚型晚期结直肠癌患者疗效评价中的应用,当脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中NHEG1的表达水平与非脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中的表达水平无明显差异时,说明药物疗效良好。



CN 107130027 B

1.生物标志物NHEG1的用途,其特征在于,用于制备诊断晚期结直肠癌是否为脾气亏虚型结直肠癌的产品。

2.根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述产品通过测定样本中生物标志物的水平与相应生物标志物的参考水平相比下调而确定患者为脾气亏虚型结直肠癌患者。

3.根据权利要求2所述的用途,其特征在于,所述生物标志物NHEG1的序列如SEQ ID NO.1所示。

4.根据权利要求1-3任一项所述的用途,其特征在于,所述产品包括通过测序技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术或免疫测定的方法检测NHEG1基因的表达水平的试剂。

5.根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述核酸扩增技术选自聚合酶链式反应、转录介导的扩增、连接酶链式反应。

6.根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述产品选自制剂、芯片、或试剂盒。

7.根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述产品包括特异性识别NHEG1基因的试剂。

8.根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述特异性识别NHEG1基因的试剂选自:

特异性扩增NHEG1基因的引物;或

特异性识别NHEG1基因的探针。

生物标志物在结直肠癌中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，涉及一种生物标志物在结直肠癌中的应用，具体地该生物标志物为NHEG1。

背景技术

[0002] 结直肠癌在全球病死率已然升至第三位，发病率和死亡率均呈上升趋势，全球每年发病人数约为90万人，死亡人数约50万人。在我国，结直肠癌发病呈明显上升趋势，尤其是近些年形势不容乐观，目前已是影响中国人健康的最常见的恶性肿瘤，发病率排在第4位，严重威胁人类的生命健康。然而，至今结直肠癌的总体治疗效果依然是人们严峻的挑战，5年生存率仍然在70％(直肠癌)和50％(结肠癌)左右徘徊。II期结肠癌，有60％～70％的患者通过手术即可治愈，但15～20％的患者术后即使接受化疗，仍然复发。III期结肠癌中，手术可以治愈40～50％的患者，但约有35％术后尽管使用化疗仍会复发。对于IV期即存在远处转移结肠癌的患者，无论放疗、化疗其获益更低。近几年，多药耐药的发现更加说明化疗药物的局限性，因此人们开始寻找耐药基因突变位点，针对靶点研究，有效延长了患者生存时间。然而由于昂贵的检测费用和单克隆抗体靶向治疗费用，使得现实中使用这类药物人群少之又少。

[0003] 故在精准医疗模式的提出下，中医药治疗成为恶性肿瘤综合治疗模式中不可或缺的手段，由于其诊疗手段迅速、有效、廉价的特征，且疗效获得广泛肯定，副作用较小，经济负担较轻，越来越受到患者的认可和学者的青睐。

[0004] 中医“证”是机体在疾病发展过程中某一阶段病因病机的高度概括，反应该阶段病理变化的本质。既然同一个“证”具有共同的临床表现和病理基础，那考虑其有共同的物质基础，而这种物质基础很有可能反映在基因水平上。从分子水平上对晚期结直肠癌脾气亏虚证的症候实质研究对于结直肠癌的治疗提供了新的思路;同时也为结直肠癌的中医治疗提供理论基础。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种生物标志物在结直肠癌中的应用。

[0006] 本发明提供了生物标志物NHEG1的用途，用于制备诊断结直肠癌诊断或疗效评价的产品。

[0007] 进一步，所述结直肠癌为脾气亏虚型晚期结直肠癌。

[0008] 进一步，所述产品通过测定样本中生物标志物的水平与相应生物标志物的参考水平相比上调而确定。

[0009] 进一步，所述生物标志物包括如SEQ ID NO.1所示核苷酸序列的多核苷酸或其片段、同系物、变体或衍生物。

[0010] 本发明提供了一种体外检测样本中NHEG1表达水平的产品，所述产品包括:通过测序技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术或免疫测定的方法检测NHEG1基因的表达水平。

[0011] 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。

[0012] 进一步，所述产品包括制剂、芯片、或试剂盒。

[0013] 进一步，所述产品包括特异性识别NHEG1基因的试剂。

[0014] 进一步，所述特异性识别NHEG1基因的试剂选自：

[0015] 特异性扩增NHEG1基因的引物；或

[0016] 特异性识别NHEG1基因的探针。

[0017] 本发明提供了上述产品在制备脾气亏虚型晚期结直肠癌的诊断或疗效评价工具中的应用。

[0018] 本发明的优点和有益效果：

[0019] 本发明首次发现了NHEG1基因与脾气亏虚型晚期结直肠癌的治疗相关，据此可以指导医生确定临床药物的使用及使用周期。

[0020] 本发明提供了一种诊断产品，通过检测NHEG1的表达水平，从而判断患者是否为脾气亏虚型患者，进而进行辨证治疗。

附图说明

[0021] 图1是利用基因芯片检测NHEG1基因在结直肠癌患者中的差异表达统计图；

[0022] 图2是利用QPCR检测NHEG1基因在结直肠癌患者中的差异表达统计图。

具体实施方式

[0023] 本发明通过使用四君子颗粒治疗脾气亏虚型晚期结直肠癌首次发现了NHEG1与脾气亏虚型晚期结直肠癌相关，并验证了血液中的NHEG1在脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中高表达。NHEG1可作为结直肠癌的独立预测因子，也可以和其他的生物标志物联合应用。

[0024] 生物标志物

[0025] 术语“生物标志物”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或蛋白。

[0026] 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标志物基因的任何特定变体的基因表达进行定量。作为非限制性的实例，标志物基因可具有SEQ ID NO.1指定的多核苷酸序列。在一些实施方案中，其具有与所列的序列至少85％相同或相似的cDNA序列，诸如上述所列的序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或至少99％相同或相似的cDNA序列。

[0027] 术语“片段”是指多核苷酸的一部分一部分。为生物标志物核苷酸序列的片段的多核苷酸通常包含至少10、15、20、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300或1,400个连续的核苷酸，或最多存在于本文所公开的全长生物标志物多核苷酸中的核苷酸个数。

[0028] “变体”旨在表示基本上相似的序列。一般来讲，本发明的特定生物标志物的变体将具有通过序列比对程序测定的与所述生物标志物至少约40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的序列同一性。

[0029] 本发明中的“多核苷酸”包括RNA、cDNA、基因组DNA、合成形式及混合的聚合物，有义链和反义链，及可以是化学或生物化学修饰的，或者可以含有非天然或衍生的核苷酸碱基，这易为本领域技术人员所意识到。这种修饰包括例如标记、甲基化、用类似物取代一或多个天然发生的核苷酸、核苷酸间修饰如无电荷的键连(例如甲基磷酸酯，磷酸三酯，磷酸酰胺，氨基甲酸酯等)、带电荷的键连(例如硫代磷酸酯，二硫代磷酸酯等)、悬垂部分(pendent moieties)(例如多肽)、嵌入物(例如吖啶、补骨脂素等)、螯合剂、烷化剂，及修饰的键连(例如α端基异构核酸等)。也包括合成分子，其具有模拟多核苷酸通过氢键及其它化学相互作用结合指定序列的能力。这种分子为本领域已知，包括例如其中在分子主链中肽键取代磷酸键。

[0030] 基因表达检测技术

[0031] 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。

[0032] 通常，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；逆转录聚合酶链式反应则将逆转录酶(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；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，转录介导的扩增任选地包括使用阻断，部分、终止部分和其他修饰部分，以改善转录介导的扩增过程的灵敏度和准确度；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。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；链置换扩增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dNTPαS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刻，以及从切口3’端进行的聚合酶介导引的物延伸以置换现有链并产生供下一轮引物退火、切刻和链置换的链，从而引起产物的几何扩增。

[0033] 核酸杂交形式的选择不是关键的。多种核酸杂交形式包括但不限于夹心测定和竞争或替代测定。杂交复合物的检测可需要产信号复合物与靶标和探针多核苷酸或核酸的双螺旋的结合。通常，这种结合通过配体和抗配体相互作用而发生，例如配体偶联的探针和偶联有信号的抗配体之间的相互作用。通过暴露于超声能，信号生成复合物的结合也易于得到加速。

[0034] 制剂、芯片或试剂盒

[0035] 术语“芯片”也称为“阵列”，指包含连接的核酸或肽探针的固体支持物。阵列通常包含按照不同的已知位置连接至基底表面的多种不同的核酸或肽探针。这些阵列，也称为“微阵列”。

[0036] “微阵列”是杂交阵列原件有序排列在基质上，所述杂交阵列原件诸如聚核苷酸探针(例如寡核苷酸)或结合剂(例如抗体)。所述基质可以是固体基质，例如，玻璃或二氧化硅玻片、珠、纤维光学粘结剂或半固态基质，例如硝酸纤维素膜。核苷酸序列可以是DNA、RNA或其中的任何排列。

[0037] 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。

[0038] 探针通常被直接标记，例如用同位素、发色团、发光团、色原体，或被间接标记，例如用生物素，链霉亲和素复合物随后可以与生物素结合。因此，本发明测定中所用的可检测的标记可以是一级标记(其中该标记包含可直接检测的元件或能产生直接可检测的元件的元件)或二级标记(其中可检测的标记与一级标记结合，例如，免疫标记中常用的)。通常，标记的信号核酸用于检测杂交。可以通过常用于检测杂交多核苷酸存在的数种方法中的任一种标记互补的核酸或信号核酸。最常用的检测方法是利用用^{3}H、^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{32}P标记的探针等的放射自显影法。其它标记包括，例如，能结合标记抗体的配体、荧光团、化学发光剂、酶以及能作为标记配体的特异结合对成员的抗体。

[0039] 在作为探针使用的多核苷酸的大小优选为18个或更多个核苷酸、更优选为20个或更多个核苷酸，以及转录区域的全长或更少。作为引物使用时，该多核苷酸大小优选为18个或更多个核苷酸，以及50个或更少核苷酸。

[0040] 上述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、LNA、ENA、GNA、TNA等人工核酸置换得到的多核苷酸。

[0041] 在本发明中，基因芯片可用于检测包括NHEG1基因在内的多个基因(例如，与结直肠癌相关的多个基因)的表达水平。蛋白质芯片可用于检测包括NHEG1蛋白在内的多个蛋白质(例如与结直肠癌相关的多个蛋白质)的表达水平。

[0042] 术语“试剂盒”包括检测有效量的检测NHEG1基因的试剂，选自下组的一种或多种物质：容器、使用说明书、阳性对照物、阴性对照物、缓冲剂、助剂或溶剂。例如用于混悬或固定细胞的溶液，可检测的标签或标记，使核酸易于杂交的溶液，用于裂解细胞的溶液，或用于核酸纯化的溶液。

[0043] 本发明的试剂盒中还可附有试剂盒的使用说明书，其中记载了如何采用试剂盒进行检测，和如何利用检测结果对肿瘤发展进行判断、对治疗方案进行选择。

[0044] 采用本发明的试剂盒，可通过选自下组的各种方法(包括但不限于)检测NHEG1：实时定量反转录PCR、生物芯片检测法、DNA印迹法、或RNA印迹法或原位杂交法。本领域普通技术人员可根据实际条件和需要对检测方式进行调整和改变。

[0045] 在本发明的上下文中，“诊断结直肠癌”既包括判断受试者是否已经患有结直肠癌、也包括判断受试者是否存在患有结直肠癌的风险。

[0046] 术语“样本”包括(但不限于)，可以是血液、组织、尿液、血清、血浆、羊水、脑脊液、胎盘细胞或者组织、内皮细胞、白细胞或单核细胞。样品可以得自患者或对象直接使用，或者进行预处理，如通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、离心、失活干扰成分、加入试剂等方式处理，以如本文所述或者本领域已知的一些方式修饰样品的特性。在本发明的具体实施例中，所

述“样本”为血液。

[0047] 本发明的生物标志物用于诊断时，当晚期结直肠癌患者中的NHEG1基因的表达水平显著低于非脾气亏虚型结直肠癌时，则表示该结直肠癌患者为脾气亏虚型结直肠癌。

[0048] 本发明的生物标志物用于评价疗效时，给予脾气亏虚型结直肠癌患者的药物时，当检测到脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中的NHEG1基因的表达水平显著高于治疗前脾气亏虚型晚期结直肠癌患者或者与非脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中的表达水平无明显差异时，则表明该药物的治疗效果较好。当检测到脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中的NHEG1基因的表达水平显著低于非脾气亏虚型晚期结直肠癌患者中的表达水平时，则表明患者还需要继续服药治疗。

[0049] 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 HarborLaboratory Press,1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0050] 实施例1筛选与结直肠癌相关的生物标志物

[0051] 1、病例收集

[0052] 收集医院肿瘤科经病理明确诊断的III～IV期结直肠癌患者；选择脾气亏虚证5例作为实验组，非脾气亏虚证5例作为对照组；仅接受纯中医治疗。

[0053] 1.1结直肠癌的诊断及分期标准

[0054] 参照中华人民共和国卫生部医政司2010年10月编著的《结直肠癌诊疗规范》，2011NCCN肿瘤临床实践指南(中国版)第一版TNM分期标准。

[0055] 1.2中医症候的诊断标准

[0056] 脾气亏虚证：

[0057] 主证：腹部隐痛，大便不畅或虽有便意解之困难，便溏；

[0058] 次证：神疲乏力，食欲不振，食后作胀，面色萎黄，舌淡胖，苔白，脉沉细。具备主证1项，次证3项可诊断。

[0059] 1.3纳入、排除标准

[0060] 纳入标准：(1)汉族III～IV期结直肠癌患者，仅接受纯中医治疗；(2)18～75岁；(3)卡氏评分(KPS)≥60分；(4)预计生存期＞3个月；(5)依从性好，已签署知情同意书。

[0061] 排除标准：(1)合并有严重的或需要治疗的心脑血管、肝、肾和造血系统疾病；(2)孕妇、哺乳期及精神病患者；(3)有明显的复合证患者。

[0062] 2、治疗方法

[0063] 入组患者抽取外周血后，以四君子颗粒(吉林省集安益盛药业股份有限公司生产)进行干预，每次15g，水冲服，3次/d，治疗时间为21d，。治疗期间，患者不接受其他西医及中医药治疗，剔除失访病例，终止出现明显不良反应及因其他缘故引发不良事件的病例。21d后再次提取外周血，进行基因芯片检测，并与干预前的芯片

[0064] 3、总mRNA提取

[0065] 使用美国sigma公司的Trizol试剂盒提取血液中的RNA，具体步骤如下：

[0066] 清晨采集患者空腹外周静脉血5mL，以红细胞裂解液分离出白细胞，加入细胞20倍体积的Trizol。移液器进行反复抽打细胞直至看不见成团的细胞块，使之充分溶解于

Trizol中形成清亮不黏稠的液体，-80℃冰箱中保存。Trizol一步法抽提总RNA。定量分析：用分光光度计在260nm和280nm处分别测定吸光度，A260/A280比值在1.8～2.0为较纯的RNA。

[0067] 4、Agilent表达谱芯片杂交

[0068] RNA质检合格后，样本的标记、芯片的杂交以及洗脱参照芯片标准流程。首先，总RNA反转录成双链cDNA，再进一步合成用Cyanine-3-CTp(Cy3)标记的cRNA。标记好的cRNA和芯片杂交，洗脱后利用Agilent Scanner G2505C(Agilent Technologies)扫描得到原始图像。

[0069] 5、数据处理

[0070] 采用Feature Extraction软件(version10.7.1.1，Agilent Technologies)处理原始图像提取原始数据。接着利用Genespring软件(version 12.5：Agilent Technologies)进行quantile标准化和后续处理。标准化后的数据进行过滤，在用于比较的每组样本中至少有一组100％标记为Detected的探针留下进行后续分析。利用t检验得到的差异显著性P值和标准化信号值的差异倍数值进行差异基因筛选，筛选的标准为上调或者下调倍数变化值≥2.0且P<0.05。

[0071] 6、结果

[0072] 结果显示，与非脾气亏虚型患者相比，脾气亏虚型晚期结直肠癌患者差异表达基因126条，其中上调的51条，下调的55条。

[0073] 脾气亏虚型患者使用四君子颗粒在干预前后共发现15个差异基因位点，其中12个上调，3个下调。

[0074] 其中，如图1所示，差异表达基因NHEG1表达相比干预前显著上调。

[0075] 实施例2QPCR测序验证NHEG1基因的差异表达

[0076] 1、根据高通量测序的检测结果选择NHEG1基因进行大样本QPCR验证。按照实施例1中的样本收集方式选择脾气亏虚型晚期结直肠癌患者和非脾气亏虚型结直肠癌患者各50例。

[0077] 2、治疗方法步骤同实施例1

[0078] 3、RNA提取步骤同实施例1。

[0079] 4、逆转录：使用TIANGEN公司的反转录试剂盒进行操作，试剂盒货号为KR106。具体步骤如下：

[0080] 去除基因组DNA反应，在试管中加入5×DNA Buffer 2.0μl，RNA 1μg，加入去RNA酶ddH_2O使总体积至10μl，水浴锅中42℃加热3min，再将10×Fast RT Buffer 2.0μL，RT Enzyme Mix 1.0μL，FQ-RT Primer Mix 2.0μL，去RNA酶ddH_2O 5.0μL，混合后加入上述试管中一起混合，水浴锅中42℃加热15min，95℃加热3min，合成的cDNA需要长期保存时，请于-20℃或更低温度保存。

[0081] 5、QPCR扩增

[0082] (1)引物设计

[0083] 根据Genebank中NHEG1基因和GAPDH基因的序列设计QPCR扩增引物，由博迈德公司合成。具体引物序列如下：

[0084] NHEG1基因：

[0085] 正向引物为5’-GCAACAAGCAAGGCAGAG-3’(SEQ ID NO.2)；

[0086] 反向引物为5’-GAAGTTCAGAGATTGGCAGTC-3’(SEQ ID NO.3)。

[0087] GAPDH基因：

[0088] 正向引物为5’-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3’(SEQ ID NO.4)；

[0089] 反向引物为5’-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3’(SEQ ID NO.5)。

[0090] (2)按照表1配制PCR反应体系：

[0091] 其中,SYBR Green聚合酶链式反应体系购自TIANGEN公司(货号FP205)。

[0092] 表1PCR反应体系

[0093]

试剂	体积
正向引物	0.6μl
反向引物	0.6μl
2×SuperReal PreMix Plus	10μl
DNA模板	2μl
50×Reference Dye△	2μl
蒸馏水	补足至20μl

[0094] (3)PCR反应条件:95°15min,(95℃10s,55℃30s,72℃32s)×40个循环。以SYBR Green作为荧光标记物,在ABI 7300型荧光定量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,Δ ΔCT法进行相对定量。

[0095] 6、统计学方法

[0096] 实验采用3次重复实验,结果数据都是以平均值±标准差的方式来表示,使用SPSS13.0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。

[0097] 7、结果

[0098] 结果如图2所示,与非脾气亏虚型患者相比,NHEG1基因在脾气亏虚型患者中表达下调,四君子颗粒干预后,NHEG1在脾气亏虚型患者中表达上调,表达量与非脾气亏虚型患者的表达水平无显著性差异,同RNA-sep结果一致。

[0099] 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> 新疆医科大学第四附属医院 乌鲁木齐市中医医院 新疆生产建设兵团医院(石河子大学医学院第二附属医院)

[0003] <120> 生物标志物在结直肠癌中的应用

[0004] <160> 5

[0005] <170> PatentIn version 3.5

[0006] <210> 1

[0007] <211> 1360

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 人源

[0010] <400> 1

[0011] taagaagtgt ctttcgcctc ctgccatgat tctgaggtct ccccagccat gtggaactgg 60

[0012] gaagaatgga aggcaacgcc tccgaattaa attttgggac ccccagtaaa atttcaggaa 120

[0013] agcccagaac tgatctgaga atgcacaaac ttggcatgtc tttgacagag aaggctctgg 180

[0014] gatttcagcg cgttcattgc cctccactaa ggagctgctc agcaaagggg cttccctctg 240

[0015] ctctgctctc gggttcggaa tccggagcga gtttccagtg agcggcgccc gctgagcgag 300

[0016] tgggaaagca tcgcgcgtgc ctttccccgc gcgcgtctgc ggatcagcgc aggcgaggtg 360

[0017] ggtgggaatg cagatgtgag gctggaggca gtagagccat ctcgcaatca tgcagcaaca 420

[0018] agcaaggcag agctggcatg ttgttgactg ataacatcga gaagctgcta tattaatcct 480

[0019] ggactgccaa tctctgaact tcttggtata ttgggaacat aaactctttt ggttaggcac 540

[0020] tgcgtcagat ttctactaca tgcagccaaa tgcaatctag attgaaatac ccctttacct 600

[0021] aagttagctt tagctgttct cacaacttgc tgtttgtgct ccacccacag catatgagat 660

[0022] ccctttgcc cacagcaccc tccctcagtg tgatgtcgtc ccccaaccag tatttgcagg 720

[0023] ttttttgttt ttttttttta atcacaaaac tgctctcagt ctgccaaatc tgttggccct 780

[0024] agagccagaa gtgctatctc ctgggaattt ttttttttt tgagacagga tcttgctgtc 840

[0025] atccaggctg gagggcagtg gcacacactc ctgggctcaa gcgatcctcc tgcttcagcc 900

[0026] ttccgagtgg ttgggactat aggtgagtgc caccactccc agctaattgt ttttatttt 960

[0027] tgtagagatg gggatgggca gggatcttac tttttgccca ggctggtctt gaactcctgg 1020

[0028] actcaagcca tcctcctgcc ttgatctctc aaagtgctgg gattacaggc atgagccacc 1080

[0029] atgcccggcc tgggatctat tcttaaccct tgccctagtc agggtggtct tcctgcagga 1140

[0030] ttaagagtta gactctgaga ctctgatatc acaccctggc ttggccttcc cttccctgtc 1200

[0031] ctacctcccc accctgctac cagtttcttc tggagatatt tcctgataga ctacagtagt 1260

[0032] cctcccttac ctgaggttta actttctgca gtttcagtta ttggcagtca acttaggtct 1320

[0033] gaaaatacta aataaaatat ccagaaataa aaaatttata 1360

[0034] <210> 2

[0035] <211> 18

[0036] <212> DNA

[0037] <213> 人工序列

[0038] <400> 2

[0039] gcaacaagca aggcagag 18

[0040] <210> 3

[0041] <211> 21

[0042] <212> DNA

[0043] <213> 人工序列

[0044] <400> 3

[0045] gaagttcaga gattggcagt c 21

[0046] <210> 4

[0047] <211> 18

[0048] <212> DNA

[0049] <213> 人工序列

[0050] <400> 4

[0051] gaaggtgaag gtcggagt 18

[0052] <210> 5

[0053] <211> 22

[0054] <212> DNA

[0055] <213> 人工序列

[0056] <400> 5

[0057] catgggtgga atcatattgg aa 22

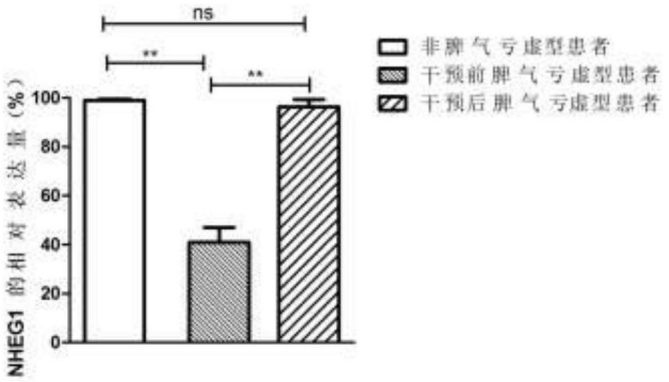

ns
**
**
非脾气亏虚型患者
干预前脾气亏虚型患者
干预后脾气亏虚型患者
NHEG1 的相对表达量（%）
100
80
60
40
20
0

图1

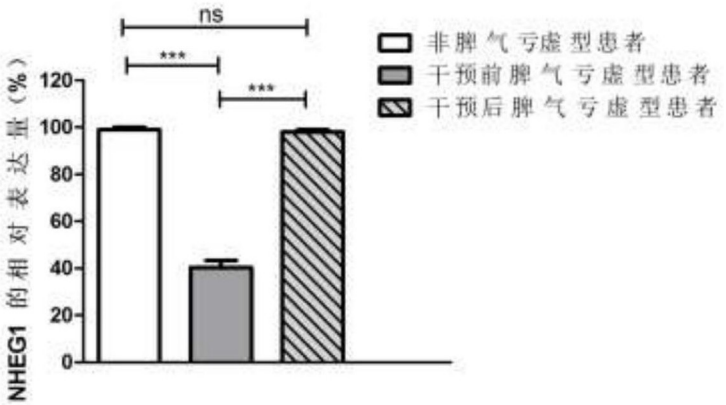

ns
***
***
非脾气亏虚型患者
干预前脾气亏虚型患者
干预后脾气亏虚型患者
NHEG1 的相对表达量（%）
120
100
80
60
40
20
0

图2