



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111560439 A  
(43)申请公布日 2020.08.21

(21)申请号 202010564676.9

(22)申请日 2020.06.19

(71)申请人 江苏华美健晟生物科技有限公司  
地址 214000 江苏省无锡市江阴市砂山路  
85号A209

(72)发明人 邹晨 范钰 郎亚昆 吴朝晖  
朱宝平

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 王玉

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/11(2006.01)

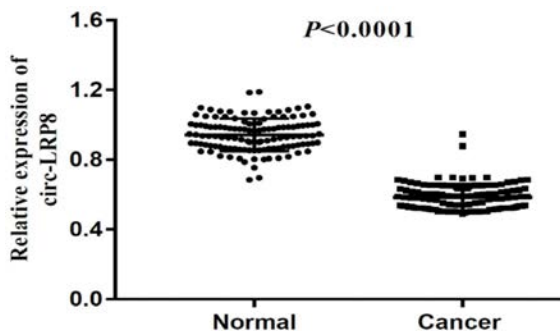
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

检测外周血外泌体circ-LRP8的引物、试剂盒及其在胃癌肝转移中的应用

(57)摘要

本发明涉及检测外周血外泌体circ-LRP8的引物、试剂盒、检测方法及其应用,试剂盒包括外周血外泌体的RNA提取试剂、引物、去基因组DNA反应体系、逆转录反应体系、qPCR操作反应体系,本发明公开了circ-LRP8在胃癌患者及正常人外周血外泌体中的表达情况,并用荧光定量PCR检测外周血外泌体circ-LRP8。circ-LRP8可用于胃癌肝转移的早期诊断,判断疾病进展和预后情况,并可评价胃癌肝转移的治疗效果。



1. 一种外周血外泌体circ-LRP8,其特征是,所述circ-LRP8的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 检测权利要求1所述的外周血外泌体circ-LRP8的引物,其特征是,所述引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。

3. 检测外周血外泌体circ-LRP8的试剂盒,其特征是,包括权利要求2所述的引物。

4. 根据权利要求3所述的检测外周血外泌体circ-LRP8的试剂盒,其特征是,还包括外周血外泌体的RNA提取试剂、去基因组DNA反应体系、逆转录反应体系、qPCR反应体系。

5. 根据权利要求4所述的检测外周血外泌体circ-LRP8的试剂盒,其特征是,去基因组DNA反应的条件为42°C 2min、4°C ∞;逆转录反应条件为37°C 15min、85°C 5s、4°C ∞;qPCR反应条件为阶段1:95°C、30S、1次循环;阶段2:95°C、5S、40次循环;60°C、31S、40次循环;阶段3:95°C、15S、1次循环;60°C、60S、1次循环;95°C、15S、1次循环。

6. 检测外周血外泌体circ-LRP8的方法,其特征是,采用权利要求3-5任意一项所述的试剂盒,包括如下步骤:

获得待检外周血中外泌体;

从外泌体样本中提取RNA;

从提取的RNA中去除基因组DNA;

对于获得的RNA进行逆转录至cDNA;

对于获得的cDNA通过qPCR法进行检测。

7. 根据权利要求6所述的检测circ-LRP8的方法,其特征是,待检外周血外泌体样本来自于胃癌病人及正常人。

8. 权利要求2所述的引物或权利要求3-5任意一项所述的试剂盒作为胃癌肝转移诊断、治疗效果评估或预后情况评估的试剂的应用。

## 检测外周血外泌体circ-LRP8的引物、试剂盒及其在胃癌肝转移中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及检测外周血外泌体circ-LRP8的引物、试剂盒及其在胃癌肝转移中的应用,属于分子诊断技术领域。

### 背景技术

[0002] 胃癌严重威胁着人类的健康,是全球五大癌症之一,世界卫生组织统计报告显示,2012年全球胃癌新发病约95.1万例,死亡约72.3万例。在东亚(特别是中国、韩国、蒙古和日本)、中欧、东欧、南美洲以及非洲大部分地区的胃癌发病率较高。中国是全世界胃癌发病率和死亡率最高的国家。全国肿瘤登记中心数据显示,2015年在中国胃癌新发病约67.9万例,死亡约49.8万例,均高居我国恶性肿瘤第二位。早期胃癌难以诊断,病人在就诊时大多处于中晚期,中晚期胃癌常常发生侵袭和转移,严重影响胃癌患者的治疗,五年生存率低于30%。肝脏是胃癌转移的主要靶器官,肝转移发生率高达44%,发生胃癌肝转移的患者中可实行切除手术的极为有限,治疗难度较大,胃癌肝转移患者五年生存率仅10%左右。

[0003] 胃癌易发生肝转移,与肝脏的生物学特点密不可分。肝脏是人体最大的腺器,受肝门静脉和肝动脉双重血液供应,其中,肝门静脉占80%,肝动脉占20%,消化道器官的血液均经肝门静脉回流,肝脏具有丰富的血流量。肝毛细血管是多孔的血窦状结构,具有很强的通透性,且肝窦导管缺乏皮下基底膜,与脑、肺和骨等其他器官相比,肿瘤细胞更加容易在肝脏发生外渗,所以肝脏是消化道肿瘤转移最主要的器官。胃癌、结直肠癌及胰腺癌等均会通过血管转移和淋巴回流等途径首先转移到肝脏。肝脏丰富的血管系统为肿瘤细胞的生长提供了充足的营养物质。除了血液循环系统的作用,胃癌细胞也容易与肝窦内皮细胞黏附。肝毛细血管可使大量的肿瘤细胞阻滞,肿瘤细胞与血管内皮细胞相互作用后,分泌细胞因子使血管内皮细胞收缩,促进肿瘤细胞侵出血管,以利于肿瘤细胞定植到肝实质组织中。

[0004] 目前对胃癌肝转移早期诊断仍是一大难题。已有一些肿瘤分子标志物应用于临床早期检测和辅助诊断,如癌胚抗原CEA、CA199、CA125、AFP等,但特异性仍较低。有报道称CD44v6、OPN、YB-1、MAGE-A10等分子可能作为胃癌肝转移潜在标志物,但仍待进一步验证。因此,发现新的调控胃癌细胞肝转移的肿瘤相关基因,不但有助于深入了解胃癌肝转移发生发展的分子机制,补充和完善现有的细胞癌变理论体系,而且有助于鉴定新的胃癌肝转移特异的生物标志物和药物靶点,为胃癌肝转移的预防、诊断、治疗提供重要的理论依据。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的缺陷,提供一种检测外周血外泌体circ-LRP8的引物、试剂盒及其应用,外周血外泌体circ-LRP8可用于胃癌肝转移早期诊断,判断疾病进展和预后情况,并可评价胃癌肝转移的治疗效果。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供一种外周血外泌体circ-LRP8,所述circ-LRP8的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 本发明还提供一种检测上述的外周血外泌体circ-LRP8的引物,所述引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。

[0008] 本发明还提供一种检测外周血外泌体circ-LRP8的试剂盒,包括上述的引物。

[0009] 进一步地,还包括外周血外泌体的RNA提取试剂、去基因组DNA反应体系、逆转录反应体系、qPCR反应体系。

[0010] 进一步地,去基因组DNA反应的条件为42℃2min、4℃∞;逆转录反应条件为37℃15min、85℃5s、4℃∞;qPCR反应条件为阶段1:95℃、30S、1次循环;阶段2:95℃、5S、40次循环;60℃、31S、40次循环;阶段3:95℃、15S、1次循环;60℃、60S、1次循环;95℃、15S、1次循环。

[0011] 本发明还提供一种检测外周血外泌体circ-LRP8的方法,采用上述的试剂盒,包括如下步骤:

[0012] 获得待检外周血中外泌体;

[0013] 从外泌体样本中提取RNA;

[0014] 从提取的RNA中去除基因组DNA;

[0015] 对于获得的RNA进行逆转录至cDNA;

[0016] 对于获得的cDNA通过qPCR法进行检测。

[0017] 进一步地,待检外周血外泌体样本来自于胃癌病人及正常人。

[0018] 本发明还提供一种上述的引物或试剂盒作为胃癌肝转移诊断、治疗效果评估或预后情况评估的试剂的应用。

[0019] 外泌体是由细胞内多泡体与细胞膜融合后,释放到细胞外基质中的一种直径约30-100nm的外排囊泡。外泌体排出细胞外可出现在体液,如血液、尿液或胸腹水等,随血流或体液在体内移动或转移,或停留于组织或器官,形成了新的肿瘤标志物,可用于筛检、早诊、预测预后以及监测个体化治疗等。外泌体包涵相应的mRNA、microRNA及其它非编码RNA,这些均功能性的转导到接受的细胞。环状RNA是RNA反向拼接的产物,具有共价闭合环状结构,缺少5'端帽子结构和3'多聚A尾结构,可以抵抗RNA核酸外切酶的水解,而且半衰期可达48h,明显高于半衰期10h的线性RNA,具有更高的稳定性。

[0020] 本发明所达到的有益效果:

[0021] (1) 本发明综合采用第二代测序技术及高通量芯片技术,从胃癌患者外周血外泌体中筛选了一系列异常circRNAs,进行了基因重注释分析,并对数据结果进行合并,发现circ-LRP8在胃癌外周血外泌体中明显下调,因此,可作为胃癌的诊断标志。

[0022] (2) 胃癌等恶性肿瘤治疗的瓶颈很大程度上在于肿瘤实时取样困难、疗效评估滞后、耐药位点难以发现等,以外泌体为主的液态活检技术克服了组织取样困难。本发明中的circ-LRP8存在于血液外泌体中,主要以外泌体为运输载体,具有细胞表型特异性和发育阶段特异性,本研究发现,该分子低表达与胃癌肝转移密切相关,说明该分子是胃癌肝转移独立预后因子。

[0023] (3) 本发明研究了circ-LRP8与胃癌患者临床参数的相关性,结果显示:外周血外泌体circ-LRP8表达水平与患者癌组织浸润深度、淋巴结转移、肝转移、临床分期显著相关(P值分别为0.002,0.001,0.001和0.001),因此创造性地得到与胃癌肝转移高度相关的分子标记物RNA hsa\_circ-LRP8,可用于胃癌肝转移早期诊断,判断疾病进展和预后情况,并

可评价胃癌肝转移的治疗效果。

[0024] (4) 本发明设计相应的引物序列,通过逆转录和RT-PCR实现对circ-LRP8的检测,检测的灵敏度和特异度各为98.33%和98.33%。

### 附图说明

[0025] 图1是胃癌患者组和健康者组外周血外泌体样本中circ-LRP8检测的扩增曲线;

[0026] 图2是胃癌患者组和健康者组外周血外泌体样本中circ-LRP8的表达情况;

[0027] 图3是胃癌患者组和健康者组外周血外泌体中circ-LRP8曲线下面积。

### 具体实施方式

[0028] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0029] 实施例1外周血外泌体中的circ-LRP8的检测

[0030] 1. 获得待检外周血样本

[0031] 120例胃癌及120例正常人的外周血样本。

[0032] 样本为所述胃癌患者以及正常人的加促凝剂外周血样本。

[0033] 2. 从待检外周血样本中提取外泌体并验证

[0034] 按照外泌体提取试剂盒说明书操作提取胃外周血中外泌体,步骤如下:(1)全血以 $3000 \times g$ 离心15min(离心半径10cm),移去细胞或细胞碎片。(2)取上层液体放入离心管,并以250 $\mu$ l血清加入63 $\mu$ l ExoQuick试剂,放入4 $^{\circ}$ C 30min静置;(3)在4 $^{\circ}$ C下以 $1500 \times g$ 离心(离心半径10cm)混合液30min;(4)吸出所有上清,在4 $^{\circ}$ C下以 $1500 \times g$ 离心(离心半径10cm)5min,并吸出全部上清;(5)放入200 $\mu$ l 1x PBS全部溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C保存。采用投射电镜鉴定外泌体。

[0035] 3. 从待检外周血样本中提取RNA

[0036] 将0.25mL外周血样品或冷冻外周血样品移至离心管中,添加0.75ml RNAiso Blood,用移液枪上下反复吸打直至细胞完全裂解。向上述匀浆裂解液中加入氯仿(样品液+RNAiso Blood体积量的1/5体积量)盖紧离心管盖,混合至溶液乳化呈乳白色。室温静置5分钟。 $12,000 \times g$ 、4 $^{\circ}$ C离心15分钟。从离心机中小心取出离心管,此时匀浆液分为三层,即:无色的上清液(含RNA)、中间的白色蛋白层(大部分为DNA)及带有颜色的下层有机层。吸取上清液移至新的离心管中。向上清中加入等量体积的异丙醇,上下颠倒离心管充分混匀后,室温下静置10分钟。 $12,000 \times g$ 、4 $^{\circ}$ C离心10分钟,试管底部会出现RNA沉淀。弃上清,加入等量的75%乙醇,使用Vortex振荡清洗沉淀后, $7,500 \times g$ 、4 $^{\circ}$ C离心5分钟,弃上清。室温干燥沉淀。沉淀干燥后,加入适量的RNase-free水(20~30 $\mu$ L)溶解沉淀。

[0037] 4. 从提取的RNA中去除基因组DNA

[0038] 去基因组DNA反应体系如表1。

[0039] 表1去基因组DNA反应体系

	反应体系成分	使用量
	5×gDNA Eraser Buffer (5×去基因组缓冲液)	2.0 μL
[0040]	gDNA Eraser (基因去除剂)	2.0 μL
	Total RNA (总 RNA)	2.0 μL
	RNase Free dH <sub>2</sub> O (无 RNA 酶水)	终体积 10 μL
[0041]	去基因组DNA反应参数为:	
[0042]	42℃ 2min;	
[0043]	4℃ ∞。	
[0044]	5. 对于获得的RNA进行逆转录至cDNA	
[0045]	逆转录操作反应体系如表2。	
[0046]	表2逆转录反应体系	
	反应体系成分	使用量
	步骤 4 后得到的反应液 (去基因组 DNA 得到的反应液)	10.0 μL
	PrimeScript RT Enzyme Mix I (反转录酶混合液 I)	1.0 μL
[0047]	RT Primer Mix (反转录引物混合液)	1.0 μL
	5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) (5×反转录缓冲液)	4.0 μL
	RNase Free dH <sub>2</sub> O (无 RNA 酶水)	4.0 μL
	总体积	20.0 μL
[0048]	逆转录操作反应参数为	
[0049]	37℃ 15min;	
[0050]	85℃ 5s;	
[0051]	4℃ ∞。	
[0052]	6. 对于获得的cDNA通过qPCR法进行反应检测	
[0053]	20μL反应体系如表3。	
[0054]	表3 qPCR反应体系	

	反应体系成分	使用量
[0055]	荧光定量PCR预混液(RNA酶 1 $\mu$ g/ $\mu$ L ; Taq酶 0.5U/ $\mu$ L)	10.0 $\mu$ L
	PCR Forward Primer (10 $\mu$ M) (正向引物)	0.5 $\mu$ L
	PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M) (反向引物)	0.5 $\mu$ L
	cDNA (互补DNA)	1.0 $\mu$ L
[0056]	DEPC水(无RNA酶的水)	8.0 $\mu$ L
	总体积	20.0 $\mu$ L
[0057]	循环参数:	
	阶段 1: 95 $^{\circ}$ C 30S 1次循环;	
	阶段 2: 95 $^{\circ}$ C 5S 40次循环;	
	60 $^{\circ}$ C 31S 40次循环;	
[0058]	阶段 3: 95 $^{\circ}$ C 15S 1次循环;	
	60 $^{\circ}$ C 60S 1次循环;	
	95 $^{\circ}$ C 15S 1次循环。	
[0059]	实验结果:	
[0060]	采用荧光实时定量PCR方法检测胃癌患者组和健康者组外周血外泌体中circ-LRP8的表达。扩增曲线指数有扩增期、平台期,曲线光滑。提示扩增效率较高。见图1。	
[0061]	荧光实时定量PCR结果如图2所示,胃癌组及健康组患者外周血中circ-LRP8表达分别为0.5830 $\pm$ 0.0753、0.9425 $\pm$ 0.0935,与健康者组比较,胃癌组的外周血circ-LRP8表达水平来说明显下调,差异明显(P<0.0001)。	
[0062]	进一步做受试者工作特征曲线,见图3,结果显示血浆中环状RNA circ-LRP8诊断胃癌的曲线下面积(AUC)为0.99,诊断胃癌的环状RNA circ-LRP8最优截断值为0.7263,结果显示其灵敏度和特异度各为98.33%和98.33%,	
[0063]	实施例2外周血外泌体circ-LRP8临床意义	
[0064]	进一步分析外周血外泌体RNA hsa_circ-LRP8表达与胃癌性别、年龄、肿瘤直径、TNM分期、组织分化程度、淋巴结转移情况、肝转移、等临床参数的相关性。	
[0065]	表4外周血外泌体circ-LRP8临床意义分析	

		circ-LRP8 expression		$\chi^2$	P
		Normal	low		
性别	男	37 (50.7)	36 (49.3)	0.035	0.852
	女	23 (48.9)	24 (51.1)		
年龄 (岁)	≤60	23 (47.9)	25 (52.1)	0.139	0.709
	>60	37 (51.4)	35 (48.6)		
	发病部位				
肿瘤大小	贲门	15 (50.0)	15 (50.0)	2.701	0.100
	胃体	11 (55.0)	9 (45.0)		
	胃窦	28 (48.3)	30 (51.7)		
	全胃	6 (50.0)	6 (50.0)		
分化程度	≤5cm	34 (57.6)	25 (42.4)	2.712	0.258
	>5cm	26 (42.6)	35 (57.4)		
	高	19 (57.6)	14 (42.4)		
浸润深度	中	27 (52.9)	24 (47.1)	14.87	0.002
	低	14 (38.9)	22 (61.1)		
	T1	22 (66.7)	11 (33.3)		
	T2	21 (65.6)	11 (34.4)		
淋巴结转移	T3	11 (29.7)	26 (70.3)	17.59	0.001
	T4	6 (33.3)	12 (66.7)		
	N0	21 (77.8)	6 (22.2)		
	N1	18 (62.1)	11 (37.9)		
	N2	11 (32.4)	23 (67.6)		
肝转移	N3	10 (33.3)	20 (66.7)	10.50	0.001
	M0	51 (59.3)	35 (40.7)		
	M1	9 (25.5)	25 (73.5)		
临床分期				17.27	0.001
	I	25 (71.4)	10 (28.6)		
	II	17 (63.0)	10 (37.0)		
	III	9 (37.5)	15 (62.5)		
	IV	9 (26.5)	25 (73.5)		

表5 多因素分析结果

变量	多因素分析		
	HR	95%CI	P



	circ-LRP8	2.202	1.498-3.238	<0.001
	浸润深度	7.946	5.534-11.411	<0.001
[0067]	淋巴结转移	4.48	3.464-5.794	<0.001
	肝转移	35.191	16.054-77.142	<0.001
	临床分期	9.07	6.247-13.169	<0.001

[0068] 由表4和表5可知:外周血外泌体RNA hsa\_circ-LRP8表达水平与患者浸润深度、淋巴结转移、肝转移、TNM分期显著相关(P值分别为0.002,0.001,0.001和0.001),而与其患者性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤直径和组织分化程度无明显相关(P值分别为0.852,0.709,0.906,0.100和0.258)。多因素分析结果提示,外周血外泌体RNA hsa\_circ-LRP8低表达是胃癌肝转移独立预后因子之一。

[0069] 上述结果表明,外周血外泌体RNA hsa\_circ-LRP8在胃癌患者外周血外泌体中表达下调,并可能作为胃癌肝转移早期诊断,疾病进展,预后情况,并可胃癌肝转移的治疗效果。

[0070] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变形,这些改进和变形也应视为本发明的保护范围。

## 序列表

<110> 江苏华美健晟生物科技有限公司

<120> 检测外周血外泌体circ-LRP8的引物、试剂盒及其在胃癌肝转移中的应用

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 171

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
ggggcagtga ggagcgagag cccagagggc ggatggaaca ggcacgcct tgaaggaagt 60
aaatgcatgc atgctctccc agcaccaggt tagtggteta ctcccaggcc catgctgtcc 120
cagggggcca gcaactgggggt ctgtgggagg gtgtggggtt gtgtccttag g 171
```

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

```
gtctactccc aggcccatg 19
```

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

```
ctctcgctcc tcactgcc 18
```

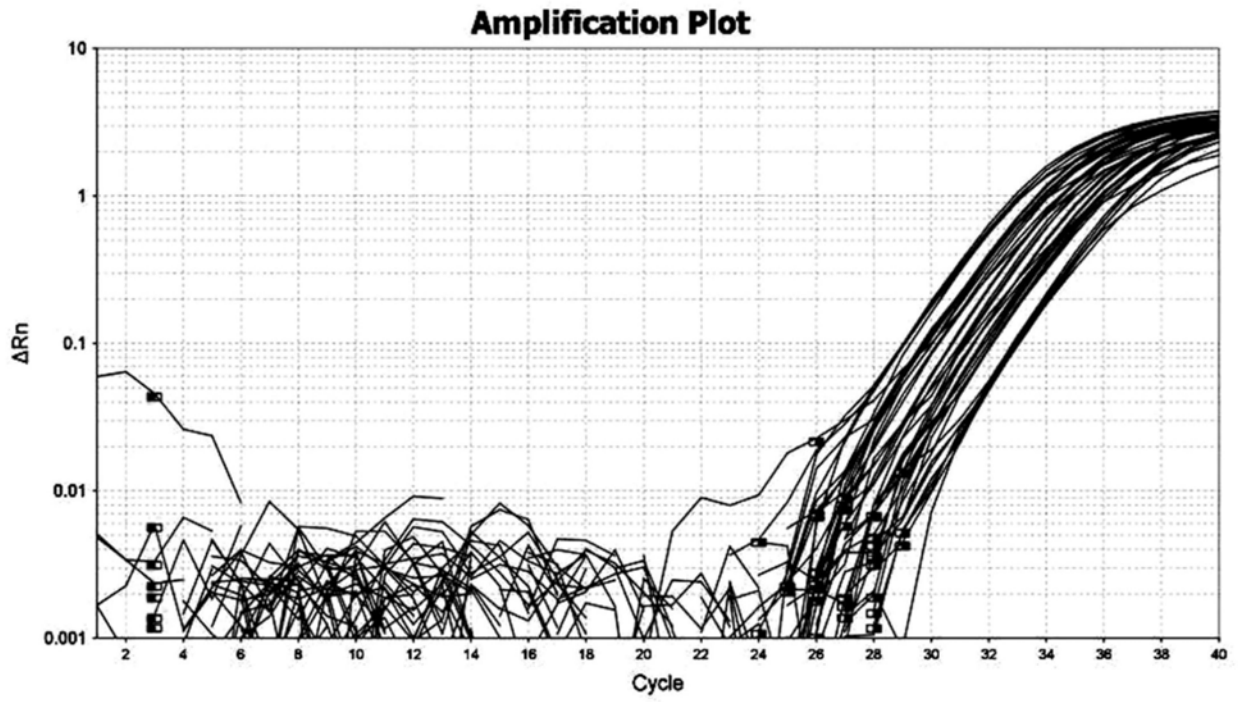


图1

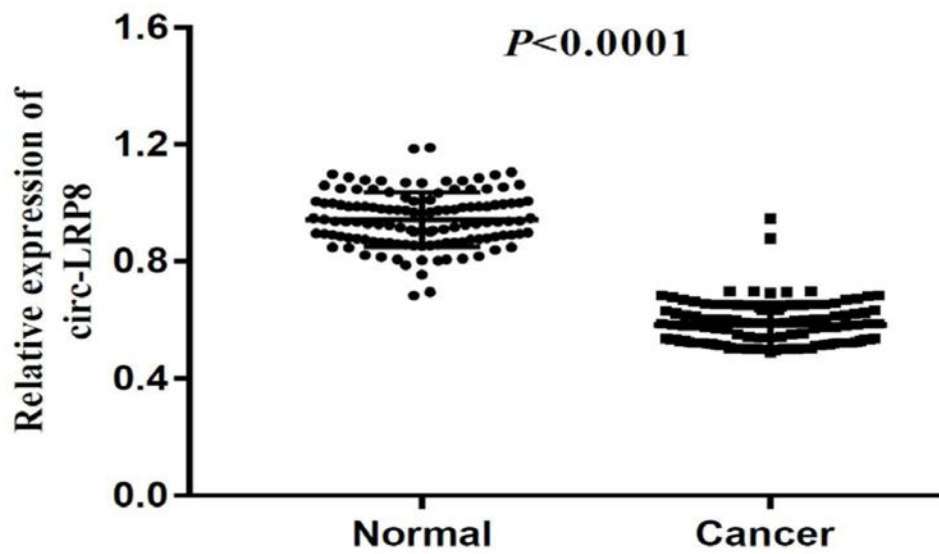


图2

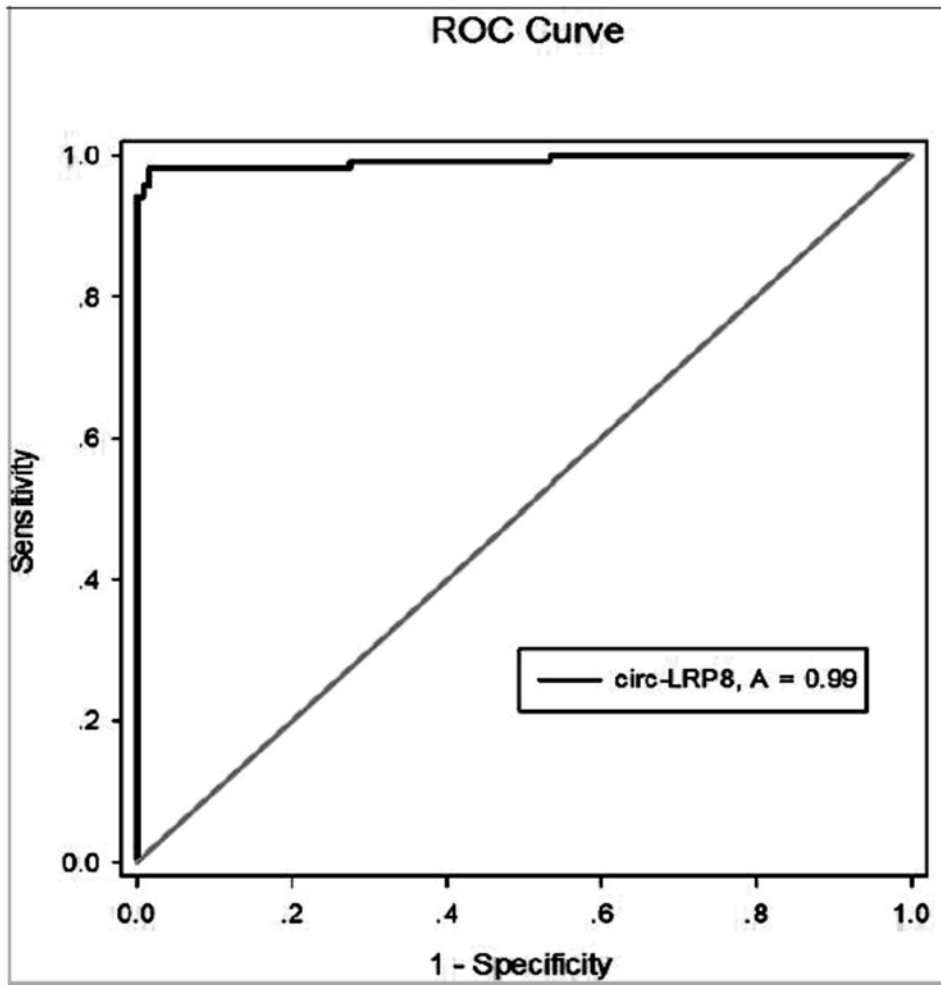


图3