



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106967719 B

(45) 授权公告日 2021. 04. 13

(21) 申请号 201710403824.7

C12Q 1/6886 (2018.01)

(22) 申请日 2017.06.01

A61K 45/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 106967719 A

C40B 40/06 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.07.21

(56) 对比文件

(73) 专利权人 上海长海医院

CN 103882118 A, 2014.06.25

地址 200433 上海市杨浦区长海路168号长海医院

CN 104962645 A, 2015.10.07

CN 103146688 A, 2013.06.12

CN 104531878 A, 2015.04.22

CN 104561001 A, 2015.04.29

(72) 发明人 孙颖浩 任善成 施晓磊 刘飞

审查员 赵彦豪

(74) 专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

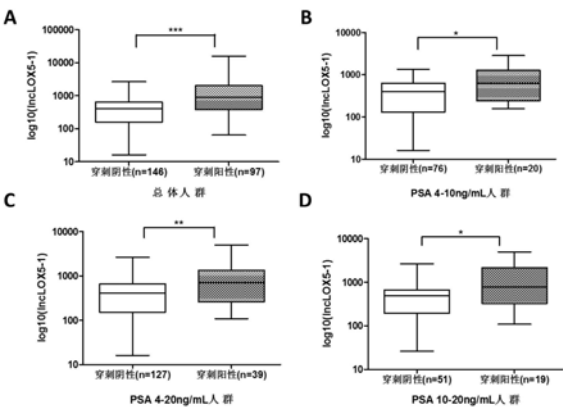
序列表1页 附图11页

(54) 发明名称

一种长链非编码RNA作为前列腺癌分子标志物的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种前列腺癌早期诊断和预后判断的标志物长链非编码RNA lncLOX5-1及其应用。本发明还公开了所述lncLOX5-1在预测前列腺癌患者肿瘤恶性程度中的应用,在预测前列腺癌患者肿瘤是否进展转移中的应用,在预测拟行前列腺穿刺的患者的阳性率中的应用等。将lncLOX5-1用于前列腺癌的早期诊断和预后判断,具有高准确度、高特异性和高灵敏度的特点。



1. 一种长链非编码RNA, lncLOX5-1, 其特征在于, 所述lncLOX5-1的核苷酸序列如SEQ ID NO.1 所示。

2. 一种分离的多核苷酸, 其特征在于, 所述多核苷酸能被细胞转录成如权利要求1所述的lncLOX5-1。

3. 如权利要求1所述的长链非编码RNA, lncLOX5-1的用途, 其特征在于, 所述lncLOX5-1作为标志物用于制备前列腺癌早期诊断和预后判断的前列腺癌体外诊断产品。

4. 如权利要求3所述的用途, 其特征在于, 所述前列腺癌体外诊断产品为试剂盒。

5. 如权利要求3所述的用途, 其特征在于, 所述前列腺癌体外诊断产品为基因芯片。

6. 如权利要求3所述的用途, 其特征在于, 所述前列腺癌体外诊断产品为固体支持体。

7. 一种lncRNA芯片, 其特征在于, 所述的lncRNA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如权利要求1所述的lncLOX5-1的部分或全部序列。

8. 一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中含有如权利要求1所述的lncLOX5-1的特异性检测试剂。

9. 如权利要求1所述的长链非编码RNA, lncLOX5-1作为标志物在制备预测前列腺癌患者肿瘤恶性程度的产品中的应用。

10. 如权利要求1所述的长链非编码RNA, lncLOX5-1作为标志物在制备预测前列腺癌患者肿瘤是否进展转移的产品中的应用。

11. 如权利要求1所述的长链非编码RNA, lncLOX5-1作为标志物在制备对拟行前列腺穿刺患者的阳性率预测的产品中的应用。

12. 一种基于lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型Model-lncLOX5-1, 其特征在于, 所述模型的构建过程为, 将年龄、PSA、%fPSA、前列腺体积、如权利要求1所述的lncLOX5-1表达量进行单因素logistic回归分析, 确定能作为预测前列腺穿刺结果的独立危险因素; 根据单因素logistic回归分析确定的独立危险因素, 将其纳入多因素logistic回归分析中, 构建所述基于lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型Model-lncLOX5-1。

## 一种长链非编码RNA作为前列腺癌分子标志物的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于癌症分子诊断领域,具体涉及长链非编码RNA lncLOX5-1作为前列腺癌早期诊断以及对前列腺癌进行预后判断的标志物中的应用,还涉及相应的lncRNA芯片和诊断试剂盒。

### 背景技术

[0002] 前列腺癌(Prostatic Cancer,PCa)是一种严重威胁男性健康的恶性肿瘤,是发达国家发病率最高的男性恶性肿瘤,占全球肿瘤发病率第二位、死亡率第六位。我国PCa的发病率近年来一直处于显著的上升趋势。在北京、上海、广州等医学、经济发达城市,PCa发病率已位于当地十大常见肿瘤之列。流行病学数据显示,中国PCa发病率已从1993年的1.71/10万男性人口增加到2005年的7.9/10万男性人口,年增幅约13%。依此推算,预计2020年,我国PCa发病率将超过40/10万男性人口,接近欧美国家水平,成为危害男性健康的主要肿瘤“杀手”。由此可见,随着我国普遍医疗水平的提高,以及中国正在步入老龄化社会,前列腺癌的防治、研究工作已经进入刻不容缓的阶段。由于PCa症状隐蔽,导致国内初诊时处于中晚期的患者居多,且超过46.3%的患者已发生局部进展或远处转移。前列腺癌患者一旦发生转移不仅预后差,而且严重影响其生活质量。SEER(Surveillance Epidemiology and End Results,SEER)数据库2004-2010年的资料显示,局限性前列腺癌的5年生存率为100%,而转移性前列腺癌仅为28%。前列腺特异性抗原(Prostate specific antigen,PSA)是目前最广泛应用于前列腺癌的分子诊断标记物,但其特异性较差,导致大量的不必要穿刺和医疗资源的浪费。因此亟需找到PCa高特异性的分子诊断标记物和相关检测技术。

### 发明内容

[0003] 本发明提供了一种长链非编码RNA lncRNA(lncLOX5-1),其核苷酸序列如SEQ ID NO.1 所示。

[0004] 本发明提供了一种所述lncLOX5-1在作为对前列腺癌进行早期诊断及预后判断的分子标志物的应用,通过lncLOX5-1的检测,提高对前列腺癌诊断的准确性和特异性。

[0005] 本发明中,可通过lncLOX5-1的表达量变化,从而对前列腺癌进行早期诊断以及预后判断。

[0006] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸(lncLOX5-1所对应的DNA),所述多核苷酸能被细胞(如,人细胞)转录成如上所述的lncLOX5-1,与所述多核苷酸的同源性为80%、85%、90%、95%及99%的序列,也可作为前列腺癌的标志物。

[0007] 本发明中,与所述lncLOX5-1如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列同源性为80%、85%、90%、95%及99%的序列,也可作为前列腺癌的标志物。

[0008] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸能被人细胞转录成权利要求1所述的lncLOX5-1。

[0009] 本发明还提供了lncLOX5-1的检测试剂在制备对前列腺癌进行早期诊断的产品中

的应用,所述lncLOX5-1的检测试剂可以但不限于是特异性检测lncLOX5-1的核酸探针。通过对所述基因lncLOX5-1的表达量进行定量,来对前列腺癌进行早期诊断。

[0010] 本发明还提供了lncLOX5-1的检测试剂在制备对前列腺癌进行预后判断的产品中的应用,所述lncLOX5-1的检测试剂可以但不限于是特异性检测lncLOX5-1的核酸探针。通过对所述基因lncLOX5-1的表达量进行定量,对前列腺癌进行预后判断。

[0011] 本发明中,所述lncLOX5-1的表达量可通过以下方法确定:微阵列技术、RNA印迹和定量PCR、组织原位杂交(In situ hybridization,ISH)等;所述定量PCR为实时定量PCR或多重PCR等。

[0012] 本发明还提供了一种寡核苷酸引物,所述引物的序列为正向:

[0013] TCCTCCTAAGCCGTATCCCATCTG (SEQ ID NO.2),反向:

[0014] CCAGGTGAGTTGAACAGTCCGATT (SEQ ID NO.3),该引物能够用来扩增所述lncLOX5-1。

[0015] 本发明还提供了一种诊断前列腺癌的检测lncLOX5-1的反转录PCR系统,该检测lncLOX5-1的系统包括如上所述的引物。

[0016] 本发明还提供了一种前列腺癌体外诊断产品,所述体外诊断产品包括特异性检测lncLOX5-1的试剂。所述前列腺癌体外诊断产品可用于对前列腺癌进行早期诊断以及对前列腺癌进行预后判断。所述特异性检测lncLOX5-1的试剂可以但不限于是核酸探针,所述核酸探针能特异性识别所述lncLOX5-1。

[0017] 其中,所述前列腺癌体外诊断产品包括试剂盒、基因芯片、固体支持体等;所述固体支持体包括阵列、微阵列等。

[0018] 本发明还提供了lncLOX5-1的检测试剂在预测前列腺癌患者肿瘤恶性程度中的应用。lncLOX5-1的表达与前列腺癌细胞恶性进展相关。

[0019] 本发明还提供了lncLOX5-1的检测试剂在预测前列腺癌患者肿瘤是否进展转移中的应用。

[0020] 本发明还提供了lncLOX5-1的检测试剂在预测拟行前列腺穿刺患者的阳性率中的应用。

[0021] 本发明还提供了一种基于lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型(Model-lncLOX5-1),所述模型的构建过程为,将年龄、PSA、%fPSA、前列腺体积、直肠指诊(DRE)、lncLOX5-1表达量、PCA3表达量进行单因素logistic回归分析,确定能作为预测前列腺穿刺结果的独立危险因素;根据单因素logistic回归分析确定的独立危险因素年龄、PSA、%fPSA、前列腺体积、lncLOX5-1表达量、PCA3表达量,将其纳入多因素logistic回归分析中,构建所述基于lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型(Model-lncLOX5-1),和基于PCA3构建的PCA3临床诊断模型(Model-PCA3);其中,所述lncLOX5-1临床诊断模型的AUC达到0.909。

[0022] 本发明还提供了所述lncLOX5-1临床诊断模型(Model-lncLOX5-1)在预测前列腺穿刺的阳性率中的应用。

[0023] 本发明还提供了一种前列腺癌进行早期诊断的方法,所述方法包括以下步骤:

[0024] a) 检测PSA异常患者行前列腺按摩后尿渣中lncLOX5-1的表达量;

[0025] b) 通过a)中测定的lncLOX5-1的表达量,采用受试者工作曲线(ROC)分析lncLOX5-

1 表达量的曲线下面积(AUC),选择敏感性和特异性最大的点作为临界点,将患者分为高表达组和低表达组,若lncLOX5-1表达量小于临界点,提示其前列腺穿刺阳性概率较低;若lncLOX5-1表达量大于等于临界点,提示其前列腺穿刺阳性概率较高;

[0026] 或,通过a)中测定的lncLOX5-1的表达量,采用受试者工作曲线(ROC)分析lncLOX5-1表达量的曲线下面积(AUC),选择敏感性和特异性最大的点作为临界点,联合患者年龄、PSA、%fPSA和前列腺体积具体数值,应用基于lncLOX5-1临床诊断模型绘制的列线图计算患者单个风险因素的风险评分,相加得到患者的累积风险评分,对应得出患者的穿刺阳性概率。

[0027] 在一个具体的实施方式中,本发明提供的前列腺癌进行早期诊断的方法,包括以下步骤:

[0028] a')检测PSA异常患者行前列腺按摩后尿渣中lncLOX5-1的表达量;

[0029] b')通过a')中测定的lncLOX5-1的表达量,以lncLOX5-1表达量等于68为界,将患者分为高表达组和低表达组,若lncLOX5-1表达量小于68,提示其前列腺穿刺阳性概率较低;若lncLOX5-1表达量大于等于68,提示其前列腺穿刺阳性概率较高;

[0030] 或,通过a')中测定的lncLOX5-1的表达量,以lncLOX5-1表达量等于68为界,联合患者年龄、PSA、%fPSA和前列腺体积具体数值,应用基于lncLOX5-1临床诊断模型绘制的列线图计算患者单个风险因素的风险评分,相加得到患者的累积风险评分,对应得出患者的穿刺阳性概率。

[0031] 其中,步骤a')中,lncLOX5-1的表达量测定方法如下,

[0032] (1)尿液RNA抽提:

[0033] 尿液RNA采用TRIzol法进行抽提。每1mL TRIzol溶解的EP管中加入200μL三氯甲烷,颠倒混匀后置于冰盒中放置5min,以4℃14000rpm离心15min。可见上层透明水样层,中间为一层白色絮状蛋白,下面红色液体为苯酚-氯仿层。小心吸取上层水相约500μL转移至新的EP管中。每个EP管中加入500μL的异丙醇,冰盒中放置10min以沉淀RNA,再以4℃14000rpm离心10min,可见管底透明或白色胶冻样沉淀,小心弃去上清加入1mL 75%乙醇冲洗一遍,再次以4℃14000rpm离心5min,小心弃去上清,充分干燥后加入10-20μL无酶水溶解RNA。抽提出来的RNA应用Nanodrop 2000c检测浓度和260/280吸光度评价质量,重复测量2次,260/280吸光度比值应介于1.80-2.00。

[0034] (2)反转录扩增:

[0035] 反转录扩增采用Sigma公司的完整全转录组扩增试剂盒(TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification Kit)。冰盒上解冻Library Synthesis Buffer, Library Synthesis Solution, Library Synthesis Enzyme, Amplification Mix, 10mM dNTP Mix, Amplification Enzyme和无酶水。

[0036] PCR仪设置程序:

[0037] WTA1:70℃,5min→18℃

[0038] WTA2:18℃10min→25℃10min→37℃30min→42℃10min→70℃20min→4℃

[0039] WTA3:94℃2min→(94℃30s→70℃5min)×17个循环→4℃。

[0040] 文库合成:100ng全RNA中加入0.5μL Library Synthesis Solution,加入无酶水补齐至3.32μL。吹打混匀后使用PCR仪WTA1程序孵育。

[0041] 向管中加入0.5μL Library Synthesis Buffer,0.4μL Library Synthesis Enzyme和0.78μL无酶水。吹打混匀后,使用PCR仪WTA2程序进行孵育。

[0042] 文库扩增:向管中加入60.2μL无酶水,7.5μL Amplification Mix,1.5μL dNTP Mix和0.75μL Amplification Enzyme,使用PCR仪WTA3程序进行孵育。反应完成后,将PCR产物cDNA储存于-20℃以备后续检测。

[0043] (3) 实时定量PCR (qRT-PCR) :

[0044] 目的基因表达水平的检测采用ABI StepOnePlus实时定量荧光PCR仪器进行检测。应用 TOYOBO公司THUNDERBIRD SYBR real-time qPCR试剂盒,每个孔20μL反应体系中含有10μL SYBR Green Master Mix,1μL上游引物,1μL下游引物,0.4μL 50×Rox Dye,2μL cDNA和5.6μL无酶水。反应条件为,95℃10min,95℃15s和60℃60s连续40个循环。数据采用StepOne Software version v2.1(Applied BioSystems,USA)软件进行统计分析和导出。lncLOX5-1表达量计算公式为: $lncLOX5-1 \text{ 表达量} = 2^{Ct(PSA) - Ct(lncLOX5-1)}$ ,PCA3表达量计算公式为: $PCA3 \text{ 表达量} = 2^{Ct(PSA) - Ct(PCA3)}$ ,以PSA作为尿渣RNA的内参,对于PSA的Ct值大于28的样本提示其RNA含量不足,故剔除样本。

[0045] qRT-PCR反应体系

| [0046] | 试剂                        | 体积    | 终浓度   |
|--------|---------------------------|-------|-------|
|        | THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix | 10μL  | 1×    |
|        | 上游引物 (10μM)               | 1μL   | 0.5μM |
|        | 下游引物 (10μM)               | 1μL   | 0.5μM |
|        | 50×Rox                    | 0.4μL | 1×    |
|        | cDNA                      | 2μL   |       |
|        | 无酶水                       | 5.6μL |       |
|        | 总体积                       | 20μL  |       |

[0047] qRT-PCR扩增反应条件

| [0048] |                             | 温度  | 时间    | 循环     |
|--------|-----------------------------|-----|-------|--------|
|        | 预变性 Initial denaturation    | 95℃ | 10min | 40 个循环 |
|        | 变性 Denaturation             | 95℃ | 15s   |        |
|        | 延长 Extension                | 60℃ | 60s   |        |
|        | 熔解曲线 Melting Curve Analysis | 95℃ | 15s   |        |
|        |                             | 60℃ | 1min  |        |
|        |                             | 95℃ | 15s   |        |

[0049] qRT-PCR引物序列

|        |           |                 |                           |
|--------|-----------|-----------------|---------------------------|
| [0050] | PSA       | Forward (5'-3') | GTCTGCGGCGGTGTTCTG        |
|        |           | Reverse(5'-3')  | TGCCGACCCAGCAAGATC        |
|        | PCA3      | Forward (5'-3') | GAAGCTTGGCATCAGAAAAACAGAG |
|        |           | Reverse(5'-3')  | CTCAGATGGTAAAGTCAGCAGCCT  |
|        | lncLOX5-1 | Forward (5'-3') | TCCTCCTAAGCCGTATCCCATCTG  |
|        |           | Reverse(5'-3')  | CCAGGTGAGTTGAACAGTCCGATT  |

[0051] 本发明还提供了一种对前列腺癌进行预后判断的方法,所述方法包括以下步骤:

[0052] a) 检测前列腺癌患者病理样本中lncLOX5-1的表达量;

[0053] b) 通过a)中测定的表达量,将前列腺癌患者分为低表达组和高表达组,若病理样本中 lncLOX5-1表达量高于前列腺癌患者人群lncLOX5-1的均值,则为高表达组,预示肿瘤恶性程度、侵袭性较高,生存预后水平较差;否则为低表达组。

[0054] 所述lncLOX5-1高表达组,以组织原位杂交中DAB显色为例,将高倍镜下综合染色强度和阳性细胞所占比例进行半定量测定,染色强度评分标准:低表达-不着色或浅黄色,高表达-棕黄色或深黄褐色。

[0055] 本发明还提供了一种lncLOX5-1的抑制剂在抑制前列腺癌中的应用,所述抑制剂用于抑制前列腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

[0056] 本发明的有益效果在于,本发明提供的诊断和预测前列腺癌的新标志物,即长链非编码RNA lncLOX5-1,该标志物能对前列腺癌进行早期诊断以及对前列腺癌进行预后判断,具有高准确度,高特异性和高灵敏度的特点;本发明提供的包含标志物lncLOX5-1的检测试剂的前列腺癌体外诊断产品,其使用方便,具有高准确度、高特异性和高灵敏度的特点。

## 附图说明

[0057] 图1为前列腺癌、良性前列腺增生、肾癌和膀胱癌患者以及健康人尿渣中lncLOX5-1的表达量;其中,前列腺癌患者尿渣中lncLOX5-1表达量显著高于其他人群。

[0058] 图2为243例行前列腺穿刺患者人群尿渣lncLOX5-1的表达量,前列腺穿刺阳性患者尿渣中lncLOX5-1表达量显著高于前列腺穿刺阴性患者;其中,A为总体人群,B为PSA 4-10ng/mL人群,C为PSA 4-20ng/mL人群,D为PSA 10-20ng/mL人群。

[0059] 图3为前列腺穿刺阳性患者人群中不同lncLOX5-1表达量的前列腺癌检出率;其中, lncLOX5-1表达量高的人群中前列腺癌检出率增高。

[0060] 图4为受试者工作曲线分析PSA、lncLOX5-1、PCA3、fPSA ratio等指标的诊断效能;其中, A为总体人群、B为PSA 4-10ng/mL人群,C为PSA 4-20ng/mL人群。

[0061] 图5为受试者工作曲线分析完全基于临床诊断指标构建的基础模型(Base Model)、基于lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型(Model-lncLOX5-1)、基于PCA3评分构建的PCA3 临床诊断模型(Model-PCA3)等的诊断效能:总体人群(A)、PSA 4-10ng/mL人群(B)和 PSA 4-20ng/mL人群(C)。

[0062] 图6为基于lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型(Model-lncLOX5-1)绘制的列线图及内部验证(列线图的校正曲线检验):A应用年龄、PSA、% fPSA、前列腺体积、

lncLOX5-1 构建的诊断模型绘制的列线图;B列线图的校正曲线检验。

[0063] 图7为前列腺癌患者尿渣lncLOX5-1表达量与肿瘤进展转移和恶性程度相关;其中,A为局限性前列腺癌与局部进展/转移前列腺癌患者尿渣lncLOX5-1表达量;B不同Gleason评分前列腺癌患者尿渣lncLOX5-1表达量。

[0064] 图8为局限性和转移性前列腺癌患者肿瘤组织的lncLOX5-1表达量。

[0065] 图9为TCGA数据库中lncLOX5-1高表达和低表达前列腺癌患者人群总体生存曲线。

[0066] 图10为外源性改变lncLOX5-1表达量后肿瘤细胞增殖能力的变化:LNCaP (A) 和PC3 (B) 细胞中干扰lncLOX5-1表达量后,肿瘤细胞增殖能力减弱;LNCaP (C) 和PC3 (D) 细胞中过表达lncLOX5-1表达量后,肿瘤细胞增殖能力增强;其中,图10A和图10B的图例相同。

[0067] 图11为外源性改变lncLOX5-1表达量后肿瘤细胞迁移和侵袭能力的变化:PC3 (A) 细胞中过表达lncLOX5-1水平肿瘤细胞迁移和侵袭能力增强;LNCaP (B) 细胞中干扰lncLOX5-1 水平肿瘤细胞迁移和侵袭能力减弱。

[0068] 图12为体内实验证实lncLOX5-1在前列腺癌中的作用;其中,A-B为干扰lncLOX5-1表达的前列腺癌细胞PC3皮下荷瘤裸鼠模型,前列腺癌肿瘤体积与正常对照组相比明显降低;C 为干扰lncLOX5-1表达的前列腺癌PC3种植瘤中lncLOX5-1表达量较对照组显著降低;D为免疫组化(IHC)显示,在干扰lncLOX5-1的前列腺癌细胞PC3的肿瘤中,细胞增殖标记物Ki-67和 PCNA表达量明显降低。

[0069] (全文中星号含义相同,即,\*: $P<0.05$ ;\*\*: $P<0.01$ ;\*\*\*: $P<0.001$ )。

## 具体实施方式

[0070] 结合以下具体实施例和附图,对本发明作进一步的详细说明。实施本发明的过程、条件、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制内容。

[0071] 实施例1前列腺癌、良性前列腺增生、肾癌和膀胱癌患者以及正常人尿液中lncLOX5-1 的表达

[0072] 以下实施例中,检测lncLOX5-1表达量时可采用上文所述的前列腺癌体外诊断试剂,如试剂盒、基因芯片等。

[0073] (1.1) 前列腺癌、良性前列腺增生、肾癌和膀胱癌患者以及正常人尿液中lncLOX5-1的表达量有显著差异

[0074] 本发明发现前列腺癌患者的尿渣中,lncLOX5-1表达量显著高于良性前列腺增生患者、肾癌患者、膀胱癌患者和健康人的尿渣中lncLOX5-1表达量(图1)。且前列腺癌患者及良性前列腺增生患者尿渣中lncLOX5-1表达量高于其他人群,lncLOX5-1可作为前列腺特异性指标。

[0075] (1.2) 前列腺穿刺阳性患者尿渣中lncLOX5-1表达量显著高于前列腺穿刺阴性患者

[0076] 如上所述,lncLOX5-1在前列腺癌患者尿渣中表达量显著高于其他人群的尿渣中lncLOX5-1表达量。通过纳入243名行前列腺穿刺患者,包括146名穿刺阴性患者和97名穿刺阳性患者,检测患者前列腺按摩后尿渣中lncLOX5-1表达量。发现穿刺阳性患者尿渣中lncLOX5-1表达量显著高于穿刺阴性患者尿渣中lncLOX5-1的表达量(图2A)。在总体人群、

PSA 4-10ng/mL人群、PSA 4-20ng/mL人群和PSA 10-20ng/mL人群中均发现lncLOX5-1表达量在穿刺阳性患者的尿渣中显著提高(图2)。

[0077] (1.3) lncLOX5-1表达量高的人群中前列腺癌检出率增高

[0078] 本发明通过检测97名前腺穿刺阳性的患者尿渣中lncLOX5-1表达量,发现lncLOX5-1表达量越高,其对应人群中前列腺癌检出率越高。将lncLOX5-1按照从小到大进行排序,0-25%是lncLOX5-1表达量最低的25%人群,75-100%是lncLOX5-1表达量最高的25%人群,发现lncLOX5-1表达量最低的群体(0-25%)前列腺癌检出率要低于表达量较高的群体(75-100%);在总体人群、PSA<10ng/mL人群、PSA 10-20ng/mL人群和PSA>20ng/mL人群中均发现相同的趋势(图3)。

[0079] (1.4) 尿渣lncLOX5-1评分作为前列腺癌的辅助诊断指标

[0080] 图4为受试者工作曲线分析各指标诊断效能。运用受试者工作曲线(ROC)分析尿渣lncLOX5-1的诊断效能,发现尿渣lncLOX5-1的曲线下面积(AUC)达到了0.782,PSA的AUC为0.798,两者之间的差异无统计学意义( $P=0.696$ )(图4A)。而PCA3评分的AUC0.662,显著低于lncLOX5-1和PSA( $P_{\text{lncLOX5-1}} < 0.001$ ,  $P_{\text{PSA}} = 0.003$ )。在PSA 4-10ng/mL诊断灰区的患者人群中,lncLOX5-1评分的诊断效能要优于PCA3评分(0.709vs 0.601,  $P=0.046$ )(图4B)。在PSA 4-20ng/mL的患者人群中,lncLOX5-1评分的诊断效能也显著优于PCA3评分(0.719vs 0.600,  $P<0.001$ )(图4C)。

[0081] (1.5) 基于尿渣lncLOX5-1诊断模型建立

[0082] 单因素logistic回归分析确定的独立危险因素,本发明将年龄、前列腺体积、PSA、%fPSA纳入多因素logistic回归分析中,构建预测前列腺穿刺活检结果的诊断预测模型。首先单独应用临床诊断指标构建的基础诊断模型(Base Model)。基于lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型(Model-lncLOX5-1)其AUC达到了0.909,显著优于基于临床诊断指标构建的基础诊断模型( $P=0.009$ )。而基于PCA3评分构建的临床诊断模型(Model-PCA3)其AUC和PA与基础诊断模型相比,差异均无显著的统计学意义(图5)。

[0083] (1.6) 基于尿渣lncLOX5-1诊断预测模型绘制列线图

[0084] 基于尿渣lncLOX5-1构建的lncLOX5-1临床诊断模型(Model-lncLOX5-1),本发明绘制了列线图(nomogram),将每个独立危险因素进行了赋值,每个临床指标以及lncLOX5-1评分的数值都给予了相应的分数,将各指标分数相加得到的总分可以迅速计算出模型预测前列腺穿刺阳性的概率(图6A)。接下来本发明对nomogram进行了校正曲线的检验,横坐标为本发明构建的预测模型的nomogram预测概率情况,纵坐标为真实发生概率,斜45°曲线代表理想曲线,表明nomogram预测概率与真实概率完全吻合;本发明的偏倚校正曲线与理想曲线贴合比较密切(图6B)。该列线图可简单、有效应用于临床,预测拟行前列腺穿刺患者的穿刺阳性概率。

[0085] (1.7) lncLOX5-1高表达与前列腺癌患者的肿瘤进展转移及恶性程度相关

[0086] 本发明对于尿液lncLOX5-1表达量在不同级别的前列腺癌患者的表达量进行了比较,发现基于尿渣检测的lncLOX5-1表达量在局限性前列腺癌和局部进展/转移前列腺癌患者人群表达存在显著差别,Gleason评分(GS)<7分和≥7分的前列腺癌人群中表达有显著差别(图7)。随着肿瘤进展转移和病理恶性程度增加,lncLOX5-1表达量增加,提示lncLOX5-1评分可用于精准诊断高级别前列腺癌。

[0087] (1.8) 局限性和转移性前列腺癌患者肿瘤组织的lncLOX5-1表达量

[0088] 本发明对41例前列腺癌患者的肿瘤组织样本进行lncLOX5-1表达量的检测,发现转移前列腺癌患者的lncLOX5-1表达量显著高于局限性前列腺癌患者肿瘤组织样本( $P < 0.01$ ) (图8)。

[0089] (1.9) lncLOX5-1高表达与前列腺癌患者的总体生存率相关

[0090] 本发明通过生物信息学的方法,分析公开数据库(TCGA)中前列腺癌患者肿瘤组织中 lncLOX5-1的表达量,发现lncLOX5-1的高表达组和低表达组患者的预后具有显著差异(图9)。在333例随访时间达到15年的前列腺癌患者人群,发现lncLOX5-1高表达是其预后较差的危险因素,风险率(Hazardrate,HR)等于3.736。提示lncLOX5-1高表达在前列腺癌预后判断方面具有重要价值。

[0091] 实施例2 lncLOX5-1在前列腺癌恶性进展过程中的作用

[0092] (2.1) lncLOX5-1与前列腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭性的相关性

[0093] 既往并无lncLOX5-1与前列腺癌恶性进展相关的研究报道。

[0094] 在本发明的前述内容中,发明人发现lncLOX5-1的表达量与肿瘤进展转移和恶性程度密切相关。而无限增殖以及侵袭迁移是肿瘤的重要特征,本发明对lncLOX5-1与前列腺癌细胞的增殖、侵袭迁移的相关性进行了研究。

[0095] 本发明通过外源性过表达质粒和siRNA转染的方式,在前列腺癌细胞系LNCaP和PC3中过表达lncLOX5-1,通过CCK8实验检测了细胞增殖能力的变化(图10),通过Transwell实验检测了肿瘤细胞侵袭和迁移能力的变化(图11),发现在上调lncLOX5-1表达量后,细胞的增殖能力出现上升,细胞的侵袭和迁移能力也发生增强;在下调lncLOX5-1表达量后,细胞的增殖能力出现下降,细胞的侵袭和迁移能力也发生减弱。

[0096] (2.2) 裸鼠荷瘤实验

[0097] 向裸鼠皮下注射前列腺癌细胞PC3:待PC3细胞生长至对数增长期,即状态最佳时,每只裸鼠注射 $1 \times 10^6$ 数量的细胞,将细胞悬液与基质胶(BD公司)按照1:1的体积比混合后注射至裸鼠大腿外侧皮下,便于进行瘤内注射与测量肿瘤情况。半周后,裸鼠皮下可触及质硬包块,将裸鼠按照体重和包块大小随机分为两组;每两天进行瘤内注射lncLOX5-1的siRNA 和对照siRNA-NC,每周一注射前测量肿瘤大小。6周后,肿瘤生长较为明显。

[0098] 结果表明,干扰lncLOX5-1表达的前列腺癌细胞PC3-siRNA-lncLOX5-1的裸鼠,前列腺癌肿瘤体积明显降低(图12A-B),干扰后,qPCR检测肿瘤中lncLOX5-1表达量显著下降(图12C)。

[0099] 免疫组化(IHC)分析显示,在干扰lncLOX5-1的前列腺癌细胞PC3-siRNA-lncLOX5-1的肿瘤中,细胞增殖标记物Ki-67和PCNA表达量明显降低(图12D)。

[0100] 以上研究均表明,lncLOX5-1的过表达可以促进前列腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

[0101] 综上所述,本发明提出的非编码RNA lncLOX5-1可有效作为前列腺癌早期诊断和预后判断的标志物;所述lncLOX5-1能够用于预测前列腺癌患者肿瘤的恶性程度,预测前列腺癌患者肿瘤是否进展转移,预测拟行前列腺穿刺的患者的阳性率等,具有高准确度、高特异性和高灵敏度的特点。

[0102] 本发明的保护内容不局限于以上实施例。在不背离发明构思的精神和范围下,本

领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中,并且以所附的权利要求书为保护范围。

- [0001] <110> 上海长海医院
- [0002] <120> 一种长链非编码RNA作为前列腺癌分子标志物的应用
- [0003] <160> 3
- [0004] <170> PatentIn version 3.3
- [0005] <210> 1
- [0006] <211> 558
- [0007] <212> lncL0X5-1
- [0008] <213> 智人(Homo sapie)
- [0009] <400> 1
- [0010] 1 aacctcctcc cacaggagct tgctacatgt gacggaaatc tggccactgg gccaaggaat
- [0011] 61 gcccgcagcc cgggattcct cctaagccgt atcccatctg tgtgggaccc cagtgaaaat
- [0012] 121 cggactgttc aactcacctg gcagccactc ccagagcccc tggaactctg gccaaggct
- [0013] 181 ctctgaccga ctcttccca gatcttctcg gcttagcggc tgaagactga cactgccc aa
- [0014] 241 tcgcctcgga agccccctag accatcacgc acgccgagct tcgggtaact ctcacagtgg
- [0015] 301 aagagatggc atcttcagca cgaacgctgg ctgtgaggac tttggatgga agaacagaag
- [0016] 361 aggagaatgc taggaattcc ctgtacaact ggaaagaaga gtgctcagca cagcatgggg
- [0017] 421 ctgaagccta agtacaacaa taatgagtta gacttggttc tcatggaacc aacaggccac
- [0018] 481 ttactccttt agctgcttgg ttaacttcac cacttgagag gccagcgaca tgcaggtctc
- [0019] 541 caccaccacc aggtacct
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 24
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列
- [0024] <400> 2
- [0025] 1 tcctcctaagccgtatcccatctg
- [0026] <210> 3
- [0027] <211> 24
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <400> 3
- [0031] 1 ccaggtgagttgaacagtccgatt

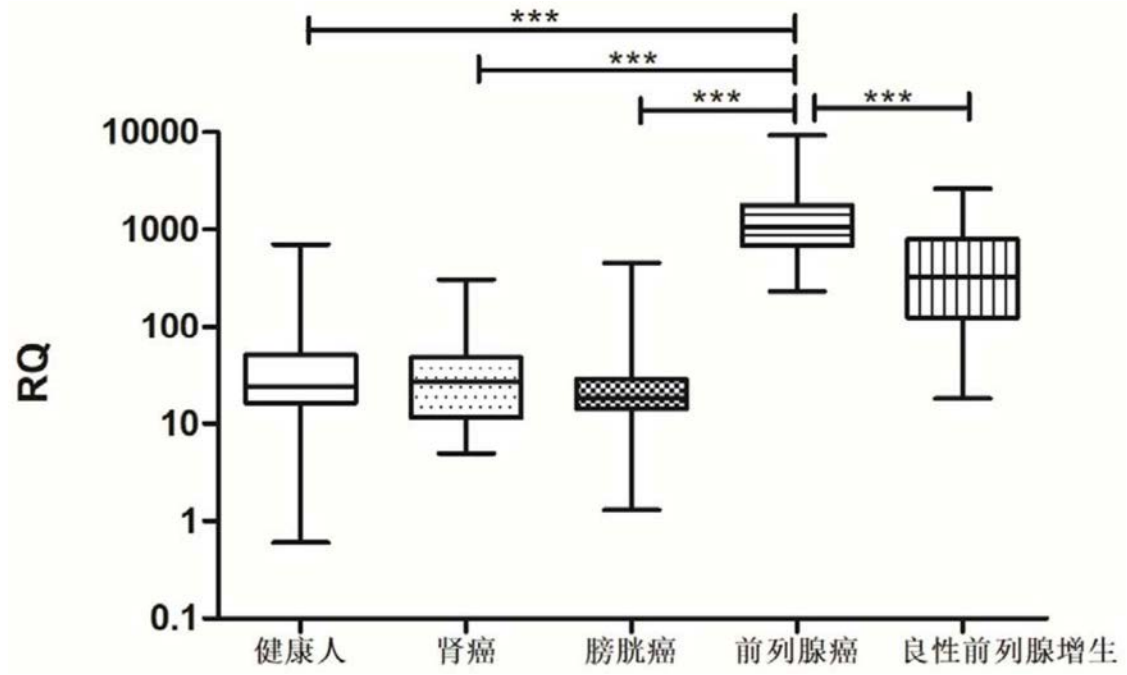


图1

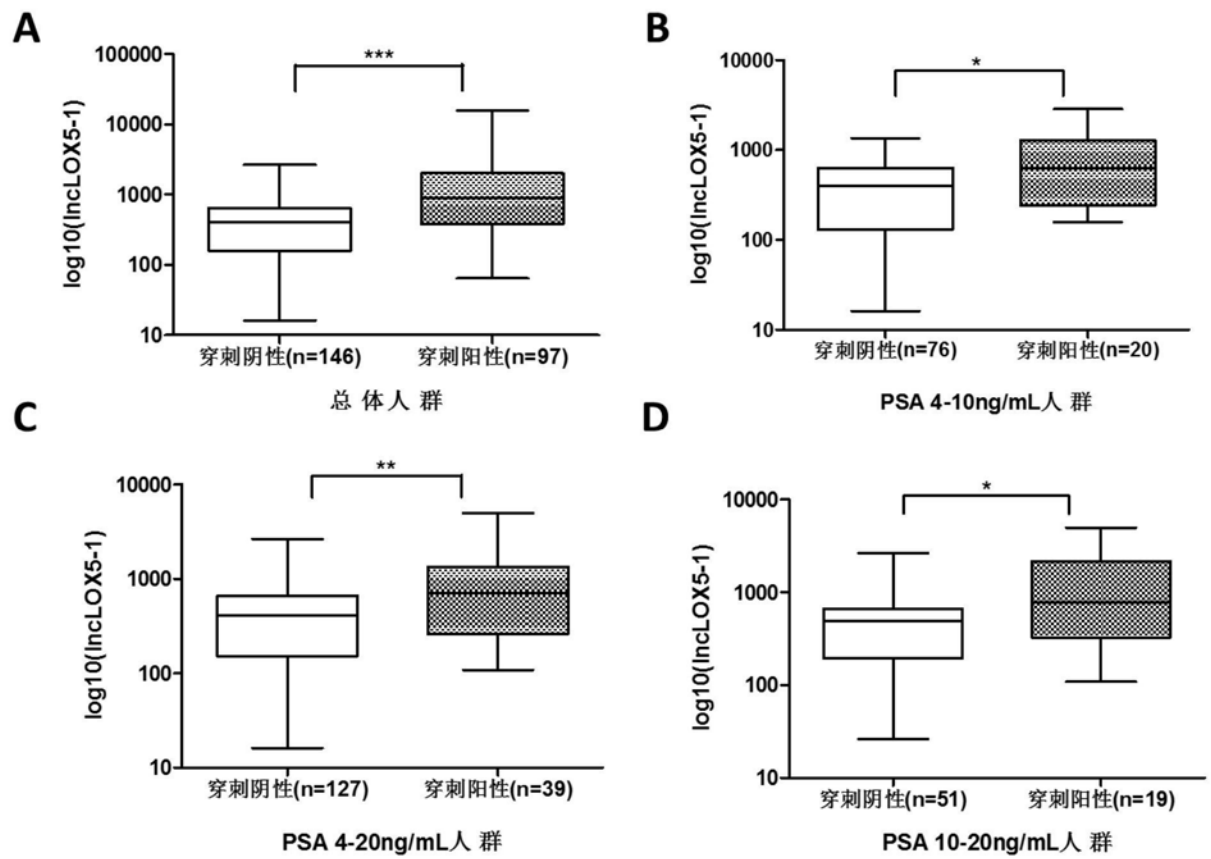


图2

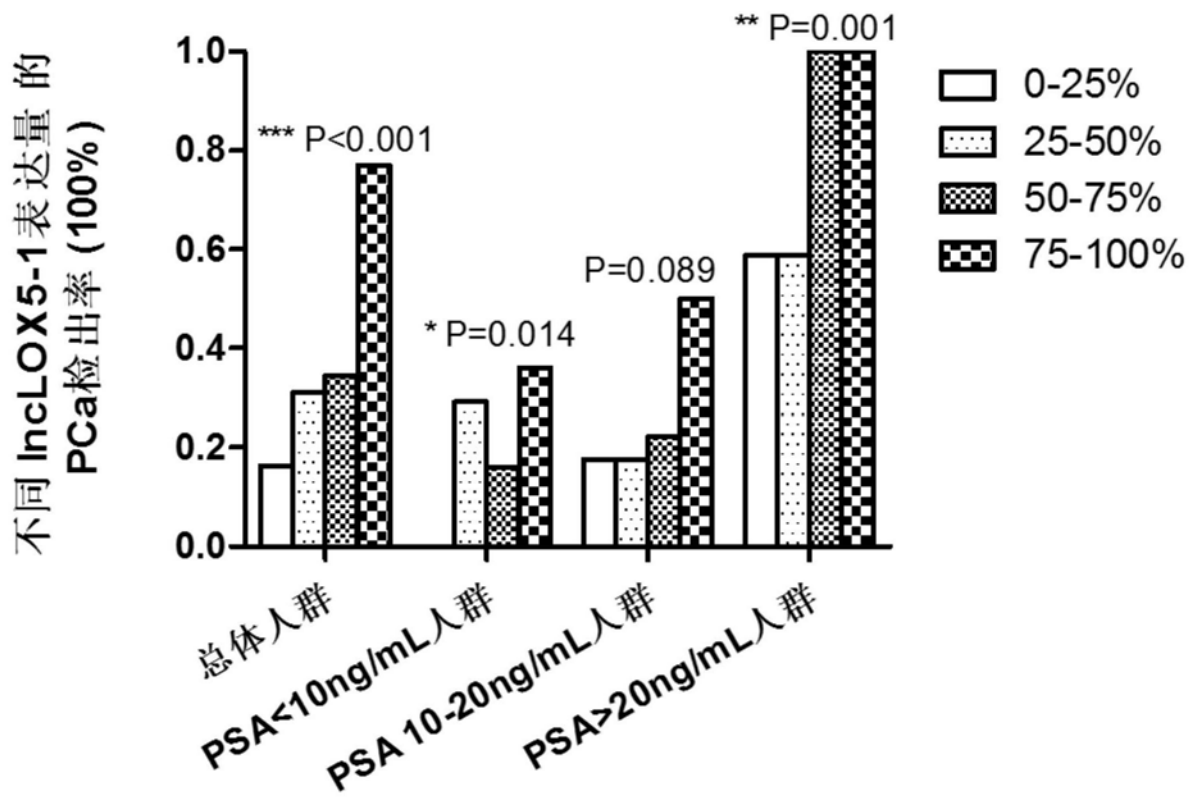
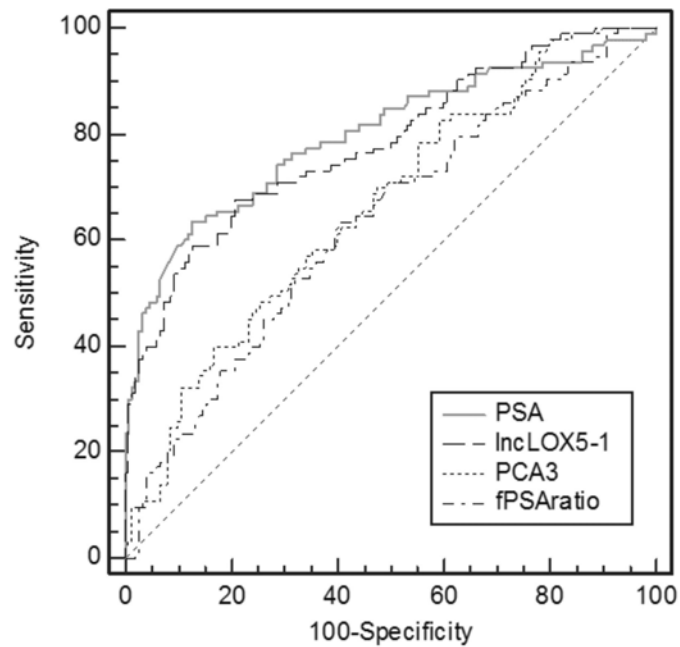


图3

### A 总体人群



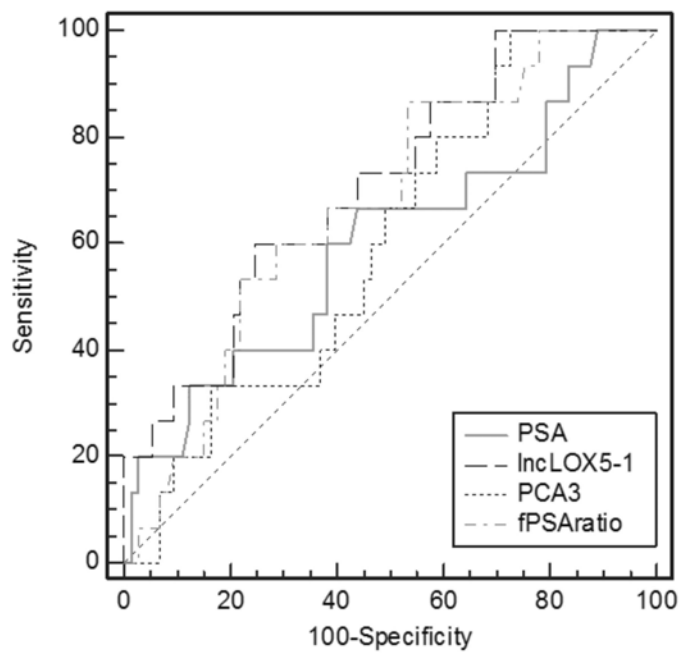
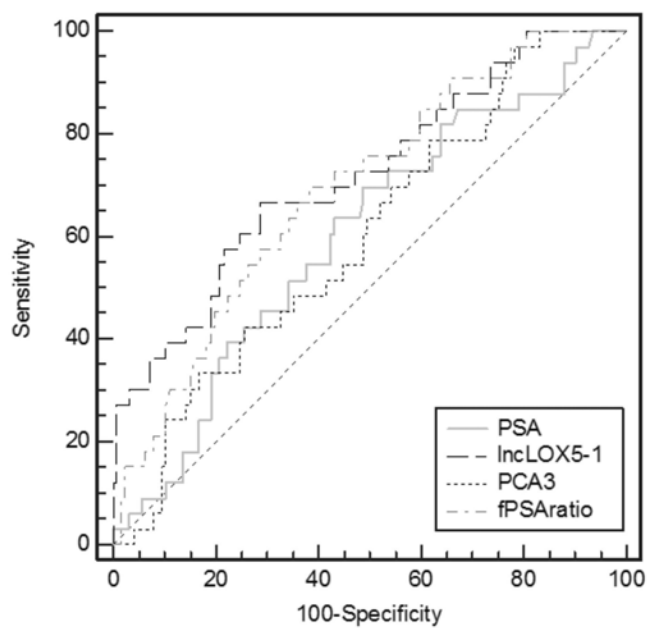
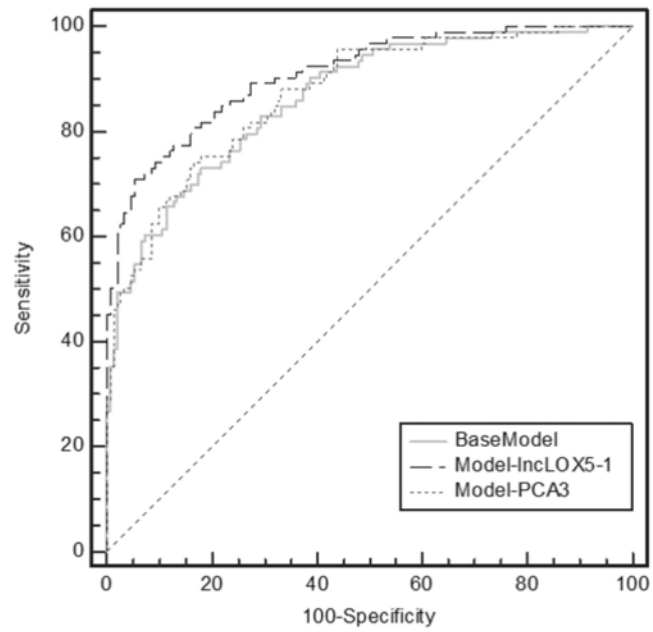
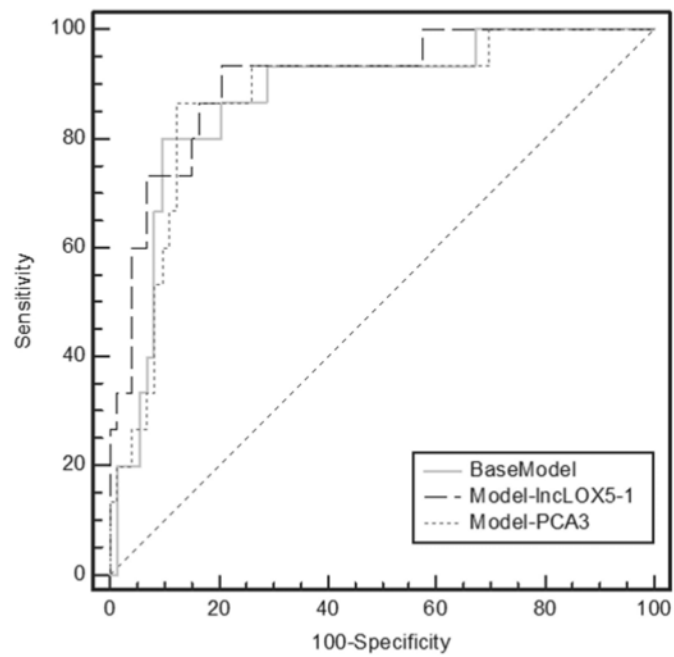
**B** PSA 4-10 ng/mL人群**C** PSA 4-20 ng/mL人群

图4

**A** 总体人群**B** PSA 4-10 ng/mL人群

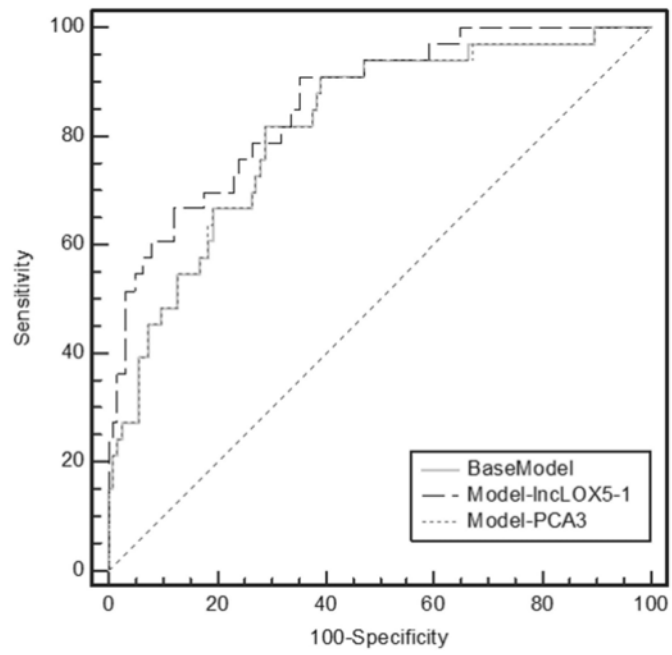
**C** PSA 4-20 ng/mL人群

图5

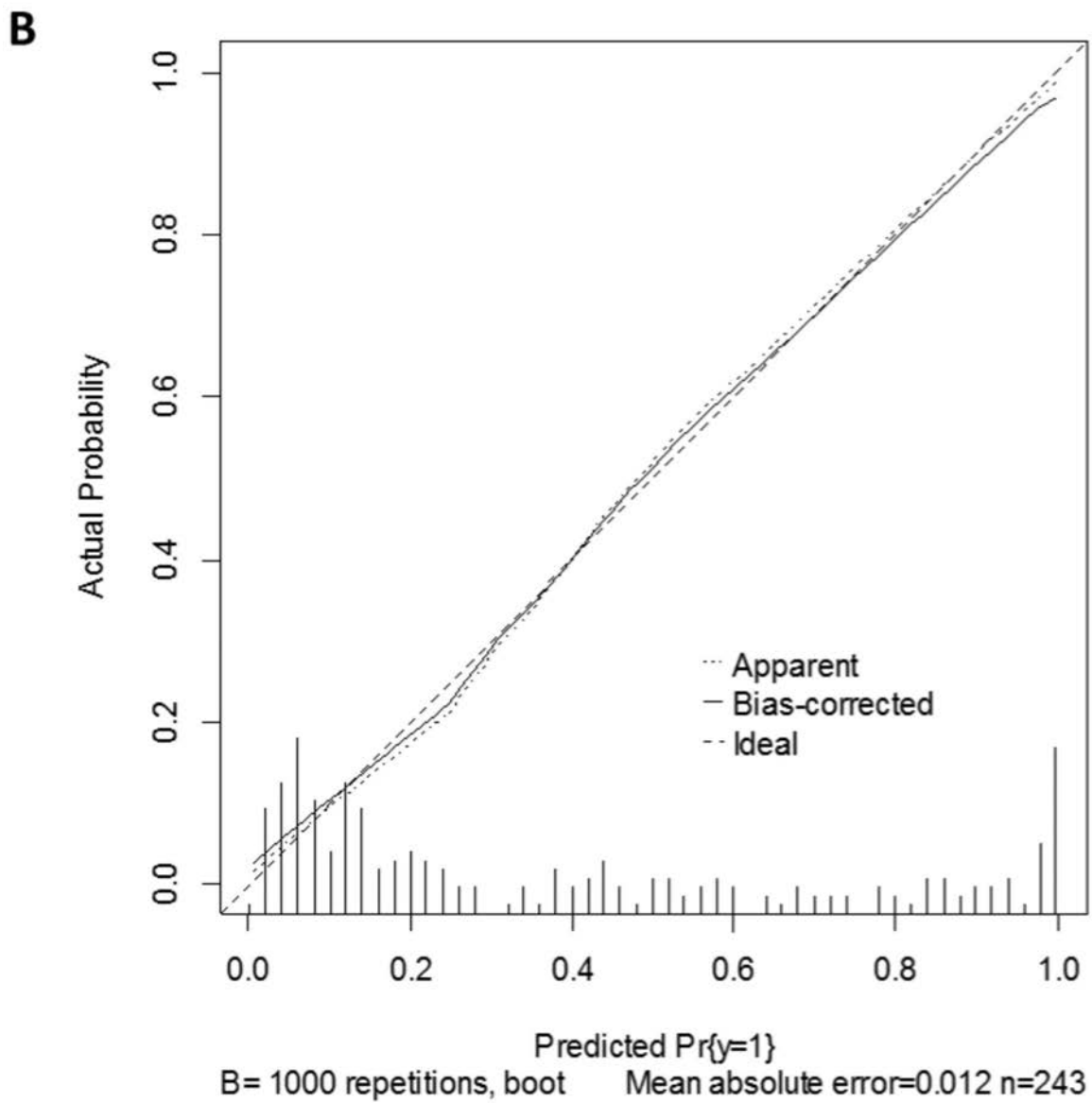
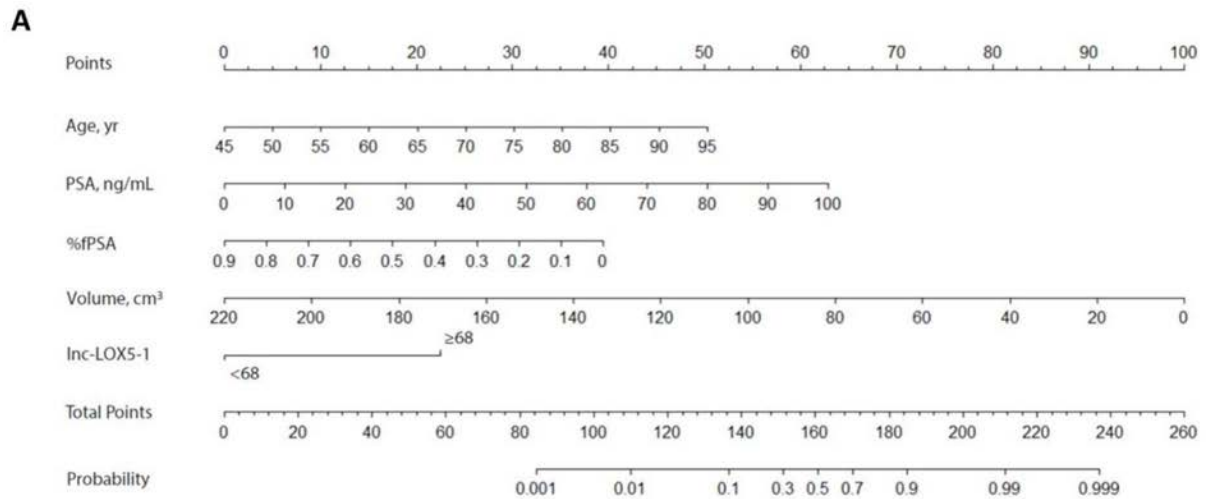


图6

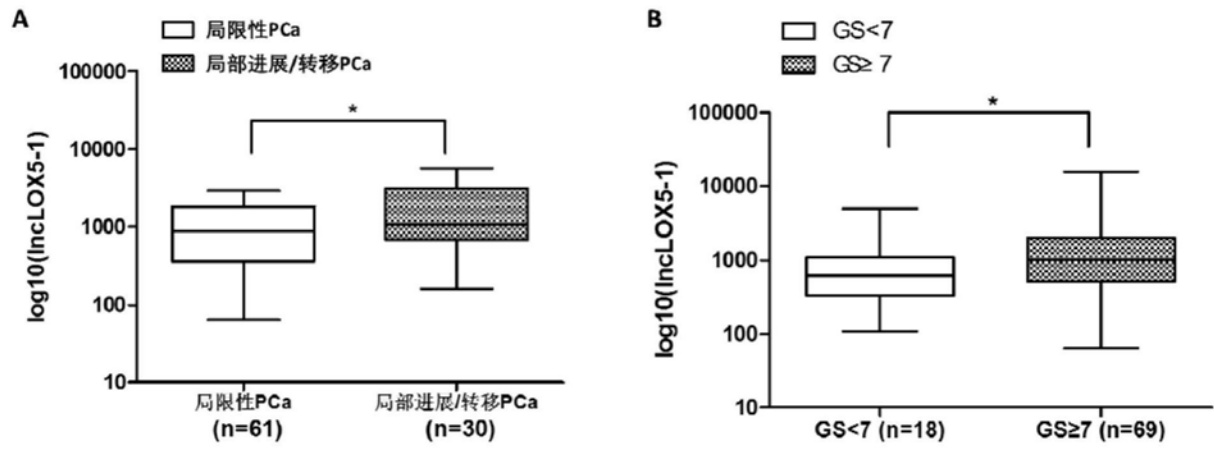


图7

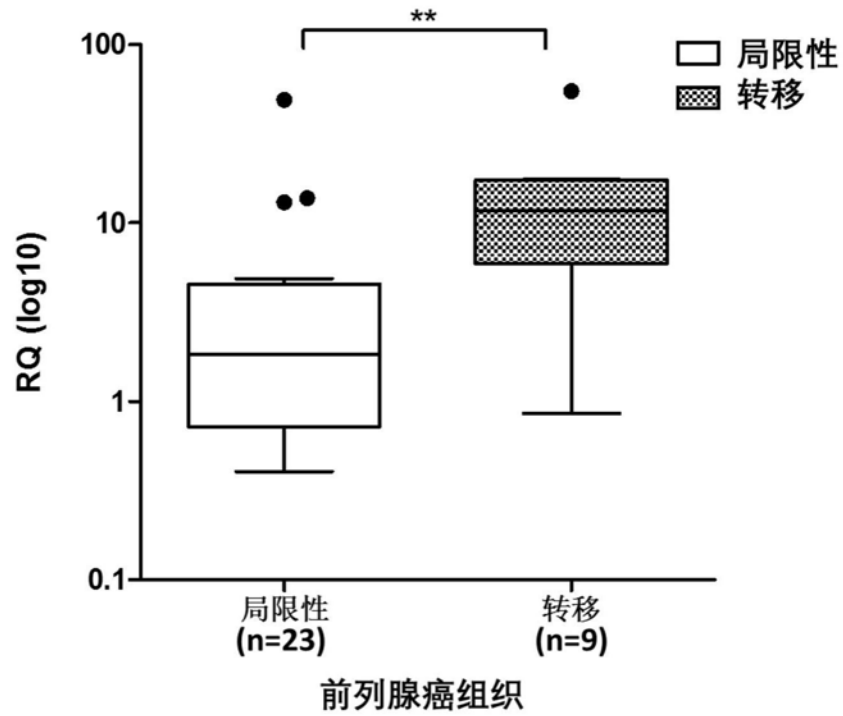


图8

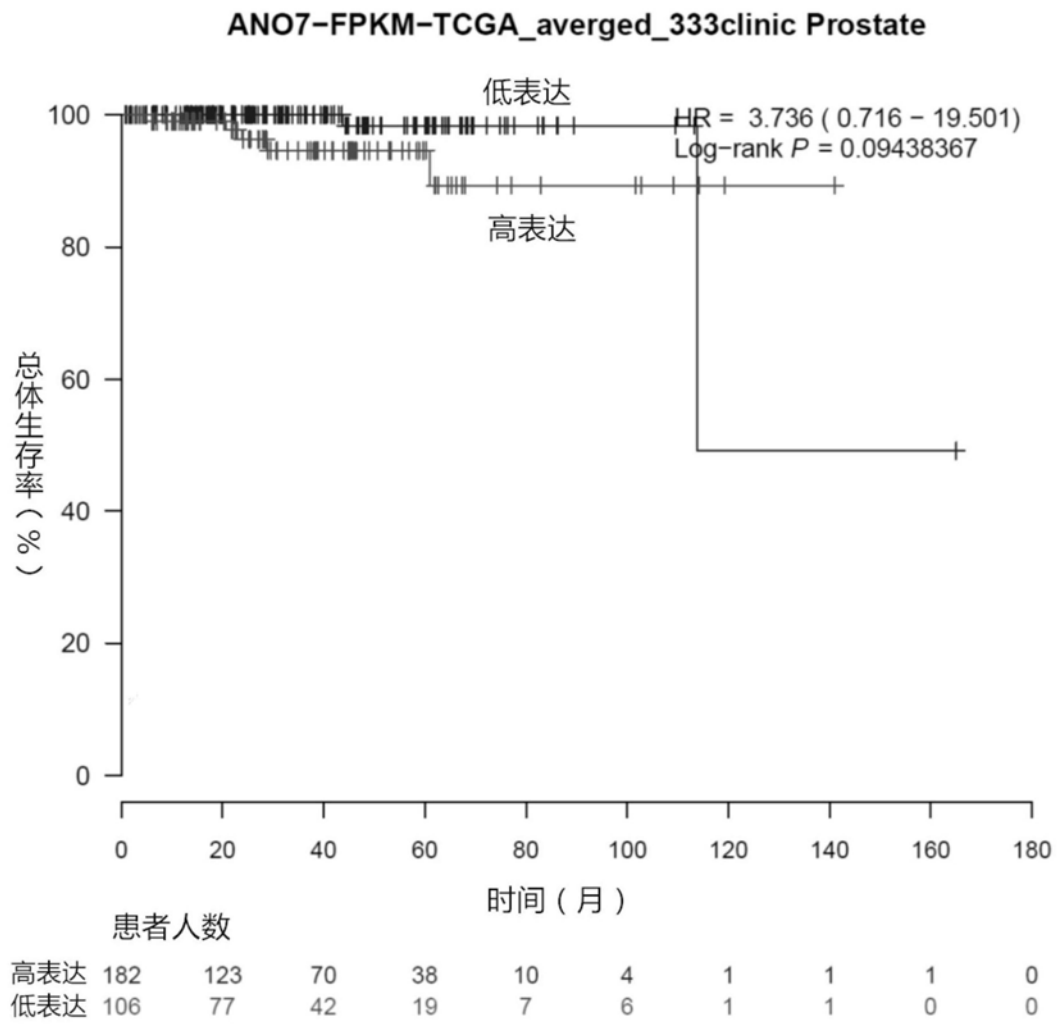


图9

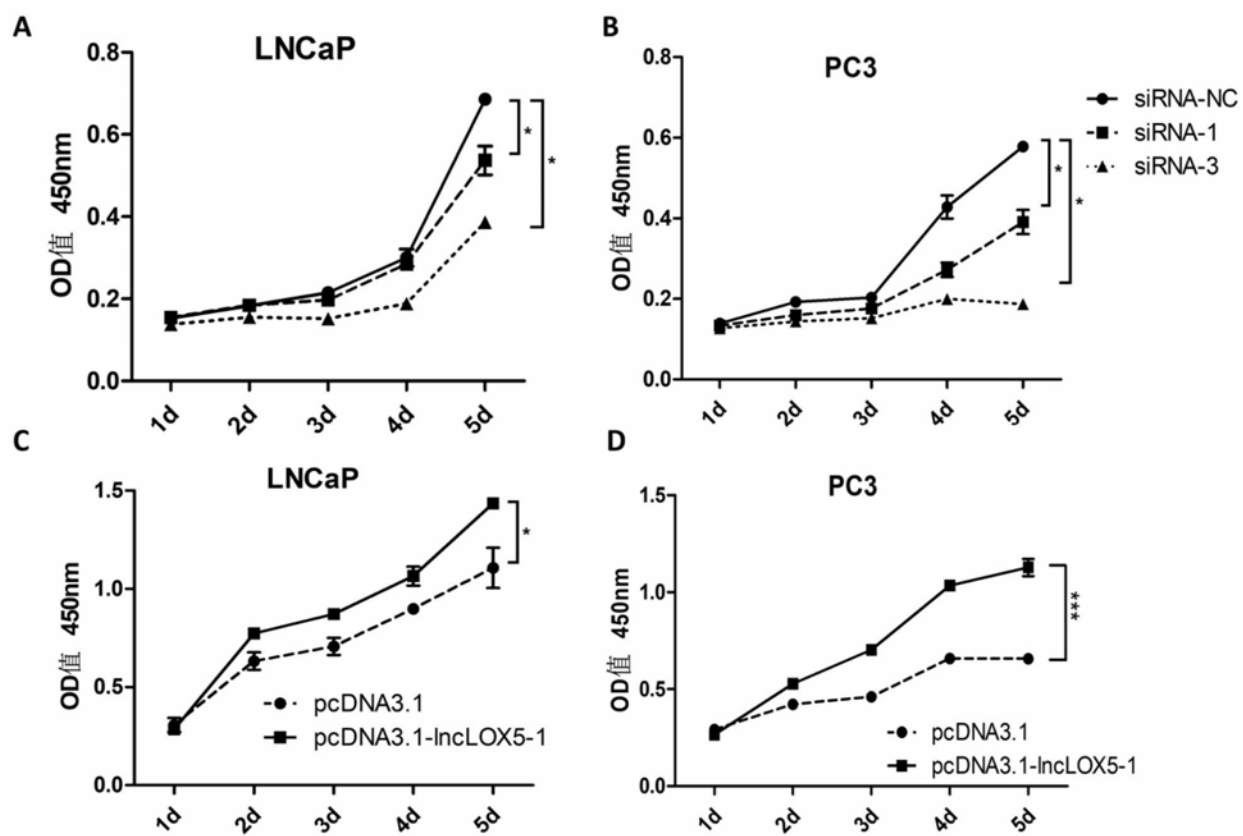


图10

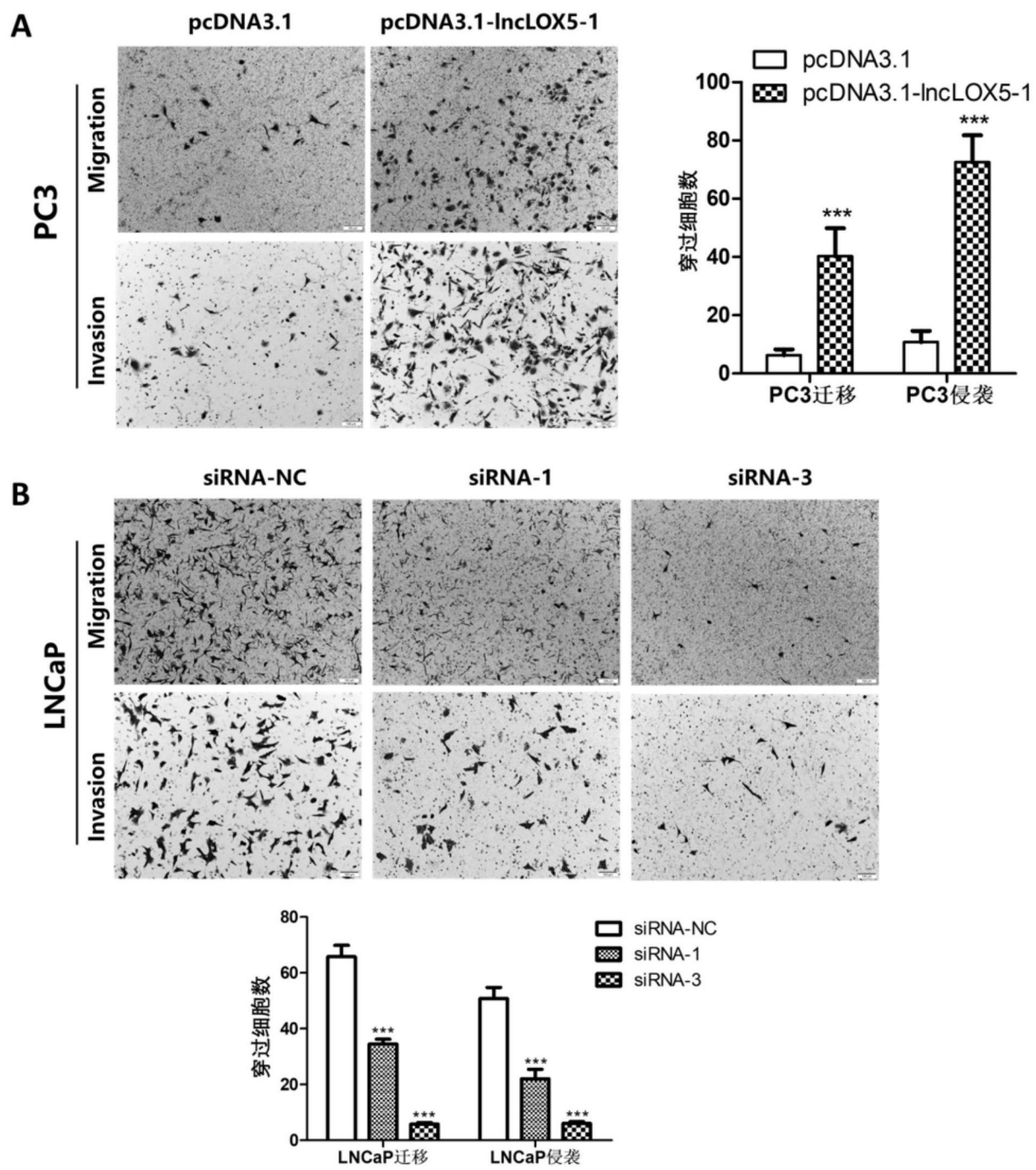


图11

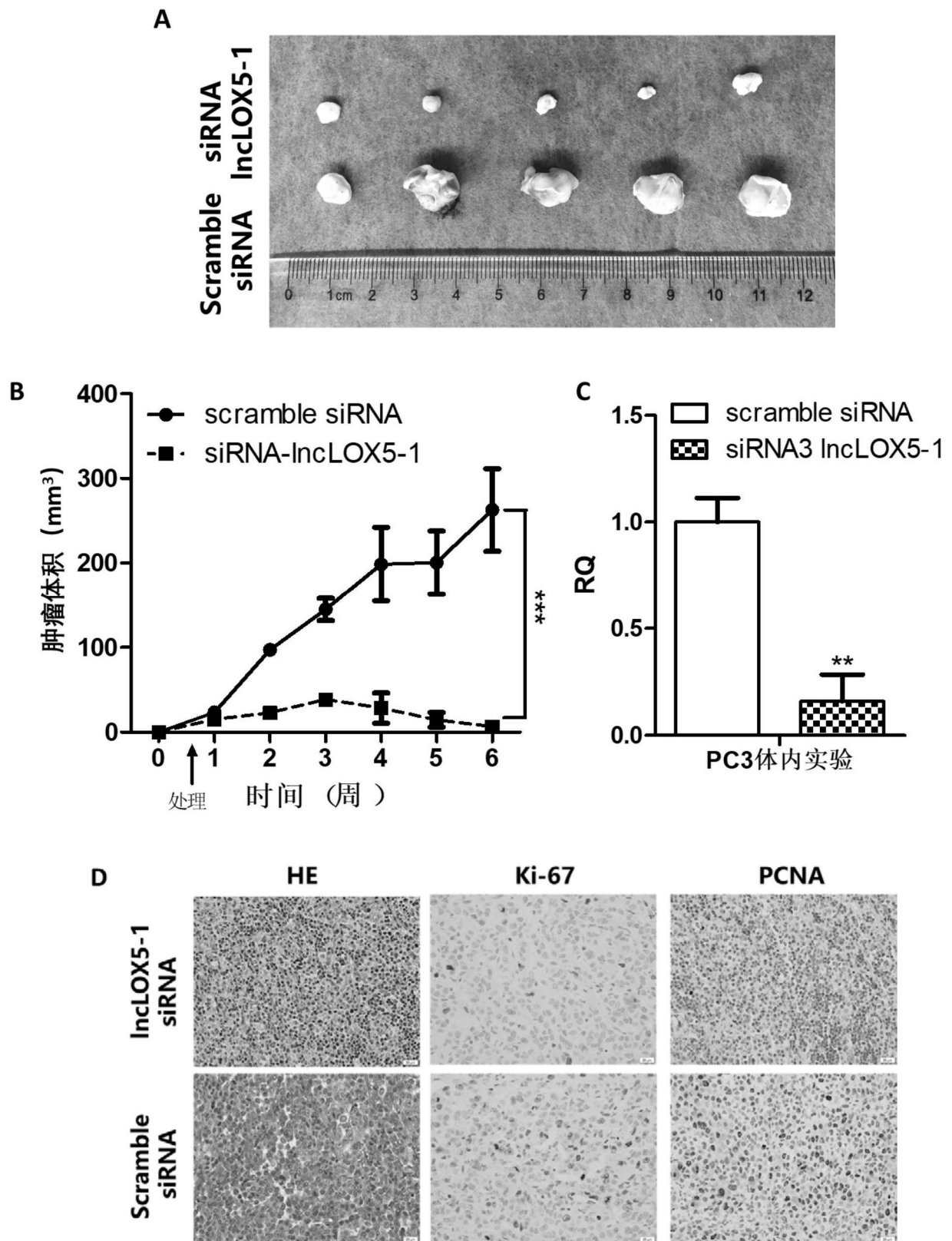


图12