



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114540501 A

(43) 申请公布日 2022.05.27

(21) 申请号 202210340572.9

(22) 申请日 2022.03.31

(71) 申请人 山东第一医科大学(山东省医学科学院)

地址 250117 山东省济南市槐荫区青岛路6699号

(72) 发明人 张强 王新立

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理有限公司 11736

专利代理师 高倩倩

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

G16H 50/20 (2018.01)

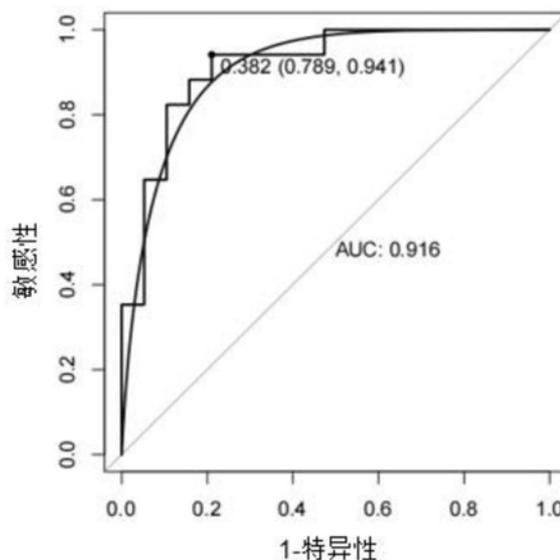
权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

用于诊断非小细胞肺癌的miRNA及其应用

(57) 摘要

本发明公开了用于诊断非小细胞肺癌的miRNA及其应用,具体的,所述的miRNA包括hsa-let-7b和/或hsa-miR-25。本发明发现,与健康人相比,hsa-let-7b在非小细胞肺癌患者中的表达显著下调,hsa-miR-25在非小细胞肺癌患者中的表达显著上调,这两个miRNA用于诊断非小细胞肺癌具有较好的诊断效能。



1. 一种能够检测样本中生物标志物的表达水平的试剂,其特征在于,所述的生物标志物包括hsa-let-7b和/或hsa-miR-25。

2. 根据权利要求1所述的试剂,其特征在于,所述的生物标志物为hsa-let-7b和hsa-miR-25。

3. 根据权利要求1所述的试剂,其特征在于,所述的试剂包括通过通过RT-PCR、实时定量PCR、原位杂交、芯片或高通量测序平台检测样本中所述的生物标志物的表达水平的试剂。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的试剂,其特征在于,所述的试剂包括:
特异性识别生物标志物的探针;或
特异性扩增生物标志物的引物。

5. 一种试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含权利要求1-4任一项所述的试剂。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包含容器、使用说明书、阳性对照物、阴性对照物、缓冲剂、助剂或溶剂。

7. 一种芯片,其特征在于,所述的芯片包含权利要求1-4任一项所述的试剂。

8. 权利要求1-4任一项所述的试剂、权利要求5或6所述试剂盒、或权利要求7所述的芯片在制备诊断非小细胞肺癌的工具中的应用。

9. 生物标志物在构建非小细胞肺癌的诊断系统中的应用,其特征在于,所述的生物标志物包括hsa-let-7b和/或hsa-miR-25,所述的诊断系统包括以下单元:

1) 检测单元:包括生物标志物检测模块;

2) 分析单元:将检测单元检测得到的生物标志物的表达水平作为输入变量,输入食管鳞癌的诊断模型进行分析;

3) 评估单元:输出样本对应的个体患非小细胞肺癌的风险值。

10. 一种筛选预防或治疗非小细胞肺癌的候选药物的方法,其特征在于,所述的方法包括:

(1) 用待测物质处理表达或含有hsa-let-7b和/或hsa-miR-25的体系;

(2) 检测步骤(1)所述的体系中hsa-let-7b和/或hsa-miR-25的表达水平;

若所述待测物质可提高hsa-let-7b和/或降低hsa-miR-25的表达水平,则表明该物质为预防或治疗非小细胞肺癌的候选药物。

用于诊断非小细胞肺癌的miRNA及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及用于诊断非小细胞肺癌的miRNA及其应用。

背景技术

[0002] 肺癌是目前全世界癌症的头号杀手,具有高发病率和高死亡率。它是严重威胁人类生命和健康的重大疾病。肺癌被分为两大主要的临床病理类型:小细胞肺癌(占全部肺癌15%)和非小细胞肺癌(占全部肺癌的85%)。对于非小细胞肺癌,只有在疾病进展早期得到诊断的病例能够进行有效的手术切除治疗。尽管过去几十年中,肺癌的诊断、分期、外科手术治疗、研究方面取得了重大的进步,但是考虑到五年生存率,相比乳腺癌的89%,结直肠癌的65%,以及前列腺癌的100%,肺癌的五年生存率始终保持在较低的16%。肺癌患者往往处于晚期时才被发现和确诊,丧失了最佳的治疗时机。如果能在较早时期发现肺癌的病变灶,将能有效的改善患者的预后。因此,提高肺癌患者预后的重中之重在于提高肺癌的早期诊断效率。

[0003] 肺癌的发病较为隐匿,超过的病人在发现时就已经处于肺癌晚期,这就导致治疗性外科手术切除机会的减少,并且预后不良。这些患者在就诊时已发展至中晚期,甚至出现转移,严重影响临床治疗效果和患者的生存质量。目前,临床所使用肺癌筛查诊断方法主要是胸部射线检查、扫描等影像学技术。虽然这些影像资料对诊断起着重要作用,但也存在很多局限性,例如假阳性率高,无法检出隐性病灶、亚临床病灶和微小转移病灶。除此之外,对肺癌的诊断方法还包括支气管镜检查、穿刺活检等有创操作,这类方法耗时长,增加患者痛苦。因此,寻找无创、无辐射、费用低廉、诊断快速且敏感性、特异性均高的筛查、诊断方法,是目前肺癌早期诊断的迫切需求。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明的目的是寻找一种敏感性、特异性高的诊断非小细胞肺癌的方法。

[0005] 为实现该目的,本发明采用了如下技术方案:

[0006] 本发明第一方面提供了一种能够检测样本中生物标志物的表达水平的试剂,所述的生物标志物包括hsa-let-7b和/或hsa-miR-25。

[0007] 进一步,所述的生物标志物为hsa-let-7b和hsa-miR-25。

[0008] 如本文中在诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”旨在包括A和B两者;A或B;A(单独);以及B(单独)。同样地,在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下实施方案的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0009] 术语“生物标志物”是指以可用于预测个体的癌症状态的不同浓度存在于个体中的生物分子。生物标志物可包括,但不限于,核酸、蛋白质及其变体和片段。生物标志物可以是包含编码该生物标志物的全部或部分核酸序列或这类序列的互补体的DNA。可用于本发

明的生物标志物核酸被认为包括包含任何目的核酸序列的全部或部分序列的DNA和RNA。

[0010] 在本发明中,当采用生物标志物在个体中指示异常进程、疾病或其他病症或作为异常进程、疾病或其他病症的标志时,该生物标志物与在个体中指示正常进程、无疾病或其他病症或作为正常进程、无疾病或其他病症的标志的生物标志物的表达水平或值相比较,通常被描述为过表达的或低表达的。“上调”、“上调的”、“过表达”、“过表达的”和其任何变化形式互换地用来指大于在健康或正常个体中通常检测到的生物标志物的值或水平(或值或水平的范围)的生物样品中的生物标志物的值或水平。该术语还可指大于在特定疾病的不同阶段可检测到的生物标志物的值或水平(或值或水平的范围)的生物样品中的生物标志物的值或水平。

[0011] “下调”、“下调的”、“低表达”、“低表达的”和其任何变化形式互换地用来指小于在健康或正常个体中通常检测到的生物标志物的值或水平(或值或水平的范围)的生物样品中的生物标志物的值或水平。该术语还可指小于在特定疾病的不同阶段可检测到的生物标志物的值或水平(或值或水平的范围)的生物样品中的生物标志物的值或水平。

[0012] 此外,与在个体中指示正常进程或无疾病或其他病症或作为正常进程或无疾病或其他病症的标记的生物标志物的“正常”表达水平或值相比较,过表达的或低表达的生物标志物还可称作“差异表达的”或称作具有“差异水平”或“差异值”。因此,生物标志物的“差异表达”还可称作标志物的“正常”表达水平的变化形式。

[0013] 进一步,所述的试剂包括通过通过RT-PCR、实时定量PCR、原位杂交、芯片或高通量测序平台检测样本中所述的生物标志物的表达水平的试剂。

[0014] 进一步,所述的试剂包括:

[0015] 特异性识别生物标志物的探针;或

[0016] 特异性扩增生物标志物的引物。

[0017] 在本发明中,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。

[0018] “引物”是指能够互补地与模板结合并使逆转录酶或DNA聚合酶能够启动模板复制的具有自由3'羟基的核酸序列。引物是具有与特定基因核酸序列互补的序列的核苷酸,可以使用长度约7bp~50bp、优选约10bp~30bp的引物。其他的RT-PCR试剂盒根据具体的实施方式可以包括试管或其他适合的容器、反应缓冲液、脱氧核苷酸(dNTP)、酶如Taq聚合酶和逆转录酶、DNA酶、RNA酶抑制剂、DEPC-水、无菌水等。

[0019] 本发明的引物或探针可以使用磷酰亚胺固相支持法或其他熟知方法化学合成。也可以使用本领域已知的许多手段修饰所述核酸序列。这些修饰的非限制性实例是甲基化、加帽、用天然核苷酸的一种或多种类似物进行的置换和在核苷酸之间的修饰,例如,修饰不带电荷的连接体(例如,磷酸甲酯、磷酸三酯、磷酰亚胺、氨基甲酸酯等),或修饰带电荷的连接体(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)。

[0020] 本发明第二方面提供了一种试剂盒,所述的试剂盒包含本发明第一方面所述的试剂。

[0021] 进一步,所述的试剂盒还包含容器、使用说明书、阳性对照物、阴性对照物、缓冲剂、助剂或溶剂。

[0022] 本发明第三方面提供了一种芯片,所述的芯片包含本发明第一方面所述的试剂。

[0023] 所述的芯片的制备可采用本领域已知的生物芯片的常规制造方法,例如,如果固相载体采用的是修饰玻片或硅片,探针的5'端含有氨基修饰的聚dT串,可将寡核苷酸探针配制成溶液,然后采用点样仪将其点在修饰玻片或硅片上,排列成预定的序列或阵列,然后通过放置过夜来固定,就可得到本发明的miRNA芯片。如果核酸不含氨基修饰,则其制备方法也可参照:王申五主编的《基因诊断技术-非放射性操作手册》;J.L.erisi,V.R.Iyer,P.O.BROWN.Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.Science,1997;278:680和马立人,蒋中华主编.生物芯片.北京:化学工业出版社,2000,1-130。

[0024] 在本发明中,术语“miRNA”具有其在本领域中的普通含义,表示来自遗传基因位点的RNA分子,其从可以形成局部RNA前体miRNA结构的转录物加工而来。成熟miRNA通常长度为20、21、22、23、24或25个核苷酸,尽管其它数目的核苷酸也可存在,例如18、19、26或27个核苷酸。

[0025] miRNA编码序列具有与侧翼基因组序列配对的潜力,使成熟miRNA放置在非完全配对的RNA双链体之内(本文也称作茎-环或发夹结构或pre-miRNA),所述双链体作为从更长的前体转录物进行miRNA加工的中间体。这一加工典型地通过分别称为Drosha和Dicer的两种特定的内切核酸酶的连续作用而发生。Drosha从初级转录物(本文也称作“pri-miRNA”)产生典型地折叠成发夹或茎-环结构的miRNA前体(本文也称作“pre-miRNA”)。采用Dicer方法切割这个miRNA前体可以得到miRNA双链体,其发夹或茎-环结构的一条臂包含成熟miRNA,另一条臂包含类似大小的节段(通常称为miRNA*)。

[0026] 本发明第四方面提供了本发明第一方面所述的试剂、本发明第二方面所述试剂盒、或本发明第三方面所述的芯片在制备诊断非小细胞肺癌的工具中的应用。

[0027] 本发明第五方面提供了生物标志物在构建非小细胞肺癌的诊断系统中的应用,所述的生物标志物包括hsa-let-7b和/或hsa-miR-25,所述的诊断系统包括以下单元:

[0028] 1) 检测单元:包括生物标志物检测模块;

[0029] 2) 分析单元:将检测单元检测得到的生物标志物的表达水平作为输入变量,输入非小细胞肺癌的诊断模型进行分析;

[0030] 3) 评估单元:输出样本对应的个体患非小细胞肺癌的风险值。

[0031] 本发明第六方面提供了一种筛选预防或治疗非小细胞肺癌的候选药物的方法,所述的方法包括:

[0032] (1) 用待测物质处理表达或含有hsa-let-7b和/或hsa-miR-25的体系;

[0033] (2) 检测步骤(1)所述的体系中hsa-let-7b和/或hsa-miR-25的表达水平;

[0034] 若所述待测物质可提高hsa-let-7b和/或降低hsa-miR-25的表达水平,则表明该物质为预防或治疗非小细胞肺癌的候选药物。

[0035] 在本发明中,曲线下面积被用来判断生物标志物的诊断效能,其是指本技术领域中所众所周知的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve;ROC)的下面积。曲线下面积(AUC)测定有助于经由整体数据范围来比较分类器的准确性。具有更

大的曲线下面积 (AUC) 的分类器具有更大的能力以在两个感兴趣的组 (例如, 非小细胞肺癌样本及正常或对照样本) 之间准确分类未知物。在于区别两个群体 (例如, 具有非小细胞肺癌的组与非非小细胞肺癌的对照组) 方面上, 受试者工作特征曲线 (ROC) 有用于以图表形式来表现特定的特征 (例如, 本发明中所描述的生物标志物和/或额外的生物医学信息的任意项目) 的性能。通常, 基于单一特征值, 经由整个群体 (例如, 患者组及对照组) 的上述特征数据被升序排列。然后, 针对上述特征的每个值, 计算对于数据的真阳性率 (true positive rate) 及假阳性率 (false positive rate)。通过计算高于针对其特性的值以上的病例数之后, 除以总病例数来测定上述真阳性率。通过计算高于针对其特性的值以上的对照组数之后, 除以总对照组数来测定上述假阳性率。尽管该定义是指患者组的特性相对于对照组高的情况, 但该定义还适用于患者组的特性相对于对照组低的情况 (在这种情况下, 可计算出低于上述特性的值的样本的数)。受试者工作特征曲线 (ROC) 可以针对其他单一计算, 还可针对单一特性生成, 为了提供单一和值, 例如, 可数学性地组合两个以上的特性 (例如, 加、减、乘等), 该单一和值可由受试者工作特征曲线 (ROC) 来表示。附加地, 能够以受试者工作特征曲线 (ROC) 来画出可导出单一计算值的多重特性的组合。这些特性组合可构成测试。上述受试者工作特征曲线 (ROC) 为表示相对于测试的假阳性率 (1-特异性) 的测试的真阳性率 (灵敏度) 的图表。

[0036] 常规地, AUC面积总是 ≥ 0.5 (如果不是这样, 那么可以颠倒决策规则来使之这样)。数值范围介于 1.0 (完美分开两个组的测试值) 和 0.5 (两个组的测试值之间没有明显分布差异) 之间。面积不仅取决于线图的特定部分诸如最接近对角线的点或 90% 特异性处的灵敏度, 而且还取决于整个线图。这是 ROC 线图如何接近完美者 (面积 = 1.0) 的一种定量、描述性表述。

[0037] 整体测定法灵敏度会取决于实施本文公开的方法要求的特异性。在某些优选设置中, 特异性 75% 可能是充分的, 而且统计方法和所得算法可以基于此特异性要求。

附图说明

[0038] 图1是hsa-let-7b在非小细胞肺癌中差异表达的箱线图;

[0039] 图2是hsa-miR-25在非小细胞肺癌中差异表达的箱线图;

[0040] 图3是hsa-let-7f在非小细胞肺癌中差异表达的箱线图;

[0041] 图4是hsa-let-7b用于诊断非小细胞肺癌的ROC曲线图;

[0042] 图5是hsa-miR-25用于诊断非小细胞肺癌的ROC曲线图;

[0043] 图6是hsa-let-7f用于诊断非小细胞肺癌的ROC曲线图;

[0044] 图7是hsa-let-7b和hsa-miR-25联合用于诊断非小细胞肺癌的ROC曲线图;

[0045] 图8是hsa-let-7b和hsa-let-7f联合用于诊断非小细胞肺癌的ROC曲线图;

[0046] 图9是qPCR验证hsa-let-7b差异表达的结果图;

[0047] 图10是qPCR验证hsa-miR-25差异表达的结果图。

[0048] 图11是qPCR验证hsa-let-7b的诊断效能的ROC曲线图;

[0049] 图12是qPCR验证hsa-miR-25的诊断效能的ROC曲线图。

具体实施方式

[0050] 以下结合附图对本申请的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本申请,并不用于限制本申请。

[0051] 实施例1非小细胞肺癌标志物筛选

[0052] 从GEO数据库下载GSE17681数据,该数据集包括17个非小细胞肺癌(NSCLC)患者和19名非癌症对照的血液样本,对数据集进行取对数处理后使用R语言limma包对其进行差异分析,得到260个差异表达基因,筛选标准为:P.Value<0.05。hsa-let-7b、hsa-miR-25、hsa-let-7f的表达情况如表1、图1-3所示。

[0053] 表1本发明所涉及基因的差异表达数据

基因	AveExpr	t	P.Value
hsa-let-7b	8.958	-2.306	0.027
hsa-miR-25	4.066	2.846	0.007
hsa-let-7f	8.557	-2.593	0.013

[0055] 实施例2诊断效能分析

[0056] 使用R包“pROC”(版本1.15.0)绘制受试者工作曲线(ROC),分析AUC值、敏感性和特异性,判断指标单独或者联合的诊断效能。在判断指标联合的诊断效能时,对各基因的表达水平进行logistics回归,通过拟合出的回归曲线计算出每个个体患癌与否的概率,确定不同的概率划分阈值,根据确定的概率划分阈值,计算得出联合检测方案的灵敏度、特异性以及准确性等。

[0057] 结果:

[0058] hsa-let-7b、hsa-miR-25、hsa-let-7f的诊断效能参见表2、图4-6,通过该结果可知hsa-let-7b、hsa-miR-25、hsa-let-7f对于非小细胞肺癌具有很好的诊断效果。

[0059] 表2、单个基因的诊断效能

基因	AUC	敏感性	特异性
hsa-let-7b	0.721	0.412	0.947
hsa-miR-25	0.847	0.706	0.947
hsa-let-7f	0.834	0.941	0.789

[0061] 基因联合诊断的数据见表3、图7、图8,通过该结果可知,hsa-let-7b+hsa-miR-25联合诊断效果优于单个标志物。

[0062] 表3、基因联合的诊断效能

基因	AUC
hsa-let-7b+hsa-miR-25	0.916
hsa-let-7b+hsa-let-7f	0.796

[0064] 实施例3 qPCR验证

[0065] 一、实验方法:

[0066] 1、样本采集

[0067] 分别收集30例健康人血液样本和30例非小细胞肺癌患者的血液样本,写明样本的详细信息,上述所有标本的取得均通过伦理委员会的同意。

[0068] 2、RNA提取

[0069] 使用Promega公司的血液RNA提取试剂盒提取总RNA。

[0070] 3、逆转录：

[0071] 1) 逆转录反应

[0072] 配制25 μ l反应体系，每个样品取1 μ g总RNA作为模板RNA，在PCR管中分别加入以下组分：DEPC水，5 \times 逆转录缓冲液，10mM dNTP，0.1mM DTT，30 μ M Oligo dT，200U/ μ l M-MLV，模板RNA。

[0073] 反应条件：42 $^{\circ}$ C孵育1h，72 $^{\circ}$ C10min，短暂离心。

[0074] 2) 引物设计

[0075] 根据hsa-let-7b、hsa-miR-25和U6基因的编码序列设计QPCR扩增引物。3) QPCR扩增检验：

[0076] 配制25 μ l反应体系：SYBR Green聚合酶链式反应体系12.5 μ l，正反向引物(5 μ M)各1 μ l，模板cDNA 2.0 μ l，无酶水8.5 μ l。每个样本设置3个平行管，所有扩增反应均重复三次以上以保证结果的可靠性。各项操作均于冰上进行。

[0077] 以SYBR Green作为荧光标记物，在Light Cycler荧光实时定量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， $\Delta\Delta$ CT法进行相对定量。

[0078] 4、统计学方法

[0079] 实验采用3次重复实验，结果数据都是以平均值 \pm 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，两者之间的差异分析采用t检验，认为当P<0.05时差异具有统计学意义。

[0080] 二、实验结果

[0081] 如图9、图10所示，与健康人相比，hsa-let-7b在非小细胞肺癌患者中的表达显著下调，hsa-miR-25在非小细胞肺癌患者中的表达显著上调，差异具有统计学意义(P<0.05)。如表4、表5、图11、图12所示，hsa-let-7b具有较高的诊断效能(AUC为0.753)，hsa-miR-25具有较高的诊断效能(AUC为0.838)，提示hsa-let-7b、hsa-miR-25可用于诊断非小细胞肺癌。

[0082] 表4 hsa-let-7b用于诊断非小细胞肺癌的ROC曲线下方的区域

[0083] 曲线下方的区域

[0084] 检验结果变量:hsalet7b

[0085]	区域	标准误差 ^a	渐近显著性 ^b	渐近 95% 置信区间	
				下限	上限
	.753	.069	.001	.618	.889

[0086] a. 按非参数假定

[0087] b. 原假设:真区域=0.5

[0088] 表5 hsa-miR-25用于诊断非小细胞肺癌的ROC曲线下方的区域

[0089] 曲线下方的区域

[0090] 检验结果变量:hsamiR25

[0091]	区域	标准误差 ^a	渐近显著性 ^b	渐近 95% 置信区间	
				下限	上限
	.838	.061	.000	.719	.956

[0092] a. 按非参数假定

[0093] b. 原假设:真区域=0.5

[0094] 以上结合附图详细描述了本申请的优选实施方式,但是,本申请并不限于上述实施方式中的具体细节,在本申请的技术构思范围内,可以对本申请的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本申请的保护范围。

[0095] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本申请对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0096] 此外,本申请的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本申请的思想,其同样应当视为本申请所公开的内容。

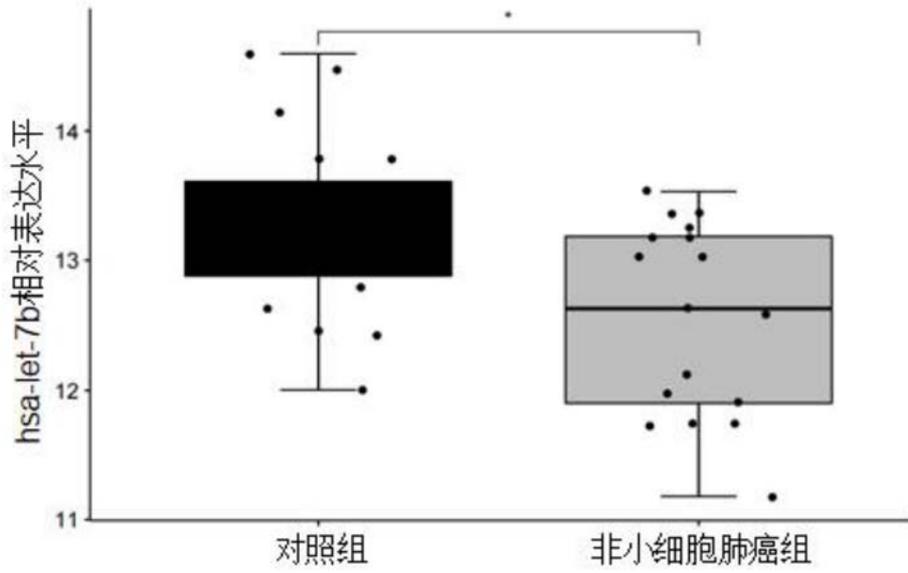


图1

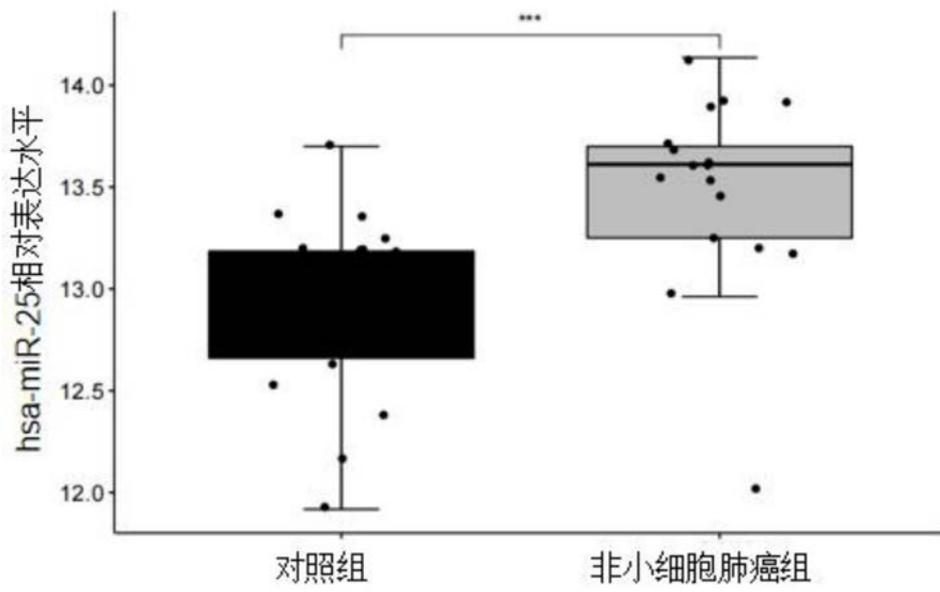


图2

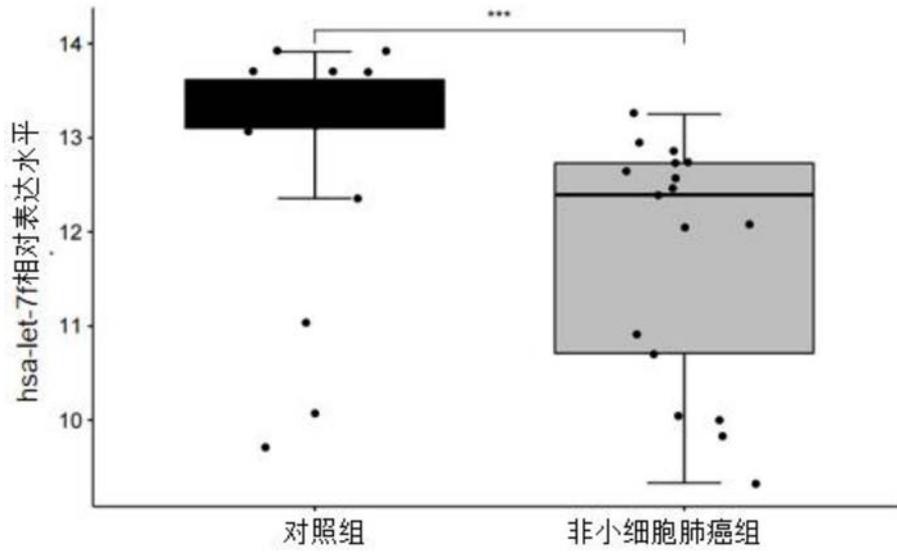


图3

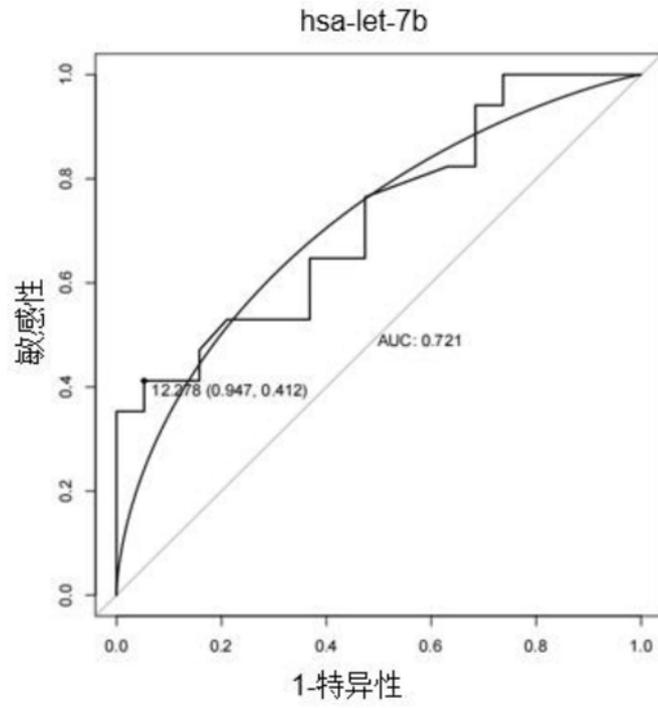


图4

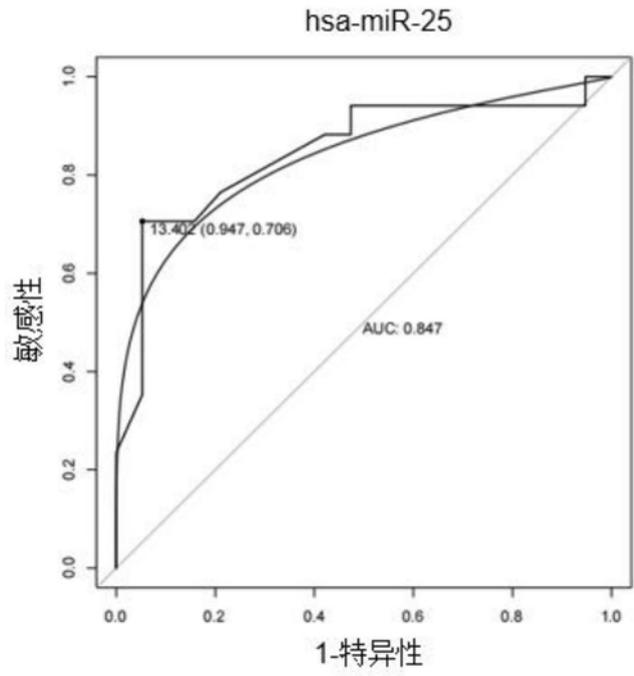


图5

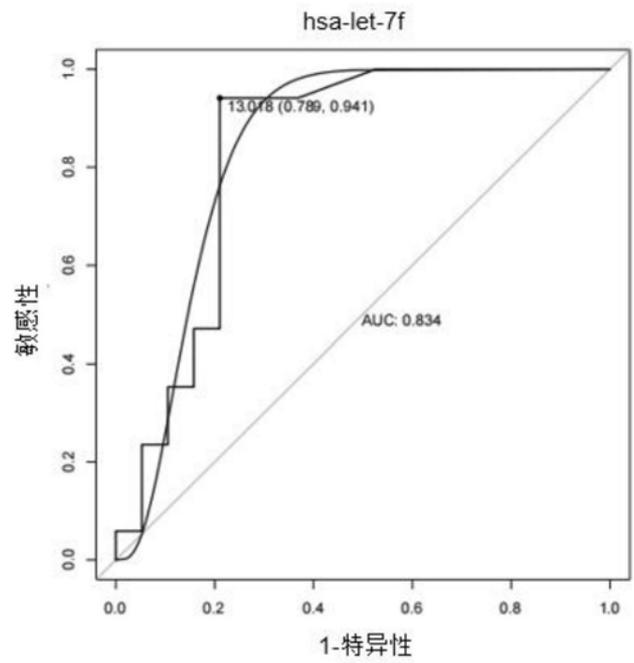


图6

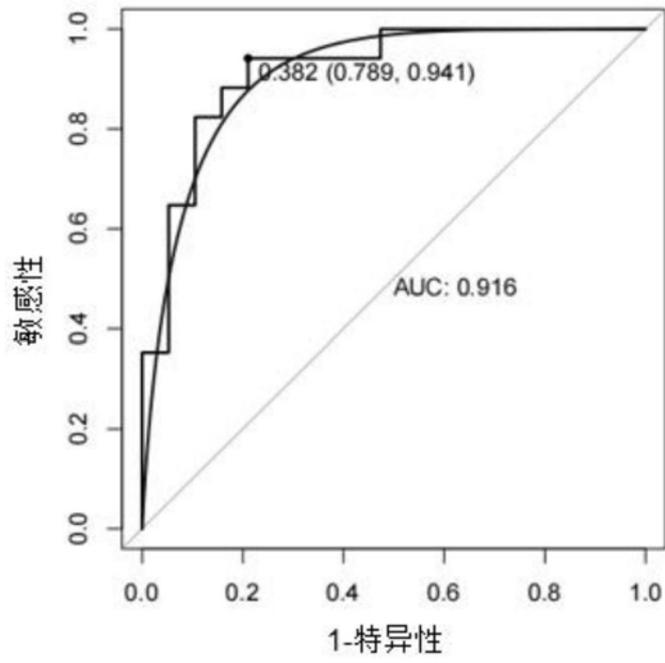


图7

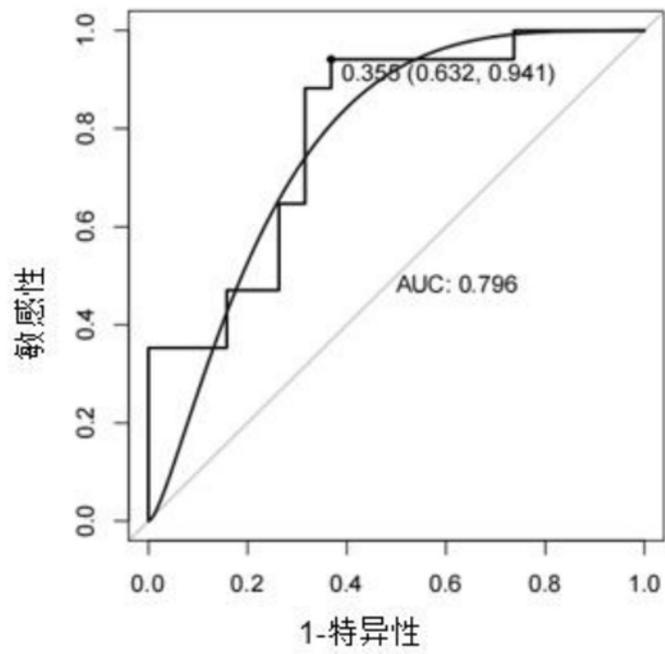


图8

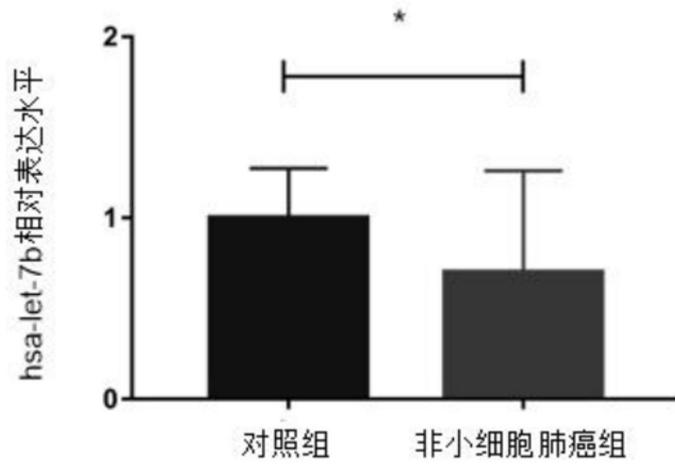


图9

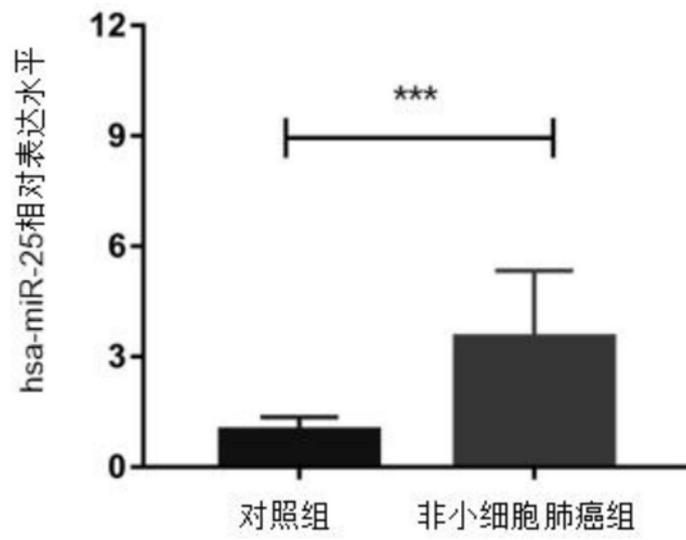


图10

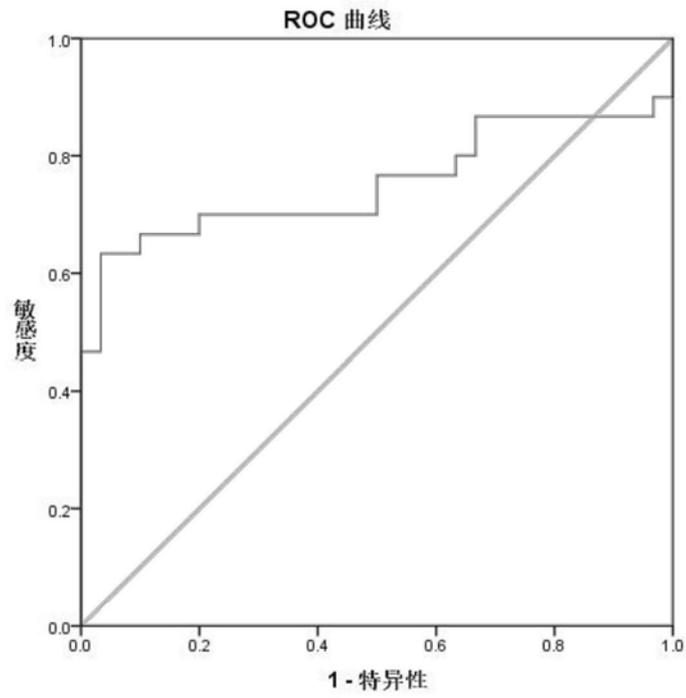


图11

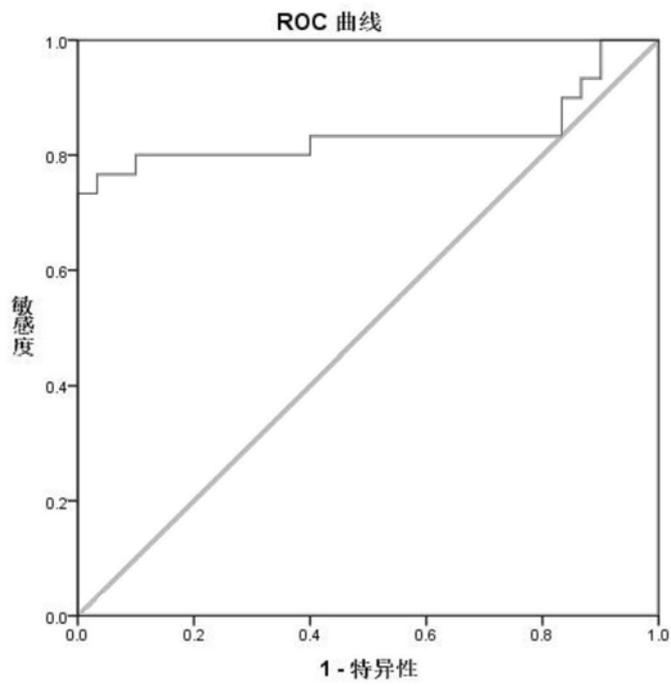


图12