



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102007223 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 18

(21) 申请号 200980112966. 1

(22) 申请日 2009. 02. 27

(30) 优先权数据

61/067, 445 2008. 02. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 10. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/035458 2009. 02. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/108853 EN 2009. 09. 03

(73) 专利权人 俄亥俄州立大学研究基金会

地址 美国俄亥俄

(72) 发明人 C·M·克罗斯 F·派特罗卡

A·维克驰欧尼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007/081740 A2, 2007. 07. 19, 权利要求

9.

Tanzer A, et al..《Molecular Evolution

of a microRNA Cluster》.《J Mol Biol》.2004, 第 339 卷 (第 2 期), 摘要.

Ivanovska I, et al.《MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression》.《Mol Cell Bio》.2008, (第 7 期), 2167-74.

Ivanovska I, et al.《MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression》.《Mol Cell Bio》.2008, (第 7 期), 2167-74.

Kim YK et al.《Processing of intronic miRNAs》.《EMBO》.2007, 第 26 卷 (第 3 期), 第 777 页左栏第 1-2 行、图 3B.

审查员 袁实

权利要求书1页 说明书42页 附图74页

(54) 发明名称

用于胃癌的诊断、预后和治疗的基于微 RNA 的方法和组合物

(57) 摘要

公开了用于胃癌相关疾病的诊断、预后和 / 或治疗的方法和组合物。

1. 用于调控 E2F1 和 BCL2L11 (Bim) 中的一个或多个在胃癌细胞中的表达的组合物,所述组合物包含分离的 miR-106b、miR-93 和 miR-25,其中所述 miR-106b 和 miR-93 以足以在胃癌细胞中下调至少 E2F1 的量存在。

2. 用于测量生物标志物的水平的试剂在制备组合物中的用途,所述组合物用于诊断受试者是否患有胃相关病症或处于发生胃相关病症的风险中,和 / 或确定患有胃癌和 / 或相关病症的受试者的预后,

其中相对于对照样品中相应的生物标志物的水平,来自受试者的测试样品中所述生物标志物的水平的改变表示受试者患有所述病症或处于发生所述病症的风险中,其中所述生物标志物由 miR-106b、miR-93 和 miR-25 组成。

3. miR-106b、miR-93 和 miR-25 在制备组合物中的用途,所述组合物用于调控 TGFE 肿瘤抑制途径,所述途径干扰 E2F1 和 / 或 BCL2L11 (Bim) 的表达。

4. 用于测量至少一个生物标志物的水平的试剂在制备组合物中的用途,所述组合物用于评估疗法预防、诊断和 / 或治疗胃癌相关疾病的有效性,其中所述至少一个生物标志物包括 miR-106b、miR-93 和 miR-25。

5. 权利要求 4 的用途,其中所述疗法中使用的治疗剂包括下列中的一种或多种:药物组合物、营养组合物和顺势疗法组合物。

6. 权利要求 4 的用途,其中被评估的疗法用于人受试者。

7. 用于调控 E2F1 和 BCL2L11 (Bim) 中的一个或多个在胃癌细胞中的表达的组合物,所述组合物包含至少一种载体,所述载体含有分离的 miR-106b、miR-93 和 miR-25。

8. 权利要求 7 的组合物,其中所述载体是慢病毒载体。

用于胃癌的诊断、预后和治疗的基于微 RNA 的方法和组合 物

[0001] 发明者 :Carlo M. Croce, Fabio Petrocca, Andrea Vecchione

[0002] 交叉参考相关申请

[0003] 本申请要求 2009 年 2 月 27 日提交的 PCT 申请 PCT/US2009/035458 (其要求 2008 年 2 月 28 日提交的美国临时申请 61/067, 445 的优先权) 的权益, 其全部公开内容明确地通过引用合并入本文。

[0004] 关于联邦政府资助的研究的声明

[0005] 本发明是在 NCI 基金 CA76259 和 CA8134 下由政府资助进行的。政府在本发明中具有某些权利。

[0006] 本发明的技术领域和工业适用性

[0007] 本发明总地说来涉及分子生物学领域。本发明的某些方面包括在胃癌相关病症的诊断、治疗和预后中的应用。

[0008] 发明背景

[0009] 不承认本部分中公开的背景技术在法律上构成了现有技术。

[0010] 虽然胃癌的发病率在西方国家中从 20 世纪 40 年代至 20 世纪 80 年代下降, 但其在整个世界上仍然是主要的公共卫生问题, 其是世界范围内第二广泛诊断的恶性肿瘤并且在每年的所有癌症相关死亡中占 12% (Uemura 等人, 2001)。95% 以上的胃肿瘤为组织学上分类为肠类型或弥漫型的腺癌 (Lauren P, 1965)。肠肿瘤的发展已被表征为经由许多连续步骤的进展。特别地, 两个事件是胃肿瘤发生的特征 :E2F1 的上调 (Suzuki 等人, 1999) 和 TGFE 抗性的发生 (Ju 等人, 2003 ;Park 等人, 1994)。

[0011] E2F1 是通过反式激活 (transactivating) 许多参与染色体 DNA 复制的基因 (包括其自己的启动子) 来促进 G1/S 转换的细胞周期的主调控剂 (DeGregori, 2002)。虽然 E2F1 的过表达本身是使细胞易于转化的致癌事件 (Pierce 等人, 1999), 但当其在高于临界阈值上发生时, 其也代表了有效的细胞凋亡信号 (Lazzerini Denchi 等人, 2005)。

[0012] 在另一个方面, 转化生长因子- β (TGF β) 是在所谓的形态发生程序 (上皮与间质区室之间的交流 (crosstalk) 的复杂系统, 其指导胃肠细胞朝向增殖、分化或细胞凋亡) 中起主要作用的细胞因子 (van denBrink 和 Offerhaus, 2007)。

[0013] 尽管对治疗此类疾病的疗法进行了相当多的研究, 但仍然难以有效地诊断和治疗它们, 并且在患者中观察到的死亡率表明, 需要改进所述疾病的诊断、治疗和预防。

[0014] 发明概述

[0015] 在第一方面, 本文中提供了诊断受试者是否患有胃相关病症或处于发生胃相关病症的风险中, 确定患有胃癌和 / 或相关病症的受试者的预后和 / 或治疗患有此类病症的受试者的方法, 其包括 : 测量来自受试者的测试样品中至少一个生物标志物的水平, 其中相对于对照样品中相应的生物标志物的水平, 测试样品中生物标志物的水平的改变表示受试者患有所述病症或处于发生所述病症的风险中。

[0016] 在某些实施方案中, 测试样品中至少一个生物标志物的水平低于对照样品中相应

的生物标志物的水平。

[0017] 在某些实施方案中,测试样品中至少一个生物标志物的水平高于对照样品中相应的生物标志物的水平。

[0018] 在某些实施方案中,差异表达的至少一个生物标志物选自图 13-表 1 中所列的组。

[0019] 在某些实施方案中,病症包括慢性胃炎并且至少一个生物标志物选自上调的 miR-1 和 miR-155。

[0020] 在某些实施方案中,病症包括慢性胃炎并且至少一个生物标志物选自下调的 miR-205、miR-203、miR-202、miR-20 和 miR-26b。

[0021] 在某些实施方案中,差异表达的至少一个生物标志物选自图 14-表 2 中所列的组。

[0022] 在某些实施方案中,病症包括胃腺癌并且至少一个生物标志物选自上调的 miR-21、miR-223、miR-25、miR-17-5-p、miR-125b、miR-181b、miR-106a、miR-107、miR-92、miR-103、miR-221、miR-93、miR-100、miR-181、miR-106b、miR-191、miR-214、miR-130、miR-342、miR-222、miR-320 和 miR-99b。

[0023] 在某些实施方案中,病症包括胃腺癌并且至少一个生物标志物选自下调的 miR-136、miR-218、miR-212、miR-96、miR-339 和 miR-130b。

[0024] 在某些实施方案中,差异表达的至少一个生物标志物选自图 16-表 3 中所列的组: miR-21、miR-223、miR-25、miR-92、miR-107、miR-93、miR-106b、miR-17-5p、miR-181b 和 miR-106a。

[0025] 在某些实施方案中,至少一个生物标志物包括 miR-160b-25 簇:miR-106b、miR-93 和 miR-25。

[0026] 在另一个方面,本文中提供了至少一个生物标志物(其包括 miR-160b-25 簇:miR-106b、miR-93 和 miR-25)在调控图 18-表 6 中所列的一个或多个基因:PHLPPL、GM632、ALX4、PLEKHM1、JOSD1、ZFPM2、GATAD2B、ZNF238、ATXN1、NEUROD1、BCL2L11、KLF12、UBE2W、OSBPL5、SNF1LK、PCAF、PAPOLA 和 CFL2 的表达中的用途。

[0027] 在另一个方面,本文中提供了在有此需要的受试者中调控 E2F1 的表达的方法,其包括施用足以调控 E2F1 的表达的有效量的 miR-106b 和 / 或 miR-93 或其功能性变体。

[0028] 在另一个方面,本文中提供了 miR-106b 和 miR-93 用于在有此需要的受试者中调控 E2F1 表达的用途。

[0029] 在另一个方面,本文中提供了调控 TGFE 肿瘤抑制途径(tumor suppressor pathway)(其干扰 CDKN1A(p21Waf1/Cip1)和 / 或 BCL2L11(Bim)的表达)的方法,该方法包括上调 miR-106b、miR-93 和 miR-25 中的一个或多个。

[0030] 在另一个方面,本文中提供了 miR-106b-25 簇在胃癌中在 E2F1 转录后调控和 TGFE 抗性发生的调控中的用途。

[0031] 在另一个方面,本文中提供了用于在有此需要的受试者中控制 E2F1 表达的方法,其包括调控受试者中的 miR-106b 和 miR-93 的水平。

[0032] 在另一个方面,本文中提供了 E2F1 在有此需要的受试者中调控 miR-106b-25 表达(与 Mcm7 平行)的用途。

[0033] 在另一个方面,本文中提供了用于在有此需要的受试者中控制 E2F1 蛋白合成速率,防止其过量积累的方法,所述方法包括调控 miR-106b-25 簇在受试者中的水平。

[0034] 在另一个方面,本文中提供了 miR-106b 和 miR-93 在有此需要的受试者中削弱 TGFE- 诱导的细胞周期停滞的用途。

[0035] 在另一个方面,本文中提供了 miR-106b 和 miR-93 在有此需要的受试者中通过在转录后水平上抑制 p21 的表达干扰 TGFO- 诱导的细胞周期停滞的用途。

[0036] 在另一个方面,本文中提供了 miR-25 与 miR-106b 和 miR-93 在有此需要的受试者中协同阻止 TGFO- 诱导的细胞凋亡的发生的用途。

[0037] 在另一个方面,本文中提供了用于在有此需要的受试者中调控 miR-106b-25 簇的表达以阻止使胃癌细胞免受细胞凋亡的保护作用的方法。

[0038] 在另一个方面,本文中提供了胃癌的独特微 RNA 表达特征 (signature), 其包括调控肿瘤微 RNA 加工的一个或多个生物标志物的表达的改变。

[0039] 在另一个方面,本文中提供了影响胃癌中靶 mRNA 的转录物丰度和 / 或蛋白质表达的方法,其包括使有此需要的受试者中一个或多个微 RNA 失调。

[0040] 在某些实施方案中,所述方法还包括抑制癌症相关基因的蛋白质表达。

[0041] 在某些实施方案中,所述方法还包括改变 miR-106b、miR-93 和 miR-25 中的一个或多个的表达以抑制癌症相关基因的蛋白质表达。

[0042] 在另一个方面,本文中提供了微 RNA 和编码蛋白质的 RNA 的大规模基因表达特征谱分析用于鉴定在人胃癌中发生的微 RNA 功能的改变的用途。

[0043] 权利要求 1 的方法,其包括确定胃癌受试者的预后,包括测量来自受试者的测试样品中至少一个生物标志物的水平,其中 :i) 所述生物标志物与此类癌症中的不利预后相关 ;和 ii) 相对于对照样品中相应的生物标志物的水平,测试样品中至少一个生物标志物的水平的改变表示不利的预后。

[0044] 在某些实施方案中,所述方法还包括诊断受试者是否患有胃癌或处于发生胃癌的风险中,其包括 :1) 从获自受试者的测试样品反转录 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸 ;2) 将靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供测试样品的杂交特征谱 ;和 3) 将测试样品杂交特征谱与从对照样品产生的杂交特征谱相比较,其中至少一个 miRNA 的信号的改变表示受试者患有此类癌症或处于发生此类癌症的风险中。

[0045] 在某些实施方案中,相对于从对照样品产生的信号,至少一个 miRNA 的信号下调,和 / 或其中相对于从对照样品产生的信号,至少一个 miRNA 的信号上调。

[0046] 在某些实施方案中,选自表 13、表 14 和表 16 中所列的组的至少一个生物标志物的信号的改变表示受试者患有具有不利预后的此类癌症或处于发生所述癌症的风险中。

[0047] 在另一个方面,本文中提供了胃病症或疾病的生物标志物,其包括 miR-106b、miR-93 和 mir-25 中的一个或多个。

[0048] 在另一个方面,本文中提供了用于在胃癌细胞中调控蛋白质表达的方法,其包括在胃癌细胞中调控下列中的一个或多个的表达 :miR-106b、miR-93 和 mir-25。

[0049] 在另一个方面,本文中提供了用于在胃癌细胞中调控 E2F1、CDKN1A (p21Waf1Cip1) 和 BCL2L11 (Bim) 中的一个或多个的表达的组合物,所述组合物包括下列中的一个或多个 : miR-106b、miR-93 和 mir-25 或其功能变体。

[0050] 在另一个方面,本文中提供了用于在有此需要的受试者中调控 E2F1 和 p21/WAF1 蛋白水平中的一个或多个的方法,其包括使用下列中的一个或多个 :miR-106b、miR-93 和

mir-25,或其功能性变体中。

[0051] 在另一个方面,本文中提供了用于在有此需要的受试者中增加胃癌细胞中 p21/WAF1 和 / 或 E2F1 蛋白水平的包含反义 miR-106b 的组合物。

[0052] 在另一个方面,本文中提供了治疗患有胃癌的受试者的胃癌的方法,在所述胃癌中至少一个生物标志物在受试者的癌细胞中相对于对照细胞下调或上调,所述方法包括: 1) 当至少一个生物标志物在癌细胞中下调时,给受试者施用有效量的至少一个分离的生物标志物,或其分离的变体或生物学活性片段,以便受试者中癌细胞的增殖被抑制;或 2) 当至少一个生物标志物在癌细胞中上调时,给受试者施用有效量的至少一种抑制至少一个生物标志物的表达的化合物,以便受试者中癌细胞的增殖被抑制。

[0053] 在另一个方面,本文中提供了治疗受试者的胃癌的方法,其包括: 1) 测定相对于对照细胞,胃癌细胞中至少一个生物标志物的量;和 2) 通过: i) 如果癌细胞中表达的生物标志物的量低于对照细胞中表达的生物标志物的量,给受试者施用有效量的至少一个分离的生物标志物;或 ii) 如果癌细胞中表达的生物标志物的量高于对照细胞中表达的生物标志物的量,给受试者施用有效量的至少一种用于抑制至少一个生物标志物的表达的化合物来改变胃癌细胞中表达的生物标志物的量。

[0054] 在另一个方面,本文中提供了用于治疗胃癌的药物组合物,其包含至少一个分离的生物标志物和可药用载体。

[0055] 在某些实施方案中,至少一个分离的生物标志物相应于相对于对照细胞在胃癌细胞中下调的生物标志物。

[0056] 在某些实施方案中,药物组合物包含至少一个 miR 表达抑制剂化合物和可药用载体。

[0057] 在另一个方面,本文中提供了鉴定抗胃癌试剂的方法,其包括给细胞提供测试试剂和测量与胃癌细胞中减少的表达水平相关的至少一个生物标志物的水平,其中相对于对照细胞,细胞中生物标志物的水平的增加表示测试试剂是抗胃癌试剂。

[0058] 在另一个方面,本文中提供了鉴定抗胃癌试剂的方法,其包括给细胞提供测试试剂和测量与胃癌细胞中增加的表达水平相关的至少一个生物标志物的水平,其中相对于对照细胞,细胞中生物标志物的水平的减少表示测试试剂是抗癌剂试剂。

[0059] 在另一个方面,本文中提供了评估疗法预防、诊断和 / 或治疗胃癌相关疾病的有效性的方法,其包括: i) 使动物经历其有效性有待评估的疗法,和 ii) 通过估计表 13、14 和 16 的一个或多个中所列的至少一个生物标志物来测定测试的疗法在治疗或预防疾病中的有效性水平。

[0060] 前述权利要求的方法,其中候选治疗剂包括: 药物组合物、营养组合物 (nutraceutical composition) 和顺势疗法组合物中的一种或多种。

[0061] 在某些实施方案中,待评估的疗法用于人受试者。

[0062] 在另一个方面,本文中提供了制品,其包含: 至少一个结合胃癌相关疾病的标志物的捕获试剂,所述标志物包括表 13、14 和 16 的一个或多个中所列的至少一个生物标志物。

[0063] 在另一个方面,本文中提供了用于筛选治疗胃癌相关疾病的治疗剂的候选化合物的试剂盒,其中试剂盒包括: 表 13、14 和 16 的一个或多个中所列的至少一个生物标志物的一个或多个试剂和表达至少一个生物标志物的细胞。

[0064] 在某些实施方案中,使用包含特异性结合至少一个生物标志物的抗体或抗体片段的试剂检测生物标志物的存在。

[0065] 在另一个方面,本文中提供了干扰胃癌相关疾病应答信号转导途径的试剂用于制造药剂的用途,所述药剂用于治疗、预防、逆转或限制个体中疾病并发症的严重度,其中所述试剂包括表 13、14 和 16 的一个或多个中所列的至少一个生物标志物。

[0066] 在另一个方面,本文中提供了治疗、预防、逆转或限制有此需要的个体中胃癌相关疾病并发症的严重度的方法,其包括:给个体施用干扰至少胃癌相关疾病应答级联的试剂,其中所述试剂包括表 13、14 和 16 的一个或多个中所列的至少一个生物标志物。

[0067] 在另一个方面,本文中提供了干扰至少胃癌相关疾病应答级联的试剂用于制造药剂的用途,所述药剂用于治疗、预防、逆转或限制个体中胃癌相关疾病并发症的严重度,其中所述试剂包括表 13、14 和 16 的一个或多个中所列的至少一个生物标志物。

[0068] 在另一个方面,本文中提供了包含 miR-106b、miR-93 和 miR-25 中的一个或多个的反义抑制剂的组合物。

[0069] 在另一个方面,本文中提供了治疗有此需要的受试者的胃病症的方法,其包括给受试者施用治疗有效量的组合物。

[0070] 在某些实施方案中,预防性施用组合物。

[0071] 在某些实施方案中,组合物的施用延迟了胃癌的一个或多个症状的发作。

[0072] 在某些实施方案中,组合物的施用抑制胃癌的发生。

[0073] 在某些实施方案中,组合物的施用抑制肿瘤生长。

[0074] 在另一个方面,本文中提供了用于检测生物学样品中胃癌的存在的方法,该方法包括:i) 将怀疑包含胃癌的生物学样品暴露于为此的标志物;和 ii) 如果有的话,检测样品中标志物的存在或不存在。

[0075] 在某些实施方案中,标志物包括可检测的标记。

[0076] 在某些实施方案中,所述方法还包括将来自受试者的生物学样品中标志物的量与来自正常受试者的相应生物学样品中标志物的量相比。

[0077] 在某些实施方案中,所述方法还包括在不同时间点从受试者收集多个生物学样品和比较各生物学样品中标志物的量以确定标志物的量在受试者中随时间增加还是减少。

[0078] 在另一个方面,本文中提供了用于治疗受试者的胃癌的方法,所述方法包括:胃癌受体激动剂。

[0079] 在某些实施方案中,受体激动剂是:miR-106b、miR-93 和 miR-25 中的一个或多个的反义抑制剂。

[0080] 在另一个方面,本文中提供了制造用于治疗胃癌的药物的用途,其包含选自下列的核酸分子:表 13、14 和 16 中显示的 miR、来源于其的序列、来自此类 miR 的互补序列和来源于这样的互补序列的序列。

[0081] 在某些实施方案中,所述药物包含提供选自下列的序列的核酸分子:表 13、14 和 16 中所列的 miR、来源于此类 miR 的序列、此类 miR 的互补序列和来源于这样的互补序列的序列。

[0082] 在另一个方面,本文中提供了鉴定诱导胃癌细胞的分化的有效治疗剂或治疗剂的组合的体外方法,该方法包括步骤:i) 培养来源于胃肿瘤细胞, ii) 向细胞系的培养基中

加入至少一种化合物, iii) 分析步骤 (i) 与 (ii) 之间至少一个 miR 的表达水平的变化和 iv) 鉴定诱导步骤 (i) 与 (ii) 之间 miR 的表达水平的改变的化合物或化合物的组合。

[0083] 在某些实施方案中, 步骤 (iii) 包括分析至少一个 miR 的表达水平。

[0084] 在某些实施方案中, 步骤 (iv) 包括鉴定调控至少一个 miR 的表达水平的化合物或化合物的组合。

[0085] 在某些实施方案中, 步骤 (iv) 包括鉴定减少至少一个 miR 的表达水平的化合物或化合物的组合。

[0086] 在某些实施方案中, 化合物是治疗癌症的治疗剂。

[0087] 当根据附图进行阅读时, 根据下列优选实施方案的详细描述, 本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员将变得显然。

[0088] 附图概述

[0089] 本专利或申请文件可包括一个或多个以彩色制成的图和 / 或一个或多个照片。具有彩色附图和 / 或照片的本专利或专利申请公开案的拷贝将应请求且支付必要的费用后由专利局 (Patent Office) 提供。

[0090] 图 1A-1E : 慢性胃炎和胃腺癌中 miRNA 表达的改变。通过 SAM 分析 ($FDR = 0\%$, $q = 0$) 确定, 与慢性胃炎 (图 1A) 或胃腺癌 (图 1B) 显著相关的 MiRNA。红色和绿色分别表示上调和下调。通过苏木素伊红 (H&E) 染色显示正常胃粘膜、慢性胃炎和胃腺癌的代表性组织学特征。图 1C : 包含在 Mcm7 的内含子 13 中的 miR-106b-25 簇基因组基因座的图示。该基因的初级转录物包含融合至单一分子 (我们使用两组不同的引物 (#1 和 #2) 从 Snu-16 细胞逆转录、扩增和测序该分子) 的所有 3 个 miRNA。该分子不仅仅只是 Mcm7 转录的副产品, 因为通过 RNAi 对 Drosha 的下调 (图 1D) 诱导了该转录物的显著积累 (图 1E), 这确认活性初级 miRNA 的存在。误差棒 (bar) 表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。该簇与分别位于 13 号染色体和 X 染色体上的 miR-17-92 和 miR-106a-92 簇共有高度的同源性。颜色标识相同家族的 miRNA。

[0091] 图 2A-2G : E2F1 调控 miR-106b-25 的表达。图 2A : 通过诺考达唑处理 12 小时在有丝分裂中同步化, 然后释放于新鲜培养基中的 AGS 细胞的 FACS 分析。在不同时间点收获细胞, 并且通过 Western 印迹法就 E2F1 蛋白的含量 (图 2B) 以及通过 qRT-PCR 就 Mcm7、miR-106b、miR-93 和 miR-25 前体 RNA 的水平 (图 2C) 对其进行分析。以一式三份进行每一个分析。误差棒表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。将 AGS 细胞以 90% 汇合涂板, 并且于 0.5% FBS RPMI 1640 培养基中饥饿 36 小时。然后以 25 的 M.O.I. 用 adeno-GFP 或 adeno-E2F1 病毒感染细胞, 将细胞再温育另外 21 小时 : 此时, 细胞未展示细胞凋亡的迹象, 如通过形态学、台盼蓝染色和亚二倍体 DNA 含量的分析所测定的 (数据未显示)。如上通过 qRT-PCR 测量 MiR-106b、miR-93 和 miR-25 前体。用抗 E2F1 的 siRNA (100nM) 转染 Snu-16 细胞, 然后在 72 小时后, 如上通过 qRT-PCR 测定 miR-106b-25 前体 (图 2E) 和成熟 (图 2F) 类别的表达。误差棒表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。图 2G : 示于图 9 中的相同胃原发性肿瘤中的 E2F1 蛋白的表达。红圆圈表示 Mcm7 和 miR-106b-25 前体 RNA 在相应的肿瘤中过表达, 如通过 qRT-PCR 测定的。

[0092] 图 3A-3F : E2F1 是 miR-106b 和 miR-93 的靶。图 3A : 通过茎 - 环 qRT-PCR 测定的成熟 miR-106b、miR-93 和 miR-25 在人胃癌细胞系和正常粘膜中的内源性表达 ; 误差棒表

示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。Snu-1 细胞据认为来源于胃神经内分泌肿瘤 (NET)，而 RF1 和 RF48 细胞来自胃的 B 细胞淋巴瘤。所有其他细胞系来自胃腺癌。图 3B：在抑制 miR-106b 和 miR-93 (通过 ASO 转染) 或 (图 3C) 相同 miRNA 的过表达 (通过寡核苷酸转染或 (图 3D) 慢病毒转导) 后 48 小时，Snu-16 细胞的 Western 印迹。乱序的 (scramble) RNA 或 LNA 寡核苷酸用作阴性对照。对蛋白质表达进行定量并且针对 GAPDH 进行标准化。在 AGS 和 MKN-74 细胞中获得相似的结果 (数据未显示)。(图 3E) 萤光素酶测定显示用 pGL3-E2F1-3' UTR 和 miR-106b 或 miR-93 寡核苷酸共转染的细胞中萤光素酶活性减少。与 miRNA 种子区域互补的 3 个假定的 miR-106b/miR-93 结合位点中前 3 个碱基的缺失消除了该效应 (MUT)。误差棒表示针对海肾萤光素酶活性标准化的萤火虫萤光素酶活性 $\pm$ SD。将各报告基因质粒转染至少 2 次 (在不同天) 并且以一式三份测定各样品。图 3F：qRT-PCR 分析显示 E2F1 mRNA 在图 3C 中显示的相同细胞中下调。误差棒表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。

[0093] 图 4A-4E：miR-106b 和 miR-93 抑制 p21 蛋白的表达。图 4A：在使用 miR-106b 和 miR-93ASO (图 4A) 或模拟物 (图 4BA) 进行转染后或在慢病毒转导相同 miRNA (图 4C) 后在 0.5% FBS RPMI 1640 中培养的 Snu-16 细胞中的 p21 表达。图 4D：qRT-PCR 结果显示用 miR-106b 或 miR-93 寡核苷酸转染的 Snu-16 细胞中 p21 mRNA 的水平无显著差异。误差棒表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。图 4E：报告基因测定显示用 pGL3-p21-3' UTR 和 miR-106b 或 miR-93 寡核苷酸共转染的细胞中萤光素酶活性减少。与 miRNA 种子区域互补的 miR-106b/miR-93 的预测的结合位点的前 3 个碱基的缺失消除了该效应 (MUT)。误差棒表示针对海肾萤光素酶活性标准化的萤火虫萤光素酶活性 $\pm$ SD。将各报告基因质粒转染至少 2 次 (在不同天) 并且以一式三份测定各样品。

[0094] 图 5A-5D：miR-106b 和 miR-93 的过表达干扰依赖于 TGFE 的 G1/S 细胞周期停滞。图 5A：Snu-16 细胞对 1ng/ml TGFE 的生理应答：在刺激的早期 (16 小时) 细胞经历 G1/S 细胞周期停滞，同时细胞凋亡 仍然有限，如通过亚二倍体 DNA 含量所测定的。经历细胞凋亡的细胞的数目在随后的数小时内逐渐增加。图 5B：在 TGFE 刺激后 16 小时，E2F1 蛋白和 (图 5C)Mcm7、miR-106b、miR-93 和 miR25 前体下调。误差棒表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。图 5D：用指定的寡核苷酸转染 Snu-16 细胞，并且在 12 小时后用 1ng/ml TGFE 进行处理。上组：p21 蛋白的表达。下组：FACS 分析，使用未配对 t 检验进行模拟物与 miRNA 转染的细胞之间的 G1/S 分数 (fraction) 的比较。

[0095] 图 6A-6F：内源 miR-106b 和 miR-93 的表达的抑制增强依赖于 TGFE 的 G1/S 细胞周期停滞。图 6A：在通过 ASO 转染抑制内源 miRNA 后用 TGFE 处理的 Snu-16 细胞的细胞周期的分析。计算 p 值 (比较 ASO 转染的细胞中的 G1 分数与模拟物转染的细胞中的 G1 分数 (未配对 t 检验)) (图 6B)。用范围从 0.1 至 5.0ng/ml 的梯度剂量 (graded dose) 的 TGFP 处理的 Snu-16 的剂量应答曲线。对内源 miR-106b 或 miR-93 的抑制 (通过 ASO 转染) 恢复了 Snu-16 细胞对 TGFP 剂量的敏感性 (否则它们对所述剂量具有抗性) (0.1-0.3ng/ml)，如通过 FACS 分析所确定的。* 表示 $p < 0.0001$ (图 6C)。分别通过 Western 印迹和 qRT-PCR 进行 p21 蛋白和 (图 6D)p21 mRNA 表达的分析。误差棒表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。TGFP 的存在大大增强了通过抑制内源 miR-106b 和 miR-93 诱导的 p21 蛋白上调的程度，这可能由增加的 p21mRNA 的转录支持。(图 6E) 用单独的抗 p21 的 siRNA 或与

miR-106b 或 miR-93 模拟物组合的所述 siRNA 转染 Snu-16 细胞,然后用 1ng/ml TGFP 处理 16 小时。虽然 miR-106b 丧失了所有其对细胞周期的作用,但 miR-93 在 p21 沉默后仍然保持残留的作用。miR-106b 与 miR-93 之间的该差异应答在统计学上是显著的 ($p = 0.0272$)。(图 6F) 在 TGFP 刺激后通过 Western 印迹分析参与 G1/S 检查点的各种蛋白的表达。

[0096] 图 7A-7G :miR-25 与 miR-106b 和 miR-93 协同阻止 TGFP- 诱导的细胞凋亡的发生。用 miRNA 模拟物转染的 Snu-16 细胞的 CCK-8 活力测定。* 表示在 miR-106b、miR-93、miR-25 和 / 或 miR-106b-25 的转染并且随后用 1ng/ml TGFP 处理 48 小时后活细胞数目的显著差异 ($p < 0.001$)。(图 7B) 相反地,miR-106b、miR-93 和 miR-25 的抑制协同地增强对 TGFP 的应答:在转染三种 ASO 的混合物后达到统计学显著性 ($p < 0.001$)。(图 7C) 通过亚二倍体 DNA 含量的分析确认了活力的显著丧失。(图 7D) 在用 miRNA 模拟物或 ASO 转染后或在慢病毒转导相同的 miRNA 后 48 小时, Snu-16 细胞中 Bim 蛋白的表达。在 AGS 和 MKN-74 细胞中获得了相同的对 Bim 表达的作用(数据未显示)。(图 7E) 萤光素酶测定显示用 pGL3-Bim-3' UTR 和 miR-25 共转染的细胞中萤光素酶活性减少。与 miRNA 种子区域互补的 miR-25 的预测的结合位点的前 3 个碱基的缺失消除了该效应(MUT)。误差棒表示针对海肾萤光素酶活性标准化的萤火虫萤光素酶活性 $\pm$ SD。将各报告基因质粒转染至少 2 次(在不同天)并且以一式三份测定各样品。(图 7F) qRT-PCR 分析显示,在用 miR-25 寡核苷酸转染的 Snu-16 细胞中 Bim mRNA 没有差异(Taqman 探针识别两个主要的同种型 Bim EL 和 Bim L)。误差棒表示针对 U6 标准化的 RNA 表达 $\pm$ SD。(图 7G) 用 miR-25 寡核苷酸、si-Bim、两者或乱序的寡核苷酸转染,然后用 1ng/ml TGFE0 处理 24 小时的 Snu-16 细胞中亚二倍体 DNA 含量的 FACS 分析。统计分析如上。

[0097] 图 8 :E2F1/miR-106b-25/p21 途径。概述本文中描述的 miR-106、miR-93 和 miR-25 的作用机制的模型。

[0098] 图 9A-9D :胃癌中 miR-106b-25 簇的表达。图 9A :用 100nM 指定的 miRNA 寡核苷酸(Ambion)转染 293T/17 细胞,并且通过茎-环 qRT-PCR 测定 miRNA 的表达。MiR-106b、miR-93、miR-25 的引物显示高度的特异性,miR-17-5p 和 miR-92 的引物分别与 miR-106a 和 miR-25 交叉杂交。将结果针对 U6 标准化并且转换成相同的标度(scale)。一组 10 个胃原发性肿瘤和 10 个非肿瘤对照中成熟(图 9B) 和前体(图 9C) miRNA 的表达,如通过 qRT-PCR 测定的。误差棒表示来自相同患者的肿瘤与非肿瘤组织之间的相对倍数改变 $\pm$ SD。以一式三份分析各样品,并且将其针对 RNU49(成熟 miRNA) 或 CAPN2(前体 miRNA 和 Mcm7) 进行标准化:这些基因显示在这些样品中测试的 12 个不同标准化者之间最小的变异性($< 0.4Ct$ 值)。(图 9) 用携带 miR-106b、miR-93、miR-25 或 miR-106b-25 簇的慢病毒载体转导 Snu-16 细胞,然后利用 qRT-PCR 在 72 小时后测量成熟 miRNA 的水平。误差棒表示针对 U6 标准化并且转换成相同标度的 RNA 表达 $\pm$ SD。通过荧光显微镜检查确认转导效率 $> 90\%$ 。在 AGS 细胞中获得相似的结果(数据未显示)。

[0099] 图 10A-10G :具有高 / 低 miR-106b-25(基础条件)的细胞的增殖研究。分别用 miRNA ASO 或模拟物转染的 Snu-16 细胞(图 10A,图 10C) 和 AGS 细胞(图 10B,图 10D) 的 FACS 分析和增殖曲线。(图 10E) 用携带在 CMV 启动子控制之下的 miR-106b、miR-93、miR-25 或 miR-106b-25 前体的荧光慢病毒载体稳定转导的 AGS 细胞的增殖曲线。通过荧光显微镜检查确定感染效率 $> 95\%$ 。(图 10F) 集落形成测定:用编码 miR-106b、miR-93、miR-25

或 miR-106b-25 前体或乱序的序列的 pRetroSuper-Puro 构建体转染 AGS 细胞并且将其在 2 μ g/ml 嘌呤霉素中培养 14 天。利用 Northern 印迹和茎-环 qRT-PCR 测定此类构建体的有效 miRNA 表达和加工（数据未显示）。(图 10G) 通过 RNAi 选择性沉默 p21 或 E2F1 的 Snu-16 细胞的增殖曲线和 (H) FACS 分析。p21 表达的抑制对细胞周期产生了难以与 miR-93 区分的作用。

[0100] 图 11 :在 TGFE 存在的情况下的 MKN-74 细胞的活力测定。用指定的 LNA 寡核苷酸转染 MKN-74 细胞以沉默内源 miRNA 的表达,然后用 TGFE 处理 96 小时。通过 CCK-8 测定确定细胞活力。

[0101] 图 12 :过表达 miR-25 的细胞的膜联蛋白 V (Annexin V) 测定。通过膜联蛋白 V 染色确认示于图 7G 中的结果。

[0102] 图 13 :表 1 :在慢性胃炎与正常胃粘膜中差异表达的 miRNA。

[0103] 图 14 :表 2 :在胃腺癌与非肿瘤胃粘膜中差异表达的 miRNA。

[0104] 图 15 :表 3 :人胃癌细胞系中的微 RNA 表达。

[0105] 图 16 :表 4 :通过 qRT-PCR 验证配对的人原发性肿瘤与非肿瘤对照的微阵列数据。

[0106] 图 17 :表 5 :10 个配对的胃原发性肿瘤和非肿瘤对照中 Mcm7 mRNA 和 miR-106b-25 的表达。

[0107] 图 18 :表 6 :在相同的 3' UTR 上具有假定的 miR-106b、miR-93 和 miR-25 结合位点的人基因。

[0108] 优选实施方案的详述

[0109] 在整个本公开内容中,通过标识引用来引用各种公开物、专利和公开的专利说明书。这些公开物、专利和公开的专利说明书的公开内容通过引用合并入本公开内容以更全面地描述本发明涉及的现有技术。

[0110] E2F1 活性的下调和对 TGFE 的抗性是胃癌的标志。微 RNA (miRNA) 是在人恶性肿瘤中被频繁误调的 (misregulated) 小非编码 RNA。

[0111] 此处我们显示,在人胃肿瘤的亚组中上调的 miR-106b-25 簇与其宿主基因 Mcm7 平行地被 E2F1 激活。反过来,miR-106b 和 miR-93 调控 E2F1 的表达,从而建立了 miRNA-指导的负反馈回路。此外,此类 miRNA 的上调削弱了干扰 CDKN1A (p21Waf1/Cip1) 和 BCL2L11 (Bim) 的表达的 TGFE 肿瘤抑制途径。结合起来,这些结果显示,miR-106b-25 簇参与 E2F1 转录后调控并且可在胃癌中在 TGFE 抗性的发生中起着至关重要的作用。

[0112] 微 RNA (miRNA) 是可控大约 30% 的所有人基因的表达 (通过抑制靶 mRNA 翻译或诱导其降解) 的小非编码 RNA。此类基因在人恶性肿瘤中异常表达,这使得它们的生物学重要性变得日益明显。胃癌引起每年 12% 的所有癌症相关死亡,这要求基于对该疾病发作背后的分子机制的更深刻理解的更好的治疗。

[0113] 此处,我们显示 miR-106b-25 簇的过表达导致重要的癌症相关基因例如 TGFE 效应物 p21Waf1/Cip1 和 Bim 的失调,从而中断了 G1/S 检查点并且赋予对依赖于 TGFE 的细胞凋亡的抗性。

[0114] 我们还显示微 RNA (miRNA) 可参与胃肿瘤发生。MiRNA 是据认为调控达到 30% 的人基因的表达 (通过抑制 mRNA 翻译或诱导其降解) 的非蛋白质编码性基因 (Lewis 等人, 2005)。除了在细胞分化和器官发育中的至关重要的作用外 (Kloosterman 和 Plasterk,

2006), miRNA 在人癌症中被频繁误调 (Lu 等人, 2005 ; Volinia 等人, 2006) 并且它们可充当有效的癌基因或肿瘤抑制基因 (Esquela-Kersher 等人 2006)。

[0115] 此处我们显示 E2F1 调控 miR-106b、miR-93 和 miR-25 (包含在 Mcm7 基因中的一簇内含子 miRNA), 包括它们在胃原发性肿瘤中的积累。反过来, miR-106b 和 miR-93 控制 E2F1 的表达, 从而建立了在阻止 E 2F1 自激活和可能地细胞凋亡中可能是非常重要的负反馈回路。

[0116] 在另一方面, 我们发现 miR-106b、miR-93 和 miR-25 的过表达通过干扰 p21 和 Bim (分别为依赖于 TGFE 的细胞周期停滞和细胞凋亡的两个最下游的效应物) 的合成引起减少的胃癌细胞对 TGFE 的应答。

[0117] 此类 miRNA 促成了癌细胞中 TGFE 抗性的产生, 在本文中本发明者现相信其代表了用于治疗胃癌的新型治疗靶。

[0118] 在下列实施例中进一步解释本发明, 其中, 除非另有说明, 所有部分和百分比以重量计并且温度是摄氏度。应理解, 表示本发明的优选实施方案的这些实施例仅通过举例说明的方式给出。根据上述讨论和这些实施例, 本领域技术人员可以确定本发明的本质特征, 并且无需背离其精神和范围, 可以对本发明进行多种变化和改进以使其适应不同的用法和条件。本说明书中涉及的所有公开物, 包括专利和非专利文献明确地通过引用并入本文。

[0119] 实施例 I

[0120] 人胃癌中 miRNA 表达的失调

[0121] 大多数胃腺癌在通常与幽门螺杆菌 (*Helicobacter Pylori*, HP) 感染相关的慢性炎症背景的环境中发生 (Uemura 等人, 2001)。然而, 导致 HP 致癌性的分子机制仍然不清楚, 尽管 Th1 免疫应答似乎在癌前病变例如胃萎缩和肠化生的发生中至关重要 (Houghton 等人, 2002 ; Fox 等人, 2000)。

[0122] 在搜索可能参与胃肿瘤发生的 miRNA 中, 我们使用定制的 miRNA 微阵列分析了 20 个肠类型的胃原发性肿瘤 (每一个肿瘤与来自相同患者的相邻非肿瘤胃组织配对) 和 6 个胃癌细胞系的总体 miRNA 表达。为了鉴定与炎症和 / 或癌前病变相关的特异改变, 我们首先将具有慢性胃炎的组织学体征的非肿瘤组织 (n = 13) 与另外的正常粘膜 (n = 7) 相比较。通过未配对微阵列显著性分析 (SAM) 显示, 7 个 miRNA 与慢性炎症相关, 包括已知对癌症易感 (Costinean 等人, 2006) 并且在免疫应答的调控中起主要作用 (Rodriguez 等人, 2007 ; Thai 等人, 2007) 的 miR-155 (图 1A, 图 13- 表 1)。

[0123] 然后我们检查了胃原发性肿瘤和癌细胞系的 miRNA 表达特征谱: 通过配对 SAM 显示, 与非肿瘤对照相比较, 总共 14 个 miRNA 在原发性肿瘤中展示了 2 倍或更大的中值过表达 (图 1B, 图 14- 表 2)。在这些 miRNA 中, 除了不表达的 miR-223 以外, 14 个中有 13 个在表达方面排列高于第 80 百分位数 (图 15- 表 3)。只有 5 个 miRNA 在癌症中下调 (图 1B, 图 14- 表 2)。通过茎-环 qRT-PCR 验证了 10 个测试 miRNA 中的 9 个的微阵列数据 (图 16- 表 4)。在被误调的 miRNA 当中, miR-21、miR-223、miR-25 和 miR-17-5p 在肿瘤中显示了最高的过表达, 其分别具有 4.5、4.2、3.7 和 3.7 的中值倍数改变。

[0124] 这些结果表明 miRNA 表达模式的特定改变是人胃癌的特征, 因为肿瘤发生的最早步骤牵涉具有已知的致癌特性的 miRNA 例如 miR-21 (Meng 等人, 2006) 和 miR-17-5p (He 等人, 2005)。

[0125] miR-106b-25 簇在胃癌中过表达

[0126] 在过表达的 miRNA 当中,发现 miR-25 是特别有用的吸引人的候选物,因为其在胃肿瘤发生中起作用。事实上,这是在原发性胃肿瘤中第 3 强上调的 miRNA (中值倍数改变: 3.7;范围 1.0-26.8) 并且在所有人胃癌细胞系中排列在最高表达的 miRNA 之中 (高于第 97 百分位数)。miR-106b (中值倍数改变:2.0;范围 1.0-6.5) 和 miR-93 (中值倍数改变: 2.3;范围 1.0-7.7) 也在原发性肿瘤中上调并且在所有胃癌细胞系中高度表达 (分别高于第 82 百分位数和第 89 百分位数)。

[0127] 这 3 个 miRNA (在下文中 miR-106b-25) 簇集在染色体 7q22 上的 Mcm7 的内含子 13 中并且在 Mcm7 初级 RNA 转录物的背景中活跃地共转录 (Kim 等人,2007 和图 1C-E)。几个研究报导了该区域在胃肿瘤中的扩增 (Weiss 等人,2004;Peng 等人,2003;Takada 等人,2005)。然而,我们在我们的样品中未能检测到 miR-106b-25 基因座的任何扩增 (数据未显示),这暗示着一定有其他机制促成 miR-106b-25 在胃癌中的过表达。

[0128] Mcm7 在 G1/S 期转变中起着中枢作用,其协调染色体 DNA 上的复制叉的正确组装以及确保所有基因组在每一个细胞周期中复制一次并且只复制一次 (Blow 和 Hodgson, 2002)。由于 Mcm7 的过表达已与前列腺和子宫内膜癌中的不良预后相关联 (Ren 等人,2006; Li 等人,2005),因此我们假定 Mcm7 的致癌性可能至少部分地与包含的 miRNA 的过表达关联。此外,miR-106b-25 簇与显示具有致癌作用的 miR-17-92 簇 (He 等人,2005;O'Donnell 等人,2005;Dews 等人,2006) 共有高度的同源性 (图 1C)。

[0129] 然后我们研究 miR-106b-25 簇。我们首先确定茎-环 qRT-PCR 的特异性。用于 miR-106b、miR-93 和 miR-25 的引物是高度特异的,然而 miR-17-5p 和 miR-92 的探针分别与 miR-106a 和 miR-25 交叉杂交 (图 9A)。然后,我们使用茎-环 qRT-PCR 在独立的一组 10 个胃原发性肿瘤 (与来自相同患者的非肿瘤胃粘膜配对) 中测定成熟 miRNA 类别的表达。

[0130] 成熟 miR-106b、miR-93 和 miR-25 分别在 6/10、6/10 和 5/10 的这些肿瘤中过表达,虽然在它们的表达水平中不存在相互关联 (图 9B)。

[0131] 我们通过常规 qRT-PCR 检查了相同肿瘤中 miRNA 前体的水平 (图 9C),我们发现 miR-106b、miR-93 和 miR-25 前体类别在肿瘤中协同表达 [$r(106b/93) = 0.93$; $r(106b/25) = 0.78$; $r(93/25) = 0.88$,图 17-表 5]。

[0132] 在 5 个过表达 miR-106b-25 前体的肿瘤中,3 个肿瘤也表达高水平的成熟 miR-106b、miR-93 和 miR-25,然而剩余的肿瘤展示可变的各成熟 miRNA 的表达,这显示控制个体 miRNA 的另外的转录后调控水平。

[0133] Mcm7 mRNA 也在 5/10 的肿瘤中过表达,这显示与 miR-106b、miR-93 和 miR-25 前体的水平几乎完全相关 (分别地 $r = 0.98$ 、 0.92 、 0.72 ,图 9C 和图 17-表 5)。

[0134] 这些数据显示,miR-106b-25 前体与 Mcm7 mRNA 平行地在胃原发性肿瘤亚组中特异性过表达。虽然我们不能排除 miR-106b-25 具有独立启动子的可能性,但我们的结果显示胃肿瘤中 miR-106b-25 的转录由其宿主基因 Mcm7 驱动。此外,转录后机制也在决定成熟 miR-106b-25 的水平中起主要作用,如最近对于其他 miRNA 所提出的 (Thomson 等人,2006)。

[0135] 负反馈回路控制 E2F1 和 miR-106b-25 的表达。

[0136] E2F1 是反式激活参与染色体 DNA 复制的众多基因 (Johnson 和 DeGregori,2006) (包括 Mcm7 (Suzuki 等人,1998;Arata 等人,2000)) 的转录因子。在本文中本发明者现相

信,miR-106b-25 的转录可类似地受 E2F1 调控。为了进行检测,我们首先确定 E2F1 蛋白水平的内源性波动是否相应于 Mcm7 和 miR-106b-25 表达的相似变化。有趣地,通过诺考达唑处理 12 小时而在有丝分裂中停滞的 AGS 胃癌细胞不表达 E2F1 蛋白并且显示 Mcm7 转录物 (2 倍) 以及 miR-106b、miR-93 和 miR-25 前体 (分别地 4.0、5.2 和 12.0 倍) 的减少 (与指数生长的细胞相比)。当细胞被释放并且重新进入 G1 期时,E2F1 表达平行于 Mcm7、miR-106b、miR-93 和 miR-25 前体 RNA 的再积累。(图 2A-C)。

[0137] 该过程与 E2F1 表达直接相关,因为其特异性过表达 (通过腺病毒转导) (图 2D) 或沉默 (通过 RNA 干扰) (图 2E) 也诱导了 miR-106b-25 前体水平的一致改变。E2F1 功能的丧失也在 72 小时后影响成熟 miRNA 的表达 (图 2F)。

[0138] 为了进一步在体内验证数据,我们通过 Western 印迹分析了 E2F1 蛋白在 10 个原发性胃肿瘤中的表达并且发现 E2F1 蛋白与 Mcm7/miR-106b-25 前体表达之间的正相关 (图 2G)。事实上,5 个过表达 E2F1 的肿瘤中有 4 个展示更高水平的 Mcm7 和 miR-106b-25 前体 (图 9C)。在这些肿瘤中,3 个肿瘤也过表达成熟 miR-106b、miR-93 和 miR-25 (图 9B)。然而,一个肿瘤显示 Mcm7 和 miR-106b-25 前体上调,而无可检测的 E2F1 水平,这显示其他转录因子也参与了 miR-106b-25 的调控。

[0139] 这些结果表明 E2F1 同时调控 miR-106b-25 和 Mcm7 的表达,从而显示,胃癌中此类 miRNA 的过表达至少部分因 E2F1 的上调而引起。

[0140] 最近,已提出 miR-17-5p 为 E2F1 的新转录后调控剂 (O' Donnell 等人,2005)。鉴于 miR-17-5p、miR-106b 和 miR-93 序列之间的相似性,我们探究了 miR-106b 和 miR-93 可能也参与 E2F1 表达的调控的可能性。因为这些 miRNA 广泛地在一组 12 个胃癌细胞系中表达 (通过 qRT-PCR 进行分析) (图 3A),所以我们采用功能丧失法来拮抗 miR-106b-25。抗 miR-106b 和 miR-93 的 LNA 反义寡核苷酸 (ASO) 的转染在 Snu-16 细胞中诱导 E2F1 蛋白的积累,这表明此类 miRNA 的内源水平控制其表达 (图 3B)。

[0141] 此外,通过寡核苷酸转染或慢病毒转导产生的此类 miRNA 的过表达 (图 9D) 明确地减少 Snu-16 和 AGS 胃癌细胞系中 E2F1 蛋白的水平 (图 3C 和图 3D) 并且抑制含有 E2F1 3' UTR 的报告基因载体的表达。报告基因载体中预测的 miRNA 结合位点的突变消除该效应,从而表明 miR-106b 和 miR-93 直接与 E2F1 3' UTR 相互作用 (图 3E)。然而,在 miR-106b 和 miR-93 转染后,E2F1 mRNA 减少 2 倍,这可能是由于部分 mRNA 降解或 E2F1 转录激活子的下调 (图 3F)。

[0142] 已争辩,miR-17-5p 可能通过抑制实际上激活 E2F1 转录并且也是 miR-17-5p 的靶的 AIB-1 蛋白来间接地抑制 E2F1 表达 (Hossain 等人,2006)。虽然 miRNA 作用于相同途径内的不同靶是非常合理的,但我们分析了 AGS 和 Snu-16 细胞中 AIB-1 蛋白的水平,并且我们发现,在分别用 miR-106b 或 miR-93 转染的细胞中水平微小减少或根本无差异,这显示 AIB-1 是 miR-106b 的真正低亲和力的靶,其可能只部分地促成 E2F1 的下调 (图 3C)。

[0143] 总的来说,这些结果显示 E2F1 调控 miR-106b-25 的表达但也是 miR-106b 和 miR-93 的靶,从而建立了胃癌细胞中的负反馈回路。因为已知 E2F1 通过正反馈回路自激活其自己的启动子,因此此类 miRNA 可控制 E2F1 蛋白合成的速率,从而阻止其过度积累,如最近对于同源物 miR-17-5p 和 miR-20a 所提出的 (Sylvestre 等人,2007 ;Woods 等人,2007)。

[0144] miR-106b 和 miR-93 削弱 TGFE- 诱导的细胞周期停滞。

[0145] 这些结果显示当细胞退出有丝分裂并且重新进入 G1 期时, E2F1 迅速诱导 miR-106b-25 的转录。在此基础上, 我们假设 miR-106b-25 与 E2F1 理想地协同抑制 G0/G1 相关活性的可能作用。因此, 我们探询 TargetScan 数据库以寻找已知受 E2F1 负调控的基因, 并且我们将 CDKN1A(p21) 鉴定为 miR-106b 和 miR-93 的假定的靶。该基因, 通常在人癌症中功能失调, 是细胞周期的关键抑制剂 (Mattioli 等人, 2007)。有趣地, 我们确认在 Snu-16 细胞中内源表达的 miR-106b 和 miR-93 转录后调控 p21。事实上, 它们的抑制 (通过 ASO) 增强了 p21 蛋白的表达 (图 4A)。相反地, 通过寡核苷酸转染 (图 4B) 或慢病毒转导 (图 4C) 获得的 miR-106b 和 miR-93 的上调抑制 p21 蛋白的表达而不显著改变 p21 mRNA 的水平 (图 4D)。此外, miR-106b 和 miR-93 模拟物抑制含有 p21 3' UTR 的报告基因载体的表达, 而预测的 miRNA 结合位点的突变消除该效应 (图 4E)。

[0146] 鉴于 p21 在细胞周期调控中的重要性, 我们决定阐明 miR106b-25 在控制胃癌细胞增殖中的作用。出人意料地, 通过 ASO 转染诱导的 miR-106b、miR-93 和 / 或 miR-25 的功能丧失不产生 Snu-16 细胞的细胞周期和增殖的任何显著变化 (图 10A 和图 10C)。类似地, 通过寡核苷酸转染或慢病毒转导产生的所述 3 个 miRNA 的过表达不显著改变 AGS 细胞的增殖速率和集落形成效率, 虽然我们注意到在 miR-93 过表达时有限的但可重现的细胞周期干扰 (+8% 的 S 期细胞, 图 10B、10D 和 10E)。

[0147] 我们使用 GTL-16 和 MKN-74 胃癌细胞系获得相似的结果 (数据未显示), 这表明 miR-106b-25 的功能不是胃癌细胞体外存活和增殖所必需的。然而, 通过 RNAi 对 p21 或 E2F1 的特异性沉默同样没有产生增殖的显著改变 (图 10G 和 10H), 从而确认这些癌症细胞系不对 p21 基础水平作出响应并且可很好地补偿 E2F1 表达的缺失。

[0148] 然后我们阐明 miR-106b-25 在 TGF β 0 存在的情况下的作用: 该细胞因子, 通过诱导 p21 和其他抗增殖分子的表达, 在胃肠道中适时确保成熟细胞的协同的细胞周期停滞和细胞凋亡, 从而控制上皮细胞的生理更新 (van den Brink 和 Offerhaus, 2007)。该至关重要的肿瘤抑制途径的削弱是胃癌的标志 (Ju 等人, 2003 ; Park 等人, 1994)。然而, Snu-16 细胞是在体外仍然对相对高剂量的 TGF β 0 作出响应, 经历 G1/S 停滞和随后大量细胞凋亡的少数胃癌细胞系之一 (Ohgushi 等人, 2005 和图 5A)。然而, 细胞活力在 24 小时后降低, 这打开了研究与 TGF β 0 相关的早期分子变化的窗口。

[0149] 有趣地, 使用 TGF β 0 的刺激在 16 小时后 (此时细胞生理性经历 G1/S 停滞) 诱导 E2F1 蛋白、Mcm7 mRNA 和 miR-106b-25 前体的显著下调, 这表明此类 miRNA 的下调是对 TGF β 0 的生理响应的一部分 (图 5B 和 5C)。为了确定该过程的重要性, 我们在 TGF β 0 存在的情况下通过在 Snu-16 细胞中引入 miR-106b、miR-93 和 / 或 miR-25 模拟物来中和 miR-106b-25 的下调。值得注意地, miR-93 的过表达完全消除 TGF β 0 诱导的细胞周期停滞, 而 miR-106b 部分地减少该效应 ($p < 0.0002$), 与由此类 miRNA 诱导的 p21 下调的程度一致 (图 5D)。

[0150] 相反地, 通过 ASO 拮抗内源 miR-106b 和 miR-93 的表达显著增加经历依赖于 TGF β 0 的细胞周期停滞的 Snu-16 细胞的数目 ($p < 0.0013$) 并且恢复了细胞对亚适量的 TGF β 0 的敏感性 ($p < 0.0001$) (否则这些细胞对所述剂量具有抗性) (图 6A 和 6B)。

[0151] 因此, 在 TGF β 0 存在的情况下通过抑制内源 miR106b 和 miR-93 获得的 p21 上调的程度 (图 6C) 是基础条件下的 2 倍 (图 4A), 这可能由 p21 mRNA 的活跃转录支持 (图 6D)。

[0152] 为了确定 p21 在诱导与 miR-106b 和 miR-93 的功能获得 / 丧失相关的表型中的

作用,我们通过 RNAi(si-p21) 在用 TGFP 处理的 Snu-16 细胞中特异性沉默 p21。这几乎全面概括了 miR-106b 和 miR-93 的过表达对细胞周期分布的作用(图 5D),然而 si-p21 与 miR-106b 和 miR-93 的共转染显著减少了此类 miRNA 对 TGFO 诱导的细胞周期停滞的作用,这表明 p21 是该生物学背景中的主要靶(图 6E)。然而,在 p21 不存在的情况下仍然可观察到 miR-93 对依赖于 TGFO 的细胞周期停滞的小的但统计学上显著的作用($p = 0.0272$),这暗示着其他直接或间接的靶与 p21 协同作用。参与 G1/S 检查点的基因的的表达的分析将 p27 指定为 miR-93 的可能的间接靶(图 6F)。

[0153] 这些数据显示 miR-106b 和 miR-93 主要通过转录后水平上抑制 p21 的表达来干扰 TGFO 诱导的细胞周期停滞。然而,不依赖于 p21 的途径也可参与传递 miR-93 对细胞周期控制的完全作用。

[0154] miR-25 与 miR-106b 和 miR-93 协同阻止 TGFO 诱导的细胞凋亡的发生。

[0155] 这些结果显示 miR-106b 和 miR-93 在 TGFP 刺激的早期调控细胞周期停滞的作用。我们分析在延长的对 TGFP 的暴露(其最终导致细胞凋亡)后的 miR-106b-25 的功能(Ohgushi 等人,2005,和图 5B)。

[0156] 我们通过四唑还原测定检查用 TGFP 刺激 24 至 48 小时的 Snu-16 细胞的活力。miR-106b、miR-93 和/或 miR-25 模拟物在此类细胞中的引入诱导显著的对 TGFP 的抗性(图 7A)。相反地,当所有 3 种 miRNA 同时被抑制时,ASO 转染在活细胞数目方面诱导了达到统计学显著性($p = 0.003$)的负趋势(图 7B)。该结果通过 FACS 分析得到证实,其显示在沉默 3 种 miRNA 后亚二倍体细胞的数目显著增加($p < 0.001$)。此外,该测定的更高的灵敏度允许检测在 miR-106b、miR-93 或 miR-25 的个别抑制后亚二倍体细胞的百分比的更小但显著的变化($p < 0.001$)(图 7C)。最后,miR-106b-25 的沉默部分恢复对 TGFE 的敏感性(否则 MKN-74 细胞对其具有抗性)(图 11)。结合起来,这些结果与其中内源 miR-106b、miR-93 和 miR-25 协同调控一个或多个介导依赖于 TGFE 的细胞凋亡的靶的表达的模型相符。

[0157] 我们搜索 TargetScan 数据库以寻找细胞凋亡的效应物,并且我们在 18 个同时具有假定的 miR-106b、miR-93 和 miR-25 结合位点的人基因中将 BCL2L11(Bim)鉴定为唯一的候选物(图 18-表 6)。Bim 是通过激活促凋亡分子如 Box 和 Bad 以及拮抗抗凋亡分子如 Bcl2 和 Bcl1 来在多种组织中关键性地调控细胞凋亡的仅 BH3 的蛋白(BH3-only protein)(Gross 等人,1999)。为了正确地调控细胞凋亡,Bim 与其伴侣蛋白的细胞内浓度的精细平衡是至关重要的。Bim 是单倍不足的并且单个等位基因的失活甚至在不丧失另一个等位基因的情况下也可加速小鼠中 Myc 诱导的肿瘤的发生(Egle 等人,2004)。值得注意的是,Bim 是 TGFE 途径的最下游细胞凋亡效应物并且其下调在 Snu-16 细胞中消除了依赖于 TGFE 的细胞凋亡(Ohgushi 等人,2005)。

[0158] 我们确定了 Bim 是否是 miR-106b-25 的直接靶。Snu-16 细胞表达 Bim 的所有 3 个主要的同种型,即 Bim EL、Bim L 和 Bim S。有趣地,通过 ASO 转染拮抗内源 miR-25 在 Snu-16 细胞中诱导了所有 3 个同种型的积累,而通过寡核苷酸转染或慢病毒转导产生的 miR-25 的过表达减少了它们的表达。相反地,miR-106b 和 miR-93 在所有 3 个测试的胃癌细胞系中不影响 Bim 的表达(图 7D)。

[0159] 虽然 miR-106b 和 miR-93 与 miR-25 在其他组织中协同调控 Bim 的表达仍然是可能的,但这支持其中细胞凋亡的多个效应物在胃癌中被 3 个 miRNA 中的每一个协同抑制的

模型。

[0160] 我们关注于作为此类细胞凋亡效应物之一的 Bim 并且通过萤光素酶测定确定,在其 3' UTR 上的 miR-25 的预测的结合位点介导靶识别和随后的翻译抑制(图 7E)。此外, Bim EL 和 Bim L mRNA 的水平在 miR-25 过表达后在 Snu-16 细胞中未发生改变,这标示着转录后调控机制(图 7F)。

[0161] 为了确定与 miR-25 的特异性抗细胞凋亡功能相关的 Bim 下调的重要性,我们使用抗其 3 个主要同种型的 siRNA (si-Bim, 图 7D) 在 Snu-16 细胞中抑制 Bim 蛋白,然后我们用 TGFE 处理这些细胞 24 小时。值得注意地,由 si-Bim 和 miR-25 赋予的免受细胞凋亡的保护作用非常相似,如通过亚二倍体 DNA 含量和膜联蛋白 V 染色所测定的。此外, Bim 和 miR-25 的共转染不具有显著的累加效应 ($p = 0.6328$),这表明 Bim 下调在过表达 miR-25 的细胞中是对 TGFE 诱导的细胞凋亡的抗性的主要机制(图 7G 和图 12)。

[0162] 我们显示,被 E2F1 激活并且在人胃腺癌中上调的 miR-106b-25 簇改变了胃癌细胞对造成细胞周期停滞和细胞凋亡的 TGFE 的生理应答(图 8)。

[0163] 这些发现在胃癌模型中具有特别的意义,因为 TGFE 肿瘤抑制途径的削弱是胃肿瘤发生中的至关重要的步骤。

[0164] 讨论

[0165] 我们在胃癌发生的不同步骤中进行 miRNA 表达的基因组范围的分析。因为绝大多数胃肿瘤源于慢性炎症背景 (Uemura 等人, 2001), 因此我们考虑区分癌前改变与肿瘤特异性改变的特定关联。

[0166] 我们第一次鉴定了迄今为止一直被忽略的 miRNA 簇在人肿瘤中的特异性过表达。虽然我们关注于胃癌,但 miR-106b、miR-93 和 miR-25 在其他类型的癌症中的过表达也可能是共同的(但仍然被低估的)事件。

[0167] 事实上,miR-106b-25 的表达与参与细胞增殖的基础机制的 E2F1 和 Mcm7 的表达密切相关。例如, Mcm7 通常在前列腺癌中过表达 (Ren 等人, 2006) 并且,事实上,我们之前在对该类型的癌症的大规模 miRNA 研究中描述了 miR-25 的上调 (Volinia 等人, 2006)。此外,我们显示,通常用于测定 miR-92 (其在大多数肿瘤中过表达 (Volinia 等人, 2006)) 的表达的茎-环 qRT-PCR 探针,与 miR-25 交叉杂交。然而,鉴于几乎相同的序列,miR-106b-25 和 miR-17-92 极可能协同发挥相似的(如果不相同的话)功能:事实上,我们发现 miR-17-5p、miR-18a 和 miR-20a 也抑制 p21 的表达,而 miR-92 抑制 Bim 的表达 (F. P. 和 A. V., 未公布的数据)。此外,miR-106b-25 和 miR-17-92 都受 E2F1 调控。然而此类簇也展示一些差异。例如,miR-106b 与 miR-17-5p 相似,但其短 3 个核苷酸:据报导 3' 末端中的特定序列可确定 miRNA 的细胞内定位 (Hwang 等人, 2007)。此外,miR-19 家族不由 miR-106b-25 簇代表 (图 2A)。

[0168] 在另一方面,miR-93 属于 miR-372 和 miR-373 的相同家族:这 3 个 miRNA 在睾丸生殖细胞肿瘤中过表达,在所述细胞中它们减少 LATS2 的表达,从而使细胞对高 p21 水平不敏感 (Voorhoeve 等人, 2006)。

[0169] 如本文中所显示的,miR-93 在相同的途径中起作用,直接靶向 p21 的表达。因此,现相信该 miRNA 家族参与调控细胞周期的至关重要的中枢的控制并且可在癌症中具有特殊关联性。

[0170] 此外, miR-93 与 miR-291-3p、miR-294 和 miR-295 共有高度序列同源性; 此类 miRNA 在多能性 ES 细胞中特异性表达并且它们在分化后沉默或下调 (Houbaviy 等人, 2003)。然而不希望受理论束缚, 本发明者在本文中现相信, 此类 miRNA 可类似地参与 p21 的调控。

[0171] 本发明者显示, miRNA 通过不同机制在细胞周期的控制中起作用。在 E2F1 的情况下, miRNA 显示主要在调控性、冗余反馈回路的背景中起作用。事实上, 位于分开的 miRNA 簇上的 miR-106b、miR-93、miR-17-5p 和 miR-20a 受 E2F1 调控并且可能协同抑制其翻译。

[0172] 同时, 我们发现此类 miRNA 参与 p21 表达的控制和对 TGFE 的早期应答。本发明者还相信, 它们也控制汇聚于 p21 上的其他肿瘤抑制途径。由于突变、缺失、超甲基化、泛素化或错误定位 (mislocalization) 而产生的 p21 功能丧失是人胃癌中的常见事件和不利预后因素 (Mattioli 等人, 2007)。然而, 之前从未探究过 miRNA 在 p21 调控中的作用。因为 80% 的研究的胃原发性肿瘤不表达可检测水平的 p21 蛋白, 因此我们不能确定 miRNA 与 p21 蛋白表达之间的负相关。然而, 原发性肿瘤中的 p21 mRNA 水平通常与正常组织相当, 这表明转录后调控是胃癌中 p21 下调的常见原因 (F. P 和 A. V., 未公布的数据)。

[0173] 有趣地, p21 表达的诱导似乎是在 TGFE 刺激的早期引发 miR-106b/miR-93 相关应答的前提条件。相反地, 通过 RNAi 沉默 p21 显著地减少了此类 miRNA 对细胞周期的作用。虽然通过计算机方法预测了每一个 miRNA 的数百个不同的靶, 但存在日益增加的证据表明, “主要的 miRNA 靶” 对于特定生物学功能可能是至关重要的。例如, miR-10b 增强乳腺癌细胞的细胞运动性和侵袭力, 但该表型在其靶 HOXD10 的组成型表达后被完全回复, 尽管对于该 miRNA 预测了 100 多个靶 (Ma 和 Weinberg, 2007)。当然, 要指出的是, 这些观察不排除其中多个靶受单个 miRNA 的平行调控是发挥特定功能所必需的其他背景。此外, 多个 miRNA 可协同发挥相同的功能。

[0174] 这在 miR-106b-25 簇的情况下是保护胃癌细胞免受细胞凋亡。这样的作用在协同抑制不同促凋亡分子的表达的 3 个 miRNA 之间分配。我们将 Bim (TGFE 途径的最下游的细胞凋亡效应物 (Ohgushi 等人, 2005)) 鉴定为 miR-25 的关键靶。这在胃癌模型中具有特别的意义。事实上, TGFE 是胃动态平衡 (homeostasis) 的主要调控剂之一并且在通过细胞凋亡调控上皮细胞的生理更新中是必需的 (van den Brink 和 Offerhaus, 2007)。虽然 miR-106b 和 miR-93 的促凋亡靶的身份 (identify) 仍然不清楚, 但我们可清楚地检测到分别与 miR-106b、miR-93 和 / 或 miR-25 的过表达和抑制相关的抗凋亡和促凋亡应答; 这些特性出现在 TGFE 刺激的后期, 此时细胞周期停滞消除并且细胞凋亡成为占优势的过程 (其表征了胃细胞对 TGFE 的应答)。当 3 种 ASO 被一起递送时, 可通过分析亚二倍体 DNA 含量容易地检测到的、在抑制单个 miRNA 后观察到的小的但显著的改变获得生物学一致性, 这确认了这些成簇的 miRNA 之间的协同关系。

[0175] 虽然通过四唑还原测定和亚二倍体 DNA 含量的分析在用单个 ASO 转染的 TGFE 刺激的细胞中观察到负趋势, 但这在四唑还原测定中未达到统计学显著性。这归咎于与该测定相关的 5-10% 的标准误差, 该标准误差在统计上排除更小的差异。相反地, 亚二倍体 DNA 含量的分析中的标准误差在我们的手中低于 2%。

[0176] 当我们在原发性肿瘤中观察 Bim 表达时, 我们注意到与正常组织相比普遍的过表达 (F. P. 和 A. V. 未公布的数据)。这与之前显示致癌胁迫 (oncogenic stress) 诱导 Bim

作为防止异常增殖的保卫机制的研究相符。特别地,Bim 在 Myc 转基因小鼠中过表达,这决定了正常细胞的大量细胞凋亡。然而,肿瘤在这些小鼠中的发生与一个 Bim 等位基因的缺失(Bim 变得不足)一致。尽管如此,与未经历致癌胁迫的健康组织相比较,Bim 仍然明确地在肿瘤中过表达(Egle 等人,2004)。因此,难以确定低于其发生 Bim 的不足的阈值,从而需要可选择的策略来确定 miR-25 上调在体内的重要性。

[0177] 已描述了导致癌症中 Bim 下调的几个机制(从转录调控至蛋白降解)(Yano 等人,2006;Tan 等人,2005)。虽然所有这些机制明确地促成了 Bim 沉默,但我们提出 miR-25 干扰作为胃癌中 Bim 的转录后调控的新机制。

[0178] miRNA 是否是恰当的细调分子或它们是否用作关键基因开关一直存在广泛争议。最近的研究表明,取决于特定的生物学背景,两个假说都可能是正确的。从这个角度看,miRNA 在癌症中的治疗潜能可以与依赖于特定 miRNA 的功能变化的发生严格相关。了解肿瘤相关 miRNA 的作用机制在建立依赖于 miRNA 的肿瘤的分子诊断,允许合理地选择最终对基于 miRNA 的疗法应答的患者中是有用的。

[0179] 实验方法

[0180] 细胞培养和处理:

[0181] 所有细胞系获自 ATCC 并且培养在补充有 10%胎牛血清、青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基中。用 Lipofectamine 2000(Invitrogen),使用 100nM 微 RNA 前体(Ambion)、100nM si-p21(Santa Cruz)、100nM si-Bim(Cell Signalling)或 100nM LNA 微 RNA 反义寡核苷酸(Exiqon)转染细胞。在指定的时间收集蛋白质裂解物和总 RNA。通过 Northern 印迹和茎-环 qRT-PCR 验证 MiRNA 的加工和表达。我们使用 BLOCK-IT Fluorescent Oligo(Invitrogen)验证所有细胞系的转染效率(>95%)。

[0182] 为了进行同步化实验,将 AGS 细胞在含有 0.03Pg/ml 诺考达唑的 10% FBS RPMI 1640 中培养 12 小时,然后释放在新鲜培养基中。通过 FACS 分析跟踪通过细胞周期的进展直至 8 小时,之后细胞迅速丧失同步化。

[0183] 为了进行 TGFE 实验,在 6 孔板中使用 5ul Lipofectamine 2000 和 100nM miRNA 前体(Ambion)或 LNA 反义寡核苷酸(Exiqon)在 1:1 的 Optimem(GIBCO)和 RPMI 1640 10% FBS(Sigma)的混合物中转染 2×10^6 个 Snu-16 细胞。12 小时后,用含有 1ng/ml 人重组 TGFE1(Sigma)的 RPMI 1640 10% FBS 替换培养基。按照制造商的说明书,使用 WST 四唑盐(CCK-8,Dojindo)测定活细胞的数目。以一式三份进行所有实验。结果表示为平均值 $\pm$ SD。

[0184] qRT-PCR:

[0185] 按照制造商的说明书(Applied Biosystems, Foster City, CA),分别使用单管 TaqMan MicroRNA Assays 和 Gene Expression Assay 来测定成熟 miRNA 和其他 mRNA。在 GeneAmp PCR 9700 Thermocycler(Applied Biosystems)上进行所有 RT 反应,包括无模板对照和 RT 阴性对照。使用 NanoDrop(NanoDrop Technologies, Inc.)测定 RNA 浓度。将样品针对 RNU49 或 CAPN2(Applied Biosystems)进行标准化,如所指定的。使用 ABI Prism 7900HT Sequence 检测系统(Applied Biosystems)定量基因表达水平。以一式三份进行比较实时 PCR,包括无模板对照。使用比较 Ct 法计算相对表达。

[0186] 荧光素酶测定

[0187] 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 用 1 μ g pGL3 萤火虫萤光素酶报告基因载体 (参见补充的实验方法)、0.1 μ g pRLSV40 对照载体 (Promega) 和 100nM 微 RNA 前体 (Ambion) 在 6 孔板中共转染 MKN-74 胃癌细胞。在转染后 24 小时使用 Dual Luciferase Assay (Promega) 连续地测量萤火虫和海肾萤光素酶的活性。将各报告基因质粒转染至少 2 次 (在不同天) 并且以一式三份测定各样品。

[0188] 流式细胞术

[0189] 为了进行细胞周期分析, 将 2×10^6 个细胞固定在冷的乙醇中, 用 RNA 酶处理, 然后用碘化丙啶 (Sigma) 染色。通过使用双重辨别门控 (doublet discrimination gating) 利用 EPICS-XL 扫描 (Beckman Coulter) 就 DNA 含量分析细胞。以一式三份进行所有分析, 计数 20,000 个门控事件 / 样品。为了进行细胞凋亡分析, 在冷的 PBS 中清洗细胞, 将其与膜联蛋白 V-FITC (BD Biopharmingen) 和 PI (Sigma) 在黑暗中一起温育 15 分钟, 然后在 1 小时内进行分析。

[0190] 统计分析

[0191] 实验的结果表示为平均值 $\pm$ SD。使用学生氏未配对 t 检验来比较测试样品与对照样品的值。P < 0.05 表示显著差异。

[0192] 实施例 II

[0193] 组织样品:

[0194] 原发性胃肿瘤样品获自 Department of Histopathology (Sant' Andrea Hospital, University of Rome "La Sapienza", Italy)。所有样品具有患者的知情同意书并且进行了组织学确认。用于获得组织的方案由 Sant' Andrea Hospital Bioethical Committee 批准。将各肿瘤与来自相同患者的非肿瘤胃粘膜对照配对。

[0195] 微阵列:

[0196] 如所描述的 (Liu 等人, 2004) 进行微阵列分析。简而言之, 将 5 μ g 总 RNA 用于在第 2 代 miRNA 微阵列芯片 (V2) 上进行杂交。这些芯片包含通过接触技术点印并且共价连接至聚合物基质的 250 个人 miRNA 的基因特异性 40 聚体寡核苷酸探针。将微阵列在 25 $^{\circ}$ C 下于 6X SSPE (0.9M NaCl_60mM NaH₂PO₄_H₂O_8mM EDTA, pH 7.4)、30% 甲酰胺中杂交 18 小时, 在 37 $^{\circ}$ C 下于 0.75X TNT (Tris/HCl/NaCl/Tween 20) 中清洗 40 分钟, 然后通过用链霉抗生物素蛋白-Alexa Fluor 647 缀合物直接检测含有生物素的转录物的方法进行处理。通过使用微阵列扫描仪 (将激光设置至 635nm, 使用固定的 PMT 设置和 10mm 的扫描分辨率) 扫描经处理的载玻片。使用 Global Median、Lowess 或 Quantile 法标准化阵列数据, 获得相似的结果。在本研究中公布的数据来源于 Quantile 标准化法。通过使用微阵列显著性分析 (SAM) 中的 t 检验法来鉴定差异表达的 miRNA。

[0197] Western 印迹:

[0198] 用于免疫印迹的抗体如下: E2F1 (Santa Cruz, 小鼠单克隆抗体, 1 : 500)、AIB-1 (Cell Signalling, 小鼠单克隆抗体, 1 : 1000)、p21 (Cell Signalling, 小鼠单克隆抗体, 1 : 1000)、p27 (Santa Cruz, 小鼠单克隆抗体 1 : 500)、CDK2 (Cell Signalling, 小鼠单克隆抗体, 1 : 1000)、CDK4 (Cell Signalling, 小鼠单克隆抗体, 1 : 1000)、细胞周期蛋白 D1 (Cell Signalling, 小鼠单克隆抗体, 1 : 1000)、细胞周期蛋白 E (Santa Cruz, 兔多克隆抗体, 1 : 500)、p15 (Cell Signalling, 兔多克隆抗体, 1 : 1000)、Bim (Cell

Signalling,兔多克隆抗体 1 : 1000)、纽蛋白 (Santa Cruz,小鼠单克隆抗体,1 : 500)、GAPDH(Calbiochem,小鼠单克隆抗体,1 : 3000)。使用 GelDoc 软件 (Biorad) 定量条带。

[0199] 腺病毒和慢病毒感染 :

[0200] Adeno-E2F1 由 G. Leone 友好提供,并且如所描述的 (Leone 等人,1998) 进行感染。从 293T/17 细胞基因组 DNA PCR- 扩增 MiR-106b、miR-93、miR-25 和 miR-106b-25 前体 cDNA 并且将其在 CMV 启动子之下克隆入变异的第三代慢病毒载体 pRRL-CMV-PGK-GFP-WPRE (称为 Tween) 以同时转导报告基因 GFP 和 miRNA。如所描述的 (Bonci 等人,2003) 进行慢病毒上清液的制备和感染。慢病毒转导产生 710 倍的 miRNA 表达的变化,如通过 qRT-PCR 所测定的。通过荧光显微镜检查确认转导效率 > 90%。

[0201] qRT-PCR(miRNA 前体) :

[0202] 为了进行微 RNA 前体 qRT-PCR,在 DNA 酶处理 (Ambion) 后使用 ThermoScript 试剂盒 (Invitrogen) 通过逆转录将使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 分离的总 RNA 直接加工成 cDNA。使用 Power Syb-Green PCR Master Mix(Applied Biosystems) 通过 qPCR 扩增靶序列。将样品针对 U6 标准化。在请求后可获得引物序列。

[0203] 传感器质粒 :

[0204] 通过 PCR 从基因组 DNA (293T/17 细胞) 扩增含有预测的 miRNA 结合位点的 E2F1、p21 和 Bim 3' UTR,然后通过利用紧在萤火虫萤光素酶的终止密码子下游的 Xba-I 位点将其插入 pGL3 对照载体 (Promega)。按照制造商的方案,使用 QuikChange 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 将 miRNA 种子区域互补位点中的前 3 个核苷酸的缺失插入突变型构建体。在请求后可获得引物序列。

[0205] 其用途和定义的实例

[0206] 除非另外指出,否则本发明的实施将使用在本领域技术人员的能力之内的药理学、化学、生物化学、重组 DNA 技术和免疫学的常规方法。此类技术在文献中得到详尽的解释。参见,例如,Handbook of Experimental Immunology,第 I-IV 卷 (D.M.Weir 和 C.C.Blackwelleds., Blackwell Scientific Publications) ;A.L.Lehninger, Biochemistry(Worth Publishers, Inc., current addition) ;Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual(第 2 版,1989) ;Methods In Enzymology(S.Colowick 和 N.Kaplan eds., Academic Press, Inc.)。

[0207] 因此,本文中提供了用于进一步解释的定义,所述定义不应解释为限定性的。

[0208] 冠词“a”和“an”在本文中是指一个或多于一个(即,至少一个)冠词的语法对象。例如,“an element”是指一个元素或多于一个的元素。

[0209] “标志物”和“生物标志物”是与其在正常或健康组织或细胞中的表达水平相比,其在组织或细胞中改变的表达水平与病症和 / 或疾病状态相关的基因和 / 或蛋白质和 / 或其功能性变体。

[0210] 标志物的“正常”的表达水平是标志物在未患病症和 / 或疾病状态的人受试者或患者的细胞中的表达水平。

[0211] 标志物的“过表达”或“显著更高的表达水平”是指测试样品中的表达水平,所述表达水平高于用于估量表达的测定的标准误,在某些实施方案中,至少 2 倍,在其他实施方案中,3、4、5 或 10 倍于对照样品(例如,来自未患有标志物相关病症和 / 或疾病状态的健康

受试者的样品)中的标志物的表达水平和在某些实施方案中几个对照样品中的标志物的平均表达水平。

[0212] 标志物的“显著更低的表达水平”是指测试样品中的表达水平,所述表达水平比对照样品(例如,来自未患有标志物相关病症和/或疾病状态的健康受试者的样品)中的标志物的表达水平和在某些实施方案中几个对照样品中的标志物的平均表达水平低至少2倍,在某些实施方案中低3、4、5或10倍。

[0213] 试剂盒是包含至少一种试剂,例如用于特异性检测标志物的表达的探针的任何产品(例如,包装或容器)。可以以用于进行本发明的方法的单位的形式推销(promote)、分配或销售试剂盒。

[0214] “蛋白质”包括标志物蛋白和它们的片段;变异标志物蛋白和它们的片段;包含标志物或变异标志物蛋白的至少15个氨基酸的区段的肽和多肽;以及包含标志物或变异标志物蛋白,或标志物或变异标志物蛋白的至少15个氨基酸的区段的融合蛋白。

[0215] 本文中所述的组合物、试剂盒和方法特别地具有下列非限定性用途:

[0216] 1) 评估受试者是否患有病症和/或疾病状态;

[0217] 2) 评估受试者的病症和/或疾病状态的分期;

[0218] 3) 评估受试者的病症和/或疾病状态的分级;

[0219] 4) 评估受试者的病症和/或疾病状态的性质;

[0220] 5) 评估受试者发生病症和/或疾病状态的可能性;

[0221] 6) 评估与受试者的病症和/或疾病状态相关的细胞的组织学类型;

[0222] 7) 制备可用于治疗受试者的病症和/或疾病状态的抗体、抗体片段或抗体衍生物;

[0223] 8) 评估病症和/或疾病状态在受试者的细胞中的存在;

[0224] 9) 评估一种或多种测试化合物抑制受试者的病症和/或疾病状态的功效;¹

[0225] 10) 评估疗法抑制受试者的病症和/或疾病状态的功效;

[0226] 11) 监控受试者的病症和/或疾病状态的进展;

[0227] 12) 选择抑制受试者的病症和/或疾病状态的组合物或疗法;

[0228] 13) 治疗患有病症和/或疾病状态的受试者;

[0229] 14) 抑制受试者的病症和/或疾病状态;

[0230] 15) 评估测试化合物的有害潜能;和

[0231] 16) 预防处于发生病症和/或疾病状态的风险中的受试者的病症和/或疾病状态的发作。

[0232] 筛选方法

[0233] 可产生动物模型以使能够筛选可用于治疗或预防受试者的病症和/或疾病状态的治疗剂。因此,该方法可用于鉴定用于治疗或预防受试者的病症和/或疾病状态的治疗剂。该方法包括对由本文所述的方法产生的动物模型施用候选试剂,评估与未施用候选试剂的对照动物模型相比动物模型中的至少一种应答。如果至少一种应答在症状上减轻或在发作上延迟,则候选试剂是用于治疗或预防疾病的试剂。

[0234] 候选试剂可以是本领域已知的药理学试剂(pharmacologic agent)或可以是之前未知具有任何药理活性的试剂。试剂可以是天然产生的或实验室中设计的。它们可从微生

物、动物或植物分离,或可重组产生或通过任何适当的化学方法合成。它们可以是小分子、核酸、蛋白质、肽或模拟肽(peptidomimetics)。在某些实施方案中,候选试剂是具有大于50且小于大约2,500道尔顿的分子量的小有机化合物。候选试剂包含与蛋白质结构性相互作用所必需的官能团。还在生物分子中发现候选试剂,包括但不限于:肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、其衍生物、结构类似物或组合。

[0235] 可从多种来源(包括合成的或天然化合物的文库)获得候选试剂。存在例如许多可获得用于随机和定向合成多种有机化合物和生物分子的方法,包括随机化寡核苷酸和寡肽的表达。备选地,以细菌、真菌、植物和动物提取物的形式存在的天然化合物的文库是可获得的或可容易地产生。此外,天然或合成产生的文库和化合物可容易地通过常规化学、物理和生物学方法进行修饰,并且可用于产生组合文库。在某些实施方案中,候选试剂可使用组合文库方法领域中的许多方法中的任一方法来获得,所述方法包括非限定性实例:生物文库法;空间可定位平行固相或溶液相文库法(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries);需要解卷积(deconvolution)的合成文库法;“一珠一化合物(one-bead one-compound)”文库法;和使用亲和层析选择的合成文库法。

[0236] 在某些其他实施方案中,可将某些药理学药剂经历定向或随机化学修饰,例如酰化、烷化、酯化、酰胺化(amidification)等以产生结构类似物。

[0237] 用于鉴定治疗受试者的病症和/或疾病状态的治疗剂的相同方法还可用于验证体外研究产生的前导化合物(lead compound)/试剂。

[0238] 候选试剂可以是上调或下调受试者中一个或多个病症和/或疾病状态应答途径的试剂。在某些实施方案中,候选试剂可以是影响这样的途径的拮抗剂。

[0239] 用于治疗病症和/或疾病状态的方法

[0240] 本文提供了用于治疗、抑制、减轻或逆转病症和/或疾病状态应答的方法。在本文所述的方法中,对此需要的个体施用干扰信号级联的试剂,所述个体例如但不限于其中这样的并发症还不明显的受试者和已具有至少一种这样的应答的受试者。

[0241] 在前一种情况下,这样的治疗用于预防此类应答的发生和/或减轻它们发生的程度。在后一种情况下,这样的治疗用于减轻此类应答发生的程度,阻止它们进一步发展或逆转所述应答。

[0242] 在某些实施方案中,干扰应答级联的试剂可以是对此类应答特异的抗体。

[0243] 生物标志物的表达

[0244] 可以以许多方式抑制标志物的表达,所述方式包括非限定性实例:可对疾病细胞提供反义寡核苷酸以抑制标志物的转录、翻译或两者。备选地,可对细胞提供编码特异性结合标志物蛋白的抗体、抗体衍生物或抗体片段并且与适当的启动子/调节子区域有效连接的多核苷酸,以产生抑制所述蛋白的功能或活性的细胞内抗体。标志物的表达和/或功能还可通过用特异性结合标志物蛋白的抗体、抗体衍生物或抗体片段处理疾病细胞来抑制。通过使用本文中描述的方法,可筛选多种分子,特别地包括足够小以使它们能够穿过细胞膜的分子,以鉴定抑制标志物的表达或抑制标志物蛋白的功能的分子。可对受试者提供如此鉴定的化合物以抑制受试者的疾病细胞。

[0245] 任何标志物或标志物的组合,以及与所述标志物组合的任何特定标志物可用于本文中描述的组合物、试剂盒和方法中。一般地,期望使用这样的标志物,对于所述标志物,疾

病细胞中该标志物的表达水平与正常结肠系统细胞中相同标志物的表达水平之间的差异尽可能大。虽然该差异可以小至用于评估标志物的表达的方法的检测极限,但期望差异至少大于评估方法的标准误,在一些实施方案中,与正常组织中相同标志物的表达水平相比,至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、100、500、1000 倍或更大的差异。

[0246] 已公认,某些标志物蛋白被分泌至围绕细胞的细胞外空间。由于此类标志物蛋白可在体液样品中检测,因此将这些标志物用于组合物、试剂盒和方法的某些实施方案,所述体液样品可以比组织活检样品更容易地从人受试者收集。此外,用于检测标志物蛋白的体内技术包括将抗所述蛋白的标记抗体引入受试者。例如,抗体可用其在受试者中的存在和定位可利用标准成像技术来检测的放射性标记物进行标记。

[0247] 为了确定任何特定的标志物蛋白是否是分泌蛋白,在例如哺乳动物细胞例如人细胞系中表达标志物蛋白,收集细胞外液体,评估蛋白质在细胞外液体中的存在或不存在(例如,使用特异性结合所述蛋白的标记抗体)。

[0248] 应理解,含有此类细胞的受试者样品可用于本文中所述的方法。在这些实施方案中,标志物的表达水平可通过评估样品中标志物的量(例如,绝对量或浓度)来评估。当然,可在评估样品中标志物的量之前将细胞样品经历多种收集后制备和贮藏技术(例如,核酸和/或蛋白质提取、固定、贮藏、冷冻、超滤、浓缩、蒸发、离心等)。

[0249] 还应理解,可使标志物流出细胞进入例如呼吸系统、消化系统、血流和/或间质间隙。可以例如通过检查痰、BAL、血清、血浆、尿、粪便等来检测流出的标志物。

[0250] 组合物、试剂盒和方法可用于检测标志物蛋白的表达,所述标志物蛋白具有至少一个展示于表达其的细胞的表面上的部分。例如,可将免疫学方法用于检测完整细胞上的此类蛋白,或可将基于计算机的序列分析法用于预测至少一个细胞外结构域(即,包括分泌蛋白和具有至少一个细胞表面结构域的蛋白质)的存在。可检测标志物蛋白的表达而无需裂解细胞(例如,使用特异性结合蛋白的细胞表面结构域的标记抗体),所述标志物蛋白具有至少一个展示于表达其的细胞的表面上的部分。

[0251] 标志物的表达可通过多种用于检测转录的核酸或蛋白质的表达的方法中的任一种来评估。此类方法的非限定性实例包括用于检测分泌蛋白、细胞表面蛋白、细胞质蛋白或核蛋白的免疫学方法、蛋白质纯化法、蛋白质功能或活性测定法、核酸杂交法、核酸逆转录法以及核酸扩增法。

[0252] 在特定的实施方案中,标志物的表达可使用特异性结合标志物蛋白或其片段(包括已经历所有或部分其正常翻译后修饰的标志物蛋白)的抗体(例如,放射性标记的、发色团标记的、荧光团标记的或酶标记的抗体)、抗体衍生物(例如,缀合有底物或蛋白质或蛋白质-配体对的配体的抗体)或抗体片段(例如,单链抗体、分离的抗体高变结构域等)来评估。

[0253] 在另一个特定的实施方案中,标志物的表达通过下述来评估:从受试者样品的细胞制备 mRNA/cDNA(即,转录的多核苷酸),然后将 mRNA/cDNA 与为标志物核酸的互补序列的参照多核苷酸或其片段杂交。任选地,可在与参照多核苷酸杂交前使用多种聚合酶链式反应方法中的任一种来扩增 cDNA;优选,其不进行扩增。同样可使用定量 PCR 检测一个或多个标志物的表达以评估标志物的表达水平。备选地,可使用检测标志物的突变或变体(例如,单核苷酸多态性、缺失等)的许多方法中的任一种来检测受试者中标志物的存在。

[0254] 在相关实施方案中,将获自样品的转录的多核苷酸的混合物与在其上固定有多核苷酸(其与标志物核酸的至少一部分(例如,至少7、10、15、20、25、30、40、50、100、500或更多个核苷酸残基)互补或同源)的基质接触。如果可在基质上差异地检测到互补或同源的多核苷酸(例如,可使用不同的发色团或荧光团检测或固定至不同的选择的位置),那么可使用单个基质(例如,固定在所选择的位置上的多核苷酸的“基因芯片”微阵列)同时评估多个标志物的表达水平。当使用包括将一个核酸与另一个核酸杂交的评估标志物表达的方法时,期望在严格杂交条件下进行杂交。

[0255] 在某些实施方案中,可使用质谱法或表面等离子共振术进行生物标志物测定(biomarker assay)。在不同的实施方案中,鉴定活性抗受试者的病症和/或疾病状态的试剂的方法可包括一个或多个下列步骤:

[0256] a) 提供含有一个或多个标志物或其衍生物的细胞的样品;

[0257] b) 从此类细胞制备提取物;

[0258] c) 将所述提取物与含有标志物结合位点的标记核酸探针混合;和,

[0259] d) 在测试试剂存在或不存在的条件下测定标志物与核酸探针之间的复合物的形成。测定步骤可包括将所述提取物/核酸探针混合物经历电泳迁移率试验(electrophoretic mobility shift assay)。

[0260] 在某些实施方案中,测定步骤包括选自酶联免疫吸附测定(ELISA)、基于荧光的测定和超高通量测定,例如,表面等离子共振术(SPR)或荧光相关光谱(FCS)测定的测定。在此类实施方案中,SPR传感器用于指导生物分子相互作用的实时观察,因为SPR对金属-电介质表面上的微小折射率改变非常敏感。SPR是对大约200nm的SPR传感器/样品介面内的 10^5 至 10^6 折射率(RI)单位的改变敏感的表面技术。因此,SPR光谱法用于监控沉积在传感层上的薄有机薄膜的生长。

[0261] 因为组合物、试剂盒和方法依赖于一种或多种标志物的表达水平的差异的检测,因此期望标志物的表达水平显著大于用于评估至少一种正常细胞和受结肠癌影响的细胞中的表达的方法的最小检测极限。

[0262] 应理解,通过使用一种或多种标志物对另外的受试者样品进行常规筛选,将了解某些标志物在不同类型的细胞,包括受试者的特定病症和/或疾病状态细胞中过表达。

[0263] 此外,通过就标志物的表达评估更大数量的受试者样品,并且使从其获得样品的个体受试者的结果相互关联,还将确认某些标志物的改变的表达与受试者的病症和/或疾病状态强相关以及其他标志物的改变的表达与其他疾病强相关。从而组合物、试剂盒和方法可用于表征受试者的病症和/或疾病状态的分期、分级、组织学类型和性质中的一种或多种。

[0264] 当组合物、试剂盒和方法用于表征受试者的病症和/或疾病状态的分期、分级、组织学类型和性质中的一种或多种时,期望选择标志物或标志物组以使在至少大约20%,在某些实施方案中,至少大约40%、60%或80%和基本上所有受试者(其患有相应分期、分级、组织学类型或性质的病症和/或疾病状态)中获得阳性结果。可选择本发明的标志物或标志物组以使对于一般群体可获得大于大约10%的阳性预测值(在非限定性的实例中,外加大于80%的测定特异性)。

[0265] 当多个标志物用于组合物、试剂盒和方法时,可在单个反应混合物(即,使用针对

各个标志物的试剂,例如不同的荧光探针)或在相应于一个或多个标志物的单独的反应混合物中,将受试者样品中各标志物的表达水平与相同类型的非病症和/或非疾病样品中多个标志物中的每一个的正常表达水平相比较。在一个实施方案中,相对于相应的正常水平,样品中一个以上的标志物的显著增加的表达水平表示受试者患有病症和/或疾病状态。当使用多个标志物时,可使用2、3、4、5、8、10、12、15、20、30或50或更多个单独的标志物;在某些实施方案中,可能期望使用更少的标志物。

[0266] 为了使组合物、试剂盒和方法的灵敏性最大化(即在干扰可归因于受试者样品中系统来源的细胞的情况下),期望本文中所使用的标志物是具有受限制的组织分布(例如通常不在非系统组织中表达)的标志物。

[0267] 应认识到,组合物、试剂盒和方法对于具有增加的发生受试者的病症和/或疾病状态的风险的受试者和他们的医学顾问将是特别有用的。被认为具有增加的发生病症和/或疾病的风险的受试者包括例如具有此类病症或疾病的家族史的受试者。

[0268] 可以以多种方法评估正常人系统组织中标志物的表达水平。在一个实施方案中,该正常表达水平通过下述来评估:评估一部分表现正常的系统细胞中标志物的表达水平且将该正常表达水平与一部分怀疑为异常的系统细胞中的表达水平相比较。备选地,特别是当由于常规进行本文中所述的方法而可获得进一步的信息时,可使用标志物的正常表达的群体平均值。在其他实施方案中,标志物的“正常”表达水平可通过评估标志物在从未受影响的受试者获得的受试者样品、在怀疑病症和/或疾病状态在受试者中发作之前从受试者获得的受试者样品、编档保存的受试者样品等中的表达来进行测定。

[0269] 本文中还提供了用于评估病症和/或疾病状态细胞在样品(例如编档保存的组织样品或从受试者获得的样品)中的存在的组合物、试剂盒和方法。这些组合物、试剂盒和方法基本上与上述的相同,除了必要时,使组合物、试剂盒和方法适用于除了受试者样品外的样品。例如,当待使用的样品是石蜡包埋的(parafinized)编档保存的人组织样品时,可能必需在用于评估样品中标志物表达水平的组合物、试剂盒或方法中调整化合物的比例。

[0270] 试剂盒和试剂

[0271] 试剂盒可用于评估疾病细胞的存在(例如在样品例如受试者样品中)。试剂盒包括多种试剂,其各自能够特异性结合标志物核酸或蛋白质。用于与标志物蛋白结合的合适的试剂包括抗体、抗体衍生物、抗体片段等。用于与标志物核酸(例如基因组DNA、mRNA、剪接的mRNA、cDNA等)结合的合适的试剂包括互补核酸。例如,核酸试剂可包括固定至基质的寡核苷酸(标记的或未标记的)、不与基质结合的标记的寡核苷酸、PCR引物对、分子信标探针等。

[0272] 试剂盒可任选地包含用于进行本文中所述的方法的另外的成分。例如,试剂盒可包含适合于使互补核酸退火或适合于使抗体与其特异性结合的蛋白质结合的液体(例如SSC缓冲液)、一个或多个样品隔室、描述方法的进行的说明书、正常结肠系统细胞样品、结肠癌相关疾病细胞样品等。

[0273] 产生抗体的方法

[0274] 本文中还提供了制备产生用于评估受试者是否患有病症和/或疾病状态的抗体的分离的杂交瘤的方法。在该方法中,合成或分离(例如通过从表达其的细胞纯化或通过体内或体外转录和翻译编码蛋白质或肽的核酸)含有完整标志物蛋白或其区段的蛋白质

或肽。使用蛋白质或肽免疫脊椎动物例如哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔或绵羊。任选地（和优选地）可用蛋白质或肽免疫脊椎动物至少另外一次，从而使脊椎动物呈现强烈的针对蛋白质或肽的免疫应答。从免疫的脊椎动物分离脾细胞，使用多种方法中的任一种将其与永生化的细胞系融合从而形成杂交瘤。然后使用标准方法筛选以该方式形成的杂交瘤，从而鉴定一个或多个产生特异性结合标志物蛋白或其片段的抗体的杂交瘤。本文还提供了通过该方法制备的杂交瘤和使用这样的杂交瘤制备的抗体。

[0275] 评估功效的方法

[0276] 本文还提供了评估测试化合物抑制疾病细胞的功效的方法。如上所述，标志物的表达水平的差异与受试者的细胞的异常状态相关。虽然公认，某些标志物的表达水平的变化可能由此类细胞的异常状态引起，但同样公认，其他标志物的表达水平的变化诱导、维持和促进此类细胞的异常状态。因此，抑制受试者的病症和 / 或疾病状态的化合物将使一个或多个标志物的表达水平改变至更接近该标志物的正常表达水平（即，所述标志物在正常细胞中的表达水平）的水平。

[0277] 因此本方法包括将在测试化合物存在的情况下维持的第一细胞样品中的标志物的表达与在测试化合物不存在的情况下维持的第二结肠细胞样品中的标志物的表达相比较。在测试化合物存在的情况下，标志物的显著减少的表达表示该测试化合物抑制相关疾病。细胞样品可以例如是获自受试者的正常细胞的单个样品的等分、获自受试者的正常细胞的混合样品、正常细胞系的细胞、获自受试者的相关疾病细胞的单个样品的等分、获自受试者的相关疾病细胞的混合样品、相关疾病细胞系的细胞等。

[0278] 在一个实施方案中，样品是获自受试者的癌症相关疾病细胞，并且检测多种据认为对于抑制各种癌症相关疾病是有效的化合物，以鉴定可能最佳地抑制受试者的癌症相关疾病的化合物。

[0279] 同样可将该方法用于评估疗法抑制受试者的相关疾病的有效性。在该方法中，评估一个或多个标志物在样品对（一个样品经历疗法，另一个不经历疗法）中的表达水平。与评估测试化合物的有效性的方法一样，如果疗法诱导显著更低的标志物表达水平，则疗法对于抑制癌症相关疾病是有效的。如上，如果来自选择的受试者的样品用于本方法，那么可在体外评估备选疗法以选择对于抑制受试者的癌症相关疾病最可能有效的疗法。

[0280] 如本文中所描述的，人细胞的异常状态与标志物的表达水平的变化相关。还提供了用于评估测试化合物的有害潜能的方法。该方法包括在测试化合物存在和不存的情况下维持分开的人细胞等分。比较各等分中标志物的表达。在测试化合物存在的情况下维持的等分中标志物的显著更高的表达水平（相对于在测试化合物不存在的情况下维持的等分）表示测试化合物具有有害的潜能。各种测试化合物的相对有害潜能可通过比较相关标志物的表达水平的增强或抑制的程度，通过比较其表达水平被增强或抑制的标志物的数目，或通过比较两者来评估。在下列部分更详细地描述了各个方面。

[0281] 分离的蛋白质和抗体

[0282] 一个方面涉及分离的标志物蛋白和其生物活性部分，以及适合用作免疫原以产生抗标志物蛋白或其片段的抗体的多肽片段。在一个实施方案中，天然标志物蛋白可使用标准蛋白质纯化技术通过适当的纯化方案从细胞或组织来源分离。在另一个实施方案中，含有完整的标志物蛋白或其区段的蛋白质或肽通过重组 DNA 技术产生。除重组表达外，可使

用标准肽合成技术化学合成此类蛋白质或肽。

[0283] “分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含细胞材料或来自细胞或组织来源（所述蛋白质源自于其）的其他污染性蛋白，或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学药品。术语“基本上不含细胞材料”包括其中将蛋白质与从其分离或重组产生所述蛋白质的细胞的细胞组分分离的蛋白质制剂。因此，基本上不含细胞材料的蛋白质包括具有低于大约 30%、20%、10% 或 5%（按干重计算）的异种蛋白质（在本文中也称为“污染性蛋白”）的蛋白质制剂。

[0284] 当重组产生蛋白质或其生物活性部分时，其也优选基本上不含培养基，即，培养基占据低于大约 20%、10% 或 5% 的蛋白质制剂的体积。当通过化学合成产生蛋白质时，其优选基本上不含化学前体或其他化学药品，即，其与参与蛋白质合成的化学前体或其他化学药品分离。因此，此类蛋白质制剂具有低于大约 30%、20%、10%、5%（按干重计算）的化学前体或除了目的多肽外的化合物。

[0285] 标志物蛋白的生物活性部分包括含有与标志物蛋白的氨基酸序列充分同一或源自于其的氨基酸序列的多肽，其包含比全长蛋白质更少的氨基酸，并且展示相应的全长蛋白质的至少一种活性。通常，生物活性部分包含具有相应的全长蛋白质的至少一种活性的结构域或基序。标志物蛋白的生物活性部分可以是其长度为例如 10、25、50、100 或更多个氨基酸的多肽。此外，其中标志物蛋白的其他区域被缺失的其他生物活性部分可通过重组技术来制备，并且可就标志物蛋白的天然形式的一种或多种功能活性对其进行评估。在某些实施方案中，有用的蛋白质与此类序列之一基本上同一（例如，至少大约 40%，在某些实施方案中，50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 同一）并且保持相应的天然发生的标志物蛋白的功能活性但因天然等位基因变异或诱变而在氨基酸序列上不同。

[0286] 此外，标志物蛋白的区段文库可用于产生用于筛选和随后选择变异标志物蛋白或其区段的多肽的多样化 (variegated) 群体。

[0287] 预测医学

[0288] 本文中还提供了动物模型和标志物在预测医学领域中的用途，其中诊断测定、预后测定、药物基因组学和监控临床试验用于预后（预测）目的，从而预防性治疗个体。因此，本文中还提供了用于测定一个或多个标志物蛋白或核酸的表达水平以确定个体是否处于发生特定病症和 / 或疾病的风险中的诊断测定。此类测定可用于预后或预测目的，从而在病症和 / 或疾病发作之前预防性治疗个体。

[0289] 在另一个方面，方法可用于相同个体的至少周期性筛查以观察该个体是否已暴露于改变他 / 她的表达模式的化学药品或毒素。

[0290] 另一方面涉及监控被施用以抑制病症和 / 或疾病或治疗或预防任何其他病症的试剂（例如，药物或其他化合物）在临床试验中对标志物的表达或活性的影响（例如，以了解这样的治疗可能具有的任何系统性作用）。

[0291] 药物组合物

[0292] 化合物可进行配制以用于在合适的药物载体中局部 (topically)、局域 (locally) 或全身性施用。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 15 版, E. W. Martin (Mark Publishing Company, 1975), 公开了常用载体和制备方法。化合物还可以封装在用于靶向细胞的合适的生物相容性微胶囊、微粒或微球体（由生物可降解或非生物可降解聚合物或

蛋白质或脂质体形成)。此类系统对于本领域技术人员来说是熟知的并且可进行最优化以与合适的核酸一起使用。

[0293] 在例如 Sambrook 等人,1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; 和 Ausubel 等人,1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 中描述了用于核酸递送的各种方法。此类核酸递送系统包括期望的核酸,例如但不限于,其以“裸露的”形式作为“裸露的”核酸,或配制于适合于递送的媒介物中例如与阳离子分子或形成脂质体的脂质的复合物中,或作为载体的成分或药物组合物的成分。可将核酸递送系统直接(例如通过将其与细胞接触)或间接(例如通过任何生物过程的作用)提供给细胞。

[0294] 用于局部施用的制剂可包括软膏、洗剂、乳膏剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。需要时可使用常规药物载体(水性的、粉状的或基于油的)或增稠剂。

[0295] 适合用于胃肠外施用例如通过关节内(关节中)、静脉内、肌内、真皮内、腹膜内和皮下途径施用的制剂包括水性和非水性的等渗无菌注射液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与期望的受者的血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌悬浮液、溶液或乳剂,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、分散剂、稳定剂和防腐剂。用于注射的制剂可以以单位剂型、与加入的防腐剂一起存在,例如存在于安瓿中或存在于多剂量容器中。本领域技术人员可容易地确定制备和配制组合物的各种参数而无需过度的实验。可单独地或与其他合适的成分组合来使用化合物。

[0296] 一般地,施用化合物(包括核酸)的方法在本领域内是熟知的。特别地,已用于核酸治疗剂的施用途径,和目前使用的制剂一起,为选择的核酸提供了优选的施用和配制途径,当然这将取决于因素例如特定的制剂、待治疗的受试者的状态的严重度和治疗功效所需的剂量。如本文中通常使用的,“有效量”是指在对其施用了制剂的受试者(与未接受所述化合物的匹配的受试者相比较)中能够治疗病症的一个或多个症状,逆转病症的一个或多个症状的进展,终止病症的一个或多个症状的进展或预防病症的一个或多个症状的发生的量。化合物的实际有效量可根据待使用的特定化合物或其组合、配制的特定组合物、施用模式,和个体的年龄、体重、状况,和待治疗的症状或病况的严重度而变化。

[0297] 本领域技术人员已知的任何可接受的方法可用于给受试者施用制剂。取决于待治疗的病况,施用可以是局部的(即,至特定区域、生理系统、组织、器官或细胞类型)或全身性的。

[0298] 药物基因组学

[0299] 标志物还可用作药物基因组学标志物。如本文中所用的,“药物基因组学标志物”是其表达水平与受试者中特定临床药物应答或易感性相关的目的生物化学标志物。药物基因组学标志物表达的存在或量与预测的受试者应答和更特别地受试者的肿瘤对用特定药物或药物种类的疗法的应答相关。通过评估受试者中一个或多个药物基因组学标志物的表达的存在或量,可选择最适合于受试者的或预测具有更大的成功程度的药物疗法。

[0300] 监控临床试验

[0301] 监控试剂(例如,药物化合物)对标志物的表达水平的影响不仅可用于基础药物筛选,而且还可用于临床试验。例如,可在接受结肠癌相关疾病治疗的受试者的临床试验中监控试剂影响标志物表达的有效性。

[0302] 在一个非限定性实施方案中,本发明提供了用于监控利用试剂(例如,激动剂、拮抗剂、模拟肽、蛋白质、肽、核酸、小分子或其他药物候选物)治疗受试者的有效性的方法,该方法包括步骤:

[0303] i) 在施用试剂之前从受试者获得施用前的样品;

[0304] ii) 检测一个或多个选择的标志物在施用前的样品中的表达水平;

[0305] iii) 从受试者获得一个或多个施用后的样品;

[0306] iv) 检测标志物在施用后的样品中的表达水平;

[0307] v) 将施用前的样品中标志物的表达水平与施用后的样品中标志物的表达水平相比较;和

[0308] vi) 相应地改变试剂至受试者的施用。

[0309] 例如,在治疗过程中增加的标志物基因的表达可表明无效剂量,从而需要增加剂量。相反地,减少的标志基因的表达可表明有效治疗,从而不需要改变剂量。

[0310] 电子设备可读介质、系统、阵列和使用其的方法

[0311] 如本文中所使用的,“电子设备可读介质”是指用于存储、保存或包含可用电子设备直接阅读和存取的数据或信息的任何适当介质。此类介质可包括但不限于:磁性存储介质,例如软盘、硬盘存储介质以及磁带;光学存储介质例如光盘;电子存储介质例如 RAM、ROM、EPROM、EEPROM 等;以及普通硬盘和这些类别的混合体例如磁性/光学存储介质。可对介质进行改造或设定以用于在其上记录本文中所述的标志物。

[0312] 如本文中所用的,术语“电子设备”旨在包括任何适当的计算或处理设备或其他经改造或设定用于存储数据或信息的装置。适合用于本发明的电子设备的实例包括独立的计算设备;网络,包括局域网(LAN)、广域网络(WAN)因特网、内联网和外联网;电子器具例如个人数字助理(PDA)、手机、寻呼机(pager)等;以及局域和分布式处理系统。

[0313] 如本文中所使用的,“记录”是指在电子设备可读介质上存储或编码信息的过程。本领域技术人员可容易地采用任何用于在介质上记录信息的方法来产生包含本文中所述的标志物的材料。

[0314] 许多软件程序和格式可用于在电子设备可读介质上存储本发明的标志物信息。为了获得或产生在其上记录了标志物的介质,可使用许多数据处理程序构建格式(data processor structuring format)(例如,文本文件或数据库)。通过以可读形式提供标志物,可常规存取用于多种目的的标志物序列信息。例如,本领域技术人员可使用可读形式的核苷酸或氨基酸序列来将靶序列或靶结构基序与存储在数据存储工具中的序列相比较。搜索工具用于鉴定匹配特定靶序列或靶基序的序列的片段或区域。

[0315] 因此,本文中还提供了用于保存进行确定受试者是否具有癌症相关疾病或对癌症相关疾病的易感性的方法的说明书的介质,其中所述方法包括步骤:确定标志物的存在或不存在,并且基于标志物的存在或不存在来确定受试者是否具有癌症相关疾病或对癌症相关疾病的易感性,和/或推荐用于癌症相关疾病或癌症相关疾病前状况(pre-cancer-related disease condition)的特定治疗。

[0316] 本文中还提供了电子系统和/或在网络中提供了用于确定受试者是否患有癌症相关疾病或具有对与标志物相关的癌症相关疾病的易感性的方法,其中所述方法包括步骤:确定标志物的存在或不存在,并且基于标志物的存在或不存在来确定受试者是否患有

特定病症和 / 或疾病或具有对此类病症和 / 或疾病的易感性, 和 / 或推荐用于此类疾病或疾病和 / 或这样的癌症相关疾病前状况的特定治疗。该方法还可包括接收与受试者相关的表型信息和 / 或从网络获取与受试者相关的表型 信息的步骤。

[0317] 本文中还提供了网络, 用于确定受试者是否患有病症和 / 或疾病或具有对与标志物相关的病症和 / 或疾病的易感性的方法, 所述方法包括步骤: 接收与标志物相关的信息, 接收与受试者相关的表型信息, 从网络获取相应于标志物和 / 或病症和 / 或疾病的信息, 并且基于表型信息、标志物和获取的信息中的一个或多个, 确定受试者是否患有病症和 / 或疾病或具有对其的易感性。所述方法还包括推荐用于病症和 / 或疾病或对其的易感性的特定治疗的步骤。

[0318] 本文中还提供了用于确定受试者是否患有病症和 / 或疾病或具有对其的易感性的商业方法, 所述方法包括步骤: 接收与标志物相关的信息, 接收与受试者相关的表型信息, 从网络获取相应于标志物和 / 或病症和 / 或疾病的信息, 并且基于表型信息、标志物和获得的信息中的一个或多个, 确定受试者是否患有病症和 / 或疾病或具有对其的易感性。所述方法还可包括推荐用于其的特定治疗的步骤。

[0319] 本文中还提供了可用于测定阵列中一个或多个基因的表达的阵列。在一个实施方案中, 阵列可用于测定组织中基因的表达, 从而确定阵列中基因的组织特异性。这样, 可就表达同时测定直至大约 7000 或更多个基因。这使得能够产生显示在一个或多个组织中特异性表达的一组基因的特征谱。

[0320] 除了此类定性测定外, 本文中还提供了基因表达的定量。因此, 不仅组织特异性而且一组基因在组织中的表达水平也是可确定的。因此, 可基于基因本身的组织表达和在该组织中的表达水平来对基因进行分类。这可用于例如确定组织间基因表达的关系。因此, 可干扰一个组织, 然后可测定对第二组织中的基因表达的影响。在本说明书中, 可测定一种细胞类型对另一种细胞类型 (响应生物刺激) 的影响。

[0321] 此类测定可用于例如在基因表达的水平上了解细胞间相互作用的效果。如果试剂被治疗性施用以治疗一种细胞类型但其对另一种细胞类型具有不期望的作用, 则所述方法提供了确定不期望的作用的分子基础的测定, 从而提供共施用中和剂 (counteracting agent) 或另外 治疗不期望的的作用的机会。类似地, 即使在单个细胞类型中, 可在分子水平上测定不期望的生物学效应。因此, 可确定和中和试剂对非靶基因的表达的作用。

[0322] 在另一个实施方案中, 阵列可用于监控阵列中一个或多个基因的表达的时程。如本文中所公开的, 这可发生在各种生物学背景 (例如病症和 / 或疾病的发生, 其进展) 和过程 (例如与其相关的细胞转化) 中。

[0323] 阵列还可用于确定基因的表达或其他基因的表达在相同细胞或不同细胞中的作用。如果不能调控最终或下游靶, 那么这提供了例如用于治疗性干预的备选分子靶的选择。

[0324] 阵列还可用于确定一个或多个基因在正常和异常细胞中的差异表达模式。这提供了可用作诊断或治疗性干预的分子靶的一组基因。

[0325] 替代标志物 (Surrogate Marker)

[0326] 标志物可用作一种或多种病症或疾病状态或导致其的状况的替代标志物。如本文中所使用的, “替代标志物” 是与疾病或病症的不存在或存在, 或与疾病或病症的进展相关的目的生物化学标志物。此类标志物的存在或量不依赖于疾病。因此, 此类标志物可用于

指示特定的疗程在减轻疾病状态或病症中是否有效。当疾病状态或病症的存在或程度难以通过标准方法来评估,或当在达到潜在危险的临床终点之前期望评估疾病进展时,替代标志物是特别有用的。

[0327] 标志物还可用作药效标志物 (pharmacodynamic marker)。如本文中所使用的,“药效标志物”是与药物作用特异性相关的目的生物化学标志物。药效标志物的存在或量与将对其施用药物的疾病状态或病症无关;因此,标志物的存在或量表示药物在受试者中的存在或活性。例如,药效标志物可表示药物在生物组织中的浓度,因为标志物在该组织中表达或转录,或者不表达或转录与药物的水平相关。这样,药物的分布或吸收可通过药效标志物来监控。类似地,药效标志物的存在或量可与药物的代谢产物的存在或量相关,这样标志物的存在或量表示药物在体内的相对分解速率。

[0328] 药效标志物在增加药物作用的检测的灵敏性中特别有用,特别是当以低剂量施用药物时。由于即使少量的药物也可足以激活多轮的标志物转录或表达,因此扩增的标志物可以以比药物本身更容易检测的量存在。同样,标志物由于其本身的性质而可以更容易地进行检测;例如,通过使用本文中描述的方法,可将抗体用于针对蛋白标志物的基于免疫的检测系统,或可使用标志物特异性放射性标记探针来检测 mRNA 标志物。此外,药效标志物的使用可提供由于药物治疗超出可直接观察的范围而产生的风险的基于机制的预测。

[0329] 用于检测的方案

[0330] 检测病症和 / 或疾病的方法可包括例如在一段时间内测量各标志物基因在来自受试者的生物样品中的表达水平和将该水平与对照生物样品中标志物基因的水平相比较。

[0331] 当标志物基因是本文中描述的基因之一并且表达水平差异表达(例如,比对照中的表达水平更高或更低)时,受试者被判断为患有病症和 / 或疾病。当标志物基因的表达水平落在容许的范围内时,受试者不可能患有所述病症和 / 或疾病。

[0332] 可通过测量对照中标志物基因的表达水平来预先测定对照的标准值,以比较表达水平。例如,可基于上述标志物基因在对照中的表达水平来测定标准值。例如,在某些实施方案中,容许的范围基于标准值采用 $\pm 2S.D.$ 。在测定标准值后,可通过只测量来自受试者的生物样品中的表达水平并将该值与测定的对照的标准值相比较来进行检测方法。

[0333] 标志物基因的表达水平包括标志物基因至 mRNA 的转录和至蛋白质的翻译。因此,基于相应于标志物基因的 mRNA 的表达强度或由标志物基因编码的蛋白质的表达水平的比较,进行检测病症和 / 或疾病的一个方法。

[0334] 可根据各种基因分析方法在病症和 / 或疾病的检测中测量标志物基因的表达水平。具体地,可使用例如利用与此类基因杂交的核酸作为探针的杂交技术,或利用与标志物基因杂交的 DNA 作为引物的基因扩增技术。

[0335] 可基于标志物基因的核苷酸序列设计用于检测的探针或引物。本文中描述了各标志物基因的核苷酸序列的标识号。

[0336] 此外,应理解,高等动物的基因通常伴有高频率的多态性。也存在许多在剪接过程中产生含有相互不同的氨基酸序列的同种型的分子。与结肠癌相关疾病相关的、具有与标志物基因的活性相似的活性的任何基因包括在标志物基因中,即使其由于多态性或为同种型而具有核苷酸序列差异。

[0337] 也应理解,标志物基因可包括除了人外的其他物种的同源物。因此,除非明确指出,否则表述“标志物基因”是指对于物种独特的标志物基因的同源物或已被导入个体的外源标志物基因。

[0338] 同样,应理解,“标志物基因的同源物”是指来源于除了人以外的物种的基因,其在严格条件下可作为探针与人标志物基因杂交。这样的严格条件对于本领域技术人员(其可通过实验或凭经验选择适当的条件来产生相同严格性)来说是已知的。

[0339] 含有标志物基因的核苷酸序列或与标志物基因的核苷酸序列的互补链互补并且具有至少 15 个核苷酸的核苷酸序列的多核苷酸可用作引物或探针。因此,“互补链”是指由 A:T(对于 RNA 为 U) 和 G:C 碱基对组成的双链 DNA 中相对于另一条链的一条链。

[0340] 此外,“互补”不仅意指与至少 15 个连续核苷酸的区域完全互补的序列,而且还指具有在某些情况下至少 40%,在某些情况下 50%,在某些情况下 60%,在某些情况下 70%,至少 80%、90% 和 95% 或更高的核苷酸序列同源性的序列。核苷酸序列之间的同源性的程度可利用算法 BLAST 等来测定。

[0341] 此类多核苷酸可用作检测标志物基因的探针,或用作扩增标志物基因的引物。当用作引物时,多核苷酸通常包含 15bp 至 100bp,在某些实施方案中 15bp 至 35bp 的核苷酸。当用作探针时,DNA 包含标志物基因的整个核苷酸序列(或其互补链),或具有至少 15bp 核苷酸的其部分序列。当用作引物时,3' 区域必须与标志物基因互补,而 5' 区域可连接至限制性内切酶识别序列或标签(tag)。

[0342] “多核苷酸”可以是 DNA 或 RNA。此类多核苷酸可以是合成的或天然发生的。同样,通常也标记用作杂交探针的 DNA。本领域技术人员易于理解此类标记方法。在本文中,术语“寡核苷酸”意指具有相对低的聚合程度的多核苷酸。寡核苷酸也包括在多核苷酸内。

[0343] 可使用例如 Northern 杂交、斑点印迹杂交或 DNA 微阵列技术进行利用杂交技术的病症和/或疾病的检测。此外,可使用基因扩增技术例如 RT-PCR 法。通过在 RT-PCR 的基因扩增步骤中使用 PCR 扩增监控法,可更加定量地分析标志物基因的表达。

[0344] 在 PCR 基因扩增监控法中,将检测靶(DNA 或 RNA 的反转录物)与用荧光染料和吸收荧光的猝灭剂标记的探针杂交。当 PCR 进行并且 Taq 聚合酶以其 5' -3' 外切核酸酶活性降解探针时,荧光染料与猝灭剂彼此分离,从而检测到荧光。实时检测荧光。通过同时测量其中靶的拷贝数是已知的标准样品,可利用循环数(其中 PCR 扩增是线性的)测定受试者样品中靶的拷贝数。同样,本领域技术人员公认 PCR 扩增监控法可使用任何适当的方法来进行。

[0345] 还可通过检测标志物基因编码的蛋白质来进行检测结肠癌相关疾病的方法。在下文中,标志物基因编码的蛋白质被描述为“标志物蛋白”。对于此类检测方法,可通过使用结合各标志物蛋白的抗体来应用例如,Western 印迹法、免疫沉淀法和 ELISA 法。

[0346] 用于检测的结合标志物蛋白的抗体可通过任何适当的技术来产生。同样,为了检测标志物蛋白,可适当地标记这样的抗体。备选地,可不标记抗体,而是标记特异性结合抗体的物质例如蛋白 A 或蛋白 G 以间接检测标志物蛋白。更特别地,此类检测方法可包括 ELISA 法。

[0347] 可以例如通过将标志物基因或其部分插入表达载体,将构建体导入适当的宿主细胞来产生转化株,培养所述转化株以表达重组蛋白,然后从培养物或培养上清液纯化表达

的重组蛋白来获得用作抗原的蛋白质或其部分肽。备选地,可化学合成由基因编码的氨基酸序列或含有由全长 cDNA 编码的氨基酸序列的一部分的寡肽,以用作免疫原。

[0348] 此外,可通过将不仅生物学样品中标志物基因的表达水平而且标志物蛋白的活性用作指标来进行结肠癌相关疾病的检测。标志物蛋白的活性意指蛋白本身固有的生物学活性。可使用各种方法测量每一种蛋白的活性。

[0349] 即使在常规检测中受试者未被诊断为患有病症和 / 或疾病 (尽管症状暗示此类疾病), 这样的受试者是否患有病症和 / 或疾病也可通过按照本文中所述的方法进行检测来容易地确定。

[0350] 更特别地,在某些实施方案中,当标志物基因是本文描述的基因之一时,其症状至少暗示对病症和 / 或疾病的易感性的受试者中,标志物基因的表达水平的增加或减少表明症状主要由所述病症和 / 或疾病引起。

[0351] 此外,检测可用于确定病症和 / 或疾病是否在受试者中得到改善。换句话说,本文中描述的方法可用于判断用于所述病症和 / 或疾病的治疗的治疗效果。此外,当标志物基因是本文描述的基因之一时,已被诊断为患有所述病症和 / 或疾病的受试者中,标志物基因的表达水平的增加或减少意味着疾病已向前发展。

[0352] 还可基于表达水平的差异测定病症和 / 或疾病的严重度和 / 或对其的易感性。例如,当标志物基因是本文描述的基因之一时,标志物基因的表达水平的增加程度与病症和 / 或疾病的存在和 / 或严重度相关。

[0353] 动物模型

[0354] 还可产生病症和 / 或疾病的动物模型,其中一个或多个标志物基因或功能上与标志物基因等同的基因的表达水平在所述动物模型中已被提高。如本文中所用的,“功能上等同的基因”通常是编码具有与标志物基因编码的蛋白质的已知活性相似的活性的蛋白质的基因。功能上等同的基因的代表性实例包括受试动物的标志物基因对应物,其是动物本身固有的。

[0355] 动物模型可用于检测由于病症和 / 或疾病而引起的生理学变化。在某些实施方案中,动物模型可用于揭示标志物基因的另外的功能和评估其靶为标志物基因的药物。

[0356] 动物模型可通过控制对应物基因的表达水平或施用对应物基因来产生。方法可包括通过控制选自本文中所述的基因的基因的表达水平来产生动物模型。在另一个实施方案中,方法可包括通过施用由本文中所描述的基因编码的蛋白质或施用抗所述蛋白的抗体来产生动物模型。还应理解,在某些其他实施方案中,可过表达标志物,以便可使用适当的方法测量标志物。在另一个实施方案中,动物模型可通过导入选自此类基因的基因,或通过施用由这样的基因编码的蛋白质来产生。在另一个实施方案中,病症和 / 或疾病可通过抑制选自此类基因的基因的表达或由这样的基因编码的蛋白质的活性来诱导。反义核酸、核酶或 RNAi 可用于抑制表达。蛋白质的活性可通过施用抑制所述活性的物质例如抗体来有效地控制。

[0357] 动物模型可用于阐明病症和 / 或疾病背后的机制,还可用于检测通过筛选获得的化合物的安全性。例如,当动物模型产生特定病症和 / 或疾病的症状时,或当牵涉某种病症和 / 或疾病的测量值在动物中改变时,可构建筛选系统以探测具有减轻疾病的活性的化合物。

[0358] 如本文中所使用的,表述“表达水平的增加”是指下列情况的任一种:人工表达作为外源基因导入的标志物基因;受试动物本身固有的标志物基因的转录和其至蛋白质的翻译得到增强;或作为翻译产物的蛋白质的水解被抑制。

[0359] 如本文中所用的,表述“表达水平的减少”是指其中受试动物的标志物基因的转录和其至蛋白质的翻译被抑制的情况,或其中作为翻译产物的蛋白质的水解被增强的情况。基因的表达水平可以例如通过 DNA 芯片上信号强度的差异来测定。此外,翻译产物(蛋白质)的活性可通过与正常情况中的活性相比较来测定。

[0360] 也在预期的范围内的是:动物模型可包括转基因动物,包括例如其中已人工导入并且表达标志物基因的动物;标志物基因敲除动物;和其中已用另一个基因置换标志物基因的基因敲入动物。已向其中导入了标志物基因的反义核酸、核酶、具有 RNAi 作用的多核苷酸或用作诱饵核酸的 DNA 等的转基因动物可用作转基因动物。此类转基因动物还包括例如这样的动物,在所述动物中标志物蛋白的活性已通过将突变导入基因的编码区而得到增强或抑制,或氨基酸序列已被修饰而变得抗水解或对水解敏感。氨基酸序列中的突变包括置换、缺失、插入和添加。

[0361] 表达的实例

[0362] 此外,标志物基因本身的表达可通过向基因的转录调控区导入突变来控制。本领域技术人员理解此类氨基酸置换。同样,被突变的氨基酸的数目不受特别限制,只要活性得到保持即可。通常,其在 50 个氨基酸以内,在某些非限定性实施方案中,在 30 个氨基酸以内,在 10 个氨基酸以内,或在 3 个氨基酸以内。突变的位点可以是任何位点,只要活性得到保持即可。

[0363] 在另一个方面,本文中提供了治疗特定病症和/或疾病的治疗剂的候选化合物的筛选方法。一个或多个标志物基因选自本文中描述的基因。可通过选择能够增加或减少标志物基因的表达水平的化合物来获得结肠癌相关疾病的治疗剂。

[0364] 应理解,表述“增加基因的表达水平的化合物”是指促进基因转录、基因翻译或蛋白质活性的表达的步骤中的任一步骤的化合物。另一方面,表述“减少基因的表达水平的化合物”,如本文中所用的,是指抑制这些步骤中的任一步骤的化合物。

[0365] 在特定的方面,可在体内或体外进行筛选用于病症和/或疾病的治疗剂的方法。该筛选方法可以例如通过下列步骤来进行:

[0366] 1) 对动物受试者施用候选化合物;

[0367] 2) 测量动物受试者的生物学样品中标志物基因的表达水平;或

[0368] 3) 选择与对照(其未与候选化合物接触)中标志物基因的表达水平相比较增加或减少标志物基因的表达水平的化合物。

[0369] 在另一个方面,本文中提供了这样的方法,其通过将动物受试者与候选化合物接触,然后监控化合物对来源于动物受试者的生物学样品中标志物基因的表达水平的作用来评估药剂的候选化合物对标志物基因的表达水平的功效。来源于动物受试者的生物学样品中标志物基因的表达水平的变化可使用与上述检测方法中所用的相同的技术来监控。此外,基于评估,可通过筛选来选择药剂的候选化合物。

[0370] 本文中所引用的所有专利、专利申请和参考文献以其全文通过引用合并入本文。虽然对于制备和使用其的本领域技术人员来说已十分详尽地描述和例示了本发明,但各种

改变、修饰和改进是显然的,且不背离本发明的精神和范围。本领域技术人员易于理解,本发明可进行适当地改变以适合于实现目的和获得提及的目标和有利方面以及其中固有的那些。

[0371] 某些核碱基 (Nucleobase) 序列

[0372] 本文中描述的成熟 miRNA 和它们的相应的茎-环序列的核碱基序列是见于 miRBase(见于 <http://microrna.sanger.ac.uk/> 的 miRNA 序列和注释的在线可搜索数据库) 中的序列。miRBase 序列数据库中的条目 (entry) 代表预测的 miRNA 转录物的发夹部分 (茎-环) 和关于成熟 miRNA 序列的定位和序列的信息。数据库中 miRNA 的茎-环序列严格说来不是前体 miRNA (pre-miRNA), 并且在一些情况下可包括 pre-miRNA 和来自假定的初级转录物的一些侧翼序列。本文中描述的 miRNA 核碱基序列包括 miRNA 的任何形式, 包括 miRBase 序列数据库的 Release 10.0 中描述的序列和 miRBase 序列数据库的任何更早的 Release 中描述的序列。序列数据库释放可导致某些 miRNA 的重新命名。序列数据库释放可导致成熟 miRNA 序列的变化。可包括此类修饰的寡核苷酸的化合物可与本文中描述的 miRNA 的任何核碱基序列形式互补。

[0373] 应理解,本文中所示的任何核碱基序列不依赖于对糖部分、核苷间连接或核碱基的任何修饰。还应理解,包含 U 的核碱基序列也包括其中在一个或多个具有 'U' 的位点上 'U' 被 'T' 置换的相同核碱基序列。反过来,应理解,包含 T 的核碱基序列也包括其中在一个或多个具有 'T' 的位点上 'T' 被 'U' 置换的相同核碱基序列。

[0374] 在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸具有与 miRNA 或其前体互补的核碱基序列,这意味着修饰的寡核苷酸的核碱基序列在 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个核碱基的区域中与 miRNA 或其前体的互补序列至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 同一,或两个序列在严格杂交条件下杂交。因此,在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的核碱基序列相对于其靶 miRNA 或靶 miRNA 前体序列可具有一个或多个错配的碱基对,并且能够与其靶序列杂交。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸具有与 miRNA 或其前体 100% 互补的核碱基序列。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的核碱基序列具有对 miRNA 的全长互补性。

[0375] miRNA (miR) 疗法

[0376] 在一些实施方案中,本发明提供了抑制受试者的一个或多个基因的表达的微 RNA。微 RNA 表达特征谱可用作新型癌症生物标志物。

[0377] 本文中包括使用一个或多个 MiR 抑制基因表达和 / 或活性的方法。在一些实施方案中,miR 抑制蛋白质的表达。在其他实施方案中,miRNA 抑制基因活性 (例如,细胞侵袭活性)。

[0378] 可通过本领域技术人员熟知的许多种技术从细胞或组织分离,重组产生或体外合成 miRNA。在一个实施方案中,从细胞或组织分离 miRNA。用于从细胞或组织分离 miRNA 的技术对于本领域技术人员来说是熟知的。例如,可使用来自 Ambion, Inc. 的 mirVana miRNA 分离试剂盒从总 RNA 分离 miRNA。另一种技术利用 flashIPAGE™ Fractionator System (Ambion, Inc.) 来进行小核酸的 PAGE 纯化。

[0379] 关于 miRNA 治疗剂的使用,本领域技术人员理解,体内施用的核酸被吸收和分配

至细胞和组织。

[0380] 可以以合适的方式递送核酸,所述方式使得能够组织特异性地吸收试剂和 / 或核酸递送系统。本文中描述的试剂可通过任何已知的常规疗法来补充治疗状况,所述疗法包括但不限于抗体施用、疫苗施用、细胞毒性剂、天然氨基酸多肽、核酸、核苷酸类似物和生物应答调节剂的施用。可一起或相继使用两个或多个组合的化合物。

[0381] 本发明的某些实施方案提供了包含 (a) 一种或多种核酸或小分子化合物以及 (b) 一种或多种其他化学治疗剂的药物组合物。

[0382] 另外的有用的定义

[0383] “受试者”是指经选择接受治疗或疗法的人或非人动物。“怀疑患有……的受试者”是指展示病症、疾病或病况的一个或多个临床指标的受试者。

[0384] “预防”或“防止”是指延迟或阻止病况或疾病的发作、发展或进展,持续一段时间,包括数周、数月或数年。“治疗”或“医治”是指一种或多种用于治愈或改善病症和 / 或疾病的特定方法的应用。在某些实施方案中,特定方法是一种或多种药剂的施用。

[0385] “改善”是指减轻病况或疾病的至少一个指标的严重度。在某些实施方案中,改善包括病况或疾病的一个或多个指标的进展的延迟或减缓。指标的严重度可通过对于本领域技术人员来说是已知的主观或客观量度来测定。

[0386] “有此需要的受试者”是指确定为需要治疗或疗法的受试者。

[0387] “施用”是指给受试者提供药剂或组合物,包括但不限于由医学专业人员施用和自我施用。

[0388] “胃肠外施用”是指通过注射或输注进行的施用。胃肠外施用包括但不限于皮下施用、静脉内施用、肌肉施用、动脉内施用和颅内施用。“皮下施用”是指紧在皮肤下方施用。

[0389] “改善功能”是指使功能向正常参数改变。在某些实施方案中,通过测量在受试者的体液中发现的分子评估功能。“药物组合物”是指适合于给个体施用的物质的混合物,其包括药剂。例如,药物组合物可包含修饰的寡核苷酸和无菌水性溶液。

[0390] “靶核酸”、“靶 RNA”、“靶 RNA 转录物”和“核酸靶”都是指能够被反义化合物靶向的核酸。“靶向”是指与靶核酸杂交并且诱导期望的作用的核碱基序列的设计和选择的过程。“被靶向”是指具有核碱基序列,所述序列允许与靶核酸杂交以诱导期望的作用。在某些实施方案中,期望的作用是靶核酸的减少。

[0391] “调控”是指对功能或活性的干扰。在某些实施方案中,调控是指基因表达的增加。在某些实施方案中,调控是指基因表达的减少。

[0392] “表达”是指藉以将基因的编码信息转变成存在于细胞中和在细胞中运转的结构的功能和步骤。

[0393] “区域”是指核酸内一部分连接的核苷。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸具有与靶核酸的区域互补的核碱基序列。例如,在某些此类实施方案中,修饰的寡核苷酸与 miRNA 茎-环序列的区域互补。在某些此类实施方案中,修饰的寡核苷酸与 miRNA 序列的区域 100% 同一。

[0394] “区段”是指更小的区域或区域的亚部分。

[0395] “核碱基序列”是指以 5' 至 3' 方向,不依赖于任何糖、连接和 / 或核碱基修饰的连续核碱基的顺序。

[0396] “连续核碱基”是指核酸中彼此紧密相邻的核碱基。

[0397] “核碱基互补性”是指两个核碱基通过氢键非共价配对的能力。“互补”是指第一核碱基序列在 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个核碱基的区域内与第二核碱基序列的互补序列至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 同一，或 100% 同一，或两个序列在严格杂交条件下杂交。在某些实施方案中，具有与 miRNA 或其前体 100% 互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸可以在修饰的寡核苷酸的整个长度上不与 miRNA 或其前体 100% 互补。

[0398] “互补性”是指第一核酸与第二核酸之间的核碱基配对能力。“全长互补性”是指第一核酸的各核碱基能够与第二核酸中相应的位点上的各核碱基配对。例如，在某些实施方案中，其中各核碱基与 miRNA 中的核碱基具有互补性的修饰的寡核苷酸与 miRNA 具有全长互补性。

[0399] “百分比互补性”是指核酸中互补核碱基的数目除以核酸的长度。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸的百分比互补性是指与靶核酸互补的核碱基的数目除以修饰的寡核苷酸的核碱基数目。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸的百分比互补性是指与 miRNA 互补的核碱基的数目除以修饰的寡核苷酸的核碱基的数目。

[0400] “百分比结合的区域”是指与寡核苷酸区域互补的区域的百分比。通过将寡核苷酸互补的靶区域的核碱基的数目除以靶区域的长度来计算百分比结合的区域。在某些实施方案中，百分比结合的区域是至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99% 或 100%。

[0401] “百分比同一性”是指第一核酸中与第二核酸相应的位点上的核碱基相同的核碱基的数目除以第一核酸中的核碱基的总数。

[0402] 本文中使用的“大体上同一的”可以指第一与第二核碱基序列在 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个核碱基的区域上至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 同一，或 100% 同一。

[0403] “杂交”是指通过核碱基的互补性发生的互补核酸的退火。

[0404] “错配”是指不能够与第二核酸的相应的位点上的核碱基配对的第一核酸的核碱基。

[0405] “非互补核碱基”是指不能够通过氢键配对的两个核碱基。

[0406] “同一的”是指具有相同核碱基序列。

[0407] “miRNA”或“miR”是指长度在 18 至 25 个核碱基之间的非编码 RNA，其与编码 RNA 杂交并且调控编码 RNA 的表达。在某些实施方案中，miRNA 是 Dicer 切割 pre-miRNA 的产物。miRNA 的实例见于称为 miRBase 的 miRNA 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。

[0408] “Pre-miRNA”或“pre-miR”是指具有发夹结构的非编码 RNA，其包含 miRNA。在某些实施方案中，pre-miRNA 是称为 Drosha 的双链 RNA 特异性核糖核酸酶切割 pri-miR 的产物。

[0409] “茎-环序列”是指具有发夹结构并且包含成熟 miRNA 序列的 RNA。Pre-miRNA 序列和茎-环序列可重叠。茎-环序列的实例可见于称为 miRBase 的 miRNA 数据库 (<http://>

microrna.sanger.ac.uk/)。

[0410] “miRNA 前体”是指源自基因组 DNA 并且包含含有一个或多个 miRNA 序列的非编码性结构化 RNA 的转录物。例如,在某些实施方案中,miRNA 前体是 pre-miRNA。在某些实施方案中,miRNA 前体是 pri-miRNA。

[0411] “反义化合物”是指具有允许与靶核酸杂交的核碱基序列的化合物。在某些实施方案中,反义化合物是具有与靶核酸互补的核碱基序列的寡核苷酸。

[0412] “寡核苷酸”是指连接的核苷的聚合物,各核苷可以彼此独立地被修饰或不被修饰。“天然发生的核苷间连接”是指核苷之间的 3' 至 5' 磷酸二酯连接。“天然核碱基”是指相对于其天然发生的形式未被修饰的核碱基。“miR 拮抗剂”是指经设计用于干扰或抑制 miRNA 的活性的试剂。在某些实施方案中,miR 拮抗剂包括靶向 miRNA 的反义化合物。在某些实施方案中,miR 拮抗剂包括具有与 miRNA 或其前体的核碱基序列互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,miR 拮抗剂包括干扰或抑制 miRNA 的活性的小分子等。

[0413] 本文中所描述的方法和试剂代表优选实施方案,是示例性的,并且不意欲限制本发明的范围。其中的改进和其他用途对于本领域技术人员来说显然的。这些改进包括在本发明的精神内并且由权利要求的范围界定。对于本领域技术人员来说,同样极显然的是可对本文中公开的发明进行各种替代和改进而不背离本发明的范围和精神。

[0414] 应理解,虽然本发明已通过优选实施方案和任选特征明确地公开,但本领域技术人员可采用本文中公开的概念的改进和变化,并且此类改进和变化被认为在由所附权利要求界定的本发明的范围内。

[0415] 虽然通过参考各种和优选实施方案描述了本发明,但本领域技术人员应当理解,可进行各种变化并且可用等同物替代其元素而不背离本发明的基本范围。此外,可进行许多改进以使特定的情况或材料适合于本发明的教导而不背离本发明的基本范围。

[0416] 参考文献

[0417] 本文中用于举例说明本发明或提供关于本发明的实施的另外的详细内容的公开案和其他材料通过引用合并入本文,并且为方便起见提供于下列参考书目中。

[0418] 本文中引用的任何文献的引用不意欲作为任何前述内容是相关现有技术的承认。关于日期的所有声明和关于这些文献的内容的所有陈述基于申请人可获得的信息,并且不构成关于这些文献的日期或内容的正确性的任何承认。

[0419] Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S., and Kato, J.Y. (2000). Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J Biol Chem* 275,6337-6345. Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23,4709-4716.

[0420] Blow, J.J., and Hodgson, B. (2002). Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol* 12,72-78.

[0421] Bonci, D., Cittadini, A., Latronico, M.V.G., Borello, U., Aycock, J.K., Drusco, A., Innocenzi, A., Follenzi, A., Lavitrano, M., Monti, M.G., et al. (2003). ' Advanced ' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo. *Gene Therapy* 10,630636.

- [0422] Costinean, S. , Zanesi, N. , Pekarsky, Y. , Tili, E. , Volinia, S. , Heerema, N. , and Croce, C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103,7024-7029.
- [0423] De Caestecker, M.P. , Piek, E. , and Roberts, A.B. (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 92,1388-1402.
- [0424] DeGregori, J. (2002). The genetics of the E2F family of transcription factors :shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* 1602,131-150.
- [0425] Dews, M. , Homayouni, A. , Yu, D. , Murphy, D. , Sevignani, C. , Wentzel, E. , Furth, E. E. , Lee, W. M. , Enders, G. H. , Mendell, J. T. , and Thomas-Tikhonenko, A. (2006).
- [0426] Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38,1060-1065.
- [0427] Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12,2245-2262.
- [0428] Egle, A. , Harris, A. W. , Bouillet, P. , and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 101,6164-6169.
- [0429] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. (2006) Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6,259-69
- [0430] Fox, J. G. , Beck, P. , Dangler, C. A. , Whary, M. T. , Wang, T. C. , Shi, H. N. , and Nagler-Anderson, C. (2000). Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med* 6,536-542. Gross, A. , McDonnell, J. M. , and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13,1899-1911.
- [0431] He, L. , Thomson, J. M. , Hemann, M. T. , Hernando-Monge, E. , Mu, D. , Goodson, S. , Powers, S. , Cordon-Cardo, C. , Lowe, S. W. , Hannon, G. J. , and Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435,828-833.
- [0432] Hossain, A. , Kuo, M. T. , and Saunders, G. F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* 26,8191- 8201.
- [0433] Houbaviy, H. B. , Murray, M. F. , and Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5,351-358.
- [0434] Houghton, J. , Fox, J. G. , and Wang, T. C. (2002). Gastric cancer :laboratory bench to clinic. *J Gastroenterol Hepatol* 17,495-502.
- [0435] Hwang, H. W. , Wentzel, E. A. , and Mendell, J. T. (2007). A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 315,97-100.
- [0436] Johnson, D. G. , and DeGregori, J. (2006). Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Curr Mol Med* 6,731-738.
- [0437] Ju, H. R. , Jung, U. , Sonn, C. H. , Yoon, S. R. , Jeon, J. H. , Yang, Y. , Lee, K. N. , and

Choi, I. (2003). Aberrant signaling of TGF- β 1 by the mutant Smad4 in gastric cancer cells. *Cancer Lett* 196, 197–206.

[0438] Kim, Y. K. and Kim, V. K. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26, 775–783.

[0439] Kloosterman, W. P., and Plasterk, R. H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11, 441–450.

[0440] Lauren P (1965) The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64:31–49.

[0441] Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2005). E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep* 6, 661–668.

[0442] Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R. S., and Nevins, J. R. (1998). E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* 12, 2120–2130.

[0443] Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 120 15–20. Li, S. S., Xue, W. C., Khoo, U. S., Ngan, H. Y., Chan, K. Y., Tam, I. Y., Chiu, P. M., Ip, P. P., Tam, K. F., and Cheung, A. N. (2005). Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathology* 46, 307–313.

[0444] Liu, C.-G., Calin, G. A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., et al. (2004). An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci* 101, 9740–9744. Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838.

[0445] Ma L., Teruya-Feldstein J. and Weinberg R. A. (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 449, 682–8.

[0446] Mattioli, E., Vogiatzi, P., Sun, A., Abbadessa, G., Angeloni, G., D'Ugo, D., Trani, D., Gaughan, J. P., Vecchio, F. M., Cevenini, G., et al. (2007). Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16 (INK4A), p27 (KIP1), p21 (WAF1), Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *J Cell Physiol* 210, 183–191.

[0447] Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J. T., Jiang, J., Schmittgen, T. D., and Patel, T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 130, 2113–2129.

[0448] Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R. V., McCurrach, M. E., Jacobson, M. D.,

Narita, M. , Zhang, M. Q. , Lazebnik, Y. , Bar-Sagi, D. , and Lowe, S. W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4, 859-864.

[0449] O' Donnell, K. A. , Wentzel, E. A. , Zeller, K. I. , Dang, C. V. , and Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.

[0450] Ohgushi, M. , Kuroki, S. , Fukamachi, H. , O' Reilly, L. A. , Kuida, K. , Strasser, A. , and Yonehara, S. (2005). Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol Cell Biol* 25,1001710028.

[0451] Park, K. , Kim, S. J. , Bang, Y. J. , Park, J. G. , Kim, N. K. , Roberts, A. B. , and Sporn, M. B. (1994). Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8772-8776.

[0452] Peng, D. F. , Sugihara, H. , Mukaisho, K. , Tsubosa, Y. , and Hattori, T. (2003). Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas :metaphase-and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples from individual tumours. *J Pathol* 201,439-450.

[0453] Pierce, A. M. , Schneider-Broussard, R. , Gimenez-Conti, I. B. , Russell, J. L. , Conti, C. J. , and Johnson, D. G. (1999). E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol* 19,6408-6414.

[0454] Ren, B. , Yu, G. , Tseng, G. C. , Cieply, K. , Gavel, T. , Nelson, J. , Michalopoulos, G. , Yu, Y. P. , and Luo, J. H. (2006). MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene* 25,1090-1098.

[0455] Rodriguez, A. , Vigorito, E. , Clare, S. , Warren, M. V. , Couttet, P. , Soond, D. R. , van Dongen, S. , Grocock, R. J. , Das, P. P. , Miska, E. A. , et al. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316,608-611.

[0456] Scandura, J. M. , Boccuni, P. , Massague, J. , and Nimer, S. D. (2004). Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101,15231-15236.

[0457] Suzuki, S. , Adachi, A. , Hiraiwa, A. , Ohashi, M. , Ishibashi, M. , and Kiyono, T. (1998). Cloning and characterization of human MCM7 promoter. *Gene* 216,85-91.

[0458] Suzuki, T. , Yasui, W. , Yokozaki, H. , Naka, K. , Ishikawa, T. , and Tahara, E. (1999). Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer* 81,535-538.

[0459] Sylvestre, Y. , De Guire, V. , Querido, E. , Mukhopadhyay, U. K. , Bourdeau, V. , Major, F. , Ferbeyre, G. , and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory

feedback loop. *J Biol Chem* 282,2135–2143.

[0460] Takada, H., Imoto, I., Tsuda, H., Sonoda, I., Ichikura, T., Mochizuki, H., Okanoue, T., and Inazawa, J. (2005). Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 96,100–110.

[0461] Tan, T. T., Degenhardt, K., Nelson, D. A., Beaudoin, B., Nieves-Neira, W., Bouillet, P., Villunger, A., Adams, J. M., and White, E. (2005). Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy. *Cancer Cell* 7, 227–238.

[0462] Thai, T. H., Calado, D. P., Casola, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J. L., et al. (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316,604–608.

[0463] Thomson, J. M., Newman, M., Parker, J. S., Morin-Kensicki, E. M., Wright, T., and Hammond, S. M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20,2202–2207.

[0464] Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., and Schlemper, R. J. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345,784–789.

[0465] van den Brink, G. R., and Offerhaus, G. J. (2007). The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer Cell* 11,109–117.

[0466] Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. -G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci* 103,2257–2261.

[0467] Voorhoeve, P. M. le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y. P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., et al. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124,1169–1181.

[0468] Weiss, M. M., Kuipers, E. J., Postma, C., Snijders, A. M., Pinkel, D., Meuwissen, S. G., Albertson, D., and Meijer, G. A. (2004). Genomic alterations in primary gastric adenocarcinomas correlate with clinicopathological characteristics and survival. *Cell Oncol* 26,307–317.

[0469] Woods, K., Thomson, J. M., and Hammond, S. M. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem* 282, 2130–2134.

[0470] Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9,189–198.

[0471] Yano, T., Ito, K., Fukamachi, H., Chi, X. Z., Wee, H. J., Inoue, K., Ida, H.,

Bouillet, P., Strasser, A., Bae, S. C., and Ito, Y. (2006). The RUNX3 tumor suppressor upregulates Bim in gastric epithelial cells undergoing transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 4474–4488.



正常胃

图 1A

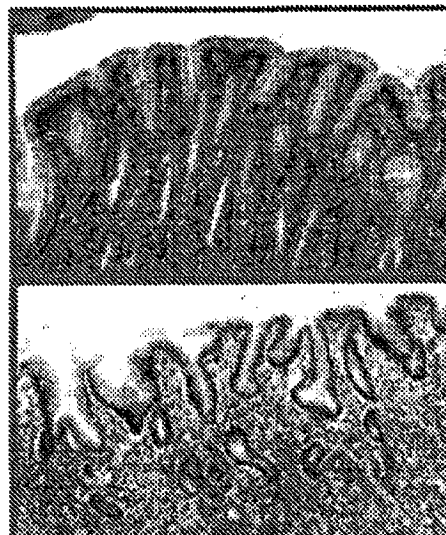


慢性胃炎

图 1A(续)

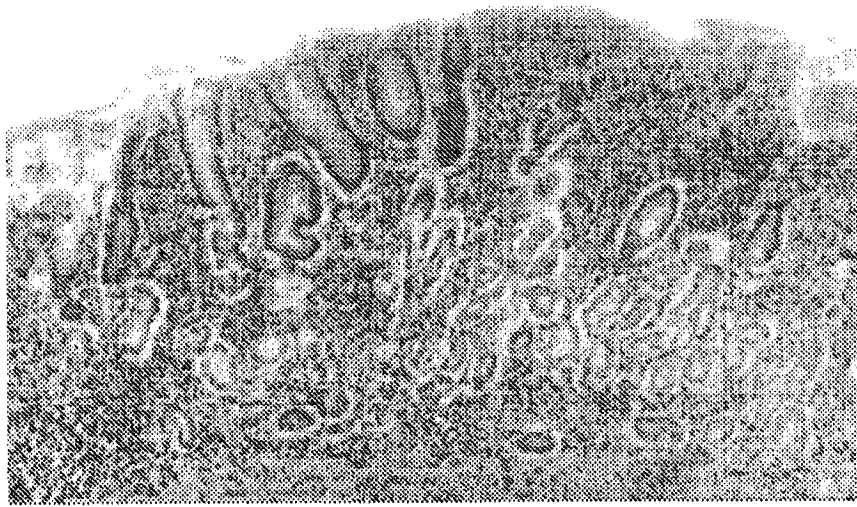
倍数变化中值	
miR-1	3.0
miR-155	2.5
miR-205	0.1
miR-203	0.1
miR-202	0.3
miR-20	0.4
miR-26b	0.4

图 1A(续)



无肿瘤粘膜

图 1B



胃癌

图 1B(续)

倍数变化中值	
miR-21	4.5
miR-223	4.2
miR-25	3.8
miR-17-5p	3.7
miR-125b	3.6
miR-181b	3.4
miR-106a	2.8
miR-107	2.7
miR-92	2.5
miR-103	2.5
miR-221	2.4
miR-93	2.3
miR-100	2.1
miR-106b	2.0
miR-136	0.6
miR-218	0.6
miR-212	0.6
miR-96	0.7
miR-339	0.7

图 1B(续)

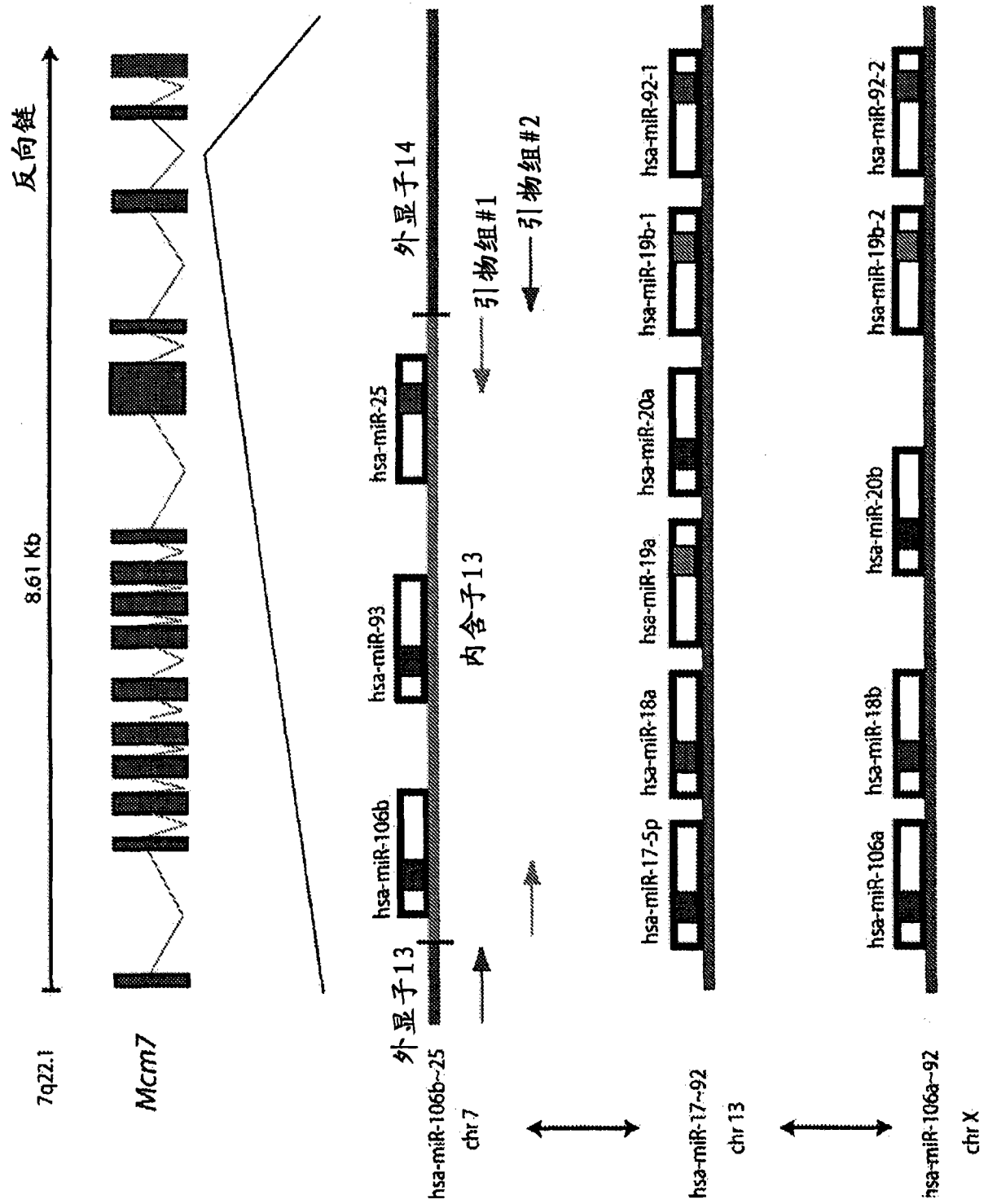


图 1C

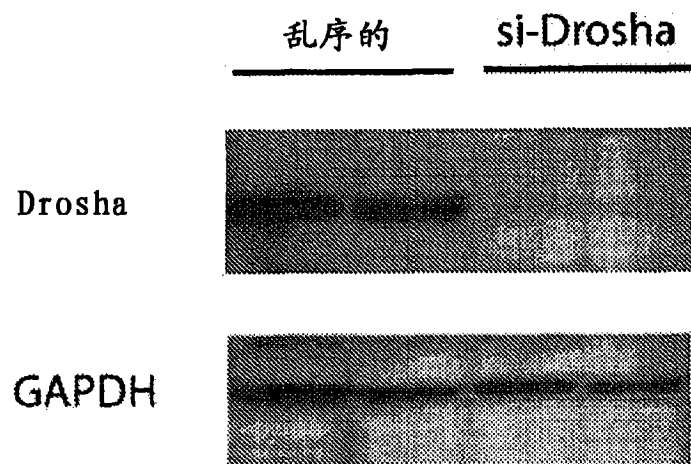


图 1D

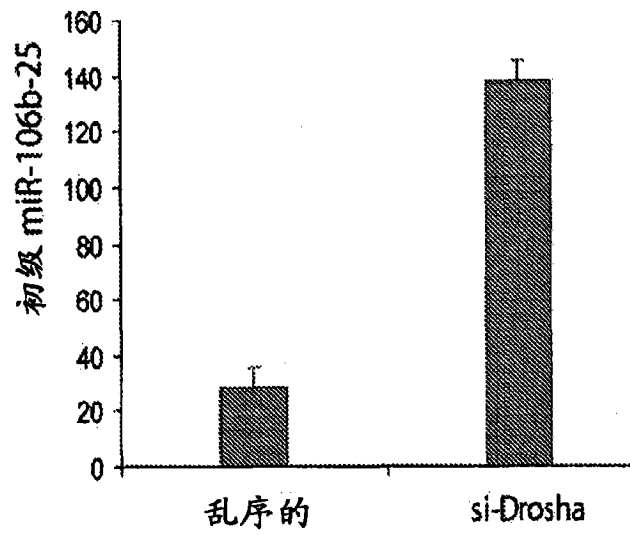


图 1E

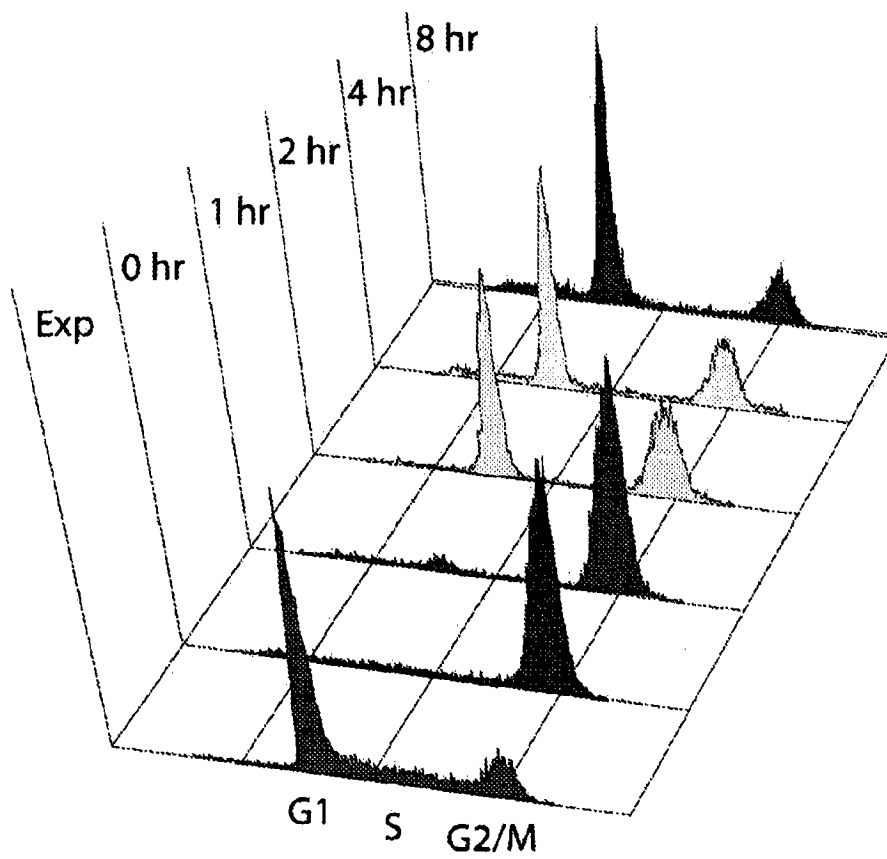


图 2A

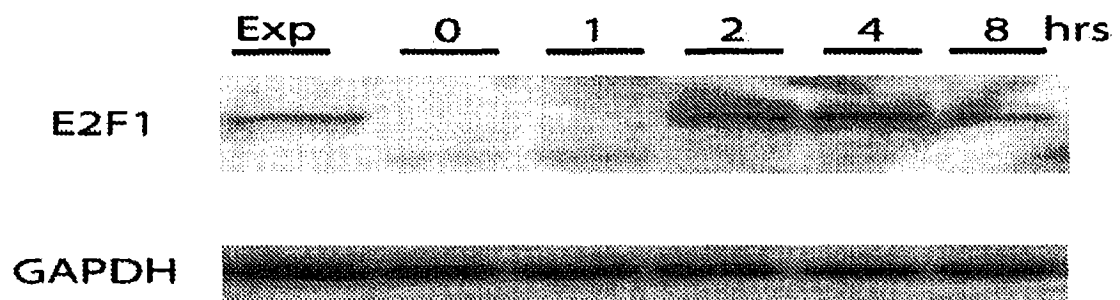


图 2B

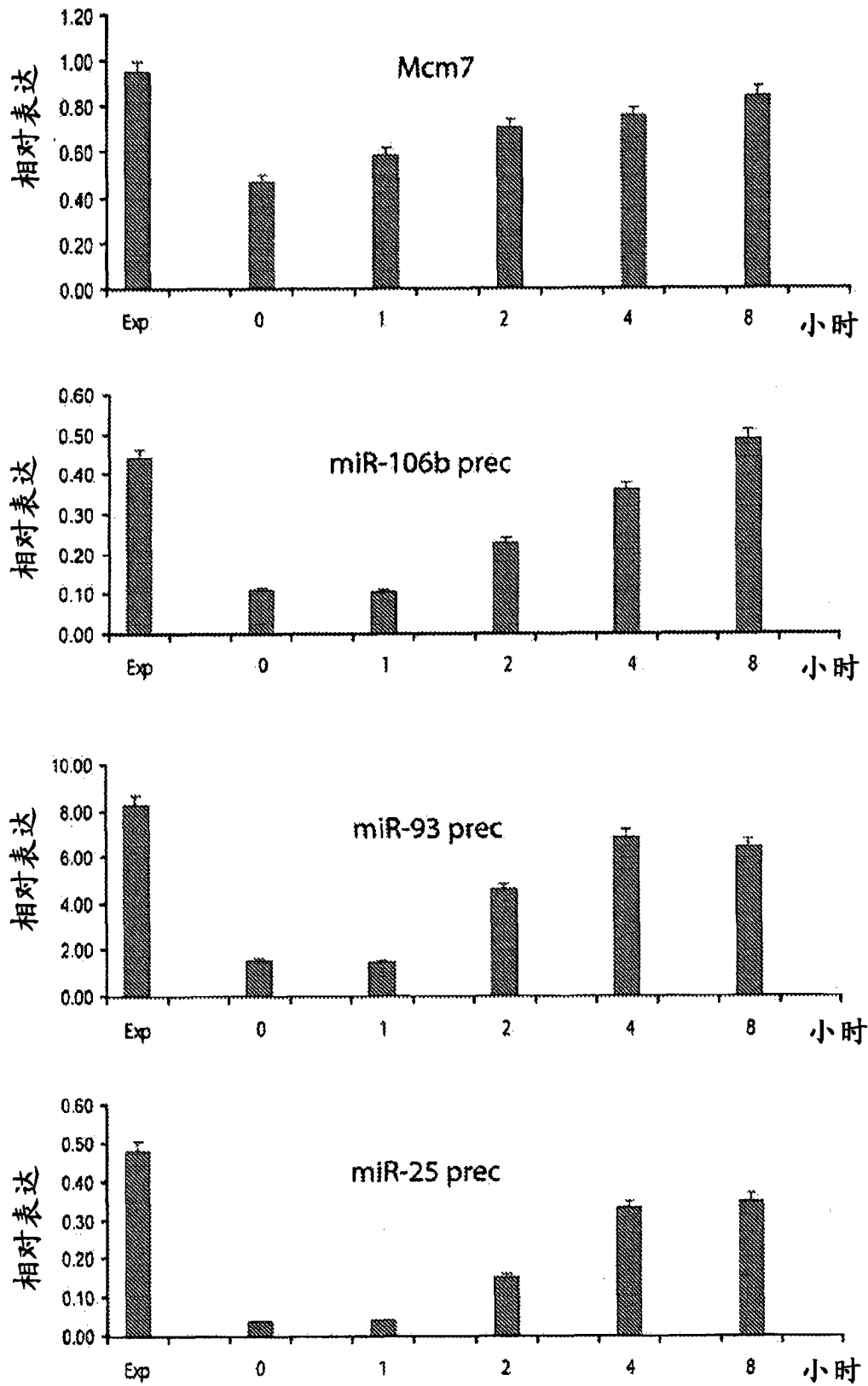


图 2C

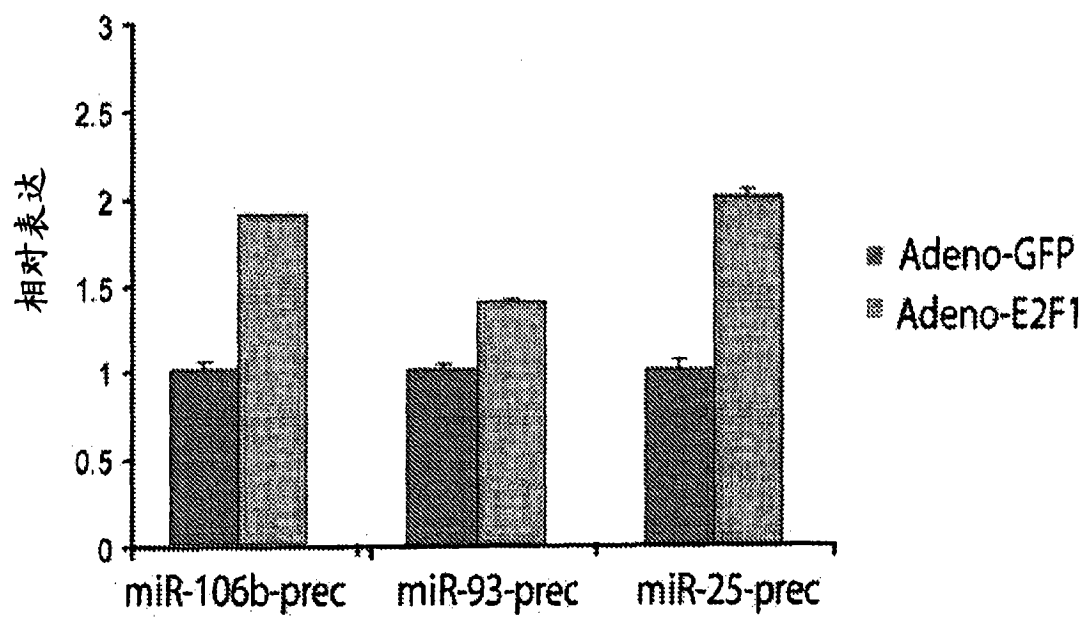


图 2D

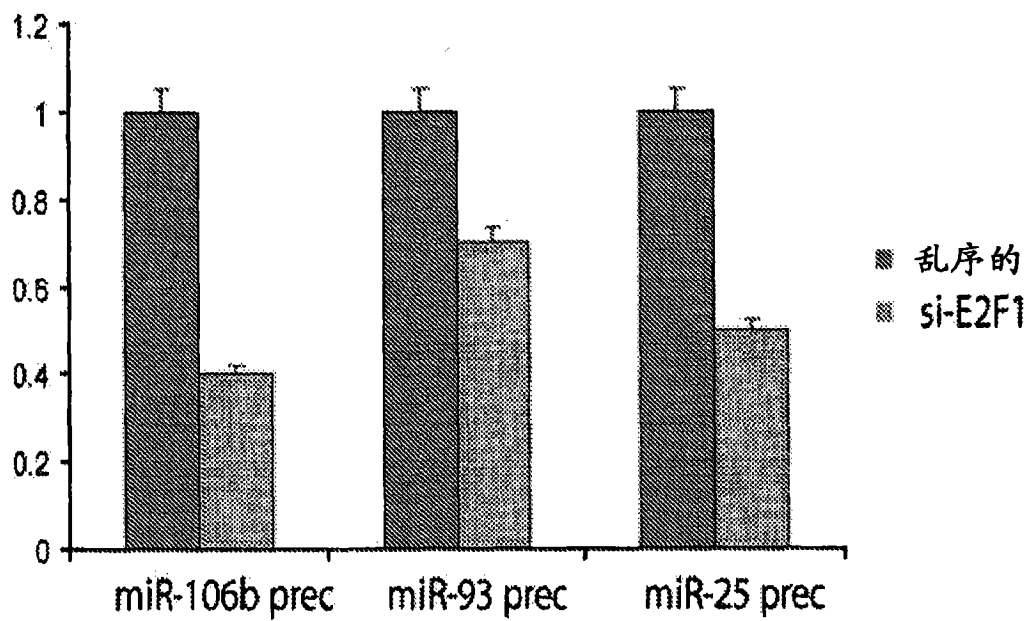


图 2E

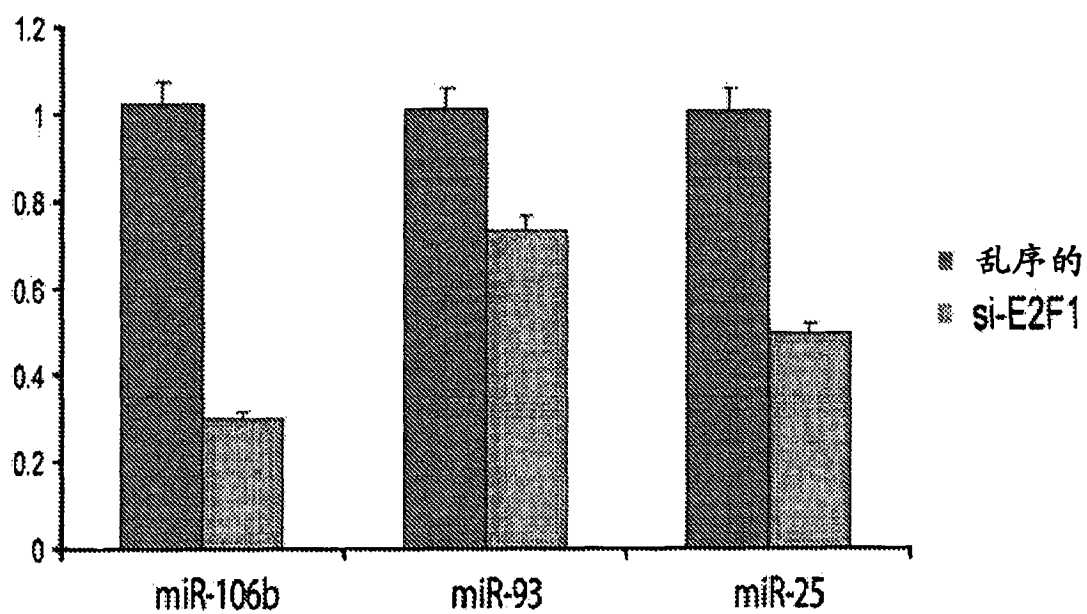


图 2F

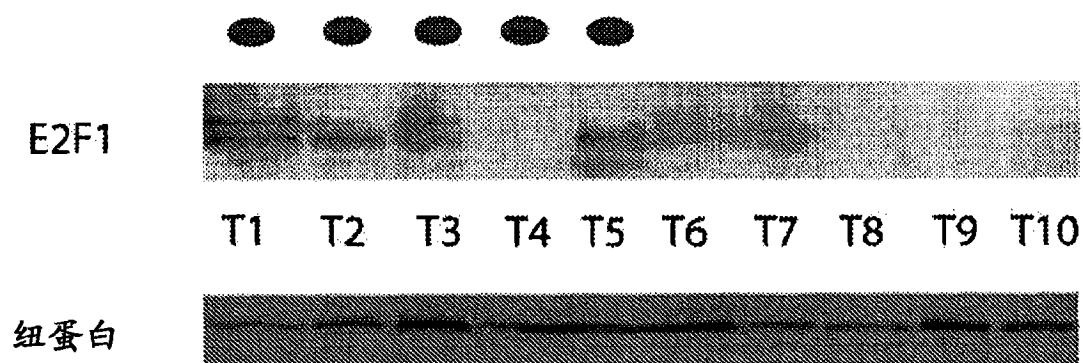


图 2G

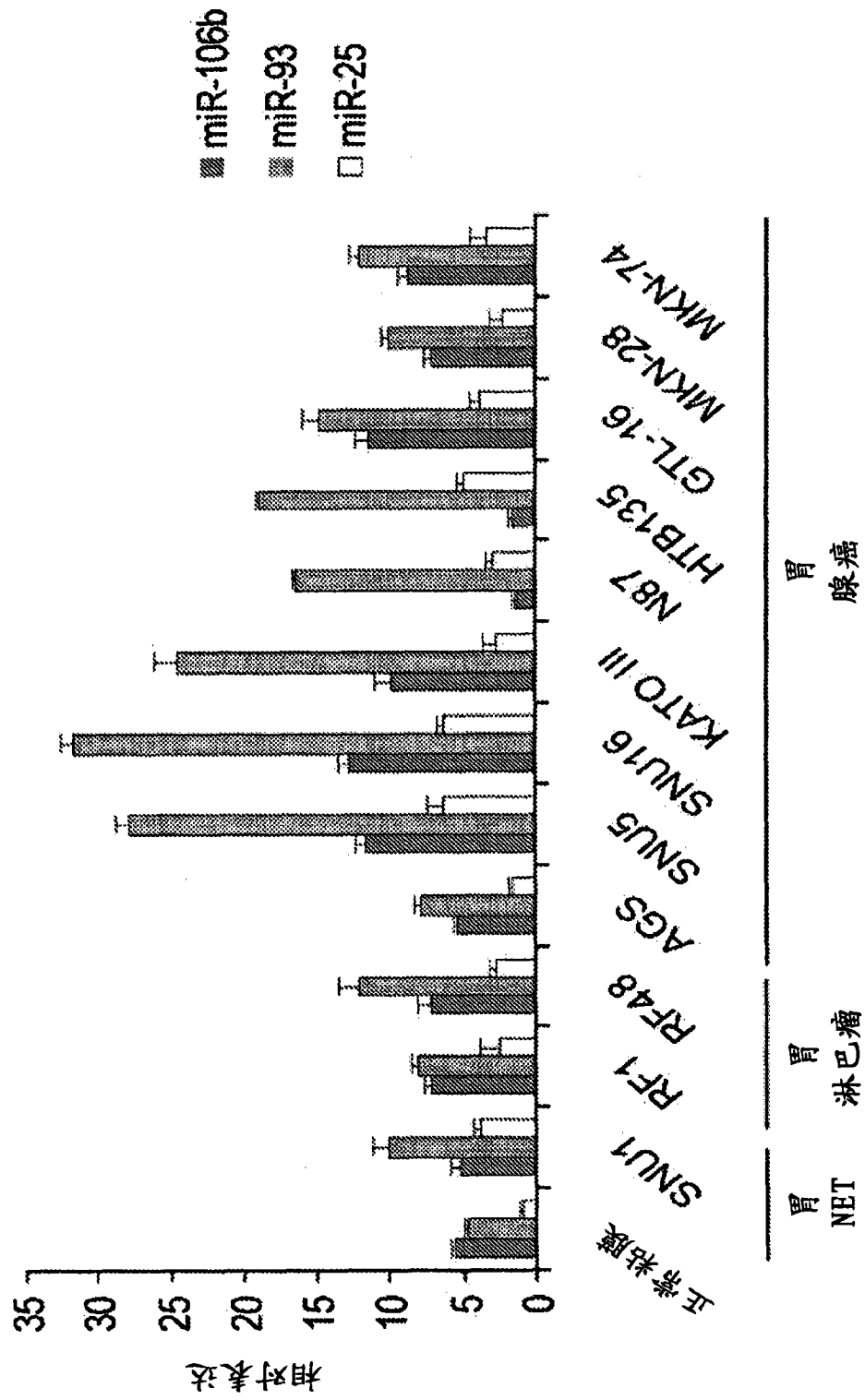


图 3A

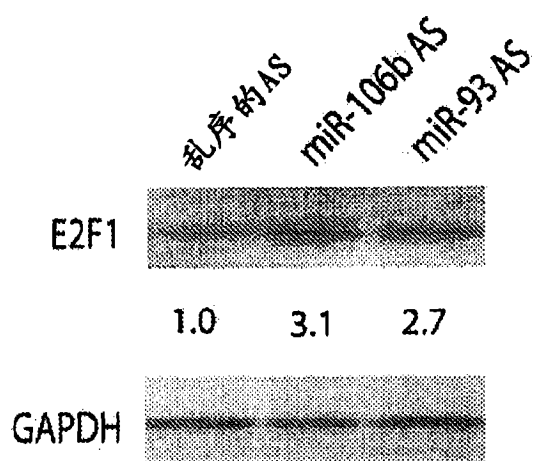


图 3B

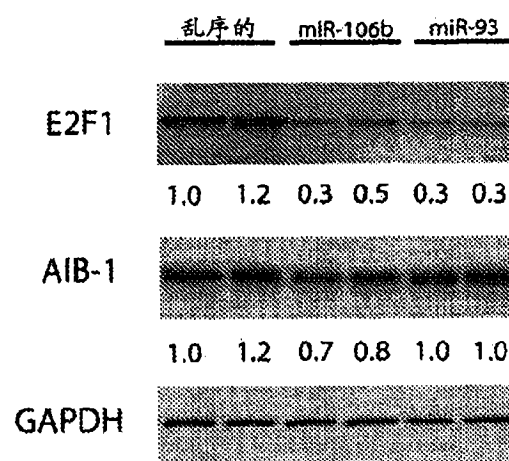


图 3C

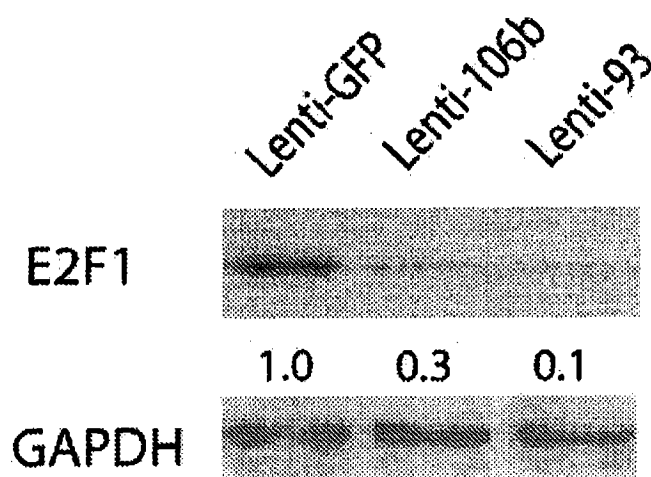


图 3D

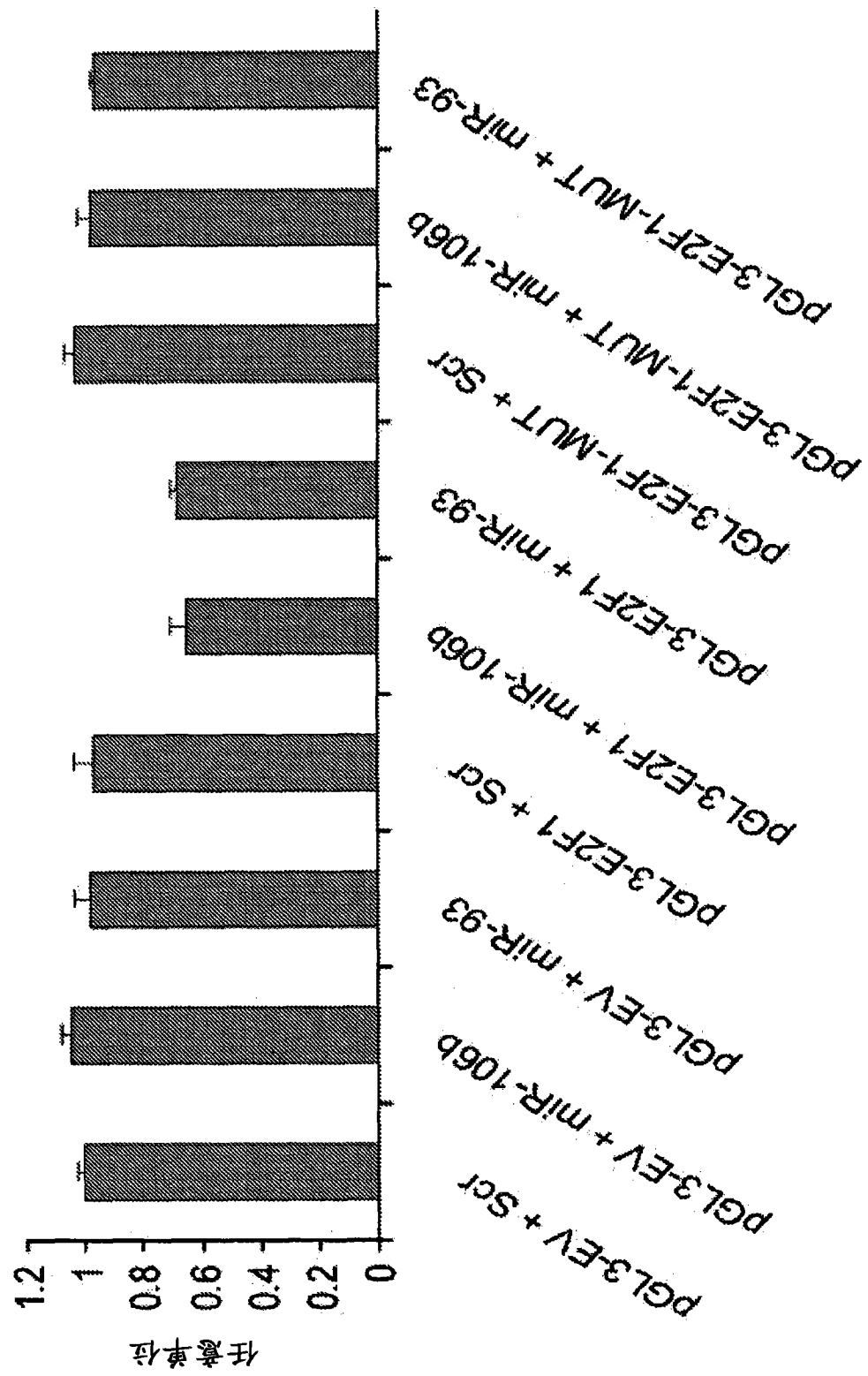


图 3E

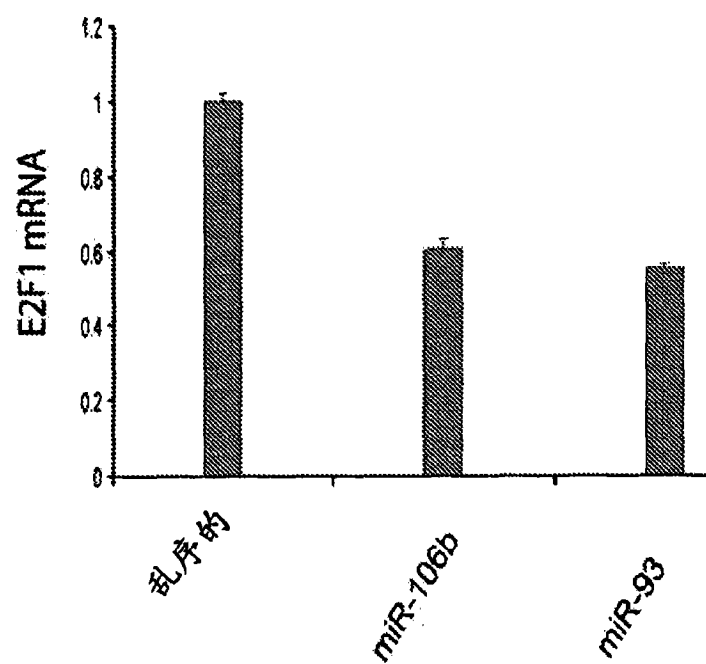


图 3F

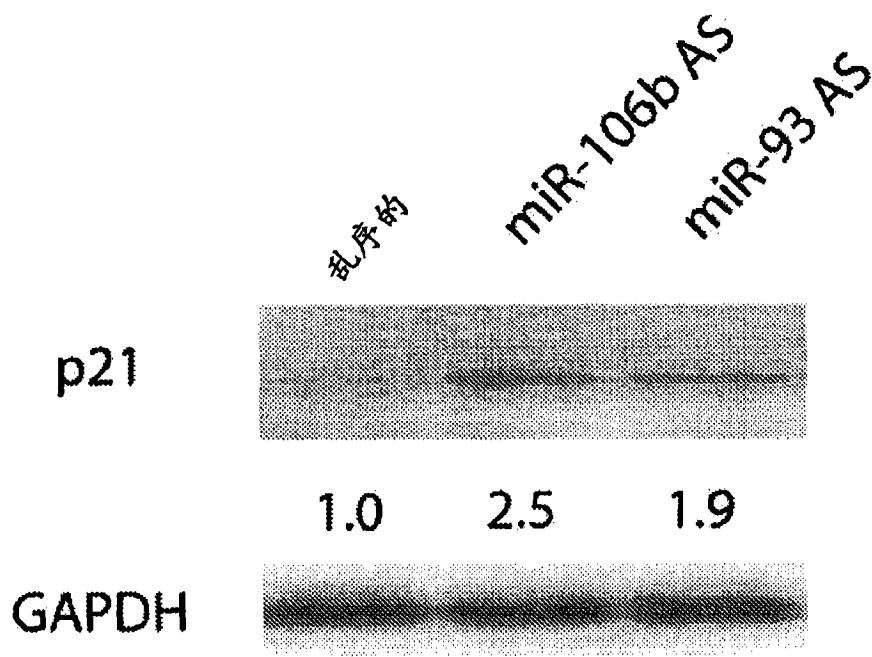


图 4A

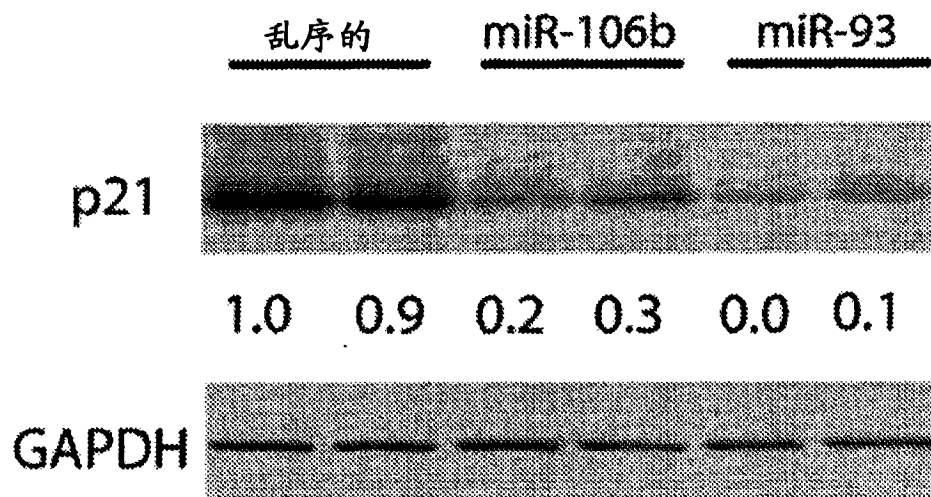


图 4B

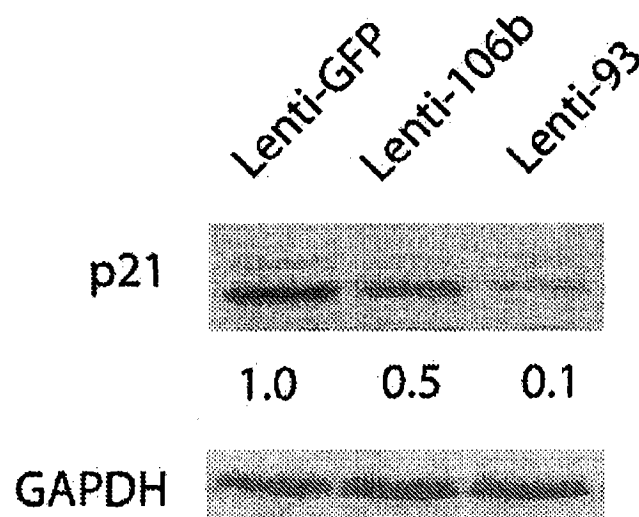


图 4C

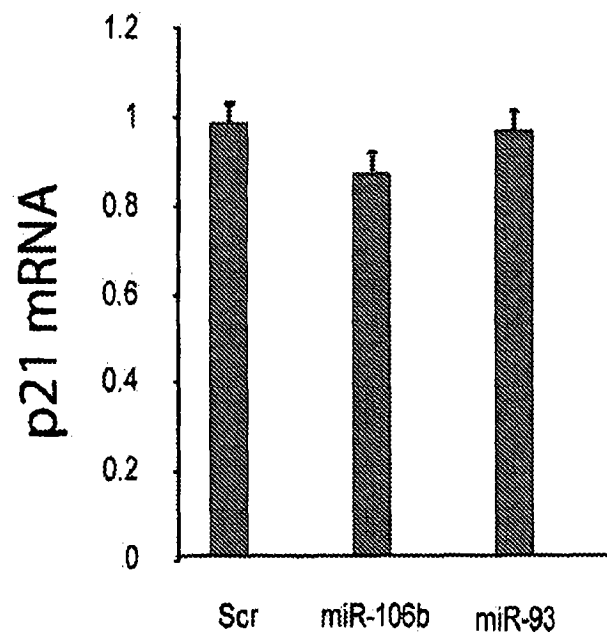


图 4D

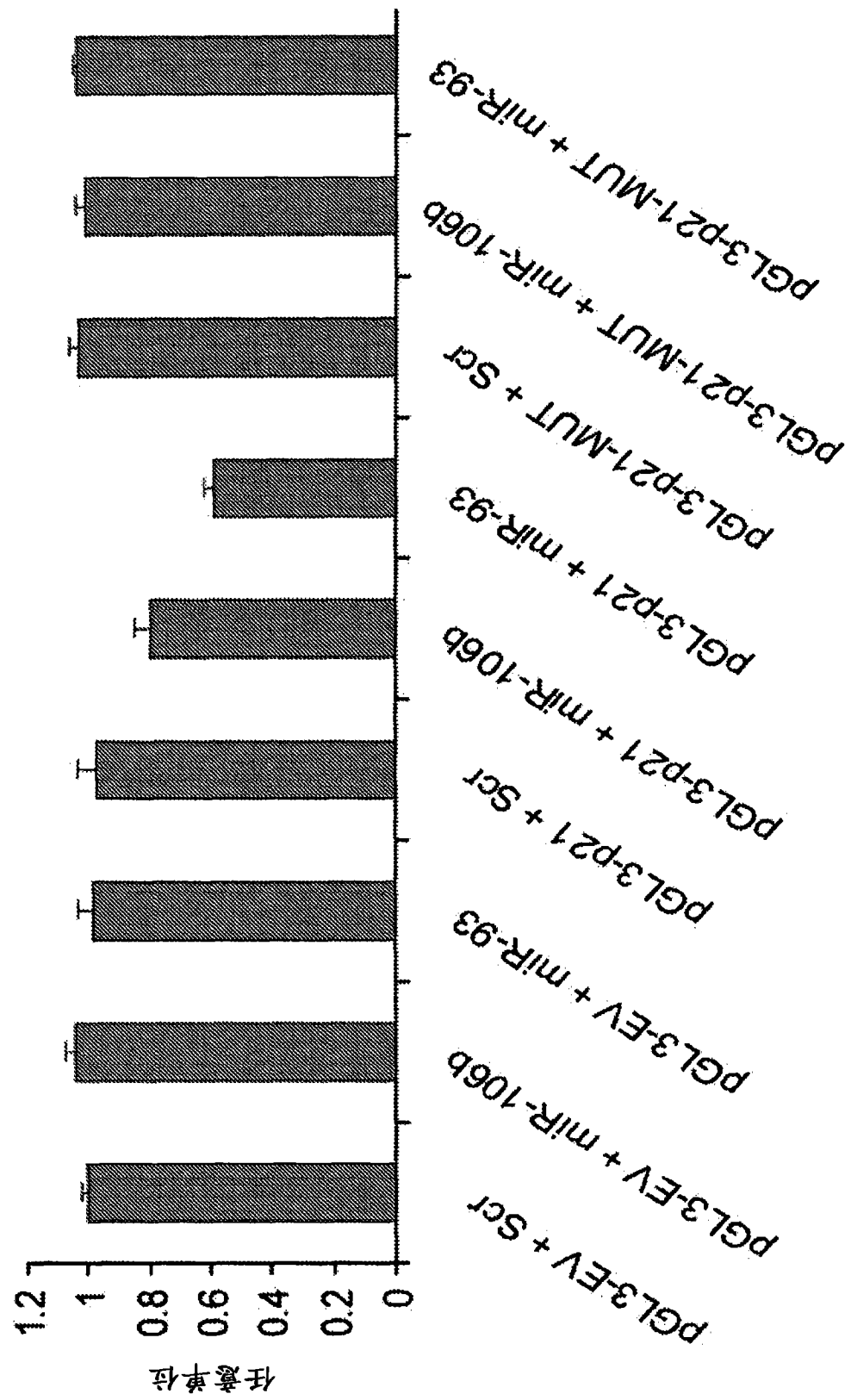


图 4E

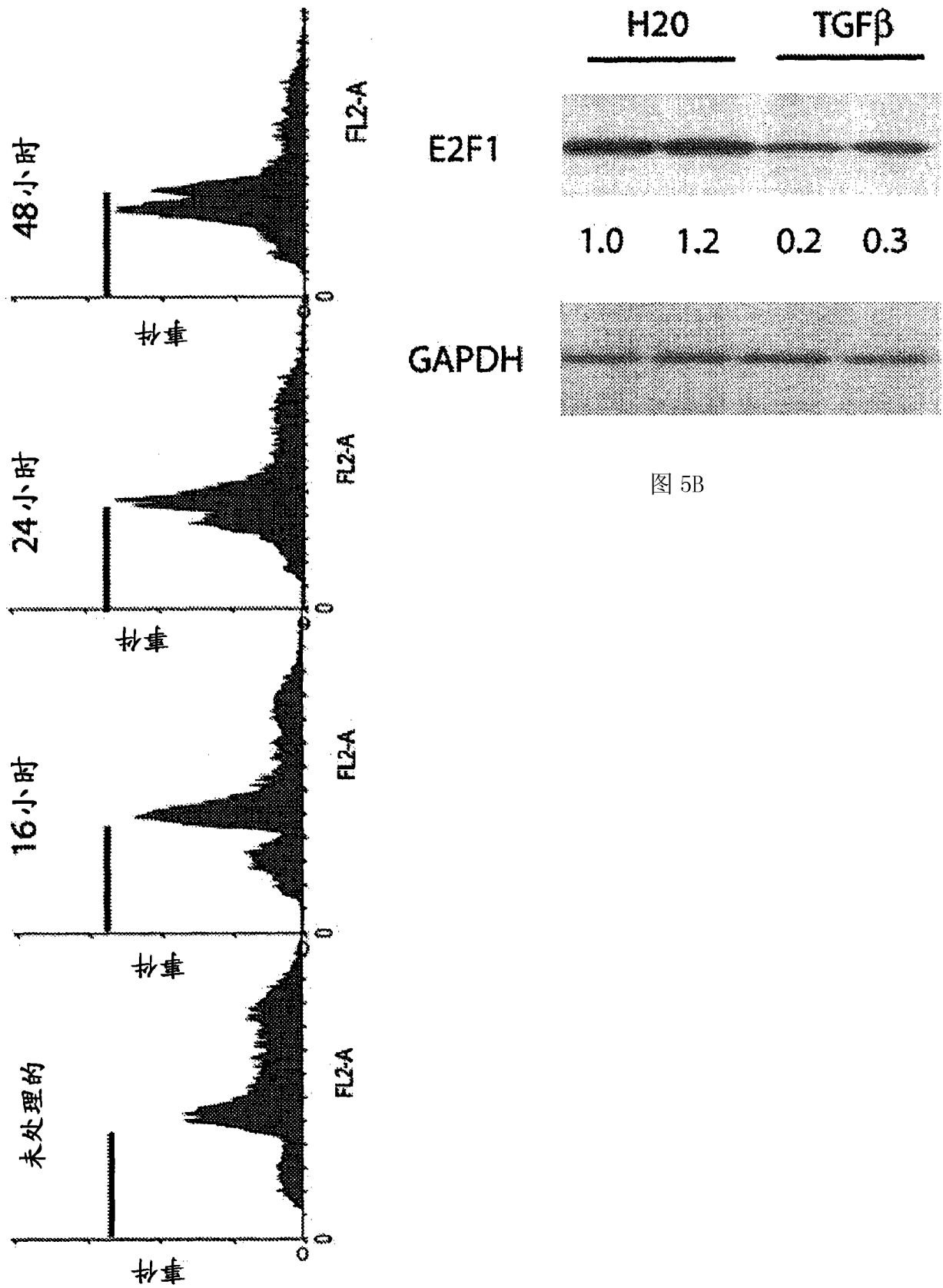


图 5B

图 5A

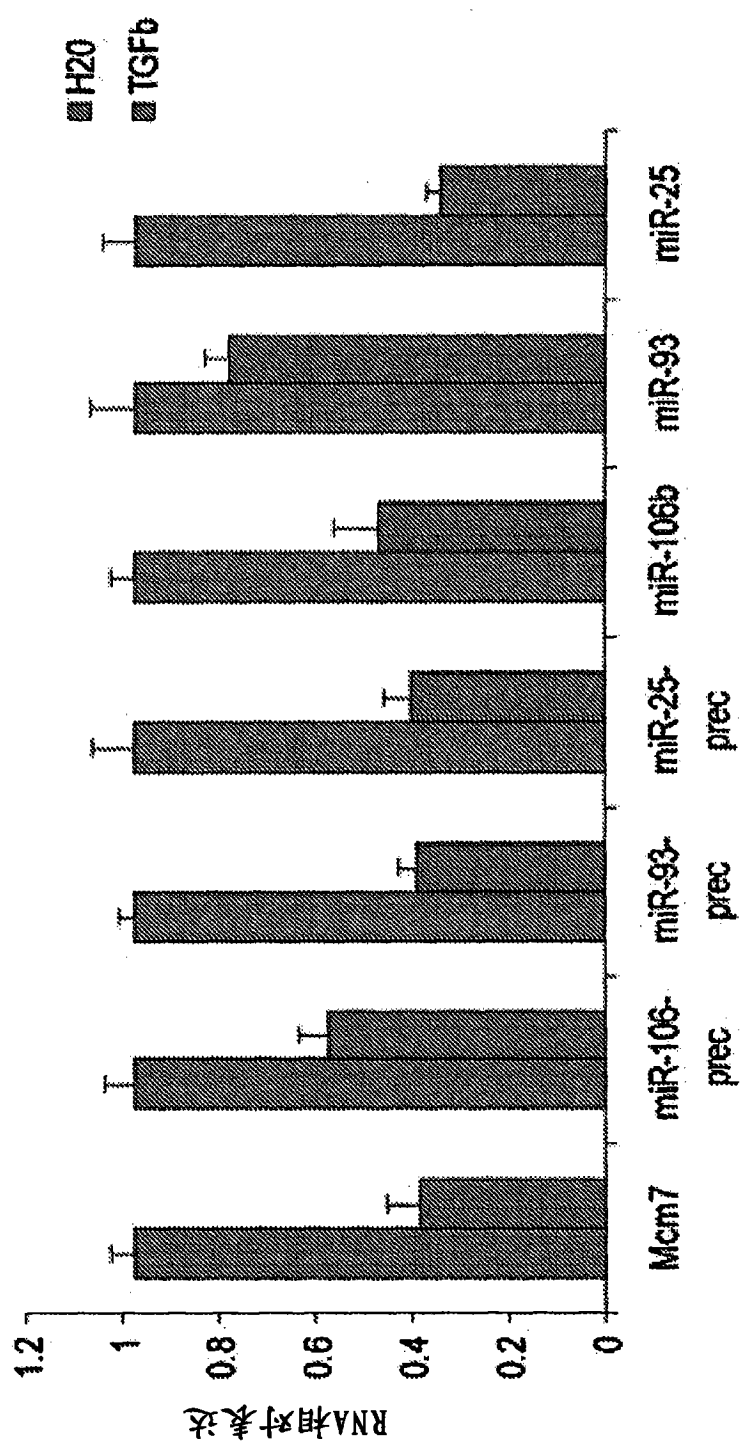


图 5C

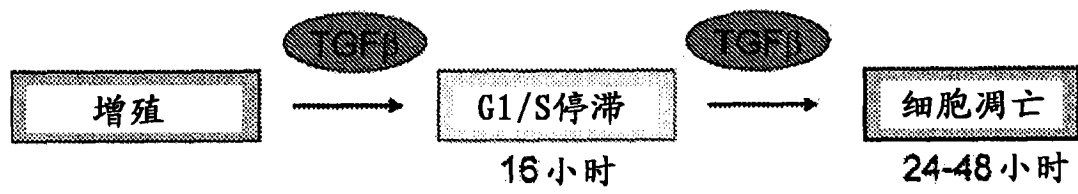


图 5D

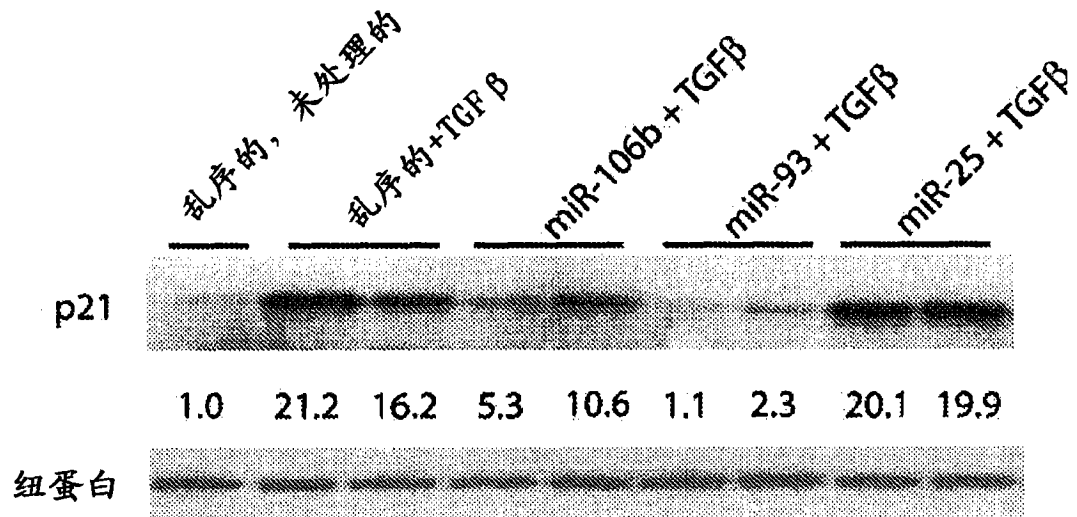


图 5D(续)

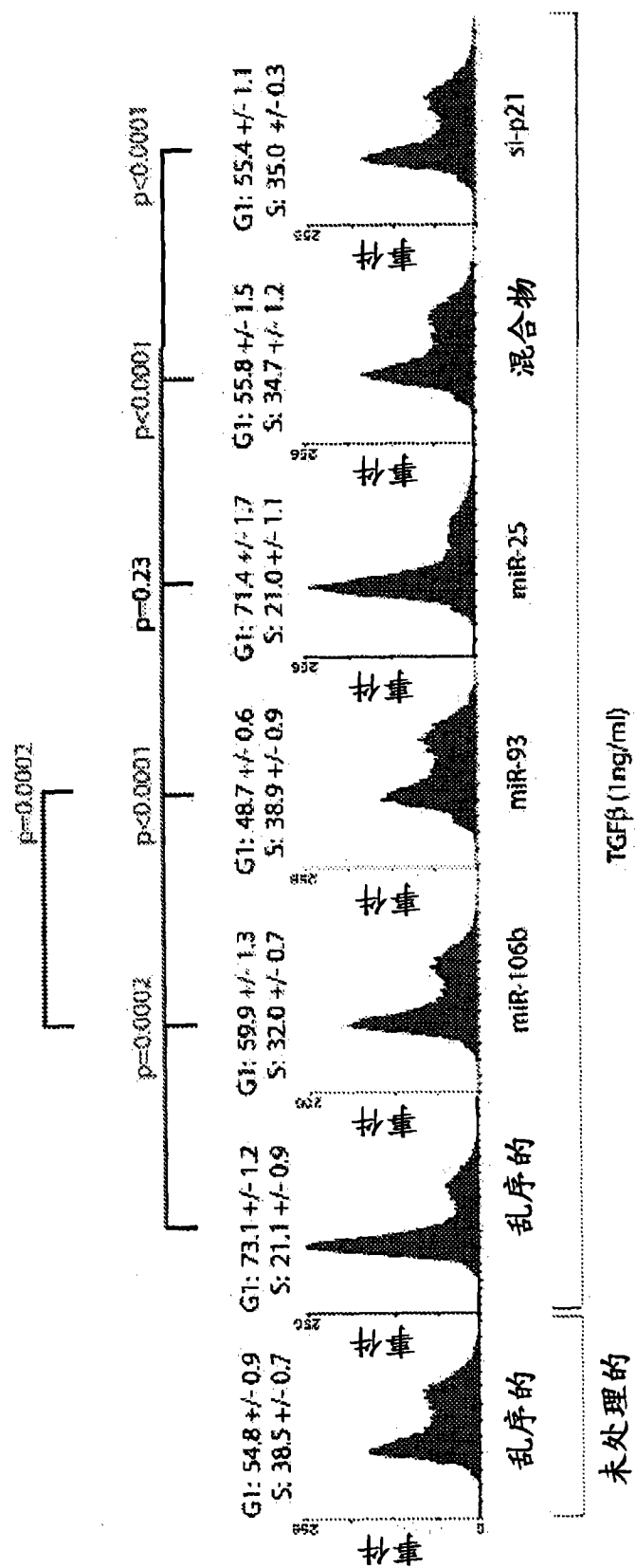


图 5D(续)

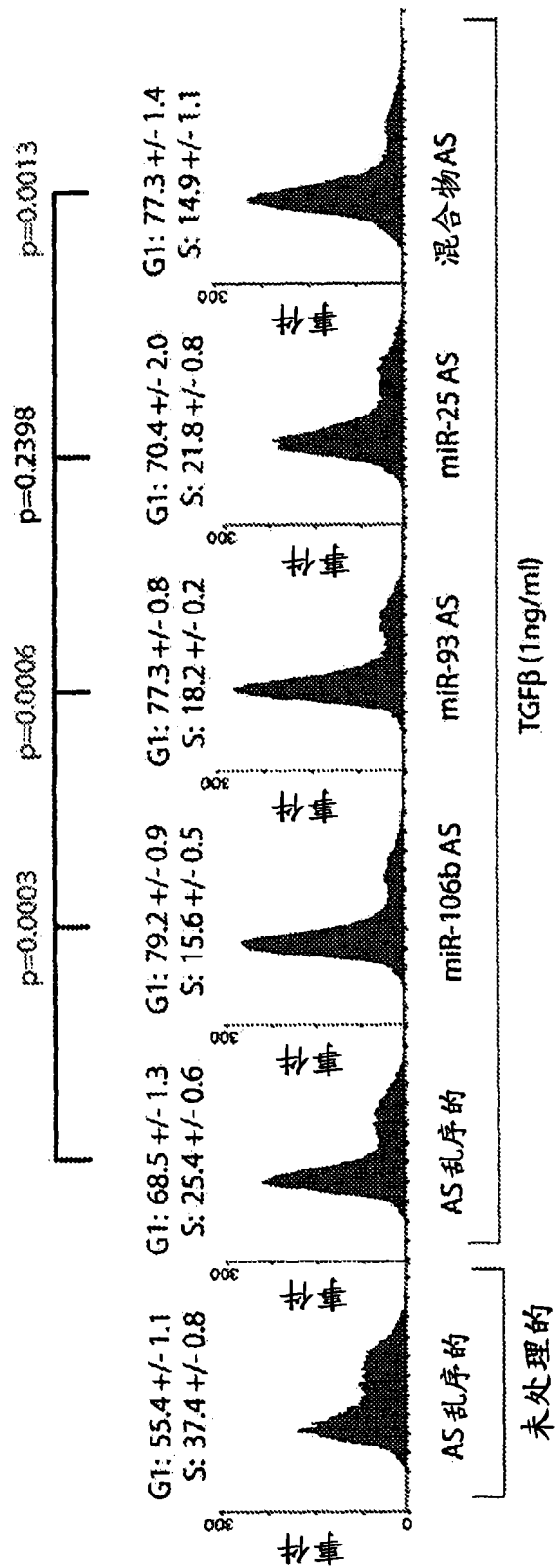


图 6A

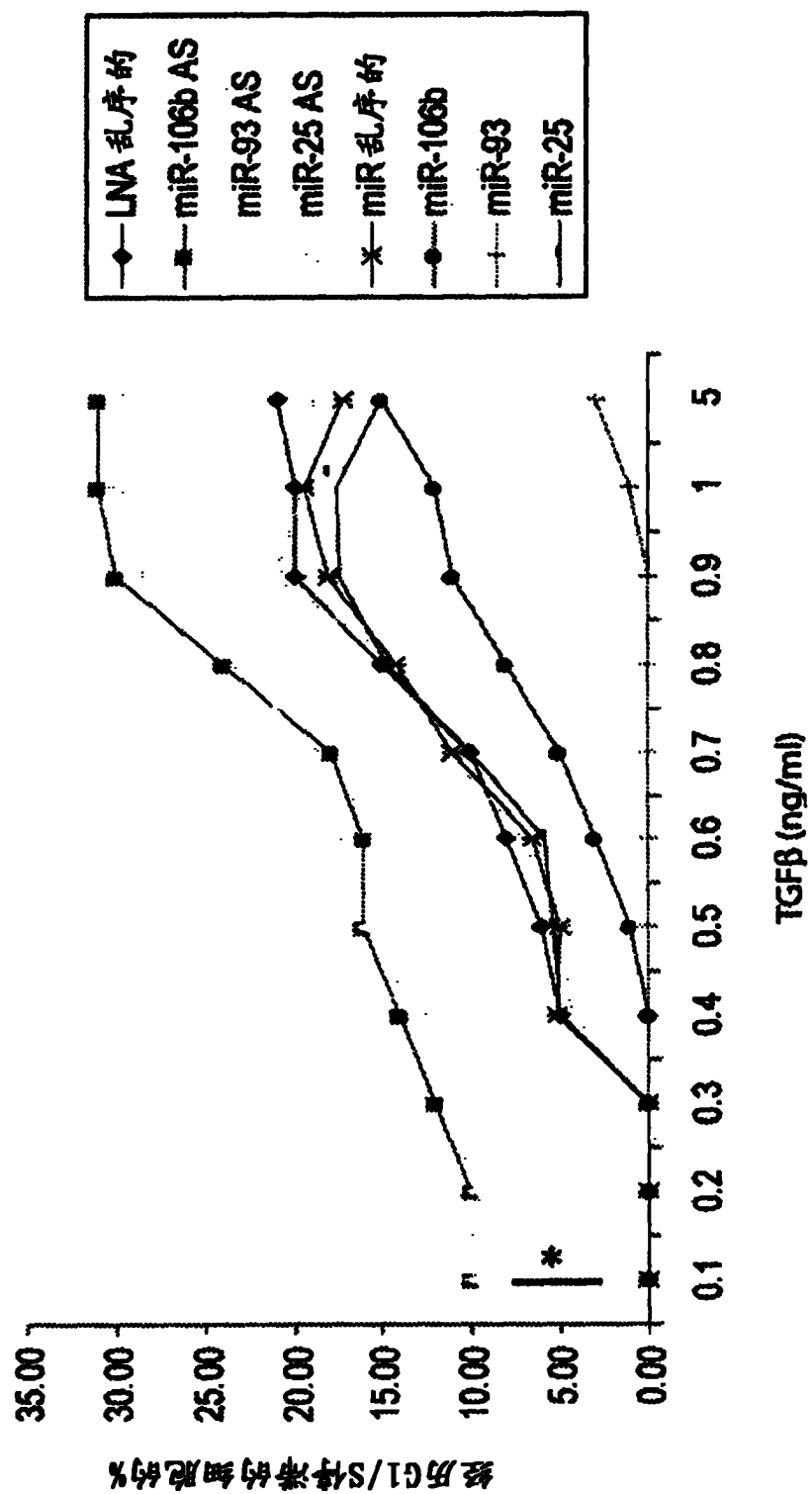


图 6B

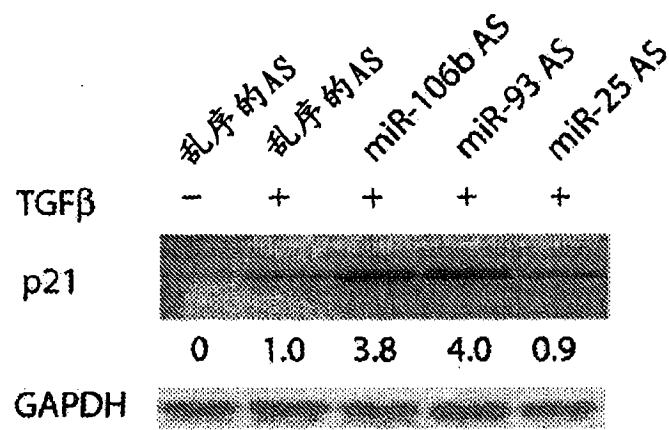


图 6C

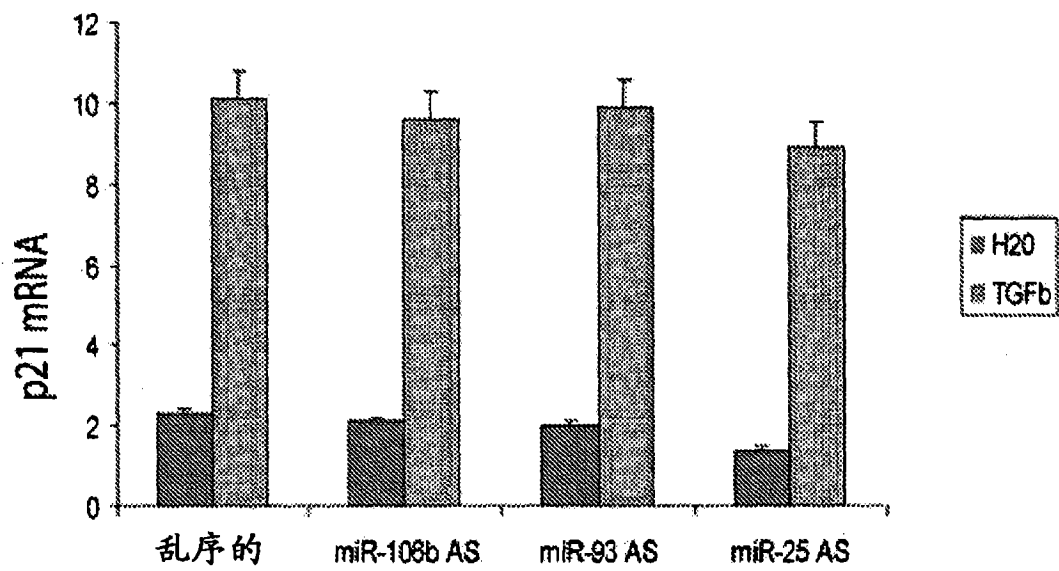


图 6D

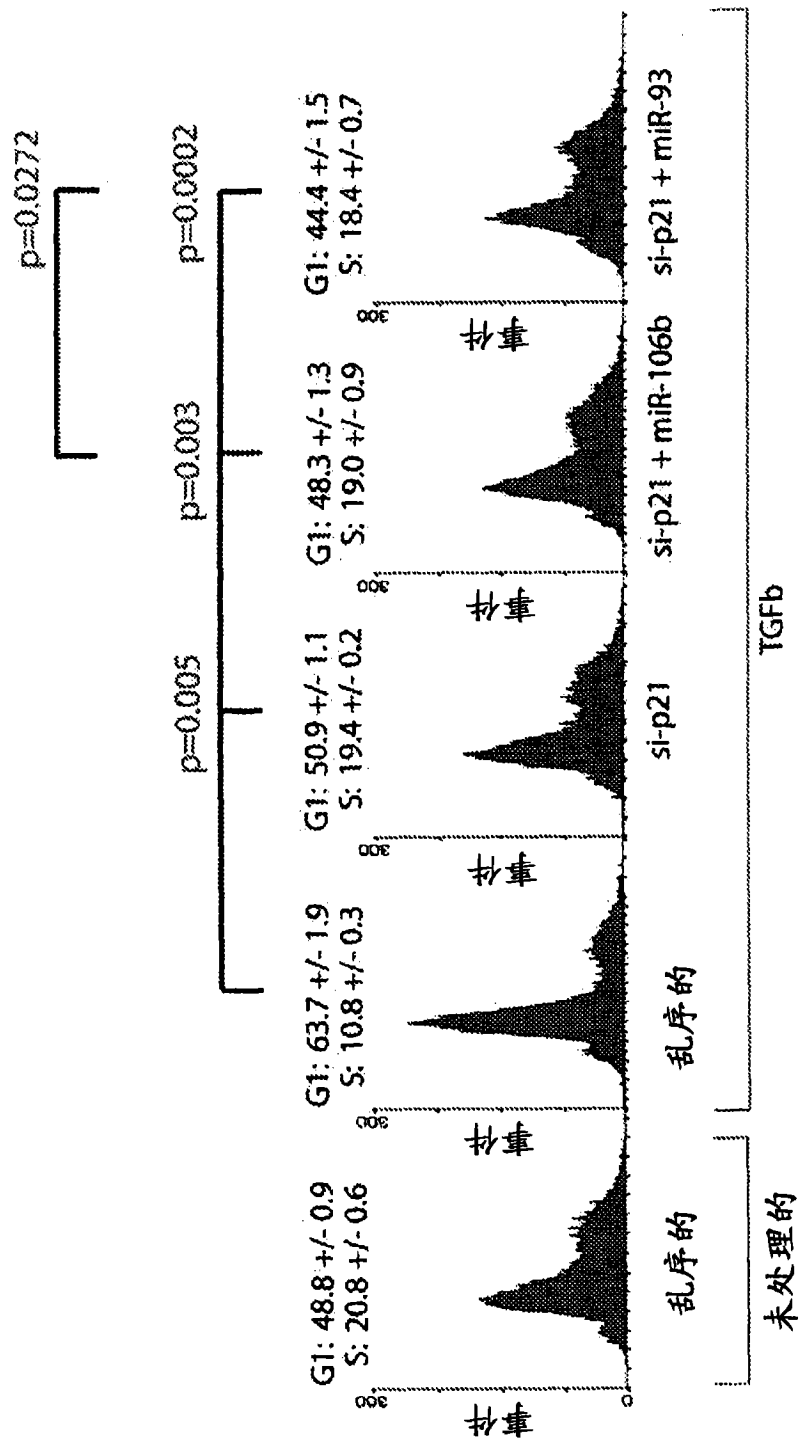


图 6E

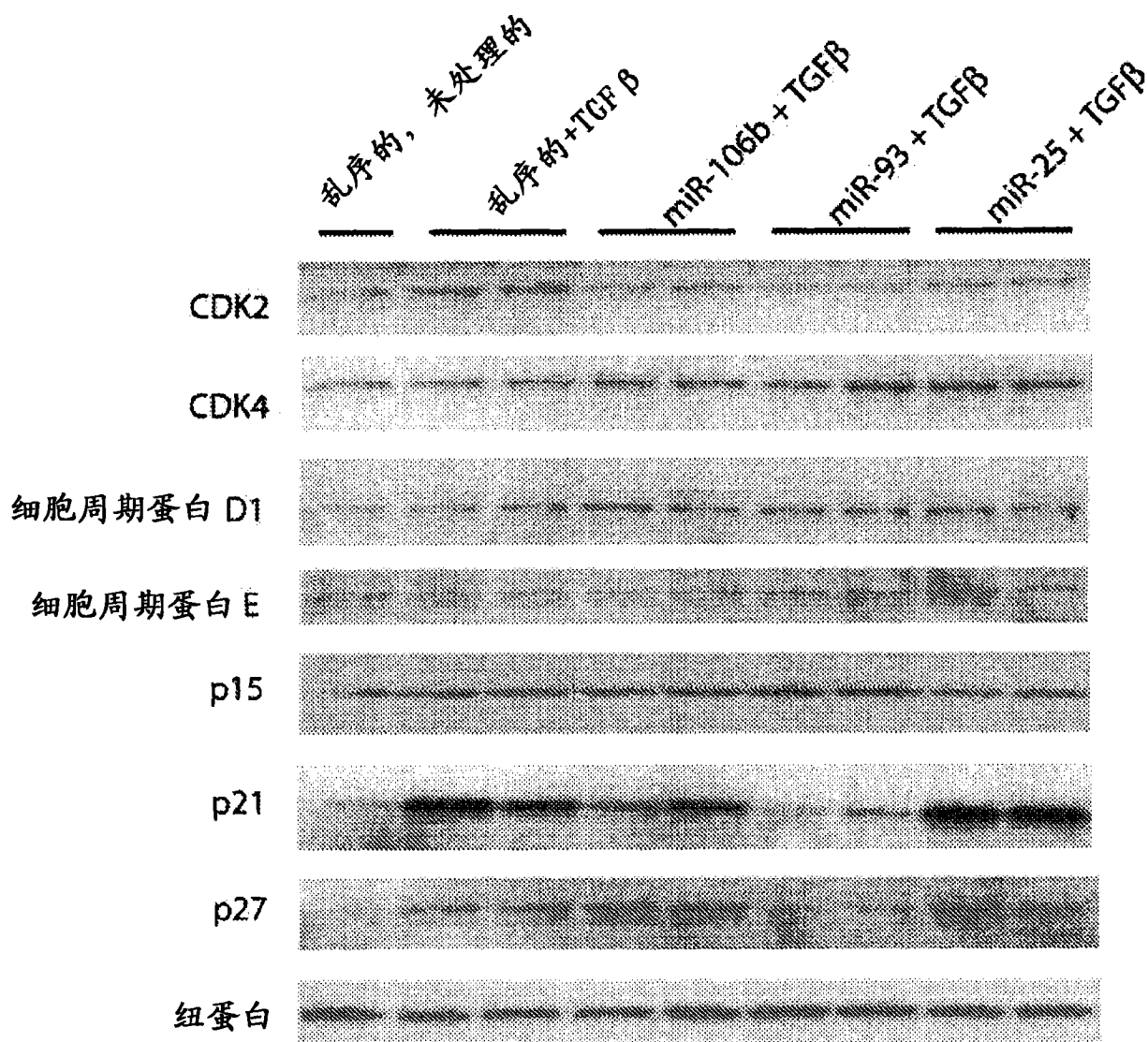


图 6F

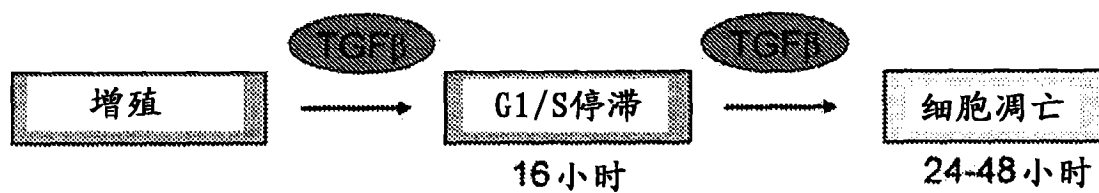


图 7

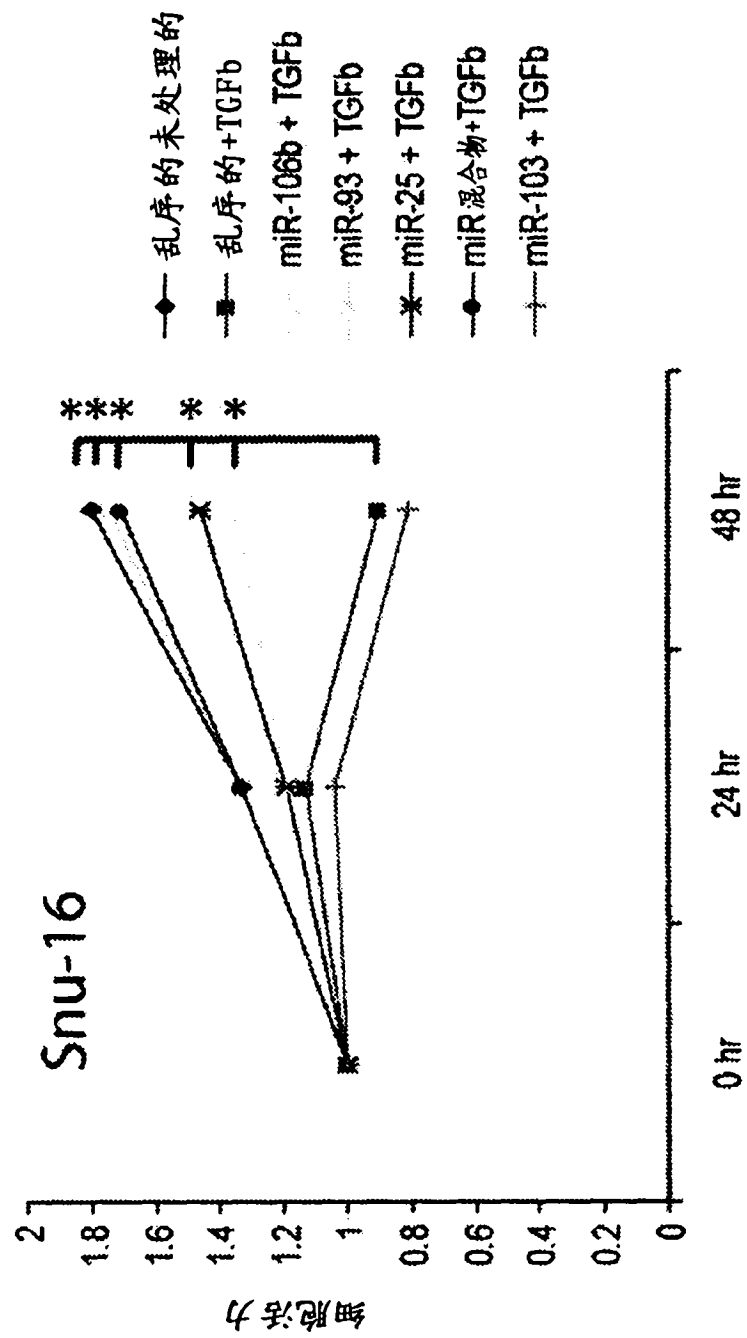


图 7A

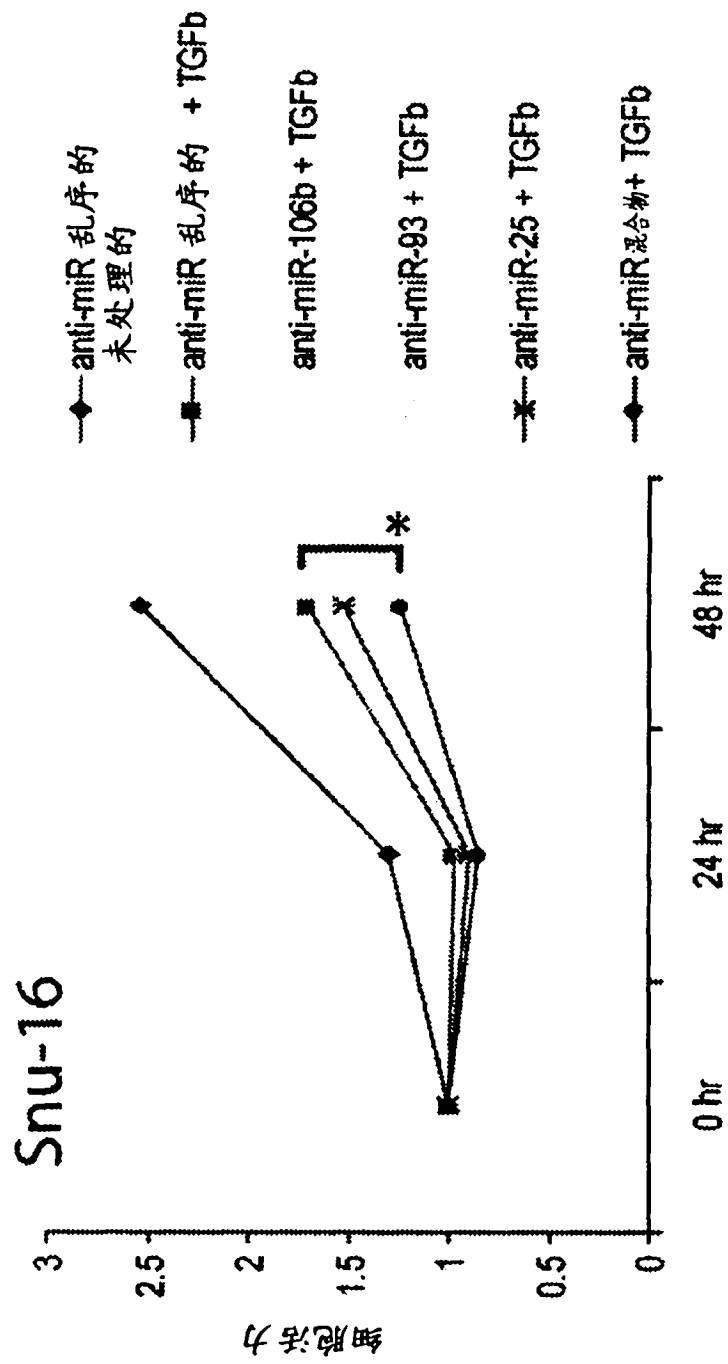


图 7B

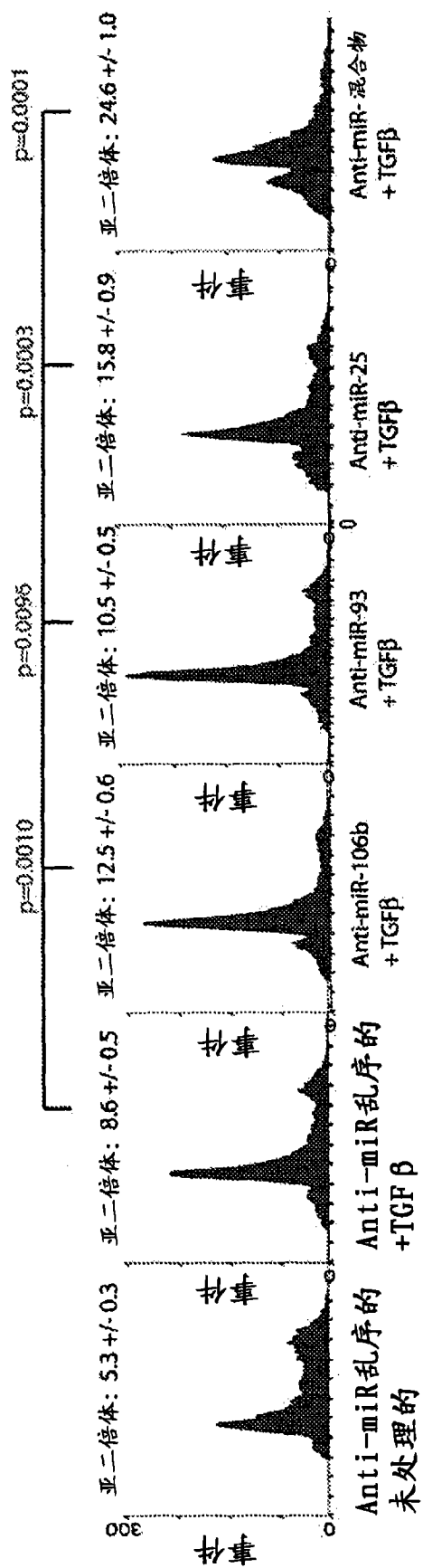


图 7C

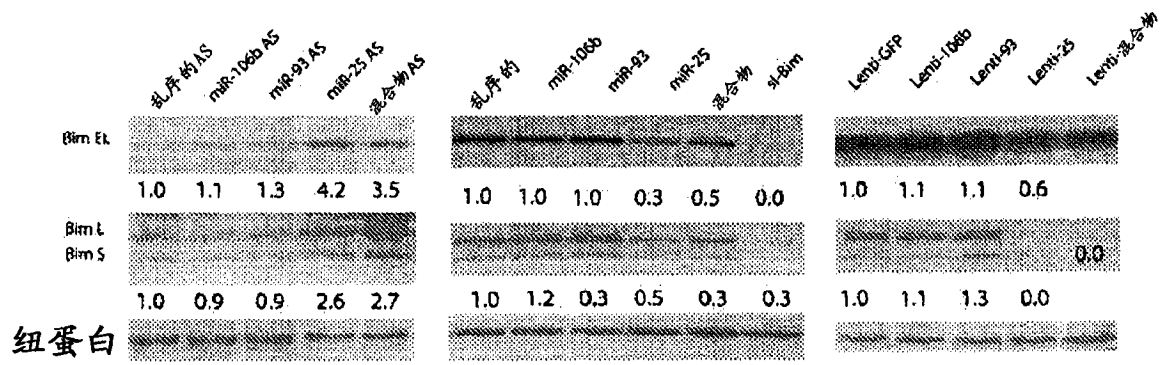


图 7D

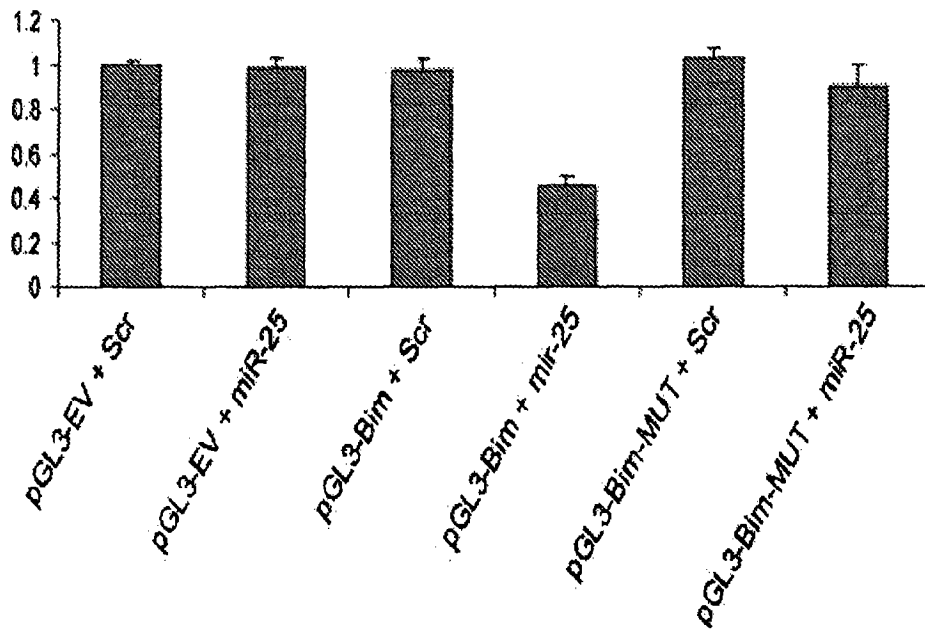


图 7E

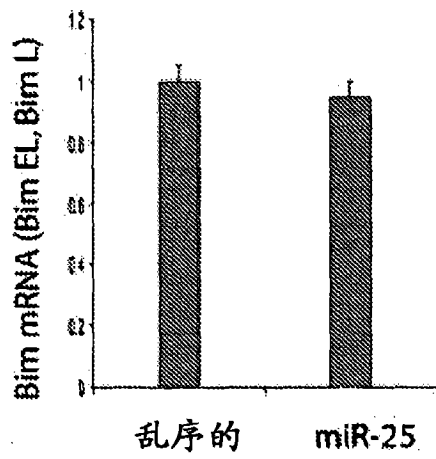


图 7F

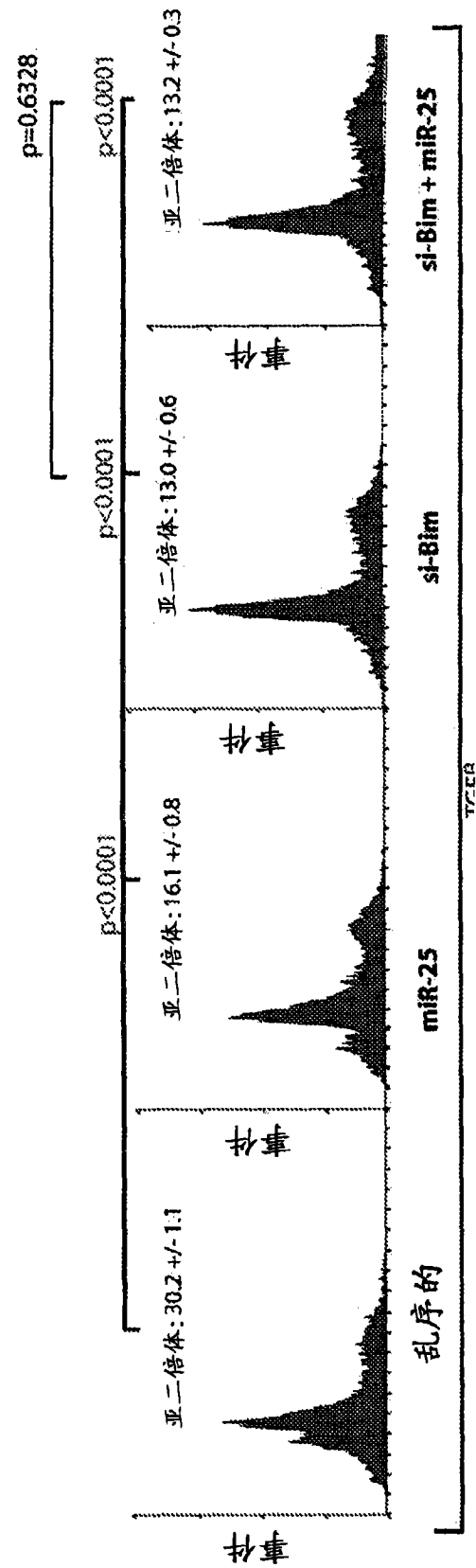


图 7G

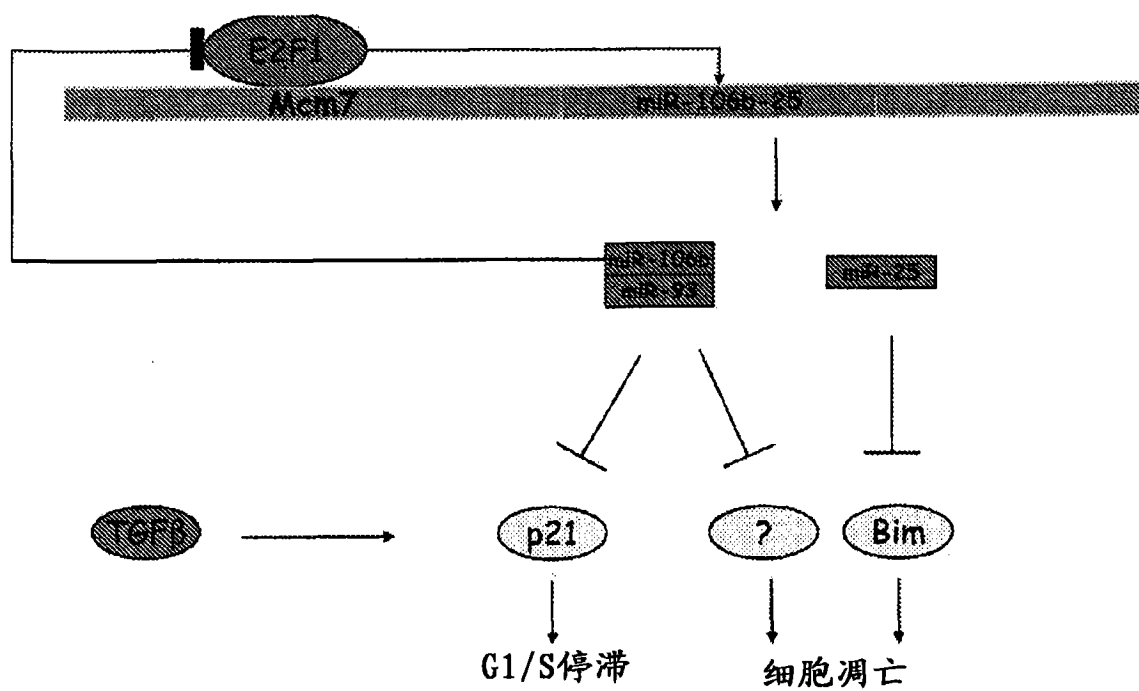


图 8

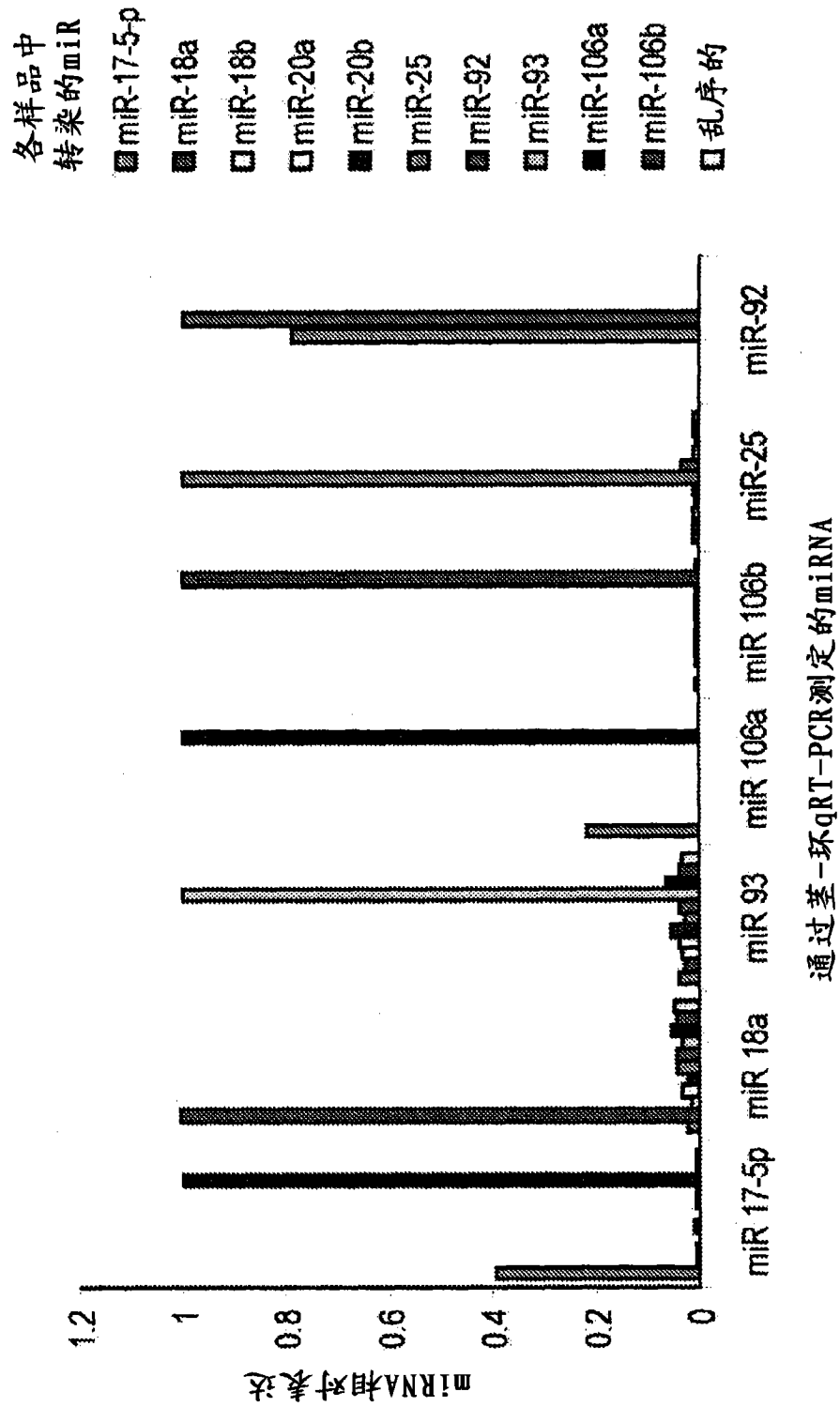


图 9A

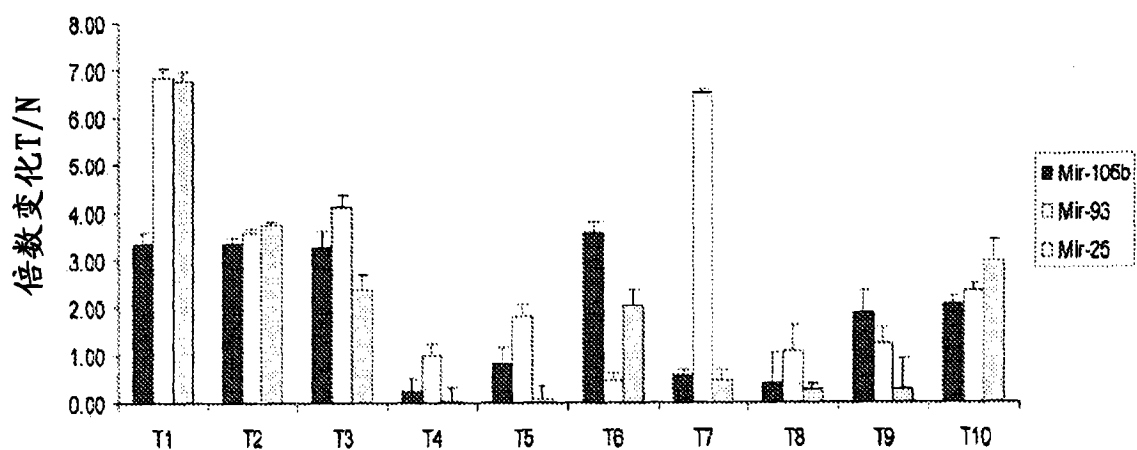


图 9B

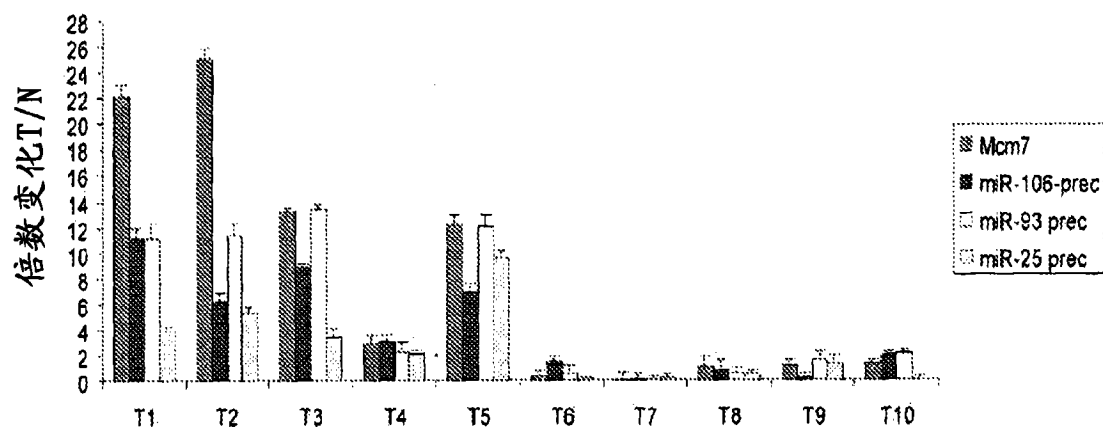


图 9C

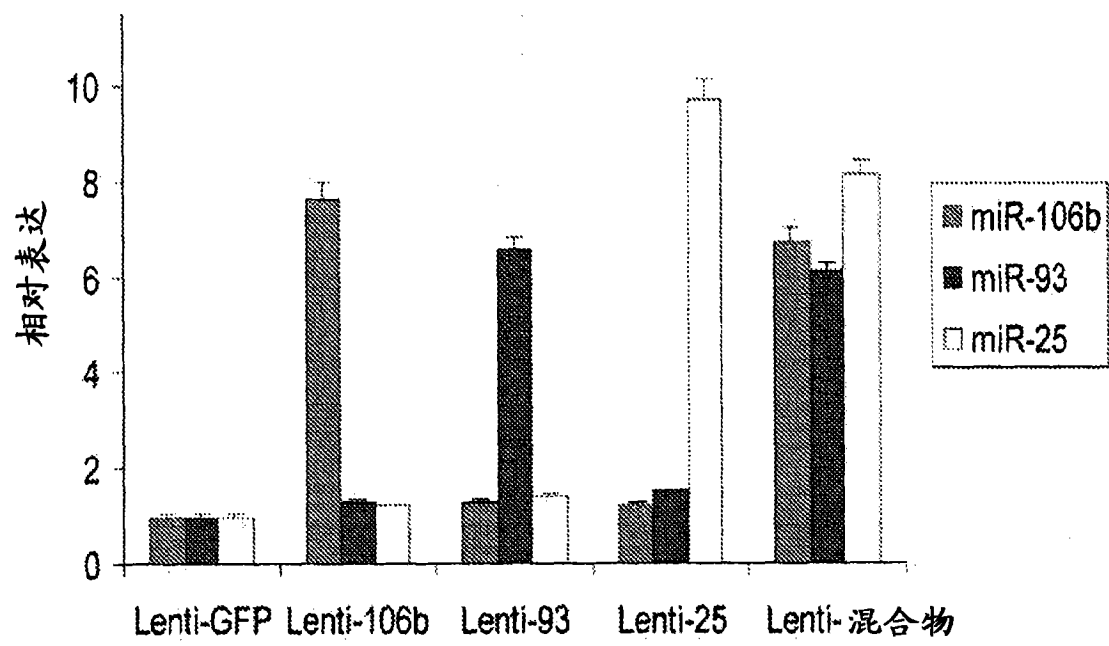


图 9D

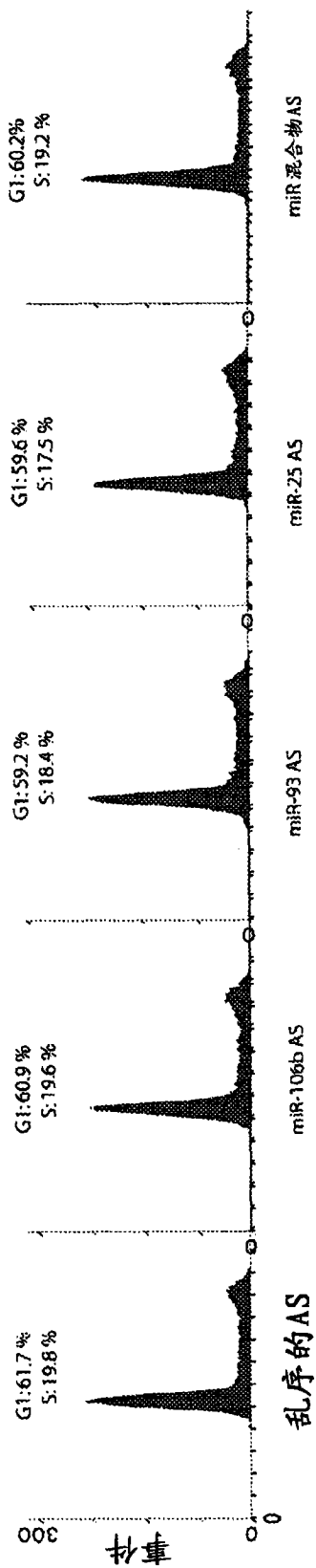


图 10A

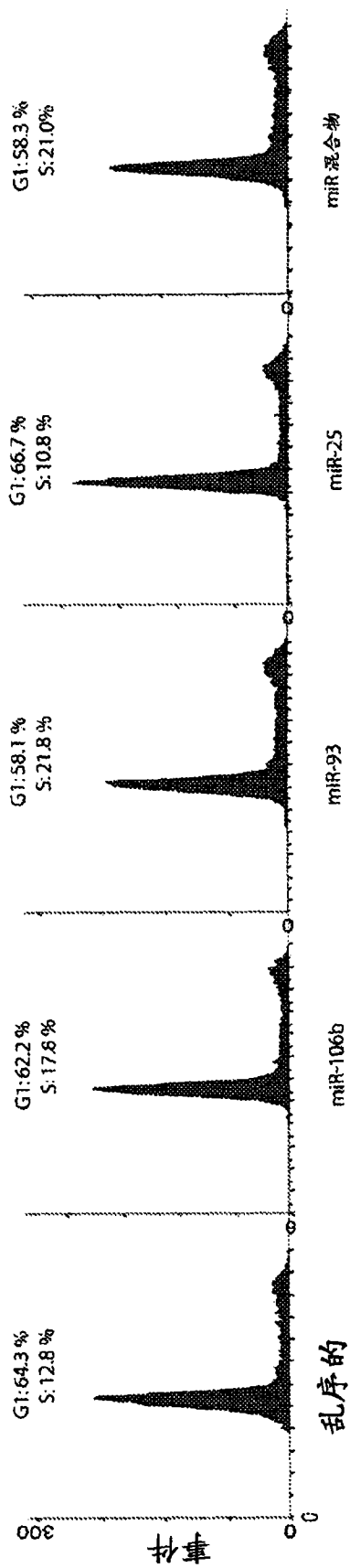


图 10B

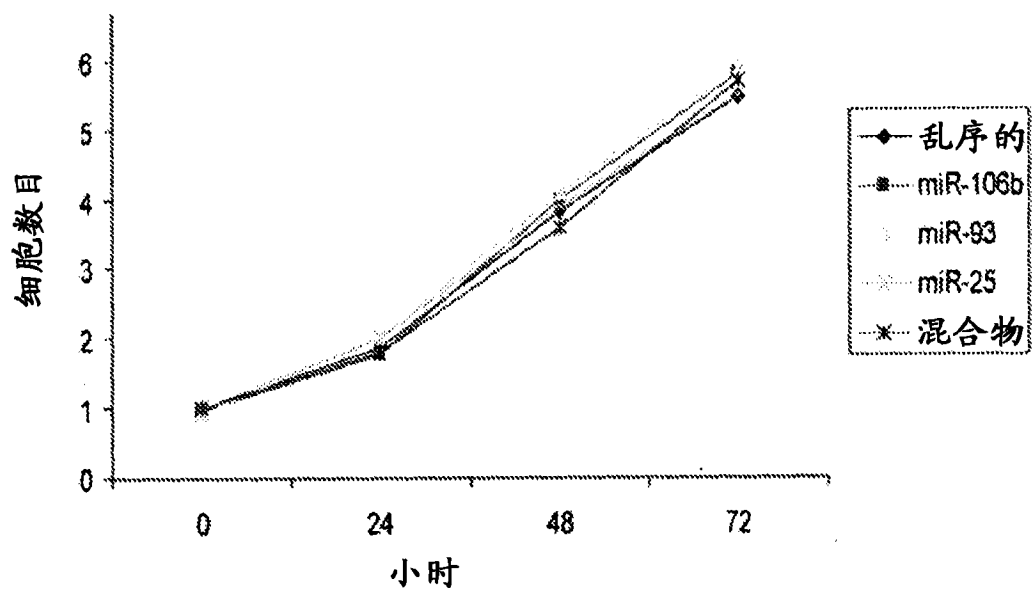


图 10C

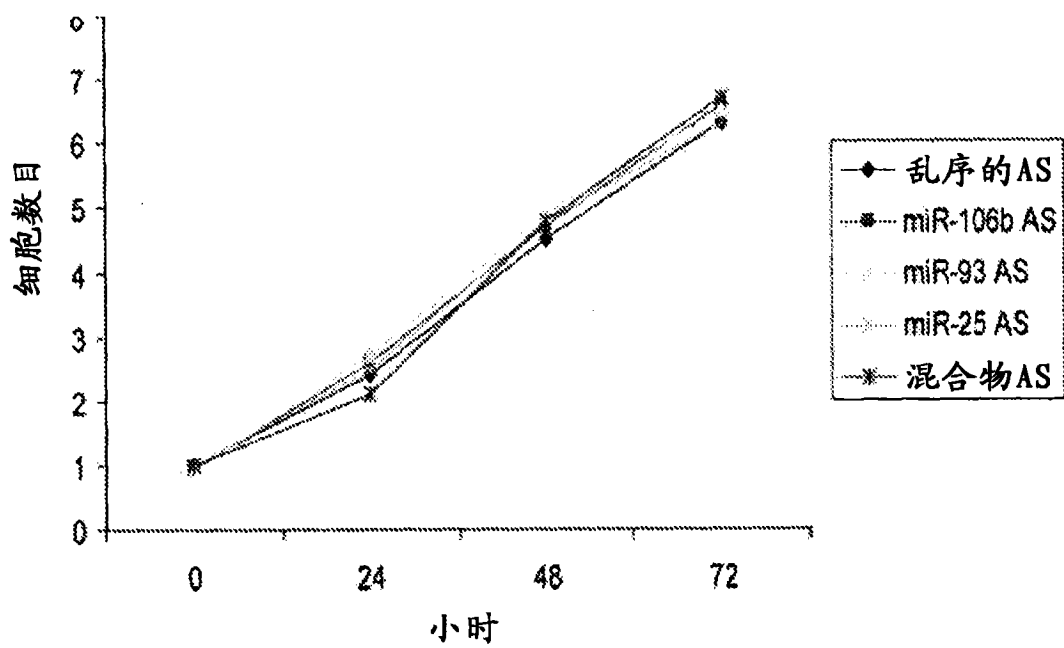


图 10D

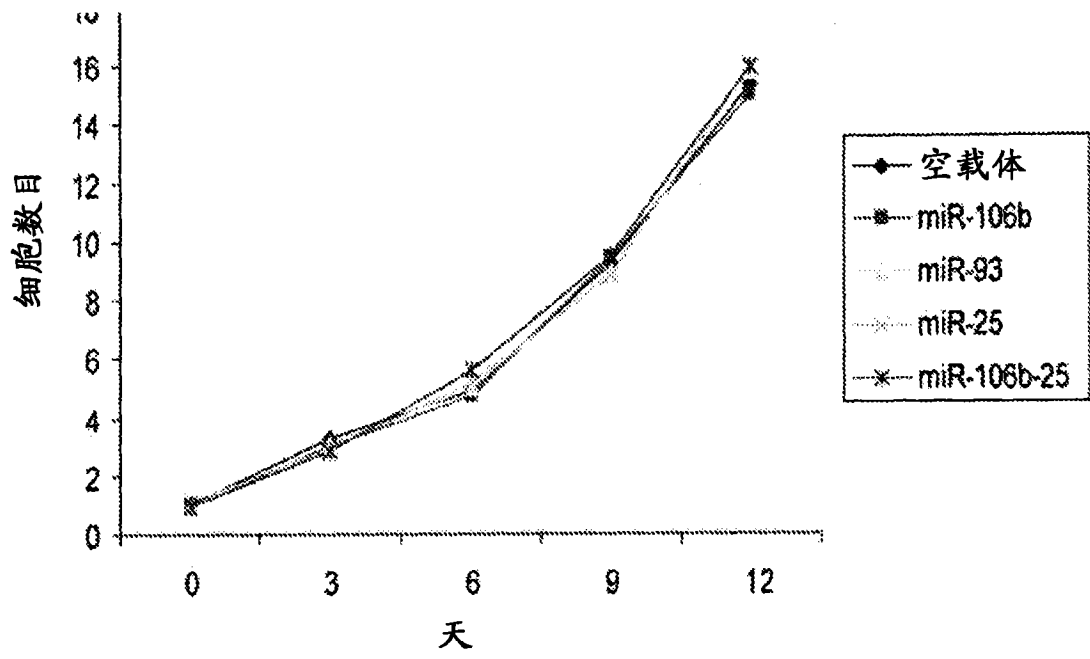


图 10E

乱序的

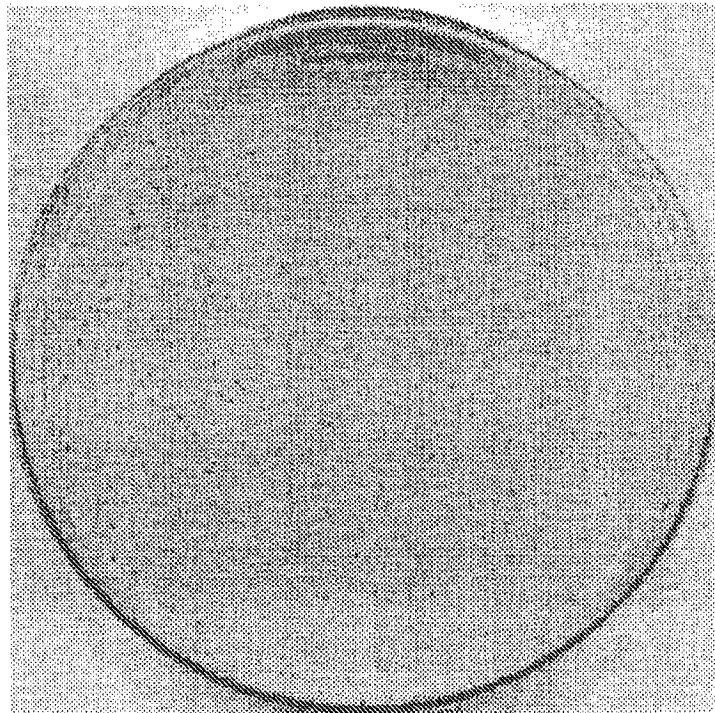


图 10F

miR-106b

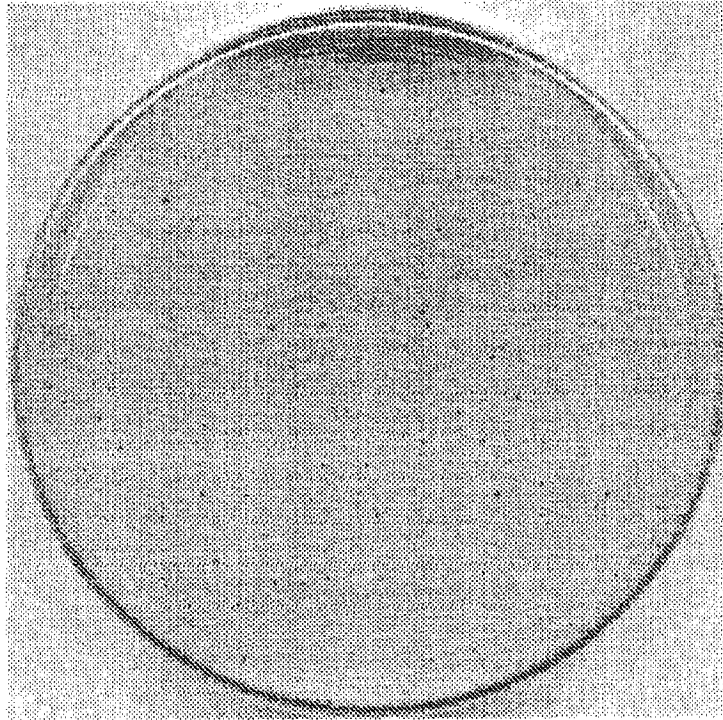


图 10F(续)

miR-93

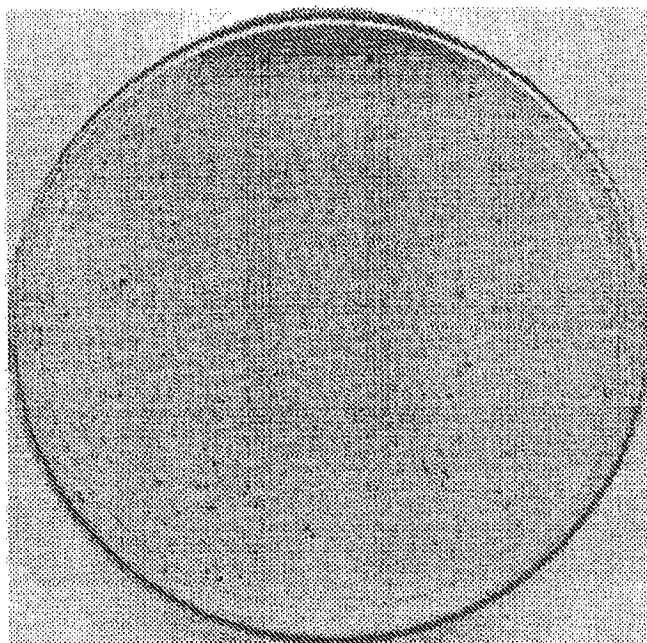


图 10F(续)

miR-25

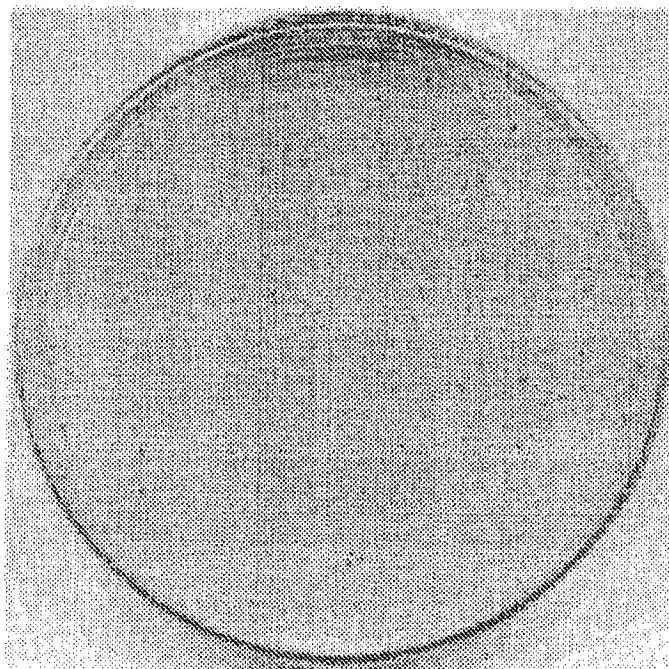


图 10F(续)

miR混合物

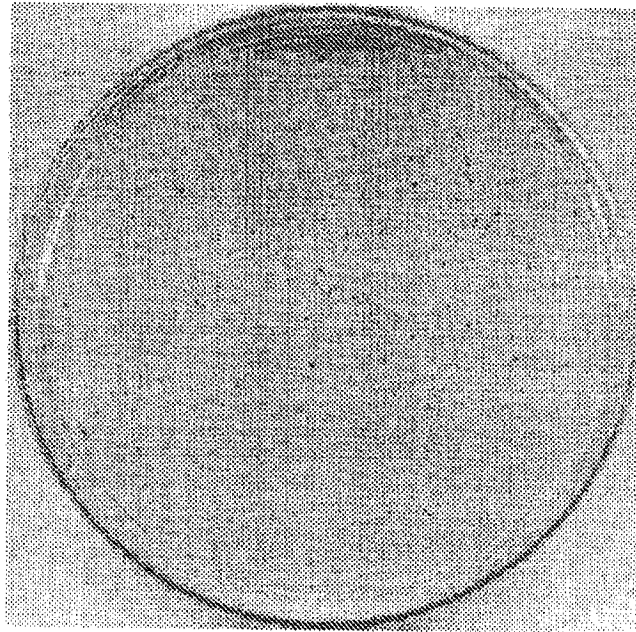


图 10F(续)

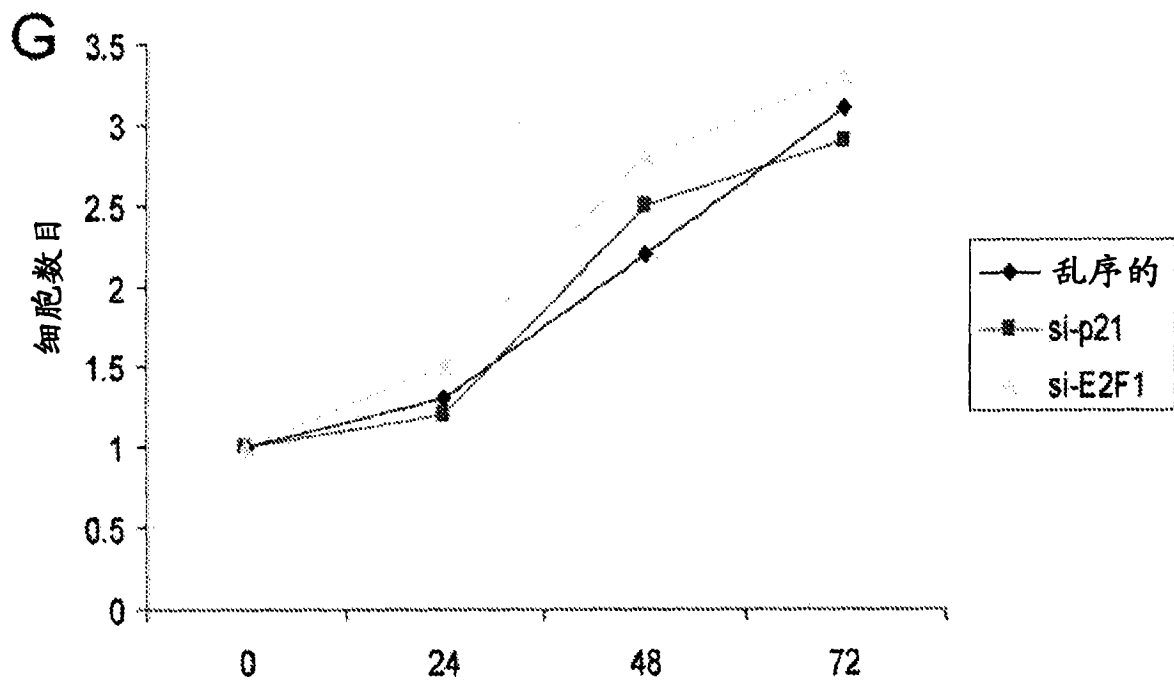


图 10G

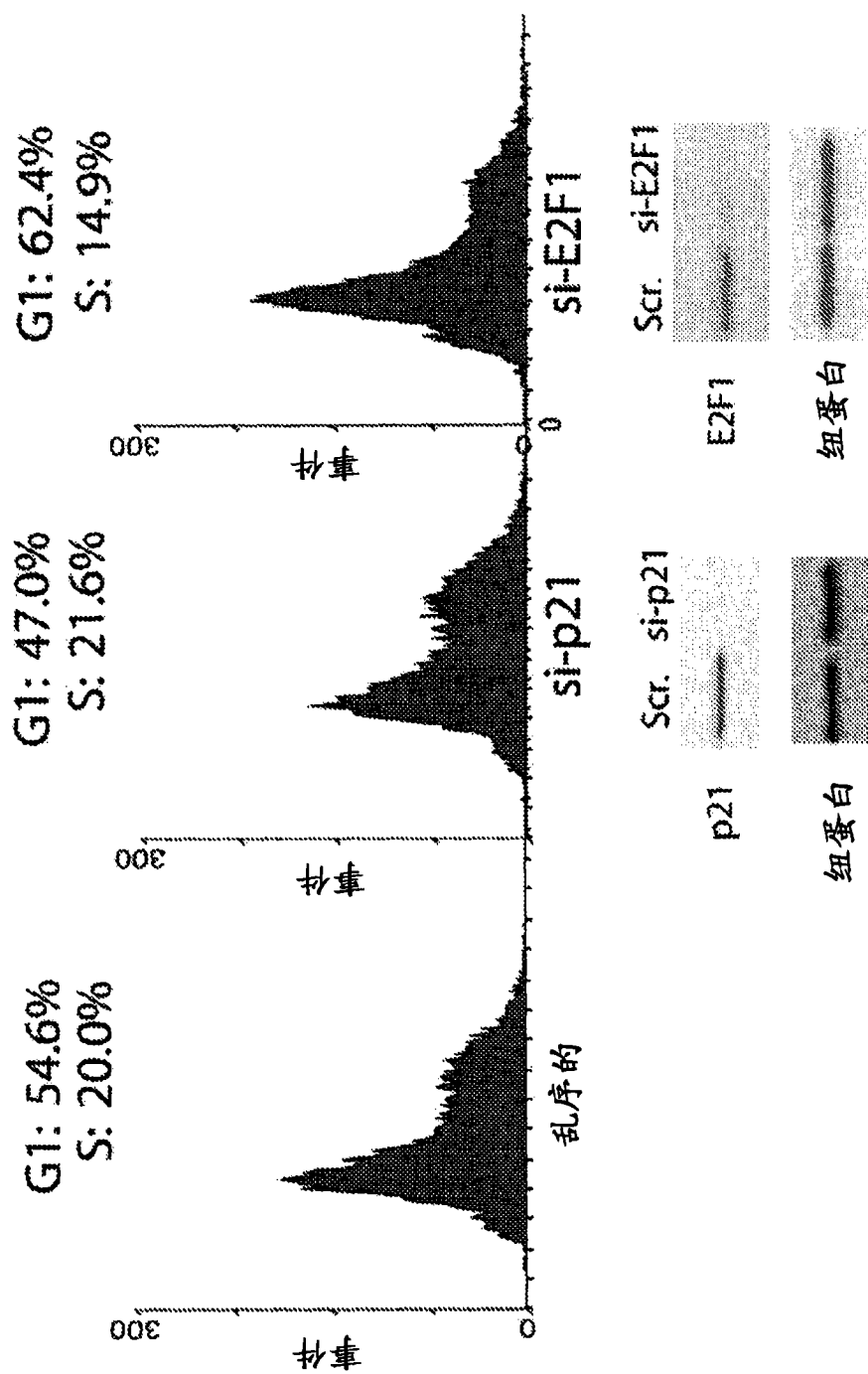


图 10H

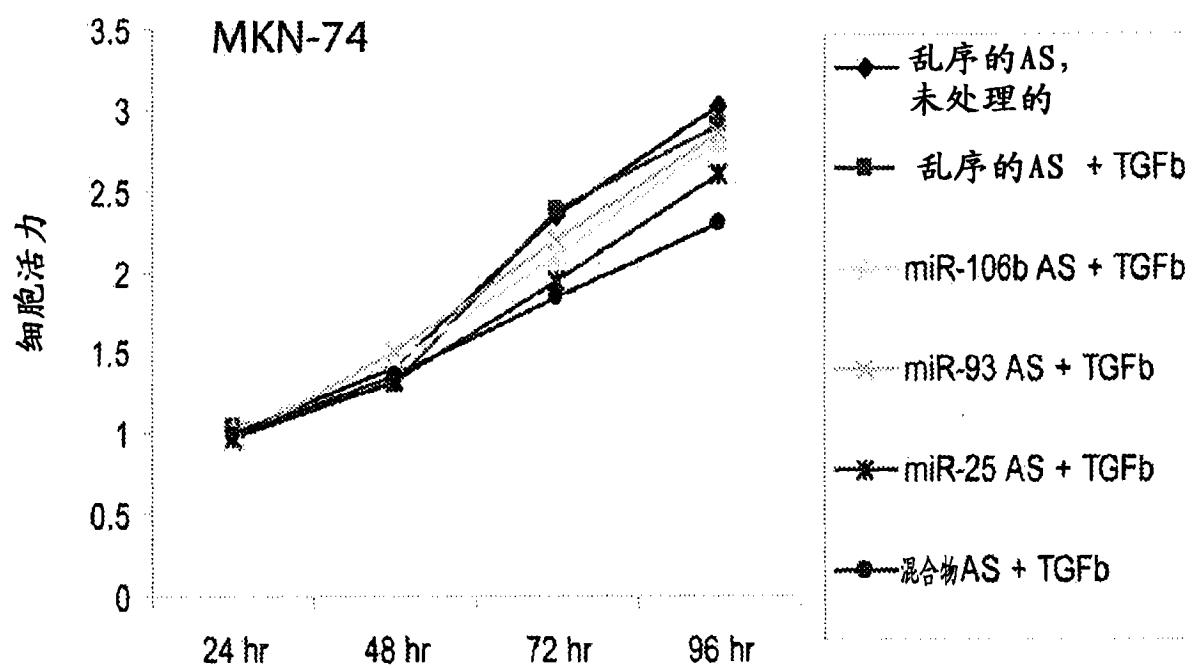


图 11

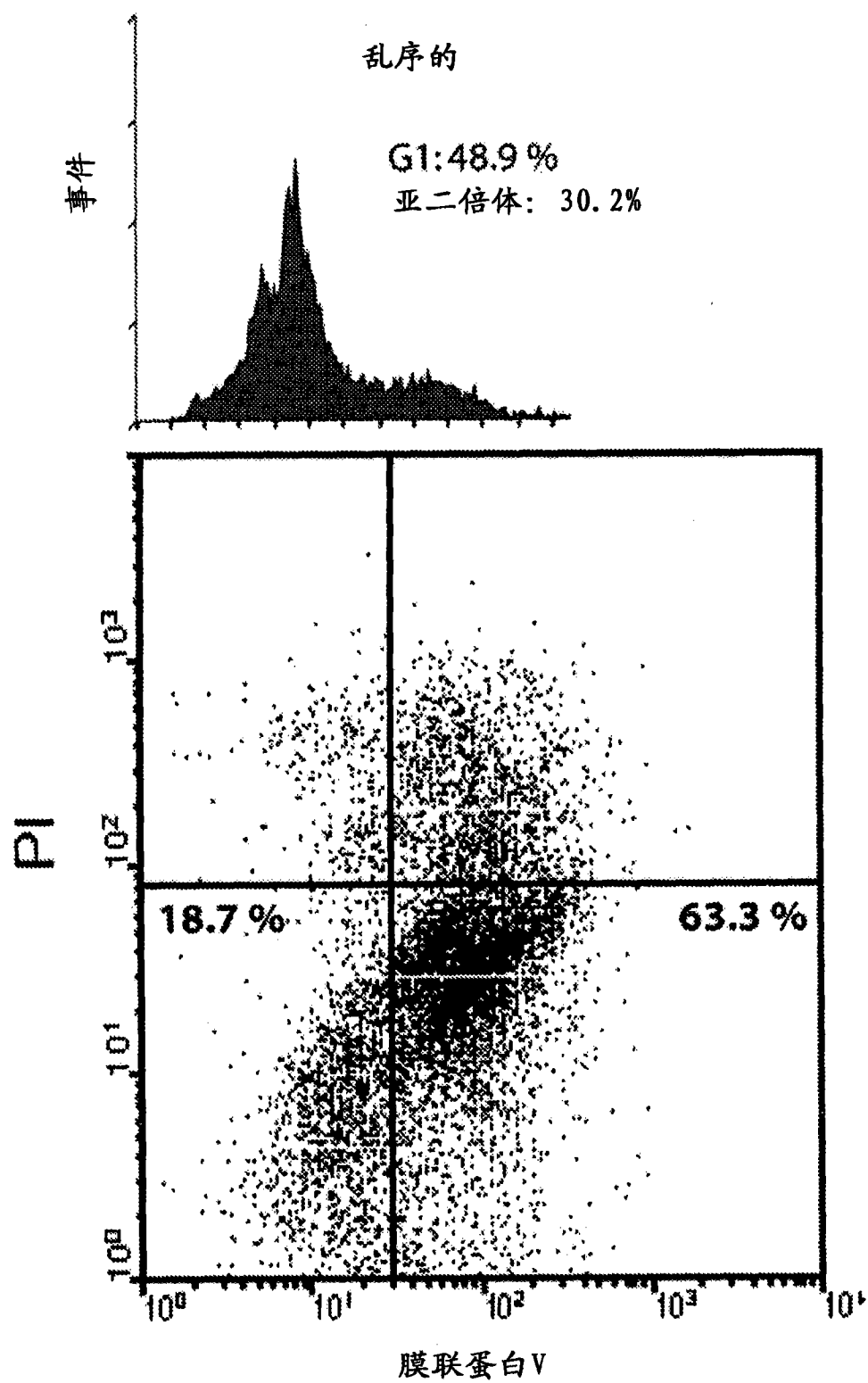


图 12

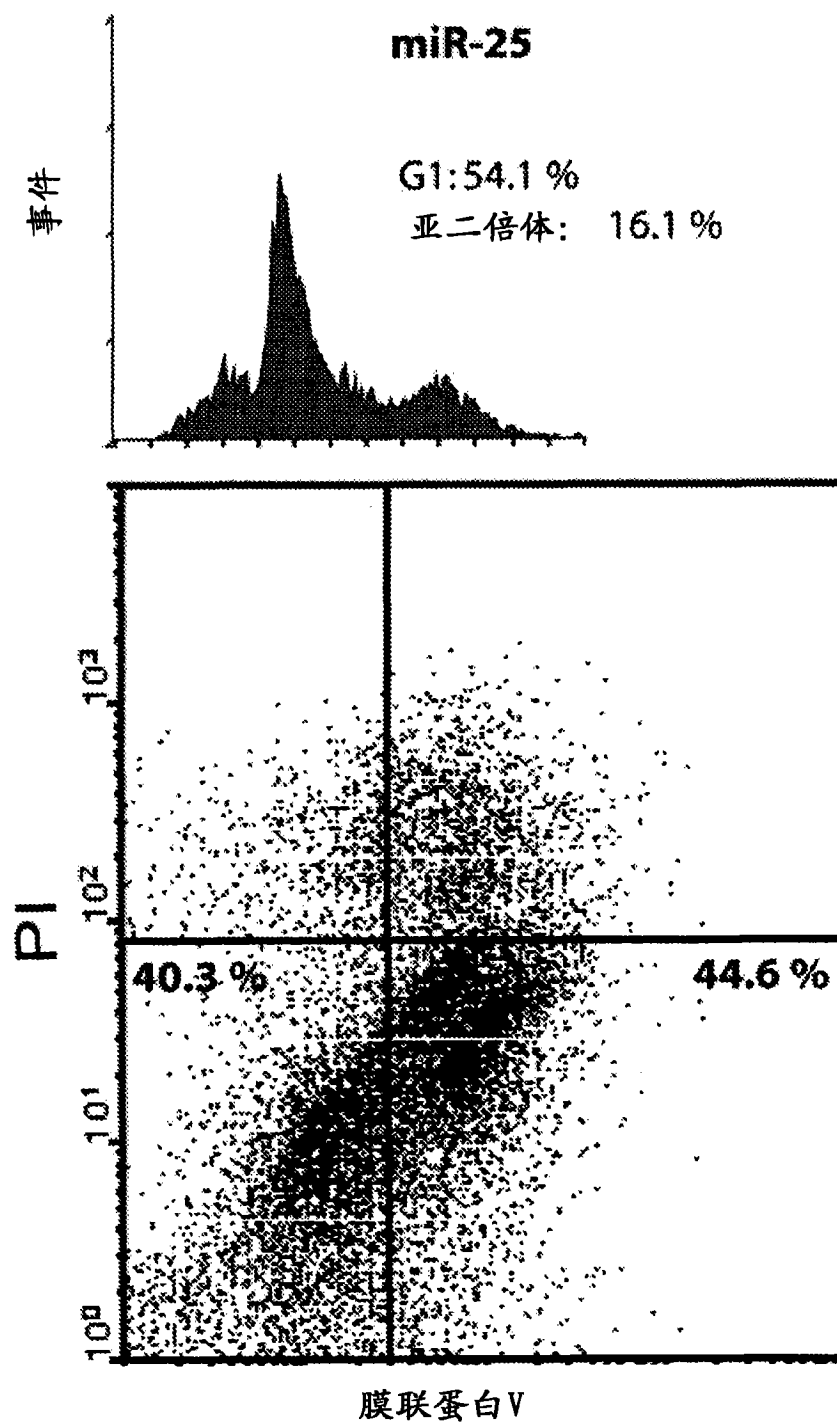


图 12(续)

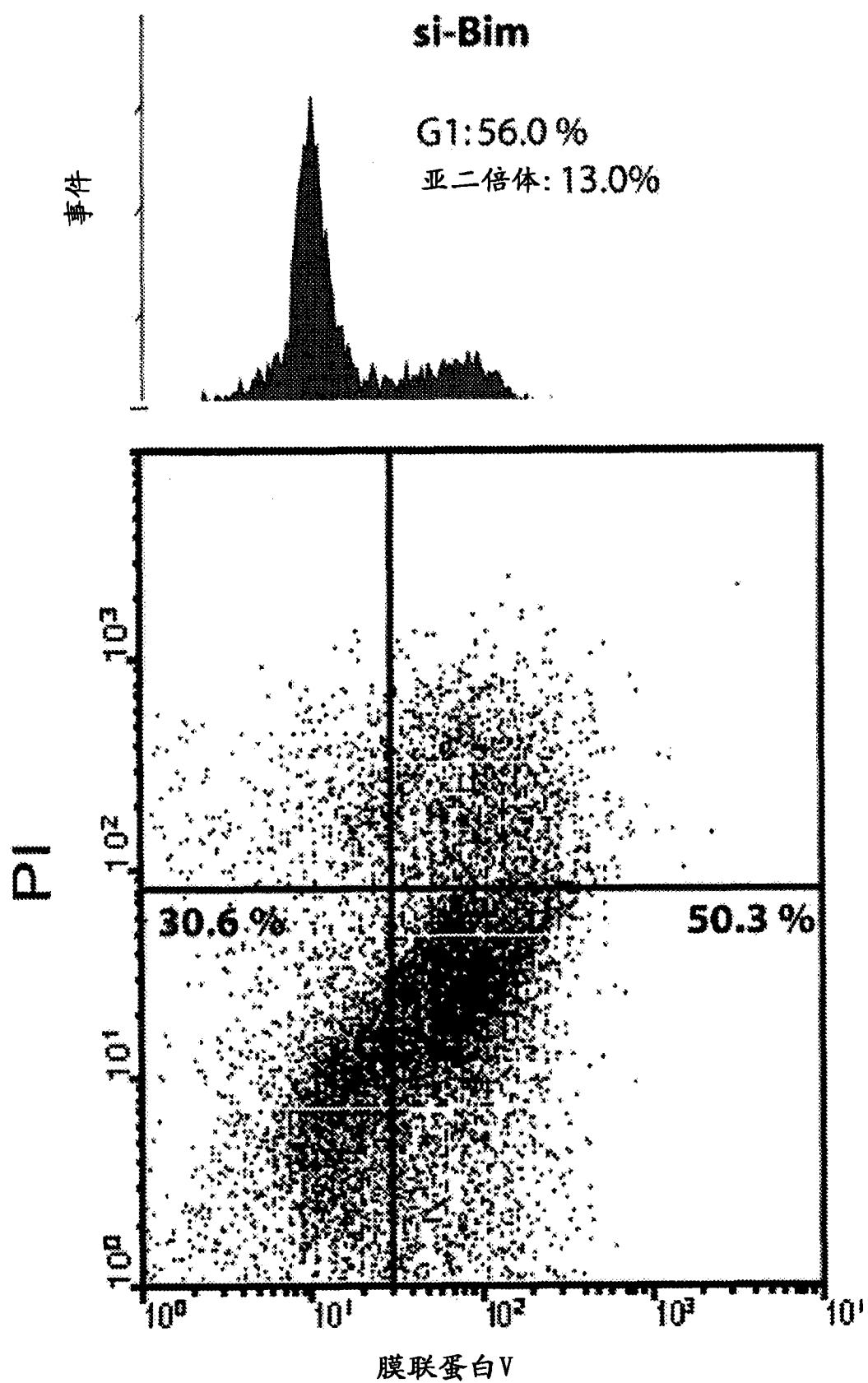


图 12(续)

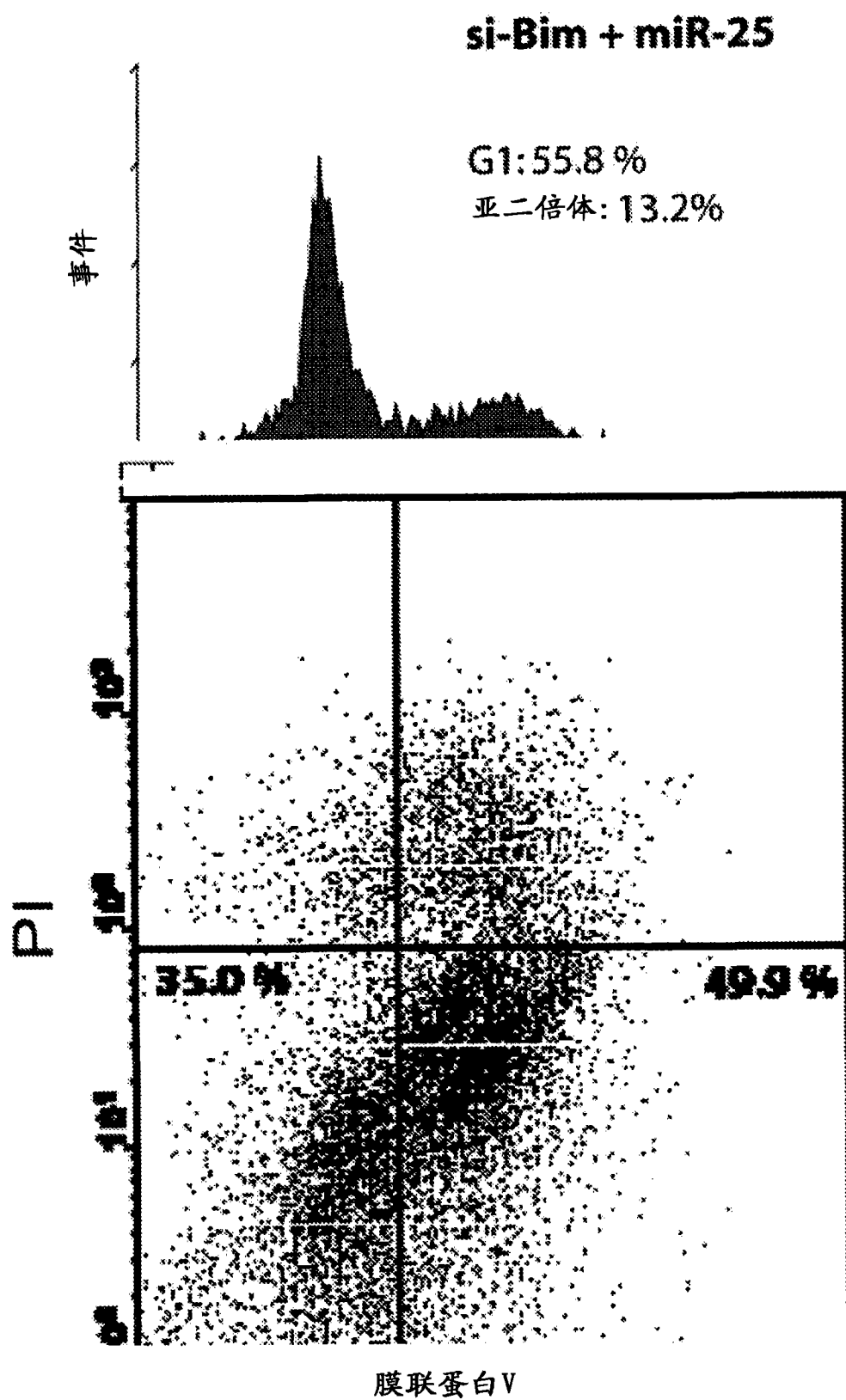


图 12(续)

表1 在慢性胃炎 (G) 与正常胃粘膜 (N) 中差异表达的miRNA					
未配对的SAM分析					
MIRNA ID	评分 (d)	分子 (r)	分母 (s+s0)	倍数变化 G/N	q值 (%)
hsa-mir-1-1No1	1.68	1.07	0.64	3.03	11.63
hsa-mir-155-prec	1.65	1.08	0.65	2.52	11.63
hsa-mir-205-prec	-2.28	-2.00	0.88	0.06	0.00
hsa-mir-203-precNo1	-1.62	-1.54	0.95	0.11	0.00
hsa-mir-202-prec	-1.02	-0.54	0.53	0.36	17.44
hsa-mir-020-prec	-1.60	-0.91	0.57	0.38	0.00
hsa-mir-026b-prec	-1.73	-1.34	0.77	0.39	0.00
输入参数					
数据类型?					
阵列居中?			两类 未配对的		
δ			是		
最小倍数变化			0.07		
检验统计			2.50		
数据是对数标度吗?			标准		
排列的数目			是		
			100.00		
可交换性因子s0的输入百分位数			自动选择		
KNN的近邻的数目			10.00		
随机数字产生器的种			1234567.00		
计算的值					
pi0的评估 (无效基因的比例)			1.05		
可交换性因子s0			0.13		
s0百分位数			0.05		
假发现率 (%)			11.63		

图 13

表2: 在胃腺癌 (T) 与非肿瘤胃粘膜 (N) 中差异表达的miRNA				
配对SAM分析				
miRNA ID	评分 (d)	分子 (r)	分母 (s+s0)	倍数变化 T/N
hsa-mir-021-prec-17No1	4.09	1.32	0.32	4.54
hsa-mir-21No1	3.55	1.21	0.34	4.41
hsa-mir-223-prec	4.40	1.35	0.31	4.20
hsa-mir-025-prec	5.19	1.39	0.27	3.76
hsa-mir-017-precNo2	3.03	1.07	0.35	3.75
hsa-mir-125b-1	2.83	1.03	0.36	3.58
hsa-mir-181b-1No1	4.49	1.31	0.29	3.44
hsa-mir-106-prec-X	3.49	1.05	0.30	2.98
hsa-mir-106aNo1	3.17	0.96	0.30	2.76
hsa-mir-107No1	3.95	1.07	0.27	2.63
hsa-mir-125b-2-precNo2	3.81	1.07	0.28	2.62
hsa-mir-092-prec-X=092-2	4.73	1.10	0.23	2.49
hsa-mir-103-2-prec	4.23	1.03	0.24	2.46
hsa-mir-107-prec-10	3.70	0.96	0.26	2.40
hsa-mir-221-prec	3.39	0.94	0.28	2.38
hsa-mir-103-prec-5=103-1	5.82	1.12	0.19	2.35
hsa-mir-093-prec-7.1=093-1	3.98	1.03	0.26	2.30
hsa-mir-125a-precNo1	2.86	0.80	0.28	2.26
hsa-mir-100-1/2-prec	4.39	0.99	0.23	2.10
hsa-mir-181b-2No1	5.63	1.06	0.19	2.07
hsa-mir-106bNo1	3.38	0.86	0.26	2.04
hsa-mir-191-prec	2.73	0.75	0.27	1.96
hsa-mir-214-prec	4.25	0.95	0.22	1.92
hsa-mir-130bNo1	3.64	0.79	0.22	1.89
hsa-mir-342No1	3.06	0.77	0.25	1.79
hsa-mir-222-precNo1	3.67	0.82	0.22	1.79
hsa-mir-320No1	3.44	0.68	0.20	1.46
hsa-mir-099b-prec-19No2	2.73	0.63	0.23	1.43
hsa-mir-136-precNo2	-3.44	-1.12	0.32	0.64
hsa-mir-218-2-precNo1	-4.87	-0.93	0.19	0.67
hsa-mir-212-precNo2	-5.09	-1.07	0.21	0.68
hsa-mir-218-2-precNo2	-3.38	-1.09	0.32	0.69
hsa-mir-096-prec-7No2	-4.65	-0.93	0.20	0.73
hsa-mir-339No1	-3.31	-0.95	0.29	0.74
hsa-mir-212-precNo1	-3.31	-0.66	0.20	0.79
hsa-mir-130bNo2	-4.52	-1.63	0.36	0.84
输入参数			两类, 配对的	
数据类型?			是	
阵列居中?			1.43	
δ			0.00	
最小倍数变化			标准	
检验统计			是	
数据是对数标度吗?			100.00	
排列的数目			自动选择	
可交换性因子s0的输入百分位数			10.00	
KNN的近邻的数目			1234567.00	
随机数字产生器的种				
计算的值			0.51	
p10的评估 (无效基因的比例)			0.03	
可交换性因子s0			0.05	
s0百分位数			1.41	
假发现率 (%)				

图 14

人胃癌细胞系中的微RNA表达 (微阵列, 对数标度)

MIRNA ID	AGS	GLT	MKN.28	MKN.74	Snu.16	Snu.J	AGS	GLT	MKN.28	MKN.74	Snu.16	Snu.J
独特id												
hsa_mir_147左	9.11	8.74	8.65	8.80	9.78	8.57	0.88	0.86	0.84	0.86	0.92	0.85
hsa_mir_147右	4.51	5.88	4.46	4.79	4.84	5.15	0.38	0.58	0.00	0.43	0.42	0.47
hsa_mir_320_Hcd306												
left	8.61	8.67	7.99	8.33	8.48	6.59	0.84	0.85	0.79	0.82	0.83	0.66
hsa_mir_320_Hcd306												
right	9.54	9.79	9.31	9.59	9.58	10.24	0.91	0.92	0.90	0.91	0.91	0.94
hsa_mir_490_Hcd20												
left	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa_mir_490_Hcd20												
right	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa_mir_95左	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa_mir_95右	4.46	4.93	4.46	4.56	6.65	4.75	0.00	0.43	0.00	0.38	0.66	0.42
hsa-let-7a-1-prec	8.65	8.18	8.51	8.00	9.61	8.72	0.84	0.80	0.83	0.78	0.91	0.86
hsa-let-7a-2-precNo1	5.42	4.46	4.46	5.06	5.31	4.57	0.50	0.00	0.00	0.46	0.48	0.40
hsa-let-7a-2-precNo2	8.37	8.64	8.82	8.34	7.68	9.12	0.81	0.84	0.85	0.82	0.76	0.89
hsa-let-7a-3-prec	8.11	8.09	8.58	7.75	7.81	8.93	0.78	0.79	0.83	0.76	0.77	0.88
hsa-let-7b-prec	10.63	10.79	10.90	10.85	10.91	11.18	0.96	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97
hsa-let-7c-prec	8.64	8.97	9.46	9.05	8.94	9.95	0.84	0.87	0.91	0.87	0.86	0.93
hsa-let-7d-prec	8.86	9.25	9.37	8.91	8.87	9.76	0.86	0.89	0.90	0.87	0.85	0.92
hsa-let-7d-v1-prec	6.85	7.50	7.48	6.73	6.91	7.00	0.68	0.75	0.74	0.67	0.68	0.71
hsa-let-7d-v2-												
precNo1	6.55	6.88	6.26	6.67	6.06	7.27	0.64	0.69	0.61	0.66	0.58	0.73
hsa-let-7d-v2-												
precNo2	9.03	9.71	9.70	9.82	9.42	10.16	0.88	0.92	0.92	0.93	0.89	0.93
hsa-let-7e-prec	9.50	9.50	10.10	9.57	9.95	10.26	0.91	0.91	0.94	0.91	0.93	0.94
hsa-let-7f-1-precNo1	5.85	4.46	6.40	5.58	5.96	4.46	0.56	0.00	0.63	0.53	0.57	0.00

图 15- 表 3

hsa-let-7f-1-precNo2	6.96	7.46	7.89	7.13	7.07	8.05	0.69	0.74	0.78	0.72	0.69	0.79
hsa-let-7f-2-prec2	6.57	5.36	6.39	5.06	6.29	6.63	0.64	0.50	0.63	0.46	0.62	0.66
hsa-let-7g-precNo1	9.19	9.27	9.31	9.21	9.43	9.67	0.89	0.89	0.90	0.89	0.90	0.92
hsa-let-7g-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	5.09	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00
hsa-let-7iNo1	9.70	10.07	10.29	10.30	10.05	10.64	0.92	0.94	0.95	0.95	0.94	0.96
hsa-let-7iNo2	6.02	6.55	5.57	6.52	5.63	7.07	0.59	0.65	0.53	0.64	0.52	0.71
hsa-mir-001b-1-prec1	6.20	6.77	6.67	5.56	5.88	6.07	0.60	0.67	0.67	0.52	0.56	0.60
hsa-mir-001b-2-prec	6.47	6.45	6.86	7.13	7.45	6.97	0.62	0.63	0.69	0.72	0.73	0.70
hsa-mir-007-1-prec	7.39	7.35	7.96	7.51	7.22	7.67	0.72	0.73	0.79	0.75	0.71	0.76
hsa-mir-007-2-precNo1	7.39	5.48	5.51	6.16	5.72	4.46	0.72	0.52	0.52	0.61	0.54	0.00
hsa-mir-007-2-precNo2	7.07	6.97	7.54	6.91	7.25	6.85	0.70	0.70	0.75	0.69	0.72	0.69
hsa-mir-007-3-precNo1	9.37	9.67	9.76	9.76	9.91	10.30	0.90	0.91	0.93	0.92	0.93	0.95
hsa-mir-007-3-precNo2	6.82	5.83	6.84	7.14	5.88	5.22	0.67	0.57	0.69	0.72	0.56	0.48
hsa-mir-009-1No1	8.39	8.62	8.73	8.79	8.73	9.38	0.81	0.84	0.84	0.86	0.84	0.91
hsa-mir-009-1No2	6.24	6.43	4.46	4.59	7.72	4.46	0.60	0.63	0.00	0.38	0.76	0.00
hsa-mir-009-2No1	4.46	5.66	5.64	4.80	6.54	4.95	0.00	0.54	0.54	0.43	0.65	0.44
hsa-mir-009-2No2	4.46	5.79	4.46	4.46	5.97	4.46	0.00	0.56	0.00	0.00	0.57	0.00
hsa-mir-009-3No1	9.18	9.44	9.56	9.57	9.37	9.80	0.89	0.90	0.91	0.91	0.89	0.92
hsa-mir-009-3No2	8.61	8.69	7.69	8.46	8.37	8.16	0.84	0.85	0.76	0.83	0.82	0.81
hsa-mir-010a-precNo1	7.02	6.92	7.65	6.82	8.08	6.66	0.70	0.69	0.76	0.68	0.80	0.67
hsa-mir-010a-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-010b-precNo1	6.31	5.66	6.30	6.34	6.79	6.57	0.61	0.54	0.62	0.63	0.67	0.65
hsa-mir-010b-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40
hsa-mir-015a-2-precNo1	6.54	6.71	6.64	6.87	5.69	6.72	0.63	0.67	0.67	0.69	0.53	0.67

图 15- 表 3

hsa-mir-015a-2-precNo2	5.49	5.81	5.81	5.93	5.50	5.81	0.50	0.56	0.55	0.58	0.51	0.56
hsa-mir-015b-precNo1	6.44	6.12	5.26	6.19	4.46	5.69	0.62	0.60	0.48	0.61	0.00	0.54
hsa-mir-015b-precNo2	4.57	4.82	4.75	4.67	4.46	4.46	0.39	0.42	0.42	0.40	0.00	0.00
hsa-mir-016a-chr13	6.88	5.61	7.45	6.55	6.16	7.55	0.68	0.53	0.74	0.64	0.60	0.75
hsa-mir-016b-chr3	7.40	7.09	7.83	7.29	7.02	8.35	0.72	0.71	0.78	0.73	0.69	0.83
hsa-mir-017-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-017-precNo2	9.30	10.31	9.42	9.92	10.10	8.91	0.90	0.95	0.91	0.93	0.94	0.87
hsa-mir-018-prec	4.55	5.06	5.46	5.61	5.44	4.46	0.38	0.45	0.51	0.54	0.50	0.00
hsa-mir-019a-prec	4.46	4.74	5.63	4.46	4.82	4.46	0.00	0.40	0.53	0.00	0.42	0.00
hsa-mir-019b-1-prec	4.46	5.53	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-019b-2-prec	4.74	5.80	4.85	4.63	4.82	4.46	0.40	0.56	0.44	0.39	0.41	0.00
hsa-mir-020-prec	8.97	10.01	9.50	9.80	9.92	8.73	0.87	0.93	0.91	0.93	0.93	0.86
hsa-mir-021-prec-17No1	9.76	9.98	9.24	9.36	8.37	7.77	0.93	0.93	0.89	0.90	0.82	0.77
hsa-mir-021-prec-17No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-022-prec	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-023a-prec	13.23	13.57	14.32	13.44	13.08	11.91	0.99	0.99	1.00	0.99	0.99	0.98
hsa-mir-023b-prec	13.33	13.73	14.41	13.38	13.28	12.12	0.99	1.00	1.00	0.99	0.99	0.99
hsa-mir-024-1-precNo1	9.21	9.44	10.19	8.88	8.54	7.26	0.89	0.90	0.95	0.86	0.84	0.73
hsa-mir-024-1-precNo2	4.46	4.46	5.57	5.57	4.46	4.46	0.00	0.00	0.53	0.53	0.00	0.00
hsa-mir-024-2-prec	8.85	9.04	9.98	8.63	7.99	7.11	0.86	0.88	0.93	0.85	0.79	0.71
hsa-mir-025-prec	10.93	12.08	11.39	11.92	11.82	10.60	0.96	0.98	0.98	0.98	0.98	0.96
hsa-mir-026a-precNo1	9.56	9.95	10.13	9.68	9.50	10.67	0.92	0.93	0.94	0.92	0.90	0.96
hsa-mir-026a-precNo2	5.81	5.84	6.55	5.70	6.22	5.74	0.55	0.57	0.65	0.55	0.60	0.55
hsa-mir-026b-prec	10.09	10.79	10.95	10.61	10.72	11.58	0.94	0.97	0.97	0.96	0.96	0.98

图 15- 表 3

hsa-mir-027a-prec	6.54	6.42	7.06	6.90	6.08	6.00	0.64	0.63	0.70	0.69	0.58	0.59
hsa-mir-027b-prec	5.88	5.85	6.25	5.80	4.46	4.46	0.56	0.57	0.61	0.56	0.00	0.00
hsa-mir-028-prec	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-029a-2No1	7.86	6.66	8.74	7.37	7.50	8.84	0.75	0.66	0.84	0.74	0.74	0.87
hsa-mir-029a-2No2	10.43	10.45	10.62	10.79	10.24	10.75	0.95	0.96	0.96	0.97	0.95	0.97
hsa-mir-029c-prec	8.62	8.74	9.05	8.48	8.65	9.09	0.84	0.86	0.88	0.83	0.84	0.89
hsa-mir-030a-precNo1	8.16	8.31	9.35	8.02	7.85	7.86	0.79	0.82	0.90	0.79	0.77	0.78
hsa-mir-030a-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.54	4.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.44
hsa-mir-030b-precNo1	8.24	8.41	9.50	8.16	8.22	7.75	0.80	0.82	0.91	0.80	0.81	0.77
hsa-mir-030b-precNo2	6.63	7.58	7.24	6.74	6.97	7.83	0.65	0.75	0.71	0.67	0.68	0.78
hsa-mir-030c-prec	8.29	8.46	9.01	7.98	7.98	8.51	0.80	0.83	0.87	0.78	0.78	0.85
hsa-mir-030d-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-030d-precNo2	8.64	8.73	10.66	8.52	8.67	8.41	0.84	0.86	0.96	0.84	0.84	0.84
hsa-mir-031-prec	7.16	4.82	4.69	4.46	4.46	4.48	0.70	0.41	0.40	0.00	0.00	0.38
hsa-mir-032-precNo1	6.18	5.69	5.64	4.75	4.46	5.21	0.60	0.55	0.53	0.42	0.00	0.48
hsa-mir-032-precNo2	10.16	11.23	10.23	11.03	10.53	8.92	0.95	0.97	0.95	0.97	0.95	0.88
hsa-mir-033b-prec	5.63	7.38	6.62	6.95	7.02	7.13	0.53	0.74	0.67	0.70	0.69	0.72
hsa-mir-033-prec	5.18	4.82	5.37	4.99	4.88	4.46	0.46	0.41	0.50	0.44	0.43	0.00
hsa-mir-034precNo1	7.07	7.99	7.33	7.88	7.53	7.63	0.70	0.78	0.72	0.77	0.74	0.76
hsa-mir-034-precNo2	4.93	4.46	4.46	4.46	4.46	4.99	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45
hsa-mir-092-prec-13=092-1No1	7.91	8.41	7.31	8.15	7.94	8.36	0.76	0.82	0.72	0.80	0.78	0.83
hsa-mir-092-prec-13=092-1No2	13.76	14.69	13.75	14.29	14.29	13.53	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hsa-mir-092-prec-X=092-2	13.20	14.28	13.29	13.88	14.14	12.97	0.99	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99
hsa-mir-093-prec	8.90	9.78	9.25	9.49	9.43	8.86	0.87	0.92	0.89	0.90	0.90	0.87

图 15- 表 3

7.1=093-1	4.46	5.39	5.36	5.40	7.59	4.46	0.00	0.50	0.50	0.75	0.00
hsa-mir-095-prec-4											
hsa-mir-096-prec-7No1	6.56	6.82	5.96	6.01	6.25	6.85	0.64	0.67	0.57	0.61	0.69
hsa-mir-096-prec-7No2	11.38	11.75	11.75	11.82	11.59	11.74	0.97	0.98	0.98	0.97	0.98
hsa-mir-098-prec-X	6.50	6.36	7.23	6.16	6.42	8.12	0.63	0.61	0.71	0.63	0.80
hsa-mir-099b-prec-19No1	5.90	5.89	7.26	5.88	5.31	5.38	0.57	0.58	0.72	0.48	0.50
hsa-mir-099b-prec-19No2	11.06	8.00	9.70	8.11	8.77	9.37	0.97	0.78	0.92	0.84	0.90
hsa-mir-099-prec-21	10.03	6.90	9.22	7.12	6.91	8.95	0.94	0.69	0.89	0.72	0.88
hsa-mir-100-1/2-prec	9.36	8.38	8.99	7.83	7.44	8.33	0.90	0.82	0.87	0.77	0.82
hsa-mir-100No1	7.86	6.82	8.04	5.71	5.37	7.51	0.76	0.68	0.79	0.55	0.75
hsa-mir-100No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-101-1/2-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-101-1/2-precNo2	5.56	5.43	4.50	5.28	5.46	4.46	0.51	0.51	0.39	0.50	0.00
hsa-mir-101-1No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-101-1No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-101-2No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-101-2No2	5.13	4.97	4.46	4.46	4.46	4.46	0.45	0.44	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-101-prec-9	5.58	5.61	4.46	4.46	4.46	4.82	0.52	0.53	0.00	0.00	0.43
hsa-mir-102-prec-1	7.59	8.09	8.73	7.85	7.99	8.90	0.74	0.79	0.84	0.78	0.87
hsa-mir-103-2-prec	9.41	8.28	8.95	9.82	9.77	9.87	0.90	0.81	0.87	0.92	0.93
hsa-mir-103-prec-5=103-1	9.42	8.21	9.19	9.93	9.90	10.07	0.91	0.80	0.89	0.92	0.93
hsa-mir-105-2No1	4.78	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-105-2No2	7.98	7.49	6.58	7.06	6.60	7.37	0.77	0.75	0.66	0.65	0.73
hsa-mir-105-prec-X.1=105-1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-106aNo1	8.21	9.32	8.68	8.60	9.18	7.76	0.79	0.89	0.84	0.87	0.77

图 15- 表 3

hsa-mir-106aNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-106bNo1	7.86	9.05	8.38	8.66	8.95	7.62	7.62	7.62	7.62	0.88	0.88	0.82	0.85	0.86	0.76	0.76	0.76
hsa-mir-106bNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-106-prec-X	8.30	9.47	9.14	9.19	9.35	8.40	9.35	8.40	9.35	0.90	0.90	0.88	0.89	0.89	0.80	0.88	0.84
hsa-mir-107No1	8.96	7.70	8.72	9.27	9.27	9.53	9.27	9.53	9.27	0.76	0.76	0.84	0.89	0.88	0.87	0.84	0.91
hsa-mir-107No2	6.08	5.90	6.00	5.39	6.33	5.64	6.33	5.64	6.33	0.58	0.58	0.57	0.50	0.62	0.59	0.57	0.54
hsa-mir-107-prec-10	9.13	8.23	9.03	9.58	9.53	9.91	9.53	9.91	9.53	0.80	0.80	0.88	0.91	0.90	0.88	0.91	0.93
hsa-mir-1-1No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-1-1No2	7.59	7.35	6.29	7.78	6.50	7.20	7.78	6.50	7.20	0.73	0.73	0.61	0.76	0.64	0.74	0.61	0.72
hsa-mir-122a-prec	10.15	10.36	10.42	10.52	10.12	10.64	10.52	10.64	10.12	0.96	0.96	0.96	0.96	0.94	0.95	0.96	0.96
hsa-mir-123-precNo1	4.99	6.99	6.68	6.38	6.35	6.37	6.38	6.35	6.37	0.70	0.70	0.67	0.63	0.63	0.44	0.67	0.63
hsa-mir-123-precNo2	5.23	4.67	4.81	5.27	4.88	4.46	5.27	4.88	4.46	0.40	0.40	0.43	0.48	0.43	0.48	0.43	0.00
hsa-mir-124a-1-prec1	5.66	5.84	7.25	5.34	5.38	6.01	5.34	5.38	6.01	0.54	0.57	0.72	0.50	0.49	0.54	0.72	0.59
hsa-mir-124a-2-prec	4.46	4.89	4.46	4.46	5.53	4.46	4.46	5.53	4.46	0.00	0.43	0.00	0.00	0.51	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-124a-3-prec	5.15	5.64	5.67	5.17	6.26	5.05	5.17	6.26	5.05	0.46	0.53	0.54	0.47	0.61	0.46	0.54	0.46
hsa-mir-125a-precNo1	8.89	4.46	7.42	5.31	4.46	6.85	5.31	4.46	6.85	0.87	0.00	0.73	0.49	0.00	0.87	0.73	0.69
hsa-mir-125a-precNo2	4.84	4.46	4.91	4.46	5.56	5.75	4.46	5.56	5.75	0.43	0.00	0.45	0.00	0.52	0.43	0.45	0.56
hsa-mir-125b-1	8.12	5.35	7.43	4.46	5.05	8.07	4.46	5.05	8.07	0.79	0.49	0.73	0.00	0.45	0.79	0.73	0.79
hsa-mir-125b-2-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-125b-2-precNo2	8.09	6.61	7.61	6.03	6.08	8.37	6.03	6.08	8.37	0.66	0.66	0.75	0.59	0.58	0.78	0.75	0.83
hsa-miR-126*No1	8.97	8.45	9.14	8.58	9.60	9.04	8.58	9.60	9.04	0.88	0.83	0.88	0.84	0.91	0.88	0.88	0.89
hsa-miR-126*No2	4.80	4.46	5.16	5.28	4.66	4.46	5.28	4.66	4.46	0.42	0.00	0.46	0.48	0.39	0.42	0.46	0.00
hsa-mir-126No1	4.73	4.48	4.80	5.31	4.97	4.78	5.31	4.97	4.78	0.40	0.37	0.43	0.49	0.44	0.40	0.43	0.43
hsa-mir-126No2	10.98	10.42	10.92	10.88	11.23	10.86	10.88	11.23	10.86	0.97	0.96	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
hsa-mir-127-prec	5.75	5.76	5.87	5.52	5.76	5.81	5.52	5.76	5.81	0.54	0.55	0.56	0.52	0.54	0.54	0.56	0.56
hsa-mir-128a-precNo1	6.89	7.41	7.02	7.03	7.49	8.12	7.03	7.49	8.12	0.68	0.74	0.70	0.70	0.74	0.68	0.70	0.80
hsa-mir-128a-precNo2	9.27	9.41	9.58	9.64	9.29	9.65	9.64	9.29	9.65	0.90	0.90	0.91	0.92	0.88	0.90	0.91	0.92

图 15-表 3

precNo2	5.89	6.51	7.06	6.17	6.96	5.88	0.57	0.64	0.70	0.61	0.68	0.57
hsa-mir-128b-precNo1	5.33	4.46	4.87	5.69	4.74	4.46	0.50	0.00	0.44	0.55	0.40	0.00
hsa-mir-128b-precNo2	10.15	10.32	10.44	10.44	10.03	10.63	0.95	0.95	0.96	0.96	0.93	0.96
hsa-mir-129-2No1	5.96	6.36	6.08	6.68	6.22	5.16	0.58	0.61	0.59	0.66	0.60	0.47
hsa-mir-129-2No2	7.41	7.93	7.91	8.01	7.46	8.24	0.73	0.77	0.78	0.79	0.74	0.82
hsa-mir-129-precNo1	8.71	8.12	7.44	8.31	8.21	7.24	0.85	0.79	0.74	0.81	0.81	0.72
hsa-mir-129-precNo2	5.13	5.80	6.03	6.63	5.70	4.46	0.45	0.56	0.58	0.65	0.53	0.00
hsa-mir-1-2No1	8.31	8.23	7.73	7.93	6.90	8.47	0.80	0.80	0.76	0.78	0.67	0.84
hsa-mir-1-2No2												
hsa-mir-130a-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-130a-precNo2	8.47	4.98	7.29	5.46	6.46	9.00	0.82	0.44	0.72	0.51	0.64	0.89
hsa-mir-130bNo1	8.36	6.99	7.86	7.72	7.66	8.44	0.81	0.70	0.78	0.76	0.76	0.84
hsa-mir-130bNo2	9.96	9.83	10.17	10.06	9.90	10.21	0.93	0.92	0.95	0.94	0.92	0.94
hsa-mir-132-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45
hsa-mir-132-precNo2	5.50	5.39	5.30	4.46	4.46	5.48	0.51	0.50	0.48	0.00	0.00	0.52
hsa-mir-133a-1	4.46	4.46	4.46	4.70	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00
hsa-mir-133a-2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-133bNo1	5.84	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-133bNo2	8.12	8.21	7.65	8.29	8.20	8.45	0.79	0.80	0.75	0.81	0.81	0.84
hsa-mir-134-precNo1	6.75	6.08	5.31	5.76	8.86	5.75	0.66	0.60	0.49	0.56	0.85	0.56
hsa-mir-134-precNo2	4.46	6.58	5.82	4.46	5.95	6.57	0.00	0.65	0.56	0.00	0.57	0.65
hsa-mir-135-1-prec	7.71	7.72	7.74	8.16	7.69	7.51	0.75	0.76	0.76	0.80	0.76	0.74
hsa-mir-135-2-prec	8.46	8.99	8.37	8.58	8.40	8.04	0.82	0.87	0.82	0.84	0.82	0.79
hsa-mir-135a-1No1	9.61	9.90	9.69	10.16	9.59	9.86	0.92	0.93	0.92	0.94	0.91	0.92
hsa-mir-135a-1No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-135a-2No1	7.50	7.90	8.09	8.67	7.54	7.54	0.73	0.77	0.80	0.85	0.75	0.75
hsa-mir-135a-2No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-135bNo1	5.61	5.87	5.99	5.52	5.81	4.46	0.52	0.58	0.57	0.52	0.55	0.00

图 15- 表 3

hsa-mir-135bNo2	5.56	5.69	6.01	5.46	6.10	6.01	0.51	0.54	0.58	0.51	0.59	0.59
hsa-mir-136-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.69	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00
hsa-mir-136-precNo2	8.80	9.00	8.96	9.53	9.30	9.32	0.85	0.88	0.87	0.90	0.88	0.90
hsa-mir-137-prec	4.46	4.46	4.46	4.46	5.05	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45	0.00
hsa-mir-138-1-prec	7.29	7.00	6.48	6.37	6.80	6.85	0.71	0.70	0.64	0.63	0.67	0.68
hsa-mir-138-2-prec	5.67	5.94	6.08	6.26	6.78	6.83	0.54	0.59	0.59	0.62	0.66	0.68
hsa-mir-139-prec	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-140No1	4.46	4.46	5.15	4.46	4.46	4.72	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.42
hsa-mir-140No2	4.46	4.46	4.62	4.46	5.92	5.42	0.00	0.00	0.40	0.00	0.56	0.51
hsa-mir-141-precNo1	6.95	6.83	6.97	7.42	8.12	6.95	0.69	0.68	0.70	0.74	0.80	0.70
hsa-mir-141-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-142-prec	5.95	5.46	4.46	4.46	5.86	5.85	0.58	0.52	0.00	0.00	0.55	0.57
hsa-mir-143-prec	4.46	4.46	4.72	4.46	5.55	4.58	0.00	0.00	0.41	0.00	0.51	0.40
hsa-mir-144-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	5.93	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56	0.00
hsa-mir-144-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-145-prec	8.05	8.03	8.33	8.59	8.04	8.79	0.78	0.78	0.81	0.84	0.79	0.87
hsa-mir-146bNo1	5.93	4.46	4.46	4.46	5.33	4.46	0.58	0.00	0.00	0.00	0.49	0.00
hsa-mir-146bNo2	4.88	5.71	5.53	4.46	4.86	5.02	0.43	0.55	0.52	0.00	0.42	0.45
hsa-mir-146-prec	4.77	4.46	4.73	4.77	5.51	4.46	0.41	0.00	0.41	0.42	0.51	0.00
hsa-mir-147-prec	4.46	5.31	5.47	4.46	4.46	5.71	0.00	0.49	0.51	0.00	0.00	0.55
hsa-mir-148aNo1	5.19	4.46	4.52	4.46	5.68	5.28	0.47	0.00	0.39	0.00	0.53	0.49
hsa-mir-148aNo2	6.38	6.42	5.74	5.92	5.50	4.46	0.61	0.63	0.55	0.58	0.51	0.00
hsa-mir-148bNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42
hsa-mir-148bNo2	10.93	10.71	10.55	10.89	10.39	10.91	0.96	0.97	0.96	0.97	0.95	0.97
hsa-mir-148-prec	4.46	5.33	5.51	4.46	5.99	4.70	0.00	0.49	0.52	0.00	0.58	0.41
hsa-mir-149-prec	5.76	5.82	6.47	5.65	6.41	6.17	0.55	0.56	0.64	0.54	0.63	0.61
hsa-mir-150-prec	8.38	8.47	8.08	8.30	8.99	7.12	0.81	0.83	0.79	0.81	0.86	0.71
hsa-mir-151-prec	7.48	5.49	6.23	6.05	7.36	4.46	0.73	0.52	0.60	0.59	0.72	0.00
hsa-mir-152-precNo1	7.32	7.81	7.37	7.90	7.89	7.64	0.72	0.77	0.73	0.78	0.77	0.76
hsa-mir-152-precNo2	5.87	6.67	6.70	6.64	6.42	6.14	0.56	0.66	0.68	0.66	0.64	0.60
hsa-mir-153-1-prec1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.53	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.00

图 15- 表 3

hsa-mir-153-1-prec2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-153-2-prec	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-154-prec1No1	4.84	4.72	4.46	4.64	4.93	4.46	4.46	4.46	4.46	0.42	0.40	0.00	0.39	0.43	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-154-prec1No2	5.83	5.06	5.48	5.00	4.46	5.24	4.46	5.24	4.46	0.55	0.45	0.52	0.45	0.00	0.49	0.49	0.49
hsa-mir-155-prec	8.28	11.18	8.34	10.29	10.17	8.64	10.17	8.64	8.64	0.80	0.97	0.82	0.95	0.94	0.86	0.86	0.86
hsa-mir-15aNo1	6.50	6.42	5.47	7.00	4.46	6.48	4.46	6.48	4.46	0.62	0.62	0.51	0.70	0.00	0.64	0.64	0.64
hsa-mir-15aNo2	4.46	4.46	4.46	4.52	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-16-1No1	7.18	6.42	6.55	6.80	6.57	7.72	6.57	7.72	7.72	0.71	0.63	0.65	0.68	0.65	0.76	0.76	0.76
hsa-mir-16-1No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-16-2No1	7.28	7.21	7.38	7.70	7.66	8.07	7.66	8.07	8.07	0.71	0.72	0.73	0.76	0.76	0.80	0.80	0.80
hsa-mir-16-2No2	5.61	6.24	6.24	4.76	5.13	5.40	5.13	5.40	5.40	0.52	0.60	0.61	0.42	0.46	0.51	0.51	0.51
hsa-mir-181a-precNo1	9.81	8.95	8.18	8.17	6.95	5.73	6.95	5.73	5.73	0.93	0.87	0.80	0.80	0.68	0.55	0.55	0.55
hsa-mir-181a-precNo2	9.43	9.51	8.79	9.39	8.84	8.31	8.84	8.31	8.31	0.91	0.91	0.85	0.90	0.85	0.82	0.82	0.82
hsa-mir-181b-1No1	11.40	10.41	9.89	9.94	8.17	7.85	8.17	7.85	7.85	0.98	0.96	0.93	0.94	0.81	0.78	0.78	0.78
hsa-mir-181b-1No2	7.06	6.37	5.86	6.85	4.84	6.03	4.84	6.03	6.03	0.70	0.62	0.56	0.68	0.42	0.59	0.59	0.59
hsa-mir-181b-2No1	11.56	10.59	10.14	10.25	9.03	8.98	9.03	8.98	8.98	0.98	0.96	0.94	0.95	0.87	0.89	0.89	0.89
hsa-mir-181b-2No2	6.27	6.41	6.60	6.39	6.85	5.71	6.85	5.71	5.71	0.60	0.62	0.66	0.64	0.67	0.55	0.55	0.55
hsa-mir-181b-precNo1	10.03	8.64	8.36	8.05	6.61	6.23	6.61	6.23	6.23	0.94	0.85	0.82	0.79	0.65	0.62	0.62	0.62
hsa-mir-181b-precNo2	6.93	5.19	5.81	6.34	6.27	5.63	6.27	5.63	5.63	0.68	0.47	0.55	0.63	0.61	0.54	0.54	0.54
hsa-mir-181c-precNo1	8.67	7.06	6.53	6.64	5.79	4.66	5.79	4.66	4.66	0.85	0.71	0.65	0.66	0.54	0.41	0.41	0.41
hsa-mir-181c-precNo2	6.39	6.49	6.17	6.33	7.24	6.12	7.24	6.12	6.12	0.61	0.64	0.60	0.62	0.72	0.60	0.60	0.60
hsa-mir-181dNo1	10.29	9.40	8.94	8.77	7.26	6.70	7.26	6.70	6.70	0.95	0.89	0.87	0.85	0.72	0.67	0.67	0.67
hsa-mir-181dNo2	5.62	6.20	6.15	6.03	6.35	6.44	6.35	6.44	6.44	0.53	0.60	0.60	0.59	0.62	0.64	0.64	0.64
hsa-mir-182-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.50	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-182-precNo2	7.22	4.86	6.41	5.03	5.60	4.46	5.60	4.46	4.46	0.71	0.42	0.63	0.46	0.52	0.00	0.00	0.00

图 15- 表 3

hsa-mir-183-precNo1	4.46	4.78	5.18	5.98	4.51	4.96	0.00	0.40	0.47	0.58	0.37	0.44
hsa-mir-183-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-184-precNo1	4.46	4.90	5.72	4.46	4.87	6.30	0.00	0.43	0.54	0.00	0.43	0.62
hsa-mir-184-precNo2	7.94	7.96	7.96	7.97	7.93	7.56	0.76	0.78	0.78	0.78	0.77	0.75
hsa-mir-185-precNo1	7.49	7.94	8.00	7.79	8.04	8.20	0.73	0.77	0.79	0.77	0.79	0.81
hsa-mir-185-precNo2	7.86	8.43	8.05	8.35	7.93	8.55	0.75	0.83	0.79	0.82	0.78	0.85
hsa-mir-186-prec	4.46	4.46	5.45	4.46	4.46	4.87	0.00	0.00	0.51	0.00	0.00	0.43
hsa-mir-187-precNo1	5.61	5.14	5.51	5.87	5.61	5.74	0.53	0.47	0.52	0.57	0.52	0.55
hsa-mir-187-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	5.58	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52	0.00
hsa-mir-188-prec	4.60	4.98	4.46	4.72	4.46	5.08	0.39	0.44	0.00	0.41	0.00	0.46
hsa-mir-18bNo1	4.46	5.66	4.46	4.46	4.46	4.75	0.00	0.53	0.00	0.00	0.00	0.42
hsa-mir-18bNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-190-prec	4.46	4.46	4.46	4.72	4.57	4.86	0.00	0.00	0.00	0.41	0.38	0.43
hsa-mir-191-prec	8.68	10.35	8.21	9.61	9.50	9.37	0.85	0.96	0.80	0.92	0.90	0.91
hsa-mir-192-2/3No1	9.44	9.68	7.53	10.24	11.72	8.21	0.91	0.91	0.74	0.95	0.98	0.81
hsa-mir-192-2/3No2	6.86	6.52	6.49	7.05	6.60	6.36	0.68	0.65	0.64	0.71	0.65	0.62
hsa-mir-192No1	9.85	9.88	4.74	10.66	12.40	6.90	0.93	0.93	0.42	0.96	0.99	0.69
hsa-mir-192No2	4.46	4.51	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-193bNo1	6.72	6.51	5.16	6.31	4.78	5.93	0.66	0.64	0.47	0.62	0.41	0.58
hsa-mir-193bNo2	5.61	5.27	5.73	5.29	4.46	4.76	0.52	0.49	0.55	0.49	0.00	0.42
hsa-mir-193-precNo1	5.13	4.69	4.46	5.06	4.70	5.30	0.46	0.40	0.00	0.46	0.39	0.49
hsa-mir-193-precNo2	6.96	7.29	7.18	7.04	7.64	7.57	0.69	0.72	0.71	0.71	0.75	0.75
hsa-mir-194-1No1	4.48	4.58	4.46	5.36	7.11	4.46	0.38	0.39	0.00	0.50	0.70	0.00
hsa-mir-194-1No2	4.46	5.38	5.36	4.46	5.01	5.81	0.00	0.50	0.50	0.00	0.44	0.56
hsa-mir-194-2No1	7.88	8.25	8.11	8.12	9.20	8.44	0.76	0.81	0.80	0.80	0.87	0.84
hsa-mir-194-2No2	4.88	4.96	4.95	4.72	5.49	5.53	0.43	0.43	0.45	0.41	0.50	0.52
hsa-mir-194-precNo1	6.67	6.55	5.75	5.99	6.98	6.33	0.65	0.65	0.55	0.59	0.68	0.62
hsa-mir-194-precNo2	4.46	5.01	4.46	5.22	5.17	5.24	0.00	0.45	0.00	0.47	0.46	0.48
hsa-mir-195-prec	7.41	6.69	7.41	7.23	6.75	7.38	0.73	0.67	0.73	0.73	0.66	0.74
hsa-mir-196-1-precNo1	6.68	7.35	7.27	7.68	6.64	7.38	0.66	0.73	0.72	0.75	0.66	0.73

图 15- 表 3

hsa-mir-196-1-precNo2	8.08	6.60	6.55	7.15	9.75	6.58	0.78	0.65	0.66	0.72	0.92	0.66
hsa-mir-196-2-precNo1	4.55	4.46	6.07	5.67	5.73	5.60	0.39	0.00	0.59	0.54	0.54	0.53
hsa-mir-196-2-precNo2	8.11	8.96	8.84	8.62	8.44	9.28	0.78	0.87	0.85	0.85	0.83	0.90
hsa-mir-196a-1No1	11.04	10.88	11.14	11.28	10.87	11.20	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97
hsa-mir-196a-1No2	9.59	8.81	8.80	9.27	10.33	8.15	0.92	0.86	0.85	0.89	0.95	0.80
hsa-mir-196a-2No1	8.51	9.17	9.06	9.17	8.80	9.39	0.83	0.88	0.88	0.88	0.85	0.91
hsa-mir-196a-2No2	6.60	7.08	6.11	6.70	7.43	6.96	0.65	0.71	0.59	0.67	0.73	0.70
hsa-mir-196bNo1	6.54	7.65	6.57	7.79	6.21	7.87	0.64	0.75	0.66	0.76	0.60	0.78
hsa-mir-196bNo2	9.08	8.75	8.89	9.03	9.70	8.55	0.88	0.86	0.86	0.87	0.91	0.85
hsa-mir-197-prec	10.53	10.29	10.81	10.66	11.19	10.30	0.95	0.95	0.97	0.96	0.97	0.95
hsa-mir-198-prec	8.61	8.71	8.77	9.07	8.59	8.95	0.83	0.85	0.85	0.87	0.84	0.88
hsa-mir-199a-1-prec	4.46	4.46	4.46	4.47	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.00
hsa-mir-199a-2-prec	5.04	6.95	4.46	5.51	4.46	5.51	0.44	0.69	0.00	0.52	0.00	0.52
hsa-mir-199b-precNo1	5.91	4.58	5.72	6.23	5.72	5.66	0.57	0.39	0.54	0.62	0.53	0.54
hsa-mir-199b-precNo2	6.32	5.52	5.35	5.59	5.90	5.89	0.61	0.52	0.49	0.54	0.56	0.57
hsa-mir-200a-prec	7.88	8.10	7.23	7.68	8.33	4.91	0.76	0.79	0.71	0.75	0.82	0.44
hsa-mir-200bNo1	7.83	8.28	7.10	7.40	8.26	4.53	0.75	0.81	0.70	0.74	0.81	0.39
hsa-mir-200bNo2	7.06	7.46	6.41	6.91	7.99	5.35	0.70	0.74	0.63	0.69	0.79	0.50
hsa-mir-200cNo1	9.01	9.55	8.99	9.09	9.05	6.94	0.88	0.91	0.87	0.88	0.87	0.70
hsa-mir-200cNo2	4.46	5.80	4.97	5.57	5.99	6.13	0.00	0.56	0.45	0.53	0.58	0.60
hsa-mir-202	5.53	5.15	6.28	5.42	4.57	6.04	0.51	0.47	0.61	0.51	0.38	0.60
hsa-mir-202*	13.58	13.62	13.47	13.53	13.52	13.61	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00	1.00
hsa-mir-202-prec	8.17	8.06	7.60	7.34	7.80	7.05	0.79	0.79	0.75	0.74	0.76	0.71
hsa-mir-203-precNo1	10.73	10.01	9.23	9.54	10.57	8.36	0.96	0.94	0.89	0.91	0.96	0.83
hsa-mir-203-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-204-precNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	5.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56
hsa-mir-204-precNo2	6.66	6.83	7.38	5.95	7.50	7.48	0.65	0.68	0.73	0.58	0.74	0.74

图 15- 表 3

hsa-mir-205-prec	8.87	8.42	8.57	8.53	9.35	7.79	0.86	0.83	0.83	0.84	0.89	0.77
hsa-mir-206-precNo1	10.03	10.32	10.49	10.34	10.23	10.47	0.94	0.95	0.96	0.95	0.95	0.95
hsa-mir-206-precNo2	6.75	6.40	6.53	7.37	7.19	6.40	0.66	0.62	0.65	0.74	0.71	0.63
hsa-mir-208-prec	4.46	4.48	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-20bNo1	8.45	9.41	8.88	9.08	9.38	8.12	0.82	0.90	0.86	0.87	0.89	0.80
hsa-mir-20bNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-210-prec	5.49	6.41	6.04	6.15	6.32	6.83	0.50	0.62	0.58	0.61	0.62	0.68
hsa-mir-211-precNo1	4.46	5.12	4.46	4.46	5.29	6.00	0.00	0.46	0.00	0.36	0.48	0.58
hsa-mir-211-precNo2	5.59	4.61	6.21	5.54	5.32	5.54	0.52	0.39	0.60	0.52	0.48	0.53
hsa-mir-212-precNo1	9.15	8.88	9.69	9.32	10.07	9.63	0.89	0.87	0.92	0.90	0.94	0.92
hsa-mir-212-precNo2	7.62	7.01	7.67	7.07	8.01	7.80	0.74	0.71	0.76	0.72	0.79	0.77
hsa-mir-213-precNo1	11.26	10.33	9.89	9.93	8.85	8.93	0.97	0.95	0.93	0.93	0.85	0.88
hsa-mir-213-precNo2	6.56	5.68	6.76	7.09	6.27	6.52	0.64	0.54	0.68	0.72	0.61	0.65
hsa-mir-214-prec	8.61	8.64	9.06	8.52	9.72	8.77	0.84	0.84	0.88	0.83	0.92	0.86
hsa-mir-215-precNo1	9.61	9.50	6.52	10.30	11.78	7.31	0.92	0.91	0.65	0.95	0.98	0.73
hsa-mir-215-precNo2	6.01	5.00	4.46	6.43	7.68	4.46	0.59	0.44	0.00	0.64	0.76	0.00
hsa-mir-216-precNo1	7.30	6.88	6.46	6.59	7.23	6.44	0.71	0.69	0.64	0.65	0.71	0.64
hsa-mir-216-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	5.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50
hsa-mir-217-precNo1	5.90	5.31	4.88	5.72	5.05	5.36	0.57	0.49	0.44	0.56	0.45	0.50
hsa-mir-217-precNo2	4.46	4.46	4.46	4.80	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00
hsa-mir-218-1-prec	4.46	4.46	5.86	5.34	5.32	6.01	0.00	0.00	0.56	0.50	0.48	0.59
hsa-mir-218-2-precNo1	4.46	4.67	4.46	4.46	4.46	5.23	0.00	0.39	0.00	0.00	0.00	0.48
hsa-mir-218-2-precNo2	6.70	6.98	6.21	6.94	7.18	6.89	0.66	0.70	0.60	0.70	0.71	0.69
hsa-mir-219-1No1	5.84	4.46	4.71	5.29	4.46	5.20	0.55	0.00	0.41	0.49	0.00	0.48
hsa-mir-219-1No2	11.47	11.28	11.65	11.50	11.82	11.63	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
hsa-mir-219-2No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-219-2No2	4.46	6.64	6.03	5.89	7.35	6.61	0.00	0.66	0.58	0.57	0.72	0.66
hsa-mir-219-prec	5.25	5.52	4.70	5.92	6.09	5.93	0.48	0.52	0.40	0.58	0.59	0.58
hsa-mir-21No1	9.74	9.69	8.92	9.23	8.17	7.14	0.93	0.92	0.86	0.89	0.80	0.72

图 15- 表 3

hsa-mir-21No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-220-prec	5.62	5.49	5.81	5.93	5.30	6.02	5.53	0.53	0.52	0.56	0.58	0.48	0.59			
hsa-mir-221-prec	8.84	10.30	10.45	9.58	8.64	10.57	8.86	0.86	0.95	0.96	0.91	0.84	0.95			
hsa-mir-222-precNo1	9.47	10.70	10.97	10.14	9.02	11.13	0.91	0.91	0.96	0.97	0.94	0.86	0.97			
hsa-mir-222-precNo2	8.78	10.08	10.09	9.15	8.12	10.27	0.85	0.85	0.94	0.94	0.88	0.80	0.94			
hsa-mir-223-prec	4.46	5.21	4.47	4.46	4.94	4.46	0.00	0.00	0.47	0.39	0.00	0.44	0.00			
hsa-mir-224-prec	4.46	4.46	4.46	4.65	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00			
hsa-mir-26a-1No1	9.11	9.35	9.60	9.14	9.30	10.18	0.88	0.88	0.89	0.92	0.88	0.88	0.94			
hsa-mir-26a-1No2	9.75	9.87	9.72	9.75	10.25	10.28	0.93	0.93	0.93	0.93	0.92	0.95	0.94			
hsa-mir-26a-2No1	7.96	8.29	8.34	6.60	7.98	8.81	0.77	0.81	0.81	0.81	0.65	0.78	0.87			
hsa-mir-26a-2No2	5.58	6.34	5.83	5.59	5.96	5.61	0.52	0.61	0.61	0.56	0.53	0.57	0.54			
hsa-mir-296No1	7.51	7.09	7.32	7.35	7.12	6.91	0.73	0.73	0.71	0.72	0.74	0.70	0.70			
hsa-mir-296No2	4.46	4.46	4.86	4.46	4.46	4.54	0.00	0.00	0.00	0.44	0.00	0.00	0.39			
hsa-mir-299No1	4.46	5.45	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-mir-299No2	4.46	4.46	4.46	5.02	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00			
hsa-mir-29b-1No1	8.81	8.80	9.05	8.78	8.94	8.54	0.86	0.86	0.86	0.88	0.86	0.86	0.85			
hsa-mir-29b-1No2	5.75	6.07	6.28	6.00	4.46	5.42	0.55	0.55	0.59	0.61	0.59	0.00	0.51			
hsa-mir-29b-2=102prec7.1=7.2	8.60	8.66	8.87	8.53	8.80	9.29	0.83	0.85	0.85	0.86	0.84	0.85	0.90			
hsa-mir-301No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-mir-301No2	13.51	13.84	13.49	13.88	13.01	13.19	0.99	0.99	1.00	0.99	1.00	0.99	0.99			
hsa-mir-302aNo1	4.63	4.46	4.70	4.46	4.46	4.46	0.40	0.40	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00			
hsa-mir-302aNo2	6.38	5.93	5.79	6.12	5.06	6.49	0.61	0.58	0.58	0.55	0.60	0.45	0.64			
hsa-miR-302b*No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-miR-302b*No2	4.46	4.46	4.46	4.53	4.80	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.41	0.00			
hsa-mir-302bNo1	5.27	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-mir-302bNo2	5.88	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-miR-302c*No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-miR-302c*No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-mir-302cNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
hsa-mir-302cNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			

图 15-表 3

[illegible]

图 15-表 3

hsa-mir-335No1	5.62	5.71	5.47	5.00	4.92	4.46	0.53	0.55	0.51	0.45	0.43	0.00
hsa-mir-335No2	9.21	9.30	8.93	9.41	9.25	8.92	0.89	0.89	0.86	0.90	0.88	0.88
hsa-mir-337No1	5.22	5.25	4.89	5.00	4.46	4.63	0.47	0.48	0.44	0.45	0.00	0.40
hsa-mir-337No2	5.81	5.98	4.79	5.42	5.85	6.18	0.55	0.59	0.43	0.51	0.55	0.61
hsa-mir-338No1	6.49	6.65	6.91	7.00	7.03	6.63	0.62	0.66	0.69	0.70	0.69	0.67
hsa-mir-338No2	4.46	5.24	4.58	4.63	4.46	4.89	0.00	0.48	0.40	0.39	0.00	0.44
hsa-mir-339No1	5.75	4.46	4.71	4.46	5.41	5.22	0.54	0.00	0.41	0.00	0.49	0.48
hsa-mir-339No2	7.67	7.69	8.21	7.43	7.58	7.91	0.74	0.76	0.80	0.75	0.75	0.79
hsa-mir-340No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-340No2	4.46	5.41	5.30	5.15	5.17	4.97	0.37	0.50	0.48	0.47	0.46	0.45
hsa-mir-342No1	9.58	10.16	9.59	10.45	10.54	9.35	0.92	0.94	0.92	0.96	0.96	0.90
hsa-mir-342No2	6.93	7.83	7.72	6.94	6.81	8.16	0.68	0.77	0.76	0.70	0.67	0.81
hsa-mir-345No1	4.46	6.87	4.46	5.24	6.27	4.46	0.00	0.68	0.38	0.48	0.61	0.00
hsa-mir-345No2	6.95	7.66	6.88	7.05	7.12	7.48	0.69	0.76	0.69	0.71	0.70	0.74
hsa-mir-346No1	8.91	9.09	8.86	9.13	8.98	9.18	0.87	0.88	0.85	0.88	0.86	0.89
hsa-mir-346No2	4.46	4.61	4.46	4.46	4.46	4.69	0.00	0.39	0.00	0.00	0.00	0.41
hsa-mir-34aNo1	8.45	8.57	8.21	8.70	8.47	8.92	0.82	0.84	0.81	0.85	0.83	0.88
hsa-mir-34aNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-34bNo1	6.07	4.46	4.46	5.67	5.03	5.48	0.59	0.00	0.00	0.54	0.45	0.52
hsa-mir-34bNo2	8.49	8.24	7.77	8.28	9.08	6.77	0.83	0.80	0.77	0.81	0.87	0.68
hsa-mir-34cNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-34cNo2	8.84	8.17	7.81	8.25	10.03	7.56	0.86	0.80	0.77	0.81	0.93	0.75
hsa-mir-361No1	8.44	7.33	7.77	7.49	8.40	7.67	0.82	0.73	0.77	0.75	0.83	0.76
hsa-mir-361No2	8.06	8.25	8.31	8.22	8.11	8.27	0.78	0.81	0.81	0.80	0.80	0.82
hsa-mir-362No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.53	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00
hsa-mir-362No2	5.29	4.99	4.46	6.05	4.46	4.46	0.49	0.44	0.00	0.60	0.00	0.00
hsa-mir-363No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-363No2	8.42	7.52	7.75	7.87	6.98	7.78	0.81	0.75	0.77	0.77	0.68	0.77
hsa-mir-365-1No1	4.46	4.57	4.47	4.46	4.46	4.53	0.00	0.38	0.39	0.00	0.00	0.38
hsa-mir-365-1No2	5.88	6.24	6.50	4.99	5.76	6.12	0.57	0.60	0.64	0.45	0.54	0.60
hsa-mir-365-2No1	4.79	5.22	4.46	4.55	4.55	4.46	0.41	0.48	0.00	0.38	0.38	0.00

图 15- 表 3

hsa-mir-365-2No2	7.01	6.99	6.58	6.62	5.82	6.33	0.69	0.70	0.66	0.65	0.55	0.62
hsa-mir-367No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-367No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-368No1	4.80	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-368No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-369No1	6.74	7.98	7.93	7.91	8.04	8.10	0.66	0.78	0.78	0.78	0.79	0.80
hsa-mir-369No2	4.98	5.03	4.46	6.24	4.46	5.54	0.44	0.45	0.00	0.62	0.00	0.52
hsa-mir-370No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-370No2	4.46	4.49	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-371No1	13.11	12.96	12.86	12.96	12.84	13.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
hsa-mir-371No2	14.53	7.77	8.37	9.14	10.67	10.30	1.00	0.76	0.82	0.88	0.96	0.95
hsa-mir-372No1	8.44	5.23	5.42	4.46	4.91	5.32	0.82	0.48	0.50	0.00	0.43	0.50
hsa-mir-372No2	8.32	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-miR-373*No1	12.58	11.60	11.43	12.01	11.60	12.08	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.98
hsa-miR-373*No2	10.56	7.13	6.37	6.65	7.29	7.43	0.96	0.72	0.62	0.66	0.72	0.74
hsa-mir-373No1	10.59	7.31	6.83	6.39	7.31	7.81	0.96	0.73	0.69	0.64	0.72	0.78
hsa-mir-373No2	12.59	11.85	11.98	12.08	11.68	12.20	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.99
hsa-mir-374No1	7.35	6.76	5.98	6.09	6.14	5.90	0.72	0.67	0.57	0.60	0.59	0.58
hsa-mir-374No2	5.31	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-375	7.31	9.84	7.23	9.63	9.35	8.20	0.72	0.92	0.71	0.92	0.88	0.81
hsa-mir-376aNo1	4.63	4.46	4.73	5.71	4.48	4.46	0.39	0.00	0.41	0.55	0.37	0.00
hsa-mir-376aNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-376bNo1	4.46	4.46	6.30	4.98	4.46	5.45	0.00	0.00	0.62	0.44	0.00	0.51
hsa-mir-376bNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-377No1	9.54	9.45	9.39	9.67	9.42	9.74	0.92	0.90	0.90	0.92	0.89	0.92
hsa-mir-377No2	4.91	4.46	4.46	4.75	5.12	4.46	0.43	0.00	0.00	0.42	0.46	0.00
hsa-mir-378No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-378No2	4.46	4.46	4.46	5.02	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00
hsa-mir-379No1	6.29	5.43	5.35	5.83	6.01	6.25	0.60	0.51	0.49	0.57	0.58	0.62
hsa-mir-379No2	6.50	6.16	4.74	6.13	6.45	6.42	0.63	0.60	0.42	0.60	0.64	0.63
hsa-mir-380-3p	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

图 15- 表 3

hsa-mir-380-5p	4.46	4.46	4.46	4.75	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-381No1	5.01	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.54	4.54	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39
hsa-mir-381No2	6.52	5.67	6.92	5.89	6.92	6.79	4.69	4.69	4.69	0.63	0.54	0.56	0.69	0.66	0.41	0.41
hsa-mir-382	6.60	7.30	7.43	6.70	7.43	7.13	7.19	7.19	7.19	0.65	0.72	0.68	0.75	0.70	0.72	0.72
hsa-mir-383No1	8.04	7.75	7.80	8.34	7.80	8.37	8.72	8.72	8.72	0.77	0.76	0.81	0.77	0.82	0.86	0.86
hsa-mir-383No2	5.27	4.60	4.55	4.46	4.55	6.23	4.94	4.94	4.94	0.49	0.39	0.00	0.37	0.60	0.44	0.44
hsa-mir-384	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-409-3p	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.75	4.96	4.96	4.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.45	0.45
hsa-mir-409-5p	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.76	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00
hsa-mir-410No1	5.20	5.07	5.82	5.65	5.82	6.26	6.09	6.09	6.09	0.47	0.46	0.54	0.56	0.61	0.60	0.60
hsa-mir-410No2	6.83	7.11	6.41	6.42	6.41	7.07	6.91	6.91	6.91	0.67	0.72	0.63	0.64	0.70	0.70	0.70
hsa-mir-412No1	9.30	9.00	9.24	8.92	9.24	9.17	8.38	8.38	8.38	0.90	0.87	0.86	0.89	0.87	0.83	0.83
hsa-mir-412No2	4.46	4.46	4.46	4.75	4.46	4.46	5.23	5.23	5.23	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.48	0.48
hsa-mir-422aNo1	4.46	5.00	5.18	4.75	5.18	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.45	0.42	0.47	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-422aNo2	5.64	5.11	5.74	4.46	5.74	4.46	4.46	4.46	4.46	0.53	0.46	0.00	0.56	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-423No1	4.46	4.91	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-423No2	9.98	9.79	10.09	10.15	10.09	10.20	10.40	10.40	10.40	0.94	0.92	0.94	0.94	0.94	0.95	0.95
hsa-mir-424No1	6.66	7.48	6.84	6.68	6.84	6.82	6.75	6.75	6.75	0.65	0.74	0.67	0.68	0.67	0.68	0.68
hsa-mir-424No2	5.85	5.24	4.46	4.46	4.46	5.31	4.46	4.46	4.46	0.56	0.48	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00
hsa-mir-425No1	5.85	6.47	6.74	6.69	6.74	6.36	6.48	6.48	6.48	0.56	0.63	0.68	0.67	0.63	0.64	0.64
hsa-mir-425No2	5.59	6.94	6.83	4.46	6.83	6.38	4.46	4.46	4.46	0.52	0.69	0.00	0.68	0.63	0.00	0.00
hsa-mir-429No1	8.22	8.30	8.35	8.15	8.35	8.40	8.07	8.07	8.07	0.79	0.82	0.80	0.82	0.82	0.80	0.80
hsa-mir-429No2	6.02	6.85	6.92	6.68	6.92	7.62	6.86	6.86	6.86	0.59	0.68	0.68	0.69	0.75	0.69	0.69
hsa-mir-431No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-431No2	10.72	10.16	10.55	10.18	10.55	11.33	9.93	9.93	9.93	0.96	0.94	0.95	0.96	0.97	0.93	0.93
hsa-mir-4323p	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-4325p	5.19	5.09	5.27	5.48	5.27	4.46	5.47	5.47	5.47	0.47	0.46	0.52	0.48	0.00	0.52	0.52
hsa-mir-433No1	4.46	4.77	4.46	5.42	4.46	5.34	6.21	6.21	6.21	0.00	0.40	0.50	0.00	0.49	0.61	0.61
hsa-mir-433No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.78	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00
hsa-mir-448No1	6.77	6.84	6.63	6.11	6.63	6.48	6.85	6.85	6.85	0.67	0.68	0.59	0.65	0.64	0.68	0.68
hsa-mir-448No2	4.46	4.46	4.56	4.46	4.56	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00

图 15-表 3

hsa-mir-449No1	5.75	5.95	6.29	6.10	5.86	6.75	0.54	0.59	0.62	0.60	0.56	0.68
hsa-mir-449No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-450-1	6.29	5.44	5.95	6.64	6.29	6.40	0.61	0.51	0.57	0.66	0.62	0.63
hsa-mir-450-2No1	4.67	5.04	4.46	4.60	4.46	4.46	0.40	0.45	0.00	0.38	0.00	0.00
hsa-mir-450-2No2	6.79	6.33	6.38	6.34	6.16	5.85	0.67	0.61	0.63	0.63	0.60	0.57
hsa-mir-451No1	5.47	4.84	4.46	4.46	4.46	4.46	0.50	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-451No2	5.27	5.42	4.46	4.46	4.46	4.73	0.49	0.51	0.00	0.00	0.00	0.42
hsa-mir-452	5.17	4.46	5.32	5.12	4.86	5.26	0.46	0.00	0.49	0.46	0.42	0.49
hsa-mir-452*	4.46	4.46	4.46	4.46	5.01	5.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45	0.56
hsa-mir-453No1	6.56	7.24	7.68	6.78	7.00	7.91	0.64	0.72	0.76	0.67	0.69	0.79
hsa-mir-453No2	4.46	4.79	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-455No1	4.82	5.24	4.98	5.32	4.53	6.15	0.42	0.48	0.45	0.49	0.37	0.61
hsa-mir-455No2	5.12	6.02	5.24	4.69	4.99	4.46	0.45	0.59	0.48	0.40	0.44	0.00
hsa-mir-483No1	11.39	11.28	11.57	11.49	11.80	11.59	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
hsa-mir-483No2	4.63	4.46	6.13	5.41	4.46	6.16	0.40	0.00	0.59	0.50	0.00	0.61
hsa-mir-484	8.01	7.35	7.62	7.20	7.89	7.59	0.77	0.73	0.75	0.73	0.77	0.76
hsa-mir-485-3p	5.92	5.70	6.03	6.64	5.88	5.41	0.58	0.55	0.58	0.65	0.56	0.51
hsa-mir-485-5p	4.46	4.46	4.52	4.65	4.46	4.46	0.00	0.00	0.39	0.40	0.00	0.00
hsa-mir-486	4.46	5.21	4.99	8.28	4.46	5.19	0.00	0.47	0.45	0.81	0.00	0.47
hsa-mir-487No1	7.86	7.77	8.35	8.46	8.10	8.17	0.76	0.76	0.82	0.83	0.80	0.81
hsa-mir-487No2	4.78	4.46	4.86	4.55	4.46	4.98	0.41	0.00	0.44	0.38	0.00	0.45
hsa-mir-488No1	7.01	6.50	6.54	6.84	5.97	5.70	0.69	0.64	0.65	0.68	0.57	0.55
hsa-mir-488No2	4.46	4.99	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-489No1	4.99	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-489No2	6.06	6.39	6.47	6.20	6.52	6.69	0.59	0.62	0.64	0.61	0.64	0.67
hsa-mir-490No1	4.82	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-490No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-491No1	5.25	6.84	5.49	4.74	5.20	5.12	0.48	0.68	0.52	0.42	0.47	0.47
hsa-mir-491No2	5.23	5.08	4.46	5.61	5.66	5.54	0.48	0.46	0.00	0.54	0.53	0.53
hsa-mir-492No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-492No2	4.46	4.46	5.15	4.91	5.70	4.46	0.00	0.00	0.46	0.44	0.53	0.00

图 15-表 3

hsa-mir-493No1	4.46	4.80	5.47	5.01	4.46	4.46	4.46	0.00	0.41	0.51	0.45	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-493No2	4.46	4.70	4.46	4.93	4.46	4.46	5.43	0.00	0.40	0.00	0.44	0.00	0.00	0.51
hsa-mir-494No1	12.67	12.38	13.50	12.94	13.15	13.27	13.27	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00
hsa-mir-494No2	4.46	4.46	4.74	4.96	4.46	5.12	5.12	0.00	0.00	0.41	0.44	0.00	0.00	0.46
hsa-mir-495No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-495No2	4.53	5.75	5.19	5.45	5.20	4.46	4.46	0.38	0.55	0.47	0.51	0.47	0.47	0.00
hsa-mir-496No1	6.52	6.30	6.57	6.21	6.55	5.88	5.88	0.63	0.61	0.66	0.62	0.65	0.65	0.57
hsa-mir-496No2	5.08	5.00	4.46	5.59	4.94	4.82	4.82	0.45	0.44	0.00	0.53	0.44	0.44	0.43
hsa-mir-497No1	8.96	8.38	9.30	8.81	10.03	9.37	9.37	0.87	0.82	0.89	0.86	0.93	0.93	0.90
hsa-mir-497No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.76	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.40	0.00
hsa-mir-498No1	12.43	12.26	12.05	12.46	12.00	12.29	12.29	0.98	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99
hsa-mir-498No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-499No1	5.89	6.49	6.81	6.35	7.11	6.58	6.58	0.57	0.64	0.69	0.63	0.70	0.70	0.66
hsa-mir-499No2	4.46	4.46	5.20	4.46	4.54	4.46	4.46	0.00	0.00	0.47	0.00	0.38	0.38	0.00
hsa-mir-500No1	5.28	6.12	5.19	5.19	6.09	5.95	5.95	0.49	0.60	0.47	0.47	0.59	0.59	0.58
hsa-mir-500No2	7.63	7.08	6.77	7.06	7.19	6.53	6.53	0.74	0.71	0.68	0.71	0.71	0.71	0.65
hsa-mir-501No1	4.46	4.86	4.46	4.46	5.17	5.14	5.14	0.00	0.42	0.00	0.00	0.47	0.47	0.47
hsa-mir-501No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.55	4.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39
hsa-mir-502No1	5.57	5.07	5.31	5.56	4.46	5.29	5.29	0.51	0.46	0.49	0.52	0.00	0.00	0.49
hsa-mir-502No2	5.11	5.44	4.82	4.46	4.59	4.68	4.68	0.45	0.51	0.43	0.00	0.39	0.39	0.41
hsa-mir-503No1	5.21	5.61	5.69	5.27	5.83	5.39	5.39	0.47	0.53	0.54	0.48	0.55	0.55	0.50
hsa-mir-503No2	5.23	4.46	5.21	4.46	5.27	5.47	5.47	0.48	0.00	0.47	0.00	0.47	0.47	0.52
hsa-mir-504No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-504No2	6.24	6.35	6.62	5.77	6.62	6.43	6.43	0.60	0.61	0.67	0.56	0.66	0.66	0.63
hsa-mir-505No1	4.46	4.46	4.47	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-505No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-506No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	5.06	5.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46
hsa-mir-506No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-507No1	4.59	4.56	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.39	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-507No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-508No1	4.46	4.49	4.46	4.46	4.46	4.46	4.80	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43

图 15- 表 3

[illegible]

图 15-表 3

[illegible]

图 15-表 3

hsa-mir-519e*	7.27	6.76	7.53	6.84	7.43	7.13	0.71	0.67	0.74	0.68	0.73	0.72
hsa-mir-520a	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	6.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.71
hsa-mir-520a*	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-520bNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41
hsa-mir-520bNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-520c	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40
hsa-mir-520c/526a	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-520d	4.94	5.39	6.16	5.47	5.56	4.46	0.44	0.50	0.60	0.51	0.51	0.00
hsa-mir-520d*	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-520eNo1	6.89	5.80	6.71	7.34	6.42	6.49	0.68	0.56	0.68	0.73	0.64	0.64
hsa-mir-520eNo2	4.46	4.46	5.23	5.27	5.11	5.57	0.00	0.00	0.48	0.48	0.46	0.53
hsa-mir-520fNo1	4.46	4.46	4.46	4.71	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00
hsa-mir-520fNo2	4.46	4.46	4.46	4.71	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00
hsa-mir-520gNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-520gNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	5.76	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00
hsa-mir-520hNo1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-520hNo2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-521-1No1	4.52	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-521-1No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.49	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38
hsa-mir-521-2No1	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00
hsa-mir-521-2No2	5.56	5.65	5.63	4.95	5.00	4.63	0.51	0.53	0.53	0.44	0.44	0.40
hsa-mir-522	4.46	4.46	4.46	4.52	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00
hsa-mir-522/526c	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-523	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-523/526c	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-524	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-524*	4.46	4.46	5.42	4.85	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00
hsa-mir-525	4.46	4.46	4.46	4.50	4.65	4.46	0.00	0.00	0.00	0.36	0.39	0.00
hsa-mir-525*	4.46	4.80	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
hsa-mir-526a-1No1	6.49	6.61	6.03	6.10	5.64	6.49	0.62	0.65	0.58	0.60	0.52	0.64
hsa-mir-526a-1No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38
hsa-mir-526a-1No2	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	4.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

图 15- 表 3

表5 10个配对的胃原发性肿瘤和非肿瘤对照中的Mcm7 mRNA和miR-106b-25的表达							
样品ID	mcm7 RNA	106b- prec	93-prec	25-prec	miR- 106b	miR-93	miR-25
N1	182.38	34.02	4.35	12.22	13.64	4.59	3.14
T1	4051.42	381.02	48.55	47.61	45.44	31.52	21.23
N2	88.50	39.46	2.82	14.05	7.31	0.90	4.53
T2	2220.21	246.89	32.20	73.72	24.43	3.20	16.80
N3	112.72	19.15	1.18	10.38	4.44	3.41	8.88
T3	1493.45	170.87	15.73	35.84	14.42	13.91	21.23
N4	50.64	14.10	9.12	22.40	9.19	5.77	6.92
T4	148.91	42.87	20.75	47.43	2.01	5.70	0.35
N5	94.31	26.75	1.35	3.74	9.06	5.24	6.02
T5	1152.24	185.85	16.25	36.45	7.36	9.50	0.49
N6	90.81	26.75	1.63	8.96	7.11	11.78	9.92
T6	32.62	40.56	0.93	1.89	25.44	5.31	20.21
N7	99.93	51.69	6.43	7.31	5.13	4.14	4.11
T7	10.17	3.79	0.53	1.77	2.95	26.88	1.89
N8	324.18	76.18	13.61	31.43	12.38	7.35	9.39
T8	339.88	65.67	6.76	15.18	4.86	7.93	2.60
N9	1.10	0.98	0.51	1.62	2.64	3.70	1.89
T9	1.35	0.25	0.80	2.10	4.99	4.50	0.49
N10	3.00	3.60	0.20	1.30	18.25	12.37	11.32
T10	3.89	7.38	0.43	0.05	37.45	28.93	33.54
Pearson积矩相关系数 (r)							
Mcm7 对 miR-106b	0.98						
Mcm7 对 miR-93	0.92						
Mcm7 对 miR-25	0.72						
miR-106b 对 miR-93	0.93						
miR-106b 对 miR-25	0.78						
miR-93 对 miR-25	0.88						

图 17

表6: miR-106b、miR-93和miR-25的预测的靶					
登录号	基因符号	基因名称			
AB023148	PHLPPL	PH结构域和富含亮氨酸重复蛋白磷酸酶样			
AB033022	GM632	假定的蛋白 LOC57473			
AB058691	ALX4	无芒样同源框4			
AK074103	PLEKHM1	含有pleckstrin同源结构域的1			
BC015026	JOSD1	含有Josephin结构域的1			
AF119334	ZFPM2	锌指蛋白，多类型2			
AF411836	GATAD2B	含有GATA锌指结构域的2B			
AJ001388	ZNF238	锌指蛋白238			
BC014548	ATXN1	Ataxin-1			
D82347	NEUROD1	神经源性分化蛋白1			
AY423442	BCL2L11	BCL2-样11 (细胞凋亡促进剂)			
BC019680	KLF12	Kruppel样因子12			
BC010900	UBE2W	泛素缀合酶E2W (假定的)			
BC017505	OSBPL5	氧化固醇结合蛋白样5			
BC038504	SNF1LK	SNF1样激酶			
U57317	PCAF	p300/CBP- 结合因子			
X76770	PAPOLA	poly(A)聚合酶 α			
AF087867	CFL2	人肌动蛋白素2 (肌肉)			

图 18