



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117683886 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202311539926.3

(22) 申请日 2019.04.30

(62) 分案原申请数据

201910392316.2 2019.04.30

(71) 申请人 觅瑞实验室私人有限公司

地址 新加坡裕廊集团科技中心都康创新林
2号楼08楼01室

申请人 杭州觅因生物科技有限公司

(72) 发明人 邹瑞阳

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

专利代理师 沈锡明

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测胃癌的miRNA标志物组合及试剂盒

(57) 摘要

本发明属于分子生物学领域,公开了一种检测胃癌的miRNA标志物组合及试剂盒所述检测胃癌的miRNA标志物组合选自hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p或hsa-miR-340-5p中至少4个。采用所述检测胃癌的标志物组合可以区分胃癌患者的血清和健康人的血清。本发明所述试剂盒可以简单有效且无创的对胃癌进行检测。

1. 一种用于识别处于患胃癌危险中的受试者的方法,包括:

a. 检测受试者外周血样本中的miRNA标志物组合的表达水平,该miRNA标志物组合选自hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p或hsa-miR-340-5p中的至少5种;

b. 以非癌症对照样本为参照,计算及校正受试者的风险评分;

c. 根据风险评分判断受试者患有胃癌的可能性。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤a所述miRNA标志物组合中必须包含hsa-miR-340-5p。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,步骤b使用线性回归模型来计算所述风险评分。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述线性回归模型计算公式如下:

$$\text{Logistic} = (K_{\text{hsa-miR29c-3p}} * Ct_{\text{hsa-miR 29c-3p}}) + (K_{\text{hsa-miR 424-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 424-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 103a-3p}} * Ct_{\text{hsa-miR103a-3p}}) + (K_{\text{hsa-miR 93-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 93-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 181a-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 181a-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 21-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 21-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 140-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 140-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 30e-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 30e-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 142-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 142-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 126-3p}} * Ct_{\text{hsa-miR 126-3p}}) + (K_{\text{hsa-miR 183-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 183-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR 340-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR 340-5p}}) + \text{Constant};$$

其中,K为每个miRNA标志物的系数,Ct为qPCR检测得到的每个miRNA标志物的相对表达量。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,步骤a所述miRNA标志物组合为不同组合时,对应的各miRNA标志物的系数见下:

miRNA	12 miRNAs	11 miRNAs	10 miRNAs	9 miRNAs	8 miRNAs	7 miRNAs	6 miRNAs	5 miRNAs
hsa-miR-29c-3p	-4.16	-4.82						
hsa-miR-424-5p	-9.31	-8.40	-9.09	-7.93	-7.48	-6.74	-7.55	
hsa-miR-103a-3p	15.03	15.89	15.98	14.96	6.93	5.71	4.07	1.81
hsa-miR-93-5p	-4.46	-3.88	-4.27					
hsa-miR-181a-5p	19.04	15.22	14.57	15.14	19.91	19.47	20.07	21.63
hsa-miR-21-5p	-21.16	-15.55	-16.22	-14.58	-13.61	-13.74	-13.26	-14.24
hsa-miR-140-5p	-12.25	-14.29	-14.83	-16.91	-20.40	-20.39	-20.36	-25.82
hsa-miR-30e-5p	7.63	10.75	8.44	4.85	-3.24	-2.18		
hsa-miR-142-5p	2.42							
hsa-miR-126-3p	-5.96	-6.86	-5.85	-5.88	-5.45			
hsa-miR-183-5p	-4.89	-6.10	-6.41	-7.35				
hsa-miR-340-5p	16.17	15.89	16.10	15.91	21.60	17.11	16.18	17.49
Constant	87.5	124.8	113.8	128.2	55.3	53.0	56.9	9.8

6. 根据权利要求1~5任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括qPCR法,芯片法或测序法来检测所述miRNA标志物。

7. miRNA标志物组合在制造用于判断受试者患有胃癌可能性的诊断试剂中的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合选自hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p或hsa-miR-340-5p中的至少5种,且其

中一种必须包含hsa-miR-340-5p。

8. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p组成。

9. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p组成。

10. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p组成。

11. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p组成。

12. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p和hsa-miR-340-5p组成。

13. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p和hsa-miR-340-5p组成。

14. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p和hsa-miR-340-5p组成。

15. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述miRNA标志物组合由hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p和hsa-miR-340-5p组成。

16. 一种检测胃癌的试剂盒,其特征在于,包括特异性检测权利要求7~14中任一项所述miRNA标志物组合的试剂。

17. 根据权利要求16所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂包括如权利要求7~14中任一项所述miRNA标志物组合的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

一种检测胃癌的miRNA标志物组合及试剂盒

[0001] 本申请是分案申请,其母案是申请号为201910392316.2、申请日为2019年04月30日、发明名称为“一种检测胃癌的miRNA标志物组合及试剂盒”发明专利申请。

技术领域

[0002] 本发明属于分子生物学领域,具体涉及一种检测胃癌的miRNA标志物组合及试剂盒。

背景技术

[0003] 胃癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一,也是死亡率最高的恶性肿瘤之一。大多数胃癌患者确诊时已错失最佳诊断和治疗时机,导致疾病进展、肿瘤转移,甚至步入终末期。从胃癌的TMN分期角度来统计,胃癌5年存活率,第一期前期为97.6%,第一期后期为94.9%,第二期为70.49%,第三期前期为56.7%,第三期后期为31.9%,第四期为6.5%。可见早期胃癌诊断是必要的。

[0004] 内窥镜(胃镜)是目前诊断胃癌最有利的工具。早期胃癌在内窥镜下的表现包括黏膜颜色的异常、黏膜表面血管的消失、黏膜层凹陷或凸起增厚、不规则的结接节、溃疡周边不正常的黏膜皱折。必要时,可切取部分组织做切片活检。检测血液中的蛋白标志物可以作为诊断胃癌的参考。胃癌常用的蛋白肿瘤标志物包括:如癌胚抗原(CEA),糖类抗原19-9(CA19-9),糖类抗原72-4(CA72-4)和糖类抗原50(CA50)以及胃蛋白酶原等。

[0005] 内窥镜检查后进行活组织检查是检测胃癌的金标准,但是,这种方法具有侵入性,会引起患者的不适和恐惧。此外,无症状患者通常不接受内窥镜检查。常规蛋白肿瘤标志物,经常被用于胃肠道癌症检测,但由于缺乏敏感性和/或特异性,不推荐用于胃癌诊断。

[0006] 目前通过检测组织,血清或血浆中的miRNA肿瘤标志物,作为诊断胃癌的参考。miRNA是一类长约19-24nt的非编码单链小RNA分子,绝大多数miRNA可以通过与靶基因3'UTR区互补结合,抑制靶基因翻译成蛋白质,进而在细胞、组织或个体水平上影响生物体的生长发育,并参与多种疾病过程。miRNA的表达谱具有明显的组织特异性,在不同肿瘤中具有特定的表达模式。这些特点使得miRNA有可能成为肿瘤诊断新的生物学标记和治疗靶标。qPCR是检测已知miRNA表达最常用的方法,快速、简单、重复性好,而且可以非常灵敏地、精确地定量分析miRNA的表达,是临床应用中最主要的方法,这为循环miRNA作为肿瘤无创诊断标志物提供了可靠的技术保障。

[0007] 尽管现有的研究发现了许多非常有前景的胃癌早期诊断血清miRNA,但这些结果并不一致,并且不能相互验证。原因在于各个研究之间样本的选取、收集、保存过程不统一。使用不同方法分离、储存的外周血样本,其生物标志物含量也会有所不同。个体之间的体液环境,遗传等非癌症因素均会影响miRNA的表达,需要大量的人群样本以排除影响。此外,miRNA的检测存在一定的难度。因此最终能用于胃癌筛查的血清miRNA生物标志物以及生物标志物组合标志物还未见定论。

发明内容

[0008] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种检测早期胃癌的标志物组合及试剂盒,以区分胃癌患者的血清和健康人的血清,区分胃癌患者的血清和胃炎患者的血清,可以简单有效且无创的对胃癌进行检测。

[0009] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种检测胃癌的miRNA标志物组合,选自hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p或hsa-miR-340-5p中的至少4个miRNA标志物。

[0011] 申请人采用RT-qPCR技术筛选获得12个miRNA为胃癌检测的生物标志物及组合,具体为hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-340-5p。采用本发明上述miRNA标志物组合对4566名受试者进行测试,与幽门螺旋杆菌测试及胃蛋白酶原测试进行比较,结果与内窥镜检查的临床金标准(AUC为0.84)显示出良好的一致性,并且分别显著优于胃蛋白酶原1/2比率和幽门螺旋杆菌测试这两种现有生物标记物(AUC为0.62和0.64)。

[0012] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共12个miRNA标志物组成。

[0013] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合,由hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共11个miRNA标志物组成。

[0014] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共10个miRNA标志物组成。

[0015] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共9个miRNA标志物组成。

[0016] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p和hsa-miR-340-5p共8个miRNA标志物组成。

[0017] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p和hsa-miR-340-5p共7个miRNA标志物组成。

[0018] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p和hsa-miR-340-5p共6个miRNA标志物组成。

[0019] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p和hsa-miR-340-5p共5个miRNA标志物组成。

[0020] 在一些实施方案中,所述的miRNA标志物组合由hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p和hsa-miR-340-5p共4个miRNA标志物组成。

[0021] 本发明还提供了一种检测胃癌的试剂盒,包括特异性检测所述miRNA标志物组合的试剂。

[0022] 本发明所述的试剂盒中所述试剂为qPCR法检测试剂、芯片法检测试剂或测序法检测试剂。

[0023] 在一些实施方案中,本发明所述的试剂盒中所述特异性检测所述miRNA标志物组合的试剂为qPCR法检测试剂。

[0024] 进一步的,在一些实施方案中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括所述的miRNA标志物组合的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0025] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共12个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0026] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共11个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0027] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共10个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0028] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p和hsa-miR-340-5p共9个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0029] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-126-3p和hsa-miR-340-5p共8个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0030] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p和hsa-miR-340-5p共7个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0031] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-424-

5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p和hsa-miR-340-5p共6个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0032] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括sa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p和hsa-miR-340-5p共5个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0033] 在一些实施例中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂包括hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p和hsa-miR-340-5p共4个miRNA标志物组成的miRNA标志物组合的各miRNA的逆转录引物和/或qPCR扩增引物。

[0034] 进一步的,在一些实施方案中,本发明所述的试剂盒中所述qPCR法检测试剂还包括阳性质控品、阴性质控品、逆转录酶、dNTPs、逆转录缓冲液、无核酸酶水、qPCR缓冲液、氯化镁、DNA聚合酶、SYBR Green荧光染料中至少一种。

[0035] 本发明还提供了一种所述的miRNA标志物组合在制备通过如下方法预测所述受试者发展或具有胃癌可能性的胃癌诊断试剂中的用途,所述方法包括:

[0036] 检测从所述受试者获得的外周血样品中miRNA的存在;

[0037] 测量所述外周血样品中所述的miRNA标志物组合中的至少1种miRNA的表达水平;

[0038] 使用基于先前所测量的miRNA的表达水平的分数来预测所述受试者发展或具有胃癌的可能性。

[0039] 所述外周血为血清或血浆。

[0040] 所述miRNA的表达水平的分数是使用逻辑回归算法、构建了简单的逻辑回归模型。采用逻辑回归模型计算风险评分。根据临床需求确定风险评分的临界值,应用两个临界值将人群定义为高风险,低风险和不确定的群体。

[0041] 所述受试者包括且不限于华裔、马来人、印度人。

[0042] 由上述技术方案可知,本发明提供了一种检测胃癌的标志物组合及试剂盒。本发明所述检测胃癌的miRNA标志物组合,选自hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p或hsa-miR-340-5p中的至少4个miRNA标志物。采用所述检测胃癌的标志物组合检测受试者血清可以区分胃癌患者的血清和健康人的血清,区分胃癌患者的血清和胃炎患者的血清,采用本发明上述miRNA标志物组合对受试者进行测试,与幽门螺旋杆菌测试及胃蛋白酶原测试进行比较,结果与内窥镜检查的临床金标准显示出良好的一致性,并且分别显著优于胃蛋白酶原1/2比率和幽门螺旋杆菌测试这两种现有生物标记物。本发明所述检测胃癌的试剂盒组成简单,可以简单有效且无创的对胃癌进行检测。

附图说明

[0043] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0044] 图1示胃癌血清miRNA临床验证路线图;

[0045] 图2示不同血液标志物的ROC特征图;

- [0046] 图3示男性、女性的ROC特征图；
 [0047] 图4示不同种族受试者在本试剂盒的ROC特征图；
 [0048] 图5示早期胃癌和晚期胃癌受试者在本试剂盒的ROC特征图；
 [0049] 图6示不同miRNA数组组合Logistic算法下的ROC特征图。

具体实施方式

[0050] 本发明公开了一种检测胃癌的miRNA标志物组合及试剂盒。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0051] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0052] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。本发明中所述miRNA的逆转录引物及RT-qPCR引物的设计方法按照公开号为US9850527B2的美国专利和Wan G, Lim Q', Too H P. High-performance quantification of mature microRNAs by real-time RT-PCR using deoxyuridine-incorporated oligonucleotides and hemi-nested primers[J]. Rna-a Publication of the Rna Society, 2010, 16(7): 1436-45中的方法进行。本发明公开的所有miRNA序列均已经储存在miRBase数据库中(<http://www.mirbase.org/>)。

[0053] 实施例1

[0054] 研发阶段使用RT-qPCR技术检测了236名胃癌患者血清和236名非癌症对照受试者血清miRNA。超过90%的受试者中可检测到191种miRNA(表达水平 ≥ 500 拷贝/ml); 191个miRNA中的75个在对照组和癌症患者之间差异表达(FDR P value < 0.01)。在75种差异表达的miRNA中, 51种在胃癌患者中上调, 24种下调。

[0055] 验证阶段使用RT-qPCR技术检测了94名胃癌患者血清和116名非癌症对照受试者血清miRNA。研发阶段和验证阶段之间miRNA表达倍数变化呈现良好的相关性。最终12个miRNA被进一步选为胃癌检测的生物标志物及组合, 具体为hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-340-5p。各miRNA序列及miRBase数据库登录号如表1所示。

[0056] 表1. 12个miRNA序列及miRBase数据库登录号

[0057]	miRNA	登录号	序列(5'→3')
	hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA

[0058]

hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA
hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
hsa-miR-181a-5p	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
hsa-miR-30e-5p	MIMAT0000692	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
hsa-miR-340-5p	MIMAT0004692	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU

[0059] 对筛选获得的12个miRNA生物标志物和非参数因子组合,进行了两百次2倍交叉验证(two-fold cross-validation),以测试结合2至12个miRNA的生物标记物组合的性能,利用AUC作为优化指标,构建了简单的逻辑回归模型。采用逻辑回归模型计算风险评分。根据临床需求确定风险评分的临界值,应用两个临界值将人群定义为高风险,低风险和不确定的群体。胃癌人群Logistic分数显著高于健康人群。

[0060] 所述逻辑回归模型计算公式如下:

$$\begin{aligned}
 \text{Logistic} = & (K_{\text{hsa-miR}29\text{c-3p}} * Ct_{\text{hsa-miR}29\text{c-3p}}) + (K_{\text{hsa-miR}424\text{-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}424\text{-5p}}) + \\
 & (K_{\text{hsa-miR}103\text{a-3p}} * Ct_{\text{hsa-miR}103\text{a-3p}}) + (K_{\text{hsa-miR}93\text{-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}93\text{-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR}181\text{a-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}181\text{a-5p}}) \\
 & + (K_{\text{hsa-miR}21\text{-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}21\text{-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR}140\text{-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}140\text{-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR}30\text{e-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}30\text{e-5p}}) + \\
 & (K_{\text{hsa-miR}142\text{-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}142\text{-5p}}) + (K_{\text{hsa-miR}126\text{-3p}} * Ct_{\text{hsa-miR}126\text{-3p}}) + (K_{\text{hsa-miR}183\text{-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}183\text{-5p}}) + \\
 & (K_{\text{hsa-miR}340\text{-5p}} * Ct_{\text{hsa-miR}340\text{-5p}}) + \text{Constant}
 \end{aligned}$$

[0062] 其中,K为各miRNA标志物的系数,不同标志物组合时各标志物系数不同,详见表2所示。

[0063] CT为各miRNA标志物的相对表达量。即经过qPCR得到的Ct值。

[0064] 表2.不同标志物组合时各miRNA标志物的系数

[0065]

miRNA	12 miRNAs	11 miRNAs	10 miRNAs	9 miRNAs	8 miRNAs	7 miRNAs	6 miRNAs	5 miRNAs	4 miRNAs
hsa-miR-29c-3p	-4.16	-4.82							
hsa-miR-424-5p	-9.31	-8.40	-9.09	-7.93	-7.48	-6.74	-7.55		
hsa-miR-103a-3p	15.03	15.89	15.98	14.96	6.93	5.71	4.07	1.81	-5.28
hsa-miR-93-5p	-4.46	-3.88	-4.27						
hsa-miR-181a-5p	19.04	15.22	14.57	15.14	19.91	19.47	20.07	21.63	27.02
hsa-miR-21-5p	-21.16	-15.55	-16.22	-14.58	-13.61	-13.74	-13.26	-14.24	-25.59
hsa-miR-140-5p	-12.25	-14.29	-14.83	-16.91	-20.40	-20.39	-20.36	-25.82	
hsa-miR-30e-5p	7.63	10.75	8.44	4.85	-3.24	-2.18			
hsa-miR-142-5p	2.42								
hsa-miR-126-3p	-5.96	-6.86	-5.85	-5.88	-5.45				
hsa-miR-183-5p	-4.89	-6.10	-6.41	-7.35					
hsa-miR-340-5p	16.17	15.89	16.10	15.91	21.60	17.11	16.18	17.49	7.26
Constant	87.5	124.8	113.8	128.2	55.3	53.0	56.9	9.8	-152.0

[0066] 实施例2

[0067] 1) 检测样本准备:采集血液,分离血清;

[0068] 2) 使用Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit试剂盒提取200μL血清中全RNA;

[0069] 3) 逆转录:使用逆转录缓冲液、逆转录酶、逆转录引物,在特定的反应条件温度下,将miRNA逆转录成cDNA;

[0070] 4) qPCR扩增:使用qPCR缓冲液、DNA聚合酶、含有引物的qPCR板,在特定的反应条件温度下,将逆转录产物cDNA进行荧光定量PCR反应。通过设定阈值得到各个miRNA的Ct值;

[0071] 5) 根据Ct值导入实施例1所述逻辑回归模型中,进行统计分析,并得出患有胃癌的风险值。

[0072] 实施例3

[0073] 选择来自新加坡国立大学医院和新加坡陈笃生医院的5282名受试者进行临床测试。具体验证路线如图1所示。共有5282名受试者进入临床验证,按照实施例2所述方法选择实施例1所述12个miRNA生物标志物对所有受试者进行miRNA测试,幽门螺旋杆菌测试及胃蛋白酶原测试,以及胃镜检测和病理学检测,经过筛选,最终有4566名受试者被用于数据分析,125名受试者被诊断患有胃癌,4441名受试者被证实为无癌症健康人。4566名受试者临床特征数据分析结果见表3。

[0074] 表3 4566名受试者临床特征数据分析

	参数统计	所有受试者			健康人			癌症患者		
		平均值(标准差)	中位数	最小值	最大值	平均值(标准差)	中位数	最小值	最大值	平均值(标准差)
[0075]	年龄 (岁)	57.17 (10.48)	56	38	94	57.17 (10.48)	56	38	94	56.9 (10.31)
	性别									
	男性 (%)	2422 (53.04%)				2346 (52.83%)				76 (60.80%)
	女性 (%)	2144 (46.96%)				2095 (47.17%)				49 (39.20%)
	种族									
	华裔 (%)	3490 (76.43%)				3394 (76.42%)				96 (76.80%)
	马来裔 (%)	332 (7.27%)				325 (7.32%)				7 (5.60%)
	印度裔 (%)	378 (8.28%)				369 (8.31%)				9 (7.20%)
	其他 (%)	366 (8.02%)				353 (7.95%)				13 (10.40%)
	癌症分期 (AJCC 2010)									
[0076]	0 期 (%)	-				-				10 (8.00%)
	1 期 (%)	-				-				16 (12.80%)
	2 期 (%)	-				-				20 (16.00%)
	3 期 (%)	-				-				31 (24.80%)
	4 期 (%)	-				-				38 (30.40%)
	未知 (%)	-				-				10 (8.00%)
	胃蛋白酶原 1/2									
	平均值(标准差)	11.23 (31.11)	6	0.2	594.1	11.27 (31.11)	6	0.2	594.1	9.6 (31.16)
	中位数	6				6				5.3
	最小值	0.2				0.2				0.4
	最大值	594.1				594.1				280
	幽门螺旋杆菌									
	阳性 (%)	2530 (55.41%)				2426 (54.63%)				104 (83.20%)
	阴性 (%)	2036 (44.59%)				2015 (45.37%)				21 (16.80%)

[0077] 对本发明所述miRNA标志物组合测试方法、幽门螺旋杆菌测试及胃蛋白酶原测试进行比较,结果见图2和表4。

[0078] 表4不同血液标志物的AUC结果

[0079]	血液标志物	AUC
	本发明miRNA标志物组合测试	0.84
	PG12-胃蛋白酶原1/2比例	0.62
	HP-幽门螺旋杆菌	0.64

[0080] 结果显示,4566名受试者在本发明所述miRNA标志物组合测试方法,与内窥镜检查的临床金标准(AUC为0.84)显示出良好的一致性,并且分别显著优于胃蛋白酶原1/2比率和幽门螺旋杆菌测试这两种现有生物标记物(AUC为0.62和0.64)。4566名受试者中的AUC(0.84)接近算法研发队列的AUC(0.89),证明了本发明所述miRNA标志物组合开发队列和盲测临床验证队列之间实验结果的一致性。

[0081] 进一步分析临床验证数据的性别差异。本发明所述miRNA标志物组合测试在男性和女性受试者中表现出一致的AUC(图3和表5)。

[0082] 表5男性和女性受试者的AUC结果

[0083]	血液标志物	AUC
	所有受试者	0.84
	男性受试者	0.85
	女性受试者	0.84

[0084] 进一步分析临床验证数据以确定本发明所述miRNA标志物组合测试对不同种族群体的表现是否不同。与新加坡的人口统计数据大体一致,参加此临床验证的大多数受试者是华裔(76.43%),马来人、印度人和其他族群各占约8%(表3)。结果显示,华人受试者的AUC高于其他种族(图4、表6)。

[0085] 表6不同种族受试者的AUC结果

[0086]	血液标志物	AUC
	所有受试者	0.84
	华人受试者	0.86
	其它种族受试者	0.79

[0087] 通过癌症分期进一步评估本发明所述miRNA标志物组合测试的性能。本发明所述miRNA标志物组合测试显示早期(0,1和2期)和晚期(3期和4期)癌症的AUC分别为0.83和0.85(图5、表7)。

[0088] 表7早期胃癌和晚期胃癌受试者的AUC结果

[0089]	血液标志物	AUC
	所有受试者	0.84
	早期癌症受试者	0.83
	晚期癌症受试者	0.85

[0090] 实施例4

[0091] 按照实施例2所述方法,按照miRNA的重要顺序,用实施例3所述癌症和对照受试者

样本,依次选择选择实施例1所述12、11、10、9、8、7、6、5、4个miRNA组合进行测试,得到ROC特征图(图6、表8)。

[0092] 表8不同miRNA数组Logistic算法下的参数

		12 miRNAs	11 miRNAs	10 miRNAs	9 miRNAs	8 miRNAs	7 miRNAs	6 miRNAs	5 miRNAs	4 miRNAs	
[0093]	40 cut-off	Sensitivity	84.8% (83.7% - 85.8%)	84.0% (82.9% - 85.0%)	83.2% (82.1% - 84.3%)	81.6% (80.4% - 82.7%)	80.0% (78.8% - 81.1%)	79.2% (78.0% - 80.4%)	79.2% (78.0% - 80.4%)	77.6% (76.4% - 78.8%)	58.4% (57.0% - 59.8%)
		Specificity	68.4% (67.1% - 69.8%)	67.6% (66.2% - 69.0%)	67.4% (66.0% - 68.8%)	67.6% (66.2% - 69.0%)	68.4% (67.0% - 69.7%)	69.0% (67.7% - 70.4%)	68.8% (67.4% - 70.1%)	68.2% (66.9% - 69.6%)	68.2% (66.9% - 69.6%)
		Accuracy	68.9% (67.5% - 70.2%)	68.0% (66.7% - 69.4%)	67.8% (66.4% - 69.2%)	68.0% (66.6% - 69.3%)	68.7% (67.3% - 70.0%)	69.3% (68.0% - 70.6%)	69.1% (67.7% - 70.4%)	68.5% (67.1% - 69.8%)	68.0% (66.6% - 69.3%)
		PPV	7.0% (6.3% - 7.8%)	6.8% (6.1% - 7.6%)	6.7% (6.0% - 7.5%)	6.6% (5.9% - 7.4%)	6.6% (6.0% - 7.4%)	6.7% (6.0% - 7.5%)	6.7% (6.0% - 7.4%)	6.4% (5.7% - 7.2%)	4.9% (4.3% - 5.6%)
		NPV	99.4% (99.1% - 99.6%)	99.3% (99.0% - 99.5%)	99.3% (99.0% - 99.5%)	99.2% (98.9% - 99.5%)	99.2% (98.9% - 99.4%)	99.2% (98.8% - 99.4%)	99.2% (98.8% - 99.4%)	99.1% (98.8% - 99.3%)	98.3% (97.9% - 98.7%)
		0.842 (0.809 - 0.875)	0.835 (0.798 - 0.871)	0.834 (0.797 - 0.871)	0.833 (0.796 - 0.870)	0.815 (0.779 - 0.852)	0.808 (0.771 - 0.844)	0.807 (0.770 - 0.843)	0.803 (0.764 - 0.841)	0.657 (0.605 - 0.709)	
[0094]	50 cut-off	Sensitivity	44.0% (42.6% - 45.5%)	44.0% (42.6% - 45.5%)	45.6% (44.1% - 47.1%)	47.2% (45.7% - 48.7%)	43.2% (41.8% - 44.7%)	40.8% (39.4% - 42.2%)	40.0% (38.6% - 41.4%)	37.6% (36.2% - 39.0%)	20.8% (19.6% - 22.0%)
		Specificity	93.9% (93.2% - 94.6%)	93.6% (92.8% - 94.2%)	93.4% (92.7% - 94.1%)	93.4% (92.6% - 94.1%)	92.7% (91.9% - 93.4%)	92.3% (91.5% - 93.0%)	92.4% (91.5% - 93.1%)	92.7% (91.9% - 93.4%)	92.0% (91.2% - 92.8%)
		Accuracy	92.6% (91.8% - 93.3%)	92.2% (91.4% - 93.0%)	92.1% (91.3% - 92.9%)	92.1% (91.3% - 92.9%)	91.3% (90.5% - 92.1%)	90.9% (90.0% - 91.7%)	90.9% (90.1% - 91.7%)	91.2% (90.3% - 92.0%)	90.1% (89.1% - 90.9%)
		PPV	17.0% (15.9% - 18.1%)	16.1% (15.1% - 17.2%)	16.4% (15.3% - 17.5%)	16.7% (15.6% - 17.8%)	14.3% (13.3% - 15.3%)	13.0% (12.0% - 14.0%)	12.9% (11.9% - 13.9%)	12.6% (11.7% - 13.6%)	6.8% (6.1% - 7.6%)
		NPV	98.3% (97.9% - 98.7%)	98.3% (97.9% - 98.7%)	98.4% (98.0% - 98.7%)	98.4% (98.0% - 98.8%)	98.3% (97.9% - 98.7%)	98.2% (97.8% - 98.6%)	98.2% (97.8% - 98.6%)	98.1% (97.7% - 98.5%)	97.6% (97.1% - 98.0%)
		AUC	0.842 (0.809 - 0.875)	0.835 (0.798 - 0.871)	0.834 (0.797 - 0.871)	0.833 (0.796 - 0.870)	0.815 (0.779 - 0.852)	0.808 (0.771 - 0.844)	0.807 (0.770 - 0.843)	0.803 (0.764 - 0.841)	0.657 (0.605 - 0.709)
				99.4% (99.1% - 99.6%)	99.3% (99.0% - 99.5%)	99.3% (99.0% - 99.5%)	99.2% (98.9% - 99.5%)	99.2% (98.9% - 99.4%)	99.2% (98.8% - 99.4%)	99.2% (98.8% - 99.4%)	99.1% (98.8% - 99.3%)

[0095] 需要注意的是,Logistic算法以不同分数作为癌症和非癌症的分界线时,表现出不同的诊断性能,适用于不同的诊断途径(表8)。例如以40分为分界线时,即40分以上定义为癌症患者,敏感性会显著高于以50分作为分界线,而特异性和准确性显著低于以50分作为分界线。因此较低的Logistic分界线适用于人群胃癌筛查,较高的Logistic分界线适用于辅助诊断。。

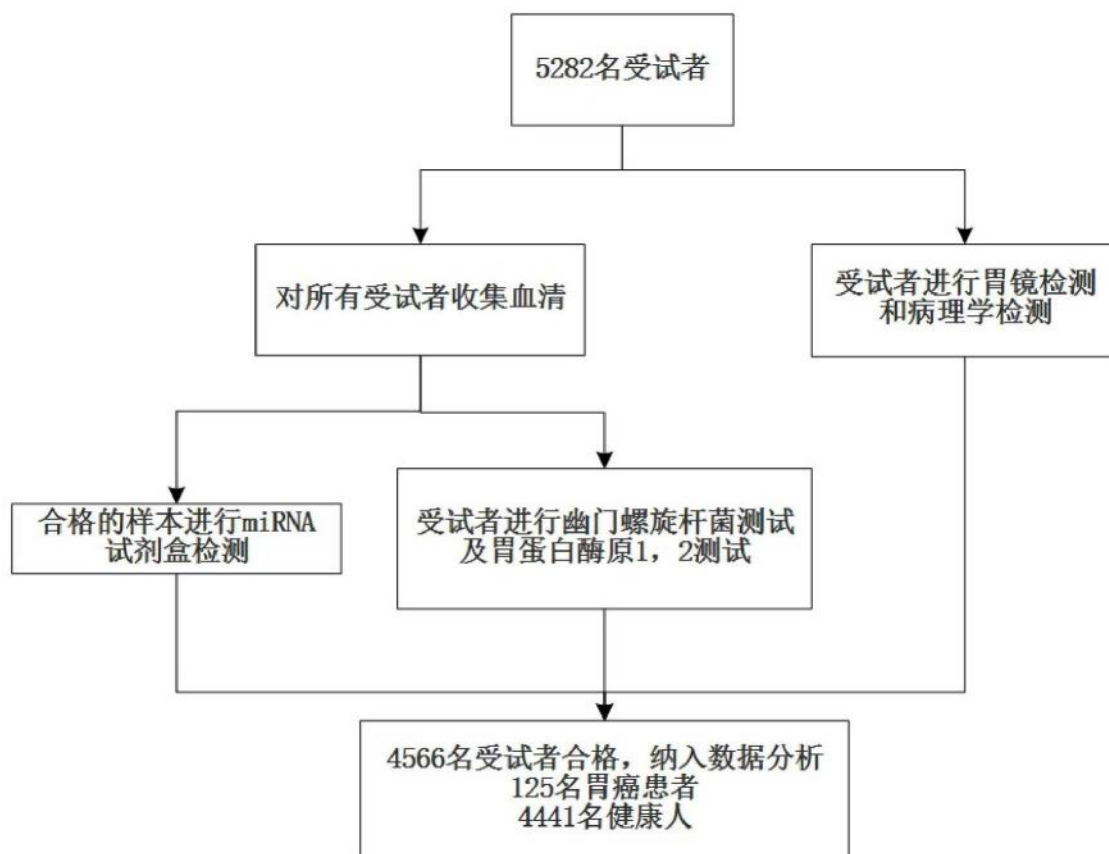


图1

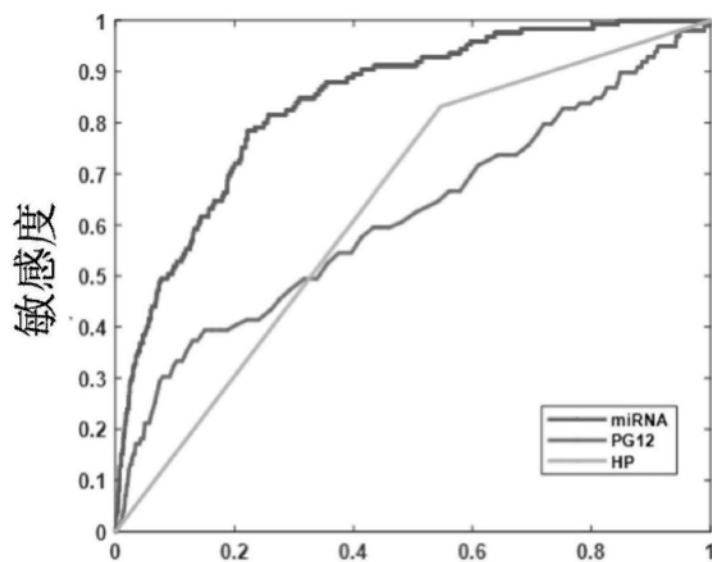


图2

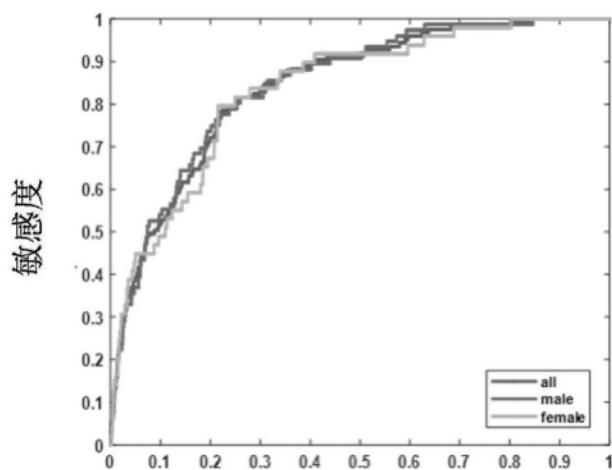


图3

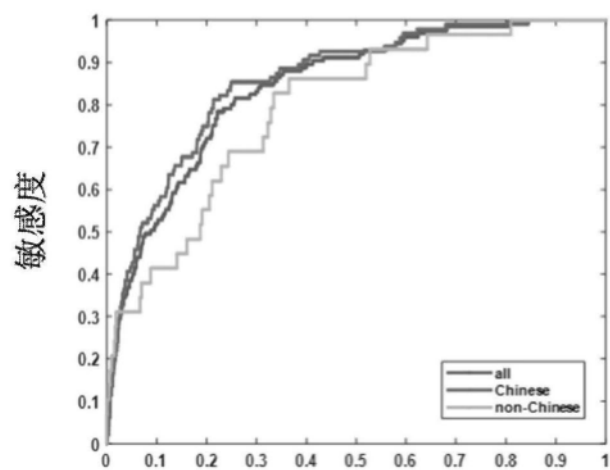


图4

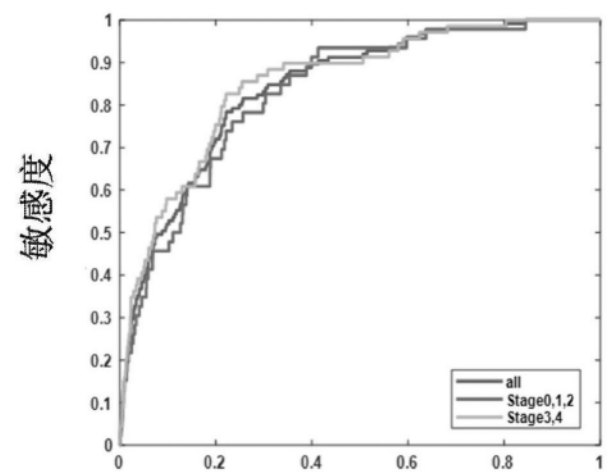


图5

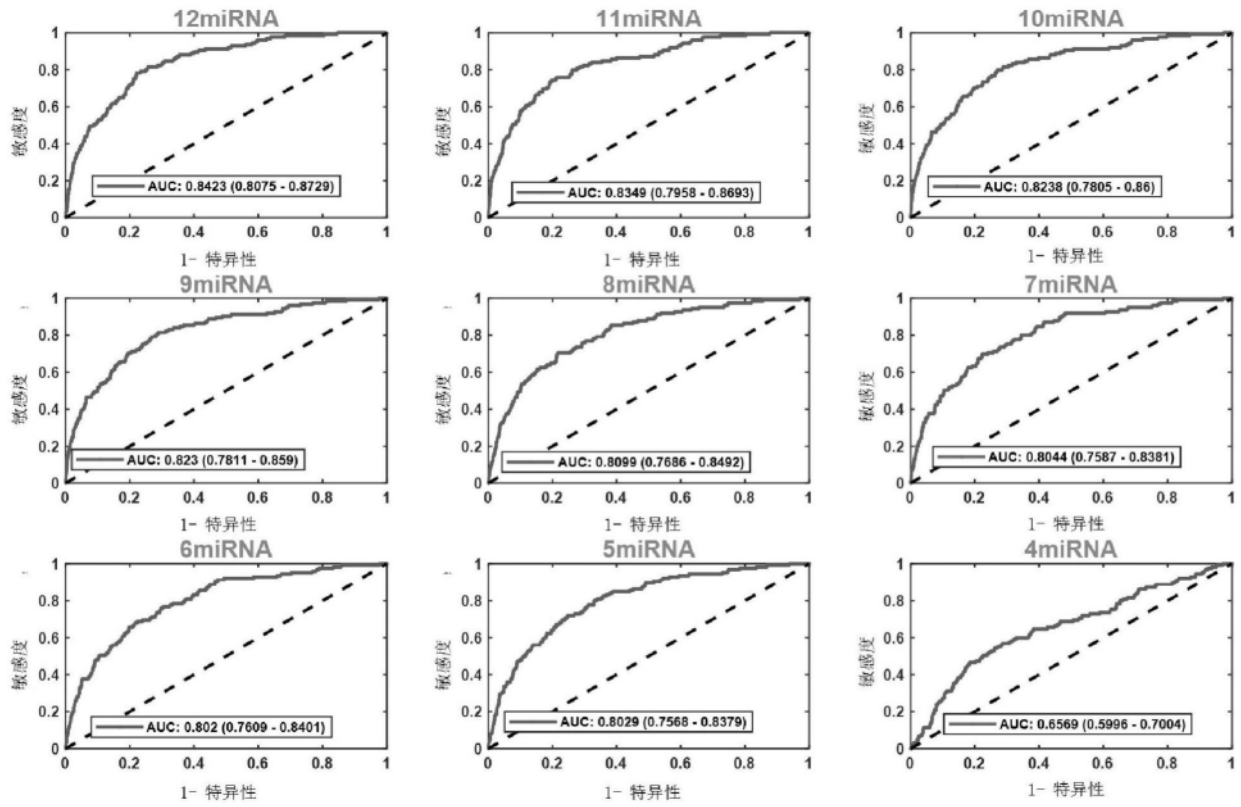


图6