



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116004796 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 25

(21) 申请号 202211408247.8

(22) 申请日 2017.01.30

(30) 优先权数据

1603967.9 2016.03.08 GB

(62) 分案原申请数据

201780015193.X 2017.01.30

(71) 申请人 伯明翰大学

地址 英国伯明翰

(72) 发明人 安托尼奥·贝利

瓦伦丁娜·迪·彼得罗

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 徐婕超

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

权利要求书3页 说明书24页

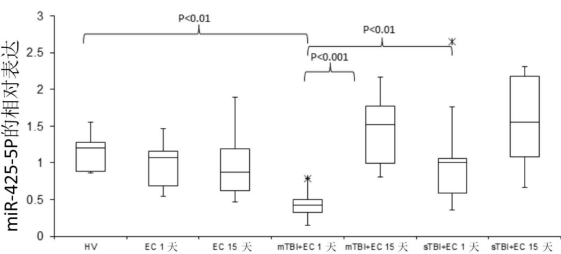
序列表 (电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

创伤性脑损伤的生物标志物

(57) 摘要

本发明提供了一种创伤性脑损伤的生物标志物。还提供了一种诊断和/或监测受试者创伤性脑损伤 (TBI) 的方法。所述方法包括确定来自受试者的流体样本中至少一种miRNA的水平。所述的miRNA可选自miR-425-5p、miR-502、miR-21和miR-335。所述的方法可以包括确定受试者是否患有轻度TBI或中度至重度TBI。还提供了用于诊断和/或监测TBI的传感器元件、检测系统、组合物和试剂盒,以及确定对疑似患有TBI的受试者适当治疗的方法。



1. 一种诊断和/或监测受试者创伤性脑损伤(TBI)的方法,所述的方法包括检测来自受试者的流体样本中至少一种miRNA的存在和/或确定其水平。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的至少一种miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*、miR-671-3p、hsa-let-7c-5p、hsa-let-7i-5p miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-27b-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、miR-424-5p、miR-30a-5p;miR-107、miR-135b-5p、miR-199b-5p、miR-324-5p、miR-652-3p、miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-192、miR-429、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642、miR-99a、miR-520D-3p以及miR-629构成的群组,或其任意组合。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的至少一种miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、hsa-miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*和miR-671-3p构成的群组,或其任意组合。

4. 如权利要求1~3任一项所述的方法,其特征在于,所述的至少一种miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g和miR-335构成的群组,或其任意组合。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的至少一种miRNA选自由let-7c-5p、let-7i-5p、miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-27b-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、miR-424-5p、miR-30A-5P、miR-107、miR-135B-5P、miR-199B-5P、miR-324-5p、miR-652-3p构成的群组,或其任意组合。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的至少一种miRNA选自由miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-192、miR-429、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-194、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642、miR-99a、miR-520D-3p以及miR-629构成的群组,或其任意组合。

7. 如权利要求1~4任一项所述的方法,其特征在于,所述的至少一种miRNA选自由miR-425-5p、miR-502、miR-21和miR-335构成的群组,或其任意组合。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述的TBI为轻度TBI(mTBI),且所述的miRNA选自由miR-425-5p和miR-502构成的群组。

9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,当确定miR-425-5p和/或miR-502的水平低于预定阈值或者相对于参照下降时,则所述的受试者被诊断为患有mTBI。

10. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述的TBI为重度TBI(sTBI),且所述的miRNA选自由miR-21和miR-335构成的群组。

11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,当miR-21和miR-335的水平被确定高于预定阈值或者相对于参照增加时,所述的受试者被诊断为患有sTBI。

12. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述的方法包括确定(i)选自miR-425-5p和

miR-502的第一miRNA,和(ii)选自miR-21和miR-335第二miRNA的水平。

13.如权利要求12所述的方法,其特征在于,当miR-425-5p或miR-502的水平被确定低于预定阈值或者相对于参照下降时;以及miR-21或miR-335被确定高于预定阈值或者相对于参照增加时,所述的受试者被诊断为患有任何严重程度的TBI。

14.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述的方法用于诊断TBI,且在从受伤后不超过48小时的受试者获得的流体样本中确定所述的至少一种miRNA的水平。

15.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述的流体样本包括唾液、血液、血浆或血清。

16.如权利要求15所述的方法,其特征在于,所述的流体样本为唾液。

17.一种用于诊断和/或监测TBI的检测系统的传感器元件,所述传感器元件包括用对靶miRNA特异的探针功能化的基板。

18.如权利要求17所述的传感器元件,其特征在于,所述的探针包含核酸。

19.如权利要求18所述的传感器元件,其特征在于,所述的核酸包含与所述靶miRNA的互补序列至少80%相同的序列。

20.根据权利要求17~19任一项所述的传感器元件,其特征在于,所述基板由金属、塑料、玻璃、二氧化硅、硅、石墨或石墨烯或其任何组合形成。

21.一种用于诊断和/或监测TBI的检测系统,其包括:

-根据权利要求17~20任一项所述的传感器元件;和

-能够检测靶miRNA与所述探针结合的检测装置。

22.一种用于在来自受试者的液体样本中诊断和/或监测的创伤性脑损伤(TBI)的方法的试剂盒,所述试剂盒包含至少一种对靶miRNA特异的探针。

23.一种用于确定是否适合向受试者施用一疗法以缓解TBI的方法,所述方法包括:

确定来自所述受试者的流体样本中至少一种miRNA的水平;和

基于所述至少一种miRNA的水平,确定是否适合向所述受试者施用一疗法以缓解TBI。

24.一种确定对疑似患有TBI的受试者适当治疗的方法,所述方法包括通过确定来自受试者的流体样本中的至少一种miRNA的水平来鉴定所述受试者是否患有TBI。

25.如权利要求24所述的方法,其特征在于,如果受试者被鉴定为患有TBI,则确定是否适合的治疗至少为以下一项:进一步评估所述受试者、将所述受试者从活动中移出、将所述受试者送入医院或诊所,以及向所述受试者施用缓解TBI的疗法。

26.一种用于缓解TBI的疗法在治疗有此需要的受试者的方法中的用途,其特征在于,通过测定来自所述受试者的流体样品中至少一种miRNA的水平来鉴定所述受试者患有TBI。

27.如权利要求24~26任一项所述的方法,其特征在于,所述缓解TBI的疗法选自至少以下一种:神经保护药物、镇静剂;并且避免使用高血压复苏。

28.一种用于诊断和/或监测受试者创伤性脑损伤(TBI)的方法的组合物,所述组合物包含针对靶miRNA特异的探针。

29.如权利要求28所述的组合物,其包含多个探针。

30.如权利要求17~29所述的传感器元件、检测系统、试剂盒、方法或者组合物,其特征在于,所述的miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、

miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*、miR-671-3p、hsa-let-7c-5p、hsa-let-7i-5p、miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-27b-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、miR-30a-5p、miR-107、miR-135b-5p、miR-199b-5p、miR-324-5p、miR-652-3p、miR-424-5p、miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-192、miR-429、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642、miR-99a、miR-520D-3p以及miR-62构成的群组。

31. 如权利要求30所述的传感器元件、检测系统、试剂盒、方法或者组合物,其特征在于,所述的miNRA选自由miR-425-5p、miR-502、miR-21、以及miR-335构成的群组,或其任意组合。

创伤性脑损伤的生物标志物

[0001] 本申请为申请号为201780015193X,申请日为2017年01月30日,发明名称为“创伤性脑损伤的生物标志物”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于诊断和/或监测创伤性脑损伤(TBI)的组合物、试剂盒、系统和方法。更具体地,本发明涉及使用miRNA生物标志物诊断和监测TBI。

背景技术

[0003] 在西方国家,创伤性脑损伤(TBI)是45岁以下死亡和残疾的主要原因。预计其医疗保健负担和社会成本将继续上升,世界卫生组织预计到2020年,TBI将在世界范围内成为残疾的第三个主要原因。

[0004] 尽管进行了许多研究,但尚未发现来评定TBI的严重程度并预测其恢复的可靠的生物标志物。对于轻度TBI(mTBI)来说尤其如此,目前这在临床实践中仍难以评估。尽管最初是通过格拉斯哥昏迷评分(GCS)和需要昂贵设备的神经成像技术对TBI患者进行评估,但目前的诊断工具缺乏精确定义和量化脑损伤实际严重程度的能力,从而导致容易检测到严重的TBI,而非代表绝大多数病例(75-90%)的mTBI。

[0005] mTBI的正确诊断对于患者例如运动员、士兵和儿童尤其重要,因为他们有更大的mTBI复发风险和一种称为二次冲击综合征(SIS)的灾难性脑损伤形式,其中复发的TBI的协同效应会导致严重的伤害、甚至死亡。因此,对TBI的严重程度的早期诊断和评估对患者的健康至关重要,最终将挽救他们的生命。

[0006] 媒体对运动脑震荡的报道日益增加,极大推动了对TBI生物标志物的探索。在过去几年中,许多研究都集中在可以支持在场地边或者运动诊所制定临床决策的生物标志物。然而,文献中报道的蛋白质生物标志物缺乏特异性或敏感性,或者在创伤后的一段时间内无法检测到。这可能是由于脑震荡(TBI的一种形式)后,脑源性化合物仅以极少量释放,而且大部分血脑屏障保持关闭。

[0007] 微小RNA(miRNA)是一类丰富的、高度保守的非编码RNA分子,其长度约为22个核苷酸,通过与靶基因的3'UTR中的部分互补位点配对,诱导mRNA降解、翻译抑制或两者兼具。人类基因组编码超过2,000种miRNA,其可能靶向所有基因的约60%。然而,尽管有大量的miRNA,但它们的生物分子功能以及在病理学中的参与仍有待彻底阐明。它们在包括细胞周期、细胞代谢、细胞凋亡和免疫应答的许多生物进程中发挥着核心作用,因此作为用于检测、鉴定以及分类癌症和其他疾病状态(包括神经退行性疾病)的潜在生物标志物,在临床研究中正吸引着越来越多的关注。

[0008] 本发明正是考虑到这些问题而设计的。

发明内容

[0009] 本发明提供了一种诊断或者监测受试者创伤性脑损伤(TBI)的方法。

[0010] 根据本发明的一个方面,其提供了一种诊断和/或监测受试者创伤性脑损伤(TBI)的方法,所述方法包括检测来自受试者的样本中至少一种miRNA的存在和/或确定其水平。

[0011] 所述的至少一种miRNA(在本发明中也被称为“miR”)可以选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*、miR-671-3p、hsa-let-7c-5p、hsa-let-7i-5p miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-27b-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、miR-424-5p、miR-30a-5p;miR-107,miR-135b-5p,miR-199b-5p,miR-324-5p,miR-652-3p,miR-10a,miR-132,miR-223,miR-143,miR-148b,miR-18a,miR-192,miR-429,miR-618,miR-95,miR-130a,miR-152,miR-27b,miR-301,miR-326,miR-345,miR-361,miR-422a,miR-579,miR-642,miR-99a,miR-520D-3p以及miR-629构成的群组。这些miRNA在本发明中可被称为目标miRNA或靶miRNA。

[0012] 在一些实施方案中,所述至少一种miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、hsa-miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*和miR-671-3p构成的群组。已发现这些微小RNA是在所有TBI患者(轻度或重度)中表达的生物标志物。

[0013] 在一些实施方案中,所述至少一种miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g和miR-335构成的群组。

[0014] 在一些实施方案中,所述至少一种miRNA选自由let-7c-5p、let-7i-5p、miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-27b-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、miR-424-5p、miR-30A-5P,miR-107,miR-135B-5P,miR-199B-5P,miR-324-5p,miR-652-3p构成的群组。

[0015] 在一些实施方案中,所述至少一种miRNA选自由miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-192、miR-429、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-194、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642、miR-99a、miR-520D-3p以及miR-629构成的群组。

[0016] 为避免疑义,应理解,如本发明所用的“所述的至少一种miRNA选自一组miRNA”是指所讨论的方法不管是出于诊断、预后还是治疗的目的,都可以使用任何一种列出的miRNA或任何多种列出的miRNA(例如,所列miRNA中的两种、三种、四种或更多种)进行。因此,任何一种或多种列出的miRNA都可能被明确排除在外。例如,当所述至少一种miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g和miR-335构成的群组时,所述方法可以包括检测和/或评定miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21和miR-let-7g中的任何组合的水平,以便排除miR-335。

[0017] 根据本发明的一个方面,其提供了一种诊断和/或监测受试者的创伤性脑损伤(TBI)的方法,所述方法包括确定来自受试者的样本中至少一种miRNA的水平,其中所述miRNA选自由miR-425-5p、miR-502、miR-21和miR-335构成的群组。

[0018] 当外力创伤性地损伤大脑时发生创伤性脑损伤。根据例如严重程度、损伤类型和预后,存在用于对TBI进行分类的不同系统。最常用的TBI分类系统是格拉斯哥昏迷量表(GCS),它根据一个人对刺激的言语、运动和开眼反应,将其意识等级划分为3~15级。一般而言,将GCS评分为13或以上的TBI定义为轻度、9-12为中度,8或以下为重度。另一个系统即梅奥(Mayo)分类系统有三个主要分类,其包括明确的中重度TBI、可能的轻度TBI和可能的TBI。在每次诊断中使用多个标准,包括意识丧失、创伤后失忆、颅骨骨折,以及神经放射学异常的证据,包括硬膜下血肿、脑挫伤和出血性挫伤。使用GCS或Mayo系统的TBI分类对于本领域技术人员来说是已知的。

[0019] 如本发明所用,提及“轻度”、“中度”和“重度”TBI是参照GCS进行的。本发明提及的“中度至重度”TBI包括参照GCS的中度和重度TBI。

[0020] 使用本发明的生物标志物诊断和/或监测TBI预期将在各种情况下支持临床决策和治疗方案,包括以下情况:作为医护人员初步评估的一部分以确定患者是否应该被运送到具有神经外科专业知识的场所、主要创伤中心或当地创伤单位;在医院的急诊科确定合适的治疗方法,包括需要进行CT脑扫描;在场地边,帮助决定是否让球员退出比赛,并评估是否需要将球员送往医院;在体育诊所,确认脑震荡事件,并就重返赛场做出决策;在战斗情形下,确定是否需要派遣救援队并撤离受害者。因此,本发明为其提供特殊益处的受试者包括事故受害者、运动员和军事人员。

[0021] 在任何情况下,但也许特别是当受试者面临更大的TBI风险时(例如,当受试者是专业运动员或应征入伍时),可以在任何已知或最近的创伤之前(例如,在运动生涯开始之前或军事部署之前)从受试者获得样本,并且当所述受试者经历可能的TBI时,可以在此时或之后评估任何目标miRNA。因此,这样的样本可以提供内部参考标准。

[0022] 在一些实施方案中,所述的受试者为人。

[0023] 所述的TBI可以为轻度TBI(mTBI)、中度TBI或重度TBI(sTBI)。在一些实施方案中,所述的TBI是中度至重度TBI(m-sTBI)。

[0024] 可以定量或半定量地确定样本中miRNA或每种miRNA的水平。所述“定量”,可以理解为确定样本中miRNA或每种miRNA的绝对量或浓度。然后将样本中miRNA或每种miRNA的所述绝对量与预定阈值(例如,预期正常水平的公开文献值)、取自健康受试者的对照样本中的相同或参照miRNA的已知水平、或取自受试者的样本中的参照miRNA的量进行比较。在一些实施方案中,当miRNA的水平低于所述的预定阈值或者相对于参照或对照样本下降时,受试者被诊断为患有TBI。在其他实施方案中,当miRNA的水平与所述的预定阈值相比增加时,所述受试者被诊断为患有TBI。

[0025] 所述“半定量”,可以理解为测量目标miRNA或每种miRNA相对于参照的水平。

[0026] 所述的参照可以为不变的miRNA,即在健康受试者和具有TBI的受试者之间保持基本不变的表达水平的miRNA。如果受试者的miRNA或每种目标miRNA的水平相对于不变的miRNA的水平增加或下降,则其可被诊断为患有TBI。合适的不变的miRNA包括miR-331、miR-223*、miR-23a-3p和miR148b-3p。miR-23a-3p和miR148b-3p仅在唾液中不变。

[0027] 在一些实施方案中,从受试者获得的样本中miRNA或每种miRNA的水平可以是低于或者高于比对照样本中的水平、参考水平或公布值的约0.01倍至约100倍、约0.05倍至约50倍、约0.1倍至约10倍、约0.5倍至约5倍、约1倍至约3倍或者约1.5倍至约2倍。

[0028] 当采用装置或方法产生一个值时,我们可以使用术语“约”来限定该值,以便捕获规定值和所使用装置或方法固有的该值的任何变化。当具体公开值的值或范围时,“约”可以表示规定值或范围的 $\pm 10\%$ 。例如,大约10分钟可能表示9-11分钟。

[0029] 可以使用本领域技术人员已知的方法确定目标miRNA或每种目标miRNA的水平。在一些实施方案中,确定该目标miRNA或每种目标miRNA的水平包括扩增miRNA。在一些实施方案中,可以首先使用标准技术,例如使用miRNeasy迷你试剂盒(Qiagen)从样本中分离总miRNA。然后可以确定目标miRNA的量。在一些实施方案中,使用PCR(聚合酶链式反应)确定样本中该目标miRNA或每种目标miRNA的水平。例如,定量PCR可用于定量确定该目标miRNA或每种目标miRNA的水平。通过比较样本中该目标miRNA或每种目标miRNA的水平与参照(例如不变的miRNA)的水平,PCR也可以用于半定量确定。

[0030] 用于miRNA检测和/或定量的合适技术,包括qPCR、miRNA测定、二代测序(NGS)和多重miRNA分析测定,是本领域技术人员已知的。

[0031] 在一些实施方案中,使用原位杂交,例如使用对miRNA特异的探针(例如,标记的探针)确定该目标miRNA或每种目的miRNA的水平。

[0032] miRNA的水平可以在创伤后立即(即创伤后不到1小时)获自受试者的样本和/或在创伤后几小时或几天的一个或多个时间点获得的样本中确定。因此,可以随时间检测miRNA水平的变化以实现TBI的监测。在miRNA水平随时间变化的情况下,本发明描述的用于监测TBI的方法可以扩展到包括相应地维持或调整受试者的治疗方案。

[0033] 根据特定的miRNA以及TBI的类型,受试者中miRNA的水平可能随时间推移而显著变化。因此,在一些实施方案中,在创伤后相对较快地测量miRNA以实现准确的诊断可能是有利的。在一些实施方案中,在获自受伤后不超过72小时、不超过48小时、不超过36小时、不超过24小时、不超过12小时、不超过6小时、不超过4小时、不超过2小时或不超过1小时的受试者的样本中确定miRNA的水平。

[0034] 一些miRNA的水平随着时间推移基本稳定,因此允许在损伤几小时后、几天后甚至几周后进行诊断。在一些实施方案中,直至损伤20天后、18天后、15天后、12天后、10天后、8天后、5天后或2天后,在从受试者获得的样品中确定miRNA的水平。

[0035] 在一些实施方案中,在创伤后立即(例如在T=0h)、创伤后4-12小时、创伤后48-72小时或创伤后15天从受试者获得的样本中确定miRNA的水平。

[0036] 在一些实施方案中,所述TBI是轻度TBI(mTBI)或中度至重度TBI(m-sTBI),并且所述至少一种miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、hsa-miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*和miR-671-3p构成的群组。

[0037] 在一些实施方案中,所述的TBI为轻度TBI(mTBI),且所述的miRNA选自由miR-425-5p和miR-502构成的群组。当miR-425-5p和/或miR-502的水平被确定低于预定阈值或者相对于参照下降时,所述的受试者则被诊断为患有mTBI。

[0038] 在一些实施方案中,当在受伤后不到48小时内获得的样本中确定水平时,若miR-425-5p和/或miR-502的水平低于预定阈值或者相对于参照下降则被诊断为mTBI。

[0039] 在一些实施方案中,所述的TBI为中度至重度TBI(m-s TBI),且所述miRNA选自由miR-21和miR-335构成的群组。当miR-21和/或miR-335的水平被确定高于预定阈值或者相

对于参照增加时,所述的受试者被诊断为患有中度至重度TBI。

[0040] 在一些实施方案中,当在受伤后达15天获得的样本中确定水平时,若miR-21和/或miR-335的水平高于预定阈值或者相对于参照增加则被诊断为中度至重度TBI。

[0041] 在一些实施方案中,所述的TBI为中度至重度TBI (m-s TBI),且所述的至少一种miRNA选自由miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-192、miR-429、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-194、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642、miR-99a、miR-520D-3p以及miR-629构成的群组。

[0042] 当miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-194、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642和/或miR-99a的水平被确定高于预定阈值,或者相对于参照增加时,所述的受试者被诊断为患有m-s TBI。

[0043] 当miR-192、miR-429、miR-520D-3p和/或miR-629的水平被确定低于预定阈值,或者相对于参照下降时,所述的受试者被诊断为患有m-s TBI。

[0044] 所述的miRNA可以单独用于诊断TBI。例如,在运动脑震荡中,miR-502或miR-425-5p可被用于确认已发生创伤性脑损伤。

[0045] 因此,本发明的另一方面是确定TBI严重程度的方法,并且所述方法的步骤可以被重复以随时监测受试者。应当理解,单个miRNA的阳性结果(例如,确定单个miRNA的水平高于/低于预定阈值,或相对于参照增加/下降)足以确定TBI的严重程度。例如,如果miR-425-5p的水平低于预定阈值,或相对于参照下降,则所述TBI的严重程度被确定为轻度(mTBI)。然而,组合不同的miRNA(例如在测试板中)以便于评估TBI的严重程度可能是合适的。

[0046] 在一些实施方案中,所述的方法包括确定样本中多种(例如,两种或更多种)miRNA的水平。在一些实施方案中,所述两种或更多种miRNA选自由miR-425-5p、miR-502、miR-21和miR-335构成的群组。

[0047] 在一些实施方案中,所述的方法包括确定(i)选自miR-425-5p和miR-502的第一miRNA,和(ii)选自miR-21和miR-335第二miRNA的水平。

[0048] 当miR-425-5p或miR-502的水平被确定低于预定阈值或者相对于参照下降时;或者miR-21或miR-335被确定高于预定阈值或者相对于参照增加时,所述的受试者可能被诊断为患有TBI。

[0049] 在一些实施方案中,所述的TBI为轻度TBI (mTBI),且所述的至少一种miRNA选自由let-7c-5p、let-7i-5p、miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、miR-424-5p、miR-30a-5p、miR-107、miR-135b-5p、miR-199b-5p、miR-324-5p以及miR-652-3p构成的群组,或其任意组合。当相对于参照,microRNA水平的倍数变化为至少0.5、至少1.0、至少1.5、至少2.0、至少2.5、至少3.0、至少3.5或者至少4.0时,所述的受试者被诊断为患有mTBI。在一些实施方案中,当所述微小RNA的水平相比于参照增加时,所述的受试者被诊断为患有mTBI。

[0050] 本发明描述的miRNA的序列和登录号在表1中提供

[0051] 表1

[0052]

miRNA	序列	miRBase 登录号
hsa-miR-21	uagcuuauacagacugauguuga (SEQ ID No. 1)	MIMAT0000076
hsa-miR-425-5p	aaugacacgaucacuccguuga (SEQ ID No. 2)	MIMAT0003393
hsa-miR-502-5p (也称为 hsa-miR-502)	auccuugcuaucugggugcua (SEQ ID No. 3)	MIMAT0002873
hsa-miR-335-5p (也称为 hsa-miR-335)	ucaagagcaauaacgaaaaugu (SEQ ID No. 4)	MIMAT0000765
hsa-miR-301b-3p (也称为 hsa-miR-301b)	cagugcaugauauugucuaaagc (SEQ ID No. 5)	MIMAT0004958
hsa-miR-184	uggacggagaacugauaagggu (SEQ ID No. 6)	MIMAT0000454
hsa-miR-505-3p (也称为 hsa-miR-505)	cgucaacacuugcugguuuccu (SEQ ID No. 7)	MIMAT0002876
hsa-miR-203a-3p (也称为 hsa-miR-203a, hsa-miR-203)	gugaaauguuuaggaccacuag (SEQ ID No. 8)	MIMAT0000264
hsa-miR-654-3p	uaugucugcugaccaucacuu (SEQ ID No. 9)	MIMAT0004814
hsa-miR-655-3p (也称为 hsa-miR-655)	auaauacaugguuaccucuuu (SEQ ID No. 10)	MIMAT0003331
hsa-miR-331-3p	gccccugggccuauccuagaa (SEQ ID No. 11)	MIMAT0000760

[0053]

(也称为 hsa-miR-331)		
hsa-miR-223-5p (也称为 hsa-miR-223*)	cguguauuugacaagcugaguu (SEQ ID No. 12)	MIMAT0004570
hsa-miR-let-7g	ugagguaguaguuguacaguu (SEQ ID No. 13)	MIMAT0000414
hsa-miR-126* (也称为 hsa-miR-126-5p)	cauuauuacuuuugguacgcg (SEQ ID No. 14)	MIMAT0000444
hsa-miR-193a-5p	ugggucuuugcggcgagauga (SEQ ID No. 15)	MIMAT0004614
hsa-miR-144* (也称为 hsa-miR-144-5p)	ggauaucaucauauacuguaag (SEQ ID No. 16)	MIMAT0004600
hsa-miR-190 (也称为 hsa-miR-190a or hsa-miR-190a-3p)	cuauauucaaaacauauuccu (SEQ ID No. 17)	MIMAT0026482
hsa-miR-194 (也称为 hsa-miR-194-5p)	uguaacagcaacuccaugugga (SEQ ID No. 18)	MIMAT0000460
hsa-miR-365 (也称为 hsa-miR-365a-3p)	uaaugccccuaaaaauccuuau (SEQ ID No. 19)	MIMAT0000710
hsa-miR-590-3p (也称为 hsa-miR-590)	uaauuuuauaguauaagcuagu (SEQ ID No. 20)	MIMAT0004801
hsa-miR-624	uaguaccaguaccuuguguuca (SEQ ID No. 21)	MI0003638
hsa-miR-625* (也称为 hsa-miR-625-3p)	gacuauagaacuuucccccuca (SEQ ID No. 22)	MIMAT0004808
hsa-miR-671-3p	uccgguucucagggcuccacc (SEQ ID No. 23)	MIMAT0004819
hsa-let-7c-5p	ugagguaguagguuguauugguu (SEQ ID No. 24)	MIMAT0000064
hsa-let-7i-5p (也称为 hsa-let-7i)	ugagguaguaguugugcuguu (SEQ ID No. 25)	MIMAT0000415
hsa-miR-142-3p	uguaguguuuccuacuuuauuga (SEQ ID No. 26)	MIMAT0000434
hsa-miR-148a-3p	ucagugcacuacagaacuuugu (SEQ ID No. 27)	MIMAT0000243

[0054]

(也称为 hsa-miR-148a)		
hsa-miR-15b-5p (也称为 hsa-miR-15b)	uagcagcacaucaugguuuaca (SEQ ID No. 28)	MIMAT0000417
hsa-miR-16-5p (也称为 hsa-miR-16)	uagcagcacguaaaauuggcg (SEQ ID No. 29)	MIMAT0000069
hsa-miR-181a-5p (也称为 hsa-miR-181a)	aacauucaacgcugcggugagu (SEQ ID No.30)	MIMAT0000256
hsa-miR-20a-5p (也称为 hsa-miR-20;hsa-miR-20a)	uaagugcuuauagucagguag (SEQ ID No.31)	MIMAT0000075
hsa-miR-20b-5p (也称为 hsa-miR-20b)	caaagucucuauagucagguag (SEQ ID No.32)	MIMAT0001413
hsa-miR-221-3p (也称为 hsa-miR-221)	agcuacauugucugcggguuc (SEQ ID No.33)	MIMAT0000278
hsa-miR-24-3p (也称为 hsa-miR-24)	uggcucaguucagcaggaacag (SEQ ID No.34)	MIMAT0000080
hsa-miR-27b-3p (也称为 hsa-miR-27b)	uucacaguggcuaaguucgc (SEQ ID No.35)	MIMAT0000419
hsa-miR-29a-3p (也称为 hsa-miR-29a)	uagcaccaucugaaaucgguua (SEQ ID No.36)	MIMAT0000086
hsa-miR-29c-3p (也称为 hsa-miR-29c)	uagcaccauuugaaaucgguua (SEQ ID No.37)	MIMAT0000681
hsa-miR-30a-5p (也称为 hsa-miR-30a)	uguaaaaccuccgacuggaag (SEQ ID No.38)	MIMAT0000087
hsa-miR-107 (也称为 hsa-miR-107-10)	agcagcauuguacaggcuauc (SEQ ID No.39)	MI0000114
hsa-miR-135b-5p (也称为 hsa-miR-135b)	uauggcuuucauuccuauuguga (SEQ ID No.40)	MIMAT0000758
hsa-miR-199b-5p (也称为 hsa-miR-199b)	cccaguguuuagacuaucuguuc (SEQ ID No.41)	MIMAT0000263
hsa-miR-324-5p	cgcaucccuagggauggugu (SEQ ID No.42)	MIMAT0000761

[0055]

hsa-miR-652-3p (也称为 hsa-miR-652)	aauggcgccacuagguugug (SEQ ID No.43)	MIMAT0003322
hsa-miR-424-5p (也称为 hsa-miR-424)	cagcagcaauucauguuuugaa (SEQ ID No.44)	MIMAT0001341
hsa-miR-10a (也称为 hsa-miR-10-5p)	uaccugugaucggaauuugug (SEQ ID No.45)	MIMAT0000253
hsa-miR-132 (也称为 hsa-miR-132-3p)	uaacagucuacagccaugguug (SEQ ID No.46)	MIMAT0000426
hsa-miR-223 (也称为 hsa-miR-223-3p)	ugucaguugucaaaacccca (SEQ ID No.47)	MIMAT0000280
hsa-miR-143 (也称为 hsa-miR-143-3p)	ugagaugaagcacuguagcuc (SEQ ID No.48)	MIMAT0000435
hsa-miR-148b (也称为 hsa-miR-148b-3p)	ucagugcaucacagaacuugu (SEQ ID No.49)	MIMAT0000759
hsa-miR-18a (也称为 hsa-miR-18; hsa-miR-18a-5p)	uaaggugcaucuagucagauag (SEQ ID No.50)	MIMAT0000072
hsa-miR-192 (也称为 hsa-miR-192-5p)	cugaccuaugaaugacagcc (SEQ ID No.51)	MIMAT0000222
hsa-miR-429	uaauacugucuguaaaaccgu (SEQ ID No.52)	MIMAT0001536
hsa-miR-618	aaacucuacuuguccuucugagu (SEQ ID No.53)	MIMAT0003287
hsa-miR-95 (也称为 hsa-miR-95-5p)	ucaauaaaugucuguugaaau (SEQ ID No.54)	MIMAT0026473
hsa-miR-130a (也称为 hsa-miR-130a-3p)	cagugcaauguuaaaagggcau (SEQ ID No.55)	MIMAT0000425
hsa-miR-152 (也称为 hsa-miR-152-5p)	agguucugugauacacuccgacu (SEQ ID No.56)	MIMAT0026479
hsa-miR-27b (也称为 hsa-miR-27b-3p)	uucacaguggcuaguucugc (SEQ ID No.57)	MIMAT0000419
hsa-miR-301	cagugcaauaguauugucaaaagc (SEQ ID No.58)	MIMAT0000688

[0056]	(也称为 hsa-miR-301a-3p 或 hsa-miR-301a)		
	hsa-miR-326	ccucugggcccuccuccag (SEQ ID No.59)	MIMAT0000756
	hsa-miR-345 (也称为 hsa-miR-345-5p)	gcugacuccuaguccaggcuc (SEQ ID No.60)	MIMAT0000772
	hsa-miR-361 (也称为 hsa-miR-361-5p)	uuaucaagaucuccaggguac (SEQ ID No.61)	MIMAT0000703
	hsa-miR-422a	acuggacuaggucagaaggc (SEQ ID No.62)	MIMAT0001339
	hsa-miR-579 (也称为 hsa-miR-579-3p)	uucuuugguauaaaccgcgauu (SEQ ID No.63)	MIMAT0003244
	hsa-miR-642 (也称为 hsa-miR-642a-5p; hsa-miR-642)	guccucuccaaaugugucuug (SEQ ID No.64)	MIMAT0003312
	hsa-miR-99a (也称为 hsa-miR-99a-5p)	aaccguagauccgaucuugug (SEQ ID No.65)	MIMAT0000097
	hsa-miR-520D-3p (也称为 hsa-miR-520D)	aaagugcuucucuugguggu (SEQ ID No.66)	MIMAT0002856
	hsa-miR-629 (也称为 hsa-miR-629-5p)	uggguuuacguugggagaacu (SEQ ID No.67)	MIMAT0004810
	hsa-miR-23a-3p (也称为 hsa-miR-23a)	aucacauugccagggauuucc (SEQ ID No.68)	MIMAT0000078
	hsa-miR-148b-3p (也称为 hsa-miR-148b)	ucagugcaucacagaacuuugu (SEQ ID No.69)	MIMAT0000759

[0057] 方便地,所述样本可以是受试者获得的任何合适的流体或组织样本。例如,生物样本可以包括由以下构成的群组中的至少一种:尿液、唾液、全血、血浆、血清、痰、精液、粪便、鼻拭子、泪液、阴道拭子、直肠拭子、宫颈涂片、组织活检和尿道拭子。在一些实施方案中,所述的样本为流体。合适地,所述的样本为可容易地从个体获得的样本,例如尿液、唾液、血液和痰。在一些实施方案中,所述的样本包括唾液、血液、血浆或血清。应理解,在一些实施方案中,获得样本的过程不构成此处所描述的本发明的一部分。

[0058] 在一些实施方案中,所述的样本包括血清或者由血清构成。血清不仅具有实际优势,而且还不含抗凝血剂如肝素,其为一种潜在的PCR反应抑制剂。与血浆相比,血清也可能受溶血的影响较小。

[0059] 在一些实施方案中,所述的样本为唾液。无需专业培训或医疗设备,就可以从患者

(例如,场边或野外)容易地获得唾液。

[0060] 已发现唾液中指示mTBI的miRNA包括:hsa-let-7ca-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-1421-3p、hsa-miR-148a-3p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-20b-5p、hsa-miR-221-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-27b-3p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-340-5p;hsa-miR-424-5p,miR-30A-5P,miR-107,miR-135B-5P,miR-199b选自由-5p、miR-324-5p和miR-652-3p构成的群组。

[0061] miRNA的水平可用于跟踪受试者从损伤中的恢复。因此,作为初始诊断的替代或补充,本发明包括监测受试者从TBI的恢复。

[0062] 在一些实施方案中,所述的方法包括监测TBI,并且在获自受伤后至少2天、至少3天、至少5天、至少7天、至少10天或至少14天的受试者的样本中确定所述至少一种miRNA的水平。在一些实施方案中,在获自受伤后15天的受试者的样本中确定所述至少一种miRNA的水平。在一些实施方案中,在创伤后的不同时间间隔获得的至少两个样本中测定所述至少一种miRNA的水平,从而实现监测恢复。例如,可以在创伤后7天和14天,或在创伤后5、10和15天确定miRNA水平。miRNA水平恢复正常可指示受试者从TBI恢复。

[0063] 在一些实施方案中,当miR-425-5p和/或miR-502的水平不再低于预定阈值或者不再相对于参照下降时,受试者被确定已经从mTBI恢复。

[0064] 在一些实施方案中,当miR-21和/或miR-335的水平不再高于预定阈值或者不再相对于参照增加时,受试者被确定已经从中度至重度TBI恢复。

[0065] 患有TBI,特别是轻度TBI或中度至重度TBI的受试者的诊断有助于确定合适的治疗。因此,本发明提供了一种测试,所述测试能够使医疗保健工作者,例如内科医生、临床医生、护理人员,甚至非医务人员(例如教师、体育教练和军事人员)为疑似患有TBI的受试者选定合适的行动。因此,被确定为患有TBI的受试者可以通过诊断得到最合适的治疗。因此,本发明的方法可以进一步包括给被诊断患有TBI的受试者指导合适的疗法。

[0066] 可以进一步评估例如通过CT扫描被诊断患有TBI的受试者。在一些实施方案中,所述受试者被送入医院。在一些实施方案中,如果可以排除中度至重度TBI,则可能不需要将所述受试者送入医院进行评估。被诊断患有中度至重度TBI的受试者可以入院或去具有神经创伤专业知识的专科中心。

[0067] 在医院环境之外,例如,在体育赛事期间、在战斗或比赛期间,可以直接将被诊断出患有TBI(特别是mTBI)的受试者从比赛或战斗中移出。所述受试者可以随后分期返回以开始游戏或战斗。

[0068] 在另一方面,提供了一种用于确定向受试者施用疗法以缓解TBI是否合适的方法,所述方法包括:

[0069] 确定来自受试者的样本中至少一种miRNA的水平;和

[0070] 基于所述至少一种miRNA的水平,确定向所述受试者施用缓解TBI的疗法是否合适。

[0071] 应当理解,除非特别说明,否则向所述受试者施用疗法的步骤不构成要求保护的方法的一部分。

[0072] 在一些实施方案中,所述的方法可以进一步包括向所述受试者施用合适的治疗。在一些实施方案中,所述的治疗可包含用于缓解TBI的疗法。因此,本发明的重点在于诊断

和治疗受试者TBI的方法,所述的方法包括以下步骤:(a)从所述受试者获得样本(例如,血液、血浆、尿液或唾液的样品);(b)检测一种或多种miRNA(选自本发明所述的那些);当所述miRNA的水平与参考标准(如本发明所述)不同时,所述患者被诊断为患有TBI;并且对所述TBI施用治疗。

[0073] 在另一方面,本发明提供了确定针对疑似患有TBI的受试者的合适治疗的方法,所述方法包括通过确定来自受试者的样本的至少一种miRNA的水平来鉴定受试者是否患有TBI。

[0074] 如果受试者被鉴定为患有TBI,则合适的治疗可包括以下一项或多项:进一步评估所述受试者,例如通过进一步测试(例如口头测试、认知测试、运动测试和/或光学测试)、CT和/或MRI扫描;将所述受试者从活动中移出(例如发生TBI的活动);将所述受试者送入医院或专科诊所;手术,以及向所述受试者施用缓解TBI的疗法。

[0075] 所述缓解TBI的疗法可包括神经保护药物,例如用于治疗脑肿胀的药物,如甘露醇和高渗盐水,和/或其他神经保护措施,如避免高血压复苏,和使用镇静剂。

[0076] 在一些实施方案中,可以随后例如在医院或诊所中,监测所述的受试者以跟踪他们的恢复。

[0077] 根据本发明的另一方面,提供了检测和/或确定受试者中靶miRNA水平的方法,所述方法包括以下步骤:(a)从所述受试者获得样本;(b)通过使所述样本与对所述靶miRNA特异的探针接触来检测和/或确定样品中所述靶miRNA的水平。

[0078] 如上所定义,所述样本可以是获自受试者的任何合适的流体或组织样本。在一些实施方案中,所述样本为血液、血清、血浆、尿液或唾液。

[0079] 在一些实施方案中,所述方法可以包括确定样本中两种或多种靶miRNA的水平。

[0080] 根据本发明的另一方面,提供了用于缓解TBI的疗法,其被用于治疗有此需要的受试者的方法,其中,通过确定来自所述受试者的样本中的至少一种miRNA的水平来鉴定所述受试者患有TBI。

[0081] 确定所述靶miRNA水平的步骤可包括使样本与用探针功能化的基板例如包含探针的芯片接触。所述基板或芯片可方便地包括多个探针,每个探针对不同的靶miRNA具有特异性。

[0082] 所述受试者可能已经受伤,特别是头部损伤。可能怀疑所述受试者患有TBI。在一些实施方案中,在受伤后不超过72小时、不超过48小时、不超过36小时、不超过24小时、不超过12小时、不超过6小时、不超过4小时、不超过2小时或不超过1小时获得样本。

[0083] 在一些实施方案中,所述方法还包括治疗所述受试者。所述治疗可包括以下一项或多项:进一步评估受试者,例如通过进一步测试(例如口头测试、认知测试、运动测试和/或光学测试)、CT和/或MRI扫描;将所述受试者从活动中移出(例如发生TBI的活动);将所述受试者送入医院或专科诊所;并且向所述受试者施用疗法以缓解TBI。在一些实施方案中,所述治疗包括施用有效量的神经保护药物。

[0084] 因此,在另一方面,本发明提供了治疗TBI的方法,所述方法包括:

[0085] 确定来自受试者的样本中的至少一种miRNA的水平;和

[0086] 当至少一种miRNA的水平指示mTBI时,施用适于mTBI的治疗;或者当至少一种miRNA的水平指示m-sTBI时,施用适于m-sTBI的治疗。

[0087] 本领域技术人员将理解,针对mTBI和m-sTBI可以使用不同的治疗途径。

[0088] 对mTBI的合适治疗可包括:将所述受试者从活动中移出;在原地或社区中进行治疗;进一步评估医院中不过夜(mTBI患者通常带着头部创伤建议及时出院)的所述受试者;或进入院观察一段时间(通常1-2天)。可以使用测试(例如,口头测试、认知测试、运动测试和/或光学测试)进一步评估所述受试者。根据NICE指南,CT扫描通常仅在存在特定适应症时才需要,包括疑似颅骨骨折、创伤后癫痫发作、局灶性神经功能障碍、反复呕吐、初始评估时GCS评分少于13(儿童少于14、或1岁以下婴儿少于15)。

[0089] 对m-sTBI的合适治疗可包括:MRI或CT扫描(特别是在受伤后1小时内);入院(可能包括进入重症监护室和/或转入专科诊所或有神经外科设施的主要创伤中心);神经监测;手术;施用缓解TBI的疗法,例如施用神经保护药物如治疗脑肿胀的药物,例如甘露醇和高渗盐水,和/或其他神经保护措施,例如避免高血压复苏和使用镇静剂。

[0090] 因此,本发明能够快速将具有TBI的受试者分为mTBI或m-sTBI,从而使他们可以接受最合适的治疗。

[0091] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于诊断和/或监测TBI的检测系统,所述检测系统包括传感器元件,所述传感器元件包括用对靶miRNA特异的探针功能化的基板。所述检测系统还可包括检测能够检测靶miRNA与探针结合的装置。

[0092] 根据本发明的又一方面,提供了一种用于诊断和/或监测TBI的检测系统的传感器元件,所述传感器元件包括用对靶miRNA特异的探针功能化的基板。

[0093] 所述传感器元件还可包括用于在其上接收样本(例如流体样本)的样本添加区。

[0094] 所述探针能够选择性地结合目的miRNA。可以用多个探针功能化所述基板。所述探针可以全部相同,或者可以提供两种或更多种不同的探针。例如,在一些实施方案中,可以用对第一miRNA特异的第一探针和对第二miRNA特异的第二探针功能化所述基板。所述第一和所述第二探针可以组合在一起,例如在所述传感器元件的不同部分上。

[0095] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于诊断和/或监测受试者创伤性脑损伤(TBI)的方法的组合物,所述组合物包含针对靶miRNA特异的探针。所述的组合物可包含任何一种列出的miRNA或任何多种列出的miRNA(例如,2、3、4或者更多种列出的miRNA)。

[0096] 在一些实施方案中,所述的目标miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*、miR-671-3p、hsa-let-7c-5p、hsa-let-7i-5p、miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-27b-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、miR-30a-5p、miR-107、miR-135b-5p、miR-199b-5p、miR-324-5p、miR-652-3p、miR-424-5p、miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-192、miR-429、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642、miR-99a、miR-520D-3p以及miR-62构成的群组。

[0097] 在一些实施方案中,所述的靶miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g、miR-335、hsa-miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*以及miR-671-3p构成的群组。已发现这些microRNA是在所有TBI患者(轻度或重度)中表达

的生物标志物。

[0098] 在一些实施方案中,所述的靶miRNA选自由miR-505、miR-203、miR-654-3p、miR-655、miR-184、miR-301b、miR-425-5p、miR-502、miR-21、miR-let-7g以及miR-335构成的群组。

[0099] 在一些实施方案中,所述的靶miRNA选自由let-7c-5p、let-7i-5p、miR-142-3p、miR-148a-3p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-181a-5p、miR-20a-5p、miR-20b-5p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-27b-3p、miR-29a-3p、miR-29c-3p、和miR-424-5p、miR-30a-5p、miR-107、miR-135b-5p、miR-199b-5p、miR-324-5p以及miR-652-3p构成的群组。

[0100] 在一些实施方案中,所述的靶miRNA选自由miR-10a、miR-132、miR-223、miR-143、miR-148b、miR-18a、miR-192、miR-429、miR-618、miR-95、miR-130a、miR-152、miR-194、miR-27b、miR-301、miR-326、miR-345、miR-361、miR-422a、miR-579、miR-642、miR-99a、miR-520D-3p以及miR-629构成的群组。

[0101] 在一些实施方案中,所述的靶miRNA选自由miR-425-5p、miR-502、miR-21以及miR-335构成的群组。

[0102] 所述的探针可包含生物分子,例如蛋白质(如抗体)或核酸。在一些实施方案中,所述探针包含核酸。所述核酸可以包含与所述靶miRNA的完整序列的互补序列至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的序列。在一些实施方案中,所述核酸包含与靶miRNA序列的互补序列100%相同的序列(即受体包含与靶miRNA序列精确互补的核酸序列)。

[0103] 可以通过任何合适的方法,例如通过本领域技术人员已知的耦合化学使所述探针附着到所述基板的表面上。在一些实施方案中,每个探针通过接头附着于所述基板的表面。在一些实施方案中,所述探针包含用于将所述探针固定在所述基板上的部分,或用于使所述探针附着到固定在所述基板上的接头的部分。

[0104] 可选择地或者另外,所述探针可包含可检测的标记。所述的可检测的标记可以为例如放射性的、荧光的、发光的或基于抗体的(例如,它可以构成常规的四聚体抗体或其可检测的片段)。

[0105] 所述传感器元件的所述基板可以由任何合适的材料形成。在一些实施方案中,所述基板包含或者由金属、塑料、玻璃、二氧化硅、硅、石墨、石墨烯或其任何组合形成。在一些实施方案中,所述的基板包括多层。例如,可以通过在碳化硅或二氧化硅层上形成石墨烯表面或石墨烯层来制备基板。所述的石墨烯表面可以是化学改性的,例如改性为氧化石墨烯(GO)或胺化石墨烯(GA)。用于形成石墨烯层的方法,例如外延生长和升华生长,对于本领域技术人员来说是已知的。

[0106] 方便地,包含核酸或由核酸构成的探针可以使用酰胺偶联试剂[例如(0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐)(HATU)]通过接头连接至GO表面。然后可以使用包含用核酸探针功能化的表面的传感器元件来选择性地检测其互补miRNA。

[0107] 合适的接头可包含苯胺部分(或其衍生物)、苯甲酸部分(或其衍生物)或乙二醇部分(或其衍生物)。苯胺接头可以通过使硝基苯分子(或衍生物)附着到石墨烯表面(例如使用重氮盐),并将硝基苯还原成苯胺来形成。然后可以使用所述苯胺的胺基团附着到所述探针上。类似地,重氮盐(例如4-苯甲酸重氮四氟硼酸盐)可用于使苯甲酸或苯甲酸衍生物附

着到石墨烯表面。可以使乙二胺部分附着到羧基化石墨烯或氧化石墨烯上。

[0108] 所述的传感器元件可以被包含在测试条内。所述的测试条可以是一次性的。

[0109] 通过本领域技术人员已知的任何合适的方法,可以将所述的检测装置配置成检测靶miRNA与受体的结合,例如通过检测电阻抗的变化、氢离子浓度或由杂交导致的构象变化。

[0110] 所述的检测设备还可以包括向用户输出数据的用户界面。

[0111] 在一些实施方案中,所述的检测装置包括治疗信息的数据库。所述装置可能能够根据目标miRNA或每种目标miRNA的水平从数据库中识别合适的治疗选择。所述治疗信息可以通过用户界面向所述用户提供。

[0112] 方便地,所述的检测装置可以是便携式的,例如手持式的。所述检测装置可包括用于存储miRNA水平和与所述受试者有关的其他信息的数据存储单元。在一些实施方案中,所述装置包括用于向其他设备传送数据的数据通信装置,例如WiFi、3G、4G、蓝牙或通过移动应用程序无线传送数据。如果需要,这可以方便地使医疗专业人员容易地访问数据。

[0113] 因此,可以设想,本发明的检测装置提供了一种可负担得起的便携式护理点装置,用于无创地诊断和监测TBI。所述装置可供救护人员、军队、学校、体育俱乐部和医疗保健专业人员使用,从而能够对疑似患有TBI的患者进行正确的评估和分类。

[0114] 在另一方面,提供了用于本方法的试剂盒。所述试剂盒可以包含至少能够选择性结合目标miRNA的探针(例如蛋白质如抗体,或者核酸)。在一些实施方案中,所述试剂盒包含含有多个探针的阵列。在一些实施方案中,所述的至少一种探针是用于进行PCR的引物。所述试剂盒还可以包括使用说明书,例如用于诊断和/或监测TBI的说明书。所述试剂盒还可以包含合适的缓冲液和试剂,例如扩增引物和酶(例如DNA聚合酶,用于将miRNA转变为cDNA的逆转录酶)。

[0115] 应当理解,本申请关于本发明的任何方面所作的陈述可以适当地同样适用于本发明的任何其他方面。

附图说明

[0116] 现在将通过示例并参考附图来描述本发明的实施例:

[0117] 图1A和图1B:miR-425-5p和miR-502在3种不同类型创伤和HV中的表达

[0118] 通过qRT-PCR分析检测在10例HV、10例mTBI+EC(1天)、10例mTBI+EC(15天)、10例EC(1天)、10例EC(15天)、10例sTBI+EC(1天)和10例sTBI+EC(15天)患者中MiR-425-5p和miR-502的表达。与HV($p<0.01$)、mTBI+EC(15天)($p<0.001$)和sTBI+EC(1天)($p<0.01$)相比,mTBI+EC(1天)中MiR-425-5p的表达显著降低(图1A);与HV($p<0.05$)、mTBI+EC(15天)($p<0.01$)和sTBI+EC(1天)($p<0.05$)相比,mTBI+EC(1天)中MiR-502的表达显著降低(图1B)。

[0119] 图2A和图2B:miR-21和miR-335在3种不同类型的创伤和HV中的表达

[0120] 通过qRT-PCR分析检测10个HV、10个mTBI+EC(1天)、10个mTBI+EC(15天)、10个EC(1天)、10个EC(15天)、10个sTBI+EC(1天)以及10个sTBI+EC(15天)患者中MiR-21和miR-335的表达。发现与HV($p<0.01$)相比,sTBI+EC(1天和15天)中MiR-21的表达显著上调(图2A);与HV($p<0.001$)、EC(15天)($p<0.001$)以及mTBI+EC(1天)($p<0.05$)相比,sTBI+EC(1天)中的MiR-335表达显著上调(图2B)。

[0121] 图3A和图3B:miR-425-5p(图3A)和miR-502(图3B)在3种不同类型的创伤和HV中表达的时间过程

[0122] 通过qRT-PCR分析检测miR-425-5p和miR-502在自30例HV、30例mTBI+EC、30例EC、30例sTBI+EC患者损伤起不同时间点(T0、T4-12h、T48-72h、15天)的表达。与HV、sTBI+EC和EC相比,在T0和T4-12h的mTBI+EC中MiR-425-5p表达显著降低($p<0.05$);与HV、sTBI+EC以及EC相比,在T0和T4-12h的mTBI+EC中MiR-502的表达显著降低($p<0.05$)。P值通过Tukey的post-hoc检验确定。

[0123] *表示显著不同于HV。

[0124] 图4A和图4B:miR-21(图4A)和miR-335(图4B)在3种不同类型的创伤和HV中表达的时间过程

[0125] 通过qRT-PCR分析检测miR-21和miR-335在自30例HV、30例mTBI+EC、30例EC以及30例sTBI+EC患者损伤起不同时间点(T0、T4-12h、T48-72h、15天)的表达。与在HV($p<0.01$)中相比,在T4-12h、T48-72h以及15天的患者中MiR-21的表达显著上调($p<0.05$);与在HV以及mTBI+EC($p<0.001$)中相比,在T0、T4-12h、T48-72h以及15天的sTBI+EC患者中MiR-335的表达显著降低($p<0.001$)。P值通过Tukey的post-hoc检验确定。

[0126] *表示显著不同于HV。

具体实施方式

[0127] 随着miRNA在一系列不同病理学中成为有前景的生物标志物,本发明人试图探索它们在TBI中的作用。

[0128] 实施例1

[0129] 材料和方法

[0130] 患者和样本收集

[0131] 从英国伯明翰伊丽莎白女王医院的外科重建和微生物学研究中心(SRMRC)招募研究参与者,其作为创伤后(黄金时段研究)的脑生物标志物研究(Ethics Ref.13/WA/0399)的一部分。

[0132] 首先,我们在创伤后第1天和第15天对带有颅外损伤(EC)的5例mTBI患者、5例sTBI+EC创伤患者和健康志愿者(HV)中的754个miRNA进行筛选,旨在选择能够区分轻度和重度TBI并预测15天后mTBI的恢复的特定候选生物标志物。根据这些信息(表2),才有可能在40例不同患者的扩大队列中确认结果研究,这些患者被分为4个不同类别:HV($n=10$)、EC($n=10$)、mTBI+EC($n=10$)和sTBI+EC($n=10$)。健康志愿者同意并参加RECOS研究。EC创伤患者有放射学证实的骨折,无头部创伤、无感染、无神经或精神疾病史且无酒精或药物依赖性。带有EC的轻度TBI包括那些非穿透性头部创伤和格拉斯哥昏迷量表(GCS)评分 >13 的患者。带有EC的重度TBI包括GCS评分为8或以下的患者。所有患者的性别和年龄均与HV相匹配。

[0133] 样本处理

[0134] 在每位患者的创伤后第1天和15天取出外周血样品。血液样本抽取后2小时内用于血清分离处理。将全血在室温下静置约30分钟,然后在4℃下以3000rpm离心10分钟。将血清分成等分试样并储存在-80℃直至分析。

[0135] 通过TaqMan低密度阵列(TLDA)进行RNA分离、逆转录和miRNA分析

[0136] 对5例mTBI+EC和5例sTBI+EC患者进行初始筛选(发现组),在两个不同的时间点(创伤后1天和15天)将其与HV进行比较。这些患者的血清用于分析754个miRNA的转录组。将血清样本以2000rpm离心10分钟以沉淀并除去任何循环细胞或碎片。根据Qiagen从血清和血浆中纯化小RNA的补充方案,使用Qiagen miRNeasy mini试剂盒(Qiagen,GmbH,Hilden, Germany)从400 μ l血清样品中提取miRNA,最后在30 μ l体积的无RNase水中洗脱。用ND-1000UV-可见分光光度计(NanoDrop)测定所得RNA的浓度和纯度。根据制造商的说明,将20ng血清RNA逆转录并预扩增。将预扩增产物加载到TLDAs,TaqMan Human MicroRNA Array v3.0 A和B(Applied Biosystems LifeTechnologies™)上。在7900HT Fast RealTime PCR System(Applied Biosystem,LifeTechnologies™)上进行TLDA的PCR。

[0137] 数据分析

[0138] 为了获得准确的miRNA分析,我们使用全局中位数归一化法。与微阵列分析类似,将来自每个样本的Ct值标准化为阵列的中位数Ct。此外,通过计算Ct中位数和每个阵列的平均值以及每个miRNA的Ct之间的Pearson相关性,我们确定了两个表达谱接近TLDAs的中位数和平均值的miRNA,即miR-331和miR-223*。通过应用两种不同的方法[DataAssistv.3software(AppliedBiosystem Life Technologies™)]和geNorm算法证实这些miRNA是TLDA中最稳定的。因此,miR-331和miR-223*被用作参照基因,用于通过单一TaqMan测定进行验证。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算表达倍数变化。通过Multi experiment viewer v4.8.1计算的微阵列分析(SAM)的显著性、在 ΔCt 中应用组间非配对检验并使用基于100个排列的p值、归责引擎:K-近邻(10个邻居)鉴定差异表达的miRNA(DE miRNA),错误发现率<0.15用作多重比较的校正。通过使用所有内源性对照,我们接受了仅作为可靠的DE miRNAs一致性。

[0139] 单TaqMan测定

[0140] 从阵列中选择10种差异表达的miRNA作为潜在的候选生物标志物,旨在区分轻度和重度TBI并监测轻度的恢复。这些候选者用于在两个不同时间点(创伤后1天和15天)通过单次TaqMan测定(AppliedBiosystems,Life Technologies™)验证30例患者(验证集)的扩大队列中的数据,该队列分为3个不同类别(mTBI+EC、sTBI+EC以及仅EC)和10例对照(HV)。如上所述,提取样本并进行逆转录,并在Bio-Rad iQ5实时PCR检测系统(Bio-Rad,CA,USA)中进行RT-qPCR分析。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算表达倍数变化。

[0141] 统计分析

[0142] 检查数据是否正态分布,并对数据进行转换以执行参数测试。通过对转化数据的单因素方差分析和Tukey事后检验法,对每个时间的不同组和组内的不同时间进行比较。使用接受者操作特征分析来计算每种生物标志物在诊断mTBI或sTBI[表示为曲线下面积(AUC)]时的灵敏度和特异性。所有分析均在SPSS v.20(IBM)上进行。在p值小于0.05时,则差异被认为在统计学上是显著的。

[0143] 结果

[0144] TaqMan低密度阵列(TLDA)的表达谱

[0145] 从TLDA的754个可筛选的miRNA中,我们在患者受伤后1天于mTBI+EC中鉴定了10个表达不同的循环miRNA,受伤后15天鉴定了13个;在sTBI+EC中受伤后1天鉴定了19个,受伤后15天鉴定了22个(表2)。从该列表中排除hsa-miR-126*、miR-193a-5p、miR-144*、miR-

190、miR-194、miR-365、miR-590-3p、miR-624、miR-625*和miR-671-3p,将其用于进一步分析,因为它们在大多数患者中表达,因此不适合仅用于轻度或严重创伤的候选生物标志物。然而,上述microRNA可以鉴定任何严重程度的TBI,因此是有用的TBI生物标志物。另一方面,选择单独在患者受伤1天后于mTBI+EC中差异表达的miR-184、miR-301b、miR-502和miR-505作为mTBI的早期候选生物标志物。此外,选择在患者受伤15天后于mTBI+EC差异表达的miR-203、miR-425-5p、miR-654-3p和miR-655作为能够追踪mTBI恢复的候选生物标志物。

[0146] 最后,选择在上述两个时间点于sTBI+EC中持续表达的两种miRNA,miR-21和miR-335用于进一步研究

[0147] 表2:通过TLDA检测相比于5个HV,在5个mTBI+EC (1和15天) 和5个sTBI+EC (1和15天) 患者中差异表达的微小RNA的倍数变化。

[0148]

与 HV 相比, mTBI+EC 1 天		与 HV 相比,mTBI+EC 15 天		与 HV 相比, sTBI+EC 1 天		与 HV 相比, sTBI+EC 15 天	
hsa-miR-184	0.1383	hsa-miR-193a-5p	24.901	hsa-let-7g	0.3250	hsa-miR-130a	14.979
hsa-miR-190	0.1278	hsa-miR-194	20.946	hsa-miR-10a	11.953	hsa-miR-152	9.8921
hsa-miR-425-5p	0.0798	hsa-miR-203	4.1763	hsa-miR-132	8.1875	hsa-miR-190	0.0277
hsa-miR-502	0.0538	hsa-miR-365	3.7087	hsa-miR-143	26.193	hsa-miR-193a-5p	13.655
hsa-miR-505	7.7696	hsa-miR-425-5p	3.0166	hsa-miR-148b	20.095	hsa-miR-194	12.301
hsa-miR-126*	0.1570	hsa-miR-654-3p	0.0878	hsa-miR-18a	26.806	hsa-miR-21	12.662
hsa-miR-144*	0.2758	hsa-miR-655	0.0756	hsa-miR-190	0.0634	hsa-miR-27b	18.977
hsa-miR-590-3p	0.3842	hsa-miR-671-3p	4.0584	hsa-miR-192	0.2245	hsa-miR-301	21.954
hsa-miR-624	0.0836	hsa-miR-126*	0.2978	hsa-miR-193a-5p	29.785	hsa-miR-326	93.099
hsa-miR-301b	0.0435	hsa-miR-144*	0.2645	hsa-miR-21	7.1654	hsa-miR-335	45.050
		hsa-miR-590-3p	0.3035	hsa-miR-223	4.6799	hsa-miR-345	37.699
		hsa-miR-624	0.1643	hsa-miR-335	37.192	hsa-miR-361	37.295
		hsa-miR-625*	0.1521	hsa-miR-365	5.5771	hsa-miR-422a	77.373
				hsa-miR-429	0.1294	hsa-miR-579	4.7203
				hsa-miR-618	29.527	hsa-miR-642	41.515
				hsa-miR-95	20.788	hsa-miR-671-3p	8.4425
				hsa-miR-144*	0.2759	hsa-miR-99a	12.218
				hsa-miR-624	0.0304	hsa-miR-144*	0.2905
				hsa-miR-625*	0.0981	hsa-miR-520D-3p	0.2579
						hsa-miR-590-3p	0.4188
						hsa-miR-625*	0.1575
						hsa-miR-629	0.2793

[0149] 单TaqMan测定mTBI的候选生物标志物

[0150] 为了验证这些发现,我们随后通过使用单TaqMan分析在两个选定的时间点(创伤后1天和15天)测试了三个分离和独立的组(10例mTBI+EC、10例sTBI+EC、10例EC)中所选miRNA的表达。将结果与10例HV进行比较。使用miR-331和miR-223*作为参照基因,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算倍数变化。

[0151] 在两个时间点的mTBI候选生物标志物(miR-184、miR-301b、miR-502、miR-505、miR-203、miR-425-5p、miR-654-3p和miR-655)中,两个显示出有趣的结果,且与在HV中相比,在三个不同的类别中显着和差异表达。特别地,miR-425-5p和miR-502显示出类似的趋势(图1A和图1B)。与在HV($p<0.001$)、EC($p<0.001$)和sTBI+EC($p<0.001$)中相比,在创伤后1

天两者在mTBI+EC(平均值分别为 0.387 ± 0.201 和 0.314 ± 0.146)中均显著下调。在轻度创伤后15天,miR425-5p和miR-502恢复到正常水平(0.886 ± 0.310 和 1.157 ± 0.258)。在创伤后1天和15天,还发现miR-425-5p和miR-502在EC样本中的表达与在HV中相似,因此表明这两种生物标志物仅在脑损伤患者中差异表达。此外,在两个时间点,与在HV中相比,它们在sTBI+EC中都没有显示出任何显著差异。因此,miR-425-5p和miR-502可被认为是对创伤后15天早期诊断和监测mTBI最有希望的候选生物标志物。表3显示这些生物标志物的AUC。

[0152] 单TaqMan测定sTBI的候选生物标志物

[0153] 分析miR-21和miR-335作为sTBI的潜在生物标志物,因为它们在初始筛选中在两个时间点于sTBI+EC中均出现上调。它们在患者的第二个数据集中也显示为强势候选生物标志物(图2A和图2B)。相比于在HV($p < 0.001$)、EC($p < 0.001$)和mTBI($p < 0.001$)中,Mir-21在带有EC的sTBI中两个时间点均显著上调(7.106 ± 4.192 和 4.012 ± 1.577)。与HV相比,其余类别未发现显著差异。miR-335在sTBI+EC中两个时间点均显示出上调(分别为 16.824 ± 14.195 和 12.324 ± 8.931)。在创伤后1天,该组与对照($p = 0.001$)和mTBI+EC($p = 0.031$)而非EC显著不同。有趣的是,发现在创伤后1天(7.951 ± 4.870)而非15天(1.260 ± 0.531),在EC患者中显著上调。因此,在创伤后15天,相对于在HV($p = 0.002$)、EC($p = 0.007$)和mTBI+EC($p = 0.001$)中,在sRBI+EC组中miR335显著更高。与在HV中相比,miR-335在两个时间点的mTBI+EC没有显示出任何显著差异。这些生物标志物的AUC也显示在表3中。

[0154] 表3:曲线下面积

变量	面积	渐进 95%置信区间	
		下限	上限
miR-502 1 天	.993	.972	1.000
miR-502 15 天	不显著	-	-
miR-425-5p 1 天	.994	.977	1.000
miR-425-5p 15 天	不显著	-	-
miR-21 1 天	.979	.934	1.000
miR-21 15 天	.975	.929	1.000
miR-335 1 天	.758	.592	.921
miR-335 15 天	.957	.884	1.000

[0156] 讨论

[0157] 本研究调查了miRNA水平的变化是否可用于TBI的诊断,并评估其严重程度。鉴定出四种miRNA在TBI中差异表达:miR-425-5p、miR 502、miR-21和miR-335。

[0158] 与在HV中相比,miR-425-5p在创伤后1天于mTBI+EC中显示出显著结果,并且在所有其他类别中获得了类似的结果。其在轻度创伤后的前24小时内下调,且15天后恢复正常水平,这使miR-425-5p成为轻度创伤的合适候选生物标志物。

[0159] 还发现miR-502在mTBI+EC中差异表达。该miRNA的趋势与miR-425-5p非常相似。它显示出对脑损伤患者的特异性,并且由于它在轻度创伤后15天恢复到正常值,因此还可用于追踪恢复。

[0160] 追踪sTBI,注意到2个miRNA(miR-21、miR-335)在创伤后1天和创伤后15天均有表达,因此被选择作为sTBI的潜在生物标志物。与sTBI+EC的对照相比,miR-21和miR-335在两个时间点均显著上调。因此,过表达证实了阵列的结果,并显示了这些分子作为sTBI生物标

志物的潜力。

[0161] 选定的miRNA组具有准确诊断TBI的潜力,并根据严重程度对患者进行分层,从而可以提供最合适的治疗。

[0162] 实施例2

[0163] 患者和样本收集

[0164] 从英国伯明翰伊丽莎白女王医院的外科重建和微生物学研究中心(SRMRC)招募研究参与者,其作为SIR(从受伤到康复的类固醇和免疫)研究(Ethics Ref.11/SW/0177)、ReCoS(运动中反复出现的脑震荡)研究(Ethics Ref.11-0429AP28)以及黄金时间研究(Ethics Ref.13/WA/0399)的一部分。在纳入研究之前,已收到参与者或有效代理人(家庭或未直接参与研究的专业人士)的书面知情同意书。

[0165] 第二个样本数据集使用来自分为4个不同类别的总共120个人的血清样本,4个不同类别为HV(n=30)、EC(n=30)、mTBI+EC(n=30)以及sTBI+EC(n=30)。并且不同时间点(T0-1h、T4-12h、T48-72h、15天)从每个患者采集血液。健康志愿者同意并参加ReCoS研究。EC创伤患者有放射学证实的骨科骨折,无头部创伤、无感染、无神经或精神疾病史且无酒精或药物依赖性。带有EC的轻度TBI包括那些非穿透性头部创伤和格拉斯哥昏迷量表(GCS)评分 ≥ 13 的患者。带有EC的重度TBI包括GCS ≤ 8 的患者。

[0166] 样本处理

[0167] 抽取血液样本,在2小时内进行血清分离处理。将全血在室温下静置约30分钟,然后在4℃下以3000rpm离心10分钟。将血清分成等分试样并储存在-80℃直至分析。

[0168] 如实施例1中所述进行RNA分离、数据分析、测定以及统计分析。

[0169] 结果

[0170] 单TaqMan测定mTBI的候选生物标志物

[0171] 为了验证实施例1的发现,使用单TaqMan分析在不同的时间点(T0-1h、T4-12h、T48-72h、15天)测定三个分离和独立的组(30例mTBI+EC、30例sTBI+EC、30例EC)中所选miRNA的表达。将结果与10例HV进行比较。使用miR-331和miR-223*作为参照基因,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算倍数变化。

[0172] 在两个时间点的mTBI候选生物标志物(miR-184、miR-502、miR-505、miR-301b、miR-203、miR-425-5p、miR-654-3p和miR-655)中,仅有两个显示出有趣的结果,且与在HV中相比,在三个不同的类别中显著和差异表达。特别地,miR-425-5p和miR-502显示出类似的趋势(图3A和图3B)。两者在mTBI+EC中均显著下调,针对miR-425-5p,是在T0-1h($p=0.01845$)和T4-12h($p=0.01962$)与在HV中相比,或者与在EC和sTBI+EC($p<0.05$)中相比;针对miR-502是在T0-1h和T4-12h,与在HV中相比(分别为 $p=0.02538$ 和 $p=0.03718$),或者与在EC和sTBI+EC($p<0.01$)中相比。在中度创伤后48小时,miR425-5p和miR-502恢复至正常水平。还发现miR-425-5p和miR-502在EC组中的表达与在HV中相似,因此表明这两种生物标志物仅在脑损伤患者中下调。此外,在所有时间点,与在HV中相比,它们在sTBI+EC中都没有显示出任何显著下调。因此,miR-425-5p和miR-502可被认为是早期诊断和监测mTBI最有希望的候选生物标志物。表4显示这些生物标志物在最相关的时间点的AUC。

[0173] 单TaqMan测定sTBI的候选生物标志物

[0174] 分析miR-21和miR-335作为sTBI的潜在生物标志物,因为它们在初始筛选中在两

个时间点于sTBI+EC中均出现上调。它们在患者的第二个数据集中也显示为强势候选生物标志物(图4A和图4B)。相比于在HV、EC和mTBI+EC(在T4-12h, $p=0.00306$; 在T48-72h, $p=0.00844$; 在15天, $p=0.00077$)中, 在创伤后4h, MiR-21在两个时间点于带有EC的sTBI中均显著上调。与HV相比, 其余类别未发现显著差异。与在HV(在T0-1h, $p=0.00109$; 在T4-12h, $p=0.00284$; 在T48-72h, $p=0.00012$; 在15天, $p=0.01284$)和mTBI+EC中相比, MiR-335在所有时间点于sTBI+EC中显示上调, 但与在EC中相比, 没有发现显著的上调。这些生物标志物的AUC也显示在表4中。

[0175] 表4: TBI的4个候选生物标志物在不同时间点的曲线下面积。仅显示最相关的时间点。

变量	面积	Sig	渐进 95%置信区间	
			下限	上限
miR-425-5p T0				
mTBI vs HV	1	.002	1	1
mTBI vs sTBI	.911	.020	.778	1.000
mTBI vs EC	.950	.01	.860	1.000
miR-502 T0				
mTBI vs HV	1	.001	1.000	1.000
mTBI vs sTBI	.990	.001	.960	1.000
mTBI vs EC	.990	.001	.940	1.000
miR-21 T4-12h				
sTBI vs HV	.961	.003	.880	1.000
sTBI vs mTBI	.960	.001	.870	1.000
sTBI vs EC	.900	.004	.740	1.000
miR-335 T0				
sTBI vs HV	.990	.000	.960	1.000
sTBI vs mTBI	.780	.023	.590	.960
sTBI vs EC	.500	1	.240	0.780

[0176] 讨论

[0178] 该研究验证了先前的发现, 即miRNA水平的变化可用于TBI的诊断, 并评估其严重程度。该研究证实, 以下4种miRNA在TBI中差异表达: miR-425-5p、miR-502、miR-21和miR-335。

[0179] 与在HV中相比, miR-425-5p在T0和T4-12h于mTBI+EC中显示出显著结果, 并且在所有其他类别中获得了类似的结果。在T48-72h后其下调回到正常水平, 证实miR-425-5p是轻度创伤的合适候选生物标志物。

[0180] 还证实miR-502在mTBI+EC中差异表达。该miRNA的趋势与miR-425-5p非常相似。它显示出对脑损伤患者的特异性, 并且由于它在中度创伤后T48-72h恢复到正常值, 因此还可用于追踪恢复。

[0181] 追踪sTBI, 注意到2个miRNA(miR-21、miR-335)在所有时间点均有表达, 因此被证实作为sTBI的潜在生物标志物。与在sTBI+EC中的对照相比, miR-21和miR-335均显著上调。因此, 过表达证实了这些分子作为sTBI生物标志物的潜力。

[0182] 实施例3

[0183] 在损伤后2-3天从受伤专业运动员收集唾液样本, 并分析唾液中存在的microRNA。这些运动员在临床上被诊断为患有mTBI。

[0184] 材料和方法

[0185] 使用nCounter技术(nanoStringTechnologies®)分析microRNA,该技术使用分子“条形码”和显微镜成像在一个杂交反应中检测和计数多达数百个独特的转录物。每个颜色编码的条形码附着于与目标microRNA对应的单个靶特异性探针。

[0186] 根据制造商的实验方法进行分析,该实验方法包括以下步骤:

[0187] 杂交:该技术每个microRNA使用2~20个碱基的探针,在溶液中杂交。报告探针携带信号,而捕获探针使复合物被固定用于数据收集。

[0188] 纯化和固定:杂交后,除去过量的探针,使探针/靶复合物对齐并将其固定在nCounter柱中。

[0189] 数据收集:将样本盒放置在数字分析仪器中以进行数据收集。对盒表面上的颜色代码进行计数并将每个目标分子列如表格。

[0190] 结果

[0191] 下面的表4是与在健康志愿者中相比,在有脑震荡的运动员中发现的显著和差异表达的microRNA的列表。该表显示了相比于对照组,患者中microRNA表达的倍数变化。使用miR-23a-3p和miR-148b-3p作为参照基因计算倍数变化。

[0192] 表5

[0193]

microRNA	倍数变化
hsa-let-7c-5p	2.80
hsa-let-7i-5p	1.82
hsa-miR-142-3p	1.41
hsa-miR-148a-3p	1.72
hsa-miR-15b-5p	2.30
hsa-miR-16-5p	2.32
hsa-miR-181a-5p	1.54
hsa-miR-20a-5p+hsa-miR-20b-5p [§]	2.16
hsa-miR-221-3p	2.90
hsa-miR-24-3p	1.94
hsa-miR-27b-3p	3.45
hsa-miR-29a-3p	4.03
hsa-miR-29c-3p	1.44
hsa-miR-424-5p	2.88
hsa-miR-30a-5p	2.16
hsa-miR-107	1.72
hsa-miR-135b-5p	1.97
hsa-miR-199b-5p	1.88
hsa-miR-324-5p	5.61
hsa-miR-652-3p	3.43

[0194] [§]由于nCounter技术无法区分miR-20a-5p和miR-20b-5p,它们的值被合并。

[0195] 讨论

[0196] 该研究表明,唾液中存在的microRNA是脑震荡/mTBI的指标。这是有意义的,因为唾液比血液更容易获得,因此唾液microRNA的检测提供了特别是在场边,用于诊断TBI快速且方便的手段。

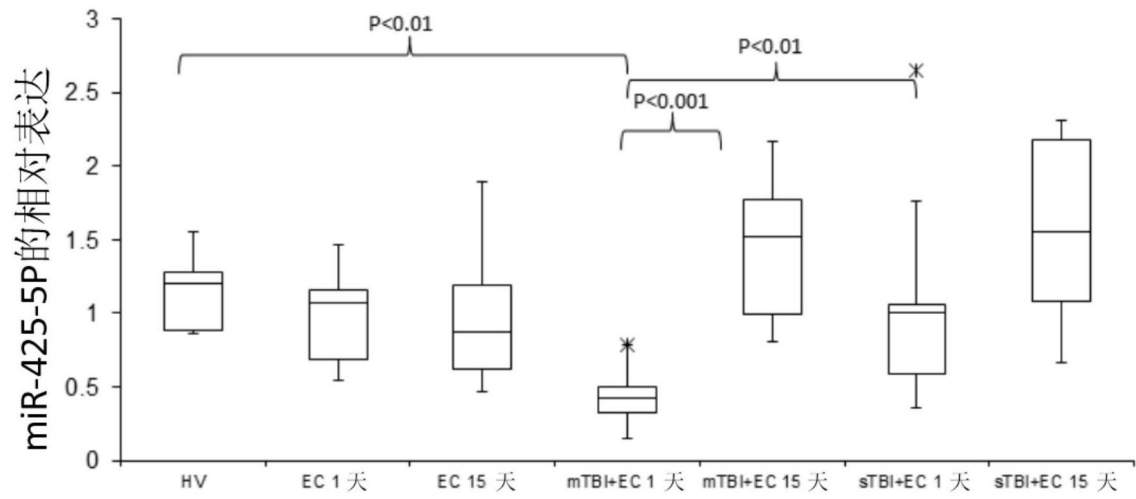


图1A

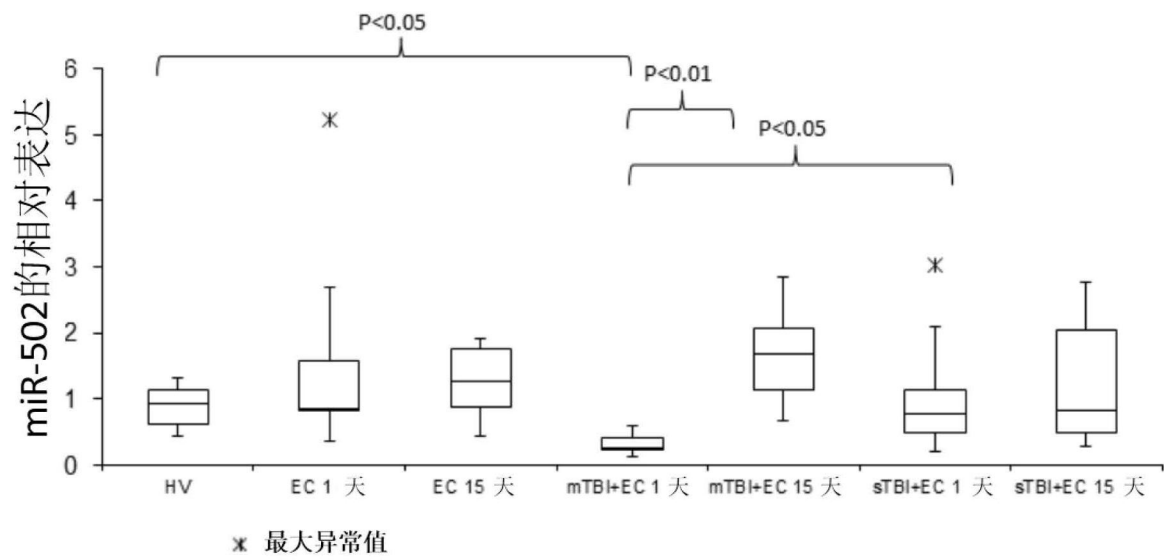


图1B

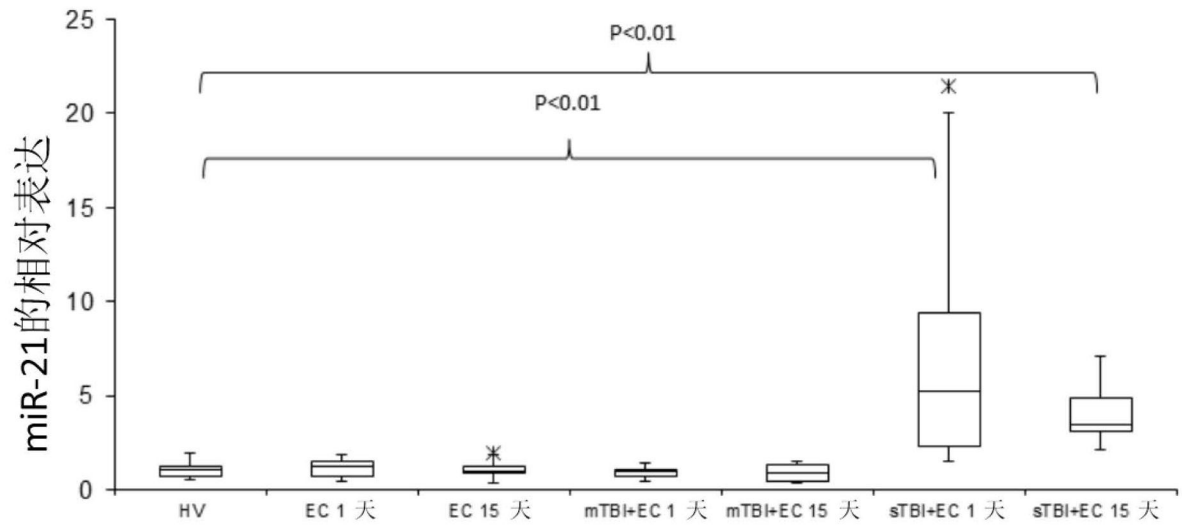


图2A

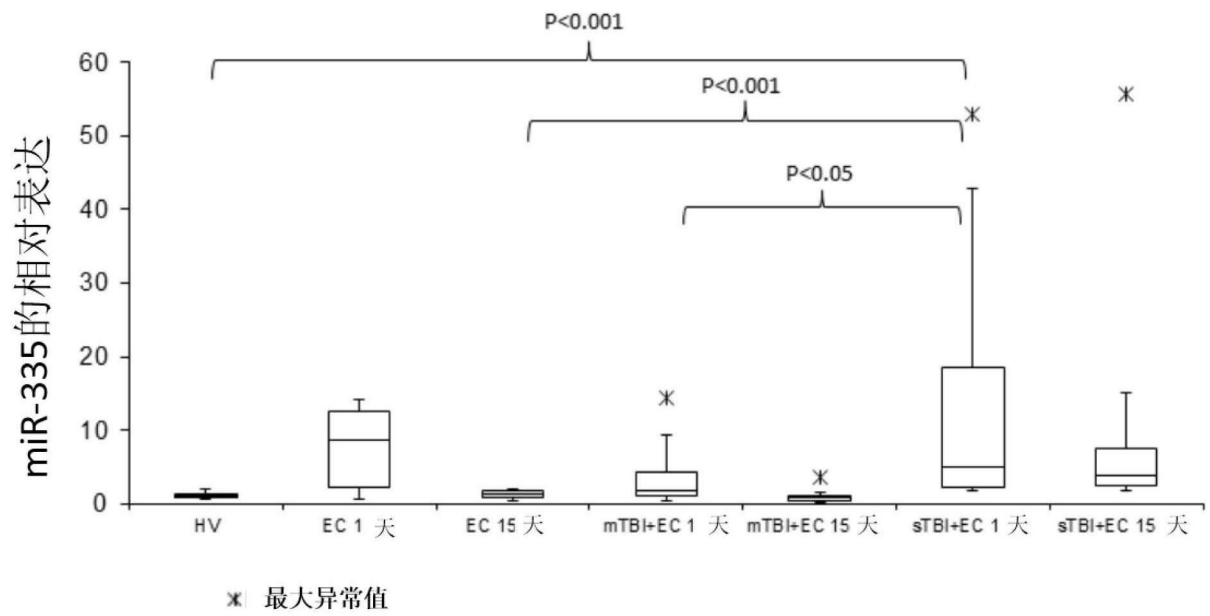


图2B

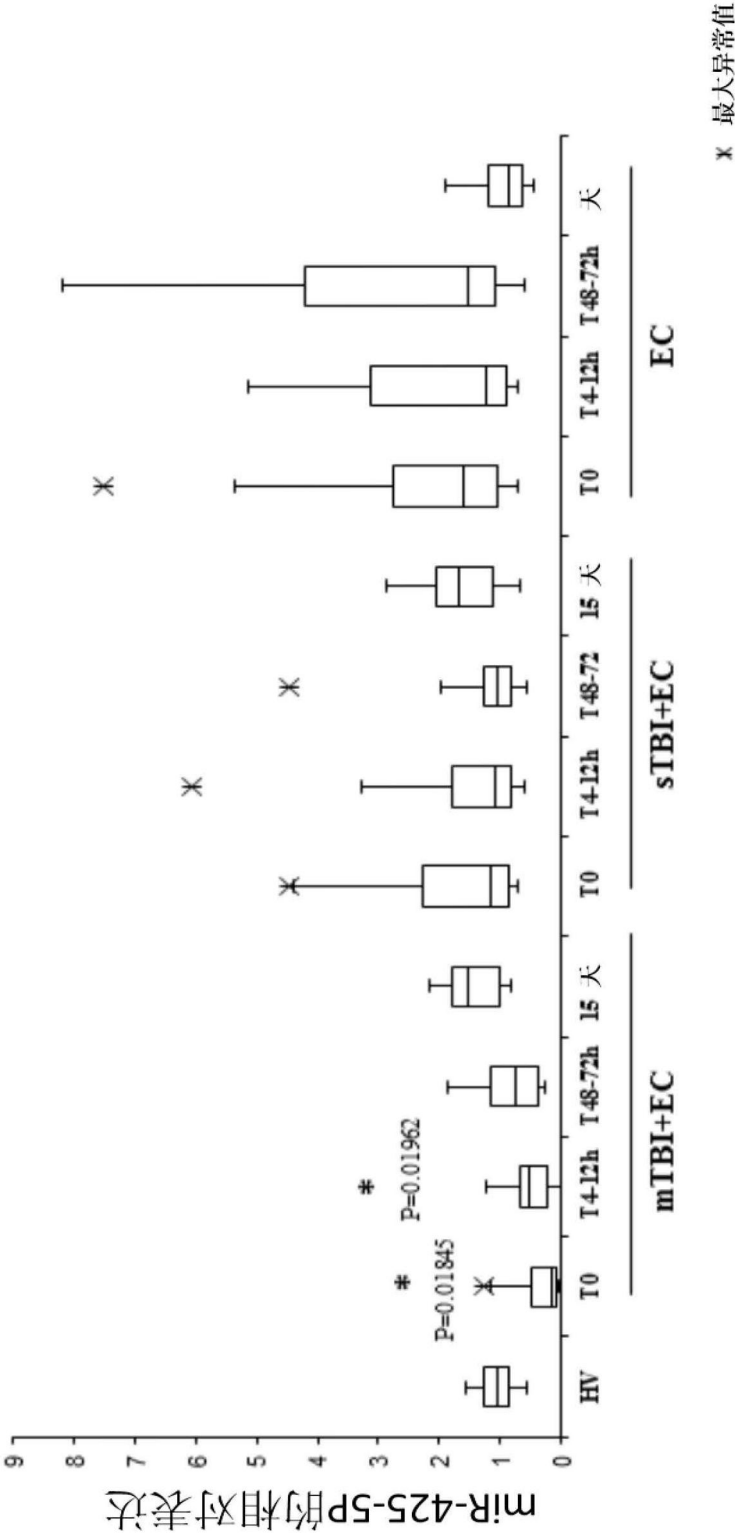


图3A

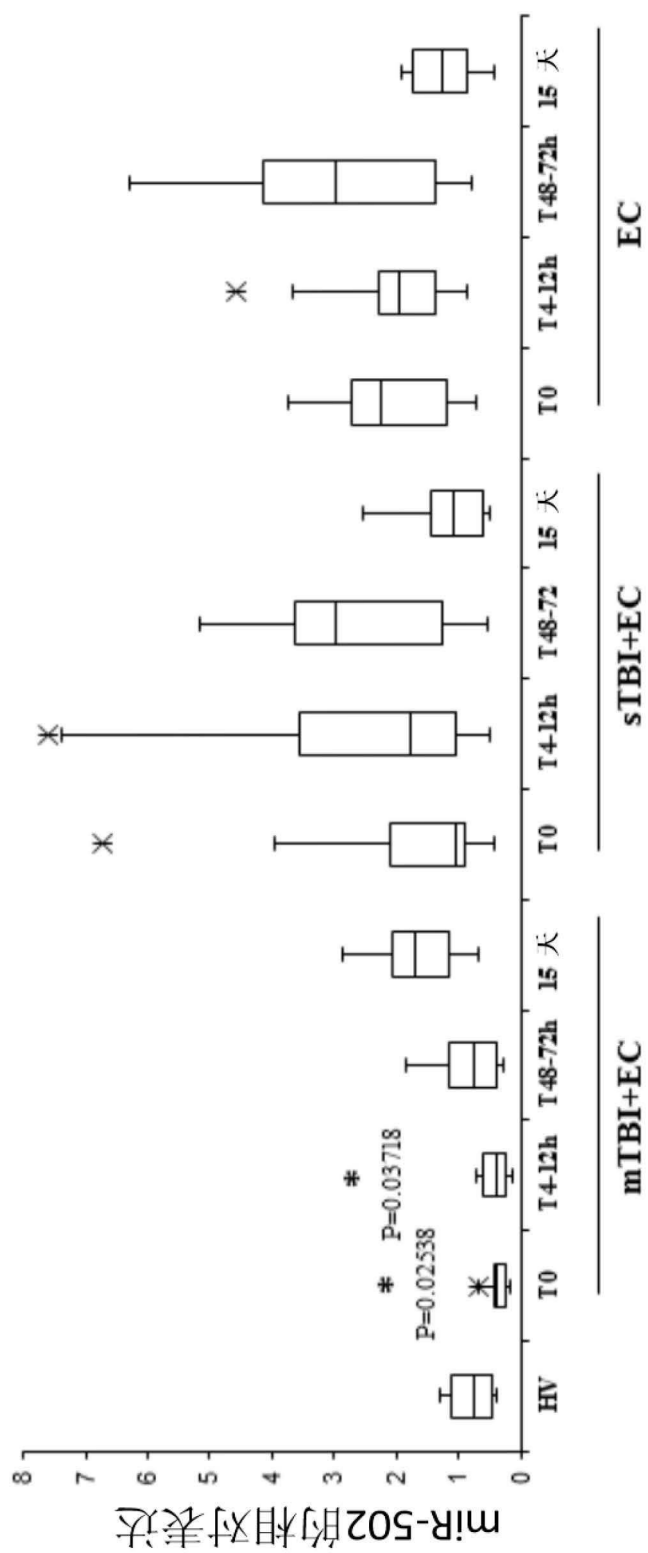


图3B

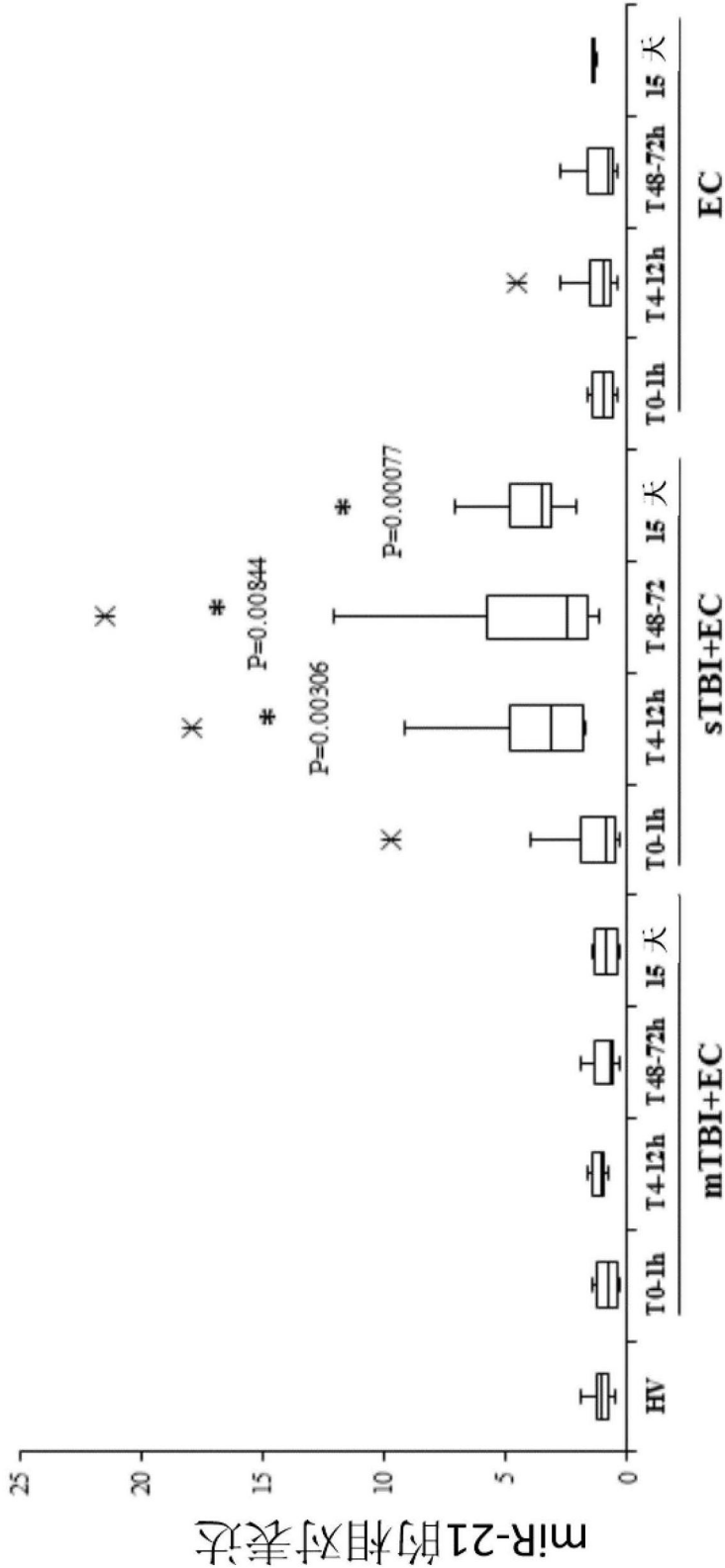


图4A

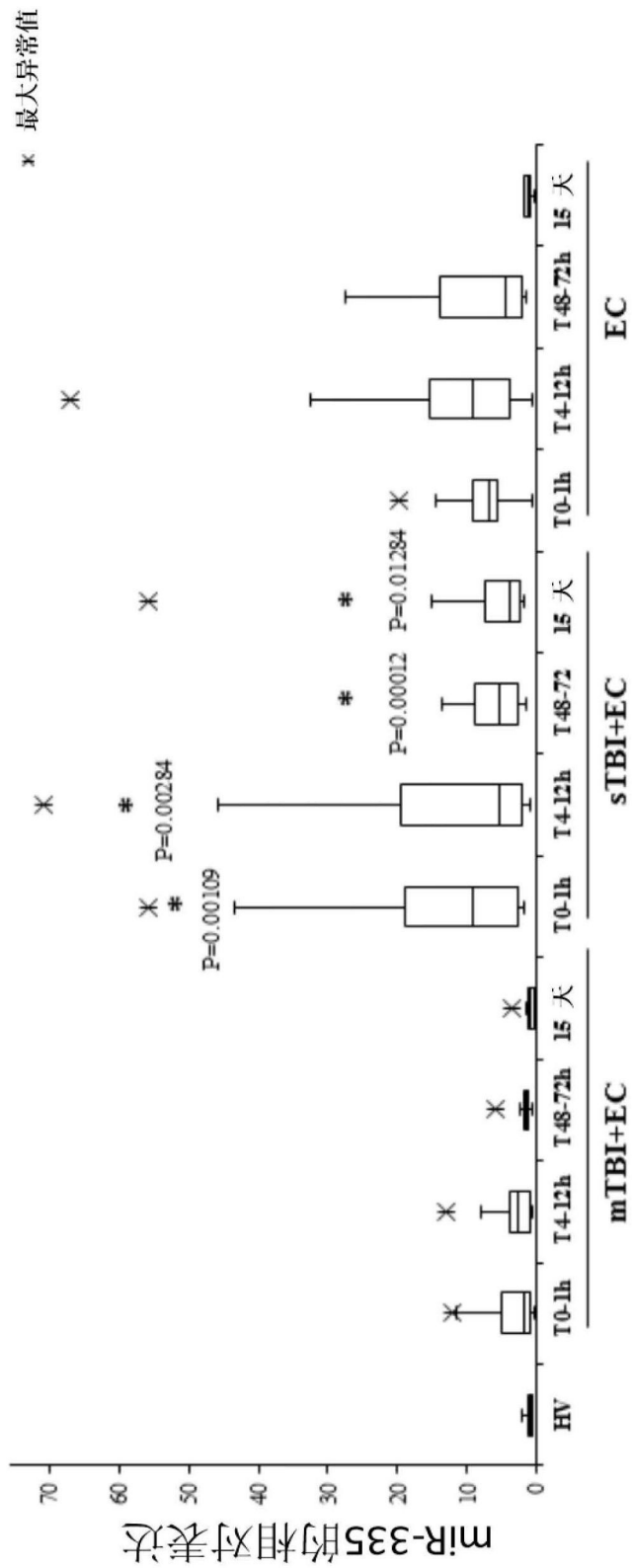


图4B