



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101842484 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 29

(21) 申请号 200880114286. 9

(22) 申请日 2008. 09. 12

(30) 优先权数据

60/993, 809 2007. 09. 14 US

61/055, 178 2008. 05. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 04. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/076109 2008. 09. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/036236 EN 2009. 03. 19

(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·B·马什 M·G·皮珀

N·伊斯梅尔

(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.

C12N 15/11(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/48(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005121369 A2, 2005. 12. 22, 说明书第
19 页第 3 行 - 第 20 页第 3 行, 第 12 页 16-28 行,
第 1 页 6-7 行, 第 8 页 21-23 行, 第 10、15、22 页.

US 20070161004 A1, 2007. 07. 12, 第
0003-0468 段, 第 7234, 4143, 4433, 4387 段.

WO 2005121369 A2, 2005. 12. 22, 说明书第
19 页第 3 行 - 第 20 页第 3 行, 第 12 页 16-28 行,
第 1 页 6-7 行, 第 8 页 21-23 行, 第 10、15、22 页.

US 20070161004 A1, 2007. 07. 12, 第
0003-0468 段, 第 7234, 4143, 4433, 4387 段.

审查员 徐俊

权利要求书1页 说明书32页 附图15页

(54) 发明名称

人外周血微泡中的 MIRNA 表达和其用途

(57) 摘要

本发明提供新的方法和组合物, 其通过检查
包含微泡的样品和其中的 miR 而用于病症的诊
断、预后和治疗。

1. 用于确定至少一种 miR 基因产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或预测来自受试者的包含微泡的样品中的前列腺癌,其中与对照的水平相比,所述样品中的微泡中所述至少一种 miR 基因产物的水平的改变诊断或预测所述前列腺癌,

其中所述至少一种 miR 基因产物包括 mir21、miR-15a、miR-16-1、miR-143 和 miR-145,并且其中 mir21 的上调以及 miR-15a、miR-16-1、miR-143 和 miR-145 的下调诊断或预测所述前列腺癌。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述对照选自:

i) 参考标准;和

ii) 来自不具有所述前列腺癌的受试者的样品的所述至少一种 miR 基因产物的水平。

3. 权利要求 1 的用途,其中用于确定至少一种 miR 基因产物的水平的试剂是 miR 阵列,其中,所述 miR 阵列用于鉴定与参照相比在代表前列腺癌的样品中差异表达的 miR。

4. 权利要求 3 的用途,其中鉴定差异表达的 miR 包括产生所述样品的 miR 特征谱和评估所述 miR 特征谱以确定所述样品中的 miR 与正常样品相比是否差异表达。

人外周血微泡中的 MIRNA 表达和其用途

[0001] 发明人 :Clay B. Marsh, Melissa G. Hunter, Noura Ismail

[0002] 优先权要求和关于联邦政府赞助的研究的声明

[0003] 本申请要求 2007 年 9 月 14 日提交的美国临时专利申请 60/993, 809 和 2008 年 5 月 22 日提交的美国临时专利申请 61/055, 178 的优先权, 其通过引用完整地并入本文。本发明并非由任何政府做出并且政府在本发明中没有权利。

[0004] 发明背景

[0005] 微 RNA (miRNA 或 miR) 是动物和植物中表达的小的非编码 RNA。它们调节细胞功能、细胞存活、细胞活化和发育期间的细胞分化。7 ;8

[0006] 微 RNA 是 19-25 个核苷酸 RNA 的小的非编码家族, 其通过以序列特异性方式靶向信使 RNA (mRNA), 诱导翻译抑制或 mRNA 降解 (取决于 miRNA 和它们的靶之间的互补程度) 来调节基因表达 (Bartel, D. P. (2004) *Cell* 116, 281-297 ;Ambros, V. (2004) *Nature* 431, 350-355)。许多 miR 在序列上在远缘生物体之间是保守的, 表明这些分子参与重要过程。的确, miR 参与发育期间基因表达的调节 (Xu, P. 等 (2003) *Curr. Biol.* 13, 790-795), 细胞增殖 (Xu, P. 等 (2003) *Curr. Biol.* 13, 790-795), 细胞凋亡 (Cheng, A. M. 等 (2005) *Nucl. Acids Res.* 33, 1290-1297), 葡萄糖代谢 (Poy, M. N. 等 (2004) *Nature* 432, 226-230), 压力抗性 (Dresios, J. 等 (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1865-1870) 和癌症 (Calin, G. A 等 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1554-15529 ;Calin, G. A. 等 (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11755-11760 ;He, L. 等 (2005) *Nature* 435, 828-833 ;和 Lu, J. 等 (2005) *Nature* 435 :834-838)。

[0007] 还有强有力的证据表明 miR 在哺乳动物造血中起作用。在小鼠中, miR-181、miR-223 和 miR-142 在造血组织中差异表达, 并且它们的表达在造血和谱系定向 (lineage commitment) 期间被调节 (Chen, C. Z. 等 (2004) *Science* 303, 83-86)。miR-181 在鼠造血祖细胞中的异位表达导致 B 细胞区室中的增殖 (Chen, C. Z. 等 (2004) *Science* 303, 83-86)。鼠造血系统的细胞中的系统性 miR 基因特征谱分析显示与神经元组织相比造血系统中不同的 miR 表达模式, 并且鉴定了在细胞分化期间发生的单独的 miR 表达变化 (Monticelli, S. 等 (2005) *Genome Biology* 6, R71)。最近的研究已经鉴定, miR-221 和 miR-222 在 CD34⁺ 脐血祖细胞的人红细胞生成培养物中下调 (Felli, N. 等 (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18081-18086)。已发现这些 miR 靶向癌基因 c-Kit。进一步的功能研究表明这两种 miR 在红细胞生成培养物中的下降在翻译水平上开启了 Kit 蛋白产生, 导致早期红系细胞的扩增 (Felli, N. 等 (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18081-18086)。与 miR 调控细胞分化的假说一致, 发现 miR-223 是牵涉 C/EBP α 和 NFI-A 的调控回路 (circuit) 的关键成员, 其在全反视黄酸处理的急性早幼粒细胞性白血病细胞系中控制粒细胞的分化 (Fazi, F. 等 (2005) *Cell* 123, 819-831)。

[0008] 在 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病中已鉴定到两种 miR 的频繁缺失和降低的表达⁹。这些发现促进了很多的论文, 其证明 miR 在头颈癌, 小细胞肺癌, 胶质母细胞瘤, 乳腺癌, 慢性淋巴细胞性白血病和 Burkitt 淋巴瘤中异常表达⁹⁻¹²。最近, 已经报道了巨噬细胞中炎症

和 miR 之间的关系。¹³

[0009] 为了检测此类病症,已获得组织样品以证实此类巨噬细胞的存在。另外,至今,一直没有报道证明在血液中循环的微泡 (microvesicle) 包含 miR。

[0010] 本发明的另外的优势,目的和特征将部分地在随后的说明书中阐明并且在检查下列内容后对本领域技术人员来说将部分地变得显然,或可以从本发明的实践中认识到。如附加的权利要求中特别指出的,可以实现和获得本发明的目的和优势。

[0011] 发明概述

[0012] 在一个方面中,提供了用于鉴定特定 miR 的方法,所述 miR 存在于微泡中,和 / 或在组织、液体和 / 或细胞中具有改变的特定 miR 的表达水平。

[0013] 微泡促进细胞之间的联系。许多细胞 (包括巨噬细胞、血小板、T-细胞和肿瘤) 释放包含核酸和 / 或蛋白的小的微泡¹⁻⁵。包含在微泡内的因子调节血管发生、细胞生长和细胞分化^{1,3}。

[0014] 在另一个方面中,确定了 miR 在液体例如患特定病症的患者的外周血中的存在。

[0015] 在另一个方面中,确定了 miR 在患肺纤维化的患者的肺组织中的存在。

[0016] 在另一个方面中,本文提供了诊断或预测受试者 (例如,人) 中的特定病症的方法。根据一种特定的方法,将来自受试者的受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平与对照样品中相应的 miR 基因产物的水平进行比较。相对于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平,受试样品中 miR 基因产物水平的变化 (例如增加,减少) 表示受试者患有急性炎症病症,或者处于发生急性炎症病症的风险中。

[0017] 在一个实施方案中,来自受试者的受试样品中 miR 基因产物的水平大于对照的水平。在另一个实施方案中,所述至少一种 miR 基因产物选自本文所示的 miRNA。

[0018] 在特定的实施方案中,被诊断或预测的病症是导致单核吞噬细胞和 / 或 THP-1 细胞释放微泡的病症。

[0019] 在特定的实施方案中,被诊断或预测的病症是引起炎症应答的病症。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明是治疗受试者 (例如,人) 的癌症和 / 或炎症病症的方法。

[0021] 在一个特定的方法中,将有效量的用于抑制至少一种 miR 基因产物的表达的化合物施用给受试者,所述 miR 基因产物选自表 I-VI 中的一个或多个组。

[0022] 在一个实施方案中,用于抑制至少一种 miR 基因产物的表达的化合物抑制选自表 I-VI 中的一个或多个组的 miR 基因产物的表达。

[0023] 本发明进一步提供了用于治疗癌症和 / 或炎症病症的药物组合物。在一个实施方案中,本发明的药物组合物包含至少一种 miR 表达抑制化合物和药学上可接受的载体。在特定的实施方案中,所述至少一种 miR 表达抑制化合物对 miR 基因产物是特异的,所述 miR 基因产物的表达,与正常相比,在来自患病的患者的血液中更高。

[0024] 在另一个实施方案中,药物组合物还包含至少一种抗炎剂。

[0025] 在一个实施方案中,本发明是用于治疗与 miR 基因产物的过表达有关的癌症和 / 或与 miR 基因产物的过表达有关的肺部病症的药物组合物。此类药物组合物包括有效量的至少一种 miR 基因产物和药学上可接受的载体,其中所述至少一种 miR 基因产物结合并且减少所述 miR 基因产物的表达。在另一个实施方案中,所述至少一种 miR 基因产物包含与

所述 miR- 基因产物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在另一个实施方案中,所述至少一种 miR 基因产物是 miR 或其变体或生物学活性片段。在另一个实施方案中,药物组合物还包含至少一种抗癌剂。

[0026] 根据下列优选实施方案的详细描述,当根据附图阅读时,本发明的各种目的和优势对本领域技术人员来说将变得显然。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 显示来自巨噬细胞的微泡的释放诱导的分化。外周血单核细胞 (PBM) 未经处理 (浅色) 或用 GM-CSF 处理 (深色) 24 小时。收集无细胞上清液并且进行超速离心。将小泡重悬浮于 PBS 中并且通过流式细胞术分析大小。分析之前,用 2 μ m 标准珠校准 FSS 和 SSC 参数 (未显示)。显示的是来自三个不同供体的代表性数据。

[0029] 图 2A-2C 显示微泡介导巨噬细胞分化。从 PMA 处理的 THP1 细胞收集微泡,然后将其添加到未分化的 THP1 细胞 (图 2B) 或单核细胞 (图 2C) 中。作为对照,THP1 细胞未进行处理 (图 2A)。每天对所述细胞拍照。显示的是第 3 天的细胞。

[0030] 图 3A-3C 显示外周血微泡的分离。经告知同意后,从来自正常志愿者供体的 20cc 血液中获得血浆。来自 0.5cc 血浆的微泡和 CD206-FITC 或 MHCII-FITC 抗体一起温育并且在 BD FACS Calibur 上分析大小 (利用前向角对侧向角散射 (forward vs. side scatter)) (图 3A) 和表面抗原表达 (图 3B)。针对图 3A 所示的门控区 (gated region),确定 CD206 或 MHC II 的百分比表达 (与同种型对照相比) (图 3C)。显示的是两个供体的平均值 \pm SEM。

[0031] 图 4. 外周血微泡的来源的分析。

[0032] 通过流式细胞术分析来自健康供体 ($n = 10$) 的外周血微泡。为了确定细胞来源,针对 CD3、CD202b (Tie-2)、CD66b、CD79a 或 CD41a 对微泡进行染色以确定来源于 T- 细胞、内皮细胞、嗜中性粒细胞、B 细胞或血小板的微泡。单核吞噬细胞衍生的微泡对于 CD14、CD206、CCR3、CCR2 或 CCR5 是阳性的。显示的是平均的总门控事件的最大值 % \pm S. E. M。

[0033] 图 5A-5D. 来自外周血微泡和 PBMC 的 miRNA 表达。(图 5A) 基于过滤标准显示微泡和 PBMC 的层次聚类 (Hierarchical clustering) 分析。产生显示微泡 (图 5B) 和 PBMC (图 5C) 的表达特征谱的热图。(图 5D) 显示各个样品组共有的和特异的数目。

[0034] 图 6 :显示多种疾病和与其相关的上调和下调的 miR 的表 I。列出了人类疾病 (包括癌和非癌) 组织中重要的微 RNA。通过将来自我们的数据集 (图 7, 表 II) 的血浆中未检测到的 miRNA 与已知在特定疾病组织中增加的 miRNA 相比较,现在发明人相信我们预测几种 miRNA 可以用作血浆中的生物标志物 (参见图 6, 表 I 增加表达栏中粗体的 miR)。

[0035] 图 7 :显示在血浆中表达的 miR 和未检测到的 miR 的表 II。

[0036] 图 8 :表 III 列出了 miR 并且显示在来自所有个体的血浆微泡和 PBMC 中表达最高的十种 miRNA。

[0037] 图 9 :表 IV 显示参与代谢和获得性免疫系统的调控的经典途径 (canonical pathway) 受这些 miRNA (仅使用 Sanger miRBase (上部)) 或来自 Sanger miRBase 和 TargetScan 的共有的靶 (底部) 的表达的高度调控。

[0038] 图 10 :表 V 显示 20 种 miRNA 在 PBMC 级分中具有三倍以上的表达增加 (与微泡血浆样品相比),并且显示血浆微泡中与 PBMC 相比的倍数变化 (最后一栏)。

[0039] 图 11 :表 VI 显示所有检测到的 miR 的标准化的表达数据 :检测器名称, ave-MNC,

std-MNC, 检测器名称, ave- 血清, std- 血清。

[0040] 优选实施方案的详细描述

[0041] 本发明部分基于参与炎性应答和 / 或在血液中具有改变的表达水平的特定微 RNA (miRNA) 的鉴定。本发明还部分基于这些 miRNA 与特定的诊断、预后和治疗特征的关联。

[0042] 如本文描述和举例说明的, 特定的 miRNA 在组织损伤和 / 或炎症期间上调或下调。

[0043] 如在本文中可互换使用的, “miR 基因产物”、“微 RNA”、“miR”、“miR”或“miRNA”是指来自 miR 基因的未加工或已加工的 RNA 转录物。由于 miR 基因产物不翻译成蛋白质, 因此术语“miR 基因产物”不包括蛋白质。未加工的 miR 基因转录物也称为“miR 前体”, 其通常包括长度大约 70-100 个核苷酸的 RNA 转录物。可通过用 RNA 酶 (例如, Dicer、Argonaut 或 RNA 酶 III (例如大肠杆菌 RNA 酶 III)) 将其消化成具有活性的 19 至 25 个核苷酸的 RNA 分子来加工 miR 前体。该具有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子也称为“已加工的”miR 基因转录物或“成熟的”miRNA。

[0044] 可通过天然加工途径 (例如使用完整的细胞或细胞裂解物) 或通过合成加工途径 (例如使用分离的加工酶, 例如分离的 Dicer、Argonaut 或 RNA 酶 III), 从 miR 前体获得具有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子。应理解, 还可通过生物或化学合成 (而不用从 miR 前体加工), 直接产生具有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子。当在本文中用名称提及微 RNA 时, 该名称对应前体和成熟形式, 除非另有说明。

[0045] 本发明包括诊断或预测受试者是否患有释放微泡的病症或处于发展释放微泡的病症的风险中的方法。

[0046] 该方法包括确定来自受试者的样品中至少一种 miR 基因产物的水平和将样品中的 miR 基因产物水平与对照相比较。如本文所使用的, “受试者”可以是患有或怀疑患有此类病症的任何哺乳动物。在一个优选的实施方案中, 受试者是患有或怀疑患有此类病症的人。

[0047] 可在从受试者获得的生物样品的细胞中, 测量至少一种 miR 基因产物的水平。

[0048] 在另一个实施方案中, 可从受试者中取出样品, 并且可通过标准技术提取和分离 DNA。例如, 在某些实施方案中, 可以在开始放射疗法、化学疗法或其它疗法之前从受试者获得样品。可从受试者的未受影响的样品、从正常人个体或正常个体的群体或从相应于受试者的样品的大部分细胞的培养细胞获得相应的对照样品或对照参照样品 (例如获自对照样品群体)。然后可将对照样品与来自受试者的样品一起进行处理, 以便可将来自受试者的样品的细胞中给定的 miR 基因产生的 miR 基因产物的水平与来自对照样品的细胞的相应的 miR 基因产物的水平进行比较。可选地, 可以从受试样品分开地得到和加工参照样品 (例如, 在不同时间), 并且可以将来自受试样品的细胞中的给定的 miR 基因产生的 miR 基因产物的水平与来自参照样品的相应 miR 基因产物水平相对比。

[0049] 在一个实施方案中, 受试样品中至少一种 miR 基因产物水平高于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平 (即, miR 基因产物的表达“上调”)。如本文中所使用的, 当来自受试者的样品中 miR 基因产物的量大于对照 (例如, 参考标准, 对照细胞样品, 对照组织样品) 中相同基因产物的量时, miR 基因产物的表达“上调”。

[0050] 在另一个实施方案中, 受试样品中至少一种 miR 基因产物水平低于对照样品中相应 miR 基因产物的水平 (即, miR 基因产物的表达“下调”)。如本文中所使用的, 当来自

受试者的样品中的该基因产生的 miR 基因产物的量低于从对照样品中的相同基因产生的量时, miR 基因的表达“下调”。可根据一个或多个 RNA 表达标准确定对照和正常样品中相对 miR 基因表达。所述标准可包括例如 0miR 基因表达水平、标准细胞系中的 miR 基因表达水平、受试者的未受影响的样品中的 miR 基因表达水平或之前从正常人对照群体获得的 miR 基因表达的平均水平(例如对照参考标准)。

[0051] 可以用本领域技术人员公知的各种技术(例如定量或半定量 RT-PCR, Northern 印迹分析, 溶液杂交检测)测量至少一种 miR 基因产物的水平。在特定的实施方案中, 通过下述测量至少一种 miR 基因产物的水平: 逆转录获自受试者的受试样品的 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸, 将靶寡脱氧核苷酸与一种或多种 miRNA 特异性探针寡核苷酸(例如包含 miRNA 特异性探针寡核苷酸的微阵列)杂交以提供受试样品的杂交特征谱, 并将受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。相对于对照样品, 受试样品中至少一种 miRNA 的信号的改变表示受试者患有特定病症或处于发展特定病症的风险中。

[0052] 还可从基因特异性寡核苷酸探针(所述探针从已知的 miRNA 序列产生)制备微阵列。对于各 miRNA, 阵列可包含两种不同的寡核苷酸探针, 一种探针包含活性成熟序列, 而另一种探针特异于 miRNA 的前体。阵列还可包含可用作杂交严格条件的对照的对照, 例如与人直系同源物只相异于少数几个碱基的一个或多个小鼠序列。还可将来自两个物种的 tRNA 和其它 RNA(例如, rRNA, mRNA)印制在微芯片上, 从而为特异性杂交提供内部的、相对稳定的阳性对照。还可将用于非特异性杂交的一个或多个合适的对照包含在微芯片上。为了该目的, 基于与任何已知的 miRNA 不存在任何同源性选择序列。

[0053] 可使用本领域内已知的技术制备微阵列。例如, 在位置 C6 上对合适长度例如 40 个核苷酸的探针寡核苷酸进行 5' - 胺修饰, 并且使用可商购获得的微阵列系统例如 GeneMachine OmniGrid™ 100Microarrayer 和 Amersham CodeLink™ 活化的载玻片进行印制。通过用标记的引物逆转录靶 RNA 来制备相应于靶 RNA 的标记的 cDNA 寡聚物。在第一链合成后, 使 RNA/DNA 杂交物变性以降解 RNA 模板。然后将所制备的标记的靶 cDNA 在杂交条件(例如在 25°C 下于 6X SSPE/30% 甲酰胺中进行 18 小时, 然后在 37°C 下于 0.75X TNT 中清洗 40 分钟)下与微阵列芯片杂交。在阵列上的其中固定的探针 DNA 识别样品中的互补靶 cDNA 的位置上, 发生杂交。标记的靶 cDNA 标记阵列上的其中发生结合的确切位置, 从而允许自动检测和定量。输出信号由一系列杂交事件组成, 其标示了特定 cDNA 序列的相对丰度, 从而标示了患者样品中相应的互补 miR 的相对丰度。根据一个实施方案, 标记的 cDNA 寡聚物是从生物素标记的引物制备的生物素标记的 cDNA。然后通过使用例如链霉抗生物素蛋白 -Alexa647 缀合物直接检测包含生物素的转录物来处理微阵列, 和使用常规扫描方法扫描微阵列。阵列上的各点的图像强度与患者样品中相应的 miR 的丰度成比例。

[0054] 使用阵列对于 miRNA 表达的检测具有几个有利方面。第一, 可在一个时间点上鉴定相同样品中的数百个基因的整体表达。第二, 通过寡核苷酸探针的仔细设计, 可鉴定成熟分子和前体分子的表达。第三, 与 Northern 印迹分析相比, 芯片需要少量 RNA, 并且使用 2.5 μg 总 RNA 可提供可重现的结果。数目相对有限的 miRNA(每物种数百个)允许对数个物种构建共同的微阵列, 其中对每一物种使用不同的寡核苷酸探针。这样的工具允许分析各已知的 miR 在不同条件下的跨物种表达。

[0055] 除了用于特定 miR 的定量表达水平测定外, 包含相应于 miRNome 的大部分(优选

整个 miRNome) 的 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微芯片可用于进行 miR 基因表达特征谱分析, 以分析 miR 的表达模式。可使不同的 miR 特征 (signature) 与已建立的疾病标志物关联或直接与疾病状态关联。

[0056] 按照本文中描述的表达特征谱分析法, 对来自怀疑患有特定病症的受试者的样品的总 RNA 进行定量逆转录以提供一组与样品中的 RNA 互补的标记的靶寡脱氧核苷酸。然后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, 从而提供样品的杂交特征谱。结果是显示样品中 miRNA 的表达模式的样品的杂交特征谱。杂交特征谱包括来自靶寡脱氧核苷酸 (其来自样品) 与微阵列中的 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的结合的信号。所述特征谱可记录为结合的存在或不存在 (信号对 0 信号)。更优选地, 记录的特征谱包括来自各杂交的信号强度。将所述特征谱与从正常的对照样品或参照样品种产生的杂交特征谱相比较。信号的改变表示受试者中存在特定病症或发展特定病症的倾向。

[0057] 用于测量 miR 基因表达的其它技术也在本领域技术人员的能力之内, 其包括用于测量 RNA 转录和降解的速率的各种方法。

[0058] 本发明还提供诊断受试者是否患有具有不利的预后的特定病症或处于发展具有不利的预后的特定病症的风险中的方法。在该方法中, 测量与特定病症的不利的预后有关的至少一种 miR 基因产物的水平, 通过逆转录来自从受试者获得的受试样品的 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸。然后使所述靶寡脱氧核苷酸与一种或多种 miRNA 特异性探针寡核苷酸 (例如包含 miRNA 特异性探针寡核苷酸的微阵列) 杂交以提供受试样品的杂交特征谱, 和将受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。相对于对照样品, 受试样品中至少一种 miRNA 的信号的改变表示受试者患有具有不利的预后的特定病症或处于发展具有不利的预后的特定病症的风险中。

[0059] 在某些情况下, 可能期望同时测定样品中多种不同的 miR 基因产物的表达水平。在其他的情况下, 可能期望测定与特定的病症相关的所有已知的 miR 基因的转录物的表达水平。评估数百种 miR 基因或基因产物的特定表达水平非常耗时并且需要大量的总 RNA (例如, 对于每一个 Northern 印迹至少 20 μ g) 和需要放射性同位素的放射自显影技术。

[0060] 为了克服这些限制, 可构建以微芯片形式 (即, 微阵列) 存在的寡核苷酸文库, 该文库包含一组特异于一组 miR 基因的寡核苷酸 (例如, 寡脱氧核苷酸) 探针。使用该微阵列, 可通过逆转录 RNA 以产生一组靶寡脱氧核苷酸, 将它们与微阵列上的探针寡核苷酸杂交以产生杂交特征谱或表达特征谱, 来测定生物样品中多个微 RNA 的表达水平。然后可将受试样品的杂交特征谱与对照样品的杂交特征谱比较, 从而确定具有改变的表达水平的微 RNA。如本文中所使用的, “探针寡核苷酸” 或 “探针寡脱氧核苷酸” 是指能够与靶寡核苷酸杂交的寡核苷酸。“靶寡核苷酸” 或 “靶寡脱氧核苷酸” 是指待检测 (例如, 通过杂交) 的分子。“miR- 特异性探针寡核苷酸” 或 “特异于 miR 的探针寡核苷酸” 是指具有选择用于与特定 miR 基因产物或特定 miR 基因产物的逆转录物杂交的序列的探针寡核苷酸。

[0061] 特定样品的 “表达特征谱” 或 “杂交特征谱” 本质上是样品状态的指纹图谱; 虽然两种状态可能具有相似表达的任何特定基因, 大量基因的同时评估允许产生对细胞状态来说是独特的基因表达特征谱。即正常样品可以区别于相应的展示病症的样品。在此类展示病症的样品中, 可以确定不同的预后状态 (例如良好的或不良的长期存活希望)。通过比较不同的状态中的展示病症的样品的表达特征谱, 获得关于在每一种状态下哪些基因是重

要的（包括基因的上调和下调）的信息。

[0062] 在展示病症的样品中差异表达的序列的鉴定，以及导致不同预后结果的差异表达，允许以许多方式使用该信息。例如，可评估特定的治疗方案（例如，以确定化疗药物是否改善特定受试者的长期预后）。类似地，可以通过比较来自受试者的样品与已知的表达特征谱来进行或确认诊断。此外，这些基因表达特征谱（或单独的基因）允许筛选药物候选物，所述药物候选物抑制特定病症的表达特征谱或将不良的预后特征谱转变为更好的预后特征谱。

[0063] 细胞中一种或多种 miR 基因产物水平的改变可导致这些 miR 的一种或多种预期的靶失调，这可导致特定的病症。因此，改变 miR 基因产物水平（例如，通过减少在展示病症的细胞中上调的 miR 的水平，通过增加在展示病症的细胞中下调的 miR 的水平）可成功地治疗病症。

[0064] 因此，本发明包括治疗受试者的病症的方法，其中至少一种 miR 基因产物在受试者的细胞中失调（例如，下调、上调）。在一个实施方案中，受试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照或参照样品种中相应的 miR 基因产物的水平。在另一个实施方案中，受试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平小于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。当至少一种分离的 miR 基因产物在受试样品中下调时，该方法包括施用有效量的该至少一种分离的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段，从而抑制受试者中展示病症的细胞的增殖。

[0065] 例如，当 miR 基因产物在受试者的癌细胞中下调时，对受试者施用有效量的分离的 miR 基因产物，可以抑制癌细胞的增殖。对受试者施用的分离的 miR 基因产物可以与在癌细胞中下调的内源野生型 miR 基因产物相同，或可以是其变体或生物学活性片段。

[0066] 如本文定义的，miR 基因产物的“变体”是指与对应的野生型 miR 基因产物具有小于 100% 的同一性且具有对应的野生型 miR 基因产物的一种或多种生物学活性的 miRNA。这样的生物学活性的实例包括、但不限于，抑制靶 RNA 分子的表达（例如，抑制靶 RNA 分子的翻译，调控靶 RNA 分子的稳定性，抑制靶 RNA 分子的加工）和抑制与癌症和 / 或骨髓增生病症有关的细胞过程（例如，细胞分化，细胞生长，细胞死亡）。这些变体包括物种变体和由于 miR 基因中的一个或多个突变（例如，置换，缺失，插入）而产生的变体。在某些实施方案中，变体与对应的野生型 miR 基因产物具有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、或 99% 的同一性。

[0067] 如本文定义的，miR 基因产物的“生物学活性片段”是指具有对应的野生型 miR 基因产物的一种或多种生物学活性的 miR 基因产物的 RNA 片段。如上所述，这样的生物学活性的实例包括、但不限于，抑制靶 RNA 分子的表达和抑制与癌症和 / 或骨髓增生病症有关的细胞过程。在某些实施方案中，生物学活性片段的长度是至少约 5, 7, 10, 12, 15 或 17 个核苷酸。在一个具体实施方案中，可以将分离的 miR 基因产物与一种或多种其它的抗癌治疗组合地施用给受试者。合适的抗癌治疗包括、但不限于，化疗，放疗和其组合（例如，放化疗（chemoradiation））。

[0068] 当至少一种分离的 miR 基因产物在癌细胞中上调时，该方法包括给受试者施用有效量的抑制至少一种 miR 基因产物的表达的化合物，从而抑制展示病症的细胞的增殖。这样的化合物在本文中称作 miR 基因表达抑制化合物。合适的 miR 基因表达抑制化合物的实

例包括、但不限于,本文所述的那些(例如,双链 RNA,反义核酸和酶促 RNA 分子)。

[0069] 在一个特定实施方案中,可以将 miR 基因表达抑制化合物与一种或多种其它的抗癌治疗组合地施用给受试者。合适的抗癌治疗包括、但不限于,化疗,放疗和其组合(例如,放化疗)。

[0070] 如本文所述的,当至少一种分离的 miR 基因产物在癌细胞中上调时,所述方法包括将有效量的至少一种用于抑制所述至少一种 miR 基因产物表达的化合物施用给受试者,从而抑制癌细胞的增殖。

[0071] 如本文中所使用的,术语“治疗”、“医治”和“疗法”是指改善与疾病或病况例如癌症和/或其他病况或病症相关的症状,包括预防或延迟疾病症状的发作,和/或减少疾病、病症或病况的症状的严重度或频率。术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文中定义为包括动物例如哺乳动物,包括但不限于灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、豚鼠、大鼠、小鼠或其它牛科、羊科、马科、犬科、猫科、啮齿目或鼠科物种。在优选实施方案中,动物是人。

[0072] 如本文中使用的,“分离的”miR 基因产物是合成的或通过人工介入从天然状态改变或取出的 miR 基因产物。例如,合成的 miR 基因产物,或部分或完全从其天然状态的共存材料分离的 miR 基因产物被认为是“分离的”。分离的 miR 基因产物可以以大体上纯化的形式存在,或可以存在于已将所述 miR 基因产物递送入其中的细胞中。因此,有意地被递送至细胞或在细胞中表达的 miR 基因产物被认为是“分离的”miR 基因产物。在细胞内从 miR 前体分子产生的 miR 基因产物也被认为是“分离的”分子。根据本发明,本文所述的分离的 miR 基因产物可以用于制备用于治疗受试者(例如,人)的药剂。

[0073] 分离的 miR 基因产物可使用许多标准技术获得。例如,可使用本领域已知的方法化学合成或重组产生 miR 基因产物。在一个实施方案中,使用适当保护的核糖核苷亚磷酸酰胺和常规的 DNA/RNA 合成仪化学合成 miR 基因产物。合成的 RNA 分子或合成试剂的提供商包括例如 Proligo (Hamburg, Germany)、Dharmacon Research (Lafayette, CO, U. S. A.)、Pierce Chemical (Perbio Science 的一部分, Rockford, IL, U. S. A.)、Glen Research (Sterling, VA, U. S. A.)、ChemGenes (Ashland, MA, U. S. A.) 和 Cruachem (Glasgow, UK)。

[0074] 或者,可使用任何合适的启动子从重组环形或线性 DNA 质粒表达 miR 基因产物。用于从质粒表达 RNA 的合适的启动子包括例如 U6 或 H1RNA pol III 启动子序列或巨细胞病毒启动子。其它合适的启动子的选择在本领域技术人员的能力之内。本发明的重组质粒还可包括用于在细胞(例如癌细胞,展示骨髓增生病症的细胞)中表达 miR 基因产物的诱导型或可调控的启动子。

[0075] 可通过标准技术从培养的细胞表达系统分离从重组质粒表达的 miR 基因产物。还可将从重组质粒表达的 miR 基因产物递送至细胞并且在其中直接表达。

[0076] miR 基因产物可从分开的重组质粒表达,或它们可从相同的重组质粒表达。在一个实施方案中,miR 基因产物从单个质粒表达为 RNA 前体分子,然后通过合适的加工系统(包括但不限于癌细胞中现有的加工系统)将该前体分子加工成功能性 miR 基因产物。

[0077] 适合用于表达 miR 基因产物的质粒的选择、用于将核酸序列插入质粒以表达基因产物的方法以及将重组质粒递送至目的细胞的方法在本领域技术人员的能力之内。参见,例如, Zeng 等人 (2002), *Molecular Cell* 9:1327-1333; Tuschl (2002), *Nat. Biotechnol.*

20 :446-448 ;Brummelkamp 等人 (2002), Science 296 :550-553 ;Miyagishi 等人 (2002), Nat. Biotechnol. 20 :497-500 ;Paddison 等人 (2002), Genes Dev. 16 :948-958 ;Lee 等人 (2002), Nat. Biotechnol. 20 :500-505 ; 和 Paul 等人 (2002), Nat. Biotechnol. 20 :505-508, 其全部公开内容通过引用合并入本文。例如, 在某些实施方案中, 表达 miR 基因产物的质粒可以包含在 CMV 立即早期启动子 (intermediate-early promoter) 控制下编码 miR 前体 RNA 的序列。如本文中所使用的, “在启动子的控制下” 是指编码 miR 基因产物的核酸序列位于启动子的 3' 端, 以便启动子可起始 miR 基因产物编码序列的转录。

[0078] miR 基因产物还可从重组病毒载体表达。预期 miR 基因产物可从两个分开的重组病毒载体或从相同的病毒载体表达。可通过标准技术从培养的细胞表达系统分离从重组病毒载体表达的 RNA 或所述 RNA 可在细胞 (例如癌细胞, 展示骨髓增生病症的细胞) 中直接表达。

[0079] 在本发明的治疗方法的其它实施方案中, 可对受试者施用有效量的至少一种抑制 miR 表达的化合物。如本文中所使用的, “抑制 miR 表达” 是指治疗后 miR 基因产物的前体和 / 或活性成熟形式的产量低于治疗前产生的量。通过使用例如本文讨论的测定 miR 转录物水平的技术, 本领域技术人员可容易地确定 miR 的表达在细胞中是否已被抑制。抑制可在基因表达的水平上 (即, 通过抑制编码 miR 基因产物的 miR 基因的转录) 或在加工的水平上 (例如, 通过抑制 miR 前体至成熟的活性 miR 的加工) 发生。

[0080] 如本文中所使用的, 抑制 miR 表达的化合物的 “有效量” 是足以在患有癌症和 / 或骨髓增生病症的受试者中抑制细胞的增殖的量。通过考虑因素, 例如受试者的大小和体重、疾病侵入的程度、受试者的年龄、健康和性别、施用的途径以及施用是局部的还是全身性的, 本领域技术人员可容易地确定对给定的受试者施用的抑制 miR 表达的化合物的有效量。

[0081] 本领域技术人员还可容易地确定用于对给定的受试者施用抑制 miR 表达的化合物的合适的给药方案, 如本文所述。用于抑制 miR 基因表达的合适的化合物包括双链 RNA (例如短的或小干扰 RNA 或 “siRNA”)、反义核酸和酶促 RNA 分子例如核酶。这些化合物中的每一种可被靶向给定的 miR 基因产物, 并且干扰靶 miR 基因产物的表达 (例如, 通过抑制翻译, 通过诱导切割和 / 或降解)。

[0082] 例如, 给定的 miR 基因的表达可通过用分离的双链 RNA (“dsRNA”) 分子诱导 miR 基因的 RNA 干扰来抑制, 所述双链 RNA 分子与 miR 基因产物的至少一部分具有至少 90%、例如至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100% 的序列同源性。在特定实施方案中, dsRNA 分子是 “短或小干扰 RNA” 或 “siRNA”。

[0083] 至少一种 miR 基因产物或至少一种用于抑制 miR 表达的化合物的施用将在患有癌症和 / 或骨髓增生病症的受试者中抑制细胞 (例如癌细胞, 展示骨髓增生病症的细胞) 的增殖。如本文中所使用的, “抑制癌细胞或展示骨髓增生病症的细胞的增殖” 是指杀死细胞或永久性暂时地阻止或减缓细胞的生长。如果受试者中所述细胞的数目在施用 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物后保持恒定或减少, 那么可推断细胞增殖被抑制。如果所述细胞的绝对数目增加但肿瘤生长的速度下降, 则也可推断癌细胞或展示骨髓增生病症的细胞增殖被抑制。

[0084] 还可通过任何合适的肠内或胃肠外施用途径对受试者施用 miR 基因产物或 miR 基

因表达抑制化合物。用于本方法的合适的肠内施用途径包括例如口服、直肠或鼻内给药。合适的胃肠外施用途径包括例如血管内给药（例如，静脉内团注（bolus injection）、静脉内输注、动脉内团注、动脉内输注和至脉管系统内的导管滴注）；组织外周（peri-tissue）和组织内注射（例如，肿瘤外周和肿瘤内注射，视网膜内注射或视网膜下注射）；皮下注射或沉积，包括皮下输注（例如通过渗透泵）；对目的组织的直接施用，例如通过导管或其它安置装置（例如，视网膜丸剂（retinal pellet）或栓剂或包含多孔的、无孔的或凝胶状材料的植入物）；以及吸入。特别合适的施用途径是注射、输注和直接注射入肿瘤。

[0085] 可在对受试者施用前，按照本领域已知的技术将 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物配制为药物组合物，有时称为“药剂”。因此，本发明包括用于治疗癌症和 / 或骨髓增生病症的药物组合物。

[0086] 本药物组合物包含与药学上可接受的载体混合的至少一种 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物（或至少一种包含编码 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物的序列的核酸）（例如，按重量计算 0.1 至 90%）或其生理上可接受的盐。在某些实施方案中，本发明的药物组合物另外包含一种或多种抗癌剂（例如，化疗剂）。本发明的药物制剂还可包含由脂质体封装的至少一种 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物（或至少一种包含编码 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物的序列的核酸）和药学上可接受的载体。

[0087] 本发明的药物组合物还可包含常规药物赋形剂和 / 或添加剂。合适的药物赋形剂包括稳定剂、抗氧化剂、重量摩尔渗透压浓度调节剂、缓冲剂和 pH 调节剂。合适的添加剂包括例如生理上生物相容性缓冲剂（例如，氨丁三醇盐酸盐）、螯合剂（例如，DTPA 或 DTPA- 双酰胺）或钙螯合络合物（例如，钙 DTPA、CaNaDTPA- 双酰胺）的添加或任选地，钙或钠盐（例如，氯化钙、抗坏血酸钙、葡萄糖酸钙或乳酸钙）的添加。本发明的药物组合物可以以液体形式包装使用或可以进行冻干。

[0088] 对于本发明的固体药物组合物，可使用常规无毒性的固体的药学上可接受的载体：例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0089] 例如，用于口服施用的固体药物组合物可包含上文所列的任何载体和赋形剂以及 10-95%，优选 25% -75% 的至少一种 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物（或至少一种包含编码它们的序列的核酸）。用于气雾剂（吸入）施用的药物组合物可包含按重量计算 0.01-20%，优选 1% -10% 的封装在上文所述的脂质体中的至少一种 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物（或至少一种包含编码 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物的序列的核酸）和喷射剂。还可如所期望的包含载体例如卵磷脂以用于鼻内递送。

[0090] 本发明的药物组合物还可以包含一种或多种抗癌剂。在一个特定实施方案中，所述组合物包含至少一种 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物（或至少一种包含编码 miR 基因产物或 miR 基因表达抑制化合物的序列的核酸）和至少一种化疗剂。适用于本发明方法的化疗剂包括、但不限于，DNA- 烷化剂，抗肿瘤抗生素，抗代谢剂，微管蛋白稳定剂，微管蛋白去稳定剂，激素拮抗剂，拓扑异构酶抑制剂，蛋白激酶抑制剂，HMG-CoA 抑制剂，CDK 抑制剂，细胞周期蛋白抑制剂，胱天蛋白酶抑制剂，金属蛋白酶抑制剂，反义核酸，三螺旋 DNA，核酸适配体，和分子上修饰的病毒、细菌和外毒素剂。适用于本发明组合物的试剂的实例包括、但不限于，胞苷阿拉伯糖苷，甲氨蝶呤，长春新碱，依托泊苷（VP-16），多柔比

星（阿霉素），顺铂（CDDP），地塞米松，arglabin，环磷酰胺，沙可来新，甲基亚硝脲，氟尿嘧啶，5-氟尿嘧啶（5FU），长春碱，喜树碱，放线菌素-D，丝裂霉素C，过氧化氢，奥沙利铂，伊立替康，托泊替康，亚叶酸，卡莫司汀，链佐星，CPT-11，紫杉酚，他莫昔芬，达卡巴嗪，利妥昔单抗，柔红霉素，1-β-D-阿糖呋喃糖胞嘧啶（1-β-D-arabinofuranosylcytosine），伊马替尼，氟达拉滨，多西他赛和 FOLFOX4。

[0091] 在一个实施方案中，该方法包括给细胞提供受试试剂和测量与癌细胞中减少的表达水平关联的至少一种 miR 基因产物的水平。与合适的对照（例如，对照细胞中 miR 基因产物的水平）相比，细胞中 miR 基因产物水平的增加指示受试试剂为抗癌试剂。

[0092] 合适的试剂包括但不限于药物（例如，小分子、肽）和生物大分子（例如，蛋白质、核酸）。试剂可通过重组、合成产生，或其可从天然来源分离（即，纯化）。用于给细胞提供此类试剂的各种方法（例如，转染）在本领域内是熟知的，并且在上文中描述了几种此类方法。用于检测至少一种 miR 基因产物的表达的方法（例如，Northern 印迹、原位杂交、RT-PCR、表达特征谱分析）在本领域内也是熟知的。本文也描述了几种此类方法。

实施例

[0093] 通过参考下列非限制性实施例可以更好地理解本发明，所述实施例用于举例说明而非限制本发明。

[0094] 本文的数据表明活化的人单核吞噬细胞和 THP-1 细胞释放诱导新鲜分离的单核细胞存活和分化的微泡。不希望受理论束缚，发明人认为，在特定的炎症疾病下，微泡的内容物可以发生改变以迅速诱导应答。数据还表明微泡在人外周血中循环。循环的微泡调控正常的细胞稳态，并且在组织损伤和炎症期间将指示传播至远端细胞。

[0095] 微泡可以用作疾病病因学生物标志物和先天免疫应答的系统性介体。因此，能够通过分离外周血中的微泡（而非通过侵入性方法获得组织）来获得类似的信息是有利的。并且对外周血中微泡的正常特征的了解提供了了解急性炎症事件期间的事件的基础。

[0096] 如本文所示，异常的巨噬细胞分化促成免疫稳态的破坏。因为 GM-CSF 或 M-CSF 诱导单核细胞成熟，因此本发明人开始研究以了解 GM-CSF 和 M-CSF 介导的分化之间的机制和差异。应答 GM-CSF 而非 M-CSF 的分化的定向（commitment）是快速和不可逆的（数据未显示）。连续的 GM-CSF 刺激并非是该效应所必需的，因为仅 4 个小时的处理即可诱导巨噬细胞分化。在用作巨噬细胞分化的模型的 PMA 处理的 THP1 细胞中获得相似的结果。

[0097] 因此，发明人确定，在诱导分化后分泌至少一种因子，其保持信号或者活化其他细胞以进行分化。因此，将单核细胞或 THP1 细胞分别暴露于 GM-CSF 4 小时或暴露于 PMA 1 小时，然后清洗所述细胞并且将其置于不具有刺激物的基本培养基中。24 小时后，收集培养上清液并且将其添加到未分化的单核细胞或 THP1 细胞中。特别地，来自 PMA 处理的 THP1 细胞或 GM-CSF 处理的单核细胞的上清液使单核细胞和 THP1 细胞分化（数据未显示）。

[0098] 通过使用 Bioplex 悬浮液阵列系统检测培养上清液中多达 27 种的不同的细胞因子，发明人未能检测到负责的细胞因子。由于发明人用 GM-CSF 刺激的单核细胞的上清液使不依赖于生长因子的 THP1 细胞系分化，发明人推断细胞因子 / 生长因子不负责该效应。接着发明人研究微泡被分泌到培养上清液中以介导骨髓成熟的可能性。

[0099] 如图 1 所示，与未经处理的单核细胞（浅色点）相比，用 GM-CSF 处理 24 小时的单

核细胞在培养上清液中释放显著数目的微泡（深色点）。

[0100] 类似地，PMA 处理的 THP1 细胞也在分化期间分泌微泡（数据未显示）。特别地，图 1 显示来自巨噬细胞的微泡的释放诱导的分化。外周血单核细胞 (PBM) 未经处理（浅色）或用 GM-CSF 处理（深色）24 小时。收集无细胞的上清液并且进行超速离心。在 PBS 中重悬小泡并且用流式细胞术分析大小。分析前，用 2 μ m 标准珠校准 FSS 和 SSC 参数（未显示）。显示的是来自三个不同的供体的代表性数据。

[0101] 纯化来自 PMA 处理的 THP1 细胞的微泡并且将其添加到新鲜分离的单核细胞或者未分化的 THP1 细胞。单独的微泡在两个细胞种类中诱导巨噬细胞分化，如通过形态学（参见图 2A-2C）和表面抗原的表达（数据未显示）所表明的。

[0102] 已分析这些微泡的内容物。发明人检测到，来自 PMA 处理的 THP1 细胞的微泡中存在 miRNA（数据未显示）。

[0103] 发明人还评估正常志愿者的外周血中循环的微泡和 miRNA。基于大小，发明人在循环中发现三个亚群的微泡（图 3A）。用检测甘露糖受体 (CD206) 和 MHC II 的抗体检测到巨噬细胞衍生的微泡（图 3B）。基于 CD206 或者 MHCII 的表达，血浆中大约 40% 的总微泡（门控区域）来源于巨噬细胞（图 3C）。

[0104] 发明人进一步确定外周血微泡中是否包含 miRNA。我们检测到很多 miRNA 的表达。检测到的表达最高的 miRNA 在展示表 III 的图 8 中显示 ($n = 51$)。

[0105] 特别地，在外周血中未检测到 miR-146，而 miR-155 的表达比表达最高的 miRNA 低 80 倍。因为 miR-146 和 miR-155 在我们的 IPF 患者样品中都升高，但在来自正常供体的外周血中低至不可检测，因此循环的 miRNA 的检查可以用作疾病的生物标志物。

[0106] 本文现表明，循环的微泡包含 miRNA 而且循环的微泡可以提供 miRNA 途径以引发细胞间联系。微泡中的 miRNA 还可以提供对疾病的遗传基础的了解并且可以用作预测性生物标志物。

[0107] 巨噬细胞分化期间释放的微泡还可以介导未成熟的细胞成熟。在巨噬细胞成熟期间收集的微泡介导人单核细胞的分化和存活并且包含 RNA。miRNA 和经加工的 mRNA 负责给予未成熟细胞的成熟信号。

[0108] 实施例 - 血浆

[0109] 从正常健康个体的血浆分离微泡。从微泡和匹配的单核细胞分离 RNA 并且通过实时 PCR 分析 420 个已知的成熟 miRNA 的特征谱。数据集的层次聚类分析表明外周血单核细胞 (PBMC) 和血浆微泡之间的 miRNA 表达的显著差异。

[0110] 我们在微泡和 PBMC 中分别观察到显著表达的 104 和 75 种 miRNA。特别地，与 PBMC 相比，33 种 miRNA 在微泡中特异性表达。对 miRNA 进行计算机建模以确定受检测到的 miRNA 调控的生物学途径。预测在来自血液的微泡中表达的大多数微 RNA 调控血细胞的细胞分化和代谢途径。有趣地，预测选择的几个微 RNA 为免疫功能的重要调谐子。

[0111] 该实施例首次鉴定和定义正常受试者的循环的血浆微泡中的 miRNA 表达。

[0112] 最近的证据显示，可通过外来体 (exosome) 介导的转移实现细胞之间的 mRNA 和 miRNA 的遗传交换 (PMID:17486113)。微泡是由正常健康的或损伤的细胞类型释放的内吞来源的小的外来体 / 小泡 (PMID:17337785, PMID:17409393, PMID:16791265)。微泡从质膜排入细胞外环境中以促进细胞间的联系。尽管尺寸较小 (50nm 至 1 μ m)，微泡富含生

物活性分子并且推测包含核酸和 / 或蛋白 ; 这些细胞颗粒在生长、分化和癌症进程中起作用 (PMID :16453000)。在外周血中, 三分之二的微泡来源于血小板。源于血小板的微泡在血管发生和癌症 (例如肺癌) 的转移性扩散中起作用 (PMID :15499615)。当调制造血、内皮和单核细胞中的基因表达时, 源于血小板的微泡诱导免疫应答 (PMID :17378242, PMID :17127485)。

[0113] 有趣地, 最近已经确定微泡和 miRNA 之间的关系。最近, Valadi 和同事报道, 从人和鼠的肥大细胞系释放的小泡包含多于 1200 种的 mRNA 和大约 121 种 miRNA 分子 (PMID :17486113)。相反, 本发明涉及天然发生的包含微 RNA 的人血浆和血液微泡, 其导致离体生物学作用。

[0114] 图 8- 表 I 显示在人类疾病 (包括癌症和非癌症) 中重要的微 RNA。与疾病组织中增加的表达相关但在人血浆微泡中通常表达低或不可检测的微 RNA 分子 (表 I, 示于图 6 中) 提供了确定健康和疾病中的变化的可能并且可能是有效的生物标志物 (粗体, 增加表达栏)。类似地, 通常丰富的微 RNA 可能在人血浆微泡中减少, 从而反映组织中观察到的减少 (粗体, 减少表达栏)。

[0115] 相当多的证据证明作为人遗传系统的不可缺少的基石的 miRNA 的重要性。使用微泡来转移遗传物质将是人体内有效的转移方法。miRNA 的微泡运输将使得能够远距离联系。

[0116] 方法

[0117] 血液收集和微泡分离。在告知同意后, 在 EDTA 管中收集来自 24 个女性和 27 个男性健康的不吸烟的高加索人 (Caucasian) 供体的外周血 (40cc)。在早晨和下午初期之间收集血液。女性供体的中值年龄是 29 岁, 男性供体也是。如之前所述, 用无菌的低内毒素的 PBS 1 : 1 稀释外周血, 在 ficoll-hypaque 上分层 ($d = 1.077$), 和进行离心 (PMID :16931806)。在 PBS 中清洗单核细胞级分一次。从血浆中纯化微泡。简单来说, 通过以 160,000xg 在 4°C 下离心 1 小时来浓缩微泡 (PMID :10648405)。

[0118] RNA 提取。通过 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提取法分离总 RNA。为了增加小 RNA 的得率, 过夜沉淀 RNA。通过在 Agilent 2100Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc Santa Clara, CA) 上进行毛细管电泳来确定 RNA 浓度和 RNA 完整性。对于分离自单核细胞的 RNA, 仅使用 RNA 完整性指数 (RNA integrity number, RIN) ≥ 9 。因为完整的 18s 和 28s rRNA 在微泡中是可变的, 因此 RIN 不是对这些样品的限制。

[0119] 通过定量 PCR 进行的 miRNA 特征谱分析。通过实时 PCR 分析 420 种成熟人 miRNA 的表达的特征谱。通过用 420 种已知的人成熟 miRNA 的环引物的混合物作为引物 (Mega Plex 试剂盒, Applied Biosystems, Foster City, CA), 用之前公开的逆转录条件将 RNA (50ng) 转变为 cDNA (PMID :18158130)。因为微泡中没有已知的对照 miRNA, 检验几种内部对照。内部对照小核仁 (sno)RNA U38B, snoRNA U43, 小核 (sn)RNA U6 以及 18S 和 5S rRNA 的引物包含于引物的混合物中。

[0120] 用配备有 384 孔反应板的 Applied Biosystems 7900HT 实时 PCR 仪分析表达的特征谱。液体操作自动仪 (Liquid-handling robot) 和 Zymak Twister 自动仪用于增加通量和减少误差。使用标准条件进行实时 PCR。

[0121] 流式细胞术。外周血微泡直接在血浆中进行免疫染色而不经离心浓缩。为了确定细胞来源, 每组抗体免疫染色 0.5cc 血浆。组 I 包含识别 CD66b-FITC (嗜中性粒细胞),

CD202b(Tie2)-PE(内皮细胞), CD206PE-Cy5(巨噬细胞/树突细胞), CD79a-APC(B细胞)和 CD14Pe-Cy7(单核细胞)的抗体。组 II 包含抗 CD41a-PE-Cy5(血小板), CCR2-APC(单核细胞), CCR3-PE(树突细胞), CCR5-PE-Cy7(巨噬细胞)和 CD3-Alexa 610(T细胞)的抗体。组 III 包含同种型对照抗体。用 BD Aria 流式细胞仪(BD Biosciences San Jose, CA)分析样品。数据表达为门控细胞的百分比。

[0122] 统计分析。为了减少背景噪声,在数据分析期间,其中 80%的个体观察结果具有大于 35 的原始 CT 得分的 miRNA 不予考虑。在血浆微泡中,内部对照(18S、5S、snoRNA U38B、snoRNA U43 和 snRNA U6)是高度可变的,并且与外周血单核细胞(PBMC)相比,在血浆微泡中表达水平显著不同。

[0123] 因此,为了减少由将特定 miRNA 用作标准化校正因子引起的偏差并且为了减少 RT-PCR 阵列间的样品变异,基于其相对表达(相对于各个阵列上的总体 miRNA 表达,使用中值标准化分析)比较血浆微泡和 PBMC 之间的 miRNA (PMID:16854228)。通过控制供体的性别和年龄,线性混合模型用于评估血浆微泡和 PBMC 之间的特定 miRNA 的差异。基于评估的均值差异计算倍数变化。

[0124] 用通过针对各个组织的过滤标准的 miRNA 产生热图并且基于 miRNA 的相对平均表达,对 miRNA 层次聚类。还基于血浆微泡和 PBMC 的 miRNA 的原始 CT 得分,对 miRNA 表达进行排列。进行另外的统计分析(例如 ANOVA)以确定在两个处理组之间显著表达的 miRNA。

[0125] 途径分析和预测。用 miRanda(microrna.sanger.ac.uk/targets/v5/)确定预测的 miRNA 靶。基于 miRanda 算法,产生各个靶的得分,仅大于 17 的得分进一步用 Ingenuity Pathway Analysis 软件(Ingenuity Systems, Redwood City, CA)分析。使用该软件,基于 miRNA 的靶确定经典途径。检查数据集以基于 miRNA 的靶的基因本体(ontology)确定相关的途径。

[0126] 结果

[0127] 外周血微泡亚群

[0128] 最初,我们检查正常健康个体的外周血内的微泡的细胞来源。使用流式细胞术,我们发现大多数外周血微泡源于血小板(图 4),如之前报道的(PMID:10648405)。

[0129] 我们还观察到第二大的微泡群体,其来源于单核细胞吞噬细胞谱系。用检测单核吞噬细胞上的表面抗原的抗体对该群体免疫染色。特别地,仅小百分比的外周血微泡来源于 T-细胞和嗜中性粒细胞。我们未能检测到来源于 B 细胞的微泡(数据未显示)。有趣的是,我们检测到表达来自内皮细胞的表面抗原的小的微泡亚群。

[0130] 血浆微泡和 PBMC 中的 miRNA 表达

[0131] 为了检测外周血内的微泡区室中是否包含 miRNA 以使得能够在体内的不同组织之间进行联系和影响遗传变化,我们对来自血浆的纯化的微泡进行 miRNA 特征谱分析。我们分析来自 51 个不吸烟的健康个体(包括 27 个男性和 24 个女性)的微泡的所有亚群。为了确定微泡和 PBMC 之间的 miRNA 表达是否存在差异,我们还从各个供体纯化了 PBMC。进行实时 PCR 分析以检查 420 种 miRNA 的表达。对过滤的数据进行层次聚类分析,比较 PBMC 和血浆样品之间的 miRNA 表达特征谱(图 5A)。

[0132] 除了三种以外的所有 PBMC 样品与微泡样品分别聚类,表明两组之间的 miRNA 表达特征谱显著不同。基于减少背景噪声的过滤标准,我们发现微泡和 PBMC 样品中分别表达

104 种和 75 种 miRNA(图 5B 和 5C)。

[0133] 在这些 miRNA 中,71 种是各个样品组共有的(图 5D)。特别地,仅两种 miRNA, miR-031 和 29c 仅在 PBMC 样品中表达,而四种 miRNA(miR-127、-134、-485-5p 和 -432)仅在血浆级分中表达。显示了通常在血浆中表达的所有 104 种 miRNA(表 II,在图 7 中显示)。

[0134] 年龄和性别的影响

[0135] 我们在任一样品组的 miRNA 表达中没有观察到年龄和/或性别的影响。特别地,女性和男性供体的中值年龄都是 29 岁。最年长的个体是 58 岁,而最年轻的是 21 岁。因此,我们进一步对数据分层以检查差异。年龄匹配的样品之间的检查没有显示对 PBMC 和微泡样品之间的 miRNA 表达的任何显著的影响。当控制性别时,我们还将上四分位年龄与下四分位年龄相比,各个组的平均年龄分别为 48.9 ± 6.2 和 21.9 ± 1.2 。然而,我们未能检测到基于年龄的样品组之间的 miRNA 表达的显著差异(数据未显示)。

[0136] 微泡和 PBMC 中的 miRNA 表达的比较

[0137] 表 III,图 8 中显示的是来自所有个体的血浆微泡和 PBMC 中表达前十的 miRNA。对于血浆来说,表达前十的 miRNA 以递减的顺序为 miR-223、-484、-191、-146a、-016、-026a、-222、-024、-126 和 -32。而 PBMC 中高表达的是 miR-223、-150、-146b、-016、-484、-146a、-191、-026a、-019b 和 -020a。微泡中表达前十的 miRNA 在 100% 的个体中被检测到。然而,在 PBMC 样品中,在 100% 的个体中观察到除 miR-150(98% 的供体)和 miR-484(89% 的供体)外的所有表达前十的 miRNA。

[0138] 我们还发现 PBMC 和微泡的表达前十的 miR 中共有六种 miR(miR-223、miR-484、miR-191、miR-146a、miR-26a 和 miR-16)。特别地,在两个区室中最显著表达的 miR 都是 miR-223。基于各个单独供体的排序分析,确定特定 miRNA 出现在表达前十的 miRNA 中的频率,miR-223 在 PBMC 和微泡中的频率为 100%。尽管 miR-486 的表达是血浆微泡中表达前十的 miRNA,但发现该 miRNA 仅在 20% 的个体特征谱中是表达前十。有趣地,在血浆微泡中高表达的 miRNA 未被鉴定为组织特异性 miR。

[0139] 我们进一步检查微泡和 PBMC 中分别具有大于 $> 66\%$ 和 $> 88\%$ 的任意值的排序评分(数据集的天然截断值)的 miR 的集体功能(collective function)。基于该标准,我们进一步检查来自微泡和 PBMC 样品的排在前 9 的 miR。因此,我们分析血浆中发现的 miR-223、-484、-191、-146a、-016、-026a、-222、-024、和 -126 的组合的功能。对于 PBMC,我们检查下列 miRNA 的组合的功能,miR-223、-150、-146b、-016、-484、-146a、-191、-026a 和 -019b。使用 Sanger miRBase Target 版本 5,我们发现血浆微泡的组合的 miR 的 1578 个预测的靶(数据未显示)。计算机分析这些组合的靶以确定它们集体调控的途径。使用 Ingenuity Pathway Analysis(IPA)软件,我们发现参与代谢和获得性免疫系统的调控的经典途径受这些显示的 miRNA 的表达高度调控(表 IV,示于图 9 中,上部)。

[0140] 在检查的来自 PBMC 级分的 9 种 miRNA 中,我们发现了 1857 个预测的 mRNA 靶(数据未显示)。最后,由这些 miRNA 调控的前五的经典途径特别地是多种氨基酸和脂质代谢途径(表 IV,示于图 9 中,上部)。我们还从 Sanger miRBase 和 TargetScan 中发现了共有的预测的靶并且确定了它们的功能(表 IV,示于图 9 中,下部)。

[0141] 然后我们检查了在微泡和 PBMC 之间差异表达的 miRNA。我们发现 20 种 miRNA 在 PBMC 级分中与微泡样品相比具有三倍以上表达增加(表 V,示于图 10)。相比之下,与

PBMC 相比,15 种 miRNA 在血浆微泡中显著表达。

[0142] 图 11:表 VI 显示在 PBMC 和血浆中表达的所有 miRNA(检测器名称)的平均的标准化的数据及各自的标准差。

[0143] 讨论

[0144] 在这些实施例中,发明人现表明 miR 在正常稳态条件下在外周血的微泡中循环。此处,我们显示了 104 种在血浆微泡中表达的 miR 并且 miR 表达显著不同于 PBMC。到目前为止,大量的研究显示了 miR 调节许多细胞功能的能力。然而,这些研究大多暗含,miR 处于其宿主细胞内以引起作用(PMID:17923084)。我们的数据表明,微泡中包含的 miRNA 可能是至远端细胞的联系信号以调节细胞稳态。

[0145] 微泡中的这些 miRNA 可循环至不同的组织靶。血浆微泡中表达最高的 miRNA 的进一步检查证实很多这些功能调控造血和细胞分化程序(表 III,示于图 8)。例如,miR-223 的表达调控骨髓、粒细胞和破骨细胞的分化(PMID:18278031, PMID:17471500, PMID:16325577)。其还显示在造血干细胞增殖中起作用(PMID:18278031)。有趣地,miR-223 在急性髓性白血病(AML)中丧失(PMID:18056805)。相反,miR-126 的下调在巨核细胞分化期间发生(PMID:16549775)。特别地,miR-24 的表达受 TGF- β (其为造血的有效的正和负调节子)调控(PMID:16123808, PMID:18353861)。在微泡中表达的 miR-24 和 miR-16 都调控红细胞产生(PMID:17906079, PMID:17976518),而 miR-16 还调节淋巴发育(PMID:16616063)。miR-16 表达的丧失已在慢性淋巴细胞性白血病(CLL)中得到广泛验证(PMID:17327404, PMID:17351108)。

[0146] 血浆微泡中表达的许多 miR 还调控细胞周期蛋白的进程(PMID:18365017, PMID:17914108)。MiR-222 靶向 p27Kipl(PMID:17914108)而 miR-24 抑制 p16(INK4a)(PMID:18365017)。miR-16 的增加的表达导致细胞在细胞周期的 G0/G1 期积累(PMID:16123808)。相反,乳腺癌细胞中 miR-126 的表达增加细胞增殖和肿瘤生长但抑制转移(PMID:18185580)。这通过血管细胞粘附分子-1(VCAM1)的调控发生(PMID:18227515)。

[0147] 与在血浆微泡中高表达的其他 miR 不同,miR-146a 显示在不同的水平上发挥作用。虽然已表明 miR-146a 作为肿瘤抑制因子起作用并且该 miR 的丧失与前列腺癌的发展相关(PMID:18174313),miR-146a 还调节免疫功能(PMID:16885212, PMID:18057241)。可能该 miR 在血浆微泡中的表达定义免疫调节功能(表 IV,示于图 9)。

[0148] 基于检查靶的基因本体的 IPA 分析,预测受 miR-146a 表达影响的最相关网络是细胞增殖,免疫和淋巴系统发育和功能。另外,预测该 miR 调控先天免疫应答。根据上述分析,我们发现 LPS/IL-1 和 toll 样受体信号传导是预测受 miR-146a 调控的前五的经典途径之一。

[0149] 到目前为止,还不清楚 miR-484 或 miR-486 的功能。与 miR-146a 相似,miR-484 和 miR-486 似乎作为免疫应答性的调节子起作用。特别地,基于相对表达,miR-484 是微泡级分中第二高表达的 miR。预测模型表明该 miR 具有多种功能。与微泡中表达的很多其他 miR 一样,预测 miR-484 调控造血作用。特别地,预测 NK 细胞信号传导和 IL-4 信号传导途径是 miR-484 的靶,而 miR-486 调控抗原呈递。此外,miR-486 显示调控细胞分化、增殖和生长。

[0150] 虽然我们在血浆微泡中检测到 104 种 miR,但存在许多在总 miR 特征谱中检测不

到的 miR。血浆微泡中检测不到的 miR 也可用作疾病的生物标志物。最近, Lawrie 等报道, 在患有 B 细胞淋巴瘤的患者的血浆中检测到 miR (PMID :18318758)。该研究表明 miR-155、miR-210 和 miR-21 在来自这些患者的血浆中升高并且 miR-21 与复发有关。基于该研究, 我们在正常个体中检测到 miR-155 和 miR-21, 但没有发现 miR-210。有趣地, 我们发现 75% 的个体在血浆中表达 miR-155 而 60% 表达 miR-21 (数据未显示)。

[0151] 因此, 对于待用作疾病的预测标志物的这些 miR, 每个个体在疾病检测前将需要基线。因此, miR-210 的表达可用作 B 细胞淋巴瘤的较好的标志物。可以存在另外的关系。例如, miR-203 在血浆微泡中检测不到。该 miR 的升高的表达与膀胱癌和结肠腺癌有关并因此可以用作生物标志物 (PMID :18230780, PMID :17826655)。

[0152] 对于在正常情况下表达而在疾病情况下丧失的血浆 miR 来说, 可存在相反的关系。例如, 在急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 中, miR-223 下调 (PMID :18056805)。因为 miR-223 是血浆微泡中表达的最显著的 miR, 其减少的表达可用作 ALL 的诊断标志物。此外, miR-15a/16 在慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 中丧失或下调 (PMID :18362358)。然而我们发现 miR-16 在检查的所有健康个体中表达, miR-15a 仅在 44% 的进行特征谱分析的个体中表达 (数据未显示)。

[0153] 有趣的是, 我们在正常个体的血液中没有检测到组织特异性 miRNA (PMID :18025253)。来自正常个体的大多数微泡来源于血细胞。我们的确检测到少量百分比的微泡来源于内皮细胞。内皮细胞损伤后, 源于内皮细胞的微泡可能增加。同样地, 在组织损伤时, 在外周血中检测到组织特异性 miR 和微泡可能是频繁的事件。因为肿瘤产生微泡 (PMID :16283305), 因此这些微泡可以在外周血中检测到。

[0154] 虽然已报道在血浆中检测到 miR (PMID :18318758), 但本文是表征来自血浆的所有已知 miR 的最早的研究。在该研究中, 我们将种族作为因素进行控制。

[0155] 检测外周体液和 / 或血液中 miR 水平的存在、缺失或变化可以用作生物标志物以检查多种疾病、鉴定独特的 miRNA 特征谱和预测疾病。包含在微泡中的循环的 miR 在调控血细胞的稳态生产以及代谢功能中具有重要功能。

[0156] 未明确通过引用并入的本文引述的所有出版物的相关教导以其全文通过引用并入本文。尽管已通过优选实施方案详细地显示和描述了本发明, 但本领域技术人员将理解其中可进行形式和细节上的各种变化, 而不背离所附权利要求包括的本发明的范围。

[0157] 虽然已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。因此, 本发明不意欲限定于本文中公开的预期用于进行本发明的特定实施方案, 而是意欲包括落在权利要求的范围内的所有实施方案。

[0158] 目的 mi R 在公共数据库中列出。在某些优选实施方案中, 公共数据库可以是由 Sanger Institute 提供的重要储库 [www.http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/](http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/), 将 miR 序列提交至该库以进行命名和系统命名分配 (nomenclature assignment), 并且将所述序列置于数据库中以进行存档和用于经由万维网的联机检索。通常, 由 Sanger Institute 收集的关于 miR 序列的数据包括物种, 来源, 相应的基因组序列和基因组位置 (染色体坐标), 以及全长转录产物和成熟的完全加工的 miRNA (具有 5' 末端磷酸基团的 miRNA) 的序

列。另一个数据库可以是 GenBank 数据库,其可通过 NationalCenter for Biotechnology Information(NCBI) 网址访问,并且由 National Institutes of Health 和 National Library of Medicine 维护。这些数据库通过引用完全并入本文。

[0159]

miR * 低水平的,功能未知的生物生成副产物	miRBase 成熟序列登录号 #	成熟序列	SEQ ID NO
hsa-let-7a*	MIMAT0004481	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	1
hsa-let-7a-1	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	2
hsa-let-7a-2	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	3
hsa-let-7a-3	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	4
hsa-let-7b	MIMAT0000063	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	5
hsa-let-7b*	MIMAT0004482	CUAUACAACCUACUGCCUCCCC	6
hsa-let-7c	MIMAT0000064	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	7
hsa-let-7c*	MIMAT0004483	UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA	8
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	9
hsa-let-7d*	MIMAT0004484	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU	10
hsa-let-7e	MIMAT0000066	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	11
hsa-let-7e*	MIMAT0004485	CUAUACGGCCUCCUAGCUUCC	12
hsa-let-7f-1	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	13
hsa-let-7f-1*	MIMAT0004486	CUAUACAAUCUAUUGCCUCCCC	14
hsa-let-7f-2	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	15
hsa-let-7f-2*	MIMAT0004487	CUAUACAGUCUACUGUCUUUCC	16
hsa-let-7g	MIMAT0000414	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	17
hsa-let-7g*	MIMAT0004584	CUGUACAGGCCACUGCCUUGC	18
hsa-let-7i	MIMAT0000415	UGAGGUAGUAGUUUGUGUGUU	19

hsa-let-7i*	MIMAT0004585	CUGC GCAAGCUACUGCCUUGCU	20
hsa-mir-009-1	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	21
hsa-mir-009-1*	MIMAT0000442	AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU	22
hsa-mir-009-2	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
hsa-mir-009-3	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	24
hsa-mir-010a	MIMAT0000253	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	25
hsa-mir-010a*	MIMAT0004555	CAAAUUCGUUUCUAGGGGAAUA	26
hsa-mir-015a	MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	27
hsa-mir-015b	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUAACA	28
hsa-mir-015b*	MIMAT0004586	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCUA	29
hsa-mir-016-1	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAUUUUUGGCG	30
hsa-mir-016-1*	MIMAT0004489	CCAGUAUUUACUGUGCUGCUGA	31
hsa-mir-016-2	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAUUUUUGGCG	32
hsa-mir-016-2*	MIMAT0004518	CCAAUUAUUACUGUGCUGCUUA	33
hsa-mir-017-3-p	MIMAT0000071	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	34
hsa-mir-017-5-p	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	35
hsa-mir-018a	MIMAT0000072	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	36
hsa-mir-018a*	MIMAT0002891	ACUGCCCUAAGUGCUCUUCUGG	37
hsa-mir-019a	MIMAT0000073	UGUGCAAUCUAUGCAAAACUGA	38
hsa-mir-019b-1	MIMAT0000074	UGUGCAAUCCAUGCAAAACUGA	39
hsa-mir-019b-1*	MIMAT0004491	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	40
hsa-mir-019b-2	MIMAT0000074	UGUGCAAUCCAUGCAAAACUGA	41

[0160]

hsa-mir-019b-2*	MIMAT0004492	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCA	42
-----------------	--------------	------------------------	----

hsa-mir-020a	MIMAT0000075	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	43
hsa-mir-020a*	MIMAT0004493	ACUGCAUUAUGAGCACUAAAAG	44
hsa-mir-020b	MIMAT0001413	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	45
hsa-mir-021	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	46
hsa-mir-021*	MIMAT0004494	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	47
hsa-mir-023a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	48
hsa-mir-023a*	MIMAT0004496	GGGGUCCUGGGGAUGGGAUUU	49
hsa-mir-023b	MIMAT0004587	UGGGUCCUGGCAUGCUGAUUU	50
hsa-mir-024-1	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	51
hsa-mir-024-1*	MIMAT0000079	UGCCUACUGAGCUGAUUCAGU	52
hsa-mir-024-2	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	53
hsa-mir-024-2*	MIMAT0004497	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG	54
hsa-mir-025	MIMAT0000081	CAUUGCACUUGUCUGGUCUGA	55
hsa-mir-025*	MIMAT0004498	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG	56
hsa-mir-026a-1	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	57
hsa-mir-026a-1*	MIMAT0004499	CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG	58
hsa-mir-026a-2	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	59
hsa-mir-026a-2*	MIMAT0004681	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	60
hsa-mir-026b	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGU	61
hsa-mir-026b*	MIMAT0004500	CCUGUUCUCAUACUUGGCUC	62
hsa-mir-027a	MIMAT0000084	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	63
hsa-mir-027a*	MIMAT0004501	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	64
hsa-mir-027b	MIMAT0000419	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	65
hsa-mir-027b*	MIMAT0004588	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	66

hsa-mir-028-3p	MIMAT0004502	CACUAGAUUGAGCUCUCCUGGA	67
hsa-mir-028-5p	MIMAT0000085	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	68
hsa-mir-029a	MIMAT0000086	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	69
hsa-mir-029a*	MIMAT0004503	ACUGAUUUUUUGGUGUUCAG	70
hsa-mir-029b-1	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	71
hsa-mir-029b-1*	MIMAT0004514	GCUGGUUUCAUUGGUGUUAGA	72
hsa-mir-029b-2	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	73
hsa-mir-029b-2*	MIMAT0004515	CUGGUUUCACAUGGUGGUUAG	74
hsa-mir-029b-3	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	75
hsa-mir-029c	MIMAT0000681	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	76
hsa-mir-030a	MIMAT0000087	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG	77
hsa-mir-030a*	MIMAT0000088	CUUUCAGUCGGAUGUUUCAGGC	78
hsa-mir-030b	MIMAT0000420	UGUAAACAUCUACACUCAGCU	79
hsa-mir-030b*	MIMAT0004589	CUGGGAGGUGGAUGUUACUUC	80
hsa-mir-030c-1	MIMAT0000244	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC	81
hsa-mir-030c-2	MIMAT0000244	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC	82
hsa-mir-030c-2*	MIMAT0004550	CUGGGAGAAGGCUGUUACUCU	83
hsa-mir-030d	MIMAT0000245	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG	84
hsa-mir-030d*	MIMAT0004551	CUUUCAGUCAGAUGUUUCUGC	85
hsa-mir-031	MIMAT0000089	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	86
hsa-mir-031*	MIMAT0004504	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU	87

[0161]

hsa-mir-032	MIMAT0000090	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA	88
hsa-mir-032*	MIMAT0004505	CAUUUAGUGUGUGAUUUU	89

hsa-mir-034a	MIMAT0000255	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	90
hsa-mir-034a*	MIMAT0004557	CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU	91
hsa-mir-092a-1	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	92
hsa-mir-092a-1*	MIMAT0004507	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU	93
hsa-mir-093	MIMAT0000093	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	94
hsa-mir-093*	MIMAT0004509	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCCG	95
hsa-mir-095	MIMAT0000094	UUCAACGGGUAUUUAUUGAGCA	96
hsa-mir-096	MIMAT0000095	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	97
hsa-mir-096*	MIMAT0004510	AAUCAUGUGCAGUGCCAAUAUG	98
hsa-mir-098	MIMAT0000096	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	99
hsa-mir-099b	MIMAT0000689	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	100
hsa-mir-099b*	MIMAT0004678	CAAGCUCGUGUCUGGGUCCG	101
hsa-mir-100	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCGGAACUUGUG	102
hsa-mir-100*	MIMAT0004512	CAAGCUUGUAUCUAUAGGUAUG	103
hsa-mir-103-1	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	104
hsa-mir-103-2	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	105
hsa-mir-105-1	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	106
hsa-mir-105-1*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	107
hsa-mir-105-2	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	108
hsa-mir-105-2*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	109
hsa-mir-106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCUCUACAGUGCAGGUAG	110
hsa-mir-106a*	MIMAT0004517	CUGCAAUGUAAGCACUUCUAC	111
hsa-mir-106b	MIMAT0000680	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	112
hsa-mir-106b*	MIMAT0004672	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC	113

hsa-mir-107	MIMAT0000104	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUA	114
hsa-mir-122	MIMAT0000421	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	115
hsa-mir-122*	MIMAT0004590	AACGCCAUUAUCACACUAAAUA	116
hsa-mir-125a-3p	MIMAT0004602	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC	117
hsa-mir-125a-5p	MIMAT0000443	UCCCUGAGACCCUUUAACCUUGUGA	118
hsa-mir-125b-1	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAAACUUGUGA	119
hsa-mir-125b-1*	MIMAT0004592	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	120
hsa-mir-125b-2	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAAACUUGUGA	121
hsa-mir-125b-2*	MIMAT0004603	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	122
hsa-mir-126	MIMAT0000445	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	123
hsa-mir-126*	MIMAT0000444	CAUUUUUACUUUUGGUACGCG	124
hsa-mir-127-3p	MIMAT0000446	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	125
hsa-mir-127-5p	MIMAT0004604	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU	126
hsa-mir-128-1	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	127
hsa-mir-128-2	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	128
hsa-mir-130a	MIMAT0000425	CAGUGCAAUGUUAAGGGCAU	129
hsa-mir-130a*	MIMAT0004593	UUCACAUUGUGCUACUGUCUGC	130
hsa-mir-130b	MIMAT0000691	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	131
hsa-mir-130b*	MIMAT0004680	ACUCUUCCCUGUUGCACUAC	132
hsa-mir-132	MIMAT0000426	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	133

[0162]

hsa-mir-132*	MIMAT0004594	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU	134
hsa-mir-133a-1	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	135
hsa-mir-133a-2	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	136

hsa-mir-133b	MIMAT0000770	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA	137
hsa-mir-134	MIMAT0000447	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	138
hsa-mir-135b	MIMAT0000758	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA	139
hsa-mir-135b*	MIMAT0004698	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG	140
hsa-mir-140-3p	MIMAT0004597	UACCACAGGGUAGAACCACGG	141
hsa-mir-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	142
hsa-mir-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	143
hsa-mir-142-5p	MIMAT0000433	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	144
hsa-mir-143	MIMAT0000435	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	145
hsa-mir-143*	MIMAT0004599	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU	146
hsa-mir-145	MIMAT0000437	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	147
hsa-mir-145*	MIMAT0004601	GGAUUCCUGGAAAUACUGUUCU	148
hsa-mir-146a	MIMAT0000449	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	149
hsa-mir-146a*	MIMAT0004608	CCUCUGAAAUCAGUUCUUCAG	150
hsa-mir-146b-3p	MIMAT0004766	UGCCCUGUGGACUCAGUUCUGG	151
hsa-mir-146b-5p	MIMAT0002809	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU	152
hsa-mir-147	MIMAT0000251	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC	153
hsa-mir-148a	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	154
hsa-mir-148a*	MIMAT0004549	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU	155
hsa-mir-148b	MIMAT0000759	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	156
hsa-mir-148b*	MIMAT0004699	AAGUUCUGUUAUACACUCAGGC	157
hsa-mir-149	MIMAT0000450	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	158
hsa-mir-149*	MIMAT0004609	AGGGAGGGACGGGGCUGUGC	159
hsa-mir-150	MIMAT0000451	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	160

hsa-mir-150*	MIMAT0004610	CUGGUACAGGCCUGGGGACAG	161
hsa-mir-151-3p	MIMAT0000757	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	162
hsa-mir-151-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	163
hsa-mir-155	MIMAT0000646	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	164
hsa-mir-155*	MIMAT0004658	CUCCUACAUAUUAGCAUUAACA	165
hsa-mir-181a-1	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	166
hsa-mir-181a-1*	MIMAT0000270	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	167
hsa-mir-181a-2	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	168
hsa-mir-181a-2*	MIMAT0004558	ACCACUGACCGUUGACUGUACC	169
hsa-mir-181b-1	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	170
hsa-mir-181b-2	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	171
hsa-mir-181d	MIMAT0002821	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	172
hsa-mir-182	MIMAT0000259	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	173
hsa-mir-182*	MIMAT0000260	UGGUUCUAGACUUGCCAACUA	174
hsa-mir-183	MIMAT0000261	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	175
hsa-mir-183*	MIMAT0004560	GUGAAUUACCGAAGGGCCAUA	176
hsa-mir-185	MIMAT0000455	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA	177
hsa-mir-185*	MIMAT0004611	AGGGGCUGGCUUCCUCUGGUC	178
hsa-mir-186	MIMAT0000456	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	179

[0163]

hsa-mir-186*	MIMAT0004612	GCCCAAAGGUGAAUUUUUGGG	180
hsa-mir-190	MIMAT0000458	UGAU AUGUUUGAUUAUUAGGU	181
hsa-mir-191	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	182
hsa-mir-191*	MIMAT0001618	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC	183

hsa-mir-192	MIMAT0000222	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	184
hsa-mir-192*	MIMAT0004543	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG	185
hsa-mir-193a-3p	MIMAT0000459	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	186
hsa-mir-193a-5p	MIMAT0004614	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	187
hsa-mir-193b	MIMAT0002819	AACUGGCCUCAAGUCCCGCU	188
hsa-mir-193b*	MIMAT0004767	CGGGUUUUUGAGGGCGAGAUGA	189
hsa-mir-195	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAUUAUUGGC	190
hsa-mir-195*	MIMAT0004615	CCAAUUAUUGGCUGUGCUGUCC	191
hsa-mir-196a*	MIMAT0004562	CGGCAACAAGAAACUGCCUGAG	192
hsa-mir-196a-1	MIMAT0000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG	193
hsa-mir-196a-2	MIMAT0000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG	194
hsa-mir-196b	MIMAT0001080	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGG	195
hsa-mir-197	MIMAT0000227	UUCACCACCUUCCACCCAGC	196
hsa-mir-198	MIMAT0000228	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC	197
hsa-mir-199a-3p	MIMAT0000232	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	198
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	199
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	200
hsa-mir-199b-3p	MIMAT0004563	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	201
hsa-mir-199b-5p	MIMAT0000263	CCCAGUUUAGACUAUCUGUUC	202
hsa-mir-200a	MIMAT0000682	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	203
hsa-mir-200a*	MIMAT0001620	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA	204
hsa-mir-200b	MIMAT0000318	UAAUACUGCCUGGUAUUGAUGA	205
hsa-mir-200b*	MIMAT0004571	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	206
hsa-mir-200c	MIMAT0000617	UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA	207

hsa-mir-200c*	MIMAT0004657	CGUCUUACCCAGCAGUGUUUGG	208
hsa-mir-203	MIMAT0000264	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	209
hsa-mir-204	MIMAT0000265	UCCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	210
hsa-mir-205	MIMAT0000266	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG	211
hsa-mir-210	MIMAT0000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	212
hsa-mir-213	MIMAT0000256	AAAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	213
hsa-mir-214	MIMAT0000271	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	214
hsa-mir-214*	MIMAT0004564	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC	215
hsa-mir-216a	MIMAT0000273	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	216
hsa-mir-216b	MIMAT0004959	AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA	217
hsa-mir-217	MIMAT0000274	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGA	218
hsa-mir-218-1	MIMAT0000275	UUGUGCUUGAUCUAAACCAUGU	219
hsa-mir-218-1*	MIMAT0004565	AUGGUUCCGUCAAGCACCAUGG	220
hsa-mir-218-2	MIMAT0000275	UUGUGCUUGAUCUAAACCAUGU	221
hsa-mir-218-2*	MIMAT0004566	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGCG	222
hsa-mir-221	MIMAT0000278	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC	223
hsa-mir-221*	MIMAT0004568	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU	224
hsa-mir-222	MIMAT0000279	AGCUACAUUGGCUACUGGGU	225

[0164]

hsa-mir-222*	MIMAT0004569	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU	226
hsa-mir-223	MIMAT0000280	UGUCAGUUUGUAAAUACCCCA	227
hsa-mir-223*	MIMAT0004570	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	228
hsa-mir-224	MIMAT0000281	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	229
hsa-mir-302a	MIMAT0000684	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA	230

hsa-mir-302a*	MIMAT0000683	ACUAAAACGUGGAUGUACUUGCU	231
hsa-mir-302b	MIMAT0000715	UAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAG	232
hsa-mir-302b*	MIMAT0000714	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUC	233
hsa-mir-302c	MIMAT0000717	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	234
hsa-mir-302c*	MIMAT0000716	UUUAACAUGGGGUACCUGCUG	235
hsa-mir-302d	MIMAT0000718	UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU	236
hsa-mir-302d*	MIMAT0004685	ACUUUAACAUGGAGGCACUUGC	237
hsa-mir-302e	MIMAT0005931	UAAGUGCUUCCAUGCUU	238
hsa-mir-302f	MIMAT0005932	UAAUUGCUUCCAUGUUU	239
hsa-mir-320a	MIMAT0000510	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	240
hsa-mir-320b-1	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	241
hsa-mir-320b-2	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	242
hsa-mir-320c-1	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	243
hsa-mir-320c-2	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	244
hsa-mir-320d-1	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	245
hsa-mir-320d-2	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	246
hsa-mir-324-3p	MIMAT0000762	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	247
hsa-mir-324-5p	MIMAT0000761	CGCAUCCCUAGGGCAUUGGUGU	248
hsa-mir-326	MIMAT0000756	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	249
hsa-mir-328	MIMAT0000752	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	250
hsa-mir-330-3p	MIMAT0000751	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA	251
hsa-mir-330-5p	MIMAT0004693	UCUCUGGGCCUGUGUCUUAGGC	252
hsa-mir-331-3p	MIMAT0000760	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	253
hsa-mir-331-5p	MIMAT0004700	CUAGGUAUGGUCCAGGGAUCC	254

hsa-mir-335	MIMAT0000765	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	255
hsa-mir-335*	MIMAT0004703	UUUUUCAUUAUUGCUCUGACC	256
hsa-mir-339-3p	MIMAT0004702	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG	257
hsa-mir-339-5p	MIMAT0000764	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	258
hsa-mir-340	MIMAT0004692	UUUAAAAGCAAUGAGACUGAUU	259
hsa-mir-340*	MIMAT0000750	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC	260
hsa-mir-342-3p	MIMAT0000753	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	261
hsa-mir-342-5p	MIMAT0004694	AGGGGUGCUAUCUGAUUGA	262
hsa-mir-345	MIMAT0000772	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	263
hsa-mir-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	264
hsa-mir-361-5p	MIMAT0000703	UUUUCAGAAUCUCCAGGGGUAC	265
hsa-mir-370	MIMAT0000722	GCCUGCUGGGGUGGAACCUUGU	266
hsa-mir-374a	MIMAT0000727	UUUAAUACAACCUGAUAGUG	267
hsa-mir-374b	MIMAT0004955	AUUAAUACAACCUGCUAGUG	268
hsa-mir-376a*	MIMAT0003386	GUAGAUUCUCCUUCUAUGAGUA	269
hsa-mir-376a-1	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	270
hsa-mir-376a-2	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	271

[0165]

hsa-mir-376b	MIMAT0002172	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUU	272
hsa-mir-376c	MIMAT0000720	AACAUAGAGGAAAAUCCACGU	273
hsa-mir-378	MIMAT0000732	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	274
hsa-mir-378*	MIMAT0000731	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU	275
hsa-mir-382	MIMAT0000737	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	276
hsa-mir-411	MIMAT0003329	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG	277

hsa-mir-411*	MIMAT0004813	UAUGUAACACGGUCCACUAACC	278
hsa-mir-423	MIMAT0004748	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	279
hsa-mir-423*	MIMAT0001340	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	280
hsa-mir-425-3p	MIMAT0001343	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCC	281
hsa-mir-425-5p	MIMAT0003393	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	282
hsa-mir-432	MIMAT0002814	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	283
hsa-mir-432*	MIMAT0002815	CUGGAUGGCUCCUCAUGUCU	284
hsa-mir-433	MIMAT0001627	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	285
hsa-mir-484	MIMAT0002174	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU	286
hsa-mir-485-3p	MIMAT0002176	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	287
hsa-mir-485-5p	MIMAT0002175	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC	288
hsa-mir-486-3p	MIMAT0004762	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU	289
hsa-mir-486-5p	MIMAT0002177	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	290
hsa-mir-487a	MIMAT0002178	AAUCAUACAGGGACAUCAGUU	291
hsa-mir-487b	MIMAT0003180	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	292
hsa-mir-532	MIMAT0002888	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	293
hsa-mir-532-5p	MIMAT0004780	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA	294
hsa-mir-539	MIMAT0003163	GGAGAAUUUAUCCUUGGUGUGU	295
hsa-mir-574-3p	MIMAT0003239	CACGCUCAUGCACACCCACA	296
hsa-mir-574-5p	MIMAT0004795	UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU	297
hsa-mir-584	MIMAT0003249	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG	298
hsa-mir-628-3p	MIMAT0003297	UCUAGUAAGAGUGGCAGUCGA	299
hsa-mir-628-5p	MIMAT0004809	AUGCUGACAUUUUACUAGAGG	300
hsa-mir-643	MIMAT0003313	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG	301

hsa-mir-660	MIMAT0003338	UACCCAUGCAUAUCGGAGUUG	302
-------------	--------------	-----------------------	-----

[0166] 参考文献

[0167] 1. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran 7, Urbanowicz B, Branski P, Ratajczak MZ, Zembala M. Tumour-derived microvesicles carry several surfacedeterminants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 ;55 :808818.

[0168] 2. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood.* 2000 ;96 :170-175.

[0169] 3. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interaction : selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood.* 1986 ;67 : 629-636.

[0170] 4. Lyberg T, Nakstad B, Hetland O, Boye NP. Procoagulant (thromboplastin) activity in human bronchoalveolar lavage fluids is derived from alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 1990 ;3 :61-67.

[0171] 5. Thiagarajan P, Le A, Benedict CR. Beta(2)-glycoprotein I promotes the binding of anionic phospholipid vesicles by macrophages. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 1999 ;19 :2807-2811.

[0172] 6. Setzer F, Oberle V, Blass M, Moller E, Russwurm S, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Reinhart K, Losche W. Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells : a DNA microarray study. *Platelets.* 2006 ;17 :571-576.

[0173] 7. Plasterk RH. Micro RNAs in animal development. *Cell.* 2006 ;124 :877-881.

[0174] 8. Willingham AT, Gingeras TR. TUF love for " junk " DNA. *Cell.* 2006 ;125 : 1215-1220.

[0175] 9. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 ;101 :9740-9744.

[0176] 10. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol.* 2006 ;33 :167-173.

[0177] 11. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk B. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2007 ;6 :5.

[0178] 12. Voorhoeve PM, Agami R. Classifying microRNAs in cancer : The good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta.* 2006.

[0179] 13. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore

D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci US A. 2006;103:12481-12486.

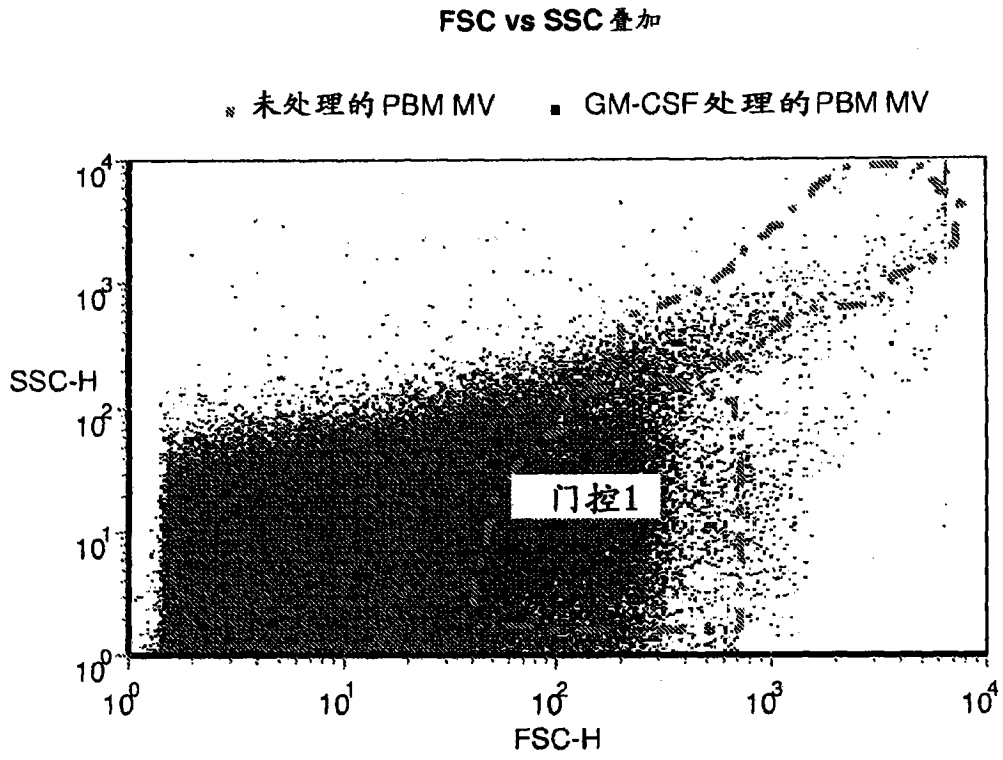


图 1

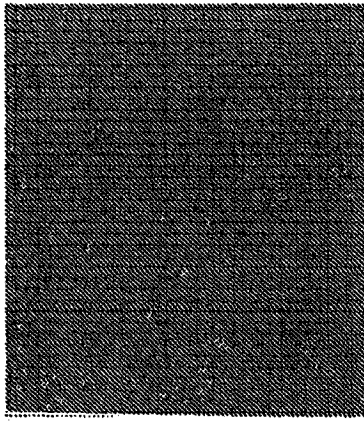


图 2a

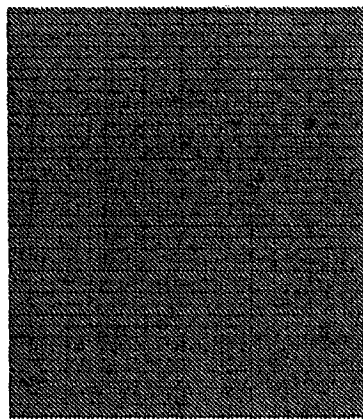


图 2b



图 2c

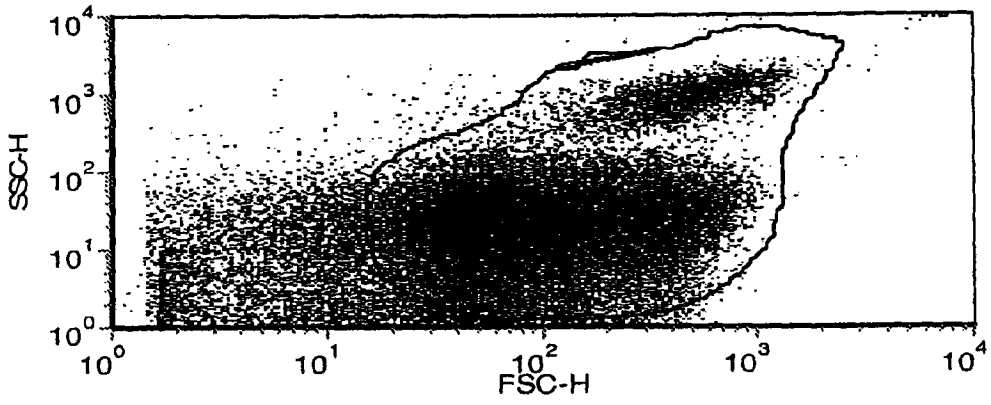


图 3a

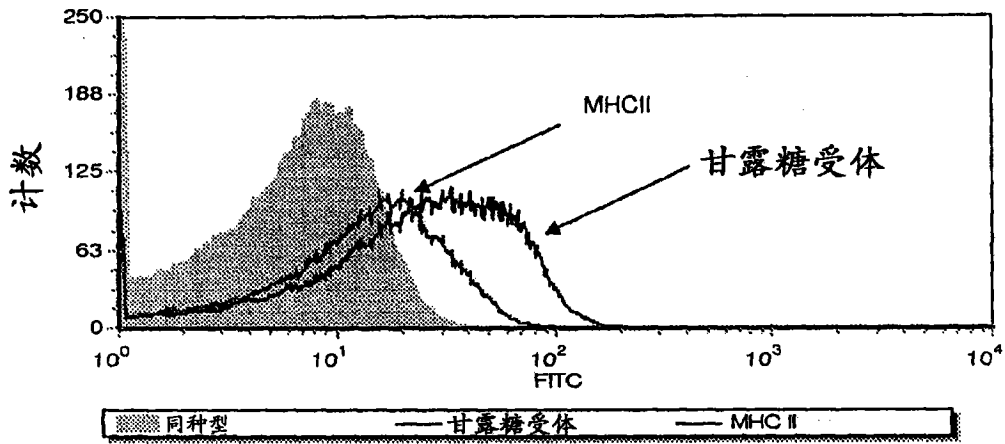


图 3b

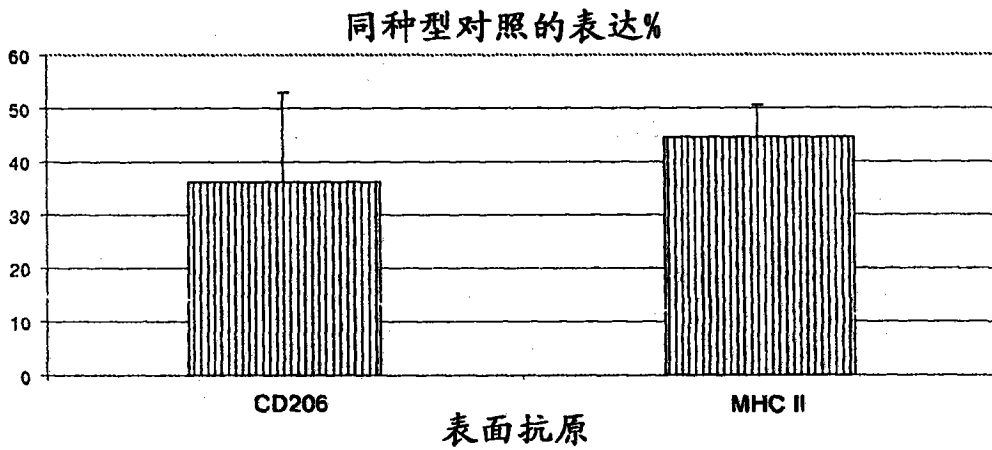


图 3c

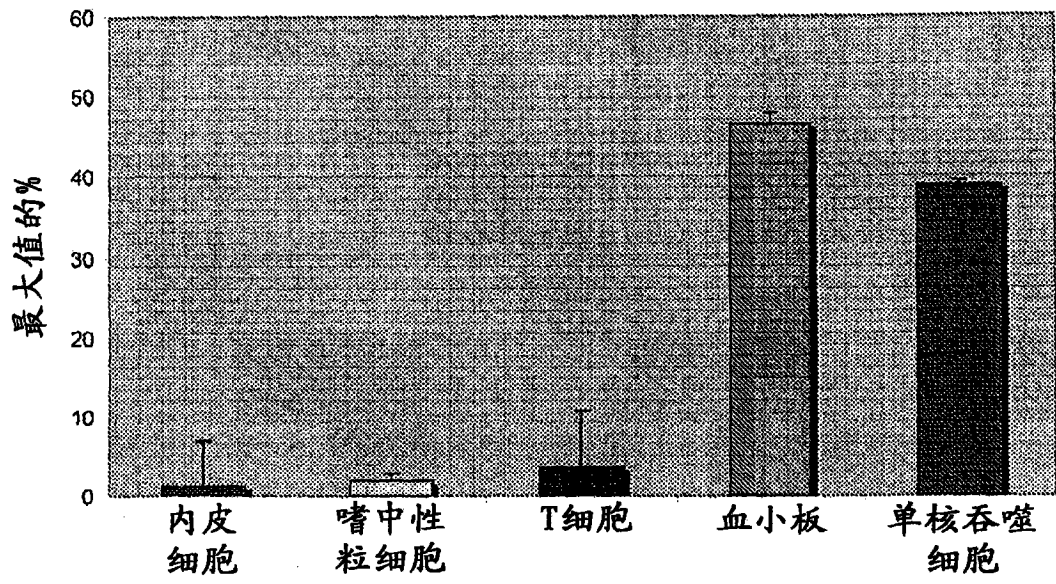


图 4

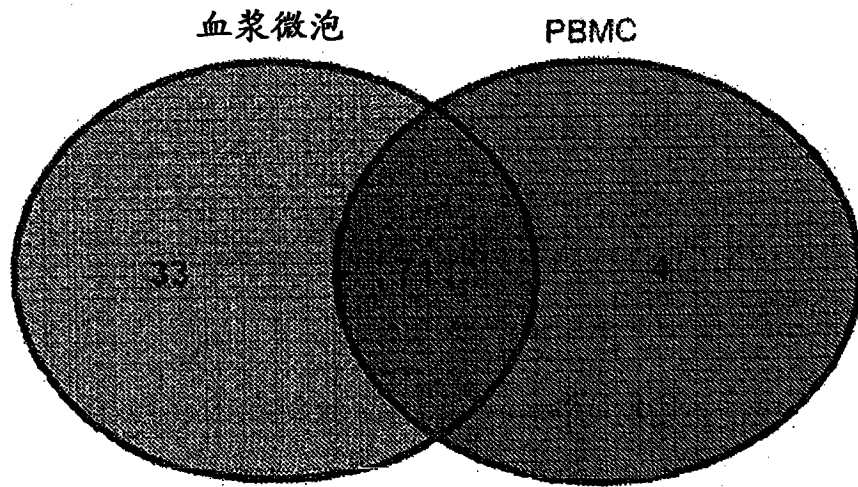


图 5D

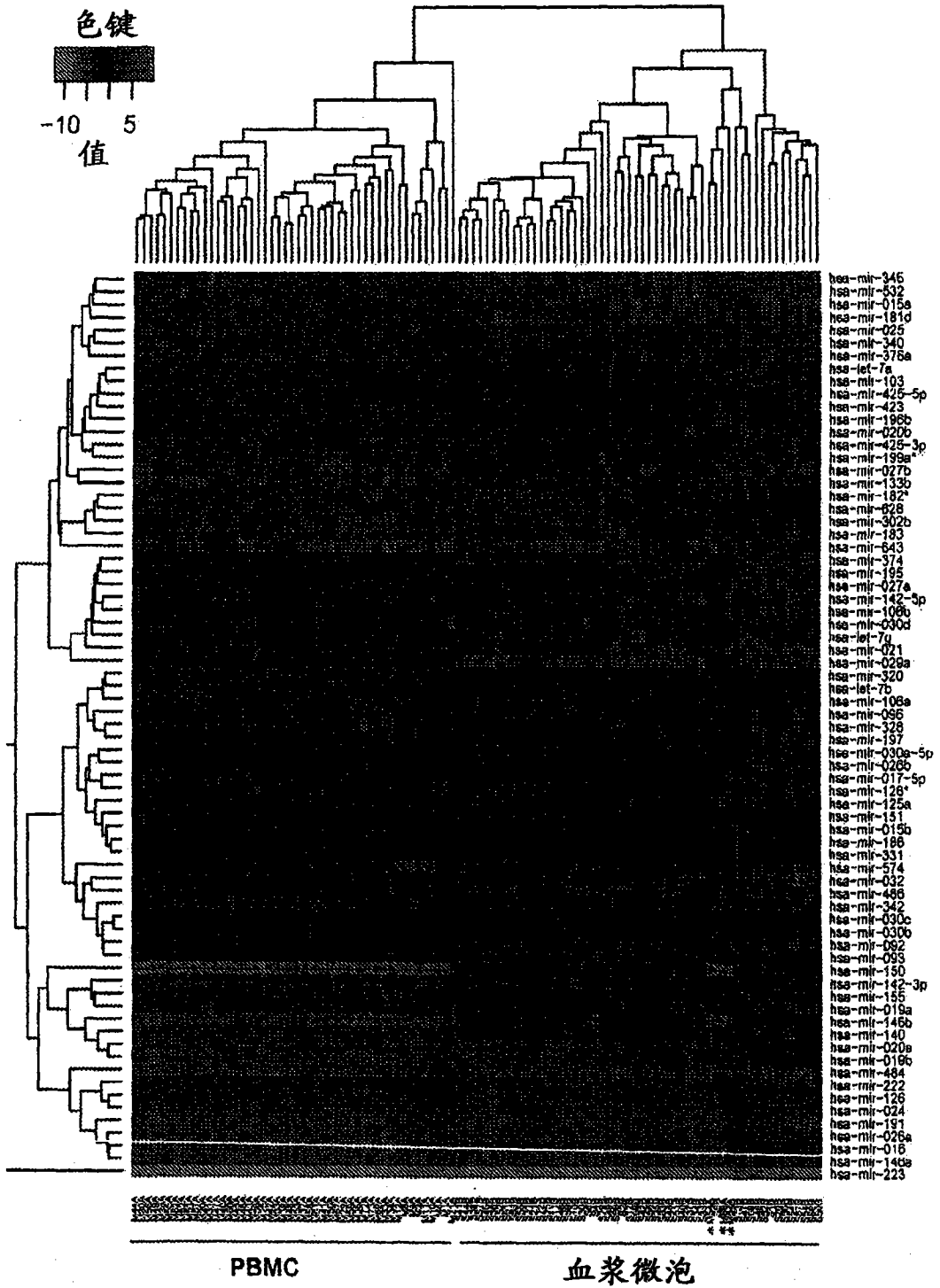


图 5A

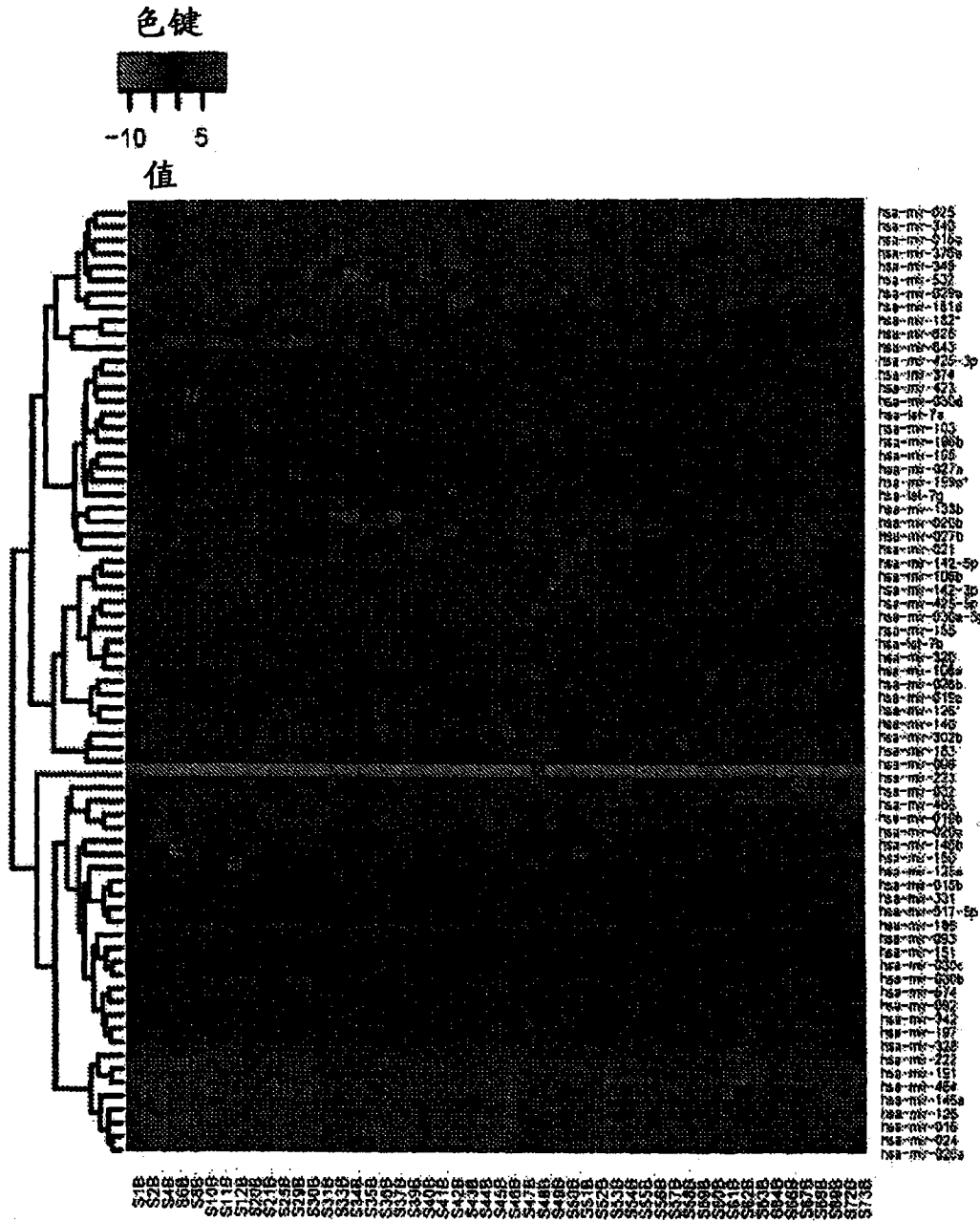


图 5B

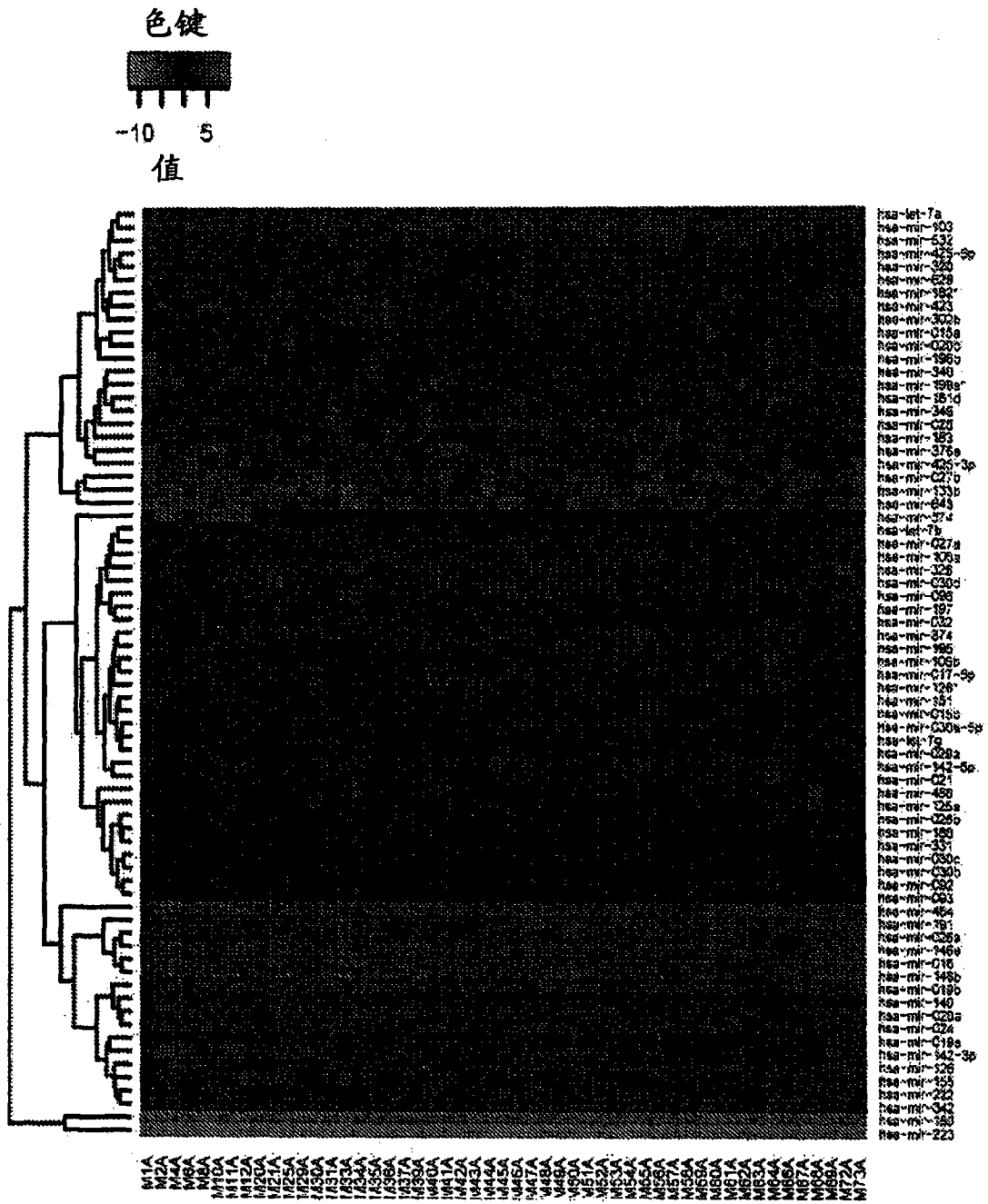


图 5C

表I			
疾病	疾病组中增加的表达	疾病组织中减少的表达	参考文献
结肠腺癌	miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203		JAMA. 2008 Jan 30; 299(4):425-36; Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
结肠直肠	miR-19a, miR-21, miR-127, <u>miR-31</u> , miR-96, <u>miR-135b</u> and miR-183,	miR-30c, miR-133a, miR-143, miR-133b and <u>miR-145</u>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77; Cancer. 2006 Jul 19; 5:29; Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
前列腺癌	miR-21	<u>miR-15a</u> , miR-16-1, miR-143, <u>miR-145</u>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
肺癌	miR-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, <u>miR-205</u> , miR- <u>miR-210</u>	<u>miR-let-7</u>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
乳腺癌	miR-21, miR-155	miR-125b, <u>miR-145</u>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
B细胞淋巴瘤	miR-155, miR-17-92, miR-19a, miR-92, miR-142, miR-155, miR-221		Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
胰腺	miR-103 and <u>miR-107</u> , miR-18a, <u>miR-31</u> , miR-93, miR-221 and miR-224, miR-155	miR-133a, miR-216, miR-217	J Clin Oncol. 2006 Oct 10; 24(29):4677-84; Oncogene. 2007 Jun 28; 26(30):4442-52
弥漫性大BCL	miR-155, miR-17-92		Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
CLL	<u>miR-23b</u> , miR-24-1, miR-146, miR-155, miR-195, miR-221, miR-331, miR-29a, miR-195, <u>miR-34a</u> , and <u>miR-29c</u>	<u>miR-15a</u> , <u>miR-16-1</u> , miR-29, miR-223	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77; Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
膀胱癌	miR-223, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, <u>miR-203</u> , miR-17-5p, <u>miR-23a</u> , and <u>miR-205</u>		Urol Oncol. 2007 Sep-Oct; 25(5):387-92
肾癌	<u>miR-28</u> , <u>miR-185</u> , miR-27, and miR-let-7f-2		Urol Oncol. 2007 Sep-Oct; 25(5):387-92
缺氧-肿瘤	<u>miR-23</u> , miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, <u>miR-107</u> , <u>miR-181</u> , <u>miR-210</u> , and miR-213		Mol Cell Biol. 2007 Mar; 27(5):1859-67.
子宫平滑肌瘤	miR-let-7 family, miR-21, <u>miR-23b</u> , <u>miR-29b</u> , and miR-197		Genes Chromosomes Cancer. 2007 Apr; 46(4):336-47
卵巢	miR-199*, <u>miR-200a</u> , <u>miR-214</u>	miR-100, <u>miR-let-7 cluster</u> , miR-125b	Cancer Res. 2008 Jan 15; 68(2):425-33
丙型肝炎病毒相关肝细胞癌	<u>miR-122</u> , miR-100, and miR-10a	miR-198 and <u>miR-145</u>	Hepatology. 2007 Dec 19 [Epub ahead of print]
ALL	<u>miR-128b</u> , <u>miR-204</u> , <u>miR-218</u> , miR-331, and miR-181b-1, miR-17-92		Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
阿尔茨海默病	<u>miR-9</u> , <u>miR-128</u>	miR-107	J Neurosci. 2008 Jan 30; 28(5):1213-23 Neuroreport. 2007 Feb 12; 18(3):297-300
骨髓纤维化	<u>miR-190</u>	miR-31, <u>miR-150</u> , and miR-95	Exp Hematol. 2007 Nov; 35(11):1708-18
骨髓纤维化, 真性红细胞增多症, 血小板增多症		miR-34a, - <u>342</u> , -326, -105, -149, and -147	Exp Hematol. 2007 Nov; 35(11):1708-18
HIV	miR-29a, <u>miR-29b</u> , <u>miR-149</u> , <u>miR-378</u> , miR-324-5p		Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec 2; 337(4):1214-8.
HIV-1潜伏期	<u>miR-28</u> , <u>miR-125b</u> , miR-150, miR-223 and miR-382		Nat Med. 2007 Oct; 13(10):1241-7.

图6-表I

表 II

过滤后的表达的血浆miRNA

检测器名称

不可检测

检测器名称	过滤器	不可检测			
hsa-let-7a	0.333333333	hsa-let-7e	hsa-mir-346	hsa-mir-520c	hsa-mir-629
hsa-let-7b	0.058823529	hsa-mir-001	hsa-mir-362	hsa-mir-520d	hsa-mir-630
hsa-let-7c	0.725490196	hsa-mir-007	hsa-mir-363	hsa-mir-520d*	hsa-mir-631
hsa-let-7d	0.529411765	hsa-mir-009	hsa-mir-363*	hsa-mir-520e	hsa-mir-632
hsa-let-7f	0.745098039	hsa-mir-009*	hsa-mir-365	hsa-mir-520f	hsa-mir-633
hsa-let-7g	0.215686275	hsa-mir-010a	hsa-mir-367	hsa-mir-520g	hsa-mir-634
hsa-mir-015a	0.568627451	hsa-mir-010b	hsa-mir-368	hsa-mir-520h	hsa-mir-635
hsa-mir-015b	0.078431373	hsa-mir-017-3p	hsa-mir-369-3p	hsa-mir-521	hsa-mir-636
hsa-mir-016	0	hsa-mir-018b	hsa-mir-369-5p	hsa-mir-522	hsa-mir-637
hsa-mir-017-5p	0.117647059	hsa-mir-022	hsa-mir-371	hsa-mir-523	hsa-mir-638
hsa-mir-018a	0.784313726	hsa-mir-023a	hsa-mir-372	hsa-mir-524	hsa-mir-639
hsa-mir-018a*	0.784313726	hsa-mir-023b	hsa-mir-373	hsa-mir-525	hsa-mir-641
hsa-mir-019a	0.176470588	hsa-mir-028	hsa-mir-373*	hsa-mir-525*	hsa-mir-642
hsa-mir-019b	0.058823529	hsa-mir-029b	hsa-mir-375	hsa-mir-526a	
hsa-mir-020a	0	hsa-mir-029c	hsa-mir-376a*	hsa-mir-526b	hsa-mir-644
hsa-mir-020b	0.37254902	hsa-mir-031	hsa-mir-376b	hsa-mir-526b*	hsa-mir-645
hsa-mir-021	0.411764706	hsa-mir-033	hsa-mir-377	hsa-mir-526c	hsa-mir-646
hsa-mir-024	0	hsa-mir-034a	hsa-mir-378	hsa-mir-527	hsa-mir-647
hsa-mir-025	0.647058824	hsa-mir-034b	hsa-mir-379		hsa-mir-648
hsa-mir-026a	0	hsa-mir-034c	hsa-mir-380-3p		hsa-mir-649
hsa-mir-026b	0.176470588	hsa-mir-095	hsa-mir-380-5p	hsa-mir-542-3p	hsa-mir-850
hsa-mir-027a	0.254901961	hsa-mir-099a	hsa-mir-381	hsa-mir-542-5p	hsa-mir-651
hsa-mir-027b	0.352941177	hsa-mir-100	hsa-mir-383	hsa-mir-544	hsa-mir-652
hsa-mir-029a	0.764705882	hsa-mir-101	hsa-mir-409-5p	hsa-mir-545	hsa-mir-653
hsa-mir-030a-3p	0.37254902	hsa-mir-105	hsa-mir-410	hsa-mir-548a	hsa-mir-654
hsa-mir-030a-5p	0.098039216	hsa-mir-107	hsa-mir-412	hsa-mir-548b	hsa-mir-655
hsa-mir-030b	0.039215686	hsa-mir-122a	hsa-mir-422a	hsa-mir-548c	hsa-mir-656
hsa-mir-030c	0.019607843	hsa-mir-124a	hsa-mir-422b	hsa-mir-548d	hsa-mir-657
hsa-mir-030d	0.274509804	hsa-mir-125b	hsa-mir-424	hsa-mir-549	hsa-mir-658
hsa-mir-032	0	hsa-mir-126	hsa-mir-429	hsa-mir-550	hsa-mir-659
hsa-mir-092	0	hsa-mir-128a	hsa-mir-432*	hsa-mir-551a	hsa-mir-660
hsa-mir-093	0.058823529	hsa-mir-128b	hsa-mir-448	hsa-mir-551b	hsa-mir-661
hsa-mir-096	0	hsa-mir-129	hsa-mir-449	hsa-mir-552	hsa-mir-662
hsa-mir-098	0.784313726	hsa-mir-133a	hsa-mir-449b	hsa-mir-553	
hsa-mir-099b	0.549019608		hsa-mir-450	hsa-mir-554	

图 7-表 II

hsa-mir-103	0.235294118	hsa-mir-135a	hsa-mir-451	hsa-mir-555
hsa-mir-106a	0.058823529	hsa-mir-135b	hsa-mir-452	hsa-mir-556
hsa-mir-106b	0.215686275	hsa-mir-136	hsa-mir-452*	hsa-mir-557
hsa-mir-125a	0.078431373	hsa-mir-137	hsa-mir-453	hsa-mir-558
hsa-mir-126	0	hsa-mir-138	hsa-mir-455	hsa-mir-559
hsa-mir-126*	0.117647059	hsa-mir-139	hsa-mir-483	hsa-mir-561
hsa-mir-127	0.176470588	hsa-mir-141	hsa-mir-485-5p	hsa-mir-562
hsa-mir-130a	0.666666667	hsa-mir-143	hsa-mir-487a	hsa-mir-563
hsa-mir-130b	0.705882353	hsa-mir-147	hsa-mir-488	hsa-mir-564
hsa-mir-132	0.705882353	hsa-mir-148a	hsa-mir-489	hsa-mir-565
hsa-mir-133b	0.529411765	hsa-mir-149	hsa-mir-491	hsa-mir-566
hsa-mir-134	0.235294118	hsa-mir-152	hsa-mir-492	hsa-mir-567
hsa-mir-140	0.078431373	hsa-mir-153	hsa-mir-493-3p	hsa-mir-569
hsa-mir-142-3p	0.196078431	hsa-mir-154	hsa-mir-493-5p	hsa-mir-570
hsa-mir-142-5p	0.254901961	hsa-mir-154*	hsa-mir-494	hsa-mir-571
hsa-mir-145	0.705882353	hsa-mir-181a	hsa-mir-495	hsa-mir-572
hsa-mir-146a	0	hsa-mir-181a*	hsa-mir-496	hsa-mir-573
hsa-mir-146b	0.078431373	hsa-mir-181c	hsa-mir-497	
hsa-mir-148b	0.784313726	hsa-mir-182	hsa-mir-498	hsa-mir-575
hsa-mir-150	0.019607843	hsa-mir-184	hsa-mir-499	hsa-mir-576
hsa-mir-151	0.019607843	hsa-mir-185	hsa-mir-500	hsa-mir-578
hsa-mir-155	0.176470588	hsa-mir-187	hsa-mir-501	hsa-mir-579
hsa-mir-181d	0.725490196	hsa-mir-189	hsa-mir-502	hsa-mir-580
hsa-mir-182*	0.196078431	hsa-mir-190	hsa-mir-503	hsa-mir-583
hsa-mir-183	0.058823529	hsa-mir-192	hsa-mir-504	
hsa-mir-186	0.039215686	hsa-mir-193b	hsa-mir-505	hsa-mir-585
hsa-mir-191	0	hsa-mir-194	hsa-mir-506	hsa-mir-586
hsa-mir-193a	0.666666667	hsa-mir-196a	hsa-mir-507	hsa-mir-587
hsa-mir-195	0.31372549	hsa-mir-198	hsa-mir-508	hsa-mir-588
hsa-mir-196b	0.254901961	hsa-mir-199a	hsa-mir-509	hsa-mir-589
hsa-mir-197	0.019607843	hsa-mir-199b	hsa-mir-510	hsa-mir-591
hsa-mir-199a*	0.254901961	hsa-mir-200a	hsa-mir-511	hsa-mir-592
hsa-mir-221	0.784313726	hsa-mir-200a*	hsa-mir-512-3p	hsa-mir-593
hsa-mir-222	0	hsa-mir-200b	hsa-mir-512-5p	hsa-mir-594
hsa-mir-223	0	hsa-mir-200c	hsa-mir-513	hsa-mir-596
hsa-mir-224	0.529411765	hsa-mir-202	hsa-mir-514	hsa-mir-597
hsa-mir-302b	0.078431373	hsa-mir-202*	hsa-mir-515-3p	hsa-mir-599
hsa-mir-320	0.098039216	hsa-mir-203	hsa-mir-515-5p	hsa-mir-600
hsa-mir-324-3p	0.705882353	hsa-mir-204	hsa-mir-516-5p	hsa-mir-601
hsa-mir-324-5p	0.470588235	hsa-mir-205	hsa-mir-517*	hsa-mir-603
hsa-mir-328	0	hsa-mir-206	hsa-mir-517a	hsa-mir-604

图7-表II(续)

hsa-mir-330	0.666666667	hsa-mir-208	hsa-mir-517b	hsa-mir-606
hsa-mir-331	0.039215686	hsa-mir-210	hsa-mir-517c	hsa-mir-607
hsa-mir-335	0.725490196	hsa-mir-211	hsa-mir-518a	hsa-mir-608
hsa-mir-339	0.607843137	hsa-mir-214	hsa-mir-518b	hsa-mir-609
hsa-mir-340	0.529411765	hsa-mir-215	hsa-mir-518c	hsa-mir-610
hsa-mir-342	0.019607843	hsa-mir-216	hsa-mir-518c*	hsa-mir-612
hsa-mir-345	0.705882353	hsa-mir-217	hsa-mir-518d	hsa-mir-613
hsa-mir-361	0.725490196	hsa-mir-218	hsa-mir-518e	hsa-mir-614
hsa-mir-370	0.549019608	hsa-mir-219	hsa-mir-518f	hsa-mir-615
hsa-mir-374	0.37254902	hsa-mir-220	hsa-mir-519a	hsa-mir-616
hsa-mir-376a	0.450980392	hsa-mir-296	hsa-mir-519b	hsa-mir-617
hsa-mir-382	0.607843137	hsa-mir-299-3p	hsa-mir-519c	hsa-mir-618
hsa-mir-411	0.607843137	hsa-mir-299-5p	hsa-mir-519d	hsa-mir-619
hsa-mir-423	0.215686275	hsa-mir-301	hsa-mir-519e	hsa-mir-621
hsa-mir-425-3p	0.31372549	hsa-mir-302a	hsa-mir-519e*	hsa-mir-622
hsa-mir-425-5p	0.215686275	hsa-mir-302a*	hsa-mir-520a	hsa-mir-624
hsa-mir-432	0.392156863	hsa-mir-302b*	hsa-mir-520a*	hsa-mir-626
hsa-mir-433	0.470588235	hsa-mir-302c	hsa-mir-520b	hsa-mir-627
hsa-mir-484	0	hsa-mir-302c*		
hsa-mir-485-3p	0.31372549	hsa-mir-302d		
hsa-mir-486	0	hsa-mir-323		
hsa-mir-487b	0.529411765	hsa-mir-325		
hsa-mir-532	0.62745098	hsa-mir-326		
hsa-mir-539	0.588235294	hsa-mir-329		
hsa-mir-574	0	hsa-mir-337		
hsa-mir-584	0.784313726	hsa-mir-338		
hsa-mir-628	0			
hsa-mir-643	0.568627451			

图 7-表 II(续)

血浆微泡				PBMC			
miRNA	标准化的表达 (±S.D.)	供体间表达的频率 (%)	前十排名频率 (%)	miRNA	标准化的表达 (±S.D.)	供体间表达的频率 (%)	前十排名频率 (%)
mir-223	1589 ± 653	100	100	mir-223	2143 ± 499	100	100
mir-484	50.9 ± 22.9	100	96	mir-150	241 ± 94.6	98	98
mir-191	46.4 ± 14.9	100	100	mir-146b	57.5 ± 21.1	100	100
mir-146a	39.5 ± 19	100	88	mir-016	54.7 ± 32.9	100	100
mir-016	25.4 ± 13.3	100	78	mir-484	40.6 ± 18.8	89	88
mir-026a	25.2 ± 9.95	100	90	mir-146a	39.6 ± 13.0	100	98
mir-222	24.5 ± 12.4	100	76	mir-191	32.4 ± 15.6	100	94
mir-024	22.7 ± 10.5	100	80	mir-026a	30 ± 8.92	100	100
mir-126	18.2 ± 8.04	100	66	mir-019b	21.7 ± 7.49	100	80
mir-032	15.3 ± 32.6	100	31	mir-020a	15 ± 5.11	100	4

图 8- 表 III

血浆微泡	P值	PBMC	P值
甘油磷脂代谢	3.29E-03	轴突导向信号传导	1.47E-02
磷酸肌醇代谢	5.77E-03	突触长期增强	2.07E-02
磷脂降解	9.17E-03	雌激素受体信号传导	2.23E-02
丙氨酸和天冬氨酸代谢	1.96E-02	甘油磷脂代谢	2.45E-02
雌激素受体信号传导	2.14E-02	D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢	2.78E-02

血浆微泡	P值	PBMC	P值
抗原呈递途径	1.28E-03	甘氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸代谢	3.63E-03
甘油磷脂代谢	9.05E-03	甘油磷脂代谢	2.38E-02
甘氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸代谢	1.56E-02	D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢	2.54E-02
天然杀伤细胞信号传导	1.57E-02	乙醛酸, 二羧酸代谢	4.37E-02

图 9- 表 IV

血浆_平均值是所有51个血浆观察结果的原始Ct的平均值
PBMC_平均值是所有51个PBMC观察结果的原始Ct的平均值

“血浆-PBMC”是血浆和PBMC之间的标准化的数据的差异

血浆-MNC “+”：miR水平在PBMC中较高，“-”：miR水平在血浆中较低

“倍数变化”是 2^{Δ} 差异。对于miR29a: $40.3=2^{(5.33)}$ ，其表示PBMC中miR水平与血清中的相比高40倍

“P值”被认为是显著的，如果P值 $<0.05/72=0.0006$

检测器 _名称	血浆 _平均值	PBMC_ 平均值	血浆_ MNC	倍数 变化	P值	血浆的 倍数变化
hsa-mir-029a	37.12771586	31.87566924	5.3333	40.31654208	9.70E-28	0.024803715
18S (CT)	12.71460766	9.451029281	3.3449	10.16050356	9.84E-25	0.098420319
hsa-mir-155	32.77301951	29.64446324	3.2098	9.252222752	6.61E-23	0.108082136
hsa-mir-146b	30.87718855	26.44380422	4.5147	22.85915231	1.81E-22	0.043746154
hsa-mir-142-3p	33.45027482	28.97701498	4.5545	23.49855274	1.91E-22	0.042555812
hsa-mir-222	27.69255453	29.77206378	-1.9982	0.250312111	1.18E-21	3.995012452
hsa-mir-328	30.15998382	32.9642692	-2.723	0.151459083	1.64E-21	6.602443268
hsa-mir-151	30.40933518	32.29093225	-1.8003	0.287114879	2.24E-21	3.482926432
hsa-mir-150	30.47592494	24.6518619	5.9053	59.93388544	7.01E-21	0.016685052
hsa-mir-486	28.73173943	31.56628224	-2.7533	0.148311256	4.31E-20	6.74257657
hsa-mir-197	30.22004439	32.22121169	-1.9199	0.264272828	5.34E-18	3.783968293
hsa-mir-140	30.80686384	28.81119314	2.077	4.219289268	2.87E-17	0.237006741
hsa-mir-320	32.3865371	33.86695527	-1.3991	0.379165604	1.63E-16	2.637370031
hsa-mir-374	34.51049488	32.67750663	1.9143	3.76930882	8.01E-15	0.265300629
hsa-mir-019a	32.11311761	29.96710463	2.2273	4.682568177	2.86E-12	0.213558022
hsa-mir-019b	29.4539469	27.85115537	1.6841	3.213398715	7.12E-12	0.311196988
hsa-mir-126	28.07632355	29.10031739	-0.9427	0.520258307	2.61E-11	1.922122121
hsa-mir-016	27.74576263	26.5689361	1.2581	2.391805375	1.35E-10	0.418094219
hsa-mir-532	36.36702118	34.20639555	2.2419	4.730196117	6.15E-10	0.211407725
hsa-mir-092	29.75216725	30.55396618	-0.7205	0.606887075	1.17E-09	1.647753003
hsa-mir-199a*	33.58726049	35.4571252	-1.7886	0.289452796	3.21E-09	3.454794744
hsa-let-7g	33.60687451	31.98889118	1.6993	3.247433539	4.99E-09	0.307935478
hsa-mir-032	29.54416735	31.80526606	-2.1798	0.220706343	8.52E-09	4.530907381
hsa-mir-345	36.51374094	34.71916814	1.8759	3.670305114	1.26E-08	0.272456913
hsa-mir-103	33.43298386	34.64525506	-1.131	0.456599125	1.99E-08	2.190104942
hsa-mir-021	34.3396759	32.34668429	2.0743	4.211400264	4.23E-08	0.237450714
hsa-mir-183	32.45422284	35.11564953	-2.5801	0.167229352	7.17E-08	5.979811469
hsa-mir-142-5p	33.80914806	32.4729949	1.4174	2.671037073	9.83E-08	0.374386417
hsa-mir-017-5p	31.31194325	32.41959375	-1.0264	0.490933663	1.26E-07	2.03693508
hsa-mir-106b	33.74281576	32.50763722	1.3165	2.490611501	1.28E-07	0.401507822
hsa-mir-342	30.04861659	29.34785373	0.782	1.719512972	3.06E-07	0.581560021

图 10- 表 V

hsa-mir-015a	36.02643541	34.41777394	1.6899	3.226343396	3.25E-07	0.309948408
hsa-mir-106a	32.27341998	33.310393	-0.9557	0.515591362	4.92E-07	1.939520467
hsa-mir-030a-5p	32.84903206	32.11457514	0.8157	1.760151976	4.98E-07	0.56813276
hsa-mir-181d	36.91248884	35.10117465	1.8926	3.713037794	5.30E-07	0.269321255
hsa-mir-574	29.77877718	31.99443544	-2.1344	0.227762162	3.05E-06	4.390544899
hsa-mir-020a	29.10969835	28.36665692	0.8243	1.770675693	3.74E-06	0.564756157
hsa-mir-133b	35.04172861	36.86655569	-1.7435	0.298644281	4.05E-06	3.348465259
hsa-let-7b	32.39289143	33.23120741	-0.757	0.591725511	4.25E-06	1.689972769
hsa-mir-026b	32.29385324	31.16910598	1.206	2.30697121	5.44E-06	0.433468782
hsa-mir-027b	34.97319163	37.12771071	-2.0732	0.23763183	1.20999E-05	4.208190455
hsa-mir-223	21.63665394	21.16179467	0.5561	1.470289246	2.99379E-05	0.680138281
hsa-mir-195	33.54064118	32.45677802	1.1652	2.242643031	0.000055077	0.44590244
hsa-mir-024	27.78702461	28.36258525	-0.4943	0.709906043	0.000137267	1.408637114
hsa-mir-030d	33.8831652	32.98623929	0.9782	1.970005968	0.000154741	0.507612675
hsa-mir-015b	31.44832671	32.07442065	-0.5448	0.685486424	0.000371404	1.458818095
hsa-mir-096	31.46980261	32.73422363	-1.1831	0.44040416	0.000386324	2.270641588
hsa-mir-191	26.63890682	27.27556098	-0.7068	0.612677595	0.00047708	1.632179808
hsa-mir-425-3p	34.77417378	35.82356186	-0.9681	0.511178832	0.00084906	1.95626254
hsa-mir-020b	34.97815304	33.84422814	1.2152	2.321729667	0.000852341	0.430713366
hsa-mir-643	35.6734501	37.16658316	-1.4118	0.375842469	0.00130314	2.660689207
hsa-mir-126*	31.16681945	32.1345669	-0.8865	0.54092482	0.001314585	1.84868574
hsa-mir-423	33.93739253	34.82278949	-0.8041	0.57271925	0.001362239	1.746056205
hsa-mir-425-5p	33.23637712	33.88098071	-0.5633	0.676752398	0.00179719	1.477645299
hsa-mir-026a	27.61150875	27.32677761	0.366	1.28877463	0.003310506	0.775930854
hsa-mir-302b	33.23113157	34.33434284	-1.0219	0.492467356	0.003731969	2.030591447
hsa-mir-484	26.55751618	28.13046808	-1.4917	0.355593289	0.009046242	2.812201558
hsa-mir-125a	30.94104939	31.63410639	-0.6118	0.654379746	0.02785181	1.528164657
hsa-let-7a	34.16573733	34.66154112	-0.4145	0.750279477	0.031855987	1.332836671
hsa-mir-628	33.65892745	34.23451988	-0.4943	0.709906043	0.033363855	1.408637114
hsa-mir-182*	34.51246341	35.19580641	-0.6021	0.65879431	0.04206113	1.517924464
hsa-mir-093	29.92991163	30.33080725	-0.3196	0.801292012	0.043597802	1.247984486
hsa-mir-376a	35.49479343	36.2218518	-0.6458	0.639138279	0.048003434	1.564606648
hsa-mir-196b	33.89190492	34.56216867	-0.589	0.664803554	0.052904716	1.504203751
hsa-mir-025	36.27231106	35.85259422	0.501	1.41519416	0.069149461	0.706616822
hsa-mir-027a	33.33901471	32.99540369	0.4249	1.342479446	0.101287776	0.744890362
hsa-mir-146a	27.051654	26.95885476	0.1741	1.12826034	0.241458101	0.886320262
hsa-mir-340	35.71472961	35.53800265	0.258	1.195819797	0.297093531	0.8362464
hsa-mir-030b	30.55810765	30.72009382	-0.0807	0.945598728	0.389875101	1.057531033
hsa-mir-186	31.31177086	31.45367741	-0.06062	0.958851963	0.659198081	1.042913858
hsa-mir-331	31.20308243	31.25979306	0.02458	1.017183525	0.843135202	0.983106761
hsa-mir-030c	30.93719829	31.01586004	0.002625	1.001821168	0.97816881	0.998182143

图 10- 表 V(续)

检测器 -名称	平均的 标准化的 表达PBMC	PBMC 标准差	检测器 -名称	平均的 标准化的 表达血浆	血浆 标准差
hsa-mir-223	2143.797514	499.6723532	hsa-mir-223	1589.265353	653.1441
hsa-mir-150	241.3339986	94.6316509	hsa-mir-484	50.93154102	22.91411
hsa-mir-146b	57.51515588	21.17347322	hsa-mir-191	46.44422571	14.98219
hsa-mir-016	54.79023342	32.92864759	hsa-mir-146a	39.5631478	19.02017
hsa-mir-484	40.62828652	18.89513879	hsa-mir-016	25.45043823	13.32435
hsa-mir-146a	39.66536453	13.01422255	hsa-mir-026a	25.2068328	9.956682
hsa-mir-191	32.44104295	15.62493155	hsa-mir-222	24.51626706	12.42177
hsa-mir-026a	30.05789737	8.928309461	hsa-mir-024	22.79169634	10.53596
hsa-mir-019b	21.72111133	7.496587814	hsa-mir-126	18.20923598	8.04666
hsa-mir-020a	15.03972998	5.117918017	hsa-mir-032	15.32305403	32.61654
hsa-mir-024	14.49037987	2.924884427	hsa-mir-486	12.89548349	11.97428
hsa-mir-142-3p	11.61802275	7.535807778	hsa-mir-020a	10.12067658	5.597534
hsa-mir-140	11.15286241	3.933184767	hsa-mir-019b	9.158209689	6.76422
hsa-mir-126	9.209558485	3.825687483	hsa-mir-150	8.165508668	25.08223
hsa-mir-342	7.803100549	3.388772813	hsa-mir-574	5.939301367	3.722014
hsa-mir-155	6.584151232	4.579272166	hsa-mir-092	5.700980896	3.157407
hsa-mir-222	5.715723219	2.105344287	hsa-mir-093	5.436799962	2.417329
hsa-mir-019a	5.53562668	2.957936571	hsa-mir-342	5.114543492	3.297305
hsa-mir-093	3.756090874	1.000518353	hsa-mir-197	4.9808586	4.507
hsa-mir-092	3.215354275	0.85390195	hsa-mir-328	4.707858075	3.592588
hsa-mir-486	3.096228853	7.676887526	hsa-mir-096	3.674085488	5.965292
hsa-mir-030b	2.865611791	0.76538861	hsa-mir-151	3.452172299	1.08377
hsa-mir-574	2.458205492	1.894539696	hsa-mir-146b	3.272000368	2.101495
hsa-mir-030c	2.335820956	0.663949738	hsa-mir-140	3.196516876	1.71678
hsa-mir-026b	2.129402092	0.705755408	hsa-mir-030b	3.134519745	1.142809
hsa-mir-331	1.985929854	0.609153141	hsa-mir-125a	3.080410769	1.975409
hsa-mir-125a	1.808127477	1.087896802	hsa-mir-126*	3.023376204	2.068206
hsa-mir-186	1.720577641	0.419612713	hsa-mir-183	2.854264163	6.494415
hsa-mir-032	1.716467503	1.338128537	hsa-mir-030c	2.412532336	0.863587
hsa-mir-029a	1.323099465	0.533548819	hsa-mir-017-5p	2.13024101	0.998316
hsa-mir-126*	1.269368187	0.759421276	hsa-mir-331	2.087433557	0.81255
hsa-let-7g	1.199246639	0.349725473	hsa-mir-186	2.022411766	0.916917
hsa-mir-021	1.161213483	0.674584117	hsa-mir-015b	1.808314178	0.81048
hsa-mir-197	1.149407136	0.647186919	hsa-mir-019a	1.697172987	1.453897

图 11- 表 VI

hsa-mir-015b	1.14628446	0.432407565	hsa-mir-302b	1.339313335	2.387044
hsa-mir-030a-5p	1.094683149	0.306485271	hsa-mir-026b	1.292369054	0.824158
hsa-mir-195	1.017673959	0.797387672	hsa-mir-106a	1.186157531	1.293289
hsa-mir-151	1.007960478	0.397967603	hsa-let-7b	0.97666637	0.625536
hsa-mir-142-5p	0.962665368	0.492490733	hsa-mir-320	0.911092198	0.420503
hsa-mir-017-5p	0.941159371	0.360846484	hsa-mir-155	0.808867743	0.52866
hsa-mir-106b	0.910164376	0.403715009	hsa-mir-030a-5p	0.727538734	0.549257
hsa-mir-096	0.875989336	0.559638262	hsa-mir-628	0.713396354	1.263219
hsa-mir-374	0.764917256	0.274388929	hsa-mir-027a	0.641903058	0.448917
hsa-mir-328	0.720096352	0.412158586	hsa-mir-142-3p	0.627217683	0.607184
hsa-mir-030d	0.662654685	0.22361572	hsa-mir-195	0.564628001	0.392046
hsa-mir-027a	0.622821419	0.251240619	hsa-mir-425-5p	0.554428361	0.275865
hsa-mir-106a	0.542577626	0.312616405	hsa-let-7g	0.515997707	0.337364
hsa-let-7b	0.534079686	0.25068168	hsa-mir-021	0.51383279	0.491008
hsa-mir-020b	0.410435233	0.262371622	hsa-mir-199a*	0.503454664	0.327551
hsa-mir-320	0.344918355	0.140441973	hsa-mir-142-5p	0.485752905	0.504504
hsa-mir-425-5p	0.334114444	0.131686276	hsa-mir-103	0.469571039	0.215895
hsa-mir-628	0.323074686	0.328272174	hsa-mir-106b	0.455236625	0.295268
hsa-mir-302b	0.31107497	0.233922375	hsa-mir-182*	0.450866408	0.779637
hsa-mir-532	0.30283697	0.175299492	hsa-mir-196b	0.424682779	0.283318
hsa-mir-196b	0.291839926	0.203868959	hsa-mir-643	0.410079866	0.934729
hsa-mir-015a	0.263528933	0.156658681	hsa-mir-030d	0.360317322	0.195419
hsa-mir-183	0.223615225	0.225419033	hsa-mir-423	0.355300524	0.267033
hsa-mir-345	0.222589939	0.14617654	hsa-let-7a	0.316043353	0.197157
hsa-mir-423	0.213547231	0.136842846	hsa-mir-027b	0.252490316	0.182518
hsa-mir-103	0.205412359	0.093491856	hsa-mir-374	0.251770179	0.197212
hsa-let-7a	0.198065472	0.082808812	hsa-mir-020b	0.227198431	0.167979
hsa-mir-181d	0.170055022	0.109234879	hsa-mir-133b	0.201227753	0.178372
hsa-mir-182*	0.151155794	0.079789533	hsa-mir-425-3p	0.183808363	0.094868
hsa-mir-340	0.128492001	0.08303611	hsa-mir-376a	0.166829158	0.161986
hsa-mir-425-3p	0.127886265	0.097067479	hsa-mir-340	0.113550436	0.088995
hsa-mir-199a*	0.127527328	0.079775882	hsa-mir-015a	0.110336695	0.095621
hsa-mir-376a	0.124903907	0.160137603	hsa-mir-181d	0.093074354	0.212993
hsa-mir-643	0.116164417	0.195641411	hsa-mir-532	0.086633253	0.064244
hsa-mir-025	0.11319355	0.079644761	hsa-mir-025	0.072911126	0.043857
hsa-mir-133b	0.100108157	0.121551814	hsa-mir-345	0.071420142	0.054899
hsa-mir-027b	0.07101679	0.067406666	hsa-mir-029a	0.058322216	0.093625

图 11- 表 VI (续)