



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111518883 B

(45) 授权公告日 2022.12.30

(21) 申请号 202010255792.2

(56) 对比文件

(22) 申请日 2020.04.02

CN 109439749 A, 2019.03.08

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 110699443 A, 2020.01.17

申请公布号 CN 111518883 A

CN 107385035 A, 2017.11.24

(43) 申请公布日 2020.08.11

CN 108165623 A, 2018.06.15

CN 109897855 A, 2019.06.18

(73) 专利权人 深圳大学

审查员 陈小燕

地址 518071 广东省深圳市南山区学苑大道1066号

(72) 发明人 苏明扬 苟德明

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 孙凤侠

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

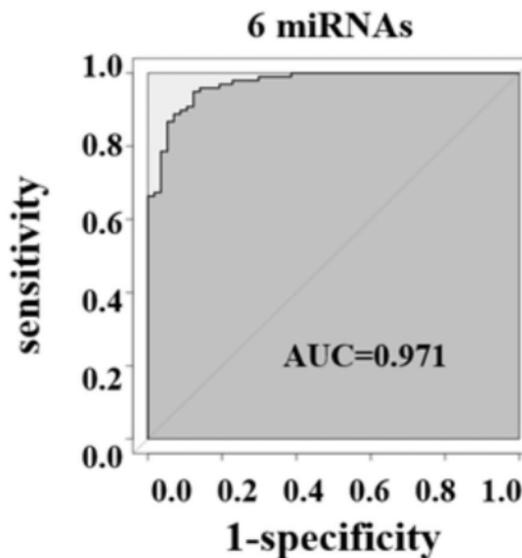
权利要求书1页 说明书9页  
序列表5页 附图4页

(54) 发明名称

一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物及其应用。本发明提供了一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物,所述miRNA标志物为hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-378b、hsa-miR-320e、hsa-miR-361-5p或hsa-miR-199a-3p中的任意一种或几种的组合;其序列依次如SEQ ID NO:1~6所示。本发明通过对血浆中的miRNA标志物的相对表达量进行差异分析,即可诊断受试者是否患有冠心病,且6个miRNA标志物的组合的AUC值为0.971,敏感性高达92.8%、特异性高达89.5%;因此,所述miRNA标志物在制备冠心病诊断试剂盒和/或制剂中具有广泛的应用前景。



1. 一种检测血浆miRNA标志物的引物和探针在制备试剂盒或试剂中的应用,其特征在于,所述血浆miRNA标志物由hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-378b、hsa-miR-320e、hsa-miR-361-5p和hsa-miR-199a-3p组成;所述hsa-miR-15b-5p的序列如SEQ ID NO:1所示,所述hsa-miR-29c-3p的序列如SEQ ID NO:2所示,所述hsa-miR-378b的序列如SEQ ID NO:3所示,所述hsa-miR-320e的序列如SEQ ID NO:4所示,所述hsa-miR-361-5p的序列如SEQ ID NO:5所示,所述hsa-miR-199a-3p的序列如SEQ ID NO:6所示。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述hsa-miR-15b-5p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:7所示,所述hsa-miR-15b-5p的正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:8~9所示;所述hsa-miR-29c-3p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:10所示,所述hsa-miR-29c-3p的正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:11~12所示;所述hsa-miR-378b的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:13所示,所述hsa-miR-378b的正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:14~15所示;所述hsa-miR-320e的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:16所示,所述hsa-miR-320e的正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:17~18所示;所述hsa-miR-361-5p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:19所示,所述hsa-miR-361-5p的正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:20~21所示;所述hsa-miR-199a-3p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:22所示,所述hsa-miR-199a-3p的正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:23~24所示;所述试剂盒或试剂中的探针的序列如SEQ ID NO:25所示。

## 一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学分子生物学技术领域。更具体地,涉及一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物及其应用。

### 背景技术

[0002] 冠状动脉疾病(Coronaryarterydisease,CAD)持续成为全世界发病率和致死率最高的疾病。经过四十年的不懈努力,尽管冠状动脉疾病的发病率有所降低,但在35岁以后死亡的个体中,仍然有超过1/3的人死于该疾病。根据《中国心血管病报告》显示,心血管病危险因素流行趋势明显,导致心血管病的发病人数持续增加,今后十年心血管患病人数将仍快速增长,心血管病死亡占城乡居民总死亡原因的首位。推算心血管病患者人数2.9亿,其中,脑卒中患病人数1300万,冠心病患病人数1100万,心衰患病人数450万,肺心病患病人数500万,风心病患病人数250万,先心病患病人数200万。

[0003] 冠心病是冠状动脉粥样硬化性心脏病的简称,是一种最常见的心脏病,是指因冠状动脉狭窄、供血不足而引起的心肌机能障碍和(或)器质性病变,故又称缺血性心肌病。

[0004] 随着对冠心病发病机制的深入研究,目前已经认识到在冠心病的发生发展过程中涉及多种分子机制,主要包括血管细胞脂类代谢异常、血管平滑肌细胞迁移、血管内皮细胞坏死引起的炎症反应以及心肌细胞缺氧引起的应激反应等。目前,冠心病常见的诊断方法为心电图、冠状动脉CT或冠状动脉造影;其中,心电图诊断的方法只对于急性缺血的患者适用,并且动态观察才能确定是否是冠心病,而对于稳定的冠心病患者,不能明确诊断,使用局限性较大;冠状动脉CT或冠状动脉造影可以明确冠心病诊断,但是此类方法属于具有放射性或者创伤性的检查手段,并且价格昂贵,不能作为常规冠心病早期诊断的筛查检查项目。同时,除了冠状动脉CT和冠状动脉造影外,也没有良好的对冠心病介入治疗后患者的术后疗效评估的方法。

[0005] 现有专利(申请号为201910678056.5)公开了用于冠心病诊断的miRNA探针组合物、引物组合物和冠心病诊断试剂盒,miRNA探针组合物miRNA-29a-3p、miRNA-574-3p或miRNA-574-5p能够作为早期冠心病的诊断标志物,但是其诊断冠心病的准确性、灵敏度和特异性均较低。因此,开发诊断准确性更高、灵敏度更高和特异性更强的冠心病的诊断方法,对有效控制冠心病的发病率和更深入的研究其发病机制具有重要意义。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是克服现有冠心病诊断方法的缺陷和不足,提供一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物及其应用。

[0007] 本发明的目的是提供一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物。

[0008] 本发明另一目的是提供所述miRNA标志物或其检测试剂在制备冠心病诊断试剂盒和/或制剂中的应用。

[0009] 本发明又一目的是提供一种检测所述miRNA标志物的引物。

[0010] 本发明再一目的是提供所述引物在制备冠心病诊断试剂盒中的应用。

[0011] 本发明再一目的是提供一种冠心病诊断试剂盒。

[0012] 本发明再一目的是提供所述试剂盒在冠心病诊断中的应用。

[0013] 本发明上述目的通过以下技术方案实现：

[0014] 本发明首先提供了一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物所述miRNA标志物为hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-378b、hsa-miR-320e、hsa-miR-361-5p或hsa-miR-199a-3p中的任意一种或几种的组合；所述hsa-miR-15b-5p的序列如SEQ ID NO:1所示，所述hsa-miR-29c-3p的序列如SEQ ID NO:2所示，所述hsa-miR-378b的序列如SEQ ID NO:3所示，所述hsa-miR-320e的序列如SEQ ID NO:4所示，所述hsa-miR-361-5p的序列如SEQ ID NO:5所示，所述hsa-miR-199a-3p的序列如SEQ ID NO:6所示。

[0015] 本发明研究发现与高风险正常对照受试者相比，所述miRNA标志物在冠心病患者血浆中的相对表达量显著升高，对应的AUC值为0.581~0.971，在诊断受试者是否患有冠心病中的准确性和敏感性高；因此，以下应用也应在本发明的保护范围之内：

[0016] 所述miRNA标志物或其检测试剂在制备冠心病诊断试剂盒和/或制剂中的应用。

[0017] 本发明还提供了一种检测所述miRNA标志物的引物，所述hsa-miR-15b-5p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:7所示，正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:8~9所示；所述hsa-miR-29c-3p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:10所示，正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:11~12所示；所述hsa-miR-378b的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:13所示，正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:14~15所示；所述hsa-miR-320e的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:16所示，正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:17~18所示；所述hsa-miR-361-5p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:19所示，正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:20~21所示；所述hsa-miR-199a-3p的逆转录引物的序列如SEQ ID NO:22所示，正向引物和反向引物的序列分别如SEQ ID NO:23~24所示。

[0018] 所述引物在制备冠心病诊断试剂盒中的应用，也应在本发明的保护范围之内。

[0019] 本发明还提供了一种冠心病诊断试剂盒，所述试剂盒包括能够检测所述miRNA标志物的引物。

[0020] 优选地，所述引物为SEQ ID NO:7~24所示的引物。

[0021] 优选地，所述试剂盒为实时荧光定量PCR检测试剂盒。

[0022] 优选地，所述试剂盒还包括探针，所述探针的序列如SEQ ID NO:25所示。

[0023] 另外，所述试剂盒在冠心病诊断中的应用，也应在本发明的保护范围之内。

[0024] 优选地，所述冠心病为冠状动脉粥样硬化。

[0025] 本发明具有以下有益效果：

[0026] 本发明提供了一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物及其应用。本发明通过对血浆中的miRNA标志物的相对表达量进行差异分析，即可诊断受试者是否患有冠心病；血浆相对于其他组织样本较易获得，与冠状动脉CT或冠状动脉造影相比，属于无创无辐射检查，极大地方便了临床使用、减轻了患者的痛苦。

[0027] 本发明筛选出的6个miRNA标志物在诊断受试者是否患有冠心病中均具有一定的准确性，均可作为冠心病诊断标志物，且6个miRNA标志物的组合的AUC值为0.971，显著提高了冠心病诊断的敏感性和特异性，敏感性高达92.8%、特异性高达89.5%，具有极其优良的

诊断参考价值;通过实时荧光定量PCR技术直接对冠心病患者的血浆miRNA进行检测,其检测效率比传统方法显著提高、定量更加准确、经济方便;另外,由于冠心病病人血液中的miRNA早于细胞内蛋白质类标志物释放进入血液中,检测其血浆水平可作为冠心病辅助早期诊断的标志物;因此,本发明提供的miRNA标志物为冠心病临床精准预防、早期诊断和个体化干预治疗提供了有效依据,为冠心病血浆miRNA的研究提供了理论依据,并为冠心病的临床分子诊断提供了新思路,具有一定的理论意义和潜在的实用价值。

## 附图说明

[0028] 图1是冠心病患者与高风险正常对照受试者的冠状动脉血管造影的分类标准,其中,“箭头”指示了血管狭窄的位置。

[0029] 图2是与高风险正常对照受试者血浆miRNA特异性表达图谱;其中,“CDH-2”和“CDH-3”均代表冠心病患者;“Nor-2”和“Nor-3”均代表高风险正常对照受试者。

[0030] 图3是冠心病患者与高风险正常对照受试者血浆初筛差异表达miRNA的火山图。

[0031] 图4是冠心病患者与高风险正常对照受试者血浆复筛差异表达miRNA的热图。

[0032] 图5是6个miRNA标志物在冠心病患者与高风险正常对照受试者中的表达差异的结果图;其中,(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)图分别为hsa-miR-15b-5p,hsa-miR-29c-3p,hsa-miR-378b,hsa-miR-320e,hsa-miR-361-5p和hsa-miR-199a-3p在冠心病患者与高风险正常对照受试者中的表达差异的结果图。

[0033] 图6是6个miRNA标志物单独在冠心病患者与高风险正常对照受试者ROC曲线分析结果图;其中,(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)图分别为hsa-miR-15b-5p,hsa-miR-29c-3p,hsa-miR-378b,hsa-miR-320e,hsa-miR-361-5p和hsa-miR-199a-3p在冠心病患者与高风险正常对照受试者ROC曲线分析结果图。

[0034] 图7是6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者ROC曲线分析结果图。

[0035] 图8是6个miRNA标志物的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者ROC曲线分析结果图。

## 具体实施方式

[0036] 以下结合具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0037] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0038] 实施例1冠心病患者血浆miRNA特异性表达图谱的绘制

[0039] 1、临床样本的搜集和临床资料的整理

[0040] 所有研究对象的血液样品来源于黑龙江省牡丹市第二人民医院,血浆收集流程为:对于冠状动脉血管造影结果显示冠状动脉阻塞和未阻塞的患者,收集其外周血于含有EDTA抗凝剂的采血管,在4℃、3000g离心力条件下离心10分钟,上清为血浆;血浆样本分装为20μL的体系,保存于-80℃;同时系统收集患者的病理学资料,包括但不限于冠状动脉造影结果、血常规检测结果等。

[0041] 2、冠心病患者与高风险正常对照的筛选

[0042] 从收集的的临床血浆中选取冠心病患者(CHD),平均年龄 $56 \pm 9$ 岁;选取高风险正常对照受试者(CK),平均年龄 $51 \pm 11$ 岁。

[0043] 冠心病患者与高风险正常对照受试者的冠状动脉血管造影的分类标准如图1所示,可以看出,冠心病患者的冠状动脉血管造影结果显示血管明显狭窄,而高风险正常对照受试者的冠状动脉血管造影结果显示血管未出现狭窄。

[0044] 3、血浆miRNA的相对表达量计算及表达图谱绘制

[0045] (1) 实验方法

[0046] 将18例不同分组的血浆样本随机混合成3例混合血浆样本,进行血浆miRNA的实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测,用于血浆miRNA特异性表达图谱的绘制。

[0047] 粗提RNA:20 $\mu$ L血浆和20 $\mu$ L裂解液在50 $^{\circ}$ C条件下孵育15分钟、95 $^{\circ}$ C变性5分钟、13000g离心力条件下4 $^{\circ}$ C离心5分钟;得到35 $\mu$ L粗提RNA。

[0048] cDNA合成:取4 $\mu$ L粗提RNA,1 $\mu$ L 0.05 $\mu$ M逆转录引物,1U PolyA Polymerase(多聚腺苷酸聚合酶),100U MMLV(鼠白血病逆转录酶),1.5 $\mu$ L reaction buffer(反应缓冲液),RNase-free Water(无RNA酶水)补足至10 $\mu$ L;37 $^{\circ}$ C保温15min,42 $^{\circ}$ C保温15min,75 $^{\circ}$ C保温5min以灭活酶,然后迅速置于冰上,静置2min以终止灭活;其中,reaction buffer(反应缓冲液)包含以下终浓度的组分:200mM Tris-HCl,600mM NaCl,40mM MgCl<sub>2</sub>,4mM ATP,2mM dNTP,pH 8.0;得到10 $\mu$ L cDNA。

[0049] RT-qPCR反应:取0.5 $\mu$ L稀释一倍后上述cDNA,2 $\mu$ L 10X Taq reaction buffer(Taq酶反应缓冲液),0.5 $\mu$ L 2.5mM dNTP(脱氧核苷酸混合液),4 $\mu$ L 1 $\mu$ M上游扩增引物,4 $\mu$ L 1 $\mu$ M下游扩增引物,5 $\mu$ L 1 $\mu$ M Taqman荧光探针引物,0.5 $\mu$ L Taq DNA polymerase(Taq DNA聚合酶),0.2 $\mu$ L 100X ROX(荧光参比试剂),Nuclease-free Water(无核酸酶水)补足至20 $\mu$ L;其中,Taq reaction buffer(Taq酶反应缓冲液)包含以下终浓度的组分:20mM Tris-HCl,50mM KCl,2mM MgCl<sub>2</sub>,5%Glycerol,pH 8.5。

[0050] RT-qPCR检测采用探针法,PCR运行仪器为ABI Step-One-Plus thermal cycler,每20 $\mu$ LRT-qPCR检测体系加入0.5 $\mu$ L稀释一倍的cDNA,RT-qPCR检测条件为:预变性95 $^{\circ}$ C,5分钟,变性95 $^{\circ}$ C,10s,退火60 $^{\circ}$ C,40s,40个循环,用时50分钟,每个RT-qPCR反应两个复孔。

[0051] 以外参cel-miR-54为参照,用 $2^{-\Delta Ct}$ 计算血浆miRNA的相对表达量,其中, $\Delta Ct$ 的计算公式为: $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{cel-miR-54}$ ,检验方法为two-tailed Student's test。

[0052] (2) 实验结果

[0053] 冠心病患者与高风险正常对照受试者血浆miRNA特异性表达图谱如图2所示,可以看出,冠心病患者与高风险正常对照受试者的血浆miRNA的相对表达量存在差异表达。

[0054] 冠心病患者与高风险正常对照受试者血浆初筛差异表达miRNA的火山图如图3所示,可以看出,特异的miRNA在冠心病患者血浆中表现出表达上调或下调的趋势。

[0055] 另外,从以上实验可知:每4 $\mu$ L粗提RNA逆转录生成10 $\mu$ L cDNA,则35 $\mu$ L粗提RNA既可合成87.5 $\mu$ L cDNA,用时35分钟左右;每个RT-qPCR反应实际消耗0.25 $\mu$ L cDNA,则87.5 $\mu$ L cDNA可检测175个不同的miRNA(每个miRNA有两个复孔,实际检测一个miRNA需消耗0.5 $\mu$ L cDNA),用时50分钟,因此,每20 $\mu$ L血浆可以在75分钟时间内检测175个miRNA;说明本发明缩短了诊断是否患有冠心病的时间,检测效率高。

[0056] 实施例2血浆miRNA标志物在冠心病患者与高风险正常对照受试者中的复筛

## [0057] 1、实验方法

[0058] 选取18例冠心病患者与和12例高风险正常对照受试者的血浆样本进行血浆miRNA直扩RT-qPCR (RT-qPCR检测方法参照实施例1),求得各样本中差异表达的血浆miRNA的Ct值,分别利用28个候选miRNA标志物 (let-7i-5p,miR-126-3p,miR-133b,miR-1-3p,miR-145-5p,miR-15b-5p,miR-16-2-3p,miR-16-5p,miR-199a-3p,miR-199a-5p,miR-199b-3p,miR-29b-3p,miR-378b,miR-361-5p,miR-409-3p,miR-149-5p,miR-155-5p,miR-15b-3p,miR-186-5p,miR-187-3p,miR-208a-3p,miR-26a-5p,miR-27a-3p,miR-29c-3p,miR-320e,miR-499a-5p,miR-92a-3p和miR-92b-5p)的Ct值比cel-miR-54的Ct值做图,同时设置阴性对照组 (RT-qPCR反应体系中不加cDNA模板,以ddH<sub>2</sub>O代替),所有RT-qPCR均做2次重复实验。

## [0059] 2、实验结果

[0060] 冠心病患者与高风险正常对照受试者血浆复筛差异表达miRNA的热图如图4所示,可以看出,28个候选miRNA标志物在冠心病患者与高风险正常对照受试者血浆中的表达量均存在显著差异。

[0061] 实施例3血浆miRNA标志物在冠心病患者与高风险正常对照受试者中的表达差异分析及临床效能评价

## [0062] 1、血浆miRNA标志物在冠心病患者与高风险正常对照受试者中的表达差异分析

## [0063] (1) 实验方法

[0064] 选取95例冠心病患者与和60例高风险正常对照受试者的血浆样本,利用表1中miRNA标志物的引物、探针 (含有FAM发光基团、BHQ1淬灭基团、经过ZEN蔡基偶氮基团进行修饰,FAM/cagagccac/ZEN/ctgggcaattt/BHQ1) 和外参标准品,进行血浆miRNA直扩RT-qPCR (RT-qPCR检测方法参照实施例1),求得各样本中差异表达的血浆miRNA的Ct值比cel-miR-54的Ct值,用 $2^{-\Delta Ct}$ 计算血浆miRNA的相对表达量,其中, $\Delta Ct$ 的计算公式为: $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{cel-miR-54}$ ,同时设置阴性对照组 (RT-qPCR反应体系中不加cDNA模板,以ddH<sub>2</sub>O代替),结果用mean±SD (平均值±标准差)表示,检验方法为two-tailed Student's test,所有RT-qPCR均做2次重复实验。

[0065] 表1 miRNA标志物及其引物、探针和外参标准品的序列

miRNA 标志物	名称	序列	
[0066] hsa-miR-15b-5p	miRNA	uagcagcacaucagguuuaca	SEQ ID NO: 1
	逆转录引物	gtgcagggtccgaggtcagagccacctgggcaat	SEQ ID NO: 7

[0067]

		tttttttttataaa	
	正向引物	ctgggtagcagcacatcatgg	SEQ ID NO: 8
	反向引物	cagtgccaggtccgaggt	SEQ ID NO: 9
hsa-miR-29c-3p	miRNA	uagcaccauuugaaaucgguaa	SEQ ID NO: 2
	逆转录引物	gtgcagggtccgaggtcagagccacctgggcaat ttttttttaaccg	SEQ ID NO: 10
	正向引物	ctgggtagcaccatttgaat	SEQ ID NO: 11
	反向引物	cagtgccaggtccgaggt	SEQ ID NO: 12
hsa-miR-378b	miRNA	acuggacuuggaggcagaa	SEQ ID NO: 3
	逆转录引物	gtgcagggtccgaggtcagagccacctgggcaat tttttttttctgc	SEQ ID NO: 13
	正向引物	ctgggactggacttgag	SEQ ID NO: 14
	反向引物	cagtgccaggtccgaggt	SEQ ID NO: 15
hsa-miR-320e	miRNA	aaagcuggguugagaagg	SEQ ID NO: 4
	逆转录引物	gtgcagggtccgaggtcagagccacctgggcaat ttttttttcctct	SEQ ID NO: 16
	正向引物	ctgggaaagctgggtg	SEQ ID NO: 17
	反向引物	cagtgccaggtccgaggt	SEQ ID NO: 18
hsa-miR-361-5p	miRNA	uuaucagaaucuccagggguac	SEQ ID NO: 5
	逆转录引物	gtgcagggtccgaggtcagagccacctgggcaat ttttttttgtacc	SEQ ID NO: 19
	正向引物	ctgggttatcagaatctccag	SEQ ID NO: 20
	反向引物	cagtgccaggtccgaggt	SEQ ID NO: 21
hsa-miR-199a-3p	miRNA	acaguagucugcacauugguaa	SEQ ID NO: 6
	逆转录引物	gtgcagggtccgaggtcagagccacctgggcaat ttttttttaacca	SEQ ID NO: 22
	正向引物	ctgggacagtagtctgcacat	SEQ ID NO: 23
	反向引物	cagtgccaggtccgaggt	SEQ ID NO: 24
	探针	cagagccacctgggcaattt	SEQ ID NO: 25

[0068]	miRNA	aggauaugagacgacgagaaca	SEQ ID NO: 26
	逆转录引物	gtgcagggtccgaggtcagagccacctgggcaat ttttttttttgttct	SEQ ID NO: 27
	正向引物	ctgggaggatatgagacgacg	SEQ ID NO: 28
	反向引物	cagtcagggtccgaggt	SEQ ID NO: 29

[0069] (2) 实验结果

[0070] 6个miRNA标志物在冠心病患者与高风险正常对照受试者中的表达差异的结果图如图5所示,其中,(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)图分别为hsa-miR-15b-5p,hsa-miR-29c-3p,hsa-miR-378b,hsa-miR-320e,hsa-miR-361-5p和hsa-miR-199a-3p在冠心病患者与高风险正常对照受试者中的表达差异的结果图,可以看出,6个miRNA标志物的血浆相对表达量聚集性良好,与高风险正常对照受试者相比,6个miRNA标志物在冠心病患者血浆中的相对表达量均显著升高( $p < 0.01$ )。

[0071] 2、血浆miRNA标志物的临床效能评价

[0072] (1) 实验方法

[0073] 为了评价单独的6个miRNA标志物(hsa-miR-15b-5p,hsa-miR-29c-3p,hsa-miR-378b,hsa-miR-320e,hsa-miR-361-5p和hsa-miR-199a-3p)、6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合(hsa-miR-378b和hsa-miR-320e的2个标志物组合,hsa-miR-378b和hsa-miR-15b-5p的2个标志物组合,hsa-miR-320e和hsa-miR-15b-5p的2个标志物组合,hsa-miR-320e、hsa-miR-15b-5p和hsa-miR-378b的3个标志物组合,hsa-miR-320e、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-378b和hsa-miR-29c-3p的4个标志物组合,hsa-miR-320e、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-378b、hsa-miR-29c-3p和hsa-miR-361-5p的5个标志物组合)、以及6个miRNA标志物的组合作为冠心病诊断标志物的能力,对冠心病患者与高风险正常对照受试者的RT-qPCR检测血浆miRNA表达结果进行了风险评估,通过ROC曲线来评价miRNA标志物在冠心病诊断中的价值。

[0074] 以敏感性(sensitivity)作为纵坐标代表真阳性率,1-特异性(specificity)作为横坐标代表假阳性率,做ROC曲线分析,ROC曲线下面积(AUC值)越大,诊断准确性越高;在ROC曲线上,最靠近坐标图左上方的点为敏感性和特异性均较高的临界值。

[0075] (2) 实验结果

[0076] 单独的6个miRNA标志物在冠心病患者与高风险正常对照受试者ROC曲线分析结果图如图6所示,其中,(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)图分别为hsa-miR-15b-5p,hsa-miR-29c-3p,hsa-miR-378b,hsa-miR-320e,hsa-miR-361-5p和hsa-miR-199a-3p在冠心病患者与高风险正常对照受试者ROC曲线分析结果图,可以看出,hsa-miR-15b-5p的AUC值为0.663,hsa-miR-29c-3p的AUC值为0.615,hsa-miR-378b的AUC值为0.784,hsa-miR-320e的AUC值为0.811,hsa-miR-361-5p的AUC值为0.603,hsa-miR-199a-3p的AUC值为0.581;说明单独的6个miRNA标志物在诊断受试者是否患有冠心病中均具有一定的准确性,均可作为冠心病诊断标志物。

[0077] 6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者

ROC曲线分析结果图如图7所示,可以看出,6个miRNA标志物中的2个、3个、4个或5个的组合的AUC值为0.849~0.961;说明与单独的6个miRNA标志物相比,6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合的准确性提高。

[0078] 6个miRNA标志物的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者ROC曲线分析结果图如图8所示,可以看出,6个miRNA标志物的组合的AUC值为0.971;说明6个miRNA标志物的组合在诊断受试者是否患有冠心病中的准确度非常高。

[0079] 另外,单独的6个miRNA标志物和6个miRNA标志物的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者敏感性和特异性结果如表2所示,可以看出,6个miRNA标志物单独用于冠心病的诊断时的敏感性为55.7%~76.5%、特异性为56.3%~76.6%,而6个miRNA标志物的组合用于冠心病的诊断时的敏感性为92.8%、特异性为89.5%。

[0080] 表2单独的6个miRNA标志物和6个miRNA标志物的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者敏感性和特异性结果

ROC	miRNAs						
	miR-15b-5p	miR-29c-3p	miR-378b	miR-320e	miR-361-5p	miR-199a-3p	6 miRNAs
[0081] AUC	0.663	0.615	0.784	0.811	0.603	0.581	0.971
敏感性(%)	72.1	59.4	76.5	68.5	56.2	55.7	92.8
特异性(%)	60.3	56.3	74.3	76.6	58.5	59.3	89.5
[0082] 95% 置信区间	0.633-0.702	0.351-0.867	0.592-0.930	0.602-0.912	0.492-0.832	0.481-0.814	0.948-0.993
显著性水平 P	< 0.004	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.003	< 0.005	< 0.001

[0083] 6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者敏感性和特异性结果如表3所示,可以看出,6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合用于冠心病的诊断时的敏感性为75.6%~90.3%、特异性为81.6%~90.3%。

[0084] 以上结果说明,相比于单独的6个miRNA标志物、6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合分别用于冠心病的诊断,hsa-miR-15b-5p,hsa-miR-29c-3p,hsa-miR-378b,hsa-miR-320e,hsa-miR-361-5p和hsa-miR-199a-3p 6个miRNA标志物的组合在诊断受试者是否患有冠心病中的准确更性、特异性更强、敏感性更高,具有极其优良的诊断参考价值。

[0085] 表3 6个miRNA标志物中的任意2~5个的组合在冠心病患者与高风险正常对照受试者敏感性和特异性结果

[0086]

ROC	miRNAs					
	miR-378b / miR-320e	miR-378b / miR-15b-5p	miR-320e / miR-15b-5p	miR-320e / miR-15b-5p / miR-378b	miR-320e / miR-15b-5p / miR-378b / miR-29c-3p	miR-320e / miR-15b-5p / miR-378b / miR-29c-3p / miR-361-5p
AUC	0.875	0.849	0.922	0.959	0.959	0.961
敏感性(%)	80.2	75.6	86.7	90.3	90.2	88.3
特异性(%)	82.3	81.6	83.4	88.4	88.5	90.3
95% 置信区 间	0.843-0.902	0.632-0.907	0.652-0.910	0.732-0.921	0.752-0.882	0.885-0.934
显著性水平 P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

[0087] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 深圳大学
- [0003] <120> 一种用于冠心病诊断的血浆miRNA标志物及其应用
- [0004] <140> 2020102557922
- [0005] <160> 29
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 22
- [0009] <212> RNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] uagcagcaca ucaugguua ca 22
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 22
- [0015] <212> RNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] uagcaccauu ugaaaucggu ua 22
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 19
- [0021] <212> RNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] acuggacuug gaggcagaa 19
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 18
- [0027] <212> RNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] aaagcugggu ugagaagg 18
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 22
- [0033] <212> RNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] uuaucagaau cuccaggggu ac 22
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 22

- [0039] <212> RNA  
[0040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0041] <400> 6  
[0042] acaguagucu gcacauuggu ua 22  
[0043] <210> 7  
[0044] <211> 50  
[0045] <212> DNA  
[0046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0047] <400> 7  
[0048] gtgcagggtc cgaggtcaga gccacctggg caattttttt tttttgtaa 50  
[0049] <210> 8  
[0050] <211> 21  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0053] <400> 8  
[0054] ctgggtagca gcacatcatg g 21  
[0055] <210> 9  
[0056] <211> 18  
[0057] <212> DNA  
[0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0059] <400> 9  
[0060] cagtgcaggg tccgaggt 18  
[0061] <210> 10  
[0062] <211> 50  
[0063] <212> DNA  
[0064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0065] <400> 10  
[0066] gtgcagggtc cgaggtcaga gccacctggg caattttttt tttttaaccg 50  
[0067] <210> 11  
[0068] <211> 21  
[0069] <212> DNA  
[0070] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0071] <400> 11  
[0072] ctgggtagca ccatttgaaa t 21  
[0073] <210> 12  
[0074] <211> 18  
[0075] <212> DNA  
[0076] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0077] <400> 12

- [0078] cagtgcaggg tccgaggt 18  
[0079] <210> 13  
[0080] <211> 50  
[0081] <212> DNA  
[0082] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0083] <400> 13  
[0084] gtgcagggtc cgaggtcaga gccacctggg caatTTTTTT tTTTTtctgc 50  
[0085] <210> 14  
[0086] <211> 18  
[0087] <212> DNA  
[0088] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0089] <400> 14  
[0090] ctgggactgg acttggag 18  
[0091] <210> 15  
[0092] <211> 18  
[0093] <212> DNA  
[0094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0095] <400> 15  
[0096] cagtgcaggg tccgaggt 18  
[0097] <210> 16  
[0098] <211> 50  
[0099] <212> DNA  
[0100] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0101] <400> 16  
[0102] gtgcagggtc cgaggtcaga gccacctggg caatTTTTTT ttttccttct 50  
[0103] <210> 17  
[0104] <211> 17  
[0105] <212> DNA  
[0106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0107] <400> 17  
[0108] ctgggaaagc tgggttg 17  
[0109] <210> 18  
[0110] <211> 18  
[0111] <212> DNA  
[0112] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0113] <400> 18  
[0114] cagtgcaggg tccgaggt 18  
[0115] <210> 19  
[0116] <211> 50

- [0117] <212> DNA  
[0118] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0119] <400> 19  
[0120] gtgcagggtc cgaggtcaga gccacctggg caatTTTTTT tttgtacc 50  
[0121] <210> 20  
[0122] <211> 21  
[0123] <212> DNA  
[0124] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0125] <400> 20  
[0126] ctgggttattc agaattctcca g 21  
[0127] <210> 21  
[0128] <211> 18  
[0129] <212> DNA  
[0130] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0131] <400> 21  
[0132] cagtgcaggg tccgaggt 18  
[0133] <210> 22  
[0134] <211> 50  
[0135] <212> DNA  
[0136] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0137] <400> 22  
[0138] gtgcagggtc cgaggtcaga gccacctggg caatTTTTTT ttttaacca 50  
[0139] <210> 23  
[0140] <211> 21  
[0141] <212> DNA  
[0142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0143] <400> 23  
[0144] ctgggacagt agtctgcaca t 21  
[0145] <210> 24  
[0146] <211> 18  
[0147] <212> DNA  
[0148] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0149] <400> 24  
[0150] cagtgcaggg tccgaggt 18  
[0151] <210> 25  
[0152] <211> 20  
[0153] <212> DNA  
[0154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0155] <400> 25

- [0156] cagagccacc tgggcaattt 20  
[0157] <210> 26  
[0158] <211> 22  
[0159] <212> RNA  
[0160] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0161] <400> 26  
[0162] aggauaugag acgacgagaa ca 22  
[0163] <210> 27  
[0164] <211> 50  
[0165] <212> DNA  
[0166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0167] <400> 27  
[0168] gtgcagggtc cgaggtcaga gccacctggg caattttttt tttttgttct 50  
[0169] <210> 28  
[0170] <211> 21  
[0171] <212> DNA  
[0172] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0173] <400> 28  
[0174] ctgggaggat atgagacgac g 21  
[0175] <210> 29  
[0176] <211> 18  
[0177] <212> DNA  
[0178] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0179] <400> 29  
[0180] cagtgcaggg tccgaggt 18

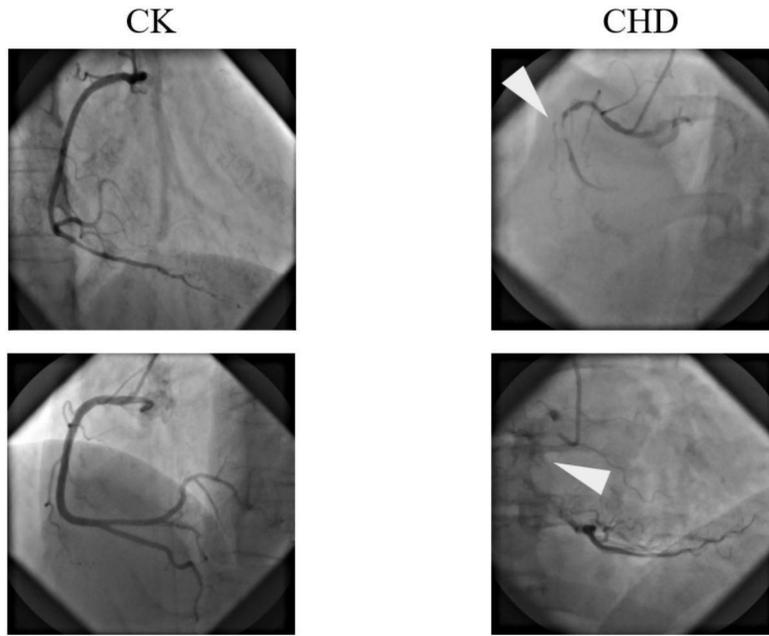


图1

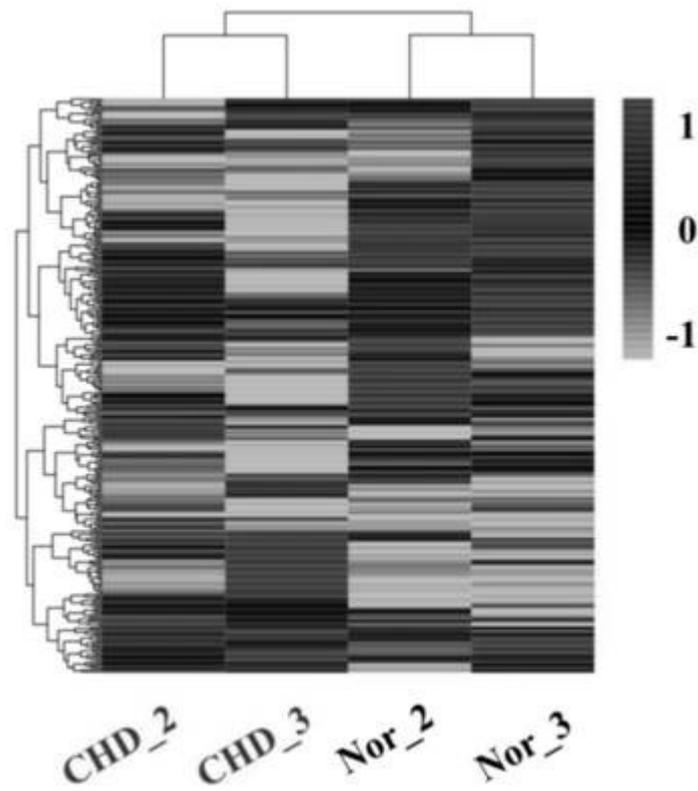


图2

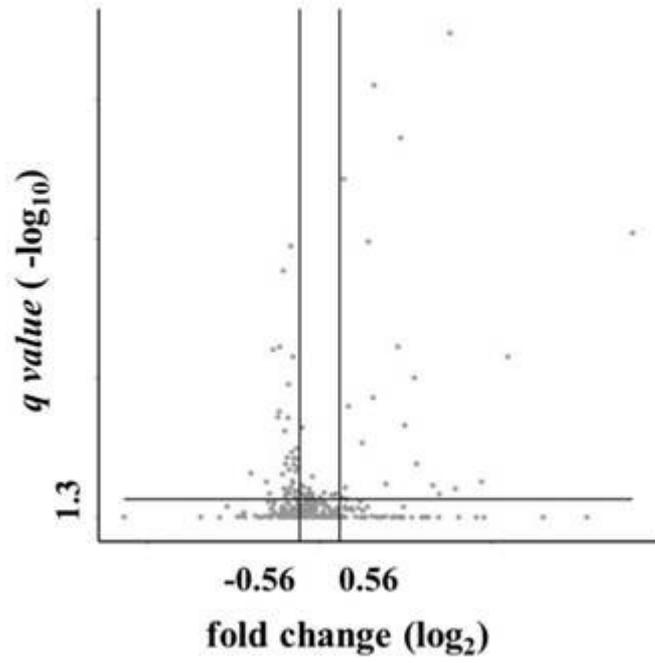


图3

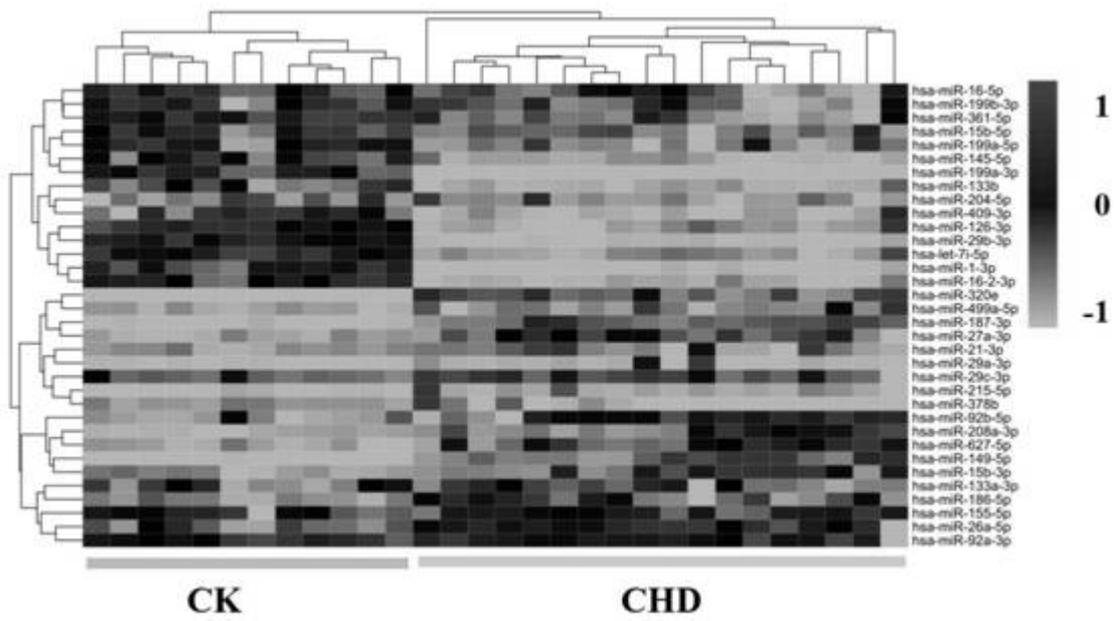


图4

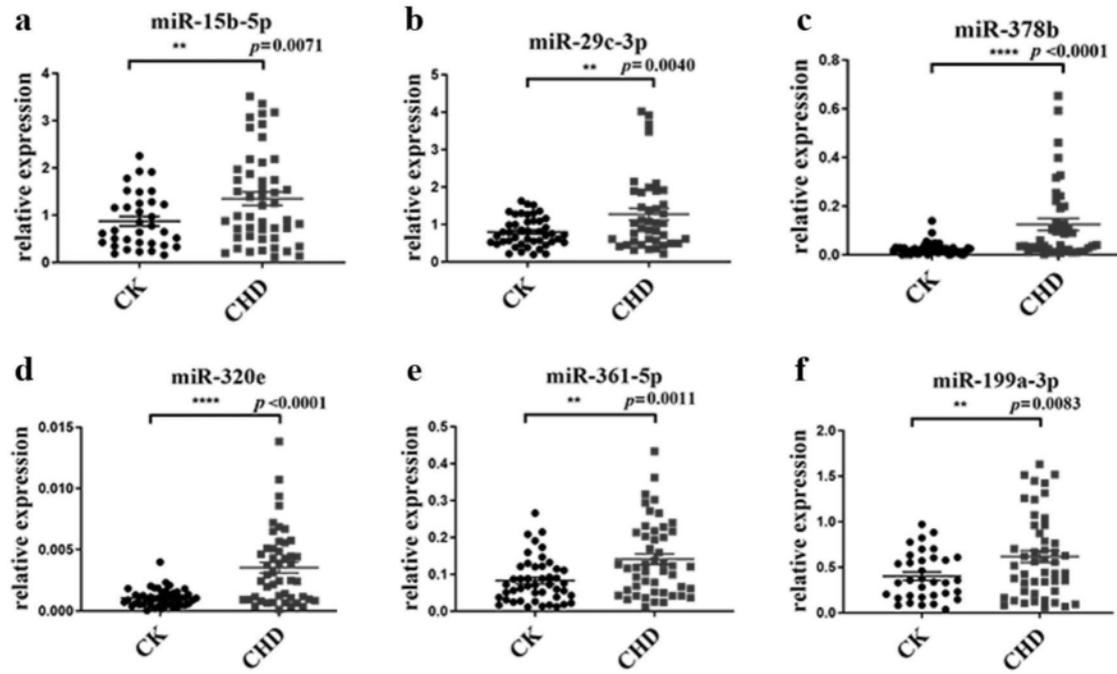


图5

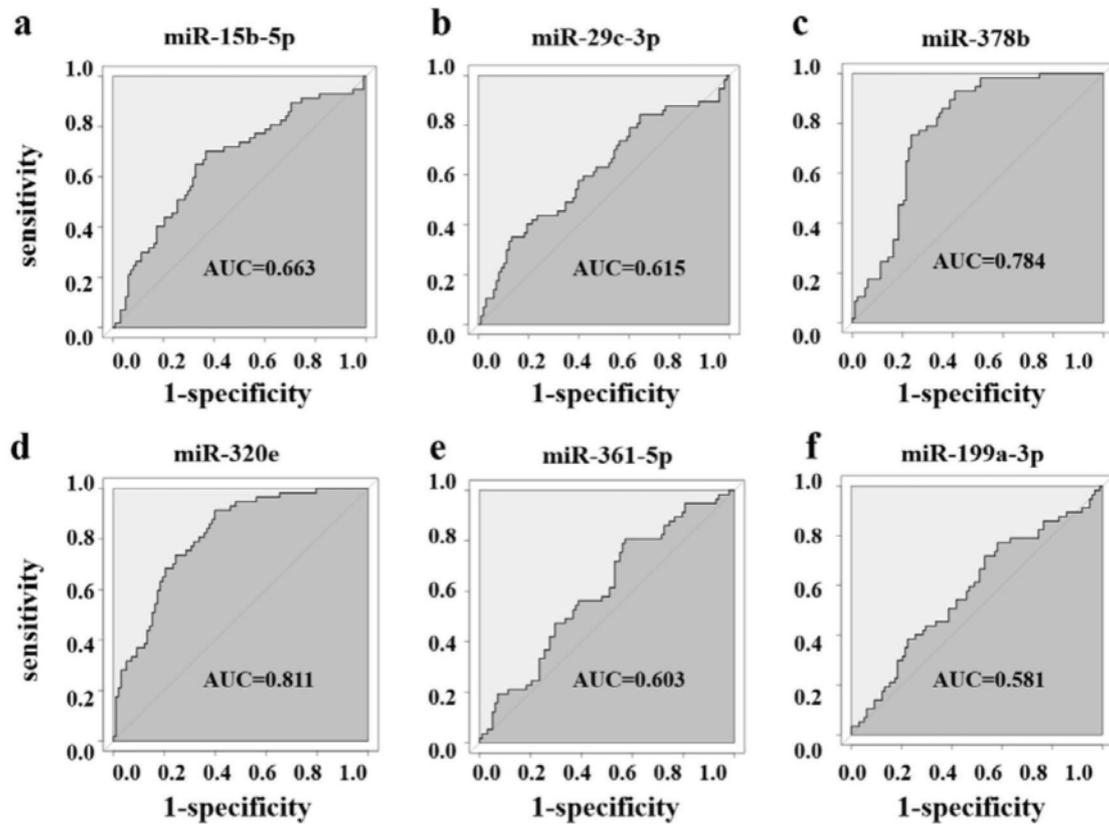


图6

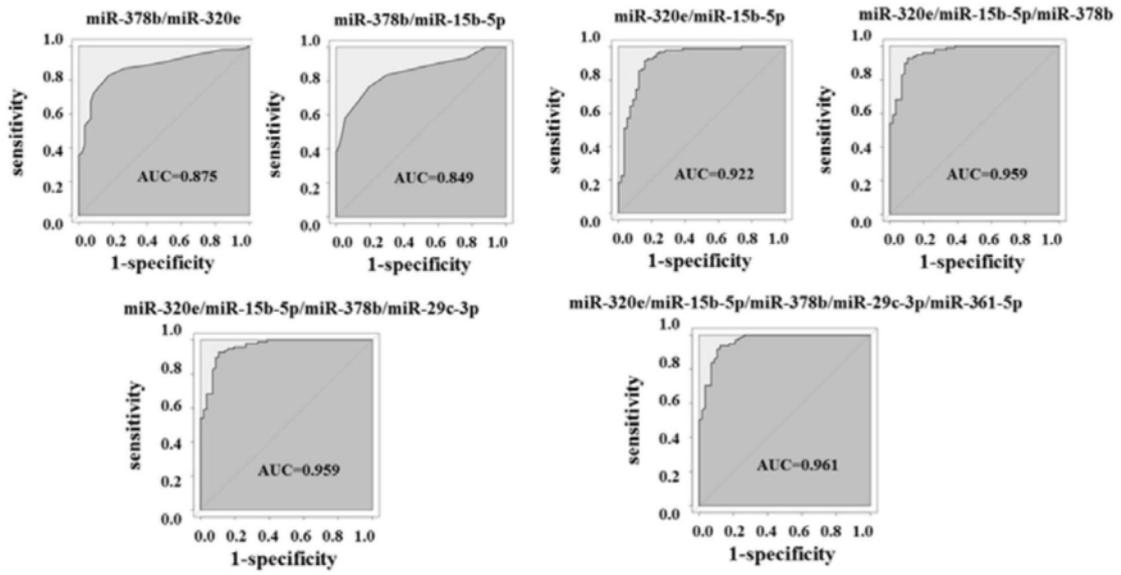


图7

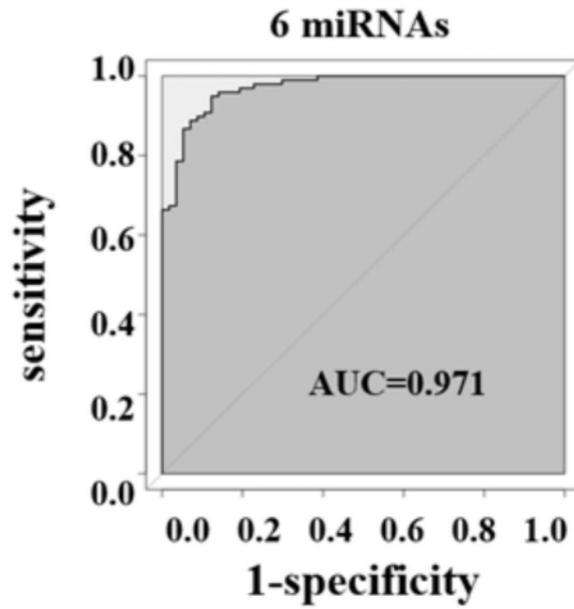


图8