



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107058469 B

(45)授权公告日 2020.09.01

(21)申请号 201611002735.3

(22)申请日 2016.11.03

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107058469 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(73)专利权人 中国人民解放军陆军军医大学

地址 400037 重庆市沙坪坝区高滩岩

(72)发明人 徐刚 黄河 高钰琪 刘宝 陈建

(74)专利代理机构 北京中政联科专利代理事务

所(普通合伙) 11489

代理人 秦佩

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

EP 2112235 A1,2009.10.28

US 2011003704 A1,2011.01.06

Accession No: NR\_030387.Homo sapiens  
microRNA 449b (MIR449B), microRNA.

《Genbank》.2010,全文.

审查员 姜紫耀

权利要求书1页 说明书4页

序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种通过循环microRNA-449b-3p表达水平  
预测急性高山病发病风险的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种检测急性高山病易感者的  
microRNA标志物,及其在制备预测急性高山病发  
病风险的试剂盒中的应用。主要通过实时荧光定  
量PCR等方法对受测人平原血浆中microRNA-  
449b-3p分子进行检测,并通过其表达水平的高  
低来预测急性高山病发病风险,该microRNA作为  
分子标志物,具有特异性强,灵敏度高,无创性,  
便捷性等特点,特别适合在平原进行大规模急性  
高山病易感者的筛选。

1. 检测microRNA-449b-3p表达水平的引物在制备急性高山病易感者的预测试剂盒中的应用,其特征在于,所述microRNA-449b-3p的序列为SEQ ID NO:1。

## 一种通过循环microRNA-449b-3p表达水平预测急性高山病发病风险的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及检测用试剂盒,具体是通过涉及一种通过平原血浆循环microRNA-449b-3p表达水平预测急性高山病发病风险,从而用于评定人体急性高山病的易感性。

### 背景技术

[0002] 急性高山病(acute mountain sickness,AMS),又称作急性轻症高原反应,是发生在长期生活于低海拔地区的人,在未适应新环境的情况下快速进入2500m以上高原后1-3天产生,包括失眠、头痛、眩晕、食欲缺乏、情绪不安及呕吐等一系列症状,其中剧烈的头疼是AMS的典型症状。而AMS根据上升速度和具体海拔的不同,其发病率高达50%至85%(Bartsch P and Swenson E R(2013),Clinical practice:Acute high-altitude illnesses,《N Engl J Med》,368(24),2294-302.),对于进入高原的人群而言,AMS会严重影响其工作和生活能力。更严重的是,如果AMS没有得到有效的控制与治疗,很可能发展成为具有高致死率的高原脑水肿(high altitude cerebral edema,HACE)(Boos C J et al.(2016),High Altitude and Acute Mountain Sickness and Changes in Circulating Endothelin-1,Interleukin-6,and Interleukin-17a,《High Altitude Medicine & Biology》,17(1),25-31.)。

[0003] AMS有明显的遗传倾向性及个体易感性,高原低压低氧的环境因素和遗传因素均可以影响AMS的发生。多年以来,AMS的遗传倾向性及个体易感性一直是国内外学者关注的热点,尽管有人已经提出使用低氧敏感基因EGLN1和HIF-1AN的SNP位点对AMS易感人群进行预测,但是目前看来这些标记物在准确性和特异性等方面都不尽如人意(Zhang E,Zhang J,Jin J,Qin J,Li H,Huang L:Variants of the low oxygen sensors EGLN1 and HIF-1AN associated with acute mountain sickness.《International journal of molecular sciences》,2014,15(12):21777-21787.)。我国高原面积辽阔(约占国土面积的1/5)近年以来,青藏高原平均海拔在4000米以上,随着国内外高原旅游业及高原经济建设的蓬勃发展,越来越多的平原世居人群进入高原,而AMS的发生已给人们的生活和工作造成十分严重的影响,所以亟待寻找到在平原对AMS的发病易感性进行预测的有效方法。

[0004] MicroRNA是一类广泛存在于真核生物中的内源性小分子非编码RNA,长度为18~24个核苷酸。MicroRNA通过转录后水平抑制靶基因的表达,调控细胞分化、增殖、凋亡等生命活动,在胚胎发育、机体代谢、疾病发生发展等多种生理和病理过程中发挥重要作用。近年来,研究人员在血液、唾液、尿液等多种体液中检测到microRNA,提出循环microRNA的概念。并且,microRNA的表达水平的高低和其遗传基因的差异性高度相关,近年来,大量的研究表明,循环microRNA对肿瘤、高血压、卒中及一系列疾病的提前诊断和发病预测都有很好的特异性和敏感性。再者血液等体液标本易于获得,临床可操作性强且创伤性小,而且循环microRNA稳定性好,检测便利,因此,循环microRNA具有作为AMS无创性生物标志物的潜能,适用于AMS易感性人群筛查(Ghai V and Wang K(2016),Recent progress toward the

use of circulating microRNAs as clinical biomarkers,《Arch Toxicol》.)。

[0005] 而关于循环microRNA与AMS易感性之间的相关性,尚未见报道。

[0006] 更未见一种用于检测血中microRNA-449b-3p表达水平来预测AMS发病风险的报道。

[0007] 通过平原世居者平原血浆循环microRNA的芯片谱筛查,结合其高原缺氧暴露后的AMS发病情况,发现平原血浆循环microRNA-449b-3p在AMS易感者和AMS耐受者之间存在着差异。再通过SYBR (即SYBR GREEN染料,缩写SYBR) 实时荧光定量PCR (聚合酶链反应) 的方法检测了平原血浆循环microRNA-449b-3p表达水平,证实了平原血浆循环microRNA-449b-3p表达水平和AMS的易感性之间存在着相关性。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于寻找与AMS相关的平原血浆新型生物学标志物,而另一个目的在于提供平原血浆microRNA-449b-3p在制备平原预测AMS发病风险的试剂盒中的运用。该试剂盒能用于平原人在进入高原前对AMS易感者的筛选,指导AMS的预防,减轻AMS的威胁。

[0009] 发明人通过对13例AMS患者和9例健康对照的血浆microRNA表达谱进行对比分析,后对41例AMS患者和46例健康对照的血浆microRNA-449b-3p表达水平进行比较,研究microRNA-449b-3p与AMS的相关性,寻找出了敏感可信的AMS易感生物遗传标记。步骤是使用EDTA-Na抗凝管采集22名拟从平原快速进入高原人群的外周血2ml,3000×g,25摄氏度下分离10分钟后提取上层血浆-80摄氏度下保存备用,通过microRNA表达谱芯片(miRCURYTM LNA Array (v.18.0))对血浆中microRNA表达水平进行检测,待人群进入高原后,根据AMS国际通用诊断标准路易斯湖评分诊断系统区分AMS和健康人群 (Maggiolini M et al. (1998) Assessment of acute mountain sickness by different score protocols in the Swiss Alps Aviat Space Environ Med,69 (12),1186-92.),比较AMS和健康人群microRNA表达谱,筛选AMS易感相关microRNA,发现microRNA-449b-3p在AMS易感者和健康人群中表达存在显著差异。

[0010] 使用qPCR技术在另一独立人群中对microRNA-449b-3p在AMS易感者(41例)和健康对照组(46例)中的表达分布进行检测。整个过程中血浆RNA提取采用德国凯杰技术有限公司的血浆microRNA柱式抽提试剂盒(miRNeasy Serum/Plasma Kit,货号:217184)提取,然后采用实时荧光定量PCR(Hairpin-it™miRNAs RT-PCR Quantitation Kit,货号:E01008)的方法进行对microRNA-449b-3p和外参cel-miR-39进行扩增;在分别计算每例标本的microRNA-449b-3p相对cel-miR-39的归一化表达水平,结果经过SPSS 19.0进行检验,以P<0.05为显著性检验标准,发现AMS易感组标本(41例)和正常人群(46例)血浆microRNA-449b-3p的表达水平存在着显著差异(表1)

[0011] 本发明所要解决的技术问题是,找到一种平原血浆microRNA标志物可以筛选出AMS易感者和耐受者。通过检测人平原血浆中的microRNA-449b-3p的含量,通过表达量高低来区分AMS易感者和耐受者,进而预测进入高原后AMS的发病风险。

[0012] 本发明解决上述问题的技术方案是:检测平原人血浆microRNA-449b-3p的含量,以区分AMS易感者和耐受者,microRNA-449b-3p具体信息见表2。

[0013] 本发明的效益是:筛选出的microRNA对AMS有很好的预测效能,能够在平原预测到

达高原后AMS的发病风险,指导AMS的预防和治疗,减轻AMS的威胁。

[0014] 本发明除了上述技术方案以外,还做了如下的改进。

[0015] 本发明还包括,血浆microRNA (microRNA-449b-3p) 在制备预测AMS发病风险的试剂盒中的作用。

### 附图说明

[0016] 图1.AMS易感者和耐受者的血浆中microRNA-449b-3p表达水平(即与cel-miR-39相比microRNA-449b-3p的归一化水平)。其中AMS是AMS发病者、non-AMS为健康对照。\*: $p < 0.05$ ,即有显著统计学差异,\*\*: $p < 0.01$ ,即有极显著统计学差异,\*\*\*: $p < 0.001$ ,即有极显著统计学差异。

[0017] 图2为AMS易感者血浆microRNA-449b-3p的工作特征曲线(receiver operating characteristic curve,简称ROC曲线),该图中的很好的显示了AMS易感者的ROC曲线、曲线下面积(area under the curve,AUC)、灵敏性(sensitivity)、特异性(specificity),其中AUC反映了预测效能( $AUC = 0.5$ ,没有预测效能; $0.5 < AUC < 0.7$ 很小的预测价值; $0.7 < AUC < 0.9$ 相当准确的预测价值; $0.9 < AUC < 1$ ,很准确的预测价值)。

### 具体实施方式

[0018] 下面结合附图对本发明进行描述,所列举的实施例仅仅是用来解释本发明,并非用于限制本发明的范围。

[0019] 实施例1血浆标本microRNA-449b-3p的表达与AMS发病风险的相关性研究

[0020] 一、材料与标本收集描述

[0021] AMS易感者血浆标本收集自急进高原人群中的AMS患者进入高原前,合计41例。正常人群的血浆标本收集自急进高原人群中的正常健康人群进入高原前,合计46例。AMS的诊断是通过国际通用诊断标准-路易斯湖评分来确认的。所有人群在取血之前没有服用任何预防性药物。每个样本用EDTA-Na抗凝管合计收集2ml血液。

[0022] 二、样品处理和RNA提取

[0023] 在静脉血采集后10min内,在 $3000 \times g$ ,25摄氏度下离心10分钟之后,用无RNA酶和无细菌的吸头取上层血浆于无RNA酶和无细菌的EP管中 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。血浆中的RNA通过德国凯杰技术有限公司的血浆microRNA柱式抽提试剂盒(miRNeasy Serum/Plasma Kit,货号:217184)按照说明书操作步骤进行提取和纯化。

[0024] 三、实时荧光定量PCR(SYBR染料法)

[0025] 运用中国上海吉玛制药技术有限公司的microRNA实时荧光定量PCR试剂盒(Hairpin-it™miRNAs RT-PCR Quantitation Kit,货号:E01008)对microRNA-449b-3p和外参cel-miR-39进行扩增;分别得到Ct值(cycle threshold),通过公式:表达量= $2^{Ct(\text{cel-miR-39}) - Ct(\text{microRNA-449b-3p})}$ 在分别计算每例标本的microRNA-449b-3p的表达水平,具体操作过程见说明书。每个样本重复三次实验。microRNA-449b-3p和cel-miR-39引物序列见表3。

[0026] 四、统计分析方法。

[0027] 运用统计学软件SPSS 19.0进行统计。正态性检验采用Shapiro-Wilk法,显著性差

异用Mann-Whitney检验 (Mann-Whitney Test),工作特征曲线(receiver operating characteristic curve,简称ROC曲线)及线下面积(area under the curve,AUC)用于评价microRNA-449b-3p的预测效能。当 $p < 0.05$ 时认为有统计学差异。

[0028] 六、结果分析

[0029] 1.AMS易感者与AMS耐受者,血浆microRNA-449b-3p的表达量相比, $p < 0.001$ ,有极显著统计学差异。

[0030] 2.血浆microRNA-449b-3p对AMS易感者与AMS耐受者的预测效能通过ROC曲线可以知道,microRNA-449b-3p对AMS易感者与AMS耐受者的预测效能是很好的,AUC为0.847 (95% CI,0.765-0.829)。

[0031] 七、结论

[0032] 血中microRNA-449b-3p对AMS易感者与AMS耐受者有很好的预测效能,能够预测AMS的发病风险。

[0033] 表1AMS易感组和AMS耐受组血浆microRNA-449b-3p的表达水平

	AMS 易感组 (n=41)	AMS 耐受组 (n=46)
[0034] <b>microRNA-449b-3p</b>	45.83 (26.171-64.475)	15.13 (4.6826-26.863)***

[0035] \*\*\*AMS易感组VS.AMS耐受组: $P < 0.001$ ,数据以中位数(25%-75%分位数)表示

[0036] 表2microRNA-449b-3p基本信息

<b>Accession number</b>	<b>MIMAT0009203</b>
[0037] <b>ID</b>	microRNA-449b-3p
<b>Sequence</b>	CAGCCACAACUACCCUGCCACU

[0038] 表3microRNA-449b-3p和cel-miR-39引物信息

名称	引物信息
[0039] <b>microRNA-449b-3p</b>	F primer:CGCGCCAGCCACAACACTAC
	R primer:TATGGTTGTTACGACTCCTTCAC
	Size:73bp
<b>cel-miR-39</b>	F Primer: ATATCATCTCACCGGGTGTAATC
	R Primer: TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT
	Size:67bp

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110>中国人民解放军第三军医大学
- [0003] <120>一种通过microRNA-449b-3p表达水平预测急性高山病发病风险的试剂盒
- [0004] <130>
- [0005] <160>1
- [0006] <170>PatentIn version 3.5
- [0007] <210>1
- [0008] <211>22
- [0009] <212>RNA
- [0010] <213>人
- [0011] <400>1
- [0012] cagccacaac uaccugcca cu 22

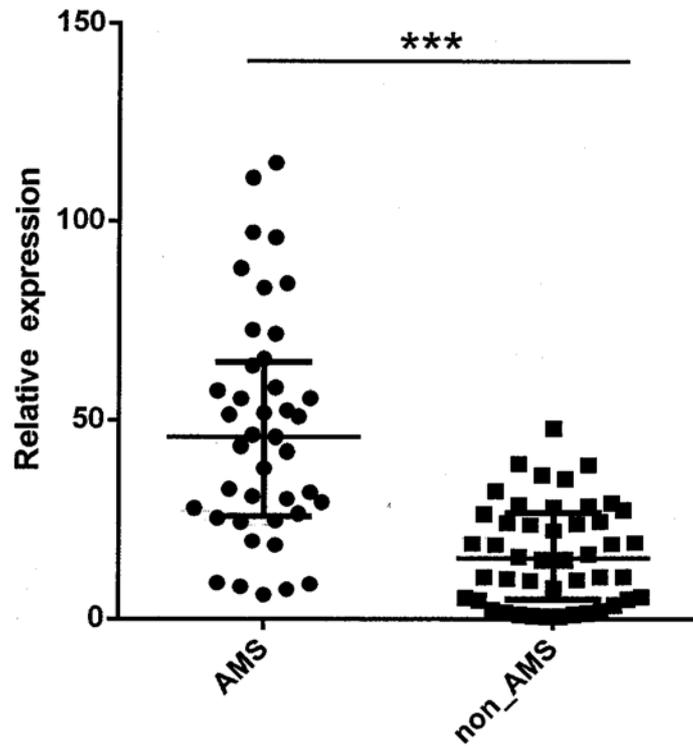


图1

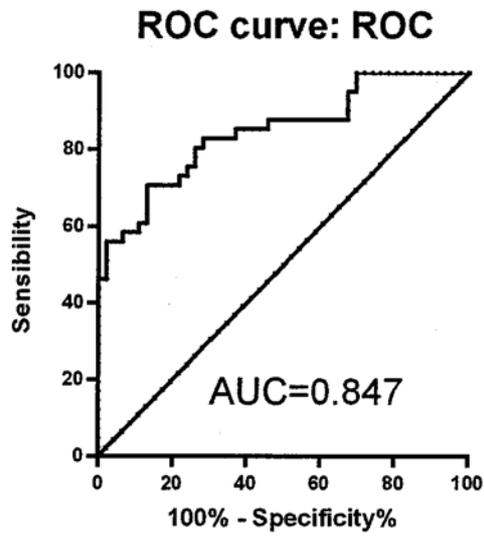


图2