



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102253218 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201110099951. 5

(22) 申请日 2011. 04. 20

(71) 申请人 中国人民解放军第二军医大学东方
肝胆外科医院

地址 200438 上海市长海路 225 号

(72) 发明人 高春芳 衣常红 房萌 赵云鹏
顾星 季君 王慧

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白检测
技术的建立及应用

(57) 摘要

本发明属于蛋白质技术领域, 涉及糖蛋白的检测, 具体涉及与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白水平的检测方法及其应用, 包括计算与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量 / 血清免疫球蛋白总量。该方法尽管不能区分健康和乙肝感染患者, 但是可用于鉴别诊断乙肝感染患者中的肝癌和非肝癌患者。

1. 一种检测与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白水平的非诊断方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(A) 血清样品通过凝集素亲和层析,收集与橙黄网胞盘菌凝集素反应的糖蛋白;

(B) 检测收集的与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量;

(C) 计算与橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白量 (A-IgG) / 血清免疫球蛋白总量 (IgG)。

2. 根据权利要求 1 所述的与橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的非诊断方法,其特征在于,所述的凝集素是橙黄网胞盘菌凝集素 (A)。

3. 根据权利要求 1 所述的与橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的非诊断方法,其特征在于,该方法不包括检测血清样品的 HBV 感染性。

4. 根据权利要求 1 所述的与橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的非诊断方法,其特征在于,与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量通过免疫比浊法来检测。

5. 根据权利要求 1 所述的与橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的非诊断方法,其特征在于,该方法进一步包括与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量 / 血清免疫球蛋白总量的比值与 24.50% 相比较的步骤。

6. 根据权利要求 1 所述的与橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的非诊断方法,其特征在于,该方法不包括与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量 / 血清免疫球蛋白总量的比值与 24.50% 相比较的步骤。

7. 用于权利要求 1-6 之任一所述的方法的检测系统,其特征在于该系统包括预装凝集素亲和层析柱、生化分析仪、输入设备、计算设备和输出设备,其中输入设备能将橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量和血清免疫球蛋白总量输入计算设备,计算设备能计算 A-Ig/Ig 值。

8. 根据权利要求 7 所述的检测系统,其中凝集素亲和层析柱是橙黄网胞盘菌凝集素亲和层析柱。

9. 权利要求 1-6 之任一所述的检测与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白水平在诊断肝癌中的应用,其中还进一步包括检测血清样品是否是 HBV 感染者的血清样品的步骤。

10. 权利要求 7-8 之任一所述的检测系统在制造用于权利要求 1-6 之任一所述的方法的装置中的应用。

橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白检测技术的建立及应用

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质技术领域,涉及糖蛋白的检测,具体涉及橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白水平检测方法及其在原发性肝癌中的创新性诊断价值。该方法尽管不能区分健康和乙型肝炎病毒(HBV)感染患者,但是可作为不能得出直接诊断结果的中间步骤用于同检测 HBV 的步骤公用以区分经诊断是 HBV 感染者中的肝癌和肝硬化患者。

背景技术

[0002] 近年来人们逐渐清楚地认识到蛋白糖基化修饰在很多疾病的发生发展中扮演着重要角色。肝脏是重要的蛋白质合成、加工场所,与血清蛋白的糖基化状态密切相关。我国是 HBV 感染大国,我们在前期研究中已分别发现了 HBV 感染后、肝硬化及肝癌患者血液中的特征性 N-糖结构标志物。但有关这种糖标志物的靶蛋白分子及其意义尚存在争议。下面以免疫球蛋白 G 为例介绍本发明的技术背景。

[0003] IgG 是血清中含量最多的免疫球蛋白类型(占人血清 Ig 的 80%),其结晶段(Fc)含有唯一的 N-糖基化修饰保守位点,即 Asn-297。Asn-297 糖链由于核心七糖上连接的末端糖基不同,存在着种属、组织、年龄和性别特异性。研究提示 IgG 的 Fc 段糖基化修饰状态与多种疾病密切相关,例如随类风湿性关节炎的发生、发展, IgG 低半乳糖基化修饰的程度增加;晚期卵巢癌病人拥有高水平不对称寡糖结构的 Con A 结合(高甘露糖)的 IgG,该异常糖链存在于 IgG 的恒定区。IgG 糖基化与功能密切相关。连接在 Asn-297 的糖链可维持抗体的四级结构以及 Fc 段的热稳定性,并通过影响 IgG 分子与 FcRs、C1q 以及 FcRn 的结合而分别调节 IgG 分子的抗体依赖细胞毒作用(ADCC)、补体依赖的细胞毒作用(CDC)以及半衰期。

[0004] HBV 感染是亚洲太平洋地区的高发性疾病,全世界每年都会新增 HBV 感染病例五千万例,其中 10-40%将发展为慢性肝病,并最终发展为肝纤维化、肝硬化和原发性肝细胞癌(HCC)。由于缺乏有效的诊断标志物,经常要在原发性肝细胞癌发展到晚期才能发现,这使得原发性肝细胞癌的五年生存率极低(只有 6%左右)。早期诊断和治疗是将显著提高原发性肝细胞癌患者的生存质量。目前临床上的常用血清标志物甲胎蛋白在 1/3 的人群中仍处于正常水平。这使得原发性肝细胞癌的早期诊断和治疗更加困难。

[0005] 现有文献没有报道橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白与 HBV 相关肝病(包括慢性乙肝、肝硬化和肝癌)的直接相关性。本发明人经过长期研究开发了橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白的检测方法,发现尽管该方法本身无法区分健康人群和乙型肝炎病毒(HBV)感染患者或 HBV 感染者中的肝癌和肝硬化患者,但是它在与 HBV 的检测方法联用的情况下,可以用于区分 HBV 感染者中的肝癌和肝硬化患者,从而可以作为诊断肝癌和肝硬化的中间步骤。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白水平的检测方法,并将该方法用于慢性乙肝(CHB)、肝硬化(LC)、原发性肝细胞癌(HCC)橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白水平的中间步骤检测,可作为无创性原发性肝细胞癌(HCC)监测、诊断中所需的中间结果,也为可能的免疫调控干预提供了潜在的治疗靶点。

[0007] 具体而言,在第一方面,本发明提供了一种检测血清橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的非诊断方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

[0008] (A) 血清样品通过凝集素亲和层析,收集橙黄网胞盘菌凝集素反应糖蛋白;

[0009] (B) 检测收集的橙黄网胞盘菌凝集素反应蛋白中的免疫球蛋白量(简称为A-Ig);

[0010] (C) 计算橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量/血清免疫球蛋白总量。

[0011] 其中,血清样品是离体样品,优选是人血清样品。本发明的方法不包括从生物体取样的步骤。

[0012] 优选其中,所述的凝集素是橙黄网胞盘菌凝集素(简称为A)。通常,Ig被表示为免疫球蛋白或其数量(在数学公式中),因此在本文中,橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白或其数量被简称为A-Ig。

[0013] 优选其中,该方法不包括检测血清样品的HBV感染性。由于本发明的方法不能区分健康人群和慢性乙肝患者,而对于其他疾病患者(如,HIV感染者)也不具有诊断依据,只能用于判断HBV感染的患者中原发性肝细胞癌的倾向。因此,当不清楚血清样品是否是来自HBV感染的患者中的时候,即使是有经验的医师,也无法根据与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量/血清免疫球蛋白总量这一比值直接诊断出是否患有原发性肝细胞癌或其倾向(包括其他误诊情况)。因此,本发明的方法是可以用于原发性肝细胞癌诊断过程中得出非充分中间结果的过程。

[0014] 优选其中,橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量通过免疫比浊法来检测。在本发明的具体实施方式中,就是通过优选的方式进行检测。

[0015] 优选其中,该方法进一步包括橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量/血清中免疫球蛋白总量的比值与24.50%相比较的步骤。这样,如果进一步检测出血清样品是来自HBV感染患者的血清(尽管这一检测不包括在本发明的方法中),这可以直接判断该患者是否有原发性肝细胞癌的倾向。

[0016] 另外其中,该方法也可以不包括与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量/血清中免疫球蛋白总量的比值与24.50%相比较的步骤。

[0017] 在第二方面,本发明提供了用于本发明第一方面的方法的检测系统,其特征在于该系统包括预装凝集素亲和层析柱、生化分析仪、输入设备、计算设备和输出设备,其中输入设备能将橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量和血清免疫球蛋白总量输入计算设备,计算设备能计算A-Ig/Ig值。这些仪器本身是常规设备,但是它们组合在一起的系统是本发明人对本发明第一方面的方法进行研究后的结果。计算设备可以是个人电脑、服务器,也可以是只能做除法的计算设备,后者已经能够满足本发明的系统对计算设备的要求。

[0018] 优选其中,凝集素亲和层析柱是橙黄网胞盘菌凝集素亲和层析柱。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了本发明第二方面的检测系统在制造用于本发明第一方面的方法的装置中的应用。

[0020] 在第三方面,本发明提供了本发明第一方面的检测血清橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的方法在诊断原发性肝细胞癌中的应用,其中还进一步包括检测血清样品是否是HBV感染者的血清样品的步骤。优选其中,包括诊断个体是HBV感染者并采集血清样品供本发明第一方面的检测血清橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白水平的方法中使用。

附图说明

[0021] 图1 四组患者 Ig、A-Ig 及 A-Ig/Ig 测定结果 ($\bar{x} \pm s$, g/L)。

[0022] ** 表示与其它两组均有统计学差异 ($P < 0.05$)

[0023] 图2:从肝硬化(LC)中辨别诊断原发性肝细胞癌(HCC)时,A-Ig/Ig和AFP的ROC曲线。

具体实施方式

[0024] 下面结合附图及实施例对本发明进行详细描述。

[0025] 实施例1:正常对照组(Control)、慢性乙肝组(CHB)、HBV肝硬化(LC)组和HBV肝癌(HCC)组与橙黄网胞盘菌凝集素反应免疫球蛋白的检测分析。

[0026] 收集2006年9月~2009年9月来上海市东方肝胆外科医院接受治疗并明确诊断的慢性乙型肝炎(CHB)、LC(肝硬化)患者的血清各30例,原发性肝细胞癌(HCC)患者血清49例,其中每组男/女为13:2;平均年龄 51.6 ± 13.2 岁。所有入选患者还必须满足以下标准:(1)均为乙型肝炎病毒(HBV)感染的乙肝患者;(2)由于经研究发现,其他病毒的感染者与正常对照组的(橙黄网胞盘菌凝集素反应性)的TP,ALB和免疫球蛋白均不具有以下规律,因此排除人类免疫缺陷病毒,肝炎病毒丙型、丁型、戊型和梅毒等除HBV感染之外的病原体感染;(3)排除自身免疫性肝病、酒精性肝病、药物性肝病和Wilson病。另外选择健康体检者30例作为对照组,平均年龄 51.2 ± 10.3 岁。肝癌组、肝硬化组、肝炎组及对照组之间性别、年龄等一般资料比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

[0027] 试剂或仪器:橙黄网胞盘菌凝集素亲和柱、清洗液和洗脱液(均购自中国人民解放军第二军医大学),免疫球蛋白G测定试剂盒(免疫比浊法)购自德赛诊断系统(上海)有限公司,仪器采用日本日立(Hitachi)7170生化分析仪,应用spss软件分析结果。

[0028] 1) 以上人员均抽提空腹全血,静置30分钟,3000rpm,10min. 吸取上层血清,-80℃冰箱保存备用。

[0029] 2) 分离纯化与橙黄网胞盘菌凝集素反应的总蛋白

[0030] a. 200ul血清加入300ul清洗液中,混匀待用;

[0031] b. 预装橙黄网胞盘菌凝集素亲和柱,并装入离心柱外管,室温以3000rpm/min离心20秒;

[0032] c. 将稀释血清加入预装橙黄网胞盘菌凝集素柱,静置10min,以3000rpm/min离心20秒;

[0033] d. 加入1ml清洗液,以3000rpm/min离心20秒;

[0034] e. 将预装橙黄网胞盘菌凝集素柱装入新离心柱外管,加500ul洗脱液,室温以3000rpm/min离心20秒;

[0035] f. 收集离心柱外管内液体。

[0036] 3) 检测分析

[0037] 采用日立 (Hitachi) 7170 生化分析仪检测血清及离心柱外管内收集液体的免疫球蛋白。血清中免疫球蛋白免疫比浊法进行检测 [参见参考文献 1]。离心柱外管内收集液体中与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白检测方法与血清中相同成分的检测相同。

[0038] 将原发性肝细胞癌组 (HCC) 检测结果与肝硬化组 (LC) 检测结果、慢性乙肝对照组 (CHB) 和阴性对照组 (健康正常组) 比较分析。本发明检测结果为：

[0039] ①肝癌组的免疫球蛋白与肝硬化组、CHB 和正常对照组相比虽存在差异，但无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1)。

[0040] ②正常对照组和 CHB 组的 A-Ig/Ig 平均值分别是 19.28% 和 19.69%，非常接近，表明该值无法用于直接诊断出健康人群和乙型肝炎患者。然而，从已经确诊为 HBV 感染的患者中鉴别原发性肝细胞癌时，发现 A-Ig/Ig 的临界值为 24.50%，大于 24.50% 被判断为原发性肝细胞癌，而小于 24.50% 被判断为一般性的乙肝携带者 (包括肝硬化和慢性乙肝的患者)，这一判断规律正确率为 82.28%。与现在临床所用的诊断指标 AFP 相比，具有一定的优势 (见表 1)。

[0041] 表 1 从肝硬化 (LC) 中辨别诊断原发性肝细胞癌 (HCC) 的诊断结果评估

[0042]

Cut off value	test	Actual status		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
A-Ig/Ig	HCC+	43	8					
24.50	HCC-	6	22	87.76	73.33	84.31	78.57	82.28
AFP	HCC+	35	12					
20 ng/ml	HCC-	14	18	71.43	60.00	74.47	56.25	67.09

[0043] PPV: 阳性预测值 (positive predictive value), NPV: 阴性预测值 (negative predictive value).

[0044] 实施例 2: 检测 30 例 AFP 阴性的原发性肝细胞癌确诊患者血清免疫球蛋白 IgG 和 A-Ig

[0045] 具体实验步骤：

[0046] 1) 收集 30 例 AFP 阴性的原发性肝细胞癌 (HCC) 患者血清。

[0047] 2) 分离纯化与橙黄网胞盘菌凝集素反应的总蛋白

[0048] a. 200ul 血清加入 300ul 清洗液中，混匀待用；

[0049] b. 将预装橙黄网胞盘菌凝集素亲和柱装入离心柱外管，室温 3000rpm/min, 20 秒；

[0050] c. 将稀释血清加入预装与橙黄网胞盘菌凝集素柱，静置 10min, 3000rpm/min, 20 秒；

[0051] d. 加入 1ml 清洗液，3000rpm/min, 20 秒；

[0052] e. 将预装橙黄网胞盘菌凝集素柱装入新离心柱外管，加 500ul 洗脱液，室温 3000rpm/min, 20 秒；

[0053] f. 收集管内液体。

[0054] 3) 检测分析

[0055] 采用日立 (Hitachi) 7170 生化分析仪检测血清及管内收集液体的免疫球蛋白。结果见表 2。

[0056] 根据 A-Ig/Ig 对患者进行分组, 即 $A-Ig/Ig \geq 24.50\%$ 的为原发性肝细胞癌, $A-Ig/Ig < 24.50\%$ 为肝硬化。

[0057] 表 2: 30 位患者的 Ig、A-Ig 和 A-Ig/Ig 值

[0058]

患者 \ 测试指标	Ig	A-Ig	A-Ig/Ig
患者 1	17.87565	4.6905	26.24
患者 2	12.8853	2.81775	21.868
患者 3	9.28545	2.38425	25.677
患者 4	18.95715	4.007	21.137
患者 5	10.815	2.8395	26.255
患者 6	20.37855	6.2135	30.49
患者 7	14.04405	3.757	26.752
患者 8	10.9386	2.23975	20.476
患者 9	9.9189	2.96225	29.865
患者 10	26.1105	4.55175	17.433
患者 11	11.20125	2.8025	25.02
患者 12	16.23795	7.00825	43.16
患者 13	15.18735	4.3785	28.83
患者 14	22.54155	7.803	34.616
患者 15	17.65935	4.335	24.548
患者 16	18.1074	3.351	18.506
患者 17	13.5033	3.6125	26.753
患者 18	13.3488	4.1905	31.392
患者 19	17.13405	5.27425	30.782
患者 20	15.46545	3.39575	21.957
患者 21	22.81965	7.15275	31.345
患者 22	10.86135	3.10675	28.604

[0059]

患者 23	19.1889	5.12975	26.733
患者 24	12.68445	3.68475	29.049
患者 25	23.71575	5.3465	22.544
患者 26	16.2534	4.55175	28.005
患者 27	11.88105	3.39575	28.581
患者 28	11.97375	3.39575	28.36
患者 29	16.08345	4.1905	26.055
患者 30	10.8768	3.6125	33.213

[0060] 7) 根据 cut off 值 24.50%, 30 例患者中 ($A-Ig/Ig \geq 24.50\%$) 有 23 例为原发性肝细胞癌患者, 而患者 2、4、8、10、16、20、25 ($A-Ig/Ig < 24.50\%$), 为非原发性肝细胞癌患者; 因该 30 例患者为确诊的原发性肝细胞癌患者, 故该诊断的准确率为 76.7%;

[0061] 8) 该 30 例确诊为原发性肝细胞癌的患者为 AFP 阴性, 即如我们使用 AFP 进行诊断时, 诊断准确率为 0%; 显然, 利用 $A-Ig/Ig \geq 24.50\%$ 进行诊断时准确率远远高于 AFP (比随机取样时的准确率 (82.28) 略低), 对临床现有的 AFP 诊断起到很好的补充作用。

[0062] 可见在临床运用上, 对于已经确诊为乙肝患者的, 本发明中的检测方法对于原发性肝细胞癌具有较高的诊断准确率 (82.28%), 并对临床现有诊断指标 AFP 起到很好的补充作用。

[0063] 参考文献

[0064] [1] 检验医学诊断技术 (第三版), ISBN-T-117-04424-1/R. 4425.

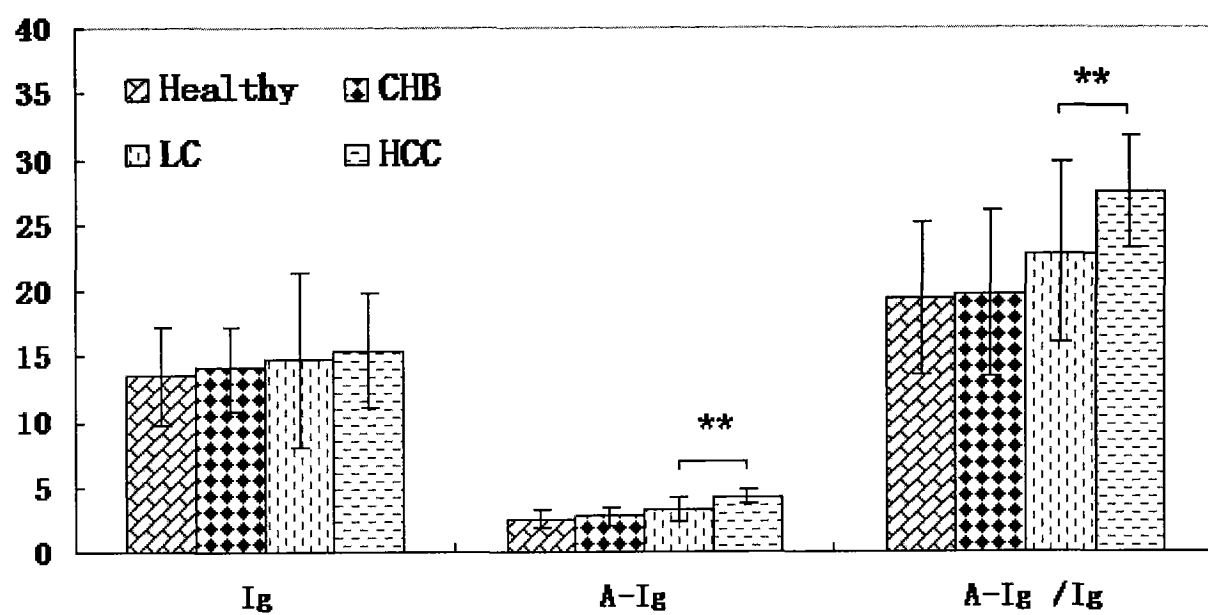


图 1

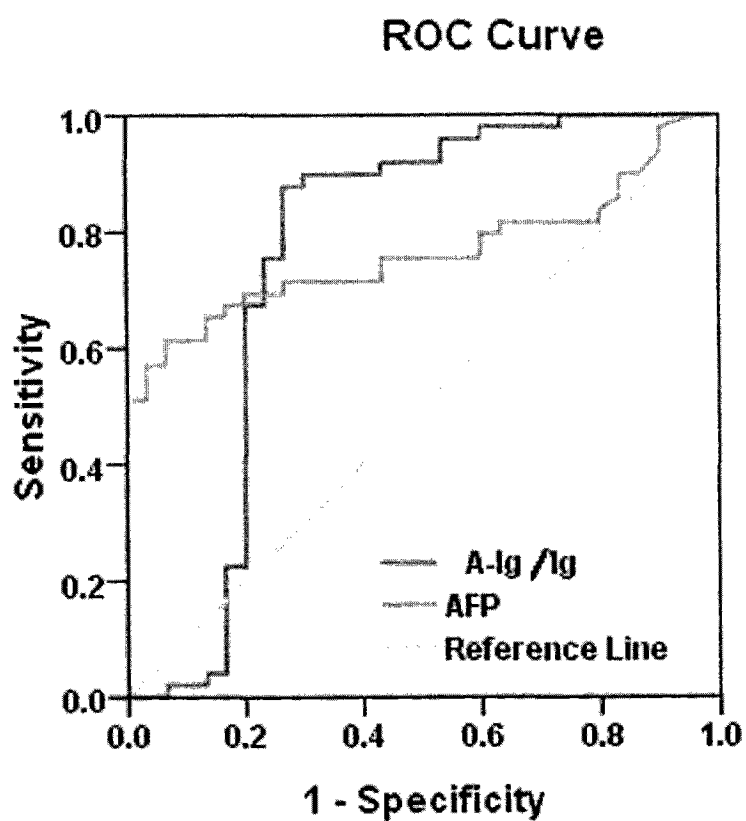


图 2

专利名称(译)	橙黄网胞盘菌凝集素反应性免疫球蛋白检测技术的建立及应用		
公开(公告)号	CN102253218A	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201110099951.5	申请日	2011-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院		
[标]发明人	高春芳 衣常红 房萌 赵云鹏 顾星 季君 王慧		
发明人	高春芳 衣常红 房萌 赵云鹏 顾星 季君 王慧		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
其他公开文献	CN102253218B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于蛋白质技术领域，涉及糖蛋白的检测，具体涉及与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白水平的检测方法及其应用，包括计算与橙黄网胞盘菌凝集素反应的免疫球蛋白量/血清免疫球蛋白总量。该方法尽管不能区分健康和乙肝感染患者，但是可用于鉴别诊断乙肝感染患者中的肝癌和非肝癌患者。

Cut off value	test	Actual status		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
A-Ig/Ig	HCC+	43	8					
24.50	HCC-	6	22	87.76	73.33	84.31	78.57	82.28
AFP	HCC+	35	12					
20 ng/ml	HCC-	14	18	71.43	60.00	74.47	56.25	67.09