



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107121541 A

(43)申请公布日 2017.09.01

(21)申请号 201710287415.5

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.04.27

(71)申请人 龙禹

地址 530021 广西壮族自治区南宁市青秀区双拥路东一巷21-3寓隆公寓2栋2单元502号

(72)发明人 龙禹 李慕军 蒋永华 陈智炜 王捷

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/534(2006.01)

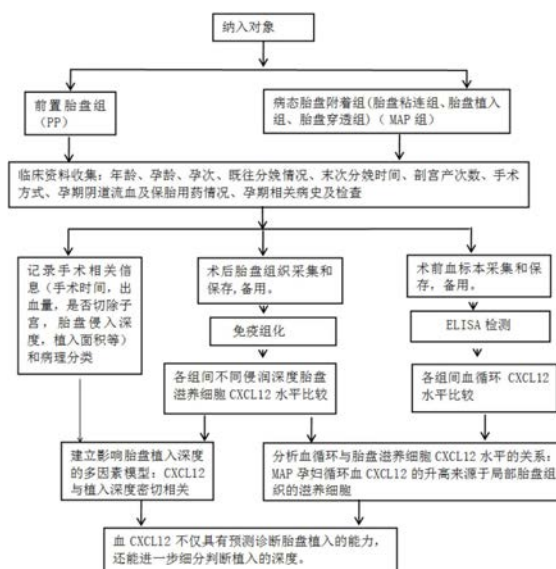
权利要求书2页 说明书16页 附图7页

(54)发明名称

检测CXCL12的试剂在制备预测诊断MAP试剂盒中的用途及试剂盒、装置、筛选方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测CXCL12的试剂在制备用于预测或诊断MAP的试剂盒中的用途及试剂盒、装置、筛选方法。本发明发现可通过测定获自妊娠个体的血液样品中CXCL12的水平来预测或诊断病态胎盘附着的风险并细分判断胎盘的植入深度。



1. 检测CXCL12的试剂在制备用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的试剂盒中的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,所述预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的方法包括如下步骤:1) 取妊娠个体的生物样本;2) 利用所述试剂盒检测生物样本中CXCL12的量;3) 将步骤2) 测得的结果与常规值进行比较,如果CXCL12的量高于常规值时,则预测或诊断所述妊娠个体发生病态胎盘附着MAP的可能性增加。

3. 根据权利要求2所述的用途,其特征在於,所述方法的步骤3) 还包括根据检测得到的所述CXCL12的量来判断胎盘的植入深度。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途,其特征在於,所述妊娠个体选自前置胎盘患者;所述检测CXCL12的试剂选自生化检测试剂或基因检测试剂中的一种或多种,优选的生化检测试剂选自免疫组织化学、免疫荧光检测、免疫印迹检测或者酶免疫EIA检测试剂中的一种或多种;所述基因检测试剂选自PCR检测试剂。

5. 根据权利要求2-4中任一项所述的用途,其特征在於,所述生物样本为血液样品,优选血浆或血清,所述常规值是根据无并发病态胎盘附着的前置胎盘患者的CXCL12测量值统计得出。

6. 根据权利要求2-5中任一项所述的用途,其特征在於,所述方法能预测或诊断前置胎盘患者并发胎盘植入或胎盘穿透的风险。

7. 一种试剂盒,其包括一种或多种用于检测CXCL12的试剂,所述试剂选自生化检测试剂或基因检测试剂中的一种或多种,优选地所述生化检测试剂选自免疫组织化学、免疫荧光检测、免疫印迹检测或者酶免疫EIA检测试剂中的一种或多种;优选地所述基因检测试剂选自PCR检测试剂。

8. 用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的装置,所述装置包括:可读介质,其用于存储针对妊娠个体的临床资料信息,其中所述临床资料信息包括用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着的信息,其包括在取自妊娠个体的一种或多种血液样品中CXCL12的量;和计算装置,其根据妊娠个体的临床资料信息来预测或诊断是否存在病态胎盘附着和/或其深度,优选的,所述妊娠个体为前置胎盘患者。

9. 一种筛选能用于预测或诊断病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的潜在生物标记物的筛选方法,其特征在於包括如下步骤:

(1) 收集前置胎盘患者和病态胎盘附着患者的胎盘组织样本和血液样本;

(2) 通过生化检测方法分析判断所述胎盘组织样本中胎盘滋养细胞中的各候选生物标记物表达水平;优选地,生化检测方法为免疫组化方法;

(3) 结合患者的临床数据建立影响胎盘植入深度的生物标记物模型,判断和胎盘的植入深度相关的生物标记物;

所述筛选方法还包括步骤(4) 或步骤(5):

(4) 通过生化分析法或基因分析法分析步骤(1) 中所述血液样本中的各候选生物标记物表达水平,判断和胎盘植入深度相关的生物标记物;

(5) 通过酶免疫方法EIA分析步骤(3) 中所获得的相关生物标记物在步骤(1) 中所述血液样本中的表达水平;

优选地,所述生化分析法选自酶免疫方法EIA,更优选为ELISA,优选地,所述基因分析法选自荧光定量PCR法。

10. 根据权利要求9所述的方法,如果步骤(4)中所述生物标记物和步骤(3)中所述的生物标记物相同,或者如果步骤(5)中所述生物标记物的表达水平和步骤(3)中所述的生物标记物表达水平相关,则所述生物标记物能够预测或诊断病态胎盘附着。

检测CXCL 12的试剂在制备预测诊断MAP试剂盒中的用途及试剂盒、装置、筛选方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及病态胎盘附着(Morbidly adherent placenta,MAP)的生物学指标筛选方法及其应用、试剂盒和装置。

背景技术

[0002] 病态胎盘附着MAP是一组胎盘绒毛不同程度侵入子宫肌层的疾病,根据胎盘的植入深度的异常分为:胎盘粘连(placenta accreta)、胎盘植入(placenta increta)和胎盘穿透(placenta percreta)。MAP主要表现为分娩后胎盘难以完整剥离,容易导致产时及产后严重大出血,是导致围产期紧急子宫切除和孕产妇死亡的主要原因,产妇死亡率达到7-10%。前置胎盘患者更易发生胎盘植入,有研究发现前置胎盘患者并发胎盘植入高达10%。随着近十年来子宫下段剖宫产率的上升,据报道MAP的发病率也从原来的0.04%上升为0.2%。大量研究已证实前置胎盘和剖宫产史是MAP的独立危险因素。如果产前能从有高危因素的孕妇中明确诊断出MAP,合理制定安全个体化的分娩方案将最大减少MAP的并发症风险。

[0003] 目前产前诊断MAP主要以影像学检查B超和磁共振成像(MRI)为主。文献1提出采用综合、量化的B超评价方法。文献2作了有关超声回顾性的分析,结论是对于不同的胎盘的植入深度没有统一的超声描述,以至于影响判断超声筛查和诊断MAP的准确性。当超声可疑有胎盘植入不能明确或者胎盘位于子宫后壁的显示不清的时候,MRI是目前产前诊断MAP最重要的依据。随着国内外通过MRI检查诊断、预测MAP发生的研究增多,文献3指出MRI也有诊断陷阱,随着妊娠晚期子宫增大肌层变薄会造成植入假阳性的诊断,相反,晚期胎盘影像学异常性结构消失,则造成假阴性的诊断。另外,产前难以区分三种类型的MAP,目前通常需要产时术中或产后组织病理检查才能明确区分。因此,产前诊断如何诊断出MAP的同时明确辨别植入深度是有效管理MAP疾病风险的关键,也是难点。

[0004] 目前国际上还没有公认的诊断MAP的血清学指标。近年来有研究尝试寻求敏感和特异性高的MAP血清生物学指标,并取得了一定进展,但也存在一定局限。有些指标检测后没有得到预想的实验结果,比如血管内皮生长因子(VEGF)、胎盘生长因子(PIGF)等,还有些指标已经被证实没有诊断意义比如肌酸酐激酶(CK)、胎儿游离DNA(cffDNA)。文献4提出了通过测量从怀孕受试者收集的体液样品尤其是羊水和血浆中选自胎盘衍生基因组PLS-001至PLS-050的一种或多种基因的表达水平以评估胎盘功能和诊断与胎盘功能异常有关的疾病的手段,但胎盘功能异常与病态胎盘附着MAP是不同的疾病,并且该研究也没有比较胎盘粘连与其他类型病态胎盘附着是否存在差异。因此寻找一种敏感和特异性高的生物学指标迫在眉睫。该指标应满足:首先能在有高危因素的孕妇中能诊断出MAP,其次还能进一步辨别胎盘异常附着的深度。

[0005] 人早孕期滋养细胞具有独特的类似于肿瘤细胞的生物学行为,但滋养细胞的侵袭受到精细的调控,具有严格的时空限制。最近10年中趋化因子及各自受体成为肿瘤生物学

行为研究的热点之一。趋化因子是对某些细胞具有定向趋化作用的小分子蛋白质。根据近氨基端半胱氨酸的数量、位置和排列方式被分为CC、CXC、C、C3XC四类。趋化因子CXCL12,又称基质细胞源性因子1(stromal cell-derived factor-1,SDF-1),主要由基质细胞和骨髓细胞分泌,具有持续表达性,与同源受体CXCR4和孤儿受体CXCR7结合对诱导多种细胞内信号级联发挥其独特的生物学效应。滋养细胞增殖与侵袭功能异常、蜕膜螺旋动脉重铸不良是先兆子痫、胎儿宫内生长迟缓、自然流产等妊娠相关疾病的主要原因之一。文献5的研究提出,CXCL12/CXCR4/CXCR7生物轴在胎盘早期着床和胚胎的生长发育中的作用越来越受到重视,其对滋养细胞的分化、增殖和侵袭的调节也已得到证实,文献5对CXCL12介导的信号通路进行了较为系统的回顾和总结,异常的CXCL12/CXCR4/CXCR7表达导致滋养细胞的功能异常,将导致早期妊娠失败(自然流产)、子痫前期。文献6的研究证实了这一观点,CXCL12在先兆子痫患者的血清和胎盘滋养细胞出现了异常表达。

[0006] 文献5虽提及胎盘植入但其实际是指胎盘早期着床(placenta implantation)即正常妊娠的建立(孕12周以前),本发明研究的MAP胎盘植入指的是胎盘过度侵袭(placental excessive invasion),MAP主要表现为孕中晚期大量异生的血管和过度侵袭的绒毛,区别于文献5提到的人早孕期滋养细胞植入着床的严格时空限制性。因此,其他研究CXCL12/CXCR4/CXCR7在肿瘤细胞和早期滋养细胞增殖和侵袭调控中起重要作用可作为本发明的相关背景技术,因为CXCL12在不同妊娠相关疾病中和不同妊娠阶段的生物学作用是不同的。目前现有技术中没有对CXCL12/CXCR4/CXCR7在MAP胎盘滋养细胞和血清中的表达进行相关研究的报道,也没有研究表明趋化因子CXCL12可以用于预测和诊断MAP。

[0007] 文献1:CN106308851A;

[0008] 文献2:Jauniaux E,Collins S L,Jurkovic D,Burton GJ.Accreta placentation:a systematic review of prenatal ultrasound imaging and grading of villous invasiveness.Am J Obstet Gynecol,2016;215(6):712-721;

[0009] 文献3:Kilcoyne A,Shenoy-Bhangle AS,Roberts D J,Sisodia RC,Gervais DA, Lee SI.MRI of Placenta Accreta,Placenta Increta,and Placenta Percreta:Pearls and Pitfalls.AJR Am J Roentgenol,2017;208(1):214-221;

[0010] 文献4:JP2008278886A;

[0011] 文献5: CXCL12/CXCR4/CXCR7轴在胎盘滋养细胞中作用机制的探,王亮等,《国际免疫学杂志》2014年9月,第37卷,第5期,p376-380

[0012] 文献6:Schanz A,Winn V D,Fisher S J,et al.Pre-eclampsia is associated with elevated CXCL12levels in placental syncytiotrophoblasts and maternal blood.Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2011,157(1):32-37。

发明内容

[0013] 发明要解决的问题

[0014] 针对上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种敏感和特异性高且能细分判断植入深度的MAP生物学指标及其筛选方法,同时提供一种利用该生物学指标预测或诊断MAP的方法。

[0015] 本发明的目的还包括提供检测该生物学指标的试剂在制备预测或诊断MAP试剂盒

中的用途。

[0016] 本发明的另一目的在于提供含检测MAP生物学指标的试剂盒及用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP的装置。

[0017] 用于解决问题的方案

[0018] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0019] 本发明提供一种检测CXCL12的试剂在制备用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的试剂盒中的用途。

[0020] 根据上述用途,所述预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP的方法包括如下步骤:

1) 取妊娠个体的生物样本;2) 利用所述试剂盒检测生物样本中CXCL12的量;3) 将步骤2) 得到的结果与常规值进行比较,如果CXCL12的量高于常规值时,则预测或诊断所述妊娠个体发生病态胎盘附着MAP的可能性增加。所述方法的步骤3) 还包括根据检测得到的所述CXCL12的量来判断胎盘的植入深度。

[0021] 根据上述用途,所述妊娠个体为前置胎盘患者。

[0022] 根据上述用途,所述妊娠个体选自前置胎盘患者;所述检测CXCL12的试剂选自生化检测试剂或基因检测试剂中的一种或多种,优选的生化检测试剂选自免疫组织化学、免疫荧光检测、免疫印迹检测或者酶免疫EIA检测试剂中的一种或多种;所述基因检测试剂选自PCR检测试剂。

[0023] 根据上述用途,所述生物样本为血液样品,优选血浆或血清。

[0024] 根据上述用途,所述常规值是根据无并发病态胎盘附着的前置胎盘患者的CXCL12测量值统计得出。

[0025] 根据上述用途,所述方法能预测或诊断前置胎盘患者并发胎盘植入(placenta increta)或胎盘穿透(placenta percreta)的风险。

[0026] 进一步,本发明还提供了一种试剂盒,其包括一种或多种用于检测CXCL12的试剂,所述试剂选自生化检测试剂或基因检测试剂中的一种或多种,优选地所述生化检测试剂选自免疫组织化学、免疫荧光检测、免疫印迹检测或者酶免疫EIA检测试剂中的一种或多种;优选地所述基因检测试剂选自PCR检测试剂。该试剂盒可以用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的风险。

[0027] 进一步,本发明还提供了用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的装置,所述装置包括:可读介质,其用于存储针对妊娠个体的临床资料信息,其中所述临床资料信息包括用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着的信息,其包括在取自妊娠个体的一种或多种血液样品中CXCL12的量;和计算装置,其根据妊娠个体的临床资料信息来预测或诊断是否存在病态胎盘附着和/或其深度,优选的,所述妊娠个体为前置胎盘患者。

[0028] 更进一步地,本发明提供一种筛选能用于预测或诊断病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的潜在生物标记物的筛选方法,其特征在于包括如下步骤:

[0029] (1) 收集前置胎盘患者和病态胎盘附着患者的胎盘组织样本和血液样本;

[0030] (2) 通过生化检测方法分析判断所述胎盘组织样本中胎盘滋养细胞中的各候选生物标记物表达水平;优选地,生化检测方法为免疫组化方法;

[0031] (3) 结合患者的临床数据建立影响胎盘植入深度的生物标记物模型,判断和胎盘

的植入深度相关的生物标记物；

[0032] 所述筛选方法还包括步骤(4)或步骤(5)：

[0033] (4)通过生化分析法或基因分析法分析步骤(1)中所述血液样本中的各候选生物标记物表达水平,判断和胎盘植入深度相关的生物标记物；

[0034] (5)通过酶免疫方法EIA分析步骤(3)中所获得的相关生物标记物在步骤(1)中所述血液样本中的表达水平；

[0035] 优选地,所述生化分析法选自酶免疫方法EIA,更优选为ELISA,优选地,所述基因分析法选自荧光定量PCR法。

[0036] 如果步骤(4)中所述生物标记物和步骤(3)中所述的生物标记物相同,或者如果步骤(5)中所述生物标记物的表达水平和步骤(3)中所述的生物标记物表达水平相关,则所述生物标记物能够预测或诊断病态胎盘附着。

[0037] 发明的效果

[0038] 本发明相对于现有技术,具有如下优点：

[0039] (1)本发明提供了一种筛选和确定MAP生物标记物的方法并分析了所获得的生物标记物在MAP中的生物学作用。根据MAP的病理特征及待定生物标记物在MAP胎盘滋养细胞的分布和表达,结合临床病理资料,建立了影响胎盘滋养细胞CXCL12表达的多因素模型；发现在该模型里胎盘滋养细胞CXCL12表达与胎盘的植入深度密切相关；本发明首次发现MAP孕妇循环血CXCL12的升高来源于局部胎盘组织的滋养细胞,胎盘入侵越深,血和胎盘滋养细胞CXCL12水平越高。

[0040] (2)本发明提供了一种利用测定血CXCL12的浓度来预测或诊断前置胎盘患者并发MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的方法,该方法便捷,易于操作,诊断准确度高且能细分判断植入深度。

[0041] (3)本发明发现血CXCL12能对胎盘的植入深度进行预测或诊断,填补MAP生物学预测指标的空白,本发明提供的含检测CXCL12试剂的诊断试剂盒及利用血CXCL12的诊断设备能在产前有高危因素的孕妇中明确判断胎盘的植入深度,有利于合理制定MAP安全个体化的分娩方案,将最大减少这项产科急危重症的风险。

附图说明

[0042] 图1为CXCL12/CXCR4/CXCR7在MAP患者和前置胎盘患者的胎盘中免疫组织化学检测结果。

[0043] 图2为一例孕36⁺²周前置胎盘合并胎盘植入患者的病理和免疫组织化学检测结果：包括胎盘的植入和非植入部位。图中英文缩写中文含义：bv,血管；dc,蜕膜细胞；db,蜕膜基底；fib,纤维组织；myo,子宫肌层；STBs,合体滋养细胞；EVTs,绒毛外滋养细胞；vill,绒毛。

[0044] 图3为孕36周前置胎盘合并胎盘植入和孕35⁺⁴周前置胎盘合并胎盘穿透的两个代表病例患者胎盘病理和免疫组织化学检测结果。图中英文缩写中文含义：bv,血管；myo,子宫肌层；STBs,合体滋养细胞；EVTs,绒毛外滋养细胞；iEVTs,细胞间绒毛外滋养细胞；eEVTs,血管内绒毛外滋养细胞；vill,绒毛；abv,异常血管。

[0045] 图4为MAP和前置胎盘孕妇血循环中CXCL12的水平。

[0046] 图5为血CXCL12的浓度和CXCL12胎盘滋养细胞免疫组化染色强度评分的相关性分

析,建立血CXCL12水平对MAP预测或诊断的ROC曲线。其中,ROC曲线以特异度1 (1-specificity) 为横坐标,以灵敏度(sensitivity) 为纵坐标。

[0047] 图6为CXCL12染色的评分指南。

[0048] 图7为CXCL12/CXCR4/CXCR7免疫组化的阳性对照和阴性对照。

[0049] 图8为筛选能够预测妊娠个体患有病态胎盘附着的风险和/或诊断病态胎盘附着的潜在生物标记物的方法流程示意图。

具体实施方式

[0050] 以下将参考附图详细说明本发明的各种示例性实施例、特征和方面。为了更好地说明本发明,在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解,没有某些具体细节,本发明同样可以实施。在另外一些实例中,对于本领域技术人员熟知的方法、手段、器材和步骤未作详细描述,以便于凸显本发明的主旨。

[0051] 定义

[0052] 除非另有定义,本发明所用的技术和科学术语具有与本发明所属技术领域中的普通技术人员所通常理解的相同含义。

[0053] 术语“胎盘粘连”(placenta accreta)是指绒毛膜的绒毛种植在没有蜕膜介入的子宫肌层,但在子宫肌层与绒毛之间有纤维蛋白样物质和多绒毛外滋养细胞(extravillous trophoblast,EVT);“胎盘植入”(placenta increta)是指绒毛在粘连的基础上进一步侵入至子宫肌层内;“胎盘穿透”(placenta percreta)是指绒毛组织更进一步贯穿子宫浆膜,常侵入膀胱或直肠,该胎盘称为穿透型胎盘。

[0054] 术语“滋养细胞”即胎盘滋养层细胞,滋养细胞由异源性细胞群组成,有3种类型,即:①细胞滋养细胞(CTB,cytotrophoblast);②合体滋养细胞(STB,syncytiotrophoblast);③中间型滋养细胞(IT)。绒毛滋养层主要是细胞滋养细胞和合体滋养细胞。中间型滋养细胞是覆盖了上述两种细胞的形态和功能特征的独立的滋养细胞类型,其是绒毛外滋养层细胞(EVTS)的主要组成。

[0055] 术语“前置胎盘”(placenta previa,可简称PP)是指胎盘附着于子宫下段,甚至胎盘下缘达到或覆盖宫颈内口,其位置低于胎先露部。

[0056] 术语“临床数据”或“临床资料信息”涉及关于患者的健康状态的全部可得到的数据和信息,包括但不限于年龄、体重、疾病发生学数据、既往病史数据、手术情况、通过体外诊断方法如组织病理学、血液或尿液检验获得的数据、通过成形方法如MRI、超声波所获得的数据。

[0057] 本发明中“受试者”是指人或非人雌性生物体,优选受试者是人类,最优选是“患者”,本发明中的患者主要是指MAP患者或者前置胎盘患者。这包括尚未确定患病、正在检查的人。

[0058] 本发明使用的术语“预测或诊断”是指本领域技术人员通过其可估计和/或确定患者是否患有给定的疾病或病状的可能性的方法。这里的“诊断”是“确定”,但不意味着暗示诊断是100%准确,在某些实施方式中“预测或诊断”可涵盖预测该疾病发生可能性、评估疾病或临床状况的严重程度。

[0059] 本发明“生物学指标”是指可测量和可量化的生物学参数,可指示健康或疾病特

征,也可称为“生物标记物”或“生物标志物”。常见生物学指标可以是蛋白质、肽或核酸分子,本发明优选趋化因子。

[0060] 本发明中“植入深度”或“入侵深度”或“侵袭深度”均具有相同的含义,即指胎盘绒毛接触、侵入子宫肌层或侵入子宫毗邻器官的程度。

[0061] 生物学指标的确定

[0062] 用于筛选能预测或诊断病态胎盘附着的潜在生物标记物的筛选方法包括使用来自妊娠个体的生物样本。生物样本可以是任何含有选定生物标记物的体液或组织样品。用于本发明所述方法的示例性生物样本包括血液、纯化的血液制品(如血清、血浆等)、绒毛膜绒毛活组织检查、胎盘组织样本。在本发明的情形下,“血浆”为在离心之后获得的含抗凝剂血液的基本无细胞上清液。“血清”为在使血液凝结之后收集的全血的液体级分,其不包含血纤维蛋白原,但是一些凝血因子保留下来。

[0063] 生物样本中存在的生物学指标的量可以利用任何适合用来测量生物样本中的蛋白质的分析形式来测定。用于该目的的常用的分析形式包括生化检测或基因检测,生化检测包括免疫组化分析、免疫荧光分析、酶免疫测定(EIA)、毛细管电泳免疫测定(CEIA)、放射免疫测定(RIA)、免疫放射分析(IRMA)、荧光偏振免疫测定(FPIA)等,酶免疫测定(EIA)包括酶放大免疫测定技术(EMIT)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、IgM抗体捕获ELISA(MACELISA)和微粒酶免疫测定(MEIA)等,优选使用免疫组化检验和酶联免疫吸附测定(ELISA)。基因检测包括PCR检测法,优选荧光定量PCR检测法。

[0064] 本发明筛选能用于预测或诊断病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的潜在生物标记物的筛选方法,其包括如下步骤:

[0065] (1) 收集前置胎盘患者和病态胎盘附着患者的胎盘组织样本和血液样本;

[0066] (2) 通过生化检测方法分析判断所述胎盘组织样本中胎盘滋养细胞中的各候选生物标记物表达水平;优选地,生化检测方法为免疫组化方法;

[0067] (3) 结合患者的临床数据建立影响胎盘植入深度的生物标记物模型,判断和胎盘的植入深度相关的生物标记物;

[0068] 所述筛选方法还包括步骤(4)或步骤(5):

[0069] (4) 通过酶免疫方法EIA分析步骤(1)中所述血液样本中的各候选生物标记物表达水平,判断和胎盘植入深度相关的生物标记物;

[0070] (5) 通过ELISA方法分析步骤(3)中所获得的相关生物标记物在步骤(1)中所述血液样本中的表达水平;

[0071] 如果步骤(4)中所述生物标记物和步骤(3)中所述的生物标记物相同,或者如果步骤(5)中所述生物标记物的表达水平和步骤(3)中所述的生物标记物表达水平相关,则所述生物标记物能够预测或诊断病态胎盘附着。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,选择趋化因子如CXCL12、CXCR4、CXCR7作为候选生物标记物。通过回顾性的免疫组化研究,证明了CXCL12/CXCR4/CXCR7在滋养细胞中起重要作用,MAP患者的胎盘滋养细胞与前置胎盘患者相比具有明显的CXCL12/CXCR4/CXCR7表达,通过对MAP深度的详细评估,本发明发现趋化因子CXCL12与受体CXCR4和CXCR7在区分子宫肌层浸润深度方面有更多的统计学差异。此外,CXCL12与临床特征之间的关系更为接近。为了进一步验证CXCL12在MAP诊断中的作用,通过前瞻性研究用ELISA检测方法评估了CXCL12的

血液水平,与前置胎盘患者相比,MAP患者血中CXCL12水平不仅升高,而且与胎盘侵袭深度相关,不同植入深度的孕妇血CXCL12水平不同,植入深度越深,CXCL12水平越高,与滋养层细胞CXCL12表达也具有显著相关性($R=0.845, P<0.001$)。ROC分析显示,诊断敏感度为78.1%,循环CXCL12浓度的准确度为88.2%,证明了血CXCL12可以用于预测和诊断MAP的能力并且能够进一步细分判断植入的深度。

[0073] 本发明发现趋化因子CXCL12、受体CXCR4和CXCR7的表达在MAP的滋养层中不是完全平行的变化。在其他疾病中,一些研究组报告说,趋化因子及其受体也不是一起改变,例如,CXCR4在乳腺癌组织和胃癌血管中高度表达,CXCR7在前列腺癌中的表达增加等。根据本发明的实验结果,所有患者的免疫组化染色强度评分或与临床特征的关系,本发明发现CXCL12与MAP中胎盘侵袭深度有显著相关性。CXCL12的上调是MAP发展的主要过程。

[0074] 最近的研究报道,先兆子痫孕妇的胎盘和母体血清中CXCL12的表达也有升高。虽然本发明在MAP中获得了类似的结果,但实际上CXCL12在这两种疾病中起着不同的作用。先兆子痫中增加的CXCL12可能参与母体-胎儿界面处的免疫细胞募集或激活,或者可能由于缺陷滋养细胞侵袭导致胎盘缺血而修复母体或胎盘血管中损伤的内皮细胞。本发明认为,趋化因子CXCL12介导调节胎盘滋养细胞具有不同的功能:①分化:参与介导细胞滋养层祖细胞向具有侵袭特征的绒毛外细胞滋养细胞(EVTs)分化;②增殖:调节滋养细胞的增殖和存活;血管再生;③EVTs入侵至母体蜕膜深部取代子宫螺旋动脉血管内皮细胞,改造成低阻力高容量特点的胎盘子宫脉管系统。本发明证实了CXCL12直接在调节过度的滋养细胞侵袭和调节大的异常扩张血管中发挥重要作用。通过本发明的研究工作可知,趋化因子CXCL12是一种新的可预测或诊断MAP的生物学指标,可以预期针对CXCL12的各种调节手段日后可以作为治疗MAP的新颖和有效的手段。

[0075] 预测或诊断MAP的方法

[0076] 基于本发明人的上述新发现,本发明提供了一种预测或诊断妊娠个体发生MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的方法,其特征是通过检测血CXCL12的量。具体地,该预测或诊断妊娠个体发生MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的方法,包括以下步骤:

[0077] 1) 取妊娠个体的生物样本;

[0078] 2) 检测生物样本中CXCL12的量;

[0079] 3) 将步骤2)测得的结果与常规值进行比较,如果CXCL12的量高于常规值时,则预测或诊断所述妊娠个体发生病态胎盘附着可能性增加。如果CXCL12的量高于常规值时,则预测或诊断所述妊娠个体发生病态胎盘附着可能性增加。

[0080] 优选地,所述方法的步骤3)还包括根据检测得到的CXCL12的量来细分判断胎盘的植入深度。

[0081] 优选地,所述妊娠个体为前置胎盘患者;所述生物样本为血液样品,优选血浆或血清。

[0082] 优选地,步骤2)的检测采用生化检测方法,优选酶免疫测定(EIA),其包括酶放大免疫测定技术(EMIT)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、IgM抗体捕获ELISA(MACELISA)和微粒酶免疫测定(MEIA)等,更优选使用酶联免疫吸附测定(ELISA)。步骤3)所述常规值是根据无并发病态胎盘附着的前置胎盘患者的CXCL12测量值统计得出。

[0083] 本发明的一个实施方式中,一种预测或诊断妊娠个体发生MAP即胎盘粘连、胎盘植

入、胎盘穿透的方法,其包括以下步骤:1)取前置胎盘患者的血浆样本;2)利用ELISA检测血浆中CXCL12的浓度;3)将该浓度与无并发病态胎盘附着的前置胎盘患者的血浆中CXCL12平均浓度即常规值相比较,如果步骤2)测得的浓度高于常规值时,则预测或诊断所述前置胎盘患者发生病态胎盘附着可能性增加,并且,根据检测得到的CXCL12的浓度还可以细分判断胎盘的植入深度,进一步地,利用该方法可以准确预测或诊断前置胎盘患者并发胎盘植入或胎盘穿透的风险。

[0084] 试剂盒及其应用

[0085] 基于本发明人的上述新发现,本发明还提供了一种检测生物学指标的试剂在制备用于预测或诊断病态胎盘附着MAP试剂盒中的用途。在本发明的一个实施方式中,该生物学指标是CXCL12,该试剂盒通过测定获自妊娠个体的血液样品中趋化因子CXCL12的水平来评估病态胎盘附着。进一步优选,所述妊娠个体为前置胎盘患者。利用该试剂盒可用于细分判断胎盘的植入深度,在本发明的一个实施方式中利用该试剂盒能预测或诊断前置胎盘患者并发胎盘植入(placenta increta)或胎盘穿透(placenta percreta)的风险。

[0086] 本发明还涉及一种用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着(MAP)的试剂盒,其包括一种或多种用于检测生物学指标的试剂,用于测定至少一种生物学指标在取自妊娠个体的生物样本中的量,其中至少一种生物学指标选自CXCL12;以及任选用于进行测试的说明书。试剂盒还可能包括一种或多种缓冲液、稀释液、过滤器、注射针或注射器。用于检测生物学指标的试剂是含有用标记物质进行标记的标记化抗体等,例如免疫组织化学法、酶免疫测定法、化学发光免疫测定法、荧光抗体法或放射免疫测定法等情况下的标记化抗体或标记化抗体片段。作为标记物质的具体例,作为酶,可以举出过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、或葡萄糖氧化酶等,作为荧光物质,可以举出异氰酸荧光素或稀土类金属螯合物等,作为放射性同位素,可以举出 ^3H 、 ^{14}C 或 ^{125}I 等,此外可以举出生物素、抗生物素蛋白或化学发光物质等。酶或化学发光物质等情况下,其本身单独不能产生可以测定的信号,因此优选选择并含有各自对应的适当的基质等。

[0087] 在本发明的一个实施方式中,该试剂盒包括一种或多种检测趋化因子CXCL12的试剂。优选地,妊娠个体为前置胎盘患者。所分析的生物样本可从全血、外周血或其中部分、血清、EDTA抗凝血浆、柠檬酸钠抗凝血浆等中选择。用于检测趋化因子CXCL12的试剂可以是例如抗体、部分抗体(antibody portion)、类抗体材料等。前述抗体、部分抗体、类抗体材料均可以通过本领域常规方法制备得到。在本发明的一个实施方式中,检测趋化因子CXCL12的试剂选自生化检测试剂或基因检测试剂中的一种或多种,生化检测试剂优选免疫组织化学、免疫荧光检测、免疫印迹检测或者酶免疫EIA检测试剂中的一种或多种;基因检测试剂优选PCR检测试剂。

[0088] 诊断装置

[0089] 本发明还提供用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着MAP即胎盘粘连、胎盘植入、胎盘穿透的装置。该装置包括:可读介质,其用于存储针对妊娠个体的临床资料信息,其中所述临床资料信息包括用于预测或诊断妊娠个体病态胎盘附着的信息,其包括在取自妊娠个体的一种或多种生物样品中生物学指标的量;和计算装置,其根据妊娠个体的临床资料信息来预测或诊断是否存在病态胎盘附着和/或其深度。优选地,所述妊娠个体为前置胎盘患者;更优选地,生物学指标是CXCL12。在本发明一个实施方式中,所述用于预测或诊断妊

娠个体病态胎盘附着的信息包括在取自前置胎盘患者的血液样品(如血浆或血清)中CXCL12的量。

[0090] 在一个实施方式中,所述装置还可以包括数据输入装置,其用于输入一种多种临床资料信息如年龄、孕龄、孕次、既往分娩情况、末次分娩时间、剖宫产次数、孕期相关病史及检查、手术信息如手术时间、手术方式、术中出血、输血情况、病理类型等,另外还包括输入CXCL12在生物样品(如血浆或血清)中的量。计算装置是利用输入的CXCL12的量和一种或多种选定的参数来预测或诊断形成病态胎盘附着的风险。

[0091] 实施例

[0092] 以下列举实施例来说明本发明,本领域技术人员能够理解,该例子仅是示例性的说明,并非穷尽性的说明。

[0093] 1、研究方法和研究对象

[0094] 本发明进行了两项独立研究。第一部分研究(sub-study 1)是一项回顾性病例对照设计。第二部分研究(sub-study 2)是一项前瞻性病例对照设计。

[0095] ①第一部分回顾性研究:对2010年1月至2015年12月广西医科大学一附院术中判断及术后病理确诊为病态胎盘附着(包括粘连型、植入型、穿透型)和前置胎盘(对照组)的孕妇,对其胎盘组织进行免疫组化检验,分析CXCL12/CXCR4/CXCR7在胎盘滋养细胞的表达水平。

[0096] ②第二部分前瞻性研究:对2016年1月至2016年12月广西医科大学一附院和南宁市第一人民医院术前B超和MRI术前诊断前置胎盘和(或)病态胎盘附着(包括粘连型、植入型、穿透型)的孕妇,术前留取静脉血ELISA法检测血CXCL12,术后对胎盘组织进行免疫组化检测CXCL12。术中判断及术后病理确诊病态胎盘附着(包括粘连型、植入型、穿透型)的孕妇为实验组,前置胎盘作为对照组。

[0097] ③纳入和排除标准:前置胎盘组、病态胎盘附着组因病情需要行剖宫产术终止妊娠,剖宫产时均未临产、胎膜早破。病态胎盘附着、前置胎盘的诊断标准参照第24版《威廉姆斯产科学》。病态胎盘附着病理学诊断为胎盘种植处子宫内膜缺乏蜕膜化,在切除的子宫标本或者在胎盘基板上发现胎盘绒毛直接侵犯子宫肌层。前置胎盘合并病态胎盘附着者纳入病态胎盘附着组。均排除其它如心脏病、妊娠期高血压疾病、妊娠期糖尿病、滋养细胞肿瘤、慢性感染性疾病等内外科合并症及妊娠并发症。所有孕妇均无抽烟、喝酒,饮食与生活习惯无特殊。所有入组研究对象均获知情同意并签署知情同意书,同时报院医学伦理委员会批准。

[0098] 2、临床资料和标本采集及处理

[0099] 1) 孕前临床资料收集:临床资料收集:年龄、孕龄、孕次、既往分娩情况、末次分娩时间、剖宫产次数、手术方式、孕期阴道流血及保胎用药情况、孕期相关病史及检查等;

[0100] 2) 手术相关信息和病理分类记录:手术时间,手术方式,术中出血,输血情况,病理类型等;

[0101] 3) 术后胎盘组织采集和保存、备用:备好装入适量福尔马林液标本袋,记录患者信息。待手术台护士测量、检查胎盘工作完成后,用无菌手术组织剪,按不同分组不同取材部位分为:胎盘植入分别留取胎盘附着植入处、胎盘附着非植入处,全层切片,前置胎盘作为对照组胎盘剪取胎盘母体面胎盘组织,避开出血、钙化及梗死区,中性福尔马林液中固定

24h用于免疫组织化学技术观察;

[0102] 4) 术前血标本采集和保存、备用:术前未用药和输血前静脉采血3ml至EDTA管抗凝,30min内离心机1000r/min离心15min分离血浆,再次在2-8℃低温离心机10000r/min离心10min将血浆中血小板完全去除。分离好的血浆分装至5份250μL EP管,-80℃冰箱储存备用。

[0103] 3、实验主要仪器和试剂

[0104] 实验主要仪器:

[0105] 80℃超低温冰箱(美国Beckman公司);高速离心机(各种型号)(美国Beckman公司);低温微型离心机(美国Eppendorf公司);蛋白定量酶标仪(美国BioRad公司);光学显微镜(日本Olympus公司);AS325切片机(英国Shandon公司);移液器(10μl、100f iK 1000p-1)(德国Eppendorf公司);垂直电泳仪(美国BioRad公司);恒温水浴槽(美国VWR Scientific INC公司);精密电子天平(瑞士AB204);一次性吸头、离心、EP管(上海);-20℃、4℃冰箱(海尔集团);超净工作台(苏州苏净公司);紫外分光光度仪(BECKMAN公司);转移脱色摇床(海门其林贝尔仪器)。

[0106] 主要试剂:

[0107] Anti-SDF1抗体(ab9797)美国abcam公司;Anti-CXCR4抗体(ab1670)美国abcam公司;Anti-CXCR7抗体(ab113410)美国abcam公司;人CXCL12试剂盒(DSA00)美国R&D Systems公司;山羊IgG,多克隆抗体-同型对照(ab37373)美国abcam公司;兔IgG,单克隆抗体[EPR25A]-同型对照(ab172730)美国abcam公司;Anti-cytokeratin-7抗体美国Invitrogen公司;Anti-vimentin antibody美国Invitrogen公司;Citrate柠檬酸盐缓冲液碧云天;PBS磷酸盐缓冲液碧云天;化学发光显影试剂碧云天;SDS裂解液碧云天;抗体稀释液(ZLI-9029)北京中杉;迈新粘附载玻片福州迈新;免洗盖玻片福州迈新;PAP pen免疫组化笔北京中杉。

[0108] 4、主要检测方法

[0109] 4.1免疫组织化学检测方法:

[0110] 4.1.1组织脱水及石蜡包埋

[0111] (1) 水洗:置水龙头下以自来水流水冲洗10min,这样可以使组织中的固定液随时溢出,洗得更干净彻底,

[0112] (2) 标本剪裁:标本固定24h后肉眼观察福尔马林液中标本的大体情况(形状、大小、色泽、表面形态、解剖层次等)避开钙化、坏死及积血区,切取横断面全程5-10mm(包括胎盘从母体面到胎儿面的胎盘全程),裁取胎盘组织约15×15mm大小,置于包埋盒中固定,并做好标记。

[0113] (3) 固定:及时将所取得组织块放入适量的甲醛固定液中,在尽量短的时间内使其停止生命活动,保持其精细结构。

[0114] (4) 脱水:按以下顺序依次将固定后的标本置入相应时间。50%乙醇(90min)→70%乙醇(90min)→85%乙醇(90min)→95%乙醇(90min)→100%乙醇(60min)→100%乙醇(60min)。

[0115] (5) 透明:将脱水后的包埋盒浸入二甲苯溶液中静置60min。

[0116] (6) 浸蜡:将透明处理后的组织块浸入透明剂与石蜡的混合液中,并不断提高石蜡

的比例,至石蜡完全替换组织中的透明剂,以便包埋与切片。

[0117] (7) 包埋:将液态的石蜡倒入器皿中,并用镊子将浸好蜡的组织块夹入器皿中,浅埋在石蜡中并展平,再倒入石蜡中包埋,待石蜡冷却。

[0118] 4.1.2免疫组织化学染色

[0119] (1) 常规脱蜡:4 μ m厚切片90℃烘烤30min→二甲苯脱蜡,3 $\times$ 10min→100%、95%、85%、75%、50%的梯度酒精浸洗二甲苯至水,5 $\times$ 5min→自来水冲洗两遍。

[0120] (2) 柠檬酸抗原热修复:将切片浸入预热至沸腾的0.01M枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),继续加热至高压锅上汽后计时2min,室温30min自然冷却,PBS冲洗3 $\times$ 5min。

[0121] (3) 阻断过氧化物酶:蒸馏水新鲜配制的3% H_2O_2 ,室温15min灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗2 $\times$ 3min,PBS浸洗3 $\times$ 5min。

[0122] (4) 抗原抗体反应:滴加分装好的抗体CXCL12和CXCR4 10 μ l,加入1000 μ l的一抗稀释液(1:100比例稀释),抗体CXCR7 5 μ l,加入1000 μ l的一抗稀释液(1:200比例稀释),37℃湿盒中孵育1h,PBS浸洗3 $\times$ 3min。滴加Envison system鼠兔通用二抗,室温孵育30min,PBS充分浸洗3 $\times$ 3min。

[0123] (5) 显色:新鲜配制DAB显色剂(取1ml蒸馏水,加DAB试剂盒中A,B,C试剂各一滴,混匀后至切片),显微镜下观察显色效果,控制显色时间,以特异性显色最强,而背景基本不着色为准,蒸馏水冲洗终止反应。

[0124] (6) 复染:苏木素复染1min→自来水冲洗→1%盐酸酒精分化→自来水冲洗两次→饱和碳酸锂溶液返蓝→自来水冲洗。

[0125] (7) 脱水、透明、封片:切片分别于浓度为75%、85%、95%、100%的酒精中脱水,4 $\times$ 5min→二甲苯透明,3 $\times$ 10min→中性树胶封片。

[0126] (8) 对照设置:所有标本均按试剂盒说明书方法进行,每次染色均设阳性对照和阴性对照。肠癌组织作为CXCL12阳性对照,脾脏作为CXCR4阳性对照,淋巴组织作为CXCR7阳性对照,以山羊和兔IgG同型对照第一抗体作为阴性对照。

[0127] (9) 免疫组织化学染色结果判定:阳性结果呈棕黄色颗粒样染色,阳性细胞计数随机选择5个高倍视野,阳性细胞数。阳性细胞数比率<5%,5-25%,26-50%,51-75%,>75%分别判定为0、1、2、3、4分;每张切片阳性细胞的着色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别判定为0、1、2、3分;根据两项积分乘积结果作为最后综合评分标准,最后综合评分为0-7分,<2分判定为阴性,2-3分判定为低表达,4-5分判定为中表达,6-7分判定为高表达。评分由两位病理科医师独立分别完成。

[0128] 4.2 ELISA法检测方法:

[0129] (1) 将MAP和前置胎盘孕妇血浆用校准品稀释液RD6Q稀释10倍,备用;

[0130] (2) 将100 μ l检测稀释液RD1-55加入到96孔板内;

[0131] (3) 将稀释后的血清标本和标准品100 μ L加入到96孔板内,室温下孵育2小时;

[0132] (4) 用洗涤液清洗各个小孔4次,每次5分钟;

[0133] (5) 将CXCL12Conjugate液体加入到96孔板内,室温下孵育2小时;

[0134] (6) 用洗涤液清洗各个小孔4次,每次5分钟;

[0135] (7) 将200 μ L反应液加入到96孔板内,室温下孵育30分钟,避光;

[0136] (8) 加入50 μ L反应终止液到各个孔内,30分钟内在450nm波长下读数,并进行统计

学分析。

[0137] 5、统计学处理方法

[0138] 实验数据采用SPSS 20.0统计软件进行分析。定量数据用均数±标准差表示,两组间的比较用t检验,多组间的差异比较用ANOVA单因素方差分析;方差不齐者采用非参数秩和检验;相关性用Pearson相关分析;多因素分析用多元线性回归;ROC曲线预测CXCL12的诊断价值。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

[0139] 实施例1:MAP和前置胎盘患者临床资料统计分析

[0140] 第一部分研究(sub-study 1)和第二部分研究(sub-study 2)的MAP和前置胎盘患者的临床特征总结在表1和表2中。纳入标准包括MAP的病理诊断或胎盘前置的临床诊断,没有过度侵袭的证据,胎龄在28-40周之间。

[0141] 表1:sub-study 1纳入研究对象的临床特征

[0142]

特征量	sub-study 1		<i>p</i> 值
	MAP (n=39)	PP (n=17)	
孕妇特点			
年龄, 岁*	35 (22-42)	34 (28-44)	0.865
体重指数 (BMI) , kg/m ² *	25.18 (13-34)	27.05 (23-33)	0.209
血压 (mmHg)*			0.605
收缩压	121(110-129)	125(110-130)	
舒张压	73(65-84)	72(68-82)	
孕次†			0.309
≤2	5(12.8%)	0(0.0%)	
≥3	34(87.2%)	17(100%)	
产次†			0.659
1	3(7.7%)	0(0.0%)	
2	29(74.4%)	14(82.4%)	
≥3	7(17.9%)	3(17.6%)	
剖宫产次数†			0.952
0	10(25.6%)	4(23.5%)	
1 次	24(61.5%)	11(64.7%)	
≥2 次	5(12.5%)	2(11.8%)	
阴道出血 (≥1 次)†	28(71.8%)	12(70.6%)	1.000
胎儿特征			
分娩孕周, 周*	36.0(30-40)	37.0(34-39)	0.157
出生体重, g*	2700.0(1660-3800)	2730.0(2030-3470)	0.545
新生儿窒息, 次†	4(10.3%)	1(5.9%)	1.000
结果表征			
介入治疗†	11(28.2%)	3(17.6%)	0.513
剖宫产子宫切除术†	21(53.8%)	0(0%)	<0.001
总共手术时间, 分钟*	152.0(66-518)	82.0 (59-169)	<0.001
失血量, mL*	2000.0(500-40000)	500.0(300-1600)	<0.001

[0143] *数据用median[range]表示,通过Kruskal-Wallis检验得到。

[0144] †数据用n[%]表示,通过卡方检验分析得到。

[0145] 表2:sub-study 2纳入研究对象的临床特征

[0146]

特征量	sub-study 2		p 值
	MAP (n=32)	PP (n=17)	
孕妇特点			
年龄, 岁*	33 (25-42)	33.75 (28-39)	0.651
体重指数 (BMI) , kg/m ² *	25.32 (21.48-33.98)	26.22 (23.14-33.30)	0.209
血压 (mmHg)*			
收缩压	119(115-130)	122(112-128)	
舒张压	75(68-82)	72(65-80)	
孕次†			0.609
≤2	4(12.5%)	3(17.6%)	
≥3	28(87.5%)	14(82.4%)	
产次†			0.846
1	3(9.4%)	2(11.8%)	
2	23(71.9%)	12(70.6%)	
≥3	6(18.8%)	3(17.6%)	
剖宫产次数†			1.000
0	9(28.1%)	5(29.4%)	
1 次	19(59.4%)	10(59.8%)	
≥2 次	4(12.5%)	2(11.8%)	
阴道出血 (≥1 次)†	26(81.3%)	13(76.5%)	1.000
胎儿特征			
分娩孕周, 周*	36.0(33-37)	37.0(35-38)	0.027
出生体重, g*	2695(1820-3130)	2930.0(2350-3470)	0.235
新生儿窒息, 次†	4(12.5%)	1(5.9%)	1.000
结果表征			
介入治疗†	10(31.2%)	4(23.5%)	0.281
剖宫产子宫切除术†	6(18.7%)	0(0%)	0.017
总共手术时间, 分钟*	144.0(70-336)	78.0 (49-117)	0.006
失血量, mL*	1575(800-5300)	542.86(200-1300)	<0.001

[0147] *数据用median[range]表示,通过Kruskal-Wallis检验得到。

[0148] †数据用n[%]表示,通过卡方检验分析得到。

[0149] 由表1、2可知,剖宫产子宫切除术的频率 (MAP:21[53.8%] vs PP:0[0%], P<0.001), 总计手术时间 (MAP:152[66-518] vs PP:82[59-169]min, P<0.001) 和失血量 (MAP:2000[500-40000] vs PP:500[300-1600]ml, P<0.001) MAP组明显高。

[0150] 实施例2:免疫组织化学技术检测MAP和前置胎盘孕妇胎盘CXCL12/CXCR4/CXCR7表达水平

[0151] MAP病例包括胎盘植入部位(MAP植入部位,MAP implanted site)和未植入部位的全层活检(MAP-未植入部位,MAP no-implanted site)。MAP-未植入部位作为内部对照,前置胎盘(PP)作为外部对照,胎盘全层活检。

[0152] 免疫组织化学检测结果显示,CXCL12/CXCR4/CXCR7主要在胎盘滋养层细胞中表达(图1.A、D、G),如细胞滋养细胞(CTBs),合体滋养细胞(STBs)和绒毛膜外细胞滋养细胞(EVTs),另外还包括少量蜕膜细胞和基质(图2和图3)。MAP孕妇胎盘组织中CXCL12/CXCR4/CXCR7的表达水平与前置胎盘比较明显增高,浸润深度越深CXCL12/CXCR4/CXCR7的表达越明显(图1.A、D、G),同一孕妇的胎盘植入部位和非植入部位表达无差异(图1.B、E、H)。免疫组织化学显示,增强的CXCL12/CXCR4/CXCR7在滋养细胞中表达,表明趋化因子和受体可能在MAP中调节功能以运输更多的氧和营养物质,并获得更强的侵袭性。

[0153] 对MAP病例的植入深度进行进一步分析时,由图1的C、F、I可知,胎盘穿透患者的CXCL12/CXCR4/CXCR7的表达显著高于胎盘粘连患者($P=0.015$ 为CXCL12; $P=0.001$ 为CXCR4;CXCR7为 $P=0.012$)和前置胎盘患者(CXCL12为 $P<0.001$;CXCR4为 $P<0.001$;CXCR7为 $P<0.001$)。胎盘中CXCL12/CXCR7的表达高于前置胎盘患者(CXCL12为 $P<0.001$;CXCR7为 $P=0.001$),但CXCR4除外($P=0.079$)。CXCL12在胎盘粘连患者中的表达高于前置胎盘患者($P=0.036$)。然而,CXCR4/CXCR7在胎盘粘连和前置胎盘患者之间的表达没有统计学差异(CXCR4为 $P=1.000$;CXCR7为 $P=0.391$)。即通过对MAP深度的详细评估,本发明发现趋化因子CXCL12与受体CXCR4和CXCR7在区分子宫肌层浸润深度方面有更多的统计学差异。

[0154] 图2是为了进一步的内部比较,通过胎盘植入的病例来说明在植入部位和非植入部位之间的免疫组化结果。植入部位的特征在于不存在蜕膜层并且通过细胞角蛋白-7阳性反应鉴定大量绒毛外滋养层细胞EVTs(图2.C)被渗透入深层子宫肌层(图2.A-E)。非植入部位的滋养层中的高CXCL12表达与植入部位(图2.F-J)一致。图3给出胎盘植入和穿透病例中免疫组化的代表性结果。胎盘穿透比胎盘植入在胎盘深层子宫肌层中有更多的异常扩张血管(图3.A,F)。胎盘穿透患者的子宫肌层中EVTs的CXCL12表达显示出比胎盘植入更强的染色(图3.E、J)。

[0155] 本发明的CXCL12染色的评分指南见图6,CXCL12/CXCR4/CXCR7免疫组化的阳性对照和阴性对照见图7。

[0156] 实施例3:MAP胎盘组织中CXCL12/CXCR4/CXCR7表达水平与临床特征的多因素分析

[0157] 建立多元线性回归模型,校正潜在干扰因素,包括年龄、孕次、产次、孕周、剖宫产次数后,发现CXCL12表达与临床特征之间的关系更为接近,总的手术时间与CXCL12在滋养细胞中的表达具有很高的相关性,与受体CXCR4和CXCR7相比,CXCL12表达和不同的植入深度(粘连、植入、穿透)更密切相关,见表3。

[0158] 表3胎盘组织CXCL12/CXCR4/CXCR7表达水平与临床病理特征的多因素分析

[0159]

表征	CXCL12 [β (95%CI)]	CXCR4 [β (95%CI)]	CXCR7 [β (95%CI)]
植入深度			
前置胎盘	1.000	1.000	1.000
胎盘粘连	0.354(0.438, 1.908)	0.095(-0.519, 1.089)	0.259(-0.014, 1.774)
胎盘植入	0.494(0.361, 1.303)	0.320(-0.025, 1.006)	0.441(0.190, 1.335)
胎盘穿透	0.657(0.448, 1.711)	0.646(0.273, 1.654)	0.577(0.204, 1.739)
总共手术时间, 分钟	0.512 (0.002, 0.012)	0.273(-0.002, 0.009)	0.353(-0.001, 0.011)
植入面积, cm ²	0.062(-0.005, 0.008)	-0.017(-0.007, 0.007)	-0.050(-0.009, 0.007)
出血量, mL	-0.219(0.000, 0.000)	-0.030(0.000, 0.000)	-0.085(0.000, 0.000)
剖宫产子宫切除术	-0.180(-1.706, 0.576)	-0.176(-1.752, 0.745)	-0.029(-1.482, 1.293)

[0160] 实施例4:MAP和前置胎盘患者血CXCL12的水平

[0161] 在分析过程中,本发明发现CXCL12的表达与胎盘入侵有显着相关性,本实施例比较分析收集的血CXCL12在MAP和前置胎盘患者中的表达水平(图4)。ELISA结果显示,MAP患者血中CXCL12的水平与前置胎盘比较明显增高(2920.06[SD 1172.34]vs.1965.92[SD 596.98]pg/mL, $P=0.003$),见图4.A,并且植入深度越深,CXCL12的水平越高。图4.B显示胎盘穿透患者的血CXCL12的水平相比胎盘粘连(4167.01[SD 576.24]vs.3106.80[SD 967.46]pg/mL, $P=0.009$)、胎盘植入(4167.01[SD 576.24]vs.1985.27[SD 915.27]pg/mL, $P<0.001$)和前置胎盘患者(4167.01[SD 576.24]vs.1965.92[SD 596.98]pg/mL, $P<0.001$)均显著增加。胎盘植入患者相比胎盘粘连(3106.81[SD 967.46]vs.1985.27[SD 915.27]pg/mL, $P=0.001$)、前置胎盘患者(3106.81[SD 967.46]vs.1965.92[SD 596.98]pg/mL, $P<0.001$),血CXCL12的水平有明显升高。

[0162] 图5显示出血CXCL12水平与胎盘组织CXCL12的表达密切相关。根据血CXCL12升高的特点,因此采用ROC曲线检验血CXCL12预测或诊断MAP,灵敏度和特异度分别是78.1%和88.2%,曲线面积是0.813,95%CI:0.689,0.936。图8是本发明筛选预测妊娠个体患有病态胎盘附着的风险和/或诊断病态胎盘附着的潜在生物标记物的方法流程示意图。

[0163] 本发明发现胎盘滋养细胞CXCL12的水平与胎盘不同入侵深度有密切关系,同时其也与临床特征具有高的相关性,通过分析血循环与胎盘滋养细胞CXCL12的表达水平的关系,发现MAP患者循环血CXCL12的升高来源于局部胎盘组织的滋养细胞,综合上述实施例的数据足以表明血CXCL12不仅具有预测或诊断胎盘侵入的能力,还能进一步细分判断附着的深度。

[0164] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何

熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

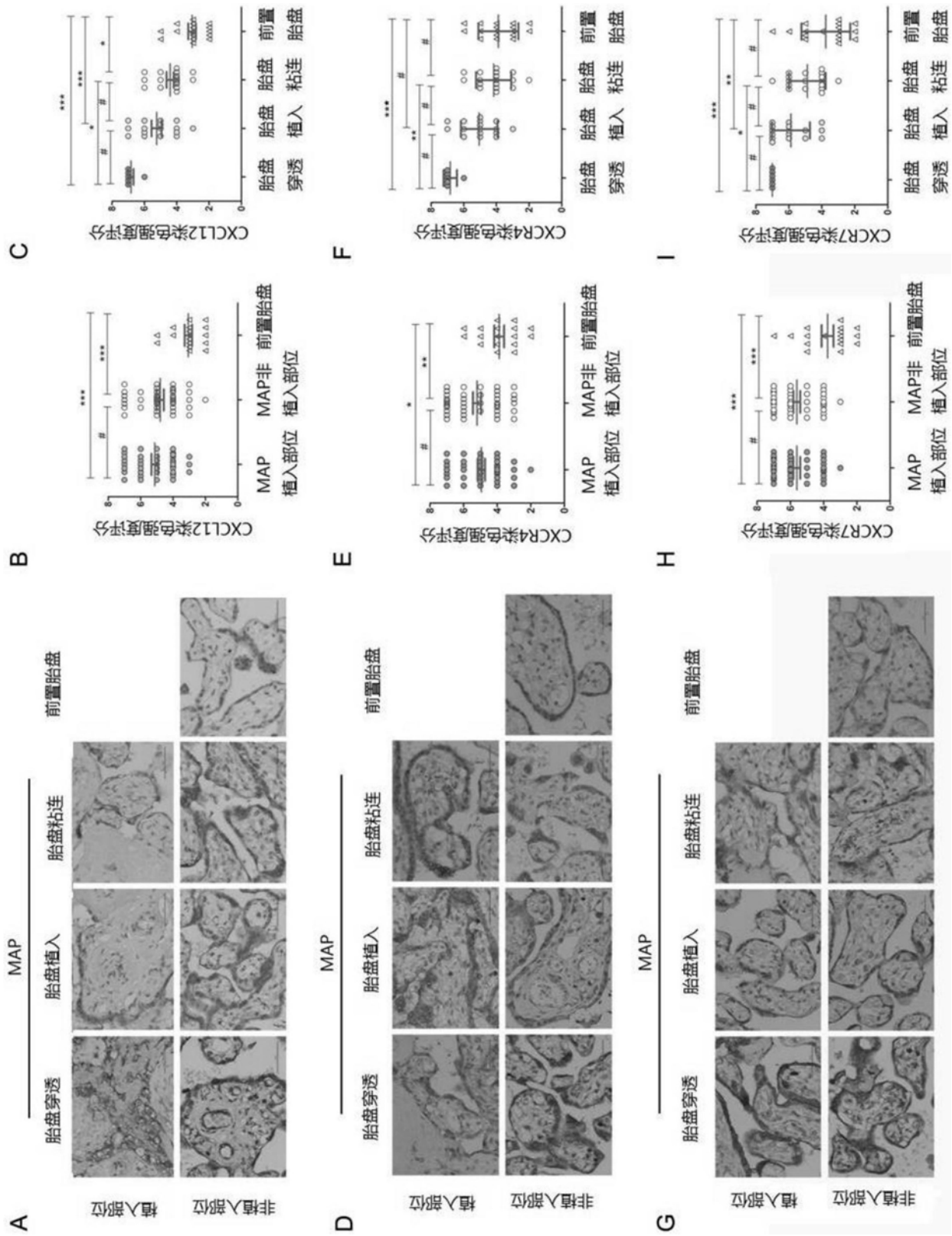


图1

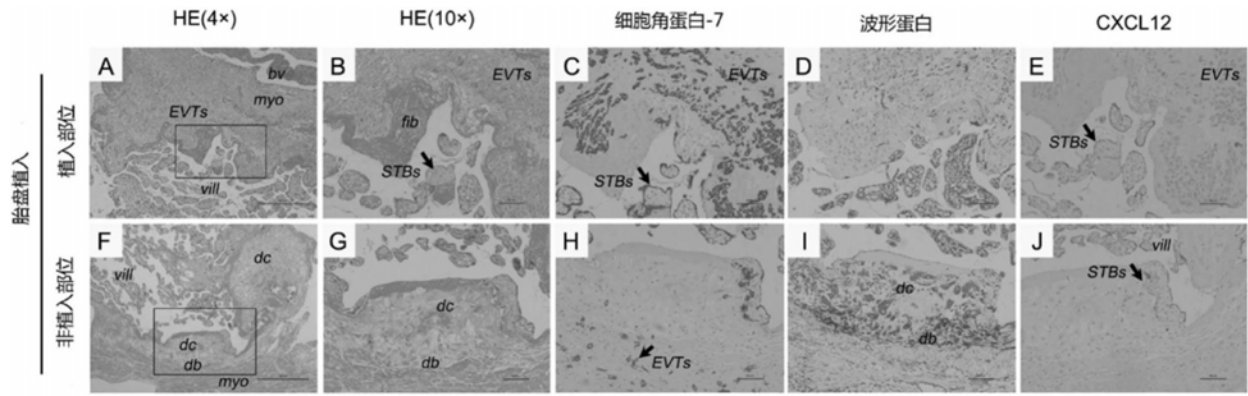


图2

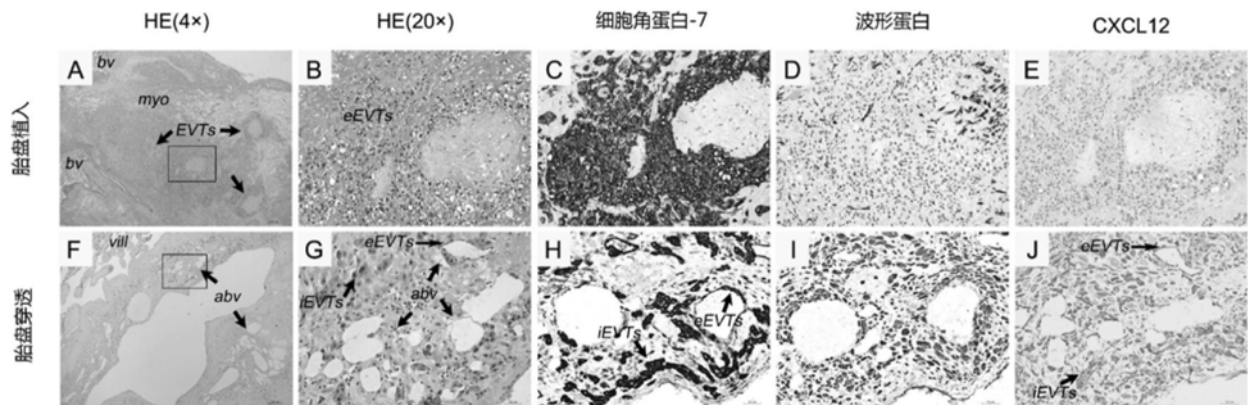


图3

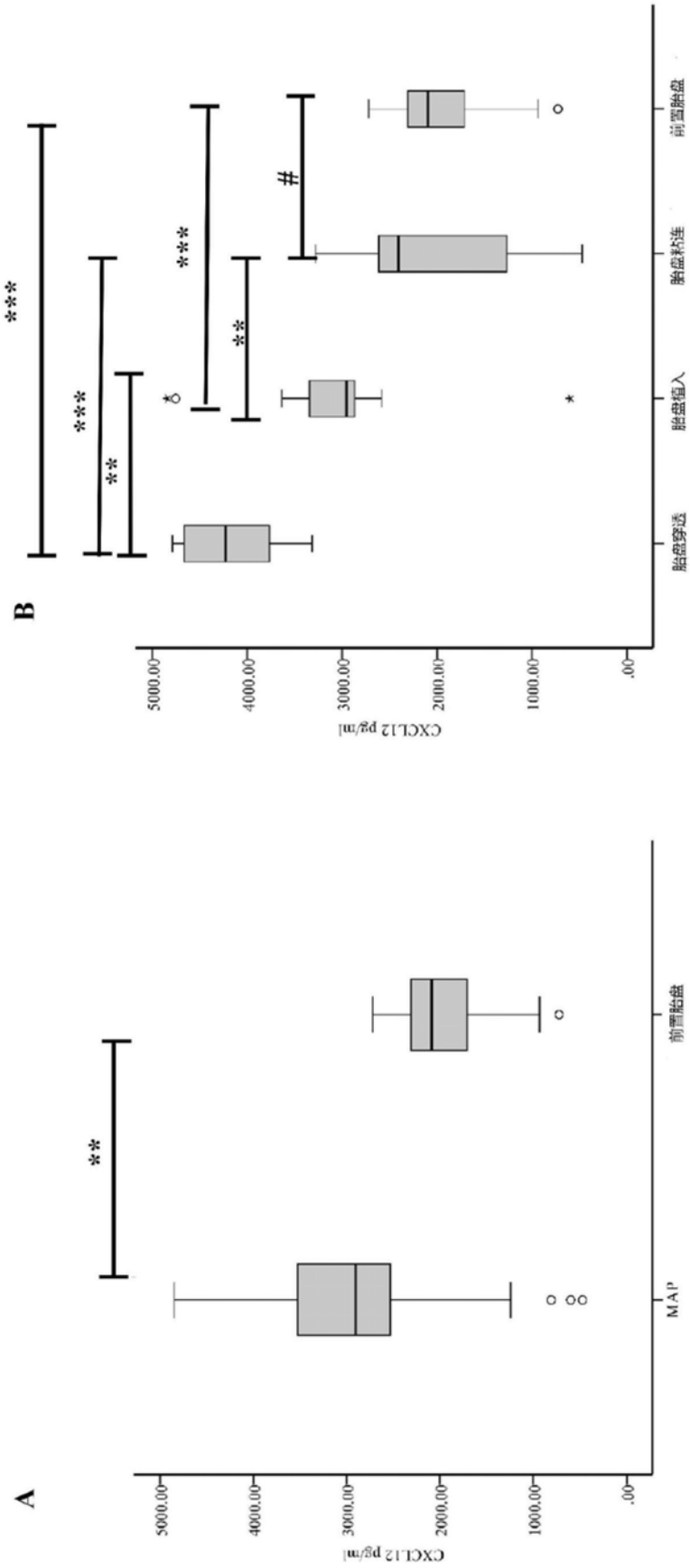


图4

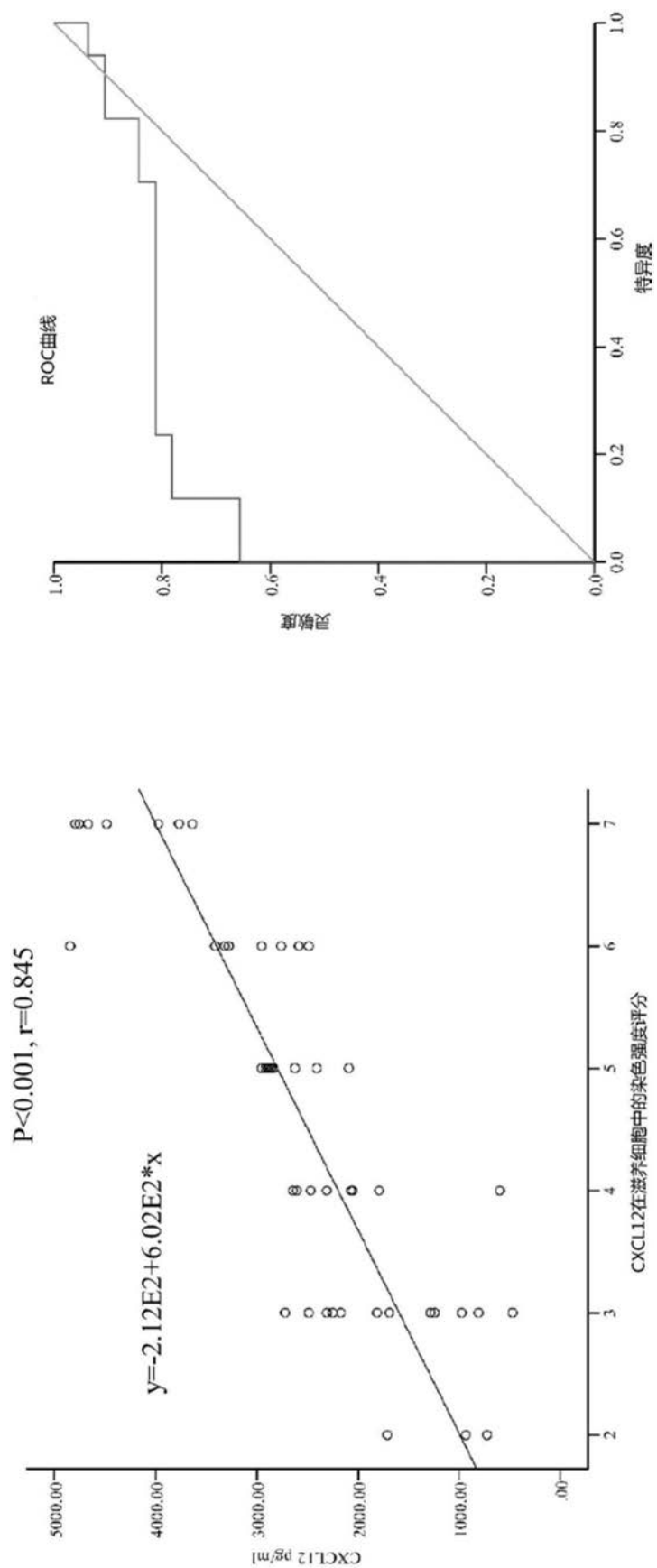


图5

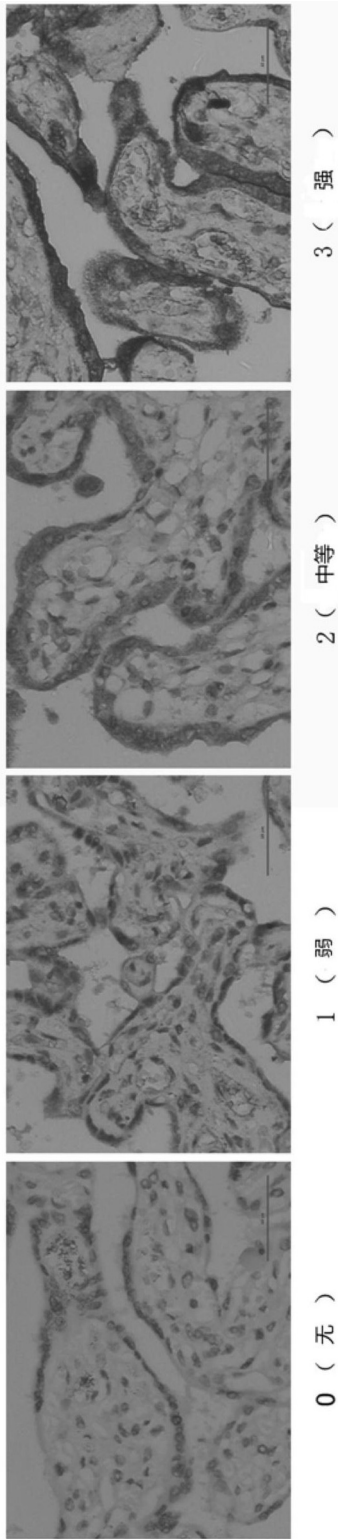


图6

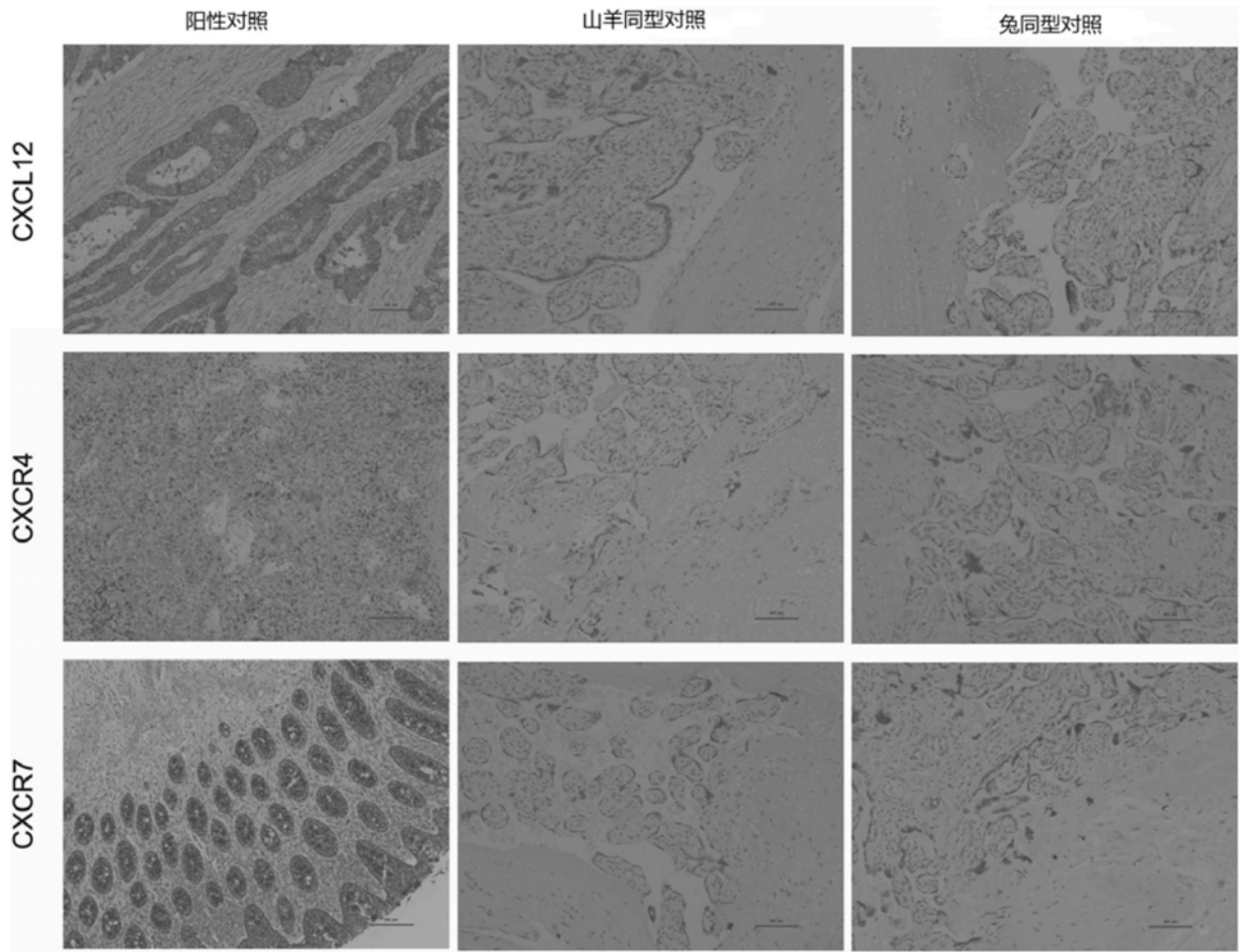


图7

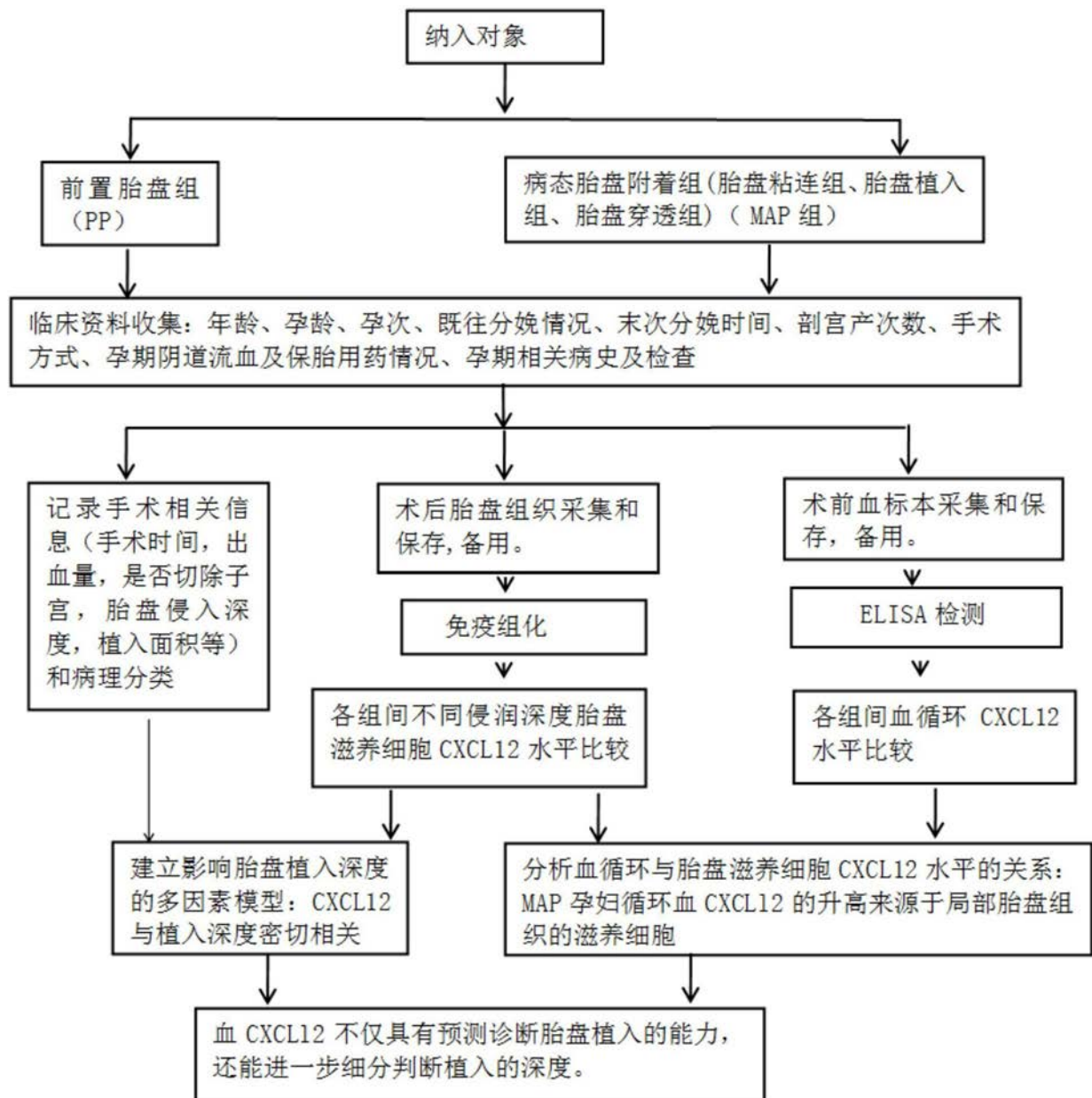


图8

专利名称(译)	检测CXCL12的试剂在制备预测诊断MAP试剂盒中的用途及试剂盒、装置、筛选方法		
公开(公告)号	CN107121541A	公开(公告)日	2017-09-01
申请号	CN201710287415.5	申请日	2017-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	龙禹		
申请(专利权)人(译)	龙禹		
当前申请(专利权)人(译)	龙禹		
[标]发明人	龙禹 李慕军 蒋永华 陈智炜 王捷		
发明人	龙禹 李慕军 蒋永华 陈智炜 王捷		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N33/558		
代理人(译)	刘新宇		
其他公开文献	CN107121541B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测CXCL12的试剂在制备用于预测或诊断MAP的试剂盒中的用途及试剂盒、装置、筛选方法。本发明发现可通过测定获自妊娠个体的血液样品中CXCL12的水平来预测或诊断病态胎盘附着的风险并细分判断胎盘的植入深度。

