



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374901 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811161440.X

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2018.09.30

(71)申请人 山东大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新区
南区虚拟大学园A301(南山区高新南
四道19号)

申请人 山东大学齐鲁医院

(72)发明人 郝盼盼 刘燕萍 李贵双

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

代理人 董洁

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图4页

(54)发明名称

一种心肌梗死预后风险指数检测装置及心
肌梗死预后预警模型的建立方法

(57)摘要

本公开涉及一种心肌梗死预后风险指数检测装置及心肌梗死预后预警模型的建立方法。本公开通过利用Pearson和Spearman两种相关性检验方法分析基线血浆中Ang-(1-7)等48种蛋白因子水平与 Δ EDV、 Δ LVEF和 $\Delta E'/A'$ 的相关性,利用多元逐步回归分析方法确定回归方程和 Δ EDV、 Δ LVEF及 $\Delta E'/A'$ 等左室重构和功能指标的独立预警因素。



1. 一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠芯片,其特征是:该微珠芯片包括微珠固体基质,材质为氯甲基化聚苯乙烯树脂,所述微珠固体基质通过酰胺键偶联心肌梗死预后预警相关的蛋白因子抗体。

2. 一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠悬浮芯片产品,其特征是:该产品每100 μ L含 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个微珠,所述微珠包括权利要求1所述的微珠芯片和未被偶联的活化后的微珠固体基质,其中,所述微珠芯片所占比例为70~80%。

3. 权利要求2所述的能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠悬浮芯片产品的制备方法,其特征是,该方法包括以下步骤:

(1) 活化微珠:

采用微珠洗涤液洗涤,分离,然后加入微珠活化缓冲液,震荡后超声,使微珠完全悬浮;

向悬浮的微珠中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)进行反应,然后加入PBS缓冲液,震荡后超声,得到羧基化微珠溶液;

(2) 偶联抗体:

向羧基化微珠溶液中加入与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子抗体,避光震荡孵育;孵育结束后,洗涤,分离,加入封闭液封闭微珠抗体;再进行洗涤,加入储存液重悬微珠,即制备得到微珠悬浮芯片产品。

4. 一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的试剂盒,其特征是:该试剂盒至少包括权利要求1所述的微珠芯片或权利要求2所述的微珠悬浮芯片产品,还包括:不同浓度的抗原标准品、微珠固体基质、PBS缓冲液、微珠活化缓冲液、微珠洗涤液和封闭液。

5. 一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的方法,其特征是:该方法包括使用权利要求1所述的微珠悬浮芯片或权利要求2所述的微珠悬浮芯片产品或权利要求4所述的试剂盒进行检测的步骤。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征是,具体包括以下步骤:

将所述微珠悬浮芯片产品加入至96孔抽滤板,真空抽干;加入微珠洗涤液,洗涤后真空抽干;分别加入待测血浆样本、不同浓度的抗原标准品,贴上封板膜;室温避光条件下孵育,真空抽滤;;加入生物素标记二抗,室温避光条件下孵育,真空抽滤;加入微珠洗涤液,洗涤后真空抽干;加入链亲和素-藻红蛋白;室温避光条件下孵育,真空抽干;加入微珠洗涤液,洗涤后真空抽干;加入封闭液重悬微珠,检测其荧光强度,得到不同抗原浓度的标准品的荧光强度变化曲线,制作线性关系曲线以及得到待测血浆样本的荧光强度,然后根据所述线性关系曲线得到待测血浆样本中蛋白因子的含量。

7. 一种心肌梗死预后风险指数检测装置,其特征是,该检测装置至少包括:

蛋白因子检测系统,该系统至少能够检测血浆中以下三组中至少一组的数值:样本中Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值,样本中肾素活性值和CTNI的含量值,样本中Ang-II和NT-proBNP的含量值;

预后数据处理器,用于接收以下三组中至少一组的数值:样本中Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值,样本中肾素活性值和CTNI的含量值,样本中Ang-II和NT-proBNP的含量值;进而至少计算 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 值其中的一个数值,其中, Δ EDV=137-0.412 \times Ang-(1-7)+0.334 \times TNF- α , Δ LVEF=85-0.358 \times 肾素活性-0.315 \times Log-CTNI, $\Delta E'/A'$ =32-0.415 \times

Ang-II-0.304×Log-NT-proBNP;

其中, Δ EDV代表左室舒张末期容积改变值; Δ LVEF代表左室射血分数改变值; $\Delta E'/A'$ 代表二尖瓣瓣环舒张早期峰值速度(E')与舒张晚期峰值速度(A')比值的变化值。

8. 如权利要求7所述的检测装置,其特征是:所述蛋白因子检测系统包括权利要求1所述的微珠芯片或权利要求2所述的微珠悬浮芯片产品或权利要求4所述的试剂盒。

9. 如权利要求7所述的检测装置,其特征是:所述检测装置还包括预警结果显示器,用于显示 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 数值。

10. 一种心肌梗死预后的预警模型的建立方法,其特征是,该建立方法包括:

(1) 分别获取若干心肌梗死患者治疗前的以下至少三组中的至少一组数值:样本中Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值、样本中肾素活性值和CTNI的含量值、样本中Ang-II和NT-proBNP的含量值;

分别获取若干患者治疗前后的LVEDV、LVEF和/或 E'/A' ,计算其 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$;

(2) 采用SPSS软件进行数据处理:

检测结果用平均值±标准误或中位数[四分位数间距]表示,如果服从正态分布,采用方差分析进行组间比较,如果组间差异有统计学意义,进一步采用Bonferroni法进行两两比较;如果不服从正态分布,组间比较采用Kruskal-Wallis秩和检验,如果组间差异有统计学意义,进一步采用Dwass-Steel-Critchlow-Fligner法进行多重比较;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义;

(3) 根据正态性检验的结果选择Pearson或Spearman相关性检验方法分析血浆中各蛋白因子水平与 Δ EDV、 Δ LVEF和 $\Delta E'/A'$ 的相关性;如果样本符合正态分布,选择Pearson相关分析;如果样本不符合正态分布,选择Spearman秩相关分析;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义;

(4) 利用多元逐步回归分析方法确定 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$ 左室重构和功能指标的回归方程,确定 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$ 的独立预警因素,建立预警模型;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

一种心肌梗死预后风险指数检测装置及心肌梗死预后预警模型的建立方法

技术领域

[0001] 本公开涉及一种心肌梗死预后风险指数检测装置及心肌梗死预后预警模型的建立方法,属于生物医学技术领域。

背景技术

[0002] 这里的陈述仅提供与本公开有关的背景信息,而不必然构成现有技术。

[0003] 随着冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention,PCI)技术的不断进步,心肌梗死急性期的死亡率和心力衰竭发生率逐年下降,而慢性心肌重构所致远期心力衰竭的发生率和死亡率逐年升高。心肌重构一般是指左室重构,不同患者左室重构的速度和严重程度差异很大。影响左室重构的因素很多,包括心肌梗死的部位及严重程度、再灌注时间、患者年龄、性别及合并症等。能否对远期左室重构的严重程度做出科学预测直接影响对急性心肌梗死患者预后的评估和个体化治疗的开展。因此,急性心肌梗死左室重构的早期预警技术成为目前心血管领域的研究热点。

[0004] 心力衰竭发展的早期阶段是心肌重构,表现为心脏大小、形状和功能的变化,是心脏对损伤或炎症的普遍反应。心肌梗死诱导心肌重构和功能障碍的机制尚不清楚,但已证实多种原因所致的心肌重构存在一个共同的机制--肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)过度激活。心肌缺血可激活RAS,促使血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme,ACE)催化血管紧张素I(angiotensin I,Ang-I)转化为血管紧张素II(angiotensin II,Ang-II)。Ang-II通过结合血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1receptor,AT1R)而发挥作用,诱导心肌重构和心肌纤维化,进而导致心力衰竭的发生和发展。ACE抑制剂和AT1R拮抗剂能延长心力衰竭患者的寿命,减轻甚至逆转心肌重构某些参数的恶化,是心肌重构治疗的基石。其他机制如微血管病变、植物神经功能紊乱、代谢紊乱及间质纤维化,也可能参与心力衰竭的发生。

[0005] 心肌中的RAS新成员血管紧张素(1-7)[angiotensin-(1-7),Ang-(1-7)]由包括血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2,ACE2)在内的几种肽链内切酶和羧基肽酶催化分解Ang-I和Ang-II而产生。最近,本申请人和其他研究者均报道,ACE2和Ang-(1-7)在体内和体外均发挥心脏保护作用。此外,本申请人还发现,血浆Ang-(1-7)水平与急性心肌梗死患者再灌注治疗后心肌损伤的改善和左室功能的恢复密切相关。然而,血浆Ang-(1-7)水平和急性心肌梗死患者的心肌重构和功能之间的关系尚不明确。

[0006] 目前据本申请人知晓,其他的血浆蛋白因子,例如肾素、Ang-II、缓激肽(bradykinin,BK)、醛固酮、皮质醇、儿茶酚抑制素(catestatin,CST)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB,CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin-I,CTNI)、N末端B型利钠肽原(N-terminal pro-brain natriuretic peptide,NT-proBNP)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)、内皮素1(endothelin-1,ET-1)、护骨素(osteoprotegerin,OPG)、骨膜蛋白

(periostin,PN)、多配体蛋白聚糖-1(syndecan-1,SDC-1)、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase-1,MMP-1)、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1,TIMP-1)、TIMP-2、TIMP-4、和肽素、血管性血友病因子(Von Willebrand factor,VWF)、组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator,t-PA)、纤维胶凝蛋白2(ficolin-2,FCN2)、甘露糖凝集素(mannose-binding lectin,MBL)、甘露糖凝集素/纤维胶凝蛋白相关蛋白1(MBL/Ficolin-associated Protein-1,MAP-1)、C反应蛋白(C-reactive protein,CRP)、白介素-1 β (Interleukin-1 β ,IL-1 β)、IL-6、IL-21、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha,TNF- α)、可溶性肿瘤坏死因子1型受体(soluble tumor necrosis factor receptor 1,sTNFR1)和2型受体(sTNFR2)、巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)、CC趋化因子配体4(chemokine C-C motif ligand 4,CCL4)、CXC趋化因子配体8(CXC chemokine ligand 8,CXCL8)、CXCL10、CXCL16、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、脂联素、氧化低密度脂蛋白(oxidized LDL,OX-LDL)、颗粒酶B、肌腱蛋白C(Tenascin-C,Tn-C)和I型胶原羧基末端肽(carboxy-terminal telopeptide of collagen type I,ICTP)等也可能与急性心肌梗死后左室重构相关。

[0007] 而目前急性心肌梗死左室重构预后预警技术中并没有采用多种相关蛋白因子进行研究分析,影响预后结果的准确性和可靠性。

[0008] 微珠芯片本质是流式细胞和酶标检测两种成熟技术有机结合,由于利用微珠在溶液中反应,克服了片膜芯片在大分子检测时受表面张力、空间效应等对反应动力学的影响,大大提高了样品检测的准确性和重复性。

[0009] 综上,目前尚缺乏同时集成检测批量蛋白因子的微珠悬浮芯片,亦无采用多种相关蛋白因子对急性心肌梗死后左室重构进行早期预警的报道。

发明内容

[0010] 针对背景技术,本公开旨在建立定量多重检测左室重构相关蛋白因子的微珠芯片集成检测系统,并与现有技术比较,寻找快速、准确、简便的左室重构相关因子检测方法。同时评价微珠芯片检测结果与急性心肌梗死患者左室重构严重程度的相关性,结合临床因素构建预警模型。以此为基石建立的新型预警技术将协助临床医生对急性心肌梗死患者进行早期危险分层和早期个体化治疗,最终减少或延缓心力衰竭的发生。

[0011] 在本公开的第一个方面,提供了一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠芯片,该微珠芯片包括微珠固体基质,即氯甲基化聚苯乙烯树脂,所述微珠固体基质通过酰胺键偶联心肌梗死预后预警相关的蛋白因子抗体。

[0012] 在本公开的第二个方面,提供一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠悬浮芯片产品,其特点是:每100 μ L含 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个微珠,所述微珠包括上述微珠芯片和未被偶联的活化后的微珠固体基质,其中,所述微珠芯片所占比例(个数)为70~80%。

[0013] 在本公开的第三个方面,提供上述微珠悬浮芯片产品的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0014] (1) 活化微珠:

[0015] 采用微珠洗涤液洗涤,分离,然后加入微珠活化缓冲液,震荡后超声,使微珠完全悬浮;

[0016] 向悬浮的微珠中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羧基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)进行反应,然后加入PBS缓冲液,震荡后超声,得到羧基化微珠溶液;

[0017] (2) 偶联抗体:

[0018] 向羧基化微珠溶液中加入与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子抗体,避光震荡孵育;孵育结束后,洗涤,分离,加入封闭液封闭微珠抗体;再进行洗涤,加入储存液重悬微珠,即制备得到微珠悬浮芯片产品。

[0019] 在本公开的第四个方面,提供一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的试剂盒,该试剂盒至少包括所述微珠悬浮芯片产品,还包括:不同浓度的抗原(即与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子)标准品、PBS缓冲液、微珠活化缓冲液、微珠洗涤液和封闭液等。

[0020] 在本公开的第五个方面,提供一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的方法,该方法包括使用所述微珠悬浮芯片或微珠悬浮芯片产品或试剂盒进行检测的步骤。

[0021] 在本公开的第六个方面,提供一种心肌梗死预后风险指数检测装置,该检测装置至少包括:

[0022] 蛋白因子检测系统,该系统至少能够检测血浆中以下三组中至少一组的数值:样本中Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值,样本中肾素活性值和CTNI的含量值,样本中Ang-II和NT-proBNP的含量值;

[0023] 预后数据处理器,用于接收以下三组中至少一组的数值:样本中Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值,样本中肾素活性值和CTNI的含量值,样本中Ang-II和NT-proBNP的含量值;进而至少计算 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 值其中的一个数值,其中, Δ EDV=137-0.412 \times Ang-(1-7)+0.334 \times TNF- α , Δ LVEF=85-0.358 \times 肾素活性-0.315 \times Log-CTNI, $\Delta E'/A'$ =32-0.415 \times Ang-II-0.304 \times Log-NT-proBNP;

[0024] 其中, Δ EDV代表左室舒张末期容积改变值; Δ LVEF代表左室射血分数改变值; $\Delta E'/A'$ 代表二尖瓣瓣环舒张早期峰值速度(E')与舒张晚期峰值速度(A')比值的变化值。

[0025] 在本公开的第七个方面,提供一种心肌梗死预后的预警模型的建立方法,该建立方法包括:

[0026] (1) 分别获取若干心肌梗死患者治疗前的以下至少三组中的至少一组数值:样本中Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值、样本中肾素活性值和CTNI的含量值、样本中Ang-II和NT-proBNP的含量值;

[0027] 分别获取若干患者治疗前后的LVEDV、LVEF和/或 E'/A' ,计算其 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$;

[0028] (2) 采用SPSS软件进行数据处理:

[0029] 检测结果用平均值 \pm 标准误或中位数[四分位数间距]表示,如果服从正态分布,采用方差分析进行组间比较,如果组间差异有统计学意义,进一步采用Bonferroni法进行两两比较;如果不服从正态分布,组间比较采用Kruskal-Wallis秩和检验,如果组间差异有统计学意义,进一步采用Dwass-Steel-Critchlow-Fligner法进行多重比较;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义;

[0030] (3) 根据正态性检验的结果选择Pearson或Spearman相关性检验方法分析血浆中各蛋白因子水平与 Δ EDV、 Δ LVEF和 $\Delta E'/A'$ 的相关性;如果样本符合正态分布,选择Pearson相关分析;如果样本不符合正态分布,选择Spearman秩相关分析;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义;

[0031] (4) 利用多元逐步回归分析方法确定 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$ 左室重构和功能指标的回归方程,确定 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$ 的独立预警因素,建立预警模型;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

[0032] 与本发明人知晓的相关技术相比,本公开其中的一个技术方案具有如下有益效果:

[0033] 本公开制备的微珠悬浮芯片,由于利用微珠在溶液中反应,克服了片膜芯片在大分子检测时受表面张力、空间效应等对反应动力学的影响,同时利用激光检测技术,大大提高了样品检测的准确性和重复性,使其既具有片膜芯片高通量的特性,又具有优于片膜芯片的操作简便、重复性好、灵敏度高和动态范围宽等特点。与ELISA相比,微珠悬浮芯片具有更高的检测灵敏度,并且具有高效、快速、敏感、特异、低成本等优点。经过微珠材料优选和检测,我们发现:选用氯甲基聚苯乙烯树脂作为微珠固体基质的微珠,其抗体包被效率是传统聚苯乙烯树脂的1.64倍。因此,本申请选用氯甲基聚苯乙烯树脂作为微珠材料。这一方法优于既往制备技术。

[0034] 本申请研制了同步检测血浆Ang-(1-7)等48种左室重构相关蛋白因子的微珠芯片集成检测系统,本公开通过利用Pearson和Spearman两种相关性检验方法分析基线血浆中Ang-(1-7)等48种蛋白因子水平与 Δ EDV、 Δ LVEF和 $\Delta E'/A'$ 的相关性,利用多元逐步回归分析方法确定回归方程和 Δ EDV、 Δ LVEF及 $\Delta E'/A'$ 等左室重构和功能指标的独立预警因素。

附图说明

[0035] 构成本公开一部分的说明书附图用来提供对本公开的进一步理解,本公开的示意性实施例及其说明用于解释本公开,并不构成对本公开的不当限定。

[0036] 图1:微珠悬浮芯片制备工艺流程。

[0037] 图2: Δ EDV与Ang-(1-7)水平关系。

[0038] 图3: Δ EDV与TNF- α 水平关系。

[0039] 图4: Δ LVEF与肾素水平关系。

[0040] 图5: Δ LVEF与Log-CTNI水平关系。

[0041] 图6: $\Delta E'/A'$ 与Ang-II水平关系。

[0042] 图7: $\Delta E'/A'$ 与Log-NT-proBNP水平关系。

具体实施方式

[0043] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本公开提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0044] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本公开的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式

也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作和/或它们的组合。

[0045] 术语解释:

[0046] 预后是指预测疾病的可能病程和结局。

[0047] 左室重构是指急性心肌梗塞后整个左心室形态和大小的改变。

[0048] 正如背景技术所介绍的,目前尚缺乏同时集成检测批量蛋白因子的微珠悬浮芯片,亦无采用多种相关蛋白因子对急性心肌梗死后左室重构进行早期预警的报道,为了解决如上的技术问题,在本公开的第一个典型的实施方式中,提供了一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠芯片,该微珠芯片包括微珠固体基质,即氯甲基化聚苯乙烯,所述微珠固体基质通过酰胺键偶联心肌梗死预后预警相关的蛋白因子抗体。抗体氨基酸侧链的氨基与羧基化微球形成酰胺键偶联。

[0049] 其中,所述心肌梗死预后预警相关的蛋白因子为血管紧张素(1-7)(Ang-(1-7))、肾素、Ang-II、缓激肽(bradykinin,BK)、醛固酮、皮质醇、儿茶酚抑制素(catestatin,CST)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB,CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin-I,CTNI)、N末端B型利钠肽原(N-terminal pro-brain natriuretic peptide,NT-proBNP)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)、内皮素1(endothelin-1,ET-1)、护骨素(osteoprotegerin,OPG)、骨膜蛋白(periostin,PN)、多配体蛋白聚糖-1(syndecan-1,SDC-1)、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase-1,MMP-1)、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1,TIMP-1)、TIMP-2、TIMP-4、和肽素、血管性血友病因子(Von Willebrand factor,VWF)、组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator,t-PA)、纤维胶凝蛋白2(ficolin-2,FCN2)、甘露糖凝集素(mannose-binding lectin,MBL)、甘露糖凝集素/纤维胶凝蛋白相关蛋白1(MBL/Ficolin-associated Protein-1,MAP-1)、C反应蛋白(C-reactive protein,CRP)、白介素-1 β (Interleukin-1 β ,IL-1 β)、IL-6、IL-21、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha,TNF- α)、可溶性肿瘤坏死因子1型受体(soluble tumor necrosis factor receptor 1,sTNFR1)和2型受体(sTNFR2)、巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)、CC趋化因子配体4(chemokine C-C motif ligand 4,CCL4)、CXC趋化因子配体8(CXC chemokine ligand 8,CXCL8)、CXCL10、CXCL16、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MP0)、脂联素、氧化低密度脂蛋白(oxidized LDL,OX-LDL)、颗粒酶B、肌腱蛋白C(Tenascin-C,Tn-C)或I型胶原羧基末端肽(carboxy-terminal telopeptide of collagen type I,ICTP)。本公开中相应的抗体来源于英国Abcam和美国Cell Signaling Technology公司。

[0050] 本公开首先选用的是传统的具有色标编码的聚苯乙烯树脂微珠进行试验,虽然其待测样品可以采用Bio-Plex微珠芯片系统进行快速检测,但是发明人进一步研究发现,其抗体包被效率较低。故在本公开的一个或一些具体的实施方式中,基于上述蛋白因子,所述微珠固体基质的材料为氯甲基聚苯乙烯树脂,微珠粒径为3~8 μ m,CAS:55844-94-5,其抗体包被效率是传统具有色标编码的聚苯乙烯树脂的1.64倍。因此,本公开选用氯甲基聚苯乙烯树脂作为微珠材料。这一方法的抗体包被效率优于既往制备技术,检测蛋白因子浓度时

采用荧光光谱仪即可。

[0051] 在本公开的第二个典型实施方式中,提供一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠悬浮芯片产品,其特点是:该产品每100 μ L含 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个微珠,所述微珠包括上述微珠悬浮芯片和未被偶联的活化后的微珠固体基质,其中,所述微珠芯片所占比例为70~80%。

[0052] 进一步的,该产品每100 μ L含 1.25×10^6 个微珠。

[0053] 在本公开的第三个典型实施方式中,提供上述微珠悬浮芯片产品的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0054] (1) 活化微珠:

[0055] 采用微珠洗涤液洗涤,分离,然后加入微珠活化缓冲液,震荡后超声,使微珠完全悬浮;

[0056] 向悬浮的微珠中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羧基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)进行反应,然后加入PBS缓冲液,震荡后超声,得到羧基化微珠溶液;

[0057] (2) 偶联抗体:

[0058] 向羧基化微珠溶液中加入与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子抗体,避光震荡孵育;孵育结束后,洗涤,分离,加入封闭液封闭微珠抗体;再进行洗涤,加入储存液重悬微珠,即制备得到微珠悬浮芯片产品。

[0059] 通过以上制备方法,可保证高的抗体包被效率,更利于蛋白因子的准确检测。

[0060] 在本公开的第四个典型的实施方式中,提供一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的试剂盒,该试剂盒包括所述微珠悬浮芯片产品,还包括:不同浓度的抗原标准品、微珠固体基质、PBS缓冲液、微珠活化缓冲液、微珠洗涤液和封闭液等。

[0061] 在本公开的第五个典型的实施方式中,提供一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的方法,该方法包括使用所述微珠悬浮芯片或微珠悬浮芯片产品或试剂盒进行检测的步骤。

[0062] 进一步的,采用双抗体夹心法进行检测。

[0063] 在本公开的一个或一些实施方式中,所述检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的方法的具体包括以下步骤:

[0064] 将所述微珠悬浮芯片产品加入至96孔抽滤板,真空抽干;加入微珠洗涤液,洗涤后真空抽干;分别加入待测血浆样本、不同浓度的抗原标准品,贴上封板膜;室温避光条件下孵育,真空抽滤;加入微珠洗涤液,洗涤后真空抽干;加入生物素标记二抗(例如生物素标记山羊抗小鼠、生物素标记山羊抗兔等),室温避光条件下孵育,真空抽滤;加入微珠洗涤液,洗涤后真空抽干;加入链亲和素-藻红蛋白;室温避光条件下孵育,真空抽干;加入微珠洗涤液,洗涤后真空抽干;加入封闭液重悬微珠,利用荧光光谱仪检测其荧光强度(波长565nm),得到不同抗原浓度的标准品的荧光强度变化曲线,制作线性关系曲线以及得到待测血浆样本的荧光强度,然后根据所述线性关系曲线得到待测血浆样本中蛋白因子的含量。

[0065] 在本公开的第六个典型的实施方式中,提供一种心肌梗死预后风险指数检测装置,该检测装置至少包括:

[0066] 蛋白因子检测系统,该系统至少能够检测血浆中以下三组中至少一组的数值:

Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值,肾素活性值和CTNI的含量值,Ang-II和NT-proBNP的含量值;

[0067] 预后数据处理器,用于接收以下三组中至少一组的数值:Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值,肾素活性值和CTNI的含量值,Ang-II和NT-proBNP的含量值;进而至少计算 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 值其中的一个数值,其中, Δ EDV=137-0.412 \times Ang-(1-7)+0.334 \times TNF- α , Δ LVEF=85-0.358 \times 肾素活性-0.315 \times Log-CTNI, $\Delta E'/A'$ =32-0.415 \times Ang-II-0.304 \times Log-NT-proBNP;

[0068] 其中, Δ EDV代表左室舒张末期容积改变值; Δ LVEF代表左室射血分数改变值; $\Delta E'/A'$ 代表二尖瓣瓣环舒张早期峰值速度(E')与舒张晚期峰值速度(A')比值的变化值;Ang-(1-7)、肾素活性、Ang-II、CTNI、TNF- α 和NT-proBNP分别代表血浆样本中的相应的蛋白因子的含量或活性数值。

[0069] 在本公开的一个或一些具体的实施方式中,所述蛋白因子检测系统包括所述微珠悬浮芯片或微珠悬浮芯片产品或试剂盒。

[0070] 进一步的,所述检测装置还包括预后结果显示器,用于显示 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 数值。

[0071] 在本公开的第七个典型的实施方式中,提供一种心肌梗死预后的预警模型的建立方法,该建立方法包括:

[0072] (1)分别获取若干心肌梗死患者治疗前的以下至少三组中的至少一组数值:样本中Ang-(1-7)和TNF- α 的含量值、样本中肾素活性值和CTNI的含量值、样本中Ang-II和NT-proBNP的含量值;

[0073] 分别获取若干患者治疗前后的LVEDV、LVEF和/或 E'/A' ,计算其 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$;

[0074] (2)采用SPSS软件进行数据处理:

[0075] 检测结果用平均值 \pm 标准误或中位数[四分位数间距]表示,如果服从正态分布,采用方差分析进行组间比较,如果组间差异有统计学意义,进一步采用Bonferroni法进行两两比较;如果不服从正态分布,组间比较采用Kruskal-Wallis秩和检验,如果组间差异有统计学意义,进一步采用Dwass-Steel-Critchlow-Fligner法进行多重比较;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义;

[0076] (3)根据正态性检验的结果选择Pearson或Spearman相关性检验方法分析血浆中各蛋白因子水平与 Δ EDV、 Δ LVEF和 $\Delta E'/A'$ 的相关性;如果样本符合正态分布,选择Pearson相关分析;如果样本不符合正态分布,选择Spearman秩相关分析;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义;

[0077] (4)利用多元逐步回归分析方法确定 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$ 左室重构和功能指标的回归方程,确定 Δ EDV、 Δ LVEF和/或 $\Delta E'/A'$ 的独立预警因素,建立预警模型;双侧 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

[0078] 通过以上建立方法,得到心肌重构预警模型如下:

[0079] Δ EDV=137-0.412 \times Ang-(1-7)+0.334 \times TNF- α ;

[0080] 左室收缩功能变化预警模型如下:

[0081] Δ LVEF=85-0.358 \times 肾素活性-0.315 \times Log-CTNI;

[0082] 其中肾素活性单位ng \times mL/hr,CTNI单位为ng/mL。

[0083] 左室舒张功能变化预警模型如下：

[0084] $\Delta E'/A' = 32 - 0.415 \times \text{Ang-II} - 0.304 \times \text{Log-NT-proBNP}$;

[0085] 其中Ang-II单位pg/mL,NT-proBNP单位为pg/mL。

[0086] ΔEDV 代表左室舒张末期容积改变值; ΔLVEF 代表左室射血分数改变值; $\Delta E'/A'$ 代表二尖瓣瓣环舒张早期峰值速度(E')与舒张晚期峰值速度(A')比值的改变值。

[0087] ΔEDV 是反映左室重构的最重要指标,数值越大代表左室重构程度越重,负值代表左室重构逆转; ΔLVEF 反映左室收缩功能的变化,数值越大代表左室收缩功能越好,负值代表左室收缩功能下降,正值代表左室收缩功能好转; $\Delta E'/A'$ 反映左室舒张功能的变化,数值越大代表左室舒张功能越好,负值代表左室舒张功能下降,正值代表左室舒张功能好转。

[0088] 步骤(1)中,还包括检测其他蛋白因子的含量值,比如上述列举到的、醛固酮、皮质醇、儿茶酚抑制素(catestatin,CST)等等。

[0089] 本公开是在患者刚发生心肌梗死时,通过血液指标检测以预测将来的心肌重构程度和心功能。心肌梗死左室重构预后可采用其中的指标之一,但为更加全面的进行预警,可将三种指标 ΔEDV 、 ΔLVEF 和 $\Delta E'/A'$ 结合起来进行评估风险。

[0090] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本公开的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本公开的技术方案。

[0091] 本公开采用的试剂如下：

[0092] 配制PBS缓冲液:NaCl 8g,KCl 0.2g,KH₂PO₄ 0.2g,Na₂HPO₄ • 12H₂O 2.88g,加三蒸水至1000mL.pH值7.4,常规高压灭菌,4℃保存。

[0093] 配制微珠活化缓冲液:称取NaH₂PO₄ 3g,双蒸水200mL,充分搅拌溶解;利用5mol/L的NaOH调节pH值至6,定容至250mL。常规高压灭菌,4℃保存。

[0094] 配制微珠洗涤液:Na₂HPO₄ 1.44g,NaCl 8.073g,KH₂PO₄ 0.24g,KCl 0.2015g,吐温20 0.5mL,加三蒸水至1000mL.pH值7.4,0.22um滤膜过滤除菌,4℃保存。

[0095] 配制封闭液:Na₂HPO₄ 1.44g,NaCl 8.073g,KH₂PO₄ 0.24g,KCl 0.2015g,BSA 10g,Thimerosal 200mg,加三蒸水至1000mL.pH值7.4,0.22um滤膜过滤除菌,4℃保存。

[0096] 配制储存液:Na₂HPO₄ 1.44g,NaCl 8.073g,KH₂PO₄ 0.24g,KCl 0.2015g,BSA 1g,Thimerosal 200mg,吐温20 0.5mL,加三蒸水至1000mL.pH值7.4,0.22um滤膜过滤除菌,4℃保存。

[0097] 配制EDC溶液:1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)购于德国Merck公司,50mg EDC加入1mL三蒸水中,混匀后即刻使用,浓度50mg/mL。

[0098] 配制Sulfo-NHS溶液:N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)购于德国Merck公司,50mg Sulfo-NHS加入1mL三蒸水中,混匀后即刻使用,浓度50mg/mL。

[0099] 实施例1

[0100] 一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠芯片,该微珠芯片包括微珠固体基质,所述微珠固体基质通过酰胺键偶联着心肌梗死预后预警相关的蛋白因子抗体。

[0101] 抗体氨基酸侧链的氨基与羧基化微球形成酰胺键偶联。

[0102] 所述微珠固体基质的材料为氯甲基聚苯乙烯树脂,其抗体包被效率是传统聚苯乙烯树脂的1.64倍。因此,本公开选用氯甲基聚苯乙烯树脂作为微珠材料。这一方法优于既往

制备技术。

[0103] 所述心肌梗死预后预警相关的蛋白因子为血管紧张素(1-7) (Ang-(1-7))、肾素、Ang-II、缓激肽(bradykinin,BK)、醛固酮、皮质醇、儿茶酚抑制素(catestatin,CST)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB,CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin-I,CTNI)、N末端B型利钠肽原(N-terminal pro-brain natriuretic peptide,NT-proBNP)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)、内皮素1(endothelin-1,ET-1)、护骨素(osteoprotegerin,OPG)、骨膜蛋白(periostin,PN)、多配体蛋白聚糖-1(syndecan-1,SDC-1)、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase-1,MMP-1)、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1,TIMP-1)、TIMP-2、TIMP-4、和肽素、血管性血友病因子(Von Willebrand factor,VWF)、组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator,t-PA)、纤维胶凝蛋白2(ficolin-2,FCN2)、甘露糖凝集素(mannose-binding lectin,MBL)、甘露糖凝集素/纤维胶凝蛋白相关蛋白1(MBL/Ficolin-associated Protein-1,MAP-1)、C反应蛋白(C-reactive protein,CRP)、白介素-1 β (Interleukin-1 β ,IL-1 β)、IL-6、IL-21、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha,TNF- α)、可溶性肿瘤坏死因子1型受体(soluble tumor necrosis factor receptor 1,sTNFR1)、2型受体(sTNFR2)、巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)、CC趋化因子配体4(chemokine C-C motif ligand 4,CCL4)、CXC趋化因子配体8(CXC chemokine ligand 8,CXCL8)、CXCL10、CXCL16、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、脂联素、氧化低密度脂蛋白(oxidized LDL,OX-LDL)、颗粒酶B、肌腱蛋白C(Tenascin-C,Tn-C)或I型胶原羧基末端肽(carboxy-terminal telopeptide of collagen type I,ICTP)。

[0104] 实施例2

[0105] 一种能够检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的微珠悬浮芯片产品,其特点是:该产品每100 μ L含 1.25×10^6 个微珠,所述微珠包括实施例1所述的微珠悬浮芯片和未被偶联的活化后的微珠固体基质,前者约占75%。

[0106] 该微珠悬浮芯片产品的制备方法,包括以下步骤:

[0107] (1) 活化微珠:

[0108] 先将微珠置于水中在振荡器上震荡1分钟(2000转/分钟),水浴超声10秒/次,3次。将4mL微珠溶液加入到避光EP管中,共48份。20000转/分钟离心5分钟,弃掉上清液。分别加入4mL微珠洗涤液,2000转/分钟振荡1分钟,水浴超声10秒/次,3次。20000转/分钟离心5分钟,弃掉上清液。分别加入4mL微珠活化缓冲液,2000转/分钟振荡1分钟,水浴超声10秒/次,3次,使微珠完全悬浮。

[0109] 各EP管分别加入临时配制的50mg/mL EDC和50mg/mL Sulfo-NHS各500 μ L,室温下2000转/分钟共30分钟。加入4mL PBS缓冲液,2000转/分钟振荡1分钟,水浴超声10秒/次,3次。20000转/分钟离心5分钟,弃掉上清液。重复加入4mL PBS缓冲液,2000转/分钟振荡1分钟,水浴超声10秒/次,3次。

[0110] (2) 偶联抗体:

[0111] 羧基化微珠溶液中分别加入48种蛋白因子的抗体40 μ L,PBS缓冲液稀释至25mL,4

℃避光振荡孵育过夜。20000转/分钟离心5分钟,弃上清液。加入25mL PBS缓冲液振荡洗涤5分钟/次,3次。重复20000转/分钟离心5分钟,弃上清液。加入25mL封闭液,1000转/分钟封闭微珠抗体,室温避光条件振荡2小时。20000转/分钟离心5分钟,弃上清液。加入25mL储存液振荡洗涤5分钟/次,3次。20000转/分钟离心5分钟,弃上清液。加入6mL储存液,1000转/分钟15秒重悬微珠,即得到微珠悬浮芯片产品。4℃避光保存。

[0112] 计数方法:

[0113] 吸取适量微珠,稀释后,用计数板(0.1mm,1/400mm²)在普通显微镜下计数。微珠数目=每个大格数×10⁴×稀释倍数×体积(mL)。

[0114] 抗体包被效率检测:

[0115] 将包被抗体的微珠以1000转/分钟重悬30秒,将生物素标记的羊抗鼠IgG(购自CST公司)用PBS缓冲液稀释至浓度2ug/mL。分装至48个EP管,每管50uL。1个EP管中加入50uL的PBS缓冲液作为空白对照。每个EP管中分别加入1 uL微珠重悬液。室温避光条件下1000转/分钟孵育30分钟,20000转/分钟离心5分钟,弃上清液。适量微珠洗涤液振荡洗涤5分钟/次,3次,20000转/分钟离心5分钟,弃上清液。

[0116] 每个EP管内分别加入浓度为2ug/mL的链亲和素-藻红蛋白50uL。室温避光条件下1000转/分钟孵育30分钟,20000转/分钟离心5分钟,弃上清液。加入100uL微珠洗涤液重悬微珠,1000转/分钟15秒重悬微珠,利用荧光光谱仪检测其荧光强度。成功偶联的微珠荧光强度应高于2000MFI,阴性对照的荧光强度应低于100MFI,若包被微珠荧光强度小于2000MFI,则说明包被不成功。经过微珠材料优选和检测,我们发现:选用氯甲基聚苯乙烯树脂作为微珠固体基质的微珠,其抗体包被效率是传统聚苯乙烯树脂的1.64倍。因此,本申请选用氯甲基聚苯乙烯树脂作为微珠材料。

[0117] 实施例3

[0118] 一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的试剂盒,该试剂盒包括实施例2所述微珠悬浮芯片产品,还包括:不同浓度的抗原标准品、微珠固体基质、PBS缓冲液、微珠活化缓冲液、微珠洗涤液和封闭液等。

[0119] 实施例4

[0120] 一种检测与心肌梗死预后预警相关的蛋白因子的方法,该方法包括:

[0121] 将实施例2中的微珠悬浮芯片产品加入至96孔抽滤板,每孔50μL,真空抽干。加入200μL微珠洗涤液,5分钟/次,共3次,洗涤后真空抽干。分别加入100μL待测血浆样本(用微珠洗涤液按1:5000稀释)、100μL不同浓度的抗原标准品,贴上封板膜。室温避光条件下按1000转/分钟孵育30分钟,真空抽滤。加入200μL微珠洗涤液,5分钟/次,共3次,洗涤后真空抽干。加入生物素标记的羊抗鼠IgG200μL,室温避光条件下按1000转/分钟孵育30分钟,真空抽滤。加入200μL微珠洗涤液,5分钟/次,共3次,洗涤后真空抽干。加入浓度为2ug/mL的链亲和素-藻红蛋白50uL。室温避光条件下1000转/分钟孵育30分钟,真空抽干。加入200μL微珠洗涤液,5分钟/次,共3次,洗涤后真空抽干。加入100uL封闭液重悬微珠,1000转/分钟15秒重悬微珠,利用荧光光谱仪检测其荧光强度(波长565nm),得到不同抗原浓度的标准品的荧光强度变化曲线,制作线性关系曲线以及得到待测血浆样本的荧光强度,然后根据所述线性关系曲线得到待测血浆样本中48种蛋白因子的含量。

[0122] 经实验分析,得到的结果与ELISA法测定值相比,无显著性差异,准确性较高。

[0123] 实施例5

[0124] 一种心肌梗死预后风险指数检测装置,该检测装置至少包括:

[0125] 蛋白因子检测系统,该检测系统采用实施例3中的试剂盒,试剂盒能够检测血浆中Ang-(1-7)、肾素、Ang-II、CTNI、TNF- α 和NT-proBNP的含量;

[0126] 预后数据处理器,用于接收Ang-(1-7)、肾素、Ang-II、CTNI、TNF- α 和NT-proBNP的含量值;进而计算 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 值,其中, Δ EDV=137-0.412 \times Ang-(1-7)+0.334 \times TNF- α , Δ LVEF=85-0.358 \times 肾素活性-0.315 \times Log-CTNI, $\Delta E'/A'=32-0.415\times$ Ang-II-0.304 \times Log-NT-proBNP;

[0127] 所述检测装置还包括预后结果显示器,用于显示 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 数值。

[0128] 实施例6一种心肌梗死预后的预警模型的建立方法,该建立方法包括:

[0129] 1受试者

[0130] 连续接诊的急性ST段抬高型心肌梗死(ST-segment elevation myocardial infarction,STEMI)发生12小时内成功接受经皮冠状动脉介入治疗(PCI治疗)的患者300例。样本量要求至少是参与分析变量个数的5倍,考虑到允许不大于20%的失访率,将样本量定为300例。

[0131] 1.1入选标准

[0132] ①STEMI发生12小时内接受PCI治疗(药物涂层支架)的患者,前降支为罪犯血管。STEMI定义:2个或2个以上胸前导联ST段抬高 ≥ 2 mm,伴随典型胸痛或心梗三项(CTnI、CK-MB和Myo)的升高;

[0133] ②年龄 ≥ 18 岁;

[0134] ③患者或授权亲属签署知情同意书。

[0135] 1.2排除标准

[0136] ①患有非缺血性心肌病;

[0137] ②计划6个月内接受心脏外科手术治疗;

[0138] ③STEMI机械性并发症(室间隔穿孔、游离壁破裂及急性重度二尖瓣返流);

[0139] ④肾脏衰竭或肝脏衰竭;

[0140] ⑤恶性肿瘤、HIV感染或中枢神经系统紊乱;

[0141] ⑥心肺复苏超过15分钟且意识丧失;

[0142] ⑦心源性休克;

[0143] ⑧正在参与其他涉及干预药物或器械的研究项目;

[0144] ⑨未签署知情同意书;

[0145] ⑩有心肌梗死病史。

[0146] 2体格检查和标本检测

[0147] 由临床专业研究人员测量患者身高、体重和血压。坐位休息15分钟后测量7次血压,取最后3次的平均值。

[0148] PCI治疗前于导管室内采集动脉血,置于蛋白酶抑制剂预处理过的肝素抗凝管中,立即高速离心分离血浆(4 $^{\circ}$ C,4000转/分钟,15分钟),液氮罐内保存,利用前述微珠芯片集成检测系统测定Ang-(1-7)等48种左室重构相关蛋白因子的血浆水平。

[0149] 3评价指标

[0150] 随访6个月,利用飞利浦SONOS IE33型实时三维超声心动图仪测定STEMI发生12小时内和PCI治疗后第6个月末时的LVEDV、LVEF和 E'/A' 。计算 ΔEDV 、 $\Delta LVEF$ 和 $\Delta E'/A'$ 。

[0151] 受试者或授权委托人签署知情同意书,取左侧卧位,取左室胸骨旁长轴、心尖四腔心、心尖两腔心、心尖长轴及左室心尖水平、乳头肌水平、二尖瓣水平短轴切面动态图像。同时应用脉冲波多普勒获取舒张期二尖瓣口血流频谱,应用组织多普勒获取二尖瓣环运动频谱。

[0152] 应用左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)评价左室收缩功能: $LVEF(\%) = [左室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV) - 左室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)] / LVEDV \times 100$;收缩功能正常定义为 $EF \geq 50\%$ 。为评价左室舒张功能,于心尖四腔心切面利用脉冲波多普勒技术测量二尖瓣舒张早期血流速度(E)、舒张晚期血流速度(A)及其比值;于心尖四腔心切面行组织多普勒检查并测量二尖瓣瓣环舒张早期峰值速度(E')、舒张晚期峰值速度(A')及其比值。连续测量3个心动周期,取其平均值。超声操作人员对本申请研究内容不知情。

[0153] 4统计学分析

[0154] 利用SPSS v19软件进行统计学处理。

[0155] (1) 利用Pearson和Spearman两种相关性检验方法分析基线血浆中Ang-(1-7)等48种蛋白因子水平与 ΔEDV 、 $\Delta LVEF$ 和 $\Delta E'/A'$ 的相关性。

[0156] (2) 利用多元逐步回归分析方法确定回归方程和 ΔEDV 、 $\Delta LVEF$ 及 $\Delta E'/A'$ 等左室重构和功能指标的独立预警因素,建立预警模型。

[0157] 5预测模型的构建

[0158] 入选受试者300例,男性186例,女性114例。患者年龄 61.4 ± 5.6 岁,胸痛持续时间 45.0 ± 8.9 分钟,发病到再灌注时间 138.9 ± 6.5 分钟。

[0159] 将上述所有因子纳入逐步回归分析,构建预警模型,预测左室重构和心功能参数。

[0160] 利用微珠悬浮芯片构建了针对急性心肌梗死患者左室重构的预警模型,结果提示:Ang-(1-7)、肾素、Ang-II、CTNI、TNF- α 和NT-proBNP是左室重构的独立预测因子,可用于预测远期预后。任意2个因子间均无显著相关性。

[0161] Pearson相关分析结果表明: ΔEDV 与Ang-(1-7)水平呈负相关(图2);Spearman秩相关分析结果表明: ΔEDV 与TNF- α 水平呈正相关(图3)。Pearson相关分析结果表明: $\Delta LVEF$ 与肾素和Log-CTNI水平呈负相关(图4和图5)。Pearson相关分析结果表明: $\Delta E'/A'$ 与Ang-II和Log-NT-proBNP水平呈负相关(图6和图7)。

[0162] 心肌重构预警模型如下:

[0163] $\Delta EDV = 137 - 0.412 \times \text{Ang}-(1-7) + 0.334 \times \text{TNF}-\alpha$;

[0164] 其中 ΔEDV 单位mL,Ang-(1-7)和TNF- α 单位均为pg/mL。

[0165] 左室收缩功能变化预警模型如下:

[0166] $\Delta LVEF = 85 - 0.358 \times \text{肾素活性} - 0.315 \times \text{Log-CTNI}$;

[0167] 其中肾素活性单位ng \times mL/hr,CTNI单位为ng/mL。

[0168] 左室舒张功能变化预警模型如下:

[0169] $\Delta E'/A' = 32 - 0.415 \times \text{Ang-II} - 0.304 \times \text{Log-NT-proBNP}$;

[0170] 其中Ang-II单位pg/mL,NT-proBNP单位为pg/mL。

[0171] 其中, Δ EDV代表左室舒张末期容积改变值; Δ LVEF代表左室射血分数改变值; $\Delta E'/A'$ 代表二尖瓣瓣环舒张早期峰值速度(E')与舒张晚期峰值速度(A')比值的变化值。

[0172] Δ EDV是反映左室重构的最重要指标,数值越大代表左室重构程度越重,负值代表左室重构逆转; Δ LVEF反映左室收缩功能的变化,数值越大代表左室收缩功能越好,负值代表左室收缩功能下降,正值代表左室收缩功能好转; $\Delta E'/A'$ 反映左室舒张功能的变化,数值越大代表左室舒张功能越好,负值代表左室舒张功能下降,正值代表左室舒张功能好转。

[0173] 表1入选患者的基线临床特征

[0174]	年龄, 岁	61.4±5.6
	男性, 例 (%)	186 (62.0)
[0175]	胸痛持续时间, 分钟	45.0±8.9
	发病到再灌注时间, 分钟	138.9±6.5
	BMI, kg/m ²	24.8±1.4
	SBP, mmHg	116.4±3.9
	心率, 次/分钟	78.3±4.4
	LVEDV, mL	131.4±7.2
	LVEF, %	56.3±2.1
	E/A	1.14±0.12
	E/Ea	16.3±0.5
	NT-proBNP, pg/mL	1232.7[747.0–1839.3]

[0176] 结果用病例个数(%）、平均数+标准误或中位数[四分位数间距]来表示。

[0177] BMI:体重指数;SBP:收缩压;E/A:舒张早期二尖瓣血流速度与舒张晚期二尖瓣血流速度比值;E/Ea:舒张早期二尖瓣血流速度与舒张早期二尖瓣环运动速度的比值;LVEDV:左室舒张末期容积;LVEF:左室射血分数;NT-proBNP:N-末端前脑钠肽。

[0178] 表2利用逐步线性回归模型预测左室重构和心功能指标

[0179]

	Δ EDV		Δ LVEF		$\Delta E'/A'$	
	Ang-(1-7)	TNF- α	肾素	Log-CTNI	Ang-II	Log-NT-proBNP
β	-0.412	0.334	-0.358	-0.315	-0.415	-0.304
p-Value	0.005	0.001	0.003	<0.001	0.004	<0.001
R ²	0.352		0.317		0.336	

[0180] 实施例8预警系统的方法学检验和推广应用

[0181] 应用研制的实施例5中的预后风险指数检测装置对心肌梗死的受试者进行左室重

构危险度预测,将所有受试者分为高危组和低危组,进行临床随访,目前最长已随访3年,检验预警系统的预测准确性。在医疗机构试用,为进一步大规模推广应用做准备。

[0182] 将300例患者根据预警模型所预测 Δ EDV中位数分为两组(高危组和低危组,各150例),随访至今,比较 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 、心因死亡和急性心力衰竭发生率。结果证实,两组人群 Δ EDV、 Δ LVEF、 $\Delta E'/A'$ 、心因死亡和急性心力衰竭发生率均有显著性差异,表明预警模型具有较高可靠性和准确性(表3)。

[0183] 表3根据预警模型分组后两组患者的随访结果

[0184]	高危组 (150 例)	低危组 (150 例)
随访时间, 月	13.5±1.5	14.6±1.0
Δ EDV, mL	148.1±3.52	96.5±6.4 [§]
Δ LVEF, %	-17.3±2.9	-8.3±0.7 [§]
[0185]		
$\Delta E'/A'$	-0.42±0.02	-0.23±0.02 [§]
心因死亡, 例 (%)	14 (9.3)	3 (2.0) [§]
急性心力衰竭, 例 (%)	33 (22.0)	8 (5.3) [§]

[0186] 结果用病例个数(%)或平均数+标准误来表示。

[0187] [§]p<0.05。

[0188] 上述实施例为本公开较佳的实施方式,但本公开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公开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,都包含在本公开的保护范围之内。

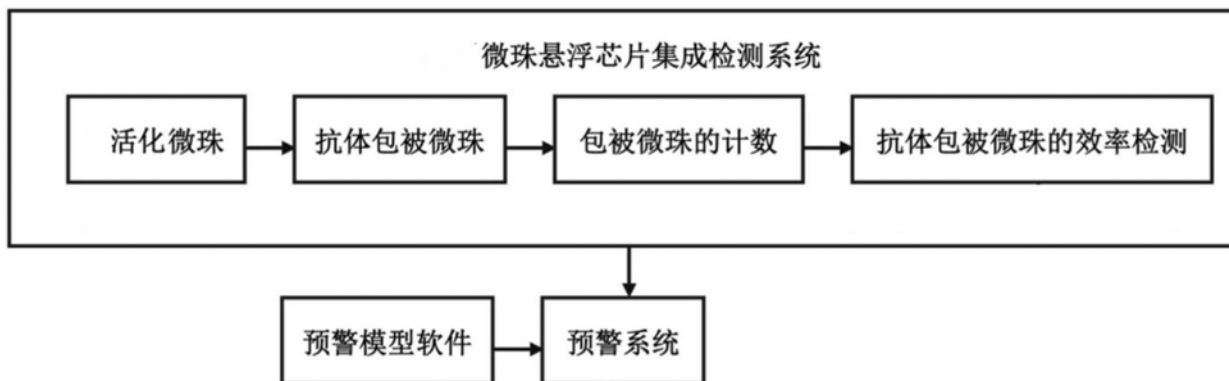


图1

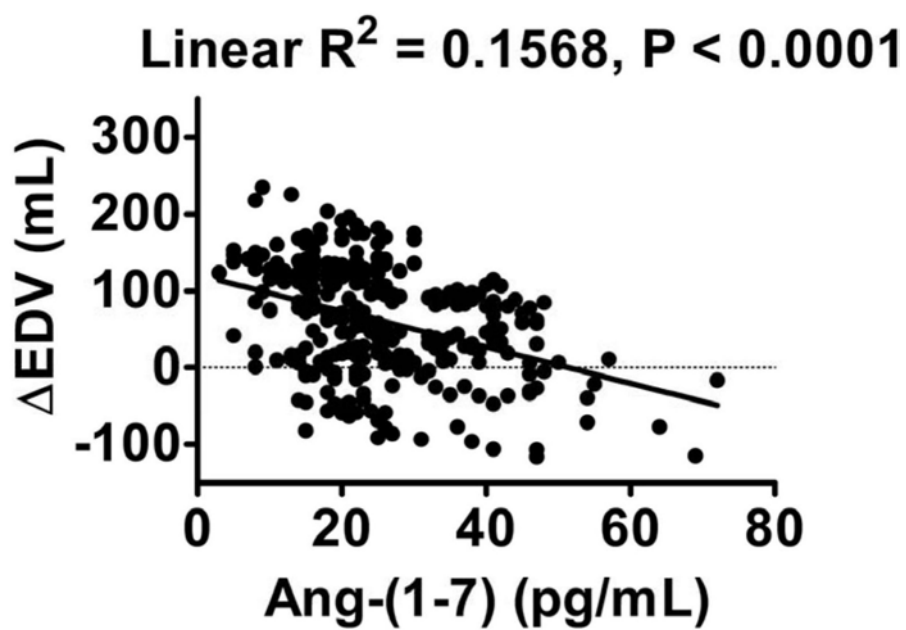


图2

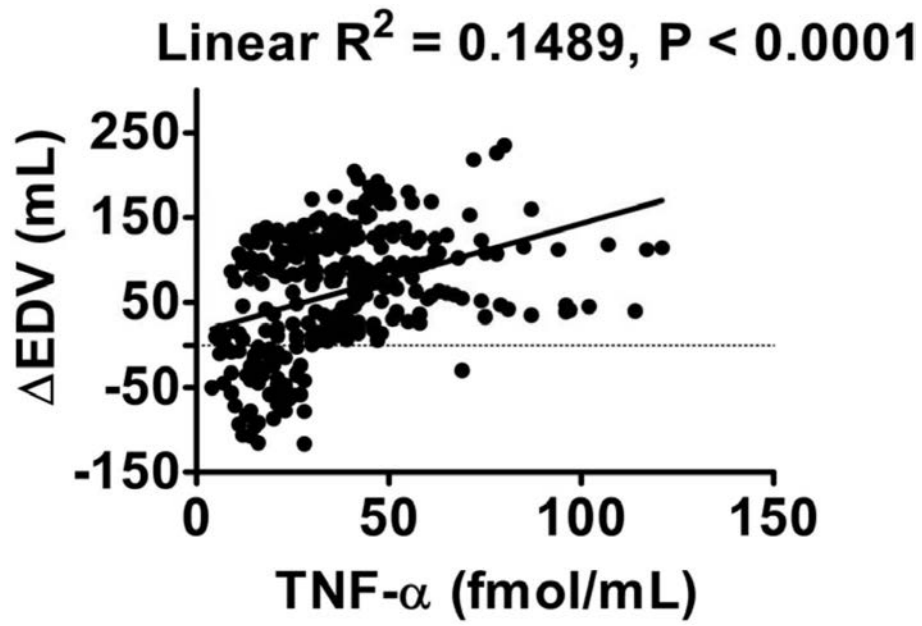


图3

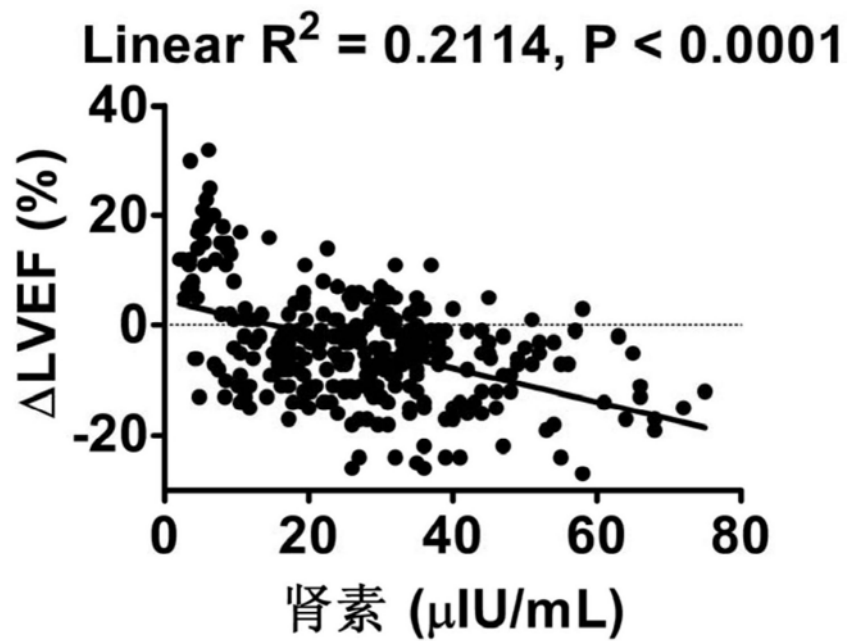


图4

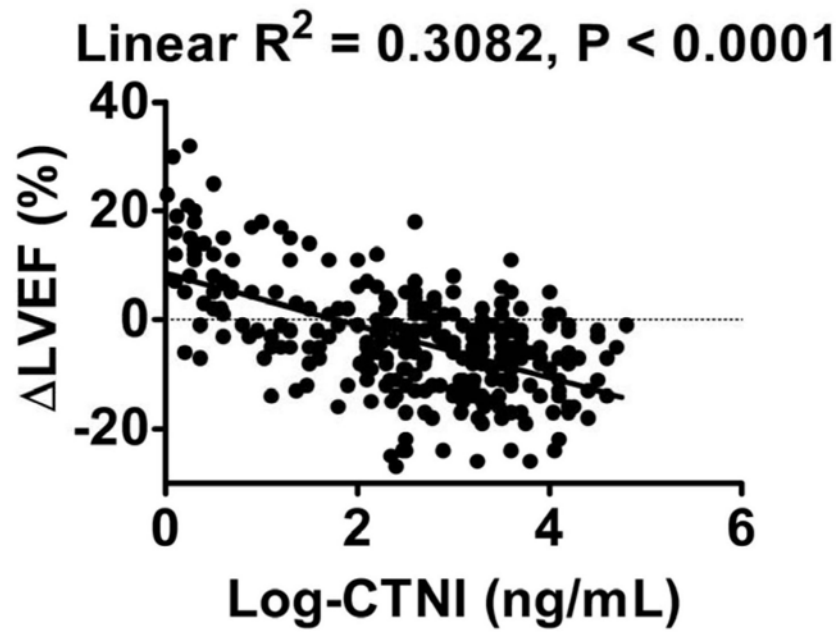


图5

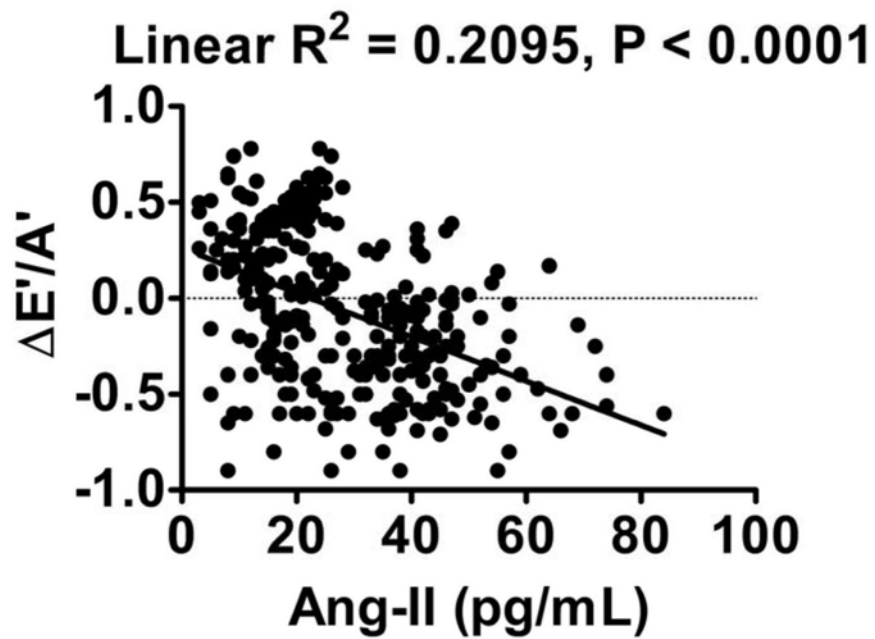


图6

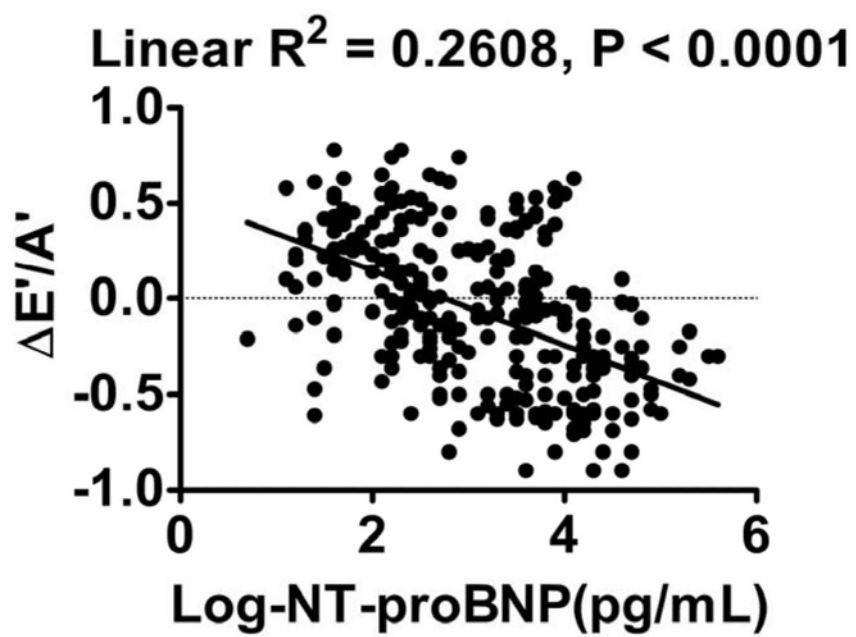


图7

专利名称(译)	一种心肌梗死预后风险指数检测装置及心肌梗死预后预警模型的建立方法		
公开(公告)号	CN109374901A	公开(公告)日	2019-02-22
申请号	CN201811161440.X	申请日	2018-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
[标]发明人	郝盼盼 刘燕萍 李贵双		
发明人	郝盼盼 刘燕萍 李贵双		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/582 G01N2800/324		
代理人(译)	董洁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开涉及一种心肌梗死预后风险指数检测装置及心肌梗死预后预警模型的建立方法。本公开通过利用Pearson和Spearman两种相关性检验方法分析基线血浆中Ang-(1-7)等48种蛋白因子水平与 Δ EDV、 Δ LVEF和 $\Delta E_{A\&\#39;}$ 的相关性，利用多元逐步回归分析方法确定回归方程和 Δ EDV、 Δ LVEF及 $\Delta E_{A\&\#39;}$ 等左室重构和功能指标的独立预警因素。

