



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107918014 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201711169089.4

(22)申请日 2017.11.22

(71)申请人 南宁科城汇信息科技有限公司

地址 530022 广西壮族自治区南宁市青秀区园湖南路7号1栋3单元371号房

(72)发明人 于思创 王海云

(74)专利代理机构 南宁指北针知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 45120

代理人 于勤 林培

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种骨关节炎标志物确认

(57)摘要

本发明公开了一种骨关节炎标志物确认,①患者样本采集②采用ELISA方法检测200例OA患者血清中的候选标志物表达,分析OA标志物与OA病程的关系;③用OA标志物建立OA疾病诊断模型,盲法筛检200例患者血清,判断OA标志物诊断OA的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,提出它们在OA的预防、早期诊断、病程预测等临床应用方面的可行性。通过人群样本进行标志物的确认,评估这些OA候选标志物诊断OA的价值并分析其与临床的相关性,提出它们在OA的预防、早期诊断等临床应用方面的可行性,及其在人群骨关节健康预警中的意义。

1. 一种骨关节炎标志物确认,其特征在於:由以下步骤组成:

①患者样本采集:在知情同意的前提下,采集OA患者血清200例;填写样本登记表,记录样本名称、编号、取样日期、病历资料等;所有操作尽量在冰上进行;血清按50u1/管分装入1.5 mL EP管,-80℃保存备用;

②采用ELISA方法检测200例OA患者血清中的候选标志物表达,分析OA标志物与OA病程的关系;

③用OA标志物建立OA疾病诊断模型,盲法筛检200例患者血清,判断OA标志物诊断OA的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,提出它们在OA的预防、早期诊断、病程预测等临床应用方面的可行性。

## 一种骨关节炎标志物确认

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因转录组学和蛋白质组学领域,尤其是一种骨关节炎标志物确认。

### 背景技术

[0002] 骨关节炎(osteoarthritis,OA)又称退行性骨关节病,是最常见的关节疾患之一,主要表现为关节缓慢发展的疼痛、僵硬、肿大,伴关节功能障碍,甚至发生残疾[1-2]。OA的发病机制是关节受遗传学、生物学和机械力学事件(如遗传、代谢异常、劳损、创伤等)的共同作用,诱发细胞和基质在形态学、生物力学、分子学等方面发生改变,导致关节软骨细胞、细胞外基质及软骨下骨的降解和合成不平衡。其结局为软骨细胞的软化、纤维化、溃疡并丢失,在失去了软骨的保护作用后,软骨下骨发生硬化、象牙化,最终导致骨赘及软骨下骨囊肿的形成。

[0003] OA可累及全身多个关节,其患病率随年龄增长而增长,尤其危害老年人健康,并给社会带来沉重负担。目前65岁以上人群中OA的患病率可达50%以上,而在75岁以上人群中,这一数值可达到80%左右。美国的调查数据显示,OA是导致50岁以上男性丧失工作能力的第2号杀手,仅次于心血管疾病[5]。随着世界及我国社会人口老龄化的加速,OA已越来越成为医患乃至社会关注的焦点话题。

[0004] 目前,对OA的诊断主要依靠临床症状、影像学资料和关节镜检查等,其中,后两者对于明确关节部位组织病理变化情况有很大价值。影像学中X线的改变是评价OA进展的常用方法,但它仍具有一定的局限性,其特异性和敏感性较差。通过病理标本研究发现,即使在X线表现正常时,关节软骨也可能已严重受累;一旦患者出现X线改变,疾病往往已经处于进展期[6-7],关节的正常功能和患者的生活质量已经受到严重的、不可逆的影响。磁共振成像(MRI)对软组织分辨率高,可从任意面成像及多参数、多序列成像,能直接显示软骨的改变情况,有助于OA的早期诊断,但由于价格昂贵,难以用于大范围的疾病评估和普查。此外,关节镜是评价关节软骨受损的最佳手段,被认为是诊断关节软骨受损的金标准,可以直接观察透明软骨的肿胀及破溃情况。但是由于检查的有创性,且不能显示软骨深层和软骨下骨质的改变,其临床应用也受到限制。因此,探究有效、廉价且微创的检查手段来检测亚临床的OA和监测病变的进展,对早期诊断和有效防治OA有着重要的意义。

[0005] 随着分子生物学的发展和研究手段的提高,研究者试图将目光放在可用于临床预测和评估OA的生物学血清标志物方面[8-9]。OA的血清标志物,为关节组织基质的分子物质或片断,它们在组织合成和分解的代谢过程中被释放进入血液,可以通过酶联免疫吸附法(ELISA)或放射免疫法进行测定,适宜在健康体检和人群筛查中应用,对人群的骨关节健康预警有重要意义。目前检测、分析和确定疾病血清标志物主要依赖蛋白组学技术,用蛋白质组学技术来阐明疾病标志物蛋白表达水平的变化与疾病发生发展不同阶段的相互关系及其规律,已成为解决疾病早期诊断难题的最有利的途径[10-11]。而质谱技术是蛋白组学技术的核心,近两年来新发展的iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute

quantification, iTRAQ) 标记结合MALDI-TOF MS/MS技术,为疾病标志物的发现与鉴定提供了定性、定量信息[12],是疾病标志物筛选研究中最新并且最强有力的手段。

[0006] 因此,应用iTRAQ标记结合MALDI-TOF MS/MS技术发现和鉴定OA标志物蛋白,是目前能让我们从数以千计的血清蛋白中筛选到确实存在血清中,又能指示OA的血清标志物的最为理想的方案。然而,由于质谱技术具有高灵敏度和高分辨率的特性,其得到的数据信息往往是海量的,在这些相对海量的差异蛋白中,既含有OA形成所必需的关键性改变,也含有仅仅因疾病基因组的不稳定性而产生的伴随性改变[13]。此外,人类疾病也非常复杂,老年OA患者更可能同时罹患多器官系统的疾病,即使都是仅患OA的病人,因年龄、性别、体质、遗传等各不相同,对血清蛋白的表达谱均有影响。如何将那些影响OA发生发展的关键性分子从非OA特异性,不稳定性以及伴随性改变中识别出来,是当前研究的重要挑战。

[0007] 为解决这些关键问题,本项目首先拟将iTRAQ标记结合MALDI-TOF MS/MS发现和鉴定疾病标志物蛋白的技术应用于骨关节炎STR/ort模型。STR/ort模型是一种自发性OA动物模型[14],其关节软组织的组织学评估表明,STR/ort小鼠的OA发病率和严重程度随年龄逐渐增加,不可逆转的变化出现在最后阶段,而退化过程十分类似人类骨关节炎,是理想的研究OA起病及进展的体内模型[15-19]。此外,STR/ort小鼠模型在品种、品系、性别、年龄、体重、活动性、健康状态、甚至遗传和微生物等方面无差异性,温度、湿度、光照、噪音、饲料等饲养条件也相同,是一种疾病条件一致的模型材料[20-21],适于OA疾病标志物发现阶段的研究,可帮助发现特异性OA候选标志物。

[0008] 生物标志物必须经过发现或鉴定(Discovery),验证(Verification),确认(Validation)三个步骤,而后才进入临床检验等更深入的阶段[22]。为此,本项目将继续验证在STR/ort模型中发现的OA血清候选标志物,包括其差异表达情况及OA特异性问题。我们拟在STR/ort小鼠和OA患者血清中进行候选标志物的表达验证,确定差异表达趋势,同时采集OA患者关节滑液,分析候选标志物与OA病变的特异性问题,使OA标志物在OA患者样本中亦得到验证。而后,我们将深入进行OA标志物在患者血清样本中的定量检测,分析其与OA病程的关系,并建立OA疾病诊断模型,计算OA标志物诊断OA的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,提出它们在OA的预防、早期诊断、病程预测等临床应用方面的可行性。

[0009] 因此,以iTRAQ标记结合MALDI-TOF MS/MS技术为基础,利用自发性OA动物模型STR/ort鼠,发现和鉴定OA血清差异表达蛋白,待验证了它们在OA患者样本中的特异性和差异表达情况后,再深入OA疾病诊断模型的研究,确认OA标志物在OA的预防、早期诊断、病程预测等临床应用方面的作用。本项目将为人群骨关节健康的预警提供新的思路。

[0010] 骨关节炎标志物是该项研究中不可或缺的构成部分,本发明一种骨关节炎标志物确认的技术方案,经检索国内同行业未见相同。

## 发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种骨关节炎标志物确认。

[0012] 这种骨关节炎标志物确认,

由以下步骤组成:

①患者样本采集:在知情同意的前提下,采集OA患者血清200例;填写样本登记表,记录样本名称、编号、取样日期、病历资料等;所有操作尽量在冰上进行;血清按50ul/管分装入

1.5 mL EP管,-80℃保存备用;

②采用ELISA方法检测200例OA患者血清中的候选标志物表达,分析OA标志物与OA病程的关系;

③用OA标志物建立OA疾病诊断模型,盲法筛检200例患者血清,判断OA标志物诊断OA的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,提出它们在OA的预防、早期诊断、病程预测等临床应用方面的可行性。

[0013] 发明有益效果:

本发明拟借助骨关节炎STR/ort模型,利用iTRAQ标记结合MALDI-TOF MS/MS技术发现OA血清差异表达蛋白,利用生物信息学技术分析它们在OA发生发展的信号网络中可能发挥的功能及相互作用;筛选出那些在骨关节炎STR/ort模型及OA患者血清、病变关节滑液中均特异性表达且差异表达趋势一致的候选血清OA标志物;再通过人群样本进行标志物的确认,评估这些OA候选标志物诊断OA的价值并分析其与临床的相关性,提出它们在OA的预防、早期诊断等临床应用方面的可行性,及其在人群骨关节健康预警中的意义。

[0014]

## 具体实施方式

[0015] 实施例:

这种骨关节炎标志物确认,

由以下步骤组成:

①患者样本采集:在知情同意的前提下,采集OA患者血清200例;填写样本登记表,记录样本名称、编号、取样日期、病历资料等;所有操作尽量在冰上进行;血清按50u1/管分装入1.5 mL EP管,-80℃保存备用;

②采用ELISA方法检测200例OA患者血清中的候选标志物表达,分析OA标志物与OA病程的关系;

③用OA标志物建立OA疾病诊断模型,盲法筛检200例患者血清,判断OA标志物诊断OA的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,提出它们在OA的预防、早期诊断、病程预测等临床应用方面的可行性。

[0016] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,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,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种骨关节炎标志物确认		
公开(公告)号	<a href="#">CN107918014A</a>	公开(公告)日	2018-04-17
申请号	CN201711169089.4	申请日	2017-11-22
[标]发明人	于思创 王海云		
发明人	于思创 王海云		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	于勤 林培		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种骨关节炎标志物确认，①患者样本采集②采用ELISA方法检测200例OA患者血清中的候选标志物表达，分析OA标志物与OA病程的关系；③用OA标志物建立OA疾病诊断模型，盲法筛检200例患者血清，判断OA标志物诊断OA的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值，提出它们在OA的预防、早期诊断、病程预测等临床应用方面的可行性。通过人群样本进行标志物的确认，评估这些OA候选标志物诊断OA的价值并分析其与临床的相关性，提出它们在OA的预防、早期诊断等临床应用方面的可行性，及其在人群骨关节健康预警中的意义。