



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110045126 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201910264499.X

(22)申请日 2019.04.03

(71)申请人 中国医学科学院北京协和医院

地址 100730 北京市东城区王府井帅府园1号

(72)发明人 胡朝军 李永哲 张文 张盼盼
李洁琼

(74)专利代理机构 北京智为时代知识产权代理
事务所(普通合伙) 11498

代理人 王加岭 杨静

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

一种用于诊断自身免疫性胰腺炎的生物标志物及其用途

(57)摘要

本发明公开了翅莢百脉根凝集素在制备用于诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。本研究通过采用凝集素微阵列检测IgG4-RD患者血清IgG4分子表面与凝集素特异性结合的聚糖谱,结果显示,LTL凝集素结合聚糖的含量在IgG4-RD患者中是降低的。由于LTL凝集素是特异性结合岩藻糖,这表明岩藻糖糖基化水平在IgG4-RD患者中的表达是减少的。进一步研究三个亚组的IgG4-RD糖基化表达,结果显示LTL凝集素结合聚糖水平在自身免疫性胰腺炎的病人中的表达量最低,表明LTL凝集素结合聚糖水平可作为自身免疫性胰腺炎疾病诊断的生物学标志物。

1. 一种用于诊断自身免疫性胰腺炎的生物标志物,其为翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物。

2. 权利要求1所述的生物标志物在用于制备诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。

3. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述诊断包括:测定获自呈现IgG4相关性疾病的患者的生物样品中翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平;任选地,

与对照数据比较所述生物样品中翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平,其中,相对于所述对照数据,所述样品中翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平可检测地降低表明患自身免疫性胰腺炎的可能性。

4. 翅莢百脉根凝集素在制备用于诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述诊断包括:将翅莢百脉根凝集素与测定获自呈现IgG4相关性疾病的患者的生物样品进行接触,测定翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平;任选地,

与对照数据比较所述生物样品中翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平,其中,相对于所述对照数据,所述样品中翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平可检测地降低表明患自身免疫性胰腺炎的可能性。

6. 如权利要求3或5所述的用途,其中,所述生物样品为血清样品。

7. 如权利要求3或5所述的用途,其中,翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平通过以下步骤来测量,包括:

- a. 使来自患者的生物样品与翅莢百脉根凝集素接触;
- b. 在生物样品中存在的IgG4与翅莢百脉根凝集素之间形成凝集素-聚糖复合物;
- c. 洗涤来除去任何未结合的IgG4;
- d. 添加被标记的并且对来自生物样品的抗体为反应性的检测抗体;
- e. 洗涤来除去任何未结合的被标记的所述检测抗体;和
- f. 将所述检测抗体的标记物转化为可检测信号。

8. 如权利要求7所述的用途,其中,所述的翅莢百脉根凝集素沉积或固定在固相表面载体上,优选的,所述的固相表面载体是乳胶珠子、多孔平板或膜条、纳米管道、带二维码的薄片等的形式,优选的,所述检测抗体通过共价连接到酶、具有荧光化合物或金属的标记物、或具有化学发光化合物的标记物来标记。

9. 一种用于检测和/或定量生物样品中能与翅莢百脉根凝集素结合的IgG4的试剂盒,包括:一种固相表面载体,其中,所述的翅莢百脉根凝集素沉积或固定在固相表面载体上,其中,翅莢百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物作为自身免疫性胰腺炎的生物标志物,优选地,所述试剂盒还包括被标记的并且对来自生物样品的抗体为反应性的检测抗体。

10. 如权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述固相表面载体是乳胶珠子、多孔平板或膜条、纳米管道、带二维码的薄片等的形式。

一种用于诊断自身免疫性胰腺炎的生物标志物及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种用于诊断自身免疫性胰腺炎的生物标志物及其用途。

背景技术

[0002] 糖基化是蛋白转录后修饰最常见的形式之一。糖基化可影响蛋白-蛋白相互作用,细胞-细胞识别,黏附以及趋化作用。越来越多的证据表明疾病状态下糖基化的改变与疾病的发生发展相关,如肿瘤、自身免疫性疾病。因此,分析糖蛋白糖基化的类型可以提高疾病诊断的特异性

[0003] IgG4相关性疾病(IgG4 related disease, IgG4RD)是近年来认识的一种新的免疫介导的自身炎症性疾病。该病以受累器官或组织增生、肿大,血清IgG4水平显著增高(>1350mg/L),受累组织中 IgG4阳性淋巴细胞浸润(IgG4阳性浆细胞占总浆细胞50%以上)为主要特征。本病可累及泪腺、唾液腺、胰腺、腹膜后组织、胆管、肺、肾脏、前列腺等多个器官或组织,临床表现为米库利兹病、自身免疫性胰腺炎、腹膜后纤维化、自身免疫性胆管炎、间质性肺炎、眶周炎性假瘤等。2010年自身免疫病综述(Autoimmunity Reviews)杂志以题为“一种新的综合征诞生: IgG4相关疾病临床谱”宣布这一新的病种得到公认。2012年国际上首次公布该病的综合诊断标准,使其诊断得以规范化。IgG4-RD特征的病理表现为淋巴细胞浸润、席纹状纤维化和闭塞性静脉炎。对IgG4-RD早期诊断,早期治疗,可以预防严重的器官损伤、组织纤维化,甚至死亡。

[0004] 人类血清中的糖蛋白浓度约为40g/L,是寻找人类疾病生物标志物的极佳来源。与RNA和蛋白质不同,糖蛋白上黏附的聚糖的合成不需要模板。糖基化是受多种因素影响的过程,包括:细胞类型及其活化状态;环境因素,例如可用代谢物的存在;细胞的年龄,因为部分聚糖可能会随着时间的推移而丢失;炎症介质,如细胞因子和趋化因子。所有这些因素都可能在自身免疫的环境中发生改变。例如,一些自身免疫疾病具有特征性的细胞因子。这些细胞因子对糖苷酶,唾液酸酶和糖基转移酶的表达产生影响,而这些酶能直接影响聚糖的合成。从理论上说,特征性的免疫状态可在血清糖蛋白的糖基化中表现出来。

[0005] 鉴于糖基化在疾病中的重要作用,通过高通量的糖基化分析技术——凝集素微阵列来筛查IgG4-RD患者血清IgG4糖基化的表达,以期探讨糖基化在IgG4-RD中的临床应用价值。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明提供一种用于诊断自身免疫性胰腺炎的生物标志物及其用途。

[0007] 首先,本发明提供一种用于诊断自身免疫性胰腺炎的生物标志物,其为翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物。

[0008] 其中,其中,所述的IgG4是含有岩藻糖聚糖的。

[0009] 其次,本发明还提供所述标志物在用于制备诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。

[0010] 具体地,所述诊断包括:测定获自呈现IgG4相关性疾病的患者的生物样品中翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平;任选地,

[0011] 与对照数据比较所述生物样品中翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平,其中,相对于所述对照数据,所述样品中翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平可检测地降低表明患自身免疫性胰腺炎的可能性。

[0012] 其中,所述生物样品为血清样品。

[0013] 优选的,翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平通过以下步骤来测量,包括:

[0014] a.使来自患者的生物样品与翅荚百脉根凝集素接触;

[0015] b.在生物样品中存在的IgG4与翅荚百脉根凝集素之间形成凝集素-聚糖复合物;

[0016] c.洗涤来除去任何未结合的IgG4;

[0017] d.添加被标记的并且对来自生物样品的抗体为反应性的检测抗体;

[0018] e.洗涤来除去任何未结合的被标记的所述检测抗体;和

[0019] f.将所述检测抗体的标记物转化为可检测信号。其次,本发明还提供翅荚百脉根凝集素在制备用于诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。

[0020] 其中,所述的翅荚百脉根凝集素沉积或固定在固相表面载体上。

[0021] 其中,所述的固相表面载体优选为乳胶珠子、多孔平板或膜条、纳米管道、带二维码的薄片等任何形式。

[0022] 其中,所述检测抗体通过共价连接到酶、具有荧光化合物或金属的标记物、或具有化学发光化合物的标记物来标记。

[0023] 另一方面,本发明还提供翅荚百脉根凝集素在制备用于诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。

[0024] 其中,所述诊断包括:将翅荚百脉根凝集素与测定获自呈现IgG4相关性疾病的患者的生物样品进行接触,测定翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平;任选地,

[0025] 与对照数据比较所述生物样品中翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平,其中,相对于所述对照数据,所述样品中翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平可检测地降低表明患IgG4相关性疾病多器官受累的可能性。

[0026] 其中,所述生物样品为血清样品。

[0027] 优选的,翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物的水平通过以下步骤来测量,包括:

[0028] a.使来自患者的生物样品与翅荚百脉根凝集素接触;

[0029] b.在生物样品中存在的IgG4与翅荚百脉根凝集素之间形成凝集素-聚糖复合物;

[0030] c.洗涤来除去任何未结合的IgG4;

[0031] d.添加被标记的并且对来自生物样品的抗体为反应性的检测抗体;

[0032] e.洗涤来除去任何未结合的被标记的所述检测抗体;和

[0033] f.将所述检测抗体的标记物转化为可检测信号。其次,本发明还提供翅荚百脉根

凝集素在制备用于诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。

[0034] 其中,所述的翅荚百脉根凝集素沉积或固定在固相表面载体。

[0035] 其中,所述的固相表面载体优选为乳胶珠子、多孔平板或膜条、纳米管道、带二维码的薄片等任何形式。

[0036] 其中,所述检测抗体通过共价连接到酶、具有荧光化合物或金属的标记物、或具有化学发光化合物的标记物来标记。

[0037] 另一方面,本发明还提供一种用于检测和/或定量生物样品中能与翅荚百脉根凝集素结合的IgG4的试剂盒,包括:一种固相表面载体,其中,所述的翅荚百脉根凝集素沉积或固定在固相表面载体上,其中,翅荚百脉根凝集素与IgG4结合所形成的复合物作为自身免疫性胰腺炎的生物标志物。

[0038] 在本发明优选的实施方案中,所述试剂盒还包括被标记的并且对来自生物样品的抗体为反应性的检测抗体。

[0039] 优选地,其中,所述的固相表面载体优选为乳胶珠子、多孔平板或膜条、纳米管道、带二维码的薄片等任何形式。

[0040] 本研究通过采用凝集素微阵列检测IgG4-RD患者血清IgG4 分子表面与凝集素特异性结合的聚糖谱,结果显示,LTL凝集素结合聚糖的含量在IgG4-RD患者中是降低的。由于LTL凝集素是特异性结合岩藻糖,这表明岩藻糖糖基化水平在IgG4-RD患者中的表达是减少的。进一步研究三个亚组的IgG4-RD糖基化表达,结果显示 LTL凝集素结合聚糖水平在自身免疫性胰腺炎的病人中的表达量最低。

[0041] 研究结果显示,IgG4-RD患者,特别是自身免疫性胰腺炎患者,LTL凝集素结合聚糖水平是降低的,LTL凝集素结合聚糖水平可作为自身免疫性胰腺炎疾病诊断的生物学标志物。

附图说明

[0042] 图1所示为凝集素微阵列56个凝集素(三复孔)在阵列载玻片的布局。

[0043] 图2所示为IgG4-RD患者凝集素微阵列示意图。

[0044] 图3 IgG4-RD组、DC组和HC组LTL凝集素信号值比较(**: $P < 0.01$)。

[0045] 图4所示为自身免疫性胰腺炎和DC患者LTL凝集素信号值比较及ROC曲线图。

[0046] 图5所示为自身免疫性胰腺炎和HC患者LTL凝集素信号值比较及ROC曲线图。

[0047] 图6所示为纯化前后IgG4浓度的相关性。

[0048] 图7所示为凝集素微阵列中血清IgG4与纯化的IgG4之间LTL 凝集素信号值的相关性。

具体实施方式

[0049] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0050] 实验标本:纳入本次研究的三组人群包括:IgG4-RD组(167例 IgG4-RD患者,其中A1组米库利兹病59例,A2组自身免疫性胰腺炎50例,A3组腹膜后纤维化58例),DC组(130例AID疾病对照),HC组(86例健康体检者)。其中IgG4-RD组和DC组的诊断均符合相应疾病的诊断标准。入组的人群均采集新鲜血液,并立即分离出血清,-80℃冻存备用。

[0051] 实施例1凝集素微阵列分析血清IgG4糖基化

[0052] 由56种凝集素微芯片组成的凝集素微阵列。将56种凝集素一式三份固定到芯片中,将每个患者的总血清进行1:1000稀释,添加到阵列中,4℃孵育过夜。然后,抗IgG4-Cy3共轭在黑暗中与微芯片杂交45分钟。对所有蛋白的荧光强度和低信号的荧光强度进行了独立分析。芯片图像被转换为数字格式进行分析。

[0053] 利用各凝集素点的信噪比(点前景相对于背景的中等强度)计算了各凝集素点的信噪比(S/N)。为了防止凝集素微阵列在阵列间的偏置,我们使用阵列之间的归一化来归一化S/N数据。根据以下规则,通过组内的数据分布来确定凝集素结合活力的显著性差异:(1) IgG4-RD组的凝集素平均S/N不应小于对照组中的最大S/N ($50\% (\text{IgG4-RD组}) \geq \text{最大值(对照组)}$); (2) IgG4-RD组的S/N下四分位数不应小于对照组的下四分位值 ($25\% (\text{IgG4-RD组}) \geq 75\% (\text{对照组})$); (3) IgG4-RD组的最小S/N不应小于对照组的中值 [$\text{最小值} (\text{IgG4-RD组}) \geq 50\% (\text{对照组})$]。

[0054] 采用含有56个凝集素的凝集素微阵列来检测实验标本中的糖基化状态(图1)。凝集素可特异性的结合糖蛋白末端的聚糖分子,形成复合物,通过不同的凝集素与聚糖的特异性结合来研究目的蛋白表面聚糖的种类与含量。凝集素微阵列因其高效的特点,现今已越来越广泛的应用到糖基化的研究。冻存的标本室温平衡后,加入到凝集素微阵列,与之反应,再经过洗涤、封闭、荧光二抗反应和荧光检测等步骤,可获得每个凝集素与之特异结合聚糖的信号值,信号值与结合亲和力以及结合强度相关(图2)。

[0055] 为了确保收集到的荧光信号来源于IgG4的特定结合,使用Cy3 标记IgG4抗体。符合前述三种规则之中的任何一种的凝集素S/N数据被认定为具有显著性差异,共有6种凝集素(表1)。

[0056] 表1凝集素微阵列中具有显著性差异的凝集素

凝集素	全称	单糖特异性
LTL	翅荚百脉根凝集素(Lotus tetragonolobus lectin)	Fuc ^a
DSL	曼陀罗凝集素(Datura stramonium lectin)	GlcNAc ^a
HPA	罗马蜗牛凝集素 (Helix pomation Lectin)	α GalNAc
MNA-M	Morniga M凝集素(Morniga M Lectin) (黑桑)	Man
VVA mannose	长柔毛野豌豆(甘露糖特异)	Man ^a
ConA	Con A 凝集素	Man ^a , Glc ^a

[0058] 6种凝集素的亲和力信号值显示出三组样本之间有显著性差异。通过凝集素-聚糖结合信号分析,我们发现,对比DC组和HC组,翅荚百脉根凝集素 (Lotus tetragonolobus lectin) (LTL) 信号值在IgG4-RD 组总体是降低的(图3),进一步分析IgG4-RD亚组LTL凝集素信号值的分布发现,A2亚组自身免疫性胰腺炎在三个亚组中的值最低(数据及ROC曲线

图如图4-5)。鉴于LTL特异性的结合岩藻糖 (Fuc) 聚糖,我们由此推断,IgG4-RD患者,特别是自身免疫性胰腺炎患者,血清中IgG4岩藻糖基化水平较其他组相比,呈现降低趋势,可作为自身免疫性胰腺炎的诊断及鉴别诊断的生物学标志物。

[0059] 实施例2血清IgG4提纯及鉴定

[0060] 为了进一步确定IgG-RD患者糖基化的变化是否由于血清 IgG4浓度的增加,还是糖基化的实际变化,使用了第二凝集素微阵列和凝集素印迹Dotblot进行验证。该第二凝集素由6种凝集素组成,包括HPA、DSL、LTL、VVA甘露糖、MNA-M和ConA。操作同前。

[0061] 通过免疫沉淀法从血清中分离出IgG4。样本包括12名 IgG-RD患者、3名DC患者和1名HC患者。将20 μ l鼠抗IgG4抗体(SouthernBiotech,Birmingham,USA)偶联到20 μ l珠子(NHS-activated SepharoseTM 4Fast Flow,GE healthcare Life Sciences, Pittsburgh,USA),然后加入0.1M Tris-HCl来密封过量的部位。用酸性溶液和碱溶液清洗鼠抗IgG4抗体珠3次。每柱子使用5 μ l血清。将柱子是孵育过夜。用PBST清洗8次,水洗2次后,用20 μ l 0.1M甘氨酸将IgG4洗脱到真空管。用Dotblot鉴定蛋白质纯度,用蛋白质银染试剂盒(Beyotome,上海,中国)测定蛋白质浓度,所有 IgG4样品均储存在-80℃进行后续处理。

[0062] 通过对16例患者纯化后的IgG4浓度和相对血清IgG4含量的比较,发现纯化后的IgG4浓度结果与血清IgG4水平有较好的相关性($r=0.593$, $P=0.015$) (图6)。结果显示,对于LTL凝集素而言,血清IgG4微阵列的信号值与纯化的IgG4微阵列信号值呈正比(图7)。这表明,IgG4-RD患者血清中的LTL凝集素结合的聚糖——岩藻糖糖基化水平是异常的。

[0063] 实施例3 167例IgG-RD患者的IgG4糖基化与实验室特征的相关性分析

[0064] 观察到IgG-RD患者的凝集素信号之间存在显著差异,我们进一步评估凝集素信号与临床实验室指标之间的关系。相关性分析结果显示:IgG4-RD患者LTL凝集素结合聚糖的含量与血清IgA水平呈正相关(表2)。

[0065] 表2 167例IgG4-RD患者凝集素结合聚糖的含量与实验室特征的相关性

[0066]

		ESR	CRP	IgG	IgA	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgE	C3	C4
LTL	r	0.08	0.07	-0.07	0.21	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	0.22	0.11
	P	NS	NS	NS	0.01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[0067] *NS:无显著性差异

[0068] 实施例4 167例IgG-RD患者IgG4糖基化与器官参与的关系

[0069] 在患者呈现各种器官受累中,对凝集素特异性结合聚糖的不同水平进行了比较。结果如表3所示。由此表明,IgG4-RD患者LTL凝集素结合聚糖水平与多胰腺、胆管受累及腹膜后纤维化相关(表3)。结果显示,LTL结合聚糖水平在胰腺、胆管和腹膜后纤维化这些器官有无受累的患者中存在统计学差异,而自身免疫性胰腺炎的临床特点也有这些器官的受累表现。由此可为该指标诊断自身免疫性胰腺炎提供证据。

[0070] 表3 IgG4-RD患者器官受累与IgG4糖基化含量的比较

[0071]

	是否受累	受累例数	LTL
胰腺	Yes	60	2.39±0.88
	No	105	2.86±0.81
	P		<0.01
胆管	Yes	41	2.32±0.77
	No	122	2.80±0.86
	P		<0.01
唾液腺	Yes	92	2.57±0.88
	No	73	2.83±0.82
	P		NS
泪腺	Yes	81	2.64±0.97
	No	84	2.73±0.74
	P		NS
腮腺	Yes	43	2.51±0.56
	No	122	2.75±0.82
	P		NS
腹膜后纤维化	Yes	39	2.89±0.79
	No	126	2.63±0.88
	P		0.043

[0072] NS*无显著性差异。

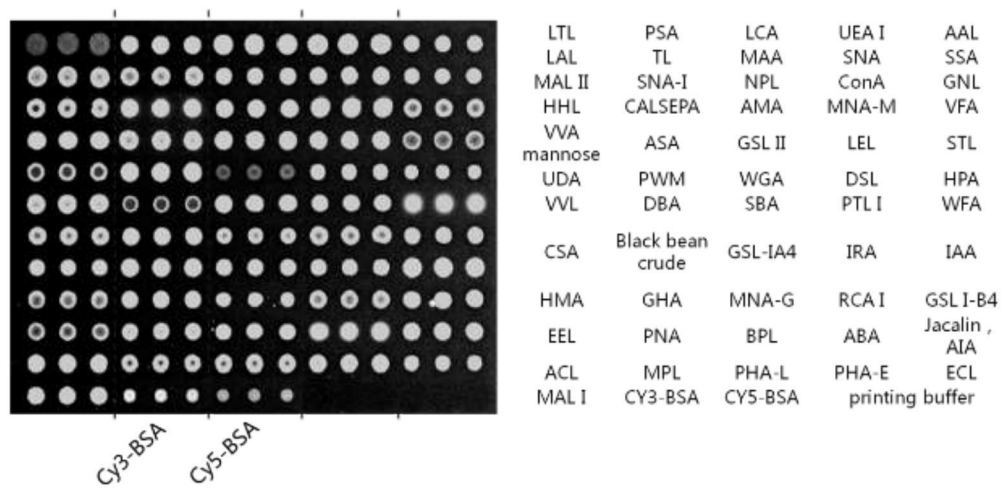


图1



图2

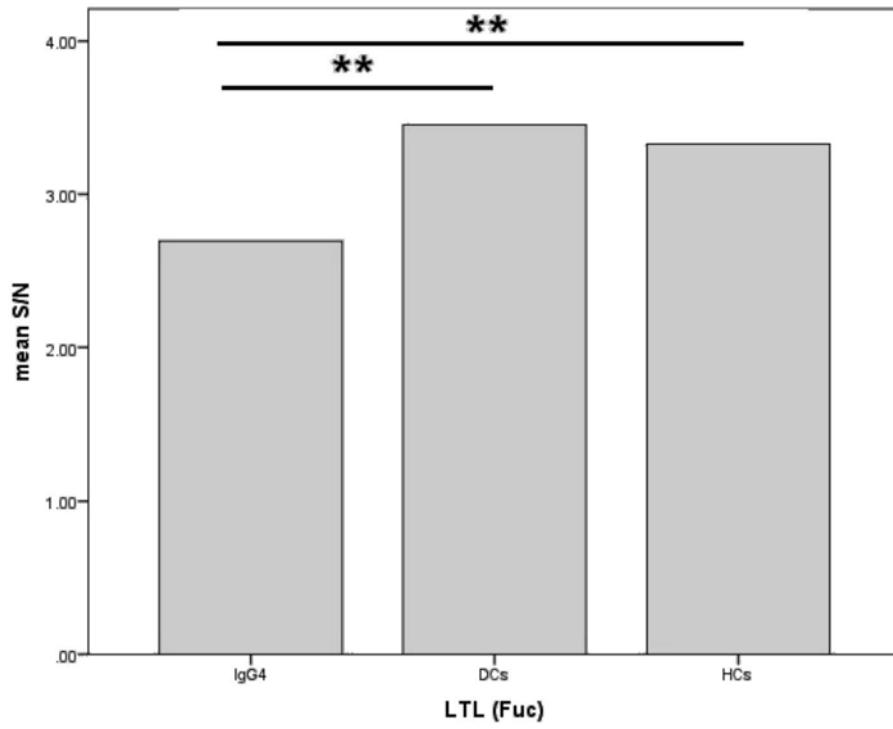
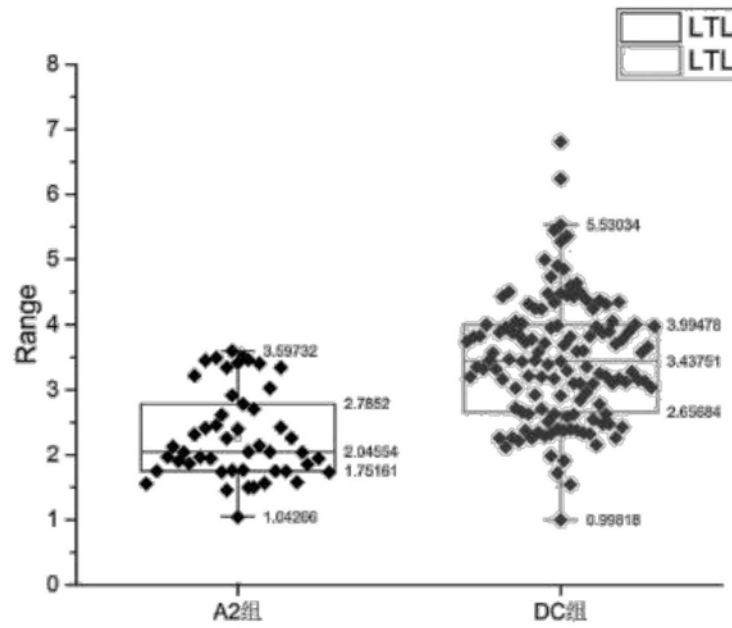


图3



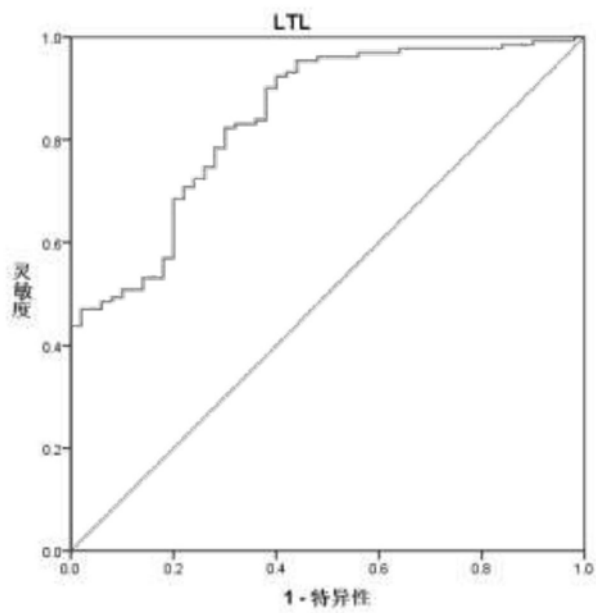
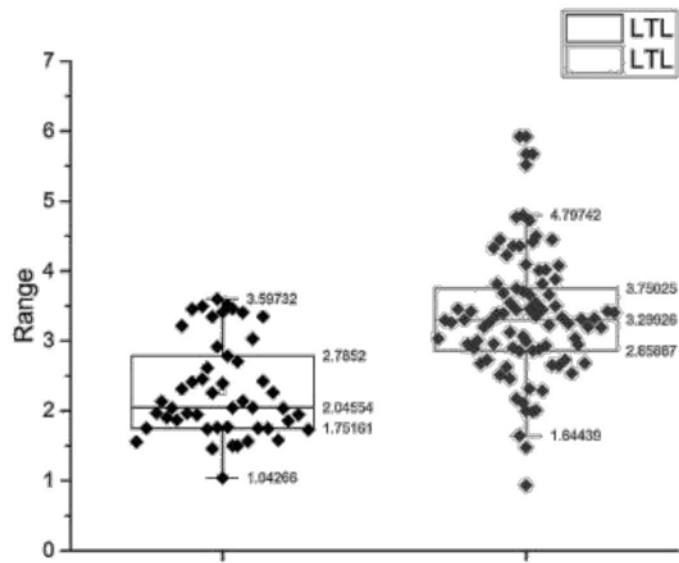


图4



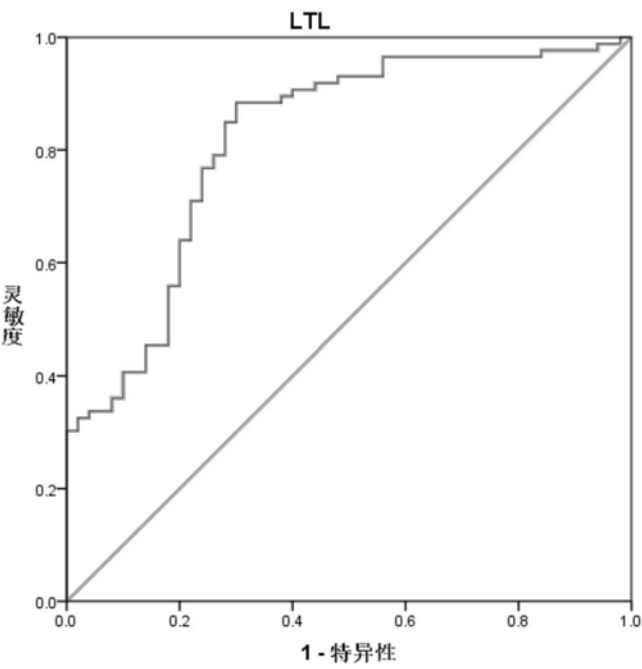


图5

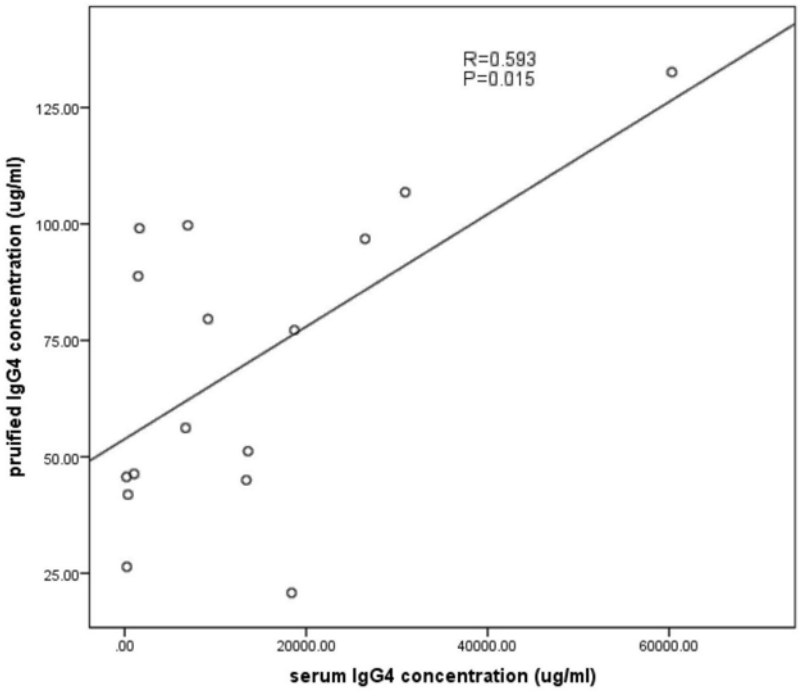


图6

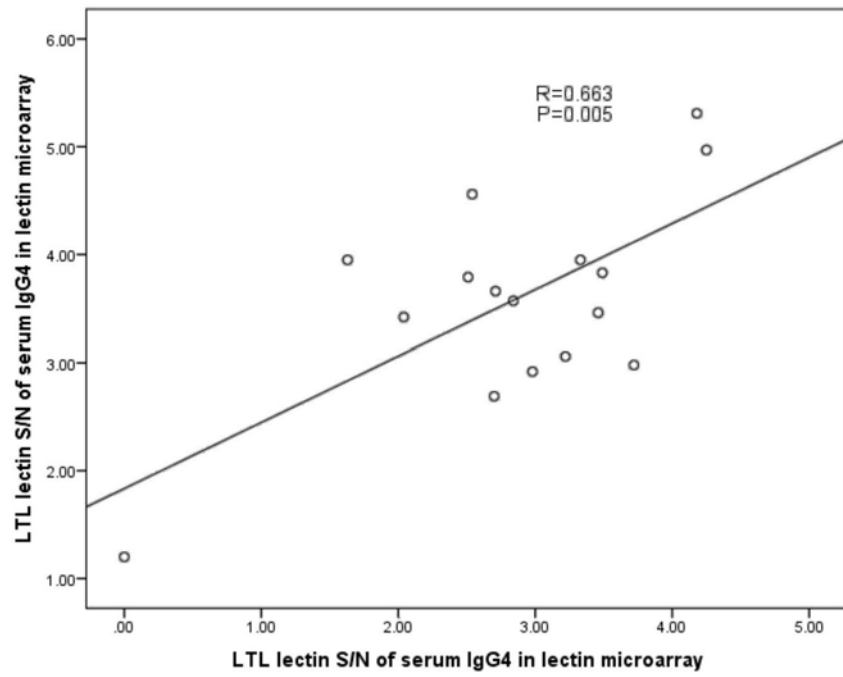


图7

专利名称(译)	一种用于诊断自身免疫性胰腺炎的生物标志物及其用途		
公开(公告)号	CN110045126A	公开(公告)日	2019-07-23
申请号	CN201910264499.X	申请日	2019-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
[标]发明人	胡朝军 李永哲 张文 张盼盼 李洁琼		
发明人	胡朝军 李永哲 张文 张盼盼 李洁琼		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/6854 G01N33/6893		
代理人(译)	杨静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了翅荚百脉根凝集素在制备用于诊断自身免疫性胰腺炎的试剂中的用途。本研究通过采用凝集素微阵列检测IgG4-RD患者血清IgG4分子表面与凝集素特异性结合的聚糖谱，结果显示，LTL凝集素结合聚糖的含量在IgG4-RD患者中是降低的。由于LTL凝集素是特异性结合岩藻糖，这表明岩藻糖糖基化水平在IgG4-RD患者中的表达是减少的。进一步研究三个亚组的IgG4-RD糖基化表达，结果显示LTL凝集素结合聚糖水平在自身免疫性胰腺炎的病人中的表达量最低，表明LTL凝集素结合聚糖水平可作为自身免疫性胰腺炎疾病诊断的生物学标志物。

凝集素	全称	单糖特异性
LTL	翅荚百脉根凝集素(Lotus tetragonolobus lectin)	Fuc ^a
DSL	曼陀罗凝集素(Datura stramonium lectin)	GlcNAc ^a
HPA	罗马蜗牛凝集素(Helix pomation Lectin)	α GalNAc
MNA-M	Morniga M凝集素(Morniga M Lectin)(黑桑)	Man
VVA mannose	长柔毛野豌豆(甘露糖特异)	Man ^a
ConA	Con A 凝集素	Man ^a , Glc ^a