



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104166003 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201410383959.8

(22) 申请日 2014.08.06

(73) 专利权人 中国人民解放军第二军医大学  
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

(72) 发明人 梁艳 杨再兴 仲人前 樊笑霞  
王皓 叶伟民

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事  
务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

(51) Int. Cl.

G01N 33/96(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101525614 A, 2009.09.09,

CN 103858008 A, 2014.06.11,

刘越飞. 血清 HE4 在卵巢上皮癌诊断及治疗  
效果评价中的价值. 《中国优秀硕士学位论文全文  
文数据库》. 2011, (第 2011/10 期),

Béla Nagy 等. Elevated human epididymis  
protein 4 concentrations in chronic kidney  
disease. 《Ann Clin Biochem》. 2012, 第 49 卷

Béla Nagy 等. Elevated human epididymis  
protein 4 concentrations in chronic kidney  
disease. 《Ann Clin Biochem》. 2012, 第 49 卷

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

人附睾蛋白 4 在制备系统性红斑狼疮性肾病  
诊断试剂或试剂盒中的应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域, 本发明提供了人  
附睾蛋白 4 (HE4) 新的用途, 特别是 HE4 蛋白在制  
备系统性红斑狼疮 (SLE) 患者狼疮性肾炎 (LN)  
和慢性肾脏疾病 (CKD) 诊断试剂或试剂盒中的应  
用。本发明采用酶联免疫吸附试验检测 HE4 蛋白  
在 SLE 患者血清中的表达量, 能够较敏感、特异地  
诊断 SLE 患者患 LN 和 CKD 的情况。基于血清 HE4  
蛋白水平与 SLE 患者 LN 和 CKD 的这种相关性, 以  
该蛋白作为生物标志物对其进行血清检测可以用于  
指导 SLE 患者 LN 和 CKD 的准确诊断。

1. 人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用。
2. 根据权利要求1所述的人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用,其特征在於,所述的系统性红斑狼疮性肾病是指狼疮性肾炎和/或系统性红斑狼疮患者慢性肾脏疾病。
3. 根据权利要求1所述的人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用,其特征在於,该应用是建立人附睾蛋白4定量检测的酶联免疫吸附试验试剂盒。
4. 根据权利要求1所述的人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用,其特征在於,该应用是指利用酶联免疫吸附试验试剂盒,检测血清中人附睾蛋白4的表达量。
5. 根据权利要求3或4所述的人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用,其特征在於,所述的试剂包括人附睾蛋白4标准品、质控品、链霉亲和素包被的微孔板、生物素标记的人附睾蛋白4抗体、辣根过氧化物酶标记的人附睾蛋白4抗体、稀释缓冲液、底物液、终止液和清洗缓冲液。

## 人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种人附睾蛋白4(HE4)的新的用途,具体地说,涉及HE4蛋白在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用。

### 背景技术

[0002] 系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,简称SLE)是一种常见的系统性自身免疫性疾病,可累及全身多个脏器。肾脏是SLE最常累及的内脏器官,而且预后常比较严重。多数SLE患者会发生慢性肾脏疾病(chronic kidney disease,简称CKD),如不及时诊断并进行有针对性的治疗,最终会发展为肾衰竭而威胁生命。目前估算肾小球滤过率(eGFR)是CKD早期诊断和严重程度判断的最好指标,但该指标涉及专业计算公式,比较麻烦。

[0003] SLE患者的CKD大多由狼疮性肾炎(lupus nephritis,简称LN)发展而来,能够早期诊断并及时治疗LN,对于预防CKD的发生具有极为重要的意义。但目前,LN的诊断主要依赖于肾组织学检测,这种损伤性检查患者不愿接受。

[0004] 综上所述,本领域迫切需要寻找能对SLE患者的LN和CKD进行早期诊断的操作简单便捷的无创性指标。这方面研究对于在SLE患者中早发现、早治疗LN和CKD,从而预防慢性肾衰,减少患者死亡具有重要意义。

[0005] 人附睾蛋白4(HE4)属于乳清酸性4-二硫化中心(WFDC)蛋白家族,是一种分泌型的糖蛋白,由一个约25kD的天然N端糖基化蛋白和一个10-12kD的核心蛋白构成,GENBANK号为NP\_006094。HE4首先发现于附睾远端上皮,与精子成熟有关。后来研究报道,HE4可以表达于呼吸道、生殖道、卵巢癌等多种组织细胞中。除了在细胞水平有表达外,大量研究还发现,卵巢癌患者血清HE4的水平亦明显增高,而且对卵巢癌具有重要的诊断价值。目前,该分子已经作为卵巢癌的标志物广泛应用于临床检测(参见文献:Drapkin R,von Horsten HH,Lin Y,Mok SC,Crum CP,Welch WR,Hecht JL.Human epididymis protein 4(HE4)is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas.Cancer Res 2005;65:2162-2169.Hellstrom I,Raycraft J,et al.The HE4(WFDC2)protein is a biomarker for ovarian cancer.Cancer Res 2003;63:3695-3700.)

[0006] 迄今为止,国内外尚无文献报道HE4蛋白在SLE患者血清中的表达水平以及HE4蛋白对SLE患者并发LN和CKD有无诊断价值。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供人附睾蛋白4的新的用途,特别是人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用。

[0008] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次发现,采用酶联免疫吸附试验检测SLE患者

血清中的HE4蛋白的表达量,能够比较准确地对LN和CKD进行诊断评估。基于HE4蛋白在血清中的表达量与LN及CKD的这种相关性,以该蛋白作为生物标志物对其表达量进行检测可以用于指导SLE患者中LN和CKD的早期诊断。即HE4蛋白可用于制备SLE患者LN和CKD诊断试剂或试剂盒。

[0009] 本发明提供了人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用。

[0010] 所述的系统性红斑狼疮性肾病是指狼疮性肾炎(LN)和/或系统性红斑狼疮患者慢性肾脏疾病(CKD)。

[0011] 本发明还提供了HE4蛋白用于制备SLE患者LN和CKD诊断标志物。

[0012] 优选的,HE4蛋白在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用,该应用是指建立HE4蛋白定量检测的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂或试剂盒。

[0013] 所述的应用,是指将HE4蛋白作为生物标志物,利用其ELISA检测试剂盒,分析HE4蛋白在SLE并发LN和CKD患者血清中的表达量。

[0014] 利用特异性抗HE4蛋白的抗体,用于制备SLE患者LN和CKD诊断的ELISA制剂或试剂盒,这对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0015] 所述的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。

[0016] 所述的应用,配套的试剂包括HE4标准品、质控品、链霉亲和素包被的微孔板、生物素标记的HE4抗体、辣根过氧化物酶标记的HE4抗体、稀释缓冲液、底物液、终止液和清洗缓冲液。

[0017] 优选的,本发明还可以利用市售的HE4蛋白测定试剂盒(如瑞典Fujirebio Diagnostics公司),体外检测HE4蛋白在SLE患者血清中的表达量的方法,该方法包括以下步骤(可根据试剂盒说明书):

[0018] (1)通过静脉穿刺采血,按照采血管制造商的程序文件分离血清。标本在检测之前可置于2℃~8℃贮存3天。长期保存标本可将其置于-80℃超低温冰箱。将冷冻标本置于室温后,在分析前应轻轻翻转试管多次,使其充分混匀;

[0019] (2)使用前将所有试剂平衡至室温(20℃至25℃);

[0020] (3)制备标准品,质控品,清洗缓冲液及示踪工作液。仔细按照使用说明书进行操作;

[0021] (4)将所需的微孔板条移至板条架上(立即将剩余的未使用的板条放回含有干燥剂的铝箔袋中并仔细密封好)。用清洗缓冲液清洗每条板条一次。不要清洗30分钟内不会使用的板条;

[0022] (5)分别将25μL HE4标准品(A,B,C,D,E,F),HE4质控品(C1,C2)及患者标本加样至微孔中;

[0023] (6)吸取100μL生物素标记的HE4抗体加入每一孔中。为了避免携带污染,不要使精密移液器的吸头触及液体的表面;

[0024] (7)在微孔板振荡器上持续振荡,室温(20℃~25℃)温育反应1小时(±10分钟);

[0025] (8)在第一次温育后将孔内液体吸干,自动洗板机清洗3次。为了确保有效的清洗,在每一次清洗循环中所有板孔均被完全注满至板孔上缘,同时清洗缓冲液以适当的流速进行分配,以及在清洗循环之间或清洗循环之后对各板孔的吸液是完全的,如果残留有液体,

则将微孔板翻转并在吸水纸上仔细拍打；

[0026] (9)每孔中加入100 $\mu$ L示踪工作液。在微孔板振荡器上持续振荡，室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)温育反应1小时( $\pm$ 5分钟)；

[0027] (10)在第二次温育后将孔内液体吸干，随后洗板6次；

[0028] (11)每孔中加入100 $\mu$ L TMB HRP-底物液。在微孔板振荡器上持续振荡，避光室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)温育反应30分钟( $\pm$ 5分钟)；

[0029] (12)加入100 $\mu$ L终止液，混匀。15分钟内在酶标仪选择405nm测定吸光度。

[0030] (13)采用3次方拟合曲线法绘制标准曲线，标准曲线应包括标准品A(数值为0pM)。每个患者标本中未知的HE4浓度可根据其吸光度平均值从标准曲线上读出。

[0031] 本发明的HE4蛋白与SLE患者并发LN和CKD相关性的发现为早期诊断SLE患者发生LN和CKD的风险提供一条全新的途径，对于早期诊断和治疗SLE性肾病具有重要作用。当ELISA法检测HE4浓度高于相应的临界值时，提示SLE患者易伴发LN或CKD。

[0032] SLE并发CKD，高于临界值233.9pM；

[0033] SLE并发LN，高于临界值150.1pM；

[0034] SLE并发LN(无CKD)，高于临界值113.1pM。

[0035] 本发明利用ELISA检测技术测定SLE患者血清中的HE4蛋白的表达水平，并结合大量临床信息，确定HE4的血清水平对于SLE患者是否发生LN和CKD具有明显的诊断意义，HE4蛋白能用于制备判断SLE患者发生LN和CKD的蛋白质分子标记，对于SLE患者病情判断和序贯治疗具有重要的指导意义。

## 附图说明

[0036] 图1为健康对照、不伴有LN和CKD的SLE组、只伴有LN的SLE组、只伴有CKD的SLE组和伴有LN和CKD的SLE组血清HE4的水平。可见伴有LN或CKD的SLE患者血清HE4水平明显高于健康对照和不伴有LN和CKD的SLE患者，差异具有显著的统计学意义( $p < 0.01$ )。

[0037] 图2为血清HE4水平对SLE患者发生CKD的诊断价值的ROC曲线图；可见曲线下面积为 $0.948 \pm 0.013$ ( $P < 0.001$ )，提示诊断价值非常高。HE4浓度最佳临界值为233.9pM，对应的敏感性、特异性和准确性分别为92.9%、93.5%和93.3%。

[0038] 图3为血清HE4水平对SLE患者发生LN的诊断价值的ROC曲线图；可见曲线下面积为 $0.878 \pm 0.025$ ( $P < 0.001$ )，提示具有很高的诊断价值。HE4浓度最佳临界值为150.1pM，对应的敏感性、特异性和准确性分别为76.8%、91.1%和81.8%。

[0039] 图4为血清HE4水平对SLE患者发生LN但尚无CKD的诊断价值的ROC曲线图；可见曲线下面积为 $0.818 \pm 0.036$ ( $P < 0.001$ )，提示诊断价值较高。HE4浓度最佳临界值为113.1pM，对应的敏感性、特异性和准确性分别为63.9%、89.6%和76.3%。

## 具体实施方式

[0040] 下面结合本发明的附图和实施例对本发明的实施作详细说明，以下实施例是在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0041] 在以下实施例中，SLE患者的血清标本均来自上海长征医院。

[0042] 实施例1:

[0043] 随机选取209例SLE患者和32例健康对照的血清(标本的获取均通过第二军医大学伦理审批),本发明采用ELISA方法检测HE4蛋白在SLE患者血清中的表达水平,所用的HE4蛋白测定试剂盒(购自瑞典Fujirebio Diagnostics公司),具体步骤为:

[0044] (1)通过静脉穿刺采血,按照采血管制造商的程序文件分离血清。标本在检测之前可置于2℃~8℃贮存3天。长期保存标本可将其置于-80℃超低温冰箱。将冷冻标本置于室温后,在分析前应轻轻翻转试管多次,使其充分混匀;

[0045] (2)使用前将所有试剂平衡至室温(20℃至25℃);

[0046] (3)制备标准品,质控品,清洗缓冲液及示踪工作液。仔细按照使用说明书进行操作;

[0047] (4)将所需的微孔板条移至板条架上(立即将剩余的未使用的板条放回含有干燥剂的铝箔袋中并仔细密封好)。用清洗缓冲液清洗每条板条一次。不要清洗30分钟内不会使用的板条;

[0048] (5)分别将25μL HE4标准品(A,B,C,D,E,F),HE4质控品(C1,C2)及患者标本加样至微孔中;

[0049] (6)吸取100μL生物素标记的HE4抗体加入每一孔中。为了避免携带污染,不要使精密移液器的吸头触及液体的表面;

[0050] (7)在微孔板振荡器上持续振荡,室温(20℃~25℃)温育反应1小时(±10分钟);

[0051] (8)在第一次温育后将孔内液体吸干,自动洗板机清洗3次。为了确保有效的清洗,在每一次清洗循环中所有板孔均被完全注满至板孔上缘,同时清洗缓冲液以适当的流速进行分配,以及在清洗循环之间或清洗循环之后对各板孔的吸液是完全的,如果残留有液体,则将微孔板翻转并在吸水纸上仔细拍打;

[0052] (9)每孔中加入100μL示踪工作液。在微孔板振荡器上持续振荡,室温(20℃~25℃)温育反应1小时(±5分钟);

[0053] (10)在第二次温育后将孔内液体吸干,随后洗板6次;

[0054] (11)每孔中加入100μL TMB HRP-底物液。在微孔板振荡器上持续振荡,

[0055] 避光室温(20℃~25℃)温育反应30分钟(±5分钟);

[0056] (12)加入100μL终止液,混匀。15分钟内在酶标仪选择405nm测定吸光度。

[0057] (13)采用3次方拟合曲线法绘制标准曲线,标准曲线应包括标准品A(数值为0pM)。每个患者标本中未知的HE4浓度可根据其吸光度平均值从标准曲线上读出。

[0058] (14)如图1和表1所示,只伴有LN、只伴有CKD和同时伴有LN和CKD的SLE患者血清HE4的水平明显高于健康对照、不伴有LN和CKD的SLE患者,差异具有显著的统计学意义( $p < 0.01$ )。

[0059] 表1不同组别血清HE4水平

[0060]

	均数(pM)	标准差(pM)	中位数(pM)	范围(pM)
健康对照 (n=32)	42.76	6.85	40.57	34.5~61.1
SLE 不伴有 LN 和 CKD 组(n=67)	78.81	58.69	64.26	16.72~425.68
SLE 只伴有 LN 组(n=72)	210.71	189.55	161.37	42.81~1218.57
SLE 只伴有 CKD 组(n=4)	536.96	577.04	282.69	182.96~1399.49
SLE 同时伴 有 LN 和 CKD 组	1312.23	1700.02	613.80	156.44~7084.92

[0061]

(n=66)				
--------	--	--	--	--

[0062] 实施例2:

[0063] 应用ROC曲线分析血清HE4水平对SLE患者发生CKD的诊断价值。在209例SLE患者中,以发生CKD的患者为靶对象,利用SPSS软件做出ROC曲线,并分析相关的各种参数。如图2所示,曲线下面积达到0.948,说明具有非常好的诊断价值。利用约登指数最大的原则,判断出HE4的最佳临界值为233.9pM,对应的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性分别为92.9%、93.5%、89.0%、96.3%和93.3%,见表2所示。

[0064] 实施例3:

[0065] 应用ROC曲线分析血清HE4水平对SLE患者发生LN的诊断价值。在209例SLE患者中,以发生LN的患者为靶对象,利用SPSS软件做出ROC曲线,并分析相关的各种参数。如图3所示,曲线下面积达到0.878,说明具有很高的诊断价值。利用约登指数最大的原则,判断出HE4的最佳临界值为150.1pM,对应的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性分别为76.8%、91.1%、94.6%、67.0%和81.8%,见表2所示。

[0066] 实施例4:

[0067] 为了探讨血清HE4蛋白对早期LN的诊断价值,排除SLE并发CKD患者。在剩下的139例无CKD的SLE患者中,以发生LN的患者为靶对象,利用SPSS软件做出ROC曲线,并分析相关的各种参数。如图4所示,曲线下面积达到0.818,说明诊断价值较高。利用约登指数最大的原则,判断出HE4的最佳临界值为113.1pM,对应的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性分别为63.9%、89.6%、86.8%、69.8%和76.3%,见表2所示。

[0068] 实施例5:

[0069] 样本:某SLE患者血清,采用以上的ELISA方法检测HE4蛋白在该SLE患者血清中的表达水平,经计算,HE4浓度为535.37pM,高于临界值233.9pM,提示SLE患者并发CKD,经CKD-EPI公式计算eGFR为43ml/min,GFR为中到重度下降,证明样本确实为SLE患者并发CKD。

[0070] 实施例6:

[0071] 样本:某SLE患者血清,采用以上的ELISA方法检测HE4蛋白在该SLE患者血清中的表达水平,经计算,HE4浓度为189.24pM,高于临界值150.1pM,提示SLE患者并发LN,经肾组织穿刺活检,证明该样本确实为SLE患者并发LN。

[0072] 由以上试验结果可知,通过采用ELISA方法检测HE4蛋白在SLE患者血清中的表达量能有效诊断出LN和CKD的发生。显然,HE4蛋白与LN及CKD有明显相关性,因此,以HE4蛋白作为生物标志物对其血清表达量进行检测能够较好地判断SLE是否发生LN及CKD作出诊断评估。相应的,其ELISA检测技术能用于制备SLE并发LN和CKD诊断的试剂或试剂盒,这对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0073] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

[0074]

表 2 HE4 蛋白对 SLE 并发 LN 和 CKD 的诊断价值

疾病分类	曲线下面积	95%可信区间	最佳临界值 (pM)	敏感性 (%)	特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	准确性 (%)
SLE 并发 CKD	0.948±0.013	0.922-0.975	233.9	92.9	93.5	89.0	96.3	93.3
SLE 并发 LN	0.878±0.025	0.829-0.926	150.1	76.8	91.1	94.6	67.0	81.8
SLE 并发 LN (无 CKD)	0.818±0.036	0.747-0.889	113.1	63.9	89.6	86.8	69.8	76.3

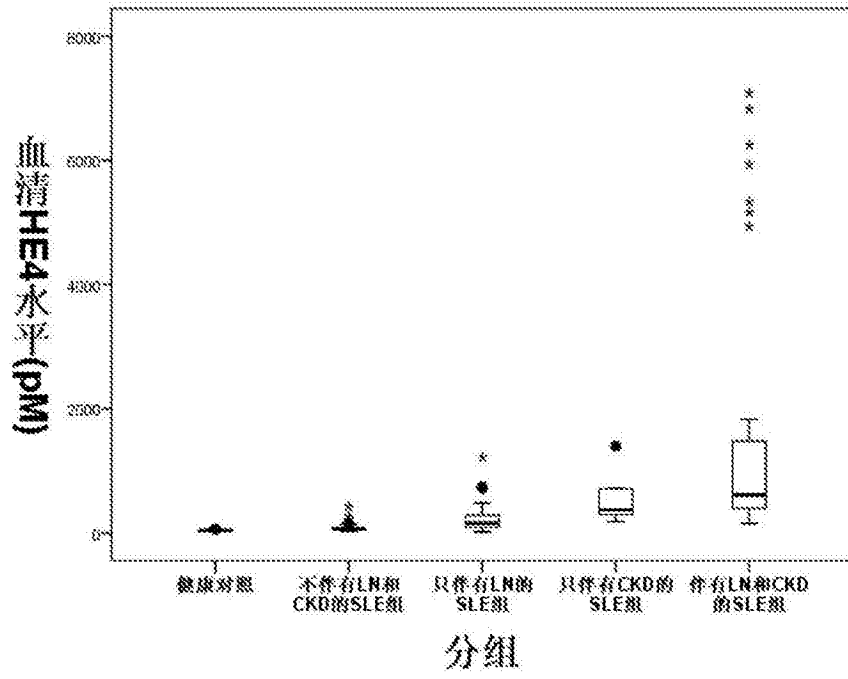


图1

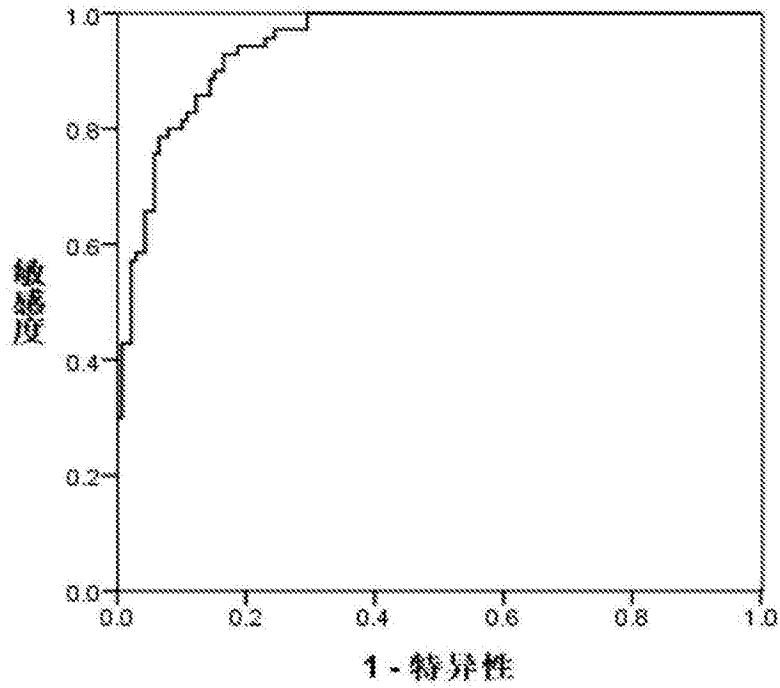


图2

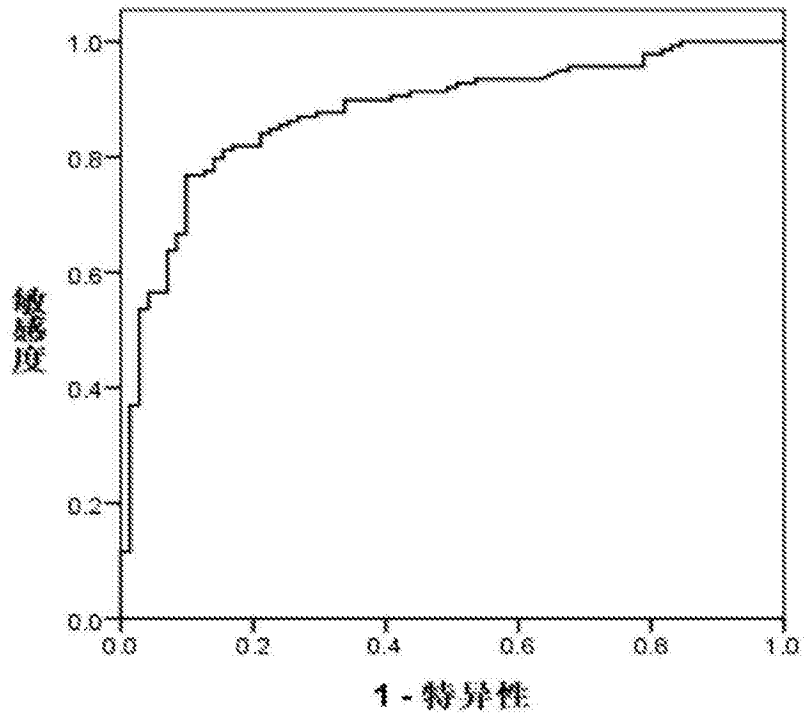


图3

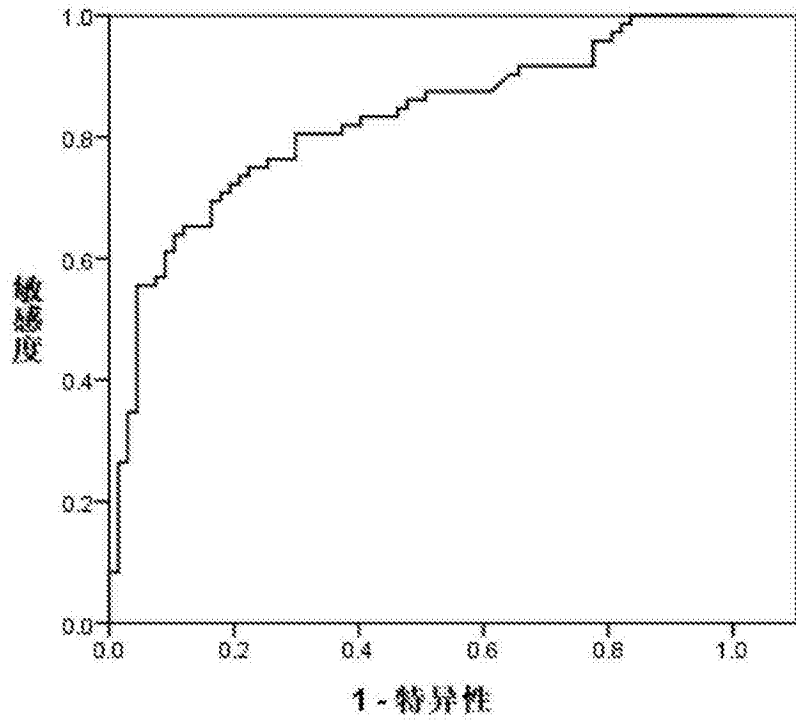


图4

专利名称(译)	人附睾蛋白4在制备系统性红斑狼疮性肾病诊断试剂或试剂盒中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104166003B</a>	公开(公告)日	2016-06-08
申请号	CN201410383959.8	申请日	2014-08-06
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	梁艳 杨再兴 仲人前 樊笑霞 王皓 叶伟民		
发明人	梁艳 杨再兴 仲人前 樊笑霞 王皓 叶伟民		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/6893 G01N2800/347		
代理人(译)	赵青		
其他公开文献	CN104166003A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，本发明提供了人附睾蛋白4(HE4)新的用途，特别是HE4蛋白在制备系统性红斑狼疮(SLE)患者狼疮性肾炎(LN)和慢性肾脏疾病(CKD)诊断试剂或试剂盒中的应用。本发明采用酶联免疫吸附试验检测HE4蛋白在SLE患者血清中的表达量，能够较敏感、特异地诊断SLE患者患LN和CKD的情况。基于血清HE4蛋白水平与SLE患者LN和CKD的这种相关性，以该蛋白作为生物标志物对其进行血清检测可以用于指导SLE患者LN和CKD的准确诊断。

	均数(pM)	标准差(pM)	中位数(pM)	范围(pM)
健康对照 (n=32)	42.76	6.85	40.57	34.5~61.1
SLE 不伴有 LN 和 CKD 组(n=67)	78.81	58.69	64.26	16.72~425.68
SLE 只伴有 LN 组(n=72)	210.71	189.55	161.37	42.81~1218.57
SLE 只伴有 CKD 组(n=4)	536.96	577.04	282.69	182.96~1399.49
SLE 同时伴 有 LN 和 CKD 组	1312.23	1700.02	613.80	156.44~7084.92