



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102154458 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

(21) 申请号 201110002146.6

(22) 申请日 2011.01.07

(66) 本国优先权数据

201010022648.0 2010.01.12 CN

(71) 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路 320 号

(72) 发明人 李立新 旷苗

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨昀

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 16 页

序列表 3 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于鉴定和治疗葛瑞夫兹氏病的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及用于鉴定和治疗葛瑞夫兹氏病 (GD) 的新方法和试剂盒。具体而言,本发明涉及一种用于 GD 分型、治疗方案选择和 / 或预后评估的试剂盒,所述试剂盒包含:(a) 检测生物样品中干扰素诱导基因表达水平的一种或多种试剂;和 (b) 容纳所述试剂的容器。本发明还提供了干扰素诱导基因作为 GD 分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估的分值标志物的用途。本发明为对 GD 的分型、临床用药及预后提供了具有指导意义的分子生物学指标,并为防治 GD 提供了新途径。

1. 一种试剂盒,其用于对象中葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估,所述试剂盒包含:

- (a) 检测生物样品中干扰素诱导基因表达水平的一种或多种试剂;
- (b) 容纳所述试剂的容器;以及
- (c) 任意的检测生物样品中抗 TSHR 抗体水平的一种或多种试剂。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述生物样品是:外周血单核细胞、甲状腺细胞或甲状腺组织。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述干扰素诱导基因是选自下组中的一种或多种:IFIT 1、IFIT 4、MX 1、OAS、LY6E 或 PRKR。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂是用于选自下组的检测方法的试剂:实时定量 PCR 检测、免疫组化检测或免疫印迹检测。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含临床上用于诊断或检测葛瑞夫兹氏病的其它试剂。

6. 干扰素诱导基因测试试剂或试剂组在制备用于葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估的试剂盒中的用途。

7. 干扰素诱导基因在作为葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估的分子标志物中的用途。

8. 一种对葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估的方法,所述方法包括:

- (a) 检测对象中干扰素诱导基因的表达水平;
- (b) 将 (a) 中检测的干扰素诱导基因的表达水平与正常对照进行比较;

若所述对象的干扰素诱导基因表达水平显著高于正常对照,则表明所述对象为 I 型干扰素敏感型,提示对该对象适于使用阻断 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因通路的药物或方法进行治疗或预后。

9. I 型干扰素 / 干扰素诱导基因信号通路阻断剂在制备治疗葛瑞夫兹氏病的药物中的用途。

10. 如权利要求 9 所述的用途,其特征在于,所述药物用于对 I 型干扰素敏感的葛瑞夫兹氏病患者。

用于鉴定和治疗葛瑞夫兹氏病的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学及医疗领域,更具体而言,涉及对葛瑞夫兹氏病的分型、临床用药及预后具有指导意义的分子生物学指标,以及防治葛瑞夫兹氏病的新途径。

背景技术

[0002] 葛瑞夫兹氏病 (Graves' disease, GD) 是一种典型的甲状腺自身免疫性疾病,其主要特征是甲亢和甲状腺肿大,有的患者还伴随有眼病和皮肤病。这种疾病具有器官特异性,主要是由于外周循环中存在着针对甲状腺刺激激素受体 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR) 的刺激性抗体,该抗体一旦结合 TSHR 之后,会刺激甲状腺细胞合成 cAMP,促进碘的摄入,从而分泌过量的甲状腺激素 (Thyroid hormone)。分泌甲状腺激素 (TH) 过多,会造成以机体的神经、循环及消化等系统兴奋性增高和代谢亢进为主要表现的临床综合征。

[0003] GD 疾病的产生原因至今还是不为人所知,但是有证据表明 GD 的发生是一个多因素共同作用的结果,基因因素和环境因素在疾病的发生中都起着重要作用。

[0004] 有研究表明,在高加索人种中,GD 的发生与 MHC II 类分子的血清学分型存在相关 [1, 2], 拥有 HLA-DR3 单倍型的个体更容易发生 GD [3]。另外,也有研究组观察到,有的 GD 患者的甲状腺细胞上异常表达 MHC II 类分子,并且能激活免疫细胞 [4-6]。遗传连锁分析也表明,GD 的发生与 HLA-DR3 的表达存在着强关联,这提示我们 HLA-DR3 的表达与 GD 的遗传易感有关,它的存在能够抑制 GD 的发生 [7-10]。甲状腺滤泡状细胞能够表达 MHC II 类分子表明甲状腺细胞本身也能向 T 细胞呈递抗原,从而促进了疾病的发生。

[0005] 此外,环境因素 (比如感染性因素) 也在 GD 的发生中发挥了作用。例如,在新诊断的 GD 患者中,有 36% 的个体中能够检测出一系列的针对细菌或者病毒的抗体,与之对应的是,正常人的这一比例只有 10%,这表明在 GD 症状出现之前,患者受到过细菌或者病毒的感染 [11]。更深入的研究显示,GD 患者体内存在的针对 B 型流感病毒抗体的频率相对于正常人群,也有显著的提高 [12]。最新研究也表明,病毒性感染因素与甲状腺疾病的发生密切相关 [13-15]。比如,当原代培养的甲状腺细胞被巨细胞病毒感染后,HLA-DR 分子的表达发生上调 [14]。大鼠甲状腺细胞感染呼肠孤病毒后,也能诱导表达 MHC II 类分子 [15]。

[0006] 正因为 GD 发生涉及到多种因素,本领域中对于 GD 患者的治疗和预后存在着一定的难度,具体表现在 GD 具有显著的生物学异质性,患者对治疗的反应可存在显著差异。

[0007] 因此,对 GD 患者进行分型对于其治疗和预后而言具有极为重要的意义。本领域中迫切需要寻找出针对 GD 患者的分型方法和分子标志物。

[0008] 现在人们普遍认为, I 型干扰素在某些自身免疫性疾病中发挥着关键作用 [16]。干扰素家族包括 I 型、II 型和最近发现的 III 型干扰素三个亚群。I 型干扰素亚群包括 IFN α 、IFN β 、IFN ω 、IFN τ 、IFN δ 、IFN κ 和 IFN ϵ 多种亚型,并且具有广泛的免疫调节功能。干扰素在天然免疫中发挥着重要作用,但是当它们分泌的时间和空间不恰当的话,也会对宿主本身造成危害 [17, 18]。

[0009] 在过去的 20 年中,已经有很多证据表明, I 型干扰素与甲状腺异常存在一定的关系。最先把 IFN α 与甲状腺异常联系起来,是在用 IFN α 治疗的黑色素瘤或者乳腺癌患者中有部分患者发生甲状腺异常 [19, 20]。此后,陆续有研究报道在接受 IFN α 治疗的患者中,甲状腺疾病的发生率大大提高了 [21, 22]。在几次对用重组人 IFN α 作为主要治疗手段治疗的丙型肝炎患者的预期研究中,针对 TSHR 抗体的产生率最高可以达到 40% [23-26]。以上证据表明, IFN α 促进了慢性病毒感染性患者中甲状腺疾病的发生。

[0010] 然而,现有技术中未揭示过 I 型干扰素(尤其是 IFN α)与 GD 发生之间的关系。

[0011] 因此,本领域迫切需要进一步明确 GD 发生中的更多相关因素,并寻找对 GD 患者进行分型和个性化治疗的新方法和手段。

发明内容

[0012] 本发明的目的之一正是提供一种 GD 患者分型的新指标和方法。本发明的另一目的是提供 GD 患者治疗的新方法。

[0013] 在本发明的第一方面中,提供了一种试剂盒,其用于对象中葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和/或预后评估,所述试剂盒包含:

[0014] (a) 检测生物样品中干扰素诱导基因表达水平的一种或多种试剂;和

[0015] (b) 容纳所述试剂的容器。

[0016] 任选地,所述试剂盒还包含检测 TSHR 抗体水平的一种或多种试剂。

[0017] 在本发明的一个实施方式中,所述生物样品是:外周血单核细胞、甲状腺细胞或甲状腺组织。

[0018] 在一个优选例中,所述生物样品是:新鲜获取的样品、固定的样品或石蜡包埋的样品。

[0019] 在另一优选例中,所述对象已经过临床治疗或未经过临床治疗,优选未经过临床治疗。

[0020] 在另一优选例中,所述对象已确诊或尚未确诊患有葛瑞夫兹氏病。

[0021] 在本发明的另一个实施方式中,所述干扰素诱导基因是选自下组中的一种或多种:IFIT 1、IFIT 4、MX 1、OAS、LY6E 或 PRKR。

[0022] 在一个优选例中,所述干扰素诱导基因是选自下组中的一种或多种:IFIT 1、IFIT 4 和 MX 1,优选为 IFIT 1。

[0023] 在本发明的另一个实施方式中,所述试剂是用于选自下组的检测方法的试剂:实时定量 PCR 检测、免疫组化检测或免疫印迹检测。

[0024] 在一个优选例中,所述试剂是用于实时定量 PCR 检测的试剂,其中包含干扰素诱导基因的特异性引物,优选所述引物对选自:SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;或 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。

[0025] 在本发明的另一个实施方式中,所述试剂盒还包含临床上用于诊断或检测葛瑞夫兹氏病的其它试剂。

[0026] 在一个优选例中,所述其它试剂用于检测样品中选自下组的一种或多种物质的水平:游离 T3、游离 T4、甲状腺刺激激素、抗甲状腺球蛋白抗体、抗甲状腺刺激激素受体抗体或抗甲状腺过氧化物酶抗体,优选抗甲状腺刺激激素受体抗体。

[0027] 在另一优选例中,所述试剂盒还包含选自下组的一种或多种物质:说明书、阳性对照物、阴性对照物、缓冲剂、稀释剂、或免疫助剂。

[0028] 在另一优选例中,所述说明书上记载了:当检测结果显示干扰素诱导基因表达水平显著高于正常水平,则表明所述对象为 I 型干扰素敏感型,并任选提示对该对象适于使用阻断 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因通路的药物或方法进行治疗或预后。

[0029] 在另一个优选例中,所述干扰素诱导基因表达水平是正常水平的 2-100 倍,优选 5-80 倍,更优选 10-50 倍。

[0030] 在另一优选例中,所述 I 型干扰素选自:INF α 、IFN β 、IFN ω 、IFN τ 、IFN δ 、IFN κ 或 IFN ϵ ,优选 INF α 。

[0031] 在本发明的第二方面中,提供了干扰素诱导基因测试试剂或试剂组在制备用于葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估的试剂盒中的用途。

[0032] 在本发明的第三方面中,提供了干扰素诱导基因在作为葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估的分子标志物中的用途。

[0033] 在一个优选例中,所述干扰素诱导基因是选自下组中的一种或多种:IFIT 1、IFIT 4、MX 1、OAS、LY6E 或 PRKR,优选 IFIT 1、IFIT 4 和 MX 1,更优选 IFIT 1 或 IFIT 4。

[0034] 在本发明的第四方面中,提供了一种对葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估的方法,所述方法包括:

[0035] (a) 检测对象中干扰素诱导基因的表达水平;

[0036] (b) 将 (a) 中检测的干扰素诱导基因的表达水平与正常对照进行比较;

[0037] 若所述对象的干扰素诱导基因表达水平显著高于正常对照,则表明所述对象为 I 型干扰素敏感型,提示对该对象适于使用阻断 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因通路的药物或方法进行治疗或预后。

[0038] 在一个优选例中,所述干扰素诱导基因表达水平是正常水平的 2-100 倍,优选 5-80 倍,更优选 10-50 倍。

[0039] 在另一个优选例中,所述方法还包括:

[0040] (c) 检测对象中抗甲状腺刺激激素受体抗体的水平;

[0041] (d) 将 (c) 中检测的抗甲状腺刺激激素受体抗体的水平与非 I 型干扰素敏感型对象中的水平进行比较;

[0042] (e) 若所述对象的抗甲状腺刺激激素受体抗体水平显著高于非 I 型干扰素敏感型对象中的水平,则进一步验证了所述对象为 I 型干扰素敏感型,且对该对象适于使用阻断 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因通路的药物或方法进行治疗或预后。

[0043] 优选所述对象的抗甲状腺刺激激素受体抗体水平比非 I 型干扰素敏感型对象中的水平提高 1-3 倍,优选 1.5-2.5 倍。

[0044] 在另一优选例中,所述步骤 (a) 是采用本发明的试剂盒进行的。

[0045] 在本发明的第五方面中,提供了 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因信号通路阻断剂在制备治疗葛瑞夫兹氏病的药物中的用途。

[0046] 在一个优选例中,所述 I 型干扰素选自:INF α 、IFN β 、IFN ω 、IFN τ 、IFN δ 、IFN κ 或 IFN ϵ ,优选 INF α 。

[0047] 在另一个优选例中,所述干扰素诱导基因选自:IFIT 1、IFIT 4、MX 1、OAS、LY6E

或 PRKR, 优选 IFIT 1、IFIT 4 和 MX 1, 更优选 IFIT 1。

[0048] 在另一个优选例中, 所述阻断剂选自: 抗 I 型干扰素的抗体、抗干扰素诱导基因表达产物的抗体、I 型干扰素或干扰素诱导基因的干扰 RNA 和 / 或抗干扰素诱导基因表达的物质, 优选抗 IFN α 抗体。

[0049] 在本发明的一个实施方式中, 所述药物用于对 I 型干扰素敏感的葛瑞夫兹氏病患者。

[0050] 在一个优选例中, 采用本发明的试剂盒或方法将葛瑞夫兹氏病患者分型为 I 型干扰素敏感型。

[0051] 本发明的其它方面由于本文的公开内容, 对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0052] 图 1: 通过定量 PCR 检测的 54 例 GD 患者和 20 例正常人外周血单核细胞 (PBMC) 中干扰素诱导基因 IFIT 1 (图 1a) 和 IFIT 4 (图 1b) 表达情况分析。以正常人对照中的诱导基因表达水平为基线, 数据分析应用的是 T 检验。

[0053] 图 2: IFIG 高表达的 GD 患者 (包括 33 位患者, 平均表达水平高于 2 倍) 与 IFIG 低表达的 GD 患者 (包括 21 位患者, 平均表达水平低于 2 倍) 血清中自身抗体 TSHR-Ab (抗甲状腺刺激激素受体抗体)、TPO-Ab (抗甲状腺过氧化物酶抗体) 和 TG-Ab (抗甲状腺球蛋白抗体) 的平均表达水平分析。

[0054] 图 3: 重组 IFN α 对甲状腺细胞中 IFIG 表达的刺激作用。由 GD 患者和非 GD 患者体内分离得到甲状腺细胞, 用 100U/ml 重组 IFN α 刺激后, 用定量 PCR 检测干扰素诱导基因 IFIT 1、IFIT 4 和 MX 1 的表达水平。其中:

[0055] (■) 表示单独用重组 IFN α 刺激; (▲) 表示同时加入重组 IFN α 和 IFN α 抗体 244 (20 μ g/ml); (▼) 表示加入的是对照抗体 G3; (◆) 表示, 只有培养液, 没有加干扰素刺激。

[0056] 图 4: 重组 IFN α 对 GD 患者甲状腺细胞表达 MHC II 类分子和 TSHR 的刺激作用。GD 患者和非 GD 甲状腺细胞在接受重组 IFN α 刺激后, 用定量 PCR 检测 HLA-DR3、HLA-DR5 和 TSHR 的基因表达水平。

[0057] 图 5: HLA-DR、TSHR 和 IFN α 受体在 GD 患者甲状腺组织中的表达。用定量 PCR 和免疫组化分别对 GD 患者和非 GD 甲状腺组织中上述分子的表达水平进行检测。

[0058] 图 5a: 两例 GD 患者和非 GD 甲状腺组织分离后, 用定量 PCR 检测其中的基因表达水平。

[0059] 图 5b-c: 通过免疫组化对 GD 患者和非 GD 甲状腺组织的冰冻切片进行 HLA-DR、TSHR 和 IFN α 受体染色的结果, 箭头表示阳性细胞。

具体实施方式

[0060] 本发明人经过长期而深入的研究发现: I 型干扰素和它们的诱导基因 (IFIG) 在 GD 疾病的免疫调节过程中发挥着重要作用。发明人通过进一步研究揭示了这些物质在 GD 患者中诱发 GD 的免疫调节原理, 从而为 GD 的分型和个性化治疗提供了新的分子标志物和方

法。在此基础上,本发明人完成了本发明。

[0061] 具体而言,作为细胞因子,干扰素能够在极低的浓度起作用。当用干扰素刺激效应细胞时,能够在几小时内诱导干扰素诱导基因的表达。在自身免疫性疾病,比如系统性红斑狼疮患者体内,干扰素诱导基因比如 IFIT 1、OAS、LY6E、IFIT 4、MX 1 和 PRKR 呈现高表达 [27,28]。虽然人们对大多数干扰素诱导基因的功能还不太了解,但是已经有研究表明,它们在宿主的防御体系内起着重要作用 [29]。

[0062] 在本次研究中,发明人在大量的 GD 患者中研究了干扰素及干扰素诱导基因的表达情况,并且把这些基因的表达情况与 GD 疾病的临床症状和血清学检测标准联系起来。同时,发明人还用 IFN α 刺激了 GD 患者和正常人的甲状腺细胞,观察 IFN α 诱导这些细胞表达 TSHR 和 MHC II 类分子的情况。实验数据表明,在大部分 GD 患者的外周淋巴细胞中,存在着干扰素诱导基因的高表达,同时,干扰素诱导基因的高表达与抗 TSHR 抗体的高水平存在正相关。并且,数据还显示 I 型干扰素可诱导 GD 患者中 TSHR 和 MHC II 类分子的高表达。

[0063] 这些数据显示了:I 型干扰素可在部分患者甲状腺细胞中通过诱导干扰素诱导基因 (IFIG) 的高表达,使得 GD 患者甲状腺细胞高表达 MHC II 类分子和 TSHR,从而导致这些患者产生 GD。

[0064] 本发明揭示了 I 型干扰素和它们的诱导基因在 GD 疾病的免疫调节过程中发挥着重要作用,这就解释了 I 型干扰素及其诱导基因推动 GD 的病理性免疫过程的原因。

[0065] 分子标志物

[0066] 在本发明中,“分子标志物”、“葛瑞夫兹氏病治疗方案选择和 / 或预后指标的分子标志物”可互换使用,均表示本发明中可用于指示 GD 治疗和 / 或预后效果、并对其临床治疗方案选择具有指导意义的分子。本发明的分子标志物为 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因信号转导通路中的干扰素诱导基因或其表达产物,例如 IFIT 1、IFIT 4 或 MX 1 等。

[0067] 根据本发明人的研究,可根据 GD 患者中干扰素诱导基因水平的高低,将其划分为“I 型干扰素敏感型”或“非 I 型干扰素敏感型”。如本文所用,术语“I 型干扰素敏感型”是指 GD 患者生物样品中干扰素诱导基因表达水平较正常对照显著提高,例如提高 2-100 倍,5-80 倍,10-50 倍。术语“非 I 型干扰素敏感型”是指 GD 患者生物样品中干扰素诱导基因表达水平与正常对照相比未发生显著变化或变化小于 2 倍(例如 1.7 倍)。

[0068] 通过比较发明人还发现,所述“I 型干扰素敏感型”患者中的抗 TSHR 抗体水平与“非 I 型干扰素敏感型”患者相比有显著提高,例如提高 1-3 倍、1.5-2.5 倍。该抗 TSHR 抗体水平也可作为进一步确定“I 型干扰素敏感型”患者的分子生物学指标之一。

[0069] 治疗方案选择和预后评估

[0070] 通过本发明的上述分子标志物,可对 GD 患者进行进一步分型,对其预后评估和治疗方案选择具有指导意义。

[0071] 本发明人的研究表明:在“I 型干扰素敏感型”GD 患者中,I 型干扰素诱导干扰素诱导基因 (IFIG) 高表达,从而激活 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因信号通路,导致下游的抗 TSHR 抗体高表达,由此造成此类患者中发生 GD。

[0072] 因此,当检测结果显示干扰素诱导基因表达水平显著高于正常水平,则表明所述对象为 I 型干扰素敏感型,提示对该对象使用阻断 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因通路的药物或方法进行治疗或预后可获得较佳的效果。

[0073] 相应的,本发明还提供了一种新的 GD(优选“I 型干扰素敏感型”)治疗方法,即给予 GD 患者 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因通路阻断剂。所述的通路阻断剂可包括(但不限于):抗 I 型干扰素的抗体、抗干扰素诱导基因表达产物的抗体、I 型干扰素或干扰素诱导基因的干扰 RNA 和 / 或抗干扰素诱导基因表达的物质,优选抗 IFN α 抗体。

[0074] 试剂盒

[0075] 本发明中还提供了用于对象中葛瑞夫兹氏病的分型、治疗方案的选择和 / 或预后评估,所述试剂盒包含:(a) 检测生物样品中干扰素诱导基因表达水平的一种或多种试剂;和 (b) 容纳所述试剂的容器。

[0076] 生物样品可以是获自 GD 患者的新鲜组织、固定(例如福尔马林、丙酮)或石蜡包埋组织、体液、血液或细胞等,优选为新鲜组织、福尔马林固定或石蜡包埋组织。这些样品可为切片、涂片、悬液、溶液等适于检测的各种形式存在,例如在结合免疫组织化学的检测中,优选采用石蜡切片标本。优选在采集样品前,所述患者未经临床治疗。

[0077] 用于本发明中的检测方法可采用本领域中常用的检测方法,只要该方法可检测出干扰素诱导基因表达水平的明显变化,这些方法包括但不限于:实时定量 PCR 法、免疫组织化学检测法、蛋白质印迹法、ELISA 法、流式细胞法、生物芯片法等定量检测方法,本领域技术人员可根据需要进行选择。

[0078] 可根据多种检测原理和方法,按照需要在试剂盒中配备检测干扰素诱导基因表达水平的试剂或试剂组。在本发明中,“试剂组”是指包含了检测所需的多种试剂的试剂组合。

[0079] 此外,本发明的试剂盒还可根据需要包括:容器、对照物(包括阳性或阴性对照)、使用说明书、缓冲剂、免疫助剂等,本领域技术人员可根据具体情况对其进行选择。

[0080] 本发明的优点

[0081] 1. 揭示了干扰素诱导基因(例如 IFIT1 和 IFIT4)可用于 GD 分型,可用作 GD 临床诊断、用药和预后的分子标志物;

[0082] 2. 证明了 I 型干扰素(例如 IFN α)及干扰素诱导基因在 GD 疾病的发生中所起的重要作用,提示通过阻断 I 型干扰素 / 干扰素诱导基因信号通路可用于治疗 GD。

[0083] 实施例

[0084] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下面实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如《分子克隆实验手册》(Molecular cloning:A laboratory manual,3rd ed., Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory,2001)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0085] 除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0086] 试验方法与材料

[0087] 1. 患者和对照的选用

[0088] 此项研究从 2006 年 3 月一直持续到 2007 年 3 月,研究组陆续从上海交通大学附属瑞金医院收集到 54 例初发甲亢患者样本。所有患者都签订了知情同意书并且整个项目通过了伦理委员会的审批。

[0089] 所选用的初发甲亢病例,都符合以下条件:都没有经过药物治疗;具有甲亢的典

型病症,比如怕热、疲劳、食欲增加、多汗和消瘦等;甲状腺肿大;临床诊断包括血清 TSH 增加,甲状腺激素含量增加。

[0090] 另外,还收集了 20 例正常人对照的样本。所有样本都包括收集血清和外周血单核细胞 (PBMC) 的 RNA 抽提。

[0091] 2. PBMC(外周血单个核细胞)和血清样本

[0092] 所有血样都在采集后马上进行分析或处理,全程在 4℃ 条件下才进行操作。每个样本包含 5 毫升用肝素抗凝的血液,离心后分离得到血浆。离心剩下的细胞用 Ficoll 密度梯度离心 (300g, 20 分钟) 分离得到 PBMC。

[0093] 分离得到的 PBMC 经过裂解后,用 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA) 抽提得到总 RNA。分离得到的血浆一部分保存在 -80℃,另一部分用检测试剂盒对 TSHR-Ab (RSR Ltd, UK)、游离 T3(Abbott Laboratories, IL)、游离 T4(Abbott Laboratories, IL)、TSH(Abbott Laboratories, IL)、TG-Ab 和抗 -TPO-Ab (Biomerica, Inc. CA) 水平进行临床检验。

[0094] 3. 定量 PCR 检测干扰素诱导基因的表达

[0095] 为了检测 GD 患者和正常人对照 PBMC 中干扰素通路的活化情况,用定量 PCR 的方法,对这些细胞中的 IFIT(包括 IFIT 1、IFIT 4、MX 1) 进行检测。每微克总 RNA 用 Reverse Transcriptase System(Promega, WI) 在 20 μl 体系中反转成 cDNA。把反转体系稀释到 100 μl(即 1 : 5 稀释),取 0.5 微升 cDNA(即稀释后的反转体系)加入 5 μl SYBR green reagent(Applied Biosystems, Foster City, CA) 和 10 μM 的正向和反向引物进行实时定量 PCR 反应 (ABI Prism 7900 Sequence Detector i. 50℃ 2 分钟 ii 95℃ 5 分钟 iii 95℃ 15 秒 iv. 55℃ 30 秒 v. 72℃ 30 秒)。以 RP 13A 基因作为管家基因内参。在每个循环,IFIT 1、IFIT 4、MX 1 和 RP13A 的荧光信息都被自动收集 (ABI 7900),从而得到一个 Ct 值。Ct 值的大小,与基因的含量成反比。

[0096] 用于上述实时定量 PCR 反应的引物序列如表 1 所示:

[0097] 表 1. 用于 IFIT 实时定量 PCR 检测的引物

[0098]

基因	引物	序列	SEQ ID NO.
IFIT 1	正向	5' -CCTCCTGGGTTTCGTCTATAA-3'	1
	反向	5' -TCAAAGTCAGCAGCCAGTCTCA-3'	2
IFIT 4	正向	5' -ATCAGCGCTACTGCAACCTT-3'	3
	反向	5' -TGCAGCAGATCTCCATTCTG-3'	4
MX 1	正向	5' -GGTGGTCCCCAGTAATGTGG-3'	5
	反向	5' -GCCATGCTGAGAGCCTCTGT-3'	6
RP13A	正向	5' -CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3'	7

	反向	5' -TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3'	8
--	----	----------------------------------	---

[0099] 4. 临床数据的采集

[0100] 疾病的活动情况和疾病相关的组织损伤在病人就诊的时候,由主治医师评估并记录。这些临床数据还根据病历的记录和临床检测数据的校正。

[0101] 5. 甲状腺组织和甲状腺细胞的分离

[0102] GD 患者的甲状腺组织由甲亢患者的手术切除中得到。非 GD 患者的甲状腺组织由结节病人的手术摘除中取得。患者在手术摘除中,都签订了知情同意书,整个研究还得到了上海交通大学伦理委员会的监督。取下的甲状腺组织分别用来提取总 RNA 或者用于分离甲状腺细胞。

[0103] 为了分离甲状腺细胞,将甲状腺组织机械切割成小块,然后用 I 型胶原酶 (Invitrogen, CA) 在 HBSS (Hanks balanced saline solution, Invitrogen) 培养液中消化 (37°C, 20 小时)。为了除去非贴壁细胞,将消化后的组织细胞在含有 10% FBS (Hyclone)、25mM HEPES (Invitrogen)、2mM L-谷氨酸 (Invitrogen)、100U/ml 青霉素 (Invitrogen) 和 100 μg/ml 链霉素 (Invitrogen) 的 RPMI-1640 (Hyclone, UT) 中培养过夜,然后用培养液充分冲洗,洗掉没有贴壁的细胞。在贴壁细胞中加入新鲜 1640 培养基继续培养 6 天,得到甲状腺细胞。所得细胞用抗甲状腺球蛋白抗体 (PBL biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) 检测,纯度超过 98%。

[0104] 6. IFN α 刺激实验

[0105] 分离得到的甲状腺细胞经过胰酶消化后,在 RPMI 1640 (含 10% FCS、2mM 谷氨酸、25mM HEPES、100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素) 中稀释到 10⁵ 个细胞/ml, 37°C 培养 18 小时 (5% CO₂)。待细胞完全贴壁后,小心的倒掉培养液,并用培养液冲洗几次,去除非贴壁细胞。然后,分别加入 0U/ml 或者 100U/ml 的 IFN α , 其中含有 / 不含有 20 μg/ml 抗 IFN α 抗体 244。以无关抗体 IgG1 用作对照抗体。继续培养 24 小时后,用 RNeasy Mini Kit 提取总 RNA, 然后反转录成 cDNA (反转录系统如 3 中所述), 并用实时定量 PCR 法 (方法如 3 中所述) 检测 MHC II 类分子和 TSHR。

[0106] 抗人 IFN α 抗体 244 的制备: 根据常规方法, 用人的 IFN α 2a 蛋白免疫小鼠后, 得到的杂交瘤细胞, 由该细胞分泌得到抗体 244。分泌的抗体用 A Sepharose 柱分离纯化, 再用离子交换柱 (Pharmacia, N. Y.) 根据厂商提供的说明书操作, 得到纯的抗体。该抗体与市售的同类产品 (例如 INTERFERON ALFA-2B, Schering-Plough) 的结构与作用相同。

[0107] 实时定量 PCR 中所用引物序列如表 2 所示:

[0108] 表 2. 用于 MHC II 类分子和 TSHR 实时定量 PCR 检测的引物

[0109]

基因	引物	序列	SEQ ID NO.
HLA-DR3	正向	5' -GGAACGGCCAGGAAGAGAAG-3'	9
	反向	5' -CCGAGGAAGTCTTCTAGCATCA-3'	10

HLA-DR5	正向	5' -GCCTGACGCTGAGTACTGGAA-3'	11
	反向	5' -AGCTCTCACCAACCCCGTAGT-3'	12
TSHR	正向	5' -GCTCCTCATCGCCTCTGTAGA-3'	13
	反向	5' -TGAAGAAACCAGCCGTGTTG-3'	14

[0110] 7. 冰冻切片和免疫组化

[0111] 取手术中分离的组织块 (0.5cm²) 马上进行冷冻。对冷冻组织进行 5 μ M 连续切片后,将冷冻切片在丙酮中固定 10 分钟,干燥后用山羊血清室温封闭 2 小时,然后加入抗 MHC II 类抗体 (PBL biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) 或者 IFN 受体抗体 (Biomeda Corp., Foster City, CA) 做一抗 (加入量分别为 100 μ l), 4℃ 孵育过夜。第二天洗掉抗体,用 AP 偶联的抗小鼠抗体 (PBL biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) 做二抗 (100 μ l), 室温孵育 2 小时,对照为无关抗体 IgG。显色后用苏木精复染,封片观察。

[0112] 实施例 1. 干扰素诱导基因在 GD 患者外周血单个核细胞 (PBMC) 中的表达

[0113] 为了研究 IFN α 或者干扰素诱导基因在 GD 患者外周血白细胞中的表达情况,采用灵敏的实时定量 PCR 方法 (参照“试验方法与材料 3”) 检测了 54 例 GD 患者和 20 例正常人外周血白细胞中的干扰素诱导基因 IFIT 1 (图 1a, 检测全部 54 例 GD 患者样本) 和 IFIT 4 (图 1b, 仅检测了其中 30 例 GD 患者样本) 表达情况。

[0114] 所有的 GD 患者都来自同一种族,并且没有经过抗甲状腺药物治疗。以正常人对照中的诱导基因表达水平为基线,数据分析应用的是 T 检验。选取 IFIT 1 和 IFIT 4 作为检测目标,是因为在诸如由 IFN α 导致的自身免疫性疾病系统性红斑狼疮 (SLE) 中,这两个基因被认为是最重要的干扰素诱导基因 [27]。

[0115] 数据表明, IFIT 1 和 IFIT 4 的 mRNA 水平在部分 GD 患者的 PBMC 中呈现高表达 (图 1)。对于 IFIT 1, 54 例 GD 患者中,有 33 例 (60%) 呈现高表达,并且平均表达水平相比正常人提高了 12 倍 ($p < 0.05$)。并且, IFIT 1 高表达的患者中, IFIT 4 也发生高表达。没有在任何样本中检测到游离 IFN α 蛋白的存在。

[0116] 实施例 2. 干扰素诱导基因 IFIG 的表达水平与 GD 患者血清中抗 TSHR 抗体水平存在正相关

[0117] 为了比较 IFIG 的表达水平与 GD 患者血清中自身抗体水平,根据 IFIT 1 的表达水平把 GD 患者分成两组,一组是 IFIT 1 高表达组 (平均表达水平高于 2 倍,包括 33 位患者),另外一组是 IFIT 1 低表达组 (平均表达水平低于 2 倍,包括 21 位患者)。IFIT 1 高表达组的 IFIT 1 表达水平平均为 18.3 (2-74.2), IFIT 1 低表达组的 IFIT 1 表达水平平均为 1 (0.2-1.7)。

[0118] 表 3 显示了这两组患者的基本数据及检测结果,其中共包括 42 位女性患者和 12 位男性患者。这两组患者的平均年龄分别为 31 岁 (13-57) 和 34 岁 (20-59 岁),平均患病时间是 2 个月和 3 个月。参照“试验方法与材料 2”中所述方法,测定并比较了两组 GD 患者血清中自身抗体如 TSHR-Ab、TPO-Ab 和 TG-Ab 的平均表达水平。

[0119] 表 3. IFIG 高表达组和低表达组患者的基本数据及血清生化检测结果

[0120]

特性	IFIG低表达组 < 2倍, n=21 (平均值±SD)	IFIG高表达组 > 2倍, n=33 (平均值±SD)	正常参考值
性别-男/女	4/17	8/25	--
年龄-(岁) 平均值 范围	31 13-57	34 20-59	-- --
吸烟 (%)	0	2/33 (6%)	--
甲亢相关眼病 有 无	0 21	0 33	-- --
眼球突出	0	1/33 (3%)	--
游离T3 (pmol/L)	21.13±13.45	24.17±14.49	2.62-6.48
游离T4 (pmol/L)	34.31±11.94	43.05±20.50	9.01-19.04
TSH (uIU/ml)	0.01±0.01	0.02±0.06	0.35-4.94
TG抗体 (%)	37.81±28.77	32.09±31.51	0-30
TSHR抗体 (U/L)	8.04±11.27	17.91±14.18	<1.5
TPO抗体 (pmol/L)	129.72±126.97	148.28±144.62	2.62-6.48

[0121]

IFIT 1表达(倍数) 平均值 范围	1 0.2-1.7	18.3 2-74.2	-- --
---------------------------	--------------	----------------	----------

[0122] 由上述结果并未观察到 IFIG 的表达水平与患者性别或者年龄之间的关系。在这两组患者中, IFIG 高表达组的 TSHR 抗体平均水平为 $17.91 \pm 14.18 \text{ U/L}$ ($n = 33$), 显著高于 IFIG 低表达组的 $8.04 \pm 11.27 \text{ U/L}$ ($n = 21$) ($p = 0.01$) (图 2)。该结果明确表明: IFIG 的表达水平与 GD 患者体内 TSHR 抗体水平呈正相关。

[0123] 与之相反的是, 通过上述结果并未观察到 IFIG 的表达水平与 GD 患者体内甲状腺素 T3 或者 T4 之间存在关联 (表 3)。两组患者之间的血清 TSH 水平 (浓度分别为 0.01 uIU/mL 和 0.02 uIU/mL)、抗甲状腺球蛋白抗体 (比例分别为 37.81% 和 32.09%) 和抗 TPO 抗体 (浓度分别 129.72 pmol/L 和 148.28 pmol/L) 都没有显著差异。

[0124] 实施例 3. IFN α 能够诱导干扰素诱导基因在甲状腺细胞中的表达

[0125] 为了与实施例 2 中对 GD 患者 PBMC 的基因研究做比较, 我们分离培养了 3 例 GD 患者和 3 例正常甲状腺组织的细胞, 经过 100 U/mL 的 IFN α 刺激 24 小时后, 用实时定量 PCR 的方法对 IFIT 1、IFIT 4 和 MX 1 的表达水平做了分析 (参照“试验方法与材料 2”)。

[0126] 试验表明, IFN α 能够快速诱导 IFIG 的表达 (图 3)。在所检测的 3 个基因中, IFIT 1 受 IFN α 的诱导水平最强, 最高达到 158 倍。IFIT 4 和 MX 1 的受诱导水平分别为 81 倍

和 36 倍。并且,IFIG 的诱导水平能够被 IFN α 抗体完全阻断(图 3)。我们还能看到,正常甲状腺细胞中 IFIG 的受诱导水平要显著高于 GD 患者甲状腺细胞。

[0127] 结果表明:IFN α 能够诱导甲状腺组织中 IFIG 的表达。GD 患者的甲状腺细胞已受到过 IFN α 的刺激,所以对于 IFN α 的再刺激没有未受 IFN α 刺激的正常甲状腺组织那么明显。

[0128] 实施例 4. IFN α 能诱导 IFIT 1 高表达的 GD 患者甲状腺细胞中 MHC II 类分子和 TSHR 的表达

[0129] 为了研究 IFN α 在 GD 发生中起的作用,我们对比了 IFIT 1 高表达的 GD 患者和正常甲状腺组织在受到 IFN α 刺激后, MHC II 类分子 (HLA-DR3 和 HLA-DR5) 和 TSHR 的表达水平。

[0130] 实验结果显示:重组 IFN α 能够诱导甲状腺细胞中 HLA-DR3、HLA-DR5 和 TSHR 的表达(图 4)。GD 患者甲状腺细胞在受到 100U/ml 的 IFN α 刺激 12 小时(总共刺激时间为 24 小时,所示数据为刺激 12 小时时的数据)后,HLA-DR3、HLA-DR5 和 TSHR 的表达水平分别升高了 1.5 倍、2.3 倍和 2.8 倍,存在显著差异。与之相反的是,非 GD 患者甲状腺细胞在受到 IFN α 刺激后,则基本不表达 MHC II 类分子和 TSHR。HLA-DR3、HLA-DR5 的本底表达水平在 GD 患者体内要显著高于非 GD 患者(数据未显示)。

[0131] 以上结果表明:IFN α 能够调节 GD 患者甲状腺细胞中 MHC II 类分子和 TSHR 的表达。

[0132] 实施例 5. IFIT 1 高表达的 GD 患者的甲状腺组织高表达 HLA-DR、TSHR 和 IFN α 受体

[0133] 为了研究 IFIT 1 高表达的 GD 患者甲状腺组织中是否高表达 MHC II 类分子和 TSHR,我们分别用实时定量 PCR 和免疫组化的方法对 GD 患者和非 GD 甲状腺组织中上述分子的表达情况进行了分析。

[0134] 实时定量 PCR 的结果显示,相比于非 GD 患者,GD 患者的甲状腺组织中高表达 HLA-DR3、HLA-DR5 和 TSHR(图 5a)。免疫组化的结果也显示,在 GD 患者甲状腺组织中,阳性细胞率(平均一个视野里 20 个)要显著高于非 GD 甲状腺组织(整张片子就一个阳性细胞)(图 5b 和 5c)。对于 IFN α 受体水平的研究结果显示出同样的趋势(图 5b 和 5c)。

[0135] 结果讨论

[0136] 在本研究中,本发明人发现在 60% 的 GD 患者中,IFIG 出现高表达,并且 IFIG 的表达水平与血清中的 TSHR-Ab 水平成正比。重组 IFN α 可在非 GD 和 GD 患者的甲状腺细胞中诱导 IFIG,而在 GD 患者的甲状腺细胞中则可进一步引起 MHC II 类分子 (HLA-DR2 和 HLA-DR3) 和 TSHR 的表达。

[0137] 以上数据表明,IFN α /IFIG 通路在 GD 中起着活化因子的作用。虽然 GD 患者中 IFIGs 表现出高表达,我们也没能在 GD 患者血清中检测出游离的 IFN α ,这正说明了 IFIGs 在 GD 发病中起到了重要作用。IFN α 与其受体结合后,能诱导多种基因的表达,包括几个大的 GTPases 和包含 IFITs 结构域的蛋白,但是这些蛋白的功能现有技术中知之甚少。以前进行的研究,基本都集中在这些基因的抗病毒作用中。比如,一种 IFN 诱导的 GTPases 蛋白 MX,就能抑制流感和 VSV 病毒的传播 [30,31];病毒 RNA 能有诱导 OAS 的表达,从而阻断病毒和宿主本身的 RNAa 转录 [32]。虽然 IFIGs 在宿主抗病毒中发挥了重要作用,同时也可

能促进人类疾病的发生。

[0138] 最近的研究也表明, ITIGs 中的 OAS、MX 1 和 IFIT 1 与自身免疫性疾病系统性红斑狼疮 (SLE) 的发病存在关联, 其中 IFIT 1 可能通过与 Rho/Rac 作用, 激活 Rho 从而促进了 SLE 的发生 [27, 33]。虽然 IFIGs 能够诱导 MHC II 类分子和 TSHR 的表达的原因还不是很清楚, 但是我们有理由相信, 它们在 GD 的发病中, 发挥了重要作用。

[0139] GD 的发病机理和自身抗体的产生我们还不是很了解, 但是已经有证据表明感染性因素可能会促进疾病的发生 [11-13]。很多的因子, 包括病毒、LPS[37, 38]、天然或合成的 RNA 都能促进内源性 IFN 的表达 [39, 40], 以前的研究表明被感染的细胞通过分泌或者旁分泌来警告旁边的细胞 [34-36]。因此, GD 患者甲状腺组织中 IFIGs 的表达可能是由于感染因素引起。已经有研究表明 IFN α 在自身免疫性疾病中起到重要作用 [17]。在 SLE 中, 自身免疫可能的两种途径分别是: 过量表达的 IFN 通过激活 DC 引起自身免疫性 T, B 细胞的活化; 和包含核酸的免疫复合物通过与 TLR-7 或者 TLR- 的结合激活 DC 的途径。

[0140] TSH 通过与其受体 TSHR 的结合导致甲状腺细胞的增殖和甲状腺激素的分泌。在 GD 患者中, TSHR 自身抗体能模拟 TSH 的功能, 从而导致甲状腺激素的过量分泌。临床上, TSHR 抗体的检测对于预测用抗甲状腺素药物的治疗效果很有效 [41-44]。由于抗甲状腺药物具有免疫抑制作用, 并且用药之后, 甲状腺自身抗原表达的降低, 当 GD 患者用抗甲状腺药物治疗后 TSHR 抗体水平会下降 [25, 43, 45]。在这次研究中, IFN α /IFIGs 的水平与 TSHR 抗体水平呈正比, 这提示 IFIGs 与 GD 疾病的活动存在相关, 也使之成为疾病预测的一个指标。

[0141] 有趣的是, IFN/IFIGs 的激活能诱导 MHC II 类分子的表达, 并且相对于非 GD, GD 患者甲状腺受到 IFN 刺激后, MHC II 类分子表达程度更高。MHC II 类分子在自身抗原呈递和免疫调剂方面起着重要作用。通常情况下, HLA-DR 的表达只限于 B 细胞、DC、巨噬细胞等抗原呈递细胞, 而人类内分泌细胞在通常条件下, 不表达 MHC II 类分子。HLA-DR 的识别是免疫激活的重要条件。GD 患者甲状腺细胞表达的 HLA-DR 可能会刺激 T 细胞活化。因此, 临床上阻断 IFN α /IFIGs, 能成为控制 GD 自身免疫的手段之一。

[0142] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文章被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0143] 参考文献

[0144] 1. Farid, N. R., Sampson, L., Noel, E. P., Barnard, J. M., Mandeville, R., Larsen, B., Marshall, W. H., 和 Carter, N. D. 1979. A study of human leukocyte D locus related antigens in Graves' disease. *J. Clin. Invest.* 63 :108-113.

[0145] 2. Farid, N. R., 和 Thompson, C. 1986. HLA and autoimmune endocrine disease 1985. *Mol. Biol. Med.* 3 :85-97.

[0146] 3. Farid, N. R., Stone, E., 和 Johnson. G. 1980. Graves' disease and HLA: clinical and epidemiologic associations. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 13 :535-544.

[0147] 4. Hanafusa, T., Pujol-Borrell, R., Chiovato, L., Russell, R. C., Doniach, D., 和 Bottazzo, G. F. 1983. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. *Lancet* 2 :1111-1115.

- [0148] 5. Pujo-Borrell, R., Hanafusa, T., Chiovato, L., 和 Bottazzo, G.F. 1983. Lectin-induced expression of DR antigen on human cultured follicular thyroid cells. *Nature* 304 :71-73.
- [0149] 6. Sospedra, M., Obiols, G., Babi, L.F., Tolosa, E., Vargas, F., Roura-Mir, C., Lucas-Martin, A., Ercilla, G., 和 Pujol-Borrell, R. 1995. Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease. A primary defect? *J. Immunol.* 154 :4213-4222.
- [0150] 7. Bech, K., Lumholtz, B., Nerup, J., Thomsen, M., Platz, P., Ryder, L.P., Svejgaard, A., Siersbaek-Nielsen, K., Hansen, J.M., 和 Larsen, J.H. 1977. HLA antigens in Graves' disease. *Acta. Endocrinol. (Copenh)* 86 :510-516.
- [0151] 8. Zamahi, M., Spaepen, M., Bex, M., Bouillon, R., 和 Cassiman, J.J. 2000. Primary role of the HLA class II DRB1*0301 allele in Graves disease. *Am. J. Med. Genet.* 95 :432-437.
- [0152] 9. Shields, D.C., Ratanachaiyavong, S., McGregor, A.M., Collins, A., 和 Morton, N.E. 1994. Combined segregation and linkage analysis of Graves disease with a thyroid autoantibody diathesis. *Am. J. Hum. Genet.* 55 :540-554.
- [0153] 10. Roman, S.H., Greenberg, D., Rubinstein, P., Wallenstein, S., 和 Davies, T.F. 1992. Genetics of autoimmune thyroid disease: lack of evidence for linkage to HLA within families. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74 :496-503.
- [0154] 11. Valtonen, V.V., Ruutu, P., Varis, K., Ranki, M., Malkamaki, M., 和 Makela, P.H. 1986. Serological evidence for the role of bacterial infections in the pathogenesis of thyroid diseases. *Acta. Med. Scand.* 219 :105-111.
- [0155] 12. Joasoo, A., Robertson, P., 和 Murray, I.P. 1975. Letter: Viral antibodies in thyrotoxicosis. *Lancet* 2 :125.
- [0156] 13. Testa, A., Castaldi, P., Fant, V., Fiore, G.F., Grieco, V., De Rosa, A., Pazardjiklian, M.G., 和 De Rosa, G. 2006. Prevalence of HCV antibodies in autoimmune thyroid disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 10 :183-186.
- [0157] 14. Khoury, E.L., Pereira, L., 和 Greenspan, F.S. 1991. Induction of HLA-DR expression on thyroid follicular cells by cytomegalovirus infection in vitro. Evidence for a dual mechanism of induction. *Am. J. Pathol.* 138 :1209-1223.
- [0158] 15. Neufeld, D.S., Platzer, M., 和 Davies, T.F. 1989. Reovirus induction of MHC class II antigen in rat thyroid cells. *Endocrinology* 124 :543-545.
- [0159] 16. Banchereau, J., 和 Pascual, V. 2006. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25 :383-392.
- [0160] 17. Vilcek, J. 2006. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity* 25 :343-348.
- [0161] 18. Stetson, D.B., 和 Medzhitov, R. 2006. Type I interferons in host defense. *Immunity* 25 :373-381.
- [0162] 19. Burman, P., Totterman, T.H., Oberg, K., 和 Karlsson, F.A. 1986.

Thyroid autoimmunity in patients on long term therapy with leukocyte-derived interferon. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 :1086-1090.

[0163] 20. Fentiman, I. S., Thomas, B. S., Balkwill, F. R., Rubens, R. D., 和 Hayward, J. L. 1985. Primary hypothyroidism associated with interferon therapy of breast cancer. *Lancet* 1 :1166.

[0164] 21. Prummel, M. F., 和 Laurberg, P. 2003. Interferon-alpha and autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 13 :547-551.

[0165] 22. Koh, L. K., Greenspan, F. S., 和 Yeo, P. P. 1997. Interferon-alpha induced thyroid dysfunction: three clinical presentations and a review of the literature. *Thyroid* 7 :891-896.

[0166] 23. Mandac, J. C., Chaudhry, S., Sherman, K. E., 和 Tomer, Y. 2006. The clinical and physiological spectrum of interferon-alpha induced thyroiditis: toward a new classification. *Hepatology* 43 :661-672.

[0167] 24. Preziati, D., La Rosa, L., Covini, G., Marcelli, R., Rescalli, S., Persani, L., Del Ninno, E., Meroni, P. L., Colombo, M., 和 Beck-Peccoz, P. 1995. Autoimmunity and thyroid function in patients with chronic active hepatitis treated with recombinant interferon alpha-2a. *Eur. J. Endocrinol.* 132 :587-593.

[0168] 25. Carella, C., Mazziotti, G., Morisco, F., Mangarella, G., Rotondi, M., Tuccillo, C., Sorvillo, F., Caporaso, N., 和 Amato, G. 2001. Long-term outcome of interferon-alpha-induced thyroid autoimmunity and prognostic influence of thyroid autoantibody pattern at the end of treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 :1925-1929.

[0169] 26. Watanabe, U., Hashimoto, E., Hisamitsu, T., Obata, H., 和 Hayashi, N. 1994. The risk factor for development of thyroid disease during interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.* 89 :399-403.

[0170] 27. Bennett, L., Palucka, A. K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchereau, J., 和 Pascual, V. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.* 197 :711-723.

[0171] 28. Crow, M. K., 和 Wohlgemuth, J. 2003. Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis. Res. Ther.* 5 :279-287.

[0172] 29. de Veer, M. J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J. M., Silverman, R. H., 和 Williams, B. R. 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukoc. Biol.* 69 :912-920.

[0173] 30. Arnheiter, H., 和 Haller, O. 1988. Antiviral state against influenza virus neutralized by microinjection of antibodies to interferon-induced Mx proteins. *EMBO J.* 7 :1315-1320.

[0174] 31. Pavlovic, J., Schroder, A., Blank, A., Pitossi, F., 和 Staeheli, P. 1993. Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. *Ciba Found*

Symp. 176 :233-243.

[0175] 32. Stark, G. R. , Kerr, I. M. , Williams, B. R. , Silverman, R. H. , 和 Schreiber, R. D. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67 :227-264.

[0176] 33. Ye, S. , Pang, H. , Gu, Y. Y. , Hua, J. , Chen, X. G. , Bao, C. D. , Wang, Y. , Zhang, W. , Qian, J. , Tsao, B. P. , 等 . 2003. Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFIT 1. *Rheumatology (Oxford)* 42 :1155-1163.

[0177] 34. Isaacs, A. , 和 Lindenmann, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 147 :258-267.

[0178] 35. Isaacs, A. , Lindenmann, J. , 和 Valentine, R. C. 1957. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 147 :268-273.

[0179] 36. Nagano, Y. , 和 Kojima, Y. 1958. [Inhibition of vaccinia infection by a liquid factor in tissues infected by homologous virus.]. *C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.* 152 :1627-1629.

[0180] 37. Ho, M. 1964. Interferon-Like Viral Inhibitor in Rabbits after Intravenous Administration of Endotoxin. *Science* 146 :1472-1474.

[0181] 38. Stinebring, W. R. , 和 Youngher, J. S. 1964. Patterns of Interferon Appearance in Mice Infected with Bacteria or Bacterial Endotoxin. *Nature* 204 :712.

[0182] 39. Kleinschmidt, W. J. , Cline, J. C. , 和 Murphy, E. B. 1964. Interferon Production Induced by Statolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 52 :741-744.

[0183] 40. Field, A. K. , Lampson, G. P. , Tytell, A. A. , Nemes, M. M. , 和 Hilleman, M. R. 1967. Inducers of interferon and host resistance, IV. Double-stranded replicative form RNA (MS2-Ff-RNA) from *E. coli* infected with MS2 coliphage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 58 :2102-2108.

[0184] 41. Szkudlinski, M. W. , Fremont, V. , Ronin, C. , 和 Weintraub, B. D. 2002. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* 82 :473-502.

[0185] 42. Van Vliet, G. 2003. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin. Genet.* 63 :445-455.

[0186] 43. De Felice, M. , Postiglione, M. P. , 和 Di Lauro, R. 2004. Minireview: thyrotropin receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland: insights from mouse models and human diseases. *Endocrinology* 145 :4062-4067.

[0187] 44. Postiglione, M. P. , Parlato, R. , Rodriguez-Mallon, A. , Rosica, A. , Mithbaokar, P. , Maresca, M. , Marians, R. C. , Davies, T. F. , Zannini, M. S. , De Felice, M. , 等 . 2002. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 99 :15462-15467.

[0188] 45. Brown, R. S. 2004. Minireview: developmental regulation of thyrotropin

receptor gene expression in the fetal and newborn thyroid. *Endocrinology* 145 : 4058-4061.

[0001]

序列表

<110>	中国科学院上海生命科学研究院	
<120>	用于鉴定和治疗葛瑞夫兹氏病的方法和试剂盒	
<130>	097182	
<160>	14	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	cctccttggg ttcgtctata a	21
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	tcaaagtcag cagccagtct ca	22
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	atcagcgcta ctgcaacctt	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
	tgcagcagat ctccattctg	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
	ggtggtcccc agtaatgtgg	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	

[0002]

<213> 人工序列	
<400> 6	
gccatgctga ggcctctgt	20
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
cctggaggag aagaggaaag aga	23
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
ttgaggacct ctgtgtatth gtcaa	25
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
ggaacggcca ggaagagaag	20
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
ccgaggaact gtttctagca tca	23
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
gcctgacgct gactactgga a	21
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	

[0003]

agctctcacc aaccccgtag t	21
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
gctcctcatt gcctctgtag a	21
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
tgaagaaacc agccgtgttg	20

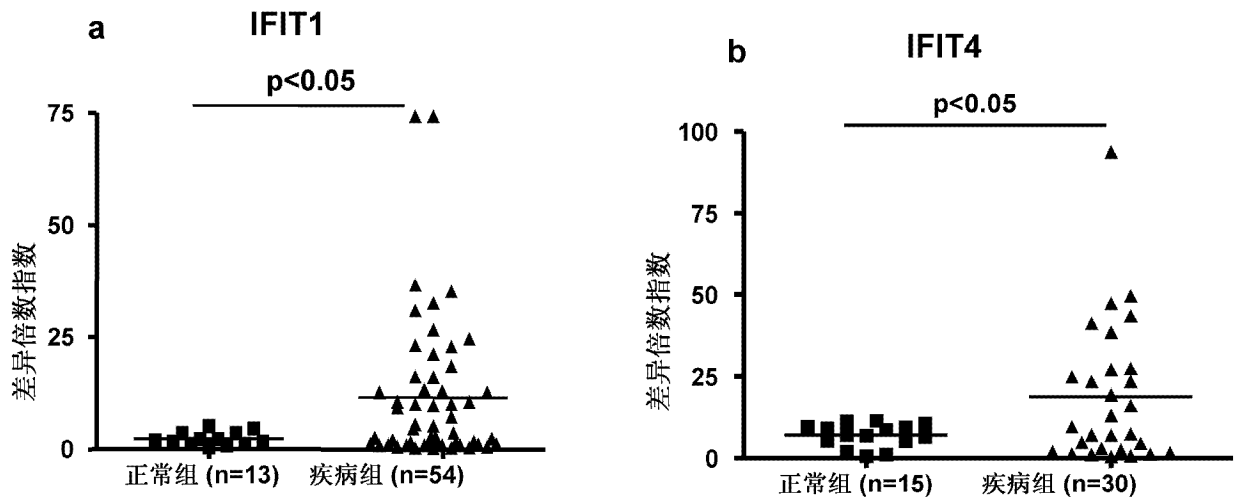


图 1

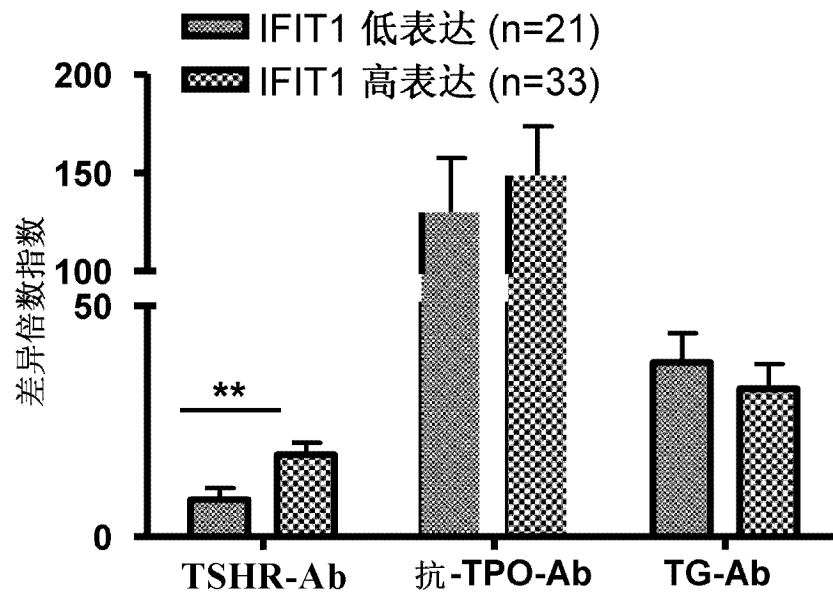


图 2

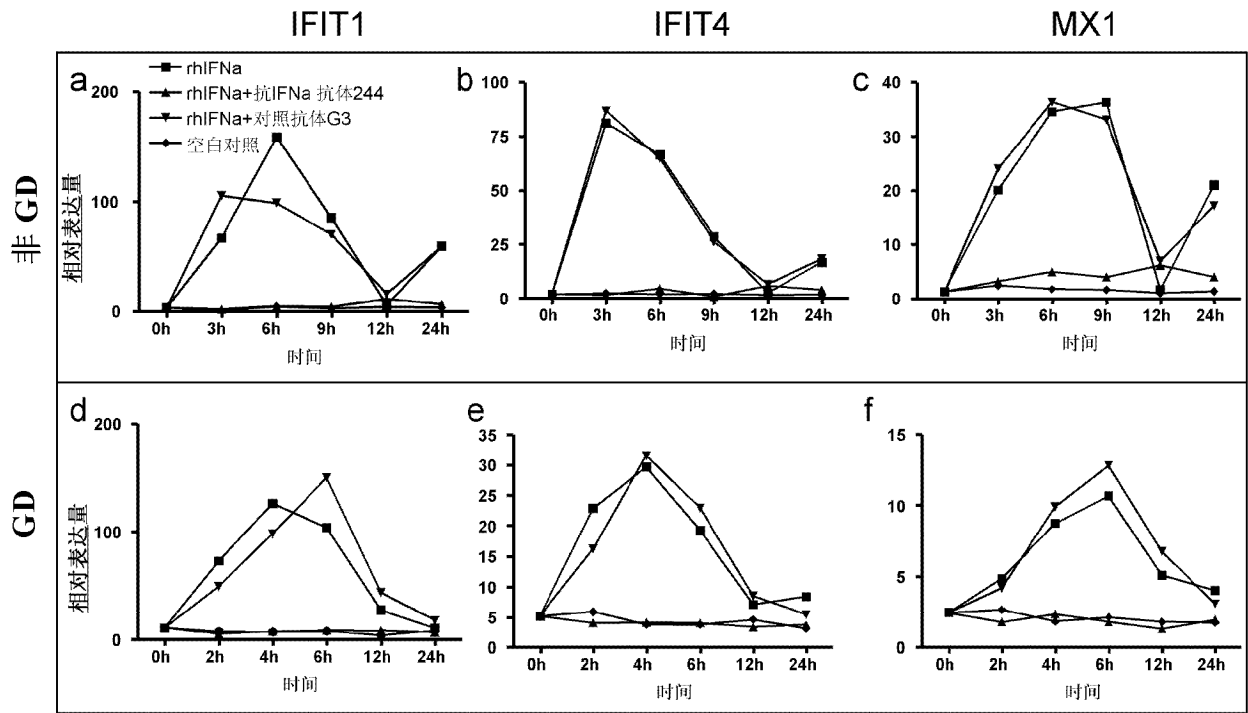


图 3

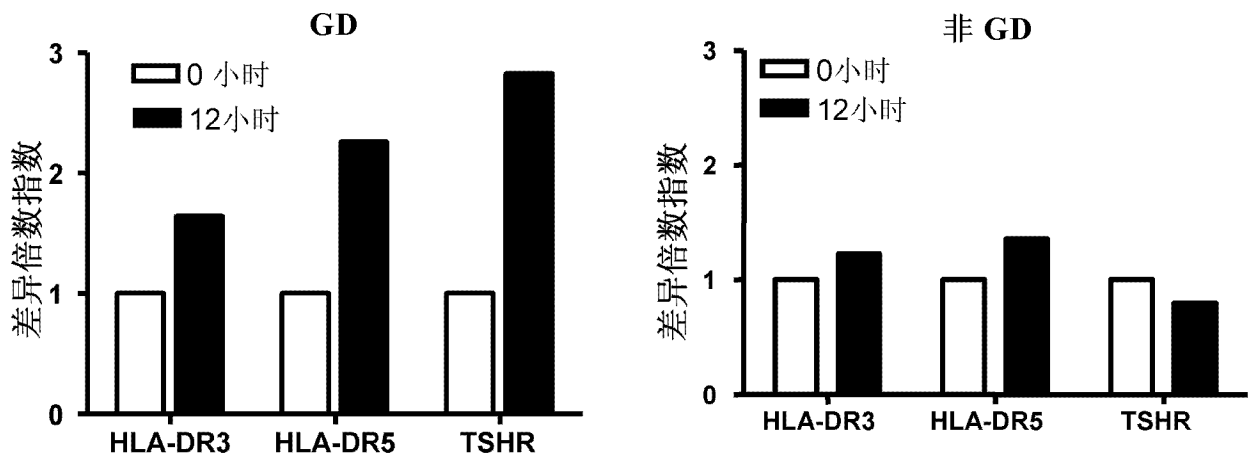
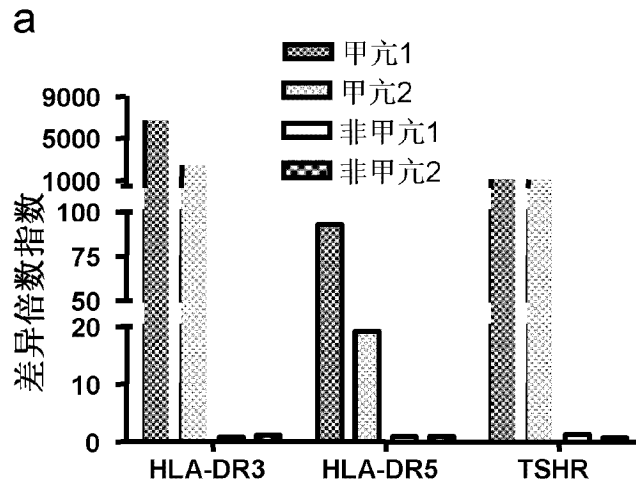
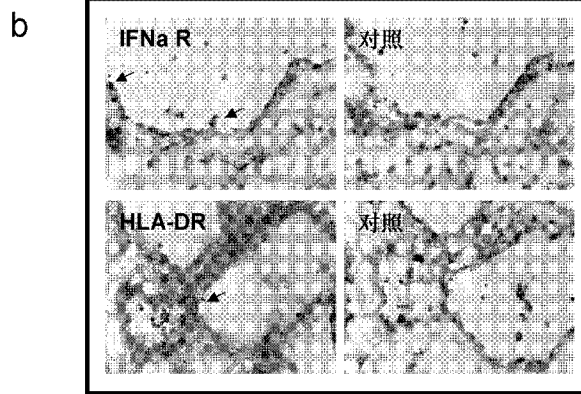


图 4



非 GD



GD

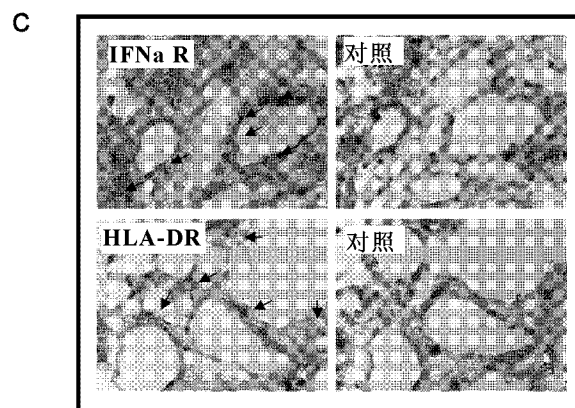


图 5

专利名称(译)	用于鉴定和治疗葛瑞夫兹氏病的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN102154458A	公开(公告)日	2011-08-17
申请号	CN201110002146.6	申请日	2011-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	李立新 旷苗		
发明人	李立新 旷苗		
IPC分类号	A61K45/00 G01N33/53 A61P37/02 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158		
代理人(译)	杨昀		
优先权	201010022648.0 2010-01-12 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于鉴定和治疗葛瑞夫兹氏病(GD)的新方法和试剂盒。具体而言,本发明涉及一种用于GD分型、治疗方案选择和/或预后评估的试剂盒,所述试剂盒包含:(a)检测生物样品中干扰素诱导基因表达水平的一种或多种试剂;和(b)容纳所述试剂的容器。本发明还提供了干扰素诱导基因作为GD分型、治疗方案的选择和/或预后评估的分值标志物的用途。本发明为对GD的分型、临床用药及预后提供了具有指导意义的分子生物学指标,并为防治GD提供了新途径。

特性	IFIG低表达组 < 2倍, n=21 (平均值±SD)	IFIG高表达组 > 2倍, n=33 (平均值±SD)	正常参考值
性别-男/女	4/17	8/25	--
年龄-(岁) 平均值 范围	31 13-57	34 20-59	-- --
吸烟 (%)	0	2/33 (6%)	--
甲亢相关眼病 有 无	0 21	0 33	-- --
眼球突出	0	1/33 (3%)	--
游离T3 (pmol/L)	21.13±13.45	24.17±14.49	2.62-6.48
游离T4 (pmol/L)	34.31±11.94	43.05±20.50	9.01-19.04
TSH (uIU/ml)	0.01±0.01	0.02±0.06	0.35-4.94
TG抗体 (%)	37.81±28.77	32.09±31.51	0-30
TSHR抗体 (U/L)	8.04±11.27	17.91±14.18	<1.5
TPO抗体 (pmol/L)	129.72±126.97	148.28±144.62	2.62-6.48