



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108982844 B

(45) 授权公告日 2021.09.24

(21) 申请号 201810939526.4

CN 101460852 A, 2009.06.17

(22) 申请日 2018.08.17

US 2016297875 A1, 2016.10.13

CN 105765385 A, 2016.07.13

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108982844 A

(43) 申请公布日 2018.12.11

(73) 专利权人 北京市心肺血管疾病研究所

地址 100029 北京市朝阳区安贞路2号北京市心肺血管疾病研究所

(72) 发明人 杜杰 李玉琳

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所

11430

代理人 唐宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107238712 A, 2017.10.10

方晗 等. 急性冠状动脉综合征患者血清钙卫蛋白水平及其与冠状动脉病变范围的关系. 《中南大学学报(医学版)》. 2014, 第39卷(第9期),

Liliana SANTAMARIA-KISIEL 等. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. 《The Biochemical journal》. 2006, 第396卷(第2期), 第201-214页.

Takashi Katashima 等. Enhanced Expression of the S100A8/A9 Complex in Acute Myocardial Infarction Patients. 《Circulation Journal: official journal of the Japanese Circulation Society》. 2010, 第74卷(第4期), 第741-748页.

审查员 张建敏

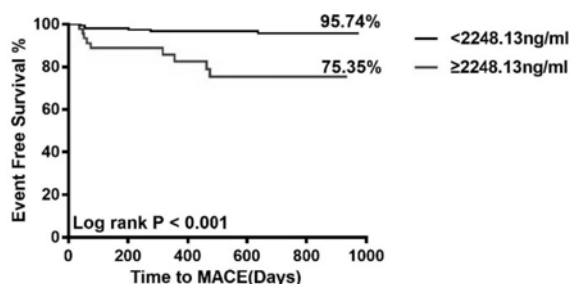
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

血清S100a8/9复合体水平在急性心肌梗死诊断及预后判断中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种血清S100a8/9复合体水平在急性心肌梗死诊断及预后判断中的应用。所述的预后判断指, 预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况, 区分患者为术后高不良事件风险组和术后低不良事件风险组, 所述的不良事件包括但不限于: 死亡、急性心力衰竭。



1. S100a8/a9复合体在制备通过检测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗术前和术后24小时的血清S100a8/a9复合体浓度差值来预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗术后一天的预后高风险情况的检测试剂盒中的应用,

所述的预后高风险是指:AMI患者经皮冠状动脉介入治疗后不良事件发生率超过20%;

所述的不良事件包括:死亡、急性心力衰竭;

所述的S100a8/a9复合体是由S100a8蛋白与S100a9蛋白以钙离子依赖性方式形成的异源二聚体复合物。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,

所述的预后高风险的判断标准为:患者经皮冠状动脉介入治疗术前和术后24小时的血清S100a8/9复合体浓度差值大于或等于2248.13ng/ml。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述试剂盒包含检测所述S100a8/a9复合体的血清表达量的检测试剂,所述的检测试剂包括:

(1) 特异性结合S100a8/a9复合体的抗体,所述的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体、功能性抗体片段、抗体Fab区,纳米抗体、嵌合抗体、多特异性抗体;

(2) 特异性结合S100a8/a9复合体的配体蛋白或多肽;

(3) 特异性识别S100a8/a9复合体的非蛋白类化合物。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述的检测试剂盒是,

(1) 酶联免疫法检测试剂盒;

(2) 胶体金试纸检测试剂盒;

(3) 化学发光检测试剂盒;

(4) 流式细胞仪检测试剂盒。

血清S100a8/9复合体水平在急性心肌梗死诊断及预后判断中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体而言,涉及一种血清S100a8/9复合体水平在急性心肌梗死诊断及预后判断中的应用。

背景技术

[0002] 随着经济社会发展、人民生活方式的改变、人口老龄化的加快,我国心血管疾病的发病率呈现上升趋势。据《中国心血管报告2015》数据显示,我国有心血管病患者2.9亿,其中急性心肌梗死患者250万。急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction,AMI)是冠心病中较为严重的类型之一,常可导致一系列严重的心血管事件。AMI多发生在冠状动脉粥样硬化狭窄基础上,由于某些诱因致使冠状动脉粥样斑块破裂,循环中的血小板在破裂的斑块表面聚集形成血栓,突然阻塞冠状动脉管腔,导致心肌缺血坏死。因此早期血运重建是治疗的关键。经皮冠状动脉介入治疗(PCI)的临床应用显著降低AMI患者死亡率,但部分AMI患者接受PCI血运重建后,仍会因缺血再灌注损伤而导致心源性休克、急性心力衰竭等恶性心血管事件。因此我们亟需早期识别这类发生缺血再灌注损伤的患者及时干预降低院内和长期不良事件发生率。

[0003] 近年来,有关AMI预后评估标志物的研究越来越多。其中最常见的包括:肌钙蛋白、NT-proBNP、GDF15、CRP等。当心肌受到损伤时,肌钙蛋白被释放入血,其具有高特异性、高敏感性等特点,临床上主要用于AMI的早期诊断,对于AMI患者近远期预后且有一定的预测价值。NT-proBNP是心肌细胞产生的,当心室的张力及负荷增加时,循环中NT-proBNP浓度升高,研究表明:NT-proBNP水平与AMI后左心室重构有关,且可预测近远期心血管不良事件的发生。现有的标志物主要反应的是AMI后中性粒细胞活化、炎症、内皮细胞活化、细胞坏死等非特异性的病理机制,并不能反映缺血再灌注损伤特性的病理变化。

[0004] S100A8蛋白(Calgranulin A蛋白、MRP8蛋白)与S100A9蛋白(Calgranulin B蛋白、MRP14蛋白)均属于钙结合蛋白S100蛋白家族成员,两者常以钙离子依赖性方式形成异源二聚体S100A8/A9蛋白复合物(以下简称S100a8/9)。在循环中性粒细胞、单核巨噬细胞中表达,而在正常巨噬细胞和淋巴细胞中无表达,在慢性炎症环境下,两蛋白也表达于上皮细胞中,可参与炎症反应,调节细胞生长分化,增长抑制,诱导细胞凋亡等。根据以往文献报道和前期基础实验,发现S100a8/9参与心肌梗死后缺血再灌注的病理生理过程。

[0005] 因此,从临床有效快速识别高危患者的角度出发,通过对AMI患者PCI在院期间连续多个时间点S100a8/9表达水平的检测,说明S100a8/9作为反映缺血再灌注损伤的指标可能用于预测PCI术后院内心血管不良事件的发生,并有效评估AMI患者长期预后情况。

发明内容

[0006] 基于上述现有临床中的问题,本发明研究了血清中S100a8/9复合体水平和急性心肌梗死(AMI)患者症状及预后情况之间的关系,本发明选择207名健康人和208名AMI患者,

利用ELISA技术对健康人和AMI患者血清中的S100a8/9复合体水平进行了定量,并用同样的方法对AMI患者在经皮冠状动脉介入治疗(PCI)术前和术后的血清S100a8/9复合体水平也进行了定量,统计结果显示,该蛋白复合体可以用作区分AMI患者和健康人群的标志物,同时,还可以用作对AMI患者PCI术后不良事件的预测指标,相比于现有临床检测产品,该标志物能够更好的区分出发生近远期不良事件的AMI患者。

[0007] 本发明首先涉及S100a8/9复合体的如下应用,

[0008] (1) 作为血清学诊断标志物区分健康人和急性心肌梗死(AMI)患者;

[0009] (2) 作为血清学诊断标志物预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况。

[0010] 所述的S100a8/a9复合体是由S100a8蛋白(Calgranulin A蛋白、MRP8蛋白)与S100a9蛋白(CalgranulinB蛋白、MRP14蛋白)以钙离子依赖性方式形成的异源二聚体复合物。

[0011] 本发明还涉及所述的S100a8/9复合体在制备如下检测试剂盒中的应用,

[0012] (1) 区分健康人和急性心肌梗死(AMI)患者的检测试剂盒;

[0013] (2) 预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况的检测试剂盒。

[0014] 所述的预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况指标,预测患者术后的不良事件发生概率,所述的不良事件包括但不限于:死亡、急性心力衰竭。

[0015] 所述的S100a8/a9复合体是由S100a8蛋白(Calgranulin A蛋白、MRP8蛋白)与S100a9蛋白(CalgranulinB蛋白、MRP14蛋白)以钙离子依赖性方式形成的异源二聚体复合物。

[0016] 本发明还涉及一种检测试剂盒,所述的检测试剂盒中包括检测S100a8/9复合体的检测试剂,所述的检测试剂包括但不限于:

[0017] (1) 特异性结合S100a8/9复合体的抗体,所述的抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体、功能性抗体片段、抗体Fab区,纳米抗体、嵌合抗体、多特异性抗体等;

[0018] (2) 特异性结合S100a8/9复合体的配体蛋白或多肽;

[0019] (3) 特异性识别S100a8/9复合体的非蛋白类化合物;

[0020] 优选的,所述的检测试剂盒是,

[0021] (1) 酶联免疫法检测试剂盒;

[0022] (2) 胶体金试纸检测试剂盒;

[0023] (3) 化学发光检测试剂盒;

[0024] (4) 流式细胞仪检测试剂盒。

[0025] 所述的S100a8/a9复合体是由S100a8蛋白(Calgranulin A蛋白、MRP8蛋白)与S100a9蛋白(CalgranulinB蛋白、MRP14蛋白)以钙离子依赖性方式形成的异源二聚体复合物。

[0026] 本发明还S100a8/9复合体在预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况中的应用,所述的预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况是指,区分患者为术后高不良事件风险组和术后低不良事件风险组,所述的不良事件包括但不限于:死亡、急性心力衰竭。

[0027] 所述的高风险组为:PCI术后不良事件发生率超过20%;

[0028] 所述的低风险组为:PCI术后不良事件发生率低于5%;

[0029] 所述的不良事件高风险组的判断标准为：患者PCI术前和术后24小时的血清S100a8/9复合体表达量差值大于或等于2248.13ng/ml；

[0030] 所述的不良事件低风险组的判断标准为：患者PCI术前和术后24小时的血清S100a8/9复合体表达量差值小于2248.13ng/ml。

[0031] 所述的S100a8/a9复合体是由S100a8蛋白(Calgranulin A蛋白、MRP8蛋白)与S100a9蛋白(CalgranulinB蛋白、MRP14蛋白)以钙离子依赖性方式形成的异源二聚体复合物。

[0032] 本发明还涉及S100a8/9复合体在制备预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况的检测试剂盒中的应用，所述的预测AMI患者经皮冠状动脉介入治疗的预后情况是指，区分患者为术后高不良事件风险组和术后低不良事件风险组，所述的不良事件包括但不限于：死亡、急性心力衰竭。

[0033] 所述的高风险组为：PCI术后不良事件发生率超过20%；

[0034] 所述的低风险组为：PCI术后不良事件发生率低于5%；

[0035] 所述的不良事件高风险组的判断标准为：患者PCI术前和术后24小时的血清S100a8/9复合体表达量差值大于或等于2248.13ng/ml；

[0036] 所述的不良事件低风险组的判断标准为：患者PCI术前和术后24小时的血清S100a8/9复合体表达量差值小于2248.13ng/ml。

[0037] 所述的S100a8/a9复合体是由S100a8蛋白(Calgranulin A蛋白、MRP8蛋白)与S100a9蛋白(CalgranulinB蛋白、MRP14蛋白)以钙离子依赖性方式形成的异源二聚体复合物。

[0038] 所述的检测试剂盒中还包含，检测S100a8/9复合体血清表达量的检测试剂，所述的检测试剂包括但不限于：

[0039] (1) 特异性结合S100a8/9复合体的抗体，所述的抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体、功能性抗体片段、抗体Fab区，纳米抗体、嵌合抗体、多特异性抗体等；

[0040] (2) 特异性结合S100a8/9复合体的配体蛋白或多肽；

[0041] (3) 特异性识别S100a8/9复合体的非蛋白类化合物。

[0042] 所述的检测试剂盒是，

[0043] (1) 酶联免疫法检测试剂盒；

[0044] (2) 胶体金试纸检测试剂盒；

[0045] (3) 化学发光检测试剂盒；

[0046] (4) 流式细胞仪检测试剂盒。

附图说明

[0047] 图1、健康人群和AMI患者的血清S100a8/9蛋白复合体的含量对比。

[0048] 图2、AMI患者PCI术后1天的S100a8/9蛋白复合体的表达水平检测结果。

[0049] 图3、MACE组和Non-MACE组患者在PCI术前和术后1天的血清S100a8/9蛋白复合体的含量。

[0050] 图4、AMI患者PCI术前术后的S100a8/9蛋白复合体表达量水平差值预测AMI患者PCI术后MACE

[0051] 事件发生率的ROC曲线图。

[0052] 图5、以AMI患者PCI术前术后的S100a8/9蛋白复合体表达量水平差值2248.13ng/ml为区分值,划

[0053] 分出的AMI患者群的PCI术MACE事件生存曲线图。

具体实施方式

[0054] 实施例1:AMI患者和健康人中S100a8/9表达水平差异

[0055] 根据性别年龄匹配的原则,选择207名健康人和208名AMI患者的血清样本,通过ELISA实验检测S100a8/9的表达水平。AMI患者中S100a8/9表达水平较健康人升高1.91倍($P < 0.001$)。

[0056] 一、实验步骤:

[0057] 试剂盒:R&D Systems, Inc, Human S100A8/S100A9, Heterodimer Immunoassay

[0058] (一) 试剂准备:

[0059] 1、使用前将所有试剂平衡至室温。

[0060] 2、洗液(Wash Buffer):如果浓缩液中已经形成结晶,平衡至室温,并轻轻地摇晃直到结晶完全溶解,加入离子水或蒸馏水稀释20ml洗涤液至500ml。

[0061] 3、底物溶液(Substrate Solution):显色试剂A和B应该在使用前15min以等体积混合,避光保存,每孔需要200ul显色试剂A和B的等体积混合物。

[0062] 4、S100a8/9标准品(S100a8/9 Standard):使用标准稀释液RD5-10(Calibrator Diluent RD5-10)重新配置S100a8/9标准品。重新配置的产品为40ng/ml贮存液。稀释前将标准品至少轻轻搅拌15min。

[0063] 5、吸取适当的标准品稀释液RD5-10(Calibrator Diluent RD5-10) 250ul到每个管子中。使用贮存液配置一系列的稀释液(20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/ml),没有稀释的标准品(40ng/ml)作为高标准,标准稀释液作为0标准(0pg/ml)。

[0064] (二) 测定步骤:

[0065] 使用前将所有试剂和样本平衡至室温,所有样本、标准和对照测定双份。

[0066] 1、准备所有的试剂和工作标准品,血清样本稀释150倍。

[0067] 2、取下多余的微量培养板条,放回装有干燥剂的锡箔袋中,重新密封。

[0068] 3、每孔加入50ul Assay Diluent RD1-34。

[0069] 4、每孔依次加入50ul标准品、样本和对照。用橡皮条密封,室温孵育2小时,记录测定标准和样本的分布。

[0070] 5、吸弃孔内液体,每孔400ul洗涤液,充分洗涤后完全去除液体,在干净的纸上拍干,反复洗涤4次。

[0071] 6、每孔加入200ul S100a8/9 Conjugate,用新的橡皮膏条密封。室温温浴2小时。

[0072] 7、重复步骤5。

[0073] 8、每孔加入200ul Substrate Solution,室温避光孵育30分钟。

[0074] 9、每孔加入50ul Stop Solution,孔内颜色应该由蓝变黄。如果孔内颜色是绿色,或者颜色变化不均匀,轻轻拍打板子以确保充分混匀。

[0075] 10、30分钟内使用酶标仪在450nm测定每孔的吸光度,如果波长校正是有效的,设定为540nm或570nm。如果波长校正不可用,从450nm波长读数减去540nm或570nm波长读数。这种方法可以校正板的光学缺陷。直接在450nm而无校正读数可以会偏高或偏低。

[0076] (三) 计算结果:

[0077] 1、标准、对照、样本的OD值减去零标准的OD值,取两个复孔的均值。

[0078] 2、用4参数曲线,使用电脑软件建立标准曲线。

[0079] 3、如果样本已经被稀释,由标准曲线得到的浓度必须乘以稀释倍数。

[0080] 二、实验结果:

[0081] 结果见图1和下表1所示,相比于健康人群,AMI患者的血清S100a8/9的含量有显著提升。

[0082] 表1、健康人群和AMI患者的血清S100a8/9蛋白复合体的含量

	检测指标	健康对照 (n=207)	AMI 患者 (n=208)
[0083]	S100a8/9, ng/ml (mean±SEM)	1723±193.7	3295±200.4

[0084] 实施例2:210名AMI患者在院期间PCI术前、术后1天,连续2个时间点S100a8/9表达情况

[0085] 210名AMI患者PCI术前(0天)、术后1天(1天),连续2个时间点样本,通过与实施例1相同的ELISA实验检测患者血清中S100a8/9蛋白复合体的表达水平。

[0086] 1、术后1天的S100a8/9的表达水平检测结果见图2、表2、结果显示,术后S100a8/9的表达水平较PCI术前升高($P<0.001$)。

[0087] 表2、PCI术前和术后1天患者血清S100a8/9蛋白复合体的含量

	检测指标	PCI 术前 (n=210)	PCI 术后 1 天 (n=210)
[0088]	S100a8/9, ng/ml (mean±SEM)	3270±134.2	4151±156.9

[0089] 实施例3:S100a8/9对院内MACE事件的预后评估价值

[0090] 根据院内发生MACE事件(死亡、急性心力衰竭)情况,将210名AMI患者分为MACE组(35人)和Non-MACE组(175人)。通过与实施例1相同的ELISA实验检测患者血清中S100a8/9蛋白复合体的表达水平。

[0091] 统计结果显示:

[0092] ①MACE组和Non-MACE组,S100a8/9复合体在PCI术前(0天)、术后1天(1天)表达差异情况。在术后1天时,两组比较有显著统计学差异,MACE组较Non-MACE组升高1.57倍($P<0.001$),见图3和表3。

[0093] 表3、在PCI术前和术后1天MACE组和Non-MACE组患者血清S100a8/9蛋白复合体的含量

	检测指标	PCI术前	PCI术后1天	
		MACE (n=35)	Non-MACE (n=175)	
			MACE (n=35)	Non-MACE (n=175)
[0094]	S100a8/9, ng/ml (mean±SEM)	3633±375.9	3197±142.4	5960±437.8 3789±153.3

[0095] ②建立logistic回归模型说明标志物水平与院内MACE事件之间的关系。为体现

S100a8/9水平波动情况,根据PCI术前(0天)和PCI术后1天(1天)两个时间点标志物水平,组合成标志物组合: $\Delta 1d$ (PCI术后1天和PCI术前之差)、 $\Delta 1d+1d$ ($\Delta 1d$ 和PCI术后1天水平之和)、 $\Delta 1d/0d$ ($\Delta 1d$ 和PCI术前水平之比)、SD(两个时间点标志物水平的标准差)。建立logistic回归模型,校正年龄、性别(男为1女为0)、开通血管时间($\leq 3h:1; 3<t\leq 6:2; 6<t\leq 9:3; 9<t\leq 12:4; >12h:5$)、高血压病史、糖尿病病史、高脂血症病史、吸烟史、梗死部位(前壁为1其余为0)八个因素,6种标志物水平(PCI术前、PCI术后1天、 $\Delta 1d$ 、 $\Delta 1d+1d$ 、 $\Delta 1d/0d$ 、SD)对于院内MACE事件均有独立预测价值,且均优于高敏肌钙蛋白I(hs-cTnI)。

[0096] 表4、logistic回归模型统计标志物水平与院内MACE事件之间的关系

	Unadjusted OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)
PCI术前(0天)	1.642 (1.048-2.573) P=0.031	1.800 (1.097-2.952) P=0.020
PCI术后1天(1天)	3.009 (1.898-4.770) P<0.001	3.988 (2.301-6.912) P<0.001
$\Delta 1d$	2.422 (1.536-3.820) P<0.001	2.624 (1.597-4.310) P<0.001
$\Delta 1d+1d$	3.420 (2.114-5.532) P<0.001	4.098 (2.375-7.071) P<0.001
$\Delta 1d/0d$	1.830 (1.171-2.858) P<0.001	1.878 (1.176-2.999) P=0.008
SD	2.165 (1.431-3.276) P<0.001	2.450 (1.540-3.895) P<0.001
Baseline hs-cTnI	0.866 (0.477-1.571) P=0.635	0.703 (0.372-1.329) P=0.279
Peak hs-cTnI	1.524 (1.085-2.141) P=0.015	1.557 (1.077-2.252) P=0.019

[0099] (Unadjusted OR是只在logistic回归模型中分别只放入标志物。Adjusted OR是在logistic回归模型中分别放入标志物和前述的校正因素,因为有8种标志物需要做8次校正)

[0100] 实施案例4:S100a8/9对长期MACE事件的预后评估价值

[0101] 在210名AMI患者中有4人发生院内死亡,故对206名患者进行长期跟踪随访,中位随访时间21.7(IQR:13.7-29.6)月,其中有15人发生MACE事件(全因性死亡、因心力衰竭再入院)。

[0102] 实验统计结果显示:

[0103] ①在院内MACE事件分析中,发现 $\Delta 1d$ S100a8/9水平有最好的预后评估价值,使用ROC曲线分析确定S100a8/9 $\Delta 1d$ 院内不良事件预测的cut-off值,具体ROC曲线见图4,其中的各项ROC数据见下表5。

[0104] 表5

	AUC = 0.732 (0.640-0.825)
	P < 0.001
	cut-off: $\geq 2248.13ng/ml$
[0105]	Sensitivity: 57.14% (39.4-73.7)
	Specificity: 84.57% (78.4-89.6)

[0106] ②使用Kaplan-Meier生存曲线评价S100a8/9 $\Delta 1d$ 院内MACE事件预测的cut-off值对长期不良事件的预测价值。标志物水平 $<2248.13ng/ml$ 的患者长期预后情况优于标志物

水平升高者 ($P < 0.001$) (两批患者的无MACE事件生存曲线见图5)。

[0107] 最后需要说明的是,以上实施例仅帮助本领域技术人员理解本发明的实质,不做对保护范围的限定。

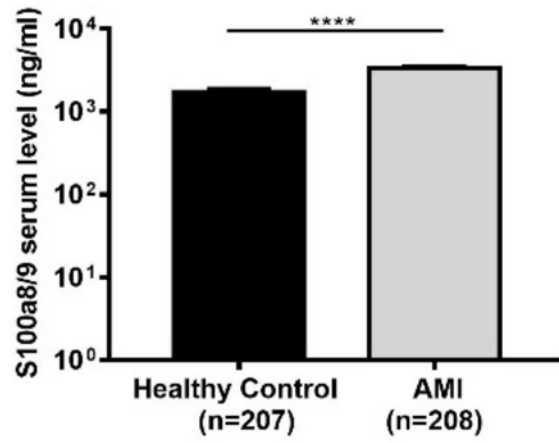


图1

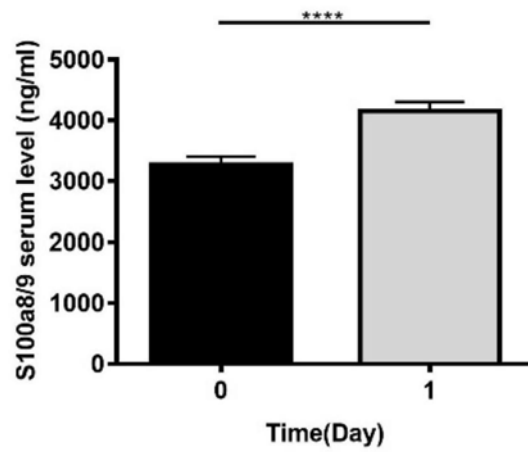


图2

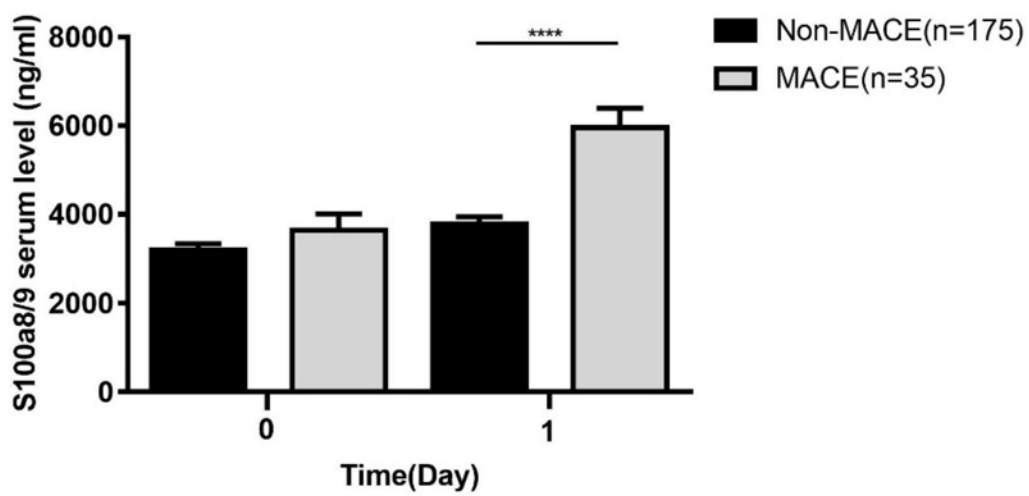


图3

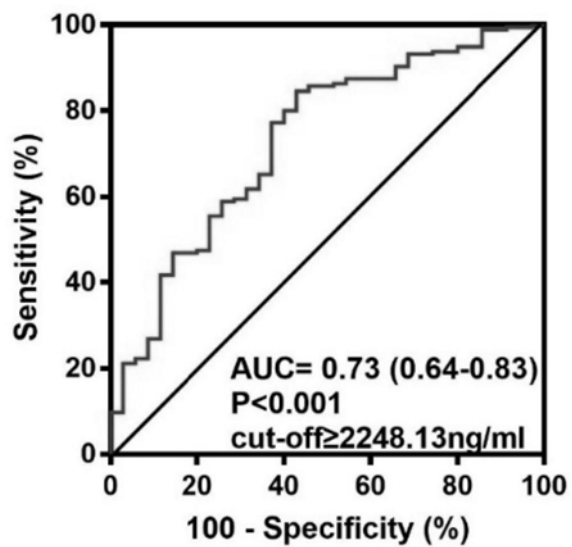


图4

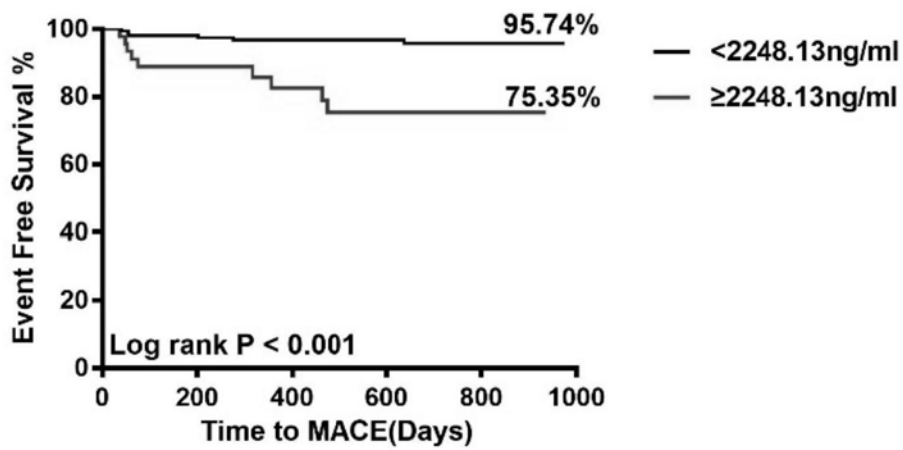


图5