



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110646617 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201910854716.0

G01N 33/535 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.10

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110646617 A

(56) 对比文件

WO 2014160275 A2, 2014.10.02

(43) 申请公布日 2020.01.03

审查员 刘彦宁

(73) 专利权人 南方医科大学珠江医院

地址 510282 广东省广州市海珠区工业大道中253号

(72) 发明人 傅强 邓婷 付晓华 严全能
陈立珩

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所
11330

代理人 刘延喜

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

主动脉夹层诊断标志物及其应用

(57) 摘要

本申请公开一种主动脉夹层诊断标志物,包括蛋白抑制剂16和纤维蛋白原样蛋白1中的至少一种。所述的主动脉夹层诊断标志物在诊断主动脉夹层中的应用。所述的主动脉夹层诊断标志物在生产诊断主动脉夹层的诊断产品中的应用。所述的主动脉夹层诊断标志物在区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合征中的应用。所述的主动脉夹层诊断标志物在生产区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合征的诊断产品中的应用。本申请主动脉夹层诊断标志物通过蛋白质组学原理筛选得出,并且经过大量样本的验证,能有效提高主动脉夹层的诊断率,以及提高区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合征的诊断率。

1. 主动脉夹层诊断标志物在生产区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合症的血清检测产品中的应用,其特征在於,所述标志物由蛋白抑制剂16、纤维蛋白原样蛋白1、光聚蛋白和基质金属蛋白酶-9组成。

2. 如权利要求1所述的主动脉夹层诊断标志物在生产区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合症的血清检测产品中的应用,其特征在於,与对照样本相比较,所述标志物在受试体样本中差异表达。

3. 如权利要求2所述的主动脉夹层诊断标志物在生产区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合症的血清检测产品中的应用,其特征在於,与对照样本相比较,所述标志物在受试体样本中表达增加。

4. 如权利要求2所述的主动脉夹层诊断标志物在生产区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合症的血清检测产品中的应用,其特征在於,所述对照样本和受试体样本来源于血清。

5. 如权利要求2所述的主动脉夹层诊断标志物在生产区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合症的血清检测产品中的应用,其特征在於,所述标志物的表达量通过酶联免疫吸附剂测定法验证。

主动脉夹层诊断标志物及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及生物检测技术领域,尤其涉及一种主动脉夹层诊断标志物及其应用。

背景技术

[0002] 主动脉夹层指主动脉腔内血液从主动脉内膜撕裂处进入主动脉中膜,使中膜分离,沿主动脉长轴方向扩展形成主动脉壁的真假两腔分离状态。本病65%~70%在急性期死于心脏压塞、心律失常等,早期诊断和治疗非常必要。目前常见的超声心动图、CT、MRI等检查对确立主动脉夹层分离的诊断有很大帮助,对拟行手术治疗者可考虑主动脉造影或IVUS检查。但是主动脉夹层发病迅速,往往病人发病后数小时可能引起主动脉撕裂导致最终死亡。一方面,因诊断的方式CT或主动脉造影等耗时较长,另一方面,主动脉夹层的症状与其他心血管类疾病的症状有相似性,如急性冠状动脉综合症和主动脉瘤,往往诊断不明时病人已出现动脉破裂甚至死亡,目前暂时没有一个快速的诊断分子标志物可用于辅助其鉴别诊断及风险评估。

发明内容

[0003] 本申请的目的是,为克服现有技术的缺陷,提供一种特异度及敏感度相对高的主动脉夹层诊断标志物,以及提供该主动脉夹层诊断标志物的应用。

[0004] 为达到以上技术目的,本申请采用的技术方案如下:

[0005] 一种主动脉夹层诊断标志物,包括蛋白抑制剂16和纤维蛋白原样蛋白1中的至少一种。

[0006] 进一步地,该主动脉夹层诊断标志物还包括光聚蛋白和基质金属蛋白酶中的至少一种。

[0007] 具体地,与对照样本相比较,所述标志物在受试体样本中差异表达。

[0008] 更具体地,与对照样本相比较,所述标志物在受试体样本中表达增加。

[0009] 优选地,所述对照样本和受试体样本来源于血清。

[0010] 优选地,所述标志物的表达量通过酶联免疫吸附剂测定法验证。

[0011] 所述的主动脉夹层诊断标志物在诊断主动脉夹层中的应用。

[0012] 所述的主动脉夹层诊断标志物在生产诊断主动脉夹层的诊断产品中的应用。

[0013] 所述的主动脉夹层诊断标志物在区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合征中的应用。

[0014] 所述的主动脉夹层诊断标志物在生产区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合征的诊断产品中的应用。

[0015] 与现有技术相比较,本申请具有如下优势:

[0016] (1) 本申请的主动脉夹层诊断标志物通过蛋白质组学原理筛选而出,作为分子标志物更具有特异性和敏感性;

[0017] (2) 本申请的主动脉夹层诊断标志物经过了大量样本的验证,证明了其特异性和

敏感性;

[0018] (3) 本申请的主动脉夹层诊断标志物,从血清即可获取,通过ELISA即可进行快速验证,实现了主动脉夹层的快速诊断,也提高了主动脉夹层的诊断正确率。

附图说明

[0019] 图1为本申请主动脉夹层诊断标志物及其应用中,主动脉夹层诊断标志物的高通量筛选流程。

[0020] 图2为本申请主动脉夹层诊断标志物及其应用中,9个初筛得到的蛋白质表达量的ELISA验证结果。

[0021] 图3为本申请主动脉夹层诊断标志物及其应用中,4个目标蛋白质表达量的ROC曲线比较结果。

具体实施方式

[0022] 以下结合附图和具体实施方式对本申请作进一步详细描述。

[0023] 一、高通量筛选过程

[0024] 参考图1,在进行针对主动脉夹层的分子标志物的高通量筛选之前,先对受试样本进行筛选,具体步骤如下:

[0025] (1) 从临床病例中纳入5997位临床诊断胸痛患者;

[0026] (2) 排除了846位稳定型心绞痛患者和859位腹主动脉瘤患者之后,剩余4292位急性冠状动脉综合征和主动脉夹层患者;

[0027] (3) 进一步排除了年龄小于18岁、孕妇和严重肝肾功能障碍患者之后,剩余77位主动脉夹层患者和73位急性冠状动脉综合征患者;

[0028] (4) 在77位主动脉夹层患者中选取其中的15位,从73位急性冠状动脉综合征患者中选取其中的15位。

[0029] 进一步地,对筛选出的15位主动脉夹层患者和15位急性冠状动脉综合征患者的血清采用同位素标记相对和绝对定量法(iTRAQ)和非标定量法(LABEL-FREE)联合技术进行差异蛋白的筛选。其中,以急性冠状动脉综合征患者的样本为对照样本,以主动脉夹层患者的样本为受试样本。

[0030] 同位素标记相对和绝对定量法(iTRAQ),依赖于iTRAQ试剂,iTRAQ试剂是可与氨基酸末端氨基及赖氨酸侧链氨基连接的胺标记同重元素。在质谱图中,任何一种iTRAQ试剂标记不同样本中的同一蛋白质表现为相同的质荷比。在串联质谱中,信号例子表现为不同质荷比(114~121)的峰,因此根据波峰的高度及面积,可以鉴定出蛋白质和分析出同一蛋白质不同处理的定量信息。iTRAQ技术灵敏度高,检测限低,可检测出低丰度蛋白;分离能力强,分析范围广,可以对任何类型的蛋白质进行鉴定,包括高分子量蛋白质、酸性蛋白质和碱性蛋白质,膜蛋白和不溶性蛋白,小于10KD或大于200KD的蛋白同样适用;高通量,可以同时8个样本进行分析,提高了实验通量,可同时对多个时间点或不同处理的蛋白质进行分析;结果可靠,定性与定量分析结果更加可靠,定性分析时还可以同时给出每一个组分的分子量和丰富的结构信息;自动化程度高,液相色谱与质谱联用,自动化操作,分析速度快,分离效果好。

[0031] 非标定量法 (LABEL-FREE), 通过比较质谱分析次数或质谱峰强度, 分析不同来源样品蛋白的数量变化, 认为肽段在质谱中被捕获检测的频率与其在混合物中的丰度成正比, 因此蛋白质被质谱检测的计数反映了蛋白质的丰度, 通过适当的数学公式可以将质谱检测计数与蛋白质的量联系起来, 从而对蛋白质进行定量。该技术无需昂贵的同位素标签做内标, 提高了低丰度蛋白质的检测效率和蛋白质定量的准确性。

[0032] 本申请通过使用iTRAQ联合Label-free技术分别检测两组患者血清(主动脉夹层及急性冠脉综合征)中的差异蛋白(包括相同蛋白的表达量差异, 相同蛋白是否表达), 可以更广范围的搜索到与主动脉夹层诊断相关的标志物, 进行大范围的两种重叠后选取相关性最大的蛋白, 同时label-free给出了单纯在主动脉夹层患者中出现的蛋白及单纯只在对照组中出现的蛋白, 通过panther软件进行聚类分析并进行蛋白互作分析筛选出9个可能性最大候选的血清蛋白标志物: 光聚蛋白 (Lumican), 蛋白抑制剂16 (PI16), 纤维蛋白原样蛋白1 (FGL1)、基质金属蛋白酶-9 (MMP9)、原纤维蛋白1抗原 (FBN1), 血小板因子4 (PF4)、血管性血友病因子 (VWF)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和多聚蛋白1 (MMRN1)。

[0033] 二、ELISA验证过程

[0034] 酶联免疫吸附剂测定法 (ELISA), 是指将可溶性的抗原或抗体吸附到聚苯乙烯等固相载体上, 进行免疫反应的定性和定量方法。由于其使用的酶标抗原的酶催化活性很高, 可以极大地放大反应效果, 从而使该测定方法可以达到很高的敏感度, 由此, ELISA血清验证是目前临床应用最广且最方便、快捷的方法。若通过高通量筛选所选中的血清蛋白标志物能够在ELISA的验证中体现出特异性和敏感性, 有助于被选中的血清蛋白标志物在临床上开展应用。

[0035] 对在高通量筛选过程中找到的所述9个血清蛋白标志物进行大量样本的血清ELISA验证, 具体可继续参考图1, 对在前选定的77位主动脉夹层患者和73为急性冠状动脉综合征患者的血清进行所述9个血清蛋白标志物的ELISA验证, 以急性冠状动脉综合征 (ACS) 样本为对照组, 以主动脉夹层 (AAD) 样本为实验组, 对各个血清蛋白标志物的数据整理成箱式图 (见图2)。

[0036] 图2中, A为Lumican分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。B为PI16分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。C为MMP9分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。D为FGL1分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。E为FBN1分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。F为MMP2分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。G为PF4分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。H为VWF分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。I为MMRN1分别在AAD样本和ACS样本中的表达量情况的比较。根据统计学分析, Lumican、PI16、FGL1和MMP9的数据反映出显著差异 (图2中标示有“#”的组别, $p < 0.05$), 说明这4个血清蛋白标志物在ACS和AAD中的表达量有显著差异, 可以用于区分ACS和AAD; FBN1、PF4、VWF、MMP2和MMRN1的数据反映出非显著差异 (图2中标示有“&”的组别, $p > 0.05$), 说明这5个血清蛋白标志物在ACS和AAD中的表达量没有显著差异, 不能通过验证这5个血清蛋白标志物来区分ACS和AAD。

[0037] 由此, 进一步进行大样本量血清ELISA验证之后, 在主动脉夹层患者血清中得到4个明显升高的血清蛋白标志物分别为Lumican、PI16、FGL1和MMP9。最后收集两组患者的主动脉组织 (主动脉夹层需要置换升主动脉及正常捐献器官患者的升主动脉) 进行免疫荧光

及蛋白电泳验证,上述目标蛋白确实在主动脉夹层组织中明显升高。最后得到结论:通过检测血清中上述4个蛋白标志物(Lumican、PI16、FGL1和MMP9)的含量,可快速提高主动脉夹层的诊断率,或者可以快速提高区分ACS和AAD的诊断率。

[0038] 三、准确性验证过程

[0039] 进一步地,绘制ROC曲线反映所述4个血清蛋白标志物对诊断主动脉夹层的敏感性和特异性。ROC曲线常用于医学领域分析某一指标的任意界限值对疾病的识别能力。ROC曲线以真阳性率(灵敏度)为纵坐标,以假阳性率(1-特异度)为横坐标,ROC曲线越靠近左上角,该指标相关的试验的准确性就越高,最靠近左上角的ROC曲线的点是错误最少的最好阈值,其假阳性和假阴性发生的情况最少。ROC曲线还可以对同一种疾病的两种或两种以上诊断方法或诊断指标进行比较,只需将各试验的ROC曲线绘制到同一个坐标中,可以直观地鉴别各个诊断方法或诊断指标之间的优劣,也可以通过分别计算各个试验的ROC曲线下的面积(AUC)进行比较,哪一种诊断方法或诊断指标的AUC最大,则哪一种诊断方法或诊断指标的诊断价值最佳。

[0040] 参考图3,A图为经ELISA验证后筛选的4个血清蛋白标志物(Lumican、PI16、FGL1和MMP9)分别统计的ROC曲线集合,其中,PI16表现出与主动脉夹层的诊断的准确性最高,AUC为0.739,敏感性为55.8%,特异性78.1%。

[0041] 图3的B图将PI16分别联合其他3个血清蛋白标志物(Lumican、FGL1和MMP9)的数据进行整合统计,其中PI16联合Lumican的ROC曲线的AUC为0.742,敏感性为90.9%,特异性43.8%;PI16联合Lumican和FGL1的ROC曲线的AUC为0.78,敏感性为67.5%,特异性76.7%。结果表明,血清蛋白标志物之间的联合使用比单独使用更能够优化主动脉夹层的诊断准确性,其中以PI16为主,联合其他相关度高的血清蛋白标志物去诊断主动脉夹层的方案更优,并且以PI16联合Lumican和FGL1为最优。

[0042] 综上所述,本申请主动脉夹层诊断标志物通过蛋白质组学原理筛选得出,并且经过大量样本的验证,能有效提高主动脉夹层的诊断率,以及提高区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合症的诊断率,进一步,该诊断标志物可以在主动脉夹层诊断产品中应用,也可以在区分主动脉夹层和急性冠状动脉综合症的诊断产品中应用。

[0043] 上述实施例为本申请较佳的实施方式,但并不意味着受上述实施例的限制,其他的任何未背离本申请的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,均包含在本申请的保护范围之内。

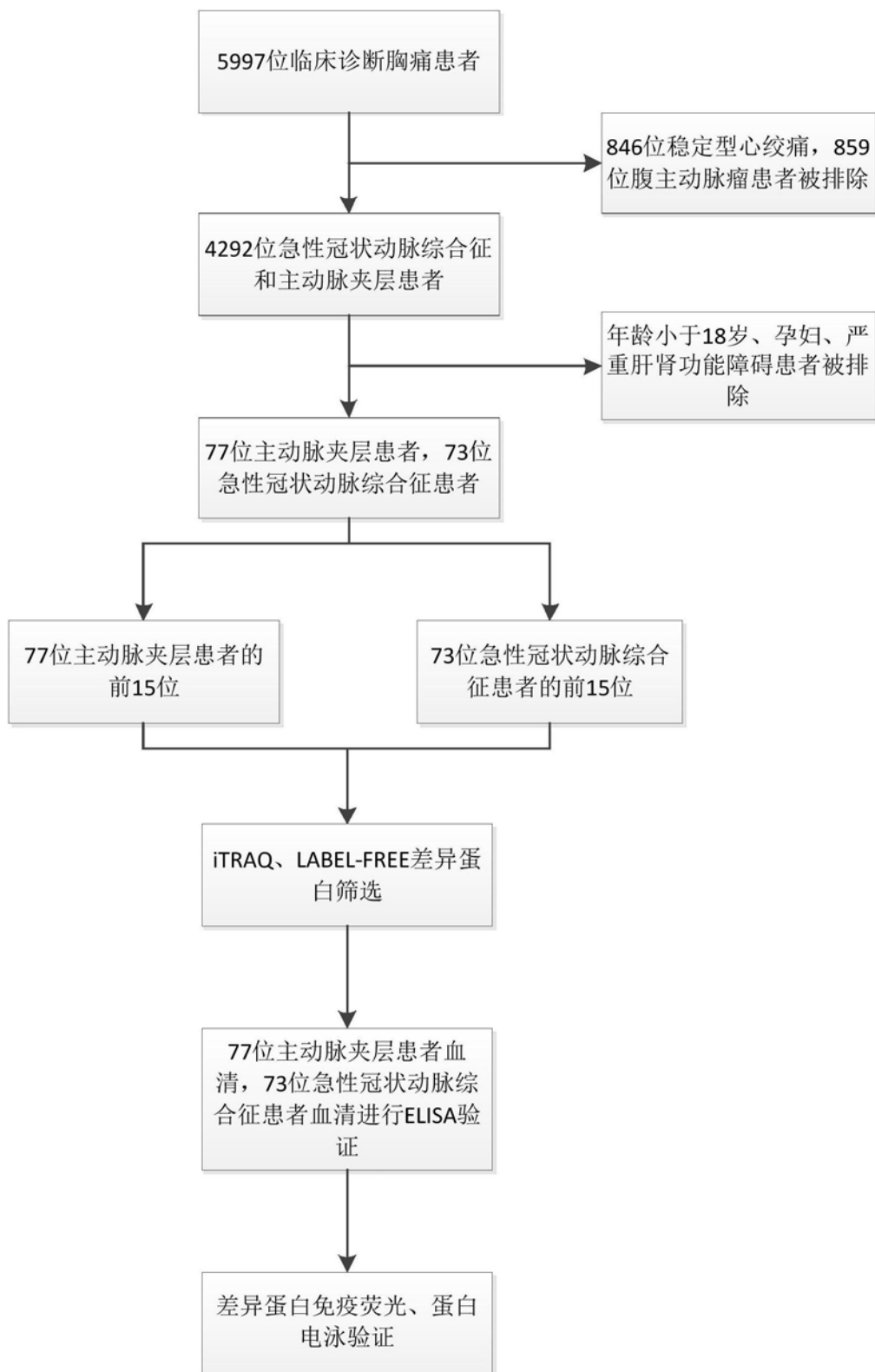


图1

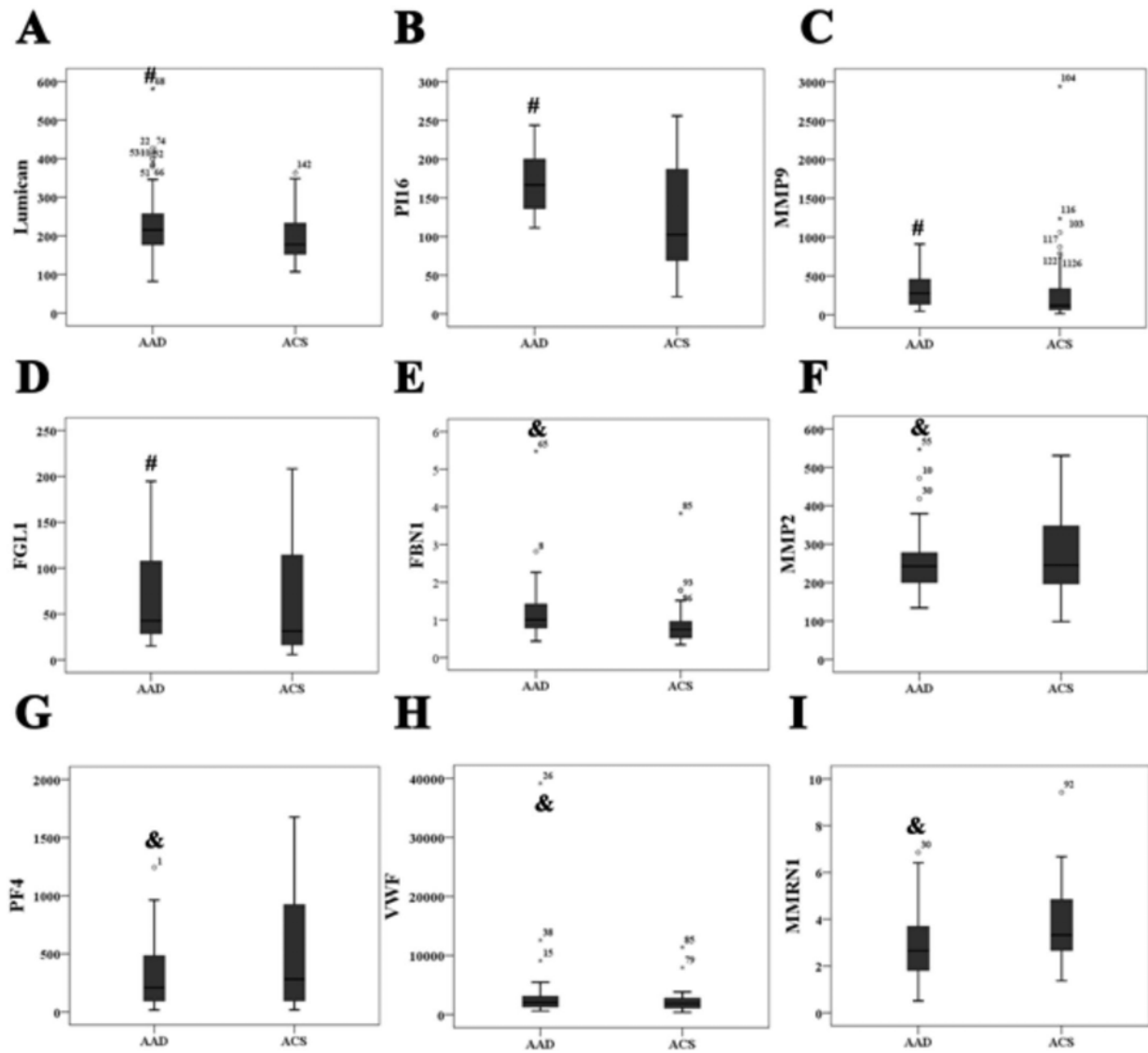


图2

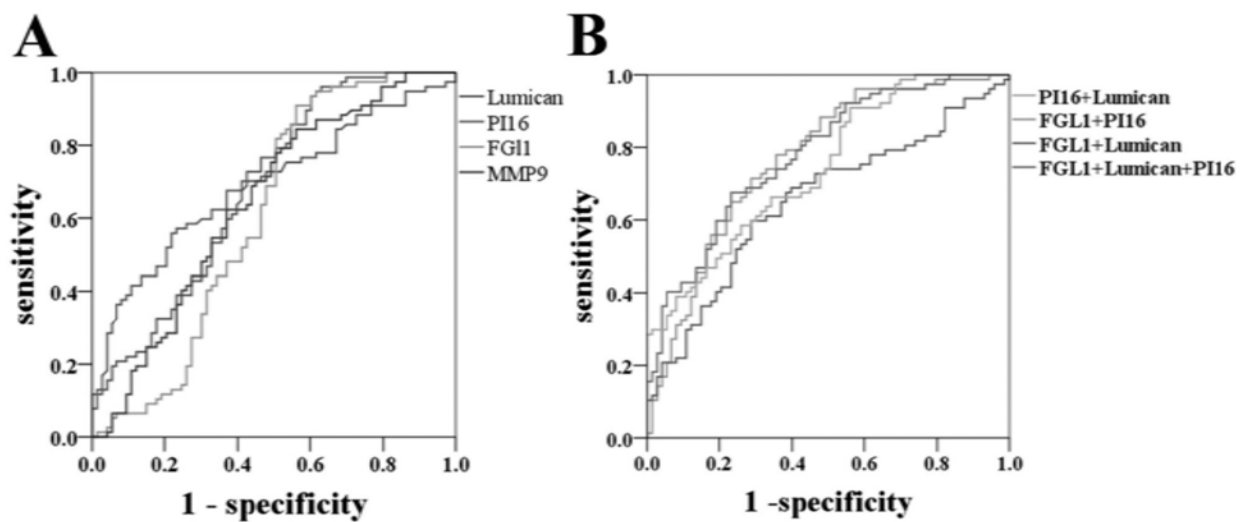


图3