



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117412703 A

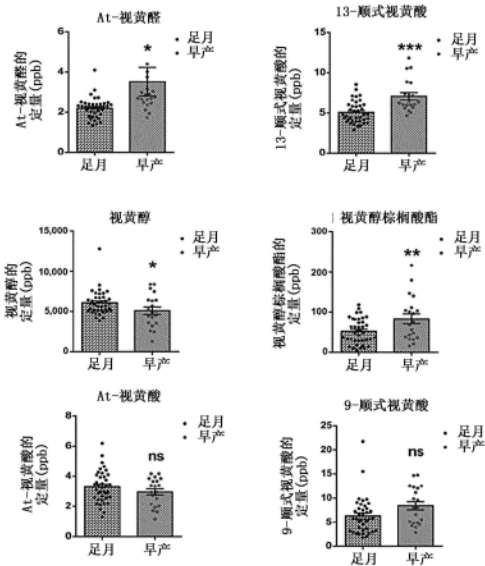
(43) 申请公布日 2024. 01. 16

(21) 申请号 202280039242.4
(22) 申请日 2022.04.11
(30) 优先权数据
10-2021-0053232 2021.04.23 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.11.30
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2022/005190 2022.04.11
(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/225241 KO 2022.10.27
(71) 申请人 梨花女子大学校 产学协力团
地址 韩国首尔
(72) 发明人 金英珠 俞泳我 A·安萨里
金修旻 朴先华 李佳仁

权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称
利用类视黄醇代谢物早期预测早产的方法

(57) 摘要
本发明涉及一种使用类视黄醇代谢物早期预测早产的方法。



1. 一种用于提供预测早产的信息的方法,其包括对生物样品中的选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组中的至少一种代谢物进行定量。
2. 根据权利要求1所述的方法,其还包括将所定量的代谢物的水平与对照组进行比较。
3. 根据权利要求2所述的方法,其还包括当所定量的代谢物的水平高于对照组时,预测存在早产的风险。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述对照组为正常分娩母体。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述生物样品分离自孕妇。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述生物样品是血液样品。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述生物样品是选自由全血、血浆和血清组成的组中的至少一种。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过选自由液相色谱-质谱仪、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA (酶联免疫吸附测定) 和质谱仪组成的组中的至少一种对所述代谢物进行定量。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述早产是指不是由肝功能障碍导致的早产。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述生物样品分离自没有肝功能障碍的母体。
11. 一种用于预测早产的组合物,其包含能够对生物样品中选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组中的至少一种代谢物进行定量的试剂。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中,所述试剂可以对所述代谢物水平的增加进行定量。
13. 根据权利要求11所述的组合物,其中,所述生物样品分离自孕妇。
14. 根据权利要求11所述的组合物,其中,所述生物样品是血液样品。
15. 根据权利要求11所述的组合物,其中,所述生物样品是选自由全血、血浆和血清组成的组中的至少一种。
16. 根据权利要求11所述的组合物,其中,通过选自由液相色谱-质谱仪、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA (酶联免疫吸附测定) 和质谱仪组成的组中的至少一种对所述代谢物进行定量。
17. 一种用于预测早产的试剂盒,其包含用于对生物样品中选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组中的至少一种代谢物进行定量的定量用试剂或定量用装置。
18. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中,所述试剂盒对所述代谢物水平的增加进行定量。
19. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中,所述生物样品分离自孕妇。
20. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中,所述生物样品是血液样品。
21. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中,所述生物样品是选自由全血、血浆和血清组成的组中的至少一种。
22. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中,所述定量用装置是选自由液相色谱-质谱仪、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA (酶联免疫吸附测定) 和质谱仪组成的组中的至少一种。
23. 一种用于预测早产的系统,其包括:

输入单元,其接收测试对象的生物样品的输入;

定量单元,其对所述样品中选自全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组中的至少一种代谢物进行定量;

计算单元,其将所定量的代谢物的水平与对照组进行比较;和

显示单元,其根据比较结果显示所述测试对象是否存在早产风险的结果。

24.根据权利要求23所述的系统,其中,当在所述计算单元中计算出所述代谢物的水平高于对照组时,所述显示单元显示所述测试对象具有早产的风险。

25.根据权利要求23所述的系统,其中,所述生物样品分离自孕妇。

26.根据权利要求23所述的系统,其中,所述生物样品是血液样品。

27.根据权利要求23所述的系统,其中,所述生物样品是选自由全血、血浆和血清组成的组中的至少一种。

28.根据权利要求23所述的系统,其中,所述定量单元通过选自由液相色谱-质谱仪、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA(酶联免疫吸附测定)和质谱仪组成的组中的至少一种对所述代谢物进行定量。

利用类视黄醇代谢物早期预测早产的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用类视黄醇代谢物早期预测早产的方法。

背景技术

[0002] 早产 (PTB) 是指不足37周分娩,根据亚洲地区107个国家地区的最新统计数据,早产发生率约为10.6%。以韩国为例,显示2006年的早产率约为4.8%,但2016年却几乎翻了一番,达到7.2%,而且早产率呈上升趋势。早产具有增加新生儿和儿童在5岁以下死亡率的风险,在短期内引起例如神经发育等问题的可能性增加,还具有增加2型糖尿病、肥胖症、高血压等的发病率的危险。

[0003] 早产的发病机制尚未明确,通常与自然分娩相关的风险因素包括生殖系统感染、多胎妊娠、妊娠第二阶段和第三阶段出血、既往早产病史等。此外,约75%的早产是由早期生产和胎膜破裂引起的,以及与之相关的宫颈机能不全和绒毛膜羊膜炎。

[0004] 韩国是一个分娩率较低的国家,但不足37周的早产率却在持续上升,这不仅威胁着母体和新生儿的健康,还进一步造成了经济损失。迄今为止,为了克服早产问题,已经通过胎儿纤连蛋白、测量CRP、测量宫颈长度等来预测早产,但是早产预测率的灵敏度仍然很低。

[0005] 因此,当在较早的周数出现早产迹象时,通过适当的治疗推迟分娩周数来提高新生儿的成熟度,对于母体和新生儿的健康和生活方式以及费用至关重要。

发明内容

[0006] [技术问题]

[0007] 本发明的一个实施方式提供了一种预测早产的方法或一种用于提供预测早产的信息的方法,该方法可以利用生物样品中类视黄醇代谢物的水平来预测早产。

[0008] 本发明的另一个实施方式涉及一种预测早产的试剂盒,其可以利用生物样品中类视黄醇代谢物的水平来预测早产。

[0009] 本发明的其他实施方式涉及一种预测早产的系统,其可以利用生物样品中的类视黄醇代谢物水平来预测早产。

[0010] [技术方案]

[0011] 本发明的一个实施方式涉及一种预测早产的方法或一种用于提供预测早产的信息的方法,其包括对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量。

[0012] 本发明的另一个实施方式涉及一种用于预测早产的组合物,其包含能够对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量的试剂。

[0013] 本发明的其它实施方式涉及一种用于预测早产的试剂盒,其包含用于定量的试剂或用于定量的装置,它们对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量。

[0014] 本发明的其它实施方式涉及一种用于预测早产的系统,其包括用于对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量的定量单元。

[0015] 下文将对本发明进行更详细的描述。

[0016] 本发明的一个实施方式涉及一种用于提供预测早产的信息的方法、一种预测早产的方法、一种用于提供诊断早产的信息的方法或一种诊断早产的方法,其包括对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量。

[0017] 在本说明书中,“早产”、“早期生产”、“早产儿”、“PTB”等术语具有相同的含义,指胎儿出生时不足37周。

[0018] 根据本申请的实施例,利用母体的血液样品对本发明的用于早产的类视黄醇代谢物标记物进行分析,结果显示早产组与足月组之间存在显著差异,因此,根据本发明的一个实施方式,可以利用用于类视黄醇代谢物的标记物预测早产。

[0019] 在本发明中,术语“早产风险诊断”或“早产风险预测”是指确定孕妇是否可能早产、是否可能有相对较高的早产可能性或是否可能出现早产迹象。

[0020] 本发明可用于通过对早产风险高的孕妇进行特殊和适当的管理来推迟或预防早产。此外,本发明可在临床上用于通过在早期阶段诊断早产,选择最合适的治疗方法,从而确定治疗方法。

[0021] 在本说明书中,术语“或”的含义包括“和/或”,除非内容有明确规定。

[0022] 在本说明书中,术语“标记物”、“用于诊断的标记物”、“诊断用标记物”、“诊断标记物”或“探针”是指用于预测早产孕妇并将其与正常分娩组区分开来的标准物质,并且指在预测早产的孕妇样品中显示出显著差异的生物有机分子。根据本发明的一个实施方式,标记物等可以包含生物样品中的代谢物。

[0023] 代谢物是体内新陈代谢产生的物质,可以表示为代谢物、中间代谢物、代谢中间体等,是指主要在细胞过程中产生的小分子代谢物整体。例如,根据本发明的一个实施方式,代谢物可以是类视黄醇代谢物。具体而言,代谢物可以包括选自由以下组成的组的至少一种:全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯。例如,代谢物可以包括选自由全反式视黄醛和13-顺式视黄酸组成的组的至少一种。

[0024] 在本说明书中,术语“生物样品”是指从测试对象或测试个体(例如孕妇)身上分离或收集的样品。生物样品可以是来自孕妇的样品,具体是孕妇的血液样品,例如,选自全血、血浆和血清的至少一种。

[0025] 根据本发明的一个实施方式,用于提供预测早产的信息的方法、预测早产的方法、用于提供诊断早产的信息的方法或诊断早产的方法,可以进一步包括将所定量代谢物的水平与对照组进行比较。

[0026] 例如,当代谢物是选自全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯的至少一种时,且所定量代谢物的水平高于对照组时,可进一步包括预测从其分离生物样品的孕妇有早产风险。对照组可以是正常分娩且没有早产的母体、怀孕37周以上分娩的母体或足月分娩的母体。

[0027] 在本说明书中,术语“增加”是指与比较对照组、例如已建立的对照组或标准对照组(例如,正常分娩的母体的生物样品或怀孕37周以上分娩的产妇的生物样品中显示的标记物代谢物的平均水平)相比,量增加、水平增加、分布增加、分布率增加或浓度增加等。具体而言,分布率可以是作为液相色谱-质谱仪等分析的结果的生物样品中特定代谢物的相对含量或相对浓度。

[0028] 例如,增加值可以超过对照组值的1倍,是对照组值的1倍以上、1.1倍以上、1.15倍以上、1.2倍以上、1.25倍以上、1.3倍以上、1.35倍以上、1.4倍以上、1.45倍以上或1.5倍以上,或统计意义上的显著增加,但是即使没有说明绝对增加值,本领域技术人员也能够清楚地理解与对照组相比显著增加的变化。对照组值可以是例如至少2个以上、3个以上、4个以上、5个以上、10个以上、15个以上、20个以上、25个以上、30个以上或35个以上对照组值的平均值。

[0029] 例如,当生物样品中全反式视黄醛的浓度是对照组值的1.5倍以上时,可以预测分离出该生物样品中的孕妇有早产的风险。

[0030] 例如,当生物样品中13-顺式视黄酸的浓度是对照组值的1.4倍以上时,可以预测分离出该生物样品中的孕妇有早产的风险。

[0031] 例如,当生物样品中视黄醇棕榈酸酯的浓度是对照组值的1.5倍以上时,可以预测分离出该生物样品中的孕妇有早产的风险。

[0032] 例如,当生物样品中全反式视黄醛的浓度为2.48ppb以上时,可以预测分离出该生物样品中的孕妇有早产的风险。

[0033] 例如,当生物样品中13-顺式视黄酸的浓度为5.56ppb以上时,可以预测分离出该生物样品中的孕妇有早产的风险。

[0034] 例如,当生物样品中视黄醇棕榈酸酯的浓度为100.33ppb以上时,可以预测分离出该生物样品中的孕妇有早产的风险。

[0035] 表示增加的术语,例如“高”、“更多”、“更高”、“显著高”、“统计意义上的显著高”等术语与上述含义相同。相反,术语“不显著”、“同样”、“基本相同”、“基本不变”等表示与标准对照组值相比变化不大或没有显著变化,例如在标准对照组的 $\pm 10\%$ 以内、 $\pm 5\%$ 以内、 $\pm 3\%$ 以内或 $\pm 2\%$ 以内等。

[0036] 在本说明书中,术语“对照组”是用于与本发明预测早产的代谢物水平进行比较的对象,可以与例如比较对照组、标准对照组或正常对照组的术语互换使用。例如,对照组可以是没有早产的母体、正常分娩的母体或怀孕37周以上分娩的母体。

[0037] 对代谢物的定量分析可以通过选自由液相色谱-质谱仪(LC/MS)、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA(酶联免疫吸附测定)和质谱仪组成的组中的至少一种进行。

[0038] 本发明一个实施方式的早产可能不是由肝功能障碍导致的早产。根据本申请的实施例,早产组与正常对照组的类视黄醇代谢物早产标记物显示出显著差异,而肝功能相关指数(具体地,肝细胞损伤因子水平,例如丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)等)没有显示出显著差异,更具体地,在妊娠第三阶段的肝细胞损伤因子水平没有显示出显著差异。因此,本发明的一个实施方式的早产可能不是肝功能障碍导致的早产。

[0039] 换句话说,本发明的一个实施方式的预测早产的受试母体可能是没有肝功能障碍的母体。具体而言,产妇可以是在怀孕第三阶段没有肝功能障碍的母体。

[0040] 例如,母体可以是肝功能相关指数或肝细胞损伤因子水平与正常对照组没有显著差异的母体。具体而言,母体可以是在妊娠第三阶段肝功能相关指数或肝细胞损伤因子水平与正常对照组没有显著差异的产妇。

[0041] 例如,母体可以是丙氨酸转氨酶(ALT)和/或天冬氨酸转氨酶(AST)水平与正常对

照组没有显著差异的母体。

[0042] 例如,母体的AST可为50U/L以下、45U/L以下、40U/L以下、35U/L以下、30U/L以下、25U/L以下或20U/L以下。

[0043] 例如,母体ALT可为50U/L以下、45U/L以下、40U/L以下、35U/L以下、30U/L以下、25U/L以下、20U/L以下、或15U/L以下。

[0044] 例如,母体可以是AST/ALT的比例是0.1至2、0.1至1.8、0.1至1.5、0.3至2、0.3至1.8、0.3至1.5、0.5至2、0.5至1.8、0.5至1.5、0.7至2、0.7至1.8、0.7至1.5、1至2、1至1.8或1至1.5的母体。

[0045] 本发明的另一个实施方式涉及一种用于预测早产的组合物,其包含能够对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量的试剂。

[0046] 类视黄醇代谢物如上所述,例如,可以包括选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组的至少一种。例如,代谢物可以包括选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸组成的组的至少一种。

[0047] 该试剂可以对生物样品中代谢物的量、水平、分布、分布率或浓度进行定量。

[0048] 例如,该试剂可以对选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸、视黄醇棕榈酸酯组成的组的至少一种(例如,选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸的至少一种)的增加进行定量,例如,量、水平、分布、分布率或浓度的增加。

[0049] 代谢物可通过液相色谱-质谱仪(LC/MS)、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA(酶联免疫吸附测定)和质谱仪(但不限于此)中的至少一种进行定量。

[0050] 本发明的另一个实施方式涉及一种用于预测早产的试剂盒,其中包括一种用于定量的试剂或一种用于定量的装置,该装置可对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量。类视黄醇代谢物如上所述。

[0051] 该试剂盒可以对选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸、视黄醇棕榈酸酯组成的组的至少一种(例如,选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸的至少一种)的增加进行定量,例如,量、水平、分布、分布率或浓度的增加。

[0052] 定量装置可以是选自由液相色谱-质谱仪(LC/MS)、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA(酶联免疫吸附测定)和质谱仪组成的组的至少一种,但不限于此。

[0053] 本发明的其他实施方式涉及一种用于预测或诊断早产的装置、设备或系统。具体而言,它涉及一种能够进行以下方法全部或部分步骤的装置、设备或系统:用于预测早产的方法、提供预测早产的信息的方法、诊断早产的方法或提供上述诊断早产的信息的方法。根据本发明的一个实施方式,装置、设备或系统可以使用用于预测早产的组合物或用于预测早产的试剂盒等进行全部或部分步骤。

[0054] 例如,装置、设备或系统可以获取测试对象的生物样品,例如,分离自测试对象孕妇的血液样品,对样品中本发明的标记代谢物的量或浓度进行定量,将该量或浓度与对照组(例如,正常分娩的对照组母体)进行比较,显示结果,该结果说明测试对象是否存在早产的风险。因此,本发明一个实施方式的装置、设备或系统可以包括用于对生物样品中的类视黄醇代谢物进行定量的定量单元。

[0055] 具体而言,装置、设备或系统可以包括:输入单元,其用于接收测试对象生物样品的输入;定量单元,其用于对样品中的本发明标记代谢物进行定量;计算单元,其用于将所定量代谢物的水平与对照组的数值进行比较;以及显示单元,其用于根据比较结果显示测试对象是否存在早产风险的结果。

[0056] 标记代谢物如上所述,例如,可以包括选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组的至少一种。例如,标记代谢物可以包括选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组的至少一种。

[0057] 当在计算单元中计算出选自由全反式视黄醛、13-顺式视黄酸和视黄醇棕榈酸酯组成的组的至少一种的水平高于对照组时,显示单元可以显示出测试对象有早产风险。

[0058] 可以从孕妇中分离生物样品。生物样品可以是血液样品,例如,可以是选自由全血、血浆和血清组成的组中的至少一种。

[0059] 定量单元可以使用选自由液相色谱-质谱仪(LC/MS)、核磁共振光谱仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、荧光光谱仪、ELISA(酶联免疫吸附测定)和质谱仪组成的组中的至少一种对代谢物进行定量。

[0060] [有益效果]

[0061] 根据本发明的一个实施方式,通过使用类视黄醇代谢物早产标记物,可以在早期阶段预测早产,实现无创、高精度的早产预测。

[附图说明]

[0062] 图1是示出了本发明的一个实施方式的选择测试对象的过程的流程图。

[0063] 图2示出了RPC阳性中PTB与TB区别明显的类别($Q^2=0.072$; $R^2=0.085$)。

[0064] 图3示出了通路影响分析的散点图,y轴表示p值。

[0065] 图4是示出了通过类视黄醇代谢物分析(39TB、20PTB)显示早产母体血浆样品中的变化的类视黄醇代谢物的示意图。

[0066] 图5是示出了代谢物的ROC曲线分析的图,并且利用灵敏度和特异性的ROC曲线示出了早产生物标志物的预测性能。

具体实施方式

[0067] 下文中,将通过以下实施例更详细地描述本发明。然而,这些实施例仅用于说明本发明,但是本发明的范围不限于这些实施例。

[0068] 实验材料和方法

[0069] 实施例1. 研究受试者

[0070] 招募了前往梨花女子大学医疗中心进行产前检查和分娩的孕妇。将受试者分为用于分析代谢物图谱的发现组(10TB和11PTB)和用于分析类视黄醇代谢物的验证组(39TB和20PTB)。研究受试者为无症状的单胎孕妇,或在怀孕16周至35周零5天之间出现早产(PTL)和/或胎膜早破(pPROM)的住院孕妇。

[0071] 通过心电图检测,宫缩规律/且在20分钟内宫缩4次以上或在60分钟内宫缩8次以上的患者,可以诊断为早产(PTL)。为了诊断胎膜早破(pPROM),进行了无菌窥镜检查以检测阴道腔内羊水的固定情况,以及硝嗪试验以检测胎膜是否破裂。通过末次月经的第一天和

超声检查确定孕龄。当孕妇来访进行产前检查或住院分娩时,采集血液样品并储存在-80℃,直到进行代谢物分析。

[0072] 本研究已获得梨花女子大学医院机构审查委员会(EUMC)批准(EUMC 2018-07-007-010)。所有实验均按照批准的指南进行,获得了所有受试者的知情同意。

[0073] 实施例2.母体血液样品的准备

[0074] 用600μL的溶剂混合物(乙腈/甲醇/丙酮;1:1:1,v/v)沉淀200μL的血浆样品,然后涡旋混合3分钟,在-20℃下静置30分钟。将沉淀后的样品在4℃下以10000g离心10分钟,然后将600μL上清液转移到另一个试管中,在温和的氮气流下蒸发和干燥。将残留物用200μL的50%甲醇复溶,然后用UPLC-LTQ-Orbitrap MS对5μL样品(RPC分离模式)进行分析。

[0075] 实施例3.利用LTQ-Orbitrap MS进行代谢物谱分析

[0076] 使用Ultimatbe 3000UHPLC系统(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)结合配备有以正离子模式(ESI+)运行的电喷雾源的LTQ-OrbitrapVelos Pro混合质谱仪(Thermo Fisher Scientific)进行代谢物谱分析。采用Acquity™UPLC BEH C18柱(2.1mm×100mm, 1.7μm, Waters, Milford, MA, USA) UPLC分析柱进行反相分离。作为流动相溶剂,使用95%水、5%ACN和0.1%甲酸(流动相A)以及95%ACN、5%水和0.1%甲酸(流动相B)。洗脱梯度如下:0至3分钟,100%流动相A;3至10分钟,线性增加至50%流动相;10至12分钟,线性增加流动相B为50%至90%;12至15分钟,保持线性增加100%流动相A;15至18分钟,重新平衡至100%流动相A。柱保持在50℃;总运行时间为18分钟。分析时,注入各个样品的等分试样5μl。在分析过程中,样品在自动进样器中保持4℃。

[0077] 实施例4.制备用于验证类视黄醇代谢物的标准储备溶液

[0078] 为了分析TB和PTB的代谢通路,决定分析类视黄醇代谢物。对于视黄醇(ROH)、乙酸视黄酯(RAc)、视黄醇棕榈酸酯(RP)、全反式视黄醛(at-RAL)、全反式视黄酸(at-RA)、13顺式视黄酸(13cis-RA)、视黄醇乙酸酯-D6(RAc-D6)、全反式视黄醛-D6(at-RAL-D6)和全反式视黄酸-D6(at-RA-D6),将所有指定的类视黄醇分析参照标准品和内部标准品的存储溶液均匀地溶解在甲醇中,使最终浓度为2000ppm。视黄醇-D6(ROH-D6)例外地制备,最终浓度为1000ppm。在-20℃下保存溶液直至使用。通过将这些标准储备溶液在800ppb至0.05ppb范围内连续稀释4次,制备用于最终定量目标类视黄醇的校准曲线。ROH、RAc、at-RAL和at-RA标准品购自Cayman Chemicals公司(Ann Arbor, Michigan),RP和13cis-RA购自Sigma Aldrich公司(St. Louis, USA, Missouri)。上述4种同位素标记的内部标准品均购自Cambridge Isotopes Laboratories公司(Tewksbury, USA, Massachusetts)。

[0079] 实施例5.样品制备

[0080] 为了有效提取血浆样品中的目标类视黄醇,采用了液液萃取法。向每份200μL的血浆样品中加入同位素标记的内部标准品混合物,在用200μL乙腈沉淀血清蛋白之前,进行涡旋片刻。涡旋1分钟后,向每个试管中加入1.2mL的甲基叔丁基醚,再次进行涡旋1分钟。然后,将样品以13000rpm、4℃离心10分钟,最后将上层有机层转移至新试管中。转移的上清液在室温下用氮气干燥,残留物用20μL甲醇复溶。涡旋5分钟后,最后将上清液转移至洁净的玻璃MS瓶中,盖上盖子以进行另外的LC-MS/MS分析。

[0081] 实施例6.LC-MS/MS分析

[0082] 在Accucore C18柱(2.1x100 mm, 粒径2.6μm, Thermo Scientific™, USA)上对血

浆样品提取物进行色谱分离,整个实验过程中温度保持在30℃。样品的进样量固定为2μL。目标类视黄醇在流动相组合物下于22分钟内被分离出来,该流动相组合物由80%乙腈(A)和100%甲醇(B)组成,两者均加入0.1%甲酸修饰。流动相系统最初在A相100%的等度模式下保持7分钟,流速从0.2mL/min线性增至0.4mL/min。然后,立即切换到100%B相,保持15分钟,流速保持在0.4mL/min。再过2分钟,系统利用线性梯度逐渐回到100%A相,流速再次降至0.2mL/min。为了再次达到平衡,将该条件保持了5分钟。此后,使用配备有ESI(电喷雾电离)源的Agilent 6460C三重四极杆LC-MS/MS系统对柱流出物进行分析。质谱仪在阳离子模式下使用喷雾气体运行。将加热喷雾器的温度设定为300℃,离子喷雾电压为4500。通过为视黄醇(ROH)、视黄醇-D6(ROH-D6)、视黄醇乙酸酯(RAc)、视黄醇乙酸酯-D6(RAc-D6)、视黄醇棕榈酸酯(RP)选择[M+H-脂肪酸-H₂O]⁺的前体离子,为at-RAL、at-RAL-D6、at-RA、9cis-RA、13cis-RA和at-RA-D6选择[M+H]⁺,采用多反应监测(MRM)模式对类视黄醇进行定量。表1总结了所有上述分析物的优化MRM通道、MS参数和LC保留时间。为了最终定量,将目标类视黄醇的各个峰面积相对于相应内部标准品的响应(在ROH的情况下为0.5ppm ROH-D6;在Rac和RP的情况下为0.25ppm RAc-D6;在at-RAL的情况下为0.25ppm at-RAL-D6;在at-RA、9cis-RA、13cis-RA的情况下为1ppm at-RA-D6)标准化。

[0083] [表1]

[0084] 目标分析物的LC保留时间、MRM过渡和MS参数

[0085] *内部标准品

[0086]

分析物	R _t (min)	极性	前体 (m/z)	产物 (m/z)	碎裂 能量(V)	碰撞 能量(V)
13 顺式视黄酸	3.128	正极	301.2	123.1	105	12
9 顺式视黄酸	3.334	正极	301.2	123.1	105	12
全反式视黄酸	3.530	正极	301.1	159.1	115	18
视黄酸-D6*	3.531	正极	307.2	165.2	115	18
全反式视黄醛	4.679	正极	285.2	161.1	115	2
视黄醛-D6*	4.679	正极	291.2	69	95	22
视黄醇	3.674	正极	269.2	93.1	115	18
视黄醇-D6*	3.674	正极	275.2	96	110	14
视黄醇乙酸酯	6.889	正极	269.2	96	108	21
视黄醇乙酸酯-D6*	6.889	正极	275.2	96	115	16
视黄醇棕榈酸酯	13.982	正极	269.1	96	111	21

[0087] 实施例7. 统计分析

[0088] 使用连续变量的学生t检验和分类变量的卡方检验来比较研究组的基本特征。进行多变量分析,以获得TB和PTB孕妇血浆中代谢谱变化的变量列表。使用Umetrics (Umea, Sweden) 的SIMCA-P软件v14.0进行多变量分析。通路影响分析和热图可视化由Metaboanalys t3.0(Montreal, QC, Canada)完成,这是一种基于网络的代谢组学数据处理工具和可视化代谢组学。通路图谱和化学相似性分析由R 3.2.2版本、MetaMapp和

CytoScape 3.4.0 (Boston, MA, USA) 生成。在使用LC-MS/MS进行验证时,使用根据采样时的孕龄进行调整的广义线性模型来分析差异代谢物水平。通过应用ROC曲线的AUC来总结PTB的诊断准确性。统计学上,人物 $P < 0.05$ 为显著的。在统计分析中,使用社会科学统计软件包(SPSS, 2.0版, Chicago, IL, USA) 和在线MEDCALC软件。

[0089] 实验结果

[0090] 1. 实验对象的临床特征

[0091] 为了确认早产组 (PTB) 的代谢组学特征 (发现组; TB, $n = 10$; PTB, $n = 11$; 表2) 并验证目标代谢物 (验证组; TB, $n = 39$; PTB, $n = 20$; 表3), 从怀孕16周至40周零5天的孕妇采集外周血 (图1)。图1是示出了选择测试对象的过程的流程图。发现组早产母体和足月母体的临床特征如表2所示, 验证组早产母体和足月母体的临床特征如表3和表4所示。

[0092] 在发现组和验证组中, 早产组和足月组在取样和分娩时的胎龄等临床因素均存在显著差异 ($P < 0.05$, 表3)。表3示出了用于验证的受试者的临床特征。在验证组中, 白细胞数量和C反应蛋白在两组间有显著差异 ($P < 0.05$)。妊娠第三阶段孕妇的肝功能酶 (例如, 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天门冬氨酸转氨酶 (AST)) 以及脂谱在早产组 (早生产) 和足月组 (足月出生) 之间没有显著差异 (表4)。足月母体中没有出现绒毛膜羊膜炎, 但早产母体中发现了2例绒毛膜羊膜炎。

[0093] [表2]

[0094] 非目标代谢物谱分析受试者的临床特征 (发现组) ($n = 21$)

[0095]

	足月出生($n=10$)	早产($n=11$)	p 值
	中位数(IQR)	中位数(IQR)	
产妇年龄	33.0 (4.8)	33.0 (4.8)	0.669*
GAS	38.5 (1.6)	31.4 (7.4)	$< 0.00*1$
奇偶校验			0.423 [†]
未育, n	3	4	
多产, n	7	7	
妊娠期			0.237 [†]
0, n	3	7	
≥ 1 , n	7	4	
WBC ($\times 10^3/\text{ml}$)	9.8 (2.9)	10.3 (8.4)	0.468*
C-反应蛋白 (mg/dl)	-	0.5 (0.9)	-

[0096]

AST (IU/L)	21.0 (7.3)	21.0 (3.0)	0.809*
ALT (IU/L)	14.5 (3.8)	14.0 (9.0)	1.000*
AST/ALT 比值	1.4 (0.6)	1.4 (0.7)	0.918*
TC (mg/dl)	259.5 (29.0)	253.0 (36.0)	0.512*
TG (mg/dl)	259.0 (115.5)	178.0 (148.0)	0.114*
BUN (mg/dl)	7.0 (1.6)	6.0 (6.0)	0.863*
肌酐 (mg/dl)	0.7 (0.1)	0.6 (0.2)	0.223*
BUN/肌酐比值	10.1 (2.9)	10.1 (8.8)	0.705*
孕期 BMI	25.2 (3.3)	25.0 (3.7)	0.029*
GAD	38.5 (1.6)	33.0 (8.6)	< 0.001*
分娩方式			0.063 [†]
正常分娩, n	7	3	
剖腹产, n	3	8	
出生体重 (Kg)	3.3 (0.3)	2.0 (1.5)	< 0.001*
性别, n(%)			0.426 [†]
男性, n	7	7	
女性, n	3	4	
APGAR 1min	10.0 (0.0)	6.0 (6.0)	< 0.001*
APGAR 5min	10.0 (0.0)	9.0 (3.0)	0.003*

[0097] 数据以中位值 (四分位数间距, IQR) 表示。*Mann Whitney 检验, $P < 0.05$;[0098] [†] χ^2 检验, $p < 0.05$

[0099] GAS: 取样时的孕龄;

[0100] PregBMI: 分娩时的体重指数;

[0101] GAD: 分娩时的孕龄。

[0102] [表3]

[0103] 验证组研究受试者 (验证受试者) 的临床特征

[0104]

	足月 (<i>n</i> = 39)	早产 (<i>n</i> = 20)	p 值
产妇年龄	33.3 ± 0.7	32.7 ± 1.0	0.626 *
GAS	23.0 ± 0.8	27.6 ± 1.6	0.010*
孕前 BMI	21.0 ± 0.4	21.7 ± 0.7	0.397 *
奇偶校验			0.488†
未育	16 (42.1)	8 (40.0)	
多产	21 (57.9)	12 (60.0)	
妊娠期			0.416†
0	25 (64.1)	11 (55.0)	
≥ 1	14 (35.9)	9 (45.0)	
WBC (× 10 ³ /ml)	8.8 ± 0.4	11.6 ± 0.6	<0.001 *
C-反应蛋白 (mg/dl)	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.034*
孕期 BMI	26.8 ± 0.6	26.4 ± 0.8	0.397
GAD	39.0 ± 0.2	33.3 ± 1.0	<0.001 *
分娩方式			0.026†
正常分娩	23 (59.0)	5 (25.0)	
剖腹产	16 (41.0)	15 (75.0)	
出生体重 (Kg)	3.2 ± 0.1	22.0 ± 0.2	<0.001 *
性别, n(%)			0.651†
男	25 (64.1)	14 (70.0)	
女性	14 (35.9)	6 (30.0)	
APGAR 1min	9.7 ± 0.1	7.9 ± 0.5	0.002 *
APGAR 5min	9.9 ± 0.1	8.9 ± 0.4	0.009 *

[0105] 连续变量的数据以平均值 ± SE表示。*学生t检验, $p < 0.05$;[0106] † χ^2 检验, $p < 0.05$ TB: 足月;

[0107] PTB: 早产;

[0108] GAS: 取样时的孕龄;

[0109] PreBMI: 孕前体重指数;

[0110] PregBMI: 分娩时的体重指数;

[0111] WBC: 白细胞;

[0112] GAD:分娩时的胎龄;

[0113] APGAR:Apgar评分(肤色、脉搏、皱眉动作即对刺激的反应(Grimace)、肌张力(Activity)、呼吸、Apgar评分)

[0114] [表4]

[0115] 与足月母体和早产母体类视黄醇代谢相关的血液指标(n=59)

[0116]

分类	足月 (n=39)	早产 (n=20)	p 值
AST (IU/L)	16.92 ± 0.70	17.75 ± 1.38	0.554
ALT (IU/L)	11.79 ± 1.17	12.95 ± 2.00	0.597
AST/ALT	1.69 ± 0.09	1.62 ± 0.11	0.642
TC (mg/dl)	263.64 ± 7.07	257.75 ± 9.96	0.630
TG (mg/dl)	307.23 ± 24.90	264.85 ± 29.62	0.303
BUN (mg/dl)	8.41 ± 0.53	7.50 ± 0.77	0.328
肌酐 (mg/dl)	0.57 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.066
BUN/肌酐	14.75 ± 0.56	15.60 ± 1.08	0.441

[0117] 数据以平均值±SE表示。

[0118] *学生t检验、

[0119] 2.母体血浆样品的代谢物分析

[0120] 为了确定早产特有的代谢物和代谢通路,使用超高效液相色谱(UPLC)结合LTQ-Orbitrap Velos Pro混合质谱仪对非目标代谢物进行了分析。进行多变量分析以获得代谢组学图谱变化的变量列表。通过应用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)的得分图,确定了可用于区分PTB和TB组的代谢组学图谱。图2示出了RPC阳性中PTB与TB区别明显的类别(Q2=0.072;R2=0.085)。如图2所示,在PLS-DA评分图中,早产母体(红色)和足月母体(蓝色)的血浆代谢物具有不同的分类。基于变量投影重要性(VIP)值大于1和p值小于0.05,确定了235个可变离子中的15种代谢物。具体数据如表5所示。

[0121] [表5]

[0122] 通过UPLC-LTQ-Orbitrap MS对可变离子进行多变量分析的排序结果

[0123]

编号	RT_Mass	检测方法	VIP值	p值	变化	倍数变化(P/C)
1	11.61_163.0094	RP	2.66	1.51E-03	↑	7.41
2	11.36_319.2058	RP	2.41	3.60E-02	↑	1.94
3	10.92_274.2816	RP	2.09	2.63E-02	↓	0.79
4	5.96_90.5243	RP	2.05	2.74E-02	↑	6.51
5	11.63_270.2154	RP	1.98	1.72E-02	↑	3.34
6	11.35_133.1127	RP	1.85	2.50E-02	↓	0.34
7	11.58_121.102	RP	1.54	3.07E-02	↑	8.11
8	10.97_106.0885	RP	1.53	4.25E-02	↓	0.73

9	10.2_95.0765	RP	1.34	4.65E-02	↑	2.60
10	11.53_834.6856	RP	1.30	3.95E-02	↑	61.76
11	2.16_90.5248	RP	1.29	4.76E-02	-	-
12	11.36_145.0167	RP	1.19	1.44E-02	↑	1.75
13	10.99_334.3113	RP	1.16	3.45E-02	↓	0.61
14	9.22_95.0809	RP	1.00	3.87E-02	↑	2.48
15	11.42_117.0732	RP	0.97	4.47E-02	↑	9.68
16	9.67_369.1706	RN	1.35	2.13E-02	↑	6.51
17	11.5_685.5345	RN	1.35	5.63E-03	↑	11.66
18	0.82_313.0628	RN	0.98	4.40E-02	↑	2.20

[0124] 3. 代谢通路相关的早产

[0125] 为了更好地了解孕妇血浆中的代谢变化如何与早产关系,对代谢通路进行了分析。通路分析(通路影响分析)基于KEGG数据库和MetaboAnalyst 3.0进行全面的代谢数据分析、可视化和解释。通路分析的结果如图3所示。图3示出了通路影响分析的散点图,y轴表示p值。x轴表示通路拓扑分析,y轴表示通路富集分析。结果表明,包括视黄醇代谢、亚油酸代谢、D-精氨酸和D-鸟氨酸代谢在内的代谢通路与早产有关。

[0126] 4. 目标血浆代谢物的分析

[0127] 以参与类视黄醇代谢的代谢物为分析目标,研究早产的病理机制。使用LC-MS分析孕妇血浆中的类视黄醇代谢物(TB,n=39;PTB,n=20)。当孕龄调整时,PTB的类视黄醇代谢物与TB相比显著变化(图4)。图4是示出了通过类视黄醇代谢物分析显示早产母体(39TB、20PTB)的血浆样品中的类视黄醇代谢物变化的图。与TB相比,PTB中的视黄醇水平显著降低,而视黄醇棕榈酸酯、全反式(AT)-视黄醛和13-顺式视黄酸(13cis-RA)显著升高($p < 0.05$)。

[0128] 5. 早产的预测性能

[0129] 通过应用ROC(接受者操作特性)曲线的AUC(曲线下面积)来验证早产的诊断准确性。类视黄醇代谢物对早产预测显示具有显著性的0.6以上的预测值($p < 0.01$;表6,图5)。图5是示出了代谢物的ROC曲线分析并且使用灵敏度和特异性的ROC曲线示出了早产生物标志物的预测性能的图。在代谢物中,AT-视黄醛(AUC 0.808,95%CI:0.683-0.933)和13cis-RA(AUC 0.826,95% CI:0.723-0.930)显示出改善的预测能力。临界值是区分早产风险组和正常组的代谢物浓度值的标准,其作为对应于在添加了灵敏度和特异性的值中最高数据值的代谢物浓度而导出。

[0130] [表6]

[0131] 视黄醇相关代谢物在预测早产方面的作用

[0132]

代谢物	AUC	p 值	临界值 (ppb)	SENS	SPEC	PPV	NPV	准确性
AT-视黄醛	0.808	< 0.001	2.48	75.0%	84.2%	68.2%	86.5%	79.7%
13cis-RA	0.826	< 0.001	5.56	85.0%	68.4%	58.6%	90.0%	74.6%
9cis-RA	0.679	0.026	9.56	45.0%	92.1%	69.2%	76.1%	74.6%
视黄醇棕榈酸酯	0.670	0.035	100.33	40.0%	94.7%	72.7%	75.0%	74.6%

[0133] 为统计分析进行ROC (接受者操作特性) 曲线分析法, 认为 $P < 0.05$ 具有显著性。

[0134] AUC: 曲线下面积;

[0135] SENS: 灵敏度;

[0136] SPEC: 特异性;

[0137] PPV: 阳性预测值;

[0138] NPV: 阴性预测值;

[0139] OR: 奇数比;

[0140] At: 全反式

[0141] RA: 视黄酸;

[0142] 截止值: 临界值

[0143] 结论

[0144] 本发明证实了血浆代谢物谱和代谢通路, 从而支持早产的致病机制, 并且研究了用于预测孕妇早产的生物标志物。根据本发明, 早产组的代谢物谱与足月组有显著差异, 并且视黄醇代谢物中的全反式视黄醛 (AT-视黄醛) 和13-顺式视黄酸 (13cis-RA) 显示出改善的对早产的预测。

[0145] 在本发明中, 收集了第二阶段或分娩时的孕妇血液。尽管孕龄调整, 但是早产组血浆代谢物谱与足月组不同, 类视黄醇代谢物的变化与早产相关。

[0146] 血液中的维生素A与视黄醇结合蛋白RBP以1:1的复合物形式转运至血浆。根据本发明, 与TB相比, PTB中血浆视黄醇水平降低, 但是PTB中与AT-视黄醛和13cis-RA水平相关的RBP水平升高, 并且这些代谢物呈正相关。RBP不仅能与视黄醇结合, 还可以与AT-视黄醛和13cis-RA结合, 可以通过Stra6受体传递至靶组织。高水平的视黄酸 (ATRA和13cis-RA) 的特定代谢产物可通过影响关键器官形成和胚胎形成过程中的基因活性而导致畸形。

[0147] 总之, 本发明发现了TB和PTB孕妇血浆之间的代谢物谱和目标代谢物的变化。特别地, 全反式视黄醛 (AT-视黄醛) 和13顺式视黄酸 (13cis-RA) 具有对于早产优异的预测准确性。

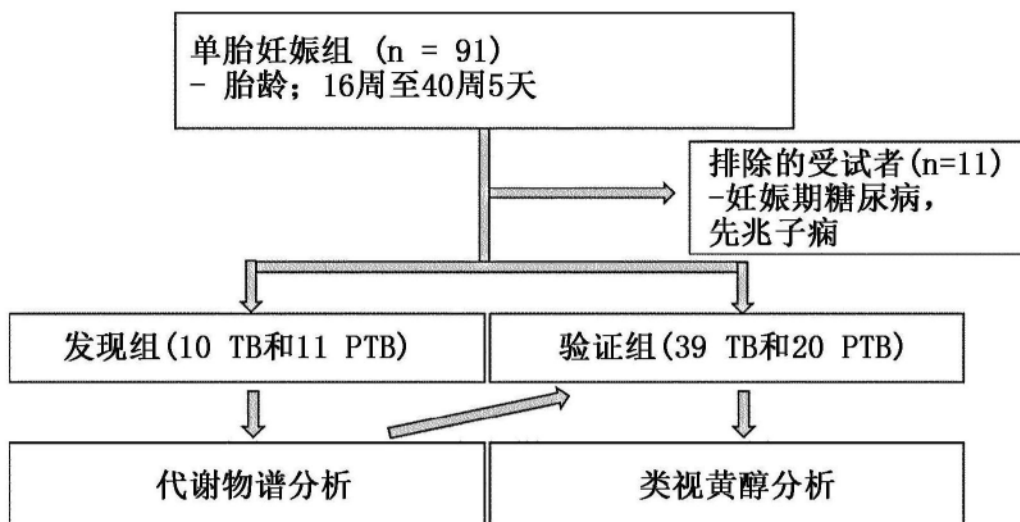


图1

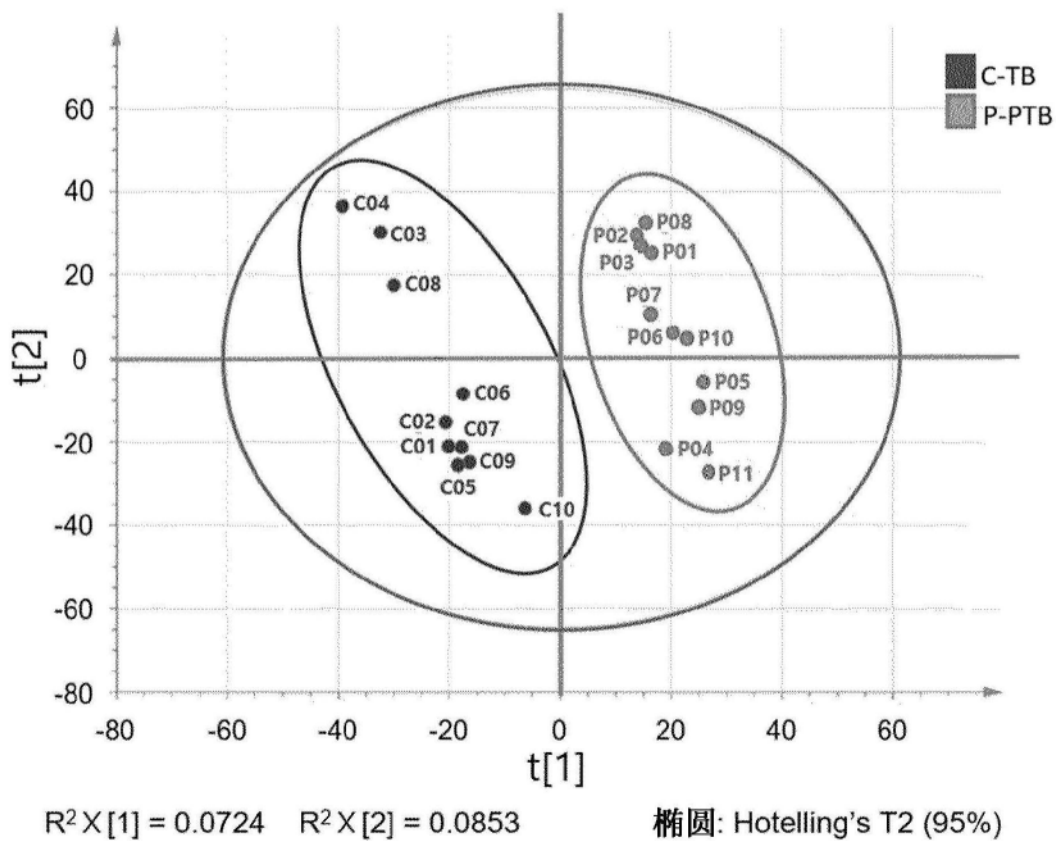


图2

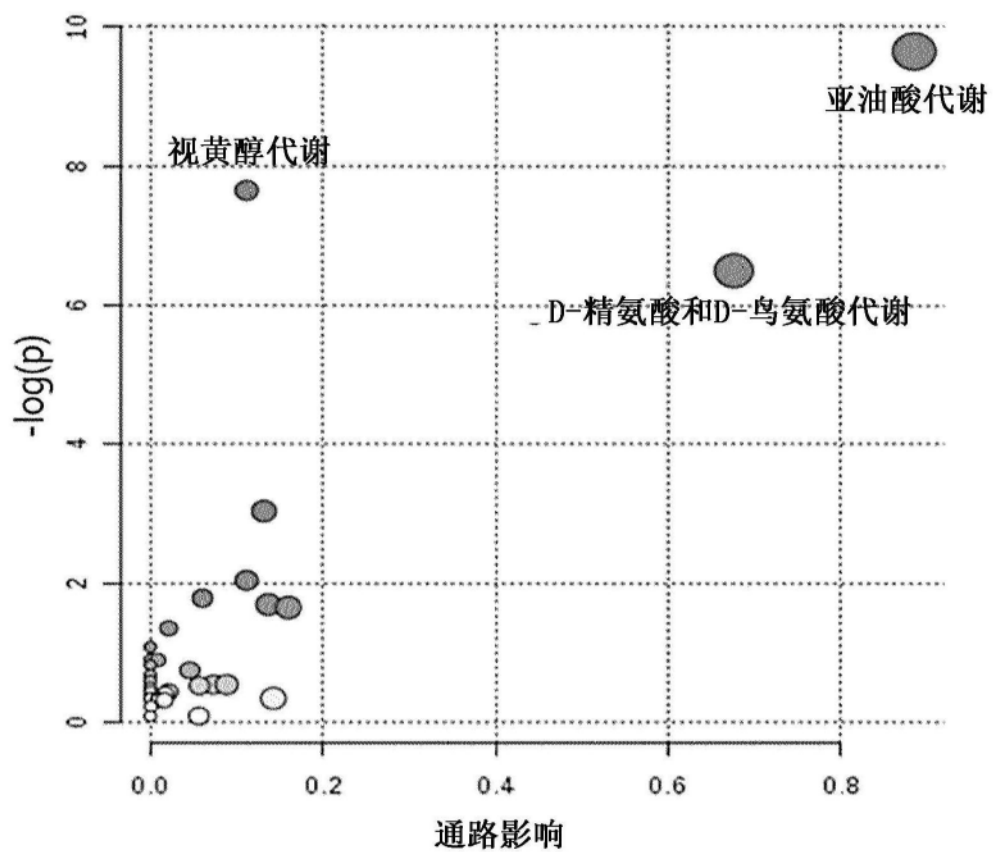


图3

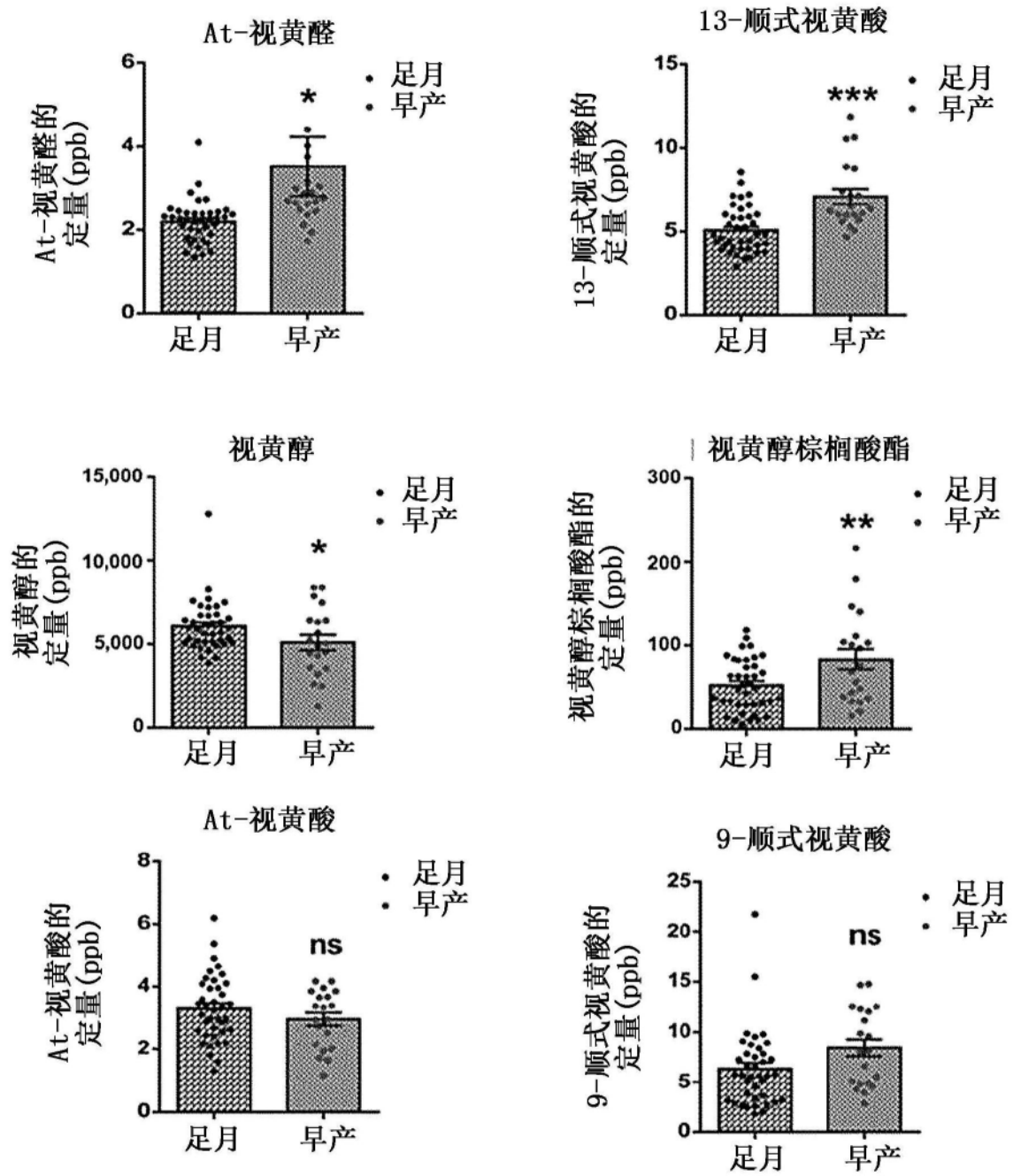


图4

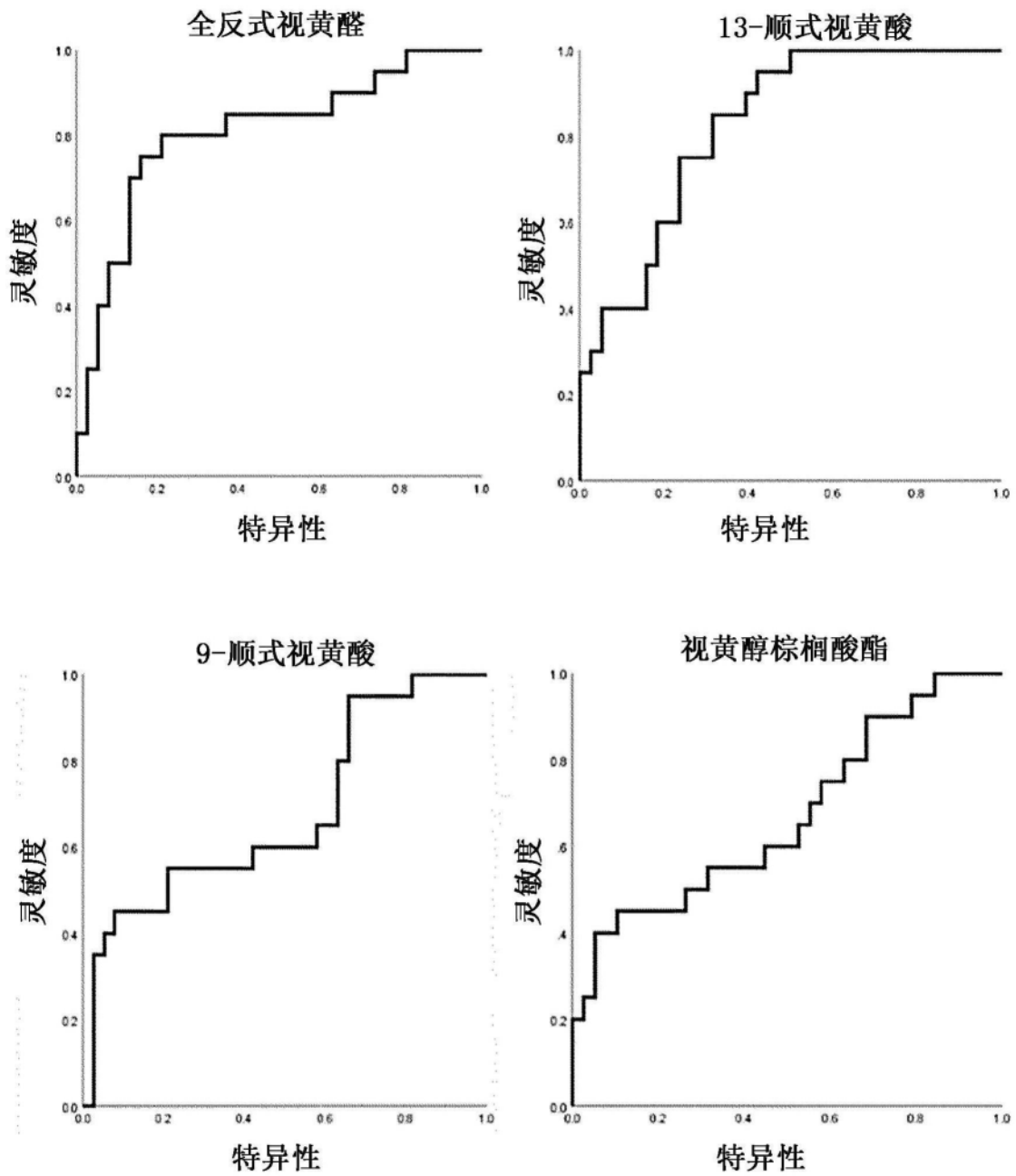


图5