



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112858552 B

(45) 授权公告日 2022.04.12

(21) 申请号 201911190717.6

(22) 申请日 2019.11.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112858552 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(73) 专利权人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山
路457-41号

(72) 发明人 陆欣 李艳丽 路鑫 胡春秀
王砚凤 许国旺

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限
公司 21002
代理人 郑伟健

(51) Int. Cl.

G01N 30/88 (2006.01)

(56) 对比文件

- CN 108333268 A, 2018.07.27
- CN 109154610 A, 2019.01.04
- JP 2011247869 A, 2011.12.08
- CN 101200755 A, 2008.06.18
- CN 108196052 A, 2018.06.22
- CN 108931598 A, 2018.12.04
- CN 101806805 A, 2010.08.18
- CN 105233291 A, 2016.01.13
- CN 105092842 A, 2015.11.25

审查员 王方

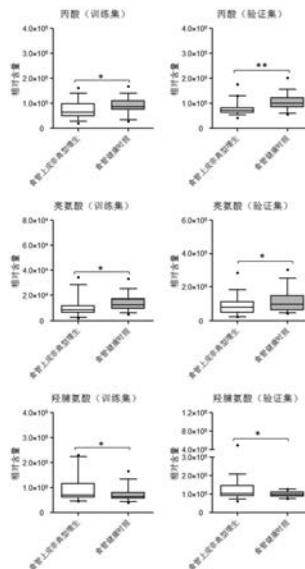
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

联合型代谢标志物的试剂在制备用于诊断食管上皮非典型增生疾病的试剂盒中的用途

(57) 摘要

本发明涉及联合型代谢标志物的试剂在制备用于诊断食管上皮非典型增生疾病的试剂盒中的用途,血清样本中小分子代谢产物丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸作为联合标志物,通过检测来自受试者的血清样本中上述联合标志物的相对浓度,基于线性回归方程计算所述联合标志物变量P,再基于确定的阈值判断所述受试者是否患有食管上皮非典型增生患者。



1. 联合型代谢标志物的试剂在制备用于诊断食管上皮非典型增生疾病的试剂盒中的用途,其特征在於:所述试剂盒包括联合型的代谢标志物丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸标准品。
2. 按照权利要求1所述的用途,其特征在於:通过患者的血清样品,区分食管健康受试者与食管上皮非典型增生患者。

联合型代谢标志物的试剂在制备用于诊断食管上皮非典型增生疾病的试剂盒中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及分析化学、生物化学及临床医学领域。

背景技术

[0002] 食管癌(esophageal cancer, EC)是我国高发的一种恶性肿瘤,我国每年的发病例数约占世界发病总数的一半,食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)为我国最为常见的食管癌类型,其术后整体5年生存率不足25%,早发现、早治疗是食管癌防治最行之有效的方法。食管鳞癌的发生往往伴随着食管相关部位的癌前病变,其中食管上皮非典型增生(esophageal squamous dysplasia, ESD)是最为常见的食管鳞癌癌前病变,该病最为有效的治疗方式是手术切除病灶,从而从根源上防止其衍进为食管鳞癌。然而,当前对于食管上皮非典型增生的主要诊断手段仍然是组织病理活检,对身体造成一定的伤害,不适用于常规体检。而体液疾病生物标志物具有操作快速、便捷、非侵袭性的优点,适用于常规体检。因此,挖掘可用于食管上皮非典型增生临床筛查的生物标志物对于高发地区食管鳞癌的早期预防及治疗具有重要意义。

[0003] 近年来,代谢组学作为系统生物学的重要组成部分被广泛地用于疾病生物标志物的发掘与应用。色谱-质谱联用技术是代谢组学研究的主要技术手段,其已成功用于检测可表征疾病状态的小分子代谢物,包括通过检测多种脂酰肉碱用于新生儿先天性缺陷疾病的筛查、通过检测血清固醇含量评估肝脏功能状态等。由于单一代谢物的诊断性能所受各种因素影响较大,因此利用少数显著性差异的代谢物通过回归模型整合成“联合型标志物”,并利用计算的“判别可能性”P值(Probability)可显著增强代谢物对疾病诊断的灵敏度和特异度。考虑到有机酸、核苷酸等中大极性代谢物在肿瘤发生发展过程中的生物学作用,本发明采用基于气相色谱-质谱的代谢组学分析方法检测血清中的极性代谢物含量。利用多变量及单变量统计分析方法筛选得到有显著性差异的代谢物,旨在在食管上皮非典型增生的临床筛查中进行应用。

[0004] 本发明基于气相色谱-质谱采集食管上皮非典型增生患者及食管健康人对照的血清代谢轮廓数据,经多变量及单变量分析,确定了基于丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸的联合使用,以作为一种联合型的代谢标志物在食管上皮非典型增生的临床筛查的新用途。筛选得到的代谢物均参与体内重要生理功能及生命活动。丙酸是肠道菌群分解碳水化合物的终产物之一,具有重要的生理活性,其在许多肝病如丙型肝炎、非酒精性脂肪肝等患者血清中的含量有显著变化。亮氨酸是人体必需支链氨基酸之一,在应激反应、能量代谢、蛋白质合成等过程中发挥重要作用,该物质可刺激胰岛素的生成,在厌食症、亨廷顿氏舞蹈病患者血清中的含量显著降低。羟脯氨酸是一种亚氨基酸,在胶原蛋白的合成的过程中发挥重要作用,已被证实在肝癌、卵巢癌等多种癌症患者血液中含量变化显著。目前尚无将该三种代谢产物联合用于食管上皮非典型增生诊断的报道。

发明内容：

[0005] 本发明的目的是针对临床上缺乏可用于食管上皮非典型增生诊断生物标志物这一临床实际问题,提供了一种基于新的血清小分子代谢物组合对食管上皮非典型增生患者与食管健康人群进行有效判别的新用途,并提供用于上述小分子代谢物检测的技术方法。

[0006] 该代谢物联合标志物包括下列三种代谢物:丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸,其中丙酸用气相色谱质谱联用检测到离子碎片包括:m/z59、m/z73、m/z103、m/z117、m/z133、m/z147、m/z189、m/z 205、m/z 217、m/z 292、m/z 307,亮氨酸的碎片包括m/z59、m/z73、m/z133、m/z147、m/z170、m/z 200、m/z 274、m/z 302,羟脯氨酸的碎片包括:m/z68、m/z103、m/z158、m/z170、m/z260。

[0007] 上述三种物质的检测试剂盒如下:标准品:包括丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸,所述标准品分别用于对应的血清代谢物丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸的定性;用于预处理来自受试者的血清样本的提取液;包含内标物十三酸(10g/mL)的甲醇溶液,甲氧胺吡啶溶液(20mg/mL)、N-甲基-N-(三甲基甲硅烷)三氟乙酰胺(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide,MSTFA)。

[0008] 计算受试者血清样本中的联合标志物变量P的方法如下:

[0009] 1) 受试者样本处理:用血清样本的提取液处理来自受试者的血清样本,然后进一步提取极性代谢物。

[0010] 2) 以气相色谱对经1)处理的血清样本进行分离,并由质谱检测。

[0011] 3) 经气相色谱-质谱联用分析后,所得的色谱峰强度分别与内标比较,获得上述三种物质的相对浓度。

[0012] 4) 进一步将丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸回归为联合标志物变量P,线性回归方程如下:

$$P=1/(1+e^{-(1.164+4.05*10^{-6}*a+2.01*10^{-5}*b-2.65*10^{-6}*c)})$$

[0014] 其中,a为血清中丙氨酸的相对含量,b为血清中亮氨酸的相对含量,c为血清中羟脯氨酸的相对含量,e为欧拉数,即自然对数函数的底数。所得变量P在食管上皮非典型增生患者中降低,该变量值可用于辅助区分食管上皮非典型增生患者与食管健康人群。本发明确定的联合标志物的对食管上皮非典型增生判断的最佳截点值(cut-off值)设为0.82,低于该截点值的则可能为食管上皮非典型增生。也可以根据实验者的实际结果通过回归得到新的方程,并定义该实验室的最佳截点值。截点值的确定依据为根据联合标志物变量P值作受试者工作特征曲线(ROC曲线),取灵敏度及特异度之和最大的P值作为最佳截点值,大于等于最佳截点值为食管健康人群,小于最佳截点值为食管上皮非典型增生。

[0015] 该联合型代谢标志物用途:将食管上皮非典型增生患者与食管健康人群进行有效区分,适用于食管上皮非典型增生患者的常规体检筛查。

[0016] 本发明原理如下:

[0017] (1) 利用气相色谱-质谱联用的代谢组学分析技术,对食管上皮非典型增生及食管健康对照血清样本进行代谢轮廓分析,获得可用于定性及定量分析的代谢组数据。

[0018] (2) 基于统计学数据分析方法对标志物进行筛选及验证,具体实施方式为:

[0019] a) 多变量分析:基于训练集数据,建立偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)模型,代谢物挑选条件:变量重要性投影(VIP)值大于1。

[0020] b) 单变量分析:基于训练集数据,利用T检验根据 $p < 0.05$ 筛选出在食管上皮非典型增生与食管健康对照组间有显著统计学差异的代谢物。

[0021] c) 利用线性回归优选出丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸这一联合标志物组合。

[0022] (3) 应用另一批次验证集中食管上皮非典型增生患者及食管健康对照的血清样本对候选代谢物进行验证。

[0023] 本发明具有如下效果:

[0024] 血清中的丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸构成的联合标志物及其衍生的联合标志物变量P,能够对食管上皮非典型增生患者及食管健康人群进行很好的区分,本发明所涉及的检测试剂盒,对上述代谢物组合的检测,具有简便、快速、重复性好的优点,适用于食管上皮非典型增生患者的常规体检筛查。

附图说明

[0025] 图1.丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸在训练集与验证集两组中的含量变化(中位数±四分位间距表示)。*和**表示两组间具有显著性差异,*: $0.01 < p < 0.05$,**: $p < 0.01$

[0026] 图2.A为实施例1(训练集)中联合标志物用于判别食管上皮非典型增生患者及食管健康对照的ROC曲线图。B为实施例2(验证集)中联合标志物用于判别食管上皮非典型增生与食管健康对照的ROC曲线图。

[0027] 图3.联合标志物用于训练集及验证集中食管上皮非典型增生及食管健康对照组的判别散点图。截点值为0.82。

具体实施方式

[0028] 实施例1

[0029] 1. 血清样本收集

[0030] 本发明中涉及到的所有志愿者在血清样本采集前均签署了知情同意书。

[0031] 在相同采集条件下收集33例食管上皮非典型增生患者及37例食管健康对照血清样本,设定为训练集。所有患者均经过组织病理学确证。采集得到的血样静置30分钟后以4000 转离心10分钟,取上层血清并置于 -80°C 冰箱中保存。

[0032] 2. 分析方法

[0033] 2.1 血清样本预处理

[0034] 从 -80°C 中取出的血清样本置于 4°C 条件下解冻,涡旋10sec后取 $50\mu\text{L}$ 血清,加入 $200\mu\text{L}$ 含有 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 十三酸(又可称之为十三烷酸)的冷甲醇(0°C),涡旋1分钟后置于冰水浴中10min。接下来将样本进行高速离心(12000g , 4°C)15min,并取 $200\mu\text{L}$ 上清液置于新的样本管中。将所得样本进行冻干,冻干后的样本中加入 $50\mu\text{L}$ 甲氧胺吡啶($20\text{mg}/\text{mL}$)并涡旋1min,置于 37°C 空气浴中脲化反应90min,再加入 $40\mu\text{L}$ 甲基三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺在 37°C 空气浴硅烷化反应1h,衍生溶液取出后以 12000g 、 4°C 离心15min,取上清置于玻璃进样瓶中待分析。

[0035] 2.2 气相色谱-质谱联用分析

[0036] (1) 气相色谱分析条件:采用7890A系列气相色谱系统(Agilent,USA),色谱柱为安捷伦DB-5MS($30\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\mu\text{m}$),氦气为载气,进样体积为 $1\mu\text{L}$,洗针液为二氯甲烷,线

速为40cm/sec,分流比为10:1,柱温箱初始温度为80℃,保持1min,以30℃/min的程升速率升至210℃,再以20℃/min的梯度升至320℃保持4min。

[0037] (2) 质谱分析条件:采用5977A系列四级杆质谱分析系统(Agilent,USA),溶剂延迟时间为2.8分钟,增益因子为4,质量范围为33至600Da,离子源温度为230℃,四级杆温度为150℃,离子源为电子轰击离子源,能量为70eV。

[0038] 3. 血清测试结果及诊断分析

[0039] 利用MassHunter定性分析软件对气相色谱质谱联用数据进行解卷积并通过与NIST数据库比对得到样本定性表,进一步利用MassHunter定量分析软件对数据进行积分、峰匹配并得到了相对含量数据矩阵。根据质荷比为 $292.0 \pm 0.5\text{Da}$,保留时间为 4.77 ± 0.1 分钟的标准提取丙酸的峰面积,根据质荷比为 $302.0 \pm 0.5\text{Da}$,保留时间为 5.84 ± 0.1 分钟的标准提取亮氨酸的峰面积,根据质荷比为 $158.0 \pm 0.5\text{Da}$,保留时间为 5.42 ± 0.1 分钟的标准提取羟脯氨酸的峰面积,并定量分析丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸在训练集中食管上皮非典型增生及食管健康人群组的血清含量,结果如图1所示。与食管健康人群组相比,食管上皮非典型增生组血清中的羟脯氨酸水平显著升高,丙酸和亮氨酸水平显著降低。

[0040] 使用数据统计软件SPSS,进一步将训练集样本血清中丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸的含量回归为联合标志物变量P。回归方程如下:

$$[0041] \quad P = 1 / (1 + e^{-(1.164 + 4.05 * 10^{-6} * a + 2.01 * 10^{-5} * b - 2.65 * 10^{-6} * c)})$$

[0042] 其中,a为血清中丙酸的相对含量、b为血清中亮氨酸的相对含量、c为血清中羟脯氨酸的相对含量。所得变量P在食管上皮非典型增生患者中降低,该变量值可用于辅助区分食管上皮非典型增生与食管健康人群。

[0043] 图2A中,该联合标志物通过判断变量P用于判定食管上皮非典型增生与食管健康人群时,基于训练集数据得到ROC曲线的曲线下面积为0.803,具有较好的灵敏度与特异性,当灵敏度有特异性之和最大时,可获得当前的最佳截点值,即0.82。图3实例1图中,当使用该截点值时,联合标志物可有效用于食管上皮非典型增生患者与食管健康人群的判别。以上结果表明该联合标志物具有较好的判别食管上皮非典型增生的潜能。

[0044] 实施例2

[0045] 1. 血清样本收集

[0046] 样品收集方法同实例1。实施例2包括了39例食管上皮非典型增生及37例食管健康对照,这些样本设定为验证集。

[0047] 2. 分析方法

[0048] 同实施例1。

[0049] 3. 血清验证结果及诊断潜力分析

[0050] 实施例2验证结果与实施例1训练集数据基本吻合。具体结果如图1所示。利用线性回归将丙酸、亮氨酸及羟脯氨酸组合使用,结果分别如图1、图2B、图3所示,其曲线下面积、灵敏度及特异度均较高,各组判别效果较好,具有较好的应用前景。

[0051] 本发明还涉及了检测受试者中的食管上皮非典型增生患者的试剂盒,通过检测来自受试者的血清样品中上述联合标志物各自的相对浓度,基于线性回归方程计算所述联合标志物变量P,再基于确定的截点值,判断所述受试者是否患有食管上皮非典型增生,所述试剂盒可实现高灵敏、高效检测本发明涉及的几种小分子代谢物,且具有检测成本低、重复

性好的特点。本发明可应用于食管上皮非典型增生及食管健康人群的辅助判别,具有较好的应用前景。

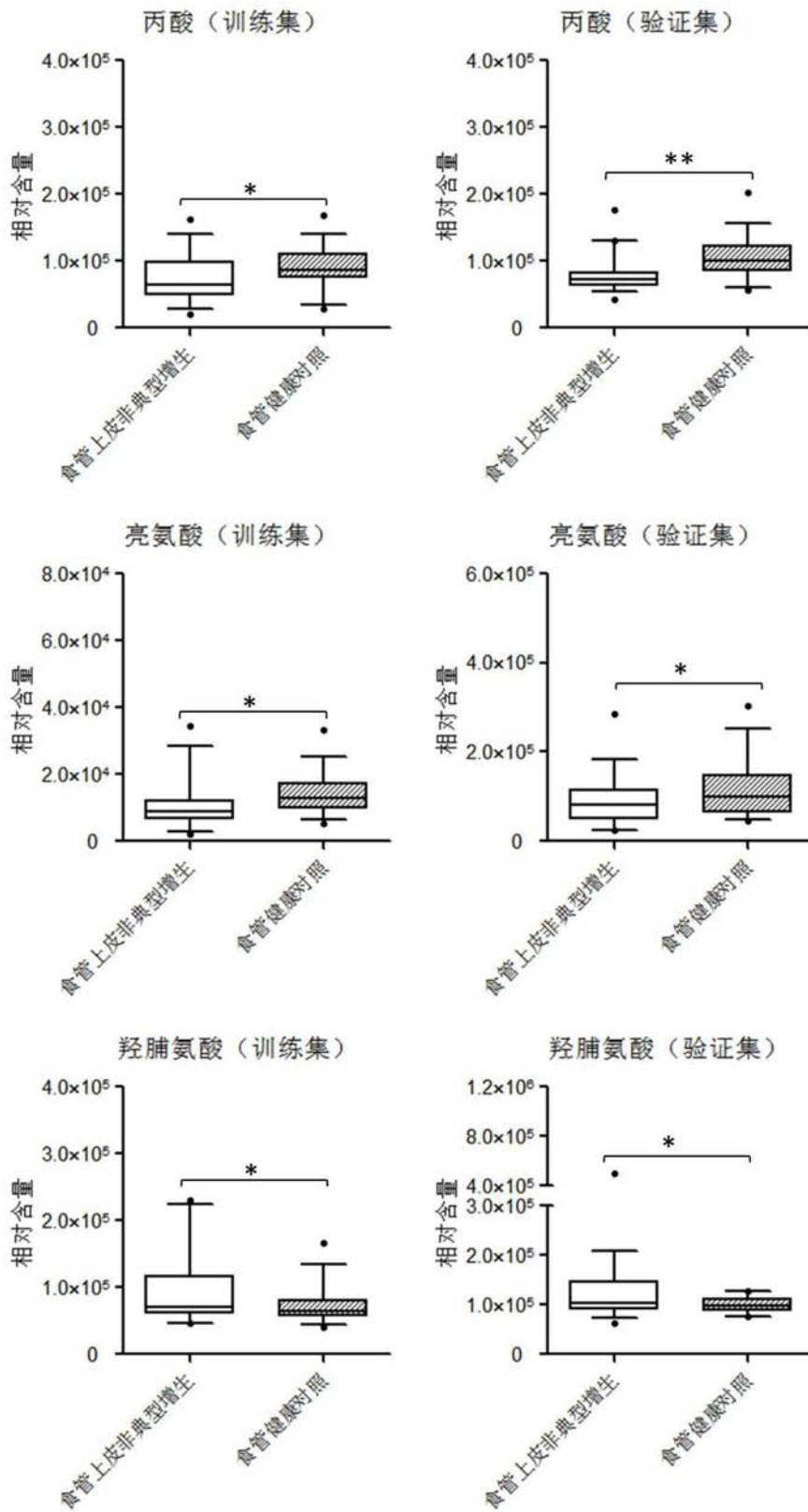


图1

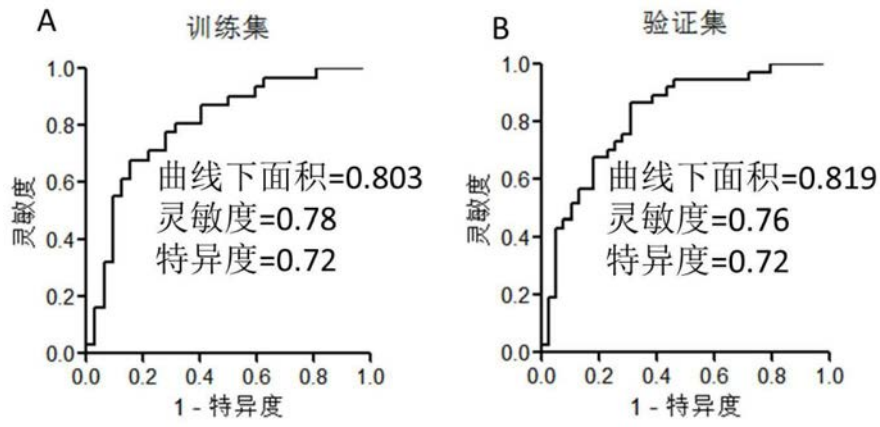


图2

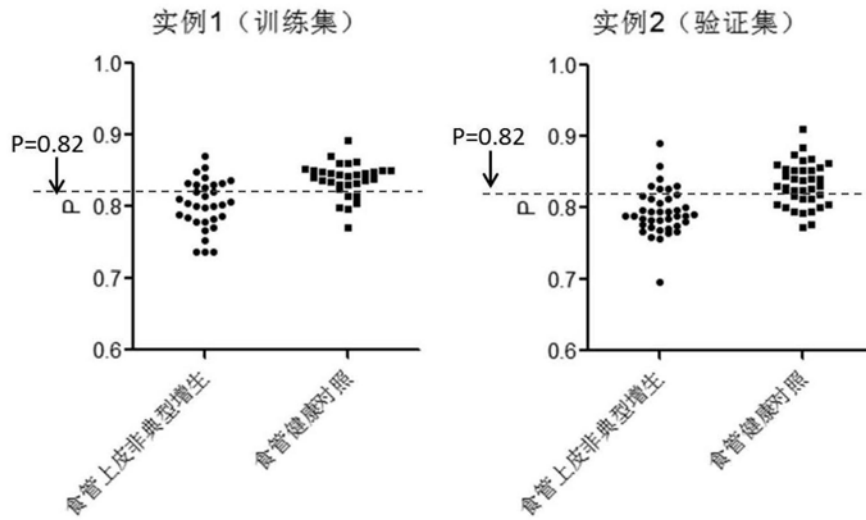


图3