



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110646557 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201910966608.2

(22)申请日 2019.10.12

(71)申请人 北京航空航天大学

地址 100191 北京市海淀区学院路37号

(72)发明人 田捷 季楠 王焱 张力伟 张扬

李春朝

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(51) Int. Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 30/72(2006.01)

G01N 30/89(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

携带IDH基因突变的胶质母细胞瘤患者的尿液代谢标志物及其用途

(57)摘要

本发明涉及携带IDH基因突变的胶质母细胞瘤患者的尿液代谢标志物及其用途。具体而言,本发明涉及测定胶质母细胞瘤患者尿液中的代谢物表达水平的试剂在制备用于确定所述患者是否携带IDH基因R132H点突变的试剂盒或芯片中的用途,其中所述尿液中的代谢物选自以下一种或多种:N-乙酰基-L-谷氨酸、海藻酸、L-谷氨酸半醛酸、细胞分裂素、茉莉酮异亮氨酸和焦曲二醇。

1. 测定胶质母细胞瘤患者尿液中的代谢物表达水平的试剂在制备用于确定所述胶质母细胞瘤患者是否携带IDH基因R132H点突变的试剂盒或芯片中的用途,其中所述尿液中的代谢物选自以下一种或多种:

N-乙酰基-L-谷氨酸,
海藻酸,
L-谷氨酸半醛酸,
细胞分裂素,
茉莉酮异亮氨酸,和
焦曲二醇。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述胶质母细胞瘤患者是人。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述胶质母细胞瘤患者在肿瘤组织中携带IDH基因R132H点突变或野生型IDH基因。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途,其中相较于对照样本,胶质母细胞瘤患者尿液中具有以下一种或多种代谢物变化,指示所述胶质母细胞瘤患者携带IDH基因R132H点突变:细胞分裂素含量升高、N-乙酰基-L-谷氨酸含量降低、海藻酸含量降低、L-谷氨酸半醛酸含量降低、茉莉酮异亮氨酸含量降低、和焦曲二醇含量降低,其中所述对照样本源自携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者。

5. 测定胶质母细胞瘤患者尿液中的代谢物表达水平的试剂在制备用于确定所述胶质母细胞瘤患者的预后或选择治疗方案的试剂盒或芯片中的用途,其中所述尿液中的代谢物选自以下一种或多种:

N-乙酰基-L-谷氨酸,
海藻酸,
L-谷氨酸半醛酸,
细胞分裂素,
茉莉酮异亮氨酸,和
焦曲二醇。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中相较于对照样本,所述胶质母细胞瘤患者尿液中具有以下一种或多种代谢物变化,指示所述胶质母细胞瘤患者预后良好:细胞分裂素含量升高、N-乙酰基-L-谷氨酸含量降低、海藻酸含量降低、L-谷氨酸半醛酸含量降低、茉莉酮异亮氨酸含量降低、和焦曲二醇含量降低,其中所述对照样本源自携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者。

7. 根据权利要求1-3或5中任一项所述的用途,其中所述试剂盒或芯片用于质谱鉴定的方法中。

8. 根据权利要求1-3或5中任一项所述的用途,其中所述尿液中的代谢物表达水平是代谢物相较于对照样本的相对含量,其中所述对照样本源自携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者。

9. 一种用于确定胶质母细胞瘤患者是否携带IDH基因R132H点突变的试剂盒或芯片,所述试剂盒或芯片包含以下代谢物的检测试剂:

N-乙酰基-L-谷氨酸,

海藻酸，
L-谷氨酸半醛酸，
细胞分裂素，
茉莉酮异亮氨酸，和
焦曲二醇；

优选地，所述试剂盒或芯片包含源自携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者的对照样本。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒或芯片，所述试剂盒或芯片用于胶质母细胞瘤患者的预后或治疗方案的选择。

携带IDH基因突变的胶质母细胞瘤患者的尿液代谢标志物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地涉及携带IDH基因突变的胶质母细胞瘤患者的尿液代谢标志物及其在胶质母细胞瘤患者的预后和治疗选择方面的用途。

背景技术

[0002] 卫生部2013年最新年鉴表明,我国每年有超过30万患者死于脑部肿瘤。胶质母细胞瘤作为脑部最常见的原发性恶性肿瘤,占有原发性脑恶性肿瘤的47.6% (2018年美国脑肿瘤登记中心报告,CBTRUS) 参见,Q.T.Ostrom,H.Gittleman,G.Truitt,A.Boscia,C.Kruchko,J.S.Barnholtz-Sloan,CBTRUS Statistical Report:Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015.Neuro Oncol 20 (2018) iv1-iv86,其恶性程度最高,WHO分级为恶性程度最高的IV级,治疗效果差。经过标准的手术、放疗及化疗之后,病人中位生存期仅为14.6个月,参见R.Stupp,W.P.Mason,M.J.van den Bent,M.Weller,B.Fisher,M.J.Taphoorn,K.Belanger,A.A.Brandes,C.Marosi,U.Bogdahn,J.Curschmann,R.C.Janzer,S.K.Ludwin,T.Gorlia,A.Allgeier,D.Lacombe,J.G.Cairncross,E.Eisenhauer,R.O.Mirimanoff,Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.N Engl J Med 352 (2005) 987-996。这不仅给患者身体造成巨大痛苦,而且给患者及其家属带来心理上的沉重负担。此外,胶质母细胞瘤本身对脑功能造成的损害以及手术治疗所导致的致残率也很高。因此该疾病给国家医疗资源以及社会保障体系带来很大的负担。

[0003] 异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 是三羧酸循环中的一种关键酶,近年来发现IDH基因突变是胶质瘤早期和关键突变,这些基因突变特异性改变酶的催化活性,被认为与肿瘤的发生发展相关。

[0004] IDH突变和野生型胶质母细胞瘤病人预后存在显著差别,在肿瘤组织上具有IDH基因R132H点突变的胶质母细胞瘤病人生存预后明显好于IDH野生型胶质母细胞瘤病人,参见P.J.Killela,C.J.Pirozzi,P.Healy,Z.J.Reitman,E.Lipp,B.A.Rasheed,R.Yang,B.H.Diplas,Z.Wang,P.K.Greer,H.Zhu,C.Y.Wang,A.B.Carpenter,H.Friedman,A.H.Friedman,S.T.Keir,J.He,Y.He,R.E.McLendon,J.E.Herndon,2nd,H.Yan,D.D.Bigner,Mutations in IDH1,IDH2,and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas.Oncotarget 5 (2014) 1515-1525。因而,区分胶质母细胞瘤患者中是否携带IDH基因R132H点突变对于胶质母细胞瘤患者的预后和治疗方式的选择具有重要的意义。

[0005] 目前胶质母细胞瘤肿瘤组织中的IDH基因突变的诊断主要通过对手术标本进行基因测序获得。采用无创的方法检测IDH基因突变,对胶质母细胞瘤早期诊断、预后判断和治疗选择具有重要意义。目前的IDH突变无创诊断研究目前主要集中在两个方向:一是基于磁共振的影像学方法来判断IDH突变胶质瘤影像组学特征,参见B.Zhang,K.Chang,

S.Ramkissoon, S.Tanguturi, W.L.Bi, D.A.Reardon, K.L.Ligon, B.M.Alexander, P.Y.Wen, R.Y.Huang, Multimodal MRI features predict isocitrate dehydrogenase genotype in high-grade gliomas. *Neuro Oncol* 19 (2017) 109-117或检测IDH突变特异性代谢产物2-HG, 参见A.Tietze, C.Choi, B.Mickey, E.A.Maher, B.Parm Ulhoi, R.Sangill, Y.Lassen-Ramshad, S.Lukacova, L.Ostergaard, G.von Oettingen, Noninvasive assessment of isocitrate dehydrogenase mutation status in cerebral gliomas by magnetic resonance spectroscopy in a clinical setting. *J Neurosurg* 128 (2018) 391-398; 二是基于质谱技术检测患者体液中2-HG参见A.T.Fathi, B.V.Nahed, S.A.Wander, A.J.Iafrate, D.R.Borger, R.Hu, A.Thabet, D.P.Cahill, A.M.Perry, C.P.Joseph, A.Muzikansky, A.S.Chi, Elevation of Urinary 2-Hydroxyglutarate in IDH-Mutant Glioma. *Oncologist* 21 (2016) 214-219。

[0006] 代谢组学方法是通过核磁共振波谱法和质谱法在一个生物样品内发现全套小分子代谢物的研究方法。本研究基于质谱技术的代谢组学方法在胶质瘤病人尿液中发现了一组全新的、能较好区分IDH基因R132H点突变和野生型胶质母细胞瘤代谢标志物。

发明内容

[0007] 鉴于本领域的上述需求, 根据本公开的一些实施方案, 提供了测定胶质母细胞瘤患者尿液中的代谢物表达水平的试剂在制备用于确定所述患者是否携带IDH基因R132H点突变的试剂盒或芯片中的用途, 其中所述尿液中的代谢物选自以下一种或多种:

[0008] N-乙酰基-L-谷氨酸,

[0009] 海藻酸,

[0010] L-谷氨酸半醛酸,

[0011] 细胞分裂素,

[0012] 茉莉酮异亮氨酸, 和

[0013] 焦曲二醇。

[0014] 优选地, 所述受试者是人, 更优选地, 所述胶质母细胞瘤患者在肿瘤组织中携带IDH基因R132H点突变或野生型IDH基因。

[0015] 在进一步的具体实施方案中, 所述试剂盒或芯片用于胶质母细胞瘤患者的预后或治疗方案的选择。

[0016] 在具体的实施方案中, 相较于对照样本, 胶质母细胞瘤患者尿液中具有以下一种或多种代谢物变化, 指示所述胶质母细胞瘤患者携带IDH基因R132H点突变: 细胞分裂素含量升高、N-乙酰基-L-谷氨酸含量降低、海藻酸含量降低、L-谷氨酸半醛酸含量降低、茉莉酮异亮氨酸含量降低、和焦曲二醇含量降低, 其中所述对照样本源自携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者。

[0017] 在进一步的具体实施方案中, 所述试剂盒用于质谱鉴定的方法中。所述质谱鉴定是在质谱全扫描模式联合靶向分析下使用的。质谱全扫描模式是同时采集质量范围100m/z到1000m/z内的所有小分子一级信息, 通过多元统计分析筛选差异代谢物, 进一步对差异代谢物进行靶向二级碎裂, 结合数据库二级谱图, 最终确定差异分子。

[0018] 在具体的实施方案中, 表达水平是代谢物相对含量; 优选地, 所述表达水平是与携

带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者尿液中代谢物含量相比较的相对含量。

[0019] 在具体的实施方案中,所述受试者是人。

[0020] 本发明的另一方面提供了一种用于确定胶质母细胞瘤患者是否携带IDH基因R132H点突变的试剂盒或芯片,所述试剂盒或芯片包含选自以下的代谢物的检测试剂:

[0021] N-乙酰基-L-谷氨酸,

[0022] 海藻酸,

[0023] L-谷氨酸半醛酸,

[0024] 细胞分裂素,

[0025] 茉莉酮异亮氨酸,和

[0026] 焦曲二醇;优选地,所述试剂盒或芯片包含源自携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者的对照样本。

[0027] 在具体的实施方案中,所述试剂盒或芯片用于质谱鉴定,具体地,所述质谱鉴定是在全扫描模式联合靶向鉴定模式下使用的。

[0028] 在具体的实施方案中,所述试剂盒或芯片用于胶质母细胞瘤的预后或治疗方案的选择。

[0029] 本发明的另一方面提供了一种用于确定受试者是否携带IDH基因R132H点突变的方法,包括步骤:

[0030] 1) 获得受试者的尿液样本,

[0031] 2) 任选地,从尿液样本中提取代谢物,

[0032] 3) 确定受试者尿液样本中选自以下的一种或多种代谢物的含量水平:

[0033] N-乙酰基-L-谷氨酸,

[0034] 海藻酸,

[0035] L-谷氨酸半醛酸,

[0036] 细胞分裂素,

[0037] 茉莉酮异亮氨酸,

[0038] 焦曲二醇及其组合。

[0039] 在具体的实施方案中,使用质谱方法确定含量水平。

[0040] 当采用质谱方法确定代谢物水平时,在获得尿液样本的步骤之后,还可以包括代谢物提取,蛋白去除。在具体的实施方案中,用2倍体积乙腈提取尿液样本中的代谢物,同时去除蛋白。

[0041] 在具体的实施方案中,所述质谱方法是一级全扫描模式联合靶向二级分析。具体地,首先通过一级全扫描检测尿液代谢组,多元统计分析筛选出潜在标志物,对潜在标志物进行靶向二级碎裂,结合数据库二级谱图确定潜在标志物。采用标志物一级谱峰面积进行定量。

[0042] 具体地,检测:

[0043] N-乙酰基-L-谷氨酸,

[0044] 海藻酸,

[0045] L-谷氨酸半醛酸,

[0046] 细胞分裂素,

[0047] 茉莉酮异亮氨酸,

[0048] 焦曲二醇及其组合。

[0049] 基于尿液上述六种代谢物的定量检测方法,可以使用源自携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者尿液的对照样本进行人群中这六种代谢物基线的建立,基于该基线的含量范围,以及获得的胶质母细胞瘤患者尿液中各代谢物的表达水平,判定所述患者是否携带IDH基因R132H点突变或野生型IDH基因。

附图说明

[0050] 图1:胶质母细胞瘤IDH基因R132H点突变和携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤对照组尿液代谢谱PCA分类图。

[0051] 图2:胶质母细胞瘤IDH基因R132H点突变和携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤对照组尿液代谢谱OPLS-DA分类图;其中对照组是指IDH基因未发生突变的胶质母细胞瘤患者。

[0052] 图3:六种代谢物组合预测胶质母细胞瘤患者中IDH基因R132H点突变的ROC曲线。

具体实施方式

[0053] 以下结合附图,通过实施例进一步说明本发明,但不作为对本发明的限制。以下提供了本发明实施方案中所使用的具体材料及其来源。然而,应当理解的是,这些仅仅是示例性的,并不意图限制本发明,与如下试剂和仪器的类型、型号、品质、性质或功能相同或相似的材料均可以用于实施本发明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0054] 我们用液相色谱-高分辨质谱(LC-MS)通过全扫描模式检测尿液中代谢物,通过多元统计分析筛选与胶质母细胞瘤IDH基因突变相关的代谢物。标志物的鉴定是采用二级靶向分析方法,通过对二级碎片的匹配或者解析进行。

[0055] 材料与试剂

[0056] 1) 仪器:Waters H-class液相色谱仪(waters公司)LTQ-Orbitrapvelos pro质谱仪(Thermofisher Scientific公司)。

[0057] 2) 主要试剂:乙腈(Thermofisher Scientific公司);C18反相色谱柱(3.0mm×100mm,C18,1.7 μ m,Waters公司)。

[0058] 3) 样本:15例患有胶质母细胞瘤并携带IDH基因R132H点突变的患者的尿液和20例携带野生型IDH基因的胶质母细胞瘤患者(作为对照组)的尿液,来自北京天坛医院。其中,IDH基因的状态为术后对取下的肿瘤组织进行基因测序后确定。IDH1基因R132H点突变是最常见的IDH突变类型,其与患者预后明确相关,存在该突变的患者预后明显要好。

[0059] 1.1人尿液样品的收集

[0060] 收集空腹晨尿,5000g的转速离心30min,去除沉淀。

[0061] 1.2代谢物提取

[0062] 取200 μ l尿液上清,加200 μ l乙腈,涡旋,4度静置30min,14000g离心10min,取上清,离心浓缩,用200 μ l 2%乙腈水复溶,14000g离心10min,过10kD滤膜后取10 μ l进样。

[0063] 1.3液相分析

[0064] Waters H-class

[0065] 色谱柱:waters BEH C18 (3.0X100mm,1.7um),柱温50℃;流动相A为0.1%甲酸水,流动相为乙腈;分析梯度为:0-1min,2%B;1-8min,2%B-98%B;8-8.1min,98%B-100%B;8.1-12min,100%B;12-12.1min,100%-2%B;12.1-17min,2%B;流速为0.5ml/min;进样体积为10ul。

[0066] 1.4质谱分析

[0067] UPLC质谱串联LTQ-Orbitrapvelos (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) 质谱,采用电喷雾离子源正离子模式;鞘气为氮气和辅助气,流速分别为45arbitrary units and 10arbitrary units;质谱扫描范围为100-1000m/z;spray voltages设为4.2KV;离子传输管温度350℃。数据采用高分辨傅里叶转换模式(FT)获取,一级分辨率为60000;二级分辨率为15000。

[0068] 1.5质谱数据分析

[0069] 由UPLC-LTQ orbitrap获得的原始数据,采用Waters公司的商业组学分析软件progenesis QI (Version 2.0, Nonlinear Dynamics, UK) 进行处理。该软件可自动完成峰对齐,峰识别和峰校正等前处理程序,最终输出三维矩阵,即由保留时间和精确质荷比组成的谱峰索引变量、样本名称和峰强度/面积组成。获得的数据矩阵导入多变量统计软件SIMCA-P software 14.0 (Umetrics AB, Umea, Sweden) 进行PCA分析,可视化组间变化趋势。组间差异变量通过OPLS-DA模型获取的VIP值进行筛选,VIP值大于1,非参检验p值小于0.05的变量认为是组间显著性差异变量,筛选为胶质母细胞瘤IDH基因突变早期潜在标志物。对筛选的差异变量进行二级碎裂,采用HCD (High collision dissociation) 碎裂方式,根据具体代谢物选择20, 40, 60eV能量。将二级碎片采用progenesis QI软件进行解卷积,搜索HMDB (HUMAN METABOLOME DATABASE) 数据库,确定差异代谢物结构。

[0070] 尿液代谢组区分胶质母细胞瘤IDH基因突变和对照组

[0071] 非监督PCA得分图显示(图1)胶质母细胞瘤IDH基因突变组和对照组呈现出一定的区分度。进一步采用监督OPLS-DA构建模型,两组区分度更加明显(图2)。筛选出差异代谢物20个。研究显示,多个代谢物联合应用可以更好的预测疾病的发生,在此,我们采用逻辑回归算方法对20个差异代谢物进行模型优化,最后得出6个代谢物,N-乙酰基-L-谷氨酸、海藻酸、L-谷氨酸半醛酸、细胞分裂素、茉莉酮异亮氨酸、焦曲二醇联合应用可以达到较好的预测效果,对以上样本组预测的AUC值为0.956,十倍交叉验证的AUC值为0.827(图3),灵敏度及特异性见表1。预测效果良好。

[0072] 表1六种代谢物组合预测胶质母细胞瘤IDH基因突变的灵敏度和特异性

[0073]	AUC	灵敏度	特异性
训练/发现	0.956 (0.933-0.978)	0.900 (0.856-0.944)	0.881 (0.827-0.936)
10-倍交叉验证	0.827 (0.670-0.983)	0.850 (0.850-1.000)	0.867 (0.695-1.000)

[0074] 表2六种代谢物单独进行胶质母细胞瘤IDH基因R132H点突变早期诊断

[0075]	数据库ID	名称	曲线下面积	P值	变化倍数
	HMDB01138	N-乙酰基-L-谷氨酸	0.83667	0.00057134	-0.10438
	HMDB03148	海藻酸	0.83667	0.0019526	-0.073509
	HMDB02104	L-谷氨酸半醛酸	0.83	0.00086454	-0.084668

HMDB39238	细胞分裂素	0.80667	0.0021461	0.6017
HMDB29391	茉莉酮异亮氨酸	0.77667	0.0046908	-0.33698
HMDB30858	焦曲二醇	0.76667	0.0039395	-0.11487

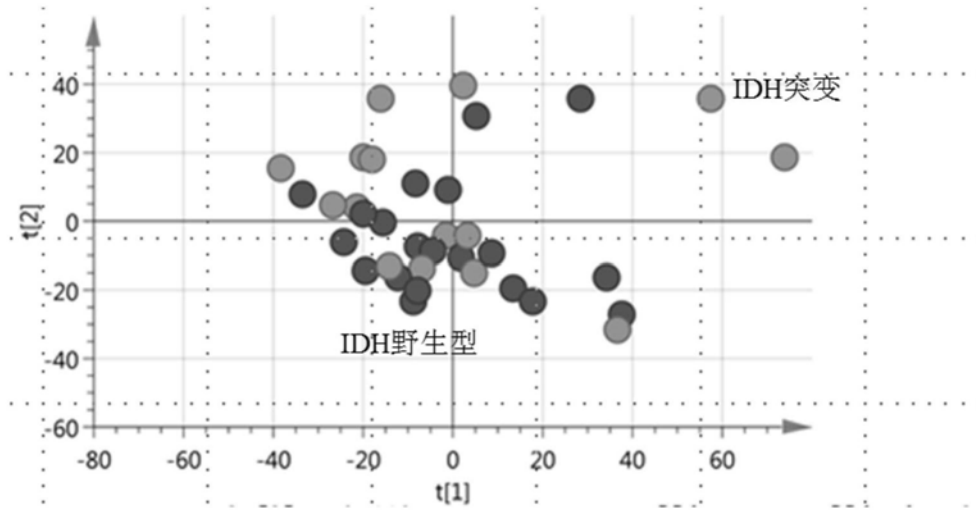


图1

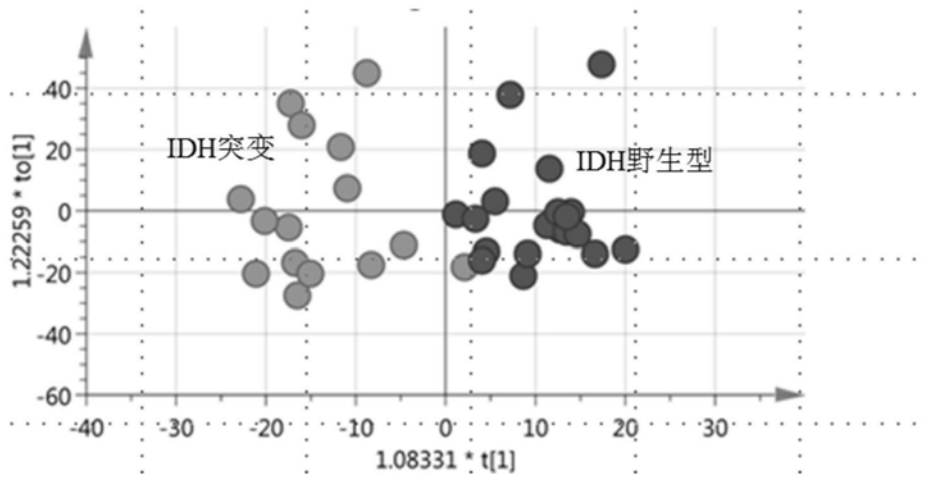


图2

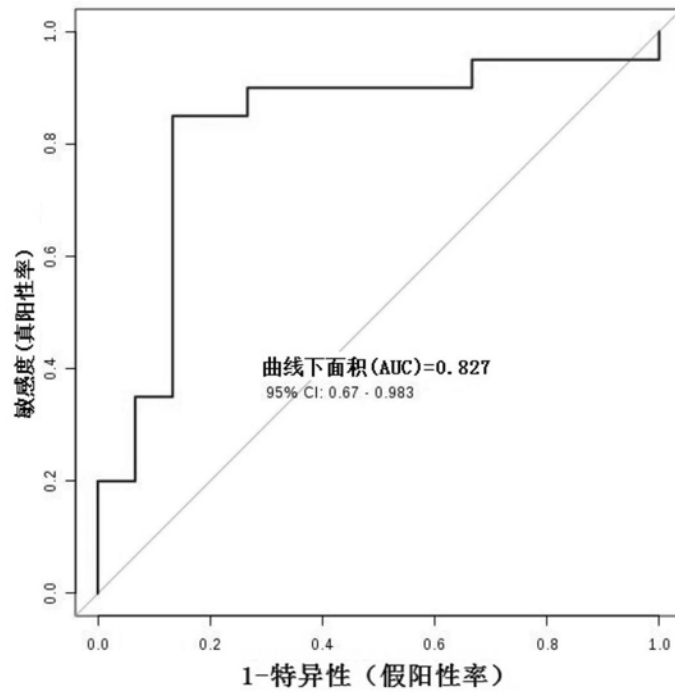


图3