



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117147737 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202311407563.8

(22) 申请日 2023.10.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117147737 A

(43) 申请公布日 2023.12.01

(73) 专利权人 中国医学科学院药物研究所
地址 100050 北京市西城区先农坛街1号

(72) 发明人 再帕尔阿不力孜 徐婧 李江硕
张瑞萍 陈艳华 贺玖明 王惠青
孙成龙 周帆

(74) 专利代理机构 北京快帮专利代理事务所
(普通合伙) 16087
专利代理师 孙婷婷

(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2019391092 A1, 2019.12.26

US 2013102486 A1, 2013.04.25

CN 105044361 A, 2015.11.11

张海平. 基于液相色谱-质谱联用技术的哈萨克族食管鳞状细胞癌代谢组学研究. 中国博士学位论文全文数据库. 2018, (第3期), E072-41.

Zhongjian Chen 等. Combined metabolomic analysis of plasma and tissue reveals a prognostic risk score system and metabolic dysregulation in esophageal squamous cell carcinoma. *Frontiers in Oncology*. 2020, 第10卷第1-13页.

袁川淑 等. 血清肿瘤标志物Cyfra 21-1、SCCAg、Ferritin、CEA、CA19-9和AFP对口腔/口咽鳞癌的诊断价值. *重庆医科大学学报*. 2017, 第42卷(第9期), 第1066-1071页. (续)

审查员 许芷菲

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

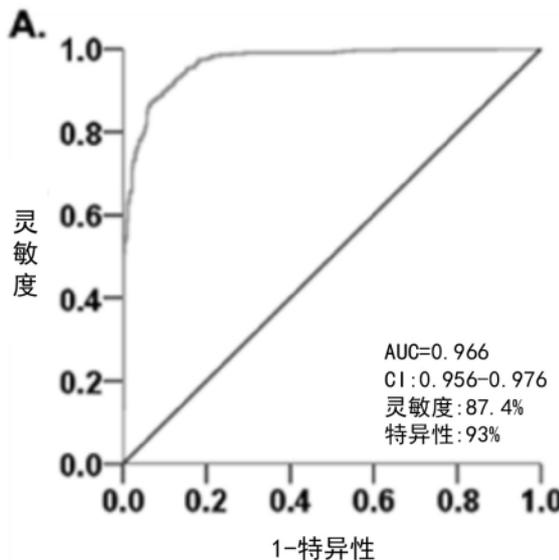
(54) 发明名称

用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物及试剂盒与检测方法

(57) 摘要

本发明提供用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物及试剂盒与检测方法, 血浆组合标志物包括: 3-甲氧基水杨酸, 2,6-二羟基苯甲酸, 马尿酸, 4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸; 通过试剂盒检测受试者血浆中上述组合标志物的含量, 并基于二元逻辑回归方程构建诊断模型, 计算组合标志物变量, 再基于确定的截点值判断受试者是否罹患食管鳞癌。本发明首次提供了辅助筛查和诊断食管鳞癌的血浆代谢标志物, 能够准确测定血浆中组合标志物含量, 对食管鳞癌诊断的特异性达93.0%, 灵敏度达87.4%, 通过患者血浆中内源性小分子代谢物含量变化这种客观检查指标进行诊断, 简化了诊断过程, 显著提高了诊断准确率, 具有良好的临床使用和推广价值。

CN 117147737 B



[接上页]

(56) 对比文件

林金欢 等. 食管癌非创伤性检查的现状与

进展. 国际消化病杂志. 2015, 第35卷(第4期), 第
258-262页.

1. 用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物,其特征在于,所述血浆组合标志物由3-甲氧基水杨酸、2, 6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸组成。

2. 如权利要求1所述的血浆组合标志物在制备用于食管鳞癌诊断的试剂盒中的应用,其特征在于,所述试剂盒包括:

(1) 标准化学品:包括3-甲氧基水杨酸、2, 6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸,所述标准化学品分别用于绘制对应的血浆代谢物的定量标准曲线;

(2) 含稳定同位素内标化合物的提取液:所述提取液用于预处理来自受试者的血浆样品,为包含稳定同位素内标化合物的乙腈溶液,所述稳定同位素内标化合物为L-色氨酸-d5;

(3) 用于洗脱色谱柱的洗脱液。

3. 根据权利要求2所述的血浆组合标志物在制备用于食管鳞癌诊断的试剂盒中的应用,其特征在于,所述用于洗脱色谱柱的洗脱液是用于洗脱ACQUITY UPLC HSS T3:2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters色谱柱的洗脱液,包括:0.1% (v/v) 甲酸水溶液和0.1% (v/v) 甲酸乙腈溶液。

4. 根据权利要求3所述的血浆组合标志物在制备用于食管鳞癌诊断的试剂盒中的应用,其特征在于,所述受试者为食管鳞癌患者和健康志愿者,诊断样品为受试者血浆。

用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物及试剂盒与检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分析化学及医学生物检测技术领域,特别地,涉及一种新的组合代谢标志物及其检测试剂盒在食管鳞状细胞癌诊断中的应用;具体而言,涉及一种用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物及试剂盒与检测方法。

背景技术

[0002] 食管癌(Esophageal cancer)是全球最常见的恶性肿瘤之一,食管癌的两种主要亚型为鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)和腺癌(esophageal adenocarcinoma,EAC)。早期食管鳞癌患者无明显症状,多数食管鳞癌患者在确诊时已处于疾病中晚期,预后极差,五年生存率仅为5%~15%,因此,对食管鳞癌进行早期诊断至关重要。

[0003] 目前临床上用于诊断食管鳞癌的主要手段包括食管拉网细胞学检查、X线钡餐造影、食管超声内镜、食管内镜检查等。但是,这些方法均为侵入性检查、操作复杂、诊断灵敏度和特异性较低,且价格高昂,因此,开发具有临床诊断潜力的标志物及其检测方法十分迫切。

[0004] 已有研究表明,食管鳞癌的发生涉及人体内多条代谢通路的改变,具体表现为血浆样本中氨基酸、脂肪酸、脂类等多种小分子代谢物的含量在食管鳞癌患者和正常人之间存在显著差异。代谢组学作为一种探寻疾病生物标志物、表征生物代谢通路的新兴生命组学手段,为研究疾病的发生机制和发现疾病标志物提供了全新的视角。近年来,相继有文献报道了代谢组学在疾病诊断中的成功案例。例如,采用液相色谱质谱联用技术检测尿液中肌氨酸的含量以判别前列腺癌(Sreekumar A, Poisson L M, Rajendiran T M, et al. *Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. Nature, 2009, 457 (7231):910-914.*),组合标志物甘氨酸和苯丙氨酸-色氨酸用于早期肝癌的诊断等(Luo P, Yin P, Hua R, et al. *A large-scale, multi-center serum metabolite biomarkers identification study for the early detection of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2017, 67.*)。

[0005] 代谢重编程是肿瘤的重要标志,食管鳞癌作为一种恶性消化道肿瘤,其通常表现为机体整体的代谢紊乱,因此代谢组学技术和方法非常适合于食管鳞癌的研究。目前,已经有人利用代谢组学对食管鳞癌进行研究,例如Xu等(Xu J, Chen Y, Zhang R, et al. *Global and targeted metabolomics of esophageal squamous cell carcinoma discovers potential diagnostic and therapeutic biomarkers. Mol Cell Proteomics, 2013, 12(5):1306-18.*)、Wang等(Wang J, Zhang T, Shen X, et al. *Serum metabolomics for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma by UHPLC-QTOF/MS. Metabolomics, 2016, 12(7):116.*)都利用代谢组学技术对食管鳞癌进行了研究。

[0006] 但是,现有的上述研究总体上大多缺乏验证实验,或者样本规模较小,临床参考价值和可信度较低。

发明内容

[0007] 鉴于此,本发明的目的在于针对食管鳞癌早期症状隐匿而诊断困难、诊断成本高、特异性差等临床实际问题,采用从发现到验证的策略通过化学计量学分析筛选出一种血浆组合标志物,应用于食管鳞癌早期诊断,并提供可用于检测上述组合标志物的试剂盒及检测方法。

[0008] 本发明提供用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物,所述血浆组合标志物包括:3-甲氧基水杨酸、2,6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸。

[0009] 本发明还提供用于食管鳞癌诊断的试剂盒,配制有用于在受试者的诊断样品中检测如上述所述的血浆组合标志物的水平的试剂,所述试剂盒包括:

[0010] (1) 标准化学品:包括3-甲氧基水杨酸、2,6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸,所述标准化学品分别用于绘制对应的血浆代谢物的定量标准曲线;

[0011] (2) 含稳定同位素内标化合物的提取液:所述提取液用于预处理来自受试者的血浆样品,为包含下述稳定同位素内标化合物的乙腈溶液,即含内标化合物L-色氨酸-d5;

[0012] (3) 用于洗脱色谱柱的洗脱液。

[0013] 进一步地,所述用于洗脱色谱柱的洗脱液是用于洗脱ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm, Waters) 色谱柱的洗脱液,包括:0.1% (v/v) 甲酸水溶液和0.1% (v/v) 甲酸乙腈溶液。

[0014] 进一步地,所述受试者为食管鳞癌患者和健康志愿者,诊断样品为受试者血浆。

[0015] 本发明还提供用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物检测方法,使用如上述所述的用于食管鳞癌诊断的试剂盒,包括计算受试者的组合标志物变量,所述组合标志物变量的计算方法包括以下步骤:

[0016] (1) 利用3-甲氧基水杨酸、2,6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸作为标准化学品,加入内标化合物L-色氨酸-d5,分别绘制相对应的标准曲线;

[0017] (2) 使用提取液预处理来自受试者的血浆样品,其中所述提取液为包含内标化合物L-色氨酸-d5的乙腈溶液;通过96孔Sirroco蛋白沉淀板(Waters)过滤血浆样品中的蛋白,将滤液离心浓缩,用水:乙腈=98:2 (v/v) 复溶,通过自动进样器将样品上样到色谱柱,洗脱分离,采用质谱在负离子模式下检测,组合标志物在三重四极杆质谱多重反应监测模式下监测的离子对分别为: m/z 167.1→108 (3-甲氧基水杨酸), m/z 153→109 (2,6-二羟基苯甲酸), m/z 178.1→134 (马尿酸), m/z 194→100 (4-羟基马尿酸), m/z 159.1→113.1 (2-羟基辛酸);

[0018] (3) 基于液相色谱-质谱分析获得的各代谢物提取离子流图,采用峰提取软件MultiQuant获得各代谢物以及内标化合物的峰面积,根据步骤(1)的定量标准曲线和步骤(2)的洗脱峰强度,计算受试者的血浆样品中各代谢物的浓度;基于二元逻辑回归分析模型计算组合标志物变量,得到食管鳞癌的诊断标准;所述二元逻辑回归分析模型的联合方程为: $P=1/[1+e^{-(3.182-0.148\times M1-0.003\times M2-0.002\times M3-0.259\times M4-0.008\times M5)}]$,其中M1为血浆中2,6-二羟基苯甲酸的含量,M2为2-羟基辛酸的含量,M3为马尿酸的含量,M4为3-甲氧基水杨酸的含量,M5为4-羟基马尿酸的含量。

[0019] 基于血浆中标志物组合的含量,计算得到组合标志物变量 P,当灵敏度与特异性之和最大时,获得组合标志物变量P的最佳截点值 0.6,表明当 $P\geq 0.6$ 时,样品可能来自食

管鳞癌患者,而当 $P < 0.6$ 时,样品可能来自健康志愿者。

[0020] 本发明的临床实际应用场景的技术方案如下:

[0021] 1) 采用超高效液相色谱质谱联用的代谢组学技术,对健康志愿者和食管鳞癌患者血浆进行代谢轮廓分析,通过p值、VIP值、变化倍率及AUC值等筛选条件对代谢物进行综合筛选,保留满足条件的差异代谢物;

[0022] 2) 应用另一批独立的样本对步骤1) 中保留的差异代谢物进行验证。确定可作为诊断食管鳞癌的组合标志物;

[0023] 3) 对步骤2) 中保留的差异代谢物,通过二元逻辑回归分析方法,回归为组合标志物变量,采用ROC曲线来评价组合标志物的灵敏度和特异性,同时兼顾简便性的组合可作为组合标志物;

[0024] 4) 应用另外一批健康志愿者和食管鳞癌患者血浆样本对组合标志物进行验证,确定3-甲氧基水杨酸、2, 6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸可作为辅助诊断食管鳞癌的组合标志物;

[0025] 5) 组合标志物的使用:使用数据统计软件SPSS,通过二元逻辑回归分析方法,将3-甲氧基水杨酸、2, 6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸的体内含量回归为组合标志物变量P,得到食管鳞癌的诊断标准,其联合方程为 $P = 1 / [1 + e^{- (3.182 - 0.148 \times M1 - 0.003 \times M2 - 0.002 \times M3 - 0.259 \times M4 - 0.008 \times M5)}]$,其中M1为血浆中2,6-二羟基苯甲酸的含量,M2为2-羟基辛酸的含量,M3为马尿酸的含量,M4为3-甲氧基水杨酸的含量,M5为4-羟基马尿酸的含量。

[0026] 所得变量P在食管鳞癌患者中增高,该变量的值可用于辅助判定食管鳞癌。在此,基于实验涉及的样本,根据诊断灵敏度和特异性最佳的原则,即ROC曲线下面积(AUC)最大的原则,该组合标志物变量的截点值(cut-off值)设为0.6,高于该截点值则有可能为食管鳞癌。也可根据实验者的实际结果通过二元逻辑回归得到新的方程,并定义该实验室的最佳截点值。参见图1 A所示为本发明组合标志物的ROC曲线分析;参见图1B所示为本发明组合标志物的最佳截点值。

[0027] (6) 诊断系统所包括的装置:色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm, Waters) 色谱柱,检测仪器为超高效液相色谱串联质谱仪,使用负离子模式检测。

[0028] 本发明采用色谱质谱联用技术分析检测血浆中的代谢物,采用从发现到验证的策略通过化学计量学分析筛选出组合标志物,成功的筛选出基于人血浆的可用于食管鳞癌诊断的组合标志物,该组合标志物的诊断灵敏度和特异性均良好,有望为食管鳞癌的临床诊断提供新的有效检测手段。

[0029] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0030] 本发明用于食管鳞癌诊断的血浆组合标志物及检测试剂盒首次提供了辅助筛查和诊断食管鳞癌的血浆代谢标志物,具有较高的准确性和诊断参考价值,能够准确测定血浆中的组合标志物的含量,利用该试剂盒及其诊断预测模型,对食管鳞癌诊断的特异性达93.0%,灵敏度达87.4%,使得食管鳞癌的诊断不再完全依靠有创检查或影像学检查,而是通过患者血浆中的内源性小分子代谢物的含量变化这种客观检查指标进行诊断,简化了诊断过程,显著提高了诊断准确率,具有广阔的市场开发前景。

附图说明

[0031] 通过阅读下文优选实施方式的详细描述,各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的,而并不认为是对本发明的限制。

[0032] 在附图中:

[0033] 图1A为本发明实施例的组合标志物的ROC曲线分析图;

[0034] 图1B为本发明实施例的组合标志物的最佳截点值图。

具体实施方式

[0035] 这里将详细地对示例性实施例进行说明,其示例表示在附图中。下面的描述涉及附图时,除非另有表示,不同附图中的相同数字表示相同或相似的要素。以下示例性实施例中所描述的实施方式并不代表与本公开相一致的所有实施方式。相反,它们仅是与本公开的一些方面相一致的装置和产品的例子。

[0036] 在本公开使用的术语是仅仅出于描述特定实施例的目的,而非旨在限制本公开。在本公开中所使用的单数形式的“一种”、“所述”和“该”也旨在包括多数形式,除非上下文清楚地表示其他含义。还应当理解,本文中使用的术语“和/或”是指并包含一个或多个相关联的列出项目的任何或所有可能组合。

[0037] 应当理解,尽管在本公开可能采用术语第一、第二、第三等来描述各种信息,但这些信息不应限于这些术语。这些术语仅用来将同一类型的信息彼此区分开。例如,在不脱离本公开范围的情况下,第一信息也可以被称为第二信息,类似地,第二信息也可以被称为第一信息。取决于语境,如在此所使用的词语“如果”可以被解释成为“在……时”或“当……时”或“响应于确定”。

[0038] 下面对本发明实施例作进一步详细说明。

实施例1

[0039] 食管鳞癌诊断血浆组合标志物的定量分析:

[0040] 1. 血浆样本收集:

[0041] 血浆样本收集包括500例食管鳞癌患者和500例健康志愿者,所有食管鳞癌患者都经过临床组织病理学确认患癌,所有健康志愿者为年龄与患者匹配的未得癌症的健康人。所有人均是在禁食8小时以上后,次日早晨采血。采集的血样于EDTA-K₂抗凝管中静置,4000 rpm/min离心10分钟后,取血浆,置于-80 °C冰箱保存备用。

[0042] 2. 分析方法:

[0043] 2.1 血浆样本预处理:

[0044] 血浆在4 °C下解冻,取100 μL血浆样本,加入300 μL提取液沉淀蛋白;通过96孔Sirroco蛋白沉淀板(美国 Waters 公司)过滤血浆样品中的蛋白,将滤液离心浓缩,保存在-80 °C冰箱中。进样前,样品用100 μL水:乙腈=98:2(v/v)复溶,震荡后,10000 rpm/min, 4 °C,离心5分钟,取上清90 μL供后续分析。

[0045] 2.2 超高效液相色谱质谱分析:

[0046] (1) 色谱条件:Waters ACQUITY UPLC 系统(美国 Waters 公司);色谱柱:ACQUITY

UPLC HSS T3柱(2.1×100 mm,1.8 μm, Waters);流动相A为0.1%(v/v)甲酸水溶液,流动相B为0.1%(v/v)甲酸乙腈溶液;洗脱梯度:0-5 min为2%B相线性变化到30%B相,5-11 min为30%B相线性变化到100%B相,保持4 min;柱温为35 °C;流动相流速为0.25 mL/min;进样量为5 μL。

[0047] (2) 质谱条件:

[0048] 使用四极杆-线性离子阱串联质谱仪(QTRAP™5500, Applied Biosystems/MDS SCIEX 公司),采用特定采集时间窗口的多反应监测模式(scheduled-MRM)对代谢物进行扫描和检测,负离子电压设为-4500 V,离子源温度设定为500 °C,保护气(Curtain gas)设定为35 psi,第一辅助气(Gas1)设定为60 psi,第二辅助气(Gas2)设定为50 psi。标志物在三重四极杆质谱多重反应监测模式下监测的离子对分别为: m/z 167.1→108(3-甲氧基水杨酸), m/z 153→109(2,6-二羟基苯甲酸), m/z 178.1→134(马尿酸), m/z 194→100(4-羟基马尿酸), m/z 159.1→113.1(2-羟基辛酸)。

[0049] 2.3血浆测试结果及辅助诊断方法:

[0050] 通过上述方法并配合试剂盒的使用,定量分析3-甲氧基水杨酸、2,6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸在食管鳞癌患者和健康志愿者血浆样本中的含量,运用模型二元逻辑回归分析计算组合标志物变量P,可以将食管鳞癌患者和健康志愿者进行良好的区分。

[0051] 本实施例中,ROC 曲线下面积(AUC值)为0.966,灵敏度和特异性分别为87.4%和93.0%。

实施例2

[0052] 食管鳞癌诊断血浆组合标志物的多中心验证:

[0053] 1. 血浆样本收集:

[0054] 血浆样本来自155例食管鳞癌患者(ESCC组),171例健康志愿者(HC组),其中食管鳞癌患者的血浆样本分别由3个不同的医院(Center1,Center2,Center3)提供,与食管鳞癌患者年龄匹配的健康人血浆由志愿者提供。样本的制备过程如下:临床采集空腹静脉血2 mL,置于EDTA-K₂抗凝真空采血管,混合均匀,3000 rpm离心10 min,分取上清,冻存于-80 °C冰箱。

[0055] 2. 分析方法:

[0056] 2.1 血浆样本预处理:

[0057] 同实施例1。

[0058] 2.2 超高效液相色谱质谱分析:

[0059] 同实施例1。

[0060] 2.3 血浆测试结果及辅助诊断方法:

[0061] 通过实施例2上述2.1、2.2的方法并配合检测试剂盒的使用,定量分析3-甲氧基水杨酸、2,6-二羟基苯甲酸、马尿酸、4-羟基马尿酸和2-羟基辛酸在食管鳞癌患者和健康志愿者血浆样本中的含量,依据计算组合标志物变量P,以0.6为截点值,可对未知样品进行快速判别,将判别结果与样品的真实分组进行比较,结果参见表1所示,组合标志物变量P对不同中心的样本的判别准确率均高于70%,假阳性率和假阴性率分别为18.13%和19.35%。结果

表明组合标志物构建的诊断模型灵敏度高,具有较高的临床应用价值。

[0062] 表1. 组合标志物的多中心验证结果

| 分组 | 入组数量 | 预测正确数量 | 准确率 | 假阳性率 | 假阴性率 |
|------|----------|--------|--------|--------|--------|
| 总计 | 326 | 265 | 81.29% | | |
| 食管鳞癌 | Center 1 | 67 | 62 | 92.54% | 7.46% |
| | Center 2 | 39 | 28 | 71.79% | 28.21% |
| | Center 3 | 49 | 35 | 71.43% | 28.57% |
| | Total | 155 | 125 | 80.65% | 19.35% |
| 健康 | 171 | 140 | 81.87% | 18.13% | |

[0064] 上述参照实施例对该组合标志物的用途及食管鳞癌检测试剂盒进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,可按照所限定范围列举出若干个实施例。本领域的技术人员应该理解,在不偏离本发明的原理的前提下,本领域技术人员可以对相关技术特征做出等同的更改或替换,这些更改或替换之后的技术方案都将落入本发明的保护范围之内。

[0065] 以上所述仅为本发明的优选实施例,并不用于限制本发明;对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

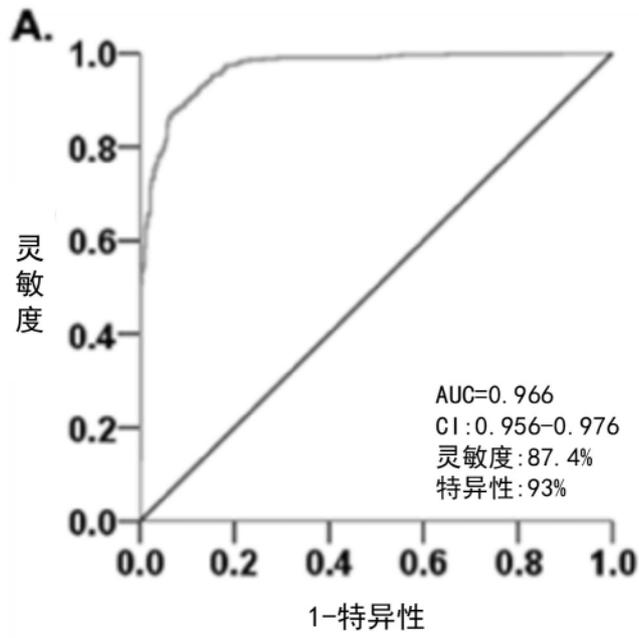


图 1A

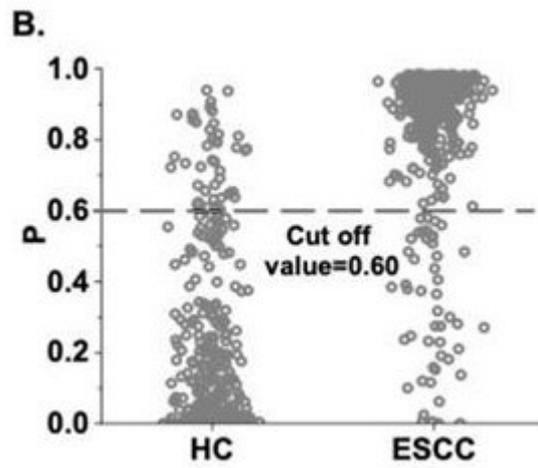


图 1B