



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114518455 A

(43) 申请公布日 2022. 05. 20

(21) 申请号 202210055678.4

(22) 申请日 2022.01.18

(71) 申请人 中国人民解放军海军军医大学第三附属医院

地址 201805 上海市嘉定区墨玉北路700号

(72) 发明人 秦文昊 夏明星 胡冰 饶春美

(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204

专利代理师 卢泓宇

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

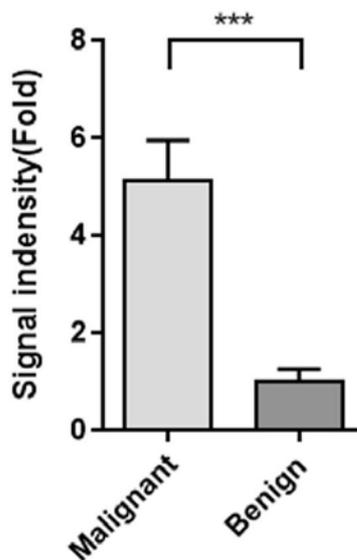
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断以及制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用

(57) 摘要

本发明提供了一种胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断以及制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,属于医学诊断领域,通过将Lipocalin-2作为新型生物标志物来检测胆汁中Lipocalin-2的蛋白水平可以进行胆管恶性狭窄的诊断,提高了胆管恶性狭窄诊断的敏感性和特异性。相比于传统诊断方法,使用该技术诊断恶性胆管狭窄具有及时性、特异性和灵敏性的优点,使患者能够尽早确认病变性质,从而采用相应的治疗方案。此外,使用胆汁作为检测样品,在ERCP操作过程中容易获取,不需有创操作,不会给患者带来额外的风险;并且Lipocalin-2检测方法所需花费较少,成本较低。



1. 一种胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断中的应用。
2. 一种胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用。
3. 根据权利要求1所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄的产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述产品用于检测患者胆汁中的Lipocalin-2水平来诊断恶性胆管狭窄。
4. 根据权利要求3所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述产品为蛋白芯片。
5. 根据权利要求4所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述应用包括:先进行胆汁预处理,然后使用所述蛋白芯片检测预处理后的胆汁中的Lipocalin-2水平,
所述胆汁预处理为:通过ERCP收取胆汁,按0.1%比例加入Tween 20及蛋白酶抑制剂,于4℃环境下以14000rpm离心10分钟,并去除脂质。
6. 根据权利要求3所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述产品为酶联免疫吸附测定试剂盒。
7. 根据权利要求6所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述应用为使用所述酶联免疫吸附测定试剂盒以及ELISA方法检测胆汁中的Lipocalin-2水平。
8. 根据权利要求3所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述产品为Lipocalin-2胶体金检测试纸。
9. 根据权利要求8所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述Lipocalin-2胶体金检测试纸的制备过程如下:
制备金标垫,该金标垫包括PVC底板、胶体金垫、样品垫、NC膜以及吸水纸,所述PVC底板上从左到右依次设置所述样品垫、所述胶体金垫、所述NC膜以及所述吸水纸,相邻组分之间部分重叠;
将胶体金颗粒与Lipocalin-2抗体连接,制成胶体金标记Lipocalin-2抗体并将所述胶体金标记Lipocalin-2抗体通过喷点或浸泡的方式设置在所述金标垫上;
在所述NC膜中间位置固定包被Lipocalin-2抗体,在所述NC膜右端包被羊抗鼠多可克隆抗体,得到所述Lipocalin-2胶体金检测试纸。
10. 根据权利要求9所述的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,其特征在在于:

其中,所述胶体金颗粒的大小为20nm~40nm。

胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断以及制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学诊断领域,具体涉及一种胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断以及制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用。

背景技术

[0002] 胆管狭窄所引起的黄疸等症状常常是患者就诊的直接原因,其病因包括良性和恶性两大类,良性狭窄有原发性硬化性胆管炎、慢性胰腺炎、胆石症及胆道损伤等,恶性狭窄包括肝、胆、胰系统恶性肿瘤及其他转移瘤,其中以胆管癌、胰腺癌最为常见。胆胰恶性肿瘤起病隐匿,当出现临床症状时多数已属瘤晚期,手术切除率低,常规放化疗效果不佳,总体预后极差。

[0003] 早期明确胆管狭窄的性质至关重要,血清肿瘤标志物CA19-9,虽然在诊断恶性胆管狭窄的敏感性达80%左右,但假阳性率较高。内镜逆行胆胰管造影术(ERCP)常常较早介入的诊疗手段,除了可以进行胆管造影之外,还获取脱离细胞或组织活检样品,用于病理诊断。然而,传统病理学诊断的阳性率较低,仅有30%左右,致使多数临床患者不能及时获得确诊,延误了治疗时机。因此,急需寻找新的高敏感性及特异性标志物,来提高恶性胆管狭窄的早期诊断率,进而改善胆胰恶性肿瘤的手术切除率及预后。

[0004] 胆管狭窄的患者往往需要进行内镜下逆行胰胆管造影ERCP治疗,而通过ERCP可较为容易的获取到胆汁样品,胆汁是能够直接接触到胆管恶性肿瘤,理论上胆汁相比于血清,其肿瘤相关蛋白含量应该更为丰富,特别是在疾病早期。因此,利用胆汁中的生物标记物对恶性胆管狭窄进行分子诊断已成为近期研究的热点。迄今为止,胆汁中已鉴定出多种生物标记物,如ApoA-I、肌动蛋白-1、S100A9、CEAM6和MCM5,但这些标记物中只有少数已纳入常规临床实践。这可能是由于患者招募标准的不一致性,以及单个标志物的生物变异性有关。

[0005] Lipocalin-2蛋白属于Lipocalin家族。该家族蛋白的生理功能是运输疏水小分子,如脂质、类固醇激素和维甲酸等。Lipocalin-2是一种中性粒细胞明胶酶相关的脂质载体蛋白,可同通过隔离含铁载体限制细菌生长,在先天免疫中发挥作用。前期研究表明血液和尿液中Lipocalin-2是急性肾损伤的早期生物标志物。同时,Lipocalin-2也是肿瘤生理病理过程中的一个关键因素,最近的一项荟萃分析报告称,血浆和尿液中的Lipocalin-2测定可能有助于预测结直肠癌和乳腺癌的预后。目前,胆汁及血浆中Lipocalin-2用于恶性胆管狭窄的诊断未见报道。

发明内容

[0006] 本发明是为了解决上述问题而进行的,目的在于提供一种胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断以及制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用。

[0007] 本发明提供了一种胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断中的应用。

[0008] 本发明提供了一种胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用。

[0009] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,产品用于检测患者胆汁中的Lipocalin-2水平来诊断恶性胆管狭窄。

[0010] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,产品为蛋白芯片。

[0011] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,应用包括:先进行胆汁预处理,然后使用蛋白芯片检测预处理后的胆汁中的Lipocalin-2水平,胆汁预处理为:通过ERCP收取胆汁,按0.1%比例加入Tween 20及蛋白酶抑制剂,于4℃环境下以14000rpm离心10分钟,并去除脂质。

[0012] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,产品为酶联免疫吸附测定试剂盒。

[0013] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,应用为使用酶联免疫吸附测定试剂盒以及ELISA方法检测胆汁中的Lipocalin-2水平。

[0014] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,产品为Lipocalin-2胶体金检测试纸。

[0015] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,Lipocalin-2胶体金检测试纸的制备过程如下:制备金标垫,该金标垫包括PVC底板、胶体金垫、样品垫、NC膜以及吸水纸,PVC底板上从左到右依次设置样品垫、胶体金垫、NC膜以及吸水纸,相邻组分之间部分重叠;将胶体金颗粒与Lipocalin-2抗体连接,制成胶体金标记Lipocalin-2抗体并将胶体金标记Lipocalin-2抗体通过喷点或浸泡的方式设置在金标垫上;在NC膜中间位置固定包被Lipocalin-2抗体,在NC膜右端包被羊抗鼠多克隆抗体,得到Lipocalin-2胶体金检测试纸。

[0016] 在本发明提供的胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用中,还可以具有这样的特征:其中,胶体金颗粒的大小为20nm~40nm。

[0017] 发明的作用与效果

[0018] 根据本发明所涉及的胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断以及制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用,因为通过将Lipocalin-2作为新型生物标志物来检测胆汁中Lipocalin-2的蛋白水平可以进行胆管恶性狭窄的诊断,提高了胆管恶性狭窄诊断的敏感性和特异性。相比于传统诊断方法,使用该技术诊断恶性胆管狭窄具有及时性、特异性和灵敏性的优点,使患者能够尽早确认病变性质,从而采用相应的治疗方案。

[0019] 此外,使用胆汁作为检测样品,在ERCP操作过程中容易获取,不需有创操作,不会给患者带来额外的风险;并且Lipocalin-2检测方法所需花费较少,成本较低。

附图说明

[0020] 图1是本发明的实施例1中蛋白芯片检测结果图;

[0021] 图2是本发明的实施例1中蛋白芯片荧光强度量化结果图;

[0022] 图3是本发明的实施例2中胆汁Lipocalin-2蛋白水平ELISA检测结果图;

[0023] 图4是本发明的实施例2中根据胆汁Lipocalin-2蛋白水平的ROC分析曲线。

具体实施方式

[0024] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,以下实施例结合附图对本发明胆汁Lipocalin-2在恶性胆管狭窄诊断以及制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用作具体阐述。

[0025] <实施例1>

[0026] 实施例1提供了一种胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用。

[0027] 实施例1中的产品为蛋白芯片,该蛋白芯片用于检测患者胆汁中Lipocalin-2的蛋白水平,购自RayBiotech公司(G-Series Human CytokineAntibodyArray 440;RayBiotech Inc.,Norcross,GA,USA)。

[0028] 利用上述蛋白芯片分别检测6例胆管恶性狭窄和良性狭窄患者胆汁中的Lipocalin-2水平,具体过程如下:

[0029] 1.胆汁预处理

[0030] 通过ERCP收取胆汁,按0.1%比例加入Tween 20及蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA),于4℃环境下以14000rpm离心10分钟,并利用CleanAscite™ (Biotech Support Group, NJ, USA) 去除脂质。

[0031] 2.蛋白芯片检测

[0032] 1) 利用5%胎牛白蛋白溶液封闭芯片膜,将膜与10-×PBS稀释胆汁在室温下孵育2小时。

[0033] 2) 利用1×TBST荡洗3次,每次5分钟。

[0034] 3) 与生物素结合的抗细胞因子混合物(试剂盒提供)孵育2小时。

[0035] 4) 利用1×TBST荡洗3次,每次5分钟,去除未结合抗体后,

[0036] 5) 将芯片膜与辣根过氧化物酶结合链霉亲和素在RT下孵育2小时。

[0037] 6) 利用1×TBST荡洗3次,每次5分钟。

[0038] 7) 荧光信号(Cy3;555nm激发)用InnoScan 300微阵列扫描仪(Innopsys,Parcd'Activités Activestree,31390Carbone-France)进行扫描和记录。

[0039] 图1是本发明的实施例1中蛋白芯片检测结果图;图2是本发明的实施例1中蛋白芯片荧光强度量化结果图。

[0040] 如图1和图2所示,胆汁Lipocalin-2蛋白水平在胆管恶性狭窄组明显高于良性狭窄组。

[0041] <实施例2>

[0042] 实施例2提供了一种胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用。

[0043] 实施例2中的产品为酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,购自Raybiotech公司。通过使用该ELISA试剂盒和ELISA方法分别对20例胆管恶性狭窄和良性狭窄患者胆汁患者的胆汁进行检测,检测过程如下:

[0044] 1.Elisa检测板包被过程:

[0045] 将Lipocalin-2抗体用包被稀释液稀释到200μg/ml,每孔100μl,放入湿盒中,置于4℃冰箱孵育24h,弃去多余抗体。

[0046] 2.标准品配置:

[0047] 标准品制备:利用重组人Lipocalin-2蛋白,稀释至1μg/ml、500ng/ml、250ng/ml、

125ng/ml、50ng/ml、15ng/ml、5ng/ml,设置零浓度空白对照管。

[0048] 3.封闭酶标反应孔:

[0049] 于反应孔中加满5%胎牛血清,震除各孔中的气泡,在37℃恒温箱内封闭40min,封闭结束后用洗涤液满孔洗涤3遍,每遍3min。

[0050] 洗涤方法:用移液枪吸干反应液,将洗涤液注满板孔,放置2min略作摇动,倾去液体后在吸水纸上拍干。洗涤次数3次

[0051] 4.加入待检测样品及标准品:

[0052] 将胆汁加入酶标反应孔中,每样品加双孔,每孔100 μ l,置于37℃恒温箱孵育40-60min,用洗涤液满孔洗涤3遍,每遍3min。

[0053] 5.加入酶标抗体:

[0054] 在反应孔中加入10 μ g/ml辣根过氧化物酶标记的Lipocalin-2抗体,于37℃孵育60min,每孔加100 μ l,洗涤同前。

[0055] 6.加入底物液(现用现配):

[0056] 每孔加入辣根过氧化物酶底物100 μ l,置于37℃避光放置3-5分钟,加入终止液显色。

[0057] 7.终止反应:

[0058] 每孔加入终止液50 μ l终止反应,于20min内测定实验结果。

[0059] 8.结果判断:

[0060] 利用酶标仪于合适波长读取荧光值,计算标准曲线,并根据标准曲线公式,计算样品Lipocalin-2浓度。

[0061] 9.统计方法:

[0062] Lipocalin-2对胆管恶性狭窄的诊断效能利用接受者操作特性曲线(ROC)分析法进行分析,Cut-off值通过约登指数法进行选取,所用软件为SPSS 21.0。

[0063] 图3是本发明的实施例2中胆汁Lipocalin-2蛋白水平ELISA检测结果图。图4是本发明的实施例2中根据胆汁Lipocalin-2蛋白水平的ROC分析曲线。

[0064] 如图3和图4所示,ELISA检测结果表明:胆管恶性狭窄患者胆汁中Lipocalin-2水平显著高于良性狭窄组,利用接受者操作特性曲线(ROC)胆汁中Lipocalin-2对恶性胆管狭窄的诊断效能,其曲线下面积(AUC)为0.948,通过计算约登指数(Youden index)得到其Cut-off值36.79ng/ml,以此为参考值上限,Lipocalin-2诊断胆管恶性狭窄的敏感性为90%,特异性为95%。

[0065] <实施例3>

[0066] 实施例3提供了一种胆汁Lipocalin-2在制备诊断恶性胆管狭窄产品中的应用。

[0067] 实施例3中的产品为Lipocalin-2胶体金检测试纸。该Lipocalin-2胶体金检测试纸的制备过程如下:

[0068] 1.制备金标垫,该金标垫包括PVC底板、胶体金垫、样品垫、NC膜以及吸水纸,PVC底板上从左到右依次设置样品垫、胶体金垫、NC膜以及吸水纸,相邻组分之间部分重叠。

[0069] 2.将胶体金颗粒与Lipocalin-2抗体连接,制成胶体金标记Lipocalin-2抗体并将胶体金标记Lipocalin-2抗体通过喷点或浸泡的方式设置在金标垫上。

[0070] 3.在NC膜中间位置固定包被Lipocalin-2抗体,在NC膜右端包被羊抗鼠多可克隆

抗体,得到Lipocalin-2胶体金检测试纸。

[0071] 通过使用上述Lipocalin-2胶体金检测试纸和胶体金法对胆汁进行定性检测,检测过程如下:

[0072] 将2-20 μ l胆汁样本加入样品垫检测孔内,加入10-50 μ l样本稀释液,样本稀释液和样本一起向右侧层析移动。样本稀释液由Tween 20及蛋白酶抑制剂等组成。

[0073] 结果判断:Lipocalin-2阳性结果为测试线(T线)处出现红色、酒红色,同时质控线(C线)处出现红色、酒红;Lipocalin-2阴性结果为测试线(T线)处无显色反应,质控线(C线)处出现红色、酒红色;无效检测:质控线(C线)处无显色反应。

[0074] 上述实施方式为本发明的优选案例,并不用来限制本发明的保护范围。

[0075] 例如,在上述实施例1中,诊断恶性胆管狭窄的产品为蛋白芯片;在上述实施例2中,诊断恶性胆管狭窄的产品为ELISA试剂盒;在上述实施例3中,诊断恶性胆管狭窄的产品为Lipocalin-2胶体金检测试纸;在实际应用时,诊断恶性胆管狭窄的产品还可以为蛋白免疫印迹试剂盒等其它产品。

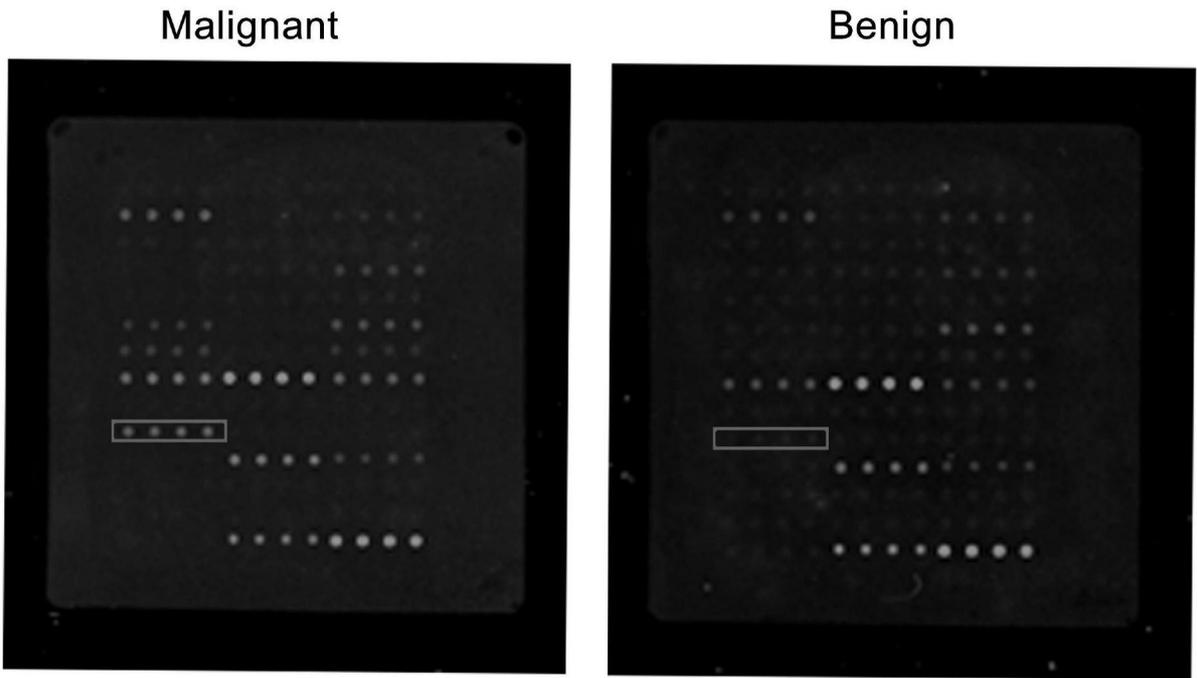


图1

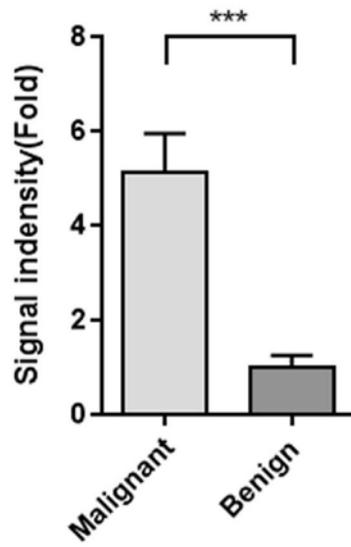


图2

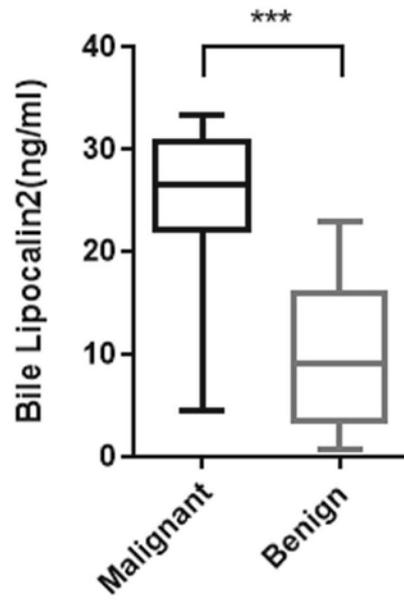


图3

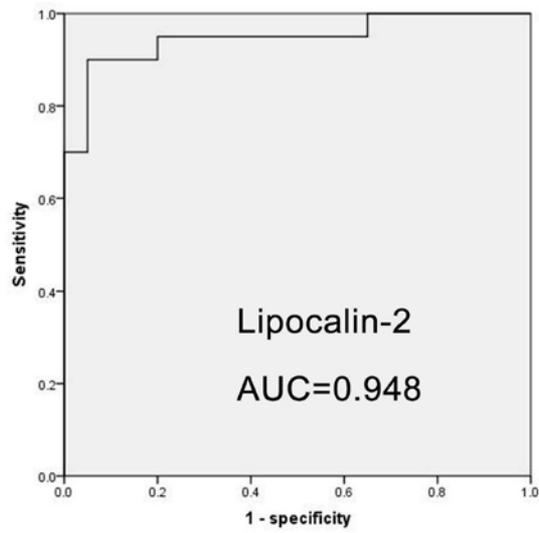


图4