



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111351945 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 202010190156.6

审查员 李倩

(22) 申请日 2020.03.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111351945 A

(43) 申请公布日 2020.06.30

(73) 专利权人 东南大学

地址 211102 江苏省南京市江宁区东南大  
学路2号

(72) 发明人 张志珺 师亚晨

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 孙斌

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

维生素D结合蛋白作为标志物在精神疾病抑  
郁症诊断中的应用

(57) 摘要

本发明公开了维生素D结合蛋白作为标志物  
在精神疾病抑郁症诊断中的应用,具体是指检测  
维生素D结合蛋白含量的试剂在制备诊断精神疾  
病抑郁症试剂中的应用。本发明表明维生素D结  
合蛋白在精神分裂症、双相躁狂、抑郁症和非精  
神疾病对照者血浆中的差异性表达,仅在抑郁症  
患者血浆中特异性升高;通过单独使用该蛋白作  
为外周血液生物标记物检测其含量用于诊断抑  
郁症,可显著提高抑郁症与健康人群或者与其他  
精神疾病精神分裂症、双相躁狂的鉴别诊断准确  
性。因此,维生素D结合蛋白含量检测在抑郁症的  
诊断中具有很高的临床应用价值,为精神疾病抑  
郁症的快速有效诊断提供了一种全新的途径。

1. 维生素D结合蛋白作为血浆中标志物在制备诊断成人精神疾病单相抑郁症试剂中的应用。
2. 检测血浆中维生素D结合蛋白含量的试剂在制备诊断精神疾病单相抑郁症试剂中的应用。
3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述诊断精神疾病单相抑郁症试剂包括从健康人群或者精神疾病包括精神分裂症和双相躁狂中诊断抑郁症的试剂。
4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述检测血浆中维生素D结合蛋白含量的试剂在制备抑郁症诊断试剂产品或工具中的应用。
5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述试剂包括利用酶联免疫方法检测维生素D结合蛋白含量的试剂,所述试剂包括维生素D结合蛋白的特异性多克隆抗体。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述利用酶联免疫方法检测维生素D结合蛋白含量的试剂为维生素D结合蛋白含量酶联免疫吸附测定试剂盒。
7. 根据权利要求5或6所述的应用,其特征在于,所述利用酶联免疫方法检测维生素D结合蛋白含量的试剂为ELISA试剂盒。
8. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述维生素D结合蛋白的特异性抗体是将纯化的人维生素D结合蛋白或它的抗原片段注射入动物体内以产生多克隆抗体;或者由表达人维生素D结合蛋白或它的抗原片段的细胞用来对动物免疫而产生抗体。
9. 一种权利要求1所述的维生素D结合蛋白作为血浆中标志物在制备用于诊断成人精神疾病抑郁症试剂盒中的应用,其特征在于,所述试剂盒包括能够与维生素D结合蛋白发生特异性结合的抗体,以及能够用于检测维生素D结合蛋白含量的辅助试剂。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述试剂盒可以单独采用维生素D结合蛋白作为指标,完成抑郁症的早期筛查,以及与健康人群或者与其他精神疾病如精神分裂症,双相躁狂的鉴别诊断。

## 维生素D结合蛋白作为标志物在精神疾病抑郁症诊断中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物科学领域,涉及快速方便特异性鉴别诊断精神疾病如抑郁症,具体涉及维生素D结合蛋白作为标志物在精神疾病抑郁症诊断中的应用。

### 背景技术

[0002] 抑郁症,亦称忧郁症,是一类以抑郁心境为主要特点的情感障碍。WHO报告2020年抑郁症将成为世界第二大疾病,到2030年将成为导致死亡和残疾的最主要原因。当前临床上对抑郁症等精神疾病的诊断主要参考《中国精神障碍分类与诊断标准(第三版)》(CCMD-3)、美国的《国际疾病分类第十版》(ICD-10)、《精神疾病诊断与统计手册(第四版)》(DSM-IV)和《精神疾病诊断与统计手册(第五版)》(DSM-V)的标准,但该方法本身存在严重的缺点:主观性强,诊断一致性差且误诊率较高。因此,为了能够实现早诊断早发现早干预各类疾病,发展有效的客观生物标记物检测对广大患者来说意义重大。

[0003] 基于几十年的研究,尽管多种客观生物标记物被发现,但仍未确定诊断抑郁症的可靠的生物标记物。最大的难题在于绝大部分生物标记物或可较准确地鉴别抑郁症与健康人群,但无法同时做到有效地鉴别抑郁症、精神分裂症及双相躁狂等精神疾病。因此,如何特异性诊断抑郁症,进而提供有效的治疗成为当前临床抑郁症诊疗中十分紧迫的事情。

[0004] 维生素D结合蛋白(VDB),又称GC球蛋白,是一种多态单链糖蛋白(~52-59 kDa),系Hirschfeld教授在1959年首次发现。由于GC表现为高度的基因多样性,从而导致VDB蛋白结构的多态性,因此,VDB表现出多样性的功能(Lisowska-Myjak B, Józwiak-Kisielewska A, Łukaszewicz J, Skarżyńska E: Vitamin D-binding protein as a biomarker to confirm specific clinical diagnoses. Expert review of molecular diagnostics 2019:1-8)。外周血中VDB主要由肝实质细胞合成,在多种组织中表达,包括肝、肾、性腺、脂肪和中性粒细胞。VDB具有三个蛋白结构域,除了参与维生素D结合的第一结构域外,另外两个结构域表现出其他多种功能,如清除肌动蛋白、激活巨噬细胞、增强中性粒细胞趋化、激活破骨细胞等免疫炎症反应过程等(Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM: Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2015, 29:773-786)。维生素D具有保护神经元的功能,作为维生素D最主要的运载体,VDB的水平异常必然会引起维生素D在脑内的功能。此外,作为重要的炎症相关蛋白,VDB参与体内多种免疫调节过程,而抑郁症中非常重要的发病假说就是神经炎症假说(Liu CH, Zhang GZ, Li B, Li M, Woelfer M, Walter M, Wang L: Role of inflammation in depression relapse. J Neuroinflammation 2019, 16:90)。2009年, Jirikowski教授等人首次在啮齿类动物的脑组织(下丘脑)中发现了VDB的mRNA和蛋白的表达,并该蛋白提出在下丘脑-神经垂体系统中可能以神经激素样的方式经轴浆转运和终末释放(Jirikowski GF, Kaunzner UW, Dief AEE, Caldwell JD: Distribution of vitamin D binding protein expressing neurons in the rat hypothalamus. Histochemistry

and cell biology 2009,131:365-370)。由于脑内VDB检测在活体中几乎难以做到,而外周血浆较易获得,而目前尚未有在抑郁症与其他精神疾病(如精神分裂症、双相躁狂等)间使用VDB做为鉴别诊断生物标记物的研究。

#### 发明内容:

[0005] 发明目的:为解决现有技术中精神疾病如抑郁症的临床诊断手段的缺陷和不足,本发明提供VDB蛋白(维生素D结合蛋白)在诊断精神疾病主要是抑郁症中的新用途,即维生素D结合蛋白作为标志物在精神疾病如抑郁症诊断中的应用,具体而言为检测维生素D结合蛋白含量的试剂在制备诊断精神疾病如抑郁症试剂中的应用。本发明通过检测受试者血浆中VDB蛋白的含量判断受试者是否患有精神疾病抑郁症,并能实现与其他的精神疾病如精神分裂症、双相躁狂的鉴别诊断,为精神疾病抑郁症的快速有效诊断提供了一种全新的途径。

[0006] 技术方案:为了实现上述目的,如本发明所述维生素D结合蛋白作为标志物在制备诊断精神疾病抑郁症试剂中的应用。

[0007] 本发明检测维生素D结合蛋白含量的试剂在制备诊断精神疾病抑郁症试剂中的应用。

[0008] 其中,所述诊断精神疾病抑郁症试剂包括从健康人群或者精神疾病包括精神分裂症和双相躁狂中诊断抑郁症的试剂。

[0009] 进一步地,所述检测维生素D结合蛋白的试剂在制备抑郁症诊断产品试剂产品或试剂工具中的应用。

[0010] 其中,所述试剂包括利用酶联免疫方法检测维生素D结合蛋白含量的试剂,主要包括维生素D结合蛋白的特异性多克隆抗体,用于该蛋白含量检测的。

[0011] 作为优选,所述利用酶联免疫方法检测维生素D结合蛋白含量的试剂为维生素D结合蛋白含量酶联免疫吸附测定试剂盒。

[0012] 作为优选,所述利用酶联免疫方法检测维生素D结合蛋白含量的试剂为ELISA 试剂盒包括Human Vitamin D BP Quantikine ELISA Kit (DVDBPOB;R&D Systems, Minneapolis,MN,USA)、人维生素D结合蛋白(VDBP)酶联免疫试剂盒(RGB- 60486H;瑞格博科技发展有限公司,北京,中国)、或者人维生素D结合蛋白(VDBP) ELISA试剂盒(MEXN-H2746;美轩生物科技有限公司,上海,中国)等。优选采用,Human Vitamin D BP Quantikine ELISA Kit;DVDBPOB;R&D Systems, Minneapolis,MN,USA。

[0013] 其中,所述维生素D结合蛋白的特异性抗体是将纯化的人维生素D结合蛋白或它的抗原片段注射入动物体内以产生多克隆抗体;或者由表达人维生素D结合蛋白或它的抗原片段的细胞用来对动物免疫而产生抗体。

[0014] 本发明用于诊断精神疾病试剂盒,包括能够与维生素D结合蛋白发生特异性结合的抗体,以及能够用于检测维生素D结合蛋白含量的其他辅助试剂。

[0015] 其中,所述试剂盒可以单独采用维生素D结合蛋白作为指标,完成抑郁症的早期筛查,以及与健康人群或者与其他精神疾病(精神分裂症,双相躁狂)的鉴别诊断。

[0016] 所述检测试剂盒的组分可以以水介质的形式或以冻干的形式来包装。试剂盒中适当的容器通常至少包括一种小瓶、试管等,其中可放置一种组分,并且可进行适当地等分。

在试剂盒中存在多于一种的组分时,试剂盒中通常也将包含第二、第三或其它附加的容器,其中分离地放置附加的组分。然而,不同组合的组分可被包含在一个小瓶中。本发明的试剂盒通常也将包括一种用于容纳反应物的容器,密封以用于商业销售。这种容器可包括注模或吹模的塑料容器,其中可保留所需的小瓶。

[0017] 本发明基于申请人发现的VDB蛋白在抑郁症、精神分裂症、双相躁狂和非精神疾病对照者血浆中的差异性表达(抑郁症患者特异性高表达),以该蛋白作为一个外周分子标志物,对其血浆水平的定量检测,可以用作抑郁症的特异性诊断指标。此外,申请人还通过比较不同研究组之间血浆VDB的浓度,评估了血浆VDB蛋白单独使用对抑郁症与精神分裂症和双相躁狂鉴别的诊断效能。

[0018] 有益效果:与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0019] 本发明首次发现VDB蛋白作为特异性诊断抑郁症的生物标志物的用途,为检测鉴别诊断抑郁症提供了一条全新的途径。本发明利用检测维生素D结合蛋白含量的试剂在制备诊断精神疾病抑郁症试剂中的应用,其中单独采用VDB蛋白作为指标检测其含量,将抑郁症患者与非精神疾病健康人群、精神分裂症、双相患者分析,ROC曲线下的面积值AUC分别为为0.750、0.734、0.648;此外,单独使用该蛋白作为外周血液生物标记物检测其含量用于诊断抑郁症,可提供较高的抑郁症与健康人群或者与其他精神疾病(精神分裂症、双相躁狂)的鉴别诊断准确性。因此,维生素D结合蛋白在抑郁症的诊断中具有较高的临床应用价值。

[0020] 本发明还提供了用于诊断精神疾病抑郁症的试剂盒,包括能够用于检测维生素D结合蛋白含量的试剂,维生素D结合蛋白的特异性多克隆抗体等,利用待测者的外周血浆,方便快捷的进行重性抑郁症与健康人群的鉴别诊断,同时还可用于从健康人群或者与其他精神疾病(精神分裂症,双相躁狂)中鉴别诊断抑郁症。

## 附图说明

[0021] 图1为抑郁症、精神分裂症、双相躁狂患者和非精神疾病对照者外周血浆中 VDB蛋白的定量结果图;

[0022] 图2为使用受试者工作特征曲线分析对抑郁症患者与非精神疾病对照者、精神分裂症、双相躁狂患者的比较结果示意图。

## 具体实施方式

[0023] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂家建议的条件。

[0024] 实施例

[0025] 收集从未服用过抗精神病药物、心境稳定剂、苯二氮卓类等药物的72名抑郁症患者、42名精神分裂症、39名躁狂症患者及60名非精神疾病对照者的血浆样品(获取空腹静脉血2mL,经200g离心10分钟,留取上层血浆1mL)。具体而言,抑郁症、精神分裂症和双相躁狂的诊断由有丰富临床经验的三级精神专科医师(主任/副主任医师、主治医师和高年资住院医师)分别根据《精神疾病诊断与统计手册(第四版)》(DSM-V)中的诊断标准进行诊断和确

认,上述精神疾病患者招募自东南大学附属中大医院、新乡医学院第二附属医院和扬州市五台山医院,健康对照者的样品来自东南大学附属中大医院及新乡医学院第二附属医院体检中心。

[0026] 所做的检验和评估包括:血浆VDB蛋白浓度测定;分别评估各组患者病情严重程度的量表,包括汉密尔顿抑郁量表(24-item Hamilton Depression Rating Scale,HAMD-24)、抑郁自评量表(Self-Rating Depression Scale,SDS)、贝克绝望量表(Beck Hopelessness Scale,BHS)、简明精神病量表(Brief Psychiatric Rating Scale,BRPS)、杨氏躁狂评定量表(Young Mania Rating Scale,YMRS),测试结果见表1。

[0027] 血浆VDB蛋白浓度使用ELISA试剂盒检测,所用试剂盒详细信息如下: Human Vitamin D BP Quantikine ELISA Kit;DVDBPOB;R&D Systems, Minneapolis,MN,USA。该试剂盒的检测范围为6.3-100ng/mL。

[0028] 该试剂盒提供了检测VDB蛋白浓度所需的必要但非全部试剂或者材料:1 块96孔酶标板(已包被重组人的VDB特异性抗体)、2管人的VDB蛋白标准品、1瓶12ml试验稀释液RD1-38、1瓶21ml的人VDB共轭结合底物液、1瓶21ml 校准稀释液RD5P、1瓶21ml洗涤液(25倍稀释)、1瓶12ml显色液A、1瓶12ml 显色液A和1瓶6ml终止液。此外,还需要的额外试剂与材料如下:酶标检测仪、移液器、移液管、量筒、吸水纸、蒸馏水或去离子水、数据分析与绘图软件等。

[0029] 在检测开始之前准备好所有需要的物品:

[0030] 1) 洗涤液配置:取20mL洗涤液加入去离子水,稀释至500mL洗涤液待用;

[0031] 2) 底物液:于使用开始前15分钟,将等体积显色液A和B混合;

[0032] 3) 校准稀释液RD5P稀释,将20mL的RD5P原液加入80ml去离子水中,混合成为100mL稀释的校准稀释液RD5P,待用;

[0033] 4) VDB标准品配置:使用稀释的校准稀释液RD5P加入1管VDB蛋白标准品中,构建浓度梯度的标准品,标准品浓度依次为:100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、6.25ng/mL。

[0034] 实验操作如下:

[0035] 1) 使用试剂盒中提供的96孔酶标板(已包被重组人的VDB特异性抗体),确定本次检测所需酶标板孔数目,每个样品、标准品和空白应当设置复孔;此外,也可以根据自身需要,采用常规免疫抗体制备方法由纯化的人维生素D结合蛋白或它的抗原片段注射入动物体内以产生特异性抗体或者由表达人维生素D结合蛋白或它的抗原片段的细胞用来对动物免疫而产生抗体,包被于干净的酶标板中自制新的试剂盒。

[0036] 2) 每孔先加入50 $\mu$ l试验稀释液RD1-38;

[0037] 3) 添加样品:倍比稀释VDB蛋白标准品后将100ng/mL、50ng/mL、25 ng/mL、6.25ng/mL的标准品各50 $\mu$ L依次加入酶标板孔中,并设置1孔空白比较(空白比较孔不添加样品和ELISA试剂,其他各步操作相同)。其余各孔加入使用校准稀释液RD5P稀释后的待测血浆样本50 $\mu$ L(需确保稀释后的血浆VDB浓度处于标准品所示浓度区间的中间,并记录每一样本稀释倍数,便于实验结束后计算,以确保试剂盒检测的准确性);室温下,摇床上孵育2小时;摇床速度设定为500 $\pm$ 50rpm;

[0038] 4) 完全倒去孔内液体,使用稀释好的洗涤液重复4次洗涤每孔,每孔约加洗涤液400 $\mu$ l,洗涤完全后,将板倒置吸水纸上拍干;

[0039] 5) 每孔加入200 $\mu$ l人VDB共轭结合底物液,室温下,摇床上孵育1小时;  
 [0040] 6) 重复操作4洗涤;  
 [0041] 7) 每孔加入200 $\mu$ l底物液,室温下,避光孵育30分钟;  
 [0042] 8) 每孔加入50 $\mu$ l终止液,停止反应(颜色立即由蓝色变为黄色);  
 [0043] 9) 以空白孔为零,添加终止液后15分钟内用酶标检测仪在450nm处测定光密度(OD值)。通过VDB的标准蛋白测出的OD值使用ELISACalc软件绘制出标准曲线及曲线的数学公式,随后将每个血浆样本的OD值依次输入软件所得到的标准曲线公式中计算当前样品中VDB的含量,基于实验开始前记录的每个样本稀释倍数,计算未稀释时的浓度,作为最终的血浆VDB的含量。

[0044] 受试者的人口学和临床特征见表1,不同精神疾病患者和非精神疾病对照者的血浆中VDB蛋白浓度结果见图1和表1,血浆VDB的诊断与诊断效能分析见图2。

[0045] 图1可见,VDB的血浆水平仅在抑郁症患者中显著增高,而其他人群之间没有统计学上的显著性差异,说明本发明利用检测维生素D结合蛋白含量可以有效地特异性诊断精神疾病抑郁症。

[0046] 图2表明血浆VDB蛋白在诊断抑郁症与健康人群、精神分裂症、双相躁狂的ROC曲线下面积(AUC)依次为0.750(95%IC:0.669-0.831)、0.734(95% IC:0.643-825)、0.648(95%IC:0.549-0.748)。通常认为 $0.5 < AUC < 1$ ,则该分类器有预测价值,且当AUC越大时,分类效能越大。因此,VDB在诊断抑郁与其他人群中均具有较高的鉴别效能,说明本发明可以从健康人群或者与其他精神疾病(精神分裂症,双相躁狂)中准确鉴别诊断抑郁症,并且本发明通过酶联免疫吸附试验试剂盒检测方便快捷有效。此外,一些其他可以检测的VDB的含量的酶联免疫试剂盒效果与上述实施例中采用的试剂盒效果一致,如人维生素D结合蛋白(VDBP)酶联免疫试剂盒(RGB-60486H)、人维生素D结合蛋白(VDBP)ELISA试剂盒(MEXN-H2746)等。

[0047] 表1受试者基本临床信息及VDB检测结果

	MDD (n=74)	HC (n=60)	SZ (n=42)	BD-I (n=39)	p value
[0048] 年龄(年)	31.54 (11.99)	34.35 (10.76)	32.50 (9.23)	30.46 (9.58)	0.255 <sup>a</sup>

	性别（女）	43 (58.11%)	36 (60.00%)	20 (47.62%)	15 (38.45%)	0.124 <sup>b</sup>
	BMI 指数	22.59 (3.50)	22.96 (3.25)	21.21 (2.89)	24.43 (2.99)	0.149 <sup>c</sup>
	吸烟	13 (17.57%)	13 (21.67%)	5 (11.90%)	7 (17.59%)	0.655 <sup>b</sup>
	首发年龄（年）	27.53 (11.37)	-	30.36 (9.10)	27.79 (8.66)	0.136 <sup>a</sup>
	病程（月）	49.46 (72.95)	-	27.73 (27.92)	32.74 (38.23)	0.754 <sup>a</sup>
	精神疾病史	26 (35.14%)	2 (3.33%)	6 (14.29%)	3 (7.69%)	0.000 <sup>b</sup>
[0049]	HAMD-24 评分	35.12 (1.85)	1.95 (2.33)	-	-	0.000 <sup>d</sup>
	SDS 评分	70.22 (11.43)	34.62 (6.50)	-	-	0.000 <sup>d</sup>
	BHS 评分	10.93 (4.84)	6.12 (1.86)	-	-	0.000 <sup>d</sup>
	BRPS 评分	-	-	48.69 (3.50)	-	-
	YMRS 评分	-	-	-	31.18 (5.96)	-
	VDB $\mu\text{g/ml}$	289.35 (77.96)	219.72 (70.39)	225.32 (55.82)	247.26 (45.16)	0.000 <sup>c</sup>

[0050] 注：数据使用平均值（标准差）或例数（百分比%）表示。

[0051] MDD: 抑郁症; HC: 非精神疾病健康人; SZ: 精神分裂症; BD-I: 双相躁狂<sup>a</sup> Kruskal-Wallis H检验; <sup>b</sup>卡方检验; <sup>c</sup>单因素方差分析; <sup>d</sup> Mann-Whitney U检验。

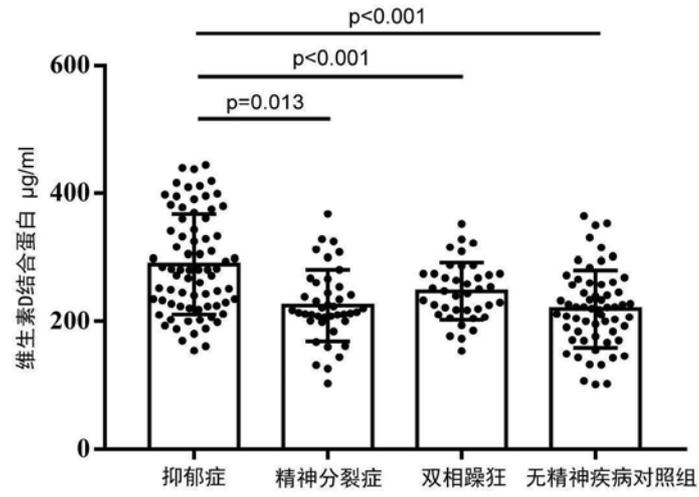


图1

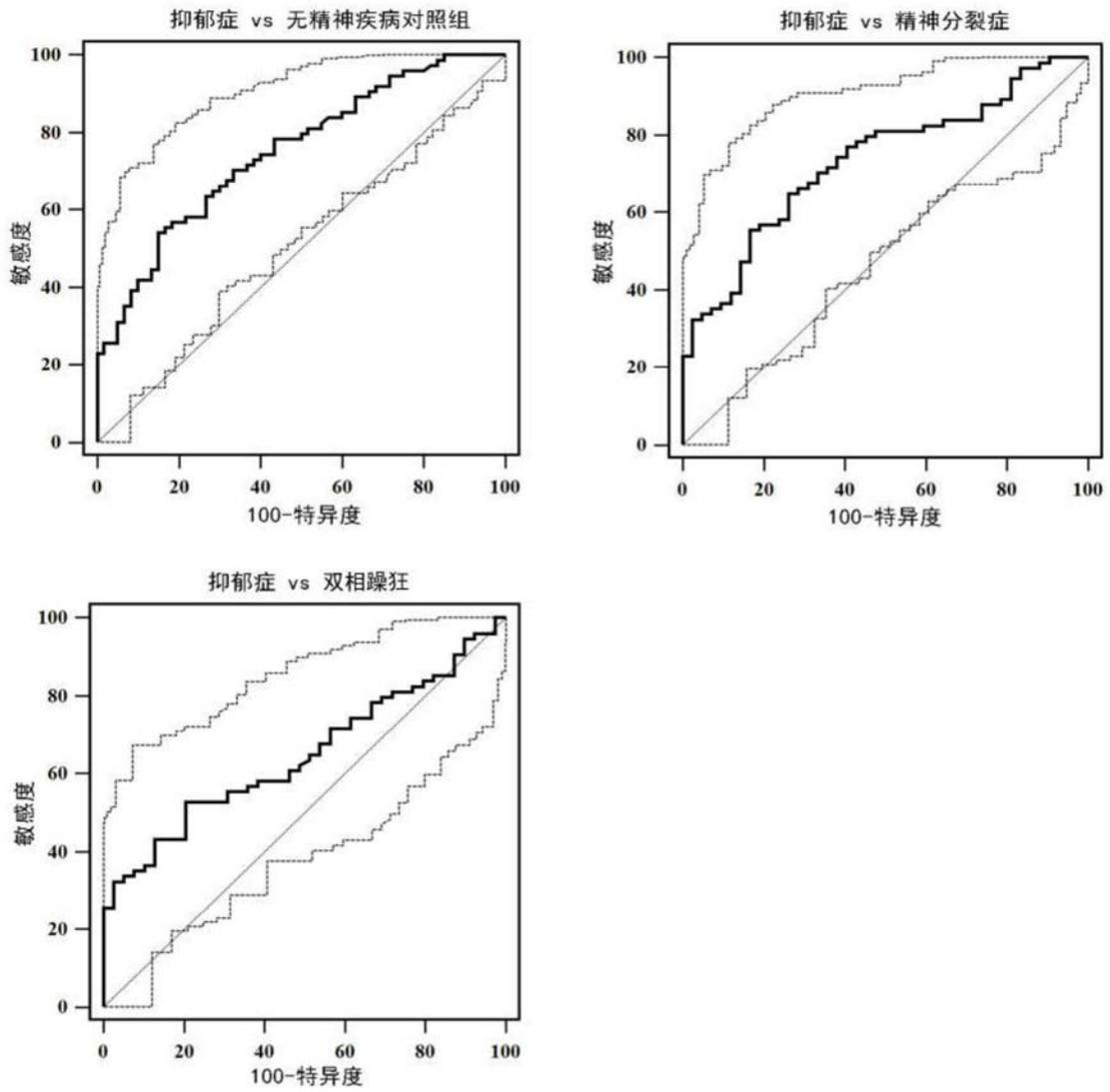


图2