



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110850075 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 201911086340.X

(22) 申请日 2019.11.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110850075 A

(43) 申请公布日 2020.02.28

(73) 专利权人 郑州大学第一附属医院
地址 450000 河南省郑州市二七区建设东
路50号

(72) 发明人 郭文治 郑清元 孙耀辉 丁明杰
于潇 何玉婷 王盼梁 李锦锦
杨东菁 李继业

(74) 专利代理机构 郑州豫开专利代理事务所
(普通合伙) 41131
专利代理师 朱俊峰

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/36 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

审查员 舒霏霏

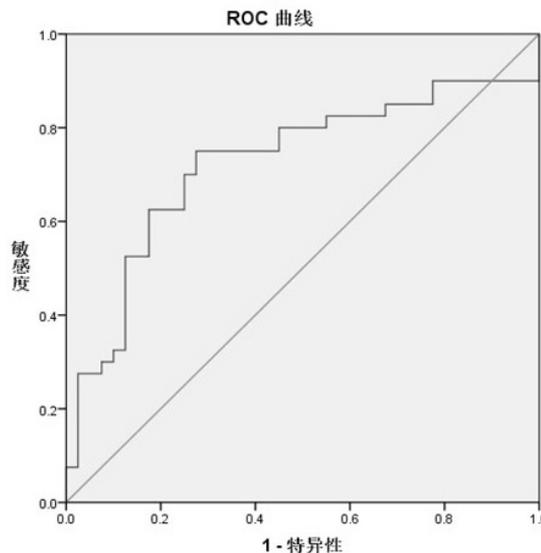
权利要求书1页 说明书9页 附图10页

(54) 发明名称

肝癌阳离子标志物的筛选方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种肝癌阳离子标志物的筛选方法,包括以下步骤:第一步,将待测样本用4℃预冷的PBS清洗2次,加入超纯水匀浆,涡旋,加入提取液,涡旋,超声破碎2次,沉淀,离心,将上清冷冻干燥后得到粉状代谢混合物,将代谢混合物于-80℃下冻存,备用;第二步,先将第一步冻存的代谢混合物复溶,再利用LC-MS/MS分离并采集质谱数据;第三步,确定每种代谢物质;第四步,筛选显著性差异代谢物质。本发明首次建立了一种与肝癌诊断相关阳离子标志物的筛选方法,通过肝癌组织与肝硬化组织中相应分子含量的差异倍数(大于2或小于0.5)筛选出了4个具有良好差异性的代谢阳离子,为日后肝癌药物的研发提供新的靶点和思路,具有重要意义。



1. 一种肝癌阳离子标志物的筛选方法,其特征在于:包括以下步骤:

第一步,将待测样本用4℃预冷的PBS清洗2次,加入超纯水匀浆,涡旋,加入提取液,涡旋,超声破碎2次,沉淀,离心,将上清冷冻干燥后得到粉状代谢混合物,将代谢混合物于-80℃下冻存,备用;其中,提取液为体积比=1:1的甲醇和乙腈混合液;

第二步,先将第一步冻存的代谢混合物用乙腈/水混合液复溶,再利用LC-MS/MS分离并采集质谱数据:用高效液相色谱分离第一步中得到的代谢混合物,将分离后的样品用质谱仪I进行检测分析,用质谱仪II采集样品的质谱数据;

质谱仪II的检测条件为:离子源气体1:40,离子源气体2:80,离子源温度:650℃,气帘气:30,离子喷嘴电压:+5000 V,正离子模式;采用高灵敏度信息依赖性获取模式采集二级质谱,分布势能:±60 V,正离子模式;碰撞能量:35±15 eV;二级谱图采用分段采集:50~300m/z,290~600 m/z,590~900 m/z,890~1200 m/z;

高效液相分离条件为:柱温为25℃、流速为0.3mL/min、上样量为2μL;流动相由两相组成:流动相A为含有25 mM乙酸铵和25 mM氨水的水溶液,流动相B为纯乙腈,洗脱程序为:0~0.5min:95% 流动相B;0.5~7min:95%~65%流动相B;7~8 min:65%~40%流动相B;8~9 min:40%流动相B;9~9.1 min:40%~95%流动相B;9.1~12 min:95%流动相B;

质谱仪I在正离子模式下采集数据,质谱检测条件为:干燥气体流速:16 L/min,气体温度:250℃,鞘气温度:400℃,鞘气流速:12 L/min,喷雾器:20 psig,升压电容正极:3000V, Nozzle喷嘴电压:175 V,相对分子质量范围:50~1200 Da,数据采集速率:4 HZ,每个循环的时间:50 ms;

第三步,将第二步得到的质谱数据转化为.mzXML格式,然后采用LC-MS光谱注释进行峰对齐、保留时间校正以及峰面积的提取,采用精确质量数匹配<25ppm和二级谱图匹配的方式确定每种代谢物质;

第四步,筛选显著性差异代谢物质:用多变量统计对第三步确定的每种代谢物质进行初步筛选;初筛出肝癌样本与肝硬化样本之间的差异代谢物质后,用单变量统计对初筛得到的差异代谢物质再次筛选,筛选出肝癌样本与肝硬化样本之间的显著性差异代谢物质即为肝癌阳离子标志物;显著性差异代谢物质包括腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子。

2. 样本组织中的腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合作为肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断试剂盒或诊断药物中的应用。

肝癌阳离子标志物的筛选方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生化检测领域,尤其是涉及一种肝癌阳离子标志物的筛选方法,还涉及筛选出的肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 肝癌一般指肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,即HCC),是一种高死亡率的原发性肝癌,它是一种全球范围最常见的恶性肿瘤,尤其是在亚洲、非洲和南部欧洲。全球每年新发病例数约65万,其发病率占有所有恶性肿瘤的第5位,死亡数约为60万,为所有恶性肿瘤的第3位。肝癌的发病原因多种多样,目前我国肝癌主要在乙肝肝硬化或非酒精性脂肪性肝炎所致肝硬化的基础上发展而来。肝癌早期症状不明显,难以被发觉;一旦发觉,一般已发展到中晚期,对患者和医疗造成沉重的负担。因此肝癌的早期筛查、早期诊断、早期治疗至关重要。

[0003] 目前,临床上的肝癌筛查方法是影像现象学(如B型超声显像)、肿瘤标志物甲胎蛋白(α -fetoprotein,即AFP)的血清含量或两者结合进行筛查。然而,B超很难鉴别小肝癌或肝硬化结节,而甲胎蛋白血清水平在诊断肝癌时存在敏感性和特异性较低的缺陷,单独用于确诊时的检出率一般只有50%~75%左右。现有筛查方法的局限性极大地限制了肝细胞癌的早期有效诊断,预警作用有限。对于肝细胞癌的早期有效诊断有助于显著提高患者的生存率,因此,开发具有临床早诊潜力的新方法对于降低肝细胞癌的发病率和死亡率具有非常重要的现实意义。

[0004] 近年来,代谢组学技术作为一个新的有力工具,被广泛运用于疾病研究中。将疾病状态下异常的或者数量变化极大的代谢小分子作为标志物,以用于诊断疾病的进程,具有重要意义。液相色谱-质谱串联技术是代谢组学的主要研究手段,前列腺癌的诊断标志物肌氨酸的检测、新生儿疾病筛查时的多种氨基酸检测等均是代谢小分子在疾病诊断中应用的已有成功案例。由于多种因素可影响机体的代谢状态,导致单一代谢物容易受到扰动,因此从众多代谢物中优选出由少数代谢物组成的“联合型代谢标志物”,并以判别公式计算“判别可能性”P值(Probability),能够显著改善代谢物对疾病诊断的灵敏度以及特异性。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种肝癌阳离子标志物的筛选方法,还涉及筛选出的肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用,为日后肝癌药物的研发提供了新的靶点和思路,对肝癌的诊断和具有重要意义。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取下述技术方案:

[0007] 本发明提供了一种肝癌阳离子标志物的筛选方法,包括以下步骤:

[0008] 第一步,将待测样本用4℃预冷的PBS清洗2次,加入超纯水匀浆,涡旋,加入提取液,涡旋,超声破碎2次,沉淀,离心,将上清冷冻干燥后得到粉状代谢混合物,将代谢混合物于-80℃下冻存,备用;

[0009] 第二步,先将第一步冻存的代谢混合物用乙腈/水混合液复溶,再利用LC-MS/MS分离并采集质谱数据:用高效液相色谱分离第一步中得到的代谢混合物,将分离后的样品用质谱仪I进行检测分析,用质谱仪II采集样品的质谱数据;

[0010] 质谱仪II的检测条件为:质谱仪II的检测条件为:离子源气体1:40,离子源气体2:80,离子源温度:650℃,气帘气:30,离子喷嘴电压:+5000 V,正离子模式;采用高灵敏度信息依赖性获取模式采集二级质谱,分布势能:±60 V,正离子模式;碰撞能量:35±15 eV;二级谱图采用分段采集:50~300m/z,290~600 m/z,590~900 m/z,890~1200 m/z;

[0011] 第三步,将第二步得到的质谱数据转化为.mzXML格式,然后采用LC-MS光谱注释进行峰对齐、保留时间校正以及峰面积的提取,采用精确质量数匹配<25ppm和二级谱图匹配的方式确定每种代谢物质;

[0012] 第四步,筛选显著性差异代谢物质:用多变量统计(OPLS-DA)对第三步确定的每种代谢物质进行初步筛选;初筛出肝癌样本与肝硬化样本之间的差异代谢物质(VIP>1、Fold change>2或<0.5)后,用单变量统计对初筛得到的差异代谢物质再次筛选,筛选出肝癌样本与肝硬化样本之间的显著性差异代谢物质(P<0.05)即为肝癌阳离子标志物。

[0013] 优选地,所述第二步中高效液相分离条件为:柱温为25℃、流速为0.3mL/min、上样量为2μL;流动相由两相组成:流动相A为含有25 mM乙酸铵和25 mM氨水的水溶液,流动相B为纯乙腈,洗脱程序为:0~0.5 min:95% 流动相B;0.5~7min:95%~65%流动相B;7~8 min:65%~40%流动相B;8~9 min:40%流动相B;9~9.1 min:40%~95%流动相B;9.1~12 min:95%流动相B。

[0014] 优选地,所述第二步中利用质谱仪I在正离子模式下采集数据,质谱检测条件为:所述第二步中利用质谱仪I在正离子模式下采集数据,质谱检测条件为:干燥气体流速:16 L/min,气体温度:250 ℃,鞘气温度:400 ℃,鞘气流速:12 L/min,喷雾器:20 psig,升压电容正极:3000 V, Nozzle喷嘴电压:175 V,相对分子质量范围:50~1200 Da,数据采集速率:4 HZ,每个循环的时间:50 ms。

[0015] 优选地,所述第一步中的提取液为体积比=1:1的甲醇和乙腈混合液。

[0016] 优选地,所述第四步得到的显著性差异代谢物质包括腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子。

[0017] 优选地,本发明还提供了腺嘌呤阳离子作为肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断试剂盒或诊断药物中的应用。

[0018] 优选地,本发明还提供了4-吡哆酸阳离子作为肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断试剂盒或诊断药物中的应用。

[0019] 优选地,本发明还提供了5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子作为肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断试剂盒或诊断药物中的应用。

[0020] 优选地,本发明还提供了花生五烯酸作为肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断试剂盒或诊断药物中的应用。

[0021] 优选地,本发明还提供了腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合作为肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断试剂盒或诊断药物中的应用。

[0022] 单变量分析方法是简单常用的实验数据分析方法。在进行两组样本间的差异代

谢物分析时,常用的单变量分析方法包括变异倍数分析(Fold Change Analysis,FC Analysis)、T检验,以及综合前两种分析方法的火山图(Volcano Plot)。利用单变量分析可以直观地显示两样本间代谢物变化的显著性,从而帮助我们筛选潜在的标志代谢物。筛选出 $FC > 1.5$ 且 $P \text{ value} < 0.05$ 的代谢物,即单变量统计分析筛选的差异代谢物。

[0023] 同时研究发现很多动植物及微生物的生理和病理变化通常伴随着代谢过程的异常改变,但是这些生理病理的变化通常只与部分代谢物的表达水平变化特异相关。因此,从海量的代谢组学数据中筛选标志代谢物并建立准确的判别模型,对于疾病的早期诊断和预后、以及生理过程的类型和时期的判别等具有重要意义。利用多变量统计分析方法建模,可以更好的筛选出差异代谢物。

[0024] 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)是一种有监督的判别分析统计方法,是多变量统计分析方法之一,其采用偏最小二乘回归建立代谢产物的表达量与样品组别之间的关系模型,以达到对样品组别预测的目的。在OPLS-DA评分图上,有两种主成分(预测主成分和正交主成分),一般预测主成分只有1个,即 t_1 ,而正交主成分可以同时有多个,OPLS-DA分析可以将组间的差异最大程度地反映在 t_1 上,因此根据 t_1 可以直接区分组间的变异,而正交主成分则可以很好地反映组内的变异。该方法是基于PLS-DA分析方法的基础上进行修正得来,滤除了与分类信息无关的噪音,显著提高了模型的有效性和解析能力。

[0025] 本发明利用OPLS-DA分析法对质谱数据进行初筛,得到差异性小分子;再用单变量分析方法对初筛得到的差异性小分子再次筛选,得到显著性差异小分子,即为肝癌阳离子标志物。

[0026] 本发明首次建立了一种与肝癌诊断相关阳离子标志物的筛选方法,具体利用LC-MS/MS质谱分析方法检测待测样本,通过大量的临床样本进行质谱分析后,通过肝癌组织与肝硬化组织中相应分子含量的差异倍数(大于2或小于0.5)筛选出了4个具有良好差异性的代谢阳离子。本发明的4个代谢小分子可以分别单独作为肝癌诊断的新的标志物,并且也可以共同作为肝癌诊断的新的标志物,该组合标志物特别适用于筛查肝癌高危人群,为日后肝癌药物的研发提供新的靶点和思路,具有重要意义。

附图说明

[0027] 图1是腺嘌呤阳离子的信号响应强度的ROC曲线。

[0028] 图2是肝癌样本与肝硬化样本中腺嘌呤阳离子的信号强度比较。

[0029] 图3是4-吡哆酸阳离子的信号响应强度的ROC曲线。

[0030] 图4是肝癌样本与肝硬化样本中4-吡哆酸阳离子的信号强度比较。

[0031] 图5是5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子的信号响应强度的ROC曲线。

[0032] 图6是肝癌样本与肝硬化样本中5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子的信号强度比较。

[0033] 图7是花生五烯酸阳离子的信号响应强度的ROC曲线。

[0034] 图8是肝癌样本与肝硬化样本中花生五烯酸阳离子的信号强度比较。

[0035] 图9是腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合的信号响应强度的ROC曲线。

[0036] 图10是肝癌样本与肝硬化样本中腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合的信号强度比较。

具体实施方式

[0037] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0038] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本申请的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0039] 现有技术中还未有关代谢阳离子小分子作为肝癌标志物的相关报道。因而,本发明提出了一种肝癌阳离子标志物的筛选方法,包括以下步骤:

[0040] 第一步,提取样本:提取待检样本(包括40个肝癌样本和40个肝硬化样本)中的代谢混合物,具体方法为:将样本组织用4℃的PBS溶液清洗两次后,加入超纯水用匀浆机(美国MP匀浆仪FastPrep)匀浆,涡旋,加入提取液(提取液由甲醇与乙腈按照1:1体积比配制而成)后再次涡旋,低温超声破碎,重复破碎两次,沉淀,离心,冷冻干燥得到代谢混合物,将代谢混合物于-80℃下冷冻冻存,备用;

[0041] 第二步,先将第一步冻存的代谢混合物用乙腈/水混合液复溶,再利用LC-MS/MS(即超高效液相色谱与三重四极杆-飞行时间质谱仪)分离并采集质谱数据:将第一步得到的代谢混合物用超高效液相色谱仪(安捷伦1290 Infinity LC超高效液相色谱系统并联合HILIC色谱柱(Waters Acquity UPLC BEH Amide 1.7μm,2.1×100mm))进行分离,分离后的样本用电喷雾电离(Electro-spray Ionization,ESI)正离子模式进行检测,采集质谱数据;

[0042] 液相分离条件为:柱温为25℃、流速为0.3mL/min、上样量为2μL;流动相由两相组成:流动相A为含有25 mM乙酸铵和25 mM氨水的水溶液,流动相B为纯乙腈,洗脱程序为:0~0.5 min:95% 流动相B;0.5~7min:95%~65%流动相B;7~8 min:65%~40%流动相B;8~9 min:40%流动相B;9~9.1 min:40%~95%流动相B;9.1~12 min:95%流动相B;

[0043] 检测样本在电喷雾电离(Electro-spray Ionization,ESI)正离子模式下进行检测,用质谱仪I(安捷伦6550质谱仪)进行检测分析,其ESI源设置参数为:干燥气体流速(Drying gas):16 L/min,气体温度:250 °C,鞘气(Sheath gas)温度:400 °C,鞘气流速:12 L/min,喷雾器(Nebulizer):20 psig,Vcap升压电容正极:3000 V,Nozzle喷嘴电压:175 V,相对分子质量范围(Mass Range):50~1200 Da,数据采集速率(Acquisition rate):4 HZ,每个循环的时间:50 ms;

[0044] 用质谱仪II(AB Triple TOF 6600质谱仪)采集一级谱图和二级谱图,其ESI源设置参数:离子源气体1(Ion Source Gas1):40,离子源气体2(Ion Source Gas2):80,离子源温度(source temperature):650℃,Curtaingas(CUR)气帘气:30,Ion Sapary Voltage Floating (ISVF)离子喷嘴电压+5000 V,正离子模式;二级质谱采用信息依赖性获取模式information dependent acquisition(IDA)获得,并且采用高灵敏度模式进行采集,Declustering potential(DP)分布势能:±60V,正离子模式,碰撞能量(Collision Energy):35±15 eV,IDA的参数设置如下:排除同位素相对分子质量范围(Exclude isotopes within):4 道尔顿,每个周期要监测的候选离子数(Candidate ions to

monitor per cycle):10;采集数据的模式按照质核比范围进行分段,50~300m/z,290~600 m/z,590~900 m/z,890~1200 m/z,以达到扩大二级谱图采集率的目的;

[0045] 第三步,将第二步得到的质谱数据经ProteoWizard转换成.mzXML格式,然后采用LC-MS光谱注释(XCMS)软件进行峰对齐、保留时间校正以及峰面积的提取,采用精确质量数匹配<25 ppm和二级谱图匹配的方式确定代谢混合物中的每种代谢物质;

[0046] 第四步,以变量权重值>1为筛选标准,用OPLS-DA对第三步确定的每种代谢物质进行初步筛选,初筛出肝癌样本与肝硬化样本之间的差异代谢物质,差异代谢物质的变量权重值>1,且差异倍数>2或<0.5;用单变量统计对初筛得到的差异代谢物质再次筛选,筛选出P值<0.05的显著性差异代谢物质即为肝癌阳离子标志物。

[0047] 本发明采用ROC曲线验证分析每个显著性代谢物质,AUC为ROC曲线下的面积,是最常用的评价ROC曲线特征的参数,是重要的试验准确度指标。若AUC在0.7以下,则表示诊断的准确率较低;AUC在0.7以上,则可以满足临床诊断的要求。

[0048] 采用本发明的筛选方法,筛选得到了四个显著性差异代谢物质:腺嘌呤(即Adenine)阳离子、4-吡哆酸(4-Pyridoxic acid)阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷(S-Methyl-5'-thioadenosine)阳离子和花生五烯酸(Eicosapentaenoic acid)阳离子。

[0049] 本发明还提供了上述四种肝癌阳离子标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用,即提供了一种肝癌诊断试剂盒或诊断药物,包括上述特异性的肝癌阳离子标志物,具体包括以下诊断试剂盒或诊断药物:

[0050] 本发明提供了腺嘌呤阳离子作为标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用,即本发明提供了一种肝癌的诊断试剂盒或诊断药物,包括腺嘌呤阳离子;

[0051] 本发明提供了4-吡哆酸阳离子作为标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用,即本发明提供了一种肝癌的诊断试剂盒或诊断药物,包括4-吡哆酸阳离子;

[0052] 本发明提供了5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子作为标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用,即本发明提供了一种肝癌的诊断试剂盒或诊断药物,包括5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子;

[0053] 本发明提供了花生五烯酸阳离子作为标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用,即本发明提供了一种肝癌的诊断试剂盒或诊断药物,包括花生五烯酸阳离子;

[0054] 本发明还提供了4-吡哆酸阳离子和5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子的组合物作为标志物在制备肝癌诊断药物或诊断试剂盒中的应用,即本发明提供了一种肝癌的诊断试剂盒或诊断药物,包括4-吡哆酸阳离子和5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子的组合。

[0055] 通过对上述标志物进行检测,可以实现对肝癌的诊断。

[0056] 为了使本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,下面结合具体实施例对本发明作更加详细的说明。本发明实施例中用到的所有试剂和设备均为现有市售产品。

[0057] 实施例1 本发明所述肝癌阳离子标志物的筛选方法,包括以下具体步骤:

[0058] 第一步,称取30mg样本组织(包括40个肝癌样本和40个肝硬化样本),用4℃预冷的PBS溶液清洗两次,再向每个样本中分别加入200μL超纯水,用匀浆机匀浆,涡旋60s,加入800μL甲醇和乙腈混合液(V/V=1:1),涡旋60s,4℃低温超声破碎30min,重复超声两次,-20℃孵育60min使样本液中的蛋白质沉淀下来,用离心机在4℃、14000rcf下离心分离20min,

取上清液冷冻干燥得到代谢混合物,将代谢混合物于 -80°C 下冷冻冻存,备用;

[0059] 第二步,将第一步冷冻冻存的各样本的代谢混合物分别用 $200\mu\text{L}$ 乙腈:水(1:1,v/v)复溶,将复溶的代谢混合物用LC-MS/MS进行分离并采集质谱数据:超高效液相色谱仪(安捷伦1290 Infinity LC超高效液相色谱系统并联合HILIC色谱柱(Waters Acquity UPLC BEH Amide $1.7\mu\text{m}$, $2.1\times 100\text{mm}$))进行分离,分离后的样本用电喷雾电离(Electro-spray Ionization,ESI)正离子模式进行检测,采集质谱数据;

[0060] 其中,液相分离条件为:柱温为 25°C 、流速为 $0.3\text{mL}/\text{min}$ 、上样量为 $2\mu\text{L}$;流动相由两相组成:流动相A为含有 25mM 乙酸铵和 25mM 氨水的水溶液,流动相B为纯乙腈,洗脱程序为: $0\sim 0.5\text{min}$:95% 流动相B; $0.5\sim 7\text{min}$:95%~65%流动相B; $7\sim 8\text{min}$:65%~40%流动相B; $8\sim 9\text{min}$:40%流动相B; $9\sim 9.1\text{min}$:40%~95%流动相B; $9.1\sim 12\text{min}$:95%流动相B;

[0061] 检测样本在电喷雾电离(Electro-spray Ionization,ESI)正离子模式下进行检测,用质谱仪I(安捷伦6550质谱仪)进行检测分析,其ESI源设置参数为:干燥气体流速(Drying gas): $16\text{L}/\text{min}$,气体温度: 250°C ,鞘气(Sheath gas)温度: 400°C ,鞘气流速: $12\text{L}/\text{min}$,喷雾器(Nebulizer): 20psig ,Vcap升压电容正极: 3000V ,Nozzle喷嘴电压: 175V ,相对分子质量范围(Mass Range): $50\sim 1200\text{Da}$,数据采集速率(Acquisition rate): 4HZ ,每个循环的时间: 50ms ;

[0062] 用质谱仪II(AB Triple TOF 6600质谱仪)采集一级谱图和二级谱图,其ESI源设置参数:离子源气体1(Ion Source Gas1): 40 ,离子源气体2(Ion Source Gas2): 80 ,离子源温度(source temperature): 650°C ,Curtaingas(CUR)气帘气: 30 ,Ion Sapary Voltage Floating (ISVF)离子喷嘴电压 $+5000\text{V}$,正离子模式;二级质谱采用信息依赖性获取模式 information dependent acquisition(IDA)获得,并且采用高灵敏度模式进行采集,Declustering potential(DP)分布势能: $\pm 60\text{V}$,正离子模式,碰撞能量(Collision Energy): $35\pm 15\text{eV}$,IDA的参数设置如下:排除同位素相对分子质量范围(Exclude isotopes within): 4 道尔顿,每个周期要监测的候选离子数(Candidate ions to monitor per cycle): 10 ;采集数据的模式按照质核比范围进行分段, $50\sim 300\text{m}/\text{z}$, $290\sim 600\text{m}/\text{z}$, $590\sim 900\text{m}/\text{z}$, $890\sim 1200\text{m}/\text{z}$,以达到扩大二级谱图采集率的目的;

[0063] 第三步,将第二步得到的质谱数据经ProteoWizard转换成.mzXML格式,然后采用LC-MS光谱注释(XCMS)软件进行峰对齐、保留时间校正以及峰面积的提取,采用精确质量数匹配 $<25\text{ppm}$ 和二级谱图匹配的方式确定代谢混合物中的每种代谢物质;

[0064] 第四步,以变量权重值 >1 为筛选标准,用OPLS-DA对第三步确定的每种代谢物质进行初步筛选,初筛出肝癌样本与肝硬化样本之间的差异代谢物质,差异代谢物质的变量权重值 >1 ,且差异倍数 >2 或 <0.5 ;用单变量统计对初筛得到的差异代谢物质再次筛选,筛选出P值 <0.05 的显著性差异代谢物质即为肝癌阳离子标志物。

[0065] 将肝癌样本和肝硬化样本的质谱数据进行筛选分析,得到四个差异性代谢小分子:腺嘌呤(Adenine)阳离子、4-吡哆酸(4-Pyridoxic acid)阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷(S-Methyl-5'-thioadenosine)阳离子和花生五烯酸(Eicosapentaenoic acid)阳离子。研究发现,腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子可以单独作为标志物用于诊断肝癌,4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合也可作为标志物用于诊断肝癌,具体如下:

[0066] 1、腺嘌呤阳离子通过样品LC-MS/MS质谱分析方法检测到在肝癌组织与肝硬化组织中存在显著性差异,经对比,腺嘌呤阳离子在肝癌样本显著性上调了3.14倍,且其P值为 $0.015762193 < 0.05$ 。

[0067] 为评腺嘌呤阳离子的信号响应强度对肝癌的诊断效能,本发明采用了ROC曲线分析,AUC为ROC曲线下的面积,是最常用的评价ROC曲线特征的参数,是重要的试验准确度指标。若AUC在0.7以下,则表示诊断的准确率较低;AUC在0.7以上,则可以满足临床诊断的要求。同时采用灵敏度和特异性之和最大时的阈值标准作为判断肝癌与否的阈值标准,倍数大于2则认为大于阈值为肝癌检测阳性,倍数小于2则认定小于阈值为肝癌检测阳性,从而得到合适的约登指数。

[0068] 腺嘌呤阳离子的信号响应强度的ROC曲线如图1所示。ROC分析显示腺嘌呤阳离子的AUC为 $0.724 > 0.7$,说明具有较好的诊断效果,即腺嘌呤阳离子可以作为肝癌的诊断标志物。

[0069] 腺嘌呤阳离子的信号响应强度为132677.2493时,灵敏度为75%,特异度为72.5%。当进行个体检测时,信号响应强度大于132677.2493时,被判为肝癌患者,否则判断为肝硬化患者(假阳性率为27.5%)。

[0070] 肝癌组织和肝硬化组织中腺嘌呤阳离子信号响应强度比较结果见图2。由图2可以看出,其在肝癌组织中的平均信号响应强度为581803.9882,肝硬化组织中的平均信号响应强度185476.8323,并且肝癌组织样本主要分布在检测阈值(图2中实线)以上,肝硬化组织主要分布在检测阈值以下,说明肝癌组织和肝硬化组织的信号响应强度相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0071] 所以,腺嘌呤阳离子可以作为肝癌的诊断标志物,从而对肝癌进行预测,为肝癌的确诊提供了一种新的靶点,具有重要意义。

[0072] 2、4-吡哆酸阳离子通过样品LC-MS/MS质谱分析方法检测到在肝癌组织与肝硬化组织中存在显著性差异。经对比,4-吡哆酸阳离子在肝癌样本显著性下调了0.42倍,p值为 $5.596E-05 < 0.05$ 。

[0073] 为评价4-吡哆酸阳离子的信号响应强度对肝癌的诊断效能,本发明采用了ROC曲线分析,AUC为ROC曲线下的面积,是最常用的评价ROC曲线特征的参数,是重要的试验准确度指标。若AUC在0.7以下,则表示诊断的准确率较低;AUC在0.7以上,则可以满足临床诊断的要求。

[0074] 4-吡哆酸阳离子的信号响应强度的ROC曲线如图3所示。ROC分析显示4-吡哆酸阳离子的AUC为 $0.813 > 0.7$,说明具有较好的诊断效果,即4-吡哆酸阳离子可以作为肝癌的诊断标志物。

[0075] 4-吡哆酸阳离子的信号响应强度为22559.2525时,灵敏度为77.5%,特异度为75%。当进行个体检测时,信号响应强度小于22559.2525时,被判为肝癌患者,否则判断为肝硬化患者(假阳性率为25.0%)。

[0076] 肝癌组织和肝硬化组织中4-吡哆酸阳离子信号响应强度比较结果见图4。由图4可以看出,4-吡哆酸阳离子在肝癌组织中的平均信号响应强度为18884.52413,肝硬化组织中的平均信号响应强度45488.96373,并且肝癌组织样本主要分布在检测阈值(图4中实线)以下,肝硬化组织主要分布在检测阈值(图4中实线)以上,说明肝癌组织和肝硬化组织的信号

响应强度相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0077] 所以,4-吡哆酸阳离子可以作为肝癌的诊断标志物,从而对肝癌进行预测,为肝癌的确诊提供了一种新的靶点,具有重要意义。

[0078] 3、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子通过样品LC-MS/MS质谱分析方法检测到在肝癌组织与肝硬化组织中存在显著性差异。经对比,5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子在肝癌样本显著性上调了4.15倍,p值为 $0.006668328 < 0.5$ 。

[0079] 为评5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子的信号响应强度对肝癌的诊断效能,本发明采用了ROC曲线分析,AUC为ROC曲线下的面积,是最常用的评价ROC曲线特征的参数,是重要的试验准确度指标。若AUC在0.7以下,则表示诊断的准确率较低;AUC在0.7以上,则可以满足临床诊断的要求。

[0080] 5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子信号响应强度的ROC曲线如图5所示。ROC分析显示5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子的AUC为 $0.763 > 0.7$,说明具有较好的诊断效果,即5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子可以作为肝癌的诊断标志物。

[0081] 5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子信号响应强度为966540.6208时,灵敏度为72.5%,特异度为75%。当进行个体检测时,信号响应强度大于966540.6208时,被判为肝癌患者,否则判断为肝硬化患者(假阳性率为25.0%)。

[0082] 肝癌组织和肝硬化组织中5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子信号响应强度比较结果见图6。由图6可以看出,其在肝癌中的平均信号响应强度为5459116.591,在肝硬化组织中的平均信号响应强度1316786.573,肝癌组织样本主要分布在检测阈值(图6中实线)以上,肝硬化组织主要分布在检测阈值(图6中实线)以下,说明肝癌组织和肝硬化组织的信号响应强度相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0083] 所以,5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子可以作为肝癌的诊断标志物,从而对肝癌进行预测,为肝癌的确诊提供了一种新的靶点,具有重要意义。

[0084] 4、花生五烯酸阳离子通过样品LC-MS/MS质谱分析方法检测到在肝癌组织与肝硬化组织中存在显著性差异。经对比,花生五烯酸阳离子在肝癌样本显著性下调了0.49倍,p值为 $4.34492E-06 < 0.05$ 。

[0085] 为评价花生五烯酸阳离子的信号响应强度对肝癌的诊断效能,本发明采用了ROC曲线分析,AUC为ROC曲线下的面积,是最常用的评价ROC曲线特征的参数,是重要的试验准确度指标。若AUC在0.7以下,则表示诊断的准确率较低;AUC在0.7以上,则可以满足临床诊断的要求。

[0086] 花生五烯酸阳离子信号响应强度的POC曲线如图7所示。ROC分析显示花生五烯酸阳离子的AUC为 $0.823 > 0.7$,说明具有较好的诊断效果,即花生五烯酸阳离子可以作为肝癌的诊断标志物。

[0087] 花生五烯酸阳离子信号响应强度为44840.5126时,灵敏度为80%,特异度为72.5%。当进行个体检测时,信号响应强度小于44840.5126时,被判为肝癌患者,否则判断为肝硬化患者(假阳性率为27.5%)。

[0088] 肝癌组织和肝硬化组织中花生五烯酸阳离子信号响应强度比较结果见图8。由图8可以看出,其在肝癌中的平均信号响应强度为36792.39166,在肝硬化组织中的平均信号响应强度75748.23231;并且肝癌组织样本主要分布在检测阈值(图8中实线)以下,肝硬化组

织主要分布在检测阈值(图8中实线)以上,说明肝癌组织和肝硬化组织的信号响应强度相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0089] 所以,花生五烯酸阳离子可以作为肝癌的诊断标志物,从而对肝癌进行预测,为肝癌的确诊提供了一种新的靶点,具有重要意义。

[0090] 5、腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合在肝癌组织与肝硬化组织中存在显著差异。

[0091] 本发明采用二元逻辑回归分析计算P(肝癌概率),SPSS软件二元逻辑回归后得到的公式为: $P=1/(1+e^{-(2.363163-0.000007a-0.000051b+0.000001c-0.000025d)})$

[0092] 其中,P为肝癌概率,a为腺嘌呤阳离子信号响应强度,b为4-吡哆酸阳离子的信号响应强度,c为5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子信号响应强度,d为花生五烯酸阳离子信号响应强度。若检测 $P>0.4082$ 则判断为肝癌患者,否则判断为肝硬化患者。

[0093] 为评价腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合对肝癌的诊断效能,本发明采用了ROC曲线分析,AUC为ROC曲线下的面积,是最常用的评价ROC曲线特征的参数,是重要的试验准确度指标。若AUC在0.7以下,则表示诊断的准确率较低;AUC在0.7以上,则可以满足临床诊断的要求。

[0094] 腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合的ROC曲线如图9所示。ROC分析显示,组合诊断的AUC为0.888 >0.7 ,说明具有较好的诊断效果,即腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合可以作为肝癌的诊断标志物。

[0095] 在cut off值为0.6138时,灵敏度为70.0%,特异度为82.5%。当进行个体检测时, $P>0.6138$ 时,被判为肝癌患者,否则被判为肝硬化患者(假阳性率为17.5%)。

[0096] 肝癌组织和肝硬化组织中P(肝癌概率)比较结果见图10。由图10可以看出,肝癌中的平均P值为0.719667914,肝硬化组织的平均P值为0.260056279;且肝癌组织样本主要分布在检测阈值(图10中实线)以上,肝硬化组织主要分布在检测阈值(图10中实线)以下,说明肝癌组织和肝硬化组织的信号响应强度相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0097] 所以,腺嘌呤阳离子、4-吡哆酸阳离子、5-脱氧-5-甲硫腺苷阳离子和花生五烯酸阳离子的组合可以作为肝癌的诊断标志物,从而对肝癌进行预测,为肝癌的确诊提供了一种新的靶点,具有重要意义。

[0098] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

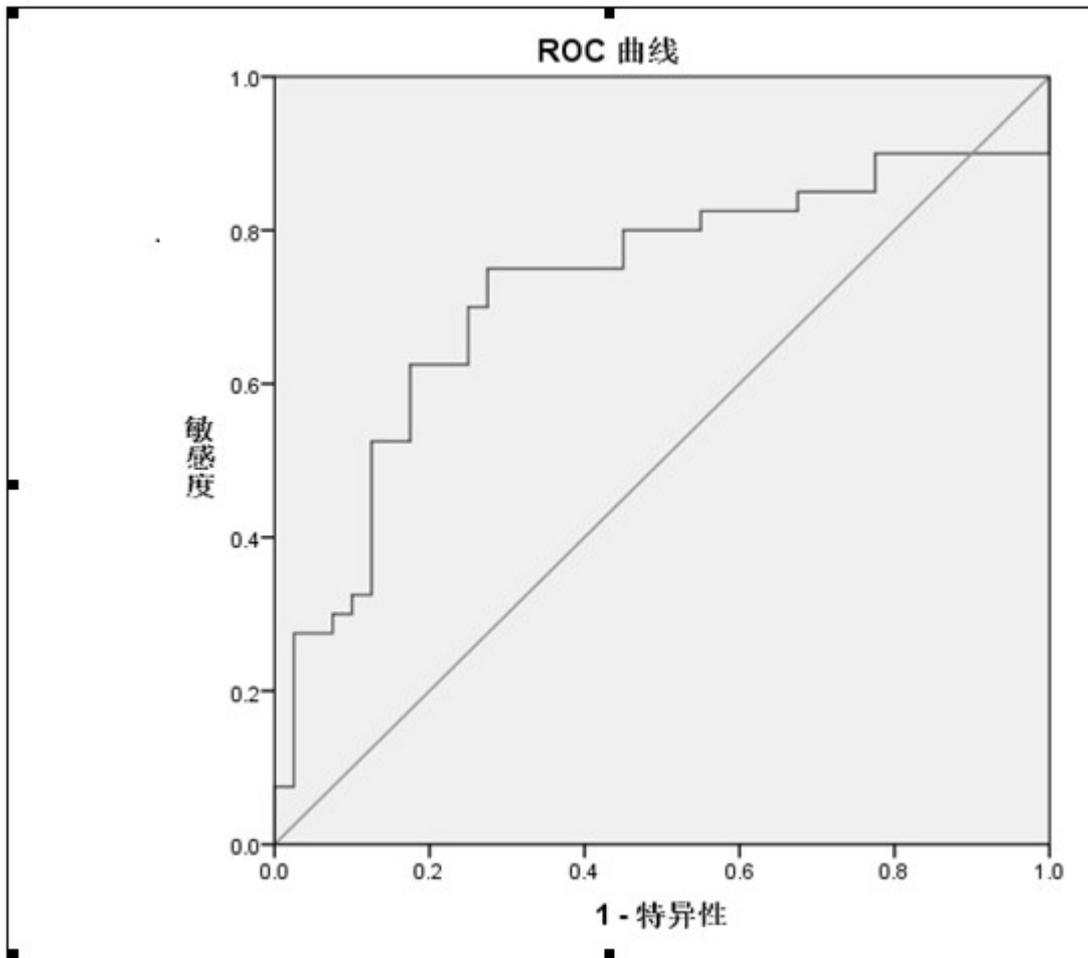


图1

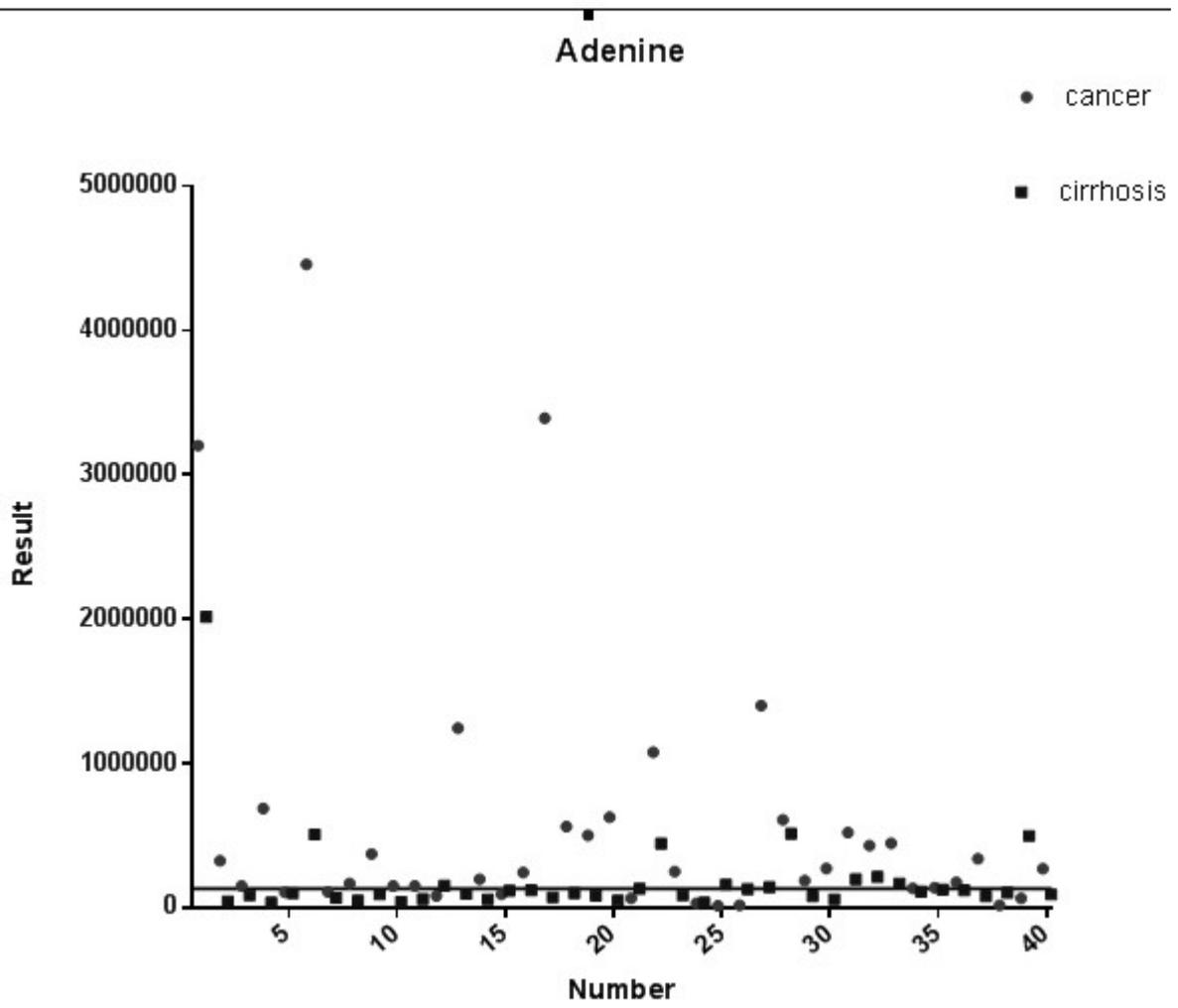


图2

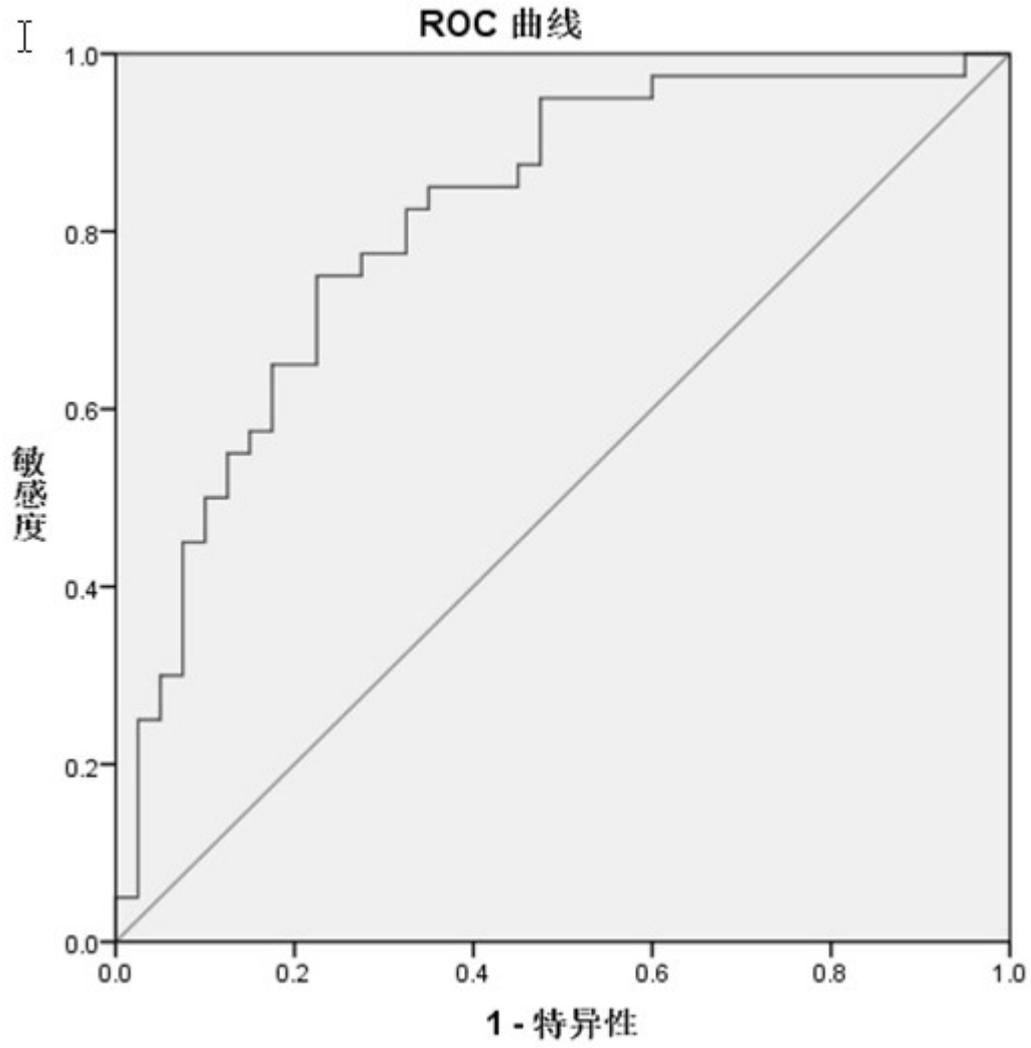


图3

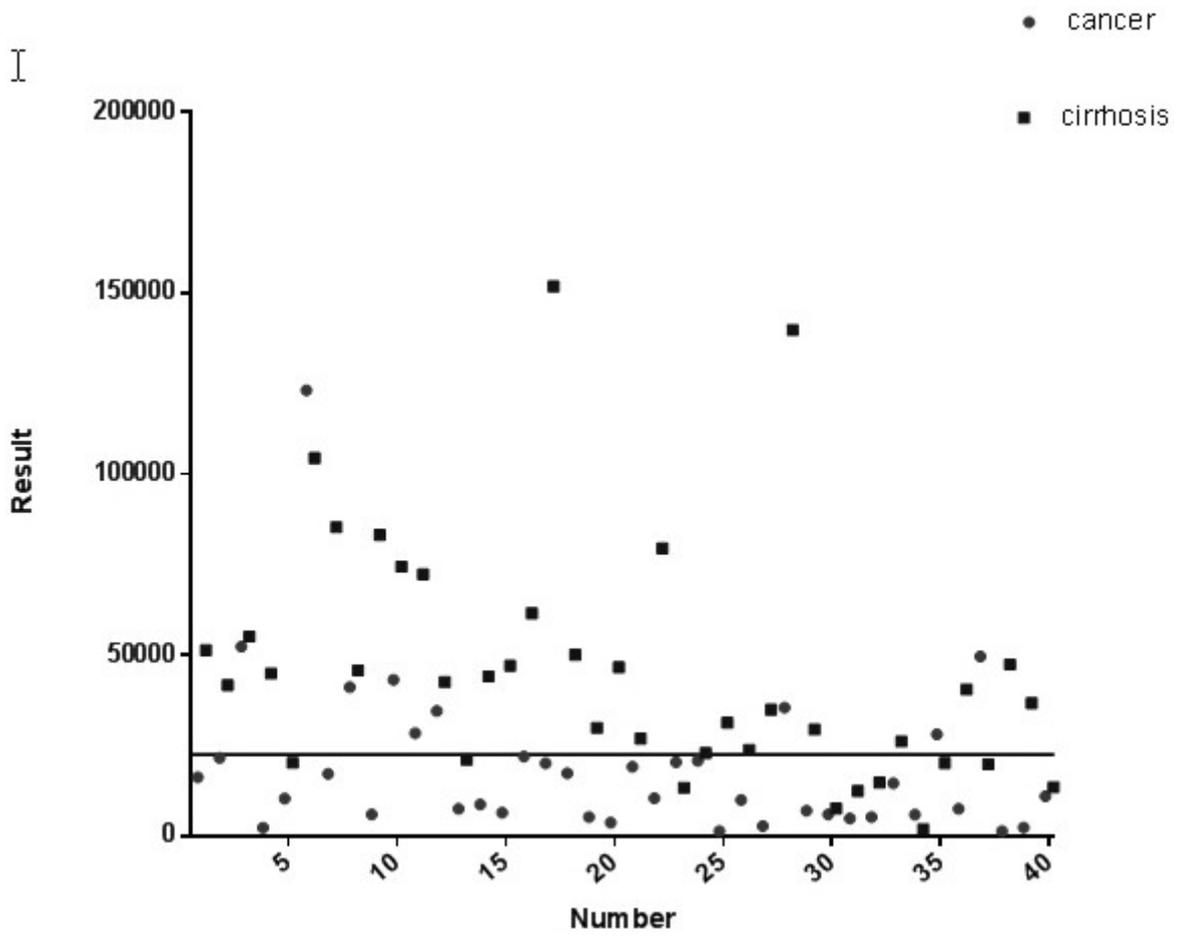


图4

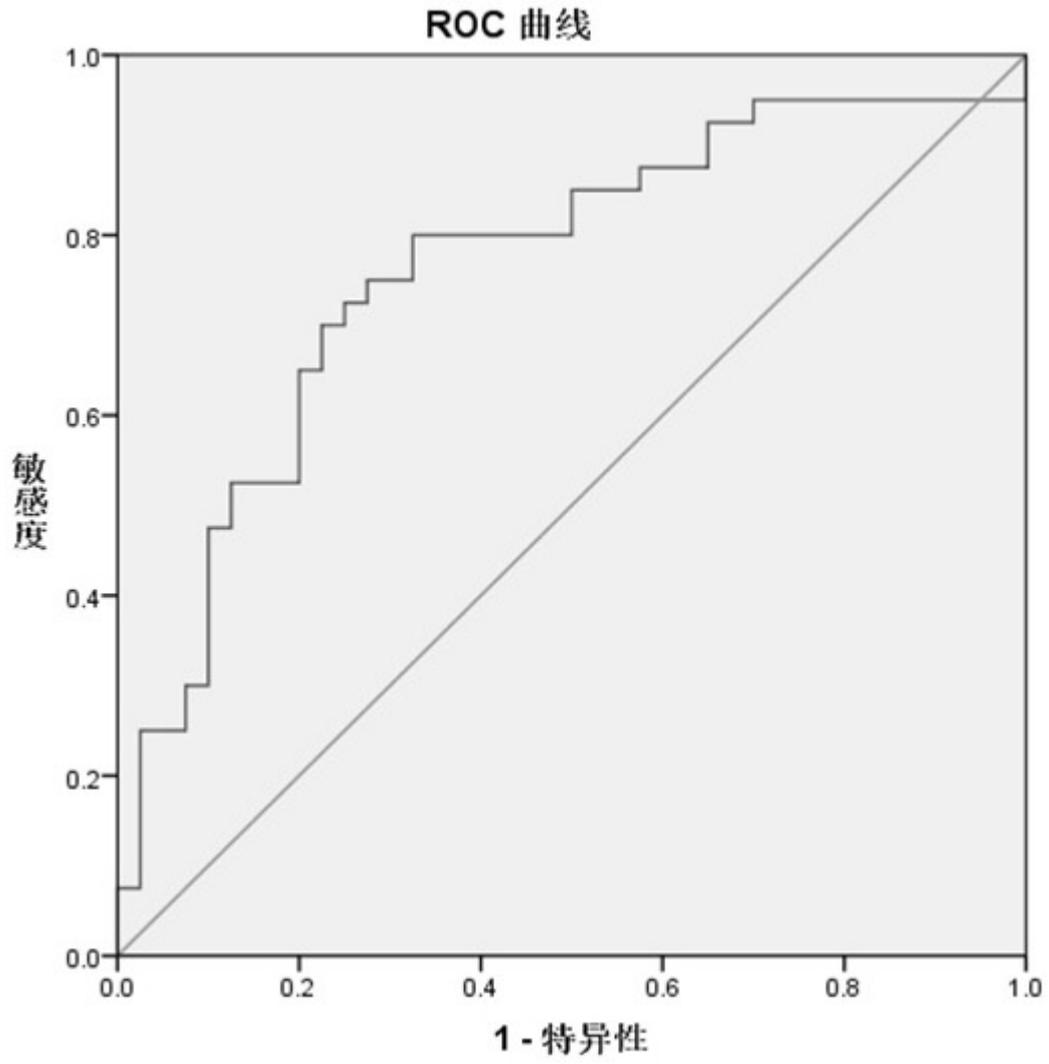


图5

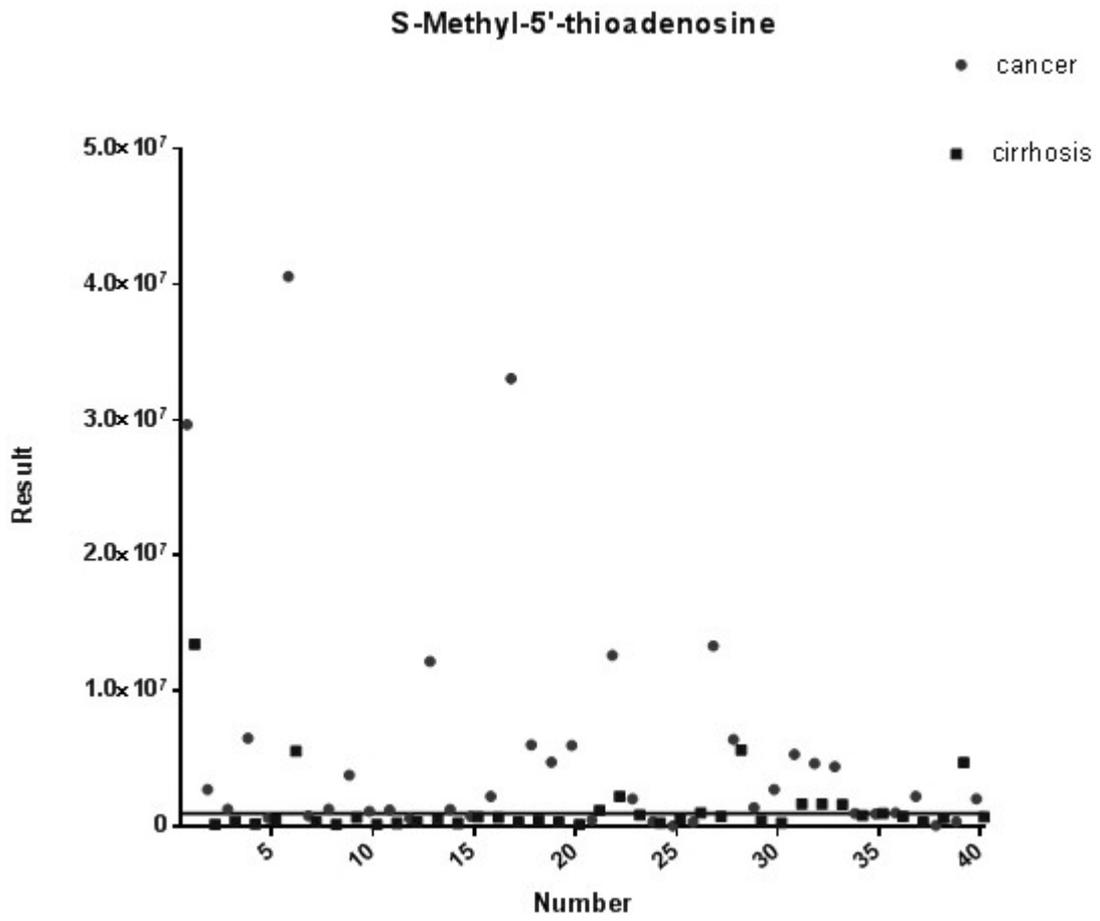


图6

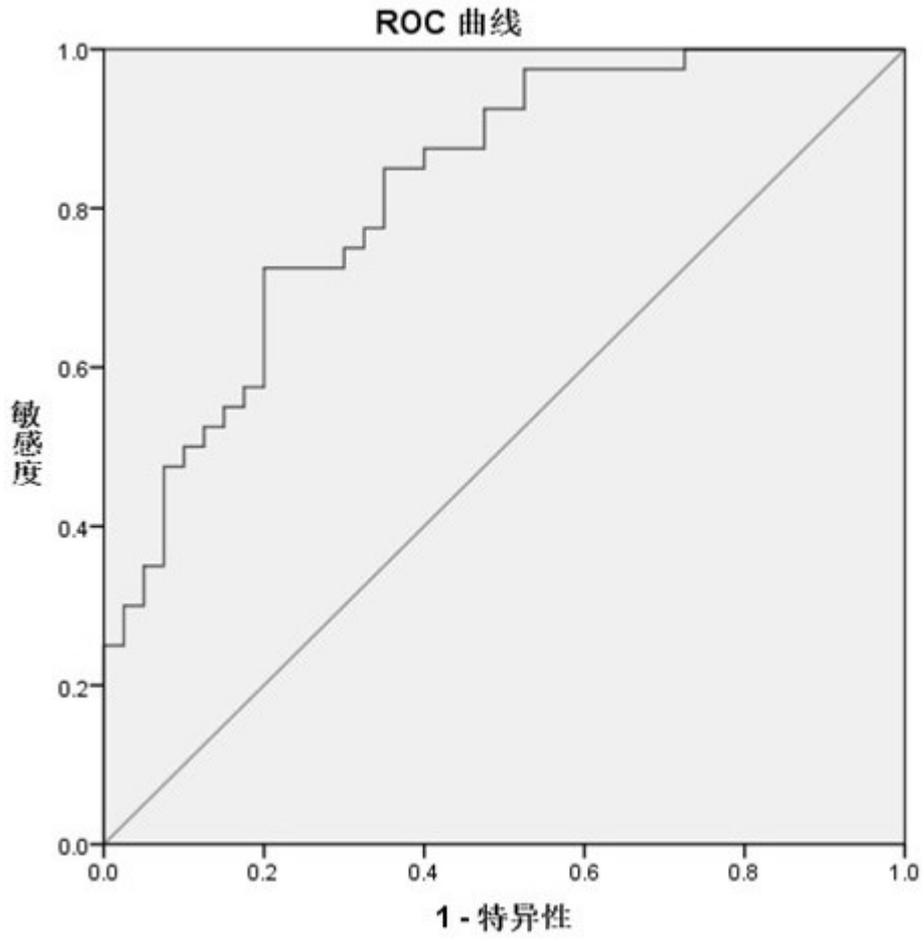


图7

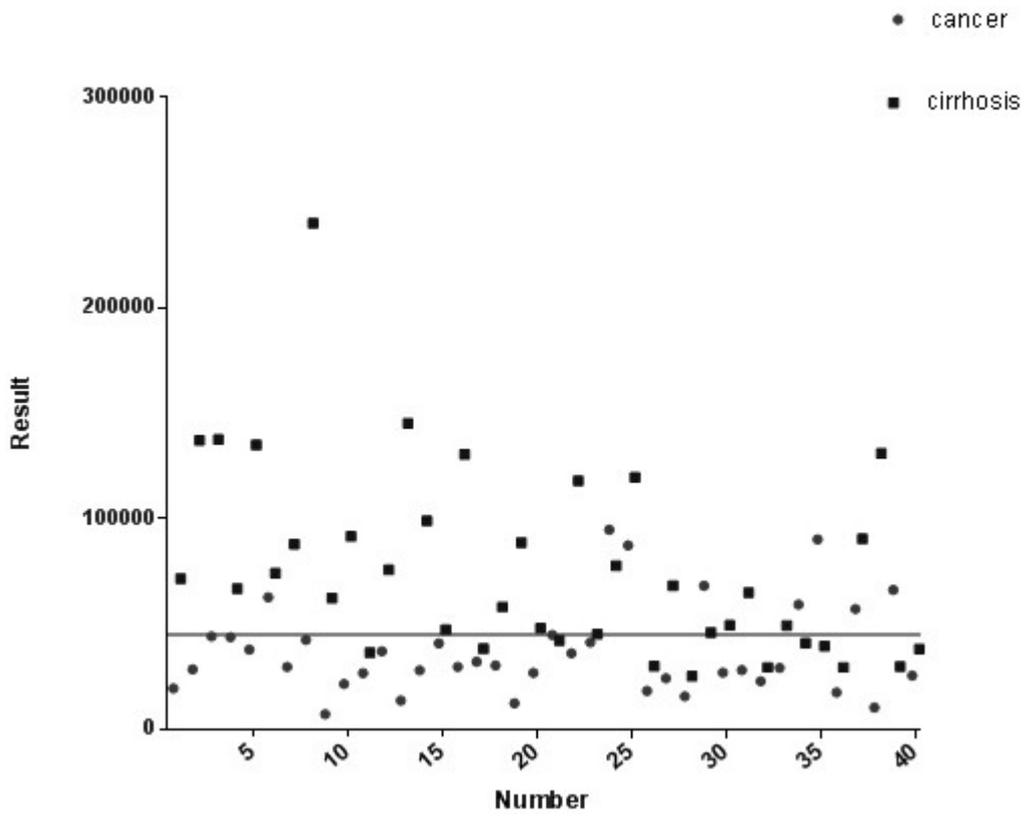


图8

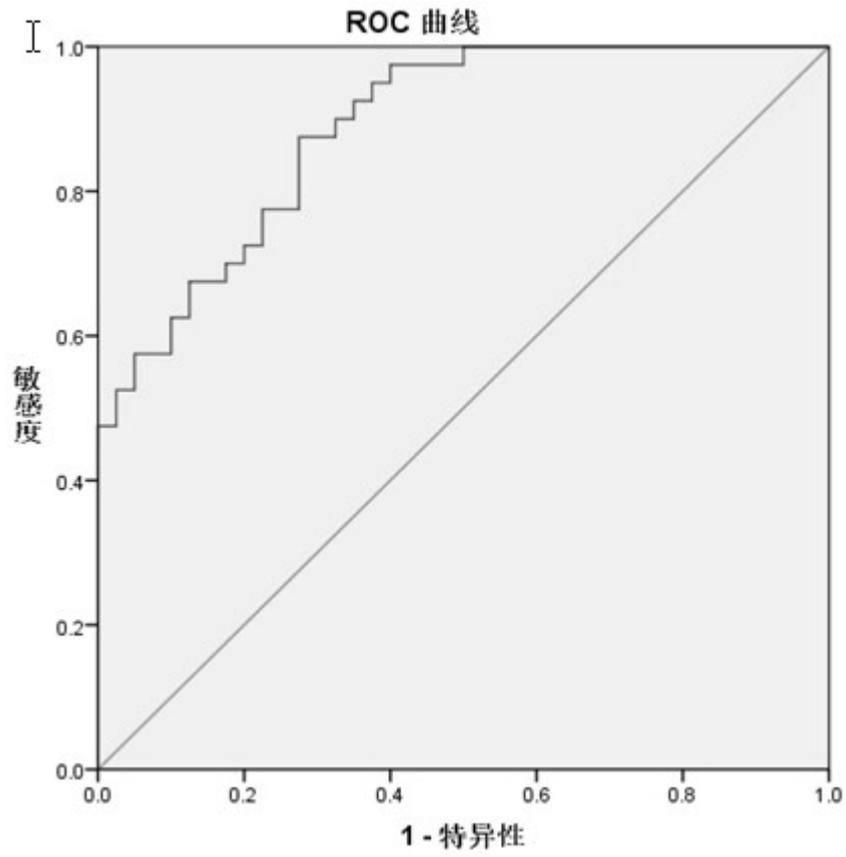


图9

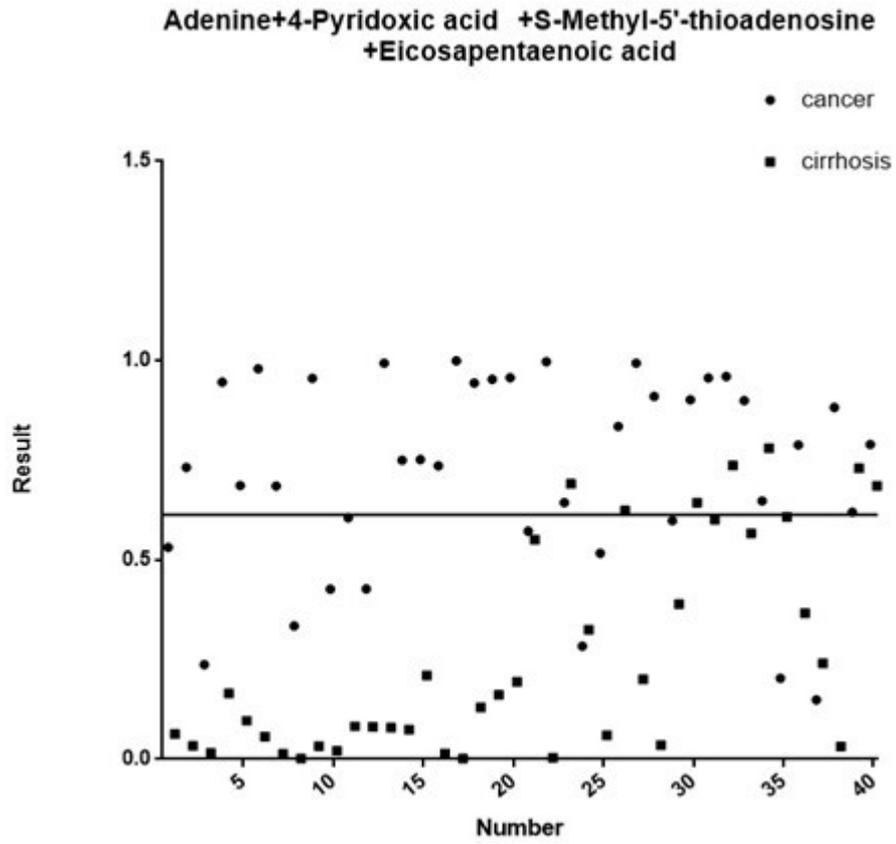


图10