



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109557311 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 15

(21) 申请号 201811524741.4

审查员 石维平

(22) 申请日 2018.12.13

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109557311 A

(43) 申请公布日 2019.04.02

(73) 专利权人 中南大学湘雅医院

地址 410008 湖南省长沙市湘雅路87号中
南大学湘雅医院

(72) 发明人 陈永恒 周敏泽 李茂玉 陈主初

(74) 专利代理机构 北京旭路知识产权代理有限公司

11567

代理人 董媛 姚自奇

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

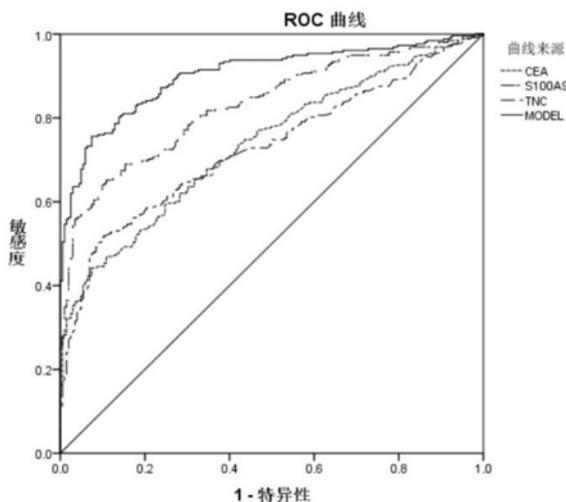
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

结直肠癌诊断标志物及结直肠癌的检测产品及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种结直肠癌诊断标志物及结直肠癌的检测产品及其应用。该结直肠癌诊断标志物,包括多种分泌蛋白,多种所述分泌蛋白包括S100A9蛋白和tenascin-c蛋白中的一种或两种,以及CEA蛋白。具有灵敏度高、特异性强的特点,诊断模型的roc曲线下面积为0.902,诊断结果可信度远远高于采用单独的蛋白标记物,对于结直肠癌诊断和治疗具有重大意义。该结直肠癌的检测产品,包括上述所述的结直肠癌诊断标志物。本发明还提出结直肠癌诊断标志物在制备用于辅助诊断结直肠癌的产品中的应用。



1. 一种结直肠癌的检测产品,其特征在于,包括结直肠诊断标志物,所述结直肠诊断标志物包括S100A9蛋白、tenascin-c蛋白和CEA蛋白;还包括计算机可读载体,所述计算机可读载体中记载有程序,当所述计算机可读载体被处理器执行时,实现以下步骤:

判读待测者外周血血浆中CEA蛋白的浓度、S100A9蛋白的浓度及tenascin-c蛋白的浓度;

将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.62;

和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.71;

和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.67;

其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL。

2. 根据权利要求1所述的结直肠癌的检测产品,其特征在于,所述检测产品为诊断试剂盒。

3. 用于检测tenascin-c蛋白的产品和用于检测S100A9蛋白的产品、以及用于检测CEA蛋白的产品和计算机可读载体在制备辅助诊断结直肠癌的产品中的应用,其中,所述计算机可读载体中记载有程序,当所述计算机可读载体被处理器执行时,实现以下步骤:

判读待测者外周血血浆中CEA蛋白的浓度、S100A9蛋白的浓度及tenascin-c蛋白的浓度;

将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.62;

和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.71;

和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.67;其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL。

结直肠癌诊断标志物及结直肠癌的检测产品及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,尤其涉及一种结直肠癌诊断标志物及结直肠癌的检测产品及其应用。

背景技术

[0002] 结直肠癌是全世界最常见的消化道恶性肿瘤之一,近20年来结肠癌的发病率及死亡率在世界上大多数国家都呈上升趋势,大多数的结肠癌患者发现已是晚期,预后较差。目前对于结肠癌的筛查和诊断的方法都是侵袭性的,结肠镜仍是其筛查诊断的金标准。近年来,粪便潜血试验是结直肠癌筛查中使用最普遍的非侵入性检查方法,但是,其灵敏度和特异度较低。如果简单的血清检测能够应用于它的早期诊断,将有助于结肠癌的预防和预后。当前临床应用广泛的结肠肿瘤标志物大大提高了结肠癌的诊断,降低死亡率和复发率,但它们的灵敏度和特异性不高。因此,它们作为结肠癌早期诊断的标志物的作用是很有限制的。在此基础上,我们希望能探索和开发更多与结肠癌相关的肿瘤标志物。

[0003] 溃疡性结肠炎和炎性肠息肉常被视为结直肠癌发病的高危因素之一,利用肠镜检测和复查是侵入性检查,病人在检测疾病进展的过程中非常不方便。因此,需要一种检测方法,可以无创追踪疾病的进展,早期发现和诊断结直肠癌,指导结直肠癌患者的治疗。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种结直肠癌诊断标志物及结直肠癌的检测产品及其应用。

[0005] 本发明提出一种结直肠癌诊断标志物,包括S100A9蛋白和tenascin-c蛋白(缩写为TNC蛋白)中的一种或两种,以及CEA蛋白。

[0006] 此外本发明还提出了结直肠诊断标志物在制备检测结直肠癌的检测产品中的应用。

[0007] 此外,本发明还提出一种结直肠癌的检测产品,包括上述所述的结直肠诊断标志物。

[0008] 优选地,所述检测产品为诊断试剂盒。

[0009] 优选地,所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个非结直肠癌患者的血清,和/或所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和一个健康个体的血清,和/或所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个溃疡性结肠炎患者的血清。

[0010] 优选地,所述检测产品还包括用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个非结直肠癌患者的血清的第一回归模型,所述第一回归模型建立P的判别函数式为 $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$,其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL;其中,P值临界值为0.62;

[0011] 和/或,所述检测产品还包括用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个健康个体的血清的第二回归模型,所述第二回归模型建立P的判别函数式为 $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$,其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL;其中,P值临界值为0.71;

[0012] 和/或,所述检测产品还包括用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个溃疡性结肠炎患者的血清的第三回归模型,所述第三回归模型建立P的判别函数式为 $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$,其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL;其中,P值临界值为0.67。

[0013] 进一步地,还包括计算机可读载体,所述计算机可读载体中记载有程序,当所述计算机可读载体被处理器执行时,实现以下步骤:

[0014] 判读待测者外周血血浆中CEA蛋白的浓度、S100A9蛋白的浓度及tenascin-c蛋白的浓度;

[0015] 将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.62;

[0016] 和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.71;

[0017] 和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.67;其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL。

[0018] 本发明还包括用于检测S100A9蛋白的产品和/或用于检测tenascin-c蛋白的产品在制备用于辅助诊断结直肠癌的产品中的应用。

[0019] 进一步地,本发明还包括用于检测tenascin-c蛋白的产品和/或用于检测S100A9蛋白的产品中的一种或两种、以及用于检测CEA蛋白的产品和计算机可读载体在制备辅助诊断结直肠癌的产品中的应用,其中,所述计算机可读载体中记载有程序,当所述计算机可读载体被处理器执行时,实现以下步骤:

[0020] 判读待测者外周血血浆中CEA蛋白的浓度、S100A9蛋白的浓度及tenascin-c蛋白的浓度;

[0021] 将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.62;

[0022] 和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.71;

[0023] 和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的

浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.67;

[0024] 其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL。

[0025] 本发明与现有技术对比的有益效果包括:本发明提出的结直肠癌诊断标志物在诊断结直肠癌中,具有灵敏度高、特异性强的特点,诊断模型的roc曲线下面积(area under the curve,AUC)为0.902,诊断结果可信度远远高于采用单独的蛋白标记物,对于结直肠癌诊断和治疗具有重大意义。包括结直肠癌诊断标志物的结直肠癌的检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个非结直肠癌患者的血清,和/或所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和一个健康个体的血清,和/或所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个溃疡性结肠炎患者的血清。

附图说明

[0026] 通过参考附图会更加清楚的理解本发明的特征和优点,附图是示意性的而不应理解为对本发明进行任何限制,在附图中:

[0027] 图1为三种蛋白单独和组合诊断结直肠癌的ROC曲线图。

具体实施方式

[0028] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图对本发明的具体实施方式做详细的说明。以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置两孔重复实验,结果取平均值。

[0029] 结直肠癌诊断的金标准为病理检测结果。

[0030] 实施例

[0031] 外周血血清样本采集方法:清晨空腹时采集10mL外周血静脉标本,室温静置两小时,在4℃下速度为1000g离心15min,分离上层血浆,并于-80℃保存备用。

[0032] 检测Tenascin-c的Elisa试剂盒的编号为CSB-E13125h;

[0033] 检测S100A9的Elisa试剂盒的编号为CSB-E11834h;

[0034] 检测CEA的Elisa试剂盒的编号为CSB-E04767h。

[0035] 研究对象

[0036] 收集中南大学湘雅医院2017年-2018年3月已通过病理检测被确诊为结直肠癌患者的患者的外周血258例。其中,男性148例,女性110例。知情同意协议和研究程序获得伦理委员会的批准,并且同意参与这项研究的所有患者及健康志愿者均签署知情同意书。

[0037] 确定蛋白标记物

[0038] 本实施例中,前期进行了结肠癌的蛋白质组学研究,通过激光捕获显微切割(LCM),iTRAQ标记和二维液相色谱-串联质谱(2D LC-MS/MS)的组合研究结直肠癌不同阶段的基质蛋白质组,共筛选得到222个差异表达蛋白。经过分析及免疫组化验证,确认了S100A9以及tenascin-c为表达差异较大的分泌蛋白,可作为备选的结肠癌的临床肿瘤标记

物。

[0039] S100A9(中文名称钙结合蛋白S100A9,英文名称protein S100-A9,gi|4506773);

[0040] Tenascin-c(中文名称肌腱蛋白Tenascin-c,英文名称protein Tenascin-c,gi|1842130,简称TNC);

[0041] 将此两种标志物与临床常用肿瘤标志物CEA联合检测。

[0042] ELISA检测验证

[0043] 取上述结直肠癌病人外周血浆258例,健康人血浆103例,良性结直肠疾病患者血浆99例,按照试剂盒说明书进行检测,使用EDTA或肝素作为抗凝血剂收集血浆。收集血浆后的30分钟内以 $1000 \times g$, $2-8^{\circ}\text{C}$ 离心15分钟,立即测定,得到460个标本的三种蛋白的浓度。(具体方法试剂盒说明书有说明)

[0044] 临界值确定

[0045] 使用spss软件进行逻辑回归分析,将结肠癌患者命名为“1”,将对照组(健康人或/和良性结肠炎患者)命名为“0”,相应输入S100A9,TNC,CEA的浓度,在spss中,将疾病类型设为“因变量”,将三者的浓度设置为“自变量”,通过逻辑分析得出三个关于P值的公式。分析得出P值(P值为逻辑分析得出的一个值,每个病例的CEA,S100A9,TNC的浓度值不同,p值也不同,可视为根据我们的模型算出的一个“检测值”)后,进行ROC曲线制作,得到最大诊断效率时的临界值,该临界值为一个具体的P值,高于此值视为“阳性”,低于此值视为“阴性”,分别分析癌症标本与炎症(良性结直肠病患者,也可以是溃疡性结肠炎患者)标本的P值临界值,癌症标本与健康人标本的P值临界值,癌症标本与非癌症标本的P值临界值。大于等于cutoff值即为患病(即阳性),低于即为阴性结果。需要说明的是,非癌症包括健康人和炎症。三个关于P值的公式如下:

[0046] 区分健康人与癌症患者的关于P值的公式为:

[0047] $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$ (cutoff: $p \geq 0.71$);大于等于0.71即为癌症患者,小于0.71为健康人;

[0048] 区分炎症患者与癌症患者的关于P值的公式为:

[0049] $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$ (cutoff: $p \geq 0.67$);大于等于0.67即为癌症患者,小于0.67为炎症患者;

[0050] 区分癌症患者与非癌的关于P值的公式为:

[0051] $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$ (cutoff: $p \geq 0.62$);大于等于0.62即为癌症患者,小于0.62为非癌。

[0052] 表1为三种蛋白单独和组合诊断结直肠癌的特异度和敏感度

[0053]

	CEA	S100A9	TNC	诊断模型
结肠癌患者VS健康人	3.23	18.74	3.87	-
约登指数	0.35	0.56	0.5	0.69
灵敏度(%)	44.2	64.7	57	78.3
特异度(%)	90.3	91.3	93.2	90.3
结肠癌患者vs良性结直肠病患者	3.36	17.06	2.43	-
约登指数	0.39	0.56	0.5	0.68
灵敏度(%)	44.2	68.2	70.9	81.8

特异度(%)	94.9	87.9	79.8	85.9
--------	------	------	------	------

[0054] 表2为三种蛋白单独和组合诊断结直肠癌的ROC曲线下面积

Variable	AUC	SEa	95%CIb
CEA	0.736	0.0227	0.693 to 0.776
S100A9	0.831	0.0186	0.793 to 0.864
TNC	0.728	0.0232	0.685 to 0.769
model	0.902	0.0142	0.872 to 0.928

[0056] 从表1可以得知,三种蛋白组合建立的诊断模型的灵敏度为81.9%,特异度为85.9%。要优于三种蛋白单独检测的灵敏度。灵敏度和特异度在临床上很难兼顾,在提升灵敏度的同时,特异度势必会有所减低,约登指数可作为衡量诊断效率的综合标准,从表1可以看出三种蛋白组合建立的诊断模型的约登指数最高。从图1和表2可以得知,三种蛋白组合建立的诊断模型的AUC值为0.902,明显高于三种蛋白单独检测的AUC值,诊断结果可信度远远高于采用单独的蛋白标记物,对于结直肠癌诊断和治疗具有重大意义。

[0057] 因此,本实施例提出一种结直肠癌诊断标志物,包括S100A9蛋白和tenascin-c蛋白中的一种或两种,以及CEA蛋白。

[0058] 此外,还提出一种结直肠癌的检测产品,包括上述所述的结直肠癌诊断标志物。

[0059] 优选地,所述检测产品为诊断试剂盒。

[0060] 优选地,所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个非结直肠癌患者的血清,和/或所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和一个健康个体的血清,和/或所述检测产品用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个溃疡性结肠炎患者的血清。

[0061] 所述检测产品还包括用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个非结直肠癌患者的血清的第一回归模型,所述第一回归模型建立P的判别函数式为 $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$,其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL;其中,P值临界值为0.62;

[0062] 和/或,所述检测产品还包括用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个健康个体的血清的第二回归模型,所述第二回归模型建立P的判别函数式为 $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$,其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL;其中,P值临界值为0.71;

[0063] 和/或,所述检测产品还包括用于区分至少一个结直肠癌患者的血清和至少一个溃疡性结肠炎患者的血清的第三回归模型,所述第三回归模型建立P的判别函数式为 $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$,其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL;其中,P值临界值为0.67。该检测产品可以通过三种模型中的一种或多种进行判别,得到一种判别结果或多种判别结果。

[0064] 本实施例还包括结直肠癌诊断标志物在制备检测结直肠癌的检测产品中的应用。

[0065] 此外,本实施例还提出用于检测S100A9蛋白的产品和/或用于检测tenascin-c蛋

白的产品在制备用于辅助诊断结直肠癌的产品中的应用。

[0066] 最后,本实施例还提出用于检测tenascin-c蛋白的产品和/或用于检测S100A9蛋白的产品中的一种或两种、以及用于检测CEA蛋白的产品和计算机可读载体在制备辅助诊断结直肠癌的产品中的应用,其中,所述计算机可读载体中记载有程序,当所述计算机可读载体被处理器执行时,实现以下步骤:

[0067] 判读待测者外周血血浆中CEA蛋白的浓度、S100A9蛋白的浓度及tenascin-c蛋白的浓度;

[0068] 将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-4.3762+0.3*X+0.16*Y+0.46*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.62;

[0069] 和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.7801+0.22*X+0.17*Y+0.5*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.71;

[0070] 和/或,将所述CEA蛋白的浓度、所述S100A9蛋白的浓度及所述tenascin-c蛋白的浓度导入判别函数式 $P=1/\{1+\exp[-(-3.61+0.42*X+0.15*Y+0.42*Z)]\}$,其中,P值临界值为0.67;其中,X为CEA蛋白的浓度,单位为ng/mL;Y为S100A9蛋白的浓度,单位为ng/mL;Z为tenascin-c蛋白的浓度,单位为ng/mL。可以将三种蛋白的浓度导入通过三种判别函数式中的一种或多种进行判别,得到一种判别结果或多种判别结果。

[0071] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0072] 虽然结合附图描述了本发明的实施方式,但是本领域技术人员可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下做出各种修改和变型,这样的修改和变型均落入由所附权利要求所限定的范围之内。

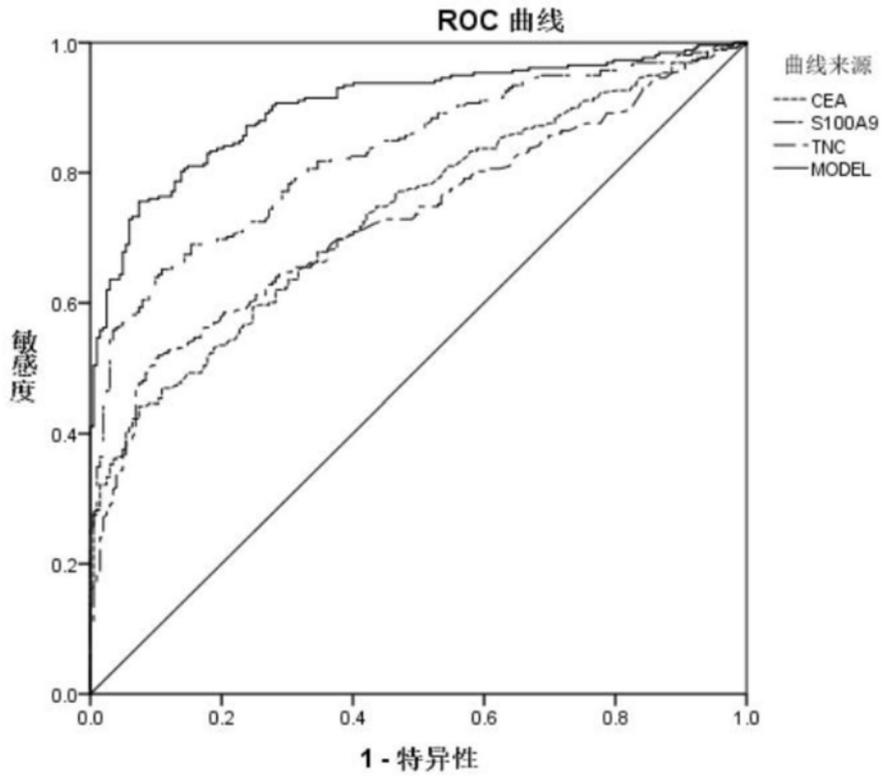


图1