



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115792220 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 14

(21) 申请号 202211589865.7

(22) 申请日 2022.12.12

(71) 申请人 武汉大学中南医院

地址 430071 湖北省武汉市武昌区东湖路
169号

(72) 发明人 李翔 陈同宇 章剑剑 魏巍
孙蔚宇

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231
专利代理师 徐绍新

(51) Int.Cl.
G01N 33/558 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

血管生成素受体Tie-2用作烟雾病诊断生物
标志物的应用

(57) 摘要

本发明公开了血管生成素受体Tie-2作为烟雾病诊断生物标志物的应用,检测人外周血中可溶性Tie-2蛋白水平可以诊断烟雾病和脑动脉粥样硬化闭塞患者以及预测烟雾病患者的术后血运重建效果。本发明为烟雾病的临床诊断以及预测患者预后提供了新的手段,具有重要的临床价值和推广应用前景。



1. 血管生成素受体Tie-2用作烟雾病诊断生物标志物的应用。
2. 用于检测血管生成素受体Tie-2的试剂在制备烟雾病诊断器械中的应用。
3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于:所述试剂是抗血管生成素受体Tie-2的抗体,所述器械是试剂盒。
4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于:所述试剂盒包括ELISA试剂盒。
5. 如权利要求2所述的应用,其特征在于:所述试剂是探针,所述器械是基因芯片。
6. 如权利要求2-5任一项所述的应用,其特征在于:利用所述器械对人体外周血中可溶性的血管生成素受体Tie-2表达量进行检测,并根据检测结果诊断烟雾病。
7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于:根据ROC曲线的截断值诊断烟雾病,所述截断值为2730pg/ml。

血管生成素受体Tie-2用作烟雾病诊断生物标志物的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学领域,涉及烟雾病的诊断,具体来说,本发明涉及血管生成素受体Tie-2用作烟雾病诊断生物标志物的应用。

背景技术

[0002] 烟雾病(Moyamoya disease)是一种罕见的脑血管疾病,其特点是颈内动脉(ICA)及其在Willis环内的近端分支逐渐狭窄或闭塞,导致颅底异常血管网形成。根据流行病学研究,在我国,烟雾病发病率以河南、安徽、湖北省为高(标准化发病率>1-5/100,000居民/年)。目前,脑血管造影(DSA)结果是诊断烟雾病的金标准。然而,在诊断烟雾病之前,必须排除颅内动脉硬化的脑血管病,成人烟雾病早期阶段,烟雾状血管发育不全,可能观察不到典型的血管造影特征,因此成年人烟雾病与颅内动脉硬化性疾病的鉴别诊断并不直接,需要寻找新的无创的手段来帮助疾病的鉴别诊断。

[0003] 简而言之,烟雾病有两大类临床表现,一类是由脑缺血引起的,包括短暂性脑缺血发作(TIA)、脑梗塞、可逆性缺血性神经功能缺损(RIND)和癫痫发作;另一类是由于应对缺血的代偿机制造成的有害后果,包括脆弱的侧支血管和微动脉瘤的破裂出血以及经硬膜血管扩张的头痛。如果不及时加以治疗,这些症状将导致患者的高致残率和死亡率。不幸的是,该病对任何药物治疗都没有反应。通过直接或间接搭桥技术进行外科血管重建是首选的治疗方法。手术的远期效果高度依赖于患者自身的血管新生能力,因此如何在手术前能判断出病人的血管重建能力对烟雾病治疗具有重大意义。

[0004] Tie-2是受体酪氨酸激酶家族中的一员,表达于血管内皮细胞,是血管生成素(Angiopoietin,Ang)的受体^[1-3]。Ang-Tie-2信号通路参与血管发育成熟、血管微环境的平衡稳定和血管新生等^[4]。Ang-1与Tie-2受体结合,使其磷酸化,起激活作用;Ang-2可与Ang-1竞争性结合Tie-2受体,抑制Tie-2的磷酸化,使其失活^[4]。近年来,有研究表明sTie-2的含量是肿瘤良恶性的标记,是肿瘤预后和治疗效果的评价指标^[5-7];也有研究表明外周血sTie-2的含量同样也可以预测急性冠脉综合征以及充血性心力衰竭患者的预后^[8-9]。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种新的烟雾病诊断方法,该方法利用血管生成素受体Tie-2作为生物标志物,通过检测其表达量实现烟雾病的临床诊断及其预后预测。

[0006] 为实现上述目的,申请人招募经常规检查诊断为烟雾病(MMD)患者36名及颅内动脉硬化的脑血管病(ACVD)患者10名,手术前采集静脉血并进行可溶性Tie-2表达量检测分析,结果发现烟雾病患者血清中存在低表达的Tie-2蛋白,与ACVD对照组相比具有显著性差异($P<0.01$),ROC曲线进一步表明Tie-2对烟雾病具有可观的诊断能力。以上试验结果表明Tie-2蛋白可以作为标志物用于烟雾病诊断。

[0007] 进一步,申请人对29名烟雾病手术后6个月随访患者进行预后分级,发现血运重建好的烟雾病患者血清中存在低表达的Tie-2蛋白,与血运重建差的烟雾病患者相比具有显

著性差异 ($P < 0.01$), 通过单因素和多因素回归分析, 发现Tie-2水平是影响预后血运重建的关键因素, ROC曲线进一步证实Tie-2对烟雾病预后具有可观的预测能力。以上试验结果表明Tie-2蛋白可以作为标志物用于烟雾病预后预测。

[0008] 因此, 血管生成素受体Tie-2可作为生物标志物应用于烟雾病的临床诊断及预后预测。在此基础上, 申请人完成以下发明, 即提供了一种用于检测血管生成素受体Tie-2的试剂在制备烟雾病诊断器械中的应用。

[0009] 用于检测血管生成素受体Tie-2的试剂包括但不限于抗体和探针, 其中, 抗体包括单抗和多抗, 可通过生物免疫反应对待测样品中的抗原进行检测; 而探针则是通过分子杂交原理从基因组中将目的基因检测出来。针对已知的蛋白或基因对其进行检测属于本领域常规技术手段, 针对已知序列的抗原或基因设计相应的抗体或探针对本领域技术人员而言也不存在任何技术障碍。本发明的目的并不在于提供检测Tie-2的抗体或探针, 且现有技术中已有针对Tie-2的检测抗体或探针的记载。

[0010] 用于诊断烟雾病的器械包括但不限于基因芯片和试剂盒, 前者含有用于分子杂交对目的基因进行检测的探针, 后者含有用于生物免疫反应对目的蛋白进行检测的抗体。在获得探针和抗体的基础上, 对基因芯片或试剂盒进行组装对本领域技术人员而言也不存任何技术障碍。

[0011] 本发明可通过对人体外周血中的可溶性Tie-2进行检测进而诊断烟雾病, 该检测对人体造成的创伤小, 依从性高。

[0012] 本发明可通过ROC曲线的截断值判断诊断结果, 当检测结果低于截断值 (2730pg/ml), 则诊断为烟雾病并将其与颅内动脉硬化的脑血管病区分。该诊断结果准确可靠, 克服了疾病诊断的主观性。

[0013] 本发明通过转录组学方法鉴定并筛选出烟雾病与颅内动脉硬化的脑血管病间差异性表达因子, 实现了烟雾病的快速诊断, 同时还能有效预测烟雾病患者术后血运重建效果, 对减少脑血管事件发生、改善预后具有重要价值和临床意义。

[0014] 更详尽的技术方案参见具体实施例。

附图说明

[0015] 图1是实施例中烟雾病患者血清中Ang-1, Ang-2, sTie-2, VEGF的蛋白含量。

[0016] 图2是实施例中sTie-2蛋白诊断烟雾病的ROC曲线图。

[0017] 图3是实施例中术后不同血运重建效果患者血清中Ang-1, Ang-2, sTie-2, VEGF蛋白含量。

[0018] 图4是实施例中sTie-2蛋白用来判断烟雾病患者术后血运重建效果的ROC曲线图。

具体实施方式

[0019] 为使本发明更加清楚, 下面将结合具体实施例对本发明技术方案进行清楚、完整地描述。显然, 所描述的实施例是本发明的一部分实施例, 而不是全部的实施例。基于所描述的本发明的实施例, 本领域普通技术人员在无需创造性劳动的前提下所获得的所有其它实施例, 都属于本发明保护的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法, 按照制造试剂盒生产公司所建议的条件或按照常规实验条件, 其中, ELISA技术使用晶美公司试剂盒, 货号:

Ang-1 JM-03156H1, Ang-2 JM-03183H1, sTie-2 JM-5571H1, VEGF JM-03270H1。

[0020] 实施例1

[0021] 一、试验方法

[0022] 1. 病例纳入

[0023] 从2021年3月至2021年11月,在武汉大学中南医院神经外科招募住院的烟雾病患者(MMD) 36名。同期在在武汉大学中南医院招募颅内动脉硬化的脑血管病对照组(ACVD) (共纳入10名)。

[0024] 2. 排除标准和诊断方法

[0025] 有感染性、炎症性、血液病、癌症病史的患者,或被诊断为其他发生病理性血管生成的脑血管疾病的患者,如脑动静脉畸形、海绵状血管瘤或动脉瘤,均不在本研究范围内。所有MMD患者和ACVD对照组在手术前都接受了全面的诊断工作,包括神经系统检查、计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)扫描、数字减影血管成像(DSA)和功能性区域脑血流测量。采集患者静脉血,采血后立即轻轻颠倒混匀采血管5-10次,以确保抗凝剂发挥作用。尽量在采血后将血样1000rpm, 4℃离心10分钟,分离出血清并置于冻存管中,冷冻在-80℃直至ELISA分析使用。

[0026] 3. 预后分级方法

[0027] 根据烟雾病患者术后6个月DSA结果,依据Matsushima分级^[10]将患者分为血运重建好的组(GOOD)以及血运重建差的组(POOR),其中Matsushima分级为A级的归为血运重建好的组,Matsushima分级为B和C级的被归为血运重建差的组。

[0028] 4. 检测方法

[0029] ELISA检测:购买商品化Ang-1, Ang-2, sTie-2, VEGF试剂盒根据说明书检测,每个样品均设立3个复孔进行质控。

[0030] 二、试验结果

[0031] 1. 利用ELISA法评估血清中Ang-1、Ang-2、sTie-2、VEGF的水平,结果证实烟雾病患者血清中存在低表达的sTie-2蛋白,与ACVD对照组相比具有显著性差异($P < 0.01$),而其它三种标志物Ang-1、Ang-2、VEGF在MMD和ACVD两组中没有明显差异($P > 0.05$) (图1),提示sTie-2蛋白可以作为烟雾病诊断新的生物标志物。

[0032] 2. 利用ROC曲线分析sTie-2诊断烟雾病的价值,sTie-2诊断烟雾病的能力(AUC 0.84, 95%CI 0.49-0.96, 敏感性75.8%, 特异性80.0%, 截断值2730pg/mL)可观(图2),提示sTie-2可作为烟雾病新的诊断工具。

[0033] 3. 共收集到了29名烟雾病患者术后6个月随访的DSA数据,其中16人血运重建的效果良好,13人血运重建的效果不好。对试验前血清中Ang-1、Ang-2、sTie-2、VEGF的水平进行评估,结果发现血运重建好的烟雾病患者血清中存在低表达的sTie-2蛋白,与血运重建差的POOR组相比具有显著性差异($P < 0.01$) (图3),提示sTie-2蛋白可以作为预测烟雾病预后的生物标志物。

[0034] 4. 通过单因素分析发现年龄,Suzuki分级以及外周血sTie-2的水平与血运重建效果相关(表1),再对这些因素进行多因素回归分析,发现与血运重建好显著相关的因素是Suzuki分级以及外周血sTie-2的水平(表2),利用ROC曲线分析sTie-2预测烟雾病预后的价值。sTie-2预测烟雾病预后的能力(AUC 0.83, 95%CI 0.49-0.96, 敏感性93.8%, 特异性

69.2%，截断值<2512pg/mL) 可观 ($P<0.01$) (图4)，提示sTie-2可以用来预测术后血运重建效果。

[0035] 表1. 术后血运重建良好组和血运重建不良组的基线特征比较

Variables	Good collaterals (n=16)	Poor collaterals (n=13)	P value
Age	47.0	57.5	0.01
Gender (Male/Female)	9/7	6/7	0.72
Initial symptoms			0.21
TIA	4(25%)	1(7.7%)	
Infarction	6(37.5%)	3(23.1%)	
Hemorrhage	6(37.5%)	9(69.2%)	
Unilateral lesions	1	1	0.99
Suzuki stage			0.01
1	0	1(7.6%)	
2	4(25%)	0	
3	2(12.5%)	3(23.1%)	
4	9(56.3%)	2(15.4%)	
5	1(6.2%)	5(38.5%)	
6	0	2(15.4%)	
PB sTie-2 (pg/ml)	2201	2583	0.002

[0037] 表2术后血运重建良好的多变量逻辑回归分析

Variables	Association with good collateral formation	
	B (SE)	P value
Age	-0.155(0.114)	0.18
Suzuki stage	5.094(2.151)	0.01
PB sTie-2	-0.011(0.005)	0.03

[0040] 相关术语说明：

[0041] 烟雾病：烟雾病是一种病因不明、以双侧颈内动脉末端及大脑前动脉、大脑中动脉起始部慢性进行性狭窄或闭塞为特征，并继发颅底异常血管网形成的一种脑血管疾病。由于这种颅底异常血管网在脑血管造影图像上形似“烟雾”，故称为“烟雾病”。

[0042] Tie-2：是一种主要表达于血管内皮细胞的酪氨酸激酶受体，其配体为血管生成素，Tie-2蛋白的氨基酸序列参见NP_000450。sTie-2(soluble Tie-2)指的是人外周血中可溶性蛋白。

[0043] Ang：血管生成素(Angiopoietins)，是一类血管生长因子家族，与Tie受体结合。该家族主要由Ang-1、Ang-2、Ang-3和Ang-4四种因子组成。Ang/Tie通路在调节血管稳定、生理

和病理条件下的血管生成,以及炎症中发挥重要作用。

[0044] Ang-1:是由498个氨基酸组成的同源六聚体,Ang-1与Tie-2结合形成二聚体,使后者磷酸化而被激活。

[0045] Ang-2:由496个氨基酸组成,与Ang-1有60%的同源性,Ang-2与Tie-2结合可抑制后者的活性。

[0046] VEGF:血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor),具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用。

[0047] ELISA:酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay),是一种将可溶性的抗原或抗体结合到固相载体上,利用抗原抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法。

[0048] 血运重建:医学术语,是指通过药物或手术的方式,使狭窄、闭塞的动脉血管重新恢复血流灌注,以恢复相应缺血器官的供血达到治疗目的。

[0049] 相关文献:

[0050] 1.Sato,T.N.et al.Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.Nature 376,70-74,doi:10.1038/376070a0 (1995) .

[0051] 2.Davis,S.et al.Isolation of angiopoietin-1,a ligand for the TIE2 receptor,by secretion-trap expression cloning.Cell 87,1161-1169,doi:10.1016/s0092-8674(00)81812-7 (1996) .

[0052] 3.Maisonpierre,P.C.et al.Angiopoietin-2,a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.Science (New York,N.Y.) 277,55-60,doi:10.1126/science.277.5322.55 (1997) .

[0053] 4.Yancopoulos,G.D.et al.Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.Nature 407,242-248,doi:10.1038/35025215 (2000) .

[0054] 5.Jayson,G.C.et al.Plasma Tie2 is a tumor vascular response biomarker for VEGF inhibitors in metastatic colorectal cancer.Nature communications 9,4672,doi:10.1038/s41467-018-07174-1 (2018) .

[0055] 6.Zhou,C.et al.Systematic analysis of circulating soluble angiogenesis-associated proteins in ICON7 identifies Tie2 as a biomarker of vascular progression on bevacizumab.British journal of cancer 115,228-235,doi:10.1038/bjc.2016.194 (2016) .

[0056] 7.Sopo,M.et al.High expression of Tie-2 predicts poor prognosis in primary high grade serous ovarian cancer.PloS one 15,e0241484,doi:10.1371/journal.pone.0241484 (2020) .

[0057] 8.Lee,K.W.,Lip,G.Y.&Blann,A.D.Plasma angiopoietin-1,angiopoietin-2,angiopoietin receptor tie-2,and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes.Circulation 110,2355-2360,doi:10.1161/01.Cir.0000138112.90641.7f (2004) .

[0058] 9.Chong,A.Y.,Caine,G.J.,Freestone,B.,Blann,A.D.&Lip,G.Y.Plasma

angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin receptor tie-2 levels in congestive heart failure. Journal of the American College of Cardiology 43, 423-428, doi:10.1016/j.jacc.2003.08.042 (2004).

[0059] 10. Matsushima, T. et al. Surgical treatment of moyamoya disease in pediatric patients--comparison between the results of indirect and direct revascularization procedures. Neurosurgery 31, 401-405, doi:10.1227/00006123-199209000-00003 (1992).

[0060] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

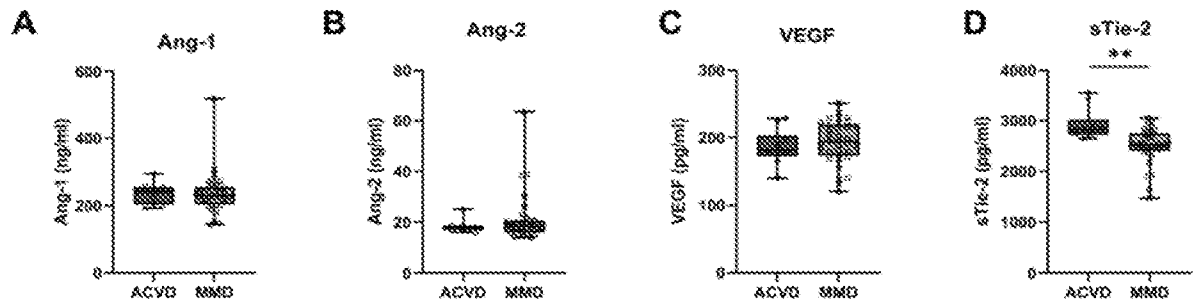


图1

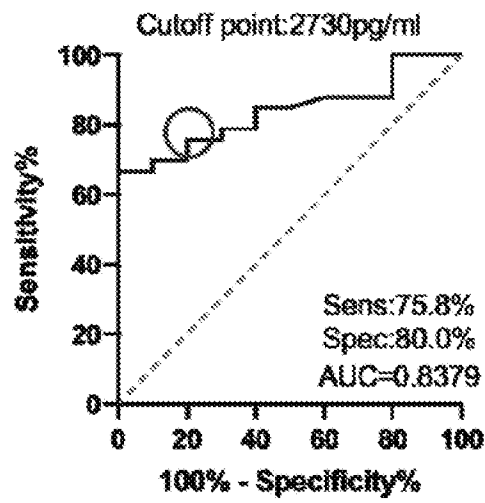


图2

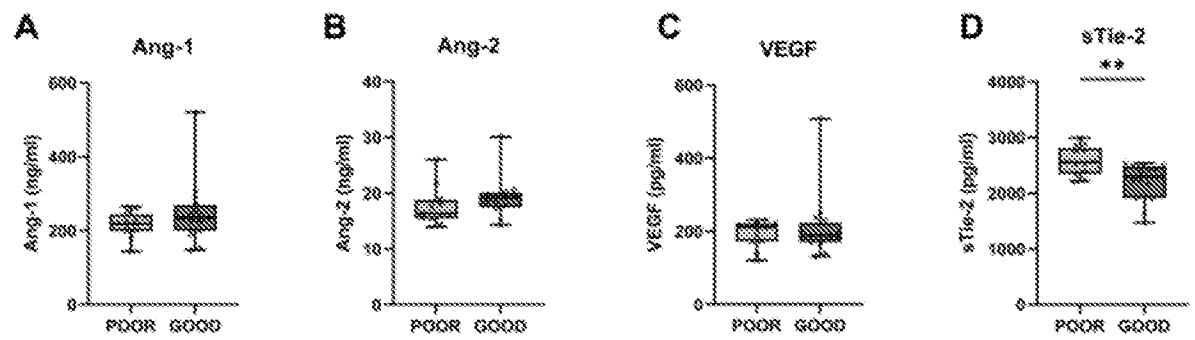


图3

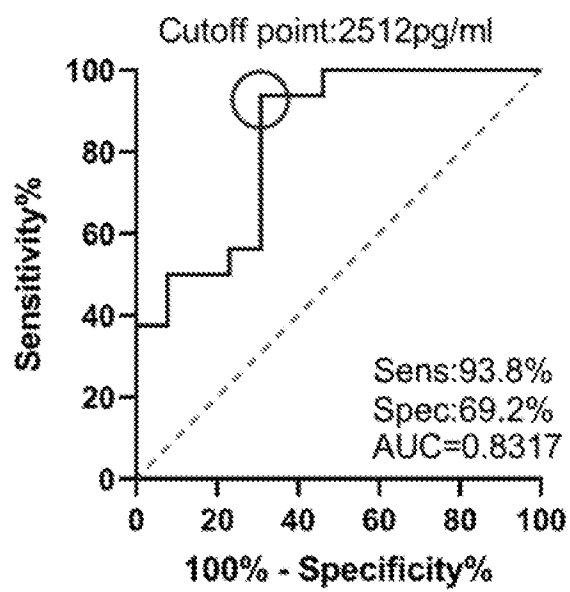


图4