



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109633142 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811575593.9

(22)申请日 2018.12.22

(71)申请人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市新城区长乐西路169号

(72)发明人 陈鹏 谭光国 张雅 吴剑维
张峰 王超丽 雷杰 赵广义
王雪娇

(74)专利代理机构 西安创知专利事务所 61213
代理人 谭文琰

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

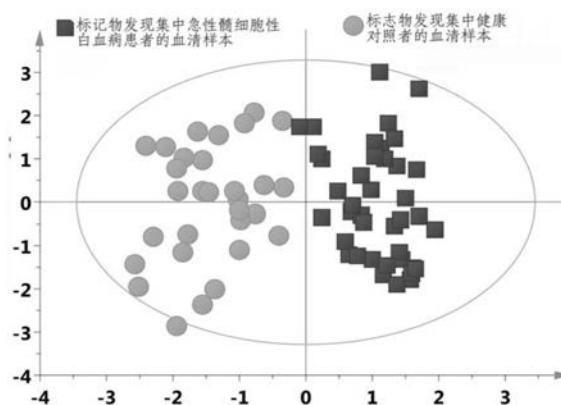
权利要求书2页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法,该方法包括:一、收集血清;二、采用超高效液相色谱和质谱联用分析检测血清;三、分析急性髓细胞性白血病患者与健康对照者的血清谱图,确定生物标志物;四、确认生物标志物的化学信息;五、确认谷氨酸、犬尿氨酸、油酸为最优生物标志物并建立诊断模型;本发明还公开了一种急性髓细胞性白血病诊断模型的应用方法,将受试者的血清带入急性髓细胞性白血病诊断模型,经计算判断受试者是否患病。本发明得到的诊断模型准确高效,避免了对患者的侵袭性;本发明的应用方法取材简单易得,灵敏度高,能无创、高效、准确的区分急性髓细胞性白血病患者与健康者,适宜推广使用。



1. 一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

步骤一、血清样本的收集:收集急性髓细胞性白血病患者血清和健康对照者血清得到标志物发现集的血清,然后置于-80℃冰冻保存;

步骤二、血清样本的分析:将步骤一中冰冻保存的标志物发现集的血清样本冻融后各取100μL,分别加入400μL含有12.5μg/mL内标物L-2-氯丙苯氨酸的甲醇涡旋1min,然后置于冰水浴中超声提取10min,再在4℃、14000×g的条件下离心15min,得到的上清液采用超高效液相色谱和质谱联用进行检测,得到标志物发现集中血清样本的检测数据;所述超高效液相色谱的检测条件为:超高效液相色谱采用Agilent1290 Infinity液相色谱系统,色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈柱,规格为2.1mm×100mm,1.7μm,柱温为40℃,流动相中的A相为甲酸质量含量0.1%的甲酸水溶液,B相为甲酸质量含量0.1%的甲酸乙腈溶液,采用梯度洗脱法进行洗脱,流速为400μL/min,进样量为3μL,色谱柱平衡时间为5min,具体洗脱条件为:0~2min采用5%B相,2min~13min采用5%~95%B相,13min~15min采用95%B相;所述质谱的检测条件为:质谱采用Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOFMS串联四极杆-飞行时间质谱仪,并采用正离子模式检测,检测参数中的毛细管电压为3500V,干燥气流速为11L/min,干燥气温度为350℃,喷雾气压为45psig,破碎电压为120V,锥孔电压为60V,数据采集范围质荷比m/z为50~1000,选取质荷比为121.0509和922.0098的内标离子作实时质量数校正;

步骤三、生物标志物的筛选:采用Agilent MassHunter Qualitative software软件将步骤二中得到的标志物发现集中血清样本的检测数据由.d文件格式转化为通用.mzData格式并通过去同位素峰的处理,然后采用XCMS数据处理软件进行去噪音、质谱峰提取、反卷积处理、峰排列、对齐、合并、列表去噪音和缝隙填补处理,得到标志物发现集中血清样本的各个离子峰的峰面积以及质荷比和保留时间等数据矩阵,并以内标物L-2-氯丙苯氨酸的峰面积进行各个离子峰的归一化,得到标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者血清谱图与健康对照者血清谱图,并对两者进行差异性的分析,然后采用版本为Version11.0的SIMCA-P统计软件进行正交偏最小二乘法判别分析,得到变量重要性因子对差异性贡献最大的代谢物,再采用独立样本t检验进一步验证上述代谢物在标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者血清和健康对照者血清的差异性,综合考虑变量重要性筛选和t检验结果,确定19种代谢物为急性髓细胞性白血病相关的生物标志物;

步骤四、生物标志物的结构鉴定:采用Agilent MassHunter软件对步骤三中确定的19种生物标记物进行分子式预测,然后将19种生物标记物的标准品采用超高效液相色谱和质谱联用进行检测,得到19种生物标记物的标准品的分子量检测信息以及碎片离子信息,并与步骤三中得到的19种生物标记物的分子量检测信息以及碎片离子信息进行对比,最终确认19种生物标记物的化学信息;所述超高效液相色谱和质谱联用的检测条件分别与步骤二中所述超高效液相色谱和质谱检测条件相同;

步骤五、诊断模型的建立:采用Logistic逐步回归分析法建立基于步骤四中得到的19种生物标记物的优化模型,得到谷氨酸、犬尿氨酸、油酸3种代谢物为急性髓细胞性白血病诊断的最优的生物标记物,并基于这3种代谢物建立急性髓细胞性白血病诊断模型为: $\text{Logit}[P=\text{AML}] = -7402.177 \times [\text{谷氨酸}] + 6000.123 \times [\text{犬尿氨酸}] - 596.626 \times [\text{油酸}] + 10.571$,其中[P=AML]代表基于该代谢物组合的急性髓细胞性白血病诊断效能,分布区间

为0~1, [谷氨酸]、[犬尿氨酸]和[油酸]分别代表血清中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸), 然后通过受试者工作特征曲线对所述急性髓细胞性白血病诊断模型进行分析, 得到所述急性髓细胞性白血病诊断模型的截断值为0.3731, 受试者工作特征曲线下面积为0.981, 灵敏度为0.975, 特异度为0.933。

2. 一种应用如权利要求1中所述的急性髓细胞性白血病诊断模型进行诊断的方法, 该方法包括以下步骤:

步骤一、血清样本的收集: 收集受试者的血清样本, 然后置于-80℃冰冻保存;

步骤二、血清样本的分析: 根据急性髓细胞性白血病诊断模型建立方法中的步骤二的血清样本的分析方法, 对步骤一中得到的受试者的血清样本进行分析, 得到受试者的血清样本中谷氨酸、犬尿氨酸和油酸三种标志物的相对浓度;

步骤三、急性髓细胞性白血病的诊断: 将步骤二中得到的标志物验证集中各血清样本中谷氨酸、犬尿氨酸和油酸三种标志物的相对浓度带入急性髓细胞性白血病诊断模型中, 计算得到 $[P=AML]$ 值, 当 $[P=AML] > 0.3731$ 时, 提示受试者患有急性髓细胞性白血病, 当 $[P=AML] \leq 0.3731$, 提示受试者患有急性髓细胞性白血病的诊断不成立。

一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法及其应用。

背景技术

[0002] 急性髓细胞性白血病(又称急性髓细胞白血病或急性髓系白血病)是一种以骨髓细胞异常增殖和分化为特征的血液系统恶性肿瘤,也是成人急性白血病的主要病理类型(占比约80%-90%),临床表现复杂,多数病例病情急重,预后凶险,如不及时治疗常可危及生命。目前,急性髓细胞性白血病的诊断主要依靠外周血细胞检查和骨髓活检,以上两种检查方法均具有一定的局限性。外周血细胞检查的一个主要限制是,很多患者在就诊时没有可供检测的循环细胞,尤其是在疾病的早期阶段。骨髓活检作为急性髓细胞性白血病诊断的“金标准”,对患者具有明显的侵袭性,且结果判定在很大程度上依赖检查者的主观经验,容易造成漏诊、误诊。因此,迫切的需要开发一种非侵入性,高特异性和敏感性的急性髓细胞性白血病检查方法。由于癌症发生、发展与代谢状态直接相关,所以通过研究代谢的变化,寻找具有代表意义的生物标志物,建立科学的诊断模式,可为疾病的诊断带来契机。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题在于针对上述现有技术的不足,提供了一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法。该方法采用代谢组学方法建立急性髓细胞性白血病诊断模型,结合采用偏最小二乘判别分析和独立样本t检验,依次采用结构验证和Logistic逐步回归分析法建立基于谷氨酸、犬尿氨酸、油酸3种代谢物的急性髓细胞性白血病诊断模型,该诊断模型准确高效,提高了急性髓细胞性白血病诊断的准确性和特异性,避免了对患者的侵袭性,有利于急性髓细胞性白血病的及时诊治。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

[0005] 步骤一、血清样本的收集:收集急性髓细胞性白血病患者血清和健康对照者血清得到标志物发现集的血清,然后置于-80℃冰冻保存;

[0006] 步骤二、血清样本的分析:将步骤一中冰冻保存的标志物发现集的血清样本冻融后各取100μL,分别加入400μL含有12.5μg/mL内标物L-2-氯丙苯氨酸的甲醇涡旋1min,然后置于冰水浴中超声提取10min,再在4℃、14000×g的条件下离心15min,得到的上清液采用超高效液相色谱和质谱联用进行检测,得到标志物发现集中血清样本的检测数据;所述超高效液相色谱的检测条件为:超高效液相色谱采用Agilent1290Infinity液相色谱系统,色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3C₁₈柱,规格为2.1mm×100mm,1.7μm,柱温为40℃,流动相中的A相为甲酸质量含量0.1%的甲酸水溶液,B相为甲酸质量含量0.1%的甲酸乙腈溶液,采用梯度洗脱法进行洗脱,流速为400μL/min,进样量为3μL,色谱柱平衡时间为5min,具体洗脱条件为:0~2min采用5%B相,2min~13min采用5%~95%B相,13min~15min采用95%B相;所述

质谱的检测条件为:质谱采用Agilent 6530Accurate-Mass Q-TOFMS串联四极杆-飞行时间质谱仪,并采用正离子模式检测,检测参数中的毛细管电压为3500V,干燥气流速为11L/min,干燥气温度为350℃,喷雾气压为45psig,破碎电压为120V,锥孔电压为60V,数据采集范围质荷比 m/z 为50~1000,选取质荷比为121.0509和922.0098的内标离子作实时质量数校正;

[0007] 步骤三、生物标志物的筛选:采用Agilent MassHunter Qualitativesoftware软件将步骤二中得到的标志物发现集中血清样本的检测数据由.d文件格式转化为通用.mzData格式并通过去同位素峰的处理,然后采用XCMS数据处理软件进行去噪音、质谱峰提取、反卷积处理、峰排列、对齐、合并、列表去噪音和缝隙填补处理,得到标志物发现集中血清样本的各个离子峰的峰面积以及质荷比和保留时间等数据矩阵,并以内标物L-2-氯丙苯氨酸的峰面积进行各个离子峰的归一化,得到标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者血清谱图与健康对照者血清谱图,并对两者进行差异性的分析,然后采用版本为Version11.0的SIMCA-P统计软件进行正交偏最小二乘法判别分析,得到变量重要性因子对差异性贡献最大的代谢物,再采用独立样本t检验进一步验证上述代谢物在标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者血清和健康对照者血清的差异性,综合考虑变量重要性筛选和t检验结果,选择VIP>1和 $p<0.05$,确定19种代谢物为急性髓细胞性白血病相关的生物标志物;

[0008] 步骤四、生物标志物的结构鉴定:采用Agilent MassHunter软件对步骤三中确定的19种生物标记物进行分子式预测,然后将19种生物标记物的标准品采用超高效液相色谱和质谱联用进行检测,得到19种生物标记物的标准品的分子量检测信息以及碎片离子信息,并与步骤三中得到的19种生物标记物的分子量检测信息以及碎片离子信息进行对比,最终确认19种生物标记物的化学信息;所述超高效液相色谱和质谱联用的检测条件分别与步骤二中所述超高效液相色谱和质谱检测条件相同;

[0009] 步骤五、诊断模型的建立:采用Logistic逐步回归分析法建立基于步骤四中得到的19种生物标记物的优化模型,得到谷氨酸、犬尿氨酸、油酸3种代谢物为急性髓细胞性白血病诊断的最优的生物标记物,并基于这3种代谢物建立急性髓细胞性白血病诊断模型为: $\text{Logit}[P=\text{AML}] = -7402.177 \times [\text{谷氨酸}] + 6000.123 \times [\text{犬尿氨酸}] - 596.626 \times [\text{油酸}] + 10.571$,其中 $[P=\text{AML}]$ 代表基于该代谢物组合的急性髓细胞性白血病诊断效能,分布区间为0~1,[谷氨酸]、[犬尿氨酸]和[油酸]分别代表血清中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸的相对浓度(内标物为L-2-氯丙苯氨酸),然后通过受试者工作特征曲线对所述急性髓细胞性白血病诊断模型进行分析,得到所述急性髓细胞性白血病诊断模型的截断值为0.3731,受试者工作特征曲线下面积为0.981,灵敏度为0.975,特异度为0.933。

[0010] 另外,本发明还提供了一种急性髓细胞性白血病诊断模型的应用方法,该方法包括以下步骤:

[0011] 步骤一、血清样本的收集:收集受试者的血清样本,然后置于-80℃冰冻保存;

[0012] 步骤二、血清样本的分析:根据急性髓细胞性白血病诊断模型建立方法中的步骤二的血清样本的分析方法,对步骤一中得到的受试者的血清样本进行分析,得到受试者的血清样本中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸三种标志物的相对浓度;

[0013] 步骤三、急性髓细胞性白血病诊断的诊断:将步骤二中得到的标志物验证集中各血清样本中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸三种标志物的相对浓度带入急性髓细胞性白血病诊

断模型中,计算得到 $[P=AML]$ 值,当 $[P=AML]>0.3731$ 时,提示受试者患有急性髓细胞性白血病,当 $[P=AML]\leq 0.3731$,提示受试者患有急性髓细胞性白血病的诊断不成立。

[0014] 本发明与现有技术相比具有以下优点:

[0015] 1、本发明采用代谢组学方法建立急性髓细胞性白血病诊断模型,首先采用超高效液相色谱和质谱联用的方法对各血清样品进行检测分析,通过对急性髓细胞性白血病患者血清谱图与健康对照者血清谱图的差异性进行比较,结合采用SIMCA-P统计软件(Version11.0)进行偏最小二乘判别分析进行判别分析,并采用独立样本t检验最终确定19种代谢物为急性髓细胞性白血病相关的生物标志物,然后对19种生物标记物进行结构验证,得到19种生物标记物的化学式,再采用Logistic逐步回归分析法确认谷氨酸、犬尿氨酸、油酸3种代谢物为急性髓细胞性白血病诊断的最优的生物标记物,并基于这3种代谢物建立急性髓细胞性白血病诊断模型: $\text{Logit}[P=AML] = -7402.177 \times [\text{谷氨酸}] + 6000.123 \times [\text{犬尿氨酸}] - 596.626 \times [\text{油酸}] + 10.571$,其中 $[P=AML]$ 代表基于该代谢物组合的急性髓细胞性白血病诊断效能, $[\text{谷氨酸}]$ 、 $[\text{犬尿氨酸}]$ 和 $[\text{油酸}]$ 分别代表血清中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸),该诊断模型只需对三种生物标记物进行检测分析即可检出急性髓细胞性白血病,准确高效,提高了急性髓细胞性白血病的准确性和特异性,避免了对患者的侵袭性,有利于急性髓细胞性白血病的及时诊出。

[0016] 2、本发明急性髓细胞性白血病诊断模型中 $[P=AML]$ 的截断值为0.3731时,该诊断模型具有最佳的诊断效能,能够高效、准确的区分出急性髓细胞性白血病患者与健康者。

[0017] 3、本发明以临床样本作为研究对象,通过经典的数学方法构建诊断模型,并结合实际临床病例对该诊断模型的诊断效能进行了验证。由此得到的基于血清中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸三种代谢物浓度的诊断模型贴近临床实际,具有较好的应用价值和前景。

[0018] 4、本发明首次发现血清中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸三种代谢物的表达水平变化与急性髓细胞性白血病发病密切相关,并在该发现基础上构建的急性髓细胞性白血病诊断模型,该模型应用过程中只需要采集患者外周血样进行分析检测即可完成诊断,检查结果不依赖主观判断,客观可靠,避免了检查者主观经验造成的漏诊和误诊;同时本发明诊断模型的应用过程中直接对患者外周血样的血清进行检测,而不是对外周血样中的血细胞进行检测,避免了急性髓细胞性白血病早期患者外周血样中循环细胞数量较少导致的检测灵敏度低、容易漏诊的现象。因此,本发明的急性髓细胞性白血病诊断模型应用时取材简单易得,且灵敏度高,能够无创、高效、准确的区分急性髓细胞性白血病患者与健康者,适宜推广使用。

[0019] 下面通过附图和实施例对本发明的技术方案作进一步的详细描述。

附图说明

[0020] 图1是本发明实施例1的标志物发现集的血清样本的正交偏最小二乘法得分图。

[0021] 图2是本发明实施例1中标志物发现集的受试者工作特征曲线图。

[0022] 图3a是本发明的生物标志物谷氨酸在实施例1标志物发现集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸)。

[0023] 图3b是本发明的生物标志物谷氨酸在实施例2标志物验证集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸)。

[0024] 图4a是本发明的生物标志物犬尿氨酸在实施例1标志物发现集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸)。

[0025] 图4b是本发明的生物标志物犬尿氨酸在实施例2标志物验证集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸)。

[0026] 图5a是本发明的生物标志物油酸在实施例1标志物发现集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸)。

[0027] 图5b是本发明的生物标志物油酸在实施例2标志物验证集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸)。

[0028] 图6是本发明实施例1的标志物发现集与实施例2的标志物验证集的正交偏最小二乘法判别分析图。

[0029] 图7是本发明实施例2中标志物验证集的受试者工作特征曲线图。

具体实施方式

[0030] 本发明的急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法通过实施例1进行详细描述。

[0031] 实施例1

[0032] 本实施例的急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法包括以下步骤：

[0033] 步骤一、血清样本的收集：收集急性髓细胞性白血病患者血清40例、健康对照者血清30例得到标志物发现集的血清样本，然后置于-80℃冰冻保存；所述标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者和健康对照者的一般信息和临床病理特征如下表1所示：

[0034] 表1标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者和健康对照者的一般信息和临床病理特征

[0035]

类别	标志物发现集		
	对照者	患者	<i>P</i> 值
年龄(岁)*	45(21~70)	47(16~72)	0.47
性别(男/女)*	21/9	27/13	0.82
谷丙转氨酶(U/L)*	22(10~58)	24(8~473)	0.61
谷草转氨酶(U/L)*	21(14~52)	23(5~567)	0.53
白细胞($10^9/L$)*		14.6(1.1~108.5)	
血小板($10^9/L$)*		40(5~368)	
骨髓原始细胞比例(%)*		65(12~93)	
细胞遗传学低危分层(%)		4(10.0%)	
细胞遗传学中危分层(%)		24(60.0%)	
细胞遗传学高危分层(%)		12(30.0%)	

[0036] *表示计量资料采用中位数(最小值-最大值)的方式描述

[0037] 步骤二、血清样本的分析:将步骤一中冰冻保存的标志物发现集的血清样本冻融后各取100 μ L,分别加入400 μ L含有12.5 μ g/mL内标物L-2-氯丙苯氨酸的甲醇涡旋1min,然后均置于冰水浴中超声提取10min,再在4 $^{\circ}$ C、14000 $\times$ g的条件下离心15min,得到上清液采用超高效液相色谱和质谱联用进行检测,得到标志物发现集中各血清样本的检测数据;所述超高效液相色谱的检测条件为:超高效液相色谱采用Agilent1290Infinity液相色谱系统,色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3C₁₈柱,规格为2.1mm $\times$ 100mm,1.7 μ m,柱温为40 $^{\circ}$ C,流动相中的A相为甲酸质量含量0.1%的甲酸水溶液,B相为甲酸质量含量0.1%的甲酸乙腈溶液,采用梯度洗脱法进行洗脱,流速为400 μ L/min,进样量为3 μ L,色谱柱平衡时间为5min,具体洗脱条件为:0~2min采用5%B相,2min~13min采用5%~95%B相,13min~15min采用95%B相;所述质谱的检测条件为:质谱采用Agilent 6530Accurate-Mass Q-TOFMS串联四极杆-飞行时间质谱仪,并采用正离子模式检测,检测参数中的毛细管电压为3500V,干燥气流速为11L/min,干燥气温度为350 $^{\circ}$ C,喷雾气压为45psig,破碎电压为120V,锥孔电压60V,数据采集范围质荷比m/z为50~1000,选取质荷比为121.0509和922.0098的内标离子作实时质量数校正;

[0038] 步骤三、生物标志物的筛选:采用Agilent MassHunter Qualitativesoftware软件将步骤二中得到的标志物发现集中各血清样本的检测数据由.d文件格式转化为通用.mzData格式并通过去同位素峰的处理,然后通过XCMS数据处理软件进行去噪音、质谱峰提取、反卷积处理、峰排列、对齐、合并、列表去噪音和缝隙填补处理,得到各血清样本的各个离子峰的峰面积以及质荷比和保留时间等数据矩阵,并以内标物L-2-氯丙苯氨酸的峰面积进行各个离子峰的归一化,得到标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者血清谱图与健康对照者血清谱图,并对两者进行差异性的分析,然后采用SIMCA-P统计软件(Version11.0)进行正交偏最小二乘法判别分析,得到变量重要性因子对差异性贡献最大的代谢物,再采用独立样本t检验进一步验证上述代谢物在标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者血清和健康对照者血清的差异性,综合考虑变量重要性筛选(VIP>1)和t检验(p<0.05)结果,确定19种代谢物为急性髓细胞性白血病相关的生物标志物;

[0039] 图1是本实施例的标志物发现集的血清样本的正交偏最小二乘法得分图,图中每个点代表标志物发现集中的一个血清样本,从图1可以看出,在该正交偏最小二乘法得分图中急性髓细胞性白血病患者和健康对照者能明显分开,说明步骤三中筛选的生物标志物能够用于预测急性髓细胞性白血病的患病与否;

[0040] 步骤四、生物标志物的结构鉴定:采用Agilent MassHunter软件对步骤三中确定的19种生物标记物进行分子式预测,然后将19种生物标记物的标准品采用超高效液相色谱和质谱联用进行检测,得到19种生物标记物的标准品的分子量检测信息以及碎片离子信息,并与步骤三中得到的19种生物标记物的分子量检测信息以及碎片离子信息进行对比,最终确认19种生物标记物的化学信息,如下表2所示;所述超高效液相色谱和质谱联用的检测条件分别与步骤二中所述超高效液相色谱和质谱检测条件相同;

[0041] 表2 19种生物标记物的化学信息

[0042]

生物 标记 物	分子式	保留 时间 (分 钟)	质荷比	变量 重要 性因 子	倍数 变化 (患 者组/ 健康 组)	统计学 差异(<i>P</i>)	伪发 现率
谷氨 基酸	C ₅ H ₉ NO ₄	0.71	148.0604	1.11	0.47	9.18E-11	1.23E-07
乙酰 肉碱	C ₉ H ₁₇ NO ₄	0.80	204.1228	1.23	1.90	1.72E-07	1.23E-07
缬氨 酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	0.90	118.0865	1.62	0.69	5.85E-04	1.19E-02
尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	0.97	169.0359	1.36	1.86	7.25E-06	1.23E-07
酪氨 酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	1.17	182.0813	2.05	2.28	2.64E-09	1.23E-07
异亮 氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	1.22	132.1019	5.65	0.63	6.31E-04	1.19E-02

[0043]

丙酰肉碱	$C_{10}H_{19}NO_4$	1.45	218.1385	1.15	3.17	1.38E-08	1.23E-07
苯基丙氨酸	$C_9H_{11}NO_2$	2.14	166.0862	3.35	1.95	7.32E-08	1.23E-07
犬尿氨酸	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	2.21	209.0918	1.01	2.24	5.84E-08	1.23E-07
色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	4.06	205.0972	2.95	2.02	2.24E-06	1.23E-07
亚油酰胺	$C_{18}H_{33}NO$	12.79	280.2634	1.04	1.77	6.43E-04	1.19E-02
油酰胺	$C_{18}H_{35}NO$	13.66	282.2792	1.17	1.72	1.25E-05	1.23E-07
氨基乙磺酸	$C_2H_7NO_3S$	0.72	124.0072	1.57	0.51	1.09E-07	1.23E-07
尿苷	$C_9H_{12}N_2O_6$	0.76	243.0609	1.34	0.52	2.96E-03	2.26E-02
酮亮氨酸	$C_6H_{10}O_3$	4.19	129.0557	5.43	2.35	5.12E-09	1.23E-07
硫酸吲哚酚	$C_8H_7NO_4S$	5.58	212.0023	1.79	1.77	3.25E-03	2.26E-02
N-非酰基甘氨酸	$C_{11}H_{21}NO_3$	6.55	214.1446	1.17	1.70	1.14E-05	1.23E-07
N-十一酰基甘氨酸	$C_{13}H_{25}NO_3$	7.69	242.1764	1.89	1.53	1.81E-06	1.23E-07
油酸	$C_{18}H_{34}O_2$	14.72	281.2486	1.43	0.62	1.10E-09	1.23E-07

[0044] 从表2可以看出,19种生物标记物中乙酰肉碱、尿酸、酪氨酸、丙酰肉碱、苯基丙氨酸、犬尿氨酸、色氨酸、亚油酰胺、油酰胺、酮亮氨酸、硫酸吲哚酚、N-非酰基甘氨酸、N-十一酰基甘氨酸在急性髓细胞性白血病患者血清中的含量水平中明显高于健康对照者血清中的含量水平,而谷氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、氨基乙磺酸、尿苷、油酸在急性髓细胞性白血病患者血清中的含量水平中明显低于健康对照者血清中的含量水平。然而,临床诊断中定量如此多种代谢物不方便也不经济,因此,进一步遴选出几种血清代谢物并建立诊断模型对于临床实践将更有价值;

[0045] 步骤五、诊断模型的建立:采用Logistic逐步回归分析法建立基于步骤四中得到

的19种生物标记物的优化模型,得到谷氨酸、犬尿氨酸、油酸3种代谢物为急性髓细胞性白血病诊断的最优的生物标记物,并基于这3种代谢物建立急性髓细胞性白血病诊断模型: $\text{Logit}[P=\text{AML}] = -7402.177 \times [\text{谷氨酸}] + 6000.123 \times [\text{犬尿氨酸}] - 596.626 \times [\text{油酸}] + 10.571$,其中 $[P=\text{AML}]$ 代表基于该代谢物组合的急性髓细胞性白血病诊断效能, $[\text{谷氨酸}]$ 、 $[\text{犬尿氨酸}]$ 和 $[\text{油酸}]$ 分别代表血清中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸)。

[0046] 将本实施例建立的急性髓细胞性白血病诊断模型通过受试者工作特征曲线进行分析,结果如图2所示,从图2可以看出,当 $[P=\text{AML}]$ 的截断值为0.3731时,受试者工作特征曲线下面积为0.981,灵敏度为0.975,特异度为0.933,急性髓细胞性白血病诊断模型具有最佳的诊断效能。

[0047] 本发明的急性髓细胞性白血病诊断模型的应用方法通过实施例2进行详细描述。

[0048] 实施例2

[0049] 本实施例应用急性髓细胞性白血病诊断模型进行诊断的方法的具体过程包括以下步骤:

[0050] 步骤一、血清样本的收集:通过静脉采血的方式收集急性髓细胞性白血病患者血清15例、健康对照者血清15例得到标志物发现集的血清样本,然后置于 -80°C 冰冻保存;所述标志物发现集中急性髓细胞性白血病患者和健康对照者的一般信息和临床病理特征如下表3所示;

[0051] 表3标志物验证集中急性髓细胞性白血病患者和健康对照者的一般信息和临床病理特征

类别	标志物验证集		
	对照者	患者	P 值
年龄 (岁) *	43(23~62)	45 (21~65)	0.39
性别 (男/女) *	9/6	10/5	0.70
谷丙转氨酶(U/L) *	21(11~44)	22(6~178)	0.29
谷草转氨酶(U/L) *	21(16~46)	22(8~218)	0.36
白细胞 ($10^9/\text{L}$) *		13.5(1.4~100.3)	
血小板($10^9/\text{L}$) *		38(4~341)	
骨髓原始细胞比例(%)*		63(14~88)	
细胞遗传学低危分层(%)		2(13.3%)	
细胞遗传学中危分层(%)		8(53.3%)	
细胞遗传学高危分层(%)		5(33.3%)	

[0053] *表示计量资料采用中位数(最小值-最大值)的方式描述

[0054] 步骤二、血清样本的分析:将步骤一中冰冻保存的标志物验证集的血清样本冻融后各取100 μL ,分别加入400 μL 含有12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标物L-2-氯丙苯氨酸的甲醇涡旋1min,然后均置于冰水浴中超声提取10min,再在 4°C 、 $14000 \times g$ 的条件下离心15min,得到上清液采用超高效液相色谱和质谱联用进行检测,得到标志物验证集中血清样本的检测数据;

[0055] 分别配制浓度均为10ng/mL的谷氨酸、犬尿氨酸、油酸的混合标准溶液,然后对混合标准溶液进行质谱检测,根据质谱检测结果中的保留时间和质荷比,得到标志物验证集中各血清样本中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸的峰面积分别与内标物L-2-氯苯丙氨酸峰总面积的比值,即标志物验证集中各血清样本中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸三种标志物的相对浓度;

[0056] 所述超高效液相色谱的检测条件为:超高效液相色谱采用Agilent1290Infinity液相色谱系统,色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3C₁₈柱,规格为2.1mm×100mm,1.7μm,柱温为40℃,流动相中的A相为甲酸质量含量0.1%的甲酸水溶液,B相为甲酸质量含量0.1%的甲酸乙腈溶液,采用梯度洗脱法进行洗脱,流速为400μL/min,进样量为3μL,色谱柱平衡时间为5min,具体洗脱条件为:0~2min采用5%B相,2min~13min采用5%~95%B相,13min~15min采用95%B相;所述标志物验证集的血清和混合标准溶液的质谱的检测条件均为:质谱采用Agilent 6530Accurate-Mass Q-TOFMS串联四极杆-飞行时间质谱仪,并采用正离子模式检测,检测参数中的毛细管电压为3500V,干燥气流速为11L/min,干燥气温度为350℃,喷雾气压为45psig,破碎电压为120V,锥孔电压60V,数据采集范围质荷比m/z为50~1000,选取质荷比为121.0509和922.0098的内标离子作实时质量数校正;

[0057] 采用独立样本t检验法对谷氨酸、犬尿氨酸、油酸三种标志物在实施例1的标志物发现集和实施例2的标志物验证集中的相对浓度差异性进行验证,结果如图3a、图3b、图4a、图4b、图5a和图5b所示;

[0058] 图3a是本发明的生物标志物谷氨酸在实施例1标志物发现集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸),图3b是本发明的生物标志物谷氨酸在实施例2标志物验证集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸),从图3a和图3b可以看出,在实施例1的标志物发现集和实施例2的标志物验证集中,谷氨酸在急性髓细胞性白血病患者中的相对浓度均显著低于在健康对照组的相对浓度($p<0.001$),说明谷氨酸的相对浓度与急性髓细胞性白血病发病显著相关,能够用于急性髓细胞性白血病诊断;

[0059] 图4a是本发明的生物标志物犬尿氨酸在实施例1标志物发现集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸),图4b是本发明的生物标志物犬尿氨酸在实施例2标志物验证集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸),从图4a和图4b可以看出,在实施例1的标志物发现集和实施例2的标志物验证集中,犬尿氨酸在急性髓细胞性白血病患者中的相对浓度均显著高于在健康对照组的相对浓度($p<0.001$),说明犬尿氨酸的相对浓度与急性髓细胞性白血病发病显著相关,能够用于急性髓细胞性白血病诊断;

[0060] 图5a是本发明的生物标志物油酸在实施例1标志物发现集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸),图5b是本发明的生物标志物油酸在实施例2标志物验证集中的相对浓度(内标物为L-2-氯苯丙氨酸),从图5a和图5b可以看出,在实施例1的标志物发现集和实施例2的标志物验证集中,油酸在急性髓细胞性白血病患者中的相对浓度均显著低于在健康对照组的相对浓度($p<0.001$),说明油酸的相对浓度与急性髓细胞性白血病发病显著相关,能够用于急性髓细胞性白血病诊断;

[0061] 步骤三、急性髓细胞性白血病诊断的诊断:将步骤二中得到的标志物验证集中各血清样本中谷氨酸、犬尿氨酸、油酸三种标志物的相对浓度带入本发明实施例1得到的急性髓细胞性白血病诊断模型中: $\text{Logit}[P=\text{AML}]=-7402.177\times[\text{谷氨酸}]+6000.123\times[\text{犬}$

尿氨酸] $-596.626 \times [\text{油酸}] + 10.571$, 计算得到 $[P=\text{AML}]$ 值, 其中 $[P=\text{AML}]$ 的截断值设为 0.3731 , 当 $[P=\text{AML}] > 0.3731$ 时, 提示受试者患有急性髓细胞性白血病, 当 $[P=\text{AML}] \leq 0.3731$, 提示受试者患有急性髓细胞性白血病的诊断不成立。

[0062] 采用SIMCA-P统计软件 (Version11.0) 对标志物验证集中的诊断结果进行正交偏最小二乘法判别分析, 结果如图6所示, 从图6可以看出, 标志物验证集中急性髓细胞性白血病患者和健康对照者区分明显, 且与实施例1中标志物发现集中的分布趋势一致, 说明本发明的急性髓细胞性白血病诊断模型具有较高的可重复性和一致性。

[0063] 通过受试者工作特征曲线对本实施例标志物验证集中15例急性髓细胞性白血病患者和15例健康对照者的诊断结果进行分析, 计算得到受试者工作特征曲线下面积为 0.973 , 灵敏度为 0.933 , 特异度为 0.933 , 结果如图7所示, 说明本发明的诊断模型对急性髓细胞性白血病与健康对照的区分诊断具有较高的准确度和灵敏度。

[0064] 以上所述, 仅是本发明的较佳实施例, 并非对本发明作任何限制。凡是根据发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变化, 均仍属于本发明技术方案的保护范围内。

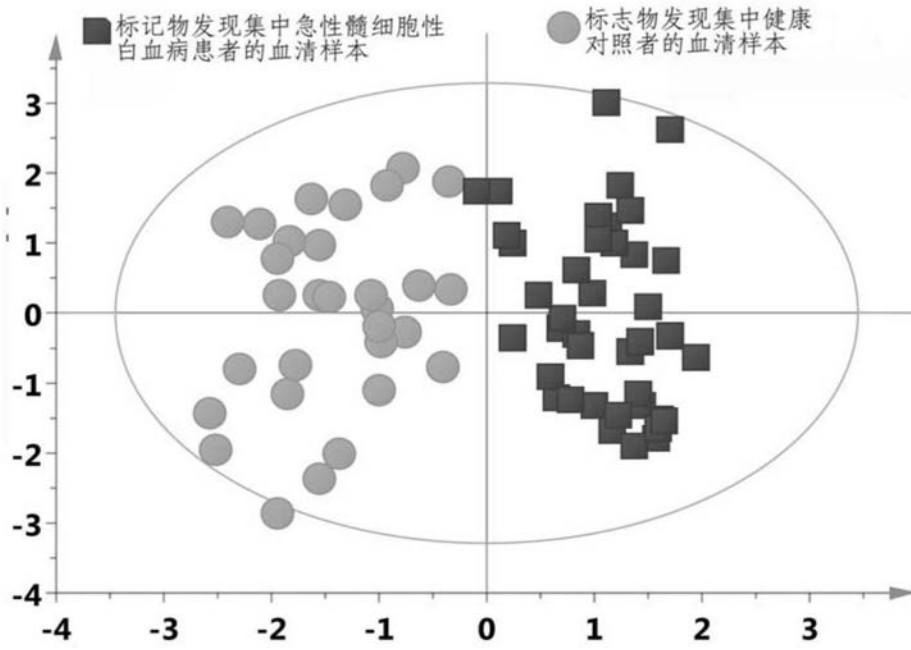


图1

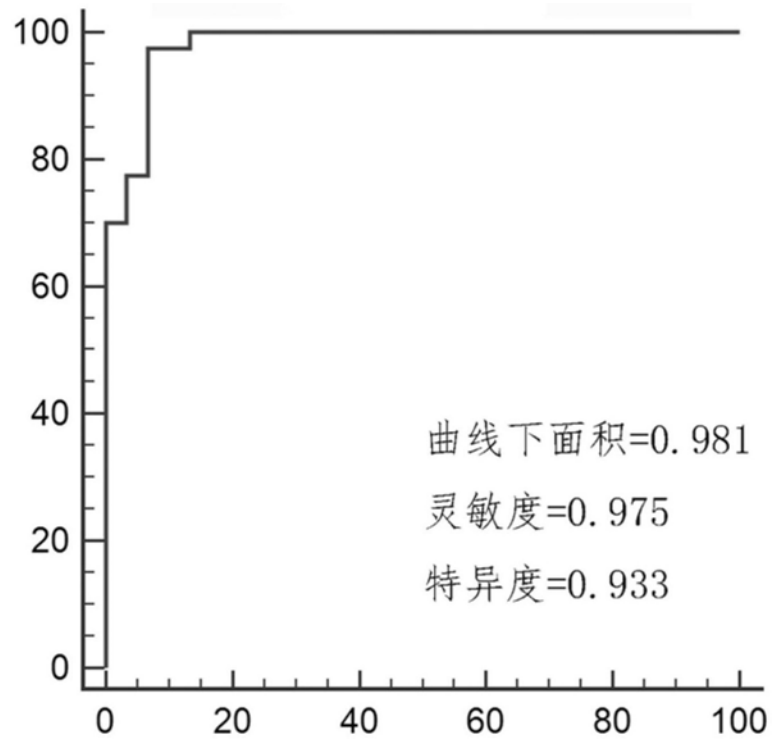


图2

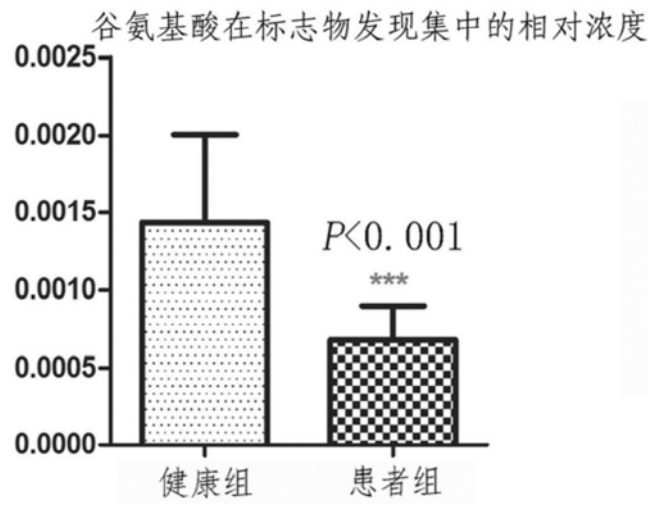


图3a

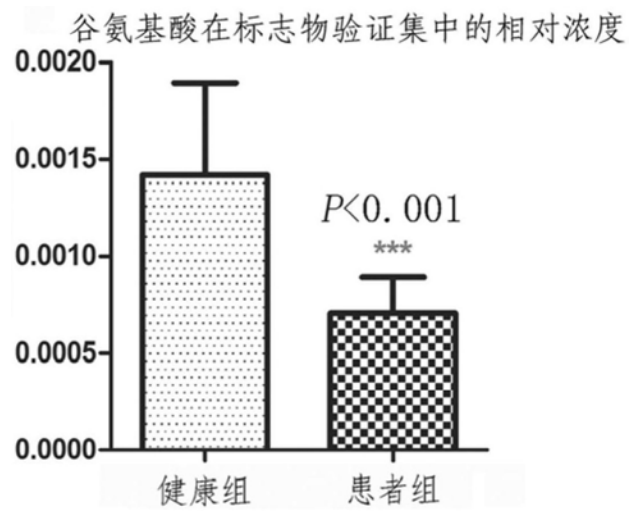


图3b

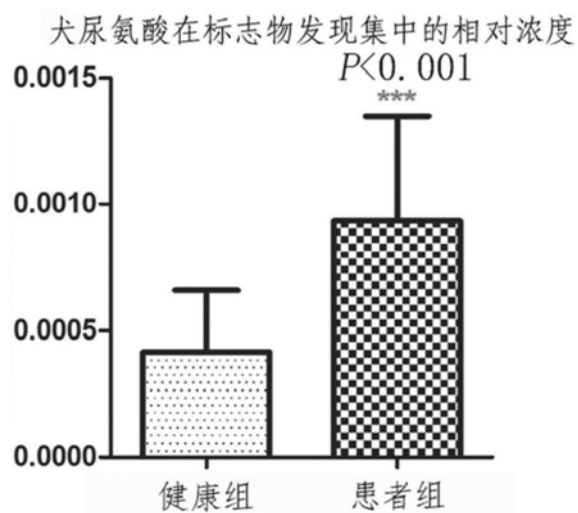


图4a

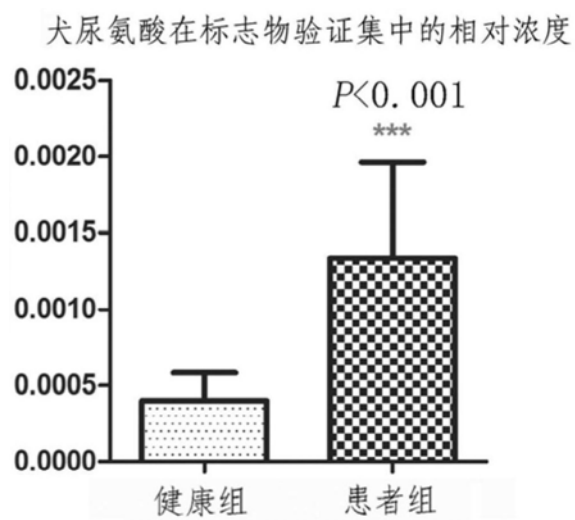


图4b

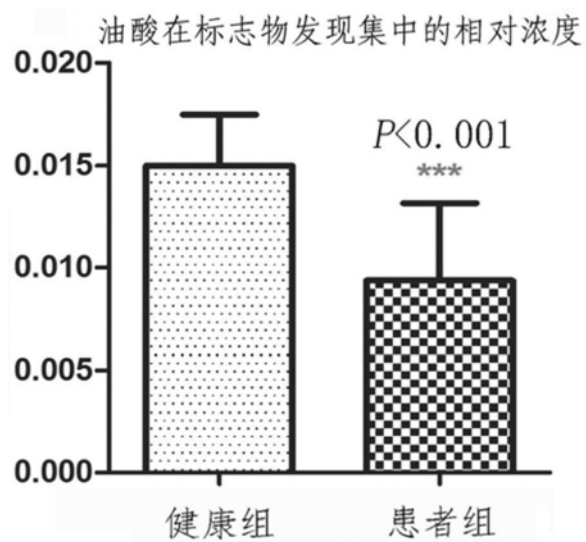


图5a

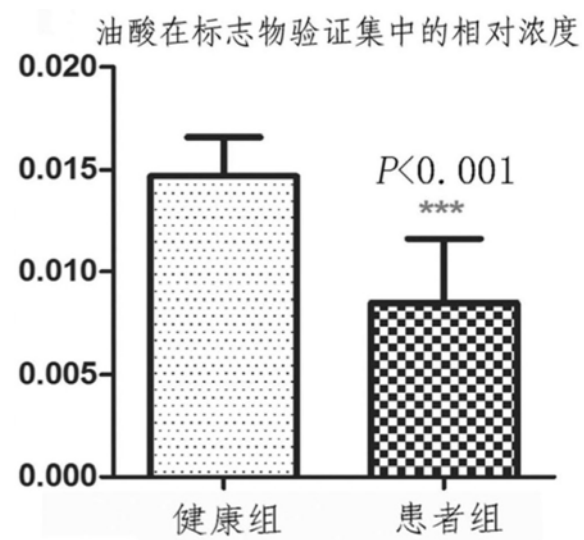


图5b

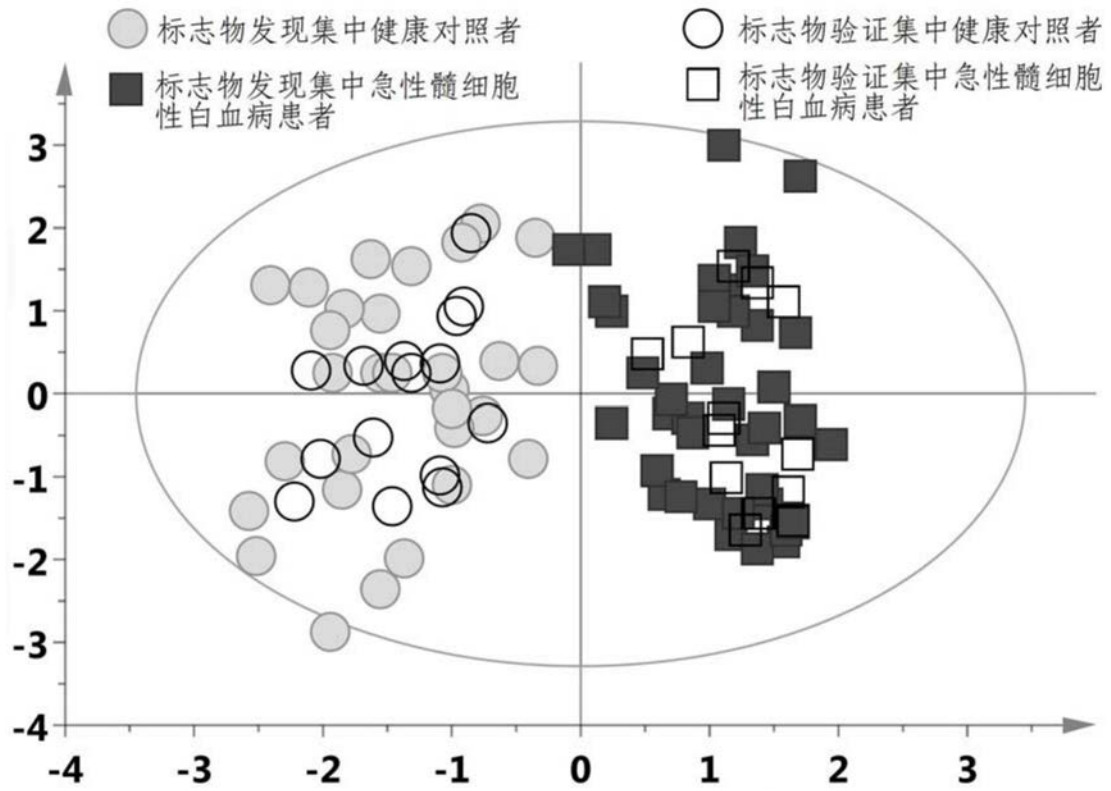


图6

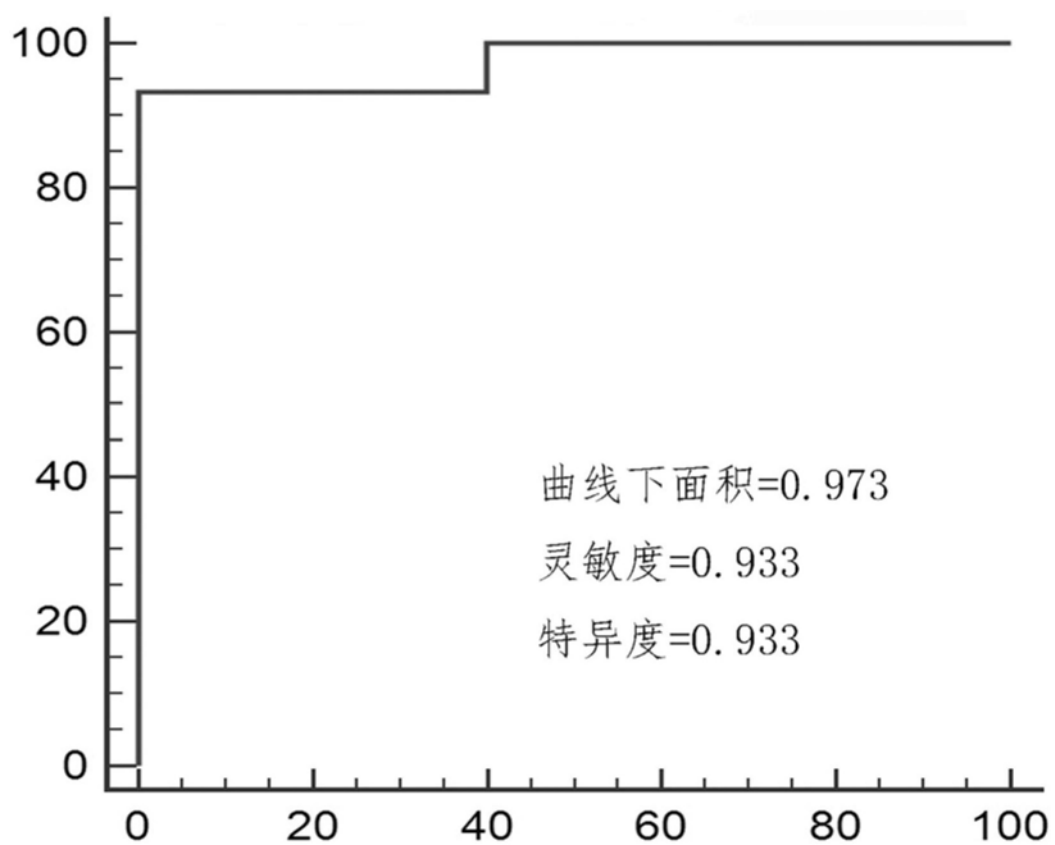


图7

专利名称(译)	一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法及其应用		
公开(公告)号	CN109633142A	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811575593.9	申请日	2018-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
[标]发明人	陈鹏 谭光国 张雅 吴剑维 张峰 王超丽 雷杰 赵广义 王雪娇		
发明人	陈鹏 谭光国 张雅 吴剑维 张峰 王超丽 雷杰 赵广义 王雪娇		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种急性髓细胞性白血病诊断模型的建立方法，该方法包括：一、收集血清；二、采用超高效液相色谱和质谱联用分析检测血清；三、分析急性髓细胞性白血病患者与健康对照者的血清谱图，确定生物标志物；四、确认生物标记物的化学信息；五、确认谷氨酸、犬尿氨酸、油酸为最优生物标记物并建立诊断模型；本发明还公开了一种急性髓细胞性白血病诊断模型的应用方法，将受试者的血清带入急性髓细胞性白血病诊断模型，经计算判断受试者是否患病。本发明得到的诊断模型准确高效，避免了对患者的侵袭性；本发明的应用方法取材简单易得，灵敏度高，能无创、高效、准确的区分急性髓细胞性白血病患者与健康者，适宜推广使用。

