



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107907610 A

(43)申请公布日 2018.04.13

(21)申请号 201711120960.1

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.11.14

G01N 33/96(2006.01)

(71)申请人 湖南省药品检验研究院(湖南药用
辅料检验检测中心)

地址 410001 湖南省长沙市八一路60号

(72)发明人 王蓉蓉 李子珊 陈子渊 林海
王湘波 欧阳杰湖 刘晓娟
闫美玲 陈萍

(74)专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责
任公司 43113

代理人 马强 周栋

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/72(2006.01)

G01N 30/86(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标
志物

(57)摘要

本发明公开了用于急性过敏反应豚鼠的血
清代谢生物标志物，所述生物标志物为溶血磷脂
酰胆碱类物质。致敏豚鼠和健康豚鼠的血清分别
与甲醇混合制成样品溶液，应用超高效液相色
谱-四级杆飞行时间串联质谱联用(UPLC-QTof/
MS)技术平台采集豚鼠的血清代谢谱，并将数据
导入EZinfo软件进行模式识别分析。致敏豚鼠的
血清与正常豚鼠相比，在溶血磷脂酰胆碱类
(lysoPC(16:0)、lysoPC(18:2)、lysoPC(18:0))
代谢物质水平上表现明显升高。由此可利用这类
物质的异常变化来判定豚鼠是否为过敏或正常。

1. 用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物,其特征在于,所述生物标志物为溶血磷脂酰胆碱类物质。
2. 如权利要求1所述的生物标志物,其特征在于,所述溶血磷脂酰胆碱类物质包括lysoPC(16:0)、lysoPC(18:2)和lysoPC(18:0)。
3. 溶血磷脂酰胆碱类物质在制备用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物中的应用。
4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述溶血磷脂酰胆碱类物质包括lysoPC(16:0)、lysoPC(18:2)和lysoPC(18:0)。

用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物

技术领域

[0001] 本发明属于分析化学和生物化学技术领域,具体涉及用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物。

背景技术

[0002] 过敏反应归属B型不良反应范畴,是一种与正常药理作用完全无关,受免疫调控的超敏反应,难以预测,发生率低,但死亡率高,约占总药物不良反应的5%~10%。通常所说的过敏反应大多指速发型过敏反应/I型过敏反应,是当已免疫机体再次接受相同变应原刺激时所产生的强烈的机体反应,通常由免疫原性的大分子物质或可与大分子载体结合的半抗原小分子物质引起。过敏原可刺激机体淋巴细胞产生IgE抗体,经循环系统与肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的IgE Fc受体(Fc ϵ RI)高亲和力结合,当相同过敏原再次进入致敏机体,与IgE结合后导致Fc ϵ RI偶联而引发肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒释放过敏介质,引发局部或全身反应。

[0003] 尽管药品出产前均需按照新药注册管理办法和相关的临床前安全性评价指南进行了致敏性检测,但是仍有不少在过敏实验中呈阴性的品种,投放临床后却出现了较多的过敏反应,甚至发生过敏性休克或死亡。反之,对部分已在临幊上引起过敏反应的产品进行过敏实验研究,却未得出阳性结果。这说明现行的致敏性评价模型用于中药注射剂致敏性评价尚存在一定的缺陷。目前各国采用的现行药品过敏反应检查方法,主要包括豚鼠主动全身过敏试验(ASA)和大鼠被动皮肤过敏试验(PCA)。以豚鼠主动全身过敏试验为例,该方法仅仅以观察豚鼠的体征症状来判断产品是否具有致敏性,观察指标单一、观察方法简单,主观性强、灵敏度不高。鉴于后基因时代出现的又一新型组学技术—代谢组学在毒理学评价中的独特优势,若结合此方法研究药物过敏,以其高通量、全景式的定性、定量分析平台能有效的提高检测的灵敏度和特异性,有助于寻找更加敏感的表征急性过敏反应的生物标志物。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服传统的急性过敏反应检测方法主观性强、灵敏度低等缺点,提出基于超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱联用平台的一组用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物,具有客观、灵敏、可靠等特点。

[0005] 本发明所述用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物为包括lysoPC(16:0)、lysoPC(18:2)和lysoPC(18:0)在内的溶血磷脂酰胆碱类物质。

[0006] 上述溶血磷脂酰胆碱类物质通过如下步骤寻找和分析:

[0007] (1)进行动物致敏实验并采集血清样本;

[0008] (2)将血清样本加入超高效液相色谱仪-四级杆飞行时间串联质谱仪进行检测,得到代谢指纹图谱;

[0009] (3)在MassLynx V4.1工作站中,采用MarkerLynx XS(SCN 678)软件对由 UPLC-

QToF/MS检测所得代谢指纹图谱中的原始数据(原始色谱峰)进行峰检测和峰匹配,提取由代谢物碎片的保留时间、质量数和相应的峰强度/峰面积组成的数据矩阵;

[0010] (4) 预处理的数据集采用Pareto标度法后导入EZinfo软件进行多元统计分析。数据的多元统计分析采用无监督的模式识别方法(如主成分分析,PCA)及有监督的模式识别方法(如偏最小二乘-判别分析,PLS-DA和正交校正-偏最小二乘-判别分析,OSC-PLS-DA)。分析结果以二维或三维得分图(scores plot)和载荷图(loadings plot)表示。根据变量投影重要性(variable importance in projection,VIP)值和相关系数绝对值(|p(corr)|)对影响较大的变量进行筛选,使用Masslynx软件中的i-FIT功能,计算可能的分子式,以此作为候选标志物。然后再利用HMDB、KEGG、METLIN等专业数据库进一步鉴定可能的潜在生物标记物信息,结合MS/MS图谱推测其结构。

[0011] 其中,步骤(1)所述动物为豚鼠;

[0012] 步骤(1)中动物致敏实验及血清样本采集的具体步骤为(动物致敏方案是在2010版药典附录中“过敏反应检查法”的基础上对致敏剂量进行筛选后确定的方案;采血手段是经预实验后确定的眼眶采血):

[0013] 将豚鼠随机分为空白对照组、急性过敏反应组;急性过敏反应组腹腔注射牛血清白蛋白致敏,连续致敏三次,每次间隔一日,所述牛血清白蛋白浓度为8—12mg/mL,优选为10mg/mL,每只豚鼠每次注射0.8—1.2mL,优选为1.0mL;于首次致敏后第14天和第21天脚趾静脉注射牛血清白蛋白进行激发,所述牛血清白蛋白浓度为40—60mg/mL,优选为50mg/mL,每只豚鼠每次注射2.0mL;空白对照组同步注射与急性过敏反应组同等体积的生理盐水;分别于致敏前、第三次致敏后、第一、二次攻击前后对豚鼠进行眼眶采血,离心,取上层血清样本保存备用,所述第一次攻击指首次致敏后第14天脚趾静脉注射牛血清蛋白进行激发,第二次攻击指首次致敏后第21天脚趾静脉注射牛血清白蛋白进行激发;在进行步骤(2)的检测前,将血清样本与甲醇混合,甲醇与血清样本的体积比为3—4.5:1,优选为4:1,静置、4℃,13000r/min离心15min,转移上清液置样品瓶内,待测。

[0014] 步骤(1)中,在致敏期间,每日观察动物的症状,激发后即刻至30min,观察每只动物的体征表现,并根据全身致敏性评价标准分级。急性过敏反应评价标准如下:“-”:过敏反应阴性(正常);“+”:过敏反应弱阳性(躁动、竖毛、颤抖、搔痒);“++”:过敏反应阳性(喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪);“+++”:过敏反应强阳性(呼吸困难、哮鸣音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、旋转、潮式呼吸);“++++”:过敏反应极强阳性(死亡)。

[0015] 速发型变态反应又可称为急性过敏反应(anaphylaxis),主要由IgE介导。当过敏原进入机体后可刺激机体淋巴细胞产生IgE抗体,经循环系统与肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的IgE Fc受体(Fc ϵ RI)高亲和力结合,当相同过敏原再次进入致敏机体后,与连接在肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的2个或以上IgE分子交联搭桥,引起Fc ϵ RI聚集并发生构型改变或由于两相邻受体分子之间的相互作用使酶活化,导致肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒释放组胺等活性介质,扩张血管、增加毛细血管通透性,从而引发局部或全身过敏反应。因此,IgE和组胺被认为是急性过敏反应中重要的生化指标,也可采用ELISA法检测豚鼠血清中总IgE和组胺水平来作为判断急性过敏反应的辅助依据。具体步骤如下:从4℃冰箱取出试剂盒后室温平衡30min。将倍比稀释的标准品(IgE:5,2.5,1.25,0.625,0.312,0.156 μ g/ml,Histamine:50,25,12.5,6.25,3.125,1.56ng/ml)和待测样品(IgE水平检测使用待测样

品的5倍稀释液,Histamine水平检测使用待测样品的原液)各0.1ml依次加入预包被有抗豚鼠IgE(或Histamine)抗体的96孔板中,空白孔加入等量的样品稀释液作为对照。加样时样品尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。酶标板加上盖,37℃反应90min后弃去液体,洗涤2次后拍干。将新配制的生物素抗体工作液按每孔0.1ml依次加入,37℃反应60min,甩干后洗涤3次,每次浸泡1min左右。弃去洗液,将板内液体拍干,接着加入0.1ml新配制的ABC工作液,37℃反应30min,同上洗板5次。加入0.1ml TMB显色工作液后37℃避光反应,待标准品的前3-4孔有明显的梯度蓝色,后3-4孔差别不明显时(大约15min),即加入0.1ml TMB终止液终止反应(此时蓝色立转为黄色)。30min内采用多功能酶标仪在450nm测定各孔吸光度(OD值)。根据标准曲线和稀释倍数求出血清中总IgE(或Histamine)浓度。

[0016] 步骤(2)中采用Waters Acquity UPLC液相系统,色谱柱:Waters Acquity BEH(C₁₈ 2.1×50mm,1.7μm);柱温:40℃;进样量:3μL;流速:0.3mL/min;流动相:0.1%甲酸水溶液-乙腈;梯度洗脱程序为:0~4min:B 5%→30%;4~6min:B 30%→40%;6~8min:B 40%→40%;8~12min:B 40%→60%;12~18min:B 60%→95%;18~20min:B 95%→95%;20~21min:B 95%→5%;21~23min:B 5%→5%,其中A表示0.1%的甲酸水溶液,B表示乙腈;

[0017] 步骤(2)中质谱检测采用Waters Acquity Xevo G2QToF四极杆飞行时间串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)和Lockspray源。在正离子模式检测下,毛细管电压3.5kV,锥孔电压45V,离子源温度110℃,脱溶剂气温度330℃,锥孔气流量50L/h,脱溶剂气流量600L/h、萃取锥孔4.0V;每0.2s采集1次谱图;数据采集范围:50~1000m/z;为确保质荷比的准确性和重现性,应用2ng/μL的亮氨酸-脑啡肽溶液(Leucine enkephalin,[M+H]⁺=556.2771Da)作为LockSpray进行实时单点校正质量数,流速5 μL/min。定期质量轴校准采用甲酸钠的异丙醇溶液。

[0018] 步骤(3)中由于原始谱图存在信号量大、噪音复杂及峰缺失等问题,因而在模式识别分析之前,还应先进行峰强度归一化、去噪、缺失值修正等处理后,再对数据矩阵进行分析和筛选。

[0019] 步骤(3)中MarkerLynx软件的参数设置如下:函数:1;起始时间:0.60min;结束时间:23.00min;最小质量数:50.00Da;最大质量数:1000.00Da;质量数范围:0.05Da;不用相对保留时间;5%峰高处峰宽:15.00seconds;峰与峰的基线噪音:50.00;不进行平滑处理;峰强度阈值:10counts;质量窗口:0.05Da;保留时间窗口:0.20min;噪音消除水平:6.00;采用同位素峰数据。

[0020] 步骤(4)中Pareto标度法是介于单位方差标度法(UV)和均值中心法(Center)之间的一种变量缩放方式,在一定程度上既可降低超强响应可能淹没较弱响应的影响,又不至于放大系统偏差,为本例最佳标度化方法。

[0021] 步骤(4)中所述,PCA是一种非监督的数据分析方法,它采用线性投影将原来的多个变量空间转换成一组新的正交变量,用几个主要的成分(PC)来描述数据的特征,这些成分是原始变量的线性组合,而且这些主成分之间垂直相交保证了从高维向低维空间投影时,尽可能多的保留有用信息。PLS-DA是一种有监督的多维数据压缩的方法,将多维数据在压缩前先按照需要寻找的差异因素分组,这样可以找到与用于分组的因素最相关的变量,而减少一些其他因素的影响。偏最小二乘法也是一种线性空间变换的方法,但区别于主成分分析,PCA的主成分投影方向是偏差最大的方向,而PLS是同时对样本数据矩阵X和相应变

量Y同时进行分解，并力图建立它们之间的回归关系。若将模式识别中的已知类别响应设为0或1，偏最小二乘也可用于模式识别，称为偏最小二乘判别分析(PLS-DA)；正交信号校正技术(OSC)是常用的滤噪技术，通过滤掉与类别判断不相关的变量信息，将与类别判断有关的变量保留，从而使类别判别分析能集中在这些与类别的判别相关的变量上，提高了判别的准确性。在分析前使用正交信号校正(OSC)可以筛去一部分与分组无关的矩阵，滤过后得到的矩阵再进行PLS-DA分析，可以更好地用于鉴别造成组间聚集和离散的主要差异变量。通过OSC-PLS-DA建模，主要以第14天的样本为重点研究对象对其UPLC/MS数据变量进行分析及差异代谢物的寻找。

[0022] 步骤(4)中所述，得分图用来获得对样品分类的信息，载荷图用来获得对分类有贡献的变量及其贡献大小。根据OSC-PLS-DA模型中V1P(variable importance in projection)值>3.00的变量作为可能差异代谢物。通过结合S-plot中的协方差p和相关系数p(corr)信息对它们的可靠性进行验证，以相关系数绝对值(|p(corr)|)>0.75为界将和分类相关性低的变量剔除，剩余变量再结合One-way ANOVA($P<0.05$)筛选出两组间有明显差异的潜在生物标志物，再使用Masslynx软件中的i-FIT功能，计算其可能的分子式。通过搜索HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)、KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)、METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)、PubChem(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)、LMD(<http://www.lipidmaps.org/>)等数据库，结合MS/MS二级质谱图，同时参考相关文献，从而初步确定差异代谢物名称及结构。

[0023] 与现有技术相比，本发明的有益效果为：

[0024] (1)与目前应用较为广泛的免疫化学试验和体外细胞试验相比，本发明的生物标志物为开急性过敏反应检测指标提供了有力的依据；

[0025] (2)克服了传统的主动全身过敏试验和被动皮肤过敏试验主观性强、灵敏度低等缺点，应用代谢组学技术，所得结果更为灵敏、可靠；

[0026] (3)国内首次将代谢组学技术应用于过敏反应研究也是将新兴技术应用于药品监管的一次创新性尝试。

附图说明

[0027] 图1为正离子模式下OPLS-DA分析结果载荷图；

[0028] 图2为溶血磷脂酰胆碱类物质(lysoPC(16:0)、lysoPC(18:2)、lysoPC(18:0))的裂解途径；

[0029]

具体实施方式

[0030] (1)将清洁级豚鼠(250~350g)随机分为空白对照组、急性过敏反应组。急性过敏反应组用牛血清白蛋白(BSA)作为阳性致敏剂，给予动物10mg/mL牛血清白蛋白，1.0mL/只，腹腔注射，隔日一次，连续3次；于首次致敏后第14天(第一次攻击)和第21天(第二次攻击)脚趾静脉注射50mg/mL(2.0mL/只)进行激发。空白组给予同等体积的生理盐水；

[0031] (2)分别于致敏前、第三次致敏后、第一、二次攻击前后30min对豚鼠进行眼眶采血，室温静置10min,4℃,3000rpm离心10min,取上层血清样品于-80℃冰箱中保存备用；

[0032] (3) 将室温解冻后的血清样本与4倍体积的甲醇混合, 涡旋震荡30s, 4℃静置5min后以13000rpm离心15min, 转移200 μ L上清至样品瓶, 进入超高效液相色谱仪-四级杆飞行时间串联质谱仪进行检测, 得到代谢指纹图谱; 其中, 液相色谱条件为: 采用Waters Acquity UPLC超高效液相色谱仪(美国Waters公司); 色谱柱: Waters Acquity BEH C₁₈(2.1 × 50mm, 1.7 μ m); 柱温: 40℃; 进样量: 3 μ L; 流速: 0.3mL/min; 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱(0~4min: B 5%→30%; 4~6min: B 30%→40%; 6~8min: B 40%→40%; 8~12min: B 40%→60%; 12~18min: B 60%→95%; 18~20min: B 95%→95%; 20~21min: B 95%→5%; 21~23min: B 5%→5%;)。质谱条件为: 采用Xevo G2 QToF四级杆飞行时间串联质谱仪(美国Waters公司); 电喷雾离子源采用正离子模式(ESI⁺)检测; 毛细管电压(Capillary voltage) 3.5kV, 锥孔电压(Sampling cone) 45V, 离子源温度(Source temperature) 110℃, 脱溶剂气温度(Desolvation temperature) 330℃, 锥孔气流量(Cone gas flow) 50L/h, 脱溶剂气流量(Desolvation gas flow) 600L/h、萃取锥孔(Extraction cone) 4.0V; 每0.2s采集1次谱图; 数据采集范围: 50~1000m/z; 为确保质量的准确性和重复性, 应用亮氨酸-脑啡肽溶液(Leucine enkephalin, [M+H]⁺=556.2771Da)作为锁定质量(Lockmass)。

[0033] (4) 采用MarkerLynx软件对代谢指纹图谱中的原始数据(原始色谱峰)进行峰检测和峰匹配, 提取出由代谢物碎片的保留时间、质量数和相应的峰强度/峰面积组成的数据矩阵, 以便进行后续的多维统计分析。具体参数设置为: 函数(Function): 1; 起始时间(Initial Retention Time): 0.60; 结束时间(Final Retention Time): 23.00; 最小质量数(Low Mass): 100.00; 最大质量数(High Mass): 1000.00; 质量数范围(Mass Tolerance): 0.05Da; 是否用相对保留时间(Use relative retention time): No; 5%峰高处峰宽(Peak Width at 5% Height): 15.00seconds; 峰与峰的基线噪音(Peak-to-Peak Baseline Noise): 50.00; 是否进行平滑处理(Apply Smoothing): No; 峰强度阈值(Intensity threshold): 10counts; 质量窗口(Mass window): 0.05; 保留时间窗口(Retention time window): 0.20; 噪音消除水平(Noise elimination level): 6.00; 是否采用同位素峰数据(Deisotope data): Yes;

[0034] (5) 预处理的数据集采用Pareto标度法后导入EZinfo软件进行多元统计分析。数据的多元统计分析采用无监督的模式识别方法(如主成分分析, PCA)及有监督的模式识别方法(如偏最小二乘-判别分析, PLS-DA和正交校正-偏最小二乘-判别分析, OSC-PLS-DA)。分析结果以二维或三维得分图和载荷图(见图1)表示。得分图用来获得对样品分类的信息, 载荷图用来获得对分类有贡献的变量及其贡献大小。根据变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)值和相关系数绝对值(|p(corr)|)对影响较大的变量进行筛选, 使用Masslynx软件中的i-FLD功能, 计算可能的分子式, 以此作为候选标志物。然后再利用HMDB、KEGG、METLIN等专业数据库进一步鉴定可能的潜在生物标记物信息, 结合MS/MS图谱推测其结构(见图2)。

[0035] 结果表明, 致敏豚鼠的血清与正常豚鼠相比, 在溶血磷脂酰胆碱类(lysoPC(16:0)、lysoPC(18:2)、lysoPC(18:0))代谢物质水平上表现明显升高。由此可利用这类物质的异常变化来判定豚鼠是否为过敏或正常。由此可知, 溶血磷脂酰胆碱类物质可用于制备用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物。

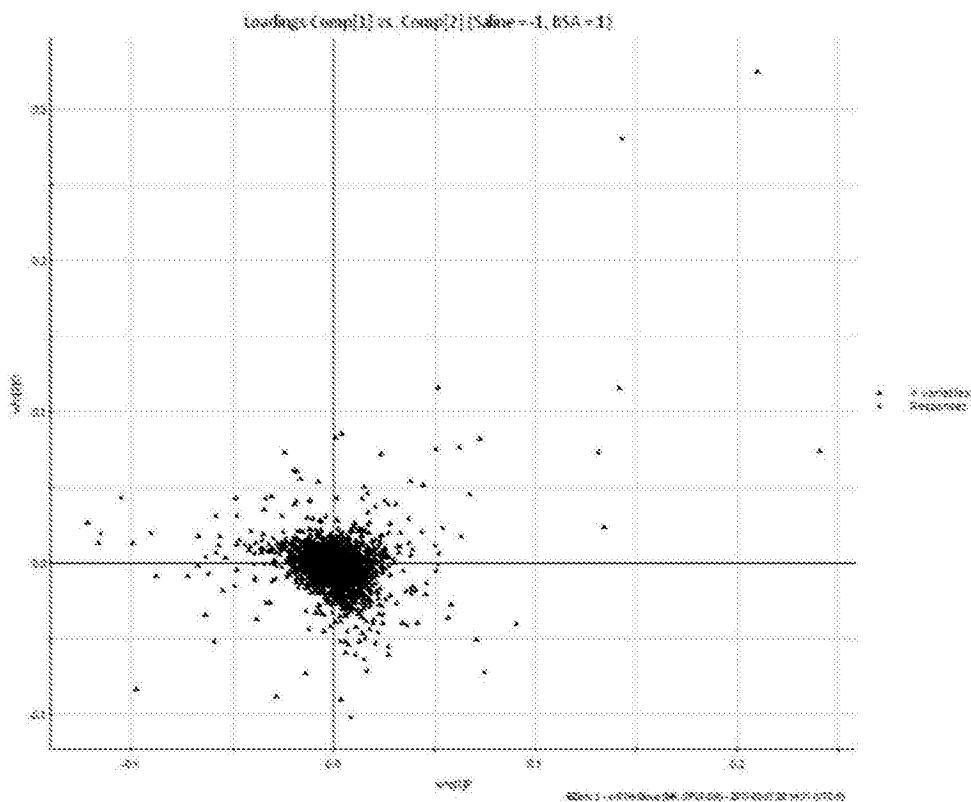


图1

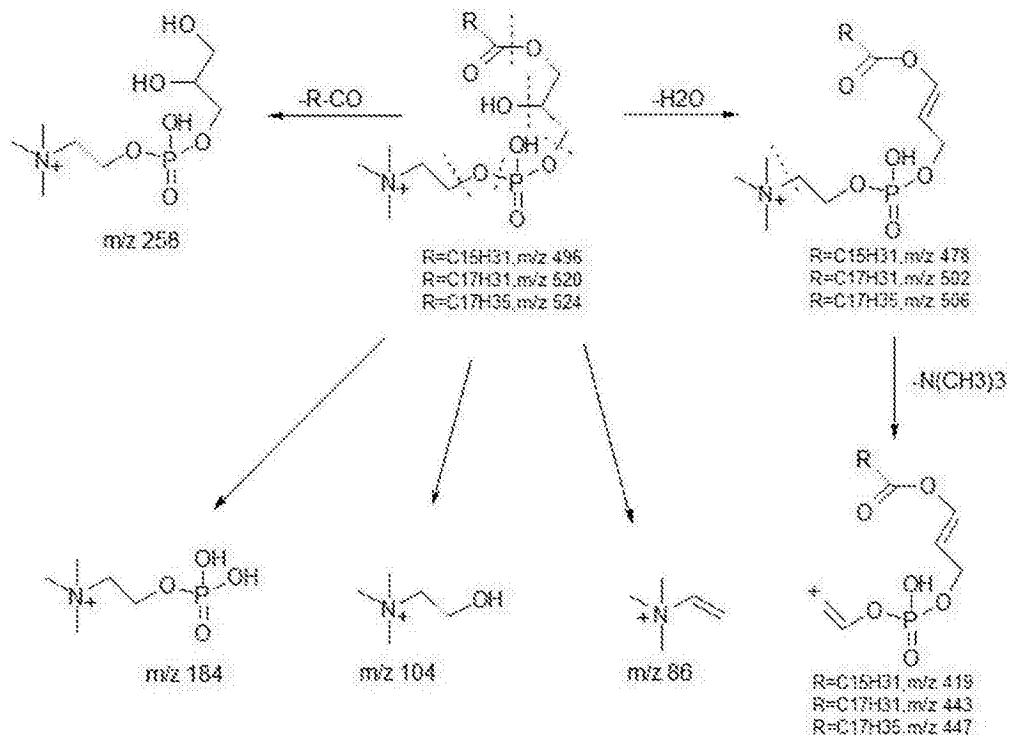


图2

专利名称(译)	用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物		
公开(公告)号	CN107907610A	公开(公告)日	2018-04-13
申请号	CN201711120960.1	申请日	2017-11-14
[标]发明人	王蓉蓉 李子珊 陈子渊 林海 王湘波 欧阳杰湖 刘晓娟 闫美玲 陈萍		
发明人	王蓉蓉 李子珊 陈子渊 林海 王湘波 欧阳杰湖 刘晓娟 闫美玲 陈萍		
IPC分类号	G01N30/02 G01N30/72 G01N30/86 G01N33/535 G01N33/96		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/72 G01N30/8634 G01N30/8686 G01N33/535 G01N33/96 G01N2570/00		
代理人(译)	马强 周栋		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了用于急性过敏反应豚鼠的血清代谢生物标志物，所述生物标志物为溶血磷脂酰胆碱类物质。致敏豚鼠和健康豚鼠的血清分别与甲醇混合制成样品溶液，应用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱联用(UPLC-QTof/MS)技术平台采集豚鼠的血清代谢谱，并将数据导入EZinfo软件进行模式识别分析。致敏豚鼠的血清与正常豚鼠相比，在溶血磷脂酰胆碱类(lyoPC(16:0)、lyoPC(18:2)、lyoPC(18:0))代谢物质水平上表现明显升高。由此可利用这类物质的异常变化来判定豚鼠是否为过敏或正常。

