



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109342717 A

(43)申请公布日 2019.02.15

(21)申请号 201811099501.4

(22)申请日 2018.09.20

(71)申请人 山东大学深圳研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区高新区
南区虚拟大学园

(72)发明人 舒强 王云情 孙姣 隋雅梦
郭伟 王飞英 李栋 李国盛

(74)专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 李桂存

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

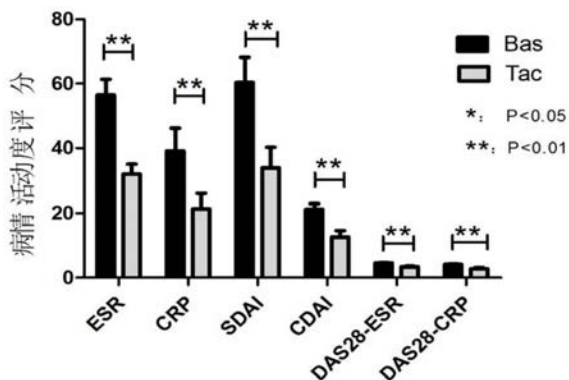
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

一种类风湿关节炎新型生物标记物及其筛选方法

(57)摘要

本发明提供了一种新型生物标记物，Galectin-9，它通过参与RA患者的炎症进程及滑膜血管生成而调节RA发生机制，能反映RA患者炎症、免疫细胞失调和血管生成三方面的水平；而且血浆Galectin-9浓度可以快速准确衡量RA患者病情活动度。同时本发明也提供了其筛选方法，从各个方面验证Galectin-9可以作为RA患者的新型生物标记物。



1. 一种类风湿关节炎新型生物标记物,其特征在于,为Galectin-9,简称为Gal-9。
2. 一种权利要求1所述的生物标记物的筛选方法,其特征在于,包括:
 - (1) 收集RA患者关节肿痛症状体征、血沉和C反应蛋白等临床资料计算出治疗前后RA患者病情活动度指标;
 - (2) ELISA 方法检测血浆中Gal-9和炎症因子的水平;
 - (3) 流式检测技术测定外周血T细胞各亚群上Gal-9的表达。
3. 根据权利要求2所述的筛选方法,其特征在于,步骤(1)中所述的RA患者,为符合1987年诊断标准的RA成年患者;所述的病情活动度指标为:以他克莫司为主的治疗方案使用前,患者DAS28、SDAI、CDAI指标中的一种或多种。
4. 根据权利要求2所述的筛选方法,其特征在于,所述的步骤(2)筛选方案如下:收集符合1987年诊断标准,他克莫司治疗前后的RA患者及健康对照者的血浆,ELISA实验方法检测受试者血浆中Gal-9的浓度。
5. 根据权利要求2所述的筛选方法,其特征在于,所述的步骤(3)筛选方案如下:收集符合1987年诊断标准的RA患者,设为病例组,同时选取年龄、性别相匹配的健康人群组成对照组,取适量外周血,加入CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD4⁻CD8⁻的双阴T细胞(DN)、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}调节T细胞(Treg)的标记抗体,流式细胞术检测T亚群的比例及各T亚群细胞内Gal-9的表达水平,所得数据使用FlowJo软件分析。
6. 根据权利要求2所述的筛选方法,其特征在于,还包括:收集符合1987年诊断标准的RA组患者,给予以他克莫司为主的治疗方案,收集并计算患者治疗前后疾病活动度指标、流式细胞术及ELISA方法检测用药前和用药后12w的外周血T亚群及血浆Gal-9的浓度,使用不同统计学方法进行组间比较及相关分析。
7. 一种权利要求1所述的生物标记物的应用,其特征在于,用于衡量RA患者的病情活动度,反映RA患者T细胞功能、炎症因子水平和血管生成的活跃程度。

一种类风湿关节炎新型生物标记物及其筛选方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种新型类风湿关节炎生物标记物及其筛选方法。

背景技术

[0002] 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种危害人类健康的常见自身免疫性疾病,至今仍无根治方法。既往研究证实RA患者存在T细胞亚群失衡而导致的免疫失调;同时血液循环中活化的炎症因子如肿瘤坏死因子(TNF- α)等促进全身炎症反应。RA的基本病理改变是关节滑膜炎,受累关节滑膜中有大量淋巴和单核细胞、炎症因子浸润。另一方面,增生的滑膜中有丰富的新生血管即血管翳出现,血管内皮生长因子(VEGF)高表达。全身和局部炎症反应与滑膜血管生成相互促进,不断加重RA患者骨侵蚀,导致骨和软骨破坏关节残疾。

[0003] 因此在RA的发病机制中血管生成与免疫细胞失调、炎症反应互相促进三者环环相扣恶性循环,破译并阻断三者的偶联机制对RA达标治疗非常重要。理想的RA生物标记物也应该能反映炎症、免疫细胞失调和血管生成三方面的变化。

[0004] RA患者可以出现类风湿因子(RF)和抗CCP等特异的自身抗体,为疾病诊断提供明确依据;但这些抗体水平与病情活动度无关,不能评估和指导治疗。

[0005] 目前临床常用的RA病情活动度评估方法均是基于患者受累关节的肿胀、疼痛数目的临床指标和血沉、C反应蛋白这两个炎症指标的组合,基本能反映患者的病情。但是后者对于特殊亚型及患者合并感染时的则无能为力。

[0006] Gal-9(Galectin-9)作为半乳凝素家族的一员,广泛表达于几乎所有种类的细胞上,具有影响细胞增殖分化、炎症、免疫调节及肿瘤形成的多种功能。既往认为其通过受体Tim-3在自身免疫病中发挥免疫负调控的作用。而近年研究发现Gal-9具有促进先天免疫调节、调控细胞增殖和肿瘤发生多方面功能。

发明内容

[0007] 针对上述问题,本发明提供了一种新型生物标记物,Galectin-9,通过参与RA患者的炎症进程及滑膜血管生成而调节RA发生机制,反映炎症、免疫细胞失调和血管生成三方面的水平;而且血浆Galectin-9水平可以快速准确衡量RA的病情活动度,为RA患者提供一种新型生物标记物,同时本发明也提供了其筛选方法。

[0008] 一种类风湿关节炎新型生物标记物,为Galectin-9,简称为Gal-9。

[0009] 一种上述生物标记物的筛选方法,包括:

(1)收集RA患者关节肿痛症状体征、血沉和C反应蛋白等临床资料计算出治疗前后RA患者病情活动度指标;

(2) ELISA 方法检测血浆中Gal-9和炎症因子的水平;

(3)流式检测技术测定外周血T细胞各亚群上Gal-9的表达。

[0010] 步骤(1)中所述的RA患者,为符合1987年诊断标准的RA成年患者;所述的病情活动度指标为:以他克莫司为主的治疗方案使用前后,患者DAS28、SDAI、CDAI指标中的一种或多种。

[0011] 所述的步骤(2)筛选方案如下:收集符合1987年诊断标准,他克莫司治疗前后的RA患者及健康对照者的血浆,ELISA实验方法检测受试者血浆中Gal-9的浓度。

[0012] 所述的步骤(3)筛选方案如下:收集符合1987年诊断标准的RA患者,设为病例组,同时选取年龄、性别相匹配的健康人群组成对照组,取适量外周血,加入CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD4⁻CD8⁻的双阴T细胞(DN)、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}调节T细胞(Treg)的标记抗体,流式细胞术检测T亚群的比例及各T亚群细胞内Gal-9的表达水平,所得数据使用FlowJo 软件分析。

[0013] 所述的生物标记物的筛选方法,还包括:收集符合1987年诊断标准的RA组患者,给予以他克莫司为主的治疗方案,收集并计算患者治疗前后疾病活动度指标、流式细胞术及ELISA方法检测用药前和用药后12w的外周血T亚群及血浆Gal-9的浓度,使用不同统计学方法进行组间比较及相关分析。

[0014] 上述的生物标记物的应用,用于标记RA患者的病情活动度、反映RA患者T细胞功能、炎症因子水平和血管生成的活跃程度。

[0015] 说明书附图

图1为RA患者他克莫司治疗前后病情活动度指标的变化。

[0016] 图2为RA患者与健康对照(HC)血浆Gal-9水平的差异及RA患者治疗前后血浆Gal-9的变化;其中2A: RA(n=105)患者血浆Gal-9水平较HC组(n=52)明显升高,两组采用独立样本T检验方法比较,**: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$; 2B: RA患者他克莫司治疗前后血浆Gal-9下降,治疗前后数据采用配对T检验方法比较,##: $P < 0.01$,#: $P < 0.05$,0w、12w与HC数据采用独立样本T检验方法比较,**: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$;

图3为RA患者血浆中Gal-9的表达水平和病情活动度指标的相关性;其中3A:RA患者血浆中Gal-9浓度与DAS28的相关性;3B:RA患者血浆中Gal-9浓度与SDAI的相关性;3C:RA患者血浆中Gal-9浓度与CRP的相关性;3D:RA患者血浆中Gal-9浓度与CDAI的相关性。

[0017] 图4为RA患者各T细胞亚群上Gal-9的表达荧光强度与HC组的比较;其中图4A:LY细胞Gal-9,图4B:CD3⁺T亚群Gal-9,图4C:CD4⁺T亚群Gal-9,图4D: Treg亚群Gal-9,图4E:CD8⁺T亚群Gal-9, 两组采用独立样本T检验方法比较,**: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$ 。

[0018] 图5 为RA治疗前后外周血T细胞亚群Gal-9表达率及荧光强度的变化及与HC的差异;图5A为各T细胞亚群Gal-9的表达率,图5B为各T细胞亚群Gal-9的表达荧光强度,治疗前后数据采用配对T检验方法比较,##: $P < 0.01$,#: $P < 0.05$,0w、12w与HC数据采用独立样本T检验方法比较,**: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$ 。

[0019] 图6为RA患者外周血T亚群中Gal-9与VEGF表达的相关性;图6A:CD4⁺T亚群Gal-9,图6B:CD8⁺T亚群Gal-9,图6C: Treg亚群Gal-9,图6D:DNT亚群Gal-9,采用spearman相关分析,**: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$ 。

[0020] 本发明的有益效果:

1. Galectin-9反映RA患者的疾病活动程度

通过ELISA方法及流式检测技术,发现RA患者血浆和T细胞亚群上表达的Gal-9水平与

其DAS28、SDAI、CDAI等疾病活动度指标有强正相关关系,结果具有统计学意义。

[0021] 2. Galectin-9是反映药物疗效的生物学标记物

通过分析,发现中重度RA患者经过以他克莫司为主的强化治疗后,Galectin-9 水平明显改变,证明Galectin-9是反映药物疗效的灵敏生物学标记物。

[0022] 3. Galectin-9参与RA患者过度的血管生成和炎症免疫反应

血浆和T细胞上的Galectin-9水平与血浆和T 亚群上的VEGF密切相关、与血浆TNF- α 水平及Treg比例正相关,(没有数据可以吗)表明其参与RA患者过度的血管生成,同时为免疫炎症反应和血管生成偶联的关键因子。

具体实施方式

[0023] 实施例1 RA患者和健康对照的一般资料采集及病情活动度评价

选取符合入组标准RA组患者,给予以他克莫司为主的治疗方案,所有入组RA患者均随访至12w,采集患者治疗基线(0w)及治疗后(12w)的WBC计数、血沉(ESR)和C反应蛋白(CRP)数值,记录患者的用药史及后续治疗情况,计数双侧膝关节、近端指间关节、掌指关节、腕关节、肘关节、肩关节共28个关节中疼痛和肿胀的关节数目即T28和SW28,请患者填写健康评价调查表(HAQ),全面评估自身整体的疾病和健康状况,并在疼痛模拟标度尺(VAS,0~10分)上标出近来能代表自己总体感觉的位置,即病人总体评分(PGA)。另外,医生也要对患者的疾病和健康状况进行VAS评估,即医生的总体评分(PHGA)。

[0024] DAS28是评价RA疾病活动程度和判断用药效果的一个包含主观和客观因素的很实用的指标,我们所采用的 $DAS28=0.56 \times \text{SQRT}(T28) + 0.28 \times \text{SQRT}(SW28) + 0.7 \times \text{LN}(ESR) + 0.014 \times \text{PHGA}$ 。

[0025] CDAI为临床疾病活动性指数, $CDAI = T28 + SW28 + PGA + PHGA$ 。

[0026] SDAI为简化的疾病活动性指数, $SDAI = T28 + SW28 + PHGA + CRP$ 。

[0027] 根据以上公式计算RA患者的DAS28、CDAI和SDAI数值。

[0028] 同时收集在我院健康查体中心进行体检且年龄、性别相匹配的健康对照者,并记录该组成员的WBC计数,淋巴细胞比率,根据其体检结果排除糖尿病、高血压、高脂血症、肝炎等慢性病史,排除血、尿常规和肝肾功能异常者。

[0029] 结果显示:RA患者他克莫司治疗前后炎症指标CRP、ESR,临床症状指标T28、SW28、PGA、PHGA,疾病活动度指标DAS28、CDAI、SDAI均有明显下降(见图1)。

[0030] 实施例2 ELISA 方法检测血浆中Gal-9和炎症因子的水平

采集RA患者0w和12w以及HC组的EDTA抗凝外周血标本,离心后取上层血浆,置于EP管中-80 $^{\circ}$ 冻存,ELISA方法检测所有受试者血浆中Gal-9和炎症因子的水平,因VEGF、IL-6、TNF- α 均为成品套盒,本实施案例主要介绍ELISA检测血浆中Gal-9水平的方法。具体实施方案如下:

(1)材料准备:

取出试剂盒内物品,放置室温。

[0031] 1)包被抗体:使用1 ml PBS配置180 ug/ml的Galectin-9抗体,在2-8 $^{\circ}$ 可以保存60天,-20~-70 $^{\circ}$ 可以保存6月。使用无载体蛋白的PBS溶解包被抗体并配置工作浓度1 ug/ml。

[0032] 2)检测蛋白:使用1ml 试剂稀释液配置生物素结合Galectin-9抗体,在2-8 $^{\circ}$ 可以

保存60天,-20~-70°可以保存6月。使用试剂稀释液溶解至工作浓度100 ng/ml。

[0033] 3) 标准品:每个小瓶包含160 ng/ml的重组Galectin-9抗体,使用0.5 ml试剂稀释液配置。在稀释前确保轻柔搅拌至少15 min。-70°可以保存2月以上。第7个标准曲线使用2倍试剂稀释液稀释,最高标准品的浓度为10000 pg/ml。

[0034] 4) Streptavidin-HRP :首次使用后2-8°保存6月,不要结冰。使用Reagent Diluent溶解至工作浓度。

[0035] (2) 溶液制备:按照试剂盒说明书制备清洗液、试剂稀释液和底物液。

[0036] (3) 实验步骤

1) 准备ELISA微孔板:

①使用试剂盒中给予的无载体蛋白的PBS液稀释包被抗体至工作浓度1 ug/ml。立即取100 ul稀释的包被抗体至96孔板上,密封板子并室温过夜(24 h)孵育。

[0037] ②吸空微孔内容物并使用全自动洗板机清洗三遍。洗完后将清洗液倾倒干净。

[0038] ③加300 ul 试剂稀释液封板,室温孵育至少1 h。孵育完成后再使用洗板机清洗3遍。这样实验的微孔板便制备完成。

[0039] 2) 实验步骤

①设计好样品分布,加100ul标准品入标准品孔和副孔,加100ul样本入样本孔,使用粘附膜封闭并室温孵育2 h。

[0040] ②按照上述步骤b洗板3次。

[0041] ③加100ul 稀释好的检测抗体入每个微孔,使用粘附膜封闭并室温孵育2h。

[0042] ④洗板3次。

[0043] ⑤加100ul 稀释好的Streptavidin-HRP,封闭微孔板并室温孵育20min,此过程注意避光。

[0044] ⑥洗板3次。

[0045] ⑦加100ul 辣根过氧化物酶,室温避光孵育20min。

[0046] ⑧加50ul 终止液,轻拍板子使充分混匀。

[0047] ⑨确定光密度,分光光度计上450nm读取吸光值,参考波长为540-570nm。

[0048] 后续收集的HC和RA的标本均按上述方法进行,并使用SPSS软件分析所有受试者血浆中Gal-9和炎症因子的水平的相关数据。

[0049] 结果表明:RA组血浆中Gal-9浓度均明显高于HCs组(见图2A),并且RA组患者经过药物治疗后,血浆中的Gal-9浓度下降($P < 0.05$)(见图2B);RA组血浆Gal-9浓度与实施案例1中病情活动度指标DAS28、CDAI、SDAI均有强正相关关系(见图3)。

[0050] 实施例3 流式细胞术测定外周血T细胞亚群上Gal-9的表达

采集RA患者0w和12w以及HC组的外周血标本,采用流式细胞术方法检测所有受试者外周血T细胞亚群Gal-9表达率,具体实施方案如下:

(1)取受试者EDTA抗凝全血100ul于流式管中;其中1'号为空白对照管,2'号为全阴对照管,3'~10'号为单阳对照管,11'~12'号为单阴对照管,其中1'~12'号管中样本均为13'号HC的全血标本。

[0051] (2)按胞内实验抗体加样表(见表1)所示加入CD3、CD4、CD8、CD25、CD127、CD14抗体和同型对照抗体(Ig)。室温避光染色20 min;

表1 胞内实验抗体加样方法

抗体 或 Ig	空 白 对 照	全 阴 对 照	单阳对照							单阴对照		检测样 本	
			CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺	CD127 ⁺	Gal- 9 ⁺	V ⁺	Gal- 9 ⁻	V ⁻	HC	RA
(μ l)	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'
CD3	Ig	2.5	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	2.5	2.5	2.5	2.5
CD4	Ig	Ig	2.5	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	2.5	2.5	2.5	2.5
CD8	Ig	Ig	Ig	2.5	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	2.5	2.5	2.5	2.5
CD25	Ig	Ig	Ig	Ig	2.5	Ig	Ig	Ig	Ig	2.5	2.5	2.5	2.5
CD127	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	2.5	Ig	Ig	Ig	2.5	2.5	2.5	2.5
Gal-9	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	5	Ig	Ig	Ig	5	5	5
V	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	Ig	5	5	Ig	5	5	5

Ig:同型对照抗体; V:VEGF

(3)加入IC Fixtion Buffer 100 μ l,室温避光固定20 min;

(4)加入PBS 3ml,1500 r/min离心5 min洗涤;

(5)弃上清,加Permeabilization Wash Buffer 100 μ l,充分混匀,按表所示加入Gal-9、VEGF(表中简称V)和同型对照抗体各5 μ l,室温避光孵育20 min;

(6)加入PBS 3 ml,1500 r/min离心5 min洗涤;

(7)弃上清,加入PBS 350 μ l重悬细胞,并使用滤膜过滤;

(8)采用流式细胞仪调节光补偿,并设定胞内染色模板,保存。

[0052] 后续收集的HC和RA的标本均按上述单阴对照和检测样本的抗体加样方法进行,并使用FlowJo 7.6软件分析所有受试者外周血T细胞亚群Gal-9表达率及荧光强度。

[0053] 结果表明:

(1)RA组与HCs组对比,RA组总淋巴细胞(Ly)、CD3⁺T、CD4⁺T、Treg、CD8⁺T各亚群Gal-9表达荧光强度均高于HC组(见图4),且RA组患者经过药物治疗后,外周血CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T亚群上Gal-9表达率(见图5A)和荧光强度(见图5B)均有显著下降,统计学有意义。

[0054] (2)相关分析发现,RA组多个T细胞亚群上Gal-9的表达率与实施案例1中病情活动度指标DAS28、SDAI、SDAI均有正相关关系(见表2)

表2. RA患者外周血T亚群Gal-9与疾病活动度的相关性

	Ly-Gal ⁺	CD3 ⁺ Gal ⁺	CD4 ⁺ Gal ⁺	CD8 ⁺ Gal ⁺	Treg ⁺ Gal ⁺	DNT-Gal ⁺
DAS28	0.169	0.137	0.217*	0.325**	0.215*	0.191
SDAI	0.215*	0.223*	0.281**	0.279**	0.288**	0.234*
CDAI	0.199*	0.205*	0.222*	0.381**	0.208*	0.223*

采用 Spearman相关性检验,**:P<0.01,*: P<0.05

(3)RA组患者各T细胞亚群上Gal-9与血浆VEGF的表达相关分析发现,CD4⁺T、CD8⁺T,

Treg、DNT各亚群Gal-9与VEGF均有正相关关系(见图6)。

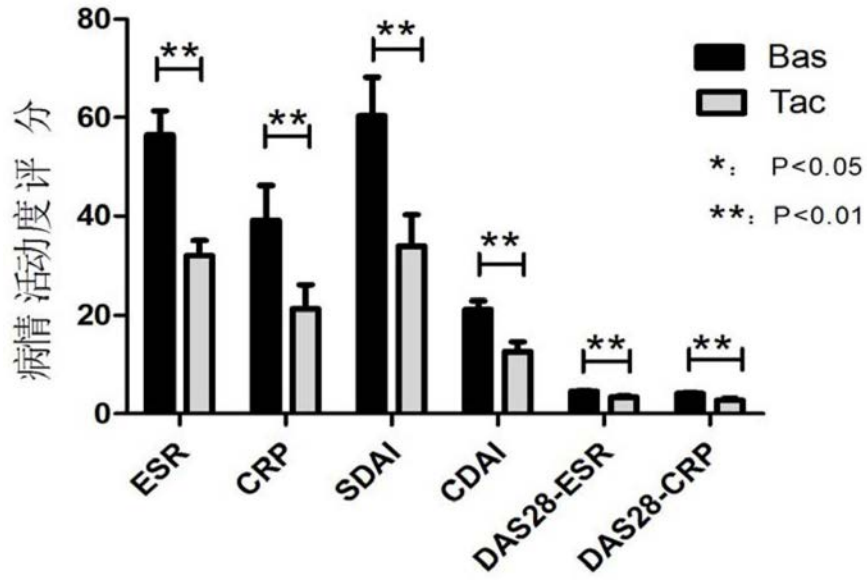


图1

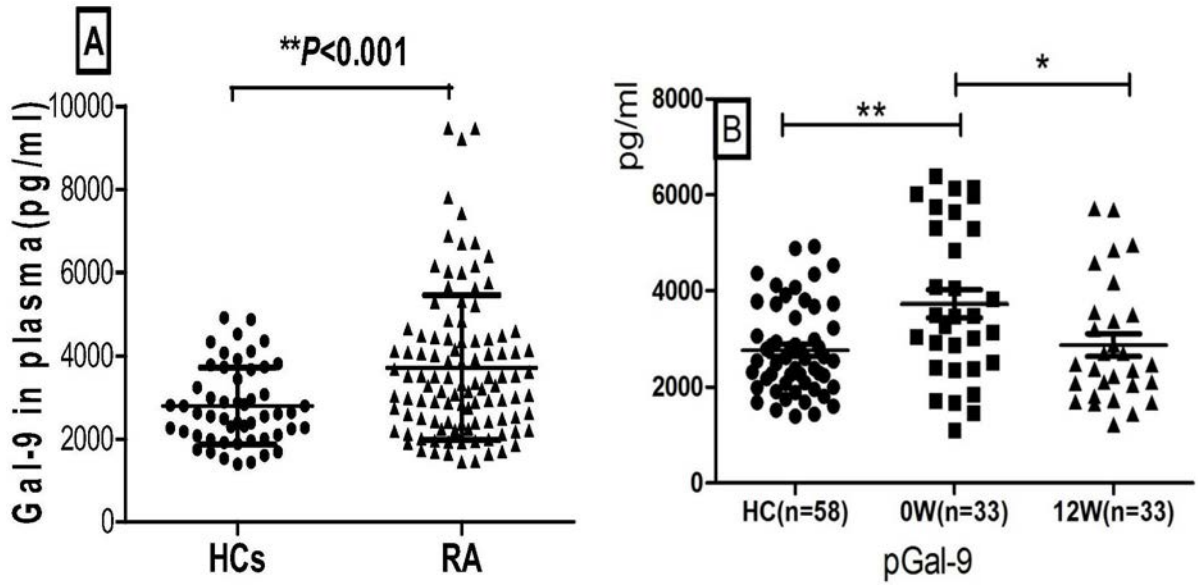


图2

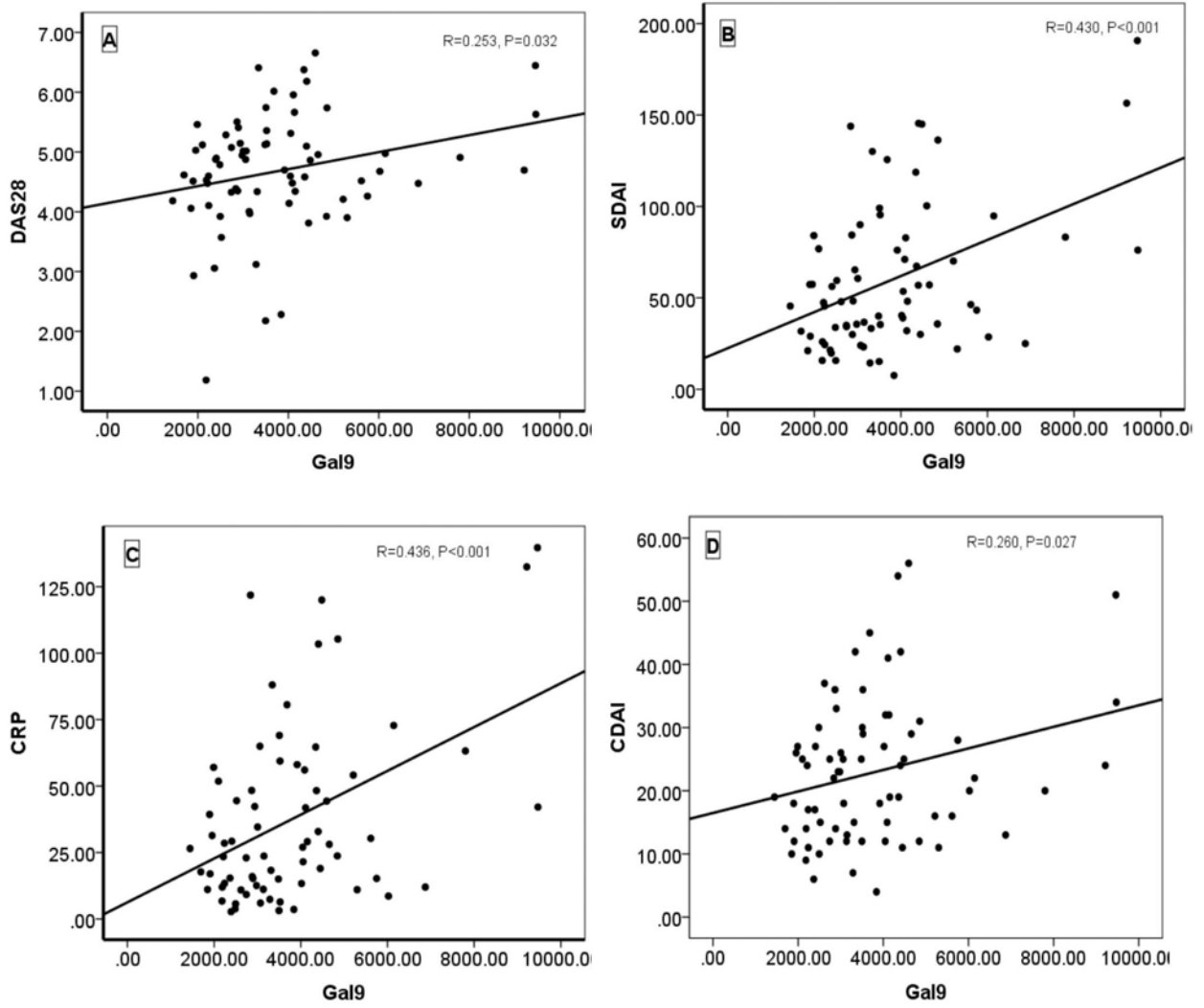


图3

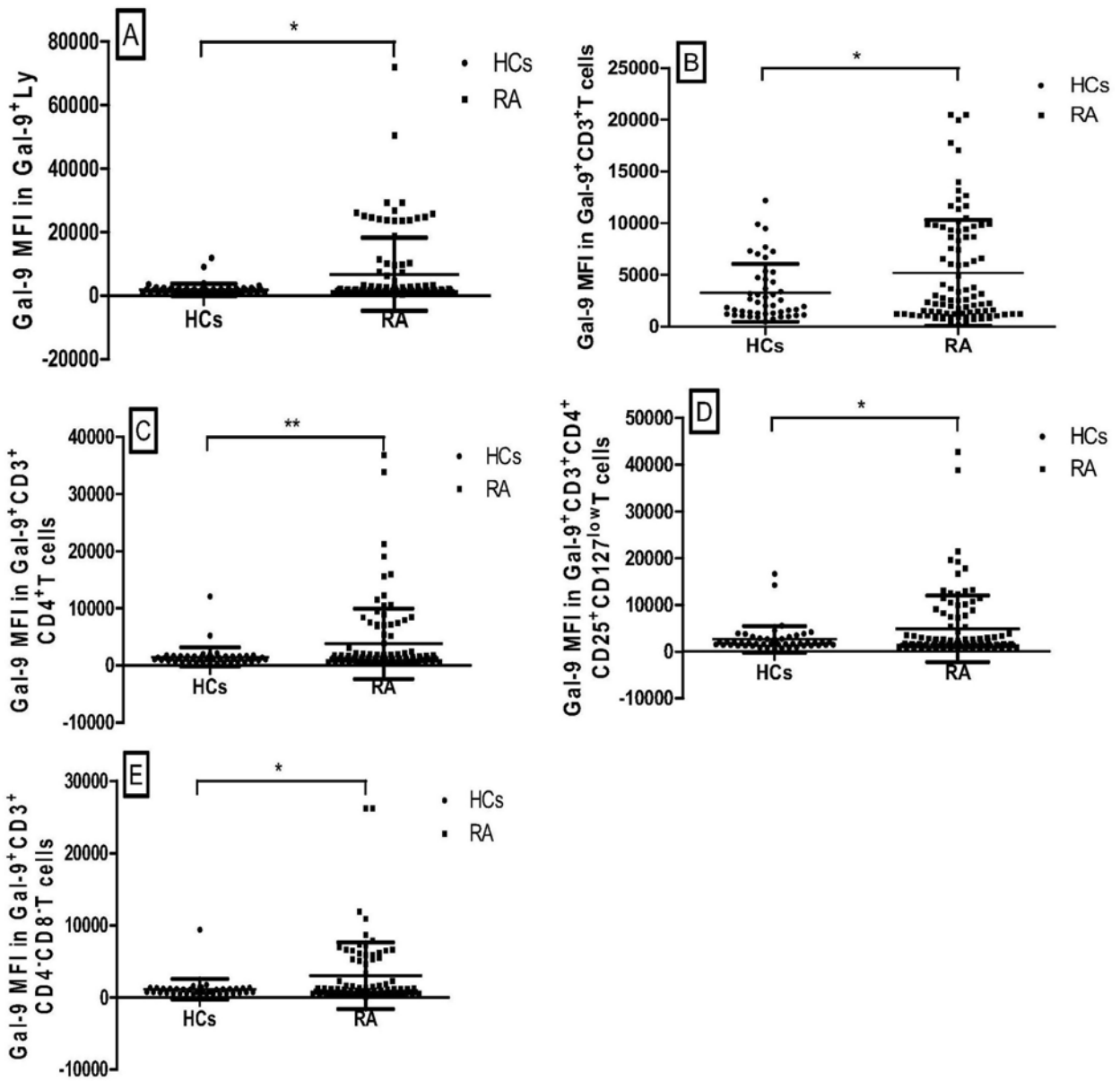


图4

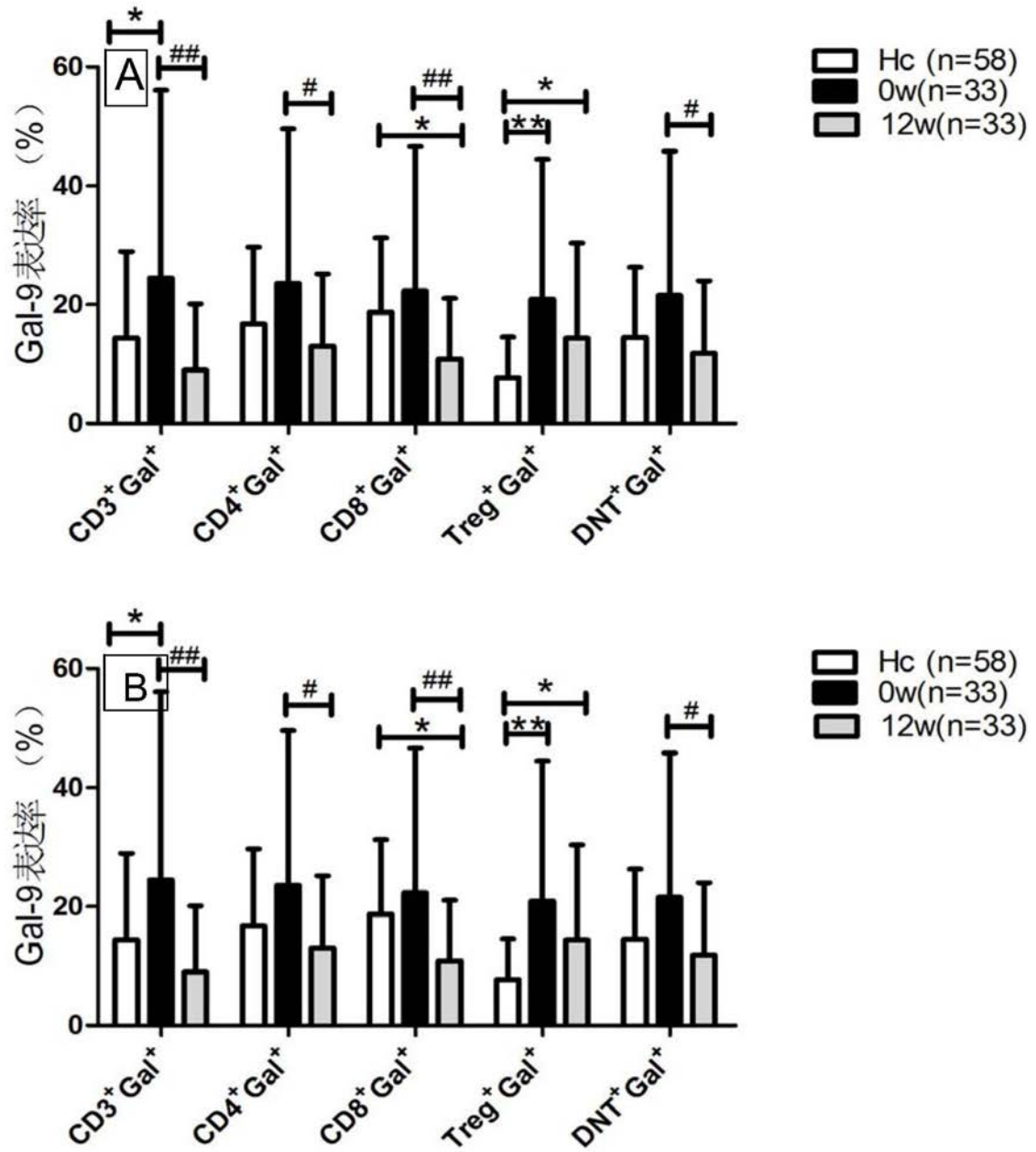


图5

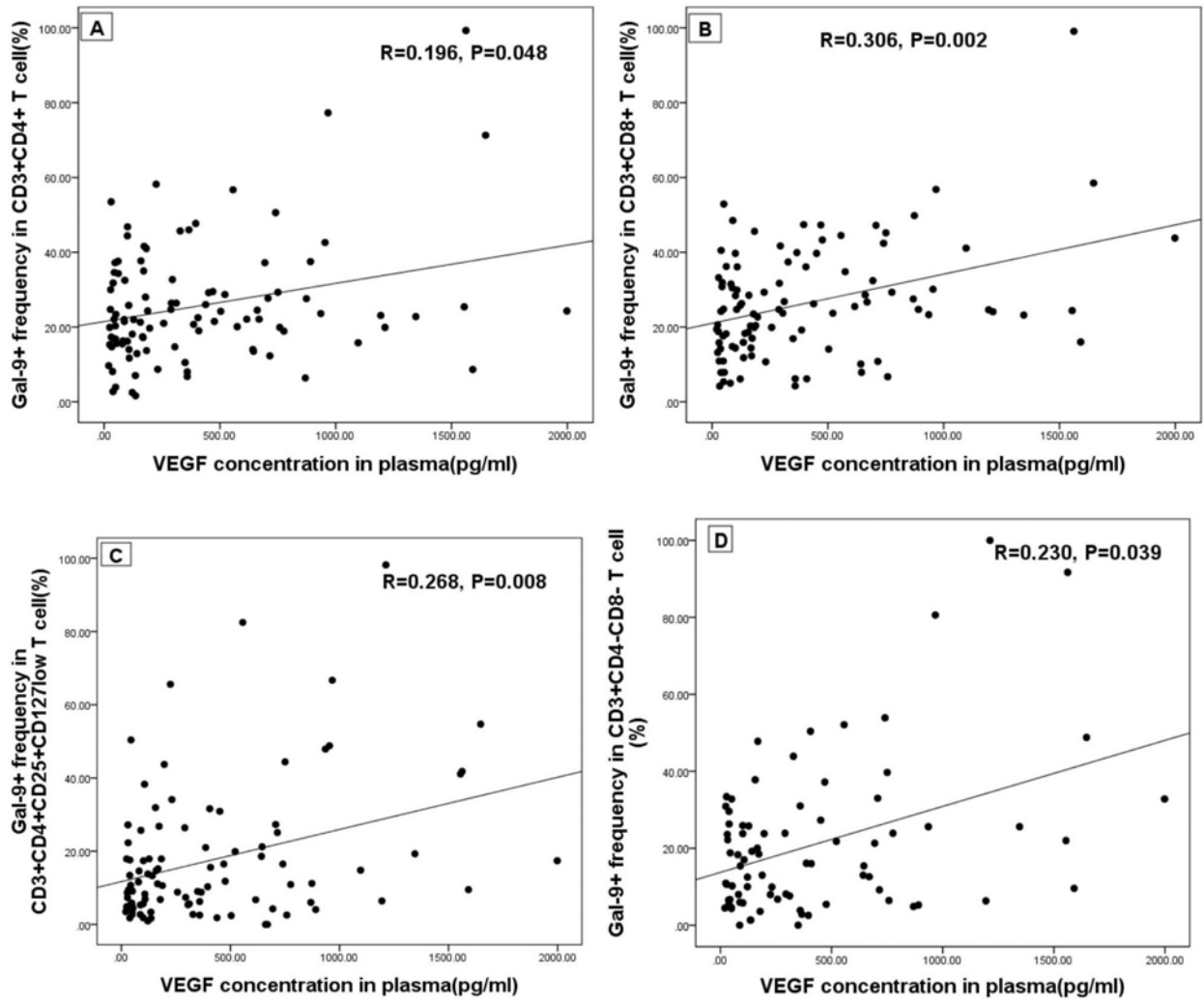


图6

专利名称(译)	一种类风湿关节炎新型生物标记物及其筛选方法		
公开(公告)号	CN109342717A	公开(公告)日	2019-02-15
申请号	CN201811099501.4	申请日	2018-09-20
[标]发明人	舒强 王云情 孙姣 隋雅梦 郭伟 王飞英 李栋 李国盛		
发明人	舒强 王云情 孙姣 隋雅梦 郭伟 王飞英 李栋 李国盛		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N2800/102		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种新型生物标记物，Galectin-9，它通过参与RA患者的炎症进程及滑膜血管生成而调节RA发生机制，能反映RA患者炎症、免疫细胞失调和血管生成三方面的水平；而且血浆Galectin-9浓度可以快速准确衡量RA患者病情活动度。同时本发明也提供了其筛选方法，从各个方面验证Galectin-9可以作为RA患者的新型生物标记物。

