



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106370856 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610675178.5

G01N 30/72(2006.01)

(22)申请日 2016.08.16

(71)申请人 北京师范大学

地址 100000 北京市海淀区新街口外大街
19号

(72)发明人 高友鹤 吴建强 李逊斗

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限
公司 11314

代理人 程伟 程云

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

肺纤维化的尿液蛋白标志物及其在诊断和
预后中的用途

(57)摘要

本发明涉及肺纤维化的尿液蛋白标志物及其在诊断和预后中的用途。具体而言,本发明涉及利用肺纤维化疾病模型和质谱分析获得的尿蛋白标志物在人肺纤维化疾病早期诊断、病程监测及疗效评估中的用途,所述尿蛋白标志物包括胶原 α -1(I)链、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、NSFL1辅因子P47、泛素羧基末端水解酶同工酶L1等。

1. 选自以下的蛋白的鉴定试剂在制备用于诊断和/或预后肺纤维化疾病的试剂中的用途:

胶原 α -1 (I) 链、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、NSFL1辅因子P47、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、血管紧张素原、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、酸性哺乳动物几丁质酶、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、催乳素诱导蛋白、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂KazaI型、血浆铜蓝蛋白、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、 α -2-HS-糖蛋白、尿调节素、4-羟基苯双加氧酶、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、激肽释放酶-1、及其组合。

2. 选自以下的蛋白的鉴定试剂在制备用于受试者的肺纤维化早期诊断的试剂中的用途:

胶原 α -1 (I) 链、NSFL1辅因子P47、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、及其组合。

3. 选自以下的蛋白的鉴定试剂在制备用于监测受试者的肺纤维化严重程度的试剂中的用途:

血管紧张素原、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、尿调节素、激肽释放酶-1、催乳素诱导蛋白、4-羟基苯双加氧酶;胶原 α -1 (I) 链、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、血浆铜蓝蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂KazaI型、及其组合。

4. 选自以下的蛋白的鉴定试剂在制备用于受试者的肺纤维化疗效评估的试剂中的用途:

小白蛋白 α 、钙结合蛋白、纤蛋白-5、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、及其组合。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中:

所述鉴定试剂是质谱鉴定试剂、抗体或其抗原结合片段,优选所述抗体是单克隆抗体;优选地,所述肺纤维化是指特发性肺纤维化。

6. 根据权利要求2所述的用途,其中:

相较于健康对照,胶原 α -1 (I) 链和/或NSFL1辅因子P47的表达水平降低指示所述受试者存在肺纤维化的早期损伤;

相较于健康对照,选自以下的蛋白的表达水平提高指示所述受试者存在肺纤维化的早期损伤:波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸

合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、及其组合。

7. 根据权利要求3所述的用途,其中:

选自以下的蛋白的表达水平提高指示所述受试者肺纤维化进展:血管紧张素原、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、尿调节素、激肽释放酶-1、催乳素诱导蛋白、4-羟基苯双加氧酶、及其组合;

选自以下的蛋白的表达水平降低指示所述受试者肺纤维化进展:胶原 α -1(I)链、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、血浆铜蓝蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal型、及其组合。

8. 根据权利要求4所述的用途,其中:

相较于治疗之前,选自以下的蛋白的表达水平提高指示所述受试者肺纤维化治疗的有效性:小白蛋白 α 、纤蛋白5、钙结合蛋白、及其组合;

相较于治疗之前,选自以下的蛋白的表达水平降低指示所述受试者肺纤维化治疗的有效性:酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、及其组合。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的用途,其中所述的表达水平是在所述受试者尿液样本中测定的。

10. 一种用于诊断和/或预后肺纤维化疾病的试剂盒或芯片,其包含选自以下的蛋白的鉴定试剂:

胶原 α -1(I)链、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、NSFL1辅因子P47、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、血管紧张素原、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、酸性哺乳动物几丁质酶、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、催乳素诱导蛋白、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal型、血浆铜蓝蛋白、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、 α -2-HS-糖蛋白、尿调节素、4-羟基苯双加氧酶、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、激肽释放酶-1、及其组合;

所述鉴定试剂是质谱鉴定试剂、抗体或其抗原结合片段,优选所述抗体是单克隆抗体;

所述诊断和/或预后选自:肺纤维化的早期诊断、肺纤维化疗效的评估、监测受试者的肺纤维化严重程度、及其组合。

肺纤维化的尿液蛋白标志物及其在诊断和预后中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及临床医学；具体而言涉及人肺纤维化相关的尿蛋白标志物。具体而言，本发明涉及利用肺纤维化大鼠疾病模型和质谱分析蛋白组学技术获得的人肺纤维化疾病诊断、病情监测及疗效评估相关的尿液蛋白标志物的用途。

背景技术

[0002] 尿液蛋白质组学在疾病标志物研究中具有重要意义。生物标志物是与病理生理过程相关的可监测的变化，可用于诊断疾病、监测病程、预测疾病预后和评估治疗效果等。

[0003] 尿液是理想的生物标志物来源，可以无创性的大量获得。相对其他体液，尿液背景值低、蛋白稳定具有更小的动态范围。最重要的是，尿液没有稳态的机制能够富集机体内的各种变化，这些变化就是潜在的疾病标志物。同时，稳态机制的缺乏也决定了尿液在疾病的早期诊断上具有很大的前景（参见Gao Y H. Urine--an untapped goldmine for biomarker discovery. *Sci China. Life Sci*, 2013, 56 (12): 1145）。

[0004] 尿液蛋白质组作为一种快速发展的分析工具，旨在建立一种新颖的无创的“液体活检”（Liquid biopsy）诊断方法。“液体活检”在尿液里挖掘疾病特异的生物标志物，部分替代器官穿刺检查。尿液蛋白质已成为科学家及临床医生关注的重要研究方向，具有重要的科学意义和巨大的临床应用前景。

[0005] 特发性肺脏纤维化是一种慢性、进展性和致死性的肺脏疾病。流行病学的研究表明，近年来特发性肺纤维化的发病率呈逐年升高的趋势。

[0006] 由于缺乏有效的治疗措施，特发性肺脏纤维化诊断后的平均生存期仅为3-5年，严重威胁患者的健康（参见King, T. E., Pardo, A., Selman, M., Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* 2011, 378, 1949-1961）。目前临床上对纤维化疾病的诊断尤其是早期诊断仍然面临很多挑战。尽管器官穿刺活检能够提供很大的诊断帮助，但活检本身也存在一定缺陷。因此，亟需开发无创的生物标志物，以部分替代穿刺活检用于纤维化疾病的诊断。

[0007] 同时，肺脏纤维化的发病机制还没有完全清楚，并且就诊的患者多处于疾病的中晚期，治疗效果不佳，严重影响患者生命质量。早期诊断后及时治疗可能是未来纤维化治疗的方向。纤维化的治疗效果取决于是否可以早期诊断。尿液反映病理改变更早期、更敏感，所以可能是攻克纤维化的突破口。药物不是对所有患者都有效的，通过检测尿液中标志物的变化来监测药物的疗效对于及时调整治疗方案具有重要的临床意义。

发明内容

[0008] 鉴于本领域的上述需求，根据本公开的一些实施方式，提供了蛋白的鉴定试剂在制备用于诊断和/或预后肺纤维化疾病的试剂中的用途，其中所述的蛋白选自以下任一项或其组合：

[0009] 胶原 α -1 (I) 链、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子

NHE-RF2 (Na⁺/H⁺exchanger regulator cofactor2)、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、NSFL1辅因子P47、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、血管紧张素原、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、酸性哺乳动物几丁质酶、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、催乳素诱导蛋白、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal型、血浆铜蓝蛋白、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、 α -2-HS-糖蛋白、尿调节素、4-羟基苯双加氧酶、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、激肽释放酶-1。

[0010] 在另一个实施方式中,提供了选自以下的蛋白的鉴定试剂在制备用于受试者的肺纤维化早期诊断的试剂中的用途:胶原 α -1 (I) 链、NSFL1辅因子P47、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、及其组合。

[0011] 在具体的实施方式中,和健康对照中的蛋白水平相比较,胶原 α -1 (I) 链和/或NSFL1辅因子P47的表达水平降低指示所述受试者存在肺纤维化的早期损伤;和健康对照中的蛋白水平相比较,选自以下的蛋白的表达水平提高指示所述受试者存在肺纤维化的早期损伤:波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、及其组合。在具体的实施方式中,健康对照是指未患有肺纤维化的个体。

[0012] 在另一个实施方式中,提供了选自以下的蛋白的鉴定试剂在制备用于监测受试者的肺纤维化严重程度的试剂中的用途:血管紧张素原、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、尿调节素、激肽释放酶-1、催乳素诱导蛋白、4-羟基苯双加氧酶;胶原 α -1 (I) 链、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、血浆铜蓝蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal型、及其组合。

[0013] 在具体的实施方式中,对受试者进行取样,和健康对照中的蛋白水平相比较,根据患者尿液中蛋白标志物的变化情况来判断患者肺纤维化的严重程度。在具体的实施方式中,相较于健康对照,受试者中选自以下的蛋白的表达水平提高指示所述受试者肺纤维化进展:血管紧张素原、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、尿调节素、激肽释放酶-1、催乳素诱导蛋白、4-羟基苯双加氧酶、及其组合。

[0014] 在具体的实施方式中,相较于健康对照,选自以下的蛋白的表达水平降低指示所述受试者肺纤维化进展:胶原 α -1 (I) 链、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、血浆铜蓝蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、血红蛋白 α

亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂KazaI型、及其组合。

[0015] 在另一个实施方式中,提供了选自以下的蛋白的鉴定试剂在制备用于受试者的肺纤维化疗效评估的试剂中的用途:小白蛋白 α 、纤蛋白-5、酸性哺乳动物几丁质酶、钙结合蛋白、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、及其组合。

[0016] 在具体的实施方式中,在治疗前和治疗后对受试者进行取样。在具体的实施方式中,相较于治疗前,治疗后选自以下的蛋白的表达水平提高指示所述受试者肺纤维化治疗的有效性:小白蛋白 α 、纤蛋白5、钙结合蛋白、及其组合。具体的实施方式中,相较于治疗前,治疗后富含半胱氨酸的分泌蛋白3和酸性哺乳动物几丁质酶的表达水平降低指示所述受试者肺纤维化治疗的有效性。

[0017] 适用于本公开的鉴定试剂是质谱鉴定试剂、抗体或其抗原结合片段。在具体的实施方式中,抗体是单克隆抗体。本公开对单克隆抗体的物种来源没有限制,任何能够结合上述蛋白的抗体均可以使用。在具体的实施方式中,抗原结合片段包括但不限于:Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、ScFv、双特异抗体、三特异抗体、四特异抗体、双-scFv、mimi抗体。任何保留了抗原结合活性的抗体片段均适用于本公开。

[0018] 在本公开的技术方案中,所述肺纤维化是指特发性肺纤维化(idiopathicpulmonaryfibrosis,IPF)。

[0019] 在具体的实施方式中,根据本公开的蛋白标记物能够用于诊断和/或预后特发性肺纤维化。

[0020] 在具体的实施方式中,表达水平选自核酸水平和蛋白质水平,尤其是蛋白质水平。

[0021] 在具体的实施方式中,表达水平是在尿液样本中测定的。

[0022] 根据另一些实施方式,还提供了一种用于诊断和/或预后肺纤维化疾病的试剂盒或芯片,其包含选自以下的蛋白的鉴定试剂、或者由选自以下的蛋白的鉴定试剂组成:

[0023] 胶原 α -1(I)链、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、NSFL1辅因子P47、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、血管紧张素原、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、酸性哺乳动物几丁质酶、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、催乳素诱导蛋白、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂KazaI型、血浆铜蓝蛋白、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、 α -2-HS-糖蛋白、尿调节素、4-羟基苯双加氧酶、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBIP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、激肽释放酶-1、及其组合。

[0024] 在一些实施方式中,试剂盒中包含上述蛋白的鉴定试剂。在另一些实施方式中,芯片上固定有上述蛋白的鉴定试剂。在一些实施方式中,所述鉴定试剂是抗体或其抗原结合片段。

[0025] 在具体的实施方式中,提供了一种用于肺纤维化早期诊断的试剂盒或芯片,其包含选自以下的蛋白的鉴定试剂、或者由选自以下的蛋白的鉴定试剂组成:胶原 α -1(I)链、NSFL1辅因子P47、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核

苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、及其组合。

[0026] 在另一些具体的实施方式中,提供了一种用于监测受试者肺纤维化严重程度的试剂盒或芯片,其包含选自以下的蛋白的鉴定试剂、或者由选自以下的蛋白的鉴定试剂组成:血管紧张素原、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、尿调节素、激肽释放酶-1、催乳素诱导蛋白、4-羟基苯双加氧酶;胶原 α -1(I)链、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、血浆铜蓝蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal型、及其组合。

[0027] 在另一些具体的实施方式中,提供了一种用于受试者肺纤维化疗效评估的试剂盒或芯片,其包含选自以下的蛋白的鉴定试剂、或者由选自以下的蛋白的鉴定试剂组成:小白蛋白 α 、纤蛋白-5、酸性哺乳动物几丁质酶、钙结合蛋白、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、及其组合。

[0028] 根据一些实施方式,提供了一种用于诊断和/或预后受试者中肺纤维化疾病的方法,包括步骤:

[0029] 1) 获得受试者的尿液样本,

[0030] 2) 任选地,从尿液样本中分离尿蛋白,

[0031] 3) 确定受试者尿液样本中选自以下的蛋白的表达水平:

[0032] 胶原 α -1(I)链、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、NSFL1辅因子P47、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、血管紧张素原、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、酸性哺乳动物几丁质酶、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、催乳素诱导蛋白、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal型、血浆铜蓝蛋白、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、 α -2-HS-糖蛋白、尿调节素、4-羟基苯双加氧酶、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、激肽释放酶-1、及其组成。

[0033] 在具体的实施方式中,使用质谱方法、ELISA方法、或Western方法确定表达水平。

[0034] 当采用质谱方法确定蛋白及其表达水平时,在获得尿液样本的步骤之后,还可以包括消化步骤。在具体的实施方式中,用蛋白酶消化尿液样本中的蛋白。

[0035] 根据一些实施方式,提供了一种用于早期诊断受试者中肺纤维化的方法,包括步骤:

[0036] 1) 获得受试者和健康对照的尿液样本,

[0037] 2) 确定受试者和健康对照的尿液样本中选自以下的蛋白的表达水平:胶原 α -1(I)链、NSFL1辅因子P47、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核

昔酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、泛素羧基末端水解酶同工酶L1、及其组合，

[0038] 3) 将受试者中所述蛋白的表达水平和健康对照中所述蛋白的表达水平进行比较，

[0039] 4) 确定所述受试者是否具有肺纤维化的早期损伤。

[0040] 根据一些实施方式，提供了一种用于监测受试者中肺纤维化严重程度的方法，包括步骤：

[0041] 1) 获得受试者和健康对照的尿液样本，

[0042] 2) 和健康对照相比，确定受试者尿液样本中选自以下的蛋白的表达水平：血管紧张素原、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、尿调节素、激肽释放酶-1、催乳素诱导蛋白、4-羟基苯双加氧酶；胶原 α -1(I)链、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、血浆铜蓝蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂KazaI型、及其组合，

[0043] 3) 将受试者所述蛋白的表达水平和健康对照所述蛋白的表达水平进行比较，

[0044] 4) 确定所述受试者的肺纤维化是否进展。

[0045] 根据一些实施方式，提供了一种用于评价受试者中肺纤维化治疗效果的方法，包括步骤：

[0046] 1) 获得受试者治疗前和治疗后的尿液样本，

[0047] 2) 确定受试者治疗前和治疗后的尿液样本中选自以下的蛋白的表达水平：小白蛋白 α 、纤蛋白-5、酸性哺乳动物几丁质酶、钙结合蛋白、富含半胱氨酸的分泌蛋白3、及其组合，

[0048] 3) 将治疗前所述蛋白的表达水平和治疗后所述蛋白的表达水平进行比较，

[0049] 4) 确定所述受试者的肺纤维化治疗有效性。

附图说明

[0050] 图1A：肺纤维造模第7天大鼠肺脏组织Massion染色结果。

[0051] 图1B：肺纤维造模第14天大鼠肺脏组织Massion染色结果。

[0052] 图1C：肺纤维造模第21天大鼠肺脏组织Massion染色结果。

[0053] 图1D：肺纤维造模第28天大鼠肺脏组织Massion染色结果；显示在不同时间点随着肺纤维化疾病进展肺脏损伤和纤维化程度逐渐升高，即肺纤维化造模成功。

[0054] 图2A：肺纤维化激素治疗前的大鼠肺脏组织Massion染色结果。

[0055] 图2B：肺纤维化激素治疗后的大鼠肺脏组织Massion染色结果。

[0056] 图3A：胰岛素样生长因子结合蛋白3的Western印记。

[0057] 图3B：WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1的Western印记。

具体实施方式

[0058] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明。本领域技术人员公知，在不背离本发明精神的情况下，可以对本发明做出许多修改，这样的修改也落入本发明的范围。

如无特别说明,所使用的实验材料均可从商业公司获取。

[0059] 实施例

[0060] 实施例1.特发性肺纤维化动物模型的建立

[0061] 1.博来霉素致肺纤维化大鼠模型是经典的特发性肺纤维化动物模型,已被用来研究肺纤维化的发病机制、研发抗纤维化药物、测试药物疗效(参见KuIkarni Y M,Dutta S,Iyer A K V等人,A proteomics approach to identifying key protein targets involved in VEGF inhibitor mediated attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.Proteomics,2016,16(1):33-46)。

[0062] 利用该动物模型模拟肺纤维化的发病过程,观察肺纤维化从正常、早期纤维化、纤维化进展及纤维化治疗的整体变化,对临床上早期诊断肺纤维化、监测肺纤维化的病情进展、评估肺纤维化的治疗效果有重要的指导意义。

[0063] 2.材料与试剂

[0064] 1) 仪器:

[0065] 大鼠代谢笼:购自北京佳源兴业科技有限公司。

[0066] TripleTOF 5600质谱仪:购自ABI公司;

[0067] LTQ-Orbitrap velos购自Thermo公司;

[0068] Agilent 1200高效液相色谱仪:购自Agilent公司;

[0069] MilliQ RG超纯水系统:购自Millipore公司;

[0070] C18反相分析柱(RP柱,0.1×150mm,3μm,200 Å):购自Michrom Bioresources公司。

[0071] 2) 主要试剂:

[0072] 去离子水来源于MilliQ RG超纯水系统;色谱级乙腈、甲酸和甲醇为Fisher公司生产;碘乙酰胺(IAA)、碳酸氢铵、二硫苏糖醇(DTT)从Sigma公司购买;测序级胰酶从Promega公司购买;标记试剂盒(iTRAQ购自ABI公司,TMT购自Thermo Fisher公司);抗体购自Abcam公司。

[0073] 3) 动物:

[0074] 雄性SD大鼠(体重200g)购自中国医学科学院实验动物研究所,在标准饲养环境中饲养。

[0075] 3.实验方法

[0076] 1) 博来霉素致肺纤维化大鼠模型建立以及样品收集。

[0077] a) 实验前新鲜配置博来霉素溶液;溶于生理盐水溶液。

[0078] b) 肺纤维化大鼠模型建立步骤:根据大鼠体重,气管内滴注博来霉素量为4mg/kg。

[0079] c) 样品收集流程:在造模之前,将大鼠置于代谢笼中收集正常尿液,在造模之后分别于第6、9、14、21天将大鼠置于代谢笼中收集尿液样品。同时部分大鼠从第8天开始接受激素(4mg/kg/d)治疗,用代谢笼收集激素治疗2周和同时期肺纤维化的大鼠尿液。

[0080] 2) 组织病理学检查:在大鼠肺纤维化不同时期(博来霉素造模7天、14天、21天、28天;以及纤维化泼尼松治疗2周和同时期纤维化未治疗)取大鼠肺脏组织用福尔马林固定,蜡块包埋后进行Massion染色判断肺纤维化的程度。

[0081] 3) 样品处理:

[0082] a) 尿蛋白提取与保存:各时段尿液于4℃2000g离心20分钟,取上清,置于新EP管内,继续12000g 4℃离心20分钟;取上清,-80℃保存。

[0083] b) 乙醇沉淀尿液蛋白,用Bradford法测蛋白浓度后进行膜上酶切,参见Wisniewski JR,Zougman A,Nagaraj N,Mann M.Universal sample preparation method for proteome analysis.Nature methods 2009;6:359-62.BCA法测量多肽浓度。

[0084] c) 多肽标记:将两只大鼠0、9、14、21天的多肽用iTRAQ试剂盒标记,将3只大鼠0天和6天的多肽用TMT试剂盒进行标记;将纤维化大鼠和同时期药物治疗的大鼠用TMT进行标记。标记的过程参见试剂盒说明书。

[0085] d) 利用高PH反相色谱分离标记后的混合多肽。每1分钟收集1份组分,共收集60份组分。之后按照第1、16组分混合为第一份样品;第2、17组分混合为第二份样品,以此规则混合30组分为15份样品。

[0086] 4) 反相高效液相色谱分离串联质谱鉴定:

[0087] a) 色谱方法:酶切后肽段经Agilent 1200高效液相色谱自动加样器加入安捷伦公司的反相Trap柱,通过六通阀转换,进行RP色谱柱(0.1×150mm,Magic C18,5μm,100 Å;Michrom Bioresources,Auburn,美国)分离。洗脱时间120分钟,色谱柱流速为0.5μl/min。RP柱洗脱梯度为5~40%流动相B(流动相A为:0.1%甲酸+2%乙腈+97.9%水;流动相B为:0.1%甲酸+99.9%乙腈)。

[0088] b) 质谱方法:从反相柱上洗脱下来的多肽应用TripleTOF 5600质谱进行鉴定。

[0089] 5) 数据库检索:

[0090] 所有质谱结果用mascot软件进行数据库检索。所用数据库为Swissprot_2012_07。检索条件为:胰酶酶切;允许有2个漏切位点;半胱氨酸+57Da的固定修饰;Tripletof 5600数据质谱数据检索容许误差为:母离子0.05Da,子离子0.05Da。

[0091] 6) 相对定量分析结果:

[0092] 所有质谱结果通过Scaffold软件进行定量结果分析。软件操作根据文献所示方法使用,蛋白的FDR值设为1%,差异蛋白倍数为1.5。

[0093] 7) Western blot验证

[0094] 将肺纤维化各时期尿蛋白分别取20μg,10%SDS-PAGE分离后将蛋白转膜至PVDF膜上,PVDF膜于5%脱脂奶粉中室温封闭1h,一抗孵育过夜,一抗分别为胰岛素样生长因子结合蛋白3(1:100),WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1(1:1000);洗膜30min后用二抗(过氧化物酶结合的IgG,1:5000)室温孵育2h,ECL显色。

[0095] 4. 实验结果

[0096] 1) 对不同时期肺纤维化的大鼠做组织病理检查,通过马松(Masson's trichrome staining)染色后发现气管滴注博来霉素后肺脏纤维化造模成功,并随着时间的推进肺脏纤维化程度不断进展(图1A至图1D)。

[0097] 来源于大鼠4个时期(0天、9天、14天和21天)的尿液经过质谱鉴定,基于两肽以上鉴定的蛋白分别为600、701个,共同鉴定的蛋白为517个。与0天蛋白定量的强度进行比对,筛选出其他时间点变化倍数在1.5倍以上的差异蛋白并且在不同大鼠中趋势一致,其中有30个尿液蛋白的表达量发生变化。这30个差异蛋白中有人同源蛋白26个。

[0098] 其中,在肺纤维化发展过程中血管紧张素原、酸性哺乳动物几丁质酶、富含半胱氨

酸的分泌蛋白3、胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2、尿调节素、激肽释放酶-1、催乳素诱导蛋白和4-羟基苯双加氧酶催乳素诱导蛋白表达量增加(见表1);胶原 α -1(I)链、小白蛋白 α 、铁蛋白轻链1、钙结合蛋白、神经细胞粘附分子1、胰岛素样生长因子结合蛋白3、硒蛋白P、潜转化生长因子 β 结合蛋白1、WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1、纤蛋白-5、血浆铜蓝蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1、蛋白质AMBP、蛋白质NOV同源物、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1、血红蛋白 α 亚基、丝氨酸蛋白酶抑制剂KazaI型表达量降低。

[0099] 表1.在肺纤维化发展过程中蛋白表达水平的变化

[0100]

大鼠蛋白	人同源蛋白	蛋白名称	变化趋势	蛋白定量比值			
				0天	9天	14天	21天
P01015	P01019	血管紧张素原	↑	1	1.65	1.65	1.85
Q6RY07	Q9BZP6	酸性哺乳动物几丁质酶	↑	1	6.65	3.05	2.55
P12020	P54108	富含半胱氨酸的分泌蛋白3	↑	1	2.39	1.39	2.70
P19218	P55259	胰腺分泌颗粒膜糖蛋白 GP2	↑	1	1.40	1.45	1.70
P27590	P07911	尿调节素	↑	1	1.34	1.28	1.52
P36374	P06870	激肽释放酶 -1	↑	1	2.00	1.70	2.50
O70417	P12273	催乳素诱导蛋白	↑	1	1.40	1.65	1.30
P32755	P32754	4-羟基苯双加氧酶	↑	1	1.50	1.45	1.00
P02454	P08123	胶原 α -1 (I) 链	↓	1	0.45	0.40	0.40
P02625	P20472	小白蛋白 α	↓	1	0.40	0.65	0.55
P02793	P02792	铁蛋白轻链	↓	1	0.50	0.75	0.55
P07171	P05937	钙结合蛋白	↓	1	0.50	0.60	0.40
P13596	P13591	神经细胞粘附分子 1	↓	1	0.70	0.65	0.65
P15473	P17936	胰岛素样生长因子结合蛋白 3	↓	1	0.60	0.55	0.50
P25236	P49908	硒蛋白 P	↓	1	0.60	0.50	0.45
Q00918	Q14766	潜转化生长因子 β 结合蛋白 1	↓	1	0.65	0.65	0.55
Q99PP0	O95388	WNT1 可诱导的信号传导途径蛋白 1	↓	1	0.65	0.55	0.55
Q9WVH8	Q9UBX5	纤蛋白-5	↓	1	0.70	0.60	0.65
P13635	P00450	血浆铜蓝蛋白	↓	1	0.70	0.65	0.60
P24090	P02765	α -2-HS-糖蛋白	↓	1	0.50	0.50	0.50
Q56A20	Q96FE7	磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白 1	↓	1	0.55	0.55	0.60
Q64240	P02760	蛋白质 AMBP	↓	1	0.65	0.60	0.55
Q9QZQ5	P48745	蛋白质 NOV 同源物	↓	1	0.45	0.50	0.45
Q9Z2L0	P21796	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白 1	↓	1	0.55	0.75	0.55
P01946	P69905	血红蛋白 α 亚基	↓	1	0.60	0.50	0.85
P09656	P00995	丝氨酸蛋白酶抑制剂 KazaI 型	↓	1	0.50	0.65	1.45

[0101] 2) 来源于大鼠的实验前(0天)和肺纤维化早期(6天)2个时期的尿液经过质谱鉴定,基于两肽以上共同鉴定的蛋白为522个。与0天蛋白定量的强度进行比对,筛选出变化倍数 >1.5 倍、t检验p值 <0.05 且在不同大鼠中趋势一致的差异蛋白,其中有19个尿液蛋白的表达量发生变化。这19个差异蛋白中,其中有人同源蛋白13个。

[0102] 在肺纤维化早期胶原 α -1(I)链和NSFL1辅因子P47表达量降低,波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白和泛素羧基末端水解酶同工酶L1表达量增加(表2)。

[0103] 表2.肺纤维化早期诊断的蛋白标志物

[0104]

大鼠蛋白	人同源蛋白	蛋白名称	趋势	蛋白变化倍数		
				大鼠 7	大鼠 8	大鼠 9
P02454	P02452	胶原 α -1 (I) 链	↓	2.76	1.69	3.00
O35987	Q9UNZ2	NSFL1 辅因子 P47	↓	0.60	0.70	0.48
P31000	P08670	波形蛋白	↑	2.83	1.69	1.65
Q5FVJ0	Q7L099	蛋白质 RUFY3	↑	2.90	3.50	4.13
Q10758	P05787	角蛋白, II 型骨架 8	↑	1.50	1.95	3.95
Q920G2	Q15599	钠氢交换监管辅因子 NHE-RF2	↑	1.40	1.50	1.45
Q5M7T9	Q86YJ6	苏氨酸合酶样 2	↑	1.61	3.24	2.37
Q71LX6	A4UGR9	锌肌动蛋白结合重复蛋白 2	↑	1.76	2.78	1.81
Q9QYP1	O75096	低密度脂蛋白受体相关蛋白 4	↑	3.30	2.38	2.31
Q9JID2	P29992	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11	↑	1.85	1.73	1.47
Q63610	P06753	原肌球蛋白的 α -3 链	↑	1.45	1.50	1.61
P48721	P38646	线粒体型应力-70 蛋白	↑	1.55	2.04	1.72
Q00981	P09936	泛素羧基末端水解酶同工酶 L1	↑	1.60	2.14	2.96

[0105] 3) 激素治疗两周后和同时期肺纤维化大鼠 (21天) 组织病理学检查的结果见图2A和图2B, 经过Massion染色后发现肺纤维化大鼠经激素治疗后肺纤维化的程度降低。

[0106] 将经激素治疗的和未治疗的肺纤维化大鼠尿液经过质谱鉴定, 基于两肽以上共同鉴定的蛋白为426个。从中筛选出变化倍数>1.5倍、t检验p值<0.05的且和表1肺纤维化发病过程中趋势相反的差异蛋白, 其中有6个尿液蛋白的表达量发生变化其中有人同源蛋白5个。激素治疗后肺纤维化的程度降低, 尿液中小白蛋白 α 、钙结合蛋白、纤蛋白5表达量增加、尿液中酸性哺乳动物几丁质酶和富含半胱氨酸的分泌蛋白3表达量降低 (表3)。

[0107] 表3. 肺纤维疗效评估的蛋白标志物

大鼠蛋白	人同源蛋白	蛋白名称	疾病趋势	治疗后趋势
P02625	P20472	小白蛋白 α	↓	↑
P07171	P05937	钙结合蛋白	↓	↑
Q9WVH8	Q9UBX5	纤蛋白-5	↓	↑
Q6RY07	Q9BZP6	酸性哺乳动物几丁质酶	↑	↓
P12020	P54108	富含半胱氨酸的分泌蛋白 3	↑	↓

[0109] 4) Western印记选择对上述蛋白标志物中的胰岛素样生长因子结合蛋白3和WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1在其他肺纤维化大鼠中进行验证, 得到与质谱结果一致的变化趋势, 使以上蛋白作为特发性肺纤维化的疾病标志物更加可信 (图3A和图3B)。结果显示: 胰岛素样生长因子结合蛋白3和WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1随着肺纤维化病情发展, 尿中该蛋白逐渐减少。

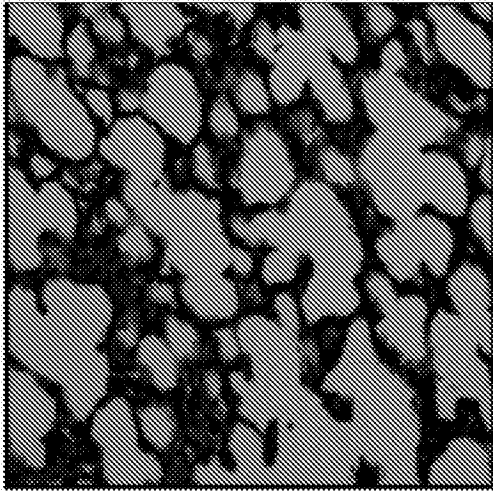


图1A

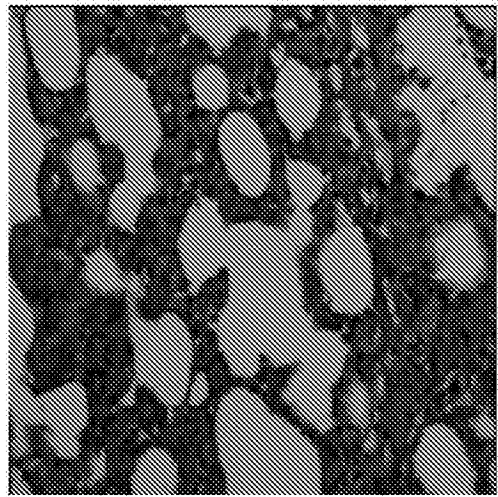


图1B

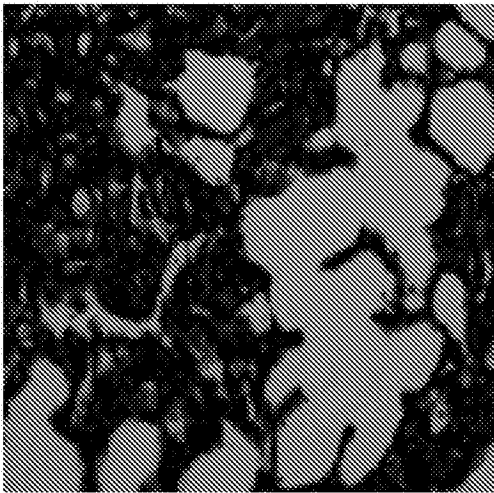


图1C

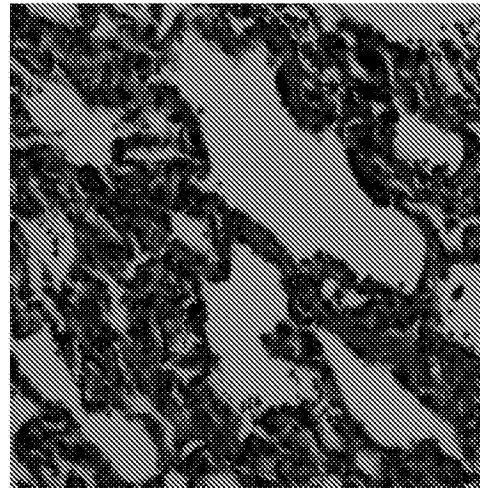


图1D

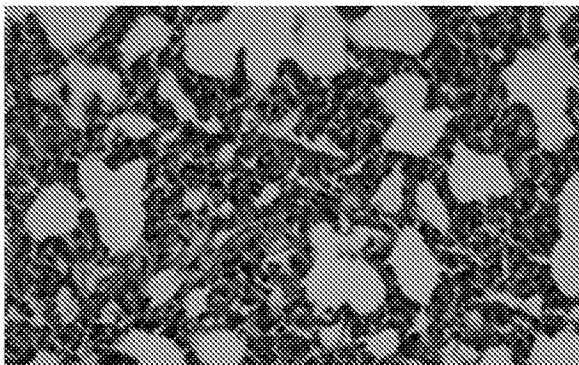


图2A

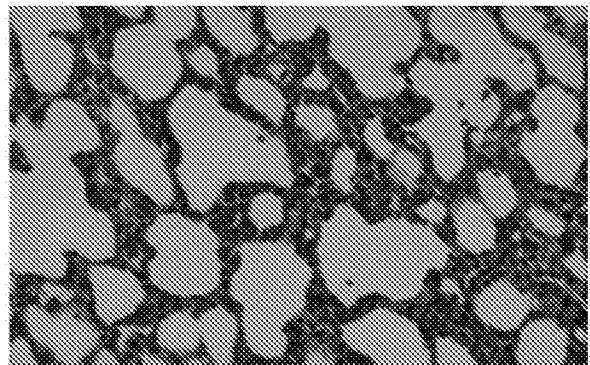


图2B

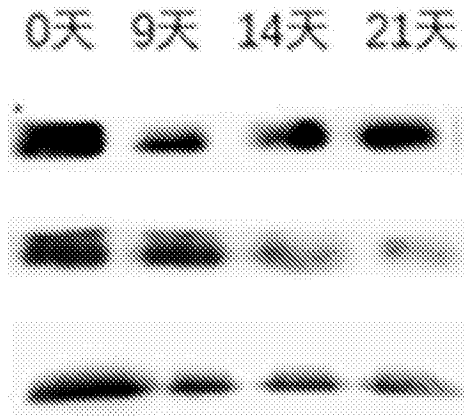


图3A

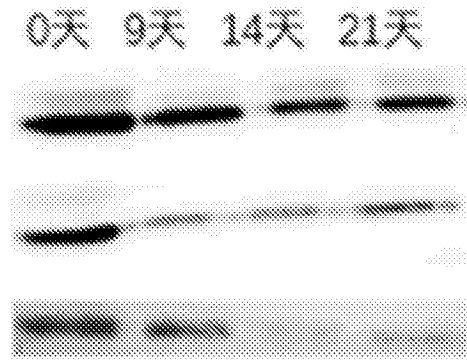


图3B

专利名称(译)	肺纤维化的尿液蛋白标志物及其在诊断和预后中的用途		
公开(公告)号	CN106370856A	公开(公告)日	2017-02-01
申请号	CN201610675178.5	申请日	2016-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京师范大学		
申请(专利权)人(译)	北京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京师范大学		
[标]发明人	高友鹤 吴建强 李逊斗		
发明人	高友鹤 吴建强 李逊斗		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/532 G01N30/02 G01N30/72		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/72 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/577 G01N33/6893		
代理人(译)	程伟 程云		
其他公开文献	CN106370856B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及肺纤维化的尿液蛋白标志物及其在诊断和预后中的用途。具体而言，本发明涉及利用肺纤维化疾病模型和质谱分析获得的尿蛋白标志物在人肺纤维化疾病早期诊断、病程监测及疗效评估中的用途，所述尿蛋白标志物包括胶原 α -1(I)链、波形蛋白、蛋白质RUFY3、角蛋白II型骨架8、钠氢交换监管辅因子NHE-RF2、苏氨酸合酶样2、锌肌动蛋白结合重复蛋白2、低密度脂蛋白受体相关蛋白4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基的 α -11、原肌球蛋白的 α -3链、线粒体型应力-70蛋白、NSFL1辅因子P47、泛素羧基末端水解酶同工酶L1等。

大鼠蛋白	人同源蛋白	蛋白名称	变化趋势	蛋白定量比值			
				0天	9天	14天	21天
P01015	P01019	血管紧张素原	↑	1	1.65	1.65	1.85
Q6RY07	Q9BZP6	酸性哺乳动物几丁质酶	↑	1	6.65	3.05	2.55
P12020	P54108	富含半胱氨酸的分泌蛋白3	↑	1	2.39	1.39	2.70
P19218	P55259	胰腺分泌颗粒膜糖蛋白GP2	↑	1	1.40	1.45	1.70
P27590	P07911	尿调节素	↑	1	1.34	1.28	1.52
P36374	P06870	激肽释放酶-1	↑	1	2.00	1.70	2.50
O70417	P12273	催乳素诱导蛋白	↑	1	1.40	1.65	1.30
P32755	P32754	4-羟基苯双加氧酶	↑	1	1.50	1.45	1.00
P02454	P08123	胶原 α -1(I)链	↓	1	0.45	0.40	0.40
P02625	P20472	小白蛋白 α	↓	1	0.40	0.65	0.55
P02793	P02792	铁蛋白轻链	↓	1	0.50	0.75	0.55
P07171	P05937	钙结合蛋白	↓	1	0.50	0.60	0.40
P13596	P13591	神经细胞粘附分子1	↓	1	0.70	0.65	0.65
P15473	P17936	胰岛素样生长因子结合蛋白3	↓	1	0.60	0.55	0.50
P25236	P49908	磷蛋白P	↓	1	0.60	0.50	0.45
Q00918	Q14766	潜转化生长因子 β 结合蛋白1	↓	1	0.65	0.65	0.55
Q999P0	O95388	WNT1可诱导的信号传导途径蛋白1	↓	1	0.65	0.55	0.55
Q9WVH8	Q9UBX5	纤蛋白-5	↓	1	0.70	0.60	0.65
P13635	P00450	血浆铜蓝蛋白	↓	1	0.70	0.65	0.60
P24090	P02765	α -2-HS-糖蛋白	↓	1	0.50	0.50	0.50
Q56A20	Q96FE7	磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白1	↓	1	0.55	0.55	0.60
Q64240	P02760	蛋白质AMBIP	↓	1	0.65	0.60	0.55
Q9QZQ5	P48745	蛋白质NOV同源物	↓	1	0.45	0.50	0.45
Q9Z2L0	P21796	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1	↓	1	0.55	0.75	0.55
P01946	P69905	血红蛋白 α 亚基	↓	1	0.60	0.50	0.85
P09656	P00995	丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal型	↓	1	0.50	0.65	1.45