



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108387722 A

(43)申请公布日 2018.08.10

(21)申请号 201810225540.8

(22)申请日 2018.03.19

(71)申请人 复旦大学附属妇产科医院

地址 200011 上海市黄浦区方斜路419号

(72)发明人 李明清 周文洁 金莉萍

(74)专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务
所(普通合伙) 31262

代理人 周春洪

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

A61K 31/7024(2006.01)

A61P 15/06(2006.01)

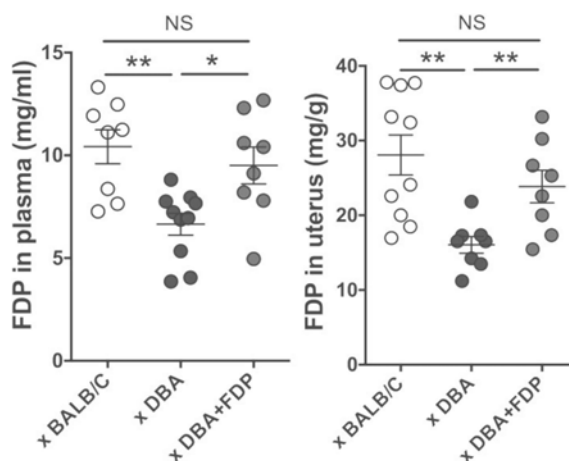
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

1,6-二磷酸果糖在制备自然流产保胎药物
中的应用

(57)摘要

本发明属医药技术领域,具体公开1,6-二磷酸果糖在制备自然流产保胎药物中的应用。经体外实验和体内动物试验显示,相对正常妊娠,反复自然流产患者外周血和蜕膜组织中1,6-二磷酸果糖浓度降低。相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型血浆和子宫FDP水平降低、子宫巨噬细胞M2表型分子表达下降、辅助性细胞T(Th)2和调节性T细胞比例下降、伴有子宫内膜蜕膜化不良和胚胎滋养细胞浸润程度减弱。上述结果表明:1,6-二磷酸果糖补充可明显改善自然流产孕鼠的子宫免疫耐受格局、蜕膜化和胚胎滋养细胞浸润,并显著降低孕鼠胚胎丢失。因此,1,6-二磷酸果糖有望作为自然流产患者的早期预警和诊断指标,且可用于制备自然流产的保胎药物。



1. 1,6-二磷酸果糖或其检测试剂的用途,其特征在于,用于制备自然流产的临床早期预警和诊断的试剂或试剂盒。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,1,6-二磷酸果糖检测试剂是1,6-二磷酸果糖的特异性抗体。

3. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述检测是指受试个体外周血检测。

4. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述检测是指离体子宫蜕膜组织样品检测。

5. 一种用于临床早期预警和诊断自然流产的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含检测1,6-二磷酸果糖浓度的试剂。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述检测1,6-二磷酸果糖浓度的试剂是1,6-二磷酸果糖的特异性抗体。

7. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述检测是指受试个体外周血检测或离体子宫蜕膜组织样品检测。

8. 1,6-二磷酸果糖的用途,其特征在于,它被用作自然流产的早期诊断标志物。

9. 1,6-二磷酸果糖在制备预防和/或治疗自然流产的药物中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,补充1,6-二磷酸果糖可诱导M Φ 向M2耐受表型分化、Th2免疫偏移和Treg分化、促进子宫内膜蜕膜化和胚胎种植,补充1,6-二磷酸果糖可改善自然流产。

1,6-二磷酸果糖在制备自然流产保胎药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体地说,是1,6-二磷酸果糖在制备自然流产保胎药物中的应用。经体外实验和体内动物试验显示,相对正常妊娠,反复自然流产患者外周血和蜕膜组织中1,6-二磷酸果糖浓度降低。相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型血浆和子宫FDP水平降低、子宫巨噬细胞M2表型分子表达下降、辅助性细胞T(Th)2和调节性T细胞比例下降、伴有子宫内膜蜕膜化不良和胚胎滋养细胞浸润程度减弱。上述结果表明:1,6-二磷酸果糖补充可明显改善自然流产孕鼠的子宫免疫耐受格局、蜕膜化和胚胎滋养细胞浸润,并显著降低孕鼠胚胎丢失。因此,1,6-二磷酸果糖有望作为自然流产患者的早期预警和诊断指标,且可用于制备自然流产的保胎药物。

背景技术

[0002] 正常妊娠类似于成功的同种异体移植,母体不仅不排斥携带父系抗原的胚胎,而且通过精细的母-胎对话建立独特的母-胎界面免疫耐受微环境,允许胎儿在子宫内生长发育直至分娩。母-胎界面主要由胚胎来源的滋养细胞与母体来源的蜕膜基质细胞和蜕膜免疫细胞共同组成。母体来源的细胞,特别是胎儿来源的滋养细胞,与这些细胞交互对话所产生的各种细胞因子及激素等共同构筑母-胎界面特殊的免疫耐受微环境,从而得以维持生理性妊娠。母-胎交互对话正常是妊娠建立和维持的基础,其核心包括母-胎免疫耐受、胎盘血管重塑和蜕膜化。这些生物学事件任一环节异常,均可导致妊娠相关疾病的发生,表现为早期妊娠失败(如反复自然流产,RSA)和中晚期妊娠并发症(如胎儿宫内生长受限、子痫前期等),严重危害母婴健康。

[0003] 近年统计资料表明,自然流产发病率高达15%。即便是在辅助生育技术飞速发展的今天,仍不能克服因母-胎免疫调节紊乱所造成的妊娠失败。研究显示流产次数越多,再次妊娠时流产发生率越高,如2次自然流产后,第3次妊娠时自然流产的风险大约为30%;3次以上自然流产后,再次妊娠时自然流产风险高达45%。其中免疫因素所致复发性自然流产(RSA)约占总RSA的63%,因此母-胎免疫调节紊乱是RSA发生和发展的重要原因。然而至今为止母-胎界面发生的这些异常生物学事件导致RSA的分子机制仍不明确,因此母-胎交互对话异常致妊娠相关疾病的研究正面临着重大挑战与机遇,基于这些机制研究的RSA早期预警和干预策略有待建立。

[0004] 1,6-二磷酸果糖,又名果糖-1,6-二磷酸(Fructose-1,6-diphosphate,FDP),是生物体内糖酵解途径的一个重要代谢中间产物,由果糖6磷酸和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)在果糖-6-磷酸激酶作用下反应生成。1,6-二磷酸果糖可作用于细胞膜,调节糖代谢中若干酶活性,尤其是激活磷酸果糖激酶,聚增细胞内高能磷酸池,产生大量的ATP,促进钾离子内流,恢复细胞极化状态,从而有益于休克、缺氧、缺血、损伤、体外循环和输血等状态下的细胞能量代谢及对葡萄糖的利用,以促进细胞修复和改善功能。在临床上,1,6-二磷酸果糖作为调节糖代谢中若干酶的活性和恢复、改善细胞代谢的分子水平药物,用于休克、急性心肌梗塞、心肌直视手术、外周血管疾患和重危病人接受胃肠外营养疗法等疾病的治疗和辅助治

疗。

[0005] 基于现有技术的现状,本申请的发明人拟通过比较正常妊娠和RSA患者外周血和蜕膜组织中的1,6-二磷酸果糖水平,进一步通过构建自然流产小鼠模型来评价1,6-二磷酸果糖在调节孕鼠子宫免疫状态、蜕膜化和滋养细胞浸润程度和改善胚胎吸收率中的潜在价值,提供1,6-二磷酸果糖有望作为自然流产患者的早期预警和诊断指标,进一步将1,6-二磷酸果糖用于制备自然流产保胎治疗的用途和方法,为自然流产的临床治疗提供新方法和新思路。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是针对现有技术中的不足,提供1,6-二磷酸果糖或其检测试剂的用途。

[0007] 本发明的第二个目的是针对现有技术中的不足,提供一种用于临床早期预警和诊断自然流产的试剂盒。

[0008] 本发明的第三个目的是针对现有技术中的不足,提供1,6-二磷酸果糖的制药用途。

[0009] 为实现上述第一个目的,本发明采取的技术方案是:

[0010] 1,6-二磷酸果糖或其检测试剂的用途,用于制备自然流产的临床早期预警和诊断的试剂或试剂盒。

[0011] 作为本发明的一个优选实施方案,1,6-二磷酸果糖的检测试剂是1,6-二磷酸果糖的特异性抗体。

[0012] 作为本发明的一个优选实施方案,所述检测是指受试个体外周血检测。

[0013] 作为本发明的一个优选实施方案,所述检测是指离体子宫蜕膜组织样品检测。

[0014] 为实现上述第二个目的,本发明采取的技术方案是:

[0015] 一种用于临床早期预警和诊断自然流产的试剂盒,所述试剂盒包含检测1,6-二磷酸果糖浓度的试剂。

[0016] 作为本发明的一个优选实施方案,所述检测1,6-二磷酸果糖浓度的试剂是1,6-二磷酸果糖的特异性抗体。

[0017] 作为本发明的一个优选实施方案,所述检测是指受试个体外周血检测或离体子宫蜕膜组织样品检测。

[0018] 为实现上述第三个目的,本发明采取的技术方案是:

[0019] 1,6-二磷酸果糖在制备预防和/或治疗自然流产的药物中的应用,补充1,6-二磷酸果糖可诱导M ϕ 向M2耐受表型分化、Th2免疫偏移和Treg分化、促进子宫内膜蜕膜化和胚胎种植,补充1,6-二磷酸果糖可改善自然流产。

[0020] 本发明还提供1,6-二磷酸果糖的用途,它被用作自然流产的早期诊断标志物。

[0021] 本发明比较正常妊娠和RSA患者外周血和蜕膜组织中的1,6-二磷酸果糖水平,进一步通过构建自然流产小鼠模型来评价1,6-二磷酸果糖在调节孕鼠子宫免疫状态、蜕膜化和滋养细胞浸润程度和改善胚胎吸收率中的潜在价值。结果显示:1) 相对于未孕妇女,早孕期妇女外周血1,6-二磷酸果糖浓度升高,且高于RSA患者;相对于未孕妇女子宫内膜组织,早孕期妇女子宫蜕膜组织1,6-二磷酸果糖浓度升高,且高于RSA患者;2) 相对于对照孕鼠,

自然流产孕鼠模型血浆和子宫1,6-二磷酸果糖浓度显著降低,腹腔注射1,6-二磷酸果糖可升高其在血浆和子宫的水平;3)相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型子宫巨噬细胞M2表型分子表达下降、辅助性细胞T(Th)2和调节性T细胞比例下降、伴有子宫内膜蜕膜化不良和胚胎滋养细胞浸润程度减弱;4)1,6-二磷酸果糖补充可明显改善自然流产孕鼠的子宫免疫耐受格局、蜕膜化和胚胎滋养细胞浸润,并显著改善孕鼠胚胎吸收率。这些结果提示该1,6-二磷酸果糖可用于自然流产患者的临床早期预警和诊断,及自然流产保胎治疗。

[0022] 具体而言,本发明公开了一种通过补充1,6-二磷酸果糖可通过改善母-胎免疫耐受格局、促进子宫内膜蜕膜化和胚胎滋养细胞浸润,进而改善孕鼠胚胎吸收,可用于制备治疗自然流产的药物,及其RSA的临床早期预警和诊断。

[0023] 收集未孕妇女外周血和子宫内膜组织,正常早孕和RSA(流产大于等于3次)患者的外周血和和蜕膜组织,结果显示相对于未孕妇女,早孕期妇女外周血1,6-二磷酸果糖浓度升高,且高于RSA患者;相对于未孕妇女子宫内膜组织,早孕期妇女子宫蜕膜组织1,6-二磷酸果糖浓度升高,且高于RSA患者(如图1所示)。随后通过构建对照孕鼠(CBA×BALB/c)和自然流产孕鼠(CBA/J×DBA/2)模型后发现,相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型血浆和子宫1,6-二磷酸果糖浓度显著降低(如图2所示)。腹腔注射1,6-二磷酸果糖(100mg/kg,从阴栓D0天开始,每天腹腔注射100u1,连续10天)可升高其在血浆和子宫的水平(如图2所示);且明显上调自然流产孕鼠模型子宫M2型巨噬细胞(CD206^{high}CD209^{high}IFR4^{high})、辅助性细胞T(Th)2和调节性T细胞比例(如图3所示)、促进子宫内膜蜕膜化不良(如图4所示)和胚胎滋养细胞浸润程度(如图5所示);4)1,6-二磷酸果糖补充明显改善孕鼠胚胎吸收率(如图6所示)。

[0024] 本发明提供1,6-二磷酸果糖可用于自然流产患者的临床早期预警和诊断,及提供1,6-二磷酸果糖用于自然流产保胎治疗的用途和方法;尤其是经动物实验证实,补充1,6-二磷酸果糖可通过改善母-胎免疫耐受格局、促进子宫内膜蜕膜化和胚胎滋养细胞浸润,进而改善孕鼠胚胎吸收,1,6-二磷酸果糖可用于自然流产的保胎治疗。

附图说明

[0025] 附图1是1,6-二磷酸果糖在未孕、早孕和RSA患者外周血、子宫内膜或蜕膜的浓度。

[0026] 其中,FDP:1,6-二磷酸果糖,

[0027] RSA:反复自然流产,

[0028] endometrium:未孕组子宫内膜,

[0029] decidua:正常早孕组子宫蜕膜,

[0030] abortion decidua:RSA组子宫蜕膜,

[0031] *P<0.05,**P<0.01and***P<0.001;NS:无显著差异。

[0032] 附图2是自然流产孕鼠血浆和子宫1,6-二磷酸果糖浓度降低。

[0033] 其中,×BALB/c:对照孕鼠并腹腔注射生理盐水100u1组,

[0034] ×DBA/2:自然流产孕鼠并腹腔注射生理盐水100u1组,

[0035] ×DBA/2+FDP:自然流产孕鼠并腹腔注射1,6-二磷酸果糖(100mg/kg,100u1)组;

[0036]

[0037] *P<0.05and**P<0.01;NS:无显著差异。

- [0038] 附图3是补充1,6-二磷酸果糖改善自然流产孕鼠子宫免疫格局。
- [0039] 其中,uMφ:孕鼠子宫巨噬细胞,
- [0040] uT cells:孕鼠子宫T细胞,
- [0041] *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001and****P<0.001;NS:无显著差异。
- [0042] 附图4是补充1,6-二磷酸果糖促进自然流产孕鼠子宫蜕膜化。
- [0043] 其中,Lif、Prlr、IL11、Ihh、Igfbp1、dPRP、Cebpb、Hoxa10、Wnt4和Bmp2是蜕膜化相关基因。*P<0.05,**P<0.01and***P<0.001。
- [0044] 附图5是补充1,6-二磷酸果糖促进自然流产孕鼠胚胎滋养细胞浸润。
- [0045] 其中,左侧为HE染色,右侧为confocal荧光染色
- [0046] DAPI:蓝光(细胞核),
- [0047] Cytokeratin(角蛋白)7:黄光(滋养细胞),
- [0048] Merge:重叠。
- [0049] 附图6是补充1,6-二磷酸果糖显著降低自然流产孕鼠胚胎丢失。
- [0050] 其中,吸收胚胎因伴有缺血、出血和坏死,其体积明显小于正常存活胚胎,此外吸收胚胎与存活胚胎的色泽表现亦有明显差别,前者为黑褐色(如图红色箭头所示)而后者为粉红色。据此计数吸收胚胎数和存活胚胎数。胚胎吸收率R(Embryo-resorbing rate%): $R = Re / (Re + F) \times 100\%$ 。Re为吸收胚胎数,F为存活胚胎数,
- [0051] Absorption:胚胎吸收率,
- [0052] Non-absorption:存活胚胎率,
- [0053] **P<0.01and***P<0.001。

具体实施方式

[0054] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明记载的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0055] 实施例1分析1,6-二磷酸果糖在未孕、早孕和RSA患者外周血、子宫内膜或蜕膜的浓度

[0056] 1) RSA患者外周血和蜕膜1,6-二磷酸果糖浓度降低

[0057] 首先利用1,6-二磷酸果糖检测试剂盒(青岛捷世康公司)检测,发现相对于未孕妇女,早孕期妇女外周血1,6-二磷酸果糖浓度升高,且高于RSA患者(如图1A所示);相对于未孕妇女子宫内膜组织,早孕期妇女子宫蜕膜组织1,6-二磷酸果糖浓度升高,且高于RSA患者(如图1B所示)。

[0058] 2) 自然流产模型孕鼠子宫1,6-二磷酸果糖浓度降低

[0059] 通过构建对照孕鼠(CBA×BALB/c)和自然流产孕鼠(CBA/J×DBA/2)模型(实验动物均购自于上海斯莱克实验动物有限公司)后发现,相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型血浆和子宫1,6-二磷酸果糖浓度显著降低(如图2所示)。自然流产孕鼠组腹腔注射1,6-二磷酸果糖(100mg/kg,Sigma公司,从阴栓D0天开始,每天腹腔注射100u1,连续10天)或对照生理盐水100u1,于孕第14天收集孕鼠的血浆子宫,利用1,6-二磷酸果糖检测试剂盒(青岛捷

世康公司)检测发现腹腔注射1,6-二磷酸果糖可升高其在自然流产孕鼠血浆和子宫的水平(如图2所示)。

[0060] 实施例2体内实验证实补充1,6-二磷酸果糖明显改善自然流产孕鼠的子宫免疫耐受格局

[0061] 利用流式细胞术(所有流式抗体来着BioLegend)分析发现,相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型子宫CD45⁺F4/80⁺巨噬细胞M2表型分子(CD206、CD209和IRF4)表达下降、CD45⁺CD4⁺GATA-3⁺辅助性细胞T(Th)2和CD45⁺CD4⁺Foxp3⁺调节性T细胞比例下降;相反CD45⁺CD4⁺Tbet⁺Th1细胞升高(如图3所示)。自然流产孕鼠组腹腔注射1,6-二磷酸果糖(方法同上)或对照生理盐水,于孕第14天收集孕鼠子宫,流式细胞术检测发现腹腔注射1,6-二磷酸果糖可升高自然流产孕鼠子宫M2型巨噬细胞、Th2和Treg细胞的比率,且降低Th1细胞的比率(如图3所示)。提示补充1,6-二磷酸果糖可改善自然流产孕鼠的子宫内膜免疫耐受格局。

[0062] 实施例3体内实验证实补充1,6-二磷酸果糖明显改善自然流产孕鼠子宫蜕膜化程度

[0063] 利用real-time RCR(Takara均购自于Takara公司)分析发现,相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型子宫蜕膜化相关基因Lif、Prlr、IL11、Ihh、Igfbp1、dPRP、Cebpb、Hoxa10、Wnt4和Bmp2(引物由上海生工合成)的转录水平显著减低(如图4所示)。自然流产孕鼠组腹腔注射1,6-二磷酸果糖(方法同上)或对照生理盐水,于孕第14天收集孕鼠子宫,real-time PCR检测发现腹腔注射1,6-二磷酸果糖可明显上调自然流产孕鼠子宫上述蜕膜化相关基因的转录(如图4所示)。提示补充1,6-二磷酸果糖明显改善自然流产孕鼠子宫蜕膜化程度。

[0064] 实施例4体内实验证实补充1,6-二磷酸果糖明显改善自然流产孕鼠胚胎种植

[0065] 于孕第14天收集孕鼠子宫切片部分行HE染色(如图5左侧所示),余行confocal荧光染色(所有抗体来自于Abcam)检测。DAPI(购自威奥生物)染的细胞核呈蓝光,角蛋白CK7染的滋养细胞呈黄光。发现相对于对照孕鼠,自然流产孕鼠模型胚胎滋养细胞的浸润程度明显降低(如图5所示)。自然流产孕鼠组腹腔注射1,6-二磷酸果糖(方法同上)或对照生理盐水,检测发现腹腔注射1,6-二磷酸果糖可明显促进自然流产孕鼠子宫胚胎滋养细胞的浸润(如图5所示)。提示补充1,6-二磷酸果糖明显改善自然流产孕鼠胚胎种植。

[0066] 实施例5体内实验证实补充1,6-二磷酸果糖明显改善自然流产孕鼠的胚胎吸收率

[0067] 如图6所示,红色箭头为吸收胚胎,余为正常胚胎。自然流产组孕鼠胚胎吸收率高于对照孕鼠。自然流产孕鼠组腹腔注射1,6-二磷酸果糖(方法同上)或对照生理盐水,检测发现腹腔注射1,6-二磷酸果糖可明显降低自然流产孕鼠组胚胎吸收率(如图6所示)。提示补充1,6-二磷酸果糖明显改善自然流产孕鼠胚胎丢失。

[0068] 本发明经体外和体内试验结果证实,RSA患者早孕期外周血和子宫蜕膜组织中1,6-二磷酸果糖浓度降低。1,6-二磷酸果糖补充可明显改善自然流产孕鼠的子宫免疫耐受格局、蜕膜化和胚胎滋养细胞浸润,并显著改善孕鼠胚胎丢失。这些结果提示该1,6-二磷酸果糖可用于自然流产患者的临床早期预警和诊断,及自然流产保胎治疗。

[0069] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

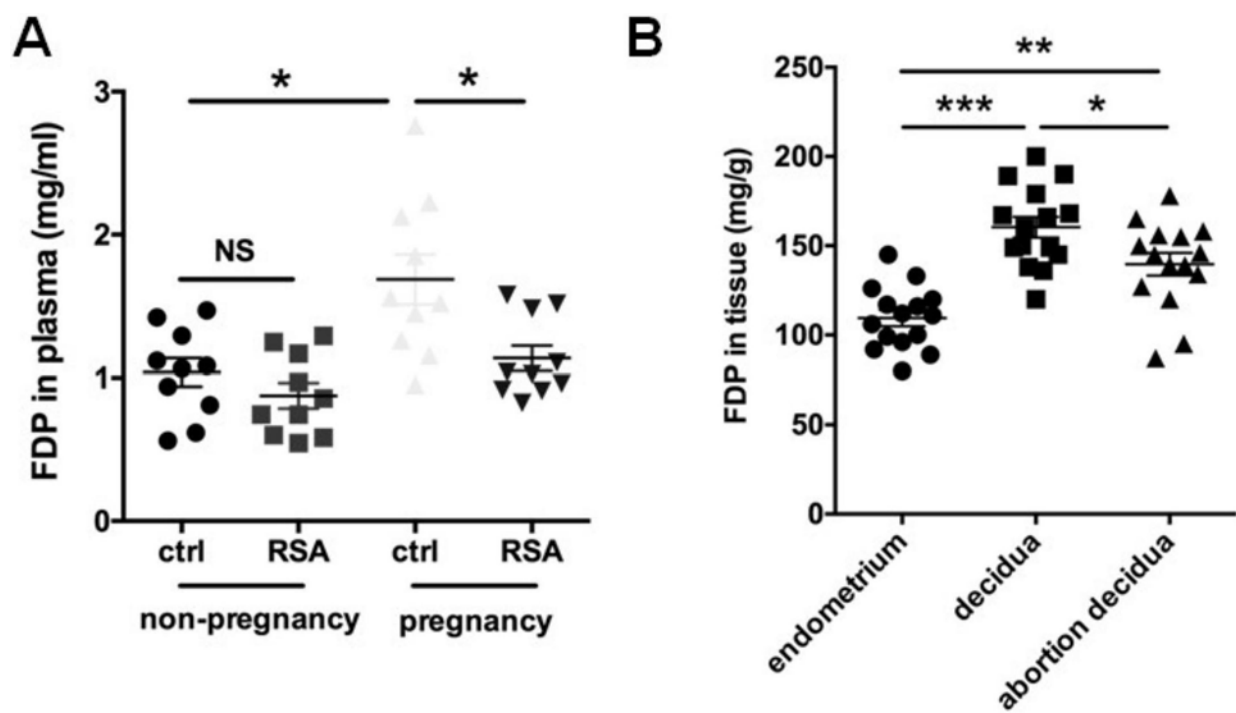


图1

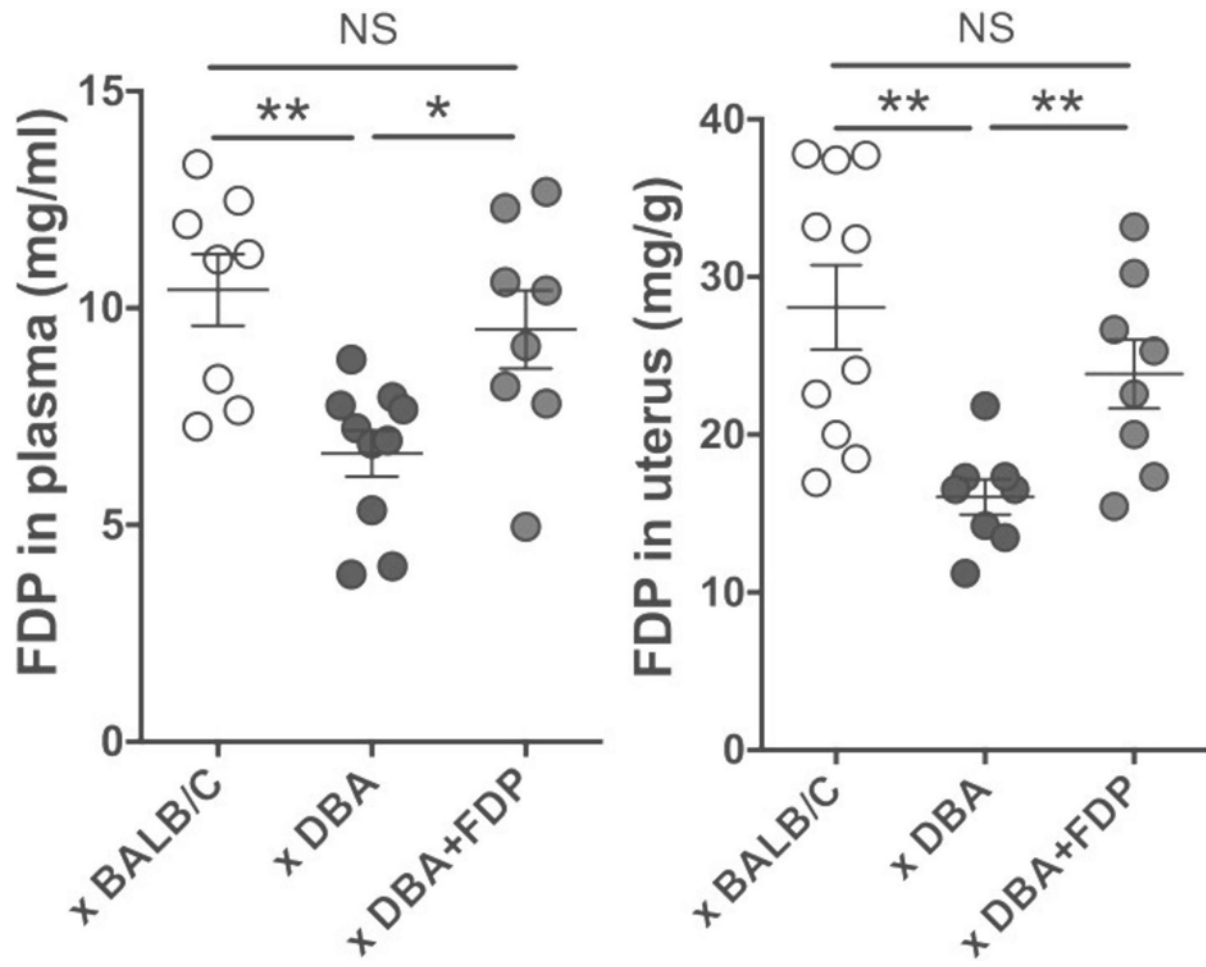


图2

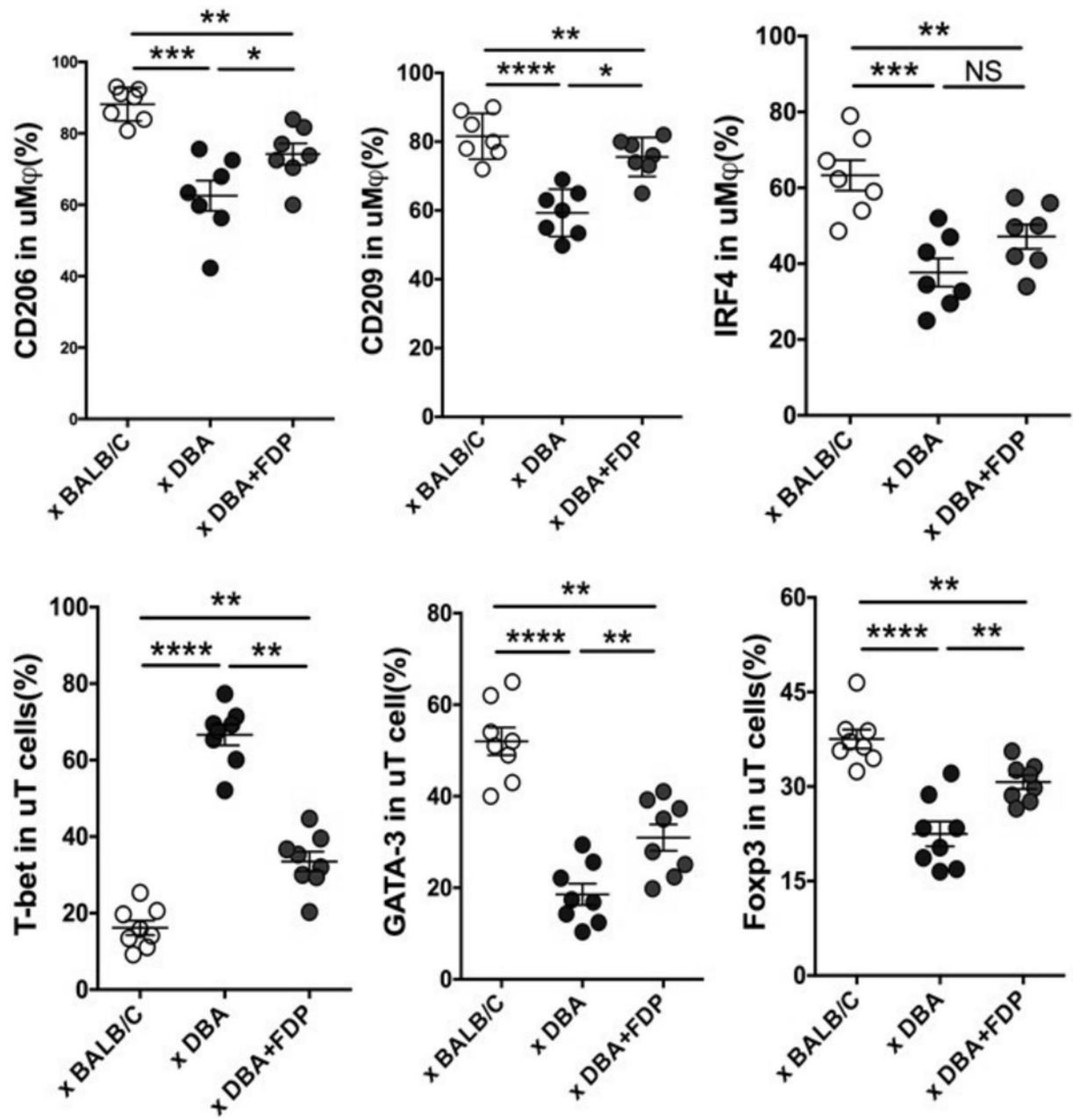


图3

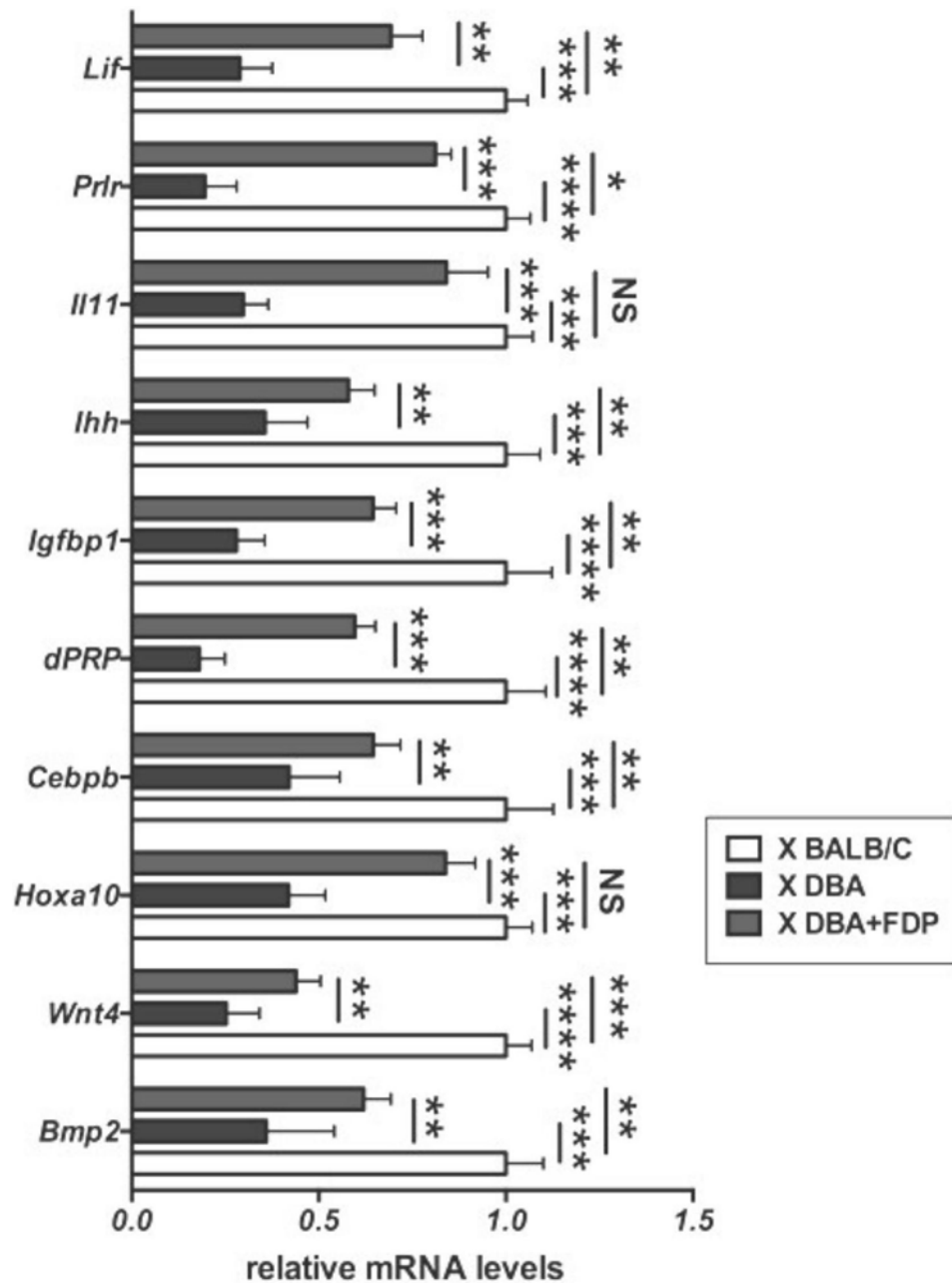


图4

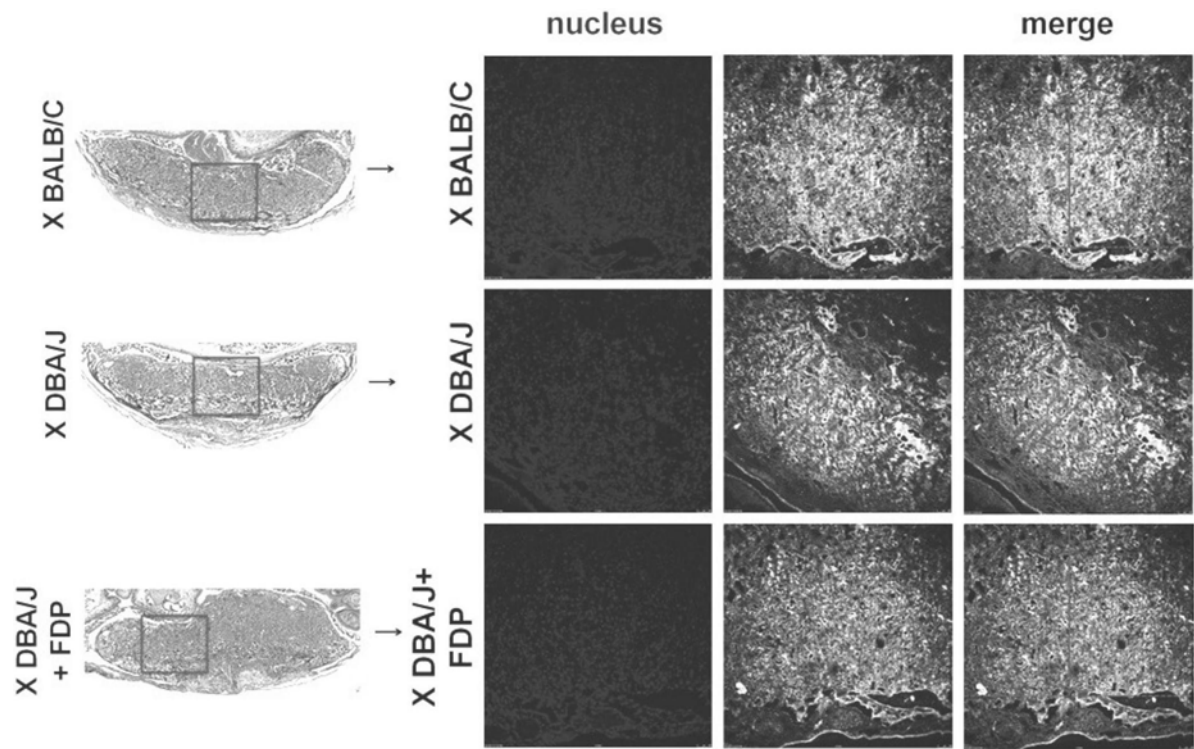


图5

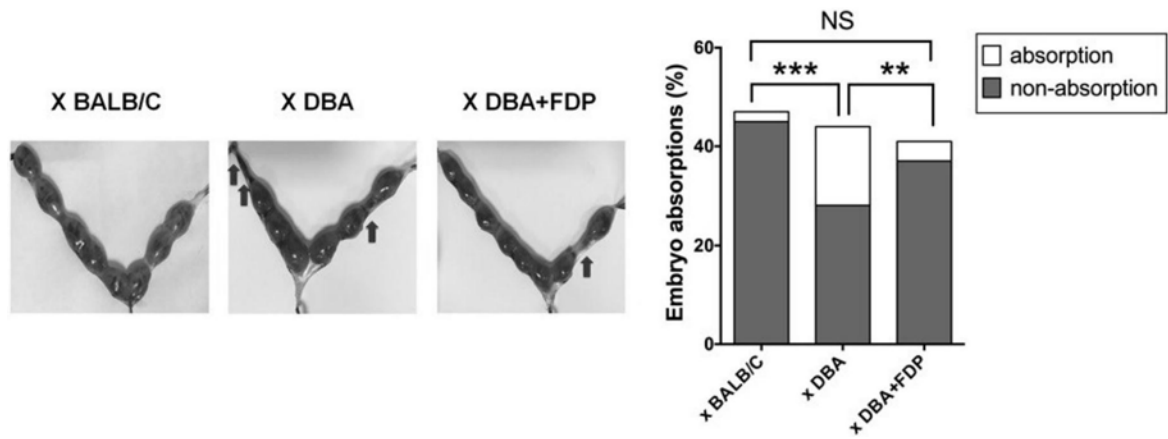


图6

专利名称(译)	1,6-二磷酸果糖在制备自然流产保胎药物中的应用		
公开(公告)号	CN108387722A	公开(公告)日	2018-08-10
申请号	CN201810225540.8	申请日	2018-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属妇产科医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属妇产科医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属妇产科医院		
[标]发明人	李明清 周文洁 金莉萍		
发明人	李明清 周文洁 金莉萍		
IPC分类号	G01N33/53 G01N15/14 A61K31/7024 A61P15/06		
CPC分类号	A61K31/7024 A61P15/06 G01N15/14 G01N33/53		
代理人(译)	周春洪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属医药技术领域，具体公开1,6-二磷酸果糖在制备自然流产保胎药物中的应用。经体外实验和体内动物试验显示，相对正常妊娠，反复自然流产患者外周血和蜕膜组织中1,6-二磷酸果糖浓度降低。相对于对照孕鼠，自然流产孕鼠模型血浆和子宫FDP水平降低、子宫巨噬细胞M2表型分子表达下降、辅助性细胞T(Th)2和调节性T细胞比例下降、伴有子宫内蜕膜化不良和胚胎滋养细胞浸润程度减弱。上述结果表明：1,6-二磷酸果糖补充可明显改善自然流产孕鼠的子宫免疫耐受格局、蜕膜化和胚胎滋养细胞浸润，并显著降低孕鼠胚胎丢失。因此，1,6-二磷酸果糖有望作为自然流产患者的早期预警和诊断指标，且可用于制备自然流产的保胎药物。

