



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102998458 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201210321227. 7

(22) 申请日 2004. 09. 27

(30) 优先权数据

03078161. 1 2003. 10. 09 EP

(62) 分案原申请数据

200480033263. 7 2004. 09. 27

(73) 专利权人 马斯特里赫特大学

地址 荷兰马斯特里赫特

(72) 发明人 Y·M·品托

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 孙式洪

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/66(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003166017 A1, 2003. 09. 04,

CN 1339107 A, 2002. 03. 06,

CN 1283269 A, 2001. 02. 07,

审查员 肖吉

权利要求书1页 说明书17页 附图10页

(54) 发明名称

通过测定半乳糖苷凝集素-3 或者血小板反应蛋白-2 的水平鉴定具有发生心力衰竭风险的受试者的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种通过测定半乳糖苷凝集素-3 或者血小板反应蛋白-2 的水平鉴定具有发生心力衰竭风险的受试者的方法。本发明涉及确定具有发生高血压性终末器官损害风险(例如,特别是心力衰竭)的受试者的方法,包括:(a) 得到所述受试者的生物样品;(b) 确定所述样品中至少一种非肌细胞标记的水平;(c) 将所述标记的水平与标准水平进行比较;以及(d) 确定标记的水平是否指示了发生高血压性终末器官损害的风险。非肌细胞标记优选是半乳糖苷凝集素-3 或者血小板反应蛋白2。

1. 确定非肌细胞标记水平的试剂在制备用于鉴定具有心力衰竭发展风险的受试者的试剂中的用途,其中所述鉴定是通过如下方法进行的,所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的非肌细胞标记的水平,其中的非肌细胞标记选自由半乳糖苷凝集素 -3 和血小板反应蛋白 2 组成的组;

(b) 将所述标记的水平与标准水平进行比较;以及

(c) 如果相对标准水平而言所述标记的水平是升高的,则确定具有心力衰竭发展的风险。

2. 权利要求 1 中的用途,其中的生物样品是来自外周血的血浆样品或血清样品。

3. 权利要求 1 或者 2 中的用途,其中通过酶联免疫吸附测定测量标记的水平。

4. 权利要求 1 或 2 中的用途,其中所述标记是半乳糖苷凝集素 -3。

通过测定半乳糖苷凝集素 -3 或者血小板反应蛋白 -2 的水平鉴定具有发生心力衰竭风险的受试者的方法

[0001] 本发明涉及鉴定具有发生高血压性终末器官损害风险（如充血性心力衰竭）的受试者的方法。

[0002] 充血性心力衰竭（HF）是一种常见但是严重和复杂的临床综合征，特别是在老年人中，特征为心脏收缩功能减退，运动承受力减弱，导致患者病情逐渐恶化，经常产生心血管死亡。因此，大量患者在确诊后的 1 到 5 年内死亡。但是，尽管相当多的患者逐渐出现危及生命的并发症，其他患者可能在较长时间内保持稳定。

[0003] 具有发生高血压性终末器官损害例如心力衰竭风险的患者的早期鉴定可能防止病情迅速发展，因此最好在心力衰竭确实出现之前鉴定有可能出现心力衰竭的患者。此外，优选地是能够鉴定具有发生严重并发症风险的患有心力衰竭的患者。

[0004] 目前的方法可以可靠地排除心力衰竭但是不能可靠地证明心力衰竭的存在，也不能预测已经存在的心力衰竭的结果，或者需要昂贵的仪器和经过特殊训练的人员才能进行预测。

[0005] 因此需要简单可靠的方法，预测心力衰竭发生的可能性以及已经出现的心力衰竭的结果。

[0006] 本发明的目的是提供一种方法，通过这种方法可以鉴定具有发生高血压性终末器官损害（例如心力衰竭）特别风险的患者，或者鉴定具有发生心力衰竭并发症特别风险的患者。在鉴定之后，例如可以在心力衰竭或者其并发症出现之前对这些患者进行治疗，这具有巨大的临床重要性。

[0007] 这通过本发明，通过提供一种方法实现，该方法用于鉴定具有发生高血压性终末器官损害风险的受试者，包括以下的步骤：(a) 获得所述受试者的生物样品；(b) 确定所述样品中至少一种非肌细胞标记的水平；(c) 将所述标记的水平与标准水平进行比较；以及 (d) 确定标记的水平是否预示发生高血压性终末器官损害的风险。

[0008] 在产生本发明的研究中确定了特异的标记，这些标记可以用于预测哪些肥厚的心脏有衰竭的倾向。

[0009] 已知高血压导致心脏肥厚，这是心力衰竭的最重要的风险因子之一。但是，不是所有的肥厚心脏最终都会衰竭。这些观察结果提示除了导致肥厚的机制以外，在代偿性心脏肥厚到衰竭的发展过程中还有其他机制在起作用。尽管最近的研究报导了导致心脏肥厚的许多分子和细胞的改变 (Lorell BH 等, *Circulation* 102 :470-479, 2000 ;Panidis 等, *J Am Coll Cardiol.* 3 :1309-1320, 1984), 至今仍然不清楚导致心力衰竭的其他因素。

[0010] Boluyt 及其同事已经举例证明了在具有心力衰竭的自发性高血压大鼠中编码胞外基质组分的基因上调 (Boluyt 等, *Cardiovasc Res.* 46 :239-249, 2000 ;*Hypertension* 30 :1362-1368, 1997 ;*Cardiovasc Res.* 30 :836-840, 1995 ;*Eur Heart J.* 16 suppl. N :19-30, 1995). 但是并不清楚这些基因的过量表达先于心力衰竭显著的临床综合征出现，还是只是已经出现的活性衰竭过程的结果。

[0011] 还使用了一些其他无偏方法确定心力衰竭的特异机制 (Korstin S 等, *Circ*

Res. 92 :715-724,2003 ;Hein S 等, Circulation 107 : 984-991,2003)。此外,最近的研究已经显示在衰竭的心脏中免疫机制被特异地激活 (Vasan RS 等, Circulation 107 : 1486-1491,2003)。

[0012] 但是这些以前的研究经常将末期以及经药物治疗的心肌与正常的心肌比较。因此得到的差异可能是衰竭及其治疗引起的,因此这些研究没有鉴定可能导致代偿性肥厚心脏衰竭的因素,这些因素可用作鉴定具有发病风险的患者的标记。

[0013] 在产生本发明的研究中,将来自正在衰竭的肥厚心脏的大量基因的基因表达谱与仍然保持代偿的肥厚心脏(的基因)进行比较。这样鉴定了在正在衰竭的与代偿性肥厚的心脏中差异表达的基因。特别地,本发明基于下列发现,即特殊的非肌细胞基因在患病的心脏组织中有异常表达(实施例 1 和 2)。

[0014] 根据本发明,使用非肌细胞(non-myocytical)标记。即标记来自非心肌细胞的细胞。这具有下列优势,即本发明的方法“探测”的是已知在应激肌细胞中出现的肌细胞变化(myocytic change)以外的其他过程。这使得不仅仅有机会确诊心脏衰竭,而且还可以连续监测已知患有心脏衰竭的病人,即监测是否出现有可能预示重大有害事件的不利的非肌细胞过程(例如炎症、瘢痕化等等)。

[0015] 根据本发明的方法,自个体患者采取生物样品。接下来,通过众所周知的技术测量在所述的样品中一个或者多个标记的水平。通常,将这一水平与标准的水平进行比较,以确定标记的水平是否是该个体可能出现心力衰竭的预示。标准水平基于所述标记在健康受试者中的水平。如果标记的水平与标准水平相比升高,则受试者具有发生 CHF 或者发生心力衰竭并发症的风险。

[0016] 生物样品可以是体液例如血液、血浆、血清、尿等等或者组织样品例如心脏活检的任何样品。但是根据本发明的优选实施方案,生物样品是来自外周血的血浆样品。外周血样品可以很容易地取自患者,不需要复杂的侵入性步骤如导管插入。可以根据众所周知的技术对生物样品进行加工,制备用于检测的样品。

[0017] 根据本发明的优选实施方案,标记是一种蛋白质。可以通过简单可靠的方法例如使用针对蛋白特异的抗体的免疫方法,容易地测定该蛋白质的水平。

[0018] 优选地,蛋白质是半乳糖苷凝集素-3(galectin-3),因为已经证明在有衰竭倾向的心脏中半乳糖苷凝集素-3的水平有早期和特异的表达。

[0019] 根据本发明的另一个优选的实施方案,蛋白质是血小板反应蛋白-2。已经证明 TSP2 提高的心脏表达鉴定了那些有向明显心力衰竭发展倾向的肥厚的心脏。

[0020] 可以通过任何众所周知的适宜的方法测定标记的水平。优选地,标记的水平通过酶联免疫吸附检测(ELISA)测定,这样提供了一个简单、可重复的可靠方法。

[0021] 本发明还涉及使用一个或者多个非肌细胞标记,鉴定具有发生高血压性终末器官损害例如充血性心力衰竭风险的受试者。根据本发明可以使用几种非肌细胞标记。优选地,标记是半乳糖苷凝集素-3和/或血小板反应蛋白-2。

[0022] 根据本发明确定的标记还可以用于高血压性终末器官损害的预防和/或治疗,特别是用于充血性心力衰竭的预防和/或治疗。例如,通过例如抗体抑制半乳糖苷凝集素-3,和/或通过适宜的调节剂激活 TSP-2,可能有利于阻止心力衰竭的发生。因此本发明还涉及半乳糖苷凝集素-3和/或其调节剂在制备药物中的用途,用于预防和/或治疗高血压性

终末器官损害。本发明还涉及血小板反应蛋白-2 和 / 或其调节剂在制备药物中的用途,用于预防和 / 或治疗高血压性终末器官损害。

[0023] 本发明通过以下的实施例和附图进行进一步阐释。

[0024] 图 1 是流程图,显示实施以前报导的统计方法的步骤以及用于数据采集的综合截止点(cutoff point)。多步骤的数据筛选将在心力衰竭易感大鼠中有差异表达的基因的数目缩减到 49 个。HF-S,心力衰竭易感大鼠;EST' s,延伸序列标签。

[0025] 图 2 显示了实时 PCR 定量 mRNA 转录产物表达的结果, mRNA 转录产物来自 10 周大的大鼠心肌活检物中四个选择的基因,(a) 那些以后出现迅速心脏失代偿的大鼠与那些在 17 周的研究时间段中仍然保持代偿的大鼠相比, TSP2 出现显著过量表达,(b) 骨活化素(Osteoactivin) 的表达,(c) 胶原蛋白 VI 的表达,(d) 脑钠肽的表达水平。数据相对于持家基因亲环素进行标准化。Comp,代偿的;Decom,失代偿的。*, $p < 0.01$ 代偿组对失代偿组;# $p < 0.05$ SD 对 Ren-2 大鼠;每组 $n = 4$ 。

[0026] 图 3 显示在诱导心肌梗死之后小鼠的存活百分比。所有的 TSP2 缺失(TSP2-null)小鼠(虚线)在手术后 72 小时内死亡($n = 16$)。除去手术以后的立即死亡,在野生型小鼠(实线)中没有观察到死亡($n = 22$)。

[0027] 图 4 是柱状图,其显示了心肌梗死(MI)之后 0 天和 48 小时心肌胶原含量的光密度分析结果(每个切片 10 个随机视野)。与野生型小鼠相比,在 MI48 小时之后 TSP2- 缺失小鼠不能进行活性的纤维化。*, $p < 0.01$,野生型对缺失品系,MI48 小时之后;# $p < 0.01$,野生型小鼠 MI 后第 0 天对 48 小时。

[0028] 图 5 显示了梗死的左心室壁的光学显微镜和电子显微镜照片。苏木素 / 伊红染色的切片显示在血管周围的完整基质,在野生型小鼠中没有间隙出血的迹象(a)。在 TSP^{-/-}小鼠中出现广泛的组织损伤和间隙出血(b)。梗死的左心室壁电子显微镜照片(野生型品系)(c)。注意相对保持较好的血管和基质结构。TSP2 缺失的小鼠的切片显示了心肌基质中广布的损伤以及间隙区域的出血(*) (d)。

[0029] 图 6 显示了 HF-S、HF-R 和 ARB 处理的大鼠的血液动力学参数。对给服和没有给服 ARB(从 7-11 周,0.05mg/kg/天坎地沙坦(candesartan))的 Ren-2 转基因大鼠进行血液动力学测定。A, LVW/BW(%),左心室肥大的代表性测量。B, LW/BW(%),表明了充血性心力衰竭的发生,以及 C, LVEDP 显示了舒张期功能障碍的程度。HF-S 和 HF-R 动物都具有左心室肥厚。具有高纤维化评分的动物具有更高的 LW/BW 和 LVEDP。参数在处死之前测定。对于 HF-S 和 HF-R 每一种都是 $N = 4$,对于 ARB, $N = 8$ 。*, HF-S 对 HF-R 和 ARB, $P < 0.05$ 。

[0030] 图 7 显示了苦味酸天狼猩红(picrosirius red)染色的大鼠心肌切片左心室胶原体积级分析的结果。柱状图显示了 LV 间隙胶原的定量。1,对照;2, HF-R;3, HF-S;4, ARB. 每组 $N = 4-6$;#, $P < 0.01$ 对对照;*, $P < 0.05$ HF-S 对 HF-R;**, $P < 0.05$ 在 HF-R 对 SD 中。

[0031] 图 8 显示了在 Ren-2 大鼠中差异表达的基因的斑点印迹。在 HF-S, HF-R 和 ARB 处理的大鼠组之间比较半乳糖苷凝集素-3mRNA 的水平。斑点的密度和直径与相比于 SD 对照的基因表达的水平直接相应。A, Phospho-imager 扫描的分别来自 HF-S, HF-R 和 ARB 处理的大鼠图像。画圈的点代表半乳糖苷凝集素-3mRNA 的表达。B, 柱状图,显示了用光密度单位定量的半乳糖苷凝集素-3 的量。每组 $N = 2$,每个样品平行点两个点。

[0032] 图 9 半乳糖苷凝集素 -3, 细胞周期蛋白 D1 和 E2F-1 的免疫印迹。大鼠心肌匀浆中半乳糖苷凝集素 -3 的表达水平 :A1, 代表性印迹 ;A2, 以对 GAPDH 标准化的以光密度单位进行的定量 ;细胞周期蛋白 D1 :B1, 代表性印迹 ;B2, 以对 GAPDH 标准化的光密度单位进行的定量。

[0033] 图 10 表明了半乳糖苷凝集素 -3, 巨噬细胞和 MHC-II 的免疫组化共定位。从 HF-S 大鼠心肌得到的平行切片使用 A, 用苏木精复染的抗 -半乳糖苷凝集素 -3 小鼠单克隆抗体 ; B, 巨噬细胞特异的抗 -CD68 小鼠单克隆抗体 ;c, 抗 MHC-II 抗原的 OX-6 小鼠单克隆抗体染色。不同的显微镜视野显示了密集的巨噬细胞浸润。D, HF-R 动物中的巨噬细胞浸润很少见到 (E), 以及在 SD 对照中保持完好的心肌形态, F。

[0034] 图 11。人受试者中的 LVH 和 HF 的心电描记与超声心动描记评估和实时定量 PCR 测定心肌半乳糖苷凝集素 -3 基因表达。A, 根据 Skowlow 和 Lyon 标准 ($SV1+RV5 > 35mm$) 评价左心室的肥厚。小于 55% 的 EF 被认为是失代偿的状态。B, 使用人半乳糖苷凝集素 -3 探针进行实时 PCR。描述了在人心肌活组织检查中半乳糖苷凝集素 -3 基因表达。结果对持家基因亲环素进行标准化。N = 6, *, P < 0.05 HF 对 LVH。

[0035] 图 12 显示在 10 周的活组织检查中的半乳糖苷凝集素 -3mRNA 表达。

实施例

[0036] 实施例 1 血小板反应蛋白 -2 :表达的增加鉴定有衰竭倾向的心肌肥厚

[0037] 心肌肥厚增加了心力衰竭 (HF) 的风险, 但是至今为止很难预测哪种肥厚的心肌会迅速地发展为衰竭。根据本发明推理, 除了与肥厚相关的基因以外, 在衰竭明显出现之前, 有独特的与衰竭相关的基因表达, 这样就可以对易于衰竭的肥厚的心脏进行分子预测。在 12-14 周大、发展为 HF 的高血压纯合肾素过表达 (Ren-2) 大鼠心脏基因的表达 (12336 个克隆), 与到 17 周大时仍然保持代偿的同窝大鼠的基因表达进行比较。在代偿性肥厚阶段 (10 周大) 取心脏活检物, 使发明者能检测所鉴定的基因表达的改变是否出现在后来向 HF 发展之前。鉴定了在 HF 大鼠的心肌中过表达的 49 个基因, 其中基质基因占最大一组。血小板反应蛋白 -2 (TSP2) 只在此后向 HF 发展的大鼠的活检物中选择性地过量表达, 而脑钠肽 (BNP) 在这个早期阶段在所有大鼠中的表达都升高。为了检测 TSP2 缺失对心脏基质的影响, 在 TSP2 缺失的小鼠中诱导心肌梗死 (MI) ;这个步骤导致所有 TSP2 缺失的小鼠中心脏破裂 ;但是野生型小鼠没有一只出现心脏破裂。结论是, 鉴定 TSP2 是心脏基质完整性的新型和重要的调节物。

[0038] 材料和方法

[0039] 转基因大鼠和血液动力学研究

[0040] 纯合 Ren-2 大鼠获自 Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, 德国。对 Sprague Dawley (SD) 背景的 30 只雄性 Ren-2 大鼠和作为对照的 9 只年龄相当的 SD 大鼠进行研究。在 30 只 Ren-2 大鼠中, 8 只在 10 周大时处死, 8 只 Ren-2 大鼠自 7-13 周大使用 0.05mg/kg/ 天的坎地沙坦进行处理, 坎地沙坦是一种血管紧张素 II 受体类型 I 阻断剂 (ARB)。在剩下的 14 只未处理的 Ren-2 大鼠中, 6 只在 13 周发生心力衰竭临床症状时处死, 将其命名为 HF-S 大鼠。对剩下的 8 只 Ren-2 大鼠进行密切监测, 在 17 周时处死, 这时它们仍然没有出现衰竭的临床症状。这些大鼠被称为 HF-R 大鼠。在处死前测定血液动

力学参数,在处死之后测量心脏、肺脏重量和体重。对动物进行管理和处理的步骤经过学院的动物管理委员会批准。

[0041] 10 周大的 Ren-2 大鼠的活检物

[0042] 对另外一组 12 只 Ren-2 大鼠和 4 只 SD 大鼠进行麻醉,在胸骨处剃下前胸上的毛。在自制的套环的帮助下将大鼠固定在位于温暖衬垫之上的硬板上。将一个钝的 20 号针头插入气管中作为气管套管。套管与一个使用室内空气的容积循环式啮齿动物呼吸机 (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA) 相连,潮气量是 2.5 到 3 毫升,呼吸速率是 80 次呼吸 /min。在显微解剖镜的视觉帮助下进行其他的步骤。在左侧第四个肋间隙切一个 5mm 的切口,以通到胸部。在清楚地看到心脏之后,使用与缓慢旋转的钻头相连的 0.35mm 的定制针头取活检物。整个步骤持续大约 15 分钟。在手术后存活的 9 只 Ren-2 大鼠中,5 只在 12 到 14 周大时出现心力衰竭,而剩下的 4 只大鼠直至 17 周时仍然保持代偿。

[0043] RNA 分离以及逆转录

[0044] 使用 RNeasy Mini Kit 根据 RNeasy Mini 实验步骤 (QIAGEN, Hilden, Germany), 从左心室分离 RNA, 储存于 -80°C 。在 2100Bioanalyser (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands) 中使用 Eukaryote Total RNA nano-assay 检测提取物的质量。使用 PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) 根据生产商的说明,从 10 周大的大鼠心脏活检物中分离 RNA。使用逆转录酶, 250ng 随机引物 (Invitrogen Life Technologies, Breda, The Netherlands) 将 RNA 转录为 cDNA。

[0045] cDNA 微阵列

[0046] 选择从标准化的大鼠 cDNA 文库中分离 cDNA 克隆,用于使用 Incyte GEM-2/GEM-3 大鼠 cDNA 文库 (总共 12336 个基因) 的微阵列分析。将 PCR 扩增的每一个 cDNA 插入物以高密度阵列的形式印制在经过处理的玻璃表面。在这些阵列元件上进行一式两份的杂交,使用 3 个不同时间点的两个 SD 和六个 Ren-2 大鼠心肌 mRNA。对数值进行 Log 转化使数据均匀,只有表达差异大于 1.7 倍才认为是有差异的表达。采用的数据采集和验证方案在以前有详细描述 (Tan 等, Proc Natl Acad Sci. 99 :11387-11392, 2002 ;Bandman 等, Ann NY Acad Sci. ,975 :77-90, 2002)。

[0047] 用于宏阵列 (macroarray) 的测序、膜点样 (spotting) 和 cDNA 杂交

[0048] 从 Incyte genomics 获得通过微阵列鉴定的差异表达的基因的克隆,并使用 5' -GGTGACACTATAGAAGAGC-3' 引物 (Eurogentec, Seraing, Belgium) 测序。在通过测序对序列进行确证以后,使用 5' -ACCATGATTACGCCAAGCTC-3' 和 3' -ACGACGGCCAGTGAATTGAA-5' 引物通过 PCR 反应对质粒插入物进行扩增。然后将每个克隆一式两份点样于尼龙膜上 (宏阵列)。使用个人 fx-phospho imager (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA) 对点印迹进行扫描。对每个杂交信号进行鉴定,并且使用 Quantity One, Version 4.2.3 软件 (BioRad, Munich, Germany) 进行光密度定量。选择甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为持家基因用于印迹的内标。

[0049] 生物信息学分析

[0050] 对选自微阵列分析和多步骤数据采集策略的 49 个 HF 特异候选基因的翻译的蛋白质序列进行生物信息学分析。根据对于这些蛋白质生物学功能的注释,选择了三个候选基因用实时 PCR 进行进一步检测,这三个基因以前没有在心肌中发现,它们编码基质相关的

蛋白。

[0051] 引物、探针和实时 PCR

[0052] 由 GenBank™ 中已有的大鼠序列设计引物和探针, 使用 Primer Express 软件 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。由来自 Ensembl-Mouse Genome Sequencing Consortium 和 Ensembl-Human Genome Browser 的保守外显子拼接位点设计探针, 这样防止检测对任何可能污染的基因组 DNA 产生识别 (表 1)。发现对于 Taqman™ 检测最佳的 PCR 条件是 12.5μL 2×PCR Master Mix, 终浓度为 5mM MgCl₂, 300nM 每个引物, 200nM 探针以及 10ng cDNA 模板, 总体积是 25μl。使用 ABI Prism 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 进行扩增和检测。相对于持家基因亲环素 A 的表达水平报告 PCR 数据。

[0053] 在 TSP2^{-/-}小鼠中的实验性心肌梗死以及形态测定法

[0054] 在 22 只野生型 (129SvJ 品系) 的小鼠和 16 只 TSP2 缺失突变体 (TSP2^{-/-}) 小鼠中, 通过闭塞冠状动脉左前降支, 诱导心肌梗死。两只假手术小鼠作为对照。在乙醚麻醉之后, 通过向腔静脉中注射 1ml 0.1M CdCl₂ 杀死小鼠。用 5% 的缓冲福尔马林灌注固定心脏 10 分钟, 在 10% 的缓冲福尔马林中浸泡固定过夜。使用标准电子显微镜技术分析野生型和 TSP2^{-/-}小鼠的组织样品。在每个切片中随机选择七个视野, 进行计算机化面积测量, 对纤维化的程度进行定量。每个视野代表了 400 μm² 的面积。选择性地定量左心室间质的胶原面积, 不包括血管周围和心外膜的胶原。胶原面积分数计算如下: 每个视野中苦味酸天狼猩红染色的面积与总的心肌面积之比。以前对该步骤有详细的报导 (Cherayil 等, Proc Natl Acad Sci USA, 87 :7324-7328, 1990 ;Cleutjens 等, Am J pathol., 147 :325-338, 1995)。

[0055] 统计分析

[0056] 数据表示为平均值 ±SEM。使用单因素方差分析 (ANOVA) 与用于对多重比较进行校正的 Dunnett 事后分析相组合, 对每个研究组 (坎地沙坦处理的和两组未处理的肾素转基因大鼠) 的数据进行比较。使用 SD 大鼠作为内部对照组。使用统计包 SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA) 进行分析。P 值小于 0.05 认为是统计显著的。

[0057] 结果

[0058] 在 Ren-2 大鼠亚组中出现向显著心力衰竭的迅速转化和死亡在 10 周大处死的 8 只大鼠中以及在较后的日期处死的其他未处理的大鼠中观察到了肥厚的左心室和右心室。在 SD 对照中没有观察到 LVH。使用安慰剂处理的 14 只 Ren-2 大鼠中有 6 只在 12 到 14 周龄之间迅速向显著的临床 HF 转化, 与在 17 周观察期期间保持代偿的 8 只大鼠相比, 这些大鼠的心脏功能指标降低。在 HF-S 大鼠中观察到胸膜积液和 dP/dt_{max} 的剧烈下降, 在 HF-R 大鼠中这些改变不显著 (表 2)。在 13 周对杀死的动物进行分析时, 血管紧张素 II 阻断完全防止了心脏肥厚和衰竭的产生 (LV 重量 / 体重%, 2.52 ± 0.36, dP/dt_{max}, 8400 ± 202)。

[0059] 微阵列显示了在心力衰竭易感的大鼠中有 49 个基因过表达。

[0060] 对于微阵列分析, 我们首先研究了 HF-S 和 HF-R 组之间基因表达的生物学变异性。在 HF-S 和 HF-R 两个组中的大部分基因的表达水平非常相似。在研究表达的总共 12336 个基因中, 多步数据采集 (图 1) 只获得了 49 个基因, 其在 HF-S 大鼠中过表达。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 转氢酶是在处于衰竭中的心肌中唯一表达降低的基因。显著地, 骨活化素、TSP2、几个原胶原和血小板反应蛋白-1 的表达增加。所鉴定的基因中许多编码具有已知功

能的蛋白,而其他的是功能未知的基因,包括新基因和以前在心脏中没有检测出的基因。

[0061] 针对三个新的心脏基质相关基因的生物信息分析

[0062] 由于没有关于在 HF 中许多过表达的基因功能的信息,我们对所有 49 个基因进行了生物信息分析。起初,我们使用 GeneFIND(基因家族鉴定网络设计, Gene Family Identification Network Design)System (<http://www-nbrf.georgetown.edu>)对 HF 易感性基因作了广泛的功能分类, GeneFIND 将几个检索/比对工具组合在一起提供了迅速和精确的基因家族。这一策略表明大多数过表达的基因编码基质相关蛋白。让人关注的是, 3 个选出的易感性基因(骨活化素,血小板反应蛋白-2 和胶原 VI)的功能以前在心肌中没有报导。

[0063] 宏阵列显示了 HF 易感性基因通过血管紧张素 II 阻滞的标准化

[0064] 为了确证在这个由血管紧张素驱动的心力衰竭模型中肾素-血管紧张素系统(RAS)激活的作用,在使用亚增压(sub-pressor)剂量的坎地沙坦对 Ren-2 大鼠亚组从 7 周到 13 周进行处理之后,我们对微阵列确定的靶基因的表达进行了重新分析。除了改善血液动力学以外,ARB 处理阻止了所有 HF-相关的候选基因的过表达(数据未显示)。

[0065] 在 10 周的心肌活检显示 TSP-2 在随后迅速向 HF 发展的大鼠中上调。

[0066] 为了评价在血液动力学和临床上 HF 明显出现之前 3 个基质相关基因在心肌中的表达状态,我们开发出了一种技术以获得在自发搏动的大鼠心脏中获得活检物。在活检后,使大鼠恢复以检查它对心力衰竭是否具有抵抗性或者易感性。这个新的方法使我们在衰竭变得明显之前确定了基因表达的水平。TSP2 的表达只在那些在 12-14 周内发生心脏迅速失代偿的大鼠中在早期的肥厚阶段(10 周)明显增加(图 2a),而在接下来保持代偿状态的大鼠中,在该早期肥厚阶段没有上调,在非转基因对照大鼠心脏中也没有。其他 HF 相关候选基因例如骨活化素(图 2b)和胶原 VI(图 2c)的表达水平,在随后出现衰竭和与对照相比保持代偿的大鼠中在早期肥厚阶段都有升高。重要的是,广泛使用的心脏肥厚和衰竭的标记在所有大鼠的 10 周活检中都上调,而不论随后是代偿或者衰竭,因此不能区别有衰竭倾向和对衰竭有抗性的大鼠(图 2d)。与我们最初的微阵列研究一致,在出现心力衰竭之后这三个基因的表达进一步提高到它们在 10 周表达水平的 2 倍以上。代偿的大鼠,尽管在 10 周时有高的骨活化素、胶原 VI 和 BNP,在 17 周处死时这些基因的表达水平没有进一步显著提高(数据未显示)。

[0067] TSP-2 敲除(TSP^{-/-})小鼠不能存活于急性心肌梗死

[0068] 与多种大鼠心力衰竭模型相反,对响应压力超负荷一向产生心力衰竭的小鼠模型没有仔细文献证明。因此,我们对 22 只野生型和 16 只 TSP2^{-/-}小鼠进行前心肌梗死,以研究 TSP2 在急性心肌结构性损伤中的作用以及接下来在快速心肌重塑中的作用。因为所有的小鼠在 MI 之后前 72 小时内由于心脏破裂而死亡,所以 TSP2 缺失的小鼠不能够承受梗死。另一方面,100%的没有死于手术后立即并发症的野生型小鼠存活(图 3)。

[0069] MI 后 48 小时的计算机形态学测定显示与野生型小鼠相比,在 TSP2 缺失的小鼠中,心肌胶原明显的完全缺乏反应性的增加(分别是 $0.38 \pm 0.05\%$ 和 $0.70 \pm 0.04\%$; $p < 0.05$) (图 4)。光学显微镜和电子显微镜显示在 TSP2 缺失的小鼠中有广泛的心肌基质破损。野生型小鼠中没有一只显示了这样的表型(图 5)。

[0070] 讨论

[0071] 在这一研究中证明 TSP2 在心脏中表达的提高鉴定了那些倾向于向显著心力衰竭发展的肥厚心脏。进一步显示在对急性心脏负荷产生有效应答时需要 TSP2。相反, 已知的肥厚标记例如 BNP 在所有形式的心脏肥厚中总是表达增加, 因此不能够区别有衰竭倾向和抵抗衰竭的肥厚形式。

[0072] 尽管在血管和血栓形成疾病中对血小板反应蛋白家族进行了广泛研究, 还没有报导证实血小板反应蛋白在心力衰竭中的重要作用。我们的发现提示 TSP2 在心脏基质生物学中可能具有直接或者间接的关键功能。

[0073] TSP2 是一种分泌的基质细胞糖蛋白, 其功能多样, 并没有被完全认识。由于在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 或者果蝇基因组中没有发现 TSP2 的相近直向同源物, 看起来这个蛋白是为了应对在脊椎动物中细胞基质相互作用复杂性的增加而进化。以前在 TSP2 缺失小鼠中的研究已经表明 TSP2 表达的缺失导致具有不规则外形的异常大的胶原纤维, 这是 TSP2 组织细胞外基质作用的证据。而且, TSP2 缺失的小鼠的皮肤脆弱, 抗张强度下降。TSP2 缺失的皮肤成纤维细胞的基质附着缺陷, 在它们的培养物中基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的水平增加。本研究发现了 TSP2 在心肌中的两个表面上相互矛盾的功能。在 Ren-2 大鼠中的慢性高血压中, TSP2 在心脏中表达的增加鉴定了那些倾向出现心力衰竭的动物。尽管这种应答看起来表明 TSP2 的表达是有害的, 但是与在延长的时间内仍然保持代偿的大鼠中的应答相比, 有可能这种应答反映出随后向显著衰竭发展的大鼠中的一种升高的、已经被激活的损伤应答。很明确 TSP2 的表达是成年动物中对损伤的应答所特有的。另一方面在小鼠的实验性心肌梗死中, TSP2 的存在明显地保护了心脏不破裂。尽管由于涉及了不同的物种, 两个实验系统很难比较, 而且就 TSP2 缺失小鼠而言, 可能存在复杂的代偿性改变, 但是两组结果都证明了 TSP2 在损伤之后产生完整的功能性细胞外基质中起到的重要作用。就 TSP2 缺失的小鼠中切割皮肤伤口的愈合而言, TSP2 的缺失看起来是有益的, 因为在这种特殊的伤口愈合形式中, 所产生的血管生成的增加和 MMP2 的增加加速了愈合, 尽管已知在该组织中存在胶原纤维已经存在的结构的改变。但是提示由于心肌基质中类似的异常情况导致心脏组织事先具有固有的薄弱状况, 使心脏在梗死之后易出现破裂。

[0074] 这里的数据提示 TSP2 在心脏中表达的增加在向衰竭发展之前发生。因为已经知道血小板反应蛋白可以与整联蛋白结合, 所以 TSP2 可能通过整联蛋白信号介导了促纤维变性 (pro-fibrotic) 的效果。最近 Zhang 等 (*J Clin Invest* 111:833-841, 2003) 报导了具有适配子蛋白基因 Grb2 单倍体机能不全 (haploinsufficiency) 的小鼠, 对于压力超负荷产生的心脏纤维化有抵御作用。在能够由于机械压力导致的整联蛋白介导的粘着斑激酶的激活中有 Grb2 的参与。在我们的研究中我们发现 $\beta 1$ 整联蛋白是在高血压的 Ren2 大鼠的心脏中表达显著升高并且在衰竭的心脏中表达进一步升高的基因之一。我们最近的观察结果 -- 心脏成纤维细胞的体外伸展提高了 $\beta 1$ 整联蛋白的蛋白水平, 证明了这一发现 (S. Pokharel 和 Y. M. Pinto, 未发表的数据)。

[0075] 应当注意用于胶原定量的苦味酸天狼猩红染色技术依赖于胶原纤维的大小、排列和装配, 才能显示可见的橙红色偏振。由于 TSP2 缺失小鼠具有异常的胶原纤维和纤维结构, 特别组织较差的纤维和无规更大的纤维, 测量的双折射可能会受到这些改变的影响。

[0076] 总之, 根据本发明提出 TSP2 发挥心脏基质完整性的至关重要的调节物的功能。由于在实验和临床形式的压力超负荷诱导的心力衰竭中都具有细胞外基质形成的特征, TSP2

的早期表达可能反映出了在代偿性肥厚向心力衰竭的转变中重要的基质应答。这些观察结果表明 TSP2 心脏中过表达的早期检测可以鉴定那些易于出现心力衰竭的肥厚的心脏,可以促进易于发展为心力衰竭的病人的早期发现和可能的治疗。

[0077] 实施例 2

[0078] 半乳糖苷凝集素 -3 标志了倾向于出现衰竭的肥厚的心脏中活化的巨噬细胞

[0079] 巨噬细胞趋化蛋白和多种不同的细胞因子心肌表达的升高提示在心力衰竭 (HF) 中有巨噬细胞的参与。但是还不清楚巨噬细胞是否仅仅对已经出现的损伤产生应答还是积极地参与 HF 的早期阶段。为了研究高血压性 HF 中的这些机制,发明人使用了纯合的高血压性 TGR(mRen2)27(Ren-2) 大鼠。这些大鼠在 10 周龄时一律出现心脏肥厚,此后一些大鼠保持代偿性直至 17 周,而其他的大鼠在 12 到 14 周龄时出现衰竭和死亡。该研究表明心脏中半乳糖苷凝集素 -3 的表达特异地 标志出倾向出现衰竭的肥厚的心脏。在有衰竭倾向的肥厚的心脏中巨噬细胞看起来被早期和特异地激活,并且来源于巨噬细胞的介体如半乳糖苷凝集素 -3 可能导致心脏纤维化的发展和向 HF 的发展。

[0080] 材料和方法

[0081] 转基因大鼠和血液动力学研究

[0082] 纯合 Ren-2 大鼠获自 Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, Germany。我们研究了 16 只雄性 Ren-2 大鼠和作为对照的 8 只年龄相当的来自非转基因背景的 Sprague Dawley (SD) 大鼠。在 16 只 Ren-2 大鼠中,8 只 Ren-2 大鼠在 7-13 周龄使用 0.05mg/kg/ 天的坎地沙坦进行处理,坎地沙坦是一种血管紧张素 II 受体类型 I 阻断剂 (ARB)。在 8 只未处理的 Ren-2 大鼠中,4 只在 13 周发生 HF 时处死。对剩下的 4 只 Ren-2 大鼠进行密切监测,在 17 周时处死,这时它们仍然没有出现衰竭的临床症状。在处死前和在 10 周时进行血液动力学测量。在处死之后测量心脏、肺脏重量和体重。对动物进行管理和处理的步骤经过学院的动物管理委员会批准。

[0083] 10 周大的 Ren-2 大鼠的心肌活检

[0084] 对另外一组 12 只 Ren-2 大鼠和 4 只 SD 大鼠进行麻醉,将一个钝的 20 号针头插入气管中作为气管套管。套管与一个使用室内空气的容积循环式啮齿动物呼吸机 (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA) 相连,潮气量是 2.5 到 3 毫升,呼吸速率是 80 次呼吸 /min。在显微解剖镜的视觉帮助下在左侧第四个肋间隙切一个 5mm 的切口,以通到胸部。使用 0.35mm 的定制针头取活检。

[0085] cDNA 微阵列

[0086] 选择从标准化的大鼠 cDNA 文库 (总共 12336 个基因) 中分离 cDNA 克隆,用于微阵列分析 (Incyte Genomics, CA, USA, 大鼠 GEM-2/3)。将 PCR 扩增的每一个 cDNA 插入物印制在玻璃表面上成为高密度阵列。在这些玻璃芯片上用 3 个不同时刻的两个 SD 和六个 Ren-2 大鼠心肌 mRNA 进行一式两份杂交。将表达显示出统计显著 ($P < 0.001$) 改变的靶基因 (在 HF-S 组中至少有 2 倍过表达) 再次印制在亚阵列上进一步进行分析,这样使每个基因都独立地分析了四次,提高了可靠性水平。采用的数据采集 (Tan FL 等, Proc Natl Acad Sci. 99 :11387-11392, 2002) 和验证方案在以前有详细描述 (Bandman O 等, Ann NY Acad Sci. , 975 :77-90, 2002)。

[0087] 引物和探针

[0088] 根据 GenBank™中的序列, 使用 Primer Express Software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 设计半乳糖苷凝集素-3 特异的引物 (正向 5' -CCCGACTGGACCACTGACA-3', 反向, 5' -CAGCATGCGAGGCATGACT-3' 以及探针, 5' -TGC CCTACGATATGCCCTTGCCTG-3')。

[0089] RNA 分离和实时 PCR

[0090] 使用 RNeasy Mini Kit 根据 RNeasy Mini 实验步骤 (QIAGEN, Hilden, Germany), 从大鼠左心室分离 RNA, 储存于 -80°C。使用 Pico Pure RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) 根据生产商的说明, 从大鼠心脏活检物中分离 RNA。发现对于 Taqman™检测最佳的 PCR 条件是 12.5 μm 2×PCR Master Mix, 终浓度为 5mM MgCl₂, 300nM 每个引物, 200nM 探针以及 10ng cDNA 模板, 总体积是 25 μl。

[0091] 测序、膜点样和宏阵列的 cDNA 杂交

[0092] 从 Incyte Genomics 获得通过微阵列鉴定的差异表达的基因的克隆, 并使用 5' -GGTGACACTATAGAAGAGC-3' 引物 (Eurogentec, Seraing, Belgium) 测序。在确证身份以后, 使用 5' -ACCATGATTACGCCAAGCTC-3' 和 3' -ACGACGGCCAGTGAATTGAA-5' 引物通过 PCR 反应对质粒插入物进行扩增。然后将每个克隆一式两份点样与尼龙膜上 (宏阵列)。使用个人 fx-phospho imager (Cyclone System Packard, Meriden, CO, USA) 对斑点印迹进行扫描。

[0093] 蛋白质分离和 Western 印迹

[0094] 根据以前的描述进行蛋白质分离和 Western 印迹。用含有 Tween20 的 Tris 缓冲盐水 (TBS-T) 将一抗 (半乳糖苷凝集素-3, Bioreagents ;ED-1 和 OX-6 由 Dr. M. de Winther, Department of Molecular Genetics, University of Maastricht, The Netherlands 惠赠) 稀释为 1/1000。二抗 (辣根过氧化物酶体缀合的 IgG, Cell Signaling Technology) 用 TBS-T 稀释为 1/2000。根据生产商的说明使用增强化学发光 (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL, USA) 呈现蛋白质条带。

[0095] 免疫组化、半乳糖苷凝集素细胞化学和共聚焦显微镜术如以前的描述 (Gabijs 等, Anal Biochem. :189 :91-94, 1990) 通过特异的抗半乳糖苷凝集素-3 单克隆抗体以及生物素化的半乳糖苷凝集素-3 呈现半乳糖苷凝集素-3 的表达和可接近的结合位点。如其他文献的详细描述 (Andre 等, Chembiochem. 2 :822-830, 2001), 在保持活性的条件下使半乳糖苷凝集素-3 生物素化。在激光共聚焦扫描显微镜术中, 使用 FITC 标记的亲和素检测半乳糖苷凝集素结合位点。使用德克萨斯红标记的二抗以免疫细胞化学的方式呈现增殖细胞核抗原 (PCNA)。关于该步骤在其他文献中有进一步的详细描述 (Broers 等, J Cell Sci. : 112(Pt 20) :3463-3475, 1999)。

[0096] 心脏成纤维细胞增殖和脯氨酸掺入检测

[0097] 如以前的描述 (Pokharel 等, Hypertension, 40 :155-161, 2002), 从 2 日龄的新生 Sprague-Dawley 大鼠中分离大鼠心脏成纤维细胞。细胞在添加 10% 胎牛血清 (FBS)、1% L- 谷氨酸、50U/ml 青霉素和 0.1g/L 链霉素的 Dulbecco 改进 Eagle' s 培养基 (DMEM) 中, 在 37°C 下在湿润的含有 5% CO₂ 的空气中培养。接种后 24 小时将细胞用含有 0.5% FBS 的培养基孵育 24 小时使其休眠。然后使用鼠的重组半乳糖苷凝集素-3 (对照、10 μg/ml 和 30 μg/ml) 处理细胞 24 小时。使用放射性标记的甲基 [³H] 胸苷掺入 (0.5 μCi 每孔)

检测测定分裂细胞的数目。使用 LKB-Wallace beta 计数器 (FSA Laboratory Supplies, Loughborough, UK) 检测成纤维细胞和闪烁液体混合物中的放射性。

[0098] 使用 [³H] 脯氨酸掺入检测测定分泌的胶原。简而言之,心脏成纤维细胞接种于 6 孔培养板中至 90-100% 汇合。在孵育的最后 24 小时中,加入 15 μ Ci/ml 的 L-[³H] 脯氨酸。使用 10% 三氯乙酸 (TCA) 沉淀条件培养基中掺入的 [³H] 脯氨酸,用液闪计数器计数。

[0099] 统计分析

[0100] 数据表示为平均值 \pm SEM。使用单因素方差分析 (ANOVA) 与用于对多重比较进行校正的 Dunnett 事后分析相组合,对每个研究的数据进行比较,使用 SD 大鼠作为内部对照组。使用统计包 SPSS 10.0 (Chicago, IL, USA) 进行分析。P 值小于 0.05 认为是统计显著的。

[0101] 结果

[0102] HF-S 大鼠中恶化的心脏功能以及心脏纤维化

[0103] 在 8 只安慰剂处理的大鼠中观察到肥厚的左右心室。相反,在坎地沙坦处理和非转基因对照大鼠中没有出现 LV 增加。8 只没有处理的大鼠中 4 只在 12-14 周龄期间发生显著的临床 HF,伴随出现下降的心脏功能指标。剩余 4 只大鼠在 17 周的研究阶段中保持代偿化。在 HF-S 大鼠中明显出现伴随着胸膜积液 (肺脏重量 / 体重% :HF-S, 10.61 \pm 0.7 对 HF-R, 4.97 \pm 0.2, $P < 0.001$) 和左心室舒张末期压力 (LVEDP) 升高的显著 HF,这些在 HF-R 大鼠和或 ARB 处理的大鼠中不存在 (图 6a, b 和 c)。在 10 周时所有安慰剂处理的 Ren-2 大鼠均出现 LVH 但是没有失代偿的血液动力学的证据 (LV 重量 / 体重% :Ren-2, HF-S, 3.88 \pm 0.08 ;非转基因对照, 2.15 \pm 0.2, 以及 dP/dt_{max} :Ren-2, 8556 \pm 296 对非转基因对照 8780 \pm 373)。由计算机辅助的光密度测量测定的心肌胶原含量显示与 HF-R 大鼠相比, HF-S 大鼠中具有更程度的心脏纤维化。ARB 使 LVH 和心肌胶原含量标准化,这样它仍然可以与具有正常血压背景的品系的相当 (图 7)。

[0104] 微阵列显示了 HF 易感大鼠中免疫相关基因的丰度

[0105] 首先,我们检查了 HF-S 和 HF-R 组之间基因表达的生物变异性。来自两个组的样品对之间大部分基因的表达水平高度相关。我们重点关注衰竭和未衰竭的肥厚心脏之间差异表达的基因。对数据进行 Log 转化,只有超过 2 倍阈值的表达水平的统计显著的差异 ($P < 0.05$) 才认为是差异表达。半乳糖苷凝集素 -3 是最突出过表达的基因,在 HF 大鼠中表达升高 5 倍以上 (表 3)。有趣的是,主要组织相容性复合体抗原 II (MHC-II) 和免疫球蛋白受体基因也在这些过表达的基因中。

[0106] 宏阵列显示 HF 易感性基因被血管紧张素 II 阻滞的标准化

[0107] 为了验证在 HF 中差异表达的基因,我们首先测序然后将这些基因重新点样在尼龙膜上 (宏阵列),在不同的生物样品中重复杂交,这样对克隆的身份进行确证。开始由微阵列确定的 7 个主要指标基因在这里也有过量表达。为了确证在这个由血管紧张素驱动的 HF 模型中肾素 - 血管紧张素系统 (RAS) 激活的作用,在使用亚增压剂量的坎地沙坦对 Ren-2 大鼠的亚组从 7 周到 13 周进行处理之后,我们对微阵列确定的靶基因的表达进行了重新分析。血管紧张素 II 阻滞完全阻止了心脏肥厚和衰竭的发生。在基因表达水平上,它阻止了所有 HF- 相关的候选基因的过表达。引起注意的是半乳糖苷凝集素 -3 的表达也被阻止了。

[0108] Western 印迹显示在正在衰竭的心肌中半乳糖苷凝集素 -3 具有高表达

[0109] 考虑到半乳糖苷凝集素 -3 转录水平的强烈增加,我们重点关注了它在心肌中的蛋白质水平。与在微阵列 / 宏阵列中得到的结果相当,在相同的动物组 (具有最大程度的心脏纤维化,在 13 周时迅速发生心脏失代偿) 中观察到了最高水平的半乳糖苷凝集素 -3 表达 (HF-S, 94.6 ± 8.9 ; HF-R, 35 ± 5.6 , $P < 0.01$) (图 8a 和 b)。

[0110] CD68 阳性、MHC-II 抗原和半乳糖苷凝集素 -3 的共定位

[0111] 我们通过免疫组化对半乳糖苷凝集素 -3 在大鼠心肌中的分布进行了监测。从组织学上看, HF 易感的大鼠显示了成片的纤维化区域。在没有受到影响的区域中组织的结构保持完好。相反在 ARB 处理的和 SD 大鼠中,以及在肥厚的未衰竭的 HF-R 大鼠中都没有看到这些高度纤维化的区域。重要的是,半乳糖苷凝集素 -3 阳性区域显示了显著的组织损伤和高度的纤维化。从形态学上看,半乳糖苷凝集素 -3 阳性细胞相当大。为了确证这些细胞是巨噬细胞的假设,我们使用巨噬细胞特异的抗体 (ED-1) 进行了连续切片分析。半乳糖苷凝集素 -3 阳性的区域与巨噬细胞特异染色共定位 (Co-localized)。这些巨噬细胞也强烈表达 MHC-II 抗原,表明这些细胞在抗原呈递中的积极作用。这些特征在 HF-R 大鼠和非转基因对照中并不显著。

[0112] 在心脏成纤维细胞中的半乳糖苷凝集素 -3 结合位点

[0113] 在确定半乳糖苷凝集素 -3 在巨噬细胞中有强烈表达之后,我们确定半乳糖苷凝集素 -3 是否结合心脏成纤维细胞。我们使用生物素化的半乳糖苷凝集素 -3 呈现心脏成纤维细胞上的半乳糖苷凝集素 -3 结合位点。在 0.1% Triton 透化的细胞中,半乳糖苷凝集素 -3 结合位点的存在导致静止细胞中的弥散细胞质和细胞核外染色 (图 10a)。相反,增殖的成纤维细胞在细胞核周围有增强的染色,显示了与有丝分裂相关的染色特征的改变 (图 10b)。这个型式由共聚焦显微镜术独立监测。实际上,这些实验确证了在增殖的 (即 PCNA 阳性) 心脏成纤维细胞的细胞核周围可接近的半乳糖苷凝集素 -3 配基紧密存在 (图 10c、d 和 e),反映了半乳糖苷凝集素 -3 过表达状态中细胞周期的激活。

[0114] 半乳糖苷凝集素 -3 诱导成纤维细胞增殖和胶原产生

[0115] 在提供了心脏成纤维细胞中存在可接近位点的证据之后,我们确定了半乳糖苷凝集素 -3 是否促进心脏成纤维细胞的生长。使用重组的半乳糖苷凝集素 -3,我们进行了增殖试验。加入不同浓度的半乳糖苷凝集素 -3 (0, 10 和 $30 \mu\text{g/ml}$),使用或者不使用血清富集。我们观察到使用 10 和 $30 \mu\text{g/ml}$ 外源半乳糖苷凝集素 -3 24 小时后心脏成纤维细胞增殖显著增加 ($30 \mu\text{g/ml}$ 半乳糖苷凝集素 -3, 347 ± 17.5 计数每分钟 (cpm); $10 \mu\text{g/ml}$ 半乳糖苷凝集素 -3, 309 ± 4.8 cpm; 对照, 145 ± 4.8 ; $p < 0.01$)。然后通过加入外源半乳糖苷凝集素 -3,使用放射性脯氨酸掺入测定,监测了心脏成纤维细胞胶原的产生。在培养基中含有 $30 \mu\text{g/ml}$ 半乳糖苷凝集素 -3 时,脯氨酸掺入提高了大约 66% ($30 \mu\text{g/ml}$ 半乳糖苷凝集素 -3, 1066 ± 56 cpm; 对照, 707 ± 52.8 cpm; $p < 0.05$)。更低浓度的半乳糖苷凝集素 -3 不能产生显著的作用 ($10 \mu\text{g/ml}$ 半乳糖苷凝集素 -3 992 ± 72 cpm, $p = 0.13$)。

[0116] 10 周时的心肌活检显示在后来快速发展为 HF 的大鼠中高半乳糖苷凝集素 -3 表达

[0117] 为了评估在 HF 成为血液动力学和临床上明显之前在心肌中的半乳糖苷凝集素 -3 的表达状态 (即 10 周龄),我们开发了获得自主搏动的大鼠心脏中心脏活检物的技术。活检后,使大鼠恢复以确定其是否抵抗或易感 HF。通过实时 PCR 测量,只在后来发展为 HF 的

大鼠中半乳糖苷凝集素-3的心肌表达增加(任意单位 5.8 ± 0.17),而其在随后仍保持代偿的大鼠中(3.4 ± 0.2)以及非转基因对照大鼠的心脏中(2.5 ± 0.033)以相对较低的水平表达(图12)。

[0118] 讨论

[0119] 本研究的目的是确定在肥厚的心室向衰竭转化的过程中的特异机制。我们证明半乳糖苷凝集素-3,一种巨噬细胞表达的蛋白,在衰竭倾向的肥厚心脏中早期和特异地表达。而且,我们确定半乳糖苷凝集素-3与心脏成纤维细胞内的结合位点结合,激活心脏成纤维细胞增殖和胶原产生,提示这一过程可能导致了心肌硬化并且很可能导致向HF的发展。

[0120] 以前的研究已经提示了巨噬细胞和炎性应答在HF中的作用。但是这些研究留下了未解答的问题,即巨噬细胞的激活是在HF之前出现还是仅仅伴随HF出现。而且,也没有对巨噬细胞与心脏纤维化关联的特异机制进行解释。

[0121] 作为首先在腹膜巨噬细胞表面发现的抗原,半乳糖苷凝集素-3是半乳糖苷凝集素家族中唯一的嵌合类型成员。它具有凝集素基团,其与 β 半乳糖苷以及蛋白质共同具有不依赖于钙的特异性,它位于巨噬细胞的吞噬细胞杯和吞噬体内。除了其抗凋亡和生长促进作用以外,半乳糖苷凝集素-3还调控单核细胞趋化性、化动性以及调节细胞因子的可获得性。而且,最近的研究还提示在通过Fc γ 受体(Fc γ R)交联之后,半乳糖苷凝集素-3在巨噬细胞的吞噬作用中起重要的作用。

[0122] 有趣的是,我们还观察到Fc γ R在我们的HF模型中的过表达(表3)。

[0123] 从10周龄的大鼠得到的活检显示只有在向迅速衰竭转化的大鼠中才出现半乳糖苷凝集素-3表达的增加。考虑到半乳糖苷凝集素-3的促炎和成纤维生长促进作用,这个阶段表达的增加可能促进了有利于衰竭的环境。与我们的发现一致,巨噬细胞的肝脏类似物(即枯否细胞)表达的半乳糖苷凝集素-3也参与在肝脏中诱导合成过量的纤丝形成胶原。这提示半乳糖苷凝集素-3是一个巨噬细胞相关的促纤维化介体,也是另外一种炎症浸润细胞因子,它在巨噬细胞浸润的特征条件下具有影响心脏重塑的能力。半乳糖苷凝集素-3如何加快向HF发展的另一个假说来自对半乳糖苷凝集素-3是晚期糖基化终产物的第三个受体(RAGE-3)的发现,该受体在胶原交联和心肌硬化方面起关键的作用。

[0124] 我们还证明了半乳糖苷凝集素-3与细胞内受体结合并且诱导心脏成纤维细胞增殖,增加胶原产生。尽管半乳糖苷凝集素-3开始是作为糖结合蛋白被发现的,但是已知半乳糖苷凝集素-3与细胞内除了糖缀合物以外的靶也发生特异相互作用。以前的研究提出了几个作为半乳糖苷凝集素-3结合位点的分子,包括Mac-2结合蛋白和层粘连蛋白。但是,仍然不知道是什么诱导增殖细胞中半乳糖苷凝集素-3结合元件迅速地向核周围迁移。它是半乳糖苷凝集素-3结合位点从正在分裂的细胞核向外运输(离心迁移)还是这些受体在指导下从胞浆向细胞核的转移(向心迁移),这还需要进一步的探究。

[0125] 本研究提示免疫系统激活以及半乳糖苷凝集素-3的产生在从左心室肥厚向HF发展过程中的重要作用,并表明在促免疫和促纤维化的因子之间的联系。在HF之前半乳糖苷凝集素-3表达的增加可能反映了在肥厚的正在衰竭的心室中巨噬细胞早期和异常的激活。反过来,半乳糖苷凝集素-3可能释放由活化的巨噬细胞向心脏纤维化的信号。对半乳糖苷凝集素-3的外周检测可以作为HF的指示,在治疗上,对半乳糖苷凝集素-3的作用进

行抑制可能成为新的治疗靶标,以抵消过度心脏纤维化。

[0126] 实施例 3 人血清中半乳糖苷凝集素 -3 的分析

[0127] 在患有心血管疾病的患者的血清中检测半乳糖苷凝集素 -3 水平。使用商品化的通过 ELISA 测量半乳糖苷凝集素 -3 的试剂盒。结果总结在表 4-6 中。显示半乳糖苷凝集素 -3 在患有心血管疾病如心力衰竭、LVH 的患者的血清中显著升高。而且,也找到了健康对照受试者中半乳糖苷凝集素 -3 水平的上限,这个上限在大多数 CHF 患者中都被超过了。

[0128] 根据本发明,第一次证明在人受试者的血清中对半乳糖苷凝集素 -3 水平的测定,将患病与非患病的受试者可靠地区分开,这样,与已知的肌细胞标记 (BNP) 相结合,为非肌细胞的疾病过程提供了额外的信息。

[0129] 数据表格:

[0130] LVH = 高血压,肥厚

[0131] CHF = 心力衰竭

[0132] Inf1 = 炎性血管疾病

[0133] Poscon = 疾病的混和组

[0134] Infarct = 梗死的患者

[0135] Healthy = 健康对照

[0136] 表 1. 候选基因转录产物实时定量 RT-PCR 引物和探针的序列

[0137]

基因/引物	序列 (5' → 3')	位置	物种
细胞亲环素 A (M19533)			
Fwd	GGGAGAAAGGATTTGGCTATAAGG	167-190	大鼠
探针	TGAAGTCACCACCCCTGGCACATGAAT	219-244	
Rev	GCCACCAGTGCCATTATGG	249-267	
血小板反应蛋白 2 (XM.214778)			
Fwd	GAAATGGTCTACTTCTCAGACCTCAAG	603-629	大鼠
探针	CCCTGCTCTCTAGGCATCTCTGCACTCAT	631-659	
Rev	GCACACTGCTGGAGCTGGA	791-809	
骨活化素 (NM.002510)			
Fwd	GGACTTCATTGTGACCTGCAAA	1350-1371	大鼠
探针	CCACTCCCACGGAAGCCTGTACGAT	1376-1400	
Rev	ACCCTGTTCTGGGCGATCT	1421-1439	
胶原 VI (TC322135)			
Fwd	CCCTCCTTGCAGGCAGAAC	816-834	大鼠
探针	ATGCCTTGCAGATCAATAACACAGCAGTAGG	845-875	
Rev	CAGGAGGACCGAGAGCTCAT	897-916	
脑钠肽 (M25297)			
Fwd	GCTGCTTTGGGCAGAAGATAGA	350-371	大鼠
探针	CCTCAGCCCGTCACAGCCCAA	394-414	
Rev	GCCAGGAGGTCTTCCTAAAACA	416-437	

[0138] 探针的 5' 和 3' 位置分别标记了 6-羧基荧光素报告因子和 6-羧基四甲基罗达明淬灭剂。根据来自 GenBank 的序列 (登录号在括号中给出) 注释引物和探针的位置。Fwd,

正向 ;Rev, 反向。

[0139] 表 2. 10 周 (肥厚, 无 HF)、12 到 14 周 (发展为 HF) 以及 17 周 (代偿性肥厚) 大鼠的血液动力学参数的比较

[0140]

参数	10 周 (n=8)		12-14 周 (n=6)		17 周 (n=8)	
	SD	Ren-2	SD	Ren-2	SD	Ren-2
LVW/BW	2.15±0.2	3.88±0.08*	2.21±0.5	3.91±0.9*	2.57±0.12	3.60±0.5*
dP/dt _{max}	9010±373	8556±296	9297±221	3764±198**	7612±124	7814±658
-dP/dt _{max}	8943±976	8200±482	9648±514	3251±312**	6937±845	6967±654

[0141] LVW/BW, 按照体重校正的左心室重量 ;dP/dt_{max} (mmHg/s), LV 压力升高的最大速率 ; -dP/dt_{min}, LV 压力降低的最大速率 ;*, P < 0.05 对年龄匹配的 SD 大鼠 ;#, P < 0.01 对 10 周和 17 周 Ren-2 大鼠。

[0142] 表 3. 候选基因转录产物半定量 PCR 和实时定量 RT-PCR 引物和探针的序列

[0143]

基因/引物	序列 (5' → 3')	物种
亲环素 A (NM_021130)		
Fwd	TGCTGGACCCAACACAAATG	
探针	TTCCCAGTTTTTCATCTGCACTGCCA	
Rev	TGCCATCCAACCACTCAGTC	人
半乳糖苷凝集素-3 (NM_002306)		
Fwd	CTCGCATGCTGATAACAATTCTG	
探针	CGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATT	
Rev	GCAACATCATTCCTCTTTGG	人
MCP-1 (M57441)		
Fwd	GCAGGTCTCTGTCACGCTTCT	
Rev	GATGATCCCAATGAGTCGGCT	大鼠

[0144] 探针的 5' 和 3' 位置分别标记了 6- 羧基荧光素报告因子和 6- 羧基四甲基罗达明淬灭剂。根据来自 GenBank 的序列 (登录号在括号中给出) 注释引物和探针的位置。Fwd, 正向 ;Rev, 反向。

[0145] 表 4. 半乳糖苷凝集素 -3, 描述

[0146]

	N	平均值	标准偏差	标准误	平均值的 95%置信区间		最小	最大
					低边界	高边界		
LVH	22	6.253	1.457	.311	5.607	6.899	3.7	8.8
chf	39	9.392	1.845	.295	8.794	9.990	5.0	13.1
infl	15	7.427	1.678	.433	6.498	8.356	4.6	10.5
poscon	3	6.660	.871	.503	4.496	8.824	5.9	7.6
infarct	6	6.317	1.262	.515	4.992	7.641	5.3	8.5
healthy	26	4.717	1.125	.221	4.262	5.171	2.8	6.8
总计	111	7.169	2.390	.227	6.720	7.619	2.8	13.1

[0147] 表 5. ANOVA

[0148]

	平方和	df	平方均值	F	Sig.
组间	373.605	5	74.721	30.832	.000
组内	254.464	105	2.423		
总计	628.069	110			

[0149] 表 6. 多重比较。因变量:半乳糖苷凝集素 -3 Bonferroni

[0150]

(I) 组	(J) 组	平均差异 (I-J)	标准误	Sig.	95% 置信区间	
					下限	上限
LVH	chf	-3,139*	,415	,000	-4,385	-1,892
	infl	-1,173	,521	,397	-2,739	,392
	poscon	-,407	,958	1,000	-3,285	2,471
	infarct	-6,348E-02	,717	1,000	-2,217	2,090
	healthy	1,536*	,451	,014	,182	2,891
chf	LVH	3,139*	,415	,000	1,892	4,385
	infl	1,965*	,473	,001	,544	3,386
	poscon	2,732	,933	,063	-6,994E-02	5,534
	infarct	3,075*	,683	,000	1,024	5,126
	healthy	4,675*	,394	,000	3,491	5,859
infl	LVH	1,173	,521	,397	-,392	2,739
	chf	-1,965*	,473	,001	-3,386	-,544
	poscon	,767	,985	1,000	-2,191	3,724
	infarct	1,110	,752	1,000	-1,149	3,369
	healthy	2,710*	,505	,000	1,194	4,226
poscon	LVH	,407	,958	1,000	-2,471	3,285
	chf	-2,732	,933	,063	-5,534	6,994E-02
	infl	-,767	,985	1,000	-3,724	2,191
	infarct	,343	1,101	1,000	-2,963	3,650
	healthy	1,943	,949	,647	-,908	4,794
infarct	LVH	6,348E-02	,717	1,000	-2,090	2,217
	chf	-3,075*	,683	,000	-5,126	-1,024
	infl	-1,110	,752	1,000	-3,369	1,149
	poscon	-,343	1,101	1,000	-3,650	2,963
	healthy	1,600	,705	,380	-,518	3,718
healthy	LVH	-1,536*	,451	,014	-2,891	-,182
	chf	-4,675*	,394	,000	-5,859	-3,491
	infl	-2,710*	,505	,000	-4,226	-1,194
	poscon	-1,943	,949	,647	-4,794	,908
	infarct	-1,600	,705	,380	-3,718	,518

[0151] * 平均差异在 .05 水平显著。

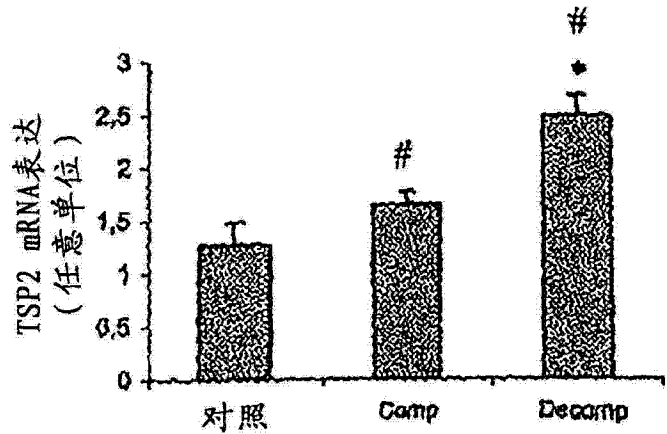
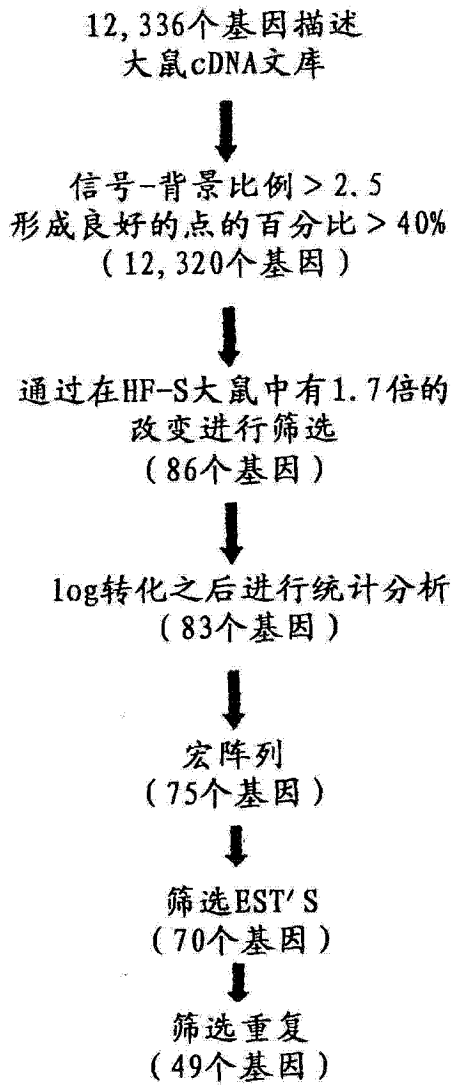


图 2A

图 1

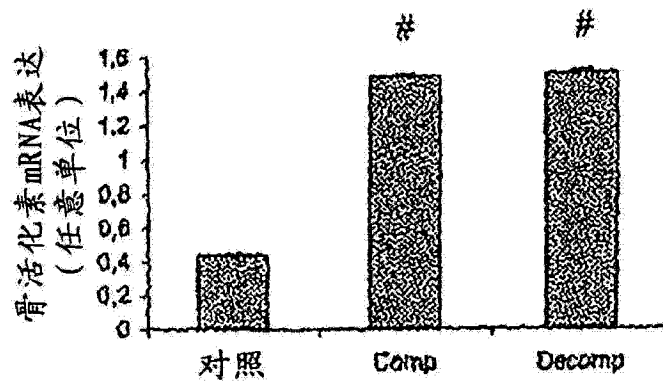


图 2B

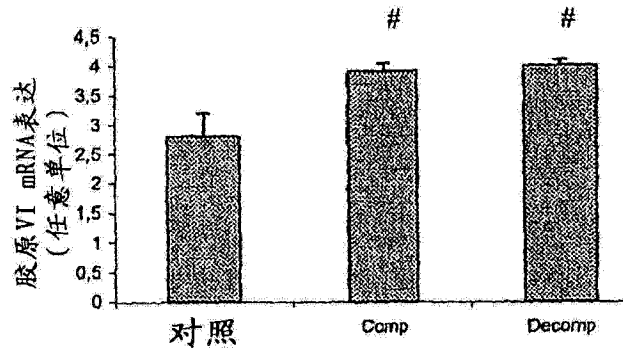


图 2C

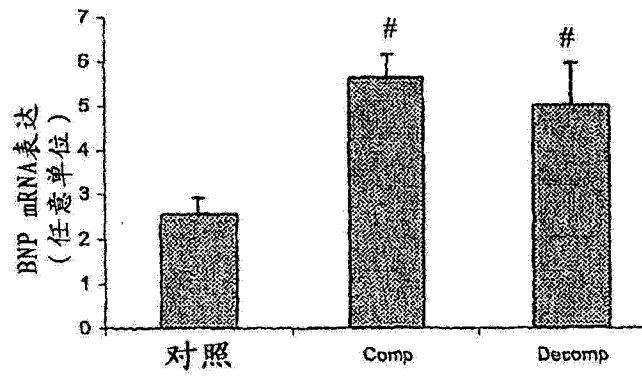


图 2D

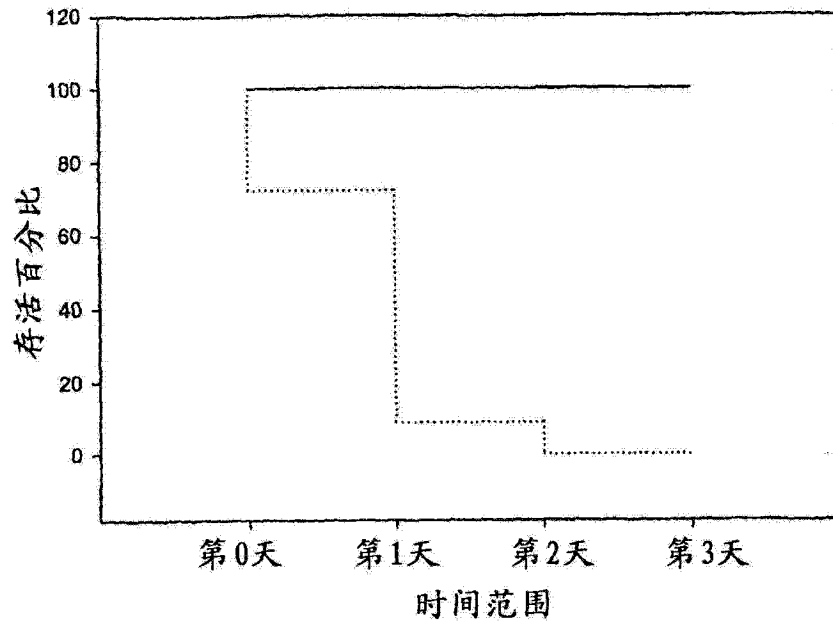


图 3

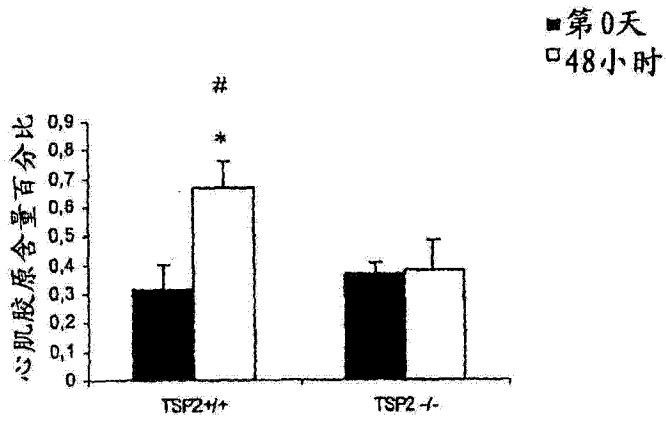


图 4

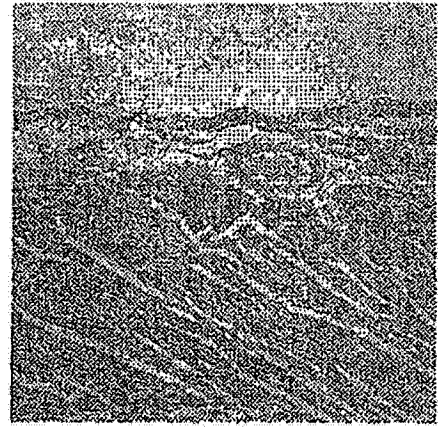


图 5A

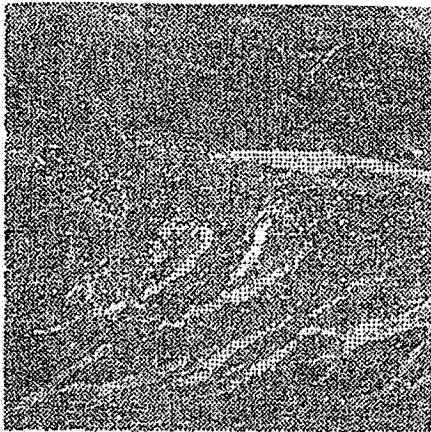


图 5B

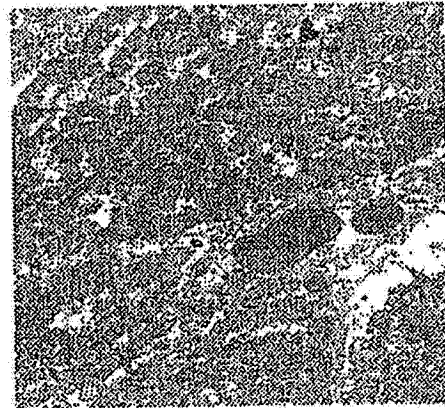


图 5C

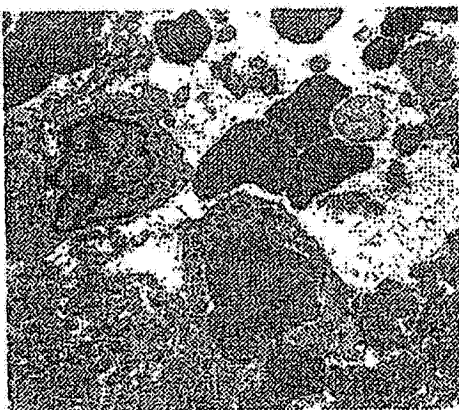


图 5D

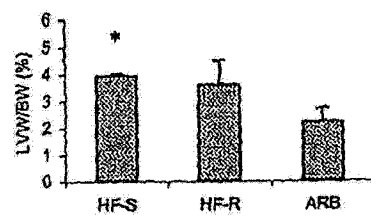


图 6A

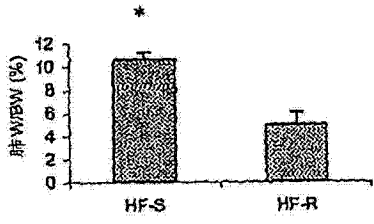


图 6B

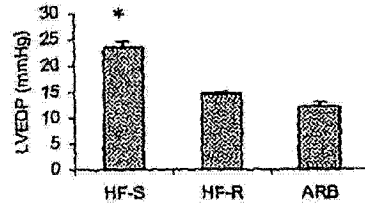


图 6C

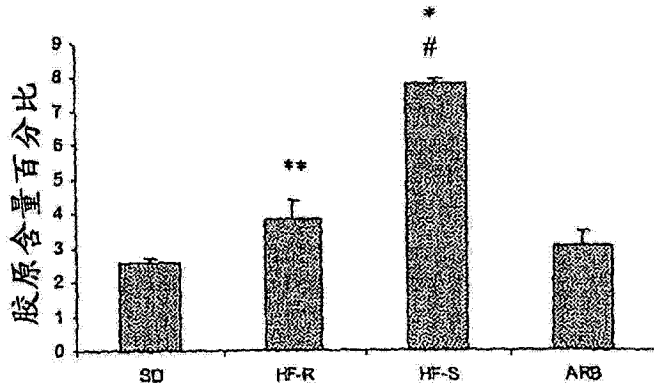


图 7

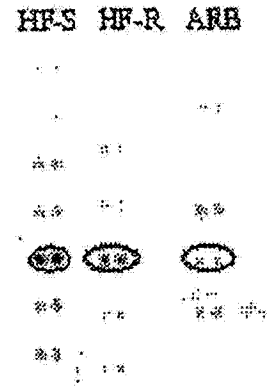


图 8A

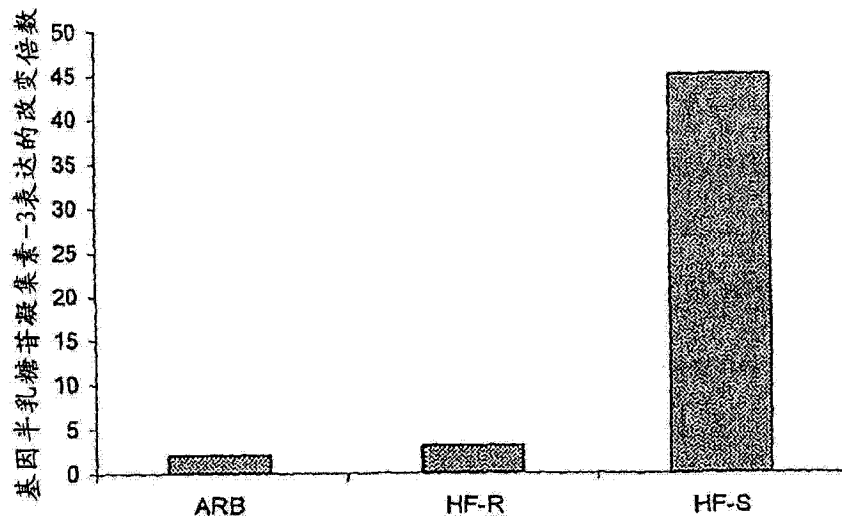


图 8B

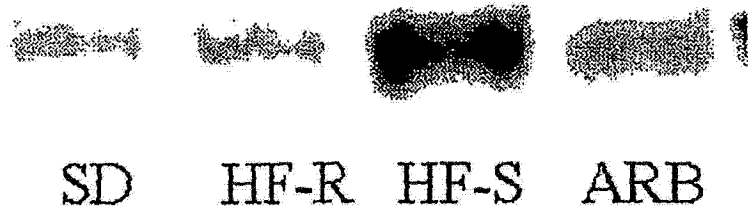


图 9A1

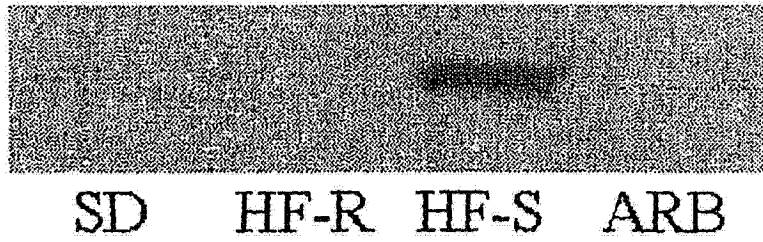


图 9B1

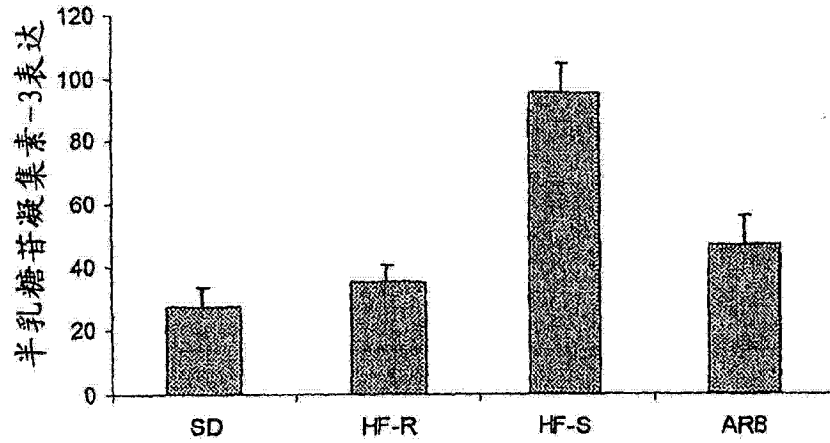


图 9A2

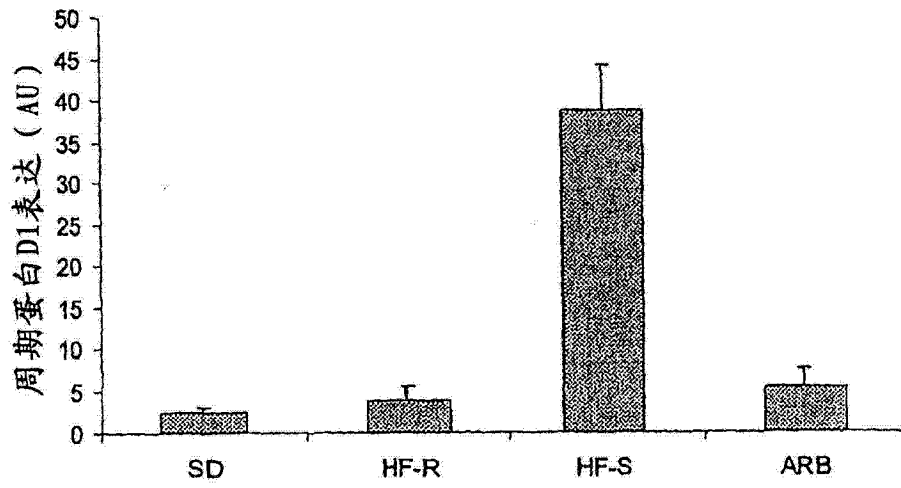


图 9B2



图 10A

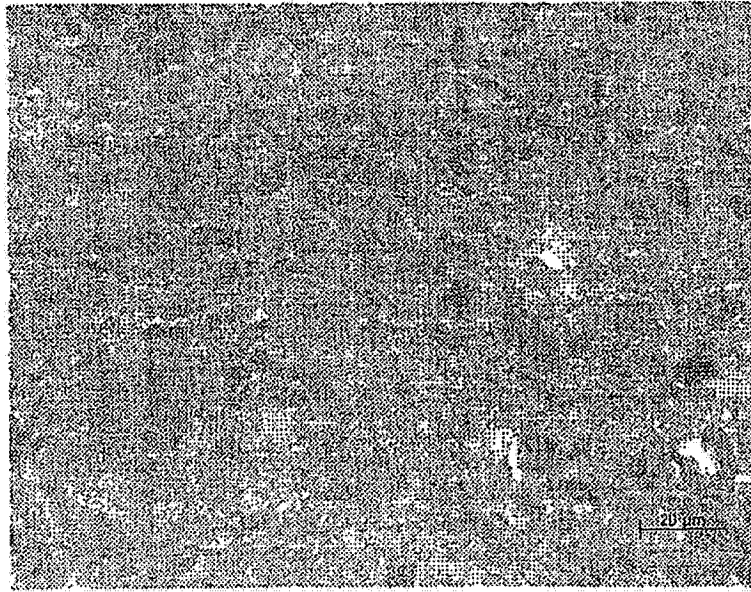


图 10B

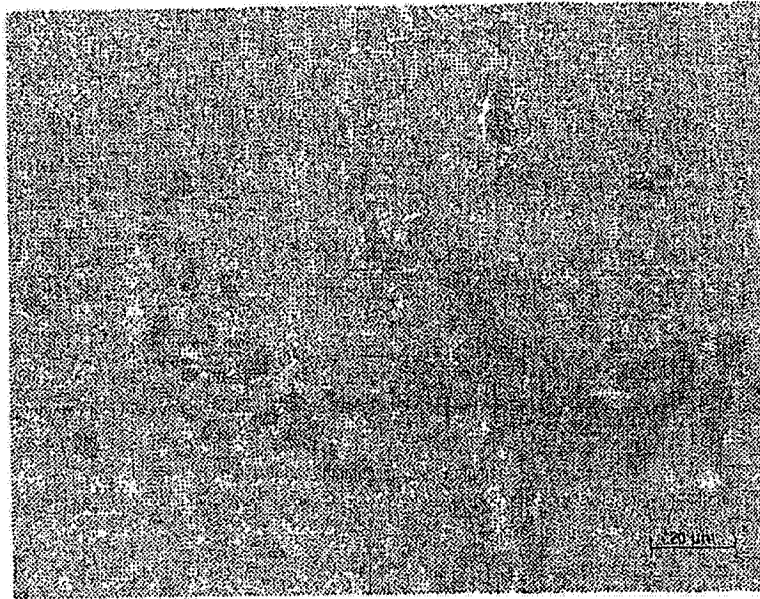


图 10C

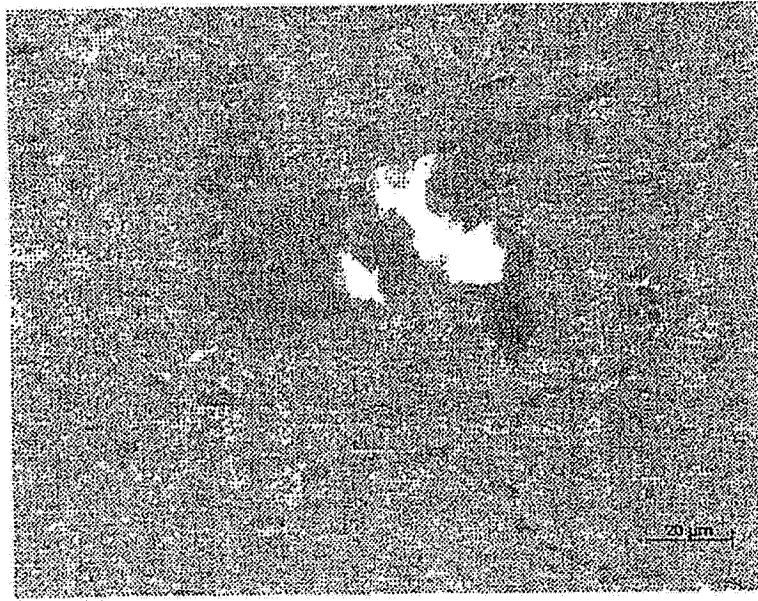


图 10D

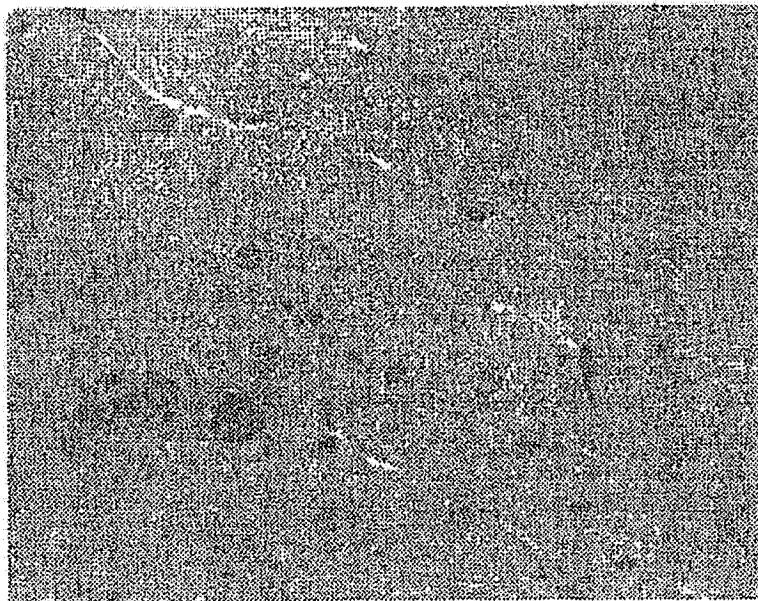


图 10E

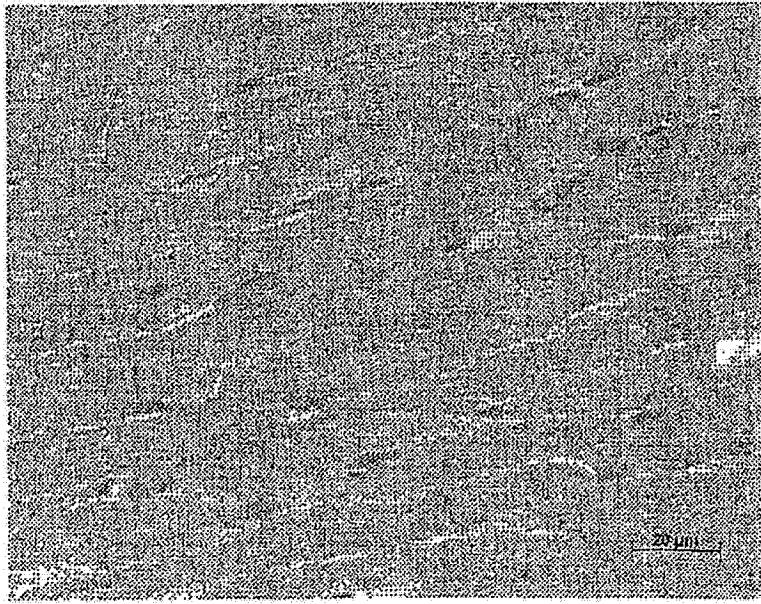


图 10F

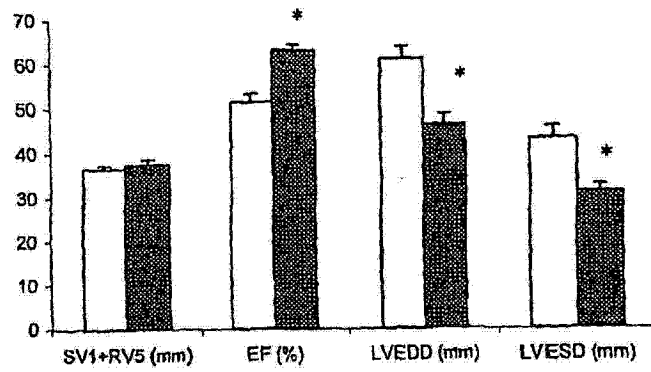


图 11A

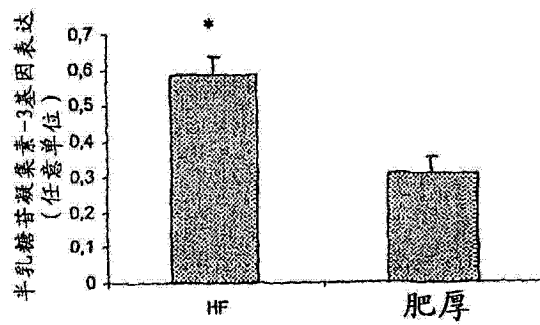


图 11B

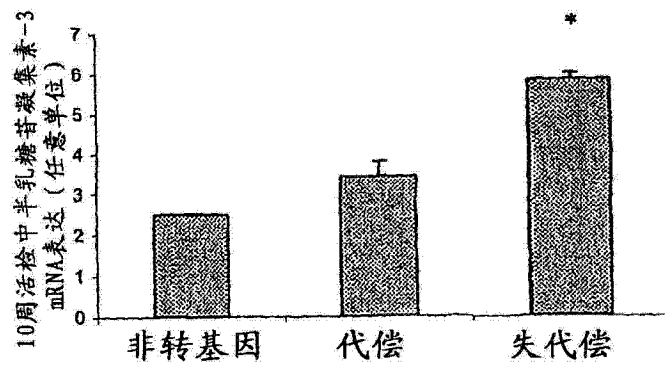


图 12

专利名称(译)	通过测定半乳糖苷凝集素-3或者血小板反应蛋白-2的水平鉴定具有发生心力衰竭风险的受试者的方法		
公开(公告)号	CN102998458B	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201210321227.7	申请日	2004-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	马斯特里赫特大学		
申请(专利权)人(译)	马斯特里赫特大学		
当前申请(专利权)人(译)	马斯特里赫特大学		
[标]发明人	YM品托		
发明人	Y·M·品托		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/66 G01N33/53 G01N33/94		
CPC分类号	Y10S436/811 G01N2333/4728 G01N2800/50 G01N2333/4704 G01N2800/325 G01N2800/321 G01N2333/4724 G01N33/6893 G01N33/6887 G01N33/9453		
审查员(译)	肖吉		
优先权	2003078161 2003-10-09 EP		
其他公开文献	CN102998458A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种通过测定半乳糖苷凝集素-3或者血小板反应蛋白-2的水平鉴定具有发生心力衰竭风险的受试者的方法。本发明涉及确定具有发生高血压性终末器官损害风险(例如,特别是心力衰竭)的受试者的方法,包括:(a)得到所述受试者的生物样品;(b)确定所述样品中至少一种非肌细胞标记的水平;(c)将所述标记的水平与标准水平进行比较;以及(d)确定标记的水平是否指示了发生高血压性终末器官损害的风险。非肌细胞标记优选是半乳糖苷凝集素-3或者血小板反应蛋白2。

基因/引物	序列 (5' → 3')	位置	物种
细胞素环素 A (M19533)			
Fwd	GGGAGAAAGGATTTGGCTATAAGG	167-190	大鼠
探针	TGAAGTCACCACCTGGCACATGAAT	219-244	
Rev	GCCACCAGTGCCATTATGG	249-267	
血小板反应蛋白 2 (XM.214778)			
Fwd	GAATGGTCTACTTCTCAGACCTCAAG	603-629	大鼠
探针	CCCTGCTCTTAGGCATCTCTGCACCTCAT	631-659	
Rev	GCACACTGCTGGAGCTGGA	791-809	
骨活化素 (NM.002510)			
Fwd	GGACTTCATTGTGACCTGCAAA	1350-1371	大鼠
探针	CCACTCCCACGGAAGCCTGTACGAT	1376-1400	
Rev	ACCCTGTTCTGGCGCATCT	1421-1439	
胶原 VI (TC322135)			
Fwd	CCCTCCTTGCAGGCAGAAC	816-834	大鼠
探针	ATGCCCTTGACAGATCAATAACACAGCAGTAGG	845-875	
Rev	CAGGAGGACCGAGAGCTCAT	897-916	
脑钠肽 (M25297)			
Fwd	GCTGCTTTGGGCAGAAGATAGA	350-371	大鼠
探针	CCTCAGCCCCTCACAGCCCAA	394-414	
Rev	GCCAGGAGCTTCTCTAAAACA	416-437	