



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108241054 A

(43)申请公布日 2018.07.03

(21)申请号 201711427770.4

(22)申请日 2017.12.26

(71)申请人 天津市中西医结合医院(天津市南开医院)

地址 300000 天津市南开区长江道6号

(72)发明人 杨磊 张兰秋 张琦 高宏伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

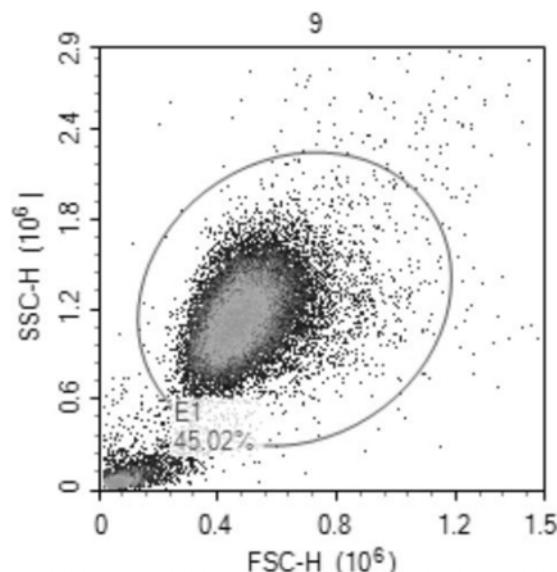
权利要求书1页 说明书5页 附图9页

(54)发明名称

G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用

(57)摘要

本发明公开了G蛋白偶联受体18表达在制备败血症诊断及病程监测和预后判断试剂中的应用，并证实G蛋白偶联受体18表达水平在败血症中性粒细胞表面的表达下调。将检测外周血中的中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18的方法应用于诊断败血症和重症细菌感染中，尤其首次发现中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达越低，败血症和重症细菌感染患者多器官损伤程度越重，预后越差。这为临床诊断败血症或重症细菌感染的病人或动物，以及监测疾病进展提供了更为简便、灵敏、快速、稳定的途径。



1. G蛋白偶联受体18表达在制备败血症诊断及病程监测和预后判断试剂中的应用。
2. 根据权利要求1所述的G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用，其特征在于：所述G蛋白偶联受体18为中性粒细胞生物标志物。
3. 根据权利要求1所述的G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用，其特征在于：所述G蛋白偶联受体18在中性粒细胞表面表达下调。
4. 根据权利要求1所述的G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用，其特征在于：所述诊断试剂为细胞膜表面蛋白水平的诊断试剂，所述细胞膜表面蛋白水平的诊断试剂包括通过免疫学方法检测G蛋白偶联受体18蛋白的表达水平。
5. 根据权利要求1所述的G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用，其特征在于：所述G蛋白偶联受体18流式抗体或G蛋白偶联受体18抗体组成试剂盒，所述G蛋白偶联受体18流式抗体和G蛋白偶联受体18抗体均带有荧光的二抗。

G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学和疾病诊断技术领域,具体为G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用。

背景技术

[0002] 败血症或败血症休克是临幊上常见的危重症,目前,虽然医学的发展日新月异,但是,败血症仍然是世界级的难题。G蛋白偶联受体18在人体内多种细胞和组织中表达。作为细胞表面受体可以被多种配体,如花生四烯酸乙醇胺、花生酰基甘氨酸、大麻素、消退素等激活,参与生殖、免疫、代谢和神经系统的调控。最新研究表明G蛋白偶联受体18在败血症炎症反应调控中发挥重要的作用,基因敲出G蛋白偶联受体18小鼠败血症死亡率明显增加,巨噬细胞炎症因子分泌明显增多,同时G蛋白偶联受体18在中性粒细胞表面高表达,调控中性粒细胞的趋化性。消退素可以激活中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18受体,降低小鼠败血症的严重程度。另外研究表明中性粒细胞表面受体的表达与败血症的严重程度密切相关,如补体受体C5aR的表达与败血症的组织器官损伤程度和病死率正相关,C5aR的表达越低,组织器官损伤越严重,病死率越高。因此,检测中性粒细胞表面相关受体的表达对败血症的早期诊断和预后判断具有重要的价值。目前败血症或重症细菌感染的检查主要靠细菌学方法、血常规尤其是白细胞计数及分类的检查、C反应蛋白检测等提示细菌感染的程度,通过采血做血液细菌培养的方法或者应用分子生物学技术的基因扩增法确定是否为感染。但细菌学方法存在耗时长和假阳性的弱点,对及时诊断和用药产生很大的局限,并且体外培养不能反映细菌感染的严重程度。因而,发展简便、灵敏、快速、稳定的辅助败血症或重症细菌感染的诊断或监测疾病进展及预后判断的新方法,对于临幊及时诊断和治疗至关重要,因此我们提出了G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:G蛋白偶联受体18表达在制备败血症诊断及病程监测和预后判断试剂中的应用。

[0005] 优选的,所述G蛋白偶联受体18为中性粒细胞生物标志物。

[0006] 优选的,所述G蛋白偶联受体18在中性粒细胞表面表达下调。

[0007] 优选的,所述诊断试剂为细胞膜表面蛋白水平的诊断试剂,所述细胞膜表面蛋白水平的诊断试剂包括通过免疫学方法检测G蛋白偶联受体18蛋白的表达水平。

[0008] 优选的,所述G蛋白偶联受体18流式抗体或G蛋白偶联受体18抗体组成试剂盒,所述G蛋白偶联受体18流式抗体和G蛋白偶联受体18抗体均带有荧光的二抗。

[0009] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:该G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用,将检测外周血中的中细胞表面G蛋白偶联受体18的方法应用于诊断败血

症和重症细菌感染中,尤其首次发现中细胞表面G蛋白偶联受体18表达越低,败血症和重症细菌感染患者多器官损伤程度越重,预后越差。这为临床诊断败血症或重症细菌感染的病人或动物,以及监测疾病进展提供了更为简便、灵敏、快速、稳定的途径。

附图说明

- [0010] 图1是本发明流式细胞仪圈定的中性粒细胞亚群图;
- [0011] 图2是本发明流式细胞仪检测G蛋白偶联受体18表达的柱状图;
- [0012] 图3是本发明正常人和败血病病人中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达图;
- [0013] 图4是本发明败血病病人中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达与SOFA评分关系图;
- [0014] 图5是本发明败血病病人中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达与C反应蛋白关系图;
- [0015] 图6是本发明败血病病人中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达与患者预后关系;
- [0016] 图7是本发明人中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达作为诊断脓毒症的临界值确认图;
- [0017] 图8是本发明败血症小鼠中中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达变化与时间相关性图;
- [0018] 图9是本发明LPS刺激正常人中性粒细胞后表面G蛋白偶联受体18表达变化与时间相关性图;
- [0019] 图10是本发明不同浓度LPS刺激正常人中性粒细胞后表面G蛋白偶联受体18变化图。

具体实施方式

[0020] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

- [0021] 请参阅图1-10,本发明提供一种技术方案,其实验过程如下:
 - [0022] 一、实验一
 - [0023] 1、实验分组:收集67例确诊败血症患者的外周血样品作为实验组,收集29例健康人的外周血样品作为对照组。各份血液样品收集在抗凝管中,体积为2ml左右,常温保存,取血当天流式测定中性粒细胞表面受体G蛋白偶联受体18表达,同时监测患者死亡人数和时间。所有受试者尚需采集以下资料:年龄,性别,伴随疾病及用药情况,生命指征数据,qSOFA评分,SOFA评分,感染的部位、类型、程度、病原微生物的种类及药敏结果,治疗方案。排除标准:妊娠,血液病,心源性休克,HIV感染,近6个月内接受规律糖皮质激素、免疫抑制剂及细胞毒素治疗,疾病进展快速预期24小时内可能死亡者。
 - [0024] 2、诊断标准:确诊的感染符合其中之一即可:(1)通过培养、染色或PCR已证实的病原微生物感染。(2)临床特异性感染体征,结合影像学证据(如:腹部X线或CT扫描可见游离气体的内脏穿孔证据;胸片可见片状影提示肺炎;腹部超声或影像学证实的脏器感染等)。

[0025] 3、多器官损伤程度评定标准:应用序贯器官衰竭估计评分评估重症监护病房败血症患者多器官损伤程度现在已被多数专家接受,也是反映患者严重程度上相对精确的量表。SOFA评分标准如下表:SOFA评分是各个系统评分总和,即先根据标准对每个系统评分,最后把各系统评分相加,综合反映患者器官损伤程度。

[0026] SOFA评分表:

[0027]

系统	0分	1分	2分	3分	4分
呼吸					
PaO ₂ /FIO ₂ ,mmHg(kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) 伴呼吸支持	<100 (13.3) 伴呼吸支持
凝血					
血小板, x10 ³ /uL	≥150	<150	<100	<50	<20
肝					
血胆红素, mg/dL(umol/L)	<1.2(20) 2)	1.2-1.9(20-32)	2.0-5.9(33-101)	6.0-11.9(102-204)	>12.0(204)
心血管	MAP≥70 mmHg	MAP<70mm Hg	多巴胺<5或 多巴酚丁胺(任何剂量)	多巴胺5.1-15 或肾上腺素≤0.1 或去甲肾上腺素≤0.1	多巴胺>15 或肾上腺素>0.1 或去甲肾上腺素>0.1
中枢神经系统					
Glasgow昏迷等级 评分	15	13-14	10-12	6-9	<6
肾					
血肌酐, mg/dL(umol/L)	<1.2(110) 170)	1.2-1.9(110-170)	2.0-3.4(171-299)	3.5-4.9(300-440)	>5.0(440)
尿量, mL/d				<500	<200

[0028] 表格说明:

[0029] MAP:平均动脉压;

[0030] 儿茶酚胺剂量均按ug/kg/min给予至少1小时;

[0031] Glasgow昏迷等级评分:范围3-15分,分数越高表明神经系统功能越好。

[0032] Glasgow昏迷量表:

睁眼反应	计分	言语反应	计分	运动反应	计分
[0033]	自动睁眼	4	回答准确	5	按吩咐动作
	呼唤睁眼	3	回答有错误	4	刺痛能定位
	刺痛睁眼	2	答非所问	3	刺痛时躲避
	不睁眼	1	只能发声	2	刺痛时肢体屈曲
			不能言语	1	刺痛时肢体伸直
					无运动
					1

[0034] 表格说明

[0035] 轻度:13-15;中度:9-12;重度:4-8;脑死亡:3。

[0036] 4、流式细胞法

[0037] 取健康人或患者全血,用PBS洗2-3遍,用10%的血清封闭10min,进行G蛋白偶联受体18抗体染色,同时设置同型对照组,加同行对照抗体染色。并用带有荧光的驴抗兔二抗染色,红细胞裂解液裂解10min,除去红细胞后,流式细胞仪圈定中性粒细胞群(图1),同型对照组画门,同时检测嗜中性粒细胞膜受体上G蛋白偶联受体18在中性粒细胞表面的表达(图2)。

[0038] 5、实验结果及分析

[0039] 67例确诊败血症患者与29名正常健康人中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达进行比较,正常健康人与败血症患者的G蛋白偶联受体18表达有着明显的不同,如图3所示,与健康人比,败血症患者中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达明显下调,提示中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平可以作为诊断败血症或重症细菌感染的可靠方法。

[0040] 同时,我们对67例患者器官损伤程度进行SOFA评分,标准如上表所示,并分析G蛋白偶联受体18表达水平与SOFA评分的相关性,结果见图4,如图4所示,G蛋白偶联受体18表达水平与SOFA评分具有相关性,G蛋白偶联受体18表达水平越低的患者,其SOFA评分一般都越高,即器官损伤越严重;另外,C反应蛋白是现在临幊上检测脓毒症病情另一个指标,以此我们分析G蛋白偶联受体18表达水平与CRP的相关性,结果见图5,如图5所示,G蛋白偶联受体18表达水平与CRP具有负相关性,提示中性粒细胞表面GPR18受体表达水平可以作为监测败血症或重症细菌感染严重程度和病情进展的可靠方法。

[0041] 另外,我们对67例患者死亡情况进行记录,并分析G蛋白偶联受体18表达水平与患者生存的相关性,结果见图6,如图6所示,G蛋白偶联受体18表达水平与患者生存具有相关

性,G蛋白偶联受体18表达水平越低的患者其预后可能性越差;我们用ROC曲线确定G蛋白偶联受体18表达水平诊断脓毒症的临界值,结果见图7,如图7所示,根据统计分析,G蛋白偶联受体18表达水平诊断脓毒症的最佳临界值为43.7% (敏感度为83%,特异性为47%),低于临界值患者28天死亡率明显升高,提示中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平可以作为判断败血症或重症细菌感染预后的可靠方法。

[0042] 实验二

[0043] 1、实验动物

[0044] 实验动物为C57BL/6小鼠,随机分为2组,即假手术组和模型组,每组30只,实验采用结扎并穿孔小鼠盲肠末端,建立败血症动物模型。分别于造模后3h,6h,24h,48h和72h取血流式测定中性粒细胞表面GPR18受体表达水平,结果见图6。

[0045] 2、实验结果及分析

[0046] CLP小鼠模型是模拟临床败血症的经典模型,研究表明CLP造成的败血症随着时间的延长逐渐加重,如果不治疗,最终多数会死亡,因此我们检查造模后不同时间G蛋白偶联受体18表达,反应其与病情严重程度变化的关系,发现造模后3h和6h,G蛋白偶联受体18表达水平没有变化,如图6所示,造模24h后开始下降,随着时间的延长,测定中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平逐渐降低,进一步提示中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平可以作为监测败血症或重症细菌感染严重程度和病情进展的可靠方法。

[0047] 三、实验三

[0048] 1、细胞实验

[0049] 取正常健康人全血,GE公司Percol分离液分离中性粒细胞,用20 μ g/mL的LPS刺激不同时间,(10min、20min、30min、1h)检测细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平变化,结果见图7,另外用不同浓度LPS(100ng/mL、1 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL)刺激30min后检测细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平变化,结果见图8。

[0050] 2、实验结果及分析

[0051] 革兰氏阴性菌产生的LPS是导致败血性的主要介质,因此我们用20 μ g/mL的LPS刺激正常人中性粒细胞观察G蛋白偶联受体18表达,如图7所示,30min,随着刺激时间延长,受体表达逐渐降低,30min后,受体表达不在变化,G蛋白偶联受体18可能受LPS刺激后迅速发生内化,提示中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平可以作为快速诊断败血症或重症细菌感染严重程度和病情进展的可靠方法。另外我们用不同浓度的LPS刺激中性粒细胞,如图8所示,刺激的浓度增大,G蛋白偶联受体18的表达越低,提示中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18表达水平与败血症或重症细菌感染严重程度正相关,可以作为快速监视败血症或重症细菌感染严重程度和病情进展的可靠方法。

[0052] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

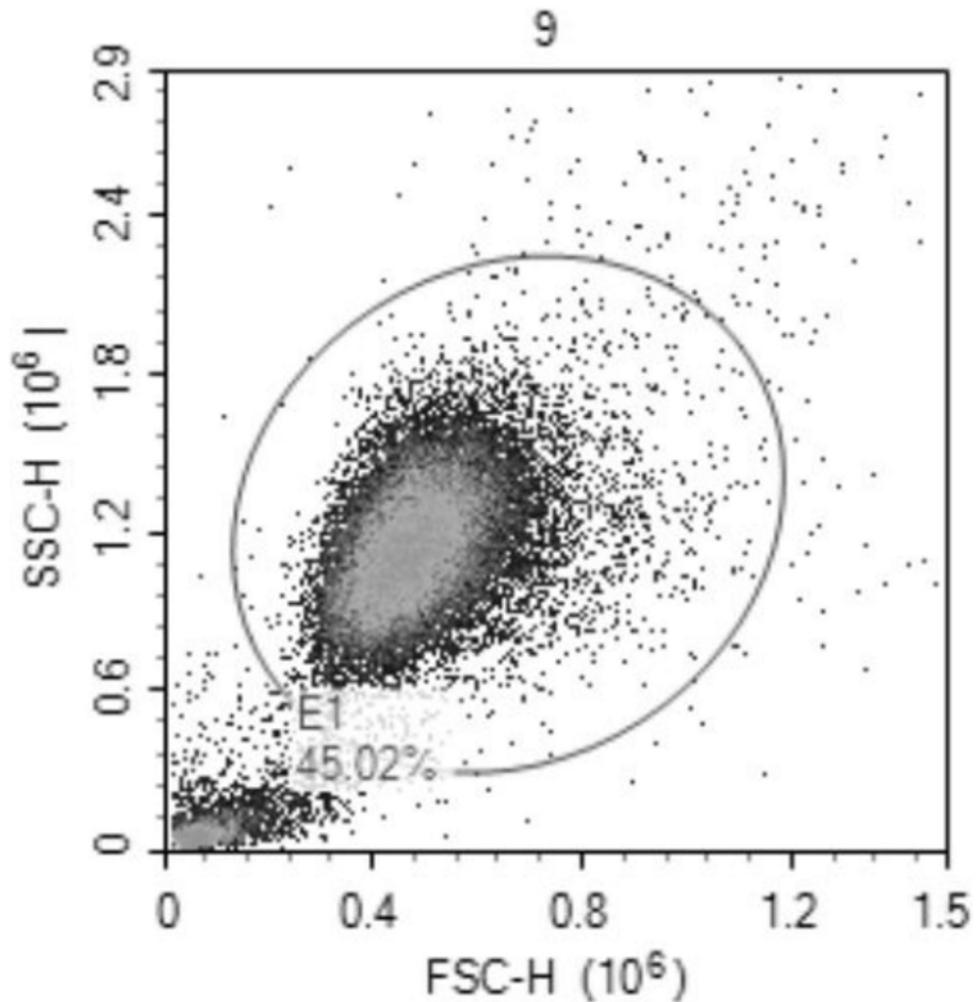


图1

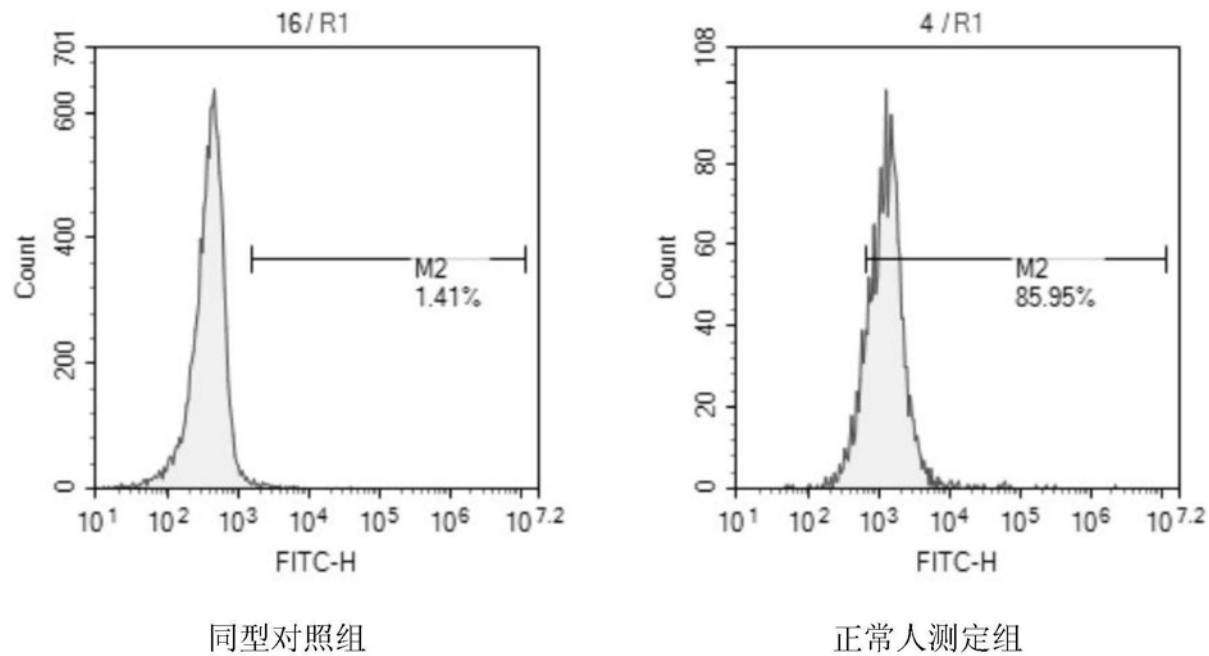


图2

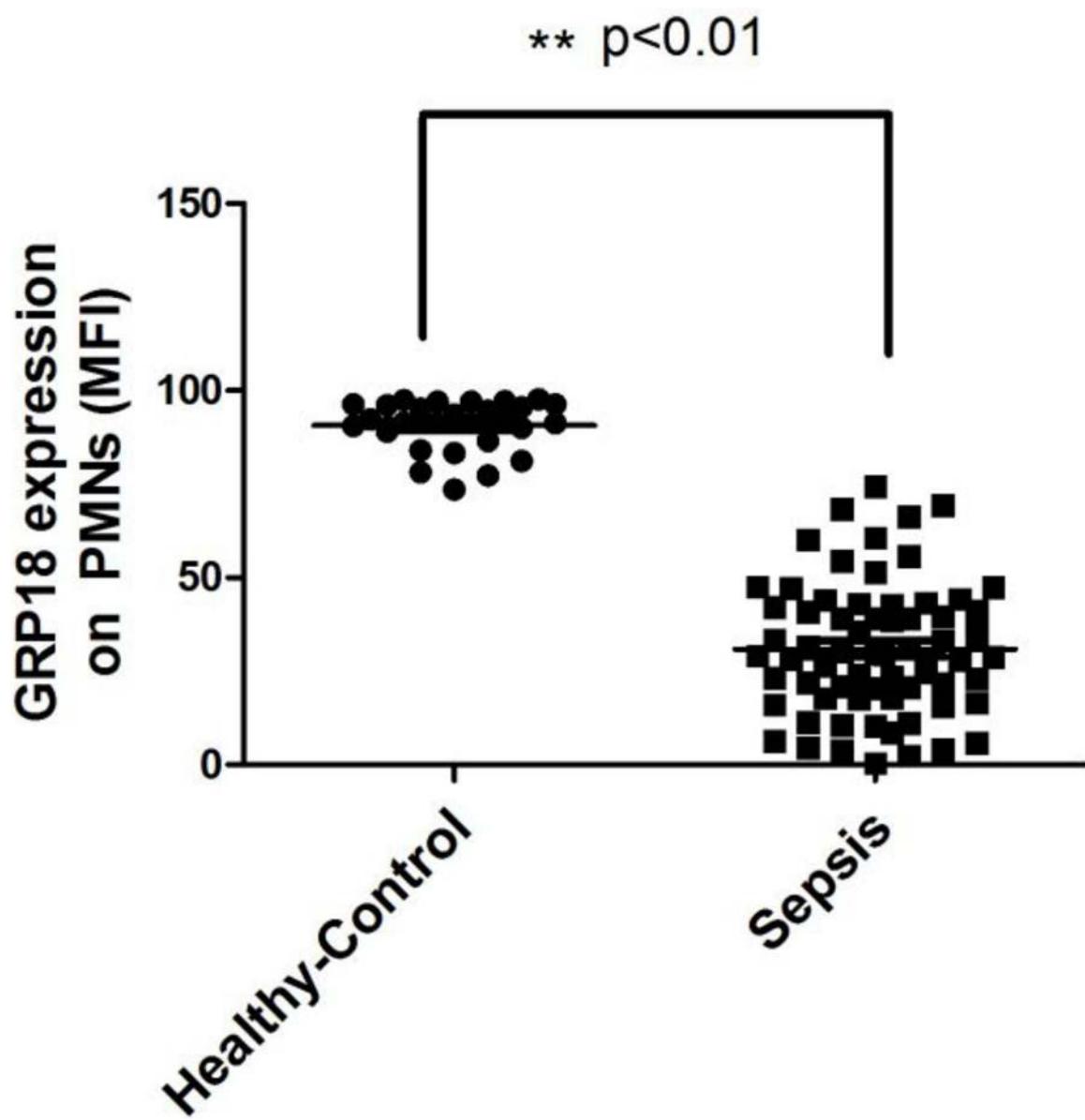


图3

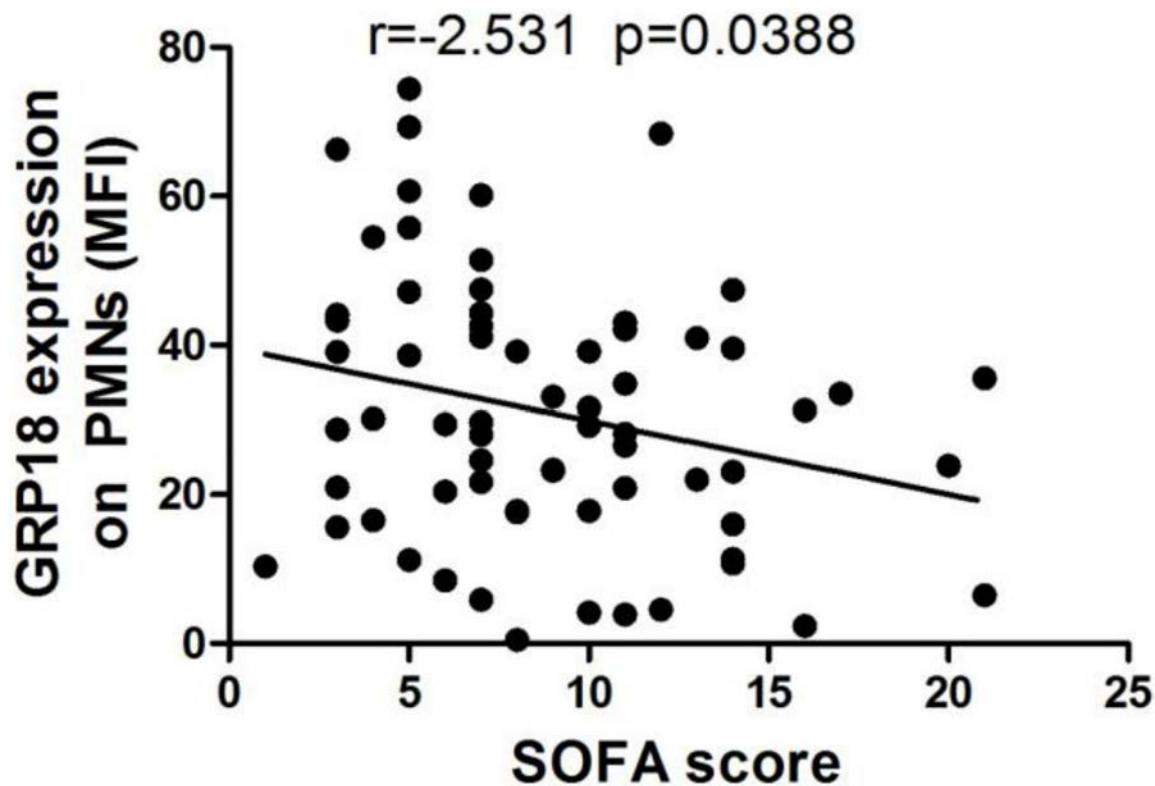


图4

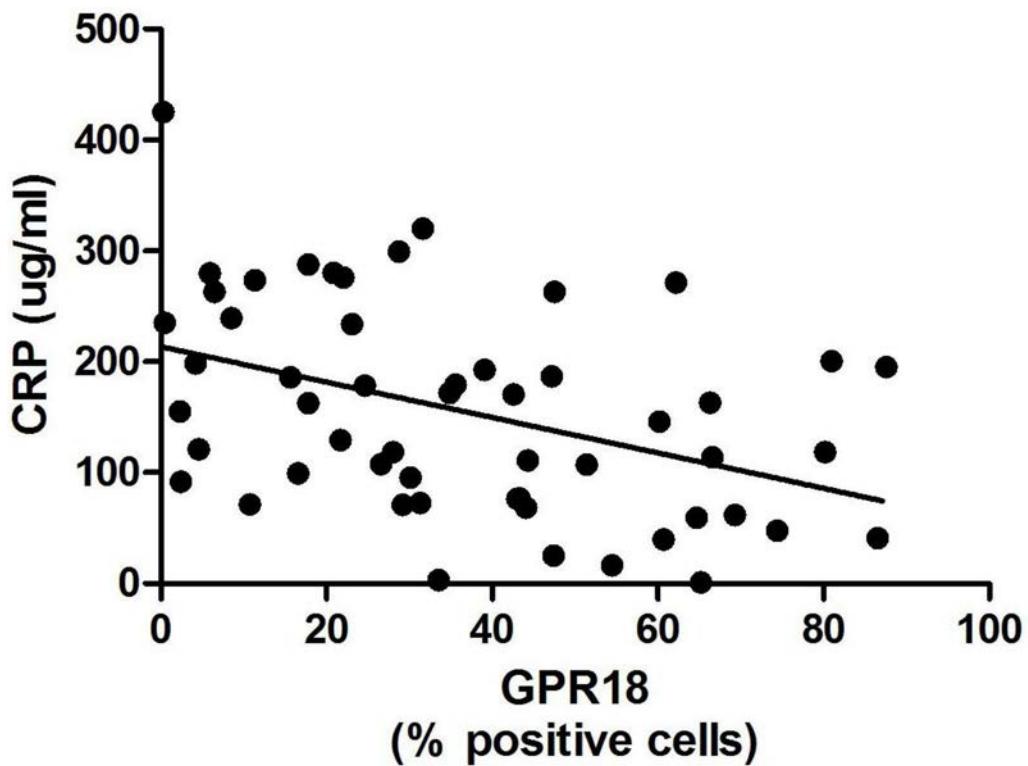


图5

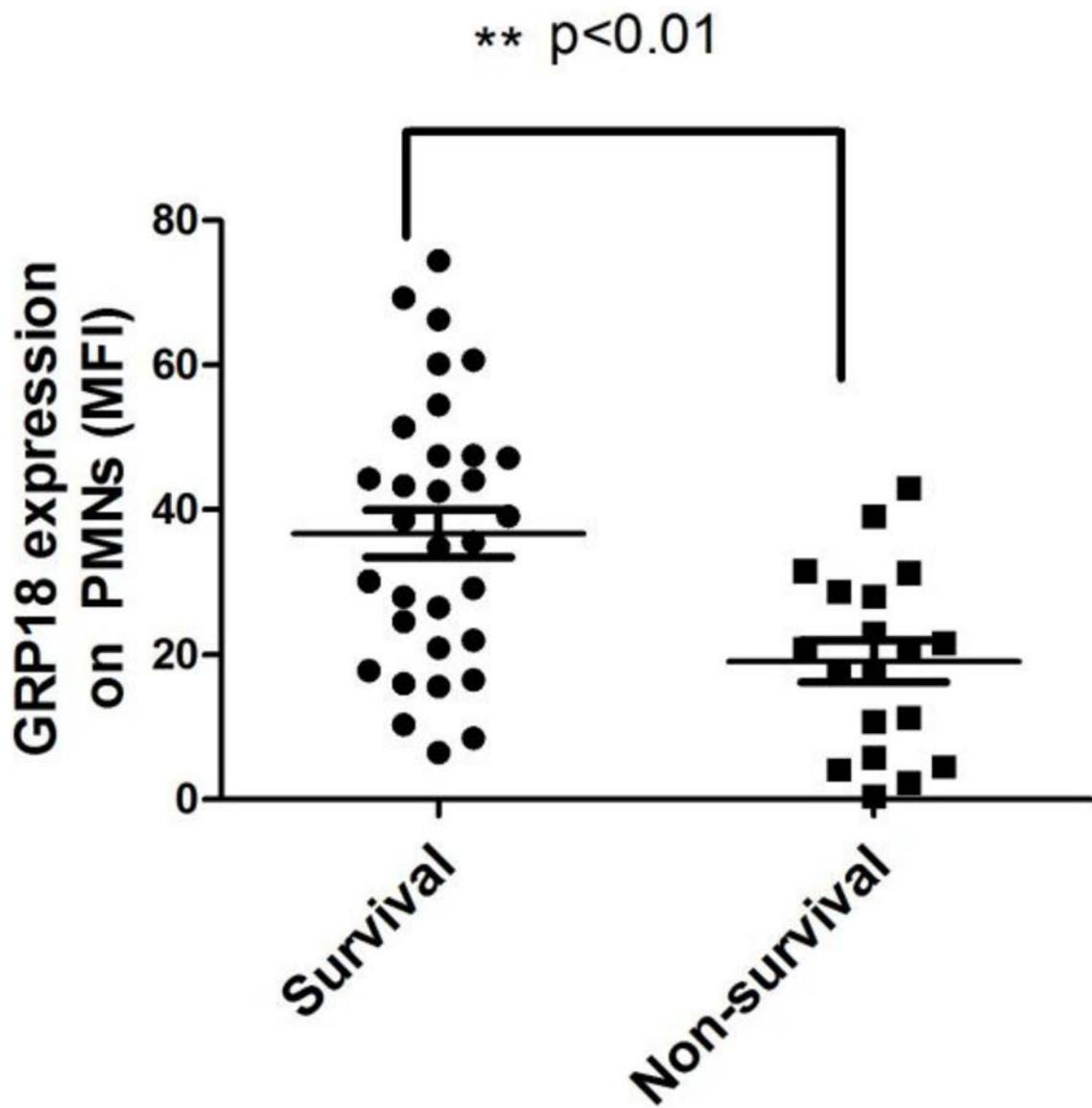


图6

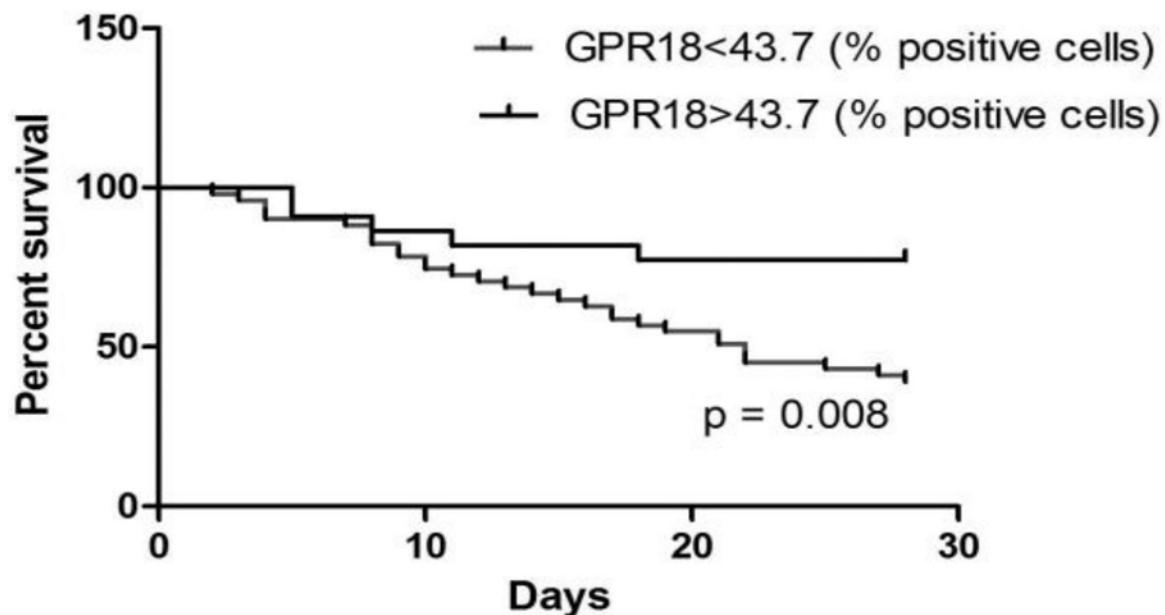
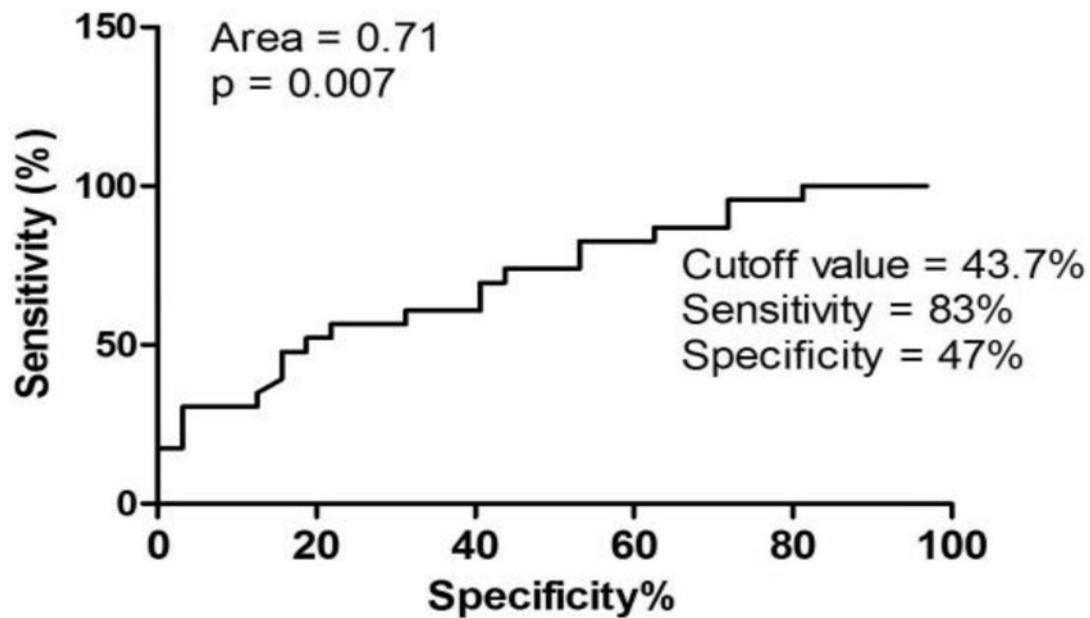


图7

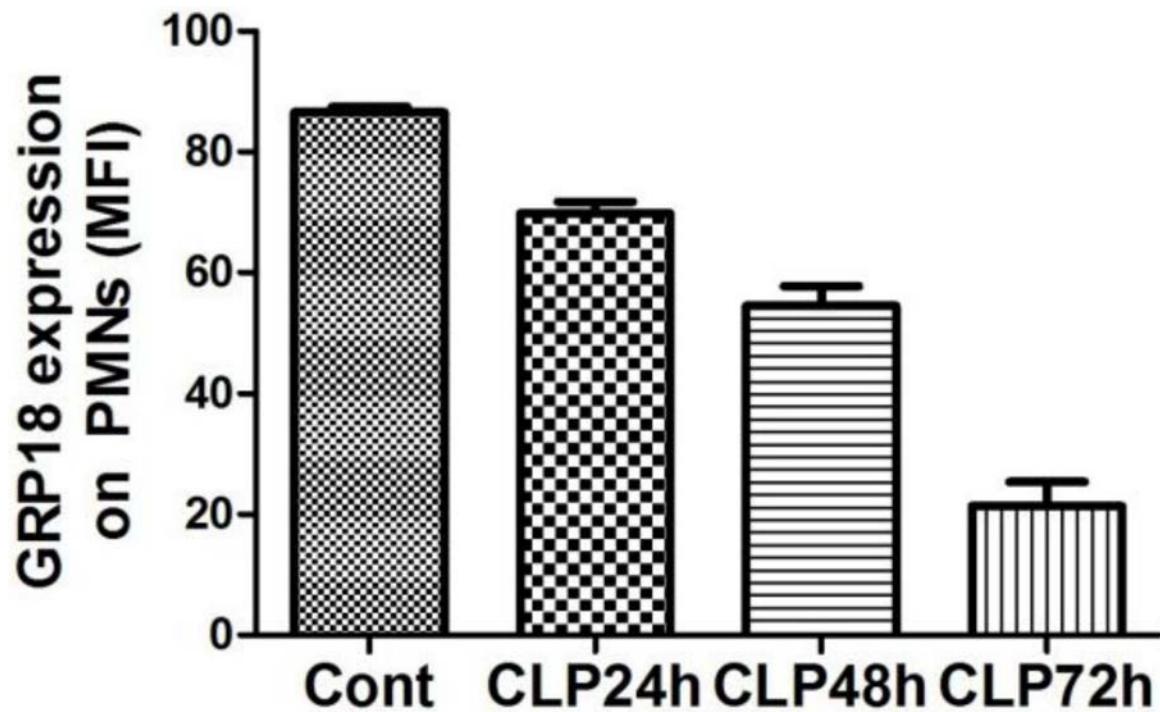


图8

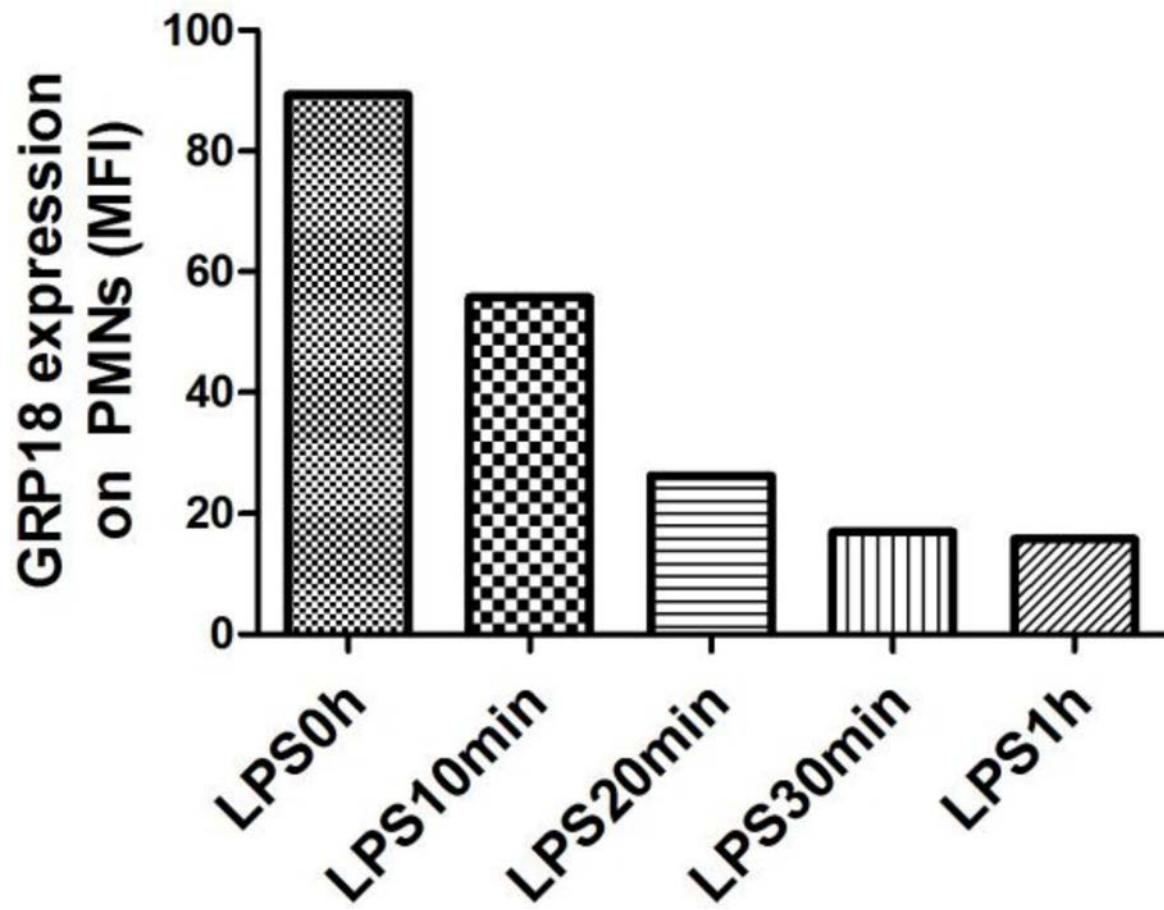


图9

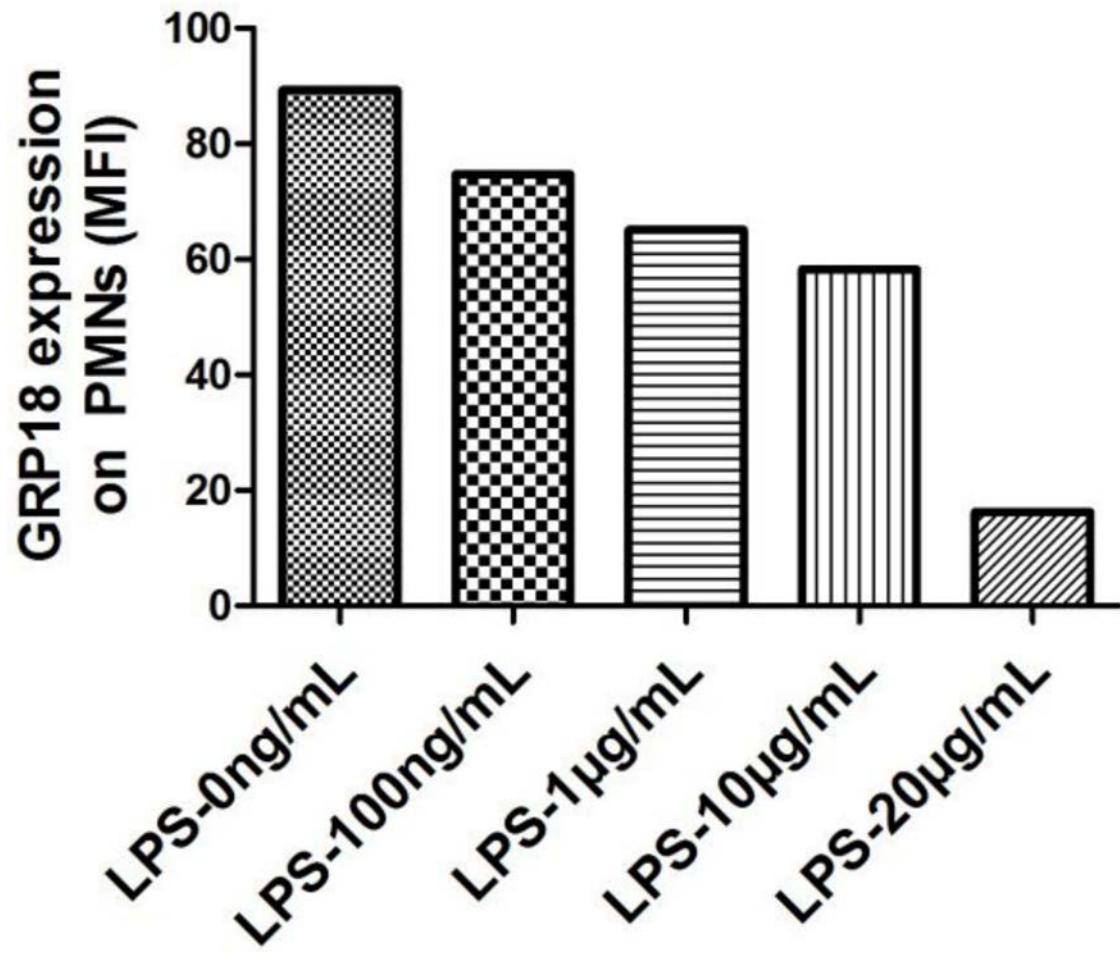


图10

专利名称(译)	G蛋白偶联受体18在制备败血症监测和判断试剂中应用		
公开(公告)号	CN108241054A	公开(公告)日	2018-07-03
申请号	CN201711427770.4	申请日	2017-12-26
[标]发明人	杨磊 张兰秋 张琦 高宏伟		
发明人	杨磊 张兰秋 张琦 高宏伟		
IPC分类号	G01N33/536		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了G蛋白偶联受体18表达在制备败血症诊断及病程监测和预后判断试剂中的应用，并证实G蛋白偶联受体18表达水平在败血症中性粒细胞表面的表达下调。将检测外周血中的中性粒细胞表面G蛋白偶联受体18的方法应用于诊断败血症和重症细菌感染中，尤其首次发现中细胞表面G蛋白偶联受体18表达越低，败血症和重症细菌感染患者多器官损伤程度越重，预后越差。这为临床诊断败血症或重症细菌感染的病人或动物，以及监测疾病进展提供了更为简便、灵敏、快速、稳定的途径。

