



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108711451 A

(43)申请公布日 2018.10.26

(21)申请号 201810281871.3

(22)申请日 2018.04.02

(71)申请人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市徐汇区枫林路180号

(72)发明人 王利新 亓云鹏 周修适 王仁萍

符伟国

(74)专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280

代理人 贾师英

(51)Int.Cl.

G16H 50/20(2018.01)

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图6页

(54)发明名称

建立急性主动脉夹层诊断标准的方法

(57)摘要

本发明公开了一种建立急性主动脉夹层诊断标准的方法,包括如下步骤:选取代谢产物溶血性磷脂酰胆碱和鞘脂类作为数理统计的可变量或者要素;采集符合统计学数量要求的受试者的血清样本;分别检测每个血清样本中所述代谢产物的浓度或含量;应用数理统计方法对所述可变量或者要素、上述浓度或含量进行统计和数据处理,得到用于判断是否属于急性主动脉夹层、急性主动脉夹层阳性是否属于Stanford A型或者Stanford B型的数学模型,作为急性主动脉夹层诊断标准。本发明还公开了一种用于急性主动脉夹层诊断的试剂盒。

1. 一种建立急性主动脉夹层诊断标准的方法,包括如下步骤:

选取代谢产物溶血性磷脂酰胆碱、鞘脂类和特定化合物作为数理统计的可变量或者要素,其中所述溶血性磷脂酰胆碱包括LysoPC (16:1)、LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0)、LysoPC (18:1)、LysoPC (18:2)、LysoPC (18:3)、LysoPC (20:3)、LysoPC (22:6)中的一种或两种以上,所述鞘脂类包括二氢鞘氨醇、植物鞘氨醇、神经酰胺、鞘磷脂中的一种或两种以上,所述特定化合物包括棕榈酰胺、油酸酰胺、十八酰胺、左旋乙酰肉碱、L-色氨酸中的一种或两种以上;

采集符合统计学数量要求的受试者的血清样本,所述受试者包括已经排除急性主动脉夹层嫌疑的对照、已经确诊为急性主动脉夹层Stanford A型的患者、已经确诊为急性主动脉夹层Stanford B型的患者;

分别检测每个血清样本中所述代谢产物的浓度或含量;

应用数理统计方法对所述可变量或者要素、上述浓度或含量进行统计和数据处理,确定急性主动脉夹层阳性指标或数值界线、Stanford A型与Stanford B型的分型指标或数值界线,从而得到用于判断是否属于急性主动脉夹层、急性主动脉夹层阳性是否属于Stanford A型或者Stanford B型的数学模型,作为急性主动脉夹层诊断标准。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,鞘磷脂和左旋乙酰肉碱在所述数学模型中作为加权因子,它们的血清浓度与急性主动脉夹层阳性结果正相关。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述数理统计方法包括非监督的PCA统计方法、有监督的PLS-DA方法。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述数学模型中的可变量或者要素还包括D-二聚体,其在血清中的浓度与急性主动脉夹层阳性结果正相关。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述数学模型中的可变量或者要素还包括高血压,其与急性主动脉夹层阳性结果正相关。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述数学模型中二氢鞘氨醇、植物鞘氨醇、神经酰胺、L-色氨酸的血清浓度与急性主动脉夹层阳性Stanford A型负相关。

7. 一种用于急性主动脉夹层诊断的试剂盒,包括鞘磷脂检测体系和左旋乙酰肉碱检测体系,其中,

所述鞘磷脂检测体系是ELISA (酶联免疫吸附测定) 测定体系,包括:(1) 能够特异性结合鞘磷脂的抗体,(2) 当鞘磷脂结合于(1)中限定的抗体时,能够结合于鞘磷脂的标记抗体,以及(3) 鞘磷脂标准品,或者

所述鞘磷脂检测体系是高效液相色谱法测定体系,包括:0.1%v/v甲酸水溶液作为流动相A,0.1%v/v甲酸溶于乙腈溶液作为流动相B,鞘磷脂标准品;

所述左旋乙酰肉碱检测体系是化学反应法测定体系,包括:辅酶A,还原型谷胱甘肽,辅酶I,L-苹果酸,草酰乙酸,苹果酸脱氢酶,柠檬酸合成酶,肉毒碱乙酰转移酶,左旋乙酰肉碱标准品,或者

所述左旋乙酰肉碱检测体系是高效液相色谱法测定体系,包括:0.1%v/v甲酸水溶液作为流动相A,0.1%v/v甲酸溶于乙腈溶液作为流动相B,左旋乙酰肉碱标准品。

8. 如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述鞘磷脂检测体系还包含:(4) 用于检测的抗体标记物,其能够与抗体结合形成偶联物。

9. 如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,用于联合检测生物样本中的鞘磷脂和左旋乙酰肉碱,所述生物样本选自于由全血、血浆、血清、尿液、唾液所构成的组。

10. 如权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述生物样本是血清。

## 建立急性主动脉夹层诊断标准的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医疗领域,具体涉及一种建立急性主动脉夹层诊断标准的方法,还涉及鞘磷脂和左旋乙酰肉碱作为生物标志物在急性主动脉夹层诊断中的应用。

### 背景技术

[0002] 急性主动脉夹层(acute aortic dissection,AAD)是累及主动脉、一种致死率极高的疾病。急性主动脉夹层是由于主动脉内膜一个或多个破口或出血,血液通过主动脉上的内膜破裂口进入血管中层,向主动脉近端或远端发展,导致管壁分离、形成真假两腔的一种病理改变。急性主动脉夹层患者的死亡原因往往是继发于主动脉破入心包造成的心脏或大血管并发症,或是脏器或肢体血管闭塞所造成的终末器官损害,死亡率在24小时内可达20%,48小时内可达30%。

[0003] 急性主动脉夹层临床上最常见的症状是胸痛、腹痛或背痛,但是缺乏典型的临床表现,对于急性主动脉夹层的早期诊断仍存在挑战,但却是至关重要的。对于不同类型的急性主动脉夹层的治疗策略也不尽相同。Stanford B型主动脉夹层通常以 $\beta$ 受体阻滞剂为主的药物治疗,复杂的主动脉夹层(如假腔累及的灌注不良综合征)则择期手术或腔内治疗;而Stanford A型主动脉夹层则通常需急诊开放手术治疗。因此,区分两种类型的急性主动脉夹层在临床上也是相当必要的。目前在临床上,CT血管造影(computed tomography angiography,CTA)、磁共振血管造影(magnetic resonance angiography,MRA)和经食管超声心动图(transesophageal echocardiography,TEE)常用于诊断急性主动脉夹层。但是这些诊断方法相对费时而且无法进行床旁检查,另外,在急性胸痛主诉的患者中大多数不是主动脉夹层,因此对所有急性胸痛患者行周围影像学检查可能效果很低、不切实际、而且费用很高。实际上,如果对急性胸痛的患者不加区分的行胸部影像学检查,可能会出现85%的假阳性率。因此,临床上缺乏一种可以在早期诊断急性主动脉夹层,甚至区分Stanford A型和Stanford B型急性主动脉夹层的相对快速、准确的方法。

[0004] 近几年来,学者们采用不同方法研究急性主动脉夹层的潜在生物标志物,发现了一些蛋白或分子如Tenascin-C、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)、D-二聚体(D-dimer)、可溶性弹性蛋白片段(soluble elastin fragments,sELAF)、平滑肌细胞肌球蛋白重链(smooth muscle myosin heavy chain)、calponin等,但是除了D-二聚体外,由于这些标志物特异性和敏感性较低,如在其心血管疾病如急性心肌梗死中也有差异性表达,这些潜在生物标志物还没广泛用于临床中。最近有一项研究显示,可溶性ST2(soluble ST2,sST2)浓度在急性主动脉夹层中升高明显,相比较于D-二聚体和cTnI显示出更有效的诊断表现,可能可以作为快速且经济的方法排除早期的急性主动脉夹层。

[0005] 高通量组学方法可以有助于筛选与疾病发生发展相关的生物标志物,如基因组学、蛋白质组学和代谢组学。有关急性主动脉夹层的血浆或组织样本的蛋白组学已有前人做过,发现主要是细胞外基质蛋白和炎症相关蛋白的含量有差异性,这些蛋白可能对于急性主动脉夹层疾病的诊断和进展有所帮助。

[0006] 相比于其他组学,代谢组学主要研究的是作为各种代谢路径的底物和产物的小分子代谢物(MW<1000),这些小分子代谢物是细胞在生命周期中应对内环境变化所做出改变的一种反应,因此代表了组学各级层次的终点。代谢组学提供了一种更加直接的生理状态检测方式,更准确的反映生物体的病理生理状态。灵敏的分析技术使其能成为一种筛选生物标志物的方法。

[0007] 超高压液相色谱-四极/飞行时间质谱(ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry,UPLC-QTOF-MS)作为一种代谢组学液质联用方法,是常用的代谢组学分析方法之一,集UPLC的高效分离和Q-TOF-MS的高灵敏度、高专属性、高分辨率于一体的一种联用技术,在定性、定量分析方面具有明显的优势。

[0008] 近几年很多研究基于非特异性代谢组学发现了多种疾病潜在的生物标志物,如乳腺癌、肝细胞癌、卵巢癌、肾细胞癌、肺癌、心肌缺血、冠心病、心衰、帕金森病、阿尔默海兹病等等,这些可能的生物标志物不仅仅用来辅助诊断,而且对早期筛查、对疾病进展、分型、分级、分期都可能有意义。

[0009] 目前关于急性主动脉夹层的代谢组学研究相对较少,在来源于常规生物样本尤其是生物流体比如血液、血清、尿液、唾液、体液、粪便水等的生物标志物方面的研究鲜有报道。因此在临床上尚没有很好的生物标志物,使用来源于生物样本中的生物标志物可以建立起急性主动脉夹层的诊断标准,用于预测AAD的发生、提示AAD的进展和预后。

[0010] AAD的发生虽然紧急,但可能是由于心血管系统的病理生理改变在某时刻的诱因下引起,而体内的代谢改变可能与这种病理生理改变有关。如果能找到AAD特异的代谢标志物,或是AAD特异的代谢谱,则可能为AAD的发生发展,甚至是手术后的风险评估有所帮助。因此寻找AAD的潜在生物标志物、并借此建立AAD的诊断标准、甚至对AAD进行分型(分级)具有重要的临床意义。

## 发明内容

[0011] 为了弥补现有急性主动脉夹层诊断技术的上述不足,发明人采用代谢组学的方法,试图从代谢途径的角度寻找AAD的潜在生物标志物。经过大量的研究工作,发现了包括鞘磷脂和左旋乙酰肉碱在内的一些代谢标志物具有显著的统计意义,可以用来诊断AAD,建立AAD的诊断标准,并且进行AAD分型(分级)。具体而言,本发明的技术方案如下所述。

[0012] 一种建立急性主动脉夹层诊断标准的方法,包括如下步骤:选取代谢产物溶血性磷脂酰胆碱(LysoPC,LPC)、鞘脂类(Sphingolipids)和特定化合物作为数理统计的可变量或者要素,其中所述溶血性磷脂酰胆碱(LysoPC,LPC)包括LysoPC(16:1)、LysoPC(16:0)、LysoPC(18:0)、LysoPC(18:1)、LysoPC(18:2)、LysoPC(18:3)、LysoPC(20:3)、LysoPC(22:6)中的一种或两种以上的组合,所述鞘脂类包括二氢鞘氨醇(sphinganine)、植物鞘氨醇(phytosphingosine,糖脂)、神经酰胺(Ceramide,CER,磷脂质)、鞘磷脂(sphingomyelin,SM)中的一种或两种以上,所述特定化合物包括棕榈酰胺(Palmitic amide)、油酸酰胺(Oleamide)、十八酰胺(Octadecanamide)、左旋乙酰肉碱(L-Acetylcarnitine)、L-色氨酸(L-tryptophan)中的一种或两种以上的组合;采集符合统计学数量要求的受试者的血清样本,所述受试者包括已经排除急性主动脉夹层嫌疑的对照、已经确诊为急性主动脉夹层

Stanford A型的患者、已经确诊为急性主动脉夹层Stanford B型的患者;分别检测每个血清样本中所述代谢产物的浓度或含量;应用数理统计方法对所述可变量或者要素、上述浓度或含量进行统计和数据处理,确定急性主动脉夹层阳性指标或数值界线、Stanford A型与Stanford B型的分型(分级)指标或数值界线,从而得到用于判断是否属于急性主动脉夹层、急性主动脉夹层阳性是否属于Stanford A型或者Stanford B型的数学模型,作为急性主动脉夹层诊断标准。

[0013] 上述对照包括健康个体。

[0014] 在一种实施方式中,鞘磷脂和左旋乙酰肉碱在所述数学模型中作为加权因子,它们的血清浓度与急性主动脉夹层阳性结果正相关。可选地,溶血性磷脂酰胆碱的血清浓度与急性主动脉夹层阳性结果负相关。

[0015] 在一种实施方式中,所述数理统计方法包括非监督的PCA统计方法、有监督的PLS-DA方法等。

[0016] 在一种实施方式中,所述数学模型中的可变量或者要素还包括D-二聚体,其在血清中的浓度与急性主动脉夹层阳性结果正相关。

[0017] 优选上述数学模型中的可变量或者要素还包括高血压,其与急性主动脉夹层阳性结果正相关。

[0018] 在一种优选的实施方式中,上述数学模型中二氢鞘氨醇、植物鞘氨醇、神经酰胺、L-色氨酸的血清浓度与急性主动脉夹层阳性Stanford A型负相关。

[0019] 在一种实施方式中,上述数学模型中溶血性磷脂酰胆碱(LPC)和L-色氨酸的血清浓度与急性主动脉夹层阳性负相关。

[0020] 可选地,通过上述数学模型可以通过编程而被输入计算机或者智能诊疗系统,方便医生诊断。

[0021] 本发明的另一个方面在于提供一种用于急性主动脉夹层诊断的试剂盒,包括鞘磷脂检测体系和左旋乙酰肉碱检测体系,其中,

[0022] 所述鞘磷脂检测体系是ELISA(酶联免疫吸附测定)测定体系,包括:(1)能够特异性结合鞘磷脂的抗体,(2)当鞘磷脂结合于(1)中限定的抗体时,能够结合于鞘磷脂的标记抗体,以及(3)鞘磷脂标准品;或者

[0023] 所述鞘磷脂检测体系是高效液相色谱法测定体系,包括:0.1%v/v甲酸水溶液作为流动相A,0.1%v/v甲酸溶于乙腈溶液作为流动相B,鞘磷脂标准品。

[0024] 所述左旋乙酰肉碱检测体系是化学反应法测定体系,包括:辅酶A(CoA),还原型谷胱甘肽(GSH),辅酶I(NAD<sup>+</sup>),L-苹果酸,草酰乙酸,苹果酸脱氢酶(MDH),柠檬酸合成酶(CS),肉毒碱乙酰转移酶(ACT),左旋乙酰肉碱标准品;或者

[0025] 所述左旋乙酰肉碱检测体系是高效液相色谱法测定体系,包括:0.1%v/v甲酸水溶液作为流动相A,0.1%v/v甲酸溶于乙腈溶液作为流动相B,左旋乙酰肉碱标准品。

[0026] 可选地,鞘磷脂ELISA测定体系还包含:(4)用于检测的抗体标记物,其能够与抗体结合形成偶联物。所述抗体标记物例如是作为报告方法的酶标签比如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、磷酸酯酶或荧光素酶,或者荧光标记,其可以与抗体结合形成偶联物。

[0027] 上述试剂盒可用于联合检测生物样本中的鞘磷脂和左旋乙酰肉碱,所述生物样本

选自于由全血、血浆、血清、尿液、唾液所构成的组,优选血清。

[0028] 通过本发明的方法建立的急性主动脉夹层诊断标准为数学模型,可以用来诊断任一待测主体是否罹患了急性主动脉夹层,并且对急性主动脉夹层进行分型。而且,本发明的急性主动脉夹层诊断试剂盒能够快速定量测定血清中的鞘磷脂和左旋乙酰肉碱浓度,通过将测定结果输入数学模型,帮助医生准确判断任一待测主体是否罹患了急性主动脉夹层、或者判断急性主动脉夹层属于Stanford A型或者Stanford B型。

### 附图说明

[0029] 图1显示了AAD组和对照组血清样本的PCA和PLS-DA模型。其中Type A AAD是Stanford A型急性主动脉夹层组,Type B AAD是Stanford B型急性主动脉夹层组,control是对照组。

[0030] 图2A-2E显示了Stanford A型AAD组、Stanford B型AAD组和对照组之间LPC相对浓度比较曲线。其中,(A) LPC相对浓度在三组间总比较;(B) LPC相对浓度在三组高血压患者之间的比较;(C) LPC相对浓度在三组非高血压个体之间的比较;(D) LPC相对浓度在三组男性个体之间的比较;(E) LPC相对浓度在三组女性个体之间的比较。数据表示为平均数±标准误差;\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.005。

[0031] 图3A-3E显示了Stanford A型AAD组、Stanford B型AAD组和对照组之间鞘脂类和其他代谢物相对浓度比较曲线。其中,(A) 代谢物相对浓度在三组间总比较;(B) 代谢物相对浓度在三组高血压患者之间的比较;(C) 代谢物相对浓度在三组非高血压个体之间的比较;(D) 代谢物相对浓度在三组男性个体之间的比较;(E) 代谢物相对浓度在三组女性个体之间的比较。数据表示为平均数±标准误差;\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.005。

### 具体实施方式

[0032] 以下结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0033] 为描述方便起见,在本文中可将Stanford A型急性主动脉夹层简称为Stanford A型AAD、Stanford A型、或者Type A。类似地,可将Stanford B型急性主动脉夹层简称为Stanford B型AAD、Stanford B型、或者Type B。

[0034] 在本文中,左旋乙酰肉碱(L-Acetylcarnitine)也可称为左旋乙酰肉毒碱、乙酰左旋肉碱、乙酰左旋肉毒碱,这是本领域技术人员所熟知的。

[0035] 应当理解,在本文中,术语“诊断标准”并非是指“急性主动脉夹层诊断”本身,其为数学模型,是包含多种可选因素或可变因素的数学等式或不等式、图表、图像、框图、数理逻辑。数学模型可以分为静态和动态模型、分布参数和集中参数模型、连续时间和离散时间模型、随机性和确定性模型、参数与非参数模型、线性和非线性模型等。

[0036] 本领域技术人员容易理解,通过本发明的上述方法建立的数学模型可以通过编程、通过数学软件包形式被输入计算机,也可以被输入云服务器形成可共享的智能医疗系统。

[0037] 当科学合理、符合实际规律的数学模型建立起来后,就可以用于AAD疑似患者的确诊或者排除了,这是个模型求解过程,即可以采用解方程、画图形、证明定理、逻辑运算、数

值运算等各种传统的和近代的数学方法,特别是使用计算机技术进行解析。大数据和互联网技术的发展进步为该数学模型求解带来了极大的便利和促进。

[0038] 申请人的研究发现,急性主动脉夹层患者的血清中鞘磷脂和左旋乙酰肉碱浓度明显高于健康人群,因此有潜力作为急性主动脉夹层的生物标志物。

[0039] 本发明的急性主动脉夹层诊断试剂盒能够同时测定血清中的鞘磷脂和左旋乙酰肉碱浓度,其包括鞘磷脂检测体系和左旋乙酰肉碱检测体系。

[0040] 该试剂盒可以是鞘磷脂ELISA测定体系与左旋乙酰肉碱化学反应法测定体系的组合,也可以是鞘磷脂ELISA测定体系与左旋乙酰肉碱高效液相色谱法测定体系的组合、鞘磷脂高效液相色谱法测定体系与左旋乙酰肉碱化学反应法测定体系的组合、或者鞘磷脂高效液相色谱法测定体系与左旋乙酰肉碱高效液相色谱法测定体系的组合。显然,对于鞘磷脂高效液相色谱法测定体系与左旋乙酰肉碱高效液相色谱法测定体系的组合,可以共用0.1%v/v甲酸水溶液作为流动相A,0.1%v/v甲酸溶于乙腈溶液作为流动相B,并包含鞘磷脂标准品和左旋乙酰肉碱标准品。

[0041] 当鞘磷脂检测体系是ELISA(酶联免疫吸附测定)测定体系时,使用抗鞘磷脂抗体来检测血清中抗原鞘磷脂。包括:能够特异性结合鞘磷脂的抗体(简称第一抗体或者一抗);当鞘磷脂结合于一抗时能够结合于鞘磷脂的标记抗体(简称第二抗体或者二抗);鞘磷脂标准品;可选的用于检测的抗体标记物,其能够与抗体结合形成偶联物,该抗体标记物例如是作为报告方法的酶标签比如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、磷酸酯酶或荧光素酶、或者荧光标记。

[0042] 上述第一抗体与第二抗体可以不相同。第一抗体可以是重组体、嵌合抗体、人源化抗体和鼠源性抗体。可以是单克隆抗体或多克隆抗体,优选单克隆抗体。第一抗体可以被固定在固相载体上,形成用于“捕获”鞘磷脂的捕获抗体。第二抗体包括任何能够结合鞘磷脂的已标记的(带有标签的)抗体或抗体片段,并且可以是重组体、嵌合抗体、人源化抗体和鼠源性抗体,优选已标记的(带有标签的)单克隆抗体或多克隆的抗体。

[0043] 也可以使用市售的商品鞘磷脂检测试剂盒,品牌包括R&D、IBL、RB、BioCheck等。其使用方法比如是:将已知浓度的鞘磷脂标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将生物素标记的抗体同时温育,洗涤后,加入亲和素标记过的HRP。再经过温育和洗涤,去除未结合的酶结合物,然后加入底物A、B,和酶结合物同时作用,产生颜色。颜色的深浅和样品中的浓度呈比例关系。

[0044] 当左旋乙酰肉碱检测体系是化学反应法测定体系时,可以使用成熟的化学反应法比如文献(丁之德;吴明章。《男性学杂志》1990年第4卷第1期,第15-18页)报道的方法,其使用的化学试剂和酶制剂主要包括:辅酶A(CoA),还原型谷胱甘肽(GSH),辅酶I(NAD<sup>+</sup>),L-苹果酸,草酰乙酸,苹果酸脱氢酶(MDH),柠檬酸合成酶(CS),肉毒碱乙酰转移酶(ACT),左旋乙酰肉碱标准品。反应原理是:第一步,在ACT的催化下,左旋乙酰肉碱与辅酶A反应,生成肉毒碱和乙酰辅酶A;第二步,在CS的催化下,乙酰辅酶A与草酰乙酸反应,生成柠檬酸和辅酶A;第三步,在MDH的催化下,苹果酸与辅酶I(NAD<sup>+</sup>)反应,生成草酰乙酸、NADH和H<sup>+</sup>。随着NADH浓度增加,在340nm波长下测定其吸光率的增加,从而标定出左旋乙酰肉碱的含量。

[0045] 在优选的实施方式中,上述试剂盒还可分别包括下述物品中的至少之一:携带工具,其空间划分为可以收容一种或多种容器、96孔板或板条的限定空间,该容器例如是药

瓶、试管、和类似物,每样容器都含有一个单独的用于本发明方法的组分;说明书,其可以写在瓶子、试管和类似物上,或者写在一张单独的纸上,或者在容器的外部或内部,例如是带有操作演示视频APP下载窗口比如二维码的纸件,说明书也可以是多媒体的形式,比如CD、电脑光盘、U盘等。

[0046] 为使本发明更明显易懂,兹以实施例配合附图作详细说明如下。本领域技术人员应当理解,下述实施例仅用于阐明本发明的可行性,并非是对本发明进行限制。

[0047] 实施例中涉及到的百分含量,除特别说明外(比如明示为体积百分比率或比例),皆指质量百分含量。

[0048] 实施例1受试者样本的纳入及排除标准

[0049] 急性主动脉夹层患者纳入标准如下:1) 患者急性起病72小时以内,并且胸痛或者背痛症状持续5分钟以上;2) 经CTA影像学确诊为急性主动脉夹层,并且按Stanford分级系统分级;3) 本次急性主动脉夹层为首次发作;患者需同时满足以上所有条件方可入组。

[0050] 急性主动脉夹层患者排除标准如下:1) 马凡(Marfan)综合征、Ehlers-Danlos综合征和Loeys-Dietz综合征等遗传性结缔组织疾病患者或者有相关家族遗传史患者;2) 既往有大血管相关疾病患者或者有着有血管介入手术史患者;3) 血液透析持续状态患者;患者符合以上标准中任意一条,即可排除。

[0051] 正常个体排除标准:1) 患有主动脉瘤、动脉粥样硬化性疾病、瓣膜相关疾病的个体;2) 既往有其他重大疾病的个体;符合以上标准中任意一条,即可排除。

[0052] 相关伦理问题已经获得复旦大学附属中山医院伦理委员会的批准,实验中所有步骤均依据1975年《赫尔辛基宣言》中涉及人类实验的相关规定制定。所有提供血样标本的健康个体和急性主动脉夹层患者均在实验入组之前签署了知情同意书,同意提供标本。

[0053] 共收集了复旦大学附属中山医院血管外科、心外科、急诊科、体检中心的未患重大疾病的正常健康个体和急性主动脉夹层患者的血样标本。共计收集对照组20例;急性主动脉夹层组35例,其中Stanford A型为20例,Stanford B型为15例。符合上述要求并纳入实验的基线数据如表1所示。

[0054] AAD组的患者都经CTA诊断为主动脉夹层患者,发病时间均在72小时以内,并根据主动脉内膜破口及真假腔形成分为Stanford A型和Stanford B型。对照组和AAD组总平均年龄相仿,分别为 $57.25 \pm 8.07$ 岁和 $58.02 \pm 14.89$ 岁。无论是Stanford A型AAD组还是Stanford B型AAD组,高血压患者的比例都明显高于对照组,但是组间没有显著性差异( $p > 0.05$ )。由于急性主动脉夹层常常表现为胸痛,我们回顾35例AAD患者入院时的cTnT水平和心电图,Stanford A型AAD组平均cTnT水平明显增高,并且cTnT阳性例数也明显增加。但是通过对所有患者的心电图查阅,我们没有发现新的病理性Q波或典型的ST-T改变,尤其是在cTnT阳性的患者中。另外,Stanford B型AAD组的D-二聚体水平较Stanford A型AAD组增高,但是没有统计学差异。

[0055] 表1研究对象基本信息

[0056]

基本信息	对照组	AAD 组		p值
		Stanford A型	Stanford B型	
年龄 (岁)	57.25 ± 7.87	56.4 ± 15.75	60.20 ± 13.88	0.676
男性 (例)	11 (55%)	14 (70%)	8 (53%)	0.517
发病至入院时间 (小时)	/	26.63 ± 29.88	28.29 ± 31.38	/
高血压 (例)	7 (35%)	12 (60%)	10 (67%)	0.128
cTnT (ng/mL)	0.017 ± 0.010	0.060 ± 0.087	0.018 ± 0.022	0.028
cTnT>0.03 ng/mL (例)	1	5	2	0.100
D-二聚体 (mg/L)	NA	5.93 ± 5.99	11.37 ± 11.57	0.186

[0057] NA:无数据

[0058] 实施例2血样采集及处理

[0059] 2.1血样采集和保存

[0060] 血样本均在早上空腹采集, BD SST血清分离胶管采集, 移除血块, 在4℃1000g离心10min, 取上层血清, 分装于200μL PCR管中, 标记, -80℃低温保存。

[0061] 2.2样本预处理

[0062] 血清4℃解冻, 取20μL血清于离心管中, 加入380μL 67%乙腈有机沉淀剂(甲醇/乙腈=1:2, v:v)(含5μM内标L-氯苯丙氨酸), 涡旋30s、在室温下静置维持5min以便沉淀蛋白质, 室温下13000rpm高速离心15min, 取120μL上清进行UPLC-MS分析。从每个样本中取等体积的溶液混合制备质控样品(QC), 用于评估实验方法的稳定性。

[0063] 实施例2 UPLC-MS分析代谢物

[0064] 本实验采用超高液相色谱-四极杆/飞行时间质谱仪。色谱柱采用ACQUITY HSS T3色谱柱(2.1×100mm, 1.8μm); 流动相A是0.1%v/v的甲酸水溶液, 流动相B是0.1%v/v甲酸溶于乙腈溶液。采用梯度洗脱进行代谢物的分离, 梯度条件设置如下: 0-2min, 5%-5%B; 2-17min, 5%-95%B; 17-19min, 95%-95%B; 流速为0.3mL/min; 进样量为3μL; 柱温为50℃; 色谱柱平衡时间为5min。整个分析过程中样品置于4℃自动进样器中。

[0065] 质谱采用正离子模式检测。参数设置如下: 毛细管电压4000V, 干燥气流速11L/min, 干燥气温度350℃, 喷雾电压45psi, 碎裂电压120V, Skimmer1电压60V, 设置m/z 200.0476内标离子为实时质量数的校正。数据采集范围m/z 100-1000。

[0066] 代谢物的测定结果列于表2中。

[0067] 实施例3数据处理和多维统计分析

[0068] 3.1将上述超高液相色谱-四极杆/飞行时间质谱仪(UPLC-QTOF-MS)获得的原始质谱数据借助于XCMSOnline (<https://xcmsonline.scripps.edu/>)完成峰提取、校正和积分, 得到样本信息、离子信息(保留时间与质核比m/z)、离子丰度的多元数据矩阵。采用修正80%规则来去除缺失值。在整张色谱图中通过标准化离子数vs总离子数来计算每个离子的强度。最后将归一化的数据导入到SIMCA-P V11.0 (Umetrics, Sweden)软件中经过中心化、标准化后进行PCA、PLS-DA多维统计分析, 基于PLS-DA统计模型计算不同离子的变量权重值(variable importance in the projection, VIP), 筛选出VIP>1.5的离子。基于现有的代谢组

学数据库HMDB进行初步定性,接着通过与标准品的质谱图进行比对来进一步定性,然后进行相对定量,从而确定其中的一些差异代谢产物。

[0069] 代谢产物的筛选和鉴定结果列于表2中。表2中所列AAD组和对照组的代谢物相对水平都是平均相对水平(血清浓度)。

[0070] 根据PLS-DA结果,筛选出权重值较高的一些代谢产物和在AAD与对照组之间的变化趋势如表2所示,在共筛选出的17个代谢产物中,主要属于溶血性磷脂酰胆碱(LysoPC, LPC)和鞘脂类(Sphingolipids)两大类代谢产物,其中有两个代谢产物鞘磷脂(SM)和左旋乙酰肉碱在AAD组中是水平上升的,另外15个是下降的。

[0071] 表2鉴定的AAD组与对照有差异的代谢物标志物

[0072]

编号	保留 时间 (min)	[M+H] <sup>+</sup>	代谢物	KEGG ID	AAD		对照	AAD vs.对照 的变化
					A	B		
1	9.847	494.3241	LysoPC (16:1)	C04230	0.4232	0.6140	1	↓
2	10.63	496.3403	LysoPC (16:0)	C04230	0.5908	0.6179	1	↓
3	11.92	524.3714	LysoPC (18:0)	C04230	0.4636	0.4963	1	↓
4	10.96	522.3557	LysoPC (18:1)	C04230	0.5377	0.5600	1	↓
5	5.14	520.3401	LysoPC (18:2)	C04230	0.4725	0.5276	1	↓
6	10.63	518.3221	LysoPC (18:3)	C04230	0.6507	0.7041	1	↓
7	11.92	546.3532	LysoPC (20:3)	C04230	0.4785	0.4845	1	↓
8	10.26	568.3396	LysoPC (22:6)	C04230	0.3466	0.3326	1	↓
9	8.84	302.3054	二氢鞘氨醇	C00836	0.0562	0.8476	1	↓
10	8.01	318.3001	植物鞘氨醇	C12144	0.0490	0.7128	1	↓
11	14.98	703.5739	SM (d18:0/16:1)	C00550	1.7462	4.6495	1	↑
12	13.13	512.5029	CER (d18:0/14:0)	C00195	0.1043	0.7993	1	↓
13	4.07	205.0973	L-色氨酸	C00078	0.7186	0.6501	1	↓
14	0.75	204.123	左旋乙酰肉碱	C02571	1.4469	1.1110	1	↑
15	13.42	256.2636	棕榈酰胺	-	0.9166	0.9240	1	↓
16	13.67	282.2793	油酸酰胺	C19670	0.6357	0.6177	1	↓
17	14.75	284.295	十八酰胺	C13846	0.8730	1.0505	1	↓

[0073] SM:鞘磷脂;CER:神经酰胺;A:Stanford A型AAD组;B:Stanford B型AAD组。

[0074] 3.2AAD组和对照组血清样本的PCA和PLS-DA模型

[0075] 首先通过非监督的PCA统计方法观察总体的趋势分析,如图1A所示,可以观察到Stanford A型AAD组、Stanford B型AAD组和对照组血清代谢之间有一定的分离趋势(R<sup>2</sup>X(0.64))。另外Stanford B型AAD组个样本分布较为离散,可能是由于该组个体之间的异质性较高导致的。为了进一步分析样本间的差异,最大化组间分离,寻找各组间水平差异显著的代谢物,采用有监督的PLS-DA方法建立统计模型,对Stanford A型AAD组、Stanford B型AAD组和对照组进行分析,如图1B所示。在这个统计模型下,Stanford A型AAD组、Stanford

B型AAD组和对照组之间均能明显区分出来,可以发现该模型有较高的拟合度和良好的预测能力(R2X(0.305),R2Y(0.604),Q2(0.395))。

[0076] 实施例4代谢通路分析

[0077] MBRole是一个集成了KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)、Human Metabolome Database(<http://www.hmdb.ca/>)和PubChem(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>)多数据库的代谢组学分析平台,根据筛选出的差异代谢产物,在MBRole平台上作代谢通路富集分析,以识别潜在重要的代谢物和代谢通路。

[0078] 根据所筛选出来的代谢产物,代谢通路富集分析结果显示其中4个代谢产物:二氢鞘氨醇和植物鞘氨醇,SM(d18:0/16:1)位于鞘脂代谢产物中,还有神经酰胺(CER(d18:0/14:0))。

[0079] 实施例5数据统计

[0080] 所有入组的AAD患者和正常对象的基线数据用平均数±标准差或百分数表示,分类型数据采用卡方( $\chi^2$ )检验统计,连续性数据采用ANOVA检验或双侧t检验统计。各组之间不同代谢物水平的两两比较采用非参数检验(Mann-Whitney)检验。所有数据均使用SPSS24进行数据统计分析。统计结果将采用双侧检验p值和95%可信区间,p值小于0.05认为是具有显著性差异。

[0081] 对代谢物溶血性磷脂酰胆碱(LysoPC,LPC)和鞘脂类(Sphingolipids)两大类代谢产物亚组进行分析。表1中所示的筛选出的17个代谢产物主要可以分为两大类:溶血性磷脂酰胆碱和鞘脂类代谢产物,根据是否有高血压病史和性别做亚组分析,从而排除高血压或性别引起的这两大类代谢产物水平的变化。

[0082] LPC亚组分析结果如图2所示,LPC相对水平在Stanford A型AAD组、Stanford B型AAD组均明显低于对照组,并且无论在高血压和非高血压亚组分析,还是性别亚组分析中,这种相对水平改变趋势仍存在,说明这种代谢物水平改变可能与疾病相关。

[0083] 鞘脂类代谢产物和特定化合物亚组分析结果如图3所示。鞘脂类代谢物中的二氢鞘氨醇(sphinganine)和植物鞘氨醇(phytosphingosine)、神经酰胺(CER)相对水平在Stanford A型AAD组明显低于Stanford B型AAD组和对照组,并且无论在高血压和非高血压亚组分析,还是性别亚组分析中,这种相对水平改变趋势仍存在。另外,CER的上游代谢物SM的相对水平在Stanford A型AAD组和Stanford B型AAD组则明显提高。另外L-色氨酸的相对水平在对照组明显高于Stanford A型AAD组和Stanford B型AAD组。

[0084] 以上实施例对于本发明的技术方案进行了验证,在不违背本发明的思想下,本领域技术人员在此基础上对本发明作出的各种改动或者修改,同样应属于本发明的范围。

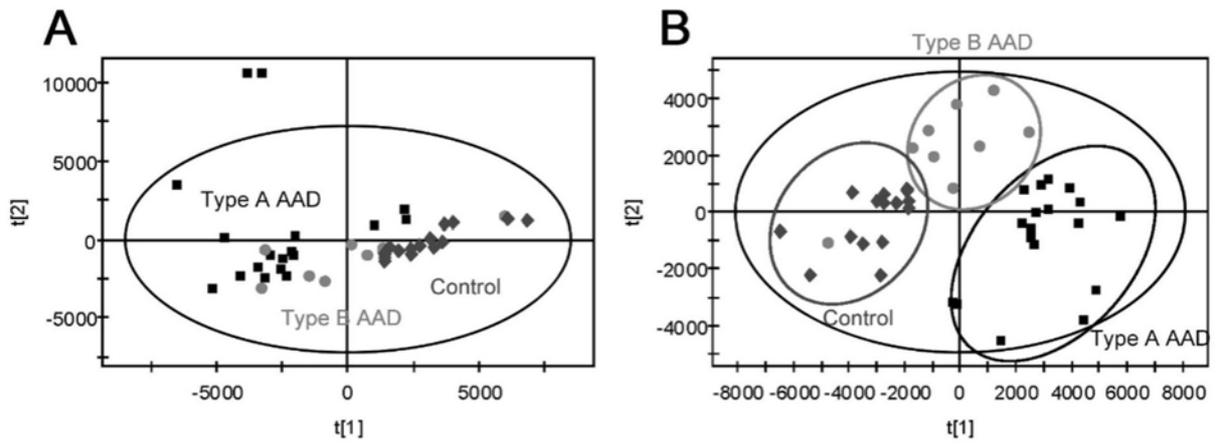


图1

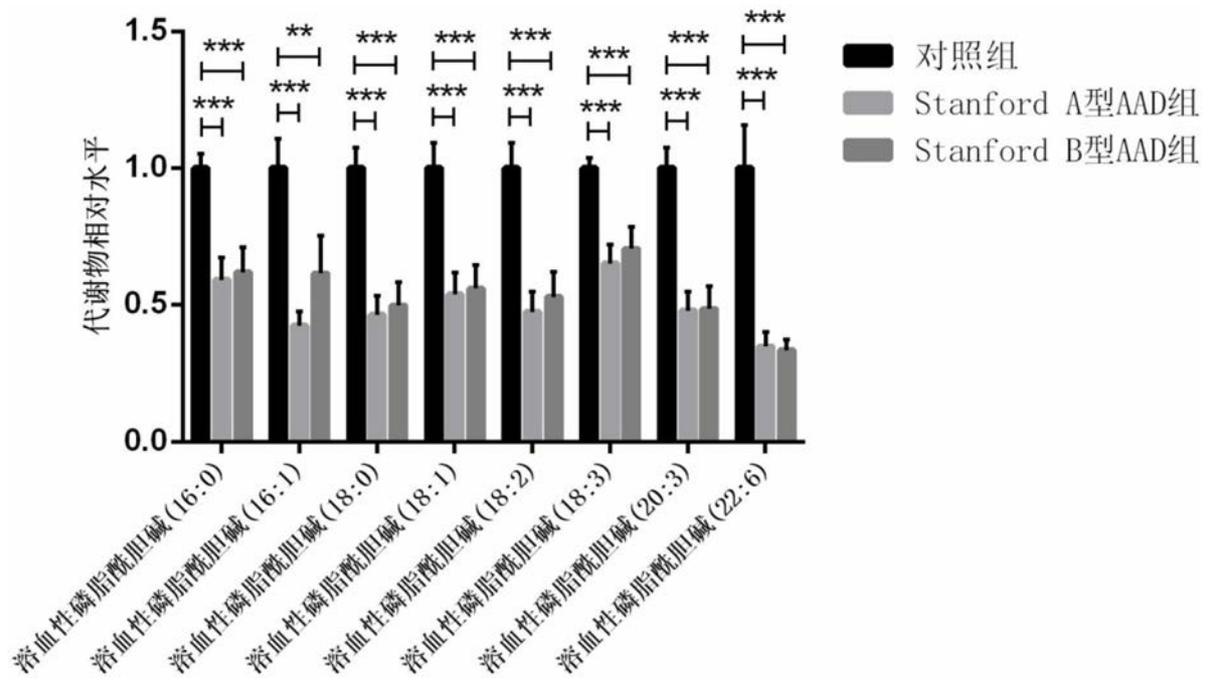


图2A

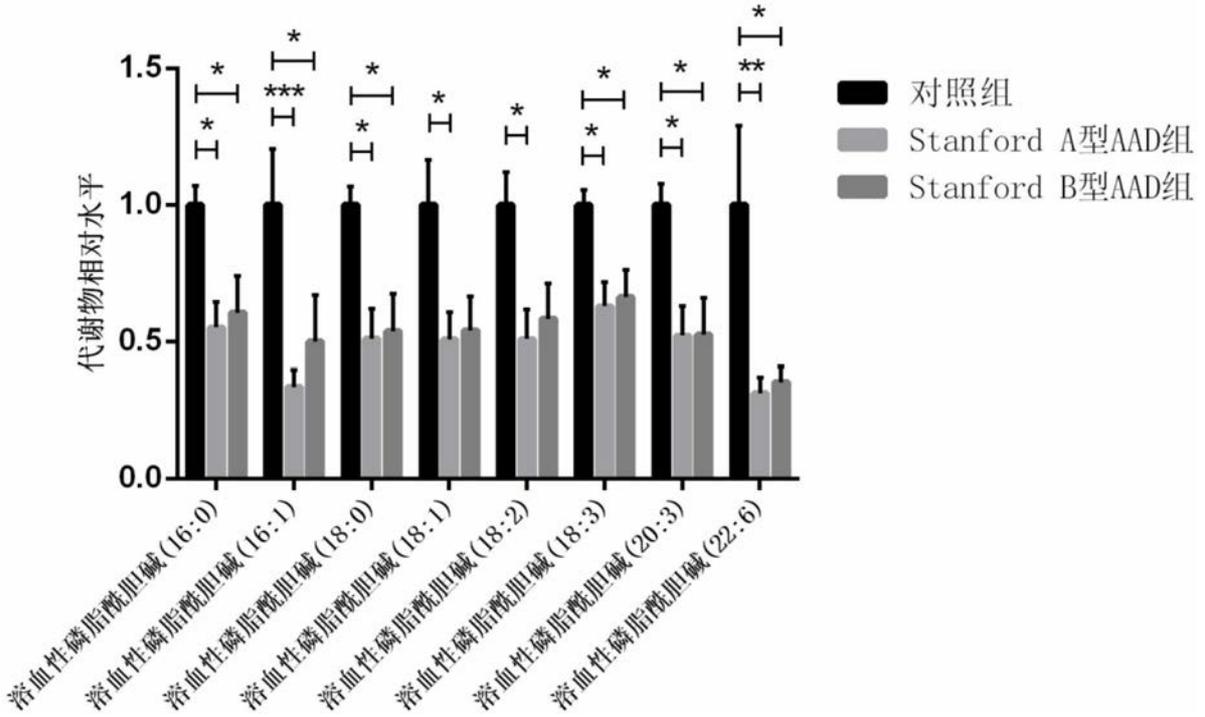


图2B

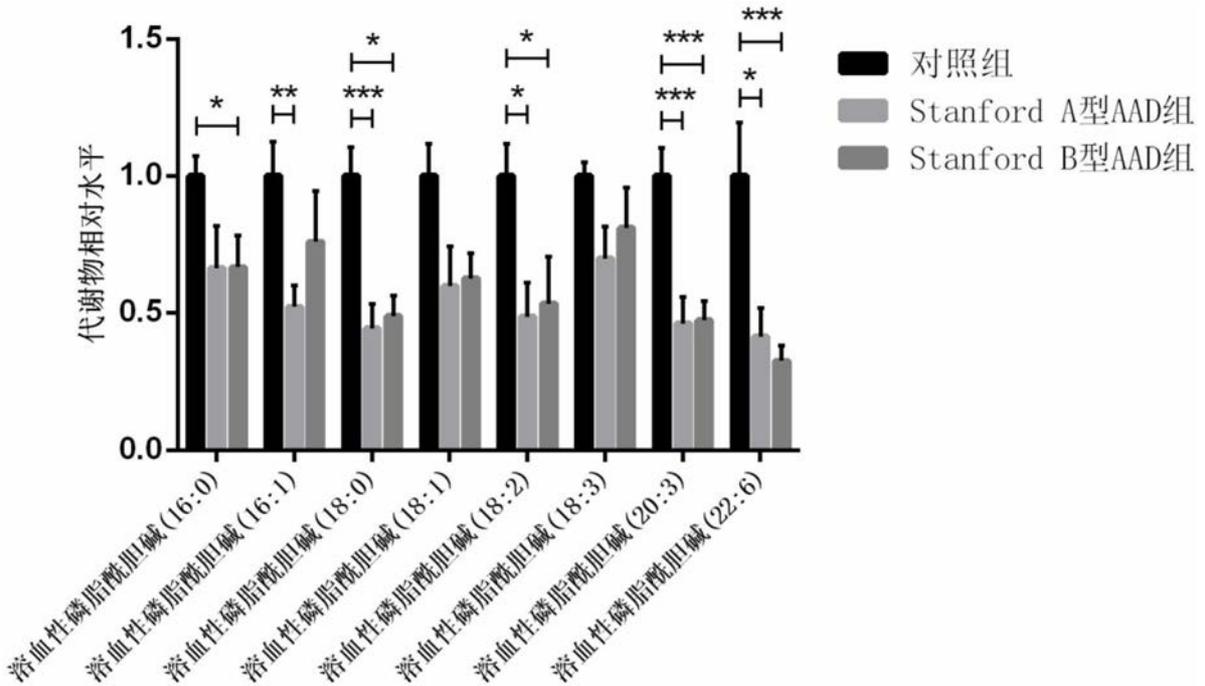


图2C

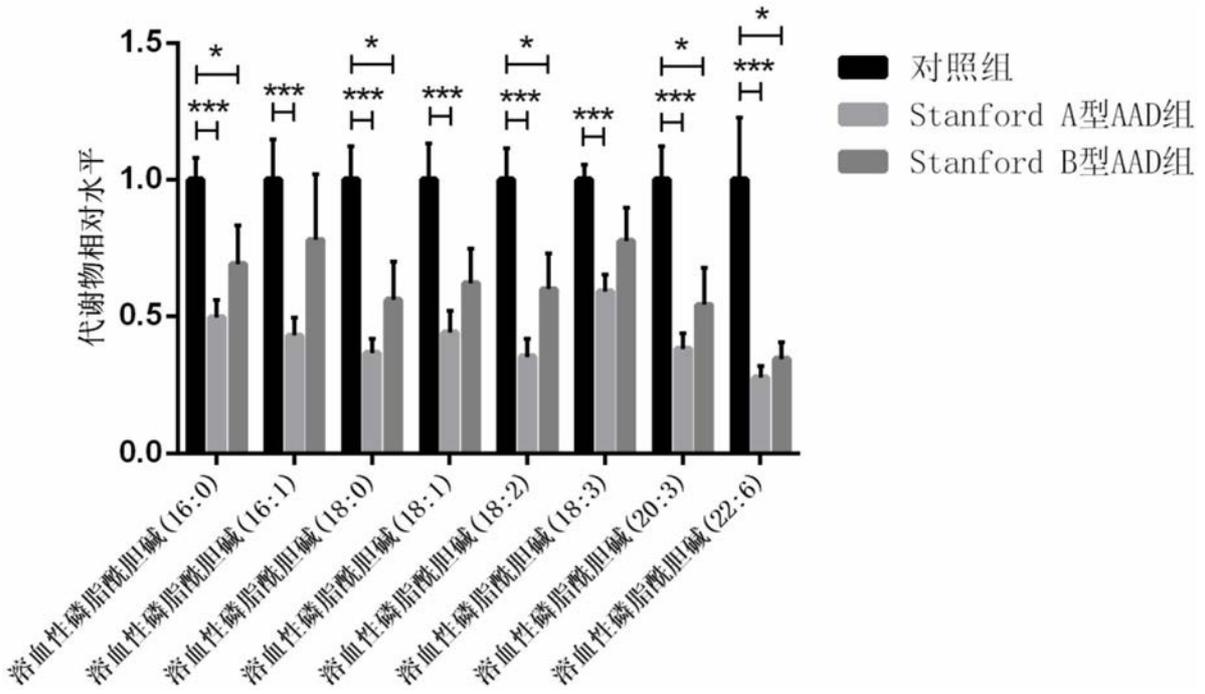


图2D

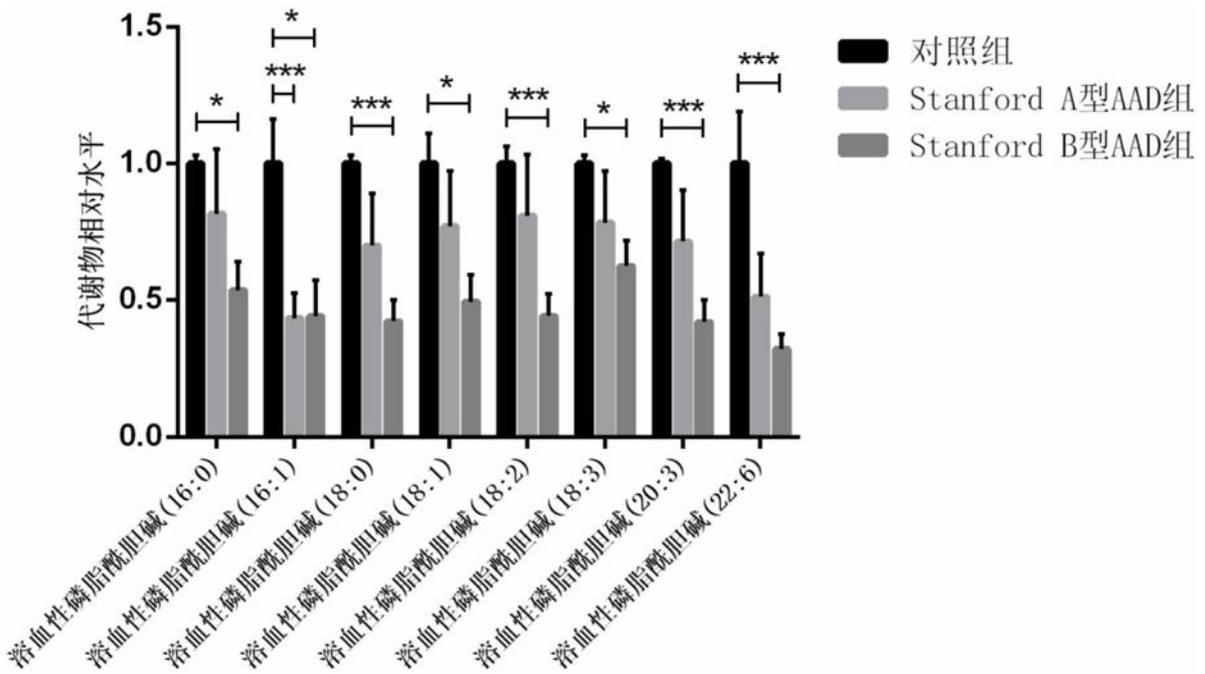


图2E

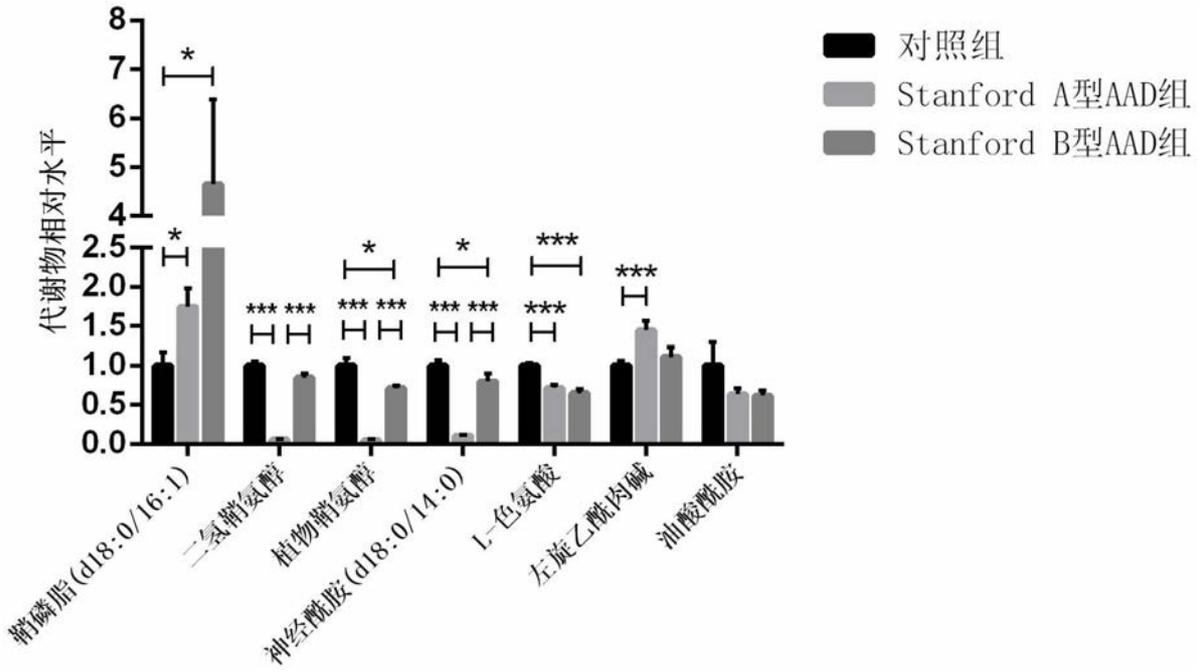


图3A

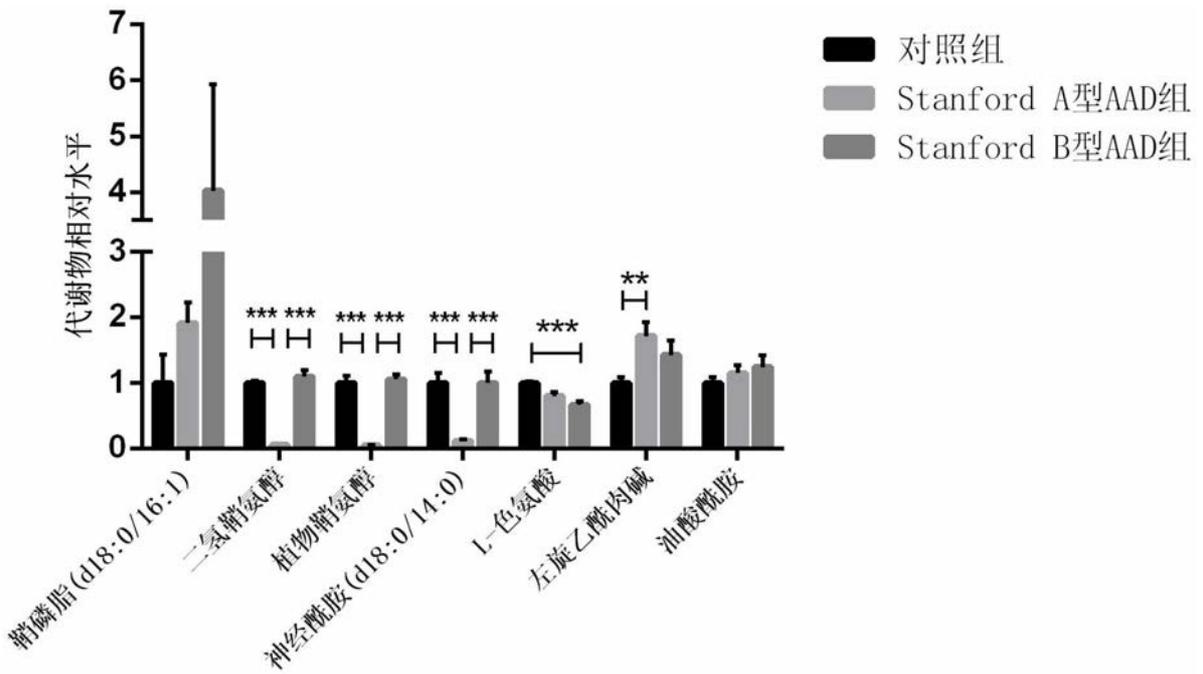


图3B

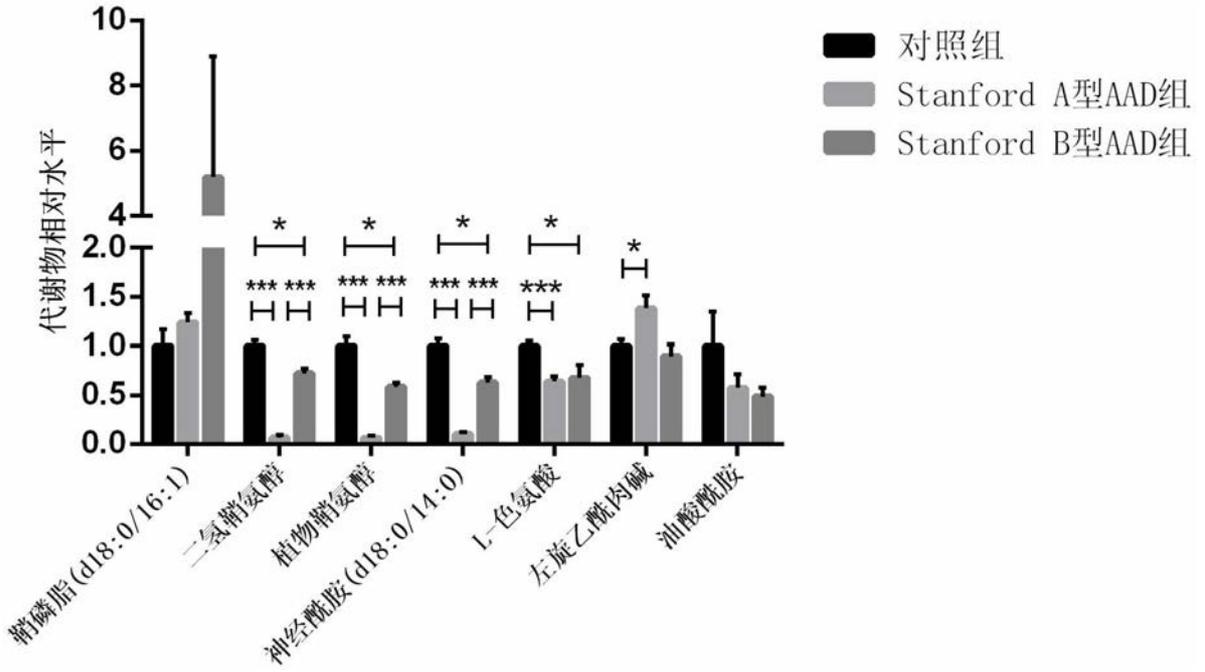


图3C

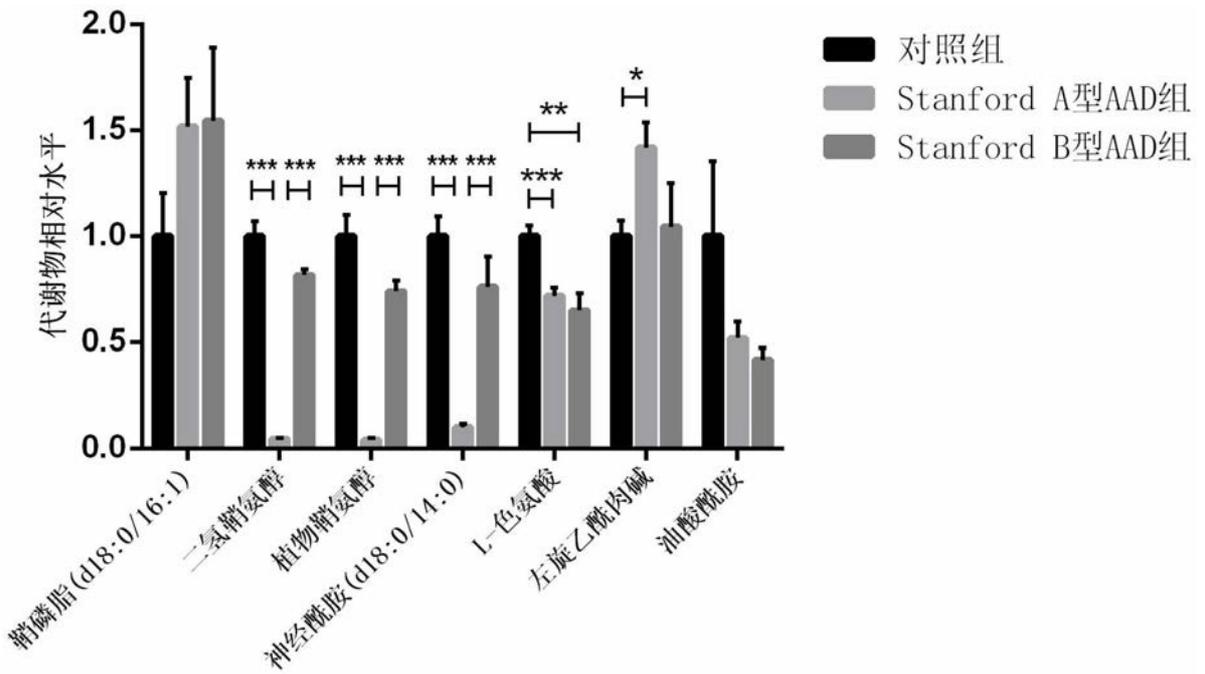


图3D

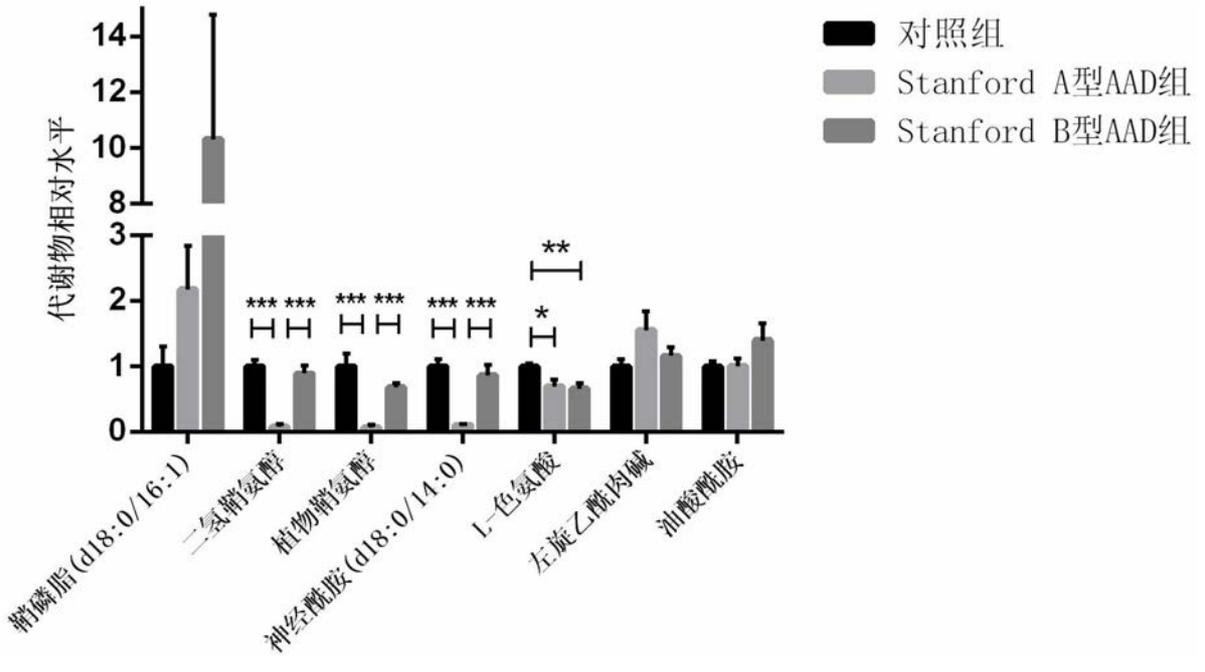


图3E

专利名称(译)	建立急性主动脉夹层诊断标准的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108711451A</a>	公开(公告)日	2018-10-26
申请号	CN201810281871.3	申请日	2018-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
[标]发明人	王利新 亓云鹏 周修适 王仁萍 符伟国		
发明人	王利新 亓云鹏 周修适 王仁萍 符伟国		
IPC分类号	G16H50/20 G01N30/02 G01N30/06 G01N33/535		
CPC分类号	G16H50/20 G01N30/02 G01N30/06 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种建立急性主动脉夹层诊断标准的方法，包括如下步骤：选取代谢产物溶血性磷脂酰胆碱和鞘脂类作为数理统计的可变量或者要素；采集符合统计学数量要求的受试者的血清样本；分别检测每个血清样本中所述代谢产物的浓度或含量；应用数理统计方法对所述可变量或者要素、上述浓度或含量进行统计和数据处理，得到用于判断是否属于急性主动脉夹层、急性主动脉夹层阳性是否属于Stanford A型或者Stanford B型的数学模型，作为急性主动脉夹层诊断标准。本发明还公开了一种用于急性主动脉夹层诊断的试剂盒。

基本信息	对照组	AAD 组		p值
		Stanford A型	Stanford B型	
年龄 (岁)	57.25 ± 7.87	56.4 ± 15.75	60.20 ± 13.88	0.676
男性 (例)	11 (55%)	14 (70%)	8 (53%)	0.517
发病至入院时间 (小时)	/	26.63 ± 29.88	28.29 ± 31.38	/
高血压 (例)	7 (35%)	12 (60%)	10 (67%)	0.128
cTnT (ng/mL)	0.017 ± 0.010	0.060 ± 0.087	0.018 ± 0.022	0.028
cTnT > 0.03 ng/mL (例)	1	5	2	0.100
D-二聚体 (mg/L)	NA	5.93 ± 5.99	11.37 ± 11.57	0.186