



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110967489 A

(43)申请公布日 2020.04.07

(21)申请号 201811137822.9

(22)申请日 2018.09.28

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 阎锡蕴 刘丹 王大吉 郝洪军
段红霞 刘铮 陈雪晖 冯静

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表6页 附图5页

(54)发明名称

可溶性CD146作为血脑屏障损伤标志物在中
枢神经系统疾病中的应用

(57)摘要

本发明涉及脑脊液中可溶性CD146蛋白在制
备用于个体炎症性中枢神经系统疾病的鉴别诊
断、病程判断和/或用药指导的试剂盒或诊断剂
中的用途以及所制备的试剂盒或诊断剂。所述用
途和试剂盒或诊断剂具有良好的灵敏度、准确
性、稳定性和可操作性。

1. 脑脊液中可溶性CD146蛋白和/或确定脑脊液中可溶性CD146量的试剂在制备用于个体炎症性中枢神经系统疾病的鉴别诊断、病程判断和/或用药指导的试剂盒或诊断剂中的用途,优选地,所述个体是人。

2. 权利要求1的用途,其中所述可溶性CD146的序列是SEQ ID NO:1中位置24-559所示氨基酸残基序列。

3. 权利要求1或2的用途,其中当所述个体脑脊液中的可溶性CD146量等于或高于阈值则判断所述个体为炎症性中枢神经系统疾病阳性,其中当所述个体脑脊液中的可溶性CD146量低于所述阈值则判断所述个体为炎症性中枢神经系统疾病阴性,优选地,所述阈值是10.5ng可溶性CD146/ml脑脊液,更优选地,所述个体脑脊液中的可溶性CD146量通过化学发光方法检测。

4. 权利要求1-3任一项的用途,其中所述炎症性中枢神经系统疾病包括:特发性脱髓鞘病、多发硬化、视神经脊髓炎谱系疾病、炎性脱髓鞘、外周神经病、中枢神经系统感染、炎症性神经免疫相关疾病、中枢神经系统白血病等。

5. 权利要求1-4任一项的用途,其中所述病程判断包括辅助诊断、疾病监测、及预后观察。

6. 权利要求1-5任一项的用途,其中所述试剂盒包含可溶性CD146标准品,检测抗体和捕获抗体,其中所述检测抗体或捕获抗体选自确定脑脊液中可溶性CD146量的试剂,并且所述检测抗体和所述捕获抗体识别可溶性CD146不同抗原决定簇。

7. 权利要求6的用途,其中所述确定脑脊液中可溶性CD146量的试剂是特异性结合可溶性CD146的抗体或其衍生物或抗原结合片段,例如结合SEQ ID NO:1中位置24-128的氨基酸的抗原表位的抗体和结合SEQ ID NO:1中位置335-400的氨基酸的抗原表位的抗体;例如包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体AA1,所述重链可变区包含序列为SEQ ID NO:2的V_HCDR1,序列为SEQ ID NO:3的V_HCDR2,和序列为SEQ ID NO:4的V_HCDR3,所述轻链可变区包含序列为SEQ ID NO:5的V_LCDR1,序列为SEQ ID NO:6的V_LCDR2,和序列为SEQ ID NO:7的V_LCDR3;包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体AA4,所述重链可变区包含序列为SEQ ID NO:8的V_HCDR1,序列为SEQ ID NO:9的V_HCDR2,和序列为SEQ ID NO:10的V_HCDR3,所述轻链可变区包含序列为SEQ ID NO:11的V_LCDR1,序列为SEQ ID NO:12的V_LCDR2,和序列为SEQ ID NO:13的V_LCDR3;包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体AA98,所述重链可变区包含序列为SEQ ID NO:14的V_HCDR1,序列为SEQ ID NO:15的V_HCDR2,和序列为SEQ ID NO:16的V_HCDR3,所述轻链可变区包含序列为SEQ ID NO:17的V_LCDR1,序列为SEQ ID NO:18的V_LCDR2,和序列为SEQ ID NO:19的V_LCDR3;例如保藏号为CGMCC NO.2310的菌株、保藏号为CGMCC NO.2311的菌株和保藏号为CGMCC NO.0491的菌株分泌的抗体。

8. 权利要求7的用途,其中所述试剂盒进一步包含能与权利要求6中定义的抗体结合的标记物,优选所述标记物选自酶例如辣根过氧化物酶或吖啶酯。

9. 用于个体炎症性中枢神经系统疾病的鉴别诊断、病程判断和/或用药指导的试剂盒或诊断剂,其包含可溶性CD146标准品,检测抗体和捕获抗体,其中所述检测抗体或捕获抗体选自权利要求6或7所定义的抗体,优选地,所述个体是人。

10. 权利要求9的试剂盒或诊断剂,其中所述试剂盒或诊断剂进一步包含能与权利要求6或7所定义的抗体结合的标记物,优选所述标记物选自酶例如辣根过氧化物酶或吖啶酯。

可溶性CD146作为血脑屏障损伤标志物在中枢神经系统疾病中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及疾病诊断与治疗领域,具体涉及人炎症性中枢神经系统疾病体外诊断与治疗,更具体涉脑脊液中可溶性CD146 (sCD146) 蛋白和/或确定脑脊液中可溶性CD146量的试剂在制备用于个体炎症性中枢神经系统疾病的鉴别诊断、病程判断和/或用药指导的试剂盒或诊断剂中的用途。

背景技术

[0002] 血脑屏障 (Blood Brain Barrier, BBB) 是血-脑之间选择性的阻止外周循环大分子进入中枢神经系统的天然屏障。其主要由脑微血管内皮细胞紧密连接、内皮细胞外基底膜、包绕的血管周细胞及神经胶质细胞组成。正常生理条件下,完整的BBB介导脑与血液之间的物质交换,严格控制血液中大于2KD的分子进入大脑,对维持中枢神经系统的正常生理功能、代谢与免疫特异性具有十分重要的意义。当出现脑缺氧、梗死、外伤、炎症或肿瘤等物理或疾病因素,血管内皮通透性增高, BBB完整性遭到破坏,使得大分子蛋白、炎症因子、细胞、病原体等通过BBB进入大脑,引起脑脊液成分的改变及大脑器质性损伤。多种中枢神经系统疾病可能伴随BBB的损伤,如炎症性脱髓鞘,中枢神经系统白血病或多种感染性疾病等。BBB完整性的检查对于这类疾病的早期诊断和及时治疗有着重要意义。

[0003] 近年来,部分针对白血病的临床试验数据表明, CAR-T免疫细胞疗法所带来的神经毒性也与BBB损伤以及炎症因子或淋巴细胞的浸润有关¹。部分白血病患者患有神经系统并发症, BBB已发生损伤,但因缺少BBB损伤的准确评估或因灵敏度受限而对神经毒性风险评估不足,导致部分患者死于CAR-T治疗后的脑部水肿。因此,临床也亟需寻找能够准确评估BBB损伤的新指标和新技术,对拟接受免疫细胞疗法的患者进行伴随诊断,从而为进一步的治疗提供参考,降低疗法所带来的神经毒性风险。

[0004] 目前,临床也采用磁共振动态增强扫描 (DCE-MRI) 等影像学技术进行BBB损伤的检查,但对仪器设备和费用的要求高,仍需辅以生化指标检测。据报道脑脊液中一些蛋白质的异常升高可能反映BBB通透性的改变。目前,临床上评估血脑屏障完整性的金指标为白蛋白商 Q_{A1b} (脑脊液白蛋白 C_{A1b} 与血清白蛋白 S_{A1b} 的含量比值 $\times 10^3$)^{2,3}。但白蛋白分子量较大 (67KD), 白蛋白的渗透并不能反映BBB大范围小分子的渗漏⁴,因此 Q_{A1b} 作为BBB损伤的间接指标,用于BBB损伤检测存在灵敏度较低等局限性,此外其值随着年龄的增长而升高,特异性不足;且可能存在短期BBB的破坏很快被修复,但是中枢神经系统损伤已经形成,这种情况下 Q_{A1b} 并不能准确的指征疾病的发生与否⁵。因此,对于大多数神经系统疾病普遍缺乏敏感且特异的生物标志物。

发明内容

[0005] 本发明通过对临床已确诊中枢神经系统疾病患者脑脊液及血清sCD146含量的回溯性检测和分析,揭示了脑脊液sCD146水平在炎症性中枢神经系统疾病患者体内相对正常

组上调,其含量与中枢神经系统疾病其它BBB临床指标及炎症因子水平呈正相关,而疾病状态血清sCD146水平与正常组无显著差异,因而鉴定脑脊液sCD46为BBB损伤的特异性生物标志物。根据其含量比照阈值可判断BBB损伤与否,从而用于炎症性中枢神经系统疾病的体外辅助诊断、用药指导、疗效监测及预后观察。

[0006] 因此,在一些实施方案中,本发明涉及脑脊液中sCD146蛋白在制备用于个体炎症性中枢神经系统疾病的鉴别诊断、病程判断和/或用药指导的试剂盒或诊断剂中的用途,优选地,所述个体是人。在一些实施方案中,所述sCD146的序列是SEQ ID NO:1 (CD146的氨基酸序列)中位置24-559所示氨基酸残基序列,即是SEQ ID NO:20 (CD146的cDNA序列)中位置70-1677的核苷酸编码的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述炎症性中枢神经系统疾病包括但不限于:特发性脱髓鞘病、多发硬化、视神经脊髓炎谱系疾病、炎性脱髓鞘、外周神经病、中枢神经系统感染、炎症性神经免疫相关疾病、中枢神经系统白血病。在一些实施方案中,炎症性中枢神经系统疾病是中枢神经系统白血病,本发明所述的sCD146在部分白血病患者的脑脊液中升高,指征此类患者BBB出现损伤,可能伴随白血病细胞对脑部的浸润,形成中枢神经系统白血病(脑白)或伴随其它神经系统并发症,提示若对这类患者实施CAR-T细胞治疗可能引起炎症因子或免疫细胞进入大脑,存在出现严重神经毒性的风险。通过检测肿瘤患者的脑脊液sCD146水平,可评估并筛选排除CAR-T细胞免疫治疗神经毒性高风险人群,避免出现细胞治疗的神经毒副作用。在一些实施方案中,所述病程判断包括对个体炎症性中枢神经系统疾病的辅助鉴别诊断、疾病监测、及预后观察。

[0007] 在一些实施方案中,所述试剂盒或诊断剂包含sCD146标准品,检测抗体和捕获抗体,其中所述检测抗体或捕获抗体选自确定脑脊液中可溶性CD146量的试剂,并且所述检测抗体和所述捕获抗体识别sCD146不同抗原决定簇。在一些实施方案中,检测抗体和捕获抗体可以是单克隆或多克隆抗体,鼠源、嵌合或人源抗体,全长抗体或抗原结合片段,条件是其能够识别并结合sCD146。在一些实施方案中,确定脑脊液中sCD146量的试剂是特异性结合sCD146的抗体或其衍生物或抗原结合片段。在一些实施方案中,确定脑脊液中sCD146量的试剂是结合SEQ ID NO:1中位置24-128的氨基酸的抗原表位的抗体和结合SEQ ID NO:1中位置335-400的氨基酸的抗原表位的抗体。在一些实施方案中,确定脑脊液中sCD146量的试剂是包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体AA1,所述重链可变区包含序列为SEQ ID NO:2 (Gly Leu Thr Phe Thr Glu Tyr Thr)的V_H CDR1,序列为SEQ ID NO:3 (Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Pro)的V_H CDR2,和序列为SEQ ID NO:4 (Ala Arg Asn Gly Gly Asp Phe Ala Tyr)的V_H CDR3,所述轻链可变区包含序列为SEQ ID NO:5 (Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Glu Asn Tyr)的V_L CDR1,序列为SEQ ID NO:6 (Trp Ala Ser)的V_L CDR2,和序列为SEQ ID NO:7 (Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr)的V_L CDR3;包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体AA4,所述重链可变区包含序列为SEQ ID NO:8 (Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala)的V_H CDR1,序列为SEQ ID NO:9 (Ile Ser Ser Gly SerArg Thr)的V_H CDR2,和序列为SEQ ID NO:10 (Val Arg Gly Pro Ala Phe Ala His)的V_H CDR3,所述轻链可变区包含序列为SEQ ID NO:11 (Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr)的V_L CDR1,序列为SEQ ID NO:12 (Leu Val Ser)的V_L CDR2,和序列为SEQ ID NO:13 (Cys Gln Gly Thr His Phe Ser Thr)的V_L CDR3;包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体AA98,所述重链可变区包含序列为SEQ ID NO:14 (Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Trp)的V_H

CDR1,序列为SEQ ID NO:15(Tyr Pro Gly Thr Asp Ile Thr Tyr)的V_H CDR2,和序列为SEQ ID NO:16(Ser Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly)的V_H CDR3,所述轻链可变区包含序列为SEQ ID NO:17(Ala Ser Lys Ser Val Ser Ile Ser Gly Tyr Ser Tyr Met)的V_L CDR1,序列为SEQ ID NO:18(Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr)的V_L CDR2,和序列为SEQ ID NO:19(His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr)的V_L CDR3。在一些实施方案中确定脑脊液中sCD146量的试剂是保藏号为CGMCC NO.2310的菌株、保藏号为CGMCC NO.2311的菌株和保藏号为CGMCC NO.0491的菌株分泌的抗体。

[0008] 抗体制备技术包括多克隆抗体制备技术和单克隆抗体制备技术例如杂交瘤技术是本领域所公知的。

[0009] 在一些实施方案中,试剂盒或诊断剂进一步包括用于显示所述结合的底物、sCD146蛋白标准品、用于标记抗体的可检测标记或捕获所述抗体的固相载体、用于标准品或样品配制的稳定稀释液及检测用的底物溶液。在一些实施方案中,sCD146蛋白标准品来源于哺乳细胞重组表达,具有已知浓度,通过梯度稀释后用于标准曲线的检测和绘制。在一些实施方案中,可用酶例如辣根过氧化物、荧光基团及化学发光物质例如吖啶酯等标记抗体,或用抗体包被固相(例如微孔板、磁珠、膜等)表面。在一些实施方案中,蛋白稳定稀释液是含有血清白蛋白的磷酸盐缓冲液、生理盐水等。

[0010] 在一些实施方案中,本发明涉及用于个体炎症性中枢神经系统疾病的鉴别诊断、病程判断和/或用药指导的试剂盒或诊断剂,其包含sCD146标准品,检测抗体和捕获抗体,其中所述检测抗体或捕获抗体选自上述所定义的抗体,优选地,所述个体是人。在一些实施方案中,试剂盒或诊断剂进一步包含能与上述所定义的抗体结合的标记物,优选所述标记物选自酶例如辣根过氧化物酶或吖啶酯。在一些实施方案中,由于脑脊液sCD146含量较低,ELISA不能满足灵敏度需求。因此本发明还开发了灵敏度更高的检测sCD146的化学发光免疫检测试剂盒,其采用酶(例如辣根过氧化物酶)促化学发光或吖啶酯直接化学发光法检测以定量分析脑脊液sCD146含量。

[0011] 在一些实施方案中,所述试剂盒或诊断剂可以检测个体脑脊液中的sCD146水平并与阈值(10.5ng可溶性CD146/ml脑脊液)比较,其中脑脊液sCD146水平等于或高于阈值指征BBB已形成损伤,表明炎症性神经系统疾病发病或疾病处于活动期,并可排除非炎症性中枢神经系统疾病;脑脊液sCD146低于阈值,则指征BBB完整性未被破坏,排除炎症性中枢神经系统疾病;脑脊液sCD146水平相对多发硬化等疾病活动期下降,指征BBB损伤的恢复,提示炎症性中枢神经系统疾病的缓解。在一些实施方案中,本发明所述的sCD146试剂盒检测方法,包括以下步骤:取临床患者脑脊液样品,4℃rpm离心5min,取上清原液或原液进一步用蛋白稳定稀释液等体积稀释用于后续含量检测;按梯度稀释sCD146蛋白标准品(0~160ng/ml),采用化学发光免疫分析法检测脑脊液sCD146水平,根据化学发光值绘制sCD146蛋白标准曲线(图8或图9);同时检测实际脑脊液样品,比照标准曲线得到脑脊液样品sCD146含量,根据检测结果与阈值的比较评估患者BBB损伤程度及疾病的进展情况:脑脊液sCD146含量超过阈值判断为炎症性中枢神经系统疾病阳性,BBB已形成损伤;脑脊液sCD146含量阈值以下判断为阴性,BBB完整性未破坏或已恢复。在一些实施方案中,检测包括酶促化学发光免疫检测和吖啶酯直接化学发光免疫检测。在一些实施方案中,采用化学发光免疫检测,用化

学发光物质如吖啶酯等直接标记检测抗体,或用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等,可催化底物(例如鲁米诺、AMPPD等)标记形成化学发光。在一些实施方案中,化学发光免疫检测试剂盒的最低检测限为0.85ng/ml,线性范围在80ng/ml以上,适用与全自动发光检测仪配套使用。

[0012] 本发明还描述了通过中和sCD146抑制BBB损伤和缓解疾病发作的可能性,所述可能性基于CD146的抗体也能结合sCD146并抑制其功能。

[0013] 从上述技术方案可以看出,本发明将脑脊液sCD146作为BBB损伤标志物,具有以下优点:BBB内皮细胞本身是sCD146的来源,因此sCD146是BBB损伤的直接标志物。其不同于白蛋白,白蛋白本身不存在于人体大脑,其全部来源于外周血。因此,现行临床BBB损伤检测指标Q_{A1b}指征脑脊液与血清之间的白蛋白浓度梯度,是BBB屏障功能损伤后的结果,只能间接反应BBB损伤;即便BBB损伤修复或疾病缓解,仍能检测到Q_{A1b}值的异常,且该指标并不能反映小范围的小分子渗透,因此现行指标缺乏特异性。此外,根据不同中枢神经系统炎症性疾病临床指标性能分析,脑脊液sCD146作为BBB损伤标志物在不同疾病中检测中敏感度、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)均高于其它临床指标(图5),脑脊液sCD146作为BBB损伤标志物与中枢神经系统炎症性疾病的发病及进展有较好的相关性。

[0014] 本发明将脑脊液sCD146检测试剂盒或诊断剂用于炎症相关中枢神经系统疾病的鉴别诊断、病程判断和/或用药指导,具有以下有益效果:灵敏度高、准确、稳定性好和可操作性强。目前,中枢神经系统疾病检查手段包括:血脑屏障通透性指标Q_{A1b}检查,及中枢神经系统损伤生化指标如寡克隆区带(OCB,检测中枢神经系统亚急性、慢性炎症性病变鞘内免疫球蛋白合成最可靠的指标)、IgG鞘内合成率、髓鞘碱性蛋白(MBP)检测,这些指标均为间接性指标,并不能准确且特异的反映BBB损伤程度,仅用于辅助诊断。

[0015] 由于脑脊液样本珍贵,来源稀少,且所含蛋白水平较低,因此本发明所述的试剂盒优选化学发光法进行脑脊液sCD146的检测。相对于传统双抗夹心ELISA方法(灵敏度2.5ng/ml,线性范围0~80ng/ml),化学发光法检测sCD146灵敏度更高,能达到0.85g/ml,线性范围更宽(80ng/mL以上),更能满足临床对BBB损伤检测灵敏度的需求。

附图说明

[0016] 图1:SDA-PAGE检测sCD146重组蛋白纯度

[0017] 图2:中枢神经系统疾病患者病理信息(Control:相对正常组对照;Remitting MS:缓解型多发硬化;NIND:神经系统非炎症性疾病;IIDD:中枢神经系统特发性炎症脱髓鞘病;CNSI:中枢神经系统感染;PNS:外周神经病变。OCB:寡克隆区带;QAb1:白蛋白商;IgG synthesis:IgG合成率;IgG Index:IgG指数;C-MBP:脑脊液髓鞘碱性蛋白;S-MBP:血清髓鞘碱性蛋白)

[0018] 图3:sCD146在中枢神经系统疾病患者脑脊液及血清中的含量(**p<0.001)

[0019] 图4:中枢神经系统疾病患者脑脊液sCD146与临床指标的相关性(*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001)

[0020] 图5:脑脊液sCD146及其它临床指标在中枢神经系统炎症性疾病中的灵敏度、阳性预测值与阴性预测值分析

[0021] 图6:中枢神经系统炎症性疾病患者脑脊液中炎症因子水平上调(*p<0.05;**p<

0.01;***p<0.001)

[0022] 图7:中枢神经系统炎症性疾病患者脑脊液sCD146与炎症因子的相关性分析(*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001)

[0023] 图8:sCD146促使体外BBB模型通透性增强;(Permrability:通透性;untreated:未处理的)

[0024] 图9:sCD146影响人脑微血管内皮细胞紧密连接;(F-actin:F-肌动蛋白)

[0025] 图10:采用本发明所述试剂盒(酶促化学发光法)检测sCD146蛋白标准曲线

[0026] 图11:采用本发明所述试剂盒(吡啶酯化学发光法)检测sCD146蛋白标准曲线

[0027] 图12:本发明所述吡啶酯直接化学发光检测与ELISA检测相关性分析

具体实施方式

[0028] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明作进一步的详细说明。这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的保护范围。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。

[0029] 实施例

[0030] 实施例1:配对单克隆抗体制备

[0031] 参考中国专利申请号200810057260.7、201210394856.2和99107586利用杂交瘤技术制备单克隆抗体AA1、AA4、和AA98或其衍生物或抗原结合片段。其所结合的抗原表位、其各自所包含的重链可变区CDR序列和轻链可变区CDR序列如上所述以及分泌其的菌株分别是保藏号为CGMCC NO.2310的菌株、保藏号为CGMCC NO.2311的菌株和保藏号为CGMCC NO.0491的菌株。

[0032] 实施例2:标准品sCD146蛋白表达与纯化

[0033] sCD146为重组表达的人CD146分子胞外区蛋白(SEQ ID NO:1中位置22-559的氨基酸,参考中国专利申请号200810057260.7,201210394856.2)。将N端带有信号肽、His-tag、strep-tag、HRV3C识别序列的CD146 cDNA(SEQ ID NO:2)序列克隆到pcDNA3.1载体(Invitrogen)上,质粒转染至CHO Lec 3.2.8.2细胞(ATCC)中,DMEM培养基培养,筛选蛋白表达量较高的细胞,扩大培养并收集培养上清。对细胞培养上清进一步浓缩,经过Ni-NTA(Qiagen)和strep-tactin(IBA)亲和纯化,得到纯度较高的含有His-tag和strep-tag的融合蛋白。经HRV3C(Sino Biological)蛋白酶切,经Ni-NTA亲和纯化去除HRV3C蛋白酶和未去除融合N端的目标蛋白后,进一步经Superdex 200分子筛,得到sCD146蛋白,用SDS-PAGE法测定其纯度不低于95%(图1)。

[0034] 实施例3:临床样本收集与分类

[0035] 发明人收集了2011年至2018年,在北京大学第一附属医院及北京安贞医院就诊的中枢神经系统疾病患者的脑脊液和血清样本,共861对。脑脊液样本通过腰椎穿刺获取,4℃1000rpm离心5min,取上清分装冻存于-80℃;血清样本取自肘前静脉,4℃2000rpm离心5min,取上清分装冻存于-80℃。所有患者对自身血清和脑脊液样本被用于该项回溯性研究具有知情权,并获得北京大学第一附属医院及北京安贞医院伦理委员会的批准。发明人根据患者的临床病理信息,将纳入分析的患者分为6组,分别是对照组(control)、缓解型多发

硬化 (Relapsing MS)、神经系统非炎性疾病 (NIND)、中枢神经系统特发性炎性脱髓鞘病 (IIDD)、中枢神经系统感染 (CNSI)、外周神经病变 (PNS)。并对不同疾病组受试患者进行临床病理检验获得白蛋白商 Q_{Alb} 、IgG合成指数、IgG合成率、脑脊液髓鞘碱性蛋白水平、血清髓鞘碱性蛋白水平、脑脊液/血清髓鞘碱性蛋白比值 (图2)

[0036] 实施例4:患者脑脊液和血清样品中可溶性sCD146检测

[0037] 采用双抗夹心ELISA方法进行定量检测:使用CD146的特异性单克隆抗体AA1 (如前所述) 作为捕获抗体,特异性单克隆抗体AA98 (如前所述) 作为检测抗体。具体步骤如下:AA1抗体 (6ug/ml) 包被96孔酶标版,每孔50u1,4℃过夜;PBST缓冲液洗板3次,PBS洗板一次,拍干;加5%脱脂牛奶于37℃封闭2h;封闭结束后洗板4次,拍干;用PBS稀释sCD146蛋白标准品至不同的浓度梯度 (80ng/ml、40ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2.5ng/ml、0ng/ml),并按1:2稀释脑脊液样本,按1:20稀释血清样本,按50u1/孔加入梯度稀释的蛋白标准品、脑脊液或血清样本,37℃孵育1.5h;洗板4次,拍干;加入1:1000稀释酶标检测抗体AA98-HRP (委托天津三箭生物技术有限公司制备,P20171024),50u1/孔,37℃孵育45min;洗板4次,拍干;加入单组份TMB显色液50μL (湖州英创,TMB-S-001),37℃温育10~15min;加入等体积2M H₂SO₄终止反应;多功能酶标仪读取OD450吸光值,根据标准品各个浓度吸光值绘制标准曲线;根据稀释样品检测读值,计算实际样品sCD146浓度。结果显示:在炎症性中枢神经系统疾病患者的脑脊液中sCD146相对于对照组或中枢神经系统非炎症性疾病组显著上调,而在血清水平并无显著性差异 (图3,数据表示为平均值±SD)。其中在多发硬化疾病组,处于疾病缓解期患者脑脊液sCD146水平 (44.3±18.9) 相对复发型多发硬化 (Relapsing MS) 组 (4.6±3.5) 显著下降,指征BBB损伤的恢复,提示炎症性中枢神经系统疾病的缓解 (图3)。通过脑脊液sCD146水平检测,若其水平较多发硬化发病期 (Relapsing MS) 有显著下调,表明该类炎症性疾病有所缓解,BBB损伤修复,可停止给药。因此,脑脊液中sCD146水平变化也可为治疗及预后提供参考。

[0038] 实施例5:脑脊液sCD146与临床指标相关性分析

[0039] 实施例4的结果提示:sCD146蛋白在患者脑脊液中的升高可能与BBB损伤及通透性改变有关。BBB的损伤会导致脑脊液中不只一种大分子含量的改变,临床上也有一些辅助性诊断指标能够间接反应BBB通透性的改变。进一步对sCD146与这些临床辅助诊断的生化指标进行相关性分析。利用实施例3中对不同疾病组受试患者进行临床病理检验获得的白蛋白商 Q_{Alb} 、IgG合成指数、IgG合成率、脑脊液髓鞘碱性蛋白水平、血清髓鞘碱性蛋白水平、脑脊液/血清髓鞘碱性蛋白比值。根据实施例4得到的脑脊液、血清sCD146含量值,采用Spearman相关性分析,得到脑脊液sCD146与上述不同临床指标及血清sCD146水平的相关系数,并进行显著差异分析。结果显示,在炎症性中枢神经系统疾病中脑脊液sCD146与BBB损伤指标白蛋白商 Q_{Alb} 显著正相关,与中枢神经系统损伤免疫指标IgG合成率、脑脊液髓鞘碱性蛋白C-MBP也呈显著正相关,与血清sCD146无显著相关性,而在非炎症性中枢神经系统疾病组与上述指标均无显著相关性 (图4)。

[0040] 实施例6:脑脊液sCD146作为BBB损伤标志物用作中枢神经系统炎症性疾病指标的性能分析

[0041] 根据实施例4中脑脊液sCD146检测结果,若以脑脊液sCD146水平高于10.5ng/ml (NIND的平均值+2SD) 作为鉴别中枢神经系统炎症性疾病的标准,本标志物敏感性达到

100% (562/562), 阳性预测值PPV为97.4% (562/577), 阴性预测值NPV为100% (202/202), 均高于其它临床生化指标如白蛋白商 Q_{A1b} 、IgG合成率、IgG指数、脑脊液髓鞘碱性蛋白C-MBP、血清髓鞘碱性蛋白S-MBP及寡克隆区带OCB的敏感性、PPV和NPV (图5)。

[0042] 实施例7: 脑脊液sCD146与多种炎症因子相关性分析

[0043] 用PBS将脑脊液样品等体积稀释, 每份样品等分为3个平行样, 采用多因子检测试剂盒 (Biolegend, USA), 利用流式细胞仪同时检测7种不同因子 (MMP2、MMP9、IL-1 β 、IL-17A、IFN- γ 、sVCAM、sICAM), 上述因子均为根据文献报道与中枢神经系统炎症性疾病相关的因子), 使用FlowCytomixPro软件分析脑脊液中不同因子含量, 采用非成对Mann Whitney U检验进行不同疾病组因子水平差异分析; 采用Spearman相关性分析得到sCD146与多种炎症因子水平的相关系数。分析结果显示: 相对于缓解型多发硬化组 (Relapsing MS), 中枢神经系统炎症性疾病组 (CSNI) 患者脑脊液中上述因子水平显著上调 (图6), 且与脑脊液sCD146含量显著正相关 (图7)。正常生理条件下, 脑脊液中炎症因子水平极低, 因而其含量的升高也提示BBB发生损伤进而通透性增强。脑脊液sCD146与脑脊液炎症因子水平存在显著的正相关性, 间接验证了脑脊液sCD146作为BBB损伤指标的合理性。

[0044] 实施例8: sCD146促使体外血脑屏障模型通透性增强

[0045] 为进一步探索sCD146在血脑屏障损伤中发挥的角色, 发明人建立了体外BBB模型来模拟体内BBB结构, 具体方法如下: 在Transwell培养板 (Corning Costar, 3 μ m孔径) 上室, 以 4×10^4 个/孔的密度接种永生化人脑微血管内皮细胞hCMEC/D3 (法国巴黎勒内·笛卡尔大学Pierre-Olivier Couraud教授提供)。利用结晶紫染色确认上层内皮细胞通过紧密连接已形成致密单层后, 添加sCD146或PBS处理4h, 在上室加入0.5 μ g/mL或5 μ g/mL HRP (40KD) 作为指示剂, 2~6h后分别在下室加入TMB底物, 并利用多功能酶标仪检测OD450吸光值。结果显示, sCD146处理组相对于PBS组HRP催化底物显色更深, 表明sCD146处理促进了内皮细胞单层的通透性, 因而导致了HRP往培养下室的渗漏 (图8)。

[0046] 实施例9: sCD146影响内皮单层紧密连接

[0047] 为进一步阐明sCD146处理对体外培养脑微血管内皮细胞的影响, 发明人通过免疫细胞化学染色对脑微血管内皮细胞进行分子水平的分析。具体方法如下: 预先在玻璃薄片上接种脑微血管内皮细胞hCMEC/D3形成细胞爬片; 添加sCD146或PBS刺激细胞2h; 取出爬片, 4%多聚甲醛室温固定细胞20min, 随后用0.1% Triton X-100处理3min, 对细胞膜进行通透; 分别加入抗细胞紧密连接蛋白抗体occludin (Abcam, ab31721)、ZO-1 (Invitrogen, 14-9776-80) 及JAM-A (Abcam, ab180821), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 加入荧光素标记二抗Alexa Fluor 555抗-兔IgG (Invitrogen, A31572), 37 $^{\circ}$ C避光孵育45min; 用DAPI进行细胞核复染; 直接采用染料phalloidine (Biolegend, #424203) 对细胞骨架蛋白F-肌动蛋白进行染色, 37 $^{\circ}$ C孵育30min; 使用抗荧光衰减剂进行封片; 利用激光共聚焦显微镜 (OLYMPUS FV100) 进行观察并采集图像。结果显示sCD146刺激组hCMEC/D3细胞紧密连接蛋白occludin、ZO-1及JAM-A表达减少, 细胞骨架蛋白肌动蛋白发生重排 (图9)。综上所述, sCD146主要通过影响脑微血管内皮细胞之间的紧密连接程度, 从而引起BBB通透性的改变。因此, 相对于 Q_{A1b} 等间接指标, sCD146是BBB损伤的直接标志物。

[0048] 实施例10: 化学发光免疫检测试剂盒定量分析脑脊液sCD146含量

[0049] 本发明中化学发光试剂盒采用酶促化学发光或吡啶酯直接化学发光法检测。在酶

促化学发光法中,在96孔白色微孔板(Nunc,463201)内包被CD146特异性单抗AA1抗体(6 μ g/ml),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;PBST缓冲液洗板三遍,PBS洗板一次;5%脱脂牛奶37 $^{\circ}$ C封闭2h后洗板4次;sCD146蛋白标准品梯度稀释成160、80、40、20、10、5、2.5、1.25ng/mL,脑脊液样本稀释2倍,每孔加100 μ L蛋白标准品或样品,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,PBST洗板后加AA98-HRP,37 $^{\circ}$ C孵育40min,PBST洗板3次,PBS洗板1次后,采用EnVision多模式检测仪(PerkinElmer)自动加入鲁米诺发光底物(Thermo,37074),测定发光值。根据蛋白标准品发光值,绘制标准曲线(图10),并由此计算样品中sCD146含量。在酶促化学发光法定量检测中灵敏度为1.25ng/mL,线性范围为不低于80ng/mL,高于实施例4的ELISA方法(2.5ng/ml,0~80ng/mL),所检测7例临床样本结果判定与ELISA检测结果100%符合。

[0050] 在吡啶酯直接化学发光法检测体系中,在顺磁微粒上包被CD146特异性单克隆抗体AA1,以吡啶酯作为发光试剂对检测抗体AA98进行标记,将梯度稀释的sCD146蛋白标准品(100 μ L)、顺磁微粒标记抗体(50 μ L)及缓冲液(50 μ L)混合于反应管中,反应20min,清洗3次后加入吡啶酯标记抗体150 μ L并进行磁分离反应10min,缓冲液清洗3次后,加入激发剂(NaOH和H₂O₂),使用全自动化学发光仪检测发光值,根据标准曲线计算待测样品中sCD146含量(图11)。应用上述方法检测的灵敏度达0.85ng/ml,线性范围不低于80ng/ml,与实施例4的ELISA检测结果相关性较好(相关系数 $r=0.935$,图12)。

[0051] 综上所述,本发明鉴定了脑脊液sCD146作为BBB损伤的生物标志物,该标志物在多种中枢神经系统炎症性疾病患者的脑脊液中显著升高,且在疾病如多发硬化症的缓解期显著下降,可指征中枢神经系统炎症性疾病的发病和进展。在炎症环境中脑微血管内皮细胞CD146表达上调,sCD146含量升高,影响内皮细胞紧密连接,因而导致BBB通透性增强,因此脑脊液sCD146是BBB损伤的直接标志物。中枢神经系统疾病早期会出现不同程度的BBB通透性改变或损伤,因此该标志物用于炎症相关中枢神经系统疾病的体外辅助鉴别诊断、病程判断或用药指导,具有相对现有临床BBB损伤指标Q_{A1b}更高的敏感性和特异性。此外,本发明还提供用于检测脑脊液sCD146蛋白的试剂盒,试剂盒采用化学发光免疫检测方法,具备相对传统ELISA检测方法更高的灵敏度、线性范围和稳定性,且不需要外接光源,能够避免外界因素影响,适用于临床样本的微量定量检测。上述生物标志物和相应的检测试剂盒在中枢神经系统疾病的临床诊断中,具有显著的实用价值和广阔的应用前景。

[0052] 以上所述的具体实施例,对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明,应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施例而已,并不用于限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0053] 参考文献

[0054] 1 Gust,J.,et al.Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells.Cancer Discov 2017,7(12):1404-1419.

[0055] 2 J.D.HUBER,K.A.W.,S.HOM,R.D.EGLETON,K.S.MARK,AND T.P.DAVIS.Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression.Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001,280,H1241-H1248.

[0056] 3 Deisenhammer,F.et al.Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis.Report from an EFNS task force.Eur J Neurol 2006,13,913-922,doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01493.x.

[0057] 4 Ivanov,A.I.et al.Cisplatin binding sites on human albumin.The Journal of biological chemistry 1998,273,14721-14730.

[0058] 5 NJ Abbott,L.M.,DEM Dolman.The blood-brain barrier in systemic lupus erythematosus.Lupus 2003,12,908-915.

序列表

<110> 中国科学院生物物理所
 <120> 可溶性CD146作为血脑屏障损伤标志物在中枢神经系统疾病中的应用
 <130> IB187574
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <400> 1
 Met Gly Leu Pro Arg Leu Val Cys Ala Phe Leu Leu Ala Ala Cys Cys
 1 5 10 15
 Cys Cys Pro Arg Val Ala Gly Val Pro Gly Glu Ala Glu Gln Pro Ala
 20 25 30
 Pro Glu Leu Val Glu Val Glu Val Gly Ser Thr Ala Leu Leu Lys Cys
 35 40 45
 Gly Leu Ser Gln Ser Gln Gly Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser
 50 55 60
 Val His Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln Ser Glu Pro Gly Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Leu Gln Asp
 85 90 95
 Arg Gly Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg
 100 105 110
 Ile Phe Leu Cys Gln Gly Lys Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile
 115 120 125
 Gln Leu Arg Val Tyr Lys Ala Pro Glu Glu Pro Asn Ile Gln Val Asn
 130 135 140
 Pro Leu Gly Ile Pro Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Glu Val Ala Thr
 145 150 155 160
 Cys Val Gly Arg Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Gln Val Ile Trp Tyr Lys
 165 170 175
 Asn Gly Arg Pro Leu Lys Glu Glu Lys Asn Arg Val His Ile Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gln Thr Val Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Gln Ser Ile Leu
 195 200 205
 Lys Ala Gln Leu Val Lys Glu Asp Lys Asp Ala Gln Phe Tyr Cys Glu
 210 215 220
 Leu Asn Tyr Arg Leu Pro Ser Gly Asn His Met Lys Glu Ser Arg Glu
 225 230 235 240

[0001]

Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val
 245 250 255

Glu Pro Val Gly Met Leu Lys Glu Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys
 260 265 270

Leu Ala Asp Gly Asn Pro Pro Pro His Phe Ser Ile Ser Lys Gln Asn
 275 280 285

Pro Ser Thr Arg Glu Ala Glu Glu Thr Thr Asn Asp Asn Gly Val
 290 295 300

Leu Val Leu Glu Pro Ala Arg Lys Glu His Ser Gly Arg Tyr Glu Cys
 305 310 315 320

Gln Gly Leu Asp Leu Asp Thr Met Ile Ser Leu Leu Ser Glu Pro Gln
 325 330 335

Glu Leu Leu Val Asn Tyr Val Ser Asp Val Arg Val Ser Pro Ala Ala
 340 345 350

Pro Glu Arg Gln Glu Gly Ser Ser Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala Glu
 355 360 365

Ser Ser Gln Asp Leu Glu Phe Gln Trp Leu Arg Glu Glu Thr Gly Gln
 370 375 380

[0002] Val Leu Glu Arg Gly Pro Val Leu Gln Leu His Asp Leu Lys Arg Glu
 385 390 395 400

Ala Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Val Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Gly
 405 410 415

Leu Asn Arg Thr Gln Leu Val Asn Val Ala Ile Phe Gly Pro Pro Trp
 420 425 430

Met Ala Phe Lys Glu Arg Lys Val Trp Val Lys Glu Asn Met Val Leu
 435 440 445

Asn Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Thr Ile Ser Trp
 450 455 460

Asn Val Asn Gly Thr Ala Ser Glu Gln Asp Gln Asp Pro Gln Arg Val
 465 470 475 480

Leu Ser Thr Leu Asn Val Leu Val Thr Pro Glu Leu Leu Glu Thr Gly
 485 490 495

Val Glu Cys Thr Ala Ser Asn Asp Leu Gly Lys Asn Thr Ser Ile Leu
 500 505 510

Phe Leu Glu Leu Val Asn Leu Thr Thr Leu Thr Pro Asp Ser Asn Thr
 515 520 525

Thr Thr Gly Leu Ser Thr Ser Thr Ala Ser Pro His Thr Arg Ala Asn
 530 535 540

Ser Thr Ser Thr Glu Arg Lys Leu Pro Glu Pro Glu Ser Arg Gly Val
545 550 555 560

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 2

Gly Leu Thr Phe Thr Glu Tyr Thr
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 3

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Pro
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 4

Ala Arg Asn Gly Gly Asp Phe Ala Tyr
1 5

[0003]

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 5

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Glu Asn Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 6

Trp Ala Ser
1

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 7

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 9

Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 10

Val Arg Gly Pro Ala Phe Ala His
1 5

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 11

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

[0004]

<210> 12
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 12

Leu Val Ser
1

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 13

Cys Gln Gly Thr His Phe Ser Thr
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 14

Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 15

Tyr Pro Gly Thr Asp Ile Thr Tyr
1 5

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 16

Ser Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
1 5 10

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 17

Ala Ser Lys Ser Val Ser Ile Ser Gly Tyr Ser Tyr Met
1 5 10

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 18

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5

[0005]

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 19

His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
1 5 10

<210> 20
<211> 1941
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 20

```

atggggcttc ccaggctggt ctgcgccttc ttgctcgccg cctgctgctg ctgtcctcgc      60
gtcgcgggtg tgcccggaga ggctgagcag cctgcgcctg agctgggtga ggtggaagtg      120
ggcagcacag cccttctgaa gtgcggcctc tcccagtcce aaggcaacct cagccatgtc      180
gactggtttt ctgtccacaa ggagaagegg acgctcatct tccgtgtgcg ccagggccag      240
ggccagagcg aacctgggga gtacgagcag eggctcagcc tccaggacag aggggctact      300
ctggccctga ctcaagteac cccccaagac gagegcatet tcttgtgcca gggcaagegc      360
cctcggctcc aggagtaccg catccagctc cgcgtctaca aagctccgga ggagccaaac      420
atccaggtea acccctggg catccctgtg aacagtaagg agcctgagga ggtcgtacc      480
tgttaggga ggaacgggta cccattcct caagtcatct ggtacaagaa tggccggcct      540
ctgaaggagg agaagaaccg ggtccacatt cagtcgtccc agactgtgga gtcgagtgg      600
ttgtacacct tgcagagtat tctgaaggca cagctggtta aagaagacaa agatgcccag      660

```


	ttttactgtg agctcaacta cggctgccc agtgggaacc acatgaagga gtccaggaa	720
	gtcaccgtcc ctgttttcta cccgacagaa aaagtgtggc tggagtgga gccctggga	780
	atgctgaagg aaggggaccg cgtggaaatc aggtgtttgg ctgatggca cctccacca	840
	cacttcagca tcagcaagca gaaccccagc accagggagg cagaggaaga gacaaccaac	900
	gacaacgggg tcctggtgct ggagcctgcc cggaaagAAC acagtgggcg ctatgaatgt	960
	cagggcctgg acttggacac catgatatcg ctgctgagt aaccacagga actactggtg	1020
	aactatgtgt ctgacgtccg agtgagtccc gcagcccctg agagacagga aggcagcagc	1080
	ctcaccetga cctgtgaggc agagagtagc caggacctcg agttccagt gctgagagaa	1140
	gagacagccc aggtgctgga aagggggcct gtgcttcagt tgcattacct gaaacgggag	1200
	gcaggaggcg gctatcgctg cgtggcgtct gtgcccagca taccggcct gaaccgaca	1260
[0006]	cagctggta acgtggccat ttttgcccc ccttgatgg cattcaagga gaggaaggtg	1320
	tgggtgaaag agaatatgt gttgaatctg tcttgaag cgtcaggga cccccggccc	1380
	accatctct ggaacgtcaa cggcacggca agtgaacaag accaagatcc acagcagtc	1440
	ctgagcacc tgaatgtct cgtgacccc gagctgttg agacaggtgt tgaatgcacg	1500
	gcctcaacg acctgggcaa aaacaccagc atctcttcc tggagctggt caatttaacc	1560
	accctcacac cagactcaa cacaaccact ggcctcagca ctccactgc cagtctcat	1620
	accagagcca acagcacctc cacagagaga aagctgccg gccggagag cggggcgtg	1680
	gtcatcgtgg ctgtgattgt gtcatcctg gtctggcgg tctgggccc tgtccttat	1740
	ttctctata agaaggcaa gctgccgtgc aggcctcag ggaagcagga gatcacgta	1800
	ccccgtctc gtaagagcga actttagtt gaagtaagt cagataagct cccagaagag	1860
	atggcctcc tgcaggcag cagcgtgac aagaggctc cgggagacca gggagagaa	1920
	tacatgatc tgaggcatta g	1941

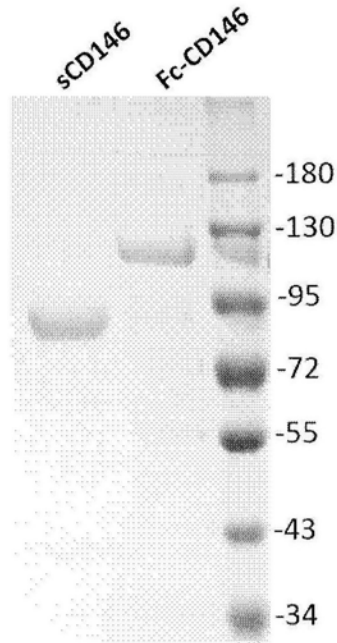


图1

	Control	Remitting MS	NIND	IIDD	CNSI	PNS
病理数	38	44	217	136	210	216
性别 (F/M)	19/15	30/14	103/114	75/61	101/109	84/132
年龄 (岁)	35.7±21.4	37.8±15.0	47.4±17.3	38.65±15.6	39.2±18.5	46.8±17.2
OCB	0	2	40	95	109	60
Q _{Alb} (×10 ⁻³)	3.61±0.5	6.3±5.2	4.6±5.2	5.9±3.3	10.5±10.2	8.7±7.3
IgG synthesis (mg/24h)	19.1±20.3	10.2±13.2	4.2±4.7	8.1±10.2	25.4±28.8	38.9±46.9
IgG Index	0.83±0.26	1.06±0.54	0.86±0.38	0.87±0.32	1.05±0.24	1.18±0.90
C-MBP(μg/L)	2.46±2.43	5.8±3.6	4.5±3.5	4.8±3.7	7.4±4.9	7.7±4.2
S- MBP(μg/L)	6.1±3.7	5.8±3.5	6.0±4.3	7.4±4.2	6.6±4.0	8.4±3.7
C-MBP/S-MBP	0.6±0.5	1.2±1.2	1.1±1.2	0.7±0.5	1.6±1.8	1.0±0.5

图2

疾病	病例	CSF sCD146	血清 sCD146
Control	38	4.2±4.6	380.0±89.7
NIND	217	4.7±2.9	380.5±97.7
IIDD	136	*** 42.6±18.4	379.8±118.3
CNSI	210	*** 37.6±10.5	381.5±94.3
PNS	216	*** 31.8±10.9	380.4±95.1
Relapsing MS	93	*** 44.3±18.9	378.1±109.2
Remitting MS	44	4.6±3.5	379.4±110.6

图3

疾病	sCD146	相关系数	P 值	数目
NIND	年龄	0.12	0.42	217
	Q _{Alb}	0.09	0.47	
	IgG index	-0.18	0.22	
	IgG synthesis	-0.02	0.90	
	C-MBP	-0.11	0.43	
	S-MBP	-0.12	0.42	
	C-MBP/S-MBP	0.02	0.90	
	血清 sCD146	0.12	0.16	
IIDD	年龄	0.16	0.07	136
	Q _{Alb}	0.48	***<0.001	
	IgG index	0.20	*0.02	
	IgG synthesis	0.42	***<0.001	
	C-MBP	0.30	***<0.001	
	S-MBP	-0.05	0.60	
	C-MBP/S-MBP	0.01	0.94	
	血清 sCD146	0.07	0.54	
CNSI	年龄	0.12	0.48	210
	Q _{Alb}	0.37	*0.02	
	IgG index	-0.03	0.74	
	IgG synthesis	0.36	*0.01	
	C-MBP	0.33	*0.02	
	S-MBP	-0.02	0.59	
	C-MBP/S-MBP	0.10	0.52	
	血清 sCD146	0.14	0.23	
PNS	年龄	0.06	0.67	216
	Q _{Alb}	0.31	*0.03	
	IgG index	0.004	0.98	
	IgG synthesis	0.39	**0.004	
	C-MBP	0.43	**0.002	
	S-MBP	0.11	0.43	
	C-MBP/S-MBP	0.16	0.25	
	血清 sCD146	0.03	0.29	

图4

	中枢神经系统炎症性疾病		
	敏感性 (%)	PPV (%)	NPV (%)
sCD146 (<10.5ng/ml)	100 (562/562)	97.4 (562/577)	100 (202/202)
Q _{Alb} (<5 × 10 ⁻³)	48.8 (274/562)	81.0 (274/338)	31.5 (139/441)
IgG synthesis (<30mg/24h)	31.7 (178/562)	85.9 (178/207)	30.9 (177/572)
IgG index (<0.85)	69.6 (391/562)	80.2 (391/488)	36.4 (106/291)
C-MBP (<3.5μg/ml)	54.7 (307/562)	79.9 (307/384)	30.9 (122/395)
S-MBP (<2.5μg/ml)	73.9 (415/562)	81.2 (415/511)	38.1 (102/268)
OCB	47 (264/562)	86.8 (264/304)	37.3 (177/475)

图5

	数目	sVCAM	sICAM	MMP2	MMP9	IL-1β	IL-17A	IFN-γ
Relapsing MS	44	7.5±8.0	20±1.2	13.4±14.1	0.15±0.4	4.22±2.2	11.5±19.7	5.2±4.1
Relapsing MS	93	**21.0±25.3	***259.2±276.3	***47.1±30.8	***1.06±1.65	*6.09±3.15	***37.3±27.3	*11.6±10.9
CNSI	109	***30.3±29.5	**283.1±258.4	**44.1±27.9	**1.29±1.78	***7.37±3.59	***55.9±31.3	***12.2±8.8

图6

疾病	sCD146	相关系数	P 值	数目
Relapsing MS	sVCAM	0.56	***<0.001	93
	sICAM	0.55	***<0.001	
	MMP2	0.49	**0.002	
	MMP9	0.58	***<0.001	
	IL-1β	0.38	*0.02	
	IL-17A	0.45	**0.005	
	IFN-γ	0.37	*0.02	
CNSI	sVCAM	0.61	**0.006	109
	sICAM	0.50	*0.03	
	MMP2	0.53	**0.007	
	MMP9	0.59	**0.007	
	IL-1β	0.49	*0.02	
	IL-17A	0.50	*0.01	
	IFN-γ	0.43	*0.04	

图7

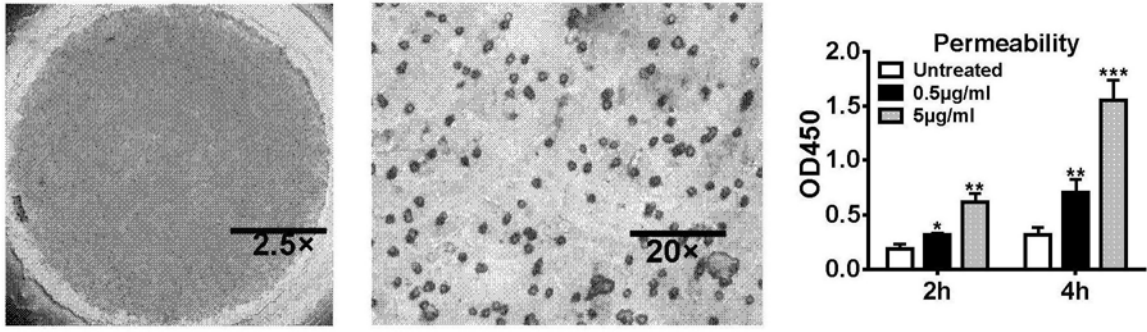


图8

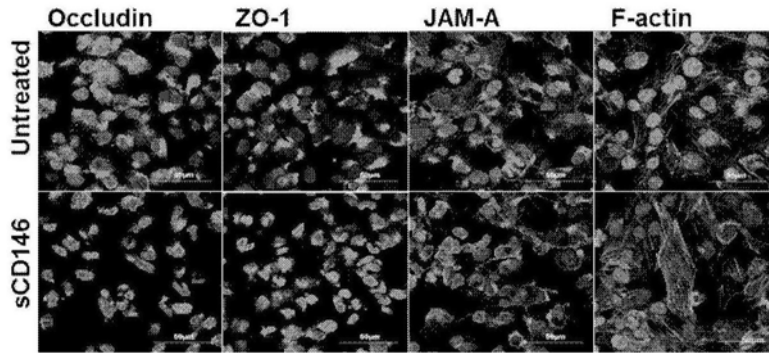


图9

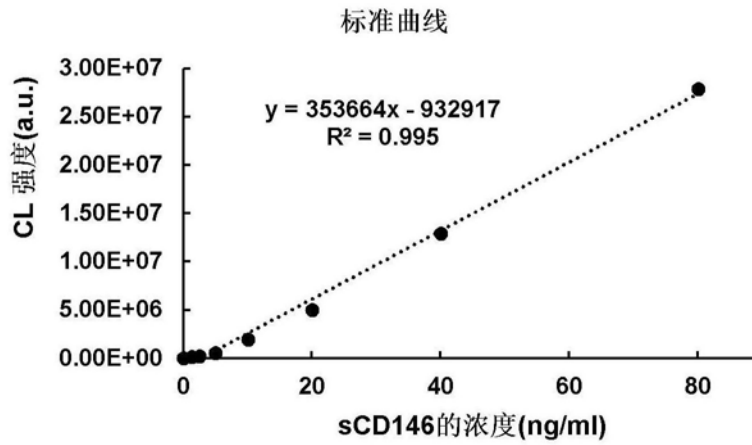


图10

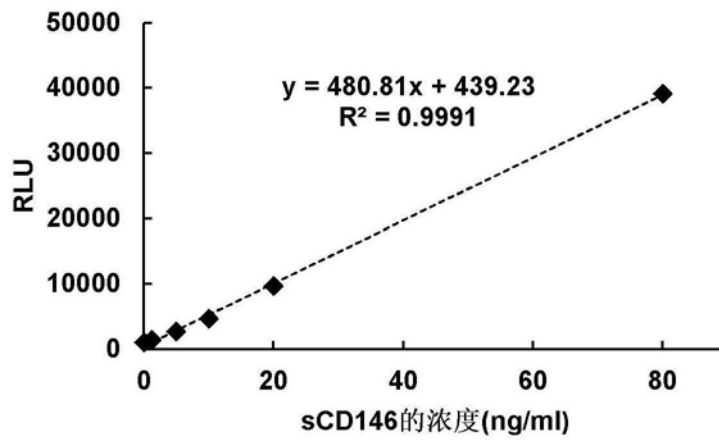


图11

Sample	sCD146 ELISA (ng/mL)	sCD146 CLIA (ng/mL)
2016-0608	10.79	14.81
2016-0487	13.76	17.00
2016-0493	14.33	21.14
2016-0636	16.63	28.32
2016-0612	21.32	29.41
2016-0629	21.03	31.68
2016-0591	17.01	37.02
2016-0490	39.40	53.11
2016-0613	43.80	53.28

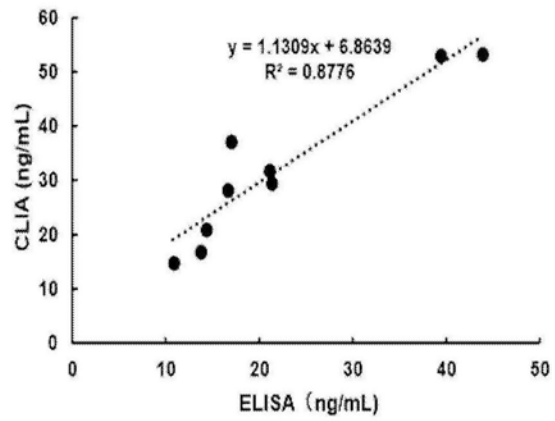


图12