



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111748624 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202010514464.X

G01N 30/88 (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.08

审查员 李紫嘉

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111748624 A

(43) 申请公布日 2020.10.09

(73) 专利权人 郑州大学第一附属医院

地址 450000 河南省郑州市二七区建设东
路50号

(72) 发明人 高洁 郭丹凤 杜潇潇 史晓奕

(74) 专利代理机构 郑州豫开专利代理事务所

(普通合伙) 41131

专利代理师 朱俊峰

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/68 (2006.01)

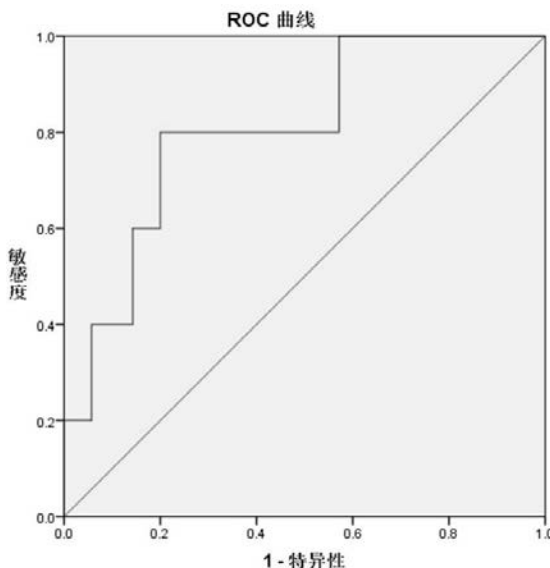
权利要求书1页 说明书9页 附图12页

(54) 发明名称

用于预测肝癌是否复发的生物标志物

(57) 摘要

本发明涉及医学分子诊断领域,具体涉及一种蛋白分子作为肝癌生物标志物及其预后方法;用于预测肝癌复发的生物标志物,包括LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白,ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白中的一种或几种蛋白分子。本发明采用LC-MS/MS质谱分析法,将大量临床样本进行质谱分析后,在蛋白质检测中筛选出来5个有代表性的蛋白分子。通过肝癌未复发患者癌组织与肝癌复发患者癌组织相应分子含量的差异倍数(大于2或小于0.5)最终确定5个蛋白分子具有良好的检验效益;将LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白,ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白作为生物标志物对被试者进行肝癌预后诊断,简单易行、诊断过程安全有效、易为病人所接受、诊断标准统一且受主观因素影响较小。



1. 检测LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白和HNRNPA3蛋白中的一种或几种蛋白的试剂在制备用于预测肝癌复发诊断的试剂盒中的用途。

用于预测肝癌是否复发的生物标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及医学分子诊断领域,具体涉及一种用于预测肝癌是否复发的生物标志物。

背景技术

[0002] 肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,发病率居世界第6位,死亡率居第三位,每年约有25万人死于肝癌。肝癌由于起病隐匿,恶性程度高,治愈率低,是严重威胁人类健康和生活质量的恶性肿瘤之一,且肝癌的发病率每年都在持续地上升。中国是全世界肝癌每年新增病例最多的国家,占全世界总发病率的一半,且欧美国家发病率虽不高但也在逐年增加。肝细胞性肝癌(HCC)是肝癌最主要的组织学类型,占原发性肝恶性肿瘤的70%~85%,在我国更是占到了约90%。迄今为止,HCC的发病机理仍然不明确,但病毒感染、黄曲霉素B1摄入和酗酒等被认为是HCC主要的致病因素。其中10%~40%慢性B型肝炎病毒携带者最终将发展为肝细胞癌,全世界每年估计超过1百万患者死于B型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和C型肝炎病毒相关的肝癌。在中国和日本,75%~80%HCC发病与肝脏慢性病毒感染关系密切,其中B型肝炎病毒感染率占50%~55%,而世界范围内80%~90%的HCC病例合并有肝硬化。因此,肝脏HBV感染及肝硬化是HCC最主要的高危因素和癌前病变过程。

[0003] 肝癌的目前治疗手段主要有介入栓塞,手术切除,射频消融,生物靶向治疗等,但是即便如此,肝癌的预后仍旧较差。究其原因,肝癌术后的复发占有相当大的比例。因此,肝癌术后定期随访监测患者肿瘤相关指标,早期发现和诊断肝癌复发转移,是肝癌预后研究的重要课题。临床上常用的肿瘤标记物甲胎蛋白(AFP)敏感性低,部分肝癌术后患者肿瘤复发未能及时检出。肝脏穿刺病理活检用于肝癌诊断及其复发诊断最为可靠,但对患者的损伤较大。影像学手段被广泛应用于术后随访中,根据与甲胎蛋白的结合能够更好地发现复发的肿瘤。上述方法虽都有一定的优势,但是都需要患者定期复查,这对于很多依从性较差的患者来说很难实现。

[0004] 肝癌复发的来源一是多中心发生,即肝癌根治性切除后,由于肝癌生长的土壤(肝硬化)和其它促癌因素的继续存在,再发新的肿瘤;二是单中心发生,即原先切除病灶术前、术中癌细胞经门静脉途径播散,发生肝内复发和肝外转移。目前对影响肝癌术后预后因素的研究,主要集中于对肿瘤大小、数目、分化程度、脉管侵犯、甲胎蛋白水平等临床病理因素的分析,而这些对肝癌肝切除后的复发尚不能进行较准确的预测。因此,针对肝癌复发这一科学难题,如何对切除术后肿瘤复发进行有效的预测,如何预防肝癌术后的肿瘤复发均对提高肝癌的疗效有重大的临床意义,探索和建立简单、快速、敏感性高和特异性强的分子预测指标和新的治疗靶点已成为提高临床疗效的迫切需要。

[0005] 因此,如果在手术切除的标本中加以分析,并且能够准确地预测患者复发的风险,那么就可以让高危复发人群加以重视,提高肝癌生存期。

发明内容

[0006] (一)解决的技术问题

[0007] 针对现有技术的不足,本发明提供了用于预测肝癌是否复发的生物标志物,采用质谱分析的方法检测生物标志物的含量来判断肝癌复发的风险;该方法简单,实用,且通过多种小分子的检测可以更好地提高检测方法的灵敏度与特异性。

[0008] (二)技术方案

[0009] 为实现以上目的,本发明通过以下技术方案予以实现:

[0010] 用于预测肝癌复发的生物标志物,包括LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白,ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白中的一种或几种蛋白分子。

[0011] 用于预测肝癌复发诊断的生物标志物的预后方法,包括以下步骤:采用LC-MS/MS质谱分析法检测待测样本中LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白,ALYREF蛋白或HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值。

[0012] 优选地,样本中LAS1L蛋白的蛋白质表达量强度值大于52085687.5时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者,且假阳性率为22.9%。

[0013] 优选地,样本中CLTB蛋白的蛋白质表达量强度值大于941197795时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者,且假阳性率为22.9%。

[0014] 优选地,样本中JAGN1蛋白的蛋白质表达量强度值大于467852297时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者,且假阳性率为8.6%。

[0015] 优选地,样本中ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值小于149218152时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者,且假阳性率为22.9%。

[0016] 优选地,样本中HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值小于4386125605时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者,且假阳性率为20%。

[0017] 一种诊断肝癌是否复发的试剂盒,包括特异性检测LAS1L蛋白的试剂、特异性检测CLTB蛋白的试剂、特异性检测JAGN1蛋白的试剂、特异性检测ALYREF蛋白和特异性检测HNRNPA3蛋白的试剂中的一种或几种。

[0018] 优选地,特异性检测LAS1L蛋白的试剂是特异性识别LAS1L蛋白核酸的引物或探针;特异性检测CLTB蛋白的试剂是特异性识别CLTB蛋白核酸的引物或探针;特异性检测JAGN1蛋白的试剂是特异性识别JAGN1蛋白核酸的引物或探针;特异性检测ALYREF蛋白的试剂是特异性识别ALYREF蛋白核酸的引物或探针;特异性检测HNRNPA3蛋白的试剂是特异性识别HNRNPA3蛋白核酸的引物或探针;试剂可用于检测组织样本。

[0019] (三)有益效果

[0020] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0021] (1)本发明采用LC-MS/MS质谱分析法检测待测样本,将大量临床样本进行质谱分析后,通过将肝癌术后未复发患者癌组织与肝癌术后复发患者癌组织相应分子含量的差异倍数(大于2或小于0.5)确定5个蛋白分子具有良好的检验效益。该5个蛋白分子(即LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白,ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白)可以作为诊断肝癌复发的生物标志物。

[0022] (2)本发明以LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白,ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白为生物标志物对被试者进行肝癌是否复发诊断,简单易行、诊断过程安全有效、易为病人所接受、

诊断标准统一且受主观因素影响较小。

[0023] (3) 本发明通过质谱分析检测出的生物标志物,该方法可以为日后的抗肝癌药物的研发提供新的治疗靶点和思路。

附图说明

[0024] 图1为LAS1L蛋白的蛋白质表达量强度值的ROC曲线图;

[0025] 图2为肝癌复发组织和术后未复发组织中LAS1L蛋白的蛋白质表达量强度值图;

[0026] 图3为CLTB蛋白的蛋白质表达量强度值的ROC曲线图;

[0027] 图4为肝癌复发组织和术后未复发组织中CLTB蛋白的蛋白质表达量强度值图;

[0028] 图5为JAGN1蛋白的蛋白质表达量强度值的ROC曲线图;

[0029] 图6为肝癌复发组织和术后未复发组织中JAGN1蛋白的蛋白质表达量强度值图;

[0030] 图7为ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值的ROC曲线图;

[0031] 图8为肝癌复发组织和术后未复发组织中ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值图;

[0032] 图9为HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值的ROC曲线图;

[0033] 图10为肝癌复发组织和术后未复发组织中HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值图;

[0034] 图11为ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白组合的蛋白质表达量强度值的ROC曲线图;

[0035] 图12为肝癌复发组织和术后未复发组织中ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白组合的蛋白质表达量强度值图。

具体实施方式

[0036] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例,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作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。

[0037] 与肝癌诊断相关的生物标志物的筛选

[0038] 1、实验步骤

[0039] (1) 蛋白质样品信息

[0040] 样本:分别取自肝癌复发患者癌组织的样本5例和取自术后未复发患者的肝癌组织35例。

[0041] (2) 样本预处理

[0042] 样品采用SDT(4%(w/v)十二烷基磺酸钠,100mM Tris/HCl pH7.6,0.1M二硫苏糖醇)裂解法提取蛋白质,然后采用BCA法进行蛋白质定量;每个样品取适量蛋白质采用Filter aided proteome preparation(FAS)法进行胰蛋白酶酶解,采用C18 Cartridge对肽段进行脱盐,肽段冻干后加入40 μ L 0.1%甲酸溶液复溶,肽段定量(OD280)。

[0043] BCA法进行蛋白质定量,是根据吸光值可以推算出蛋白浓度,在碱性条件下,蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , Cu^+ 与BCA试剂形成紫颜色的络合物,两分子BCA螯合一个 Cu^+ 。将该水溶性复合物在562nm处的吸收值,与标准曲线对比,即可计算待测蛋白的浓度。

[0044] (3) LC-MS/MS数据采集

[0045] 每份样品采用纳升流速的HPLC液相系统Easy nLC进行分离。

[0046] 其中:缓冲液A液为0.1%甲酸水溶液,B液为0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为84%)。

[0047] 色谱柱以95%的A液平衡,样品由自动进样器上样到上样柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap100, 100 μ m*2cm, nanoViper C18),经过分析柱(Thermo scientific EASY column, 10cm, ID75 μ m, 3 μ m, C18-A2)分离,流速为300nL/min。

[0048] 样品经色谱分离后用Q-Exactive质谱仪进行质谱分析。检测方式为正离子,母离子扫描范围300-1800m/z,一级质谱分辨率为70,000 at 200m/z,AGC(Automatic gain control) target为1e6,Maximum IT为50ms,动态排除时间(Dynamic exclusion)为60.0s。多肽和多肽碎片的质量电荷比按照下列方法采集:每次全扫描(full scan)后采集20个碎片图谱(MS2 scan),MS2 Activation Type为HCD,Isolation window为2m/z,二级质谱分辨率17,500 at 200m/z,Normalized Collision Energy为30eV,Underfill为0.1%。

[0049] (4)蛋白质鉴定和定量分析

[0050] 质谱分析原始数据为RAW文件,用软件MaxQuant软件(版本号1.5.3.17)进行查库鉴定及定量分析。

[0051] iBAQ Intensity是基于iBAQ算法得到的样品X中的蛋白质表达量,近似等于该样品中的蛋白质绝对浓度。LFQ Intensity是基于LFQ算法得到的样品X的蛋白相对表达量,常应用于组间比较。一般Labelfree选择其中之一作为定量结果。

[0052] iBAQ(Intensity-based absolute quantification)和LFQ属于Maxquant软件提供的两种不同的蛋白质定量算法。

[0053] iBAQ一般用于样本的蛋白质绝对定量,主要算法是基于该蛋白质鉴定到的肽段的强度之和与理论肽段个数的比值。

[0054] LFQ一般用于多组间的两两定量比较,主要算法是经过肽段和蛋白质多层的pair-wise矫正。本专利采用LFQ进行蛋白质定量。

[0055] (5)统计学分析

[0056] 对符合组三次重复数据中至少有两个非空值的数据进行比值计算和统计学分析,包含各比较组的LFQ或者iBAQ强度值比值和P-value;初步筛选出各组间的差异物。

[0057] 进一步根据P-value验证差异蛋白物是否具有显著性。选择同时具有多维统计分析Fold change>2或<0.5认为癌组织和癌旁组织之间该蛋白物的含量存在明显的倍数差异,并且筛选出单变量统计分析P value<0.05的蛋白物,作为具有显著性差异的蛋白质;从而得到差异蛋白分子。然后利用SPSS软件作出差异蛋白物ROC曲线,并计算其曲线下面积(AUC),进而判断其诊断价值。具体判断方法为AUC线下面积大于0.7,且P<0.05,利用约登指数最大时候的阈值标准(cut off值)作为判断肿瘤与否的阈值标准(倍数大于2者认为大于阈值为肿瘤检测阳性,倍数小于0.5者认定小于阈值者为肝癌检测阳性),从而得到较高的敏感度和特异度。

[0058] (6)生物信息学分析

[0059] ① GO功能注释

[0060] 利用Blast2GO对目标蛋白质集合进行GO注释,过程大致可以归纳为序列比对(Blast)、GO条目提取(Mapping)、GO注释(Annotation)和InterProScan补充注释(Annotation Augmentation)等四个步骤。

[0061] ② KEGG通路注释

[0062] 利用KAAS(KEGG Automatic Annotation Server)软件,对目标蛋白质集合进行KEGG通路注释。

[0063] ③ GO注释和KEGG注释的富集分析

[0064] 采用Fisher精确检验(Fisher's Exact Test),比较各个GO分类或KEGG通路在目标蛋白质集合和总体蛋白质集合中的分布情况,对目标蛋白质集合进行GO注释或KEGG通路注释的富集分析。

[0065] ④ 蛋白质聚类分析

[0066] 首先对目标蛋白质集合的定量信息进行归一化处理(归一化到(-1,1)区间)。然后,使用Complexheatmap R包(R Version 3.4)同时对样品和蛋白质的表达量两个维度进行分类(距离算法:欧几里得,连接方式:Average linkage),并生成层次聚类热图。

[0067] ⑤ 蛋白质相互作用网络分析

[0068] 基于STRING(<http://string-db.org/>)数据库中的信息查找目标蛋白质之间的相互作用关系,并使用CytoScape软件(版本号:3.2.1)生成相互作用网络并对网络进行分析。

[0069] (7) 差异表达蛋白质筛选

[0070] 以倍数变化大于2.0倍(上调大于2倍或者下调小于0.5)且P value小于0.05的标准筛选差异表达蛋白质,各比较组的差异表达蛋白质数目。

[0071] (8) 实验基本原理

[0072] 非标记定量蛋白质组学(Label-free)技术近年来已成为重要的质谱定量方法。Label-free技术的定量原理主要有两种:首先,spectrum counts类的非标记定量方法发展较早,也形成了多种定量算法,但核心原理都是根据MS2的鉴定结果作为定量的基础,各种方法的差别在于后期算法对高通量数据的修正;第二种非标记定量方法的原理是以MS1为基础,计算每个肽段信号在LCMS色谱上的积分。本发明采用的Maxquant算法即基于第二种原理。

[0073] 2、实验结果

[0074] 经质谱数据分析和将复发患者肝癌组织与未复发患者肝癌组织(术后未复发)的蛋白分子进行比较,从而得到5个蛋白分子,可以作为与肝癌复发的生物标志物。

[0075] 为了评估蛋白分子的蛋白质表达量强度值对肝癌复发的诊断效能,本发明采用了ROC曲线分析,AUC为ROC曲线下的面积,是最常用的评价ROC曲线特征的参数,也是重要的试验准确度指标。若AUC在0.7以下,则表示诊断的准确率较低;AUC在0.7以上,则可以满足临床诊断的要求。

[0076] 具体结果与分析如下:

[0077] (1) 采用LC-MS/MS质谱分析法,检测到LAS1L蛋白在肝癌复发组织与术后未复发组织中存在差异。

[0078] 研究发现,LAS1L蛋白在肝癌复发样本显著性上调了11.68倍,p值<0.05。

[0079] 由图1可知,LAS1L蛋白的AUC为0.806>0.7,说明LAS1L蛋白具有较好的判断效果,可以作为肝癌是否复发的生物标志物。

[0080] 在LAS1L蛋白的cut off值为52085687.5时,灵敏度为80%,特异度为77.1%。当进行个体检测时,LAS1L蛋白的蛋白质表达量强度值大于52085687.5时,被判为复发患者,否则

被判为未复发患者(假阳性率为22.9%)。

[0081] 由图2可知,肝癌复发组织样本主要分布在检测阈值(图2中实线)以上,术后未复发组织主要分布在检测阈值以下,说明肝癌复发组织和术后未复发组织的蛋白质表达量强度值相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0082] 综上所述,LAS1L蛋白可以作肝癌复发的生物标志物。

[0083] (2)采用LC-MS/MS质谱分析法,检测到CLTB蛋白在肝癌复发组织与术后未复发组织中

[0084] 研究发现,CLTB蛋白在肝癌复发样本显著性上调了6.68倍,p值<0.05。

[0085] 由图3可知,CLTB蛋白的AUC为0.806>0.7,说明CLTB蛋白具有较好的判断效果,可以作为肝癌是否复发的生物标志物。

[0086] 在CLTB蛋白的蛋白质表达量强度值为941197795时,灵敏度为80%,特异度为77.1%。当进行个体检测时,CLTB蛋白的蛋白质表达量强度值大于941197795时,被判为复发患者,否则被判为未复发患者(假阳性率为22.9%)。

[0087] 由图4可知,肝癌复发组织样本主要分布在检测阈值(图4中实线)以上,术后未复发组织主要分布在检测阈值以下,说明肝癌复发组织和术后未复发组织的蛋白质表达量强度值相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0088] 综上所述,CLTB蛋白可以作为肝癌复发的生物标志物。

[0089] (3)采用LC-MS/MS质谱分析法,检测到JAGN1蛋白在肝癌复发组织与术后未复发组织中

[0090] 研究发现,JAGN1蛋白在肝癌复发样本显著性上调了2.45倍,p值<0.05。

[0091] 由图5可知,JAGN1蛋白的AUC为0.840>0.7,说明JAGN1蛋白具有较好的判断效果,可以作肝癌是否复发的生物标志物。

[0092] 在JAGN1蛋白的蛋白质表达量强度值为467852297时,灵敏度为80%,特异度为91.4%。JAGN1蛋白的当进行个体检测时,蛋白质表达量强度值大于467852297时,被判为复发患者,否则被判为未复发患者(假阳性率为8.6%)。

[0093] 由图6可知,肝癌复发组织样本主要分布在检测阈值(图6中实线)以上,术后未复发组织主要分布在检测阈值以下,说明肝癌复发组织和术后未复发组织的蛋白质表达量强度值相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0094] 综上所述,JAGN1蛋白可以作为肝癌复发的生物标志物。

[0095] (4)采用LC-MS/MS质谱分析法,检测到ALYREF蛋白在复发组织与未复发组织中

[0096] 研究发现,ALYREF蛋白在肝癌复发样本显著性下调了0.19倍,p值<0.05。

[0097] 由图7可知,ALYREF蛋白的AUC为0.937>0.7,说明ALYREF蛋白具有较好的判断效果,可以作为肝癌是否复发的生物标志物。

[0098] 在ALYREF蛋白的cut off值为149218152时,灵敏度为100%,特异度为77.1%。当进行个体检测时,ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值小于149218152时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者(假阳性率为22.9%)。

[0099] 由图8可知,肝癌复发组织样本主要分布在检测阈值(图8中实线)以下,未复发组织主要分布在检测阈值以上,说明肝癌复发组织和未复发组织的蛋白质表达量强度值相差

甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0100] 综上所述,ALYREF蛋白可以作为肝癌复发的生物标志物。

[0101] (5)采用LC-MS/MS质谱分析法,检测到HNRNPA3蛋白在复发组织与未复发组织中存在差异。

[0102] 研究发现,HNRNPA3蛋白在肝癌复发样本显著性下调了0.49倍,p值<0.05。

[0103] 由图9可知,HNRNPA3蛋白的AUC为0.920>0.7,说明HNRNPA3蛋白具有较好的判断效果,可以作为肝癌复发是否的生物标志物。

[0104] 在HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值为4386125605时,灵敏度为100%,特异度为80%。当进行个体检测时,HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值小于4386125605时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者(假阳性率为20%)。

[0105] 由图10可知,肝癌复发组织样本主要分布在检测阈值(图10中实线)以下,未复发组织主要分布在检测阈值以上,说明肝癌复发组织和未复发组织的蛋白质表达量强度值相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0106] 综上所述,HNRNPA3蛋白可以作为肝癌复发的生物标志物。

[0107] (6)ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白组合在制备早期肝癌诊断试剂盒中的应用。

[0108] 本发明还提供一种肝癌的诊断方法,步骤为:采用二元逻辑回归分析计算P(肝癌术后复发概率)的数值,SPSS软件二元逻辑回归后得到的公式为:

$$[0109] \quad P(\text{肝癌术后复发概率}) = \frac{1}{1 + e^{-(10.592034 + 4.4674E-8 \cdot a - 1.912E-9 \cdot b)}}$$

[0110] 其中a为ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值,b为HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值;若检测P(肝癌术后复发概率)大于0.0694114则被判为会复发患者,否则被判为未复发患者。

[0111] 如图11所示,组合蛋白的AUC为0.977>0.7,说明具有较好的判断效果,即组合蛋白可以作为肝癌是否复发的生物标志物。

[0112] 在组合蛋白的蛋白质表达量强度值为0.0694114时,灵敏度为100%,特异度为88.6%。当进行个体检测时,组合蛋白的蛋白质表达量强度值大于0.0694114时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者(假阳性率为11.4%)。

[0113] 由图12可知,肝癌复发组织样本主要分布在检测阈值(图12中实线)以上,未复发组织主要分布在检测阈值以上,说明肝癌复发组织和未复发组织的蛋白质表达量强度值相差甚大,该检测阈值检测效果良好。

[0114] 鉴于上述结果,ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白组成的组合蛋白可以作为肝癌复发的生物标志物。

[0115] 实施例1

[0116] 用于预测肝癌复发的生物标志物,包括LAS1L蛋白。

[0117] 用于预测肝癌复发肝癌诊断的生物标志物的预后方法,包括以下步骤:采用LC-MS/MS质谱分析法检测待测样本中LAS1L蛋白的蛋白质表达量强度值;样本中LAS1L蛋白的蛋白质表达量强度值大于52085687.5时,被判为复发患者,否则被判为未复发患者(假阳性率为22.9%)。

[0118] 一种诊断肝癌是否复发的试剂盒,包括特异性检测LAS1L蛋白的试剂,特异性检测

LAS1L蛋白的试剂是特异性识别LAS1L蛋白核酸的探针。

[0119] 实施例2

[0120] 用于预测肝癌复发的生物标志物,包括CLTB蛋白。

[0121] 用于预测肝癌复发肝癌诊断的生物标志物的预后方法,包括以下步骤:采用LC-MS/MS质谱分析法检测待测样本中CLTB蛋白的蛋白质表达量强度值;样本中CLTB蛋白的蛋白质表达量强度值大于941197795时,被判为复发患者,否则被判为未复发患者(假阳性率为22.9%)。

[0122] 一种诊断肝癌是否复发的试剂盒,包括特异性检测CLTB蛋白的试剂,特异性检测CLTB蛋白的试剂是特异性识别CLTB蛋白核酸的探针。

[0123] 实施例3

[0124] 用于预测肝癌复发的生物标志物,包括JAGN1蛋白。

[0125] 用于预测肝癌复发肝癌诊断的生物标志物的预后方法,包括以下步骤:采用LC-MS/MS质谱分析法检测待测样本中JAGN1蛋白的蛋白质表达量强度值;样本中JAGN1蛋白的蛋白质表达量强度值大于467852297时,被判为复发患者,否则被判为未复发患者(假阳性率为8.6%)。

[0126] 一种诊断肝癌是否复发的试剂盒,包括特异性检测JAGN1蛋白的试剂,特异性检测JAGN1蛋白的试剂是特异性识别JAGN1蛋白核酸的探针。

[0127] 实施例4

[0128] 用于预测肝癌复发的生物标志物,包括ALYREF蛋白。

[0129] 用于预测肝癌复发肝癌诊断的生物标志物的预后方法,包括以下步骤:采用LC-MS/MS质谱分析法检测待测样本中ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值;样本中ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值小于149218152时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者(假阳性率为22.9%)。

[0130] 一种诊断肝癌是否复发的试剂盒,包括特异性检测ALYREF蛋白的试剂,特异性检测ALYREF蛋白的试剂是特异性识别ALYREF蛋白核酸的探针。

[0131] 实施例5

[0132] 用于预测肝癌复发的生物标志物,包括HNRNPA3蛋白。

[0133] 用于预测肝癌复发肝癌诊断的生物标志物的预后方法,包括以下步骤:采用LC-MS/MS质谱分析法检测待测样本中HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值;样本中HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值小于4386125605时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者(假阳性率为20%)。

[0134] 一种诊断肝癌是否复发的试剂盒,包括特异性检测HNRNPA3蛋白的试剂,特异性检测HNRNPA3蛋白的试剂是特异性识别HNRNPA3蛋白核酸的探针。

[0135] 实施例6

[0136] 肝癌诊断的生物标志物,包括ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白。

[0137] 肝癌诊断的生物标志物的预后方法,包括以下步骤:采用二元逻辑回归分析计算P(肝癌术后复发概率)的数值,SPSS软件二元逻辑回归后得到的公式为:

$$[0138] \quad P(\text{肝癌术后复发概率}) = \frac{1}{1 + e^{-(10.592034 + 4.4674E-8 \cdot a - 1.912E-9 \cdot b)}}$$

[0139] 其中:a为ALYREF蛋白的蛋白质表达量强度值,b为HNRNPA3蛋白的蛋白质表达量强度值;若检测P(肝癌术后复发概率)大于0.0694114则判为会复发患者,否则判为未复发患者。

[0140] 当进行个体检测时,组合蛋白的蛋白质表达量强度值大于0.0694114时,被判为复发患者,否则被判为术后未复发患者(假阳性率为11.4%)。

[0141] 本发明以LAS1L蛋白,CLTB蛋白,JAGN1蛋白,ALYREF蛋白和HNRNPA3蛋白中至少一种蛋白作为生物标志物对被试者进行肝癌诊断,简单易行、诊断过程安全有效、易为病人所接受、诊断标准统一受个人主观因素影响较小。

[0142] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

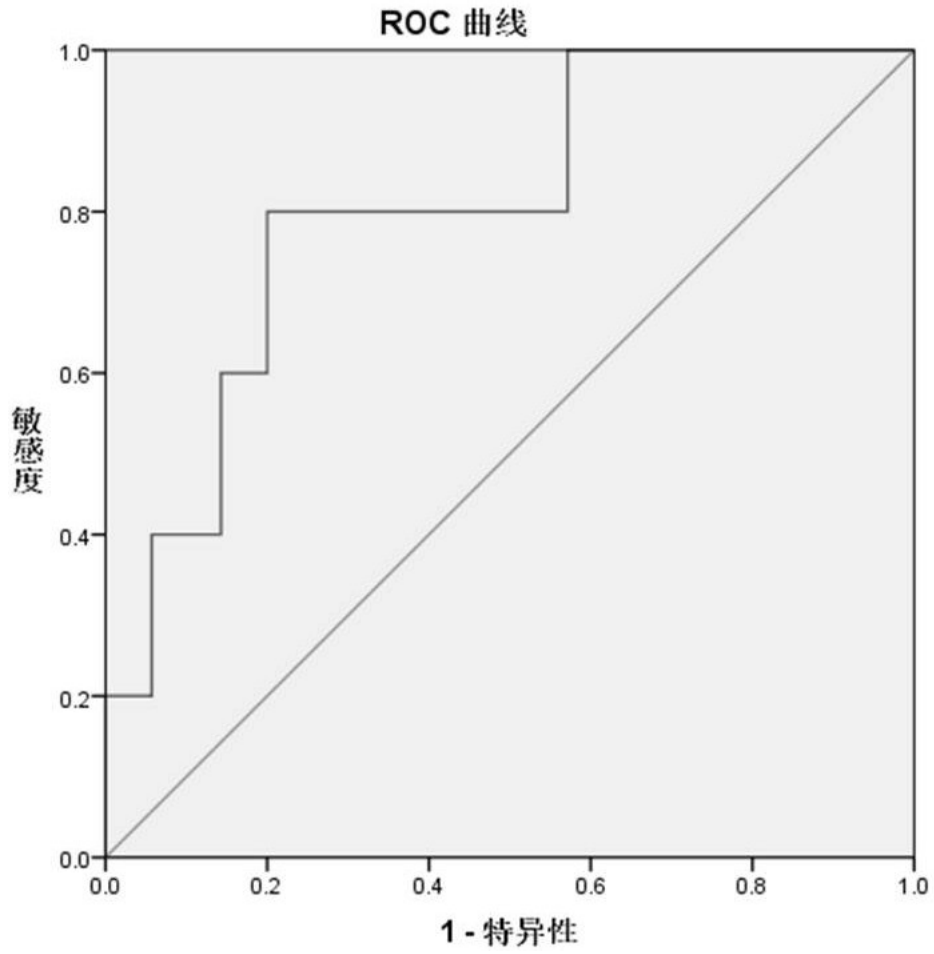


图1

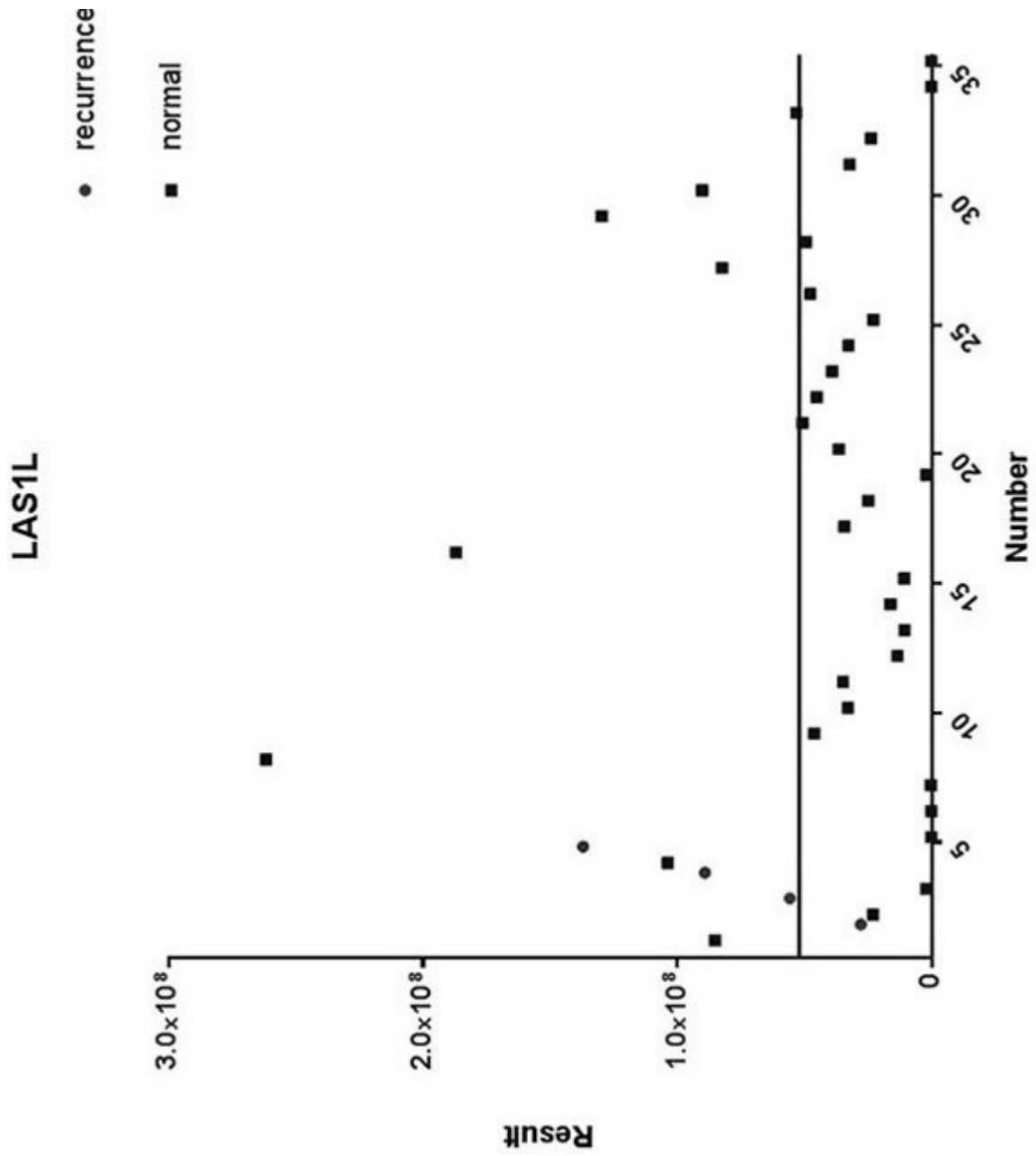


图2

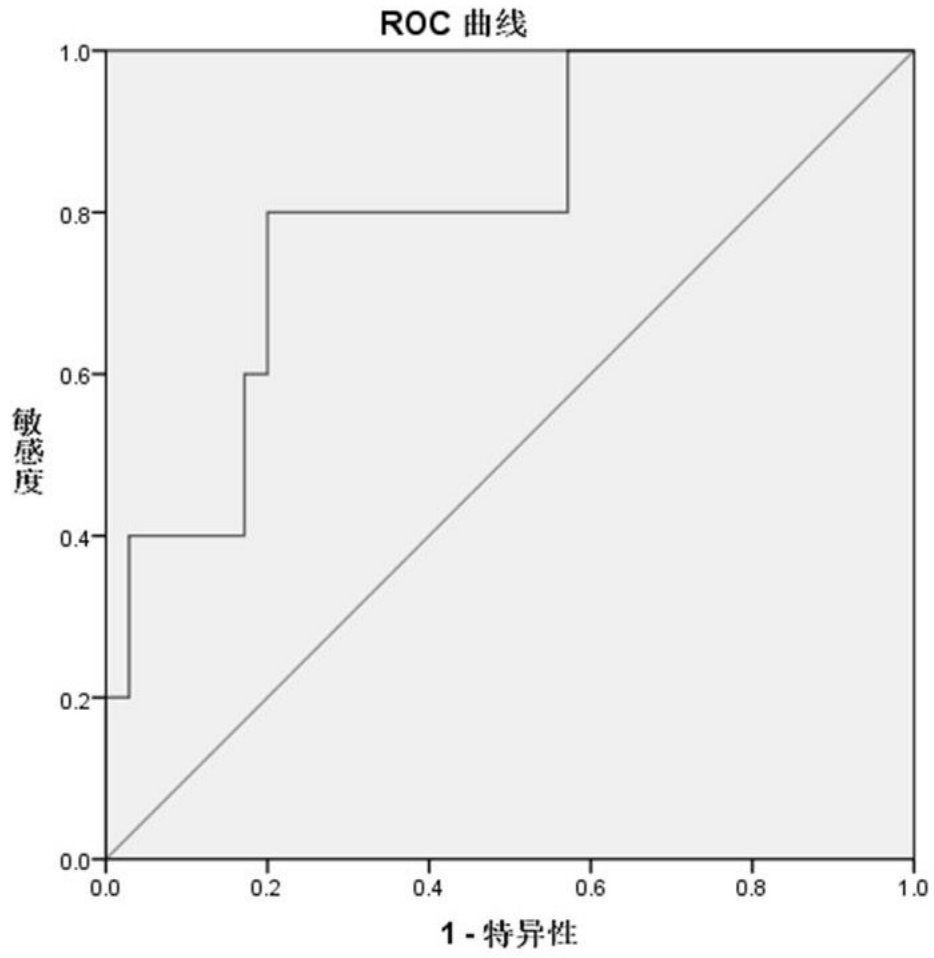


图3

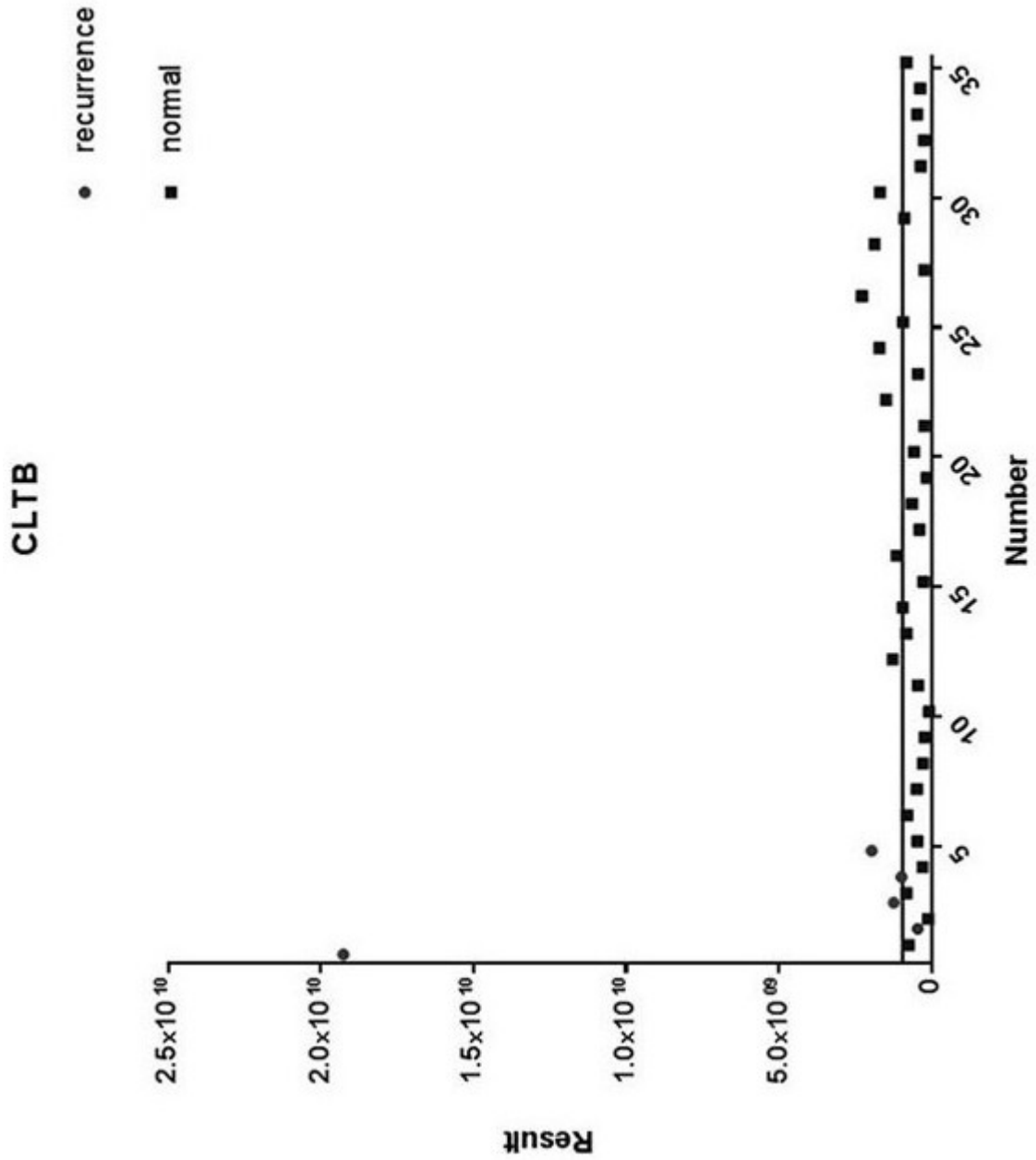


图4

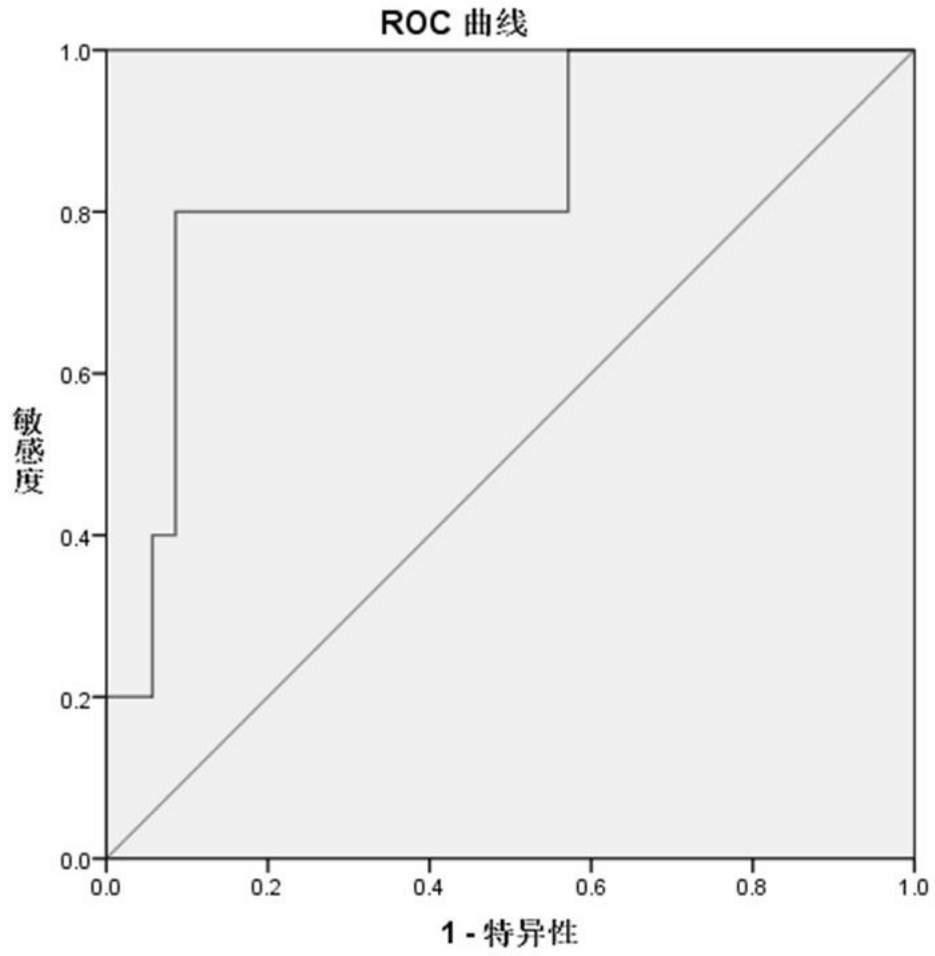


图5

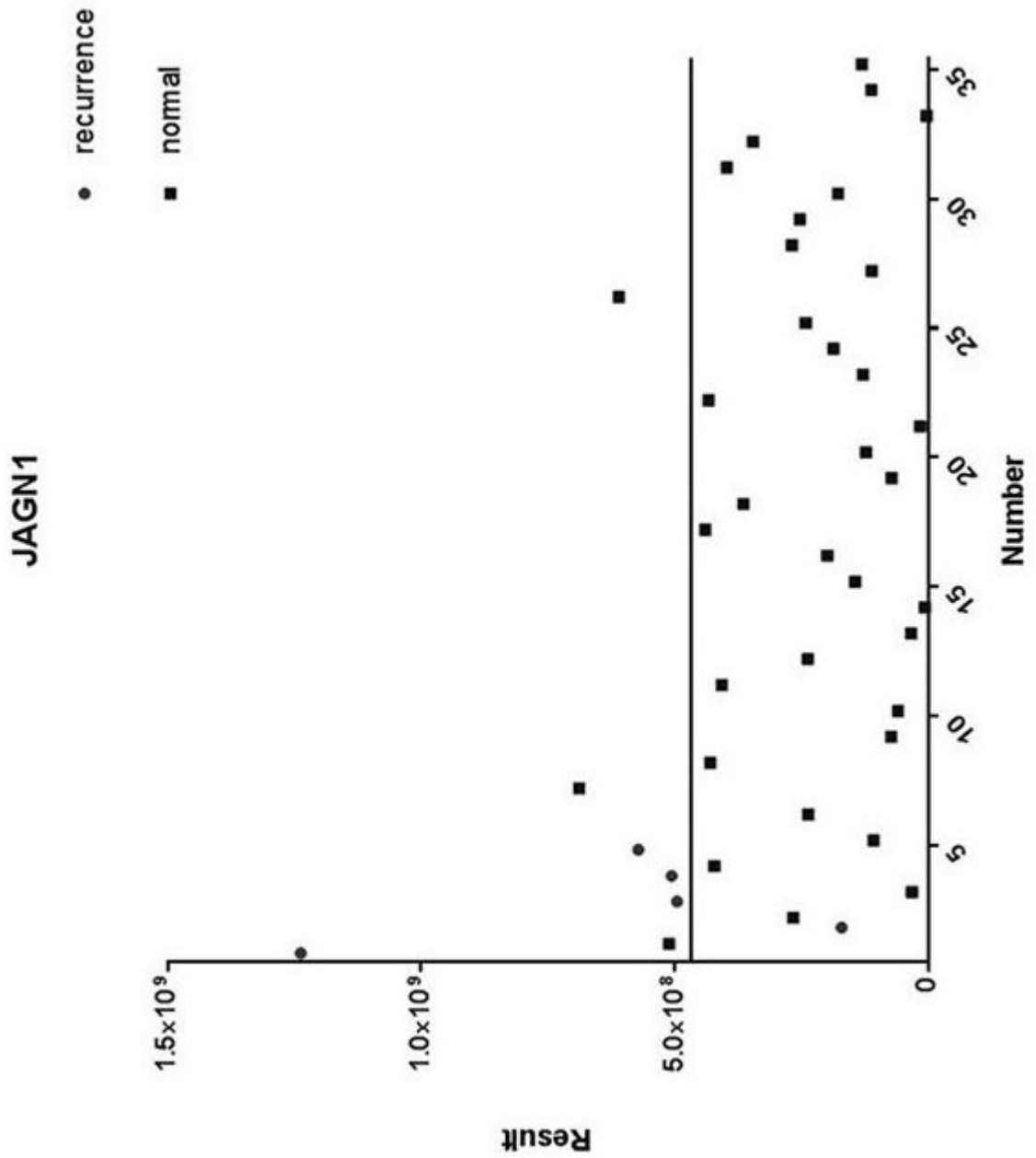


图6

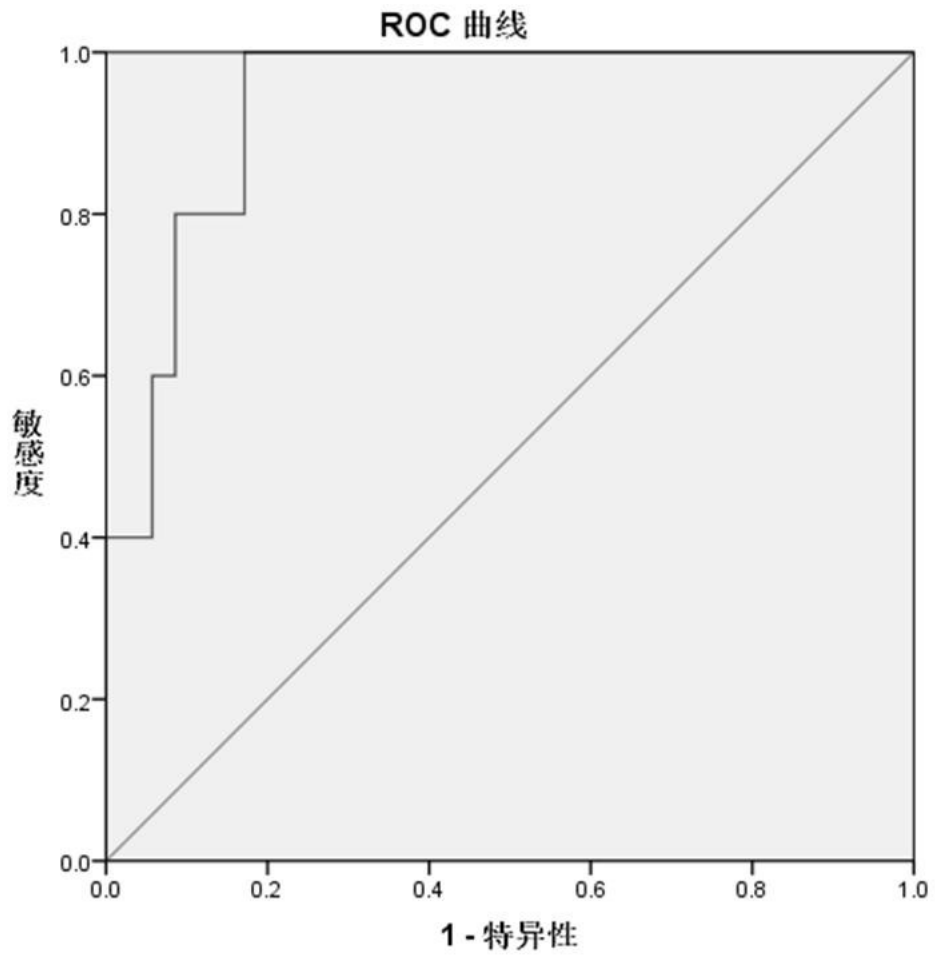


图7

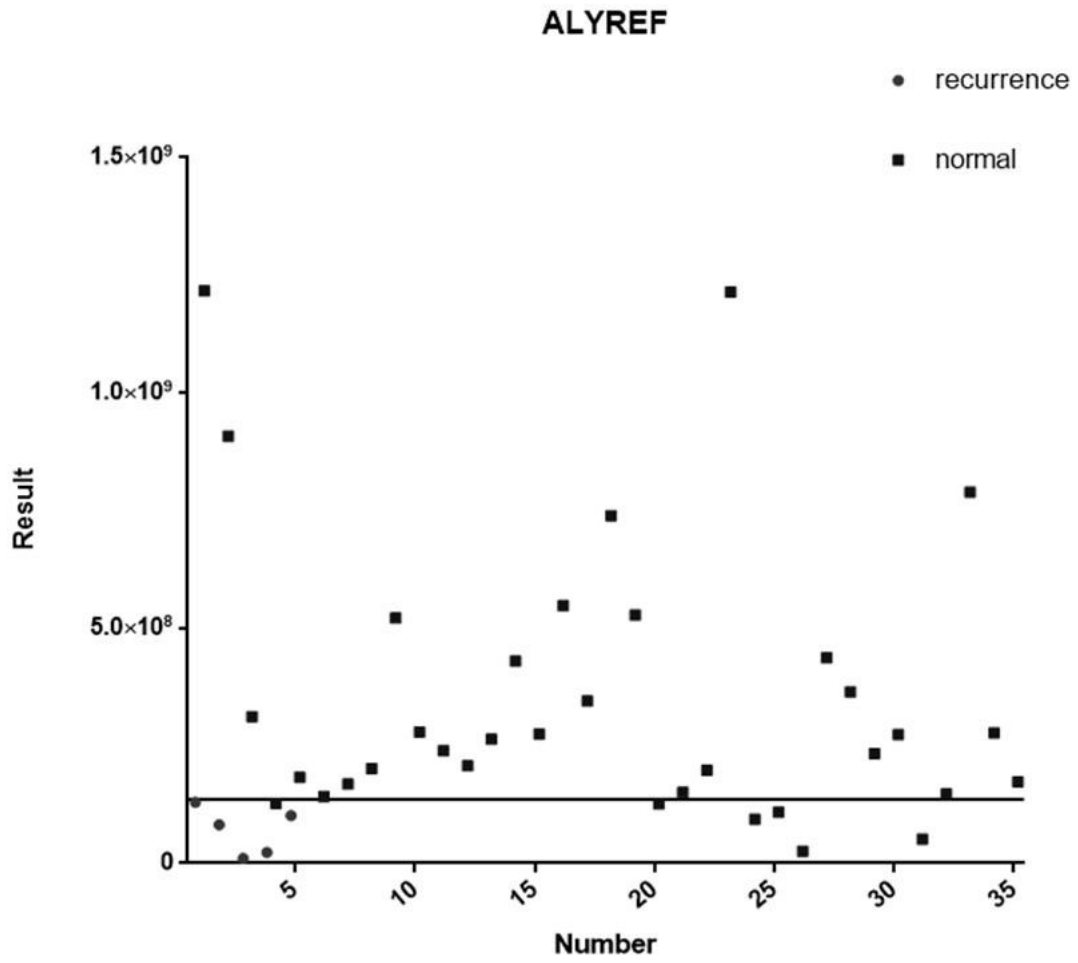


图8

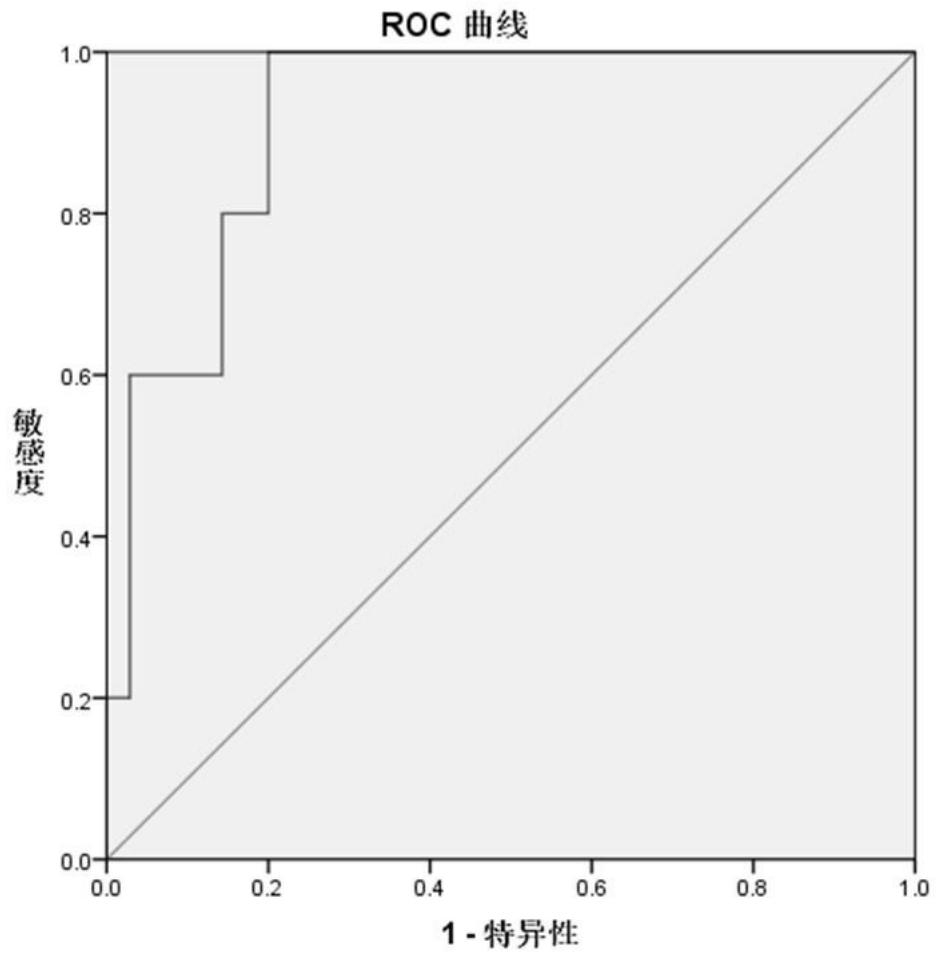


图9

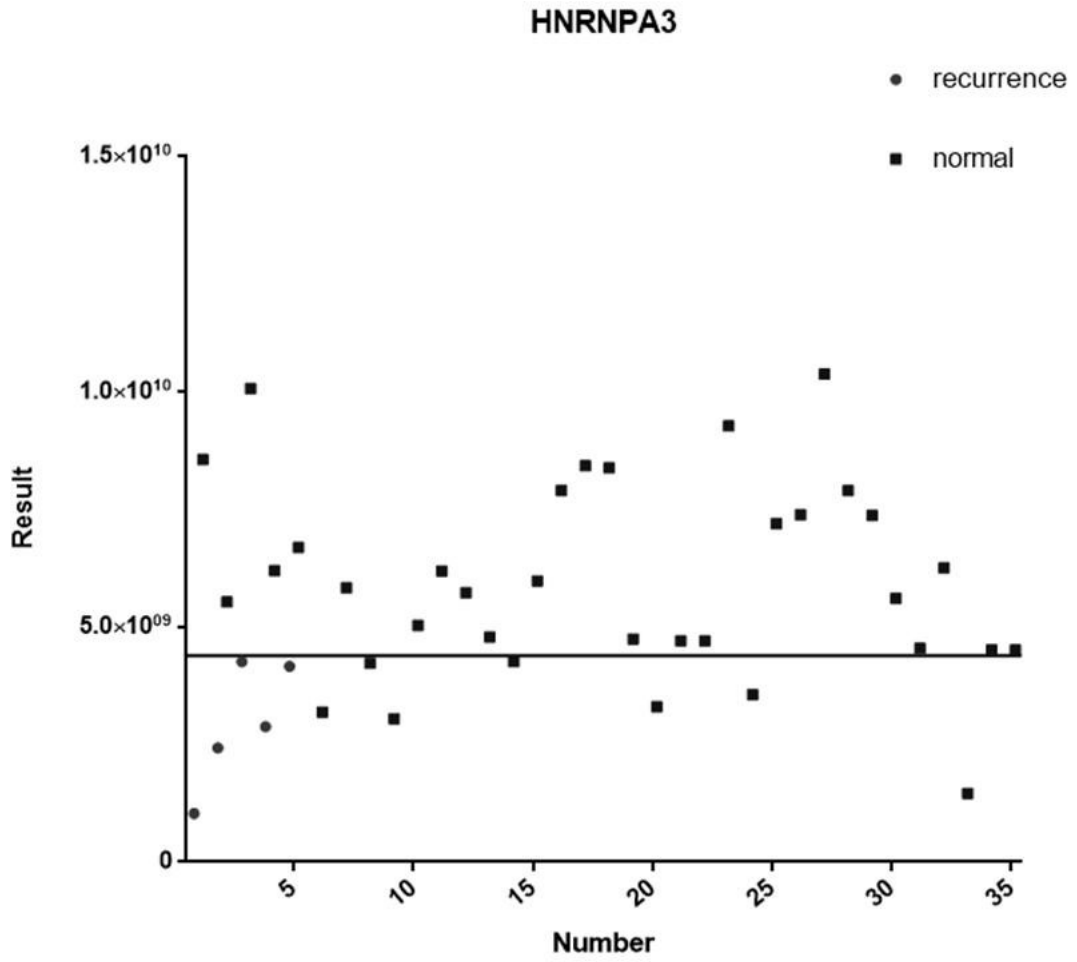


图10

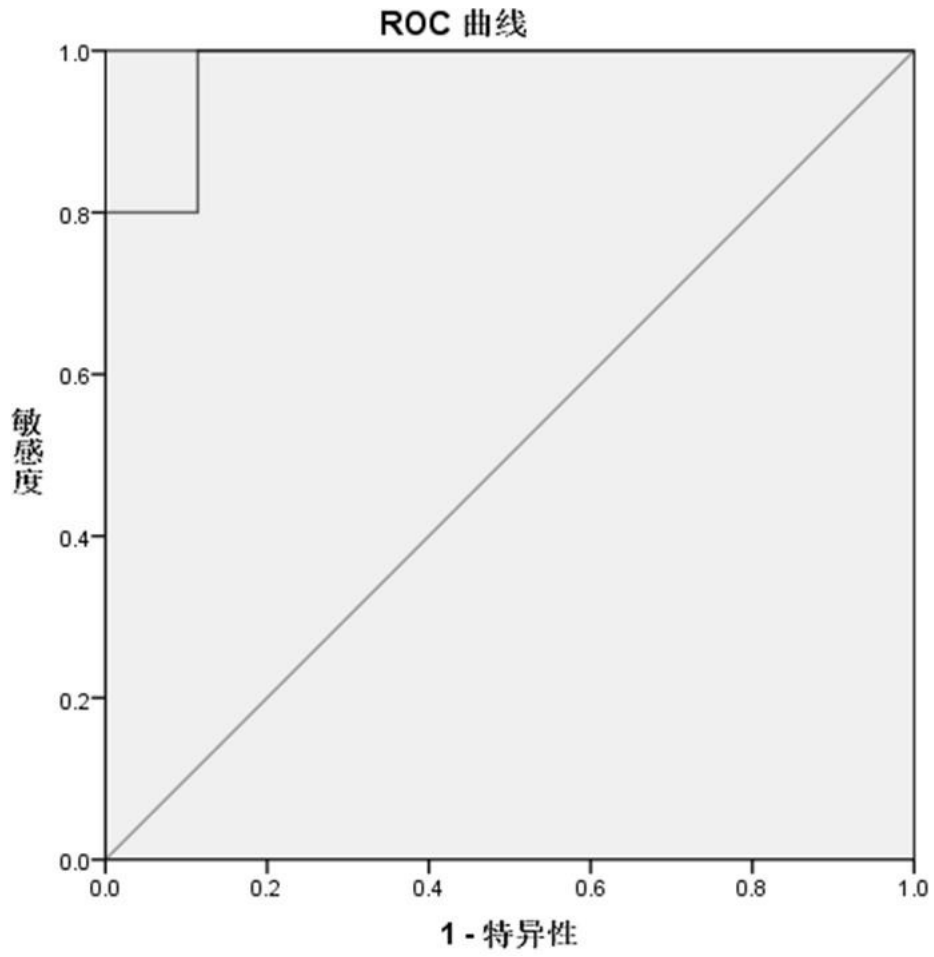


图11

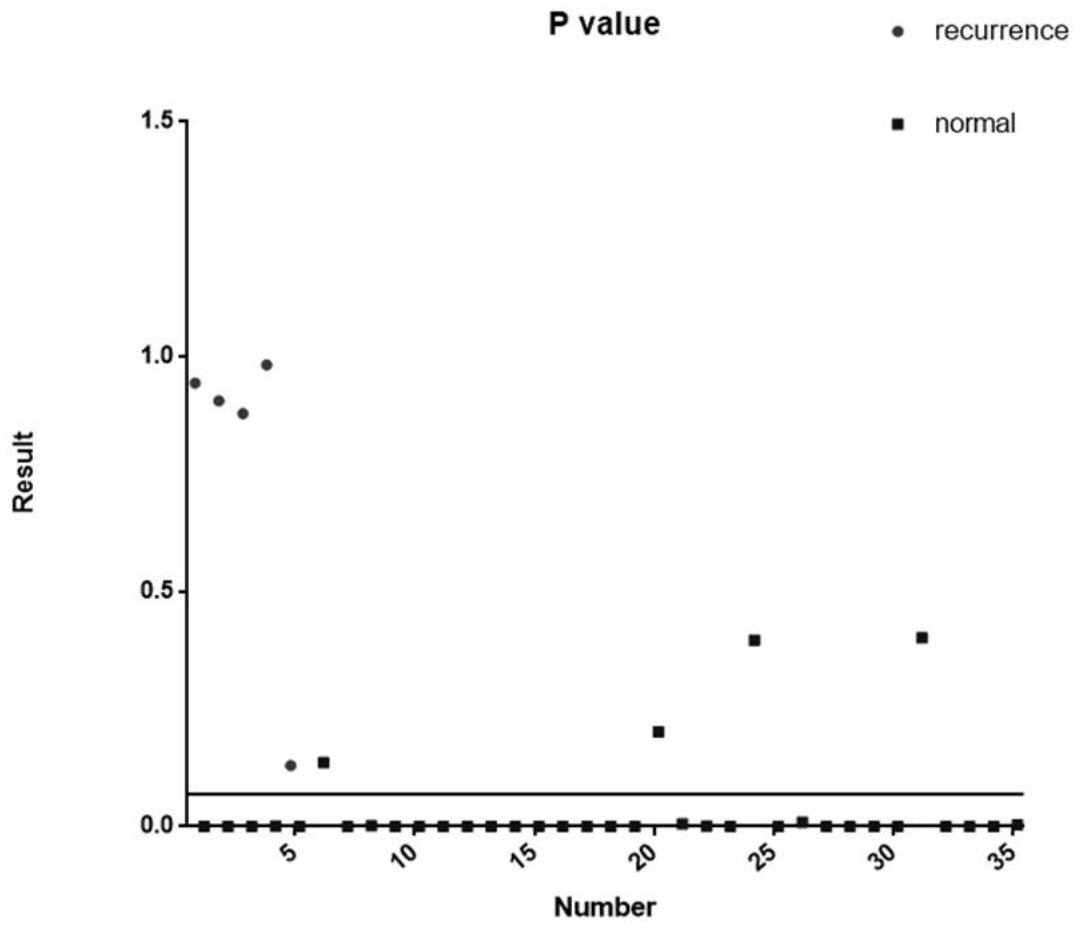


图12