



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113607960 A

(43) 申请公布日 2021.11.05

(21) 申请号 202110812471.2

(22) 申请日 2021.07.19

(71) 申请人 重庆医科大学附属第一医院  
地址 400016 重庆市渝中区袁家岗友谊路1号

(72) 发明人 漆洪波 栾晓瑾 付雍 童超

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275  
代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

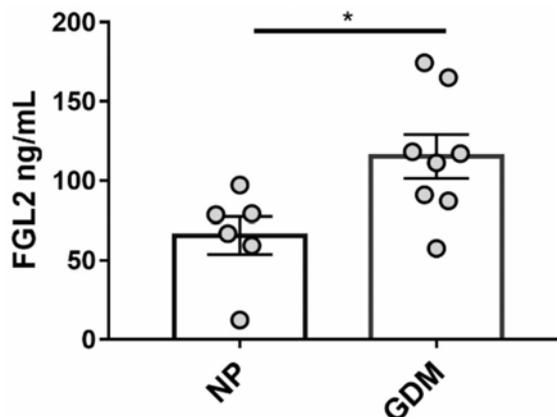
权利要求书1页 说明书4页  
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用

(57) 摘要

本发明涉及FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用,属于疾病诊断领域。本发明通过检测FGL2基因和蛋白表达水平,可以及早判断和预示是否存在GDM,并且通过监测FGL2表达水平的变化可以判断GDM的进程,预示是否存在GDM子代胚胎和胎盘发育不良,以及反映GDM患者治疗效果和预后,为患者的疾病风险及治疗方案提供重要依据。



1. FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用,其特征在于,所述FGL2的核苷酸序列为SEQ ID NO.1,所述FGL2来源于血液。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述FGL2的编码蛋白氨基酸序列为SEQ ID NO.2。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述FGL2的基因和蛋白的表达水平与妊娠期糖尿病的发展呈正相关。

4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述所述FGL2的基因和蛋白的表达水平与妊娠期糖尿病孕妇宫内胎儿的发育和胎盘功能呈负相关。

5. 如权利要求1~4任一项所述的应用,其特征在于:所述诊断和预示具体为妊娠期糖尿病的筛查、辅助诊断、疗效评价、预后评估或复发监控。

## FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于疾病诊断领域,具体涉及FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用。

### 背景技术

[0002] 妊娠期糖尿病(Gestational diabetes mellitus,GDM)是指妊娠期间首次发生的糖耐量受损或者血糖升高。GDM是最常见的妊娠并发症之一,在全球育龄期妇女中的患病率约为16.9%。目前,推荐的GDM诊断标准是:孕妇在妊娠24-28周进行75g口服葡萄糖耐量实验(OGTT),空腹血糖 $\leq 5.1\text{mmol/L}$ 、口服葡萄糖1小时后血糖 $\leq 10.0\text{mmol/L}$ 、口服葡萄糖2小时后血糖 $\leq 8.5\text{mmol/L}$ ,任意一点血糖值达到或超过以上标准即可诊断为GDM。迄今为止,关于GDM发病机制的研究主要集中于:妊娠期间的胰岛素抵抗和胰岛 $\beta$ 细胞功能障碍导致的胰岛素分泌不足。已知妊娠期间雌激素,孕酮和皮质醇水平升高,会诱导胰岛素抵抗。除此之外,各种免疫细胞(包括如巨噬细胞,树突状细胞和Th1细胞)功能失调并在母体蜕膜和胎盘中释放炎症介质也可以诱导胰岛素抵抗和损伤 $\beta$ 细胞功能,从而导致GDM的发生。GDM严重威胁了母婴的健康,GDM孕妇易患妊娠期高血压和子痫前期,新生儿易患高胆红素血症、巨大儿和呼吸窘迫综合征等。因此,早期诊断和干预对GDM的预防至关重要。由于GDM的发病机理复杂,并且在妊娠期间缺乏可靠的筛查和监测的生物学指标,因此,寻找预防、诊断和治疗GDM的潜在分子靶点具有重要意义。

### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用。

[0004] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0005] 1、FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用,所述FGL2的核苷酸序列为SEQ ID NO.1,所述FGL2来源于血液。

[0006] 作为优选的技术方案之一,所述FGL2的编码蛋白氨基酸序列为SEQ ID NO.2

[0007] 作为优选的技术方案之一,所述FGL2的基因和蛋白的表达水平与妊娠期糖尿病的发展呈正相关。

[0008] 作为优选的技术方案之一,所述FGL2的基因和蛋白的表达水平与妊娠期糖尿病孕妇宫内胎儿的发育和胎盘功能呈负相关。

[0009] 作为优选的技术方案之一,所述诊断和预示具体为妊娠期糖尿病的筛查、辅助诊断、疗效评价、预后评估或复发监控。

[0010] 本发明的有益效果在于:

[0011] 本发明提供了一种新的GDM有效检测标志物。本发明通过检测FGL2(Fibrinogen-Like Protein 2,纤维蛋白原样蛋白2)蛋白表达水平,可以及早判断和预示是否存在GDM,并且通过监测FGL2表达水平的变化来判断GDM的进程。并且,通过检测FGL2基因和蛋白表达

水平的变化,可预示是否存在GDM子代胚胎和胎盘发育不良,以及反映GDM患者治疗效果和预后。本发明只需通过制备血清即可进行检测,患者在医院就医进行常规查血检验时就可一并进行,无需特殊设备,操作简便。本发明通过检测FGL2基因或FGL2蛋白在GDM小鼠和正常妊娠小鼠蜕膜中的表达水平,为深入研究GDM发病机理提供靶分子。

### 附图说明

[0012] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明作优选的详细描述,其中:

[0013] 图1为GDM患者血清中FGL2表达水平。

[0014] 图2为GDM患者OGTT血糖值与FGL2表达水平相关性分析。

[0015] 图3为GDM小鼠血清中FGL2表达水平。

[0016] 图4为GDM小鼠OGTT血糖值与FGL2表达水平相关性分析。

[0017] 图5为GDM小鼠子代胚胎的吸收情况。

[0018] 图6为GDM小鼠子代胚胎和胎盘与FGL2表达水平相关性分析。

[0019] 图7为GDM小鼠蜕膜中FGL2基因和蛋白表达水平。

### 具体实施方式

[0020] 下面结合具体的优选实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如分子克隆实验指南(第三版,J.萨姆布鲁克等著)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0021] 实施例1

[0022] FGL2蛋白在正常孕妇和GDM孕妇中的表达

[0023] (1) GDM动物模型的建立

[0024] 实验动物为6~8周健康雌性C57小鼠20只,6~8周健康雄性C57小鼠10只。

[0025] 将雌鼠随机分为2组,GDM组(n=10)和control组(n=10)。适应性喂养1周后与雄鼠按2:1比例合笼,次日清晨检查阴栓,若观察到阴栓则标记为妊娠0.5d。于孕12.5d予模型组腹腔注射链脲佐霉素(Streptozocin,STZ)150mg/kg,予control组腹腔注射等体积PBS缓冲液。于孕16.5d行OGTT试验,若模型组血糖异常升高,则造模成功。

[0026] (2) 制备检测血清

[0027] GDM孕妇和正常孕妇的血液样本来自重庆医科大学附属第一医院产科。将GDM孕妇和正常孕妇、GDM孕鼠和正常孕鼠的血样置于37℃孵箱放置20min,然后3000rpm离心10min,小心收集上层清亮液体备用。

[0028] (3) 检测FGL2蛋白表达水平

[0029] 采用Biologend试剂盒说明书进行。操作步骤如下:所有试剂在使用前均恢复室温,并在室温下静置20min。①配制蛋白标准品及检测样品:蛋白标准品采用Assay Buffer A进行梯度稀释,浓度分别是40ng/ml,20ng/ml,10ng/ml,5ng/ml,2.5ng/ml,0ng/ml;待测血清用Assay Buffer A进行10倍稀释并充分混匀。②免疫反应:用300μL洗涤液洗涤ELISA上样板4次,然后加入50μL Assay buffer A和50μL①中配制好的标准品和检测样品,混匀,封

板,在室温孵育2h。接着,弃去每孔废液,用300 $\mu$ L洗板4次,拍干后于每孔内加入100 $\mu$ L FGL2 detection antibody,封板后室温摇床孵育1h。然后,弃去每孔废液并洗涤,拍干后加入100 $\mu$ L Anti-rabbit IgG-HRP二抗,封板后室温摇床孵育1h。洗板后每孔加入100 $\mu$ L Substrate Solution F,封板后室温避光孵育30min,每孔加入100 $\mu$ L Stop Solution终止反应。③OD值检测:立即于波长450nm处检测吸光度值并记录,最后根据标准品绘制标准曲线并计算出样品浓度。

#### [0030] (4) 结果

[0031] 结果如图1、2和3所示,NP(normal pregnancy)为正常妊娠孕妇的样本,GDM为经OGTT试验确诊为GDM患者的样本。从图1中可以看出,GDM患者的血清中FGL2的表达水平较正常孕妇显著提高,差异具有统计学意义。并且,将FGL2的表达水平分别与OGTT试验服糖0h、1h、2h时的血糖值进行相关性分析,结果显示FGL2的表达水平与各时间点的血糖值呈正比(图2)。此外,动物实验结果同样展示了,与control组孕鼠相比,GDM小鼠体内FGL2的表达水平显著升高(图3),并且FGL2的表达水平与各时间点的血糖值也呈正比(图4)。此结果说明,通过检测FGL2蛋白表达水平,可以及早判断和预示是否存在GDM,并且通过监测FGL2表达水平的变化来判断GDM的进程。

#### [0032] 实施例2

[0033] FGL2基因和蛋白表达水平与GDM子代胚胎和胎盘发育的关系

##### [0034] (1) 评估GDM小鼠子代胚胎和胎盘的发育情况

[0035] 按照实施例1中的方法构建GDM组和control组动物模型。于孕18.5d安乐死两组孕鼠,取出孕鼠的胚胎和胎盘,观察子代胚胎和胎盘的吸收情况,并称重。

##### [0036] (2) 检测孕鼠蜕膜组织中FGL2 mRNA表达水平

[0037] 分离GDM组和control组孕鼠的蜕膜组织,用TRIzol法提取总RNA,紫外分光光度计测量RNA浓度。采用逆转录试剂盒(TAKARA)合成cDNA。利用TB Green荧光染料(TAKARA)、cDNA、引物配制PCR反应体系。

[0038] 反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性2min;95 $^{\circ}$ C变性15s,60 $^{\circ}$ C退火20s,共40个循环。Ct值应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法处理,FGL2的相对表达量按照内参(GAPDH)的表达量进行标准化处理。

[0039] FGL2引物序列为:

[0040] 5'-CTCAAAGAAGTGC GGACCCTCAAG-3'(SEQ ID NO.3);

[0041] 3'-TCGGCTGTCTCTGCTCCATTCC-5'(SEQ ID NO.4)。

##### [0042] (3) 检测孕鼠蜕膜组织中FGL2蛋白表达水平

[0043] 收集的孕鼠蜕膜组织使用RIPA裂解液(Beyotime Biotechnology)提取总蛋白,BCA法测定总蛋白浓度。配制10%分离胶和4%浓缩胶,将制备好的蛋白样品加入凝胶上样孔中,电泳起始电压为80V,待蛋白样品电泳到分离胶后将电压调整为110V,电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳,进行转膜。利用恒定电流250mA转膜90min,将目的蛋白转移至PVDF膜。将膜用5%BSA室温封闭1h,FGL2鼠单克隆抗体(1:200,Abnova)、Tubulin抗体(1:1000,Beyotime Biotechnology)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBS-T洗涤膜,用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:5000,Beyotime Biotechnology)在室温下孵育1h。利用化学发光法(ECL,Vazyme)检测蛋白质含量,在显像仪下曝光并拍摄照片。使用ImageJ软件对每个条带的灰度值进行定量分析。

[0044] (4) 结果

[0045] 结果如图5、6和7所示,与control组相比,GDM组孕鼠的子代胚胎吸收率增加(图5),并且,将两组孕鼠血清FGL2的表达水平分别与子代胚胎和胎盘的重量进行相关性分析,结果显示FGL2的表达水平与胚胎和胎盘的重量均呈反比(图6),FGL2蛋白表达水平随胚胎和胎盘的重量减少而升高。此外,与control组蜕膜组织相比,GDM蜕膜组织中FGL2 mRNA和蛋白相对表达水平均升高,差异具有统计学意义(图7)。结果说明,通过检测FGL2蛋白表达水平,可判断GDM孕妇宫内胎儿的发育和胎盘功能是否异常,或是通过监测FGL2蛋白表达水平反映GDM患者治疗效果和预后。

[0046] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

## 序列表

<110> 重庆医科大学附属第一医院

<120> FGL2在制备妊娠期糖尿病诊断和预后的试剂中的应用

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

atgaagctgg ctaactggta ctggetgagc tcagctgttc ttgccactta cggttttttg 60
gttgtggcaa acaatgaaac agaggaaatt aaagatgaaa gagcaaagga tgtctgcccc 120
gtgagactag aaagcagagg gaaatgcaaa gaggcagggg agtgccccta ccaggtaagc 180
ctgccccctt tgactattca gctcccgaag caattcagca ggatcgagga ggtgttcaaa 240
gaagtccaaa acctcaagga aatcgtaaatt agtctaaaga aatcttgcca agactgcaag 300
ctgcaggctg atgacaacgg agaccaggc agaaacggac tgttgttacc cagtacagga 360
gccccgggag aggttggtga taacagagtt agagaattag agagtgaggt taacaagctg 420
tcctctgagc taaagaatgc caaagaggag atcaatgtac ttcattggtc cctggagaag 480
ctgaatcttg taaatatgaa caacatagaa aattatgttg acagcaaagt ggcaaactta 540
acatttggtg tcaatagttt ggatggcaaa tgttcaaagt gtcccagcca agaacaaata 600
cagtcacgtc cagttcaaca tctaataat aaagattgct ctgactacta cgcaataggc 660
aaaagaagca gtgagaccta cagagttaca cctgatccca aaaatagtag ctttgaagtt 720
tactgtgaca tggagacat ggggggagc tggacagtgc tgcaggcacg tctcgatggg 780
agcaccaact tcaccagaac atggcaagac tacaagcag gctttgaaa cctcagaagg 840
gaattttggc tggggaacga taaaattcat cttctgacca agagtaagga aatgattctg 900
agaatagatc ttgaagactt taatggtgtc gaactatatg cttgtatga tcagttttat 960
gtggctaatt agtttctcaa atatcgttta cacgttggtta actataatgg cacagctgga 1020
gatgcattac gtttcaacaa acattacaac cagcatctga agtttttcac cactccagat 1080
aaagacaatg atcgatatcc ttctgggaac tgtgggctgt actacagttc aggctggtgg 1140
tttgatgcat gtctttctgc aaacttaaat ggcaaatatt atcaccaaaa atacagaggt 1200
gtccgtaatg ggattttctg gggtacctgg cctgggtgtaa gtgaggcaca ccctggtggc 1260
tacaagtcc cttcaaaga ggctaagatg atgatcagac ccaagcactt taagccataa 1320

```

<210> 2

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Met Lys Leu Ala Asn Trp Tyr Trp Leu Ser Ser Ala Val Leu Ala Thr

1	5	10	15
Tyr Gly Phe Leu Val Val Ala Asn Asn Glu Thr Glu Glu Ile Lys Asp			
	20	25	30
Glu Arg Ala Lys Asp Val Cys Pro Val Arg Leu Glu Ser Arg Gly Lys			
	35	40	45
Cys Glu Glu Ala Gly Glu Cys Pro Tyr Gln Val Ser Leu Pro Pro Leu			
	50	55	60
Thr Ile Gln Leu Pro Lys Gln Phe Ser Arg Ile Glu Glu Val Phe Lys			
65	70	75	80
Glu Val Gln Asn Leu Lys Glu Ile Val Asn Ser Leu Lys Lys Ser Cys			
	85	90	95
Gln Asp Cys Lys Leu Gln Ala Asp Asp Asn Gly Asp Pro Gly Arg Asn			
	100	105	110
Gly Leu Leu Leu Pro Ser Thr Gly Ala Pro Gly Glu Val Gly Asp Asn			
	115	120	125
Arg Val Arg Glu Leu Glu Ser Glu Val Asn Lys Leu Ser Ser Glu Leu			
	130	135	140
Lys Asn Ala Lys Glu Glu Ile Asn Val Leu His Gly Arg Leu Glu Lys			
145	150	155	160
Leu Asn Leu Val Asn Met Asn Asn Ile Glu Asn Tyr Val Asp Ser Lys			
	165	170	175
Val Ala Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Ser Leu Asp Gly Lys Cys Ser			
	180	185	190
Lys Cys Pro Ser Gln Glu Gln Ile Gln Ser Arg Pro Val Gln His Leu			
	195	200	205
Ile Tyr Lys Asp Cys Ser Asp Tyr Tyr Ala Ile Gly Lys Arg Ser Ser			
	210	215	220
Glu Thr Tyr Arg Val Thr Pro Asp Pro Lys Asn Ser Ser Phe Glu Val			
225	230	235	240
Tyr Cys Asp Met Glu Thr Met Gly Gly Gly Trp Thr Val Leu Gln Ala			
	245	250	255
Arg Leu Asp Gly Ser Thr Asn Phe Thr Arg Thr Trp Gln Asp Tyr Lys			
	260	265	270
Ala Gly Phe Gly Asn Leu Arg Arg Glu Phe Trp Leu Gly Asn Asp Lys			
	275	280	285
Ile His Leu Leu Thr Lys Ser Lys Glu Met Ile Leu Arg Ile Asp Leu			
	290	295	300
Glu Asp Phe Asn Gly Val Glu Leu Tyr Ala Leu Tyr Asp Gln Phe Tyr			
305	310	315	320

Val Ala Asn Glu Phe Leu Lys Tyr Arg Leu His Val Gly Asn Tyr Asn  
 325 330 335  
 Gly Thr Ala Gly Asp Ala Leu Arg Phe Asn Lys His Tyr Asn His Asp  
 340 345 350  
 Leu Lys Phe Phe Thr Thr Pro Asp Lys Asp Asn Asp Arg Tyr Pro Ser  
 355 360 365  
 Gly Asn Cys Gly Leu Tyr Tyr Ser Ser Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys  
 370 375 380  
 Leu Ser Ala Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Tyr His Gln Lys Tyr Arg Gly  
 385 390 395 400  
 Val Arg Asn Gly Ile Phe Trp Gly Thr Trp Pro Gly Val Ser Glu Ala  
 405 410 415  
 His Pro Gly Gly Tyr Lys Ser Ser Phe Lys Glu Ala Lys Met Met Ile  
 420 425 430  
 Arg Pro Lys His Phe Lys Pro  
 435

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

ctcaaagaag tgcggaccct caag 24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

tccgctgtct ctgctccatt cc 22

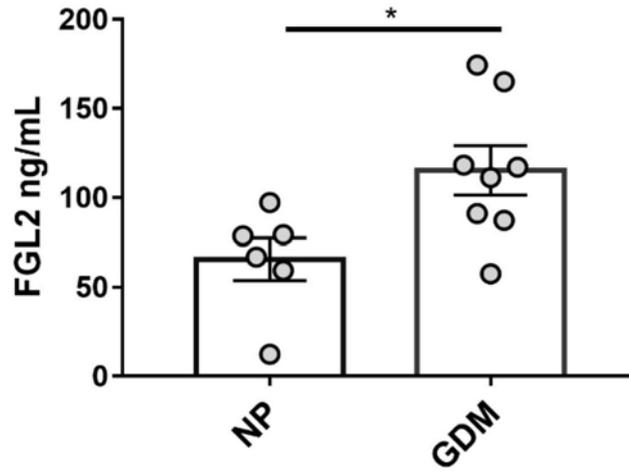


图1

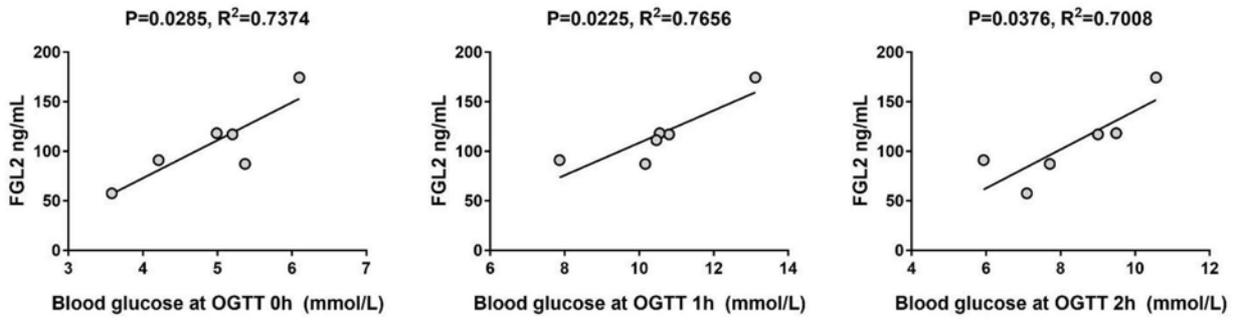


图2

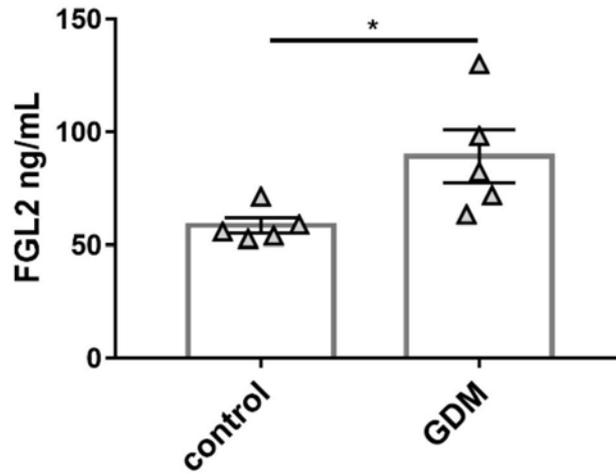


图3

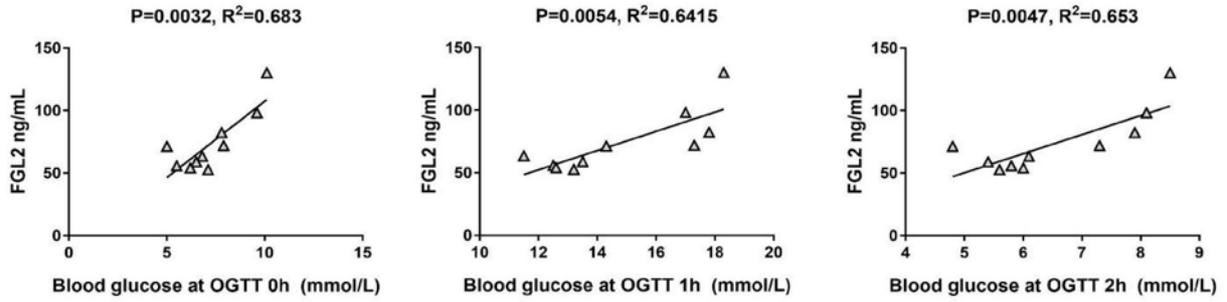


图4

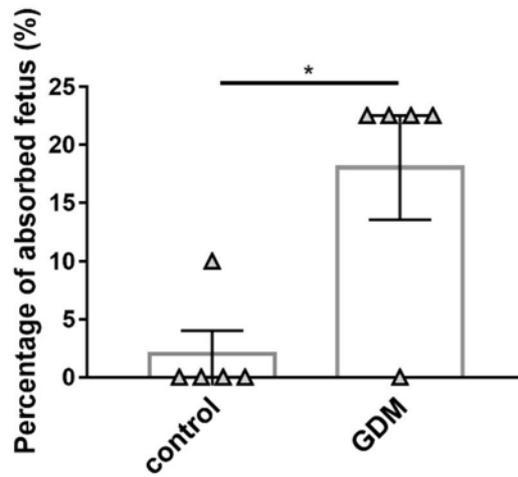


图5

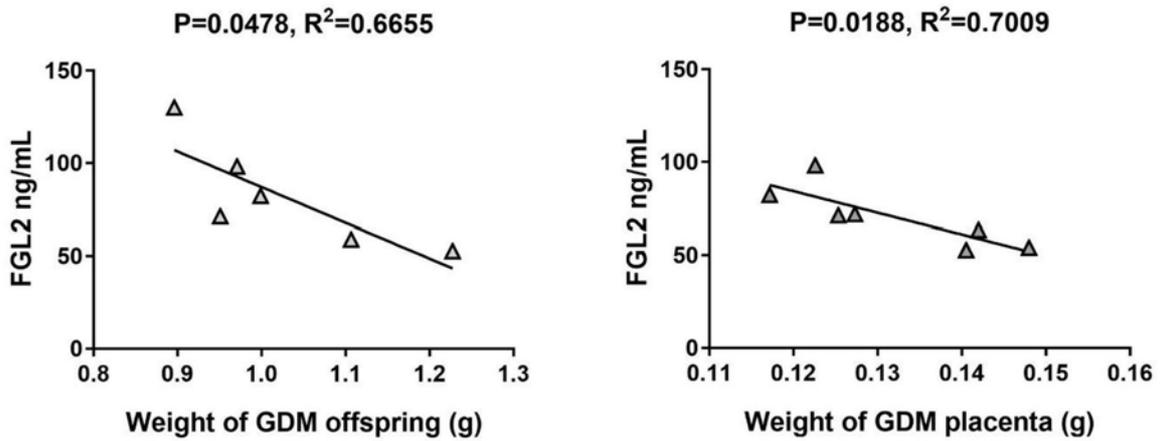


图6

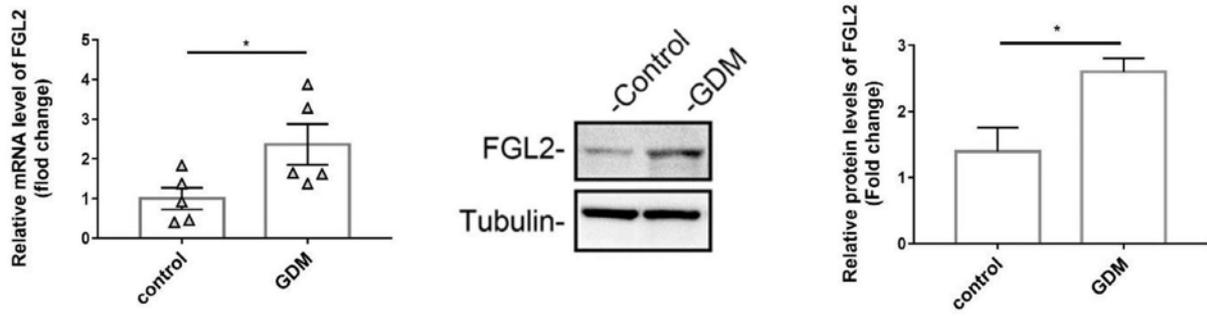


图7