



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112740045 A

(43) 申请公布日 2021.04.30

(21) 申请号 201980061697.4

(22) 申请日 2019.09.24

(30) 优先权数据

18197378.5 2018.09.27 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/075638 2019.09.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/064690 EN 2020.04.02

(71) 申请人 雀巢产品有限公司

地址 瑞士沃韦

(72) 发明人 F-P·马丁 J·哈格尔

J·品克内 J·霍斯金

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 宋卫霞 黄革生

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书3页 说明书18页

(54) 发明名称

在儿童期和青年期发展成胰岛素抗性的风险的标志物

(57) 摘要

本发明通常涉及一种用于预测个体的生物流体中的高血液葡萄糖水平的方法。还提供了改善青少年个体的葡萄糖水平管理的方法。本发明整体涉及一种用于预测个体的生物流体中的高HOMA-IR的方法。还提供了改善儿童或青少年个体或青年的葡萄糖和胰岛素代谢的方法。

1. 用于预测个体的胰岛素抗性 (IR) 的方法, 所述方法包括:
  - a. (i) 测定所述个体的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平, 以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平; 或 (ii) 测定所述个体的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;
  - b. 将乳酸、组氨酸、肌酸: 甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较;
  - c. 在以下情况下将所述个体鉴定为处于 IR 高风险:
    - (I) 乳酸、肌酸: 甘氨酸比中的一者或多者的水平高于 b 中的所述参考值; 或
    - (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于 b 中的所述参考值。
2. 根据权利要求 1 所述的用于预测个体的 IR 的方法, 所述方法包括:
  - a. (i) 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平, 以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平; 或 (ii) 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;
  - b. 将乳酸、组氨酸、肌酸: 甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较;
  - c. 在以下情况下将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于 IR 高风险:
    - (I) 乳酸、肌酸: 甘氨酸比中的一者或多者的水平高于 b 中的所述参考值; 或
    - (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于 b 中的所述参考值。
3. 根据权利要求 1 和 2 所述的用于预测个体的 IR 的方法, 所述方法包括:
  - a. 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的所述生物流体样品中的乳酸的水平;
  - b. 将乳酸的水平与参考值进行比较;
  - c. 如果乳酸的水平高于 b 中的所述参考值, 则将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于 IR 高风险。
4. 根据权利要求 1 和 2 所述的用于预测个体的 IR 的方法, 所述方法包括:
  - a. 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的所述生物流体样品中的甘氨酸和肌酸的水平;
  - b. 将肌酸: 甘氨酸比的水平与参考值进行比较;
  - c. 如果肌酸: 甘氨酸比的水平高于 b 中的所述参考值, 则将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于 IR 高风险。
5. 根据权利要求 1 和 2 所述的用于预测个体的 IR 的方法, 所述方法包括:
  - a. 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的所述生物流体样品中的组氨酸的水平;
  - b. 将乳酸的水平与参考值进行比较;
  - c. 如果组氨酸的水平高于 b 中的所述参考值, 则将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于 IR 高风险。
6. 根据权利要求 1 和 2 所述的用于预测个体的 IR 的方法, 其中测定在步骤 a (i) 中从所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、肌酸、甘氨酸的水平和柠檬酸、3-D-羟基丁酸、

赖氨酸中的一者或多者的水平。

7. 根据权利要求1和2所述的用于预测个体的IR的方法,其中测定在步骤a(i)中从所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、肌酸、甘氨酸的水平,以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的两者或更多者的水平。

8. 根据权利要求1和2所述的用于预测个体的IR的方法,其中测定在步骤a(i)中从所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、肌酸、甘氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸的水平。

9. 根据权利要求1至8所述的用于预测个体的IR的方法,其中在步骤a(i)中从儿童个体收集所述生物流体样品,并且在步骤c中将所述个体鉴定为在青春期处于IR高风险。

10. 根据权利要求1至8所述的用于预测个体的IR的方法,其中在步骤a(i)中从儿童个体收集所述生物流体样品,并且在步骤c中将所述个体鉴定为在成年期处于IR高风险。

11. 根据权利要求1至8所述的用于预测个体的IR的方法,其中在步骤a(i)中从青春期个体收集所述生物流体样品,并且在步骤c中将所述个体鉴定为在青春期处于IR高风险。

12. 根据权利要求1至8所述的用于预测个体的IR的方法,其中在步骤a(i)中从青春期个体收集所述生物流体样品,并且在步骤c中将所述个体鉴定为在成年期处于IR高风险。

13. 根据权利要求1至10所述的用于预测个体的IR的方法,其中当所述个体年龄在5岁和7岁之间时收集所述生物流体样品。

14. 根据权利要求13所述的用于预测个体的IR的方法,其中当所述个体年龄为6岁时收集所述生物流体样品。

15. 根据任一前述权利要求所述的用于预测个体的IR的方法,其中当收集所述生物流体样品时,所述个体不超重。

16. 根据任一前述权利要求所述的用于预测个体的IR的方法,其中当收集所述生物流体样品时,所述个体不肥胖。

17. 根据任一前述权利要求所述的用于预测个体的IR的方法,其中所述生物流体样品为人类血清。

18. 用于改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,所述方法包括:(i) 根据权利要求1至17所述预测所述个体是否具有IR;以及(ii) 提供改变被鉴定为在青春期和/或成年期处于更高胰岛素抗性风险的个体的生活方式的方法,其中所述膳食干预增强胰岛素敏感性、降低胰岛素抗性和/或降低葡萄糖水平。

19. 根据权利要求18所述的改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,其中所述生活方式的改变降低胰岛素抗性。

20. 根据权利要求18或19所述的改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,其中所述生活方式的改变在青春前期和青春期提供。

21. 根据权利要求18至20所述的改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,其中所述方法降低了一种或多种代谢疾病尤其是2型糖尿病的可能性或预防其发作,尤其是在成年期早期。

22. 根据权利要求18至21所述的改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,其中所述生活方式的改变在青春前期、青春期和青少年期提供。

23. 根据权利要求18至21所述的改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,其

中所述个体的生活方式的改变包括饮食的改变。

24. 根据权利要求18至21所述的改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,其中所述饮食的改变包括向所述个体施用作为调节葡萄糖水平的饮食的一部分的至少一种营养产品。

25. 根据权利要求24所述的改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,其中向所述个体施用作为饮食的一部分的至少一种营养产品促进所述个体中葡萄糖的降低或防止葡萄糖水平的升高。

26. 部件套盒,所述部件套盒包括用于测量儿童或青少年个体的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中一者或多者的水平的装置。

27. 根据权利要求26所述的部件套盒用于预测儿童或青少年个体在青少年期和/或成年期具有IR或发展成前驱糖尿病的用途。

## 在儿童期和青年期发展成胰岛素抗性的风险的标志物

### 背景技术

[0001] 全球有18亿青少年(全球人口的25%),并且2013年有约4200万5岁以下超重或肥胖的儿童,因此儿童期和青春期的前驱糖尿病和2型糖尿病(T2D)管理已变得非常重要。由于前驱糖尿病和T2D在很大程度上是可预防的并且与生活方式、膳食摄入和运动密切相关,因此营养起到关键作用。

[0002] 此外,儿童的(前驱)糖尿病与成人的不同之处在于许多生理方面和代谢方面,包括胰岛素、性成熟和生长、神经系统易受低血糖的影响以及提供自我护理的能力。然而,与成人研究相比,在儿童中存在较少数据,儿童的胰岛素抗性(IR)发生显著变化,尤其受到青春期时间表以及身体成分和体力活动两者变化的影响。在青年人中,青春期IR的重要性广为争议,同时对联系肥胖症和IR的潜在机制的理解是不完全的。鉴于IR与对胰岛素敏感组织中胰岛素介导的葡萄糖摄取的抗性相关,儿童期和青春期IR很可能是由多种代谢需求和生理需求引起,包括生长激素分泌增加的影响(直接和/或经由IGF-1的作用)(Pinkney、Streeter等人,2014年)。

[0003] 在代谢健康、儿童期和青少年期的背景下,肥胖对正常生长和青春期模式造成显著干扰(Sandhu等人,2006年;Marcovecchio和Chiarelli,2013年)。最近来自Earlybird研究的分析证明青春期的年龄和性别对IR有重要影响(Jeffery S等人,Pediatric Diabetes,2017年),其在许多方面与成人表型不同(Jeffery等人,2012年)。研究举例说明了在青春期之前几年的儿童期中期,IR是如何开始升高的,青春期之前的IR变化中有超过60%仍然未被解释。此外,用于检测糖尿病、用于鉴定发展成糖尿病的高风险的个体以及用于成人代谢疾病风险诸如HbA1c的常规标志物对于儿科应用丧失敏感性和特异性,表明其它因素影响这些标志物在青少年中的差异(Hosking等人,2014年)。

[0004] 目前正在研究的一个潜在重要因素是儿童期超重的作用。这还可通过对青春期开始时间表和激素水平的效应来影响青春期发育(Marcovecchio和Chiarelli,2013年)。肥胖与青春期的相互作用是复杂的和性别特异性的。此外,对于女孩,较高水平的IR限制了长期体内脂肪的进一步增加,这种观察可能与将IR作为是对体重增加的适应性响应的胰岛素脱敏机制的概念一致(Hosking等人,2011年)。最近,体重增长和葡萄糖代谢降低被证明能够由低效的皮下脂肪细胞脂解预测(Arner、Andersson等人,2018年)。脂肪酸的脂肪细胞动员(脂解)是能量消耗的工具。脂解显示出自发(基础)活性和激素刺激活性。因此,低效脂解(高基础/低刺激)与未来体重增加和葡萄糖代谢降低相关并且可构成治疗靶标。

[0005] 儿童静息能量消耗和体重增加的作用存在争议,尤其关注于研究青春期对长期身体成分的影响。当能量摄入大于能量消耗时发生肥胖,过量的能量主要作为脂肪贮存在脂肪组织中。可通过降低能量摄入或生物利用率、增加能量消耗和/或减少作为脂肪贮存,来实现体重减轻以及预防体重增加。然而,超重受试者或处于超重风险的受试者常常需要营养辅助来更好地管理他们的体重,例如通过增加饱腹感和/或减少体重增加来管理。

[0006] 肥胖与IR的发展密切相关,并且在成人和儿童的肥胖、IR、异常葡萄糖调节和2型糖尿病的发展之间存在强关联。然而,并非所有肥胖个体都发展成糖尿病,并且对将肥胖和

IR关联的基础机制的理解仍然不完全。虽然人们广泛接受糖尿病是由胰岛素分泌失败和/或IR的组合引起的,但对人体内的胰岛素分泌和IR的精确测量存在问题。针对此类测量的最灵敏方法(例如,高血糖钳夹、正葡萄糖高胰岛素钳夹或多点口服葡萄糖耐受性测试)不太适合具有重复测量的长期前瞻研究,并且它们一般被认为对于在儿童中反复使用太过侵入性。因此,需要更简单的替代方案。新型代谢生物标志物的鉴定的潜力是不仅比简单的肥胖测量或更复杂的胰岛素分泌和作用测量更准确地识别有糖尿病风险的个体,而且还能进一步阐明肥胖与IR关联的机制。

[0007] 为了解决这些特定证据缺陷,设计了EarlyBird研究作为健康儿童的纵向同期群研究,其明确意图是研究人体测量、临床和代谢过程对儿童期和青少年时期的葡萄糖和胰岛素代谢的影响。EarlyBird同期群是一项针对300名健康英国儿童的非介入性前瞻研究,该研究在整个儿童期每年进行跟进。调查人员解决了整合并关联从5岁至20岁的EarlyBird儿童同期群中的这些不同数据类型的时间变化这一挑战性任务,包括人体测量、临床和血清生物标志物(代谢组学)数据。

[0008] 定义

[0009] 在本说明书全文中使用的各种术语如下文所述进行定义。

[0010] 在本说明书全文中使用以下术语来描述本发明的个体尤其是人类个体的不同早期生命阶段:

[0011] -新生婴儿:出生后第一个月内的人类个体;

[0012] -婴儿:年龄在1个月至23个月之间(包括端值在内)的人类个体;

[0013] -学前儿童:年龄在2岁至5岁之间(包括端值在内)的人类个体;

[0014] -儿童:年龄在6岁至12岁之间(包括端值在内)的人类个体;

[0015] -青春前期:6岁或7岁的人类个体;

[0016] -儿童期中期:7或8岁的人类个体;以及

[0017] -青少年(或青少年期):年龄在13岁至18岁(包括端值在内)之间的人类个体(其它个体的相应早期生命阶段,例如对于犬而言,将是介于6个月至18个月之间(包括端值在内))

[0018] -成年期:19岁及以上

[0019] 本说明书全文中提及的各种代谢物也以其它名称已知。例如,代谢物“3-D-羟基丁酸(3-D-hydroxybutyrate)”也被称为(R)-(-)- $\beta$ -羟基丁酸;(R)-3-羟基丁酸;3-D-羟基丁酸;D-3-羟基丁酸;(R)-(-)- $\beta$ -羟基丁酸;(R)-(-)- $\beta$ -羟基丁酸;(R)-(-)- $\beta$ -羟基丁酸;(R)-(-)- $\beta$ -羟基丁酸;(R)-(-)- $\beta$ -羟基丁酸;(R)-3-羟基丁酸;(R)-3-羟基丁酸;3-D-羟基丁酸;D-3-羟基丁酸;3- $\Delta$ -羟基丁酸;3- $\Delta$ -羟基丁酸;BHIB;D-(-)-3-羟基丁酸;D- $\beta$ -羟基丁酸; $\Delta$ -(-)-3-羟基丁酸; $\Delta$ -3-羟基丁酸; $\Delta$ -3-羟基丁酸;以及 $\Delta$ - $\beta$ -羟基丁酸。

[0020] 代谢物“柠檬酸(citrate)”也称为柠檬酸;2-羟基-1,2,3-丙烷三羧酸;2-羟基三羧酸;3-羧基-3-羟基戊烷-1,5-二酸;2-羟基-1,2,3-丙烷三羧酸;2-羟基三羧酸;3-羧基-3-羟基戊烷-1,5-二酸; $\beta$ -羟基三羧酸; $\beta$ -羟基三羧酸。

[0021] 代谢物“乳酸(lactate)”也被称为L-乳酸;(+) -乳酸;(S) - (+) -乳酸;(S) -2-羟基丙酸;(S) -2-羟基丙酸;L-(+) - $\alpha$ -羟基己酸;L-(+) -乳酸;L-(+) - $\alpha$ -羟基丙酸;(S) -2-羟基丙酸;1-羟乙烷1-羧酸;乳酸;肌乳酸;D-乳酸。

[0022] 代谢物“肌酸”也被称为((氨基(亚氨基)甲基)(甲基)氨基)乙酸;( $\alpha$ -甲基胍基)乙酸; (N-甲基脒基氨基(methylcarbamimidamido))乙酸; $\alpha$ -甲基胍基乙酸;甲基乙酸胍;N-(氨基亚氨基甲基)-N-甲基甘氨酸;N-[(e)-氨基(亚氨基)甲基]-N-甲基甘氨酸;N-脒基肌氨酸;N-甲脒基-N-甲基甘氨酸;N-甲基-N-脒基甘氨酸;( $\alpha$ -甲基胍基)乙酸;胍基乙酸甲酯;[氨基(亚氨基)甲基](甲基)氨基]乙酸; (N-甲基脒基氨基(methylcarbamimidamido))乙酸。

[0023] 代谢物“组氨酸”也被称为(S)-4-(2-氨基-2-羧乙基)咪唑;(S)- $\alpha$ -氨基-1H-咪唑-4-丙酸;(S)- $\alpha$ -氨基-1H-咪唑-4-丙酸;(S)-1H-咪唑-4-丙氨酸;(S)-2-氨基-3-(4-咪唑基)丙酰胺;(S)-组氨酸;(S)1H-咪唑-4-丙氨酸;3-(1H-咪唑-4-基)-L-丙氨酸;氨基-1H-咪唑-4-丙酸酯;氨基-1H-咪唑-4-丙酸;氨基-4-咪唑丙酸酯;氨基-4-咪唑丙酸;咪唑-5-丙氨酸。

[0024] 代谢物“甘氨酸”也被称为甘氨酸;氨基醋酸;氨基乙酸;氢氨乙酸(Glycocoll); Glykokoll;Glyzin;Leimzucker;2-氨基乙酸酯;氨基乙酸;Glicoamin;Glycolixir; Glycosthene;Gyn-hydralin;Padil HMDB。

[0025] 代谢物“赖氨酸”也被称为(S)-2,6-二氨基己酸;(S)- $\alpha, \epsilon$ -二氨基己酸;(S)-赖氨酸;6-氨基-L-正亮氨酸;L-2,6-二氨基己酸;L-赖氨酸;Lysina;赖氨酸;Lysinum;(S)-2,6-二氨基己酸酯;(+) -S-赖氨酸;(S)-2,6-二氨基己酸盐;(S)-2,6-二氨基己酸;(S)- $\alpha, \epsilon$ -二氨基己酸酯;(S)- $\alpha, \epsilon$ -二氨基己酸;2,6-二氨基己酸酯;2,6-二氨基己酸;6-氨基-左旋赖氨酸;6-氨基-L-正亮氨酸; $\alpha$ -赖氨酸; $\alpha$ -赖氨酸;左旋赖氨酸;L-2,6-二氨基己酸酯;L-2,6-二氨基己酸;Enisyl MeSH。

[0026] 代谢物“精氨酸”也被称为(2S)-2-氨基-5-(氨基甲酰亚氨基)戊酸;(2S)-2-氨基-5-胍基戊酸;(S)-2-氨基-5-胍基戊酸;(S)-2-氨基-5-胍基正缬氨酸;L-(+)-精氨酸;(S)-2-氨基-5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-戊酸酯;(S)-2-氨基-5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-戊酸;(S)-2-氨基-5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]戊酸酯;(S)-2-氨基-5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]戊酸;2-氨基-5-胍基正缬氨酸酯;2-氨基-5-胍基正缬氨酸;5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-L-正缬氨酸;L- $\alpha$ -氨基-D-胍基正缬氨酸酯;L- $\alpha$ -氨基-D-胍基正缬氨酸;L- $\alpha$ -氨基- $\Delta$ -胍基正缬氨酸酯;L- $\alpha$ -氨基- $\Delta$ -胍基正缬氨酸;N5-(氨基亚氨基甲基)-L-鸟氨酸。

[0027] 术语胰岛素抗性(IR)是细胞不能正常应答激素胰岛素的病理状况。当葡萄糖开始从消化饮食中的(主要)碳水化合物释放到血流中时,身体产生胰岛素。在正常胰岛素反应性条件下,此胰岛素应答触发葡萄糖被摄入到体细胞中用于能量,并且抑制身体使用脂肪用于能量,从而导致血液中葡萄糖的浓度因此而降低,即使在消耗大量碳水化合物时也保持在正常范围内。然而,在胰岛素抗性期间,即使在存在胰岛素的情况下,过量的葡萄糖也不能被细胞充分吸收,从而导致血糖水平升高。IR是涉及2型糖尿病和前驱糖尿病的因素中的一个因素。

[0028] IR可通过不同的方式诊断:

[0029] • 空腹胰岛素水平:大于25mIU/L或174pmol/L的空腹血清胰岛素水平被视为胰岛素抗性

[0030] • 葡萄糖耐受性测试和Matsuda指数

[0031] • 稳态模型评估法(HOMA),HOMA-IR的正常参考范围根据种族和性别有所不同,因此必须针对每个群体进行定义。

[0032] • 定量胰岛素敏感性检测指数 (QUICKI)。

[0033] • 高胰岛素正常血糖钳

[0034] • 改良胰岛素抑制试验

[0035] 术语“前驱糖尿病”描述空腹血液葡萄糖水平等于或高于5.6mmol/L血浆的状况，尽管还不足以被诊断为2型糖尿病。前驱糖尿病无病征或症状。患有前驱糖尿病的人患2型糖尿病和心血管（心脏和循环系统）疾病的风险更高。如果没有持续的生活方式改变，包括健康饮食、增加活动和体重减轻，约三分之一的前驱糖尿病患者将继续发展成2型糖尿病。存在两种前驱糖尿病症状：

[0036] • 葡萄糖耐量降低被定义为在75g口服葡萄糖耐受性测试中140mg/dL至199mg/dL (7.8mmol至11.0mmol) 的两小时葡萄糖水平。因此，糖尿病的水平在ogtt中高于11mmol。

[0037] • 空腹血糖异常 (IFG) 是血液葡萄糖水平在空腹状态下升高但不足以被分类为糖尿病的症状。空腹血糖异常被义为空腹患者的葡萄糖水平为100mg/dL至125mg/dL (5.6mmol/L至6.9mmol/L)。因此，糖尿病的水平高于6.9mmol。

[0038] • 有可能同时具有空腹血糖异常 (IFG) 和葡萄糖耐量降低 (IGT)。

[0039] 如本文所用，术语“参考值”可定义为在基本上健康的正常血糖群体的生物流体样品中测量的平均值。所述群体可具有小于5.6mmol/L的平均空腹血糖水平。所述群体的平均年龄优选地与个体的平均年龄基本上相同。所述群体的平均BMI sds优选地与个体的平均BMI sds基本上相同。所述群体的平均体力活动优选地与个体的平均体力活动基本上相同。所述群体可具有与人类个体基本上相同的种族。所述群体可具有至少2个、5个、10个、100个、200个、500个或1000个个体。当个体是宠物时，所述群体可为基本上相同的品种。

[0040] 如在个体的生物流体样品中所测量的，术语“高水平的葡萄糖”或“高葡萄糖水平”被定义为等于或高于5.6mmol/L。

[0041] 术语“生物流体”可为例如人类血液（尤其是人类血清、人类血浆）、尿液或间质液。

[0042] “超重”被定义为成人的BMI介于25和30之间。“体重指数”或“BMI”是指体重(千克)除以身高(米)的平方所得的比值。“肥胖”是指储存在动物（尤其是人类和其它哺乳动物）脂肪组织中的天然能量储备增至与某些健康症状或死亡率上升有关的程度的病症。“肥胖”被定义为成人的BMI大于30。成人人类的“正常体重”被定义为18.5至25的BMI，而“体重不足”可被定义为小于18.5的BMI。体重指数 (BMI) 是用于确定儿童和青少年的儿童期超重和肥胖的量度。儿童和青少年的超重被定义为达到或高于相同年龄和性别儿童和青少年的第85百分位并低于第95百分位的BMI。肥胖被定义为达到或高于相同年龄和性别儿童和青少年的第95百分位的BMI。儿童和青少年的正常体重被定义为达到或高于相同年龄和性别儿童和青少年的第5百分位并低于第85百分位的BMI。儿童和青少年的体重不足被定义为低于相同年龄和性别儿童和青少年的第5百分位的BMI。BMI是用人的体重(千克)除以身高(米)的平方计算得出的。对于儿童和青少年，BMI是特定于年龄和性别的并且通常被称为年龄的BMI。儿童的体重状况使用BMI的特定于年龄和性别的百分位数而不是用于成人的BMI类别来确定。这是因为儿童的身体成分随着年龄而有所不同，并且男孩和女孩之间也不同。因此，儿童和青少年的BMI水平需要相对于相同年龄和性别的其它儿童来表达。

[0043] 术语“个体”优选地为人类个体或可为宠物个体，例如猫或狗。

[0044] 术语“基本上”被认为是指50%或更大，更优选地为75%或更大，或更优选地为

90%或更大。当涉及值或量或百分比时,术语“约”或“大约”是指涵盖与指定值、量或百分比之间的变化,在一些实施方案中涵盖 $\pm 20\%$ 的变化,在一些实施方案中涵盖 $\pm 10\%$ 的变化,在一些实施方案中涵盖 $\pm 5\%$ 的变化,在一些实施方案中涵盖 $\pm 1\%$ 的变化,在一些实施方案中涵盖 $\pm 0.5\%$ 的变化,并且在一些实施方案中涵盖 $\pm 0.1\%$ 的变化。

### 具体实施方式

[0045] 本发明提供了用于预测个体的胰岛素抗性(IR)的方法,所述方法包括:

[0046] a. (i) 测定所述个体的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平,以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;或(ii) 测定所述个体的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;

[0047] b. 将乳酸、组氨酸、肌酸:甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较;

[0048] c. 在以下情况下将所述个体鉴定为处于IR高风险:

[0049] (I) 乳酸、肌酸:甘氨酸比中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值;以及/或者

[0050] (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值。

[0051] 本发明还提供了用于预测个体的IR的方法,所述方法包括:

[0052] a. (i) 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平,以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;和/或(ii) 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;

[0053] b. 将乳酸、组氨酸、肌酸:甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较;

[0054] c. 在以下情况下将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于IR高风险:

[0055] (I) 乳酸、肌酸:甘氨酸比中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值;以及/或者

[0056] (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值。

[0057] 在一个实施方案中,用于预测个体的IR的方法包括:

[0058] a. 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的所述生物流体样品中的乳酸的水平;

[0059] b. 将乳酸的水平与参考值进行比较;

[0060] c. 如果乳酸的水平高于b中的所述参考值,则将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于IR高风险。

[0061] 在一个实施方案中,用于预测个体的IR的方法包括:

[0062] a. 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的所述生物流体样品中的甘氨酸和肌酸的水平;

- [0063] b. 将肌酸:甘氨酸比的水平与参考值进行比较;
- [0064] c. 如果肌酸:甘氨酸比的水平高于b中的所述参考值,则将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于IR高风险。
- [0065] 在一个实施方案中,用于预测个体的IR的方法包括:
- [0066] a. 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的所述生物流体样品中的组氨酸的水平;
- [0067] b. 将组氨酸的水平与参考值进行比较;
- [0068] c. 如果组氨酸的水平低于b中的参考值,则将个体鉴定为在青春期和/或成年期处于IR高风险。
- [0069] 本发明还提供了用于预测个体的IR的方法,所述方法包括:
- [0070] a. (i) 测定从作为儿童的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平,以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;和/或(ii) 测定从作为儿童的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;
- [0071] b. 将乳酸、组氨酸、肌酸:甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较;
- [0072] c. 在以下情况下将个体鉴定为在青春期处于IR高风险
- [0073] (I) 乳酸、肌酸:甘氨酸比中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值;以及/或者
- [0074] (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值。
- [0075] 本发明还提供了用于预测个体的IR的方法,所述方法包括:
- [0076] a. (i) 测定从作为儿童的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平,以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;和/或(ii) 测定从作为儿童的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;
- [0077] b. 将乳酸、组氨酸、肌酸:甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较;
- [0078] c. 在以下情况下将个体鉴定为在成年期处于IR高风险:
- [0079] (I) 乳酸、肌酸:甘氨酸比中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值;以及/或者
- [0080] (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值。
- [0081] 本发明还提供了用于预测个体的IR的方法,所述方法包括:
- [0082] a. (i) 测定从作为青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平,以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;和/或(ii) 测定从作为青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平;
- [0083] b. 将乳酸、组氨酸、肌酸:甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多

者的水平与参考值进行比较；

[0084] c. 在以下情况下将个体鉴定为在青春期处于IR高风险：

[0085] (I) 乳酸、肌酸：甘氨酸比中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值；以及/或者

[0086] (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值。

[0087] 本发明还提供了用于预测个体的IR的方法，所述方法包括：

[0088] a. (i) 测定从作为青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平，以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平；和/或(ii) 测定从作为青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平；

[0089] b. 将乳酸、组氨酸、肌酸：甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较；

[0090] c. 在以下情况下将个体鉴定为在成年期处于IR高风险：

[0091] (I) 乳酸、肌酸：甘氨酸比中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值；以及/或者

[0092] (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值。

[0093] 在一个实施方案中，测定在步骤a(i)中从所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、肌酸、甘氨酸的水平，以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平。

[0094] 在一个实施方案中，测定在步骤a(i)中从所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、肌酸、甘氨酸的水平，以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的两者或更多者的水平。

[0095] 在一个实施方案中，测定在步骤a(i)中从所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、肌酸、甘氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸的水平。

[0096] 在一个实施方案中，高IR对应于等于或高于1.5的HOMA-IR值。

[0097] 在一个实施方案中，高IR对应于等于或高于2的HOMA-IR值。

[0098] 在一个实施方案中，IR是严重的，对应于等于或高于5的HOMA-IR值。

[0099] 在一个实施方案中，当收集所述生物流体样品时，所述个体不超重。

[0100] 在一个实施方案中，当收集所述生物流体样品时，所述个体不肥胖。

[0101] 在一个另选的实施方案中，本发明提供了用于预测个体的低于1.5的HOMA-IR的方法，所述方法包括：

[0102] a. (i) 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸和组氨酸的水平，以及柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平；和/或(ii) 测定从作为儿童或青少年的所述个体收集的生物流体样品中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸中的一者或多者的水平；

[0103] b. 将乳酸、组氨酸、肌酸：甘氨酸比、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平与参考值进行比较；

- [0104] c. 在以下情况下将所述个体鉴定为在青春期和/或成年期处于IR高风险:
- [0105] (I) 乳酸、肌酸:甘氨酸比中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值;以及/或者
- [0106] (II) 组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸中的一者或多者的水平高于b中的所述参考值。
- [0107] 在一个实施方案中,所述生物流体样品集合取自个体5岁、6岁、7岁、8岁、9岁、10岁、11岁、12岁、13岁、14岁、15岁、16岁、17岁或18岁时,并且分隔至少一年时间间隔。
- [0108] 在本发明的一个方面,在个体年龄为5岁时收集生物流体样品。
- [0109] 在本发明的一个方面,在个体年龄为6岁时收集生物流体样品。
- [0110] 在本发明的一个方面,在个体年龄为7岁时收集生物流体样品。
- [0111] 在本发明的一个方面,在步骤a (i) 和/或a (ii) 中从所述个体收集多于一种的生物流体样品。
- [0112] 在本发明的一个方面,代谢物测量通过NMR (核磁共振) 进行。另选地,代谢物测量可通过质谱或通过临床测定进行。
- [0113] 在本发明的一个方面,选择13岁至16岁(包括端值在内)的年龄子范围作为青少年期的代表。
- [0114] 在本发明的一个方面,选择15岁作为青少年期的代表。
- [0115] 在本发明的一个方面,选择20岁作为成年期的代表。
- [0116] 在本发明的一个方面,参考值为预先确定的标准。
- [0117] 在本发明的一个方面,生物流体样品为人类血清。
- [0118] 本发明还提供了用于改善儿童或青少年个体的葡萄糖水平管理的方法,该方法包括:(i) 根据本发明预测所述个体是否具有IR;以及(ii) 提供改变被鉴定为在青春期和/或成年期处于高胰岛素抗性风险的个体的生活方式的方法,其中所述膳食干预增强胰岛素敏感性、减少胰岛素抗性可能性、降低或预防胰岛素抗性和/或降低葡萄糖水平。
- [0119] 在本发明的一个方面,所述生活方式的改变降低胰岛素抗性。在本发明的一个方面,所述生活方式的改变预防胰岛素抗性。在本发明的一个方面,所述生活方式的改变预防胰岛素抗性。
- [0120] 在本发明的一个方面,所述生活方式的改变在青春前期和/或青春期提供。
- [0121] 在本发明的一个方面,所述方法降低了一种或多种代谢障碍尤其是2型糖尿病的可能性或预防其发作,尤其是在成年期早期。
- [0122] 在本发明的一个方面,所述生活方式的改变在青春前期、青春期和青少年期提供。
- [0123] 在本发明的一个方面,个体的生活方式的改变包括饮食的改变,优选地包括向个体施用作为调节葡萄糖水平的饮食的一部分的至少一种营养产品。
- [0124] 在本发明的一个方面,向个体施用作为调节葡萄糖水平的饮食的一部分的至少一种营养产品促进个体中葡萄糖的降低或防止葡萄糖水平的升高。
- [0125] 在本发明的一个方面,饮食的改变包括降低的脂肪消耗和/或低脂肪食物消耗的增加,使得从脂肪中获得不超过20%的每日卡路里。
- [0126] 低脂肪食物包括:面包和面粉,燕麦,早餐谷类,全粒大米和面食,新鲜、冷冻和罐装的蔬菜和水果,干的豆和扁豆,烤马铃薯或煮马铃薯,干果,白鱼,贝壳类,瘦白肉诸如鸡

肉和无皮火鸡胸,脱脂和半脱脂奶,白干酪或凝乳干酪,低脂酸奶或蛋白。大多数成年人每天从脂肪中获得20%至35%的卡路里。如果一天消耗2,000卡路里,这等同于每天消耗约44至77克脂肪。低脂肪食物还可选自全麦面粉和面包、燕麦片、高纤维早餐谷类、干的豆和扁豆、胡桃、鲱鱼、鲭鱼、沙丁鱼、腌鱼、皮尔彻德鱼、鲑鱼和瘦白肉。

[0127] 在本发明的一个方面,饮食的改变包括生酮饮食,该生酮饮食提供足够蛋白质供身体生长和修复,并且提供足够的卡路里以维持符合年龄和身高的正确体重。

[0128] 通过排除高碳水化合物食物(诸如淀粉性水果和蔬菜、面包、面食、谷物和糖),同时增加高脂肪食物(诸如坚果、奶油和黄油)的消耗,可实现生酮饮食。被称为中链甘油三酯(MCT)生酮饮食的传统饮食的变体使用富含MCT的椰子油形式来提供约一半的卡路里。由于在此饮食变体中需要较少的总脂肪,因此可消耗更大比例的碳水化合物和蛋白质,从而允许更多的食物选择。在本发明的一个方面,饮食的改变包括改为生酮饮食。在一个实施方案中,生酮饮食每天消耗不超过20g碳水化合物。

[0129] 在本发明的一个方面,饮食的改变包括改为地中海式饮食。

[0130] 在一个实施方案中,所述地中海式饮食的脂肪较高,可包括间歇空腹。例如,在典型的地中海国家/地区,早餐可能被跳过,而是可以早餐加午餐的等量卡路里吃一顿丰盛的午餐。

[0131] 地中海式饮食通常包含每日三至九份蔬菜、半份至两份水果、一至十三份谷物和至多八份橄榄油。在一个实施方案中,其包含约不小于9300kJ热量。在一个实施方案中,其包含不超过37%的总脂肪(具体地讲是单不饱和脂肪不少于18%并且饱和脂肪不超过9%)。在一个实施方案中,其包含每天不少于33g纤维。

[0132] 例如,Davis等人描述了地中海式饮食的食物类型和摄入量以及营养物质含量(Reference Definition of the Mediterranean Diet:A Literature Review,Davis et al.,Nutrients,7(11),9139-9153,2015)(地中海式饮食的参考定义:文献综述,Davis等人,《营养学》,第7卷第11期,第9139-9153页,2015年);

[0133] 在本发明的一个方面,饮食的改变包括改为中度低碳水化合物饮食,以维持或达到全天的正常血糖水平。在一个实施方案中,中度低碳水化合物饮食每天消耗20g至50g碳水化合物。相比之下,标准饮食是每天消耗约50g至100g碳水化合物。

[0134] 在本发明的一个方面,饮食的改变包括改为全素饮食。通常,全素饮食在宏量营养素和微量营养素组合物中平衡良好,并且得到全天较低的平均血糖水平。全素饮食是基于植物的饮食方案,不包括肉、蛋、乳制品和任何其它动物来源食物和成分。

[0135] 相比之下,素食饮食强调基于植物的食物,但也可包括乳制品、蛋、蜂蜜和鱼。只要适当选择足以满足蛋白质、铁、n-3脂肪酸、碘、锌、钙和维生素B12的营养要求的基于植物的食物,全素饮食和素食饮食对于所有生命阶段均可健康的。在习惯性的平衡杂食饮食中交替的间歇性全素饮食方案也可满足这些营养要求。

[0136] 在本发明的一个方面,饮食改变包括补充旨在改善葡萄糖管理的基本营养物质,诸如必需氨基酸、脂质和水溶性维生素、矿物质或营养物质的组合。

[0137] 必需营养物质的示例为:氨基酸(苯丙氨酸、缬氨酸、苏氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸和组氨酸);脂肪酸( $\alpha$ -亚油酸( $\omega$ -3脂肪酸)和亚油酸( $\omega$ -6脂肪酸));维生素(维生素A、维生素B族(1-12)、维生素C、维生素D、维生素E);矿物质,诸如“主要

矿物质”(钙、磷、钾、钠、氯和镁)和“微量矿物质”(诸如铁、锌、锰和铜等金属);以及症状型营养物质(胆碱、肌醇、牛磺酸、精氨酸、谷氨酰胺和核苷酸)。

[0138] 在本发明的一个方面,饮食的改变与体育活动计划管理相关联。所述体育活动计划应适应于个体的身体成分、医疗状况和年龄,旨在减轻体重或管理体重,以及改善身体脂肪质量和瘦质量,以获得最佳葡萄糖管理结果。

[0139] 例如,该解决方案可为体育活动计划的一部分,该计划使用学生的所有机会进行体育活动,满足国家建议的每天体育活动分钟数(例如,每天60分钟的中度到剧烈体育活动)。例如,该计划可遵循针对儿童和青少年体力活动的公共健康指导方针(例如,英国国家健康与保健卓越研究所:<https://www.nice.org.uk/guidance>)。

[0140] 本发明的一个方面还包括在改变个体的生活方式之后重复预测个体IR水平步骤的步骤。

[0141] 本发明还提供了包括用于测量青春前期个体的生物流体中的乳酸、组氨酸、柠檬酸、3-D-羟基丁酸、赖氨酸、甘氨酸和肌酸水平的装置的部件套盒。

[0142] 本发明还提供了本发明的部件套盒用于预测青春前期个体在青春期和/或成年期具有IR或发展成前驱糖尿病的用途。

[0143] 实施例

[0144] 实施例1

[0145] 研究中使用的方法

[0146] 研究群体

[0147] EarlyBird糖尿病研究纳入了1995/1996年出生的同期群,于2000/2001年招募,当时儿童年龄为5岁(307个儿童,170个男孩)。来自EarlyBird同期群的数据集合由从5岁至16岁每年测量的若干临床和人体测量变量组成。该研究根据第二次赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki II)的道德准则执行;道德批准由普利茅斯地方研究道德委员会(Plymouth Local Research Ethics Committee)(1999年)授予,父母出具书面同意书并且儿童口头同意。

[0148] 在一定年龄保持良好的同期群之后,一些年轻人将开始离家以开启自己的生活。随访研究从2013年6月进行准备,并且在2015年2月至2016年夏季开始研究访视。总共178名Earlybird参与者作为成人(平均年龄20岁)完成了该随访访视,其中使用经调整的研究方案收集数据。

[0149] 人体测量参数

[0150] BMI来源于身高(Leicester身高测量;英国伦敦儿童生长基金会(Child Growth Foundation,London,U.K.))和体重(Tanita Solar 1632电子秤)的直接测量,以盲重复方式进行并取平均值。BMI SD评分根据英国1990年标准来计算。

[0151] 使用加速度计(Acti-Graph[之前为MTI/CSA])从5岁起每年进行体育活动测量。要求儿童在每个年度时间点连续佩戴加速度计7天,并且仅使用捕获至少4天的记录。

[0152] 使用通风流经罩技术(气体交换测量,英国曼彻斯特Nutren科技有限公司(Nutren Technology Ltd,Manchester,UK)),通过间接量热法测量静息能量消耗。据报告,性能测试显示在测量氧气消耗方面的平均误差为 $0.3 \pm 2.0\%$ ,并且二氧化碳生产的平均误差为 $1.8 \pm 1\%$ 。在至少6小时的过夜空腹期之后,在安静的热中性室( $20^{\circ}\text{C}$ )中进行测量,以最小化归

因于食物热效应的任何效应。收集至少10分钟的数据,并且计算呼吸商(RQ)作为基础代谢率(BMR)的指标。

#### [0153] 临床参数

[0154] 在过夜空腹期之后,每年将周边血液收集到EDTA管中,并保存在-80℃下。每年使用已在儿童中得到验证的稳态模型评估程序(HOMA-IR)由空腹血糖(Cobas Integra 700分析仪,罗氏诊断公司(Roche Diagnostics))和胰岛素(DPC IMMULITE)(与胰岛素原的交叉反应性,1%)来测定胰岛素抗性(IR)。

#### [0155] 血清代谢组学

[0156] 将400μL血清与含有1mM的3-(三甲基甲硅烷基)-[2,2,3,3-2H<sub>4</sub>]-1-丙酸钠(TSP,化学位移参考δH=0.0ppm)的200μL氘代磷酸盐缓冲溶液0.6M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>混合。将550μL混合物转移到5mm NMR管中。

[0157] 用配备5mm冷冻探针且温度为310K的Bruker Avance III 600MHz光谱仪(德国莱茵斯泰腾的布鲁克拜厄斯宾公司(Bruker Biospin,Rheinstetten,Germany))获取血清样品的<sup>1</sup>H NMR代谢谱,并使用TOPSPIN(2.1版,德国莱茵斯泰腾的布鲁克拜厄斯宾公司(Bruker Biospin,Rheinstetten,Germany))软件包进行处理,如前所述。使用32次扫描和98000个数据点获得标准<sup>1</sup>H NMR一维脉冲序列(具有水抑制)、Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)自旋回波序列(具有水抑制)和扩散编辑序列。将光谱数据(从δ0.2到δ10)导入分辨率为22000个数据点的Matlab软件(R2013b版,美国马塞诸塞州纳蒂克的迈斯沃克公司(Mathworks Inc,Natwick MA)),并在去除溶剂峰后归一化为总面积。从后续分析中丢弃质量差或高度稀释的光谱。

[0158] 人类血浆的<sup>1</sup>H-NMR光谱能够监测与甘油三酯、磷脂和胆固醇酯中存在的脂蛋白结合的脂肪酰基相关的信号,以及来自甘油三酯的甘油基和磷脂酰胆碱的胆碱头基的峰。此数据还涵盖血液中存在的主要低分子量分子的定量分析。基于内部数据库,整合了<sup>1</sup>H CPMG NMR光谱上可分配的代谢物的代表性信号,包括天冬酰胺、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-酮丁酸、3-甲基-2-氧代乙酸、α-酮异戊酸、(R)-3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、精氨酸、赖氨酸、乙酸、N-乙酰糖蛋白、O-乙酰基糖蛋白、乙酰乙酸、谷氨酸、谷氨酰胺、柠檬酸、二甲基甘氨酸、肌酸、瓜氨酸、三甲胺、N-氧化三甲胺、牛磺酸、脯氨酸、甲醇、甘氨酸、丝氨酸、肌酸酐、组氨酸、酪氨酸、甲酸、苯丙氨酸、苏氨酸和葡萄糖。此外,在扩散编辑光谱中,整合了与不同脂质类别相关的信号,包括含有胆碱、VLDL亚型、不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的磷脂。信号以对应于归一化为总代谢谱的峰面积的任意单位表达,这代表血清中代谢物浓度的相对变化。

#### [0159] 基于质谱法的血清氨基酸测定

[0160] 使用通过UPLC-MS/MS对人类血浆和血清中的氨基酸进行的内部自动定量方法对所选样品进行血清氨基酸定量。简而言之,在沉淀、衍生化和稀释步骤之后,将样品提交到与质谱分析(Xevo TQ-XS三重四极杆,沃特世(Waters))偶联的液相色谱(Acquity I类,沃特世)。对于色谱分离,梯度由甲酸铵的流动相(0.55g/L甲酸铵水溶液,0.1%甲酸)和乙腈的第二流动相(乙腈0.1%甲酸)组成。分析物浓度由化合物与其对应内标的峰面积比计算得出。结果以μM表示。使用MassLynx软件中包括的TargetLynx功能中的AA\_quantitationmeth对峰进行积分。

[0161] 统计学分析

[0162] 结果变量IR的分布是偏斜的,因此进行对数转换以用于分析。对于中试和主要研究分析,同时使用所有年龄的数据,使用混合效应建模来评估IR (HOMA-IR) 与个体代谢物之间的关联,考虑年龄、BMI sds、体力活动和青春期时间表 (APHV)。包括随机截取以及年龄(被分类以允许IR随时间的非线性变化)、性别、DEXA%脂肪、APHV、MVPA (中度至剧烈体力活动的分钟数) 和单独代谢物 (在单独的模型中) 作为固定效应。

[0163] 本发明人对5岁至14岁的40名参与者的子集进行了第一项研究 (中试研究), 并且对5岁至16岁的150名参与者的另一个子集评估了可重复性 (主要研究)。本发明人对5岁至14岁的40名参与者的子集进行了第一项研究 (中试研究), 并且对5岁至16岁的150名参与者的另一个子集评估了可重复性 (主要研究)。在中试研究中,基于在5岁和14岁之间的每个时间点具有可用于分析的全套样品选择40名个体 (20名男孩), 在5岁和14岁时按IR进行分层。在主要研究中,选择150名个体以包括在研究过程中的一个或多个时间点显示空腹血糖异常的所有个体。仅28名儿童参与了两项研究。将表现出空腹血糖异常的个体进行性别匹配,从而选出105名男孩和45名女孩。

[0164] 为了进一步评估哪个IR相关的代谢物可能是IR轨迹的早期指标,本发明人根据14岁至16岁年龄范围内的低或高IR状态将主要研究群体进行分层。随意地,HOMA-IR分布的第91百分位数被用作定义具有高IR状态的儿童的阈值。此处,使用混合效应建模来评估IR与单个代谢物之间的关联。在R软件 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)) 中使用软件包lme4 (Bates、Maechler等人,2015年) 中的lmer函数进行建模,并且使用在lmerTest软件包 (Kuznetsova、Brockhoff等人,2016年) 中实现的Satterthwaite近似来计算p值。

[0165] 实施例2[0166] 代谢物浓度的测量

[0167] 中试研究中儿童在5岁和14岁时的临床特征和人体测量特征汇总于表1中,并且主要研究中5岁、14岁和16岁时的特征汇总于表2中。在两种性别中,HOMA-IR在最大约8岁时降低,随后在青春期增大,该趋势取决于峰值高度速度的时间表 (年龄\*APHV相互作用 $p < 0.001$ )。IR也与BMI sds正关联 ( $P < 0.001$ )。

[0168] 表1:同期群在5岁和14岁时的特征,按性别分开。

		男孩	女孩
年龄 (岁)	5 岁	5.1 (4.8 – 5.3)	4.8 (4.7 – 5.0)
	14 岁	13.9 (13.6 – 14.1)	13.8 (13.7 – 14.1)
BMI sds	5 岁	-0.04 (-0.50 – 0.72)	0.40 (0.04 – 0.80)
	14 岁	0.43 (-0.13 – 1.29)	0.78 (-0.05 – 1.48)
中度至剧烈体力活动 (分钟/天)	5 岁	46.1 (34.1 – 67.1)	55.1 (44.9 – 62.5)
	14 岁	52.4 (29.7 – 77.0)	42.7 (29.3 – 51.4)
处于峰值高度速度的年龄 (岁)		13.4 (12.9 – 13.8)	11.9 (11.1 – 12.5)
IR (HOMA2-IR)	5 岁	0.47 (0.37 – 0.84)	0.85 (0.34 – 1.02)
	14 岁	1.25 (0.56 – 1.63)	0.98 (0.78 – 2.23)

[0170] 数据为中值 (四分位数范围)

[0171] 表2:主要同期群在5岁、14岁和16岁时的特征,按性别分开。

		男孩	女孩	
[0172]	年龄 (岁)	5 岁	4.8 (4.7 – 5.0)	4.9 (4.8 – 5.1)
		14 岁	13.8 (13.6 – 14.0)	13.9 (13.8 – 14.0)
		16 岁	15.8 (15.6 – 16.0)	15.9 (15.8 – 16.1)
	BMI sds	5 岁	0.09 (-0.48 – 0.80)	0.36 (-0.49 – 1.16)
		14 岁	0.32 (-0.64 – 0.98)	0.85 (0.21 – 1.60)
		16 岁	0.44 (-0.31 – 1.32)	0.70 (0.03 – 1.60)
	中度至剧烈体力活动 (分钟/天)	5 岁	53.1 (41.6 – 64.1)	40.1 (31.9 – 51.6)
		14 岁	44.4 (30.7 – 63.14)	35.3 (18.4 – 50.4)
		16 岁	43.9 (22.5 – 58.6)	27.0 (16.8 – 40.9)
[0173]	处于峰值高度速度的年龄 (岁)	13.0 (12.8 – 13.4)	11.6 (10.8 – 12.3)	
	IR (HOMA2-IR)	5 岁	0.49 (0.22 – 0.74)	0.76 (0.60 – 1.00)
		14 岁	1.00 (0.79 – 1.47)	1.47 (1.00 – 1.70)
		16 岁	0.70 (0.23 – 1.16)	0.84 (0.23 – 1.18)

[0174] 数据为中值(四分位数范围)

[0175] 同时使用所有年龄的数据,应用混合效应模型来评估HOMA-IR与个体代谢物之间的关联。在中试研究中,包括BCAA、脂质和其他氨基酸在内的若干种代谢物在纵向模型中显示出与HOMA-IR的显著关联( $P < 0.05$ ),而与BMI sds、体力活动和青春期时间表无关,如表3所示。表4报告了对主要研究同期群进行的相同分析的结果。

[0176] 表3:在中试研究中,用于检查代谢物与胰岛素抗性之间的关联的混合效应模型的估计值和p值( $n=40$ )

	代谢物	代谢途径	系数	SE	p 值
[0177]	柠檬酸	糖酵解相关	-0.132	0.028	0.000003
	磷脂	脂质	-0.131	0.031	0.000038
	3-D-羟基丁酸	酮体	-0.106	0.027	0.000126
	肌酸	有机酸	-0.095	0.029	0.001101
	脂质 (主要是 LDL, 脂肪酸 (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> 部分)	脂质	0.087	0.028	0.002272
	乳酸	糖酵解相关	0.067	0.025	0.007194
	赖氨酸	氨基酸	-0.060	0.027	0.025594
	组氨酸	氨基酸	-0.057	0.027	0.036010
	脂质 (主要是 VLDL, 脂肪 酸 (CH <sub>2</sub> ) 部分)	脂质	0.043	0.023	0.061526
	二甲基甘氨酸	氨基酸	-0.046	0.026	0.082072
	甘氨酸	氨基酸	0.007	0.030	0.818118

[0178] 表4:在主要研究中,用于检查代谢物与胰岛素抗性之间的关联的混合效应模型的估计值和p值( $n=150$ )

	代谢物	代谢途径	系数	SE	p 值 (未经 调整)
[0179]	柠檬酸	糖酵解相关	-0.188	0.021	<0.0001
	磷脂	脂质	-0.066	0.024	0.0067

	3-D-羟基丁酸	酮体	-0.092	0.018	<0.0001
	肌酸	有机酸	-0.142	0.023	<0.0001
	脂质 (主要是 LDL, 脂肪酸 (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> 部分)	脂质	0.133	0.023	<0.0001
	乳酸	糖酵解相关	0.101	0.019	<0.0001
[0180]	赖氨酸	氨基酸	-0.139	0.02	<0.0001
	组氨酸	氨基酸	-0.124	0.022	<0.0001
	脂质 (主要是 VLDL, 脂肪 酸(CH <sub>2</sub> )部分)	脂质	-0.12	0.022	<0.0001
	二甲基甘氨酸	氨基酸	-0.118	0.021	<0.0001
	甘氨酸	氨基酸	-0.08	0.026	0.0023

[0181] 分析突出了在氨基酸、酮体、糖酵解和脂肪酸代谢中特定代谢物在描述整个儿童期的HOMA-IR变化方面的重要性。据信这是具体代谢过程以纵向和连续方式对总胰岛素代谢变化的代谢贡献的首次报告。

#### [0182] 中枢能量相关代谢物

[0183] 在中试和主要研究同期群中,混合效应建模描述了IR与柠檬酸和3-D-羟基丁酸总体的负关联 ( $p < 0.001$ ),以及IR与乳酸的正关联 ( $p < 0.01$ )。主要研究的分析描述了柠檬酸的统计学显著的同比相关性,范围从 $r = 0.28$ 到 $r = 0.66$  ( $p < 0.05$ ),而3-D-羟基丁酸在8岁前不显著,然后范围从 $r = 0.21$ 到 $r = 0.58$  ( $p < 0.05$ )。在主要研究中,柠檬酸在5岁至16岁之间的每个横截面时间点处与IR负相关(相关性范围从 $r = -0.21$ 到 $r = -0.52$ ,  $p < 0.05$ )。3-D-羟基丁酸显示与年龄的负横截面相关性(相关性范围从 $r = -0.21$ 到 $r = -0.53$ ,  $p < 0.05$ )。乳酸显示出与IR的正横截面相关性(相关性范围从 $r = 0.13$ 到 $r = 0.45$ ,  $p < 0.05$ )。

#### [0184] 氨基酸代谢

[0185] 混合效应建模确定组氨酸、肌酸和赖氨酸与IR之间的统计学显著的负关联 ( $p < 0.05$ ),其在主要研究中重复 ( $p < 0.001$ )。每种代谢物也显示与IR的负横截面相关性,尤其是在9岁和14岁之间(相关性范围从 $r = -0.17$ 到 $r = -0.46$ ,  $p < 0.05$ )。

#### [0186] 与IR相关联的脂质相关代谢物

[0187] 人类血清的<sup>1</sup>H-NMR谱能够监测与甘油三酯、磷脂和胆固醇酯中存在的脂蛋白结合的脂肪酰基相关的信号,以及来自甘油三酯的甘油基和磷脂酰胆碱的胆碱头基的峰。

[0188] 此处,得自含磷脂胆碱中的甲基脂肪酰基的信号显示出与IR的负关联,而得自LDL颗粒中的甲基脂肪酰基的信号显示出与IR的正关联。脂质信号彼此高度相关(在5岁和13岁之间 $r > 0.8$ ,并且在14岁时 $r = 0.6$ )。在混合效应模型和单个时间点两种情况下的主要研究中也发现了这些关联。IR与磷脂之间的横截面关联是负的并且从7岁起具有统计学显著性(相关性范围为 $r = -0.19$ 至 $r = -0.54$ ),而LDL颗粒中IR与脂肪酰基之间的关联是正的并且在7岁和14岁之间具有统计学显著性(相关性范围为 $r = 0.24$ 至 $r = 0.41$ )。虽然在中试研究中不显著 ( $p = 0.06$ ),但VLDL颗粒中的脂肪酰基在混合效应模型中显示出与IR的正关联,这与在5岁时以及在7岁和14岁之间为正且统计学显著的横截面关联一致(相关性范围为 $r = 0.25$ 至 $r = 0.46$ )。

#### [0189] 实施例3

#### [0190] 指示青少年期较高HOMA-IR的代谢物

[0191] 对于显示出随时间推移与IR显著关联的每种代谢物,本发明人进一步评估了在14岁至16岁的年龄范围内其血清浓度是否提供低或高IR状态的信息。随意地,HOMA-IR分布的第91百分位数被用作定义具有高IR状态的儿童的阈值(表5)。还进一步探索了在对儿童期的HOMA-IR变化贡献最大的代谢物中,哪些代谢物可能是青少年期较高HOMA-IR的更早且更具指示性的指标。

[0192] 表5:用于检查代谢物与HOMA-IR组之间的关联的混合效应模型的估计值和p值

	代谢物	p 值 组差异	p 值 年龄: 组相互作用
	柠檬酸	<0.01	NS
[0193]	磷脂	<0.001	NS
	3-D-羟基丁酸	<0.05	NS
	脂质(主要是 LDL, 脂肪酸 (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> 部分)	<0.01	NS
	乳酸	<0.001	NS
	组氨酸	<0.05	NS
	赖氨酸	<0.01	NS
	脂质(主要是 VLDL, 脂肪 酸(CH <sub>2</sub> )部分)	<0.01	NS
[0194]	肌酸	0.56	<0.05
	甘氨酸	<0.01	NS
	肌酸:甘氨酸比	<0.05	<0.001

[0195] 因此,在儿童期导致高HOMA-IR的最有影响的生化物质中,分析表明:

[0196] • 混合效应建模鉴定出高IR状态与乳酸、LDL和VLDL颗粒中的脂肪酰基、以及肌酸:甘氨酸比之间随时间推移的显著正关联。

[0197] • 发现高IR状态与柠檬酸、组氨酸、3-D-羟基丁酸、甘氨酸、肌酸、赖氨酸和磷脂之间随着时间推移的显著负关联。

[0198] • 在高IR组中,脂肪量(腰围)也是随时间推移增大的统计学显著变量( $p < 0.001$ ),并且年龄与组之间存在显著相互作用( $p < 0.001$ )。

[0199] Mayer Davis等人最近报告,美国青少年(10岁至19岁)1型糖尿病和2型糖尿病的年发病率均显著增大(Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012, The New England Journal of Medicine, 376:1419-1429, 2017(青少年1型和2型糖尿病发病趋势, 2002-2012《新英格兰医学杂志》, 第376期, 第1419-1429页, 2017年))。众所周知,种族和民族群体之间存在着差异。如Mayer Davis等人所指出的,作为示例,这包括美国非西班牙裔白人以外的种族和民族群体中2型糖尿病发病率的相对较高增大。跨人口统计学亚组的变化可反映导致糖尿病的遗传因素、环境因素和行为因素的不同组合。因此,应为提出的标志物相应地生成参考值。

[0200] 例如,在本研究同期群中,各组之间的变化倍数根据群体确定并且在代表性年龄处提供(表6)。

[0201] 表6:与参考组相比,高HOMA-IR个体的变化倍数(百分比)

[0202]	年龄	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00	13.00	14.00	15.00	16.00
	乳酸	11.68	4.89	11.50	8.52	13.14	13.50	12.01	18.69	13.19
[0203]	赖氨酸	1.32	0.52	6.13	-2.77	-4.62	-0.02	-6.82	-3.61	2.47
	柠檬酸	-4.66	-7.23	-5.50	-7.28	-6.13	-6.66	-16.67	-2.42	-1.07
	肌酸	-10.87	0.28	-3.78	-13.86	-6.72	-0.57	-10.57	-3.43	2.83
	甘氨酸	-3.83	-5.92	-7.94	-4.48	-10.02	-11.62	-15.75	-10.49	-6.74
	组氨酸	2.99	-6.44	-1.70	-3.22	-3.96	-9.30	-8.46	-3.54	-5.27

[0204] 5岁儿童超重或肥胖的群体在整个青春期和青少年期保持并进一步发展成脂肪量过度增加和体重过度增加,并且具有比其他儿童更高的HOMA-IR。具体地讲,在青少年期处于HOMA-IR的第91百分位数的个体的血清从9岁起具有特别显著较低的组氨酸浓度,这对应于IR轨迹在各组之间发散的时间段。他们还在整个儿童期表现出较高的体脂和中心性肥胖(腰围)。Earlybird群体的组氨酸状态与每个年龄的C-反应蛋白水平负关联。

[0205] 我们的结果还描述了循环磷脂物质在整个儿童期、生长和发育中的重塑。这是在IR和T2D领域中被充分证明的现象(Szymanska、Bouwman等人,2012年),但在儿童期不涉及生长、发育和脂肪增加过量。磷脂物质的重塑通常与已在若干疾病(例如糖尿病、脉管疾病和肥胖症)中报告的与氧化应激相关的醚-脂质(缩醛磷脂)的浓度降低相关。

[0206] 组氨酸和赖氨酸是氧化修饰的两个代表性靶标。组氨酸对金属催化的氧化极为敏感,产生2-氧代-组氨酸及其环断裂产物,而赖氨酸的氧化产生羰基产物,诸如氨基己二酸半醛。另一方面,组氨酸和赖氨酸都是亲核氨基酸,并且因此容易被由脂质过氧化得到的亲电试剂(诸如由脂质过氧化得到的2-烯醛、4-羟基-2-烯醛和酮醛)修饰。组氨酸显示对2-烯醛和4-羟基-2-烯醛的特异性反应性,而赖氨酸是醛的普遍靶标,从而产生各种类型的加合物。反应性醛与组氨酸和赖氨酸的共价结合与羰基反应性和蛋白质抗原性的出现关联。这些氨基酸都不是成人肥胖个体中IR的报告标志物。在患有代谢综合征的肥胖成年女性中,组氨酸和精氨酸状态与炎症和氧化应激反应关联(Niu、Feng等人,2012年)。此外,组氨酸补充被认为通过减轻患有代谢综合征的肥胖妇女的炎症来改善IR(Feng、Niu等人,2013年)。

[0207] 由于低效脂解(高基础/低刺激)与未来体重增加和葡萄糖代谢降低相关并且可构成治疗靶标(Arner、Andersson等人,2018年),因此我们的观察表明,在生长和发育过程中有独特的营养需求以促进健康的脂肪代谢。在Earlybird同期群中,5岁的超重儿童在整个儿童期保持超重,并且将在青春期发育和额外脂肪量的发育期间从10岁期获得高IR状态。因此,我们对与组氨酸、赖氨酸和精氨酸状态负关联的观察结果可能指示在生长和发育过程中氧化应激反应和脂肪细胞脂解的潜在失调,这伴随或促成IR发展。

[0208] 实施例4

[0209] 青春期的氨基酸和HOMA-IR状态与成年期的HOMA-IR状态相关

[0210] 对于胰岛素和HOMA-IR两者,使用斯皮尔曼相关性分析,本发明人描述了儿童和青少年中的胰岛素和HOMA-IR状态如何与整个儿童期和青春期从11岁起的成人状态一致地显著统计学关联(表7)。因此,对儿童期HOMA-IR变化贡献最大的代谢物是儿童期较高HOMA-IR的更多指标,是成年期高HOMA-IR状态的相关标志物。

[0211] 表7:儿童期个体参数与同一个体20岁时的参数之间的斯皮尔曼相关系数

	读数 (n=141)	16岁	15岁	14岁	13岁	12岁	11岁
[0212]	胰岛素	0.2208 (p<0.001)	0.1893 (p<0.05)	0.3109 (p<0.001)	0.2579 (p<0.001)	0.1894 (p<0.05)	0.2126 (p<0.01)
	HOMA1	0.2366	0.1992	0.3142	0.2606	0.1904	0.2235
	IR	(p<0.01)	(p<0.05)	(p<0.001)	(p<0.001)	(p<0.05)	(p<0.01)

[0213] 图例:斯皮尔曼相关性分析,数据为r系数,p值,\*95%CI,\*\*99%CI,\*\*\*99.9%CI

[0214] 此外,在15岁和20岁收集的同一健康个体的血清样品中进行氨基酸的定量测量,以提供关于健康参考范围的指导。

[0215] 表8:参考个体组中的参考氨基酸浓度(N=168)

		以微摩尔计的代谢物浓度(平均值±标准偏差)	
[0216]	标志物	15岁	20岁
	组氨酸	92 ± 14	90 ± 15
[0217]	赖氨酸	174 ± 39	177 ± 48
	甘氨酸	304 ± 67	279 ± 64

[0218] Amed,S.,N.Islam,J.Sutherland and K.Reimer(2018).“Incidence and prevalence trends of youth-onset type 2 diabetes in a cohort of Canadian youth:2002-2013.”Pediatr Diabetes 19(4):630-636.

[0219] Bates,D.,M.Maechler,B.Bolker and S.Walker(2015).“Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4.”Journal of Statistical Software 67(1):1-48.

[0220] Guasch-Ferre,M.,A.Hruby,E.Toledo,C.B.Clish,M.A.Martinez-Gonzalez,J.Salas-Salvado and F.B.Hu(2016).“Metabolomics in Prediabetes and Diabetes:A Systematic Review and Meta-analysis.”Diabetes Care 39(5):833-846.

[0221] Kuznetsova,A.,P.B.Brockhoff and R.H.B.Christensen(2016).“lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models.R package version 2.0-30.[https://CRAN.R-project.org/package=lmerTest.](https://CRAN.R-project.org/package=lmerTest)”

[0222] Lauria,M.,M.Persico,N.Dordevic,O.Cominetti,A.Matone,J.Hosking,A.Jeffery,J.Pinkney,L.Da Silva,C.Priami,I.Montoliu and F.P.Martin(2018).“Consensus Clustering of temporal profiles for the identification of metabolic markers of pre-diabetes in childhood(EarlyBird 73).”Sci Rep 8(1):1393.

[0223] Martin,F.J.,I.Montoliu and M.Kussmann(2017).“Metabonomics of ageing-Towards understanding metabolism of a long and healthy life.”Mech Ageing Dev

165 (Pt B) :171-179.

[0224] Mayer-Davis,E.J.,D.Dabelea and J.M.Lawrence (2017) .“Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths,2002-2012.”N Engl J Med 377 (3) : 301.

[0225] Pinkney,J.,A.Streeter,J.Hosking,M.Mohammad,A.Jeffery and T.Wilkin (2014) .“Adiposity,chronic inflammation,and the prepubertal decline of sex hormone binding globulin in children:evidence for associations with the timing of puberty (Earlybird 58).”J Clin Endocrinol Metab 99 (9) :3224-3232.

[0226] Riedl,A.,C.Gieger,H.Hauner,H.Daniel and J.Linseisen (2017) . “Metabotyping and its application in targeted nutrition:an overview.”Br J Nutr 117 (12) :1631-1644.

[0227] Sperisen,P.,O.Cominetti and F.P.Martin (2015) .“Longitudinal omics modeling and integration in clinical metabonomics research:challenges in childhood metabolic health research.”Front Mol Biosci 2:44.

[0228] Zhao,X.,X.Gang,Y.Liu,C.Sun,Q.Han and G.Wang (2016) .“Using Metabolomic Profiles as Biomarkers for Insulin Resistance in Childhood Obesity:A Systematic Review.”J Diabetes Res 2016:8160545.