



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039134 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280039113. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 06. 10

A01N 1/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/00 (2006. 01)

61/495, 955 2011. 06. 10 US

G01N 31/00 (2006. 01)

61/650, 353 2012. 05. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/041792 2012. 06. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/170974 EN 2012. 12. 13

(71) 申请人 宾夕法尼亚大学董事会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 E·R·莫勒 J·S·摩尔 L·张

W·罗杰斯 A·D·班特雷

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

代理人 赵蓉民

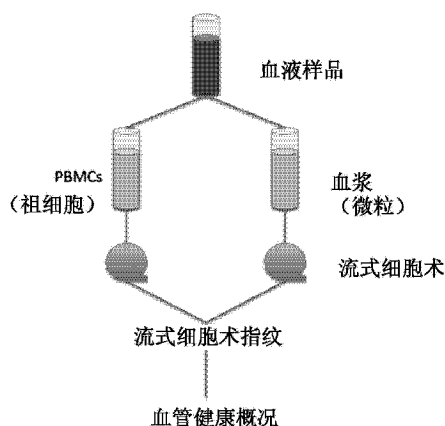
权利要求书2页 说明书32页 附图27页

(54) 发明名称

细胞组学血管健康概况分析的系统和方法

(57) 摘要

本发明涉及确定对象中血管健康的方法。该方法包括以下步骤：从对象获得生物样品；基于生物样品中至少一组微粒的水平获得微粒数据；基于生物样品至少一组祖细胞的水平获得祖细胞数据；基于微粒和祖细胞数据产生生物样品的流式细胞术指纹；和基于产生的流式细胞术指纹确定对象的血管健康。



1. 确定对象中血管健康的方法,包括:
从所述对象获得生物样品;
基于所述生物样品中至少一组微粒的水平获得微粒数据;
基于所述生物样品至少一组祖细胞的水平获得祖细胞数据;
基于所述微粒和祖细胞数据产生所述生物样品的流式细胞术指纹;和
基于所述产生的流式细胞术指纹确定所述对象的所述血管健康。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述至少一组微粒的所述水平通过流式细胞术测量。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述生物样品是血浆样品。
4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述对象是具有银屑病的对象。
5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述对象是具有狼疮的对象。
6. 权利要求 1 所述的方法,其中所述对象是具有已知 CVD 风险因素的对象。
7. 权利要求 1 所述的方法,其中所述对象是没有已知 CVD 风险因素的对象。
8. 权利要求 1 所述的方法,其中所述对象是糖尿病对象。
9. 权利要求 1 所述的方法,其中所述对象是糖尿病对象。
10. 权利要求 9 所述的方法,其中所述对象是 1 型糖尿病对象。
11. 权利要求 9 所述的方法,其中所述对象是 2 型糖尿病对象。
12. 权利要求 1 所述的方法,其中所述祖细胞是内皮祖细胞 (EPCs)。
13. 权利要求 1 所述的方法,其中当至少一个微粒组的水平上调时,所述对象处于心血管疾病或血管机能异常的风险或使心血管疾病或血管机能异常进展的风险。
14. 权利要求 1 所述的方法,其中当至少一个祖细胞组的水平下调时,所述对象处于心血管疾病或血管机能异常的风险或使心血管疾病或血管机能异常进展的风险。
15. 权利要求 1 所述的方法,其中当至少一个微粒组的水平上调和至少一个祖细胞组的水平下调时,所述对象处于心血管疾病或血管机能异常的风险或使心血管疾病或血管机能异常进展的风险。
16. 确定对象中与心血管疾病或血管机能异常相关的风险的方法,包括:
从所述对象获得生物样品;
基于所述生物样品中至少一组微粒的水平获得微粒数据;
基于所述生物样品中至少一组祖细胞的水平获得祖细胞数据;
基于所述微粒和祖细胞数据产生所述生物样品的流式细胞术指纹;和
基于产生的流式细胞术指纹确定与所述对象心血管疾病或血管机能异常相关的风险。
17. 权利要求 16 所述的方法,其中所述至少一组微粒的所述水平通过流式细胞术测量。
18. 权利要求 16 所述的方法,其中所述生物样品是血浆样品。
19. 权利要求 16 所述的方法,其中所述对象是糖尿病对象。
20. 权利要求 19 所述的方法,其中所述对象是 1 型糖尿病对象。
21. 权利要求 19 所述的方法,其中所述对象是 2 型糖尿病对象。
22. 权利要求 16 所述的方法,其中所述祖细胞是内皮祖细胞 (EPCs)。
23. 权利要求 16 所述的方法,其中所述产生的流式细胞术指纹表明细胞损伤。
24. 权利要求 16 所述的方法,其中所述产生的流式细胞术指纹表明内皮完整性、内皮

修复能力的丧失、或其组合。

25. 权利要求 16 所述的方法,进一步包括产生健康对照样品的流式细胞术指纹,和将所述对象的生物样品的所述产生的流式细胞术指纹与所述健康对照样品的所述流式细胞术指纹进行比较。

细胞组学血管健康概况分析的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 6 月 10 提交的美国临时申请序列号 61/495,955 和 2012 年 5 月 22 日提交的美国临时申请序列号 61/650,353 的优先权权益,其全部公开内容通过引用被并入本文,如同每个以其全部在本文中列出。

[0003] 发明背景

[0004] 心血管疾病 (CVD) 在美国是最主要的死亡原因;每 39 秒一个成人死于心脏病发作、中风或其它心血管疾病 (“在美国,高血压和胆固醇失去控制”。疾病控制中心网站。<http://www.cdc.gov/Features/Vitalsigns/CardiovascularDisease/>。2011 年 1 月 31 日更新,2012 年 2 月 6 日访问)。美国 CVD 患病率已经非常高 (36.9% 的成人或约 8 千 1 百万人) 并预测在接下来的 20 年里增加约 10%,到 2030 年估计超过 40% 的成人 (大约 1 亿 1 千 6 百万人) 将患有一种或多种形式的 CVD (Heidenreich et al., 2011, Circulation 123:933-944)。很早以前症状在临床上明显的,新生血管疾病开始于内皮细胞机能异常。当动脉粥样硬化进展到阻塞的血流引起缺血的点时,或当由于破裂或侵蚀,血栓从存在的斑块形成时,有症状的、临床 CVD 事件通常发生 (Heidenreich et al., 2011, Circulation 123:933-944)。

[0005] 令人遗憾地,目前不存在有成本效益的和准确的可确定患者心血管健康的血液测试。相反,心血管风险通常由若干循环生物标记,如高灵敏度 C-反应蛋白 (hsCRP) 和纤维蛋白原进行评估 (Ridker, 2003, Circulation 107:363-369)。由于这些生物标记通常是急性期反应物,因此对于动脉粥样硬化不是特异性的,它们只被推荐给具有心血管事件的中等风险的患者 (Greenland et al., 2010, Circulation 122:e584-e636)。同样,在临床实践中没有可用的生物标记来灵敏地和准确地评价对医学治疗的反应。心血管风险分层的基于弗雷明汉 (Framingham) 的方法没有结合生物标记或遗传异常,因此预测值受限。

[0006] 一个公开的心血管风险算法,雷诺尔德 (Reynolds) 评分,包括 hsCRP,但是,如同弗雷明汉,遗传背景不包括在方案中。实践和预防工作组中基因组应用的评价 (Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention Working Group (EWG)) 发现推荐测试 28 个基因中 219p21 遗传变体或 57 个其它变体以在一般人群中评估 CVD 特别是心脏病和中风风险的证据不充分。EWG 提出来自单独或组合使用这些基因组标记中任何一个的净健康益处的量是可以忽略的 (Evaluation of Genomic Applications in Practice Prevention Working Group, 2010. Recommendations from the EGAPP Working Group: Genomic profiling to assess cardiovascular risk to improve cardiovascular health. Journal 12:839-843 10.1097/GIM.1090b1013e3181f1872c1090)。

[0007] 因此,存在对早期诊断测试未满足的临床需要,该早期诊断测试提供在明显的 CVD 之前心血管健康的测量和治疗干预的评估。本发明通过细胞基试验满足该需要,该细胞基试验基于血管健康概况 (Vascular Health Profile) (VHP) 的建立中祖细胞 (PCs),如内皮祖细胞 (EPCs) 和微粒 (MPs) 的测量而评估心血管状态。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及确定对象中的血管健康的方法。该方法包括以下步骤：从对象获得生物样品；基于生物样品中至少一组微粒的水平获得微粒数据；基于生物样品中至少一组祖细胞的水平获得祖细胞数据；基于微粒和祖细胞数据产生生物样品的流式细胞术指纹 (cytometric fingerprint)；和基于产生的流式细胞术指纹确定对象的血管健康。

[0010] 在一个实施方式中，至少一组微粒的水平通过流式细胞术测量。在另一个实施方式中，生物样品是全血液样品。在另一个实施方式中，生物样品是血浆样品。在另一个实施方式中，对象是具有银屑病的对象。在另一个实施方式中，对象是具有狼疮的对象。在另一个实施方式中，对象是具有已知 CVD 风险因素的对象。在另一个实施方式中，对象是没有已知 CVD 风险因素的对象。在另一个实施方式中，对象是糖尿病对象。在另一个实施方式中，对象是 1 型糖尿病对象。在另一个实施方式中，对象是 2 型糖尿病对象。在另一个实施方式中，祖细胞是内皮祖细胞 (EPCs)。在另一个实施方式中，当至少一个微粒组的水平上调时，对象处于心血管疾病或血管机能异常的风险，或使心血管疾病或血管机能异常进展的风险。在另一个实施方式中，当至少一个祖细胞组的水平下调时，对象处于心血管疾病或血管机能异常的风险，或使心血管疾病或血管机能异常进展的风险。在另一个实施方式中，当至少一个微粒组的水平上调和至少一个祖细胞组的水平下调时，对象处于心血管疾病或血管机能异常的风险，或使心血管疾病或血管机能异常进展的风险。

[0011] 本发明还涉及确定对象中与心血管疾病或血管机能异常相关的风险的方法。所述方法包括以下步骤：从对象获得生物样品；基于生物样品中至少一组微粒的水平获得微粒数据；基于生物样品中至少一组祖细胞的水平获得祖细胞数据；基于微粒和祖细胞数据产生生物样品的流式细胞术指纹；和基于产生的流式细胞术指纹，确定与对象的心血管疾病或血管机能异常相关的风险。

[0012] 在一个实施方式中，至少一组微粒的水平通过流式细胞术测量。在另一个实施方式中，生物样品是血浆样品。在另一个实施方式中，生物样品是全血液样品。在另一个实施方式中，对象是具有银屑病的对象。在另一个实施方式中，对象是具有狼疮的对象。在另一个实施方式中，对象是具有已知 CVD 风险因素的对象。在另一个实施方式中，对象是没有已知 CVD 风险因素的对象。在另一个实施方式中，对象是糖尿病对象。在另一个实施方式中，对象是 1 型糖尿病对象。在另一个实施方式中，对象是 2 型糖尿病对象。在另一个实施方式中，祖细胞是内皮祖细胞 (EPCs)。在另一个实施方式中，产生的流式细胞术指纹指示细胞损伤。在另一个实施方式中，产生的流式细胞术指纹指示内皮完整性、内皮修复能力丧失或其组合。在另一个实施方式中，所述方法进一步包括产生源自一个或多个个体的健康对照样品的流式细胞术指纹和比较对象的生物样品的产生的流式细胞术指纹与健康对照样品的流式细胞术指纹。

[0013] 附图简述

[0014] 为了说明本发明的目的，在附图中描述本发明的某些实施方式。然而，本发明不限于附图中描述的実施方式的精确安排和手段。

[0015] 图 1 是显示用于确定血管健康概况的高通量流式细胞术试验的示意图。血液样品分成外周血单核细胞 (PBMCs) 和血浆。祖细胞在 PBMCs 中鉴定，而微粒在血浆中鉴定。

[0016] 图 2 是 Canto A 上 FSC/SSC 阈值优化的图解。如图 2 所描述的，FSC 和 SSC 阈值由具有不同 FSC 或 SSC 阈值的以中等速度通过机器的 $0.3\ \mu\text{m}$ 小球 (A 排) 或 0.3 、 1 和 $3\ \mu\text{m}$ 小

球（在 FFC/SSC 等值线图上的 B 排和在 SSC-W 直方图上的 C 排）确定。D 和 E 列显示在具有设为 5000 的 FSC 阈值或设为 200 的 SSC 阈值（D 列）以及只有设为 200 的 SSC 阈值和没有 FSC 阈值（E 列）的 FFC/SSC 等值线图和 SSC-W 直方图上 3 个小球的更好的分辨率。设为 200 的 FSC 阈值或设为 200 的 SSC 阈值（F 列）获得更多的背景噪声。设为 200 的 FSC 阈值和没有 SSC（G 列），0.3 μm 小球缺失。对于小颗粒，侧向散射较前向散射是更好的参数。在该研究中为了在 FSC/SSC 等值线和 SSC-W 直方图上的 3 个混合物小球的更好的分辨率，将 FSC 和 SSC 阈值设为 5000 和 200（D 列）。

[0017] 图 3 是 Canto A 上 FSC/SSC PMT 确定的图解。如图 3 所描述的，双重过滤的 PBS 和 0.3 μm 小球用于建立 FSC、SSC PMT。当双重过滤的 PBS 以中等流速通过机器时，接受每秒小于 10 个事件。分别将 FSC 和 SSC 的阈值设为 5000 和 200。利用不同 SSC 电压通过机器上运行的相同样品来确定 FSC 和 SSC PMT。利用 SSC300 和 325，更多的 MPs 丧失，并且 SSC375 和 400 上获得更多的背景噪声。在该研究中，接受 350 的 SSC 电压。由于大量背景噪声，这里未显示 400 的 SSC 电压数据。

[0018] 图 4 是窗口延伸确定的图解。如图 4 所描述的，FACS Canto A Window Extension (WE) 通过以 WE0 至 7 的中等速度运行的 0.3、1 和 3 μm 小球来确定。为了 SSC-W 直方图上 3 个小球的更好的分辨率和低背景噪声，选择 WE0.2。

[0019] 图 5 是 Canto A 上样品检测中窗口延伸 0.2 和 7 的比较。如图 5 所描述的，将 PFP 用 FITC-Annexin（或 CD31）、PerCP-Cy5.5-CD41、PE-CD105（或 CD144）、APC-CD64 染色和在 WE0.2 或 7 上运行。当固定数目的 3 μm 小球（100,000）被计数时停止捕获。将 A 排在点图上用设为 0.2 的 WE 门控（gated）在小于约 1 μm 上。将 B 排在点图上用设为 7 的 WE 门控在小于约 1 μm 上。在 SSC-W 直方图上用 WE0.2 将 C 排门控在小于约 1 μm 上和用 WE7 将 D 排门控在小于约 1 μm 上。利用 WE7 采集更多的背景噪声和更少的阳性颗粒（B 排和 D 排）。

[0020] 图 6 是门控策略的图解。如图 6 所描述的，0.3、1 和 3 μm 小球用于估计 MPs 大小（Canto A 上的 A 和 B 以及 Gallios 上的 C）。将 MPs 门控在小于约 1 μm 上（Canto 上在 SSC-W 直方图上门控的 D 和在 FSC/SSC 点图上的 E 以及 Gallios 上的 F）。对于 Canto A 设置，分别将前向和侧向散射阈值设为 5000 和 200，和将窗口延伸设为 0.2。对于 Gallios 设置，将 FS 的鉴别器值设为 1，前向散射采集角是 W2。

[0021] 图 7 是抗体优化的图解。如图 7 所描述的，500 μl 双重过滤的 PBS 中用于 MP 检测的相同体积的抗体在 Canto A 上运行。未过滤的抗体（A 排）较双重过滤的抗体（B 排）显示更多的假阳性事件。用于 MPs 检测的所有试剂应当通过 0.1–0.22 μm 低蛋白结合过滤器进行双重过滤以从运行缓冲液去除抗体聚集物和背景噪声。

[0022] 图 8 是抗体优化的进一步图解。如图 8 所描述的，将 50 μl PFP 用未过滤的抗体（A 和 C 排）和双重过滤的抗体（B 和 D 排）标记。将 A 和 B 排在 SSC-W 直方图上门控在小于 1 μm 上。将 C 和 D 排在 FSC 和 SSC 点图上门控在小于 1 μm 上。预先过滤抗体有助于通过去除抗体聚集而减少假阳性颗粒。

[0023] 图 9 是 Canto A 和 Gallios 上 MP 检测的图示。如图 9 所描述的，在 Canto 和 Gallios 上检测 MPs。在 Canto（A 排）和 Gallios（B 排）上将 MPs 门控在小于 1 μm 上。基于荧光扣除对照（fluorescence minutes one）（FMO）管确定阳性 MPs。

[0024] 图 10 是 BD Canto A 和 BC Gallios 的比较。如图 10 所描述的，计算的斯皮尔曼

等级相关用于在两个平台之间比较 MP 计数,大多数相关超过 0.8,除了显示 0.6 相关的 CD105(+) ($P < 0.05$)。Gallios 上 MPs 计数大于 Canto A 上两倍。A 排显示两个平台的相关,而 B 排显示两个平台上 MPs 数目的比较。

[0025] 图 11 是用于 MP 分析的门控策略的图解。MPs 通过小于约 $1\ \mu\text{m}$ 的校准器小球限定的 FSC/SSC 图上的 P1 区上第一门控进行鉴定 (A 和 B)。微粒的来源通过针对源自内皮的 MPs (C) 的 Annexin-V 和 CD144、针对源自血小板的 MPs (D) 的 Annexin-V 和 CD41、针对源自单核细胞的 MPs (E) 的 Annexin-V 和 CD14 的共表达而鉴定。

[0026] 图 12 是显示与抑制素应用相比低密度脂蛋白水平 (图 A) 和 EPO 水平 (图 B) 的散布图 (具有中线) 图解。LDL, 低密度脂蛋白胆固醇; EPO, 促红细胞生成素; H, 健康的; ES, 早期糖尿病; LT, 长期糖尿病。

[0027] 图 13 是 CD34+PCs、板基试验的 nM PS+MPs 以及 nM PS+MPs /CD34+PCs 比的散布图 (具有中线) 和显著性的图解。KW 计算的 P。H, 健康的; ES, 早期糖尿病; LT, 长期糖尿病; MP, 微粒; PC, 祖细胞。

[0028] 图 14 是 ELISA 板 MPs、流式细胞术测量的 CD34 细胞和比的中间水平的图解。插入表显示与“非细胞”动脉粥样硬化生物标记的比较。

[0029] 图 15 是用于 EPC 分析的门控策略的图解。用于 EPCs 的连续门控策略由门控以下组成: (a) 活力 (viable) 事件 (上面的左图), 在红色虚线下面; (b) 与淋巴细胞一致的大小区域中的细胞 (下面的右图), 红色椭圆形内; (c) 单峰事件 (下面的左图), 黑色多边形内; 和最后 (d) 对谱系标记 CD3、CD19 或 CD33 阴性和对 CD45 暗至阴性的事件 (下面的右图), 彩色显示的左下象限内。使用的活力标记是碘化丙啶 (Propidium Iodide), 在 PE-A 通道上检测的 (上面的左图)。门控是完全自动的, 并且无需操作员干预而单独地应用于每个样品。

[0030] 图 16 是原始的 (未门控的) 微粒分布的图解。显示未门控的、任意选择的样品中的微粒分布。显示 7 个荧光参数加侧向散射宽度的所有配对组合。

[0031] 图 17 也是原始的 (未门控的) 微粒分布的图解。针对 $1\ \mu\text{m}$ 以下的颗粒门控之后, 显示图 16 中描述的相同样品。

[0032] 图 18 是单变量微粒分布的图解。聚集个体微粒数据组。相对于侧向散射 (y 轴) 绘制 (x 轴) 关于每个荧光参数的事件分布。这些分布上重叠的是单变量分布的核心密度估计 (黑色曲线)。代表阳性标记表达的阈值通过这些分布的检查来选择 (垂直的黑线)。

[0033] 图 19 是另一个原始的 (未门控的) 微粒分布的图解。在针对 $1\ \mu\text{m}$ 以下的颗粒和针对以在阳性表达阈值以上的水平表达至少一个标记的颗粒门控之后, 显示图 16 和 17 中描述的相同样品 (如图 18 所示)。

[0034] 图 20 是通过与 HC 相比以显著低的浓度存在于 DM 的流式细胞术指纹确定的 EPCs 亚型的图解。将个体 HC 数据集聚集并利用双指数变换在三个二变量图中显示为彩色分布。将 CF 发现的指纹面元 (bin) 中与 DM 相比在 HC 中更强地表达的事件 ($P < 0.001$) 显示为黑点。利用荧光扣除对照 (FMO) 对每个个体样品确定每个显示的标记 (CD31、CD24 和 CD133) 的阳性表达阈值, 并显示它们的平均值 (实黑线) 和标准差 (包围灰色区域的点虚线)。

[0035] 图 21 是与 HC 相比以不同浓度存在于 DM 中的 MP 亚型的图解。MP 分布的 CF 分析导致在 HC 和 DM 之间差别表达的 8 个群体的发现。差别表达的面元 (bin) 中的事件显示为

所有个体 DM 数据组的聚集（显示为彩色分布）上重叠的黑点。黑线代表对每个参数个别确定的阳性表达阈值（参见图 18）。在每个图上面，给出差别表达的亚型的表型。在每个图内显示更高表达的亚型（DM 或 HC）的群。

[0036] 图 22 是组合 EPC 和 MP 测量的图解。在上面的图中，垂直轴线代表 MP 亚型 $CD31^{\text{亮}}/CD41^{\text{亮}}$ 与 $CD31^{\text{暗}}/CD41^{\text{暗}}$ 的比。水平轴线代表 EPC^{Rel} ，如文本中所描述的。将测量除以 HC 组之中的中值而标准化和对数转换。将 DM 对象绘制为红点，而将 HC 对象绘制为蓝点。下面的两个图独立地将两个测量描绘为箱式图，其中中值由水平棒指示，箱从第一四分位数延伸到第三四分位数，须（whiskers）延伸不超过 1.5 倍四分间距。

[0037] 图 23 是 VEGF-R2 试剂的荧光扣除对照（Fluorescence Minus One）（FMO）分析的图解。FMO 对照管通过用图中除一个之外的所有标记染色而制备。显示任意选择的 3 个样品的 VEGF-R2FMO 分布。FMO 阈值通过以下来确定：首先找到针对 VEGF-R2 分布与侧向散射区域（红色椭圆形）的 2D 核心密度估计的主要阴性簇边界，然后找到与该边界的水平切线（红色虚线）。注意，在这些样品中存在显著数目的超过 FMO 阈值的事件。而且，这些事件经常出现以形成从阴性群体去除的丛式孔（clusters well）。这些代表“假阳性”事件，因为这些对照管中没有 VEGF-R2 试剂，所以阳性表达是由于除外这些细胞上 VEGF-R2 受体实际表达的一些原因。因此，VEGF-R2 的实际表达不能被可靠地查明，尤其当靶事件不常发生时，如在 EPCs 的情况中。

[0038] 图 24 是微粒表型差异表达的图解。显示表 7 中描述的微粒亚型的糖尿病和健康对照之间差异表达的箱式图。每个箱式图显示等级特定的分布的中值以及第一和第三四分位数。

[0039] 详细描述

[0040] 本发明涉及对血管健康概况分析的系统和方法。本发明的系统和方法包括基于多种 PCs（如 EPCs）和 MPs 测量的用于评估心血管状态的细胞基试验。该“细胞组学（cytomic）”方法——利用系统生物学的力量结合高度灵敏的高维流式细胞术——是对心血管健康的遗传和环境影响的反映，在细胞水平整合和靶向在内皮功能中起积极作用的细胞（和亚细胞颗粒）。

[0041] 在本发明的一个方面，所述系统和方法利用具有无偏分析方案的广泛的细胞表面标记图，该方案利用流式细胞术指纹来评价具有糖尿病（DM）的患者和健康对照（HC）之间的差异。与先前的研究——其通过获得 MP 和 EPC 样品只单独观察 MPs 或 EPCs 的水平——不同，血管机能异常（通过 MP 水平）和修复能力（通过 EPC 水平）如何相互作用的平衡可被观察和提供显著提高的诊断和 / 或风险确定。

[0042] 定义

[0043] 除非另外限定，本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同的意思。虽然与本文描述的那些方法和材料相似或相等的任何方法和材料可在本发明的实施或测试中使用，但是描述优选的方法和材料。

[0044] 如本文所用，以下术语中每个具有与在该部分中与其相关的意思。

[0045] 冠词“一个（a）”和“一个（an）”在本文用于指一个或指超过一个（即，指至少一个）的冠词语法对象。作为实例，“要素（an element）”指一个要素或超过一个要素。

[0046] “约”如本文所用当指可测量的值如量、短暂的持续时间等时意思包括从特定值的

±20%或±10%,更优选±5%,甚至更优选±1%和仍然更优选±0.1%的变化,因为这样的变化对进行公开的方法是适当的。

[0047] 术语“异常的”当用于对象、生物体、组织、细胞或其组分的上下文中时,指在至少一个可观察的或可检测的特性(例如,年龄、治疗、天的时间等)方面与显示“正常的”(期望的)各自特性的那些对象、生物体、组织、细胞或其组分不同的那些对象、生物体、组织、细胞或其组分。对一个细胞或组织类型来说是正常或期望的特性可能对不同细胞或组织类型来说是异常的。

[0048] 术语“评估(assessing)”包括任何形式的测量,并且包括确定是否存在要素。术语“确定”、“测量”、“评价”、“评估”和“试验(assaying)”可互换地使用并包括定量和定性确定。评估可以是相对的或绝对的。“评估……的存在”包括确定存在的事物的量,和/或确定它是否存在或不存在。

[0049] 如本文所用,术语“生物标记”是生物实体如细胞或细胞组或其一个或多个片段、蛋白质或其片段,包括可从生物样品分离或在生物样品中或在生物样品上测量的多肽或肽,与取自不具有CVD的表面上正常的对象的可比较样品相比,其差别地存在于取自具有确定的或可能临床上显著的CVD的对象的样品中。生物标记可以是完整的细胞或分子,或它可以是其部分——其可以部分有功能或例如通过特定的结合蛋白或其它检测方法被识别。如果与预定值或对照群体的参考概况比较,生物标记的可测量方面与对象中CVD的存在或风险相关,则认为该生物标记是提供信息的。这样的可测量方面可包括例如生物样品中生物标记或其部分的存在、不存在、量或浓度,和/或其作为超过一个生物标记的部分概况的存在。生物标记的可测量方面还被称作特征。特征可以是比或生物标记的两个或多个可测量方面的其它这样的数学上定义的关系。生物标记概况包括至少一个可测量特征,并可包括两个、三个、四个、五个、10个、20个、30个或任何数目的特征。生物标记概况还可包括相对于至少一个外部或内部标准的至少一个特征的至少一个可测量方面。

[0050] 如本文所用,术语“流式细胞术指纹”指多个细胞、微粒或流式细胞仪中所测量的其它对象的多变量概率分布的表示。在流式细胞术方法中,每个细胞或微粒通常由不小于两个被测变量来表征,并常常由多至二十或更多个被测变量表征。多个细胞的流式细胞测量因此可以由与测量变量数目一样多的维限定的超空间中的分布表征。流式细胞术指纹是该多变量概率分布以数字载体(vector)形式的紧凑表示,每个数字代表多变量空间的特定亚区域中分布函数的密度。

[0051] 如本文所用,术语“心血管疾病”或“CVD”通常指心脏和血管疾病,包括动脉粥样硬化、冠心病、脑血管疾病和外周血管疾病。心血管病症是CVD的急性现象并且包括心肌梗塞、中风、心绞痛、短暂性缺血发作和充血性心力衰竭。心血管疾病,包括动脉粥样硬化,通常由脂肪物质、炎性细胞、细胞外基质和斑块的积累产生。

[0052] 如本文所用,术语与一个或多个生物标记有关的“数据”,或术语“生物标记数据”通常指反应样品中生物标记的产物的绝对和/或相对丰度(水平)的数据。如本文所用,术语与一个或多个生物标记有关的“数据集”指代表对象的参考群体中一组生物标记的一个或多个生物标记产物中每个水平的数据集。数据集可用于产生本发明的式/分类器。根据一个实施方式,数据集不需要包括参考群体每个个体的组的每个生物标记产物的数据。例如,“数据集”当用于将应用于式的数据集的上下文中时可指代表一个或多个参考群体中

每个个体的每个生物标记产物水平的数据,但是如将被理解的,也可指代表所述一个或多个参考群体中每个的 99%、95%、90%、85%、80%、75%、70% 或更少个体的每个生物标记产物水平的数据,并可仍然用于应用到式的目的。

[0053] 糖尿病 (DM) 是由胰岛素不充分产生引起并导致碳水化合物、脂肪和蛋白质异常代谢的一种严重的慢性形式的糖尿病。该疾病以血液和尿中增加的糖水平、过度口渴、频繁排尿、酸中毒和消耗为特征。该状况由肥胖和不活动的生活方式恶化。该疾病常常没有症状,通常通过指示葡萄糖耐受不良的试验诊断,并用饮食改变和锻炼计划来治疗。糖尿病与包括冠状、外周和颈动脉疾病的心血管并发症的高风险相关。如本文所显示的,将 DM 用作血管疾病的模型系统,并且将来自糖尿病群的本发明的血管健康概况结果与年龄和性别相似的健康对照 (HC) 进行比较以发现生物学上提供信息的标记以辅助血管并发症的检测和治疗。

[0054] “疾病”是一种动物的健康状态,其中动物不能保持内稳态,并且其中如果疾病没有改善,那么动物的健康持续恶化。

[0055] 相比之下,动物中的“病症”是一种健康状态,其中动物能保持内稳态,但是其中动物的健康状态较缺少病症的情况不好。如果不治疗,病症不会必然引起动物健康状态的进一步下降。

[0056] “式”、“算法”或“模型”是任何数学方程、算法、分析或编程的过程,或采取一个或多个连续或范畴的输入(或“参数”)和计算输出值的统计学技术,有时称作“指数”或“指数值”。“式”的非限制实例包括和、比和回归运算符,如系数或指数,生物标记值转换和标准化(没有限制地包括基于临床参数,如性别、年龄或种族性的那些标准化方案)、规则和指导方针、统计分类模型以及在历史的群体上培养的神经网络。在组合 CVD 标记和其它生物标记中具有特别用途的是线性和非线性方程和统计分类分析以确定对象样品中检测的 CVD 标记的水平之间的关系。在组和组合构建中,具有特别意义的是结构统计分类算法,以及风险指数构建的方法,利用模式识别特征,包括建立的技术如交互相关、主成分分析(Principal Components Analysis) (PCA)、因子旋转、逻辑回归(Logistic Regression) (LogReg)、线性判别分析(Linear Discriminant Analysis) (LDA)、Support Vector Machines (SVM)、随机森林(Random Forest) (RF)、偏最小二乘法(Partial Least Squares)、稀疏偏最小二乘法(Sparse Partial Least Squares)、柔性判别分析(Flexible Discriminant Analysis)、递归分类树(Recursive Partitioning Tree) (RPART)、以及其它相关的决策树分类技术、最接近收缩质心(Nearest Shrunken Centroids (SC))、分步模型选择程序、Kth-最近相邻(Kth-Nearest Neighbor)、提升树(Boosting 或 Boosted Tree)、决策树(Decision Trees)、神经网络(Neural Networks)、贝叶斯网络(Bayesian Networks)、支持向量机(Support Vector Machines)和隐马尔科夫模型(Hidden Markov Models) 以及其它。其它技术可用于存活和事件发生时间危害分析,包括本领域技术人员熟知的 Cox、Weibull、Kaplan-Meier 和 Greenwood 模型。

[0057] “增加的发展(developing)CVD 的风险”在本文用于指对象发展 CVD 的可能性或概率的增加。该风险可相对于个体的自身风险,或相对于不具有 CVD 临床证据的参考群体而被评估。参考群体可以代表关于近似的年龄、年龄组和 / 或性别的个体。

[0058] “增加的进展(progressing)CVD 的风险”在本文用于指具有 CVD 的对象具有进展

CVD 的可能性或概率的增加。该风险可相对于个体的自身风险,或相对于不具有 CVD 临床证据的参考群体而被评估。参考群体可以代表关于近似的年龄、年龄组和 / 或性别的个体。

[0059] 如本文所用,“指导材料”包括出版物、记录、图表或任何其它表达介质,其可用于在实现本文描述的多种疾病或病症的确定或评价风险的试剂盒中传达本发明的化合物、组合物、载体、生物标记或递送系统的有用性。本发明的试剂盒的指导材料可例如附于含有本发明的鉴定的化合物、组合物、载体、生物标记或递送系统的容器或与含有鉴定的化合物、组合物、载体、生物标记或递送系统的容器一起运送。可选地,指导材料可以与发明容器分开运送,目的是指导材料和化合物、组合物、载体、生物标记或递送系统被接收者合作地使用。

[0060] 一个或多个生物标记的“水平”指样品中生物标记的绝对或相对量或浓度。

[0061] “测量(Measuring)”或“测量(measurement)”,或可选地“检测(detecting)”或“检测(detection)”指评估来自临床或对象的样品内给定物质——包括这样的物质的定性或定量浓度水平的衍生化——的存在、不存在、数量或量(其可以是有效量),或另外评价对象临床参数的值或分类。

[0062] “微粒”(MPs) 如本文所用是由于激活或凋亡通过胞吐出芽(exocytic budding)形成的从真核细胞脱落的 0.1-1 μm 血浆颗粒,并指示细胞损伤。如本文所考虑的,MPs 可以是内皮 MPs (EMPs)、血小板 MPs (PMPs) 和 / 或单核细胞 MPs (MMPs)。MPs 含有来自它们的母细胞的 miRNA、蛋白质和其它抗原,并常常是促凝结和促炎的。

[0063] 术语“患者”、“对象”、“个体”等在本文可互换地使用,并指任何动物或其体外或原位细胞,顺从本文描述的方法。在某些非限制的实施方式中,患者、对象或个体是人。

[0064] 如本文所用,术语“预定值”指获自对象的一般群体或选择的群体的生物样品中一个或多个生物标记的量。例如,选择的群体可以由表面上健康的对象,如先前不具有任何指示 CVD 存在的征兆或症状的个体组成。在另一个实例中,预定值可以由具有确定的 CVD 的对象组成。在另一个实例中,预定值可以由具有 DM 的对象组成。预定值可以是断开值或范围。预定值可基于表面上健康的对象和具有确定的 CVD、ES 或 LT 或 DM 的对象之间的比较测量而确定,如本文所描述的。

[0065] “祖细胞”(PC) 如本文所用可包括本领域技术人员理解的任何类型的 PC,包括促血管生成细胞 (PACs)、内皮祖细胞 (EPCs) 和循环造血干细胞和祖细胞 (CHSPCs)。如本文所显示的,发现了一群细胞,其表型上与 EPCs 的通常定义一致,但是也与 CHSPCs 一致。为了简洁和清楚的目的,这样的细胞在本文被简单称作 PCs。

[0066] “样品”或“生物样品”如本文所用指从个体分离的生物材料。生物样品可含有适合检测期望的生物标记的任何生物材料,并可包括获自个体的细胞和 / 或非细胞材料。

[0067] 贯穿本公开,本发明的各个方面可以以范围形式存在。应当理解,以范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本发明范围的固定限制。相应地,范围的描述应被认为已具体地公开了该范围内所有可能的亚范围以及个体数值。例如,诸如 1 至 6 的范围的描述应被认为已具体地公开了该范围内的亚范围如 1 至 3、1 至 4、1 至 5、2 至 4、2 至 6、3 至 6 等以及个体的数,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3、6 和其间的任何全部和部分增量。这适用而不论范围的宽度。

[0068] 描述

[0069] 细胞基系统分析,也称作‘细胞组学’,整合环境和遗传的心血管风险因素的生物学结果。对发展可常规地用于指导医学治疗和风险评估这样的试验存在未满足的临床需要。本发明的系统和方法通过利用模式发现计算方法对血管健康提供综合的见解以分析若干靶,包括血管微粒(最近被鉴定为血管健康的强大生物标记)和内皮祖细胞群体的特性。例如,可评价无症状的患者的 cardiovascular 风险,并可纵向地监测有症状的患者。这些能力实现个性化医疗的主要目标。

[0070] 如本文所考虑的,本发明的系统和方法包括在明显的 CVD 之前提供心血管健康测量的早期诊断测试,以及治疗干预的评估。应当理解,本发明可用于心血管健康的任何参数的测量,并可适合本领域技术人员将理解的任何 CVD 风险的检测和确定。

[0071] 例如,糖尿病(DM)与包括冠状、外周和颈动脉疾病的心血管并发症的高风险相关。具有 2 型 DM 的患者 CAD 和 PAD 的风险增加 2 至 4 倍(Beckman et al., 2002, JAMA287:2570-2581)。因此,认为来自具有长期 2 型 DM 和具有临床上明显的动脉粥样硬化的患者的血液样品将具有与非糖尿病对照对象不同的异常血管健康概况。如本文所显示的,将 DM 用作血管疾病的模型系统,并将来自糖尿病群的本发明的血管健康概况结果与年龄和性别相似的健康对照(HC)比较以发现生物学上提供信息的标记以辅助血管并发症的检测和治疗。

[0072] 祖细胞和测量方法

[0073] 如本文所考虑的,本发明包括样品中多种祖细胞(PCs)的鉴定和门控。PCs 在本文被限定为包括 PACs、EPCs 和 / 或 CHSPCs 以及与 CVD 相关的任何其它祖细胞类型。这些细胞是修复能力的介质,并且虽然这样的细胞的精确表型限定还未确定,但是认为它们通过结构发展或旁分泌作用参与血管发生以支持血管生长。

[0074] EPCs 是骨髓衍生细胞,其响应内源的(例如,来自缺血组织、肿瘤细胞)或外源的(例如,抑制素)信号而动员进循环。简言之,EPCs 的生理功能促进血管内稳态,血管内稳态对防止由于血管损伤的多种疾病的发病是重要的(Möbius-Winkler et al., 2009, Cytometry Part A75A:25-37)。

[0075] 常常用于用流式细胞术鉴别 EPCs 的表面标记包括 CD133、CD34 和 VEGF-R2(也称为 KDR)(Möbius-Winkler et al., 2009, Cytometry Part A75A:25-37;Hirschi et al., 2008, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28:1584-1595;Khan et al., 2005, Cytometry B Clin Cytom64:1-8)。Estes 等的最近研究用体外造血集落形成活性和具有表型 CD31⁺、CD34⁺、CD133⁺ 和 CD45^{暗-阴性}的 NOD/SCID 小鼠中的多谱系移植限定了细胞群体(Estes et al., 2010, Cytometry Part A77A:831-839),他们将其称作循环造血干和祖细胞(CHSPCs)。如本文所考虑的,对用于表征 PC 或 PCs 群体的表面标记的数目和类型没有限制,如本领域技术人员所将理解的。

[0076] PCs 可通过本领域技术人员了解的任何合适的方法测量。例如,细胞可通过高通量方法测量。在一个实施方式中,细胞通过流式细胞术测量。在另一个实施方式中,细胞通过 ELISA 基技术测量。在另一个实施方式中,细胞通过板基捕获试验测量。在另一个实施方式中,将通过流式细胞术测量的细胞利用流式细胞术指纹来表示。在一些实施方式中,细胞通过以任何组合的多种方法测量。例如,可使用流式细胞术、ELISA 基技术和板基捕获试验或其任何组合。

[0077] 微粒和测量方法

[0078] 微粒 (MPs) 是由于激活或凋亡通过胞吐出芽形成的从真核细胞脱落的 $0.1-1\ \mu\text{m}$ 血浆颗粒, 并指示细胞损伤。如本文所考虑的, MPs 可以是内皮 MPs (EMPs)、血小板 MPs (PMPs) 和 / 或单核细胞 MPs (MMPs)。

[0079] MPs 含有来自它们的母细胞的 miRNA、蛋白质和其它抗原, 并常常是促凝结和促炎的。MPs 在凝结和炎症中的作用是动脉粥样硬化病理生理学的重要部分, 使作为潜在的血管健康生物标记的 MPs 特别吸引人。实际上, 许多研究已证明在血管机能异常的情况中细胞特异的 MPs 升高 (Tushuizen et al., 2011, Arterioscler Thromb Vasc Biol 31:4-9)。另外, MPs 可在它们的母细胞中通过“输出”促凋亡化合物如胱天蛋白酶 3 而防止凋亡, 由此降低细胞溶质的水平 (Hussein et al., 2007, Thromb Haemost 98(5):1096-107)。然而, 与具有稳定的心绞痛症状的患者相比, MPs 在具有急性冠脉综合征的患者中显著提高 (Bernal-Mizrachi et al., 2003, American Heart Journal 145:962-970), 并且是继发性心肌梗塞或死亡的强大预测物 (Sinning et al., 2011, European Heart Journal 32:2034-2041)。它们还在急性缺血性中风 / 脑血管意外之后升高 (Jung et al. 2009, Ann Neurol. 66(2):191-9)。在糖尿病患者的预测观察性研究中, 升高的 MPs 强烈预示冠状损害的存在, 并被证明是较糖尿病持续时间、脂质浓度或高血压的存在更重要的独立风险因素 (Koga et al., 2005, J Am Coll Cardiol 45:1622-1630)。循环白细胞衍生的 MPs 在 216 名无症状的对象中预示亚临床动脉粥样硬化和斑块数 (Chironi et al., 2006, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26:2775-2780)。如本文所考虑的, MP 的存在、数目和类型可用作生物标记和 / 或用作本发明的敏感和特异的血管健康概况试验的组分, 在预测无症状的患者动脉粥样硬化风险中具有临床实用性。

[0080] 这些亚微米颗粒被释放进入循环, 携带大量表面标记, 用于鉴定它们的细胞来源。暴露的膜磷脂酰丝氨酸 (PS) 和组织因子, 连同过多的其它表面分子和细胞质组分, 包括核质, 使 MPs 能够影响许多种生物学功能, 包括凝结、血栓形成和血管发生。

[0081] MPs 可通过本领域技术人员了解的任何合适的方法测量。例如, MPs 可通过高通量方法测量。在一个实施方式中, 细胞通过流式细胞术测量, 如各个实施例中所显示的。如本文所考虑的, 对用于表征 MP 或 MPs 群体的表面标记的数目和类型没有限制, 如本领域技术人员所将理解的。

[0082] 流式细胞术指纹

[0083] 流式细胞术指纹 (Rogers et al., 2008, Cytometry Part A 73A:430-441; Rogers&Holyst, 2009, Adv Bioinformatics:193947) (CF) 提供一种快速分析高维、大容量流式细胞术数据而无需研究者或系统偏倚的方法。CF 将多变量分布分解成大量非重叠区域, 在本文被称作“面元(bin)”, 其完全地跨越空间, 产生的在数据集中记录的每个事件在面元之一中找到。给定面元组, CF 将每个事件分配到面元, 计数每个面元中的事件数, 以及将样品的完全多变量分布表示为变平的载体, 在本文称作每个面元事件数的“指纹”。如本文所显示的, 可将指纹当成数据的完全的微门控, 每个门控或面元被加以标记。

[0084] 还如本文所显示的, 针对多样品的多变量概率分布函数可利用简单的统计分析方法比较。例如, 可搜索这样的面元, 其与利用与现在常规用于基因表达数据分析相似的方法的另一组样品相比, 在一组样品中显著地上调和 / 或下调 (Boscolo et al., 2008, IEEE/

ACM Transactions on 5(1):15-24)。因此,CF 的使用不仅赋予“数据挖掘”方法以流式细胞数据分析,由此多变量分布的疾病相关或治疗相关的改变直接从数据中发现,而且建立通向用其它技术综合分析的桥梁(例如, Doring et. al. (Döring et al., 2012, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 32:182-195))。这不同于依赖研究者限定的门控的常规分析方法,研究者限定的门控代表由于疾病或治疗可改变的多变量空间的特定区域的假设。因此,CF 不仅消除研究者偏倚(其可通过门控主观性而无意地引入)的概率,而且允许所有多变量区域的综合分析,不仅是研究者的期望所预先限定的那些。

[0085] 本发明方法

[0086] 如本文所描述的,本发明在对象血管健康确定中利用大量细胞基生物标记。该方法可被如图 1 所示概括地描述,其中从对象采集生物样品如血液。如本文所考虑的,对象的和用于进行本文描述的方法的生物样品可以是血液、血清、血浆或本领域技术人员所将了解的任何其它合适的流体、组织或细胞样品。接下来,至少一个 PC 和至少一个 MP 通过高通量方法,如流式细胞术测量。接下来,进行流式细胞术数据的流式细胞术指纹以将数据分成多个分类,而没有研究者或系统偏倚,以便获得鉴定的生物标记的血管健康概况。利用该概况,与另一组样品相比,一组样品中显著上调和 / 或下调的生物标记可被鉴定并且在对象中 CVD 或增加或发展 CVD 的风险的确定或预测中和使用。

[0087] 在另一个实施方式中,本发明涉及确定对象中血管健康的方法。该方法包括以下步骤:从对象获得生物样品;基于生物样品中至少一组微粒的水平获得微粒数据;基于生物样品至少一组祖细胞的水平获得祖细胞数据;基于微粒和祖细胞数据产生生物样品流式细胞术指纹;以及基于产生的流式细胞术指纹确定对象的血管健康。

[0088] 在另一个实施方式中,利用综合组(comprehensive panel),其中首先基于大小来选择细胞。然后,属于成熟的造血谱系的细胞通过门控掉 CD3⁺、CD19⁺、CD33⁺ 和 CD45^亮细胞而去除。然后,利用流式细胞术指纹,将剩下的群体再分并进行统计评价,而没有任何预定的偏倚,以发现是否存在 DM 患者和 HC 之间差别表达的细胞群体。

[0089] 在一个实施方式中,本发明涉及通过测量微粒与祖细胞的关系确定糖尿病对象中心血管疾病发病率或血管机能异常的风险的方法。在一个实施方式中,该方法确定或预示增加的发展 CVD 的风险。在另一个实施方式中,该方法确定或预示增加的进展 CVD 的风险。例如,该方法包括以下步骤:从对象获得生物样品;基于生物样品中至少一组微粒的水平获得微粒数据;基于生物样品至少一组祖细胞的水平获得祖细胞数据;基于微粒和祖细胞数据产生生物样品流式细胞术指纹;以及基于产生的流式细胞术指纹确定对象的与心血管疾病或血管机能异常相关的风险。

[0090] 在另一个实施方式中,本发明包括确定对象中血管健康的方法,其中该方法包括以下步骤:从对象获得生物样品;和确定样品中相对于祖细胞水平的微粒的类型和 / 或水平,其中微粒相对于祖细胞的水平指示对象中与心血管疾病或血管机能异常相关的风险,由此确定所述对象中的血管健康。

[0091] 在另一个实施方式中,本发明包括确定糖尿病对象中与心血管疾病或血管机能异常相关的风险的方法,该方法包括以下步骤:从所述对象获得生物样品;确定样品中相对于祖细胞水平的微粒水平,其中微粒相对于祖细胞的水平指示所述对象中与心血管疾病或血管机能异常相关的风险。在一个实施方式中,糖尿病对象是 1 型糖尿病对象。在另一个

实施方式中,糖尿病对象是 2 型糖尿病对象。

[0092] 在另一个实施方式中,本发明包括确定对象中糖尿病相关的风险的方法,该方法包括以下步骤:从对象获得生物样品;确定所述样品中相对于祖细胞水平的微粒水平,其中微粒相对于祖细胞的水平指示对象中与心血管疾病或血管机能异常相关的风险,由此确定对象中糖尿病相关的风险。

[0093] 在一些实施方式中,本发明的方法包括确定相对于 PACs 或 EPCs 水平的微粒水平的步骤。

[0094] 在一个实施方式中,微粒相对于 PCs、PACs 或 EPCs 的水平指示细胞损伤。在另一个实施方式中,微粒相对于 PCs、PACs 或 EPCs 的水平指示内皮完整性、内皮修复能力的丧失、或其组合。

[0095] 在一个实施方式中,微粒和祖细胞水平的比较是微粒与祖细胞的比。在一些实施方式中,该比可直接与主动脉脉搏波速度 (aPWV) 相关,提供血浆胆固醇水平、MPs、PACs、内皮损伤和动脉硬化之间的函数联系。

[0096] 实验实施例

[0097] 现在参考以下实施例描述本发明。仅为了说明的目的提供这些实施例,并且本发明应决不被解释为受限于这些实施例,而是应被解释为包括由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有改变。

[0098] 无需进一步描述,据认为,本领域的普通技术人员可利用先前的描述和以下示例的实施例,制造和利用本发明和实施要求保护的方法。以下工作实施例因此具体指出本发明的优选实施方式,并且不被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0099] 实施例 1:通过流式细胞术的循环 MPs 的检测

[0100] 如先前所说明的,流式细胞术 (FCM) 可用于血液中微粒 (MPs) 的检测。该技术能够进行一个样品中数千 MPs 的测量,同时确定鉴定多种 MP 亚型的多个标记。MPs 非常小的尺寸 (0.1 至 1.0 μm) 使它们的检测在标准流式细胞仪的尺寸分辨率的界限处。因此,精确的检测需要敏锐地注意样本制备、样品获取和数据分析的细节。如本文所显示的,利用 BD Biosciences FACS Canto A 和 Beckman Coulter Gallios 优化患者中人血浆的 MPs 的检测。

[0101] 以下材料和方法用于实施例 1:

[0102] 无血小板的血浆 (PFP) 通过肝素化血液的两步离心从 37 名健康的对象获得 (1500g, 15min 以及 13,000g, 2 分钟)。将 50 μl PFP 用双重过滤的 5 μl FITC-CD31 (555445, BD)、5 μl PE-CD144 (560410, BD)、2.5 μl APC-CD64 (CD6405, Invitrogen) 和 5 μl PerCP-Cy5.5-CD41a (340930, BD) 或 2.5 μl FITC-Annexin V (556570, BD)、1.25 μl PE-CD105 (560839, BD) 和 5 μl Percp-Cy5.5-CD3 (340949, BD) 标记。FMO 管用于建立阴性门控。

[0103] 在室温 30 分钟温育之后,将 50 μl 3 μm 的珠 (BCP-30-5, Spherotech) 和双重过滤的 PBS 或 Annexin 缓冲液加入管以使总的终体积达 500 μl 。然后将样品在 FACS Canto A (BD) 和 Gallios (Beckman Coulter) 上运行。

[0104] 为了数据获取和分析,利用 0.3、1 和 3 μm 校准珠将前向和侧向散射阈值、光电倍增管 (PMT) 电压和窗口延伸 (WE) 优化以检测 0.1-1 μm 颗粒。将 MP 在具有前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 的方案中以对数模式分析。标准珠 0.3 (Sigma)、1 和 3.0 μm 直径

(Spherotech) 用于 MP 大小的估计。将 SSW 或 FSC-SSC 图上具有 0.3 至 1.0 μm 大小的事件门控为 MPs。当对于 Canto 和 Gallios 计数固定数目的 3 μm 珠 (200,000) 时, 停止获取。用 BD FACS Canto A 上的 DiVa version 6.1.2 和 BC Gallios 上的 Kaluza version 1.1 进行分析。

[0105] 如图 2 所示, FSC 和 SSC 阈值由具有不同 FSC 或 SSC 阈值的以适中速度通过机器的 0.3 μm 珠 (A 排) 或 0.3、1 和 3 μm 珠 (FSC/SSC 等值线图上 B 排和 SSC-W 直方图上 C 排) 确定。D 和 E 列显示在具有设为 5000 的 FSC 阈值或设为 200 的 SSC 阈值 (D 列), 以及只有设为 200 的 SSC 阈值和没有 FSC 阈值 (E 列) 的 FSC/SSC 等值线图 and SSC-W 直方图上 3 个珠的更好的分辨率。设为 200 的 FSC 阈值或设为 200 的 SSC 阈值 (F 列) 获得更多的背景噪声。设为 200 的 FSC 阈值和没有 SSC (G 列), 0.3 μm 珠缺失。对于小颗粒, 侧向散射较前向散射是更好的参数。在该研究中, 为了 FSC/SSC 轮廓和 SSC-W 直方图上的 3 个混合物珠的更好的分辨率, 将 FSC 和 SSC 阈值设为 5000 和 200 (D 列)。

[0106] 如图 3 所示, 双重过滤的 PBS 和 0.3 μm 珠用于建立 FSC、SSC PMT。当双重过滤的 PBS 以中等速度通过机器时, 接受每秒小于 10 个事件。分别将 FSC 和 SSC 的阈值设为 5000 和 200。利用不同 SSC 电压通过机器上运行的相同样品来确定 FSC 和 SSC PMT。利用 SSC 300 和 325, 更多的 MPs 丧失, 并且 SSC 375 和 400 上获得更多的背景噪声。在该研究中, 接受 350 的 SSC 电压。由于大量背景噪声, 这里未显示 400 的 SSC 电压数据。

[0107] 如图 4 所示, FACS Canto A Window Extension (WE) 通过以 WE0 至 7 的中等速度运行的 0.3、1 和 3 μm 珠来确定。为了 SSC-W 直方图上 3 个珠的更好的分辨率和低背景噪声而选择 WE0.2。

[0108] 如图 5 所示, 将 PFP 用 FITC-Annexin (或 CD31)、Percep-Cy5.5-CD41、PE-CD105 (或 CD144)、APC-CD64 染色和在 WE0.2 或 7 上运行。当固定数目的 3 μm 珠 (100,000) 被计数时停止捕获。将 A 排在点图上用设为 0.2 的 WE 门控在小于约 1 μm 上。将 B 排在点图上用设为 7 的 WE 门控在小于约 1 μm 上。在 SSC-W 直方图上用 WE0.2 将 C 排门控在小于约 1 μm 上和用 WE7 将 D 排门控在小于约 1 μm 上。利用 WE7 采集更多的背景噪声和更少的阳性颗粒 (B 排和 D 排)。

[0109] 如图 6 所示, 0.3、1 和 3 μm 小球用于估计 MPs 大小 (Canto A 上的 A 和 B 以及 Gallios 上的 C)。将 MPs 门控在小于约 1 μm 上 (Canto 上在 SSC-W 直方图上门控的 D 和在 FSC/SSC 点图上的 E 和 Gallios 上的 F)。对于 Canto A 设置, 分别将前向和侧向散射阈值设为 5000 和 200, 并将窗口延伸设为 0.2。对于 Gallios 设置, 将 FS 的鉴别器值设为 1, 前向散射采集角是 W2。

[0110] 如图 7 所示, 将 500 μl 双重过滤的 PBS 中用于 MP 检测的相同体积的抗体在 Canto A 上运行。未过滤的抗体 (A 排) 较双重过滤的抗体 (B 排) 显示更多的假阳性事件。用于 MPs 检测的所有试剂应当通过 0.1-0.22 μm 低蛋白结合过滤器双重过滤以从运行缓冲液去除抗体聚集物和背景噪声。

[0111] 如图 8 所示, 将 50 μl PFP 用未过滤的抗体 (A 和 C 排) 和双重过滤的抗体 (B 和 D 排) 标记。将 A 和 B 排在 SSC-W 直方图上门控在小于约 1 μm 上。将 C 和 D 排在 FSC 和 SSC 点图上门控在小于约 1 μm 上。预先过滤抗体有助于通过去除抗体聚集而减少假阳性颗粒。

[0112] 如图 9 所示, 在 Canto 和 Gallios 上检测 MPs。在 Canto (A 排) 和 Gallios (B 排)

上将 MPs 门控在小于约 $1\mu\text{m}$ 上。基于荧光扣除对照 (FMO) 管确定阳性的 MPs。

[0113] 如图 10 所示, 计算的斯皮尔曼等级相关用于在两个平台之间比较 MP 计数, 大多数相关超过 0.8, 除了显示 0.6 的相关的 CD105(+) ($P < 0.05$)。Gallios 上 MPs 计数大于 Canto A 上两倍。A 排显示两个平台的相关, 而 B 排显示两个平台上 MPs 数目的比较。

[0114] 如该实施例所显示的, 流式细胞术仪设置的优化可显著减少背景噪声。优选, 试剂, 包括缓冲液和抗体, 应通过 $0.1 - 0.2\mu\text{m}$ 低蛋白结合过滤器双重过滤以减少抗体聚集和来自缓冲液的背景噪声。Gallios 和 FACSCanto 上获得的值是相关的, 并且 Gallios 在目的区域中检测到大量事件。

[0115] 实施例 2: 作为糖尿病群体中血管健康测量的微粒与祖细胞关系

[0116] 考查 MPs 与 PCs/PACs 的关系以查看是否它可用作改进的和临床上可行的血管病理学指标。将血浆样品从具有早期 (ES, 诊断 < 1 年) 和长期 (LT, 诊断 > 5 年) 2 型糖尿病的患者采集并与年龄相关的健康的对象 (H) 比较。PC 和 MP 亚型通过流式细胞术和 ELISA 方法的组合来测量。促凝血的 MPs/CD341 PCs 的比证明在对象组之间区分的有价值的指标 ($P = 0.01$)。该受损的血管功能的指标在 LT 组中是最高的, 虽然有加强的抑制素治疗, 并且较一些可溶蛋白生物标记提供更多的信息。

[0117] 意想不到地, 发现了 2 型糖尿病中 MPs 和 PCs 之间的关系。该比提供具有糖尿病的患者中血管机能异常和心血管风险的定量的和临床上可行的测量。

[0118] 以下材料和方法用于实施例 2:

[0119] 患者招募和研究设计

[0120] 将在先前的 12 个月内诊断有 2 型糖尿病的患者称作“早期” (ES), 并将超过五年以前诊断的那些患者称作“长期” (LT)。在没有先前或目前的糖尿病 - 或心血管 - 相关状况病史的基础上将年龄相关的“健康的” (H) 对象招募进入研究, 并且不采取任何类型的 CV 相关的药物治疗——包括抑制素或高脂血症、高血压或糖尿病的药物。ES 组的四个 (36%) 和 LT 组的 14 个 (67%) 接受抑制素药物治疗, 连同一些其它药物治疗以治疗糖尿病、高血压和其它状况。关于心血管疾病的家族史, 健康组中 18 个 (66%) 对象中的 12 个, 早期中 11 (90%) 中的 10 个和长期组中每个参加者 (100%) 答复存在先前的心血管疾病家族史。LT 患者中糖尿病的平均时间长度是 20 年。所有的研究参加者都是不抽烟者。从所有的研究参加者获得书面的知情同意, 并且研究方案经 Institutional Review Board (IRB) 批准。每个对象在上午 8:00 左右捐献约 50mL 静脉血, 并且所有对象在前一天晚上禁食。将血液采集在肝素化 (Baxter) 注射器中, 用于细胞和可溶蛋白分析 (30mL)、柠檬酸钠用于微粒 (10mL) 和 EDTA 用于脂质分析 (10mL)。记录每个对象的人口统计数据、医学 / 药物治疗历史、体格检查和生命体征。

[0121] PCs/PACs 的流式细胞术

[0122] 样品采集后不到约 1h, 利用氯化铵溶胞作用将白血细胞从 30mL 血液分离, 如先前所描述的。不确定血小板计数。细胞染色、门控策略、流式细胞术方法以及分析被如下描述。将大约 5×10^6 个细胞用 6- 色抗体组: FITC- 抗 CD31 (PECAM) (Pharmingen)、PE- 抗 -CD133 (Miltenyi Biotec.)、PerCP-Cy5.5- 抗 -CD3, -CD19, -CD33 (Becton Dickinson)、APC-H7 抗 -CD45 (Becton Dickinson)、PE-Cy7- 抗 -CD34 (Becton Dickinson) 和 APC- 抗 -VEGF-R2 (R&D 系统) 染色。生存能力通过碘化丙啶排除来评估。利用

Becton-Dickinson LSRII 流式细胞仪, 对每个样品处理 2E6 个活事件, 并且六个荧光标记连同光散射只允许有活力的、低至中的侧向散射。对 PCs 和 PACs 分析单峰, 其是 CD3、19、33- 阴性的。将单峰门控为从侧向散射宽度对前向散射宽度的图鉴定的突出的细胞簇以保证将细胞聚集物从分析中排除。将荧光扣除对照 (FMO) 样品用作阴性对照。将细胞群体 (PCs 和 PACs) 定量为以每 ml 血液的数目的单核细胞百分数。分析集中于对 PCs 和 PACs 的亚型定义 (表 1)。利用 FlowJo 分析软件 (Treestar, Ashland, OR) 进行数据分析。

[0123] 表 1

[0124] 通过流式细胞术的每个表面标记的细胞或颗粒基因型

[0125]

细胞/颗粒类型	标记定义
祖细胞(PC)	CD133 ⁺ 、CD34 ⁺ 、CD133 ⁺ /34 ⁺
促血管生成细胞(PAC)	CD133 ⁺ VEGF-R2 ⁺ 、CD34 ⁺ VEGF-R2 ⁺ 、CD133 ⁺ CD34 ⁺ VEGF-R2 ⁺
内皮微粒 (EMP)	CD144 ⁺
血小板微粒(PMP)	CD41 ⁺
单核细胞微粒(MMP)	CD14 ⁺
磷酸酰丝氨酸 ⁺ PS ⁺ MP	AnnV ⁺

[0126]

[0127] MP 分离

[0128] 贫血小板血浆 (PPP) 获自采血之后 1 小时内的柠檬酸化血以分离 MPs。将全血以 1500g 离心 15min, 收集上清, 并通过在室温以 13, 500g 离心 5min 获得 PPP。对每个对象, 将 PPP 等分进分离管和在 -80℃ 储存直到以后使用。使用的所有样品只进行一次冻融循环。

[0129] MPs 的流式细胞术

[0130] 为了 MPs 的表征和定量, 将 PPP 与 1×BD annexin-V 结合缓冲液 (10mM Hepes, pH7.4, 140mM NaCl 和 2.5mM CaCl₂) (BD Biosciences) 中的 Annexin-V (FITC)、PECY5-CD41a、APC-CD14 (BD Biosciences) 和 PE-CD144 (R&D 系统) 的混合物一起在黑暗中在室温温育 30min, 然后加入 1×BD annexin-V 结合缓冲液以制成 1mL 的总体积 / 管。将阴性对照制备为用 Annexin-V (FITC) 和无钙结合缓冲液中相同量的匹配的对照型对照抗体染色的 PPP。利用 BD Biosciences FACSCanto 流式细胞仪, 通过校准珠限定 FSC-H 和 SSC-H 散射 (对数尺度) 上的 P1 区 (<11m) (图 11A)。每 1L MPs 的数目利用 P1 区和 6-1m 微球体珠 (Bacteria Counting Kit, Invitrogen) 确定以确定分析的样品 (1L) 的体积 (图 11B)。用每个特异 Ab 和 AnnexinV 染色的 MPs 的数目利用 FACSDiva 软件 (BD Biosciences) 来分析和确定并且表示为 MPs/1L。通过阳性抗体染色的 MPs 细胞起源的表征列在上面的表 1 中。

[0131] MP 板基捕获试验

[0132] PS+MPs 的浓度利用 Zymuphen MP Activity Kit (Aniara-CAT#A521096) 确定。在该试验中, 将 MPs 从 PPP 捕获到不溶解的 annexin-V 上, 并且通过功能性凝血酶原酶试验测量它们的 PS 含量。这通过外膜表面上 nM 磷脂酰丝氨酸的测量提供总 MP 促凝血活性的间接

测量。将通过该方法测量的 MPs 以 nM 磷脂酰丝氨酸当量表示。

[0133] 可溶蛋白

[0134] 可溶蛋白通过电化学发光(electro-chemiluminescent)检测利用商业上测试的试剂盒,按照制造商的说明书从柠檬酸化血浆确定。Meso-Scale Discovery 多种试剂盒——包括血管损伤 II 试验试剂盒 (CAT#K11136C-1)——用于测量 SAA、CRP、VCAM1 和 ICAM1。IL6、IL8、TNF α 和 IL1b 利用人促炎性基础试剂盒(Human Pro-Inflammatory Base Kit) (KI5025A-5) 测量。人低氧试验(Human Hypoxia Assay) (CAT#KI5122C-1) 测量 VEGF、IGFBF-1 和 EP0。纤溶酶原激活剂抑制剂 (PAI-1) 用来自 American Diagnostica 的 Imubind 试剂盒检测。间质细胞衍生的因子 1 (SDF-1) 通过 R&D 系统 (CAT#DY350) 测量。IL1b、SAA、IL6 和 IL8 是用这些试验的下面的检测。

[0135] HbA1c

[0136] HbA1c 根据制造商的方案利用 Primus 硼酸盐亲和性 HPLC 方法 (Primus Corporation, Kansas City, MO) 进行。

[0137] 脂质概况分析

[0138] 将血液样品采集在 EDTA 中用于脂质分析。HDL 利用酶体外试验按照制造商的方案在罗氏自动化临床化学分析仪上进行,用于人 HDL 胆固醇的直接定量确定。甘油三酯和胆固醇利用 VITROS TRIG 载玻片和 VITROS 化学产品校准器试剂盒 2 在 VITROS 化学系统 (VITROS950Chemistry System) 上进行。LDL 通过 Friedewald Equation 计算。

[0139] 全血细胞计数 (CBC) 和白细胞计数 (WBC) 区别分析

[0140] 血细胞分析利用 COULTER LH780 血液分析仪 (Beckman Coulter) 按照制造商的方案进行。

[0141] 统计学分析

[0142] 疾病状态组的所有单变量比较使用双侧非参数检验或构成比的卡方比较,其不需要高斯分布。大多数测量的特性,特别是 MP、PACs 和可溶蛋白水平,具有强的非高斯分布。对象特性的疾病状态组比较没有呈现与疾病状态相关的响应趋势。这些比较使用 KruskalWallis (KW) 检验 (非参数 ANOVA 比较)。PC、PAC、MP 和可溶蛋白水平的分析相对于疾病状态呈现响应趋势。这些趋势的统计学显著性的评估使用 Jonckheere-Terpstra (JT) 检验 (非参数趋势比较)。个体疾病状态组 (例如 ES 对 LT) 之间差异的事后比较使用 Wilcoxon 两样品检验。通过性别的患者构成比的比较应用跨组的构成比相等的精确卡方检验。该检验比较疾病状态组中观察到的构成比与所有疾病状态组构成比是相同的假设。其它特征性的构成比 (例如抑制素使用) 是用于从 H 组排除的标准,因此只比较 ES 和 LT 组。对特定协变量调整之后,MP 和 PAC 关系与疾病状态的分析基于逻辑回归模型,协变量已经包括在模型中。

[0143] 在假定疾病状态差异和响应变化性的相似关系的基础上,能力计算用来自 Koga 等的的数据利用 CD144+EMPs 进行。ES 中的 11 个、LT 中的 22 个和 H 中的 18 个的样品大小在检测相对疾病状态差异 (对照对糖尿病) 中具有约 90% 能力,如前面提到的研究中所记录的。

[0144] 实施例 2 结果

[0145] 在先前发现——糖尿病是心血管疾病的风险因素,并且糖尿病的持续时间是该风

险的另外的附加成分——的基础上,我们招募 ES 和 LT 患者。对象特性呈现在表 2 中。包括总共 41 名对象(平均年龄 57 岁)。在三组之间不区分年龄和性别。如预期的,血糖控制、糖化血红蛋白、HbA1c 的标准标记在所有糖尿病和健康个体之间显著改变,但在 ES 和 LT 组之间不能区分。糖尿病组中观察到的较低水平的 LDL 最可能与抑制素使用相关(ES 中 36%, LT 中 67%)。为了研究糖尿病组中的该效应,在由抑制素使用分开的每组中绘制 LDL 水平,如图 12A 所示。接受抑制素的 LT 糖尿病患者具有与健康个体相比减少的 LDL 水平,指示若没有这样的治疗,该群中 LDL 水平将实质上更高。相对用抑制素,LDL 水平在不用抑制素的 LT 患者中较低的事实可能是由于与后者(n=14)相比前者的小样本大小(n=7)。HDL 和甘油三酯在三组之间没有差别。虽然 LDL 水平在 LT 组中被控制,但是相对 H 组,LT 组中收缩压更高($P<0.01$)。重要地,当我们的研究调查某些细胞来源的标记(特别地单核细胞 MPs)的作用时,单核细胞和淋巴细胞计数在三组之中在统计学上未改变。红血细胞计数在 ES 和 H 组之间没有改变,但是在 LT 组中显著降低。相似地,相对 H 组,LT 中血红蛋白水平显著较低(表 2)。

[0146] 表 2

[0147] 患者特性

[0148]

	H (18)	ES (11)	LT (22)	P
年龄(岁)	57 ± 14	51 ± 13	64 ± 13	NS
性别(%男性)	61%	64%	81%	NS
门诊收缩压(mmHg)	125 ± 11	133 ± 14	139 ± 13 [†]	*
门诊舒张压(mmHg)	78 ± 5	80 ± 11	76 ± 12	NS
总胆固醇(mg/dL)	185 ± 34	168 ± 43	156 ± 34 [†]	**
LDL(mg/dL)	109 ± 32	84 ± 23 [‡]	80 ± 31 [†]	**
HDL(mg/dL)	55 ± 11	44 ± 13	51 ± 19	NS
TG(mg/dL)	107 ± 61	169 ± 129	126 ± 103	NS
HgbA1c	5.3 ± 0.3	7.2 ± 1.7 [‡]	7.1 ± 1.5 [†]	**
WBC	5.3 ± 1	6.2 ± 2	5.8 ± 1	NS
单核细胞计数(n/μL)	432 ± 148	531 ± 255	483 ± 118	NS
淋巴细胞计数(n/μL)	1557 ± 522	2074 ± 920	1660 ± 634	NS
RBC(百万/μL)	4.48 ± 0.45	4.55 ± 0.36	3.99 ± 0.54 ^{‡, #}	**
血红蛋白(g/dL)	13.92 ± 1.58	13.46 ± 1.83	12.22 ± 1.45 [‡]	**
高血压	0	7 (64%) [‡]	15 (68%) [†]	NA
高胆固醇血症	0	8 (72%) [‡]	14 (63%) [†]	NA
心肌梗死/心绞痛	0	1 (9%)	2 (9%)	NA
中风	0	0	1 (4%)	NA
外周动脉疾病	0	1 (9%)	3 (14%)	NA
抑制素(%使用)	0	4 (36%)	14 (67%)	NA

[0149] 数据是平均值 ± SD

[0150] * $P<0.01$, ** $P<0.001$, NS, 非显著的; NA, 未分析的。事后比较显著性水平(未对多个比较进行调整)。[†] $P<0.01$ LT 对 H, [‡] $P<0.01$ ES 对 H, [#] $P<0.05$, LT 对 H, [‡] $P<0.05$, ES 对 H, [#] $P<0.05$, LT 对 ES

[0151] KW 用于检验针对测量值的所有三组之间的显著性。对于测量的数据,患者组之间的事后分析使用两样本 Wilcoxon 检验。性别数据的比较使用双侧精确 Pearson 卡方检验,用于三组的比较和用于事后分析。具有零健康患者的特性将其作为组要求,因此未分析与该组的比较。

[0152] 进行 PCs、PACs 和总 MPs 连同一些细胞特异的 MPs 的评估。观察到通常的关系,其中开始或疾病持续期间,PC 和 PAC 水平降低,MPs 和大多数 MP 亚型增加(表 3)。上述的例外是 PCs 从 H 增加到 ES 状态,但是在 LT 疾病状态中全部降到 H 水平以下,然而这不具有统计学意义($P<0.05$)。PACs 以较 PCs 显著低的频率检测到,并且观察到一些显著的变化。

[0153] 所有三个 PACs 在 H 和 ES 疾病状态之间大致相等,但是 CD133VEGF-R2 从 ES 到 LT 对象显著下降。三个阳性 PACs, CD133+、CD34+、VEGFR2 中显著的减少只在 H 和 LT 组之间观察到。有意思的是,注意到每组内具有流式细胞术未检测到的水平的三种阳性 PACs (CD133+、CD34+、CDVEGF-R2) 的个体的数目随着疾病的开始也引人注目地上升 (H 中 33%, ES 中 63 和 LT 中 68%)。对于细胞衍生的 MPs, 循环 EMPs 和 PMPs 水平在 H 和 LT 之间显著的改变 ($P=0.03$)。CD14 单核细胞衍生的 MPs 不受疾病状态或持续期间影响 (表 3)。流式细胞术测量的 AnnV+MPs 和板基试验测量的 PS+MPs 的 nM 的改变实质上相等 ($P=0.02$)。然而,流式细胞术方法可检测到 H 对 ES 随着疾病的开始的差异,而板基方法检测到 ES 和 LT 随着疾病持续期间,的变化。两个试验之间的不同分辨率可能是由于它们的分开的读取;细胞计量术 (AnnV+MPs) 计数 PS+MPs 的数目,而板捕获 PS+MPs 和利用凝血酶原酶试验定量。但是,两个试验都检测到 H 和 LT 之间的差异。这些结果显示利用较流式细胞术更可行的板基试验在临床研究中测量 MPs 的可能性。还进行协变量调节以评价在协变量、年龄、性别、高血压和抑制素使用包括在回归模型中之后是否观察到的组差异仍然显著。由于 H 组内高血压和抑制素使用是排除标准,只有年龄和性别可在那些比较中使用。随着对年龄和性别的调节,AnnV+MPs 在 H 和 ES 之间仍然是显著的 ($P=0.02$), EMPs ($P=0.03$) 和 PMPs ($P=0.01$) 在 H 和 LT 之间也是。AnnV+MPs 在 H 和 LT 之间是在显著的边缘 ($P=0.053$)。对于 ES 和 LT 之间的比较,在包括年龄之后,调节年龄、性别、高血压和抑制素使用,没有其它协变量改进模型。

[0154] 通过流式细胞术测量两个和三个阳性 PACs 以及细胞衍生的 MPs 在技术上具有挑战性并且昂贵。研究通过流式细胞术测量单个阳性 PCs 和通过板基试验测量 PS+MPs 的值。CD34+PCs 显示从 H 到 E 的减少在显著的边缘 ($P=0.06$),而通过板基试验测量促凝血的 MPs 显示显著的向上趋势 ($P=0.02$),如图 13 所示。

[0155] 评估是否 MP/PC 之比在 PCs/PACs 或 MPs 单独的研究中提供另外的信息。有意思的是,PS+MPs/CD34+PC 之比证明区别对象组的有价值指标 ($P=0.01$) (图 13),并且该改变较分析的任何其它单个 PC、PAC 或 MP 亚型更显著 (表 3)。ELISA 板 MPs 的中间水平、流式细胞术测量的 CD34 细胞、两个水平之间的比以及与“非细胞”动脉粥样硬化生物标记的比较显示在图 14 中。还将 PCs、PACs 和 MPs 与一些可溶蛋白标记比较。MP/PC 之比与许多常常利用的可溶蛋白——包括 CRP、ICAM1 和 VCAM1——相比更有预测性 (表 4)。将这些可溶蛋白通过多元化试验定量,有成本效益的和有效的方法常常用于临床研究。TNF α 、VEGF、IGFBF-1、SDF-1 和 PAI-1 虽然可检测,但是不显著。有意思的是,EP0 浓度在 LT 组中较高 ($P1/4 0.004$) (表 4),并且不是由于外源重组人 EP0 (rhEP0) 或与抑制素使用有关 (图 12B)。LT 组内的那些具有显著降低的红细胞 (RBC) 计数和血红蛋白并因此与健康人和 ES 比较,接近贫血状态 (表 2)。

[0156] 表 3

[0157] 细胞和细胞衍生的生物标记

[0158]

标记类型	H	ES	LT	P
CD133 ⁺ PC	954 (712-157)	1052 (538-1277)	639 (448-1243)	0.08
CD34 ⁺ PC	2676 (1763-4644)	3432 (2153-4125)	1818 (1341-3268)	0.06
CD133 ⁺ CD34 ⁺ PC	778 (618-1251)	868 (407-1228)	605 (356-1208)	0.15
CD133 ⁺ VEGF-R2 ⁺ PAC	8.6 (0-20)	18.3 (0-21)	0 (0-9) [#]	0.04*
CD34 ⁺ VEGF-R2 ⁺ PAC	15.3 (9-26)	7.9 (6-40)	8.0 (0-18) [#]	0.03*
CD133 ⁺ CD34 ⁺ VEGF-R2 ⁺ PAC	6.9 (0-12)	0 (0-20)	0 (0-7) [#]	0.04*
CD144 ⁺ MPs	204 (93-411)	453 (187-616)	571 (207-892) [#]	0.03*
CD41 ⁺ MPs	300 (155-583)	693 (239-894)	367 (258-939) [#]	0.03*
CD14 ⁺ MPs	120 (68-347)	340 (178-469)	230 (77-488)	0.15
AnnV ⁺ MPs	355 (240-760)	761 (449-996) [#]	682 (330-1044) [#]	0.02*
nM of PS ⁺ MPs	0.31 (0.21-0.36)	0.27 (0.16-0.40)	0.45 (0.28-0.56) ^{#, #}	0.02*

[0159] 数据是中值(25%-75%四分位距)。P(A)C值对应细胞/mL, MP值对应MPs/ μ L,除了PS⁺MPs,其对应通过板基试验的nMPS等价物。H,健康;ES,早期糖尿病;LT,长期糖尿病。
* $P < 0.05$ 。事后比较显著性水平(未对多个比较进行调整)。[#] $P < 0.05$ LT对H, [#] $P < 0.05$ ES对H, [#] $P < 0.05$ LT对ES。

[0160] P值通过JT检验计算以检验三组之间的差异。患者组之间的事后分析使用两样本Wilcoxon检验。

[0161] 表4

[0162] 可溶蛋白分析

[0163]

	H	ES	LT	P
EPO (pg/mL)	2.8 $\pm$ 1.8	3.0 $\pm$ 2	5.1 $\pm$ 4.2 [#]	0.004**
CRP (pg/mL)	13.8 $\pm$ 13	77 $\pm$ 90 [#]	42 $\pm$ 83	0.109
ICAM1 (pg/mL)	1.4 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 1.8 [#]	1.6 $\pm$ 0.1 [#]	0.382
VCAM1 (pg/mL)	2.43 $\pm$ 0.9	3.58 $\pm$ 2.01	3.22 $\pm$ 1.31	0.071

[0164] * $P < 0.01$ H,健康;ES,早期糖尿病;LT,长期糖尿病。事后比较显著性水平(未对多个比较进行调整)。[#] $P < 0.01$ LT对H, [#] $P < 0.05$ ES对H, [#] $P < 0.05$ LT对ES。

[0165] P值通过JT检验计算以检验三组之间的差异。患者组之间的事后分析使用两样本Wilcoxon检验。

[0166] 据认为这是显示随着2型糖尿病的开始和持续时间,PACs降低和MP增加的首次研究。另外,为以下提供证据:评价MPs与PCs之比(nMPS+MPs/CD34+PCs)的价值;临床上可行的和较一些标准蛋白标记提供更多信息的测量。PCs和MPs不是心血管疾病的副产物,而是该疾病的活性成分,并因此反映特异的疾病途径。例如,MPs不仅是细胞损伤的标记,而且是促进内皮机能异常和凝结的活性剂。PCs和PACs的减少指示血管修复能力的丧失。在证明PCs/PACs和MPs水平与糖尿病的持续时间相关中,我们的结果还提供对糖尿病的分步病因学和其促成血管病理学的机制见解。

[0167] 冠状动脉疾病(CAD)的存在在具有糖尿病的个体中常常是无症状的。虽然最近的非侵入性研究表明,CAD可在显著数目的这些个体中检测到,但是常规筛查方法尚未显示在临床上有用或有成本效益。生物标记,特别是源自细胞的生物标记,可证明更加预示心血管事件。对处于血管并发症风险的患者的细胞生物标记的寻找是有希望的,但是尚未成为临床实践的一部分,因为快速、容易进行的细胞基试验尚未被验证。

[0168] 如实施例1所显示的,鉴定了2型糖尿病中和随着疾病的持续时间的PCs/PACs和细胞衍生的MPs的显著改变。这是示例性的利用MPs/PCs之比的价值,其包括两个生物学相关的标记,所述标记在功能上影响疾病进展。进一步,显示该比可以较通常用于使处于提

高的心血管风险的个体分层的许多个体标准蛋白生物标记提供更多信息。从临床的角度，来自这些研究的结果表明，用于造血祖细胞的单个平台高通量、多元化流式细胞术试验和用于 MPs 的板基试验是鉴定处于最高心血管事件风险的那些个体的可行和有成本效益的方法。

[0169] 实施例 3：糖尿病 (DM) 中 MPs 和 PCs 的研究

[0170] 进行 50 个对象的研究以利用流式细胞术和 ELISA 评价与健康对照相比最近诊断的 DM 的患者和长期诊断的那些患者中 MPs 和 PCs 的水平。除了测量内皮、血小板和单核细胞 MPs，还测量内皮祖细胞 (EPCs)。

[0171] 以下材料和方法用于实施例 3：

[0172] 研究人群和方法学

[0173] 将先前的 12 个月内诊断有 2 型 DM 的患者称为“早期” (ES)，并将诊断超过 5 年的那些患者称为“长期” (LT)。在没有先前或目前的糖尿病或心血管疾病史的基础上招募年龄相关的“健康的”H) 对象进行研究，并且不采取任何类型的 CV 相关的药物治疗——包括抑制素。只有非吸烟者才允许参与该研究。每个对象捐献大约 50mL 静脉血。所有对象在就诊之前的晚上禁食，并在上午大约 8 点抽取血液样品。将血液采集在肝素化 (Baxter) 注射器中，用于 PCs 和可溶蛋白分析 (30mL)、柠檬酸钠用于 MPs (10mL) 和 EDTA 用于脂质分析 (10mL)。MPs 利用流式细胞术并且还利用 annexin V 抗体的非细胞特异的 ELISA 试验来测量。

[0174] 确定产生的数据，具有非高斯分布，因此进行两种适当的比较检验。跨对象组的差异利用 Kruskal-Wallis (KW) 检验（非参数 ANOVA 比较）来确定。由于跨对象组存在时间成分（即疾病持续时间）和潜在趋势，利用 Jonckheere-Terpstra (JT) 检验——非参数检验，以比较数据中的趋势。如所预期的，血糖控制、糖化血红蛋白、HbA1c 的标准标记随着疾病持续时间而显著改变 ($P < 0.0001$)。

[0175] PCs 和 MPs 的研究表征

[0176] 根据细胞表面标记将细胞衍生的 MPs 和 PCs 在每个对象组中鉴定和定量。利用流式细胞术，CD133 和 / 或 CD34 表达限定 PCs，而另外的 VEGF-R2 的表面表达限定 EPCs。将最初通过尺寸 ($< 1\mu\text{m}$ ，利用流式细胞术) 从无血小板的血浆 (PFP) 限定的 MPs 进一步利用单标记表面表达通过细胞类型来表征。内皮、血小板和单核细胞 MPs 分别通过 CD144、41 和 14 的表面表达来确定。在许多细胞衍生的 MPs 上质膜的外部小叶上检测到的阴离子性磷脂 (phospholipid)、磷脂酰丝氨酸经由流式细胞术通过 AnnV 结合来确定。另外，将商业上可获得的 ELISA 基板基试验用于 MP 检测。这经由外膜表面上 nM 磷脂酰丝氨酸的测量提供总 MP 量的间接测量。表 5 示例了用于 MPs 鉴定的单克隆抗体的特异性。

[0177] 表 5

[0178]

用于微粒鉴定的单克隆抗体的特异性			
亚型	抗原	注解	参考
内皮	CD144	VE 钙粘素	1
血小板	CD41	GpIbIIa	2
单核细胞	CD14	内毒素受体	3

[0179] 实施例 3 结果

[0180] 一般而言,随着糖尿病对象中疾病的持续时间,PC 和 EPC 水平降低,MPs 和大多数 MP 亚型增加 (图 11)。有意思的是,EPCs 的变化较祖细胞更显著。对于细胞特异的 MPs,循环内皮 MPs (EMPs) 和血小板衍生的微粒 (PMPs) 的水平在组之间改变最显著 (图 11)。CD14+ 单核细胞衍生的 MPs (MMPs) 受疾病或持续时间影响最小。通过流式细胞术和 ELISA 板基的试验的 AnnV+MP 的定量在选择疾病组之间显示相同的趋势和显著性,提供该 ELISA 基试验在临床研究中应用的验证和保证。具有流式细胞术不能检测水平的三个阳性 EPCs 的每组内个体的数目随着疾病和疾病持续时间增加,H 中 33%,ES 中 63% 和 LT 中 68%。为了鉴别哪些组彼此最分离,对三个组合 (即健康对 EST、健康对 LTD 和 ESD 对 LTD) 上所有列出的 PCs、EPCs 和 MPs 进行单独的 t 检验。这些之中,H 和 LTD 彼此最不同。

[0181] 结果显示,与健康的个体比较,长期糖尿病患者中 MPs 升高,EPCs 降低。与 MPs 相比,长期糖尿病患者中 CD34 阳性细胞的比率较两者任一单独的更大。

[0182] 实施例 4 :流式细胞术指纹

[0183] 流式细胞术指纹 (CF) 将对应表格式数据的多变量概率分布函数表示为 “变平的”、计算上高效的指纹显示,其便于样品的定量比较。为了测试灵敏度和特异性,产生实验和合成数据以充当用于评价 CF 的参考组。无需现有知识的引入,CF 能 “发现” 覆盖四个数量级至 100,000 个事件的背景中 10 个示踪事件等级的下限的浓度范围内未门控分析中示踪 (spiked) 细胞的位置和浓度。

[0184] 如本文所显示的,这呈现了对表格式流式细胞术数据的定量分析的方法。同样,称作 “flowFP” 的 Bioconductor 软件包已被开发以整合指纹法方法与数据分析的其它先进方法。该整合的便利产生计算平台,其支持假定的产生和测试,消除操作者偏倚的来源和提供增加水平的数据分析自动化。重要地,流式细胞术数据的指纹基表示允许多形式数据的直接融合,能够进行双平台 (流式细胞术和 ELISA) 数据的整合分析。

[0185] 实施例 5 :微粒 ELISA 试验

[0186] 在一些实施方式中,通过流式细胞术检测的样品 (例如,无血小板血浆样品) 还可通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测试。ELISA 样品可用 1%EDTA/ 盐水连续稀释。可将预滴定量 (PBS 中 5ug. ml) 的 Annexin V (BD Biosciences) 加入 96 孔微量滴定板的每个孔作为捕获试剂 (以靶向 MP 表面上的磷脂酰丝氨酸) 并且在 4℃ 温育 18h。可洗涤板,并且 PFP 连续稀释的样品可加入孔中,在 25℃ 在板振荡器 (200r. p. m.) 上温育 18h。洗涤之后,可将预滴定量的生物素化抗体 (CD144、14、41a) 加入每个孔并且在 25℃ 在板振荡器上温育 2h。洗涤之后,可将过氧化物酶结合的抗生物素蛋白加入每个孔。每个孔可随后洗涤和然后与过氧化物酶底物溶液在室温温育 20min。该温育之后,可将终止溶液加入每个孔,并且吸光

度可用 EIA 读数器在 450 的波长测量。

[0187] 具体地,可如下测试该 ELISA 试验和单平台流式细胞术试验的特异性、准确性、精确度、线性、限度和范围。

[0188] 所述试验的特异性是明确地评估 MP 颗粒与 annexin-V 结合的能力。分析程序的准确性表示被接受为约定真值或接受的参考值与发现的值之间一致的接近度。ELISA 试验不是定量试验,而流式细胞术试验是。可比较两个平台上的结果。分析程序的精确度表示在规定的条件下获自相同均质样品的多次抽样的一系列测量之间一致的接近度。精确度可在三个水平考虑:重复性、中间精确度和再现性。重复性或试验内精确度与该研究最相关。分析程序的线性是其获得与样品中分析物浓度直接成比例的结果的能力。个体分析程序的检测限是样品中分析物的最低量,其可被检测到但不必定量为精确值。分析程序的范围是样品——对于其已证明,分析程序具有合适水平的精确度、准确性和线性——中分析物的较高和较低浓度之间的间隔。限度和范围又可通过比较数据与流式细胞术数据来评估。

[0189] 实施例 6:具有糖尿病和动脉粥样硬化的患者中 MPs 和 EPCs 的研究

[0190] 该研究基于具有利用流式细胞术指纹的无偏倚分析方案的广泛细胞表面标记组而利用新的科学发现方法以评价 DM 患者和 HC 之间的差异。与通过获得 MP 和 EPC 样品只观察 MPs 或 EPCs 水平的其它研究不同,该研究观察血管机能异常——通过 MP 水平,和修复能力——通过 EPC 水平,如何相互作用的平衡。

[0191] 患者招募和研究设计

[0192] 诊断有 2 型 DM 超过 5 年和具有临床上明显的动脉粥样硬化、心肌梗塞病史、中风、跛行或血管再形成程序的患者包括在该研究中。研究登记之前 3 个月内急性疾病、心肌梗塞或中风和孕妇从该研究中排除。在没有之前或当前的糖尿病史或心血管病史或主要的心血管风险因素——包括吸烟、高血压或升高的 LDL 胆固醇——的基础上将年龄相似的‘健康的’对象招募进研究。

[0193] 开始,连续招募 104 个对象 (52 个 DM 和个 52HC)。随后,由于需要新鲜而不是冷冻样品的分析进行 MP 分析的协议的修订,连续招募另外的对象 (n=14DM 和 n=7HC)。从这些对象中,62 个 DM 和 51 个 HC 样品产生可用于定量 EPCs 的数据。将四十八个 DM 和 48 个 HC 样品用于 MP 分析。47 个 DM 和 43 个 HC 样品的数据用于组合的 MP 和 EPC 分析。来自全血细胞计数 (CBC) 结果的绝对淋巴细胞计数 (ALC) 用于标准化 EPC 计数,96 个样品中五个不具有 ALC,因此不可用于 EPC 分析。具有 EPC 数据的二十二个对象不具有可用的新鲜样品,因此不包括在 MP 分析中。记录每个对象的人口统计信息、医学和药物治疗史、体格检查和生命体征。数据利用如下进行分析:用于统计计算的 R 环境 (版本 2.13.1, R Development Core Team, Vienna, Austria) 和 flowFP (Rogers et al., 2008, Cytometry Part A73A:430-441)、flowCore (Ellis, B., Haaland, P., Hahne, F., Le Meur, N., 以及 Gopalakrishnan, N. 2009. flowCore: Basic Structures for flow cytometry data. Bioconductor package version 1.18.0。软件可获自 <http://bioconductor.org/packages/2.10/bioc/html/flowCore.html>) 以及 KernSmooth (Wand, M. (R port by Brian Ripley). 2011. KernSmooth: Functions for kernel smoothing for Wand&Jones (1995). R package version 2.23-6。软件可获自 <http://CRAN.R-project.org/package=KernSmooth>) 包。

[0194] 样品采集

[0195] 禁食一晚上之后,利用 21- 规格针将血液采集在金盖 (Fisher Scientific) 血浆分离管 (SST) 中用于脂质分析和具有 EDTA 添加剂 (Fisher Scientific) 的淡紫色盖管中用于 HbA_{1c} 和 CBC 分析,如先前所描述的 (Curtis et al., 2010, Cytometry B Clin Cytom78(5):329-37)。将四个柠檬酸钠真空采血管 (vacutainer tubes) 充满 3ml 外周血用于 MP 分析,并且还将 30ml 外周血抽进 60ml 涂有肝素的注射器用于 EPC 分析。

[0196] EPC 流式细胞术

[0197] 样品采集后一个小时之内,将 30ml 全血用氯化铵裂解,用 PBS 中的 3%FCS 洗涤和再悬浮于 10ml PBS 中的 3%FCS。将 8×10^6 个细胞与小鼠 IgG (Sigma, Cat#I5381-10MG) 在冰上温育 10 分钟。封闭之后,将细胞在冰上在黑暗中用以下染色 45 分钟:20 μ l FITC-CD31 (BD Cat#555445, 克隆 WM59)、20 μ l PE-Cy7-CD34 (BD Cat#348791, 克隆 8G12)、20 μ l Percp-Cy5.5-CD3 (BD Cat#340949, 克隆 SK7)、20 μ l Percp-Cy5.5-CD33 (BD Cat#341650, 克隆 P67.6)、20 μ l Percp-Cy5.5-CD19 (BD Cat#340951, 克隆 SJ25C1)、5 μ l V450-CD45 (BD Cat#560367CloneHI30)、10 μ l PE-CD133 (Miltenyl Biotec Cat#130-080-801, 克隆 AC133) 和 20 μ l APC-VEGFR2 (R&D Cat#FAB357A, 克隆 89106)。荧光扣除对照管用于建立阴性门控 (Roederer, 2001, Cytometry45:194-205)。染色之后,将样品洗涤两次并向每管加入具有 0.1%BSA 和 5 μ g/ml 碘化丙啶 (Sigma cat#P4170) 的 600 μ l PBS。

[0198] 补偿管用 BD CompBeads (抗小鼠 IgG 和阴性对照, Cat#552843) 制备。8 个峰值荧光校准珠 (Spherotech, cat#RCP-30-SA) 每天在捕获之前和之后运行,用于在天之间标准化。所有捕获发生在 BD FACS Canto A 分析流式细胞仪上并且在计数至少 200,000 个淋巴细胞之后停止。

[0199] EPC 数据分析

[0200] 对于每个对象,读取表格式数据并利用 flowCore Bioconductor 包 (Ellis, B., Halland, P., Hahne, F., Le Meur, N., and Gopalakrishnan, N. 2009. flowCore: Basic Structures for flow cytometry data. Bioconductor package version 1.18.0。软件可获自 <http://bioconductor.org/packages/2.10/bioc/html/flowCore.html>) 在未转换的线性坐标中处理。基于通过 FACSDiva 捕获软件确定和在 FCS 首部储存的溢出矩阵而应用数字补偿,并且基于每天运行的参考珠 (Spherotech, Cat#RCP-30-5A) 利用最亮的峰将数据标准化。将荧光数据双指数转换,并将散射数据线性转换以将荧光和散射数据置于相似等级。开发完全自动化的门控策略以便消除可能的操作员偏倚 (图 15)。简言之,将其前向散射区域 (FSC-A) 或侧向散射区域 (SSC-A) 在目标区之上发信号的事件和前向散射区域上 (淋巴细胞簇下面) 的小事件去除以防止对自动化门控的干扰。应用生存能力门控,其中排除超过 PE-A (Phycoerythrin) 检测器 (在 575/26 带通滤波器上) 上恒定阈值的所有事件——其代表 PI 结合。利用区块分析算法基于 2D 核心密度估计的自动化多边形门控用于检测 FSC-A 对 SSC-A 中淋巴细胞区中的事件。产生自动化的门控以基于在 FSC-A 对前向散射宽度 (FSC-W) 上双峰群体与单峰群体分开的事实选择单峰细胞。最后,产生 CD45 对谱系混合物 (CD3T 细胞、CD19B 细胞和 CD33 单核细胞) 中的二维长方形门控以消除已分化成造血谱系的细胞和 / 或光亮地表达 CD45 的细胞,只留下谱系^{阴性}和 CD45^{暗-阴性}事件。剩下的事件然后利用 flowFP 包 (Holyst, H. A., and Rogers, W. T. 2009. FlowFP: Fingerprinting for Flow

Cytometry. Bioconductor Package version 1.12.1。软件可获自 <http://bioconductor.org/packages/2.10/bioc/html/flowFP.html>) 分析。利用具有默认分辨率的方法 flowFPModel 基于来自健康对照对象的所有门控事件的聚集——利用不用于门控的四个测量的荧光参数 (PE-Cy7-CD34、PE-CD133、APC-VEGF-R2 和 FITC-CD31)——而构建面元划分模型。产生的面元划分模型含有 1024 个面元。然后利用用于所有样品的方法 flowFP 从 DM 和 HC 对象产生指纹。每个面元中相对事件计数通过小细胞门控中的事件数 (通常视为代表流式细胞仪中测量的淋巴细胞数) 除以面元中的事件数而计算。绝对事件计数通过表示为每 μl 全血数千个淋巴细胞的 ALC 实验室结果乘以相对事件计数而获得。最后, 利用 Wilcoxon 检验在 DM 和 HC 样品之间比较面元, 利用 Benjamini-Hochberg 校正对多个比较校正 P 值。P 值 <0.05 被认为是显著的。

[0201] MP 分离

[0202] 贫血小板血浆 (PPP) 利用从在柠檬酸钠管中采集的血液离心而分离。血液采集后一小时内, 为了如前面所描述分离 MPs (Curtis et al., 2010, Cytometry B Clin Cytom 78(5):329-37), 将全血在室温以 2,500g 离心 15 分钟。将 PPP 小心地移到新管并轻轻地混合。然后将新鲜样品经由流式细胞术分析。

[0203] MP 流式细胞术

[0204] 将 50 μl PPP 用 2.5 μl FITC-Annexin-V (BD Bioscience Cat#556570)、2.5 μl PE-CD144 (BD Bioscience Cat#560410, 克隆 55-7H1)、0.75 μl Percp-Cy5.5-CD64 (BD Bioscience Cat#561194, 克隆 10.1)、0.75 μl AF647-CD105 (BD Bioscience Cat#561439, 克隆 266)、0.75 μl APC-H7-CD41a (BD Bioscience Cat#561422, 克隆 HIP8)、2.5 μl PE-Cy7-CD31 (Biolegend Cat#303118, 克隆 WM59) 和 0.75 μl BV421-CD3 (Biolegend Cat#300433, 克隆 UCHT1) 在黑暗中在室温标记 30 分钟。在标记之前将抗体用 0.1 μm 低蛋白结合过滤器 (Millipore, Cat#SLV033RS) 双重过滤。

[0205] 将样品管染色之后, 将 5 μl 3.0 μm 珠加入每个管作为参考计数珠。将 Annexin 缓冲液 (10mM Hepes, pH7.4, 140mM NaCl 和 2.5mM CaCl_2) 加入每个管以使总体积 500 μl 。将 Annexin 缓冲液用 0.22 微米滤器, 之后是 0.1 μm 滤器双重过滤。

[0206] BD FACSCanto A 流式细胞仪每天用 Cell Tracker 珠 (BD) 利用 Diva 软件版本 6.1.2 校准。将前向和侧向散射阈值、光电倍增管 (PMT) 电压和窗口延伸 (WE) 优化以利用 0.3、1.0 和 3.0 μm 校准珠检测 0.1-1.0 μm 颗粒。已知尺寸的珠 (0.3 μm 、1.0 μm 和 3.0 μm) 用于 MP 尺寸的估计。

[0207] 当计数固定数目的 3.0 μm 珠 (20,000) 时停止捕获, 导致每个样品 8 万 2 千至 220 万个 MPs。补偿管也利用 PPP、BD CompBead (BD Bioscience Cat#552843) 运行, 并利用与用于样品管相同的试剂染色。

[0208] MP 数据分析

[0209] 将用于统计计算的 R 环境用于流式细胞术数据的分析。flowCore 包 (38) 用于读取文件、补偿和门控。FlowFP (Rogers et al., 2008, Cytometry Part A 73A:430-441) 用于流式细胞术指纹 (CF) 分析。对于每个对象, 表格数据在未转换的线性坐标中读出。基于通过 Diva 捕获软件确定和在 FCS 首部储存的溢出矩阵而应用数字补偿。将数据在侧向散射宽度上门控 (图 16 和 17) 为粒度的相对测量以消除大于 1 μm 的所有事件, 如通过每天采

集的尺寸校准珠所确定的。标记阳性表达的阈值通过考查所有捕获的事件的单变量分布的核心密度估计来鉴定（图 18）。为了确定分析结果对阈值选择的灵敏度，在阳性和阴性群体之间核心密度估计中没有清楚分离的荧光标记的阈值通过多种因素增加约 1.4 至 2.5 倍之间，并且结果显示稳定，证明阈值的选择没有实质上影响结果。将荧光数据双指数转换，并将组中不表达标记的事件假定为碎片并门控掉（图 19）。利用 R 包 flowFP (Holyst, H. A., and Rogers, W. T. 2009. FlowFP: Fingerprinting for Flow Cytometry. Bioconductor Package version 1.12.1。软件可获自 <http://bioconductor.org/packages/2.10/bioc/html/flowFP.html>) 对产生的分布进行指纹法分析。面元划分模型基于 HC 对象利用方法 flowFPModel——利用在默认分辨率的所有荧光标记——而产生，导致 8192 个面元。然后利用方法 flowFP 基于该模型产生针对每个样品的指纹。利用 Wilcoxon 检验在 DM 和 HC 样品之间比较面元，利用 Benjamini-Hochberg 校正对多个比较进行校正。校正的 P 值 < 0.05 被认为是显著的。将判断是显著的面元进一步通过表型相似性分组。因此，确定为在 DM 与 HC 之间差别表达的表型亚型可由多变量空间中邻近的一个或多个面元组成，其所有均可落到针对阳性表达的每个参数阈值的同一侧上。

[0210] 高灵敏度 C- 反应蛋白测量

[0211] 高灵敏度 C- 反应蛋白利用激光基免疫比浊定量方法在自动化激光基比浊计 (Siemens Healthcare Diagnostics, Model BNII) 上按照制造商建议的方法进行测量。

[0212] 统计学分析

[0213] 参加者特性视情况利用威尔科克森秩和检验或费希尔的精确检验在 DM 和 HC 组之间进行比较。EPC 和 MP 计数利用威尔科克森秩和检验在 DM 和 HC 组之间进行比较。多变量线性回归模型用于估计组之间 EPC 和 MP 计数中调节的差异。调节变量基于分步模型选择程序进行选择，分步模型选择程序基于 Akaike 信息判据 (AIC)，对于其保持减少 AIC 的变量。评价的变量是：年龄、性别、种族、目前的锻炼和体重指数。因为 EPC 和 MP 计数确实倾斜，所以应用对数变换以便针对 DM 对 HC 的指数化回归系数定量 DM 和 HC 组之间平均计数的比。在事后分析中，显示 DM 和 HC 组之间最强差异的 MP 和 EPC 计数均通过 HC 组中的中值标准化。标准化的 EPCs 对标准化的 MPs 的绘图用于图解地评价是否 MPs 和 EPCs 的组合用于区分 DM 与 HC。更正式地，接受者操作特性 (ROC) 曲线用于评价 MP 和 EPC 计数的能力，具有和没有 hsCRP，以在 DM 和 HC 组之间进行区分。所有分析利用 R 完成。

[0214] 实施例 6 结果

[0215] DM 组较 HC 组稍微年长，如表 6 所示。

[0216] 表 6

[0217] 参加者特性

[0218]

	EPC 群			微粒群		
	糖尿病 <i>n</i> = 62	对照 <i>n</i> = 51	P*	糖尿病 <i>n</i> = 48	对照 <i>n</i> = 48	P*
<i>人口统计特性</i>						
年龄, 岁	67(58,73)	59(55,68)	0.019	66(59,72)	59(55,67)	0.010
女性, <i>n</i> (%)	26 (42)	32 (63)	0.037	19 (40)	30 (63)	0.041
黑人或非洲裔美国人, <i>n</i> (%)	33 (53)	12 (24)	0.002	26 (54)	12 (25)	0.006
吸烟状态, <i>n</i> (%)			<0.001			<0.001
目前	14 (23)	0 (0)		11 (23)	0 (0)	
以前	38 (61)	18 (35)		30 (63)	16 (33)	
未曾	10 (16)	33 (65)		7 (15)	32 (67)	
定期锻炼, <i>n</i> (%)	34 (55)	42 (82)	<0.001	26 (54)	38 (79)	<0.001
体重指数, kg/m ²	30(27,36)	24(23,26)	<0.001	31(27,36)	24(23,26)	<0.001
扁桃体切除术, <i>n</i> (%)	21 (34)	25 (49)	0.13	17 (35)	24 (50)	0.22
<i>实验室值</i>						
<i>血压, mmHg</i>						
收缩压	136(120, 150)	122 (111, 129)	< 0.001	133 (121, 148)	122 (111, 131)	< 0.001
舒张压	78 (70, 85)	77 (72, 85)	0.93	78 (70, 85)	77 (72, 86)	0.80
<i>胆固醇水平, mg/dL</i>						
总计	154 (126, 201)	211 (186, 226)	< 0.001	145 (126, 192)	211 (185, 225)	< 0.001
低密度脂蛋白	80 (66, 106)	127 (117, 148)	< 0.001	75 (65, 100)	127 (116, 147)	< 0.001

[0219]

高密度脂蛋白	38 (32, 58)	48) (49, 73)	< 0.001	37 (32, 59)	49) (49, 74)	< 0.001
高灵敏度 C 反应蛋白, mg/L	2.4 (1.0, 6.8)	0.9 (0.4, 1.5)	< 0.001	2.4 (1.0, 7.0)	0.9 (0.4, 1.6)	< 0.001
血红蛋白 A1c, %	7.0 (6.5, 8.8)	5.6 (5.5, 5.7)	< 0.001	7.0 (6.5, 8.7)	5.6 (5.5, 5.7)	< 0.001
绝对淋巴细胞计数, 10 ³ 细胞 / 微升	1.8 (1.2, 2.4)	1.4 (1.2, 1.8)	0.009	1.8 (1.1, 2.2)	1.3 (1.2, 1.7)	0.045

药物治疗使用

抗血小板, n (%)	45 (73)	5 (10)	< 0.001	37 (77)	3 (6)	< 0.001
抑制素, n (%)	42 (68)	0 (0)	< 0.001	35 (73)	0 (0)	< 0.001

[0220] 概括呈现为中值（四分位距）除非另外记录为 n (%)

[0221] *P 值视情况获自威尔科克森秩和检验或费希尔精确检验

[0222] 性别在 DM 和 HC 之间稍微不同, 与 DM 组中 ~ 40% 女性相比, HC 组中 ~ 60% 女性。与 HC 组相比, DM 组中还有更多数目的非洲裔美国人。此外, DM 组中有更高比例的吸烟者、更低比例的报道的锻炼和更高的平均 BMI。如所期望的, HbA_{1c} 在 DM 组中升高, 血压也是如此; 然而, 与对照相比, DM 中 LDL 水平更低, 同时不与对照相比, 对于 EPC 分析, DM 群的 68% 以及 MP 分析中 DM 群的 73% 依赖抑制素。有意思的是, 不依赖抑制素的 DM 患者的 LDL 较依赖抑制素的那些患者更高, 但是仍然较 HC 低。这不是完全意料之外的, 因为理论上, 虽然对于 DM 患者, LDL 可与 HC 相似, 但是 LDL 的组成不同和更致动脉粥样化 (Nesto, 2008, Clinical Diabetes 26:8-13)。另外, 与 HC 组相比, DM 组中 HDL 水平较低。MP 和 EPC 群中, 高灵敏度 CRP 的水平在 DM 中较 HC 更高 (Haffner, 2006, Am J Cardiol 97(2A):3A-11A)。虽然大多数 DM 患者依赖抗血小板和 / 或抑制素药物, 但是对照中几乎没有依赖预防性抗血小板药物治疗的。

[0223] 经由传统的手动连续门控分析 (利用 FlowJo, Treestar, Ashland, OR) 的 EPCs 的评估没有显示在 DM 和 HC 之间统计学上显著性的差异。然而, 当应用流式细胞术指纹时, 不同的表型亚型——在本文称作 EPCs——在一个指纹面元中被辨别。该亚型具有表型 CD34⁺/CD31⁺/CD133^亮/CD45^{暗-阴性} (图 20), 并且与 HC 相比, 在 DM 患者中平均较低。该亚型的相对事件计数 (EPC_{相对}) 在 DM 和 HC 之间显著不同, 甚至在如上面所讨论的协变量调节之后。单独地, ALC 水平在糖尿病患者和对照之间显著不同 (P<0.001), 但是该差异在混杂因素调节之后减小 (P=0.11)。该发现与发现淋巴细胞计数与心血管事件相关的其它作者的工作一致; 然而, 在混杂变量调节之后, 不存在相关性 (Eryd et al., 2012, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 32(2):533-9)。

[0224] 经由流式细胞术指纹的 MPs 的评估导致发现在 HC 和 DM 组之间显著不同的 MPs 的 8 个不同表型亚型 (图 21)。在除一个之外 (下面讨论) 的所有这些中, 与 HC 相比, 浓度在

DM 中平均较高。经由指纹法发现的每个统计学上显著的群体实际上是对指示的标记（或多个）阳性的 MPs 亚型。例如，图 21G 显示对 CD41 阳性的 MPs 亚型。这些不全是对 CD41 阳性的 MPs 亚型，而是那些这样的事件，其对 CD41 阳性，同时也对组中所有其它标记阴性，并落入在 DM 和 HC 群之间显著不同地占据的指纹面元。在 DM 和 HC 之间强烈不同的一个亚型是 CD3⁺T- 淋巴细胞 MPs (TMP) 的亚型，与 HC 相比，其还以较高浓度存在于 DM 患者中。相似地，CD105⁺ 内皮 MP (EMP) 群的亚型以更高的平均浓度存在于 DM 患者中。另一个显著的亚型由为 Annexin V⁺ 的事件组成，其在 DM 中上调。虽然 Annexin V 单阳性亚型表示凋亡 MP，但是它不是对母细胞类型特异的标记。另一个增加的亚型是 CD31⁺ 表型。虽然该亚型具有 p 值 >0.05，但是在混杂变量调节之后它是显著的。单独 PE-CAM1 (CD31) 标记对一种细胞类型不是特异的。发现是显著的 MP 的最后 4 个亚型都是血小板 MP (PMP) 并且对 CD41 阳性（并且一些也对 CD31 阳性）。CD41 单阳性群体和 Annexin V⁺/CD31⁺/CD41⁺ 三阳性亚型在 DM 患者中都是近乎 (marginally) 显著的 (P<0.05) 和上调的。CD41⁺ 和 Annexin V⁺/CD31⁺/CD41⁺ 亚型在混杂变量调节之后都不是显著的。最后，存在两个 CD31⁺/CD41⁺ 双阳性 PMP 亚型，其通过指纹法发现在 DM 和 HC 之间不同。这些之一是近乎显著的 (P=0.11) 和在 DM 患者中上调 (CD31^暗/CD41^暗)，而其它是高度显著的 (P<0.001) 并且是与 HC 相比以平均更低浓度存在于 DM 的差别表达的亚型中仅有的一个 (CD31^亮/CD41^亮)。最后，CD31^暗/CD41^暗 亚型与 CD31^亮/CD41^亮 亚型之比与单独的暗或亮的亚型或通过流式细胞术指纹发现的其它差别表达的 MP 亚型中任何一个相比更强烈地差别表达 (P<0.001)，并因此用于形成本发明的 EPCs 和 MPs 的组合测量。

[0225] 由于通常认为，祖细胞在细胞修复能力和新血管生长中发挥作用，并且微粒是细胞损伤的度量，所以假设两个的组合将较任何一个单独在临床上提供更多关于心血管状态的信息。评价每个淋巴细胞和通过暗与亮 CD31⁺/CD41⁺ 微粒之比的 EPCs (CD31⁺、CD34⁺、CD133^亮、CD45^{暗-阴性}) 的相对事件计数的能力以在 DM 和 HC 之间区分 (图 22)。针对这两个标记组合的 ROC 曲线下面积 (AUC) 是 0.86、95%CI : (0.79、0.94)，指示高区分准确性。当与 CRP 组合时，AUC 增加到 0.90、95%CI : (0.83、0.96)。表 7 显示 DM 和 HC 组之间 EPC 和 MP 亚型的比较。

[0226] 表 7

[0227] DM 和 HC 组之间 EPC 和 MP 亚型的比较

[0228]

糖尿病	对照	p*	调节的比**
-----	----	----	--------

[0229]

	中值(IQR)	中值(IQR)	(95% CI)	
内皮祖细胞				
EPC ^{绝对}	97 (61, 170)	165 (100, 250)	0.005	0.85 (0.63, 1.2)
EPC ^{相对}	6.1 (4.0, 9.9)	12 (7.5, 18)	< 0.001	0.65 (0.49, 0.88)
微粒计数(每 ml 血浆)				
CD31 ⁺ /CD41 ⁺ 亮	15 (8.1, 37)	51 (20, 150)	< 0.001	0.28 (0.16, 0.49)
CD31 ⁺ /CD41 ⁺ 暗	120 (55, 340)	89 (50, 180)	0.11	1.4 (0.86, 2.2)
CD31 ⁺ /CD41 ⁺ 暗与亮的比	11 (3.1, 21)	2.1 (0.72, 4.2)	< 0.001	6.5 (3.5, 12)
Annexin ⁺	4.2 (2.9, 7.1)	2.3 (1.6, 3.2)	< 0.001	1.6 (1.2, 2.1)
CD31 ⁺	10 (5.6, 27)	7.8 (3.3, 14)	0.058	1.7 (1.1, 2.8)
CD41 ⁺	0.38 (0.20, 0.99)	0.20 (0.051, 0.66)	0.027	1.6 (1.0, 2.5)
Annexin ⁺ /CD31 ⁺ /CD41 ⁺	4.9 (1.9, 13)	3.2 (1.6, 6.6)	0.031	1.4 (0.88, 2.4)
CD3 ⁺	3.1 (1.5, 4.4)	0.98 (0.60, 2.4)	< 0.001	2.5 (1.5, 4.3)
CD105 ⁺	1.9 (1.3, 3.8)	1.2 (0.69, 2.1)	0.001	1.9 (1.3, 2.6)

[0230] IQR, 四分位距

[0231] *P 值获自威尔科克森秩和检验

[0232] ** 获自针对对数变换计数的多变量线性回归模型

[0233] ***EPC^{绝对} 指示每 ml 血液 CD31⁺/CD34⁺/CD45^{暗至阴性}/CD133⁺ 祖细胞的亚型

[0234] ****EPC^{相对} 指示作为 FSC - A 对 SSC-A 淋巴细胞区域中事件百分比的 CD31⁺/CD34⁺/CD45^{暗至阴性}/CD133⁺ 祖细胞的亚型

[0235] 研究结果鉴定了一个与 DM 相比在 HC 中上调的 CD31⁺/CD34⁺/CD45^{暗-阴性}/CD133⁺ EPCs 的亚群。此外,确定了存在对应于血小板、T- 淋巴细胞、Annexin V⁺ 和内皮微粒的微粒的 7 个亚群。因此,该研究证实了 EPCs 和 MPs 水平在具有动脉粥样硬化的 HC 和 DM 患者之间不同的假设,并提示这些测量用作心血管健康的预测标记。

[0236] EPCs 作为生物标记的使用是有意义的,因为它直接涉及心血管系统中的病理过程,这与非特异地响应潜在情况的其它通常使用的生物标记相反。在 DM 患者对 HC 的情况中,存在一个 EPCs 群体,具有在对照组中上调的 CD31⁺/CD34⁺/CD45^{暗-阴性}/CD133⁺ 的表型。该 EPC 群体与 Estes 等人 (Estes et al., 2010, Cytometry Part A 77A:831-839) 描述的循环造血干细胞和祖细胞 (CHSPC) 群体相似并且显示在图 20 中。EPCs 是异质群体,其特异的表型定义仍有争论。一般,文献中描述的 EPC 表型将包括干细胞标记如 CD34、未成熟标记如 CD133 和内皮标记如 VEGF-R2 (KDR) (Möbius-Winkler et al., 2009, Cytometry Part A 75A:25-37)。

[0237] 在该研究中,利用广泛的组,其中细胞首先基于尺寸而被选择。然后,属于成熟造血谱系的细胞通过门控掉 CD3⁺、CD19⁺、CD33⁺ 和 CD45^亮细胞而被去除。然后,利用指纹法,将剩余的群体再分并进行统计学评价,而没有任何预定的偏倚,以发现是否存在 DM 患者和 HC 之间差别表达的细胞群体。与一些其它研究一样,发现 VEGF-R2 在分析中不是有用的标记 (Estes, M. L., Mund, J. A., Ingram, D. A., and Case, J. 2001. Identification of Endothelial Cells and Progenitor Cell Subsets in Human Peripheral Blood. In Current Protocols in Cytometry: John Wiley&Sons, Inc.), 这表明所述标记不提供信息或,如一些研究已显示的,所述试剂不可靠。如可在图 23 中看到的,存在许多针对 VEGF-R2 的假阳性事件,因此难于发现真正的阳性阈值。另外,已显示 VEGF-R2 抗体不能充分滴定,因为组中抗体浓度的增加增加产生的信号。本研究中的组含有另外的内皮标记 (CD31),其也在提供信息的表型中阳性表达,这支持被接受以在 EPCs 上表达的不成熟 (CD133)、干 (CD34) 和内皮 (CD31) 标记的相似的一般表型。

[0238] 发现在本研究中差别表达的群体表达 Estes 等研究 (Estes et al., 2010, Cytometry Part A77A:831-839) 中发现的显示为促血管生成的相同的标记。在 Estes 等中,小鼠体内肿瘤模型显示,具有与该研究中 EPCs 相同表型的细胞导致肿瘤生长显著增加,这表明这些细胞涉及新生血管发生。另外,发现相似的细胞群体 CD34⁺/CD133⁺/CD117⁺ (CD117, c-Kit, 是干细胞标记) 在缺血组织中产生增加的血管发生,导致 2 周之后大鼠梗死区中 3-5 倍高的毛细血管数目,与不表达 CD133 的更成熟的血管内皮相反 (Kocher et al., 2001, Nat Med7:430-436)。本研究不包括 CD117,然而,可能是由于两个群体重叠和共享相似功能的两个其它标记。因此,我们的研究的无偏倚结果在显示促血管生成的 EPCs 在动脉粥样硬化群体和 HC 之间差别表达方面与其它研究是一致的。

[0239] 血小板 MPs (PMP) 已知对血管健康具有有利和不利作用 (Tushuizen et al., 2011, Arterioscler Thromb Vasc Biol31:4-9)。这些主张得到本研究的支持,因为多个不同 PMP 群体在两个群体之间显著不同,其中三个在 DM 患者中上调,而其它的在 HC 中上调。Omoto 等 (Omoto et al., 1999, Nephron81:271-277) 发现与没有并发症的 DM 患者相比, PMPs 在具有肾病的 2 型 DM 患者中显著上调,这提示 PMPs 涉及导致肾功能异常的活性。此外, Tan 等 (Tan et al., 2005, Diabetic Medicine22:1657-1662) 发现具有临床上明显的动脉粥样硬化的 DM 患者较没有临床上明显的动脉粥样硬化的 DM 患者和 HC 具有显著更高水平的 PMPs。另外,显示 PMPs 和 EMPs 均在具有严重高血压的患者中上调 (Preston et al., 2003, Hypertension41:211-217),这提示 EMPs 和 PMPs 可以是血压对内皮和因此血管损伤的影响的标记。还显示 PMPs 体外刺激内皮细胞以释放细胞因子和表达粘附分子 (Nomura et al., 2001, Atherosclerosis158:277-287)。本结果显示多数 MP 亚型是差的血管健康的标记。然而,无偏倚的流式细胞术指纹方法也能发现在 HC 中上调的 PMPs 群体,这与 PMPs 可具有有利作用的其它发现一致。已显示 PMP 辅助人脐静脉内皮细胞的血管生成活性和外周血单核细胞中增大的 EPC 分化 (Kim et al., 2004, Br J Haematol124(3):376-384)。Mause 等已显示 PMPs 可提高血管生成的早期向外生长细胞的潜能以在血管损伤之后恢复内皮完整性 (Mause et al., 2010, Circulation122:495-506)。因此,通过无偏倚的计算方法,该研究区分在血管健康中发挥作用的 PMPs 的两个单独群体。

[0240] 内皮 MPs (EMP), 如同 PMPs, 在 DM 患者中升高,并且已建立理论,即, EMPs 与血管

机能异常相关,是细胞凋亡的预兆,并因此反映血管壁损伤 (Chironi et al., 2009, Cell Tissue Res335:143-151)。在一个研究中,EMP 水平与流量介导的扩张 (FMD) 负相关,这表明 EMPs 与内皮机能失调相关 (Feng et al., 2010, Atherosclerosis208:5)。另外,另一个研究显示,EMPs 在具有冠状动脉疾病的患者中较对照中显著更高 (Bernal-Mizrachi et al., 2003, American Heart Journal145:962-970)。该研究中发现的 CD105⁺ 群体亚型可能对应于 EMPs,其已在许多研究中显示是疾病和血管机能异常的标记。因此,本文呈现的结果与对 EMPs 的先前工作一致,显示具有临床动脉粥样硬化的 DM 患者与 HC 相比具有更高的 EMPs 水平。

[0241] 结果还显示,与 HC 相比,CD3⁺T 细胞 MP (TMP) 群体亚型在 DM 患者中显著上调。该发现支持先前的工作,因为已知 TMPs 是促炎的,通过减少 eNOS 表达水平和增加内皮细胞中氧化应激降低 NO 产生 (Martin et al., 2004, Circulation109:1653-1659)。另外, TMPs 通过改变 NO 前列环素途径而在传导和阻力动脉中引起内皮功能失调。此外, TMPs 以与人相似的浓度损害乙酰胆碱诱发的主动脉环松弛 (Martin et al., 2004, Circulation109:1653-1659)。最后, TMPs 也已显示响应流动和化学刺激而产生内皮机能失调 (Martin et al., 2004, Circulation109:1653-1659)。

[0242] Annexin V⁺ 细胞结合磷脂酰丝氨酸,其是凋亡的标记。对动脉粥样硬化斑块进行的研究已显示,斑块中发现的凋亡 MP 解释几乎所有的斑块提取物的 TF (组织因子) 活性。这表明 MPs 可在凝血级联的启动中发挥作用 (Mallat et al., 1999, Circulation99:348-353)。另外,与具有稳定心绞痛的患者相比,对 Annexin V 阳性的 MPs 在具有急性冠脉综合征的患者中显著地上调 (Mallat et al., 2000, Circulation101:841-843)。这表示增加的 Annexin V⁺MPs 反映患者动脉粥样硬化状况的恶化。然而,研究限制是对 Annexin V⁺MP 的凝血酶原酶试验与流式细胞术分开进行,因此这些细胞可以具有任何来源。本研究支持这些发现,因为 Annexin V⁺ 群体亚型在 DM 患者中显著地上调。

[0243] 细胞基系统分析,也称作‘细胞组学’,整合环境和遗传的心血管风险因素的生物学结果。对发展可常规地用于指导医学治疗和风险评估这样的确定存在未满足的临床需要。目前的结果通过利用模式发现计算的方法对血管健康提供综合的见解以分析若干靶——包括血管微粒 (最近被鉴定为血管健康的强大生物标记) 群体和内皮祖细胞的特性。例如,可评价无症状患者的心血管风险,并可纵向地监测有症状的患者。这些能力实现个性化医疗的主要目标。

[0244] 该研究的目的是利用无偏倚的方法发现在动脉粥样硬化 DM 群体和 HC 之间差别表达的细胞和微粒的表型亚型。因此,没有在发现的 EPC (如 ECFC 或体内动物模型) 或 MP (如凝血酶原酶试验) 群体上进行功能试验。这些群体提示的功能源自讨论中引用的其它组进行的研究

[0245] 仍然,不像其它研究,流式细胞术指纹和广泛试验的使用允许我们去除任何无意的门控偏倚以发现在群体中差别表达的很多群体。此外,使用的方法包括严格的流式细胞术方案,包括:利用珠标准随着时间对仪器仔细地进行标准化,利用珠标准在数学上校正另外的残留仪器改变,FMO 对照用于阳性,双指数变换,以及数字仪器的使用。最后,如与回顾相反,连续招募 DM 患者和 HC。

[0246] 该研究的结果表明,与具有动脉粥样硬化的 DM 群体相比,在健康对照中 EPCs 较

高,并且大多数 MP 亚型较低。重要的是,这些结果用流式细胞术指纹——能够发现利用常规分析方法时可保持隐藏的分布模式的新的无偏倚数据分析方法——获得。若干亚型在这两个群体中显著地差别表达,其中一些在文献中得到支持,而其它的是新发现。有意思的是,VEGF-R2——通常与 EPCs 相关的标记——是不提供信息的。流式细胞术指纹是客观的、综合的和节省劳动的方法,并在可能含有隐藏数据模式的复杂、多变量分布分析中具有普遍的实用性。这些结果合在一起提供血管健康概况的依据,其可用于许多应用,包括药物研发、临床风险评估和伴随诊断学。

[0247] 本文引用的每个和每一专利、专利申请和公开的公开内容由此以其全部通过引用并入本文。

[0248] 虽然本发明已参考具体实施方式进行了公开,但是,显然本发明的其它实施方式和改变可以由本领域技术人员想到而不背离本发明的真正精神和范围。所附权利要求意图被解释为包括所有这样的实施方式和等同的改变。

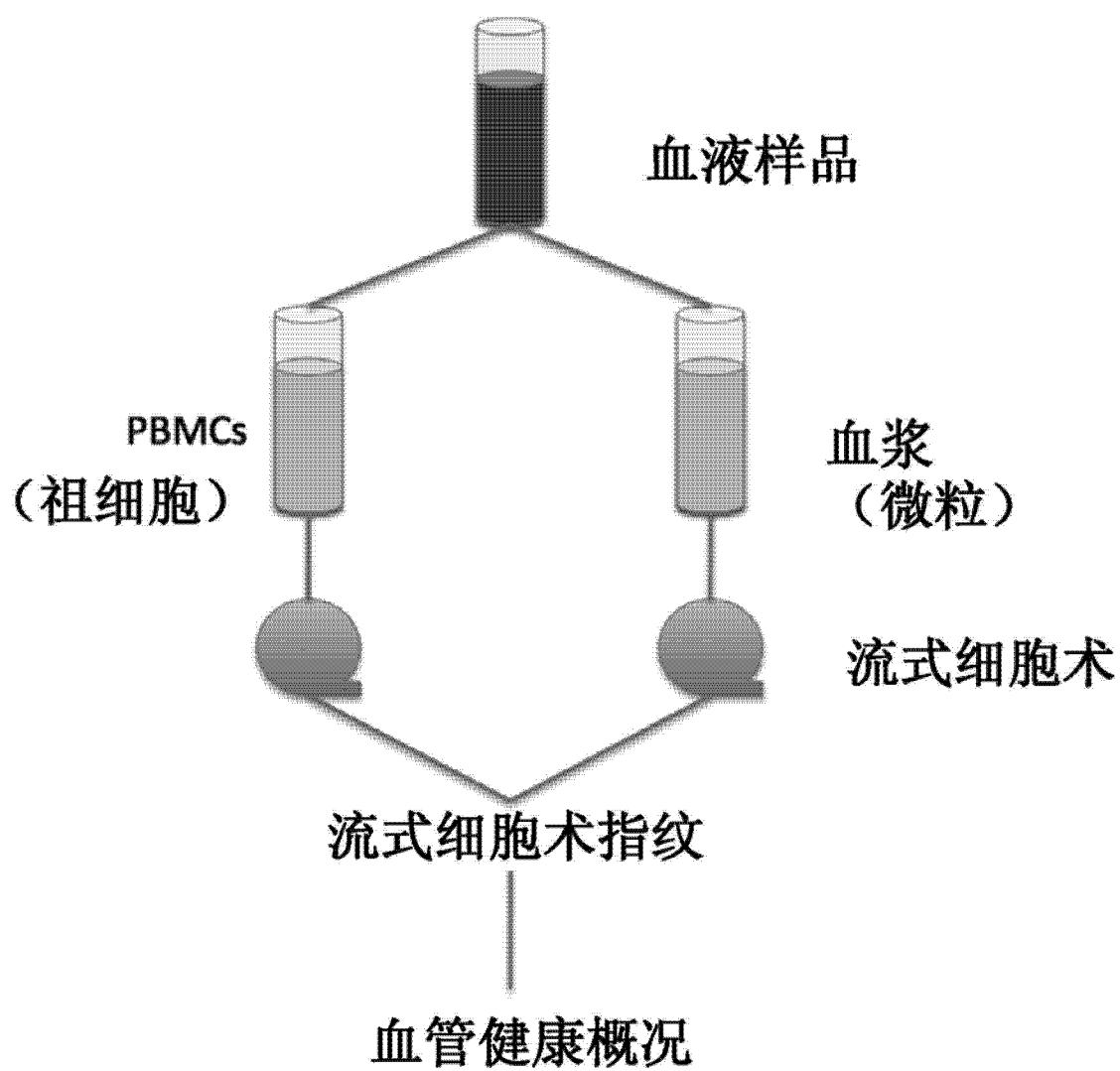


图 1

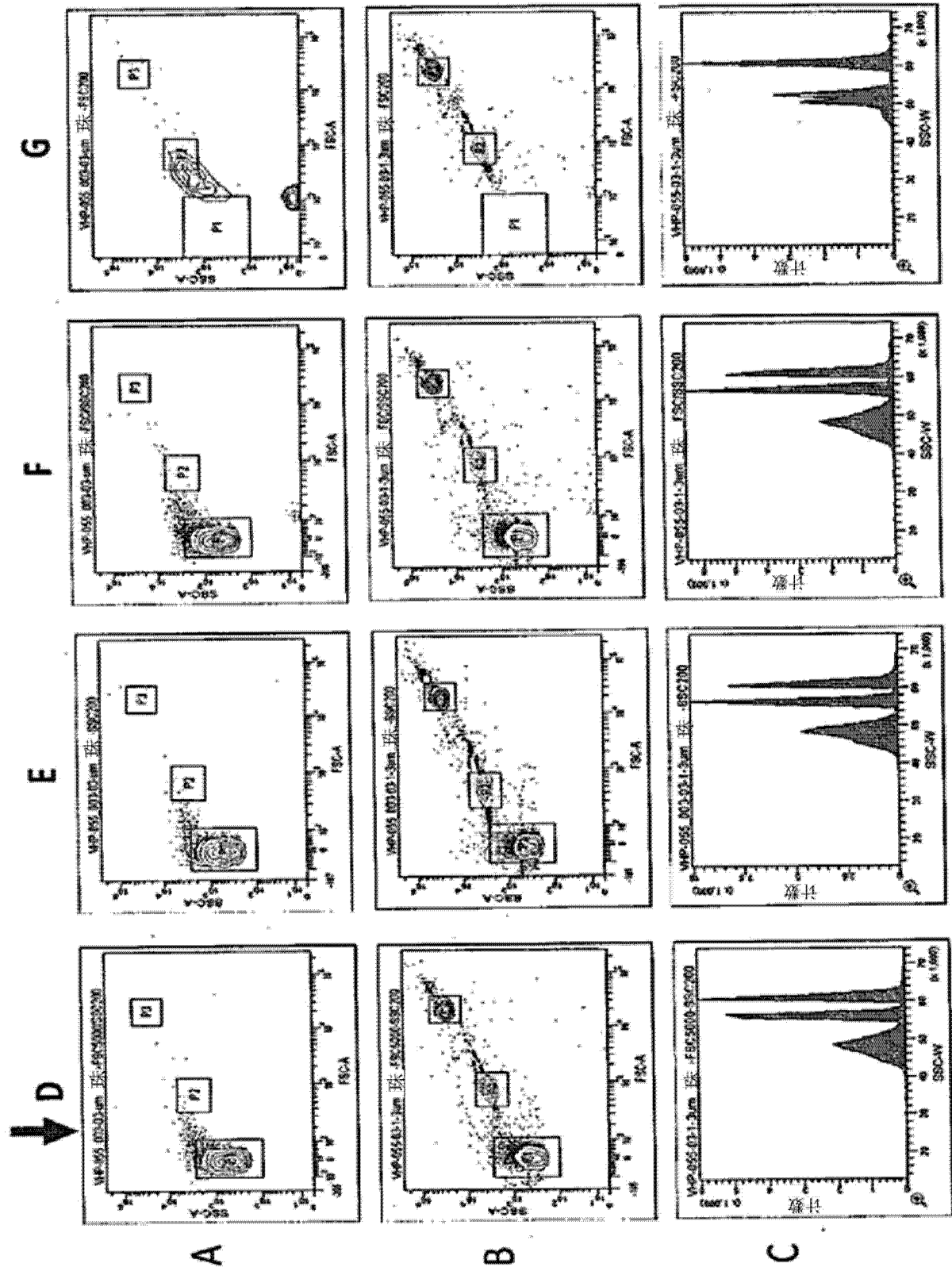


图 2

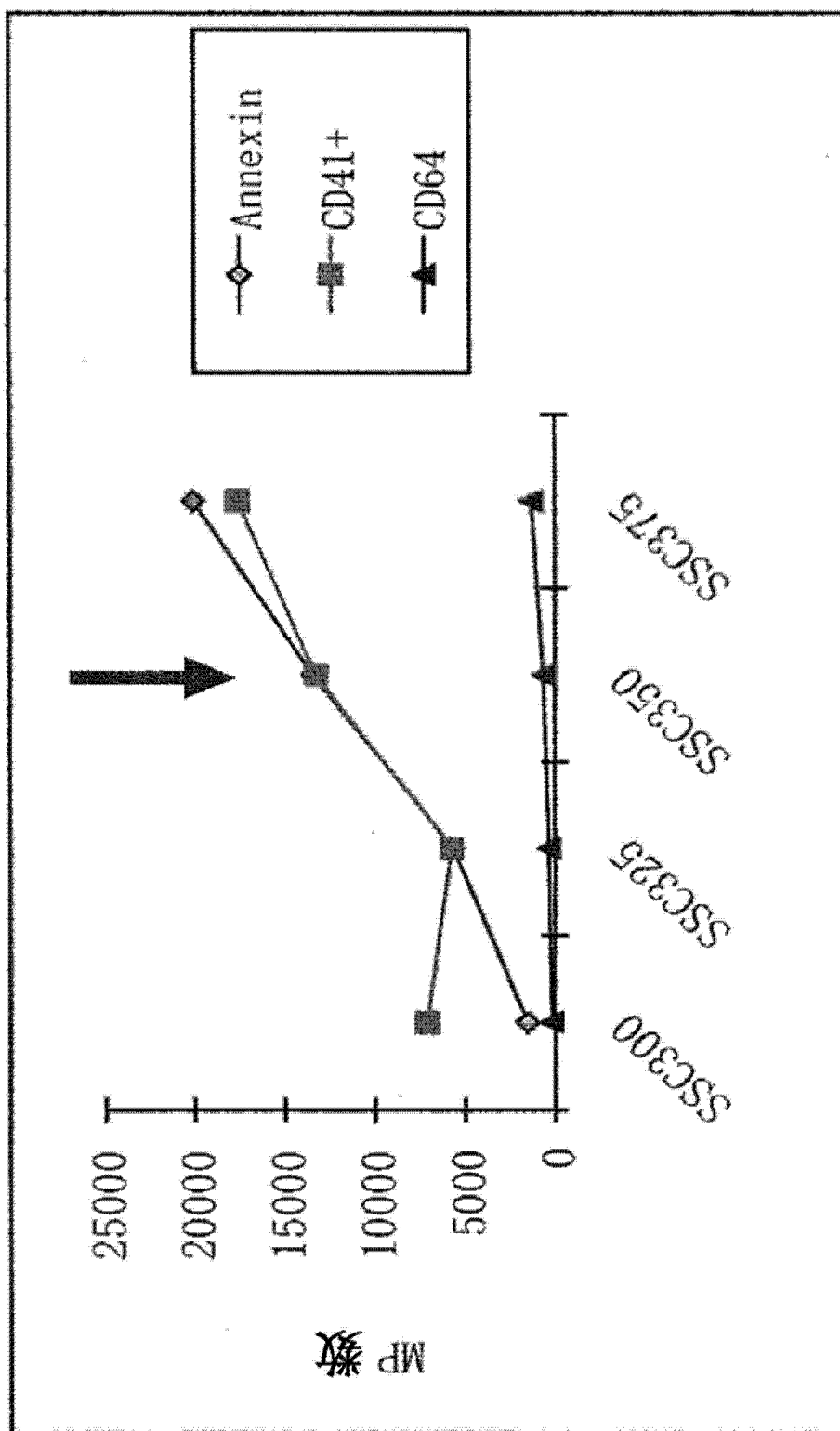


图 3

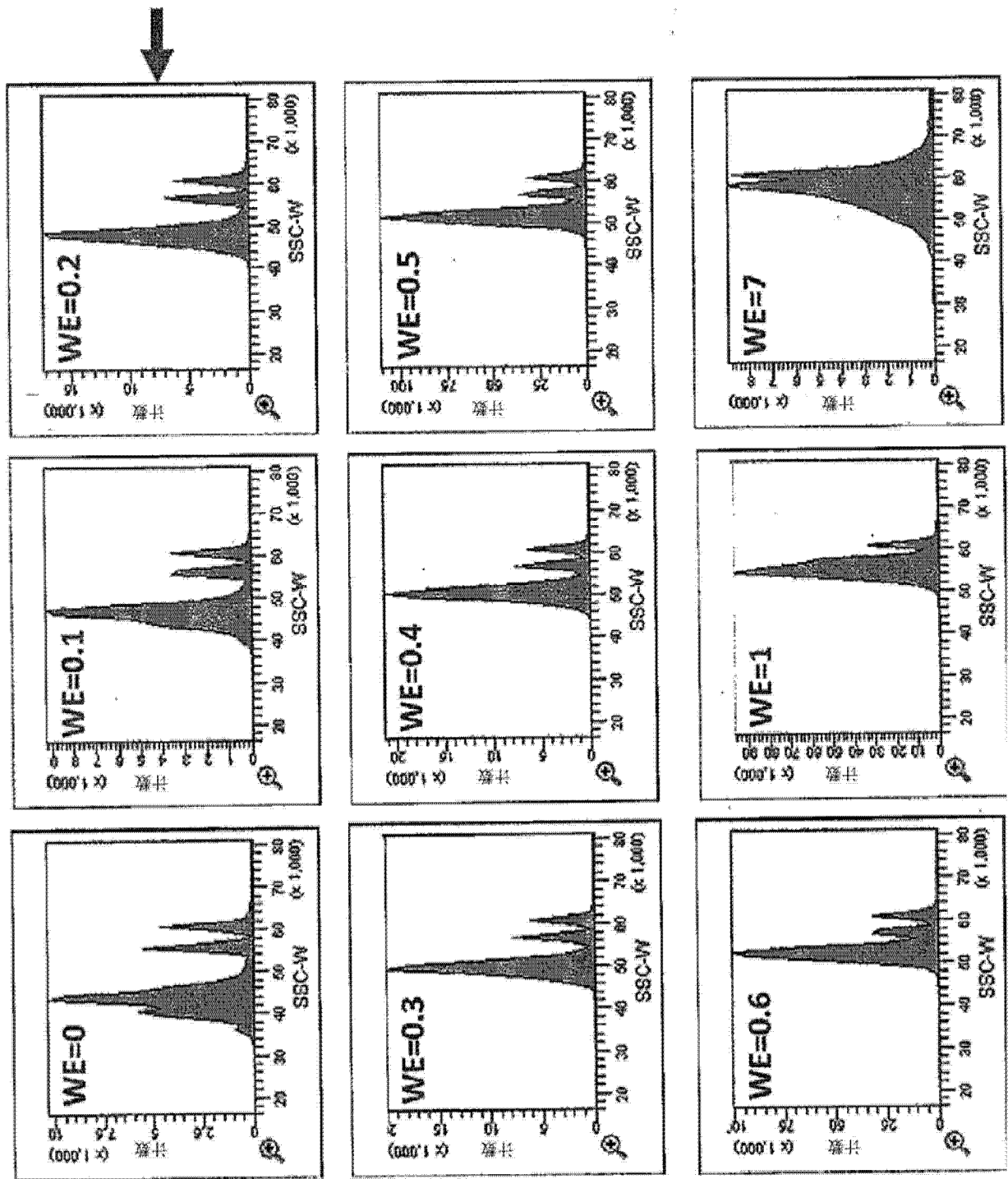


图 4

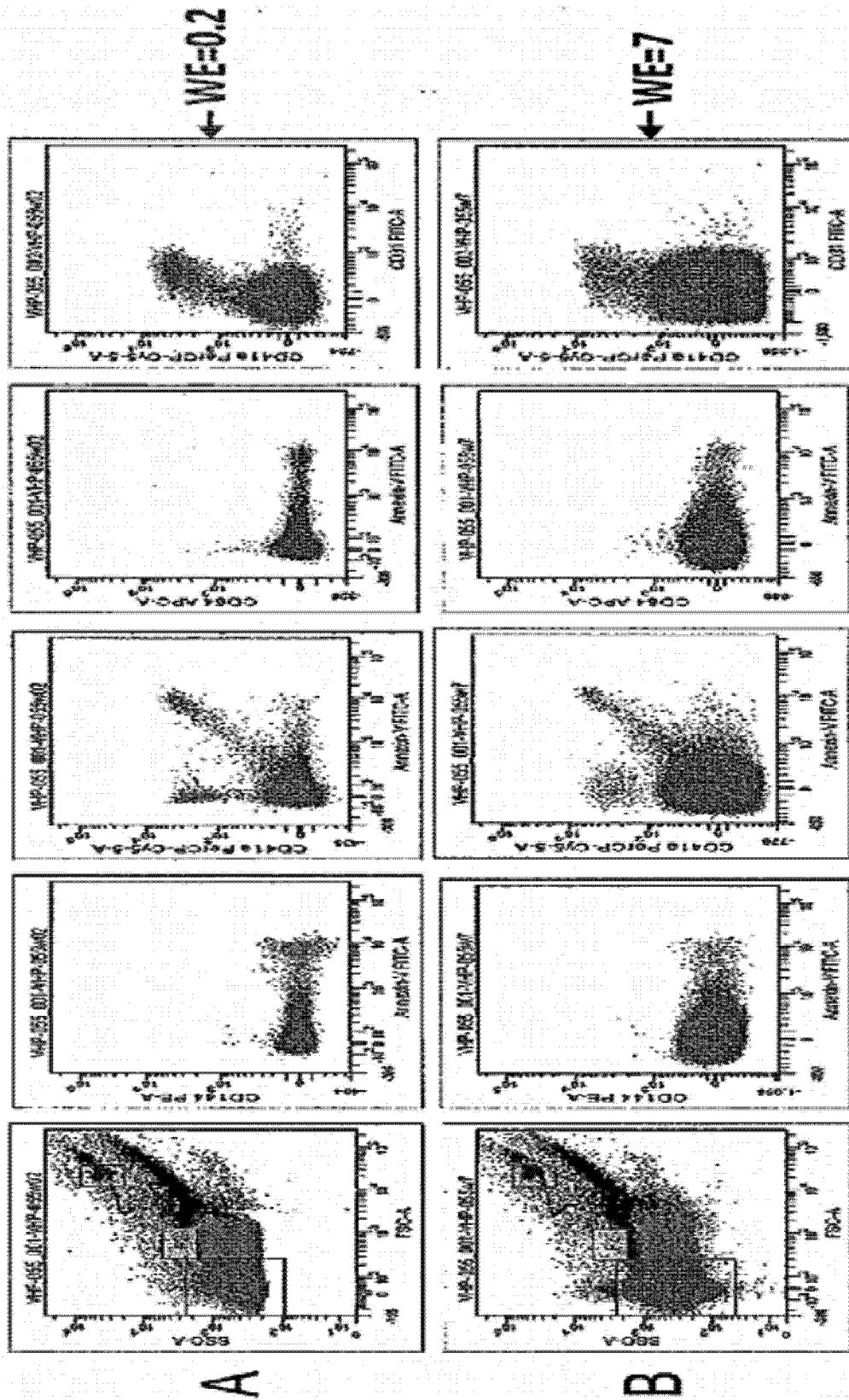


图 5

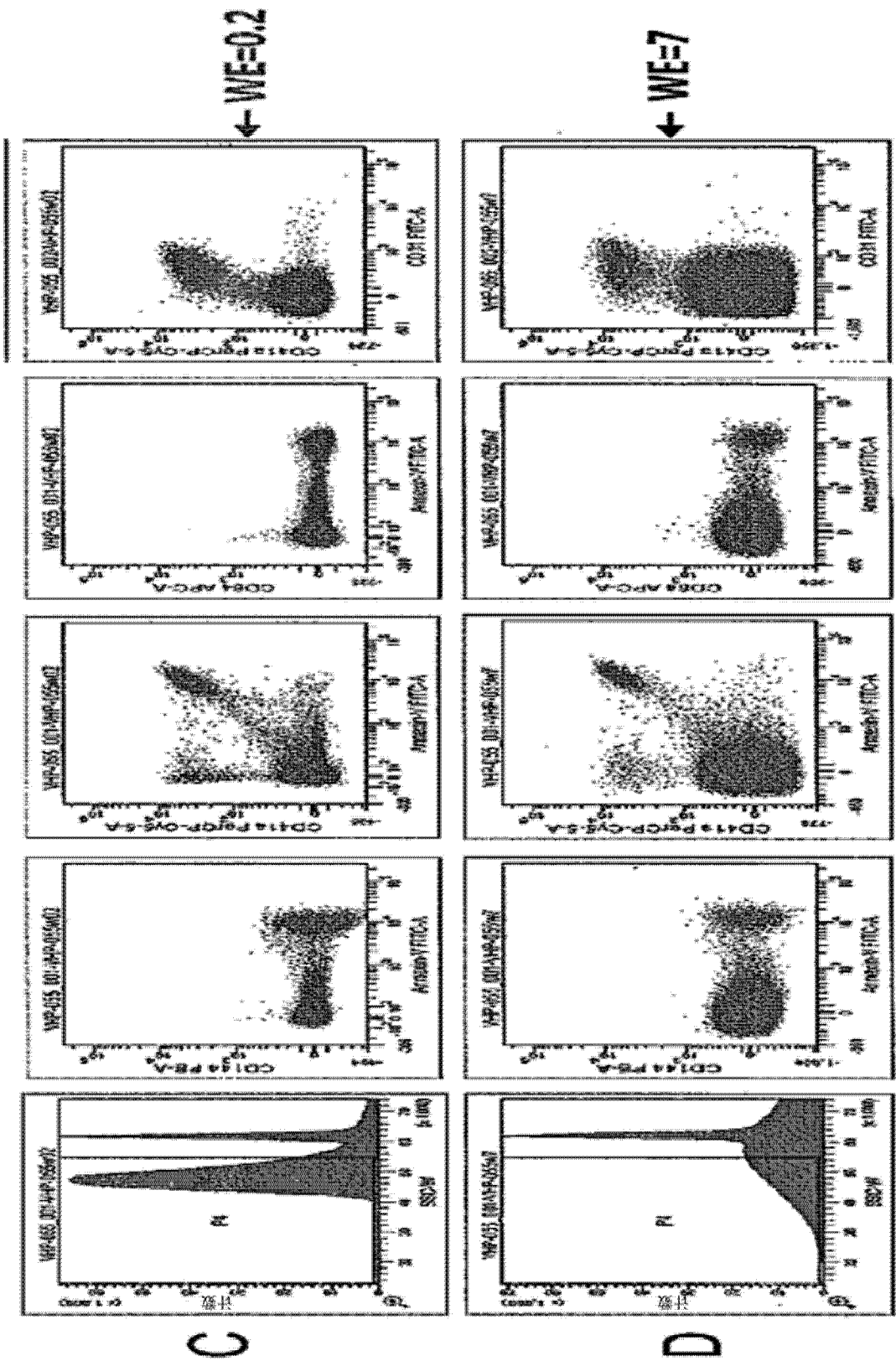


图 5 续

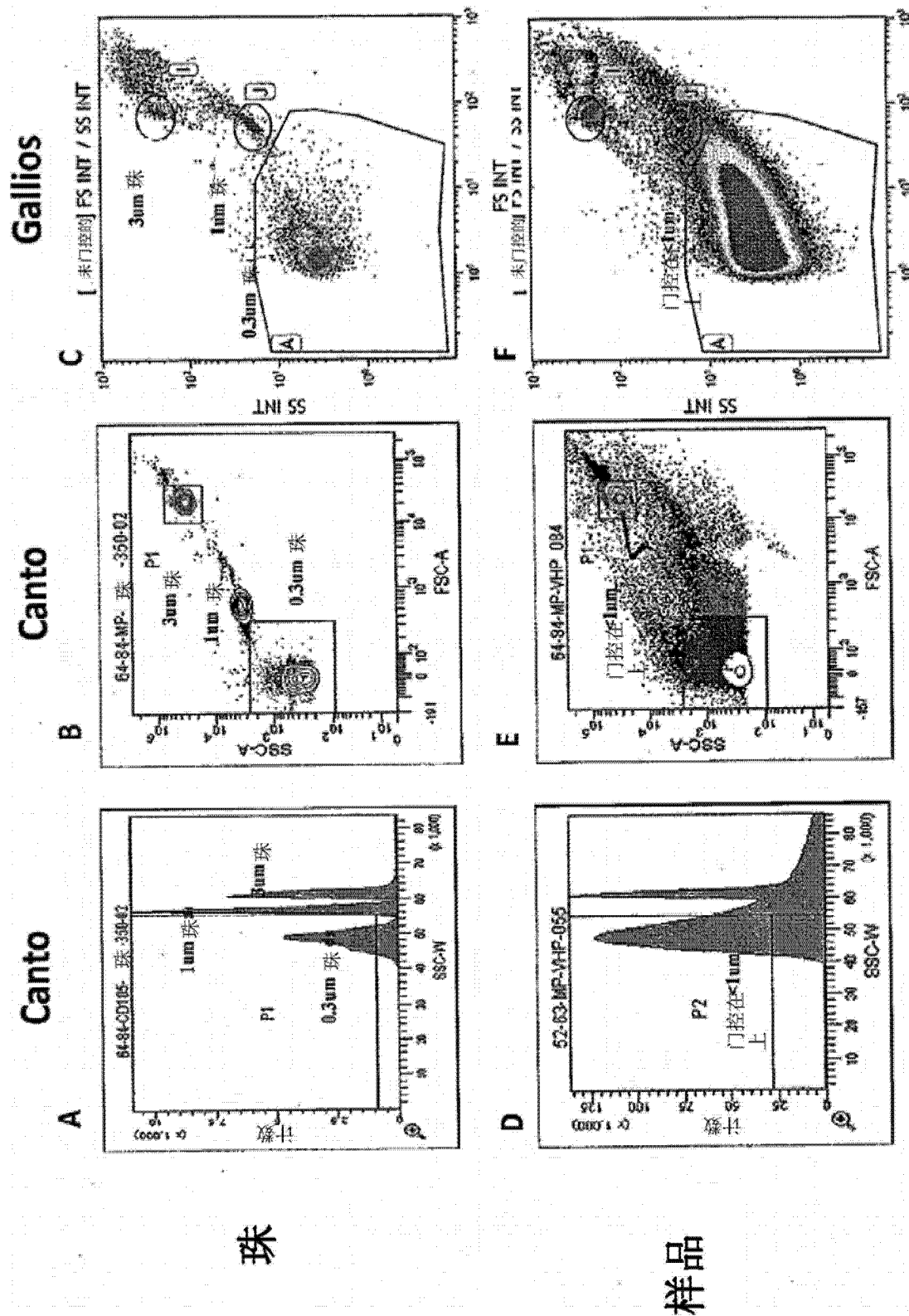


图 6

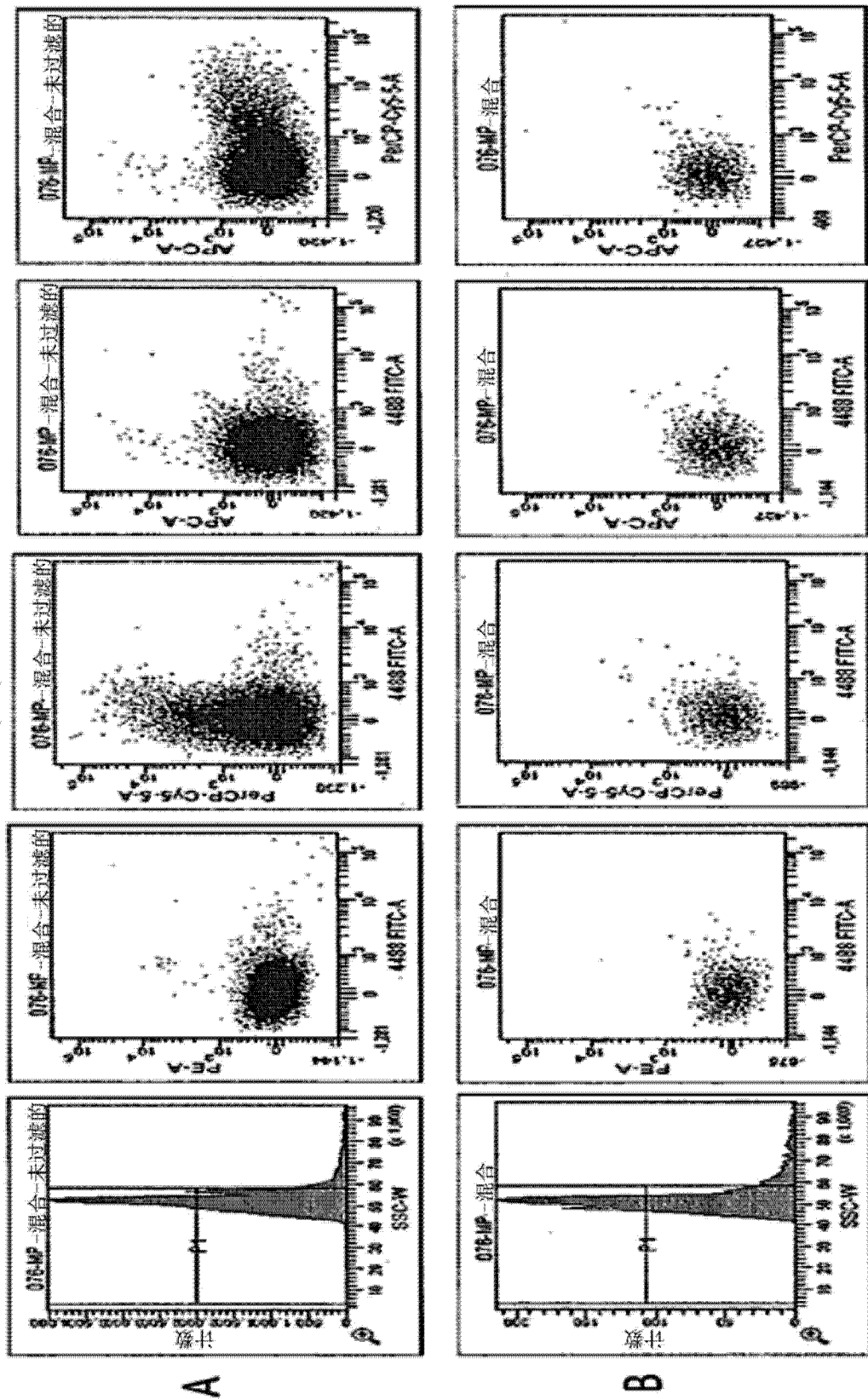


图 7

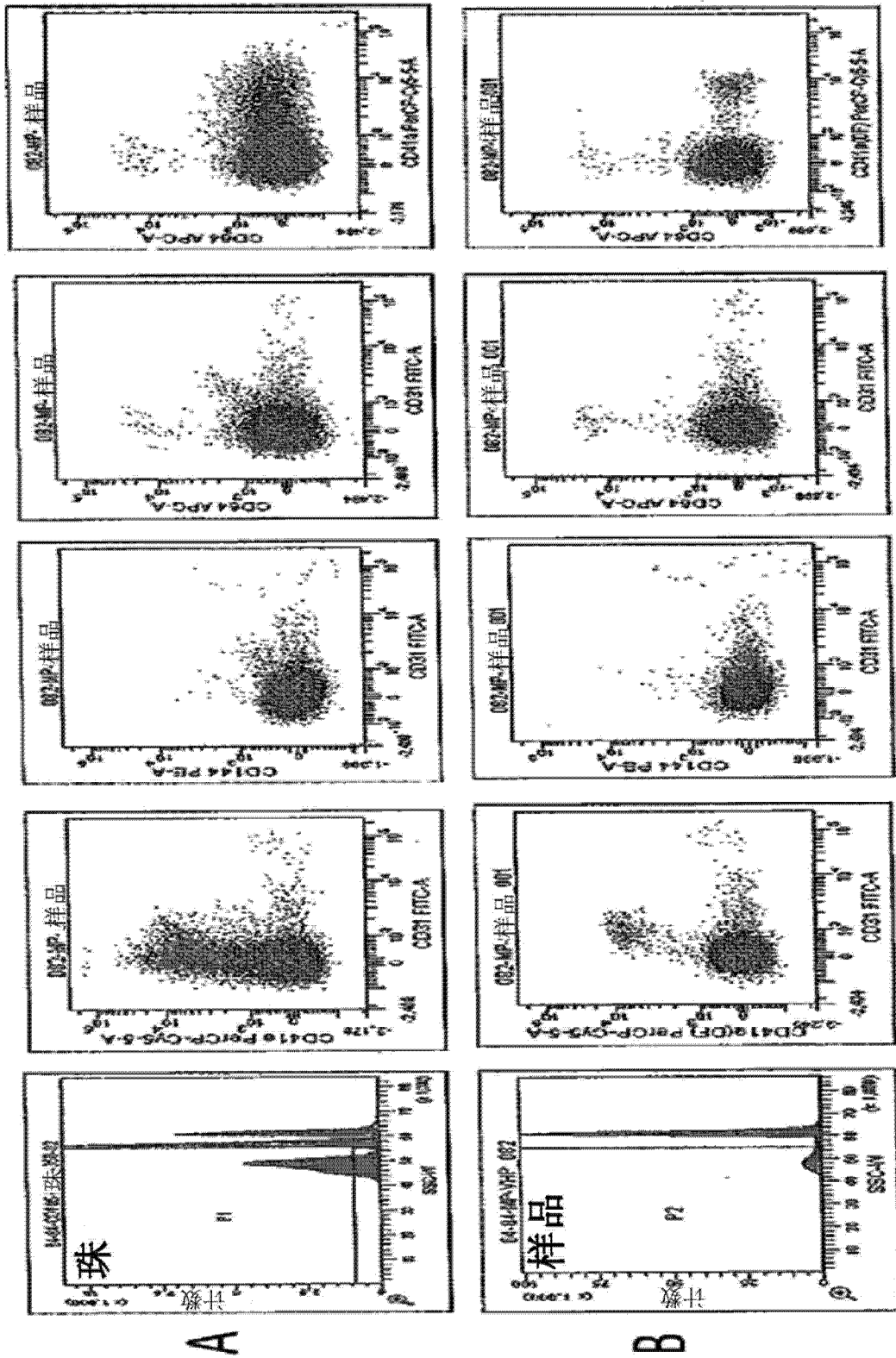


图 8

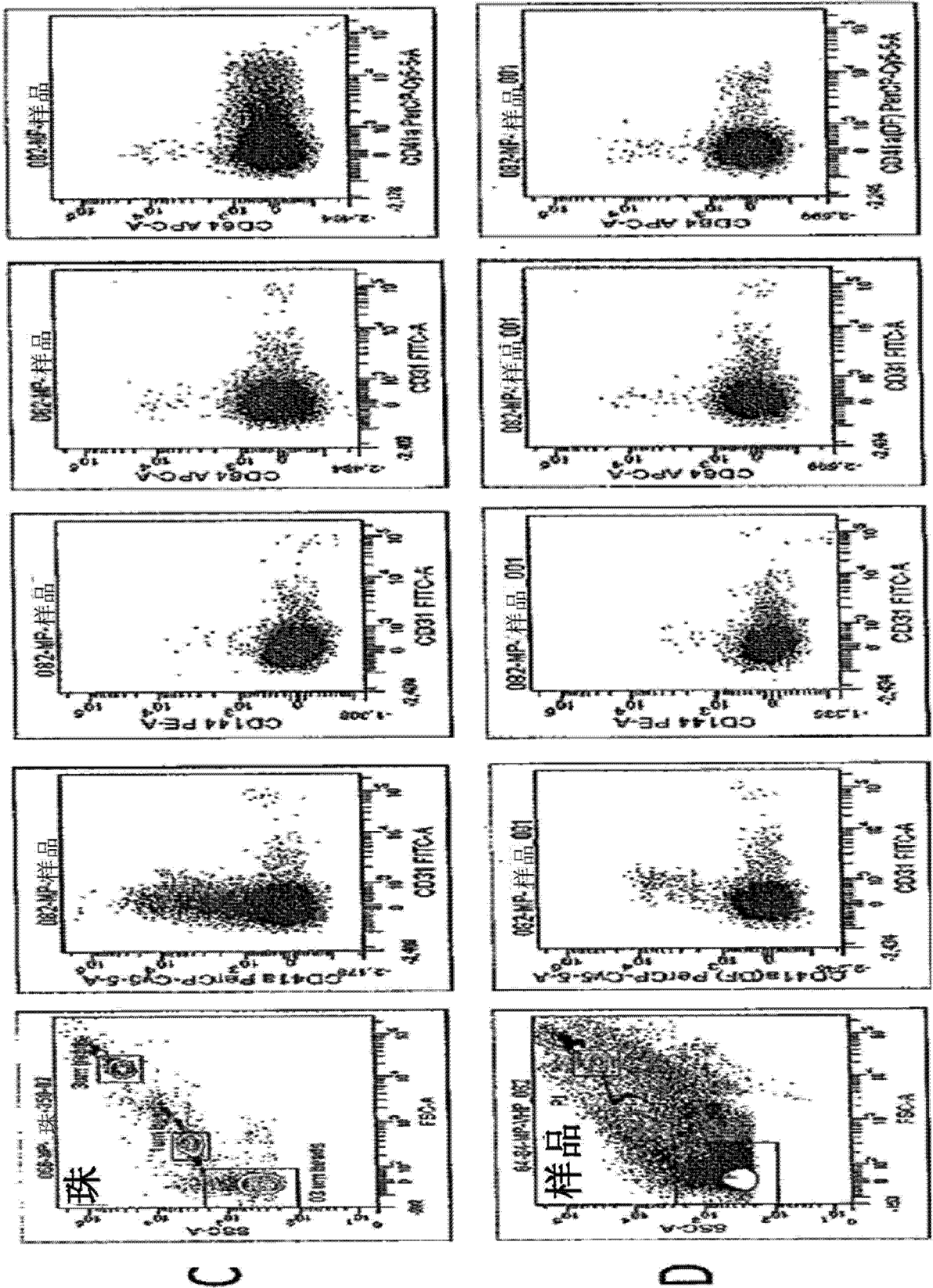


图 8 续

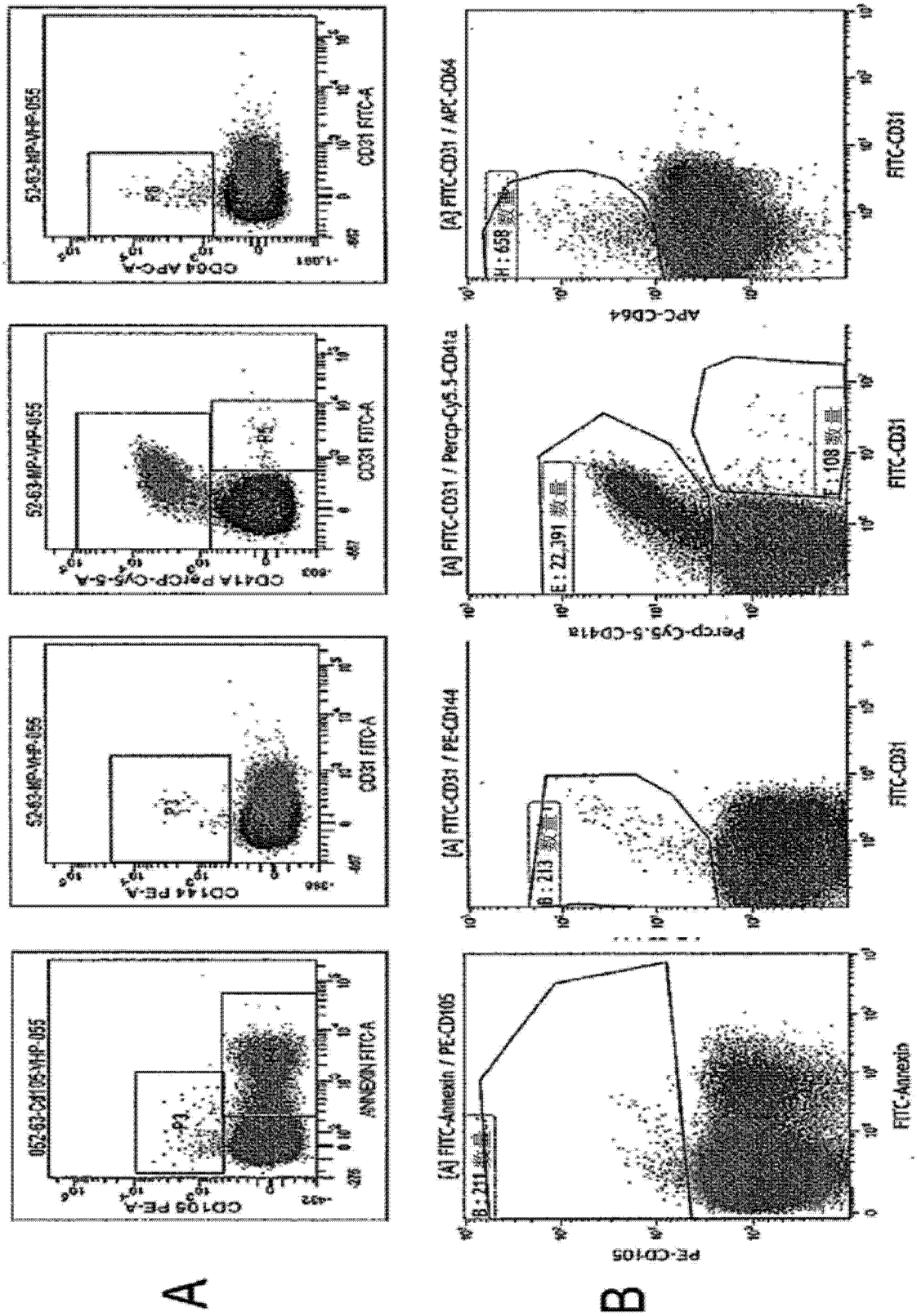


图 9

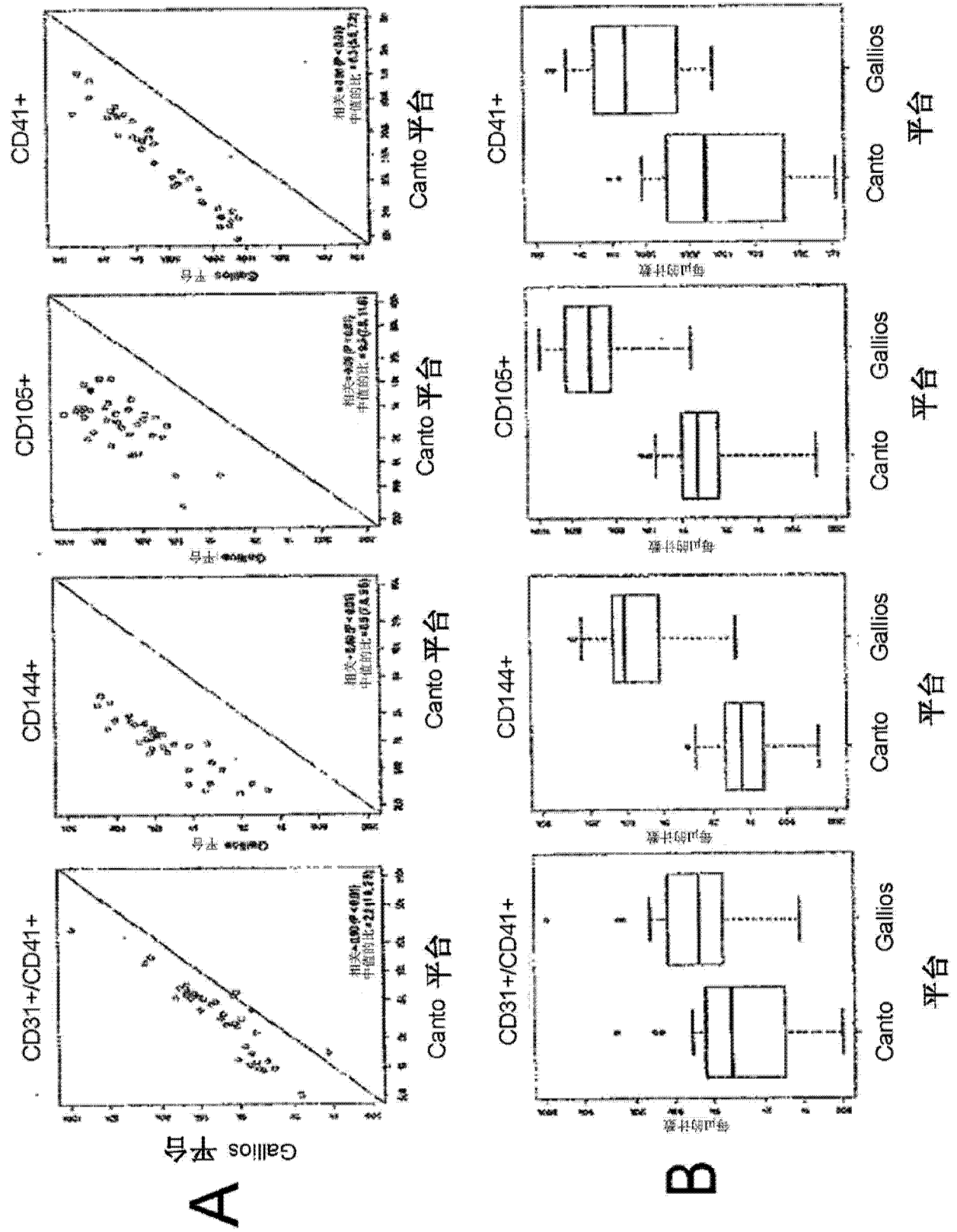


图 10

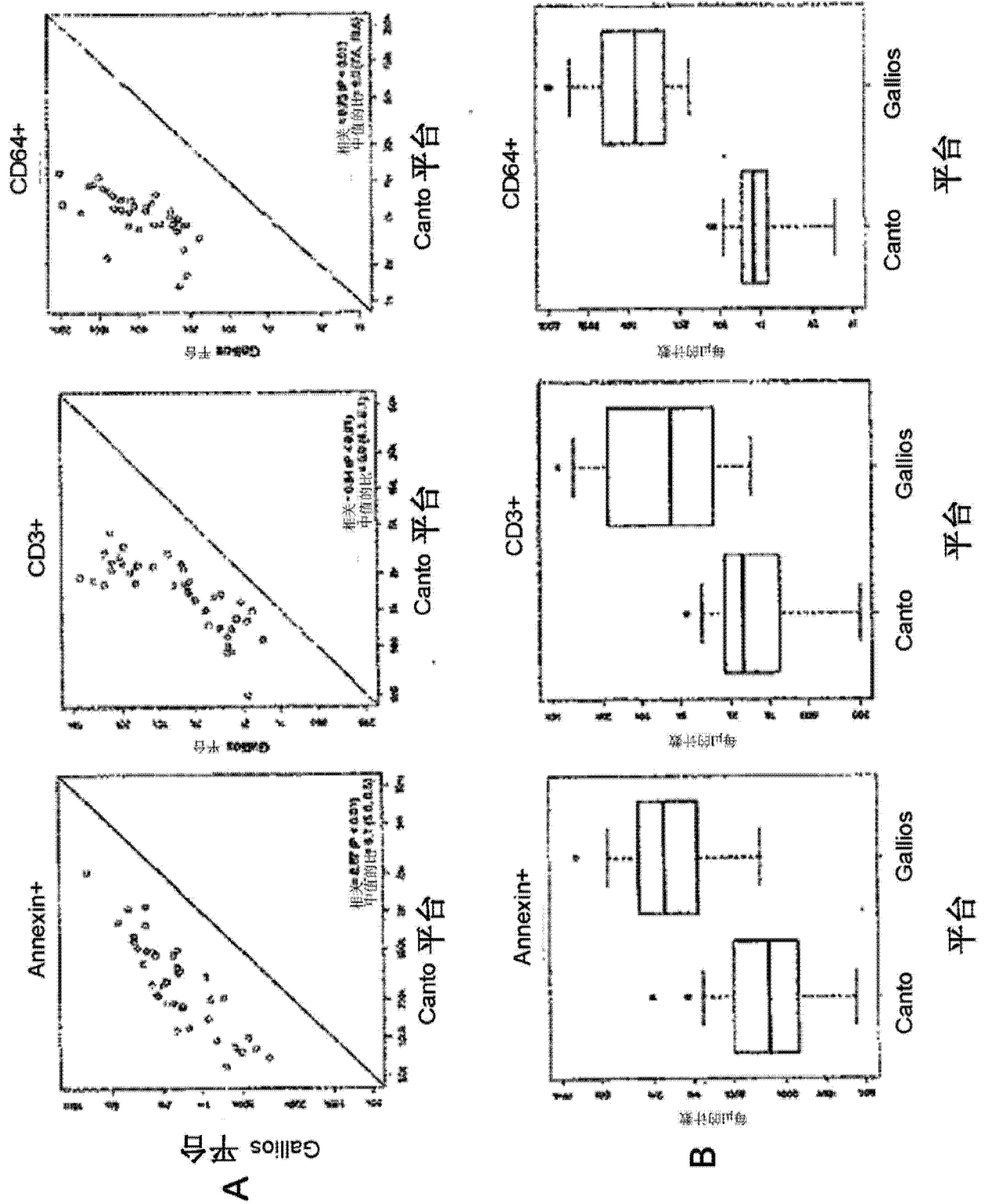


图 10 续

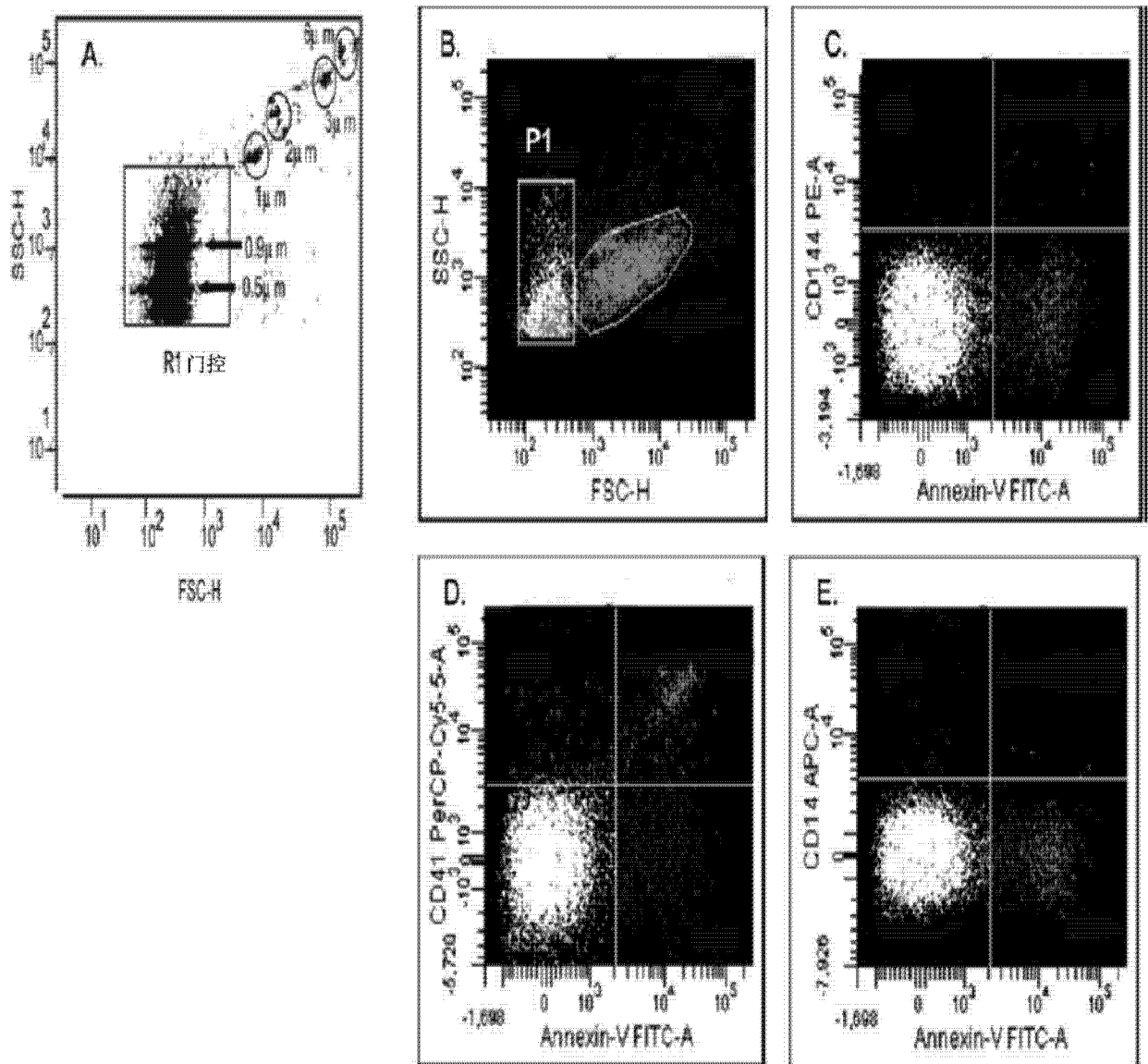


图 11

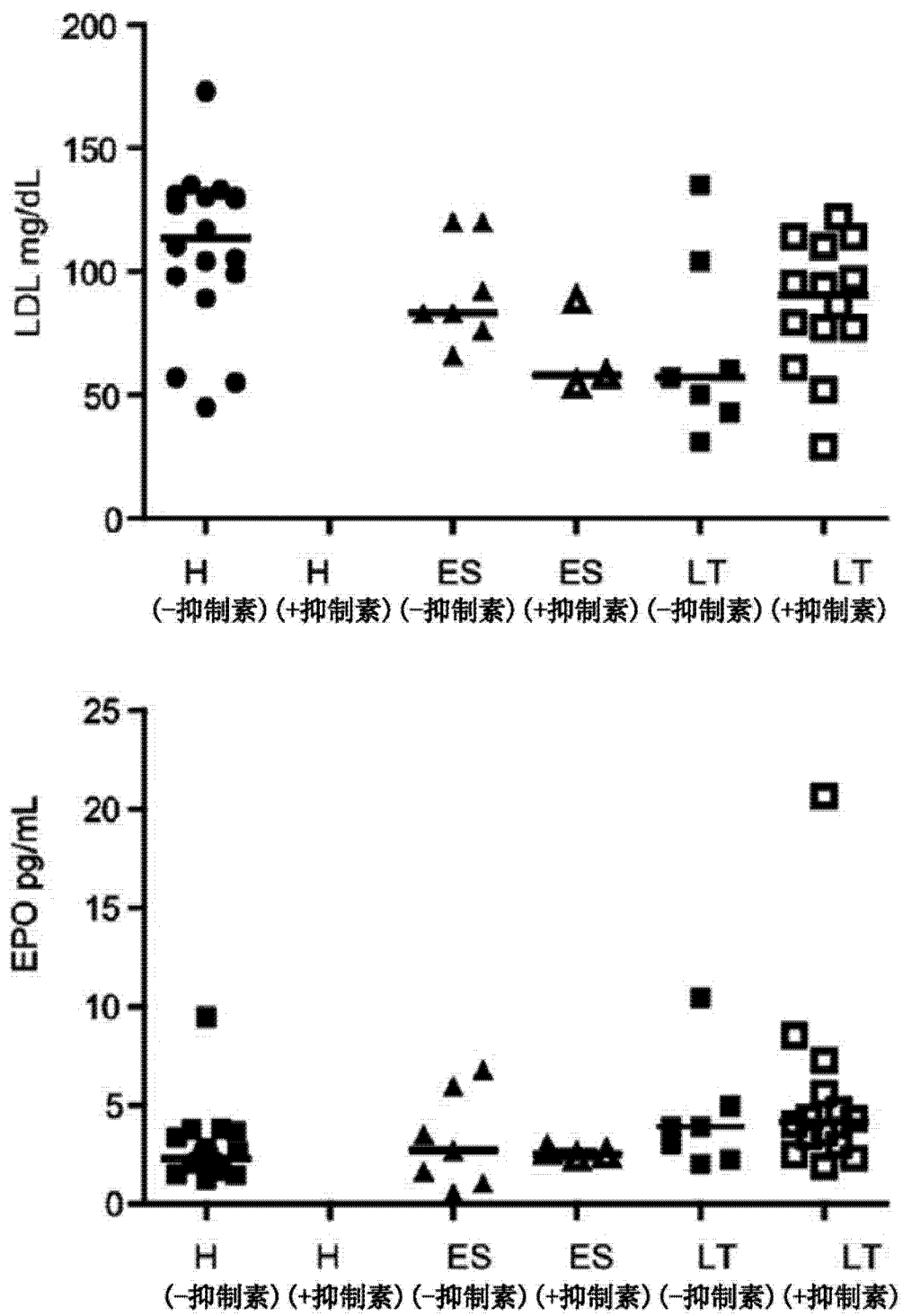


图 12

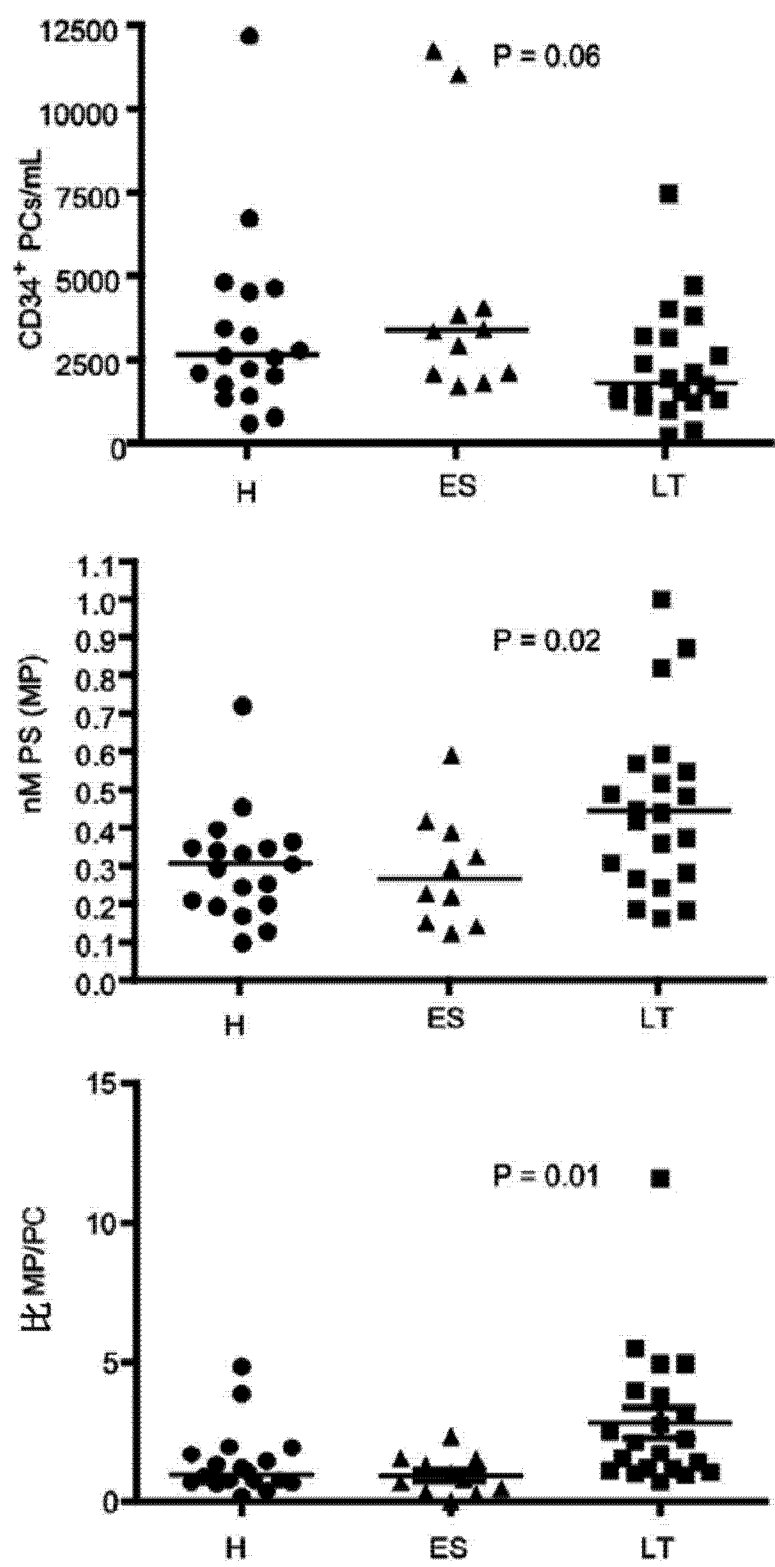


图 13

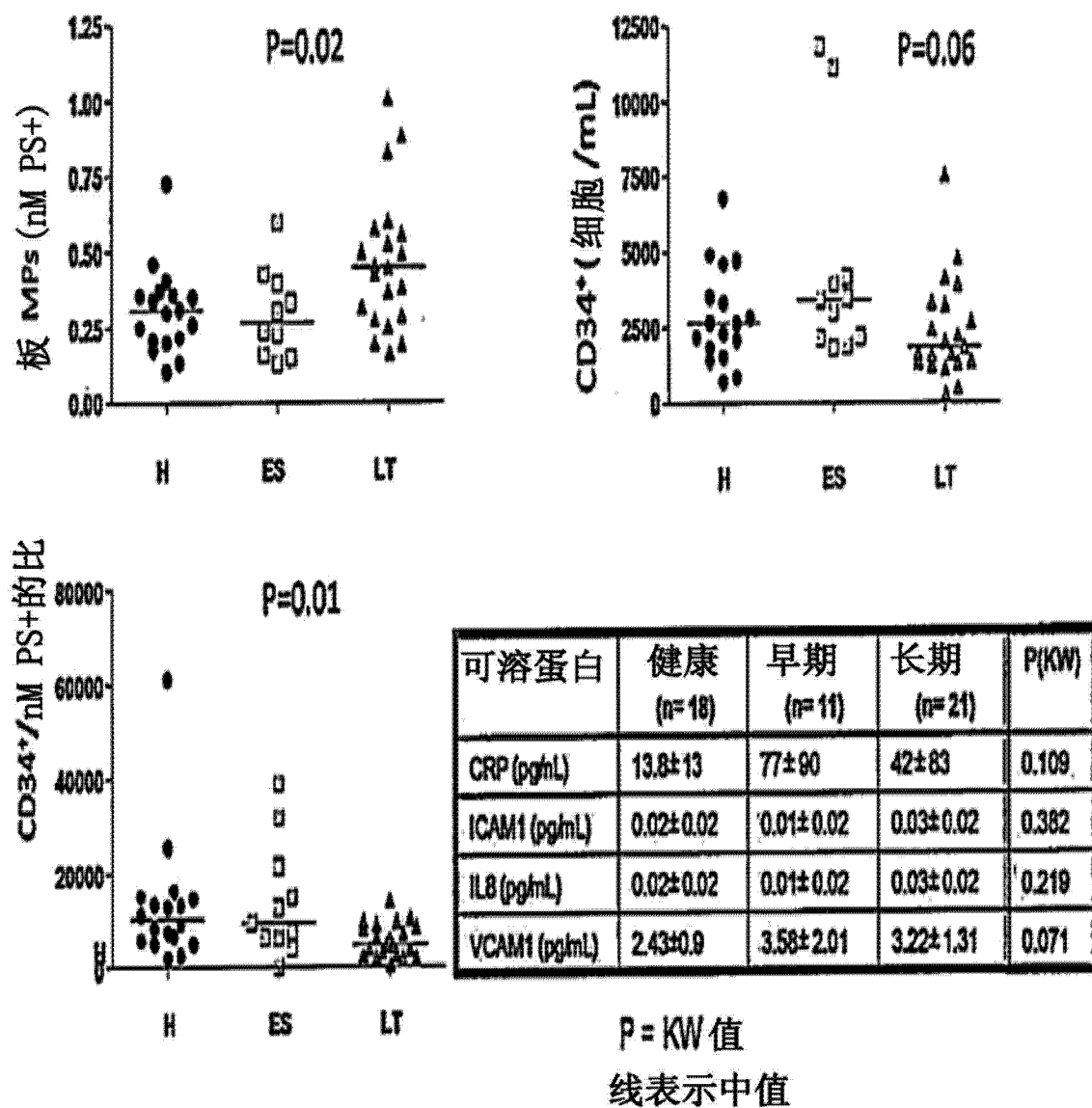


图 14

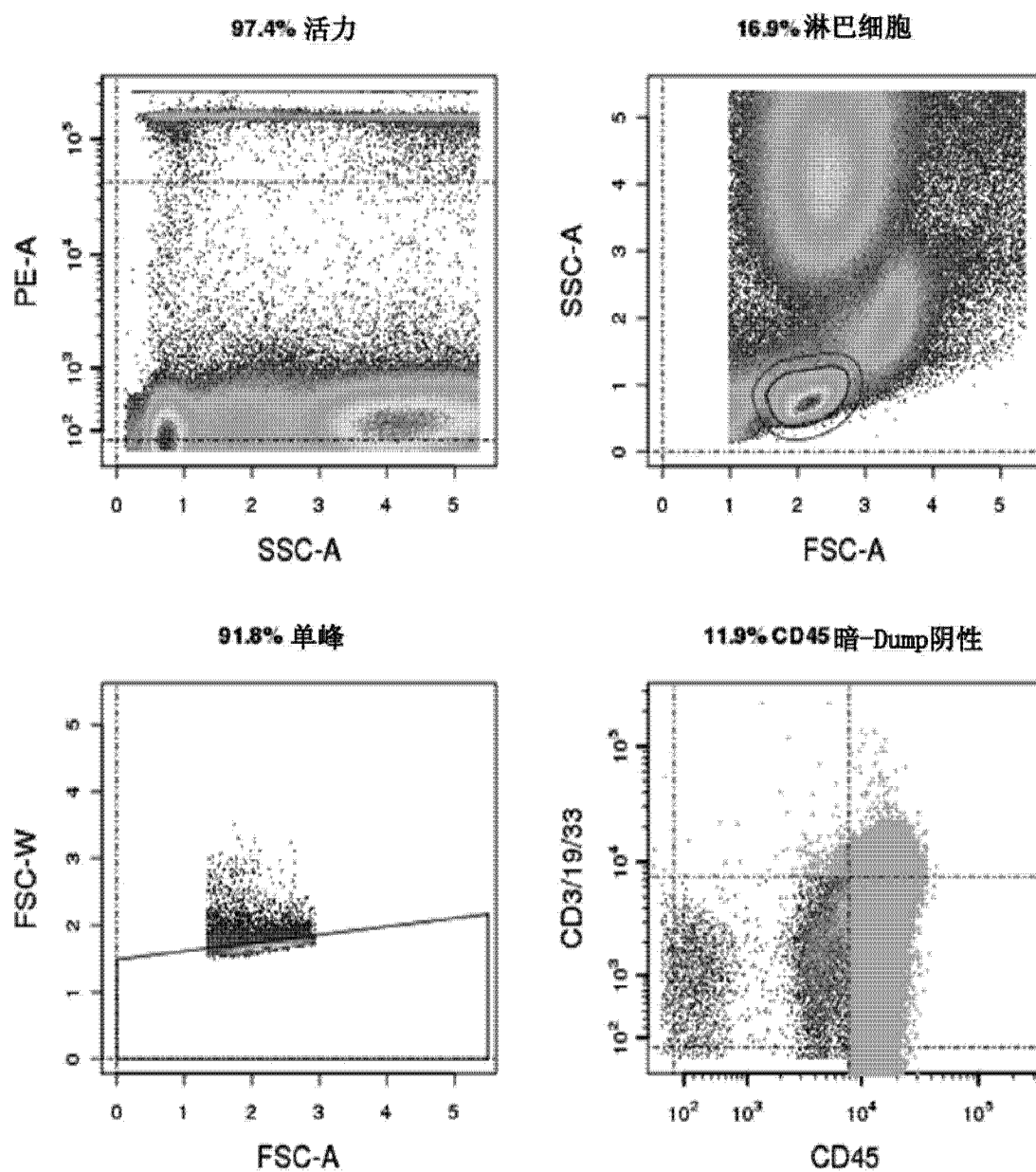


图 15

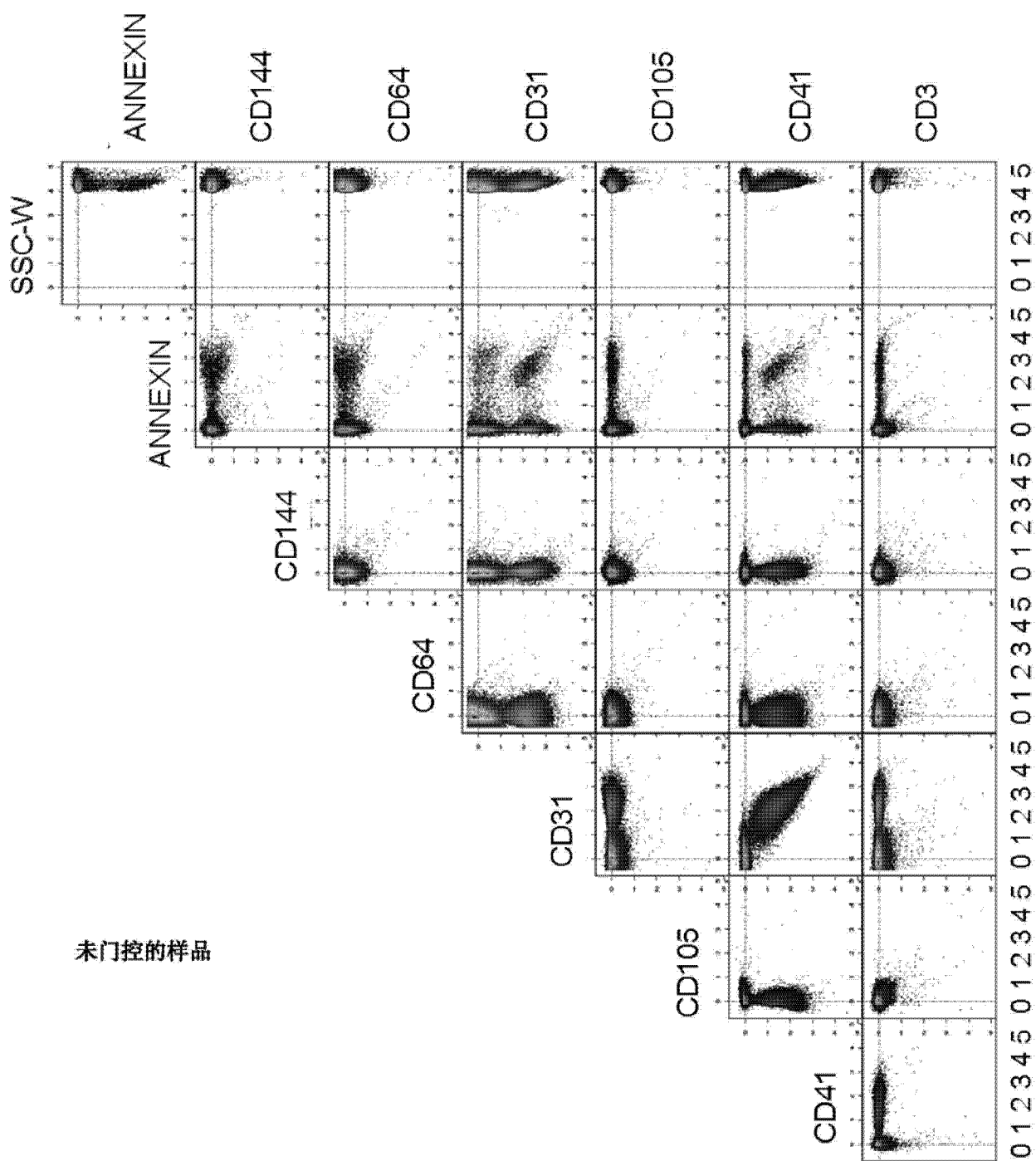


图 16

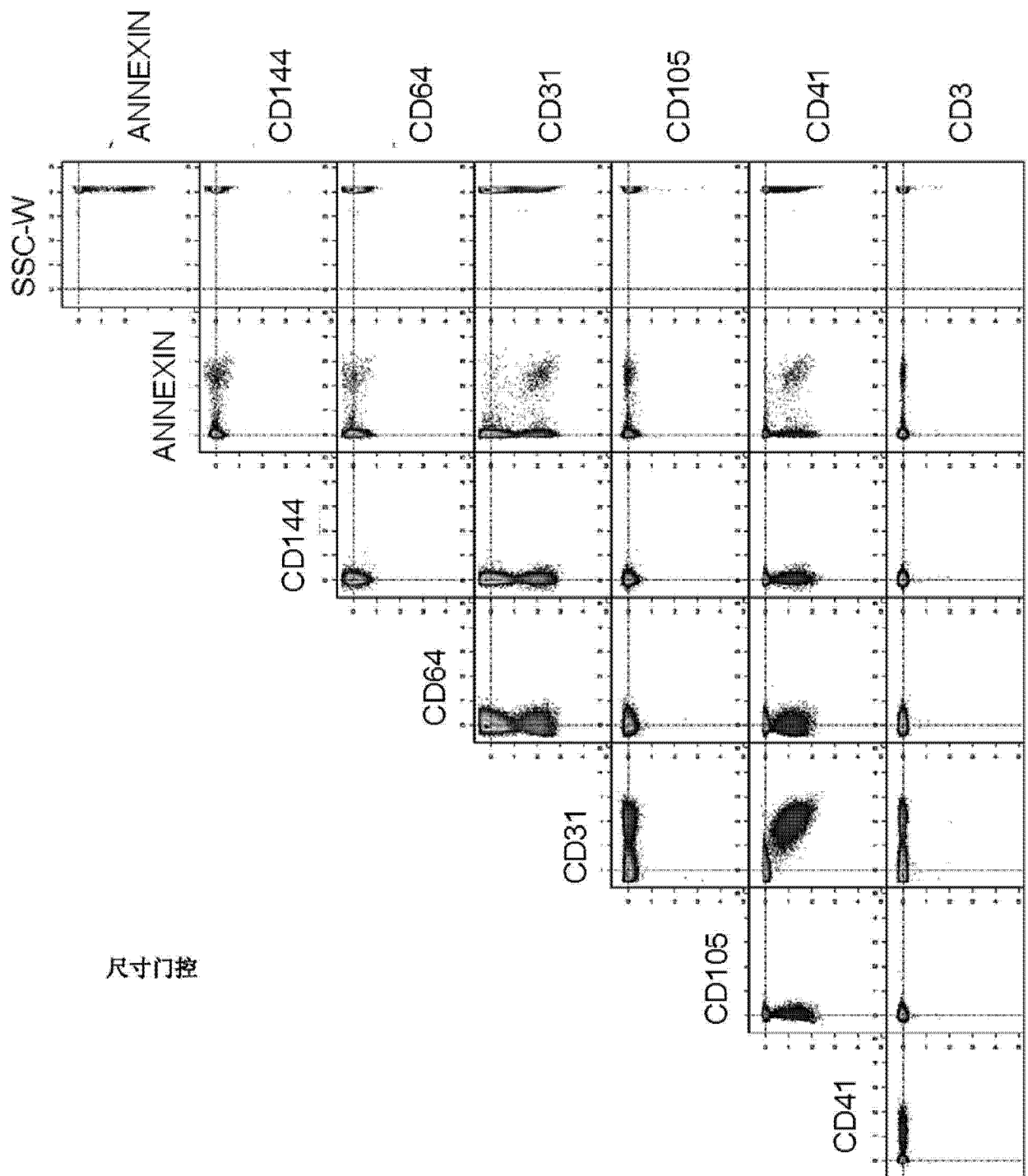


图 17

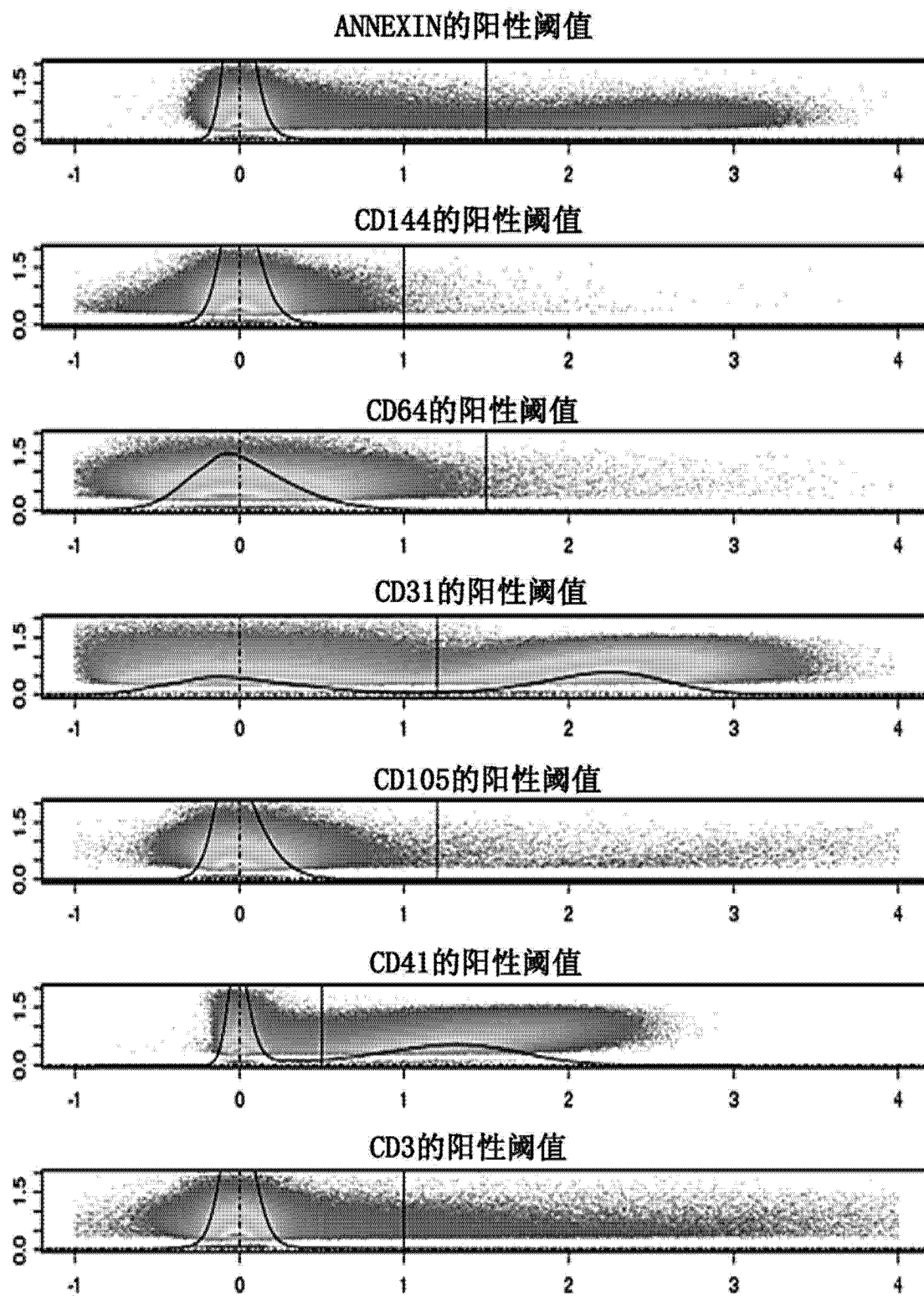


图 18

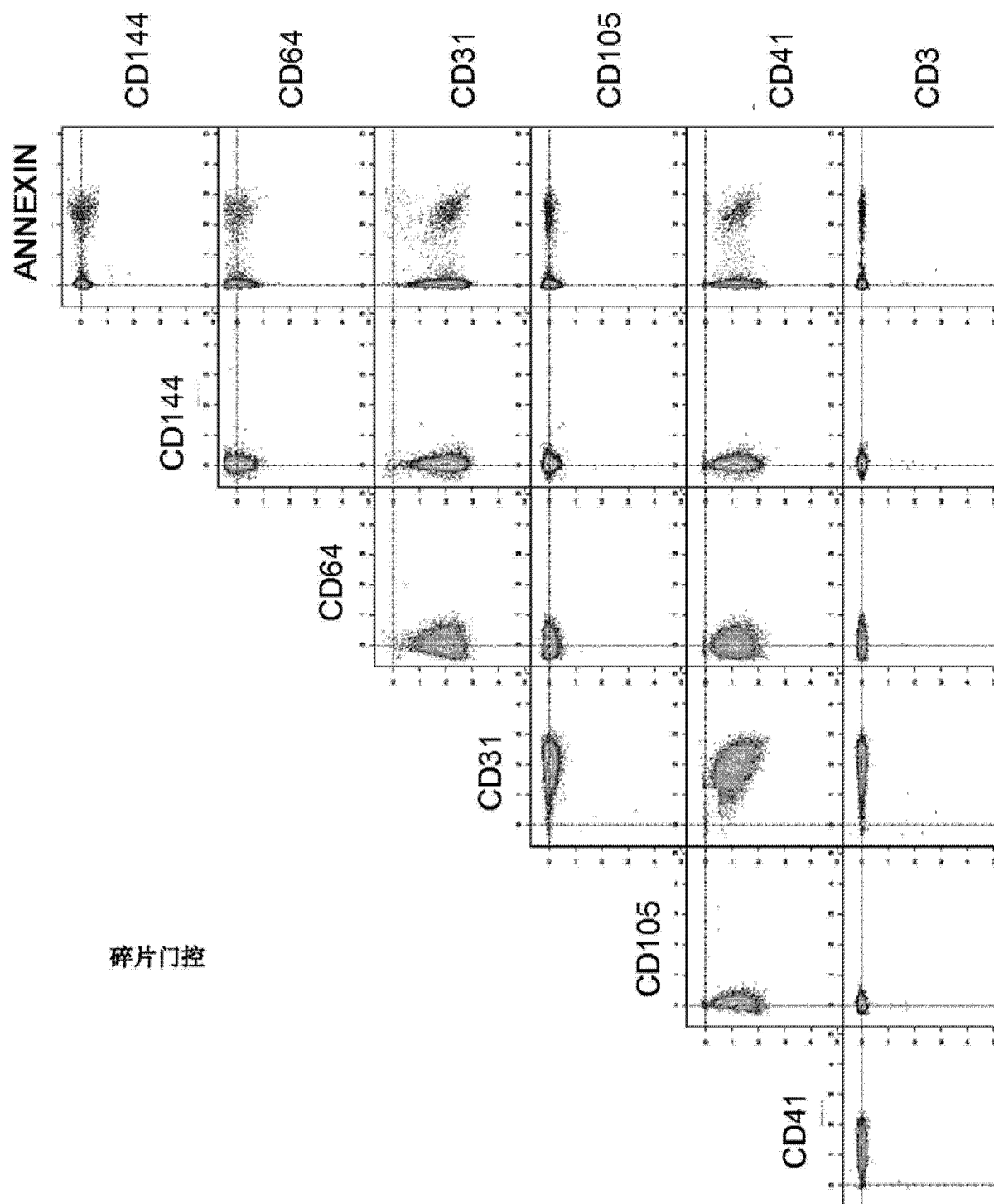


图 19

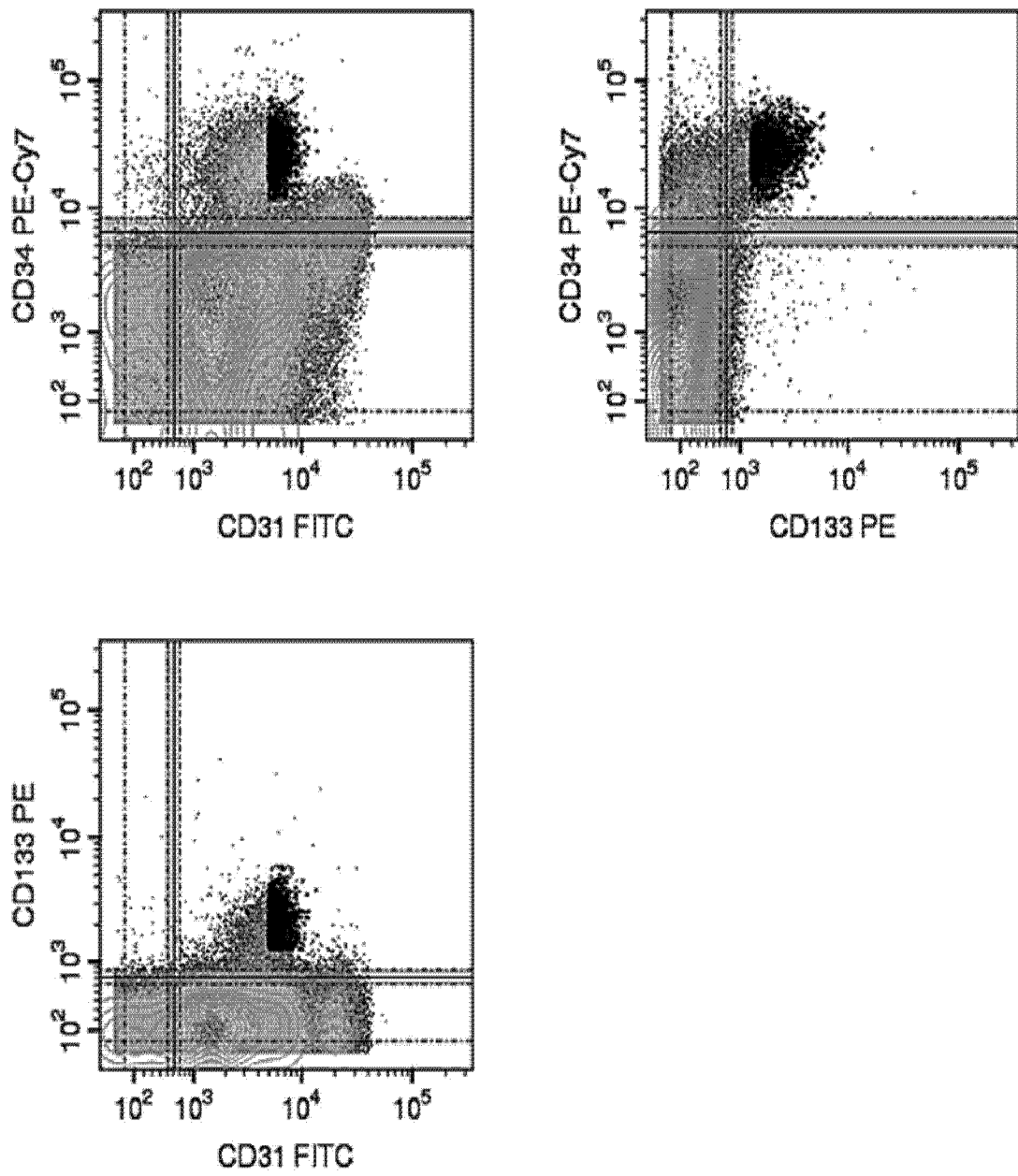


图 20

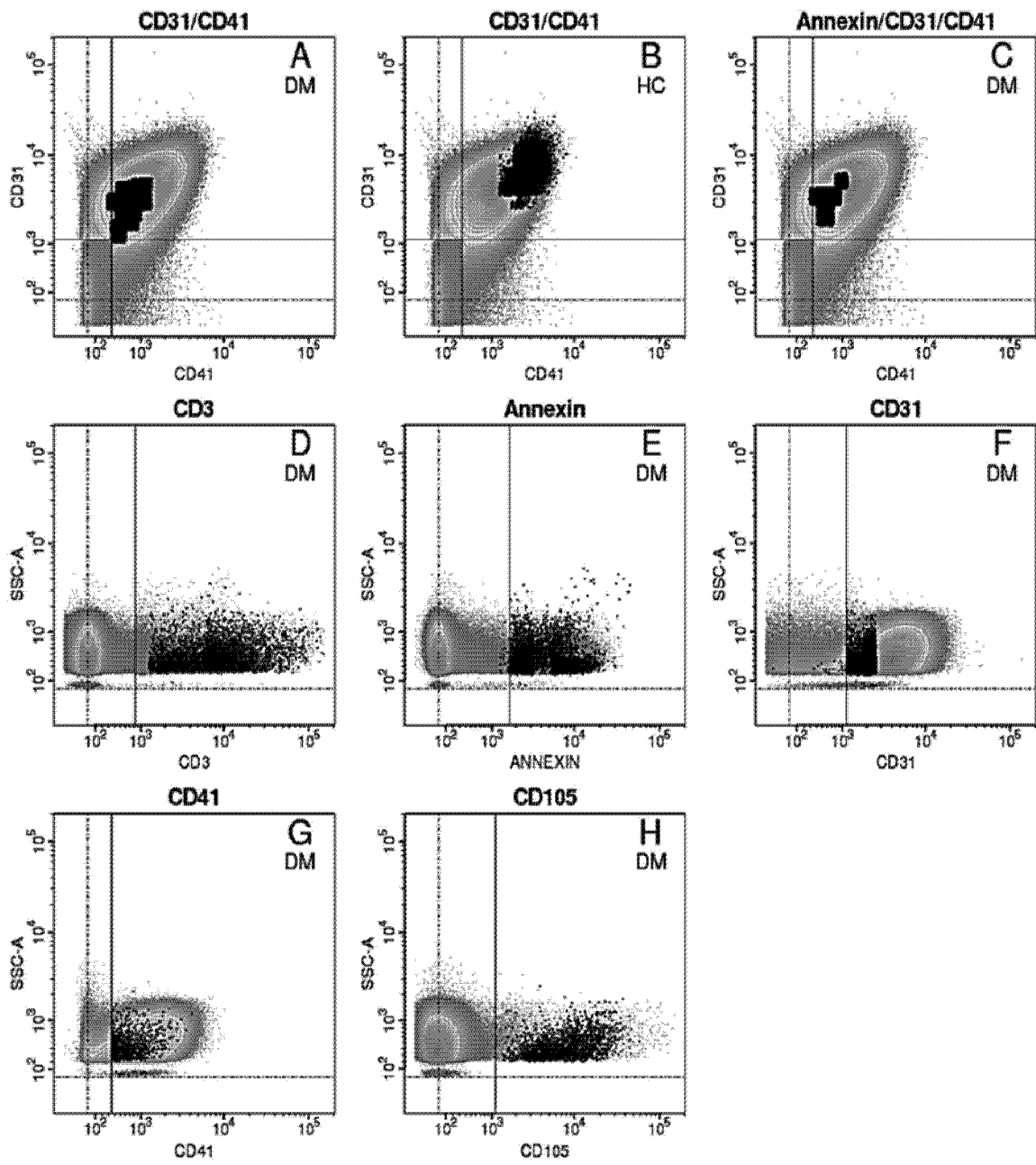


图 21

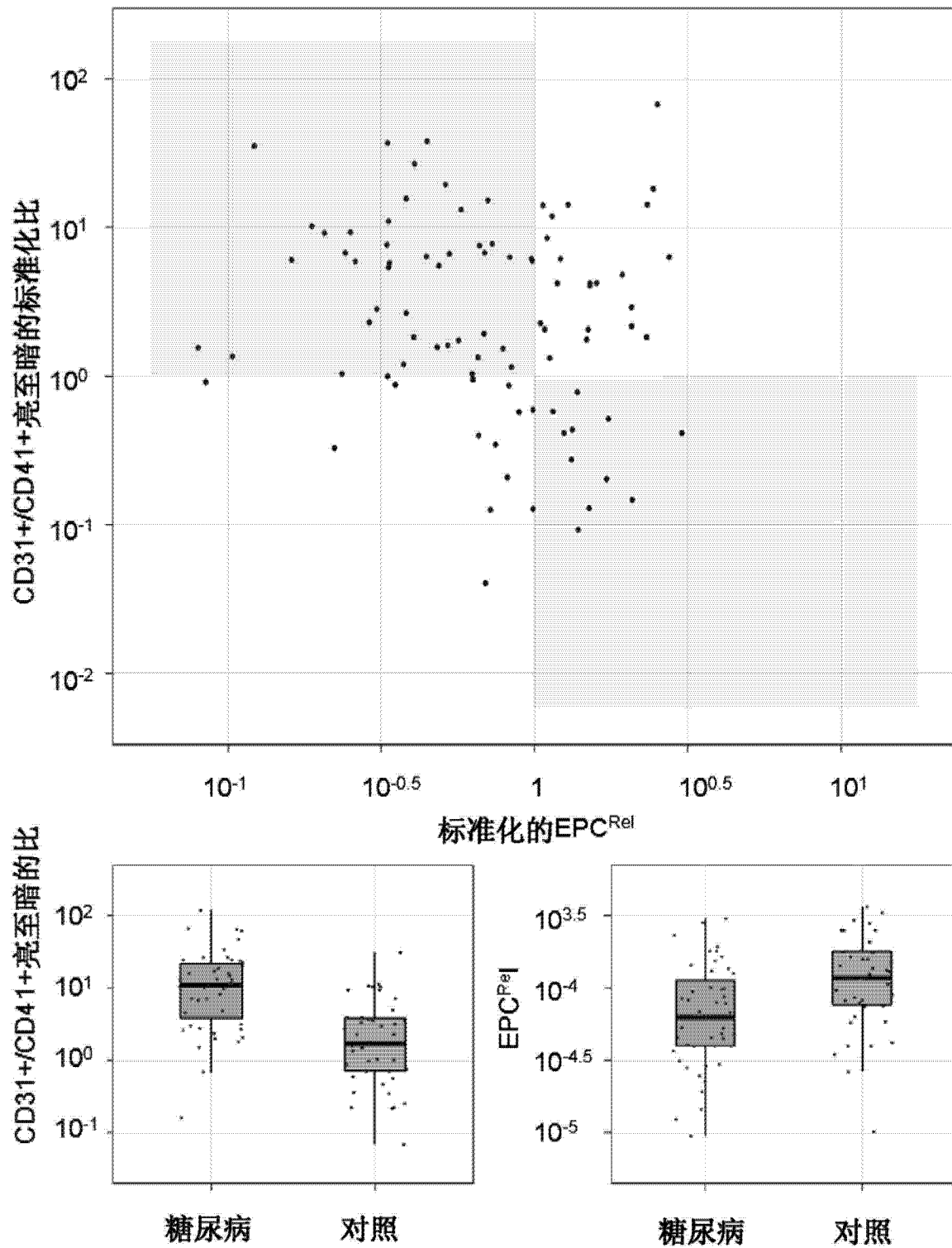


图 22

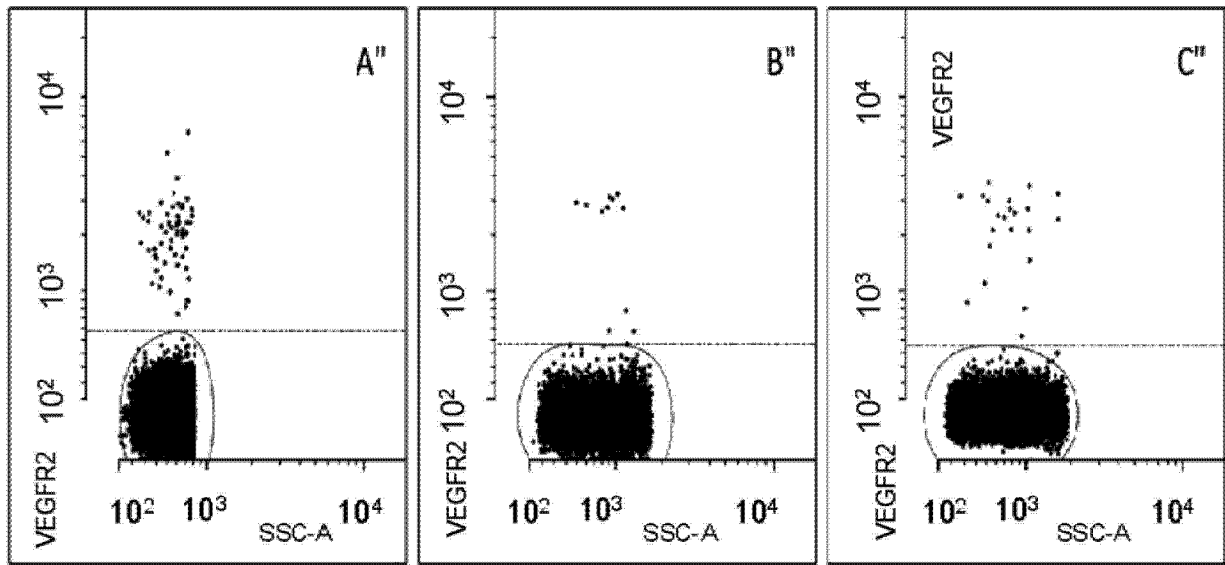


图 23

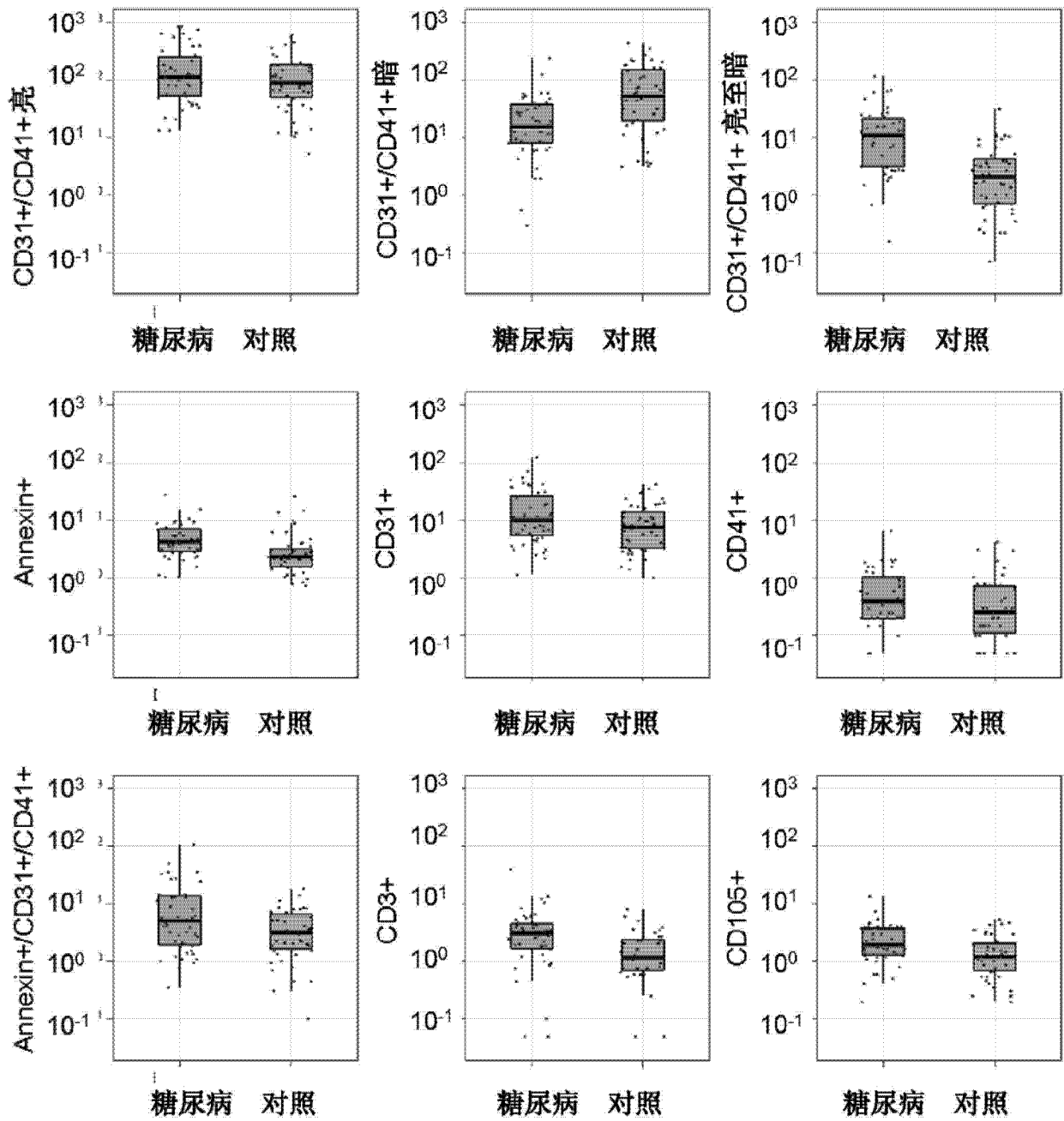


图 24