



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110325106 A

(43)申请公布日 2019.10.11

(21)申请号 201880012101.7

(22)申请日 2018.02.20

(30)优先权数据

62/461,161 2017.02.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/018836 2018.02.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/152537 EN 2018.08.23

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·D·欣曼 G·肖

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 刘文娜 郝名悦

(51)Int.Cl.

A61B 5/00(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

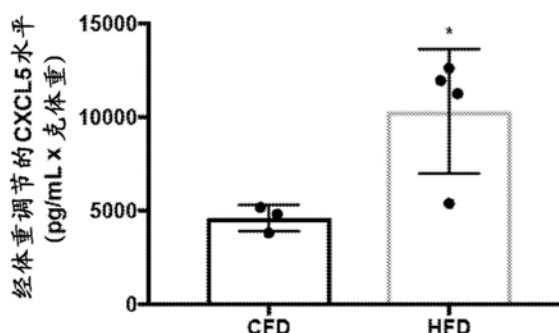
权利要求书2页 说明书13页 附图6页

(54)发明名称

无症状性脑缺血的血清学测定

(57)摘要

一种检测或监测无症状性脑缺血(SBI)和脑血管健康的状态的方法。本文描述的测定试剂和方法提供了脑微血管疾病的特异性指示物,使临床医生能够识别处于SBI发展风险中的患者。治疗患有无症状性脑缺血和/或代谢综合征的受试者的方法包括当两种或更多种SBI标志物的水平升高时,向所述受试者施用阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。本文描述了由暴露于慢性血管风险因素的脑内皮细胞产生的分子,所述慢性血管风险因素包括肥胖、高脂血症、高血压和葡萄糖耐受不良。这些由脑内皮细胞产生的应激分子可在血清中检测到,并用作脑特异性内皮细胞损伤的诊断指示物,并且与无症状性中风和认知功能受损的MRI指示物相关联。



1. 一种监测受试者的脑血管状态的方法,所述方法包括:
 - (a) 使从所述受试者获得的样品与特异性结合至少一种选自表1或表2的标志物的试剂接触;
 - (b) 测量与所述标志物结合的水平;
 - (c) 相对于正常对照分配反映标志物的测得量的状态评分;
 - (d) 如果所述状态评分显著大于1,则指示所述受试者进行代谢综合征和/或中风的治疗。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述标志物是C-X-C基序趋化因子5 (CXCL5) 或C-X-C基序趋化因子6 (CXCL6)。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述标志物是表1的标志物。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中针对表1和/或表2中的所述标志物中的至少三种标志物进行步骤(b)的所述测量。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其还包括测量表3的标志物。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述样品是CSF样品、尿液样品、血液样品或其它体液。
7. 一种诊断受试者的无症状性中风的方法,所述方法包括:
 - (a) 使从所述受试者获得的样品与特异性结合至少一种选自表1或表2的标志物的试剂接触;
 - (b) 测量与所述标志物结合的水平;
 - (c) 相对于正常对照分配反映标志物的测得量的状态评分;
 - (d) 如果所述状态评分显著大于1,则指示所述受试者进行代谢综合征和/或中风的治疗。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其还包括治疗所述受试者的代谢综合征和/或中风。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述治疗是阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。
10. 一种监测受试者的无症状性中风的方法,所述方法包括:
 - (a) 使从所述受试者获得的样品与特异性结合至少一种选自表1或表2的标志物的试剂接触;
 - (b) 测量与所述标志物结合的水平;
 - (c) 相对于正常对照分配反映标志物的测得量的状态评分;
 - (d) 如果所述状态评分显著大于1,则治疗所述受试者的代谢综合征和/或中风;
 - (e) 重复步骤(a)至(c);以及
 - (f) 在所述状态评分不趋于1时调整所述治疗。
11. 一种治疗有需要的受试者的无症状性中风和/或代谢综合征的方法,所述方法包括:
 - (a) 测量选自表1的至少一种标志物的水平;
 - (b) 当所述标志物的水平升高时,向所述受试者施用阿司匹林疗法、血压疗法、血糖管理、胆固醇管理、体重管理,和/或饮食和运动计划。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述至少一种标志物包含C-X-C基序趋化因子5 (CXCL5) 和/或C-X-C基序趋化因子6 (CXCL6)。

13. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述至少一种标志物包含IGFBP2。

14. 根据权利要求11所述的方法, 其中针对表1中的至少两种标志物进行步骤(a)的所述测量。

15. 根据权利要求11所述的方法, 其中针对表1和/或表2中的所述标志物中的至少三种标志物进行步骤(a)的所述测量。

16. 根据权利要求11-15中任一项所述的方法, 其还包括测量表3的标志物。

17. 根据权利要求11-16中任一项所述的方法, 其中所述样品是CSF样品、尿液样品、血液样品或其它体液。

18. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法, 其中所述试剂是抗体或核酸探针。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述测量包括免疫测定。

20. 一种试剂盒, 其包含特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2中的每一种, 且任选结合ITGB3的试剂。

无症状性脑缺血的血清学测定

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年2月20日提交的美国临时专利申请号62/461,161的权益,其全部内容以引用方式并入本申请中。

背景技术

[0003] 肥胖是美国主要的公共健康问题。超过三分之一的成人肥胖。肥胖与代谢综合征的发展密切相关,代谢综合征产生各种血管风险因素,包括高血糖、高脂血症、高血压和低高密度脂蛋白。这些因素增加了发展慢性血管疾病,尤其是脑血管疾病的风险。研究表明,患有代谢综合征的患者发展脑部微血管梗塞的风险增加了六倍,微血管梗塞主要损害脑白质,从而导致痴呆、残疾,甚至死亡。

[0004] 每年有数百万美国人患有无症状性中风,这些无症状性中风的另一个名称是脑部微血管梗塞。在无症状性中风期间,血流中断会损伤不控制重要功能的大脑部分。虽然可以在MRI或CT扫描上检测到损伤,但是损伤太小而不会产生任何明显的症状。

[0005] 目前,临床医生在临床症状发作后利用脑MRI来诊断脑微血管疾病。这种方法非常有限,只可用于预防额外损伤,而不可用于识别处于风险中、在持久性脑损伤发生之前可能受益于更积极的药理学和生活方式干预的患者。目前用于中风预测测定的现场标准是基于在急性中风时到达医疗机构的患者,而不是识别无症状形式的中风,这增加了包括残疾、痴呆和死亡在内的长期性后果的风险。另外,这些预测测定中没有一个是基于基于发现的研究,而是使用必然受限并且通常使用单分子谱而不是靶阵列的病例-对照方法。

[0006] 没有可以预测个体中风风险的诊断试验,也没有可以实际指示脑血管健康的诊断试验。仍然需要一种实用且易于获得的诊断工具来识别处于无症状性中风风险中和患有无症状性中风的患者,从而促进及时的治疗干预。

发明内容

[0007] 本文描述的测定试剂和方法通过提供脑微血管疾病的特异性指示物来满足这些需要和其它需要。如本文描述的测定对于许多专业的执业临床医生非常有用,以识别处于发展无症状性脑缺血(SBI)的风险中的患者。本文描述了治疗患有无症状性脑缺血和/或代谢综合征的受试者的方法。该方法包括当两种或更多种SBI标志物的水平升高时,向受试者施用阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。

[0008] 本文描述了由暴露于慢性血管风险因素的脑内皮细胞产生的分子,所述慢性血管风险因素包括肥胖、高脂血症、高血压和葡萄糖耐受不良。这些应激分子是由脑内皮细胞产生的并且可在血清中检测到。这些分子作为脑特异性内皮细胞损伤的诊断指示物,并且与无症状性中风和认知功能受损的MRI指示物相关联。

[0009] 下文提供了用于该测定的标志物的列表。1级分子(CXCL5/6、IGFBP2、ITGB3、IL-17B)是优选分子,每个分子都可以作为无症状性脑血管损伤的独立标志物。2级分子(IL-17A、GDF-15、FGF-23、MCP-1)提供其它标志物。这些2级标志物以及其它标志物(诸如TNF α 、

IL-18、IL-6、纤维蛋白原、BDNF、ST2、SRAGE、MPO和LpPLA2)可以与一种或多种1级标志物组合使用。这些标志物中的一种或多种与一种或多种1级标志物的组合将提供高于每任何一种测定组分的额外诊断准确性。该标志物小组提供纵向预测值,并且可通过各种药理学或生活方式干预进行调节。

[0010] 在一个实施方案中,所述方法、试剂盒或测定旨在检测和/或测量从受试者获得的样品中的IGFBP2、ITGB3、CXCL5和/或CXCL6中的任一种或其组合。在一个实施方案中,待测标志物是CXCL5。在一个实施方案中,待测标志物是CXCL6。在另一个实施方案中,待测标志物是IGFBP2。在一个实施方案中,待测标志物是ITGB3。通常,测量至少两种或三种标志物。在某些实施方案中,测量CXCL5和IGFBP2两者。在一些实施方案中,测量CXCL5、CXCL6和IGFBP2。在其它实施方案中,测量CXCL5、IGFBP2和ITGB3。

[0011] 在一个实施方案中,标志物是选自表1或表2的至少一种标志物。在一个实施方案中,将表1、表2和/或表3的至少两种或更多种标志物组合使用。标志物组合的实例包括: CXCL5和选自表1、表2或表3的其它标志物; CXCL6和选自表1、表2或表3的其它标志物; IGFBP2和选自表1、表2或表3的其它标志物; ITGB3和选自表1、表2或表3的其它标志物; IL-17B和选自表1、表2或表3的其它标志物; IL-17A和选自表1、表2或表3的其它标志物; GDF-15和选自表1、表2或表3的其它标志物; FGF-23和选自表1、表2或表3的其它标志物; CCL2/MCP-1和选自表1、表2或表3的其它标志物; IL-6和选自表1、表2或表3的其它标志物; TNF- α 和选自表1、表2或表3的其它标志物; CXCL5和CXCL6以及选自表1、表2或表3的其它标志物; 选自表1、表2和表3的3种或更多种标志物的任何组合; 表1、表2和表3的4、5、6、7、8、9、10或11种标志物的任何组合。在一个实施方案中,标志物的组合是选自表1的2、3、4或5种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表1的至少一种标志物和来自表2的至少一种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表1的至少一种标志物和来自表3的至少一种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表2的至少一种标志物和来自表3的至少一种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表1、表2和表3中的每一个的至少一种标志物。

[0012] 如上所述,上表4列出了新型的和先前报道的标志物。在一些实施方案中,将表4中列出的两种或更多种标志物的组合用于如本文所描述的方法或测定中。在一些实施方案中,将表4中列出的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15种或所有16种标志物一起用于所述测定中。任选地,这些标志物的全部或子集可以连同本文或别处描述的其它标志物一起使用。

[0013] 本发明提供了用于监测从受试者获得的样品中的脑血管状态、用于诊断受试者的无症状性中风的方法,以及用于预测、治疗和/或监测无症状性中风、脑血管损伤和/或代谢综合征的方法。

[0014] 在一个典型实施方案中,所述方法包括:

[0015] (a) 使从所述受试者获得的样品与特异性结合至少一种选自表1或表2的标志物的试剂接触;

[0016] (b) 测量与所述标志物结合的水平;

[0017] (c) 相对于正常对照分配反映标志物的测得量的状态评分;

[0018] (d) 如果所述状态评分显著大于1,则指示所述受试者进行代谢综合征和/或中风

的治疗。

[0019] 在一些实施方案中,所述方法还包括治疗受试者的代谢综合征和/或中风。治疗的实例包括但不限于阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。

[0020] 还提供了一种监测受试者的无症状性中风的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:

[0021] (a) 使从所述受试者获得的样品与特异性结合至少一种选自表1或表2的标志物的试剂接触;

[0022] (b) 测量与所述标志物结合的水平;

[0023] (c) 相对于正常对照分配反映标志物的测得量的状态评分;

[0024] (d) 如果所述状态评分显著大于1,则治疗所述受试者的代谢综合征和/或中风;

[0025] (e) 重复步骤(a)至(c);以及

[0026] (f) 在所述状态评分不趋于1时调整所述治疗。

[0027] 还提供了治疗有需要的受试者的无症状性中风和/或代谢综合征的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:

[0028] (a) 测量选自表1的至少一种标志物的水平;

[0029] (b) 当所述标志物的水平升高时,向所述受试者施用阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。

[0030] 在一些实施方案中,所述至少一种标志物包含C-X-C基序趋化因子5(CXCL5)和/或C-X-C基序趋化因子6(CXCL6)。在一些实施方案中,所述至少一种标志物包含IGFBP2。在一些实施方案中,针对表1的至少两种标志物进行步骤(a)的测量。在其它实施方案中,针对表1和/或表2的标志物中的至少三种标志物进行步骤(a)的测量。在一些实施方案中,所述方法还包括测量表3的标志物。

[0031] 在典型的实施方案中,样品是血清样品、CSF样品、尿液样品、血液样品或其它体液。为了用于本文描述的方法,样品的代表性实例包括但不限于血液、血浆或血清、唾液、尿液、脑脊髓液、乳汁、宫颈分泌物、精液和其它体液。

[0032] 受试者通常是哺乳动物受试者,诸如人。在一些实施方案中,受试者是兽医受试者,诸如宠物或其它伴侣动物。

[0033] 在一些实施方案中,所述试剂是抗体。在其它实施方案中,所述试剂是能够与靶标特异性杂交以进行检测的核酸探针。所述试剂可任选地用可检测标志物标记。所述方法可以使用例如免疫测定技术进行,诸如酶免疫测定、多重测定。如本领域技术人员将理解的,可以采用其它测定,诸如探针杂交。

[0034] 本发明提供了试剂盒,其包含一组如本文所描述的试剂,诸如特异性结合本发明的一种或多种标志物的抗体,和任选地,一个或多个含有本发明试剂的合适容器。试剂包括特异性结合本发明的一种或多种标志物的分子。试剂的一个实例是对标志物有特异性的抗体。试剂可任选地包括可检测的标记。标记可以是荧光的、发光的、酶促的、显色的或放射性的。

[0035] 本发明的试剂盒任选地包括单独地或与其它试剂一起的一个测定标准品或一组测定标准品。测定标准品通过提供代表健康个体的给定标志物的正常表达的参考水平,可用作正常对照。

[0036] 除了用于蛋白质检测的抗体之外,试剂盒还可以包括用于检测替代性基因表达产物的探针。该试剂盒可任选地包括缓冲剂。

[0037] 在一个实施方案中,试剂盒包含特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2和/或ITGB3的表达产物的抗体或探针。在一个实施方案中,试剂盒包含特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2和ITGB3的试剂。在一些实施方案中,试剂盒包含特异性结合CXCL5和IGFBP2的试剂。此类试剂盒还可任选地包含特异性结合CXCL6和/或ITGB3的试剂。通常,试剂盒包含特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2和/或ITGB3中的至少两种的抗体或探针。在一些实施方案中,试剂盒的抗体或探针特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2和/或ITGB3中的至少三种或任选地全部四种。任选地,试剂盒还可包含特异性结合1、2、3、4、5、6、7、8、9种或最多10种其它表达产物的抗体或探针。所述其它表达产物可以选自本文的表2、表3或表4。任选地,所述其它表达产物可以是其它感兴趣的标志物。

附图说明

[0038] 图1是示出经体重调节的CXCL5血清水平的条形图,证实上调的患病内皮标志物之一在小鼠体内分泌,并且在从患有代谢综合征的小鼠脑部排出的眶后血液中上调。

[0039] 图2是示出CXCL5和CXCL6数据的散点图。

[0040] 图3是示出在CXCL5和CXCL6血清水平与Trails A性能之间发现显著相关性的散点图。

[0041] 图4是示出在具有低于500pg/mL与高于500pg/mL的CXCL5血清水平的受试者之间发现Trails A性能方面的显著差异的条形图。

[0042] 图5是示出在具有低于500pg/mL与高于500pg/mL的CXCL5血清水平的受试者之间发现数字广度(Digit Span)性能方面的显著差异的条形图。

[0043] 图6是示出白质病变的量度Fazekas评分的条形图。

[0044] 图7示出了技术验证的结果,分析了在健康对照中的平板之间观察到的变异系数(CoV)百分比。

[0045] 图8示出了技术验证的结果,分析了在受试者之间观察到的变异系数(CoV)百分比。

[0046] 图9是示出血清髓过氧化物酶(MPO)水平随Fazekas评分(FS)变化(弱相关)的散点图。

[0047] 图10是示出IGFBP2血清水平与FS评分显著相关的散点图。

具体实施方式

[0048] 本发明基于意外发现由暴露于慢性血管风险因素的脑内皮细胞产生的分子,所述慢性血管风险因素包括肥胖、高脂血症、高血压和葡萄糖耐受不良。这些应激分子是由脑内皮细胞产生的并且可在血清中检测到。本发明提供了使用这些分子作为脑特异性内皮细胞损伤的诊断指示物的测定,并且所述分子与无症状性中风和认知功能受损的MRI指示物相关联。本文描述的测定试剂和方法提供脑微血管疾病的特异性指示物。这些指示物对于许多专业的执业临床医生非常有用,使他们能够识别处于发展无症状性脑缺血(SBI)的风险中的患者,否则无症状性脑缺血将无法被检测到。标志物还可以用作非侵入性筛查工具,用

于检测和治疗小血管缺血性疾病 (SVID) 和其它形式的脑血管疾病 (CVD)。

[0049] 定义

[0050] 除非另有说明, 否则本申请中使用的所有科学和技术术语具有本领域常用的含义。如本申请中所用, 以下单词或短语具有指定的含义。

[0051] 如本文所用, “对照” 样品意指表示各个标志物的正常度量 (诸如将从正常健康对照受试者获得的), 或用于比较的标志物的基线量的样品。通常, 基线将是来自相同受试者或患者获得的测量值。样品可以是用于测试的实际样品, 或基于相应标志物的已知正常测量值的参考水平或范围。

[0052] 如本文所用, “术语“核酸”或“多核苷酸”或“寡核苷酸”是指这样的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物的序列, 所述核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物为单链或双链形式, 并且除非另有限制, 否则涵盖以与天然存在的核苷酸相似的方式与核酸杂交的已知天然核苷酸类似物。

[0053] 如本文所用, “杂交” 意指寡核苷酸在标准条件下与靶DNA分子形成非共价相互作用。标准杂交条件是允许寡核苷酸探针或引物与靶DNA分子杂交的那些条件。对于寡核苷酸探针或引物和靶DNA分子而言, 使用本领域技术人员熟知的技术容易地确定此类条件。靶多核苷酸的核苷酸序列通常是与寡核苷酸引物或探针互补的序列。杂交寡核苷酸可含有不干扰形成非共价相互作用的非杂交核苷酸。寡核苷酸引物或探针的非杂交核苷酸可位于杂交寡核苷酸的末端或杂交寡核苷酸内。因此, 只要在标准杂交条件下存在杂交, 寡核苷酸探针或引物就不必与靶序列的所有核苷酸互补。

[0054] 如本文所用, “显著差异” 意指可以以本领域技术人员认为可靠的方式检测到的差异, 诸如统计上显著的差异, 或者足够大、在所述情况下可以以合理的可靠性水平检测到的差异。如本文所用, 除非另有明确说明, 否则“一”或“一个 (种)” 意指至少一个 (种)。

[0055] 如本文所用, “预防” 或“防御” 病症或疾病意指阻碍、减少或延迟所述病症或疾病的发作或进展。

[0056] 如本文所用, 除非另有明确说明, 否则“一”或“一个 (种)” 意指至少一个 (种)。

[0057] 标志物

[0058] 本文描述了由暴露于慢性血管风险因素的脑内皮细胞产生的分子, 所述慢性血管风险因素包括肥胖、高脂血症、高血压和葡萄糖耐受不良。这些应激分子是由脑内皮细胞产生的并且可在血清中检测到。这些分子作为脑特异性内皮细胞损伤的诊断指示物, 并且与无症状性中风和认知功能受损的MRI指示物相关联。

[0059] 下面提供了用于该测定的标志物的列表。1级分子 (表1) 是我们最强的候选分子, 每种分子都可以作为无症状性脑血管损伤的独立标志物。2级分子 (表2) 提供了其它标志物。这些标志物的组合将提供高于任何一种测定组分的额外诊断准确性。该标志物小组提供纵向预测值, 并且可通过各种药理学或生活方式干预进行调节。先前已知的心血管疾病 (CVD) 标志物, 诸如表3中列出的那些, 可以连同表1和表2中列出的一种或多种标志物一起使用。

[0060] 表1

[0061]

蛋白质首字母缩略词	全名
-----------	----

CXCL5 (ENA-78)	C-X-C基序趋化因子5
CXCL6 (GCP-2)	C-X-C基序趋化因子6
IGFBP2	胰岛素样生长因子结合蛋白2
ITGB3 (CD61)	整联蛋白, $\beta 3$ (血小板糖蛋白 IIIa)
IL-17B	白细胞介素-17-B

[0062] 表2

[0063]

蛋白质首字母缩略词	全名
IL-17A	白细胞介素-17-A
GDF-15	生长/分化因子15
FGF-23	成纤维细胞生长因子-23
CCL2/MCP-1	趋化因子 (C-C基序) 配体2

[0064] 表3

[0065]

蛋白质首字母缩略词	全名
IL-6	白细胞介素-6
TNF- α	肿瘤坏死因子- α

[0066] 在一个实施方案中,标志物是选自表1或表2的至少一种标志物。在一个实施方案中,表1、表2和/或表3的至少两种或更多种标志物组合使用。标志物组合的实例包括: CXCL5和选自表1、表2或表3的其它标志物; CXCL6和选自表1、表2或表3的其它标志物; IGFBP2和选自表1、表2或表3的其它标志物; ITGB3和选自表1、表2或表3的其它标志物; IL-17B和选自表1、表2或表3的其它标志物; IL-17A和选自表1、表2或表3的其它标志物; GDF-15和选自表1、表2或表3的其它标志物; FGF-23和选自表1、表2或表3的其它标志物; CCL2/MCP-1和选自表1、表2或表3的其它标志物; IL-6和选自表1、表2或表3的其它标志物; TNF- α 和选自表1、表2或表3的其它标志物; CXCL5和CXCL6以及选自表1、表2或表3的其它标志物; 选自表1、表2和表3的3种或更多种标志物的任何组合; 表1、表2和表3的4、5、6、7、8、9、10或11种标志物的任何组合。在一个实施方案中,标志物的组合是选自表1的2、3、4或5种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表1的至少一种标志物和来自表2的至少一种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表1的至少一种标志物和来自表3的至少一种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表2的至少一种标志物和来自表3的至少一种标志物。在另一个实施方案中,标志物的组合是来自表1、表2和表3中的每一个的至少一种标志物。

[0067] C-X-C基序趋化因子配体5 (CXCL5) 是趋化因子CXC亚家族的成员。CXCL5也称为小诱导型细胞因子亚家族B (Cys-X-Cys), 成员5 (SCYB5) 和ENA-78。募集和激活白细胞的趋化因子按功能 (炎症性或稳态性) 或按结构进行分类。提出这种蛋白质会结合G蛋白偶联受体趋化因子 (C-X-C基序) 受体2以募集中性粒细胞, 促进血管生成和重塑结缔组织。认为这种蛋白质在癌细胞增殖、迁移和侵袭中起作用。

[0068] C-X-C基序趋化因子配体6 (CXCL6) 是趋化因子CXC亚家族的另一成员。CXCL6也称为粒细胞趋化蛋白2 (GCP2), CKA-3和SCYB6。另外, 对于中性粒细胞的趋化性 (通过其受体

CXCR1和CXCR2的结合和激活进行信号传导)和血管生成,CXCL6对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌具有很强的抗菌活性(与之CXCL5和CXCL7相比,高90倍)。

[0069] 胰岛素样生长因子结合蛋白2(IGFBP2)抑制IGF介导的生长和发育速率。IGF结合蛋白延长IGF的半衰期,并已证实会抑制或刺激IGF对细胞培养物的生长促进作用。它们改变了IGF与其细胞表面受体的相互作用。

[0070] 整联蛋白 β -3(ITGB3)蛋白产物是整联蛋白 β 链 β 3。整联蛋白是由 α 链和 β 链组成的完整细胞表面蛋白。给定的链可以与多个配偶体组合,产生不同的整联蛋白。整联蛋白 β 3与 α IIb链一起在血小板中被发现。已知整联蛋白参与细胞粘附以及细胞表面介导的信号传导。

[0071] 在一个实施方案中,所述方法、试剂盒或测定旨在检测和/或测量从受试者获得的样品中的IGFBP2、ITBG3、CXCL5和/或CXCL6。

[0072] 表4

[0073]

分析物	新型的/已报道的
IGFBP2	新型的
ITBG3	新型的
CXCL5	新型的
CXCL6	新型的
TNFA	Jefferson等,Neurology 2007
IL-18	Miwa等,Stroke 2011
IL-6	Nadkarni等,Neurology 2016
纤维蛋白原	Aono等,Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007
MCP-1	Bettcher等,Alzheimers Dement 2016
BDNF	Pikula等,Stroke 2013
GDF-15	Andersson等,Stroke 2015
ST2	Andersson等,Stroke 2015
FGF-23	Wright等,Stroke 2016
SRAGE	Hudson等,Atherosclerosis 2011
MPO	Shoamanesh等,Neurology 2015
LpPLA2	Shoamanesh等,Neurology 2015

[0074] 如上所述,上表4列出了新型的和先前报道的标志物。在一些实施方案中,表4中列出的两种或更多种标志物的组合用于如本文所描述的方法或测定中。在一些实施方案中,表4中列出的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15种或所有16种标志物一起用于所述测定中。任选地,这些标志物的全部或子集可以连同本文或别处描述的其它标志物一起使用。

[0075] 本发明的方法

[0076] 本文描述了治疗患有无症状性脑缺血和/或代谢综合征的受试者的方法。该方法包括当两种或更多种SBI标志物的水平升高时,向受试者施用阿司匹林疗法、血压疗法、血糖控制、胆固醇管理、体重管理,和/或饮食和运动计划。

[0077] 本发明提供了用于监测从受试者获得的样品中的脑血管状态,诊断受试者的无症

状性中风的方法,以及用于预测、治疗和/或监测无症状性中风、脑血管损伤、认知障碍和/或代谢综合征的方法。

[0078] 在一个典型实施方案中,所述方法包括:

[0079] (a) 使从所述受试者获得的样品与特异性结合至少一种选自表1或表2的标志物的试剂接触;

[0080] (b) 测量与所述标志物结合的水平;

[0081] (c) 相对于正常对照分配反映标志物的测得量的状态评分;

[0082] (d) 如果所述状态评分显著大于1,则指示所述受试者进行代谢综合征和/或中风的治疗。

[0083] 在一些实施方案中,所述方法还包括治疗受试者的代谢综合征和/或中风。治疗的实例包括但不限于阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。

[0084] 还提供了一种监测受试者的无症状性中风的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:

[0085] (a) 使从所述受试者获得的样品与特异性结合至少一种选自表1或表2的标志物的试剂接触;

[0086] (b) 测量与所述标志物结合的水平;

[0087] (c) 相对于正常对照分配反映标志物的测得量的状态评分;

[0088] (d) 如果所述状态评分显著大于1,则治疗所述受试者的代谢综合征和/或中风;

[0089] (e) 重复步骤(a)至(c);以及

[0090] (f) 在所述状态评分不趋于1时调整所述治疗。

[0091] 还提供了治疗有需要的受试者的无症状性中风和/或代谢综合征的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:

[0092] (a) 测量选自表1的至少一种标志物的水平;

[0093] (b) 当所述标志物的水平升高时,向所述受试者施用阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。

[0094] 在一些实施方案中,所述至少一种标志物包含C-X-C基序趋化因子5(CXCL5)和/或C-X-C基序趋化因子6(CXCL6)。在一些实施方案中,所述至少一种标志物包含IGFBP2。在一些实施方案中,针对表1的至少两种标志物进行步骤(a)的测量。在其它实施方案中,针对表1和/或表2的标志物中的至少三种标志物进行步骤(a)的测量。在一些实施方案中,所述方法还包括测量表3的标志物。

[0095] 在典型的实施方案中,样品是CSF样品、尿液样品、血液样品或其它体液。为了用于本文描述的方法,样品的代表性实例包括但不限于血液、血浆或血清、唾液、尿液、脑脊髓液、乳汁、宫颈分泌物、精液和其它体液。

[0096] 受试者通常是哺乳动物受试者,诸如人。在一些实施方案中,受试者是兽医受试者,诸如宠物或其它伴侣动物。

[0097] 所述方法可以使用例如免疫测定技术进行,诸如酶免疫测定。如本领域技术人员将理解的,可以采用其它测定。

[0098] 试剂盒和测定标准品

[0099] 本发明提供了试剂盒,其包含一组如本文所描述的试剂,诸如特异性结合本发明

的一种或多种标志物的抗体,和任选地,一个或多个含有本发明试剂的合适容器。试剂包括特异性结合本发明的一种或多种标志物的分子。试剂的一个实例是对标志物有特异性的抗体。试剂可任选地包括可检测的标记。标记可以是荧光的、发光的、酶促的、显色的或放射性的。

[0100] 本发明的试剂盒任选地包括单独地或与其它试剂在一起的一个测定标准品或一组测定标准品。测定标准品通过提供代表健康个体的给定标志物的正常表达的参考水平,可用作正常对照。

[0101] 除了用于蛋白质检测的抗体之外,试剂盒还可以包括用于检测替代性基因表达产物的探针。该试剂盒可任选地包括缓冲剂。

[0102] 在一个实施方案中,试剂盒包含特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2和/或ITGB3的表达产物的抗体或探针。通常,试剂盒包含特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2和/或ITGB3中的至少两种的抗体或探针。在一些实施方案中,试剂盒的抗体或探针特异性结合CXCL5、CXCL6、IGFBP2和/或ITGB3中的至少三种或任选地全部四种。任选地,试剂盒还可包含特异性结合1、2、3、4、5、6、7、8、9种或最多10种其它表达产物的抗体或探针。所述其它表达产物可以选自本文的表2、表3或表4。任选地,所述其它表达产物可以是其它感兴趣的标志物。

[0103] 实施例

[0104] 呈现以下实施例以说明本发明并且帮助普通技术人员制造和使用本发明。所述实施例不意图以任何方式另外限制本发明的范围。

[0105] 实施例1:患有代谢综合征的小鼠中微血管复杂性和内皮细胞基因表达的显著改变

[0106] 该实施例描述了代谢综合征对脑微血管系统的影响,并揭示了调控这些变化的分子机制。小鼠中的这种综合征强烈模仿以肥胖、胆固醇升高和葡萄糖耐受性受损为标志的人类病症。这一系列症状大大增加了中风(尤其是无症状性中风)的风险(6倍)。无症状性中风会损伤脑白质并导致残疾、痴呆和死亡。

[0107] 方法

[0108] 为转基因小鼠(Tie2-Cre:flox-stop tdtomato plus flox-RiboTAG)供给来自脂肪饮食的60%kCal以诱导代谢综合征。受试者在2月龄时喂食高脂饮食12周,并且将来自脂肪饮食的10%kCal用作对照。通过Tie2-Cre:flox-stop tdtomato小鼠的内皮细胞中的报告基因表达来评估白质中脑血管系统的体积。使用Ribotag核糖体免疫沉淀技术(Tie2-Cre:flox-RiboTAG)分离来自脑内皮细胞的转录组。在核糖体相关的转录组分离后,进行RNA-seq。

[0109] 结果

[0110] 饮食诱导的肥胖产生了代谢综合征血清学特征,如下表所示。

饮食	总胆固醇	HDL	甘油三酯	LDL	葡萄糖	HgbA1c
对照 (n=3)	110.7	56.0	88.7	37.0	162.0	5.6
高脂 (n=3)	187.3* *p<0.007	68.3*	96.0	99.7*	373.3*	6.6

[0112] 代谢综合征导致大血管($30 \pm 2.2\%$, $P < 0.04$)和微血管($23 \pm 3.7\%$, $P < 0.01$)中的

白质血管体积显著减小。白质内皮细胞的转录分析揭示了正常小鼠和患有代谢综合征的小鼠之间的表达谱的差异。内皮细胞基因表达的显著变化 (参见实施例2) 与具有代谢综合征的白质中通过血管生成受体配体的变化导致的血管体积减小相关。

[0113] 代谢综合征使白质中大血管和微血管的体积减小,并显著改变内皮细胞基因表达。这些发现有助于为代谢综合征患者开发分子治疗方法,以预防包括中风在内的脑微血管并发症。

[0114] 实施例2:脑内皮血管损伤的标志物的免疫测定

[0115] 该实施例使用产生实施例1中描述的‘代谢综合征’的肥胖小鼠模型。使用用这种肥胖小鼠模型的新转基因小鼠技术,我们已经鉴定了一系列在肥胖和这些常见代谢紊乱的情况下出现的早期脑血管损伤的分子指示物。这些基因中的许多编码在血液中分泌的蛋白质,因此可用于指示早期脑血液损伤

[0116] 这导致开发了针对本文描述的内皮数据集中的标志脑内皮血管损伤的分泌分子的多点酶免疫测定 (EIA) 试验。

[0117] 方法

[0118] 将患者血浆样品连续稀释并移液到微量滴定板的各个孔中。针对5-10种我们独特的肥胖诱导的脑内皮基因产生的新型抗体主要用荧光指示剂标记。将多达4种具有非重叠荧光指示剂的不同抗体与每个患者样品孔一起孵育。将板进行反复洗涤以去除非特异性结合,然后在多通道荧光分光光度计中扫描,并记录对于每个孔而言的每个通道的荧光强度。重复该方法,直到测量了该谱中的所有分子。将累积荧光强度对所有靶标取平均值并与标准值进行比较。

[0119] 以下是可用于该测定的标志物列表,包括一些先前鉴定的作为内部对照的分子。表1分子是优选的分子,并且每个分子都可以作为无症状性脑血管损伤的独立标志物 (例如,单独使用)。CXCL5和CXCL6在实验研究中已经展示出独立的预测能力。表2分子包括与患病内皮和脑血管损伤相关的其它标志物,这些标志物可在血清中检测到,用作如本文所描述的无症状性中风的指示物。表3分子包括与患病内皮和脑血管损伤相关的其它已知标志物,这些标志物可在血清中检测到,用作如本文所描述的无症状性中风的指示物。使用这些标志物的组合将提供高于单一测定试剂的额外诊断准确性。该标志物小组可以提供纵向预测值,并且可通过各种药理学或生活方式干预进行调节。

[0120] 表1

[0121]	蛋白质首字母缩略词	全名
	CXCL5 (ENA-78)	C-X-C 基序趋化因子 5
[0122]	CXCL6 (GCP-2)	C-X-C 基序趋化因子 6
	IGFBP2	胰岛素样生长因子结合蛋白 2
	ITGB3 (CD61)	整联蛋白, β 3 (血小板糖蛋白 IIIa)
	IL-17B	白细胞介素-17-B

[0123] 表2

[0124]

蛋白质首字母缩略词	全名
-----------	----

IL-17A	白细胞介素-17-A
GDF-15	生长/分化因子15
FGF-23	成纤维细胞生长因子-23
CCL2/MCP-1	趋化因子 (C-C基序) 配体2

[0125] 表3

[0126]

蛋白质首字母缩略词	全名
IL-6	白细胞介素-6
TNF- α	肿瘤坏死因子- α

[0127] 实施例3:脑内皮血管损伤标志物的开发

[0128] 该实施例描述了导致鉴定出小血管脑血管疾病 (SVD) 的新型脑内皮生物标志物的研究。肥胖、高血压、高脂血症和糖尿病都会增加白质损伤的发生率,并协同促进脑微血管系统内的信号传导改变。然而,这些慢性病症在脑微血管系统中激活的精确分子途径仍然未知。为了解决这一知识缺口,利用一种新型翻译方法来鉴定肥胖/代谢综合征小鼠模型中白质内的脑内皮的细胞特异性转录谱。使用RiboTAG转基因技术(其中主要的核糖体蛋白用血凝素抗原进行遗传修饰),结合细胞特异性Cre-loxP转基因建模,可以分离脑内皮的转录谱。这种无偏方法鉴定了慢性血管病症的第一直接和独立的脑血管标签,所述慢性血管病症为诸如肥胖、葡萄糖耐受不良和高脂血症,其全部与SVD直接相关。使用这种建模方法来合理地鉴定新的SVD生物标志物,该实施例鉴定了肥胖诱导的脑血管标签,所述肥胖诱导的脑血管标签包括可在血清中检测到的细胞表面分子和分泌的分子。

[0129] 对患病的脑内皮内上调的主要基因的途径分析揭示了与血栓形成 (ITGB3)、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease) (IGFBP2) 和炎症性信号传导 (CXCL5) 的直接联系,从而将慢性血管风险与阿尔茨海默氏病和血管性痴呆直接联系起来。剔除上调基因(具有足够低的错误发现率,或FDR<0.1)的列表以鉴定可能被分泌的那些或流入血流的细胞表面分子(参见表1)。表5列出了通过mRNA水平检测到的上调基因。LogFC是指mRNA检测中倍数变化差异的对数变换。从该列表中,选择可能分泌的基因和先前在人血清中检测到的基因。

[0130] 表5

[0131]

基因	名称	LogFC
Itgb3	整联蛋白 β 3	10.65
Ttc21a	三十四肽重复结构域21a	13.06
Foxm1	叉头框M1	11.62
Odf21	精子尾外致密纤维2样	12.00
Cxcl5	趋化因子配体5	11.67
Igfbp2	胰岛素样生长因子结合蛋白2	6.96
Gnpda2	葡糖胺-6-磷酸脱氢酶2	6.87

[0132] 我们证实上调的患病内皮标志物之一在小鼠体内分泌,并且在从患有代谢综合征的小鼠脑部排出的眶后血液中上调(图1)。因此,这些数据证明脑内皮细胞可以产生可以在血流中测量到的疾病标签。

[0133] 实施例4:检测人类中脑内皮血管损伤标志物

[0134] 为了证实这种脑内皮分子标签的相关性,我们使用Freesurfer测定了15名来自UCSF MAC(记忆与衰老中心)的认知正常受试者的CXCL5和CXCL6(小鼠CXCL5的人类直系同源物)的水平,所述受试者具有如白质低信号量所指示的不同程度的白质病。在具有至少轻度SVD的受试者中,白质低信号量与我们的信号传导因子之间的相关性接近显著性,即使在我们的小样品中也如此(CXCL5的斯皮尔曼等级相关系数 ρ (Spearman ρ) = .56;CXCL6 = .57; $p < .10$)。图2示出了显示CXCL5和CXCL6数据的散点图。这些数据证明了使用这些最近在小鼠中发现的脑内皮分子作为反映内皮细胞水平的脑微血管疾病的人生物标志物的翻译有效性。

[0135] CXCL5和CXCL6是与CXC受体2结合的ELR趋化因子配体家族中的两种。已知这些分子在中性粒细胞归巢到损伤部位中起作用,因此是通过损伤部位的细胞上调的。近年来,已将两种分子与动脉粥样硬化和SVD风险因素的发病机制和进展联系起来,尽管确切的机制未知,可能涉及免疫调节作用而不是中性粒细胞迁移的调节。已经证实CXC家族的趋化因子,尤其是CXCL5,具有促血管生成特性,因此对于血管生成可以提供独特的脑SVD信号。

[0136] 整联蛋白 α -V/ β -3 (ITGB3)是一种多功能内皮细胞受体,其主要功能是结合可溶性纤维蛋白原,从而激活血小板,导致血栓形成。已经确定纤维蛋白原水平的增加与白质病变和血管性痴呆有关联。然而,由于血清纤维蛋白原水平可以通过各种刺激而改变,并且先前确定的OR较低(<2),因此将脑内皮ITGB3鉴定为纤维蛋白原的潜在配体可能会导致生物标志物的灵敏度高于血清纤维蛋白原水平。

[0137] 胰岛素样生长因子结合蛋白-2 (IGF-BP2)是一种肽激素,其与血清中的其它蛋白质复合并起到调节胰岛素样生长因子(IGF)的半衰期的作用。IGF-BP2也可具有促血管生成特性。先前已将IGF-BP2与阿尔茨海默氏病和年龄特异性认知衰退中的皮质萎缩关联起来。它与白质病变的关系尚未进行研究。

[0138] 最近我们对来自弗雷明汉心脏研究(Framingham Heart study)的近12岁以上的3374名无中风和痴呆的个体进行了纵向随访,以评估GDF-15血清水平对中风和SVD的影响。在调整传统心血管风险因子诸如B型利钠肽、高敏C反应蛋白和尿白蛋白水平后,较高的GDF-15水平与视觉记忆测试的性能较差(对于GDF-15而言,Q4与Q1的 $\beta = -0.62$, $p = 0.009$)和经过对数变换的白质高信号体积更大(Q4与Q1的 $\beta = 0.19$, $p = 0.01$)横向相关。该证据表明GDF-15可能是初期SVD的优良标志物,但尚未进行纵向研究来检验该假设。

[0139] 循环性炎症因子:我们实验室和其它人的先前工作提供了充分研究的细胞因子如C反应蛋白(CRP)和白细胞介素-6 (il-6)与SVD相关联的证据。

[0140] 我们现在正在研究可以作为内皮功能更直接的标志物的细胞因子和趋化因子。例如,单核细胞趋化蛋白(CCL-2;MCP-1)可以通过引起单核细胞从内腔渗透到内皮下间隙而在血管疾病的发展中发挥关键作用,在内皮下间隙中单核细胞变成泡沫细胞,引发脂纹形成,脂纹形成导致动脉粥样硬化斑块形成。我们研究了131名功能完好的老年受试者(平均年龄=72.7岁),这些老年受试者进行了纵向3T结构MRI。使用Mesoscale vplex趋化因子小组在血浆中测量MCP-1。我们使用胼胝体的总体积作为白质完整性的一般标记,并且我们的主要因变量是胼胝体体积的年度变化率。使用对年龄和颅内容量的多元回归控制,我们发现较高水平的MCP-1与胼胝体体积随时间的急剧下降相关。这些数据支持内皮特异性炎

性分子在脑血管健康中的可能作用。

[0141] 我们已经鉴定了脑内皮功能障碍的几种重要蛋白质组学标志物,其可以提高对早期SVD的敏感度,并作为SVD进展的预测因子。

[0142] 实施例5:标志物与认知障碍和小血管缺血性疾病的关联

[0143] 该实施例支持表1中列出的标志物与认知障碍的关联,并且还支持标志物IGFBP2与无症状性中风的成像证据的关联。这些早期损伤血清指示物与脑小血管疾病(CSVD)(也称为小血管缺血性疾病(SVID))的成像指示物相关。

[0144] 从先前的研究中获得遗留血清样品,选择具有相对较低的血管疾病负担的65名受试者的小亚群。使用Trail Making测试(一种视觉注意力的神经心理学测试)的Trails A性能和数字广度性能(一种短期记忆评估工)对受试者进行认知表型分析。

[0145] 在CXCL5和CXCL6血清水平与Trails A性能之间发现显著相关性(图3)。在具有低于500pg/mL与高于500pg/mL的CXCL5血清水平的受试者之间,在Trails A性能(图4)和数字广度性能(图5)方面,也发现显著差异。

[0146] 一项针对近期中风患者的研究包括应允18岁以上的,在六个月内被送到急诊室的具有急性神经症状(在过去的24小时内)的患者。使用改进的Fazekas评分法,在轴向T2加权液体衰减反转恢复(FLAIR)图像上测量白质高信号。在最初招募的202名受试者中,只有168名患者进行了MRI。在这些(进行了MRI的)患者中,100名对于检测急性缺血性中风的弥散加权成像为阴性。在这100名受试者中,42名在成像时显示出中风/TIA的迹象,而58名未显示出中风的迹象。图6是示出白质病变的量度Fazekas评分的条形图。

[0147] 图7和图8示出了技术验证的结果,分析了在健康对照中的平板之间(图7)和在受试者之间(图8)观察到的变异系数(CoV)百分比。这些数字显示了样品间变异的水平。

[0148] 图9示出血清髓过氧化物酶(MPO)水平随Fazekas评分(FS)变化(弱相关)。如图10所示,IGFBP2血清水平与FS评分显著相关。

[0149] 这些结果证实血清标志物,诸如CXCL5/6和IGFBP2可用于检测无症状性中风。这些测定可以使早期治疗能够降低中风以及内皮疾病的其它有害后果的风险。

[0150] 在整个申请中,引用了各种出版物。这些出版物的公开内容特此以引用的方式整体并入本申请中以便更充分地描述本发明所属领域的技术现状。

[0151] 本领域技术人员将认识到,前述说明中公开的概念和具体实施方案可以容易地用作修改或设计用于实现本发明的相同目的其它实施方案的基础。本领域技术人员还将认识到,此类等效实施方案未脱离所附权利要求中阐述的本发明的精神和范围。

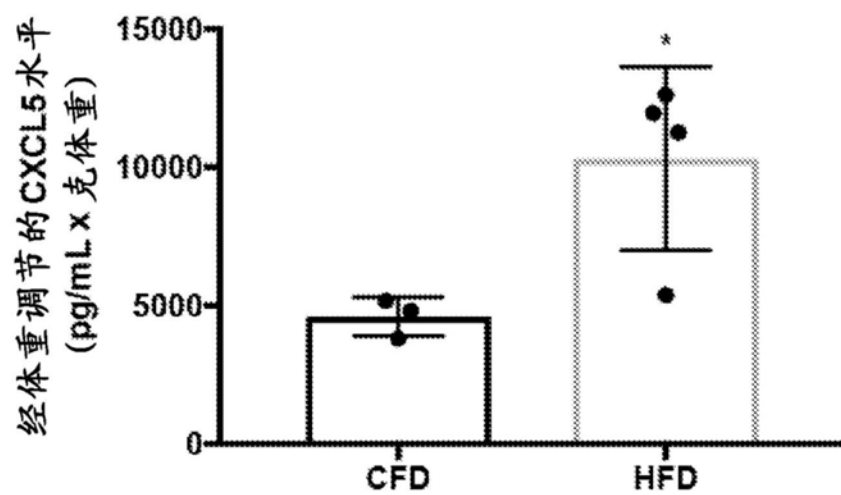


图1

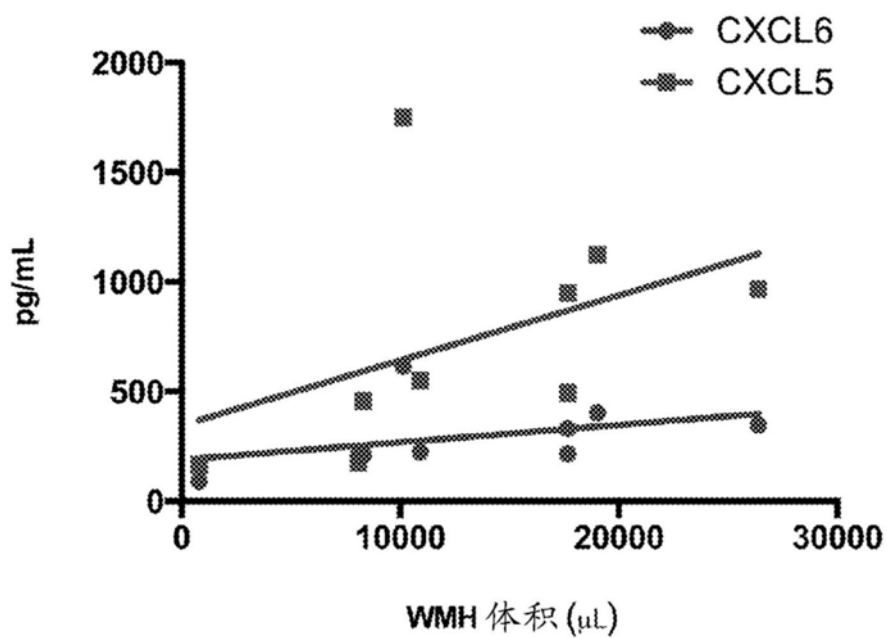


图2

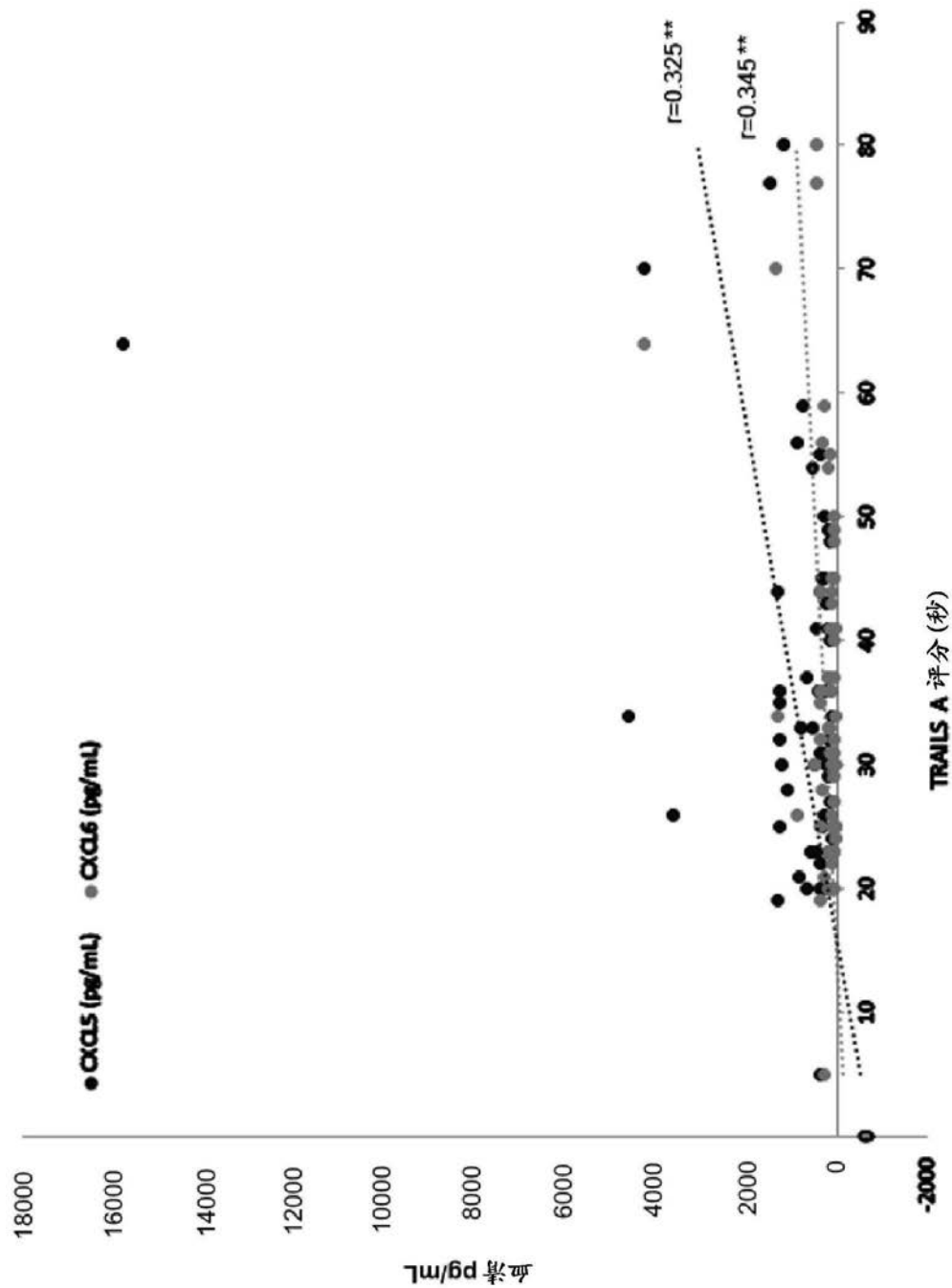


图3

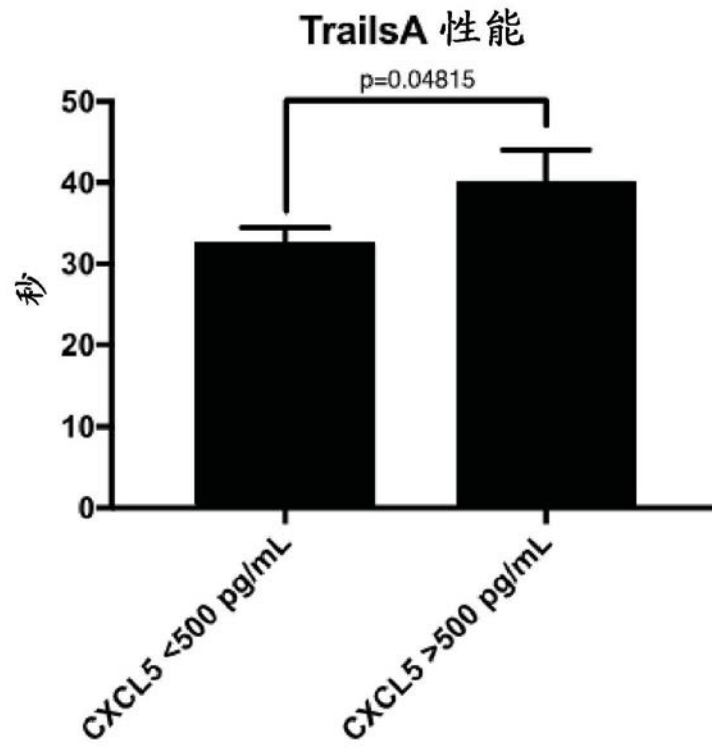


图4

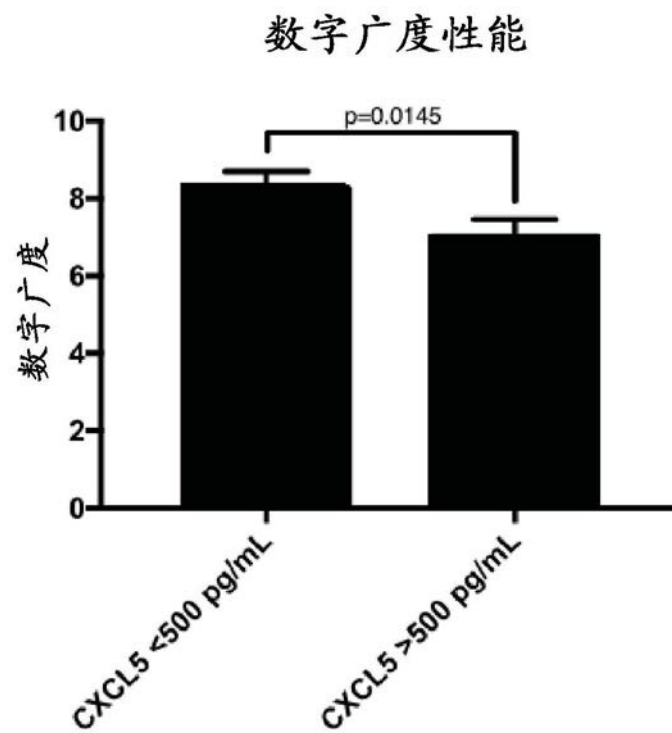


图5

Fazekas 评分分布 (模拟组群)

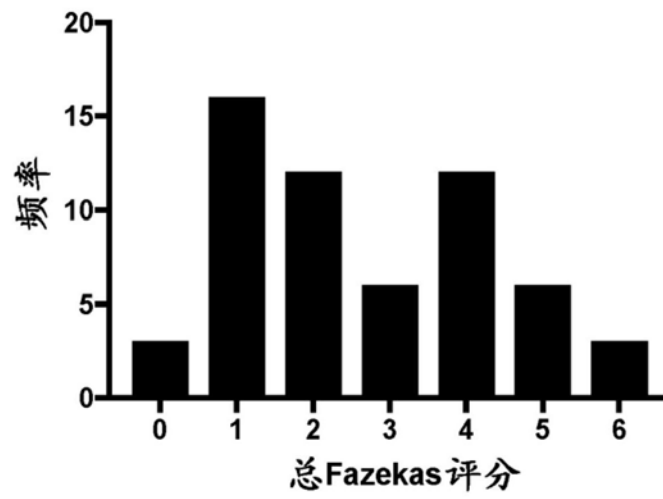


图6

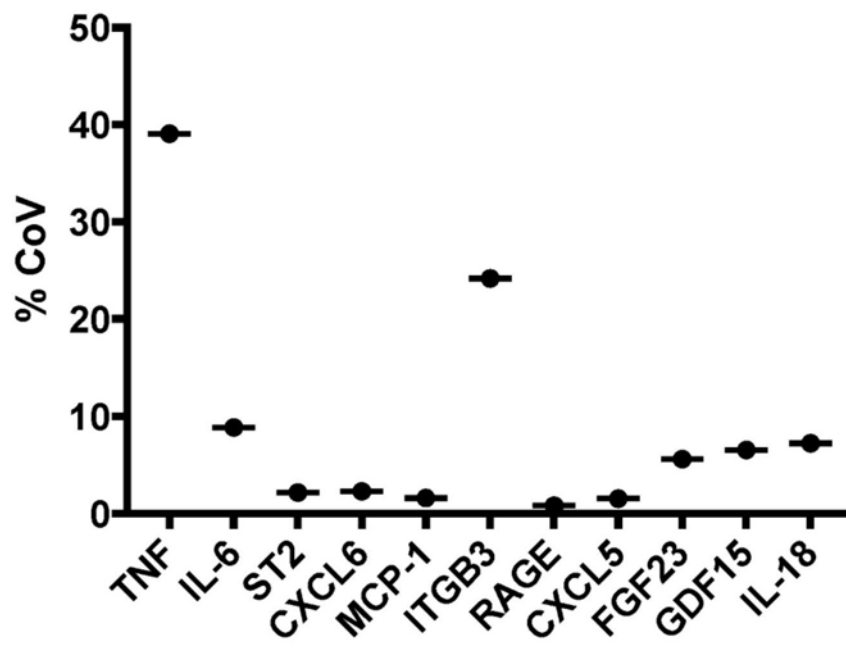


图7

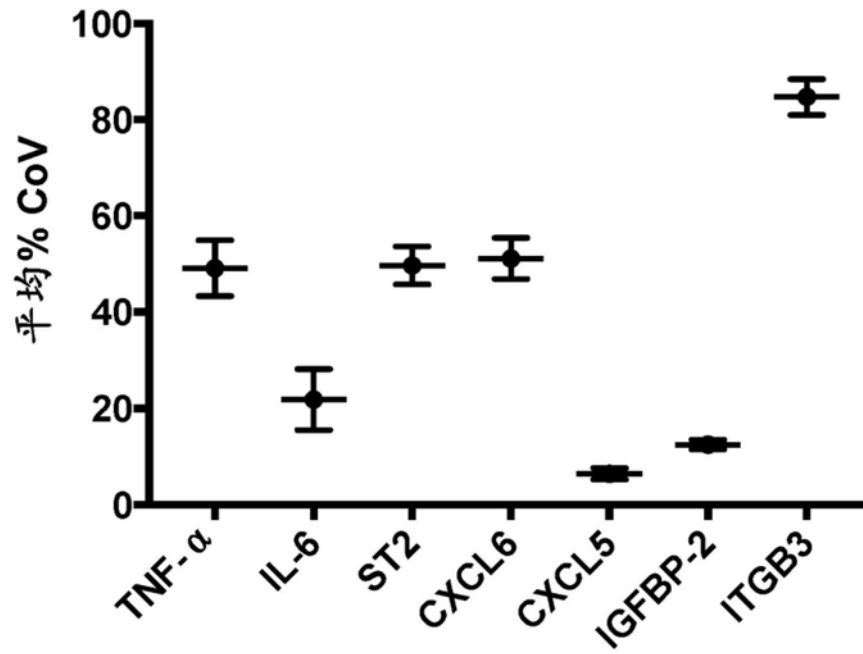


图8

髓过氧化物酶 (MPO)

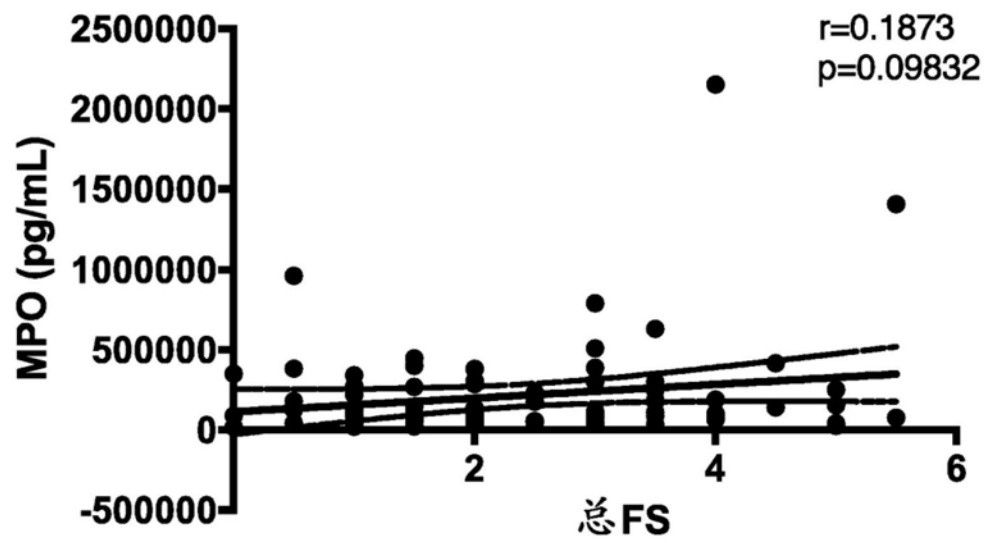


图9

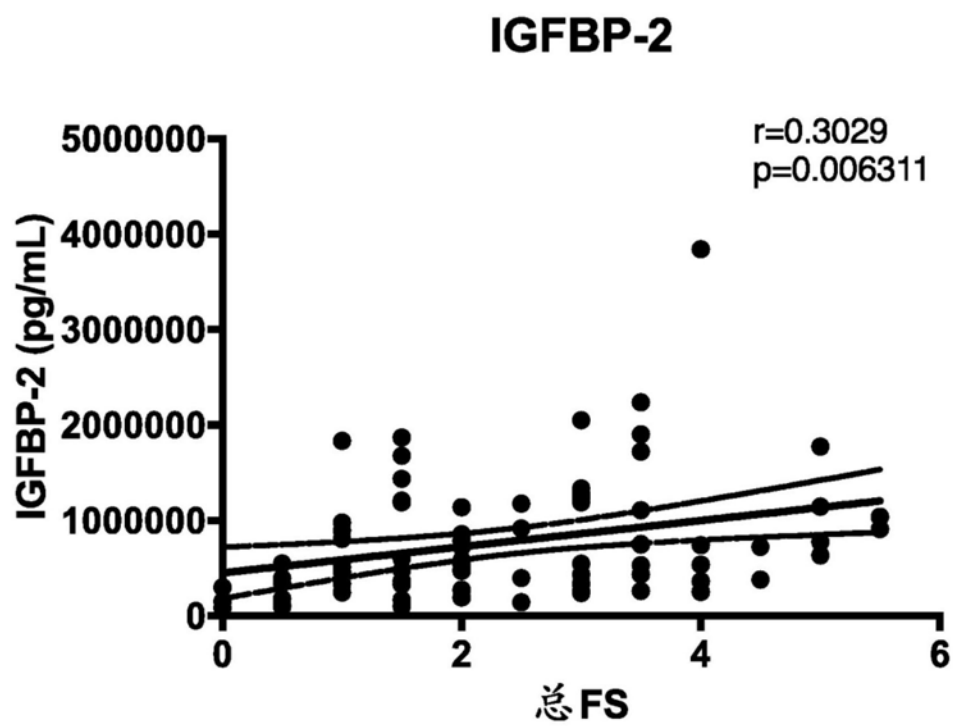


图10

专利名称(译)	无症状性脑缺血的血清学测定		
公开(公告)号	CN110325106A	公开(公告)日	2019-10-11
申请号	CN201880012101.7	申请日	2018-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	G·肖		
发明人	J·D·欣曼 G·肖		
IPC分类号	A61B5/00 A61P9/10 C07K14/435 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61B5/0042 A61B5/0071 A61B5/055 A61B5/4064 A61P9/10 C07K14/522 G01N33/6893 G01N2333/4745 G01N2333/521 G01N2333/70557 G01N2800/04 G01N2800/2871 G01N33/5091 G01N33/6869		
代理人(译)	刘文娜 郝名悦		
优先权	62/461161 2017-02-20 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测或监测无症状性脑缺血(SBI)和脑血管健康的状态的方法。本文描述的测定试剂和方法提供了脑微血管疾病的特异性指示物,使临床医生能够识别处于SBI发展风险中的患者。治疗患有无症状性脑缺血和/或代谢综合征的受试者的方法包括当两种或更多种SBI标志物的水平升高时,向所述受试者施用阿司匹林疗法、血压疗法、体重管理,和/或饮食和运动计划。本文描述了由暴露于慢性血管风险因素的脑内皮细胞产生的分子,所述慢性血管风险因素包括肥胖、高脂血症、高血压和葡萄糖耐受不良。这些由脑内皮细胞产生的应激分子可在血清中检测到,并用作脑特异性内皮细胞损伤的诊断指示物,并且与无症状性中风和认知功能受损的MRI指示物相关联。

