

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年1月16日 (16.01.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/010958 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/089441

(22) 国际申请日: 2019年5月31日 (31.05.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810743032.9 2018年7月9日 (09.07.2018) CN

(71) 申请人: 上海风劲生物医药科技有限公司 (SHANGHAI FENGJING BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海

市宝山区淞滨路500号3幢1A27室, Shanghai 200940 (CN)。

(72) 发明人: 缪朝玉 (MIAO, Chaoyu); 中国上海市宝山区淞滨路500号3幢1A27室, Shanghai 200940 (CN)。 郑斯莉 (ZHENG, Sili); 中国上海市宝山区淞滨路500号3幢1A27室, Shanghai 200940 (CN)。 缪玉恩 (MIAO, Yuen); 中国上海市宝山区淞滨路500号3幢1A27室, Shanghai 200940 (CN)。 胡文君 (HU, Wenjun); 中国上海市宝山区淞滨路500号3幢1A27室, Shanghai 200940 (CN)。

(74) 代理人: 上海卓阳知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHANGHAI ZHUOYANG INTELLECTUAL PROPERTY AGENT FIRM); 中国上海市静

(54) Title: APPLICATION OF METRNL PROTEIN OR GENE IN BLOCKED BLOOD VESSEL DISEASE

(54) 发明名称: Metrnl蛋白或基因在血管堵塞性疾病中的应用

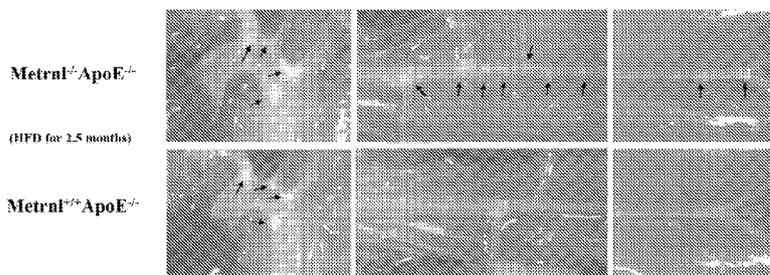


图5

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is an application of Metrnl in diagnosis of atherosclerosis. A Metrnl^{-/-}-ApoE^{-/-}-double knockout atherosclerotic rat model and an EC-Metrnl^{-/-}-ApoE^{-/-}-atherosclerotic rat model are constructed. The experiment shows that the severity of atherosclerosis, the area of atherosclerotic plaque, and the degree of atherosclerosis and inflammatory infiltration in an aortic root of two Metrnl knockout rats are higher than a rat in a control group. The experiment shows that a vascular endothelial cell can secrete Metrnl, and the vascular endothelium and blood Metrnl levels decrease during atherosclerosis, and the degree of decrease in Metrnl levels increases as the disease is exacerbated. The antithrombotic effect of a Metrnl recombinant protein does not have a species difference, and represents a dose-effect relationship on the inhibition effect of a clot contraction reaction. By comparing the function and characteristic of the Metrnl protein with a classical thrombolytic drug, it is found that the antithrombotic effect of Metrnl can reduce an adverse reaction of bleeding.

(57) 摘要: 本发明公开了Metrnl在诊治动脉粥样硬化中的应用。构建Metrnl^{-/-}-ApoE^{-/-}-双敲小鼠动脉粥样硬化模型和EC-Metrnl^{-/-}-ApoE^{-/-}-小鼠动脉粥样硬化模型, 实验显示: 两种Metrnl敲除小鼠发生动脉粥样硬化的严重程度、动脉粥样斑块面积以及主动脉根部血管粥样硬化增厚程度和炎症浸润程度高于对照组小鼠。实验显示血管内皮细胞可分泌Metrnl, 动脉粥样硬化时血管内皮和血液Metrnl水平下降, 且随着疾病加重Metrnl水平下降程度增加。Metrnl重组蛋白抗血栓作用没有种属差异, 对凝块收缩反应的抑制作用呈现量效关系。通过比较Metrnl蛋白与经典溶栓药物的作用特点, 发现Metrnl的抗血栓作用可减少出血不良反应。

安 区 恒 丰 路 638 号 苏 河 1 号 2318 室,
Shanghai 200070 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

Metnrl 蛋白或基因在血管堵塞性疾病中的应用

技术领域

本发明涉及医药技术领域，具体地说，涉及 Metnrl 蛋白或基因在血管堵塞性疾病中的应用。

背景技术

血管堵塞是指由于年龄、饮食等因素，使血流缓慢、血液成分改变或血液粘度增加形成血栓，导致血管闭塞。血管堵塞性疾病包括：动脉在硬化基础上的血栓形成、心脏血栓脱落后的动脉栓塞、静脉血栓形成、静脉曲张后的血液回流受阻等，较常见的包括脑血管堵塞、心脏冠状血管堵塞等，动脉粥样硬化、糖尿病、高脂血症和高血压等可加速它们的发展。血管堵塞性疾病的治疗目标是血管再通，目前常用的药物包括链激酶 (SK)、酰基纤溶酶原链激酶活化剂复合物 (APSAC)、尿激酶 (UK)、组织型纤溶酶原活化剂 (t-PA) 等，然而现有的溶栓药物会引起纤维蛋白原及其他凝血因子降低所致的不良反应，临床表现为局部渗血、皮下片状出血，甚至颅内出血。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)，作为心脑血管疾病的共同病理基础，长期以来始终是心血管病研究领域的重点和热点之一，AS 也是心血管疾病致残致死的主要原因。因此，如何防治 AS 对于心血管疾病患者的治疗及远期预后的改善至关重要。

Metnrl 又称 Subfatin、Cometin、Interleukin39，是本实验室（缪朝玉课题组）近年来发现的一个新型脂肪因子，其在皮下脂肪组织、肠道上皮组织等部位高表达，与 Meteorin 是同源蛋白，但表达分布与功能却大不相同。目前，关于 Metnrl 蛋白功能的研究较少，有限的研究表明，Metnrl 在胰岛素敏感性、神经轴突生长、白色脂肪棕色化、软骨细胞分化等方面具有功能活性。国际专利公布号 WO2010009732A1 和中国专利公布号 CN102164611A 公开了 Metnrl 在减轻内耳听力损害方面的应用。中国专利公布号 CN103536903A、CN103536904A 和国际专利公布号 WO2015062167A8 公开了 Metnrl 在降血脂、降血糖中的应用。中国专利公布号 CN104808004A 公开了 Metnrl 在诊断结肠癌中的应用。但是，关于 Metnrl 蛋白或基因在血管堵塞性疾病中的用途目前还未见报道。

发明内容

本发明的第一个目的是针对现有技术中的不足，提供 Metnrl 蛋白或基因的新的治疗用途。

第一方面，提供了 Metrnl 蛋白或基因或它们的增效剂在制备抗动脉粥样硬化的药物中的应用。

第二方面，提供了 Metrnl 蛋白或基因在治疗动脉粥样硬化的药物中的应用。

第三方面，提供了 Metrnl 蛋白或基因或它们的增效剂在制备药物中的应用，所述药物用于：

- a) 抑制高脂饮食条件下主动脉内粥样斑块的形成和斑块面积；或
- b) 抑制高脂饮食条件下主动脉血管粥样硬化增厚；或
- c) 降低高脂饮食条件下主动脉内炎症相关因子 VCAM-1、ICAM-1、TNF α 、IL-6 及巨噬细胞标记物分子 F4/80、CD68 的表达。

所述药物可采用医学领域常规的方法，将 Metrnl 蛋白作为活性成分，与药学上可接受的辅料制成各种剂型。当用于口服时，可将其制备成常规的固体制剂如片剂、粉剂或胶囊剂等；用于注射时，可将其制备成注射液。在各种制剂中，活性成分的重量含量为 0.1~99.9%，优选的重量含量为 0.5~90%。

所述药物可以按不同剂型通过腹腔注射、皮下注射、静脉注射、肌肉注射、淋巴结内注射、粘膜用药等途径应用于需要治疗的个体。个体可以是人或动物。剂量一般为 0.01~1000 mg/公斤体重/天，具体可根据个体的年龄、病情等进行变化。

本发明的第二个目的在于，提供一种治疗动脉粥样硬化的方法。

为实现上述目的，本发明采取的技术方案是：一种治疗动脉粥样硬化的方法，它包括将有效量的 Metrnl 蛋白或其增效剂给予需要受治疗的个体，所述的增效剂选自激动剂、上调剂或稳定剂。

本发明的第三个目的在于，提供 Metrnl 蛋白新的诊断用途。

第一方面，提供了 Metrnl 蛋白或其特异性抗体的用途，用于制备检测动脉粥样硬化的诊断试剂或试剂盒。

第二方面，提供了 Metrnl 蛋白或其特异性抗体的用途，用于制备检测动脉粥样硬化疾病程度的诊断试剂或试剂盒。

第三方面，提供了 Metrnl 蛋白的用途，它被用作检测动脉粥样硬化的诊断标志物。

本发明的第四个目的在于，提供一种检测动脉粥样硬化的方法。

为实现上述目的，本发明采取的技术方案是：一种检测动脉粥样硬化的方法，所述的方法是检测血清样品中 Metrnl 蛋白的含量，以此判断所述的血清样品来源的对象是否

患动脉粥样硬化。

在另一优选例中，所述的检测是血清检测。

在另一优选例中，所述的血清检测是 ELISA 法。

在另一优选例中，所述检测是以常规方法制备抗 Metrnl 蛋白的抗体，建立检测 Metrnl 蛋白的定性或定量方法，通过检测血清样品中 Metrnl 蛋白的含量，判断血清样品来源的对象是否患动脉粥样硬化。具体如下：首先检测待测血清样品中的 Metrnl 蛋白的含量，其次与正常人血清样品中 Metrnl 蛋白的含量进行比较，判断待测血清样品中的 Metrnl 蛋白的含量是否降低，根据比较结果判断待测血清样品来源的对象是否患动脉粥样硬化。

本发明的第五个目的在于，提供一种检测动脉粥样硬化患者疾病程度的方法。

实现上述目的，本发明采取的技术方案是：一种检测动脉粥样硬化患者疾病程度的方法，所述的方法是检测患者血清样品中 Metrnl 蛋白的含量，以此判断所述的血清样品来源的对象动脉粥样硬化的疾病程度。

在另一优选例中，所述检测是以常规方法制备抗 Metrnl 蛋白的抗体，建立检测 Metrnl 蛋白的定性或定量方法，通过连续检测不同时间的动脉粥样硬化患者血清样品中 Metrnl 蛋白的含量，以此来判断血清样品来源的对象动脉粥样硬化的疾病程度。具体如下：连续多天检测动脉粥样硬化患者血清样品中的 Metrnl 蛋白的含量，进行比较，如果患者血清样品中的 Metrnl 蛋白的含量（浓度）下降，表示疾病程度加重；如果患者血清样品中的 Metrnl 蛋白的含量（浓度）升高，表示疾病程度减轻。

本发明优点在于：

1、本发明首次通过实验发现，Metrnl 可用于诊治动脉粥样硬化。

2、本发明构建 Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠动脉粥样硬化模型和 EC-Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型，实验显示：Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠的主动脉较对照小鼠具有更多的白色粥样斑块，EC-Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠的主动脉较对照小鼠具有更多的白色粥样斑块；Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠主动脉粥样斑块面积高于对照小鼠，EC-Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样斑块面积高于对照小鼠；动脉粥样硬化小鼠主动脉根部血管发生明显病理性增厚，管腔变窄，Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠的管壁增厚程度比对照组小鼠严重，EC-Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠的管壁增厚程度比对照组小鼠严重；动脉粥样硬化小鼠主动脉根部有明显的脂质斑块，Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠的主动脉根部发生动脉粥样硬化的严重程度高于对照组小鼠，EC-Metrnl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠主动脉根部的动脉粥样硬化严重程度也高于对照组小鼠；

EC-Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠主动脉根部的 F4/80 分子表达明显多于对照组小鼠，EC-Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠主动脉根部的 α -SMA 分子表达明显多于对照组小鼠；EC-Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织的促炎因子 VCAM-1、ICAM-1、TNF α 、IL-6 及巨噬细胞标记物分子 F4/80、CD68 都上调，而抗炎因子 IL-10、Fizz 和 Ym1 表达水平无明显改变。

3、发现血管内皮细胞可分泌 Metn1，是通过经典分泌途径实现的；动脉粥样硬化时血管内皮和血液 Metn1 水平下降，且随着疾病加重 Metn1 水平下降程度增加。提示 Metn1 的重要性，不但具有抗动脉粥样硬化的用途，而且可作为疾病诊断指标。

4、前期发现小鼠 Metn1 抗血栓作用，本发明发现 Metn1 重组蛋白抗血栓作用没有种属差异，小鼠 Metn1 重组蛋白能够抑制大鼠和人血小板凝块收缩反应 (clot retraction)，人 Metn1 重组蛋白也可抑制小鼠和大鼠血小板凝块收缩反应。Metn1 重组蛋白对凝块收缩反应的抑制作用呈现量效关系，且不论人还是小鼠的 Metn1 蛋白皆在低浓度 (0.1 μ g/ml) 即出现抑制作用，且随浓度增加抑制作用增强，其中 Metn1 蛋白 30 μ g/ml 时凝块收缩启动时间较正常延迟 1 倍以上。Metn1 重组蛋白对 Metn1 基因敲除小鼠血小板的凝块收缩反应也具有抑制作用。Metn1 蛋白能够抑制血小板活化，表现为血小板活化标记物 CD62p 水平的下降。此外，通过比较 Metn1 蛋白与经典溶栓药物 t-PA 之间抗凝作用的特点，发现两者在血小板凝块收缩实验和全血凝固实验中的不同点，Metn1 的抗凝作用特点可减少出血不良反应。

附图说明

附图 1: Metn1^{-/-}小鼠的培育流程和基因型鉴定。

附图 2: Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠的培育流程和基因型鉴定。

附图 3: EC-Metn1^{-/-}小鼠的培育流程和基因型鉴定。

附图 4: EC-Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠的培育流程和基因型鉴定。

附图 5: Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠及其对照小鼠 HFD 第 2.5 个月时主动脉的在体形态。图中黑色箭头所示为粥样斑块的位置。

附图 6: EC-Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉的离体形态。图中白色箭头所示为粥样斑块的位置。

附图 7: Metn1^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠及其对照小鼠 HFD 第 2.5 个月时主动脉纵向剖面油红 O 染色结果。** P<0.01 vs 对照组小鼠。

附图 8: EC-Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉纵向剖面油红 O 染色结果。图 A 为雄性小鼠的结果, 图 B 为雌性小鼠的结果。* P<0.05 vs 对照组小鼠。

附图 9: C57 野生型小鼠和 Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠及其对照小鼠 HFD 第 2.5 个月时主动脉根部 HE 染色代表图。

附图 10: EC-Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉根部 HE 染色代表图。

附图 11: C57 野生型小鼠和 Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠及其对照小鼠 HFD 第 2.5 个月时主动脉根部冰冻切片油红 O 染色结果。* P<0.05 vs 对照组小鼠。

附图 12: EC-Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉根部冰冻切片油红 O 染色结果。* P<0.05 vs 对照组小鼠。

附图 13: EC-Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉冰冻切片油红 O 染色代表图。

附图 14: EC-Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉根部冰冻切片 F4/80 免疫组化代表图。

附图 15: EC-Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉根部冰冻切片 α -SMA 免疫组化代表图。

附图 16: EC-Metrl^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠及其对照小鼠 HFD 第 5.5 个月时主动脉炎症因子 mRNA 定量检测结果。* P<0.05, ** P<0.01 vs 对照组小鼠。

附图 17: 小鼠原代内皮细胞孵育液及其浓缩液中 Metrl 的浓度。

附图 18: 人脐静脉内皮细胞经 brefeldin A 或 eeyarestatin1 处理后其孵育液中 Metrl 的浓度。** P<0.01 vs Vehicle 对照组。

附图 19: EC-Metrl^{-/-}小鼠的血液 Metrl 水平。每组 n = 16-17。** P<0.01 vs 对照组小鼠。

附图 20: 不同 AS 疾病程度的小鼠其主动脉和颈动脉血管形态。

附图 21: 不同 AS 疾病程度的小鼠其血液 Metrl 水平。每组 n = 4-5, * P<0.05 vs C57 正常小鼠, # P<0.05 vs ApoE^{-/-}小鼠。

附图 22: Metrl 和 CD31 在小鼠主动脉 AS 斑块区与非 AS 斑块区的免疫荧光染色。

附图 23: 动脉粥样硬化并发心梗 (AS+MI) 患者的血液 Metrl 水平显著低于对照组。

对照组 11 例（男 8 例，女 3 例），AS+MI 患者组 21 例（男 17 例，女 4 例）。*** $P < 0.001$ vs 对照组患者。

附图 24: Metrnl 抑制血小板凝块收缩的作用无种属差异。A. 小鼠 Metrnl 重组蛋白对大鼠血小板凝块收缩反应的作用；B. 小鼠 Metrnl 重组蛋白对人血小板凝块收缩反应的作用；C. 人 Metrnl 重组蛋白对小鼠血小板凝块收缩反应的作用；D. 人 Metrnl 重组蛋白对大鼠血小板凝块收缩反应的作用。

附图 25: Metrnl 重组蛋白抑制血小板凝块收缩反应的量效关系。

附图 26: Metrnl 重组蛋白对 Metrnl 基因敲除小鼠血小板凝块收缩反应的抑制作用。

附图 27: Metrnl 重组蛋白可降低血小板活化指标 CD62p 含量。每组 $n=3$ ，* $P < 0.05$ vs 对照组。

附图 28: 人 Metrnl 重组蛋白与 t-PA 重组蛋白抗凝作用特点的比较。A. Metrnl 和 t-PA 抗血小板凝块收缩实验；B. Metrnl 和 t-PA 抗全血凝固实验；C. 不同浓度 t-PA 抗全血凝固实验；D. Metrnl 对全血凝固时间的影响，对照组 $n=6$ ，各实验组 $n=3$ ，* $P < 0.05$ vs 对照组；E. t-PA 对全血凝固时间无明显影响，对照组 $n=7$ ，各实验组 $n=3$ 。

具体实施方式

下面结合附图对本发明提供的具体实施方式做详细说明。

Metrnl 蛋白及基因

本文中，所用的 Metrnl 蛋白可以是天然存在的，比如其可被分离纯化自哺乳动物。

此外，所述 Metrnl 蛋白也可以是人工制备的，比如根据常规基因工程技术来制备得到。任何合适的 Metrnl 蛋白均可适用于本发明。所述 Metrnl 蛋白包括全长的 Metrnl 蛋白或其生物活性片段。作为一种具体实施方式，所述 Metrnl 蛋白可以是一种人 Metrnl 蛋白，大小为 30 kDa 左右，氨基酸序列见 NP_001004431.1。也可以是大鼠、小鼠等 Metrnl 蛋白。

经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的 Metrnl 蛋白的氨基酸序列也包括在本发明中。Metrnl 蛋白或其生物活性片段包括一部分保守氨基酸的替代序列，所述氨基酸替代的序列并不影响其活性或保留了其部分活性。适当替换氨基酸是本领域内的公知技术，所述技术可以很容易地被实施并且确保不改变已知分子的生物活性。这些技术使本领域人员认识到，一般来说，在一种多肽的非必需氨基酸区域改变单个氨基酸并不会改变生物活性。

任何一种 *Metrn1* 蛋白的生物活性片段均可以应用到本发明中。在这里，*Metrn1* 蛋白的生物活性片段的含义是指一种多肽，其仍然能保持全长的 *Metrn1* 蛋白的全部或部分功能。通常情况下，所述的生物活性片段至少保持 50%、60% 至 99% 或者 100% 的全长 *Metrn1* 蛋白的活性。

本发明也可以采用经修饰或改良的全部或部分氨基酸的 *Metrn1* 蛋白，比如，可以为了促进半衰期、有效性、代谢和/或蛋白的效力而加以修饰或改良的 *Metrn1* 蛋白。所述经过修饰或改良的 *Metrn1* 蛋白可以是一种 *Metrn1* 蛋白的共轭物，或其可被取代的或人工的氨基酸。所述经过修饰或改良的 *Metrn1* 蛋白或基因可以与天然 *Metrn1* 蛋白或基因有一定的不同点，但也具有本发明所述的功能，且不会带来其它不良反应或毒性。也就是说，任何不影响 *Metrn1* 蛋白的生物活性或者说是基因的生物学功能的变化形式都可用于本发明。

Metrn1 增效剂及其用途

所述的“*Metrn1* 增效剂”包括了激动剂、上调剂、稳定剂等，是指任何可提高 *Metrn1* 的活性、提高 *Metrn1* 的稳定性、上调 *Metrn1* 的表达、增加 *Metrn1* 有效作用时间的物质，这些物质均可用于本发明。它们可以是化合物、化学小分子、生物分子等。所述的生物分子可以是核酸水平（包括 DNA、RNA）的，蛋白水平的，也可以是上调 *Metrn1* 表达的病毒产品等。

实施例 1: *Metrn1* 基因工程小鼠动脉粥样硬化模型的构建

1.1 *Metrn1*^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠动脉粥样硬化模型的构建

(1) *Metrn1* 全身性敲除小鼠(*Metrn1*^{-/-})的培育和基因型鉴定

Metrn1 全身性敲除小鼠（简称为 *Metrn1*^{-/-}）采用 Cre-LoxP 基因敲除系统 (Diabetes 2015;64:4011-4022)，按图 1 A 培育流程交配繁殖获得。其中 *Metrn1*^{loxP/loxP} 来自本单位，Ella-Cre 小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司，C57BL/6J 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。基因型鉴定方法：需鉴定 Ella-Cre 基因和 *Metrn1* 基因。采用相应基因上下游引物分别进行鼠尾基因型鉴定，Ella-Cre 基因阳性出现 100 bp 条带；*Metrn1* 敲除序列扩增产物为 289 bp，*Metrn1* 野生序列扩增产物为 150 bp。如图 1 B 所示，*Metrn1*^{+/-}Ella-Cre 小鼠出现 100 bp、150 bp 和 289 bp 三条带（泳道 1）；*Metrn1*^{+/-}出现 150 bp 和 289 bp 两条带（泳道 2）；*Metrn1*^{-/-}全敲小鼠出现 289 bp 一条带（泳道 4）；野生对照小鼠出现 150 bp 一条带（泳道 3）。

(2) $Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 双敲小鼠的培育和基因型鉴定

$Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 双敲小鼠利用 $Metn1^{-/-}$ 小鼠和 $ApoE^{-/-}$ 小鼠，按图 2 A 培育流程交配繁殖获得，其中 $ApoE^{-/-}$ 小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司。基因型鉴定方法：需鉴定 $Metn1$ 基因和 $ApoE$ 基因。采用相应基因上下游引物分别进行鼠尾基因型鉴定， $Metn1$ 敲除序列扩增产物为 289 bp， $Metn1$ 野生序列扩增产物为 150 bp， $ApoE$ 敲除序列扩增产物为 245 bp， $ApoE$ 野生序列扩增产物为 155 bp。如图 2B 所示， $Metn1^{+/+}$ - $ApoE^{+/+}$ 小鼠出现 289 bp、150 bp、245 bp 和 155 bp 三条带（泳道 3）； $Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 双敲小鼠出现 289 bp 和 245 bp 两条带（泳道 6）；双敲小鼠的野生对照小鼠出现 150 bp 和 245 bp 两条带（泳道 2）。

(3) 利用西方高脂饮食饲料制备 $Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 双敲小鼠动脉粥样硬化模型

西方高脂饮食饲料购自上海普路腾生物科技有限公司，饲料配方为每 100 g 饲料含：普通繁殖饲料 60 g，猪油 16.4 g，蔗糖 10 g，酪蛋白 8.5 g，胆固醇 1.3 g，胆盐 0.3 g，预混料 1.6 g，麦芽糊精 1.9 g。自小鼠 2-3 月龄起，开始将其正常普通饲料换以高脂饮食喂养 (High Fat Diet, HFD)，在 HFD 第 2.5 个月时考察动脉粥样硬化各项指标。

1.2 EC- $Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化模型的构建

(1) $Metn1$ 内皮细胞特异性敲除小鼠 (EC- $Metn1^{-/-}$) 的培育和基因型鉴定

$Metn1$ 内皮细胞特异性敲除小鼠（即 $Metn1^{loxP/loxP}$ - Tek -Cre 小鼠，简称为 EC- $Metn1^{-/-}$ ）采用 Cre-LoxP 基因敲除系统按图 3 A 培育流程交配繁殖获得，其中 Tek -Cre 小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司。基因型鉴定方法：需鉴定 Tek -Cre 基因和 $Metn1$ -floxed 基因。采用相应基因上下游引物分别进行鼠尾基因型鉴定， Tek -Cre 基因阳性出现 100 bp 条带； $Metn1$ -floxed 序列扩增产物为 243 bp，对应野生序列扩增产物为 131 bp。如图 3B 所示， $Metn1^{loxP/wt}$ - Tek -Cre 小鼠出现 100 bp、243 bp 和 131 bp（泳道 1）；EC- $Metn1^{-/-}$ 小鼠出现 100 bp 和 243 bp（泳道 2）；特敲小鼠的对照小鼠出现 243 bp（泳道 3）。

(2) EC- $Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 小鼠的培育和基因型鉴定

EC- $Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 双敲小鼠利用 EC- $Metn1^{-/-}$ 小鼠和 $ApoE^{-/-}$ 小鼠，按图 4A 培育流程交配繁殖获得，基因型鉴定方法：需鉴定 Tek -Cre 基因、 $Metn1$ -floxed 基因和 $ApoE$ 基因。采用相应基因上下游引物分别进行鼠尾基因型鉴定， Tek -Cre 基因阳性出现 100 bp 条带； $Metn1$ -floxed 序列扩增产物为 243 bp，对应野生序列扩增产物为 131 bp； $ApoE$ 敲除序列扩增产物为 245 bp， $ApoE$ 野生序列扩增产物为 155 bp。如图 4B 所示，EC- $Metn1^{-/-}$ - $ApoE^{-/-}$

双敲小鼠出现 100 bp、243 bp 和 245 bp (泳道 2)，其对照小鼠出现 243 bp 和 245 bp 两条带 (泳道 3)。

(3) 利用西方高脂饮食饲料制备 EC-Met^{rl}^{-/-}ApoE^{-/-}双敲小鼠动脉粥样硬化模型

西方高脂饮食饲料同上。自小鼠 2-3 月龄起，开始将其正常普通饲料换以西方高脂饲料喂养，在 HFD 第 5.5 个月时考察动脉粥样硬化各项指标。

实施例 2: Met^{rl} 抗动脉粥样硬化的实验方法和结果

2.1 实验方法

(1) 小鼠心脏和主动脉分离

将小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 进行麻醉，酒精棉球擦湿其胸腹部，自胸骨柄下方依次剪开腹腔、胸腔，充分暴露心脏及其底部静脉，用 1 ml 注射器从腔静脉取血，然后在心脏右心房剪一个小口，用 10 ml 注射器装满预冷的 1×PBS 缓冲液，将针尖插入心脏左室，缓慢推入 PBS 缓冲液进行灌流。之后剪去肺、肝、胃、脾、胰腺、肠、脂肪和生殖脏器，留心脏、主动脉和双肾，在显微镜下分离主动脉。分离时注意勿伤主动脉，先将主动脉各部脂肪去除干净，再逐一剪断主动脉与在体的连接，分离出主动脉和与其相连的心脏 (保留左右心耳)。最后将心脏浸在 4% 多聚甲醛中固定；将主动脉浸在 4% 多聚甲醛中固定或者立即用液氮速冻用于提取 mRNA。

(2) 小鼠主动脉纵向剖面粥样斑块油红 O 染色

油红 O 染液配法：先用异丙醇将油红 O 粉末 (Sigma 公司) 配成 0.5% 油红 O 原液，用滤纸过滤，使用前将油红 O 原液和 ddH₂O 按照 3:2 体积比混匀。染色方法：当主动脉浸在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后，将其转移至装有 1×PBS 缓冲液的硅胶皿中，纵向剖开主动脉，并用针将其平整地固定于硅胶平面，然后倒掉 PBS 缓冲液，加入油红 O 染液，静置 15 min，再倒掉油红 O 染液并加入 70%乙醇，静置 10-15 min 后再倒掉 70% 乙醇，加 ddH₂O，拍照。

(3) 小鼠主动脉根部冰冻切片

当心脏浸在 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后，取出，沿左右心耳下缘将心脏的心尖部分切除，将心脏主动脉根部组织以切面平放于预冷的冰冻切片机样品头上，用冰冻包埋剂包埋组织，于 -20℃ 冷冻 30 min，然后开始冰冻切片，切至主动脉根部时每张样品的切片厚度为 10 μm，室温放置 30 min 后转存于 -20℃。

(4) 小鼠主动脉根部冰冻切片 HE 染色

将冰冻切片从 -20°C 取出, 于 37°C 烘 1 h, 将片子依次放入: 无水乙醇 $\times 1\text{ min}$ \rightarrow 95% 乙醇 $\times 1\text{ min}$ \rightarrow 85% 乙醇 $\times 1\text{ min}$ \rightarrow 75% 乙醇 $\times 1\text{ min}$ \rightarrow 流水冲洗 $\times 5\text{ min}$ \rightarrow 甩掉水滴 \rightarrow 苏木素 $\times 5\text{ min}$ \rightarrow 流水冲洗 $\times 5\text{ min}$ \rightarrow 甩掉水滴 \rightarrow 0.5% HCl-75% 乙醇 $\times 3\text{ s}$ \rightarrow 流水冲洗 $\times 5\text{ min}$ \rightarrow 甩掉水滴 \rightarrow 75% 乙醇 $\times 1\text{ min}$ \rightarrow 伊红 $\times 5\text{ min}$ \rightarrow 无水乙醇 $\times 1\text{ min}$ $\times 4$ 次 \rightarrow 电吹风吹干 \rightarrow 中性树胶封片。

(5) 小鼠主动脉根部冰冻切片油红 O 染色

将冰冻切片从 -20°C 取出, 于 37°C 烘 1 h, 将片子依次放入: 油红 O 染液 $\times 15\text{ min}$ \rightarrow 60% 乙醇 $\times 1\text{ min}$ \rightarrow ddH₂O $\times 1\text{ min}$ \rightarrow 甩掉水滴 \rightarrow 稍晾干 \rightarrow 甘油封片。

(6) 小鼠主动脉根部冰冻切片免疫组化

F4/80 抗体购自 abcam 公司, α -SMA 抗体和 SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。免疫组化方法: 将冰冻切片从 -20°C 取出, 于 37°C 烘 1 h, 用免疫组化笔在每张片子的组织周围画圈。向圈内加入 3% H₂O₂, 避光孵育 $\times 8\text{ min}$ \rightarrow ddH₂O 洗 $\times 5\text{ min}$ $\times 3$ 次 \rightarrow 向圈内加入 0.2% Triton X-100, 5 min \rightarrow 甩掉水滴 \rightarrow 1 \times PBS 缓冲液洗 $\times 5\text{ min}$ $\times 2$ 次 \rightarrow 向圈内加入 5% BSA, 30 min \rightarrow 向圈内滴加适当稀释的抗体, 置湿盒中 4°C 过夜 \rightarrow 1 \times PBS 缓冲液洗 $\times 5\text{ min}$ $\times 3$ 次 \rightarrow 向圈内滴加二抗, 20 min \rightarrow 1 \times PBS 缓冲液洗 $\times 5\text{ min}$ $\times 3$ 次 \rightarrow 向圈内滴加 SABC 液体, 20 min \rightarrow 1 \times PBS 缓冲液洗 $\times 5\text{ min}$ $\times 4$ 次 \rightarrow 取 1 ml ddH₂O 至 1.5 mL EP 管中, 向里滴加 ABC 试剂各一滴, 混匀后往圈内滴数滴, 显微镜下控制反应时间(约 1min) \rightarrow 流水冲洗 $\times 10\text{ min}$ \rightarrow 苏木素 $\times 45\text{ s}$ \rightarrow 流水冲洗 $\times 5\text{ min}$ \rightarrow 甩掉水滴 \rightarrow 0.5% HCl-75% 乙醇 $\times 5\text{ s}$ \rightarrow 流水冲洗 $\times 5\text{ min}$ \rightarrow 无水乙醇 $\times 5\text{ s}$ \rightarrow 二甲苯 $\times 5\text{ s}$ \rightarrow 稍晾干 \rightarrow 中性树胶封片。

(7) 小鼠主动脉炎症因子表达检测

提取小鼠主动脉 mRNA 的试剂盒“RNeasy Micro Kit”购自 QIAGEN 公司。小鼠主动脉获取及冻存方法同实验方法“(1) 小鼠心脏和主动脉分离”。按照试剂盒的说明操作, 提取主动脉 mRNA, 并按照 500 ng/10 ul 的浓度将 mRNA 逆转成 cDNA, 进行 QPCR 扩增, 采用 $\Delta\Delta\text{C}_t$ 法进行定量分析。所用各引物序列如下:

Gene	Forward primer (5' \rightarrow 3')	Reverse primer (5' \rightarrow 3')
VCAM-1	TGCCGGCATATACGAGTGTGA	CCCGATGGCAGGTATTACCAAG
ICAM-1	CAATTCACACTGAATGCCAGCTC	CAAGCAGTCCGTCTCGTCCA
TNF α	AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTTG

IL-6	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	GCAAGTGCATCATCGTTGTTCATAC
IL-1 β	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
F4/80	GAGATTGTGGAAGCATCCGAGAC	GATGACTGTACCCACATGGCTGA
CD68	CATCAGAGCCCCGAGTACAGTCTACC	AATTCTGCGCCATGAATGTCC
IL-10	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
Fizz1	TTGCAACTGCCTGTGCTTAC	CAAGAAGCAGGGTAAATGGG
Ym1	TTTGATGGCCTCAACCTGGA	AGTGAGTAGCAGCCTTGAATGTC
GAPDH	GTATGACTCCACTCACGGCAAA	GGTCTCGCTCCTGGAAGATG

2.2 实验结果

(1) 小鼠主动脉粥样硬化造模后主动脉形态

小鼠心脏经 1×PBS 缓冲液充分灌流后，血管内血液被冲净，可在低倍显微镜下肉眼观察主动脉粥样斑块的分布情况。图 5 所示为 *Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小鼠及其对照小鼠在 HFD 第 2.5 个月时主动脉在体形态，可见心脏、主动脉和肌肉组织，结果显示，*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小鼠的主动脉具有更多的白色粥样斑块（图中黑色箭头所示）。图 6 所示为 EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠及其对照小鼠在 HFD 第 5.5 个月时主动脉离体形态，可见心脏和主动脉，结果显示，EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠的主动脉具有更多的白色粥样斑块（图中黄色箭头所示）。

(2) 小鼠主动脉纵向剖面粥样斑块油红 O 染色结果

油红 O 是一种脂溶性的呈明亮红色的染料，组织经油红 O 染色后，脂质沉积部位被染成红色，非脂质沉积部位不着色，因此可以反映主动脉组织粥样斑块的严重程度。如图 7 所示，*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小鼠在 HFD 第 2.5 个月时，其主动脉红色粥样斑块面积占整个主动脉纵向剖面面积的比例明显高于对照组。如图 8 所示，在 HFD 第 5.5 个月时的 EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠，其主动脉产生粥样斑块的面积比也高于对照组小鼠，雄鼠小鼠（图 8A）和雌鼠小鼠（图 8B）都得到证明。

(3) 小鼠主动脉根部冰冻切片 HE 染色结果

HE 染色用于观察组织的形态。图 9 所示为 HFD 第 2.5 个月时 C57、*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小鼠及其对照小鼠主动脉根部的 HE 染色结果。可发现，未发生动脉粥样硬化的 C57 野生型小鼠其主动脉根部的血管壁很薄，而发生了动脉粥样硬化的 *Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小

鼠及其对照小鼠，其主动脉根部血管发生明显病理性增厚，管腔变窄，且 *Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小鼠的管壁增厚程度比对照组小鼠严重。图 10 所示为 EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠及其对照小鼠在 HFD 第 5.5 个月时主动脉根部 HE 染色结果，同样，EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠的管壁增厚程度比对照组小鼠严重。

(4) 小鼠主动脉及主动脉根部冰冻切片油红 O 染色结果

小鼠主动脉根部冰冻切片油红 O 染色反映主动脉根部粥样斑块的形成情况。如图 11 所示，未发生动脉粥样硬化的 C57 野生型小鼠其主动脉根部不存在脂质沉积，而发生了动脉粥样硬化的 *Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小鼠及其对照小鼠，其主动脉根部有明显的脂质斑块，导致原来的旧管腔变窄形成新管腔。以管腔内红色粥样斑块的面积与旧管腔的面积比表示主动脉根部受累情况，统计发现，*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 双敲小鼠的主动脉根部发生动脉粥样硬化的严重程度高于对照组小鼠。同样，如图 12 所示，EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠主动脉根部的动脉粥样硬化严重程度也高于对照组小鼠。图 13 所示为 EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠及其对照组小鼠主动脉油红 O 染色的结果，与主动脉根部染色结果一致。

(5) 小鼠主动脉根部冰冻切片免疫组化结果

动脉粥样硬化作为一种慢性炎症反应疾病，F4/80 分子作为巨噬细胞的标记物，可以用于观察动脉粥样硬化的炎症反应程度。如图 14 所示，EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠在 HFD 第 5.5 个月时其主动脉根部的 F4/80 分子表达明显多于对照组小鼠。

在动脉粥样硬化发生发展过程中，平滑肌细胞由血管中膜向内膜迁移，并在内膜增生， α -SMA 作为平滑肌细胞的标记物，可以反映动脉粥样硬化的严重程度。如图 15 所示，EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠在 HFD 第 5.5 个月时其主动脉根部的 α -SMA 分子表达明显多于对照组小鼠。

(6) 小鼠主动脉炎症因子表达检测

动脉粥样硬化作为一种慢性炎症反应疾病，其发生发展过程中会出现很多炎症因子表达水平的改变。如图 16 所示，EC-*Metrn1*^{-/-}*ApoE*^{-/-} 小鼠在 HFD 第 5.5 个月时，其主动脉组织的促炎因子 VCAM-1、ICAM-1、TNF α 、IL-6 及巨噬细胞标记物分子 F4/80、CD68 都上调，IL-1 β 有上调趋势但无统计学意义，而抗炎因子 IL-10、Fizz 和 Ym1 表达水平无明显改变。

实施例 3：内皮细胞可分泌 *Metrn1*，是通过经典分泌途径实现的

3.1 实验方法

(1) 小鼠原代内皮细胞孵育液及其浓缩液搜集

待细胞生长至约 90% 融合时, 用 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液将细胞轻柔漂洗 3 遍, 加入不含血清的内皮培养基, 置于细胞培养箱中培养 12 h。将细胞孵育液吸至 15 ml 离心管中, 离心: 室温 $\times 1200 \text{ rpm} \times 5 \text{ min}$, 所得上清液即为细胞孵育液原液。取 2 ml 孵育液原液加入至超滤离心管中, 离心: 室温 $\times 4000 \text{ rpm} \times 20 \text{ min}$, 浓缩管中液体 (约 0.7 ml) 即为孵育液的浓缩液。以无血清培养基为对照处理组。分装保存于 -80°C 。

(2) 人脐静脉内皮细胞加药处理及孵育液搜集

待细胞生长至约 90% 融合时, 用 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液将细胞轻柔漂洗 2 遍。加入含有药物 (brefeldin A 或 eeyarestatin1, 终浓度各为 $5 \mu\text{g/ml}$) 的无血清培养基, 置于细胞培养箱中孵育 24 h。将孵育液吸至 15 mL 离心管中, 离心: 室温 $\times 1200 \text{ rpm} \times 5 \text{ min}$, 吸取上清液。以无血清培养基为对照处理组。分装保存于 -80°C 。

(3) ELISA 测定 Metrnl 浓度

使用 ELISA 试剂盒 (#DY6679, R&D system 公司) 来测定小鼠原代内皮细胞孵育液中的 Metrnl 水平; 使用 ELISA 试剂盒 (#DY7867-05, R&D system 公司) 来测定人脐静脉内皮细胞孵育液中 Metrnl 水平。实验皆为双复孔加样检测, 操作步骤均根据试剂盒提供的说明书严格执行, 测定的标准曲线均具有高度的拟合度 ($R^2 > 0.99$)。

3.2 实验结果

(1) 内皮细胞 Metrnl 的分泌性

如图 17 所示, Metrnl 在小鼠原代内皮细胞孵育液原液及其浓缩液中都被成功检测到, 且原液中 Metrnl 浓度约为浓缩液中浓度的 $1/3$, 与浓缩步骤相符 (2 ml 孵育液原液浓缩至约 0.7 ml 浓缩液)。此外, Metrnl 在空白无血清培养基中的浓度低于检测限。本结果证明了内皮细胞确实可以分泌 Metrnl。

(2) 内皮细胞 Metrnl 的分泌途径

brefeldin A 是高尔基体转运功能抑制剂, eeyarestatin 1 是内质网运输通道抑制剂。如图 18 所示, 使用 brefeldin A 或 eeyarestatin 1 处理内皮细胞后, 几乎检测不到培养基中 Metrnl, 说明内皮细胞 Metrnl 的分泌过程能被 brefeldin A 和 eeyarestatin1 成功抑制, 反映内皮细胞 Metrnl 的分泌途径属于经典的内质网-高尔基体 (ER-Golgi) 蛋白分泌途径。

(3) 内皮细胞特异性敲除 Metrnl 可明显降低血液 Metrnl 水平, 平均下降 74%

如图 19 所示, Metrnl 内皮细胞特异性敲除小鼠 (EC-Metrnl^{-/-}) 的血液 Metrnl 水平较

其正常对照组小鼠显著降低，平均下降 74%，说明内皮细胞是血液 Metrnl 的主要分泌来源。

实施例 4：动脉粥样硬化时血管内皮和血液 Metrnl 水平下降，而且随着疾病加重 Metrnl 水平下降程度增加

4.1 实验方法

(1) 动脉粥样硬化小鼠模型的制备

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 易感小鼠 ApoE^{-/-}小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司。不同 AS 程度小鼠模型的制备：在同样饲养环境下，将 ApoE^{-/-}小鼠以普通饲料喂养至 7 月龄，随机分为两组，一组继续喂以普通饲料，另一组将普通饲料换成西方高脂饮食饲料。22 周后考察小鼠（12 月龄）动脉粥样硬化情况。

(2) 小鼠主动脉和颈动脉的分离

小鼠主动脉的分离方法同前。小鼠颈动脉的分离在主动脉分离完成后进行，将小鼠仰卧位，沿颈部前正中切开，分离直至暴露颈总、颈内和颈外动脉，取血管分叉处附近的颈动脉。

(3) 小鼠主动脉免疫荧光染色

分离小鼠胸主动脉，并将其剪成 2-3 mm 一段，浸于 4% 多聚甲醛溶液中固定至少 48 h，制成冰冻切片冻存于 -20℃。免疫组化实验前先将冰冻切片置 37℃ 烘 2 h，之后用 1 × PBS 缓冲液将片子漂洗 2 次；使用柠檬酸钠抗原修复液和微波炉加热的方式对片子进行抗原修复；用免疫组化笔在组织周围画圈；将片子漂洗 3 次；向圈内滴加封闭血清，室温下湿盒封闭 2 h；甩去封闭血清，向圈内滴加稀释好的 Metrnl 一抗（Abcam 公司，#ab121775，稀释比例 1:200）或 CD31 一抗（Abcam 公司，#ab121775，稀释比例 1:200），于 4℃ 湿盒孵育过夜。次日将片子漂洗 3 次；向圈内滴加二抗，室温下湿盒避光孵育 1 h；将片子漂洗 3 次；向圈内滴加 DAPI 染液，室温下湿盒避光孵育 3-5 min；将片子漂洗 3 次；向圈内滴加抗荧光淬灭剂，封片，激光共聚焦显微镜下观察拍照。

4.2 实验结果

(1) 不同 AS 疾病程度的小鼠其主动脉和颈动脉血管形态

ApoE^{-/-}小鼠广泛用于 AS 疾病的临床前研究，其在正常饮食条件下即可自发 AS，而 HFD 可加速 AS 的发生发展。如图 20 所示，未发生 AS 疾病的 C57 正常小鼠，其血管内干净无异物；正常饮食条件下自发 AS 的 ApoE^{-/-}小鼠（12 月龄）其主动脉和颈动脉内都

出现了类白色的 AS 斑块；相比之下，经过 22 周 HFD 的 ApoE^{-/-}小鼠（12 月龄），其 AS 情况更严重，可见主动脉和颈动脉内出现大量 AS 斑块。

(2) 不同 AS 疾病程度的小鼠其血液 Metrnl 浓度

取不同 AS 疾病程度的小鼠（如图 20 所示）进行血清 Metrnl 浓度检测，如图 21 所示，血清 Metrnl 水平随着 AS 疾病程度加重而下降。

(3) Metrnl 和 CD31 在小鼠主动脉 AS 斑块区与非斑块区免疫荧光染色

CD31 分子是非常丰富的内皮细胞间连接蛋白，常作为内皮细胞分子标记物。取 C57 小鼠和正常饮食条件下自发 AS 的 ApoE^{-/-}小鼠（如图 20 所示），对其胸主动脉冰冻切片进行免疫荧光染色（如图 22 所示），可见 CD31 分子（绿色荧光）在正常 C57 小鼠的血管壁呈非常明显的连续表达，与 Metrnl 染色（红色荧光）重叠；ApoE^{-/-}小鼠非斑块区的 CD31 分子在血管壁也有线性表达，提示非斑块区存在较完整的内皮细胞，同时也可检测到 Metrnl 在血管壁的表达减弱；相比之下，斑块区的 CD31 和 Metrnl 表达都非常少，几乎缺乏，提示斑块区内皮细胞被破坏。Metrnl 是一种分泌性蛋白，该结果不仅与 AS 发展过程中血管内皮受损加重的特点相符，也与上述血清 Metrnl 水平随着 AS 疾病程度加重而下降的结果相一致。

(4) AS 疾病并发心肌梗死患者的血液 Metrnl 水平也明显下降

根据病历、心电图、生化指标、血管影像学等诊断 AS 合并心梗患者，采血、抗凝、离心，取血浆测定，如图 23 所示，AS 并发心梗患者血液 Metrnl 水平显著低于对照组患者。

上述实验证实血管内皮细胞可分泌 Metrnl，是通过经典分泌途径实现的；动脉粥样硬化时血管内皮和血液 Metrnl 水平下降，且随着疾病加重 Metrnl 水平下降程度增加。提示 Metrnl 的重要性，不但具有抗动脉粥样硬化的用途，而且可作为疾病诊断指标。

实施例 5: Metrnl 重组蛋白抑制血小板凝块收缩反应无种属差异

5.1 实验方法

(1) 血小板悬液制备

小鼠血小板悬液制备：腹腔注射 10%水合氯醛（300 mg/kg）对小鼠进行麻醉，取 1 ml 注射器用 2%枸橼酸钠抗凝剂湿润注射器内壁，同时预留 100 μ l 抗凝剂于注射器内。小鼠麻倒后固定其四肢，沿腹正中线将其腹部打开（避免损伤到血管），小心拨开内脏，暴露出腹主动脉，用带针头的 1 ml 注射器斜 45° 刺进腹主动脉取血（约取到 1 ml），取血完

毕后立即轻柔颠倒注射器，将动脉血和抗凝剂混匀，并转移至 15 ml 离心管。离心（1750 rpm × 2 min，室温），吸取血小板层至新 15 ml 离心管，继续往装有剩余血细胞的 15 ml 离心管中加约 300 μ l 生理盐水，轻柔混匀，再次离心（1750 rpm × 30 s，室温），吸取血小板层。两次血小板层溶液混在一起，离心（2750 rpm × 3 min，室温），获得血小板沉淀，先将上层透明 PPP (Poor Platelet Plasma) 溶液转移至新的 1.5 ml 离心管中于 37°C 孵育用于后续实验，之后继续向 15 ml 离心管中加入适量 37°C TB (Tyrode's Buffer) 溶液（含 0.04 U/ml Apyrase），小心吹打重悬血小板，获得血小板悬液用于后续实验。

大鼠血小板悬液制备：腹腔注射 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 对大鼠进行麻醉，取 10 ml 注射器用 3.8% 枸橼酸钠抗凝剂湿润注射器内壁，同时预留 1 ml 抗凝剂于注射器内。大鼠麻倒后将其仰卧位，沿腹正中线将其腹部打开（避免损伤血管），小心拨开内脏，暴露出腹主动脉，用带针头的 10 ml 注射器斜 45° 刺进腹主动脉取血（约取到 10 ml），取血完毕后立即轻柔颠倒注射器，使血液与抗凝剂混匀，并转移至 15 ml 离心管中。离心（1750 rpm × 10 min，室温），吸取血小板层至新的 15 ml 离心管，离心（2750 rpm × 5 min，室温），获得血小板沉淀，先将上层透明 PPP 溶液转移至新的 1.5 ml 离心管中于 37°C 孵育用于后续实验，之后继续往 15 ml 离心管中加入适量 37°C TB 溶液（含 0.04 U/ml Apyrase），小心吹打重悬血小板，获得血小板悬液用于后续实验。

人血小板悬液制备：由医院护士采集志愿者肘部静脉血液，收集至加有 ACD 抗凝剂的真空采血管中，立即将血液与抗凝剂混匀，转移至 15 ml 离心管。离心（1750 rpm × 4 min，室温），吸取血小板层至新的 15 ml 离心管，离心（2550 rpm × 2.5 min，室温），获得血小板沉淀，先将上层透明 PPP 溶液转移至新的 1.5 ml 离心管中于 37°C 孵育用于后续实验，之后继续往 15 ml 离心管中加入适量 37°C TB 溶液（含 0.04 U/ml Apyrase），小心吹打重悬血小板，获得血小板悬液用于后续实验。

(2) 药物孵育

向血小板悬液 (250 μ l) 中加入 Metrnl 重组蛋白溶液或等体积对照溶剂，混匀后于 37°C 孵育 15 min 用于实验。人和小鼠 Metrnl 重组蛋白均购自 R&D Systems 公司，加至血小板悬液后终浓度均为 1.923 μ g/ml。

(3) 凝块收缩实验

向血小板悬液中依次加入 10 μ l 自体 PPP 溶液、2.5 μ l 100 mM CaCl₂ 溶液、1 μ l 10 U/ml thrombin，轻柔混匀，转移至透明玻璃管中，静置观察悬液收缩情况，实时拍照。

5.2 实验结果

如图 24 所示，小鼠 *Metrn1* 重组蛋白能够明显抑制大鼠（图 24A）和人（图 24B）的血小板凝块收缩速度；同样，人 *Metrn1* 重组蛋白亦能够明显抑制小鼠（图 24C）和大鼠（图 24D）的血小板凝块收缩速度。说明 *Metrn1* 重组蛋白对血小板凝块收缩反应的抑制作用没有种属差异。实验重复 3 次。

实施例 6: *Metrn1* 重组蛋白抑制血小板凝块收缩反应呈现量效关系

6.1 实验方法

(1) 血小板悬液制备

小鼠血小板悬液制备同前。

(2) 药物孵育

向血小板悬液 (250 μ l) 中加入等体积不同浓度的 *Metrn1* 重组蛋白或对照溶剂，混匀后于 37°C 孵育 15 min 用于实验。人和小鼠 *Metrn1* 重组蛋白均购自 R&D Systems 公司，加至血小板悬液后终浓度分别为 0 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.3 μ g/ml、1 μ g/ml、3 μ g/ml、10 μ g/ml、30 μ g/ml。

(3) 凝块收缩实验

同前。

6.2 实验结果

如图 25 所示，低剂量 (0.1 μ g/ml) 小鼠 *Metrn1* 重组蛋白即可表现出抑制血小板凝块收缩反应的作用，且这种抑制作用随着 *Metrn1* 浓度的增加 (0.1~10 μ g/ml) 而增强。继续提高 *Metrn1* 浓度，这种抑制作用继续加强，其中 30 μ g/ml 时可以观察到血小板在 25 min 时仍未见明显凝块收缩反应，该组反应较 10 μ g/ml 组的启动时间更晚，较 Vehicle 组的启动时间延迟 1 倍以上，并且收缩反应速度降低。另外，人 *Metrn1* 重组蛋白也表现出相似的量效关系。实验各重复 2 次。

实施例 7: *Metrn1* 重组蛋白对 *Metrn1* 基因敲除小鼠血小板凝块收缩反应具有抑制作用

7.1 实验方法

(1) 血小板悬液制备

小鼠血小板悬液制备同前。

(2) 药物孵育

向血小板悬液（250 μl ）中加入 Metrn1 重组蛋白溶液或等体积对照溶剂，混匀后于 37°C 孵育 15 min 用于实验。人和小鼠 Metrn1 重组蛋白均购自 R&D Systems 公司，加至血小板悬液后终浓度均为 1.923 $\mu\text{g/ml}$ 。

(3) 凝块收缩实验

同前。

7.2 实验结果

如图 26A 所示，Metrn1 全敲小鼠（Metrn1^{-/-}, KO）的血小板凝块收缩反应速度明显比野生对照小鼠（WT）快，与前期观察结果一致。然而加入 Metrn1 重组蛋白后，KO 小鼠的血小板收缩速度明显减慢，与野生对照组速度相当。类似地，如图 26B 所示，Metrn1 内皮细胞特异性敲除小鼠（EC-Metrn1^{-/-}）的血小板凝块收缩反应速度也比对照小鼠（WT）快，在加入 Metrn1 重组蛋白后，EC-Metrn1^{-/-}小鼠的血小板收缩速度明显减慢，甚至慢于野生对照组。说明 Metrn1 重组蛋白对 Metrn1 基因敲除小鼠血小板凝块收缩反应具有抑制作用。实验各重复 3 次。

实施例 8：Metrn1 重组蛋白能够抑制血小板活化

8.1 实验方法

(1) 富含血小板血浆（Platelet Rich Plasma, PRP）制备

腹腔注射 10%水合氯醛（300 mg/kg）对小鼠进行麻醉，取 1 ml 注射器用 2%枸橼酸钠抗凝剂湿润注射器内壁，同时预留 100 μl 抗凝剂在注射器内。小鼠麻倒后将其仰卧位，充分打开胸腔，暴露心脏并去除心包膜，用 1 ml 注射器自心脏底部静脉汇合处缓慢抽取血液（约取到 1 ml），取血完毕后立即轻柔颠倒注射器，使血液和抗凝剂混匀，并转移至 15 ml 离心管中。离心（2000 rpm \times 8min，室温），吸取上层 PRP 溶液至新的 1.5 ml 离心管中，用于后续实验。

(2) 药物孵育

PRP 等体积分为 4 份，分别向其中加入等体积不同浓度的人 Metrn1 重组蛋白或对照溶剂，混匀后于 37°C 孵育 15~20 min，之后分别加入 1.5 μl 1 U/ml thrombin，混匀，于 37°C 继续孵育 5 min，用于后续实验。加至 PRP 后的 Metrn1 终浓度分别为 10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 。

(3) ELISA 检测 CD62p 含量

使用 ELISA 试剂盒（上海哈灵生物科技有限公司，#H11006）来检测小鼠 PRP 中 CD62p

蛋白的含量，实验均为双复孔加样检测，操作步骤根据试剂盒提供的说明书严格执行，测定的标准曲线均具有高度的拟合度 ($R^2 > 0.98$)。

8.2 实验结果

如图 27 所示，人 Metrnl 重组蛋白可以抑制血小板活化，表现为在 thrombin 的刺激条件下，Metrnl 重组蛋白能够降低 PRP 中血小板活化指标 CD62p 蛋白的浓度。本实验设置 3 个剂量组，每个剂量组 3 例，实验重复 2 次。

实施例 9：Metrnl 重组蛋白与 t-PA 抗凝作用特点的比较

9.1 血小板凝块收缩实验

9.1.1 实验方法

(1) 血小板悬液制备

小鼠血小板悬液制备同前。

(2) 药物孵育

向血小板悬液中加入人 Metrnl 重组蛋白、t-PA 重组蛋白或等体积对照溶剂，混匀后于 37°C 孵育 15 min 用于实验。人 Metrnl 重组蛋白购自 R&D Systems 公司，t-PA 重组蛋白购自 novoprotein 公司，加至血小板悬液后的蛋白终浓度均为 1.923 $\mu\text{g/ml}$ 。

(3) 血凝块收缩实验

同前。

9.1.2 实验结果

如图 28A 所示，人 Metrnl 重组蛋白和 t-PA 重组蛋白对小鼠血小板凝块收缩反应的抑制作用表现不同。其中，Metrnl 重组蛋白可抑制血小板凝块收缩反应的速度；而 t-PA 作用下的血小板悬液不收缩成凝块而呈絮状液，即无明显凝块收缩反应。实验重复 3 次。

9.2 全血凝固时间测定（试管法）

9.2.1 实验方法

(1) 药物准备

向干净的玻璃试管（内径为 10 mm）中加入等体积 10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 人 Metrnl 重组蛋白，10 $\mu\text{g/ml}$ t-PA 重组蛋白或对照溶剂。

(2) 凝血时间测定

腹腔注射 10%水合氯醛（300 mg/kg）对小鼠进行麻醉，待小鼠麻倒后将其仰卧位，充分打开胸腔，暴露心脏并去除心包膜，用 1 ml 注射器自心脏底部静脉汇合处抽取血

液，记录抽血所用的时间为 T_1 ，待取血完毕后立即将血液转移至预先加有药物的玻璃试管中， 37°C 孵育，并立即开始计时，至计时第 3 min 时，倾斜各玻璃试管 (45°)，观察血液是否凝固，以后每隔 30 s 将试管倾斜一次，直至试管倾倒时血液不流动为止。记录首次观察血液不流动的时间（即凝血时间）为 T_2 。

9.2.2 实验结果

如图 28B-E 所示，人 *Metrnl* 重组蛋白与 t-PA 重组蛋白抗小鼠全血凝固的作用特点不同：*Metrnl* 重组蛋白可使全血凝固时间延长，但血液一旦凝固就不再发生溶解（最长观察时间为 60 min）；而 t-PA 重组蛋白对全血凝固时间无明显影响，但能在血液凝固后使其发生溶解，并保持在流动状态（最长观察时间为 90 min）。实验重复 3 次。

上述实验证实 *Metrnl* 重组蛋白抗血栓作用没有种属差异，小鼠 *Metrnl* 重组蛋白能够抑制大鼠和人血小板凝块收缩反应（clot retraction），人 *Metrnl* 重组蛋白也可抑制小鼠和大鼠血小板凝块收缩反应。*Metrnl* 重组蛋白对凝块收缩反应的抑制作用呈现量效关系，且不论人还是小鼠的 *Metrnl* 蛋白在低浓度（ $0.1\ \mu\text{g/ml}$ ）即出现抑制作用，随浓度增加抑制作用增强，其中 *Metrnl* 蛋白 $30\ \mu\text{g/ml}$ 时凝块收缩启动时间较正常延迟 1 倍以上。*Metrnl* 重组蛋白对 *Metrnl* 基因敲除小鼠血小板的凝块收缩反应也具有抑制作用。*Metrnl* 蛋白能够抑制血小板活化，表现为血小板活化标记物 CD62p 水平的下降。此外，通过比较 *Metrnl* 蛋白与经典溶栓药物 t-PA 之间抗凝作用的特点，发现两者在血小板凝块收缩实验和全血凝固实验中的不同点，*Metrnl* 的抗凝作用特点可减少出血不良反应。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员，在不脱离本发明方法的前提下，还可以做出若干改进和补充，这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求

1. Metrnl 蛋白或基因或它们的增效剂在制备抗动脉粥样硬化的药物中的应用，所述的增效剂选自激动剂、上调剂或稳定剂。
2. Metrnl 蛋白或基因在治疗动脉粥样硬化的药物中的应用。
3. Metrnl 蛋白或基因或它们的增效剂在制备药物中的应用，其特质在于，所述的增效剂选自激动剂、上调剂或稳定剂，所述药物用于：
 - a) 抑制高脂饮食条件下主动脉内粥样斑块的形成和斑块面积；或
 - b) 抑制高脂饮食条件下主动脉血管粥样硬化增厚；或
 - c) 降低高脂饮食条件下主动脉内炎症相关因子 VCAM-1、ICAM-1、TNF α 、IL-6 及巨噬细胞标记物分子 F4/80、CD68 的表达。
4. 一种治疗动脉粥样硬化的方法，其特征在于，它包括将有效量的 Metrnl 蛋白或其增效剂给予需要受治疗的个体，所述的增效剂选自激动剂、上调剂或稳定剂。
5. Metrnl 蛋白或其特异性抗体的用途，其特征在于，用于制备检测动脉粥样硬化的诊断试剂或试剂盒。
6. Metrnl 蛋白或其特异性抗体的用途，其特征在于，用于制备检测动脉粥样硬化疾病程度的诊断试剂或试剂盒。
7. Metrnl 蛋白的用途，其特征在于，它被用作检测动脉粥样硬化的诊断标志物。
8. 一种检测动脉粥样硬化的方法，其特征在于，所述的方法是检测血清样品中 Metrnl 蛋白的含量，以此判断所述的血清样品来源的对象是否患动脉粥样硬化。
9. 一种检测动脉粥样硬化患者疾病程度的方法，其特征在于，所述的方法是检测患者血清样品中 Metrnl 蛋白的含量，以此判断所述的血清样品来源的对象动脉粥样硬化的疾病程度。

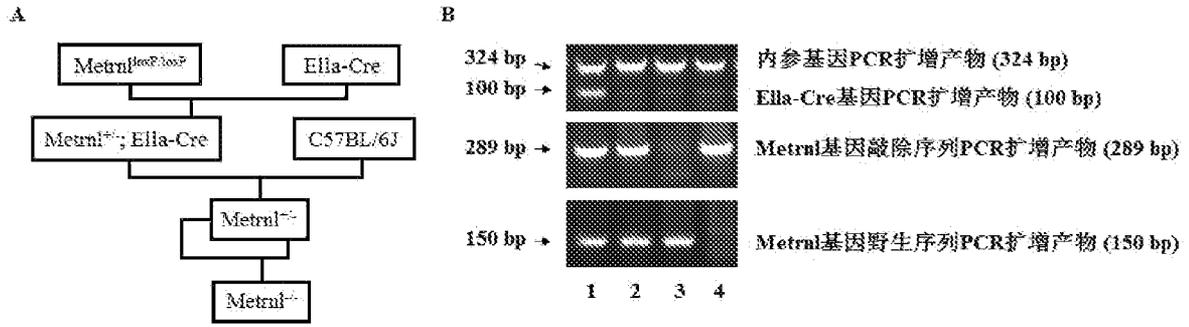


图 1

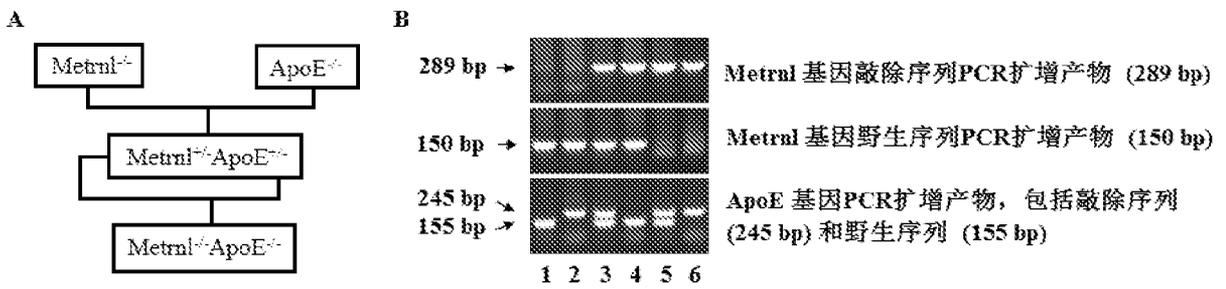


图 2

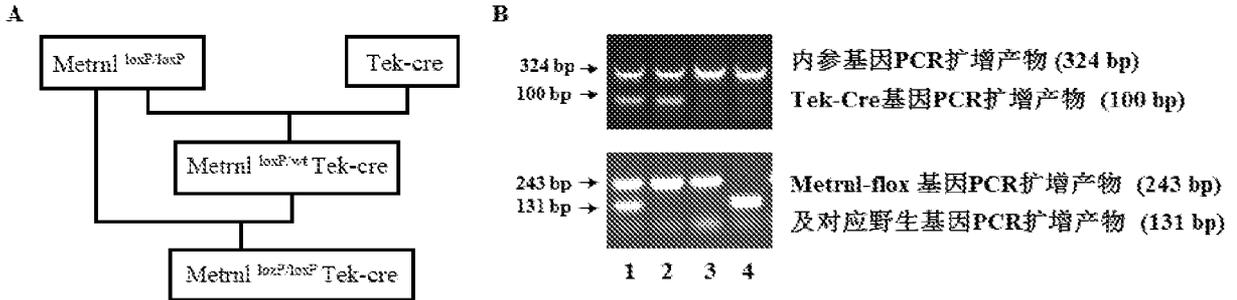


图 3

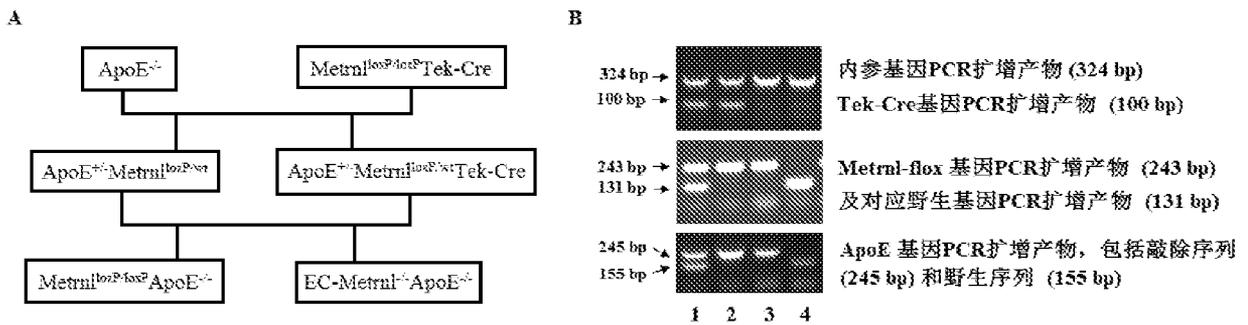


图 4

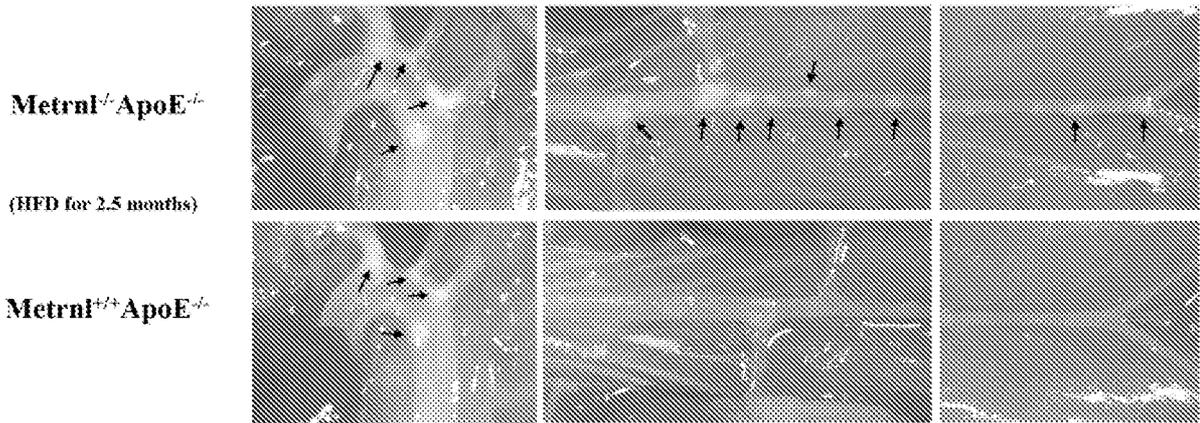


图 5

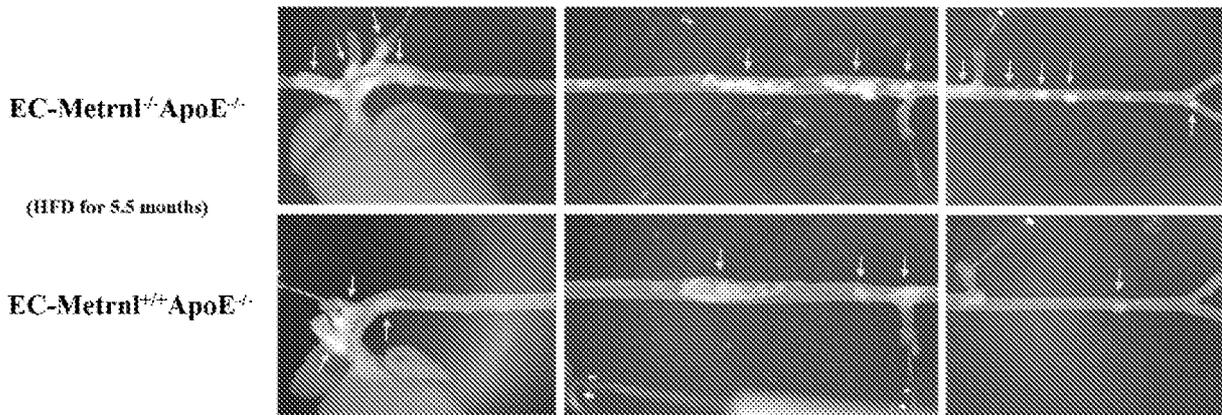


图 6

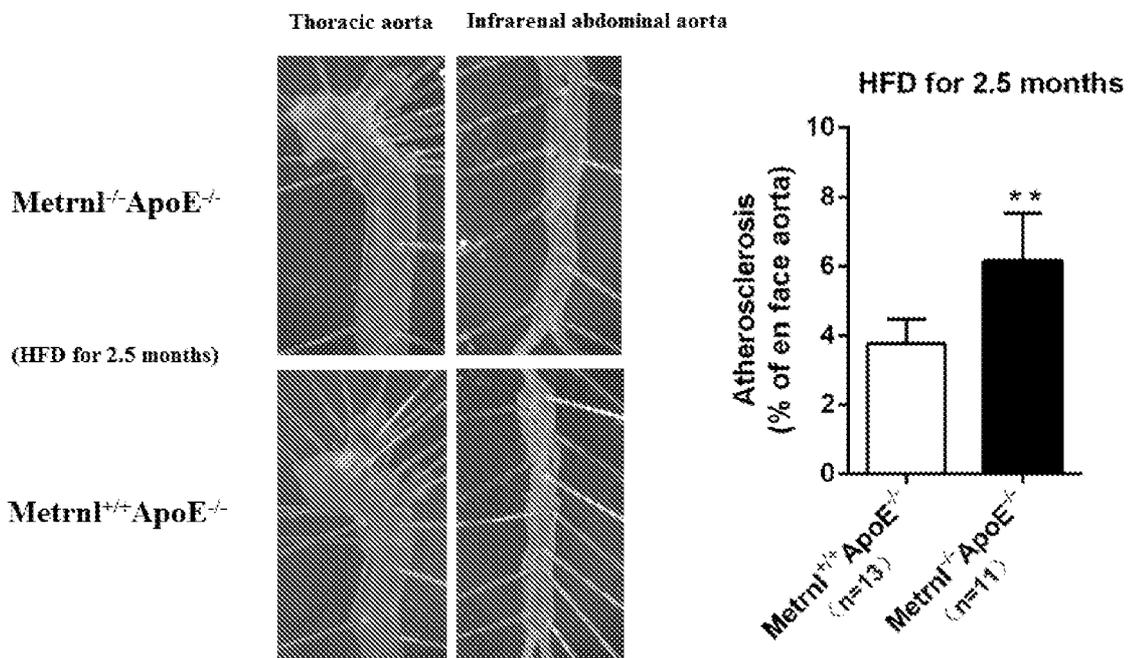


图 7

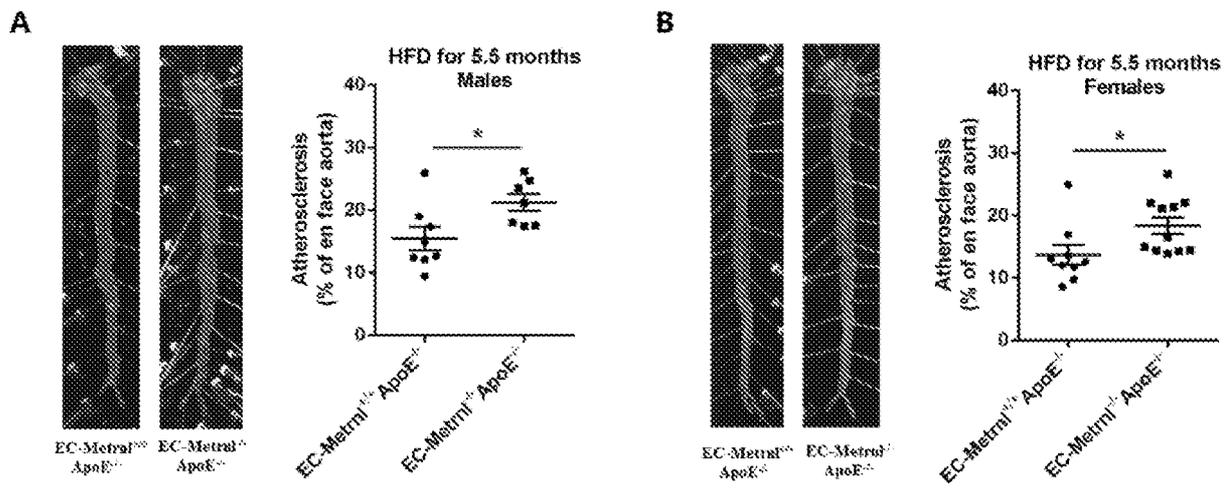


图 8

(HFD for 2.5 months)

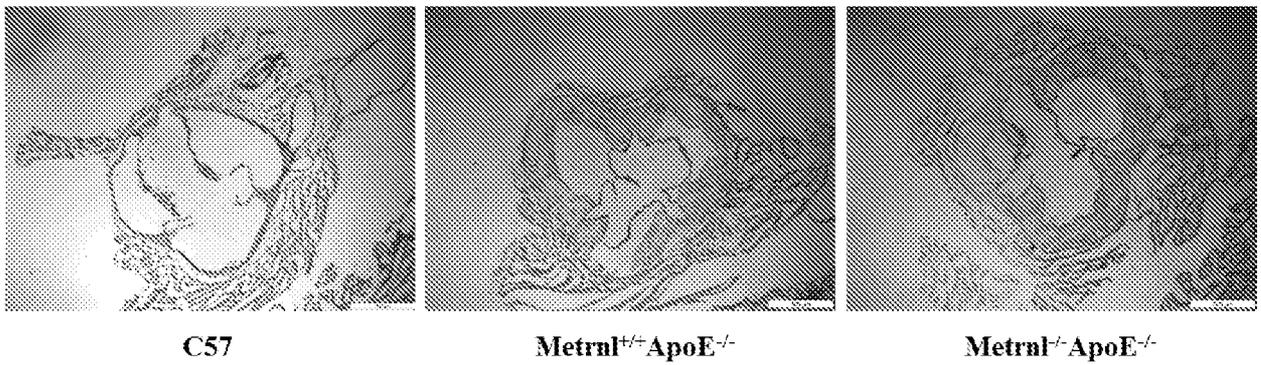


图 9

(HFD for 5.5 months)

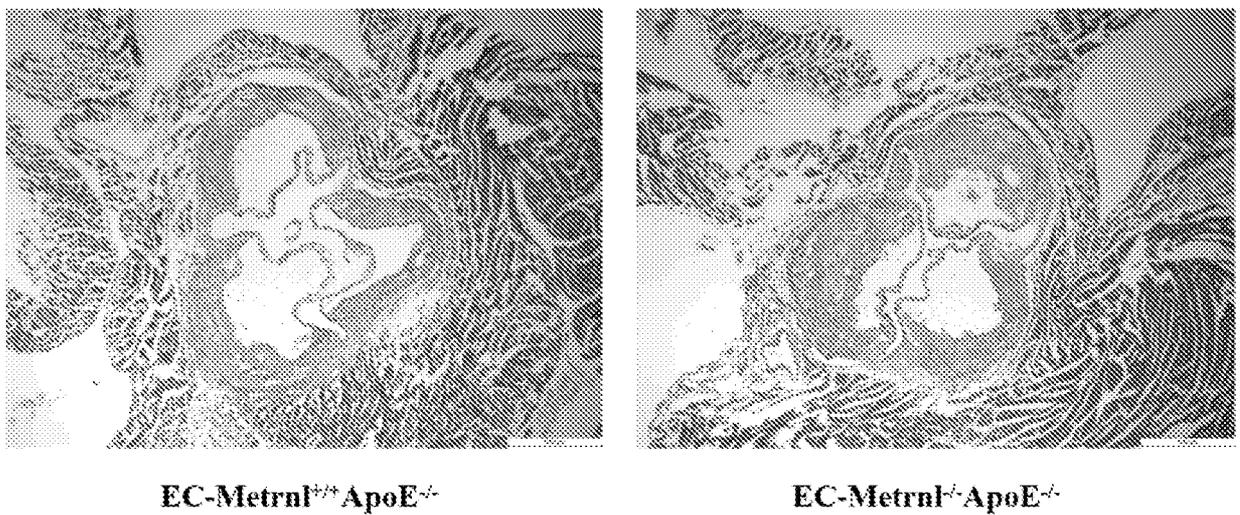


图 10

(HFD for 2.5 months)

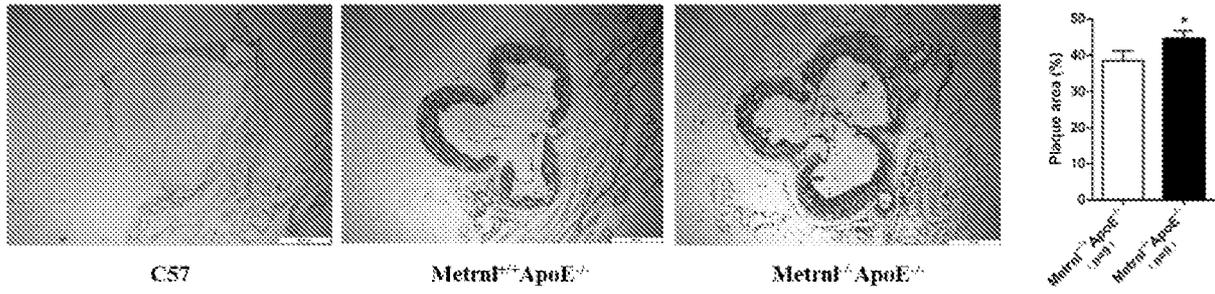


图 11

(HFD for 5.5 months)

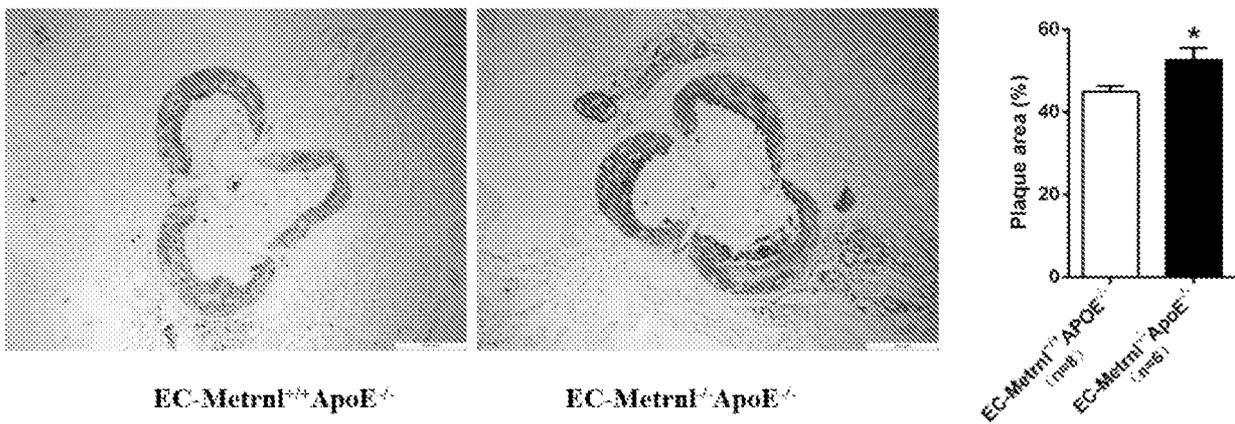


图 12

$EC-Metrn^{+/+}ApoE^{-/-}$

(HFD for 5.5 months)

$EC-Metrn^{-/-}ApoE^{-/-}$

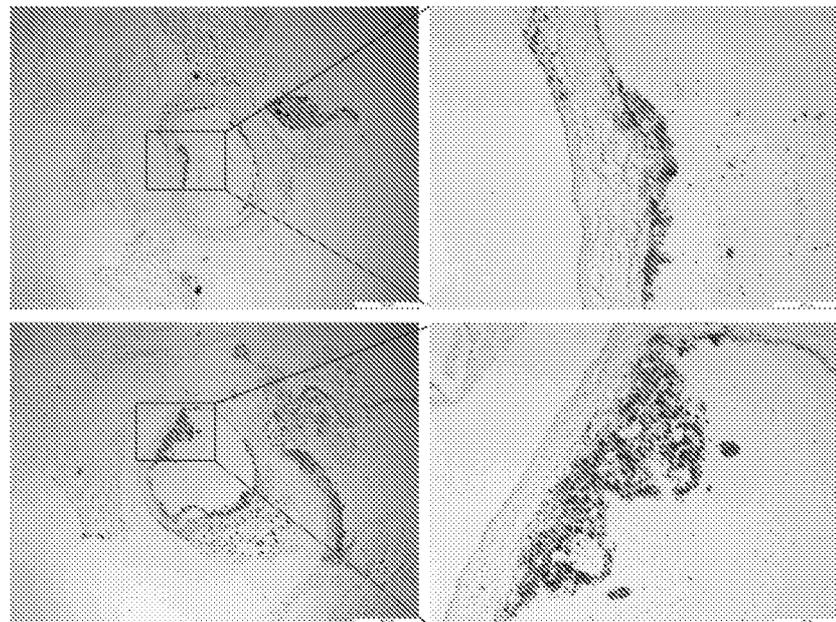
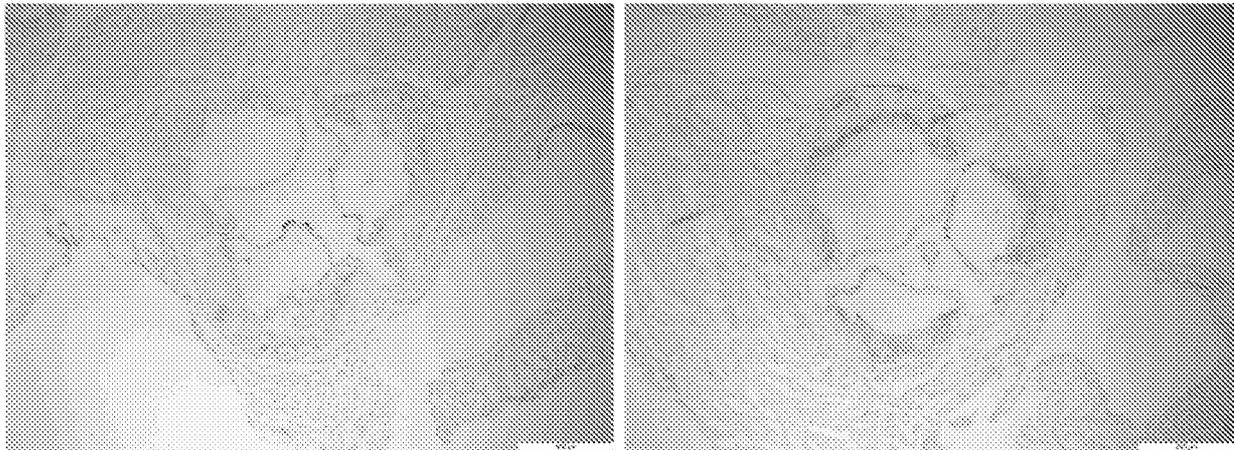


图 13

(F4/80, HFD for 5.5 months)

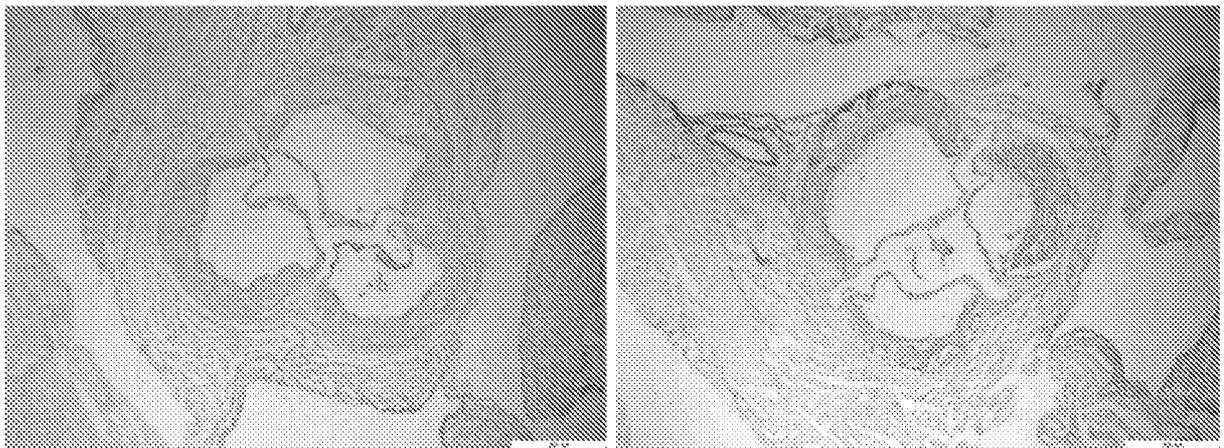


EC-Metnrl^{+/+}ApoE^{-/-}

EC-Metnrl^{-/-}ApoE^{-/-}

图 14

(α -SMA, HFD for 5.5 months)



EC-Metnrl^{+/+}ApoE^{-/-}

EC-Metnrl^{-/-}ApoE^{-/-}

图 15

HFD for 5.5 months

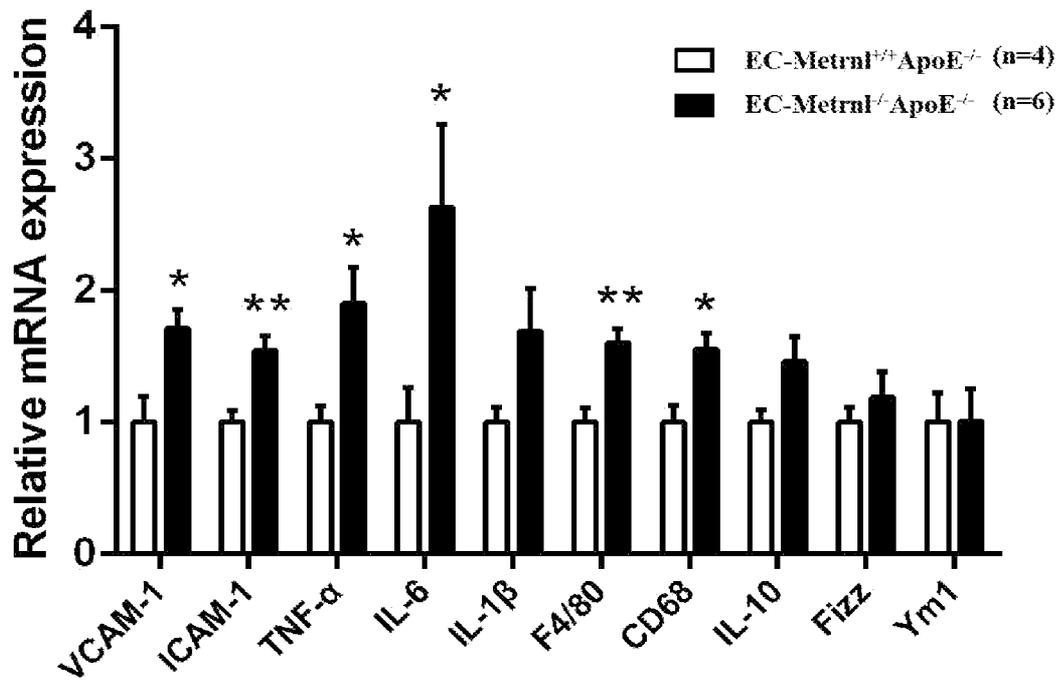


图 16

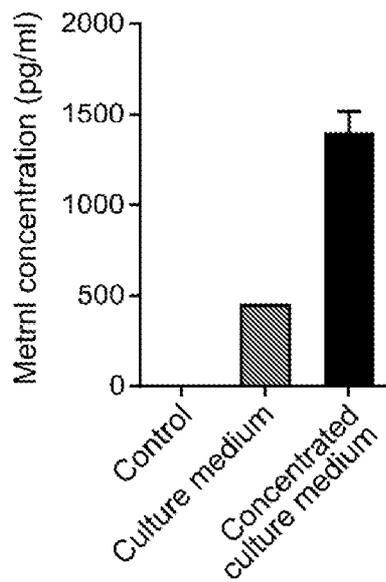


图 17

7/13

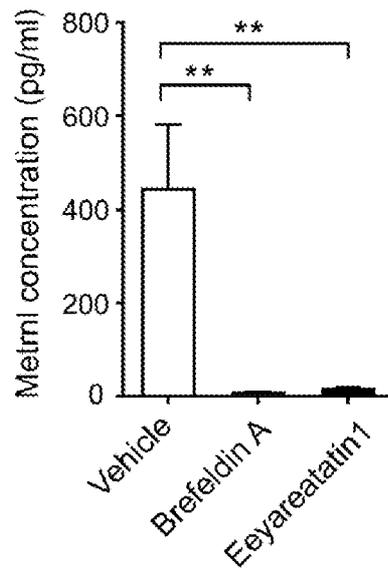


图 18

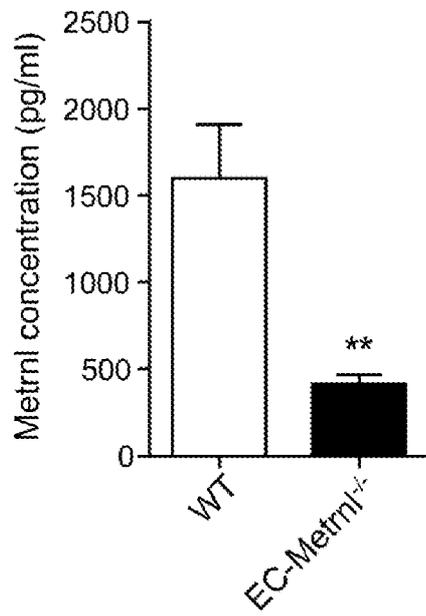


图 19

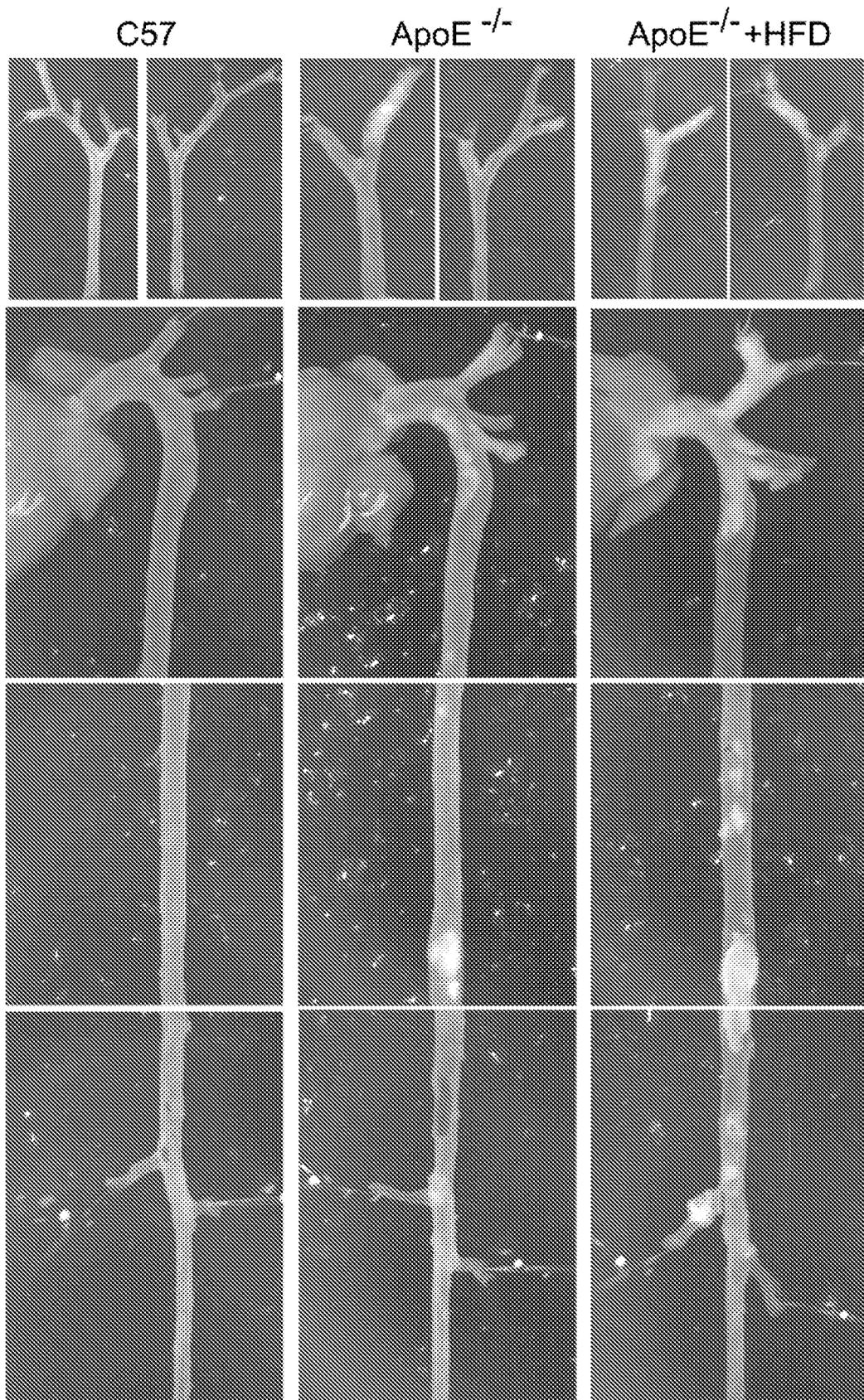


图 20

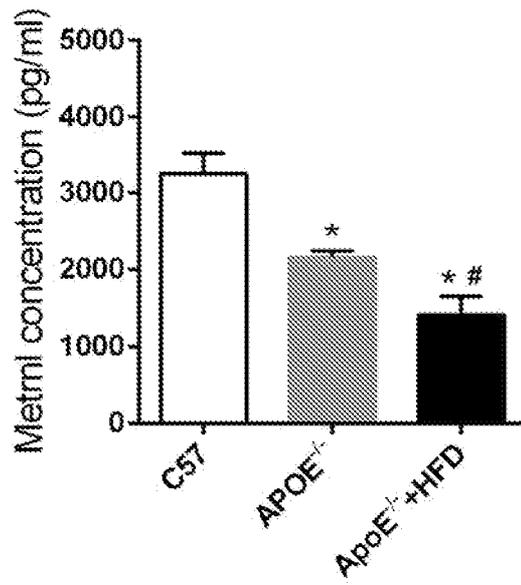


图 21

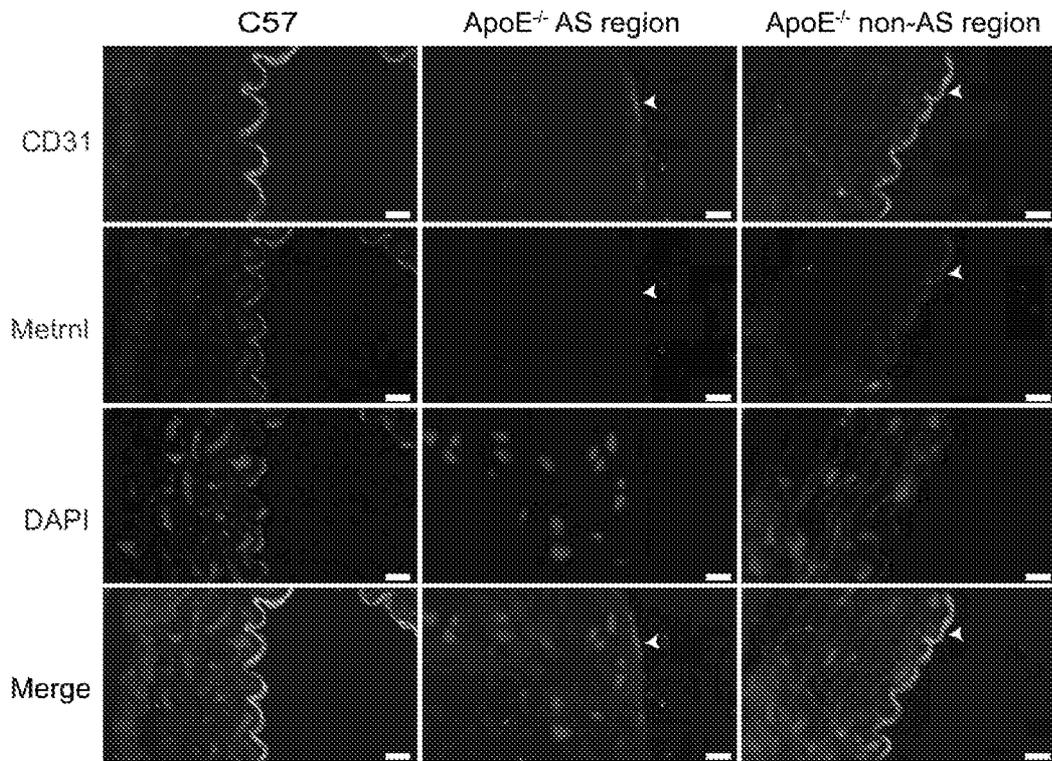


图 22

10/13

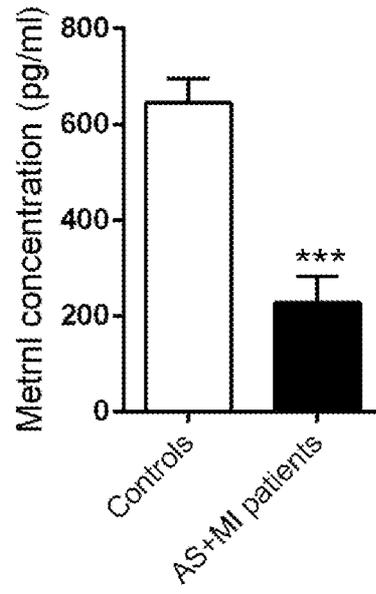


图 23

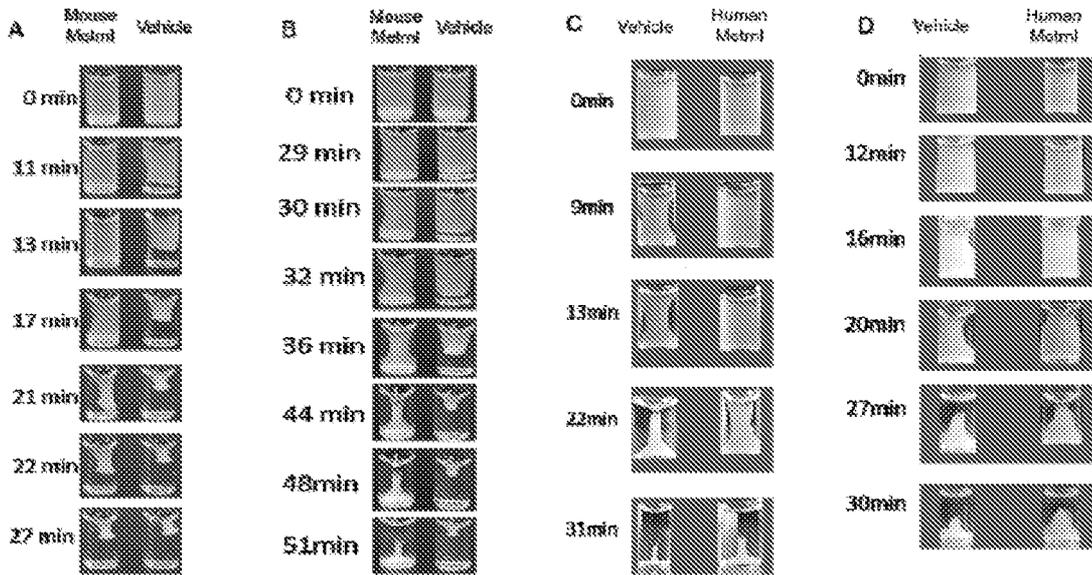


图 24

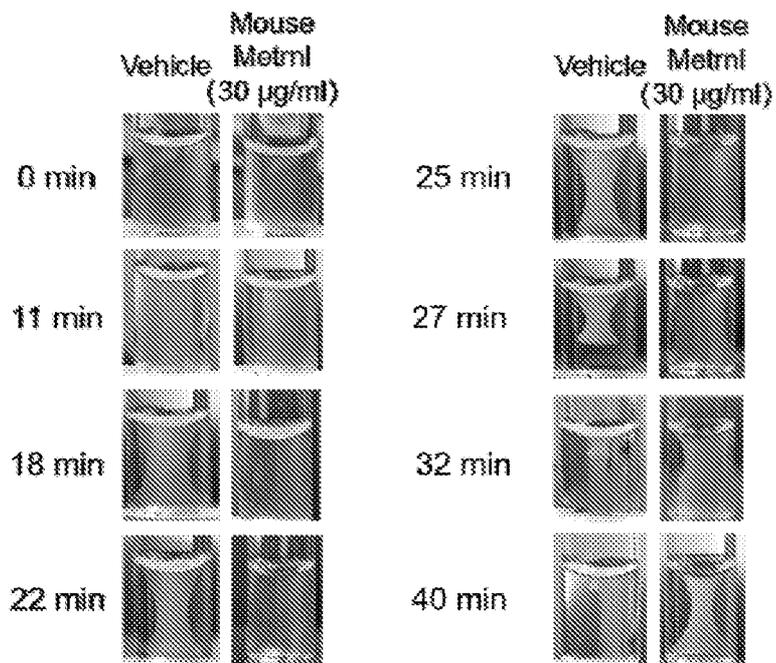
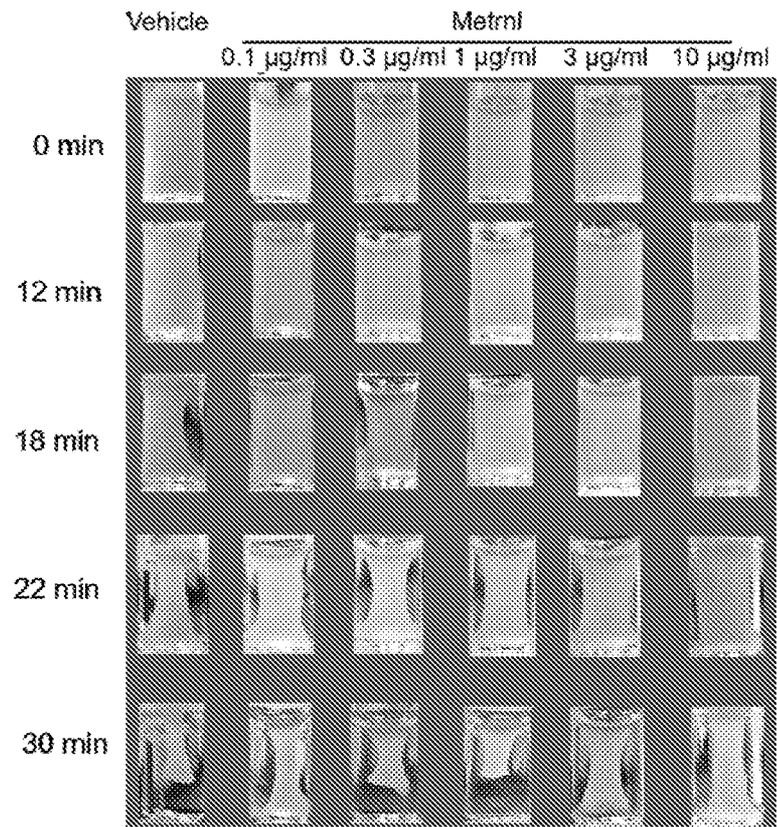


图 25

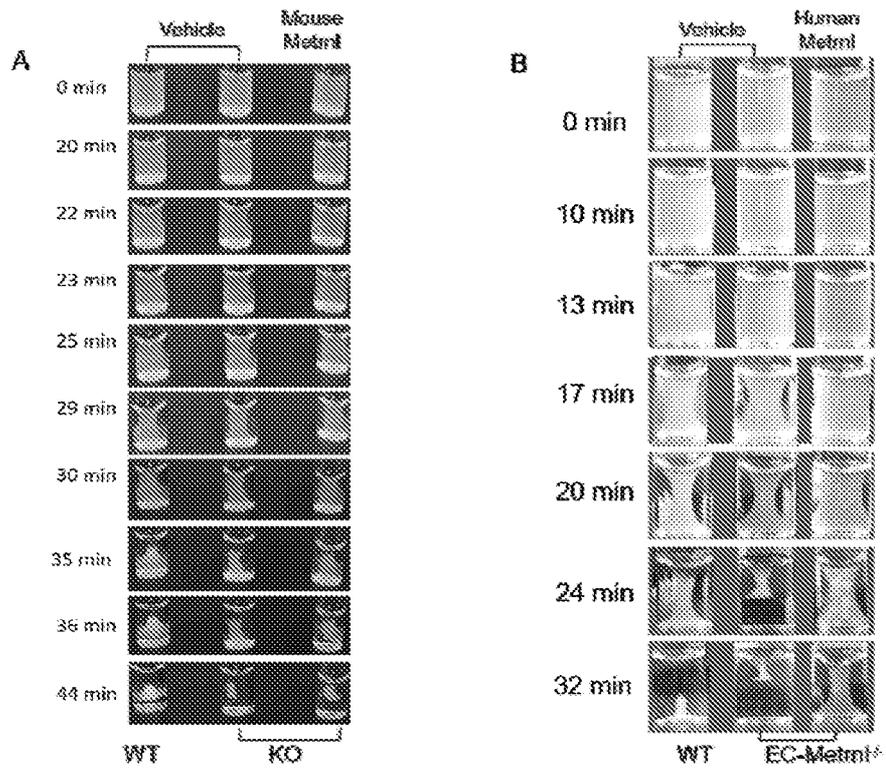


图 26

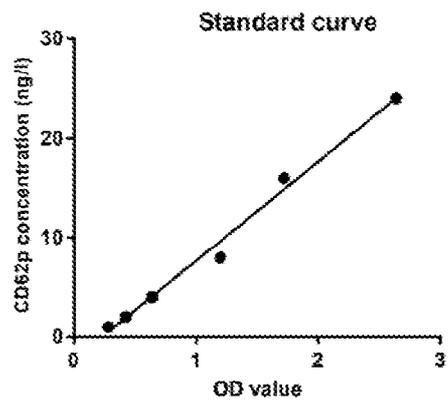
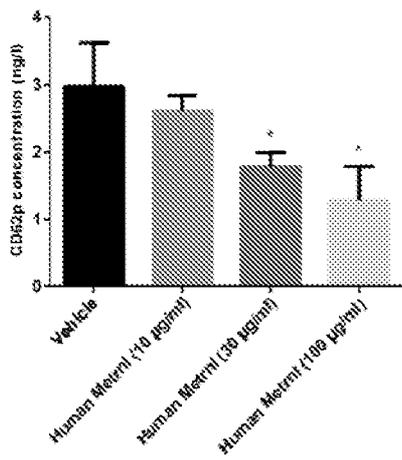


图 27

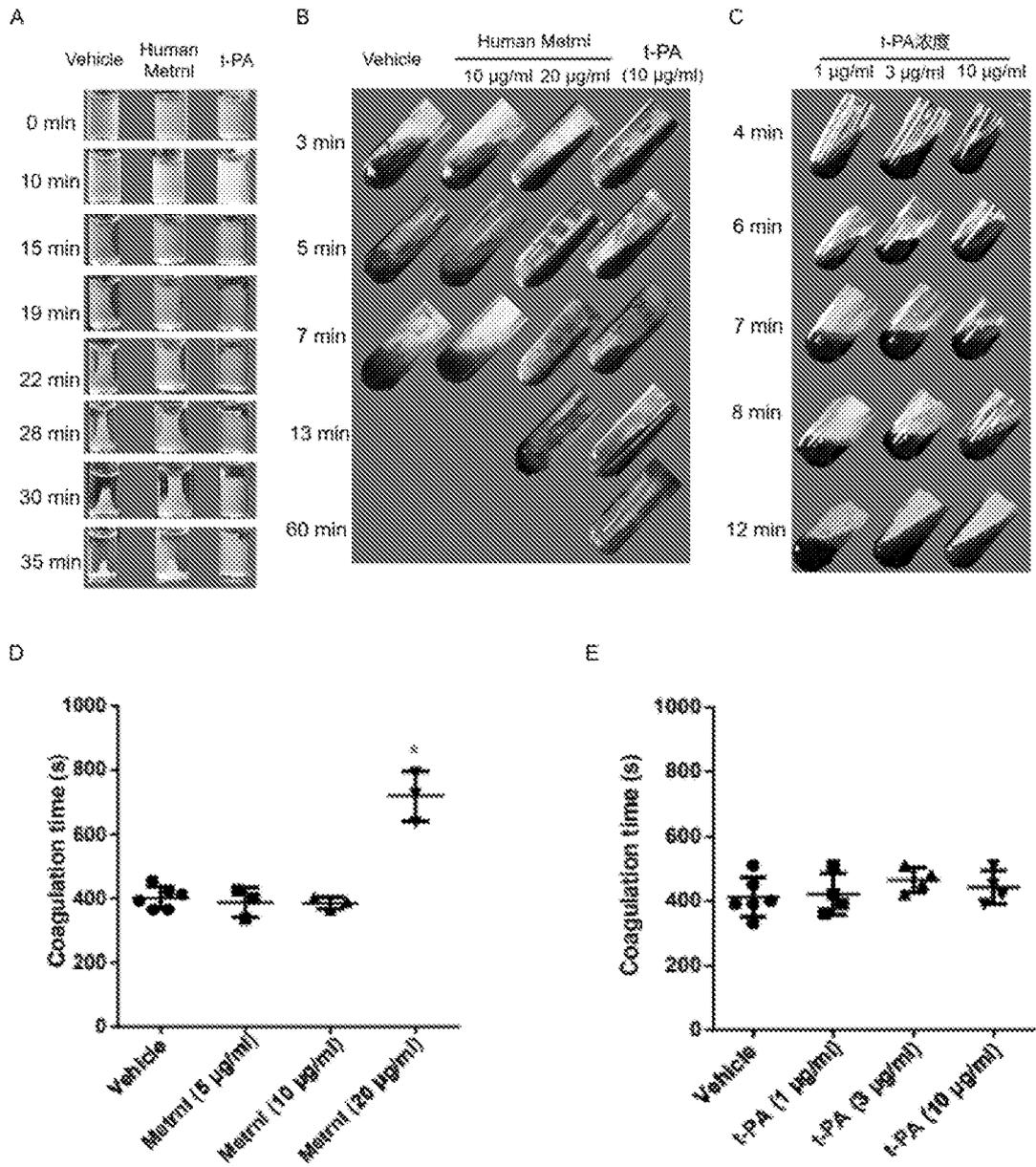


图 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/089441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; G01N; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH, WEB OF SCIENCE, PubMed: Metrnl蛋白, 动脉粥样硬化, atherosclerosis, AS, Subfatin, Cometin, Interleukin39

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107088223 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF CHINESE PLA) 25 August 2017 (2017-08-25) see claims 1-10, and description, paragraphs 6, 26-42 and 72-92	1-3, 5-9
X	CN 103536903 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF CHINESE PLA) 29 January 2014 (2014-01-29) see claim 1, and description, paragraph 4	1-3, 5-9
A	CN 103536904 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF CHINESE PLA) 29 January 2014 (2014-01-29) see entire document	1-3, 5-9
A	CN 104808004 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF CHINESE PLA) 29 July 2015 (2015-07-29) see entire document	1-3, 5-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2019

Date of mailing of the international search report

06 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/089441

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claim 4 relates to a method for treatment of the human or animal body under PCT Rule 39.1(iv).

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/089441

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107088223	A	25 August 2017	None			
CN	103536903	A	29 January 2014	CN	103536903	B	15 April 2015
CN	103536904	A	29 January 2014	CN	103536904	B	18 February 2015
CN	104808004	A	29 July 2015	CN	104808004	B	01 March 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/089441

<p>A. 主题的分类 A61K 38/17(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; G01N; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed; Metrn1 蛋白, 动脉粥样硬化, atherosclerosis, AS, Subfatin, Cometin, Interleukin39</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 107088223 A (中国人民解放军第二军医大学) 2017年 8月 25日 (2017 - 08 - 25) 参见权利要求1-10, 说明书第6, 26-42, 72-92段</td> <td>1-3, 5-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103536903 A (中国人民解放军第二军医大学) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见权利要求1, 说明书第4段</td> <td>1-3, 5-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103536904 A (中国人民解放军第二军医大学) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见全文</td> <td>1-3, 5-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104808004 A (中国人民解放军第二军医大学) 2015年 7月 29日 (2015 - 07 - 29) 参见全文</td> <td>1-3, 5-9</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 107088223 A (中国人民解放军第二军医大学) 2017年 8月 25日 (2017 - 08 - 25) 参见权利要求1-10, 说明书第6, 26-42, 72-92段	1-3, 5-9	X	CN 103536903 A (中国人民解放军第二军医大学) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见权利要求1, 说明书第4段	1-3, 5-9	A	CN 103536904 A (中国人民解放军第二军医大学) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见全文	1-3, 5-9	A	CN 104808004 A (中国人民解放军第二军医大学) 2015年 7月 29日 (2015 - 07 - 29) 参见全文	1-3, 5-9
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 107088223 A (中国人民解放军第二军医大学) 2017年 8月 25日 (2017 - 08 - 25) 参见权利要求1-10, 说明书第6, 26-42, 72-92段	1-3, 5-9															
X	CN 103536903 A (中国人民解放军第二军医大学) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见权利要求1, 说明书第4段	1-3, 5-9															
A	CN 103536904 A (中国人民解放军第二军医大学) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见全文	1-3, 5-9															
A	CN 104808004 A (中国人民解放军第二军医大学) 2015年 7月 29日 (2015 - 07 - 29) 参见全文	1-3, 5-9															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期 2019年 8月 21日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期 2019年 9月 6日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员 赵彦豪 电话号码 62411043</p>															

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 4
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求4涉及人体或动物体的治疗方法（PCT实施细则39.1（iv））
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求， 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/089441

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107088223	A	2017年 8月 25日	无			
CN	103536903	A	2014年 1月 29日	CN	103536903	B	2015年 4月 15日
CN	103536904	A	2014年 1月 29日	CN	103536904	B	2015年 2月 18日
CN	104808004	A	2015年 7月 29日	CN	104808004	B	2017年 3月 1日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)