

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02825955.6

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100427609C

[22] 申请日 2002.10.24 [21] 申请号 02825955.6

[30] 优先权

[32] 2001.10.24 [33] US [31] 60/335,244

[86] 国际申请 PCT/US2002/034208 2002.10.24

[87] 国际公布 WO2003/035670 英 2003.5.1

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.23

[73] 专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 M·梅拉比恩 H·阿拉耶

A·J·鲁西斯

[56] 参考文献

US5428048A 1995.6.27

审查员 邹 凯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 9 页

[54] 发明名称

鉴定 5 - 脂氧化酶作为引起动脉硬化症的主要基因

[57] 摘要

5 - LO 在单核细胞/巨噬细胞 (mono/mac) 和动脉硬化损伤的泡沫细胞中表达, 并在 CAST 和 CON6 小鼠中相对 B6 小鼠差异表达。当用于无效突变 5 - LO 的杂合小鼠被置于 LDLR_{-/-} 背景时, 与对照 LDLR_{-/-} 小鼠相比动脉硬化症显著减少。在遗传性流行病学研究中, 发现普遍的 5 - LO 多态性与颈动脉内膜 - 介质厚度 (IMT) 紧密相连。这些结果表明 5 - LO 是动物模型中动脉硬化症和人对动脉硬化症易感的主要原因。

1. 一种筛选降低动脉硬化症易感性的药剂的方法，包括：
 - (a) 在体外将备选药剂与 5-脂氧化酶多肽混合，和
 - (b) 分析 5-脂氧化酶多肽的催化活性；将抑制 5-脂氧化酶多肽催化活性的药剂选为可用于降低动脉硬化症易感性的药剂。
2. 一种筛选降低动脉硬化症易感性的药剂的方法，包括：
 - (a) 将备选药剂与含有编码 5-脂氧化酶的核酸的细胞接触，和
 - (b) 测定备选药剂对以下事件的作用：
 - (i) 由所述核酸编码的 5-脂氧化酶的表达水平，将降低所述表达水平的药剂选为可用于降低动脉硬化症易感性的药剂；
 - (ii) 细胞内一种或多种具心血管病特征的细胞表型，将缓解所述一种或多种具心血管病特征的细胞表型的药物选为可用于降低动脉硬化症易感性的药剂。
3. 如权利要求 2 所述的方法，所述细胞是体外培养细胞。
4. 如权利要求 2 所述的方法，所述细胞是动物的一部分。
5. 如权利要求 2 所述的方法，所述细胞是单核细胞，所述一种或多种具心血管病特征的细胞表型包括 LDL 吸收速度降低、附于内皮细胞、穿过内皮单层并移入内皮下空间胶原层的迁移、泡沫细胞形成、脂带形成和泡沫细胞生成生长因子。
6. 如权利要求 5 所述的方法，所述单核细胞是动物的一部分，所述动物是 5-脂氧化酶基因功能的非人动物模型。
7. 如权利要求 6 所述的方法，所述动物是含稳定转导的外源 5-脂氧化酶基因的转基因动物。
8. 如权利要求 5 所述的方法，所述生长因子选自：bFGF、IGF-1、VEGF、IL-1、M-CSF、TGF β 、TGF α 、TNF α 、HB-EGF、PDGF、IFN- γ 和 GM-CSF。

鉴定 5-脂氧化酶作为引起动脉硬化症的主要基因

介绍

心血管病是工业化社会的主要健康威胁。动脉硬化症是最普遍的心血管病，是引起心脏病发作、中风和极度坏疽的主要因素，因此在美国是导致死亡的主要原因。动脉硬化症是涉及许多细胞类型和分子因子的复杂疾病。该过程在正常环境中是对动脉壁内皮和平滑肌细胞(SMCs)损伤的保护性反应，它包括纤维脂肪和纤维损伤或斑块形成，这先于并伴随炎症。发展的动脉硬化症损伤可闭塞涉及的动脉，由对多种不同损伤形式的过度炎症-纤维增殖性反应引起。例如，认为切应力导致动脉硬化斑在出现湍动血流的循环系统区域中频繁出现，如枝点和不规则结构。

动脉硬化斑形成中第一个可观测现象在血管生成的单核细胞附于血管内皮细胞并迁移穿过亚内皮层时发生。相邻内皮细胞同时生成氧化低密度脂蛋白(LDL)。随后单核细胞通过它们表面表达的清除受体大量吸收这些氧化的 LDL。与天然 LDL (nLDL) 被 nLDL 特异受体吸收的调节途径相反，清除途径的吸收不受单核细胞调节。

这些充满脂的单核细胞被称为泡沫细胞，是脂条的主要构成。泡沫细胞和内皮及围绕它们的 SMCs 间相互作用导致慢性局部炎症状态，可最终引起平滑肌增殖和迁移及形成纤维斑。这种斑使涉及血管闭塞并因此限制血流，导致局部缺血。

局部缺血的特征是器官组织缺乏氧供应，由不充分灌流引起。这种不充分灌流可具有一些天然原因，包括动脉硬化或再狭窄损伤、贫血或中风，这些仅是一部分。许多医学干扰如在旁路手术中中断血流，也导致局部缺血。除了有时由患病心血管组织引起，局部缺血有时可影响心血管组织，如局部缺血性心脏病。然而局部缺血可在任何缺乏氧供应的器官中发生。

心脏局部缺血的最常见原因是心外膜冠状动脉的动脉硬化疾病。动脉硬化症通过减少这些血管内腔导致本底状态心肌灌流的绝对降低或在增强流需求时限制灌流适当增加。冠状血流也能被动脉血栓症、痉挛和较少的冠状栓以及梅毒主动脉炎引起的心门缩小限制。先天性异常如来自肺动脉左前部下降冠状动脉的异常来源，可在幼儿中引起心肌局部缺血和梗塞形成，但此原因在成人中很少见。如果心肌氧需求异常增加，也可发生心肌局部缺血，如高血压或主动脉缩窄引起的严

重心室肥大。后者可与绞痛一起存在，绞痛不能与冠状动脉硬化症引起的区别。血液氧携带能力下降是心肌局部缺血的罕见原因，如在极度严重的贫血或碳氢血红蛋白存在时。两个或多个局部缺血原因常共存，例如左心室肥大引起的氧需求增加和仅次于冠状动脉硬化症的氧供应减少。

出版物

人 5L0 序列由 Dixon 等, (1988) Proc. Nat. Acad. Sci 85:416-42 报导。Drazen 等, (1999) Nature Genetics 22:168-170 报导了 5-L0 启动子基因型和对抗哮喘治疗反应间的遗传药理联系, 本文特别纳入此文章供参考。In 等, (1997) J. Clin. Invest. 99:1130-1137 描述了人 5-L0 基因启动子中天然产生的突变。

Lusis (2000) Nature 407:233-41 综述动脉硬化症。Mehraban 等, (2000) Circ Res 89:125-30 描述了参与对动脉硬化症易感的基因座位置图谱。

发明概述

本发明提供的方法和组合物用于治疗 and 诊断心血管病, 包括但不限于动脉硬化症、局部缺血/重灌注、高血压、再狭窄和动脉炎症; 也用于诊断高血糖情况, 包括糖尿病、胰岛素抗性等。5-脂氧化酶基因被特异鉴定为对心血管病状态的易感性相关。包括启动子区域变化的等位基因与疾病的易感性相关, 它们的检测用于诊断易患这些情况的倾向。

发明也提供鉴定化合物的方法, 化合物调节参与心血管病的基因表达或基因产物活性, 以及提供治疗心血管病的方法, 可涉及施用这些化合物给表现出心血管病症状或倾向的个体。

对动脉硬化症易感的主要基因座在小鼠染色体 6 上鉴定。此遗传基因座提供几乎完整的动脉硬化形成抗性, 尽管低密度脂蛋白受体缺乏 (LDLR^{-/-}) 产生极端高脂血症。编码 5-脂氧化酶 (5-L0) 的基因对此区域作图。5-L0 在单核细胞/巨噬细胞 (mono/mac) 和动脉硬化损伤的泡沫细胞中表达且与敏感动物相比在抗动脉硬化形成的动物中差异表达。

附图简述

图 1A 和 1B。与 B6 对照相比, CON6 小鼠的骨髓细胞中 5-L0 mRNA 和蛋白质水平下降。A, 总骨髓 RNA 分离自 CON6 /LDLR^{-/-} (n=3)、5L0 +/- / LDLR^{-/-} (n=3)

和 LDLR^{-/-} (n=3) 小鼠, Northern 分析用 5-L0 或作为对照的 GAPDH 的 cDNA 探针进行。MRNA 水平通过磷成像定量且以 5-L0 与 GAPDH 的比例表达。B, 免疫印迹分析来自 B6 (n=4) 和 CON6 (n=4) 小鼠的骨髓匀浆用特异的商业购买兔抗人 5-L0 抗体 (Cayman Chemical) 进行。数据来自用固型食物喂养的 4 到 6 个月大小鼠且代表至少 3 次实验。

图 2A 和 2B。CON6 和 B6 小鼠中 LTB₄、LTA₄ 水解酶和 LTB₄ ω-羟化酶水平。A, B6 (n=3) 和 CON6 (n=3) 小鼠骨髓细胞中的 LTB₄ 水平用 ELISA (Cayman Chemical) 确定。B, B6 (n=3) 和 CON6 (n=3) 的 LTA₄ 水解酶和 LTB₄ 羟化酶水平在免疫印迹分析后确定, 分析使用特异的、商业购买的抗体 (Cayman Chemical)。数据来自用固型食物喂养的 4 到 6 个月大小鼠且代表至少 3 次实验。

图 3A-3F。5-L0 存在于 apoE^{-/-}和 LDLR^{-/-}小鼠动脉硬化损伤中。A 到 C, 主动脉部分用巨噬细胞特异 MOMA-2 染色显示大损伤发展。D 到 F, 相邻接近部分用抗 5-L0 抗体染色显示 5-L0 (箭头) 与包围坏死核心 (NC) 的巨噬细胞亚群上局部化, 但不与所有巨噬细胞染色区域上局部化。A 和 D 和 B 和 E 来自两只用固型食物喂养的 1 岁大 apoE^{-/-}小鼠。C 和 F 代表用 8 周高脂肪、高胆固醇食物的 4 到 6 个月大 LDLR^{-/-}小鼠的损伤。I 表示内膜; L, 内腔; M, 介质。

图 4A 和 4B。与 B6 小鼠相比, CON6 的巨噬细胞中 5-L0 蛋白质减少。巯基乙酸盐治疗后 3 天从用固型食物喂养的 4 到 6 个月大 CON6 (n=4) 和 B6 (n=4) 小鼠中分离腹膜单核细胞/巨噬细胞。细胞在载玻片上过夜培养并用 5-L0-特异抗体和苏木精染色。

图 5。与 LDLR^{-/-}对照相比, 5-L0 +/- LDLR^{-/-}小鼠中 5-L0 蛋白质减少。免疫印迹分析用兔抗人 5-L0 抗体染色的骨髓细胞表明 5-L0 +/- LDLR^{-/-}小鼠 (n=3) 相较对照 LDLR^{-/-}小鼠 (n=3) 5-L0 蛋白质减少约 90%。数据来自用固型食物或高脂肪食物的 4 到 6 个月大小鼠。用固型食物或高脂肪 (HF) 食物的 LDLR^{-/-}小鼠中 5-L0 蛋白质水平没有差异。

图 6 A 和 6B。5-L0-无效突变甚至在存在总胆固醇水平提高时减少主动脉损伤。具 LDLR^{-/-}背景的 4 到 6 个月大 5-L0 +/- (n=4) 和 5-L0 +/+ (n=4) 小鼠用高脂肪、高胆固醇食物喂养 8 周, 损伤形成下降 26 倍, 尽管胆固醇水平超过 500mg/dL。LDL/VLDL-胆固醇水平没有显著差异。

图 7。5-L0 +/- LDLR^{-/-}小鼠中的血浆胰岛素水平与 LDLR^{-/-}对照相比。用固型食物喂养的 4 到 6 个月大 5-L0 +/- LDLR^{-/-} (n=5) 和 5-L0 +/+ LDLR^{-/-} (n=5)

小鼠的胰岛素水平通过材料和方法中所述免疫测定来确定。喂食高脂肪、高胆固醇食物(对于各基因型 n=5)的小鼠具有类似的差异。

图 8A 和 8B。移植 5-L0 +/-骨髓的 LDLR -/-小鼠表现出骨髓细胞中 5-L0 mRNA 水平降低且动脉硬化损伤减少。移植 5-L0 +/- LDLR -/-或 LDLR -/-骨髓的 4 个月大 LDLR -/-小鼠可恢复 4 周, 随后用导致动脉硬化的食物喂养 8 周。检测各基因型的 9 只小鼠, (A)通过 Northern 印迹分析检测来自骨髓细胞的 5-L0 mRNA 水平和 (B)检测图 6 所述主动脉损伤。

图 9 描述了 5-L0 启动子基因型与胰岛素水平的相互关系。

图 10 描述了 5-L0 基因型与胰岛素抗性的相互关系。

实施方案详述

所述用于诊断和治疗心血管病的方法和组合物包括但不限于动脉硬化症、局部缺血/重灌流、高血压、再狭窄和动脉炎症。于诊断高血糖情况, 包括糖尿病、胰岛素抗性等。发明部分以 5-L0 表达和作用的评估为基础, 5-L0 在疾病模型中表达不同, 本文鉴定了诱导动脉硬化形成的等位基因。这可定义疾病途径和鉴定途径中的靶, 靶对于药物筛选中诊断和治疗都有用。诱导冠心病(CAD)的 5-L0 等位基因也与胰岛素抗性相连且可指示易患糖尿病的倾向。

白细胞三烯构成具生物活性的花生四烯酸衍生化合物组, 表明在炎症和速发过敏性中的重要作用。酶 5-脂氧化酶(EC 1. 13. 11. 34)催化白细胞三烯形成中的 2 个反应。纳入本文供参考的 Matsumoto 等, (1988) Proc. Nat. Acad. Sci **85**:26-30 分离了人肺和胎盘 5-脂氧化酶的 cDNA 克隆并推出酶的完整氨基酸序列。

人 5-L0 等位基因具有启动子多态性, 其中转录因子 Sp1/Egr-1 串联合位点的数量可变(Drazen 等, (1999) Nat Genet **22**:168-170 和 In 等, (1997) J. Clin. Invest. **99**:1130-1137, 纳入本文供参考), 各重复具有序列基序 GGGCGG。人群中普遍的等位基因由 5 个重复结合位点组成且定义为“5”或“N”等位基因。少于 5 个重复的等位基因通常为 3 个重复或 4 个重复, 可用数字称作“3”或“4”, 或者共同称作缺失或“D”等位基因。重复扩展大于数字 5 的等位基因通常为 6 个重复或 7 个重复, 可共同称作“E”扩展或“A”加入等位基因。定义 4 个基因型组: 纯合子 55(指示等位基因都由 5 个重复结合位点组成); 33、34 和 44(1 或 2 个结合位点缺失); 35 和 45(1 个等位基因缺失); 56、57 和 67(1 个或 2 个等位基因都扩展)。基因型组间的比较揭示携带缺失重复等位基因的个体(基因型 33、34 或 44)

与具野生型等位基因或更大量重复的个体相比，冠心病发生率大幅增加。

诱病 5-L0 等位基因相对人群中的普遍等位基因可有一个或多个 Sp1/Egr-1 结合位点缺失，通常各染色体上至少缺失 1 个结合位点，野生型等位基因由 5 个重复 Sp1/Egr-1 结合位点组成。一般这种易受影响的等位基因不具有超过 4 个的 Sp1/Egr-1 结合位点重复。其它诱病等位基因在 5-L0 DNA 序列中有变化，使对动脉硬化症的易感性增加。

在本发明的一方面，提供方法用于确定个体中易患动脉硬化症的倾向。方法包括分析个体基因组 DNA 的 5-脂氧化酶启动子等位基因，等位基因使对动脉硬化症的易感性增加。筛选个体通过分析它们基因组 5-L0 基因序列的诱病等位基因存在，与正常 5-L0 序列相比较。要理解正常 5-L0 序列包括不影响基因表达水平的非编码区序列变化和不改变氨基酸序列的编码区变化，如“第 3 位置”改变。

可确定序列变化对于 5-L0 表达或功能的效果，通过分析序列变化与疾病表型的分离，如 CAD 发生率、存在葡萄糖耐受、胰岛素水平等。诱病突变与疾病发生率分离。除了家族研究，进行生化研究以确定 5-L0 编码区或对照区中候选序列变化是否影响蛋白质的量或功能。候选变化等位基因的表达水平通过本领域多种已知方法与正常等位基因的表达水平相比。确定启动子或增强子强度的方法包括表达天然蛋白质的定量；将变化对照元件插入有报告基因的载体，报告基因如容易定量的 β -半乳糖苷酶、氯霉素(chloramphenical)乙酰转移酶等；等等。

一些方法用于确定个体中诱病突变的存在。基因组 DNA 分离自待测试的个体。DNA 可从任何有核细胞来源分离，如血液、毛干、唾液、粘液、活组织切片、排泄物等。用 PCR 扩增的方法可对来自单细胞的 DNA 进行，尽管使用至少约 10^5 个细胞方便。当有大量 DNA 时，直接使用基因组 DNA。另外，感兴趣区域克隆到适当载体且以足够量生长用于分析或通过常规技术扩增。特定兴趣是用聚合酶链式反应(PCR)扩增位于 2 个特异引物间的 DNA。聚合酶链式反应的使用描述于 Saiki 等，(1985) *Science* 239:487，当前技术的综述可发现于 McPherson 等，(2000)《PCR(基础:从背景到操作)》(PCR(Basics:From Background to Bench)) Springer Verlag; ISBN:0387916008。可检测标记能包含在扩增反应中。适当标记包括荧光染料如荧光素异硫氰酸盐(FITC)、若丹明、德克萨斯红、藻红蛋白、别藻蓝蛋白、6-羧基荧光素(6-FAM)、2', 7'-二甲氧-4', 5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、6-羧基-X-若丹明(ROX)、6-羧基-2', 4', 7', 4, 7-六氯荧光素(HEX)、5-羧基荧光素(5-FAM)或 N, N, N', N'-四甲基-6-羧基若丹明(TAMRA)，放射性标记如 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H ；等。标记可

以两阶段系统，其中扩增 DNA 结合到生物素、半抗原等，它们具有高亲和结合伴侣如抗生物素蛋白、特异抗体等，结合伴侣与可检测标记结合。标记可结合 1 个或 2 个引物。另外，扩增中所用核苷酸集合被标记，用于将标记纳入扩增产物。

引物对用常规选择标准选自 5-L0 基因组序列。引物对与相反链杂合，共同在感兴趣区域侧翼。引物在严格条件下与互补序列杂合，一般至少约 16nt 长度，可以是 20、25 或 30 个核苷酸长度。选择引物以扩增怀疑含诱病突变的 5-L0 基因特异区域。通常选择扩增片段长度以区分 3 到 7 单元的重复。可进行多重扩增，其中一些引物对在相同反应管中结合用于同时分析多个外显子。各引物可结合不同标记。

特别感兴趣的诊断筛选方法检测人 5-L0 基因启动子区的 SP-1 重复数量。区域组成包括约 3 到约 76 个碱基对重复的重复区，结合基序为 GGGCGG，侧翼有独特序列。在 5' 和 3' 侧翼序列中选择序列用于扩增引物。引物序列的确切组成对于发明不重要，但它们必须在严格条件下与侧翼序列杂合。前面讨论了选择扩增引物的标准。为最大化分辨基因座的大小差异，优选选择接近重复序列的引物序列，从而总扩增产物至少约 30 个核苷酸长度，更常至少约 50 个，优选至少约 100 或 200 个，随着存在的重复数量而变化，不超过约 500 个核苷酸长度。如前所述，发现重复数量具多态性，因而产生位于扩增引物间 DNA 长度的个体差异。

引物用于扩增含重复的基因组 DNA 区域。如前所述，可检测标记容易包含在扩增反应中。可进行多重扩增，其中一些引物对在相同反应管中结合。当有限量样品 DNA 用于分析时这尤其有利。各对引物容易用不同荧光染料标记。

扩增后，产物按大小分开。分离用凝胶电泳进行，特定是变性聚丙烯酰胺或琼脂糖胶。方便的系统使用变性聚丙烯酰胺胶结合自动 DNA 测序仪，参见 Hunkapillar 等, (1991) *Science* 254:59-74。自动测序仪特定用于多重扩增或不同 PCR 反应的集合产物。毛细管电泳也用于分离。毛细管电泳的综述可发现于 Landers 等, (1993) *BioTechniques* 14:98-111。扩增产物大小与基因座中存在的重复数量成正比，重复数由引物确定。大小在群体中有多态性，因而是此基因座的等位基因标记。

扩增或克隆片段可通过双脱氧或其它方法测序，扩增区域长度或碱基序列与正常 5-L0 序列相比。另外，当诱病突变产生或破坏限制性内切酶识别位点时，片段用该内切酶消化，产物按大小分开以确定片段是否被消化。分离用凝胶电泳进行，特定是聚丙烯酰胺或琼脂糖胶。通过 Southern 印迹、点印迹等与不同序列杂合也可用于确定其存在。单链构象多态性 (SSCP) 分析、梯度变性凝胶电泳 (DGGE) 和胶基

质中的异源双链分析用于通过电泳迁移率改变来检测 DNA 序列变化产生的构象改变。对照和变化序列与寡核苷酸探针排列的杂合模式在微阵列上固定，也可用作检测变化序列存在的方法。

诱病突变的存在指示个体发展动脉硬化症和/或高血糖症的风险增加。诊断疾病倾向使受影响个体能寻求潜在损伤的早期治疗并防止增加心血管病风险的活性。

除了动脉硬化症和其它心血管病，5-L0 多态性与胰岛素抗性相关。胰岛素抗性在 25%非糖尿病、非肥胖、外表健康的个体中发生，诱导他们患糖尿病和冠心病。II 型糖尿病中的高血糖症来自于对肌肉和其它关键胰岛素靶组织中胰岛素的抗性和 β 细胞胰岛素分泌减少。纵向研究具强糖尿病家族史的个体表明胰岛素抗性先于分泌异常。发展糖尿病前，这些个体通过分泌额外的胰岛素补偿其胰岛素抗性。当补偿血胰岛素增多失败时，导致糖尿病。随后胰 β 细胞分泌缺乏在糖尿病严重性中发挥主要作用。

然而，即使没有发展高血糖症和糖尿病，这些胰岛素抗性个体在总体健康方面付出重大代价。胰岛素抗性使血浆甘油三酯(TG)提高的风险增加，降低高密度脂蛋白(HDL)、高血压、异常集合，异常集合诱捕同研究者定义为综合症 X、胰岛素抗性综合症或代谢综合症。认为血胰岛素增多、胰岛素抗性或两者都在引起这些异常中发挥直接作用。来自种族、家族的数据和纵向研究表明抗性的主要组成被遗传。

评估胰岛素抗性最实际的方法是动态平衡模型评估(HOMAIR)，包括禁食胰岛素和葡萄糖水平。此值计算为禁食血浆胰岛素($\mu\text{mol/L}$)·次数·禁食血浆葡萄糖(mmol/L)/22.5(Matthews 等, (1985) *Diabetologia*. 28:412-9)。稳态本底血浆葡萄糖和胰岛素浓度通过它们在反馈回路中的相互作用确定。计算机解决的模型用于预测不同程度 β 细胞缺乏和胰岛素抗性产生的稳态浓度。比较患者禁食值和模型预测可定量评估胰岛素抗性和缺乏 β 细胞功能对禁食高血糖症的作用。稳态模型评估获得的胰岛素抗性估计与 euglycaemic clamp、禁食胰岛素浓度和高血糖症夹获得的估计相互关联。在一些研究中，无代谢疾病的非糖尿病受试者中 HOMA(IR) 分布第一个五分线的下限(即 2.77)被选为胰岛素抗性阈(Bonora 等, (1998) *Diabetes* 47:1643-9)。此研究结果证明 1) 在高甘油三酯血症和低 HDL 胆固醇状态中，胰岛素抗性与 NIDDM 中一样普遍，而它在高胆甾醇血症、高尿酸血和高血压中较少；2) 大部分有多代谢疾病的受试者是胰岛素抗性；3) 在分离高胆甾醇血症、

高尿酸血症和高血压中，胰岛素抗性不比单独偶然可预期的更频繁；4) 在一般群体中，胰岛素抗性甚至可在缺少任何主要代谢疾病时发现。

测量胰岛素浓度可在过夜禁食条件下进行，因为餐后状态中葡萄糖水平迅速变化且葡萄糖可变水平混淆同时测量作为胰岛素作用指标的胰岛素水平。如夹技术所测，禁食胰岛素水平和胰岛素作用间有显著关联。在正常葡萄糖水平设置中非常高的血浆胰岛素值很可能反映胰岛素抗性。随着个体发展糖尿病，血浆葡萄糖增加且血浆胰岛素减少，从而血浆胰岛素水平不再仅反映胰岛素抗性，因为它受 β 细胞缺陷和高血糖症的出现影响。

发现 5-L0 基因在动脉硬化症的动物模型中差异表达。如本文所用，“差异表达”指基因暂时和/或组织表达模式中的定量以及定性差异。因此，不同表达的基因在保护性相对易受影响的心血管情况中其表达减少或失活。因而发现 5-L0 基因用于筛选调节表达或活性的试剂以及用于治疗心血管病的试剂。感兴趣的药物候选包括已知的 5-L0 抑制剂，其中许多在本领域已知，例如齐留通(zileuton)、ABT-761(参见 Drazen 等, 同上); 美国专利号 6, 294, 574 所示 2, 5-二芳基四氢咪喃、2, 5-二芳基四氢噻吩、2, 4-二芳基四氢咪喃、2, 4-二芳基四氢噻吩、1, 3-二芳基环戊烷、2, 4-二芳基吡咯烷和 2, 5-二芳基吡咯烷; 美国专利号 6, 194, 585 所示化合物等。

筛选测试鉴定调节 5-L0 表达或活性的化合物。例如 5-L0 抑制剂可作为改进心血管病的基础，如动脉硬化症、局部缺血/重灌注、高血压、再狭窄和动脉炎症。这种化合物可包括但不限于肽、抗体、或着小有机或无机化合物。鉴定这种化合物的方法描述于下。

以细胞和动物为基础的系统能作为心血管病模型且用于这种药物筛选。以细胞和动物为基础模型可用于鉴定有效治疗心血管病的药、药物、疗法和干扰。此外，这种动物模型能用于确定试验动物中的 LD_{50} 和 ED_{50} ，这些数据可用于确定潜在心血管病治疗的体内功效。以动物为基础的心血管病模型系统可包括但不限于非重组和改造的转基因动物。非重组、非遗传的动脉硬化症动物模型可包括例如猪、兔或大鼠模型，其中动物通过饮食添加 LDL 接受化学损伤或通过如气囊导管接受机械损伤。另外，表现出心血管病的动物模型能被改造，如用 5-L0 基因序列结合本领域技术人员熟知的转基因动物生成技术。例如靶基因序列可在感兴趣动物基因组中导入、敲除或过表达。任何种类动物包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猪、显微猪、山羊以及非人的灵长类动物如狒狒、猴子和黑猩猩，能用于产生心

血管病动物模型。

任何本领域已知技术可用于将靶基因转基因导入动物以产生转基因动物的起始系。这种技术包括但不限于前核微注射(Hoppe, P. C. 和 Wagner, T. E., 1989, 美国专利号 4, 873, 191); 逆转录病毒调节的基因转移到生殖系(Van der Putten 等, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152); 胚胎干细胞中的基因靶(Thompson 等, 1989, Cell 56:313-321); 电穿孔胚胎(Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3:1803-1814); 精子-调节的基因转移(Lavitrano 等, 1989, Cell 57:717-723)等。

可分析动物中的特异细胞种类并测定具心血管病特征的细胞表型。在单核细胞情况中, 这种表型可包括但不限于 LDL 吸收速度增加、附于内皮细胞、迁移、泡沫细胞形成、脂带形成和生成泡沫细胞特异产物。此外, 这种细胞表型能包括特定细胞类型的表达指纹模式, 与表现心血管病症状的动物中特定细胞类型的已知指纹表达分布相比较。

包含且表达 5-L0 的细胞可用于鉴定表现抗心血管和/或抗高血糖疾病活性的化合物。在单核细胞情况中, 这种表型可包括但不限于 LDL 吸收速度增加、附于内皮细胞、迁移、泡沫细胞形成、脂带形成和泡沫细胞生成生长因子如 bFGF、IGF-1、VEGF、IL-1、M-CSF、TGF β 、TGF α 、TNF α 、HB-EGF、PDGF、IFN- γ 和 GM-CSF。例如迁移速度能用体外系统测量以定量穿过内皮单层并移入内皮下空间胶原层的单核细胞数量。

已知参与心血管和/或高血糖疾病的细胞类型细胞可用序列转染, 序列能增加或减少细胞中 5-L0 基因表达量。例如, 5-L0 基因序列可在感兴趣细胞基因组中导入和过表达, 或如果存在内源靶基因序列, 它们可过表达或者另外破坏以使靶基因表达过低或失活。

转染靶基因序列核酸可伴随使用标准技术。能评估转染细胞的重组 5-L0 基因序列存在、5-L0 基因 mRNA 表达和积聚以及重组 5-L0 蛋白质存在。当需要 5-L0 基因表达减少时, 标准技术可用于证明是否达到表达下降。

能设计体外系统以鉴定能抑制 5-L0 的化合物。这种化合物可包括但不限于 D-和/或 L-构象氨基酸组成的肽、磷酸肽、抗体、小有机或无机分子。用于鉴定抑制 5-L0 化合物的测定原理包括在条件下制备 5-L0 与测试化合物的反应混合物且时间足以使两种成分相互作用, 检测白细胞三烯形成中所得催化活性变化。另外, 简单的结合测定可用作起始筛选方法。这些测定能以多种方法进行。例如, 一种进行这种测定的方法包括在固相上锚定 5-L0 蛋白质或测试物质并在反应末期检测固

相上锚定的复合体。在这种方法的另一个实施方案中，测定试验 5-L0 催化的产物存在。

例如，5-L0 活性的常规测定可在混合物中进行，混合物在 200ml 终体积中含 pH7.4 的 50mM 磷酸钾缓冲液、2mM CaCl_2 、2mM ATP、25M 花生四烯酸(0.1Ci)和 5-L0 酶(50-100mg 蛋白质)。反应在 24℃进行 3 分钟。混合物用 0.2ml 乙基醚: 甲醇:0.2M 柠檬酸(30:4:1)的冰混合物提取。提取物在-10℃接受薄层层析，溶剂系统是石油醚:乙基醚:乙酸(15:85:0.1)。对应于真实花生四烯酸和其代谢物的硅胶区刮入闪烁管以计数。酶活性以氧化 3 分钟的花生四烯酸量表达。

在结合测定中，反应可在固相或液相上进行。在固相测定中，非固定成分加入含锚定成分的包被表面。反应完成后，未反应成分在任何形成的复合体保持固定在固体表面的条件下去除。检测固体表面上锚定的复合体可以一些方法完成。当前面非固定成分被预标记时，检测到在表面上固定的标记说明形成复合体。当前面非固定成分没有被预标记时，间接标记可用于检测表面上锚定的复合体，如使用对前面的非固定成分特异的标记抗体(抗体依次可被直接标记或用标记的抗 Ig 抗体间接标记)。

另外，结合反应可在液相中进行，反应产物与未反应成分分离且检测复合体，如使用对靶基因产物特异的固定抗体或测试化合物以锚定溶液中形成的任何复合体，使用对可能复合体其它成分特异的标记抗体以检测锚定复合体。

如上所述以细胞为基础的系统可用于鉴定改进心血管病症状的化合物。例如，这种细胞系统可暴露于足够浓度的测试化合物足够时间以在暴露细胞中引起心血管病症状改进。暴露后，检测细胞以确定一种或多种心血管病细胞表型是否改变而类似一种更正常或更加野生型、非心血管病的表型。例如，不作为限制，在单核细胞情况中，这种更正常的表型可包括但不限于 LDL 吸收速度减小、附于内皮细胞、迁移、泡沫细胞形成、脂带形成和泡沫细胞生成生长因子如 bFGF、IGF-1、VEGF、IL-1、M-CSF、TGF β 、TGF α 、TNF α 、HB-EGF、PDGF、IFN- γ 和 GM-CSF。

此外，如上所述以动物为基础的疾病系统可用于鉴定能改进疾病症状的化合物。这种动物模型可用作测试底物以鉴定有效治疗疾病的药、药物、疗法和干扰。例如，动物模型可暴露于足够浓度的测试化合物足够时间以在暴露动物中引起疾病症状改进，化合物怀疑能改善心血管病症状。动物对暴露的反应能通过评估疾病相关紊乱恢复来监控，例如通过计算动脉硬化斑数量和/或测量它们治疗前和后的尺寸。

关于干扰,恢复任何方面心血管病症状或胰岛素抗性和其它高血糖情况的任意治疗应考虑为人疾病治疗干扰的候选。测试剂的剂量可通过衍生剂量反应曲线来确定。

这种化合物的毒性和治疗功效可用标准制药过程在细胞培养或实验动物中确定,如用于确定 LD_{50} (对 50%群体致命的剂量) 和 ED_{50} (对 50%群体治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果间的剂量比例是治疗指数且可表示为比例 LD_{50}/ED_{50} 。表现出高治疗指数的化合物优选。使用表现出毒副作用的化合物时,应注意设计将这种化合物靶向受影响组织位置的传递系统以最小化对未感染细胞的可能损伤,从而减少副作用。

获得自细胞培养测定和动物研究的数据可用于制成人使用的剂量范围。这种化合物剂量优选位于循环浓度范围内,包括少量或没有毒性的 ED_{50} 。剂量可在此范围内变化,取决于所用剂量形式和施用途径。对于发明方法中使用的任何化合物,治疗有效量开始可从细胞培养测定估计。剂量可在动物模型中制成以获得循环血浆浓度范围,范围包括 IC_{50} (即达到最大症状抑制一半的测试化合物浓度),如细胞培养中所确定。这种信息能用于更精确确定人中有用的剂量。例如可通过高效液相层析测量血浆水平。

根据本发明使用的药物组合物可用一种或多种生理上可接受载体或赋形剂以常规方式制成。因此,可制成化合物和它们生理上可接受盐和溶剂化物用于吸入或吹入(通过口或鼻)施用或口头、颊、肠胃外或直肠施用。

对于口头施用,药物组合物可采用例如片剂或胶囊形式,通过常规方法药理学上可接受赋形剂制备,如结合剂(如预胶凝玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);滑润剂(如硬脂酸镁、滑石或硅石);分解质(如马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或润湿剂(如月桂醇硫酸钠)。片剂能用本领域熟知方法包被。用于口头施用的液体制备可采用例如溶液、糖浆或悬浮液形式,或它们可作为干产品存在,使用前与水或其它适当载体结合。这种液体制备能通过常规方法药理学上可接受添加剂制备,如悬浮剂(如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(如卵磷脂或阿拉伯树胶);非含水载体(如杏仁油、油酯、酒精或分级植物油);防腐剂(如甲基或丙基-p-羟基安息香酸或山梨酸)。制备也可适当包含缓冲盐、调味料、着色剂和甜味剂。可适当制成口头施用的制备以控制活性化合物释放。对于颊部施用,组合物能采用常规方式制成的片剂或菱形形式。

对于吸入施用,根据本发明使用的化合物容易以气溶胶喷射形式从压缩包装或喷雾器传递,使用适当推进物,如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟甲烷、二氧化碳或其它适当气体。在压缩气溶胶情况中,确定剂量单位是通过提供阀以传递计量量。例如可制成用于吸入器或吹入器的明胶胶囊和药筒,包含化合物和适当粉末基础如乳糖或淀粉的粉末混合物。

可制成化合物用于通过注射肠胃外施用,如通过大丸药注射或连续灌输。注射制剂可以单位剂量形式,如在安瓿或多剂量容器中,加入防腐剂。组合物可采用的形式如悬浮液、溶液或者油或含水载体中的乳剂,可包含制剂如悬浮、稳定和/或分散剂。另外,活性组成以粉末形式在使用前结合适当载体,如无热原的无菌水。

化合物也能在直肠组合物如栓剂或保留灌肠剂中制成,例如含常规栓剂基础如可可油或其它甘油酯。

除了上述制剂,化合物也可制成贮存制备。这种长作用制剂可通过移植(例如皮下或肌肉内)施用或通过肌肉内注射。因此例如,化合物能用适当聚合或疏水物质(例如作为可接受油中的乳剂)或离心交换树脂制成,或作为少量可溶衍生物,如少量可溶盐。

如果需要,组合物可在包装或分散装置中,它们包含一个或多个含活性组成的单位剂量形式。例如包装可包括金属或塑料薄片,如泡罩包装。包装或分散装置附有施用说明。

可进行本文所述方法,例如使用含至少一种本文所述特异 5-L0 核酸反应物的预包装诊断试剂盒,它可在临床环境中方便地用于预测易患心血管病的患者。

在进一步描述本发明前,要理解的是发明不限于下述发明的特定实施方案,可对特定实施方案做出改变且仍在所附权利要求范围内。同样要理解的是所用术语是为了描述特定实施方案,不用于限制。本发明范围由所附权利要求确立。

在此说明书和所附权利要求中,除非上下文另有清楚说明,单数形式包括复数。除非另外定义,本文所用全部技术和科学术语的意义与此发明所属领域普通技术人员一般理解的相同。

当提供一定范围的值时,要理解除非另有说明,到下限单位十分之一、此范围上和下限间的各干扰值、以及任何在此确定范围的其它确定或干扰值包括在罚命中。这些较小范围的上和下限可单独包括在更小范围中,同样包括在发明中,接受确定范围中任何明确排除的限制。当确定范围包括 1 个或 2 个限制时,排除 1

个或2个这些所含限制的范围也包括在发明中。

除非另有说明,本文所用全部技术和科学术语的意义与此发明所属领域普通技术人员一般理解的相同。尽管任何与本文所述类似或相当的方法、装置和材料可用于发明实践或测试,现在描述优选的方法、装置和材料。

本文所述全部出版物纳入本文供参考,用于描述和揭示出版物所述的发明试验成分,成分可结合目前所述发明使用。

实验

动脉硬化症通过低密度脂蛋白(LDL)陷入动脉壁的内皮下层并氧化来起始,导致刺激血管细胞的生物活性种类形成以产生炎症分子。这表明白细胞补充级联、进一步的脂蛋白氧化、泡沫细胞形成、坏死和纤维增生。为鉴定有助于复杂过程的基因,我们预先构建了动脉硬化症抗性小鼠品系 CAST 和易患病品系 B6 的杂交系。动脉硬化症的主要基因座在小鼠染色体 6 上鉴定,随后用名为 CON6 的同类品系确认,其中来自 CAST 的染色中央区域在 B6 背景上生长。当在 LDL 受体-无效(LDL^{-/-})背景上生长且用导致动脉硬化的食物喂养时,这些 CON6 小鼠的胰岛素水平下降且损伤形成剧烈减少。此外,骨髓移植研究表明抗性表型部分由骨髓衍生细胞赋予。

在检测可能位置候选基因的同类区域中,我们观察到 5-脂氧化酶(5-L0)图谱直接在基因座连锁峰下。5-L0 是白细胞三烯(LT)生物合成中的限速酶且主要在白细胞中表达,包括单核细胞和巨噬细胞。白细胞三烯是潜在的促炎脂类调节物,获得自花生四烯酸且影响一些病理生理情况。因此,5-L0 能通过脂氧化和/或炎症过程潜在有助于动脉硬化症发展。检测 5-L0 对动脉硬化损伤形成的作用,检测以 5-L0 在染色体 6 同类区域中的位置、炎症中的作用和在白细胞中的表达为基础。结果表明 5-L0 参与动脉硬化形成。

材料和方法

动物饲养。小鼠购自 Jackson 实验室、Bar Harbor、Maine,每笼 4 只在 25°C 以 12 小时亮/暗循环居住。持续用固型食物或高脂肪、高胆固醇食物喂养,后者含 15%脂肪、1.25%高胆固醇和 0.5%胆酸(食物号 90221, Harlan-Teklad)。用于下述实验的小鼠两种性别都有且 4 到 6 个月大。所有过程根据当前的国立卫生院指南并由 UCLA 动物研究委员会批准。

B6 背景上的 5-L0^{-/-}小鼠如上所述生长。为产生双敲除动物,5-L0^{-/-}小鼠首先

与 LDLR^{-/-}小鼠杂交(也在 B6 背景上), F1 后代与 LDLR^{-/-}小鼠回交以产生 5-LO^{+/-}/LDLR^{-/-}小鼠。这些小鼠随后互交以产生双敲除动物。尽管获得少量 5-LO^{-/-}/LDLR^{-/-}小鼠, 它们不产生后代。因此, 本文所述实验用 5-LO^{+/-}/LDLR^{-/-}小鼠进行。接着分离 5-LO^{-/-}突变, 使用对靶等位基因(neo 引物)特异的 PCR 引物(SEQ ID NO:2) 5'-ATCGCCTTCTTGACGAGTTC-3'; 用于+/+和内含子 6 中 KO 的下游引物(SEQ ID NO:3) 5'-GCAGGAAGTGGCTACTGTGGA-3'; 对 +/+ 特异的引物 (SEQ ID NO:4) 5'-TGCAACCCAGTACTCATCAAG-3'。用于 LDLR+/+等位基因的 PCR 引物是 (SEQ ID NO:5) 5'-ACCCCAAGACGTGCTCCAGGATGA-3'和 (SEQ ID NO:6) 5'-CGCAGTGCTCCTCATCTGACTTGT-3', 用于突变等位基因的 PCR 引物是 (SEQ ID NO:7) 5'-AGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGA-3'和 (SEQ ID NO:8) 5'-GAGCGGCGATAACCGTAAAGCACGAGG-3'。

血浆脂和胰岛素测量。小鼠过夜禁食且在异氟烷麻醉下眼眶后 (retroorbitally) 放血。酶测定血浆胆固醇水平如上所述进行。胰岛素水平通过 ELISA 重复测量 (Crystal Chemical IUSKRO20)。

Northern 印迹分析。总 RNA 用 Trizol 试剂 (Life Technologies Inc) 从骨髓细胞分离。RNA (10 μg) 在 1% 琼脂糖甲醛胶上跑, 转移到尼龙膜, 与 700-bp 小鼠-特异探针杂交, 探针来自 5-LO cDNA 的 3' 末端。剥下印迹并探测作为内参的 GAPDH。5-LO mRNA 水平通过磷成像定量且表达为 5-LO 与 GAPDH mRNA 的比例。

Western 印迹分析。SDS 样品缓冲液中的骨髓细胞匀浆 (80 μg 蛋白质) 在 NuPAGE 4% 到 12% 预制 SDS 聚丙烯酰胺梯度胶 (Novex) 上以厂商建议的还原条件电泳。蛋白质转移到尼龙膜, 用 5-LO、LTA₄ 水解酶或 LTB₄ ω-水解酶的抗体 (Cayman Chemical) 过夜孵育 (1:3000 稀释), 通过 ECL 检测显现 (Amersham, Little Chalfont)。Image-Quant 软件 (Molecular Dynamics) 用于定量带, 带根据 GAPDH 标准化。

测量 LTB₄ 水平。LTB₄ 水平用商业购买的 ELISA 试剂盒重复测量 (Cayman Chemical)。测定在骨髓细胞 (25 μg 蛋白质) 上进行, 细胞在 10mmol/L Tris, pH8.0 中均化。

5-LO cDNA 的序列分析。cDNA 用 Superscript rtPCR 试剂盒 (Gibco BRL) 制备自 CAST 和 B6 小鼠的腹膜巨噬细胞 RNA。用于测序的 PCR 引物如下: (SEQ ID NO:9) 5'-ATGCCCTATGCCCTCCTACTGTGAC-3' / (SEQ ID NO:10) 5'-CCACTCCATCCATCTATACTG-3'; (SEQ ID NO:11) 5'-GCAGCACAGACGTAAAGAACTG-3'; (SEQ ID NO:12) 5'-GAGGAAGTCACTGGAACGCAC; (SEQ ID NO:13) 5'-CTACGGATTCAAAGTACGACTG-3' / (SEQ ID NO:14) CAGGTACTCGGACAGCTTCTC-3'; (SEQ ID NO:15) 5'-GCTATCCAGTCGTTACGATG-

3'; SEQ ID NO:16) 5'-GCAGCACTTCGAGCTTGGAAG-3'。产物由 Laragen, Inc (Los Angeles) 纯化和测序。结果用 NCBI 上的程序分析。

分离骨髓细胞和腹膜巨噬细胞。骨髓细胞用 DMEM/5%胎牛血清 (FCS) 从小鼠大腿骨中冲洗并以 1500 RPM 离心 15 分钟(重复 3 次洗和离心)。用 DMEM/5% FCS 灌洗后分离腹膜巨噬细胞, 如用于骨髓细胞所述。

通过免疫组化测量 5-L0。如下所述, 免疫染色在来自阿朴脂蛋白 E^{-/-} (apoE^{-/-}) 和 LDLR^{-/-}小鼠的主动脉损伤恒冷箱切片上进行。另外的切片可用甲醛固定, PBS 洗, 封闭缓冲液中孵育, 接着用兔抗人 5-L0 (Cayman Chemical, Mich) 或大鼠抗小鼠 MOMA-2 (Accurate Chemical, NY) 抗血清。随后洗切片并用生物素化山羊抗兔 IgG 以 1:200 稀释孵育。充分洗后, 巨噬细胞和 5-L0 蛋白通过碱性磷酸酶用载体红 (Vector Red) 作为底物显现。进行合适的对照实验, 包括省略初次抗体。4%巯基乙酸盐 (DIFCO, MI) 注射后 3 天, 腹膜单核细胞/巨噬细胞用 20mL DMEM/5% FCS 收集。细胞以 1500 rpm 离心 15 分钟, 用培养基洗 3 次, 在载玻片上过夜培养。玻片用 1:200 稀释的兔抗人 5-L0 和苏木精染色。

主动脉损伤分析。用高脂肪、高胆固醇食物 8 周后, 小鼠被安乐死且取出心脏上部和附近大动脉, 包埋在 OCT 化合物中 (Miles 实验室) 并 -70°C 保存。收集来自主动脉弓左心室中部的连续 10 μ m-厚恒冷箱切片并置于聚-D-赖氨酸覆盖的平板上。切片用油红 O 和苏木精染色, 脂染色区域通过光学显微镜以盲方式 (blinded fashion) 计数。

骨髓移植。4 个月大 LDLR^{-/-}小鼠用作骨髓受体, 骨髓移植自 3 个月大 5-L0^{+/-}/LDLR^{-/-}小鼠或对照 LDLR^{-/-}小鼠。受体小鼠受到致命辐射, 随后经尾部静脉注射 10⁷ 个骨髓细胞, 如前所述。移植后 4 周, 分析来自血液衍生白细胞的 DNA 的靶 5-L0 等位基因存在, 动物用 8 周高脂肪、高胆固醇食物。

统计分析。小鼠组间的测量变量差异通过 ANOVA (Statview 版本 5.0) 确定。值表示为平均数 ± SEM, P < 0.05 时认为差异是统计显著。

结果

CON6 小鼠的 5-L0 表达减少。对动脉硬化损伤发展抗性的 CAST 和易受影响的 B6 小鼠间杂交的定量特性基因座图谱显示对动脉硬化症具有力效果的小鼠染色体 6 上的基因座。随后, 构建同类品系 CON6, 在 B6 背景上含来自 CAST 的基因座。同类品系几乎完全抗动脉硬化症, 甚至在导入 LDL 受体-无效突变时。这些研究定

义小鼠染色体 6 上约 45cM 和 74cM 间的基因关键区域。为补充此方法，测试基因座中的多种候选基因。5-L0 基因位于同类区域中部附近，在约 53cM。

考虑到 5-L0 和白细胞三烯的促炎性质，推断 5-L0 基因变化可参与 CON6 小鼠对动脉硬化症的抗性。为检测此可能性，定量骨髓细胞中 5-L0 mRNA 表达，此组织以前显示合成 5-L0。Northern 印迹分析用小鼠 5-L0 cDNA 探针进行，信号用磷成像仪和作为内参的 GAPDH 定量。

如图 1A 所示，LDL 受体-无效背景上的 CON6 小鼠仅表现出约 15%的 LDLR^{-/-}小鼠 mRNA 水平。类似的，CON6 小鼠与 B6 对照相比表现出非常显著的 5-L0 蛋白质水平降低，如免疫印迹分析所确定(图 1B)。印迹的光密度分析表明 CON6 小鼠具有约 25%的 B6 小鼠 5-L0 蛋白质水平。5-L0 催化花生四烯酸氧化成 5-HPETE 和 LTA₄，LTA₄ 随后通过 LTA₄ 水解酶转变成 LTB₄。如 ELISA 测定所测，CON6 小鼠中 LTB₄ 水平仅为 B6 小鼠的几个百分比(图 2A)，证明 5-L0 活性也在

CON6 小鼠中减少。LTA₄ 水解酶和 LTB₄ ω-羟化酶是来自 5-L0 的 2 个下游酶，也通过免疫印迹分析在骨髓细胞中检测到(图 2B)。LTA₄ 水解酶和 LTB₄ ω-羟化酶的蛋白质水平在 CON6 中都相对 B6 小鼠增加，表明这些酶对应于 5-L0 水平减少而上调。

B6 和 CAST 5-L0 cDNA 间的序列变化。5-L0 cDNA 的 5'UTR 和编码区是来自 B6 和 CAST 小鼠的序列以检测能影响酶合成和/或功能的可能变化(本文作为 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 提供)。5-L0 序列在 2 个品系中高度保守，仅有 6 个变化，其中 4 个不产生氨基酸取代。2 个氨基酸变化发生在残基 645 和 646，在 645 中 B6 具有异亮氨酸且 CAST 具有缬氨酸，646 中 B6 具有缬氨酸且 CAST 具有异亮氨酸。

5-L0 在动脉硬化损伤和巨噬细胞中表达。为确定 5-L0 是否存在于动脉硬化损伤，进行小鼠主动脉切片的免疫组化研究。apoE^{-/-}和 LDLR^{-/-}小鼠的近端主动脉(从主动脉底部至主动脉弓)被切片并用 5-L0 或巨噬细胞-特异标记 MOMA-2 的抗体染色(图 3)。如所预期，油红 O 染色显示 apoE^{-/-}和 LDLR^{-/-}小鼠损伤中都存在充满脂的大区域和坏死核心。巨噬细胞-特异标记 MOMA-2 染色显示单核细胞/巨噬细胞渗透入内皮下空间的位置(3A-C)。相邻切片用 5-L0 抗体染色，显示丰富的 5-L0 蛋白质染色，至少部分与单核细胞/巨噬细胞亚群发生上局部化(图 3D 到 3F)。有趣的是，5-L0 染色不在所有含单核细胞/巨噬细胞的区域中存在，如 LDLR^{-/-}切片所证明(3C 和 F)。我们接着通过用抗 5-L0 的抗血清免疫染色细胞来测试 5-L0 是否在来自 CON6 和 B6 小鼠的巨噬细胞中表达。如图 4 所示，B6 巨噬细胞表现出显著的 5-L0 染色，而 CON6 巨噬细胞染色急剧下降。

5-L0 缺乏在 LDLR^{-/-}模型中使动脉硬化症大幅减少。考虑到如表 1 所示, CON6 小鼠中主动脉损伤尺寸大幅减小且 5-L0 表达下降, 我们通过检测 5-L0 敲除小鼠中的动脉硬化症来评估损伤发展中 5-L0 的参与, 敲除小鼠在前面由 Funk 和同事构建。

5-L0-无效小鼠在 B6 背景上繁殖, LDL 受体-无效小鼠也在 B6 背景上繁殖。双敲除小鼠的频率比在孟德尔分离基础上预期的低许多, 大概因为 2 次突变与生命不相容。由于 CON6 小鼠表现出 5-L0 活性减少, 但不是没有, 我们在 LDL 受体-无效背景上检测 5-L0-无效突变的杂合小鼠。喂养固型食物或高脂肪、高胆固醇食物的 LDL^{-/-}小鼠中 5-L0 蛋白质水平没有差异(图 5)。然而, 与用固型食物喂养的 LDLR^{-/-}小鼠相比, 5-L0^{+/-}/LDL^{-/-}小鼠中 5-L0 mRNA 水平(图 1A)和蛋白质(图 5)水平减少, 小于杂合子预期的 50%。由于没有获得纯合双敲除小鼠, 可能 LDLR 和 5-L0 间有相互作用, 从而两者的破坏都导致 1 个或 2 个基因表达改变以及与生命不相容。

喂食导致动脉硬化的食物 8 周后, 观察到 5-L0 对动脉硬化症的显著效果。如所预期, 5-L0^{+/+}/LDLR^{-/-}对照小鼠有发展的大损伤, 平均面积为 153,080 ± 21,010 μm²。另一方面, 5-L0^{+/-}/LDLR^{-/-}小鼠的主动脉损伤面积仅为 5830 ± 2080 μm²(图 6A)。因此, 5-L0-无效突变的杂合小鼠中损伤尺寸减小超过 26 倍, 尽管胆固醇水平类似 LDLR^{-/-}小鼠, 大于 500mg/dL(图 6B)。当 CON6 基因座转移到 LDLR^{-/-}背景 3 时, 此动脉硬化症的减少非常类似于我们前面所观察到的, 说明 5-L0 对损伤大小有取决于剂量的效果。

LDLR^{-/-}背景上的 5-L0^{+/-}小鼠胰岛素水平下降。在前面 CAST B6 互交的研究中, 我们观察到染色体 6 上胰岛素水平的重要定量特性基因座, 与损伤形成的基因座一致。此外, CON6 品系相较 B6 小鼠胰岛素水平减小。为检测 5-L0 是否也部分作用于胰岛素与此基因座的连锁, 我们测量 5-L0^{+/-}/LDLR^{-/-}小鼠中的胰岛素水平。与损伤结果类似, LDL^{-/-}背景上 5-L0-无效等位基因的杂合小鼠与 5-L0^{+/+}/LDLR^{-/-}对照, 胰岛素水平减少 3 倍(图 7)。这表明 5-L0 基因也对调节此基因座相关胰岛素水平有作用。

骨髓移植 5-L0^{+/-}等位基因赋予动脉硬化症抗性。前面我们证明 CON6 骨髓移植到 B6 小鼠使损伤形成减少约 2 倍, 与 CON6 和 B6 品系间遗传变化部分由于白细胞功能的观念一致。为测试 5-L0^{+/-}小鼠是否对动脉硬化症有类似的骨髓-依赖效果, 我们移植 5-L0^{+/-}/LDLR^{-/-}或 5-L0^{+/+}/LDLR^{-/-}骨髓到 LDL 受体-缺乏小鼠。如前所述, 成功的移植在此过程后 4 周确认。用高脂肪、高胆固醇食物 8 周后, 移植 5-L0^{+/-}

/LDLR^{-/-}骨髓的 LDLR^{-/-}小鼠腹膜巨噬细胞中 5-L0 mRNA 保持显著下降, 指示成功的骨髓移植。

与 CON6 发现一致, 接受 5-L0^{+/-}骨髓的 LDLR^{-/-}小鼠与对照相比动脉硬化症减少 2 倍(图 8A 和 8B), 表明巨噬细胞中的 5-L0 参与损伤形成。除了获得自骨髓的动脉壁细胞假定也参与动脉硬化症, 可解释为什么移植 5-L0 缺乏骨髓不使损伤减少到与 5-L0^{+/-}整体破坏相同的程度。

本研究提供显著证据表明位置候选基因 5-L0 参与动脉硬化损伤的发展。更重要的是, 敲除模型中缺乏酶的杂合子使 LDLR^{-/-}小鼠损伤大小减少约 95%, 可能除了巨噬细胞集落刺激因子(MCSF), 效果远比任何其它基因大。酶在动脉硬化损伤的巨噬细胞丰富区充分表达, 表明 5-L0 和/或其产物可局部作用以促进损伤发展。有一些这些产物可作用的潜在机制。这些包括下列:通过 5-L0 途径生成的氧化产物产生 LDL; 生成天然配基用于核受体, 如过氧化物酶体增殖-活化受体 α (PPAR α); 经 G 蛋白-相关主要白细胞三烯受体调节的多种自分泌和旁分泌作用。这种作用可潜在影响特异免疫功能, 如其它细胞分化和迁移。

有趣的是, 注意到移植 5-L0 缺乏骨髓不使动脉硬化症减少到与 5-L0^{+/-}小鼠中观察的相同程度。一个解释是宿主骨髓细胞没有完全被破坏, 即使移植前受体接受辐射。随后受体的血细胞会因此不完全获得自供体。此外, 一些具有长半衰期的肝淋巴细胞和 Kupffer 细胞不由于移植而被取代且仍保持来自于受体。最后, 5-L0 在内皮细胞中表达, 虽然水平很低, 即使在巨噬细胞 5-L0 缺乏时能继续促进损伤发展和动脉壁炎症状态。相反, 5-L0 整体破坏大概使其在内皮细胞中的表达减少到大于巨噬细胞中的程度, 因此说明 5-L0 敲除小鼠中观察到的更大下降。

我们的研究也提供强推定证据表明 5-L0 基因变化解释 CON6 小鼠中观察到的动脉硬化症抗性。此可能性由下列证据支持: (1) 5-L0 是在其已知促炎性质基础上的合理候选; (2) 5-L0 在小鼠损伤的巨噬细胞丰富区中表达; (3) 5-L0 在 CON6 小鼠和杂合 5-L0 敲除小鼠中下降类似, 对动脉硬化症都具有相似的显著作用; (4) 胰岛素水平在 CON6 或杂合 5-L0 敲除小鼠中都减少; (5) 骨髓移植 CON6 或杂合 5-L0 敲除骨髓对 LDLR^{-/-}小鼠的动脉硬化症具有类似(约 2 到 3 倍减少)作用。

尽管大部分关于 5-L0 对 CON6 小鼠动脉硬化症作用的直接解释是表达减少, 可能结构差异也有作用。测序 B6 和 CAST 5-L0 cDNA 显示 2 个品系在位置 645 (CAST/Val; B6/Ile) 和 646 (CAST/Ile; B6/Val) 的 2 个氨基酸差异。5-L0 在哺乳动物中高度保守, 人和大鼠序列与 B6 在位置 645 和 646 的序列相同。这些取代是否影响 5-L0

功能未知，但它们可影响细胞运输 5-L0。例如，这 2 个残基在位置 639 到 656 的碱性氨基酸保守区域中，在许多蛋白质中发现从细胞溶质转移到核中。合成 639 到 656 的融合肽显示此 5-L0 中的潜在核定位序列(NLS)作为调节结构域参与核转移来自细胞溶质的酶。相反，使用含 5-L0 C-末端最后 90 个氨基酸的合成融合肽，此肽不能转移到核。由于此序列在含 NLS 的蛋白质中高度保守，这些氨基酸取代可能在调节 5-L0 转移到核中潜在重要。

动脉硬化症在动脉壁中的发展过程复杂且包括多种步骤，如脂氧化和白细胞迁移/增殖。小鼠研究表明 12/15-L0 是动脉硬化症的重要调节物，大概由于用反应氧种类“产生”LDL，导致促炎 LDL 生成。5-L0 的类花生酸产物可类似的促进脂蛋白氧化，从而有助于炎症和泡沫细胞形成。5-L0 和其产物也包含在白细胞趋化性中，可提供其在动脉硬化症中促炎作用的另一种机制。例如，5-HETE 表现出趋化活性，尽管仅以相对高的浓度。在嗜中性、树突细胞和单核细胞/巨噬细胞中，5-HETE 可转变成 5-oxo-EETE、19、20，在刺激单核细胞迁移中比 5-HETE 有效约 10 倍。此外，5-oxo-EETE 和 5-HETE 都显示对应单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)协同诱导单核细胞迁移。这些结果更相关，因为 LTB₄ 和 MCP-1 水平显示相互交叉调节。研究显示腹膜内注射 MCP-1 诱导 LTB₄ 生成，而 MCP-1 以剂量-依赖方式刺激来自小鼠腹膜巨噬细胞的 LTB₄ 生成。这些研究表明 5-L0 和其产物 LTB₄ 能通过补充单核细胞到血管壁来促进动脉硬化症。

对于 LTB₄ 活化炎症反应提出了一些机制，包括结合和活化 PPAR α 和白细胞三烯受体调节的直接 G 蛋白信号途径。PPAR α 在所有血管细胞中表达且能在血管炎症中发挥作用。例如，当用最小修饰的 LDL 或氧化磷脂刺激时，PPAR α 在小鼠主动脉内皮细胞中调节 MCP-1 合成。LTB₄ 是活化 PPAR α 和以纳摩尔范围亲和性结合的配基之一。此外，各白细胞三烯具有特异高亲和性 G 蛋白-偶联细胞表面受体，可影响分化、迁移和免疫功能。例如，LTB₄ 受体-无效突变体在嗜中性和巨噬细胞补充中有显著缺陷且表现出细胞功能改变，如钙流出的变化。因此，5-L0 和其代谢物可在动脉硬化症中发挥重要作用，作为天然核受体配基或经受体-调节的炎症信号途径。

实施例 2

在随机确定的个体研究中，我们观察到 5-L0 多态性与颈动脉内膜-介质厚度相连的证据，这是动脉硬化症确认的替代标记。因此，5-L0 中的遗传变化也可影响

人心脏病。此研究结果提供进一步证据表明炎症调节物可在动脉硬化症中发挥重要作用且提供实现新治疗策略的途径，因为发展了 5-L0 的有效抑制剂。

在上面小鼠研究基础上，评估 5L0 基因对人动脉硬化症的作用。这些结果证明 5L0 也参与人的冠心病 (CAD) 和糖尿病易感性。例如，我们观察到一些 5L0 基因形式 (定义为缺失等位基因) 在 CAD 患者中 3 倍于对照受试者中所发现的 (9% 相对 3%； $P < 0.4$ ；表 2)。5-L0 基因型的命名讨论于 Drazen 等，(1999) 同上。基因型通过启动子区域中 Sp1 重复数确定，其中 3 和 4 个重复称为“D”或缺失等位基因。5 个重复是“N”或正常等位基因；6 个重复是“A”或加入等位基因。基因型如 Drazen 等，所列进行。尽管风险组仅为群体的约 9%，由于 CAD 如此普遍因而这具有重要的卫生保健意义。

表 2

CAD 和 5-L0 基因型

	不是 CAD	是 CAD	总体
DD	16	5*	21
DN	132	18	150
NN	350	32	382
总体	498	55	553

*P 值为 0.04, $\chi^2=6.263$

缺失等位基因也导致明显更高的禁食胰岛素水平 (图 9) 以及胰岛素抗性 (HOMA 分析；图 10)，两者都是已知的糖尿病风险因素。一起考虑，这些结果强烈说明 5L0 基因中的遗传变化有助于人群中 CAD-相关特性，缺失等位基因使个体易患 CAD 和糖尿病。考虑到美国和其它西方社会中 CAD 的重要性和频率，我们相信鉴定携带 CAD 的个体可用作一般群体中有益和有利的筛选测试或用于已有发展 CAD 风险的人。

我们发展了可用作诊断 DNA 测试的方法以确定个体具有的 5L0 基因形式。使用 PCR 扩增来自个体的 5L0 基因部分。在此扩增片段大小基础上，能确定个体是否携带 5L0 基因的正常形式 (野生型等位基因) 或变化形式 (缺失等位基因)。目前没有遗传测试用于 CAD 或糖尿病的普遍形式，迄今为止说明大部分个体经历的心脏病发作。考虑到 CAD 和糖尿病的重要性和普遍性，我们相信这是第 1 个能广泛用于鉴定群体中风险个体的测试。

显然本发明提供方便和有效的方法确定患者是否易患动脉硬化症和高血糖症。方法提供一些益处，包括防止性治疗和饮食。这样，本发明对本领域做出重要贡献。

本说明书引用的所有出版物和专利申请纳入本文供参考，好象各单独出版物或专利申请被特别和单独指示纳入供参考。引用任何归档日期前的出版物揭示且不应作为允许使本发明由于前面的发明而不能先于这些出版物授权。

尽管前述发明通过说明和例子详细描述用于使理解清晰，对本领域普通技术人员显然的是可根据本发明教授作出一些变化和修改而不离开所附权利要求的精神或范围。

<110> M.梅拉比恩(Margarete Mehrabian)
 A.J.鲁西斯(Hooman Allayee)
 H.阿拉耶(Aldons J. Lasis)

<120> 鉴定5-脂氧化酶作为引起动脉硬化症的主要基因

<130> UCLA-004W0

<150> 60/335,244

<151> 2001-10-24

<160> 18

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2497

<212> DNA

<213> 智人(H.sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (45)...(2069)

<223> 野生型5LO编码序列

<400> 1

```

gggcgccgag gctccccgcc gctcgtctgct ccccgcccg cgcc atg ccc tcc tac      56
                                         Met Pro Ser Tyr
                                         1

acg gtc acc gtg gcc act ggc agc cag tgg ttc gcc ggc act gac gac      104
Thr Val Thr Val Ala Thr Gly Ser Gln Trp Phe Ala Gly Thr Asp Asp
  5                10                15                20

tac atc tac ctc agc ctc gtg ggc tgc gcg ggc tgc agc gag aag cac      152
Tyr Ile Tyr Leu Ser Leu Val Gly Ser Ala Gly Cys Ser Glu Lys His
                25                30                35

ctg ctg gac aag ccc ttc tac aac gac ttc gag cgt ggc gcg gtg gat      200
Leu Leu Asp Lys Pro Phe Tyr Asn Asp Phe Glu Arg Gly Ala Val Asp
                40                45                50

tca tac gac gtg act gtg gac gag gaa ctg ggc gag atc cag ctg gtc      248
Ser Tyr Asp Val Thr Val Asp Glu Glu Leu Gly Glu Ile Gln Leu Val
                55                60                65

aga atc gag aag cgc aag tac tgg ctg aat gac gac tgg tac ctg aag      296
Arg Ile Glu Lys Arg Lys Tyr Trp Leu Asn Asp Asp Trp Tyr Leu Lys
                70                75                80

tac atc acg ctg aag acg ccc cac ggg gac tac atc gag ttc ccc tgc      344
Tyr Ile Thr Leu Lys Thr Pro His Gly Asp Tyr Ile Glu Phe Pro Cys
  85                90                95                100

tac cgc tgg atc acc ggc gat gtc gag gtt gtc ctg agg gat gga cgc      392
Tyr Arg Trp Ile Thr Gly Asp Val Glu Val Val Leu Arg Asp Gly Arg
                105                110                115

```

gca aag ttg gcc cga gat gac caa att cac att ctc aag caa cac cga Ala Lys Leu Ala Arg Asp Asp Gln Ile His Ile Leu Lys Gln His Arg 120 125 130	440
cgt aaa gaa ctg gaa aca cgg caa aaa caa tat cga tgg atg gag tgg Arg Lys Glu Leu Glu Thr Arg Gln Lys Gln Tyr Arg Trp Met Glu Trp 135 140 145	488
aac cct ggc ttc ccc ttg agc atc gat gcc aaa tgc cac aag gat tta Asn Pro Gly Phe Pro Leu Ser Ile Asp Ala Lys Cys His Lys Asp Leu 150 155 160	536
ccc cgt gat atc cag ttc gat agt gaa aaa gga gtg gac ttt gtt ctg Pro Arg Asp Ile Gln Phe Asp Ser Glu Lys Gly Val Asp Phe Val Leu 165 170 175 180	584
aat tac tcc aaa gcg atg gag aac ctg ttc atc aac cgc ttc atg cac Asn Tyr Ser Lys Ala Met Glu Asn Leu Phe Ile Asn Arg Phe Met His 185 190 195	632
atg ttc cag tct tct tgg aat gac ttc gcc gac ttt gag aaa atc ttt Met Phe Gln Ser Ser Trp Asn Asp Phe Ala Asp Phe Glu Lys Ile Phe 200 205 210	680
gtc aag atc agc aac act att tct gag cgg gtc atg aat cac tgg cag Val Lys Ile Ser Asn Thr Ile Ser Glu Arg Val Met Asn His Trp Glu 215 220 225	728
gaa gac ctg atg ttt ggc tac cag ttc ctg aac ggc tgc aac cct gtg Glu Asp Leu Met Phe Gly Tyr Gln Phe Leu Asn Gly Cys Asn Pro Val 230 235 240	776
ttg atc cgg cgc tgc aca gag ctg ccc gag aag ctc ccg gtg acc acg Leu Ile Arg Arg Cys Thr Glu Leu Pro Glu Lys Leu Pro Val Thr Thr 245 250 255 260	824
gag atg gta gag tgc agc ctg gag cgg cag ctc agc ttg gag cag gag Glu Met Val Glu Cys Ser Leu Glu Arg Gln Leu Ser Leu Glu Gln Glu 265 270 275	872
gtc cag caa ggg aac att ttc atc gtg gac ttt gag ctg ctg gat ggc Val Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ile Val Asp Phe Glu Leu Leu Asp Gly 280 285 290	920
atc gat gcc aac aaa aca gac ccc tgc aca ctc cag ttc ctg gcc gct Ile Asp Ala Asn Lys Thr Asp Pro Cys Thr Leu Gln Phe Leu Ala Ala 295 300 305	968
ccc atc tgc ttg ctg tat aag aac ctg gcc aac aag att gtc ccc att Pro Ile Cys Leu Leu Tyr Lys Asn Leu Ala Asn Lys Ile Val Pro Ile 310 315 320	1016
gcc atc cag ctc aac caa atc ccg gga gat gag aac cct att ttc ctc Ala Ile Gln Leu Asn Gln Ile Pro Gly Asp Glu Asn Pro Ile Phe Leu 325 330 335 340	1064
cct tcg gat gca aaa tac gac tgg ctt ttg gcc aaa atc tgg gtg cgt Pro Ser Asp Ala Lys Tyr Asp Trp Leu Leu Ala Lys Ile Trp Val Arg 345 350 355	1112

tcc agt gac ttc cac gtc cac cag acc atc acc cac ctt ctg cga aca Ser Ser Asp Phe His Val His Gln Thr Ile Thr His Leu Leu Arg Thr 360 365 370	1160
cat ctg gtg tct gag gtt ttc ggc att gca atg tac cgc cag ctg cct His Leu Val Ser Glu Val Phe Gly Ile Ala Met Tyr Arg Gln Leu Pro 375 380 385	1208
gct gtg cac ccc att ttc aag ctg ctg gtg gca cac gtg aga ttc acc Ala Val His Pro Ile Phe Lys Leu Leu Val Ala His Val Arg Phe Thr 390 395 400	1256
att gca atc aac acc aag gcc cgt gag cag ctc atc tgc gag tgt ggc Ile Ala Ile Asn Thr Lys Ala Arg Glu Gln Leu Ile Cys Glu Cys Gly 405 410 415 420	1304
ctc ttt gac aag gcc aac gcc aca ggg ggc ggt ggg cac gtg cag atg Leu Phe Asp Lys Ala Asn Ala Thr Gly Gly Gly Gly His Val Gln Met 425 430 435	1352
gtg cag agg gcc atg aag gac ctg acc tat gcc tcc ctg tgc ttt ccc Val Gln Arg Ala Met Lys Asp Leu Thr Tyr Ala Ser Leu Cys Phe Pro 440 445 450	1400
gag gcc atc aag gcc cgg ggc atg gag agc aaa gaa gac atc ccc tac Glu Ala Ile Lys Ala Arg Gly Met Glu Ser Lys Glu Asp Ile Pro Tyr 455 460 465	1448
tac ttc tac cgg gac gac ggg ctc ctg gtg tgg gaa gcc atc agg acg Tyr Phe Tyr Arg Asp Asp Gly Leu Leu Val Trp Glu Ala Ile Arg Thr 470 475 480	1496
ttc acg gcc gag gtg gta gac atc tac tac gag ggc gac cag gtg gtg Phe Thr Ala Glu Val Val Asp Ile Tyr Tyr Glu Gly Asp Gln Val Val 485 490 495 500	1544
gag gag gac ccg gag ctg cag gac ttc gtg aac gat gtc tac gtg tac Glu Glu Asp Pro Glu Leu Gln Asp Phe Val Asn Asp Val Tyr Val Tyr 505 510 515	1592
ggc atg cgg ggc cgc aag tcc tca ggc ttc ccc aag tcg gtc aag agc Gly Met Arg Gly Arg Lys Ser Ser Gly Phe Pro Lys Ser Val Lys Ser 520 525 530	1640
cgg gag cag ctg tgg gag tac ctg acc gtg gtg atc ttc acc gcc tcc Arg Glu Gln Leu Ser Glu Tyr Leu Thr Val Val Ile Phe Thr Ala Ser 535 540 545	1688
gcc cag cac gcc gcg gtc aac ttc ggc cag tac gac tgg tgc tcc tgg Ala Gln His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Asp Trp Cys Ser Trp 550 555 560	1736
atc ccc aat gcg ccc cca acc atg cga gcc ccg cca ccg act gcc aag Ile Pro Asn Ala Pro Pro Thr Met Arg Ala Pro Pro Pro Thr Ala Lys 565 570 575 580	1784
ggc gtg gtg acc att gag cag atc gtg gac acg ctg ccc gac cgc ggc Gly Val Val Thr Ile Glu Gln Ile Val Asp Thr Leu Pro Asp Arg Gly 585 590 595	1832

cgc tcc tgc tgg cat ctg ggt gca gtg tgg gcg ctg agc sag ttc cag	1980
Arg Ser Cys Trp His Leu Gly Ala Val Trp Ala Leu Ser Gln Phe Gln	
600 605 610	
gaa aac gag ctg ttc ctg ggc atg tac cca gaa gag cat ttt atc gag	1928
Glu Asn Glu Leu Phe Leu Gly Met Tyr Pro Glu Glu His Phe Ile Glu	
615 620 625	
aag cct gtg aag gaa gcc atg gcc cga ttc cgc aag aac ctc gag gcc	1976
Lys Pro Val Lys Glu Ala Met Ala Arg Phe Arg Lys Asn Leu Glu Ala	
630 635 640	
att gtc agc gtg att gct gag cgc aac aag aag aag cag ctg cca tat	2024
Ile Val Ser Val Ile Ala Glu Arg Asn Lys Lys Lys Gln Leu Pro Tyr	
645 650 655 660	
tac tac ttg tcc cca gac cgg att ccg aac agt gtg gcc atc tga	2069
Tyr Tyr Leu Ser Pro Asp Arg Ile Pro Asn Ser Val Ala Ile *	
665 670	
gcacactgcc agtctcactg tgggaaggcc agctgccccca gccagatgga ctccagcctg	2129
cctggcaggc tgtctggcca ggctcttgg cagtcacatc tcttctccg aggccagtac	2189
ctttccattt attctttgat cttcaggga ctgcatagat tgtatcaaag tgtaaacacc	2249
atagggaccc attctacaca gagcaggact gcacaggcgt cctgtccaca ccagctcag	2309
catttcacaca ccaagcagca acagcaaatac acgaccactg atagatgtct attcttgtg	2369
gagacatgg atgattattt tctgttctat ttgtgcttag tccaattcct tgcacatagt	2429
aggtacccaa ttcaattact attgaatgaa ttaagaattg gttgccataa aaataaatca	2489
gttcattt	2497
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 2	
atgccttct tgacgagtc	20
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 3	
gcaggaagtg gctactgtgg a	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 4	
tgcaaccag tactcatcaa g	21
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 5	
acccaagac gtgctcccag gatga	25
<210> 6	

<211> 24	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 6	
cgcagtgctc ctcatctgac ttgt	24
<210> 7	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 7	
aggatctcgt cgtgacccat ggcca	25
<210> 8	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 8	
gagcggcgat accgtaaagc acgagg	26
<210> 9	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 9	
atgccctatg ccctcctaca ctgtcac	27
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 10	
ccaactccatc catctatact g	21
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 11	
gcagcacaga cgtaaagaac tg	22
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 12	
gaggaagtca ctggaacgca c	21
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 小鼠(M.musculus)	
<400> 13	
ctacggattc aaagtacgac tg	22

```

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠(M.musculus)

<400> 14
caggctactcg gacagcttct c                               21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠(M.musculus)

<400> 15
gctatccagt cgttcacgat g                               21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠(M.musculus)

<400> 16
gcagcacttc gagcttgaa g                               21

<210> 17
<211> 2107
<212> DNA
<213> 小鼠(M.musculus)

<220>
<221> CDS
<222> (83)...(2107)
<223> 小鼠的CAST品系, 编码序列

<221> misc_feature
<222> (1)...(2107)
<223> n = A,T,C 或 G

<400> 17
agggtcaana agttggtggg ctgccacgcc gagcttcgcg ggctcntgcg cccacgccag   60
cagcaccac ttgcccggtg tc atg ccc tcc tac acg gtc acc gtg gcc acc   112
                               Met Pro Ser Tyr Thr Val Thr Val Ala Thr
                               1                               5                               10

ggc agc cag tgg ttc gcg ggc acc gac gac tac atc tac ctc agc ctc   160
Gly Ser Gln Trp Phe Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Ile Tyr Leu Ser Leu
                               15                               20                               25

att ggc tct gcg ggc tgt agc gag aag cat ctg ctg gac aag gca ttc   208
Ile Gly Ser Ala Gly Cys Ser Glu Lys His Leu Leu Asp Lys Ala Phe
                               30                               35                               40

tac aat gac ttc gaa cgt ggc gcg gtg gac tcc tac gat gtc act gtg   256
Tyr Asn Asp Phe Glu Arg Gly Ala Val Asp Ser Tyr Asp Val Thr Val
                               45                               50                               55

gat gag gag ctg ggc gag atc tac cta gtc aaa att gag aag cgc aaa   304
Asp Glu Glu Leu Gly Glu Ile Tyr Leu Val Lys Ile Glu Lys Arg Lys
                               60                               65                               70

```

tac tgg ctc cat gat gac tgg tac ctg aag tac atc aca ctg aag aca Tyr Trp Leu His Asp Asp Trp Tyr Leu Lys Tyr Ile Thr Leu Lys Thr 75 80 85 90	352
ccc cac ggg gac tac atc gag ttc cca tgt tac cgc tgg atc aca ggc Pro His Gly Asp Tyr Ile Glu Phe Pro Cys Tyr Arg Trp Ile Thr Gly 95 100 105	400
gag ggc gag att gtc ctg agg gat gga cgt gca aaa ttg gcc cga gat Glu Gly Glu Ile Val Leu Arg Asp Gly Arg Ala Lys Leu Ala Arg Asp 110 115 120	448
gac caa att cac atc ctc aag cag cac aga cgt aaa gaa ctg gag gca Asp Gln Ile His Ile Leu Lys Gln His Arg Arg Lys Glu Leu Glu Ala 125 130 135	496
cgg caa aaa cag tat cga tgg atg gag tgg aac ccc ggc ttc cct ttg Arg Gln Lys Gln Tyr Arg Trp Met Glu Trp Asn Pro Gly Phe Pro Leu 140 145 150	544
agt atc gat gcc aaa tgc cac aag gat ctg ccc cga gat atc cag ttt Ser Ile Asp Ala Lys Cys His Lys Asp Leu Pro Arg Asp Ile Gln Phe 155 160 165 170	592
gat agt gaa aaa gga gtg gac ttt gtt ctg aac tac tca aaa gcg atg Asp Ser Glu Lys Gly Val Asp Phe Val Leu Asn Tyr Ser Lys Ala Met 175 180 185	640
gag aac ctg ttc atc aac cgc ttc atg cac atg ttc cag tct tcc tgg Glu Asn Leu Phe Ile Asn Arg Phe Met His Met Phe Gln Ser Ser Trp 190 195 200	688
cac gac ttt gct gac ttt gag aaa atc ttc gtc aaa atc agc aac act His Asp Phe Ala Asp Phe Glu Lys Ile Phe Val Lys Ile Ser Asn Thr 205 210 215	736
ata tct gag cga gtc aag aac cac tgg cag gaa gac ctc atg ttt ggc Ile Ser Glu Arg Val Lys Asn His Trp Gln Glu Asp Leu Met Phe Gly 220 225 230	784
tac cag ttc ctg aat ggc tgc aac cca gta ctc atc aag cgc tgc aca Tyr Gln Phe Leu Asn Gly Cys Asn Pro Val Leu Ile Lys Arg Cys Thr 235 240 245 250	832
gcg ttg ccc ccg aag ctc cca gtg acc aca gag atg gtg gag tgc agc Ala Leu Pro Pro Lys Leu Pro Val Thr Thr Glu Met Val Glu Cys Ser 255 260 265	880
cta gag cgg cag ctc agt tta gaa cag gaa gta cag gaa ggg aac att Leu Glu Arg Gln Leu Ser Leu Glu Gln Glu Val Gln Glu Gly Asn Ile 270 275 280	928
ttc atc gtt gat tac gag cta ctg gat ggc atc gat gct aac aaa act Phe Ile Val Asp Tyr Glu Leu Leu Asp Gly Ile Asp Ala Asn Lys Thr 285 290 295	976
gac ccc tgt aca cac cag ttc ctg gct gcc ccc atc tgc ctg cta tat Asp Pro Cys Thr His Gln Phe Leu Ala Ala Pro Ile Cys Leu Leu Tyr 300 305 310	1024

aag aac cta gcc aac aag att gtt ccc att gcc atc cag ctc aac caa	1072
Lys Asn Leu Ala Asn Lys Ile Val Pro Ile Ala Ile Gln Leu Asn Gln	
315 320 325 330	
acc cct gga gag agt aac cca atc ttc ctc cct acg gat tca aag tac	1120
Thr Pro Gly Glu Ser Asn Pro Ile Phe Leu Pro Thr Asp Ser Lys Tyr	
335 340 345	
gac tgg ctt ttg gcc aaa atc tgg gtg cgt tcc agt gac ttc cac gtc	1168
Asp Trp Leu Leu Ala Lys Ile Trp Val Arg Ser Ser Asp Phe His Val	
350 355 360	
cat caa acg atc acc cac ctt ctg cgc acg cat ctg gtg tct gag gtg	1216
His Gln Thr Ile Thr His Leu Leu Arg Thr His Leu Val Ser Glu Val	
365 370 375	
ttt ggt atc gcc atg tac cgc cag ctg cct gct gtg cat ccc ctt ttc	1264
Phe Gly Ile Ala Met Tyr Arg Gln Leu Pro Ala Val His Pro Leu Phe	
380 385 390	
aag ctg ctg gta gcc cat gtg agg ttc acc att gct atc aac act aag	1312
Lys Leu Leu Val Ala His Val Arg Phe Thr Ile Ala Ile Asn Thr Lys	
395 400 405 410	
gcc cgg gaa cag ctt atc tgc gag tat ggc ctt ttc gac aag gcc aat	1360
Ala Arg Glu Gln Leu Ile Cys Glu Tyr Gly Leu Phe Asp Lys Ala Asn	
415 420 425	
gcc acc ggg ggt gga ggg cac gtg cag atg gtg cag agg gct gtc cag	1408
Ala Thr Gly Gly Gly Gly His Val Gln Met Val Gln Arg Ala Val Gln	
430 435 440	
gat ctg acc tat tcc tcc ctg tgt ttc ccg gag gcc atc aag gcc cgg	1456
Asp Leu Thr Tyr Ser Ser Leu Cys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Ala Arg	
445 450 455	
ggc atg gac agc acg gaa gac atc ccc ttc tac ttc tat cgt gat gat	1504
Gly Met Asp Ser Thr Glu Asp Ile Pro Phe Tyr Phe Tyr Arg Asp Asp	
460 465 470	
gga ctg ctc gtg tgg gag gct atc cag tcg ttc aca atg gag gtg gtg	1552
Gly Leu Leu Val Trp Glu Ala Ile Gln Ser Phe Thr Met Glu Val Val	
475 480 485 490	
agc atc tac tat gag aac gac cag gtg gtg gag gag gac cag gaa ctg	1600
Ser Ile Tyr Tyr Glu Asn Asp Gln Val Val Glu Glu Asp Gln Glu Leu	
495 500 505	
cag gac ttc gtg aag gat gtt tac gtg tac ggc atg cgg ggc aaa aag	1648
Gln Asp Phe Val Lys Asp Val Tyr Val Tyr Gly Met Arg Gly Lys Lys	
510 515 520	
gcc tca ggt ttc ccc aag tcc atc aag agc agg gag aag ctg tcc gag	1696
Ala Ser Gly Phe Pro Lys Ser Ile Lys Ser Arg Glu Lys Leu Ser Glu	
525 530 535	
tac ctg acg gtg gtg atc ttc acg gcc tct gcc cag cat gca gct gta	1744
Tyr Leu Thr Val Val Ile Phe Thr Ala Ser Ala Gln His Ala Ala Val	
540 545 550	

```

aac ttc ggc cag tat gac tgg tgc tcc tgg atc ccc aac gct cct cca      1792
Asn Phe Gly Gln Tyr Asp Trp Cys Ser Trp Ile Pro Asn Ala Pro Pro
555                               560                               565                               570

act atg cgg gcc cca cca ccc acg gcc aag ggt gtg gtc acc atc gag      1840
Thr Met Arg Ala Pro Pro Pro Thr Ala Lys Gly Val Val Thr Ile Glu
                               575                               580                               585

cag atc gtg gat act cta cca gac cgt ggc cga tca tgt tgg cat cta      1888
Gln Ile Val Asp Thr Leu Pro Asp Arg Gly Arg Ser Cys Trp His Leu
                               590                               595                               600

ggt gca gtg tgg gcc ttg agc cag ttt caa gaa aat gag ctg ttt cta      1936
Gly Ala Val Trp Ala Leu Ser Gln Phe Gln Glu Asn Glu Leu Phe Leu
                               605                               610                               615

ggc atg tac cca gag gag cat ttc att gag aag cca gtg aag gaa gcc      1984
Gly Met Tyr Pro Glu Glu His Phe Ile Glu Lys Pro Val Lys Glu Ala
620                               625                               630

atg atc cga ttc cgc aag aac ctg gag gcc gtc atc agc gtg atc gcc      2032
Met Ile Arg Phe Arg Lys Asn Leu Glu Ala Val Ile Ser Val Ile Ala
635                               640                               645                               650

gag cgc aat aag aac aaa aag ctc ccc tac tac tac cag tca cca gac      2080
Glu Arg Asn Lys Asn Lys Lys Leu Pro Tyr Tyr Tyr Leu Ser Pro Asp
                               655                               660                               665

agg att ccc aac agt gta gcc atc taa      2107
Arg Ile Pro Asn Ser Val Ala Ile *
                               670

```

<210> 18
 <211> 2107
 <212> DNA
 <213> 小鼠(M.musculus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (83)...(2107)
 <223> B6品系编码序列

```

<400> 18
agggtcaaga agttggtggg ctgccacgcc gagcttcgcg ggctcctgct cccacaccag      60
cagcaactcac ttgcccgag tc atg ccc tcc tac acg gtc acc gtg gcc acc      112
                               1                               5                               10

ggc agc cag tgg ttc gcg ggc acc gac gac tac atc tac ctc agc ctc      160
Gly Ser Gln Trp Phe Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Ile Tyr Ieu Ser Leu
                               15                               20                               25

att ggc tct gcg ggc tgt agc gag aag cat ctg ctg gac aag gca ttc      208
Ile Gly Ser Ala Gly Cys Ser Glu Lys His Leu Leu Asp Lys Ala Phe
                               30                               35                               40

tac aat gac ttc gaa cgg ggc gcg gtg gac tcc tac gat gtc acc gtg      256
Tyr Asn Asp Phe Glu Arg Gly Ala Val Asp Ser Tyr Asp Val Thr Val
                               45                               50                               55

```

gat gag gag ctg ggc gag atc tac cta gtc aaa att gag aag cgc aaa Asp Glu Glu Leu Gly Glu Ile Tyr Leu Val Lys Ile Glu Lys Arg Lys 60 65 70	304
tac tgg ctc cat gat gac tgg tac ctg aag tac atc aca ctg aag aca Tyr Trp Leu His Asp Asp Trp Tyr Leu Lys Tyr Ile Thr Leu Lys Thr 75 80 85 90	352
ccc cac ggg gac tac atc gag ttc cca tgt tac cgc tgg atc aca ggc Pro His Gly Asp Tyr Ile Glu Phe Pro Cys Tyr Arg Trp Ile Thr Gly 95 100 105	400
gag ggc gag att gtc ctg agg gat gga cgt gca aaa ttg gcc cga gat Glu Gly Glu Ile Val Leu Arg Asp Gly Arg Ala Lys Leu Ala Arg Asp 110 115 120	448
gac caa att cac atc ctc aag cag cac aga cgt aaa gaa ctg gag gca Asp Gln Ile His Ile Leu Lys Gln His Arg Arg Lys Glu Leu Glu Ala 125 130 135	496
cgg caa aaa cag tat aga tgg atg gag tgg aac ccc ggc ttc cct ttg Arg Gln Lys Gln Tyr Arg Trp Met Glu Trp Asn Pro Gly Phe Pro Leu 140 145 150	544
agt att gat gcc aaa tgc cac aag gat ctg ccc cga gat atc cag ttt Ser Ile Asp Ala Lys Cys His Lys Asp Leu Pro Arg Asp Ile Gln Phe 155 160 165 170	592
gat agt gaa aaa gga gtg gac ttt gtt ctg aac tac tca aaa gcg atg Asp Ser Glu Lys Gly Val Asp Phe Val Leu Asn Tyr Ser Lys Ala Met 175 180 185	640
gag aac ctg ttc atc aac cgc ttc atg cac atg ttc cag tct tcc tgg Glu Asn Leu Phe Ile Asn Arg Phe Met His Met Phe Gln Ser Ser Trp 190 195 200	688
cac gac ttt gct gac ttt gag aaa atc ttc gtc aaa atc agc aac act His Asp Phe Ala Asp Phe Glu Lys Ile Phe Val Lys Ile Ser Asn Thr 205 210 215	736
ata tct gag cga gtc aag aac cac tgg cag gaa gac ctc atg ttt ggc Ile Ser Glu Arg Val Lys Asn His Trp Gln Glu Asp Leu Met Phe Gly 220 225 230	784
tac cag ttc ctg aat ggc tgc aac cca gta ctc atc aag cgc tgc aca Tyr Gln Phe Leu Asn Gly Cys Asn Pro Val Leu Ile Lys Arg Cys Thr 235 240 245 250	832
gcg ttg ccc ccg aag ctc cca gtg acc aca gag atg gtg gag tgc agc Ala Leu Pro Pro Lys Leu Pro Val Thr Thr Glu Met Val Glu Cys Ser 255 260 265	880
cta gag cgg cag ctc agt tta gaa cag gaa gta cag gaa ggg aac att Leu Glu Arg Gln Leu Ser Leu Glu Gln Glu Val Gln Glu Gly Asn Ile 270 275 280	928
ttc atc gtt gat tac gag cta ctg gat ggc atc gat gct aac aaa act Phe Ile Val Asp Tyr Glu Leu Leu Asp Gly Ile Asp Ala Asn Lys Thr 285 290 295	976

gac ccc tgt aca cac cag ttc ctg gct gcc ccc atc tgc ctg cta tat	1024
Asp Pro Cys Thr His Gln Phe Leu Ala Ala Pro Ile Cys Leu Leu Tyr	
300 305 310	
aag aac cta gcc aac aag att gtt ccc att gcc atc cag ctc aac caa	1072
Lys Asn Leu Ala Asn Lys Ile Val Pro Ile Ala Ile Gln Leu Asn Gln	
315 320 325 330	
acc cct gga gag agt aac cca atc ttc ctc cct acg gat tca aag tac	1120
Thr Pro Gly Glu Ser Asn Pro Ile Phe Leu Pro Thr Asp Ser Lys Tyr	
335 340 345	
gac tgg ctt ttg gcc aaa atc tgg gtg cgt tcc agt gac ttc cac gtc	1168
Asp Trp Leu Leu Ala Lys Ile Trp Val Arg Ser Ser Asp Phe His Val	
350 355 360	
cat caa acg atc acc cac ctt ctg cgc acg cat ctg gtg tct gag gtg	1216
His Gln Thr Ile Thr His Leu Leu Arg Thr His Leu Val Ser Glu Val	
365 370 375	
ttt ggt atc gcc atg tac cgc cag ctg cct gct gtg cat ccc ctt ttc	1264
Phe Gly Ile Ala Met Tyr Arg Gln Leu Pro Ala Val His Pro Leu Phe	
380 385 390	
aag ctg ctg gta gcc cat gtg agg ttc acc att gct atc aac act aag	1312
Lys Leu Leu Val Ala His Val Arg Phe Thr Ile Ala Ile Asn Thr Lys	
395 400 405 410	
gcc cgg gaa cag ctt atc tgc gag tat ggc ctt ttt gac aag gcc aat	1360
Ala Arg Glu Gln Leu Ile Cys Glu Tyr Gly Leu Phe Asp Lys Ala Asn	
415 420 425	
gcc acc ggg ggt gga ggg cac gtg cag atg gtg cag agg gct gtc cag	1408
Ala Thr Gly Gly Gly Gly His Val Gln Met Val Gln Arg Ala Val Gln	
430 435 440	
gat ctg acc tat tcc tcc ctg tgt ttc ccg gag gcc atc aag gcc cgg	1456
Asp Leu Thr Tyr Ser Ser Leu Cys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Ala Arg	
445 450 455	
ggc atg gac agc acg gaa gac atc ccc ttc tac ttc tat cgt gat gat	1504
Gly Met Asp Ser Thr Glu Asp Ile Pro Phe Tyr Phe Tyr Arg Asp Asp	
460 465 470	
gga ctg ctc gtg tgg gag gct atc cag tcc ttc aca atg gag gtg gtg	1552
Gly Leu Leu Val Trp Glu Ala Ile Gln Ser Phe Thr Met Glu Val Val	
475 480 485 490	
agc atc tac tat gag aac gac cag gtg gtg gag gag gac cag gaa ctg	1600
Ser Ile Tyr Tyr Glu Asn Asp Gln Val Val Glu Glu Asp Gln Glu Leu	
495 500 505	
cag gac ttc gtg aag gat gtt tac gtg tac ggc atg cgg ggc aaa aag	1648
Gln Asp Phe Val Lys Asp Val Tyr Val Tyr Gly Met Arg Gly Lys Lys	
510 515 520	
gcc tca ggt ttc ccc aag tcc atc aag agc agg gag aag ctg tcc gag	1696
Ala Ser Gly Phe Pro Lys Ser Ile Lys Ser Arg Glu Lys Leu Ser Glu	
525 530 535	

tac ctg acg gtg gtg atc ttc acg gcc tct gcc cag cat gca gct gta Tyr Leu Thr Val Val Ile Phe Thr Ala Ser Ala Gln His Ala Ala Val 540 545 550	1744
aac ttc ggc cag tat gac tgg tgc tcc tgg atc ccc aac gct cct cca Asn Phe Gly Gln Tyr Asp Trp Cys Ser Trp Ile Pro Asn Ala Pro Pro 555 560 565 570	1792
act atg cgg gcc cca cca ccc acg gcc aag ggt gtg gtc acc atc gag Thr Met Arg Ala Pro Pro Thr Ala Lys Gly Val Val Thr Ile Glu 575 580 585	1840
cag atc gtg gat act cta cca gac cgt gcc cga tca tgt tgg cat cta Gln Ile Val Asp Thr Leu Pro Asp Arg Gly Arg Ser Cys Trp His Leu 590 595 600	1888
ggt gca gtg tgg gcc ttg agc cag ttt caa gaa aat gag ctg ttt cta Gly Ala Val Trp Ala Leu Ser Gln Phe Gln Glu Asn Glu Leu Phe Leu 605 610 615	1936
ggc atg tac cca gag gag cat ttc att gag aag cca gtg aag gaa gcc Gly Met Tyr Pro Glu Glu His Phe Ile Glu Lys Pro Val Lys Glu Ala 620 625 630	1984
atg atc cga ttc cgc aag aac ctg gag gcc atc gtc agc gtg atc gcc Met Ile Arg Phe Arg Lys Asn Leu Glu Ala Ile Val Ser Val Ile Ala 635 640 645 650	2032
gag cgc aat aag aac aaa aag ctc ccc tac tac tac ctg tca cca gac Glu Arg Asn Lys Asn Lys Lys Leu Pro Tyr Tyr Tyr Leu Ser Pro Asp 655 660 665	2080
agg att ccc aac agt gta gcc atc taa Arg Ile Pro Asn Ser Val Ala Ile + 670	2107

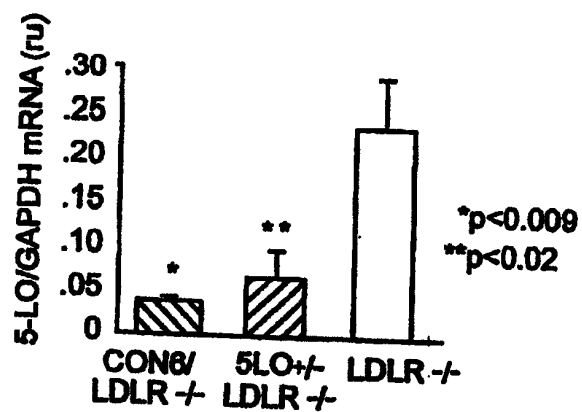


图 1A

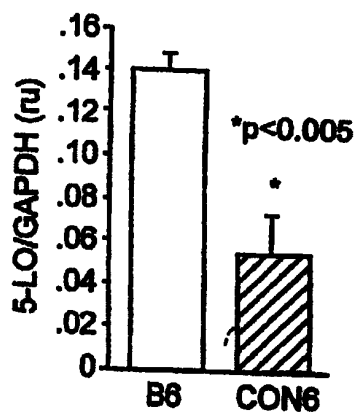


图 1B

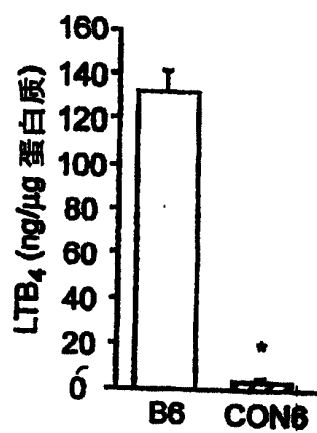


图 2A

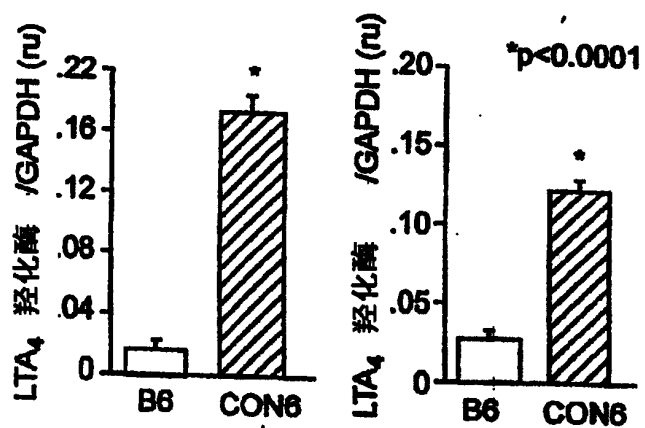


图 2B



图 3A



图 3D

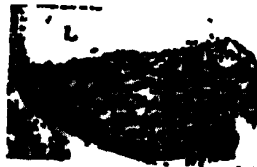


图 3B



图 3E

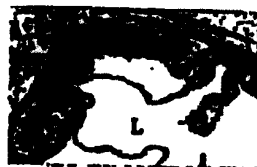


图 3C



图 3F

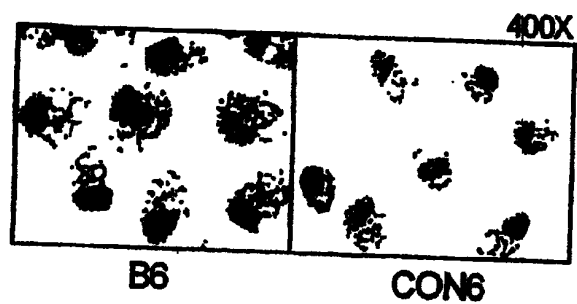


图 4A 图 4B

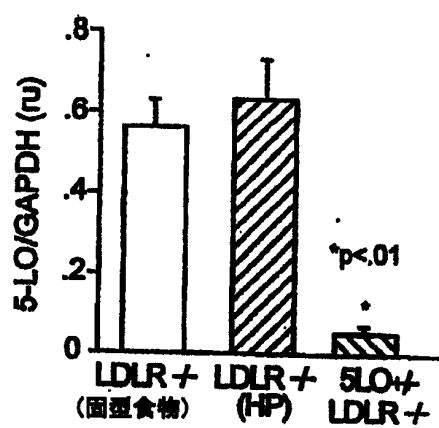


图 5

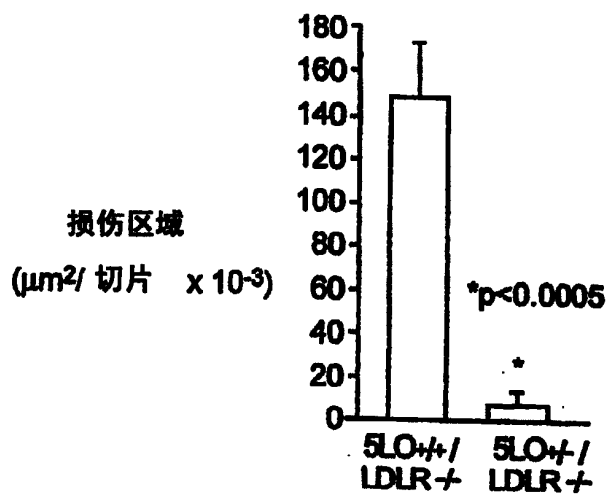


图 6A

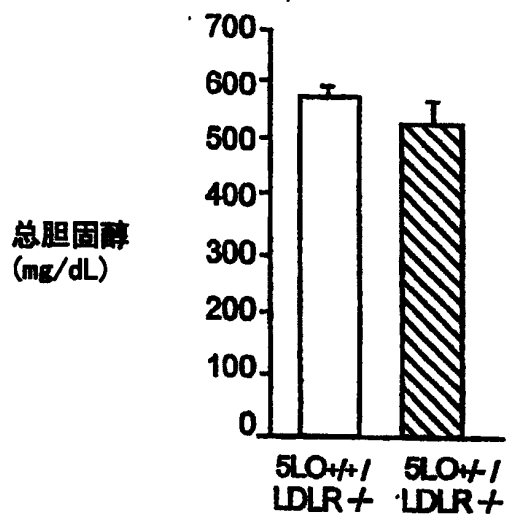


图 6B

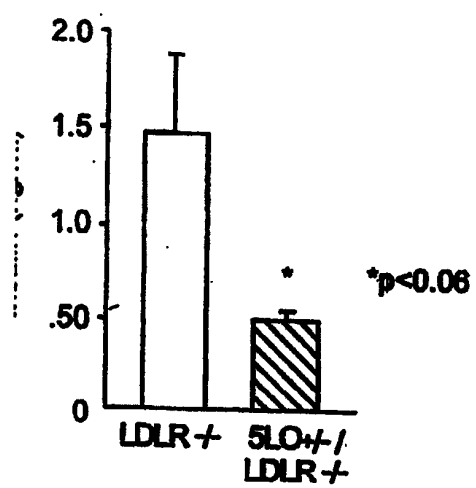


图 7

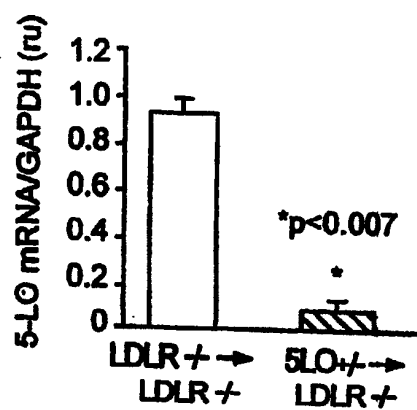


图 8A

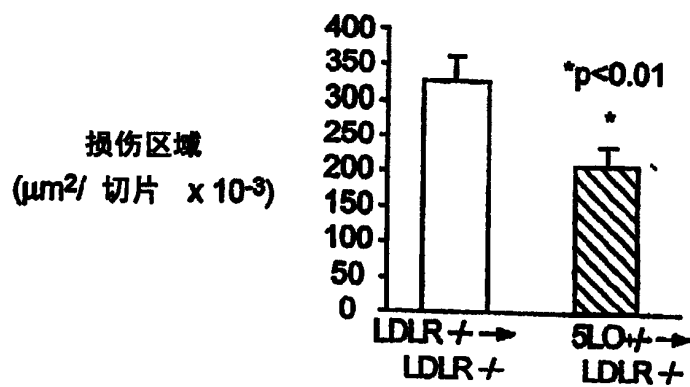


图 8B

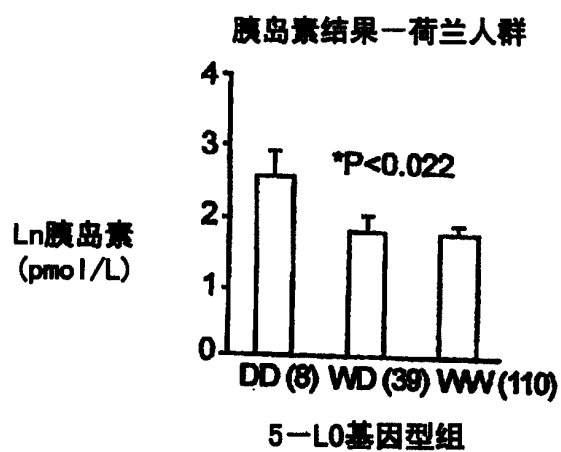


图 9

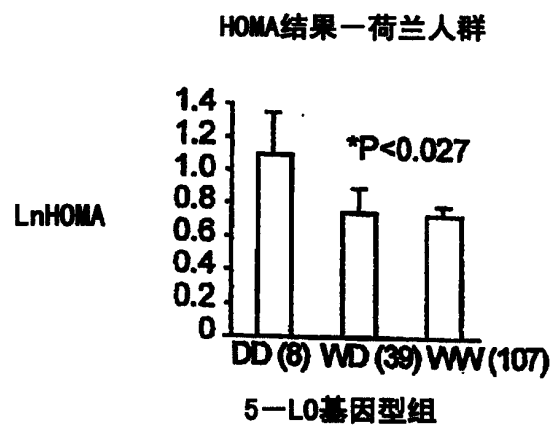


图 10

专利名称(译)	鉴定5 - 脂氧化酶作为引起动脉硬化症的主要基因		
公开(公告)号	CN100427609C	公开(公告)日	2008-10-22
申请号	CN02825955.6	申请日	2002-10-24
[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	M梅拉比恩 H阿拉耶 AJ鲁西斯		
发明人	M·梅拉比恩 H·阿拉耶 A·J·鲁西斯		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/50 A61K45/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P43/00 C12N15/09 C12P19/34 C12Q1/26 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N2333/90241 C12Q1/6883 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P43/00		
代理人(译)	周承泽		
审查员(译)	邹凯		
优先权	60/335244 2001-10-24 US		
其他公开文献	CN1633506A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

5-LO在单核细胞/巨噬细胞(mono/mac)和动脉硬化损伤的泡沫细胞中表达，并在CAST和CON6小鼠中相对B6小鼠差异表达。当用于无效突变5-LO的杂合小鼠被置于LDLR^{-/-}背景时，与对照LDLR^{-/-}小鼠相比动脉硬化症显著减少。在遗传性流行病学研究中，发现普遍的5-LO多态性与颈动脉内膜-介质厚度(IMT)紧密相连。这些结果表明5-LO是动物模型中动脉硬化症和人对动脉硬化症易感的主要原因。