



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104288781 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201310302420. 0

A61P 27/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 15

A61P 7/04 (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 王平 冯静 杨东玲

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

A61P 27/02 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

miR-329 在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了 miR-329 的一种新用途。该新用途是 miR-329 或 miR-329 修饰物在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用。实验证明, miR-329 基因治疗显著减轻了缺血性眼部疾病的严重程度。其作用机理主要是 miR-329 能够抑制内皮细胞中 VEGF 诱导的下游信号通路的激活以及多种促血管生成基因的表达, 进而抑制内皮细胞的血管生成及迁移能力, 从而改善了缺血性眼部疾病的异常血管新生及迁移, 缓解了视网膜血管的迂曲扩张、出血渗漏以及血管簇状异常生长等症状。这种视网膜结构与形态的正常化, 可以缓解眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状, 并抑制疾病的发生发展。因此, miR-329 能够预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病, 具有广阔的应用前景。

1. miR-329 或 miR-329 修饰物在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用 ;

所述 miR-329 的序列为 SEQ ID No. 1 或 SEQ ID No. 3 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於:所述缺血性眼部疾病为早产儿视网膜病变、糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑病变或新生血管性青光眼。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在於:所述缺血性眼部疾病为缺血性眼底病变。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的应用,其特征在於:所述缺血性眼底病变为视网膜病变或脉络膜病变。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的应用,其特征在於:所述视网膜病变为视网膜血管迂曲扩张或视网膜血管渗漏或视网膜出血。

6. 根据权利要求 1-5 任一所述的应用,其特征在於:所述视网膜病变为视网膜血管新生或视网膜血管从视网膜迁移到玻璃体腔。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的应用,其特征在於:所述脉络膜病变为脉络膜血管迂曲扩张或脉络膜血管渗漏或脉络膜出血。

8. 根据权利要求 1-7 任一所述的应用,其特征在於:所述脉络膜病变为脉络膜血管新生。

9. miR-329 或 miR-329 修饰物在制备抑制血管内皮细胞生成血管或抑制血管内皮细胞迁移的药物中的应用 ;

所述 miR-329 的序列为 SEQ ID No. 1 或 SEQ ID No. 3 所示。

10. 根据权利要求 1-9 任一所述的应用,其特征在於:miR-329 修饰物为将 miR-329 进行如下修饰中的至少一种:硫代磷酸骨架修饰;甲基化或氟代核糖修饰;胆固醇、聚乙二醇或短肽末端修饰。

miR-329 在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及 miR-329 在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 缺血可引起多种代谢物质的缺乏,但最为紧急、损害最重的病变是由缺氧所致。在绝大多数情况下,缺血性病变的核心为缺氧性损害。大量研究报道,视网膜和脉络膜缺血、缺氧是缺血性眼部疾病的重要驱动因素,是导致视力下降和丧失的重要原因(1,2)。常见的该类眼部疾病包括早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)、年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、新生血管性青光眼(neovascular glaucoma, NVG)等。上述疾病在全球发病率呈上升趋势,是儿童、成年人和老年人各年龄段致盲的首要原因(3-6)。

[0003] 氧诱导的视网膜病变小鼠模型(OIR 小鼠)是经典的缺血性眼部疾病的动物模型。OIR 小鼠模型诱导过程中,小鼠眼睛组织内的缺血缺氧引起 VEGF 和 TNF- α 等促血管生成因子的过度分泌,进而导致眼底血管异常成簇状生长,血管迂曲、扩张和渗漏。这些缺血性眼部病变会导致眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状。(2,7)

[0004] 1. Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. 2007. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 52(Suppl 1): S3-19.

[0005] 2. Sapieha P, Joyal JS, Rivera JC, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Hardy P, Lachapelle P, Chemtob S. 2010. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest* 120: 3022-3032.

[0006] 3. Gilbert C. 2008. Retinopathy of prematurity: a global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control. *Early Hum Dev* 84: 77-82.

[0007] 4. Xu J, Wei WB, Yuan MX, Yuan SY, Wan G, Zheng YY, Li YB, Wang S, Xu L, Fu HJ, Zhu LX, Pu XL, Zhang JD, Du XP, Li YL, Ji Y, Gu XN, Li Y, Pan SF, Cui XL, Bai W, Chen YJ, Wang ZM, Zhu QS, Gao Y, Liu de Y, Ji YT, Yang Z, Jonas JB. 2012. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy: the Beijing Communities Diabetes Study 6. *Retina* 32: 322-329.

[0008] 5. Cheung CM, Tai ES, Kawasaki R, Tay WT, Lee JL, Hamzah H, Wong TY. 2012. Prevalence of and risk factors for age-related macular degeneration in a multiethnic Asian cohort. *Arch Ophthalmol* 130: 480-486.

[0009] 6. Olmos LC, Lee RK. 2011. Medical and surgical treatment of neovascular glaucoma. *Int Ophthalmol Clin* 51: 27-36.

[0010] 7. Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. 2010. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog Retin Eye Res* 29:500-519.

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供 miR-329 的一种新用途。

[0012] 本发明所提供的 miR-329 的新用途之一为 miR-329 或 miR-329 修饰物在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用 ; 所述 miR-329 的序列为 SEQ ID No. 1 或 SEQ ID No. 3 所示。

[0013] 上述应用中, 所述缺血性眼部疾病可为早产儿视网膜病变、糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑病变或新生血管性青光眼。

[0014] 上述应用中, 所述缺血性眼部疾病可为缺血性眼底病变。

[0015] 上述应用中, 所述缺血性眼底病变可为视网膜病变或脉络膜病变。

[0016] 上述应用中, 所述视网膜病变可为视网膜血管迂曲扩张或视网膜血管渗漏或视网膜出血。

[0017] 上述应用中, 所述视网膜病变可为视网膜血管新生或视网膜血管从视网膜迁移到玻璃体腔。

[0018] 上述应用中, 所述脉络膜病变可为脉络膜血管迂曲扩张或脉络膜血管渗漏或脉络膜出血。

[0019] 上述应用中, 所述脉络膜病变为脉络膜血管新生。

[0020] 本发明所提供的 miR-329 的新用途之二为 miR-329 或 miR-329 修饰物在制备抑制血管内皮细胞生成血管或抑制血管内皮细胞迁移的药物中的应用 ; 所述 miR-329 的序列为 SEQ ID No. 1 或 SEQ ID No. 3 所示。

[0021] 上述任一所述应用中, miR-329 修饰物为将 miR-329 进行如下修饰中的至少一种 : 硫代磷酸骨架修饰 ; 甲基化或氟代核糖修饰 ; 胆固醇、聚乙二醇或短肽末端修饰。

[0022] 本发明首次提出 miR-329 是预防或 / 和治疗缺血性眼部疾病的新型药物。因此, 本发明提供 miR-329 或 miR-329 修饰物在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用。实验证明, miR-329 基因治疗显著减轻了缺血性眼部疾病的严重程度, 表现为有效缓解了发病小鼠视网膜的血管迂曲扩张、出血渗漏以及血管簇状异常生长等症状 ; 显著减少了视网膜新生血管数量以及从视网膜迁移到玻璃体腔的异常血管数量。这种视网膜结构与形态的正常化, 可以缓解眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状, 并抑制疾病的发生发展。miR-329 治疗缺血性眼部疾病的作用机理在于 miR-329 可以抑制内皮细胞中促血管生成因子 VEGF 诱导的下游信号通路 SKI、p38MAPKs 和 NF- κ B 的激活以及多种促血管生成基因的表达, 进而显著抑制内皮细胞的血管生成及迁移能力, 从而改善了缺血性眼部疾病的异常血管新生及迁移。这些结果表明 miR-329 可以作为预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的新的手段。

附图说明

[0023] 图 1 为正常小鼠和 OIR 小鼠的视网膜表型, 显示 OIR 小鼠模型构建成功。

[0024] 图 2 为 miR-329 治疗后 OIR 小鼠视网膜血管的形态结构正常化。

- [0025] 图 3 为 miR-329 治疗后显著减轻 OIR 小鼠视网膜异常血管新生和血管迁移。
- [0026] 图 4 为 miR-329 抑制内皮细胞中 VEGF 诱导的下游信号通路的激活。
- [0027] 图 5 为 miR-329 抑制内皮细胞中 VEGF 和 TNF- α 联合诱导的 NF- κ B 信号通路的激活。
- [0028] 图 6 为 miR-329 抑制内皮细胞中多种促血管生成效应基因的表达。
- [0029] 图 7 为 miR-329 抑制内皮细胞的血管生成及细胞迁移能力。
- [0030] 图 8 为 miR-329 抑制小鼠异种移植物中内皮细胞的血管生成。

具体实施方式

- [0031] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0032] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0033] 下述实验中使用的视网膜荧光铺片实验按照如下方法进行:
- [0034] (一)将小鼠麻醉,左心室心脏灌流 600 μ l 150mg/ml 的 FITC 荧光标记的 dextran,此时小鼠的全身血管都灌注有荧光分子。
- [0035] (二)将小鼠眼睛剥离,4% 多聚甲醛固定 1 小时。
- [0036] (三)小心剥离视网膜,并用剪刀剪成四叶草状。用荧光体式显微镜观察并拍照。
- [0037] 下述实验中使用的组织免疫荧光实验按照如下方法进行:
- [0038] (一)剥离小鼠的眼球进行石蜡包埋切片。
- [0039] (二)取出切片,放入二甲苯溶液脱蜡三次,每次 5 分钟。
- [0040] (三)放入 100%-95%-80%-70%-50% 乙醇和蒸馏水中水化。
- [0041] (四)将样品放入 0.01M pH6.0 的柠檬酸缓冲液中,100 $^{\circ}$ C 沸水浴 30 分钟进行抗
- [0042] (五)5% 羊血清封闭 1 小时。
- [0043] (六)加入一抗(5% 羊血清稀释的 CD31 腹水,体积比为 1:50)37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 3 次。
- [0044] (七)加入荧光标记的二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,PBS 洗 3 次。
- [0045] (八)DAPI 染核,并用抗荧光淬灭封片剂封片。
- [0046] Matrigel (不含生长因子)购自 BD Biosciences。
- [0047] 实施例 1、miR-329 能够有效治疗缺血性眼部疾病
- [0048] 小鼠 miR-329 序列:5' -AACACACCCAGCUAACCUUUUU-3' (SEQ ID No. 1);
- [0049] 对照 miRNA 为线虫 miR-239b,与人、小鼠、大鼠的 miRNA 具有最小同源性。
- [0050] 对照 miRNA 序列:5' -UUUGUACUACACAAAAGUACUG-3' (SEQ ID No. 2);
- [0051] 以下实验均使用双链的小鼠 miR-329 和对照 miRNA,并分别对其序列进行如下修饰:2' - 甲氧基修饰,硫代磷酸骨架修饰和序列 5' 端连接胆固醇。
- [0052] 上述修饰过的小鼠 miR-329 序列和修饰过的对照 miRNA 序列均购自广州锐博生物公司。
- [0053] 一、构建 OIR 小鼠模型
- [0054] 将出生后第 7 天的 C57BL/6J 乳鼠(P7)和母鼠放入含 75% 氧气的高氧培养箱中 5 天,在第 12 天(P12)将其从氧箱中取出,放在正常氧气(21% 氧气)中饲养,造成相对低氧的环境,在第 17 天(P17)的乳鼠即为模型鼠。将正常鼠(正常 C57BL/6J 小鼠)和 OIR 模型鼠

进行视网膜荧光铺片实验,结果如图 1 所示。

[0055] 结果显示,与正常鼠相比, OIR 小鼠的视网膜血管呈现明显的迂曲、扩张和渗漏并成血管簇状异常生长。视网膜血管的荧光渗漏点表示视网膜出血严重。以上视网膜形态结构的异常说明模型构建成功。

[0056] 二、构建 OIR 小鼠治疗模型

[0057] 将出生后第 7 天的 C57BL/6J 乳鼠(P7)和母鼠放入含 75% 氧气的高氧培养箱中 5 天,在第 12 天(P12)将其从氧箱中取出,将修饰过的鼠 miR-329 (5 μ g/ μ l, 1 μ l)、修饰过的鼠对照 miRNA (5 μ g/ μ l, 1 μ l)或 0.9%NaCl 的水溶液(1 μ l)分别注射到乳鼠眼睛玻璃体腔内,继续饲养。

[0058] 三、视网膜荧光铺片分析

[0059] 在第 17 天对各组 OIR 小鼠及正常 C57BL/6J 小鼠(每组 8 只)的视网膜进行荧光铺片分析。

[0060] 对异常新生血管,即迂曲、扩张的血管及血管渗漏点,进行面积的统计分析,以正常小鼠为对照,最终判定疾病的治疗情况。

[0061] 结果如图 2 所示。

[0062] 图 2 中 :NV 为新生血管。

[0063] 结果表明,与对照 miRNA 组相比, miR-329 注射组小鼠的视网膜血管迂曲、视网膜血管扩张、视网膜血管出血、渗漏以及血管簇状异常生长的症状显著减轻,呈现较好的视网膜结构,并且 miR-329 注射后视网膜血管新生的面积显著减少。这种视网膜形态的正常化,可以缓解眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状,减轻疾病的发病程度。

[0064] 四、组织免疫荧光分析

[0065] 在第 17 天剥离各组 OIR 小鼠及正常 C57BL/6J 小鼠(每组 9-14 只)的眼球分别进行石蜡包埋切片,进行组织免疫荧光分析。

[0066] 结果如图 3 所示。

[0067] 图 3 中 :

[0068] GCL 为视网膜神经节细胞层 ;

[0069] VC 为玻璃体腔 ;

[0070] INL 为视网膜内核层 ;

[0071] 绿色标记物为血管内皮标志物 CD31。

[0072] 结果表明,正常小鼠中,只有极少数血管从视网膜迁移到玻璃体腔。与正常小鼠相比, OIR 小鼠中视网膜新生血管数量以及从视网膜异常迁移到玻璃体腔的血管数量明显增多。并且与对照 miRNA 组相比, miR-329 注射组小鼠视网膜血管数量以及从视网膜迁移到玻璃体腔的血管数量明显减少。从荧光图片可以看出注射 miR-329 会改善拉长的不规则呈簇状生长的异常血管形态(箭头所示)。

[0073] 综合以上结果,表明 miR-329 能够有效减轻缺血性眼部疾病的发病程度,可以作为该疾病有效的治疗手段。

[0074] 以下实施例 2-4 中使用的 miR-329 为人 miR-329 的双链模拟物,人对照 miRNA 为无义序列。上述人 miR-329 序列和人对照 miRNA 序列均购自上海吉玛公司。

[0075] 人 miR-329 序列 :5' -AACACACCUUGUUAACCUCUUU-3' (SEQ ID No. 3)

[0076] 人对照 miRNA 序列:5' - UUCUCCGAACGUGUCACGUTT - 3' (SEQ ID No. 4)

[0077] 以下实施例 2-4 中使用的内皮细胞为人脐静脉内皮细胞系 HUVEC。

[0078] 实施例 2、miR-329 抑制内皮细胞中 VEGF 诱导的下游信号通路的激活。

[0079] 缺血性眼部疾病发生发展过程中,眼睛组织内的缺血缺氧引起 VEGF 和 TNF- α 等促血管生成因子的过度分泌,进而导致眼底血管异常成簇状生长,血管迂曲、扩张和渗漏。因此,我们关注 miR-329 能否抑制促血管生成因子刺激内皮细胞引起的信号通路的激活。

[0080] 一、VEGF 刺激 HUVEC 条件下,miR-329 抑制 VEGF 下游信号通路的激活

[0081] (一) 实验分为下列 3 组

[0082] (1) 转染对照 miRNA 并且不刺激 HUVEC ;(2) 转染对照 miRNA 并用促血管生成因子 VEGF 刺激 HUVEC ;(3) 转染 miR-329 并用 VEGF 刺激 HUVEC。

[0083] (二) 将上述的各组对照 miRNA 或 miR-329 分别转染 HUVEC 细胞。

[0084] (三) 转染后 24 小时,刺激细胞:先将各组的 HUVEC 细胞用无血清 1640 培养基培养,饥饿 12 小时。内皮细胞生长密度达 80% 左右时,第(2)和(3)组加入终浓度为 50ng/ml 的细胞因子 VEGF 刺激。

[0085] (四) 在 VEGF 刺激下,继续培养 20 分钟,检测 SKF 或 p38MAPKs 信号通路中的蛋白磷酸化水平。或在 VEGF 刺激下,继续培养 12 小时,检测 NF- κ B 信号通路中的蛋白磷酸化水平。

[0086] (五) 在上述时间点收集各组细胞,进行 western blot。

[0087] 实验结果如图 4 所示。

[0088] 图 4A 为 VEGF 下游 SKF 信号通路中的蛋白磷酸化水平。

[0089] 图 4B 为 VEGF 下游 p38MAPKs 信号通路中的蛋白磷酸化水平。

[0090] 图 4C 为 VEGF 下游的 NF- κ B 信号通路中的蛋白磷酸化水平。

[0091] 图 4 表明,对照 miRNA 转染 HUVEC 细胞,并用 VEGF 刺激之后,VEGF 下游 SKF, p38 和 NF- κ B p65 的磷酸化水平升高,I κ B α 发生降解。而 miR-329 的过表达可以抑制 VEGF 下游 SKF, p38 和 NF- κ B p65 的磷酸化以及 I κ B α 的降解。

[0092] 二、VEGF 和 TNF- α 联合刺激 HUVEC 的条件下,miR-329 抑制下游 NF- κ B 通路的激活

[0093] 在体内病理性血管生成中,VEGF 和 TNF- α 通常是过度分泌并且在微环境中同时存在的。本实验为了更好的模拟体内的病理环境,在 VEGF 和 TNF- α 联合刺激下研究 miR-329 是否可以抑制 NF- κ B 通路的激活。

[0094] (一) 实验分为下列 3 组

[0095] (1) 转染对照 miRNA 并且不刺激 HUVEC ;(2) 转染对照 miRNA 并用细胞因子刺激 HUVEC ;(3) 转染 miR-329 并用细胞因子刺激 HUVEC。

[0096] (二) 将上述的各组对照 miRNA 或 miR-329 分别转染 HUVEC 细胞。

[0097] (三) 转染 24 小时后,刺激细胞:先将各组的 HUVEC 细胞用无血清 1640 培养基培养,饥饿 12 小时。内皮细胞生长密度达 80% 左右时,第(2)和(3)组加入终浓度为 50ng/ml 的细胞因子 VEGF 和 TNF- α 共同刺激。

[0098] (四) 在 VEGF 和 TNF- α 共同刺激下,继续培养 12 小时,检测 NF- κ B 信号通路中的蛋白磷酸化水平。

[0099] (五) 收集各组细胞,进行 western blot。

[0100] 结果如图 5 所示。

[0101] 图 5 和图 4C 相比较表明,以 VEGF 和 TNF- α 联合刺激 HUVEC 细胞,NF- κ B 通路的激活比单独刺激更为显著,并且 miR-329 同样可以显著抑制联合刺激下的 NF- κ B p65 的磷酸化以及 I κ B α 的降解,即抑制 NF- κ B 通路的激活。

[0102] 三、VEGF 和 TNF- α 共同刺激 HUVEC 的条件下,miR-329 抑制促血管生成效应基因 mRNA 的表达。

[0103] (一) 实验分为下列 3 组

[0104] (1) 转染对照 miRNA 并且不刺激 HUVEC ;(2) 转染对照 miRNA 并用细胞因子刺激 HUVEC ;(3) 转染 miR-329 并用细胞因子刺激 HUVEC。

[0105] (二) 将上述的各组对照 miRNA 或 miR-329 分别转染 HUVEC 细胞。

[0106] (三) 转染 8 小时后,刺激细胞:先将各组的 HUVEC 细胞用无血清 1640 培养基培养,饥饿 12 小时。内皮细胞生长密度达 80% 左右时,第(2)和(3)组加入终浓度为 50ng/ml 的细胞因子 VEGF 和 TNF- α 共同刺激。

[0107] (四) 在 VEGF 和 TNF- α 共同刺激下,继续培养 24 小时,

[0108] (五) 实时荧光定量 PCR 检测 miR-329 对促血管生成效应基因 mRNA 表达水平的影响,以 GAPDH 为内参,每组实验中未刺激组细胞的 RNA 相对表达量设为 1。

[0109] 所检测的基因及相对应的引物如下:

[0110]

VEGF	Sense	GAGGGCAGAATCATCACGAA
	Antisense	CATGGTGATGTTGGACTCCT
ICAM-1	Sense	CTGCAGACAGTGACCATC
	Antisense	GTCCAGTTTCCCGGACAA
IL-8	Sense	AAGAAACCACCGGAAGGAACC
	Antisense	GTGTTGGCGCAGTGTGGTC
MMP-9	Sense	AACCAATCTCACCGACAG
	Antisense	AAAGGCGTCGTC AATCAC

[0111] PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C,5 分钟;95 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 20s,40 个循环。

[0112] 结果如图 6 所示。

[0113] 图 6 表明,miR-329 可以抑制所检测基因的 RNA 表达量,证实 miR-329 可以抑制多种促血管生成基因的表达。

[0114] 以上结果表明,miR-329 能够显著抑制血管内皮细胞中促血管生成因子 VEGF 及 VEGF 与 TNF- α 联合诱导的下游信号通路的激活,进而抑制多种促血管生成因子的表达,提示 miR-329 治疗在血管内皮细胞中的重要作用。

[0115] 实施例 3、miR-329 抑制内皮细胞的血管生成及细胞迁移能力

[0116] 缺血性眼部疾病发生发展过程中,眼睛组织内的缺血缺氧将会导致眼底血管异常成簇状生长,血管迂曲、扩张和渗漏。而这些眼底的异常血管新生是导致眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状的重要原因。因此,我们关注 miR-329 能否抑制血管内皮细胞的功能。

[0117] 一、血管生成实验

[0118] (一) 实验分为下列 3 组

[0119] (1) 转染对照 miRNA 并且不刺激 HUVEC ;(2) 转染对照 miRNA 并用细胞因子刺激

HUVEC ;(3) 转染 miR-329 并用细胞因子刺激 HUVEC。

[0120] (二) 将上述的各组对照 miRNA 或 miR-329 分别转染 HUVEC 细胞。

[0121] (三) 在 96 孔板中包被 70 μ l/ 孔冰浴的 Matrigel, 37°C 固化 30 分钟。

[0122] (四) 将转染后 24 小时的 HUVECs 以 1×10^5 个 /ml 重悬于 1640 培养基(含 10% 血清)

[0123] (五) 将三种细胞悬液向 96 孔板的每个孔中加入 100 μ l, 每种细胞悬液设三个平行孔, VEGF 和 TNF- α (使用浓度 50ng/ml) 在接种细胞的时候同时加入。在培养箱中 37°C 孵育过夜。

[0124] (六) 倒置显微镜下观察, 拍照。

[0125] (七) 用图像处理软件 Image Pro Plus 计算每孔血管状细胞总长度。

[0126] 结果如图 7A 所示。

[0127] 结果表明, VEGF 和 TNF- α 联合刺激可以显著增强内皮细胞 HUVEC 的血管生成能力, 而 miR-329 能够显著抑制联合刺激引起的 HUVEC 血管生成。

[0128] 二、细胞迁移实验

[0129] (一) 实验分为下列 3 组

[0130] (1) 转染对照 miRNA 并且不刺激 HUVEC ;(2) 转染对照 miRNA 并用细胞因子刺激 HUVEC ;(3) 转染 miR-329 并用细胞因子刺激 HUVEC。

[0131] (二) 将上述的各组对照 miRNA 或 miR-329 分别转染 HUVEC 细胞。

[0132] (三) 将转染后 24 小时的 HUVEC 以 1×10^5 个 /ml 重悬于无血清 1640 培养基。

[0133] (四) Transwell 上室分别加入细胞悬液 (100 μ l/ 孔, 每种处理设三个平行孔), VEGF 和 TNF- α (使用浓度 50ng/ml) 在接种细胞的时候同时加入。下室加入 200 μ l 含 10% 血清的培养基。Transwell 系统在 37°C 二氧化碳培养箱中放置过夜。

[0134] (五) 将膜上层的细胞用棉签擦掉, 将膜揭下。下层细胞以 4% 多聚甲醛固定后, 用 1% 结晶紫染色, 显微拍照。用 Image J 软件统计每孔迁移的细胞数量。

[0135] 结果如图 7B 所示。

[0136] 图 7 表明, miR-329 能够显著抑制 VEGF 和 TNF- α 联合刺激引起的 HUVEC 内皮细胞的迁移能力。

[0137] 实施例 4、miR-329 抑制小鼠异种移植物中内皮细胞的血管生成。

[0138] (一) 实验分为下列 3 组

[0139] (1) 转染对照 miRNA 并且不刺激 HUVEC ;(2) 转染对照 miRNA 并用细胞因子刺激 HUVEC ;(3) 转染 miR-329 并用细胞因子刺激 HUVEC。

[0140] (二) 将上述的各组对照 miRNA 或 miR-329 分别转染 HUVEC 细胞。

[0141] (三) 在转染 HUVECs 细胞 20 小时之后, 将细胞消化并用 60 μ l PBS 重悬。

[0142] (四) 将细胞悬液 (5×10^6 个 / 样) 与 500 μ l Matrigel, 15U 的肝素, VEGF 和 TNF- α (使用浓度 50ng/ml) 混合。

[0143] (五) 将混合物皮下注射到 SCID/Beige 雌性小鼠(年龄 4 周) 的侧背部。

[0144] (六) 6 天以后, 内皮细胞将在体内 Matrigel 中形成血管。处死小鼠, 将异种移植物剥离, 放入 4% 多聚甲醛固定并进行石蜡切片和免疫组化实验。

[0145] (七) 利用 Image J 软件计算体内成血管数量。

[0146] 结果如图 8 所示。

[0147] 结果表明,与第(2)组相比,第(3)组能显著抑制小鼠中内皮细胞血管的生成,与体外实验结果一致。

[0148] 以上体外及体内结果表明,miR-329 可以抑制内皮细胞的血管生成及细胞迁移能力,揭示了 miR-329 抑制缺血性眼部疾病视网膜上的血管新生及迁移并最终治疗该疾病的作用机制。

[0001]

序列表

<110>中国科学院生物物理研究所

<120> miR-329 在制备预防和/或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用

<160>4

<210>1

<211>22

<212> RNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

aacacaccca gcuaacuuu uu

22

<210>2

<211>22

<212> RNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

uuuguacuac acaaaaguac ug

22

[0002]

<210>3

<211>22

<212> RNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

aacacaccug guuaaccucu uu

22

<210>4

<211>21

<212> RNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>4

uucuccgaac gugucagut t

21

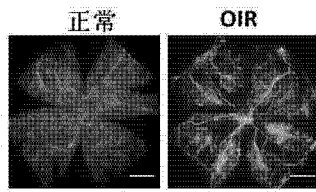


图 1

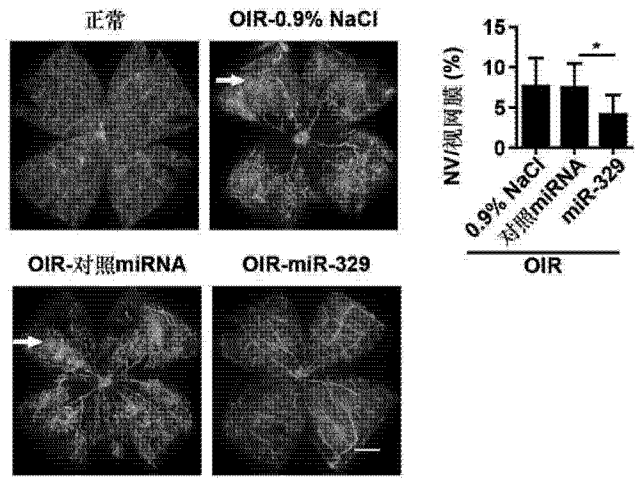


图 2

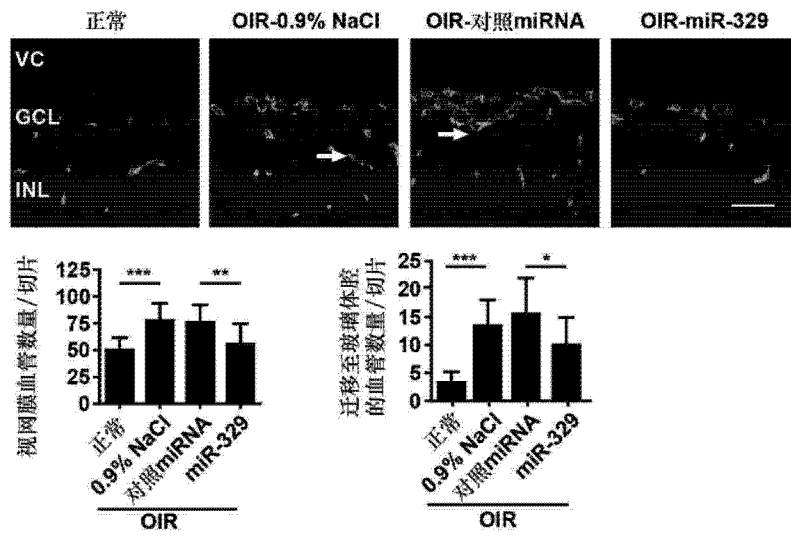


图 3

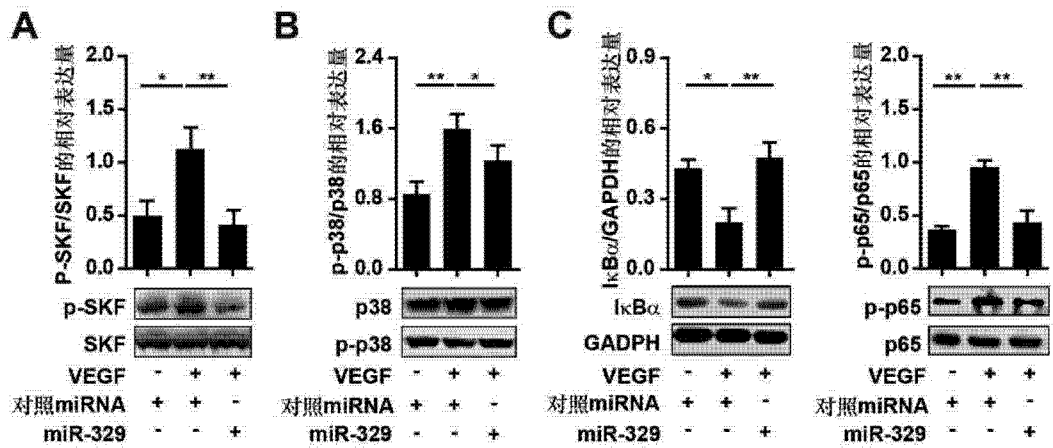


图 4

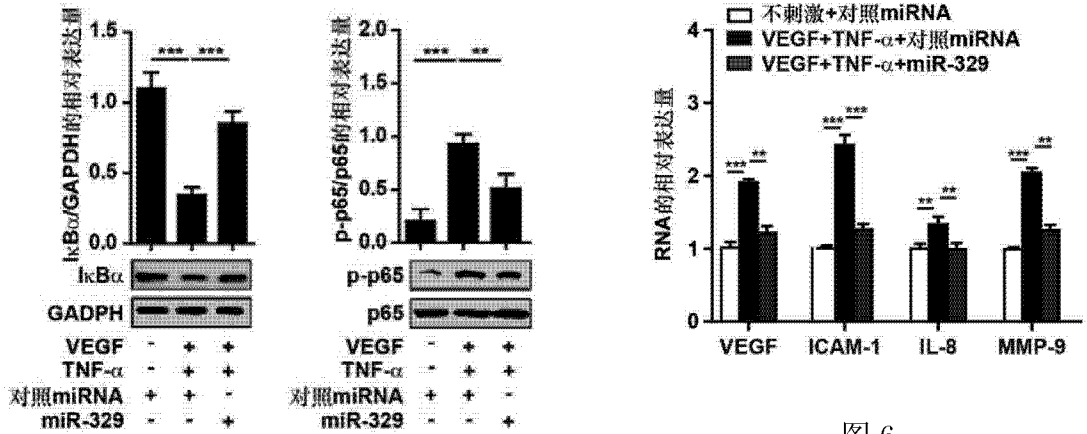


图 6

图 5

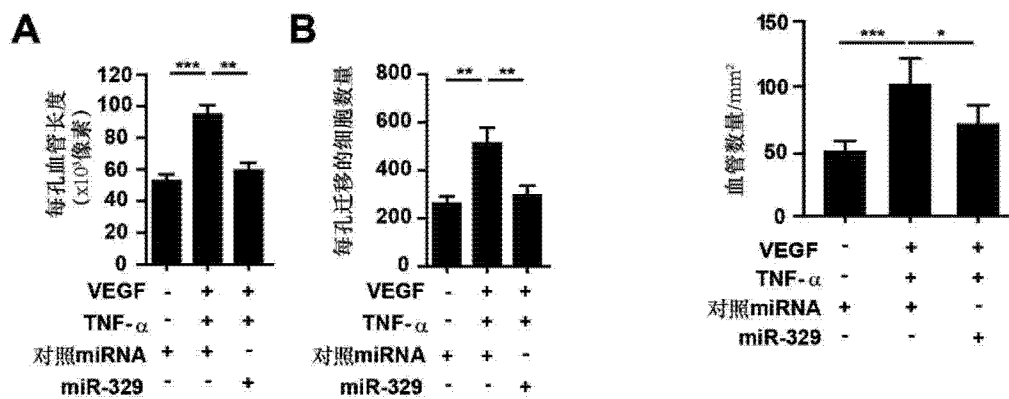


图 8

图 7