

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103520740 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310495250. 2

(22) 申请日 2013. 10. 21

(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 秦志海 陈琳 李洁

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 1/16(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

肝纤维化治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及用于抑制哺乳动物 S100A4 基因表达的试剂在制备用于治疗所述哺乳动物的肝纤维化的药物中的用途。

1. 用于抑制哺乳动物 S100A4 基因表达的试剂在制备用于治疗所述哺乳动物的肝纤维化的药物中的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述试剂是针对所述 S100A4 基因的 RNA 干扰试剂。
3. 根据权利要求 2 所述的用途,其中所述 RNA 干扰试剂包含与递送载体结合的针对所述 S100A4 基因的 RNA 干扰序列。
4. 根据权利要求 3 所述的用途,其中所述递送载体选自:质粒载体、病毒载体、胆固醇、纳米颗粒、壳聚糖和脂质体。
5. 根据权利要求 3 所述的用途,其中所述递送载体选自:腺病毒载体和逆转录病毒载体。
6. 根据权利要求 3 所述的用途,其中所述递送载体是腺病毒载体。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的用途,其中所述哺乳动物选自人、猴、狗、猫、牛、马、羊、猪、兔、小鼠和大鼠。
8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中所述哺乳动物是小鼠。
9. 根据权利要求 7 所述的用途,其中所述哺乳动物是人。
10. 一种药物组合物,其包含与递送载体结合的针对哺乳动物 S100A4 基因的 RNA 干扰序列,所述递送载体选自:质粒载体、病毒载体、胆固醇、纳米颗粒、壳聚糖和脂质体。

肝纤维化治疗方法

技术领域

[0001] 本发明属于肝纤维化治疗领域。具体地,本发明涉及通过抑制哺乳动物 S100A4 基因的表达来治疗所述哺乳动物的肝纤维化。

背景技术

[0002] 肝纤维化是指肝脏中细胞外基质成分的大量沉积,它是一种对肝脏慢性损伤的修复反应¹。肝纤维化是各种慢性肝病发展成肝硬化的必经阶段,由于肝硬化是肝脏实质性病变,医学界普遍认为较难逆转,在治疗上除肝脏移植外,缺乏其它有效措施²。近年来,随着医学分子生物学技术的应用,人们对肝纤维化发生的机制进行了广泛而深入的讨论,明确提出了肝纤维化可以逆转的论点。因此,逆转肝纤维化的研究已成为世界医学攻关中的一个热点课题。

[0003] 目前,国内外对于肝纤维化治疗的研究已经取得了一些成果。临床上常用的治疗肝纤维化的药物主要有干扰素、秋水仙碱、白介素-10 等,但是这些药物的治疗效果有限,且副作用大,不宜长期使用。因此亟需肝纤维化治疗的新靶点和新方法。

[0004] S100A4 是 S100 钙结合蛋白超家族中的一员,它在细胞质、细胞核以及胞外基质中均有分布³。S100A4 在哺乳物种间的保守性很高,人 S100A4 (NCBI 数据库编号:NP_002952) 与小鼠 S100A4 (NCBI 数据库编号:NP_035441) 在氨基酸序列上的相似性高达 93%。已有研究表明 S100A4 能通过多种途径促进肿瘤的转移,如促进肿瘤血管新生⁴、增强肿瘤细胞的运动性⁵ 以及上调胞外基质中金属蛋白酶的表达^{6,7} 等。但是 S100A4 在治疗肝纤维化方面的作用至今还没有报道。

[0005] 为了探讨新的肝纤维化治疗的方法,发明人进行了本发明。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种通过靶向 S100A4 分子治疗肝纤维化的方法。所述方法具体是通过 RNA 干扰沉默 S100A4 基因来治疗肝纤维化。

[0007] 为了抑制 S100A4 的表达,本发明采用了 RNA 干扰技术。RNA 干扰是指一种分子生物学上由双链 RNA 诱发的基因沉默现象,其机制是通过阻碍特定基因的翻译或转录来抑制基因表达。当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时,双链 RNA 复合体先降解成为 35nt 左右的小 RNA 分子,然后他们通过序列互补与 mRNA 结合,从而导致 mRNA 降解⁸。其中短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 包括两个短反向重复序列,中间由一茎环 (loop) 序列分隔的,组成发夹结构。

[0008] 目前常用的体内 RNA 干扰方法是将干扰 RNA 序列作为“短发夹”克隆到质粒载体中,在体内该发夹序列被表达出来,形成一个双链 RNA,并被双链 RNA 复合体降解为有效的小 RNA 分子。将双链 RNA 导入动物体内的方法主要包括:直接注射含 RNA 干扰序列的质粒、将含 RNA 干扰序列的质粒包装成腺病毒或逆转录病毒注射入体内、以及脂质体介导的体内转染等。

[0009] 因此,靶向 S100A4 的 RNA 干扰可以通过直接注射含 RNA 干扰序列的质粒、将含 RNA 干扰序列的质粒包装成腺病毒或逆转录病毒注射入体内、以及脂质体介导的体内转染等方法来实现。

[0010] 在本发明的一些实施方案中,采用腺病毒介导的 RNA 干扰。采用其他方式的 RNA 干扰同样可以实现本发明。

[0011] 腺病毒是一种非整合型双链 DNA 病毒,在自然界中广泛分布。目前常用的应用于基因治疗的腺病毒多为复制缺陷型重组人 V 型腺病毒,删除了与腺病毒复制相关的 E1 和 E3 基因。尽管一些类型的腺病毒会引起人胃肠道、呼吸系统或眼部的急性感染,但是应用于基因治疗研究的腺病毒是安全的。由于腺病毒可以感染呼吸道和消化道,所以它所介导的基因治疗不仅可以静脉注射,还可以通过口服经肠道吸收或通过喷雾、滴注经呼吸道吸收,使得基因治疗易于推广应用。腺病毒易于制备、纯化和浓缩,病毒滴度可以高达 10^{11} pfu/ml。所以,腺病毒是目前基因治疗临床试验中应用最多的一种载体。

[0012] 因此本发明采用腺病毒介导的 RNA 干扰技术抑制 S100A4 基因的表达。首先根据小鼠 S100A4 mRNA 序列设计与其互补的 shRNA 序列,将其克隆到表达腺病毒载体中。进而利用 AdEasy™ 系统重组出携带靶向 S100A4 shRNA 的腺病毒,经氯化铯密度梯度离心纯化出腺病毒。纯化的腺病毒通过尾静脉注射的方式给予诱导肝纤维化的小鼠。

[0013] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0014] 1. 用于抑制哺乳动物 S100A4 基因表达的试剂在制备用于治疗所述哺乳动物的肝纤维化的药物中的用途。

[0015] 2. 根据 1 所述的用途,其中所述试剂是针对所述 S100A4 基因的 RNA 干扰试剂。

[0016] 3. 根据 2 所述的用途,其中所述 RNA 干扰试剂包含与递送载体结合的针对所述 S100A4 基因的 RNA 干扰序列。

[0017] 4. 根据 3 所述的用途,其中所述递送载体选自:质粒载体、病毒载体、胆固醇、纳米颗粒、壳聚糖和脂质体。

[0018] 5. 根据 3 所述的用途,其中所述递送载体选自:腺病毒载体和逆转录病毒载体。

[0019] 6. 根据 3 所述的用途,其中所述递送载体是腺病毒载体。

[0020] 7. 根据 1-6 中任一项所述的用途,其中所述哺乳动物选自人、猴、狗、猫、牛、马、羊、猪、兔、小鼠和大鼠。

[0021] 8. 根据 7 所述的用途,其中所述哺乳动物是小鼠,并且所述 S100A4 基因的序列如 SEQ. ID. NO. 1 所示。

[0022] 9. 根据 7 所述的用途,其中所述哺乳动物是人,并且所述 S100A4 基因的序列如 SEQ. ID. NO. 2 所示。

[0023] 10. 一种药物组合物,其包含与递送载体结合的针对哺乳动物 S100A4 基因的 RNA 干扰序列,

[0024] 11. 根据 10 所述的药物组合物,其中所述递送载体选自:质粒载体、病毒载体、胆固醇、纳米颗粒、壳聚糖和脂质体。

[0025] 12. 一种治疗哺乳动物肝纤维化的方法,所述方法包括抑制所述哺乳动物 S100A4 基因的表达。

[0026] 13. 用于抑制哺乳动物 S100A4 基因表达的试剂作为治疗所述哺乳动物的肝纤维

化的药物的用途。

附图说明

[0027] 图 1:用于将干扰序列构建到其上的腺病毒载体 pRNAT-H1.1/Adeno(上海闪晶分子生物科技有限公司)的载体图谱。

[0028] 图 2:注射到体内的携带绿色荧光蛋白(GFP)腺病毒可以感染肝脏组织几乎所有细胞,如图所示腺病毒组肝组织全部为绿色,没有注射腺病毒的空白对照组则没有绿色。图中蓝色为细胞核。

[0029] 图 3:通过流式细胞术检测所有肝脏细胞 GFP 的表达情况,sh-con 及 sh-S100A4 组 GFP 的表达峰明显高于空白对照组。

[0030] 图 4:sh-S100A4 重组腺病毒可以有效降低肝脏组织中 S100A4,图中所示为肝组织匀浆后的 western blot 结果, β -actin 为内参。

[0031] 图 5:sh-S100A4 重组腺病毒降低 S100A4 基因后肝纤维化水平降低。

具体实施方式

[0032] 以下通过实施例来进一步阐明本发明。但是应该理解,所述实施例只是举例说明的目的,并不意欲限制本发明的范围和精神。

[0033] 实施例 1:RNA 干扰敲低 S100A4 基因

[0034] 1. 针对小鼠 S100A4 基因的 shRNA 序列设计及合成

[0035] 小鼠 S100A4(NM_011311.2)的序列如 SEQ. ID. NO. 1 所示,针对其第 3 外显子序列(194-499),设计出与其互补的一段序列,如下:

[0036] sh-S100A4:5'-GGACAGATGAAGCTGCATT-3'

[0037] 同时,设计一段无关的对照序列,如下:

[0038] sh-con:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

[0039] 按照酶切位点(Mlu I)+正向序列+茎环序列+反向序列+polyT+酶切位点(Hind III)的原则,合成如下寡核苷酸序列:

[0040] sh-S100A4-正向:5'-cgcgtGGACAGATGAAGCTGCATTTTC

[0041] AAGAGAAATGCAGCTTCATCTGTCTTTTTTCCAAa-3'

[0042] sh-S100A4-反向:5'-agcttTTGGAAAAAAGGACAGATGAAGC

[0043] TGCATTTCTCTTGAAAATGCAGCTTCATCTGTCCa-3'

[0044] sh-con-正向:5'-cgcgtTTCTCCGAACGTGTCACGTTTC

[0045] AAGAGAACGTGACACGTTTCGGAGAATTTTTTCCAAa-3'

[0046] sh-con-反向:5'-agcttTTGGAAAAAATCTCCGAACGTGTCA

[0047] CGTTCTCTTGAAAACGTGACACGTTTCGGAGAAa-3'

[0048] shRNA 序列的合成由上海闪晶分子生物科技有限公司完成。

[0049] 将合成得到的正向和反向两条单链 DNA 序列用 TE 溶解,两条单链各取 5 μ l 混合,退火(95 $^{\circ}$ C 2min,72 $^{\circ}$ C 2min,37 $^{\circ}$ C 2min,25 $^{\circ}$ C 2min,4 $^{\circ}$ C 10min)形成双链结构,待连接(注:对 sh-S100A4 以及 sh-con 分别进行以下步骤 2-步骤 6 的处理)。

[0050] 2. 腺病毒载体双酶切,凝胶回收

[0051] 根据 pRNAT-H1.1/Adeno 质粒 (Genscript, SD1209) 的结构图, 该质粒携带珊瑚虫 GFP(cGFP) 标签 (图 1), 将 pRNAT-H1.1/Adeno 质粒用 Mlu I (Promega, R6381) 和 Hind III (Promega, R6041) 进行酶切 (酶切体系为: 质粒 10 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, BamHI 1 μ l, Hind III 1 μ l, 双蒸水 6 μ l, 总体系为 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 4h)。

[0052] 参照凝胶回收试剂盒 (天根生化科技有限公司, DP214) 说明书步骤, 对酶切后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收较大的 (约 8kb) pRNAT-H1.1/Adeno 线性化片段。

[0053] 3. 载体与 shRNA DNA 双链连接与转化

[0054] 步骤 1 中的 DNA 双链片段与步骤 2 中的线性化载体的摩尔数比为 3:1, 反应体系为 1.5 μ l T4DNA 缓冲液 (Promega, C126A), 1 μ l T4DNA 连接酶 (Promega, M1801), 8.5 μ l 双蒸水, 总体系为 15 μ l, 充分混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 4h。

[0055] 将连接后的体系转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞 (全式金生物技术有限公司, CD101)。转化的具体步骤: 将连接体系与感受态细胞混合后冰浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90s, 冰浴 1min。在混合体系中加入 1ml LB 培养基 (配方: 胰蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 5g/L, 氯化钠 10g/L) 于 37 $^{\circ}$ C 摇床温育 1h。铺板 37 $^{\circ}$ C 培养 12-16h。将平皿中单菌落挑入 5ml LB 培养基培养过夜, 用试剂盒提取质粒 (天根生化科技有限公司, DP103)。

[0056] 4. 重组腺病毒质粒的构建

[0057] 1) 准备大肠杆菌 BJ5183-AD1 感受态细胞 (Stratagene, 200157);

[0058] 2) 利用 Pme I (New England Biolabs, R0560) 酶切、线性化并回收步骤 3 中得到的质粒, 浓度约为 100ng/ μ l;

[0059] 3) 取出 2 管 1) 中准备好的 BJ5183-AD1 感受态细胞, 放在冰上融化, 将 1-5 μ l (约 1 μ g) 在 2) 中制备的线性化的质粒加入至含约 50 μ l BJ5183-AD1 感受态的 1.5ml 离心管中混匀, 冰上放置 30min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90s 转化, 快速将离心管移至冰上, 放置 1min 后每管加 1ml LB 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 摇床温育 1h, 使细菌复苏;

[0060] 4) 取 50 μ l 步骤 3) 中的转化细胞液涂于 50 μ g/ml 卡那霉素 (Sigma, K0879) 抗性平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 16-20h;

[0061] 5) 次日挑取平板上长出的菌落 (选择最小的菌落), 接种于 3ml 含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 15h;

[0062] 6) 用试剂盒提取质粒 (天根生化科技有限公司, DP103), 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 大质粒为可能阳性克隆, 进一步酶切鉴定。以 Pac I (New England Biolabs, R0547) 单酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳如显示出一条大片段 (约 30kb), 及一条小片段 (约 3.0 或 4.5kb), 则确定为阳性克隆;

[0063] 7) 取 1-5 μ l 阳性质粒转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞 (全式金生物技术有限公司, CD101) 扩增细菌并提取质粒, 得到的即为重组腺病毒质粒;

[0064] 8) 利用 Pac I 酶切, 线性化并回收重组质粒。

[0065] 5. 重组腺病毒的包装

[0066] 1) AD-293 细胞 (Stratagene, 240085) 在转染前 24 小时接种于六孔板的 1 个孔中, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养基 (Gibco, 12800-017) 中, 在 pH 值 7.2-7.4、温度 37 $^{\circ}$ C、相对湿度 95%、5%CO₂ 的条件下培养, 使之在转染时细胞汇合率为 50-70%;

[0067] 2) 用 **Lipofectamine®** 2000 Transfection Reagent 转染试剂 (Invitrogen, 11668027), 依照说明书将 $4\mu\text{g}$ 线性化的重组质粒转染 AD-293 细胞;

[0068] 3) 6 个小时后移去上清液, 加入 3ml DMEM 37°C 预热的完全 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清, 1% 青霉素 / 链霉素);

[0069] 4) 在转染后 7 到 10 天, 在显微镜下看到含绿色荧光的彗星状细胞脱落, 将细胞从瓶中刮下并移入 15ml 锥形管。4000g, 5min 离心后将细胞重悬于 0.5ml 磷酸盐缓冲液 (PBS, 配方: NaCl 137mmol/L, KCl 2.7mmol/L, Na_2HPO_4 10mmol/L, KH_2PO_4 2mmol/L) 中。液氮中冻结细胞, 37°C 水浴中溶解 40s-60s。此步骤共重复 3 次, 中间可剧烈振荡一次; 之后 10000g, 10min 离心, 取上清液 (含重组腺病毒), 存于 -80°C 冰箱。

[0070] 6. 重组腺病毒的扩增和纯化

[0071] 1) AD-293 细胞铺于含 10ml 完全 DMEM 培养基的 100mm^2 培养皿中, 在 pH 值 7.2-7.4、温度 37°C、相对湿度 95%、5% CO_2 的条件下培养。至 50-70% 的汇合率时, 用不含血清的 DMEM 5ml 培育细胞半小时, 之后加入 $100\mu\text{l}$ 步骤 5 中得到的含重组腺病毒的上清液, 10 小时后弃掉上清, 换为正常完全培养基;

[0072] 2) 上述细胞被感染 3-4 天后, 观察到有 1/3 到 1/2 的细胞脱离漂浮; 此时, 将细胞从皿中刮下并移入 15ml 锥形管。4000g, 5min 离心后将细胞重悬于 1ml PBS 中。液氮中冻结细胞, 37°C 水浴中溶解 40s-60s。此步骤共重复 3 次, 中间可剧烈振荡一次; 之后 10000g, 10min 离心, 取上清液 (含重组腺病毒), 分装后存于 -80°C 冰箱。

[0073] 3) 为了进一步扩增和纯化, 新铺 20 个 175mm^2 细胞培养瓶的 AD-293 细胞, 在 pH 值 7.2-7.4、温度 37°C、相对湿度 95%、5% CO_2 的条件下培养。至 50-70% 的汇合率时, 用不含血清的 DMEM 10ml 培育细胞半小时, 之后加入步骤 2) 中的病毒上清 (每瓶 $50\mu\text{l}$) 孵育 10h, 之后换为含血清的完全培养基。2-3 天后, 将细胞从皿中刮下并移入 15ml 锥形管。4000g, 5min 离心后将细胞重悬于 12ml PBS 中。液氮中冻结细胞, 37°C 水浴中溶解 40s-60s。此步骤共重复 3 次, 中间可剧烈振荡一次; 之后 10000g, 10min 离心, 取上清液 (含重组腺病毒);

[0074] 4) 病毒纯化: CsCl 不连续梯度离心, 20ml 超速离心管中缓慢加入 8ml 1.4g/ml CsCl (53g+87ml 10mM Tris-HCl, pH=7.9), 上面小心加入 6ml 1.2g/ml CsCl (26.8g+92ml 10mM Tris-HCl, pH=7.9), 再小心加入 3) 中获得的病毒上清液至体积达到 20ml。平衡后, 4°C, 23000rpm, 离心 90min, 用注射器抽吸下层蓝白色病毒带;

[0075] 5) 病毒透析去盐: 配置透析液 (10mM Tris pH8.0, 2mM MgCl_2 , 5% 蔗糖), 灭菌处理。4°C 透析, 更换 3 次透析液, 每次一小时, 可基本去除 CsCl, 病毒保存于 -80°C。

[0076] 6) 病毒滴度测定: 在 Eppendorf Biophotometer 中测量透析后的病毒中的总蛋白量, $1\mu\text{g}$ 病毒蛋白相当于 4×10^9 病毒颗粒;

[0077] 7. RNA 干扰沉默 S100A4 治疗肝纤维化

[0078] 18 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠 (购自维通利华公司), 分为两组 (实验组: sh-S100A4 组, 以及对照组: sh-con 组), 每组 9 只小鼠。将 CCl_4 与玉米油 (Sigma, C8267) 按体积比 1:9 混合, 按照每 20g 小鼠 $100\mu\text{l}$ 的剂量腹腔注射, 16 小时后, 通过尾静脉注射 4×10^{10} 个步骤 6 中制备的病毒颗粒, 之后继续按照相同剂量一周两次注射 CCl_4 与玉米油的混合液, 共注射 5 次, 在第 5 次注射 CCl_4 与玉米油的混合液后 48 小时, 断颈处死小鼠, 取肝脏组织进行免疫组织化学染色观察肝纤维化程度。

[0079] 在尾静脉注射腺病毒 7 天后,取小鼠肝脏,通过免疫荧光染色检测肝脏细胞(具体方法参照文献 Zhang, J., et al. FSP1⁺ fibroblasts promote skin carcinogenesis by maintaining MCP-1-mediated macrophage infiltration and chronic inflammation. *The American journal of pathology* 178, 382-390 (2011)),如图 2 所示,携带 GFP 标签的腺病毒在所采用剂量下,即 4×10^{10} 个步骤 5 中制备的病毒颗粒,可以感染所取的全部肝脏组织。

[0080] 同时,通过流式细胞术检测肝脏细胞(具体方法参照文献 Zhao, X., et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *The Journal of clinical investigation* 122, 4094-4104 (2012)),如图 3 所示,携带 GFP 标签的腺病毒在所采用剂量下,即 4×10^{10} 个步骤 5 中制备的病毒颗粒,可成功感染肝脏组织中的细胞。

[0081] 在第 5 次注射 CCl_4 与玉米油的混合液后 48 小时,通过肝组织匀浆的 Western blot 检测 S100A4 蛋白质的表达,可以观察到 sh-S100A4 可成功抑制肝脏中 S100A4 的表达(图 4)。同时,通过参照所引文献(Wang, J., et al. CD137-mediated pathogenesis from chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-transgenic mice. *Journal of immunology* 185, 7654-7662 (2010)) 中所述的方法对肝脏组织切片进行天狼星红染色(组织中胶原蛋白染色呈红色,其他组织染色呈绿色),如图 5 所示,sh-S100A4 组中的胶原含量明显少于 sh-con 组 ($p=0.0019$, t 检验),说明 sh-S100A4 组的肝纤维化水平低于 sh-con 组。

[0082] 参考文献

[0083] 1. Batailler, R. & Brenner, D. A. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 115, 209-218 (2005).

[0084] 2. Cohen-Naftaly, M. & Friedman, S. L. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Therapeutic advances in gastroenterology* 4, 391-417 (2011).

[0085] 3. Boye, K. & Maelandsmo, G. M. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *The American journal of pathology* 176, 528-535 (2010).

[0086] 4. Ambartsumian, N., et al. The metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 20, 4685-4695 (2001).

[0087] 5. Kim, E. J. & Helfman, D. M. Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin. *The Journal of biological chemistry* 278, 30063-30073 (2003).

[0088] 6. Saleem, M., et al. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14825-14830 (2006).

[0089] 7. Zhang, H. Y., et al. S100A4 mediated cell invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via the regulation of MMP-2 and E-cadherin activity. *Molecular biology reports* 39, 199-208 (2012).

[0090] 8. Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. Systemic signalling in gene silencing. Nature 389, 553 (1997).

[0001]

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 肝纤维化治疗方法

<130> IB130570

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 513

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

aaacctctct attcagcaact tectctctct tggctctggte tcaacgggta ccatggcaag
60

acccttggag gaggccctgg atgtaattgt gtcacacctt cacaataact caggcaaaga
120

gggtgacaag ttcaagctga acaagacaga gctcaaggag ctactgacca gggagctgcc
180

tagcttcctg gggaaaagga cagatgaage tgcattccag aaggtgatga gcaacttgga
240

cagcaacagg gacaatgaag ttgacttcca ggagtactgt gtcttctctgt cctgcattgc
300

catgatgtgc aatgaattct ttgagggtctg cccagataag gageccccgga agaagtgaag

[0002]

360

actcctcaga tgaagtgttg gggtagtatt tgccagtggg ggatcttccc tgttgctgt
420

gagcatagtg ccttactctg gcttcttcgc acatgtgcac agtgcctgagc aaattcaata
480

aaaggttttg aaactattaa aaaaaaaaaa aaa
513

<210> 2

<211> 512

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

attcttcccc tctctacaac cctctctctt cagccttctt tctttcttgg ttgatcctg
60

actgctgtca tggcgtgccc tctggagaag gccctggatg tgatgggtgac caccttccac
120

aagtactcgg gcaaagaggg tgacaagttc aagctcaaca agtcagaact aaaggagctg
180

ctgaccgggg agctgcccag cttcttgggg aaaaggacag atgaagctgc tttccagaag
240

[0003]

ctgatgagca acttggacag caacagggac aacgaggtgg acttccaaga gtactgtgtc
300

ttcctgtect geategecat gatgtgtaac gaattetttg aaggettccc agataageag
360

cccaggaaga aatgaaaact cctctgatgt ggttgggggg tctgccaget ggggccctcc
420

ctgtcgccag tgggcacttt tttttttcca ccttggetcc ttcagacacg tgettgatgc
480

tgagcaagtt caataaagat tcttgggaagt tt
512

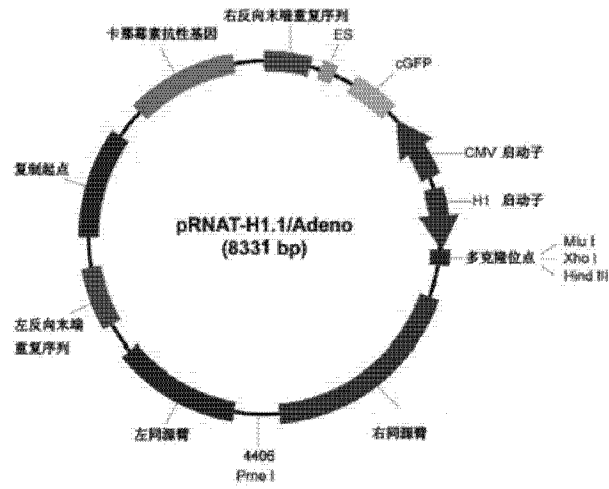


图 1

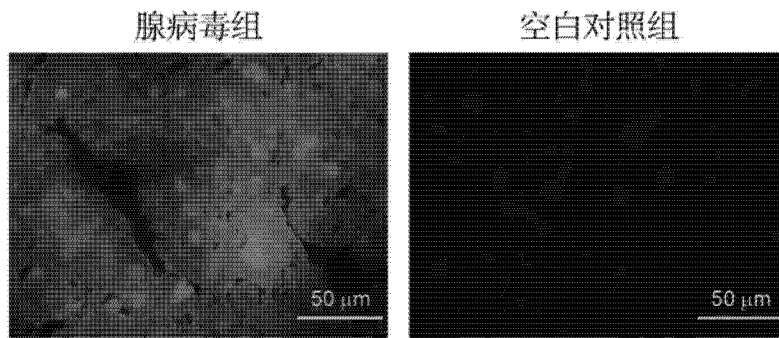


图 2

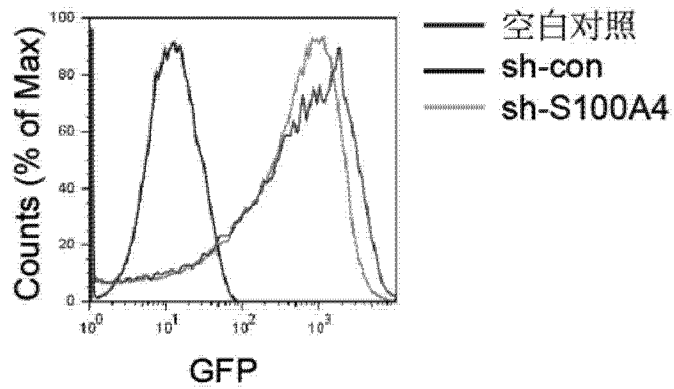


图 3

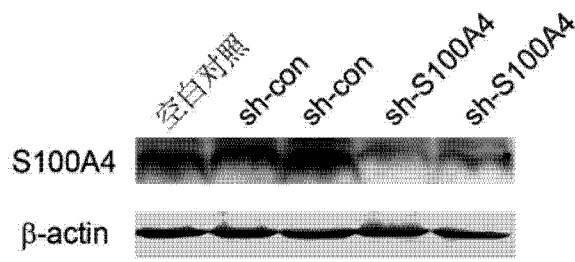


图 4

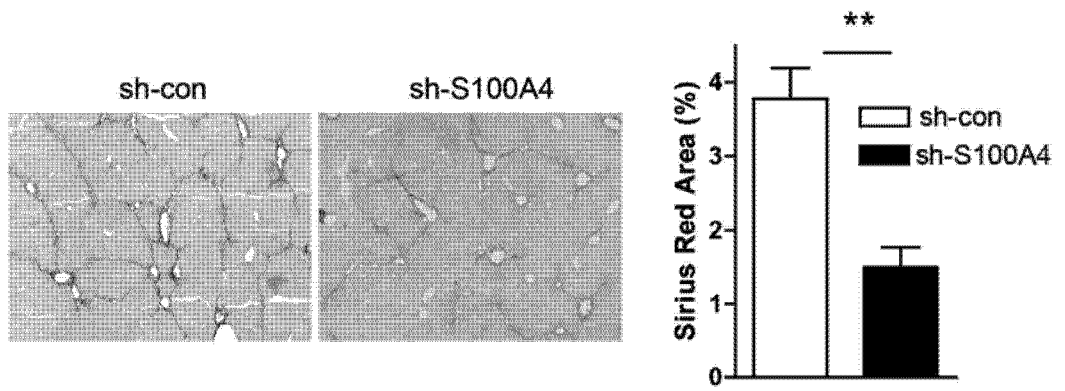


图 5