

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810224115.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101368180A

[22] 申请日 2008.10.15

[21] 申请号 200810224115.3

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 殷勤伟 赵春华 谷同军 边春景  
张洪杰

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

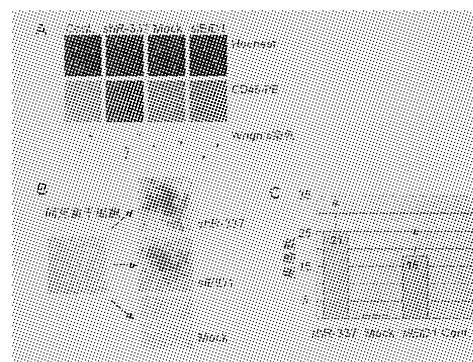
权利要求书1页 说明书21页 附图3页

## [54] 发明名称

一类能将间充质干细胞分化为造血细胞的小RNA分子及其作用靶点

## [57] 摘要

本发明提供了一种能够将人的非造血干细胞，如间充质干细胞(MSC)，分化为造血干细胞(HSC)的一种小RNA(shR337)及其衍生物，该小RNA的发现还提供了能够将非造血干细胞，如骨髓间充质干细胞，分化成造血细胞的作用靶点。将该小RNA转染到人骨髓间充质干细胞中后可以抑制EID1基因的蛋白质翻译，使人骨髓间充质干细胞转化成具有CD45<sup>+</sup>表面抗原阳性的造血干细胞，并能进一步分化为髓样细胞和淋巴样细胞。小鼠活体实验表明该类小RNA对间充质干细胞的分化是定向、专一的。



1. 一种将间充质干细胞转化为造血干细胞的小 RNA 或其衍生物，其包括具有 SEQ. ID. No.1 的核心核苷酸序列的发夹核酸或其衍生物。

2. 权利要求 1 所述的小 RNA 或其衍生物，其还包括由所述发夹核酸衍生出来的单链核酸 5'-GAUCCCGUGU AACACAAUGGUGAGUAUUUG-3' 等，或双链核酸

5'-GUAACACAAUGGUGAGUAUUUG-3'

|||||

3'-CAUUGUGUUACCACUCAUAAAC-5' 等。

3. 权利要求 1 所述的小 RNA 或其衍生物，其还包括沉默 EID1 的小干扰 RNA siR-EID1，其包括 SEQ. ID. No. 2-23 对应的 siRNAs，以及它们的衍生物。

4. 权利要求 1 到 3 任一项所述的小 RNA 或其衍生物，其作用靶点是 EID1 基因。

5. 权利要求 1 到 3 任一项所述的小 RNA 或其衍生物，所述核苷酸序列中的任意一个核苷酸是自然无修饰的，或是经不同化学方法修饰的，包括肽核苷酸（PNA）、闭锁核苷酸（LNA）、或甲氧-或乙氧修饰的核苷酸。

6. 权利要求 1 到 3 任一项所述的小 RNA 或其衍生物，其还包括通过能表达所述小 RNA 的各种病毒和质粒克隆载体将所述小 RNA 序列所对应的 DNA 序列所构成的小 RNA 表达体系。

7. 一种将间充质干细胞转化为造血干细胞的方法，其包括将权利要求 1 到 6 任一项所述的小 RNA 或其衍生物转染到间充质干细胞中，通过抑制作用靶点 EID1 的表达而将间充质干细胞转化为造血干细胞。

8. 权利要求 1 到 6 任一项所述的小 RNA 或其衍生物用途，其通过抑制作用靶点 EID1 的表达而将间充质干细胞转化为造血干细胞。

9. 权利要求 8 所述的用途，其用于制备将间充质干细胞转化为造血干细胞的药物。

10. 一种将间充质干细胞转化为造血干细胞的试剂盒，其包括权利要求 1 到 6 任一项所述的小 RNA 或其衍生物。

## 一类能将间充质干细胞分化为造血细胞的小 RNA 分子及其作用靶点

### 技术领域

本发明属于基因药物领域，更具体地，涉及一种具有特定序列的小的发夹 RNA，其通过抑制 E1A 样的分化抑制因子的表达，从而将间充质干细胞分化成造血细胞。

### 背景技术

造血干细胞移植是治疗某些难以治愈的疾病的一种有希望的新兴治疗技术。然而，造血干细胞的来源仍然是阻碍造血干细胞治疗技术在临床上发挥功效的主要障碍之一。寻找其它来源的干细胞并使之分化成造血干细胞是目前科学家们研究的重要课题。间充质干细胞(MSC)是各国科学家研究的比较多的一种干细胞，与造血干细胞(HSC)一样，两者都具有自我更新的能力和维持器官的造血功能。组织培养扩增的骨髓间充质干细胞区别于造血干细胞的特征是骨髓间充质干细胞不表达 CD45 和 CD31 分子(1)。尽管近来有报道认为，在适当的培养条件下，骨髓间充质干细胞能够被诱导分化成造血干细胞(2)，但大多数的研究人员仍然认为体外培养尚不能将骨髓间充质干细胞转化为造血干细胞(4-5)。因此寻找新的方法将骨髓间充质干细胞转化成造血干细胞在拓展干细胞在临床上的应用具有重要意义。

近年来的研究发现不同类型的造血细胞中小 RNA 的表达显著不同，而且这种不同在细胞的发育过程中起着重要的调节作用。例如，miR-181 和 B-淋巴细胞的发育有关(6)，miR-142 和 miR-223 与 T-淋巴细胞的发育有关，miR-221 和 miR-222 与人的红细胞生成有关(7)，miR-223 和小鼠的粒细胞分化相关，而 miR-10, miR-126 和 miR-17 与巨核细胞减少有关(8)。除此之外，人们还发现某些小 RNA，如 miR-128 和 miR-181，能起到阻止造血干细胞分化的作用(9)。尽管已经发现某些 miRNA，例如 miR-130a 和 miR-10a，通过作用 HOXA1 基因和 MAFB 基因的转录因子基

因而诱导细胞分化，人们仍然不清楚是否某一个 miRNA 或其它的小 RNA 就能决定细胞的自我更新过程，并能在细胞发育的早期阶段将骨髓间充质干细胞定向分化为造血干细胞。

## 发明内容

本发明涉及一种具有特定序列的小的发夹 RNA，其通过抑制 E1A 样的分化抑制因子 (EID1) 的表达，从而将间充质干细胞 (MSC) 分化成造血干细胞 (HSC)。

本发明的核心内容有以下六个方面。

第一方面，本发明提供了一种能将非造血干细胞分化成造血干细胞的短发夹核酸 shR-337 或其衍生物，所述短发夹核酸 shR-337 具有核心核苷酸序列：  
5'-GAUCCCGUGUAACACAAUGGUGAGUAUUUG  
acuagaauauaCAAUACUCACCAUUGUGUUACAUUUUUUGGAAA-3'

(SQE. ID. No.1)。该短发夹核酸的结构产生于人体蛋白质编码基因 *SH3PXD2B* 的第一个内含子部位，与外源的短发夹核酸类似，该短发夹核酸的茎部的两条链呈完全互补，包含至少 21 个核苷酸 (ACAUUGUGUUACCACUCAUAA，见图 1B)。这类小核酸能够在造血干细胞中高丰度表达，而在非造血干细胞中，如骨髓间充质干细胞中的表达丰度很低。由此衍生的含有上述核酸的核心结构的小 RNA，包括不同长度的小核酸以及在体内能转录生成此类小核酸的小核酸表达载体，也具有一定的将间充质干细胞转化为造血干细胞的功能。

本领域的技术人员应该理解，本发明所述的核苷酸序列中的任意一个核苷酸可以是自然无修饰的，也可以是经不同化学方法修饰的，包括肽核苷酸 (PNA)、闭锁核苷酸 (LNA)、或甲氧-或乙氧修饰的核苷酸。

另外，本领域的技术人员还应该理解，本发明所述的核苷酸其还可以包括由上述发夹核酸衍生出来的单链核酸，如 5'-GAUCCCGUGUAACACAAUGGUGAGUAUUUG-3' 等，或双链核酸

5'-GUAACACAAUGGUGAGUAUUUG-3'

|||||

3'-CAUUGUGUUACCACUCAUAAAC-5' 等。

第二方面，本发明提供了能将间充质干细胞分化为造血干细胞的作用

靶点 EID1(E1A-样分化抑制因子 1) (GeneBank 基因登记号为: NM\_014335.2)。在 EID1 的 3'不翻译区存在着 5 个与本发明第一方面所述的小 RNA 相互作用的作用位点(图 1C)。抑制 EID1 的表达能够诱导非造血干细胞,如骨髓干细胞向造血干细胞的定向分化。

第三方面,根据上述方面,本发明进一步研究表明靶向 EID1 的一些 siRNA 分子也具有内源性小 RNA 的作用,它们能有效地抑制靶 EID1 的表达,从而像内源性的 shR-337 一样能够诱导骨髓间充质干细胞向造血干细胞的定向分化。本发明将这种靶向 EID1 的 siRNA 分子命名为 siR-EID1,其包括,但不限于,下表 1 中所列出的 SEQ. ID. No. 2-23 对应的 siRNAs,以及它们的衍生物。

第四方面,本发明提供了一种将间充质干细胞转化为造血干细胞的方法,其包括将本发明所述的小 RNA 或其衍生物转染到间充质干细胞中,通过抑制作用靶点 EID1 的表达而将间充质干细胞转化为造血干细胞。

第五方面,本发明提供了本发明所述的小 RNA 或其衍生物的用途,其可以用于制备将间充质干细胞转化为造血干细胞的药物,用于治疗人的血液疾病。另外,本发明所述的小 RNA 或其衍生物还可以用于制备包含其的试剂盒。

第六方面,本发明提供了包含本发明所述的小 RNA 或其衍生物的试剂盒。

以下将通过实施例对本发明作进一步的阐述,但实施例并不限制本发明的保护范围。本领域的技术人员完全可以根据本发明的构思和所公开的技术方案,进行不背离本发明的精神和范围的修改和变动,这也在本发明的保护范围之内。

## 附图说明

图 1. 一种具有能够将非造血干细胞分化为造血干细胞的小发夹 RNA shR-337。(A) shR-337 在不同干细胞中的表达水平;(B) shR-337 的代表性结构,和 (C) shR-337 抑制 EID1 基因表达的作用靶点。

图 2. 过表达 shR-337 小 RNA 能有效地在转译水平抑制靶 EID1 的生物合成。(A) 无功能小 RNA 和 shR-337 有功能小 RNA 表达载体的构建。

(B) 新鉴定的 shR-337 小 RNA 在不同细胞中的表达水平。(C) 实时定量 PCR 对不同条件下的 EID1 基因表达量的分析, 揭示 shR-337 小 RNA 对 EID1mRNA 的表达没有影响, 而相应的 siRNA 却能明显的下调 EID1mRNA 的表达。(D) 蛋白质印迹分析显示 shR-337 小 RNA 明显地诱导 EID1 蛋白质水平的下降, 揭示 shR-337 小 RNA 能在转译水平抑制 EID1 的合成, 其中相同的蛋白质上样量通过使免疫印记分析获得的相同的肌动蛋白的量来保证。

图 3. 在人骨髓间质干细胞中强制表达 shR-337 能诱导细胞的增殖和分化。(A)在倒置显微镜下(型号: EHSY LAB, 日本 OLYMPUS)观察到的人骨髓间质干细胞, 转染有假的小 RNA (Mock) 的人骨髓间质干细胞以及转染有 shR-337 的人骨髓间质干细胞的细胞形态。(B) 细胞转染后在生长培养基中培养 24 小时, 再在转移到细胞分化培养基中培养 12 小时后进行造血干细胞专一的 CD45 的免疫组化染色。(C) CD45 阳性的造血干细胞的细胞集落形成能力分析。人骨髓间质干细胞转染 shR337 和假的小 RNA 载体后 14 天形成的细胞集落数。n>6/组, p<0.001。。

图 4. 体内强制表达 shR-337 对造血干细胞系分化的影响。(A)细胞移植后 60 天小鼠骨髓部位的免疫荧光和 Hoechst33342(Sigma-Aldrich, cat. no. H-3201)染色。图中展示了种植了对照, 转染了假小 RNA(Mock)和 shR-337 60 天后的小鼠骨髓中具有人 CD45, CD13 或 CD33 专一性抗原的细胞。(B) 在 NOD-SCID 鼠体内由人骨髓间质干细胞进行的造血干细胞重建。将  $10^5$  GFP+CD45+BMSCs 移植到经临界致死剂量的辐射处理过的 NOD-SCID 小鼠。移植 8 周后, 小鼠骨髓细胞的流式细胞图表明具有多种细胞系(淋巴细胞和骨髓细胞)的重建。(C) shR-337 诱导造血干细胞系分化的工作机制图。(D) RUNX1 在不同情况中的表达水平。

### 具体实施方式

以下将通过实施例对本发明作进一步的阐述。但是, 本领域的普通技术人员应该理解, 下述实施例仅是用于举例说明的目的, 并不限制本发明的保护范围, 本发明的精神和范围由后附的权利要求所限定。本领域有关的技术人员完全可以根据本发明的构思和所公开的技术方案, 进行不

背离本发明的精神和范围的修改和变动，这也在本发明的保护范围之内。

### 实施例 1. 细胞与细胞培养

骨髓样本来源于 30 位健康的志愿者（年龄为 20-50 岁），骨髓的获取遵循北京协和医院管理委员会的利用人体材料进行科学研究的指导原则，在捐献者同意的前提下进行的。从骨髓中分离具有表型为 Flk1<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>的干细胞的基本步骤为：通过蔗糖梯度密度离心（离心力为 1.077g/ml）获得单核细胞。利用结合有 CD5, GlyA 和 CD34 的磁珠将获得的单核细胞中的造血干细胞剔除。为了获得单细胞来源的细胞克隆，每一位病人的骨髓细胞通过有限稀释法依次稀释到 9600 个孔的铺有纤连蛋白(fibronectin, 目录号 W1509, 购自 Genitix, 英国)和胶原蛋白(collagen, 目录号 W1557, 购自 Genitix, 英国)的培养板上，使细胞数为 1 个/孔。细胞培养基为 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基和含 40% MCDB-201(目录号 M6770, Sigma-Aldrich) 及微量元素的 Ham F12 完全培养基，上述培养基补充了 2%的胎牛血清（目录号 12319018, GIBCO），1 ng 的转铁胰岛素（insulin transferrin selenium）（目录号 17-838Z ITS, 毕龙-毕特博生物技术有限公司, 西安）， $10^{-9}$  M 地塞米松（dexamethasone）（目录号 D-2915, Sigma）， $10^{-4}$  M 2-磷酸-抗坏血酸（目录号 A-8960, Sigma），20 ng/ml 白介素-6（R&D systems, 目录号 406-ML），10 ng/ml 表皮生长因子（目录号 E-9644, Sigma），10 ng/ml 血小板来源的生长因子 BB（Sigma-Aldrich, 目录号 P-3201），50 ng/ml 胎牛肝酪氨酸激酶 3（Flt-3）的配体（Sigma 目录号 P2850），30 ng/ml 的骨的形态蛋白-4（目录号 P2714, Sigma Chemical, St Louis, MO）以及 100 单位/ml 的青霉素（目录号 15140 - 122, Gibco Invitrogen）和 100 μg/ml 的链霉素（目录号 15140 - 122, Gibco Invitrogen）。将细胞在 37°C，5%二氧化碳的湿润空气中培养。培养基每 4-6 天更换一次。组织培养时，对培养槽中的单个贴壁细胞在培养的第一天进行鉴定。每天检查单细胞集落的形成。单细胞集落通过台盼蓝法收集并进行扩增培养。CD133<sup>+</sup>的造血干细胞从血库中的血液经过偶联有 CD133<sup>+</sup>免疫抗体的磁珠进行分离。

## 实施例 2. 短发夹小核酸 pre-shR337 的表达载体的构建与转染

我们使用生物信息学从人体蛋白质编码基因 *SH3PXD2B* 的第一个内含子中发现了一个短发夹小 RNA 基因, 命名为 shr-337。为证实此小 RNA 基因能产生相应的功能性小 RNA, 我们用克隆测序技术在造血干细胞中检测到它的表达 (图 1A)。为了构建能表达这个小 RNA 的病毒载体, 用化学合成的方法合成了与 pre-shR337 的序列相对应的短的发夹 DNA 序列: 5'-GATCCCGTGTAACACAATGGTGAGTATTTGactagaatataCAAATACTC ACCATTGTGTTACATTTTTTTGGAAA-3' 和 5'-AGCTTTTCCAAAAAATGTAACACAATGGTGAGTATTTGtatattctagtCAAATACTCACCATTTGTGTTACACGG-3', 将合成的两条 DNA 退火形成双链 DNA, 利用标准的分子克隆方法将上述 DNA 克隆到逆转录酶病毒载体 pMSCV (目录号 35140, Invitrogen) 中。构建的小核酸表达质粒利用 U6 启动子表达目的小核酸 pre-shR337。将该质粒通过细胞转染试剂转染到人肾上皮细胞 H293T (来源: 医科院基础所细胞中心) 中 (4, 8, 9, 11)。对照质粒 mock-GFP 用同样的方法转染。含 mock-GFP 和 shR337-GFP 的转染 H293T 细胞中的逆转录病毒分别为  $3 \times 10^6/\text{ml}$  和  $4 \times 10^6/\text{ml}$ 。

## 实施例 3. 过表达 shR-337 能够诱导骨髓间质干细胞分化成造血干细胞

图 2B 给出了将含 shR-337 的病毒载体转染到实施例 1 中培养的人骨髓间质干细胞后, 通过标准的定量 RT-PCR 检测的 shR-337 在细胞中的表达水平。与对照以及假的小 RNA 转染的情况相比较, 转染 shR-337 病毒表达载体 (表达载体图谱示意图见图 2A) 后, 细胞内的 shR-337 的表达水平显著增高 (图 2B)。而且转染 shR337 后能在细胞中长期维持。高效表达 shR-337 后 2 天用 RT-PCR 反应可以检测到 shR337 的靶基因 EID1 在其转录水平上有微小的变化 (图 2C), 但是用免疫印记分析发现 EID1 的蛋白表达水平发生了显著的降低 (图 2D)。这一点和造血干细胞中内源性的 EID1 下调相一致, 同时伴随着 CD45 标志分子的表达 (图 3A 和 3B)。

为了明确证实单细胞通过培养生长能生成分化了的后代, 将转染过的干细胞分离出来再接种到涂有纤连蛋白和胶原蛋白的 24 孔培养板中, 并向培养基中加入造血干细胞细胞因子和生长因子的混合物。转染的人骨髓



间质干细胞通过检测转染载体中所含的绿色荧光蛋白来鉴定，而骨髓间质干细胞分化成为造血干细胞通过鉴定专一性的 CD45 表面抗原（图 3A）来鉴定。

从每一组的骨髓中选取 2000 个细胞，并进行 14 天的组织培养。体外细胞群落形成能力分析表明（1,2,3,5），在这 14 天的培养过程中，过表达 shR-337 有利于生长并形成祖细胞。这种变化是因为转染细胞的选择性扩增。只有在含 shR-337 的细胞扩增时，扩增的细胞主要才主要是含绿色荧光蛋白的细胞并具有 CD45 阳性的特征，如图 3B 所示。虽然在骨髓间质干细胞，转染有假的小 RNA 载体的骨髓间质干细胞和转化有 shR-337 的骨髓干细胞的三种情况下起始接种的细胞数均为 5000 个/孔，但是，只有含有 shR337 的转染细胞才能快速增殖（图 3C）。定量分析表明在感染有假小 RNA 载体的骨髓干细胞中只有 0.02% 的细胞经过 14 天的培养能够形成 CD45 阳性的群落，而在感染有 shR337 的骨髓间质细胞中经过 14 天的培养有 0.5% 的细胞能够形成 CD45 阳性的细胞群落。这一结果表明强制性升高 shR337 在骨髓间质干细胞中的表达量能够将骨髓间质干细胞专一性的定向分化成造血干细胞。

#### **实施例 4. 抑制 shR-337 的靶基因 EID1 同样能够诱导骨髓间质干细胞向造血干细胞的转化**

本实施例通过化学合成法合成了高专一性地沉默 EID1 基因的一系列干扰小 RNAs 分子 siR-EID1(序列见表 1, SQE. ID. No.2-23)，但本领域的技术人员应该理解其不局限于这些 siRNAs，还可以包括其它相应的能使靶 EID1 基因下调的 siRNAs 分子，或它们的衍生物。在本实施例中，将其中一个 siR-EID1，即 SQE. ID. No.2，转染到实施例 1 中培养的骨髓间充质干细胞中，并用定量 RT-PCR 方法分析 EID1 基因的表达改变，与假的小 RNA 对照相比，转染了 EID1-siRNA 的骨髓间充质干细胞中 EID1 的表达量降低了 40%（图 2C），而经过上述处理的骨髓间充质干细胞能够分化成为造血干细胞，并伴随着 CD45 专一性表面抗原的表达(图 3A)，而转染假小 RNA 却没有 CD45 表面抗原的专一性表达。从本实施例的研究结果我们发现 shR-337 的作用靶点是 EID1 基因，敲除骨髓间质干细胞中的 EID1

基因能够导致骨髓间质干细胞定向分化成为造血干细胞。

表 1. 靶向 EID1 mRNA 不同位点的 siRNA 分子 (siR-EID1) 的序列。

SQE. ID. No.	对应的 DNA 序列 (正义链)
2	GGAGGACGACTACGACTATTT
3	GCATCTGTCTTGCTGGAAGCT
4	GGTTGAGCGGTTTGCACAATG
5	GGTTTGCACAATGTCGGAAAT
6	GGCGAGGAATTTGATGACTGG
7	GCGAGGAATTTGATGACTGGG
8	GCTCTTGAAGAAGCCGACAAG
9	GACAAGATGTTTCTGAGAACA
10	GGCGGGTTTCAGATGCATTAT
11	GCGGGTTTCAGATGCATTATG
12	GGTTTCAGATGCATTATGATT
13	GGACCCAAC TTTCCGCTATCT
14	GCCACAGTTATCAAAGGCTAC
15	GACACTAAATGTGTGTGAATG
16	GCCCAGAAATTACCTTGGTAT
17	GCTTGTTATTTGTCATGCACC
18	GCTTCAGCTATCTAATTCACA
19	GCCCTATCAATGAGTATGTTG
20	GCCGTGGTTACCTTACTAAGA
21	GCTGAAGTTCTAGGAGAGTAA
22	GCTCCATTATAGCAGTAAAGA
23	GAACGAATATCCAATGCAACA

实施例 5. 动物实验表明在人的骨髓间质干细胞中高效表达 shR-337 后能定向分化成造血干细胞

将转染有 shR-337 以及假的 shRNA 的逆转录病毒酶载体的骨髓间质

干细胞分别移植到经临界致死剂量的放射处理的联合免疫缺陷小鼠（小鼠的品系为非肥胖糖尿病（nonobese diabetic）（NOD）/ *LtSz-scid/scid*（SCID），来源：上海肿瘤生物技术研究所，体重 20g 左右，年龄：6–8 周，雄性）体内。60 天后能够检测到由表达 GFP 的骨髓间质干细胞分化成的造血细胞。利用抗人源性细胞抗原的单克隆抗体对鼠的骨髓进行免疫组化分析，发现在经临界致死辐射剂量的放射处理的小鼠的骨髓中能够检测到造血干细胞祖细胞基因标志分子的表达，这些造血祖细胞能够进一步分化成以特征表达 CD33 分子标志物的髓样白细胞和以特征表达 CD13 分子标志物的淋巴细胞（图 4A）。相反，在对照组和移植有假 siRNA 的小鼠实验组的骨髓部位，几乎检测不到人源细胞的 CD45, CD33 或 CD13 特征分子标志物阳性的细胞。

我们还分别收集了实验鼠的各个器官，通过 GFP 发光法检测各器官中是否存在由人的骨髓间质干细胞分化后的细胞。检测结果未观察到人的骨髓间质干细胞的分化细胞。由此可见 shR-337 能够专一性地将人的骨髓间质干细胞定向分化成造血干细胞。我们还采用了三种抗人源白细胞和干细胞分子标志物的单克隆抗体如抗 CD13, CD33 和 CD45 抗体对小鼠骨髓中的间质干细胞分化细胞进行表型分析。8 周后从小鼠的骨髓腔中获取感染了转染有 shR-337 的人骨髓间质干细胞的组分进行细胞流式分析（图 4B）。和体外研究的结果一致，在人的骨髓间质干细胞中表达 shR-337 能使 CD13 阳性的淋巴细胞从对照组的 0.5% 提高到实验组的 2.8%。同样，对 CD33 阳性的骨髓细胞也有显著的提高。

上述实施例表明 shR-337 和其它 EID1 相关的 siRNAs, 通过抑制 EID-1 基因的表达，能够在体内和体外专一性地将非造血干细胞，如人骨髓间质干细胞分化成造血干细胞。这一研究结果揭示这些小 RNA 分子也许可用于大规模的间充质干细胞向造血细胞的分化，以致代替造血干细胞用于人体血液病的治疗。

---

## 参考文献

1. Angelopoulou, M., Novelli, E., Grove, J.E., Rinder, H.M., Civin, C., Cheng, L., Krause, D.S., 2003. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol* 31, 413–420.
2. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2739-49.
3. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M., 2002a. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49.
4. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. & Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303, 83–86.
5. Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Sep;24(9):2052-9.
6. Chen Y, Haviernik P, Bunting KD, Yang YC. Cited2 is required for normal hematopoiesis in the murine fetal liver. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2889-98.
7. Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C. & Bozzoni, I. (2005) A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*, 123, 819–831.
8. Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., Valtieri, M., Calin, G.A., Liu, C.G., Sorrentino, A., Croce, C.M. & Peschle, C. (2005) MicroRNAs 221 and 222

- inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *PNAS*, 102, 18081–18086.
9. Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., Calin, G.A., Liu, C.G., Bloomfield, C.D., Andreeff, M. & Croce, C.M. (2006) MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *PNAS* 103, 5078–5083.
  10. Georgantas, III, R.W., Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C.G., Heimfeld, S., Calin, G.A., Croce, C.M. & Civin, C.I. (2007) CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *PNAS*, 104, 2750–2755.
  11. Yin, J.Q. & Zhao, R.C. Identifying expression of new small RNAs by microarrays. *Methods*. 43, 123-30 (2007).
  12. T. Gu et al. A novel class of endogenous short hairpin RNA in human. (Accompanying manuscript) 2008.
  13. Kasper LH, Boussouar F, Ney PA, Jackson CW, Rehg J, van Deursen JM, Brindle PK. A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature*. 2002 Oct 17;419 (6908):738-43.
  14. Kung AL, Rebel VI, Bronson RT, Ch'ng LE, Sieff CA, Livingston DM, Yao TP. Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev*. 2000 Feb 1;14(3):272-7.
  15. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000 Nov;6(11):1282-6.
  16. Liu X, Wang L, Zhao K, Thompson PR, Hwang Y, Marmorstein R, Cole PA. The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature*. 2008 Feb 14;451(7180):846-50.
  17. Messina, D. N., J. Glasscock, W. Gish, and M. Lovett. 2004. An ORFeome-based analysis of human transcription factor genes and the construction of a microarray to interrogate their expression. *Genome Res*. 14:2041–2047.

18. Miyake S, Sellers WR, Safran M, Li X, Zhao W, Grossman SR, Gan J, DeCaprio JA, Adams PD, Kaelin WG Jr. Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(23):8889-902.
19. Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. & Nakatani, Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953–959 (1996).
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
21. Ramkissoon, S.H., Mainwaring, L.A., Ogasawara, Y., Keyvanfar, K., Philip McCoy, Jr, J., Sloand, E.M., Kajigaya, S. & Young, N.S. (2005) Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leukemia Research*, 30, 643–647.
22. Rebel VI, Kung AL, Tanner EA, Yang H, Bronson RT, Livingston DM. Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 12;99(23):14789-94.
23. G. Ren, L. Zhang, X. Zhao, G. Xu, Y. Zhang, A. I. Roberts, R. C. Zhao, and Y. Shi. (2008) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2(2):141-150
24. Reyes, M. T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, and C.M. Verfaillie. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615–2625 (2001).
25. Sandberg ML, Sutton SE, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Hogenesch JB, Cooke MP. c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Dev Cell*. 2005 Feb;8(2):153-66.
26. Serafini M, Dylla SJ, Oki M, Heremans Y, Tolar J, Jiang Y, Buckley SM,

- 
- Pelacho B, Burns TC, Frommer S, Rossi DJ, Bryder D, Panoskaltsis-Mortari A, O'Shaughnessy MJ, Nelson-Holte M, Fine GC, Weissman IL, Blazar BR, Verfaillie CM. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2007 Jan 22;204(1):129-39.
27. Sorrentino BP. Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2004 Nov;4(11):878-88.
28. Xu W, Fukuyama T, Ney PA, Wang D, Rehg J, Boyd K, van Deursen JM, Brindle PK. Global transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 are highly essential collectively but not individually in peripheral B cells. *Blood*. 2006 107(11):4407-16.

## SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一类能将间充质干细胞分化为造血细胞的小 RNA 分子及其作用靶点

<130> IB083046

<160> 23

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工的

<400> 1

gaucgccgugu aacacaaugg ugaguauuug acuagaauau acaaaauacuc accauugugu 60

uacauuuuuu ggaaa 75

<210> 2

<211> 21

<212> DNA



<213> 人工的

<400> 2

ggaggacgac tacgactatt t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 3

gcatctgtct tgctggaagc t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 4

ggttgagcgg ttgcacaat g

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

---

<400> 5  
ggtttgaca atgtcggaaa t 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 6  
ggcgaggaat ttgatgactg g 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 7  
gcgaggaatt tgatgactgg g 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 8

---

gctcttgaag aagccgaaa g	21
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<400> 9	
gacaagatgt ttctgagaac a	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<400> 10	
ggcgggtttc agatgcatta t	21
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<400> 11	
gcgggtttca gatgcattat g	21

---

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 12

ggtttcagat gcattatgat t

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 13

ggaccaact ttcgctatc t

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 14

gccacagtta tcaaaggcta c

21

<210> 15

<211> 21

---

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 15

gacactaaat gtgtgtgaat g

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 16

gcccagaaat taccttgga t

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 17

gcttgttatt tgcatgcac c

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

---

<213> 人工的

<400> 18

gcttcagcta tctaattcac a

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 19

gccctatcaa tgagtatggt g

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<400> 20

gccgtggtta ccttactaag a

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

---

<400> 21	
gctgaagttc taggagagta a	21
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<400> 22	
gctccattat agcagtaaag a	21
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<400> 23	
gaacgaatat ccaatgcaac a	21

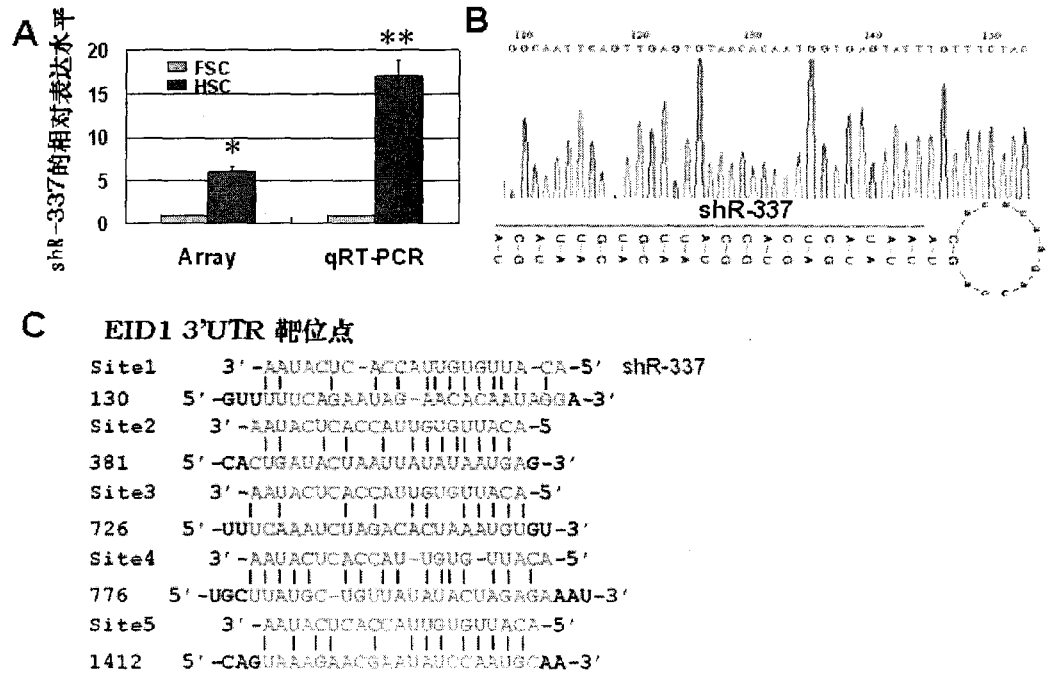


图 1

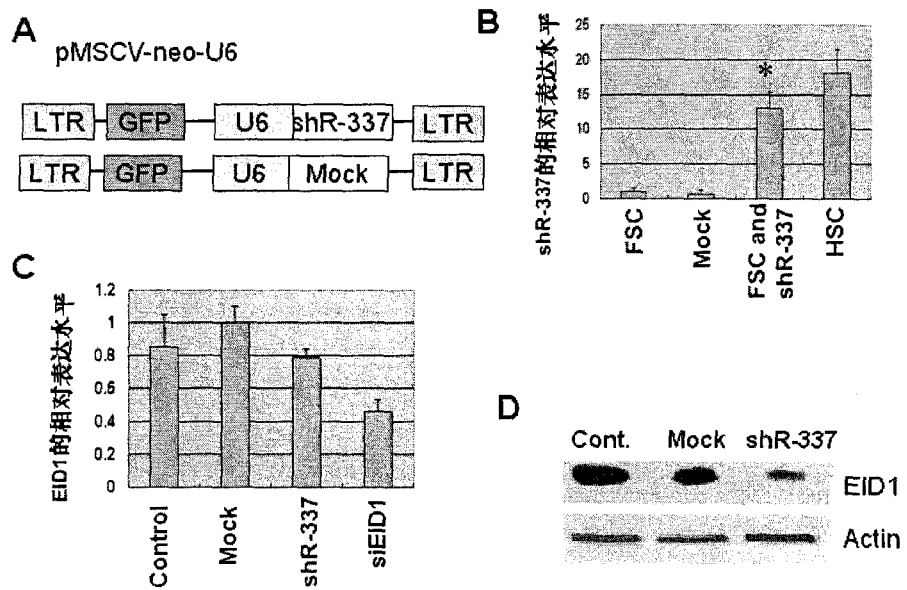


图 2



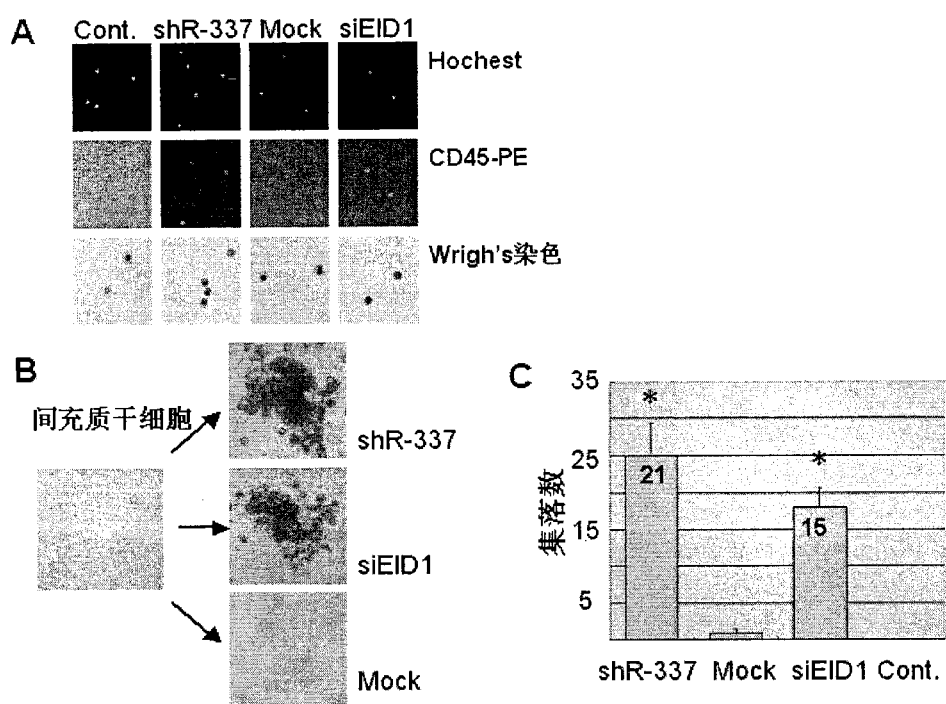


图 3

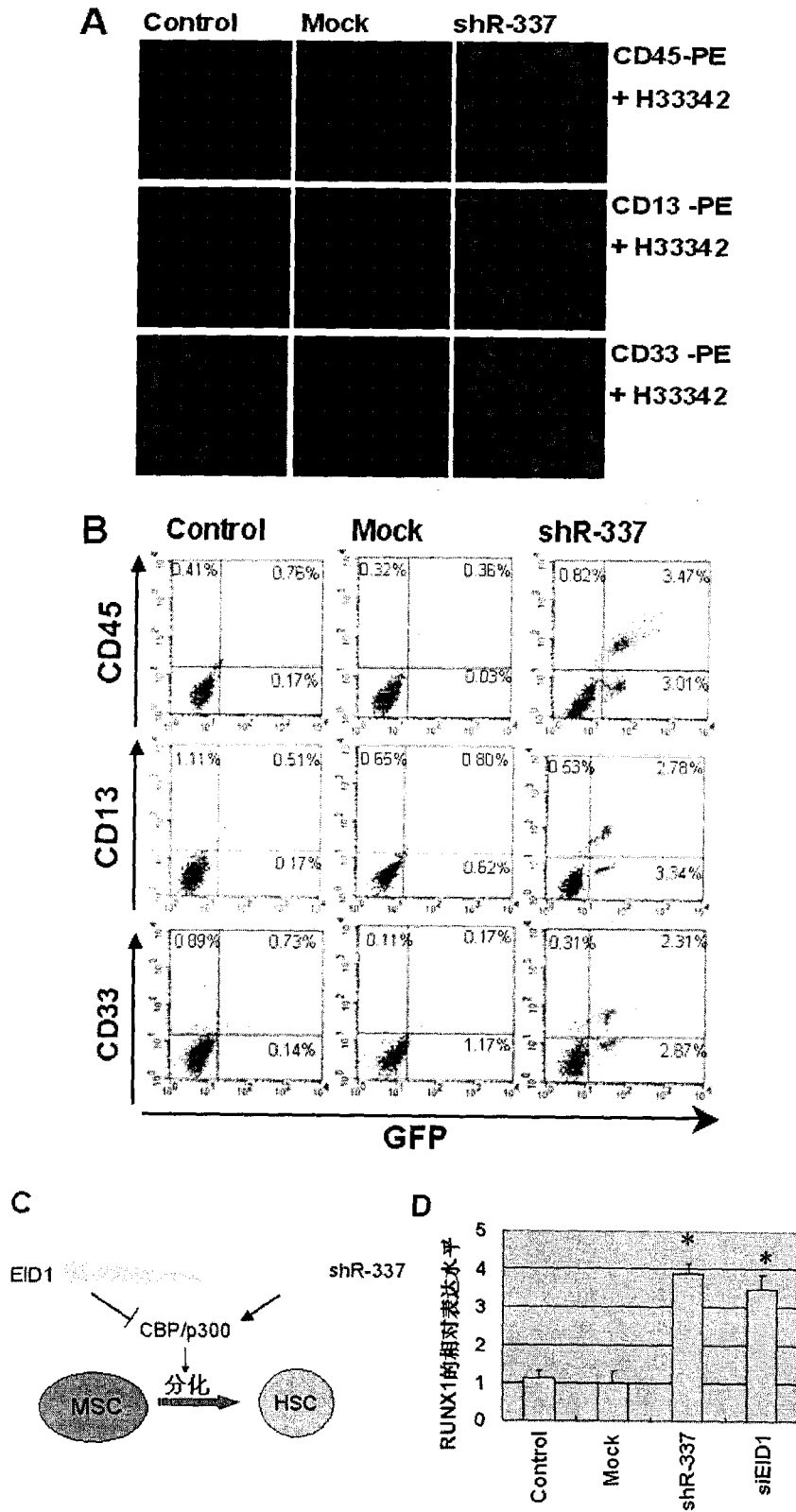


图 4