



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112587654 B

(45) 授权公告日 2022.10.14

(21) 申请号 202011500878.3

US 6083907 A,2000.07.04

(22) 申请日 2020.12.18

CN 109675019 A,2019.04.26

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109364249 A,2019.02.22

申请公布号 CN 112587654 A

CN 104619727 A,2015.05.13

US 2017157243 A1,2017.06.08

(43) 申请公布日 2021.04.02

US 2019177433 A1,2019.06.13

(73) 专利权人 安徽医科大学

郜一贺等.靶向抑制巨噬细胞Act1表达对溃疡性结肠炎的作用.《中国实验动物学报》.2016,第24卷(第06期),

地址 230032 安徽省合肥市蜀山区梅山路81号

韩暄等.新型神经营养因子CDNF/MANF家族与帕金森病.《立体定向和功能性神经外科杂志》.2011,第24卷(第5期),

(72) 发明人 沈玉先 杨琳 邵伟 陈滢

沈玉君

张忠等.小鼠溃疡性结肠炎模型的建立及病理组织学比较.《中国实验动物学报》.2012,第20卷(第06期),

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

专利代理师 任凤华

Walker,BW et al..Engineering

Electroconductive Scaffolds for Cardiac

Tissue Regeneration.《TISSUE ENGINEERING:

Part A》.2017,第23卷

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

审查员 白婧

(56) 对比文件

CN 109613258 A,2019.04.12

权利要求书1页 说明书10页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

中脑星形胶质细胞源性神经营养因子在治疗溃疡性结肠炎中的应用

(57) 摘要

本发明公开了中脑星形胶质细胞源性神经营养因子在治疗溃疡性结肠炎中的应用。本发明研究发现了MANF在人溃疡性结肠炎患者以及小鼠溃疡性结肠炎模型中表达上调,说明MANF在溃疡性结肠炎中表达增加。本发明通过动物实验表明,MANF能显著缓解溃疡性结肠炎造成的血便,增加模型小鼠体重,改善腹泻状况。MANF能减少溃疡性结肠炎的炎性巨噬细胞浸润,减少炎症因子的表达。MANF可用于治疗或者缓解或改善溃疡性结肠炎。

1. MANF在制备治疗和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的产品中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述MANF为重组人MANF。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述重组人MANF为R1)或R2)的蛋白质:
 - R1) 氨基酸序列是SEQ ID No.2的蛋白质,
 - R2) 氨基酸序列是SEQ ID No.2的第3-160位的蛋白质。
4. 与MANF相关的生物材料在制备治疗和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的产品中的应用;所述生物材料为下述任一种:
 - B1) 编码权利要求1-3中任一权利要求中所述的MANF的核酸分子,
 - B2) 含有B1)所述核酸分子的表达盒,
 - B3) 含有B1)所述核酸分子的重组载体、或含有B2)所述表达盒的重组载体,
 - B4) 含有B1)所述核酸分子的重组微生物、或含有B2)所述表达盒的重组微生物、或含有B3)所述重组载体的重组微生物,
 - B5) 含有B1)所述核酸分子的转基因动物细胞系、含有B2)所述表达盒的转基因动物细胞系或含有B3)所述重组载体的转基因动物细胞系,
 - B6) 含有B1)所述核酸分子的转基因植物细胞系、含有B2)所述表达盒的转基因植物细胞系或含有B3)所述重组载体的转基因植物细胞系。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:B1)所述核酸分子为B11)或B12):
 - B11) 编码序列为SEQ ID No.1所示的DNA分子,
 - B12) 核苷酸序列是SEQ ID No.1第9-482位所示的DNA分子。

中脑星形胶质细胞源性神经营养因子在治疗溃疡性结肠炎中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域中的中脑星形胶质细胞源性神经营养因子在治疗溃疡性结肠炎中的应用。

背景技术

[0002] 溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC) 是以肠粘膜或固有层的持续复发性炎症为特征的肠道炎性病变, 它起病于直肠, 并向近端结肠侵袭, 病变主要于粘膜及粘膜下层, 临床症状为血性腹泻、体重减轻、粘液便伴有里急后重感以及腹部绞痛。溃疡性结肠炎被认为是经济发达国家和地区的常见病, 高发地区主要包括欧洲及北美地区等, 但值得注意的是, 随着社会经济的发展, 生活习惯和饮食习惯的西方化, 近二十几年来, 溃疡性结肠炎的发病率在发展中国家出现快速上升趋势, 被认为是一种新兴的全球性疾病。由于该病发病隐匿, 容易复发, 花费昂贵, 迁延不愈等特点, 给患者身心带来了巨大的痛苦, 被世界卫生组织列为现代难治病之一。溃疡性结肠炎不仅严重影响到患者的个人生存质量, 也给社会经济和医疗资源造成了巨大负担。

[0003] 目前临床上治疗溃疡性结肠炎的手段主要包括药物和手术治疗, 治疗的目的是使溃疡性结肠炎处于长期静止状态, 避免结肠切除手术和结肠癌的发生。目前, 溃疡性结肠炎治疗药物主要有5-氨基水杨酸、柳氮磺胺吡啶、糖皮质激素和免疫抑制剂。抗TNF- α 药物英夫利昔单抗和阿达木单抗对于中到重度溃疡性结肠炎的治疗很有疗效, 能有效缓解其症状并维持疾病静息状态。结肠切除术用于不能控制的出血, 穿孔和结直肠癌病人, 也用于难治性的重度溃疡性结肠炎病人。

[0004] 溃疡性结肠炎的发病机制尚未完全明确, 目前认为遗传易感性、外界环境刺激、自身免疫失调以及肠道菌群紊乱等多方面因素共同参与溃疡性结肠炎的发生与发展。对于溃疡性结肠炎, 现有的临床用药只能控制症状而不能彻底治愈, 且还伴随严重的副作用, 给患者带来了沉重的经济和心理负担。此外, 随着溃疡性结肠炎发病时间的延长, 可损害结肠的正常解剖学结构和生理学功能, 增加溃疡性结肠炎患者患结肠炎相关肿瘤 (colitis associated cancer, CAC) 的风险。值得注意的是, 大多数结直肠癌发生前并不存在明显的炎症反应病理特征, 因此深入挖掘溃疡性结肠炎发生发展的病理生理机制, 以及寻找安全有效的新的药物治疗靶点具有重要意义。

[0005] 硫酸葡聚糖钠盐 (DSS) 诱导的溃疡性结肠炎模型是利用化学法建立小鼠溃疡性结肠炎模型最常用的方法。1985年, 日本研究人员首次使用DSS来建立溃疡性结肠炎的动物模型。DSS诱导溃疡性结肠炎的机制可能是抑制上皮细胞的增生, 破坏肠黏膜屏障, 致使蛋白质、多糖等大分子物质渗到肠黏膜组织, 并能导致肠道菌群的失调和巨噬细胞的功能受损等。另有研究证实, DSS诱导的溃疡性结肠炎模型由Th1/Th2细胞反应所介导, 可明显引起TNF- α 、IFN- γ 和IL-10的高表达, 能较好模拟人体内的免疫反应。该模型操作简单, 仅需在饮水中添加特定浓度的DSS试剂, 便于操作, 建模周期也可根据需要调整; 其结果重复性好,

可反复用DSS刺激产生类似于人溃疡性结肠炎急性期和缓解期的症状,是较为理想的模拟人类溃疡性结肠炎的模式。

[0006] 中脑星形胶质细胞源性神经营养因子(Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor, MANF)是Petrova等于2003年首次在体外培养的大鼠中脑I型星形胶质细胞的培养基中分离得到的一种能促进多巴胺神经元存活的神经营养因子,也被称为ARMET(Arginine Rich, Mutated in Early stage of Tumors)或ARP(Arginine-Rich Protein)。MANF基因长度为4.3kb,包含4个外显子,位于人类3号染色体上。MANF初级转录本包含1109bp,编码179个氨基酸蛋白。N端含有21个氨基酸的信号肽,将新合成的MANF输入到ER。分泌形式的MANF是没有信号肽序列的全长蛋白,即158个氨基酸,分子量约为18kDa。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的一个技术问题是如何治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎。

[0008] 为了解决以上技术问题,本发明提供了MANF在制备治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用。

[0009] 上述应用中,所述MANF可为人MANF。所述人MANF可为重组人MANF。

[0010] 上述应用中,所述重组人MANF可为R1)、R2)或R3)的蛋白质:

[0011] R1)氨基酸序列是SEQ ID No.2的蛋白质,

[0012] R2)氨基酸序列是SEQ ID No.2的第3-160位的蛋白质,

[0013] R3)将R1)或R2)所示的蛋白质经过一个以上氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与R1)或R2)所示的蛋白质具有90%以上的同一性且具有缓解溃疡性结肠炎活性的蛋白质。

[0014] 上述应用中,同一性是指氨基酸序列的同一性。可使用国际互联网上的同源性检索站点测定氨基酸序列的同一性,如NCBI主页网站的BLAST网页。例如,可在高级BLAST2.1中,通过使用blastp作为程序,将Expect值设置为10,将所有Filter设置为OFF,使用BLOSUM62作为Matrix,将Gap existence cost,Per residue gap cost和Lambda ratio分别设置为11,1和0.85(缺省值)并进行检索一对氨基酸序列的同一性进行计算,然后即可获得同一性的值(%)。

[0015] 上述应用中,所述90%以上的同一性可为至少91%、92%、95%、96%、98%、99%或100%的同一性。

[0016] 上述应用中,SEQ ID No.2由168个氨基酸残基组成,SEQ ID No.2的第3-160位为人MANF片段。

[0017] 上述应用中,所述治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的产品可含有所述MANF。

[0018] 为了解决以上技术问题,本发明提供了与MANF相关的生物材料在制备治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的产品(如药物、疫苗、保健品和/或食品)中的应用;所述生物材料可为下述任一种:

[0019] B1) 编码所述MANF的核酸分子,

[0020] B2) 含有B1)所述核酸分子的表达盒,

- [0021] B3) 含有B1) 所述核酸分子的重组载体、或含有B2) 所述表达盒的重组载体，
- [0022] B4) 含有B1) 所述核酸分子的重组微生物、或含有B2) 所述表达盒的重组微生物、或含有B3) 所述重组载体的重组微生物，
- [0023] B5) 含有B1) 所述核酸分子的转基因动物细胞系、含有B2) 所述表达盒的转基因动物细胞系或含有B3) 所述重组载体的转基因动物细胞系，
- [0024] B6) 含有B1) 所述核酸分子的转基因植物细胞系、含有B2) 所述表达盒的转基因植物细胞系或含有B3) 所述重组载体的转基因植物细胞系。
- [0025] 上述应用中，所述核酸分子可以是DNA，如cDNA、基因组DNA或重组DNA；所述核酸分子也可以是RNA，如mRNA或hnRNA等。
- [0026] 上述应用中，B2) 所述的表达盒，是指能够在宿主细胞中表达所述MANF的DNA，该DNA不但可包括启动所述MANF基因转录的启动子，还可包括终止所述MANF基因转录的终止子。进一步，所述表达盒还可包括增强子序列。
- [0027] 上述应用中，所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。
- [0028] 上述应用中，所述微生物可为细菌、酵母、藻或真菌。
- [0029] 上述应用中，所述细菌可为大肠杆菌，如BL21 (DE3)。
- [0030] 上述应用中，B1) 所述核酸分子可为B11) 或B12)：
- [0031] B11) 编码序列为SEQ ID No.1所示的DNA分子。
- [0032] B12) 核苷酸序列是SEQ ID No.1第9-482位所示的DNA分子。
- [0033] 其中，SEQ ID No.1由509个核苷酸组成，其编码序列是SEQ ID No.1的第3-509位核苷酸，编码SEQ ID No.2所示的蛋白质。
- [0034] 上述应用中，所述治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的产品可含有所述生物材料。
- [0035] 为了解决以上技术问题，本发明提供了治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的药物。
- [0036] 本发明所提供的治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的药物由所述MANF和药用辅料组成。
- [0037] 上述药物中，所述药用辅料可为水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯、氯化钠、葡萄糖或甘油、助溶剂、缓冲剂或pH调节剂。
- [0038] 上述药物中，所述药物的剂型可为注射给药剂型。
- [0039] 上述药物中，所述注射给药剂型可包括静脉注射注射剂、肌肉注射注射剂、皮下注射注射剂、皮内注射注射剂或腔内注射注射剂。
- [0040] 为了解决以上技术问题，本发明提供了治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的方法。
- [0041] 本发明所提供的治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎的方法，包括给受体动物施用所述MANF或/和所述生物材料，进行治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎。
- [0042] 上文中，所述治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎可体现为缓解溃疡性结肠炎引起的便血，改善溃疡性结肠炎引起的腹泻，缓解溃疡性结肠炎引起的体重下

降,缓解溃疡性结肠炎引起的结肠长度缩短,缓解溃疡性结肠炎引起的巨噬细胞浸润和/或降低溃疡性结肠炎引起的结肠组织中炎症因子的表达水平。所述炎症因子可为IL-6。

[0043] 上文中,所述动物可为哺乳动物,如小鼠。

[0044] 上文中,所述MANF可为天然的MANF,如来源于哺乳动物的MANF,也可为非天然的MANF,如重组MANF等,所述重组MANF只要具有天然的MANF的功能即可。

[0045] 本发明研究发现了MANF在人溃疡性结肠炎患者以及小鼠溃疡性结肠炎模型中表达上调,说明MANF在溃疡性结肠炎中表达增加。本发明通过动物实验表明,MANF能显著缓解溃疡性结肠炎造成的血便,增加模型小鼠体重,改善腹泻状况。MANF能减少溃疡性结肠炎的炎性巨噬细胞浸润,减少炎症因子的表达。MANF可用于治疗和/或预防和/或缓解和/或改善溃疡性结肠炎。

附图说明

[0046] 图1为免疫组化方法检测MANF在溃疡性结肠炎患者中高表达。图中,正常黏膜表示健康人的结肠黏膜;病变黏膜表示溃疡性结肠炎患者的结肠黏膜;重症病变黏膜表示重症溃疡性结肠炎患者的结肠黏膜。

[0047] 图2为免疫组化方法检测MANF在小鼠溃疡性结肠炎模型中高表达。图中,H₂O表示对照组(饮用超纯水)小鼠的结肠黏膜;DSS(葡聚糖硫酸钠盐)表示溃疡性结肠炎模型(连续饮用3%DSS水溶液7天)小鼠的结肠黏膜。

[0048] 图3为溃疡性结肠炎模型的造模过程中的体重变化指数、腹泻指数、直肠出血指数和疾病活动指数变化情况。图中,DSS表示造模组,Normal表示对照组;“**”表示与对照组比较具有统计学差异,P<0.01,“****”表示与对照组比较具有统计学差异,P<0.0001。

[0049] 图4为溃疡性结肠炎模型的造模第7天的结肠组织切片HE染色(A)、病理学评分(B)、结肠大体样本(C)和结肠长度(D)。图中,DSS表示造模组,Normal表示对照组;“****”表示与对照组比较具有统计学差异,P<0.0001。

[0050] 图5为MANF治疗改善小鼠溃疡性结肠炎症状。图中,DSS+PBS表示模型对照组,Normal+PBS表示正常对照组,DSS+MANF表示MANF治疗组;“*”表示与模型对照组比较具有统计学差异,P<0.05;“**”表示与模型对照组比较具有统计学差异,P<0.01。

[0051] 图6为MANF治疗减轻溃疡性结肠炎损伤。图中,DSS+PBS表示模型对照组,Normal+PBS表示正常对照组,DSS+MANF表示MANF治疗组;“*”表示与模型对照组比较具有统计学差异,P<0.05;“**”表示与模型对照组比较具有统计学差异,P<0.01。

[0052] 图7为MANF治疗减轻炎性巨噬细胞细胞浸润。Normal+PBS表示正常对照组,DSS+PBS表示模型对照组,DSS+MANF表示MANF治疗组;“***”表示P<0.001,表示与模型对照组比较具有统计学差异。

具体实施方式

[0053] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0054] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。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。

[0055] 1. 下述实施例中的溃疡性结肠炎模型的造模方法如下:6-8周龄SPF级雌性C57BL/6小鼠,每只体重20-23g,小鼠禁食8小时,随机分为两组:造模组(DSS)和对照组(Normal),每组12只。称重并标记各组C57BL/6小鼠。对照组每只小鼠第1-7天饮用超纯水,造模组每只小鼠第1-7天饮用3%DSS水溶液(向上述超纯水中加入DSS至DSS的质量含量为3%得到的液体)。第8天造模组和对照组每只小鼠均饮用超纯水。通过测定疾病活动指数(Disease Activity Index,DAI score)、组织学变化评分和结肠长度综合评估组织病理学变化,以此来证明溃疡性结肠炎小鼠模型是否建立成功。

[0056] 1.1. 疾病活动指数评分

[0057] 疾病活动指数(DAI)评分是临床上溃疡性结肠炎的综合评价指标,反映了体重变化、腹泻及粪便出血三项的整体情况。评分细则见表1。DAI评分为三个指标之和除以3。在整个溃疡性结肠炎造模期间,各组小鼠均没有出现死亡情况。但从第4天开始,与对照组比较,造模组的DAI评分出现快速上升趋势。第7天对照组未出现损伤,DAI评分分值为0;第7天造模组的DAI评分分值为 2.3 ± 0.47 (图3)。

[0058] 表1.DAI评分规则

[0059]

评分分值	体重下降百分比	粪便粘稠度	粪便隐血
0	0	正常	阴性
1	1-5%	软便	浅蓝
2	5-10%	黏液样便	蓝色
3	10-20%	稀液状便	深蓝
4	>20%	稀液样便	肉眼血便

[0060] 注:评分分值分别为体重变化指数、腹泻指数和直肠出血指数。

[0061] 1.1.1 粪便隐血评分

[0062] 粪便隐血是溃疡性结肠炎的重要临床指标。结果表明饮用超纯水的对照组小鼠未出现直肠出血。造模组小鼠在饮用3%DSS水溶液的第2天,个别小鼠均出现了大便隐血实验阳性;第3天开始小鼠隐血实验出现强阳性;第5天造模组小鼠大部分出现了肉眼可见的便血;第7天造模组小鼠整体出血严重的便血。采用SPSS11.5统计软件对数据进行处理,实验结果以均数±标准差表示,采用One-way ANOVA检验。连续饮用3%DSS水溶液7天的造模组小鼠的直肠出血指数为 3.4 ± 0.49 ,而连续饮用超纯水7天的对照组小鼠的直肠出血指数为0(图3)。

[0063] 1.1.2 腹泻指数评分

[0064] 腹泻是溃疡性结肠炎的另一个重要临床指标。饮用超纯水的对照组小鼠没有出现腹泻。造模组小鼠在饮用3%DSS水溶液的第3天,部分小鼠出现粪便湿软情况;第5天,所有小鼠都出现粪便湿软情况;在第6天和第7天,造模组小鼠出现严重的半稀便和稀便情况。采用SPSS11.5统计软件对数据进行处理,实验结果以均数±标准差表示,采用One-way ANOVA检验。连续饮用3%DSS水溶液7天的造模组小鼠腹泻指数为 3 ± 1 ;连续饮用超纯水7天的对照组小鼠未出现腹泻,腹泻指数评分为0(图3)。

[0065] 1.1.3 体重评分

[0066] 体重下降也是溃疡性结肠炎的重要临床指标。一直饮用超纯水的正常对照组

(Normal) 小鼠在整个实验阶段,其体重保持平稳增长趋势,且表现活跃。造模组(DSS)小鼠前4天体重无明显变化,状态活跃;造模第4天开始至第7天,与对照组比较,造模组小鼠的平均体重百分比明显下降,且状态较差。采用SPSS11.5统计软件对数据进行处理,实验结果以均数±标准差表示,采用One-way ANOVA检验。实验开始第8天,造模组小鼠的体重降低的比例(体重变化指数)为 0.78 ± 0.04 ,而对照组小鼠的体重增加的比例(体重变化指数)为 1.1 ± 0.01 (图3)。

[0067] 1.2组织病理学评分

[0068] 溃疡性结肠炎的发生会导致结肠组织出现明显的病理学变化。本申请采用HE染色方法对结肠组织切片进行染色,并采用双盲的方法进行病理学评分。结肠切片组织病理学的评分标准为0-4:0,正常组织;1,粘膜轻度炎症,并有一些浸润的单核细胞;2,粘膜中炎症加重,有更多的细胞浸润,隐窝腺体和上皮受损;3,在粘膜和粘膜下层区域细胞广泛浸润,上皮细胞破坏。4,组织中大量浸润细胞,隐窝完全消失。

[0069] 结果显示,对照组小鼠结肠组织结构表现为:完整,粘膜无明显缺损,腺体排列整齐,无萎缩,粘膜固有层无明显的炎性细胞浸润;造模组小鼠有大量的炎性细胞浸润粘膜下层,粘膜固有层的腺体萎缩,大部分消失,取而代之的是大量的炎性细胞(图4中A)。连续饮用3%DSS水溶液7天的造模组小鼠的组织病理学评分分值为 1.5 ± 0.5 ,而连续饮用超纯水7天的对照组小鼠未出现组织病理学损伤,评分分值为0(图4中B)。

[0070] 1.3结肠长度检测

[0071] 结肠缩短是小鼠溃疡性结肠炎模型的典型特征之一。测量了小鼠的结肠长度并进行统计学分析。结果发现:与对照组比较,造模组小鼠的结肠明显缩短。连续饮用3%DSS水溶液7天的造模组小鼠的结肠长度为 $4.4 \pm 0.2\text{cm}$,连续饮用超纯水7天的正常对照组小鼠的结肠长度为 $6.45 \pm 0.31\text{cm}$ (图4中C和D)。

[0072] 说明C57BL/6小鼠连续饮用3%DSS水溶液7天能成功构建溃疡性结肠炎模型,得到了溃疡性结肠炎模型小鼠。

[0073] 实施例一、重组人MANF治疗溃疡性结肠炎

[0074] 1. MANF在溃疡性结肠炎患者结肠组织中表达上调

[0075] 发明人从安徽医科大学第一附属医院收集了30例溃疡性结肠炎病人结肠样本。通过免疫组织化学染色,发现MANF在患者结肠组织中高表达。随着炎性病变的程度加重,MANF表达水平也相应增加(图1)。其中,重症患者每日排便十次以上,脓血便,大量便血;有明显的腹痛和鼓肠,重症患者在活动期还会伴随高热等,以及引起一些肠外并发症。

[0076] 其中,免疫组化方法检测MANF在患者结肠组织中的表达方法如下:组织切片,福尔马林固定,石蜡包埋,然后分别与抗MANF抗体(抗MANF抗体即为ARMET的单克隆抗体,按照如下文献的方法制备:王法财、王海萍、李琪、方圣云、沈玉先.ARMET的原核表达及其单克隆抗体的制备.安徽医科大学学报,2009,44(6):665-669)在4℃过夜。使用中杉金桥ABC试剂盒(SP-9000),在每个实验中均设阴性对照,通过省略第一抗体获得阴性对照。

[0077] 2. MANF在DSS诱导的C57小鼠溃疡性结肠炎模型中表达上调

[0078] 通过免疫组织化学染色(方法同步骤1)检测上述溃疡性结肠炎模型小鼠结肠组织中MANF的表达情况,结果发现MANF在溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中高表达(图2),与溃疡性结肠炎患者结果一致。

[0079] 2. 重组人MANF治疗小鼠溃疡性结肠炎

[0080] 2.1 重组人MANF蛋白的诱导表达与纯化

[0081] (1) 用SEQ ID No.1的第1-488位所示的人MANF基因替换pET-28a (+) 的NcoI和XhoI识别位点间的片段(包括NcoI识别位点和XhoI识别位点在内的小片段), 保持pET-28a (+) 其他序列不变, 得到重组表达载体, 将其命名为pET28a-MANF。pET28a-MANF含有SEQ ID No.1所示的人重组MANF蛋白-His标签融合蛋白hMANF-His编码基因, hMANF-His编码基因编码的蛋白质hMANF-His的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0082] (2) 将pET28a-MANF质粒转化至BL21感受态细胞, 利用卡那霉素抗性筛选阳性克隆筛选培养, 挑取单克隆, 提取质粒进行测序, 将测序结果表明含有pET28a-MANF的重组大肠杆菌命名为BL21/pET28a-MANF。

[0083] (3) 挑取BL21/pET28a-MANF菌株, 接种于含100 μ g/ml卡那霉素的LB培养基(在LB培养基中加入卡那霉素至卡那霉素的浓度为100 μ g/ml得到的培养基)中, 37 $^{\circ}$ C恒温摇床培养, 250rpm, 过夜(13-16小时)。第二天上午以1:100的比例, 将培养过夜的菌液再次接种于含100 μ g/ml卡那霉素的LB培养基中, 置恒温摇床37 $^{\circ}$ C振荡250rpm, 扩大培养2-3h左右。待菌液OD₆₀₀为0.6-0.8时, 加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L诱导表达2.5h左右。将菌液4 $^{\circ}$ C离心, 7000rpm, 5min, 弃上清, 收集菌体, 并加裂解液裂解, 超声破碎(400w, 间歇3s, 超声3s) 20min。

[0084] (4) 将超声后的菌液离心, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 取上清, 加入到已预装好的Ni-beads柱中, 封闭柱口, 固定于静音混合器上, 4 $^{\circ}$ C下结合2h左右。取下蛋白层析柱, 于4 $^{\circ}$ C冰箱垂直悬挂, 打开盖让柱中液体垂直流出, 控制滴速在每30sec一滴, 接取蛋白流出液, 保存用于后续蛋白分析。

[0085] (5) 向柱中加入4-5ml去杂质缓冲液(溶质为: 50mmol/L NaH₂PO₄, 300mmol/L NaCl、50mmol/L咪唑, 溶剂为水, pH8.0), 封闭柱口, 重新固定于静音混合器, 混合1h左右之后让液体流出, 并收集流出液。该步骤重复两次以便洗去柱中与Ni-beads非特异结合的蛋白。

[0086] (6) 向层析柱内添加洗脱缓冲液(溶质为: 50mmol/L NaH₂PO₄、300mmol/L NaCl、250mmol/L咪唑, 溶剂为水, pH8.0) 1ml洗脱目的蛋白。该步骤重复两次, 并收集含目的蛋白的洗脱液(约3ml)。

[0087] (7) 将纯化后的蛋白洗脱液转移至超滤管中浓缩, 超滤管中事先添加预冷的pH值为7.4的PBS 7ml左右, 离心(4 $^{\circ}$ C, 7500g, 20min), 重复3-4次, 将其中的咪唑缓冲液置换成pH值为7.4的PBS缓冲液, 得到浓缩后的重组人MANF蛋白溶液。

[0088] 其中, pH值为7.4的PBS缓冲液的配制: 8.5g NaCl、0.2g KCl、2.9g Na₂HPO₄·12H₂O、0.59g NaH₂PO₄·2H₂O, 1L去离子水。

[0089] (8) 浓缩后的重组人MANF蛋白溶液, 分装保存在-80 $^{\circ}$ C冰箱, 备用。该浓缩后的重组人MANF蛋白溶液中重组人MANF蛋白的含量为1mg/mL。

[0090] 2.2 重组人MANF治疗小鼠溃疡性结肠炎

[0091] 6-8周龄SPF级雌性C57BL/6小鼠, 每只体重20-23g, 小鼠禁食8小时, 随机分为3组: 正常对照组(Normal+PBS)、模型对照组(DSS+PBS)和MANF治疗组(DSS+MANF), 每组12只。称重并标记各组C57BL/6小鼠。实验期8天。正常对照组每只小鼠第1-7天饮用超纯水, 从第4天开始每只小鼠每天尾静脉注射一次pH值为7.4的PBS缓冲液200 μ l, 连续3天; 模型对照组每

只小鼠第1-7天饮用3%DSS水溶液(向上述超纯水中加入DSS至DSS的质量含量为3%得到的液体),从第4天开始每只小鼠每天尾静脉注射一次pH值为7.4的PBS缓冲液200 μ l,连续3天。MANF治疗组每只小鼠第1-7天饮用3%DSS水溶液(向上述超纯水中加入DSS至DSS的质量含量为3%得到的液体),从第4天开始每只小鼠每天尾静脉注射一次重组人MANF蛋白溶液(将2.1的重组人MANF蛋白溶液用pH值为7.4的PBS缓冲液稀释得到的液体)200 μ l,使每只小鼠的给药剂量以重组人MANF蛋白计为1mg/kg体重,连续3天。第8天三组小鼠每只均饮用超纯水,然后处死。

[0092] 2.2.1 MANF治疗缓解溃疡性结肠炎小鼠便血情况

[0093] 按照上述1.1.1粪便隐血评分方法检测小鼠便血情况。结果表明饮用超纯水的正常对照组小鼠在实验过程中不出现便血,模型对照组小鼠在饮用3%DSS水溶液的第2天,个别小鼠出现了大便隐血实验阳性;第3天开始个别小鼠大便隐血实验呈强阳性;第5天模型对照组小鼠大部分出现了便血;第7天模型对照组小鼠整体出现严重的便血。而MANF治疗组小鼠便血症状明显减轻。连续饮用3%DSS水溶液7天的模型对照组小鼠的直肠出血指数为 3.6 ± 0.47 ,连续饮用超纯水7天的正常对照组小鼠的直肠出血指数为0,MANF治疗组小鼠第7天的直肠出血指数为 2.6 ± 0.49 (图5)。

[0094] 2.2.2 MANF治疗改善溃疡性结肠炎小鼠腹泻情况

[0095] 按照上述1.1.2粪便粘稠度评分方法检测小鼠腹泻情况。结果表明饮用超纯水的正常对照组小鼠在实验过程中未出现腹泻,粪便正常。在饮用3%DSS水溶液的第3天,模型对照组个别小鼠出现粪便湿软情况,MANF治疗组个别小鼠出现粪便湿软情况;在饮用3%DSS水溶液的第5天,模型对照组小鼠整体都出现粪便湿软情况,MANF治疗组有个别小鼠出现粪便湿软,但无统计学意义;在饮用3%DSS水溶液的第6天和第7天,模型对照组小鼠出现严重的半稀便和稀便情况,MANF治疗组小鼠腹泻情况有所减轻。采用SPSS11.5统计软件对数据进行处理,实验结果以均数 \pm 标准差表示,采用One-way ANOVA检验。连续饮用3%DSS水溶液7天的模型对照组小鼠的腹泻指数为 3.3 ± 0.94 ,连续饮用超纯水7天的正常对照组小鼠的腹泻指数为0。连续饮用3%DSS水溶液7天的MANF治疗组小鼠的腹泻指数为 2.3 ± 1.37 (图5)。

[0096] 2.2.3 MANF治疗增加溃疡性结肠炎小鼠体重

[0097] 按照上述1.1.3体重评分方法检测小鼠体重变化情况。结果表明一直饮用超纯水的正常对照组(Normal)小鼠在整个实验阶段,其体重保持平稳增长趋势,且表现活跃。模型对照组(DSS)和MANF治疗组小鼠前4天体重无明显变化,状态活跃;从饮用3%DSS水溶液的第4天开始至第7天,与正常对照组相比,模型对照组小鼠的平均体重百分比明显下降,且状态较差;与模型对照组相比,MANF治疗组体重百分比的下降情况有所缓解,且状态较为活跃。采用SPSS11.5统计软件对数据进行处理,实验结果以均数 \pm 标准差表示,采用One-way ANOVA检验。实验开始第8天,模型对照组小鼠的体重降低的比例(体重变化指数)为 0.79 ± 0.03 ,正常组小鼠的体重增加的比例(体重变化指数)为 1.1 ± 0.03 。MANF治疗组小鼠的体重降低的比例(体重变化指数)为 0.86 ± 0.02 (图5)。

[0098] 2.2.4 MANF治疗提高溃疡性结肠炎小鼠疾病活动指数(DAI)评分

[0099] 按照上述1.1.疾病活动指数评分方法计算DAI评分。结果表明,在整个实验期间,各组小鼠均没有出现死亡情况。但从第4天开始,与正常对照组比较,模型对照组的DAI评分

出现快速上升趋势,而MANF治疗组则显著地减低DAI评分。第7天正常对照组的DAI评分分值为0,第7天造模组的DAI评分分值为 2.2 ± 0.75 ,第7天MANF治疗组的DAI评分分值为 1.9 ± 0.3 (图5)。

[0100] 2.2.5 MANF治疗改善溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理学评分

[0101] 按照上述1.2组织学变化评分方法对各组小鼠进行病理学评分。结果显示,正常对照组小鼠结肠组织结构表现为:完整,粘膜无明显缺损,腺体排列整齐,无萎缩,粘膜固有层无明显的炎性细胞浸润;模型对照组小鼠有大量的炎性细胞浸润粘膜下层,粘膜固有层的腺体萎缩,大部分消失,取而代之的是大量的炎性细胞;MANF治疗组的病理学评分有所下降。MANF治疗对结肠组织的炎症有明显改善作用,表现为粘膜固有层的腺体排列较为整齐,炎性细胞数量显著减少(图6中A)。连续饮用3%DSS水溶液7天的模型对照组小鼠的组织病理学评分分值为 1.6 ± 0.75 ,连续饮用3%DSS水溶液7天的MANF治疗组小鼠的组织病理学评分分值为 1.2 ± 0.39 ,连续饮用超纯水7天的正常对照组小鼠的组织病理学评分分值为0(图6中B)。

[0102] 2.2.6 MANF治疗可部分恢复溃疡性结肠炎小鼠结肠长度

[0103] 测量各组小鼠的结肠长度并进行统计学分析。结果表明:与正常对照组比较,模型对照组小鼠的结肠明显缩短;与模型对照组比较,MANF治疗后结肠则有明显的恢复(图6中C)。连续饮用超纯水7天的正常对照组小鼠的结肠长度为 $6.45 \pm 0.31\text{cm}$;连续饮用3%DSS水溶液7天的模型对照组小鼠的结肠长度为 $4.37 \pm 0.32\text{cm}$,连续饮用3%DSS水溶液7天的模型小鼠经MANF治疗后小鼠的结肠长度为 $5.1 \pm 0.29\text{cm}$ (图6中D)。

[0104] 2.2.7 MANF缓解溃疡性结肠炎中巨噬细胞的浸润

[0105] 炎性细胞浸润是溃疡性结肠炎的显著特征。其中,结肠组织中巨噬细胞的浸润和激活在溃疡性结肠炎发病机制中发挥着重要作用。为检测MANF对溃疡性结肠炎中巨噬细胞浸润的影响,采用免疫组织化学染色方法,用抗CD68抗体(Abcam,爱博抗,ab125212)对巨噬细胞特异性标志分子CD68进行了检测。结果显示,模型对照组小鼠结肠组织中CD68的表达较正常对照组增加,提示模型对照组小鼠结肠组织中巨噬细胞浸润严重。MANF治疗组与模型对照组比较,巨噬细胞浸润情况有所缓解(图7中A)。

[0106] 2.2.8 MANF治疗降低溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中炎症因子的表达

[0107] 为了观察MANF治疗对溃疡性结肠炎小鼠肠道炎性细胞因子表达的影响,采用实时荧光定量PCR对结肠组织中炎症因子IL-6的mRNA水平进行检测。结果显示,与正常对照组比较,模型对照组的IL-6含量明显上升。MANF治疗能显著降低IL-6的转录水平(图7中B)。该结果提示,MANF可显著抑制溃疡性结肠炎中IL-6的表达。

[0108] 其中,实时荧光定量PCR方法中,根据TOYOBO SYBR反应酶的说明书配制PCR体系,采用实时定量PCR仪检测反应体系。IL-6的mRNA水平检测特异引物序列:

[0109] F:5' -ACACATGTTCTCTGGGAAATCGT-3' ;

[0110] R:5' -AAGTCATCATCGTTGTTTCATACA 3' 。

[0111] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申

请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	安徽医科大学
[0003]	<120>	中脑星形胶质细胞源性神经营养因子在治疗溃疡性结肠炎中的应用
[0004]	<160>	2
[0005]	<170>	PatentIn version 3.5
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	509
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0010]	<400>	1
[0011]		ccatggggct gggccgggc gactgcgaag ttgtatttc ttatctggga agattttacc 60
[0012]		aggacctcaa agacagagat gtcacattct caccagccac tattgaaaac gaacttataa 120
[0013]		agttctgccg ggaagcaaga ggcaaagaga atcggttgtg ctactatatac ggggccacag 180
[0014]		atgatgcagc caccaaaatc atcaatgagg tatcaaagcc tctggccac cacatccctg 240
[0015]		tggagaagat ctgtgagaag cttagaaga aggacagcca gatatgtgag cttagatg 300
[0016]		acaagcagat cgacctgagc acagtggacc tgaagaagct ccgagttaa gagctgaaga 360
[0017]		agattctgga tgactggggg gagacatgca aaggctgtgc agaaaagtct gactacatcc 420
[0018]		ggaagataaa tgaactgatg cctaaatg cccccaaggc agccagtgca cggaccgatt 480
[0019]		tgctcgagca ccaccaccac caccactga 509
[0020]	<210>	2
[0021]	<211>	168
[0022]	<212>	PRT
[0023]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0024]	<400>	2
[0025]		Met Gly Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser Tyr Leu Gly
[0026]		1 5 10 15
[0027]		Arg Phe Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe Ser Pro Ala
[0028]		20 25 30
[0029]		Thr Ile Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala Arg Gly Lys
[0030]		35 40 45
[0031]		Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp Ala Ala Thr
[0032]		50 55 60
[0033]		Lys Ile Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His Ile Pro Val
[0034]		65 70 75 80
[0035]		Glu Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln Ile Cys Glu
[0036]		85 90 95
[0037]		Leu Lys Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp Leu Lys Lys
[0038]		100 105 110

[0039]	Leu Arg Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp Gly Glu Thr
[0040]	115 120 125
[0041]	Cys Lys Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys Ile Asn Glu
[0042]	130 135 140
[0043]	Leu Met Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg Thr Asp Leu
[0044]	145 150 155 160
[0045]	Leu Glu His His His His His His
[0046]	165

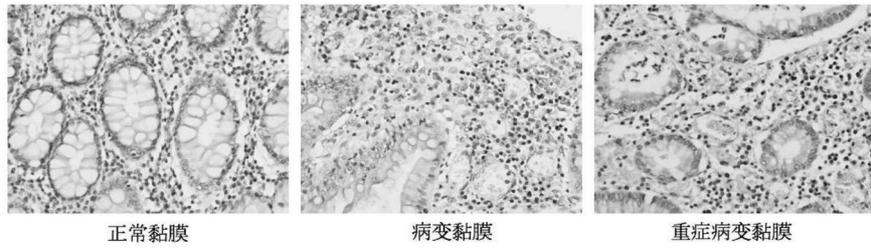


图1

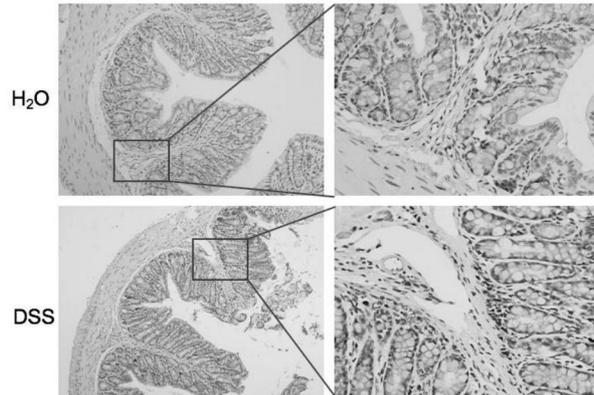


图2

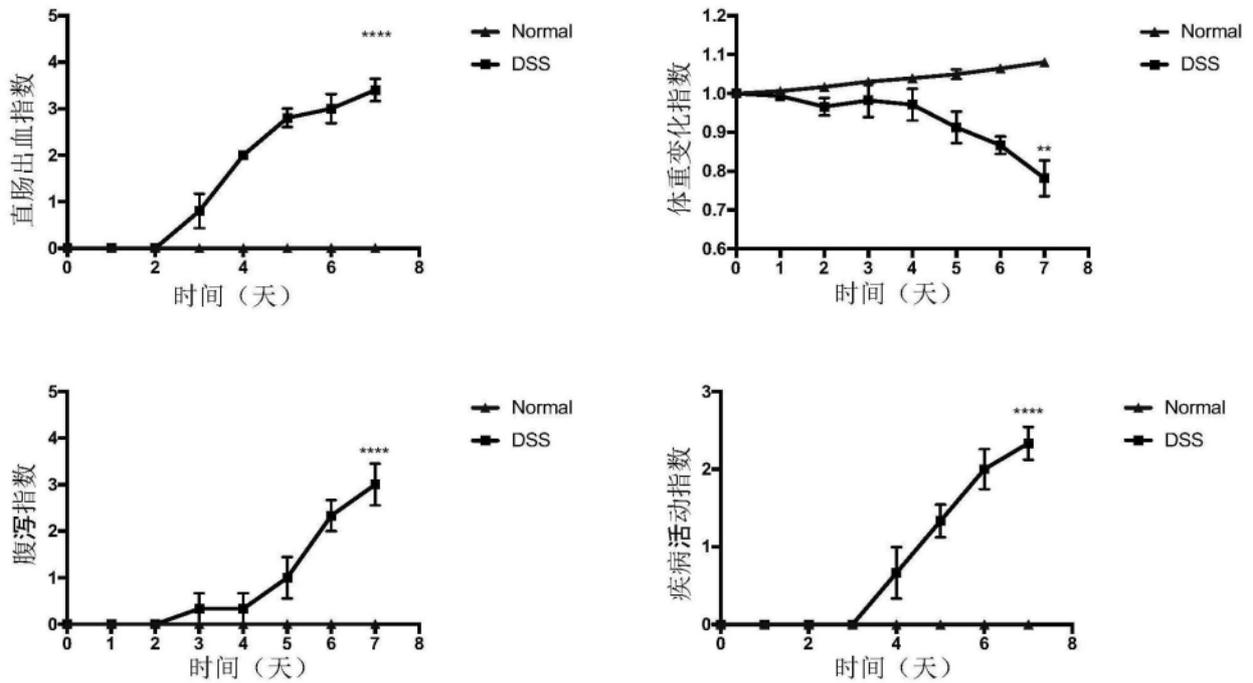


图3

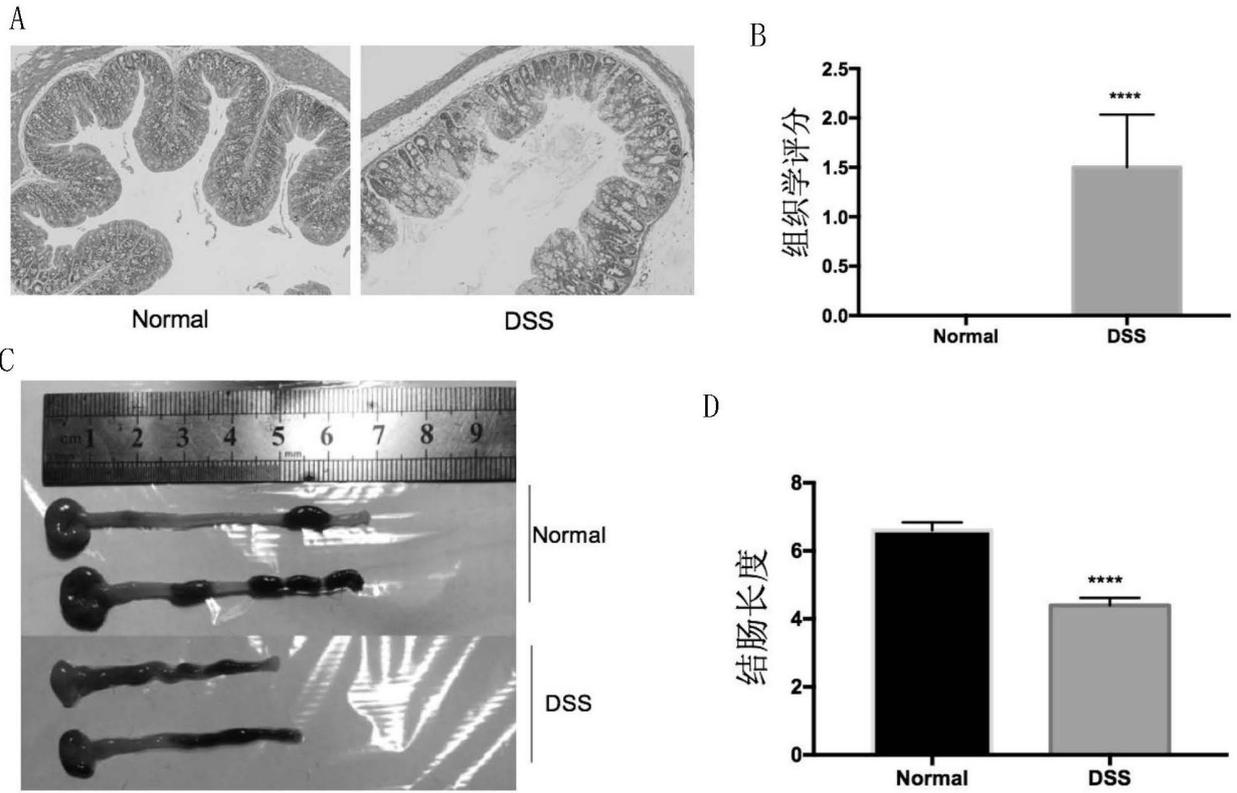


图4

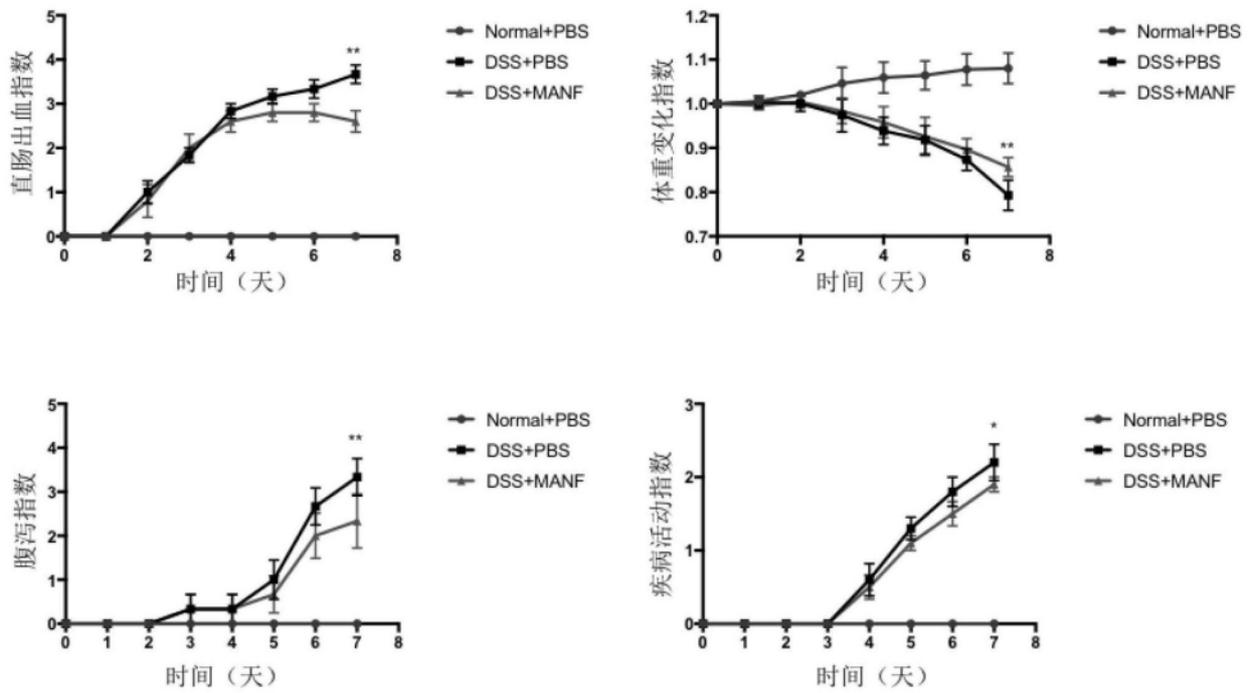


图5

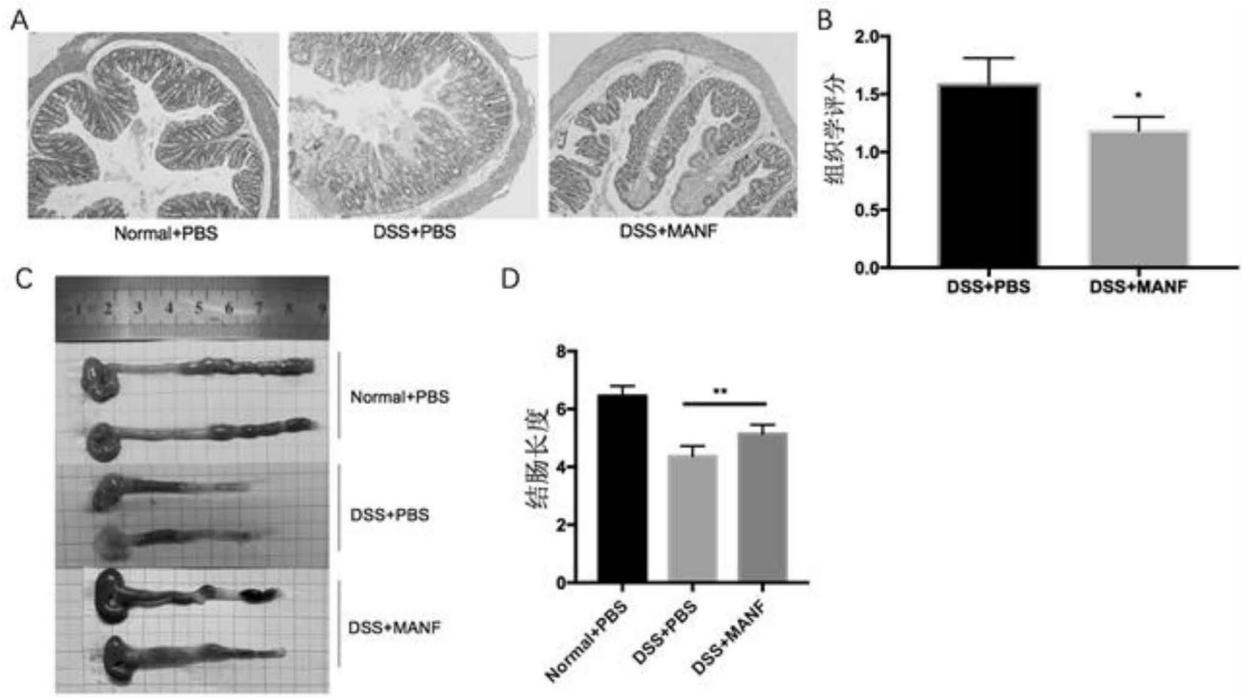


图6

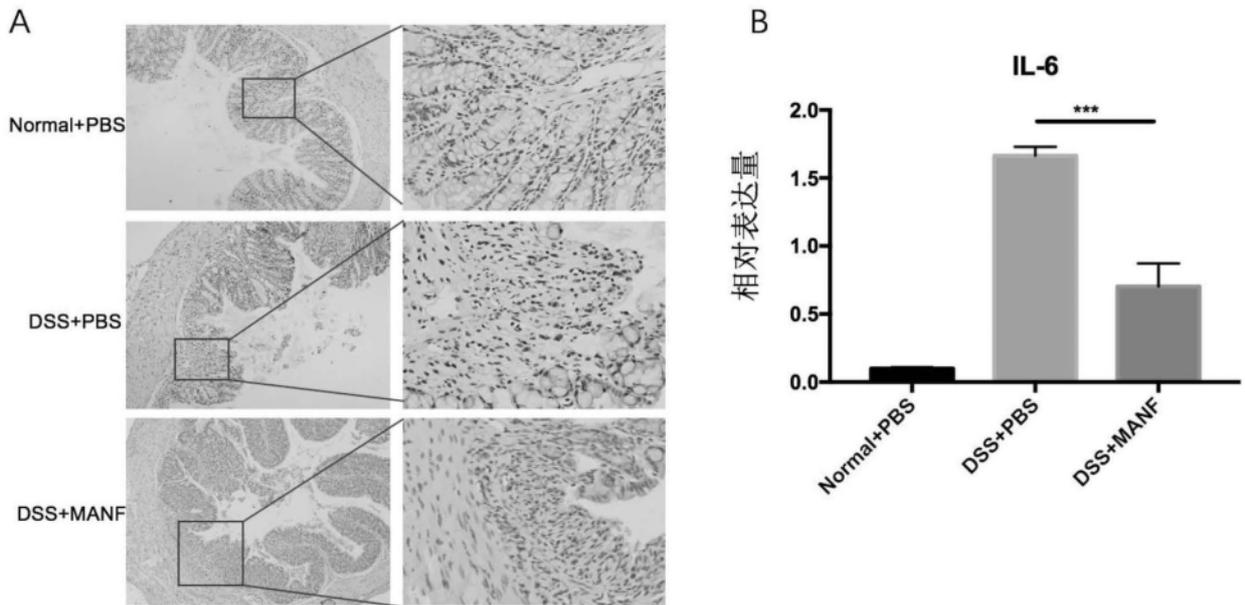


图7