



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111686124 B

(45) 授权公告日 2021.07.20

(21) 申请号 202010431840.9

A61P 25/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.20

A61P 29/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111686124 A

(43) 申请公布日 2020.09.22

(73) 专利权人 皖南医学院第一附属医院(皖南
医学院弋矶山医院)

地址 241001 安徽省芜湖市镜湖区赭山西
路2号

(72) 发明人 赖年升 姚阳 李真保 方兴根
吴德刚 袁金龙 赵心同 夏大勇

(74) 专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有
限公司 11577

代理人 杜立军

(56) 对比文件

CN 110684835 A,2020.01.14

CN 102218144 A,2011.10.19

US 2019038769 A1,2019.02.07

WO 2009045356 A2,2009.04.09

Niansheng Lai 等.Systemic exosomal
miR-193b-3p delivery attenuates
neuroinflammation in early brain injury
after subarachnoid hemorrhage in mice.
《Journal of Neuroinflammation》.2020,第17
卷(第74期),

审查员 陈振中

(51) Int.Cl.

A61K 31/7105 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

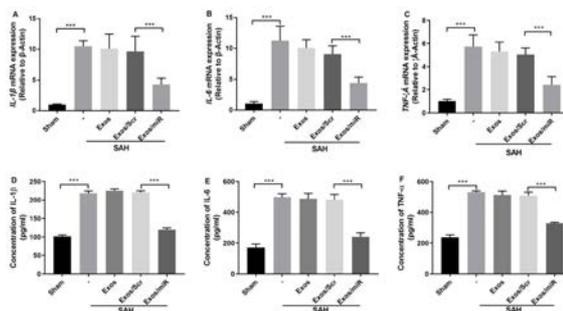
序列表5页 附图5页

(54) 发明名称

miR-486-3p在制备治疗SAH导致的神经炎症
产品中的应用

(57) 摘要

本发明公开了miR-486-3p在制备治疗SAH导
致的神经炎症产品中的应用,本发明提供miR-
486-3p相关生物材料的制备如下(a1)或(a2)产
品中的应用:(a1)制备治疗蛛网膜下腔出血症
的产品;(a2)制备抑制蛛网膜下腔出血导致的
神经炎症的产品;所述miR-486-3p的相关生物
材料为miR-486-3p,或者装载有miR-486-3p
的外泌体,或者能够促进所述miR-486-3p表
达的物质。本发明的实验证明用RVG融合到
膜糖蛋白Lamp2b修饰的外泌体装载miR-486-
3p可以更加有效地将miRNA传递到大脑。
miR-486-3p通过抑制Sirtuin2(Sirt2)的表
达,发挥抗炎作用。



1. miR-486-3p相关生物材料在制备如下(a1)或(a2)产品中的应用:

(a1) 制备治疗蛛网膜下腔出血症的产品; (a2) 制备抑制蛛网膜下腔出血导致的神经炎症的产品; 所述miR-486-3p的相关生物材料为miR-486-3p, 或者装载有miR-486-3p的外泌体; 所述抑制蛛网膜下腔出血导致的神经炎症是通过所述miR-486-3p抑制Sirt2的表达起到抗神经炎症的作用; 所述miR-486-3p的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述装载有miR-486-3p的外泌体为RVG修饰的外泌体。

3. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述产品为药物; 所述蛛网膜下腔出血导致的神经炎症是由Sirt2 mRNA和蛋白质过表达引起。

miR-486-3p在制备治疗SAH导致的神经炎症产品中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及miR-486-3p在制备治疗SAH导致的神经炎症产品中的应用。

背景技术

[0002] 动脉瘤性蛛网膜下腔出血(SAH)通常是由动脉瘤破裂引起的,这是一种临床综合征,每年死亡率为45%,发病率约为每10万人6-16人,通常是年轻个体。SAH占脑卒中总发生率的5%-7%。主要的预后决定因素是SAH后早期脑损伤(EBI)和早期脑血管痉挛(CVS),和迟发性脑缺血(DCI)。越来越多的研究表明SAH后EBI可能是导致SAH后不利结果的主要因素。SAH后EBI相关的几种病理生理过程和炎症级联反应有关。开发新的治疗手段对促进SAH后EBI的恢复是至关重要的。

[0003] MiRNA(miRNAs)是由17-24个核苷酸组成的非编码RNA家族,在转录后水平调控几个靶基因的表达。以前的研究表明,miRNAs参与了许多生理/病理过程,可作为各种疾病的诊断标记物和药物靶点,包括中风、帕金森病、创伤性脑损伤(TBI)和阿尔茨海默病。miRNAs常规化的在脑脊液和血液中表达,但SAH后miRNAs的改变研究较少。而且血脑屏障(BBB)已被认为是向大脑皮层递送药物的主要障碍。据估计,98%的药物分子难以达到临床效果,因为它们无法跨越BBB。

[0004] 外泌体是直径为30至150nm的脂质膜囊泡,能够穿过血脑屏障,可以从事远距离细胞间通信,携带蛋白质、脂质、功能性mRNA和miRNA,以调节靶细胞中蛋白质的表达。脑细胞释放的外泌体能够穿过血脑屏障,并能在血液循环中检测到。同样,内皮细胞和血管外周细胞也分泌外泌体进入循环。外泌体已被用作治疗几种中枢神经系统疾病的药物递送载体。外泌体也作为治疗中风的一种选择。狂犬病毒糖蛋白(RVG多肽)是一种具有噬神经的病毒组分,可以结合广泛存在于脑血管内皮细胞和神经细胞表面的烟碱型乙酰胆碱受体,穿透血脑屏障,从而实现物质的非侵入性跨血脑屏障高效靶向递送入脑。RVG多肽可与外泌体膜上溶酶体相关膜糖蛋白2b(LAMP2b)进行融合,解决外泌体定向转运的问题,可跨越BBB并将miRNAs特异性地转运到脑皮层。与脑室内给药不同的是,RVG/外泌体(RVG/Exos)是静脉给药的,因此是一种无创治疗中枢神经系统疾病的方法。它们能够将小分子和大分子药物迅速转运到中枢神经系统,而逃过单核吞噬细胞系统的降解。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供miR-486-3p在制备治疗SAH导致的神经炎症产品中的应用。

[0006] 本发明提供miR-486-3p相关生物材料在制备如下(a1)或(a2)产品中的应用:

[0007] (a1)制备治疗蛛网膜下腔出血症的产品;

[0008] (a2)制备抑制蛛网膜下腔出血导致的神经炎症的产品;

[0009] 所述miR-486-3p的相关生物材料为miR-486-3p,或者装载有miR-486-3p的外泌

体,或者能够促进所述miR-486-3p表达的物质。

[0010] 优选地,所述抑制蛛网膜下腔出血导致的神经炎症是通过所述miR-486-3p抑制Sirt2的表达起到抗神经炎症的作用。

[0011] 优选地,所述miR-486-3p的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0012] 优选地,所述装载有miR-486-3p的外泌体为RVG修饰的外泌体。

[0013] 本发明还提供miR-486-3p或者能够促进所述miR-486-3p表达的物质在如下(b1)或(b2)中的应用:(b1)制备治疗蛛网膜下腔出血症的产品;(b2)制备抑制蛛网膜下腔出血导致的神经炎症的产品。

[0014] 优选地,所述能够促进所述miR-486-3p表达的物质为如下任一:miR-486-3p类似物;能够转录成所述miR-486-3p的DNA,含所述DNA的表达盒、重组载体或重组细胞。

[0015] 优选地,所述miR-486-3p的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0016] 优选地,所述产品为药物;

[0017] 所述蛛网膜下腔出血导致的神经炎症是由Sirt2 mRNA和蛋白质过表达引起。

[0018] 本发明具有如下优点:

[0019] 本发明的实验证明:外周注射修饰后外泌体(RVG/Exos)装载miRNAs靶向SAH的出血脑皮层,从而调节其神经炎症。用RVG融合到膜糖蛋白Lamp2b的修饰外泌体可以更加有效地将miRNA传递到大脑。miR-486-3p通过抑制Sirt2的表达,发挥抗炎作用。本发明使用RVG/Exos/MiR-486-3p治疗,表明静脉注射MiR-486-3p装载的RVG/Exos可显著降低脑组织中Sirt2mRNA和蛋白质水平。

[0020] 本发明试验证明SAH后脑组织中的炎症细胞因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)水平升高,与细胞凋亡(Fluoro-Jade C实验)、脑水肿和神经功能损伤有关。而RVG/Exos/MiR-486-3p可以抑制SAH后脑组织中的炎症细胞因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)的表达,从而改善细胞凋亡、减轻脑水肿及改善神经功能损伤。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0022] 图1为本发明提供的克隆载体pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZsGreen-T2A-PURO的图谱;

[0023] 图2为本发明提供的HBLV-GFP-PURO和HBLV-m-RVG-lamp2b-3xflag-GFP-PURO感染荧光图;

[0024] 图3为本发明提供的qPCR验证RVG-LAMP2B过表达基因表达柱状图;

[0025] 图4为本发明提供的SAH病人及SAH小鼠模型血浆外泌体miRNA和SAH小鼠模型脑组织中miRNA的表达水平;其中,A:SAH病人血浆外泌体miRNAs的表达情况;B:在SAH小鼠和Sham小鼠血浆外泌体中miR-486-3p表达;C:在SAH小鼠和Sham小鼠的大脑中miR-486-3p表达(24小时后,n=10);

[0026] 图5为本发明提供的外泌体的特征表征图;其中,A:转染后BMSCs和对照组中

Lamp2B的表达情况(PC:阳性对照,HepG2;BC:空白对照,BMSCs;NC:正常对照);B:TEM图像,标尺=200nm;C:免疫印迹分析Lamp2b、CD63、GM130和ALIX在RVG-Lamp2b修饰的外泌体和其细胞中的作用;D:用qRT-PCR分析,测定了在RVG/Exos/无序miRNAs(对照组)与RVG/Exos/miR-486-3p外泌体中miR-486-3p的表达水平,内参为U6,表示为平均值 \pm SD(* p <0.001);

[0027] 图6为本发明提供的小鼠脑组织外泌体的靶向传递功能验证;其中,A:建立SAH模型和给药的策略;B:免疫荧光图像,分别静脉注射了FAM标记的miRNAs,未修饰的Exos转染了FAM标记的miRNAs和RVG修饰的Exos转染了FAM标记的miRNAs,出血皮层(颞叶底部)切片的免疫荧光图,最后一列为放大图像,标尺=50 μ m;

[0028] 图7为本发明提供的Exos/miR-486-3p对靶基因mRNA表达的影响的图;其中,A,B:SAH后12、24、48和72h的表达水平($n=6$);C,D:评估Exos/miR-486-3p或Exos/Scr处理小鼠脑组织中Sirt2 mRNA和蛋白表达的变化($n=6$);内参为 β -actin或p65,表示为均数 \pm 标准误差(SE)(* p <0.05,** p <0.01,*** p <0.001);

[0029] 图8为本发明提供的Exo/miR-486-3p可抑制SAH后细胞凋亡,降低炎症细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平的图;其中,A-C:qRT-PCR评估SAH模型中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 表达的变化,内参为 β -actin表达,表示为均数 \pm SE(*** p <0.001,NS:无显著差异; $n=6$),D-F.ELISA测定小鼠脑组织炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平的结果, $n=6$ (*** p <0.001);

[0030] 图9为本发明提供的Exo/miR-486-3p对SAH小鼠神经行为神经功能评分、脑水肿和神经变性的影响的图;其中,A:各组小鼠的神经功能评分($n=18$);B:各组脑水含量的变化($n=6$);C,D:FJC染色和FJC阳性细胞的数量,图像的第一行表示较低的放大率图像,而其他图像表示来自第一行框的较高放大率图像,标尺=20 μ m。所有定量数据均为均数 \pm SE(*** p <0.001,NS:无显著差异)。

具体实施方式

[0031] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 动物和伦理,所有参与者通过皖南医学院第一附属医院招募,研究遵循赫尔辛基宣言,参与者都由自己或者家属签署知情同意书。伦理通过皖南医学院弋矶山医院伦理委员会通过。所有实验均经皖南医学院第一附属医院研究伦理委员会批准,并按照国家卫生研究院关于动物护理和使用的指导方针进行。所有体重25-30g的成年雄性C57BL/6小鼠均购自中国科学院上海动物中心,所有小鼠都饲养在温度和湿度适宜的,光/暗各12小时的动物房。尽一切努力尽量减少动物的使用,并减少它们的痛苦。

[0033] 本发明的小鼠SAH模型,小鼠SAH模型根据Mohammed Sabri等(Stroke.2011;42(5):1454-60.)介绍的小鼠前循环SAH模型。将体重28-32g雄性小鼠麻醉(应用4%的水合氯醛麻醉)后固定于立体定向仪上,根据小鼠脑立体定向图谱,暴露头皮后正中切开头皮,暴露颅骨,在前囟前方约4.5mm处钻骨孔一枚,经骨孔用27号脊髓穿刺针与水平线呈40°的角度缓慢进针约4-5mm,触碰到颅底再向后退0.5mm~1mm,确保针尖位于前交叉池内,然后在另一小鼠心脏抽取非肝素化动脉血约50-100 μ l,经脊髓穿刺针缓慢注入前交叉池,对照

组小鼠则给予100 μ l灭菌生理盐水。为防止小鼠脱水,手术后皮下注射1ml0.9%生理盐水。观察到颞叶底部常被血液浸染,根据实验时间处死小鼠,并留取小鼠的血浆和脑组织进行后续分析。

[0034] 实施例1、qRT-PCR对NGS数据进行验证

[0035] 1. QIAzol-离心柱法提取外泌体总RNA,测定RNA纯度,对RNA定量,以相应溶剂为对照(Blank),取2 μ L RNA溶液于Merinton SMA4000检测,观察 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 比值及连续波长吸收峰,并计算RNA溶液浓度,判断RNA提取质量: $A_{260}/A_{280}>2.0$ 且 <2.3 ,则可以满足后续RT-qPCR所需。使用QIAzol Lysis试剂(Qiagen,德国)从外泌体或脑组织中提取总RNA。

[0036] 表1

Primer name	序列(5'→3')	
m-RVG-LAMP2b	Forward (SEQ ID NO.2)	caccatttgg atgcccg
	Reverse (SEQ ID NO.3)	ccgttgatg ctcc
Sirt2	Forward (SEQ ID NO.4)	cagctacttc aagaaacatc cg
	Reverse (SEQ ID NO.5)	tattcttttc tgcaggaggt gt
IL-1 β	Forward (SEQ ID NO.6)	gcagcacagc ctgtctcc
	Reverse (SEQ ID NO.7)	acctgttggc cgaggactag
IL-6	Forward (SEQ ID NO.8)	acgtagctag ctagtcgga tg
	Reverse (SEQ ID NO.9)	tcgtagcttg gctagtcgat cg
TNF- α	Forward (SEQ ID NO.10)	atgtctcagc ctctcatc
	Reverse (SEQ ID NO.11)	gcttgcact cgaattttga ga
β -actin	Forward (SEQ ID NO.12)	gcttccctgt atgcctctg
	Reverse (SEQ ID NO.13)	cgctcgttgc aatagtgatg
Mi RNA-193b-3p	Forward (SEQ ID NO.14)	actggccctc aagccccgc t
Mi RNA-486-3p	Forward (SEQ ID NO.15)	gcgggcagct cagtagaggat
Mi RNA-369-3p	Forward (SEQ ID NO.16)	accggcccgg aatacatggt tgatctt
Mi RNA-410-3p	Forward (SEQ ID NO.17)	ccgcgggaat aacagatggc ctgt
Mi RNA-136-3p	Forward (SEQ ID NO.18)	ccgcggcatc gtctcaatga gtct
Mi RNA-195-5p	Forward (SEQ ID NO.19)	cgccggtagc agcagaaata ttggc
Cel-mi R-39	Forward (SEQ ID NO.20)	cgcaggtcca
	通用反向引物	Reverse (SEQ ID NO.21) gttttttt tttttttt

[0039] 2. miRNA的定量PCR:为了分析miRNA水平,使用miRcute miRNA FirstStrand cDNA Synthesis Kit试剂盒(中国天根生物技术公司)将总RNA反转录到cDNA。反转录体系配制:总RNA2 μ g,2 \times miRNA RT Reaction Buffer10 μ l,miRNA RT Enzyme Mix 2 μ l,加RNase-Free ddH₂O到20 μ l。混匀,短暂离心,42 $^{\circ}$ C干浴60min;95 $^{\circ}$ C,3min终止反应。-20 $^{\circ}$ C保存cDNA。并使

用miRcute miRNA qPCR检测试剂盒(中国天根生物技术公司)进行qRT-PCR。引物序列见表1所示。所有PCR反应重复三次,miRNA水平内参或外参为cel-miR-39或U6 snRNA水平表达。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算组织和培养基中miRNA水平,用 $2^{-\Delta CT}$ 法计算血浆中miRNA的表达水平。其中,miR-486-3p核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示:5'-cgggcagctc agtagaggat-3'。

[0040] 3. 总共20个血浆样本进行验证外泌体miRNAs的表达,其中包括SAH患者的样本(n=10)和来自健康对照受试者的样本(n=10)。SAH组由4名男性和6名女性组成,中位年龄为60岁(年龄范围:55-67岁)。健康对照组包括4名男性和6名女性,中位年龄为61岁(年龄范围:54-66岁)。通过比较SAH患者与正常对照者之间的血浆外泌体水平,确定这六种血浆外泌体miRNAs是否表达差异具有意义。qRT-PCR证实其中四个miRNAs表达(hsa-miR-369-3p、hsa-miR-410-3p、hsa-miR-193b-3p和hsa-miR-486-3p)在实验组(SAH后24h)和健康对照组之间有统计学差异,如图4中A所示。再使用SAH小鼠模型对外泌体miR-486-3p表达进行验证,发现SAH组后24小时相对于Sham组血浆外泌体miR-486-3p的表达增加,而在SAH小鼠脑组织中相对于对照组表达降低,如图4中B,C所示。使用SAH小鼠模型对外泌体miR-486-3p表达进行验证,发现SAH组后24小时相对于Sham组血浆外泌体miR-486-3p的表达增加,而在SAH小鼠脑组织中相对于对照组表达降低,如图4中B,C所示。

[0041] 实施例2、RVG-LAMP2B-overexpression慢病毒载体构建

[0042] 1. 实验方法:

[0043] 1.1用PCR方法得到RVG-LAMP2B-mus序列片段

[0044] 1.1.1载体全基因合成由捷瑞生物工程有限公司合成

[0045] 1.1.2引物:基因名称:RVG-LAMP2B-mus;克隆载体:pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZsGreen-T2A-PURO,克隆载体如图1所示。克隆策略:BamHI+EcoI。目的基因上下游引物分别加上PHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZSGREEN-T2A-PURO载体上EcoI和BamHI两侧同源序列,用于载体的亚克隆,引物序列如下:

[0046] 引物由上海汉恒生物有限公司合成

[0047] m-RVG-lamp2b-F:(SEQ ID NO.22)

[0048] agaggatcta tttccggtga attcgccacc atgtgcctct ctccggtta

[0049] m-RVG-lamp2b-R:(SEQ ID NO.23)

[0050] cacttaagct tggtagcag gatccagag tctgatatcc agcataggt

[0051] 1.1.3 PCR体系

[0052] 将oligo溶解成50 μ M,分别取相同体积至一1.5mL离心管,混合均匀,配成oligo mix。

[0053] 1.1.4载体酶切

[0054] 酶切体系如表2所示,40 μ L酶切体系,载体(400ng/ μ L),2 μ L;酶,1 μ L;10*buffer,4 μ L,ddH₂O,33 μ L。37 $^{\circ}$ C 2h左右。

[0055] 1.1.5电泳:用DNA凝胶回收试剂盒回收载体PHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-ZSGREEN-T2A-PURO。纯化DNA溶液。获得的DNA溶液,可直接应用于后续实验中,或保存于-20 $^{\circ}$ C备用。

[0056] 1.2处理好的目的片段与载体连接反应体系(20 μ L),片段,50ng;酶切后载体,10-25ng;HB-infusion Master Mix(2 \times),10 μ l;超纯H₂O,Up to 20 μ l。以上反应体系置于50 $^{\circ}$ C,在温浴20min。

[0057] 1.3将连接产物转化感受态细胞

[0058] 从-70℃中取出感受态细胞,将装有感受态细胞的离心管冰上放置4min,待感受态细胞解冻后,加入10μL连接产物,轻柔混匀内容物,在冰中放置30min。将离心管放到预加温到42℃的水浴锅中放好的试管架上,放置90秒,不要摇动离心管。快速将离心管转移到冰浴中,使细胞冷却3min。

[0059] 向每支离心管加入800μL不含抗生素LB培养基,然后将离心管转移到37℃摇床,250转/min,培育45min使细菌复苏。取200μL培育后的细胞均匀涂布于含50μg/mL Ampicillin LB平板上。等平板上液体被吸收后,将平板倒置于37℃培养箱中,培养16h。从平板上挑取克隆菌落,小抽质粒并做鉴定挑出阳性克隆

[0060] 1.4将抽提好的质粒进行双酶切鉴定,酶切37℃,1h后电泳,在目的条带大小对应区域有酶切得到的条带对应的克隆即为阳性克隆。

[0061] 1.5重组质粒测序验证并大量抽提,取200μL阳性克隆对应的菌液送测序,并将剩余的菌液用甘油保存。将测序结果与目的基因序列进行比对,正解无误后,用保存的甘油菌液接菌LB培养基,进行大量质粒抽提,得到足够量的重组质粒。至此,载体构建实验完成。

[0062] 实施例3、RVG-LAMP2B-overexpression慢病毒包装

[0063] 2.实验步骤:

[0064] 2.1 293T细胞的培养及转染

[0065] 293T细胞在10cm培养皿中培养至80-90%融合时,接种15cm培养皿。倾去培养液,用1mL D-Hank's solution洗涤细胞两次。加入1mL Trypsin-EDTA solution,混匀后,37℃放置2-3min。

[0066] 小心吸去胰酶溶液,加入2mL含10%FBS的DMEM培养液,吹打使细胞形成单细胞悬液。将细胞悬液接种15cm培养皿,加入18mL含10%FBS的DMEM培养液,混匀后37℃5%CO₂培养过夜。

[0067] 在一支无菌的5mL离心管中加入1.5mL无血清DMEM,按比例加入穿梭质粒V3120和包装质粒(pGag/Pol、pRev、pVSV-G),混匀,取另一支无菌的5mL离心管,加入1.5mL无血清DMEM,再加入300μL RNAi-mate,混匀,室温放置5min后将两管混合,室温放置20~25min。

[0068] 除去15cm培养皿中的培养液,加入8mL无血清的DMEM培养液。将转染混合物逐滴加入15cm培养皿中,轻轻地前后摇晃培养皿以混匀复合物,在37℃5%CO₂培养箱中温育4-6h。吸弃转染液,加入18mL含10%FBS的DMEM培养液。37℃5%CO₂继续培养72h。

[0069] 2.2病毒的收集

[0070] 将培养皿中细胞上清液吸到50mL离心管中,4℃,4000rpm,4min。低速离心后,将离心管上清液倒入50mL注射器内,用0.45μm过滤器过滤。滤液在离心机中进行超速离心,4℃,20000rpm,2h。将浓缩液收集分装至1.5mL Ep管中。分装的病毒液贴上标签,-80℃冰箱保存。

[0071] 2.3滴度检测

[0072] 293T细胞在10cm dish中培养至80-90%融合时,倾去培养液,用3mL D-Hank's solution洗涤细胞两次。加1mL Trypsin-EDTA solution,混匀后,小心吸去胰酶溶液,37℃放置3-5min。在加入2mL含10%FBS的DMEM培养液,吹打使细胞形成单细胞悬液。按3×10⁴细胞/孔的浓度接种96孔板,混匀后于37℃5%CO₂培养24h。将慢病毒原液(10-20μL),用10%

FBS的DMEM培养液10倍稀释3-5个梯度。吸去96孔板中的培养液,每孔加入100 μ L稀释的病毒液,同时设立空白对照组,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养24h。

[0073] 吸弃96孔板中的稀释病毒液,每孔加入100 μ L 10%FBS的DMEM培养液,于37 $^{\circ}$ C 5%CO₂继续培养72h。通过荧光显微镜或FACS计数荧光细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度。

[0074] 3.1滴度结果:HBLV-GFP-PURO过表达对照,4*10⁸TU/mL,HBLV-m-RVG-lamp2b-3xflag-GFP-PURO,4*10⁸TU/mL。

[0075] 3.2感染染荧光图(\times 100),病毒感染:将PBS与培养基按照1:1000混匀,加入各孔,病毒按照MOI=80计算加入量。将细胞置于含5%CO₂的37 $^{\circ}$ C培养箱中继续孵育;感染24h后换液;感染48h后拍照记录,同时进行1:4传代;过夜后进行二次感染MOI=40,48h后拍照记录同时收样用于qPCR。如图2所示,为HBLV-GFP-PURO和HBLV-m-RVG-lamp2b-3xflag-GFP-PURO感染荧光图。

[0076] 实施例4、qPCR验证RVG-LAMP2B过表达效果

[0077] 1.实验目的:qPCR验证RVG-LAMP2B过表达效果。

[0078] 2.实验步骤:离心柱法提取总RNA,分光光度计检测RNA浓度及纯度。反转录实验,为了分析mRNA水平,使用Fast Quant RT Kit(with gDNase;天根生物技术,中国)进行逆转录(RT),将组织中提取的总RNA 3 μ l加入5 \times gDNA Buffer 2 μ l+RNase-free ddH₂O 5 μ l,配置后混匀,简短离心后置于42 $^{\circ}$ C孵育3分钟后置于冰上,配置成gDNA去除反应液中;再按10 \times Fast RT Buffer 2 μ l、RT Enzyme Mix 1 μ l、FQ-RT Primer Mix 2 μ l和RNase-free ddH₂O 5 μ l配置混合液;再将混合液加入gDNA去除反应液中,充分混匀;42 $^{\circ}$ C孵育15分钟;95 $^{\circ}$ C孵育3分钟后放于冰上,得到的cDNA可用于后续qRT-PCR实验或置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0079] 3.qPCR扩增,获得的cDNA进行qRT-PCR使用SuperReal PreMix Color试剂盒(SYBR Green;天根生物技术,中国)进行定量分析。所有PCR反应重复三次,mRNA水平内参或外参为 β -actin。用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算组织和培养基中mRNA水平。引物序列列于表1或表2所示。

[0080] 表2

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度
Mouse RVG-LAMP2B-F	caccatttgg atgcccgaga (SEQ ID NO.24)	84bp
[0081] Mouse RVG-LAMP2B-R	ccgttgatg ctcttccc (SEQ ID NO.25)	
Mouse-Actin-F	agagggaat cgtgcgtgac (SEQ ID NO.25)	90bp
Mouse-Actin-R	aggaagagga tgcggcagt (SEQ ID NO.26)	

[0082] 实验结果如图3所示的基因表达柱状图,骨髓间充质干细胞感染RVG-LAMP2B过表达病毒后目的基因有过表达。

[0083] 实施例5、MiR-193b-3p的装载

[0084] 1.细胞培养

[0085] 选取6周龄成年雄性小鼠,从小鼠股骨中提取骨髓。细胞用PBS洗涤,在加入20%胎牛血清和抗生素的DMEM中进行混悬(均来自美国GIBCO)。三天后,通过更换新鲜培养基来去除非贴壁细胞,并且仍然紧密附着在塑料烧瓶上的细胞被认为是BMSC的0代细胞。BMSCs只能用到第八代(P8)进行外泌体收集。

[0086] 2. 外泌体的分离制备

[0087] 从骨髓间充质干细胞无血清培养基中的细胞培养上清液中纯化外泌体。在收集培养基前,用PBS洗涤两次BMSCs,加入37℃无血清培养基中,在5%CO₂的培养箱中培养48h。收集培养基上清液或血浆样品,先4℃,2000g连续离心10min,去除细胞碎片,然后用0.22μm过滤器进行过滤,在4℃下先10000g下离心30min,然后100000g离心4h。沉淀的外泌体用PBS洗涤一次,并重新悬浮准备下一步实验。将外泌体吸附在碳包覆的镍网格上1h,然后用PBS洗涤三次,每次5min,用2%甲醛固定10min。样品用乙酸铀酰和柠檬酸铅进行对比(Sigma-Aldrich,美国)。在去离子水中洗涤三次后,栅格干燥几分钟,最后用TECNAI-10透射电子显微镜(TEM;飞利浦,荷兰)进行检查。

[0088] 3. MiR-486-3p装载

[0089] 将总蛋白浓度为20μg(BCA测定试剂盒测定,Beyotime)和20μl的miR-486-3p mimics或无序miRNAs(吉玛基因生物,中国)混合在180μl的转染液中(Cell Line Nucleofector Kit V, Amaxa),并在Nucleofector IIs/2b电专仪中用350V和150μF下电转。为了去除未转染成功的miRNA mimics,采用超速离心法在PBS(4℃)中洗涤两次外泌体。用qRT-PCR检测miR-486-3p水平,验证转染效率。用qRT-PCR分析测定了用miR-486-3p mimics或无序miRNA的电穿孔转染后的外泌体中的MiR-486-3p水平。发现,在转染miR-486-3p mimics的外泌体中,miR-486-3p水平明显高于阴性对照,如图5中D所示。

[0090] 实施例6、RVG/Lamp2b修饰外泌体的制造与表征

[0091] 为了获得RVG/Lamp2b/Exos,用HBLV-RVG/Lamp2b质粒或阴性对照(NC)的慢病毒载体转导BMSCs。使用western blot分析来测量这四组中LAMP2B的蛋白质水平,以验证慢病毒载体是否成功地感染到BMSCs中,如图5中A所示。然后,从BMSCs的培养上清液中纯化外泌体。

[0092] 为了分析从BMSCs中提取的RVG/Exos的特征,用TEM观察了这些外泌体的形态,揭示了一个具有典型外泌体颗粒的群体如图5中B所示。Westernblot分析表明,Lamp2b、CD63和GM130(一种高尔基体标记物)以及内吞途径形成相关蛋白Alix在外泌体中表达,如图5中C所示。

[0093] 实施例7、RVG/Exos靶向入脑

[0094] 为了检测RVG/Exos是否可以靶向入脑,建立了小鼠SAH模型。未修饰/Exos和RVG/Exos装载FAM标记的miR-486-3p。静脉注射后2h取SAH模型小鼠脑组织切片观察,如图6中A所示。发现RVG/Exos组小鼠颞叶底部(SAH出血部位)FAM荧光数量明显多于未修饰/Exos组,在静脉注射miR-193b-3p mimics组颞叶底部几乎没有FAM荧光,如图6中B所示。这些数据表明,与未经修饰/Exos相比,RVG/Exos有效地将miR-486-3p输送到脑出血区域,miRNA本身几乎不能由细胞单独内吞的。另FAM主要定位在细胞核中。这些结果表明,miR-486-3p靶基因定位于细胞核,如图6中B所示。

[0095] 实施例8、NAD依赖性蛋白脱乙酰酶2(Sirt2)在SAH中的表达情况及MiR-486-3p对靶基因Sirt2表达的影响

[0096] 1. 免疫印迹实验(western blot): 冷冻组织样品或骨髓间充质干细胞应用细胞裂解液进行机械裂解(Beyotime,中国)。采用增强BCA蛋白检测试剂盒(Beyotime,中国)测定裂解液中蛋白浓度。在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上分离分子量标

记物 (5 μ l/Lane;ThermosScience,美国) 和蛋白质样品 (20 μ g/Lane), 并蛋白电泳转移到聚乙烯二氟化物膜 (PVDF, 美国Millipore Corporation, 美国) 上。在室温下用5%脱脂牛奶封闭1h, 然后将PVDF膜放到加了一抗的稀释液中, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。主要抗体为: 羊抗-Lamp2b (1:1000, Abcam, USA), 鼠抗 β -actin (1:5000, Abcam, USA), 鼠抗-CD63 (1:1000, Abcam, USA), 兔抗-Alix (1:1000, Abcam, USA), 兔抗-GM130 (1:1000, Abcam, USA), 兔抗-Sirt2 (1:5000, Abcam, USA) 和鼠抗-GAPDH (1:5000, Abcam, USA)。再与HRP-结合的二抗有抗山羊, 抗兔, 或抗鼠 (1:10000, CST, 美国) 在室温下孵育2h。用增强化学发光 (ECL) 试剂盒 (Affinity, 中国) 观察条带。

[0097] 2. 利用miRNA靶点预测算法 (TargetScan7.0和miRanda3.3a), 确定了miR-486-3p的潜在靶点。还注意到miR-486-3p在先前的一项研究中具有调节Sirt2表达的能力。然后测量了SAH后小鼠脑组织Sirt2的动态表达水平变化。发现, 与Sham组相比, Sirt2的mRNA水平在SAH后24h达到峰值, Sirt2的蛋白水平在SAH后24h达到峰值, 如图7中A和B所示。在Exos/miR-486-3p处理后, Sirt2 mRNA和蛋白水平较低, 如图7中C和D所示。

[0098] 实施例9、不同组炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的表达水平

[0099] 1. 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 取SAH后24H的小鼠脑组织。将脑组织加入0.9%生理盐水中机械匀浆, 混合比例为200mg/ml。后放在4 $^{\circ}$ C 12000rpm下离心10min。脑组织匀浆中炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的浓度, 使用相对应的ELISA试剂盒 (Elabscience生物科技公司, 中国) 进行量化的。炎症因子的浓度通过OD值进行计算。使用qRT-PCR定量炎症因子表达水平, SAH后IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的mRNA水平较高, Exos/miR-486-3p显著降低促炎细胞因子的表达, 如图8中A-C所示。用ELISA法测定脑皮层的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。发现SAH后, 炎症细胞因子水平显著升高, 而Exos/miR-486-3p处理后SAH后脑中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的表达水平显著降低, 如图8中D-F所示。

[0100] 实施例10、MiR-486-3p对SAH后小鼠神经行为障碍、脑水肿及神经凋亡变性的影响

[0101] 1. 神经行为障碍: 一名单独的实验员对SAH后24小时的所有小鼠进行神经行为学评分, 使用Garcia评分表。Garcia评分表包括自主活动、尾部悬空四肢活动的对称性、提起鼠尾放置桌面边缘观察前肢伸展、攀爬和抓持铁笼的能力、身体感觉反应和对胡须触碰的反应。每组测试得分为0到3分。总分18分评价神经行为障碍, 较高的分数代表较轻的神经功能缺损。

[0102] 2. 脑水肿: 取SAH后24小时小鼠大脑, 去除脑干和小脑, 取出样品立即称重 (湿重量, WW), 然后在100 $^{\circ}$ C下干燥72h, 以获得干重 (D W)。脑含水量 (BWC) 的百分比计算为: [(湿重-干重)/湿重] \times 100%。

[0103] 3. Fluoro-Jade C染色, 用Fluoro-Jade C (FJC) 染色检测神经变性。去石蜡化和再水化后, 用含1%NaOH的80%酒精孵育5分钟, 70%酒精孵育2分钟, 0.06%高锰酸钾孵育10分钟, 0.0001%FJC (AG325, Millipore, 德国) 工作液孵育30分。接下来, 切片洗涤和干燥10分钟, 然后滴树脂压片。再对切片进行荧光显微镜观察。所有数据均以平均 \pm 标准误 (SE) 表示在分析之前, 使用Kolmogorov-Smirnov检验每组数据集的正态分布。使用Mann-Whitney U检验和/或独立t检验分析两组之间的差异。使用Kruskal-Wallis检验或ANOVA方差分析对两组以上进行比较。当 $p < 0.05$ 时, 差异被认为具有统计学意义。使用Med Calc版本13.0.0 (Broekstraat 529030, Mariakerke, 比利时) 进行所有统计分析。

[0104] 测定miR-486-3p对SAH小鼠的神经保护功能,分别做了神经行为障碍评分,神经凋亡变性和脑水含量实验。如图9中A所示,SAH组神经系统评分低于Sham组($p < 0.01$)。与SAH和Exos/Scramble miRNA组相比,在SAH后24h,Exos/miR-486-3p明显改善了小鼠的神经功能评分。同样,Exos/miR-486-3p组的脑水肿程度明显低于SAH组和Exos/Scramble miRNA组图9中B所示。与Sham组相比,Exos/miR-486-3p组FJC阳性细胞数较低,SAH和Exos/Scramble miRNA组较高,如图9中C和D所示。

[0105] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 皖南医学院第一附属医院（皖南医学院弋矶山医院）
 <120> miR-486-3p 在制备治疗 SAH 导致的神经炎症产品中的应用
 <130> GG20758042A
 <160> 27
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 1
 cggggcagctc agtacaggat 21
 <210> 2
 <211> 18
 [0106] <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 2
 caccatttg atgcccga 18
 <210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 3
 ccgttgatg ctcc 15
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 4

	cagctacttc aagaacatc cg	22
	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 5	
	tattcttttc tgcaggaggt gt	22
	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 6	
	gcagcacagc ctgtctcc	18
	<210> 7	
[0107]	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 7	
	acctgttggc cgaggactag	20
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 8	
	acgtagctag ctagtcggta tg	22
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<400> 9	
	tcgtagcttg gctagtcgat cg	22
	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 10	
	atgtctcagc ctctcattc	19
	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 11	
	gcttgctact cgaatttga ga	22
[0108]	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 12	
	gcttcctgt atgcctctg	19
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 13	
	cgctcgttgc aatagtgatg	20
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	

	<213> Artificial Sequence	
	<400> 14	
	actggccctc aagtcctccgc t	21
	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 15	
	gcgggcagct cagtagagga t	21
	<210> 16	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 16	
[0109]	accggcccgg aatacatggt tgatctt	27
	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 17	
	ccgegggaat aacagatggc ctgt	24
	<210> 18	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 18	
	ccgeggcatc gtctcaatga gtct	24
	<210> 19	
	<211> 25	

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 19	
	cgccggtagc agcagaaata ttggc	25
	<210> 20	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 20	
	cgcaggtcca	10
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
[0110]	<400> 21	
	gtttttttt tttttttt	20
	<210> 22	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 22	
	agaggatcta ttccggtga atcgccacc atgtgcctct ctccggtta	49
	<210> 23	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 23	
	cacttaagct tggtagcgag gatcccagag tctgatatcc agcataggt	49
	<210> 24	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 24	
	caccatttg atgcccgaga	20
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 25	
	ccgttgatg ctctctccc	20
[0111]	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 26	
	agaggaaat cgtgcgtgac	20
	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<400> 27	
	aggaagagga tgcggcagt	19

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 皖南医学院第一附属医院(皖南医学院弋矶山医院)
- [0003] <120> miR-486-3p在制备治疗SAH导致的神经炎症产品中的应用
- [0004] <130> GG20758042A
- [0005] <160> 27
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] cgggcagctc agtagaggat 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 18
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> Artificial Sequence
- [0017] <400> 2
- [0018] caccatttgg atgcccga 18
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 15
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> Artificial Sequence
- [0023] <400> 3
- [0024] ccgttgatg cttcc 15
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 22
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <400> 4
- [0030] cagctacttc aagaaacatc cg 22
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 22
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> Artificial Sequence
- [0035] <400> 5
- [0036] tattcttttc tgcaggaggt gt 22
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 18

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> Artificial Sequence
[0041] <400> 6
[0042] gcagcacagc ctgtctcc 18
[0043] <210> 7
[0044] <211> 20
[0045] <212> DNA
[0046] <213> Artificial Sequence
[0047] <400> 7
[0048] acctgttggc cgaggactag 20
[0049] <210> 8
[0050] <211> 22
[0051] <212> DNA
[0052] <213> Artificial Sequence
[0053] <400> 8
[0054] acgtagctag ctagtccgta tg 22
[0055] <210> 9
[0056] <211> 22
[0057] <212> DNA
[0058] <213> Artificial Sequence
[0059] <400> 9
[0060] tcgtagcttg gctagtcgat cg 22
[0061] <210> 10
[0062] <211> 19
[0063] <212> DNA
[0064] <213> Artificial Sequence
[0065] <400> 10
[0066] atgtctcagc ctctcattc 19
[0067] <210> 11
[0068] <211> 22
[0069] <212> DNA
[0070] <213> Artificial Sequence
[0071] <400> 11
[0072] gcttgtcact cgaattttga ga 22
[0073] <210> 12
[0074] <211> 19
[0075] <212> DNA
[0076] <213> Artificial Sequence
[0077] <400> 12

[0078] gcttcctgt atgcctctg 19
[0079] <210> 13
[0080] <211> 20
[0081] <212> DNA
[0082] <213> Artificial Sequence
[0083] <400> 13
[0084] cgctcgttgc aatagtgatg 20
[0085] <210> 14
[0086] <211> 21
[0087] <212> DNA
[0088] <213> Artificial Sequence
[0089] <400> 14
[0090] actggccctc aagtccccgc t 21
[0091] <210> 15
[0092] <211> 21
[0093] <212> DNA
[0094] <213> Artificial Sequence
[0095] <400> 15
[0096] gcgggcagct cagtagagga t 21
[0097] <210> 16
[0098] <211> 27
[0099] <212> DNA
[0100] <213> Artificial Sequence
[0101] <400> 16
[0102] accggcccgg aatacatggt tgatctt 27
[0103] <210> 17
[0104] <211> 24
[0105] <212> DNA
[0106] <213> Artificial Sequence
[0107] <400> 17
[0108] ccgcgggaat aacagatggc ctgt 24
[0109] <210> 18
[0110] <211> 24
[0111] <212> DNA
[0112] <213> Artificial Sequence
[0113] <400> 18
[0114] ccgcggcatc gtctcaatga gtct 24
[0115] <210> 19
[0116] <211> 25

- [0117] <212> DNA
[0118] <213> Artificial Sequence
[0119] <400> 19
[0120] cgccggtagc agcagaaata ttggc 25
[0121] <210> 20
[0122] <211> 10
[0123] <212> DNA
[0124] <213> Artificial Sequence
[0125] <400> 20
[0126] cgcaggtcca 10
[0127] <210> 21
[0128] <211> 20
[0129] <212> DNA
[0130] <213> Artificial Sequence
[0131] <400> 21
[0132] gttttttttt tttttttttt 20
[0133] <210> 22
[0134] <211> 49
[0135] <212> DNA
[0136] <213> Artificial Sequence
[0137] <400> 22
[0138] agaggatcta tttccggtga attcgccacc atgtgcctct ctccggtta 49
[0139] <210> 23
[0140] <211> 49
[0141] <212> DNA
[0142] <213> Artificial Sequence
[0143] <400> 23
[0144] cacttaagct tggtagcgag gatccagag tctgatatcc agcataggt 49
[0145] <210> 24
[0146] <211> 20
[0147] <212> DNA
[0148] <213> Artificial Sequence
[0149] <400> 24
[0150] caccatttgg atgcccgaga 20
[0151] <210> 25
[0152] <211> 20
[0153] <212> DNA
[0154] <213> Artificial Sequence
[0155] <400> 25

-
- [0156] ccgttggatg ctctcttccc 20
[0157] <210> 26
[0158] <211> 20
[0159] <212> DNA
[0160] <213> Artificial Sequence
[0161] <400> 26
[0162] agagggaaat cgtgcgtgac 20
[0163] <210> 27
[0164] <211> 19
[0165] <212> DNA
[0166] <213> Artificial Sequence
[0167] <400> 27
[0168] aggaagagga tgcggcagt 19

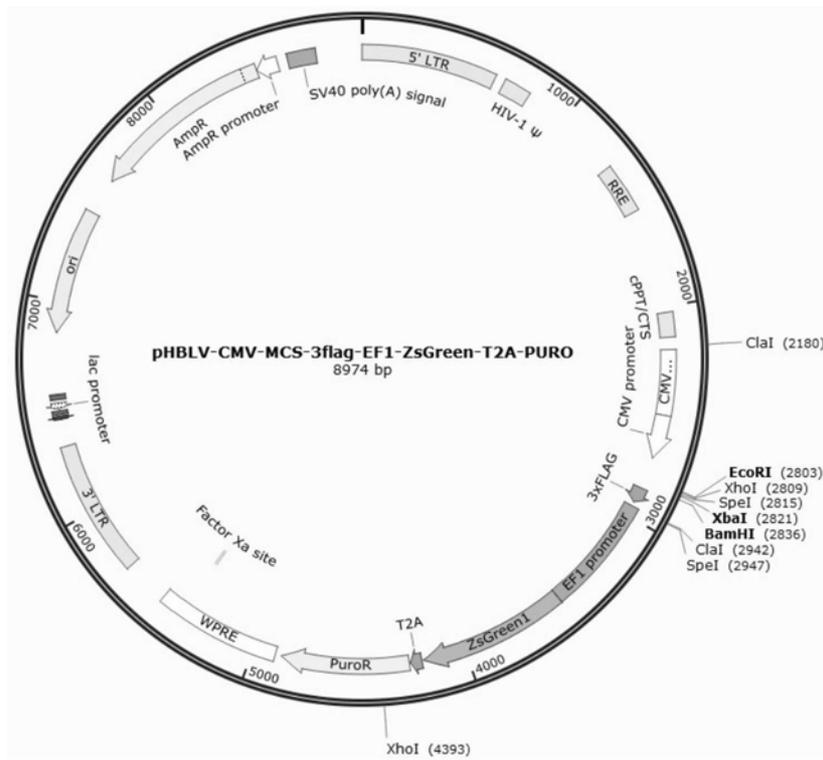


图1

样品 (骨髓间充质)	荧光场	明场
CK		
NC		
RVG-lamp2b-overexpression		

图2

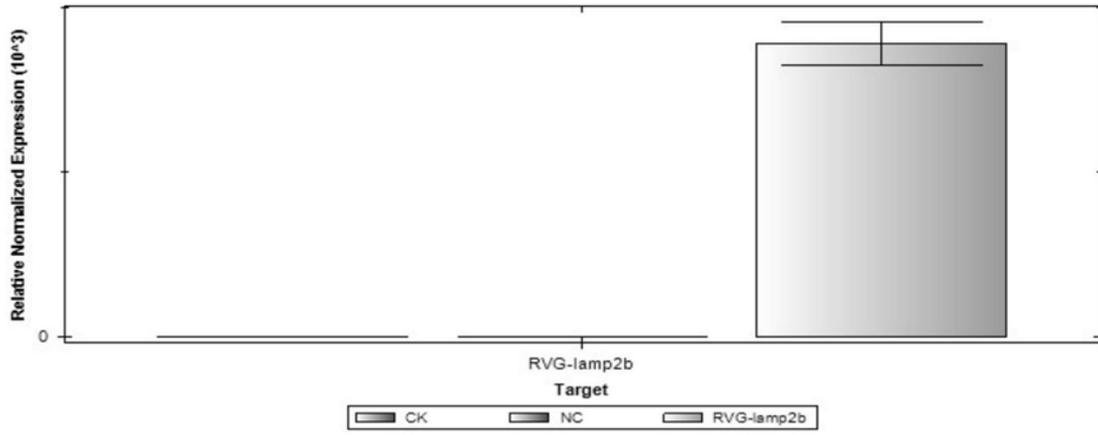


图3

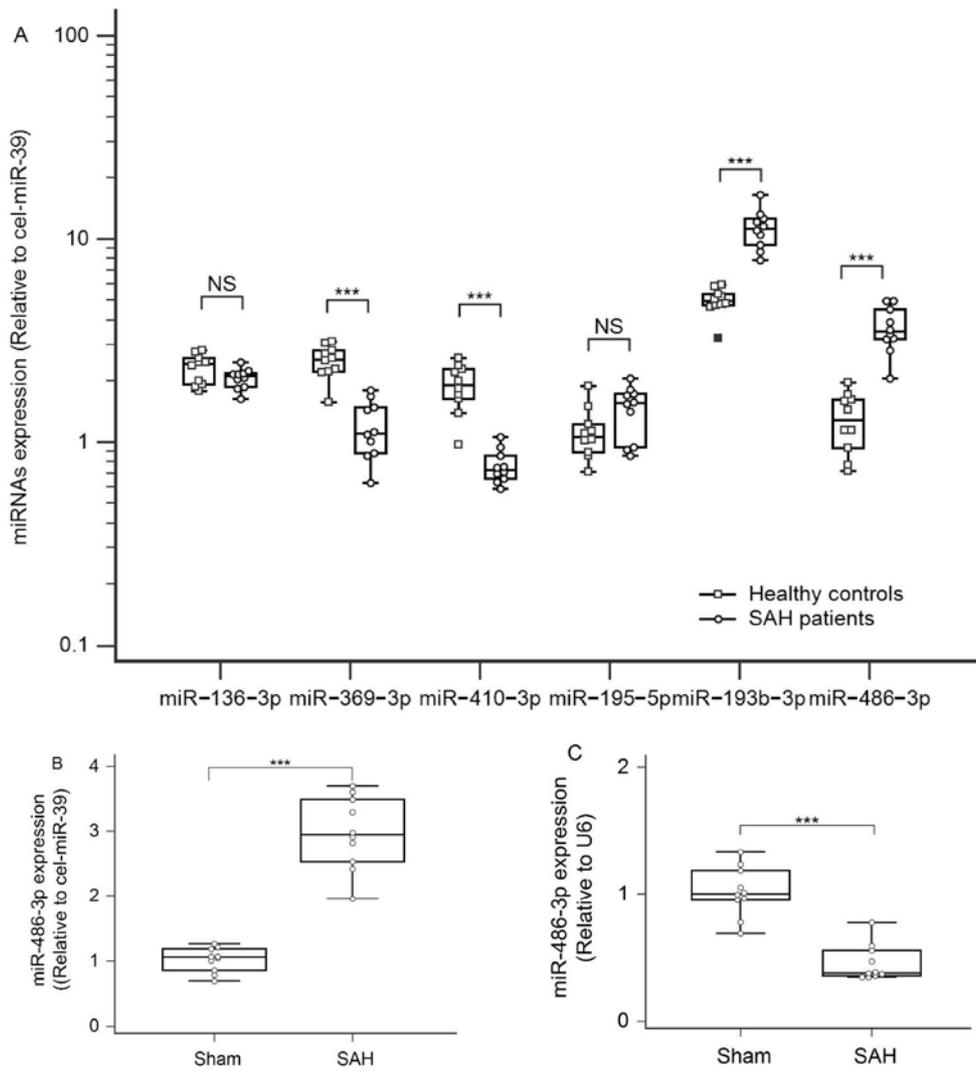


图4

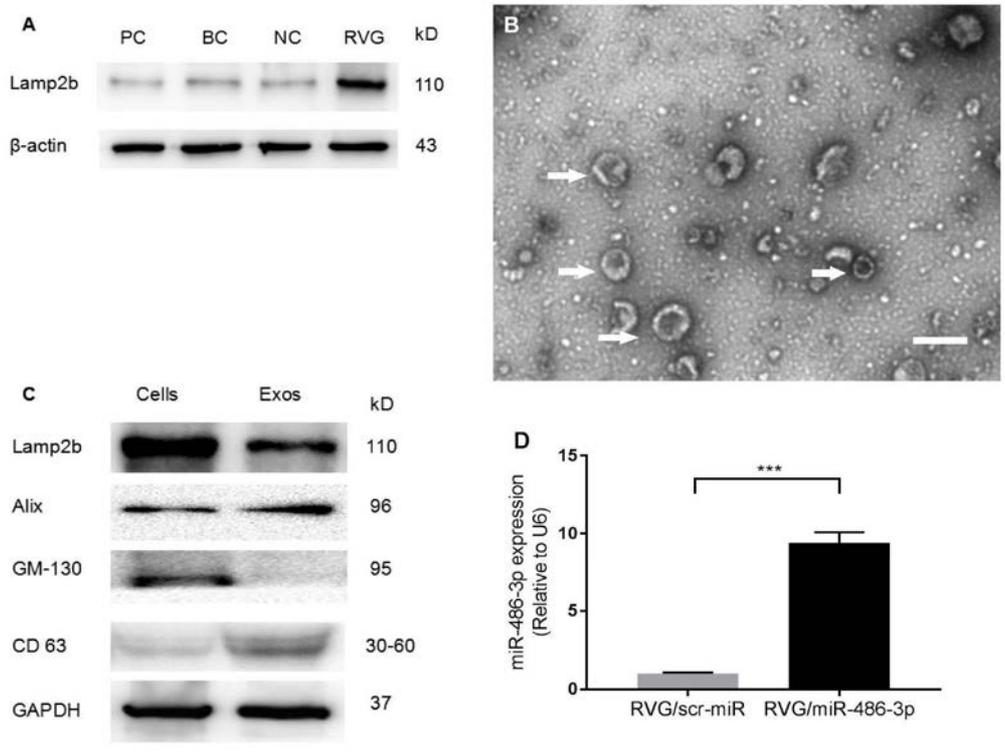


图5

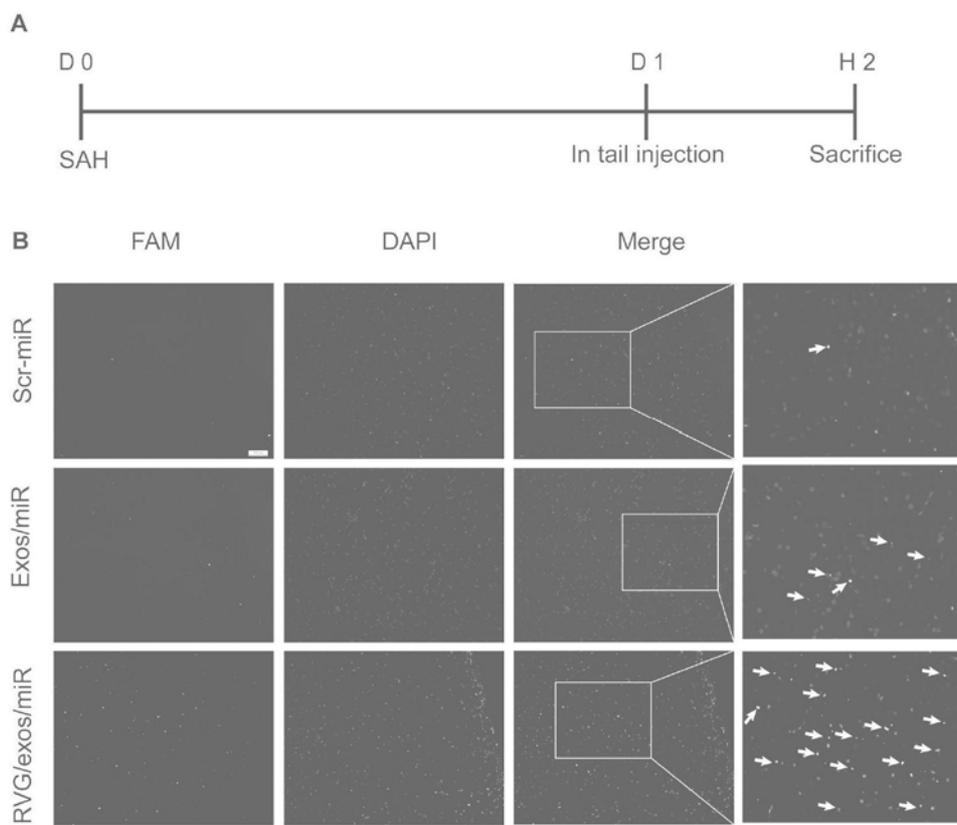


图6

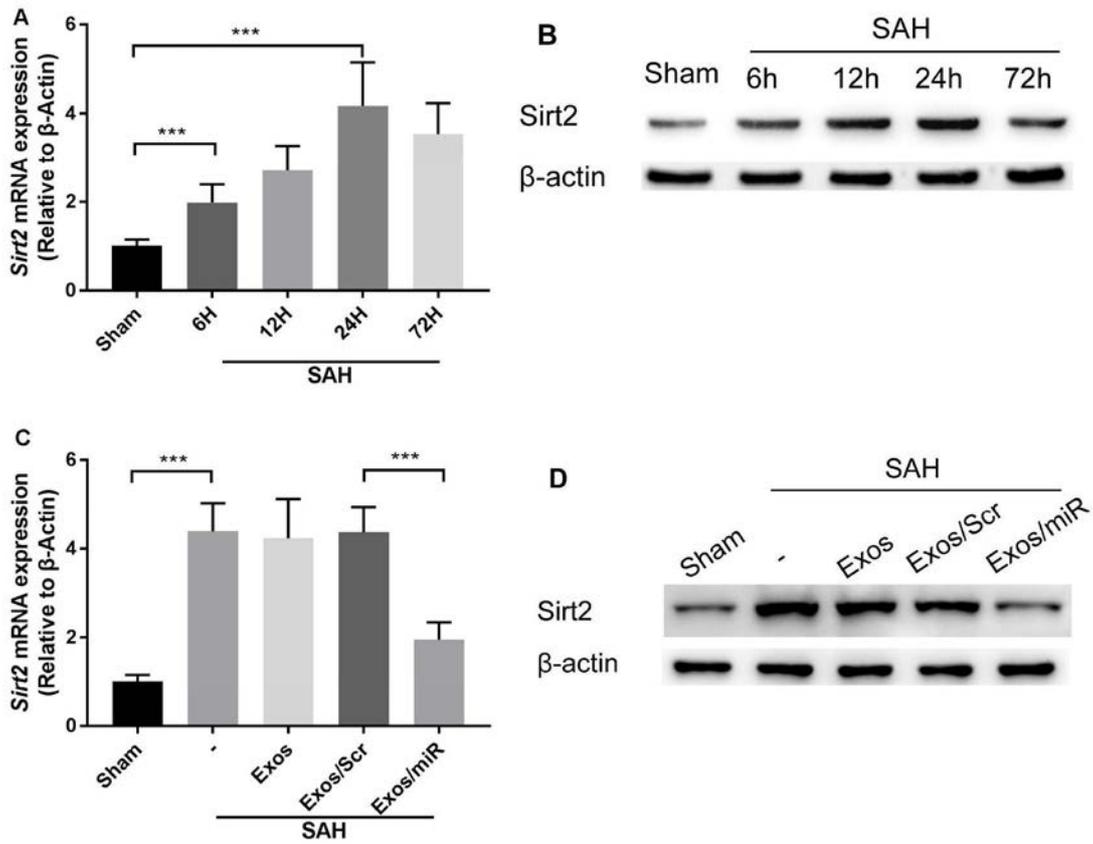


图7

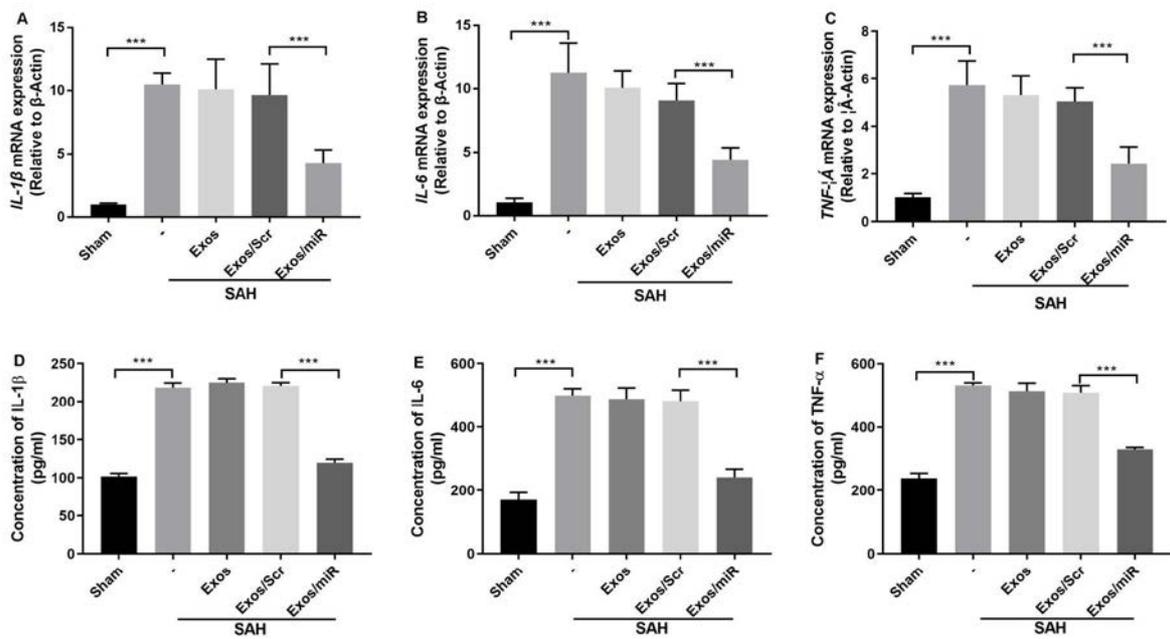


图8

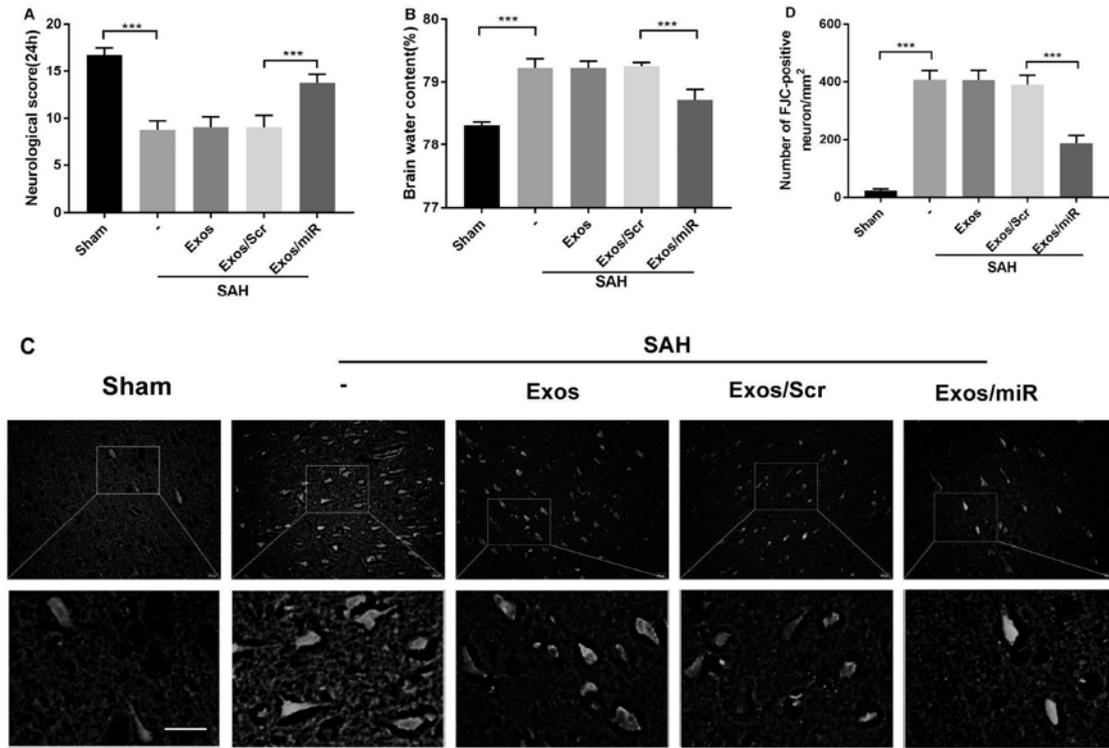


图9