



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101974529 B

(45) 授权公告日 2013.04.03

(21) 申请号 201010291081.7

(22) 申请日 2010.09.21

(73) 专利权人 南京大学(苏州)高新技术研究院
地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路 150 号

(72) 发明人 魏继武 马柯思·斯诺

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/113(2010.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 1/18(2006.01)

(56) 对比文件

Mouldy Sioud. Modulation of Dendritic Cell Maturation and Function by siRNA-Bearing 5"-Triphosphate. 《RNA Therapeutics(Methods in Molecular Biology)》. 2010, 第 629 卷 393 - 402.

Mouldy Sioud. Modulation of Dendritic Cell Maturation and Function by siRNA-Bearing 5"-Triphosphate. 《RNA Therapeutics(Methods in Molecular Biology)》. 2010, 第 629 卷 393 - 402.

Young A.Yoo, et al.. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-β-mediated activation of the ALK5 - Smad 3 pathway. 《Carcinogenesis》. 2008, 第 29 卷 (第 3 期), 480 - 490.

Young A.Yoo, et al.. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-β-mediated activation of the ALK5 - Smad 3 pathway. 《Carcinogenesis》. 2008, 第 29 卷 (第 3 期), 480 - 490.

审查员 宋智刚

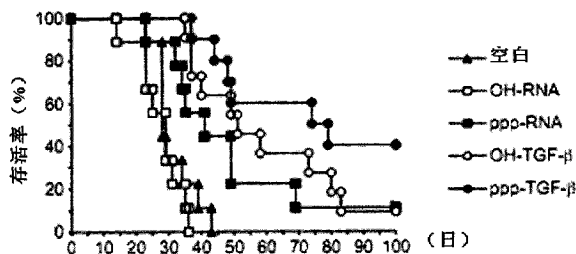
权利要求书 1 页 说明书 7 页
序列表 8 页 附图 6 页

(54) 发明名称

含自由三磷酸基团的 TGF-β 特异性 siRNA 及其应用

(57) 摘要

本发明属于 RNA 干扰技术领域,公开了含自由三磷酸基团的 TGF-β 特异性 siRNA 及其应用。该含自由三磷酸基团的 TGF-β 特异性 siRNA 的反义链和正义链序列 5' 端均为鸟嘌呤核苷,该鸟嘌呤核苷的戊糖 3' 位点上修饰有一个自由三磷酸基团。本发明 siRNA 结合了 TGF-β 特异性基因沉默作用机制和诱导真核细胞抗病毒的固有免疫作用机制,不仅能抑制介导肿瘤免疫逃逸的重要分子 TGF-β,还能有效激活机体的抗肿瘤免疫,能显著性地提高治疗肿瘤的效果。有效地解决了传统 siRNA(OH-RNA) 仅有单一基因沉默功能,而治疗肿瘤疗效不佳的问题。本发明 ppp-TGF-β 可在制备治疗肿瘤特别是胰腺癌的药物中应用。



1. 含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA,其特征在于该 TGF- β 特异性 siRNA 的反义链和正义链序列 5' 端均为鸟嘌呤核苷,该鸟嘌呤核苷的戊糖 5' 位点上修饰有一个自由三磷酸基团;所述的 TGF- β 特异性 siRNA 序列选自 :ppp-TGF- β 1,其正义链序列为 SEQ ID NO. 1,反义链序列为 SEQ ID NO. 2 ;或 ppp-TGF- β 2,其正义链序列为 SEQ ID NO. 3,反义链序列为 SEQ ID NO. 4。

2. 权利要求 1 所述的含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA 在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

3. 权利要求 1 所述的含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA 在制备治疗胰腺癌的药物中的应用。

含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA 及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于 RNA 干扰技术领域,涉及 siRNA 及其应用,具体涉及含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA 及其应用。

背景技术

[0002] 由于早期的转移、高度耐受化疗和放疗等原因,使胰腺癌的预后极差。在胰腺癌的进程中,生长转化因子 β (TGF- β) 的异常表达起到了关键性的作用。高表达的 TGF- β 能促进肿瘤的生长、浸润、转移及血管生成,另外,肿瘤来源的 TGF- β 具有很强的抑制机体免疫的作用,能帮助肿瘤建立免疫逃逸机制。如何抑制肿瘤介导的免疫抑制,是今后治疗胰腺癌的一大挑战。针对这个与肿瘤生长、浸润、转移及免疫逃逸相关的重要分子,目前最有效的方法之一是使用小干扰核糖核酸技术 (siRNA) 直接沉默,以阻断其促进肿瘤生长的通路。这种含 21-23 个碱基对的特异双链 RNA 序列,其反义链能靶向识别这些分子相应的信使 RNA (mRNA),并在相关酶的协同作用下,剪切 mRNA 从而干预 TGF- β 的蛋白合成。但前期临床肿瘤治疗效果并不理想,原因可能与其作用靶点单一、不能有效激活机体对肿瘤的免疫监视 / 杀伤功能、缺乏直接促进肿瘤细胞凋亡作用等有关。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA,该 ppp-siRNA 分子同时具备 TGF- β 特异性基因沉默、激活机体免疫应答和直接促进肿瘤细胞凋亡的三重功能,从而能很好的抑制肿瘤。

[0004] 本发明的另一目的是提供该 siRNA 的应用。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA (简称为 ppp-TGF- β),其反义链和正义链序列 5' 端均为一鸟嘌呤核苷,该鸟嘌呤核苷戊糖 5' 位点上修饰有一个自由三磷酸基团。

[0007] 所述的 TGF- β 特异性 siRNA 序列选自: ppp-TGF- β 1,其正义链序列为 SEQ ID NO. 1,反义链序列为 SEQ ID NO. 2; ppp-TGF- β 2,其正义链序列为 SEQ ID NO. 3,反义链序列为 SEQ ID NO. 4。

[0008] 本发明所述的含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA 在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

[0009] 本发明所述的含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA 在制备治疗胰腺癌的药物中的应用。

[0010] 本发明的有益效果:

[0011] 发明人通过大量实验设计并筛选出具有良好基因沉默功能的小鼠和人 TGF- β 特异性 siRNA,通过设计 5' \rightarrow 3' 端依次含有 TGF- β 特异性 siRNA 的 cDNA 序列、胞嘧啶核苷及 T7RNA 聚合酶启动子序列的 DNA 模板,在体外利用 T7RNA 聚合酶转录合成得到 5' 端含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA (以下简称 ppp-TGF- β)。该 ppp-TGF- β 通过如下三

种机制抑制肿瘤：

[0012] (1) 本发明 ppp-TGF- β 能有效地特异性沉默 TGF- β 基因,抑制 TGF- β 蛋白的表达。

[0013] (2) 本发明 ppp-TGF- β 能被细胞胞浆内的特异性识别受体 - 视磺酸诱导基因 -I (RIG-I, 一种真核细胞胞浆螺旋酶, 参与机体抗病毒的固有免疫) 识别, 并激活其下游 I- 型干扰素信号转导通路, 能诱导细胞产生 IFN- β 和干扰素诱导蛋白 10 (IP-10)、显著提高肿瘤细胞免疫递呈分子 MHC-I 的表达 (能提高机体免疫系统对肿瘤细胞的识别、攻击), 从而激活细胞及机体对肿瘤的免疫应答。

[0014] (3) 本发明 ppp-TGF- β 还能激活内源性凋亡通路中 caspase-9 而促进肿瘤细胞凋亡。

[0015] 本发明将 TGF- β 特异性基因沉默作用机制和诱导真核细胞抗病毒的固有免疫作用机制, 引入到抗肿瘤的治疗中, 不仅能抑制介导肿瘤免疫逃逸的重要分子 TGF- β , 还能有效激活机体的抗肿瘤免疫, 能显著性地提高治疗肿瘤的效果。有效地解决了传统 siRNA (OH-RNA) 仅有单一基因沉默功能, 而治疗肿瘤疗效不佳的问题。故本发明 ppp-TGF- β 可在制备治疗肿瘤特别是胰腺癌的药物中应用。

附图说明

[0016] 图 1 实施例 2 中定量 RT-PCR 检测 ppp-TGF- β 特异性基因沉默及免疫诱导功能结果图。

[0017] 其中, 图 1A 为 ppp-TGF- β 体外转染人胰腺癌细胞, 对 TGF- β mRNA 表达量的影响; 图 1B 为 ppp-TGF- β 体外转染人胰腺癌细胞, 对 I- 型干扰素 mRNA 的表达量的影响; 图 1C 为 ppp-TGF- β 体外转染鼠胰腺癌细胞, 对 TGF- β mRNA 表达量的影响; 图 1D 为 ppp-TGF- β 体外转染人胰腺癌细胞, 对 I- 型干扰素 mRNA 的表达量的影响; 图 1E 为鼠 ppp-TGF- β 经静脉注射胰腺癌小鼠, 对其肿瘤实体中 TGF- β 的 mRNA 表达水平的影响; 图 1F 为鼠 ppp-TGF- β 经静脉注射胰腺癌小鼠, 对其肿瘤实体中 I- 型干扰素的 mRNA 表达水平的影响; 图 1G 为鼠 ppp-TGF- β 经静脉注射胰腺癌小鼠, 对其肿瘤实体中干扰素诱导蛋白 (IP-10) 的 mRNA 表达水平的影响。

[0018] 图 2 实施例 3 中 ELISA 检测 ppp-TGF- β 基因沉默及免疫诱导功能结果图。

[0019] 其中图 2A ~ 2B 依次为 ppp-TGF- β 体外转染小鼠胰腺癌细胞, 24h 后对 TGF- β 蛋白水平和干扰素诱导蛋白水平的影响; 图 2C ~ 图 2F 为鼠 ppp-TGF- β 治疗的荷瘤小鼠, 对血浆 TGF- β 水平的抑制情况; 图 2G ~ 2I 为鼠 ppp-TGF- β 静脉注射荷瘤小鼠 6 小时后, 对血浆 IFN- α 、IP-10 和 TNF- α 蛋白水平的影响。

[0020] 图 3 ppp-TGF- β 转染胰腺癌细胞, 肿瘤细胞表面 I- 型抗原呈递分子表达情况。

[0021] 其中见图 3A 为人 ppp-TGF- β 转染不同人胰腺癌细胞, 肿瘤细胞表面 I- 型抗原呈递分子表达情况; 图 3B 为鼠 ppp-TGF- β 转染鼠胰腺癌细胞, 肿瘤细胞表面 I- 型抗原呈递分子表达情况。

[0022] 图 4 ppp-TGF- β 静脉注射小鼠后 12 小时, B 淋巴细胞、CD4、CD8 淋巴细胞、NK 细胞及 NKT 细胞的活化情况。

[0023] 图 5 ppp-TGF- β 处理鼠及人胰腺癌细胞后 48 小时, 细胞凋亡情况。

[0024] 图 6 实施例 4 中 ppp-TGF- β 转染人及鼠的胰腺癌细胞 48 小时后,活化 caspase-9 在细胞中表达情况。

[0025] 图 7 ppp-TGF- β 转染小鼠胰腺癌细胞后 48 小时,肿瘤细胞活性情况。

[0026] 图 8 ppp-TGF- β 转染人胰腺癌细胞后 48 小时,肿瘤细胞活性情况。

[0027] 图 9 实施例 6 中 ppp-TGF- β 转染小鼠胰腺癌细胞后 24 小时,胞内活化的 caspase-9 荧光免疫染色照片。

[0028] 图 10 ppp-TGF- β 治疗原位胰腺癌小鼠组,肿瘤 TUNEL 染色结果。

[0029] 图 11 小鼠生存曲线图。

[0030] 本发明各幅附图横坐标:A 均为空白组,即未给予 RNA 治疗组;B 均为 OH-RNA 组,即给予无意义 siRNA 治疗组;C 均为 ppp-RNA 组,即给予含自由三磷酸基团的无意义 siRNA 治疗组;D 均为 OH-TGF- β 组,即给予 TGF- β 特异性 siRNA 治疗组;E 均为 ppp-TGF- β 组,即给予 5' 端含自由三磷酸基团的 TGF- β 特异性 siRNA 治疗组。

具体实施方式

[0031] 实施例 1 本发明 ppp-TGF- β 的合成

[0032] 1.1 人及小鼠 TGF- β 特异小干扰 RNA 的设计和筛选:

[0033] 根据 PUBMED 基因库中,人及小鼠的 TGF- β mRNA 完整编码序列,使用 siRNA 设计软件 (Dharmacon RNAi Technologies),筛选出数条相应匹配的反义短序列,各含 19 核糖核苷。在体外合成相应的 siRNA (Metabion, Germany),并于每条单链 3' 端链接 2 个游离尿嘧啶核苷,用作体外筛选及抑瘤实验的 OH-TGF- β 组。

[0034] 将合成的 siRNA 序列 (OH-TGF- β),在体外用脂质体 (Lipofectamine 2000) 按 0.5 微克/微升在 OptiMEM 培养基中混合包被,体外转染胰腺癌细胞,在不同的时间 24h、48h 及 72h 提取细胞 RNA,用定量 RT-PCR 方法检测 TGF- β 1 的 mRNA 表达量,根据对 TGF- β 的抑制作用效果而选择抑制效果最佳的 siRNA,从而得到两条 TGF- β 特异性 siRNA。其中一条为人 TGF- β 特异性 siRNA,其正义链序列为 SEQ ID NO. 5,反义链序列为 SEQ ID NO. 6;另一条为鼠 TGF- β 特异性 siRNA,其正义链序列为 SEQ ID NO. 7,反义链序列为 SEQ ID NO. 8。

[0035] 同时,设计并合成对人及小鼠均无意义 siRNA,其正义链序列为 SEQ ID NO. 9,反义链序列为 SEQ ID NO. 10,该序列通过与 PUBMED 基因库中相关 mRNA 进行匹配分析,证实无任何干扰作用。合成时为增强其稳定性,于每条单链 3' 端链接 2 个游离尿嘧啶核苷。该 3' 端链接 2 个 UU 的无意义 siRNA,在考察抑瘤效果时作为 OH-RNA 对照。

[0036] 1.2 合成 ppp-TGF- β 的 DNA 模板设计:

[0037] 根据 1.1 筛选得到的序列,在相应的正义链或反义链的 cDNA 序列的 3' 端依次链接一个胞嘧啶核苷和一段 T7RNA 聚合酶启动子序列 SEQ ID NO. 11,作为编码相应的 ppp-TGF- β 正义链或反义链的 DNA 模板,序列见表 1,送交基因公司 (Metabion, Germany) 合成。其中胞嘧啶的加入是为了增强转录效率,T7RNA 聚合酶启动子序列的加入是使 T7RNA 聚合酶能特异识别并启动从 5' 端向 3' 端的转录,从而得到在 5' 端核糖核苷的戊糖 5' 位点上修饰有一自由三磷酸基团转录的产物,即 ppp-TGF- β 。

[0038] 表 1. 在体外利用 T7RNA 聚合酶合成 ppp-TGF- β 的 DNA 模板

[0039]

类别	序列
无意义 siRNA 正义链 DNA 模板	SEQ ID NO. 12
无意义 siRNA 反义链 DNA 模板	SEQ ID NO. 13
含自由三磷酸基团的人 TGF- β 特异性 siRNA 正义链 DNA 模板	SEQ ID NO. 14
含自由三磷酸基团的人 TGF- β 特异性 siRNA 反义链 DNA 模板	SEQ ID NO. 15
含自由三磷酸基团的鼠 TGF- β 特异性 siRNA 正义链 DNA 模板	SEQ ID NO. 16
含自由三磷酸基团的鼠 TGF- β 特异性 siRNA 反义链 DNA 模板	SEQ ID NO. 17

[0040] 1.3 DNA 模板双链的合成：

[0041] A. 引物与模板链杂交：体外合成识别 T7RNA 聚合酶启动子序列的引物：SEQ ID NO. 18 (Metabion, Germany)。于 PCR 反应微管中，加入 10 微升杂交缓冲液、2 微升引物、2 微升相应的 DNA 模板，于 70°C 孵育 5 分钟，再于 25°C 孵育约 25 分钟。

[0042] B. 在上述 PCR 反应管中，加入 5 微升不含 RNA 酶的纯水、2 微升 Klenow 缓冲液、2 微升 dNTP 混合液 (2.5mM) 和 1 微升 Exo-Minus Klenow DNA 多聚酶 (20 单位 / 微升, Fermentas)，置于 37°C 孵育 30 分钟，以合成双链 DNA。PCR 反应管再于 70°C 孵育 5 分钟，以灭活剩余 Exo-Minus Klenow DNA 多聚酶。

[0043] 1.4 ppp-TGF- β 体外转录：

[0044] 自由三磷酸基团 siRNA 合成的原理：T7RNA 聚合酶能特异识别 DNA 模板链上的 T7RNA 聚合酶启动子序列，并启动从 5' 端向 3' 端（即从 T7RNA 聚合酶启动子端向另一端）的转录，并在 RNA 的转录过程中，于新合成的 RNA 序列 5' 端的首个核糖核苷戊糖 5' 位点上，修饰一个不被其它分子包被的自由三磷酸基团。

[0045] 合成过程与反应体系：在灭菌 PCR 反应管中，加入 6 微升不含 RNA 酶的无菌纯水、2 微升 10xT7Rxn 缓冲液、8 微升 NTP 混合物、2 微升双链 DNA 模板和 2 微升 T7RNA 聚合酶 (MegashortskriptTMT7 kit, Ambion)，在 37°C 过夜，合成 5' 端含三磷酸基团 TGF- β siRNA 的正义链或反义链。再将合成的正义链和反义链混合，置于 37°C 过夜，杂交形成稳定双链（即为 ppp-TGF- β ）。其中人 ppp-TGF- β （即 ppp-TGF- β 1）其正义链序列为 SEQ ID NO. 1，反义链序列为 SEQ ID NO. 2；鼠 ppp-TGF- β （即 ppp-TGF- β 2），其正义链序列为 SEQ ID NO. 3，反义链序列为 SEQ ID NO. 4。

[0046] 利用上述方法，转录合成 5' 端含自由三磷酸基团的无意义 siRNA，正义链序列为 SEQ ID NO. 19，反义链序列为 SEQ ID NO. 20，在考察抑瘤效果时作为 ppp-RNA 对照。

[0047] 1.5 ppp-TGF- β 的提纯：

[0048] 在 1.4 合成产物中，加入 2 微升 Turbo-DNA 酶并孵育 30 分钟去除残存的 DNA 链，再加入 30 微升乙酸铵灭活 DNA 酶，将合成产物转移到 1.5 毫升反应管，加入 115 微升不含 RNA 酶的纯水，再加入 300 微升酚：氯仿混合物混合均匀，于 12000G 室温下离心 5 分钟，将上层苯酚（相）吸出，转移到新的 1.5 毫升 EP 管中，再加入 300 微升氯仿，混合均匀后，于 12000G 室温下离心 5 分钟，吸出上层苯酚（相），转移至新的 EP 管。向苯酚 / RNA 混合液中加

入 600 微升 100%乙醇,吹打均匀,将混合物置于 -20°C 过夜,使 RNA 沉淀析出,再于 14000G 4°C 离心 30 分钟,取出 EP 管立即置于冰上,弃去上清液,将所得的 RNA 沉淀溶于 50 微升不含 RNA 酶纯水中。进一步可以将 RNA 加入到 Mini Quick Spin Columns (Roche) 过柱,离心进行提纯,最后进行 RNA 定量及纯度测定。

[0049] 实施例 2 定量 RT-PCR 检测 ppp-TGF- β 基因沉默及免疫诱导功能:

[0050] 细胞、小鼠的转染:人胰腺癌细胞株 PANC-1, MIAPaCa-2(来自美国 ATCC), PaTu 8988t (DSMZ, 德国微生物菌种保藏中心)、BxPC-3(中国科学院上海生科院细胞资源中心)、IMIM PC-1(由德国 Marburg 大学 Patrick Michl 博士赠送,其分离及体外培养方法由 ViláMR 等详细描述^[1])。Panc02 细胞株是由甲基胆蒽诱导的小鼠胰腺腺癌(德国慕尼黑大学),其诱导及培养方法首先由 Corbett 等人公开^[2]。

[0051] 2.1 体外转染:肿瘤细胞株按 3×10^5 每孔种植在 6 孔细胞培养板中。将 RNA 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 按厂家说明书方法包被,然后分别溶于 OptiMEM 培养基 (Gibco BRL),终浓度为 0.5 微克/毫升,用于体外转染细胞。转染细胞 18 或 24 小时后用胰酶消化细胞,离心收集细胞(以下体外转染细胞同)。实验共有五组, A 组为空白组,即空白 Lipofectamine 2000, B 组为 Lipofectamine 2000 包被的 OH-RNA, C 组为 Lipofectamine 2000 包被的 ppp-RNA, D 组为 Lipofectamine 2000 包被的 OH-ppp-TGF- β , E 组为 Lipofectamine 2000 包被的 ppp-TGF- β , 以下实验的分组标记同本实验。

[0052] 2.2 体内实验, 2×10^5 鼠 Panc02 细胞株经开腹手术注射至 6 周龄雌性小鼠 C57Bl/6 (Harlan-Winkelmann, 每只平均体重约 25 克) 胰腺包膜下, 12 天后, 将 50 微克 RNA 按说明书的方法包被于 in vivo-JetPEI 试剂 (PeqLab), 并溶于 200 微升 5% 葡萄糖溶液中静脉注射小鼠, 48 小时后取出肿瘤组织。实验分组情况同 2.1 体外转染实验。

[0053] mRNA 的提取与定量:将肿瘤细胞和组织在液氮中速冻后匀浆,用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen, Invitrogen) 按说明书提供的方法提取细胞总 mRNA, 然后用 DNA 合成试剂盒 (New England Biolabs, Germany), 按说明书提供的方法转录成 cDNA, 最后, 定量 RT-PCR 采用 LC 480 Probes Master 试剂盒在 Light Cycler 480 定量 RT-PCR (Roche) 仪上检测相关指标。引物根据 the Universal Probes library (Roche) 设计并由 Metabion (Martinsried, Germany) 合成。每样本拷贝数均以 HPRT 拷贝数为参考。

[0054] 结果显示:含自由三磷酸基团的人 TGF- β 特异性 siRNA (简称人 ppp-TGF- β) 体外转染人胰腺癌 PANC-1 细胞, 其 TGF- β mRNA 的表达量显著降低 (见图 1A), 人 ppp-TGF- β 转染不同的人胰腺癌细胞, I-型干扰素 mRNA 表达水平均较 OH-TGF- β 显著增高 (见图 1B); 含自由三磷酸基团的小鼠 TGF- β 特异性 siRNA (简称鼠 ppp-TGF- β) 体外转染小鼠胰腺癌细胞 Panc02, 其 TGF- β mRNA 的表达量显著降低 (见图 1C), 鼠 ppp-TGF- β 转染小鼠胰腺癌细胞 Panc02, 其 I-型干扰素 mRNA 表达量较 OH-TGF- β 显著增高 (见图 1D), 鼠 ppp-TGF- β 经静脉注射胰腺癌小鼠, 其肿瘤实体中 TGF- β 的 mRNA 表达水平较对照组显著降低, I-型干扰素的 mRNA 表达水平和干扰素诱导蛋白 mRNA 水平较 OH-TGF- β 显著增高 (见图 1E ~ G)。

[0055] 实施例 3 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 ppp-TGF- β 基因沉默及免疫诱导功能

[0056] 小鼠胰腺癌肿瘤细胞 Panc02 或实验小鼠按实施例 2 所述方法转染 RNA 或接受 RNA 治疗后, 在不同时间点收集细胞培养上清、小鼠的血清或肿瘤实体的匀浆上清液, 用

酶联免疫吸附检测试剂盒,按厂家说明书提供的方法分别检测 IFN- α (PBL Interferon source)、IP-10 (R&D Systems)、TGF- β (eBiosciences) 和 TNF- α (BD Biosciences)。结果显示:ppp-TGF- β 体外转染小鼠胰腺癌细胞 Panc02,24 小时后 TGF- β 蛋白水平显著降低(见图 2A),干扰素诱导蛋白水平较 OH-TGF- β 显著增高(见图 2B);鼠 ppp-TGF- β 治疗的荷瘤小鼠,其血浆 TGF- β 水平在治疗后 14 天及 25 天后,仍被显著抑制(见图 2C~F);鼠 ppp-TGF- β 静脉注射荷瘤小鼠 6 小时后,血浆 IFN- α 、IP-10 和 TNF- α 蛋白水平较 OH-TGF- β 显著增高(见图 2G~I)。

[0057] 实施例 4 流式细胞分析法 (FACS) 检测 ppp-TGF- β 免疫诱导及促进肿瘤细胞凋亡的功能

[0058] 人及小鼠胰腺癌细胞表面 I-型抗原递呈分子检测抗体分别为抗人 HLA-A, B, C(clone G46-2.6, BD Pharmingen) 或抗鼠 H-2K^b(clone AF6-88.5, BD Pharmingen),在流式细胞分析仪 (BD) 上检测 RNA 处理后肿瘤细胞的表达。结果显示人 ppp-TGF- β 转染不同人胰腺癌细胞,肿瘤细胞表面 I-型抗原呈递分子表达均较 OH-TGF- β 处理后显著增高(见图 3A),ppp-TGF- β 转染小鼠胰腺癌细胞 Panc02 后,I-型抗原呈递分子表达较 OH-TGF- β 增高约 5 倍(见图 3B)。

[0059] 淋巴细胞活化实验:小鼠在接受 RNA 治疗后 12 小时,取出小鼠脾脏,通过 40 μ m 细胞滤网分离单细胞悬液,红细胞则用 BD PharmLyse™ 裂解液 (BD Bioscience) 去除。再将脾脏细胞用 CD69(clone H1.2F3, Caltag Laboratories) 单克隆抗体作为细胞活化的阳性标记,结合其它小鼠单克隆抗体,检测 B 细胞 (CD3⁻CD19⁺)、辅助性 T 细胞 (CD3⁺CD4⁺)、CD8⁺ 性 T 细胞 (CD3⁺CD8⁺)、NK 细胞 (CD3⁻NK1.1⁺)、NKT (CD3⁺NK1.1⁺) 中活化水平,抗体均购自 BD Biosciences。结合抗体后,细胞在流式细胞分析仪上检测。结果用 FlowJo 软件进行分析(版本 8.5.3, Tree Star Inc., Ashland, Oregon)。结果显示 ppp-TGF- β 静脉注射小鼠后 12 小时,活化的 B 淋巴细胞、CD4、CD8 淋巴细胞、NK 细胞及 NKT 细胞数较 OH-TGF- β 显著增高(见图 4)。

[0060] 细胞凋亡检查:经 RNA 处理后 48 小时的肿瘤细胞,用 AnnexinV-APC (Invitrogen) 和 Propidium iodide (PI, Sigma) 进行荧光染色,再于流式细胞分析仪检测细胞凋亡。结果显示:ppp-TGF- β 处理鼠及人胰腺癌细胞后 48 小时,Annexin-V 阳性的凋亡细胞数较 OH-TGF- β 显著增高(见图 5)。

[0061] 肿瘤细胞 Caspase-9 活化检测:肿瘤细胞经 RNA 转染后 48 小时,细胞用 Caspase-9FLICA 试剂盒 (ImmunoChemistry, Biomol) 进行免疫荧光染色,活化的 Caspase-9 用流式细胞分析仪检测。结果显示:ppp-TGF- β 转染人及鼠的胰腺癌细胞 48 小时后,活化的 caspase-9 阳性细胞较 OH-TGF- β 显著增高(见图 6)。

[0062] 实施例 5 XTT 法检测肿瘤细胞活性

[0063] ppp-TGF- β 转染细胞后,采用 XTT 法 (Sigma-Aldrich) 检测细胞活性。细胞以 4×10^3 每孔种植于 96 孔板使贴壁,用 2 微克/毫升 RNA 浓度转染细胞,48 小时后,将培养基更换为含 20% XTT 无酚红培养基,孵育 4 小时后在 450 纳米波长下检测吸光度。结果显示:ppp-TGF- β 转染小鼠胰腺癌细胞后 48 小时,细胞活性较 OH-TGF- β 组显著降低,并呈剂量依赖趋势(见图 7);ppp-TGF- β 转染人胰腺癌细胞 PANC-148 小时,肿瘤细胞活性较 OH-TGF- β 显著降低(见图 8)。

[0064] 实施例 6 免疫荧光法检测 ppp-TGF- β 体内促肿瘤凋亡作用及诱导肿瘤凋亡机制

[0065] 体外实验:小鼠肿瘤细胞经 RNA 按实施例 2 的方法处理后 24 小时,细胞用 caspase-9FLICA 试剂盒 (ImmunoChemistry, Biomol) 按照厂家提供的操作方法进行荧光免疫染色,最后细胞膜用 Alexa Fluor® 647 标记的 cholera toxin subunit B (Invitrogen) 染色 5 分钟, PBS 洗后在共聚焦荧光显微镜下观察照相 (Leica TCS SP5)。结果显示: ppp-TGF- β 转染小鼠胰腺癌细胞后 24 小时,显示胞内 caspase-9 活化(照片所呈现的亮点即为活化的) caspase-9,对照及 OH-TGF- β caspase-9 染色阴性,说明未活化(见图 9)。

[0066] 体内实验:按实施例 2 所述方法处理后的小鼠肿瘤实体进行冰冻切片,常规固定后,用原位杂交细胞死亡检测试剂盒 (TUNEL, Roche),按厂家提供说明书操作,然后用含 DAPI 的荧光上样液 Vectashield® (Vector Laboratories) 盖片,用共聚焦荧光显微镜观察照相 (Leica TCS SP5),见图 10。结果显示: ppp-TGF- β 治疗原位胰腺癌小鼠组,肿瘤 TUNEL 染色阳性(图中呈现亮点),说明肿瘤细胞凋亡;PBS 对照组及 OH-TGF- β 则为阴性,说明肿瘤细胞未凋亡。

[0067] 实施例 7 原位胰腺癌小鼠试验检测 ppp-TGF- β 抗肿瘤的作用

[0068] 6 周龄雌性小鼠 C57Bl/6 (Harlan-Winkelmann),每只平均体重约 25 克,全身麻醉后,经开腹手术暴露小鼠胰腺,将 2×10^5 胰腺癌细胞悬于 20 微升 PBS 中注射至胰腺包膜下,回置胰腺,关腹,小鼠保暖至苏醒活动。于第 10 天予以尾部静脉注射 RNA,每周两次共三周,每天观察小鼠生存情况,当小鼠出现不能进食、运动等明显垂危征兆时处死小鼠。每组小鼠数目为 9-11 只,至第 100 天时终止实验。以上操作均根据当地政府伦理道德条例规定进行。绘制小鼠生存曲线图(图 19),由图可知: ppp-TGF- β 组小鼠较之其他四组平均生存时间显著延长,说明本发明 ppp-TGF- β 抗胰腺癌肿瘤的作用优越于其他四组。

[0069] 参考文献

[0070] 1. Vilá MR, Lloreta J, Schüssler MH, Berrozpe G, Welt S, Real FX. New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. Lab Invest. 1995 Apr;72(4):395-404.

[0071] 2. Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP Jr, Schabel FM Jr. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. Cancer Res. 1984;44:717-726

[0001]

序 列 表

<110> 魏继武

<120> 含自由三磷酸基团的TGF- β 特异性siRNA及其应用

<160> 20

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的人TGF- β 特异性siRNA的正义链序列

<400> 1

gauuguugcu guauuucugg 20

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的人TGF- β 特异性siRNA的反义链序列

<400> 2

gccagaaaua cagcaacaau 20

[0002]

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的鼠TGF- β 特异性siRNA的正义链序列

<400> 3

guauuuuucu gguagaguuc 20

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的鼠TGF- β 特异性siRNA的反义链序列

<400> 4

ggaacucucac cagaaauaia 20

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 人TGF- β 特异性siRNA的正义链序列

<400> 5

auuguugcug uauuucugg 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人TGF- β 特异性siRNA的反义链序列

<400> 6

ccgaaaauac agcaacaau 19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 鼠TGF- β 特异性siRNA的正义链序列

<400> 7

uauuuucug guagaguuc 19

<210>8

<211> 19

[0004]

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 鼠TGF- β 特异性siRNA的反义链序列

<400> 8

gaacucuacc agaaauaua 19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 无意义siRNA正义链序列

<400> 9

gcugaccug aagucauc 19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 无意义siRNA反义链序列

<400> 10

[0005]

gaugaacuuc agggucagc 19

<210> 11

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T7RNA聚合酶启动子序列

<400> 11

tatagtgagt cg 12

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 无意义siRNA正义链DNA模板序列

<400> 12

gctgaccctg aagttcatcc tatagtgagt cg 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 无意义siRNA反义链DNA模板序列

<400> 13

gatgaacttc agggtcagcc tatagtgagt cg 32

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的人TGF- β 特异性siRNA正义链DNA模板序列

<400> 14

ccagaaatac agcaacaatc tatagtgagt cg 32

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的人TGF- β 特异性siRNA反义链DNA模板序列

<400> 15

attgttgetg tatttctggc tatagtgagt cg 32

<210> 16

[0007]

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的鼠TGF- β 特异性siRNA正义链DNA模板序列

<400> 16

gaactctacc agaatatac tatagtgagt cg

32

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含自由三磷酸基团的鼠TGF- β 特异性siRNA反义链DNA模板序列

<400> 17

tatattctg gtagagttcc tatagtgagt cg

32

<210> 18

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T7RNA聚合酶启动子序列的引物序列

[0008]

<400> 18	
cgactcacta ta	12
<210> 19	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 含自由三磷酸基团的无意义siRNA正义链序列	
<400> 19	
ggcugacccu gaaguucauc	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 含自由三磷酸基团的无意义siRNA反义链序列	
<400> 20	
ggaugaacuu caggucagc	20

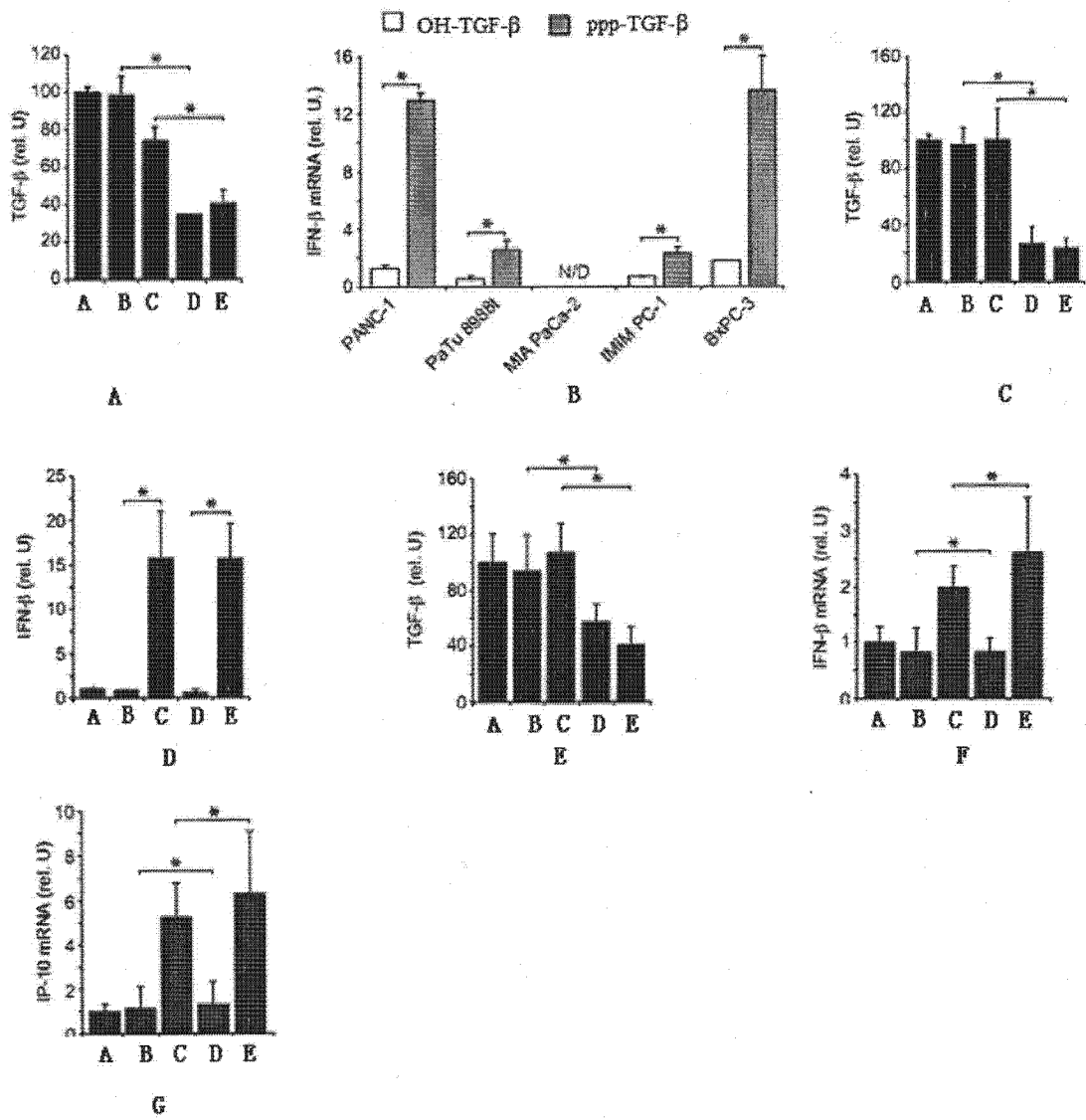


图 1

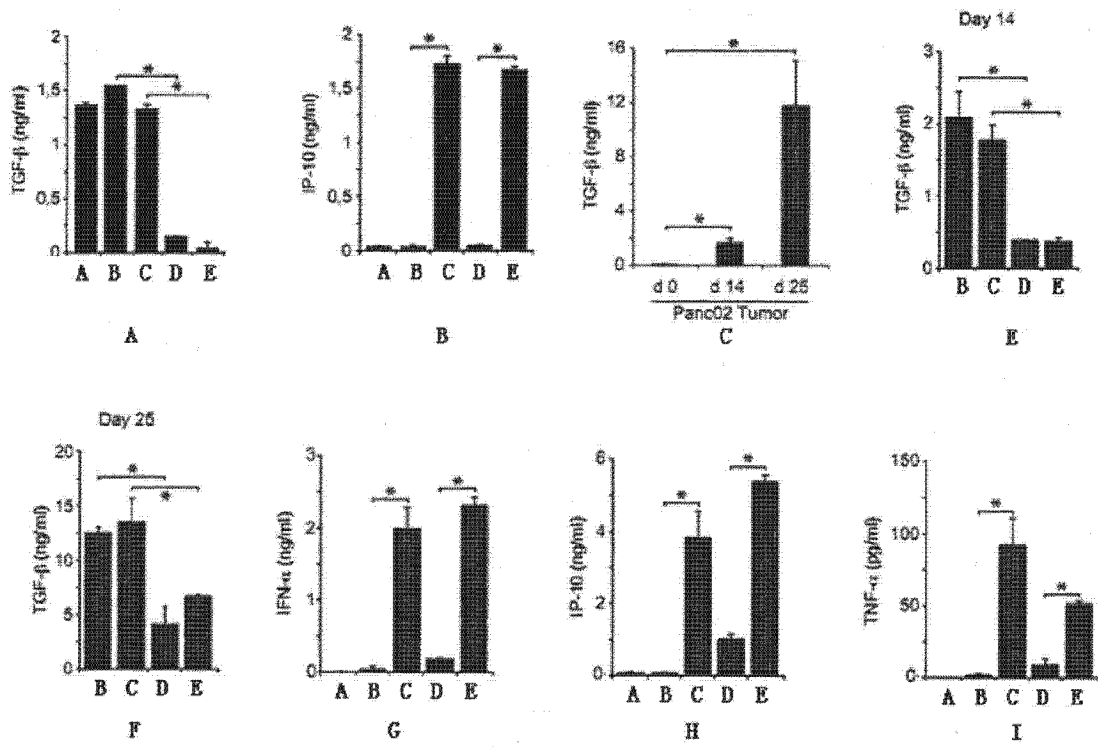


图 2

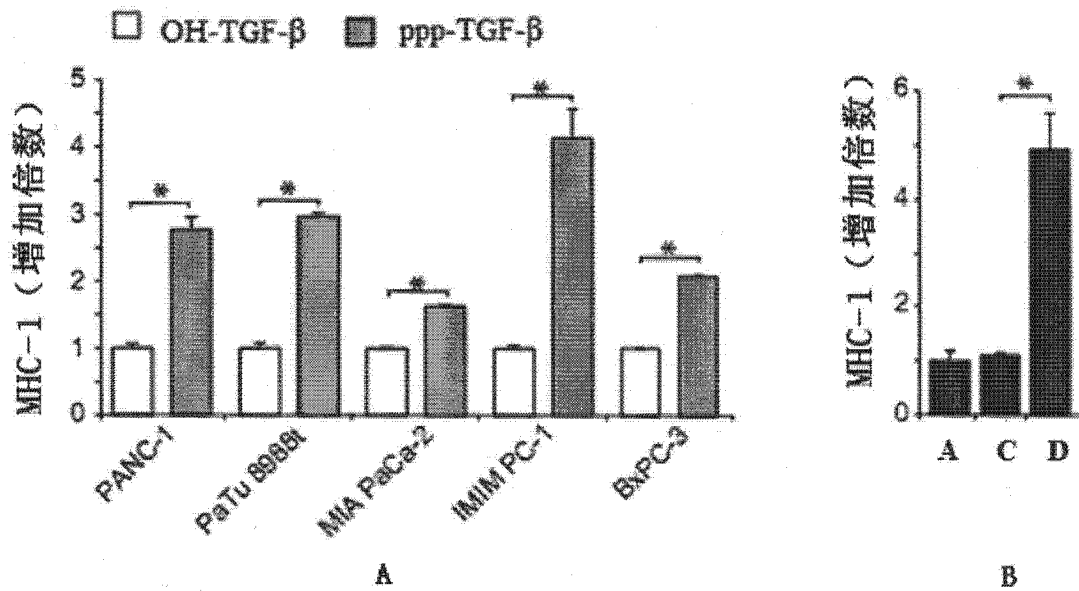


图 3

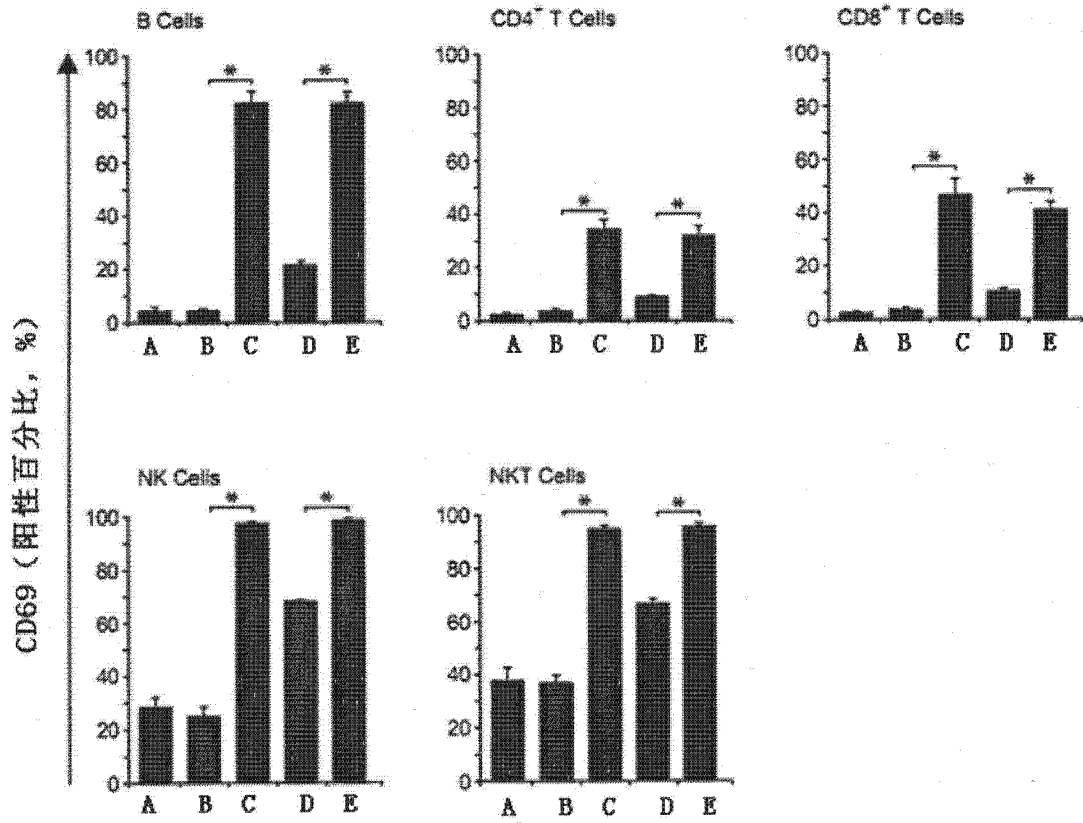


图 4

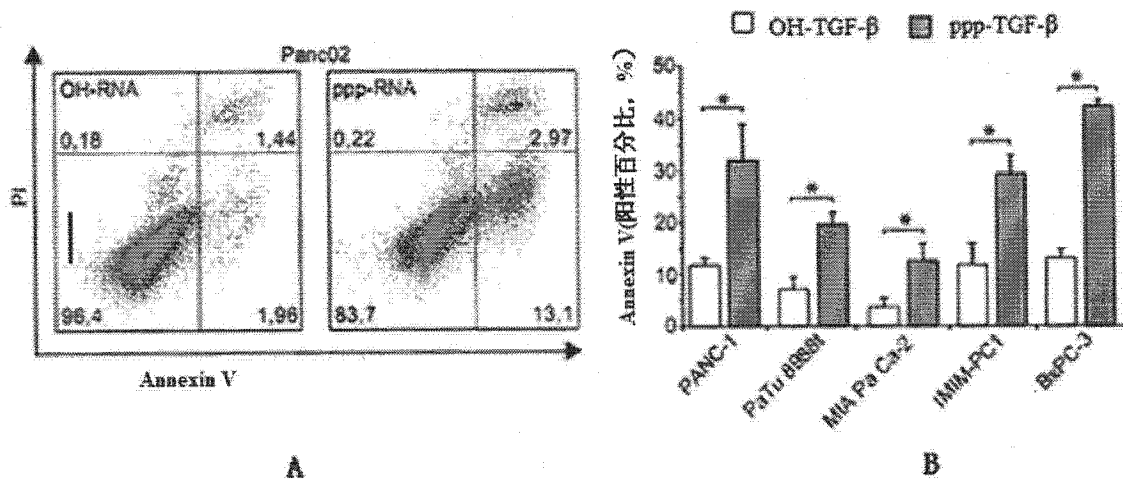


图 5

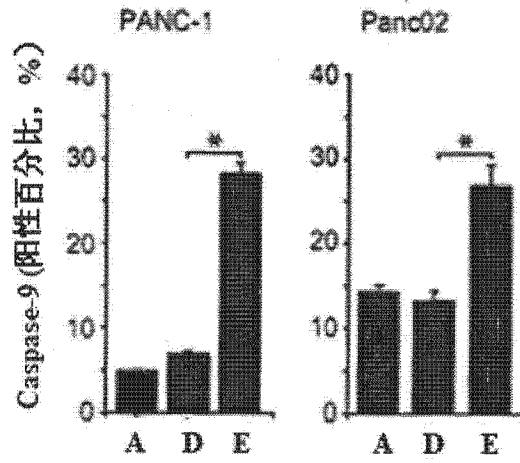


图 6

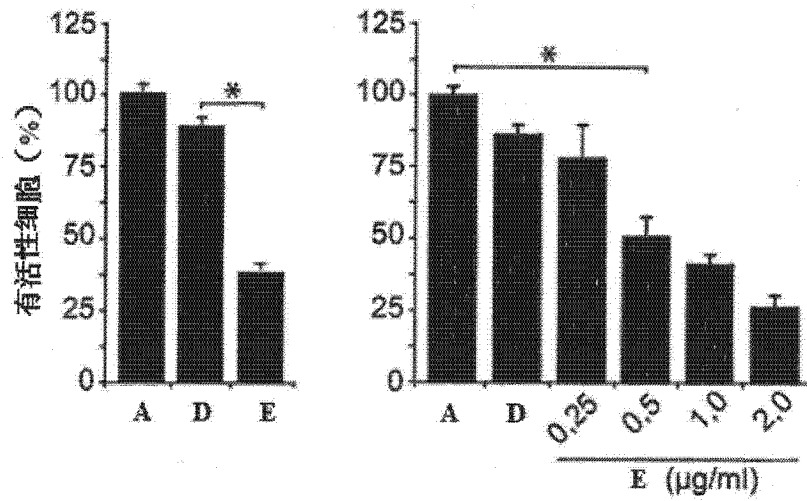


图 7

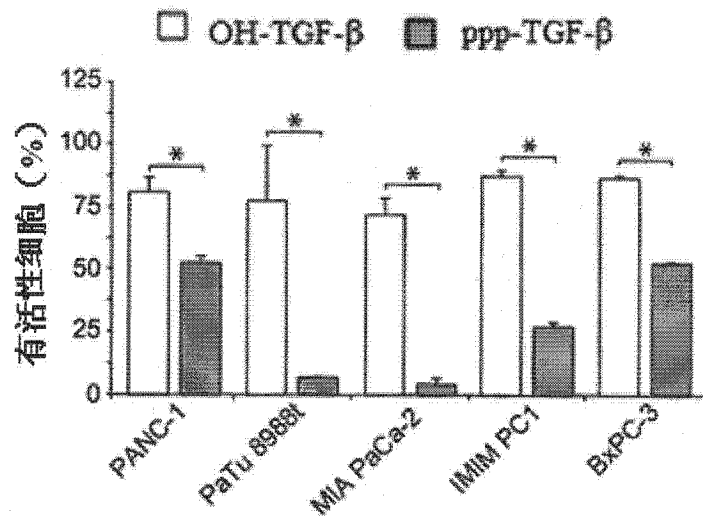


图 8

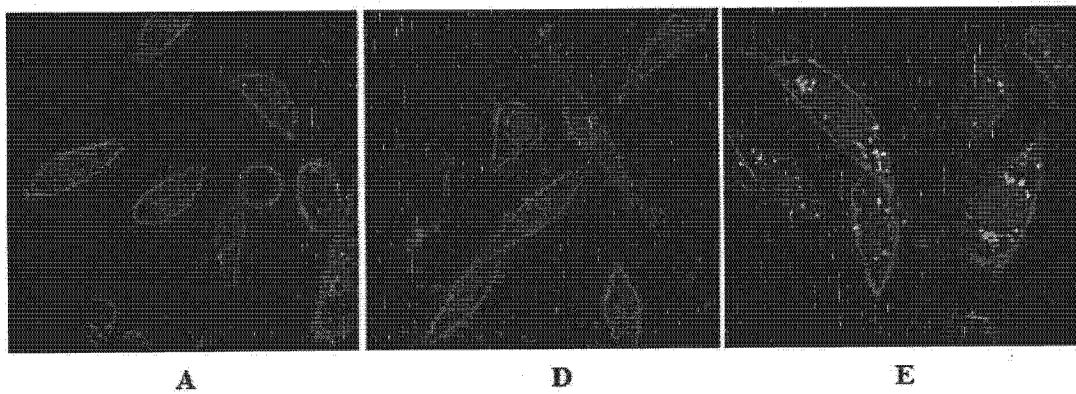


图 9

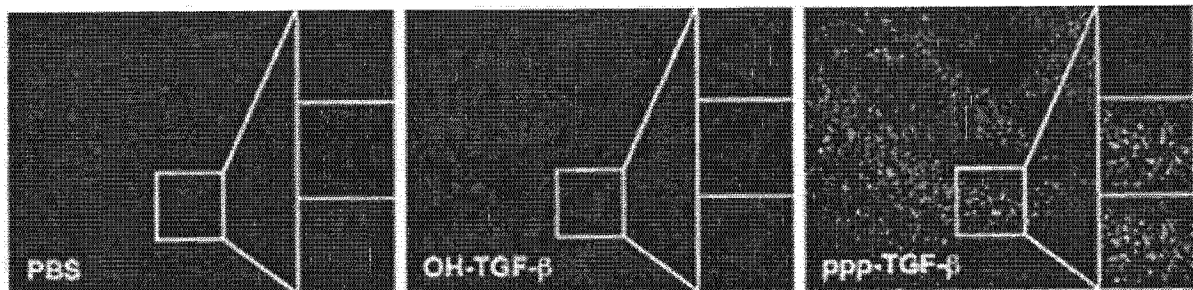


图 10

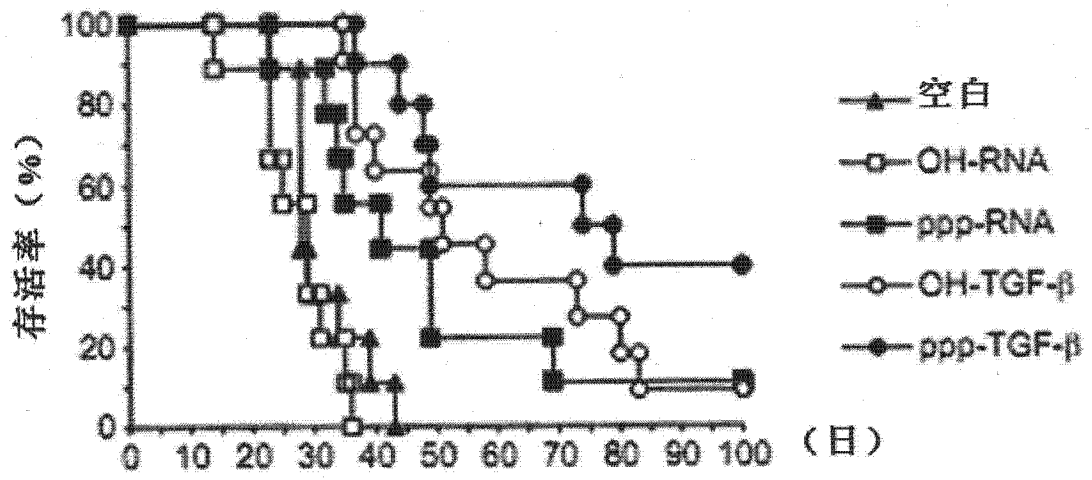


图 11