



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110699442 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 23

(21) 申请号 201910930479.1

A61P 9/00 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.29

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 108096269 A, 2018.06.01

申请公布号 CN 110699442 A

CN 108998514 A, 2018.12.14

(43) 申请公布日 2020.01.17

Shaoyan Liu等. MiR-378a-5p Regulates Proliferation and Migration in Vascular Smooth Muscle Cell by Targeting CDK1.

(73) 专利权人 青岛大学附属医院

《Frontiers in genetics》. 2019, 第10卷

地址 266071 山东省青岛市市南区江苏路16号

韩文静等. 非编码RNA调节自噬参与缺血性心脏病的发生和发展. 《青岛大学医学院学报》. 2017, 第53卷 (第5期),

(72) 发明人 于涛 辛辉 杨艳艳 何兴强

审查员 郝明媚

(74) 专利代理机构 北京酷爱智慧知识产权代理有限公司 11514

专利代理师 袁克来

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

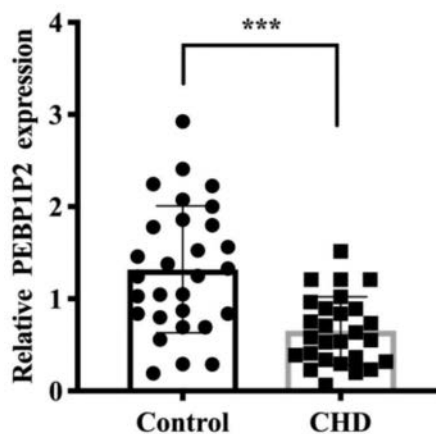
权利要求书1页 说明书9页 附图14页

(54) 发明名称

LncRNA PEBP1P2的应用、诊断心脏疾病的试剂盒及治疗心脏疾病的药物

(57) 摘要

本发明公开了一种LncRNA PEBP1P2的应用、诊断心脏疾病的试剂盒及治疗心脏疾病的药物, 涉及生物技术领域, 本发明提供的与心脏疾病相关的长链非编码RNA PEBP1P2, 其cDNA序列如SEQ ID NO. 1所示。qRT-PCR分析显示LncRNA PEBP1P2在冠心病患者、损伤的大鼠颈动脉组织中下调, 通过对LncRNA PEBP1P2进行特异性的检测能达到诊断心脏疾病的目的。同时, 通过过表达LncRNA PEBP1P2能够有效抑制血管平滑肌细胞的过度增殖和表型转换。提示LncRNA PEBP1P2有望为临床心脏疾病的诊断和治疗提供有意义的生物学指标, 并为抗心脏疾病的设计提供新的作用靶点和新思路。



1. 特异性靶向CDK9的小干扰RNA在制备降低PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞的增殖和迁移的产品中的应用。

LncRNA PEBP1P2的应用、诊断心脏疾病的试剂盒及治疗心脏疾病的药物

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是涉及一种LncRNA PEBP1P2的应用、诊断心脏疾病的试剂盒及治疗心脏疾病的药物。

背景技术

[0002] 随着生活水平的提高、生活习惯改变、人口老龄化、环境变化,我国心血管病(Cardiovascular diseases,CVD)患病率持续上升。据推算,我国CVD现患病人数为2.9亿,其中高血压2.7亿,脑卒中1300万,冠心病1100万,肺心病500万,心衰450万,风心病250万,先心病200万。在我国,CVD的死亡率高于肿瘤和其他疾病,居首位。CVD死亡占全部死因的43.8%左右,每5例死亡中就有2例死因为CVD。相应地,心血管病住院费用也在快速增长,自2004年,年均增长速度远高于GDP增速。心血管病流行广,病程长,负担大,致死致残率高。因此,CVD的防治已成为当今社会所面临的重要公共卫生问题,加强心血管疾病的防治已刻不容缓。

[0003] 动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是导致CVD的主要原因。作为一种慢性进行性炎症性疾病,动脉粥样硬化的特征为中动脉和大动脉血管壁的多灶性结构改变,最终导致AS斑块的形成。其发病机制包括:内皮功能障碍和活化;单核细胞及巨噬细胞黏附、活化和迁移;局部氧化应激;脂质沉积;细胞外基质合成;平滑肌细胞迁移;斑块的增殖和新生血管形成等众多环节。血管平滑肌细胞(VSMC)在动脉粥样硬化的起始和进展中起着重要作用。正常动脉的平滑肌细胞表达一系列平滑肌细胞标记物,包括平滑肌细胞肌球蛋白重链(SMHC)、22kDa平滑肌细胞谱系限制性蛋白(SM22 α)、 α -SMA、CNN1等。在体外培养和动脉粥样硬化中,血管平滑肌细胞中的这些标志物的表达下降,并获得了增殖、迁移和分泌各种细胞外基质蛋白和细胞因子的能力。血管平滑肌细胞进行表型转换也可以获得巨噬细胞标记和特性,这种表型转换长期以来被认为对动脉粥样硬化至关重要。因此,研究血管平滑肌细胞表型转换对动脉粥样硬化的防治具有重要作用。

[0004] 长链非编码RNA(Long non-coding RNA,LncRNA)是一类长度超过200个核苷酸的转录本,没有蛋白质编码能力,其广泛参与发育、分化和致癌等多种生物学过程。已经有越来越多的证据表明,长链非编码RNA对维持心血管正常生理功能具有重要作用,心血管中的LncRNA异常表达与许多心血管疾病的发生、发展密切相关。因此,将LncRNA作为心血管疾病治疗的靶点,开发相关药物具有潜在的临床应用价值。一条LncRNA可作用于多个靶点,影响多个信号通路,调节多个参与调控心血管病基因的表达,从整体上达到治疗疾病的目的。另外,由于LncRNA在病理状态下差异表达,因此可以通过检测其表达水平来预测和诊断疾病。

[0005] 对于心血管相关疾病的发病机制及其治疗现状,仍有很大未知的领域,仍需要不断的探索和研究,鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 针对现有技术中的缺陷,本发明的第一个目的在于提供LncRNA PEBP1P2在制备诊断和/或治疗心脏疾病的产品中的应用,以至少缓解了现有技术中存在的技术问题之一。

[0007] 本发明的第二个目的在于提供一种诊断心脏疾病的试剂盒,以实现心脏疾病的有效诊断。

[0008] 本发明的第三个目的在于提供一种治疗心脏疾病的药物,以实现心脏疾病的靶向治疗。

[0009] 本发明提供了LncRNA PEBP1P2在制备诊断和/或治疗心脏疾病的产品中的应用,所述LncRNA PEBP1P2含有如SEQ ID NO.1所示的cDNA序列。

[0010] 进一步地,所述心脏疾病包括由血管平滑肌增殖和表型转换引起的心脏疾病。

[0011] 进一步地,所述心脏疾病包括冠心病或动脉粥样硬化。

[0012] 进一步地,所述产品包括试剂盒或药物。

[0013] 本发明还提供了一种诊断心脏疾病的试剂盒,所述试剂盒包括识别LncRNAPEBP1P2的标记物;

[0014] 所述LncRNA PEBP1P2含有如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0015] 进一步地,所述识别LncRNA PEBP1P2的标记物包括如下a)或b)中的至少一种:

[0016] a) 结合LncRNA PEBP1P2的引物;

[0017] b) 结合LncRNA PEBP1P2的生物大分子,所述的生物大分子包括:抗体或抗体功能片段,或,RNA结合蛋白或其功能片段。

[0018] 进一步地,所述结合LncRNA PEBP1P2的引物具有如SEQ ID NO.2和SEQ IDNO.3所示的核苷酸序列。

[0019] 另外,本发明还提供了一种治疗心脏疾病的药物,所述药物包括如下I)-IV)中的一种或多种:

[0020] I) LncRNA PEBP1P2;

[0021] II) 含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组载体;

[0022] III) 含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒;

[0023] IV) 含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒载体;

[0024] 所述LncRNA PEBP1P2含有如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0025] 进一步地,所述药物还包括药学上可接受的载剂;

[0026] 优选地,所述载剂包括壳聚糖、胆固醇、脂质体和纳米颗粒中的一种或几种。

[0027] 进一步地,所述药物的剂型包括口服制剂或注射制剂。

[0028] 本发明提供的与心脏疾病相关的长链非编码RNA PEBP1P2,其cDNA序列如SEQ ID NO.1所示。发明人通过高通量测序技术筛选出差异表达于人冠状动脉血管平滑肌细胞系(HCASMC)的长链非编码RNA-PEBP1P2,qRT-PCR分析显示LncRNA PEBP1P2在冠心病患者、损伤的大鼠颈动脉组织中下调,通过对LncRNA PEBP1P2进行特异性的检测能达到诊断心脏疾病的目的。同时,通过过表达LncRNA PEBP1P2能够有效抑制血管平滑肌细胞的增殖。提示LncRNAPEBP1P2有望为临床心脏疾病的诊断和治疗提供有意义的生物学指标,并为抗心脏疾病的设计提供新的作用靶点和新思路。针对该长非编码RNA可以开发出不同的产品,例如研发新的检测LncRNA PEBP1P2的试剂盒以诊断心脏疾病,或以LncRNA PEBP1P2为靶点的药

物以治疗心脏疾病等等,对于心脏疾病的诊断和治疗具有重要的影响。

附图说明

[0029] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体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。在所有附图中,类似的元件或部分一般由类似的附图标记标识。附图中,各元件或部分并不一定按照实际的比例绘制。

[0030] 图1A为本发明实施例提供的通过编码潜能评估工具CPAT得出的LncRNAPEBP1P2的编码概率的结果图;

[0031] 图1B为本发明实施例提供的通过编码潜能评估工具CPAT得出的LncRNAPEBP1P2的编码概率的柱状图;

[0032] 图2A为本发明实施例提供的LncRNA PEBP1P2在冠心病患者组织中下调的结果图;

[0033] 图2B为本发明实施例提供的LncRNA PEBP1P2在损伤的大鼠颈动脉组织中下调的结果图;

[0034] 图2C为本发明实施例提供的LncRNA PEBP1P2在血管平滑肌中富集的结果图;

[0035] 图2D为本发明实施例提供的LncRNA PEBP1P2在大鼠主动脉中富集的结果图;

[0036] 图3为本发明实施例提供的敲低PEBP1P2后CCK8分析血管平滑肌细胞增殖的结果图;

[0037] 图4A为本发明实施例提供的敲低PEBP1P2后进行血管平滑肌细胞划痕实验的结果图;

[0038] 图4B为本发明实施例提供的敲低PEBP1P2后进行血管平滑肌Transwell实验的结果图;

[0039] 图5A为本发明实施例提供的敲低PEBP1P2后血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC的mRNA表达量的结果图;

[0040] 图5B为本发明实施例提供的敲低PEBP1P2后血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC的蛋白表达量的结果图;

[0041] 图6为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后CCK8分析血管平滑肌细胞增殖的结果图;

[0042] 图7A为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后进行血管平滑肌细胞划痕实验的结果图;

[0043] 图7B为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后进行血管平滑肌Transwell实验的结果图;

[0044] 图8A为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC的mRNA表达量的结果图;

[0045] 图8B为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC的蛋白表达量的结果图;

[0046] 图9为本发明实施例提供的血管平滑肌细胞经PDGF-BB (20ng/mL) 处理后PEBP1P2表达量的结果图;

[0047] 图10A为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后CCK8分析PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞增殖的结果图;

[0048] 图10B为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后进行PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞划痕实验的结果图；

[0049] 图10C为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后进行PDGF-BB诱导的血管平滑肌Transwell实验的结果图；

[0050] 图10D为本发明实施例提供的过表达PEBP1P2后血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC的蛋白表达量的结果图；

[0051] 图11A为本发明实施例提供的RIP证实PEBP1P2与下游靶标CDK9直接结合而发挥作用的结果图；

[0052] 图11B为本发明实施例提供的敲低和过表达PEBP1P2后CDK9表达量的结果图；

[0053] 图12为本发明实施例提供的CDK9在损伤的大鼠颈动脉组织中表达量的结果图；

[0054] 图13A为本发明实施例提供的敲低的CDK9可因敲低PEBP1P2而部分恢复的结果图；

[0055] 图13B为本发明实施例提供的因敲低CDK9导致的细胞增殖降低可因敲低PEBP1P2而部分恢复的结果图；

[0056] 图14A为本发明实施例提供的敲低CDK9后细胞的迁移降低可被敲低PEBP1P2而部分恢复的细胞划痕实验结果图；

[0057] 图14B为本发明实施例提供的敲低CDK9后细胞的迁移降低可被敲低PEBP1P2而部分恢复的Transwell实验结果图；

[0058] 图15A为本发明实施例提供的敲低CDK9后血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC的蛋白表达量的结果图；

[0059] 图15B为本发明实施例提供的敲低CDK9并经PDGF-BB处理后CDK9的蛋白表达量的结果图；

[0060] 图16A为本发明实施例提供的敲低的CDK9能显著降低PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞的增殖的结果图；

[0061] 图16B为本发明实施例提供的敲低的CDK9能显著降低PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞的迁移的结果图；

[0062] 图17A为本发明实施例提供的过表达的CDK9可因敲低PEBP1P2而部分恢复的结果图；

[0063] 图17B为本发明实施例提供的过表达CDK9后细胞的增殖增高可被过表达PEBP1P2而部分恢复的结果图；

[0064] 图18A为本发明实施例提供的过表达CDK9后细胞的迁移降低可被过表达PEBP1P2而部分恢复的细胞划痕实验结果图；

[0065] 图18B为本发明实施例提供的过表达CDK9后细胞的迁移降低可被过表达PEBP1P2而部分恢复的Transwell实验结果图；

[0066] 图19为本发明实施例提供的过表达CDK9后血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC的蛋白表达量的结果图。

具体实施方式

[0067] 下面将结合附图对本发明技术方案的实施例进行详细的描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案，因此只作为示例，而不能以此来限制本发明的保护范

围。

[0068] 需要注意的是,除非另有说明,本申请使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域技术人员所理解的通常意义。

[0069] 一般地,连同本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白和核酸化学和杂交使用的命名法和其技术是本领域众所周知和通常使用的那些。除非另有说明,本发明的方法和技术一般根据本领域众所周知,且如各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法来进行,所述参考文献在本说明书自始至终引用和讨论。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书、如本领域通常实现的或如本文所述来进行。连同本文描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的命名法、以及其实验室程序和技术是本领域众所周知和通常使用的那些。

[0070] 根据本发明的一个方面,提供了LncRNA PEBP1P2在制备诊断和/或治疗心脏疾病的产品中的应用,所述LncRNA PEBP1P2含有如SEQ ID NO.1所示的cDNA序列。

[0071] 本发明的发明人通过高通量测序技术筛选出差异表达于人冠状动脉血管平滑肌细胞系(HCASMC)的长链非编码RNA-PEBP1P2,qRT-PCR分析显示LncRNAPEBP1P2在冠心病患者、损伤的大鼠颈动脉组织中下调,通过对LncRNA PEBP1P2进行特异性的检测能达到诊断心脏疾病的目的。同时,通过过表达LncRNAPEBP1P2能够有效抑制血管平滑肌细胞的增殖。提示LncRNA PEBP1P2有望为临床心脏疾病的诊断和治疗提供有意义的生物学指标,并为抗心脏疾病的设计提供新的作用靶点和新思路。

[0072] 需要说明的是,在本发明中,LncRNA PEBP1P2含有如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列,指的是LncRNA PEBP1P2除去SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列外,还可以含有其他功能序列,如标签序列或连接序列等。

[0073] 诊断和/或治疗心脏疾病,指的是本发明提供的LncRNA PEBP1P2可以用于诊断心脏疾病,或者用于治疗心脏疾病,或者同时用于诊断心脏疾病和治疗心脏疾病。

[0074] 在一些优选的实施方式中,所述心脏疾病包括由血管平滑肌增生引起的心脏疾病。

[0075] 血管平滑肌细胞作为血管壁的重要成分,调节着血管的收缩舒张功能,同时也分泌多种细胞因子及细胞间质,其是引起易损斑块破溃的主要因素,因此血管平滑肌细胞在动脉粥样硬化或血管狭窄性疾病中产生着重要的影响。由血管平滑肌增生引起的心脏疾病例如动脉粥样硬化、冠心病等,在高血压、肺动脉高压等疾病中血管平滑肌增生也起着重要作用。

[0076] 在一些优选的实施方式中,所述产品包括试剂盒或药物。

[0077] 本发明还提供了一种诊断心脏疾病的试剂盒,所述试剂盒包括识别LncRNA PEBP1P2的标记物;

[0078] 所述LncRNA PEBP1P2含有如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0079] LncRNA PEBP1P2在正常人体组织或细胞中表达较高,但在冠心病患者、损伤的大鼠颈动脉组织中LncRNA PEBP1P2的表达量显著下调,通常较对照组降低40-60%,本发明提供的试剂盒以LncRNA PEBP1P2作为检测靶点,通过检测LncRNA PEBP1P2在细胞中的表达水平,可以在一定程度上实现对心脏疾病的诊断。

[0080] 在一些优选的实施方式中,所述识别LncRNA PEBP1P2的标记物包括如下a)或b)中

的至少一种：

[0081] a) 结合LncRNA PEBP1P2的引物；

[0082] b) 结合LncRNA PEBP1P2的生物大分子，所述的生物大分子包括：抗体或抗体功能片段，或，RNA结合蛋白或其功能片段。

[0083] 其中，抗体或抗体功能片段优选为荧光标记的抗体或抗体功能片段；RNA结合蛋白或其功能片段优选为荧光标记的RNA结合蛋白或其功能片段。

[0084] 利用上述标记物，可以对细胞中的LncRNA PEBP1P2的表达水平进行定量检测。

[0085] 在一些优选的实施方式中，所述结合LncRNA PEBP1P2的引物具有如SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。

[0086] 优选地，所述试剂盒中还包括阳性对照，所述阳性对照为N1rp3，该阳性对照的正向引物序列为：5'-GGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAA-3' (SEQ ID NO.4)，反向引物序列为：5'-GCTGTCTTCCTGGCATATCACA-3' (SEQ ID NO.5)。通过设置阳性对照，能够更准确地判断检测结果的有效性。

[0087] 另外，本发明还提供了一种治疗心脏疾病的药物，所述药物包括如下I)-IV)中的一种或多种：

[0088] I) LncRNA PEBP1P2；

[0089] II) 含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组载体；

[0090] III) 含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒；

[0091] IV) 含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒载体；

[0092] 所述LncRNA PEBP1P2含有如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0093] 需要说明的是，本发明提供的治疗心脏疾病的药物，可以包括LncRNAPEBP1P2、含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒、含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒或含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒载体中的一种或两种或以上，例如仅包括LncRNA PEBP1P2，或者仅包括含有LncRNAPEBP1P2的编码基因的重组载体，或者包括LncRNA PEBP1P2和含有LncRNAPEBP1P2的编码基因的重组病毒载体，或者包括含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组载体、含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒和含有LncRNAPEBP1P2的编码基因的重组病毒载体，或者同时包括LncRNA PEBP1P2、含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒、含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒和含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒载体。

[0094] 在一些优选的实施方式中，所述药物还包括药学上可接受的载剂；

[0095] 优选地，所述载剂包括壳聚糖、胆固醇、脂质体和纳米颗粒中的一种或几种。

[0096] 上述载剂均能够有效包裹LncRNA PEBP1P2、含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒、含有LncRNA PEBP1P2的编码基因的重组病毒或含有LncRNAPEBP1P2的编码基因的重组病毒载体中的一种或多种，并携上述活性成分进入体内并释放，以起到给药治疗的目的。优选地，通过对上述载体进行进一步修饰，如连接结合位点等，还能够进一步起到靶向给药的作用。

[0097] 在一些优选的实施方式中，所述药物的剂型可以为口服制剂或注射制剂。

[0098] 当口服用药时，上述药物可制成任意口服可接受的制剂形式，例如可以为，但不限于片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、糖浆剂、口服溶液剂、口服混悬剂或口服乳剂。

[0099] 其中,片剂使用的载体一般包括乳糖和玉米淀粉,另外也可加入润滑剂如硬脂酸镁。胶囊剂使用的稀释剂一般包括乳糖和干燥玉米淀粉。口服混悬剂则通常是将活性成分与适宜的乳化剂和悬浮剂混合使用。

[0100] 任选地,以上口服制剂形式中还可加入一些甜味剂、芳香剂或着色剂。

[0101] 当以注射的形式给药时,上述药物可制成任意注射可接受的制剂形式,例如可以为,但不限于注射液或粉针剂。

[0102] 其中,可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质,如单甘油酯或二甘油酯。

[0103] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0104] 本发明实施例中用到的主要生物样本和实验操作信息如下,如无特殊说明,本发明实施例中所用的生物样本及实验操作均按照如下进行:

[0105] 1、临床样本

[0106] 所有血液样本均取自经冠状动脉造影证实的冠心病患者(n=27),在没有支架植入的情况下或在支架植入之前采血,没有任何疾病的健康人(n=29)作为对照组。排除标准为:糖尿病,肿瘤,免疫系统疾病,血液系统疾病或感染。从全血样本中提取血清并在测试前储存在-80℃。所有患者都需要签署知情同意书。该研究经青岛市研究伦理委员会批准,所有实验均按照赫尔辛基宣言的原则进行。

[0107] 2、实验动物

[0108] 雄性SD大鼠(300-350g)购自维通利华公司,根据之前的文献报道构建大鼠颈动脉球囊损伤模型。分别在第3、7和21天处死大鼠,收集主动脉组织用于后续测试,右颈动脉作为阴性对照。所有实验动物和方案均经青岛大学动物保护委员会批准。

[0109] 3、细胞培养,转染

[0110] 人主动脉平滑肌细胞系(HASMC)在含有10%胎牛血清和青霉素(50U/ml)及链霉素(50μg/ml)的DMEM培养基中培养。使用Lipofectamine 2000并根据制造商的说明转染细胞。

[0111] 4、构建PEBP1P2和CDK9敲低或过表达细胞系

[0112] 经吉玛基因公司设计并合成了特异性靶向PEBP1P2或CDK9的小干扰RNA(siRNA)。通过稳定转染si-PEBP1P2或si-CDK9在HASMC细胞系中敲低PEBP1P2或CDK9,以非沉默的siRNA转染作为对照。经华大基因公司生物合成PEBP1P2序列并克隆到pcDNA3.0载体中,通过PCR扩增CDK9的CDS区,并将其克隆到pAsRed2载体中,分别构建PEBP1P2和CDK9过表达载体。通过稳定转染pcDNA3.0-PEBP1P2或pAsRed2-CDK9实现PEBP1P2或CDK9的过表达,分别用空pcDNA3.0、pAsRed2载体转染HASMC作为对照。

[0113] 5、RNA提取,逆转录和实时定量PCR(qRT-PCR)

[0114] 使用TRIzol试剂从血液、组织和细胞样品中提取总RNA。然后,通过PrimeScript™ RT试剂盒合成cDNA。使用Hieff UNICON Power qPCR SYBR GreenMaster Mix实施qRT-PCR。GAPDH用作内源对照。Delta-delta Ct法用于分析相对基因表达数据。所有实验程序均按照制造商的说明进行。

[0115] 6、蛋白质印迹分析

[0116] 将细胞在PBS溶液中清洗2次,并根据说明用RIPA缓冲液裂解细胞。使用BCA方法测

定蛋白质浓度。然后,将蛋白质在SDS-PAGE上样缓冲液中于95℃加热5分钟,用10% SDS-PAGE分离等量的蛋白质,并将凝胶印迹到0.45μm PVDF膜上。将膜置于5%的脱脂牛奶中封闭1小时,一抗孵育过夜,经TBS-T浸洗3次(10分钟/次)候,二抗孵育一小时,再次经TBS-T浸洗后显影。

[0117] 7、细胞增殖、迁移分析

[0118] 将细胞接种于96孔板中,然后通过EdU和CCK-8试剂盒测试细胞增殖。应用伤口愈合和Transwell试验检测细胞迁移。伤口愈合实验:将HASC MC接种于6孔板中用于伤口愈合试验。在细胞处理12小时后,使用1000μl枪头划开单层细胞,并在不同时间点使用倒置相差显微镜拍摄照片。Transwell实验:HASC MC在含有10% FBS的DMEM培养基中培养24小时。然后,将经处理的细胞(1×10^5 个)用胰蛋白酶消化后并接种到不含FBS的DMEM培养基(200μl)的上室中,然后将上室浸入到含有10% FBS培养基(500μl)或/和含有PDGF-BB(20ng/ml)的下室中24小时。然后,去除培养基,经PBS清洗后,用4%多聚甲醛固定下膜中的细胞半小时,然后用0.1%龙胆紫染色半5小时后拍照。

[0119] 8、RNA免疫沉淀(RIP)

[0120] 每个样品约使用 1×10^7 个HASC MC。用PBS清洗细胞两次,用含RNA酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解细胞5分钟。将裂解物在12000rpm,4℃下离心4分钟,收集上清液,使用BCA法测定蛋白质浓度。随后将蛋白质(500μg)和磁珠(30μl)分别与CDK9抗体(5μg)或对照IgG(5μg)在4℃孵育过夜。使用TRIzol在免疫沉淀磁珠、蛋白质和RNA复合物中提取RNA,然后进行逆转录,RT-PCR和琼脂糖凝胶电泳。

[0121] 9、细胞免疫荧光

[0122] 将HASC MC接种在玻片上24小时。然后,将细胞在PBS溶液中洗涤两次,并通过4%多聚甲醛固定15分钟。后将细胞与CDK9抗体一起孵育过夜,随后与荧光(FITC)二抗孵育1小时。DAPI用于染色细胞核。使用Leica TCS SP8激光共聚焦显微镜拍摄照片。

[0123] 10、统计分析

[0124] 连续和分类变量分别用平均值±标准差和数量(百分比)表示。使用GraphPad Prism 8.0和SPSS 25.0进行统计学分析。根据变量分布,使用非配对t检验、单因素方差分析或Mann-Whitney检验进行分析。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。每个实验在最少重复三次。

[0125] 实施例1 LncRNA PEBP1P2的基本特性研究

[0126] (1) 通过编码潜能评估工具CPAT,结果如图1和图2所示,PEBP1P2的编码概率为0.0029434043899346,说明LncRNA PEBP1P2为非编码转录本,无蛋白编码能力。

[0127] (2) 结果如图2A、2B、2C和2D所示,qRT-PCR分析显示PEBP1P2在冠心病患者、损伤的大鼠颈动脉组织中下调,在血管平滑肌、大鼠主动脉中富集。

[0128] 实施例2 LncRNA PEBP1P2功能和机制的研究

[0129] 通过siRNA敲低PEBP1P2后:

[0130] 如图3所示,通过CCK8分析,提示血管平滑肌的增殖增强。

[0131] 如图4A和图4B所示,划痕实验和Transwell结果示血管平滑肌的迁移增强。

[0132] 如图5A和图5B所示,PEBP1P2敲低后,血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC在mRNA和蛋白水平下降,而周期相关蛋白CCDN1没有显著变化。

[0133] 过表达PEBP1P2后:

[0134] 如图6所示,通过CCK8分析,提示血管平滑肌的增殖降低。

[0135] 如图7A和图7B所示,划痕实验和Transwell结果示血管平滑肌的迁移降低。

[0136] 如图8A和图8B所示,PEBP1P2过表达后,血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC在mRNA和蛋白水平升高,而周期相关蛋白CCDN1没有显著变化。

[0137] 如图9所示,在血管平滑肌细胞经PDGF-BB (20ng/mL) 处理后,PEBP1P2表达下降。

[0138] 如图10A、10B、10C和10D所示,过表达PEBP1P2能显著降低PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞的增殖、迁移和表型转换。

[0139] 如图11A和图11B所示,通过生物信息学方法,本实施例发现PEBP1P2与下游靶标CDK9直接结合而发挥作用,且通过RIP证实;在敲低PEBP1P2后,CDK9表达上调,过表达PEBP1P2后,CDK9表达下调。

[0140] 如图12所示,CDK9在损伤的大鼠颈动脉组织中上调。

[0141] 如图13A和图13B所示,在血管平滑肌中,敲低的CDK9可因敲低PEBP1P2而部分恢复;敲低CDK9后细胞的增殖降低,可被敲低PEBP1P2而部分恢复。

[0142] 如图14A和图14B所示,敲低CDK9后细胞的迁移降低,迁移可被敲低PEBP1P2而部分恢复。

[0143] 如图15A和图15B所示,敲低CDK9后,血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC在mRNA和蛋白水平升高,而周期相关蛋白CCDN1没有显著变化。在PDGF-BB处理后,CDK9的表随时间依耐性升高。

[0144] 如图16A和图16B所示,敲低的CDK9能显著降低PDGF-BB诱导的血管平滑肌细胞的增殖、迁移。

[0145] 如图17A和图17B所示,在血管平滑肌中,过表达的CDK9可因敲低PEBP1P2而部分恢复;过表达CDK9后细胞的增殖增高,可被过表达PEBP1P2而部分恢复。

[0146] 如图18A和图18B所示,过表达CDK9后细胞的迁移降低,迁移可被过表达PEBP1P2而部分恢复。

[0147] 如图19所示,过表达CDK9后,血管平滑肌收缩标志物 α -SMA、CNN1、SMMHC在mRNA和蛋白水平下降,在过表达PEBP1P2后恢复,而周期相关蛋白CCDN1没有显著变化。

[0148] 综上所述,本实施例鉴定出在血管平滑肌中差异表达的长链非编码RNA-PEBP1P2,并证明其通过负调控下游靶标CDK9而抑制血管平滑肌细胞的增殖、迁移及表型转换,提示PEBP1P2为调控血管平滑肌发育的重要靶点。鉴于PEBP1P2对血管平滑肌的调控特性,其可用于动脉粥样硬化性疾病的治疗。

[0149] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围,其均应涵盖在本发明的权利要求和说明书的范围当中。

CPAT		
ID	Coding Label	Coding Probability
PEBP1P2	no	0.0029434043899346
MALAT1	no	0.020711595574509
PINC	no	0.0056974609714006
CNN1	yes	1
CCND1	yes	1

图1A

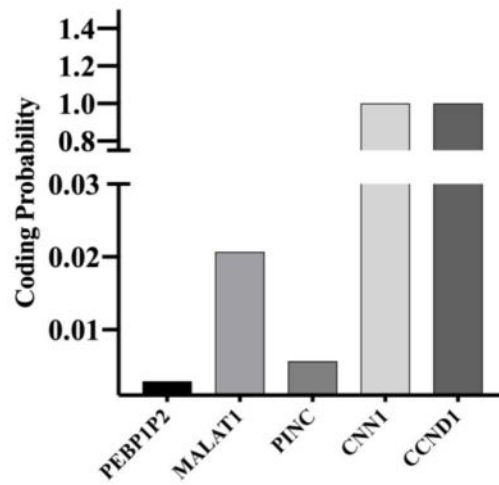


图1B

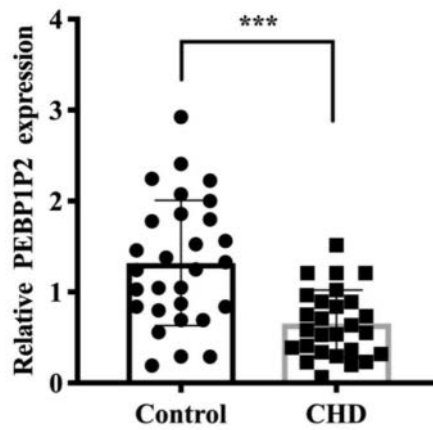


图2A

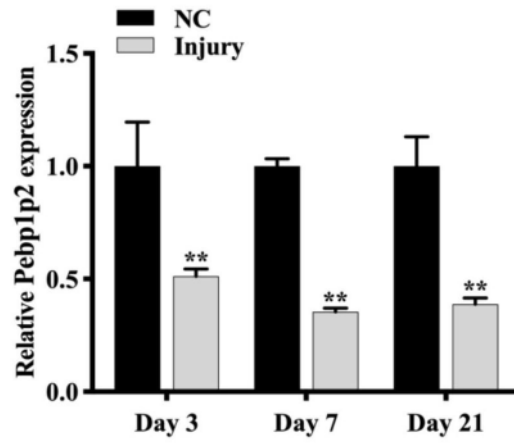


图2B

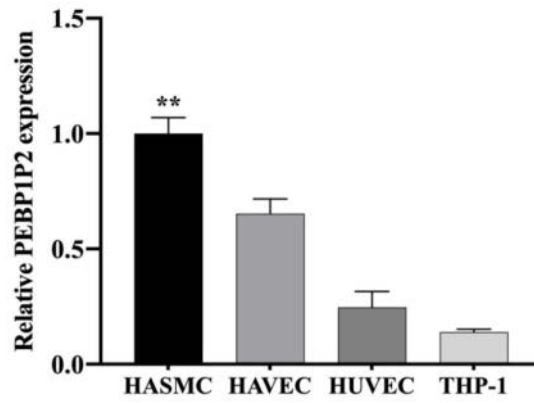


图2C

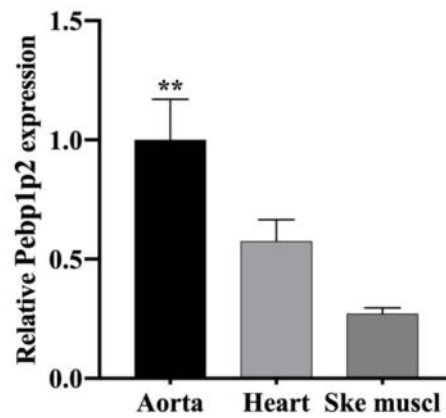


图2D

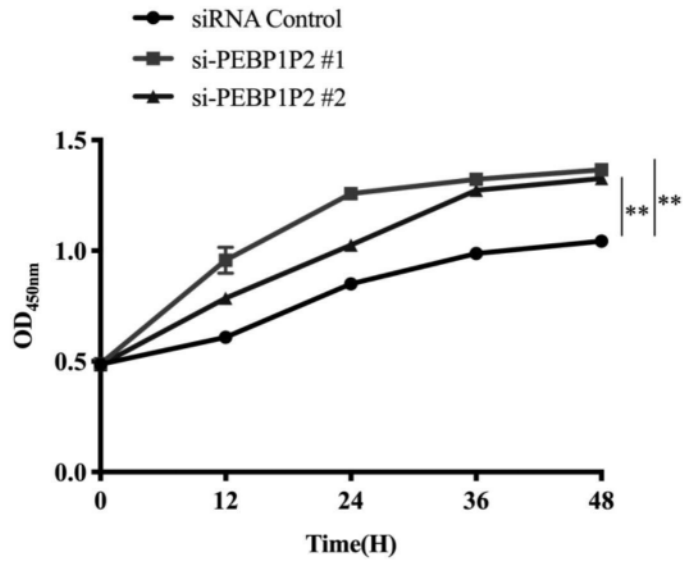


图3

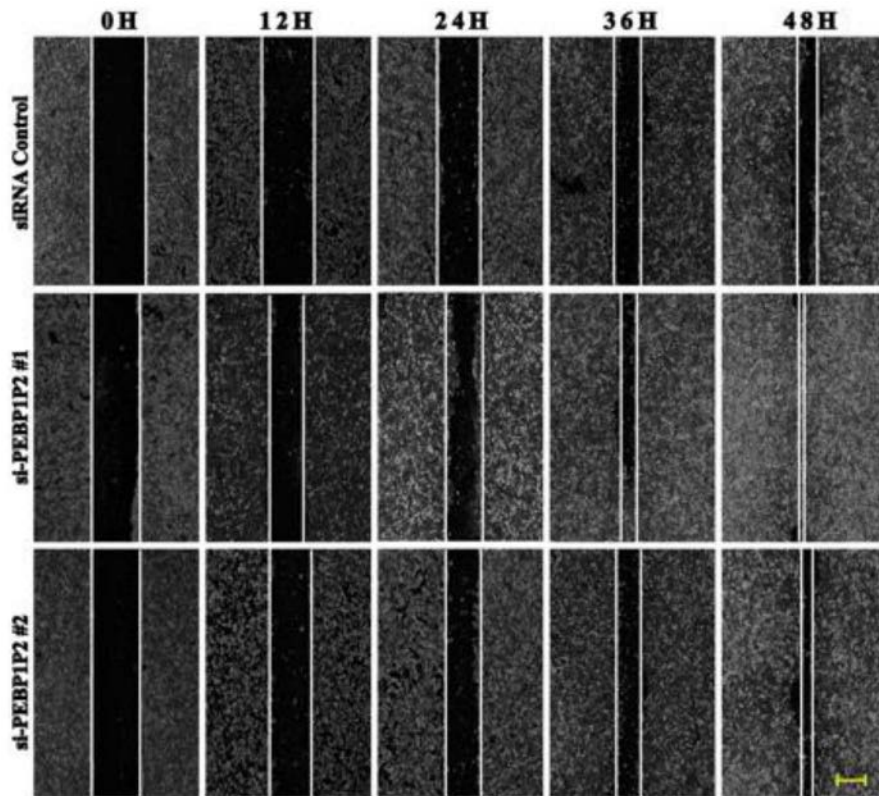


图4A

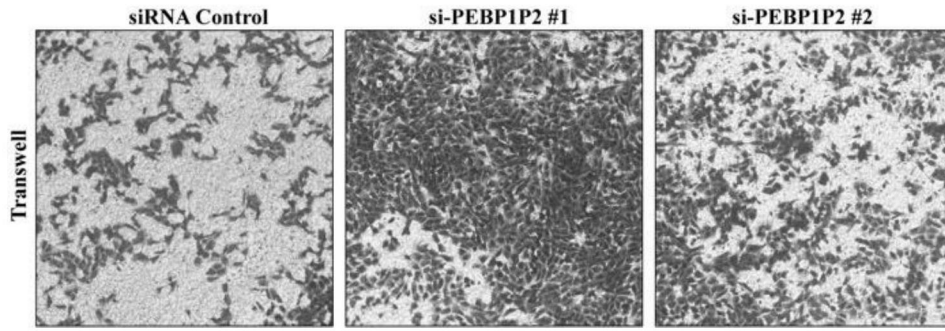


图4B

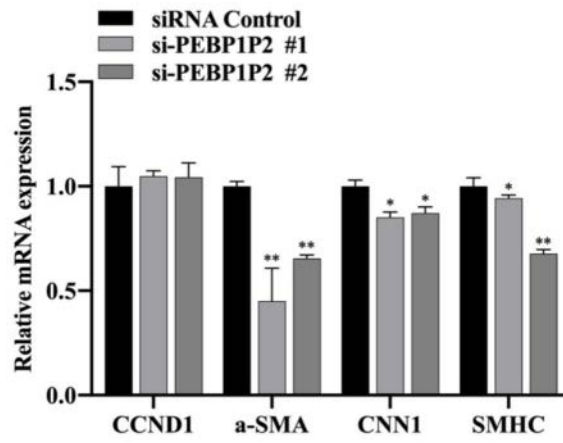


图5A

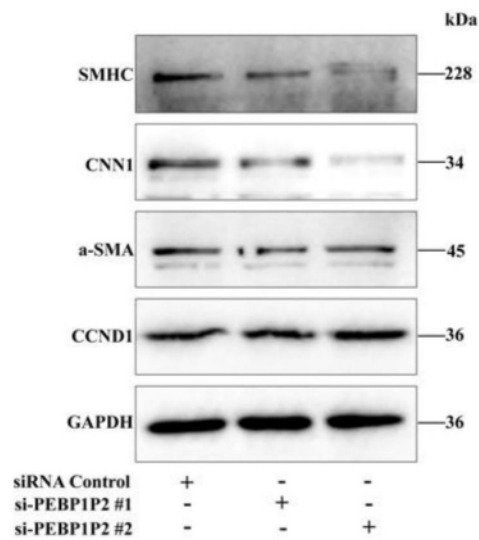


图5B

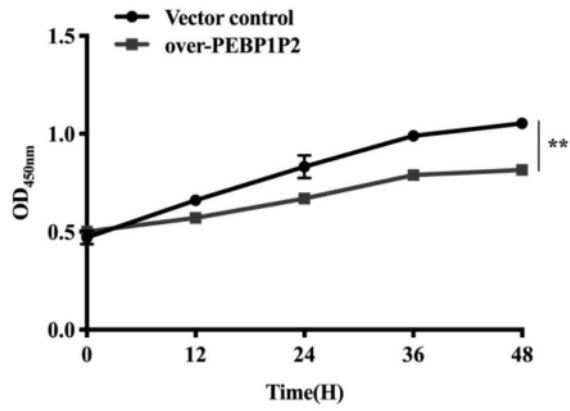


图6

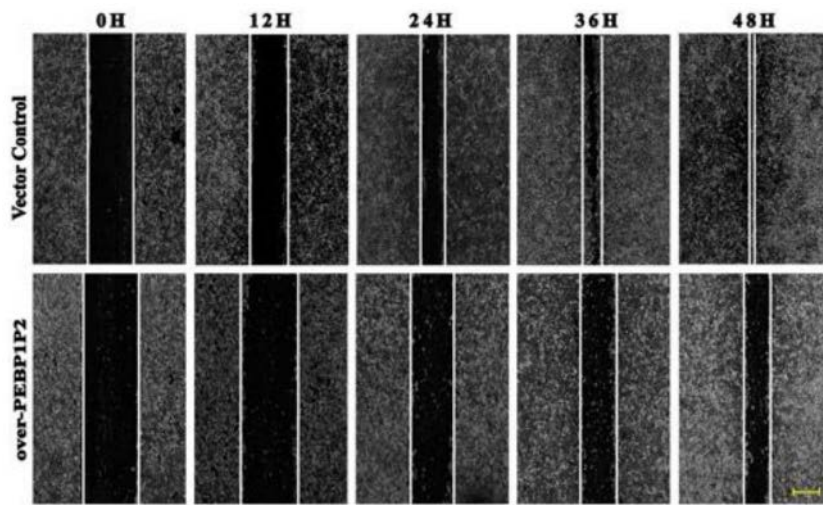


图7A

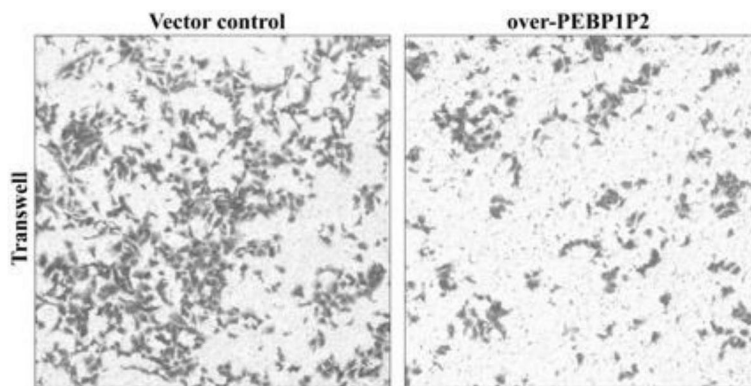


图7B

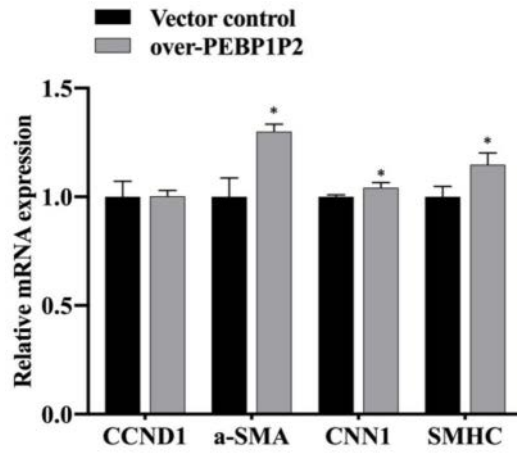


图8A

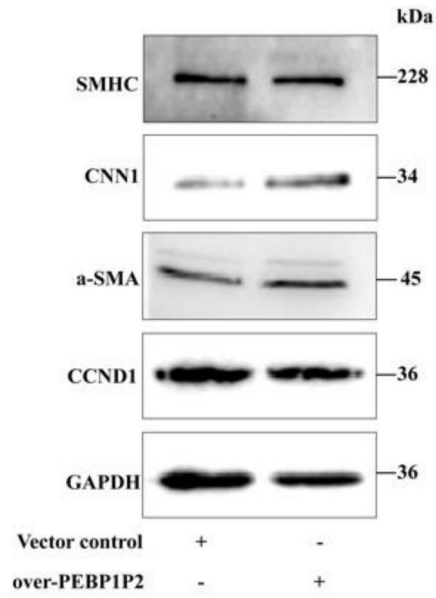


图8B

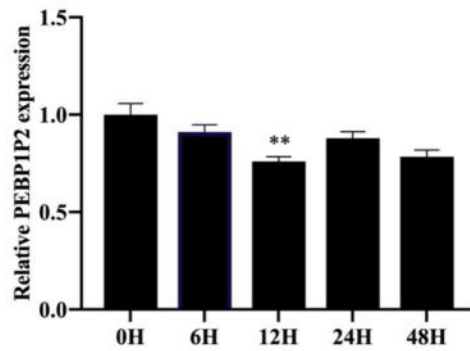


图9

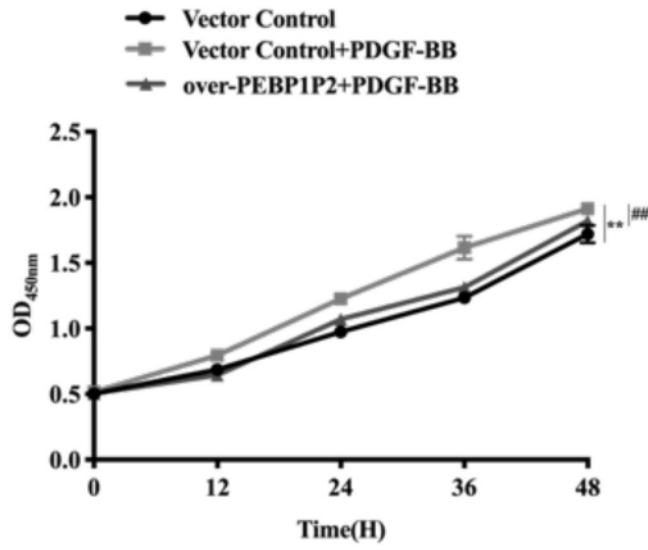


图10A

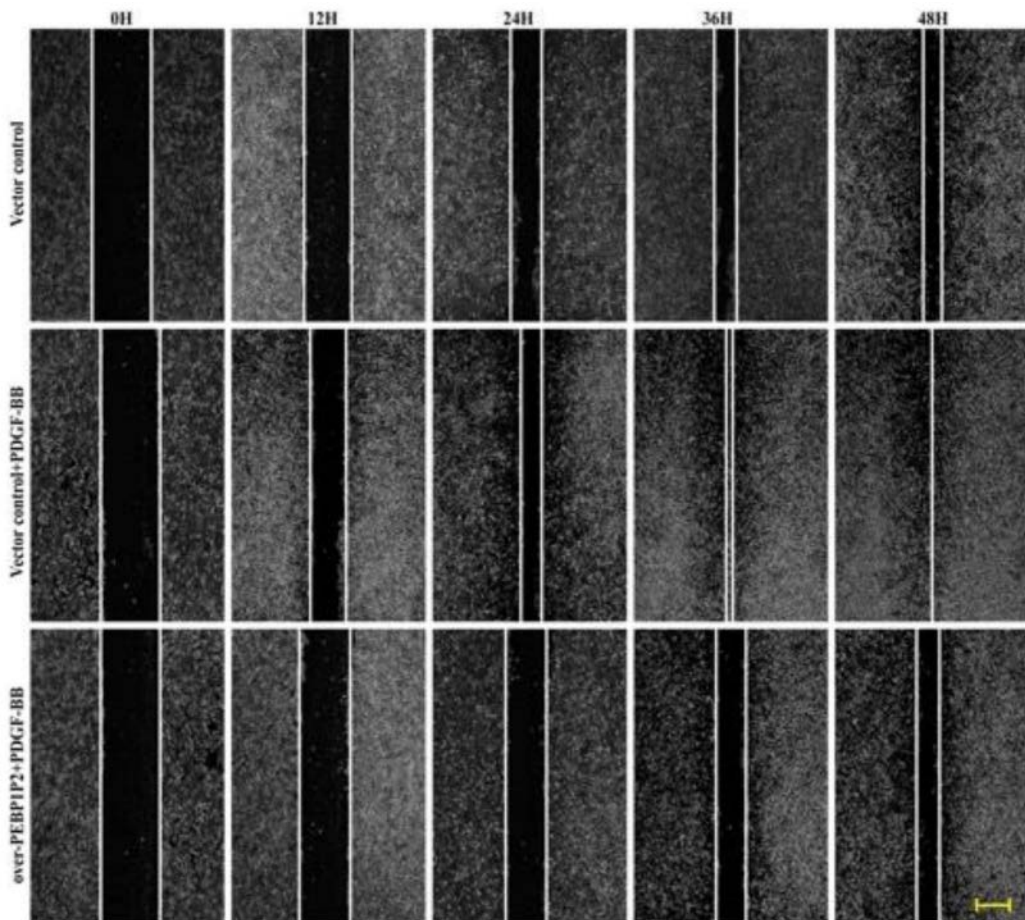


图10B

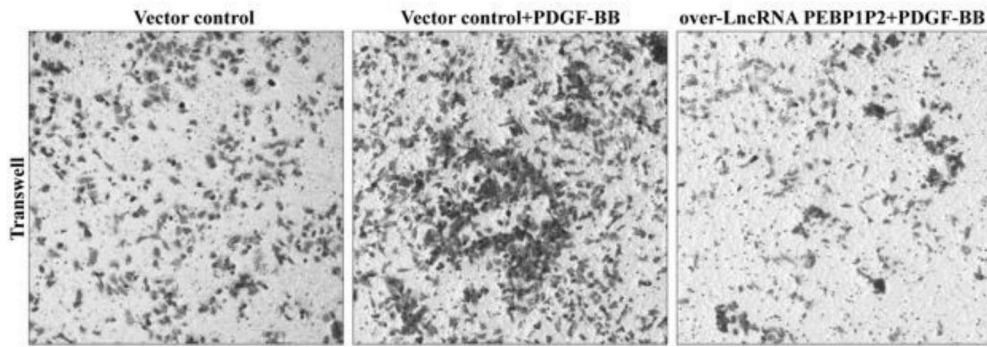


图10C

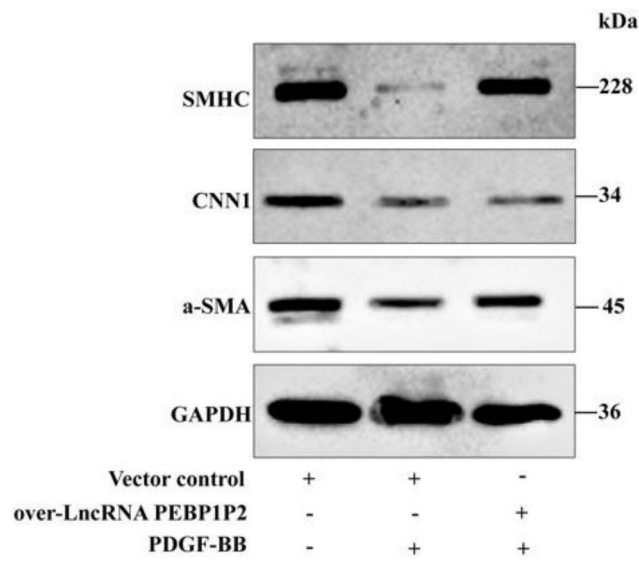


图10D

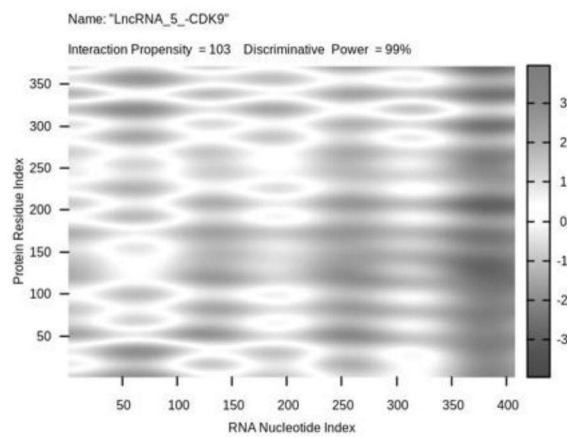


图11A

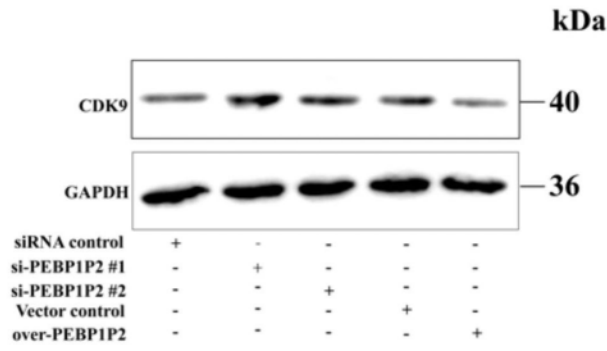


图11B

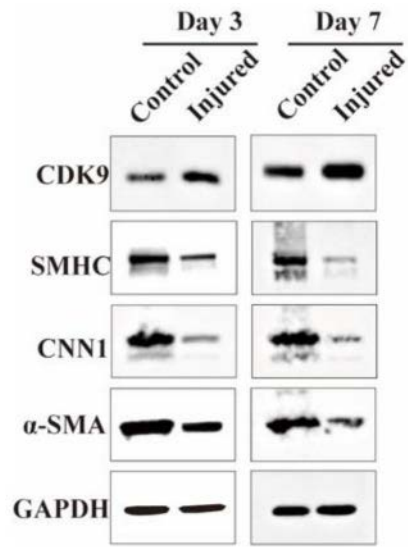


图12

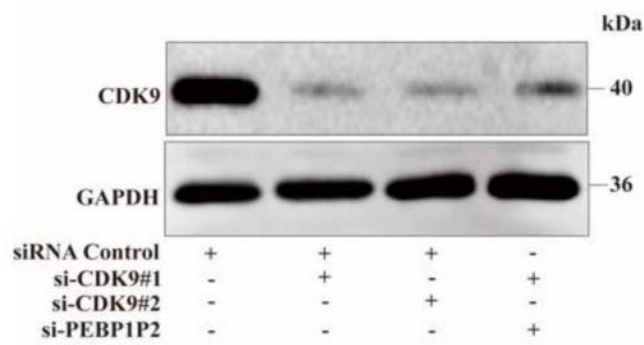


图13A

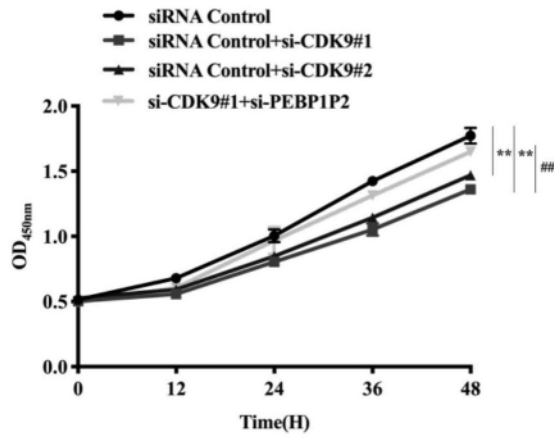


图13B

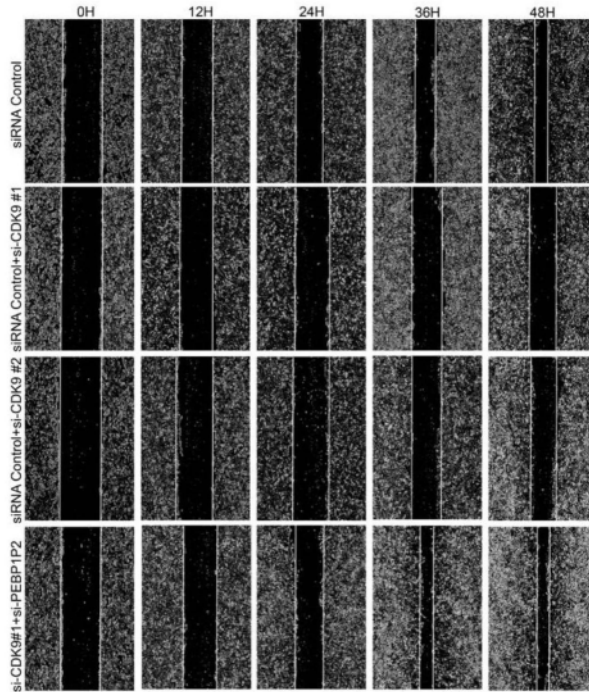


图14A

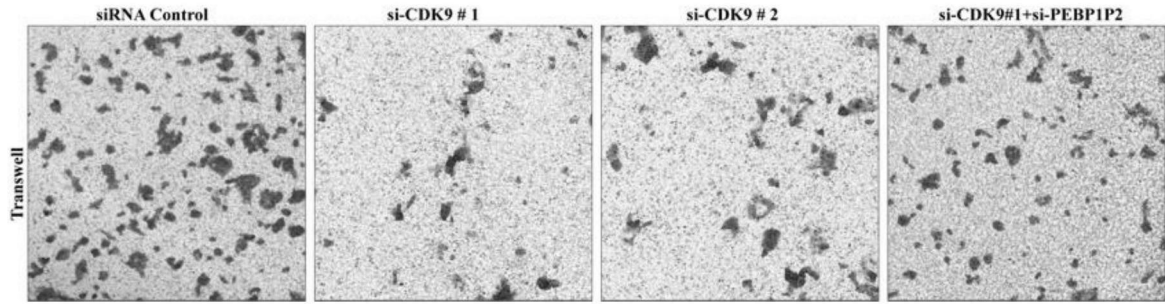


图14B

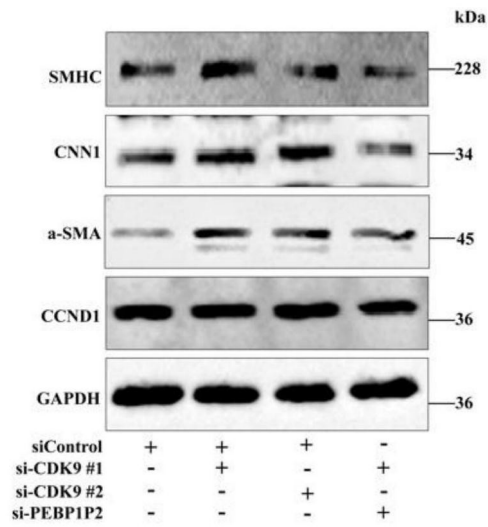


图15A

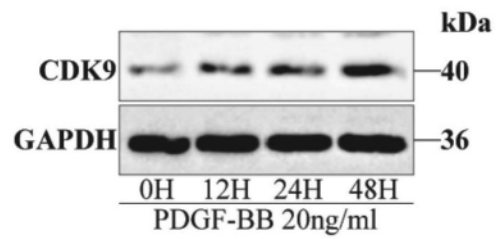


图15B

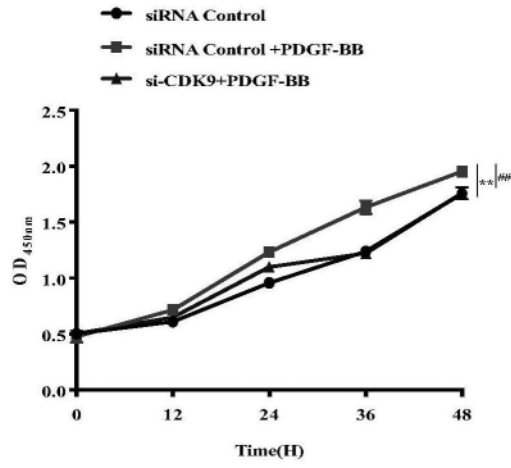


图16A

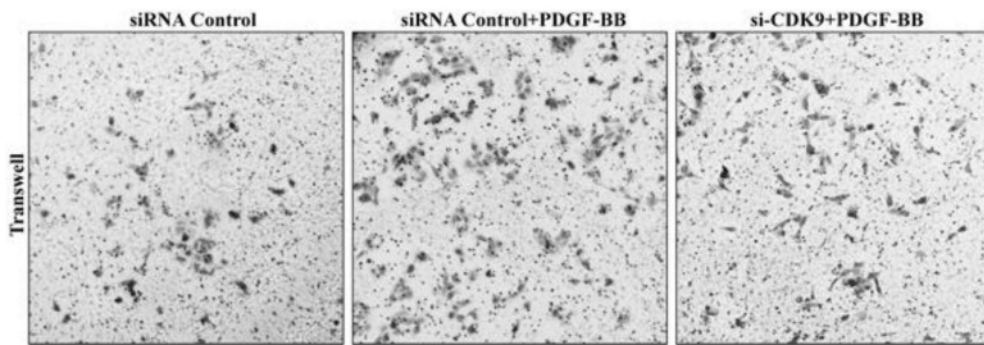


图16B

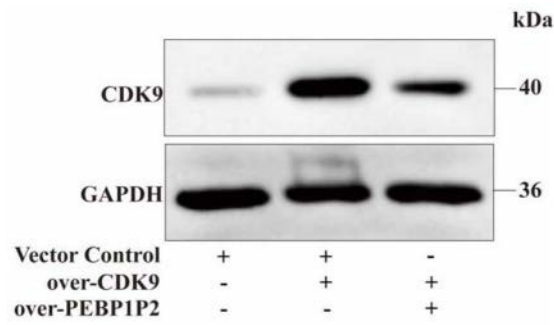


图17A

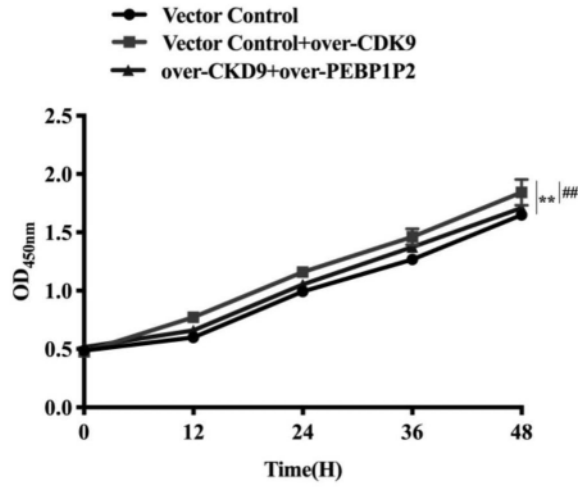


图17B

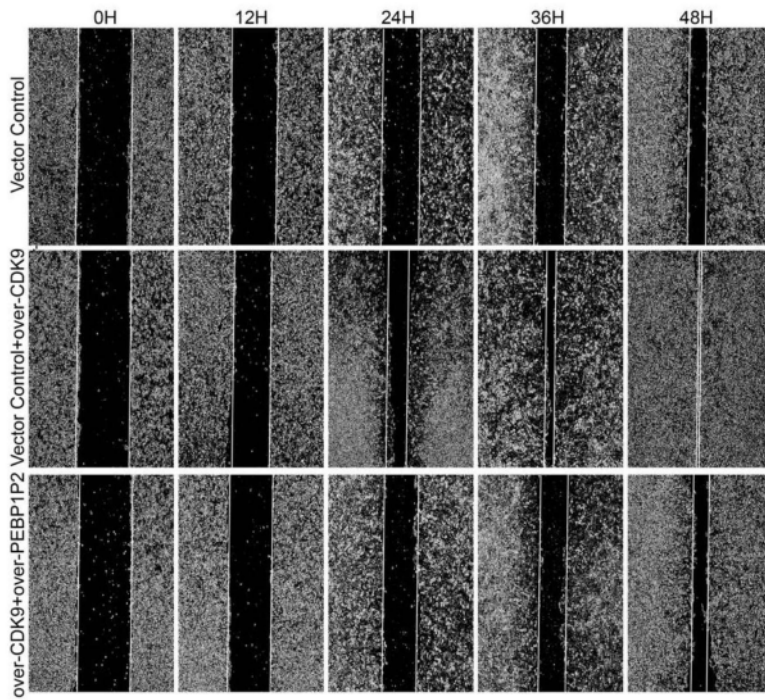


图18A

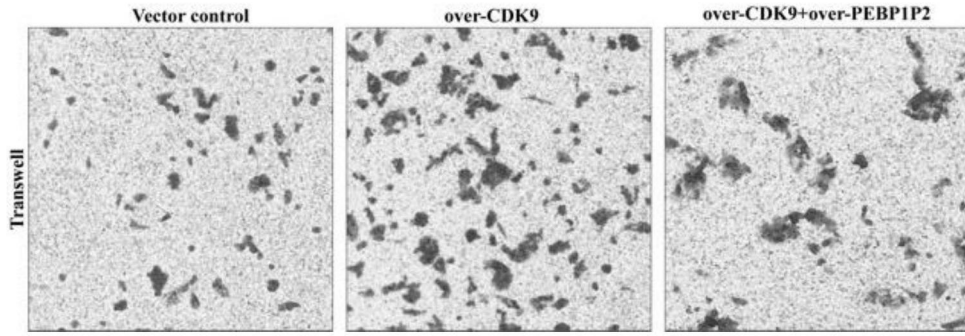


图18B

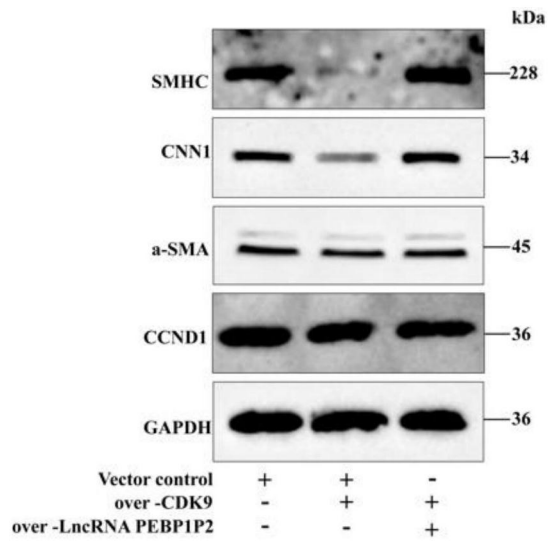


图19