



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111388499 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 201811642767.9

(22)申请日 2018.12.29

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 于政权 杜素娟 徐久智

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

A61K 31/7105(2006.01)

A61K 9/51(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61P 1/04(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

序列表2页 附图10页

(54)发明名称

miR-31在制备预防和治疗溃疡性结肠炎的结肠靶向纳米药物中的应用

(57)摘要

本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及miR-31在制备预防和治疗溃疡性结肠炎的结肠靶向纳米药物中的应用。本发明提供miR-31或miR-31类似物在制备预防或治疗消化道疾病、尤其是结肠炎的药物中的应用,所述miR-31的序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示。本发明发现miR-31能够有效缓解溃疡性结肠炎的发生发展,是预防和治疗溃疡性结肠炎的理想活性成分;通过利用蛋白纳米颗粒-魔芋多糖凝胶微球载体递送miR-31分子,并配合灌肠给药的方式,既能够靶向结肠肠道,又能发挥药物缓释作用,显著提高了纳米药物的生物利用率,进而有效提升了溃疡性结肠炎的预防和治疗效果。

1. miR-31或miR-31类似物在制备预防或治疗消化道疾病的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物的活性成分包含miR-31或miR-31类似物;所述miR-31类似物包括miR-31激动剂或经化学修饰的miR-31;  
优选地,所述miR-31的序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示。
3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述消化道疾病为肠道疾病;  
优选地,所述肠道疾病为结肠或直肠疾病;  
更优选地,所述结肠或直肠疾病为溃疡性结肠炎。
4. 一种用于预防或治疗消化道疾病的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有miR-31或miR-31类似物;  
优选地,所述药物组合物还含有药学可接受的载体。
5. 一种靶向结肠的药物递送系统,其特征在于,其包含蛋白纳米颗粒、吸附在蛋白纳米颗粒表面的药物和包覆在吸附药物的蛋白纳米颗粒外的魔芋葡甘聚糖凝胶微球。
6. 根据权利要求5所述的药物递送系统,其特征在于,所述药物为带负电荷的分子;所述蛋白纳米颗粒为白蛋白纳米颗粒;所述魔芋葡甘聚糖凝胶微球为氧化魔芋葡甘露聚糖凝胶微球;  
优选地,所述药物为核酸;  
更优选地,所述药物为RNA分子。
7. 根据权利要求5或6所述的药物递送系统,其特征在于,所述药物为miR-31或其类似物;所述药物递送系统包含乳白蛋白纳米颗粒、吸附在乳白蛋白纳米颗粒表面的miR-31或其类似物和包覆在吸附miR-31或其类似物的乳白蛋白纳米颗粒外的氧化魔芋葡甘露聚糖凝胶微球。
8. 根据权利要求7所述的药物递送系统,其特征在于,所述药物递送系统中,所述乳白蛋白纳米颗粒和所述miR-31或其类似物质量比为60:1~80:1;  
所述乳白蛋白纳米颗粒和所述氧化魔芋葡甘露聚糖凝胶微球的质量比为3:25~6:25;  
优选地,所述药物靶向系统的粒径为20~30 $\mu\text{m}$ 。
9. 权利要求5~8任一项所述药物递送系统的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
  - (一) 吸附药物的蛋白纳米颗粒的制备:蛋白经蛋白酶和超声处理制备得到蛋白纳米颗粒;蛋白纳米颗粒经活化后加入药物进行吸附反应;所述蛋白纳米颗粒的粒径为35~40nm,所述蛋白纳米颗粒的电势为11~13mV;
  - (二) 魔芋葡甘聚糖凝胶微球包埋吸附药物的蛋白纳米颗粒:分别制备含有表面活性剂的油相以及含有魔芋葡甘聚糖凝胶、交联剂和吸附药物的蛋白纳米颗粒的水相,采用W/O乳化法进行包埋;  
优选地,步骤(二)包括如下步骤:
    - (1) 油相制备:将span-80和液体石蜡按质量比为1:20混合;
    - (2) 水相制备:将魔芋葡甘聚糖凝胶、七水硫酸亚铁和吸附药物的蛋白纳米颗粒按照质量比为25:6:3混匀;
    - (3) 将所述水相逐滴滴加至所述油相中,超声剪切,将剪切后的混合液于35 $^{\circ}\text{C}$ ,搅拌处理4~6h,进行交联和包埋反应;
    - (4) 离心弃上清,分别采用正己烷和无水甲醇洗涤包埋微球。

10. 权利要求5~8任一项所述药物递送系统在制备预防或治疗结肠疾病的药物中的应用;

优选地,所述结肠疾病为溃疡性结肠炎。

## miR-31在制备预防和治疗溃疡性结肠炎的结肠靶向纳米药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及miR-31或其类似物在制备预防或治疗结肠炎的蛋白颗粒-魔芋微球纳米药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 溃疡性结肠炎是一种炎症性肠病。随着人们生活水平的日益提高,该病的发病率也越来越高,日趋引发人们的关注。目前溃疡性结肠炎的发病机制尚不清楚,因此缺乏有效的治疗药物,是不可治愈的疾病,严重威胁人类健康水平(Colombel J F, Mahadevan U, Gastroenterology, 2016, 152 (2) :309.)。因此,探究溃疡性结肠炎的病理机制并寻找有效的治疗策略对于阻止溃疡性结肠炎的发展具有重要意义。目前,关于治疗溃疡性结肠炎的研究主要集中在免疫系统的调控上。溃疡性结肠炎的治疗策略主要是免疫抑制,虽然有一定疗效,但很容易复发,无法根治。因此,亟需寻找有效的溃疡性结肠炎治疗方法。

[0003] microRNA作为一类非常重要的转录后调控因子,在应激条件下发挥重要作用,并且具有调控干细胞的功能,具有成为临床治疗药物的潜力。然而,传统的microRNA药物存在容易降解、没有靶向性、利用率低和给药困难等缺陷。纳米递送系统能够有效地弥补了这些缺陷,使得microRNA作为药物成为可能。 $\alpha$ -乳白蛋白可被加工为一种易于修饰、组织相容性较好的纳米载体,并且该载体可以承载药物用于治疗疾病(Li Y, Li W, Bao W, et al., Nanoscale, 2017, 9.)。但是,以 $\alpha$ -乳白蛋白纳米颗粒为载体的药物无论是通过静脉注射还是口服的给药方式都难以安全高效地到达结肠,因此难以用于结肠炎的治疗。

[0004] 来源于魔芋的氧化魔芋多糖可被加工成凝胶、微球等多种形态,并且由于其pH响应的特性,有望成为靶向结肠的新型药物载体;尤其是魔芋微球体具有粒径均一、具有一定载药量且生物相容性好等优点,具有包埋纳米颗粒的潜力(Chen X, Wang S, Lu M, et al., Biomacromolecules, 2014, 15 (6) :2166.)。

### 发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供miR-31或其类似物在制备预防或治疗结肠炎的蛋白颗粒-魔芋微球纳米药物中的应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明的技术方案如下:本发明首先发现miR-31具有缓解结直肠疾病等消化道疾病,尤其是溃疡性结肠炎的发生发展的功能;在此基础上,尝试利用miR-31开发预防和治疗肠道疾病的药物,然而,miR-31存在易降解、缺乏靶向性、利用率低和给药困难的问题,针对上述问题,发明人通过对大量药物载体进行筛选,但是,现有技术中的药物载体系统均无法同时解决miR-31的降解和靶向结肠运输的问题,因此,发明人开发了蛋白纳米颗粒和魔芋多糖凝胶的复合载体,该载体中,蛋白纳米颗粒具有高效的RNA吸附功能,魔芋多糖凝胶具有靶向结肠的功能,以该载体为基础制备的miR-31药物递送系统不但能够靶向结肠给药,而且具有很好的缓释作用,有效避免了miR-31的降解,实现了miR-31的

结肠靶向的缓慢释放,提高了miR-31的利用率。

[0007] 哺乳动物的miRNA-31具有高度的保守性,其中,人类和小鼠的miR-31基因的GenBank登录号分别为NR\_029505.1和NR\_029747.1,人类和小鼠的miR-31的基因序列分别如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示,两者的基因序列仅在3'端相差1个碱基,功能区序列完全保守。

[0008] 首先,本发明提供miR-31或miR-31类似物在制备预防或治疗消化道疾病的药物中的应用。

[0009] 本发明中,所述预防或治疗消化道疾病的药物的活性成分包含miR-31或miR-31类似物。

[0010] 本发明中,所述miR-31类似物为与miR-31具有相同功能的miRNA分子,包括miR-31激动剂或经化学修饰的miR-31。

[0011] 优选地,所述miR-31的序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示。

[0012] 本发明中,所述消化道疾病为肠道疾病。

[0013] 优选地,所述肠道疾病为结肠或直肠疾病。

[0014] 更优选地,所述结肠或直肠疾病为溃疡性结肠炎。

[0015] 在此基础上,本发明提供一种用于预防或治疗消化道疾病的药物组合物,所述药物组合物含有miR-31或miR-31类似物。

[0016] 优选地,所述药物组合物还含有药学可接受的载体。

[0017] 作为本发明的一种优选实施方式,所述药学可接受的载体为蛋白纳米颗粒-魔芋葡甘聚糖凝胶微球载体系统。

[0018] 进一步地,本发明提供一种靶向结肠的药物递送系统,其包含蛋白纳米颗粒、吸附在蛋白纳米颗粒表面的药物和包覆在吸附药物的蛋白纳米颗粒外的魔芋葡甘聚糖凝胶微球。

[0019] 上述靶向结肠的药物递送系统中,所述药物为带负电荷的分子;所述蛋白纳米颗粒为白蛋白纳米颗粒;所述魔芋葡甘聚糖凝胶微球为氧化魔芋葡甘露聚糖凝胶微球。

[0020] 所述带负电荷的分子包括但不限于核酸、带负电荷的蛋白分子。优选地,所述药物为核酸。

[0021] 更优选地,所述药物为RNA分子。

[0022] 所述RNA分子可以为任意分子量大小的RNA分子,可以为编码RNA或非编码RNA,所述非编码RNA包括但不限于miRNA、siRNA、lncRNA、circRNA等。

[0023] 所述miRNA包括但不限于miR-31、miR-29、miR-155。

[0024] 作为本发明的一种示例,所述药物为miR-31或其类似物。

[0025] 当所述药物为miR-31或其类似物时,乳白蛋白制备的纳米颗粒能够更好地与miR-31分子结合,因此,所述miR-31药物递送系统包含乳白蛋白纳米颗粒、吸附在乳白蛋白纳米颗粒表面的miR-31或其类似物和包覆在吸附miR-31或其类似物的乳白蛋白纳米颗粒外的氧化魔芋葡甘露聚糖凝胶微球。

[0026] 为实现更好的蛋白颗粒吸附作用和魔芋微球包埋作用,制备均一稳定的纳米药物,上述miR-31药物递送系统中,所述乳白蛋白纳米颗粒和所述miR-31或其类似物质量比为60:1~80:1

[0027] 所述乳白蛋白纳米颗粒和所述氧化魔芋葡甘露聚糖凝胶微球的质量比为3:25~6:25。

[0028] 优选地,所述药物靶向系统的粒径为20~30 $\mu\text{m}$ 。

[0029] 本发明还提供所述药物递送系统的制备方法,包括如下步骤:

[0030] (一)吸附药物的蛋白纳米颗粒的制备:蛋白经蛋白酶和超声处理制备得到蛋白纳米颗粒;蛋白纳米颗粒经活化后加入药物进行吸附反应;所述蛋白纳米颗粒的粒径为35~40nm,所述蛋白纳米颗粒的电势为11~13mV;

[0031] (二)魔芋葡甘露聚糖凝胶微球包埋吸附药物的蛋白纳米颗粒:分别制备含有表面活性剂的油相以及含有魔芋葡甘露聚糖凝胶、交联剂和吸附药物的蛋白纳米颗粒的水相,采用W/O乳化法进行包埋。

[0032] 优选地,上述步骤(二)包括如下步骤:

[0033] (1)油相制备:将span-80和液体石蜡按质量比为1:20混合;

[0034] (2)水相制备:将魔芋葡甘露聚糖凝胶、七水硫酸亚铁和吸附药物的蛋白纳米颗粒按照质量比为25:6:3混匀;

[0035] (3)将所述水相逐滴滴加至所述油相中,超声剪切,将剪切后的混合液于35 $^{\circ}\text{C}$ ,搅拌处理4~6h,进行交联和包埋反应;

[0036] (4)离心弃上清,分别采用正己烷和无水甲醇洗涤包埋微球。

[0037] 本发明还提供所述药物递送系统在制备预防或治疗结肠疾病的药物中的应用。

[0038] 优选地,所述结肠疾病为溃疡性结肠炎。

[0039] 本发明的有益效果在于:

[0040] (1)本发明发现miR-31能够有效缓解溃疡性结肠炎的发生发展,是预防和治疗溃疡性结肠炎的理想活性成分,为溃疡性结肠炎的治疗提供了新的药物活性成分。

[0041] (2)本发明发现魔芋多糖凝胶微球能够包埋蛋白纳米颗粒,并且能够高效靶向结肠运输药物,利用本发明提供的蛋白纳米颗粒-魔芋多糖凝胶微球作为药物递送系统的载体能够实现有效的结肠靶向缓释作用,有效提高了药物的结肠利用率。

[0042] (3)本发明利用蛋白纳米颗粒-魔芋多糖凝胶微球载体递送miR-31分子,并配合灌肠给药的方式,解决了传统纳米药物无法靶向结肠、药物利用率低等问题;既能够通过灌肠给药方式直达患处,又能通过载体粘附在结肠表面,发挥药物缓释作用,显著提高了纳米药物的生物利用率,进而有效提升了溃疡性结肠炎的预防和治疗效果,为制备microRNA纳米药物和利用microRNA纳米药物治疗溃疡性结肠炎提供了新的方法,具有很大的应用潜力。

## 附图说明

[0043] 图1为本发明实施例1中miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的制备过程示意图,其中,PS为乳白蛋白纳米颗粒,PS/miR-31为吸附miR-31的乳白蛋白纳米颗粒,OKGM为氧化魔芋葡甘露聚糖。

[0044] 图2为本发明实施例1中荧光染色分析魔芋微球体成功包埋乳白蛋白纳米颗粒的结果图。

[0045] 图3为本发明实施例1中miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的乳白蛋白颗粒的电势和粒径的稳定性分析,其中A为粒径的稳定性分析;B为电势的稳定性分析。

[0046] 图4为本发明实施例2中miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的结肠靶向性分析,其中,A为给药荧光标记的miR-31的纳米药物的小鼠结肠冰冻切片荧光显微镜观察结果图;B为结肠细胞的miR-31表达量分析。

[0047] 图5为本发明实施例2中给药纳米药物空载体OKGM-PS的小鼠小肠和结肠的HE染色和免疫组化结果,其中Ctrl为灌肠生理盐水的对照,OKGM-PS为给药纳米药物空载体,H&E为HE染色结果图,p65和P-STAT分别为p65、P-STAT的免疫组化结果。

[0048] 图6为本发明实施例2中给药纳米药物空载体OKGM-PS后,小鼠的肺、肾、肝、脾组织的HE染色结果,其中,Ctrl为灌肠生理盐水的对照,OKGM-PS为给药纳米药物空载体。

[0049] 图7为本发明实施例2中给药纳米药物后小鼠的体重情况分析。

[0050] 图8为本发明实施例2中给药纳米药物后小鼠的结肠长度分析,其中,A为小鼠的结肠图片,B为小鼠结肠长度统计结果。

[0051] 图9为本发明实施例2中给药OKGM-PS-miR-31后,小鼠结肠的HE染色结果。

[0052] 图10为本发明实施例2中免疫荧光染色分析给药OKGM-PS-miR-31对于小鼠Ki67的表达水平的影响。

[0053] 图11为本发明实施例2中免疫组化染色分析给药后小鼠P-Stat3、p65的表达量。

[0054] 图12为本发明实施例2中免疫组化染色分析给药后小鼠Gp130、Gsk3 $\beta$ 、Lats2、Dlg1表达量。

[0055] 图13为本发明实施例2中Western blot分析给药后小鼠IL-17、Gp130、Axin1、Gsk3 $\beta$ 、Dlg1的表达量。

[0056] 图14为本发明实施例3中的给药方式示意图,为DSS处理5天后,撤除DSS,灌肠给药七天,每天一次。

[0057] 图15为本发明实施例3中给药纳米药物后小鼠的体重情况分析。

[0058] 图16为本发明实施例3中给药纳米药物后小鼠的结肠长度分析。

[0059] 图17为本发明实施例3给药OKGM-PS-miR-31后,小鼠结肠的HE染色结果。

[0060] 图18为本发明实施例4中给药纳米药物后miR-31敲除小鼠的体重情况分析。

[0061] 图19为本发明实施例4中给药纳米药物后miR-31敲除小鼠的结肠长度分析。

[0062] 图20为本发明实施例4中免疫荧光染色分析给药后miR-31敲除小鼠的Ki67的表达量。

[0063] 图21为本发明实施例4中利用CRISPR-Cas9系统构建miR-31敲除小鼠的基因剪切和miR-31的敲除序列的示意图。

[0064] 图22为本发明实施例4中利用CRISPR-Cas9系统构建miR-31敲除小鼠的PCR鉴定结果图,其中,M为DNA marker,泳道1、4、9、10、11为miR-31基因成功敲除的小鼠,泳道2、5、6、7、8为杂合小鼠,泳道3为野生型小鼠。

## 具体实施方式

[0065] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0066] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

- [0067] 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。
- [0068] 实施例1 miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的制备
- [0069] 本实施例以人类miR-31为例(人类miRNA的基因序列如SEQ ID NO.1所示),制备携带miR-31的乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物,并分析纳米药物的包埋结构以及纳米药物粒径和电势的保存稳定性。
- [0070] 1、miR-31的合成
- [0071] 按照人类miR-31的序列(如SEQ ID NO.1所示),送合成公司合成miR-31分子,合成的miR-31分子的两条链的序列分别如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。
- [0072] 2、制备吸附miR-31模拟物的蛋白颗粒
- [0073] (1)称取6mg $\alpha$ -乳白蛋白溶于6ml Tris-HCl (pH=7.5)中,加入2.5 $\mu$ l Protease,振荡混匀,50℃水浴1h,冷却至室温,超声30s制得乳白蛋白纳米球;
- [0074] (2)用3500d透析袋将上述制备的蛋白纳米球置于去离子水中透析2h,每0.5h换水一次,测电势为-11mv左右即透析完成;
- [0075] (3)在6ml步骤(2)得到的纳米球中加入0.5mg EDC,活化15min,再加入0.5mg mal 旋转反应2h,在去离子水中透析2h,每0.5h换水一次,测电势为-3mv左右即反应完成;
- [0076] (4)在步骤(3)得到的6ml反应体系中加入miR-31继续旋转反应2h,在去离子水中透析2h,每0.5h换水一次,测电势约为12mv左右即反应完成;
- [0077] (5)将步骤(4)制备得到的6ml纳米球体系浓缩至200 $\mu$ l,在200 $\mu$ l体系中加入20D(约66 $\mu$ g)合成的miR-31(溶于100 $\mu$ l DEPC水中),室温震荡10s。
- [0078] 经检测,上述制备的乳白蛋白纳米颗粒的粒径为35-40nm,电势为11-13mV。吸附miR-31的乳白蛋白纳米颗粒(纳米球)中miR-31和乳白蛋白纳米颗粒的质量比为60:1-80:1。
- [0079] 分别以NC(不具有miR-31功能的miRNA对照,其两条链的序列分别如SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6所示)和DEPC水替换miR-31作为阴性对照和空白对照,其制备方法与吸附miR-31的乳白蛋白颗粒的制备方法的区别仅在于,在步骤(4)中加入等摩尔的NC或DEPC水。
- [0080] 2、魔芋微球体包埋吸附miR-31的乳白蛋白颗粒
- [0081] (1)在50ml的烧杯中,加入1.5g span80和40ml液体石蜡,封口搅拌备用。
- [0082] (2)将12mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O溶于100 $\mu$ l去离子水中备用;
- [0083] (3)取1ml氧化魔芋葡甘露聚糖(OKGM,50mg/mL),在其中加入步骤(2)制备的FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O溶液和上述1中制备的吸附miR-31的乳白蛋白颗粒,混匀;
- [0084] (4)在超声破碎仪上将步骤(3)得到的水相混合液逐滴滴加到步骤(1)得到的油相混合液中,采用超声破碎进行剪切,超声条件为3000r,2min;
- [0085] (5)将步骤(4)得到的剪切好的油水混合物置于磁力搅拌仪上,35℃搅拌4h。
- [0086] (6)3000rpm离心2min,弃上清。
- [0087] (7)加入5ml正己烷,吹打均匀,3000r离心2min,弃上清,重复三次。
- [0088] (8)加入5ml无水甲醇,吹打均匀,3000r离心2min,弃上清,重复三次。
- [0089] (9)将上述洗涤后得到的沉淀溶于4ml去离子水(pH=3),4℃保存。
- [0090] 对照组NC和DEPC的制备方法与miR-31相同。
- [0091] 上述制备得到的miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的浓度为21.425 $\mu$ g/



ml, 粒径为20~30 $\mu\text{m}$ 。miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的吸附和包埋制备过程示意图如图1所示。

### [0092] 3、荧光染色分析miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的包埋结构

[0093] 采用cy3SE染料对上述制备的 $\alpha$ -乳白蛋白颗粒进行染色,再将其包埋到魔芋微球体中,使用荧光显微镜进行观察,结果如图2所示,结果表明,我们成功将蛋白颗粒包埋到了魔芋微球体中。

### [0094] 4、乳白蛋白纳米颗粒的稳定性分析

[0095] 将蛋白颗粒静置于4 $^{\circ}\text{C}$ 存放,定时检测其粒径和电势变化,结果如图3所示,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置一周时间内乳白蛋白颗粒的粒径电势均没有明显变化,表明蛋白颗粒载体十分稳定。

### [0096] 实施例2 miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物在预防DSS诱导型结肠炎中的应用DSS

[0097] 本实施例利用Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) 诱导构建小鼠结肠炎模型,将实施例1制备得到的miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物用于DSS诱导型结肠炎的预防,在DSS处理前和处理过程中灌肠给药miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物,通过HE染色、Ki67免疫荧光染色观察表型变化,并通过Western blot进一步分析药物的作用机制及表型恢复的机制。

#### [0098] (一) DSS诱导型结肠炎小鼠模型的制备

[0099] 选取8周龄C57雄性小鼠15只,打耳标进行编号,随机分组分为纳米药物空载体OKGM-PS (加入DEPC水进行吸附的空白对照组)、OKGM-PS-NC (加入NC分子的阴性对照组) 和OKGM-PS-miR-31 (实验组) 三组,其中OKGM-PS和OKGM-PS-NC组为对照组,OKGM-PS-miR-31组为实验组。通过连续5天饮水给药3.5%DSS,即可出现急性结肠炎的症状。

#### [0100] (二) miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的给药

[0101] 通过灌肠给药的方式,利用实施例1制备的miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物OKGM-PS-miR-31以及不含miR-31的对照药物OKGM-PS和OKGM-PS-NC分别对上述各组小鼠进行灌肠处理,每天1次,每次灌肠100 $\mu\text{L}$ /只,于DSS处理前2天开始灌肠给药,DSS处理期间继续给药至DSS处理5天,采样进行后续分析。

#### [0102] (三) 取样

[0103] 在DSS处理5天后将OKGM-PS、OKGM-PS-NC和OKGM-PS-miR-31三组小鼠进行颈部脱臼处死,医用酒精消毒后用剪刀取出结直肠,PBS将肠道内容物冲洗干净,留取适量作为蛋白样品和mRNA样品,剩余结肠用4%的多聚甲醛常温固定24h后,PBS清洗3次,每次10min,然后进行组织脱水和石蜡切片制作。

#### [0104] (四) miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物靶向结肠情况分析

[0105] 采用cy3SE染料对按照实施例1的方法制备的 $\alpha$ -乳白蛋白颗粒进行染色,然后按照实施例1的方法吸附带有绿色荧光标记的miR-31,采用上述制备的荧光标记的纳米药物对小鼠进行灌肠处理,4h后取结肠进行冰冻切片,结果如图4所示,结果表明,在给药4h后miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物成功到达小鼠结肠细胞,实验组小鼠结肠细胞中miR-31的表达量与NC对照组相比显著提高。

#### [0106] (五) 小鼠表型以及肠、肺、肾、肝、脾等组织的病理切片、免疫组化和western blot分析

[0107] 1、体重和结肠长度、完整性分析

[0108] 以DSS处理前体重为初始体重,并记录其它各时间点的小鼠体重。体重变化能够在宏观上指示小鼠肠炎病变速度、病变程度以及病变恢复速度。小鼠结肠的炎症程度也不同,体重以及结肠长度也会随之变化。

[0109] 2、石蜡包埋切片的制备

[0110] (1) 组织脱水

[0111] 脱水程序如下:50%乙醇,30min;70%乙醇,4-7.5h;80%乙醇,1h;95%乙醇,40min;100%乙醇I,15min;100%乙醇II,15min;二甲苯:乙醇(体积比1:1),5min;二甲苯I,10min;二甲苯II,5min;二甲苯:软蜡(体积1:1),30min;软蜡30min;硬蜡,3h;最后3步处理的温度设定为60℃,用来溶解蜡,其余步骤均在常温进行。

[0112] (2) 石蜡包埋

[0113] 常规组织石蜡包埋,然后切成3-5μm厚度切片,在39℃水浴锅中展片,实体显微镜下观察是否完全展开,将展平的片子用粘附性载玻片捞取,晾干,用于后续组织病理染色和免疫染色。

[0114] 3、小鼠组织表型分析(HE染色)

[0115] 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining),简称HE染色法,该方法是细胞学,组织学,胚胎学以及病理学中使用最常见的方法,能够直观的观察组织细胞的异常变化,具体步骤如下:

[0116] (1) 烤片:63℃,1h;(2) 脱蜡,水化;(3) 二甲苯I处理15min;(4) 二甲苯II处理15min;(5) 梯度乙醇处理:100%乙醇I,II处理各5min;95%乙醇I,II处理各5min;80%乙醇处理5min;70%乙醇处理5min;(6) 蒸馏水处理5min;(7) 苏木精处理10min;(8) 自来水处理5min;(9) 95%乙醇I,II处理各3min;(10) 伊红处理10s;(11) 95%乙醇I,II处理各3min;(12) 100%乙醇I,II处理各3min;(13) 二甲苯I处理10min;二甲苯II处理10min;(14) 封片,拍照。

[0117] 4、小鼠组织免疫组化分析

[0118] 具体方法如下:(1) 烤片:63℃,1h;(2) 脱蜡,水化;(3) 二甲苯I:15min;(4) 二甲苯II:15min;(5) 梯度乙醇处理:100%乙醇I,II:各5min;95%乙醇I,II:各5min;80%乙醇:5min;70%乙醇:5min;蒸馏水:5min;(6) 抗原修复:柠檬酸钠(pH=6.0)煮沸20min;(7) 自然冷却:1h左右;(8) PBS:处理3次,5min/次;(9) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:避光20min;(10) PBS:处理3次,5min/次;(11) 封闭:封闭液作用至少1h;(12) 一抗杂交:按照适当比例加入现配制好的一抗,4℃过夜;(13) 复温:室温放置半小时;(14) PBS:处理3次,5min/次;(15) B液:室温30min;(16) PBS:处理3次,5min/次;(17) C液:室温30min;(18) PBS:处理3次,5min/次。(19) 蒸馏水:处理5min。(20) DAB:根据抗体的特点,在显色合适的时间下,终止显色,放入蒸馏水中;(21) 苏木精:复染5min;(22) 自来水:处理5min;(23) 梯度乙醇处理:70%乙醇:3min;80%乙醇:3min;90%乙醇:3min;100%乙醇:3min;(24) 二甲苯I:5min;二甲苯II:5min;(25) 封片,拍照。

[0119] 上述免疫组化染色所用的一抗如下:p65(cell signaling technology,1;1000,#8242)、P-Stat3(cell signaling technology,1;1000,#9145)、Ki67(cell signaling technology,1;1000,#9449)、β-catenin(Sigma,1;2000,#C7082)、Gp130(Santa cruz,1;600,#sc-376280)、Gsk3β(cell signaling technology,1;1000,#9323)、Lats2(Abcam,1;

2000, #ab70565)、Dlg1 (Abcam, 1;2000, #ab3437)。

[0120] 上述免疫组化染色所用二抗为鼠源和兔源抗体, DAB显色试剂盒购自中杉金桥, B液和C液均来自于中杉金桥试剂盒, 目录号: sp9001, sp9002。

[0121] 5、Western blot检测结肠组织基因表达情况

[0122] 具体方法如下:

[0123] (1) 提取蛋白质

[0124] ①剪适当大小的结肠组织, 用剪刀剪碎;

[0125] ②向上述样品中加入400 $\mu$ L蛋白裂解液 (PMSF: IP体积比1:100), 匀浆机分散均匀组织在冰上裂解30min;

[0126] ③4 $^{\circ}$ C, 12000rpm离心10min;

[0127] ④吸取上清, 取一部分蛋白样品检测浓度, 用于Western blot实验, 其余样品放在-80 $^{\circ}$ C保存。

[0128] (2) 检测蛋白质浓度: 采用碧云天试剂盒BCA检测蛋白质浓度, 每个泳道上样50 $\mu$ g。

[0129] (3) 电泳: 浓缩胶: 60V, 分离胶: 80V。

[0130] (4) 转膜: 湿转, 330mA转膜1h。

[0131] (5) 封闭: 5%脱脂奶粉封闭1h。

[0132] (6) 一抗杂交: 按照蛋白分子量大小, 剪取适当大小膜, 封膜, 加入适量一抗, 4 $^{\circ}$ C过夜。

[0133] (7) 复温: 摇床上摇30min, 回收一抗。

[0134] (8) 洗膜: TBST: 3X10min/次

[0135] (9) 二抗杂交: 加入二抗 (购自碧云天公司), 室温孵育1h。

[0136] (10) 洗膜: TBST: 处理3次, 10min/次。

[0137] (11) 显色: 采用DAB显色试剂盒进行显色。

[0138] 上述Western blot所用一抗: IL-7r (Santa cruz, 1;1000, #sc-662)、Gp130 (Santa cruz, 1;500, #sc-376280)、Axin1 (cell signaling technology, 1;1000, #2074)、Gsk3 $\beta$  (cell signaling technology, 1;1000, #9323)、Dlg1 (Abcam, 1;600, #ab3437)、 $\beta$ -tubulin (上海翊圣生物科技有限公司, 稀释比例1:4000, 30101ES50)。

[0139] Western blot所用二抗 (碧云天, 稀释比例1:10000, 货号: A0208 (兔源), A0216 (小鼠源))。

[0140] 6、实验结果

[0141] (1) 纳米药物对于小鼠的毒副作用分析: 给药纳米药物空载体OKGM-PS的小鼠小肠和结肠的HE染色结果和p65、P-STAT的3免疫组化结果如图5所示, 肺、肾、肝、脾组织的HE染色结果如图6所示, 结果表明, 小鼠结肠、小肠以及肺、肾、肝、脾组织均表现正常, 与正常小鼠无差异, 证明该纳米药物对于小鼠无毒副作用, 安全性很高。

[0142] (2) 纳米药物对于小鼠的体重和结肠长度影响分析: 给药后小鼠的体重情况如图7所示, 结果表明, 相较于对照组, 给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠体重明显高于对照组。

[0143] 给药后小鼠的结肠性状分析结果如图8所示, 结果表明, 给药OKGM-PS-miR-31的实验组的结肠长度显著高于对照组, 且结肠结构更完整。

[0144] (3) 纳米药物对于小鼠DSS诱导的结肠炎的发生发展的影响分析:小鼠结肠的HE染色的结果如图9所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的结肠结构明显优于对照组(给药OKGM-PS和OKGM-PS-NC);免疫荧光染色的结果如图10所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的Ki67表达水平显著提高,表明给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的结肠炎症损伤较对照组显著减轻;免疫组化的结果如图11和图12所示,Western blot结果如图13所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的P-Stat3、p65、Gp130、Gsk3 $\beta$ 、Lats2、Dlg1、IL-17、Axin1等炎症因子和miR-31的靶基因的表达量显著降低,表明在给药OKGM-PS-miR-31后,WNT通路被激活,Hippo通路被抑制,进而减轻了DSS造成的损伤。综上所述,miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物对于DSS诱导的结肠炎具有很好的预防效果。

[0145] 实施例3 miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物在治疗DSS诱导型结肠炎中的应用

[0146] (一) DSS诱导型结肠炎小鼠模型的制备

[0147] 选取8周龄C57雄性小鼠15只,打耳标进行编号,随机分组分为纳米药物空载体OKGM-PS、OKGM-PS-NC和OKGM-PS-miR-31三组,其中OKGM-PS和OKGM-PS-NC组为对照组,OKGM-PS-miR-31组为实验组。通过连续5天饮水给药3.5%DSS,即可出现急性结肠炎的症状。

[0148] (二) miR-31模拟物蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的给药

[0149] 通过灌肠给药的方式,利用实施例1制备的miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物OKGM-PS-miR-31以及不含miR-31的对照药物OKGM-PS和OKGM-PS-NC分别对上述各组小鼠进行灌肠处理,每天1次,每次灌肠100 $\mu$ L/只,在DSS处理5天后停止DSS处理并开始纳米药物灌肠,灌肠处理七天后取材,采样进行后续分析。给药方式示意图如图14所示。

[0150] (三) 取样

[0151] 灌肠处理七天后将OKGM-PS、OKGM-PS-NC和OKGM-PS-miR-31三组小鼠进行颈部脱臼处死,医用酒精消毒后用剪刀取出结直肠,PBS将肠道内容物冲洗干净,留取适量结肠作为蛋白样品和mRNA样品,剩余结肠用4%的多聚甲醛固定常温24h后,PBS清洗3次,每次10min,然后进行组织脱水。

[0152] (四) 小鼠表型以及肠、肺、肾、肝、脾等组织的病理切片、免疫组化和western blot分析

[0153] 实验方法同实施例2。

[0154] (五) 实验结果

[0155] 1、纳米药物对于小鼠的体重和结肠长度影响分析:给药后小鼠的体重情况如图15所示,结果表明,相较于对照组,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠体重明显高于对照组。

[0156] 给药后小鼠的结肠性状分析结果如图16所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的结肠长度显著高于对照组,且结肠结构更完整,表明给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的炎症较对照组明显减轻。

[0157] 2、纳米药物对于小鼠DSS诱导的结肠炎的发生发展的影响分析:HE染色的结果如图17所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的结肠结构明显优于对照组(给

药OKGM-PS和OKGM-PS-NC),表明给药OKGM-PS-miR-31的实验组小鼠在受到DSS损伤后的损伤更小、修复更快,说明miR-31纳米药物具有很好的结肠炎的治疗效果。

[0158] 实施例4 miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物在预防miR-31敲除鼠DSS诱导型结肠炎中的应用

[0159] (一)miR-31敲除鼠的构建

[0160] 利用CRISPR/Cas9技术构建miR-31基因敲除小鼠,敲除过程的示意图如图21所示,具体方法如下:

[0161] 将K14rtta转基因小鼠与TRE-Msi1转基因小鼠进行交配(两种转基因小鼠的构建方法参见Wang S,Li N,Yousefi M,Nakauka-Ddamba A,Li F,Parada K,et al.(2015) Transformation of the intestinal epithelium by the MSI2RNA-binding protein.Nat Commun 6:6517),产生子代小鼠,待子代小鼠长到6周时,向小鼠的饮水中添加终浓度为0.2g/L的四环素,让小鼠自由饮水,保证饮水充足,诱导基因Musashi1过表达。饲喂四环素48h后,即可出现乳腺外paget病样症状的小鼠,即乳腺外小鼠paget病模型(DTG小鼠)。

[0162] miR-31敲除鼠基因型的鉴定:

[0163] 提取小鼠基因组DNA作为模板,以F1和R1为引物,进行PCR扩增(PCR靶为miR-31基因),检测扩增产物,出现300bp和700bp两条特征条带。PCR反应体系:mix 6 $\mu$ L(康维世纪,货号:01037/30252),F1 0.6 $\mu$ L,R1 0.6 $\mu$ L,基因组DNA模板1 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 4.3 $\mu$ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,35个循环;72 $^{\circ}$ C 2min。

[0164] miR-31敲除鼠基因型的鉴定结果如图22所示,其中,具有300bp条带的小鼠为miR-31敲除鼠,具有700bp条带小鼠为野生型小鼠。

[0165] 所用引物序列如下(SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8):

[0166] F1:5'-AGGTCACCTGCACCTCTATGGAC-3'

[0167] R1:5'-GTGCCCAATGATTCTGACAAGTCAG-3'

[0168] (二)DSS诱导型结肠炎小鼠模型的制备

[0169] 选取8周龄miR-31敲除鼠15只,打耳标进行编号,随机分组分为OKGM-PS-NC和OKGM-PS-miR-31两组,其中OKGM-PS-NC组为对照组,OKGM-PS-miR-31组为实验组。通过连续5天饮水给药3.5%DSS,即可出现急性结肠炎的症状。

[0170] (三)miR-31蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物的给药

[0171] 通过灌肠给药的方式,利用实施例1制备的miR-31乳白蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物OKGM-PS-miR-31以及不含miR-31的对照药物OKGM-PS-NC分别对上述各组小鼠进行灌肠处理,每天1次,每次灌肠100 $\mu$ L/只。DSS处理前2天开始灌肠给药纳米药物,DSS处理期间继续给药纳米药物至DSS处理5天,采样进行后续分析。

[0172] (三)取样

[0173] 将OKGM-PS-NC和OKGM-PS-miR-31两组小鼠进行颈部脱臼处死,医用酒精消毒后用剪刀取出结直肠,PBS将肠道内容物冲洗干净,留取适量结肠作为蛋白样品和mRNA样品,剩余结肠用4%的多聚甲醛固定常温24h后,PBS清洗3次,每次10min,然后进行组织脱水。

[0174] (四)小鼠表型以及肠、肺、肾、肝、脾等组织的病理切片、免疫组化和western blot分析

[0175] 实验方法同实施例2。

[0176] (五) 实验结果

[0177] 1、纳米药物对于小鼠的体重和结肠长度影响分析:给药后小鼠的体重情况如图18所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠体重明显高于对照组OKGM-PS-NC。

[0178] 给药后小鼠的结肠性状分析结果如图19所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的结肠长度显著高于对照组,且结肠结构更完整,表明给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的炎症较对照组明显减轻。

[0179] 2、纳米药物对于小鼠DSS诱导的结肠炎的发生发展的影响分析:免疫荧光染色的结果如图20所示,结果表明,给药OKGM-PS-miR-31的实验组的小鼠的Ki67表达水平显著提高,表明给药OKGM-PS-miR-31的miR-31敲除小鼠的结肠炎症损伤较对照组显著减轻,进一步说明miR-31蛋白颗粒-魔芋微球体纳米药物对于结肠炎具有较好预防效果。

[0180] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

## 序列表

<110>	中国农业大学	
<120>	miR-31在制备预防和治疗溃疡性结肠炎的结肠靶向纳米药物中的应用	
<130>	KHP181118837.8	
<160>	8	
<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	1	
	aggcaagatg ctggcatagc t	21
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	2	
	aggcaagatg ctggcatagc tg	22
<210>	3	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	3	
	aggcaagaug cuggcauagc u	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	4	
	cuaugccagc aucuugccuu u	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	5	
	uucuccgaac gugucacguu u	21
<210>	6	
<211>	21	

---

<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 6	
acgugacacg uucggagaau u	21
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 7	
aggtcactgc actcctatgg ac	22
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 8	
gtgcccaatg attctgacaa gtcag	25



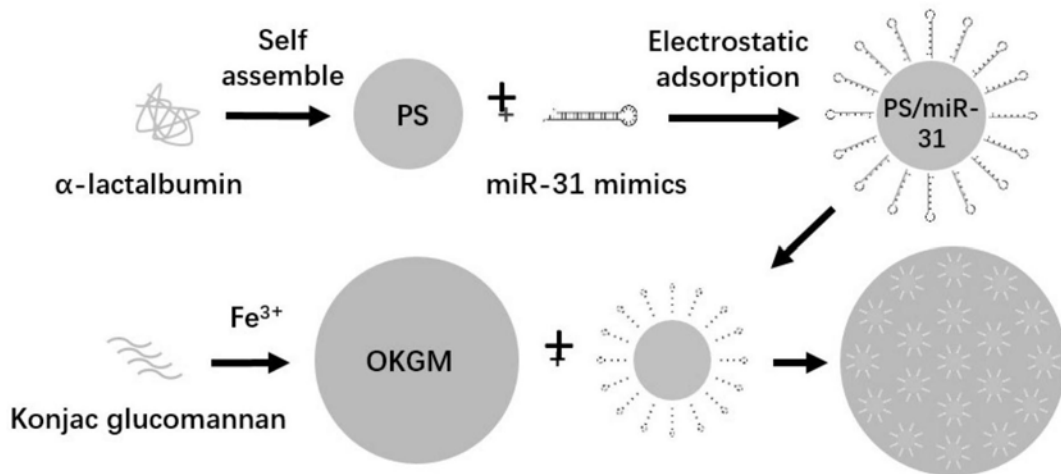


图1

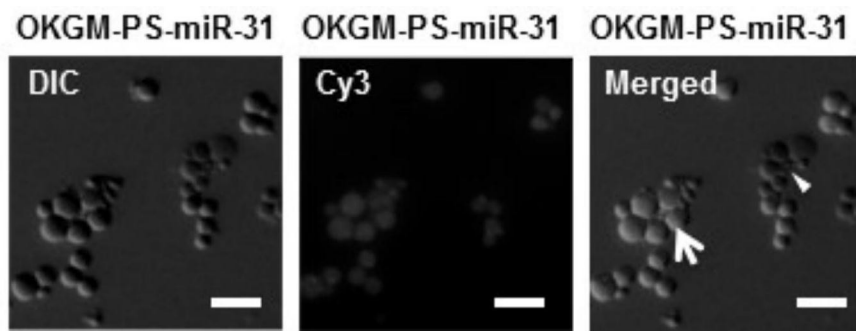


图2

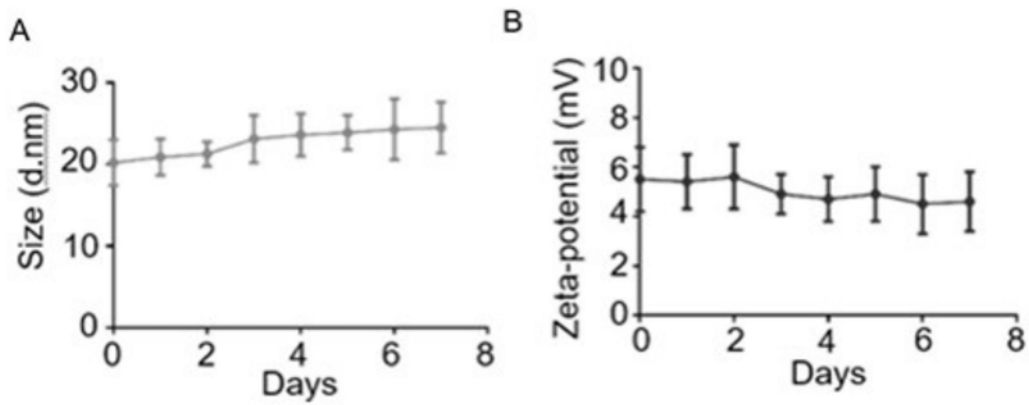


图3

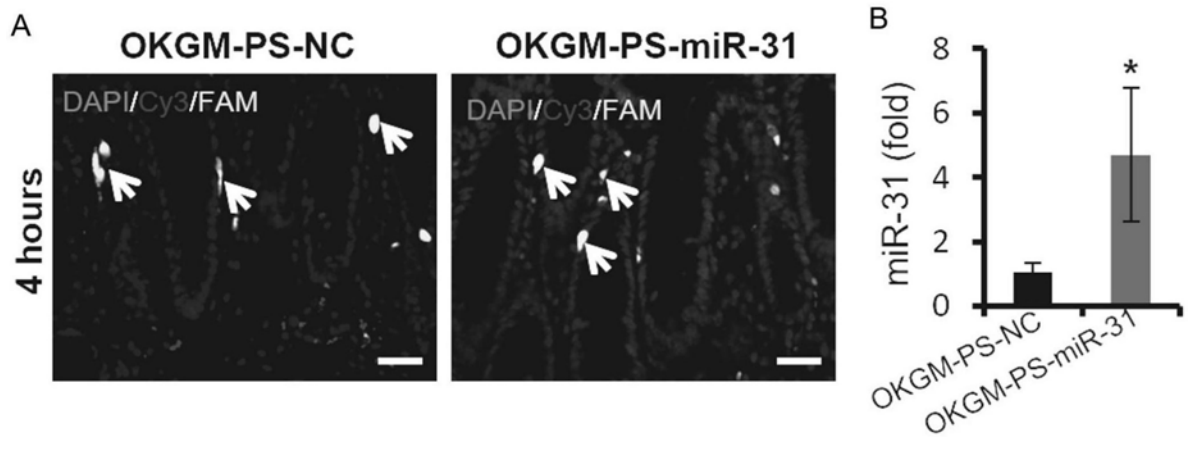


图4

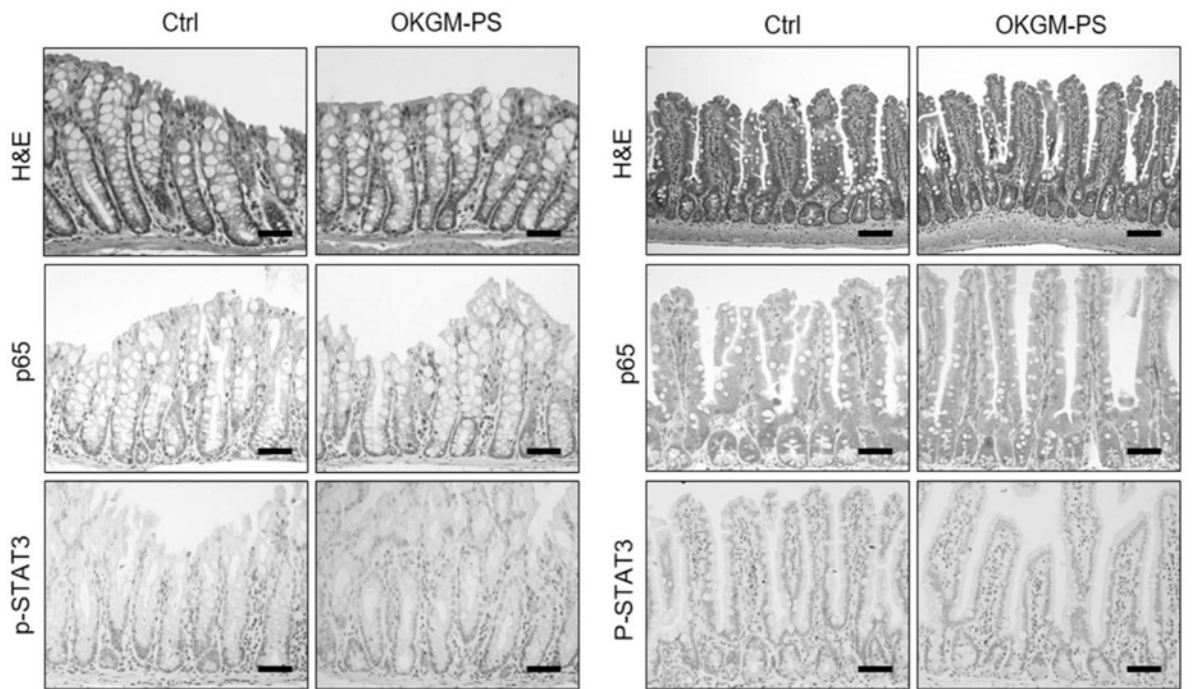


图5

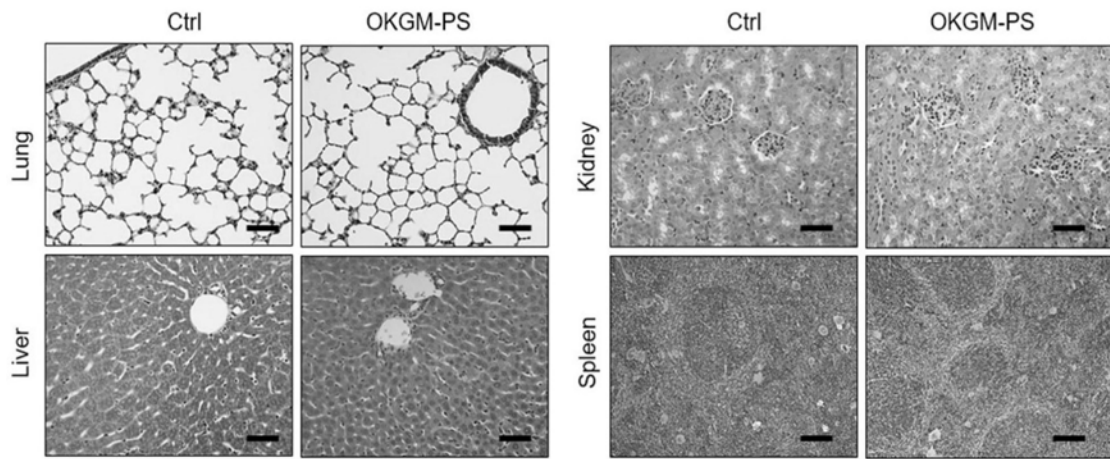


图6

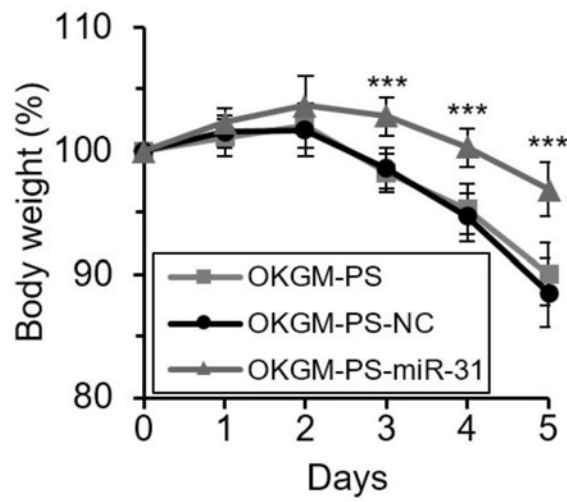


图7

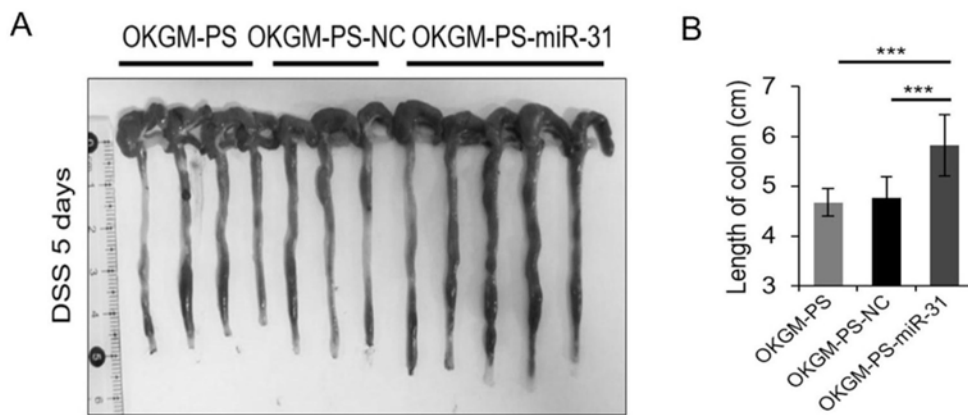


图8

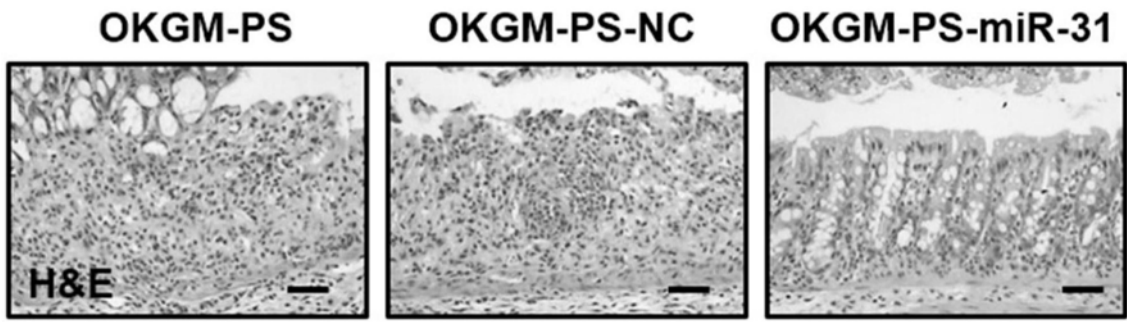


图9

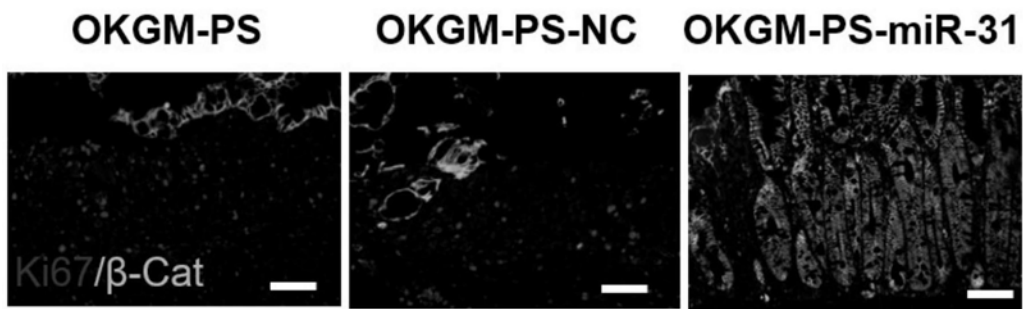


图10

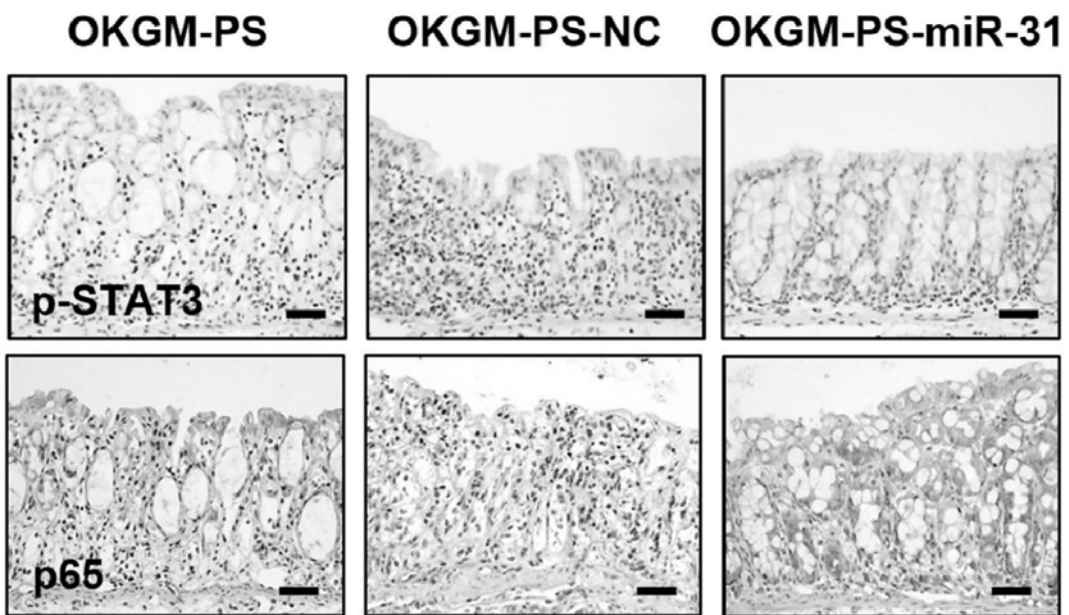


图11

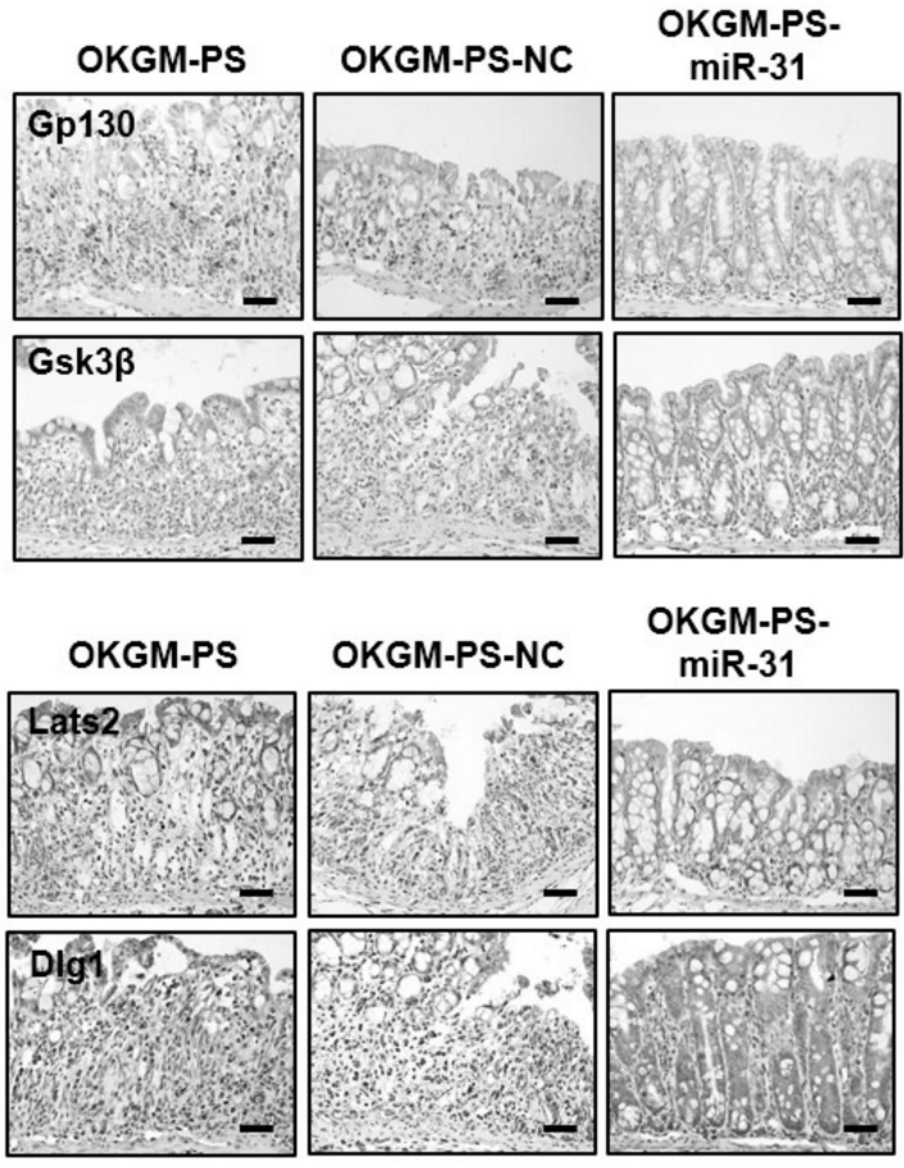


图12

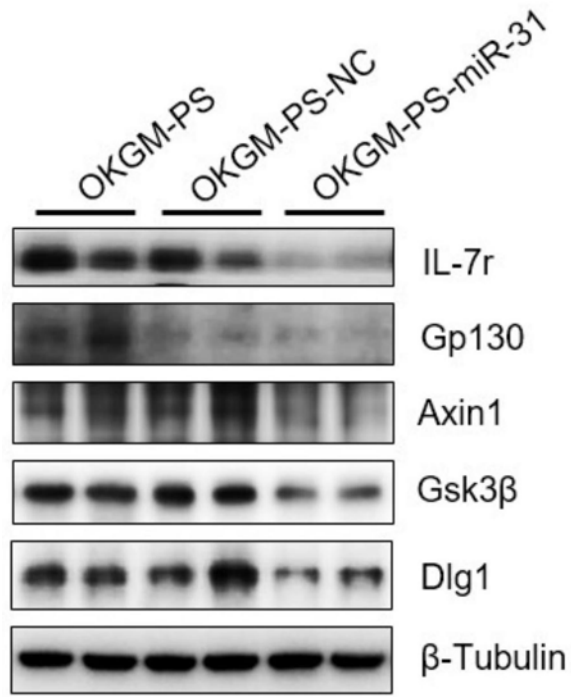


图13

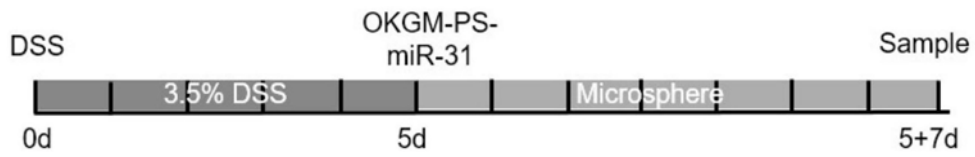


图14

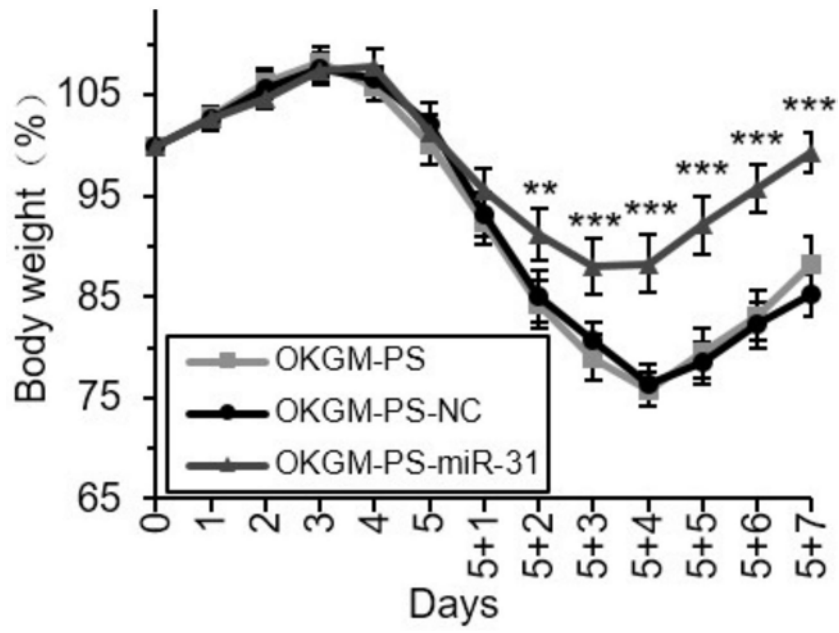


图15

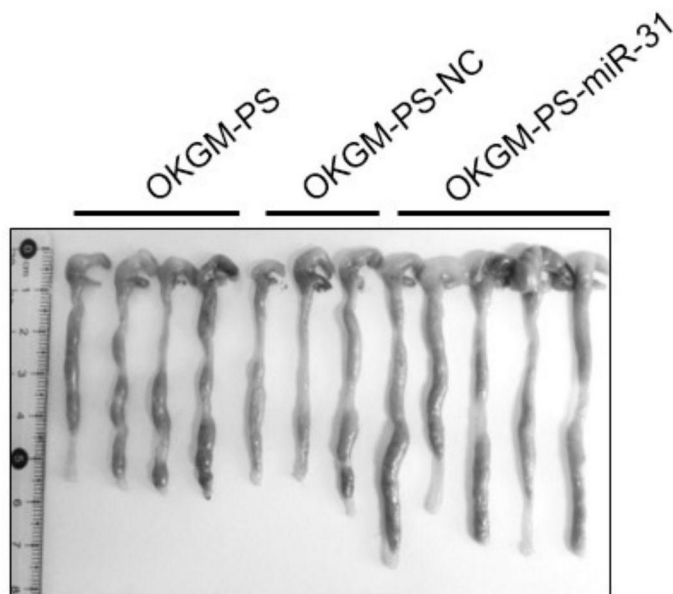


图16

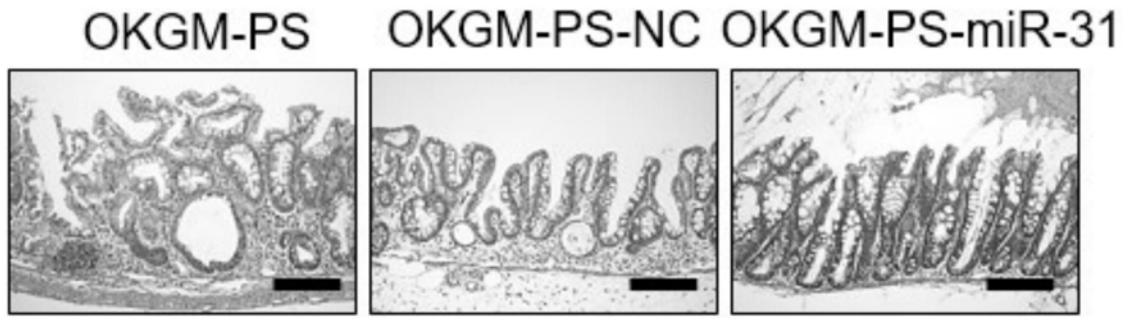


图17

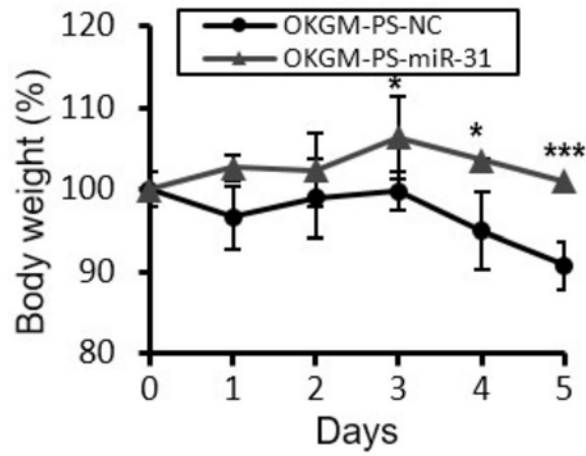


图18

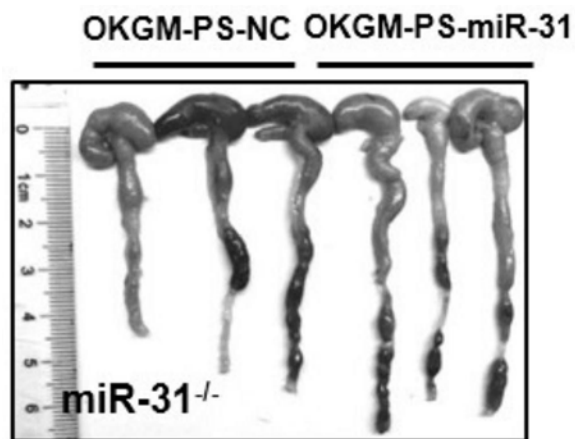


图19



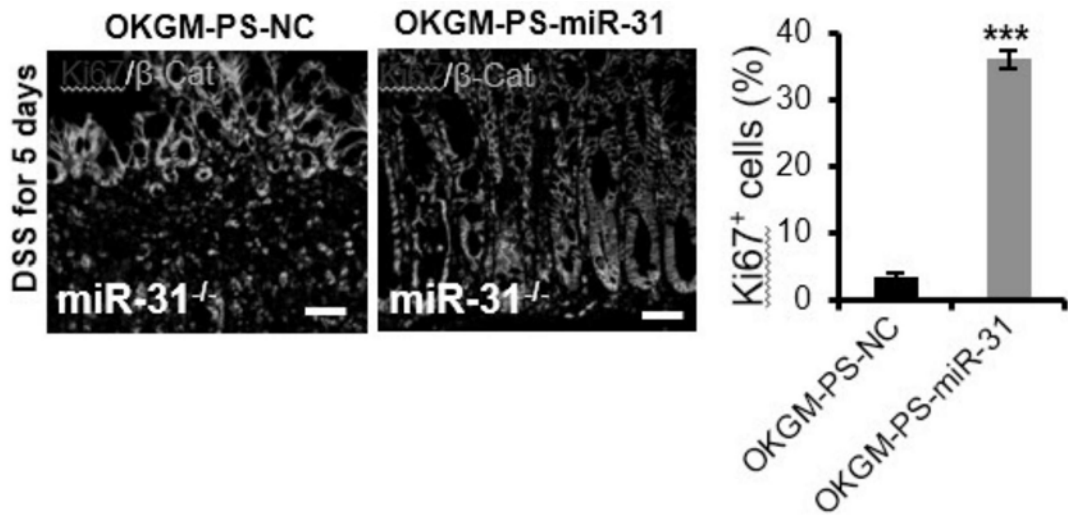


图20

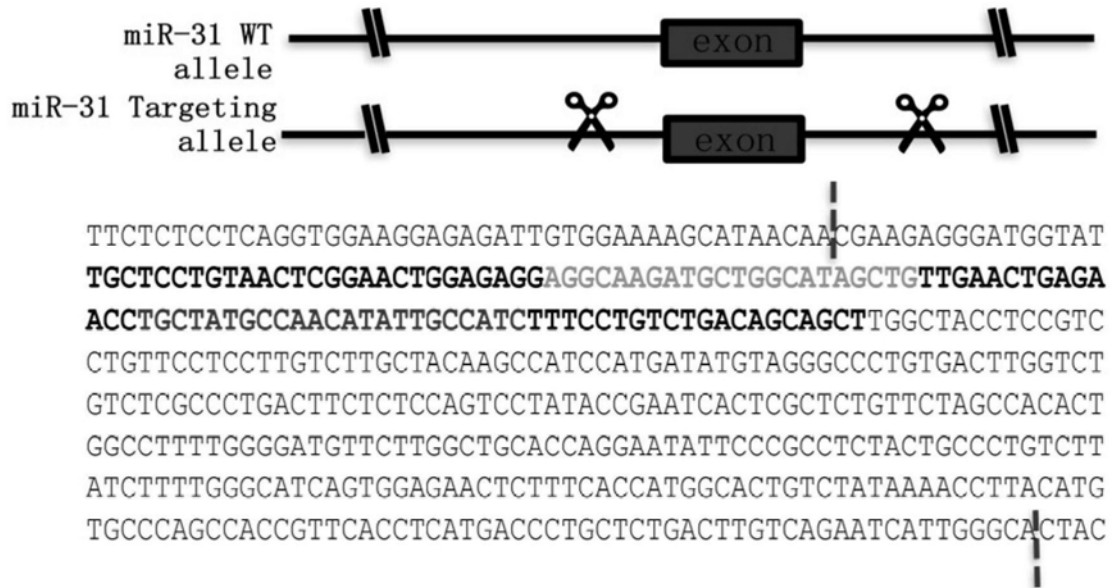


图21

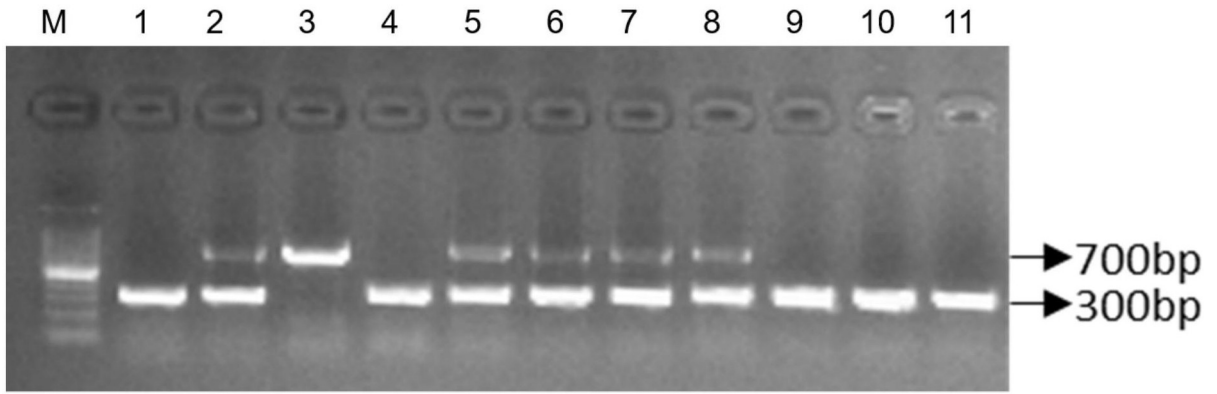


图22