



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108524534 A

(43)申请公布日 2018.09.14

(21)申请号 201810489580.3

(22)申请日 2018.05.21

(66)本国优先权数据

201810459841.7 2018.05.15 CN

(71)申请人 南京市儿童医院

地址 210008 江苏省南京市鼓楼区广州路72号

(72)发明人 李树珍 张爱华 贾占军 公伟  
于婧 夏薇薇 于晓文 杨运文

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 楼高潮

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

A61P 9/12(2006.01)

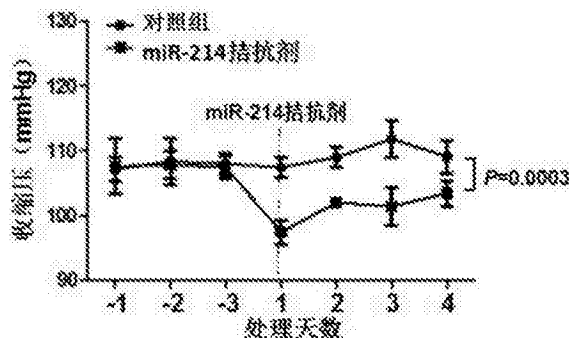
权利要求书1页 说明书5页  
序列表1页 附图6页

(54)发明名称

miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用

(57)摘要

本发明公开了miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用。该应用以依据miR-214拮抗剂及其类似物可通过与体内的成熟miR-214强竞争性结合,阻止miR-214与其靶基因mRNA的互补配对,抑制miR-214发挥作用,进而提高一氧化氮合酶的表达,从而实现降血压的效果。与现有技术相比,miR-214拮抗剂及其类似物降压效果明显,无明显副作用。



1. miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用。
2. 根据权利要求1所述的miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用,其特征在于,所述高血压由血管紧张素 II 诱导引起。
3. 根据权利要求1所述的miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用,其特征在于,所述产品为药物。
4. 根据权利要求1所述的miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用,其特征在于,所述miR-214拮抗剂的序列为5' ACUGCCUGUCUGUGCCUGCUGU 3'。
5. 一种治疗高血压的药物,其特征在于,活性成分为miR-214拮抗剂及其类似物。

## miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用。

[0002]

### 背景技术

[0003] 高血压是最常见的慢性病,也是心脑血管病最主要的危险因素。以往的调查资料表明,中国高血压的患病率和绝对数正在快速增长,且只有28.8%的人血压可得到有效控制。因此,如何有效治疗并防治高血压是目前的热点问题之一。高血压患者除了进行非药物干预外,各类降压药的产生无疑可有效控制患者血压。常见降压药有六大类,包括利尿剂, $\beta$ -受体阻滞剂,钙拮抗剂,血管紧张素转换酶抑制剂,血管紧张素II受体拮抗剂及 $\alpha$ -受体阻滞剂。但降压药物在治疗过程中产生的副作用却限制了其广泛应用,如钙拮抗剂(二氢吡啶类地平等)疗效迅速,强力,且疗效个体差异小,但会引起患者心动过速,足踝水肿,头痛,眩晕等,个别患者会有恶心,胃部不适,过敏反应等。因此,如何避免毒副作用及需找新的高血压药物,是目前亟待解决的关键问题。

[0004] 研究发现,高血压的发生与血管内皮细胞功能紊乱存在着密切的关系。血管内皮细胞是介于血流和血管壁组织之间的一层单核细胞,可通过自分泌、内分泌、旁分泌三种途径分泌一系列NO、PGI<sub>2</sub>、ET-1等血管活性物质发挥调节血管紧张性、抗血栓形成、抑制平滑肌细胞增殖及血管壁炎症反应等功能。NO是内皮细胞产生最重要的舒血管因子,由内皮细胞的NO合酶(eNOS)作用于L-精氨酸产生,NO可扩散至血管壁平滑肌细胞激活鸟氨酸环化酶,介导cGMP调控的血管舒张。不仅如此,NO还具有抑制血小板聚集、抑制单核细胞粘附于内皮细胞、抑制平滑肌细胞增殖等作用。然而血管内皮在受到一系列有害因素作用时,内皮细胞释放的舒血管因子减少,缩血管因子增多,打破血管平衡稳态。原发性高血压患者几乎都有血管内皮损伤,虽然内皮损伤与高血压孰因孰果尚未明确,但目前的研究结果倾向于认为高血压患者内皮受损继发于高血压。血压急剧升高损害内皮细胞,使内皮细胞释放NO减少,NO生物利用度降低。

[0005] 微小RNA(microRNA, miRNA)为体内分泌,因其在多组织、多器官中广泛表达,参与血液循环,且可同时对多个靶点进行有效调控,目前已成为各领域的研究热点。miRNAs在肾脏和心血管系统中的调控作用已得到广泛关注。业已证实miRNAs参与调控心肌肥厚、动脉粥样硬化、心力衰竭以及先天性心脏病等。目前的研究发现人体有2000多种成熟的miRNAs,调控约60%的mRNAs表达和翻译。

[0006] 近年来研究发现,miR-214多与恶性肿瘤相关,且miR-199a/miR-214聚合体通过靶向E-Cadherin及Claudin-2促进高糖诱导的腹膜纤维化,此外,miR-214的调节异常还会导致缺氧性肺动脉高压,但其在系统性高血压中机制仍不明确。

[0007]

### 发明内容

[0008] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用。

[0009] miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用。

[0010] 作为改进的是,所述高血压由血管紧张素II诱导引起。

[0011] 作为改进的是,所述产品为药物。

[0012] 作为改进的是,所述miR-214拮抗剂的序列为5' ACUGCCUGUCUGUGCCUGCUGU 3'。

[0013] 一种治疗高血压的药物,活性成分为miR-214拮抗剂及其类似物。

[0014] 上述miR-214拮抗剂的类似物可通过与体内的成熟miR-214强竞争性结合,阻止miR-214与其靶基因mRNA的互补配对,抑制miR-214发挥作用。

[0015] 有益效果:

我们的研究表明,给予C57BL/6小鼠腹腔注射miR-214拮抗剂可显著降低小鼠收缩压(7-8 mmHg),这对于正常生理状态下的小鼠机体机能影响不大。而给予血管紧张素II处理后的C57BL/6小鼠注射miR-214拮抗剂,可显著降低小鼠收缩压(20-30 mmHg),降压幅度明显高于生理状态。此外,给予血管内皮细胞条件性miR-214敲除小鼠血管紧张素II(AngII)处理,发现miR-214敲除小鼠(miR-214<sup>f1/f1</sup>;Tek-Cre)的血压显著低与对照鼠(miR-214<sup>f1/f1</sup>)。这与给予C57BL/6小鼠腹腔注射miR-214拮抗剂的效果一致。同时,无论给予miR-214拮抗剂还是血管内皮细胞条件性miR-214敲除小鼠的主动脉中eNOS的水平均显著升高。此外,高血压病人血清中miR-214的水平也显著高于正常对照组(如图11所示)。因此,miR-214可能通过靶向一氧化氮合酶(eNOS)降低小鼠血压,是一种治疗高血压的有效手段,从而为后期研发相关制备高血压药物提供可能。与现有技术相比,miR-214拮抗剂及其类似物可以降血压,说明miR-214拮抗剂具有降血压的作用;血管内皮条件性敲除miR-214可显著降低血管紧张素II诱导的高血压,且血压的降低可能通过调控eNOS的表达升高介导。

[0016]

### 附图说明

[0017] 图1为腹腔注射mir-214拮抗剂后C57BL/6小鼠血压变化情况;

图2为对已进行血管紧张素II处理的C57BL/6小鼠腹腔注射mir-214拮抗剂后,C57BL/6小鼠血压变化情况;

图3为血管内皮条件性miR-214敲除小鼠收缩压的变化情况;

图4为给予miR-214拮抗剂处理后C57BL/6小鼠主动脉miR-214的相对表达量的变化情况;

图5为给予miR-214拮抗剂处理后C57BL/6小鼠主动脉总eNOS的mRNA表达量的变化情况;

图6为给予miR-214拮抗剂处理后C57BL/6小鼠主动脉磷酸化及总eNOS的蛋白表达量的变化情况,其中,1-对照组,2-miR-214拮抗剂;

图7为对已进行血管紧张素II处理的C57BL/6小鼠腹腔注射mir-214拮抗剂后,小鼠主

动脉磷酸化及总eNOS的蛋白表达量的变化情况,其中,3-给予血管紧张素II,4-给予血管紧张素II和miR-214拮抗剂;

图8为血管内皮细胞条件性敲除miR-214后小鼠主动脉miR-214的表达量的变化情况;

图9为血管内皮细胞条件性敲除miR-214后小鼠主动脉总eNOS的mRNA表达量的变化情况;

图10为血管内皮细胞条件性敲除miR-214后小鼠主动脉磷酸化及总eNOS的蛋白表达量的变化情况,其中,5-对照组,6-miR-214敲除小鼠;

图11为高血压病人血清中miR-214的表达水平显著高于正常对照组。

[0018]

## 具体实施方式

[0019] 下面结合具体实例对本发明的发酵方法进行详细描述和说明。其内容是对本发明的解释而非限定本发明的保护范围。

[0020] 主要仪器及试剂:

小动物无创血压分析系统(BP-2000-M6-R4,Visitech Systems,美国);ABI Prism 7500型荧光定量PCR仪(Applied Biosystems,美国);血管紧张素II(sigma,美国),miR-214拮抗剂(吉玛,上海);Trizol(Invitrogen);SYBR Prime Script RT-PCR kit(TaKaRa)。总的eNOS抗体购自Abcam (Cat.#ab73980);p-eNOS(Ser1179 Cat.# 9574)购自CST (Danvers, MA)。

[0021] 实验动物:

取8周龄C57BL/6小鼠(南京模式动物研究所提供)各8只,分为两组。miR-214<sup>f1/f1</sup>小鼠由南京模式动物研究所引进,Tek-Cre转基因小鼠则由美国Jackson公司引进。血管内皮细胞条件性 miR-214基因敲除小鼠模型(miR-214<sup>f1/f1</sup>;Tek-Cre)已经成功制备。取8周龄对照组(miR-214<sup>f1/f1</sup>)和miR-214基因敲除小鼠(miR-214<sup>f1/f1</sup>;Tek-Cre)各8只,分为两组。

[0022] 统计学方法:实验数据用均数±标准误表示。用SPSS11.5统计软件,以t检验分析各组之间的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

[0023]

### 实施例1

取8周龄C57BL/6小鼠,分为两组,经血压监测训练后,记录小鼠尾部收缩压3天左右后,腹腔注射miR-214拮抗剂(10mg/kg),于次日进行血压测定。

[0024] 结果如图1所示,给予miR-214拮抗剂的小鼠血压明显低于对照组,且以第一天的结果尤为明显,经过时间的推迟,实验组小鼠血压逐渐升高,四天后与对照组接近,说明miR-214拮抗剂的效果可以持续四天左右。图中,(-1)-(-3)天表示未注射miR-214拮抗剂时小鼠的基础血压数值。

[0025]

### 实施例2 miR-214拮抗剂对AngII诱导的高血压模型的影响

取8周龄C57BL/6小鼠,分为两组,经血压监测训练后,记录小鼠尾部收缩压4天左右后,制备AngII诱导的高血压模型。小鼠用3%戊巴比妥麻醉后,将14天AngII缓释渗透性微型真空泵(1.4mg/kg/d)植于两侧肩胛骨中间的皮下区域,并进行缝合,于次日进行血压监测。给

泵3天后腹腔注射miR-214拮抗剂(10mg/kg),次日进行血压测定。其中每4天给予miR-214拮抗剂腹腔注射一次。

[0026] 结果如图2所示,给予miR-214拮抗剂的小鼠血压明显低于对照组(即仅给予血管紧张素II),且以第一天的结果尤为明显,经过时间的推迟,实验组小鼠血压逐渐升高,四天后与对照组接近,说明miR-214拮抗剂的效果可以持续四天左右。图中,(-1)-(-4)天表示未给予miR-214拮抗剂及AngII时小鼠的基础血压数值。

[0027]

#### 实施例3 血管内皮条件性敲除miR-214对AngII诱导的高血压模型的影响

取已经进行血压监测训练的8周龄血管内皮细胞条件性敲除miR-214的小鼠(miR-214<sup>f1/f1</sup>;Tek-Cre),制备AngII诱导的高血压模型,用miR-214<sup>f1/f1</sup>小鼠制备的高血压模型作对照组。小鼠用3%戊巴比妥麻醉后,将14天AngII缓释渗透性微型真空泵(1.4mg/kg/d)植于两侧肩胛骨中间的皮下区域,并进行缝合,于次日进行血压监测。

[0028] 利用BP2000血压分析系统对小鼠进行血压监测,所有的小鼠需在血压分析仪上适应至少一周后方可进行血压测定。在测定过程中,设定仪器参数为三个循环,每个循环重复15次。每只小鼠一天只能测定一次,且至少测定三天方可为有效数据。

[0029] 结果如图3所示,次日两组小鼠的血压均大幅升高,但与对照组相比,敲除miR-214的小鼠血压升高的幅度低于对照组(对照组小鼠升高30mmHg左右,敲除miR-214的小鼠血压升高10mmHg左右),且随时间推移,对照组小鼠的血压仍有不断升高的趋势,而敲除miR-214组的小鼠血压基本维持在同一水平线(130mmHg左右)。最终造模13天后,由于AngII的含量下降致使两组小鼠的血压呈下降趋势。图中,(-1)-(-4)天表示未给予AngII时小鼠的基础血压数值。

[0030]

#### 实施例4

小鼠用3%的戊巴比妥麻醉后立即处死,并分离胸腹主动脉置于冰上,显微镜下将血管周围结缔组织等剥离,取呈透明状的血管,加入Trizol(TaKaRa)抽提组织总RNA。采用ABI Prism 7500型荧光定量PCR仪进行扩增。

[0031] miR-214定量PCR的引物试剂盒Bulge-loop<sup>TM</sup> miRNA qRT-PCR Primer Sets由广州锐博设计合成(锐博,广州)。

[0032] eNOS上游引物:5'-CGTCCTGCAAACCGTGCAGA-3',

下游引物:5'-TCCTGG GTGCGCAATGTGAG-3';

GAPDH上游引物:5'-GTCTTCACTACCATGGAGAAGG-3',

下游引物:5'-TCATGGATGACCTTGGCCAG-3'。

[0033] PCR反应条件:95℃预变性10分钟,95℃变性15秒,60℃延伸1分钟,共40个循环;每例样品均设3个平行复孔取均值。依据荧光(SYBR Green)反应曲线应用 $\Delta$ Ct法分析样本目的基因与内参基因(U6或GAPDH)表达的差异,其中Ct值为每个反应管内荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数, $\Delta$ Ct为目的基因Ct值与内参基因(U6或GAPDH)Ct值的差值。根据理想状态PCR呈线性扩增的原理,采用 $2^{-\Delta$ Ct计算目的基因表达相对于内参照基因变化的倍数。

[0034] 小鼠血压测定结束后,取材小鼠胸腹主动脉进行总mRNA的提取,并逆转录为cDNA,

利用ABI Prism 7500型荧光定量PCR仪进行扩增。从图4和图5中可以看出miR-214拮抗剂降低miR-214表达水平的同时,可显著提高总eNOS的表达水平,从图8和图9中可以看出,血管内皮细胞条件性敲除miR-214小鼠的主动脉中总eNOS的表达水平明显低于对照组。

[0035]

#### 实施例5

小鼠用3%的戊巴比妥麻醉后立即处死,并分离胸腹主动脉置于冰上,显微镜下将血管周围结缔组织等剥离,取呈透明状的血管加入RIPA裂解液,分离蛋白,变性后备用。上样于8%聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE电泳,300mA恒流1.5小时。封闭液(0.01%正丁醇,0.02% Tween,5%脱脂奶粉,0.02%叠氮钠w/v)封闭PVDF膜2小时,TBST封闭1h,结合I抗(GAPDH单克隆抗体,浓度为1:2000;eNOS单克隆抗体,浓度为1:500;p-eNOS抗体,浓度为1:500),4℃过夜,TBST漂洗3次,滴加辣根酶标记的羊抗兔IgII抗(1:2000)室温孵育1h,TBST漂洗3次,并显影。

[0036] 取呈透明状的血管加入RIPA裂解液,分离蛋白,变性后跑SD-PAGE胶。从图6和图7中可以看出,miR-214拮抗剂可增加C57BL/6小鼠主动脉血管磷酸化及总eNOS的蛋白表达水平,此外,图10显示血管内皮条件性敲除miR-214小鼠主动脉血管中磷酸化及总eNOS的水平也呈增加趋势,说明miR-214增加了总eNOS表达水平,进而增加了eNOS的磷酸化水平。

## 序列表

<110> 南京市儿童医院

<120> miR-214拮抗剂在制备治疗高血压产品中的应用

<160> 5

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

cgtcctgcaa accgtgcaga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

tcttgggtgc gcaatgtgag 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

gtcttcaacta ccatggagaa gg 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

tcatggatga ccttggccag 20

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

acugccuguc ugugccugcu gu 22



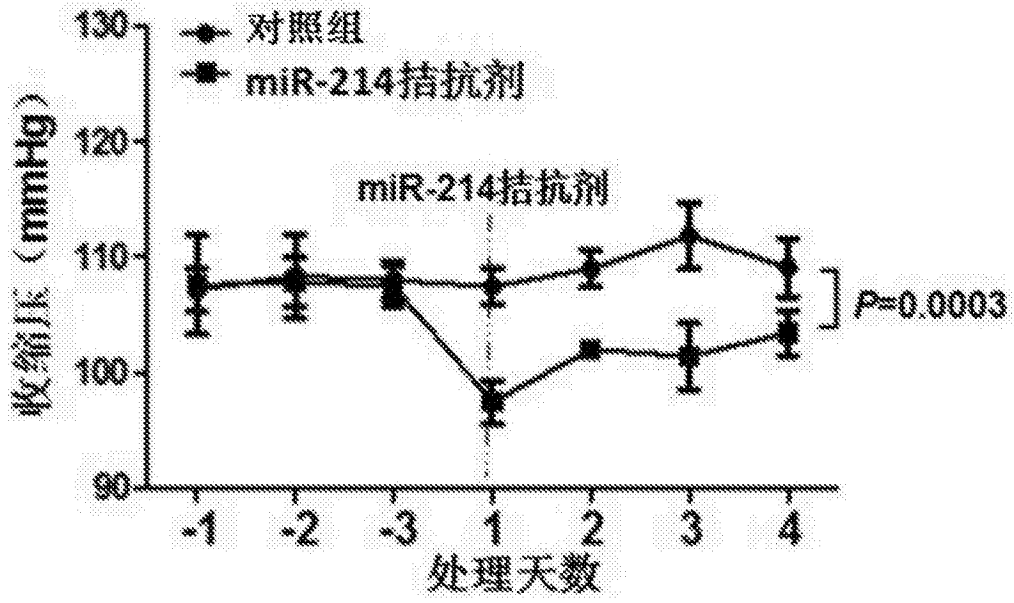


图1

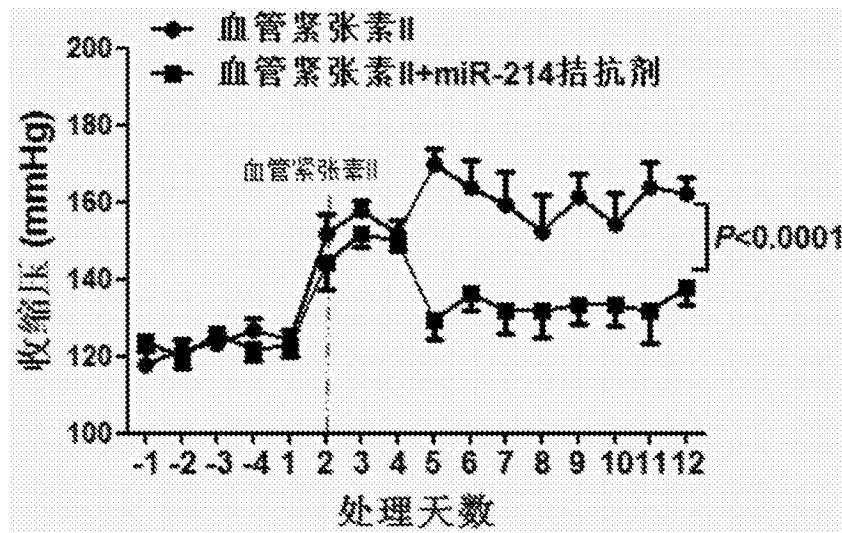


图2

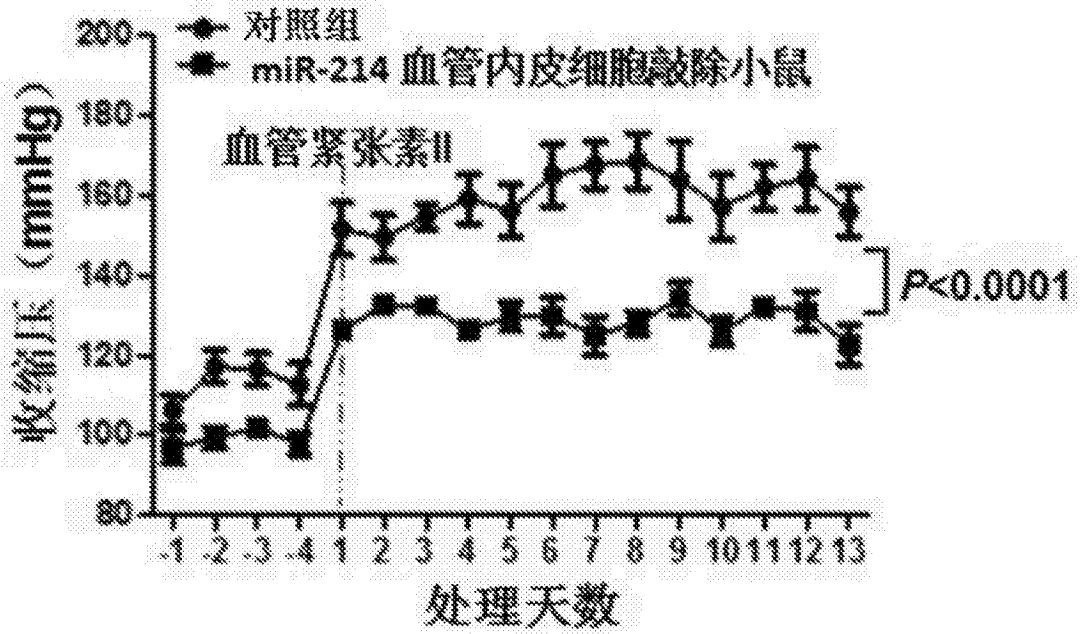


图3

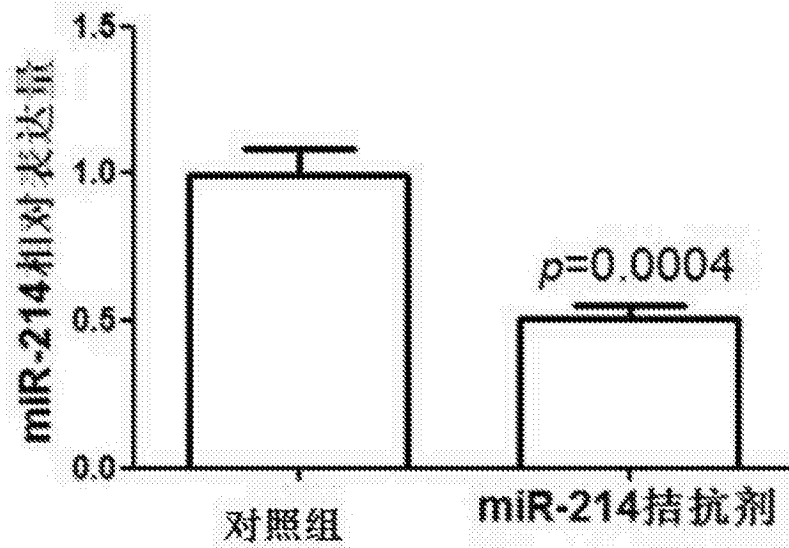


图4

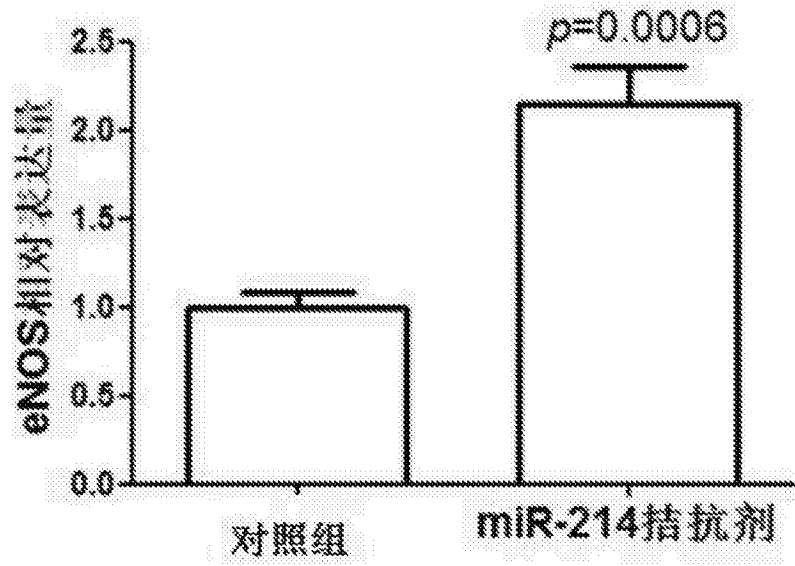


图5

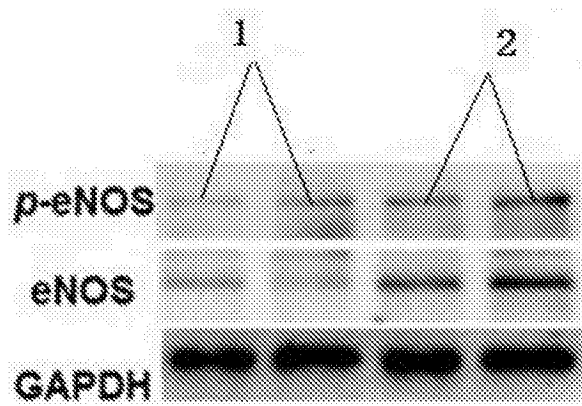


图6

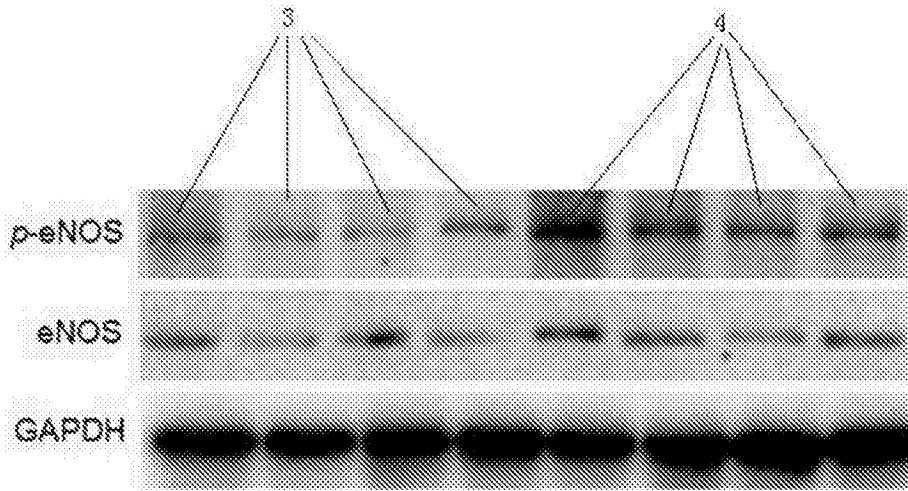


图7

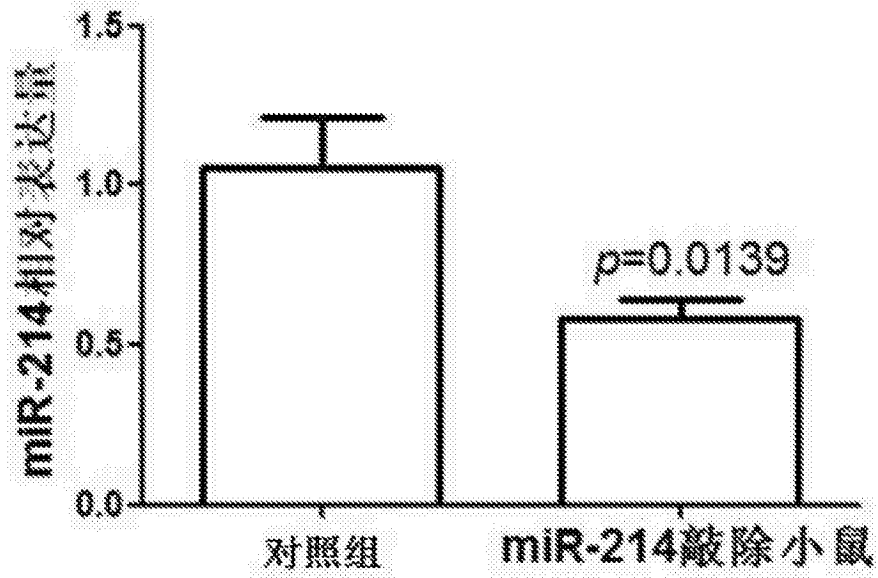


图8

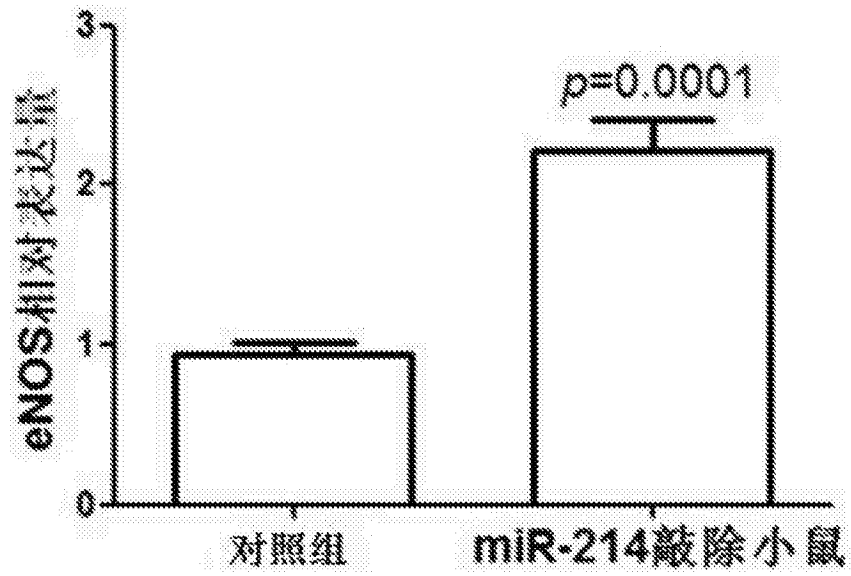


图9

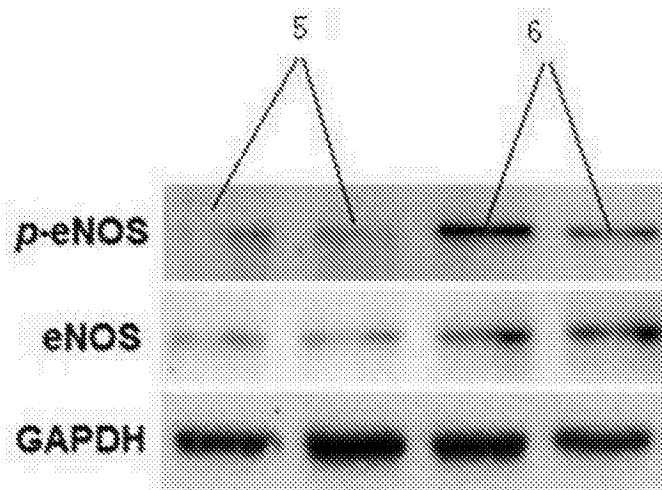


图10

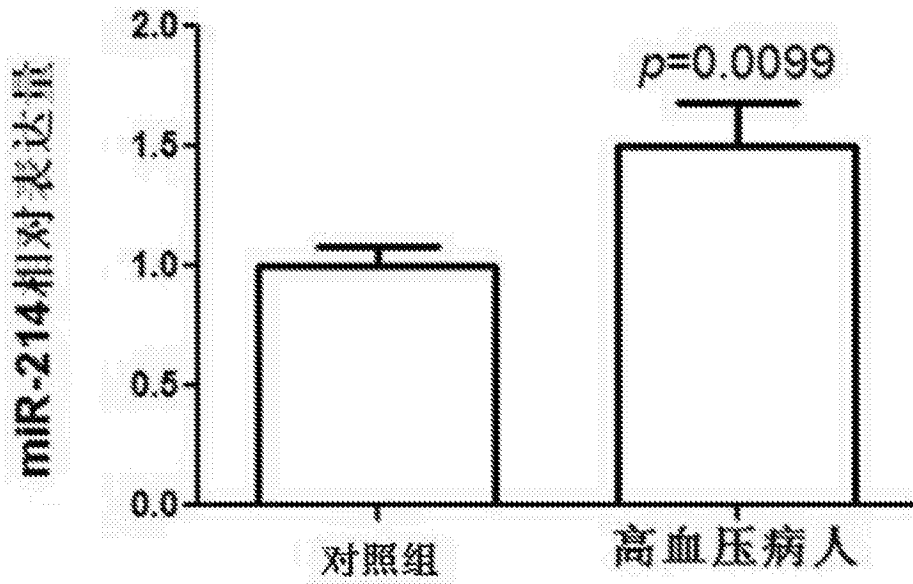


图11