



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107625781 B

(45)授权公告日 2020.05.22

(21)申请号 201710943202.3

(22)申请日 2017.10.11

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107625781 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(73)专利权人 苏州大学  
地址 215137 江苏省苏州市相城区经济学路8号

(72)发明人 陈维倩 沈振亚 肖亦敏

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 孙周强 陶海锋

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 105925677 A,2016.09.07,  
CN 104988151 A,2015.10.21,  
CN 102895671 A,2013.01.30,

审查员 陈振中

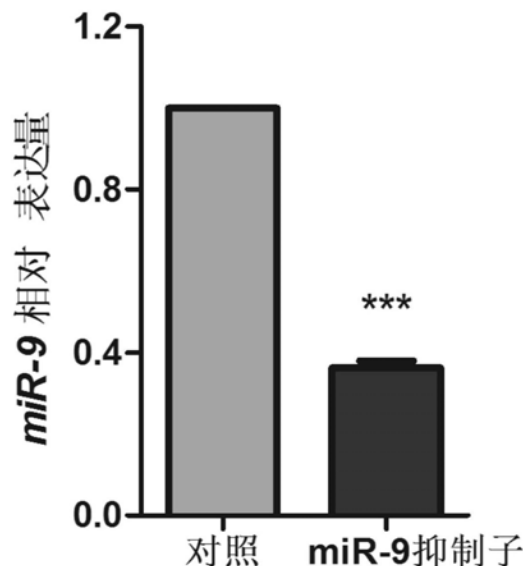
权利要求书1页 说明书5页  
序列表1页 附图8页

(54)发明名称

miRNA抑制子在制备防治心肌梗死药物中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种miRNA抑制子在制备防治心肌梗死药物中的应用。本发明针对心肌梗死首次利用miRNA-9抑制子,参见实施例,miR-9抑制子经心肌直接注射可显著降低心脏miR-9表达量,对急性心梗周边区注射miR-9抑制子,能有效改善梗死后心功能、降低心梗面积、梗死周边区炎症水平和ROS堆积程度,可用于心肌梗死的预防和治疗,取得了意想不到的技术效果。



1. miRNA抑制子在制备防治心肌梗死药物中的应用;所述miRNA抑制子为miR-9抑制子;所述miRNA抑制子为SEQ ID NO:1序列的核酸;

SEQ ID NO:1:UCAUACAGCUAGAUAAACCAAAGA。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:miRNA抑制子用于减轻缺血缺氧H9c2细胞ROS堆积。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:miRNA抑制子用于降低缺血缺氧H9c2细胞凋亡。

## miRNA抑制子在制备防治心肌梗死药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种miRNA抑制子在制备防治心肌梗死药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 心肌梗死是一种严重危害人类健康的心血管疾病,随着我国人民生活水平的不断提高,缺血性心肌梗死的发病率也在不断上升。缺血性心肌梗死会导致心肌细胞坏死和瘢痕形成,进而影响心脏功能,特别是冠状动脉粥样硬化性心脏病的最严重临床类型——急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction,AMI)。目前药物或器械治疗大多只能缓解症状,但却不能逆转心脏组织损伤。心脏移植虽能彻底改善心脏状态,但因供体来源稀缺、免疫排斥以及昂贵的治疗费用等因素,在临床上很难广泛应用。随着人类基因组计划完成和基因芯片技术的发展,许多单基因疾病的致病基因被发现,并应用到疾病的诊断与治疗当中。而AMI作为一种受多种遗传与环境因素影响的疾病,遗传学在AMI发病中的作用仍未明确。具体是哪些基因,通过何种细胞过程,有哪些通路参与了AMI过程尚未明确。

[0003] MicroRNA(miRNA)是一类高度保守的、内源性、长度约为22个核苷酸的非编码小RNA,主要通过和靶基因mRNA 3'非编码区域(3' untranslated region,3' UTR)完全或不完全互补配对来抑制mRNA翻译或促进其降解从而调控靶基因表达。目前已经发现超过1000个miRNA,每个miRNA参与靶向数百个基因;与此同时,一个基因也受到多个miRNA调节,因此,miRNA-mRNA构成一个复杂的调控模式网。miRNA参与心血管疾病的多种病理生理过程,包括心肌损伤、心室重构和心肌再生等。目前,miRNA的研究已经成为心血管领域的研究热点。目前研究发现许多miRNA通过调控凋亡相关靶蛋白的表达而参与细胞凋亡的发生,这些miRNA有促凋亡的,也有抑凋亡的。

### 发明内容

[0004] 本发明公开了一种新的预防和治疗心肌梗死的药物,能有效改善梗死后心功能、降低心梗面积、梗死周边区炎症水平和ROS堆积程度,具有极其重要的意义和应用前景。

[0005] 本发明采用如下技术方案:miRNA抑制子在制备防治心肌梗死药物中的应用;所述miRNA抑制子能够降低心脏miRNA表达量。

[0006] 进一步的,本发明的miRNA抑制子为miR-9(miRNA-9)抑制子;进一步优选的,所述miRNA抑制子为包含以下SEQ ID NO:1序列的核酸或者其生物活性功能片段或变体:

[0007] SEQ ID NO:1:UCAUACAGCUAGAUAAACCAAGA

[0008] 目前关于miR-9的报道主要集中于肿瘤、恶性血液系统和神经系统等疾病;最近有报道称miR-9通过直接靶向降低myocardin表达而抑制心肌肥厚并改善心脏功能,myocardin生理条件下仅少量表达,但在心肌肥厚时被强烈激活;另外,miR-9也可以通过靶向ELAVL1抑制高糖诱导的心肌细胞死亡。到目前为止,还没有任何报道提及miR-9与心肌梗死的关系。本发明针对心肌梗死首次利用miR-9抑制子,参见实施例,miR-9抑制子经心肌直

接注射可显著降低心脏miR-9表达量,对急性心梗周边区注射miR-9抑制子,能有效改善梗死后心功能、降低心梗面积、梗死周边区炎症水平和ROS堆积程度,可用于心肌梗死的预防和治疗,取得了意想不到的技术效果。

[0009] 本发明还公开了一种防治心肌梗死的药物,包括miRNA抑制子,优选miRNA抑制子为miR-9抑制子;进一步优选的,所述miRNA抑制子为包含以下SEQ ID NO:1序列的核酸或者其生物活性功能片段或变体:

[0010] SEQ ID NO:1:UCAUACAGCUAGAUAAACCAAGA

[0011] 进一步的,本发明的防治心肌梗死的药物,还包括药学上可接受的病毒、载体或辅料;所述药学上可接受的载体或辅料选自壳聚糖、胆固醇、脂质体、纳米颗粒、分散介质、转染试剂等,其中纳米颗粒是一种人工制造的、大小不超过100 纳米的微型颗粒,可能是乳胶体、聚合物、陶瓷颗粒、金属颗粒或者碳颗粒,病毒可以为腺相关病毒等。

[0012] 进一步的,本发明药物的给药方式为口服给药或注射给药;比如,所述注射给药方式选自静脉注射、肌肉注射、冠状动脉内注射或者心肌注射。

[0013] 本发明还公开了一种防治心肌梗死的药物的制备方法,将miRNA抑制子与其他物质组合,得到防治心肌梗死的药物;所述其他物质包括药学上可接受的病毒、载体或辅料;所述药学上可接受的载体或辅料选自壳聚糖、胆固醇、脂质体、纳米颗粒、分散介质、转染试剂等,其中纳米颗粒是一种人工制造的、大小不超过100 纳米的微型颗粒,可能是乳胶体、聚合物、陶瓷颗粒、金属颗粒或者碳颗粒,病毒可以为腺相关病毒等,分散介质可以为缓冲液等。

[0014] 优选miRNA抑制子为miR-9抑制子;进一步优选的,所述miRNA抑制子为包含以下SEQ ID NO:1序列的核酸或者其生物活性功能片段或变体:

[0015] SEQ ID NO:1:UCAUACAGCUAGAUAAACCAAGA

[0016] 本发明进一步公开了上述防治心肌梗死的药物在制备用于防治心肌梗死药物中的应用。

[0017] 进一步的,本发明还公开了检测miR-9的制剂在制备诊断心肌梗死试剂中的应用,检测miR-9的制剂为现有产品,比如QPCR检测相关制剂。本发明首次公开了miR-9与心肌梗死的关系并提出来新的防治方案,根据实施例的记载,QPCR检测心肌miR-9表达水平,给予miR-9抑制子降低心脏miR-9含量;心梗术后7天检测心功能,miR-9抑制子显著改善心梗后心功能,射血分数和短轴缩短率均有显著改善;以Masson染色观察各组心梗术后7天梗死面积,发现miR-9抑制子组的心梗面积显著低于对照组,细胞间隙的纤维化程度表现出相同趋势;可以看出,miR-9抑制子对于心肌梗死具有有效的预防和治疗价值。

[0018] 因此,本发明提供了将miR-9抑制子与适当载体或辅料如壳聚糖、胆固醇、脂质体、纳米颗粒等包装形成药物,通过口服、静脉注射、肌肉注射、冠状动脉内注射或直接心肌注射的方式,用于预防和/或治疗心肌梗死的发生。

## 附图说明

[0019] 图1为心肌注射miR-9抑制子显著降低miR-9转录表达;

[0020] 图2为miR-9抑制子改善心梗后心功能(M型超声图);

[0021] 图3为miR-9抑制子促进心梗后EF和FS指标恢复;

- [0022] 图4为miR-9抑制子缩小梗面积；  
[0023] 图5为miR-9抑制子减弱细胞间隙纤维化程度；  
[0024] 图6为miR-9抑制子降低梗周边区炎症水平；  
[0025] 图7为miR-9抑制子缓解梗周边区ROS堆积；  
[0026] 图8为miR-9抑制子减轻缺血缺氧处理H9c2细胞的ROS堆积；  
[0027] 图9为miR-9抑制子促进缺血缺氧处理H9c2细胞的生存；  
[0028] 图10为miR-9类似物促进缺血缺氧处理H9c2细胞凋亡。

### 具体实施方式

[0029] 以下参照具体的实施例以及附图来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

[0030] 所使用的主要材料和来源分别如下：

[0031] C57BL/6J小鼠(昭衍(苏州)新药研究中心提供,此实验由苏州大学伦理委员会批准;小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司,上海);水合氯醛(苏州大学附属第一医院自制,苏州);手术器械(六六视觉公司,苏州);缝合针线(上海浦东金环医疗用品有限公司,上海);转染试剂Dharmafect Duo(Thermo公司,美国);实时荧光定量PCR仪(ABI Stepone Plus);微量分光光度计(Nanodrop2000);小动物超声影像系统(Visual Sonics Vevo 2100);组织化学染色试剂(索莱宝公司,北京);正置荧光显微镜(Olympus, BX51);倒置荧光显微镜(Olympus, IX51);DHE(碧云天,上海);CD68抗体(Abcam);转染试剂Lipofectamine2000(Life公司,美国);DCFH-DA染色试剂盒(碧云天,上海)。

[0032] miR-9抑制子序列为SEQ ID NO:1:UCAUACAGCUAGAUACCAAAGA,由苏州吉玛基因股份有限公司合成。

[0033] 实施例1:心肌注射miR-9抑制子制剂有效降低心脏miR-9含量

[0034] 1、在体心肌注射miR-9抑制子并验证心脏miR-9表达水平

[0035] 选用25g左右的C57BL/6J雄性小鼠为实验对象,在左心室选择两个位点注射miR-9抑制子和Dharmafect Duo混合制剂,以antagomir NC作为阴性对照。每只小鼠注射的混合制剂包括60 μg miR-9抑制子和8 μl Dharmafect Duo;

[0036] 2、QPCR检测心脏miR-9表达水平

[0037] 按常规心脏总RNA提取、反转和QPCR,每个样品设4个复孔,反应体系为10 μl,以U6作为内参;

[0038] 参见附图1,为QPCR检测心肌miR-9表达水平图,可以看出,给予miR-9抑制子有效降低心脏miR-9含量,\*\*\* $P < 0.001$ 。

[0039] 实施例2:miR-9抑制子有效改善梗后左室射血分数(ejection fraction, EF, %)和左室短轴缩短分数(fractional shortening, FS, %)

[0040] 1、小鼠心肌梗死模型的建立

[0041] 选用25g左右的C57BL/6J雄性小鼠为实验对象,采用左冠状动脉前降支结扎法制作梗死模型。腹腔注射麻醉后,经气管插管,接空气呼吸机,呼吸频率110次/min,潮气量3ml,吸呼比1:1.3。右侧卧位,左胸纵切口切开外层皮肤,剥离胸大肌,第三、四肋间横切口开胸,暴露心脏,用镊子撕开心包膜。借助手术显微镜可见左冠状动脉大致走行。在左心耳

下缘约1~2mm处,将LAD 连同少量心肌组织一起结扎,进针深度约1mm,宽度控制在3mm以内。逐层关胸。假手术组仅穿过LAD下方不打结,其余同模型组;结扎后肉眼可见结扎处至心尖变白,1 周后取左心室组织进行心脏组织染色,可看到明显的纤维化,证明心梗模型建立成功;

[0042] 2、在体心肌注射miR-9抑制子:同实施例1;

[0043] 3、心脏超声检测心梗后心功能

[0044] 小鼠麻醉(方法同前),脱毛后左侧卧位,将心脏超声诊断仪探头置于心前壁,于乳头肌水平取左室二维短轴观,同时记录M型扫描,连续3个心动周期测量左室射血分数(EF)和缩短分数(FS);参见附图2、附图3,心梗术后7天检测心功能(图2),miR-9抑制子显著改善心梗后心功能,射血分数(图3A)和短轴缩短分数(图3B)均有显著改善;\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

[0045] 实施例3:miR-9抑制子显著缩小心肌梗死面积

[0046] 1、小鼠心肌梗死模型的建立:同实施例2;

[0047] 2、在体心肌注射miR-9抑制子:同实施例1;

[0048] 3、Masson染色:术后7天处死小鼠,取左心室组织进行心脏组织染色,观察治疗效果。按常规Masson染色步骤进行,在普通光学显微镜下观察并拍照。采用图像分析软件Image J分析各部分面积,计算心梗面积/心脏面积;

[0049] 参见附图4、附图5,以Masson染色观察各组心梗术后7天梗死面积(图4A),发现miR-9抑制子组的心梗面积显著低于对照组(图4B);细胞间隙的纤维化程度表现出相同趋势(图5),照片显示的是每组样本中的代表性图片;\* $P < 0.05$ 。

[0050] 实施例4:miR-9抑制子降低心梗周边区炎症、减少ROS堆积

[0051] 1、小鼠心肌梗死模型的建立:同实施例2;

[0052] 2、在体心肌注射miR-9抑制子:同实施例1;

[0053] 3、CD68免疫荧光:术后7天处死小鼠,心肌冰冻切片,按常规免疫荧光染色步骤进行,用抗荧光衰减封片剂封片,在荧光显微镜下观察并拍片;

[0054] 4、DHE染色:术后7天处死小鼠,取新鲜心肌组织行冰冻切片,按常规DHE染色步骤进行,用抗荧光衰减封片剂封片,在荧光显微镜下观察并拍片;

[0055] 分别以CD68标记炎症细胞,以DHE标记ROS水平,参见附图6、附图7,结果发现miR-9抑制子组心脏明显炎症水平低于对照组(图6),ROS堆积弱于对照组(图7)。

[0056] 实施例5:miR-9抑制子减轻缺血缺氧H9c2细胞ROS堆积

[0057] 1、H9c2细胞培养:大鼠心肌母细胞H9c2是源于BD1X大鼠胚胎心脏组织的亚克隆细胞株。以含10%FBS的DMEM培养,每2-3 d换一次培养液,待细胞长到70%-80%时传代培养。倒置显微镜下H9c2细胞呈圆形或椭圆形,无心肌搏动。取长势良好的细胞用于进一步实验;

[0058] 2、miR-9抑制子转染:按Lipofectamine2000说明书行常规转染miR-9;

[0059] 3、缺血缺氧处理细胞:待miR-9抑制子转染后的细胞贴壁后,换为无血清DMEM培养基培养24h使细胞同步化,按以下分组培养48h:对照组(DMEM + 10%FBS、5%CO<sub>2</sub>、21%O<sub>2</sub>);缺血缺氧处理组(DMEM + 2%FBS、5%CO<sub>2</sub>、1%O<sub>2</sub>);

[0060] 4、DCFH-DA染色:活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针DCFH-DA进行活性氧检测的试剂盒。DCFH-DA本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内后,可以被细胞内的酯

酶水解生成DCFH。而DCFH不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF,检测DCF的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。按DCFH-DA染色试剂盒进行常规染色,在荧光显微镜下观察并拍片;

[0061] 参见附图8,结果发现miR-9抑制子组H9c2细胞ROS堆积弱于对照组。

[0062] 实施例6:miR-9抑制子降低缺血缺氧H9c2细胞凋亡

[0063] 1、H9c2细胞培养:同实施例5;

[0064] 2、miR-9抑制子转染:同实施例5;

[0065] 3、缺血缺氧处理细胞:同实施例5;

[0066] 4、DAPI染色:按DAPI染色试剂盒进行常规染色,在荧光显微镜下观察并拍片,凋亡细胞核成固缩或不规则形态;

[0067] 参见附图9,结果发现miR-9抑制子组H9c2细胞凋亡显著低于对照组;\* $P < 0.05$ 。

[0068] 实施例7:miR-9类似物增加缺血缺氧H9c2细胞凋亡

[0069] 1、H9c2细胞培养:同实施例5;

[0070] 2、miR-9类似物转染:按Lipofectamine2000说明书行常规转染miR-9类似物;大鼠源miR-9类似物购于吉玛生物;

[0071] 3、缺血缺氧处理细胞:同实施例5;

[0072] 4、DAPI染色:同实施例6;

[0073] 参见附图10,结果发现miR-9类似物组H9c2细胞凋亡显著高于对照组;\* $P < 0.05$ ;\*\*\* $P < 0.001$ 。

[0074] 上述实施例的结果综合证明:心肌注射miR-9抑制子能显著减少心肌miR-9表达水平,使用miR-9抑制子能显著改善心梗后心功能,降低心梗面积、梗死周边区炎症水平和ROS堆积程度。

[0075] 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。

- 
- [0001] 序列表
  - [0002] <110> 苏州大学
  - [0003] <120> miRNA抑制子在制备防治心肌梗死药物中的应用
  - [0004] <160> 1
  - [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
  - [0006] <210> 1
  - [0007] <211> 23
  - [0008] <212> RNA
  - [0009] <213> 人工序列(Artificial)
  - [0010] <400> 1
  - [0011] ucauacagcu agauaaccaa aga 23



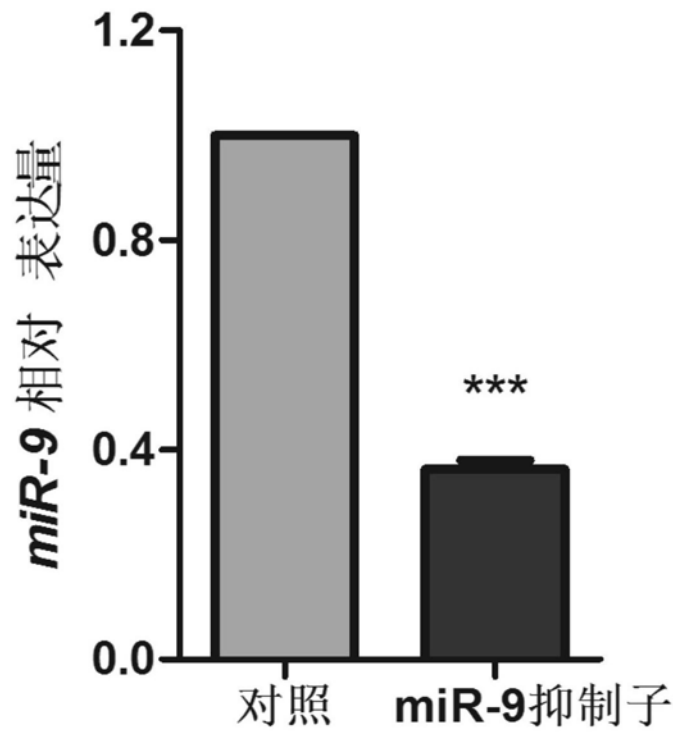


图1

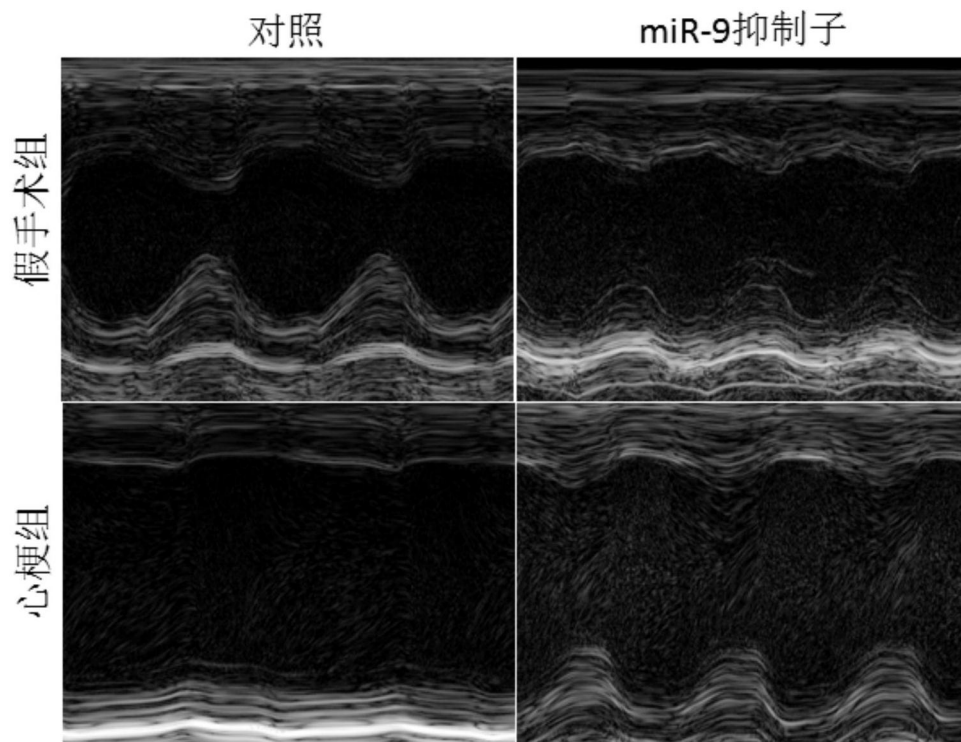


图2

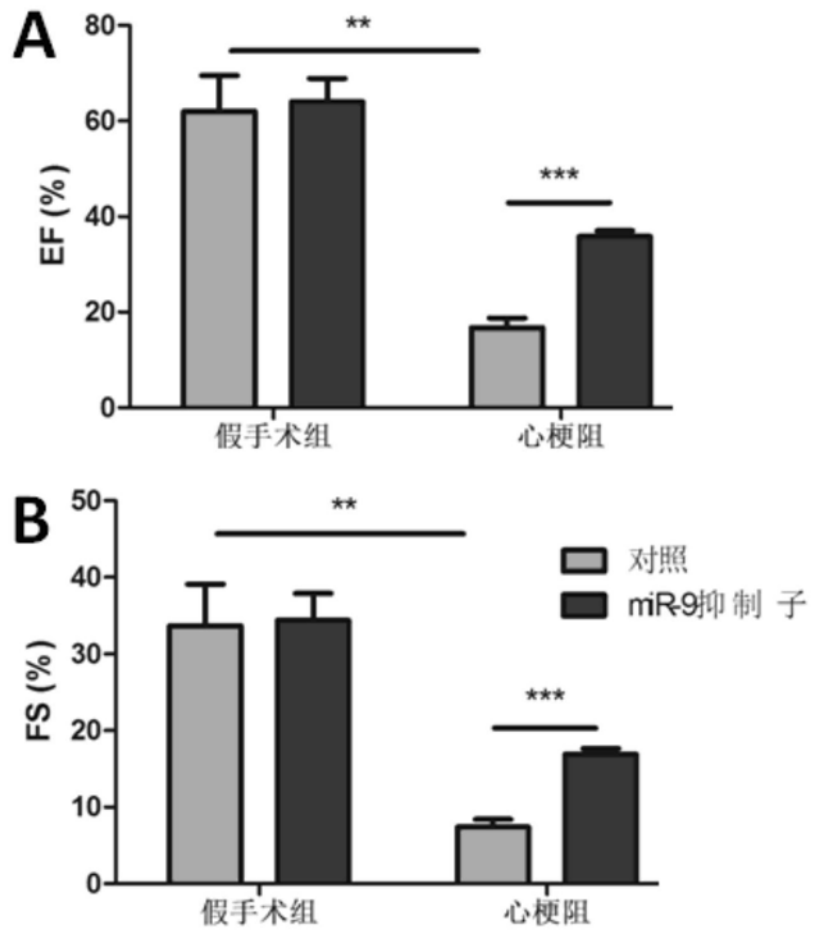


图3

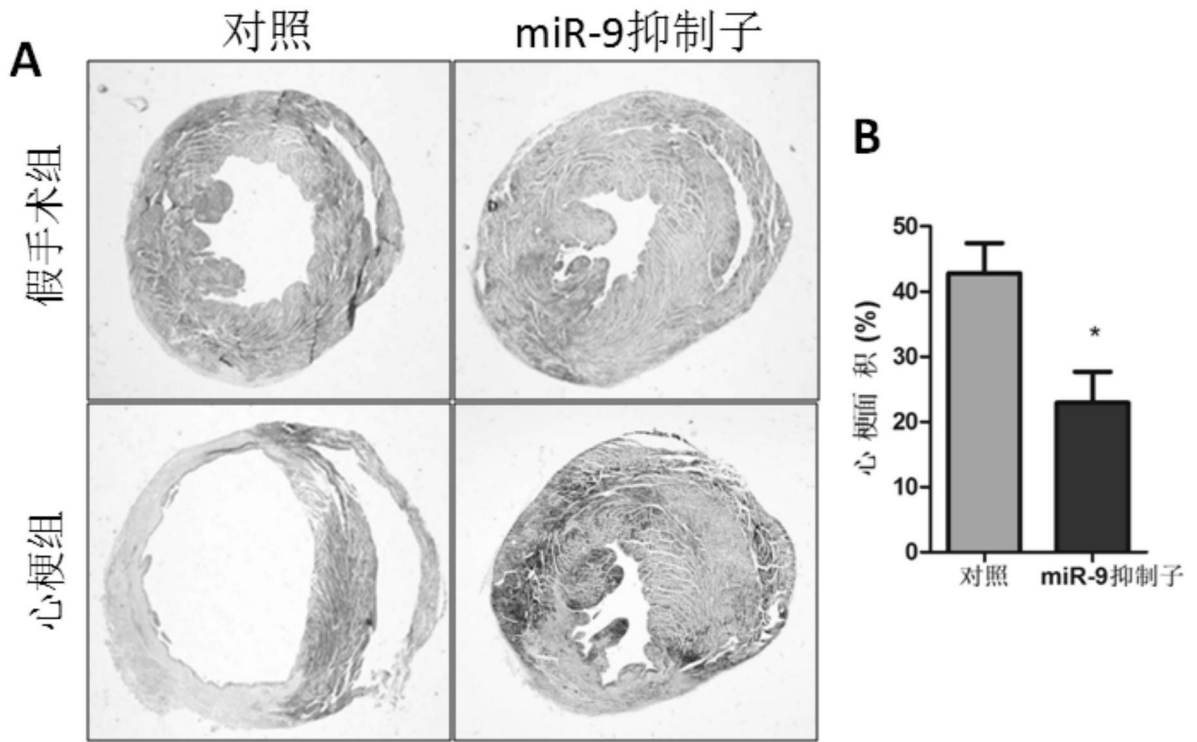
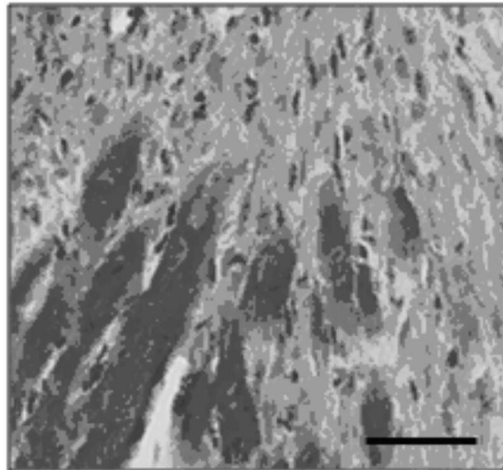


图4

### 心梗组 对照



### miR-9抑制子

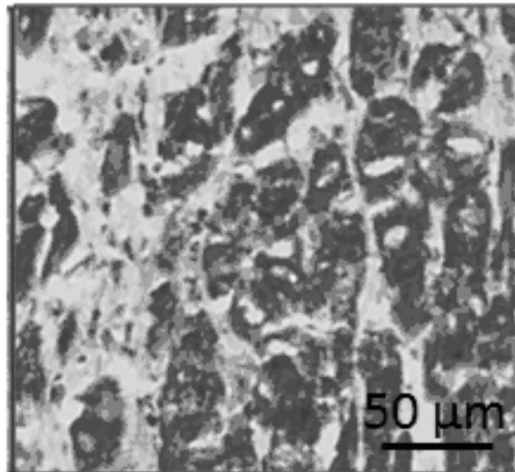


图5

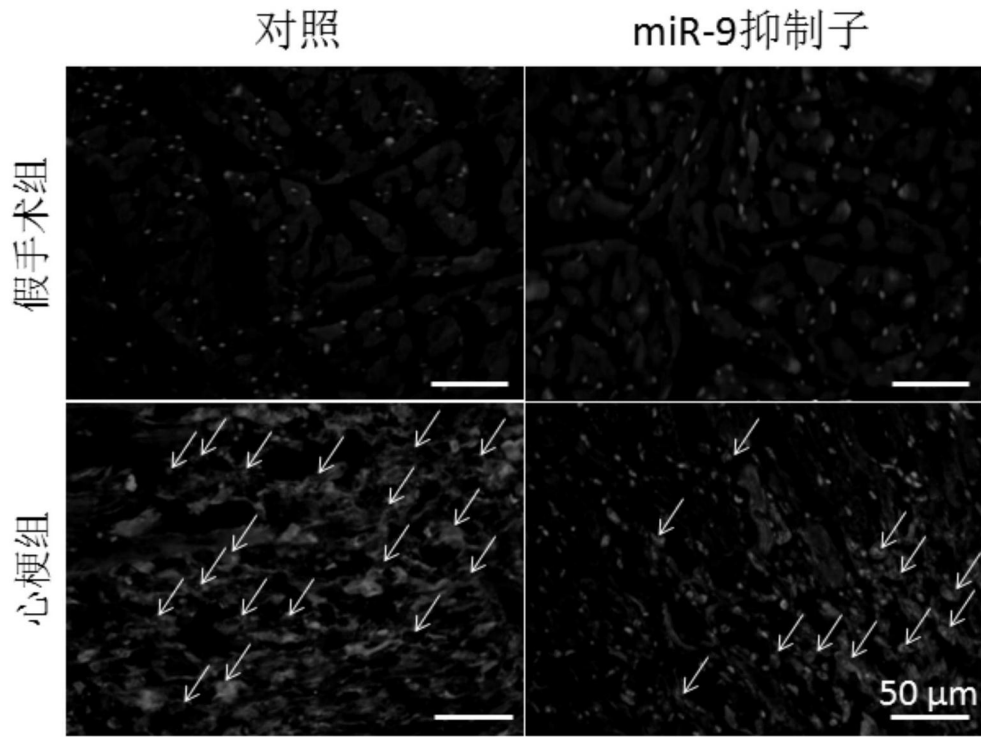


图6

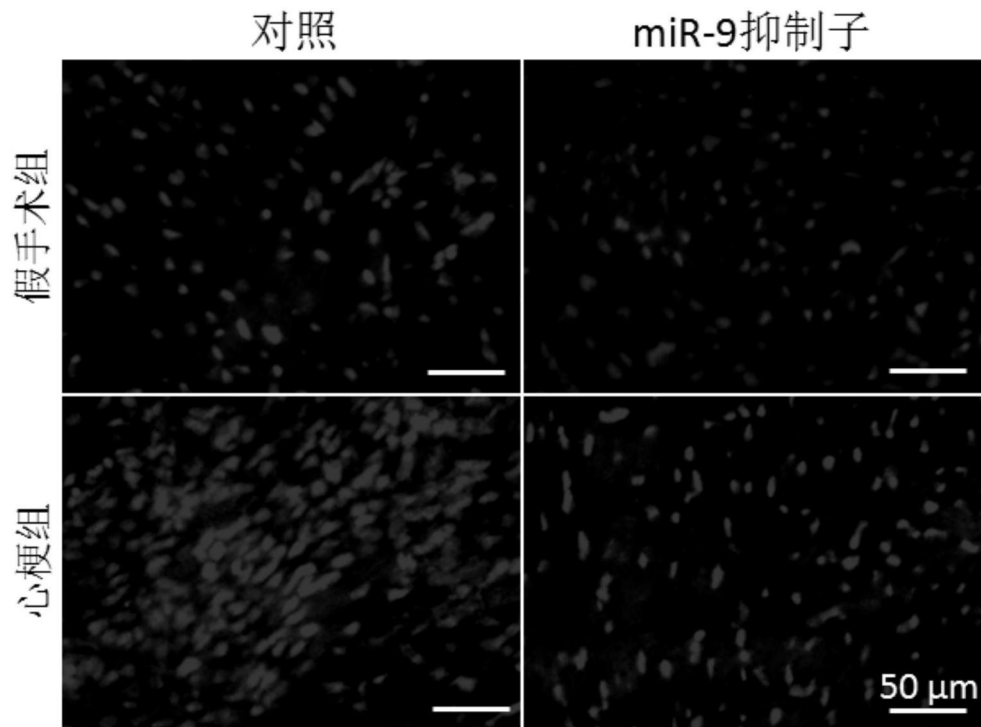


图7

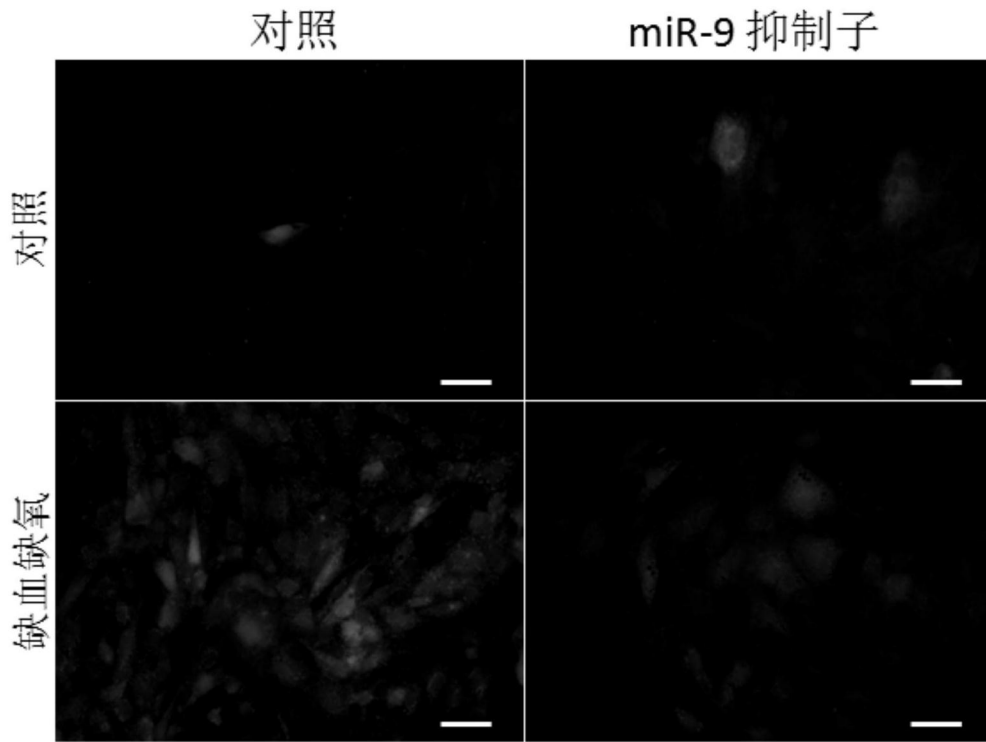


图8

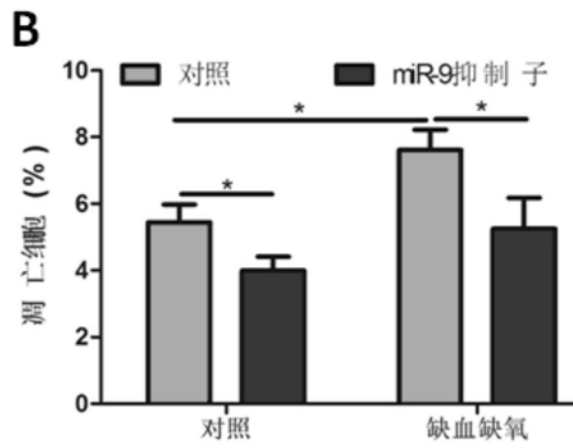
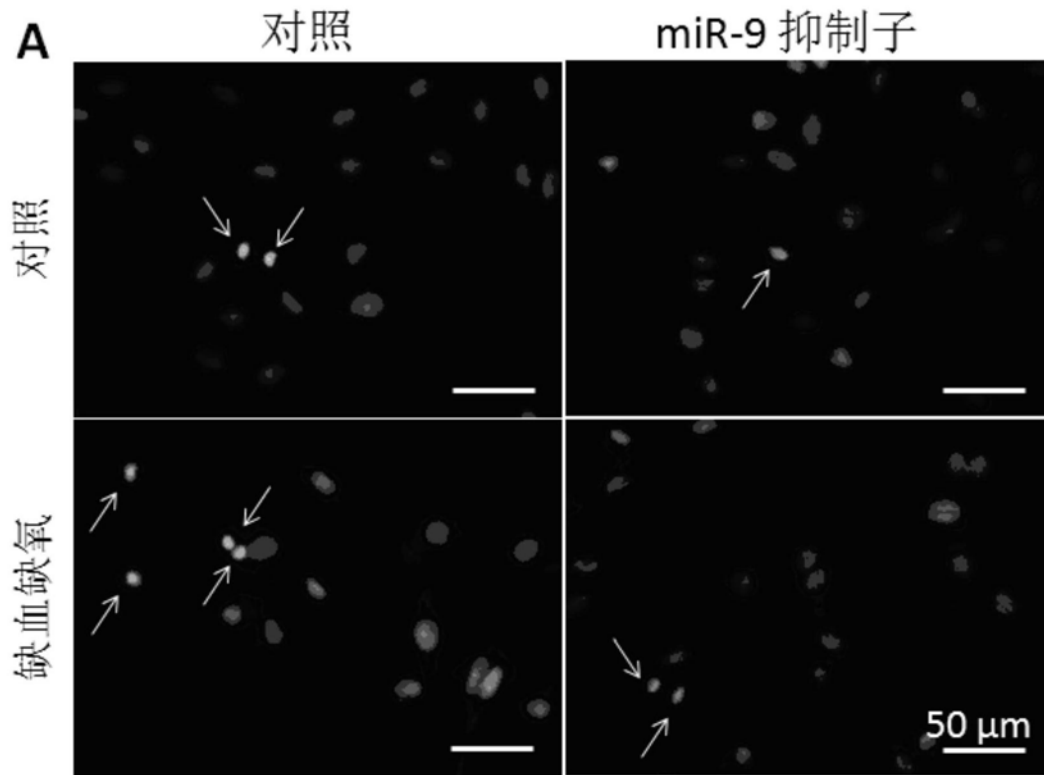


图9

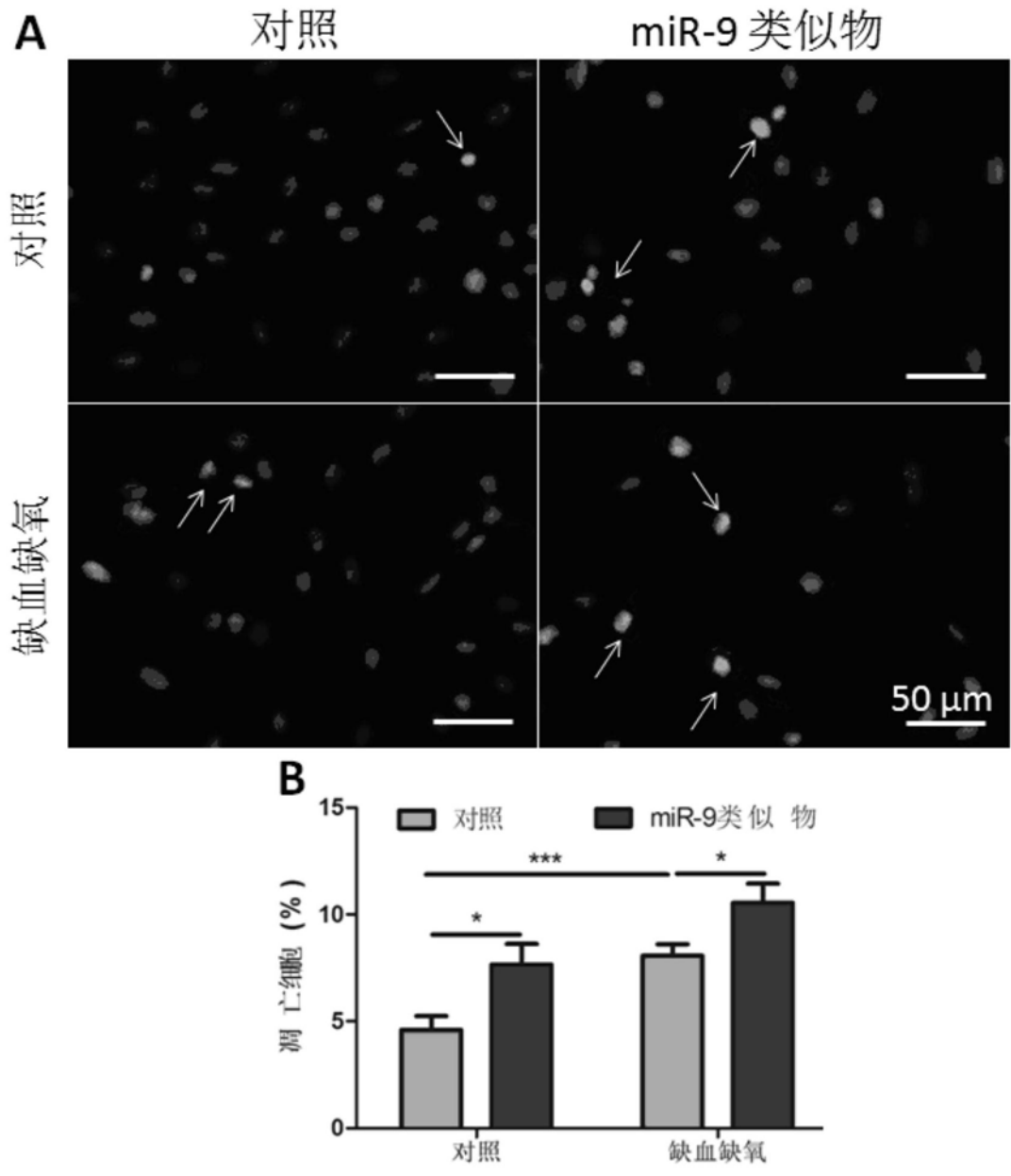


图10