(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 5 月 31 日 (31.05.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/101115 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/711 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/116846

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 22 日 (22.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201711175863.2 2017年11月22日 (22.11.2017) CN

(71) 申请人: 四川大学 (SICHUAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。

(72) 发明人: 林云锋 (LIN, Yunfeng); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。 邵晓茹 (SHAO, Xiaoru); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。 蔡潇潇 (CAI, Xiaoxiao); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。 马文娟 (MA, Wenjuan); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。 谢雪萍 (XIE, Xueping); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。

(74) 代理人: 成都高远知识产权代理事务所（普通合伙） (GAOYUNG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国四川省成都市高新区衣冠庙邮局A-42号信箱, Sichuan 610041 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) **Title:** USES OF DNA TETRAHEDRON FOR PREPARING DRUG FOR TREATING ALZHEIMER'S DISEASE

(54) 发明名称: DNA四面体在制备治疗阿尔兹海默症药物中的用途

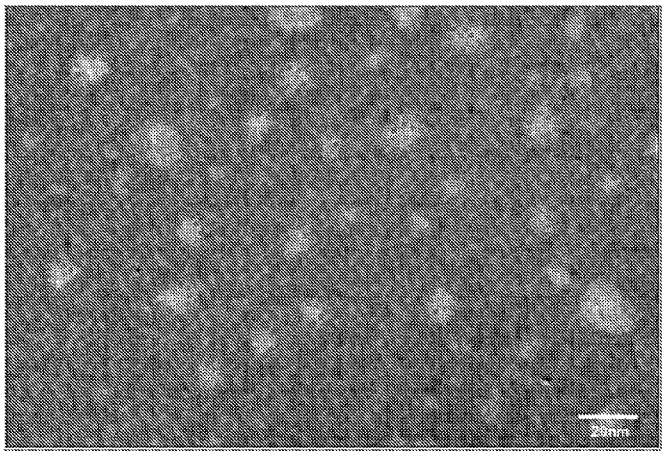


图 3

(57) **Abstract:** The invention relates to the uses of a DNA tetrahedron for preparing a drug for treating Alzheimer's disease. Said DNA tetrahedron is assembled into a tetrahedral structure by means of a four single-stranded DNA using complementary base pairing, wherein each rib has a double-stranded DNA structure, can protect neural cells in an environment with amyloid beta protein, and inhibits apoptosis thereof.

(57) 摘要: DNA四面体在促神经修复药物制备中的用途，所述DNA四面体由四条单链DNA通过碱基互补配对方式组装成四面体结构；所述四面体的每条棱都是双链DNA结构，所述DNA四面体能够保护β类淀粉样蛋白环境下的神经细胞，抑制其凋亡。

[见续页]

WO 2019/101115 A1

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

DNA 四面体在制备治疗阿尔兹海默症药物中的用途

技术领域

本发明涉及神经修复领域，具体涉及 DNA 四面体在制备治疗阿尔兹海默症药物中的用途。

背景技术

阿尔兹海默病（AD）是常见的神经退行性疾病之一，具有年龄相关性，其发病特点为在疾病初期主要表现为轻微的认知功能障碍，而后出现神经元的损伤，最后演变为痴呆。有研究指出，凋亡性神经元死亡可能是 AD 的重要组成部分，在 AD 早期就已经发现了神经元凋亡，而在 AD 患者的尸检中也显示大脑皮层和海马中有大量凋亡神经元。

阿尔兹海默病的发病机制目前尚不明确，影响较广的是 β 类淀粉样蛋白（Aβ）级联假说。该假说认为 Aβ 在脑内沉积是 AD 病理改变的中心环节，可引发一系列病理过程，这些病理过程又进一步促进 Aβ 沉积，从而形成级联式放大反应，最终产生细胞毒性，其毒性包括引发线粒体途径的凋亡。

线粒体途径的凋亡中，Bax 蛋白是主要的凋亡基因之一，它可以增强线粒体的通透性，使线粒体释放细胞色素 C，介导凋亡复合体形成，进而激活 Caspase 3/6/7 发挥水解作用，切割细胞中如 α-tubulin、Actin、PARPA、Lamin 等超过 100 种的底物，最终导致细胞凋亡。而 Bcl-2 能与 Bax 蛋白形成二聚体，降低线粒体通透性，抑制凋亡。

目前有研究表明，一些治疗阿尔兹海默症的药物可能导致细胞毒性。

DNA 四面体（TDNs）是一种新型的 DNA 纳米材料，目前在生物医学领域具有广泛的应用前景。TDNs 是由四条 DNA 单链通过严格碱基互补配对原则形成的具有三维结构的 DNA 纳米材料。TDNs 具有良好的生物相容性、生物安全性和生物可降解性且制备方法简单，产率较高，具有较好核酸酶耐受性。关于 TDNs 的研究虽多，但它对细胞各项生理活动影响的研究却很少，尤其是它治疗阿尔兹海默症的研究更是没有。

发明内容

为了解决上述问题，本发提供了 DNA 四面体在制备药物中的用途，所述药物是治疗阿尔兹海默症的药物。

所述 DNA 四面体由四条单链 DNA 通过碱基互补配对方式组装成四面体结构；所述四面体的每条棱都是双链 DNA 结构。

所述 DNA 四面体的制备方法是：将含有等浓度所述四条单链 DNA 的水溶液加热，使得碱基间氢键完全断开，维持 5~20min，然后快速降温到 0~10℃，保持至少 15min；所述水溶液中还含有 10mM Tris-HCl、50mM MgCl2；所述水溶液加热前的 pH 值为 8。

进一步地，所述加热后维持时间为 10min，所述降温的具体温度为 4℃，所述降温后保持时间为 20min。

进一步地，所述四条单链 DNA 的序列分别如 SEQ ID NO.1~4 所示。

前述的用途中，所述药物是促进神经细胞增殖的药物。

前述的用途中，所述药物是降低 β 类淀粉样蛋白对神经细胞的损伤的药物。

前述的用途中，所述药物抑制神经细胞凋亡的药物。

进一步地，所述药物是降低 Bax、Caspase 3 和/或细胞色素 C 蛋白表达的药物。

进一步地，所述药物是升高 Bcl-2 蛋白表达的药物。

本发明还提供了一种治疗阿尔兹海默症的药物，它是使用前述 DNA 四面体作为活性物质，加上药学上可接受的辅料或辅助性成分制备而成。

本发明具有以下有益效果：

DNA 四面体可以使保护 PC12 细胞，维持其高浓度外源 β 类淀粉样蛋白环境中的活性。

DNA 四面体还可以促进 PC12 细胞的增殖。

DNA 四面体可以通过降低凋亡正相关蛋白 Bax、Caspase 3、细胞色素 C 的表达，以及升高负相关蛋白 Bcl-2 的表达，来抑制细胞凋亡。

动物模型实验也证实了患有阿尔兹海默症的大鼠大脑中，TDNs 可以显著降低 Bax 和激活的 Caspase3 的蛋白水平到接近正常值，同时能显著提高 Bcl-2 的蛋白水平。

DNA 四面体同样能显著减少患有阿尔兹海默症的大鼠大脑中细胞凋亡的数量。

本发明的还通过定位航行实验和空间探索实验证明了 DNA 四面体能改善大鼠的学习记忆能力。

DNA 四面体因为其代谢终产物为游离核苷酸，对细胞完全没有毒性，相比现有阿尔兹海默症治疗药物具有很好的安全性。

上述有益效果进一步表明，DNA 四面体可以用作制备治疗阿尔兹海默症的药物。

显然，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，在不脱离本发明上述基本技术思想前提下，还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

以下通过具体实施方式对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。下面通过具体实施方式对本发明做进一步详细说明，但是并不是对本发明的限制，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，在不脱离本发明上述基本技术思想前提下，还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

附图说明

图 1 为四条单链合成 TDNs 的示意图。

图 2 为 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）鉴定结果图。

图 3 为透射电镜鉴定结果示意图。

图 4 为原子力显微镜鉴定结果示意图。

图 5 为 $A\beta_{25-35}$ 的浓度对 PC12 细胞活性影响的检测结果示意图。

图 6 为 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞活性的检测结果图。

图 7 为 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞凋亡的检测结果图。

图 8 为另一个 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞凋亡的检测结果图。

图 9 为采用流式细胞术检测 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞的细胞周期检测结果图。

图 10 为采用流式细胞术检测 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞凋亡的检测结果图。

图 11 为 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞中凋亡正相关蛋白 Bax、Caspase 3、细胞色素 C，以及凋亡负相关蛋白 Bcl-2 表达量的检测结果图。

图 12 为 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞中凋亡正相关基因 Bax、Caspase 3，以及凋亡负相关基因 Bcl-2 表达量的检测结果图。

图 13 为为 TDNs 和/或 Aβ 处理下的 PC12 细胞中凋亡负相关蛋白 Bcl-2 表达量的检测结果图。

图 14 为大鼠定位巡航实验的各组逃避潜伏期结果：* p<0.05, **p<0.01 表示和 DNA 组相比具有显著差异；#p<0.05, ##p<0.01 表示和模型组相比具有显著差异；&p<0.05,&&p<0.01 表示和第一天比具有显著差异。

图 15 为大鼠第 5 天定位巡航实验的第二象限入水的轨迹图

图 16 为大鼠空间探索实验各组在靶象限的时间占总时间的百分比结果

图 17 为大鼠空间探索实验各组穿越平台数结果

图 18 为大鼠空间探索实验各组第一次寻找到平台的潜伏时间结果

图 19 为大鼠空间探索实验轨迹图

图 20 为各组大鼠海马组织中 active Caspase 3、Bax 、Bcl-2 的蛋白表达水平：Control 为空白对照组；sham 为假手术组；AD+PBS 为阿尔茨海默病模型（AD）+生理盐水组；AD+DNA 组为缺 AD+DNA 材料组；* p<0.05,**p<0.01 表示与对照组相比具有显著性差异；^

p<0.05,^^p<0.01 表示与假手术组相比具有显著差异；& p<0.05,&&p<0.01 表示与 AD 模型+PBS 组相比具有显著性差异。

图 21 为海马组织中 caspase-3 的表达水平统计图，组别名称和统计学显著差异同图 20。

图 22 为海马组织中 Bcl-2 的表达水平统计图，组别名称和统计学显著差异同图 20。

图 23 为海马组织中 Bax 的表达水平统计图，组别名称和统计学显著差异同图 20。

图 24 为 TUNEL 染色检测各组海马组织凋亡的荧光图，组别名称同图 20。

图 25 为 Tunel 染色检测各组海马组织凋亡的阳性细胞统计图，组别名称同图 20。

具体实施方式

实施例 TDNs 的合成

1. 合成

将四种 DNA 单链(S1、S2、S3、S4)以相同终浓度溶解到 TM buffer 溶液中，其中，TM buffer 溶液的溶质为 Tris-HCl 和 MgCl2，它们的浓度分别为 10 mM 和 50 mM，并调节溶液的 pH 值为 8.0。然后将混合物经过涡旋、混匀、离心后置于 PCR 仪内，将温度迅速升高到 95℃稳定 10~15min，再冷却至 4℃稳定 20 min。即合成如图 1 所示的四面体结构。

所述 DNA 单链的序列如表 1 所示。

表 1 TDNs 单链的序列

名称	SEQ ID NO.	序列(5'→3')
S1	1	ATTTATCACCCGCCATAGTAGACGTATCACCAGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAA
S2	2	ACATGCGAGGGTCCAATACCGACGATTACAGCTTGCTACACGATTCAGACTTAGGAATGTTCG
S3	3	ACTACTATGGCGGGTGATAAAACGTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGAAGAGCATGCCCATCC
S4	4	ACGGTATTGGACCCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGGATGGGCATGCTCTTCCCG

2. 鉴定

2.1 凝胶电泳

采用 4.2mL 蒸馏水、1.2mL 40%丙烯酰胺、0.6mL 10×TAE、60μL 10%Aps 以及 6μL TEMED 制备得到聚丙烯酰胺凝胶；

然后取 1μL 6×loading buffer 和 5μL 制备得到的 TDNs 混合均匀，分别将其和 marker 加入对应的电泳槽中，冰浴、恒压 100V，电泳 60min；然后采用浓度比为 1:50 的 GelRed 和蒸馏水，在避光条件下，摇床处理 15~25min，然后曝光，再进行检测，其结果见图 2。

结果如图 2 所示，红色圆圈标注为所合成的四面体，500bp 左右的条带为合成四面体过程中形成的多聚物，表明成功合成了 DNA 四面体。

2.2 透射电镜

取适量样本液于金属片上，红外下照射 5~10 分钟使其干燥，上机检测。

结果：如图 3 所示，TDNs 的形状在透射电镜下呈近似三角形形状，粒径大小在 10~15nM 范围内。圆圈标注的为多聚物。

2.3 原子力显微镜

使用原子力显微镜检测 TDNs。

如图 4 所示，TDNs 粒径在 10~15nM 左右，与透射电镜结果吻合，进一步表明成功合成了 DNA 四面体。

为了证明 TDNs 确实有助于阿尔兹海默症的治疗，以下将用实验例的方式进一步说明。

实验例 1 Aβ 处理 PC12 细胞可以模拟阿尔兹海默症

1.方法

（1）在 96 孔板中接种 PC12 细胞悬液（100μL /孔），将培养板置于孵箱中预培养 24 小时（37℃，5%CO_2），再将组分为 DMEM+10%血清+1%双抗的培养基中的血清浓度由 10%降到 6%，于孵箱中培养 6 小时（37℃，5%CO_2），然后将培养基中的血清浓度由 6%降到 0，于孵箱中培养 1 小时（37℃，5%CO_2）。

（2）将培养的细胞悬液分为对照组和实验组，实验组加入不同浓度的 $Aβ_{25-35}$，对照组加入等量的血清，然后在孵箱中培养 24h（37℃，5%CO_2），培养结束后，向每孔中加入 10μL 的 CCK-8 溶液，并避免生产气泡，然后在孵箱中培养 1~4h（37℃，5%CO_2）培育结束后，在 450nm 处检测每孔的吸光度，并进行数据处理。

2.结果

如图 5 所示，$Aβ_{25-35}$ 的浓度分别为 6.25μM、12.5μM、25μM，50μM 和 100μM，当 $Aβ_{25-35}$ 的浓度为 25μM 时，细胞活性低于 70%。

结合 Aβ 积累是导致阿尔兹海默症的主要原因这一主流理论，本实验表明外源的 $Aβ_{25-35}$ 处理 PC12 细胞可以模拟阿尔兹海默症的发生。

实验例 2 TDNs 减少 Aβ 对 PC12 细胞的活性损伤

1.方法

（1）在 96 孔板中接种 PC12 细胞悬液（100μL /孔），将培养板置于孵箱中预培养 24 小时（37℃，5%CO_2），再将组分为 DMEM+10%血清+1%双抗的培养基中的血清浓度由 10%降到 6%，于孵箱中培养 6 小时（37℃，5%CO_2），然后将培养基中的血清浓度由 6%降到 0，于孵箱中培养 1 小时（37℃，5%CO_2）。

（2）将培养的细胞悬液分为空白对照组、TDNs 组、AD 细胞模型组以及 TDNs 预处理的 AD 细胞模型组；其中，空白对照组不加 $Aβ_{25-35}$；TDNs 预处理的 AD 细胞模型组先用 250nM 的 TDNs 预处理 6h，然后加入浓度为 25μM 的 $Aβ_{25-35}$；AD 细胞模型组用无血清培养基预处理 6h，然后再加入浓度为 25μM 的 $Aβ_{25-35}$；然后空白对照组、TDNs 组、AD 细胞模型组以及 TDNs 预处理的 AD 细胞模型组均置于孵箱中培养 24h（37℃，5%CO_2）。

（3）在 450nm 处检测每孔的吸光度，并进行数据处理。

2.结果

如图 6 所示，加入四面体后，细胞有明显增殖，经 TDNs 预处理的 TDNs+$Aβ_{25-35}$ 组，细胞活性较 $Aβ_{25-35}$ 组有提高，表明 TDNs 可提高阿尔兹海默模型细胞的细胞活性。

实验例 3 TDNs 预防 Aβ 导致的细胞凋亡

1、采用免疫荧光技术检测 TDNs 对细胞凋亡的影响

1.1 方法

（1）将 PC12 细胞悬浮液接种于共聚焦小皿中，并按实验例 2 中步骤（2）进行分组，并进行相应处理，然后吸去组分为 DMEM+10%血清+1%双抗的培养基，PBS 反复洗三遍，每遍 15 分钟；

（2）使用 4%多聚甲醛在 4℃固定 15 分钟，而后空气中放置 5 分钟，PBS 洗三遍，每遍 15 分钟；

（3）0.5% tritonX-100 试剂 37℃打孔 15 分钟，PBS 洗三遍，每遍 15 分钟；

（4）羊血清室温孵育 1 小时，PBS 洗，每次三遍；

（5）孵育所要观察的一抗（抗 nestin 抗体），4℃过夜；

（6）37℃复温 30 分钟，PBS 洗三遍，每次 15 分钟；

（7）37℃孵育二抗 1 小时，PBS 洗三遍，每次 15 分钟；

（8）细胞核染料 DAPI 处理 10 分钟，再用 PBS 清洗；

（9）用试剂鬼笔环肽进行细胞骨架染色 10 分钟，PBS 洗；

（10）镜检，共聚焦显微镜观察细胞免疫荧光染色的情况。

1.2 结果

如图 7 和图 8 所示，四面体组较空白对照组，细胞有更好的铺展。AD 细胞模型组细胞出现明显凋亡，细胞数目减少，细胞核出现裂解，固缩。TDNs 预处理的 AD 细胞模型组虽然细胞数目有所减少，细胞铺展较空白对照组差，但细胞核完整，未出现明显核固缩的现象，凋亡现象较 AD 细胞模型组有了大幅的降低。

2、采用流式细胞术检测细胞周期

2.1 方法

（1）在 25mL 培养瓶中接种 PC12 细胞悬液，将培养瓶置于孵箱中预培养 24 小时（37℃，5%CO2），再将组分为 DMEM+10%血清+1%双抗的培养基中的血清浓度由 10%降到 6%，于孵箱中培养 6 小时（37℃，5%CO2），然后将培养基中的血清浓度由 6%降到 0，于孵箱中培养 1 小时（37℃，5%CO2）；

（2）按实验例 2 中步骤（2）进行分组，并进行相应处理，然后诱导细胞凋亡，同时设立阴性对照组，并收集细胞；

（3）用 PBS 洗涤细胞一次，收集并调整细胞浓度为 1×106/mL；然后将制备的单细胞悬液用体积分数为 70%乙醇固定，4℃保存，染色前用 PBS 洗去固定液；

（4）向步骤（3）所得细胞悬液中加入 RNase A，37℃，水浴 30min，再加入 PI 染色混匀，于 4℃下避光 30min，然后上机检测，并记录激发波长为 488nm 处的红色荧光；

（5）用 0.25%胰蛋白酶消化收集红色荧光处细胞于 15mL 离心管中（2000rpm、5 分钟），弃上清，PBS 洗涤，离心（2000rpm、5 分钟）。加入冰乙醇 500ul 固定细胞，4℃过夜。第二天加入 PBS 离心，弃上清，再加入 PBS 洗涤，离心，弃上清。加入 100μL RNase，37℃水浴，30 分钟。加入 400μL PI 染色混匀，4℃避光，30 分钟。将细胞转移至流式管中，上机检测，使用 WinMDI 2.9 和 WinCycle 32 软件进行数据分析。

2.2 结果

如图 9 所示，与空白对照组相比，TDNs 组中处于 S 期（DNA 合成期）的细胞数目明显增加，说明 TDNs 改变了 PC12 的细胞周期，促进其增值。TDNs 预处理的 PC12 细胞较 AD 细胞模型组，无明显凋亡峰，且处于 S 期（DNA 合成期）的细胞数目明显增加，说明 TDNs 改变了 PC12 细胞的细胞周期。

3、采用流式细胞术检测 TDNs 对阿尔兹海默细胞凋亡的抑制作用

3.1 方法

（1）在 25mL 培养瓶中接种 PC12 细胞悬液，将培养瓶置于孵箱中预培养 24 小时（37℃，5%CO2），再将组分为 DMEM+10%血清+1%双抗的培养基中的血清浓度由 10%降到 6%，于孵箱中培养 6 小时（37℃，5%CO2），然后将培养基中的血清浓度由 6%降到 0，于孵箱中培养 1 小时（37℃，5%CO2）；

（2）按实验例 2 中步骤（2）进行分组，并进行相应处理；

（3）使用不含 EDTA 的胰蛋白酶，分别消化收集细胞于 15mL 离心管中（300g、5 分钟），弃上清，PBS 洗涤，离心（300g、5 分钟）。用 400μL Annexin V 结合液悬浮细胞，浓度大约为 1×106 cells/mL。在细胞悬液中加入 5μL Annexin V-FITC 染色液，轻轻混匀于 4℃避光条件下孵育 15 分钟。加入 5μL PI 染色液，轻轻混匀于 4℃避光条件下孵育 5 分钟。将细胞转移至流式管中，上机检测，数据分析。

3.2 结果

如图 10 所示，空白对照组相比，TDNs 组中凋亡比例有所降低。说明 TDNs 对于 PC12 细胞凋亡具有一定抑制作用。TDNs 预处理的 PC12 细胞较 AD 细胞模型组，凋亡比例明显降低，说明 TDNs 对于 Aβ 导致的细胞凋亡现象具有明显的抑制作用。

综上，TDNs 能抑制 PC12 细胞的凋亡，尤其能预防 Aβ 导致的细胞凋亡。

实验例 4 TDNs 抑制细胞凋亡的机制

线粒体途径的凋亡中，Bax 蛋白是主要的凋亡基因之一，它可以增强线粒体的通透性，

使线粒体释放细胞色素 C，介导凋亡复合体形成，进而激活 Caspase 3/6/7 发挥水解作用，进而导致凋亡。其中 Caspase 3 除了在线粒体途径的凋亡中发挥作用，在其他途径（死亡受体配体途径和内质网途径）的凋亡中也发挥作用。

本实验例通过检测 Bax、Caspase 3、细胞色素 C 和 Bcl-2 的表达，来探究 TDNs 对阿尔兹海默细胞模型的凋亡抑制作用。

1、采用蛋白质印迹法检测 Bax、Caspase 3、细胞色素 C 和 Bcl-2 的蛋白水平

1.1 方法

（1）在 6 孔板中接种 PC12 细胞悬液（100μL /孔），将培养板置于孵箱中预培养 24 小时（37℃，5%CO2），再将组分为 DMEM+10%血清+1%双抗的培养基中的血清浓度由 10%降到 6%，于孵箱中培养 6 小时（37℃，5%CO2），然后将培养基中的血清浓度由 6%降到 0，于孵箱中培养 1 小时（37℃，5%CO2）；

（2）按实验例 2 中步骤（2）进行分组处理，并使用全蛋白提取试剂盒，分别提取空白对照组、TDNs 组、AD 细胞模型组以及 TDNs 预处理的 AD 细胞模型组中的蛋白；

（3）然后再分别进行 SDS-PAGE 电泳，其具体过程为：灌胶→上样→电泳→转膜→封闭液摇动封闭 1 小时→一抗 4℃过夜→回收一抗，TBST 洗涤 3 次，每次 5-10 分钟→二抗，1 小时→弃二抗，TBST 洗涤 3 次，每次 5-10 分钟→曝光，检测并进行数据处理。

1.2 结果

如图 11 所示，相比空白组，TDNs 处理的 PC12 细胞表达了更多的 Bcl-2 蛋白，以及更少的 Caspase-3 蛋白。而 Aβ 处理的 PC12 细胞组别中，TDNs 预处理会显著升高细胞色素 C、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达。

表明 TDNs 能增强 PC12 细胞抗凋亡的能力，并确实能预防 Aβ 导致的细胞凋亡。

2、采用荧光定量 PCR（Q-PCR）检测 Bax、Caspase 3、细胞色素 C 和 Bcl-2 的转录水平

2.1 方法

（1）在 6 孔板中接种 PC12 细胞悬液（100μL /孔），将培养板置于孵箱中预培养 24 小时（37℃，5%CO2），再将培养基中的血清浓度由 10%降到 6%，于孵箱中培养 6 小时（37℃，5%CO2），然后将培养基中的血清浓度由 6%降到 0，于孵箱中培养 1 小时（37℃，5%CO2）；

（2）按实验例 2 中步骤（2）进行分组，并进行相应处理；

（3）Q-PCR 检测：每孔加入 20μl 的反应体系（2μl cDNA、10μl SYBR、0.8μl 引物 Forward、0.8μl 引物 Reserve、6.4μl ddH2O），上机检测，并进行数据处理。

2.2 结果

如图 12 所示，相比空白对照组，TDNs 处理的 PC12 细胞显著提高 Caspase-3、Bax 基因的表达，显著降低了 Bcl-2 基因的表达。而 Aβ 处理的 PC12 细胞组别中，TDNs 预处理会显著升高 Bax 和 Caspase-3 基因的表达，非显著地提高 Bcl-2 基因的表达，与蛋白表达结果基本一致。

表明 TDNs 能增强 PC12 细胞抗凋亡的能力，并确实能预防 Aβ 导致的细胞凋亡。

3、采用免疫荧光技术检测 Bcl-2

3.1 方法

（1）在共聚焦小皿中接种 PC12 细胞悬液（100μl/孔），将培养板在孵箱中预培养 24 小时（37℃，5%CO2），然后将组分为 DMEM+10%血清+1%双抗的培养基中的血清浓度由 10%降到 6%，于孵箱中培养 6 小时（37℃，5%CO2），再将培养基中的血清浓度由 6%降到 0，于孵箱中培养 1 小时（37℃，5%CO2）；

（2）按实验例 2 中步骤（2）进行分组，并进行相应处理；

（3）然后吸去步骤（2）所述培养基，PBS 洗 3 次，每次 5 分钟；

（4）4%多聚甲醛固定 25 分钟后，吸去多聚甲醛，PBS 洗 3 次，每次 5 分钟；

（5）0.5% Triton-100 处理 20-25 分钟，吸去 Triton-100，PBS 洗 3 次，每次 5 分钟；

（6）羊血清处理 1 小时，吸去羊血清，PBS 洗 3 次，每次 5 分钟；

（7）一抗 Bcl-2 抗体处理，4℃，过夜。第二天，37℃复温 0.5 小时，回收一抗，PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。携带荧光的二抗处理，避光，37℃，1 小时，吸去二抗，PBS 洗 3 次，每次 5 分钟；

（8）DAPI 处理，避光，10 分钟，吸去 DAPI，PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。10%甘油封样，避光，4℃保存。荧光共聚焦显微镜检测。

3.2 结果

如图 13 所示，与空白对照组相比，TDNs 组中凋亡负相关蛋白 Bcl-2 的表达有所增加，从而，进一步说明 TDNs 能增强 PC12 细胞抗凋亡的能力。TDNs 预处理的 AD 细胞模型组较 AD 细胞模型组，凋亡负相关蛋白 Bcl-2 的表达有所增加，从而，进一步说明 TDNs 对于 Aβ 导致的细胞凋亡具有明显的抑制作用。

综上，TDNs 可以通过降低细胞色素 C、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达，以及提高 Bcl-2 蛋白的表达，来预防 PC12 细胞的凋亡，特别是预防 Aβ 导致的细胞凋亡。

以上各实验例证明，TDNs 可以中和 Aβ 对神经细胞的伤害，维持神经细胞的活性，促进神经细胞的增殖，预防神经细胞的凋亡。以下使用动物实验进一步验证 TDNs 具有治疗阿尔兹海默症的活性，可应用在相关药物制备中。

实验例 5 大鼠行为学检测

1.方法

1.1 实验分组（每组 6 只）

A：空白对照组

B：假手术组

C：阿尔茨海默病模型（AD）+生理盐水组

D：AD+TDNs 材料组

AD 模型建立方法 SD 大鼠均采用 1%戊巴比妥钠 40 μg/g 腹腔内注射麻醉，麻醉后继而固定于脑立体定位仪上。按照大鼠脑立体定位图谱，以前囟为零起点，前囟后 3.5 mm 处为穿刺点，中线右侧旁开 2mm，而后牙科钻钻开颅骨，采用微量注射器自脑表面垂直进针 3mm，即：(AP= -3.5 mm, ML=2.0 mm, DV=3.0 mm)，双侧海马 CA1 区缓慢匀速注射 Aβ1-40 各 10 μg (1 μL)，留针 5 min，退针后缝合伤口。

AD 模型造模成功后 3d，将大鼠随机分为两组，一组开始尾静脉注射，注射生理盐水，大鼠每只给药 100μl/次/d，连续给药 21d。另一组尾静脉注射 DNA 材料，大鼠每只给药 100μl/次/d，连续给药 21d。假手术组脑立体定位注射等量的生理盐水，退针后缝合伤口，其余处理相同。而空白组不进行任何处理。

1.2 行为学检测

所有组别，于给药后 21d，进行 Morris 水迷宫试验，试验分为定位航行实验和空间探索实验。

定位航行实验：大鼠连续接受 5 天的训练，每天 4 次，每次时间间隔 30min，记录下大鼠从 4 个入水点和入水并找到平台所需要的时间，即逃避潜伏期。4 次潜伏期的平均成绩作为当日的最终结果进入到最后统计。

空间探索实验：实验的第 6 天，撤去平台，从距离平台的最远端入水后，将大鼠放入水中，记录下 30s 内大鼠的游泳轨迹，并观察分析大鼠在目标象限的停留时间，它的穿越平台的次数以及它第一次寻找到平台的潜伏时间。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析，所有数据以均值±标准差（$\bar{x}$±S）表示，所有组间比较采用采用多变量方差分析方法（MANOVA），同一组不同时间点采用单因素方差分析（One-way ANOVA）中的 LSD 法（最小显著性法），$p<0.05$ 为有显著性差异的统计学

意义，p<0.01 为有极显著性差异的统计学意义。

2.结果

图 14 和 15 是连续进行 5 天定向航行实验的实验结果和轨迹图，从结果中显示定向航行实验期间，与第 1 天实验相比，各组大鼠的逃避潜伏期都有所降低，其中空白组(Normal)、假手术组(Sharm)以及 TDNs 材料注射组(DNA)的第 5 天实验结果差异具有极显著性(P<0.01)。从定向航行第 2 天开始,与空白组相比，模型组(Model)大鼠的逃避潜伏期显著升高(P<0.05)，DNA 材料注射组大鼠的逃避潜伏期显著降低(P<0.05)。之后这种趋势更加显著,定向航行第 5 天，与模型组相比，空白组、假手术组以及 DNA 材料注射组大鼠的逃避潜伏期显著降低(P<0.05)，其中 DNA 材料注射组差异最显著(P<0.01)。

图 16-19 是第 6 天进行空间探索实验结果和轨迹图，图 16 结果显示，与模型组相比，空白组、假手术组以及 DNA 材料注射组在目标象限的所停留的时间增加，但差异不具有统计学意义(P>0.05)。图 17 结果显示，与模型组相比，空白组、假手术组以及 DNA 材料注射组在穿越平台次数增加，但差异不具有统计学意义(P>0.05)。图 18 结果显示，与模型组相比，空白组、假手术组以及 DNA 材料注射组的第一次寻找到平台的潜伏期减少，但差异不具有统计学意义(P>0.05)。

以上结果提示，DNA 材料注射后能改善大鼠学习记忆能力。

行为学结束后，将各组大鼠摘取全脑，冰上剥去小脑，将剩余部分左右对切，一半放入多聚甲醛固定，用于病理学检测，另一半取海马用于 pcr 和蛋白检测。

实验例 6 实验动物蛋白检测

1.方法

1.1 蛋白样品制备

根据组织量加入 200 μL 蛋白裂解液，重悬细胞后用移液器将裂解液移至 1.5 mL 离心管中，4 ℃裂解 30 min，期间摇晃数次。

4℃，12000 rpm 离心 10 min，将上清转移到 1.5 mL 离心管中并于-80℃保存。

1.2 BCA 法测定蛋白浓度

将 0.5 mg/mL 标准牛血清蛋白按 0 μL、1 μL、2 μL、4 μL、8 μL、12 μL、16 μL、20 μL 加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20 μL。

样品用标准品稀释液稀释一定浓度后加 20 μL 到 96 孔板中。

按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50：1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀，各孔加入 200 μL BCA 工作液，37℃放置 30 min。

测定 562 nm 处的吸光度值，根据标准曲线计算样品的蛋白浓度。

1.3 SDS-PAGE 电泳和转膜

制胶：清洗干净玻璃板，固定在支架上，在玻璃板之间灌入按上表配制的 10 %的分离胶，立即用去离子水封闭表面，于室温下聚合。当水封层与分离胶层之间出现明显界面时，表示分离胶的聚合已完成。弃去离子水，用滤纸吸干，再灌入 4%的浓缩胶，插入梳子，待胶凝固后，小心拔去梳子，备用。

上样前样品的处理：加入 5×上样缓冲液混匀，沸水中煮沸 5 min，迅速冰浴中冷却，上样量为每泳道 30 μg。

电泳：在电泳槽内加入电泳缓冲液，接通电源，80 V 恒压电泳至溴酚蓝跑完浓缩胶层，时间大约为 30 min。分离胶电泳电压为 120 V，当溴酚蓝迁移至分离胶下缘时，关掉电源，停止电泳。

预先配置 1 L 转移缓冲液并冷却至 4℃。先将 PVDF 膜在甲醇中浸泡约 30 s，再在转移缓冲液浸泡 10 min，后与滤纸、凝胶一起放入电转移缓冲液中。按夹心法依次将海绵、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵按顺序放好，小心去除所有气泡，PVDF 膜位于阳极侧，凝胶位于阴极侧，插入电泳槽中，倒入转膜缓冲液，200mA 恒流转移，根据所转蛋白分

子量，约 1 min/kd。

1.4 封闭及抗原抗体反应

封闭：将 PVDF 膜放入平皿中，加入含 5%脱脂奶粉的封闭液，摇床振荡 1.5~2 h；

封闭结束后，用 TBST 洗膜 10 min×3 次；

将膜放入含一抗稀释液 Bcl-2（稀释比例 1：1000），active Caspase 3（稀释比例 1：2000）,Bax(稀释比例 1:1080)和 GAPDH（稀释比例 1：3000）的平皿中，4℃摇床振荡孵育过夜；

第二天取出，室温振荡 30 min，吸弃一抗，TBST 洗 10 min×3 次；

用 TBST 稀释二抗（稀释比例 1：5000），室温摇床振荡反应 1~2 h；

二抗反应结束后，回收二抗。然后用 TBST 洗膜 5~10 min×3 次。

1.5 显色曝光

将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1：1 比例混匀，滴加工作液于 PVDF 膜上，反应数分钟待荧光带明显后，用滤纸吸去多余的底物液，覆上保鲜膜，X 光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影，冲洗胶片。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析，所有数据以均值±标准差（$\bar{x}$±S）表示，不同组间两两比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）中的 LSD 法（最小显著性法），$p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2.结果

图 20 为各组大鼠海马组织中 active Caspase 3、Bcl-2、Bax 的蛋白表达水平。结果显示，control 组和 Sham 组的 active Caspase 3、Bcl-2、Bax 的蛋白表达水平无差异；AD+PBS 组的 active Caspase 3 和 Bax 的表达水平极显著高于 control 组和 Sham 组，Bcl-2 的表达水平显著低于 control 组和 Sham 组；AD+DNA 材料组的 active Caspase 3 的表达水平与 control 组和 Sham 组无差异，但是极显著低于 AD+PBS 组；AD+DNA 材料组 Bax 的表达水平与 control 组和 Sham 组无差异，但极显著低于 AD+PBS 组；AD+DNA 材料组 Bcl-2 的表达水平 control 组和 Sham 组无差异，但是极显著高于 AD+PBS 组。

以上结果表明：空白对照组和假手术组凋亡水平没有差异；而 AD 模型组凋亡水平显著升高，DNA 材料治疗后，能够有效地抑制凋亡水平。

实验例 7 荧光定量 PCR 检测

1.方法

1.1 引物

RT-PCR 所用引物序列如下表：

引物名称	SEQ ID NO.	引物序列（5'-3')
Caspase-3-F	5	CGGACCTGTGGACCTGAAAA
Caspase-3-R	6	TAACCGGGTGCGGTAGAGTA
Bcl-2-F	7	CTGGTGGACAACATCGCTCT
Bcl-2-R	8	GCATGCTGGGGCCATATAGT
Bax-F	9	CACTAAAGTGCCCGAGCTGA
Bax-R	10	CTTCCAGATGGTGAGCGAGG
GAPDH-F	11	TTCCTACCCCCAATGTATCCG
GAPDH-R	12	CATGAGGTCCACCACCCTGTT

1.2 实时荧光定量 PCR 检测

取 0.2 mL PCR 管，配制如下反应体系

2× qPCR Mix	12.5 μL
7.5 μM 基因引物	2.0 μL
反转录产物	2.5 μL

ddH2O 8.0 μL
PCR 扩增
预变性 95℃，10 min
循环（40 次） 95℃，15 s→60℃，60s
溶解曲线 75℃→95℃，每 20 s 升温 1℃
1.3 数据处理
数据以 2-ΔΔCt 进行处理：
A=CT(目的基因，待测样本)- CT(内标基因，待测样本)
B=CT(目的基因，对照样本)- CT(内标基因，对照样本)
K=A-B
表达倍数=2-K
采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析，所有数据以均值±标准差（$\bar{x}$±S）表示，不同组间两两比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）中的 LSD 法（最小显著性法），仅两组间比较采用 t 检验，$p<0.05$ 为有显著性差异的统计学意义，$p<0.01$ 为有极显著性差异的统计学意义。
2.结果
如图 21-23 所示，control 组和 sham 组之间的 caspase-3、Bcl-2、Bax 表达水平无显著性差异（P>0.05）；AD+PBS 组的 caspase-3、Bax 表达水平较 control 组和 sham 组均极显著性升高（P<0.01），Bcl-2 极显著性降低（P<0.01）；AD+DNA 组的 caspase-3、Bax 表达水平较 control 组和 sham 组极显著性升高（P<0.01），而 Bcl-2 极显著性降低（P<0.01）。与 AD+PBS 组相比，AD+DNA 组的 caspase-3、Bax 表达水平极显著性降低（P<0.01），Bcl-2 表达水平极显著性升高（P<0.01）。
以上结果表明，空白对照组和假手术组凋亡水平没有差异；而 AD 模型凋亡水平显著性升高，DNA 材料治疗后，能够有效地抑制凋亡水平。

实验例 8 Tunel 荧光染色实验

1.方法
1）冰冻切片组织用 4%多聚甲醛固定组织 20 分钟
2）PBS 清洗 30min，置于透性处理液中冰上孵育 2min。
3）制备 TUNEL 反应混合液。
4）加 50 μL TUNEL 反应混合液于标本上，加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应 37 ℃反应 1 h；PBS 洗 3 min×3 次。
5）防淬灭封片剂与 DAPI 1:500 稀释封片，-20 ℃冰箱保存，荧光显微镜或激光共聚焦显微镜拍片。
6）图像采集。通过显微镜采集分析样本相关部位，计算凋亡率。
2.结果
图 24 为 TUNEL 染色检测各组大鼠海马组织细胞凋亡情况。图 25 为 TUNEL 染色检测各组大鼠海马组织细胞 Tunel 阳性细胞统计情况。Con 组为空白对照组；Con 组为空白对照组；sham 组为假手术组；AD 组为阿尔茨海默病模型（AD）+生理盐水组； AD+DNA 组为 AD+DNA 材料组。
从图 24 和 25 可以看出，与 Con 组相比，Sham 组海马组织凋亡水平无显著性统计学差异；AD 组、AD+DNA 组大鼠海马组织凋亡水平明显升高，其中 AD 组组织细胞凋亡水平高于 AD+DNA 组组织细胞凋亡水平。
本实验例表明 TDNs 材料可以抑制 AD 模型中大鼠海马组织细胞凋亡的发生。
实验例 1~8 证明了 DNA 四面体材料具有显著的预防和治疗阿尔兹海默症的活性，DNA 四面体可以用于制备预防和治疗阿尔兹海默症药物。

权利要求书

1. DNA 四面体在制备药物中的用途，其特征在于，所述药物是治疗阿尔兹海默症的药物。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述 DNA 四面体由四条单链 DNA 通过碱基互补配对方式组装成四面体结构；所述四面体的每条棱都是双链 DNA 结构。

3. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述 DNA 四面体的制备方法是：将含有等浓度所述四条单链 DNA 的水溶液加热，使得碱基间氢键完全断开，维持 5~20min，然后快速降温到 0~10℃，保持至少 15min；所述水溶液中还含有 10mM Tris-HCl、50mM $MgCl_2$；所述水溶液加热前的 pH 值为 8。

4. 如权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述加热后维持时间为 10min，所述降温的具体温度为 4℃，所述降温后保持时间为 20min。

5. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述四条单链 DNA 的序列分别如 SEQ ID NO.1~4 所示。

6. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述药物是促进神经细胞增殖的药物。

7. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述药物是降低 β 类淀粉样蛋白对神经细胞的损伤的药物。

8. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述药物抑制神经细胞凋亡的药物。

9. 如权利要求 7 或 8 所述的用途，其特征在于，所述药物是降低 Bax、Caspase 3 和/或细胞色素 C 蛋白表达的药物。

10. 如权利要求 6 或 7 所述的用途，其特征在于，所述药物是升高 Bcl-2 蛋白表达的药物。

11. 一种治疗阿尔兹海默症的药物，其特征在于，它是使用权利要求 1~10 所述 DNA 四面体作为活性物质，加上药学上可接受的辅料或辅助性成分制备而成。

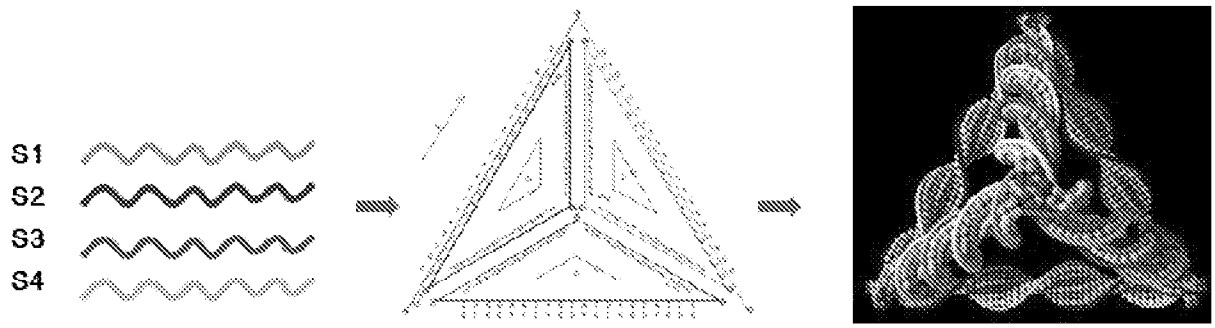

S1
S2
S3
S4

图 1

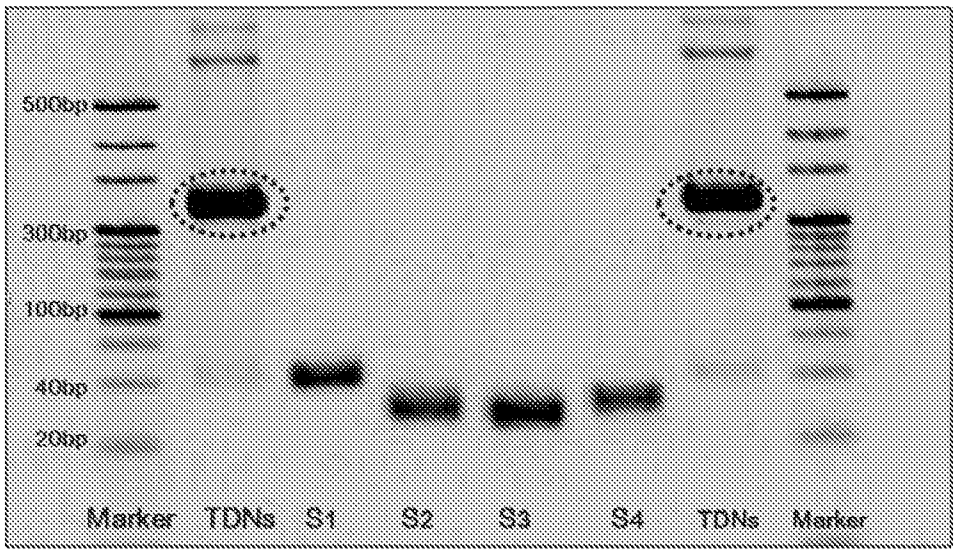

500bp
300bp
100bp
40bp
20bp
Marker
TDNs
S1
S2
S3
S4
TDNs
Marker

图 2

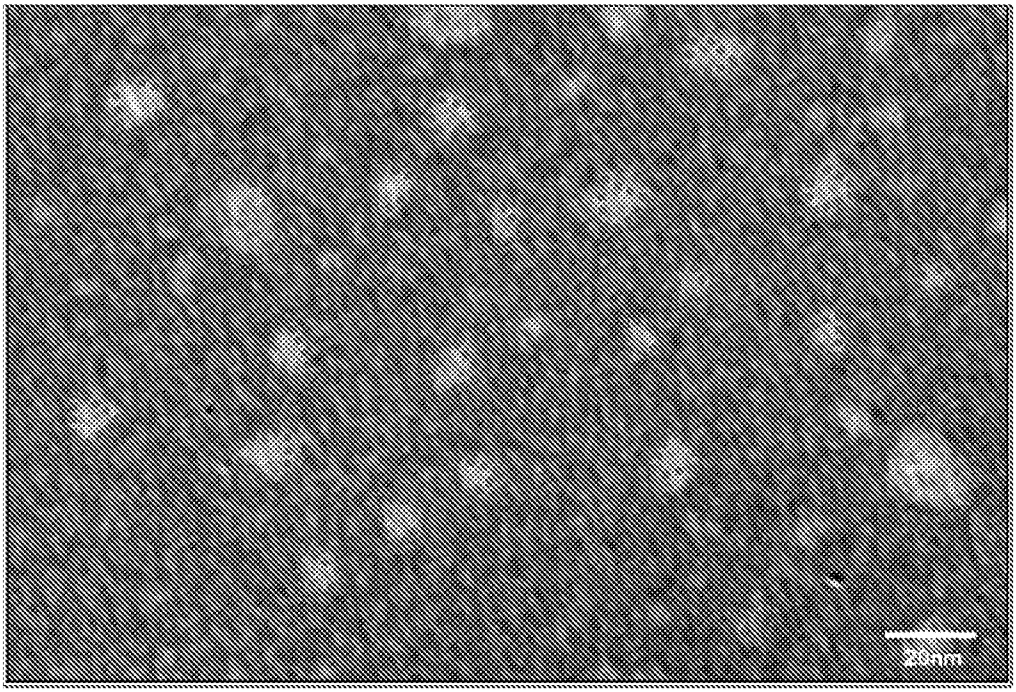


图 3

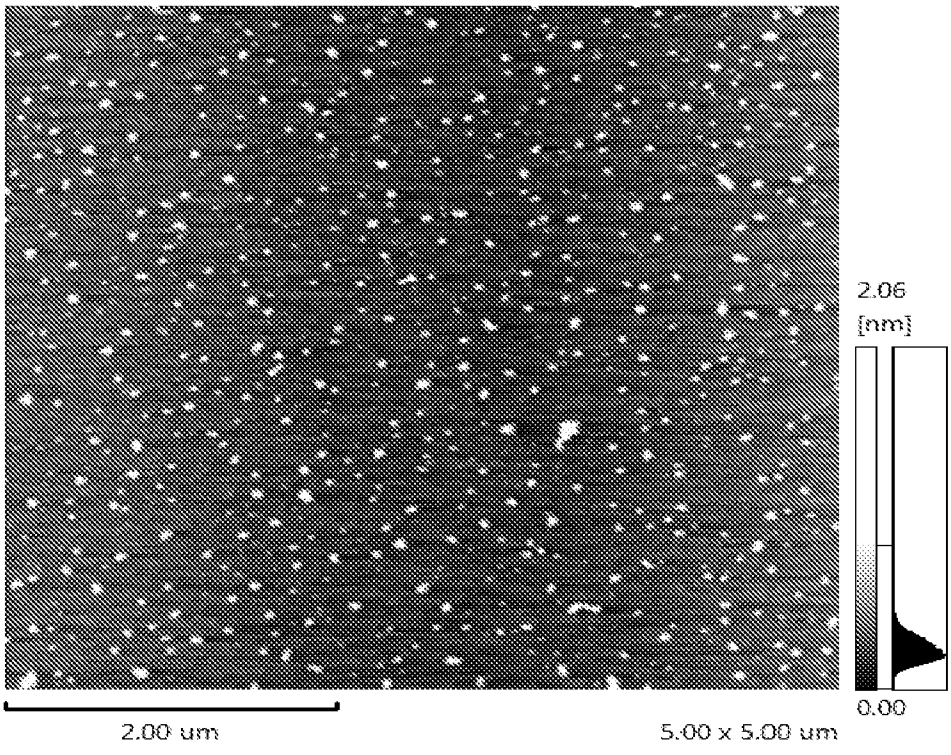


图 4

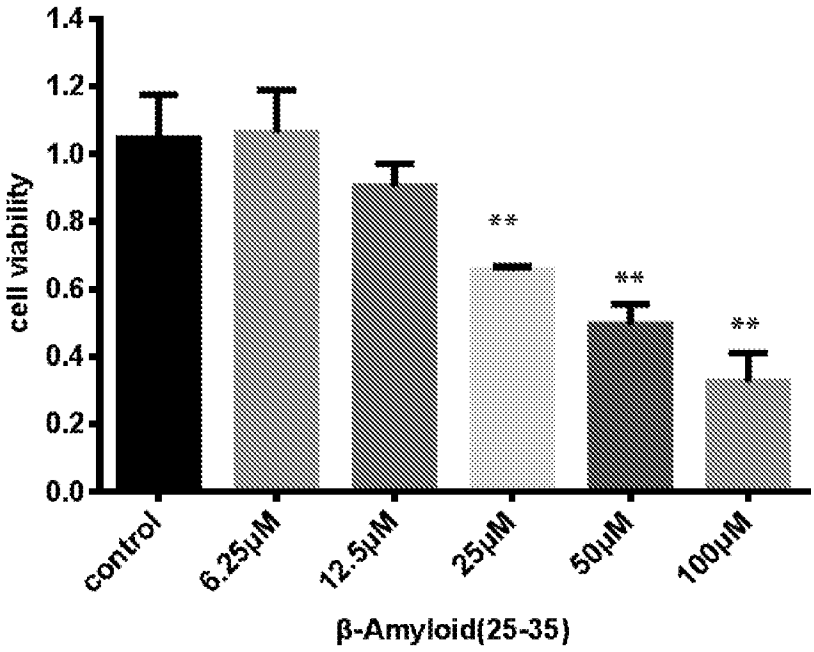

cell viability
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
**
control
6.25μM
12.5μM
25μM
50μM
100μM
β-Amyloid(25-35)

图 5

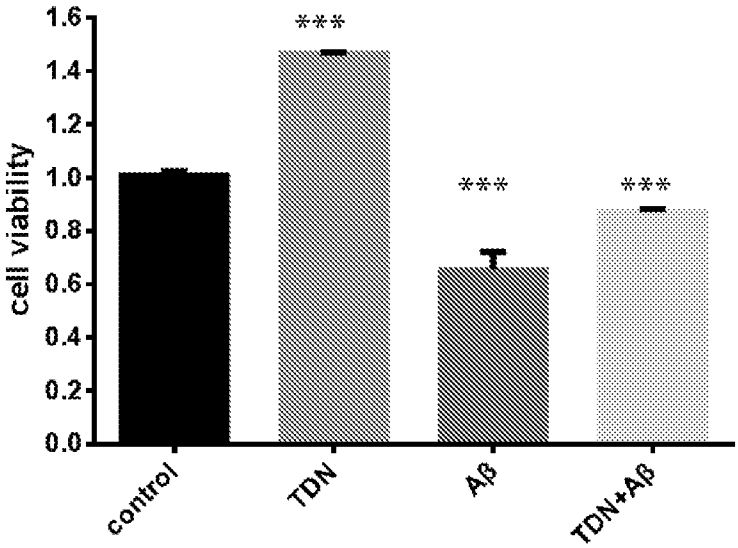

cell viability
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
***
***
control
TDN
Aβ
TDN+Aβ

图 6

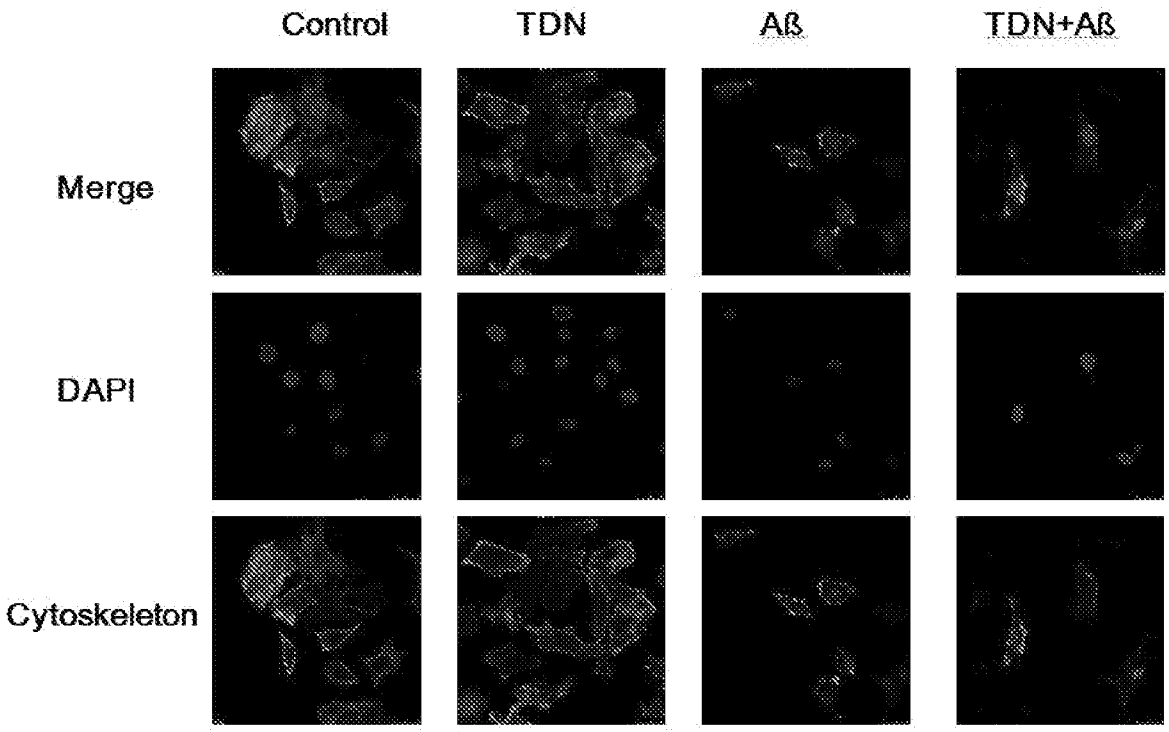

Control
TDN
Aß
TDN+Aß
Merge
DAPI
Cytoskeleton

图 7

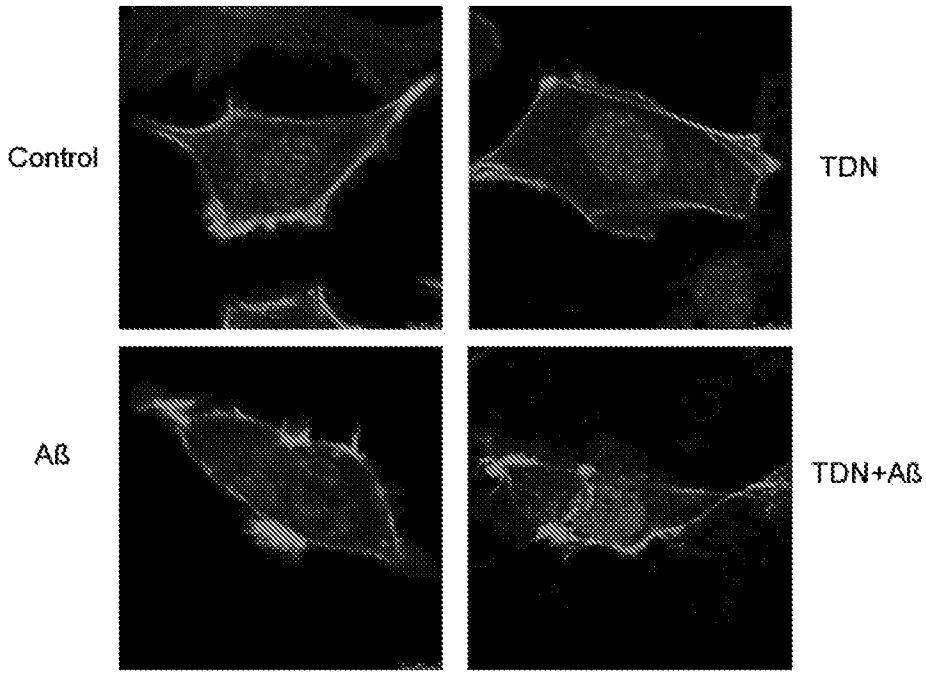
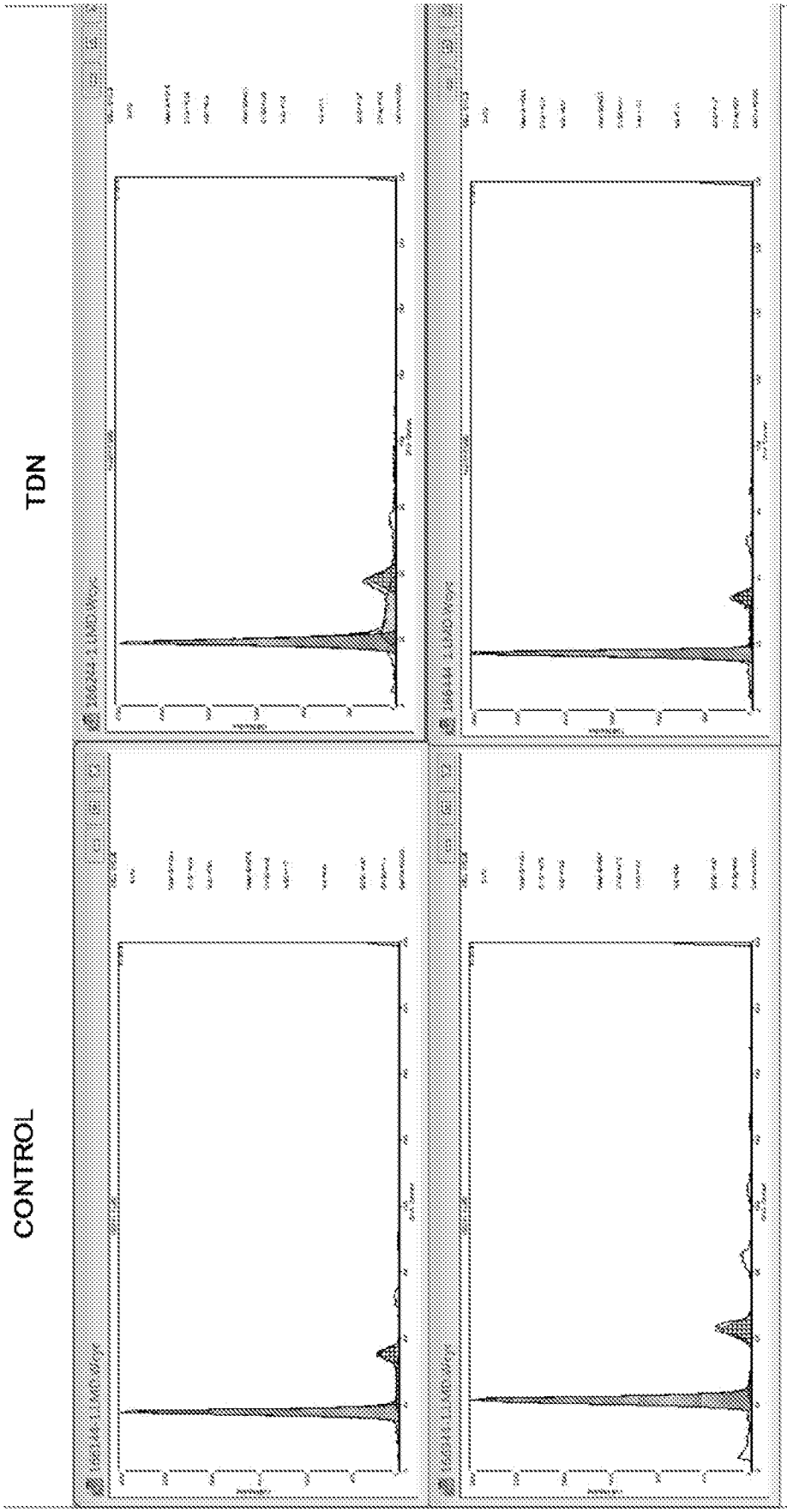

Control
TDN
Aß
TDN+Aß

图 8



	G1	S	G2
CONTROL	79.43±0.25	8.81±0.21	11.76±0.25
TDN	63.96±0.21	22.43±0.40	13.61±0.26

图 9

control

Region	Count	% Hist	% All	
Total	20000	100.00	100.00	(1.00,1
R2	364	1.82	1.82	(1.00,1
R3	477	2.38	2.38	(416.49
R4	19011	95.06	95.06	(1.00,1
R5	148	0.74	0.74	(416.4

TDN

Region	Count	% Hist	% All	
Total	20000	100.00	100.00	(1.00,1
R2	364	1.82	1.82	(1.00,1
R3	205	1.03	1.03	(279.94
R4	19380	96.90	96.90	(1.00,2
R5	51	0.26	0.26	(279.94

Aβ

Region	Count	% Hist	% All	
Total	20000	100.00	100.00	(1.00,1
R2	938	4.69	4.69	(1.00,1
R3	2116	10.58	10.58	(202.25
R4	15497	77.48	77.48	(1.00,2
R5	1449	7.25	7.25	(202.25

TDN+Aβ

Region	Count	% Hist	% All	
Total	20000	100.00	100.00	(1.00,1
R2	1434	7.17	7.17	(1.00,1
R3	397	1.98	1.98	(279.94
R4	18023	90.11	90.11	(1.00,2
R5	146	0.73	0.73	(279.94

图 10

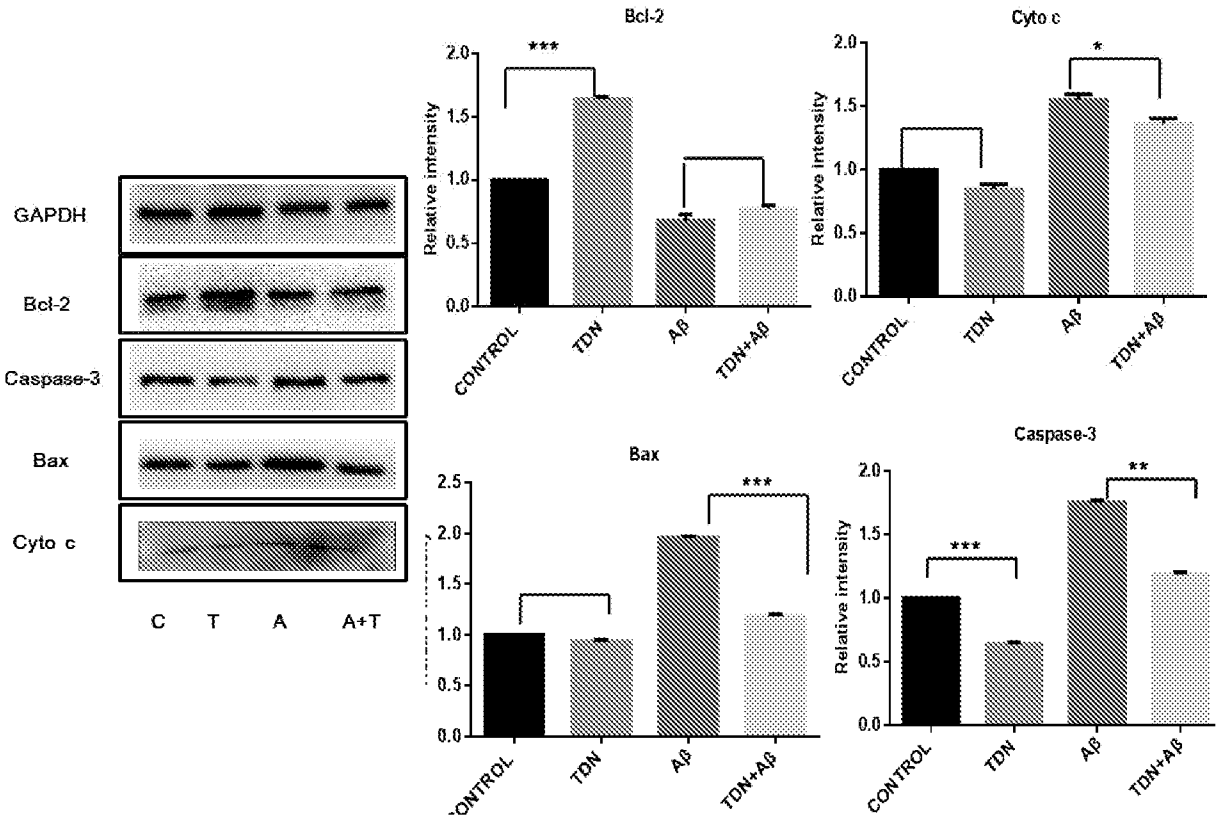


图 11

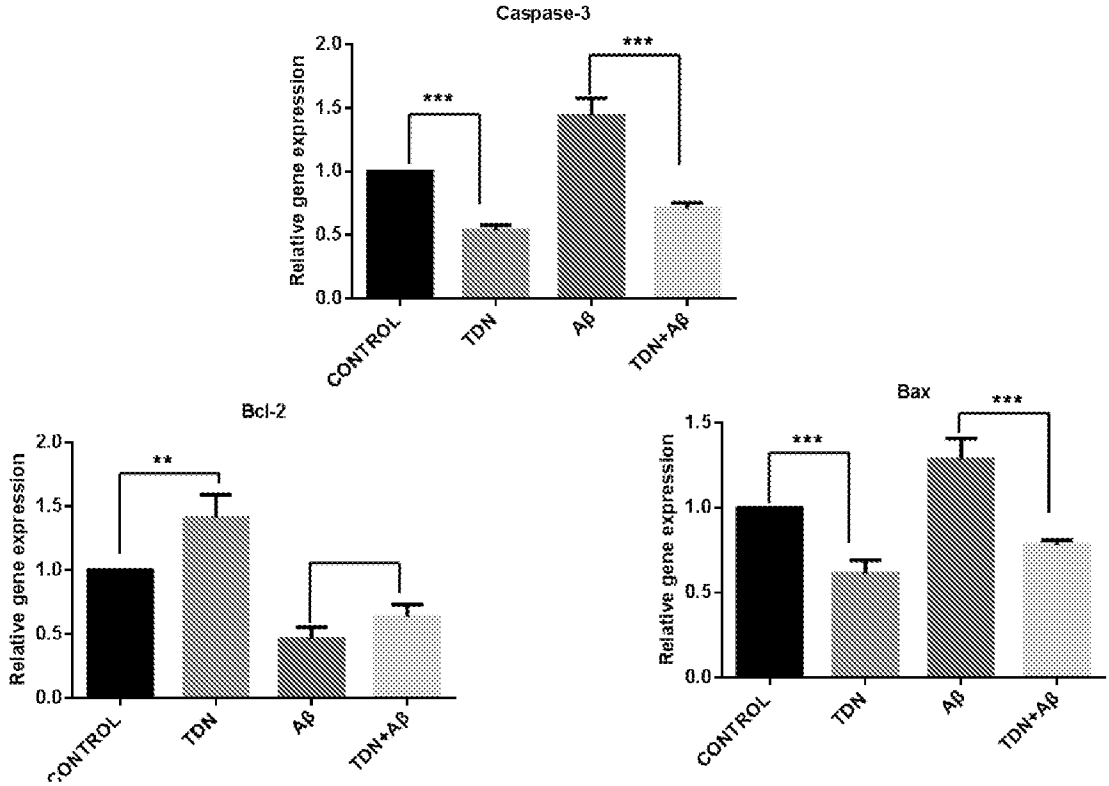

Caspase-3
Relative gene expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
CONTROL
TDN
Aβ
TDN+Aβ
Bcl-2
Relative gene expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
CONTROL
TDN
Aβ
TDN+Aβ
Bax
Relative gene expression
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
CONTROL
TDN
Aβ
TDN+Aβ

图 12

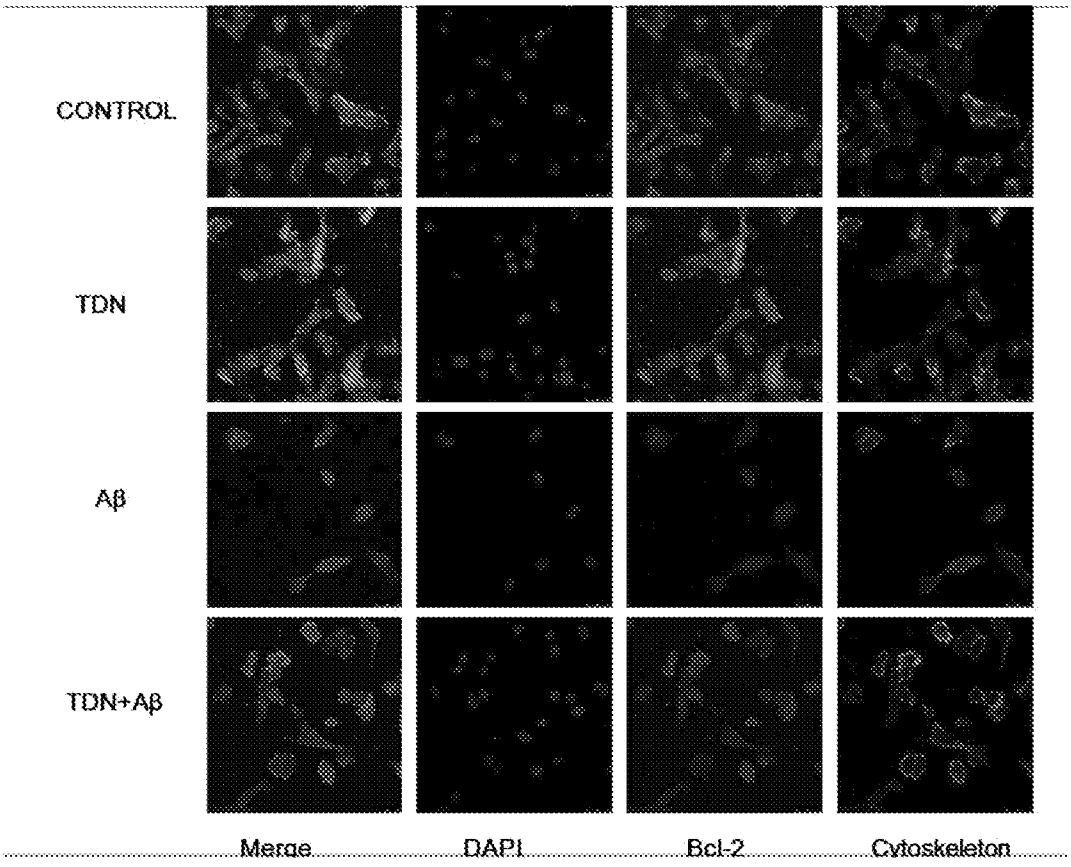

CONTROL
TDN
Aβ
TDN+Aβ
Merge
DAPI
Bcl-2
Cytoskeleton

图 13

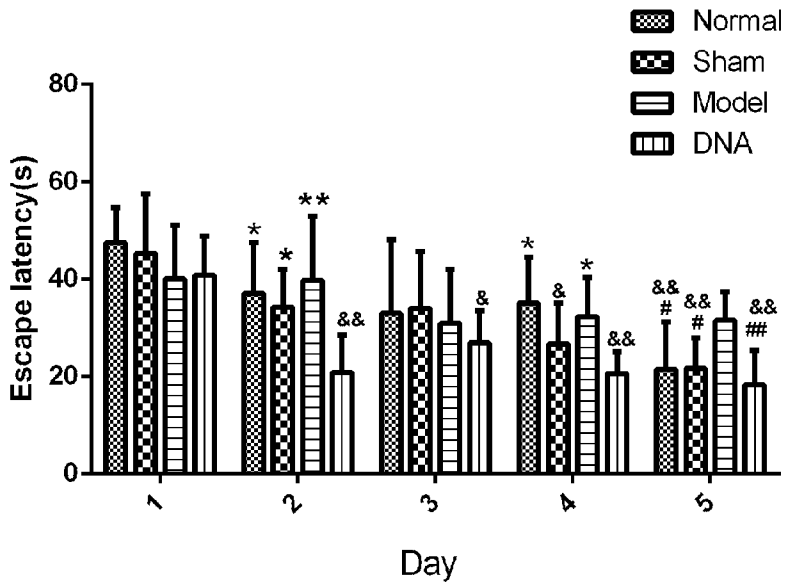

Normal
Sham
Model
DNA
Escape latency(s)
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
Day

图 14

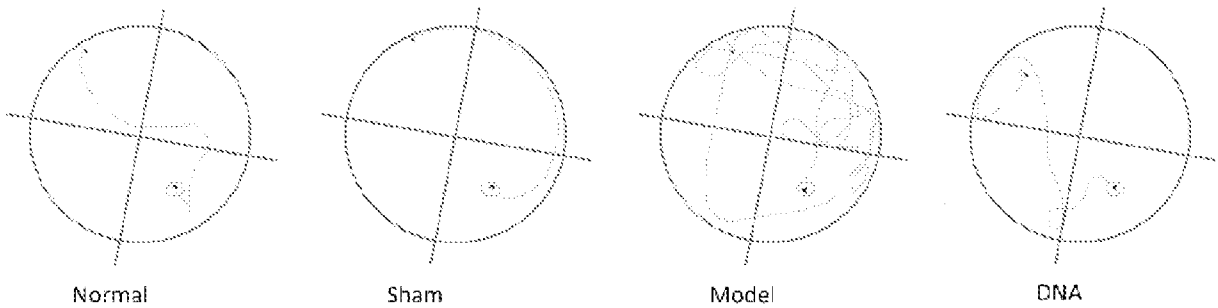

Normal
Sham
Model
DNA

图 15

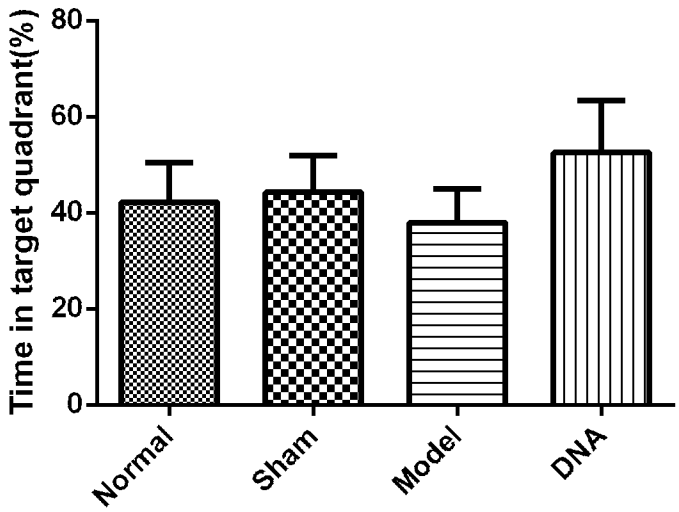

Time in target quadrant(%)
80
60
40
20
0
Normal
Sham
Model
DNA

图 16

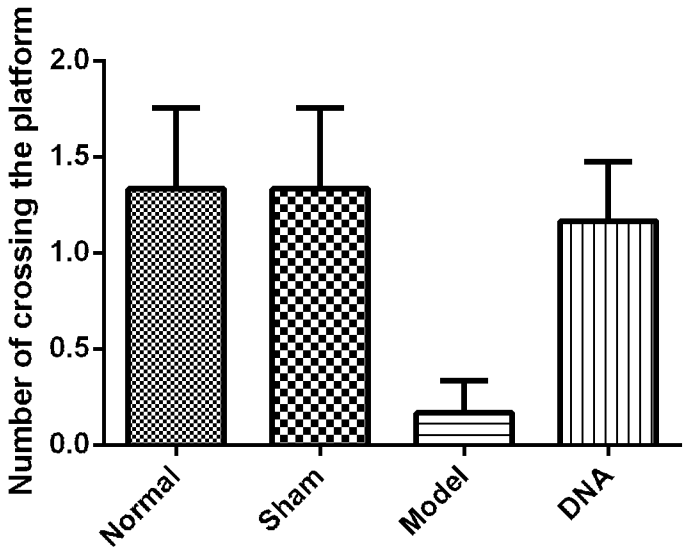

Number of crossing the platform
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Normal
Sham
Model
DNA

图 17

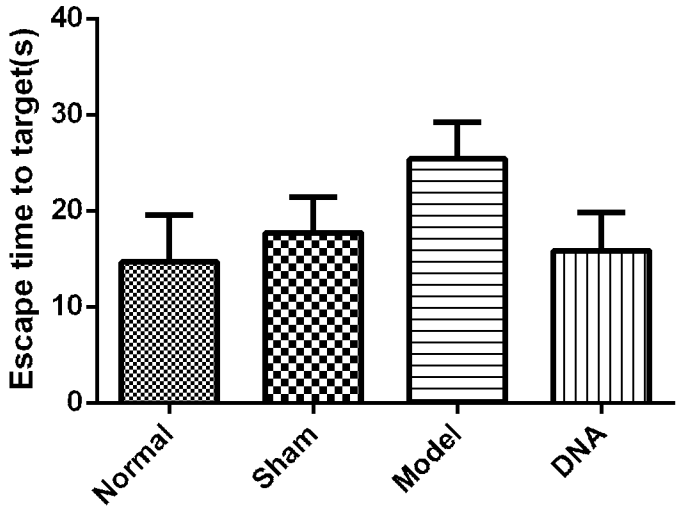

Escape time to target(s)
40
30
20
10
0
Normal
Sham
Model
DNA

图 18

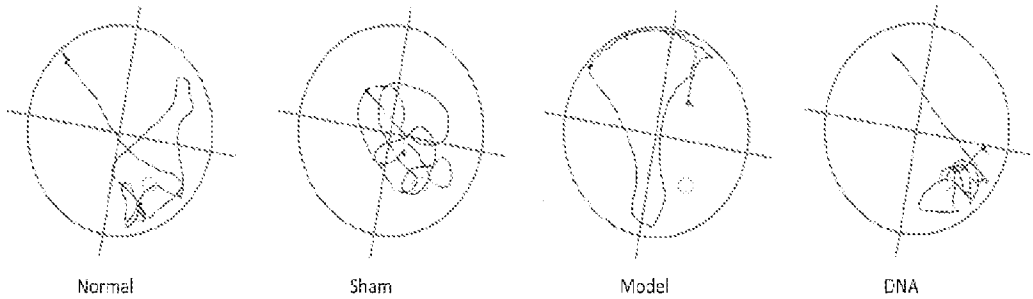

Normal
Sham
Model
DNA

图 19

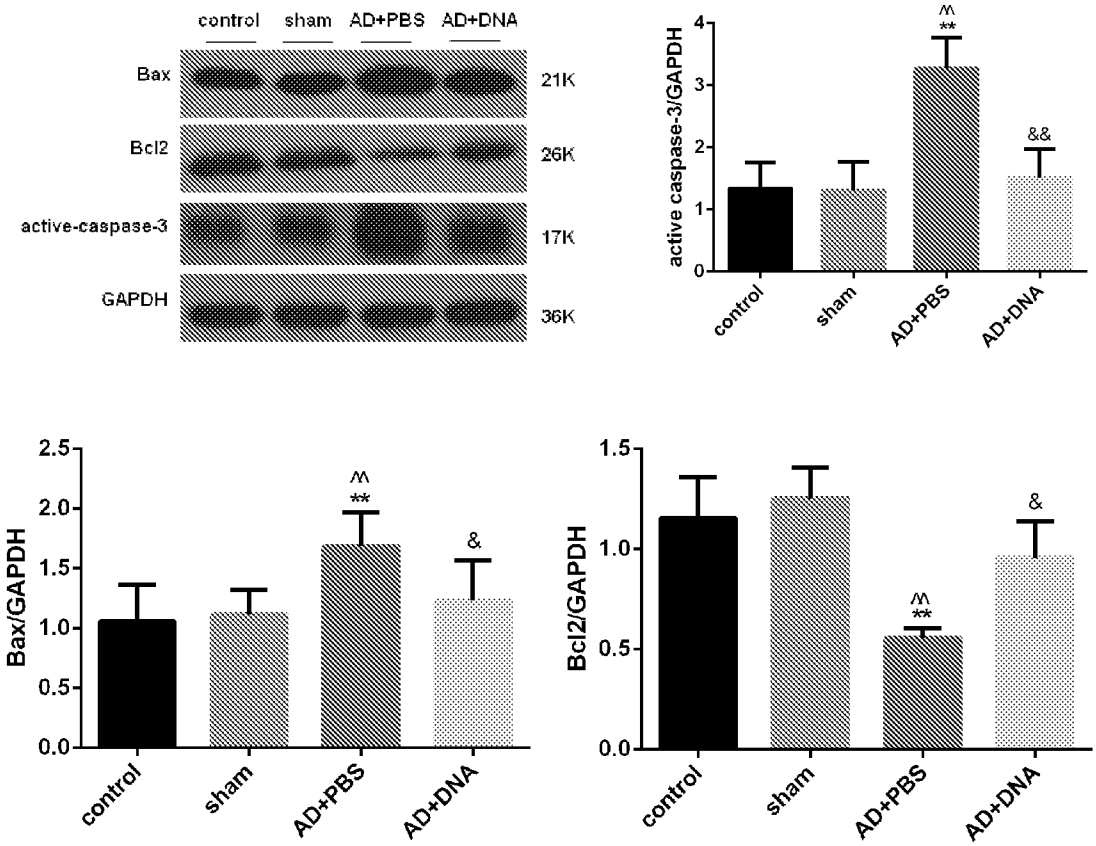

control
sham
AD+PBS
AD+DNA
Bax
Bcl2
active-caspase-3
GAPDH
21K
26K
17K
36K
active caspase-3/GAPDH
Bax/GAPDH
Bcl2/GAPDH
^^
**
&
&&

图 20

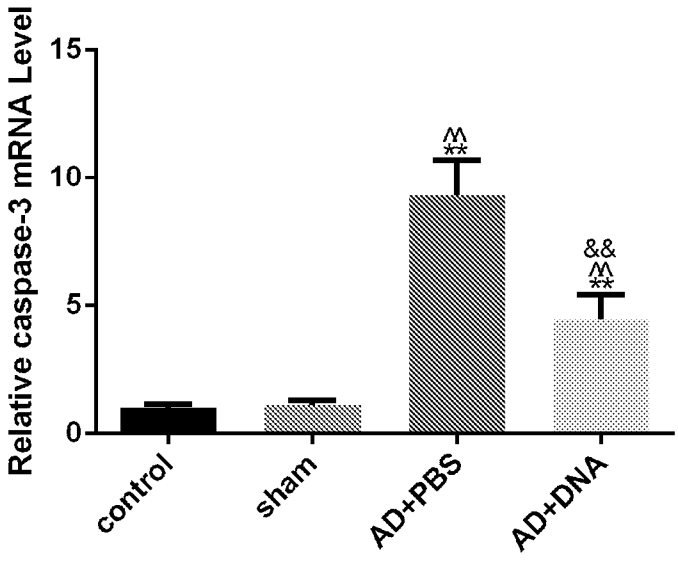

Relative caspase-3 mRNA Level
control
sham
AD+PBS
AD+DNA
^^
**
&&

图 21

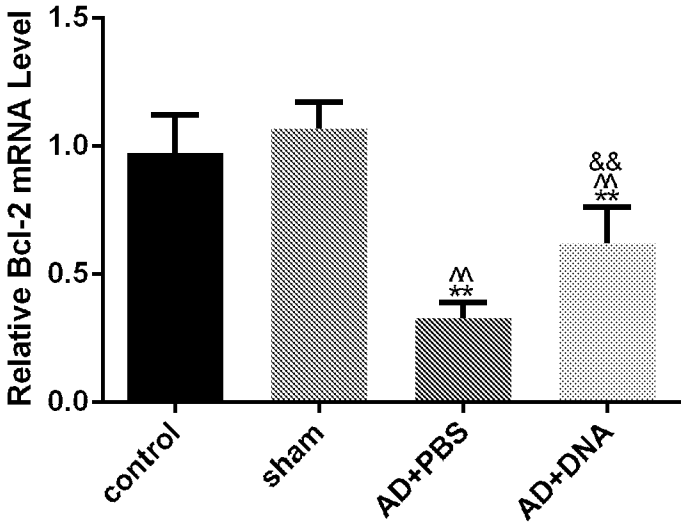

Relative Bcl-2 mRNA Level
1.5
1.0
0.5
0.0
control
sham
AD+PBS
AD+DNA
**
&&
**

图 22

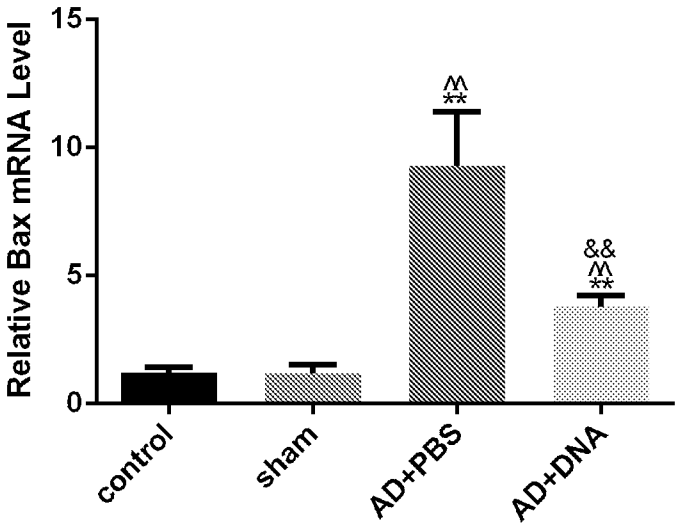

Relative Bax mRNA Level
15
10
5
0
control
sham
AD+PBS
AD+DNA
**
&&
**

图 23

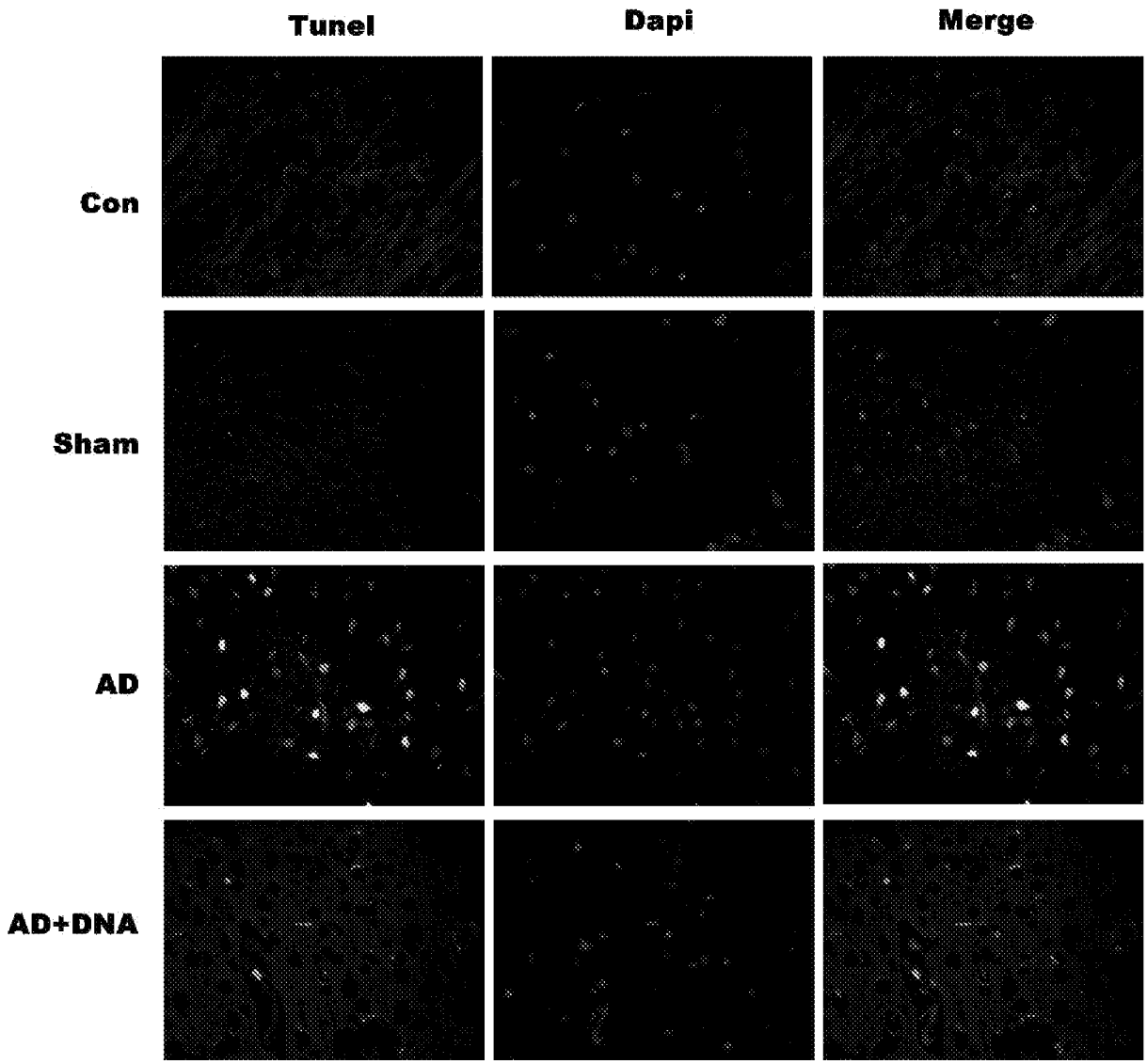


图 24

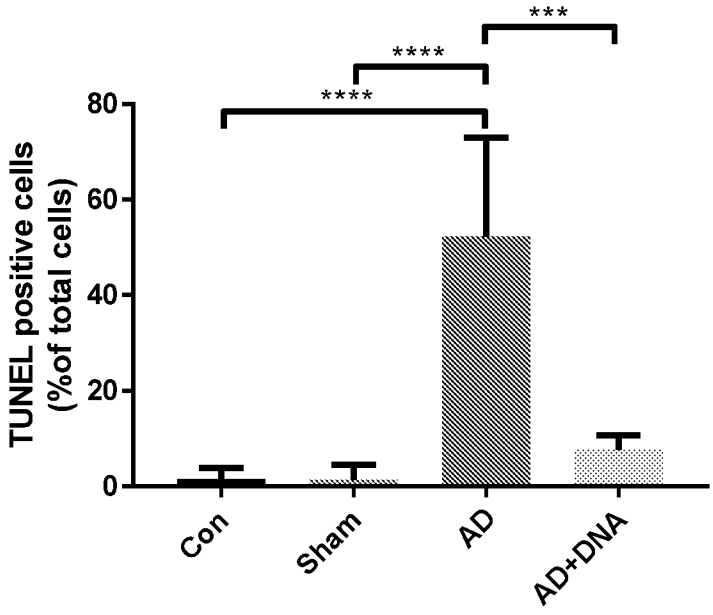

***
****
****
TUNEL positive cells
(%of total cells)
80
60
40
20
0
Con
Sham
AD
AD+DNA

图 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/116846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/711(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; JPABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; NCBI GenBank; 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; EMBL-EBI; DDBJ; UNIPROT; CNKI: DNA四面体, 三维, 阿尔兹海默, 阿尔茨海默, 海默, 纳米, search based on SEQ ID NOs: 1-4, TDNs, Tetrahedral DNA, AD, Alzheimer Disease, Nanostructure

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107669697 A (SICHUAN UNIVERSITY) 09 February 2018 (2018-02-09) description, paragraphs 0004-0106	1-11
PX	SHAO, Xiaoru et al. "Neuroprotective Effect of Tetrahedral DNA Nanostructures in a Cell" *ACS Appl. Mater. Interfaces*, Vol. vol. 10, 21 June 2018 (2018-06-21), paragraphs 23682-23692	1-11
Y	SHAO, Xiaoru et al. "Tetrahedral DNA Nanostructure: A Potential Promoter for Cartilage Tissue Regeneration via Regulating Chondrocyte Phenotype and Proliferation" *SMALL*, Vol. vol. 13, 23 January 2017 (2017-01-23), pp. 1-12	1-11
Y	聂晶 等 (NIE, Jing et al.). "早老素在阿尔茨海默病发病机制中的作用 (Non-official translation: The Role of Presenilin in the Pathogenesis of Alzheimer Disease)" *华西药学杂志 (West China Journal of Pharmaceutical Sciences)*, Vol. 32, No. (1), 15 February 2017 (2017-02-15), pp. 99-103	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 January 2019	**12 February 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing** **100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/116846

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/116846

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 107669697 A	09 February 2018	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/116846

A. 主题的分类

A61K 31/711(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS;DWPI;SIPOABS;JPABS;CNTXT;EPTXT;USTXT;WOTXT;JPTXT;NCBI GenBank;中国专利生物序列检索系统;EMBL-EBI;DDBJ;UNIPROT;CNKI:DNA四面体，三维，阿尔兹海默，阿尔茨海默，海默，纳米，根据SEQ ID NO:1-4中的序列进行了序列检索，TDNs,Tetrahedral DNA,AD,Alzheimer Disease,Nanostructure

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 107669697 A (四川大学) 2018年 2月 9日 (2018-02-09) 说明书第0004-0106段	1-11
PX	SHAO, Xiaoru 等. "Neuroprotective Effect of Tetrahedral DNA Nanostructures in a Cell" ACS Appl.Mater.Interfaces, 第10卷，2018年 6月 21日 (2018-06-21), 第23682-23692段	1-11
Y	SHAO, Xiaoru 等. "Tetrahedral DNA Nanostructure: A Potential Promoter for Cartilage Tissue Regeneration via Regulating Chondrocyte Phenotype and Proliferation" SMALL, 第13卷，2017年 1月 23日 (2017-01-23), 第1-12页	1-11
Y	聂晶 等. "早老素在阿尔茨海默病发病机制中的作用" 华西药学杂志, 第32卷，第1期，2017年 2月 15日 (2017-02-15), 第99-103页	1-11

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 1月 29日	2019年 2月 12日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	何华山
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-512)88996498

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/116846

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/116846

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 107669697 A	2018年 2月 9日	无	