



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101200721 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 200710154504.9

(22) 申请日 2007.09.18

(66) 本国优先权数据

200610116174.X 2006.09.18 CN

(73) 专利权人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市医学院路 136 号

(72) 发明人 邹云增 姜红 李纪明 张磊

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
31200

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1337884 A, 2002.02.27, 全文.

CN 1174509 A, 1998.02.25, 全文.

GenBank Database. 1994, Accession
number: M64673.

Yunzeng Zou et al.. Heat shock
transcription factor 1 protects cardiomy
ocytes from ischemia/reperfusion injury.
Circulation 108. 2003, 108 摘要, 3024 页右栏第
11-21 行, 3025 页左栏第 47-50 行, 3026 页左栏第
4 行-3027 页右栏第 14 行.

审查员 赵硕

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

人心肌保护基因及其用途

(57) 摘要

本发明属生物技术领域, 涉及人心肌保护基因热休克转录因子 (HSF1) 及其筛选方法和用途。本发明采用“死亡陷阱”的方法, 从人心脏基因库中筛选具有抵抗心肌细胞死亡的基因, 从所获得的基因中, 克隆人心肌保护基因热休克转录因子 1。经转染细胞和动物实验, 结果显示所获得的人心肌保护基因具有抗细胞死亡的作用, 在活体的心脏内也具有抵抗缺血保护心肌细胞和防治心力衰竭发生发展的作用。本发明可制备治疗缺血性心脏病和预防心功能不全的药物, 为进一步的功能研究和基因工程药物开发提供新的靶基因, 对心衰的早期预防、治疗及研发有关药物及手段有重要意义。

1. 序列 1 的人心肌保护基因热休克转录因子在制备治疗心力衰竭药物中的用途。
2. 序列 1 的人心肌保护基因热休克转录因子在制备预防心力衰竭药物中的用途。

人心肌保护基因及其用途

技术领域

[0001] 本发明属生物技术领域,涉及一种人心肌保护基因,具体地说,涉及人心肌保护基因热休克转录因子(HSF1)及其筛选方法和用途。

背景技术

[0002] 心力衰竭是一组复杂的临床症候群,是多数器质性心脏病人的严重阶段,5年存活率与恶性肿瘤相仿。心脏病病人一旦出现心力衰竭,其1年死亡率为43%,5年死亡率达75%,严重危害人类健康。流行病学资料显示目前全球心衰患病人数高达2250万,并且每年新增病例200万。人口快速老龄化及各种危险因素的增加使缺血性心脏病成为引起心衰最常见的病因,在发达国家心肌梗死生存率提高是心力衰竭增加的主要原因,在发展中国家流行病学从感染、结核到心脏病的转变也是一个重要问题。与全球流行趋势一致,缺血性心脏病是我国引起心衰最常见的病因,尤其是我国有约1.3亿高血压人口,并且仍然处于低知晓率、低治疗率、低达标率的现状,在我国缺血性心脏病现在及今后相当一段时间内都将是导致心力衰竭的主要原因,且呈上升趋势,是我国公共卫生面临的重大问题,给国民经济造成了沉重的负担。

[0003] 随着对心衰发病机制的逐步阐明及大规模循证医学的研究,心衰的治疗模式也在不断更新和演变。从20世纪50至80年代以纠正血流动力学异常、改善症状到90年代以后的长期修复性策略、改善预后。然而目前心衰的治疗方式均是针对已经受损或坏死心肌的姑息治疗,恢复程度有限。心肌细胞一般认为是终末期细胞,功能心肌细胞的丧失是引起心肌收缩力低下、导致心衰的直接原因。而缺氧是多种致病因素导致细胞损伤、死亡的共同环节,细胞在损伤刺激作用下存活与死亡结局取决于其内源性保护机制与死亡信号之间的动态平衡,如何在细胞损伤极早期调节其保护因子与死亡信号的平衡,激发保护性机制是保护功能性心肌组织、预防心衰的关键问题。

[0004] 随着遗传学和生物信息学的发展,通过基因修饰改变基因功能曾经一度成为治疗心衰的希望,然而目前关于基因的研究主要侧重于单个基因的功能,而器官组织的功能是多种基因相互协调共同调节的结果,并且心衰是多种因素共同参与导致的一种临床综合征,以单个基因为靶点的治疗方式并不能取得理想的效果。现有技术用基因芯片的方法找出差异表达基因,再对这些基因(往往成百上千个)进行功能学的鉴定,往往有大海捞针的感觉。虽然能得到大量的有关基因的序列信息,但其中对阐明功能起关键作用的并不多。Vito P于1996年报道了从诱导死亡的培养细胞中筛选保护性基因的方法,称死亡陷阱(Death Trap)的方法。尚未见有将死亡陷阱基因筛选的方法应用于心脏疾病的研究。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种人心肌保护基因,具体涉及细胞损伤极早期具有保护心肌抵抗缺氧损伤的基因。更具体地说涉及人心肌保护基因热休克转录因子(HSF1)。

[0006] 本发明的进一步目的是提供上述基因的筛选方法及其用途。

[0007] 本发明采用死亡陷阱”(Death Trap) 的方法,进行功能基因筛选,从人心脏基因库中筛选出具有抵抗心肌细胞死亡的基因,从中,克隆出具有序列 1 结构的热休克转录因子 1 (HSF1)。

[0008] 本发明所述的 HSF1 经细胞实验证实具有抗细胞死亡的作用;经动物实验结果证明具有抵抗缺血保护心肌细胞和防治心力衰竭发生发展的作用。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现,

[0010] 1. 采用 death trap 功能基因筛选法筛选保护心肌抵抗缺氧损伤的基因并克隆其 cDNA ;

[0011] 2. 通过细胞及动物实验进一步验证克隆的 cDNA 中具有心肌保护作用的基因 ;

[0012] 3. 在基本阐明筛选基因相互联系和作用的基础上,寻求最优化的相互作用模式,并通过细胞及动物实验验证能否达到最佳的心肌保护效果 ;

[0013] 4. 根据筛选的具有心肌保护功能的基因序列预测产物形式,将能产生分泌蛋白的基因转化大肠杆菌,并进行细胞因子活性筛选、鉴定 ;

[0014] 5. 比较患者心肌缺血后血清及心脏相关保护基因的表达变化,筛选具有判断预后价值的早期预测指标,并进行临床验证。

[0015] 本发明进行了细胞实验,将上述 HSF1 基因转染细胞,结果显示 60% 以上转染了所述基因的细胞能够抵抗缺氧引起的死亡,确认所述的 HSF1 具有抗细胞死亡的作用。

[0016] 本发明进行了动物实验,首先,用心脏 HSF1 基因过表达的转基因小鼠制作了心脏缺血 / 再灌注损伤模型,结果显示,心脏缺血 / 再灌注损伤后,HSF1 转基因小鼠心肌坏死的面积比非转基因小鼠减少了 30% 以上,心肌细胞凋亡的数量则减少了 40% 以上。同时,本发明证实了 HSF1 是通过热休克蛋白 HSP27、HSP70 和 HSP90 而不是 HSP110 来对心脏进行保护。这些保护作用也同时体现在转基因小鼠的心电图上——缺血 / 再灌注损伤后 ST-T 改变的更快恢复;另外,本发明用心脏 HSF1 基因过表达的转基因小鼠和心脏 HSF1 基因敲除的小鼠制作了压力超负荷心力衰竭模型。结果显示,前者同对照组比,延缓了心力衰竭的发生发展,并且同时显示可以促进心脏新生微血管的形成,后者反之。动物实验的结果证明了 HSF1 基因在活体的心脏内也具有抵抗缺血保护心肌细胞和防治心力衰竭发生发展的作用。

[0017] 本发明将死亡陷阱这一直接功能基因筛选的方法应用于心脏,更具有目的性和精确性。可以对筛选到的基因有针对性地进行再组合,更加有利于寻找到最佳的基因治疗方法。

[0018] 本发明实验中使用 COS7 细胞株(购自美国 ATCC 公司)进行基因筛选;人类心脏基因库购自美国 Life Technologies 公司;采用 HSF1 转基因鼠(日本山口大学应用医学工程科)进行动物实验。

[0019] 本发明将人的心脏基因库转染培养细胞并使用过氧化氢进行死亡诱导,从存活的细胞株中提取的基因中克隆了热休克转录因子 (HSF1)。进一步研究表明 HSF1 不仅能抗细胞死亡,在活体的心脏内也具有保护作用,而且还发现 HSF1 通过激活具有细胞保护作用的蛋白激酶 Akt1 的同时,抑制了能够引起细胞凋亡的激酶 JNK 和蛋白质 caspase3 的活性,从而减少了心肌细胞的凋亡,起到了心肌保护的作用。

[0020] 本发明从处于不同死亡阶段的细胞或不同心力衰竭程度的心脏组织中筛选出相关基因,并人工制作出这些基因的 cDNA,将这些 cDNA 导入培养细胞或动物心脏内,观察它

们的相互联系和作用。能为进一步的功能研究和基因工程药物开发提供新的靶基因。通过“死亡陷阱”功能基因筛选的方法,筛选出在心肌损伤 极早期具有逆转心肌死亡、保护心肌的新基因,并阐明其相互作用模式,对心衰的早期预防、治疗及进一步研发有关药物及手段均有重要意义。

[0021] 本发明对寻找治疗缺血性心脏病和预防心功能不全的药物和手段具有重要的意义。

附图说明

[0022] 图 1 是本发明的技术路线图。

[0023] 图 2 是压力超负荷模型左室射血分数测量数值图。

[0024] 图 3、4 是压力超负荷模型新生血管数测量数值图。

[0025] 图 5 是 ASK1 与 HSF1 之间存在的联系。

[0026] 图 6 是 HSF1 对细胞的保护作用。

具体实施方式

[0027] 实施例 1

[0028] 一、用 death trap 方法筛选保护心肌抵抗缺氧损伤的基因

[0029] 以大鼠心脏成纤维细胞为研究对象,通过电穿孔法转染人心脏基因库 (pCMVSPORT heart cell expression cDNA library)。48 小时后对转染细胞给予致死性缺氧刺激诱导细胞死亡,存活的细胞克隆可能包含有保护心肌抵抗缺氧损伤的基因。从存活的细胞克隆中提取亚基因库后再转染心脏成纤维细胞,重复实验程序 4 次。从最后存活的细胞克隆中筛选改变最明显的几种基因,克隆出其 cDNA。

[0030] 二、验证筛选的 cDNA 是否具有心肌保护作用并优化其相互作用模式

[0031] 1. 细胞学水平

[0032] 将克隆的 cDNA 分别转染心肌细胞,给予致死性缺氧刺激后,观察细胞存活与死亡情况,明确 death trap 方法筛选的哪几种基因具有保护心肌细胞抵抗缺氧刺激的作用。

[0033] 本发明将具有保护细胞抵抗缺氧损伤的几种基因以不同组合方式共转染心肌细胞,给予致死性缺氧刺激后,比较不同转染方式对细胞存活与死亡的影响,在细胞水平优化不同基因的相互组合模式。

[0034] ASK1 的 967 位 ser 在生理状态下自身磷酸化,试验结果显示:温度升高时, p967 发生脱磷酸化,此时 ASK1 激活 (易致细胞凋亡)。结果显示,将培养乳鼠 心肌细胞置于 42℃ 2 小时,此时 HSF1 的活性最高,高于 37℃ 时,故 42℃ ASK1 表达下降较 37℃ 时更明显,而总 ASK1 的表达没有明显的变化。以上结果说明, HSF1 激活可抑制 ASK1 表达,进而可能使细胞凋亡减少,保护心肌。

[0035] 培养新生鼠心肌细胞,0.1M 过氧化氢诱导凋亡,选用 ROS 作为指标, DCFH-DA 标记 ROS,流式检测 ROS,细胞转染 HSF1,结果显示,加入 H2O2 后心肌细胞凋亡明显增加,转染 HSF1 后的细胞对于 H2O2 诱导的凋亡与不转染细胞相比,ROS 水平可以降低 20% 以上,对于未加过氧化氢诱导凋亡的细胞,转染 HSF1 并不一定降低细胞内的 ROS 水平。

[0036] 上述细胞培养结果显示:HSF1 可抑制 ASK1 表达,抑制 ROS 水平,保护心肌。

[0037] 2. 动物水平

[0038] 复制大鼠急性心肌梗死模型,于冠脉结扎即刻、急性缺血后 30min,3h,6h,12h 分别于局部缺血心肌单独或共转染克隆的 cDNA,分别于术后 1 个月、3 个月、6 个月行心脏超声检查评价心功能,取心肌组织行病理学检查观察形态学改变,在动物水平评价哪一种基因或几种基因的组合具有保护心肌抵抗急性缺氧刺激的作用。

[0039] 复制冠状动脉狭窄慢性心肌缺血模型,于局部单独或共转染克隆的 cDNA,分别于术后 1 个月、3 个月、6 个月行心脏超声检查评价心功能,取心肌组织行病理学检查观察形态学改变,在动物水平评价所述基因或几种基因的组合具有保护心肌抵抗慢性缺氧刺激的作用。

[0040] 复制小鼠机械压力负荷诱导的心力衰竭模型,于局部单独或共转染克隆的 cDNA,分别于术后 1 周、2 周和 4 周行心脏超声检查评价心功能,取心肌组织行病理学检查观察形态学改变,在动物水平评价所述基因或几种基因的组合具有防治心力衰竭发生发展的作用。

[0041] 结果显示:

[0042] 1. 压力超负荷模型建立成功后,野生小鼠 (NO) 组左室射血分数 (LVEF) 在第 3 周开始下降,第 4 周下降明显,出现心力衰竭;同 NO 组比较,基因敲除小鼠 (KO) LVEF 从第一周就开始下降直到第 4 周都降低,出现心力衰竭,而基因转染小鼠 (TG) 组直到第 4 周 LVEF 也未下降,未出现心力衰竭。其具体的测量数值见图 2。

[0043] 2. 压力超负荷模型建立成功后,在第 4 周末用免疫组化检测新生血管数目,可观察到,野生小鼠 (NO) 组,基因敲除的小鼠 (KO) 组,数目下降,但基因转染的小鼠 (TG) 组增多。其具体的测量数值及图表见图表 3、4。

[0044] 上述动物实验初步显示:HSF1 可促进新生血管生成,改善心脏功能。

[0045] 三、根据筛选的具有心肌保护功能的基因序列预测产物形式,将其中产生分泌蛋白的基因转化大肠杆菌,并进行细胞因子活性筛选、鉴定,为进一步开发生长因子和蛋白质类药物提供源头创新的靶基因。

[0046] 四、比较患者心肌缺血后血清及心脏相关保护基因的表达变化,筛选具有判断预后价值的早期预测指标

[0047] 1. 收集健康志愿者及急性心肌梗死患者梗死后 6h,12h,24h 的血清标本,提取基因组 cDNA。根据上述实验筛选的保护基因序列分别设计并合成探针,与血清标本 cDNA 杂交,观察健康志愿者及急性缺氧后不同时间段筛选基因在血清的表达变化。

[0048] 2. 收集意外死亡及因缺血性心脏病终末期心力衰竭行心脏移植患者的心肌标本,提取基因组 cDNA。将合成探针与心肌组织 cDNA 杂交,观察筛选基因在慢性缺氧心肌组织的表达变化。通过比较分析血清及心肌组织标本相关保护基因的表达变化,筛选可能作为判断缺血性心脏病预后的极早期指标,并进一步进行临床随访验证。

[0049] SEQUENCE LISTING

[0050] <110> 复旦大学附属中山医院

[0051] <120> 人心肌保护基因及其用途

[0052] <130>11

[0053] <160>1

[0054] <170>PatentIn version 3.1
[0055] <210>1
[0056] <211>2156
[0057] <212>DNA
[0058] <213> 人类
[0059] <400>1
[0060] cgggccccgtt gcaagatggc ggcggccatg ctgggccccg gggctgtgtg tgcgcagcgg 60
[0061] gcggcggcgc ggcgcgaag gctggcgcgg cgacggcggt agccccggcc tcggcccctc 120
[0062] tttgcggcgc ctccccccgc ctattccctc cttgctcgag atggatctgc ccgtgggccc 180
[0063] cggcgcggcg gggcccagca acgtcccggc cttcctgacc aagctgtgga cctcgtgag 240
[0064] cgaccgggac accgacgcgc tcctctgctg gagcccgagc gggaacagct tccacgtgtt 300
[0065] cgaccagggc cagtttgcca aggaggtgct gcccagtac ttcaagcaca acaacatggc 360
[0066] cagcttcgtg cggcagctca acatgtatgg cttccggaaa gtggtccaca tcgagcaggg 420
[0067] cggcctggtc aagccagaga gagacgacac ggagttccag caccatgct tcctgcgtgg 480
[0068] ccaggagcag ctcttgaga acatcaagag gaaagtgacc agtgtgtcca ccctgaagag 540
[0069] tgaagacata aagatccgcc aggacagcgt caccaagctg ctgacggagc tgcagctgat 600
[0070] gaaggggaag caggagtga tggactccaa gctcctggcc atgaagcatg agaatgaggc 660
[0071] tctgtggcgg gaggtggcca gccttcggca gaagcatgcc cagcaacaga aagtcgtcaa 720
[0072] caagctcatt cagttcctga tctacttgtt gcagtcaaac cggatcctgg gggatgaagag 780
[0073] aaagatcccc ctgatgctga acgacagtgg ctcagcacat tccatgcccc agtatagccg 840
[0074] gcagttctcc ctggagcacg tccacggctc gggccccctac tcggccccct cccagccta 900
[0075] cagcagctcc agcctctacg cccctgatgc tgtggccagc tctggacca tcctctccga 960
[0076] catcacggag ctggctcctg ccagcccat ggcctcccc ggcgggagca tagacgagag 1020
[0077] gcccctatcc agcagcccc tgggtgcgtgt caaggaggag cccccagcc cgcctcagag 1080
[0078] cccccgggta gaggaggcga gtcccgggcg cccatcttc gtggacaccc tcttgctccc 1140
[0079] gaccgcccctc attgactcca tcctgcggga gagtgaacct gccccgcct ccgtcacagc 1200
[0080] cctcacggac gccaggggcc acacggacac cgaggggcgg cctccctccc ccccgccac 1260
[0081] ctccaccctc gaaaagtgcc tcagcgtagc ctgcctggac aagaatgagc tcagtgacca 1320
[0082] cttggatgct atggactcca acctggataa cctgcagacc atgctgagca gccacggctt 1380
[0083] cagcgtggac accagtgcc tgctggacct gtccagcccc tcggtgaccg tgcccagcat 1440
[0084] gacgtgcct gaccttgaca gcagcctggc cagtatccaa gagtcctgt ctcccagga 1500
[0085] gccccccagg cctcccgagg cagagaacag cagcccggtat tcagggaagc agctggtgca 1560
[0086] ctacacagcg cagccgtgt tctgtctgga ccccggtcc gtggacaccg ggagcaacga 1620
[0087] cctgccgtg ctgtttgagc tgggagaggg ctctacttc tccgaagggg acggcttcgc 1680
[0088] cgaggacccc accatctccc tgctgacagg ctcggagcct cccaaagcca aggacccac 1740
[0089] tgtctcctag aggccccgga ggagctgggc cagccgccc ccccccaccc cagtgcaggg 1800
[0090] ctggtcttgg ggaggcaggg cagcctcgcg gtcttgggca ctggtgggtc ggccgccata 1860
[0091] gcccagtag gacaaacggg ctcgggtctg ggcagcacct ctggtcagga gggtcacct 1920
[0092] ggcctgccag tctgccttcc cccaacccg tgtcctgtgg tttggttggg gcttcacage 1980

[0093] cacacctgga ctgaccctgc aggttggtca tagtcagaat tgtatttttg atttttacac 2040
[0094] aactgtcccg ttccccgctc cacagagata cacagatata tacacacagt ggatggacgg 2100
[0095] acaagacagg cagagatcta taaacagaca ggctctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa2156

技术路线

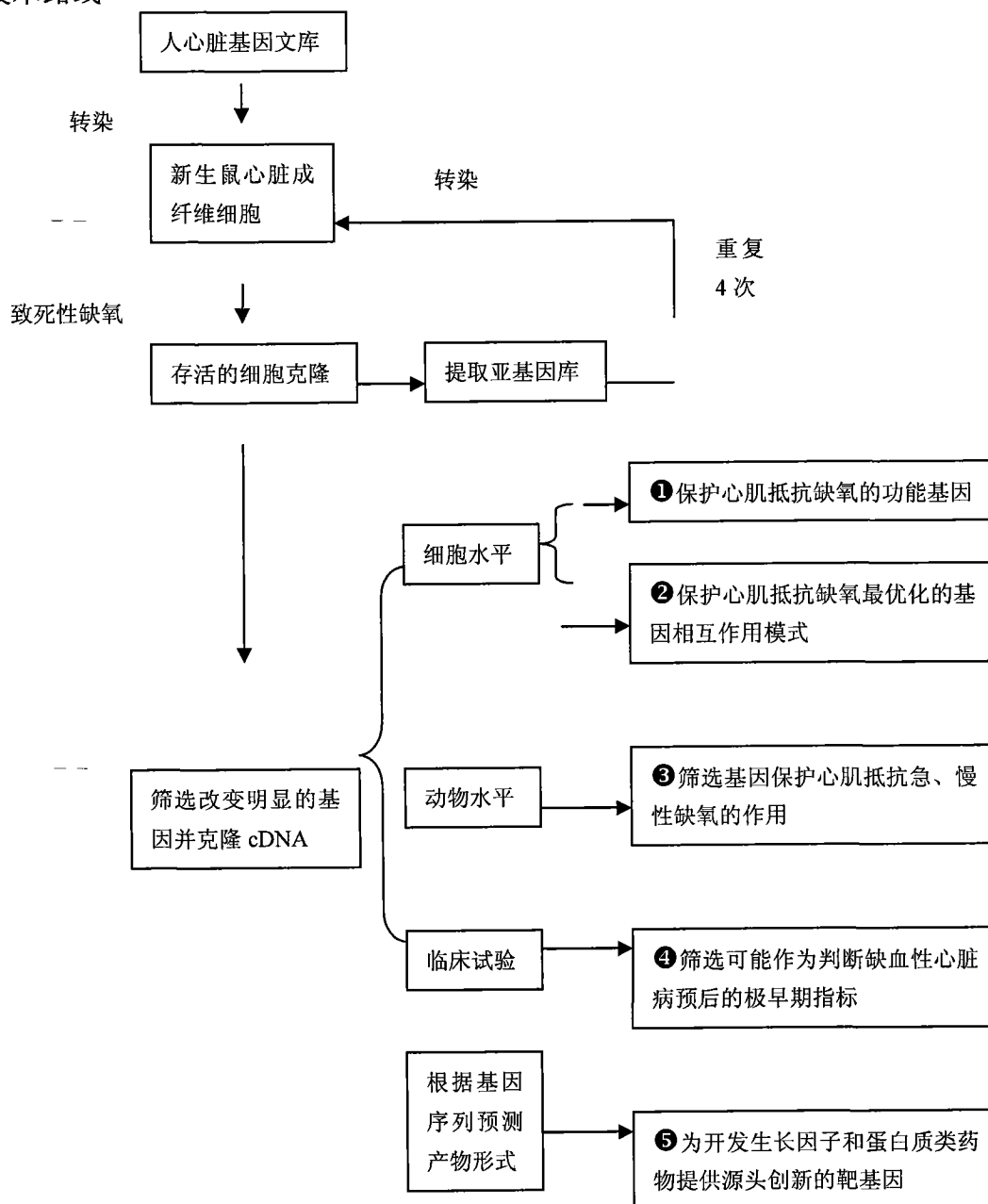


图 1

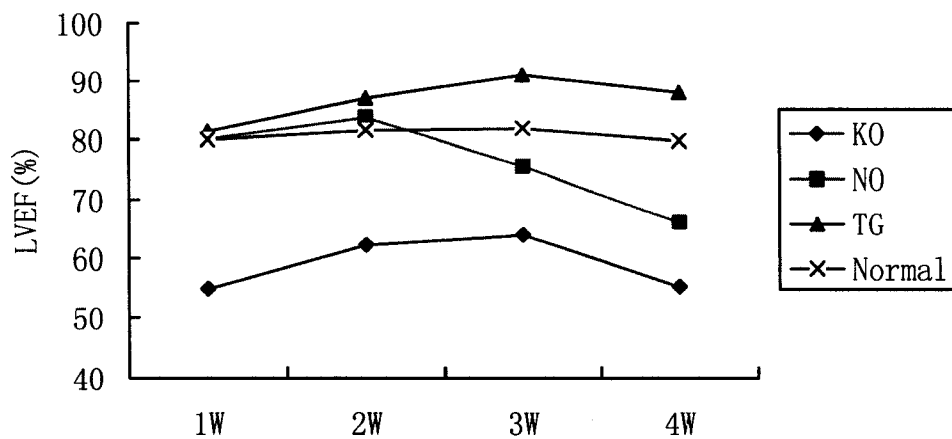


图 2

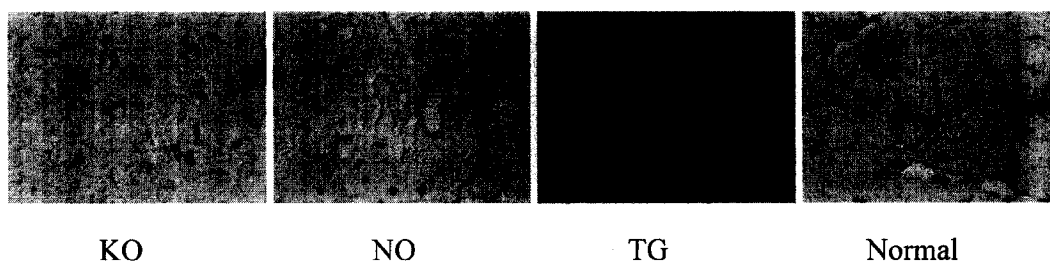


图 3

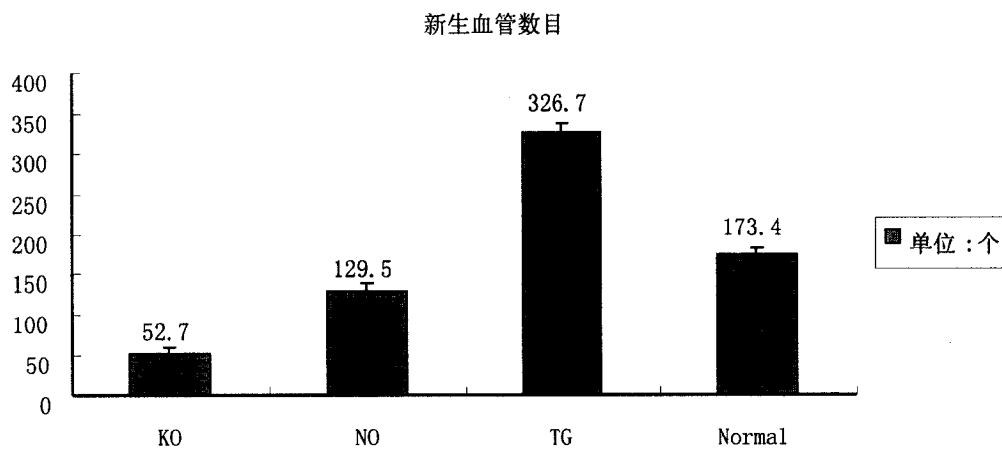


图 4

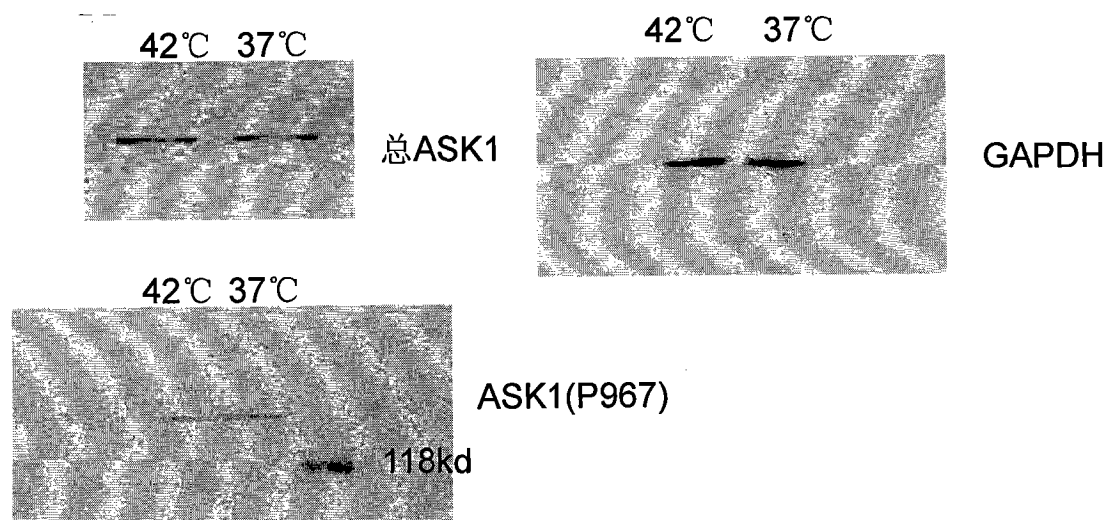


图 5

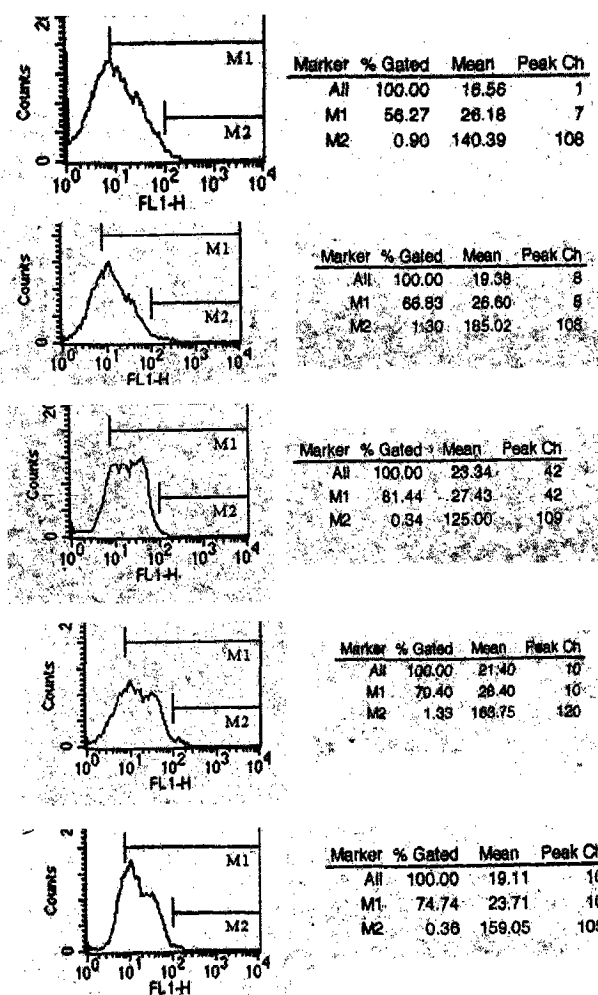


图 6