



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102772425 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201110120854. X

(22) 申请日 2011. 05. 11

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号

(72) 发明人 董莺莺 耿燕 宁文 朱敏生

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006. 01)

A61K 9/08 (2006. 01)

A61P 11/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

Fst11 的小干扰 RNA 抗肺纤维化的用途

(57) 摘要

本发明公开了 Fst11 的小干扰 RNA 在抗纤维化中的用途。本发明经药理实验验证, Fst11 的小干扰 RNA 显著降低博莱霉素灌注小鼠的死亡率; 减少 Fst11 的表达能显著降低博莱霉素诱导的肺部损伤和肺纤维化。说明 Fst11 的小干扰 RNA 能用于制备预防和 / 或治疗肺纤维化药物。

1. Fst11 的小干扰 RNA 在制备预防和 / 或治疗肺纤维化药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于所述 Fst11 的小干扰 RNA 在制备预防、治疗特发性肺纤维化药物时的剂型为喷雾液剂。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 其特征在于所述药物的注射途径为舌下气管喷雾。

Fst11 的小干扰 RNA 抗肺纤维化的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及 Fst11 的小干扰 RNA 在预防和治疗肺纤维化中的新用途,属于医药技术领域。

背景技术

[0002] 特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种以寻常型间质性肺炎 (UIP) 为特征性病理改变的慢性炎症性间质性肺疾病,病程一般呈进行性发展,预后差,确诊后平均存活时间为 2-4 年。其病因复杂、发病机制尚不明确,临床上缺乏有效的治疗手段。虽然对于特发性肺纤维化的发病机制研究已经从细胞、细胞因子、细胞外基质 (ECM)、细胞信号转导途径等多方面深入展开,但是其确切发病机制尚未明确,因此其治疗也主要是从抑制肺纤维化和改善肺纤维化入手,从而也使其治疗上缺乏特异性和有效性。对 IPF 的发病机理及分子机制进行深入研究可为 IPF 的治疗及药物开发提供帮助。

[0003] 利用特定手段诱导动物发生肺纤维化建立肺纤维化疾病模型对于该疾病的研究有十分重要的意义,疾病动物模型可以帮助我们揭示在发病过程中涉及的分子及作用机理。目前用于诱发特发性肺纤维化制作动物模型的手段很多,博莱霉素作为最常用的诱导试剂因其造模方法较为简单成本较低因而得到了广泛应用。利用博莱霉素诱导小鼠肺纤维化模型可以帮助研究者更好地描绘 IPF 的病理学特征并为鉴定 IPF 新的治疗方法及新药的研制提供有力保障。

[0004] TGF- β 是肺纤维化的发展过程中的一个极其关键的因子。大量可影响 TGF- β 的药物已经开始用于博莱霉素小鼠模型的研究中,其中一些已显现出可喜的应用前景。而 Fst11 (Follistatinlike 1) 是一种分泌型的细胞外糖蛋白。它最初从小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 中克隆获得,其表达量可由 TGF- β 1 (转化生长因子 β 1) 诱导上调。已有的研究表明 Fst11 与胚胎发育、肿瘤迁移及炎症反应有关。最近的 microarray 数据分析表明 IPF 患者肺中 FSTL1 的表达较正常组织显著升高 (GEO_accession :GDS1252)。这表明 Fst11 极可能对肺纤维化有影响。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的技术问题,尤其是肿瘤病人在药物治疗过程中经常出现的肺纤维化副作用,本发明提供了一种新的技术方案,即利用 Fst11 干扰小 RNA 用于预防和治疗肺纤维化。

[0006] 本发明通过系统的研究发现对于 C57BL/6 小鼠经气管注射博莱霉素 (5U/Kg) 造成肺纤维化的动物模型,在造模后 3、7、11、15 和 19 天分别经舌下气管喷雾 Fst11 的干扰小 RNA 和无义干扰小 RNA。通过病理组织学分析研究博莱霉素灌注小鼠肺部损伤和纤维化的改变,发现减少 Fst11 的表达能显著降低博莱霉素处理小鼠的死亡率;减少 Fst11 的表达显著降低博莱霉素诱导的肺部损伤和肺纤维化程度。

[0007] 与现有技术相比,本发明的优点为:TGF- β 是纤维化过程中最重要的细胞因子,

可以增加 Fst11 的表达,而利用 Fst11 干扰小 RNA 减少 Fst11 表达后能明显抑制博莱霉素所致肺纤维化进程,大大降低其死亡率,减少博莱霉素的副作用,为病人赢得宝贵的治疗时间。

附图说明

- [0008] Sham:假手术组
- [0009] ScRNA:无义干扰小 RNA 组
- [0010] Si-Fst11:Fst11 干扰小 RNA 组
- [0011] n = 10-15
- [0012] **P < 0.01 与假手术组相比
- [0013] ^{##}P < 0.01 与模型组相比
- [0014] 图 1 三组小鼠的生存率
- [0015] 图 2 三组小鼠肺 HE 染色
- [0016] 图 3 博莱霉素处理 21 天后三组小鼠肺 Masson 染色

具体实施方案

- [0017] 以下将结合实施例对发明作进一步说明,但并不限制本发明的范围。
- [0018] 实施例 1
- [0019] 【材料和方法】
- [0020] 主要试剂和实验动物
- [0021] 实验中所使用的 Fst11 干扰小 RNA 购自 (Dharmacon RNAi Technologies, Thermo); 无义小 RNA 购自 (Dharmacon RNAi Technologies, Thermo); 博莱霉素 (Bleomycin) 购自日本化药株式会社 (批号:Y91450)。
- [0022] Fst11 干扰小 RNA 对博莱霉素所致肺纤维化实验中所使用的动物规格为 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (雄性,8-10 周,20-25g),购自南京大学模式动物研究所,动物合格证号 SCXK(苏)2010-0001。动物饲养于南京大学模式动物研究所,恒温恒湿,自由饮食。
- [0023] 肺纤维化动物模型制备
- [0024] 雄性 C57BL/6J(周龄 8-10 周)小鼠,以 7.5%水合氯醛按 0.6ml/100g 腹腔 (I.P.) 注射麻醉小鼠,气管内注射博莱霉素 (5U/kg)。具体方案如下:称量体重并记录后将小鼠固定于操作台,颈部用 70%酒精消毒,利用手术刀在小鼠颈部垂直划开大约 1cm 长,利用显微镊分离组织暴露气管,将注射器经气管软骨环间隙朝向心端刺入气管,然后按 5U/kg 的计量缓慢注入与其体重相适应体积的博莱霉素生理盐水溶液 (5u/ml),立即将动物直立并左右旋转,使药液在肺内均匀分布。假手术组气管内注射等量的注射用生理盐水。实验期间按照 10ug/只标准给干扰小 RNA,同时记录体重及动物的死亡率,至第 21 天结束实验。
- [0025] 实验分组设计如下:
- [0026] 实验共分为对照组 (Sham)、Fst11 干扰小 RNA 组、无义小 RNA 组。在博莱霉素造模的第 3、7、11、15 和 19 天经舌下气管喷雾 10ug/20ul Fst11 干扰小 RNA、无义干扰小 RNA 和相应体积的生理盐水作为对照组。至第 21 天结束实验。详细的分组设计参见表 1。
- [0027] 表 1. Fst11 干扰小 RNA 对博莱霉素所致肺纤维化作用实验设计

[0028]

组别及代号		剂量及给药方案		溶剂
假手术组 (n=15)	Sham	等量溶剂	在博莱霉素造模的	0.9%NaCl
无义小 RNA 组 (n=15)	ScRNA	10ug/ul, 气管喷雾	第 3、7、	0.9%NaCl
Fst11 干扰小 RNA 组 (n=15)	Si-Fst11	10ug/ul, 气管喷雾	11、15 和 19 天给予	0.9%NaCl

[0029] 小鼠存活率统计

[0030] 各组小鼠各 15 只,在博莱霉素给药后第 1 天到第 21 天期间,每天同一时间(10:00)对其称重,记录每只小鼠每天的体重变化及两组中各自死亡小鼠的数量。利用 GraphPad Prism 软件对三组小鼠 21 天内生存率进行比较。

[0031] 博莱霉素所致肺纤维化实验病理形态学分析及 Masson 染色病理影像学分析

[0032] 取动物左侧肺组织,中性福尔马林固定后石蜡包埋,从肺组织的肺门处开始进行切片,苏木素 / 伊红 (HE) 染色观察病理改变,Masson 染色观察纤维化状况、胶原沉积。

[0033] 应用正置透射荧光显微镜 (LeicaDFC420C) 获得高清晰的 Masson 染色的病理图片 (200 倍放大),在 Image-Pro Plus Version 6.0(Media Cybernetics,Inc.American) 中打开,利用软件选区工具选定全部肺组织区域,利用软件自动计算功能得出所选区域的总像素 Pw,然后用同样的方法选取该切片中纤维化的区域利用软件计算出纤维化区域的总像素 Pf,纤维化区域总像素 Pf 与全肺总像素 Pw 之比即为纤维化所占比例。按 Szapiele 等提供的方法评定肺组织纤维化程度。

[0034] 肺纤维化分为四级:1)0 级:无纤维化;2)I 级:范围< 20%,累及胞膜及胸膜下肺实质,肺泡结构发生紊乱;3)II 级:病变范围占全肺 20%-50%,肺纤维化从胸膜开始延伸,但仍属局部;4)III 级:弥散性肺纤维化,范围> 50%,融合损伤并伴有广泛肺实质结构紊乱。

[0035] 统计分析

[0036] 采用 Excel,数据以 (x±s) 表示,等级资料转化为计量资料,0 级为 0 分,I 级为 1 分,II 级为 2 分,III 级为 3 分。3 个组件死亡率采用卡方检验,计量资料采用 t 检验,P< 0.05 认为有统计学显著性差异。

[0037] 【结果】

[0038] 减少 Fst11 在肺部的表达降低了博莱霉素诱导的肺损伤和纤维化。

[0039] 我们采用 C57BL/6J 小鼠经气管注射博莱霉素 (5U/Kg) 造成肺纤维化动物模型,检测 Fst11 干扰小 RNA 对博莱霉素所致肺纤维化的调节作用。

[0040] 结果表明,由于肺部损伤较重,模型组动物的生存率在 55%左右,给予 Fst11 干扰小 RNA 减少 Fst11 活性,可非常显著地增加动物的生存率 (P< 0.01) (图 1)。与假手术组相比,在博莱霉素给药 7 天时,模型组动物肺部中成纤维细胞增生灶及肺泡腔炎症细胞数量开始增加,而 Fst11 活性被减少之后小鼠肺部的炎症细胞浸润显著减少;在博莱霉素给药 14 天时,模型组动物肺部纤维化程度加深,纤维化面积扩大,但 Fst11 干扰小 RNA 组肺部的纤维化程度明显较轻,纤维化面较小;在博莱霉素给药 21 天时,模型组动物肺部出现大

面积的实质化区域（箭头所指）肺泡结构被严重破坏，Fst11 干扰小 RNA 组肺部实质化面积明显少，同时还可见到存在正常的肺泡结构（图 2）。另外与假手术组相比，模型组动物肺部胶原沉积、纤维化病理指数均显著增加；Fst11 干扰小 RNA 处理组动物胶原沉积、纤维化病理指数均显著降低（ $P < 0.01$ ）（图 3，表 2）。

[0041] 表 2 三组小鼠肺纤维化程度评分（ $\bar{x} \pm s$ ）比较

[0042]

组别	n(只)	肺纤维化程度评分
假手术组	15	0 ± 0
无义小 RNA 组	15	$2.28 \pm 0.76^{**}$
Fst11 干扰小 RNA 组	15	$1.14 \pm 0.38^{**\#}$

[0043] 【结论】

[0044] 本发明采用 Fst11 干扰小 RNA 减少 Fst11 活性，可显著抑制博莱霉素所致肺纤维化，显著降低肺纤维化小鼠死亡率。用半数剂量的博莱霉素与 Fst11 干扰小 RNA 合用可获得与全量博莱霉素同样的治疗效果，但显著减少博莱霉素的副作用。

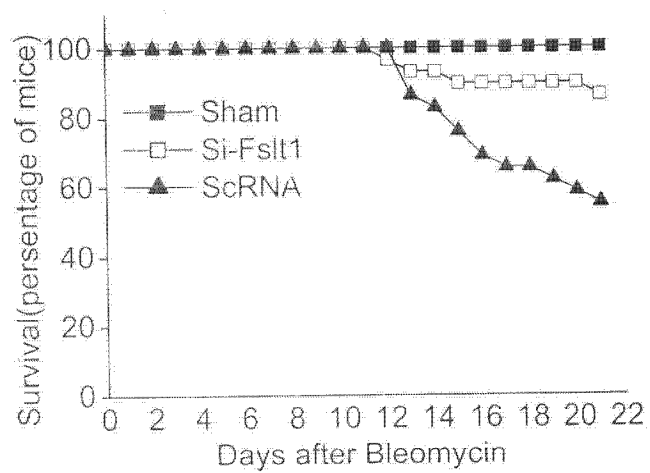


图 1

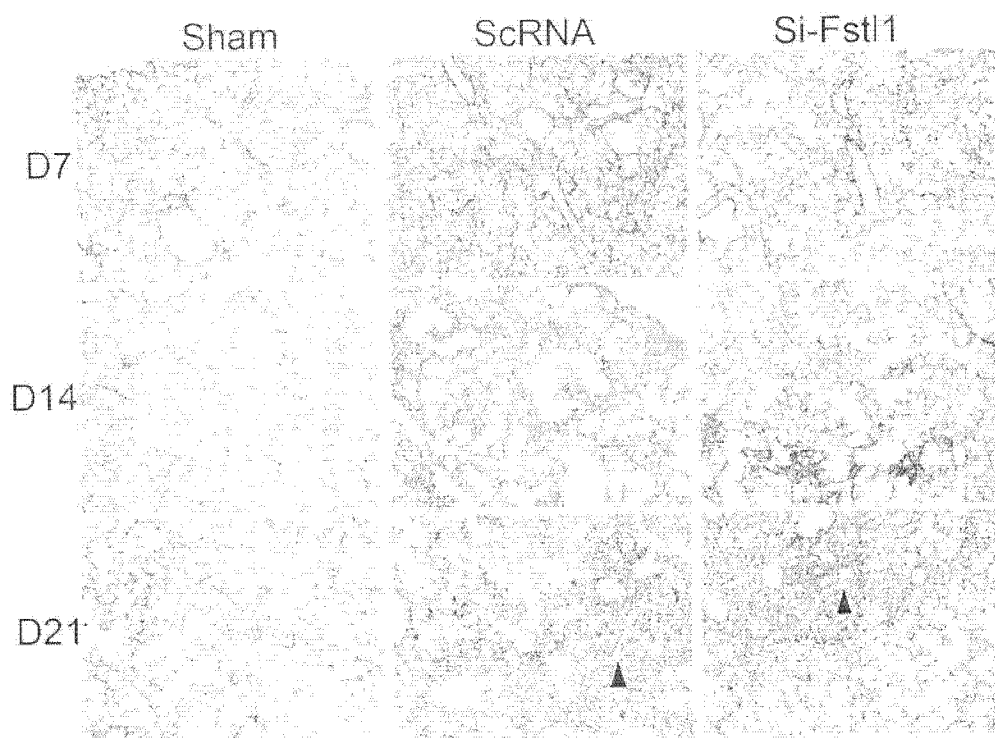


图 2

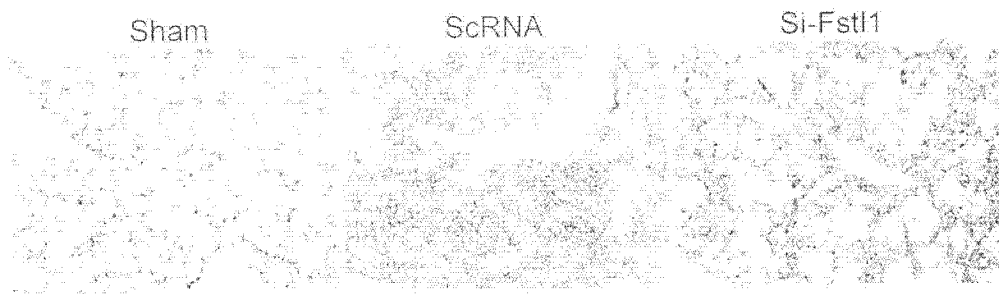


图 3