



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114594271 A

(43) 申请公布日 2022.06.07

(21) 申请号 202210333399.X

C12Q 1/6883 (2018.01)

(22) 申请日 2022.03.30

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(71) 申请人 唐颢

地址 450000 河南省郑州市郑东新区阜外
大道1号

申请人 邢珺月

(72) 发明人 唐颢 邢珺月 刘词航 刘琳

程晓雷 简冬冬 李臻 李然

王世星

(74) 专利代理机构 郑州翊博专利代理事务所

(普通合伙) 41155

专利代理师 周玉青

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

CIRBP基因或其编码的蛋白在心肌损伤治疗
中的应用

(57) 摘要

本发明医药生物技术领域,涉及CIRBP基因或其编码的蛋白在心肌损伤治疗中的应用。本发明提供了一种治疗抗肿瘤药物诱导心肌细胞损伤的药物,所述药物中含有CIRBP基因表达的促进剂或CIRBP蛋白;所述促进剂为提高CIRBP基因表达量的物质,进一步地,所述促进剂为含有编码CIRBP蛋白的重组载体或含有编码CIRBP蛋白的重组载体重组细胞。本发明确定了CIRBP与抗肿瘤药物诱导心肌损伤之间的关系,因此,CIRBP可作为药物、药物靶点或基因治疗中的靶基因,应用于抗肿瘤药物诱导心肌损伤的预防、缓解或/和治疗。

1. CIRBP基因或其编码的蛋白在制备预防、缓解或/和治疗抗肿瘤药物诱导心肌损伤的药物中的应用。
2. CIRBP基因作为筛选预防、缓解或/和治疗抗肿瘤药物诱导心肌损伤药物的药物靶标的应用。
3. CIRBP基因表达的促进剂在制备预防、缓解或/和治疗抗肿瘤药物诱导的心肌损伤的药物中的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述促进剂为提高CIRBP基因表达量的物质。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述促进剂为含有编码CIRBP蛋白的重组载体或含有编码CIRBP蛋白的重组载体重组细胞。
6. 根据权利要求1-5任一所述的应用,其特征在于,所述抗肿瘤药物为化疗药物。
7. 一种治疗抗肿瘤药物诱导心肌细胞损伤的药物,其特征在于,所述药物中含有CIRBP基因表达的促进剂、CIRBP基因或CIRBP蛋白。
8. 根据权利要求7所述的药物,其特征在于,所述促进剂为提高CIRBP基因表达量的物质。
9. 根据权利要求8所述的药物,其特征在于,所述促进剂为含有编码CIRBP蛋白的重组载体或含有编码CIRBP蛋白的重组载体重组细胞。
10. 根据权利要求9所述的药物,其特征在于,所述药物中还含有药学上可接受的载体/辅料。

CIRBP基因或其编码的蛋白在心肌损伤治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体涉及CIRBP基因或其编码的蛋白在心肌损伤治疗中的应用。

背景技术

[0002] 肿瘤治疗技术的发展已极大程度地改善患者生存质量,提高其生存率。然而,频发的心血管事件,俨然已成为掣肘肿瘤治疗效果,威胁患者生存时间的首要原因。化疗药物心脏毒性是导致心血管不良事件的主因。传统药物(如阿霉素、氟尿嘧啶等广谱化疗药)与靶向药物(如曲妥珠单抗)均可产生不同程度的心肌损伤,诱发心肌梗死、心律失常、扩心病,甚至心源性猝死等高危心脏疾病。大量证据表明,化疗药物引起心肌损伤和心室病理性重构,是肿瘤患者化疗过程中心衰危象的潜在病因。探讨化疗心肌损伤与重构的调控途径有助于阐明化疗药物诱导心肌损伤的机制,制定针对性干预措施以及合理、有效的化疗方案,为相应临床实施提供理论指导和依据。

[0003] 心肌细胞凋亡是化疗药物致心肌损伤的共性分子病理过程,涉及多层次的调控。例如,阿霉素等蒽环类药物既可通过靶向拓扑异构酶Top2 β 造成DNA损伤,激活细胞凋亡信号;也可与铁离子作用干扰心肌细胞线粒体氧化呼吸链反应,产生大量氧自由基(ROS),启动凋亡进程。曲妥珠单抗则通过结合心肌细胞膜ERBB2受体,阻断细胞生长、存活依赖性通路,诱使细胞凋亡,最终导致扩张性心肌病形成。由此可见,阐明不同化疗药物或方案诱导心肌细胞凋亡在不同层次的调节机制,并据此探索干预手段,以求减少化疗心肌损伤至关重要,是肿瘤心脏病学心肌保护研究中的重点探讨方向。

[0004] RNA结合蛋白CIRBP是一种重要的应激蛋白。低温、缺氧、紫外辐照、细菌感染以及昼夜节律等环境改变与刺激均可诱导细胞内CIRBP表达改变,提示其具备较强的适应性调节潜力。CIRBP的调节功能依赖于其转录后调控作用,在不同应激条件下可分别或同时调控RNA剪接、加尾、转运、翻译以及降解等重要分子过程。胞内CIRBP的细胞保护效应对维持细胞内环境稳态、增强细胞存活和适应能力、抵御胞外不利刺激不可或缺。但CIRBP是否参与调节肿瘤化疗过程中的心肌细胞凋亡以及心肌损伤保护,尚未可知。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的问题和不足,本发明的目的旨在提供CIRBP基因或其编码的蛋白在心肌损伤治疗中的应用。

[0006] 为实现发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0007] 第一方面,本发明提供了一种可用于抗肿瘤药物诱导心肌损伤诊断的生物标志物,所述生物标志物为CIRBP基因或其编码的蛋白。

[0008] 通过实时荧光定量PCR、Western Blot检测CIRBP在抗肿瘤药物处理心肌细胞及正常心肌细胞中的表达情况,发现CIRBP在抗肿瘤药物处理心肌细胞中的表达水平显著低于正常心肌细胞;说明CIRBP在抗肿瘤药物处理心肌细胞中表达下调。

[0009] 通过实时荧光定量PCR、Western Blot检测CIRBP在抗肿瘤药物诱导心肌损伤的小鼠及正常小鼠心肌细胞中的表达情况,发现CIRBP在抗肿瘤药物诱导心肌损伤的小鼠心肌细胞中的表达水平显著低于正常小鼠心肌细胞;说明CIRBP在抗肿瘤药物诱导心肌损伤的小鼠心肌细胞中表达下调。

[0010] 第二方面,本发明提供了CIRBP基因或其编码的蛋白在制备预防、缓解或/和治疗抗肿瘤药物诱导心肌损伤的药物中的应用。

[0011] 根据上述的应用,优选地,所述抗肿瘤药物为化疗药物。更加优选地,所述化疗药物为抗肿瘤抗生素、抗代谢药、烷化剂、抗肿瘤激素、抗肿瘤植物成分药中的至少一种。最优选地,所述化疗药物为DOX(阿霉素)、5-FU(5氟尿嘧啶)、顺铂(cisplatin)、环磷酰胺、他莫昔芬、紫杉醇中的至少一种。

[0012] 第三方面,本发明提供了CIRBP基因作为筛选预防、缓解或/和治疗抗肿瘤药物诱导心肌损伤药物的药物靶标中的应用。

[0013] 根据上述的应用,优选地,所述抗肿瘤药物为化疗药物。更加优选地,所述化疗药物为抗肿瘤抗生素、抗代谢药、烷化剂、抗肿瘤激素、抗肿瘤植物成分药中的至少一种。最优选地,所述化疗药物为DOX(阿霉素)、5-FU(5氟尿嘧啶)、顺铂(cisplatin)、环磷酰胺、他莫昔芬、紫杉醇中的至少一种。

[0014] 第四方面,本发明提供了CIRBP基因表达的促进剂在制备预防、缓解或/和治疗抗肿瘤药物诱导的心肌损伤的药物中的应用。

[0015] 根据上述的应用,优选地,所述促进剂为提高CIRBP基因表达量的物质。

[0016] 根据上述的应用,优选地,所述促进剂为含有编码CIRBP蛋白的重组载体或含有编码CIRBP蛋白的重组载体重组细胞。

[0017] 根据上述的应用,优选地,所述抗肿瘤药物为化疗药物。更加优选地,所述化疗药物为抗肿瘤抗生素、抗代谢药、烷化剂、抗肿瘤激素、抗肿瘤植物成分药中的至少一种。最优选地,所述化疗药物为DOX(阿霉素)、5-FU(5氟尿嘧啶)、顺铂(cisplatin)、环磷酰胺、他莫昔芬、紫杉醇中的至少一种。

[0018] 第五方面,本发明提供了一种治疗抗肿瘤药物诱导心肌细胞损伤的药物,所述药物中含有CIRBP基因表达的促进剂、CIRBP基因或CIRBP蛋白。

[0019] 根据上述的药物,优选地,所述促进剂为提高CIRBP基因表达量的物质。

[0020] 根据上述的药物,优选地,所述促进剂为含有编码CIRBP蛋白的重组载体或含有编码CIRBP蛋白的重组载体重组细胞。

[0021] 根据上述的药物,优选地,所述药物中还含有药学上可接受的载体/辅料。

[0022] 进一步,所述载体/辅料包括(但并不限于):稀释剂、赋形剂如乳糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、淀粉、水等;填充剂如淀粉、蔗糖等;粘合剂如单糖浆、葡萄糖溶液、淀粉溶液、纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如干淀粉、海藻酸钠、海带多糖粉末、琼脂粉末、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂季铵化合物、十二烷基硫酸钠等;表面活性剂如聚氧化乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、十二烷基硫酸钠、硬脂酸单甘油酯、十六烷醇等;致湿剂如甘油、淀粉等;吸附载体如淀粉、乳糖、斑脱土、硅胶、高岭土和皂粘土等;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、聚乙二醇、硼酸粉末等。

[0023] 根据上述的药物,优选地,所述抗肿瘤药物为化疗药物。更加优选地,所述化疗药

物为抗肿瘤抗生素、抗代谢药、烷化剂、抗肿瘤激素、抗肿瘤植物成分药中的至少一种。最优选地,所述化疗药物为DOX(阿霉素)、5-FU(5氟尿嘧啶)、顺铂(cisplatin)、环磷酰胺、他莫昔芬、紫杉醇中的至少一种。

[0024] 与现有技术相比,本发明取得的积极有益效果如下:

[0025] 本发明首次发现CIRBP在抗肿瘤药物诱导的心肌细胞中表达下调,通过在心肌细胞中过表达CIRBP能明显缓解抗肿瘤药物诱导的心肌损伤,挽救细胞凋亡,因此,CIRBP可作为药物、药物靶点或基因治疗中的靶基因,应用于抗肿瘤药物诱导心肌损伤的预防、缓解或/和治疗,能够为抗肿瘤药物诱导心肌损伤的防治提供新的策略,同时,也将为进一步的研究抗肿瘤药物诱导心肌损伤的病因病机和相应的防治策略提供新的方向。

附图说明

[0026] 图1为不同化疗药物诱导AC16细胞、T0519细胞、hiPSC-CMs细胞、NRVMs细胞中CIRBP的Western Blot检测结果;其中,A为AC16细胞Western Blot检测结果,B为T0519细胞Western Blot检测结果,C为hiPSC-CMs细胞Western Blot检测结果,D为NRVMs细胞Western Blot检测结果;

[0027] 图2为小鼠化疗模型的超声心动检测结果;其中,Vehicle为空白对照组小鼠,Dox为阿霉素诱导组小鼠,***表示 $p < 0.001$;

[0028] 图3为小鼠化疗模型的心脏损伤和心力衰竭标志物cTNT、LDH、CKMB和NT-proBNP的检测结果;其中,Vehicle为空白对照组小鼠,Dox为阿霉素诱导组小鼠,***表示 $p < 0.001$;

[0029] 图4为小鼠化疗模型心肌的TUNEL染色结果;其中,Vehicle为空白对照组小鼠,Dox为阿霉素诱导组小鼠,DAPI指示细胞核;cTNT指示心肌细胞;TUNEL指示凋亡细胞,***表示 $p < 0.001$;

[0030] 图5为小鼠化疗模型心肌中CIRBP的Western Blot检测结果;其中,Vehicle为空白对照组小鼠,Dox为阿霉素诱导组小鼠;

[0031] 图6为AC16细胞中CIRBP基因敲除后的Western Blot检测结果;其中,NC为转染空白对照组AC16细胞,SiCIRBP为转染敲低CIRBP siRNA组AC16细胞;

[0032] 图7为NRVMs细胞中CIRBP基因敲除后的Western Blot检测结果;其中,NC为转染空白对照组NRVMs细胞,SiCIRBP为转染敲低CIRBP siRNA组NRVMs细胞;

[0033] 图8为CIRBP基因敲除后AC16细胞凋亡率的流式细胞术检测结果;其中,NC为转染空白对照组AC16细胞,SiCIRBP为转染敲低CIRBP siRNA组AC16细胞,***表示 $p < 0.001$;

[0034] 图9为AC16细胞中CIRBP过表达后DOX处理的Western Blot检测结果;其中,pcDNA为转染空白对照组AC16细胞,pCIRBP为转染CIRBP过表达质粒组AC16细胞;

[0035] 图10为腺病毒AVV9-CIRBP干预后小鼠的超声心动检测结果;其中,AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载组小鼠,AVV9-CIRBP表示注射AVV9-CIRBP过表达组小鼠,ns表示统计学无差异;

[0036] 图11为腺病毒AVV9-CIRBP干预后小鼠化疗模型的超声心动检测结果;其中,Vehicle+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和生理盐水小鼠,DOX+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和DOX小鼠,DOX+AVV9-CIRBP表示注射AVV9-CIRBP过表达和DOX小鼠,***表示 $p < 0.001$;

[0037] 图12为腺病毒AVV9-CIRBP干预后小鼠化疗模型的心脏损伤和心力衰竭标志物

cTNT、LDH、CKMB和NT-proBNP的检测结果;其中,Vehicle+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和生理盐水小鼠,DOX+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和DOX小鼠,DOX+AVV9-CIRBP表示注射AVV9-CIRBP过表达和DOX小鼠,***表示 $p < 0.001$;

[0038] 图13为腺病毒AVV9-CIRBP干预后小鼠化疗模型心脏组织免疫荧光染色结果;其中,Vehicle+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和生理盐水小鼠,DOX+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和DOX小鼠,DOX+AVV9-CIRBP表示注射AVV9-CIRBP过表达和DOX小鼠,DAPI指示细胞核,cTNT指示心肌细胞,GFP指示AVV9载体;

[0039] 图14为腺病毒AVV9-CIRBP干预后小鼠化疗模型心脏组织Tunel染色结果;其中,Vehicle+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和生理盐水小鼠,DOX+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和DOX小鼠,DOX+AVV9-CIRBP表示注射AVV9-CIRBP过表达和DOX小鼠,DAPI指示细胞核,cTNT指示心肌细胞,TUNEL指示凋亡细胞;

[0040] 图15为腺病毒AVV9-CIRBP干预后小鼠化疗模型心脏组织Western Blot检测结果;其中,Vehicle+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和生理盐水小鼠,DOX+AVV9-Ctrl表示注射AVV9空载和DOX小鼠,DOX+AVV9-CIRBP表示注射AVV9-CIRBP过表达和DOX小鼠。

具体实施方式

[0041] 以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0042] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、部件和/或它们的组合。

[0043] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,均采用本技术领域常规技术,或按照生产厂商所建议的条件;所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0044] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本发明的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本发明的技术方案。

[0045] 实施例1:CIRBP在化疗药物诱导的心肌细胞中的表达情况研究

[0046] 采用Western Blot检测化疗药物(DOX、顺铂和5-FU)诱导人类永生生化心室肌细胞AC16、人类永生生化心室肌细胞T0519(从加拿大Abm公司购买)、人多能干细胞衍生心肌细胞(hiPSC-CMs)、新生大鼠心室肌细胞(NRVMs)与正常细胞中CIRBP的表达水平。

[0047] 1、细胞选取及培养:

[0048] 实验选用的细胞有人类永生生化心室肌细胞AC16、人类永生生化心室肌细胞T0519(从加拿大Abm公司购买)、人多能干细胞衍生心肌细胞(hiPSC-CMs)、新生大鼠心室肌细胞(NRVMs)。

[0049] 细胞的培养方法为:细胞均使用含有10%胎牛血清的培养基[AC16和NRVMs使用DMEM高糖培养基、T0519使用Prigrow I培养基(abm, TM001)、hiPSC-CMs使用心肌细胞专用培养基(南京艾尔普, Help99A06)],加入100U/ml的青霉素和100 μ g/ml链霉素,在37 $^{\circ}$ C含5%

CO₂及饱和湿度的通用条件下培养。细胞生长至50%汇合度时,分别加入Dox、顺铂、5-FU,培养24小时后,进行后续检测。

[0050] 2、实验方法:

[0051] Western Blot检测的具体操作步骤如下:

[0052] (1) 蛋白提取及定量

[0053] 弃去细胞中的培养基,用PBS清洗细胞表面两次,胰酶消化或者用细胞刮将细胞收集到离心管中,4℃、3000rpm,离心5分钟;吸弃上清,加入RIPA裂解液(含100×cocktail) 200μl(以6孔板为例),冰上裂解30分钟,每10分钟震荡混匀;4℃、12000rpm离心10分钟,弃沉淀。

[0054] 将蛋白样品按一定倍数稀释后,取25μl置于96孔板中;另取25μl H₂O作空白对照,从5个不同浓度的牛血清蛋白标准液(125μg/ml,250μg/ml,500μg/ml,1000μg/ml,2000μg/ml)中各取出25μl,加入96孔板中,再向各孔中加入200μl BCA反应混合液(A液:B液=50:1),37℃孵育30分钟,在酶标仪上检测570nm处吸收峰,根据不同浓度蛋白标准液读数拟合得到的标准曲线,然后根据样品的吸光度值计算得到样品的蛋白质浓度。

[0055] (2) SDS-PAGE电泳

[0056] 根据蛋白浓度,取适量细胞裂解液,加入6×SDS蛋白上样缓冲液(100mM Tris-HCl,200mM DTT pH=6.8,4%SDS,0.01%溴酚蓝,20%甘油),混匀后95℃孵育5分钟,上样,准备电泳。

[0057] 电泳系统:

浓缩胶:		4ml
[0058]	30% Acr-Bis (Acr:Bis=29:1)	0.67ml
	1M Tris-HCl, pH6.8	0.5ml
	10% SDS	0.04ml
	10% AP	0.04ml
	TEMED	0.004ml
	ddd H ₂ O	2.7ml
分离胶:		10ml
	30% Acr-Bis (Acr:Bis=29:1)	4ml
	1.5M Tris-HCl, pH8.8	2.5ml
	10% SDS	0.1ml
	10% AP	0.1ml
	TEMED	0.005ml
[0059]	ddd H ₂ O	3.3ml

[0060] 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液:

[0061] Tris	15.1g
甘氨酸	94g
10%SDS	50ml
加ddH ₂ O至	1000ml

[0062] 样品在浓缩胶中以10V/cm,分离胶中以15V/cm的电压电泳至溴酚蓝距凝胶底部1cm时停止电泳。

[0063] (3) 湿式转膜

[0064] 取出凝胶,去除浓缩胶部分,裁剪与待转印凝胶大小相同的滤纸4张及硝酸纤维素膜(NC膜)1张,将膜在转膜缓冲液(48mM Tris,39mM甘氨酸,20%甲醇)浸泡5分钟以上。阴极板上整齐地堆放4张以转印缓冲液浸湿的滤纸,将凝胶对齐放于其上。将膜覆盖在凝胶上,作好标记,将另外4张浸湿的滤纸放在膜上,将阳极板盖上,整个过程注意排出气泡。根据蛋白分子量大小,采用250mA恒流转印90-120分钟。将硝酸纤维素膜取下,进行下面的杂交反应。

[0065] (4) 杂交和结果处理

[0066] 将转印好的NC膜用TBST(20mM Tris-HCl pH 7.5,150mM NaCl,0.5%Tween 20)漂洗5分钟。室温摇床上用含5%脱脂奶粉的TBST中封闭1小时;用TBST漂洗2次,按抗体说明书比例加入一抗(浓度0.2μg/ml),4℃孵育过夜。室温下用TBST漂洗5分钟×4次,加入相应的HRP-标记的二抗(1:2000)或荧光标记二抗(1:2000),室温下避光孵育1小时。TBST漂洗5分钟×4次,用ECL超敏发光液暗室曝光或者采用Odyssey双色红外激光成像系统进行扫描。使用Image-J软件,对Western Blot曝光结果进行灰度扫描并分析。

[0067] 3、实验结果

[0068] Western Blot的检测结果如图1所示。

[0069] 由图1可知,在不同化疗药物(DOX、顺铂和5-FU)体外诱导心肌细胞凋亡过程中,CIRBP表达均明显降低。

[0070] 实施例2:CIRBP在化疗药物诱导的小鼠心肌细胞中的表达情况研究

[0071] 采用Western Blot检测化疗药物(DOX、顺铂和5-FU)诱导小鼠心肌损伤的小鼠化疗模型心肌细胞中CIRBP的表达水平。

[0072] 1、小鼠选取:

[0073] 选取6-7周龄的C57BL/6雄性小鼠(购自中国医学科学院实验动物科学研究所,中国北京),并在研究开始前接受适应性喂养1周。所有小鼠均在特定(温度:20-25℃;湿度:50±5%)屏障条件下,在单独的通风笼中饲养。

[0074] 2、小鼠化疗模型的构建:

[0075] (1) 小鼠化疗模型的构建:

[0076] 小鼠尾静脉注射DOX(注射剂量为5mg/kg),每周注射一次,连续注射四周,建立小鼠化疗模型。小鼠注射最后一剂DOX 8天后,进行后续实验。

[0077] (2) 小鼠化疗模型心肌损伤情况的检测:

[0078] 1) 超声心动检测

[0079] 采用带有MS400C探头的Vevo 3100系统对敲除CIRBP基因小鼠进行超声心动检测。

计算射血分数(EF)、缩短分数(FS)和HW/TL(心重/胫骨长度比)。具体结果如图2所示。

[0080] 由图2可知,阿霉素诱导的小鼠化疗模型中,EF和FS明显下降、HW/TL明显下降,提示小鼠心功能明显下降。

[0081] 2) 心脏损伤和心力衰竭标志物cTNT、LDH、CKMB和NT-proBNP的检测cTNT、LDH、CKMB和NT-proBNP均采用ELISA试剂盒进行检测,其中,cTNT采用ELISA试剂盒的货号为No.E-EL-M1801c,购自Elabscience公司;LDH采用ELISA试剂盒的货号为No.E-EL-M0419c,购自Elabscience公司;CKMB采用ELISA试剂盒的货号为No.E-EL-M0355c,购自Elabscience公司;NT-proBNP采用ELISA试剂盒的货号为No.E-EL-M0834c,购自Elabscience公司。检测结果如图3所示。

[0082] 由图3可知,小鼠化疗模型中,CKMB增加约2.5倍、cTNT增加约1.9倍、LDH增加约2.2倍、NT-proBNP增加约2.3倍,均明显上升,心肌酶谱表达明显差异,提示心脏细胞损伤增加。

[0083] 3) TUNEL染色:

[0084] 采用TUNEL染色检测检测小鼠心肌细胞凋亡。TUNEL染色的具体检测试剂盒为原位细胞死亡检测试剂盒(货号为No.11684795910,,购自Roche公司),其具体操作按照试剂盒的说明书进行。TUNEL染色的结果如图4所示。

[0085] 由图4可知,阿霉素诱导小鼠模型中,心肌细胞TUNEL染色结果阳性率明显上升,提示心肌细胞凋亡明显增加。

[0086] 3、Western Blot检测

[0087] 采用小鼠化疗模型心肌细胞中CIRBP的表达水平。Western Blot检测的具体操作步骤与实施例1相同,在此不再赘述。Western Blot的检测结果如图5所示。

[0088] 由图5可知,阿霉素诱导的小鼠化疗模型的心肌中CIRBP的表达明显降低。

[0089] 实施例3:CIRBP基因敲除及基因敲除后对心肌的影响研究

[0090] 1、细胞选取:

[0091] 实验选用的细胞有人类永生化心室肌细胞AC16、新生大鼠心室肌细胞(NRVMs)。

[0092] 2、siRNA设计:

[0093] 针对CIRBP基因的siRNA序列为:

[0094] 人的CIRBP的siRNA正义序列为:GGCUCCAGAGACUACUAUA,

[0095] 人的CIRBP的siRNA反义序列为:UUAUAGUAGUCUCUGGAGCCTT;

[0096] 大鼠的CIRBP的siRNA正义序列为:AUUUCAAAGGUGACAAACCC,

[0097] 大鼠的CIRBP的siRNA反义序列为:GUUUGUCACCUUUGAAAAUUAU;

[0098] 阴性对照siRNA(记作NC)正义序列:UUGUUCGAACGUGUCACGUUU,

[0099] 阴性对照siRNA(记作NC)反义序列:AACAAGCUUGCACAGUGCAAA。

[0100] 3、实验方法:

[0101] (1) 基因敲除的具体实验过程及敲除后DOX用药的具体实验过程:

[0102] 提前一天将细胞种植在6孔板中,以转染时细胞密度30-50%为宜;取12pmol siRNA用400μl无血清培养基液体稀释,充分混匀,再加入4μlLipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)转染试剂制成转染混合物,之后用振荡器将其充分混匀,离心,室温静置20分钟。将转染复合物加入到2ml 10%血清培养基中,轻柔混匀,移除细胞原有培养基,加入上述转染复合物的培养基。6小时后进行细胞换液,48小时后,加入DOX诱导24小时,进行后续

实验,。(2)Western Blot检测:

[0103] 采用Western Blot检测CIRBP基因敲除后CIRBP蛋白、Pro-Caspase3、Cleaved-Caspase3、Tubulin的水平,Western Blot的具体实验操作过程与实施例1相同,在此不再赘述。

[0104] (3) 心肌细胞的凋亡率检测:

[0105] 采用流式细胞术检测基因敲除后心肌细胞的凋亡率。

[0106] 4、实验结果:

[0107] AC16细胞中CIRBP基因敲除后的Western Blot检测结果如图6所示。

[0108] 由图6可知,在体外培养AC16细胞中敲除CIRBP,DOX诱导的心肌细胞中Cleaved-Caspase3明显增加,提示敲除CIRBP能明显增加DOX诱导的细胞凋亡。

[0109] NRVMs细胞中CIRBP基因敲除后的Western Blot检测结果如图7所示。

[0110] 由图7可知,在体外培养大鼠的心肌细胞中敲除CIRBP,DOX诱导的心肌细胞中Pro-Caspase3明显下降,Cleaved-Caspase3明显增加,提示敲除CIRBP能明显增加DOX诱导的大鼠原代心肌细胞凋亡。

[0111] 流式细胞术检测基因敲除后AC16细胞的凋亡率,其结果如图8所示。

[0112] 由图8可知,流式细胞分析同样显示敲除CIRBP,DOX诱导的心肌细胞凋亡细胞的百分比明显上升,提示CIRBP敲除可加剧DOX诱导的心肌毒性。

[0113] 实施例4:过表达CIRBP基因及过表达后对心肌的影响研究

[0114] 1、体外心肌细胞中过表达CIRBP基因

[0115] (1) 细胞选取:

[0116] 实验选用的细胞有人类永生生化室肌细胞AC16。

[0117] (2) 过表达质粒构建及细胞转染:

[0118] 将CIRBP构建于pcDNA3.1载体(购自invitrogen公司)上,在NCBI上检索CIRBP基因并确定需要克隆靶标的CDS序列,通过设计带有酶切位点的上下游引物:

[0119] 上游引物(带EcoR I酶切位点)cggaattccatggcatcagatgaag,

[0120] 下游引物(带BamH I酶切位点)cgggatcccgtcaaccgtaactgtcat。

[0121] 以逆转录产物为模板,通过高保真pfu酶进行PCR反应,扩增出所需的片段。凝胶电泳后回收扩增片段,酶切连接并使用一代测序方法进行鉴定。

[0122] 将AC16细胞铺在6cm细胞培养皿中至70-80%汇合度,将6 μ gPCDNA3.1空载、或pcDNA3.1-CIRBP过表达质粒分别加入到500ul Opti-MEM中,用涡旋仪震荡混匀,随后加入12 μ l的LipofectamineTM2000Transfection Reagent,再次用涡旋仪震荡混匀,瞬时离心,室温静置30分钟后,将转染复合物加入到AC16细胞中,轻轻晃动混匀,放入CO₂恒温培养箱中;培养6小时后更换为新鲜的完全培养基;24小时后加入DOX进行后续实验。

[0123] (3) Western Blot检测:

[0124] 采用Western Blot检测过表达CIRBP基因的AC16细胞在DOX诱导下的蛋白表达水平,Western Blot的具体实验操作过程与实施例1相同,在此不再赘述。Western Blot检测结果如图9所示。

[0125] 由图9可知,在体外培养AC16细胞中过表达CIRBP,DOX诱导的心肌细胞中Cleaved-Caspase3明显降低,提示过表达CIRBP能明显抑制DOX诱导的细胞凋亡。

[0126] 2、小鼠中过表达CIRBP基因

[0127] (1) 小鼠选取:

[0128] 选取6-7周龄的C57BL/6雄性小鼠(购自中国医学科学院实验动物科学研究所,中国北京)。

[0129] (2) 过表达CIRBP基因小鼠化疗模型构建:

[0130] 过表达CIRBP基因小鼠化疗模型构建及过表达后DOX用药的具体实验过程为:小鼠尾静脉注射腺相关病毒AAV9空载或者AVV9-CIRBP(心肌细胞特异性过表达CIRBP,购自汉恒生物科技有限公司) 1×10^{11} PFU,四周后,尾静脉注射DOX(注射剂量为5mg/kg,1次/周,连续注射四周),模拟小鼠化疗模型。小鼠注射最后一剂DOX 8天后,进行后续实验。

[0131] (3) 过表达CIRBP基因的小鼠超声心动检测:

[0132] 小鼠超声心动检测的具体操作与实施例2相同,在此不再赘述。超声心动检测结果如图10、图11所示。

[0133] 由图10可知,过表达CIRBP并不影响基线水平的心脏功能;但加入DOX诱导心肌细胞毒性后,过表达CIRBP能明显缓解化疗诱导的EF、FS及HW/TL下降,缓解心功能不全(图11)。

[0134] (4) 心脏损伤和心力衰竭标志物cTNT、LDH、CKMB和NT-proBNP的检测:

[0135] 心脏损伤和心力衰竭标志物cTNT、LDH、CKMB和NT-proBNP的检测方法与实施例2相同,在此不再赘述。检测结果如图12所示。

[0136] 由图12可知,DOX诱导能显著增加小鼠血清中CKMB、cTNT、LDH、NT-proBNP的含量,心肌特异性过表达CIRBP能缓解心肌酶谱表达的上调,明显改善了DOX诱导的心肌损伤。

[0137] (5) 过表达CIRBP基因的小鼠心脏组织的免疫荧光分析:

[0138] 过表达CIRBP基因的小鼠心脏组织的免疫荧光分析的具体操作为:收集小鼠的心脏组织,4%多聚甲醛固定24小时后,梯度脱水,二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、抗原修复、组化笔画圈后,山羊血清封闭30分钟,加入一抗(cTNT)湿盒内4℃孵育过夜,PBST洗涤后,加入对应种属荧光二抗室温避光孵育60分钟,PBST洗涤后,滴加含DAPI抗荧光淬灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。过表达CIRBP基因的小鼠心脏组织的免疫荧光分析结果如图13所示。

[0139] 由图13可知,心脏组织的免疫荧光分析结果显示,腺病毒AVV9可特异性在小鼠心肌细胞内高表达,证实了CIRBP的心脏特异性过度表达。

[0140] (6) TUNEL染色:

[0141] TUNEL染色的具体方法与实施例2相同,在此不再赘述。TUNEL染色结果如图14所示。

[0142] 由图14可知,DOX诱导能显著增加小鼠心肌细胞的凋亡水平(TUNEL染色增加),但在心肌中特异性过表达CIRBP,可成功挽救DOX诱导的心肌细胞凋亡。

[0143] (7) Western Blot检测:

[0144] 采用Western Blot检测过表达CIRBP基因敲除后CIRBP蛋白、Pro-Caspase3、Cleaved-Caspase3、Tubulin的水平,Western Blot的具体实验操作过程与实施例1相同,在此不再赘述。Western Blot检测如图15所示。

[0145] 由图15可知,DOX诱导能显著降低Pro-Caspase蛋白水平、增加Cleaved-Caspase水

平,提示增加心肌细胞凋亡;而在心肌中过表达CIRBP可恢复DOX诱导的心肌细胞凋亡。

[0146] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

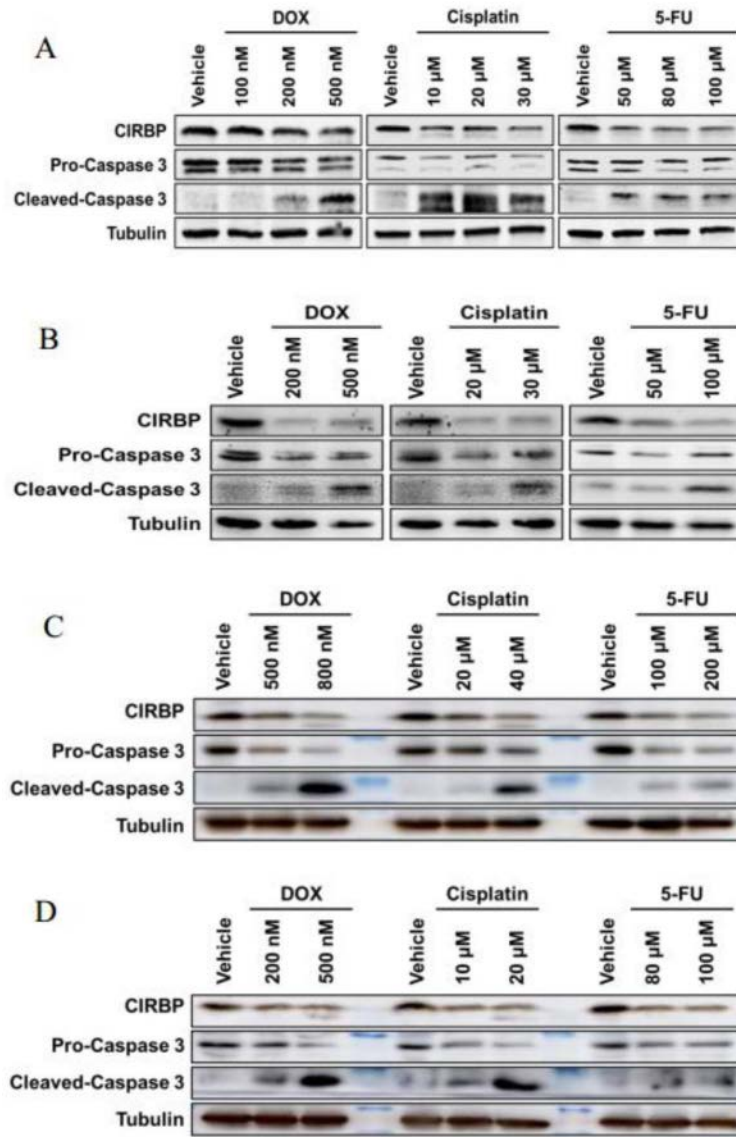


图1

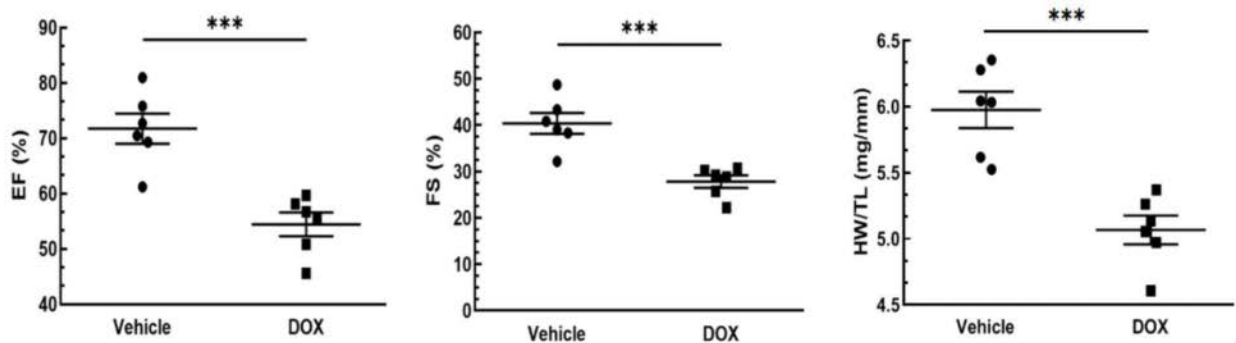


图2

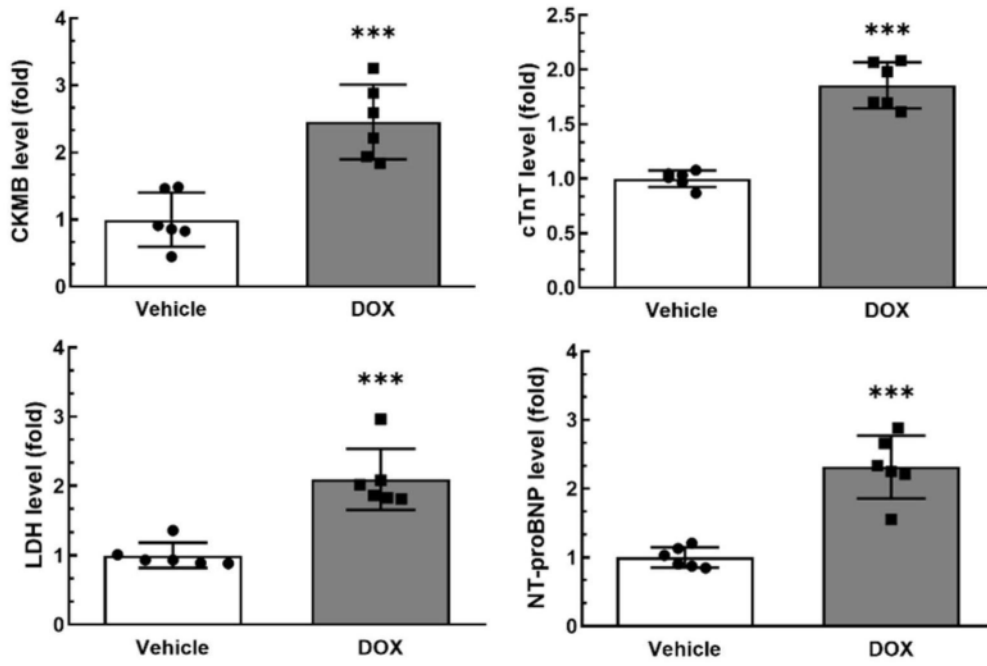


图3

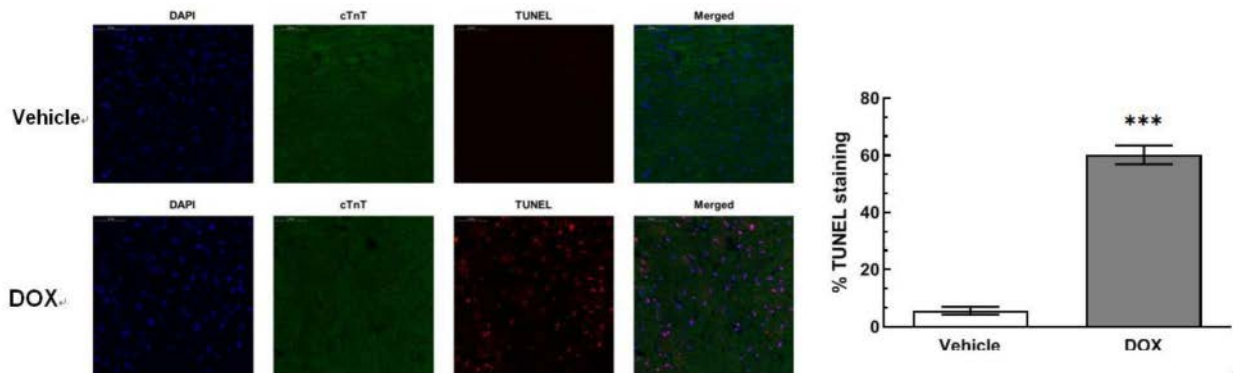


图4

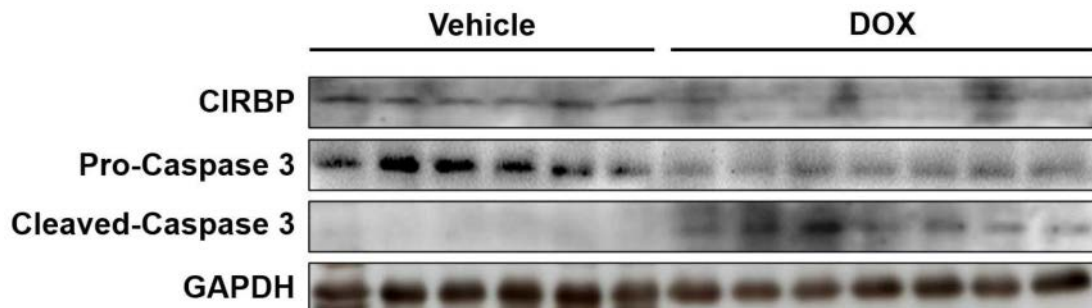


图5

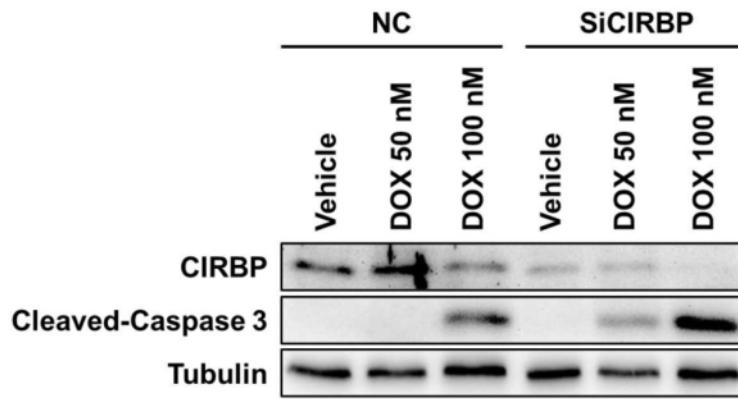


图6

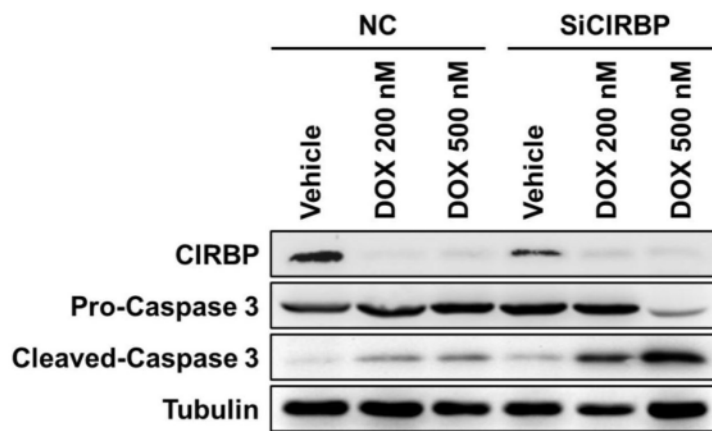


图7

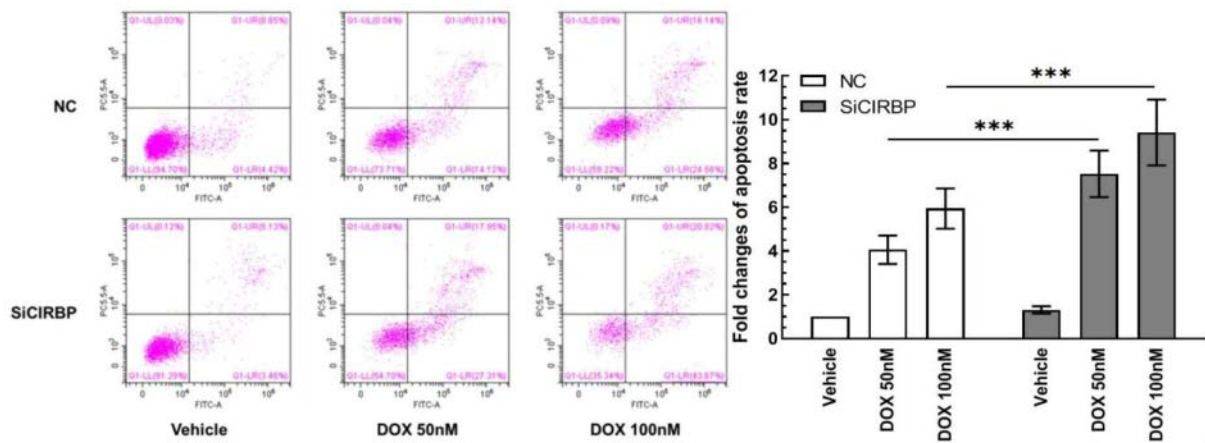


图8

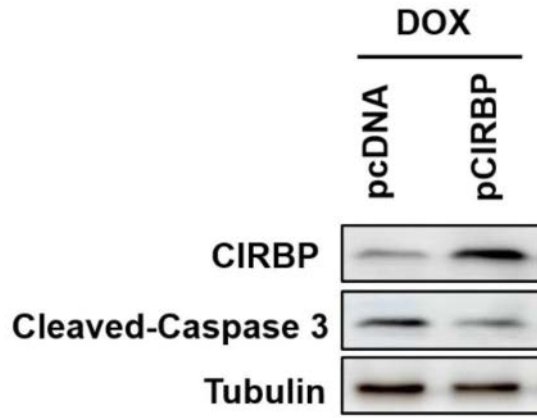


图9

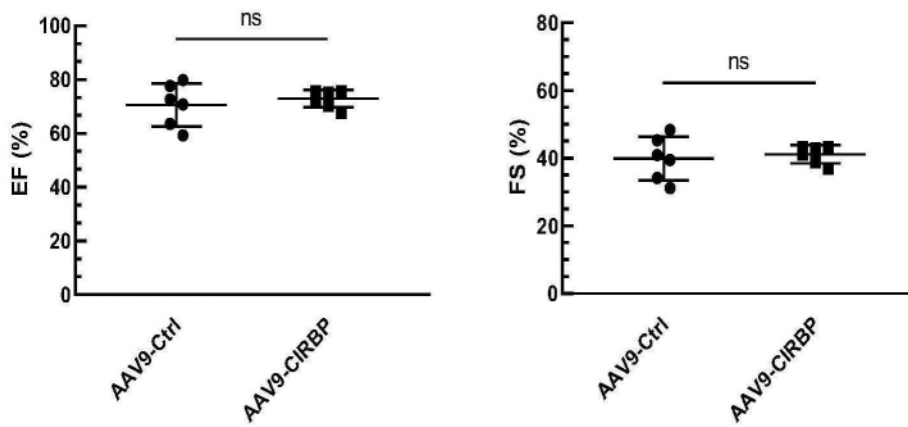


图10

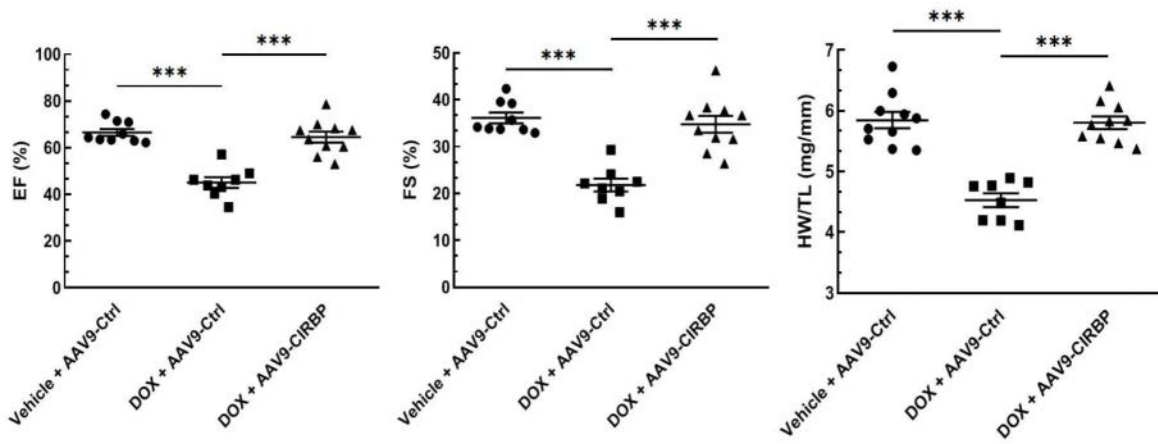


图11

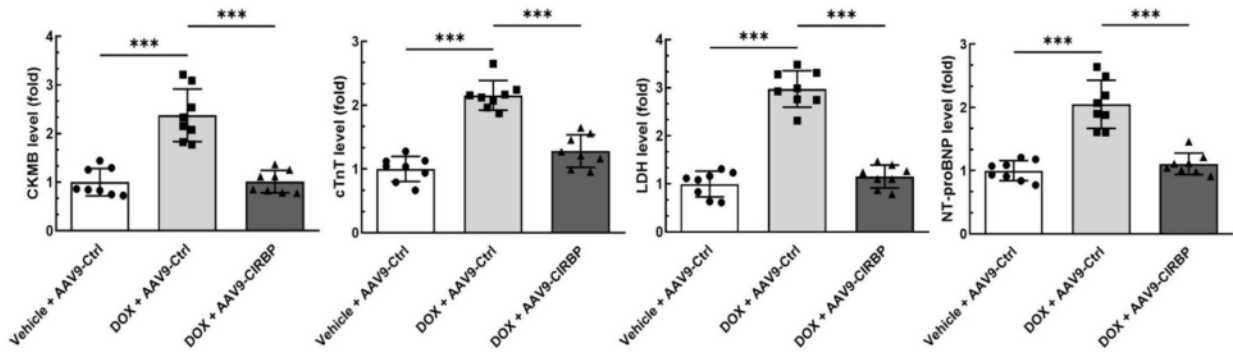


图12

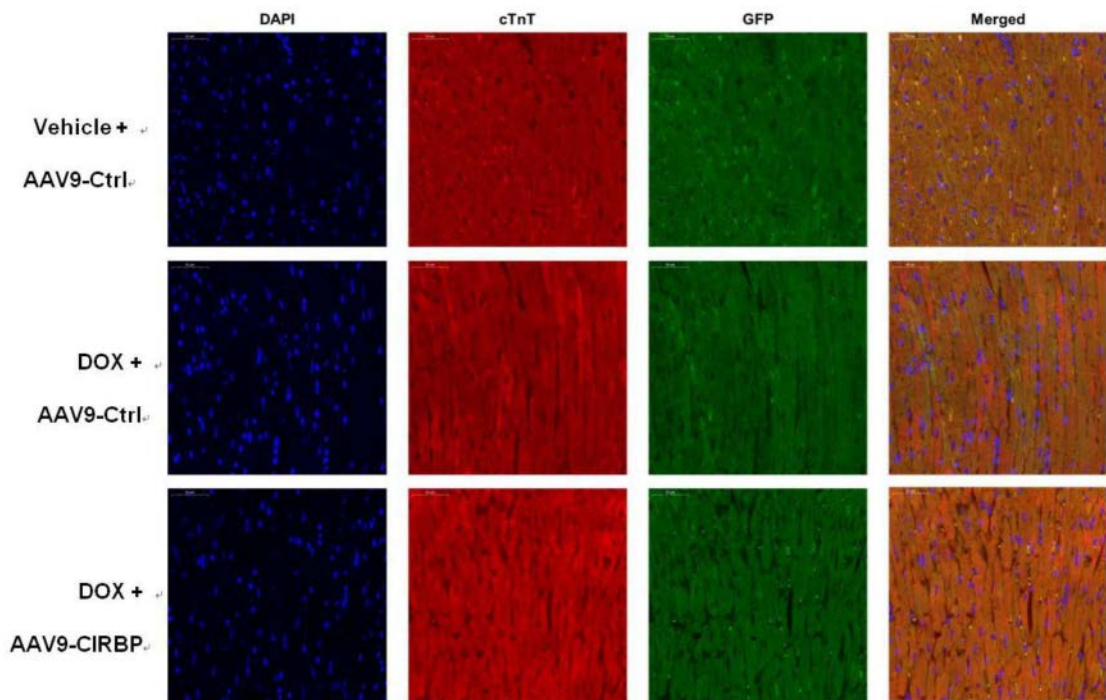


图13

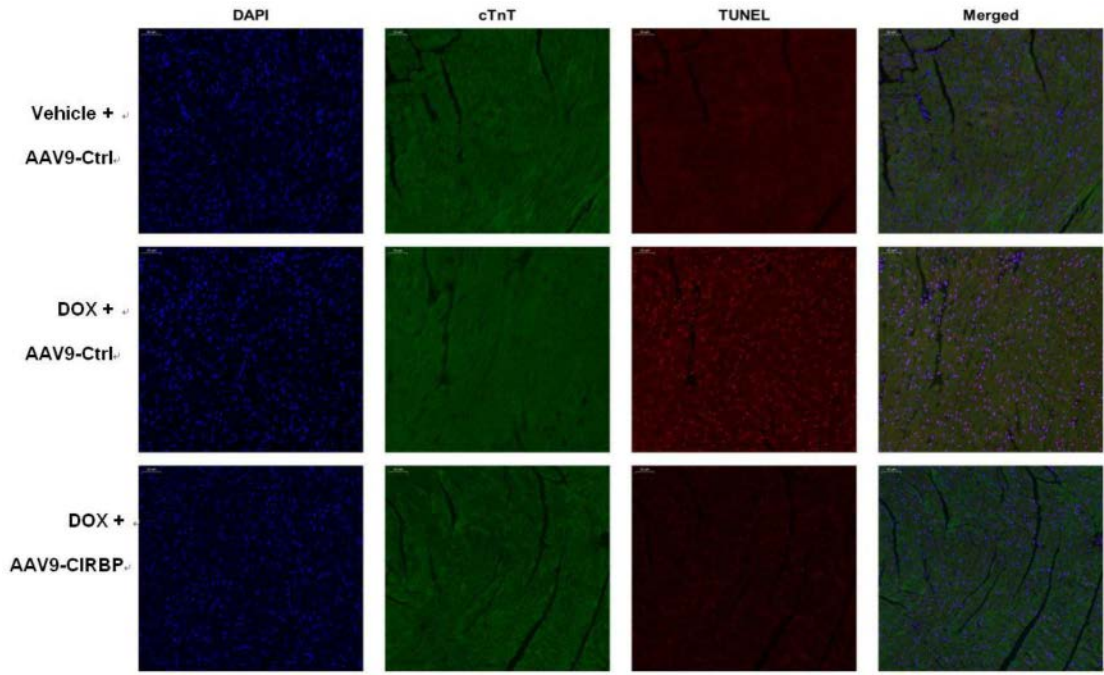


图14

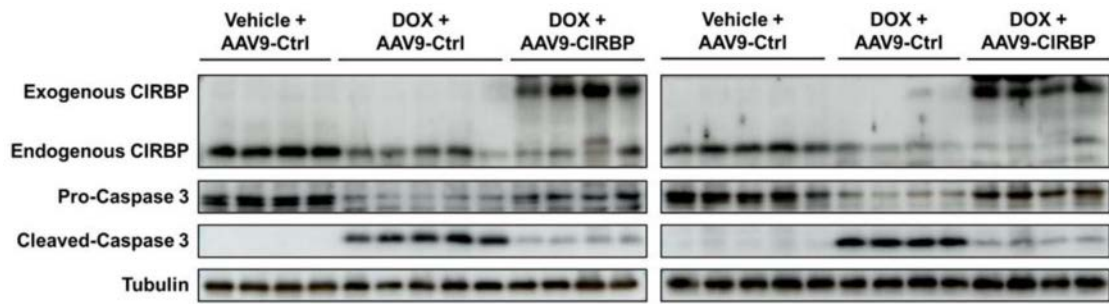


图15