

(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)



(10) 国际公布号
WO 2019/100727 A1

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

都市成华区建材路37号隆鑫九熙广场三期1幢2412号李蕊, Sichuan 610000 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/094562

(22) 国际申请日: 2018 年 7 月 4 日 (04.07.2018)

(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号林云锋, Sichuan 610064 (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 610064 (CN)。邵晓茹(SHAO, Xiaoru); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号林云锋, Sichuan 610064 (CN)。蔡潇潇(CAI, Xiaoxiao); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号林云锋, Sichuan 610064 (CN)。马文娟(MA, Wenjuan); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号林云锋, Sichuan 610064 (CN)。谢雪萍(XIE, Xueping); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号林云锋, Sichuan 610064 (CN)。

(74) 代理人: 成都正华专利代理事务所(CHENGDU ZHENGHUA PATENT AGENCY); 中国四川省成

(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。

(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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

(54) Title: USES OF DNA TETRAHEDRON FOR INHIBITING ALZHEIMER'S DISEASE

(54) 发明名称: DNA四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用

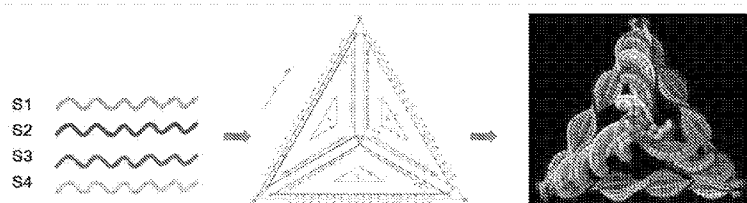


图1

(57) Abstract: Disclosed are uses of a DNA tetrahedron for inhibiting Alzheimer's disease. Sequences of the four single-stranded DNA tetrahedron are shown as in SEQ ID NO: 1-4. Such uses can effectively inhibit cell apoptosis, and improve cell activity.

(57) 摘要: 一种DNA四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用。其中, DNA四面体的四条单链序列如SEQ ID NO:1-4所示。该应用可有效的抑制细胞凋亡, 提升细胞活性。

[见续页]

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 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用

技术领域

本发明属于细胞凋亡抑制技术领域，具体涉及一种 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用。

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。阿尔兹海默病的发病机制目前尚不明确，影响较广的是 β 类淀粉样蛋白级联假说。该假说认为 $A\beta$ 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 $A\beta$ 沉积，从而形成级联式放大反应。因此，对抗 $A\beta$ 的形成，沉积及毒性作用成为治疗 AD 的根本策略。目前关于某些药物或材料阿尔兹海默细胞模型神经保护作用的研究发现，所使用的药物或者材料可能对细胞一定的毒性作用，即具有生物相容性、生物安全性、生物可降解性较差等特点。

DNA 四面体纳米材料（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（S1、S2、S3、S4）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 DNA 四面体的研究虽多，但它对细胞各项生理活动影响的研究却很少，尤其是抑制细胞凋亡的研究更是没有。

发明内容

针对现有技术中的上述不足，本发明提供一种 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，该 DNA 四面体可有效的抑制细胞中的 $A\beta_{25-35}$ ，提升细胞

活性，抑制细胞凋亡。

为实现上述目的，本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：

DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其中，DNA 四面体的四条单链序列如 SEQ ID NO:1-4 所示。

进一步地，DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡是通过调节与凋亡正负相关的蛋白的表达量来实现的。

进一步地，DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括抑制凋亡正相关蛋白 Bax 的蛋白表达量。

进一步地，DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括抑制凋亡正相关蛋白 Caspase 3 的蛋白表达量。

进一步地，DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括抑制凋亡正相关蛋白细胞色素 C 的蛋白表达量。

进一步地，DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括促进凋亡负相关蛋白 Bcl-2 的蛋白表达量。

进一步地，DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程分别包括抑制凋亡正相关基因 *Bax* 和 *Caspase 3* 的表达量，以及促进凋亡负相关基因 *Bcl-2* 的表达量。

进一步地，DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡过程中的浓度为 50~500nM。

进一步地，DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡过程中的浓度为 100~300nM。

进一步地，DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡过程中的浓度为 250nM。

本发明的有益效果为：

1、DNA 四面体 (TDNs) 通过抑制阿尔兹海默细胞中与凋亡正相关的 Bax, Caspase 3, 细胞色素 C 蛋白的表达量, 促进凋亡负相关的 Bcl-2 的表达量, 达到抑制细胞凋亡的目的, 同时, TDNs 还可抑制阿尔兹海默细胞内 $A\beta_{25-35}$ 的形成, 以降低 $A\beta_{25-35}$ 的沉积量, 提升细胞的活性。

2、TDNs 具有良好的生物相容性, 生物可降解性以及较低的细胞毒性, 对于神经细胞的增殖分化具有一定的促进作用, 研究 TDNs 对于阿尔兹海默细胞模型的神经保护作用, 为预防和治疗阿尔兹海默病提供新的思路。

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 $A\beta_{25-35}$ 的浓度对阿尔兹海默细胞活性影响的检测结果示意图。

图 6 为 TDNs 对阿尔兹海默细胞模型细胞活性影响的检测结果图。

图 7 为 TDNs 对阿尔兹海默细胞模型细胞凋亡影响的检测结果图。

图 8 为 TDNs 对阿尔兹海默细胞模型细胞凋亡影响的检测结果图。

图 9 为采用流式细胞术检测 TDNs 对阿尔兹海默细胞细胞周期影响的检测结果图。

图 10 为采用流式细胞术检测 TDNs 对阿尔兹海默细胞凋亡抑制作用的检测结果图。

图 11 为在 TDNs 作用下, 阿尔兹海默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 为在 TDNs 作用下, 阿尔兹海默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 为在 TDNs 作用下, 阿尔兹海默细胞中凋亡负相关蛋白 *Bcl-2* 表达量的检测结果图。

具体实施方式

下面对本发明的具体实施方式进行描述, 以便于本技术领域的技术人员理解本发明, 但应该清楚, 本发明不限于具体实施方式的范围, 对本技术领域的普通技术人员来讲, 只要各种变化在所附的权利要求限定和确定的本发明的精神和范围内, 这些变化是显而易见的, 一切利用本发明构思的发明创造均在保护之列。

实施例 1 TDNs 的合成及鉴定

1、TDNs 的合成

通过 10mM Tris-HCl 和 50mM MgCl₂ 制备得到 TM buffer, 并将其 pH 调节至 8.0, 然后采用超微量定量法将四条 ss DNA 单链 (S1、S2、S3、S4) 制备为 100μL, 每条单链浓度为 1μM 的体系;

然后再涡旋, 混匀, 离心后置于 PCR 仪内, 将温度迅速升高到 95℃, 并保持 10min, 再冷却至 4℃, 保持 20min, 即合成得到浓度约为 1000nM 的 TDNs, 其合成过程如图 1 所示; 其中, 四条 DNA 单链的具体序列如下:

S1:

5'-ATTTATCACCCGCCATAGTAGACGTATCACCAGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAA-3' (SEQ ID NO:1);

S2:

5'-ACATGCGAGGGTCCAATACCGACGATTACAGCTTGCTACACGATTTCAGACTTAGGAATGTTCG-3' (SEQ ID NO:2);

S3:

5'-ACTACTATGGCGGGTGATAAAACGTGTAGCAAGCTGTAATCGA
CGGGAAGAGCATGCCCATCC-3' (SEQ ID NO:3);

S4:

5'-ACGGTATTGGACCCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGA
GGATGGGCATGCTCTTCCCG-3' (SEQ ID NO:4)。

2、TDNs 的鉴定

(1) 采用 8%非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 进行鉴定

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。

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) 分别采用透射电镜和原子力显微镜对 TDNs 进行鉴定, 其结果分别见图 3 和图 4;

如图 3 所示, TDNs (红色三角形标注) 的形状在透射电镜下呈近似三角形形状, 粒径大小约在 10~15nm 左右; 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。

实施例 2 阿尔兹海默细胞模型的建立及验证

(1) 在 96 孔板中接种细胞悬液 (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) 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 A β ₂₅₋₃₅, 对照组加入等量无血清的 DMEM 培养基, 然后在孵箱中培养 24h (37℃, 5%CO₂), 培养结束后, 向每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 并避免生产气泡, 然后在孵箱中培养 1~4h (37℃, 5%CO₂) 培育结束后, 在 450nm 处检测每孔的吸光度, 并进行数据处理, 其结果见图 5;

如图 5 所示, A β ₂₅₋₃₅ 的浓度分别为 6.25 μ M、12.5 μ M、25 μ M、50 μ M 和 100 μ M, 当 A β ₂₅₋₃₅ 的浓度为 25 μ M 时, 细胞活性低于 70%, 表明建模成功。

实施例 3 TDNs 对阿尔兹海默细胞模型细胞活性的影响

(1) 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/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) 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 A β 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 25 μ M 的 A β 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 25 μ M 的 A β 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%CO₂)。

(3) 在 450nm 处检测每孔的吸光度, 并进行数据处理, 其结果见图 6;

如图 6 所示, 加入四面体后, 细胞有明显增殖, 与前期结果一致, 且经 TDNs

预处理的 TDNs+A β_{25-35} 组，细胞活性较 A β_{25-35} 组有提高，表明 TDNs 可提高阿尔兹海默细胞的细胞活性。

实施例 4 TDNs 对阿尔兹海默细胞模型细胞凋亡的影响

1、采用免疫荧光技术检测 TDNs 对阿尔兹海默细胞模型细胞凋亡的影响

(1) 将细胞悬浮液接种于共聚焦小皿中，并按实施例 3 中步骤 (2) 进行分组，并进行相应处理，然后 24 小时后吸去各组不同的培养基，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，其结果见图 7、图 8；

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

(1) 在 25mL 培养瓶中接种细胞悬液，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) 按实施例 3 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 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ；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，其结果见图 9；

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 AD 细胞模型组较 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 AD 细胞模型的细胞周期。

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

(1) 在 25mL 培养瓶中接种细胞悬液，将培养瓶置于孵箱中预培养 24 小时 (37°C, 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°C, 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°C, 5%CO₂)；

(2) 按实施例 3 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°C 避光条件下孵育 15 分钟。加入 5μL PI 染色液，轻轻混匀于 4°C 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，其结果见图 10。

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 细胞的细胞凋亡具有一定抑制作用。TDNs 预处理的 AD 细胞模型组较 AD 细胞模型组，凋亡比例明显降低，说明 TDNs 对于 AD 细胞模型的细胞凋亡现象具有明显的抑制作用。

实施例 5 TDNs 抑制阿尔兹海默细胞凋亡的机制

1、采用蛋白质印迹法检测 TDNs 抑制阿尔兹海默细胞凋亡的机制

(1) 在 6 孔板中接种细胞悬液 (100μL /孔)，将培养板置于孵箱中预培养 24 小时 (37°C, 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°C, 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°C, 5%CO₂)；

(2) 按实施例 3 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，其结果见图 11。

如图 11 所示，与空白对照组相比，TDNs 组中凋亡正相关蛋白 Bax, Caspase 3, 细胞色素 C 的蛋白表达量均有所下降，负相关蛋白 Bcl-2 的表达有所增加，从而，进一步说明 TDNs 抑制 PC12 细胞的凋亡。TDNs 预处理的 AD 细胞模型组较 AD 细胞模型组，凋亡正相关蛋白 Bax, Caspase 3, 细胞色素 C 的蛋白表达量均有所下降，负相关蛋白 Bcl-2 的表达有所增加，从而，进一步说明 TDNs 对于 AD 细胞模型的细胞凋亡现象具有明显的抑制作用。

2、采用荧光定量 PCR (Q-PCR) 检测 TDNs 抑制阿尔兹海默细胞凋亡的机制

(1) 在 6 孔板中接种细胞悬液 (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) 按实施例 3 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，其结果见图 12；

如图 12 所示，与空白对照组相比，TDNs 组中凋亡正相关基因 *Bax*, *Caspase*

3 的表达量均有所下降, 负相关基因 *Bcl-2* 的表达有所增加, 从而, 进一步说明 TDNs 抑制 PC12 细胞的凋亡。TDNs 预处理的 AD 细胞模型组较 AD 细胞模型组, 凋亡正相关基因 *Bax*, *Caspase 3* 的表达量均有所下降, 负相关基因 *Bcl-2* 的表达有所增加, 从而, 进一步说明 TDNs 对于 AD 细胞模型的细胞凋亡现象具有明显的抑制作用。

3、采用免疫荧光技术检测 TDNs 抑制阿尔兹海默细胞凋亡的机制

(1) 在共聚焦小皿中接种细胞悬液 (100 μ l/孔), 将培养板在孵箱中预培养 24 小时 (37 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C, 5%CO₂);

(2) 按实施例 3 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%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;

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

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

一抗 *Bcl-2* 抗体处理, 4 $^{\circ}$ C, 过夜。第二天, 37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C, 1 小时, 吸去二抗, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟;

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 $^{\circ}$ C 保存。上机检测, 其结果见图 13。

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 抑制 PC12 细胞的凋亡。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 AD 细胞模型的细胞凋亡现象具有明显的抑制作用。

1.DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其中，DNA 四面体的四条单链序列如 SEQ ID NO:1-4 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡是通过调节与凋亡正负相关的蛋白的表达量来实现的。

3.根据权利要求 2 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括抑制凋亡正相关蛋白 Bax 的蛋白表达量。

4.根据权利要求 2 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括抑制凋亡正相关蛋白 Caspase 3 的蛋白表达量。

5.根据权利要求 2 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括抑制凋亡正相关蛋白细胞色素 C 的蛋白表达量。

6.根据权利要求 2 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程包括促进凋亡负相关蛋白 Bcl-2 的蛋白表达量。

7.根据权利要求 2 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体抑制阿尔兹海默细胞凋亡的过程分别包括抑制凋亡正相关基因 Bax 和 Caspase 3 的表达量，以及促进凋亡负相关基因 Bcl-2 的表达量。

8.根据权利要求 1~7 任一项所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡过程中的

浓度为 50~500nM。

9.根据权利要求 8 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡过程中的浓度为 100~300nM。

10.根据权利要求 8 所述的 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡中的应用，其特征在于，所述 DNA 四面体在抑制阿尔兹海默细胞凋亡过程中的浓度为 250nM。

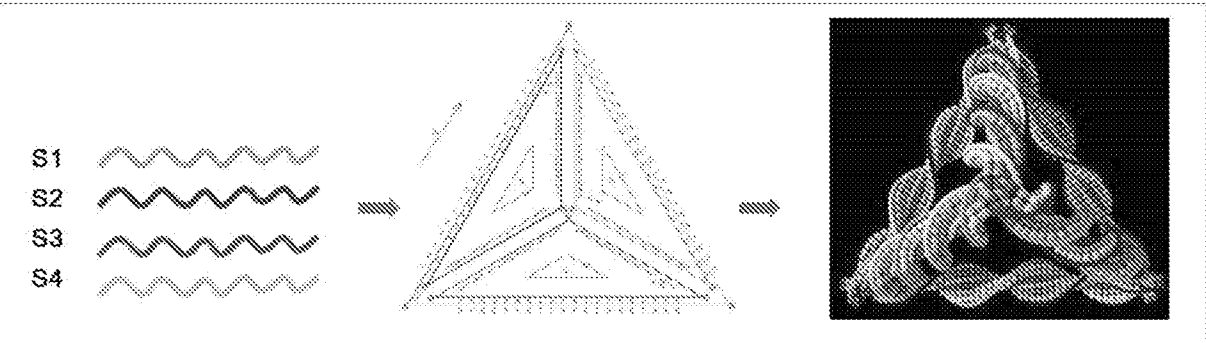


图 1

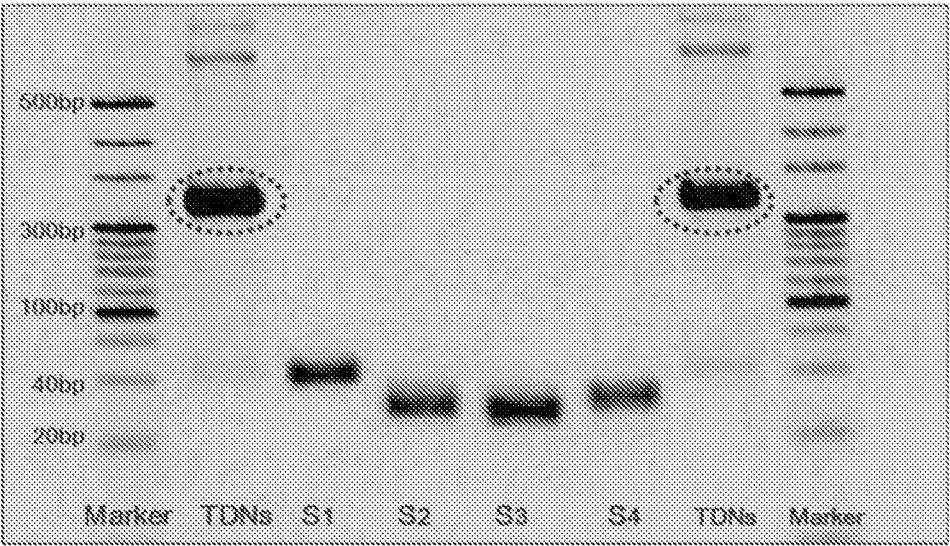


图 2

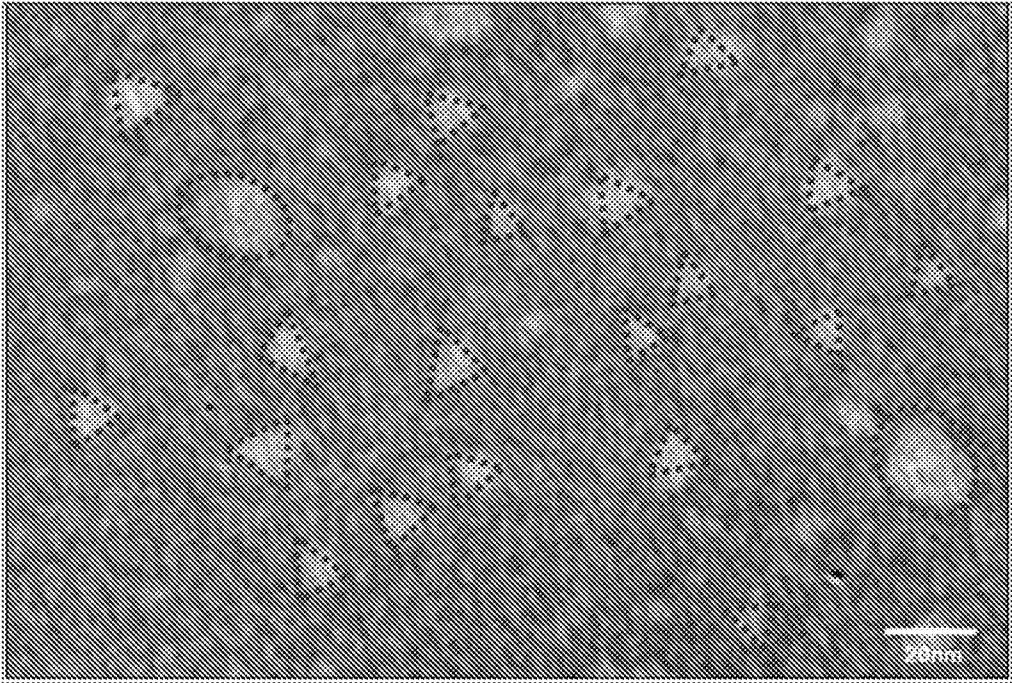
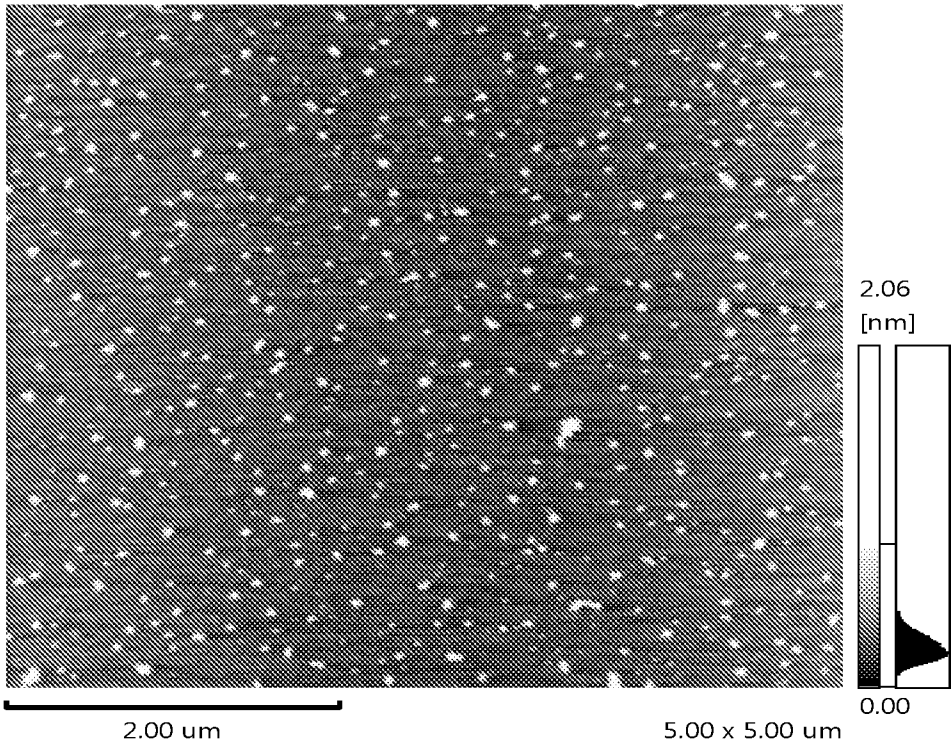


图 3



2

图 4

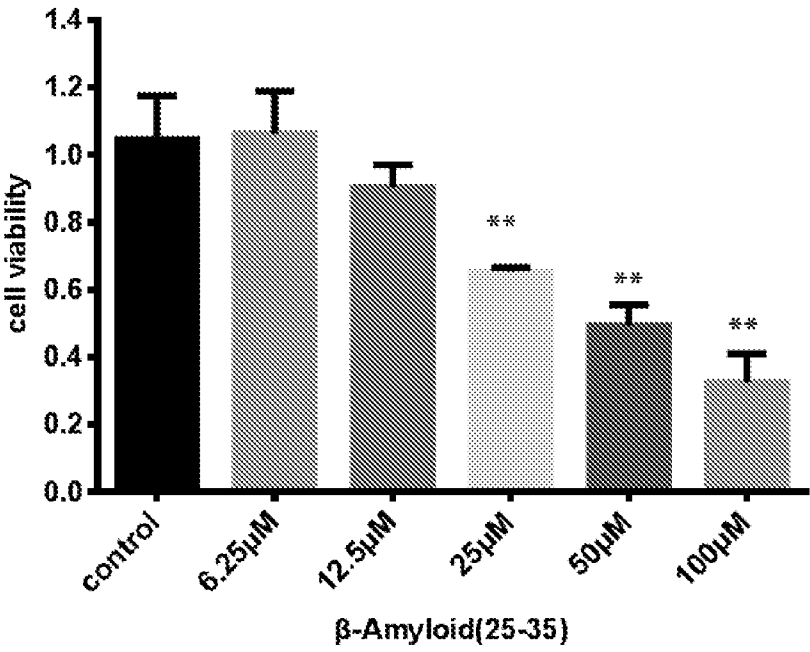


图 5

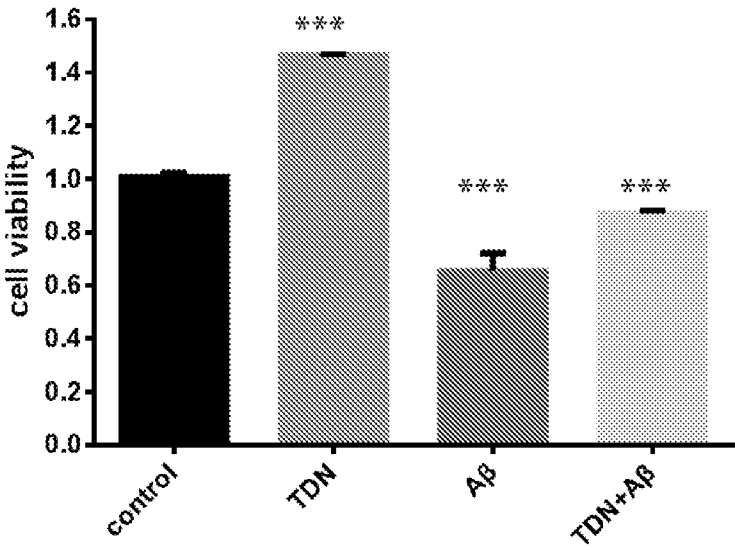


图 6

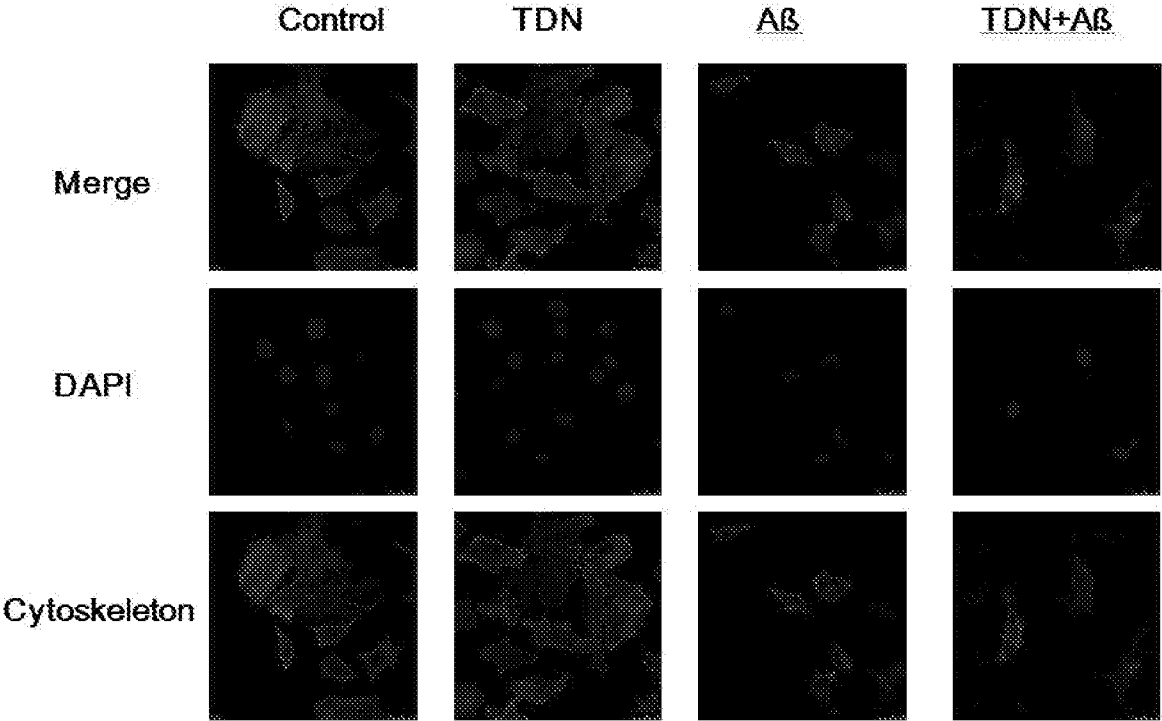


图 7

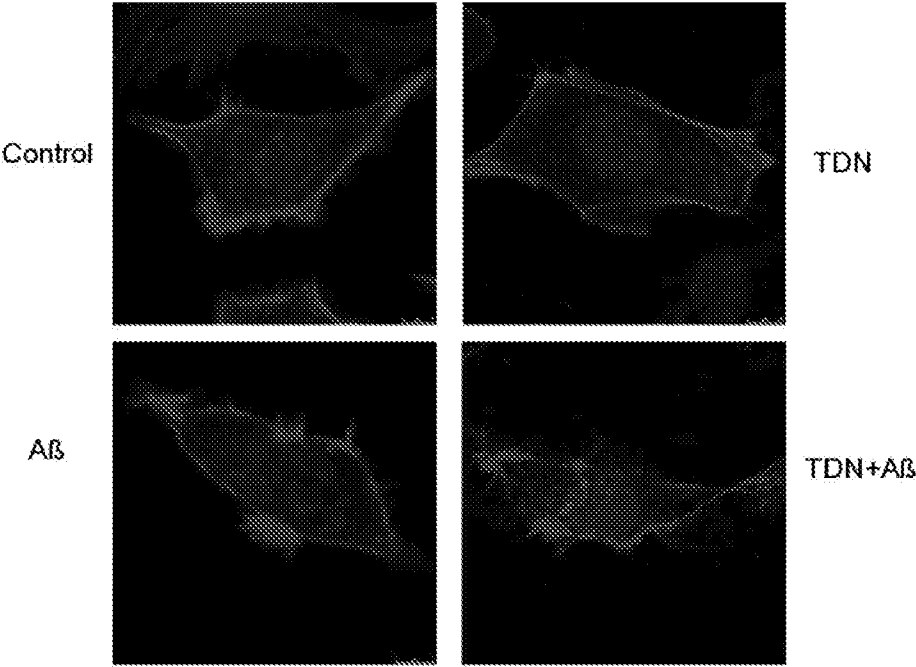


图 8

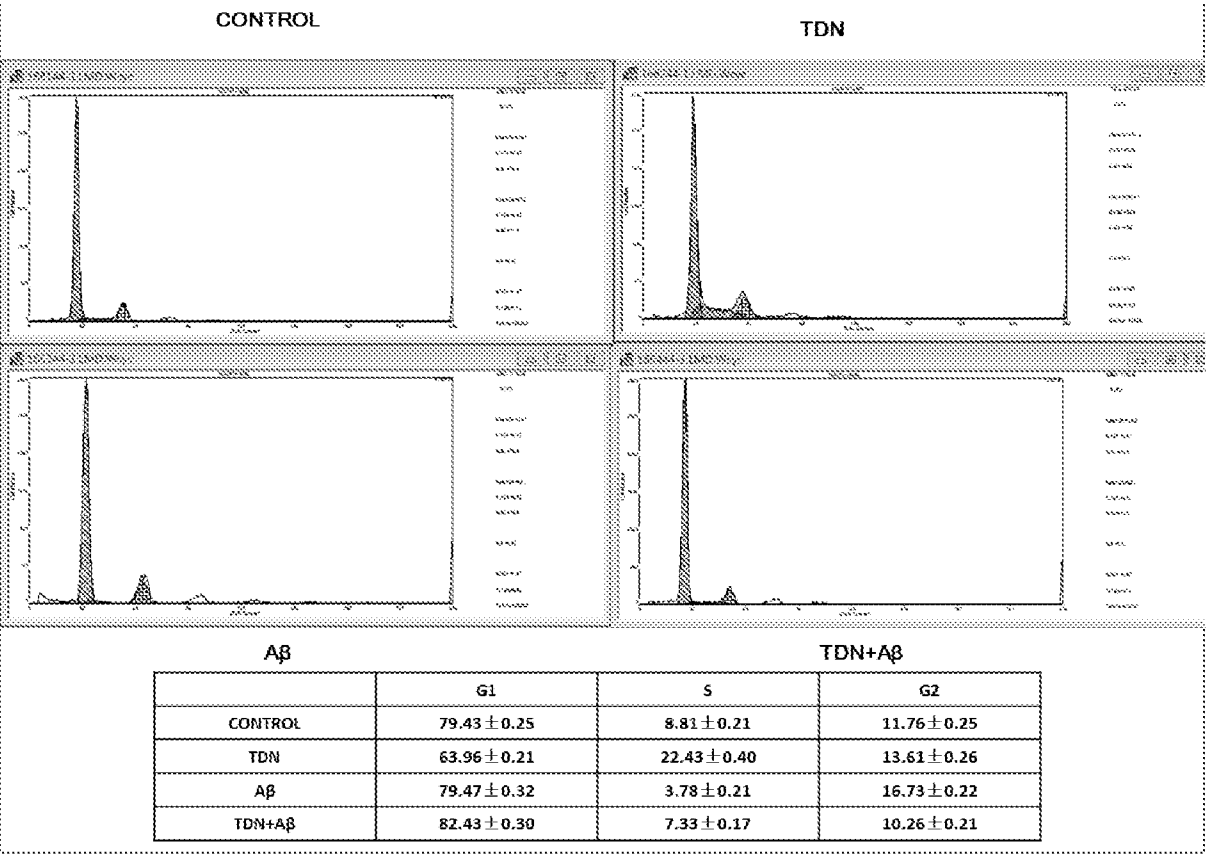


图 9

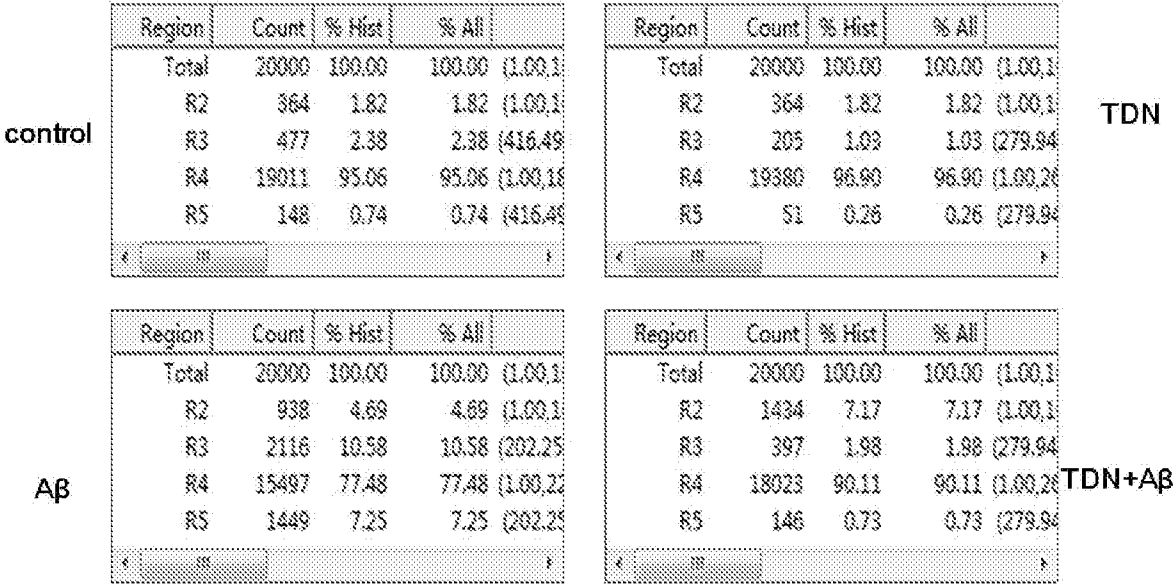


图 10

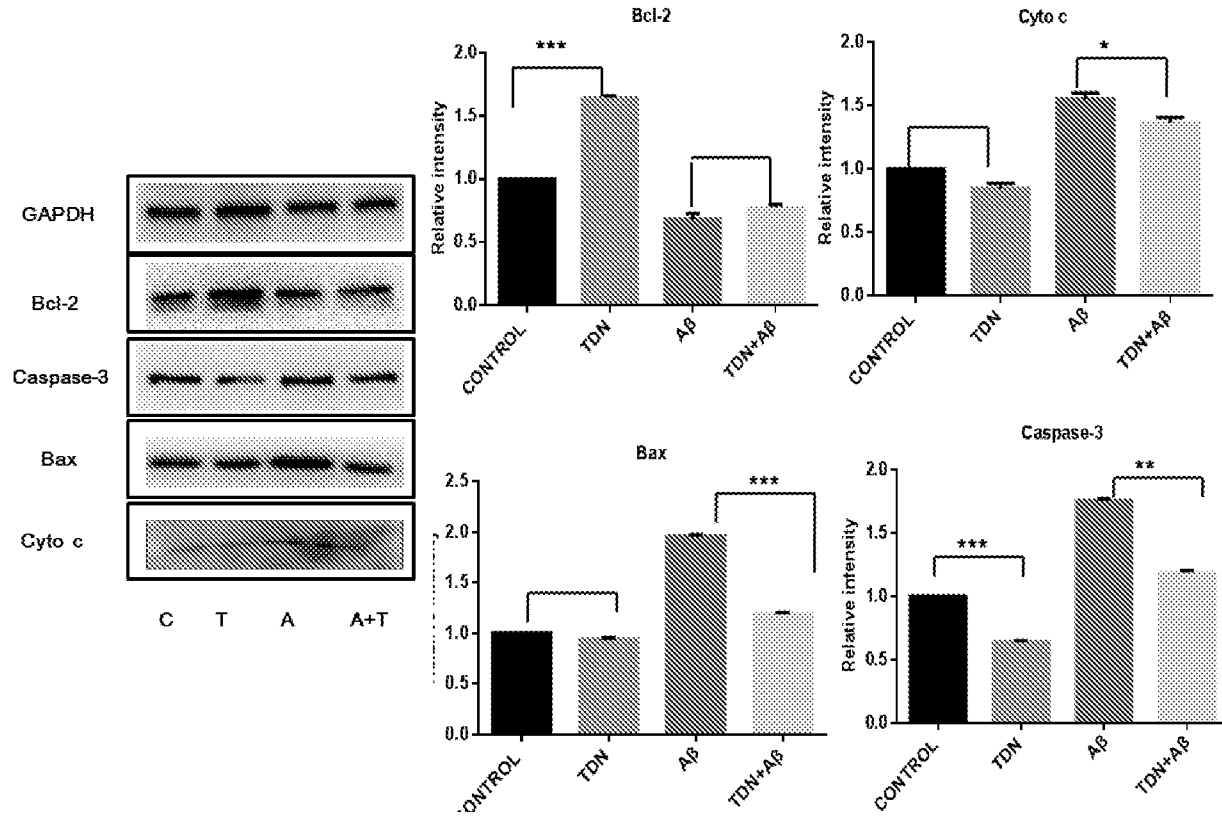


图 11

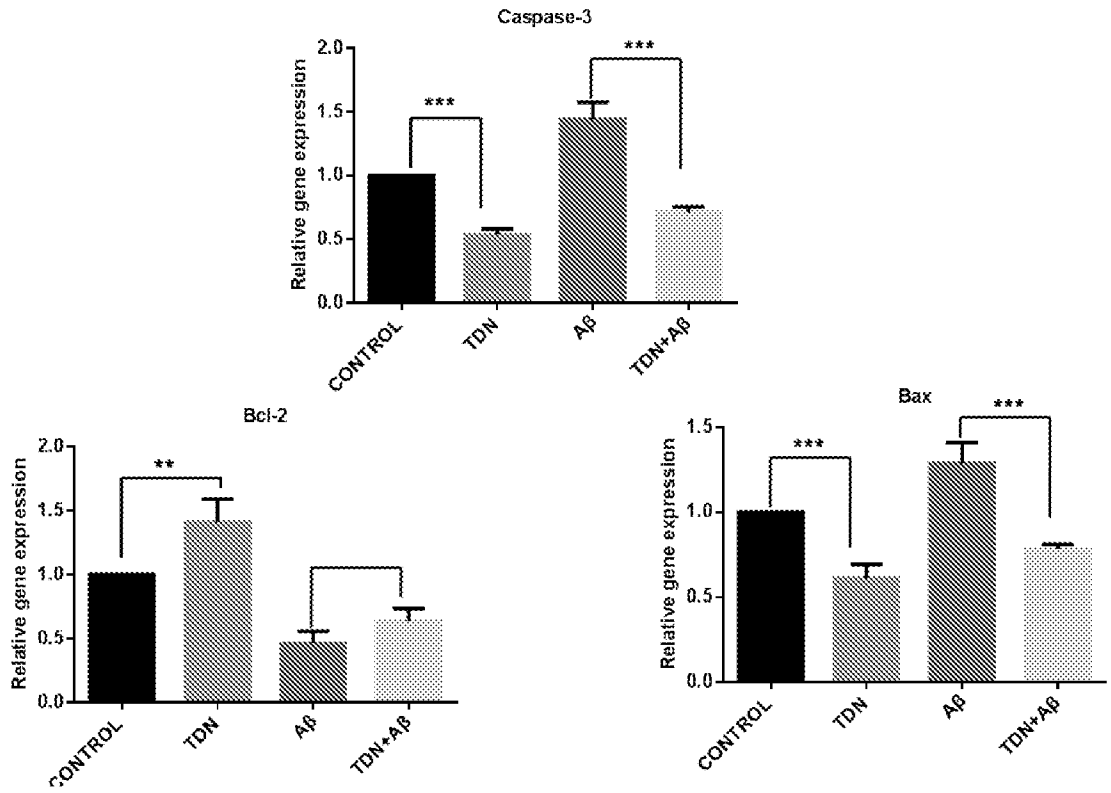


图 12

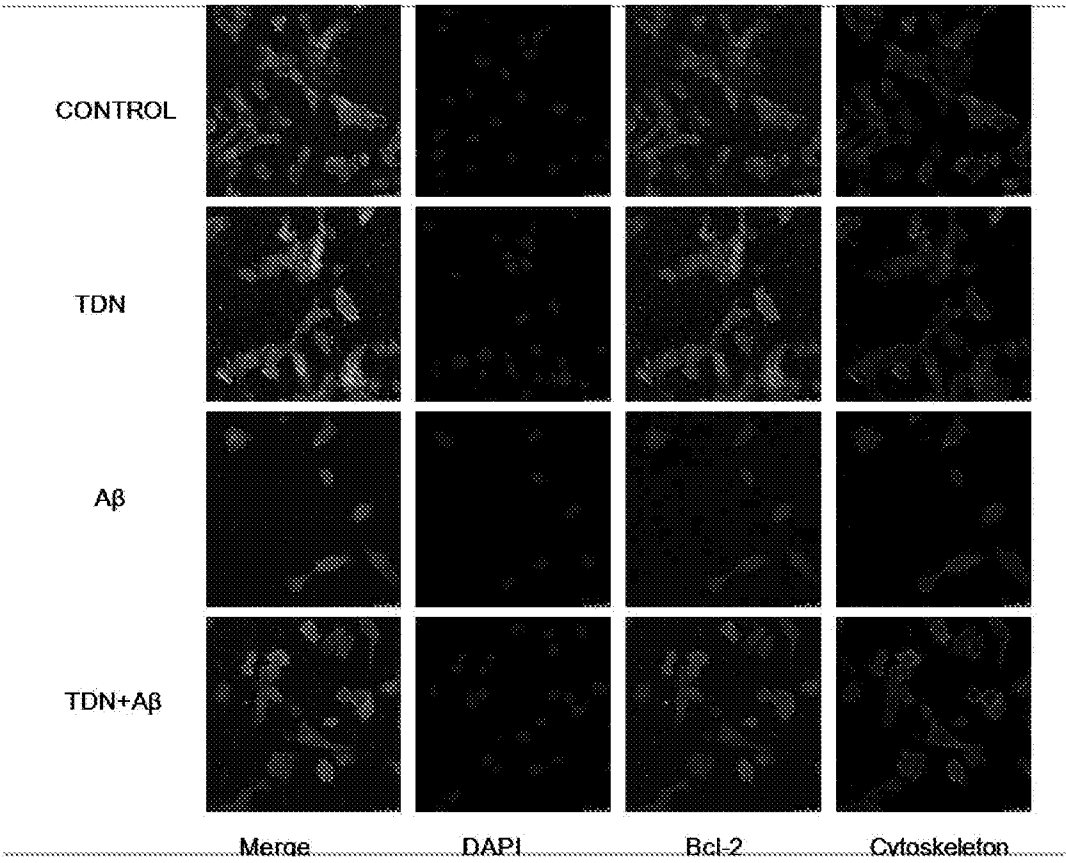


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094562

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, VEN, CNKI, ISI Web of Science, GOOGLE Scholar, BAIDU学术, BAIDU SCHOLAR, Patentics, 中国生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM OF CHINA, NCBI, EBI, STN: 四川大学, sichuan university, DNA, 核酸, nucleic acid, 四面体, 纳米结构, 纳米材料, tetrahedron, nano structure, nano material, 阿尔兹海默, 老年痴呆, alzheimer disease, AD, SEQ ID Nos: 1-4

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) claims 1-10, and sequence table	1-10
A	CN 106497919 A (SICHUAN UNIVERSITY) 15 March 2017 (2017-03-15) entire document	1-10
A	CN 106540268 A (SICHUAN UNIVERSITY) 29 March 2017 (2017-03-29) entire document	1-10
A	SHAO, Xiaoru et al. "Tetrahedral DNA Nanostructure: A Potential Promoter for Cartilage Tissue Regeneration via Regulating Chondrocyte Phenotype and Proliferation." <i>Small.</i> , Vol. volume 13, 23 January 2017 (2017-01-23), 1602770, pages 1-12	1-10
A	US 2014255307 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 11 September 2014 (2014-09-11) entire document	1-10
A	WO 2007122405 A1 (ISIS INNOVATION LTD.) 01 November 2007 (2007-11-01) entire document	1-10



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

09 September 2018

Date of mailing of the international search report

25 September 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094562

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	董世彪等 (DONG, Shibiao et al.). "DNA四面体结构纳米材料及其应用 (The DNA Tetrahedron Nanostructure Materials and Their Applications)." <i>化学进展 (Progress in Chemistry)</i> , Vol. 27, No. (9), 25 August 2015 (2015-08-25), pages 1191-1197	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/094562

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/CN2018/094562

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			
CN	106497919	A	15 March 2017	WO	2018082143	A1	11 May 2018
CN	106540268	A	29 March 2017	WO	2018082126	A1	11 May 2018
US	2014255307	A1	11 September 2014	KR	20140110401	A	17 September 2014
				KR	101485389	B1	26 January 2015
				US	9669114	B2	06 June 2017
WO	2007122405	A1	01 November 2007	GB	0607866	D0	31 May 2006
				WO	2007122405	A8	16 July 2009
				US	2009227774	A1	10 September 2009
				EP	2010655	A1	07 January 2009

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/094562

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, VEN, CNKI, ISI Web of Science, GOOGLE Scholar, BAIDU学术, Patentics, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STN: 四川大学, sichuan university, DNA, 核酸, nucleic acid, 四面体, 纳米结构, 纳米材料, tetrahedron, nano structure, nano material, 阿尔兹海默, 老年痴呆, alzheimer disease, AD, SEQ ID Nos: 1-4																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107669697 A (四川大学) 2018年 2月 9日 (2018 - 02 - 09) 权利要求1-10, 序列表</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106497919 A (四川大学) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106540268 A (四川大学) 2017年 3月 29日 (2017 - 03 - 29) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Shao, X.R. 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), 1602770, 第1-12页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014255307 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2014年 9月 11日 (2014 - 09 - 11) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2007122405 A1 (ISIS INNOVATION LTD.) 2007年 11月 1日 (2007 - 11 - 01) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			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) 权利要求1-10, 序列表	1-10	A	CN 106497919 A (四川大学) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 全文	1-10	A	CN 106540268 A (四川大学) 2017年 3月 29日 (2017 - 03 - 29) 全文	1-10	A	Shao, X.R. 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), 1602770, 第1-12页	1-10	A	US 2014255307 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2014年 9月 11日 (2014 - 09 - 11) 全文	1-10	A	WO 2007122405 A1 (ISIS INNOVATION LTD.) 2007年 11月 1日 (2007 - 11 - 01) 全文	1-10
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) 权利要求1-10, 序列表	1-10																					
A	CN 106497919 A (四川大学) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 全文	1-10																					
A	CN 106540268 A (四川大学) 2017年 3月 29日 (2017 - 03 - 29) 全文	1-10																					
A	Shao, X.R. 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), 1602770, 第1-12页	1-10																					
A	US 2014255307 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2014年 9月 11日 (2014 - 09 - 11) 全文	1-10																					
A	WO 2007122405 A1 (ISIS INNOVATION LTD.) 2007年 11月 1日 (2007 - 11 - 01) 全文	1-10																					
☒ 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																					
2018年 9月 9日		2018年 9月 25日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																					
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		冯晓亮 电话号码 86-(10)-53961927																					

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
A	董世彪等. "DNA四面体结构纳米材料及其应用." 化学进展., 第27卷, 第9期, 2015年 8月 25日 (2015 - 08 - 25), 第1191-1197页	1-10

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/CN2018/094562

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			
CN	106497919	A	2017年 3月 15日	WO	2018082143	A1	2018年 5月 11日
CN	106540268	A	2017年 3月 29日	WO	2018082126	A1	2018年 5月 11日
US	2014255307	A1	2014年 9月 11日	KR	20140110401	A	2014年 9月 17日
				KR	101485389	B1	2015年 1月 26日
				US	9669114	B2	2017年 6月 6日
WO	2007122405	A1	2007年 11月 1日	GB	0607866	D0	2006年 5月 31日
				WO	2007122405	A8	2009年 7月 16日
				US	2009227774	A1	2009年 9月 10日
				EP	2010655	A1	2009年 1月 7日