



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105063048 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510497040. 6

(22) 申请日 2015. 08. 13

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699 号

(72) 发明人 谢晶 邢高扬 李剑光 滕乐生 孟庆繁 逯家辉 刘艳 权宇彤

(74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225

代理人 刘锋 郑丹

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

A61K 31/713(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

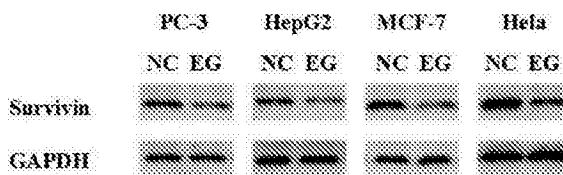
权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种抑制 Survivin 基因表达的 siRNA 及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抑制 survivin 基因表达的 siRNA 分子及其应用。具体涉及一种高效的小分子干扰 RNA 在制备调控肿瘤细胞周期药物中的应用,这种高效的小分子干扰 RNA 双链序列通过某种方式进入到生物体内时,能够特异的抑制疾病相关蛋白的表达,使有关疾病基因发生沉默,达到治疗目的。该 siRNA 分子具有光谱的抗癌活性,如白血病、胃癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌,乳腺癌,肺癌,肝癌等有显著抑制效果,可以用于制备抑制肿瘤细胞增殖和转移的药物。



1. 一种抑制 survivin 基因表达的双链 siRNA 分子,其特征在于,具有如下序列结构:
正义链 5' -GAGACAGAAUAGAGUGAUA-3' SEQ ID NO:1
反义链 5' -UAUCACUCUAUUCUGUCUC-3' SEQ ID NO:2。
2. 一种抑制 survivin 基因表达的双链 siRNA 分子,其特征在于,具有如下序列结构:
正义链:5' -GAGACAGAAUAGAGUGAUA tt-3' SEQ ID NO:3
反义链:5' -UAUCACUCUAUUCUGUCUC tt-3' SEQ ID NO:4。
3. 一种 siRNA 重组质粒,其特征在于,所述 siRNA 重组质粒包含权利要求 1 或 2 中所述的双链 siRNA 分子。
4. 一种 Survivin 基因沉默试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 或 2 中所述的双链 siRNA 分子或权利要求 2 所述的 siRNA 重组质粒。
5. 权利要求 1 中或 2 所述的双链 siRNA 分子或权利 3 所述的 siRNA 重组质粒在制备抗肿瘤药物或抗肿瘤药物组合物中的应用。
6. 一种抗肿瘤药物,其特征在于,含有有效量的如权利要求 1 或 2 中所述的双链 siRNA 分子或权利要求 3 所述的 siRNA 重组质粒。
7. 根据权利 6 中所述的抗肿瘤药物,其中肿瘤是白血病、胃癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌,乳腺癌,肺癌,肝癌中至少一种。

一种抑制 Survivin 基因表达的 siRNA 及其应用

技术领域

[0001] 本发明公开了一种抑制 survivin 基因表达的 siRNA 分子及其在制备抗肿瘤药物的应用,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 目前,恶性肿瘤临床进展快、生存期短以及传统临床治疗的中远期疗效均不理想,化疗药物一方面起到治疗作用,同时另一方面,化疗药物的毒副作用对患者的身体起到破坏作用。因此,因而寻找新的肿瘤治疗策略是全球临床及科研工作者所面临的重大问题。随着分子生物学的发展,针对肿瘤基因进行靶向治疗成为癌症治疗研究的方向。药物作用于肿瘤某分子、某基因等靶向部位,一方面提高了疗效,另一方面减少了药物的用量。寻找能成为肿瘤治疗的靶标已成为治疗肿瘤的前提之一。可能成为药物作用的靶标包括:癌细胞具有的特殊抗原、特殊生长因子受体、肿瘤血管生长相关因子、癌细胞特殊信息传递途径中的各种分子、癌细胞内细胞周期和细胞凋亡的调控分子。

[0003] 人类 survivin 基因是 1997 年美国耶鲁大学的 Ambrosini 等利用效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1) cDNA 在人类基因组的杂交筛选中分离并克隆出来的,与 EPR-1 同位于染色体 17q25,全长 14.7kb,由 3 个内含子和 4 个外显子组成,其 mRNA 长约 1.9kb,其编码产生的蛋白由 142 个氨基酸组成,相对分子量为 16.5×10^3 ,是近年来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族中的一个新成员,具有抑制细胞凋亡和维持细胞有丝分裂的双重功能,在正常的终末分化组织中几乎不表达。在生理状态下, survivin 仅表达于成人分泌期子宫内膜、胎盘、睾丸、胸腺及胚胎中,但在病理状态下, survivin 广泛表达于人类各种恶性肿瘤组织中,如胃癌、食管癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、白血病、黑色素瘤、淋巴瘤、III~IV 期神经母细胞瘤等。survivin 表达增高可抑制肿瘤细胞凋亡而促进其增殖,而且其表达与病程进展明显相关。因此, survivin 可能作为一种新的肿瘤标志物,成为检测恶性肿瘤的指标。

[0004] RNA 干扰 survivin 表达技术, RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 是指在生物体细胞内,外源性或内源性的双链 RNA(double-stranded RNA) 引起与其同源的 mRNA 特异性的降解,从而抑制 survivin 基因的转录和表达,具有高度特异性、高效性的特点。总结近年来的研究成果,其在临床应用中具有较广阔的前景。

发明内容

[0005] 本发明公开一种抑制 survivin 基因表达的双链 siRNA 分子其在抗肿瘤药物的应用,是一种新的 siRNA 序列,可以抑制肿瘤细胞的增殖和转移。

[0006] 本发明所述的双链 siRNA 分子,其特征在于,该双链 siRNA 分子是一种高效靶向 survivin 基因的广谱双链的小分子干扰 RNA(siRNA),具有如下序列结构:

[0007] 正义链 5' -GAGACAGAAUAGAGUGAUA-3' SEQ ID NO:1

[0008] 反义链 5' -UAUCACUCUAUUCUGUCUC-3' SEQ ID NO:2

[0009] 本发明所述的双链 siRNA 分子的主干序列即为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列,即正义链和反义链分别具有 SEQ ID NO:1 和 2 所示的核苷酸序列的双链分子。

[0010] 优选的,所述双链 siRNA 分子,具有如下的序列结构:

[0011] 正义链:5' -GAGACAGAAUAGAGUGAUA tt-3' SEQ ID NO:3

[0012] 反义链:5' -UAUCACUCUAUUCUGUCUC tt-3' SEQ ID NO:4。

[0013] 本发明的 siRNA 分子来源于针对 survivin 基因开放阅读框的功能保守区而制备的 siRNA 分子库,该序列的正义链与 survivin 基因的 mRNA 结合,干扰 survivin 基因 mRNA 的翻译,从而抑制肿瘤细胞的分裂,使肿瘤细胞阻滞在 G2/M 期。

[0014] 本发明的 siRNA 分子的优点在于,所制备的 siRNA 随机分布于 survivin 基因开放阅读框区段,长度可控性分布于 19-23bp,可以提高有效靶点的命中率。

[0015] 本发明还提出了一种 siRNA 重组质粒,所述的 siRNA 重组质粒包含前面所述的任意一种双链 siRNA 分子的序列。由此,利用 siRNA 重组质粒转染动物细胞,能够有效的沉默 survivin 基因,进而诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞分裂、抑制肿瘤血管的生成,从而能够有效的治疗肿瘤。进一步,该 siRNA 分子与 siRNA 重组质粒能够有效的用于抗肿瘤药物的制备,从而利用制备的抗肿瘤药物对患者进行给药,有效的治疗肿瘤。

[0016] 根据本发明还提出了一种 survivin 基因沉默试剂盒,所述试剂盒包含前面所述的任意一种双链 siRNA 分子或 siRNA 重组质粒。利用本发明的试剂盒能够有效的将肿瘤患者的细胞进行 survivin 基因沉默,从而能够有效的治疗肿瘤。

[0017] 本发明的 siRNA 分子可以作为抗肿瘤药物的有效成分,肿瘤疾病包括如白血病、胃癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌,乳腺癌,肺癌,肝癌等。

[0018] 因而,本发明还提出了前面所述的任意一种双链 siRNA 分子、或者 siRNA 重组质粒在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0019] 本发明提出一种抗肿瘤药物,该药物含有有效量的 siRNA 分子或 siRNA 重组质粒,该抗肿瘤药物可以采用常规方法制备成相应制剂,如可被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。针剂、溶液等宜在无菌条件下制造。

[0020] 本发明的积极效果在于:提供了一种新的高效靶向 survivin 基因的广谱双链的小分子干扰 RNA (siRNA),同时还公开了其在制备抗肿瘤药物中的应用。

附图说明

[0021] 图 1 是化学合成的 siRNA 转染两种细胞后实时定量 PCR 检测 survivin mRNA 表达量柱形图,纵坐标表示 survivin 相对于 GAPDH 的 mRNA 表达水平;横坐标表示四个处理实验组,分别为未转染的细胞组,转染实验包括三个 siRNA 浓度,分别为 10nM、20nM 和 30nM。

[0022] 图 2 是 Western Blot 检测 siRNA 转染人前列腺癌细胞 PC-3、肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MCF-7 和宫颈癌细胞 HeLa 后的 survivin 蛋白表达量,NC 所对应的是阴性对照组,EG 所对应的是加入 20nM/孔的 siRNA 组。

具体实施方式

[0023] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。这些实施例只用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0024] 实施例 1 :siRNA 沉默效率验证

[0025] 1. 主要仪器、试剂和材料。

[0026] 1.1 仪器 :核酸合成仪 (GE 公司)、PCR 仪 (ABI 公司);实时定量 PCR (Bio-Rad);细胞培养箱 (Thermo) 等。

[0027] 1.2 材料和试剂 :RNAiMAX™ (invitrogen), DMEM 培养基 (Gibco),

[0028] TurboCapture mRNA kit (QIAGEN), SensiMix™ one-Step Kit (Quantace) 等。其他生化试剂均购于上海生工生物工程技术有限公司。

[0029] 1.3 PCR 引物 (百奥迈科生物技术有限公司合成):

[0030] survivin 正向引物 :5' -AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG-3'

[0031] survivin 反向引物 :5' -CTTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3'

[0032] GAPDH 正向引物 ;5' -GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'

[0033] GAPDH 反向引物 :5' -GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

[0034] 2. 化学合成 siRNA

[0035] 根据 survivin 基因的核苷酸序列,设计小分子干扰 siRNA:

[0036] 正义链 :5' -GAGACAGAAUAGAGUGAUAtt-3'

[0037] 反义链 :5' -UAUCACUCUAUUCUGUCUC tt-3'

[0038] 将该序列在人类 EST 数据库中比对,确定没有与它相同的其它基因序列。siRNA 由广州锐博生物科技有限公司合成。

[0039] 3. RT-PCR 检测 survivin 基因 mRNA 水平

[0040] 3.1 细胞培养 :宫颈癌细胞 HeLa 和人肺癌细胞 A549 分别在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,37°C、5% CO₂培养箱培养。

[0041] 3.2 细胞铺板并转染 :将宫颈癌细胞 HeLa 和人肺癌细胞 A549 按 1×10^5 个 / 孔接种到 96 孔细胞培养板中,两种细胞分别设置未转染组、siRNA 10nM 组、siRNA 20nM 组和 siRNA 30nM 组,共 8 组。在 37°C、5% CO₂培养箱细胞培养过夜,在无双抗含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,转染按照 RNAiMAX™ 的说明书转染,将实施例 1 步骤 2 中合成的 siRNA 分别按 10nM/ 孔、20nM/ 孔和 30nM/ 孔加入两组细胞对应的分组。

[0042] 用基因特异性引物检测样本中 survivin mRNA 表达水平,同时扩增看家基因 GAPDH 作为内参对照。每个反应做 3 个平行。建立如下 25 μL 反应体系 :4 μL 模板 RNA, 12.5 μL 2×SensiMix one-step, 1 μL 5' 正向引物 (6 μM), 1 μL 3' 反向引物 (6 μM) 0.5 μL 50×SYBR Green I, 用无 RNase 水补足体系至 25 μL。反应条件 :40°C 反转录 30min, 95°C 预变性 7min, 95°C 变性 20sec, 60°C 退火 30sec, 72°C 延伸 30sec, 循环 45 次。

[0043] 3.4 结果分析 :用实时定量 PCR 分析实验结果,并作出柱状图,如图 1 所示,实验分为四组,其中“未转染”为未经任何处理的细胞样品,其他三组为本发明 siRNA,浓度分别为 10nM、20nM、30nM。结果显示靶向 survivin 基因的 siRNA 沉默效果显著,具有一定的浓度依赖性。在 siRNA 为 30nM 时, survivin 基因的沉默效率即可达到 80% 以上。

[0044] 实施例 2 :survivin 基因沉默对肿瘤细胞增殖影响

[0045] 将宫颈癌细胞 HeLa、肝癌 HepG2 和人肺癌细胞 A549 按 5×10^3 个 / 孔分别接种到

96孔细胞培养板中,三种细胞分别培养,分别进行试验。在37℃、5% CO₂培养箱细胞培养24小时,在无双抗含10% FBS的DMEM培养基中,按照RNAiMAX™的说明书转染,实施例1步骤2中合成的siRNA按10、20、40nM/孔加入,37℃孵育48小时后,每孔加入20 μL MTT(5mg/mL),37℃继续孵育4h,吸除培养基,加入200 μL DMSO溶解甲瓚结晶,于490nm处测定吸光度值。

[0046] MTT法检测siRNA对肿瘤细胞增殖的抑制结果,siRNA在20nM至50nM对肿瘤肺癌A549、肝癌HepG2、宫颈癌HeLa和乳腺癌MCF-7的抑制作用逐渐增强,抑制率结果见表1。用临床上常用的抗肿瘤的顺铂作为siRNA的药效对照药物,顺铂在10 μM至40 μM对肿瘤肺癌A549、肝癌HepG2、宫颈癌HeLa和乳腺癌MCF-7的抑制作用逐渐增强,作用48小时后,MTT法检测的对肿瘤细胞的抑制率结果,见表2。

[0047] 表1 siRNA作用48小时对肿瘤细胞生长的抑制率(%)

[0048]

细胞	20nM	30nM	50nM
A549	20.4±2.2	49.8±3.6	61.3±2.4

[0049]

HepG2	22.6±1.4	50.3±2.8	64.9±4.3
HeLa	25.1±0.6	55.6±2.4	68.7±3.6
MCF-7	18.3±2.5	47.2±3.1	60.3±2.7

[0050] 表2 顺铂作用48小时对肿瘤细胞生长的抑制率(%)

[0051]

细胞	10 μM	20 μM	40 μM
A549	8.3±2.5	28.9±5.3	58.7±1.7
HepG2	12.1±3.1	30.5±4.5	62.3±5.1
HeLa	15.7±3.8	35.7±3.3	60.4±2.7
MCF-7	12.7±1.2	37.8±3.7	57.6±1.5

[0052] 由于细胞株A549、细胞株HepG2、细胞株HeLa和细胞株MCF-7分别为肺癌细胞株、肝癌细胞株、宫颈癌细胞株和乳腺癌细胞株,所以本发明所述的siRNA可以用于肝癌、宫颈癌和乳腺癌的治疗。

[0053] 实施例3:Western Blot检测siRNA对survivin表达的抑制情况

[0054] 将人前列腺癌细胞PC-3、肝癌细胞HepG2、乳腺癌细胞MCF-7细胞和宫颈癌细胞HeLa分别按 1.5×10^5 个/孔接种到6孔细胞培养板中,四种细胞分别培养,分别进行试验,在37℃、5% CO₂培养箱细胞培养24小时,在无双抗含10% FBS的DMEM培养基中,按照RNAiMAX™的说明书转染,siRNA按20nM/孔加入,37℃孵育48小时后,吸除培养基,用PBS洗

两遍,加入 100 μ L 细胞裂解液,在冰浴上裂解 10min,用细胞刮将细胞刮下,转移至 1.5ml 离心管中,10000rpm 离心 5min 后,取上清液测定蛋白浓度。每组取 30 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE,电泳完成后转至 PVDF 膜上,封闭后进行 survivin 一抗及羊抗兔二抗处理,然后进行化学发光反应,显影。结果见图 2,加入 siRNA 后细胞的 survivin 蛋白表达量明显低于不经过 siRNA 处理的阴性对照组。

[0055] 在四种细胞系中,siRNA 都能显著的降低 survivin 蛋白的表达,所以本发明所述的 siRNA 可以用于前列腺癌、肝癌、乳腺癌和宫颈癌的治疗。

[0001]

<110> 吉林大学
<120> 一种抑制 survivin 基因表达的 siRNA 分子及其用途
<130> DI15-8045-XC47
<160> 4
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 19
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 正义链序列 SEQ ID NO.1
<223>
<400> 1
GAGACAGAAU AGAGUGAUA 19

<210> 2
<211> 19
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 反义链序列 SEQ ID NO.2
<223>
<400> 2
UAUCACUCUA UUCUGUCUC 19

<210> 3
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 正义链序列 SEQ ID NO.3
<223>
<400> 3
GAGACAGAAU AGAGUGAUA+t 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 反义链序列 SEQ ID NO.4

[0002]

<223>

<400> 4

UAUCACUCUA UUCUGUCUCUtt 21

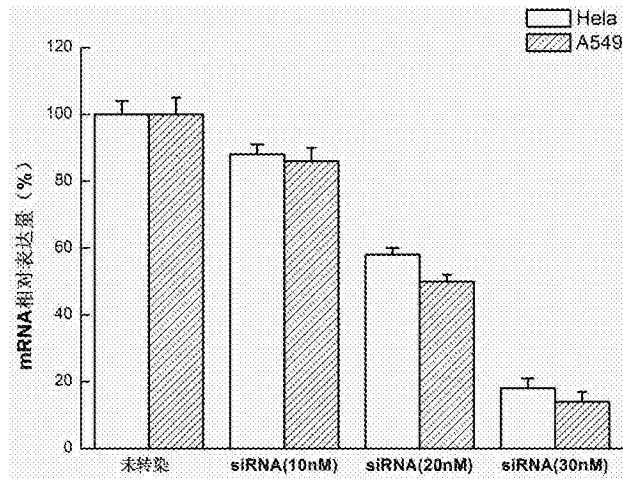


图 1

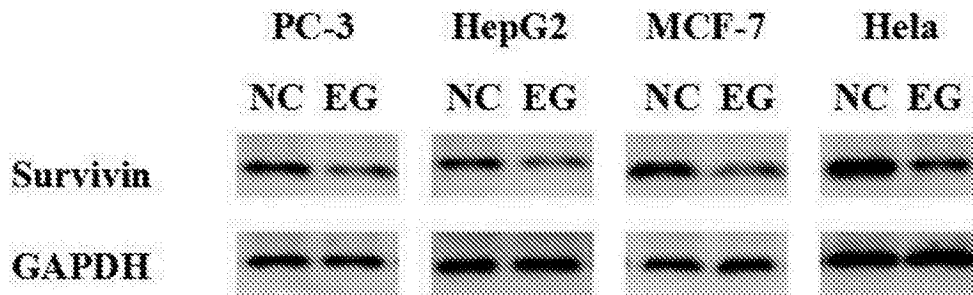


图 2