



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105106942 B

(45)授权公告日 2019.04.12

(21)申请号 201510639254.2

(22)申请日 2015.09.29

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105106942 A

(43)申请公布日 2015.12.02

(73)专利权人 武汉大学
地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72)发明人 李红良 李毅刚 李昌义

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222
代理人 常海涛

(51)Int.Cl.
A61K 38/46(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
A61P 9/04(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)

(56)对比文件

Keiichiro Iwao et al..The Krüppel-Like Factor Gene Target Dusp14 Regulates Axon Growth and Regeneration.《ARVO Annual Meeting Abstract》.2014,1447.

Francesc Marti et al..Negative-Feedback Regulation of CD28 Costimulation by a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase, MKP6.《J Immunol》.2001,197-200.

赵金红等.p38MAPK 信号通路与心脏重构关系的研究进展.《医学综述》.2013,2312-2314.

Pablo Ríos et al..Dual-Specificity Phosphatases as Molecular Targets for Inhibition in Human Disease.《ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING》.2014,2251-2273.

审查员 宋梦

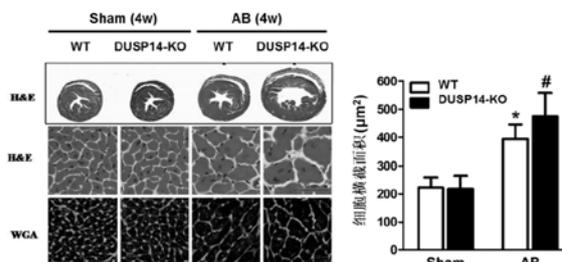
权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

双特异性磷酸酶14(DUSP14)在治疗心肌肥厚中的功能及应用

(57)摘要

本发明公开了一种双特异性磷酸酶14(DUSP14)在治疗心肌肥厚中的功能及应用,属于基因的功能与应用领域。本发明确定了DUSP14的表达与心肌肥厚之间的相互关系,研究结果表明在发生心肌肥厚的模型中,DUSP14的表达和正常组相比显著降低;抑制DUSP14表达显著促进了心肌肥厚、纤维化,恶化心功能,促进DUSP14过表达则显著抑制了心肌肥厚、纤维化,保护心功能。因此,DUSP14可作为靶基因,用于筛选保护心脏功能、抗心脏纤维化和/或预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物,用于制备保护心脏功能、抗心肌肥厚和/或预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物,为心肌肥厚的治疗提供了一条有效的途径。



1. 双特异性磷酸酶14在筛选抗心脏纤维化的药物中的应用。
2. 双特异性磷酸酶14在制备抗心脏纤维化的药物中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:包括双特异性磷酸酶14作为抗心脏纤维化的药物的有效成分。
4. 双特异性磷酸酶14在筛选预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物中应用。
5. 双特异性磷酸酶14在制备预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物中应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于:包括双特异性磷酸酶14作为预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物的有效成分。

双特异性磷酸酶14 (DUSP14) 在治疗心肌肥厚中的功能及应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因的功能与应用领域,特别涉及一种双特异性磷酸酶14(DUSP14)在治疗心肌肥厚中的功能及应用。

背景技术

[0002] 心肌肥厚是心肌对长期生物力学压力或容积负荷增加的代偿性反应,常见于高血压、主动脉瓣狭窄等心血管疾病,其主要表现为心肌细胞体积增大、蛋白合成增多、细胞外基质增多等特征[1-3]。高血压、老年退行性主动脉瓣疾病在我国呈逐年上升趋势。由高血压等疾病所致的心肌肥厚、高血压心脏病发病率也随之增加。尽管心肌肥厚最初可以使心肌细胞增大,心肌收缩力加强,是一种维持正常心输出量的代偿机制,但长期持续性的压力或容积负荷过重则会引起心肌重构,同时由于心肌需氧量增大,而冠状动脉血供相对不足,引起心肌缺血、心肌细胞凋亡,进而导致失代偿,从而引起心力衰竭、恶性心律失常、甚至猝死等[4,5]。研究表明随着心脏左室肥厚的发生发展,心肌缺血、室性心律失常、心力衰竭、猝死等心血管事件的发生率增加了6~10倍[6]。

[0003] 目前认为心肌肥厚是一种多种因素参与调节的复杂的动态过程。研究发现长期的生物力学压力和/或容积负荷过度,使心室壁应力增加,导致心肌肥厚。此外,血管紧张素II(Ang II)、内皮素(ET)、儿茶酚胺、转化生长因子- β (TGF- β)等各种胞外刺激信号可诱导核内基因表达的改变,从而导致心肌细胞肥大[7-11]。从分子水平上看心肌肥厚的病变过程分三个环节:胞外肥厚刺激信号的出现、胞内信号转导及核内基因转录活化,最终诱发细胞发生肥大表型变化。目前研究已经显示多种信号通路参与心肌肥厚的过程。其中,钙调神经磷酸酶calcineurin/NFAT、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)与PI3K/Akt/GSK3 β 信号转导通路以及由这三条通路所调节的下游转录因子Myc1.4、NF- κ B、AP-1、MEF2、mTOR等在心肌肥厚的发生发展中起着重要作用[1,2,12-17]。钙调神经磷酸酶(calcineurin)是一种受钙离子及钙调素调节的多功能信号酶,可通过使活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells,NFAT)转位入核,调节核内肥大基因(ANP、BNP)的表达[18,19]。MAPK包括三个亚家族[20]:ERKs、JNKs和p38-MAPK。磷酸化的MAPKs激活促进与心肌肥厚有关的下游转录因子NF- κ B、AP-1、MEF2、NFAT等的转录活性,而调节细胞基因转录和蛋白合成,引起心肌细胞肥大,导致心肌肥厚[20]。

[0004] 双特异性磷酸酶(Dual Specificity Phosphatase,DUSP)是蛋白酪氨酸磷酸酶I型亚家族中的一个重要成员,其既能对磷酸化酪氨酸去磷酸化,也能对磷酸化丝/苏氨酸去磷酸化。双特异性磷酸酶的结构域特征和催化机制与典型的酪氨酸磷酸酶相似。但是双特异性磷酸酶的催化结构比典型的酪氨酸磷酸酶的更浅更宽,这一特征被认为是其能够快速识别两种以上氨基酸残基的原因。因为双特异性磷酸酶的酪氨酸磷酸酶活性比丝/苏氨酸磷酸酶活性高40-500倍,所以将其归为一类酪氨酸磷酸酶而不单独分类。目前已经发现61种形态和结构不同的双特异性磷酸酶,一般将其分为七类:slingshots, PRLs(phosphatases of regenerating liver), Cdc14 phosphatases(Cdc is celldivision

cycle), PTENs (phosphatase and tensin homologues deleted on chromosome 10), myotubularins, MKPs (mitogen activated protein kinase phosphatases) and atypical DUSPs.

[0005] DUSP14是一种atypical DUSP(非典型双特异性磷酸酶),分子量22.26kDa,在几乎所有细胞系和组织中都有表达,细胞定位实验显示DUSP14存在于细胞质中。DUSP14首次在酵母菌中发现,实验证实DUSP14能与T细胞共同刺激因子CD28相互作用来调节IL-2的分泌,GST标记的外源性DUSP14能够导致ERK、JNK、p38MAPK去磷酸化,在T细胞内,无活性的DUSP14会使ERK和JNK的磷酸化水平升高,而p38磷酸化水平未发生改变。DUSP14可以通过调节ERK的活性影响胰岛β细胞的增殖。

[0006] 参考文献:

[0007] 1. Li H, He C, Feng J, Zhang Y, Tang Q, Bian Z, Bai X, Zhou H, Jiang H, Heximer SP, Qin M, Huang H, Liu PP, Huang C. Regulator of g protein signaling 5 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107:13818-13823.

[0008] 2. Lu J, Bian ZY, Zhang R, Zhang Y, Liu C, Yan L, Zhang SM, Jiang DS, Wei X, Zhu XH, Chen M, Wang AB, Chen Y, Yang Q, Liu PP, Li H. Interferon regulatory factor 3 is a negative regulator of pathological cardiac hypertrophy. Basic Res Cardiol. 2013;108:326.

[0009] 3. Li H, Tang QZ, Liu C, Moon M, Chen M, Yan L, Bian ZY, Zhang Y, Wang AB, Nghiem MP, Liu PP. Cellular fllice-inhibitory protein protects against cardiac remodeling induced by angiotensin ii in mice. Hypertension. 2010;56:1109-1117.

[0010] 4. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. Nat Rev Cardiol. 2011;8:30-41.

[0011] 5. Diwan A, Dorn GW, 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: Cellular mechanisms and novel therapeutic targets. Physiology (Bethesda). 2007;22:56-64.

[0012] 6. Zile MR, Gottdiener JS, Hetzel SJ, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Baicu CF, Massie BM, Carson PE. Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. Circulation. 2011;124:2491-2501.

[0013] 7. Ai D, Pang W, Li N, Xu M, Jones PD, Yang J, Zhang Y, Chiamvimonvat N, Shyy JY, Hammock BD, Zhu Y. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin ii-induced cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:564-569.

[0014] 8. Kurdi M, Booz GW. New take on the role of angiotensin ii in cardiac hypertrophy and fibrosis. Hypertension. 2011;57:1034-1038.

[0015] 9. Komati H, Maharsy W, Beauregard J, Hayek S, Nemer M. Zfp260 is an

inducer of cardiac hypertrophy and a nuclear mediator of endothelin-1 signaling. *J Biol Chem.* 2011;286:1508-1516.

[0016] 10. Ramunddal T, Lindbom M, Tang MS, Shao Y, Boren J, Omerovic E. Overexpression of apolipoprotein b attenuates pathologic cardiac remodeling and hypertrophy in response to catecholamines and after myocardial infarction in mice. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012;72:230-236.

[0017] 11. Koitabashi N, Danner T, Zaiman AL, Pinto YM, Rowell J, Mankowski J, Zhang D, Nakamura T, Takimoto E, Kass DA. Pivotal role of cardiomyocyte tgf-beta signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. *J Clin Invest.* 2011;121:2301-2312.

[0018] 12. Li HL, Wang AB, Huang Y, Liu DP, Wei C, Williams GM, Zhang CN, Liu G, Liu YQ, Hao DL, Hui RT, Lin M, Liang CC. Isorhapontigenin, a new resveratrol analog, attenuates cardiac hypertrophy via blocking signaling transduction pathways. *Free Radic Biol Med.* 2005;38:243-257.

[0019] 13. Yan L, Wei X, Tang QZ, Feng J, Zhang Y, Liu C, Bian ZY, Zhang LF, Chen M, Bai X, Wang AB, Fassett J, Chen Y, He YW, Yang Q, Liu PP, Li H. Cardiac-specific mindin overexpression attenuates cardiac hypertrophy via blocking akt/gsk3beta and tgf-beta1-smad signalling. *Cardiovasc Res.* 2011;92:85-94.

[0020] 14. Cai J, Yi FF, Bian ZY, Shen DF, Yang L, Yan L, Tang QZ, Yang XC, Li H. Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking mek-erk1/2 signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2009;13:909-925.

[0021] 15. Cai J, Yi FF, Yang L, Shen DF, Yang Q, Li A, Ghosh AK, Bian ZY, Yan L, Tang QZ, Li H, Yang XC. Targeted expression of receptor-associated late transducer inhibits maladaptive hypertrophy via blocking epidermal growth factor receptor signaling. *Hypertension.* 2009;53:539-548.

[0022] 16. Bian ZY, Huang H, Jiang H, Shen DF, Yan L, Zhu LH, Wang L, Cao F, Liu C, Tang QZ, Li H. Lim and cysteine-rich domains 1 regulates cardiac hypertrophy by targeting calcineurin/nuclear factor of activated t cells signaling. *Hypertension.* 2010;55:257-263.

[0023] 17. Xiao J, Moon M, Yan L, Nian M, Zhang Y, Liu C, Lu J, Guan H, Chen M, Jiang D, Jiang H, Liu PP, Li H. Cellular flice-inhibitory protein protects against cardiac remodelling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2012;107:239.23.

[0024] 18. Liu Q, Chen Y, Auger-Messier M, Molkenin JD. Interaction between nf-kappab and nfat coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling. *Circ Res.* 2012;110:1077-1086.

[0025] 19. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkenin JD. Calcineurin/nfat coupling participates in

pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2004;94:110-118.

[0026] 20. Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: Angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev.* 2010;90:1507-1546.

发明内容

[0027] 为解决上述现有技术的缺陷和不足,本发明的目的在于确定DUSP14的表达和心肌肥厚的相互关系,提供一种DUSP14在制备保护心脏功能、抗心脏纤维化和/或预防、缓解和/治疗心肌肥厚的药物中的新应用。

[0028] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0029] 本发明通过试验确定了DUSP14表达与心肌肥厚之间的关系:

[0030] 1、发生心肌肥厚时心肌细胞肥大标志物ANP、Myh7的表达明显上调,DUSP14的表达明显下调

[0031] 本发明分别选用正常人和扩张型心肌病患者心脏,正常假手术(Sham)小鼠和通过主动脉弓缩窄手术(AB)造成心肌肥厚的小鼠心脏,分别检测了ANP、Myh7、DUSP14的蛋白表达情况。结果表明,扩张型心肌病患者和发生心肌肥厚的小鼠心脏中的心肌细胞肥大标志物ANP、Myh7的表达明显上调,DUSP14的表达明显下调(图1、图2)。

[0032] 2、DUSP14干扰(Adsh DUSP14)及过表达(Ad DUSP14)腺病毒对经Ang II诱导的心肌细胞肥大模型的影响

[0033] 本发明发现在经血管紧张素II(Ang II)诱导的体外心肌肥厚模型中,DUSP14过表达心肌细胞的肥大明显被抑制,DUSP14不表达心肌细胞出现明显肥大(图3)。

[0034] 3、DUSP14基因敲除显著促进了心肌肥厚、纤维化,恶化心功能

[0035] 本发明选用野生型小鼠、DUSP14基因敲除小鼠进行试验,并将每种小鼠分成假手术组和手术组,每组10只小鼠。手术组给予主动脉弓缩窄手术,假手术组不予主动脉弓缩窄,然后通过对假手术组和手术组的各组小鼠进行心脏心肌肥厚、纤维化及心功能的测定,研究DUSP14基因敲除对主动脉弓缩窄诱导的心肌肥厚的影响。结果表明敲除DUSP14基因所致的DUSP14缺陷显著恶化心肌肥厚、纤维化及心功能(图4、图5、图6、图10)。

[0036] 4、DUSP14基因过表达显著抑制了心肌肥厚及其纤维化,改善心功能

[0037] 本发明选用心脏特异性DUSP14转基因小鼠和非转基因小鼠进行试验,并将每种小鼠分成假手术组和手术组,每组10只小鼠。手术组给予主动脉弓缩窄手术,假手术组不予主动脉弓缩窄,然后通过对假手术组和手术组的各组小鼠进行心脏心肌肥厚、纤维化及心功能的测定,研究DUSP14基因过表达对主动脉弓缩窄诱导的心肌肥厚的影响。结果表明过表达DUSP14基因显著抑制心肌肥厚及纤维化,保护心功能(图7、图8、图9、图11)。

[0038] 由以上结果可知在发生心肌肥厚的模型中,DUSP14的表达和正常组相比显著降低;抑制DUSP14表达显著促进了心肌肥厚、纤维化,恶化心功能,促进DUSP14过表达则显著抑制了心肌肥厚、纤维化,保护心功能。因此DUSP14具有保护心功能和抑制心肌肥厚及纤维化的作用,特别是DUSP14具有能够抑制主动脉弓缩窄引起的心肌肥厚相关疾病发生的作用。

[0039] 一种DUSP14在心肌肥厚中的功能,主要体现在DUSP14具有保护心功能和抑制心肌肥厚的作用,特别是DUSP14具有能够抑制主动脉弓缩窄引起的心肌肥厚发生的作用。

[0040] 针对DUSP14的上述功能,提供一种DUSP14的应用,主要体现为DUSP14在保护心脏、抗心脏纤维化和治疗心肌肥厚中的应用,特别是DUSP14在筛选或制备保护心脏功能、抗心脏纤维化和/或预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物中应用。所述的应用包括 DUSP14直接作为保护心脏功能、抗心脏纤维化和/或预防、缓解和/或治疗心肌肥厚药物的有效成分,能够促进DUSP14表达的化学物质间接作为保护心脏功能、抗心脏纤维化和/或预防、缓解和/或治疗心肌肥厚药物的有效成分。

[0041] 一种保护心脏功能的药物,包含DUSP14。

[0042] 一种抗心脏纤维化的药物,包含DUSP14。

[0043] 一种预防、缓解和/治疗心肌肥厚的药物,包含DUSP14。

[0044] 本发明具有如下有益效果:

[0045] 本发明发现了DUSP14基因的新功能,即DUSP14基因具有能够保护心脏功能、抗心脏纤维化和抑制心肌肥厚的作用。因此,DUSP14可作为靶基因,用于筛选保护心脏功能、抗心脏纤维化和/或预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物,用于制备保护心脏功能、抗心肌肥厚和/或预防、缓解和/或治疗心肌肥厚的药物,为心肌肥厚的治疗提供了一条有效的途径。

附图说明

[0046] 图1是正常人和扩张性心肌病患者(扩心病)心脏中ANP、Myh7、DUSP14的蛋白表达情况及统计柱状图;扩张性心肌病患者心脏DUSP14的表达下调(*:p<0.05 vs正常人组)。

[0047] 图2是小鼠在假手术(Sham)和主动脉弓缩窄手术(AB)后心脏中ANP、Myh7、DUSP14的表达情况及统计柱状图,GAPDH作为内参,其中4W表示4周,8W表示8周;发生心肌肥厚的心脏DUSP14的表达下调(*:p<0.05 vs野生型小鼠Sham组)。

[0048] 图3是SD乳鼠原代心肌细胞用腺病毒AdshRNA、AdshDUSP14、AdGFP 和AdDUSP14感染,经Ang II刺激后的免疫荧光及细胞表面面积统计柱状图,DUSP14的干扰腺病毒促进心肌细胞肥大,DUSP14的过表达腺病毒抑制心肌细胞肥大(*:p<0.05 vs PBS组,#:p<0.05 vs Ang II组)。

[0049] 图4是野生型小鼠(WT)和DUSP14基因敲除小鼠(DUSP14-KO)AB手术4周后 HW/BW、LW/BW及HW/TL的统计柱状图;其中,HW为心脏质量,BW为体重,LW为肺脏总量,TL为胫骨长度(*:p<0.05 vs野生型Sham组,#:p<0.05 vs野生型AB组)。

[0050] 图5是野生型小鼠(WT)和DUSP14基因敲除小鼠(DUSP14-KO)AB手术4周后心室横截面以及心脏组织HE染色、WGA染色和心肌细胞横截面积统计柱状图(*:p<0.05 vs野生型Sham组,# p<0.05 vs野生型AB组)。

[0051] 图6是野生型小鼠(WT)和DUSP14基因敲除小鼠(DUSP14-KO)AB手术4周后心脏组织天狼星红染色及左室胶原面积统计柱状图(*:p<0.05 vs野生型Sham组,#:p<0.05 vs野生型AB组)。

[0052] 图7是NTG和TG小鼠AB手术4周后 HW/BW、LW/BW及HW/TL的统计柱状图(*:p<0.05 vs NTG Sham组,#:p<0.05 vs NTG AB组)。

[0053] 图8是NTG和TG小鼠AB手术4周后心室横截面以及心脏组织HE染色、WGA染色和心肌细胞横截面积统计柱状图(*:p<0.05 vs NTG Sham组,#:p<0.05 vs NTG AB组)。

[0054] 图9是NTG和TG小鼠AB手术4周后心脏组织天狼星红染色及左室胶原面积统计柱状图(*:p<0.05 vs NTG Sham组,#:p<0.05 vs NTG AB组)。

[0055] 图10是野生型小鼠(WT)和DUSP14基因敲除小鼠(DUSP14-KO)AB手术4周后心功能检测结果的统计柱状图;EF为射血分数,FS为短轴缩短率,LVEDd为左室舒张末期内径,LVSDd为左室收缩末期内径(*:p<0.05 vs野生型Sham组,#:p<0.05 vs野生型AB组)。

[0056] 图11是NTG和TG小鼠AB手术4周后心功能检测结果的统计柱状图;EF为射血分数,FS为短轴缩短率,LVEDd为左室舒张末期内径,LVSDd为左室收缩末期内径(*:p<0.05 vs NTG Sham组,#:p<0.05 vs NTG AB组)。

具体实施方式

[0057] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0058] 实验用动物及饲养

[0059] 实验动物:选用8-10周龄、体重在23.5-27.5g,背景为雄性C57BL/6的野生型小鼠(命名WT)、全身DUSP14敲除小鼠(DUSP14-KO)、心脏特异性DUSP14转基因小鼠(DUSP14-TG)及非转基因小鼠(NTG,同窝对照非转基因小鼠)为实验对象。

[0060] (1)全身性DUSP14基因敲除小鼠的构建:

[0061] 利用CRISPR-Cas9技术构建全身性DUSP14基因敲除小鼠。首先,通过在线CRISPR设计工具(<http://crispr.mit.edu>)预测小鼠DUSP14的引导序列,设计2条单链oligo:

[0062] oligo1:TAGGATGACGCAGGTGATGCCGC,

[0063] oligo2:AAACGCGGCATCACCTGCGTCAT。

[0064] oligo1和oligo2退火形成双链DNA,将双链DNA连入经BsaI酶切的pUC57-sgRNA(Addgene 51132)构建sgRNA表达载体。

[0065] 以上述构建的sgRNA表达载体为模板,使用如下引物通过PCR扩增含有T7启动子及引导序列的DNA片段:

[0066] Forward primer:GATCCCTAATACGACTCACTATAG,

[0067] Reverse primer:AAAAAAGCACCGACTCGGT。

[0068] 以所扩增的PCR产物为模板使用MEGAscript Kit(Ambion,AM1354)进行体外转录;Cas9质粒(Addgene 44758)通过T7 Ultra kit(Ambion,Am1345)进行转录。将转录得到的Cas9和引导序列RNA的mRNA使用miRNeasy Micro Kit(Qiaen,217084)纯化后,通过FemtoJet 5247显微注射系统注射入野生型C57BL/6小鼠的单细胞受精卵内。选取经显微注射后存活的受精卵,将其移植到健康雌鼠输卵管中,经过21天妊娠之后得到F0代小鼠。

[0069] F1代及F2代小鼠通过PCR鉴定,野生型小鼠包含一段长347bp的DNA序列,而突变小鼠(DUSP14基因敲除小鼠)含有291bp的DNA序列。最终蛋白产物通过western blot进行检测鉴定。其中,PCR鉴定引物如下:

[0070] Primers-F:5'-GGAGAGCTGCAAAACATAATGC-3',

[0071] Primers-R:5'-CAGCTGTCAAAGCCACATA-3'。

[0072] 实验所用小鼠为突变体纯合子。

[0073] (2) 心脏特异性DUSP14转基因小鼠的构建:

[0074] 以野生型C57BL/6小鼠DUSP14基因cDNA为模板,用如下引物PCR扩增小鼠DUSP14全长基因(NCBI,DUSP14 mus NM_011909.2):

[0075] 上游引物: TGCTCTAGAGCCACCATGAGCTCCAGAGGTCACAG,

[0076] 下游引物: TGCTCTAGACTAAATCCCCCAATAAGGCA。

[0077] 扩增的DUSP14全长基因及pCAG-loxP-CAT-loxP质粒(pCAG-loxP-CAT-loxP质粒由北京协和医学院基础学院杨青林老师提供,制备过程参见文献:Kim T, Zhelyabovska O, Liu J, et al. Generation of an Inducible, Cardiomyocyte-Specific Transgenic Mouse Model with PPAR α Overexpression[J]. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs), 57.)经XbaI(NEB,# R0145L)酶切后连接,形成pCAG-loxP-CAT-loxP-DUSP14-hGHpA载体(CAG(chicken beta-actin)-CAT(chloramphenicol acetyltransferase)-DUSP14-hGHpA),将构建的质粒通过显微注射系统注射入野生型C57BL/6小鼠的单细胞受精卵内,该受精卵移植入健康雌鼠中,发育得到F0代小鼠,将得到的F0代小鼠与 α -MHC-Cre小鼠杂交,并通过他莫昔芬诱导(他莫昔芬80mg/kg/D,腹腔注射,连续刺激5天)得到心脏特异性DUSP14转基因老鼠(上述的转基因小鼠参照下述文献制备: Jiang DS, Bian ZY, Zhang Y, Zhang SM, Liu Y, Zhang R et al. Role of interferon regulatory factor 4 in the regulation of pathological cardiac hypertrophy. Hypertension 2013; 61:1193-1202.)。

[0078] 饲养环境:所有实验小鼠均饲养在SPF级实验动物中心,SPF级大小鼠饲料购自北京华阜康生物科技有限公司。饲养条件:室温在22-24℃之间,湿度在40-70%之间,明暗交替照明时间为12h,自由饮水摄食。

[0079] 实施例1 DUSP14在正常人和心肌病患者心脏中的表达

[0080] 选用正常人心脏(非心脏原因的死亡捐献的个体)、扩张型心肌病患者心脏(做心脏移植手术病人置换的受体,DCM),对心脏提取蛋白质进行SDS-PAGE-免疫印迹试验(Western blot),结合特异性识DUSP14蛋白和心肌细胞肥大标志物ANP(Millipore, AB2232)、Myh7(santa cruz,sc53090)的抗体进行检测,测定其DUSP14(Abnova,PAB4143)的表达,GAPDH(Cell Signaling Technology,2128)作为内参。检测结果如图1所示,扩张型心肌病患者心脏中的心肌细胞肥大标志物ANP、Myh7的表达明显上调,DUSP14的表达明显下调(图1)。

[0081] 实施例2 DUSP14在野生型小鼠假手术组和心肌肥厚模型组心脏中的表达

[0082] 1. 采用主动脉弓缩窄手术(AB)建立小鼠心肌肥厚模型,模型操作流程:

[0083] 1.1 术前准备

[0084] (1) 麻醉:先给小鼠称重,按照90mg/kg体重计算所需麻药(3%戊巴比妥钠)量,通过腹腔注射,并记录注射时间点。夹尾、夹趾无明显反应且小鼠状态良好为麻醉成功标准(一般注射后约10min无明显反应,以麻醉后约50min小鼠夹趾有反应,麻醉后30min左右为最佳手术时间)。

[0085] (2) 术区准备:将小鼠左胸部、左侧胸部及左前肢腋下的皮肤去毛。剃毛后用湿纱布擦拭术区去除鼠毛,以不影响手术视野为宜。

[0086] (3)气管插管:用橡皮筋将小鼠上门齿固定于V形板斜面上,并迅速将气管插管经声门准确插入气管内,随后右侧卧位置于加热垫上(加热垫需提前预热),然后将气管插管与呼吸机连接,固定小鼠。若小鼠的胸廓起伏与呼吸机频率一致,说明气管插管成功。

[0087] 1.2 主动脉弓缩窄术(AB)

[0088] AB术心肌肥厚模型组:取右侧卧位,小鼠左前肢置于右前肢上方,并用医用胶带将两前肢固定。右胸部下方垫入棉签,抬高胸廓,依次用碘酒及体积分数为75%酒精对手术区域皮肤消毒。左手持眼科镊将左胸部皮肤捏起,右手持眼科剪剪开皮肤约1cm,依次分离肌肉及软组织,于第2-3肋水平打开胸腔,用棉签稍拨开左肺,游离主动脉弓降支,将7-0手术缝线穿过血管,并在血管上方平行放置一段26G(25.0-27.5g小鼠)或者27G(23.5-25.0g)注射器针头,将血管及针头一起结扎好,再抽出针头即可达到相应程度的血管缩窄。结扎完毕后依次缝合,关闭胸腔,用注射器从缝口处插入胸腔并抽出1cc气体以恢复胸腔内负压,拔出注射器后迅速缝合皮肤切口。

[0089] 假手术组(Sham)在游离出主动脉降支后只穿线不结扎,其余步骤同AB术心肌肥厚模型组。

[0090] 1.3 术后护理

[0091] 手术中主动脉弓降支结扎后,待小鼠出现自主呼吸、夹趾出现强烈反应,拔出气管插管,并将小鼠放入装有高压灭菌过的垫料、饲料和饮用水的饲养笼内,于饲养室继续饲养观察。

[0092] 2. 取材

[0093] 打开分析天平,调零备用。再称重处死小鼠。眼科弯镊夹住心耳下方的血管蒂,剪下心脏,迅速置于灭菌纱布上,轻轻挤压心腔内液体,蘸干表面液体后,称重并记录,将心脏放入相应的冻存管中,迅速置于液氮罐中,于-80℃冰箱保存后用于分子生物学检测。

[0094] 3. DUSP14在Sham组小鼠和心肌肥厚模型组小鼠心脏中的表达

[0095] 分别选野生型小鼠Sham组和心肌肥厚模型组AB手术后4周及8周的心脏,对心脏提取蛋白质进行SDS-PAGE-免疫印迹试验(Western blot),结合特异性识别DUSP14蛋白及心肌细胞肥大标志物ANP、Myh7的抗体进行检测,测定其DUSP14的表达,GAPDH作为内参,检测结果如图2所示。心肌细胞肥大标志物在AB术后ANP、Myh7的表达明显上调,DUSP14的表达在AB术后明显下调。表明发生心肌肥厚的心脏DUSP14的表达下调。

[0096] 实施例3 DUSP14干扰(Adsh DUSP14)及过表达(Ad DUSP14)腺病毒对Ang II刺激的原代心肌细胞肥大的影响

[0097] 1. 原代新生SD大鼠心肌细胞培养

[0098] (1)新生1天Sprague-Dawley乳鼠8只,颈部以下75%酒精消毒,用眼科剪和显微镊取下心脏,放入盛有10mL DMEM/F12液的玻璃平皿中。再取另一只,重复以上过程。

[0099] (2)用DMEM/F12培养基清洗心脏,并将心脏剪成1-2mm³的碎片。转入到放有转子的血清瓶中,吸去DMEM/F12,加入胰酶消化液。转速为120r/min,消化15min,静止数秒钟,弃去上清液。

[0100] (3)加入胰酶消化液,转速为120r/min,消化15min。静止数秒钟,吸取上清液,用20%小牛血清的DMEM/F12培养基终止消化,并置于4℃冰箱保存。重复该步骤,循环若干次。取上清时应尽量取尽,当组织块变白并明显变小时,终止消化。

[0101] (4)将收集好的心肌细胞悬液,以1500rpm转速离心8min,弃去上清液。在离心管中加入适量培养基,轻柔吹打重悬细胞,集中至1个50mL离心管中,细胞悬液用细胞40 μ m过滤网过滤。

[0102] (5)将细胞接种在100mm的培养皿中,差时贴壁90min,吸取未贴壁的细胞悬液过滤。根据细胞悬液的总量加入BrdU(终浓度0.1mM),混匀之后,加入到用0.1%明胶包被的器皿中。

[0103] (6)轻摇分散细胞,勿漩涡摇晃。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵育48小时用PBS清洗1次,更换培养基。

[0104] 2. DUSP14干扰(Adsh DUSP14)及过表达(Ad DUSP14)腺病毒对经Ang II诱导的心肌细胞肥大模型的影响

[0105] AdshRNA(含shRNA(沉默RNA)的腺病毒,用作对照)、Adsh DUSP14(含shRNA-DUSP14(沉默RNA-DUSP14融合蛋白)的腺病毒)、AdGFP(含GFP(绿色荧光蛋白)的腺病毒,用作对照)及Ad DUSP14(含GFP-DUSP14(绿色荧光蛋白-DUSP14融合蛋白)的腺病毒)(这些腺病毒的构建过程参见文献:Chen K, Gao L, Liu Y, et al. Vinexin- β protects against cardiac hypertrophy by blocking the Akt-dependent signalling pathway[J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(2): 1-14.)腺病毒10 MOIs分别感染培养3天的原代心肌细胞,12小时后用1 μ M血管紧张素II(Ang II)(购自Sigma公司,A9525)或对照PBS刺激48小时,然后进行免疫荧光试验。结果表明Adsh DUSP14腺病毒感染后的心肌细胞表面面积较AdshRNA对照组增加,而经AdDUSP14腺病毒感染的心肌细胞表面面积则比对照组AdGFP明显减少(图3),即DUSP14的干扰腺病毒促进心肌细胞肥大,DUSP14的过表达腺病毒抑制心肌细胞肥大。

[0106] 实施例4 心肌肥厚模型小鼠心肌肥厚及纤维化检测和心功能检测

[0107] 1. 采用主动脉弓缩窄手术(AB)建立小鼠心肌肥厚模型

[0108] 选用8-10周龄、体重在23.5-27.5g的野生型小鼠(WT)、DUSP14基因敲除小鼠(DUSP14-KO)、心脏特异性DUSP14转基因小鼠(DUSP14-TG)及非转基因小鼠(NTG)各分成假手术组(Sham)和AB术心肌肥厚模型组,即WT Sham组、WT AB组,DUSP14-KO Sham组、DUSP14-KO AB组,DUSP14-TG Sham组、DUSP14-TG AB组,NTG Sham组、NTG AB组,每组10只小鼠。造模方法同实施例2。AB术后4周分别进行心肌肥厚及纤维化的检测和心功能的检测。

[0109] 2. 取材

[0110] (1)前期工作:预先准备装有20mL的体积分数10%甲醛的尿杯,并贴好标签(小鼠编号、组别、手术类型及取材日期)。将倒满质量分数10% KCl溶液的培养皿置于取材处。打开分析天平,调零备用。再称重处死小鼠。

[0111] (2)取材:眼科弯镊夹住心耳下方的血管蒂,剪下心脏,迅速置于质量分数10% KCl溶液中。待心脏停跳在舒张期后,置于灭菌纱布上,轻轻挤压心腔内液体,蘸干表面液体后,称重并记录,将心脏放入相应的尿杯中,固定48h后用于病理学检测。

[0112] (3)相关测量及计算:取出小鼠肺脏,修剪后滤纸吸干,称重并记录。剪开小鼠后肢胫骨处皮肤,测量并记录胫骨长度。计算心重与体重的比值(HW/BW),肺重与体重的比值(LW/BW)以及心重与胫骨长度的比值(HW/TL)。

[0113] 3. 病理学检测

[0114] 3.1 制备石蜡标本切片

[0115] 主要操作程序包括修剪心脏→包埋框处理→流水冲洗→脱水→透明→浸蜡→包埋→切片→摊片→晾干或烘烤后备用。

[0116] 3.2 苏木精-伊红(HE)染色

[0117] 主要步骤为:取石蜡标本切片55℃烘烤30min→二甲苯5min,3次→100%酒精1min→95%酒精1min→70%酒精1min→双蒸水1min→苏木素溶液(珠海贝索,BA-4021)5min→水洗1min→1%盐酸酒精(取3mL浓盐酸与297mL 70%酒精充分混合均匀)1-3s→水洗1min→Scott液(碳酸氢钠0.35g,七水硫酸镁2g,两者溶于100mL蒸馏水)1min→水洗1min→伊红溶液(珠海贝索,BA-4024)3-5min→蒸馏水洗去浮色→70%酒精1s→95%酒精1s→100%酒精30s,3次→二甲苯2min,3次→趁二甲苯未干立即封片→通风橱内吹干,显微镜拍照。

[0118] HE染色图片统计:每张图片选择3个以上边界清楚,核大致位于中央的细胞,用Image-Pro Plus 6.0软件圈细胞面积。

[0119] 3.3 麦胚凝聚素(WGA)染色

[0120] 主要步骤:将经60℃烘烤30min的石蜡标本切片置于二甲苯 5min×3次→100%乙醇 5min×2次→95%乙醇5min→70%乙醇5min→蒸馏水漂洗5min×2次→PBS漂洗5min→PBS漂洗10min→弃去 PBS,滴加胰酶工作液(DIG-3008,福州迈新)37℃避光孵育20min→PBS漂洗5min×3次→取出切片,用滤纸擦干组织周围的液体(组织切勿干燥),用组化笔划圈平放于湿盒中→滴加 WGA-Alexa Flour 488工作液(10μg/mL)37℃避光孵育2h→弃去染液,PBS漂洗5min×3次→SlowFade Gold antifade reagent with DAPI 封片→荧光镜下观察,显微镜拍照。

[0121] 3.4 天狼星红(PSR)染色

[0122] 主要步骤为:取石蜡标本切片55℃烘烤30min→二甲苯2min,3次→100%酒精1min→95%酒精1min→70%酒精1min→流水冲洗10min→双蒸水1min→质量分数0.2%磷钼酸2min→0.1%天狼星红苦味酸溶液滴于组织上,湿盒中染色90min→去除残液→0.01N盐酸4s→70%酒精1次→90%酒精1次→100%酒精30s,3次→二甲苯2min,3次→趁二甲苯未干立即盖玻片封片,显微镜拍照。

[0123] PSR染色图片统计(Image-Pro Plus 6.0软件):胶原比例=胶原面积/(总面积-空白面积)×100%。

[0124] 心肌组织由心肌细胞和间质组织组成,心脏是一终末分化器官,心肌细胞失去增殖能力,各种生理或病理性刺激引起的心肌细胞反应,只能是单个细胞的体积增大而不能在数量上增殖。因此,在心肌肥厚的病理生理过程中,主要表现为心肌细胞体积增大,肌节数量增多,细胞排列紊乱,心脏间质改变包括心肌成纤维细胞的增殖与转化,胶原纤维密度增加,胶原分泌增加,胶原比例平衡失调等。

[0125] WT及DUSP14-KO小鼠采用AB术建立心肌肥厚模型后的表型结果见图4-6。Sham(假手术)组中WT及DUSP14-KO小鼠的HW/BW、LW/BW及HW/TL之间的差异均无统计学意义;WT小鼠AB术后4周的HW/BW、LW/BW、HW/TL高于其Sham组;AB术后4周,DUSP14-KO小鼠的HW/BW、LW/BW及HW/TL均较WT小鼠上升(图4)。HE染色及WGA染色切片可观察到:Sham组心脏无明显差异,AB组较Sham组的心脏均增大,DUSP14-KO小鼠的心脏明显大于WT组小鼠;Sham组心肌肌原纤维细胞排列整齐、致密,形态完整,胞核及核仁结构清晰;AB组肌丝排列紊乱、松散,心肌细

胞体积明显增大,形态不规整,胞核深染、增大、畸形,核仁模糊,DUSP14-KO组则比WT组细胞肥大明显,差异有统计学意义(图5)。PSR染色后,发现AB组心室心肌间质胶原含量较Sham组增加,动脉血管周围胶原增加更为明显,胶原增粗,排列紊乱成网络状;DUSP14-KO小鼠AB术后心肌间质胶原含量及血管周围胶原含量则比WT小鼠AB术后增加较多(图6)。以上结果说明经AB术建模后,小鼠发生明显的心肌肥厚及纤维化,DUSP14-KO小鼠的心肌肥厚及纤维化程度大于WT小鼠。

[0126] 图7-9是NTG和DUSP14-TG小鼠采用AB术建立心肌肥厚模型后的表型结果。AB术后4周TG小鼠的HW/BW、LW/BW及HW/TL增大的程度明显小于NTG小鼠(图7)。HE染色及WGA染色切片可观察到:AB组较Sham组的心脏均增大,且AB术后TG小鼠心脏增大的程度远小于NTG小鼠;TG小鼠AB术后心肌细胞横截面积显著小于NTG小鼠AB组(图8)。PSR染色可见,TG小鼠AB术后心肌间质胶原含量及血管周围胶原含量小于NTG小鼠AB组(图9)。以上结果说明经AB术建模后,DUSP14-TG小鼠的心肌肥厚及纤维化程度小于NTG小鼠。

[0127] 4. 超声检测心功能

[0128] 4.1 前期准备

[0129] (1)麻醉机准备:先连接氧气瓶和麻醉机上的进气接口,再拧开麻醉机上加药口密封盖,迅速加入异氟烷至安全刻度后拧紧密封盖。拧开氧气瓶上总阀门,调整流量控制阀的旋钮,出气压力维持在0.2-0.3mPa。

[0130] (2)待测小鼠准备:待检测小鼠用异氟烷迅速麻醉后,左胸前区剃毛,将处理好的小鼠头部伸入麻醉剂导管套头内,以1.5-2.0%异氟烷维持小鼠稳定的麻醉状态。

[0131] 4.2 心功能检测

[0132] 小鼠取左侧卧位或仰卧位,并在剃毛区均匀涂抹超声耦合剂(天津成信公司)。采用高频超声诊断仪,频率为15MHz,选取标准左心室乳头肌短轴切面,测量左室舒张末期径(LVEDd)、左室收缩末期径(LVESd)、射血分数(EF)及短轴缩短率(FS)。

[0133] 图10是WT和DUSP14-KO小鼠采用AB术建立心肌肥厚模型后的心功能检测结果。与WT Sham组相比,WT小鼠AB术后4周表现出心功能减弱和心肌肥厚,主要表现为心肌肥厚的指标LVEDd、LVESd增加,而反映心功能的指标EF、FS则下降。AB术后4周,DUSP14-KO小鼠心肌肥厚的指标增大的程度及反映心功能的指标下降的程度大于WT小鼠。

[0134] 图11是NTG和DUSP14-TG小鼠采用AB术建立心肌肥厚模型后的超声检测结果。结果表明,AB术后4周,与NTG小鼠相比,TG小鼠心肌肥厚的指标增大的程度及反映心功能的指标下降的程度则小于NTG组。

[0135] 由以上结果可知,在主动脉弓缩窄引起的心肌肥厚疾病模型中,DUSP14基因缺陷显著促进了心肌肥厚、纤维化,恶化心功能,DUSP14基因过表达显著抑制了心肌肥厚、纤维化,保护心功能。因此DUSP14基因具有保护心功能和抑制心肌肥厚及纤维化的作用,特别是DUSP14基因具有能够抑制主动脉弓缩窄引起的心肌肥厚相关疾病发生的作用。

[0136] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110>	武汉大学	
<120>	双特异性磷酸酶 14 (DUSP14) 在治疗心肌肥厚中的功能及应用	
<130>	1	
<160>	8	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	oligo1	
<400>	1	
	taggatgacg caggtgatgc cgc	23
[0001]		
<210>	2	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	oligo2	
<400>	2	
	aaacgcggea tcacctgagt cat	23
<210>	3	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Forward primer	
<400>	3	

	gatccctaat acgactcact atag	24
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Reverse primer	
	<400> 4	
	aaaaaaagca ccgactcggg	20
	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Primers-F	
[0002]	<400> 5	
	ggagagctgc aaaacataat gc	22
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Primers-R	
	<400> 6	
	cagctgtcaa agcccacata	20
	<210> 7	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	

	<223> 上游引物	
	<400> 7	
	tgctctagag ccacatgag ctccagaggt cacag	35
[0003]	<210> 8	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> 下游引物	
	<400> 8	
	tgctctagac taaatcccc aataaggca	29

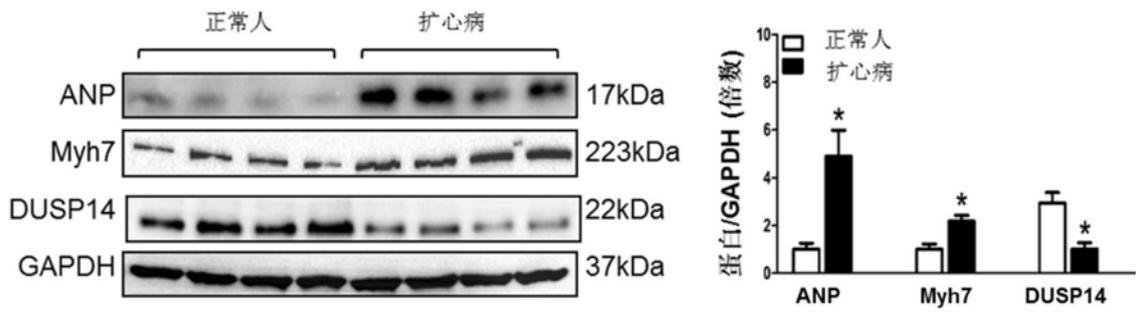


图1

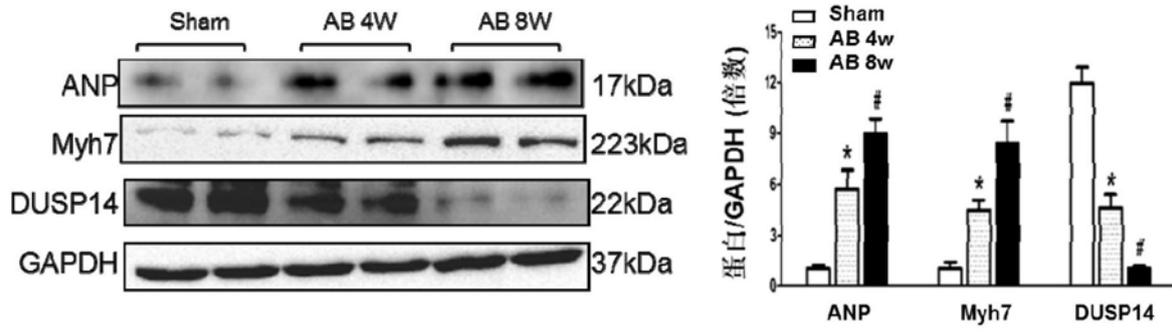


图2

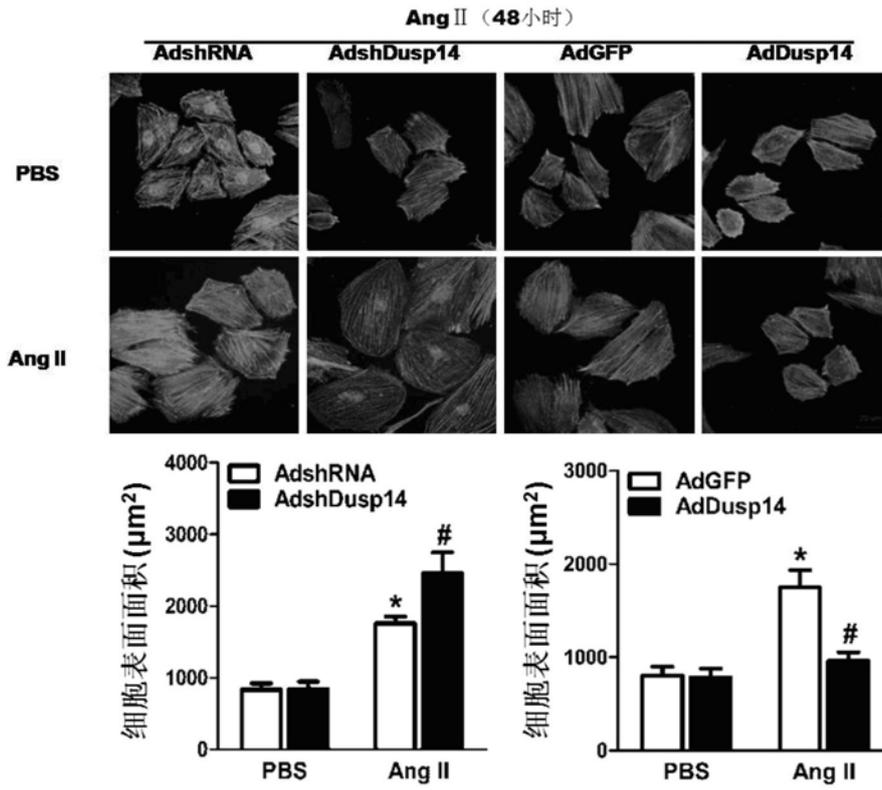


图3

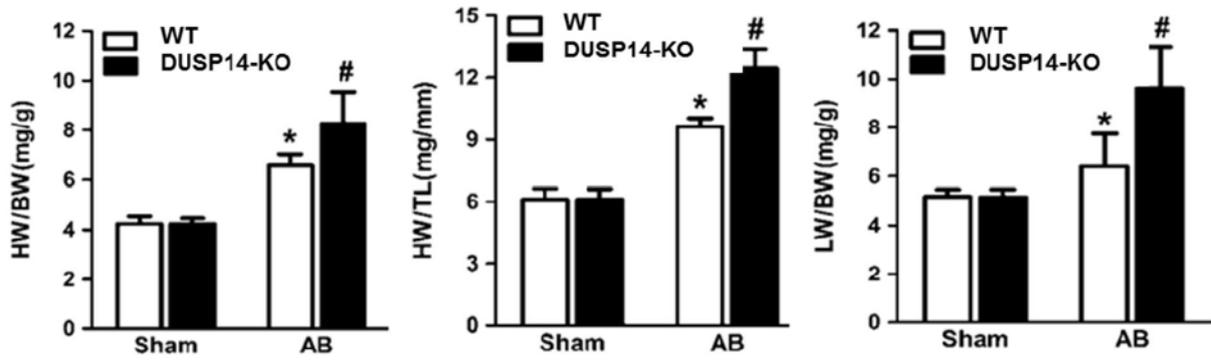


图4

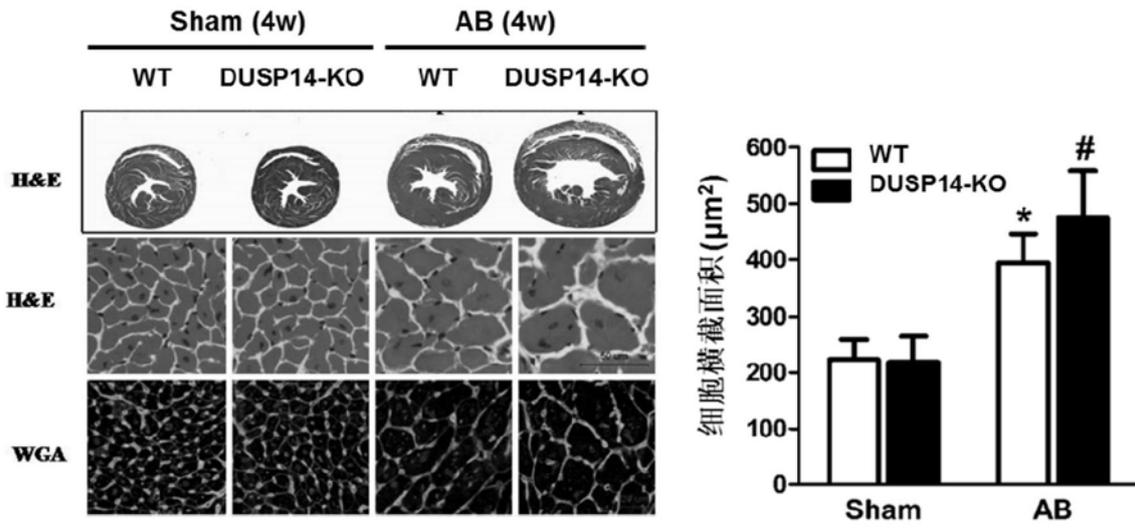


图5

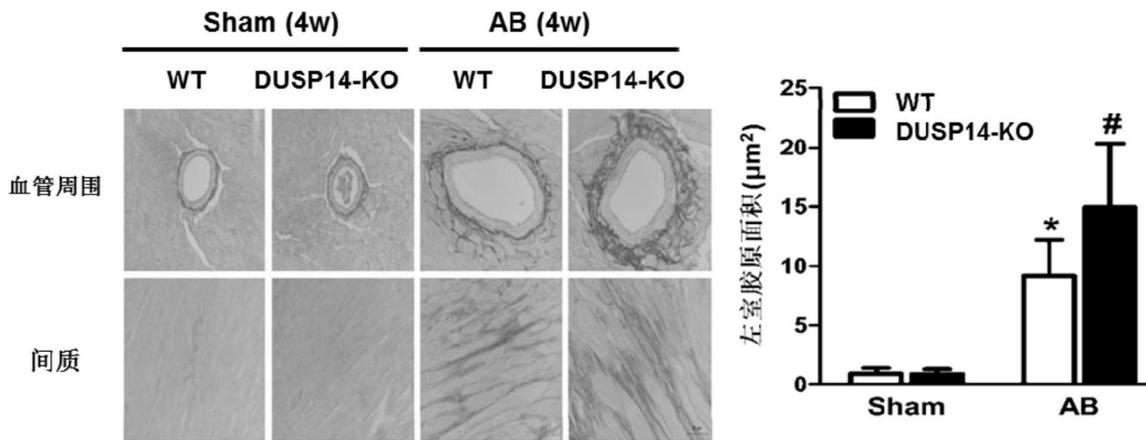


图6

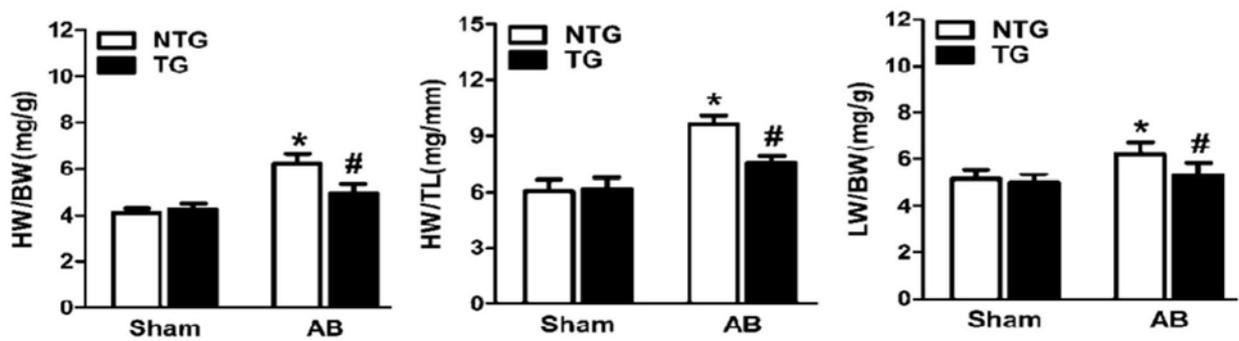


图7

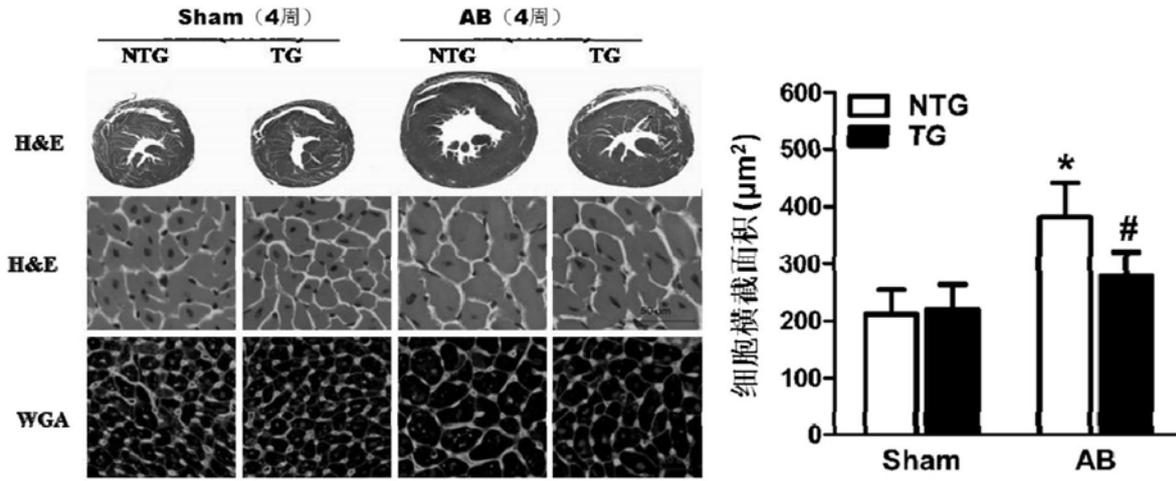


图8

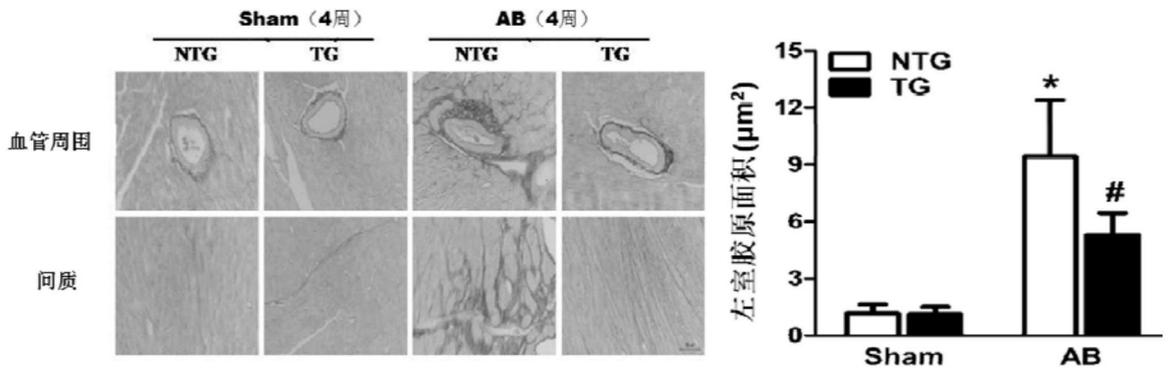


图9

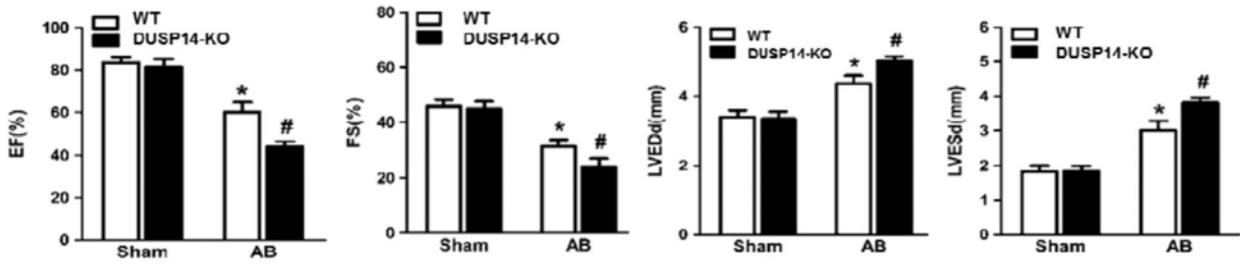


图10

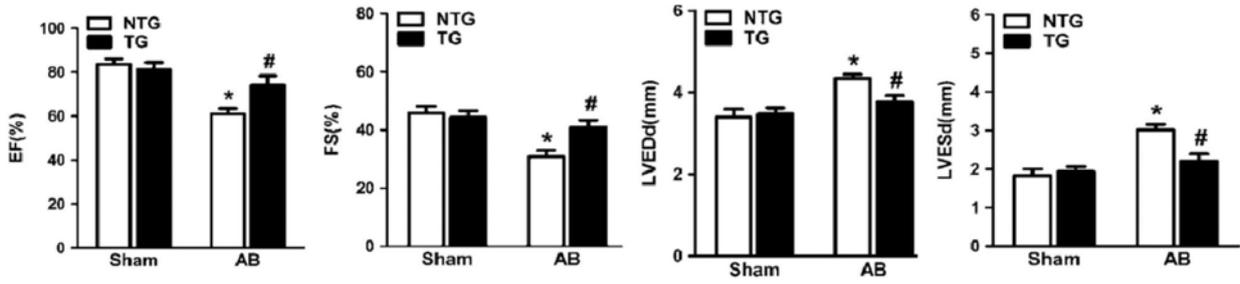


图11