

抑制癌细胞活性的小 RNA 药物

本申请要求申请日为 2022 年 01 月 28 日的中国专利申请 CN202210106273.9 的优先权，本申请引用上述中国专利申请的全文。

5

技术领域

本发明涉及核酸治疗领域，更具体涉及能够治疗和/或预防癌症的小 RNA、包含其的组合物以及其用途。

10

背景技术

癌症是一大类疾病，肿瘤和恶性肿瘤是癌症的其他常见名称，以持续增殖、逃避生长抑制、逃避免疫清除、无限复制、促炎症、激活浸润和转移、促血管生成、基因组的不稳定和突变、抵抗细胞死亡、细胞能量代谢的失控、解锁表型可塑性、衰老细胞、非突变表观遗传重编程、多态微生物组为主要特征。癌症是全球第二大死亡原因，全球癌症负担持续增加，给个人、家庭、社区和卫生系统带来巨大的身体、情感和经济压力。

15

原发性支气管肺癌，简称肺癌，是最常见的恶性肿瘤之一，每年估计有 180 万新病例，而在诊断后的五年内有 85% 以上的病例预后较差。2019 年 1 月，中国癌症中心发布了最新一期的《中国恶性肿瘤流行情况分析报告》，显示：肺癌是我国最主要的恶性肿瘤，新发病例 78.4 万，发生率和病死率分别占全部恶性肿瘤发病和死亡的 20.03%、26.99%，皆占据全部癌症的首位，而男性患肺癌的发生率和死亡率显著高于女性。肺癌按组织病理学分为非小细胞肺癌（Non-small cell lung cancer, NSCLC）和小细胞肺癌（Small cell lung cancer, SCLC）。肺癌发病患者中有大约 80% 为 NSCLC，起源于肺上皮细胞。NSCLC 进一步细分为腺癌、鳞癌、大细胞癌，其中最主要的腺癌约占 NSCLC 的 40%，并且发病率还在一直上升，是女性和非吸烟者中最常见的癌症类型，而鳞癌（Squamous carcinoma, SCC）约占 NSCLC 发病的 25%，大细胞癌约占 15%。SCLC 约占肺癌的 15%，起源于支气管的神经内分泌细胞，恶性程度高。在临床中，鳞状细胞癌在吸烟的老年患者中较为常见；而混合组织肿瘤和大细胞癌发病病例较为罕见。由于肺癌的早期症状不明显，易错过最佳治疗时期，近半数以上患者在确诊时已发生脑、肾上腺、骨骼和肝脏部位的转移或不易完全切除而导致五年生存率约在 15% 左右。肺癌的发病危险因素较多，其中吸烟是最主要的因素之一，WHO 申明使用烟草是肺癌死亡的主要危险因素之一，而另一方面仍然有 15% 的 NSCLC 患者是未吸烟患者。NSCLC 患者的症状大致分为原发病灶相关针状、胸内症状、肺外症状、浸润和转移症状等，其中约有 50% 至 75% 的患者最常见的症状为咳嗽，其次是咯血、胸痛和呼吸困难。目前临床仍然组织学检查对患者肿瘤类型和阶段进行分类，并以此

25

30

35

于选择治疗方法。

肺癌在临床指南中常见处理方法是进行手术、放疗和化疗。按照肺癌 TNM 分期标准, I、II 期 NSCLC 患者和部分 III 期 NSCLC 患者满足手术切除的限制条件。对于部分处于 III A 及 III B 阶段的 NSCLC 患者, 不建议进行手术切除。目前的 I 期患病推荐治疗手段为同步放化疗比如以铂类为主的序贯放化疗以及紫杉醇、铂类、吉西他滨等多药组合。对于处于 NSCLC 患者, 会根据测序技术检测到的驱动基因的突变情况进行药物的选择, 其中大部分是单克隆抗体。随着分子生物学和组织学技术的发展, 出现了针对 NSCLC 的靶向治疗, 使得治疗方案更加个体化、精确化。肺癌的治疗已经进入精准分层治疗的时代。靶向治疗是分层诊疗最典型最有价值的体现。美国国家综合癌症网络(National comprehensive cancer network, NCCN) 最新发布的 2019 年第 3 版 NSCLC 指南中指出, 与靶向治疗相关的突变驱动基因有:表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)、间变性淋巴瘤激酶(Anaplastic lymphoma kinase, ALK)、c-ros 原癌基因 1 酪氨酸激酶(C-ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase, ROS1)、人类表皮生长因子受体 2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、间充质上皮转化因子(Mesenchymal to epithelial transition factor, MET)、v-raf 鼠类肉瘤病毒癌基因同源体 B1(V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, BRAF)、鼠类肉瘤病毒癌基因(Kirsten rat sarcoma, KRAS)、转染重排基因(Rearranged during transfection, RET)及神经营养酪氨酸受体激酶(Neurotrophic tyrosine receptor kinase, NTRK)。

胰腺癌是一类非常致命的恶性肿瘤, 根据 WHO 分类, 胰腺恶性肿瘤按照组织起源可分为上皮来源和非上皮来源, 其中上皮来源者主要包括来自导管上皮、腺泡细胞和神经内分泌细胞的导管腺癌、腺泡细胞癌、神经内分泌肿瘤及各种混合性肿瘤等。CA 发布的最新的流行病学调查显示, 胰腺导管腺癌 2020 年全球新发 495, 773 例, 新增死亡 466, 003 例, 死亡比例列第 7 位, 新发人数和死亡人数相差无几。可见胰腺癌的病死率极高, 恶性程度极大, 被称为癌症之王, 而在胰腺癌患者当中, 大约 90%的分型都是胰腺导管腺癌。而且随着肥胖率、糖尿病患病率和酒精消费的增加, 还在呈现稳步上升趋势。一项对 28 个欧洲国家的研究预测, 到 2025 年, 胰腺癌将超过乳腺癌, 成为癌症死亡的第三大原因。胰腺导管腺癌(Pancreatic Ductal Adenocarcinoma,PDA)是胰腺癌中最常见(90%以上)的恶性肿瘤,5 年生存率低,约为 7.7%,中位生存期不足 6 个月,一旦发生远处转移,5 年生存期将低于 3%。2018 年,共造成全球 458,898 例癌症发病和 432,242 例死亡,分别排名癌症发病和死亡的第 14 位和第 7 位,而且呈上升趋势.PDA 的特点是关键癌基因突变(K-Ras,超过 90%)、抑癌基因修饰(TP53,超过 75%)、CDKN2 失活(超过 95%)和 Smad4 低表达或表达缺失等的连续累积,另一个特点是具有独特的肿瘤微环境,包括多种不同的成分,包括血管网、细胞外基质以及多种细胞类型包括免疫细胞、成纤维细胞等,细胞外成分包括生长因子、细胞因子等。

中药来源 sRNA 是近年来在中药水煎液中提取发现的一种中药新的有效成分，是对中药发挥疗效的一种新的阐释，是一种能靶向调控基因表达的精准医疗药物。发明人在中药来源 sRNA 有良好的研究基础。随着各种靶点的逐年不断被发现,各种靶向药物的不断研发，肺癌、胰腺癌的药物治疗正由传统的化疗疗法真正进入了精准治疗时代。虽然肺癌、胰腺癌长期以来都是一种确诊较晚的疾病，但如果能够在治疗方案上有所突破，快速有效改善患者的症状，成为科研工作者、药企和患者共同期盼的治疗选择。

发明内容

本发明人意想不到地发现了能够抑制癌症的小 RNA，因而，提出了本申请。

本申请部分基于发明人对小 RNA 的发现。发明人发现了本申请中的小 RNA 可以抑制肺癌细胞的细胞活性。发明人发现了本申请中的小 RNA 可以抑制胰腺癌细胞的细胞活性。

本发明人从中药中筛选具有抑制肺癌或胰腺癌细胞活性功能的小 RNA。肺癌细胞模型：H460 细胞、A549 细胞和 H23 细胞；胰腺癌细胞模型：PANC-1 细胞、ASPC-1 细胞、HS 766T 细胞、BXPC-3 细胞；多谱细胞模型：PC-3（前列腺癌）、MCF-7(乳腺癌)、MDA-MB-231(乳腺癌)、MKN45（胃癌）、HCT116(结肠癌)、AGS（胃腺癌）、ASPC1(胰腺癌)、HS766T(胰腺癌)、BXPC-3（胰腺癌）、A549(肺癌)。所有细胞购于中国医学科学院细胞中心。

具体地，本发明提供了以下具有抑制肺癌细胞活性的小 RNA，其具体序列如下表 1 所示：

表 1

名称	序列	SEQ ID NO:
LQi-sRNA-3	UAGUGGUAUGAUUCUCGC	1
PGY-sRNA-6	GUUCAGAGUUCUACAGUCCGA	2
CHu-sRNA-48	UGCUGUAGUAGGUUGUAUAG	3
YXC-sRNA-39	UGCUGUAGUAGUUUGUGCUGU	4
YXC-sRNA-62	UCUUCCCAGUGCUCUGAAUGU	5
HQi-sRNA-2	AUGGUUCGAUUCCGGAGAGGG	6
YXC-sRNA-49	AGGGUUCGAGUGUGAGCAUGC	7
BZL-sRNA-15	GGGGGCGUAGCUCAGAUGGU	8
BZL-sRNA-25	UGGAAACGGCUGCUAAUACC	9
BZL-sRNA-32	AGCUGGAAACGGCUGCUAAUACC	10
BZL-sRNA-34	GAGCCCCGUCGUGCCCGGACC	11

CHu-sRNA-1	ACAACUUUCAGCAACGGA	12
BHSC-sRNA-15	UACCUGGUUGAUUCUGCCA	13
BHSC-sRNA-17	UGUGGGCACUCAAGUGAC	14
BHSC-sRNA-18	UGUGGGCACUCAAGUGA	15
BHSC-sRNA-22	UGUGGGUGCUUGUGAGUACGGACU	16
BHSC-sRNA-24	UACCUGGUUGAUCCUGCCA	17
BHSC-sRNA-42	UAUCUGGUUGAUUCUGCC	18
MDM-sRNA-1	UCCGUUGUCGUCCAGCGGUUAGGAUAUCUGG	19
MDM-sRNA-4	GCGUCUGUAGUCCAACGGUUAGGAUAAUUGC	20
MDM-sRNA-7	GCGUCUGUAGUCCAACGGUUAGGAUA	21
MDM-sRNA-11	AGGGCACGUCUGCCUGGGUGUCACGU	22
MDM-sRNA-12	CUGGGAAGUCCUCGUGUUGCACCCUC	23
MDM-sRNA-22	AUUCGGUCGGGAACUCAAGGAGACUGCC	24
MDM-sRNA-27	UCCAUUGUCGUCUAGUCCGGUUUAGGAUA	25
MDM-sRNA-28	GGGGAUGUAGCUCAGAUGG	26
MDM-sRNA-33	GAAACGACUCUCGGCAACGGUAUUC	27
MDM-sRNA-38	CUUGAGUUCGACUCUCAACGAGAGCACCA	28
MDM-sRNA-39	GGGAUUGUAGUUCAAUUGGUCAGAGCACC	29
MDM-sRNA-41	UGAAACGACUCUCGGCAACGGUAUUC	30
MDM-sRNA-163	UGACUCUAGUCCGACUUUGUGAAAUGACU	31

另一方面，本发明提供了具有多谱抗癌功能的小 RNA，其能够用于抑制前列腺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌和肺癌。本发明采用的癌症细胞系为：PC-3（前列腺癌）、MCF-7(乳腺癌)、MDA-MB-231(乳腺癌)、MKN45(胃癌)、HCT116(结肠癌)、AGS（胃腺癌）、ASPC1(胰腺癌)、HS766T(胰腺癌)、A549(肺癌)。所述小 RNA 的具体序列如下表 2 所示：

表 2

名称	序列	SEQ ID NO:
MDM-sRNA-1	UCCGUUGUCGUCCAGCGGUUAGGAUAUCUGG	19
MDM-sRNA-4	GCGUCUGUAGUCCAACGGUUAGGAUAAUUGC	20
MDM-sRNA-7	GCGUCUGUAGUCCAACGGUUAGGAUA	21
MDM-sRNA-11	AGGGCACGUCUGCCUGGGUGUCACGU	22
MDM-sRNA-12	CUGGGAAGUCCUCGUGUUGCACCCUC	23
MDM-sRNA-22	AUUCGGUCGGGAACUCAAGGAGACUGCC	24

MDM-sRNA-27	UCCAUUGUCGUCUAGUCCGGUUUAGGAUA	25
MDM-sRNA-28	GGGGAUGUAGCUCAGAUGG	26
MDM-sRNA-33	GAAACGACUCUCGGCAACGGUAUUC	27
MDM-sRNA-38	CUUGAGUUCGACUCUCAACGAGAGCACCA	28
MDM-sRNA-39	GGGAUUGUAGUUCAAUUGGUCAGAGCACC	29
MDM-sRNA-41	UGAAACGACUCUCGGCAACGGUAUUC	30
MDM-sRNA-163	UGACUCUAGUCCGACUUUGUGAAAUGACU	31

另一方面，本发明提供了抗胰腺癌功能的小 RNA，其功能抑制胰腺癌细胞活性，本发明采用的癌症细胞系为：HS 766T(胰腺癌)、PANC-1(胰腺癌)、BXPc-3（胰腺癌）；所述小 RNA 的具体序列如下表 3 所示：

5

表 3

		SEQ ID
名称	序列	NO :
Hqi-sRNA-2	AUGGUUCGAUUCGGAGAGGG	6
BHSC-sRNA-15	UACCUGGUUGAUUCUGCCA	13
MDM-sRNA-1	UCCGUUGUCGUCCAGCGGUUAGGAUAUCUGG	19
MDM-sRNA-4	GCGUCUGUAGUCCAACGGUUAGGAUAAUUGC	20
MDM-sRNA-7	GCGUCUGUAGUCCAACGGUUAGGAUA	21
MDM-sRNA-22	AUUCGGUCGGGAACUCAAGGAGACUGCC	24
MDM-sRNA-27	UCCAUUGUCGUCUAGUCCGGUUUAGGAUA	25
MDM-sRNA-33	GAAACGACUCUCGGCAACGGUAUUC	27
MDM-sRNA-38	CUUGAGUUCGACUCUCAACGAGAGCACCA	28
MDM-sRNA-39	GGGAUUGUAGUUCAAUUGGUCAGAGCACC	29
MDM-sRNA-41	UGAAACGACUCUCGGCAACGGUAUUC	30
MDM-sRNA-16	UGACUCUAGUCCGACUUUGUGAAAUGACU	31
3		
LGT-sRNA-8	GGUGGCUGUAGUUUAGUGGUAAGAAUCCACGU	32
	U	
LGT-sRNA-10	CCGACUGUUUAAUUAACA	33
LGT-sRNA-14	UCCGUUGUCGUCCAGCGGUUAGGAUAUCUGGC	34
LGT-sRNA-16	UCCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGC	35
LGT-sRNA-17	UCCGACUGUUUAAUUAACA	36
LGT-sRNA-20	UCCGACUUUGUGAAAUGA	37

		SEQ ID
名称	序列	NO :
LGT-sRNA-21	UCCGACUGUUUAAUUAACAAAGCA	38
LGT-sRNA-22	AGGCUUGUAGCUCAGGUGGUUAGAGCGCA	39
LGT-sRNA-23	UCCGUUGUCGUCCAGCGGUUAGGAUAUCUG	40
LGT-sRNA-28	CUCUAGUCCGACUUUGUGAAA	41
LGT-sRNA-29	CGUCGUCGCGGCGAUCGUG	42
LGT-sRNA-30	UGAACUAAUUCAGACUGUG	43
LGT-sRNA-34	CUCUAGUCCGACUUUGUGAA	44
LGT-sRNA-35	CAAAACGACUCUCGGCAACGGA	45
LGT-sRNA-38	GUAAGGAUUGACAGACUG	46
LGT-sRNA-39	CGACUCUCGGCAACGGAUA	47
LGT-sRNA-43	GUGCUCUGAAUGUCAAGUGA	48
LGT-sRNA-46	AAAACGACUCUCGGCAACGGAUA	49
TYSW10	CCCUAUAACUUUCGAUGGUAGG	50
TYSW29	AUAUCUCGGCUCACGCAUCG	51
TYSW30	CGUUGCUUUUUGAUCCUUCG	52
TYSW31	CUGCCGGCGGACUGCUCGAGC	53
TYSW60	UUCACGUCGGGUUCACCA	54
TYSW104	UUGUCGUCCAGCGGUUAGGAUA	55
TYSW105	CCGGAGACGUCGGCGGGGGCCUCGGGA	56
TYSW106	UGAUUCAUGAUAACUCGUCGGA	57
TYSW107	ACAGACUGAGAGCUCUUUC	58
TYSW108	UCCUUAGUUCGAUCCUGAGUGCGAGCUC	59
TYSW109	UACUGACCGGGGUUCGUUCCCCGGA	60
TYSW110	UGAUAAACUCGUCGGAUCGCA	61
TYSW112	CCCGCCGCCUGUUUGCCGAC	62
TYSW113	UGGUCCCUGCGGAUGCUC	63
TYSW115	CUUCACUGGCUGUGGGGGGAACC	64
TYSW116	GUGCUGAAAUUGUCGGGAGGGA	65
TYSW117	AUGAACAAAUUCAGACUGUG	66
TYSW118	GGCCGGGGGACGGACUGGGA	67
TYSW119	ACCCGUCGGCUGUCGGCGA	68
TYSW120	CACACCGCCCGUCGCUCCU	69

		SEQ ID
名称	序列	NO :
TYSW121	UAAUAGAAUAGGACGUGUG	70
TYSW122	CAGUCAACUCAGAACUGGUACGGA	71
TYSW123	GAACCGUUGAUUCGCACA	72
TYSW124	CCCUCCGAAGUUUCCCUCAGG	73
TYSW126	CGACUCUCGACAACGGAUA	74
TYSW129	CCGACCUUAGCUCAGUUGGU	75
TYSW131	U AACUCGUCGGAUCGCACG	76
TYSW132	CCGGCUGGGGGACGGACUGGGA	77
TYSW133	GGUGGCUGUAGUUUAGUGGUGAGA	78
TYSW134	GUCCGAUCAACUGUAGUU	79
TYSW135	CCACCGACCUAAGUUCUUGGAACA	80
TYSW136	UGCAAACUCCGAAUACCUACA	81
TYSW137	GCGAUUCUGACGUGCAAAUCGAUCGUCA	82
TYSW138	CGAAACUCAGGUGCUGCAAUC	83
TYSW139	UCCCGAACUUGGUGGUUAAACUCUA	84
TYSW140	CUUAUUCGUGAAUCGGA	85
TYSW141	UCAACUUUCGAUGGUAGGA	86
TYSW143	UUCGUGCAAGGCUAAAUACUG	87
TYSW162	GCCGGCCGGGGACGGACUG	88
TYSW163	AUUUUGUUGGUUUCUAGGACC	89
TYSW164	CCCGGUGGCGGACGCUCUUGGCA	90
TYSW165	AAGGAUUGGCUCUGAGGGCUG	91
TYSW166	CGGGUCGUGAACUUCUUUCCCGGA	92
TYSW167	UUUCGGUCUUAUUACGUU	93
TYSW168	CGGAUAUCUCGGCUCACGCA	94
TYSW169	ACUUGAGAGGUGUAGGAUA	95
TYSW170	CCGACCUUAGCUCAGUUGGC	96
TYSW171	AUUAGUGGAACGCUCUGGAAAGUGC	97
TYSW172	UCGAUUCGGGCUUGCGCACCA	98
TYSW173	AGCUCGUUUGAUUCUGAUUUCC	99
TYSW175	AUCCACGGCCAUAGGACUCUG	100
TYSW176	GGGUGAAGGACUUGCUCCGUA	101

		SEQ ID
名称	序列	NO :
TYSW177	UGACGAGUGUUCUUUUAGA	102
TYSW178	UCUCUGAAUGGGGGAACCCACUC	103
TYSW179	CGGACUGCUCGAGCUGCCUCG	104
TYSW260	CGUUUGGAAUUCUGGAGACG	105
TYSW460	CCGUCGCUAGCUUGGUUGAA	106
TYSW461	UCCGAUCAACUGUAGUUA	107
TYSW462	CUUUGAAUUUGCUUGUGUAGGAUA	108
TYSW463	GUUCGAUUCUCGGCGAGAGAGCCA	109
TYSW464	UCUUGACGACCAUAGAGCAUUG	110
TYSW465	UUGGUCUUGUAAUUGGAAUG	111
TYSW475	CGACUCAGAACUGGUACG	112
TYSW476	AGGGAAAGAUGAAAAGGACU	113
TYSW478	AACCUUAACCUAUUCUCAAAAC	114
TYSW480	UGUGUCGCUUCGAUUCGU	115
TYSW483	CGUCUGCCUGGGUGUCACGU	116
TYSW484	GUCUGCCUGGGCGUCACGU	117
TYSW494	CUGGUCGGGUCGUGCCUCC	118
TYSW497	CCCCGGGCGCGAGCCCGGGCGGA	119
TYSW502	UCUCCGAUCGUUAGUGGCUAGUA	120
TYSW538	UCCCGAACCCGCCGGCUGUCG	121
TYSW746	CGCGGGCUCUGCCCGUUGCUGCGA	122
TYSW751	GUUUGUUUGAUGGUAUCUACUACU	123
TYSW753	CGGACUGCUCGAGCUGCUUCC	124
TYSW754	CAAGUGGAAGUGCAGUGAUGUAUGCAG	125
TYSW755	GUCUUUGGGUUCGGGGGG	126
TYSW761	GUCCCGAGUUCGUUUCUCGGA	127
TYSW767	CUGACUCAGAACUGGUACG	128
TYSW768	CAUGUCUGCCUGGGUGUCACGC	129
TYSW770	UCGUGGGUUCGGGUCCCACGGA	130
TYSW781	UCCAUUCUCAAAUUUAAAUA	131
TYSW785	CCGAUGUCGUCCAGCGGUUAGGAUA	132
TYSW791	UCGCGUGCCGGCCGGGGGA	133

应用序列聚类软件 CD-HIT，依据核酸序列相似性，对表 1 中 133 条小 RNA 进行聚类分组。同一个分组（Cluster）内的一组小 RNA，以组内序列长度最大的那一条小 RNA 为参考序列，组内小 RNA 完全一样的连续核苷酸为核心序列。

5 小 RNA 的序列相似度为该条小 RNA 与该组的参考序列一致的核酸长度/该条小 RNA 的核酸序列总长。设置同组内其它小 RNA 与该组的参考序列的序列相似度均大于等于 70%（程序参数“-C 0.7”）；与该组的参考序列一致的核酸长度，纳入计算的阈值为：小 RNA 与该组的参考序列比对完全一样的连续核苷酸的长度不低于 5（程序参数“-n 5”）。

10 表 1、表 2 与表 3 中 133 条小 RNA 在满足上述条件的情况下，通过 CD-HIT 可以聚类为 78 个组别，每组至少有两条序列。组别、每组的参考序列、包含的小 RNA 及组内共有核心序列在表 4 所示。

表 4：sRNA 分组聚类及作用靶点

组别	参考序列	核心序列	同组内的小 RNA
聚类 1	LQi-sRNA-3	UAGUGGU	LQi-sRNA-3, TYSW133
聚类 2	LGT-sRNA-14	UAGGAUA	MDM-sRNA-1, MDM-sRNA-4, MDM-sRNA-7, LGT-sRNA-14, MDM-sRNA-27, LGT-sRNA-14, LGT-sRNA-23, TYSW104, TYSW169, TYSW785,
聚类 3	MDM-sRNA-22	AACUCA	TYSW138, MDM-sRNA-22
聚类 4	MDM-sRNA-38	GUUCGA	HQi-sRNA-2, MDM-sRNA-38, YXC-sRNA-49, TYSW463
聚类 5	MDM-sRNA-39	UUGUAG	LGT-sRNA-22, MDM-sRNA-39
聚类 6	MDM-sRNA-163	UUUGUG	YXC-sRNA-39, LGT-sRNA-20, LGT-sRNA-28, LGT-sRNA-34,

			MDM-sRNA-163
聚类 7	LGT-sRNA-16	UUCAG	CHu-sRNA-1, LGT-sRNA-16
聚类 8	TYSW108	GAUCCUG	BHSC-sRNA-24, TYSW108
聚类 9	TYSW137	UCGAU	TYSW480, TYSW137
聚类 10	TYSW105	CGGGGG	TYSW791, TYSW105
聚类 11	TYSW754	-	TYSW754
聚类 12	MDM-sRNA-11	GUCUGCCUGGG (SEQ ID NO: 134)	TYSW483, TYSW484, TYSW768, MDM-sRNA-11
聚类 13	MDM-sRNA-12	-	MDM-sRNA-12
聚类 14	MDM-sRNA-41	CGACUCUCG	MDM-sRNA-33, MDM-sRNA-41, LGT-sRNA-35, LGT-sRNA-39, LGT-sRNA-46, TYSW126
聚类 15	LGT-sRNA-21	CCGACUGUUUAAUAAAACA (SEQ ID NO: 133)	LGT-sRNA-10, LGT-sRNA-17, LGT-sRNA-21, TYSW461
聚类 16	TYSW109	GUUCG	TYSW109, TYSW761, TYSW770
聚类 17	TYSW135	CCGACCUUAGCUCAGUUGG (SEQ ID NO: 135)	TYSW129, TYSW135, TYSW170

聚类 18	TYSW139	-	TYSW139
聚类 19	TYSW166	-	TYSW166
聚类 20	TYSW171	AAAGUG	BHSC-sRNA-17, BHSC-sRNA-18, TYSW171
聚类 21	BHSC-sRNA-22	-	BHSC-sRNA-22
聚类 22	TYSW122	ACUCAGAACUGGUACG (SEQ ID NO: 136)	TYSW122, TYSW475, TYSW767
聚类 23	TYSW462	-	TYSW462
聚类 24	TYSW502	-	TYSW502
聚类 25	TYSW746	-	TYSW746
聚类 26	TYSW751	-	TYSW751
聚类 27	BZL-sRNA-32	UGGAAACGGCUGCUAAUACC (SEQ ID NO: 9)	BZL-sRNA-25, BZL-sRNA-32
聚类 28	TYSW10	UCAACUUUCGAUGGUAGG (SEQ ID NO: 137)	TYSW10, TYSW141
聚类 29	TYSW115	-	TYSW115
聚类 30	TYSW116	-	TYSW116

聚类 31	TYSW164	GGCGGAC	TYSW164, TYSW31
聚类 32	TYSW178	-	TYSW178
聚类 33	TYSW497	-	TYSW497
聚类 34	TYSW106	UGAUAACUCGUCGGA (SEQ ID NO: 138)	TYSW106, TYSW110
聚类 35	TYSW132	GGGGGACGGACUG (SEQ ID NO: 139)	TYSW118, TYSW132, TYSW162
聚类 36	TYSW172	-	TYSW172
聚类 37	TYSW173	UUGAUUCUG	BHSC-sRNA-15, BHSC-sRNA-42, TYSW173
聚类 38	TYSW464	-	TYSW464
聚类 39	PGY-sRNA-6	-	PGY-sRNA-6
聚类 40	YXC-sRNA-62	-	YXC-sRNA-62
聚类 41	BZL-sRNA-34	-	BZL-sRNA-34
聚类 42	LGT-sRNA-43	-	LGT-sRNA-43

聚类 43	TYSW124	-	TYSW124
聚类 44	TYSW136	-	TYSW136
聚类 45	TYSW163	-	TYSW163
聚类 46	TYSW165	AAGGAUUG	LGT-sRNA-38, TYSW165
聚类 47	TYSW175	-	TYSW175
聚类 48	TYSW176	-	TYSW176
聚类 49	TYSW478	-	TYSW478
聚类 50	TYSW538	CGGCUGUCG	TYSW119, TYSW538
聚类 51	TYSW753	GACUG	TYSW107, TYSW753
聚类 52	TYSW781	-	TYSW781
聚类 53	CHu-sRNA-48	-	CHu-sRNA-48
聚类 54	BZL-sRNA-15	GUAGCUCAGAUGG (SEQ ID NO: 140)	MDM-sRNA-28, BZL-sRNA-15
聚类 55	TYSW29	AUAUCUCGGCUCACGCA (SEQ ID NO: 141)	TYSW29, TYSW168

聚类 56	TYSW30	-	TYSW30
聚类 57	TYSW112	-	TYSW112
聚类 58	LGT-sRNA-30	AAUUCAGACUGUG (SEQ ID NO: 142)	LGT-sRNA-30, TYSW117
聚类 59	TYSW460	-	TYSW460
聚类 60	TYSW465	-	TYSW465
聚类 61	TYSW476	-	TYSW476,
聚类 62	LGT-sRNA-29	-	LGT-sRNA-29
聚类 63	TYSW113	-	TYSW113
聚类 64	TYSW120	-	TYSW120
聚类 65	TYSW121	-	TYSW121
聚类 66	TYSW131	UCGCAC	TYSW123, TYSW131
聚类 67	TYSW177	-	TYSW177

聚类 68	TYSW494	-	TYSW494
聚类 69	TYSW755	-	TYSW755
聚类 70	TYSW167	-	TYSW167
聚类 71	TYSW143	-	TYSW143
聚类 72	TYSW179	-	TYSW179
聚类 73	TYSW260	-	TYSW260
聚类 74	TYSW140	-	TYSW140
聚类 75	TYSW134	-	TYSW134
聚类 76	TYSW60	-	TYSW60
聚类 77	TYSW461	-	TYSW461
聚类 78	TYSW135	-	TYSW135

因而，在本发明的一个方面提供了分离的核酸分子，其包含以下序列或由以下序列组成：

- A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列；
- 5 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列；
- C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列相比具有至少 10 个、优选地至少 9 个、至少 8 个、至少 7 个、至少 6 个、至少 5 个、至少 4 个、至少 3 个、至少 2 个、至少 1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，
- 10 D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列，或
- F) 包含表 4 中所列出的核心序列中的任一项的核苷酸序列。

在优选的实施方案中,根据本发明所述的核酸分子是 RNA 分子或 DNA 分子,优选地,其是小 RNA 分子,优选地,其是长度为 18-36 核苷酸的小 RNA 分子,优选地,其是长度为 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 或 36 个核苷酸的小 RNA 分子。

5 在本发明的实施方案中,本发明提供了分离的小 RNA 分子,其包含以下序列或由以下序列组成:

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列;

B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、10 98%、99% 序列同一性的序列;

C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列,优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列,

D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列,或 15

E) 包含表 4 中所列出的核心序列中的任一项的核苷酸序列。

在本发明的一个实施方案中,本发明提供了分离的小 RNA 分子,其包含以下序列或由以下序列组成:

A) 如 SEQ ID NO: 6、7、28 或 109 中任一项所示的核苷酸序列;

20 B) 与 SEQ ID NO: 6、7、28 或 109 中任一项所示的核苷酸序列有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列,其靶向环氧化酶-2,并且包含核心序列 GUUCGA; 或

C) 如 SEQ ID NO: 39 或 29 所示的核苷酸序列;

D) 与 SEQ ID NO: 39 或 29 所示的核苷酸序列有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序 25 列,其包含核心序列 UUGUAG; 或

E) 如 SEQ ID NO: 31、4、37、41 或 44 所示的核苷酸序列;

F) 与 SEQ ID NO: 31、4、37、41 或 44 所示的核苷酸序列有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列 30 同一性的序列,其包含核心序列 UUUGUG。

在本发明的实施方案中,本发明的小 RNA 分子可以是单链形式或双链形式。

根据本发明的双链形式的小 RNA 分子包含正义链和反义链,其中所述正义链包含以下序列或由以下序列组成:

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列;

35 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、

98%或 99%序列同一性的序列；

C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列，

5 D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列，或

E) 包含表 4 中所列出的核心序列中的任一项的核苷酸序列。

在本发明的实施方案中，本发明提供小 RNA 分子可以是单链或双链形式的小 RNA 分子。

10 在本发明的实施方案中，本发明提供小 RNA 分子可以从自然界中分离获得、获得可以通过人工合成获得。

在本发明的实施方案中，根据本发明的双链形式的小 RNA 分子包含正义链和反义链，其中所述正义链包含以下序列或由以下序列组成：

A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列；

15 B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列；

C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列相比具有至多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的核苷酸序列，优选地与 SEQ ID NO: 1 至
20 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列相比具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的核苷酸序列，

D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列杂交的核苷酸序列，或

25 E) 包含表 4 中所列出的核心序列中的任一项的核苷酸序列；和
所述反义链包含与所述正义链互补的序列。

另一方面，本发明提供了一种前体 miRNA，其可在宿主内加工成本发明所述的分离的小 RNA 分子。

另一方面，本发明提供了一种多核苷酸，其可被宿主转录成本发明所述的前体 miRNA。

30 另一方面，本发明提供了包含本发明的核酸分子、分离的小 RNA 分子、前体 miRNA 和/或多核苷酸的表达载体。

另一方面，本发明提供了被本发明的表达载体转染的宿主细胞。

35 另一方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含治疗有效量的根据本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体或宿主细胞，以及一种或多种药学上可接受的佐剂、赋形剂和/或稳定剂。

优选地，根据本发明的药物组合物可用于口服、肌肉内、静脉内、皮下、经

皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径施用，优选地，根据本发明的组合物通过口服施用。

优选地，在本发明的药物组合物中，所述核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体或宿主细胞的含量为 0.1-1000 μ M、优选为 3.0 μ M-300 μ M；
5 优选为 0.3 μ M、0.6 μ M、0.9 μ M、1.0 μ M、3.0 μ M、6.0 μ M、9.0 μ M、10.0 μ M、13.0 μ M、16.0 μ M、19.0 μ M、20.0 μ M、23.0 μ M、26.0 μ M、29.0 μ M、30.0 μ M、33.0 μ M、36.0 μ M、39.0 μ M、40.0 μ M、43.0 μ M、46.0 μ M、49.0 μ M、50.0 μ M、53.0 μ M、56.0 μ M、59.0 μ M、60.0 μ M、63.0 μ M、66.0 μ M、69.0 μ M、70.0 μ M、73.0 μ M、76.0 μ M、79.0 μ M、80.0 μ M、83.0 μ M、86.0 μ M、89.0 μ M、90.0 μ M、100 μ M、130 μ M、160 μ M、190 μ M、200 μ M、
10 250 μ M、300 μ M、350 μ M、400 μ M、450 μ M、500 μ M、550 μ M、600 μ M、650 μ M、700 μ M、750 μ M、800 μ M、850 μ M、900 μ M、950 μ M、1000 μ M、或这些点值之间的任意范围。

另一方面，本发明提供了根据本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途；
15 优选地，所述癌症选自肺癌，优选为鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌；神经胶质瘤；消化系统肿瘤，优选为胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌；肾癌；卵巢癌；子宫癌；子宫内膜癌；前列腺癌；甲状腺癌；神经母细胞瘤；脑癌；多形性成胶质细胞瘤；宫颈癌；膀胱癌；乳腺癌；头颈癌；横纹肌肉瘤；尤文氏肉瘤；骨肉瘤；软组织肉瘤；鼻腔 NK/T 细胞淋巴瘤；骨髓瘤；黑色素瘤；白血病，优选为急性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病。

优选地，根据本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物与其他癌症治疗结合用于治疗癌症，所述其他癌症治疗选自化疗、免疫疗法、放射疗法和手术。

25 在另一方面，本发明提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

除非有相反的说明，否则本文使用的术语具有本领域技术人员通常理解的含义。

30 在另一方面，提供了一种治疗基因表达异常相关疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

在另一方面，本发明提供了一种抑制基因表达和/或活性的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的核酸分子、小 RNA 分子、前体 miRNA、
35 多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

术语

通常，人们一般把siRNA，miRNA及其它非编码小RNA不加区分地称之为小核酸或小RNA(sRNA)。如本文使用的“小RNA”是一大类小的非编码RNA，其由动、植物基因组内所编码，长度大约为18-24个核苷酸。研究表明，小RNA参与各种各样的调节途径，包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋
5 亡、脂肪代谢等等。

如本文中所用的小RNA（sRNA），可以是单链或双链RNA，包括但不限于siRNA、miRNA，其可以是天然的或合成的RNA。

如本文所用的术语“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”，并且通常意指DNA或RNA聚合物，其可以是单链的或双链的、合成的或从天然来源获得的(例如分离的和/或纯化的)；其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸。
10 在一些实施方案中，核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或替换。然而，如本文所讨论的，在一些情况下对核酸而言，包含一个或更多个插入、缺失、倒位和/或替换可以是合适的。

如本文所用的术语在“严格条件下杂交”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列(例如，SEQ ID NO: 1所示的序列)特异性杂交。严格性条件可以包括例如低盐和/或高温条件，例如由在约50℃至70℃的温度下约0.02M至0.1M NaCl或等同物提供的。
15

如本文所用，“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基占据时，例如如果两个DNA分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同一的。两个序列之间的同一性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100的函数。
20

如本文所用的术语“载体”，是指并入本文所述的核酸的重组表达载体。所述重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体，并且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞，包括但不限于植物表达载体、动物表达载体、病毒载体，例如
25 逆转录病毒载体或慢病毒载体。这些载体是本领域技术人员熟知的，并且可以商购获得。

本文所用的术语“宿主细胞”是指可以转染有本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞，例如植物、动物、真菌或藻类，或者可以是原核细胞，例如细菌或原生动物。

多种转染技术是本领域公知的，包括但不限于磷酸钙共沉淀、直接微注射到培养的细胞内、电穿孔、脂质体介导的基因转移、脂质介导的转导和使用高速微型射弹的核酸递送。
30

如本文所用，“治疗”包括治疗在哺乳动物中(特别是在人类中)的疾病状态，并且包括：(a)抑制疾病状态，即阻止其发展；和/或(b)缓解疾病状态，即引起疾病状态消退。
35

如本文所用，术语“受试者”是指可能潜在地从用本发明的核酸分子、包含其的

载体、细胞或组合物的治疗中受益的任何人类或非人类生物体。示例性受试者包括患有糖尿病的受试者。优选地，如本文所用的“受试者”是脊椎动物，更优选地是哺乳动物，甚至更优选地是家畜或伴侣动物，例如鸡、鹅、鸭、山羊、绵羊、牛、猪、马、狗、猫、仓鼠、大鼠、小鼠、仓鼠或豚鼠。最优选地，受试者是人。

5 如本文所用，术语“治疗有效量”旨在包括当单独或组合施用本发明的核酸分子、包含其的载体、细胞或组合物时，使受试者获益的所述核酸分子、包含其的载体、细胞或组合物的量。

 如本文所用，术语“互补结合”或“互补地结合”是指两条单链彼此碱基配对以形成可检测的双链。但是，只要可以形成稳定的双链，就允许两条单链之间
10 存在一定百分比的不匹配。例如，在一些实施方案中，双链具有约 1%，约 2%，约 3%，约 4%，约 5%，约 6%，约 7%，约 8%，约 9%，约 10%，约 15%，约 20%，约 25%，约 30%，约 35%，约 40%，约 45%，或约 50%的不匹配。

 为了更详细的说明本发明，本说明书提供了下列具体实施方案，并结合附图说明这些具体实施方案，但本公开的方案并非仅限于此。本领域技术人员可以结合
15 本领域的公知常识，对本发明的方法、用途和小 RNA 进行适当的改变，只要其能够实现本发明所述的功能，即应落入本发明的范围内。

附图说明

 图 1A 至图 1C：MTS 法检测转染 31 种小 RNA 进入肺癌细胞后对其细胞活力的影响。
20 图 2A 至图 2I：在多种癌症细胞系中的抗细胞活力影响。

 图 3A 至图 3H：MTS 法检测转染 116 种小 RNA 进入胰腺癌细胞后对其细胞活力的影响。

 图 4A 和图 4B：HQi-sRNA-2 对 H460 和 A549 细胞活性呈浓度依赖性。

25 图 5A：HQi-sRNA-2 可抑制 H460 细胞的迁移、侵袭，并促进 H460 细胞的细胞凋亡。图 5A 显示 Celigo 细胞划痕实验的结果；图 5B 显示细胞迁移的结果；图 5C 显示对细胞侵袭的抑制；图 5D 显示促进细胞凋亡的结果。

 图 6：HQi-sRNA-2 可显著延长原发性肺癌小鼠生存。

 图 7：HQi-sRNA-2 可显著维持原发性肺癌小鼠的体重。

30 图 8A 和图 8B：HQi-sRNA-2 可显著减少原发肺癌小鼠肿瘤负担。

 图 9A 和图 9B：HQi-sRNA-2 可显著增加原发肺癌小鼠肿瘤组织凋亡。

 图 10A 和图 10B：MDM-sRNA-39 可抑制肺癌 H460 细胞的迁移。

 图 11A 和图 11B：MDM-sRNA-39 可抑制肺癌 H460 细胞的侵袭

 图 12：MDM-sRNA-39 可促进肺癌 H460 细胞的细胞凋亡。

35 图 13A 和图 13B：MDM-sRNA-163 可抑制肺癌 H460 细胞的迁移。

 图 14A 和图 14B：MDM-sRNA-163 可抑制肺癌 H460 细胞的侵袭。

图 15: MDM-sRNA-163 可促进肺癌 H460 细胞的细胞凋亡。

图 16A 和图 16B: MDM-sRNA-39 对肺癌 H460 和 A549 细胞活性的抑制呈浓度依赖性。

图 17A 和图 17B: MDM-sRNA-163 对肺癌 H460 和 A549 细胞活性的抑制呈
5 浓度依赖性。

图 18A 和图 18B: MDM-sRNA-39、MDM-sRNA-163 可显著减少原发肺癌小鼠肿瘤负担。

图 19: MDM-sRNA-39、MDM-sRNA-163 可显著延长原发性肺癌小鼠生存。

图 20A 至图 20F: MDM-sRNA-39 对乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231
10 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞、胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞活性的抑制呈浓度依赖性。

图 21A 至图 21F: MDM-sRNA-163 对乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞、胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞活性的抑制呈浓度依赖性。

图 22A-图 22B: MDM-sRNA-39 可促进胰腺癌 PANC-1 细胞、BXP-3 细胞的
15 凋亡。

图 23A-图 23D: MDM-sRNA-39 可抑制胰腺癌 ASPC-1 细胞、BXP-3 细胞的迁移。

图 24A-图 24D: MDM-sRNA-39 可抑制胰腺癌 ASPC-1 细胞、BXP-3 细胞的
20 侵袭。

图 25A 至图 25B: MDM-sRNA-163 可促进胰腺癌 PANC-1 细胞、BXP-3 细胞的凋亡。

图 26A 至图 26D: MDM-sRNA-163 可抑制胰腺癌 ASPC-1 细胞、BXP-3 细胞的迁移。

图 27A 至图 27B: MDM-sRNA-163 可抑制胰腺癌 BXP-3 细胞的侵袭。

图 28: MDM-sRNA-39 可促进乳腺癌 MCF7 细胞的凋亡。

图 29: MDM-sRNA-39 可促进前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡。

图 30: MDM-sRNA-163 可促进乳腺癌 MCF7 细胞的凋亡。

图 31: MDM-sRNA-163 可促进前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡。

图 32: HQi-sRNA-2 在转录水平下调的基因的功能主要聚类在肿瘤、免疫等相关生物学通路。

图 33: MDM-sRNA-39 在转录水平下调的基因的功能主要聚类在肿瘤、免疫等相关生物学通路。

图 34: MDM-sRNA-163 在转录水平下调的基因的功能主要聚类在肿瘤、免疫
35 等相关生物学通路。

图 35A 至图 35D: HQi-sRNA-2 可以显著下调 H460 细胞和肺癌小鼠肺组织的

环氧化酶-2 (COX2) 的 mRNA 及蛋白水平。

图 36: 荧光素酶报告基因实验证明 HQi-sRNA-2 可以下调环氧化酶-2(COX2) 表达, 证实 COX2 是 HQi-sRNA-2 的靶点。

以下结合实施例用于进一步描述本发明, 但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件; 或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂, 为市场购买的常规试剂。

在以下实施例中使用的的小 RNA 分子, 是在细胞实验中使用的是根据提供序列互补配对合成的双链 RNA 序列, 在动物实验中使用的是单链 RNA 序列。

10

具体实施方式

实施例 1. 验证中药来源的小 RNA 在 H460、H23、A549 细胞上的增殖抑制功能

1) 取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460、H23、A549 细胞, 根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板, 12h 后进行转染, 分组 (每组 3 孔) 为:

空白对照: 20ul opti-MEM (无血清培养基)

阴性对照组 (NC 组)、实验组:

A. 10ul opti-MEM 和 0.2ul iMax(RNAimax 转染试剂)混匀 5min

B. 10ul opti-MEM 和 0.5ul 小 RNA 混匀 (终浓度 100nM/L)

20 C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 于 20ul/孔体系加入

阳性组: 将紫杉醇的浓度调到 100nM/L

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 ul 无核酸酶水溶解后为储存浓度:

20uM/L

2) 细胞活力的检测: 于 48h 后进行 MTS 检测。

25 MTS 检测液试剂 (G1112, promega) 的配置: opti-MEM: MTS A 液: MTS B 液=100:20:1。去除上清后, 每孔添加 100ul MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm 波长时的吸光度值。

结果参见图 1A 至图 1C。

30 **实施例 2. 验证中药来源小 RNA 在多种细胞系中的增殖抑制功能**

1) 取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 PC3、MCF7、MDA-MB-231、MKN45、HCT116、AGS、A549、HS766T、ASPC1 细胞, 根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板, 12h 后进行转染, 分组 (每组 3 孔) 为:

空白对照组: 20ul opti-MEM

35 阴性对照组 (NC 组)、实验组:

A. 10ul opti-MEM 和 0.2ul iMax 混匀 5min

B. 10ul opti-MEM 和 0.5ul 小 RNA 混匀（终浓度 100nM/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，于 20ul/孔体系加入

阳性组：将紫杉醇的浓度调到 100nM/L

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 ul 无核酸酶水溶解后为储存浓度：

5 20uM/L

2) 细胞活力的检测：于 48h 后进行 MTS 检测。

MTS 检测液的配置：opti-MEM：MTS A 液：MTS B 液=100:20:1。去除上清后，每孔添加 100ul MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm 波长时的吸光度值。

10 结果参见图 2A 至图 2I。

实施例 3. 验证中药来源小 RNA 在胰腺癌细胞系中的增殖抑制功能

1) 取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 PANC-1、HS 766T 细胞，根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

15 空白对照组：20ul opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组：

A. 10ul opti-MEM 和 0.2ul iMax 混匀 5min

B. 10ul opti-MEM 和 0.5ul 小 RNA 混匀（终浓度 100nM/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，于 20ul/孔体系加入

20 阳性组：将紫杉醇的浓度调到 100nM/L

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 ul 无核酸酶水溶解后为储存浓度：

20uM/L

2) 细胞活力的检测：于 48h 后进行 MTS 检测。

MTS 检测液的配置：opti-MEM：MTS A 液：MTS B 液=100:20:1。去除上清后，每孔添加 100ul MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm 波长时的吸光度值。

结果参见图 3A 至图 3H。

实施例 4. 验证黄芩来源的 sRNA-2 在 H460 和 A549 细胞上的增殖抑制功能的浓度依赖性

1) 取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 和 A549 细胞，根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

空白（BLANK）组：20uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组：

35 A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和小 RNA 混匀（H460 细胞实验组浓度梯度设置为：0.01noml/L、0.03noml/L、0.1noml/L、0.39noml/L、0.78noml/L、1.56noml/L、

3.125nmol/L、6.25nmol/L、12.5nmol/L、25nmol/L、50nmol/L、100nmol/L；A549 细胞实验组浓度梯度设置为：0.01nmol/L、0.03nmol/L、0.1nmol/L、0.3nmol/L、1nmol/L、3nmol/L、10nmol/L、30nmol/L、100nmol/L、300nmol/L；NC 组 sRNA 终浓度为 100nmol/L）

- 5 C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，加入 20uL 总体系
备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L
2)细胞活力的检测：于 48h 后进行 MTS 检测。
MTS 检测液的配置如下，opti-MEM：MTS A 液：MTS B 液=100:20:1。去除
10 上清后，每孔添加 100uL MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm 波长时的吸光度值。发现黄芩来源的 HQi-sRNA-2 在 H460 和 A549 细胞上的增殖抑制功能呈现浓度依赖性。
结果参见图 4A 至图 4B。

15 实施例 5. 验证黄芩来源的 sRNA-2 在 H460 细胞上的迁移、侵袭抑制功能以及凋亡促进功能

- 1)迁移抑制功能
方法一：取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞，根据细胞增长速度使用无血清培养基进行 12 孔板铺板，12h 后使用 200uL 枪头在孔内画直线，洗去漂
20 浮细胞后进行转染，分组（每组三孔，每孔划线两条）为：
空白对照组：每孔 200uL opti-MEM
阴性对照组（NC 组）、实验组：
A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min
B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）
25 C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，每孔加入 200uL 总体系
备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L
48h 后弃去上清，镜下进行拍照。结果参见图 5A。
方法二：取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞，消化后用 1mL 无血
30 清培养基重悬并进行细胞计数，每个 Transwell（迁移小室）小室上室铺 10w 个细胞（100uL），下室加入 10%FBS 的完全培养基，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：
空白对照组：20uL opti-MEM
阴性对照组（NC 组）、实验组：
35 A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min
B. 10uL opti-MEM 和 0.5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 每孔加入 20uL 总体系

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度:
20umol/L

48h 后弃去上下室培养基, 多聚甲醛室温固定 15min, 0.1%结晶紫室温染色
5 15min, PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室; 按照使用流程打 Leica
倒置显微镜 DMI8, 选择 5×物镜, 调节参数并且进行白平衡后, 逐个小室进行拍
照, 后续计数统计。结果参见图 5B。

2)侵袭抑制功能

前一晚碎冰上融化 Matrigel (基质胶), 用无血清培养基稀释基质胶使其终浓
10 度为 200-300ug/mL, 每个上室加入 100uL, 37℃放置 30min 后吸出上清; 取细胞
密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞, 消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行
细胞计数, 每个小室上室铺 10w 个细胞 (100uL), 下室加入 10%FBS 的完全培
养基, 12h 后进行转染, 分组 (每组 3 孔) 为:

空白对照组: 20uL opti-MEM

15 阴性对照组 (NC 组)、实验组:

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和 0.5uL 小 RNA 混匀 (终浓度 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 每孔加入 20uL 总体系

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度:
20 20umol/L

48h 后弃去上下室培养基, 多聚甲醛室温固定 15min, 0.1%结晶紫室温染色
15min, PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室; 按照使用流程打 Leica
倒置显微镜 DMI8, 选择 5×物镜, 调节参数并且进行白平衡后, 逐个小室进行拍
照, 后续计数统计。结果参见图 5C。

25 3)凋亡促进功能

取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞, 根据细胞增长速度进行 12 孔
板铺板, 12h 后进行转染, 分组为:

空白对照组 (4 孔): 每孔 200uL opti-MEM

阴性对照组 (NC 组)、实验组 (各 3 孔): 每孔体系如下

30 A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀 (终浓度 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 每孔加入 200uL 总体系

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度:
20umol/L

35 48h 后收集上清和细胞, 预冷 PBS 清洗两次后, 空白对照组 4 管细胞分别加
入①200uL 1×binding buffer (结合缓冲液); ②200uL 1×binding buffer 及 5uL

Annexin V 染料；③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料；④200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀并通过 300 目滤网过滤，根据空白对照组选择活细胞群及十字门定位后，检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图 5D。

实施例 6. HQi-sRNA-2 可显著延长原发性肺癌小鼠生存

原发性肺癌小鼠模型为 $Kras^{LSL-G12D}p53^{f1/f1}$ (KP)。

将小鼠称重，按照区组随机的方法，将小鼠分配到阴性对照组 (NC 组)、HQi-sRNA-2 组。NC 组为阴性对照，由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。HQi-sRNA-2 组为实验组，将 HQi-sRNA-2 与鞘氨醇 (sphingosine (d18:1))，构建成 sphingosine (d18:1)-HQi-sRNA-2 本草递送系统。

本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水，90℃水浴加热 15 分钟，混匀构建而成。

每一只体重均匀的小鼠采用灌胃的给药方法，每一只小鼠 10nmol HQi-sRNA-2 mimic，每天灌胃，直至出现小鼠死亡。

记录每一只小鼠的生存时间，绘制生存曲线，并作统计分析。发现 HQi-sRNA-2 可显著延长原发性肺癌小鼠生存。结果参见图 6。

实施例 7. HQi-sRNA-2 可显著维持原发性肺癌小鼠的体重

原发性肺癌小鼠模型为 $Kras^{LSL-G12D}p53^{f1/f1}$ (KP)。

将小鼠称重，按照区组随机的方法，将小鼠分配到阴性对照组 (NC 组)、HQi-sRNA-2 组。NC 组为阴性对照，由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。HQi-sRNA-2 组为实验组，将 HQi-sRNA-2 构建成 sphingosine (d18:1)-HQi-sRNA-2 本草递送系统。

本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水，90℃水浴加热 15 分钟，混匀构建而成。

每一只体重均匀的小鼠采用灌胃的给药方法，每一只小鼠 10nmol HQi-sRNA-2 mimic，每天灌胃，持续一个月。

记录每一只小鼠的体重，绘制体重随时间的变化曲线，并作统计分析。发现 HQi-sRNA-2 可显著维持原发性肺癌小鼠的体重。结果参见图 7。

实施例 8. HQi-sRNA-2 可显著减少原发肺癌小鼠肿瘤负担

原发性肺癌小鼠模型为 $Kras^{LSL-G12D}p53^{f1/f1}$ (KP)。

将小鼠称重，按照区组随机的方法，将小鼠分配到阴性对照组 (NC 组)、HQi-sRNA-2 组。NC 组为阴性对照，由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA

本草递送系统。HQi-sRNA-2 组为实验组，将 HQi-sRNA-2 构建成 sphingosine (d18:1)-HQi-sRNA-2 本草递送系统。

本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水，90℃水浴加热 15 分钟，混匀构建而成。

5 每一只体重均匀的小鼠采用灌胃的给药方法，每一只小鼠 10nmol HQi-sRNA-2 mimic，每天灌胃，持续一个月。

取小鼠的肺部做病理切片，统一取左肺，最大面切片，HE 染色，统计肿瘤占整个病理切片的面积，计算肿瘤负担，并作统计分析。发现 HQi-sRNA-2 可显著减少原发肺癌小鼠肿瘤负担。结果参见图 8A 和图 8B。

10

实施例 9. HQi-sRNA-2 可显著增加原发肺癌小鼠肿瘤组织凋亡

原发性肺癌小鼠模型为 Kras^{L;SL-G12D}p53^{f1/f1} (KP)。

将小鼠称重，按照区组随机的方法，将小鼠分配到阴性对照组 (NC 组)、HQi-sRNA-2 组。NC 组为阴性对照，由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。HQi-sRNA-2 组为实验组，将 HQi-sRNA-2 构建成 sphingosine (d18:1)-HQi-sRNA-2 本草递送系统。

15

本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水，90℃水浴加热 15 分钟，混匀构建而成。

每一只体重均匀的小鼠采用灌胃的给药方法，每一只小鼠 10nmol HQi-sRNA-2 mimic，每天灌胃，持续一个月。

20

取小鼠的肺部做病理切片，统一取左肺，最大面切片，做半胱天冬酶-3 的免疫组化，统计阳性细胞群占整个病理切片的面积，计算肿瘤负担，并作统计分析。发现 HQi-sRNA-2 可显著增加原发肺癌小鼠肿瘤组织凋亡。结果参见图 9A 和图 9B。

25

实施例 10. 验证美登木来源的 sRNA-39 在 H460 细胞上的迁移抑制功能

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞，消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数，每个 Transwell 小室上室铺 10w 个细胞 (100uL)，下室加入 10%FBS 的完全培养基，12h 后进行转染，分组 (每组 3 孔) 为：

空白对照组：20uL opti-MEM

30

阴性对照组 (NC 组)、实验组：

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和 0.5uL 小 RNA 混匀 (终浓度 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静置 15min 后，每孔加入 20uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：

35

20umol/L

2)固定染色拍照及统计：

48h 后弃去上下室培养基，多聚甲醛室温固定 15min，0.1%结晶紫室温染色 15min，PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室；按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMi8，选择 5×物镜，调节参数并且进行白平衡后，逐个小室进行拍照，后续计数统计。结果参见图 10A 和图 10B。

5

实施例 11. 验证美登木来源的 sRNA-39 在 H460 细胞上的侵袭抑制功能

1)前一晚碎冰上融化 Matrigel 基质胶，用无血清培养基稀释基质胶使其终浓度为 200-300ug/mL，每个上室加入 100uL，37℃放置 30min 后吸出上清；取细胞密度为 90%以上 10cm²皿的 H460 细胞，消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数，每个小室上室铺 10w 个细胞（100uL），下室加入 10%FBS 的完全培养基，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

10

空白对照组：20uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组：

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

15

B. 10uL opti-MEM 和 0.5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静置 15min 后，每孔加入 20uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：

20umol/L

2)固定染色拍照及统计：

20

48h 后弃去上下室培养基，多聚甲醛室温固定 15min，0.1%结晶紫室温染色 15min，PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室；按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMi8，选择 5×物镜，调节参数并且进行白平衡后，逐个小室进行拍照，后续计数统计。结果参见图 11A 和图 11B。

25

实施例 12. 验证美登木来源的 sRNA-39 在 H460 细胞上的凋亡促进功能

1)取细胞密度为 90%以上 10cm²皿的 H460 细胞，根据细胞增长速度进行 12 孔板铺板，12h 后进行转染，分组为：

空白对照组（4 孔）：每孔 200uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组（各 3 孔）：每孔体系如下

30

A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静置 15min 后，每孔加入 200uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：

20umol/L

35

2): 凋亡检测

48h 后收集上清和细胞，预冷 PBS 清洗两次后，空白对照组 4 管细胞分别加入①200uL 1×binding buffer;②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料；

③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料；④200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀并通过 300 目滤网过滤，根据空白对照组选择活细胞群及十字门定位后，检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图 12。

实施例 13. 验证美登木来源的 sRNA-163 在 H460 细胞上的迁移抑制功能

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞，消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数，每个 Transwell 小室上室铺 10w 个细胞（100uL），下室加入 10%FBS 的完全培养基，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

空白对照组：20uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组：

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和 0.5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，每孔加入 20uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L

1) 固定染色拍照及统计：

48h 后弃去上下室培养基，多聚甲醛室温固定 15min，0.1%结晶紫室温染色 15min，PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室；按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMI8，选择 5×物镜，调节参数并且进行白平衡后，逐个小室进行拍照，后续计数统计。结果参见图 13A 和图 13B。

实施例 14. 验证美登木来源的 sRNA-163 在 H460 细胞上的侵袭抑制功能

1)前一晚碎冰上融化 Matrigel 基质胶，用无血清培养基稀释基质胶使其终浓度为 200-300ug/mL，每个上室加入 100uL，37℃放置 30min 后吸出上清；取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞，消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数，每个小室上室铺 10w 个细胞（100uL），下室加入 10%FBS 的完全培养基，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

空白对照组：20uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组：

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和 0.5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，每孔加入 20uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L

2)固定染色拍照及统计：

48h 后弃去上下室培养基，多聚甲醛室温固定 15min，0.1%结晶紫室温染色 15min，PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室；按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMi8，选择 5×物镜，调节参数并且进行白平衡后，逐个小室进行拍照，后续计数统计。结果参见图 14A 和图 14B。

5

实施例 15. 验证美登木来源的 sRNA-163 在 H460 细胞上的凋亡促进功能

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞，根据细胞增长速度进行 12 孔板铺板，12h 后进行转染，分组为：

空白对照组（4 孔）：每孔 200uL opti-MEM

10

阴性对照组（NC 组）、实验组（各 3 孔）：每孔体系如下

A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，每孔加入 200uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：

15

20umol/L

2): 凋亡检测

48h 后收集上清和细胞，预冷 PBS 清洗两次后，空白对照组 4 管细胞分别加入①200uL 1×binding buffer; ②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料; ③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料; ④200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀后通过 300 目滤网过滤，根据空白对照组选择活细胞群及十字门定位后，检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图 15。

20

25

实施例 16. 验证美登木来源的 sRNA-39 在 H460 和 A549 细胞上的增殖抑制功能的浓度依赖性

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 和 A549 细胞，根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

空白对照组：20uL opti-MEM

30

阴性对照组（NC 组）、实验组：

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和小 RNA 混匀（H460 细胞实验组浓度梯度设置为：0.01nmol/L、0.03nmol/L、0.1nmol/L、0.3nmol/L、1nmol/L、3nmol/L、10nmol/L、30nmol/L、100nmol/L、300nmol/L、400nmol/L、500nmol/L；A549 细胞实验组浓度梯度设置为：0.01nmol/L、0.03nmol/L、0.1nmol/L、0.3nmol/L、1nmol/L、3nmol/L、10nmol/L、30nmol/L、100nmol/L、300nmol/L；NC 组 sRNA 终浓度为 100nmol/L）

35

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 加入 20uL 总体系

阳性组: 将紫杉醇的浓度调到 100nmol/L

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度: 20umol/L

5 2)细胞活力的检测: 于 48h 后进行 MTS 检测。

MTS 检测液的配置如下, opti-MEM: MTS A 液: MTS B 液=100:20:1。去除上清后, 每孔添加 100uL MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm 波长时的吸光度值。结果参见图 16A 和图 16B。

10 实施例 17. 验证美登木来源的 sRNA-163 在 H460 和 A549 细胞上的增殖抑制功能的浓度依赖性

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 和 A549 细胞, 根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板, 12h 后进行转染, 分组 (每组 3 孔) 为:

空白对照组: 20uL opti-MEM

15 阴性对照组 (NC 组)、实验组:

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和小 RNA 混匀 (H460 细胞实验组浓度梯度设置为:

0.1nmol/L、0.3nmol/L、1nmol/L、3nmol/L、10nmol/L、30nmol/L、100nmol/L、300nmol/L; A549 细胞实验组浓度梯度设置为: 0.01nmol/L、0.03nmol/L、0.1nmol/L、

20 0.3nmol/L、1nmol/L、3nmol/L、10nmol/L、30nmol/L、100nmol/L、300nmol/L; NC 组 sRNA 终浓度为 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 加入 20uL 总体系

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度: 20umol/L

25 2)细胞活力的检测: 于 48h 后进行 MTS 检测。

MTS 检测液的配置如下, opti-MEM: MTS A 液: MTS B 液=100:20:1。去除上清后, 每孔添加 100uL MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm 波长时的吸光度值。结果参见图 17A 和图 17B。

30 实施例 18. MDM-sRNA-39、MDM-sRNA-163 可显著减少原发性肺癌小鼠肿瘤负担

原发性肺癌小鼠模型为 Kras^{LSL-G12D}p53^{f1/f1} (KP)。

将小鼠称重, 按照区组随机的方法, 将小鼠分配到阴性对照组 (NC 组)、MDM-sRNA-39 组、MDM-sRNA-163 组。NC 组为阴性对照, 由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。MDM-sRNA-39 组为实验组, 将 MDM-sRNA-39 构建成 sphingosine (d18:1)-MDM-sRNA-39 本草递送系统。MDM-sRNA-163 组为实验组, 将 MDM-sRNA-163 构建成 sphingosine (d18:1)-

MDM-sRNA-163 本草递送系统。

本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水，90℃水浴加热 15 分钟，混匀构建而成。

5 每一只体重均匀的小鼠采用灌胃的给药方法，每一只小鼠 10nmol HQi-sRNA-2 mimic，每天灌胃，持续一个月。

取小鼠的肺部做病理切片，统一取左肺，最大面切片，HE 染色，统计肿瘤占整个病理切片的面积，计算肿瘤负担，并作统计分析。发现 MDM-sRNA-39、MDM-sRNA-163 可显著减少原发肺癌小鼠肿瘤负担。结果参见图 18A 和图 18B。

10 **实施例 19. MDM-sRNA-39、MDM-sRNA-163 可显著延长原发性肺癌小鼠生存**

原发性肺癌小鼠模型为 Kras^{LSL-G12D}p53^{f1/f1} (KP)。

将小鼠称重，按照区组随机的方法，将小鼠分配到阴性对照组 (NC 组)、MDM-sRNA-39 组、MDM-sRNA-163 组。NC 组为阴性对照，由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。MDM-sRNA-39 组为实验组，将 MDM-sRNA-39 构建成 sphingosine (d18:1)-MDM-sRNA-39 本草递送系统。MDM-sRNA-163 组为实验组，将 MDM-sRNA-163 构建成 sphingosine (d18:1)-MDM-sRNA-163 本草递送系统。

20 本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水，90℃水浴加热 15 分钟，混匀构建而成。

每一只体重均匀的小鼠采用灌胃的给药方法，每一只小鼠 10nmol HQi-sRNA-2 mimic，每天灌胃，直至小鼠死亡。

记录每一只小鼠的生存时间，绘制生存曲线，并作统计分析。发现 MDM-sRNA-39、MDM-sRNA-163 可显著延长原发性肺癌小鼠生存。结果参见图 19。

25 **实施例 20. MDM-sRNA-39 对乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞活性的抑制呈浓度依赖性**

30 1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞，根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

空白对照组：20uL opti-MEM

阴性对照组 (NC 组)、实验组：

35 A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和小 RNA 混匀（实验组浓度梯度设置为：0.01noml/L、

0.03nmol/L、0.1nmol/L、0.39nmol/L、0.78nmol/L、1.56nmol/L、3.125nmol/L、6.25nmol/L、12.5nmol/L、25nmol/L、50nmol/L、100nmol/L； NC 组 sRNA 终浓度为 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静置 15min 后，加入 20uL 总体系

5 备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L

2)细胞活力的检测：于 48h 后进行 MTS 检测。

MTS 检测液的配置如下，opti-MEM：MTS A 液：MTS B 液=100:20:1。去除上清后，每孔添加 100uL MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm
10 波长时的吸光度值。发现 MDM-sRNA-39 在乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞上的增殖抑制功能呈现浓度依赖性。结果参见图 20A 至图 20F。

实施例 21. MDM-sRNA-163 对乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3
15 **细胞活性的抑制呈浓度依赖性**

1)取细胞密度为 90%以上 10cm²皿的乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞，根据细胞增长速度进行 96 孔板铺板，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）
20 为：

空白对照组：20uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组：

A. 10uL opti-MEM 和 0.2uL iMax 混匀 5min

B. 10uL opti-MEM 和小 RNA 混匀（实验组浓度梯度设置为：0.01nmol/L、
25 0.03nmol/L、0.1nmol/L、0.39nmol/L、0.78nmol/L、1.56nmol/L、3.125nmol/L、6.25nmol/L、12.5nmol/L、25nmol/L、50nmol/L、100nmol/L； NC 组 sRNA 终浓度为 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静置 15min 后，加入 20uL 总体系

30 备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L

2)细胞活力的检测：于 48h 后进行 MTS 检测。

MTS 检测液的配置如下，opti-MEM：MTS A 液：MTS B 液=100:20:1。去除上清后，每孔添加 100uL MTS 检测液孵育 0.5-2h。于酶标仪中检测 490nm 和 630nm
35 波长时的吸光度值。发现 MDM-sRNA-163 在乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、胃癌 AGS 细胞、胰腺癌 HS766T 细胞胰腺癌 ASPC-1 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞上的增殖抑制功能呈现浓度依赖性。结果参见图 21A 至图 21F。

实施例 22. 验证美登木来源的 sRNA-39 在 PANC-1 细胞、BXPC-3 细胞上的凋亡促进功能

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 PANC-1 细胞、BXPC-3 细胞, 根据细胞增长速度进行 12 孔板铺板, 12h 后进行转染, 分组为:

5 空白对照组 (4 孔): 每孔 100uL jetPRIME Buffer

阴性对照组 (NC 组)、实验组 (各 3 孔): 每孔 100uL jetPRIME Buffer 与 3uL jetPRIME reagent 及 5uL 小 RNA 混匀静置 15min 后, 每孔加入 100uL 总体系 (终浓度 100nmol/L)

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度:
10 20umol/L

2): 凋亡检测:

72h 后收集上清和细胞, 预冷 PBS 清洗两次后, 空白对照组 4 管细胞分别加入①200uL 1×binding buffer; ②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料;
③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料; ④200uL 1×binding buffer、5uL
15 Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀后通过 300 目滤网过滤, 根据空白对照组选择活细胞群及十字门定位后, 检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图 22A 至图 22B。

20 **实施例 23. 验证美登木来源的 sRNA-39 在 ASPC-1 细胞、BXPC-3 细胞上的迁移抑制功能**

1) 取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 ASPC-1 细胞、BXPC-3 细胞, 消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数, 每个 Transwell 小室上室铺 10w 个细胞 (100uL), 下室加入 10%FBS 的完全培养基, 12h 后进行转染, 分组 (每
25 组 3 孔) 为:

空白对照组: 10uL jetPRIME Buffer

阴性对照组 (NC 组)、实验组: 10uL jetPRIME Buffer 与 0.5uL jetPRIME reagent 及 0.5uL 小 RNA 混匀静置 15min 后, 每孔加入 10uL 总体系 (终浓度 100nmol/L)

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度:
30 20umol/L

2) 固定染色拍照及统计:

72h 后弃去上下室培养基, 多聚甲醛室温固定 15min, 0.1%结晶紫室温染色 15min, PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室; 按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMI8, 选择 5×物镜, 调节参数并且进行白平衡后, 逐个小室进行
35 拍照, 后续计数统计。结果参见图 23A 至图 23D。

实施例 24. 验证美登木来源的 sRNA-39 在 ASPC-1 细胞、BXP-3 细胞上的侵袭抑制功能

1)前一晚碎冰上融化 Matrigel 基质胶,用无血清培养基稀释基质胶使其终浓度为 200-300ug/mL,每个上室加入 100uL,37℃放置 30min 后吸出上清;取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 ASPC-1 细胞、BXP-3 细胞,消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数,每个小室上室铺 10w 个细胞(100uL),下室加入 10%FBS 的完全培养基,12h 后进行转染,分组(每组 3 孔)为:

空白对照组: 10uL jetPRIME Buffer

阴性对照组(NC 组)、实验组: 10uL jetPRIME Buffer 与 0.5uL jetPRIME reagent 及 0.5uL 小 RNA 混匀静置 15min 后,每孔加入 10uL 总体系(终浓度 100nmol/L)

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度: 20umol/L

2)固定染色拍照及统计:

72h 后弃去上下室培养基,多聚甲醛室温固定 15min,0.1%结晶紫室温染色 15min,PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室;按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMI8,选择 5×物镜,调节参数并且进行白平衡后,逐个小室进行拍照,后续计数统计。结果参见图 24A 至图 24D。

实施例 25. 验证美登木来源的 sRNA-163 在 PANC-1 细胞、BXP-3 细胞上的凋亡促进功能

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 PANC-1 细胞和 BXP-3 细胞,根据细胞增长速度进行 12 孔板铺板,12h 后进行转染,分组为:

空白对照组(4 孔): 每孔 100uL jetPRIME Buffer

阴性对照组(NC 组)、实验组(各 3 孔): 每孔 100uL jetPRIME Buffer 与 3uL jetPRIME reagent 及 5uL 小 RNA 混匀静置 15min 后,每孔加入 100uL 总体系(终浓度 100nmol/L)

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度: 20umol/L

2): 凋亡检测:

72h 后收集上清和细胞,预冷 PBS 清洗两次后,空白对照组 4 管细胞分别加入①200uL 1×binding buffer;②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料;③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料;④200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀后通过 300 目滤网过滤,根据空白对照组选择活细胞群及十字门定位后,检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图 25A 至图 25B。

实施例 26. 验证美登木来源的 sRNA-163 在 ASPC-1 细胞、BXPc-3 细胞上的迁移抑制功能

1) 取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 ASPC-1 细胞、BXPc-3 细胞，消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数，每个 Transwell 小室上室铺 10w 个细胞（100uL），下室加入 10%FBS 的完全培养基，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

空白对照组：10uL jetPRIME Buffer

阴性对照组（NC 组）、实验组：10uL jetPRIME Buffer 与 0.5uL jetPRIME reagent 及 0.5uL 小 RNA 混匀静止 15min 后，每孔加入 10uL 总体系（终浓度 100nmol/L）

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L

2) 固定染色拍照及统计：

72h 后弃去上下室培养基，多聚甲醛室温固定 15min，0.1%结晶紫室温染色 15min，PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室；按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMi8，选择 5×物镜，调节参数并且进行白平衡后，逐个小室进行拍照，后续计数统计。结果参见图 26A 至图 26D。

实施例 27. MDM-sRNA-163 可抑制胰腺癌 BXPc-3 细胞的侵袭

1)前一晚碎冰上融化 Matrigel 基质胶，用无血清培养基稀释基质胶使其终浓度为 200-300ug/mL，每个上室加入 100uL，37℃放置 30min 后吸出上清；取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 BXPc-3 细胞，消化后用 1mL 无血清培养基重悬并进行细胞计数，每个小室上室铺 10w 个细胞（100uL），下室加入 10%FBS 的完全培养基，12h 后进行转染，分组（每组 3 孔）为：

空白对照组：10uL jetPRIME Buffer

NC 组、实验组：10uL jetPRIME Buffer 与 0.5uL jetPRIME reagent 及 0.5uL 小 RNA 混匀静止 15min 后，每孔加入 10uL 总体系（终浓度 100nmol/L）

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：20umol/L

2)固定染色拍照及统计：

72h 后弃去上下室培养基，多聚甲醛室温固定 15min，0.1%结晶紫室温染色 15min，PBS 冲洗并用棉签轻柔擦去上室细胞后晾干小室；按照使用流程打 Leica 倒置显微镜 DMi8，选择 5×物镜，调节参数并且进行白平衡后，逐个小室进行拍照，后续计数统计。结果参见图 27A 至图 27B。

实施例 28. MDM-sRNA-39 可促进乳腺癌 MCF7 细胞的凋亡

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 MCF-7 细胞, 根据细胞增长速度进行 12 孔板铺板, 12h 后进行转染, 分组为:

空白对照组 (4 孔): 每孔 200uL opti-MEM

5 阴性对照组 (NC 组)、实验组 (各 3 孔):

A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀 (终浓度 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 每孔加入 200uL 总体系

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度:

10 20umol/L

2): 凋亡检测:

48h 后收集上清和细胞, 预冷 PBS 清洗两次后, 空白对照组 4 管细胞分别加入①200uL 1×binding buffer; ②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料;

③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料; ④200uL 1×binding buffer、5uL

15 Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、

5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀后通过 300 目滤网过滤, 根据空白对照

组选择活细胞群及十字门定位后, 检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图 28。

20 **实施例 29. MDM-sRNA-39 可促进前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡**

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 PC-3 细胞, 根据细胞增长速度进行 12 孔板铺板, 12h 后进行转染, 分组为:

空白对照组 (4 孔): 每孔 200uL opti-MEM

阴性对照组 (NC 组)、实验组 (各 3 孔): 每孔体系如下

25 A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀 (终浓度 100nmol/L)

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后, 每孔加入 200uL 总体系

备注: 向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度:

20umol/L

30 2): 凋亡检测:

48h 后收集上清和细胞, 预冷 PBS 清洗两次后, 空白对照组 4 管细胞分别加入①200uL 1×binding buffer; ②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料;

③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料; ④200uL 1×binding buffer、5uL

Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、

35 5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀后通过 300 目滤网过滤, 根据空白对照

组选择活细胞群及十字门定位后, 检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图

29。

实施例 30. MDM-sRNA-163 可促进乳腺癌 MCF7 细胞的凋亡

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 MCF7 细胞，根据细胞增长速度进行 12
5 孔板铺板，12h 后进行转染，分组为：

空白对照组（4 孔）：每孔 200uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组（各 3 孔）：每孔体系如下

A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

10 C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，每孔加入 200uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：
20umol/L

2)：凋亡检测：

48h 后收集上清和细胞，预冷 PBS 清洗两次后，空白对照组 4 管细胞分别加
15 入①200uL 1×binding buffer；②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料；
③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料；④200uL 1×binding buffer、5uL
Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、
5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀后通过 300 目滤网过滤，根据空白对照
20 组选择活细胞群及十字门定位后，检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图
30。

实施例 31. MDM-sRNA-163 可促进前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡

1)取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 PC-3 细胞，根据细胞增长速度进行 12
孔板铺板，12h 后进行转染，分组为：

25 空白对照组（4 孔）：每孔 200uL opti-MEM

阴性对照组（NC 组）、实验组（各 3 孔）：每孔体系如下

A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀（终浓度 100nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静止 15min 后，每孔加入 200uL 总体系

30 备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：
20umol/L

2)：凋亡检测：

48h 后收集上清和细胞，预冷 PBS 清洗两次后，空白对照组 4 管细胞分别加
入①200uL 1×binding buffer；②200uL 1×binding buffer 及 5uL Annexin V 染料；
35 ③200uL 1×binding buffer 及 5uL PI 染料；④200uL 1×binding buffer、5uL
Annexin V 染料及 5uL PI 染料。NC 组及实验组均每管加入 200uL 1×binding buffer、
5uL Annexin V 染料及 5uL PI 染料。混匀后通过 300 目滤网过滤，根据空白对照

组选择活细胞群及十字门定位后,检测 NC 组及实验组细胞凋亡情况。结果参见图 31。

5 实施例 32. HQi-sRNA-2 在转录水平下调的基因的功能主要聚类在肿瘤、免疫等相关生物学通路

原发性肺癌小鼠模型为 $Kras^{LSL-G12D}p53^{fl/fl}$ (KP)。将小鼠称重,按照区组随机的方法,将小鼠分配到 NC 组、HQi-sRNA-2 组。NC 组为阴性对照,由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。HQi-sRNA-2 组为实验组,将 HQi-sRNA-2 构建成 sphingosine (d18:1)-HQi-sRNA-2 本草递送系统。本草递送系统
10 由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水,90℃水浴加热 15 分钟,混匀构建而成。给药 30 天后收小鼠鼠肺组织并提取总 RNA 后进行非链特异性转录组测序,使用生物信息学软件分析计算实验组与对照组的差异表达基因,并使用 metacore 数据库聚类分析差异基因主要发挥功能的生物学通路,通过可视化软件包 ggplot2 对差异基因所在通路进行可视化展示。结果参见图 32。

15

实施例 33. MDM-sRNA-39 在转录水平下调的基因的功能主要聚类在肿瘤、免疫等相关生物学通路

原发性肺癌小鼠模型为 $Kras^{LSL-G12D}p53^{fl/fl}$ (KP)。将小鼠称重,按照区组随机的方法,将小鼠分配到 NC 组、MDM-sRNA-39 组。NC 组为阴性对照,由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。MDM-sRNA-39 组为实验组,
20 将 MDM-sRNA-39 构建成 sphingosine (d18:1)-MDM-sRNA-39 本草递送系统。本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水,90℃水浴加热 15 分钟,混匀构建而成。给药 30 天后收小鼠鼠肺组织并提取总 RNA 后进行非链特异性转录组测序,使用生物信息学软件分析计算实验组与对照组的差异
25 表达基因,并使用 metacore 数据库聚类分析差异基因主要发挥功能的生物学通路,通过可视化软件包 ggplot2 对差异基因所在通路进行可视化展示。结果参见图 33。

实施例 34. MDM-sRNA-163 在转录水平下调的基因的功能主要聚类在肿瘤、免疫等相关生物学通路

原发性肺癌小鼠模型为 $Kras^{LSL-G12D}p53^{fl/fl}$ (KP)。将小鼠称重,按照区组随机的方法,将小鼠分配到 NC 组、MDM-sRNA-163 组。NC 组为阴性对照,由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。MDM-sRNA-163 组为实验组,
30 将 MDM-sRNA-163 构建成 sphingosine (d18:1)-MDM-sRNA-163 本草递送系统。本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水,90℃
35 水浴加热 15 分钟,混匀构建而成。给药 30 天后收小鼠鼠肺组织并提取总 RNA 后进行非链特异性转录组测序,使用生物信息学软件分析计算实验组与对照组的差

异表达基因，并使用 metacore 数据库聚类分析差异基因主要发挥功能的生物学通路，通过可视化软件包 ggplot2 对差异基因所在通路进行可视化展示。结果参见图 34。

5 **实施例 35. HQi-sRNA-2 可以显著下调 H460 细胞和肺癌小鼠肺组织的环氧化酶-2 (COX2) 的 mRNA 及蛋白水平**

细胞实验方法：取细胞密度为 90%以上 10cm² 皿的 H460 细胞，根据细胞增长速度进行 12 孔板铺板（2 个），12h 后进行转染，分组为：

空白对照组（4 孔）：每孔 200uL opti-MEM

10 阴性对照组（NC 组）、实验组（各 3 孔）：每孔体系如下

A. 100uL opti-MEM 和 2uL iMax 混匀 5min

B. 100uL opti-MEM 和 5uL 小 RNA 混匀（终浓度 10nmol/L）

C. 将 A 和 B 液混匀静置 15min 后，每孔加入 200uL 总体系

备注：向 2 nmol 小 RNA 干粉中加入 100 uL 无核酸酶水溶解后为储存浓度：

15 20umol/L

孵育 24h 后用 Trizo 收集细胞，并提取 RNA；另外一板孵育 48h 后用 RIPA 裂解液收集细胞，并提取蛋白质。

动物实验方法：原发性肺癌小鼠模型为 KrasLSL-G12Dp53fl/fl (KP)。

将小鼠称重，按照区组随机的方法，将小鼠分配到 NC 组、HQi-sRNA-2 组。

20 NC 组为阴性对照，由 NC-sRNA 构建成 sphingosine (d18:1)-NC-sRNA 本草递送系统。HQi-sRNA-2 组为实验组，将 HQi-sRNA-2 构建成 sphingosine (d18:1)-HQi-sRNA-2 本草递送系统。

本草递送系统由 10nmol sRNA、100ug sphingosine (d18:1)、300ul 无菌无酶水，90℃水浴加热 15 分钟，混匀构建而成。

25 每一只体重均匀的小鼠采用灌胃的给药方法，每一只小鼠 10nmol HQi-sRNA-2 mimic，每天灌胃，持续一个月。

统一取小鼠的右肺提取 RNA 和蛋白质。

30 将方法一和方法二中的 RNA，利用 RT-PCR 技术和 QPCR 技术，测量 COX-2 的 mRNA 的相对量，发现 HQi-sRNA-2 可以显著下调 H460 细胞和肺癌小鼠肺组织 COX2 的 mRNA 水平。

将方法一和方法二中的蛋白质，利用蛋白印迹技术，测量 COX-2 的蛋白质的相对量，发现 HQi-sRNA-2 可以显著下调 H460 细胞和肺癌小鼠肺组织 COX2 的蛋白质水平。结果参见图 35A 至图 35D。

35 **实施例 36. 荧光素酶报告基因实验证明 HQi-sRNA-2 可以下调环氧化酶-2 (COX2) 表达，证实 COX2 是 HQi-sRNA-2 的靶点**

通过双荧光素酶报告基因检测系统研究了本发明人从药用植物获得的 HQi-sRNA-2 对环氧化酶-2 (COX2) 的靶向作用，从而研究了其发挥降脂功效的潜能。

培养 293T 细胞，并且分别转染戴筛选的 HQi-sRNA-2 和 NC-sRNA，之后转

5 染 COX2 的双荧光素酶报告基因质粒，48h 后检测双荧光素酶活性。

与阴性对照组（NC-sRNA）相比，HQi-sRNA-2 通过与 COX2 转录本序列碱基结合，可以显著降低荧光素酶的活性。在对结合位点的碱基序列进行突变后荧光素酶活性恢复，证明这些 HQi-sRNA-2 可能通过碱基序列结合 COX2 转录本序列下调 COX2 基因表达。结果参见图 36。

10

备注：

H460 人大细胞肺癌细胞

H23 人非小细胞肺癌细胞

A549 人非小细胞肺癌细胞

15 PC3 人前列腺癌细胞

MCF7 人乳腺癌细胞

HS766T 人胰腺癌细胞

ASPC-1 人转移胰腺腺癌细胞

AGS 人胃腺癌细胞

20 PANC1 人乳腺癌细胞

BXPC3 人原位胰腺腺癌细胞

权利要求书:

1. 一种分离的核酸分子, 其包含以下序列或由以下序列组成:
- A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列;
 - B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列;
 - C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列, 优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列,
 - D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列, 或
 - E) 包含表 4 中所列出的核心序列中的任一项的核苷酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的核酸分子, 其是 RNA 分子或 DNA 分子, 优选地, 其是小 RNA 分子, 优选地, 其是长度为 18-36 核苷酸的小 RNA 分子, 优选地, 其是长度为 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 或 36 个核苷酸的小 RNA 分子。
3. 一种分离的小 RNA 分子, 其包含以下序列或由以下序列组成:
- A) 如 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列;
 - B) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;
 - C) 与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列相比具有最多 10 个核苷酸取代、缺失或添加的序列, 优选地具有 9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个、1 个核苷酸取代、缺失或添加的序列,
 - D) 在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 133 中任一者所示的核苷酸序列杂交的序列, 或
 - E) 包含表 4 中所列出的核心序列中的任一项的核苷酸序列。
4. 一种分离的小 RNA 分子, 其包含以下序列或由以下序列组成:
- A) 如 SEQ ID NO: 6、7、28 或 109 中任一项所示的核苷酸序列;
 - B) 与 SEQ ID NO: 6、7、28 或 109 中任一项所示的核苷酸序列有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列, 其靶向环氧化酶-2, 并且包含核心序列 GUUCGA; 或
 - C) 如 SEQ ID NO: 39 或 29 所示的核苷酸序列;

D) 与 SEQ ID NO: 39 或 29 所示的核苷酸序列有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列，其包含核心序列 UUGUAG；或

E) 如 SEQ ID NO: 31、4、37、41 或 44 所示的核苷酸序列；

5 F) 与 SEQ ID NO: 31、4、37、41 或 44 所示的核苷酸序列有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、96%、97%、98%、99% 序列同一性的序列，其包含核心序列 UUUGUG。

10 5. 根据权利要求 3 或 4 所述的分离的小 RNA 分子，其是单链或双链形式的小 RNA 分子。

6. 一种前体 miRNA，其可在宿主内加工成如权利要求 3-5 中任一项所述的分离的小 RNA 分子。

15 7. 一种多核苷酸，其可被宿主转录形成如权利要求 6 所述的前体 miRNA。

8. 一种表达载体，其包含权利要求 1 或 2 所述的分离的核酸分子、权利要求 3-5 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 6 所述的前体 miRNA、和/或权利要求 7 所述的多核苷酸。

20

9. 一种宿主细胞，其被权利要求 8 所述的表达载体转染。

25 10. 一种药物组合物，其包含治疗有效量的权利要求 1 或 2 所述的分离的核酸分子、权利要求 3-5 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 6 所述的前体 miRNA、权利要求 7 所述的多核苷酸、权利要求 8 所述的表达载体或权利要求 9 所述的宿主细胞，以及一种或多种药学上可接受的佐剂、赋形剂和/或稳定剂，优选地，所述药物组合物用于口服、肌肉内、静脉内、皮下、经皮、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、心室内、和/或吸入途径施用。

30 11. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述药物组合物中分离的核酸分子、分离的小 RNA 分子、前体 miRNA、多核苷酸、表达载体或宿主细胞的含量为 0.1-1000 μ M、优选为 3.0 μ M-300 μ M。

35 12. 根据权利要求 1 或 2 所述的分离的核酸分子、权利要求 3-5 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 6 所述的前体 miRNA、权利要求 7 所述的多核苷酸、权利要求 8 所述的表达载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、或权利要求 10 或 11 所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

13. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述癌症选自肺癌，优选为鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌；神经胶质瘤；消化系统肿瘤，优选为胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌；肾癌；卵巢癌；子宫癌；子宫内膜癌；前列腺癌；
5 甲状腺癌；神经母细胞瘤；脑癌；多形性成胶质细胞瘤；宫颈癌；膀胱癌；乳腺癌；头颈癌；横纹肌肉瘤；尤文氏肉瘤；骨肉瘤；软组织肉瘤；鼻腔 NK/T 细胞淋巴瘤；骨髓瘤；黑色素瘤；白血病，优选为急性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病。

10

14. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1 或 2 所述的分离的核酸分子、权利要求 3-5 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 6 所述的前体 miRNA、权利要求 7 所述的多核苷酸、权利要求 8 所述的表达载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、或权利
15 要求 10 或 11 所述的药物组合物。

15. 一种治疗基因表达异常相关疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1 或 2 所述的分离的核酸分子、权利要求 3-5 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 6 所述的前体 miRNA、权利要求 7 所述的多核苷酸、权利要求 8 所述的表达载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、或权利
20 要求 10 或 11 所述的药物组合物。

16. 一种抑制基因表达和/或活性的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1 或 2 所述的分离的核酸分子、权利要求 3-5 中任一项所述的分离的小 RNA 分子、权利要求 6 所述的前体 miRNA、权利要求 7 所述的多核苷酸、权利要求 8 所述的表达载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、或权利
25 要求 10 或 11 所述的药物组合物。

30