



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110215517 A

(43)申请公布日 2019.09.10

(21)申请号 201910292845.5

(22)申请日 2019.04.12

(71)申请人 温州医科大学

地址 325000 浙江省温州市瓯海经济开发区
东方南路38号006信箱

(72)发明人 许可 郑绿珍 王清清 徐家科

(74)专利代理机构 温州金瓯专利事务所(普通合伙)
33237

代理人 林益建

(51)Int.Cl.

A61K 45/00(2006.01)

A61K 31/7024(2006.01)

A61P 19/10(2006.01)

A61K 36/23(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页 附图10页

(54)发明名称

信号通路信号抑制剂或蛋白合成抑制剂或
羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用

(57)摘要

一种信号通路信号抑制剂或蛋白合成抑制剂或羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用,羟基积雪草苷可通过NF- κ B,钙/钙调素依赖性激酶和MAPK三条信号转导通路抑制破骨细胞发挥作用所需的关键蛋白——NFATc1的表达,并最终抑制RANKL诱导的破骨细胞生成,本发明首次描述和证实羟基积雪草苷对雌激素缺乏导致的骨质疏松具有令人满意的疗效,提示从中草药中提取的天然化合物羟基积雪草苷在预防和治疗骨质疏松中具有良好的应用前景,为骨质疏松的治疗提供新的选择和药物研发思路。

Genes	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Tm (°C)
Nfatc1	GGAGAGTCGAGAATCGAGAT	TTGCAGCTAGGAAGTACGTCT	60
C-Fos	GCGAGCAACTGAGAAGAC	TTGAAACCGAGAATCATC	60
Acp5	TGTGGCCATCTTATGCT	GTCAITTTCTTGGGGCTT	59
V-Atase-d2	AGCAGACTACCTGAGTTTGAACC	GCTGCATCTGAAGAATGCGGTG	60
Hprt	GTTGGGCTTACCTCACTGCT	TAATCAGACGCTGGGACTG	60

1. NF- κ B, 钙/钙调素依赖性激酶或MAPK三条信号转导通路中的其中一条信号转导通路或同时多条信号转导通路的信号抑制剂在制备治疗骨质疏松药物上的应用。

2. 蛋白NFATc1合成抑制剂在制备治疗骨质疏松药物上的应用。

3. 羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用。

4. 根据权利要求3所述的羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用, 其特征在于, 所述的羟基积雪草苷为从中草药积雪草中提取的天然成分。

5. 根据权利要求3所述的羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用, 其特征在于, 所述的治疗骨质疏松药物中羟基积雪草苷的有效浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 。

信号通路信号抑制剂或蛋白合成抑制剂或羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及骨质疏松药物技术领域,特别涉及一种信号通路信号抑制剂或蛋白合成抑制剂或羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松(Osteoporosis)是一种以骨量减少,骨组织显微结构退化,骨脆性增加为特征的全身代谢性骨病,多见于绝经后女性和老年男性。目前,我国60岁以上人口已超过2.1亿(约占总人口的15.5%),65岁以上人口近1.4亿(约占总人口10.1%),是世界上老年人口绝对数最大的国家,且根据人口结构预测及人均寿命的延长,未来老年人口数将进一步增加。作为一种与增龄相关的骨骼疾病,我国50岁以上人群骨质疏松症患病率女性为20.7%,男性为14.4%;60岁以上人群骨质疏松症患病率明显增高,女性尤为突出。骨质疏松症患者骨量下降,骨折风险增加。据估计,2015年我国骨质疏松性骨折(腕部、椎体和髋部)约269万例次,2035年约为483万例次,到2050年约达599万例次,女性一生发生骨质疏松性骨折的危险性(40%)高于乳腺癌、子宫内膜癌和卵巢癌的总和,男性一生发生骨质疏松性骨折的危险性(13%)高于前列腺癌。且骨质疏松骨折危害巨大,是老年患者致残和致死的主要原因之一,其危害不亚于癌症。

[0003] 骨质疏松症的发病机制目前尚未完全探明,涉及遗传、环境、激素等方面。但目前认为成骨细胞的凋亡增加及破骨细胞的活化是其最终通路。目前对于骨质疏松症的临床治疗药物,主要包括四大类,骨吸收抑制剂、骨形成促进剂、中药及其他机制类药物。其中应用最广泛的药物有双膦酸盐、降钙素、雌激素等。然而双膦酸盐类药物胃肠道副作用较大、具有肾脏毒性,老年患者难以耐受;降钙素长期使用会增加潜在患肿瘤的风险;雌激素主要用于绝经后妇女骨质疏松症患者,但其副反应较大,会增加女性患子宫内膜癌、乳腺癌及心血管疾病的风险。因此,寻找一种副作用小、适合长期使用的抗骨质疏松药物十分必要。

[0004] 羟基积雪草苷(Madecassoside,MA),是一种从积雪草中分离的五环三萜皂苷类物质,具有抗炎抗氧化等多种生物活性。MA可显著减轻心肌缺血,再灌注损伤和脂质过氧化。

发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种信号通路信号抑制剂或蛋白合成抑制剂或羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用,希望通过对羟基积雪草苷在骨质疏松中的治疗作用研究,开拓其作为中药提取物的应用范围,为临床治疗骨质疏松提供新的方向,也为中药物质的临床应用带来新的生机。

[0006] 本发明采用的技术解决方案是: NF- κ B, 钙/钙调素依赖性激酶或MAPK三条信号转导通路中的其中一条信号转导通路或同时多条信号转导通路的信号抑制剂在制备治疗骨质疏松药物上的应用。

[0007] 蛋白NFATc1合成抑制剂在制备治疗骨质疏松药物上的应用。

- [0008] 羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用。
- [0009] 所述的羟基积雪草苷为从中草药积雪草中提取的天然成分。
- [0010] 所述的治疗骨质疏松药物中羟基积雪草苷的有效浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 。
- [0011] 本发明的有益效果是：本发明提供了一种信号通路信号抑制剂或蛋白合成抑制剂或羟基积雪草苷在制备治疗骨质疏松药物上的应用，羟基积雪草苷可通过NF- κ B，钙/钙调素依赖性激酶和MAPK三条信号转导通路抑制破骨细胞发挥作用所需的关键蛋白——NFATc1的表达，并最终抑制RANKL诱导的破骨细胞生成，本发明首次描述和证实羟基积雪草苷对雌激素缺乏导致的骨质疏松具有令人满意的疗效，提示从中草药中提取的天然化合物羟基积雪草苷在预防和治疗骨质疏松中具有良好的应用前景，为骨质疏松的治疗提供新的选择和药物研发思路。

附图说明

- [0012] 图1为本发明qRT-PCR中使用的引物序列。
- [0013] 图2为本发明中草药筛选步骤示意图。
- [0014] 图3为本发明中草药提取物对破骨细胞增殖分化的影响筛选结果。
- [0015] 图4为本发明A以剂量依赖性方式抑制RANKL诱导的破骨细胞形成。其中(A)用不同浓度梯度的MA处理BMMs后得到的OC的代表性图像(放大倍数= $100\times$)。(B)定量分析每孔(96孔板)的TRAcP+多核细胞(> 3个细胞核)的数量。(C)通过MTS测定法测量指定浓度的MA对BMMs的影响。(D)对F-actin和细胞核染色的OC的代表性共聚焦图像；图像包括未处理的OC和用 $5\mu\text{mol/L}$ 和 $10\mu\text{mol/L}$ MA处理的OC。比例尺= $200\mu\text{m}$ 。(E-F)单位区域的平均破骨细胞数量和单位细胞中的平均核数。数据表示为平均值 \pm SD；与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，和*** $P < 0.001$ 。
- [0016] 图5为本发明MA在分化早期阶段抑制RANKL诱导的破骨细胞生成。图(A-B)在指定时间用 $10\mu\text{mol/L}$ MA处理的经TRAcP染色的破骨细胞的代表性图像(放大倍数= $40\times$)。(C)定量分析在不同时间段用MA处理的经TRAcP染色的破骨细胞(> 3个细胞核)数量。数据表示为平均值 \pm SD；相对于RANKL诱导的对照，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 和*** $P < 0.001$ 。
- [0017] 图6为本发明MA抑制破骨细胞骨吸收活动。其中(A)在存在或不存在 $10\mu\text{mol/L}$ MA(放大倍数= $40\times$)的情况下，羟基磷灰石涂覆的板上侵蚀区域和对应TRAcP染色细胞的代表性图像。(B)每个孔(96孔板)中TRAcP阳性细胞的定量分析。(C)用指定浓度的MA处理后，每个破骨细胞的再吸收面积百分比。数据表示为平均值 \pm SD；相对于RANKL诱导的对照，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 和*** $P < 0.001$ 。
- [0018] 图7为本发明MA阻断破骨细胞特异性基因表达。其中(A) NFATc1，(B) c-Fos，(C) ATP酶和(D) Acp5将基因表达水平标准化以Hprt表达作为标准。数据表示为平均值 \pm SD；相对于RANKL诱导的对照，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 和*** $P < 0.001$ 。
- [0019] 图8为本发明MA抑制NFATc1活性和下游蛋白表达。其中(A)条形图描绘了用NFATc1荧光素酶报告基因转染的RAW264.7细胞的NFATc1荧光素酶活性。用不同浓度的MA处理细胞，并用GST-rRANKL(50ng/mL)刺激24h。(B)分别测定MA处理组和对照组中的BMMs在第0天，第1天，第3天和第5天中NFATc1，c-Fos，ATP酶，CTSK，integrin $\beta 3$ 的表达情况。(C-G)分析MA处理组和对照组之间蛋白质表达差异的统计学显著性。以 β -actin的表达作为标准，对

上述蛋白的表达进行标准化。数据代表平均值±SD。治疗组和对照组之间的显著差异表示为* P <0.05,** P <0.01,和*** P <0.001。

[0020] 图9为本发明在破骨细胞生成过程中,MA抑制NF-κB的活化和钙振荡。其中(A) Western Blot代表性图像,反映了以β-肌动蛋白作标准化的IκB-α的表达水平。(B) MA (10μmol/L)处理后IκB-α表达倍数变化的定量分析。(C) 条形图描绘了用NF-κB荧光素酶报告基因转染的RAW264.7细胞的NF-κB荧光素酶活性。(D) 在没有RANKL刺激情况下Ca2+振荡模式的代表性图像(仅M-CSF)。(E) 由RANKL刺激下的Ca2+振荡模式的代表性图像。(F) MA (10μmol/L)+ RANKL刺激下的Ca2+振荡模式的代表性图像。(G) 定量分析每组中Ca2+振荡的荧光强度的幅度。每幅图像中具有不同颜色的线代表三次独立实验的结果。图中的数据代表平均值±SD。治疗组和对照组之间的显著差异表示为* P <0.05,** P <0.01,和*** P <0.001。

[0021] 图10为本发明MA抑制RANKL诱导的MAPK信号通路。其中(A) 分别测定MA处理组和对照组在处理开始0,10,20,30,60 min时p-JNK1/2,JNK,p-ERK1/2,p-p38,p38,ERK和β-肌动蛋白的代表性Western Blot图像。(B-F) 定量测定以上各组磷酸化蛋白与未磷酸化蛋白的相对比例。图中的数据代表平均值±SD。治疗组和对照组之间的显著差异表示为* P <0.05,** P <0.01,和*** P <0.001。

[0022] 图11为本发明MA可改善OVX诱导的系统性骨质流失。其中(A) 通过高分辨率μCT捕获并通过3D计算机重建处理的股骨结构。(B-E) Sham,OVX和OVX + MA(10 mg)三组中骨微结构相关参数的定量测量,包括BV/TV,Tb.N,Tb.Th和Tb.Sp./kg。图中的数据代表平均值±SD。治疗组和对照组之间的显著差异表示为* P <0.05,** P <0.01,*** P <0.001。

[0023] 图12为本发明MA通过抑制破骨细胞活性来预防OVX诱导的骨质流失。其中(A) 来自sham组小鼠,OVX小鼠和用10mg/kg MA处理的OVX小鼠的H&E和TRAcP染色的脱钙骨的代表性图像。比例尺= 500mm; 比例尺= 200mm。(B) 骨体积/总体积(BV/TV),破骨细胞表面/骨表面(Oc.S/BS)和破骨细胞数/骨表面(N.Oc/BS)的定量分析。* P <0.05和** P <0.01。

具体实施方式

[0024] 为了更清楚地说明本发明内容,用具体实施例说明如下,具体实施例不限定本发明内容范围。

[0025] 材料和方法

材料

主要抗体

一抗:

NFATc1,兔单克隆IgG	Santa Cruz公司
Integrin β3,兔单克隆IgG	Santa Cruz公司
Cathepsin K,鼠单克隆IgG	Santa Cruz公司
V-ATPase-d2,兔单克隆IgG	Santa Cruz公司
IκB-α,兔单克隆IgG	Santa Cruz公司
pERK1/2,鼠单克隆IgG	Santa Cruz公司
ERK1/2,兔单克隆IgG	Santa Cruz公司

β -actin, 鼠单克隆IgG	Santa Cruz公司
c-Fos, 兔单克隆IgG	Cell Signaling Technology公司
pJNK1/2, 兔单克隆IgG	Cell Signaling Technology公司
JNK1/2, 鼠单克隆IgG	Cell Signaling Technology公司
p-p38, 兔单克隆IgG	Cell Signaling Technology公司
p38, 兔单克隆IgG	Cell Signaling Technology公司

二抗:

568, 647驴抗鼠/兔	Ab cam公司
488羊抗鼠/兔	Ab cam公司
羊抗兔IgG—HRP	Santa cruz公司
羊抗鼠IgG—HRP	Santa cruz公司

主要试剂与药品

羟基积雪草苷(100mmol/L)	中国食品药品检定研究院
甲酰胺	北京鼎国生物技术有限公司
多聚赖氨酸	武汉博士德生物工程有限公司
5X SDS蛋白上样缓冲液	碧云天生物技术研究
BCA蛋白测定试剂盒	碧云天生物技术研究
Western及IP细胞裂解液	碧云天生物技术研究
PMSF	碧云天生物技术研究
水合氯醛	上海顺强生物科技有限公司
头孢唑林钠	汕头金石粉针剂有限公司
0.9%生理盐水	山东鲁抗辰欣药业有限公司
二甲苯	无锡市佳妮化工有限公司
无水酒精	杭州萧山试剂厂
甲醇	杭州萧山试剂厂
中性树脂	国药集团化学试剂有限公司
多聚甲醛	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸缓冲溶液	北京中桔金桥生物技术有限公司
0.1M PBS	Solarbio公司
Tris碱	Bio-Rad公司
甘氨酸	Bio-Rad公司
双抗(链霉素/青霉素)溶液	Thermo公司
α -MEM培养基	Thermo公司
胎牛血清	Thermo公司
DMSO	上海浩然生物有限公司
胰蛋白酶	吉诺生物医药有限公司
MTS溶液	Thermo公司
TRIzol	Thermo公司
罗丹明偶联的鬼笔环肽	Thermo公司

Oligo-dT引物	Imgenex公司
SYBR Green	Imgenex公司
HANKS	Sigma-Aldrich
TRAcP染色液	自制
Fluo-4M染色液	Sigma-Aldrich
M-CSF	自制
GST-rRANKL	自制

主要仪器

Bio-Rad低温台式高速离心机	Bio-Rad公司
Bio-Rad酶标仪	Bio-Rad公司
ChemiDoc TMXRS+凝胶成像仪器	Bio-Rad公司
电子分析天平	Bio-Rad公司
电热恒温水浴箱	上海森信实验有限公司
电热恒温干燥箱	上海博迁实业有限公司
水平摇床	上海琪特分析仪器有限公司
正置荧光显微镜	Nikon公司
倒置荧光显微镜	Nikon公司
超低温冰箱(-80℃)	Thermo公司
包埋机	Thermo公司
病理切片机	Feicel公司
Direct-Q3型超纯水仪	Millipore公司
常规手术器械	上海医疗器械有限公司
微量移液枪	Eppendorf公司
细胞培养箱	Thermo公司
超净台	Thermo公司
Skyscan 1176 micro-CT	比利时Skyscan公司

破骨细胞培养及药物筛选

细胞培养

我们从10周龄的C57BL/6型小鼠长骨骨髓中提取骨髓单核细胞。并在含有10% (v/v) FBS、1% (v/v) P/S和50 ng/mL M-CSF的 α -MEM完全培养液中培养。将培养基放置于含5%CO₂ 37℃培养箱中,每隔2天更换一次新鲜培养液,3天传代1次。

[0026] 药物筛选

(1)将状态良好的经培养的骨髓单核细胞(破骨细胞前体)经胰蛋白酶消化后,以 5×10^3 细胞/ml/孔的浓度接种到预先加好 α -MEM完全培养液的96孔板中,于5%CO₂ 37℃培养箱中放置过夜,待其贴壁。

[0027] (2)加入GST-rRANKL (50 ng/mL)以刺激细胞。

[0028] (3)加入10 μ mol L⁻¹不同的天然化合物来筛选有效药物,分别为:Madecassoside, Shikonin, Gentiopicroside, Stachydrine, hydrochloride, Calceolarioside B, Dicoumarol, Alantolactone。

[0029] (4) 每2天更换一次完全培养基,同时加入新鲜的GST-rRANKL和上述天然化合物,直至第6天形成破骨细胞。

[0030] (5) 将细胞用2.5%戊二醛固定15min并用TRAcP溶液染色。

[0031] (6) 将胞内含有三个以上细胞核的TRAcP阳性多核细胞作为成熟破骨细胞并计数,用单位孔中破骨细胞数目来评估天然化合物对破骨细胞生长分化的抑制效果。

[0032] 羟基积雪草苷细胞毒性测定

1. 同上述,将骨髓单核细胞以 5×10^3 细胞/ml/孔的浓度接种到预先加好 α -MEM完全培养液的96孔板中,于37℃恒温培养箱中放置过夜,待其贴壁,之后加药处理。

[0033] 2. 往各孔中加入不同浓度的羟基积雪草苷,浓度依次为:0,1 μ mol/L,2.5 μ mol/L,5 μ mol/L,10 μ mol/L。

[0034] 3. 将96孔板置于37℃恒温培养箱培养5天。

[0035] 4. 往每个孔加入MTS溶液20 μ l,孵化2h。

[0036] 5. 用490nm扫描光谱测定细胞存活率。

[0037] 细胞免疫荧光染色

1. 同上述,将骨髓单核细胞以 5×10^3 细胞/ml/孔的浓度接种到预先加入 α -MEM完全培养液的96孔板中,于37℃恒温培养箱中放置过夜,待其贴壁。

[0038] 2. 向每孔中加入GST-rRANKL (50 ng/mL),并加药处理,共培养6天。

[0039] 1) 阴性对照组(Control):不做任何处理

2) A1:加入MA (5 μ mol/L)

3) A2:加入MA (10 μ mol/L)

3. 弃培养液,PBS洗涤后,每孔加入4%多聚甲醛20 μ l,37℃静置10min。

[0040] 4. PBS洗涤3次,每次5min。

[0041] 5. 封闭:每孔加入5%胎牛血清,37℃静置20min。

[0042] 6. PBS洗涤3次,每次5min。

[0043] 7. 加入罗丹明标记的鬼笔环肽(Thermo Fisher Scientific),37℃静置45min

8. PBS洗涤3次,每次5min。

[0044] 9. 往每孔滴加DAPI覆盖玻片,避光静置5min。

[0045] 10. 滴加抗荧光猝灭剂,进行封片,使用共聚焦荧光显微镜以100 \times 放大倍数进行观察。

[0046] 实时荧光定量PCR

1. 将骨髓单核细胞以每孔 5×10^3 个细胞的浓度接种到6孔板中培养5天,培养液含GST-rRANKL (50 ng/mL) 和 M-CSF (50 ng/mL) 以及不同浓度的羟基积雪草苷,浓度分别为:0,5 μ mol/L,10 μ mol/L,每隔2天更换一次培养液。

[0047] 2. 弃培养液,PBS洗涤2次后,向每孔加入1ml TRIzol提取细胞中的RNA。

[0048] 3. 使用oligo-dT引物,将RNA逆转录后,得到cDNA。

[0049] 4. 将得到的cDNA,用SYBR Green进行实时PCR,特异性引物见图1,将表达水平标准化为Hmbs的表达,使用Livak方程确定倍数变化,并计算与载体组相比的比率。

[0050] 羟基磷灰石吸附试验

羟基磷灰石吸收试验用于检测诱导的破骨细胞的功能。

- [0051] 1. 将BMMs细胞首先接种于6孔胶原蛋白涂层板,每孔含 1.5×10^5 个细胞。
- [0052] 2. 用M-CSF (50 ng/ml) 和GST-rRANKL (100 ng/ml) 刺激。
- [0053] 3. 待出现破骨细胞融合现象时,刮刀轻轻刮起细胞,制成悬液并离心收集细胞,并将相等数量的细胞转移到羟基磷灰石包被的6孔板中。
- [0054] 4. 在存在或不存在MA (5 μ M或10 μ M) 的情况下,破骨细胞在具有GST-rRANKL (50 ng/ml) 和M-CSF (50 ng/ml) 的完全培养基中培养至成熟。
- [0055] 5. 培养2-3天后,将每孔的细胞分成两组:一组用于TRAcP染色计数每个孔中的多核细胞的数量;另一组将孔板漂洗10分钟后,通过光学显微镜观察各组骨吸收面积,并通过ImageJ软件分析以计算各组骨吸收面积的百分比。

[0056] 荧光素酶报告基因测定

用两种荧光素酶报告基因构建体 (p-NF- κ B-TA-Luc和p-NFAT-TA-Luc) 稳定转染RAW264.7细胞,使其分别表达NF- κ B和NFATc1。

- [0057] 1. 将等数量转染的RAW264.7细胞接种到48孔板中,每孔 1.5×10^5 个细胞,贴壁过夜后,加不同浓度的MA (1, 2.5, 5和10 μ M) 预处理1h。
- [0058] 2. 用50 ng/ml GST-rRANKL刺激细胞6小时 (用于测量NF- κ B) 或24h (用于测量NFAT)。
- [0059] 3. 加细胞裂解液裂解细胞,将刮下的裂解物转移到EP管中,12000r/min 离心10min,用于荧光素酶活性分析。
- [0060] 4. 按照Promega双荧光素酶试剂盒说明书进行实验。
- [0061] 5. 用BMG Polar Star Optima发光读数器进行荧光素酶检测。

[0062] Western Blot检测

[0063] 为了测定骨吸收相关蛋白及NFATc1信号通路的表达,将BMMs细胞接种到 6孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,予以GST-rRANKL (50ng/ml) 刺激和MA (10 μ M) 干预,每隔1天更换培养液,持续培养5天。并于0,1,3和5天提取细胞总蛋白,具体为:向6孔板中的每孔细胞加入70 μ L RIPA细胞裂解缓冲液,冰上放置15min,使用细胞刮刀刮下,并将刮下的液体转移至EP管内,4 $^{\circ}$ C,12000r/min离心15min,进行Western Blot检测。对于研究短时间点信号传导途径,将BMMs细胞接种到6孔板中, 5×10^5 个细胞/孔,并在含50 ng/ml M-CSF完全培养基中孵育过夜。第2天,将细胞饥饿处理4h后,用MA 预处理2h。之后,向孔中加入50ng/ml GST-rRANKL刺激,并在0,10,20, 30和60分钟的时间点通过RIPA细胞裂解液裂解提取细胞总蛋白。

WB的具体步骤:

1. 蛋白提取后使用BCA法测定蛋白浓度,细胞上样量为50 μ g,按1体积 5X Loading buffer,4体积的样品,混匀,在沸水中煮10min,分装,上样。

[0064] 2. 配胶:10%的分离胶 (1.9ml去离子水,1.7ml 30%丙烯酰胺,1.3mlTris-HCl (pH8.8),0.05ml AP,0.001ml TEMED),4%浓缩胶 (5ml,3ml去离子水,0.66ml30%丙烯酰胺,1.3mlTris-HCl (pH6.8),0.05ml AP,0.001ml TEMED)。

[0065] 3. 电泳:在90V电压下电泳大约15min,使浓缩胶上蛋白样品呈一条直线,然后转换至120V电压下电泳大约80min至电泳完成。

[0066] 4. 转膜:300mA电流下转膜90min。提前将海绵、滤纸等放入转膜液中浸润,PVDF膜

使用甲醇激活。转膜时电泳槽放置于含有冰水混合物水盆中,避免转膜液温度过高。

[0067] 5.封闭:5%脱脂牛奶封闭,置于摇床上90min。

[0068] 6.孵育一抗:将膜在4℃下与以下一抗孵育过夜(一抗使用0.05%TBST稀释): NFATc1(1:1000),c-Fos(1:2000),Integrin β 3(1:1000),CTSK(1:2000),V-ATPase-d2(1:1000),I κ B- α (1:1000),pERK1/2(1:1000),ERK1/2(1:1000),pJNK1/2(1:1000),JNK1/2(1:2000),p-p38(1:1000),p38(1:1000)和 β -actin(1:3000)。

[0069] 7.孵育二抗:次日,将膜与相应二抗孵育1h(二抗使用0.05%TBST稀释,浓度为1:1000),用0.1%TBST洗涤3次,每次各5min。

[0070] 8.曝光:取ECL化学发光液(A、B液按1:1比例混合),将洗涤后的蛋白条带放置于平皿中,在蛋白条带上滴加混合后的发光液,均匀滴于蛋白条带上有蛋白的一面,待发光液充分浸润后,放置30s,曝光、显影、成像(使用Image quant LAS 4000仪器进行曝光)。

[0071] 9.图像及数据处理:运用Quantity One 4.6.2凝胶图像分析系统对结果进行光密度扫描分析。

[0072] Ca^{2+} 振荡测量

1.将BMMs细胞接种至48孔板中, 3×10^4 个细胞/孔。

[0073] 2.将细胞分成三组:

1)治疗组:GST-rRANKL(50 ng/ml)+ M-CSF(50 ng/ml)+ MA(10 μ M)

2)阳性对照组:RANKL(50 ng/ml)+ M-CSF(50 ng/ml)

3)对照组:M-CSF(50 ng/ml)

3.培养24h后,使用Assay缓冲液(1mM丙磺舒和2%FCS溶解于HANKS缓冲液)洗涤细胞2次,并滴加Fluo-4M染色溶液,37℃避光孵育45min。

[0074] 4.再次使用Assay缓冲液冲洗细胞,去除染色溶液后,室温下避光孵育20min。

[0075] 5.通过倒置荧光显微镜在荧光(488nm的激发波长)下观察荧光强度。

[0076] 6.每2s采集一次细胞荧光,共采集4min。将至少具有两次振荡的细胞计数为振荡细胞。通过Nikon 基础研究软件分析每个振荡细胞的平均振幅。

[0077] 鼠卵巢切除术(OVX)模型制作

1.实验动物分组

雌性C57BL/6小鼠(10周,n = 30)由中国科学院动物中心(中国上海)提供。饲养于本校动物实验中心SPF级别动物房的个体通气笼(IVC)中,每笼5只小鼠,室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度55%左右,控制12小时白天、12小时晚上的光照,自由摄食饮水,饲养观察一周后,将能正常进食、饮水小鼠纳入实验用鼠。随机分为三组:假手术组(n = 10),OVX组(n = 10)和OVX + MA组(n = 10)(MA 10mg/kg)。

[0078] 2.实验动物双侧卵巢切除构建骨质疏松模型

[0079] 小鼠用4%水合氯醛(1ml/100g)腹腔注射麻醉后,使用动物电动剃毛器剃毛,取俯卧位,碘伏消毒,以小鼠两侧后肢大腿根部上缘连线上0.5cm与背部后正中中线交点为中心,沿背部后正中中线作一长约0.5-1.0cm的皮肤切口,沿皮下组织分别向左右游离手术切口皮肤,先将皮肤切口向左侧水平切开约0.5cm,透过菲薄的肌层,在切口视野中可见一乳白色发亮的脂肪团,紧靠肾脏下极,是寻找卵巢重要的解剖标志。用镊子提起脂肪团表面的肌层,沿腰大肌外侧缘用眼科剪作一长约0.5cm的纵行切口剪开肌层,,在该脂肪团中即可找

到小鼠左侧粉红色卵巢。在输卵管和卵巢的连接狭窄处切除卵巢,使用5/0可吸收丝线缝合,同法可切除小鼠右侧卵巢,最后用5/0可吸收丝线缝合皮肤,并用碘伏消毒。

[0080] 手术后7天,OVX+MA组腹腔内注射MA (10mg/kg),假手术组和OVX 组腹腔内注射同等剂量的PBS溶液,每2天腹腔注射一次,共6周。然后,将小鼠全部颈椎脱臼法处死,取出股骨进行组织学实验和micro-CT扫描。

Micro-CT扫描

将股骨样品用4%多聚甲醛固定24h,并通过Skyscan 1176micro-CT仪器对股骨远端进行扫描,获得股骨远端骨结构数据,并进行3D重建,观察骨量大小。图像在X光电压50-kV,电流500 μ A,9 μ mol/L大小的各向同性像素尺寸(1600 \times 2672像素图像矩阵)和一个用于射束硬化的0.5mm厚的铝过滤器的条件下获取。使用NRecon Reconstruction软件重建图像。之后,使用 DATAVIEWER和CTVox软件程序,测量生长板下0.5mm处1mm厚的层面中进行进一步的定性和定量分析。通过CTAn软件分析其骨小梁相关参数,包括骨小梁体积比(BV/TV),骨小梁数目(TB.N),骨小梁厚度(Tb.Th)和骨小梁之间的间隙(Tb.Sp)。

[0081] 组织学和组织形态学分析

将右股骨样品在4%多聚甲醛中固定48h,后使用14%乙二胺四乙酸(EDTA)在37 $^{\circ}$ C脱钙10天。脱钙后,将样品用石蜡进行包埋。将蜡块置于石蜡切片机上,进行连续5 μ m厚的切片(矢状平面上切割)。采用苏木精和伊红(HE)染色和TRAcP染色等方法,评价各组骨组织显微结构的改变,以及药物作用后目标区域骨小梁周围破骨细胞数目及活性的改变,评价参数包括破骨细胞表面骨表面比(Oc.S/BS)和破骨细胞数骨表面比(N.Oc/BS)等。

[0082] 1. HE染色

[0083] 首先将切片置于60 $^{\circ}$ C烤箱烘片30min,后将切片浸入二甲苯脱蜡 7min,再浸入新鲜二甲苯脱蜡7min。再以100%、95%、85%、75%梯度乙醇水化。蒸馏水浸泡2min。擦干,用苏木素染色液染色7min。用自来水冲洗 10min洗去多余的染色液。伊红染色液染色5min后,用蒸馏水漂洗3-5s。再用75%、85%、95%、100%乙醇各脱水2min。二甲苯透明5min。再更换新鲜二甲苯透明5min,中性树胶封片。

2. TRAcP染色

首先将切片置于60 $^{\circ}$ C烤箱烘片30min,接着切片浸入二甲苯脱蜡 15min,再浸入新鲜二甲苯脱蜡15min。PBS浸泡3次,每次5min。滴加 TRAcP染色液,37 $^{\circ}$ C避光孵育1h。纯水冲洗,苏木素复染2min,再用自来水冲洗数分钟,直至出现蓝色细胞核。封片,显微镜观察。

[0084] 统计学处理

利用SPSS17.0软件进行数据统计分析,采用均值 \pm 标准差(Mean \pm S.D)表示。通过t检验确定两组之间差异的显著性。单因素方差分析,当数据符合正态分布,采用t检验分析组间差异;当数据不符合时,采用Kruskal-Wallis检验方法分析组间差异。进行双因素方差分析,以检查时间和不同治疗组的影响。当P<0.05时,具有统计学差异。

[0085] 结果分析

MA以剂量依赖性方式抑制RANKL诱导的破骨细胞形成

团队从1000多种中草药提取物中根据是否具有抗炎作用筛选得到205种药物,进而评估它们在10 μ mol/L的浓度下对RANKL诱导破骨细胞形成的抑制作用。使用MTS评估这些天然化合物的细胞毒性,以排除具有细胞毒性的药物。据图3可以看出,MA在10 μ mol/L的浓度下

显著抑制破骨细胞形成,而大多数其他化合物对抑制破骨细胞生成没有影响。

[0086] 由图4C可以看出,加入不同浓度的MA后,BMMs的数量相对于对照组并未下降。这表明MA对破骨细胞形成的抑制作用并不是通过对破骨细胞前体BMM细胞的毒性作用造成的,反之,MA可能是通过对破骨细胞分化增殖的抑制作用引起破骨细胞的数目下降。接下来,为了检查MA的抑制作用是否具有剂量依赖性的,在50ng/mL RANKL存在下用不同浓度梯度的MA (1至10 μ mol/L) 处理BMMs 5天,并用TRAcP缓冲液染色来观察OC的形成。从图4 A&B可以观察到TRAcP阳性细胞的数目减少,呈剂量依赖性。当MA的浓度高于2.5 μ mol/L 时,细胞数目减少显著。此外,OC核融合也是OC成熟的重要步骤。为了进一步测试MA对OC核融合的影响,我们对细胞骨架和细胞核进行免疫荧光染色以观察每个破骨细胞的细胞核数。图4的D-F显示在MA的浓度为5 μ mol/L和10 μ mol/L的情况下,OC的平均面积和细胞核数显著减少,这些结果也与图4A中TRAcP染色获得的结果一致。

[0087] 基于这些结果,我们通过进一步实验以确定MA的抑制作用在何时开始起作用。如图5A-C所示,BMMs用MA处理几个不同的时间段(1-3,3-5,5-6和1-6天)。当MA作用于第1-3天或第3-5天时,TRAcP阳性细胞显著减少,而当作用于第5-6天时,效应减弱,表明MA在早期和中期阶段起抑制作用。总之,我们的研究结果表明,MA在整个过程中抑制了RANKL诱导的破骨细胞形成,表现出剂量依赖性且主要在早期与中期发挥作用。

[0088] MA抑制破骨细胞的骨吸收活性

MA除了能够抑制破骨细胞的形成,我们还通过羟基磷灰石吸附实验进一步研究MA减弱破骨细胞骨吸收功能的作用。将成熟的破骨细胞用MA (5 μ M或10 μ M) 处理2天,测量每孔的破骨细胞数量和再吸收面积百分比。如图6所示,尽管能在MA治疗组中观察到较小尺寸的破骨细胞,但是每个孔中的破骨细胞数量在所有组中没有显示出明显差异,这与上述MA主要在早期和中期阶段抑制破骨细胞生成的结论一致。然而,羟基磷灰石吸收面积随着药物浓度的增加而减少,尤其是在10 μ M时,这表明MA除了抑制破骨细胞形成外还可以减弱成熟破骨细胞的骨吸收能力。

[0089] MA抑制与RANKL诱导的OC形成和功能相关的基因的表达

[0090] 接下来,通过qRT-PCR,对在RANKL诱导的破骨细胞形成和功能中起重要作用的各种关键基因如,Acp5,ATP酶,(NFATc1和c-Fos) 的表达情况进行测定。图7显示,在用RANKL (50ng/mL) 刺激5天后,这些破骨细胞形成和功能相关基因的表达水平显著增加。然而,经过MA (10 μ mol/L) 处理后,两种破骨细胞形成的关键调节基因,NFATc1和c-fos,和破骨细胞功能相关的基因,(Acp5和ATP酶) 在MA (10 μ mol/L) 的作用下显著下调。如上所述,这些结果均证实了MA对RANKL诱导破骨细胞的形成和溶骨功能具有抑制作用。

[0091] MA抑制NFATc1的活性及其下游蛋白的表达

[0092] 为了完整、详细地研究MA在调节破骨细胞NFATc1的活性及其下游蛋白表达中的作用的机制,我们选择荧光素酶报告基因测定和蛋白质印迹来检测 NFATc1的活性及其下游蛋白质表达。如图8A中所示,在5 μ M和10 μ M的浓度下,MA能显著减弱NFATc1的活性。此外,MA能明显抑制NFATc1蛋白的表达,但其在RANKL刺激后的第3天显著上升(如图8B&C)。AP-1是细胞内的一个转录激活因子,作为NFATc1调节剂,其组成之一c-Fos的表达也在相同时间点被MA抑制(图8B&D)。与此同时,我们检测了与破骨细胞骨吸收活性相关的下游蛋白质的表达水平,例如ATP酶、integrin integrin β 3和CTSK,它们也在MA处理3-5天后出现表达水平

的下降(如图8B&E-G)。总之,这些实验结果表明MA能显著抑制转录调节因子NFATc1和c-Fos的活性,而这些转录因子在破骨细胞分化过程中是必不可少的,因此也抑制了下游破骨细胞功能特异性基因和蛋白质的表达。

[0093] MA抑制NF- κ B的活化和钙振荡

[0094] 转录调节因子NFATc1在破骨细胞分化中扮演着关键的作用。为了能详细地理解NFATc1调节和激活的分子机制,我们通过荧光素酶测定、蛋白质印迹和钙振荡实验来检测NF- κ B和Ca²⁺信号通路。I κ B是一种与NF- κ B活化相关的主要信号分子。正如图9A和B所示,与仅用RANKL刺激的对照组相比,用MA处理20-30min后,能明显抑制I κ B的降解。此外,如图9C所示的结果表明,通过RANKL刺激后,NF- κ B活化明显增加,而当MA浓度高于5 μ M时,MA抑制NF- κ B活化的作用呈浓度依赖性,从而进一步证明了在RANKL诱导NFATc1激活时,MA能抑制NF- κ B的活化。Ca²⁺振荡是由RANKL刺激的Ca²⁺信号转导途径启动的,它也有助于NFATc1的激活。因此,我们进一步研究了MA对Ca²⁺振荡的影响(如图9D-G)。与我们的预想一致,当MA浓度为10 μ M时,RANKL诱导的钙振荡水平显著降低了近60%。总之,这些结果表明MA对NFATc1活化的强烈抑制作用可能是由于抑制了RANKL介导的NF- κ B活化和Ca²⁺振荡导致的。

MA抑制RANKL诱导的MAPK信号通路

c-Fos是AP-1家族成员之一,在破骨细胞分化过程中调节和诱导NFATc1不可缺少的转录激活因子。P38,JNK和ERK是MAPK信号传导途径的成员,在调节AP-1活性中起关键作用,其在加或不加MA的RANKL刺激后的0,10,20,30,60min被检测。如图10所示,在RANKL刺激30,60min后,MA能显著抑制JNK的磷酸化。此外,在与RANKL共孵育10,20min后,MA能明显的降低BMMs中p-ERK1和p-ERK2的表达水平。然而,在加或不加MA的组之间未发现p-P38表达的差异。这些实验结果表明MA可以抑制RANKL诱导的MAPK信号通路,尤其是抑制p-JNK和p-ERK1/2的表达,为MA对c-Fos的抑制作用提供了进一步的支持。

MA可防止体内雌激素缺乏所引起的骨质流失

为了进一步评估MA在溶骨性疾病中的治疗价值,我们建立了雌激素缺乏诱导的骨质疏松症的小鼠模型,隔天腹腔注射MA(10mg/kg),持续6周。然后分别进行micro-CT和组织形态学实验,对几种反映MA对维持骨量作用的骨参数进行定性和定量分析。micro-CT结果表明,与对照组相比,MA在防止骨丢失方面起着重要的作用,MA能使BV/TV和Tb.N增加(如图11A-C)。MA也能显著降低骨小梁间距(Tb.Sp)(如图11B)。此外,在所有实验组中未发现Tb.Th有统计学显著差异,表明骨小梁厚度对雌激素缺乏不敏感(图11E)。总之,这些结果表明,MA在防止雌激素缺乏引起的骨丢失方面具有保护作用。

为了进一步提高结果的可信度,我们做了组织形态学评估(如图12)。OVX+MA组BV/TV的值明显高于OVX组。其他骨骼评估参数,例如Oc.S/BS和N.Oc/BS在使用MA处理后显著降低(与OVX+PBS组相比,p<0.05)。综上,我们的研究结果表明,MA在动物实验和组织形态学评估中具有保护系统性骨丢失的治疗价值。

[0095] 讨论

如前所述,骨性疾病的高发病率和严重危害性不容忽视。而目前临床上用于治疗溶骨性疾病的药物存在诱导骨坏死和激素水平紊乱等副作用。因此,研发可用于预防和治疗骨质疏松的新药仍然是迫切需要的。近年来,天然化合物因其所具有的广泛生物学活性和轻微副作用而受到越来越多的关注。本研究中,我们筛选了一系列具有一种或多种生物学活

性(如抗氧化,抗炎和抗菌活性)的天然化合物,并将它们以临床可耐受的治疗浓度应用于骨质疏松动物和细胞模型。筛选结果显示,从积雪草(*centella asiatica*)中提取的三萜衍生物——羟基积雪草苷(MA)能够显著抑制RANKL诱导的破骨细胞生成。MA是一种被广泛应用的传统中草药,具有减轻胶原诱导的关节炎症反应、减少局部缺血性心肌梗死的缺血再灌注损伤等多种生物学作用。此外,临床试验显示,MA可通过调节炎症介质对人体皮肤的光氧化衰老产生长期影响,这进一步证实其生物安全性。总之,在本次研究中,我们不仅发现MA能够抑制破骨细胞(OCs)的形成,还证明了MA可通过调节NF- κ B和MAPK信号通路中转录因子的活性来降低OCs对骨质的吸收。此外,我们还在雌激素缺乏所诱导的骨质疏松小鼠模型中成功验证了MA在体内对骨质流失的拮抗作用。我们的研究结果提示MA在骨质疏松症的治疗中具有很大的应用前景。

[0096] OCs活动增强、对骨质吸收的增加是骨质疏松发生的重要原因。OCs是由前体细胞融合形成的多核细胞;当细胞缺乏ATP酶时,这种融合过程就会受到抑制。骨吸收是OCs在人体内的重要功能。当OCs通过integrin β 3附着到骨膜上时,骨膜表面就会形成一个密封区来加固这种附着。然后,OCs便会分泌产生包括CTSK、TRAcP在内的多种酶,其中,CTSK是降解骨基质的主要活性成分,而TRAcP则可增强CTSK的活性。实验结果显示,MA能够显著抑制CTSK, Acp5 (TRAcP), ATP酶以及整合素 β 3的基因和蛋白质的表达,而这种抑制作用有助于下调RANKL诱导的破骨细胞对骨质的吸收。

[0097] 研究证明,上述骨吸收相关的基因和蛋白的转录与表达受NFATc1的调节,且NFATc1同时也是骨髓单核细胞(BMMs)分化形成OCs必不可少的转录因子。我们的实验结果显示MA能够显著抑制NFATc1的表达。在RANKL诱导OCs生成过程中,NFATc1的表达与NF- κ B密切相关:一方面,经脱氢甲基喹啉(DHMEQ)(NF- κ B抑制剂)处理后,NFATc1的活性显著降低;另一方面,p50和p65(NF- κ B通路中的一部分)在RANKL与RANK相互作用1小时后会触发NFATc1的表达。这些现象提示NF- κ B可触发NFATc1的表达。在未受刺激的情况下,NF- κ B在细胞质内与I κ B结合形成复合物,无法发挥作用;当细胞接受RANKL刺激后,I κ B被 κ B激酶抑制剂(IKK)降解,NF- κ B得以游离并进入细胞核,进而启动与破骨细胞生成相关的关键基因的转录。因此,I κ B可间接反映细胞内NF- κ B的活化情况。我们的研究结果显示NF- κ B的活化以及I κ B的降解均能被MA所抑制。此外,NFATc1的激活和自主扩增还可由RANKL触发的Ca²⁺振荡介导,提示NFATc1的表达还受钙/钙调素依赖性激酶的调节。实验过程中,我们发现MA能够显著抑制Ca²⁺振荡。因此,我们的研究结果表明MA可通过调节NF- κ B和钙/钙调素依赖性激酶抑制OCs的分化及其对骨质的吸收。

[0098] c-Fos(AP-1中的成分)可产生NFATc1并与之发挥协同作用,共同触发转录调控级联反应,从而激活与破骨细胞分化和发挥功能相关的多个靶基因。研究发现RANKL诱导的NFATc1的表达在c-Fos基因敲除小鼠中消失;更重要的是,这些缺失c-Fos基因的小鼠还得了骨硬化症。这进一步证明c-Fos在RANKL诱导的破骨细胞生成过程中发挥重要作用。我们的研究结果显示,MA显著抑制c-Fos基因和蛋白的表达。MAPK是RANKL与其受体结合后激活的另一条信号通路,由JNK,ERK和p38组成,主要调节AP-1的表达。早期研究证明,ERK能够保护OCs免于凋亡并刺激破骨细胞分化,该结论可用于解释我们在实验过程中发现的RANKL处理后细胞数目增加的现象。阻断JNK则会导致破骨细胞生成障碍;p38虽然对破骨细胞功能无直接影响,但能调节破骨细胞分化。蛋白质印迹结果显示,在RANKL结合细胞触发相关信

号通路后,MA首先抑制ERK1 / 2的磷酸化(发生于刺激后的10和20分钟),然后抑制JNK1 / 2的磷酸化(30和60分钟)。因此,我们认为MA可通过干扰MAPK信号转导通路调节AP-1的活化,从而抑制下游NFATc1的表达。

[0099] 总之,我们的研究表明,MA可通过NF- κ B,钙/钙调素依赖性激酶和MAPK三条信号转导通路抑制破骨细胞发挥作用所需的关键蛋白——NFATc1的表达,并最终抑制RANKL诱导的破骨细胞生成。本研究首次描述和证实MA对雌激素缺乏导致的骨质疏松具有令人满意的疗效,提示从中草药中提取的天然化合物MA在预防和治疗骨质疏松中具有良好的应用前景,为骨质疏松的治疗提供新的选择和药物研发思路。

[0100] 各位技术人员须知:虽然本发明已按照上述具体实施方式做了描述,但是本发明的发明思想并不仅限于此发明,任何运用本发明思想的改装,都将纳入本专利专利权保护范围内。

[0101] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,本发明的保护范围并不仅局限于上述实施例,凡属于本发明思路下的技术方案均属于本发明的保护范围。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理前提下的若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

Genes	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Tm (°C)
Nfatc1	GGAGAGTCCGAGAATCGAGAT	TTGCAGCTAGGAAGTACGTCT	60
C-Fos	GCGAGCAACTGAGAAGAC	TTGAAACCCGAGAACATC	60
Acp5	TGTGGCCATCTTTATGCT	GTCATTTCTTTGGGGCTT	59
V-Atpase-d2	AGCAGACTACCTGAGTTTGAACC	GCTGCATCTGAAGAATGCGGTG	60
Hprt	GTTGGGCTTACCTCACTGCT	TAATCACGACGCTGGGACTG	60

图1

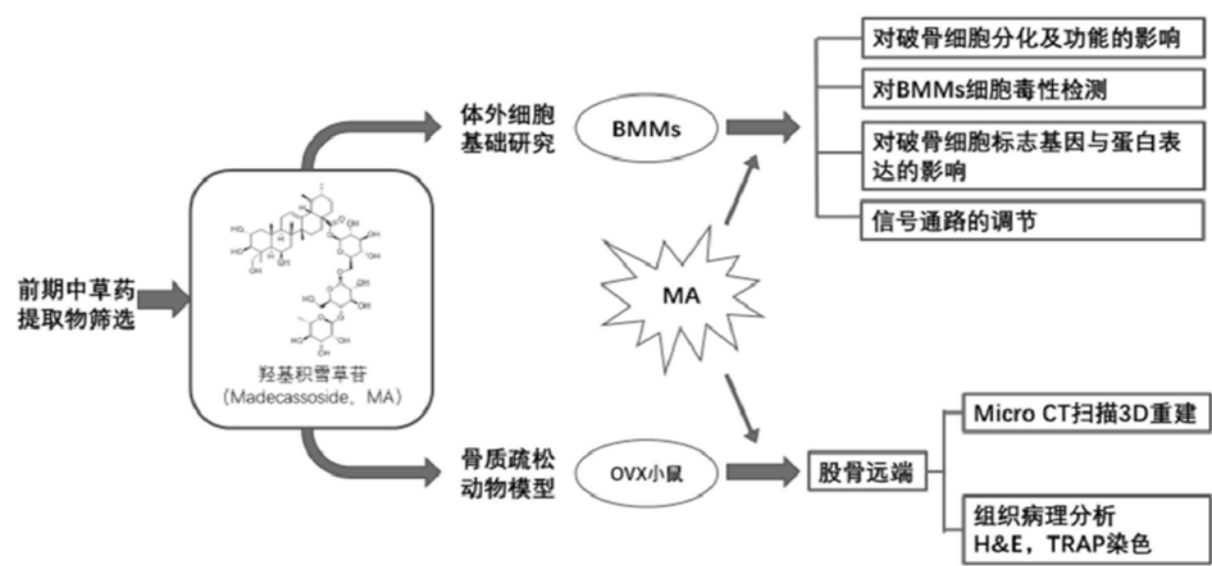


图2

中草药提取物	来源	对破骨细胞增值的抑制作用
Madecassoside	天然	$IC_{50} \approx 5 \mu\text{mol L}^{-1}$
Shikonin	天然	毒性
Gentiopicroside	天然	$IC_{50} > 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 无效
Stachydrine hydrochloride	天然	$IC_{50} > 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 无效
Calceolarioside B	天然	$IC_{50} > 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 无效
Dicoumarol	天然	$IC_{50} > 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 无效
Alantolactone	天然	$IC_{50} > 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 无效

图3

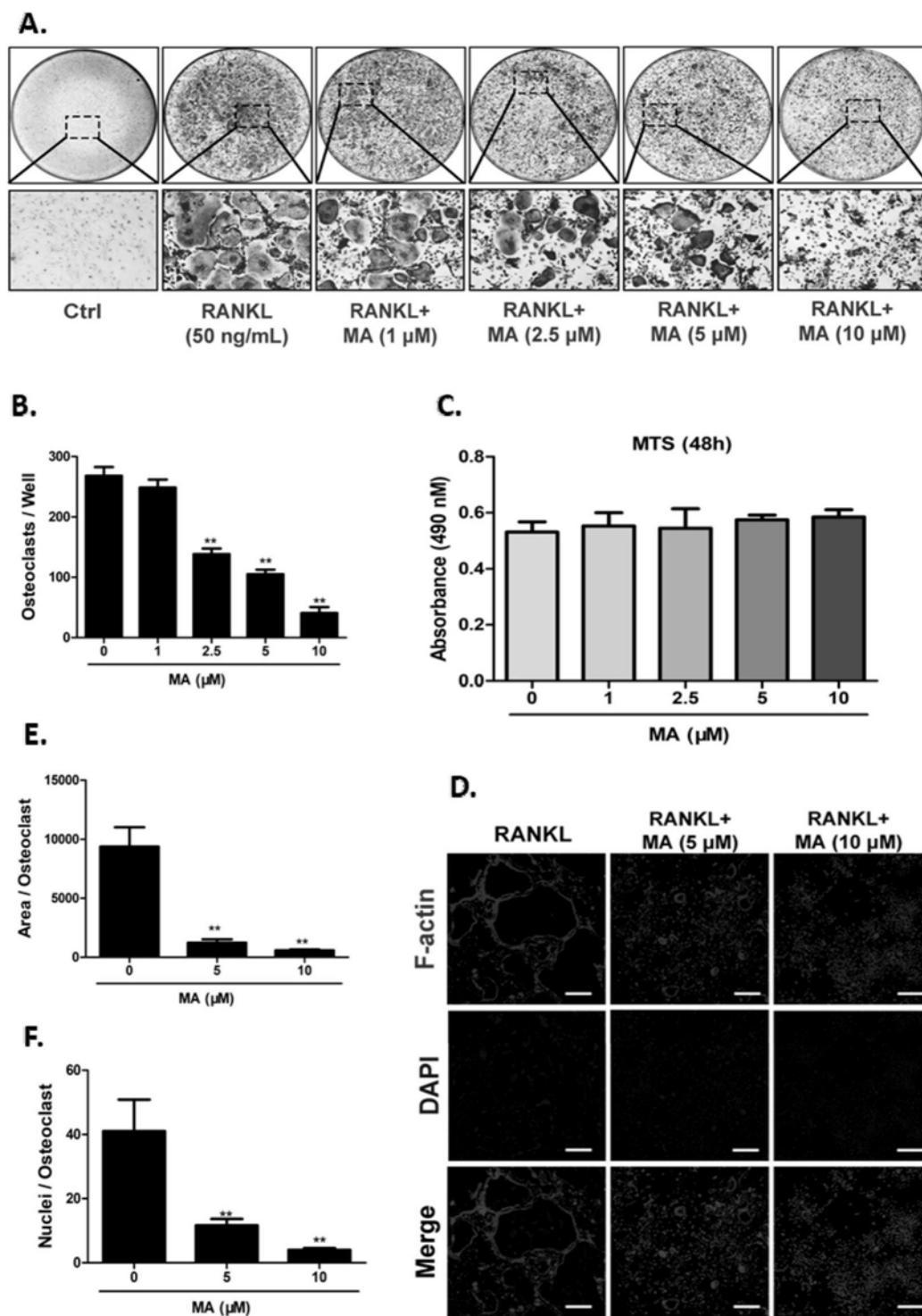


图4

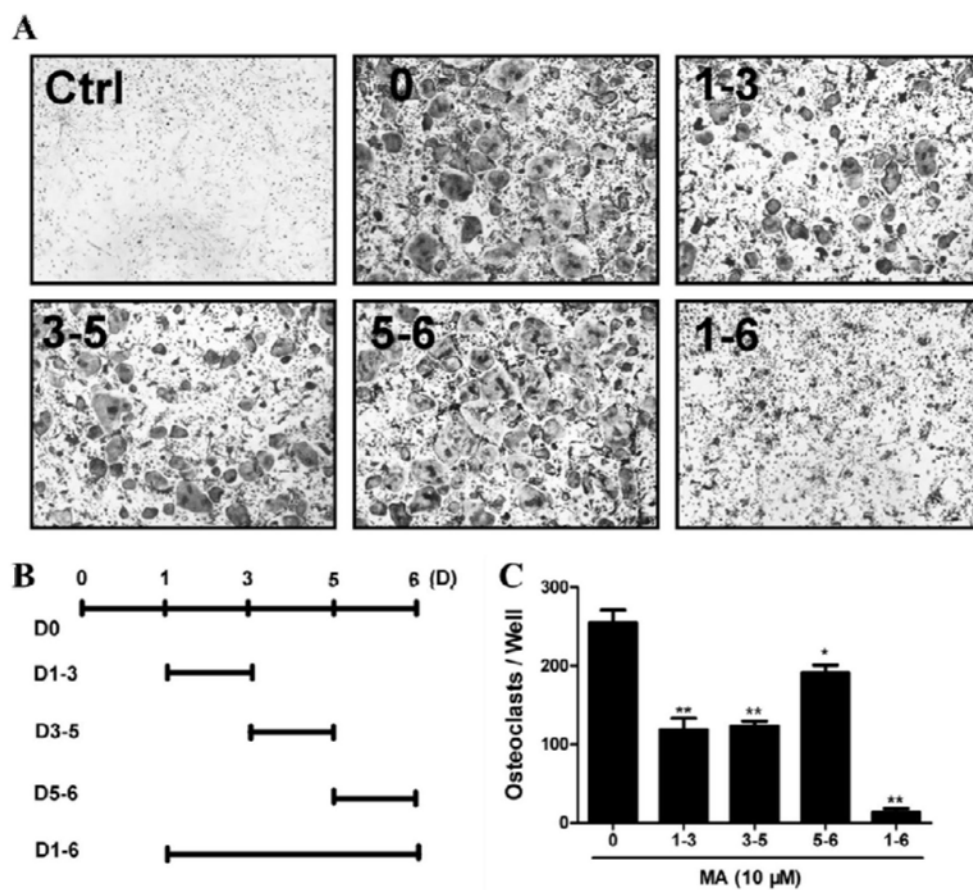


图5

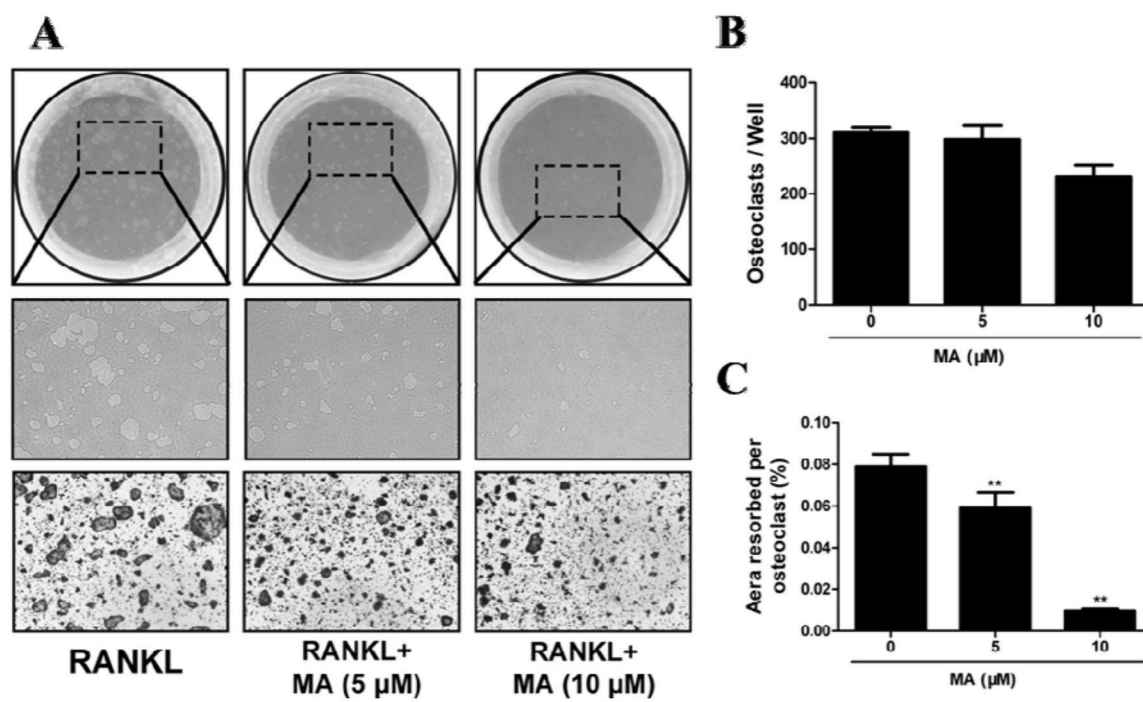


图6

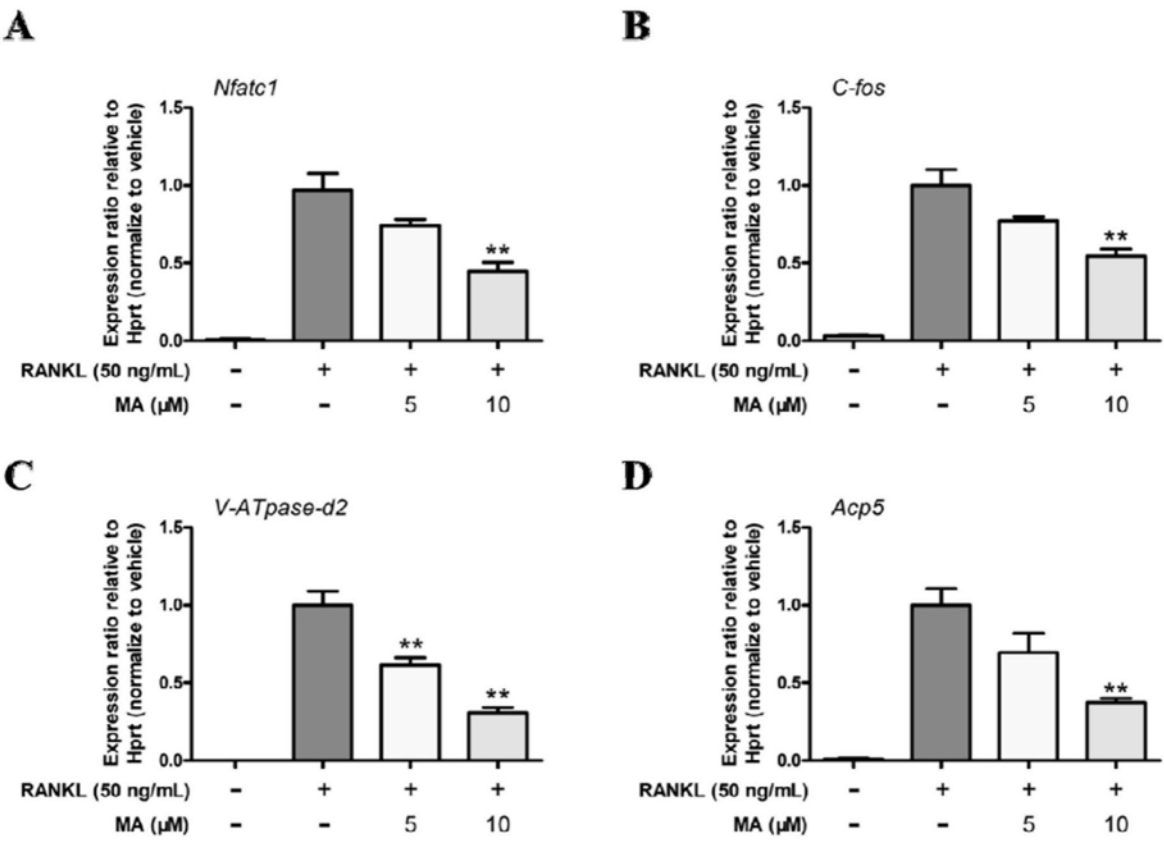


图7

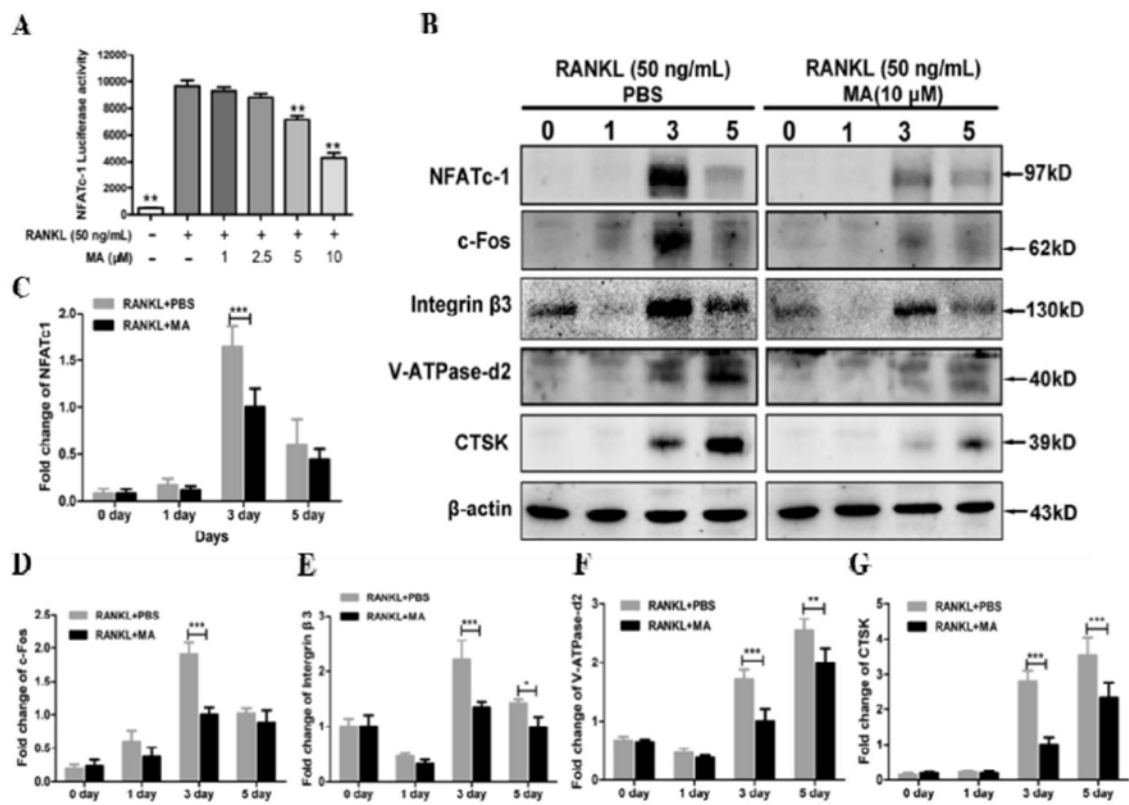


图8

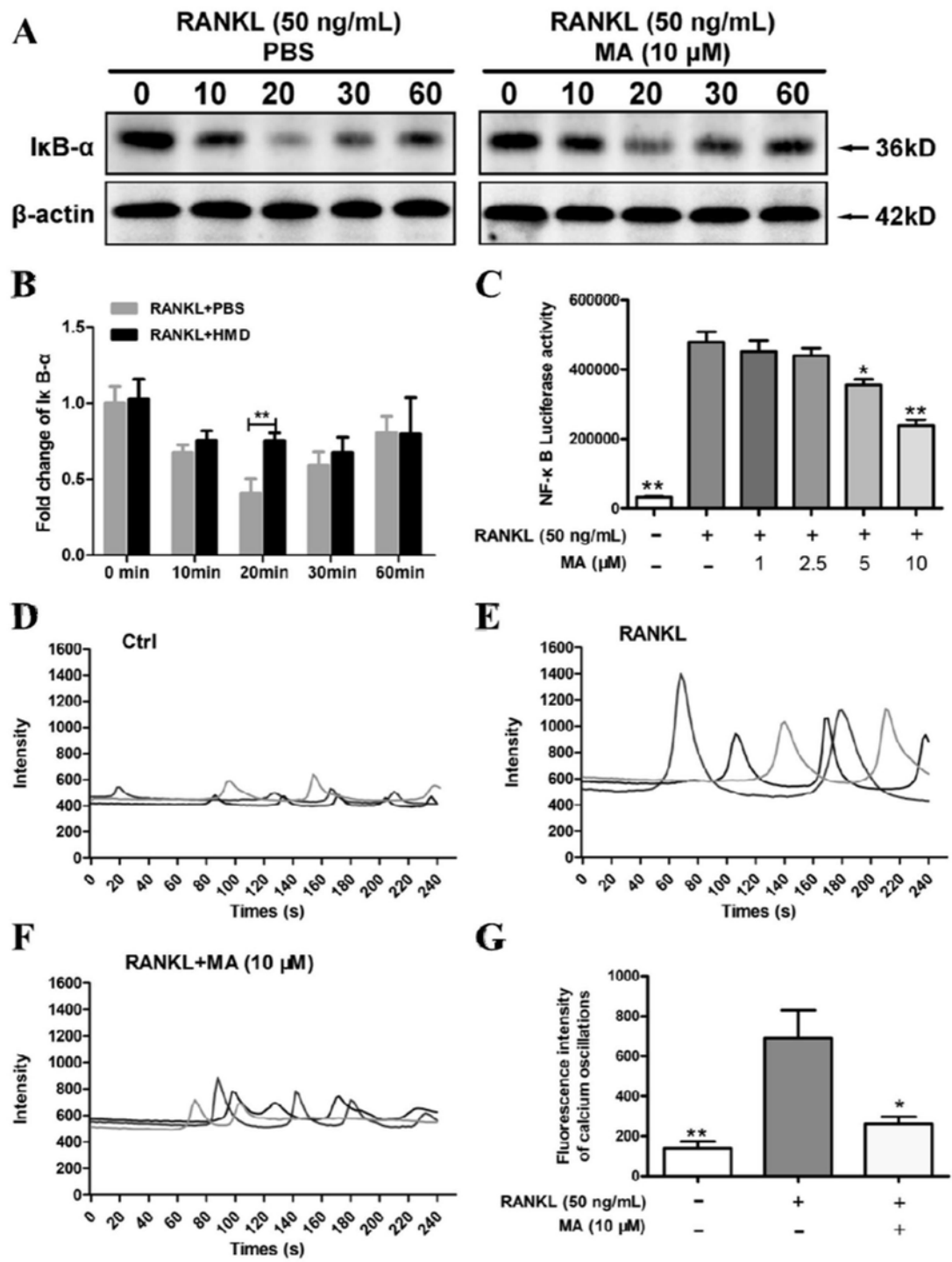


图9

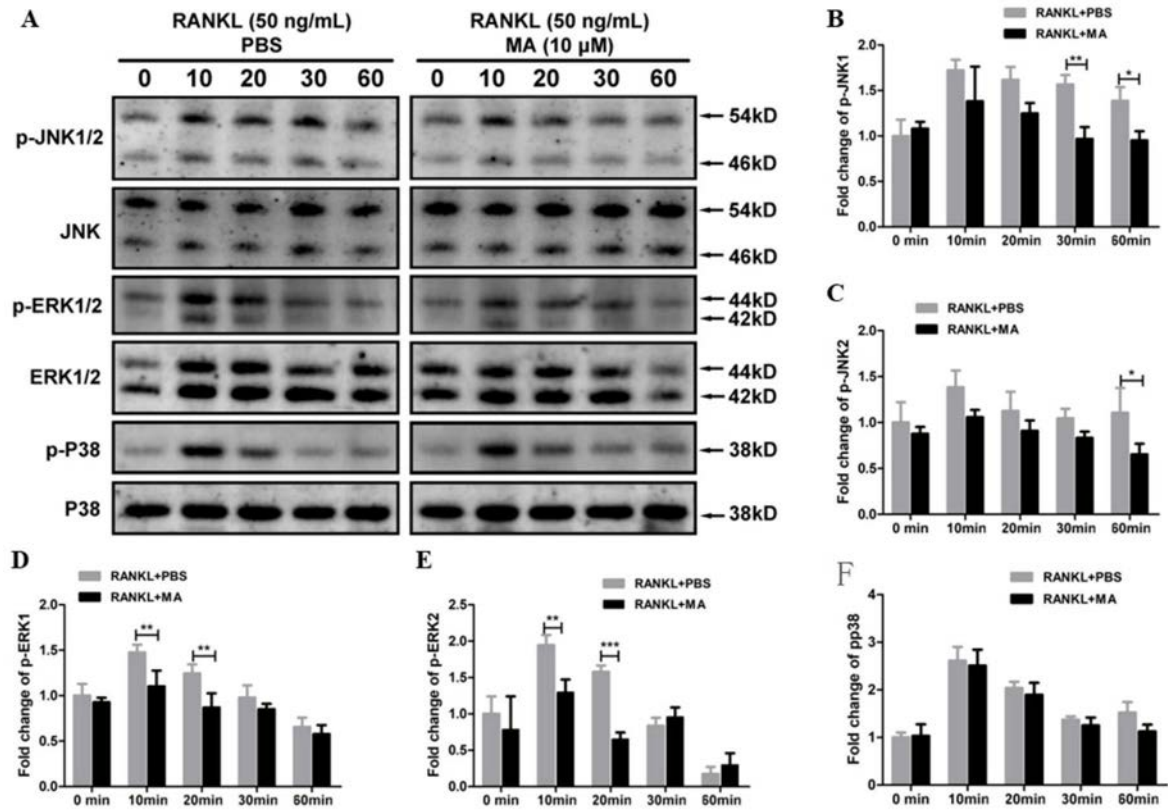


图10

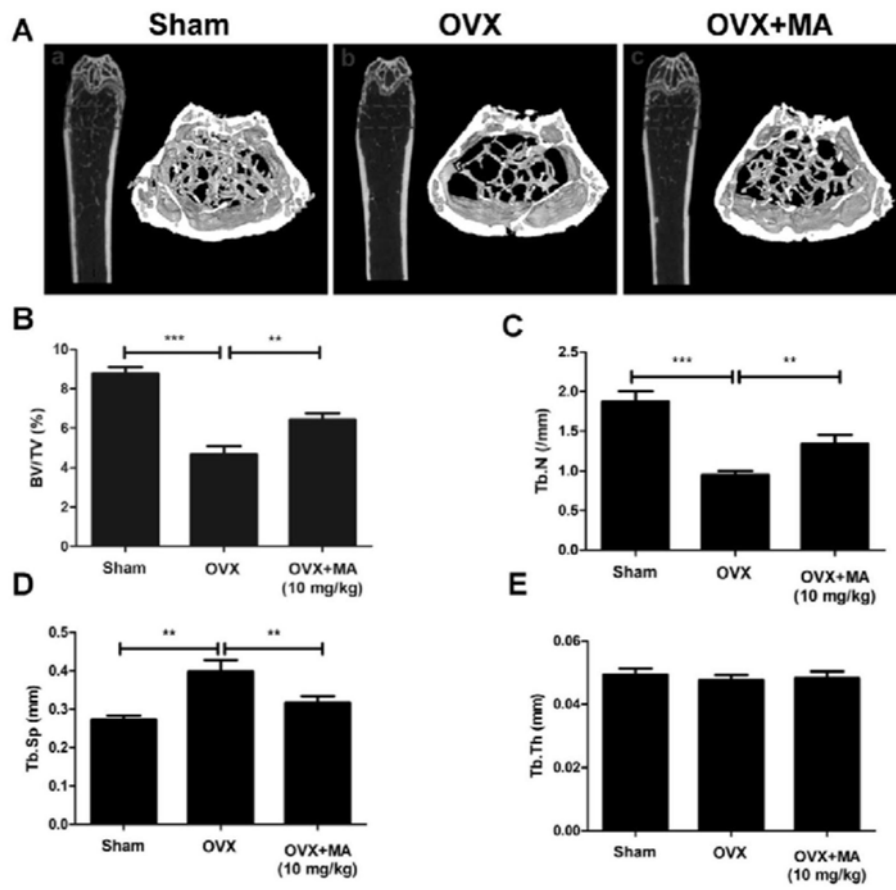


图11

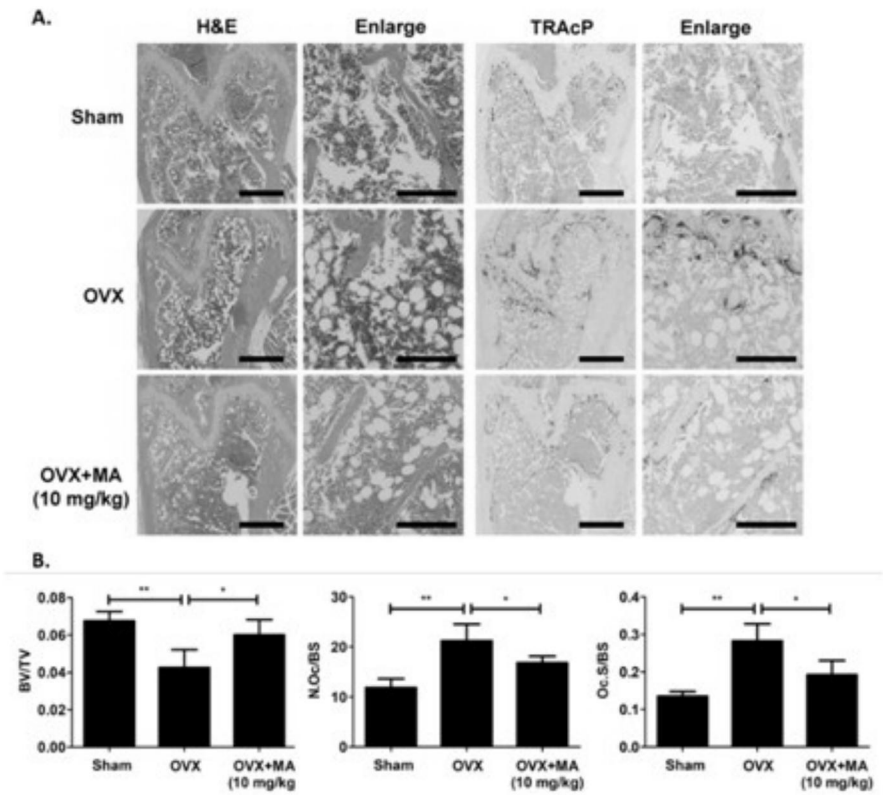


图12