



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106581006 B

(45)授权公告日 2019.11.29

(21)申请号 201510673284.5

(22)申请日 2015.10.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106581006 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(73)专利权人 香港理工大学深圳研究院
地址 518000 广东省深圳市南山区高新园
南区粤兴一道18号香港理工大学产
学研大楼205室

专利权人 临淄区妇幼保健院(齐都医院)

(72)发明人 李小花 董晓莉 赵清 张焕

(74)专利代理机构 深圳中一专利商标事务所
44237

代理人 左光明

(51)Int.Cl.

A61K 31/56(2006.01)

A61P 25/16(2006.01)

(56)对比文件

CN 102548571 B,2014.08.27,

WO 2014198842 A1,2014.12.18,

审查员 常明露

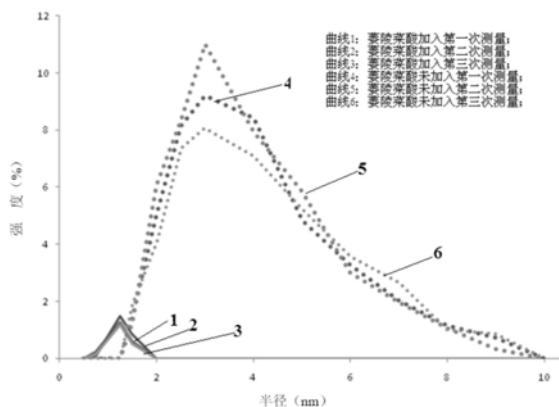
权利要求书1页 说明书11页 附图8页

(54)发明名称

三萜类化合物在制备治疗帕金森药物中的应用

(57)摘要

本发明提供了一种三萜类化合物的应用和治疗帕金森药物。本发明用于阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,以诱发神经细胞自噬;以及用于制备治疗帕金森药物;所述三萜类化合物为山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物。本发明治疗帕金森药物包括药物可接受的辅料,还包括有效剂量的山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物。本发明三萜类化合物即山楂酸和委陵菜酸能直接阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,从而在神经细胞中具有促进自噬的作用。并对帕金森病细胞的神经保护作用。因此,将山楂酸和委陵菜酸能够直接用于制备治疗帕金森药物,以赋予该治疗帕金森药物良好的药效。



1. 三萜化合物在制备治疗帕金森药物中的应用,所述三萜类化合物为委陵菜酸与山楂酸的混合物,且所述山楂酸与委陵菜酸的质量比为(1-2):(1-3)。

三萜类化合物在制备治疗帕金森药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于诱发自噬化合物技术领域,具体的涉及一种能够诱发神经细胞自噬的三萜类化合物的应用和含有该三萜类化合物的治疗帕金森药物及其制备方法。

背景技术

[0002] 帕金森病(Parkinson's disease,PD)又称震颤麻痹(shaking palsy,paralysis agitans),是一种常见于中老年的神经变性疾病。全球累计600万人群罹患帕金森病,随着全球老龄化程度加剧,帕金森病患者人数在逐年增加。帕金森病最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺(dopamine,DA)能神经元的变性死亡导致纹状体DA含量显著性减少以及神经元内大量路易小体聚集而致病。帕金森病病因目前仍不清楚,是遗传因素、环境因素、年龄老化、氧化应激等多种因素共同作用的结果。帕金森病药物治疗主要在于提高脑内多巴胺的含量以及降低乙酰胆碱的活力,多数患者的症状可因而得到缓解,但不能阻止病变的自然进展。因此,亟需研发能够提高疗效与安全性,以及效果持久的新药用于帕金森病的治疗。

[0003] 细胞自噬(Autophagy)是近年来提出的与帕金森病发病密切相关的分子机制,自噬诱导剂被作为神经保护类药物广泛应用于抗帕金森病药物研发。自噬是真核细胞中进化上高度保守的、用于降解和回收利用细胞内生物大分子和受损细胞器的过程。自噬的完成依赖于正常的溶酶体功能,溶酶体通过与自噬体(双膜囊泡结构,包裹自噬的目标降解产物)融合,清除降解细胞内受损伤的细胞结构、衰老的细胞器,以及不再需要的生物大分子。正常的自噬过程对细胞内环境的稳定及细胞生命活动的顺利进行十分重要。帕金森病产生的基础是大量突变和错误折叠的蛋白质在神经元细胞内聚集,帕金森病的特征性标志物是细胞内的路易小体,路易小体的主要组成部分是纤维状的 α -突触核蛋白(α -synuclein)。细胞内 α -synuclein主要通过泛素-蛋白酶体系和自噬溶酶体通路清除。 α -synuclein的过表达会抑制自噬,间接促进了异常蛋白的累积、线粒体功能障碍、活性氧水平的增加以及帕金森病的发展。自噬可以清除错误折叠的蛋白质,减少蛋白质在神经元内聚集,能够有效预防帕金森病等神经退行性病变的发生。

[0004] 自噬过程由一系列自噬相关蛋白(Atg蛋白)介导完成,这些蛋白在自噬体形成的不同阶段发挥作用。自噬分子机制的核心成分是Beclin1-VPS34复合体,这是一个多蛋白的组合。蛋白Beclin1是复合体中的骨架蛋白,许多自噬调控因子通过动态地结合于Beclin1上,发挥各自对自噬过程的调节作用。VPS34是哺乳动物III型磷脂酰肌醇3激酶(PI3K),它特异性地磷酸酯化肌糖环三位的磷脂酸肌醇并将其转译为磷脂酸肌醇3磷酸酯(PI3Ps)。VPS34胞质激酶活性的激活是自噬启动机制中的关键步骤,因为自噬过程的标志成员-用来包裹胞浆内容物的双膜自噬体-的形成需要大量由VPS34产生的PI3Ps。Beclin1与VPS34紧密结合,该结合作用对于VPS34活性至关重要。Beclin1作为自噬调节因子提供相互作用的平台,因此它在自噬调控中扮演着独特而重要的角色,是调控信号汇聚的关键点。Beclin1包含多个独立的功能区,其卷曲螺旋区(Coiled Coil)是募集众多自噬调节因子的蛋白作用平台。

[0005] 本领域研究人员公开了多种自噬促进剂,用于治疗或预防神经变性疾病。Bradner等人发现的双吡啶基马来酰亚胺核心的化合物,Rubinsztein等人发现雷帕霉素,Yuan等人公开了化合物包括洛哌丁胺、胺碘酮、尼古地平、匹莫齐特,李敏等人公开的异钩藤碱,这些促进剂都是通过刺激自噬活性用于治疗以细胞内蛋白聚集物形成为特征的病症。然而,研究发现,很多自噬诱导剂,尤其是经典的自噬诱导剂(mTOR抑制剂),不能诱导动物大脑皮质中的自噬或者仅在神经元中诱导轻度自噬,从而导致其在神经退行性疾病不能发挥清除变性蛋白的能力,无法起到帕金森病治疗作用。同时,很多非mTOR抑制剂靶点不明确。因此,对于治疗可以受益于自噬作用的神经退行性病变帕金森病的在神经元中不依赖于mTOR、特异性诱导自噬的强效药剂存在着需求。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的上述不足,提供一种靶点明确且不同于经典mTOR抑制剂的三萜类化合物的应用,旨在解决现有自噬诱导剂靶点不明确的问题。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种治疗帕金森病的自噬诱导剂,解决现有自噬诱导剂由于不能诱导动物大脑皮质中的自噬或者仅在神经元中诱导轻度自噬而导致药效不佳的技术问题。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明的技术方案如下:

[0009] 三萜化合物用于阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,以诱发神经细胞自噬,所述三萜类化合物为山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物。

[0010] 以及,三萜化合物在制备治疗帕金森药物中的应用,所述三萜类化合物为山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物。

[0011] 以及,一种治疗帕金森药物,包括药物可接受的辅料,还包括有效剂量的三萜类化合物,且所述三萜类化合物为山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物。

[0012] 以及,一种治疗帕金森药物的制备方法,包括采用本发明治疗帕金森药物中的所述药物可接受的辅料与所述有效剂量的三萜类化合物照药学人员能够理解的方法和制剂上能够接受的工艺处理的步骤。

[0013] 本发明与现有技术相比,本发明三萜类化合物的应用中,山楂酸和委陵菜酸能直接阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,从而在神经细胞中具有促进自噬的作用,其作用靶点明确,且不同于经典mTOR抑制剂作用原理,有效克服了现有自噬诱导剂靶点不明确缺陷。同时,山楂酸和委陵菜酸具有对帕金森病细胞的神经保护作用。因此,将山楂酸和委陵菜酸能够直接用于制备治疗帕金森药物,以赋予该治疗帕金森药物良好的药效。

[0014] 上述本发明治疗帕金森药物以山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物为药物活性成分,能直接阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,从而在神经细胞中具有促进自噬的作用,并对帕金森病细胞的神经保护作用,使得本发明治疗帕金森药物对治疗帕金森有良好的药效。

[0015] 上述本发明治疗帕金森药物制备方法能够根据剂型的要求而灵活选用辅料,而且该有效药物成分山楂酸、委陵菜酸能够与辅料照药学人员能够理解的方法和制剂上能够接

受的工艺处理成药,其制备工艺稳定,有效保证了药物的活性稳定性,而且还降低了生产成本。

附图说明

[0016] 图1为实施例1采用ITC检测Beclin1与Bcl-2之间的相互作用关系图;其中图1(a)为无山楂酸加入时Beclin1滴定到Bcl-2中两者相互作用引起的热转化关系图(纵坐标为负值表明放热);图1(b)为山楂酸加入时,Beclin1滴定到Bcl-2中两者相互作用引起的热转化关系图(纵坐标为正值表明吸热);

[0017] 图2为实施例1采用ITC检测Beclin1与Bcl-2之间的相互作用关系图;其中图2(a)为无委陵菜酸加入时Beclin1滴定到Bcl-2中两者相互作用引起的热转化关系图(纵坐标为负值表明放热);图2(b)为委陵菜酸加入时,Beclin1滴定到Bcl-2中两者相互作用引起的热转化关系图(纵坐标为正值表明吸热);

[0018] 图3为实施例2采用Pull-down试验检测Beclin1与Bcl-2之间的相互作用后的SDS-PAGE分离图;其中,图3(a)为无和有山楂酸加入后的SDS-PAGE分离图;图3(b)为无和有委陵菜酸加入后的SDS-PAGE分离图;

[0019] 图4为实施例3采用动态光散射测定当无或有山楂酸加入后的Beclin1-Bcl-2混合物的粒径图;其中,图4中的1表示山楂酸未加入时测得蛋白粒子,图4中的2表示山楂酸加入时测得蛋白粒子;

[0020] 图5为实施例3采用高效液相色谱-光散射联用测定当无或有委陵菜酸加入后的Beclin1-Bcl-2蛋白分子量分布图;

[0021] 图6为实施例4采用WB检测山楂酸和委陵菜酸对PC12细胞中自噬标志蛋白LC3-I/II转化率以及p62降解后的SDS-PAGE分离图;

[0022] 图7为实施例5采用以山楂酸和委陵菜酸以及二者不同混合比例对MPP⁺诱导的神经毒性的保护作用关系图;其中,图7(a)不同浓度的MPP⁺对神经细胞损毁的关系图(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 对照组);图7(b)不同浓度的山楂酸存在与神经细胞成活率的关系图(*** $p < 0.001$ vs. Control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. MPP⁺组);图7(c)不同浓度的委陵菜酸存在与神经细胞成活率的关系图(*** $p < 0.001$ vs. Control group; ## $p < 0.01$ vs. MPP⁺组);图7(d)不同混合比例的山楂酸和委陵菜酸存在与神经细胞成活率的关系图(*** $p < 0.001$ vs. Control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. MPP⁺组);

[0023] 图8为实施例6中6-OHDA损毁模型鼠采用Rapamycin、山楂酸、委陵菜酸以及山楂酸委陵菜酸1:2混合物不同实验处理组的动物旋转行为关系图;其中,图8中的* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 生理盐水处理的6-OHDA损毁模型鼠;

[0024] 图9为实施例6中6-OHDA损毁模型鼠采用FCV法测定电刺激腹侧被盖区(VTA)后药物组Rapamycin、山楂酸、委陵菜酸以及山楂酸委陵菜酸1:2混合物不同实验处理组的纹状体多巴胺(DA)释放关系图;其中,图9中的*** $p < 0.001$ vs. 生理盐水处理的6-OHDA损毁模型鼠;

[0025] 图10为实施例6中Rapamycin、山楂酸、委陵菜酸以及山楂酸委陵菜酸1:2混合物不同实验处理组大鼠腹侧被盖区损毁侧酪氨酸羟化酶免疫组化染色图;

[0026] 图11为实施例6中Rapamycin、山楂酸、委陵菜酸以及山楂酸委陵菜酸1:2混合物不

同实验处理组大鼠腹侧被盖区损毁侧酪氨酸羟化酶免疫反应神经元数目关系图。

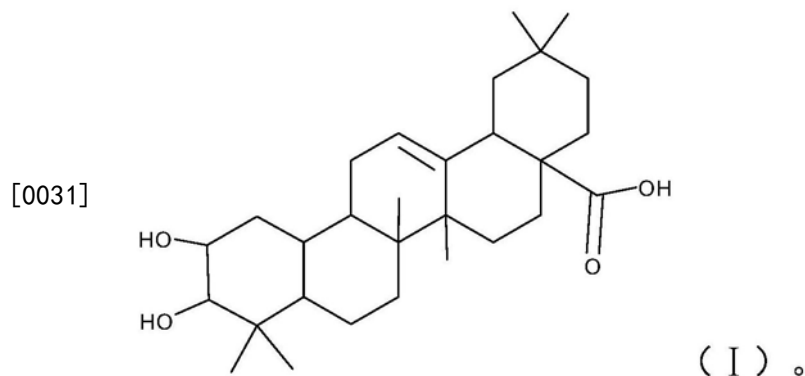
具体实施方式

[0027] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明作进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

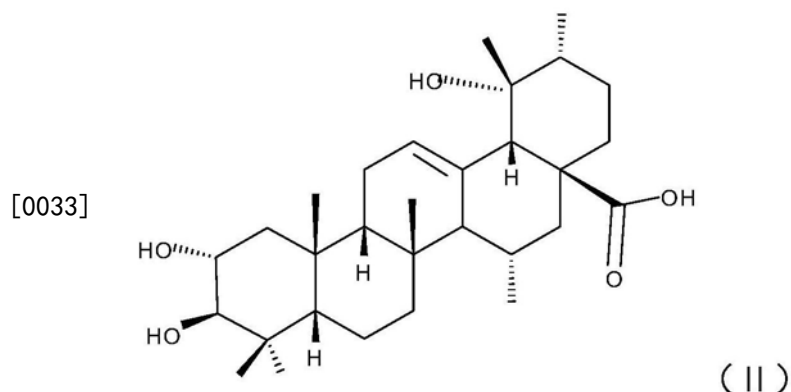
[0028] 本发明实施例提高了三萜化合物的一种应用方法。在一实施例中,该三萜化合物为山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物,且该山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物用于阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,以诱发神经细胞自噬。

[0029] 在另一实施例中,三萜化合物在制备治疗帕金森药物中的应用,即是该三萜化合物被用于制备治疗帕金森药物。在该实施例中,三萜化合物为山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物。

[0030] 在一具体实施例中,上述的山楂酸(Maslinic Acid,2 α ,3 β -二羟基-12-烯-28-酸,MA)是一个分布广泛、含量丰富的天然三萜类化合物,存在于多种天然植物中,特别是山楂、红枣、枇杷叶和油橄榄等,对人体具有高安全性。其分子结构式如下述式I所示:



[0032] 委陵菜酸(Tormentolic Acid,2A,19A-二羟基熊果酸,TA)也是一个分布较广泛的天然三萜类化合物,存在于委陵菜、枇杷叶和柳叶菜等植物中。委陵菜酸具有抗癌、抗动脉粥样硬化和抗炎等属性。委陵菜酸分子结构式如下述式II所示:



[0034] 另外,上述山楂酸和委陵菜酸也可以是由人工合成的山楂酸与委陵菜酸。不管是天然提取还是人工合成,其均能被应用于阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,以诱发神经细胞自噬。

[0035] 在一实施例中,三萜类化合物为山楂酸与委陵菜酸的混合物,且山楂酸与委陵菜酸的质量比为(1-2):(1-3),在具体实施例中,山楂酸与委陵菜酸的质量比可以是1:2、1:3、2:1等,优选为1:2。将两者的有效成分进行配伍,并控制两者的用量比例,能有效提高山楂酸与委陵菜酸阻断自噬骨架蛋白Becn1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合的效果,以提高含有山楂酸与委陵菜酸配伍的治疗帕金森药物的药效。

[0036] 在上述三萜化合物的应用中,由于山楂酸、委陵菜酸单体或者两者的混合物能够阻断自噬骨架蛋白Becn1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,从而在神经细胞中具有促进自噬的作用,以降低有效清除错误折叠的蛋白质,减少蛋白质在神经元内聚集,从而发挥神经保护作用。

[0037] 因此,将上述山楂酸、委陵菜酸单体或者两者的混合物用于制备治疗帕金森药物中,该含有山楂酸、委陵菜酸单体或者两者的混合物的药物能够起自噬诱导物的作用,从而降低错误折叠的蛋白质的量,减少蛋白质在神经元内聚集,从而对受益于自噬诱导的疾病有良好的药效,特别是对治疗帕金森有良好的药效。

[0038] 相应地,在上文所述的山楂酸、委陵菜酸三萜化合物应用的实施例基础上,本发明实施例还提供了一种治疗帕金森药物。在一实施例中,该治疗帕金森药物包括药物可接受的辅料,更重要的是还包括有效剂量的三萜类化合物。

[0039] 其中,该三萜类化合物为上文所述的山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物。另外,该三萜类化合物的有效剂量是指治疗有效量,是指足以对个体显示益处或临床意义的本发明的化合物的量。本领域技术人员将会理解,给药的量或剂量以及给药时程将取决于被治疗的疾病的性质和严重性、被治疗的受试者的年龄和一般状况以及给药方式等。

[0040] 在一优选实施例中,三萜类化合物为山楂酸与委陵菜酸的混合物,且山楂酸与委陵菜酸的质量比如上文所述的为(1-2):(1-3),在具体实施例中,山楂酸与委陵菜酸的质量比可以是1:2、1:3、2:1等,优选为1:2。将两者的有效成分进行配伍,并控制两者的用量比例,能有效提高本发明实施例治疗帕金森药物对受益于自噬诱导的疾病的药效,特别是对治疗帕金森的药效。

[0041] 在一实施例中,上述治疗帕金森药物中所含的药物可接受的辅料是指本领域技术人员已知的适合于特定的给药模式的任何辅料。如在具体实施例中,该药物可接受的辅料可以包括与本发明实施例三萜类化合物配伍的一种或多种药学上可接受的载体、溶剂、赋形剂、缓冲剂、稳定剂、佐剂、前药和治疗能够受益于自噬诱导的疾病帕金森病或增强上述三萜类化合物自噬诱导活性的其他治疗剂。

[0042] 其中,上述各辅料应当是无毒的、不干扰或不损害本发明实施例上述三萜类化合物的效力。另外,该辅料所选用可以根据上述实施例治疗帕金森药物的存在的剂型而灵活选用。如在具体实施例中,该载体包括但不限于糖类诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖,淀粉诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素及其衍生物诸如梭甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素,西黄蓍胶粉,麦芽,明胶,滑石,克列莫佛,Solutol等中的至少一种。赋形剂包括但不限于可可脂,栓剂蜡,油类诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油,二醇类如丙二醇,酯类如油酸乙酯和十二酸乙酯,琼脂等中的至少一种。缓冲剂包括但不限于氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无致热原水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇和磷酸盐缓冲溶液等中

的至少一种。当然,上述辅料还可以根据药物剂型或者给药方式还包括润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁、着色剂、释放剂、包衣剂、增甜剂、调味剂和芳香剂,或者根据本领域技术人员的判断,防腐剂和抗氧化剂也可以存在于药物辅料中。

[0043] 另外,上述治疗帕金森药物的给药方式可以是动物,包括人。其给药方给药模式包括局部、胃肠外、静脉内、动脉内、皮下、肌内、颅内、眶内、经眼 (ophthalmical)、心室内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、鼻内、通过气溶胶、通过栓剂、或通过口服递送。而且,上述治疗帕金森药物可以单独给药,也可以与如果必要的其他组合物联合给药。

[0044] 在一实施例中,根据上述本发明实施例治疗帕金森药物的给药模式,可以灵活选用上述的所述药物可接受的辅料与有效剂量的山楂酸、委陵菜酸中至少一种三萜类化合物配伍制备成不同剂型的诸如乳膏、凝胶剂、洗剂、溶液剂、丸剂、片剂、胶囊剂、散剂、糊剂、气溶胶等。

[0045] 因此,由于上述本发明实施例治疗帕金森药物以山楂酸、委陵菜酸中的任一种或两者的混合物为药物活性成分,能直接阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互结合,从而在神经细胞中具有促进自噬的作用,并对帕金森病细胞的神经保护作用,使得本发明实施例治疗帕金森药物对治疗帕金森有良好的药效。

[0046] 相应地,本发明实施例还提供了上文所述的治疗帕金森药物的一种制备方法。在一实施例中,该制备方法包括将上文所述的治疗帕金森药物中药物可接受的辅料与所述有效剂量的三萜类化合物照药学人员能够理解的方法和制剂上能够接受的工艺处理。通过该处理,制备成给药模式所需要的治疗帕金森药物。因此,本发明实施例治疗帕金森药物制备方法能够根据剂型的要求而灵活选用辅料,而且该有效药物成分山楂酸、委陵菜酸能够与辅料照药学人员能够理解的方法和制剂上能够接受的工艺处理成药,其制备工艺稳定,有效保证了药物的活性稳定性,而且还降低了生产成本。

[0047] 现以山楂酸、委陵菜酸具体应用和治疗帕金森药物具体实施例对本发明做进一步详细说明。

[0048] 实施例1

[0049] 等温量热滴定法 (ITC) 山楂酸 (MA) 与委陵菜酸 (TA) 对自噬相关蛋白功能的影响试验:

[0050] 利用等温量热测定仪iTC200 (MicroCal) 测定山楂酸或委陵菜酸加入或不加入时自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互作用所引起的热转化。测定前,Beclin1及Bcl-2均被透析至50mM Tris,pH 8.0,and 150mM NaCl缓冲液中,缓冲液包含或不包含10 μ M终浓度的山楂酸或委陵菜酸。测定时,于等温量热测定仪之滴定注射器上样40 μ l Beclin1 (浓度12mg/ml),于等温量热测定仪之样品池上样220 μ l Bcl-2 (500 μ g/ml),每次测定含20次进样,每次进样2 μ l,每两次进样之间平衡180秒。数据经Origin 7.0采集和分析。

[0051] 本实施例1试验分析结果如图1和图2所示。由图1和图2可知,缓冲液中未加入山楂酸或委陵菜酸时,Beclin1滴定到蛋白Bcl-2中,有明显放热,表明两者之间有较强的相互作用,如图1a和图2a所示;当加入山楂酸后,只有因Beclin1的滴入而引起的稀释吸热,并无Beclin1与Bcl-2两者相互作用引起的放热反应发生,如图1a所示;当加入委陵菜酸后,只有因Beclin1的滴入而引起的稀释吸热,也并无Beclin1与Bcl-2两者相互作用引起的放热反

应发生,如图2b所示。

[0052] 由本实施例1试验可知,山楂酸或委陵菜酸对自噬相关蛋白功能的有影响,山楂酸和委陵菜酸能够有效阻断自噬骨架蛋白Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间的相互作用,从而能够在神经细胞中具有促进自噬的作用。

[0053] 实施例2

[0054] Pull-down实验检测山楂酸(MA)与委陵菜酸(TA)对Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间相互作用的影响试验:

[0055] 将GST作为自噬抑制因子Bcl-2的融合标签,以GST-Bcl-2作为bait,以纯化的自噬骨架蛋白Beclin1作为prey开展pull-down实验,纯化的GST-Bcl-2(或GST) 1.0mM与纯化的Beclin11.0mM(摩尔浓度1:1)混于50mM Tris,pH 8.0,and 150mM NaCl缓冲液中,缓冲液包含或不包含10 μ M终浓度的山楂酸或委陵菜酸。混合物室温孵育30分钟。混合物加入经上述缓冲液平衡过的GST亲和琼脂糖珠中,经标准的pull-down步骤处理,蛋白复合物洗脱后加入SDS样品缓冲液,经SDS-PAGE分离检测。

[0056] 结果如图3a、3b所示,由图3可知,山楂酸或委陵菜酸未加入时Beclin1可以被GST-Bcl-2拉下(见圆圈区域);山楂酸或委陵菜酸加入后,Beclin1不能被拉下(见圆圈区域),表明山楂酸或委陵菜酸阻断了Beclin1与Bcl-2之间的相互作用。

[0057] 实施例3

[0058] 光散射测定山楂酸(MA)与委陵菜酸(TA)对Beclin1与自噬抑制因子Bcl-2之间相互作用的影响试验:

[0059] 以快速蛋白液相色谱-静态光散射联用测定蛋白分子量;以动态光散射检测蛋白粒径。纯化的GST-Bcl-2(或GST) 1.0mM与纯化的Beclin11.0mM(摩尔浓度1:1)混于50mM Tris,pH 8.0,and 150mM NaCl缓冲液中,缓冲液包含或不包含10 μ M终浓度的山楂酸或委陵菜酸。混合物室温孵育30分钟。混合物上样至凝胶层析柱,经快速蛋白液相色谱分离纯化,静态光散射仪检测不同出峰时间成分的分子量;或者以动态光散射仪检测蛋白粒径。数据经Astra数据分析软件处理与分析。

[0060] 以动态光散射测定Beclin1-Bcl-2混合物的粒径,结果如图4所示,山楂酸未加入时,测得蛋白粒径均值为3.4nm,如图4中的1所示;山楂酸加入后,测得蛋白粒径均值为1.6nm,如图4中的2所示,参照对照数据(单独测定两者粒径),表明A与B之间的结合被阻断。

[0061] 以高效液相色谱-光散射联用测定Beclin1-Bcl-2分子量以及蛋白粒径分布,结果显示,无委陵菜酸加入时(如附图5中曲线3-6),蛋白分子量约为35kD,蛋白粒径偏大,即为Beclin1-Bcl-2复合体;有委陵菜酸加入时(如附图5中曲线1-3),蛋白分子量介于8-20kD之间,蛋白粒径偏小,曲线左移,即表示Beclin1和Bcl-2均为单体,如图5所示。

[0062] 实施例4

[0063] 细胞培养实验表征山楂酸(MA)和委陵菜酸(TA)对自噬的影响试验:

[0064] 选用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞,在补充了10%FBS以及1%马血清的DMEM中培养。细胞传代至6孔板,转换成含有2%FBS以及1%马血清的DMEM中培养过夜,第二天细胞贴壁后,在不同孔中加入阳性对照药Rapamycin(Rap,mTOR抑制剂),以及山楂酸(MA)和委陵菜酸(TA)不同浓度后,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育24小时,将细胞用PBS清洗后,lysis buffer裂解细胞,提取细胞蛋白。收取的细胞蛋白经过煮沸变性后,利用免疫印迹实验进行目标蛋白表

征,检测山楂酸以及委陵菜酸对细胞自噬活性标志物LC3-I/II转化及p62蛋白降解水平,即从外源和内源两个层次测定细胞自噬水平。

[0065] 通过一系列WB试验已经证实PC12细胞经山楂酸和委陵菜酸处理24小时后,内源性LC3-II转化率提高,同时p62蛋白降解增加,如图6所示,即表明山楂酸和委陵菜酸具有促进自噬的作用。

[0066] 实施例5

[0067] 帕金森病细胞模型验证山楂酸(MA)和委陵菜酸(TA)以及二者不同比例混合后的神经细胞保护作用试验:

[0068] 选用人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞,在补充了10%FBS的DMEM中培养。细胞传代至96孔板,转换成含有2%FBS的DMEM中培养过夜,第二天细胞贴壁后,在不同孔中加入不同浓度的MPP+,37℃培养箱中孵育48小时后,MTT检测不同浓度MPP+对神经细胞的毒性,以优化帕金森病细胞模型。

[0069] 细胞模型建好后,SH-SY5Y细胞传代至96孔板,在不同孔中加入山楂酸(MA)或委陵菜酸(TA)不同浓度,或者是二者以不同比例混合加入细胞后,37℃培养箱中孵育2小时,将细胞培养基抽走,换成新鲜含有2%FBS的DMEM后,加入优化浓度的MPP+进行细胞损毁,37℃培养箱中孵育48小时后,MTT检测山楂酸(MA)和委陵菜酸(TA)以及二者不同比例混合后的神经细胞保护作用。

[0070] 结果证实,浓度为1mM的MPP+可以损毁神经细胞一半,作为建立帕金森病细胞模型的最佳浓度,如图7a所示,且在该模型中* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ vs. Control group。山楂酸(MA)在3 μ M至30 μ M范围内都能保护损毁的神经细胞生长,以10 μ M的浓度保护作用最佳,如图7b所示。委陵菜酸(TA)在1 μ M至30 μ M范围内都能保护损毁的神经细胞生长,以10 μ M的浓度保护作用最佳,如图7c所示。当选用二者混合终浓度为10 μ M的情况下,山楂酸(MA)与委陵菜酸(TA)比例为1:2时,保护作用最强,效果优于二者相同浓度下单用以及二者的其它混合比例,如图7d所示。

[0071] 实施例6

[0072] 帕金森病动物模型验证山楂酸(MA)和委陵菜酸(TA)以及二者不同比例混合后的神经细胞保护作用试验:

[0073] 选用三月大Sprague Dawley雄鼠,重量200-250克用于实验。动物适应环境后,随机分为6组,分别为①正常鼠;②6-OHDA损毁模型鼠;③阳性对照组,Rapamycin(i.p.,10mg/kg/day);④山楂酸组(i.p.,10mg/kg/day);⑤委陵菜酸组(i.p.,10mg/kg/day);⑥山楂酸委陵菜酸混合组(山楂酸:委陵菜酸=1:2,总剂量为i.p.,10mg/kg/day)。每组n=8。帕金森病动物模型由大脑单侧内侧前脑束(MFB)两点注射6-OHDA,形成左侧神经元损毁。阳性对照选用经典自噬诱导剂mTOR抑制剂Rapamycin。Rapamycin与山楂酸或委陵菜酸或其混合物在动物模型手术前两个周开始腹腔注射,剂量均为10mg/kg/day;动物模型手术后继续腹腔注射两周后结束实验。正常组以及6-OHDA损毁模型组均以腹腔注射等体积生理盐水作为对照。

[0074] 实验结束后,动物在本室自制的四道自动旋转仪中测试由皮下注射APO(0.05mg/kg)诱发的旋转行为,测试时间为注射后首个5分钟。随后,动物麻醉,头部固定于立体定位仪上,进行快速周期伏安法(FCV)测定纹状体(Str)的多巴胺(DA)释放,检测药物处理后可

能的黑质神经元保护作用。测定完成后,动物灌注、固定、取脑组织石蜡包埋,用石蜡切片机作冠状连续切片,片厚10 μ m,按照Hsu的ABC方法进行酪氨酸羟化酶(TH)免疫组织化学染色,比较组间TH阳性细胞的数量差异。

[0075] 以下为动物实验所用方法的详细描述。

[0076] 1. PD模型大鼠的制备:

[0077] 将雌鼠以8%水合氯醛腹腔注射麻醉后,将大鼠头部固定于立体定位仪上,暴露颅骨后参照Paxions和Watson鼠脑立体定位图谱,在左侧相当于MFB区的颅骨表面钻孔,直径约2.5mm。清理脑膜后参照Earl法在三维推动器的引导下内侧前脑束(MFB)两点注射6-OHDA(3.6mg/kg),注射量分别为2.5 μ l及3.0 μ l,注射速度控制在1 μ l/min,每次注射后留针5min,缓慢出针,缝合头皮,术后连续3d肌注青霉素20万u/d以预防感染。

[0078] 2. 行为学测试:

[0079] 药物处理结束后,动物在本室自制的四道自动旋转仪中测试由皮下注射APO(0.05mg/kg)诱发的旋转行为。测试前,先把动物置于旋转测试仪中适应环境10min,测试时间为60min。

[0080] 3FCV测定:

[0081] 3.1工作电极的制备、检测及选择:

[0082] 实验用工作电极为碳纤维电极,由本室自制。制备工序为:把单根碳纤维穿入特制玻璃管、拉制电极、镜下处理尖端及焊接等。密封入玻璃管内的单根碳纤维直径为8 μ m,暴露在玻璃管尖端外的碳纤维长度为20~60 μ m,电极不做任何表面预处理。

[0083] 检测和选择电极:将制备好的工作电极垂直地固定在立体定位仪上,尖端浸入盛有0.1M磷酸缓冲液(PBS)的小烧杯内,与液面保持良好接触。观察伏安仪输出的电流波形是否正确和信号是否稳定。待信号稳定后取10⁻⁶M的标准DA溶液迅速推入PBS溶液中,观察电流波形的变化。合格的电极应具备反应快、背景电流稳定、噪音低等特点。选择合格的碳纤维电极备用。

[0084] 3.2用FCV法检测Str或Amy的DA释放:

[0085] 动物麻醉后,头部固定于立体定位仪上。暴露颅骨后用牙科钻在相对于Str和MFB或Amy和VTA区的同一侧颅骨表面钻两个小孔,分别放置碳纤维工作电极和刺激电极。在同侧两孔间合适位置钻第三个小孔,放置参考电极。按照坐标:AP:+1.1mm,ML:2.8mm,V:-5.5mm将碳纤维微电极插入Str,将刺激电极插入同侧MFB区,将参考电极置于脑膜表面。或者按照坐标:AP:-2.5mm,ML:3.6mm,V:-7.8mm将碳纤维微电极插入Amy,将刺激电极插入同侧VTA区,将参考电极置于脑膜表面。

[0086] 由伏安测定仪(英国剑桥电子设计公司生产)加到碳纤维电极上的1.5周期的三相扫描工作电压波形,相对于Ag/AgCl参考电极在-1.0~+1.4V间进行扫描。扫描始于阴极,扫描电压为480V/s,扫描频率控制为2Hz,每次扫描大约15ms。扫描前及两次扫描相间的电位维持在0V水平,此波形在示波器及微机上都可监视到。工作电极的输出电流波形可显示在示波器及微机的显示屏上。在给刺激之前,示波器及微机显示及贮存的是背景电流信号,此信号在工作电极稳定的情况下是无漂移的,即不随扫描次数的增加而改变。以一定强度的电流刺激MFB或VTA时,Str或Amy工作电极周围的DA浓度会迅速增加,在背景电流信号的特定位置上可看到一凸起的波形变化部分,此即DA的氧化反应信号,另一凸起的波形变化部

分通常较小,为DA的还原反应信号。反应信号减去背景电流的结果即由单个氧化波和还原波组成的感应电流。在体电刺激MFB或VTA引起Str或Amy释放的DA和离体外源性存在DA时产生的氧化还原波形是相同的。

[0087] 电刺激诱发释放的DA产生的氧化还原波形通过CED1401plus(英国剑桥电子设计公司生产)的特定微机接口输入微机,通过特定的CED Average软件可对波形进行即时的观察、贮存及联机或脱机分析。DA的氧化电位设定为+600mV,在整个实验过程中保持恒定。

[0088] 每次实验结束后,均用标准DA溶液进行碳纤维电极的离体校准,常规评价电极敏感性和伏安测定信号。根据各种DA溶液浓度及对应的氧化电流(电压)值,绘出标准曲线,并根据标准曲线推算出实验测得的各氧化电流(电压)数据对应的DA浓度值,即可代表电刺激MFB或VTA诱发Str或Amy DA释放的实际释放量(以 $\mu\text{mol/L}$ 为释放量的单位)。

[0089] 3.3组织学检查:

[0090] 实验后将动物断头取脑,观察刺激电极及工作电极尖端位置是否准确,电极位置不准确的资料弃去不用。

[0091] 4.免疫组化:

[0092] 4.1动物灌注固定、取材:

[0093] 将大鼠麻醉后,剪开其胸腔,将20号皮下注射针头(切成平头,磨光滑)从左心室插入到主动脉口处,用止血钳固定好,剪开右心耳,快速滴注生理盐水(37°C)150~200ml冲洗,至大鼠肝脏发白,流出液基本无血为止。随即灌注4%多聚甲醛,先快速灌注200ml,再缓慢滴注100ml。取出前囟后4.8mm~6.8mm脑块放入4%多聚甲醛中后固定10~12小时,然后经脱水后行石蜡包埋,用石蜡切片机作冠状连续切片,片厚 $10\mu\text{m}$,按照Hsu的ABC方法作免疫组化(如下4.2所示)。

[0094] 4.2免疫组化流程:

[0095] 石蜡切片,常规脱蜡至水 \rightarrow 入0.3% H_2O_2 甲醇溶液中,孵育15min,消除内源性过氧化物酶的活性 \rightarrow PBS冲洗(以下均为0.01M,PH 7.4),5min \times 3 \rightarrow 10%正常山羊血清, 37°C 孵育15min \rightarrow 吸去羊血清,加一抗(1:10000,用抗体稀释液稀释),于湿盒内 4°C 过夜 \rightarrow PBS冲洗,5min \times 3 \rightarrow 滴加生物素标记的二抗工作液, 37°C 孵育30min \rightarrow PBS冲洗,5min \times 3 \rightarrow 滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液, 37°C 孵育30min \rightarrow PBS冲洗,5min \times 3 \rightarrow 0.05% DAB -3% H_2O_2 液呈色5min \rightarrow 梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片 \rightarrow 镜检,照相。

[0096] 4.3细胞计数方法:

[0097] 取黑质、腹侧背盖区均最明显处的3张切片(隔一取一),在密集阳性细胞中央部分取4个互不重叠的高倍视野(40×10)计数视野内阳性细胞数。每个视野数两遍,取平均数作为该视野内的阳性细胞数,顺序为自上而下,由左至右,不完全位于视野内的细胞不计数。最后把各视野内的细胞数再取平均数。

[0098] 5.实验结果:

[0099] 根据PD大鼠APO诱发的旋转行为实验学方法,大鼠在经过药物预处理两周后进行6-OHDA单侧损毁内侧前脑束(MFB),术后继续药物处理两周后,大鼠先后经过行为学测试,纹状体多巴胺释放测试以及大鼠处死后行脑切片,免疫组化方法检测黑质、腹侧被盖区的TH阳性细胞数。

[0100] 结果发现,6-OHDA损毁大鼠模型在APO诱导下,出现明显剧烈的旋转行为,此为帕

金森病模型的重要特征。药物处理组包括Rapamycin,山楂酸,委陵菜酸以及山楂酸委陵菜酸1:2混合物均能明显降低大鼠的旋转数。而且,数据显示,山楂酸和委陵菜酸效果均优于经典自噬诱导剂Rapamycin;山楂酸委陵菜酸1:2混合物效果最好,能够将PD模型大鼠的旋转数降低47%,如图8所示。

[0101] 另外,FCV法测定电刺激腹侧被盖区(VTA)后纹状体多巴胺(DA)释放结果显示,大鼠损毁侧的DA释放量极具下降。相比较生理盐水处理组,药物处理组大鼠纹状体DA释放量明显增加。对应以上所述行为学数据,山楂酸和委陵菜酸效果均优于阳性对照Rapamycin;山楂酸委陵菜酸1:2混合物效果最好,能够将PD模型大鼠的DA释放量提高5.5倍,如图9所示。

[0102] 最后,TH染色发现,在DA神经元密集的VTA区呈现出大量的TH阳性颗粒,TH阳性颗粒可被认为是DA能神经元。在40×10高倍显微镜下,集中在阳性颗粒组成区域的中央部分进行拍照,如图10所示。相比较正常组,6-OHDA损毁后,VTA区TH阳性颗粒急剧下降,即代表VTA区DA能神经元数量下降。经过不同药物处理后,DA能神经元数目有不同程度的提高,如图11所示。

[0103] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

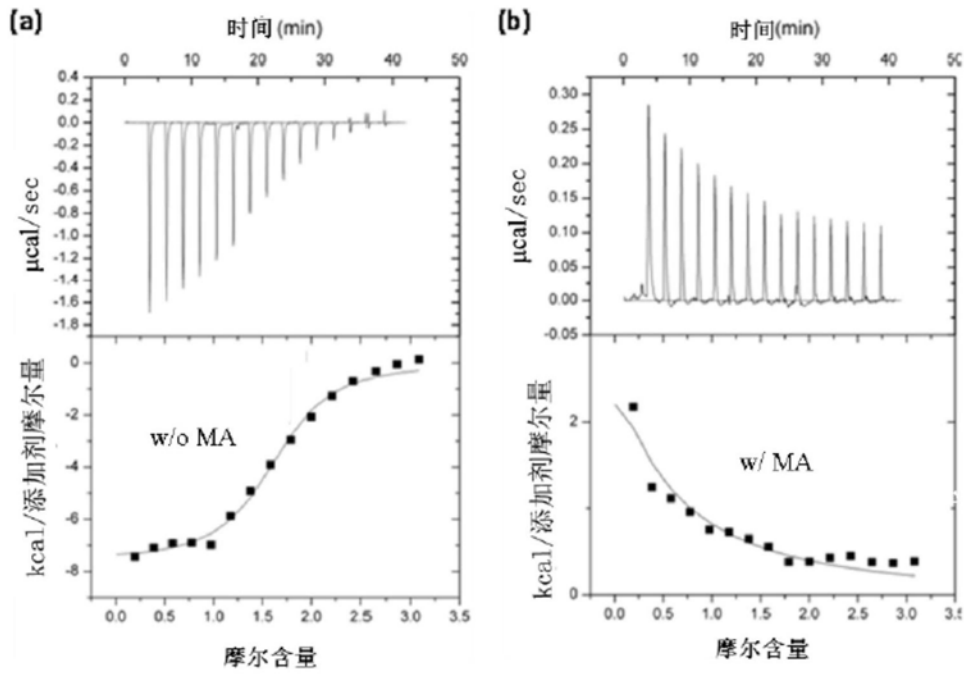


图1

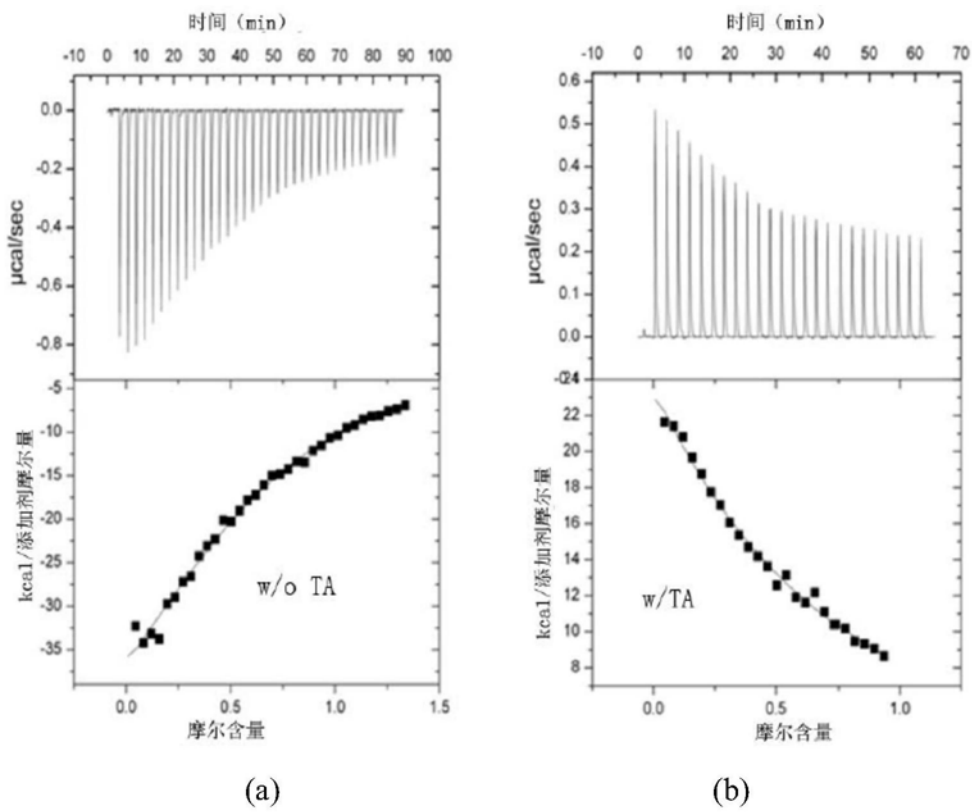


图2

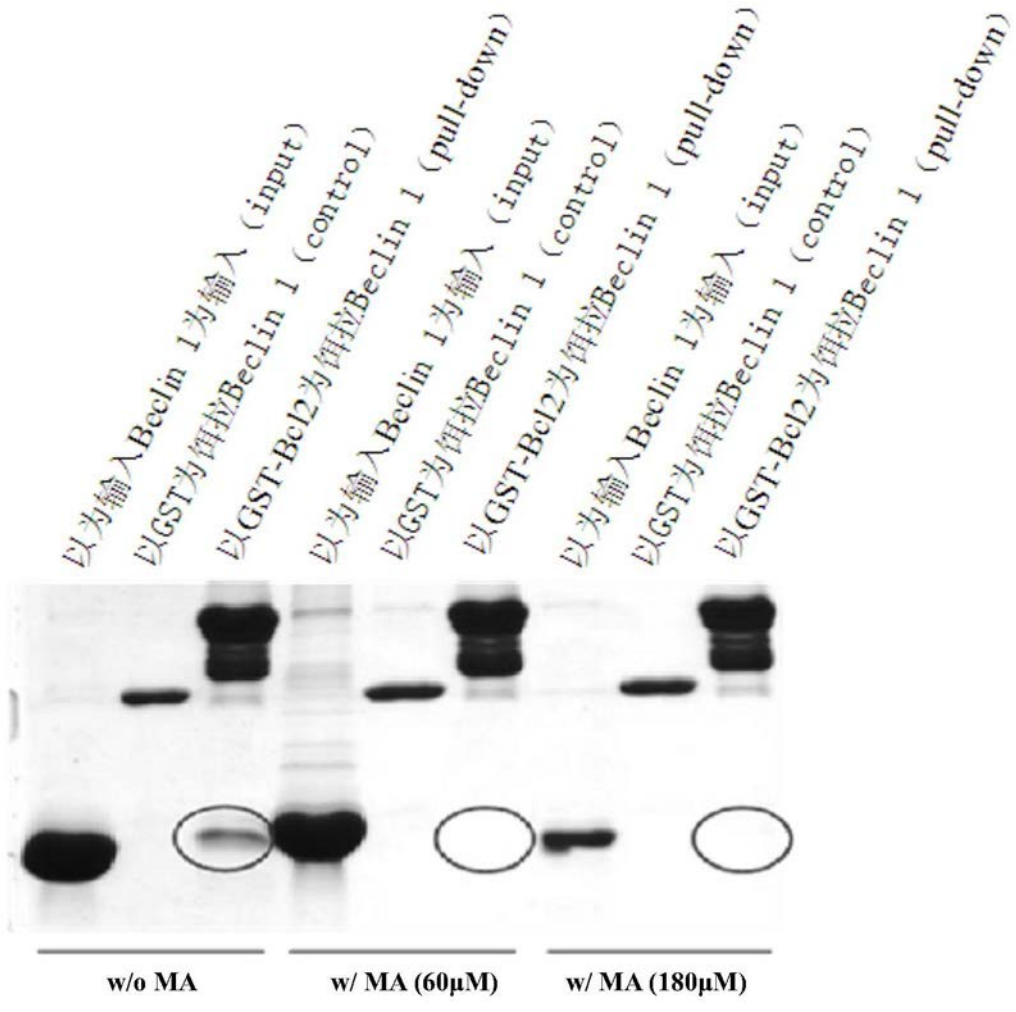


图3a

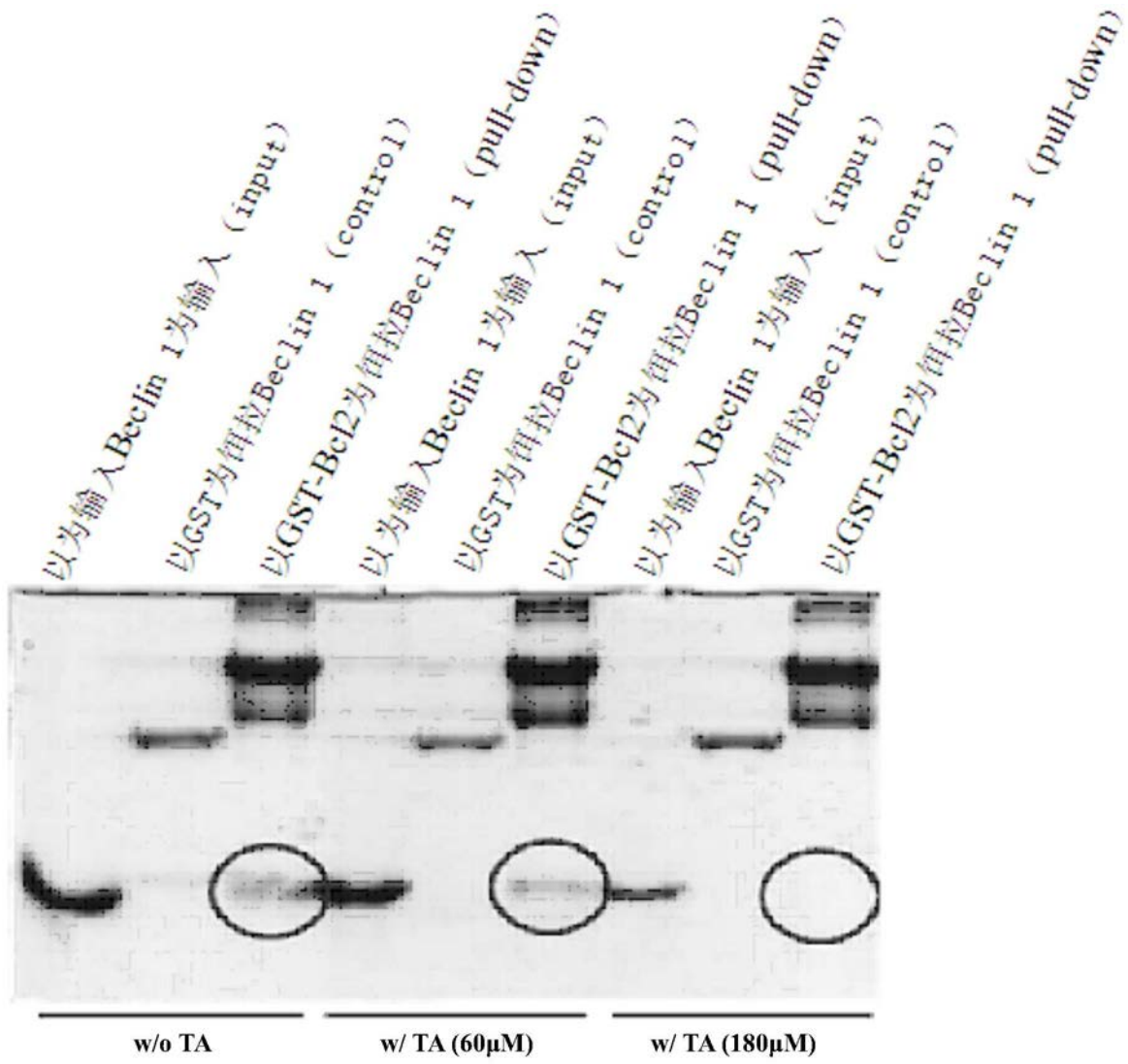


图3b

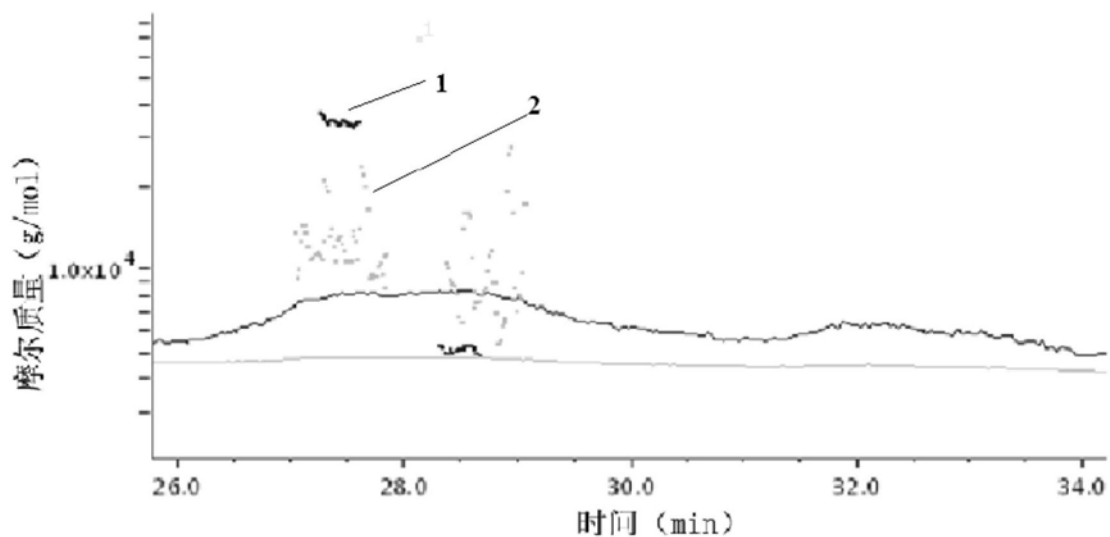


图4

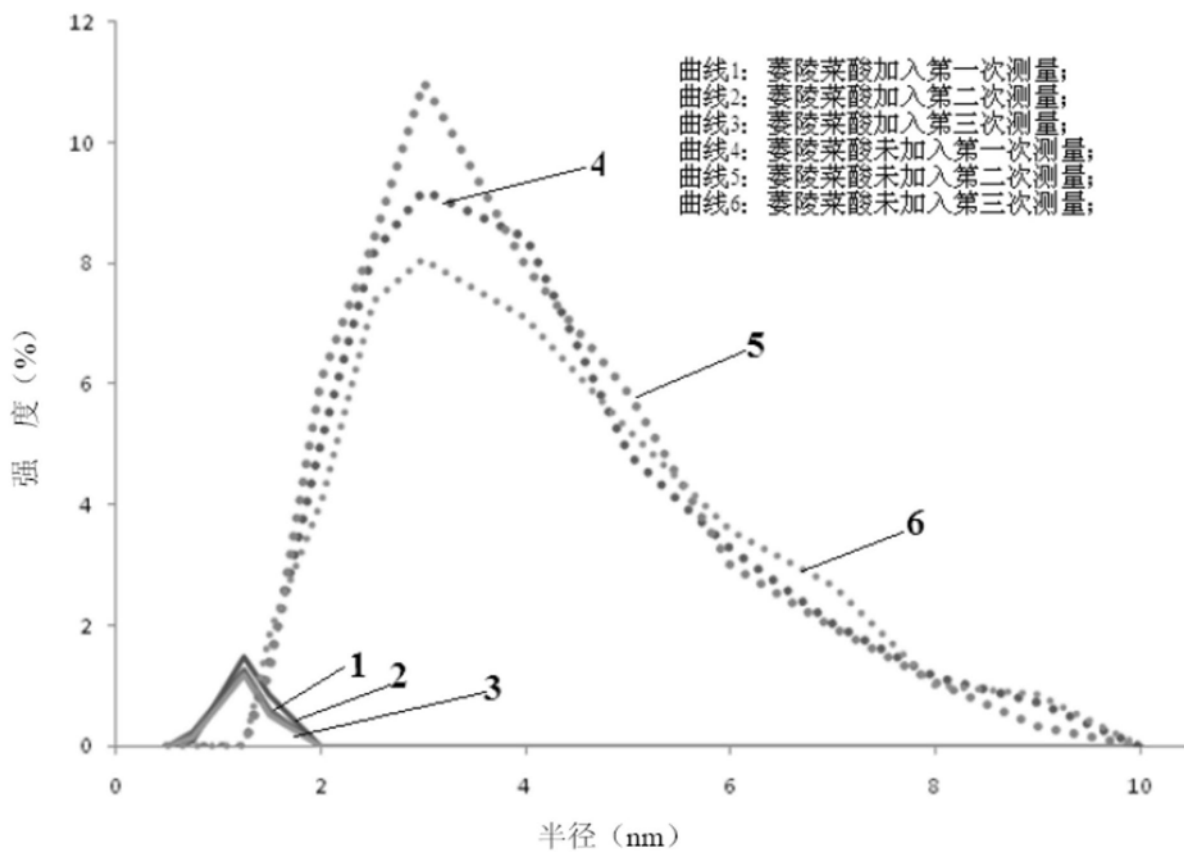


图5

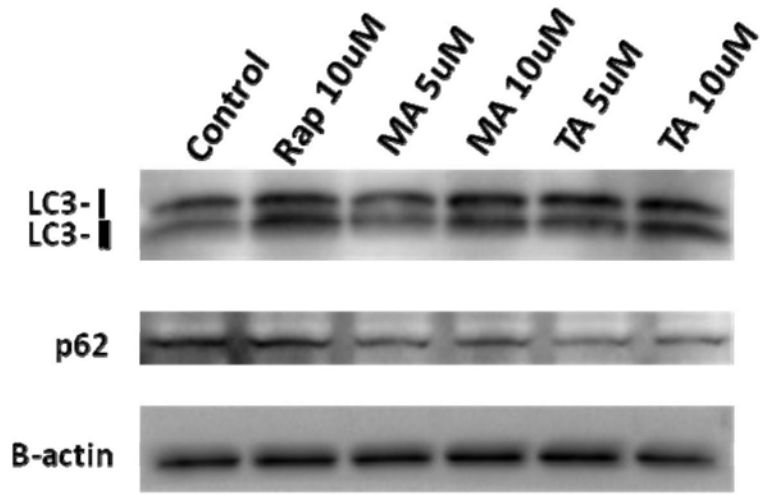


图6

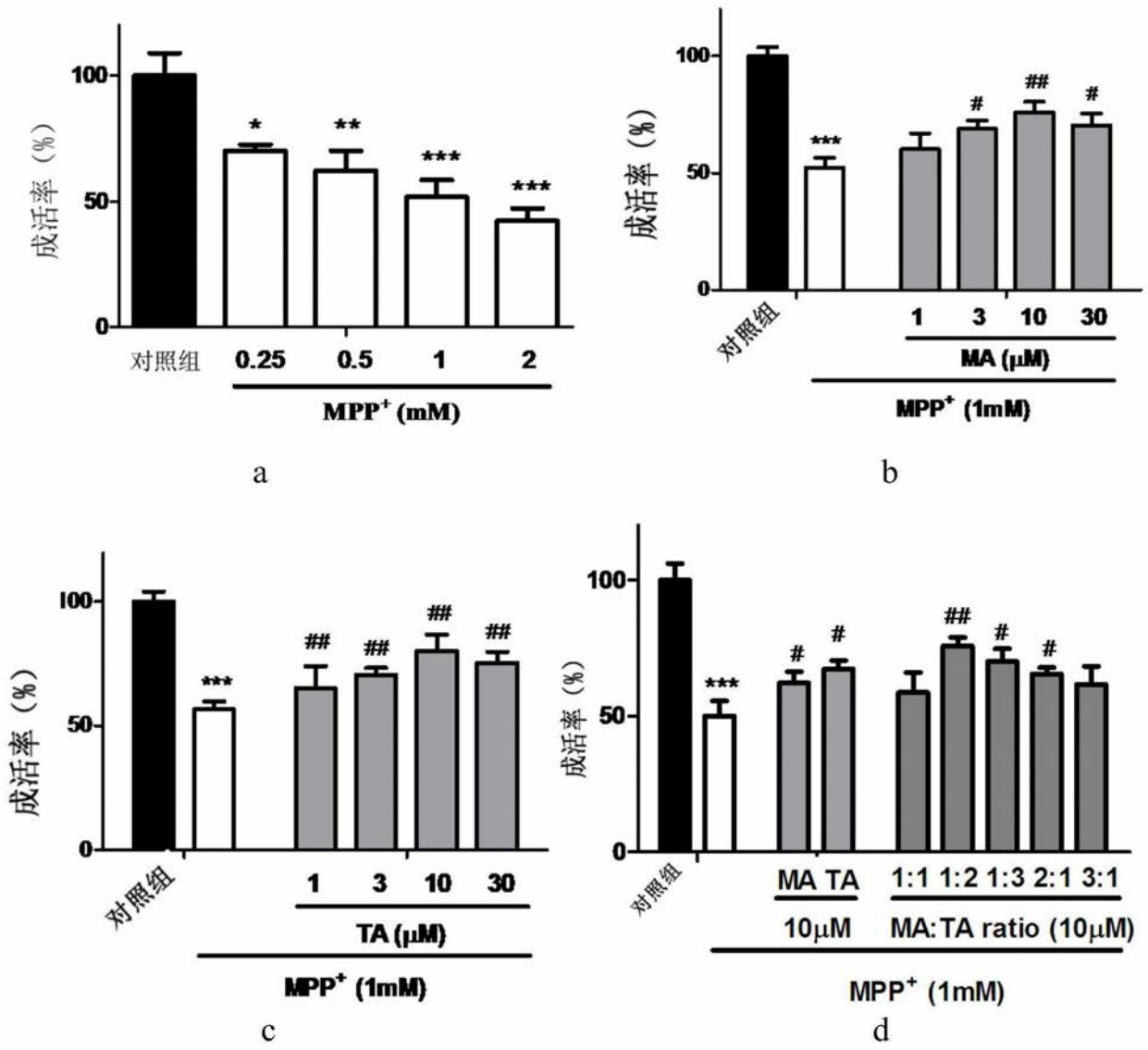


图7

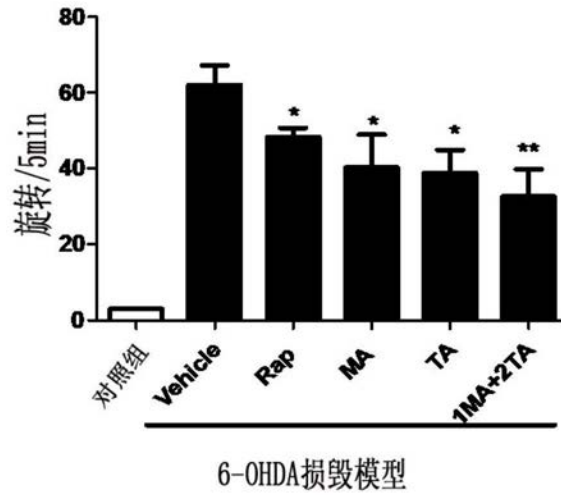


图8

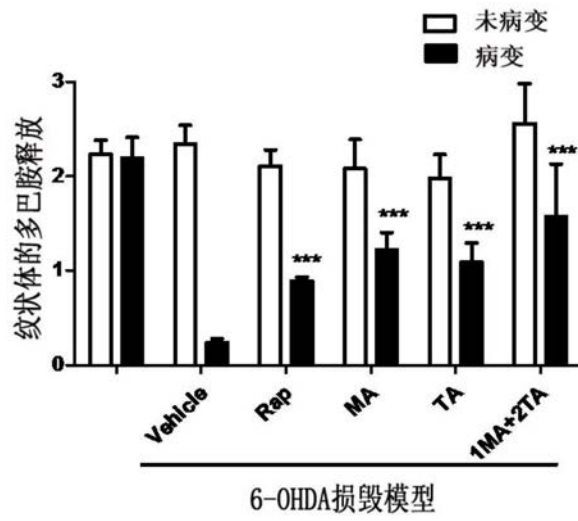


图9

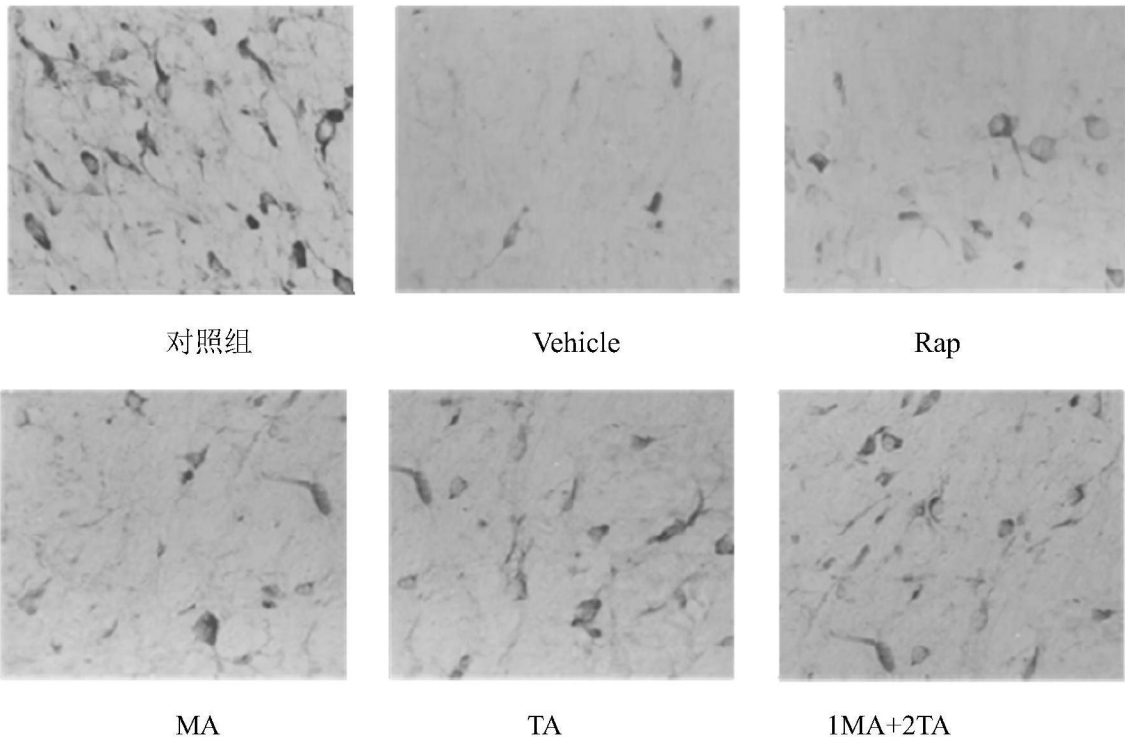


图10

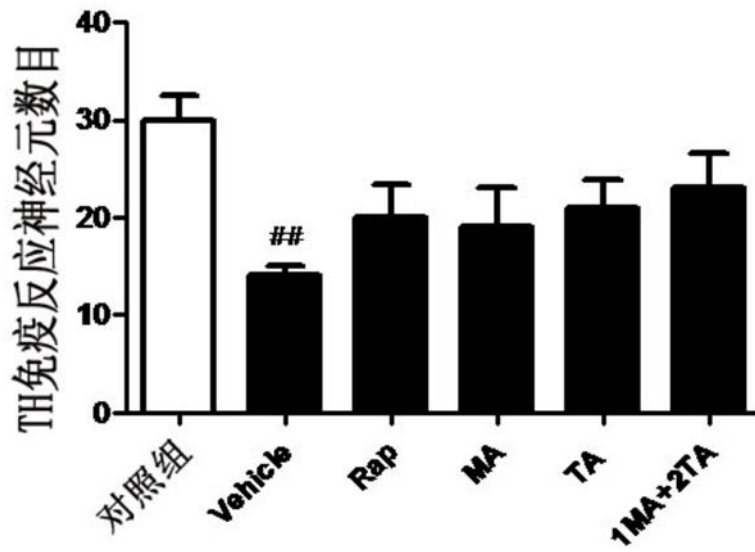


图11