



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105738630 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201610086468.6

(22)申请日 2016.02.16

(71)申请人 林兴

地址 530021 广西壮族自治区南宁市双拥路22号广西医科大学

(72)发明人 林兴 黄权芳 韦玲 梁春宏
吕淑娟 黄仁彬 张士军

(74)专利代理机构 广西南宁明智专利商标代理有限公司 45106

代理人 黎明天

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

丝/苏氨酸激酶抑制蛋白在治疗免疫性肝纤维化药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了丝/苏氨酸激酶抑制蛋白在治疗免疫性肝纤维化药物中的作用的研究。首次对RKIP在免疫性肝纤维化形成过程中的作用机制进行了探讨,通过动物实验及体外细胞实验表明,在免疫性肝纤维化形成过程中,Raf-1/ MEK/ ERK1,2信号转导途径的激活与RKIP的蛋白表达下降和磷酸化增加密切相关,RKIP 在肝纤维化发生机制中具有重要的调控作用。因此,通过RKIP超表达从而抑制Raf-1/ MEK/ERK1,2信号转导通路,是治疗免疫性肝纤维化新药的重要靶向。丝/苏氨酸激酶抑制蛋白可应用在制备治疗免疫性肝纤维化的药物中。

1. 丝/苏氨酸激酶抑制蛋白在治疗免疫性肝纤维化中的应用。
2. 丝/苏氨酸激酶抑制蛋白作为药物作用靶标在制备治疗免疫性肝纤维化药物中的应用。

丝/苏氨酸激酶抑制蛋白在治疗免疫性肝纤维化药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及丝/苏氨酸激酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitory protein, RKIP)的用途,具体地说是RKIP作为药物作用靶标在制备治疗免疫性肝纤维化药物中的应用。

背景技术

[0002] 肝纤维化是由多种病因导致慢性肝病共有的病理改变,特征性地表现为肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度合成与沉积。有多项研究证实,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝纤维化形成过程中的关键细胞成分,是肝内ECM的主要细胞来源。目前认为抑制HSCs活化与增殖是阻止并逆转肝纤维化的主要途径之一。

[0003] 近年来研究发现,Raf-1/MEK/ERK1,2信号通路参与了HSCs活化与增殖的调控过程,与肝纤维化的发生发展关系密切,可从多方面影响肝纤维化的形成。

[0004] 丝/苏氨酸(Ser/Thr)激酶抑制蛋白(简称:Raf激酶抑制蛋白,英文名:Raf kinase inhibitory protein, RKIP)是磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidylethanolamine binding protein, PEBP)家族中重要一员。该蛋白是一种和Raf-1相互作用并抑制Raf-1/MEK/ERK1,2信号通路的蛋白,RKIP也是目前在生物体内发现与Raf-1相互结合中起抑制作用的蛋白分子,预示其可能具有重要的生物学功能。RKIP作为信号通路的抑制因子在免疫性肝纤维化中的作用仍知之不多。

发明内容

[0005] 本发明的目的是研究开发丝/苏氨酸激酶抑制蛋白 RKIP作为药物作用靶标在制备治疗免疫性肝纤维化药物中的应用。

[0006] 本发明是基于发明人的实验研究而完成的。

[0007] (一)Raf激酶抑制蛋白在免疫性肝损伤诱导大鼠肝纤维化形成过程中的动态表达情况

将SD雄性大鼠以无菌猪血清诱导形成免疫性肝纤维化动物模型,观察研究RKIP、p-RKIP等在肝纤维化不同时期肝组织中的分布及表达变化,以及Raf-1/MEK/ERK1,2通路的活化情况的作用。结果表明,猪血清成功复制出大鼠肝纤维化模型,该模型在形成过程中伴随着肝功能标志物的改变,出现肝细胞慢性炎细胞浸润,肝索排列紊乱,汇管区和中央静脉结缔组织变厚,肝组织胶原纤维明显增多,同时血清学指标HA、LN、COL-I、PCIII的含量升高。

[0008] 采用免疫组化检测肝组织RKIP、ERK及其磷酸化蛋白表达,RT-PCR检查RKIP、ERK、Col-I及Col-III mRNA的表达,Western blot检测RKIP、ERK等及其磷酸化蛋白的表达,结果表明,在肝纤维化形成过程中,RKIP表达水平下降,同时磷酸化RKIP水平升高。同时磷酸化ERK、Raf-1、MEK-1表达明显增加,表明肝纤维化发生过程中存在Raf-1/MEK/ERK1,2信号转导通路的活化。

[0009] (二)Raf激酶抑制蛋白在活化HSCs 中的表达情况和磷酸化水平

细胞结果显示,IL-1 β 刺激组、Locostatin+ IL-1 β 组及Locostatin组的大鼠 HSCs的 ERK1 mRNA表达量显著升高。经IL-1 β 作用48h的HSCs的RKIP、ERK、p-ERK的蛋白表达量均显著升高,经Locostatin作用48h的HSCs的 RKIP蛋白表达量显著下降,而p-ERK、 α -SMA的蛋白表达量显著升高,以上结果提示,RKIP经Locostatin抑制后表达量下降,Raf-1/MEK/ ERK1, 2信号转导通路被激活促进了HSCs的活化、增殖。

[0010] 总之,本发明首次对RKIP在治疗免疫性肝损伤、肝纤维化中的作用进行了研究,实验表明,在肝纤维化形成过程中,RKIP表达水平下降和磷酸化RKIP水平升高与Raf-1/MEK/ ERK1, 2信号转导途径的激活密切相关,上调RKIP水平可抑制肝纤维化发生发展,因而是药物治疗肝纤维化的重要靶标。丝/苏氨酸激酶抑制蛋白可应用在制备治疗免疫性肝纤维化的药物中。

具体实施方式

[0011] 实验方案:

(一)、RKIP在免疫性肝损伤诱导大鼠肝纤维化形成过程中的动态表达情况

(1)实验动物模型的制备、分组及处理

SD雄性大鼠88只,体重为(140 \pm 20)g,分为正常对照组28只,模型组60只。正常对照组腹腔注射生理盐水0.5mL/只,每周两次。模型组用无菌猪血清腹腔注射 0.5mL/只,每周 2次,共 18周,复制大鼠肝纤维化模型。分别于 8wk、11wk、14wk、18wk随机选取模型组大鼠 15只、正常组大鼠7只,拔眼球取血后处死大鼠,无菌条件切开皮肤进入腹腔,立即留取左叶肝组织于-80 $^{\circ}$ C保存,再切取部分肝脏左叶以 4%多聚甲醛固定,以备后用。肝组织均取自肝左叶的相同部位。

[0012] (2)检测指标

①全自动生化分析仪检测血清ALT、AST。

[0013] ②ELISA试剂盒检测血清I型胶原(COL-I)、III型前胶原(PCIII)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)。

[0014] ③ELISA试剂盒检测肝组织III型前胶原(PCIII)、层粘连蛋白(LN)。

[0015] ④HE 染色:石蜡包埋的肝组织以5 μ m 的厚度连续切片,按常规实验步骤进行染色。

[0016] ⑤Masson 三色染色:肝组织以5 μ m 厚度连续切片,按常规实验步骤进行染色。

[0017] ⑥免疫组织化学检测:RKIP、p-RKIP、p-ERK1/2、ERK1/2的表达情况。

[0018] ⑦RT-PCR 测定RKIP mRNA、COL-I mRNA、COL-III mRNA、ERK1 mRNA、ERK2 mRNA 的表达量。

[0019] ⑧Western blot方法检测RKIP、p-RKIP、p-ERK1/2、ERK1/2、COL-I、COL-III、 α -SMA、MEK、p-MEK的表达水平。

[0020] (3)实验结果:

①大鼠生命体征、肝脏指数的变化

正常对照组和模型组大鼠精神状态均良好、毛发光滑,活动及饮食饮水量正常,体重增长无统计学差异。从实验开始至实验结束时,正常对照组及模型组大鼠均无死亡。解剖时可见模型组大鼠肝脏发生一定程度的肿大、增生,与正常对照组相比,模型组大鼠肝脏指数增

大($p < 0.05$)。结果见表1-1。

表1-1 免疫性肝纤维化大鼠肝脏指数的变化($\pm s$)

组别	时间(周)	n	肝脏指数
正常组	—	12	0.0237±0.0016
模型组	8	10	0.0308±0.0013**
	11	12	0.0485±0.0033**
	14	15	0.0351±0.0033**
	18	15	0.0258±0.0023*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

②免疫性肝纤维化大鼠肝脏组织的病理变化

HE染色结果显示,正常组大鼠肝小叶结构清晰且完整,以中央静脉为中心,向四周呈放射状排列,肝细胞未见变性或坏死。模型组肝细胞可见慢性炎细胞浸润,肝索排列紊乱,随造模时间延长汇管区和中央静脉结缔组织变厚,小叶内形成粗大的纤维间隙,分隔肝实质或小叶,形成大小不等的假小叶。

[0021] Masson 染色结果显示,正常对照组大鼠肝组织血管周围有少量蓝色胶原表达。模型对照组大鼠肝组织胶原纤维明显增多,蓝色胶原多位于汇管区及血管周围并向外延伸,连接形成较粗大的纤维间隔,肝细胞呈不同程度的肿大,胞质疏松。

[0022] ③免疫性肝纤维化大鼠血清HA、LN、COL-I、PCⅢ的含量变化

结果显示,模型组大鼠血清HA、LN、COL-I、PCⅢ的含量均显著高于正常组大鼠($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。结果见表1-2。

[0023] 表1-2免疫性肝纤维化大鼠血清HA、LN、COL-I、PCⅢ的含量变化($\pm s$)

组别	时间(周)	n	HA($\mu\text{g/l}$)	LN($\mu\text{g/l}$)	COL-I ($\mu\text{g/l}$)	PCⅢ($\mu\text{g/l}$)
正常	—	12	17.582±3.847	57.570±9.174	33.528±5.070	10.620±2.711
模型	8	10	46.604±7.501**	383.103±15.759**	371.902±17.327**	67.791±6.418**
	11	12	48.561±2.942**	330.760±11.373**	613.454±20.661**	136.052±7.233**
	14	15	49.252±5.626**	325.571±15.448**	396.556±18.124**	108.312±10.013**
	18	15	52.274±6.435**	322.520±15.447**	267.095±18.085**	64.857±64.657**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

④对肝纤维化大鼠肝组织LN、PCⅢ含量的影响

结果显示,模型组大鼠肝组织PCⅢ含量高于正常组大鼠,随着造模时间的延长,含量保持在相对平稳的水平;而肝组织LN的含量在第8、11周显著高于正常组,结果见表1-3。

[0024] 表1-3 免疫性肝纤维化大鼠肝组织LN、PCⅢ的含量变化($\pm s$)

组别	时间(周)	n	LN(μg/l)	PCIII(μg/l)
正常	-	12	22.962±2.716	55.664±10.647
模型	8	10	39.250±4.819**	151.300±7.144**
	11	12	29.556±3.800**	160.716±12.905**
	14	15	26.894±2.790	163.310±16.849**
	18	15	23.790±1.604	164.509±17.947**

注：与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

⑤免疫组织化学方法检测RKIP和ERK的磷酸化水平

免疫组织化学方法检测结果显示,正常组大鼠肝组织中RKIP表达量较高,模型组大鼠肝组织中RKIP阳性细胞明显减少;p-RKIP在正常大鼠肝组织的表达量较低,随造模时间延长,模型组大鼠肝组织中p-RKIP表达增强;正常大鼠肝组织较少表达ERK及 p-ERK,而模型组大鼠肝组织中ERK及 p-ERK的表达量较高(p<0.05或p<0.01),主要分布于汇管区和静脉周围,且随着造模时间的延长,ERK及 p-ERK的表达量呈递增趋势,统计结果如表1-4所示。

[0025] 表1-4免疫性肝纤维化大鼠肝组织RKIP、p-RKIP、ERK1/2、p-ERK1/2的含量变化(±s)

组别	时间(周)	n	RKIP	p-RKIP	ERK1/2	p-ERK1/2
正常	-	12	0.254±0.032	0.078±0.0116	0.070±0.008	0.075±0.021
模型	8	10	0.193±0.038**	0.115±0.0161**	0.101±0.012**	0.116±0.026*
	11	12	0.128±0.026**	0.116±0.138**	0.122±0.025**	0.127±0.034**
	14	15	0.102±0.016**	0.124±0.010**	0.135±0.010**	0.153±0.046**
	18	15	0.096±0.025**	0.135±0.026**	0.156±0.036**	0.159±0.019**

注：与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

⑥免疫性肝纤维化大鼠组织RKIP mRNA、COL-I mRNA、COL-III mRNA、ERK1 mRNA、ERK2 mRNA的表达变化

RT-PCR检测结果显示,模型组大鼠肝组织中 RKIP mRNA表达随造模时间的延长出现降低的趋势,ERK1 mRNA和ERK2 mRNA的表达随造模时间延长呈上升趋势,COL-I mRNA、COL-III mRNA 的表达量显著高于正常组,结果如表1-5所示。

[0026] 表1-5 免疫性大鼠肝组织RKIPmRNA、ERK1mRNA、ERK2mRNA、COL-I mRNA、COL-III mRNA的动态表达(±s,n=8)

组别	时间 (周)	RKIP	ERK1	ERK2	COL-I	COL-III
正常	-	1.022±0.150	1.168±0.115	1.078±0.172	1.124±0.385	1.196±0.361
模型	8	0.838±0.097**	1.636±0.305*	1.281±0.177**	3.470±0.579**	3.019±0.668**
	11	0.594±0.072**	1.700±0.162*	1.210±0.197*	3.805±0.728**	2.917±0.526**
	14	0.553±0.114**	1.843±0.351**	1.346±0.091**	2.251±0.784**	2.619±0.219**
	18	0.557±0.088**	2.615±0.220**	1.433±0.146**	2.191±0.452**	2.248±0.568**

注：与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

⑦Western blot方法检测RKIP和Raf-1/MEK/ERK1,2 信号通路相关蛋白及其磷酸化水平

Western blot方法检测结果显示,RKIP在正常组大鼠肝组织中表达量较高,模型组大鼠肝组织中RKIP表达量降低;ERK在正常肝组织中表达量较少,模型组中ERK表达增多;p-ERK在正常组大鼠肝组织中表达量较少,随造模时间的延长,模型组中p-ERK的表达量先升高后出现下降的趋势;随造模时间的延长,Raf的表达量呈下降趋势,而p-Raf呈上升趋势;MEK的在正常组的表达量较高,随造模时间的延长出现下降的趋势,p-MEK的表达量则呈上升趋势;COL-I、COL-III、α-SMA的表达量随造模时间的延长而上升(p<0.05或p<0.01)。结果如表1-6~1-8所示。

[0027] 表1-6 免疫性肝纤维化大鼠RKIP、ERK、Raf、MEK蛋白的动态表达(±s,n=8)

组别	时间 (周)	RKIP/ GAPDH	ERK/ GAPDH	Raf/ GAPDH	MEK/ GAPDH
正常	-	1.815±0.307	0.625±0.012	0.380±0.125	4.762±0.573
模型	8	1.488±0.288	0.780±0.077	0.231±0.052**	3.269±0.362*
	11	1.193±0.191**	0.849±0.194*	0.180±0.031**	3.487±0.363*
	14	1.107±0.292**	1.235±0.126**	0.187±0.014**	3.484±0.347*
	18	1.034±0.425**	1.438±0.138**	0.155±0.019**	3.010±0.366*

注：与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

表1-7 免疫性肝纤维化大鼠COL-I、COL-III、α-SMA蛋白的动态表达(±s,n=8)

组别	时间 (周)	COL-I/ GAPDH	COL-III/ GAPDH	α -SMA/ GAPDH
正常	—	0.029±0.009	0.049±0.010	0.074±0.016
模型	8	0.085±0.015*	0.129±0.035*	0.279±0.055*
	11	0.154±0.036*	0.198±0.074*	0.333±0.111*
	14	0.212±0.068*	0.236±0.096*	0.337±0.110*
	18	0.237±0.098*	0.253±0.113*	0.335±0.189*

注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

表1-8免疫性肝纤维化大鼠p-RKIP、p-ERK、p-Raf、p-MEK蛋白的动态表达(±s,n=8)

组别	时间 (周)	p-RKIP/RKIP	p-ERK/ERK	p-Raf/RAF	p-MEK/MEK
正常	—	0.189±0.070	0.171±0.012	0.612±0.188	0.289±0.043
模型	8	0.246±0.030	0.407±0.051**	0.757±0.105	0.317±0.057
	11	0.251±0.064	0.319±0.060	1.089±0.149*	0.604±0.122**
	14	0.305±0.096*	0.288±0.105	1.186±0.255**	0.615±0.195**
	18	0.356±0.111*	0.290±0.103	0.950±0.273	0.636±0.222**

注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

(二)、RKIP 在活化HSCs 中的表达情况和磷酸化水平

(1)实验方法及检测指标

①提取分离大鼠原代肝星状细胞成功培养及传代,并做了以下相关鉴定实验:

台盼兰染色,观察细胞存活率;应用荧光显微镜观察HSCs 的自发荧光;活化细胞鉴定:免疫细胞化学染色检测刚分离的肝星状细胞及培养8天以上的肝星状细胞 α -SMA 染色。

[0028] ②MTT 法检测Locostatin对 IL-1 β 刺激的大鼠 HSCs 增殖的影响

③RT-PCR 测定使用RKIP 的特异性抑制剂 Locostatin作用的肝星状细胞之间RKIP mRNA、ERK1 mRNA、COL-I mRNA、COL-III mRNA表达量。

[0029] ④Western blot 实验检测IL-1 β 同时间过度激活的肝星状细胞,与同时使用Locostatin作用的肝星状细胞之间RKIP、ERK、p-ERK、COL-I、COL-III及 α -SMA蛋白的表达

(2)实验结果:

① MTT 法检测IL-1 β 和 Locostatin对大鼠 HSCs 增殖的影响

MTT 法检测实验结果显示,与正常组比较,采用IL-1 β 刺激组的细胞增殖率为80.2%,Locostatin+IL-1 β 组的细胞增殖率为25.1%,Locostatin组的细胞增殖率为7.7%。

[0030] ② Locostatin 对大鼠肝星状细胞 ERK信号通路相关基因表达的影响

RT-PCR 法检测结果显示,与正常组比较,采用IL-1 β 刺激组、Locostatin+IL-1 β 组及Locostatin组的大鼠 HSCs的RKIP mRNA 的表达量无统计学差异,而ERK1 mRNA、COL-I mRNA、COL-III mRNA表达量显著升高(p<0.05或p<0.01)。结果如表2-1所示。

[0031] 表2-1.大鼠肝星状细胞RKIPmRNA、ERK1mRNA、COL-1mRNA、COL-III mRNA表达的影响($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)($\pm s$)

Groups	RKIP	ERK1	COL-I	COL-III
Control	0.936±0.110	1.521±0.231	1.200±0.227	1.086±0.115
IL-1 β	1.081±0.142	2.206±0.374**	1.465±0.274	1.975±0.346**
Locostatin+IL-1 β	0.971±0.146	1.799±0.220*	1.998±0.275**	1.828±0.235**
Locostatin	0.911±0.150	2.135±0.300**	1.920±0.334**	2.603±0.326**

注:与空白对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

③ Locostatin 对大鼠肝星状细胞信号通路相关蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示,与正常组比较,经IL-1 β 作用48h的HSCs的RKIP、ERK、p-ERK及COL-I、COL-III的蛋白表达量均显著升高,经Locostatin作用48h的HSCs的 RKIP、COL-I、COL-III蛋白表达量显著下降,而p-ERK、 α -SMA的蛋白表达量显著升高,经Locostatin作用1h后经IL-1 β 作用47 h的HSCs的RKIP的蛋白表达量显著下降,而p-ERK的蛋白表达量显著升高(p<0.05或p<0.01)。结果如表2-2、2-3所示。

[0032] 表2-2.大鼠肝星状细胞RKIP、ERK、p-ERK蛋白的表达情况($\pm s$)

Groups	RKIP/ β -actin	ERK/ β -actin	p-ERK/ERK
Control	2.221±0.189	1.229±0.251	1.478±0.170
IL-1 β	3.031±0.599**	3.040±0.475**	3.535±0.823**
Locostatin+IL-1 β	1.259±0.303**	1.274±0.234	2.918±0.698**
Locostatin	1.089±0.213**	1.230±0.245	2.260±0.242*

注:与空白对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

表2-3.大鼠肝星状细胞COL-I、COL-III、 α -SMA蛋白的表达($\pm s$)

Groups	COL-I/ β -actin	COL-III/ β -actin	α -SMA/ β -actin
Control	0.700±0.044	0.628±0.133	0.369±0.057
IL-1 β	0.870±0.080**	0.747±0.064*	2.237±0.302**
Locostatin+IL-1 β	0.387±0.088**	0.316±0.056**	2.528±0.355**
Locostatin	0.485±0.096**	0.349±0.061**	6.052±0.961**

注:与空白对照组比较,*P<0.05,**P<0.01。