



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115737616 B

(45) 授权公告日 2024.06.07

(21) 申请号 202211485913.8

(22) 申请日 2022.11.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115737616 A

(43) 申请公布日 2023.03.07

(66) 本国优先权数据
202111432753.6 2021.11.29 CN

(73) 专利权人 南方医科大学南方医院
地址 510515 广东省广州市广州大道北路
1838号

(72) 发明人 黄冰 林莹 刘思德 张亚历
李爱民 蒋文 李艺闻

(74) 专利代理机构 广州广典知识产权代理事务
所(普通合伙) 44365
专利代理师 万志香

(51) Int. Cl.
A61K 31/166 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 113631158 A, 2021.11.09
CN 108379585 A, 2018.08.10
CN 111686097 A, 2020.09.22
CN 112912093 A, 2021.06.04
CN 1843508 A, 2006.10.11
US 2015038545 A1, 2015.02.05
WO 2020046002 A1, 2020.03.05
任旭等.《消化内科主治医生550问 第4版》.

中国协和医科大学出版社, 2021, 第142-143页.

Mélissa Chervy et al. Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients. 《GUT MICROBES》. 2022, 第14卷(第1期), 第e2127444页.

Linda Marek et al. "Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors with a Novel Connecting Unit Linker Region Reveal a Selectivity Profile for HDAC4 and HDAC5 with Improved Activity against Chemoresistant Cancer Cells". 《Journal of Medicinal Chemistry》. 2012, 第56卷(第2期), 第427-436页.

Linda Marek et al. "Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors with a Novel Connecting Unit Linker Region Reveal a Selectivity Profile for HDAC4 and HDAC5 with Improved Activity against Chemoresistant Cancer Cells". 《Journal of Medicinal Chemistry》. 2012, 第56卷(第2期), 第427-436页. (续)

审查员 宋秋轶

权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称
LMK-235在医学中的新应用

(57) 摘要
本发明涉及一种LMK-235在制备预防或者治疗炎症性肠病的药物中的应用。本发明发现LMK-235为HDAC4/5抑制剂,在已有的单细胞转录组数据提示HDAC4/5在成纤维细胞中富集。给予LMK-

235后,靶向抑制成纤维细胞中HDAC4/5的表达或者活性,并且抑制成纤维细胞的激活和分化,下调纤维化标志物和胶原蛋白的表达,从而缓解结肠炎的发生和发展,将有望为IBD增加新的治疗手段,同时拓宽了HDAC抑制剂在临床上的应用范围。

CN 115737616 B

[接上页]

(56) 对比文件

C. Felice et al. "Review article:
selective histone deacetylase isoforms as

potential therapeutic targets in
inflammatory bowel diseases".《Alimentary
Pharmacology and Therapeutics》.2014,第41卷
(第1期),第26-38页.

1. LMK-235在制备预防或者治疗炎症性肠病的药物中的应用,所述炎症性肠病是溃疡性结肠炎。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征是,所述药物的剂型是口服制剂。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征是,所述药物的剂型是注射剂。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的应用,其特征是,所述LMK-235在应用时靶向抑制患者的成纤维细胞中HDAC4/5的表达,并且抑制成纤维细胞的激活和活化。

LMK-235在医学中的新应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体是涉及LMK-235在医学中的新应用。

背景技术

[0002] 炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD) 又称肠炎,为累及回肠、直肠、结肠的一组非特异性的慢性肠道炎症性疾病,主要分为克罗恩病(Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC) 两类。除此之外,还有一些结肠病变,无法归入这两类,称为未定型结肠炎,一般较为少见。

[0003] IBD多发病于青壮年时期,致病因素尚不明确,多认为与遗传易感背景、环境的改变、肠道菌群失衡及免疫稳态失调等有关,致病因素的不确定性及其多样性使得IBD的治疗难度增加。近年来IBD的发病率呈上升趋势,发病率为11.6/10万,UC在发达国家发病率高,在发展中国家发病率大幅上升,已演变成全球性负担。

[0004] 由于发病原因尚不明确,目前对于IBD的治疗方法也很局限。目前主要的治疗方式仍以营养疗法、药物治疗、单克隆抗体相关的生物治疗、免疫抑制剂疗法为主,实践显示,上述传统疗法均不能完全有效地控制炎症的发展,且常并发严重的不良反应,极大地影响患者的生活质量和社会生产能力。

[0005] 炎症性肠病常用氨基水杨酸制剂柳氮磺胺吡啶、美沙拉嗪等,根据不同的严重程度,通常用免疫抑制剂来缓解症状,如强的松、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、6-巯嘌呤等。近年来,尽管在病人护理方面有了较大改善,但仍有相当一部分UC患者对免疫抑制剂相关药物的治疗不耐受,最终发展为结肠炎相关结直肠发育不良或癌症的病人,从而进行恢复性直肠切除术,严重影响患者的生活质量。因此,目前的临床现状为,针对免疫功能的治疗手段存在药物耐受、病情易反复、价格昂贵、普及率低及临床风险等问题。为此,靶向免疫细胞的药物已不能满足现有UC的防治需求,亟待开发新型的靶向非免疫细胞的防治手段。

[0006] 组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC) 是一类蛋白酶,对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥着重要的作用。在细胞核内,组蛋白乙酰化与组蛋白去乙酰化过程处于动态平衡,并由组蛋白乙酰化转移酶(histone acetyltransferase, HATs) 和HDACs共同调控。HDAC使组蛋白去乙酰化,从而与带负电荷的DNA紧密结合,促使染色质致密卷曲,导致特定基因转录受到抑制。多项研究显示,抑制HDACs可能减少促炎反应,缓解多种炎症症状。然而,目前HDAC抑制剂仍多用于肿瘤方面研究中,作用于肠道炎症方面的研究报道很少,尤其是它在治疗炎症性肠病方面迄今未有报道。

[0007] LMK-235是一种有效的、选择性的HDAC4/5抑制剂,化学式为 $C_{15}H_{22}N_2O_4$,淡黄色粉末状固体,在DMSO和乙醇中的溶解度为58mg/mL。目前LMK-235的研究主要集中在针对肿瘤的治疗和机制探索,如多发性骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、乳腺癌、卵巢癌,也有一部分研究阐述了其在炎症相关性疾病中的机制作用,如Graves眼病等,但总体来说研究极其有限,具有较高的开发价值。

[0008] 由于至今炎症性肠病的病因仍不明确,一直以来认为免疫稳态失调是其发生发展

的一个重要因素,与之相对应的是一系列免疫抑制剂药物在治疗炎症性肠病中的推广和应用。然而,针对免疫功能的治疗手段存在药物耐受、病情易反复、价格昂贵、普及率低及临床风险等问题。因此,靶向免疫细胞的药物已不能满足现有的防治需求,亟待开发新型的靶向非免疫细胞的防治手段。

发明内容

[0009] 基于此,本发明的目的是提供LMK-235在医药中的新应用。

[0010] 实现上述目的的技术方案包括如下:

[0011] LMK-235在制备预防或者治疗炎症性肠病的药物中的应用。

[0012] 在其中一些实施例中,所述炎症性肠病是克罗恩病。

[0013] 在其中一些实施例中,所述炎症性肠病是溃疡性结肠炎。

[0014] 本发明的另一目的是提供一种用于预防和/或治疗炎症性肠病的药物组合物,所述药物组合物包括活性成分以及药学上可接受的辅料,所述活性成分包括LMK-235。

[0015] 本发明的另一目的提供一种预防和/或治疗炎症性肠病的方法。

[0016] 一种治疗炎症性肠病的方法,包括有需要的患者施用有效量的LMK-235或者LMK-235药物组合物或者LMK-235制剂。

[0017] 本发明的发明人发现LMK-235在单细胞转录组数据提示HDAC4/5在成纤维细胞中富集。给予LMK-235后,靶向抑制成纤维细胞中HDAC4/5的表达,并且抑制成纤维细胞的激活和活化,下调了胶原蛋白和纤维化标志物的表达,明显减缓了纤维化的进程,从而缓解结肠炎的发生和发展,将有望为IBD增加新的治疗手段,同时拓宽了LMK-235在临床上的应用范围。

[0018] 本发明通过发现了LMK-235对DSS(葡聚糖硫酸钠盐)诱导的小鼠实验性结肠炎具有显著的改善作用,并且在体内细胞实验(CCD-18CO细胞系)中也证实LMK-235能在转录和翻译水平抑制成纤维细胞的激活和活化,下调胶原蛋白和纤维化标志物的表达,减缓纤维化进程。综上所述,这将有助于扩展LMK-235在临床上尤其是炎症性肠病这一领域的应用范围。

附图说明

[0019] 图1为实施例1中试验后小鼠的记录情况,其中,A为体重百分比,B为DAI评分,C为生存率,D为结肠长度,E为病理评分。

[0020] 图2为实施例1中典型结肠结构HE示意图。

[0021] 图3为实施例2中热图,显示肠道各细胞亚群中HDAC亚型的分布水平。

[0022] 图4为实施例3中的Western blotting检测结果。

[0023] 图5为实施例3中ATAC2、COL1A1、COL1A2、FAP、FN1、HDAC4、HDAC5、MMP1、MMP3、MMP9、MMP10的mRNA表达水平检测结果。

具体实施方式

[0024] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述。本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本

发明公开内容的理解更加透彻全面。

[0025] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0026] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。本发明所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0027] 本发明涉及了LMK-235在医药中的新应用,即在一些实施例中,提供了LMK-235制备预防或者治疗炎症性肠病的药物中的应用。

[0028] 所述LMK-235在应用时靶向抑制成患者的纤维细胞中HDAC4/5的表达,并且抑制成纤维细胞的激活和活化。

[0029] 本发明的一些实施例中,还提供了所述一种治疗炎症性肠病的方法。

[0030] 一种治疗炎症性肠病的方法,包括有需要的患者施用有效量的LMK-235或者LMK-235药物组合物或者LMK-235制剂。

[0031] LMK-235制剂,可以是口服制剂,如胶囊剂,片剂;也可以是注射剂,等等。

[0032] 可以以多种剂型施用本发明的LMK-235或者LMK-235药物组合物或者LMK-235制剂。在一个实施方案中,可以将包含本发明的化合物的药物组合物配制成适于可以局部、非肠道、口服、肺部、气管内、鼻内、经皮或十二指肠内给药的形式。典型的给药途径为肠胃外给药、鼻内给药或经皮给药或者通过吸入给药。

[0033] 也可以肠胃外施用本发明的化合物,不论是皮下、静脉内、肌内、胸骨内、透皮或通过输注技术施用。

[0034] 在本发明的某些实施例中,对患有炎症性肠病的患者进行治疗。患者可以是患有炎症性肠病的任何动物,优选为哺乳动物,优选为人。所述药物制备成适用于儿童或成人的剂型。

[0035] 在本发明的各种实施例中,炎症性肠病可以是以下任一种:克罗恩病、胃十二指肠性克罗恩氏病、克罗恩(肉芽肿性)结肠炎、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、贝赫切特氏病、显微镜下结肠炎、溃疡性直肠炎、直肠乙状结肠炎、空肠回肠炎、左半结肠炎、全结肠炎、回肠结肠炎、回肠炎和未定型结肠炎。

[0036] 在本发明的优选实施例中,所述炎症性肠病是克罗恩病。

[0037] 在本发明的另一优选实施例中,所述炎症性肠病是溃疡性结肠炎。

[0038] 以下结合具体实施例对本发明作进一步详细的说明。

[0039] 实施例1

[0040] 通过DSS造模的实验性小鼠结肠炎,观察LMK-235对其是否有缓解及治疗作用。

[0041] (1) 动物、试剂和材料准备:18只5周龄C57BL/6雄性小鼠来自辽宁长生(广州言诚生物科技有限公司)。DSS(葡聚糖硫酸钠盐,美国MP Biomedical公司)、LMK-235(selleck, S7569)。

[0042] (2) 配液:实验所用试剂均采用5% Drug in DMSO(二甲基亚砜)+10% Solutol+

85%生理盐水的配方。50mg LMK-235溶解于1.25mL的DMSO,浓度为40mg/mL,随后加入2.5mL Solutol+21.25mL生理盐水,配制成浓度为2mg/mL的LMK-235溶液。同样,配制等量的对照溶剂vehicle:1.25mLDMSO+2.5mL Solutol+21.25mL生理盐水。

[0043] (3) 分组:18只5周龄C57BL/6雄性小鼠经一周隔离检疫后(6周龄),平均分成3组,每组6只,分别为DSS+LMK-235组、DSS+vehicle组、control组。实验开始初期(Day0)各组平均体重分别为20.615g、20.850g、20.615g,无组间差异。

[0044] (4) 小鼠炎症性肠病模型的建立:DSS+LMK-235组和DSS+vehicle组采用3%DSS饮水7天,从Day0 9:00am持续至Day7 9:00am,随后换回正常饮用水。Control组饮用正常水。含3%DSS饮用水用双蒸水配制,现配现用,每3天更换1次。鼠粮为一般谷物饲料,小鼠自由食用,每3天更换1次。

[0045] (5) 实验处理:DSS+LMK-235组腹腔注射200uL/只,每天1次,从Day0-7共处理8天。DSS+vehicle组腹腔注射200uL/只,每天1次,从Day0-7共处理8天。Control组不予处理。

[0046] (6) 观察终点和肠道取样:

[0047] Day8 9:00am处死小鼠,解剖取出小鼠结肠,观察各组小鼠结肠形态及肝肾有无异常情况,记录结肠长度并进行统计分析,在结肠远、中、近三个位置分别取三个肠环进行固定和H.E.染色,得到病理评分并进行统计分析,余下进行单细胞测序进行进一步分析。

[0048] (7) 观察记录指标:实验过程中每天观察记录小鼠一般情况、体重、粪便性状、便血情况,并用EXCEL软件和GraphPad软件统计分析小鼠的体重百分比(weight percentage)、疾病活动指数(DAI)、生存率、结肠长度和病理评分。疾病活动指数包括三个指标:体重下降百分比(0/0-82%/4),粪便成形度(正常0-重度稀便4),粪便血量(正常0-重度便血4),总分12分。病理评分包括五个指标:隐窝结构(正常0-重度缺损/完全缺失3)、炎症细胞浸润程度(无0-密集3)、肌层增厚(隐窝基底位于粘膜肌层0-显著增厚3)、隐窝脓肿(无0-有1)、杯状细胞消失(无0-有1),总分11分,有两名有经验的病理师评分。

[0049] 即:实验组(DSS+LMK-235):3%DSS饮用7天,同时腹腔注射浓度为2mg/mL的LMK-235溶液200uL/只,每天1次,从Day0-7共处理8天。

[0050] 对照组(DSS+vehicle):3%DSS饮用7天,同时腹腔注射对照溶剂vehicle200uL/只,每天1次,从Day0-7共处理8天。

[0051] 空白对照组(control):饮用正常水,不做其他任何处理。

[0052] 结果及分析:

[0053] (1) LMK-235治疗组的体重下降水平和DAI评分显著低于溶剂对照组,生存率好于溶剂对照组,病理评分也明显低于溶剂对照组。LMK-235治疗组小鼠体重下降程度和DAI评分在DAY5-DAY8均明显小于对照组(* $P < 0.05$,

[0054] ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$), LMK-235和control组在DAY8的生存率均为100%,而溶剂对照组为83%,生存率上存在优势。(图1)

[0055] (2) LMK-235治疗组的结肠长度与溶剂对照组相比没有明显差异,但结肠病理评分存在差异,且结肠HE染色切片(图2)可明显观察到LMK-235治疗组的上皮和隐窝结构的破坏程度、炎症细胞浸润程度、肌层增厚等均明显轻于溶剂对照组,提示LMK-235明显改善了DSS诱导的结肠炎。这些结果都证实LMK-235在体内对结肠炎具有显著的缓解作用。

[0056] 实施例2

[0057] 通过人肠道组织单细胞测序,确定肠道各细胞HDAC亚型表达富集情况。(1) $10 \times$ 基因组单细胞5'端的RNA-seq文库制备和V(D)J测序。

[0058] 17名儿童(6名对照组,6名结肠炎,2名UC和3名CD受试者)的5个不同结肠节段的活检组织被汇集在一起,以及9名成人(3名结肠癌正常段,6名CD患者活动段)。用胶原酶1A (1mg/mL)和脱氧核糖核酸酶I (10U/mL)在37°C温和旋转30min,获得单细胞悬液。按照Chromium单细胞5'文库试剂盒的说明书,制备出单细胞5'基因文库表达。简而言之,将单细胞悬浮液与RT-PCR母液混合,装入纳升级别的凝胶珠,并根据制造商的说明将油分配到单细胞5'芯片中。来自单个细胞的RNA转录本是唯一条形码的。反转录后,条形码cDNA被提纯、扩增、末端修复,并根据制造商的说明书与Illumina适配器连接以产生单个多重库。所有得到的文库在Illumina Novaseq 6000平台上测序。

[0059] (2) 单细胞RNA-seq数据的预处理

[0060] 首先,利用Cell Ranger v2.1.1管道(10x基因组学)对细胞条形码进行多路分解,并将读数与人类转录组(build GRCh38)进行比对。根据测序深度对细胞文库的生成结果进行归一化,并将其合并到原始基因表达矩阵(基因计数与细胞)中。使用R package Seurat v2.3.4将唯一分子标识符(UMI)计数矩阵转换为Seurat对象。使用以下程序来控制数据质量:检测到少于200个基因或大于5000个基因的细胞,检测到超过40000个UMI的细胞,以及超过15%的UMI来源于线粒体基因的细胞都被排除。用Seurat的NormalizeData功能对筛选出的基因表达矩阵进行归一化,其中每个基因的UMI数除以每个细胞的UMI总数,再乘以10,000,然后转换成对数尺度($\ln(\text{UMI-per-10000}+1)$)。

[0061] (3) 主要细胞簇的降维与识别

[0062] 利用数据预处理后的归一化基因表达矩阵,通过降维和聚类识别主要细胞簇。选取平均归一化表达值在0.01~3之间、离散度(方差/均值)大于0.5的可变表达基因进行主成分分析(PCA)。使用Seurat的RunTSNE功能的默认设置,将主成分用于t-stochastic neighbor embedding (TSNE)降维。通过在二维tSNE图谱上定位典型标记基因,确定了主要类群。

[0063] (4) 主要细胞团内功能细胞亚群的分析

[0064] 进一步分析了每个簇的可变表达基因进行主成分分析,并使用Seurat的JackStraw permutation test确定有意义的主成分,用于后续的聚类和tSNE可视化。Seurat的FindCluster功能使用默认参数(Adapted K参数和分辨率除外)来识别细胞亚群。值得注意的是,显示双系基因表达(UMI计数 ≥ 1)的细胞,包括CD3+CD19+细胞和CD68+CD19+细胞,从下游分析中移除,以消除潜在的双重捕获偏差。使用Seurat的FindAllMarkers功能鉴定每个细胞亚群的差异表达基因(DEGs)和特异性标记基因。通过Seurat中的差异分析包确定每个细胞亚群中HDACs亚型的分布水平。

[0065] 结果与分析:热图显示肠道各细胞亚群中HDAC亚型的分布水平(参见图3),可以看到,HDAC4/5在成纤维细胞中的分布水平高于其他细胞亚群,成纤维细胞中各HDAC亚型的表达情况也呈现HDAC4/5表达水平高于其他HDAC亚型,这提示LMK-235作为HDAC4/5抑制剂,其缓解结肠炎症的作用机制很可能是通过抑制肠道成纤维细胞的HDAC4/5表达或活性,进而抑制成纤维细胞的功能活性,减少胶原蛋白和纤维化标志物的产生,延缓纤维化进程,从而缓解结肠炎的发生和发展。

[0066] 实验例3

[0067] 通过TGF- β 和IGF-1诱导人正常结肠成纤维细胞激活,刺激胶原和纤维化相关分子的表达,观察体外条件下LMK-235是否能缓解甚至逆转纤维化的进程。

[0068] (1) 细胞、培养基、培养条件的准备:人正常结肠成纤维细胞系CCD-18CO

[0069] (ATCC, CRL-1459) 在EMEM(ATCC, 30-2003)+10%胎牛血清

[0070] (CTCC-002-071-500)+1%链霉素-青霉素(Gibco, 15140122)培养基中于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的细胞培养箱中培养,传代初期细胞密度为30%,2-3天后细胞密度可达到80-90%,选用第5-10代细胞进行相应实验。

[0071] (2) 试剂准备:LMK-235溶解于DMSO中,分别配制浓度为1mM、2mM、

[0072] 3mM、4mM的溶液,分装后存储于-80 $^{\circ}$ C条件,使用时添加1%

[0073] LMK-235于培养基中对细胞进行处理(DMSO有一定的细胞毒性,浓度不能超过1%)。TGF- β (peprotech, 96-100-21-10)和IGF-1

[0074] (peprotech, 100-11-100ug)先溶解于柠檬酸溶液至浓度为0.1mg/ml,随后加入海藻糖PBS将其分别稀释至终浓度为50ng/ μ l和10ng/ μ l,分装后存储于-80 $^{\circ}$ C,使用时分别添加1%TGF- β 和IGF-1。

[0075] (3) 体外细胞纤维化模型的建立:CCD-18CO在50ng/ml TGF- β +10ng/ml IGF-1的刺激条件下处理24h,胶原合成释放增加,成纤维细胞活化为肌成纤维细胞,为经典的体外细胞纤维化模型。

[0076] (4) 实验处理——翻译水平验证:将CCD-18CO稳定培养至第5-10代后,将细胞均匀铺板至六孔板中(8万/孔),培养24h后换成无血清培养基,饥饿处理过夜。次日将对照组的1个孔换成添加1%DMSO的正常培养基;刺激组的1个孔换成添加有1%DMSO的含有TGF- β 50

[0077] ng/ml+IGF-1 10ng/ml的正常培养基;实验组的4个孔换成添加有1%

[0078] 1mM、1%2mM、1%3mM、1%4mM的含有TGF- β 50ng/ml+IGF-1

[0079] 10ng/ml的正常培养基。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养24h。24h后在显微镜下观察细胞状态,去除培养基,用PBS清洗3遍,每孔加入70 μ l添加1%的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(新赛美, P002)的RIPA裂解液(碧云天, p0013B),用细胞刮刀将细胞刮取下来至1.5ml离心管中,用频率为35%的超声破碎10s,随后在冰上裂解30min,4 $^{\circ}$ C、14000rpm离心20min,取上清液。随后用BCA试剂盒将蛋白浓度调节至同一浓度,加入5x loading buffer(弗德, FD002),振荡混匀后于100 $^{\circ}$ C煮沸7min,将蛋白分装后于-20 $^{\circ}$ C保存。采用7.5%的SDS凝胶(雅酶, PG211)对蛋白样品进行western blotting检测实验,检测GADPH、ACTA2、SMAD2/3、P-SMAD2/3、FAP1、MMP9、COL1A1、COL1A2、Fibronectin、HDAC5的蛋白质表达水平。每组实验重复三次。

[0080] (5) 实验处理——转录水平验证:将CCD-18CO稳定培养至第5-10代后,将细胞均匀铺板至六孔板中(8万/孔),培养24h后换成无血清培养基,饥饿处理过夜。次日将对照组的1个孔换成添加1%DMSO的正常培养基;刺激组的1个孔换成添加有1%DMSO的含有TGF- β 50

[0081] ng/ml+IGF-1 10ng/ml的正常培养基;实验组的4个孔换成添加有1%

[0082] 1mM、1%2mM、1%3mM、1%4mM的含有TGF- β 50ng/ml+IGF-1

[0083] 10ng/ml的正常培养基。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养24h。24h后在显微镜下观察细胞状态,去除培养基,用PBS清洗3遍,每孔加入1ml RNAiso Plus(Takara, 9109),充分

吹打后吸取至1.5ml离心管中,室温静置5min;随后加入200ul氯仿,震荡混匀后室温静置15min,4°C、12000g离心15min;小心吸取上层水样液体(约400ul)至新的1.5ml离心管中,加入400ul异丙醇室温静置10min,4°C、12000g离心15min,弃上清;加预冷的75%乙醇1ml温和振荡,4°C离心7500g,5min;弃上清,空气干燥5-10min,用20ul DEPC水溶解。取1ug RNA进行逆转录,得到DNA。RNA存于-80°C,DNA存于-20°C。进行RT-qPCR实验,检测ATAC2、COL1A1、COL1A2、FAP、FN1、HDAC4、HDAC5、MMP1、MMP3、MMP9、MMP10的mRNA表达水平。每组实验重复三次。

[0084] 结果及分析:

[0085] (1)Western blotting结果参见图4,可以看出,TGF- β 50ng/ml+IGF-1 10

[0086] ng/ml刺激CCD-18CO后,ACTA2表达量增加,表明其成纤维细胞被激活,分化为肌成纤维细胞,而LMK-235可以抑制ACTA2的表达,预示LMK-235能在一定程度上抑制成纤维细胞的激活。TGF- β 1激活SMAD2/3磷酸化入核,进而与核内转录因子或辅助蛋白结合来调控基因表达,是TGF- β 诱导的纤维化最经典的通路。检测了SMAD2/3和P-SMAD2/3蛋白,发现在TGF- β 和IGF-1刺激后,SMAD2/3和P-SMAD2/3表达下调,LMK-235处理后这种下调有所恢复,表明LMK-235抑制纤维化可能是通过影响TGF- β /SMAD通路来发挥作用。而其他纤维化指标如FAP1、Fibronectin在TGF- β 和IGF-1刺激后显著上调,LMK-235处理后显著抑制这种上调,且存在浓度依赖性,即浓度越高,抑制表达效果越明显。TGF- β 和IGF-1可增加金属基质蛋白酶MMP9的表达,而LMK-235处理后可下调其表达。此外,TGF-

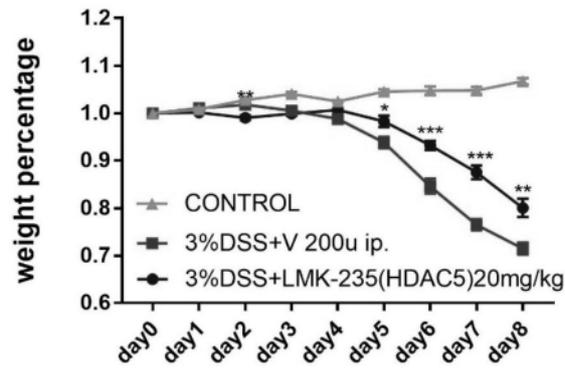
[0087] β 和IGF-1刺激可明显促进COL1A1、COL1A2这些胶原蛋白的表达,LMK-235可明显降低其表达,尤其是COL1A1,也具有浓度依赖性。

[0088] 综上所述,LMK-235能确切地抑制纤维化细胞活化和分泌胶原蛋白,

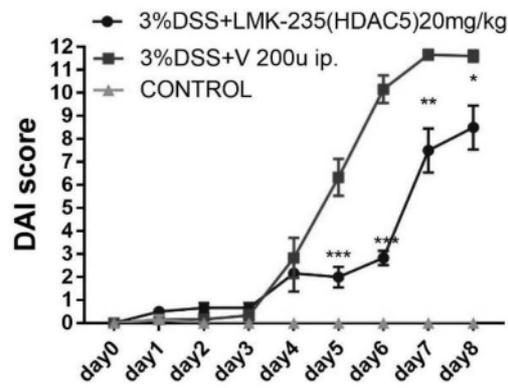
[0089] 减缓纤维化的进程,这一过程可能通过影响TGF- β /SMAD通路实现。(2)RT-qPCR结果如图5所示,COL1A1、COL1A2、ACTA2、FN1(Fibronectin)、FAP的mRNA表达水平与蛋白水平基本一致,在TGF- β 和IGF-1刺激后上调,LMK-235处理后均有不同程度的下调,其中ACTA2、FAP的下调更显著,表明LMK-235下调这些胶原蛋白和纤维化相关蛋白的表达是通过转录水平实现的,具体的相关机制仍需进一步探索。而金属基质蛋白酶如MMP1、MMP3、MMP9、MMP10在LMK-235处理后其转录水平的表达均有不同程度的上调,尤其是MMP9(与蛋白水平相反,可能存在转录后翻译调控的因素)。HDAC4和HDAC5的mRNA在LMK-235处理后也有所提高,表明LMK-235可能是通过影响组蛋白乙酰化酶的活性发挥作用,而非通过影响其表达含量。

[0090] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

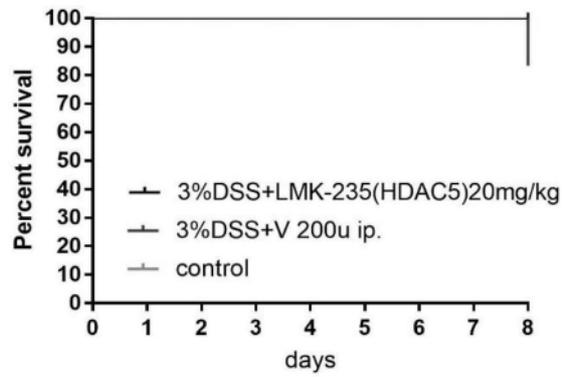
[0091] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。



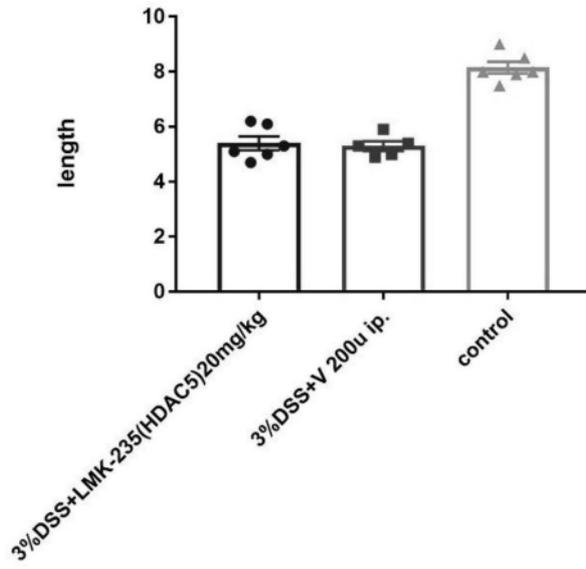
A



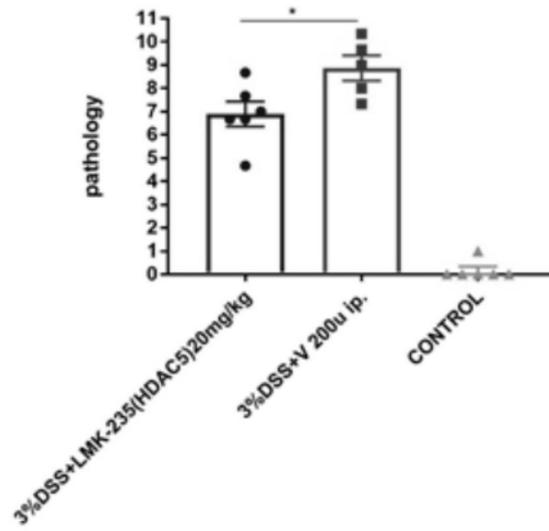
B



C

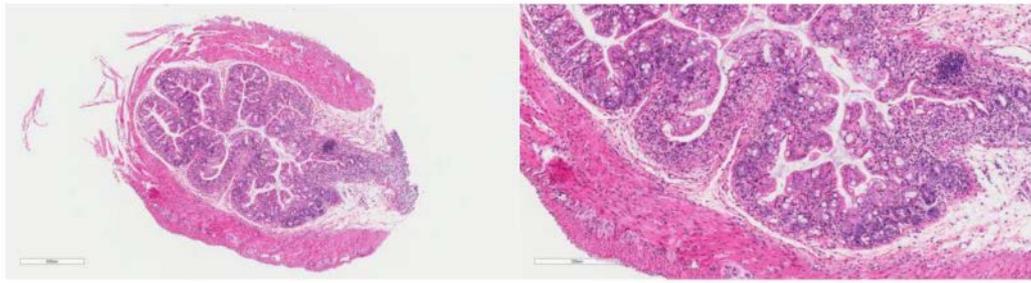


D

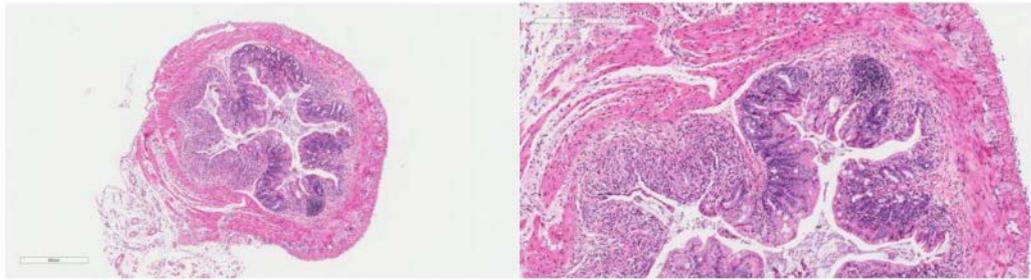


E

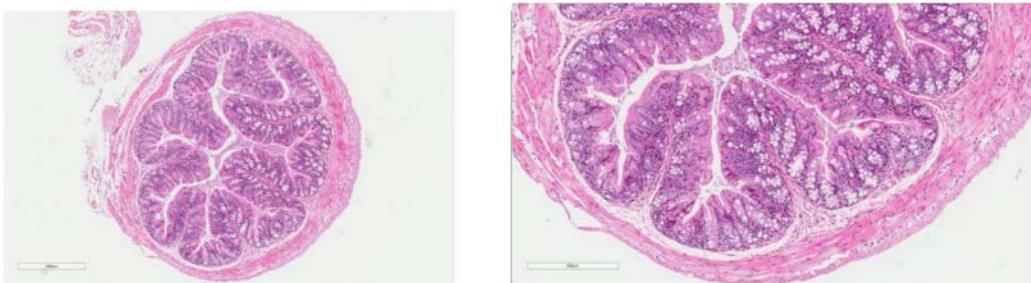
图1



DSS+LMK-235



DSS+vehicle



Control

图2

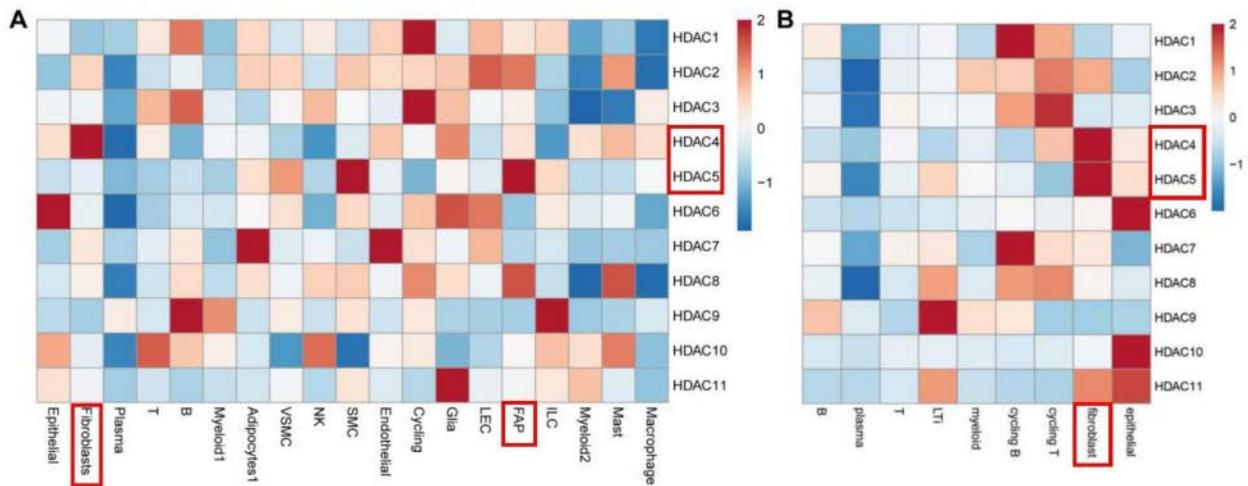


图3

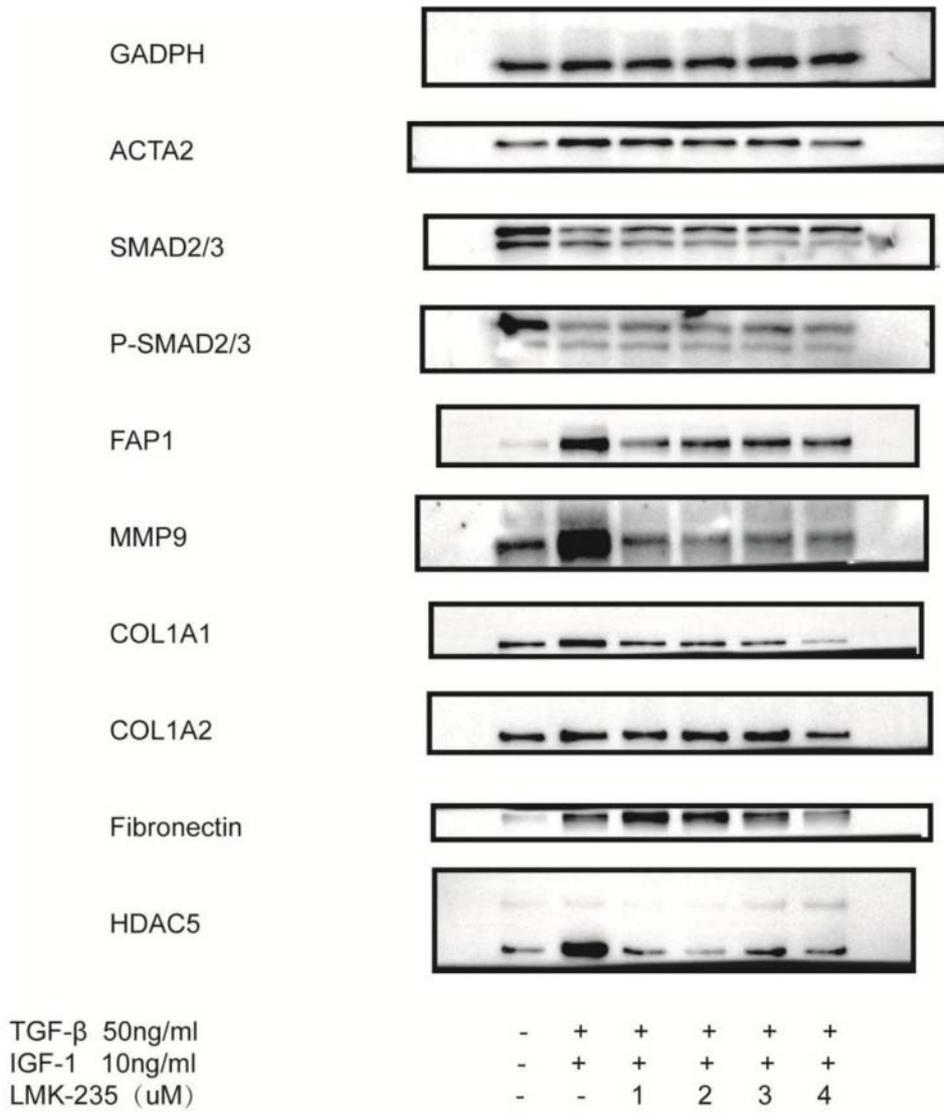


图4

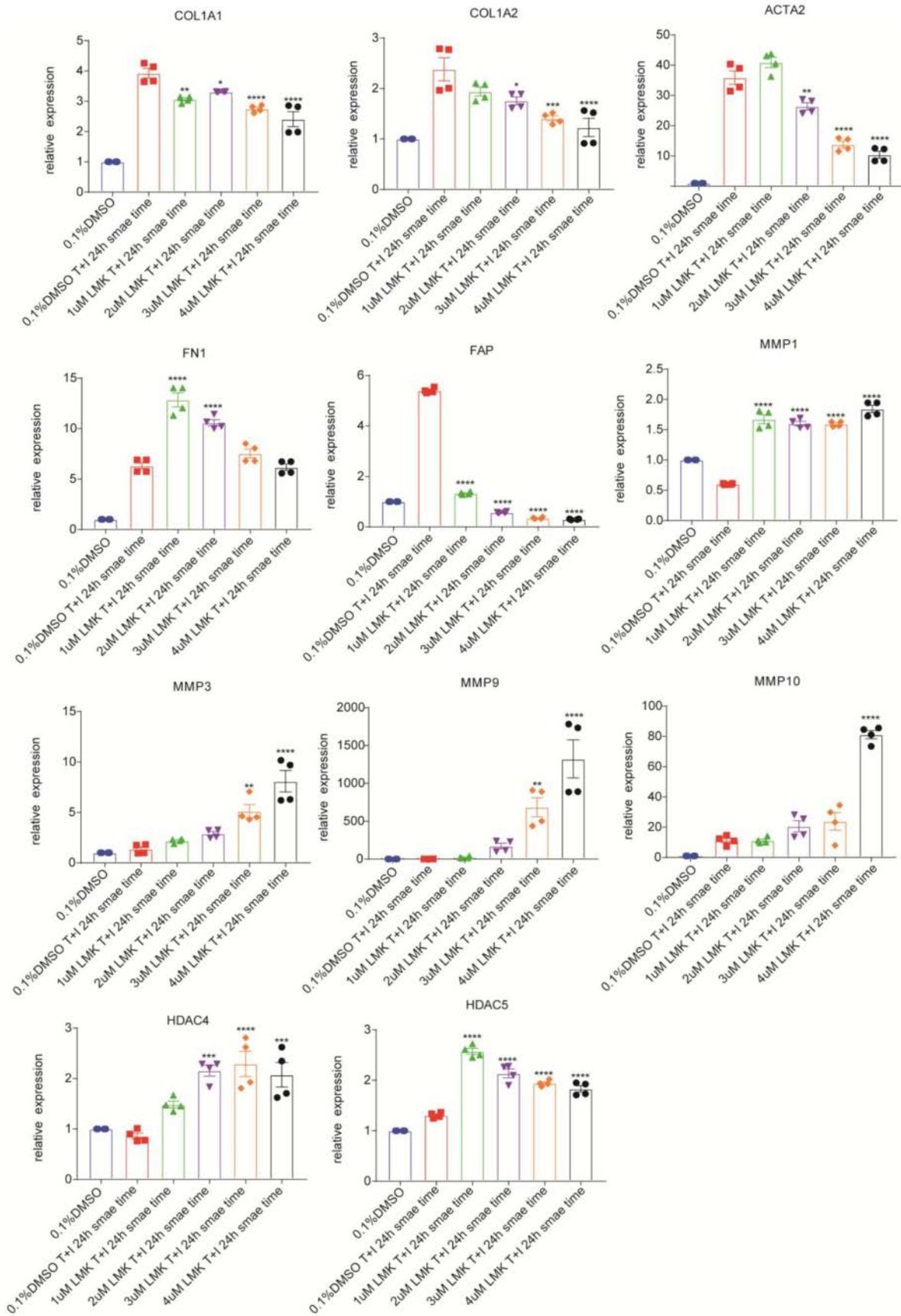


图5