



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108159399 B

(45)授权公告日 2020.07.24

(21)申请号 201711484916.9

CN 1252726 A,2000.05.10,

(22)申请日 2017.12.29

CN 1303428 A,2001.07.11,

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 1535313 A,2004.10.06,

申请公布号 CN 108159399 A

Dae-Hwan Nam等.Activated protein C

(43)申请公布日 2018.06.15

prevents methylglyoxal-induced endoplasmic reticulum stress and cardiomyocyte apoptosis via regulation of the AMP-activated protein kinase signaling pathway.《Biochemical and Biophysical Research Communications》.2016,第480卷摘要.

(73)专利权人 华中科技大学同济医学院附属同济医院

地址 430030 湖北省武汉市解放大道1095号

Wei Dong等.Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination.《J Am Soc Nephrol》.2015,第26卷2789-2799.

(72)发明人 曾和松 王洪杰 王涛

(74)专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 陈家安

Brenda Griffin等.A Friend in Need: Activated Protein C Stabilizes YB-1 during Renal Ischemia Reperfusion Injury.《J Am Soc Nephrol》.2015,第26卷2605-2607.

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

审查员 李娟娟

(56)对比文件

CN 1254284 A,2000.05.24,

CN 1265598 A,2000.09.06,

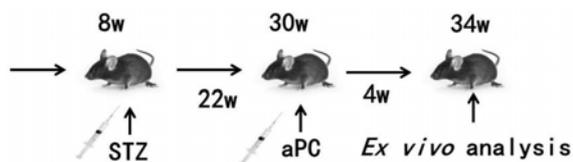
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54)发明名称

一种凝血蛋白酶aPC在防治糖尿病心肌病药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种凝血蛋白酶aPC在防治链脉佐菌素诱发导致的糖尿病心肌病药物中的应用;在本发明中凝血蛋白酶aPC能够通过抑制高糖状态下心肌细胞YB1的泛素化,稳定YB1的表达,从而减轻心肌细胞肥大以及纤维化。治疗性研究结果显示,凝血蛋白酶aPC具有显著减轻心肌细胞肥大及纤维化、改善心肌收缩功能、提高射血分数的疗效。



1. 一种凝血蛋白酶aPC在制备减轻糖尿病心肌细胞肥大及纤维化、改善心肌收缩功能的产品中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述凝血蛋白酶aPC与其他抗糖尿病性心肌病的药物联合作为活性成分在制备治疗或预防糖尿病性心肌病的药物中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述的糖尿病心肌病为链脲佐菌素诱发导致的糖尿病心肌病。

4. 根据权利要求2-3任一项所述的应用,其特征在于,所述药物的剂型为口服制剂或注射剂。

一种凝血蛋白酶aPC在防治糖尿病心肌病药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物新用途技术领域,具体地说,涉及一种凝血蛋白酶aPC在防治糖尿病心肌病药物中的应用。

背景技术

[0002] 糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)是一种由糖尿病引起的心脏结构和功能障碍,独立于高血压、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心脏瓣膜病及其他已知心脏病的疾病。通常表现为进行性左室肥厚及舒张和/或收缩功能障碍,其病理特点为心肌细胞肥大、凋亡,微血管病变及间质纤维化等。1972年Rubler等首次提出糖尿病心肌病这一概念,近40余年来,国内外学者在此领域中进行了大量的基础和临床研究,证实DCM是糖尿病患者心力衰竭发生率高死亡率的主要原因。DCM作为糖尿病独立的并发症目前已被肯定,并逐渐被临床医生和流行病学专家所重视。DCM的发病机制非常复杂,涉及到代谢紊乱、氧化应激、炎症反应、自主神经功能紊乱、胰岛素抵抗等,其具体的发生机制仍不明确。目前尚无治疗糖尿病心肌病的药物。

[0003] 蛋白C(PC)系统是维持机体内环境稳定的重要天然抗凝体系,其活性的发挥主要以活化蛋白C(aPC)为主。在凝血酶-血栓调节蛋白(Thrombin-TM)复合物作用下,PC发生酶解反应,暴露丝氨酸水解酶活性中心,成为aPC。aPC与内皮细胞蛋白C受体(EPCR)结合并通过水解G蛋白偶联受体-蛋白酶激活受体(protease activated receptor,PAR)细胞外肽链从而暴露其自身配体与自身受体相结合将细胞外信号借助偶联的G蛋白以及其他信号分子传递至细胞内而发挥生物学功能。近年来大量动物及临床研究证实,aPC及其激活异常与脓毒症、弥散性血管内凝血(DIC)、深静脉血栓形成、暴发性紫癜等多种疾病的发生发展密切相关。aPC不仅调控机体的凝血及纤溶平衡,而且通过抗炎、抗凋亡机制,保护内皮细胞、改善微循环、减缓器官功能障碍,参与多种疾病的病理生理过程。很多研究表明aPC可以通过抗凋亡、抗炎症、调节能量代谢及自噬体功能对心脏缺血再灌注损伤起保护作用。另外,外源性aPC对糖尿病肾病有很强的保护作用。

[0004] 冷休克蛋白YB-1(Ybox binding protein-1)是高度保守的核酸结合蛋白,冷休克域(Cold Shock Domain)蛋白超家族的一员,它存在于哺乳动物细胞质和细胞核中,具有多种细胞效能,参与基因转录、翻译调控、DNA损伤诱导修复、抗癌药耐药以及环境刺激的细胞反应等。YB-1由富含丙氨酸/脯氨酸的N-末端、中间介导DNA及RNA结合的冷休克域和一个带有由正或负电荷氨基酸交替组成的C-末端拉链结构组成,它在基因表达中的作用是非常复杂的,它可以与DNA结合直接调节基因表达或改变DNA构象从而间接影响其他转录因子的结合。此外,YB-1还可以与RNA结合调节基因的翻译以及和其他蛋白结合而影响其功能。YB-1可以诱导或抑制基因的表达,包括细胞因子和趋化因子及其受体,这些功能部分由YB-1在细胞内由胞浆向核的转位调节。值得注意的是,YB-1可以非常规地由单核细胞或肾小球系膜细胞分泌,YB-1的分泌与其C端的301/304赖氨酸残基相关,分泌蛋白具有趋化因子类似作用或作为配体与一些受体结合(如NOTCH-3)从而发挥作用。研究表明YB-1参与并调控了

心脏疾病,如David JJ等通过对心脏移植后患者心脏组织活检发现YB-1可以调控心肌细胞胚胎基因表达并与患者远期预后相关,以及Kamalov G等研究发现YB-1可以通过调小鼠心肌梗死后组织中肌成纤维细胞的增殖及迁移来影响心肌梗死的预后。然而目前仍未有研究报告YB-1与DCM发生及发展之间的关系。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的不足,本发明的目的在于提供一种凝血蛋白酶aPC在制备治疗或预防糖尿病心肌病中作为具有心功能保护药物的新用途,特别是在链脲佐菌素诱发的糖尿病心肌病中具有明显的治疗作用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采取了如下技术方案:

[0007] 一种凝血蛋白酶aPC在制备治疗或预防链脲佐菌素诱发导致的糖尿病心肌病药物中的应用。

[0008] 一种凝血蛋白酶aPC在制备下述产品中的应用,包括:1) 治疗和/或预防糖尿病心肌病的药物;2) 抑制高糖状态下心肌细胞YB1的泛素化,从而稳定YB1表达的药物(产品);3) 减轻心肌细胞肥大及纤维化、改善心肌收缩功能的药物(产品)。

[0009] 本发明中,所述凝血蛋白酶aPC与其他抗糖尿病性心肌病的药物联合作为活性成分在制备治疗或预防糖尿病性心肌病的药物中的应用。

[0010] 本发明中,所述的糖尿病心肌病为链脲佐菌素诱发导致的糖尿病心肌病。

[0011] 本发明中,所述药物的剂型为口服制剂或注射剂。

[0012] 另外,本发明还要求保护一种预防和/或治疗糖尿病心肌病的药物,所述活性成分包括凝血蛋白酶aPC。

[0013] 本发明与现有技术相比,具有以下如下优点和效果:

[0014] 在本发明中凝血蛋白酶aPC能够通过抑制高糖状态下心肌细胞YB1的泛素化,稳定YB1的表达,从而减轻心肌细胞肥大以及纤维化。治疗性研究结果显示,凝血蛋白酶aPC具有显著减轻心肌细胞肥大及纤维化、改善心肌收缩功能、提高射血分数的疗效。

附图说明

[0015] 图1为本发明实施例1中动物实验流程图;

[0016] 图2A为本发明实施例1心脏组织HE染色及细胞面积测定结果图;

[0017] 图2B为本发明实施例1心脏组织WGA染色及细胞面积统计结果图;

[0018] 图2C为本发明实施例1小鼠心脏组织Masson染色结果图;

[0019] 图3A为本发明实施例1心肌肥厚标志物 β -MHC的表达及柱状图;

[0020] 图3B为本发明实施例1心肌纤维化标志物TGF- β 的表达及柱状图;

[0021] 图4A从左到右依次为本发明实施例1对照组、模型组、凝血蛋白酶aPC给药组小鼠的典型超声心动图;

[0022] 图4B为本发明实施例1凝血蛋白酶aPC对STZ诱导糖尿病心肌病小鼠心脏射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)及后壁(LVPW)厚度的影响统计图;

[0023] 图5为本发明实施例1心导管检测心功能图;

[0024] 图6A为本发明实施例1对照组、模型组、凝血蛋白酶aPC给药组小鼠心脏组织YB1表

达典型免疫组化图；

[0025] 图6B为本发明实施例1Westernblotting检测对照组、模型组、凝血蛋白酶aPC给药组小鼠心脏组织YB1蛋白的表达情况及柱状图统计；

[0026] 图7为本发明实施例2凝血蛋白酶aPC对心肌细胞YB1表达的影响图；

[0027] 图8为本发明实施例3免疫共沉淀方法验证凝血蛋白酶aPC对心肌细胞中YB1蛋白的泛素化的影响图。

具体实施方式：

[0028] 下面将结合具体的实施例对本发明的技术方案做进一步的详细说明。应理解，所举实施例的目的在于进一步阐述本发明的内容，而不能在任何意义上解释为对本发明保护范围的限制。

[0029] 实施例1

[0030] 凝血蛋白酶aPC对糖尿病心肌病小鼠心功能不全的治疗作用

[0031] 将雄性C57BL6/J小鼠(8周龄)随机分为3组：对照组、糖尿病组和aPC治疗组。采用多次小剂量链脲霉素(STZ,溶解在0.05M pH4.5的柠檬酸缓冲液,60mg/kg)给药法对糖尿病组和aPC治疗组小鼠连续5天腹腔注射STZ溶液,对照组腹腔注射柠檬酸缓冲液(图1)。在注射STZ22周后运用心脏彩超检测小鼠形成糖尿病后左心室射血分数(leftventricular ejection fraction,LVEF)、左心室短轴缩短率(left ventricularfractional shortening,LVFS)、左心室舒张期或收缩期室间隔厚度(leftventricular internal dimension at diastole and systole,LVIDd和LVIDs)、左心室后壁厚度(posterior wall thickness at diastole and systole,LVPWd和LVPWs)超声心动参数。有创血流动力学检测左室舒张末压(LV end-diastolicpressure,PED)、左室收缩末压(LV end-systolic pressure,PES)、左室压力最大下降速度(maximal rates of decline ofventricularpressure,dp/dt_{min})和左室压力最大上升速率(maximal rates ofrise ofventricular pressure,dP/dt_{max})等血流动力学数据。然后收获小鼠血浆及按照需要采取不同方法保存各个器官样本并记录体重及器官重量。并进行心脏病理切片HE、WGA、Masson、YB-1免疫组化等染色。WesternBlot检测小鼠心脏标本中β-MHC、TGF-β、YB-1等指标。

[0032] 结果显示,HE和WGA染色表明凝血蛋白酶aPC可以改善STZ导致的糖尿病心肌病小鼠心肌细胞肥大(图2A和图2B)。同时,Masson染色检测表明凝血蛋白酶aPC可以抑制STZ导致的糖尿病心肌病小鼠心肌纤维化程度(图2C)。Western Blot检测表明凝血蛋白酶aPC可抑制心肌肥厚标志物β-MHC及纤维化标志物TGF-β的表达(图3A和图3B)。Western Blot及免疫组化检测表明凝血蛋白酶aPC可增加STZ诱导的糖尿病心肌病小鼠心脏组织冷休克蛋白YB1的表达的下降(图6A和图6B)。并且心脏超声结果表明糖尿病心肌病小鼠的射血分数和短轴缩短率下降,而凝血蛋白酶aPC可以起到明显的改善作用(图4A和图4B),心导管检测的结果与此一致(图5),表明凝血蛋白酶aPC明显改善了糖尿病心肌病小鼠心脏功能损伤。

[0033] 实验结论证实了本发明所涉及的凝血蛋白酶aPC具有治疗糖尿病心肌病心功能不全的作用。

[0034] 实施例2

[0035] 凝血蛋白酶aPC抑制心肌细胞YB1蛋白的降解

[0036] H9C2细胞随机分为组:PBS对照组,蛋白酶体抑制剂MG132处理组,凝血蛋白酶aPC干预组。按照以上分组,分别给予蛋白合成抑制剂CHX (10mg/ml) 干预1小时后,予以干预PBS, MG132, 凝血蛋白酶aPC 0, 1, 3, 6, 12小时后,收取细胞蛋白, BCA法定量后,取20ug/孔 Western Blot检测YB-1及内参蛋白GAPDH的表达。

[0037] 结果显示, Western Blot结果表明凝血蛋白酶aPC可以明显抑制心肌细胞YB1蛋白的降解(图7)。

[0038] 实验结论证实了本发明所涉及的凝血蛋白酶aPC可以稳定心肌细胞YB1蛋白的表达。

[0039] 实施例3

[0040] 凝血蛋白酶aPC抑制心肌细胞YB1蛋白的泛素化水平

[0041] H9C2细胞用高糖处理0, 1, 3, 6, 12, 24小时后,收取细胞蛋白,免疫共沉淀实验检测YB1蛋白的泛素化水平。

[0042] H9C2细胞分为3组:对照组,高糖处理组,高糖加凝血蛋白酶aPC处理组。按照以上分组,高糖加凝血蛋白酶aPC处理组给予凝血蛋白酶aPC干预1小时后,高糖处理组及高糖加凝血蛋白酶aPC处理组分别干预高糖3小时后,收取细胞蛋白,进行免疫共沉淀实验检测各组YB1蛋白的泛素化水平。

[0043] 所有加入高糖刺激的细胞实验均增加等渗透压甘露醇组,排除因高糖所导致的渗透压变化对实验结果的影响。

[0044] 结果显示,免疫共沉淀实验结果表明高糖诱导的H9C2细胞YB1泛素化水平在3小时达到最高,凝血蛋白酶aPC可以抑制高糖诱导的心肌细胞YB1蛋白的泛素化(图8)。

[0045] 实验结论证实了本发明所涉及的凝血蛋白酶aPC可以抑制心肌细胞YB1蛋白的泛素化,从而稳定YB1的表达。

[0046] 应当指出,以上所述具体实施方式可以使本领域的技术人员更全面地理解本发明,但不以任何方式限制本发明。因此,本领域技术人员应当理解,仍然可以对本发明进行修改或者等同替换;而一切不脱离本发明的精神和实质技术方案及其改进,其均应涵盖在本发明专利的保护范围当中。

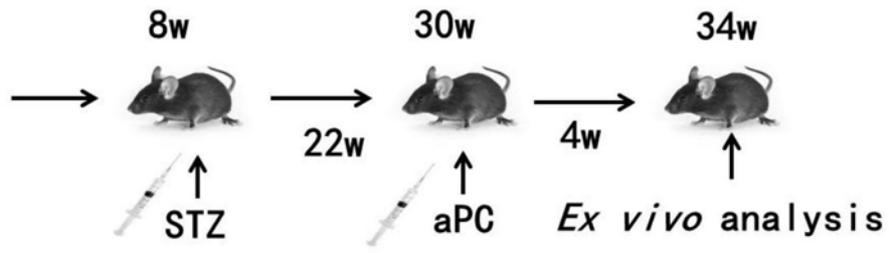


图1

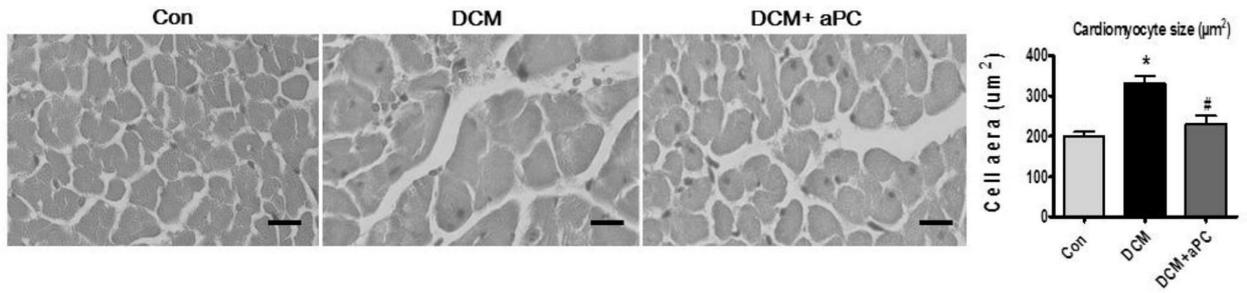


图2A

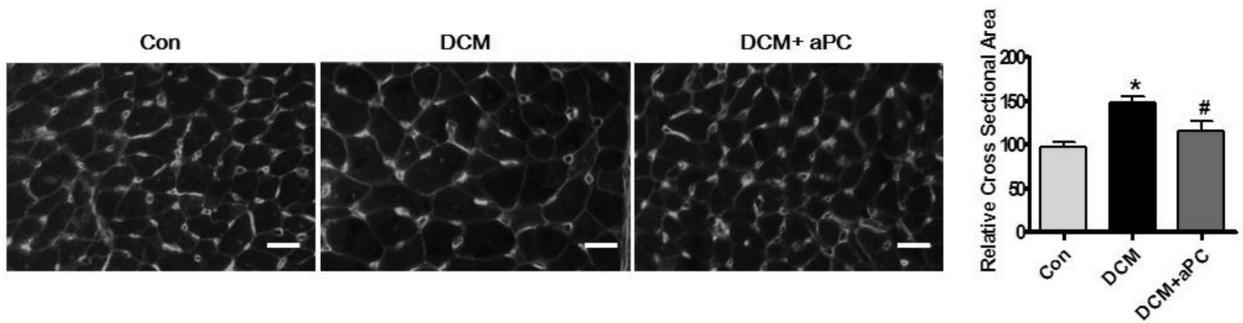


图2B

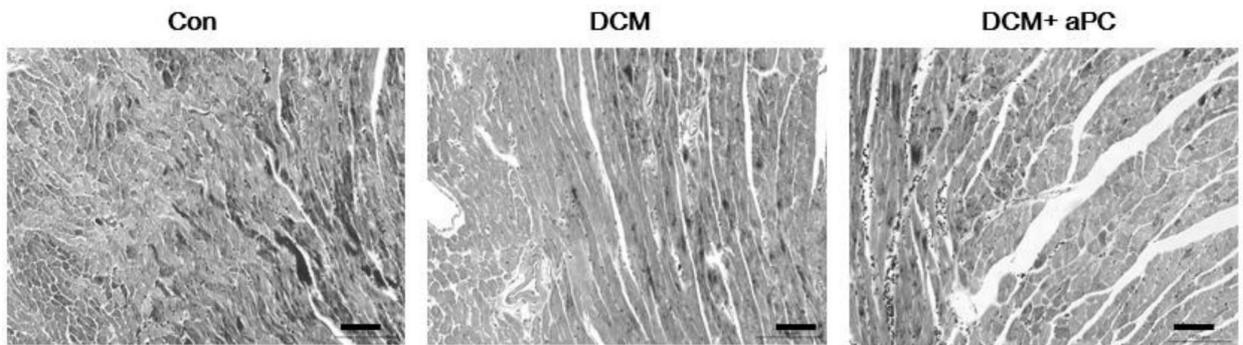


图2C

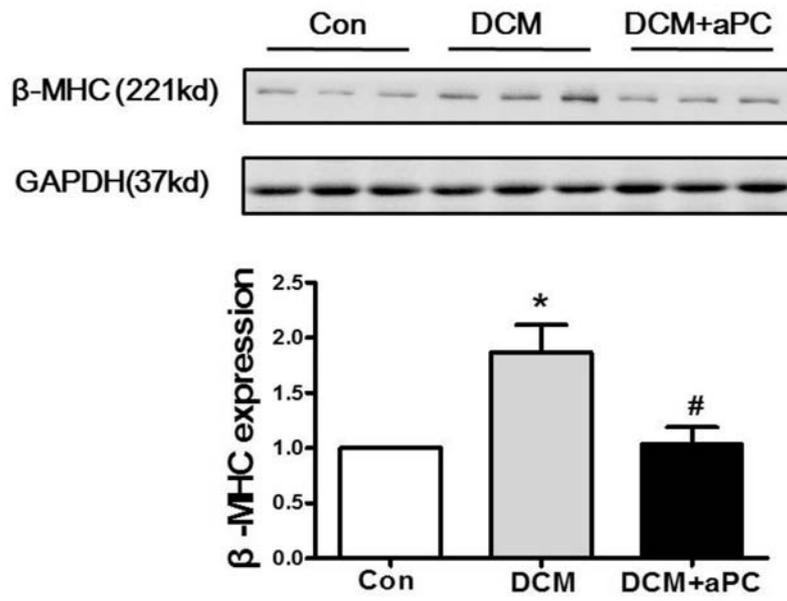


图3A

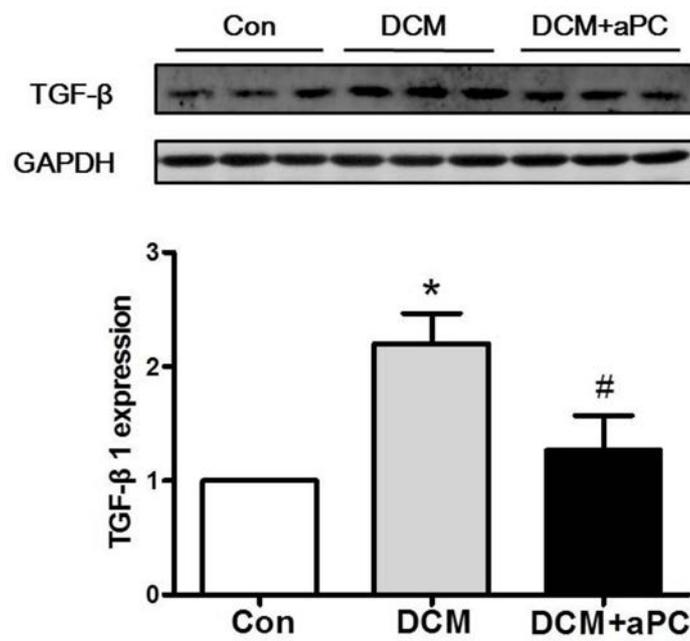


图3B

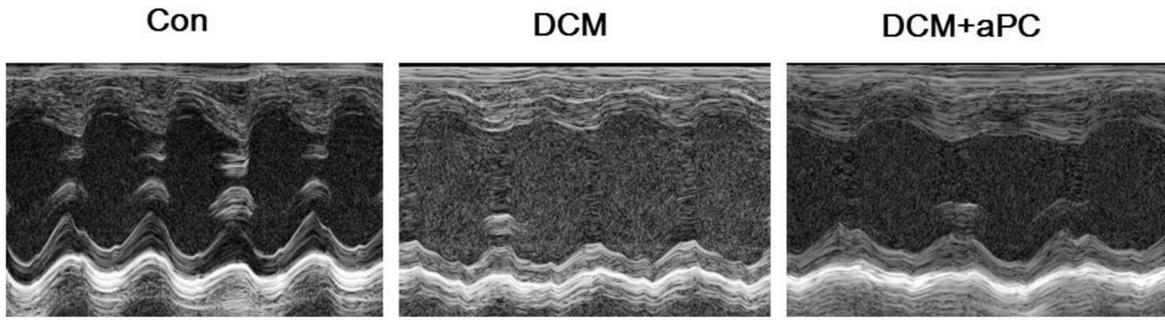


图4A

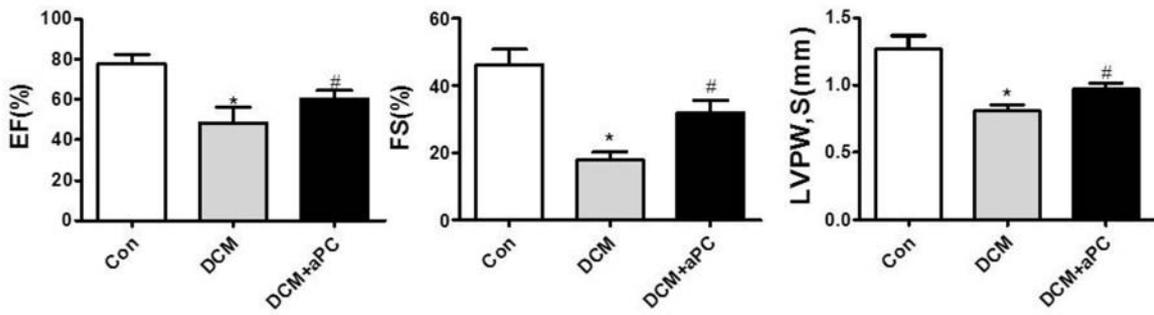


图4B

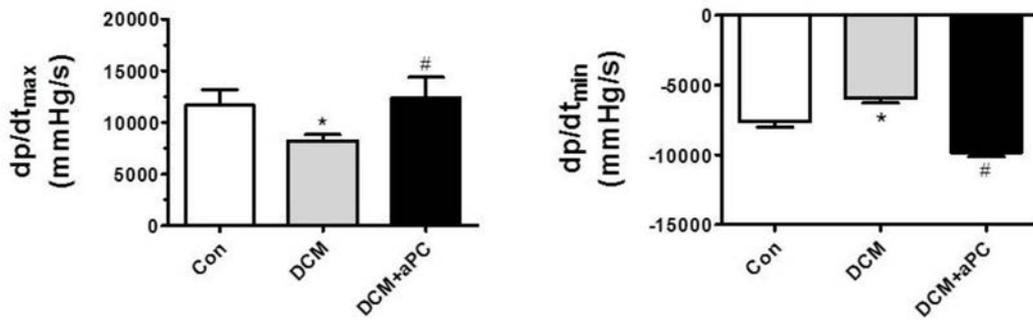


图5

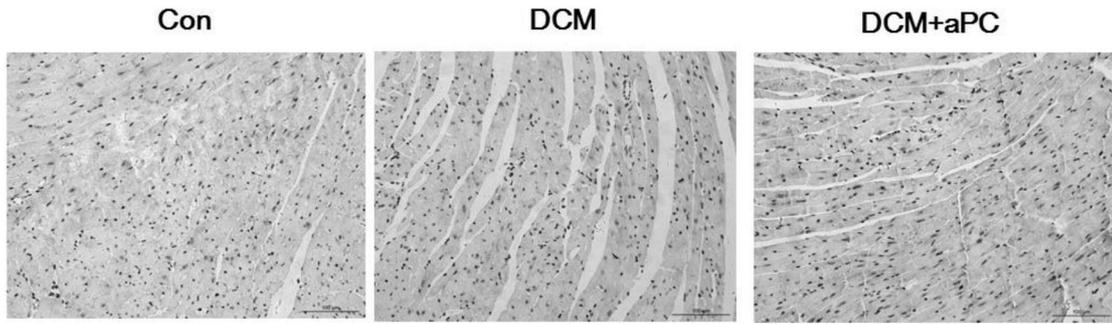


图6A

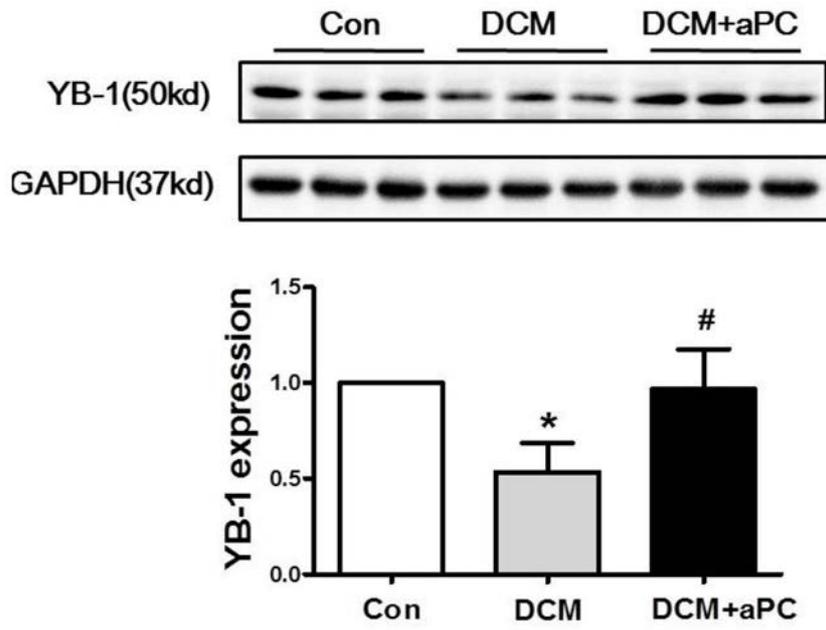


图6B

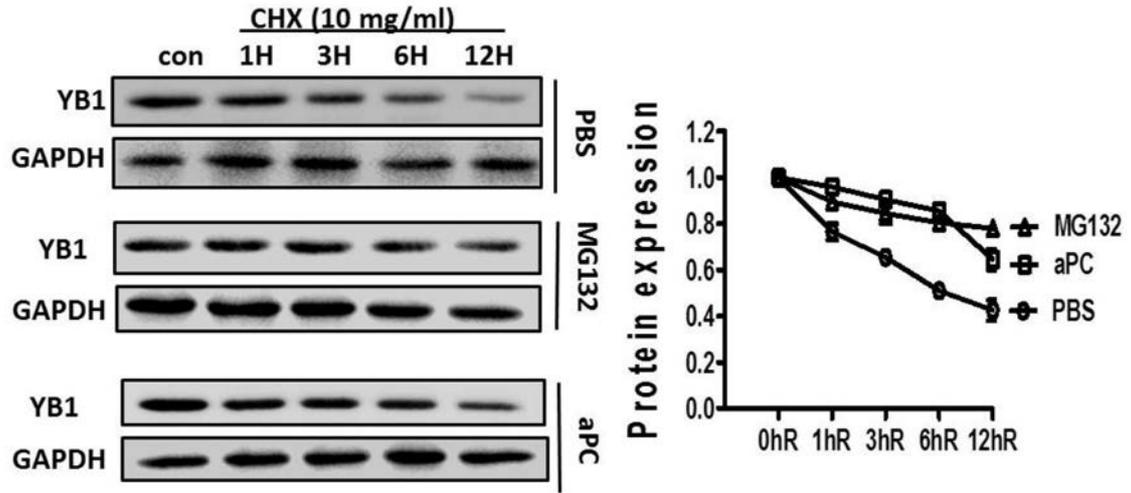


图7

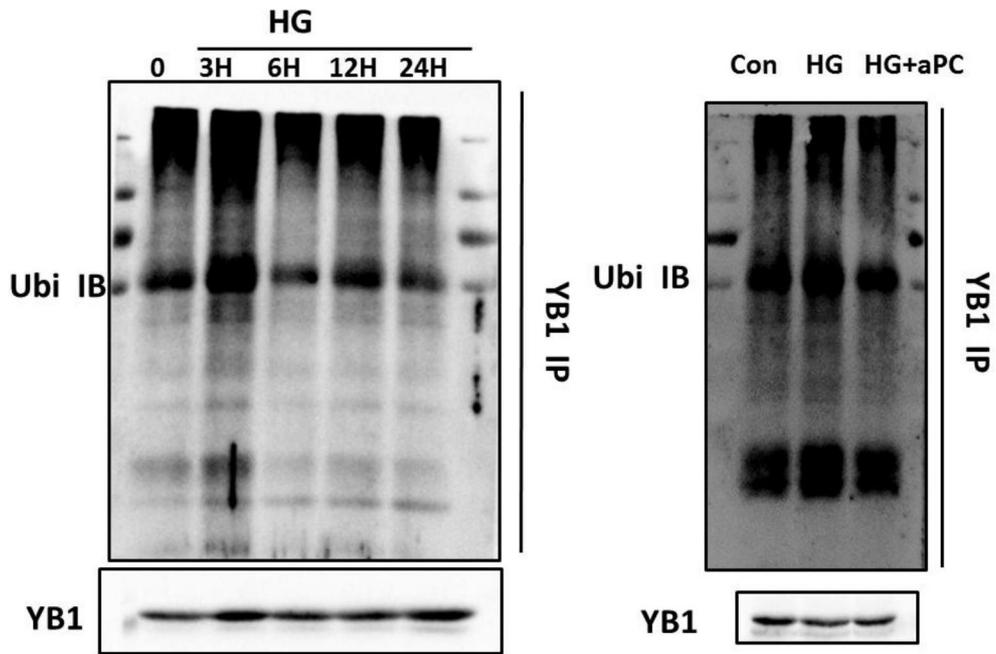


图8