



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102727505 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201210237572. 2

(22) 申请日 2012. 07. 09

(71) 申请人 中国航天员科研训练中心

地址 100094 北京市海淀区北清路 26 号院
5132 信箱 15 分箱

(72) 发明人 陈晓萍 张鹏 刘红菊 高月

范明 白延强 陈善广

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129

代理人 张涛

(51) Int. Cl.

A61K 31/7032(2006. 01)

A61P 21/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

红景天苷在防治肌萎缩疾病中的应用

(57) 摘要

本发明涉及红景天苷在制备预防和治疗肌萎缩的药物中的应用。本发明通过实验证明红景天苷能够抑制肌萎缩发生过程中肌萎缩特异因子 Atrogin-1 的表达、肌管萎缩和骨骼肌纤维横截面积的减少,并具有增加骨骼肌内慢肌纤维蛋白的含量,抑制快肌纤维蛋白表达的作用,从而预防和对抗肌萎缩的发生。

1. 红景天苷在制备预防和治疗肌萎缩的药物中的应用。
2. 权利要求 1 所述的应用,所述肌萎缩是骨骼肌肌管直径减小。
3. 权利要求 1 所述的应用,所述肌萎缩是骨骼肌纤维横截面积减小。
4. 权利要求 1 所述的应用,所述肌萎缩是肌萎缩特异因子(Atrogin-1) 表达的增加。
5. 权利要求 1 所述的应用,所述肌萎缩是慢肌纤维蛋白含量减少。
6. 权利要求 1 所述的应用,所述肌萎缩是快肌纤维蛋白含量增加。
7. 一种预防和治疗肌萎缩的药物,其活性成分是红景天苷。

红景天苷在防治肌萎缩疾病中的应用

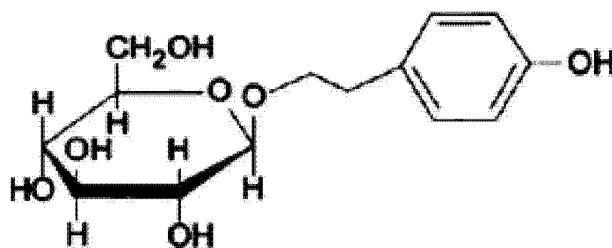
技术领域：

[0001] 本发明涉及化合物红景天苷的新用途，具体涉及红景天苷在制备预防和治疗肌萎缩的药物中的应用。

背景技术：

[0002] 红景天苷(式 I) 是已知化学结构的化合物，英文名 Salidroside，分子式 $C_{14}H_{20}O_7$ ，CAS 登录号 10338-51-9。

[0003]



式 I

[0004] 国内外研究表明，红景天苷在抗疲劳、抗衰老、免疫调节、清除自由基、增强记忆、改善睡眠中起着重要的作用。临床基础研究也提示，红景天苷能明显逆转肺动脉高压、糖尿病或低氧引起的肾脏损伤、血管平滑肌细胞增殖分化潜能削弱等以及干扰肝纤维化的形成。但迄今为止未见红景天苷在骨骼肌中的作用及机制研究的报道。

[0005] 骨骼肌按照本身的代谢类型特性可分为慢肌和快肌，分别由慢肌纤维蛋白和快肌纤维蛋白组成。慢肌又称为红肌，以有氧代谢为主，收缩缓慢、持久，不易产生疲劳，主要是维持姿势和进行慢而持久的工作；快肌也称白肌，以无氧酵解代谢为主，收缩快，爆发力强，但容易出现疲劳。骨骼肌中快、慢肌纤维蛋白含量的变化对肌萎缩的发生、发展具有重要的调控作用，即慢肌纤维蛋白含量的增加，可提高机体运动耐力，对肌萎缩疾病的发生具有预防和对抗作用。而在肌萎缩疾病中常伴有快肌纤维蛋白含量的增加。由此，慢肌纤维蛋白的增加或和快肌纤维蛋白的减少可预防和治疗骨骼肌萎缩。

[0006] 生理状态下，骨骼肌蛋白及其快慢肌纤维蛋白的合成和降解处于动态平衡。但临床肌营养不良性疾病(如杜氏肌营养不良、脊髓侧索硬化症等)、废用性肌萎缩(长期卧床、外伤制动、航天飞行中失重性肌萎缩等)、去/失神经性肌萎缩、老年性肌萎缩、恶性疾病(如癌症晚期恶病质、心脏衰竭、肾衰竭、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、艾滋病及长期应用糖皮质激素等疾病)晚期的肌萎缩等，骨骼肌蛋白质代谢失衡，表现为骨骼肌重量明显减轻、肌纤维横截面积的减小、肌纤维类型相关蛋白(即慢肌纤维蛋白和快肌纤维蛋白)的选择性丢失等特征性改变，导致肌力下降、运动障碍、易疲劳和代谢紊乱等，严重影响日常工作和生活。但目前临床尚无很好的治疗方法。

[0007] 在肌萎缩过程中，蛋白质合成与降解的动态平衡受到破坏，蛋白质降解增加是导致骨骼肌萎缩的根本原因(Russell AP, Clinical and Experimental Pharmacology and

Physiology, 37, 378 - 384, 2010; Glass DJ, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 13:225 - 229, 2010)。目前已公认,包括骨骼肌营养不良性疾病、废用性肌萎缩、去神经性肌萎缩以及癌症晚期恶病质和艾滋病等严重疾病并发性肌萎缩等几乎所有类型肌萎缩,其最终的共同改变是骨骼肌特异的萎缩因子 Atrogin-1 表达增加,骨骼肌蛋白降解大于合成,引起骨骼肌纤维横截面积减小以及肌纤维类型相关蛋白改变,导致肌萎缩的发生(Bodine SC, et al. Science, 294:1704-1708, 2001; Foletta VC, et al. Pflugers Arch-Eur J Physiol, 461:325 - 335, 2011)。因此,通过抑制 Atrogin-1 的表达、增加肌纤维横截面积和调节肌纤维类型相关蛋白含量,可预防和治疗骨骼肌萎缩疾病的发生发展,提高工作和生活能力。

发明内容:

[0008] 本发明的目的在于开发红景天苷的新用途。具体目的是通过实验证明红景天苷能够抑制骨骼肌中肌萎缩特异因子 Atrogin-1 的表达、肌管直径和骨骼肌纤维横截面积的减少;并发现红景天苷具有增加骨骼肌内慢肌纤维蛋白的含量,抑制快肌纤维蛋白表达的作用,从而起到预防和对抗肌萎缩的作用。最终用红景天苷制备出预防和治疗骨骼肌萎缩性疾病的药物。

[0009] 本发明用以下实验证实了红景天苷的新功能:

[0010] 1、红景天苷对肌萎缩特异因子 Atrogin-1 表达的影响

[0011] 肌管(myotubes)是骨骼肌成肌细胞(myoblasts)在体外分化、融合形成的大于三个核的多核合胞体,具有肌纤维的结构与功能特性,广泛用于骨骼肌的体外实验研究,尤其用于药理学实验中观察分析药物对骨骼肌萎缩的直接作用效应。

[0012] 本实验通过诱导成肌细胞 C2C12 体外分化形成多核肌管,并采用国际公认的体外肌管萎缩模型(Sandri M et al, Cell, 30; 117(3):399-412, 2004)进行肌管萎缩实验,用实时定量 real time PCR 方法分析了红景天苷对肌萎缩特异因子 Atrogin-1 mRNA 表达的影响。实验结果表明,在诱导体外肌管萎缩过程中,与对照组相比,红景天苷处理组肌萎缩特异因子 Atrogin-1 mRNA 的表达明显抑制($P < 0.01$)。证明红景天苷可抑制肌萎缩特异因子 Atrogin-1 mRNA 表达,具有预防和治疗肌萎缩发生的作用。

[0013] 详见实验一。

[0014] 2、红景天苷对肌管萎缩的影响

[0015] 肌管直径减少是体外肌管发生萎缩的直接证据。本实验利用以上所述的肌管萎缩模型,通过细胞免疫荧光的方法,分析了红景天苷对肌萎缩的直接作用。实验结果表明,在体外肌管萎缩中,与对照组相比,红景天苷处理组肌管的直径明显增加($P < 0.01$)。证明红景天苷对肌萎缩具有直接的抑制作用。

[0016] 详见实验二。

[0017] 3、红景天苷对肌萎缩的影响

[0018] 为进一步验证红景天苷抑制肌萎缩的在体效应,我们应用红景天苷(50mg/公斤/天)溶液及其等体积 PBS,每天灌胃处理 C57 小鼠,连续 14 天,制备红景天苷处理组及其对照组小鼠。并采用国际公认的尾悬吊方法(Gregory R. Adams, et al. J Appl Physiol 95:2185 - 2201, 2003),尾悬吊 14 天诱导肌萎缩形成,制备在体骨骼肌萎缩模型。

[0019] 肌纤维横截面积的减小是在体骨骼肌萎缩发生的直接证据。本实验中,利用尾悬吊诱导骨骼肌萎缩后,采用免疫组织化学方法,分析了骨骼肌纤维横截面积的变化。实验结果表明,与对照组相比,红景天苷处理组小鼠肌纤维横截面积显著增加($P<0.05$)。证明在整体水平上,红景天苷也发挥了抑制肌萎缩的作用效应。

[0020] 详见实验三。

[0021] 4、红景天苷对肌纤维类型相关蛋白表达的影响

[0022] 骨骼肌中快、慢肌纤维蛋白含量的变化对肌萎缩的发生、发展具有重要的调控作用,即慢肌纤维蛋白含量的增加,可提高机体运动耐力,对肌萎缩疾病的发生具有预防和对抗作用。而在肌萎缩疾病中常伴有快肌纤维蛋白含量的增加。由此,慢肌纤维蛋白的增加或和快肌纤维蛋白的减少可预防和治疗骨骼肌萎缩。

[0023] 本实验中,应用红景天苷($50\text{mg}/\text{公斤}/\text{天}$)溶液及其等体积PBS,每天灌胃处理C57小鼠,连续14天,制备红景天苷处理组及其对照组小鼠。采用Western Blot方法,分析了红景天苷对小鼠快、慢肌纤维蛋白含量的影响。实验结果表明,与对照组相比,红景天苷处理组小鼠慢肌纤维标志性蛋白Troponin I-SS的表达显著增加($P<0.01$),而快肌纤维标志性蛋白Troponin I-FS有降低趋势。证明红景天苷具有预防和对抗肌萎缩的作用。

[0024] 详见实验四。

[0025] 以上实验所用受试品红景天苷,购买自成都普思生物科技有限公司,纯度(用HPLC方法检测):99%。

[0026] 本发明的有益效果是:

[0027] 首次发现和证实了红景天苷对于预防和治疗肌肉萎缩性疾病的新功能。

[0028] 本发明通过实验证明红景天苷具有降低肌萎缩特异因子表达;抑制肌萎缩发生过程中肌管直径和肌纤维横截面积的减小;增加骨骼肌内慢肌纤维蛋白含量和抑制快肌纤维蛋白表达的作用。

[0029] 而抑制肌萎缩特异因子的表达以及增加肌管直径或肌纤维横截面积和肌肉中慢肌纤维蛋白的含量,是防止和改善肌萎缩状态的先决条件。因此,本发明证明了利用红景天苷作为原料药物可用于制备预防和治疗肌肉萎缩性疾病的药物。

四、附图说明

[0030] 图1是实时定量real time PCR检测对照组及红景天苷处理组肌管萎缩后Atrogin-1的表达。

[0031] 图2是细胞免疫荧光显示对照组及红景天苷处理组肌管萎缩后的形态。

[0032] 图3是Image-Pro Plus6.0软件统计对照组及红景天苷组处理组肌管萎缩后直径的变化。

[0033] 图4组织免疫荧光显示对照组及红景天苷组小鼠肌萎缩后腓肠肌肌纤维的横截面积。标尺为50微米。

[0034] 图5Image-Pro Plus6.0软件统计对照组及红景天苷组小鼠肌萎缩后腓肠肌肌纤维横截面积的变化。

[0035] 图6是Western blot检测对照组及红景天苷组小鼠骨骼肌内快、慢肌纤维蛋白(Troponin I-FS、Troponin I-SS)的表达变化。Troponin I-FS和Troponin I-SS是肌钙

蛋白抑制亚单位存在于快肌纤维和慢肌纤维中的亚型,分别可以反映快肌纤维蛋白和慢肌纤维蛋白的含量;beta Actin 为内参,可以反映总蛋白上样量的一致。

[0036] 图 7 是 Image-Pro Plus6.0 软件统计对照组及红景天苷组小鼠骨骼肌内慢肌纤维蛋白的相对表达量。

[0037] 图 8 是 Image-Pro Plus6.0 软件统计对照组及红景天苷组小鼠骨骼肌内快肌纤维蛋白的相对表达量。

具体实施方式

[0038] 以下实验中所用的实验动物及材料来源如下:

[0039] 实验动物:雄性 C57 小鼠购自北京维通利华动物中心,生产许可证号:SCXK(京)2012-0001;实验动物质量合格证号:0261086。

[0040] C2C12 细胞系购于中国医学科学院。

[0041] 肌管为本实验制备的单核细胞 C2C12 体外成肌分化后形成的多核合胞体。

[0042] 受试药物:红景天苷,购买自成都普思生物科技有限公司,HPLC:99%。

[0043] 其它材料来源:

[0044] 组织包埋剂购自 Thermo 公司;

[0045] 兔源 laminin 抗体购自 Abcam 公司;

[0046] 羊抗兔 FITC 荧光标记二抗购自 Invitrogen 公司;

[0047] 羊抗鼠 FITC 荧光标记二抗购自 Invitrogen 公司;

[0048] Trizol、反转录酶购自 Invitrogen 公司;

[0049] SYBR 购自 ABI 公司;

[0050] 兔源 Troponin I-SS 抗体购自 Aviva 公司;

[0051] 兔源 Troponin I-FS 抗体购自 Aviva 公司;

[0052] 兔源 beta actin 抗体购自 Santa Cruz 公司;

[0053] 鼠源 myosin 抗体购买自北京中山公司

[0054] DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司;

[0055] 胎牛血清(FBS)、马血清(HS)、胰蛋白酶购自 HyClone 公司;

[0056] 谷氨酰胺购自 Sigma 公司;

[0057] 青霉素和链霉素购自 Sigma 公司;

[0058] 细胞培养液:生长液为 DMEM,加 20%FBS,1% 谷氨酰胺,1% 青霉素和链霉素双抗;分化液为 DMEM,加 2%HS,1% 谷氨酰胺,1% 青霉素和链霉素双抗;

[0059] 主要仪器设备:Bio-Rad 电泳仪, Bio-Rad 电泳槽及湿转电转槽, ABI Step-One Plus real time PCR 仪,三洋冰冻切片机, Leica 激光共聚焦显微镜, Format CO₂ 孵箱,长城超净工作台;奥林巴斯倒置显微镜。

[0060] 实验一:红景天苷对肌萎缩特异因子 Atrogin-1 表达的影响

[0061] 1. 实验目的:

[0062] 本实验采用对照组和红景天苷处理组肌管,通过体外诱导肌管萎缩,用实时定量 realtime PCR 的方法,分析红景天苷对肌管萎缩中肌萎缩特异因子 Atrogin-1 表达水平的影响。

[0063] 2. 实验方法：

[0064] 2.1 成肌细胞复苏、培养

[0065] A、从液氮罐中快速取出冻存的成肌细胞 C2C12, 将冻存管快速放于 37℃ 水浴中, 轻摇使其快速溶解。

[0066] B、转入 15mL 一次性灭菌离心管中, 加入 5mL 细胞生长液, 1000rpm, 离心 5min 去除冷冻保护剂。

[0067] C、吸去上清, 加入 5mL 细胞生长液, 用吹打管轻轻吹打为细胞悬液, 接种到 75mm 的培养瓶中。

[0068] D、5%CO₂ 孵箱 37℃ 条件下培养。

[0069] 2.2 成肌细胞实验

[0070] A、当复苏细胞生长密度达到 80% 时, 弃去旧培养基, 用 PBS 将细胞洗涤 2 次。

[0071] B、加入 2mL 0.25% 胰蛋白酶-EDTA, 在倒置显微镜下观察到细胞将要分离、呈现圆形时, 加入 3mL 细胞生长液终止消化。

[0072] C、用吸管轻轻吹打培养瓶, 使细胞脱落完全。吸出细胞悬液, 放入 15mL 离心管中, 以 1000rpm 的转速, 离心 5min。

[0073] D、吸掉上清液, 加入细胞生长液 5mL, 并用拉制的细尖头吸管吹打细胞悬液, 直至细胞均匀分散成单个细胞。

[0074] E、按照常规方法, 用血细胞计数仪进行细胞计数, 将细胞稀释为浓度: 10⁴/ML 细胞悬液。

[0075] F、按照每 60mm 培养皿接种细胞悬液 1mL, 并加入 2mL 生长液, 使每个 60mm 培养皿在 3mL 生长液下培养。

[0076] G、细胞生长约 24 小时, 到达约 80% 生长密度。

[0077] H、将培养皿分组为: 对照组和红景天苷处理组各 4 皿, 进行标注。

[0078] 2.3 肌管制备

[0079] A、去除对照组和红景天苷处理组皿中生长液, 更换为:

[0080] a. 对照组: 3mL/皿的分化液;

[0081] b. 红景天苷处理组: 终浓度为 30ug/ml 红景天苷的 3mL/皿分化液。

[0082] B、诱导成肌细胞分化, 每 24 小时更换培养液。

[0083] C、分化 72 小时后, 可见成肌细胞形成大于三个核的多核肌管。

[0084] 2.4 体外肌管萎缩实验

[0085] 应用以上实验分化形成的肌管, 采用国际公认的体外肌萎缩模型实验方法 (Sandri M et al, Cell, 30;117(3):399-412, 2004), 吸去对照组和红景天苷组皿中的培养液, 加入 3mL PBS 诱导肌管萎缩 6 小时, 每组选取 4 皿, 用于 real time PCR 分析。

[0086] 2.5 RNA 的提取、检测与定量

[0087] A、裂解: 吸去对照组和红景天苷组中的 PBS, 每皿加入 1ml Trizol 反复吹打裂解肌管, 吸入到 1.5ml 的 EP 管中放置 30min。

[0088] B、各相分离: 按 0.2ml 氯仿/1ml Trizol 的比例加入氯仿, 盖紧剧烈混匀 15 秒, 室温放置 2-3 分钟。4℃, 12000g 离心 15 分钟。之后吸取上清水相置于另一新的 EP 管中。

[0089] C、沉淀 RNA: 按 0.5ml 异丙醇/1ml Trizol 的比例, 向吸取的水相中加入异丙醇,

颠倒混匀,室温放置 15 分钟。 4°C , 12000g 离心 10 分钟得到 RNA 沉淀。

[0090] D、漂洗 RNA: 弃去上清,按 1ml75% 乙醇 /1ml Trizol 的比例,加入 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀两次,然后 4°C , 7500g 离心沉淀 5 分钟,弃去上清。

[0091] E、重溶 RNA: 室温空气中干燥 RNA 沉淀 5-10 分钟,以适量 DEPC 水溶解 RNA 沉淀, 55°C - 60°C 水溶 10 分钟。

[0092] F、RNA 纯度检测及定量: 取 $1\mu\text{L}$ RNA 溶液加入 $99\mu\text{L}$ DEPC 水中混匀,用紫外分光光度计测定 A260/A280 的比值和浓度。

[0093] 2.6 反转录反应

[0094] $25\mu\text{L}$ 反应体系操作步骤:

[0095]

a 取 0.5mL EP 管	{	oligodT $1.0\mu\text{L}$ RNA 样品 $2.0\mu\text{g}$ DEPC 水调总体积 $8\mu\text{L}$
----------------	---	--

[0096] b 轻甩后, 70°C 10min, 放 -20°C 3 ~ 5min, 轻甩。

[0097] c 在 a 管内加入: $5\times\text{Buffer}$ $5\mu\text{L}$

[0098] dNTP $10\mu\text{L}$

[0099] RNasin $1\mu\text{L}$

[0100] M-MLV $1\mu\text{L}$

[0101] d 42°C 90min, 95°C 10min

[0102] e 合成的 cDNA 于 -20°C 保存备用。

[0103] 2.7 引物设计

[0104] 根据 NCBI 数据库序列利用 DNAMAN 软件设计引物,然后根据退火温度和序列特异性选择合适的引物进行合成(见表 1)。

[0105] 表 1 目的基因 Atrogin1 及内参 GAPDH 引物序列

[0106]

基因	引物序列	退火温度
Atrogin-1	上游: $5' - \text{GCAGAGAGTCGGCAAGTC} - 3'$ 下游: $5' - \text{CAGGTCGGTGATCGTGAG} - 3'$	62°C
GAPDH	上游: $5' - \text{CTGCACCACCAACTGCTTAG} - 3'$ 下游: $5' - \text{ATCCACAGTCTTCTGGGTGG} - 3'$	62°C

[0107] 2.8 real time PCR 检测 Atrogin1mRNA 的表达

[0108] $50\mu\text{L}$ 反应体系操作步骤:

[0109]

cDNA	2 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
SYBR mix	25 μ L
无菌水	21 μ L

[0110] PCR 反应条件 :94℃变性 5 分钟。94℃ 40 秒,62℃ 15 秒,72℃ 20 秒,40 个循环。72℃延伸 10 分钟。

[0111] 3. 数据分析方法

[0112] 数据以平均值 \pm 标准差表示,数据分析采用组间 t 检验。 $p \leq 0.01$ 表示具有显著性统计学差异。

[0113] 4. 实验结果

[0114] 如图 1 所示。可见,红景天苷组处理组肌管萎缩后肌萎缩特异因子 Atrogin-1mRNA 的表达仅为对照组的 39%,与对照组相比,Atrogin-1mRNA 的表达受到了明显抑制 (** $P < 0.01$)。

[0115] 5. 实验结论

[0116] 红景天苷可显著抑制肌萎缩特异因子 Atrogin-1mRNA 的表达,对抗肌萎缩。

[0117] 实验二:红景天苷对肌管萎缩的影响

[0118] 1. 实验目的:

[0119] 本实验采用对照组和红景天苷处理组肌管,通过体外诱导肌管萎缩,用细胞免疫荧光化学方法,分析红景天苷对体外肌管萎缩的影响。

[0120] 2. 实验方法:

[0121] 2.1 成肌细胞复苏、培养

[0122] A、从液氮罐中快速取出冻存的成肌细胞 C2C12,将冻存管快速放于 37℃水浴中,轻摇使其快速溶解。

[0123] B、转入 15mL 一次性灭菌离心管中,加入 5mL 细胞生长液,1000rpm,离心 5min 去除冷冻保护剂。

[0124] C、吸去上清,加入 5mL 细胞生长液,用吹打管轻轻吹打为细胞悬液,接种到 75mm 的培养瓶中。

[0125] D、5%CO₂ 孵箱 37℃条件下培养。

[0126] 2.2 成肌细胞实验

[0127] A、当复苏细胞生长密度达到 80% 时,弃去旧培养基,用 PBS 将细胞洗涤 2 次。

[0128] B、加入 2mL 0.25% 胰蛋白酶-EDTA,在倒置显微镜下观察到细胞将要分离、呈现圆形时,加入 3mL 细胞生长液终止消化。

[0129] C、用吸管轻轻吹打培养瓶,使细胞脱落完全。吸出细胞悬液,放入 15mL 离心管中,以 1000rpm 的转速,离心 5min。

[0130] D、吸掉上清液,加入细胞生长液 5mL,并用拉制的细尖头吸管吹打细胞悬液,直至细胞均匀分散成单个细胞。

[0131] E、按照常规方法,用血细胞计数仪进行细胞计数,将细胞稀释为浓度:104/ML 细

胞悬液。

[0132] F、按照每 60mm 培养皿接种细胞悬液 1mL, 并加入 2mL 生长液, 使每个 60mm 培养皿在 3mL 生长液下培养。

[0133] G、细胞生长约 24 小时, 到达约 80% 生长密度。

[0134] H、将培养皿分组为 : 对照组和红景天苷处理组各 4 皿, 进行标注。

[0135] 2.3 肌管制备

[0136] A、去除对照组和红景天苷处理组皿中生长液, 更换为 :

[0137] a. 对照组 : 3ml/ 皿的分化液 ;

[0138] b. 红景天苷处理组 : 终浓度为 30ug/ml 红景天苷的 3ml/ 皿分化液。

[0139] B、诱导成肌细胞分化, 每 24 小时更换培养液。

[0140] C、分化 72 小时后, 可见成肌细胞形成大于三个核的多核肌管。

[0141] 2.4 体外肌管萎缩实验

[0142] 应用以上实验分化形成的肌管, 采用国际公认的体外肌萎缩模型实验方法 (Sandri M et al, Cell, 30;117(3):399-412, 2004), 吸去对照组和红景天苷组皿中的培养液, 加入 3mLPBS 诱导肌管萎缩 6 小时, 每组选取 4 皿, 用于细胞免疫荧光化学染色分析。

[0143] 2.5 细胞免疫荧光化学染色分析

[0144] A、将对照组和红景天苷组肌管培养皿中的 PBS 吸去。

[0145] B、加入 4% 多聚甲醛 2ml, 室温放置 30min。

[0146] C、吸去甲醛, 加入 PBS 稀释的 0.3%Triton X-100 室温处理 30 分钟。

[0147] D、吸去 0.3%Triton X-100, 加入 5% 的羊血清室温封闭 1 小时。

[0148] E、弃去封闭液, 加入抗 myosin 一抗 (1:100 稀释), 4℃过夜。

[0149] F、0.1%PBST 洗 3 次, 每次 10 分钟。

[0150] G、加入 FITC- 标记 IgG 二抗 (1:1000 稀释), 室温 30 分钟。

[0151] H、PBST 洗 3 次, 每次 10 分钟。

[0152] I、DAPI 封片, 激光共聚焦显微镜下观察拍照。

[0153] 2.6 应用 Image-Pro Plus6.0 软件对图像进行定量分析。

[0154] 3. 数据分析

[0155] 数据以平均值 ± 标准差表示, 数据分析采用组间 t 检验。P ≤ 0.01 表示具有显著性统计学差异。

[0156] 4. 实验结果

[0157] 如图 2 所示。可见, 对照组肌管饥饿 6 小时后, 肌管直径明显变小 ; 而红景天苷处理组肌管比对照组肌管直径明显增加 ; 应用 Image-Pro Plus6.0 软件统计分析后表明, 红景天苷处理组肌管直径为对照组的 2.15 倍 (**P<0.01) (见图 3)。说明红景天苷抑制了肌管萎缩。

[0158] 5. 实验结论

[0159] 红景天苷可通过增加肌管萎缩中的肌管直径, 对抗肌管萎缩。

[0160] 实验三 : 红景天苷对肌纤维横截面积的影响

[0161] 1. 实验目的 :

[0162] 本实验采用尾悬吊诱导骨骼肌萎缩, 用组织免疫荧光化学方法, 分析红景天苷对

小鼠肌萎缩中肌纤维横截面积降低的影响。

[0163] 2. 实验方法：

[0164] 2.1 红景天苷处理和未处理小鼠模型的制备

[0165] 将红景天苷粉剂用 PBS 稀释成 10mg/ml 浓度。24 只雄性 C57 按照体重相近的原则分为两组,小鼠于尾悬吊前 14 天,红景天苷处理组按照每天每公斤体重 50mg (50mg/kg/day) 红景天苷剂量、未处理对照组用处理组等体积溶剂 PBS 同步每天灌胃,连续 14 天。灌胃时间统一为上午 8-9 点。

[0166] 2.2 尾悬吊小鼠肌萎缩模型的制备

[0167] 将红景天苷处理组和未处理对照组 C57 小鼠,按照国际公认的小鼠尾悬吊方法 (Gregory R. Adams, et al. J Appl Physiol 95:2185 - 2201, 2003),使小鼠后肢刚好离地,身体与地面的倾斜角度大约为 30°。小鼠可以在鼠笼内头低位自由活动、摄食和饮水。动物均单笼饲养,室温保持在 23±2℃,每日保持 12 小时光照。尾悬吊 14 天诱导肌萎缩形成,结束后,颈部脱臼猝死小鼠,取小鼠后肢背侧腓肠肌。

[0168] 2.3 组织冰冻切片

[0169] A、预冷:将盛有异戊烷的小烧杯放在液氮内,预冷 10 分钟。

[0170] B、包埋:用铂纸做成托,滴上包埋剂,将取出的新鲜组织放入包埋剂内,置于异戊烷中 30 秒 -1 分钟,待包埋剂变成乳白色。

[0171] C、切片:在轮转切片机上切片。

[0172] D、固定:将切片放置丙酮中固定 5 分钟,之后放置 -20℃ 保存。

[0173] 2.4 组织免疫荧光化学染色分析

[0174] A、将切片放置在 PBST 中,洗 5 分钟。

[0175] B、0.3% Triton X-100 室温作用 30 分钟。

[0176] C、5% 的羊血清室温封闭 1 小时。

[0177] D、加入抗 Laminin 一抗 (1:500 稀释),4℃ 过夜。

[0178] E、PBST 洗 3 次,每次 10 分钟。

[0179] F、加入 FITC- 标记 IgG 二抗 (1:1000 稀释),室温 30 分钟。

[0180] G、PBST 洗 3 次,每次 10 分钟。

[0181] H、DAPI 封片,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

[0182] 2.5 应用 Image-Pro Plus 6.0 软件对图像进行分析。

[0183] 3. 统计学分析

[0184] 数据以平均值 ± 标准差表示,数据分析采用组间 t 检验。0.01 < p ≤ 0.05 表示具有统计学差异。

[0185] 4. 实验结果

[0186] 对照组小鼠尾悬吊 14 天后,腓肠肌肌纤维的横截面积平均为 1415 μm²,而喂食红景天苷组小鼠尾悬吊 14 天后,腓肠肌肌纤维的横截面积平均为 1669 μm²,相对于对照组,红景天苷组小鼠萎缩后肌纤维的横截面积明显增加 (*P<0.05) (见图 4,图 5)。

[0187] 5. 实验结论

[0188] 红景天苷可通过增加小鼠肌萎缩形成中肌纤维的横截面积,对抗肌萎缩。

[0189] 实验四:红景天苷对小鼠肌纤维类型相关蛋白表达的影响

[0190] 1. 实验目的：

[0191] 本实验通过提取对照组及红景天苷组小鼠腓肠肌蛋白,利用 Western blot 的方法,检测红景天苷处理后对小鼠腓肠肌内慢肌纤维蛋白和快肌纤维蛋白表达的影响。

[0192] 2. 实验方法

[0193] 2.1 组织蛋白的提取

[0194] A、组织蛋白裂解液配制：

[0195] 表 2 组织蛋白裂解液的组成成分及含量

[0196]

试剂	浓度	体积
Tris	1M	1ml
EDTA	0.5M	0.4ml
NaCl	5M	3ml
Brij96	10%	8.75ml
NP40	10%	1.25ml

[0197] 以上成分加 ddH₂O 至 100ml,使用时加蛋白酶抑制剂 PMSF、Leupeptin、Aprotinin 至终浓度 100 μ g/ml、2 μ g/ml 和 2 μ g/ml。

[0198] B、取 50-100mg 肌肉组织加入到 1mL 组织裂解液中(已加入蛋白酶抑制剂),用匀浆器在冰上充分匀浆。

[0199] C、冰上裂解 30 分钟。

[0200] D、4℃,12000g 离心 20 分钟,取上清,置 -80℃ 保存。

[0201] E、将 0.2mg/ml 的 BSA 稀释成一系列标准溶液 (0、25、50、100、200 μ g/ml),取标准溶液和适当稀释的待测样品各 20 μ l,加入 5 倍稀释的蛋白浓度分析试剂中,振荡混匀后,595nm 波长下测光密度值。以标准蛋白浓度的光密度值作标准曲线,计算待测样品蛋白浓度。

[0202] 2.2 SDS-PAGE 电泳

[0203] A、灌胶：分别配制 12% 的分离胶和 5% 的积层胶,灌制分离胶和积层胶；

[0204] B、样品制备：在样品加入 5× 凝胶加样缓冲液 (终浓度 1×),沸水变性 3-5min；

[0205] C、上样：组织蛋白 80 μ g/孔,蛋白分子量 marker 10 μ l/孔；

[0206] D、电泳：恒压电泳 (积层胶 90V,分离胶 180V),电泳至凝胶底部；

[0207] E、取下凝胶,放入预冷的电转缓冲液中平衡 5min。

[0208] 2.3 转膜

[0209] A、裁剪与凝胶大小相同的厚滤纸和 NC 膜,在预冷的电转缓冲液中平衡 5min。

[0210] B、在半干式电转仪的正极极板上依次放置 4 层厚滤纸、NC 膜、凝胶和 4 层厚滤纸,赶走各层间的气泡,压上负极极板。

[0211] C、以 1.25mA/cm² 的恒流进行电转。

- [0212] D、电转结束后,将膜置于 TBS 中漂洗 3 次,每次 5min.
- [0213] 2.4 抗原抗体反应
- [0214] A、封闭:将转印膜放入杂交袋内,加入适量封闭液,室温轻摇 2h.
- [0215] B、一抗反应:倾掉封闭液,按照 0.1ml/cm² 的比例加入用封闭液稀释的一抗 (Troponin I-SS 或 Troponin I-FS),除尽气泡,封口,4 度轻摇过夜。
- [0216] C、漂洗:取出转印膜,用 TBS-T 洗 3 次,每次 10min。
- [0217] D、二抗反应:将转印膜放入杂交袋内,按照 0.1ml/cm² 的比例加入封闭液稀释的二抗,赶除气泡后封口,在室温振荡 2h.
- [0218] E、漂洗:取出转印膜,用 TBS-T 洗 3 次,每次 10min。
- [0219] 2.5ECL 显色
- [0220] A、各取等体积 ECL 试剂 A 液、B 液混合(按照每平方厘米转引膜 0.125ml ECL 混合液计算)。
- [0221] B、将转印膜轻轻接触滤纸吸干液体,有蛋白质的一面朝上放在保鲜膜上。
- [0222] C、将 ECL 混合液加到转印膜上,反应 1min,提起转印膜,用滤纸吸干液体。
- [0223] D、用保鲜膜覆盖转印膜,注意表面要平整。
- [0224] E、用透明胶带将保鲜膜覆盖的转印膜固定在暗盒中,有蛋白的一面朝上。在暗室进行 X 光曝光,冲片观察结果。
- [0225] 2.6 应用 Image-Pro Plus6.0 软件对图像灰度进行分析。
- [0226] 3. 数据分析
- [0227] 数据以平均值 ± 标准差表示,数据分析采用组间 t 检验。 $p \leq 0.01$ 表示具有显著性统计学差异。
- [0228] 4. 实验结果
- [0229] 红景天苷灌胃 14 天后,腓肠肌内慢肌纤维蛋白(Troponin I-SS)的表达比对照组增加了 6.2 倍(** $P < 0.01$) (见图 6,图 7),而快肌纤维蛋白(Troponin I-FS)的表达比对照组减少了 8%, (见图 6,图 8)。
- [0230] 5. 实验结论
- [0231] 红景天苷能够显著增加骨骼肌内慢肌纤维蛋白的含量,并具有抑制快肌纤维蛋白表达的趋势,可发挥预防和治疗肌萎缩的作用。

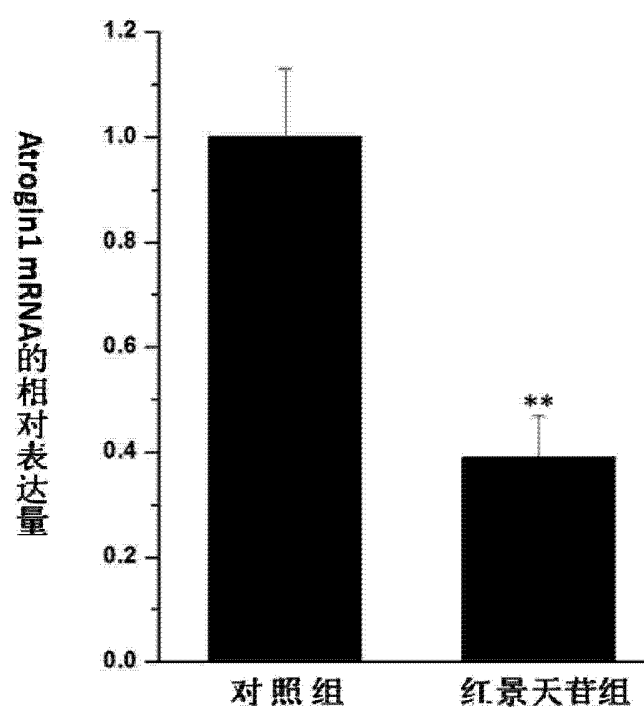


图 1

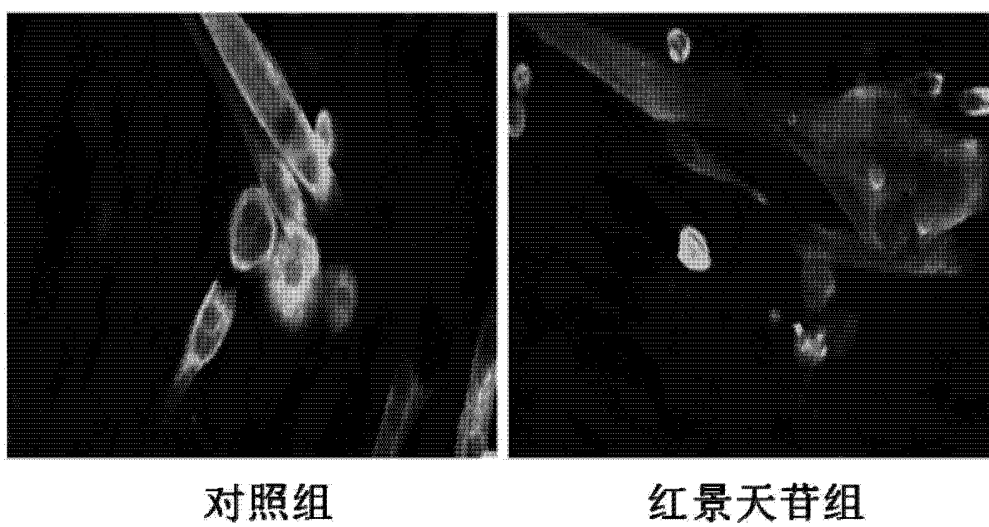


图 2

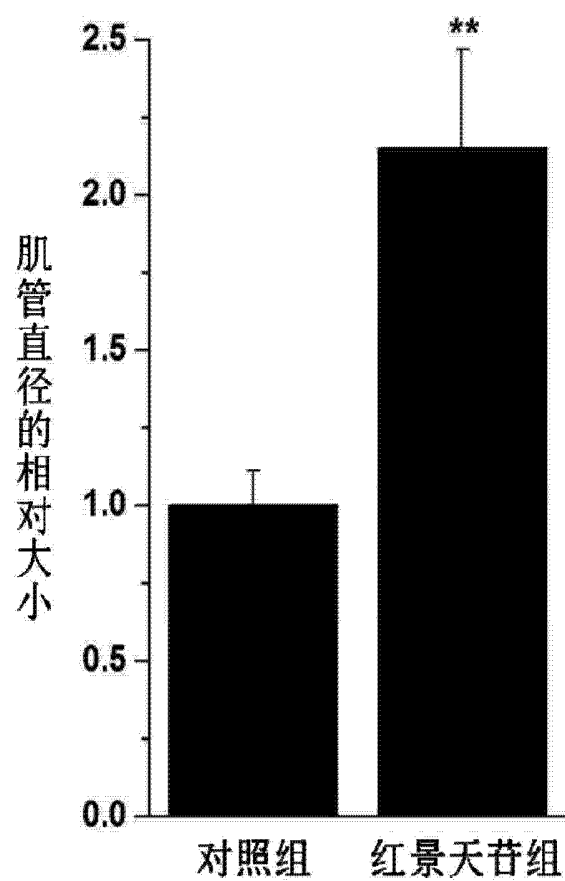


图 3

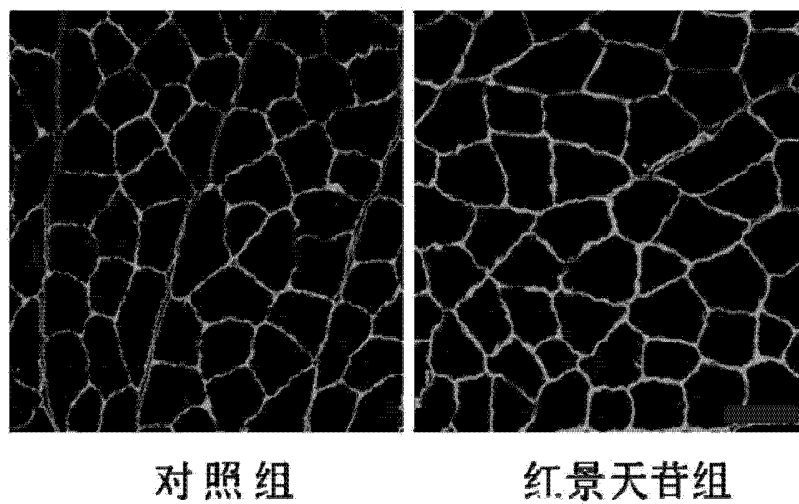


图 4

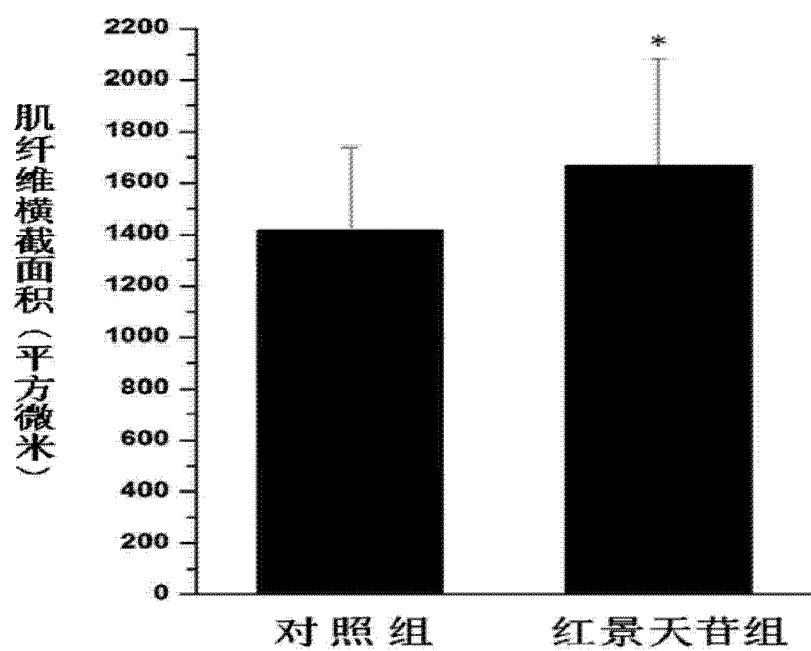


图 5

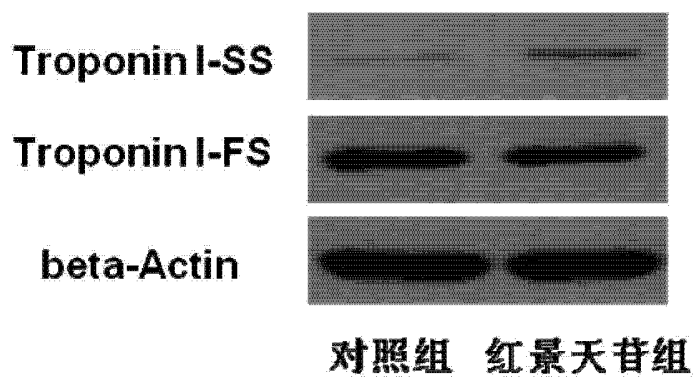


图 6

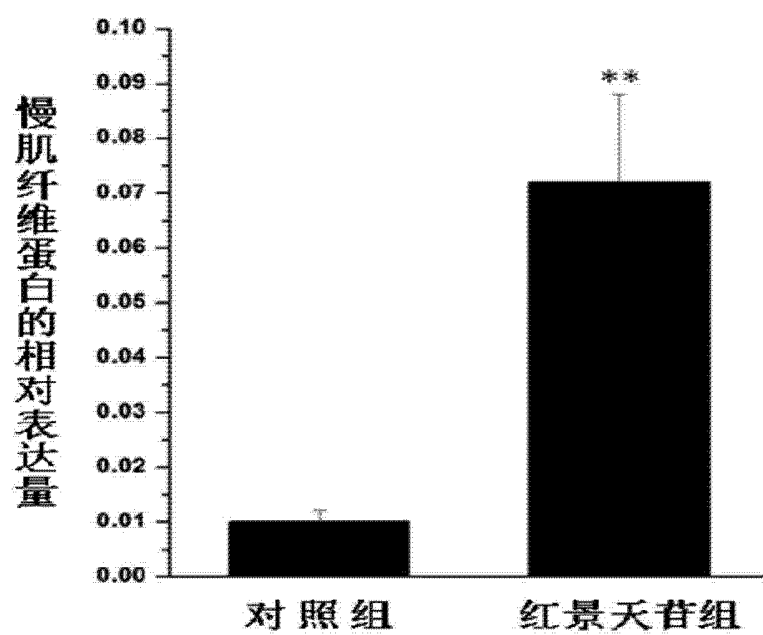


图 7

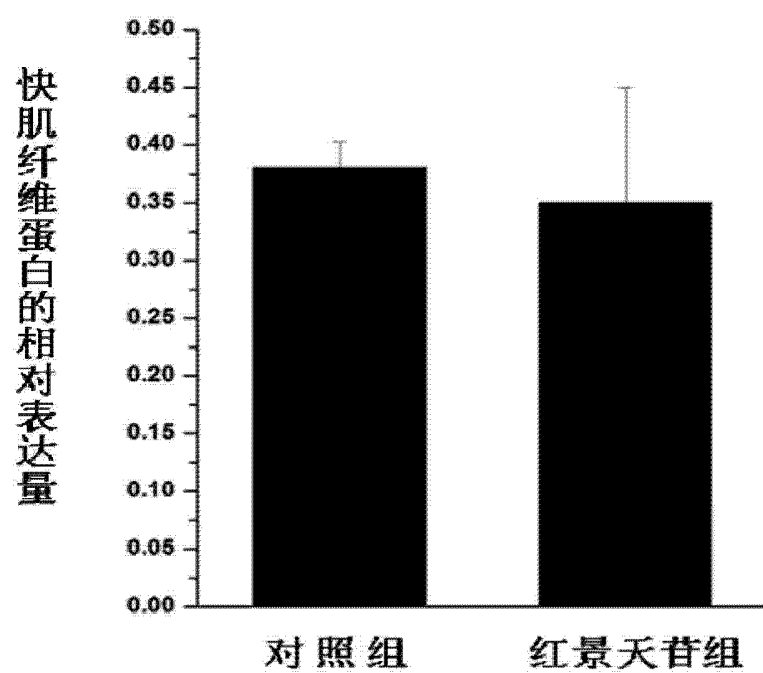


图 8