

墨旱莲组分中组织蛋白酶 K 非活性位点抑制剂研究

蒋益萍¹, 吴岩斌², 秦路平¹, 张巧艳¹, 辛海量¹, Dieter Bromme^{3*}, 薛黎明^{1, 3, 4*}

(1. 中国人民解放军第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350108; 3. 加拿大不列颠哥伦比亚大学, 温哥华 V6T1Z3; 4. 上海市疾病预防控制中心化学品毒性检定所, 上海 200336)

摘要: 组织蛋白酶 K (CTSK) 是抗骨质疏松药物的关键靶标。CTSK 活性位点抑制剂能抑制胶原蛋白降解活性, 同时抑制 CTSK 降解其他蛋白的水解活性, 存在较大的不良反应, CTSK 非活性位点 (exosite) 抑制剂具有抑制骨胶原降解活性且不影响活性位点 (active site) 的生物活性。本研究通过毕赤酵母表达系统表达出重组 CTSK, 进一步通过 N 端正丁基琼脂糖凝胶柱和 SP-琼脂糖凝胶柱分离, 得到高纯度有活性的重组 CTSK。利用所得 CTSK 考察筛选了中药墨旱莲不同提取物及化学成分对 CTSK 的胶原降解活性和对 CTSK 与 Z-FR-MCA 底物结合的抑制作用, 明确了墨旱莲的正丁醇部位为理想的潜在非活性位点活性部位, 从中提取的墨旱莲皂苷 IX 为潜在的非活性位点抑制剂。

关键词: 组织蛋白酶 K; 墨旱莲; 活性位点抑制剂; 非活性位点抑制剂; 正丁醇部位; 墨旱莲皂苷 IX

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0936-07

Study on exosite inhibitor of cathepsin K from *Herba Ecliptae* fractions

JIANG Yi-ping¹, WU Yan-bin², QIN Lu-ping¹, ZHANG Qiao-yan¹, XIN Hai-liang¹,
Dieter Bromme^{3*}, XUE Li-ming^{1, 3, 4*}

(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 3. The University of British Columbia, Vancouver V6T1Z3, Canada; 4. Institute of Chemical Toxicity and Safety Assessment, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Cathepsin K (CTSK) is considered a critical pharmaceutical target in the treatment of osteoporosis. CTSK exerts proteolytic activities against regulatory proteins besides its collagenase function, which may account for some of the adverse reactions when blocked by active site-directed inhibitors. Exosite inhibitors that can discriminate between the therapeutic collagenase and other biological activities of CTSK specifically inhibit the collagenase activity of CTSK without interfering with the other proteolytic activities of the protease. Active recombinant CTSK was expressed in *Pichia pastoris*, and purified by *n*-butyl sepharose and SP sepharose column chromatography. *Herba Ecliptae* is a common traditional Chinese medicine in the treatment of bone diseases. Collagenase assay and benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-FR-MCA) substrate assay based on CTSK are applied to verify the exosite inhibitors. *n*-Butanol extract of *Herba Ecliptae* are the most active fraction and eclalbasaponin IX isolated from *n*-butanol fraction is the potential exosite inhibitor of CTSK.

Key words: cathepsin K; *Herba Ecliptae*; active site inhibitor; exosite inhibitor; *n*-butanol fraction of *Herba Ecliptae*; eclalbasaponin IX

收稿日期: 2016-12-28; 修回日期: 2017-03-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503493, 81403162).

*通讯作者 Tel: 86-21-62758710, Fax: 86-21-62754623, E-mail: dbromme@dentistry.ubc.ca; xueliming@scdc.sh.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1234

组织蛋白酶 K (CTSK) 是溶骨活性最强的一种半胱氨酸蛋白酶, 选择性高表达于破骨细胞中, 降解 I 型骨胶原、骨桥接素和骨连接素等生理底物, 是骨吸收过程中一个关键酶^[1]。人体 CTSK 基因表达的变异会导致致密性成骨不全症、骨质疏松和骨脆性的增加等症^[2]。CTSK 基因缺失小鼠骨髓培养的离体破骨细胞不能形成骨吸收陷窝, 不能有效降解 I 型胶原^[3]。因此, CTSK 抑制剂是抗骨质疏松药物研发的热点之一。目前临床前和临床研究以 CTSK 活性位点为靶点, 尚无成功上市药物。研究结果显示, 作用于活性位点 (active site) 的 CTSK 抑制剂, 不仅抑制骨胶原降解活性, 同时抑制 CTSK 酶的其他正常蛋白水解生物活性, 导致非骨骼组织的纤维化等不良反应。不列颠哥伦比亚大学 Bromme 教授基于生物化学和结构分析的研究发现组织蛋白酶 K 与黏多糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 可形成一种复合物, 如硫酸软骨素 (chondroitin 4-sulfate, C4-S 或 CSA), 只有 CTSK 二配体与一个 CSA 分子形成复合物才具有胶原酶作用, 降解骨胶原^[4,5]。因此, 具有抑制 CTSK 与 GAGs 形成复合物的作用, 而不影响 CTSK 活性位点的生理活性, 称为非活性位点 (exosite) 抑制剂^[6]。寻找这种新型的非活性位点抑制剂将是未来开发临床治疗骨质疏松药物的重要方向。

墨旱莲, 收录于 2015 版《中国药典》, 来源于植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分, 具滋补肝肾、凉血止血的功效, 主治肝肾阴虚、牙齿松动、须发早白、眩晕耳鸣、腰膝酸软、阴虚血热吐血、衄血和尿血症等^[7]。化学成分主要为三萜皂苷类、噻吩类、香草醚类及黄酮类等^[8]。现代药理研究表明, 墨旱莲具有显著的抗骨质疏松活性, 其根和叶的乙醇提取物、总挥发油和总皂苷均显著促进 UMR106 成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶的活性^[8-10]。墨旱莲有效成分刺囊酸和蟛蜞菊内酯均显示能有效抑制破骨细胞骨吸收活性^[11,12]。因此, 本研究拟从墨旱莲活性成分寻找抑制 CTSK 活性的抑制剂, 以期筛选得到理想的抗骨质疏松的非活性位点抑制剂。

材料与方法

材料与试剂 墨旱莲药材购自上海华宇药业有限公司, 经中国人民解放军第二军医大学秦路平教授鉴定为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分。重组 CTSK 的毕赤酵母表达菌株 GS115-pPIC9K, 由不列颠哥伦比亚大学 Dieter Bromme 实验

室提供; 固体酵母浸出粉/胰蛋白胨/右旋葡萄糖培养基 (yeast extract peptone dextrose medium, YPD)、缓冲复合甘油培养基 (buffered glycerol complex medium, BMGY) 和缓冲复合甲醇培养基 (buffered methanol complex medium, BMMY) 均购自 Invitrogen 公司; Benzylloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-FR-MCA) 购自日本 WAKO 公司; I 型胶原购自美国 Affymetrix 公司; E-64 (*L*-3-carboxy-trans-2-3-epoxypropionyl-leucylamido-(4guanidino)-butane)、CSA 和胃蛋白酶购自 Sigma 公司; *n*-Butyl 琼脂糖柱和 SP 琼脂糖柱购自美国 GE Healthcare 公司; 微孔过滤滤膜离心管购自 Amico Millipore 公司。

仪器与设备 荧光分光光度计 (LB50, Perkin-Elmer 公司); GeneSnap 凝胶成像系统 (MD, Syngene Inc. Frederick 公司); J21-M 型高速离心机 (美国 Beckman 公司); 蛋白电泳仪 (Bio-Rad 公司); 微孔板酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Beckman Du 530 分光光度计 (德国 Beckman 公司)。

墨旱莲提取物制备 称取两份墨旱莲药材, 每份 100 g, 分别用 10 倍量的 95% 乙醇回流提取, 每次 2 h, 提取 3 次, 合并滤液。一份得到醇提物 11.0 g; 另一份分别用正丁醇、石油醚、乙酸乙酯和二氯甲烷依次萃取, 将各部位药液分别浓缩至干浸膏, 醇提石油醚部位 1.6 g、乙酸乙酯部位 2.2 g、正丁醇部位 3.6 g 和二氯甲烷部位 2.1 g。分别用 DMSO 配成质量浓度为 40 mg·mL⁻¹ 的供试溶液; 墨旱莲皂苷 (I、II、V、VII、IX) 和刺囊酸是墨旱莲正丁醇部位经凝胶柱层析分离得到 (结构式见图 1), DMSO 溶解, 制备成 10 μmol·mL⁻¹ 的供试液。

人组织蛋白酶 K 的制备和纯化 取出重组毕赤酵母菌, 在超净台中将菌株 20 μL 接种于 5 mL YPD 培养基, 37 °C 培养 1 天。将 YPD 培养菌液体 5 mL, 加入 BMGY 培养液 50 mL, 200 r·min⁻¹ 摇床 28 °C 培养 1~2 天, 用 Beckman Du 530 分光光度计至吸光度 (OD) 值为 6。菌液于 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集全部菌体, 分别重新悬浮于 2×500 mL BMGY 培养基, 培养 24 h 后, 重新悬浮于 2×200 mL BMMY 培养基, 于摇床 28 °C、200 r·min⁻¹ 进行诱导表达 2~3 天, 每天加入 100% 甲醇 1 mL 诱导发酵, 培养液合并, 4 °C 下 6 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 浓缩至 40 mL, 存放于 -80 °C 冰箱。纯化过程如下: 取发酵液 20 mL, 加入 0.6 mg·mL⁻¹ 胃蛋白酶激活 CTSK, 用 20% 乙酸溶液调节 pH 至 4.0, 于 37 °C 孵育, 利用 Z-FR-MCA 底物实时检测酶活性。取发酵液 5 μL 置

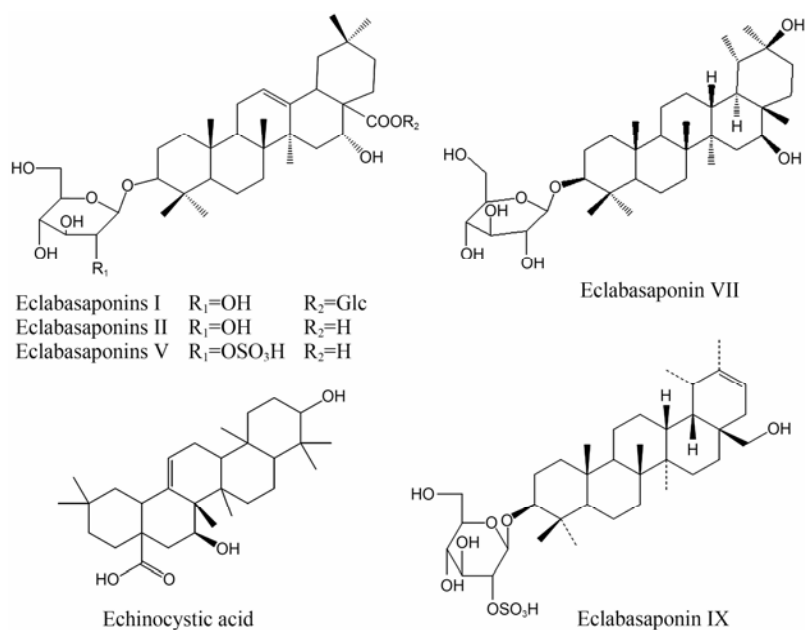


Figure 1 Compounds isolated from butanol extract of *Herba Ecliptae*

于 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液中 (pH 5.5, 含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 和 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA), 加入底物 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Z-FR-MCA 溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 开始反应, 检测 1 min 荧光信号 slope, 直到 CTSK 活性最强, 将发酵液置于冰上, 待进一步纯化。胃蛋白酶活化后的发酵液, 加入硫酸铵使最终达到 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液上样过 N 端正丁基琼脂糖凝胶柱, 采用硫酸铵梯度洗脱 (100%、70%、50% 和 0%), CTSK 酶被洗脱下来, 用 Z-FR-MCA 实时观察酶活性, 洗脱收集合并活性强的部位, 用 Millipore 10KD 微孔过滤滤膜在 $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液。再经 SP-琼脂糖凝胶柱, 采用氯化钠梯度洗脱 (0%、30%、50% 和 100%), 收集活性集中组分合并, 用 Millipore 10KD 微孔过滤滤膜在 $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液, 得到浓缩酶液 1.5 mL , 保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱, 备用。

组织蛋白酶 K 纯度 采用凝胶电泳方法验证 CTSK 蛋白纯度。取纯化 CTSK $1\text{ }\mu\text{L}$ 加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5, 含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 和 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) $15\text{ }\mu\text{L}$, 再分别取 $16\text{ }\mu\text{L}$ 胃蛋白酶活化前后的菌液、经正丁基柱和 SP 柱纯化后, 分别加入 $5\times\text{SDS}$ 上样缓冲液 $5\text{ }\mu\text{L}$, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 5 min 后, 上样, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 胶体用卡马斯亮蓝染色 20 min, 用乙酸-甲醇 (4:1) 脱色。灰度用 GeneSnap 软件进行定量分析。

组织蛋白酶 K 浓度 酶浓度测定采用活性位点滴定法。取浓缩后 CTSK 酶溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$, 分别加入

$5\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的抑制剂 E-64 (0 、 2 、 5 、 8 、 10 、 15 和 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 溶液于 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5, 含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 和 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) $40\text{ }\mu\text{L}$ 中孵育 30 min 后, 从中取溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$, 于 $990\text{ }\mu\text{L}$ 醋酸钠缓冲液中, 加入 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Z-FR-MCA 底物溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 反应 30 s 后, 在微孔板酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 测定 1 min 内的荧光 slope 值 (发散光波长 460 nm , 吸收光波长 355 nm)。计算公式: 酶活 (U) = slope/测定样品量 (μL) \times 总溶液容量 (μL), $1\text{ U}=4.68\times 10^{-6}\text{ mg}$ 。

组织蛋白酶 K 动力学 Michaelis-Menten 常数 (K_m) 采用非线性回归分析, 总反应液为 $200\text{ }\mu\text{L}$, 用 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5, 含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 和 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) 稀释配制终浓度为 $2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CTSK, 加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 不同终浓度 (0.5 、 2.5 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 和 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Z-FR-MCA 底物孵育 30 s, 测定 1 min 内的荧光 slope 值, 方法同上。

组织蛋白酶 K 稳定性 总反应液为 $200\text{ }\mu\text{L}$, 用 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5, 含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 和 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) 稀释配制终浓度 $2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CTSK, 存放在不同温度 ($22\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $37\text{ }^\circ\text{C}$) 下孵育, 分别在 0 、 0.5 、 1 、 2 、 3 和 4 h , 加入 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Z-FR-MCA 底物 $5\text{ }\mu\text{L}$ 孵育 30 s, 测定 1 min 内的荧光 slope 值, 方法同上。

胶原降解活性 总反应液为 $50\text{ }\mu\text{L}$, 可溶性 I 型胶原溶解在 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5, 含

2.5 mmol·L⁻¹ DTT 和 2.5 mmol·L⁻¹ EDTA), 最终质量浓度为 0.6 mg·mL⁻¹, 分别加入抑制剂: 最终质量浓度为 400 μg·mL⁻¹ 墨旱莲石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和二氯甲烷部位; 100 μmol·L⁻¹ 墨旱莲皂苷 (I、II、V、VII、IX) 和刺囊酸, 依次将 CTSK (最终浓度 400 nmol·L⁻¹) 和 CSA (最终浓度 200 nmol·L⁻¹) 加入含有 I 型胶原蛋白的反应液中, 使总反应液容量达 50 μL。混匀, 28 °C 孵育 4 h, 取出后加入 5 μL 100 μmol·L⁻¹ E64 终止反应。采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 卡马斯亮蓝染色 20 min, 用乙酸乙酯-甲醇 (4:1) 脱色。I 型胶原的 α1 条带的灰度用 GeneSnap 软件进行定量分析。实验重复 3 次, 每次重复 3 组胶。

Z-FR-MCA 活性 墨旱莲石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和二氯甲烷部位分别用 100 mmol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5, 含 2.5 mmol·L⁻¹ DTT, 和 2.5 mmol·L⁻¹ EDTA) 稀释至质量浓度为 25 μg·mL⁻¹; 墨旱莲皂苷 (I、II、V、VII、IX) 和刺囊酸稀释至 25 μmol·mL⁻¹, 于比色皿中, 最终反应容量为 1 mL。加入终浓度为 5 nmol·L⁻¹ 的 CTSK 孵育 5 min, 再加入底物 1 mmol·L⁻¹ Z-FR-MCA 溶液 5 μL, 孵育 30 s, 测定 1 min 内的荧光 slope 值 (发射光波长 460 nm, 吸收光波长 355 nm)。实验设阴性对照组 (无抑制剂), 阳性对照组 (E64, 活性位点抑制剂)。计算公式: 抑制率 (%) = 100 - (1 - V_i/V₀)。其中 V_i 和 V₀ 分别表示存在和不存在抑制剂时荧光信号。

统计学分析 所有实验重复 3 次, 实验所得数据均采用 SPSS18.0 软件进行单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结果

1 组织蛋白酶 K 纯度和浓度检测

对制备 CTSK 不同阶段留样进行凝胶电泳分析 (图 2), 5 号为纯化浓缩后的 CTSK, 为单一深黑色条带, 其灰度值为 99.9%, 达到纯化标准, 作为定性位置。胃蛋白酶活化前, 在同一纬度并无条带出现; 活化后, 在同一位置出现暗灰色的条带。经 N 端正丁基琼脂糖柱后, 出现明显的 CTSK 条带, 但仍然有较多其他蛋白条带, 灰度值显示纯度只能达到 50%。经 SP 柱纯化后, 只有一条显著的 CTSK 条带, 无明显的其他条带, 纯度达到 99%。因此经两步柱分离后, 可得到纯 CTSK。

对最终浓缩制备的 CTSK 稀释 10 倍进行浓度测定, E64 和底物 Z-FR-MCA (1:1) 竞争性 CTSK 酶

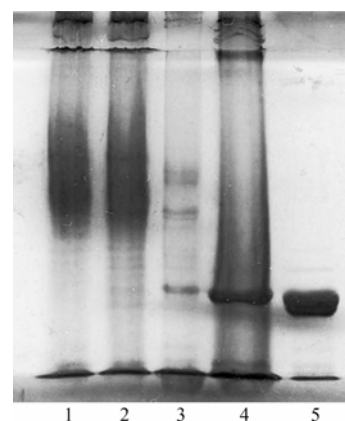


Figure 2 SDS-PAGE analysis on identification and purification of cathepsin K (CTSK). Run 10% polyacrylamide gel with CTSK solutions 10 μL in different purification process. 1: Fermentation broth before activation by pepsin; 2: Fermentation broth before activation by pepsin; 3: After *n*-butyl agarose column purification; 4: After SP agarose column purification; 5: After ultrafiltration using Millipore centrifugal filter unit with M_w 10 000 cut-off

结合, 采用 E64 的浓度来反向滴定测定酶浓度。图 3A 结果显示, 当 E64 浓度为 20 μmol·mL⁻¹ 时, 可完全抑制酶与底物结合, 随 E64 浓度的升高, CTSK 与 Z-FR-MCA 结合反应的荧光信号降低。线性方程 $y = -0.2095x + 4.0145$, $R = 0.996$, 得到 CTSK 浓度为 19.16 μmol·mL⁻¹。不加 E64 的 slope 值为 4.0145 dA·min⁻¹, 经计算, 酶活为 12.04×10^6 U, 约等于 56.4 mg。

2 组织蛋白酶 K 与底物结合能力和稳定性

对制备的 CTSK 进行酶动力学参数考察, K_m 、 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 采用 Michaelis-Menten 方程公式计算, 不同底物浓度测得的数据 (图 3B), 随着时间的延长, 荧光 slope 逐渐升高, 反应 25 min 后, 数值趋于平稳, 反应终止。非线性回归分析结果显示 K_m 为 8.77 ± 1.70 μmol·L⁻¹, K_{cat} 为 9.99 ± 1.10 s⁻¹, K_{cat}/K_m 为 1.14 ± 0.90 (10⁶ s⁻¹ mol⁻¹·L)。

研究考察了 22 °C (室温)、28 °C 和 37 °C 的稳定性。在室温、pH 5.5 环境下, 经 4 h 孵育, 还剩 20% CTSK 活性。在 28 °C 和 37 °C 条件下, 30 min 孵育后 CTSK 剩余酶活降低至 39.5% 和 5.3%; 在 1 h 后, 28 °C 时孵育剩下 19.5% 活性, 37 °C 时孵育无剩余活性 (图 4)。

3 墨旱莲不同提取物的潜在非活性位点抑制剂筛选

墨旱莲不同提取部位 (正丁醇、石油醚、乙酸乙酯和二氯甲烷) 抑制 CTSK 引起胶原降解活性筛选结果显示, 墨旱莲正丁醇, 石油醚和乙酸乙酯部位在 400 μg·mL⁻¹ 显示较强的抑制作用, 分别为 78.3%、95.6% 和 68.9%; 二氯甲烷部位对胶原降解无抑制作用。对不同部位提取物进行 Z-FR-MCA 底物结合实验

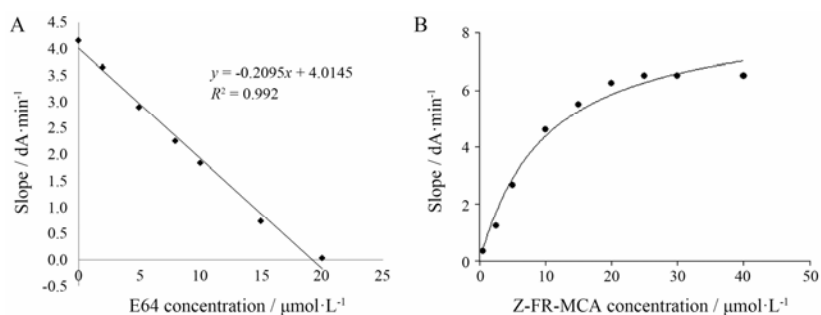


Figure 3 Plots for the determination of CTSK concentration with different E64 concentrations (A) and plot for K_m and K_{cat} according to Michaelis-Menten kinetics (B). Determine the fluorescence units (FU) per min (‘slope’) for enzyme incubated with inhibitor E64 concentrations (0, 2, 5, 8, 10, 15, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at a constant Z-FR-MCA substrate concentration (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and for Z-FR-MCA substrate concentrations (0.5, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at a constant 5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ enzyme concentration, which measured at E_x 355 nm and E_m 460 nm. Z-FR-MCA: Benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin

结果显示, 墨旱莲石油醚、二氯甲烷和乙酸乙酯部位抑制作用明显, 超过 50%, 可能其中的 CTSK 抑制剂主要作用于活性位点; 墨旱莲正丁醇部位对 CTSK 与底物结合抑制作用为 25.9%。石油醚部位胶原降解活性显著高于正丁醇部位, 石油醚、二氯甲烷和乙酸乙酯部位的 Z-FR-MCA 活性显著高于正丁醇部位 (表 1)。

4 墨旱莲的有效成分潜在非活性位点抑制剂筛选

从正丁醇部位分离得到的主要是皂苷类化合物, 有墨旱莲皂苷 (I、II、V、VII、IX) 和刺囊酸等化合物 (图 1)。通过考察这些活性成分抑制 CTSK 胶原降解活性和抑制 Z-FR-MCA 活性。结果显示墨旱莲皂苷 IX 胶原 $\alpha 1$ 条带灰度值为 CK 灰度值 70.3% (图 5A), 墨旱莲皂苷 (I、II、V、VII) 和刺囊酸显示无抑制作用; 6 个化合物对 Z-FR-MCA 均不显示抑制活性 (图 5B)。

讨论

CTSK 抑制剂可特异性地抑制破骨细胞胶原降解酶的活性, 而不影响细胞活力, 可以避免成骨细胞和破骨细胞双向调节的失衡。临床前和临床研究数

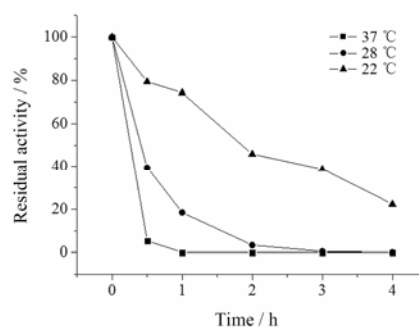


Figure 4 Stability of CTSK under different temperatures was tested against the substrate Z-FR-MCA (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Samples were tested at 22 °C (room temperature), 28 °C, and 37 °C at the time points of 0.5, 1, 2, 3, and 4 h. The residual activities were plotted against time

Table 1 Inhibition effect of different fractions of *Herba Ecliptae* on collagenase activity and Z-FR-MCA substrate activity of CTSK. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs *n*-butanol

Fraction of <i>Herba Ecliptae</i>	Z-FR-MCA binding inhibition / %	Collagen degradation inhibition / %
<i>n</i> -Butanol	25.9 ± 1.7	78.3 ± 8.7
Petroleum ether	72.3 ± 2.9***	95.6 ± 10.3*
Ethyl acetate	60.4 ± 3.1***	68.9 ± 6.2
Dichloromethane	60.5 ± 2.2***	0.0 ± 0.2***

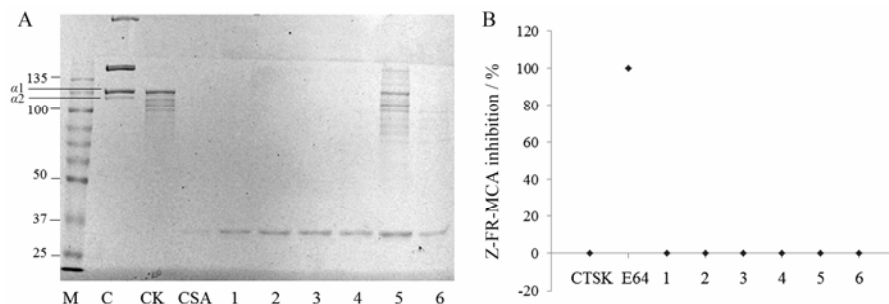


Figure 5 Inhibition effect of compounds from butanol extract of *Herba Ecliptae* on collagenase activity (A) and Z-FR-MCA substrate activity (B) of CTSK. 1: Eclalbasaponin I; 2: Eclalbasaponin II; 3: Eclalbasaponin V; 4: Eclalbasaponin VII; 5: Eclalbasaponin IX; 6: Echinocystic acid

据表明 CTSK 抑制剂对骨吸收的抑制作用可以达到 80%, 而不降低骨形成的生物指标^[13, 14]。然而, 临床试验表明, 基于这种新型的防治骨质疏松策略的 4 种 CTSK 抑制剂中至少 2 种的临床试验结果失败, 其原因与导致非骨骼组织的纤维化有关^[15]。默克公司 odanacatib 虽然成功通过了 III 期临床试验, 但增加了房颤和中风风险而放弃。除了骨骼系统预期的表型外, CTSK 缺陷鼠还表现出肺气道损伤^[16], 使肺和皮肤易于发生纤维化^[15, 17], 甲状腺球蛋白加工 (thyroglobulin processing) 改变^[18, 19], TGF- β 转换, 甚至学习记忆缺陷^[20], 表明活性位点抑制剂可能引起诸多不良反应, 为开发新型的抗骨质疏松药物提出了挑战。Bromme 教授提出非活性位点的概念, 寻找这种选择性的、不抑制非胶原基质降解的 CTSK 抑制剂将避免目前活性位点抑制剂的安全性问题。中草药含有丰富的活性物质, 有些化合物经反复验证可治疗包括骨骼疾病在内的多种病症, 但大多数化合物的药理学靶标尚不清楚。因此, 长期临床治疗骨骼疾病的中草药是理想的候选药物库。墨旱莲与女贞子组方二至丸被临床医家常用于治疗更年期骨质疏松, 疗效确切, 能明显改善更年期骨质疏松征症状, 增强骨密度^[21]。本研究期望发现墨旱莲中具有抗骨质疏松活性的 CTSK 非活性位点抑制剂。

CTSK 是通过在毕赤酵母菌发酵、制备和纯化得到的, 最终 20 mL 浓缩菌液获得 CTSK 约 56.2 mg。采用 Z-FR-MCA 底物活性测试, 全程监控制备、纯化过程, 以期获得最大的酶活量。纯化过程经两步柱纯化, 采用梯度洗脱, 最大地保留了酶量, 同时达到了纯化要求。对 CTSK 进行了酶动力参数和酶稳定性研究, 酶动力参数 $K_m=8.77\pm 1.70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{cat}}=9.99\pm 1.10 \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{cat}}/K_m=1.14\pm 0.90 (10^6 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L})$, 与文献^[5]报道大致相同, 确保制备得到的酶是 CTSK。稳定性实验表明, 在 22 °C 条件下, 4 h 后仍有约 20% 剩余活性; 28 °C 条件下缓慢失活, 3 h 基本失活; 37 °C 条件下 1 h 内基本失活。因此本研究选择 28 °C 下孵育 4 h 用于胶原降解实验。

CTSK 选择性地大量表达于破骨细胞, 其生理作用底物正是在有机骨基质中含量达 95% 的 I 型胶原, 非活性位点和活性位点抑制剂均能抑制 I 型胶原的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 条带降解。Z-FR-MCA 是 CTSK 人工合成底物, 作用于 CTSK 活性位点, 具有荧光发光基团 MCA, 发射波长 460 nm, 激发波长 355 nm。CTSK 将裂解底物端 FR-MCA 结合, 释放游离的 MCA 基团, 通过检测 MCA 产生的荧光信号来检测 CTSK 的

活性; 抑制胶原降解活性考察是否为 CTSK 抑制剂; Z-FR-MCA 实验判断抑制剂作用于活性位点还是非活性位点。

通过对治疗骨质疏松常用药物墨旱莲的有效部位筛选, 发现墨旱莲正丁醇部位表现较强的胶原降解活性, 且抑制 Z-FR-MCA 与 CTSK 结合不明显, 是比较理想的非活性位点有效部位。墨旱莲石油醚和乙酸乙酯部位虽然具有较强的抑制胶原降解活性, 但其抑制 Z-FR-MCA 活性同样很强, 超过 60% 以上, 极有可能是活性位点抑制剂。虽然不排除可能存在非活性位点抑制剂, 但筛选发现墨旱莲正丁醇部位分离活性化合物更有可能得到非活性位点抑制剂。墨旱莲正丁醇部位主要分离得到皂苷类成分, 墨旱莲皂苷 (I、II、V、VII、IX) 和刺囊酸均为五环三萜类化合物 (图 1), 但仅墨旱莲皂苷 IX 表现出明显的抑制胶原降解活性, 可能与糖环上磺酸根基团和苷元上羟基基团密切相关。本研究对墨旱莲各部位及正丁醇部位皂苷类成分进行了筛选, 发现 CTSK 非活性位点抑制剂是潜在存在的, 未来计划从墨旱莲正丁醇部位中分离更多的有效成分进行筛选。

References

- [1] Lecaille F, Kaleta J, Brömme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design [J]. Chem Rev, 2002, 102: 4459–4488.
- [2] Fratzi-Zelman N, Valenta A, Roschger P, et al. Decreased bone turnover and deterioration of bone structure in two cases of pycnodysostosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89: 1538–1547.
- [3] Duque G, Troen BR. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome [J]. J Am Geriatr Soc, 2008, 56: 935–941.
- [4] Li Z, Hou WS, Escalante-Torres CR, et al. Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 28669–28676.
- [5] Aguda AH, Panwar P, Du X, et al. Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111: 17474–17479.
- [6] Panwar P, Se K, Guido RV, et al. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173: 396–410.
- [7] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part

- I. Beijing: China Medical Science Press, 2015, 374–375.
- [8] Lee MK, Ha NR, Yang H, et al. Stimulatory Constituents of *Eclipta prostrata* on mouse osteoblast differentiation [J]. *Phytother Res*, 2009, 23: 129–131.
- [9] Lin XH, Wu YB, Lin S, et al. Effects of volatile components and ethanolic extract from *Eclipta prostrata* on proliferation and differentiation of primary osteoblasts [J]. *Molecules*, 2010, 15: 241–250.
- [10] Huang YX, Yi J, Wu JG, et al. Comparative study on antiosteoporosis activity and chemical composition from different parts of *Eclipta prostrata* L [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2014, 26: 1229–1232.
- [11] Liu YQ, Zhan LB, Liu T, et al. Inhibitory effect of *Ecliptae herba* extract and its component wedelolactone on pre-osteoclastic proliferation and differentiation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157: 206–211.
- [12] Deng YT, Kang WB, Zhao JN, et al. Osteoprotective effect of echinocystic acid, a triterpene component from *Eclipta prostrata*, in ovariectomy-induced osteoporotic rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0136572.
- [13] Costa AG, Cusano NE, Silva BC, et al. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7: 447–456.
- [14] Eisman JA, Bone HG, Hosking DJ, et al. Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: three-year continued therapy and resolution of effect [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26: 242–251.
- [15] Rüniger TM, Adami S, Benhamou CL, et al. Morphea-like skin reactions in patients treated with the cathepsin K inhibitor balicatib [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2012, 66: 89–96.
- [16] Zhang D, Leung N, Weber E, et al. The effect of cathepsin K deficiency on airway development and TGF- β 1 degradation [J]. *Respir Res*, 2011, 12: 72.
- [17] Bühling F, Röcken C, Brasch F, et al. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164: 2203–2216.
- [18] Tepel C, Bromme D, Herzog V, et al. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113: 4487–4498.
- [19] Friedrichs B, Tepel C, Reinheckel T, et al. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111: 1733–1745.
- [20] Dauth S, Sîrbulescu RF, Jordans S, et al. Cathepsin K deficiency in mice induces structural and metabolic changes in the central nervous system that are associated with learning and memory deficits [J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 74.
- [21] Yu QY. Clinical observation of Er-Zhi-Wan in treating climacteric osteoporosis [J]. *Strait Pharm J (海峡药学报)*, 2009, 21: 169–170.