



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108196068 B

(45)授权公告日 2019.09.10

(21)申请号 201810086032.6

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.01.29

审查员 舒霏霏

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108196068 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(73)专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72)发明人 陈廖斌 汪晖 文印宪 潘正启

上官杨帆 肖浩

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 42222

代理人 彭劲松

(51)Int.Cl.

A61K 45/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

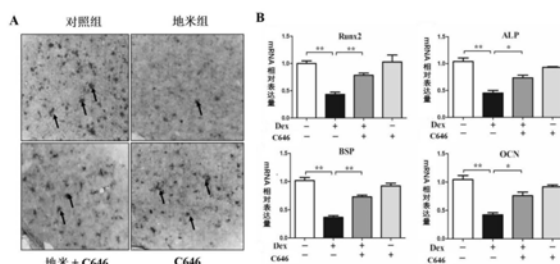
序列表6页 附图3页

(54)发明名称

血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化在制备改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化在制备改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用。本发明根据孕期外源物暴露可致子代出现骨发育迟缓表现以及成年后骨质疏松症发生,构建了胎源性成年骨质疏松症模型。在此胎源性骨质疏松症模型中发现,ACE基因启动子区组蛋白乙酰化修饰水平较对照组显著增加。通过促进ACE基因启动子区组蛋白乙酰化修饰水平及其表达可显著降低骨量并引起骨质疏松症发生,抑制ACE基因启动子区组蛋白乙酰化修饰水平及其表达则可逆转骨量降低及骨质疏松症发生。因此,ACE基因启动子区组蛋白乙酰化修饰改变可作为胎源性成年骨质疏松症的防治靶点,为胎源性成年骨质疏松症的治疗提供了一条新的途径。



1. 血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化作为药物靶标在筛选改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用,其特征在于,所述的血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化是指H3K27ac。

2. 血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化的抑制剂在制备改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用,其特征在于,所述的血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化是指H3K27ac。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述的血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化的抑制剂为组蛋白乙酰化酶p300抑制剂C646。

血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化在制备改善胎源性 成年骨质疏松症药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因的功能与应用领域,特别涉及血管紧张素转化酶(ACE)启动子区组蛋白乙酰化作为药物靶标在筛选改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用,以及血管紧张素转化酶(ACE)启动子区组蛋白乙酰化的抑制剂在制备改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松症是一种病理性骨代谢改变,表现为骨形成减少和骨吸收增加,可导致骨量丢失、骨脆性增加,全身各处易于骨折。前期研究发现,低出生体重儿成年后罹患骨质疏松症等疾病的风险增加,其发生原因与孕期母体所处的不良环境密切相关^[1]。多项流行病学调查也发现,低出生体重与成年后股骨颈、腰椎的骨量降低密切相关^[2-4]。提示,骨质疏松症存在宫内发育起源。但是,胎源性成年骨质疏松症的发生机制和早期防治靶点尚不清楚。

[0003] 成骨细胞是由骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化而来的特异性间充质细胞,可合成类骨质并矿化成骨,在软骨内过程中扮演至关重要的角色,并且是维持骨量稳定的重要因素之一^[5, 6]。因此,各种因素引发的BMSCs成骨定向分化能力降低,均可导致子代骨量减少和成年后骨质疏松症易感。肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)是机体内调节血压平衡和水盐代谢的重要内分泌系统。近年来研究发现,各脏器组织中(包括骨组织)存在局部的RAS,并通过自分泌/旁分泌途径参与调节细胞增殖、分化及凋亡等过程^[7]。RAS主要成分包括血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)、血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)、血管紧张素受体(angiotensin receptors, ATRs)等。其中ACE是一种金属蛋白酶,能将无生物活性的Ang I转变为有活性的Ang II,后者可通过结合AT1R或AT2R产生特定的生物功能。因此,ACE是RAS的主要调节者,通过上调ACE表达可以导致RAS激活,并进一步抑制AT1R和AT2R表达分别影响细胞增殖和分化^[8-10]。但是,ACE上调介导的骨局部RAS激活是否可导致BMSCs成骨分化抑制进而引起子代骨发育毒性改变,目前尚不清楚。

[0004] 宫内编程是指胎儿在发育过程中,所处的环境异常使其原本的发育过程发生改变,导致机体功能产生长期或永久的变化,且主要与表观遗传修饰发生改变有关^[11]。组蛋白修饰是表观遗传修饰主要表现形式之一。通过抑制组蛋白乙酰化过程是由组蛋白乙酰化酶介导发生并可上调目的基因表达^[12]。已知糖皮质激素(包括地塞米松)主要通过糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合后调控基因表达。GR是核受体家族成员之一,与糖皮质激素结合并活化入核后形成二聚体并与目的基因上的糖皮质激素反应元件结合,并且此过程可以通过招募转录因子以及相关表遗传酶共同调控基因转录^[13, 14]。然而,地塞米松是否可导致ACE启动子区发生表遗传改变并介导RAS宫内编程改变和胎源性成年骨质疏松症发生,以及ACE表遗传改变是否可作为胎源性成年骨质疏松症的防治靶点,仍有

待进一步探索。

[0005] 参考文献:

[0006] [1]Godfrey KM,Inskip HM,Hanson MA.The long-term effects of prenatal development on growth and metabolism[J].Semin Reprod Med,2011,29(3):257-265.

[0007] [2]Javaid MK,Arden N,Cooper C.Association of birth weight with osteoporosis and osteoarthritis in adult twins[J].Rheumatology(Oxford),2004,43(3):401.

[0008] [3]Baird J,Kurshid MA,Kim M,et al.Does birthweight predict bone mass in adulthood?A systematic review and meta-analysis[J].Osteoporos Int,2011,22(5):1323-1334.

[0009] [4]Schlüssel MM,Vaz JS,Kac G.Birth weight and adult bone mass:a systematic literature review[J].Osteoporos Int,2010,21(12):1981-1991.

[0010] [5]Chen XD,Dusevich V,Feng JQ,et al.Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts[J].J Bone Miner Res,2007,22(12):1943-1956.

[0011] [6]Guan M,Yao W,Liu R,et al.Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass[J].Nat Med,2012,18(3):456-462.

[0012] [7]Paul M,Poyan MA,Kreutz R.Physiology of local renin-angiotensin systems[J].Physiol Rev,2006,86(3):747-803.

[0013] [8]Rodgers KE,Dizerega GS.Contribution of the Local RAS to Hematopoietic Function:A Novel Therapeutic Target[J].Front Endocrinol (Lausanne),2013,4:157.

[0014] [9]Uz B,Tatonyan SC,Sayitoglu M,et al.Local Renin-Angiotensin system in normal hematopoietic and multiple myeloma-related progenitor cells[J].Turk J Haematol,2014,31(2):136-142.

[0015] [10]Durik M,Seva PB,Roks AJ.The renin-angiotensin system,bone marrow and progenitor cells[J].Clin Sci(Lond),2012,123(4):205-223.

[0016] [11]Fowden AL,Giussani DA,Forhead AJ.Intrauterine programming of physiological systems:causes and consequences[J].Physiology(Bethesda),2006,21:29-37.

[0017] [12]Haberland M,Montgomery RL,Olson EN.The many roles of histone deacetylases in development and physiology:implications for disease and therapy[J].Nat Rev Genet,2009,10(1):32-42.

[0018] [13]Moisiadis VG,Matthews SG.Glucocorticoids and fetal programming part 1:Outcomes[J].Nat Rev Endocrinol,2014,10(7):391-402.

[0019] [14]Moisiadis VG,Matthews SG.Glucocorticoids and fetal programming part 2:Mechanisms[J].Nat Rev Endocrinol,2014,10(7):403-411.

发明内容

[0020] 为了解决上述现有技术的缺陷和不足,本发明的目的在于确定ACE启动子区组蛋白乙酰化改变与胎源性成年骨质疏松症之间的相互关系,提供ACE启动子区组蛋白乙酰化抑制剂在制备改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用。

[0021] 上述目的是通过如下技术方案实现的:

[0022] 本发明通过孕期外源物(如咖啡因、地塞米松等)暴露构建了胎源性成年骨质疏松症模型。在此胎源性骨质疏松症模型中发现,ACE基因启动子区组蛋白乙酰化修饰较对照组显著增加。

[0023] 同时,本发明从细胞水平明确地塞米松对BMSCs向成骨细胞定向分化的影响,通过检测成骨分化标志基因(Runx2、ALP、BSP、OCN)的表达情况,发现高浓度的地塞米松可显著抑制上述标志基因表达,并呈现出良好的浓度依赖性改变。本发明进一步检测了RAS主要指标(ACE、AngII、AT1R、AT2R)。结果发现,高浓度地塞米松可以显著促进ACE mRNA表达并且抑制AT1R mRNA、AT2R mRNA表达,同时,AngII含量也明显增加。蛋白结果表现与上述基因表达改变一致。提示,高浓度地塞米松可以激活RAS并抑制BMSCs成骨分化。

[0024] 此外,为了在细胞水平探究地塞米松激活RAS的分子机制,本发明用高浓度地塞米松处理BMSCs后发现,地塞米松可导致细胞核中GR蛋白水平增加,但是胞浆中GR蛋白水平降低。表明,地塞米松可促使GR转位入核增加。而且,高浓度地塞米松处理BMSCs后ACE启动子区组蛋白乙酰化水平(H3K27ac)较对照组显著升高,GR抑制剂RU486(Sigma-Aldrich,Cat#M8046)可逆转上述表现。发明人进一步检测了地塞米松处理BMSCs后的胞核中C/EBP α ,组蛋白乙酰化酶p300蛋白水平变化,结果发现,地塞米松可显著促进胞核中C/EBP α 、p300蛋白表达增加,应用GR抑制剂RU486后可部分逆转此过程。且C/EBP α siRNA(吉玛基因)、p300抑制剂C646(Sigma-Aldrich,Cat#SML0002)后可逆转地塞米松对ACE启动子区乙酰化增加的表现。因此,在细胞水平证实了地塞米松可通过GR招募C/EBP α 、p300入核,促进ACE启动子区乙酰化水平(H3K27ac)增加,从而导致ACE持续高表达及RAS激活。

[0025] 最后,本发明在运用不同浓度地塞米松处理BMSCs成骨分化的基础上,给予p300抑制剂如C646联合处理BMSCs成骨分化14天。通过茜素红染色和检测成骨分化标志基因,发现p300抑制剂可以显著逆转高浓度地塞米松对BMSCs成骨分化的抑制作用。因此,从反向证实了ACE启动子区乙酰化增加介导了地塞米松所致BMSCs向成骨分化抑制。

[0026] 因此,ACE基因启动子区组蛋白乙酰化修饰改变可作为胎源性成年骨质疏松症的防治靶点,为胎源性成年骨质疏松症的治疗提供了一条新的途径。

[0027] 在此基础上,本发明第一方面,提供血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化作为药物靶标在筛选改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用。

[0028] 本发明第二方面,提供血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化的抑制剂在制备改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用。

[0029] 优选地,所述血管紧张素转化酶启动子区乙酰化的抑制剂是组蛋白乙酰化酶抑制剂。

[0030] 优选地,所述的组蛋白乙酰化酶抑制剂包括C646。

[0031] 优选地,上述血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化是指H3K27ac。

[0032] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0033] (1) 本发明发现血管紧张素转化酶基因的新功能,即血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化水平升高导致ACE持续高表达及RAS激活,抑制骨髓间充质干细胞向成骨分化,引起胎源性成年骨质疏松症。

[0034] (2) 基于血管紧张素转化酶组蛋白启动子区乙酰化水平升高在恶化胎源性成年骨质疏松症中的作用,其为研制改善胎源性成年骨质疏松症药物提供靶标。

[0035] (3) 血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化的抑制剂可用于制备改善胎源性成年骨质疏松症的药物。

[0036] (4) 本发明发现组蛋白乙酰化酶抑制剂C646的新功能,其可用于制备改善胎源性成年骨质疏松症的药物。

附图说明

[0037] 图1:孕期地塞米松暴露后成年子代大鼠出现骨质疏松症;

[0038] A:Micro-CT检测三维重建图片;B:Micro-CT检测定量分析值;C:成骨分化标志基因检测;(*P<0.05,**P<0.01vs对照组)。

[0039] 图2:孕期地塞米松暴露可致子代出生前、后成骨分化抑制及骨局部RAS激活;

[0040] A:骨局部成骨分化标志基因指标;B:骨局部RAS相关指标检测;C:胎鼠骨局部ACE免疫组化图片;D:出生后2周骨局部ACE免疫组化图片;E:出生后12周骨局部ACE免疫组化图片;F:宫内到出生后12周骨局部ACE免疫组化定量分析值;(*P<0.05,**P<0.01vs对照组)。

[0041] 图3:ACE乙酰化水平增加介导孕期地塞米松暴露后子代骨局部RAS持续激活及其宫内编程机制;

[0042] A:宫内骨局部ACE启动子乙酰化水平检测;B:出生后2周骨局部ACE启动子乙酰化水平检测;C:出生后12周骨局部ACE启动子乙酰化水平检测;D:骨局部GR检测;E:骨局部转录因子检测;F:骨局部p300检测;(*P<0.05,**P<0.01vs对照组)。

[0043] 图4:地塞米松通过激活RAS抑制BMSCs成骨分化;

[0044] A:地塞米松处理BMSCs后成骨分化相关指标检测,Dex:地塞米松;B:地塞米松处理BMSCs后RAS相关指标检测;C:地塞米松处理BMSCs后RAS相关指标蛋白水平检测;(*P<0.05,**P<0.01vs对照组)。

[0045] 图5:ACE乙酰化增加介导地塞米松所致RAS激活及其分子机制;

[0046] A:地塞米松处理BMSCs后胞浆及胞核GR蛋白水平检测;B:地塞米松或联合GR抑制剂RU486处理BMSCs后ACE启动子区乙酰化水平检测;C:地塞米松处理BMSCs胞核C/EBP α 、p300蛋白水平检测;D:地塞米松或联合C/EBP α siRNA、p300抑制剂C646处理BMSCs后ACE启动子区乙酰化水平检测。(*P<0.05,**P<0.01vs对照组)。

[0047] 图6:通过降低ACE启动子区乙酰化增加可逆转地塞米松对成骨分化的抑制效应

[0048] A:地塞米松或联合p300抑制剂C646处理BMSCs后茜素红染色图片;B:成骨分化标志基因检测。(*P<0.05,**P<0.01vs对照组)。

具体实施方式

[0049] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0050] 本发明中的实验所涉及的试剂在国内国际市场购买,或按照说明书中的配方自行配制;未做特殊说明的实验方法都是采用本领域已知的常规方法。

[0051] 【实施例1】

[0052] 1、实验动物

[0053] SPF级健康Wistar大鼠,购自湖北省疾病预防控制中心,动物许可证号:SCXK(鄂)2008-2010。本研究获武汉大学医学部伦理委员会批准,并严格按照国际实验动物保护认证评估机构相关处理准则执行。

[0054] 实验动物饲养于屏障环境内,温度22~25摄氏度,湿度50%,12小时昼夜交替。

[0055] 2、动物处理

[0056] 从湖北省疾控中心购买健康且成年的Wistar大鼠,雌性体重为 209 ± 12 g,雄性体重为 258 ± 17 g。每晚6时按照雌雄2:1进行合笼,次晨检查阴栓及精子涂片确定雌鼠是否成功受孕,并记为孕0天(gestation day 0, GD0)。受孕大鼠随机分为2组:对照组、地塞米松组。于GD9开始,每天上午8-10时,地塞米松组给予地塞米松(0.2mg/kg.d)皮下注射,对照组皮下注射等体积的生理盐水。在GD20,一部分孕鼠经乙醚麻醉并剖宫取胎鼠股骨和胫骨($n=8$),左侧股骨和胫骨用4%多聚甲醛固定进行形态学检测,右侧骨组织经液氮速冻后立即置于 -80°C 冰箱保存备用。另一部分孕鼠(包括对照组、地米组)自然分娩。以生产日作为出生后0天(postnatal day 0, PD0),每窝挑选一只雄性仔鼠在出生后2周(posnatal week 2, PW2)处死并取按照上述方式取股骨和胫骨进行相关指标检测($n=8$)。另一部分雄性仔鼠PW4进行断奶并给予正常饮食,于PW12经乙醚麻醉处死动物,按照上述方式取股骨和胫骨进行后续相关指标检测($n=8$),其余部分子代在PW28时取股骨进行骨质疏松症相关指标检测($n=8$)。

[0057] 3、Micro CT

[0058] 收集PW28的子代大鼠股骨置于75%酒精固定,随后通过Micro-CT($\mu\text{CT 35}$ and software IPL V5.15, Scanco Medical AG, Switzerland)对松质骨量进行定量分析。

[0059] 4、免疫组织化学染色

[0060] 上述骨组织石蜡切片脱腊至水,用Retrieval溶液处理切片, TBST洗涤2次,用含有5%马血清的UBB溶液封闭30分钟后予以含有一抗1:200(Anti-ACE, Abcam, Cat#ab11734)的UBB溶液在室温孵育1小时或 4°C 孵育过夜。TBST洗涤2次后用0.3%双氧水室温孵育10分钟。TBST洗涤两次后用二抗进行室温孵育30分钟,最后用TBST洗涤两次后用DAB试剂盒显色。并在显微镜下观察和拍照,通过Image-Pro Plus6.0软件对光密度值进行定量分析。

[0061] 5、细胞培养

[0062] 提取1月龄Wistar大鼠BMSCs,以 2×10^5 /孔接种于六孔板中。待细胞丰度达80%时,用成骨分化培养基诱导分化培养,在此期间予以不同浓度地塞米松(0、20、100、500、2500nM)或联合p300抑制剂C646处理14天进行茜素红染色或检测成骨分化标志基因表达。此外,予以不同浓度地塞米松或联合GR抑制剂处理BMSCs成骨分化3天检测RAS相关基因表达。

[0063] 6、ELISA检测

[0064] 从上海森雄科技有限公司购得AngII ELISA试剂盒并按照试剂盒说明书操作,检测地塞米松或联合GR抑制剂RU486处理BMSCs 3天后的细胞培养基中的AngII含量,在450nm

处检测OD值,通过绘制标准曲线求出培养基中AngII含量。

[0065] 7、茜素红染色

[0066] 倒去细胞培养基,使用PBS清洗两次后使用4%多聚甲醛室温固定15分钟,完成后使用蒸馏水冲洗两次。按照1ml/孔加入40mM的茜素红染液(武汉赛维尔生物科技有限公司, Cat#G1038),室温孵育20min并轻微振荡后用蒸馏水漂洗1次,在倒置显微镜观察并拍照记录。

[0067] 8、基因检测

[0068] 提取宫内胎鼠长骨初级骨化中心和PW2、PW12次级骨化中心总RNA,之后逆转录为cDNA,并通过RT-PCR进行定量分析相关基因表达情况。各基因引物序列如表1所示:

[0069] 表1:RT-PCR引物序列

[0070]

Genes	Forward primers	Reverse primers	Annealing
Runx2	TACTTCGTCAGCGTCCTATC	CAGCGTCAACACCATCATT	60 °C, 30 s
osterix	GGAAAGGAGGCACAAAGAAGC	CCCCTTAGGCACTAGGAGC	58 °C, 20 s
ALP	CGTCTCCATGGTGGATTATG	GGATGTAGTTCTGCTCATGG	58 °C, 20 s
BSP	GAGTACAACACTGCGTATGA	GTAATAATCCTGACCCTCGTAG	58 °C, 20 s
OCN	CAGACCTAGCAGACACCATG	GCTTGGACATGAAGGCTTTG	60 °C, 30 s
ACE	CGTCAACTTCCTGGGTATG	GGAGGCTGTGATGGTTATG	58 °C, 20 s
AT1R	CTCTGTTCTACGGCTTTCTG	GAGCTCATGTTATCCGAAGG	58 °C, 20 s
AT2R	GAGAAATATGCTCAGTGGTCTG	GACTTGGTCACGGGTAATTC	60 °C, 30 s
GR	CCAGGCTTCAGAACTTACA	CATGCAGGGTAGAGACATTC	60 °C, 30 s
NF-κB	CGACGTATTGCTGTGCCTTC	TTGAGATCTGCCAGGTGGTA	58 °C, 20 s
C/EBPα	CGCAAGAGCCGAGATAAAG	TTGACCAAGGAGCTCTCA	60 °C, 30 s
c-Fos	GGGAGCTGACAGATACGCTC	TTGGCAATCTCGGTCTGCAA	60 °C, 30 s
c-Jun	TGCAAAGATGGAAACGACCTT	GCCGTAGGCGCCACTCT	60 °C, 30 s
SP1	AGGATGCGGCAAAGTATATG	GCTCATCCGAACGAGTAAAG	60 °C, 30 s
p300	CAAATGCAGGCATGGGCAAT	TCCTGGTTGTCTCCCATCT	60 °C, 30 s
GAPDH	GCAAGTTCAACGGCACAG	GCCAGTAGACTCCACGACA	60 °C, 30 s

[0071] 9、蛋白检测

[0072] 将处理后的细胞用PBS洗涤后加入200 μ l RIPA裂解液和1mM PMSF,并置于冰上静置5分钟以提取细胞中的总蛋白。胞浆和胞核蛋白按照试剂盒说明书进行提取。标定后的蛋白进行凝胶电泳、转膜及封闭后用特定的一抗进行孵育,并在显影仪下进行显影以对蛋白水平进行相对定量分析。

[0073] 10、染色质免疫共沉淀

[0074] 在匀浆后的骨组织用1ml PBS洗涤3次所获取下层细胞沉淀以及地塞米松处理后的BMSCs中加入37%的甲醛,室温放置10min进行染色质交联,然后加入2.5mM的甘氨酸室温放置5min终止交联。PBS清洗收集细胞后用超声破碎仪(仪器来源)(工作条件为30%功率,0.5s on,0.5s off),进行超声破碎5min裂解DNA链。4摄氏度环境下12,000rpm离心10min,取上清收集DNA片段。每次ChIP检测细胞数量 4×10^6 。取1%体积上清50 $^{\circ}$ C水浴2小时解交联,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA超声裂解效果,确保DNA片段长度为147bp。分装DNA上清液,分别为IgG、Input、H3K27三管。除Input外各分装DNA上清液中加入1mg/ml的BSA封闭Protein G beads封闭,加入总量为1 μ g的对应抗体(ABclonal,Cat#A7253),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。3000rpm离心1min,收集免疫沉淀物。清洗并离心3次免疫沉淀物,65 $^{\circ}$ C水浴过夜解交联。应用PCR纯化试剂盒(Tiangen Co.,Beijing,China)纯化DNA,纯化后的DNA用50 μ L水溶解,于-20 $^{\circ}$ C保存。每个纯化后的样本针对ACE启动子区进行Real time PCR,引物序列如表2所示,每个反应设置双管。组蛋白乙酰化结果以Input为参照。

[0075] 表2.RT-PCR引物序列

基因	上游引物	下游引物	退火温度
[0076] ACE	TCCACAAACACAACAGCTCG	AGAGAGGAGGAAGGTGGCTA	60 $^{\circ}$ C

[0077] 12、实验结果

[0078] 12.1孕期地塞米松暴露后成年子代大鼠出现骨质疏松症表型

[0079] 如图1所示,孕期地塞米松暴露后子代成年后期(PW28)表现出骨量显著降低,主要表现为骨相对体积分数(BV/TV, $P < 0.01$,图1B)、骨小梁数量(Tb.N, $P < 0.01$,图1B)及骨小梁厚度(Tb.Th, $P < 0.01$,图1B)均较对照组低。进一步检测成骨分化标志基因时也发现孕期地塞米松暴露可导致子代成骨分化抑制($P < 0.05$, $P < 0.01$,图1C)。表明,孕期地塞米松暴露后子代大鼠成年时出现骨质疏松症表型。

[0080] 12.2孕期地塞米松暴露可致子代出生前、后成骨分化抑制及骨局部RAS激活

[0081] 其次,我们检测子代出生前、后不同时间点(GD20、PW2和PW12)骨局部成骨定向分化标志基因(如Runx2、Osterix、BSP、ALP)时,也发现上述标志基因表达均对照组显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$,图2A)。提示,孕期地塞米松暴露可致子代出生前、后成骨分化持续抑制。我们进一步检测了子代出生前、后骨局部RAS主要成分表达情况。结果发现,孕期地塞米松暴露组骨局部ACE mRNA表达和骨局部Ang II含量在出生前、后均较对照组显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$,图2B)。AT1R mRNA表达在出生前较对照组显著降低,然而出生后较对照组显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$,图2B)。AT2R mRNA在出生前、后均较对照组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$,图2B)。同时,免疫组化结果也表明了孕期地塞米松暴露组骨局部ACE蛋白水平在出生前后均较对照组高($P < 0.05$,图2C-F)。以上结果表明,孕期地塞米松暴露可显著促进出生前、后ACE表达,导致Ang II含量增加并抑制AT2R表达。提示,孕期地塞米松暴露所致骨局部RAS激

活介导了子代出生前、后成骨分化持续抑制。

[0082] 12.3 ACE乙酰化水平增加介导孕期地塞米松暴露后子代骨局部RAS持续激活及其宫内编程机制

[0083] 在探究孕期地塞米松暴露所致子代骨局部RAS持续激活的潜在发生机制时,我们检测了出生前、后不同时间点(GD20、PW2、PW12)骨局部ACE启动子区乙酰化水平。发现,孕期地塞米松暴露组胎鼠(GD20)骨局部ACE启动子区乙酰化水平较对照组显著升高,且以H3K27乙酰化位点表现明显($P < 0.01$,图3A)。然而,在出生后2、12周(PW2、PW12)时,孕期地塞米松暴露仅可增加ACE启动子区H3K27乙酰化水平($P < 0.01$,图3B-C)。我们进一步检测了PDE可致胎骨组织中GR以及与GR密切相关的转录因子表达情况,结果发现孕期地塞米松暴露可显著促进GR、转录因子C/EBP α 和组蛋白乙酰化酶p300表达增加($P < 0.01$, $P < 0.01$,图3D-F)。以上结果提示,地塞米松可通过GR并招募C/EBP α 和p300,导致ACE启动子区乙酰化水平增加。

[0084] 12.4地塞米松通过激活RAS抑制BMSCs成骨分化

[0085] 为了从细胞水平明确地塞米松对BMSCs向成骨细胞定向分化的影响,我们在BMSCs向成骨定向分化培养的基础上,运用不同浓度的地塞米松(20、100、500nM)处理。通过检测成骨分化标志基因(Runx2、ALP、BSP、OCN)表达情况,发现高浓度的地塞米松可显著抑制上述标志基因表达,并呈现出良好的浓度依赖性改变($P < 0.01$, $P < 0.001$,图4A)。我们进一步检测了RAS主要指标(ACE、AngII、AT1R、AT2R)。结果发现,高浓度地塞米松可以显著促进ACE mRNA表达并且抑制AT1R mRNA、AT2R mRNA表达,同时,AngII含量也明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$,图4B)。蛋白结果表现与上述基因表达改变一致(图4C)。综上所述,高浓度地塞米松可以激活RAS并抑制BMSCs成骨分化。

[0086] 12.5 ACE乙酰化增加介导地塞米松所致RAS激活及其分子机制

[0087] 为了在细胞水平探究地塞米松激活RAS的分子机制,我们用高浓度地塞米松处理BMSCs后发现,高浓度地塞米松可以导致细胞核中GR蛋白水平增加,但是胞浆中GR蛋白水平降低(图6A)。表明,地塞米松可促使GR转位入核增加。而且,高浓度地塞米松处理BMSCs后ACE启动子区组蛋白乙酰化水平(H3K27ac)较对照组显著升高,RU486逆转上述表现($P < 0.05$, $P < 0.01$,图5B)。我们进一步检测了地塞米松处理BMSCs后胞核中C/EBP α ,组蛋白乙酰化酶p300蛋白水平变化,结果发现地塞米松可显著促进胞核中C/EBP α 、p300蛋白表达增加,应用GR抑制剂后可部分逆转此过程(图5C)。同时,C/EBP α siRNA、p300抑制剂C646后可逆转地塞米松对ACE启动子区乙酰化增加的表现($P < 0.05$, $P < 0.01$,图5D)。因此,在细胞水平证实了地塞米松可通过GR招募C/EBP α 、p300入核,促进ACE启动子区乙酰化水平(H3K27ac)增加,从而导致ACE持续高表达及RAS激活。

[0088] 12.6通过降低ACE启动子区乙酰化增加可逆转地塞米松对成骨分化的抑制效应

[0089] 如图6所示,在运用不同浓度地塞米松处理BMSCs成骨分化的基础上,给予p300抑制剂如C646联合处理BMSCs成骨分化14天。通过茜素红染色和检测成骨分化标志基因,我们发现p300抑制剂可以显著逆转高浓度地塞米松对BMSCs成骨分化的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$,图6A-B)。因此,从反向证实了ACE启动子区乙酰化增加介导了地塞米松所致BMSCs向成骨分化抑制。

[0090] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,

均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 武汉大学
- [0003] <120> 血管紧张素转化酶启动子区组蛋白乙酰化在制备改善胎源性成年骨质疏松症药物中的应用
- [0004] <160> 34
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] tacttcgtca gcgtcctatc 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 19
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] cagcgtcaac accatcatt 19
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 21
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] ggaaaggagg cacaaagaag c 21
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 19
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] ccccttaggc actaggagc 19
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 20
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] cgtctccatg gtggattatg 20
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 20

- [0038] <212> DNA
[0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0040] <400> 6
[0041] ggatgtagtt ctgctcatgg 20
[0042] <210> 7
[0043] <211> 20
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0046] <400> 7
[0047] gagtacaaca ctgcgtatga 20
[0048] <210> 8
[0049] <211> 22
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0052] <400> 8
[0053] gtaataatcc tgaccctcgt ag 22
[0054] <210> 9
[0055] <211> 20
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0058] <400> 9
[0059] cagacctagc agacaccatg 20
[0060] <210> 10
[0061] <211> 20
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0064] <400> 10
[0065] gcttggacat gaaggctttg 20
[0066] <210> 11
[0067] <211> 19
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0070] <400> 11
[0071] cgtcaacttc ctgggtatg 19
[0072] <210> 12
[0073] <211> 19
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0076] <400> 12

- [0077] ggaggctgtg atggttatg 19
[0078] <210> 13
[0079] <211> 20
[0080] <212> DNA
[0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082] <400> 13
[0083] ctctgttcta cggctttctg 20
[0084] <210> 14
[0085] <211> 20
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0088] <400> 14
[0089] gagctcatgt tatccgaagg 20
[0090] <210> 15
[0091] <211> 22
[0092] <212> DNA
[0093] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0094] <400> 15
[0095] gagaaatatg ctcagtggtc tg 22
[0096] <210> 16
[0097] <211> 20
[0098] <212> DNA
[0099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0100] <400> 16
[0101] gacttgggtca cgggtaattc 20
[0102] <210> 17
[0103] <211> 20
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0106] <400> 17
[0107] ccaggcttca gaaacttaca 20
[0108] <210> 18
[0109] <211> 20
[0110] <212> DNA
[0111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0112] <400> 18
[0113] catgcagggt agagacattc 20
[0114] <210> 19
[0115] <211> 20

- [0116] <212> DNA
[0117] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0118] <400> 19
[0119] cgacgtattg ctgtgccttc 20
[0120] <210> 20
[0121] <211> 21
[0122] <212> DNA
[0123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0124] <400> 20
[0125] ttgagatctg cccaggtggt a 21
[0126] <210> 21
[0127] <211> 19
[0128] <212> DNA
[0129] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0130] <400> 21
[0131] cgcaagagcc gagataaag 19
[0132] <210> 22
[0133] <211> 18
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0136] <400> 22
[0137] ttgaccaagg agctctca 18
[0138] <210> 23
[0139] <211> 20
[0140] <212> DNA
[0141] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0142] <400> 23
[0143] gggagctgac agatacgctc 20
[0144] <210> 24
[0145] <211> 20
[0146] <212> DNA
[0147] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0148] <400> 24
[0149] ttggcaatct cggctctgcaa 20
[0150] <210> 25
[0151] <211> 21
[0152] <212> DNA
[0153] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0154] <400> 25

- [0155] tgcaaagatg gaaacgacct t 21
[0156] <210> 26
[0157] <211> 17
[0158] <212> DNA
[0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0160] <400> 26
[0161] gccgtaggcg ccactct 17
[0162] <210> 27
[0163] <211> 20
[0164] <212> DNA
[0165] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0166] <400> 27
[0167] aggatgcggc aaagtatatg 20
[0168] <210> 28
[0169] <211> 20
[0170] <212> DNA
[0171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0172] <400> 28
[0173] gctcatccga acgagtaaag 20
[0174] <210> 29
[0175] <211> 20
[0176] <212> DNA
[0177] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0178] <400> 29
[0179] caaatgcagg catgggcaat 20
[0180] <210> 30
[0181] <211> 20
[0182] <212> DNA
[0183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0184] <400> 30
[0185] tcctggttgt cctcccatct 20
[0186] <210> 31
[0187] <211> 18
[0188] <212> DNA
[0189] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0190] <400> 31
[0191] gcaagttcaa cggcacag 18
[0192] <210> 32
[0193] <211> 19

-
- [0194] <212> DNA
[0195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0196] <400> 32
[0197] gccagtagac tccacgaca 19
[0198] <210> 33
[0199] <211> 20
[0200] <212> DNA
[0201] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0202] <400> 33
[0203] tccacaaaca caacagctcg 20
[0204] <210> 34
[0205] <211> 20
[0206] <212> DNA
[0207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0208] <400> 34
[0209] agagaggagg aaggtggcta 20

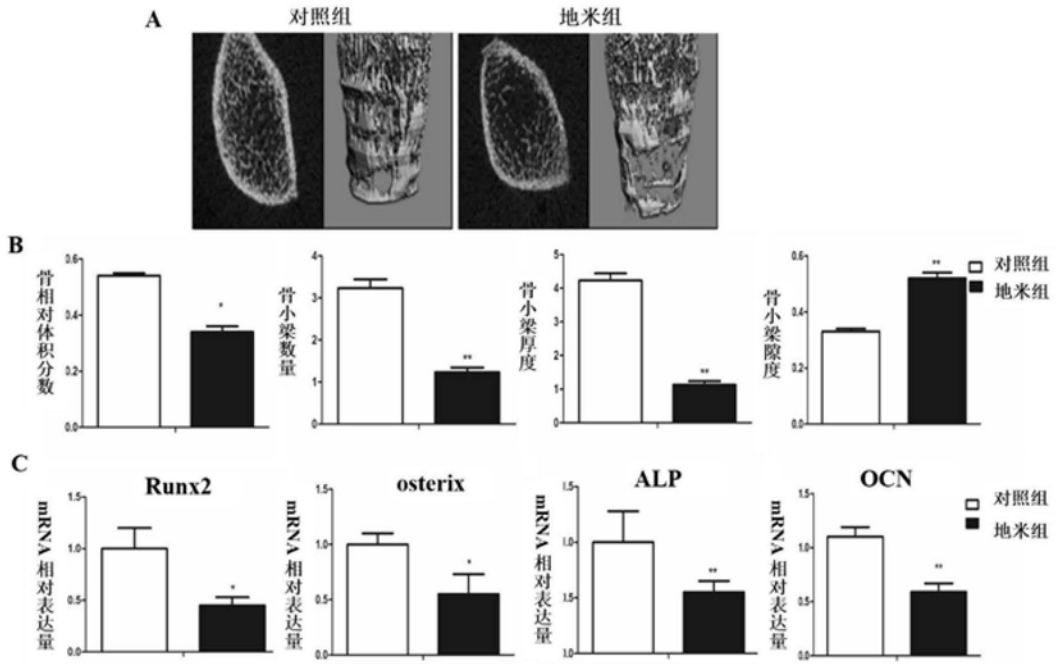


图1

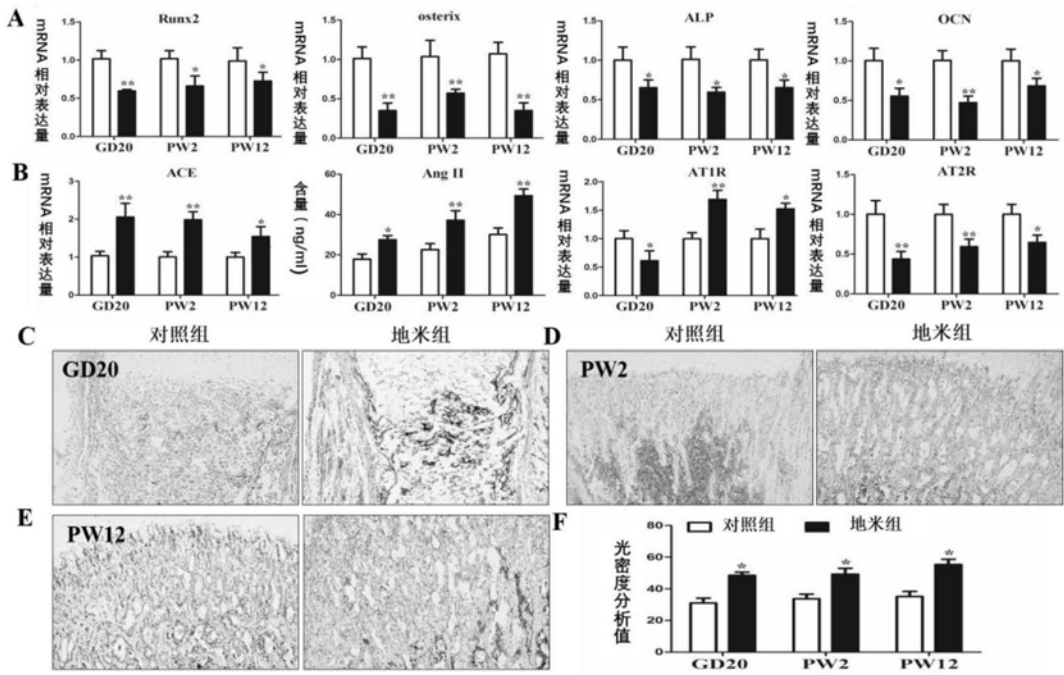


图2

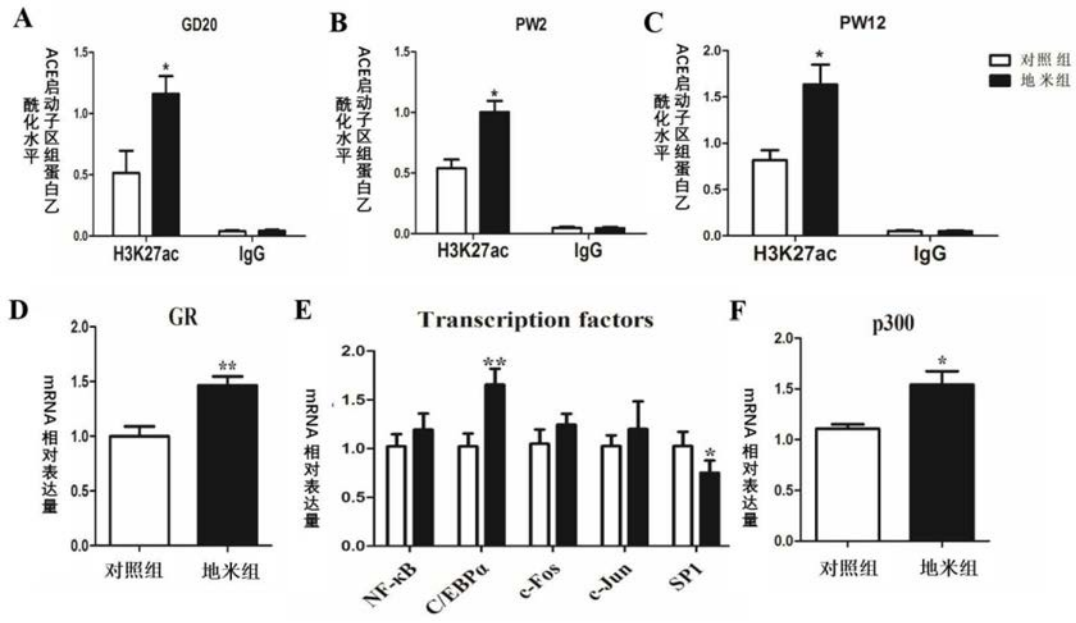


图3

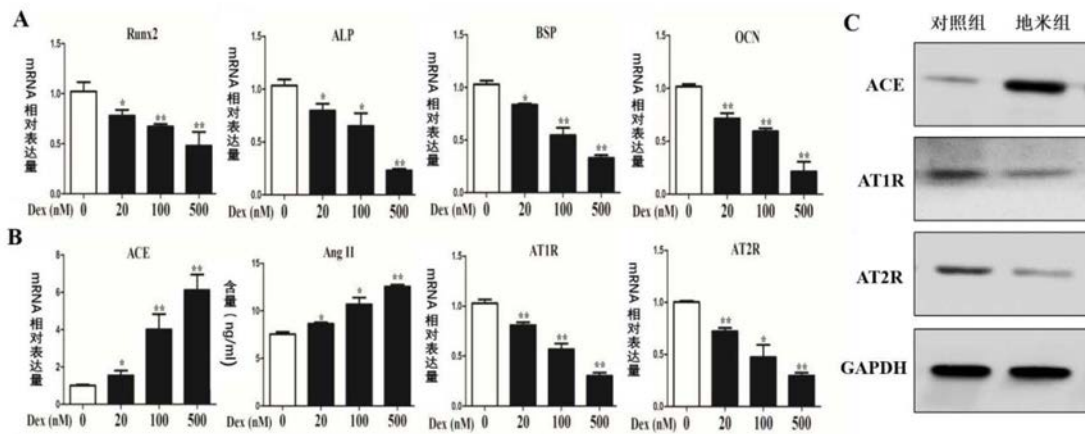


图4

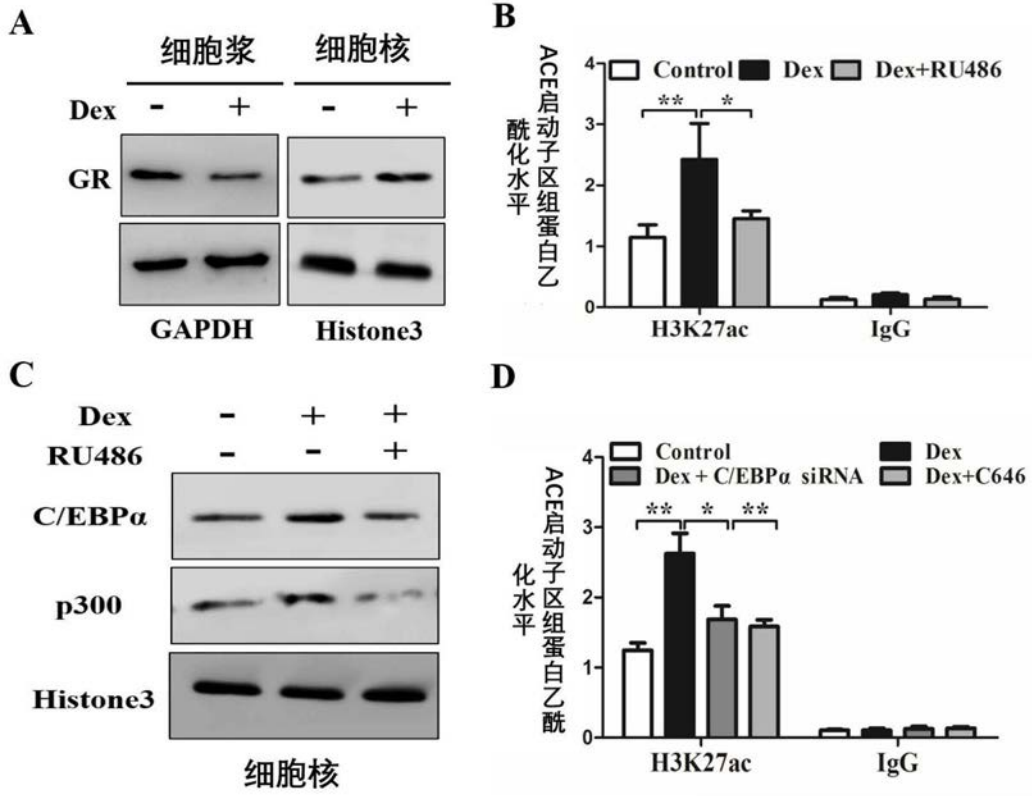


图5

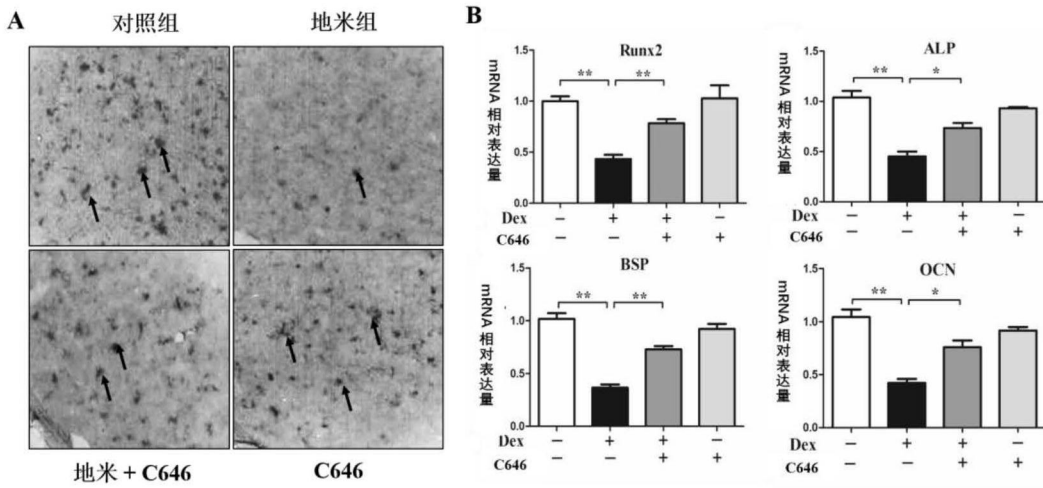


图6