

· 论著 ·

二至丸中抑制组织蛋白酶 K 活性的物质基础研究

蒋益萍¹, 金玉娥^{2,3}, 张志玮^{2,3}, 夏天爽¹, 徐佳乐², 薛黎明^{2,3} (1. 海军军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433; 2. 上海市疾病预防控制中心化学品毒性检定所, 上海 200336; 3. 上海市预防医学研究院, 上海 200336)

【摘要】 目的 考察传统补肾经典名方二至丸中抑制组织蛋白酶 K 的活性部位和活性成分。**方法** 采用高通量荧光方法筛选二至丸中正丁醇、二氯甲烷、乙酸乙酯和石油醚提取部位, 以及二至丸主要活性成分对组织蛋白酶 K(CTSK) 与荧光合成底物 Z-FR-MCA 结合活性的抑制率, 和对 CTSK 与硫酸软骨素 A(CSA) 复合物形成活性抑制率。进而考察二至丸不同提取部位和活性成分抑制 CTSK 生理底物 I 型胶原蛋白降解活性, 并采用分子对接和底物结合实验验证潜在 CTSK 抑制剂。**结果** 二至丸的正丁醇和石油醚提取部位对 CTSK 与 CSA 复合物形成抑制率超过 90%, 石油醚提取部位对 CTSK 与底物 Z-FR-MCA 结合抑制率超过 90%, 正丁醇提取部位对 CTSK 的胶原降解抑制率超过 95%、石油醚提取部位为 58.6%。30 个有效成分中 11 个显示对 CTSK 与 CSA 复合物形成抑制率超过 50%, 有 5 个成分对 CTSK 与荧光底物 Z-FR-MCA 结合活性抑制率超过 50%。最终筛选确定 4 个成分墨旱莲皂苷 IX、表儿茶素没食子酸酯、女贞苷和蟛蜞菊内酯, 对胶原降解抑制率超过 50%, 其中墨旱莲皂苷 IX 抑制胶原纤维与 CTSK 的结合率最高达 60%, 但均与 CTSK 活性位点分子对接不成功。**结论** 二至丸中存在抑制组织蛋白酶 K 的活性物质, 主要存在于正丁醇部位, 但活性成分不是活性位点抑制剂, 可能通过与其他位点结合, 间接抑制 CTSK 与寡多糖结合, 进而降低了 CTSK 的胶原降解活性。

【关键词】 二至丸; 骨质疏松; 组织蛋白酶 K; 活性部位; 潜在抑制剂

【文章编号】 2097-2024(2023)02-0091-06

【DOI】 10.12206/j.issn.2097-2024.202202008

Study on material basis of cathepsin K targeted inhibitor in Erzhi Wan

JIANG Yiping¹, JIN Yue^{2,3}, ZHANG Zhiwei^{2,3}, XIA Tianshuang¹, XU Jiale², XUE Liming^{2,3} (1. Department of Pharmacognosy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of Chemical Toxicity, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 3. Shanghai institutes of Preventive Medicine, Shanghai 200336, China)

【Abstract】 Objective To investigate the active ingredients and components that inhibiting cathepsin K activity in Erzhi Wan, a classic kidney-tonifying formula. **Methods** Then-butanol, dichloromethane, ethyl acetate and petroleum ether parts and 30 active components in Erzhi Wan were screened by established high throughput fluorescence methods of inhibit the binding activity of CTSK with Z-FR-MCA substrate, the formation of CTSK and chondroitin sulfate A (CSA) complex activity, and the activity of substrate type I collagen degradation by CTSK. Molecular docking and insoluble collagen substrate binding assays were applied to verify the potential CTSK inhibitors. **Results** The n-butanol and petroleum ether parts of Erzhi Wan inhibited the formation of CTSK and CSA^{*} complex by more than 90%, the petroleum ether part inhibited the binding of CTSK to substrate Z-FR-MCA by more than 90%, the collagen degradation inhibition rate of CTSK in n-butanol part was more than 95% and that in petroleum ether part was 58.6%. Among the 30 active components, 11 showed that the inhibition rate of CTSK and CSA^{*} complex formation was more than 50%, and 5 components with the inhibition rate of Z-FR-MCA binding activity more than 50%. Finally, there were four components including eclalbasaponin IX, (-)-epicatechin gallate, nuezhenoside and wedelolactone. The inhibition rate of collagen degradation was more than 50%. Eclipta saponin IX inhibited the binding rate between collagen fibers and CTSK, up to 60%, but all of them failed to dock with CTSK active site. **Conclusion** There are active components that inhibiting cathepsin K in Erzhi Wan, which mainly exists in the n-butanol ingredients, but the active components is not an active-site inhibitor. It might inhibit the binding of CTSK with oligosaccharides by binding to other sites of CTSK, and then reduce the collagen degradation activity of CTSK.

【Key words】 Erzhi Wan; osteoporosis; cathepsin K; active fraction; potential inhibitor

【基金项目】 上海市卫生健康委员会中医药重点项目 (2020YZ001), 上海市‘医苑新星’青年医学人才培养资助计划 (沪卫人事〔2021〕99 号), 国家自然科学基金项目 (81503493)

【作者简介】 蒋益萍, 高级实验师, 研究方向: 中药药效物质基础和中药药理研究, Email: msjyz@163.com

【通信作者】 薛黎明, 副主任技师, 研究方向: 中药药理、组织蛋白酶 K 与骨疾病研究, Email: xueliming@scdc.sh.cn

组织蛋白酶 K(CTSK) 属于半胱氨酸蛋白酶, 是细胞内重要的溶酶体酶, 在很多组织中有表达, 如肺、脑、皮肤、骨骼和甲状腺等。CTSK 在体内主要发挥降解骨胶原蛋白、弹性纤维蛋白、甲状腺球蛋白及细胞外基质的作用, 与人类多种疾病密切相关, 如肿瘤^[1]、骨疾病、心血管疾病和肺纤维化等^[2]。CTSK 最早发现在破骨细胞特异性高表达, 主要发挥降解骨基质中含量达 95% 的 I 型胶原^[2]。基于生物化学和结构分析研究发现 CTSK 与黏多糖(GAGs) 可形成一种复合物, 如硫酸软骨素 (chondroitin-4-sulfate, C4S 或 CSA), 且只有这种复合物形成下才能更好发挥降解胶原作用^[3]。

二至丸是治疗肾阴虚证的经典名方, 由女贞子和墨旱莲组成, 经考证出自明代吴曼辑所著的《扶寿精方》, 收载于 2020 版《中国药典》, 具补益肝肾、滋阴止血功效^[4]。药理研究发现二至丸具有保肝降酶、增强免疫调节、改善血液系统功能、抗肿瘤、抗骨质疏松、抗衰老、抗氧化、抗变态反应性炎症和植物雌激素样等作用^[5]。临床报道, 二至丸常用于治疗骨质疏松^[6-8], 药理发现二至丸显著降低去卵巢骨质疏松大鼠血清中 CTSK 水平^[5]。我们前期研究发现墨旱莲的正丁醇提取部位和活性成分墨旱莲皂苷 IX 能显著抑制 CTSK 的胶原降解活性^[9]。因此, 二至丸很有可能存在抑制组织蛋白酶 K 的活性成分, 故有可能从中筛选组织蛋白酶 K 抑制剂。本研究采用荧光偏振法考察 CTSK 与硫酸软骨素 A(CSA) 复合物形成活性, 荧光光度法考察 CTSK 与合成荧光底物 benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-FR-MCA) 结合活性, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳法考察 CTSK 降解生理底物胶原蛋白和明胶的活性, 以期从二至丸不同提取部位和活性成分中筛查具有抑制 CTSK 活性的抑制剂, 最终阐明二至丸抑制 CTSK 酶活性的物质基础。

1 材料

墨旱莲、酒女贞子药材购自上海华宇药业有限公司, 经海军军医大学生药学教研室韩婷教授鉴定墨旱莲为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分, 女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。其活性成分异毛蕊花糖苷、橄榄苦苷、蟛蜞菊内酯、熊果酸、齐墩果酸、蒙花苷、槲皮苷、木樨草苷、异去甲基蟛蜞菊内酯、松果菊苷、特女贞苷、红景天苷、女贞苷、女贞苷 G13 等 24 种标准品均购自成都瑞芬思生物科

技有限公司。

Z-FR-MCA 购自日本 WAKO 公司; E-64 (L-3-carboxy-trans-2-3-epoxypropionyl-leucylamido-(4guanidino)-butane) 和硫酸软骨素 A (CSA) 购自美国 Sigma 公司; 荧光标记硫酸软骨素 A(CSA*) 购自日本株式会社 Cosmo Bio 公司; 人 I 型胶原蛋白 (Human collagen I) 购自美国 Affymetrix 公司, 牛不溶性 I 型胶原蛋白 (Bovine type I insoluble collagen) 购自生工生物工程 (上海) 公司。

2 实验方法

2.1 二至丸样品及提取物制备

墨旱莲 500 g, 加入 10 倍量水 (W/V), 煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 煎煮浓缩, 冷冻干燥, 粉碎得墨旱莲水提取物。酒女贞子按照 2020 版药典二至丸制备方法, 粉碎过 80 目筛。将酒女贞子粉末 500 g 与墨旱莲水提取物粉末混匀, 用 10 倍量正丁醇 (W/V) 回流提取 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 旋转蒸发浓缩后, 冷冻干燥得正丁醇部位提取物。滤渣挥干, 按照正丁醇方法依次分别用石油醚、二氯甲烷和乙酸乙酯溶液对滤渣进行萃取, 冷冻干燥得到二至丸的正丁醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯提取物。

研究报道二至丸的活性成分, 主要包括墨旱莲三萜皂苷类和女贞子环烯醚萜苷类成分, 及一些黄酮类、苯乙醇苷类等成分^[10-12]。本研究 30 个成分中墨旱莲皂苷 (I、II、V、VII、IX) 和刺囊酸是由墨旱莲正丁醇部位经凝胶柱层析分离得到^[9], 墨旱莲中蟛蜞菊内酯、异去甲基蟛蜞菊内酯、木樨草素、槲皮苷、木樨草苷和女贞子中异毛蕊花糖苷、橄榄苦苷、熊果酸、齐墩果酸、木樨草素、槲皮苷、木樨草苷、松果菊苷、特女贞苷、红景天苷、女贞苷、女贞苷 G13、3-O-乙酰基齐墩果酸、19 α -羟基熊果酸、大黄素甲醚、 β -谷甾醇、3, 4-二羟基苯乙醇、对羟基苯乙醇等成分为购买标准品。

2.2 不同部位和成分抑制 CTSK 的 Z-FR-MCA 活性

二至丸不同提取部位和化合物用 DMSO 溶解分别配置 40 mg/ml 和 10 mmol/L 的储备溶液, 并在分析之前用 100 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH5.5, 包含 2.5 mmol/L DTT 和 2.5 mmol/L EDTA) 分别稀释至浓度为 25 μ g/ml 和 25 μ mol/ml (DMSO 低于 1%), 加入黑色荧光 96 孔板, 最终反应容量为 0.2 ml。加入终浓度为 5 nmol/L 的 CTSK 孵育 5 min, 加入 Z-FR-MCA 底物 (终浓度 1 mmol/L), 孵育 30 s, 实时检测 5 min 荧光生成斜率 (slope) 值 (发散光波

长 460 nm, 吸收光波长 355 nm)。所有测量均使用荧光仪 Tecan spark(美国)在 96 孔板中进行, 单孔体积为 200 μ l。实验设阴性对照组(无抑制剂), 阳性对照组(E-64, 活性位点抑制剂)。计算公式: 抑制率(%)=100-(1-V_i/V₀)。V_i和V₀分别表示存在和不存在抑制剂情况下的荧光信号。

2.3 不同部位和成分抑制 CTSK/CSA*复合物形成活性

将 100 μ g/ml 不同部位或 25 μ mol/ml 有效成分与 200 nmol/L 的 CTSK 在含有 2.5 mmol/L DTT 和 EDTA 的 100 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH 5.5)中, 混匀放置 5 min, 然后添加 20 nmol/L CSA*, 混匀放置 15 min, 室温下实时检测 5 min 荧光生成斜率(slope)值(发散光波长 485 nm, 吸收光波长 520 nm), 所有测量均使用荧光仪 Tecan spark(美国)在黑色荧光 96 孔板中进行, 总体积为 100 μ l。设置不使用抑制剂(阴性对照)和 300 mmol/L NaCl(阳性对照)。CTSK 和 FP 之间的关系使用抑制百分比进行分析, 计算公式: 抑制率(%)=100-[100 $\times$ (FP_{CTSK/抑制剂/CSA*}-FP_{CSA*})/(FP_{CTSK/CSA*}-FP_{CSA*})]其中, FP_{CTSK/抑制剂/CSA*}和 FP_{CTSK/CSA*}分别是在存在和不存在抑制剂的情况下测定荧光信号。

2.4 胶原降解活性

人 I 型胶原 0.6 mg/ml 溶解于 100 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH 5.5, 包含 2.5 mmol/L DTT 和 2.5 mmol/L EDTA)中, 依次加入 CTSK(最终浓度 400 nmol/L)、CSA(最终浓度 200 nmol/L)和 400 μ g/ml 二至丸不同提取部位或不同浓度潜在抑制剂(100、80、60、40、20、10 μ mol/L), 加入到含有 I 型胶原蛋白的缓冲液, 单孔体积 50 μ l, 混匀, 28 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。取出后加入 1 μ l 的 100 μ mol/L E64 终止反应。采用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 考马斯亮蓝染色 20 min, 用乙酸-甲醇(4:1)脱色。I 型胶原的 α_1 条带的灰度用 ImageJ 2 软件进行定量分析。

2.5 潜在抑制剂与 CTSK 结合实验

称取 1 mg 不溶性牛 I 型胶原蛋白置于 1.5 ml EP 管中, 加入 1 μ mol/L CTSK 酶和 25 μ mol/L 潜在抑制剂于 40 μ l 缓冲液中(100 mmol/L 醋酸盐缓冲液, pH 值 5.5, 含有 2.5 mmol/L DTT 和 2.5 mmol/L EDTA)。采用 Z-FR-MCA 底物结合活性方法在 T0 min 测定 CTSK 活性, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min 后, 检测 T30 min 时的 CTSK 活性。从中取出 40 μ l 上清液, 添加 2.0 μ l NaCl(最终 300 mmol/L), 然后再次检查 CTSK 活性, 记录为 T30_{salt} min。计算

公式: 结合率(%)=[1-(T0 min-T30_{salt} min)/(T0 min-T30 min)] $\times$ 100%。

2.6 分子对接 libdock

用 Discovery studio 2016 软件中的 libdock 分子对接方法考察活性成分和组织蛋白酶 K(1ATK)蛋白进行刚性对接。利用 LibDock 得分作为表征化合物与活性位点结合的核心指标。LibDock 得分分数越高, 小分子与受体结合的活性越高。

2.7 统计分析

每组实验重复 3 次。采用 SPSS 软件经 ANOVA 方差分析检验, 若有显著性差异($\alpha=0.05$), 再采用 Student's *t* 检验进行两组比较, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DMSO 浓度对 CTSK 活性筛选方法的影响

本研究考察了 DMSO 浓度(10%、5%、2% 和 1%)对 CTSK 的 Z-FR-MCA 活性和 CTSK/CSA*复合物形成活性高通量筛查方法, 及 SDS-PAGE 胶原降解活性筛选方法的影响。结果发现, 10%、5%、2% 的 DMSO 显著抑制 CTSK 的 Z-FR-MCA 底物结合(图 1A)和 CTSK/CSA*复合物形成活性(图 1B)。10% 的 DMSO 显著抑制 CTSK 的胶原降解, 1% 和 2% 的 DMSO 对胶原降解无明显抑制作用。因此, 本研究筛查二至丸的抑制 CTSK 活性方法将 DMSO 浓度控制在 1% 以下。

3.2 二至丸不同提取部位抑制 CTSK 活性作用

对二至丸的不同提取部位(正丁醇、石油醚、乙酸乙酯和二氯甲烷)进行了抑制 CTSK 活性筛选, 其中 Z-FR-MCA 底物结合实验结果显示, 二至丸的石油醚部位抑制作用明显, 为 96.3%, 正丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷提取部位抑制率分别为 26.1%、50.8% 和 43.5%(见图 2A)。二至丸正丁醇、石油醚、乙酸乙酯和二氯甲烷提取部位提取物对 CTSK/CSA*复合物形成的抑制率分别为 99.6%、52.0%、94.8% 和 59.8%(见图 2B), 胶原降解活性结果显示二至丸的正丁醇部位抑制作用最明显, 达到 100%, 石油醚提取部位抑制作用为 58%, 二氯甲烷和乙酸乙酯提取部位作用也不明显, 分别为 33.1% 和 6.7%(见图 2C 和 2D)。

3.3 二至丸活性成分对 CTSK 的活性作用

本研究对 30 种二至丸中的活性成分进行了体外筛选, 结果发现 25 μ mol/L 的墨旱莲皂苷 IX、异毛蕊花糖苷、蟛蜞菊内酯、木樨草素、槲皮素、松果菊苷、女贞苷、特女贞苷、3,4-二羟基苯乙醇和对

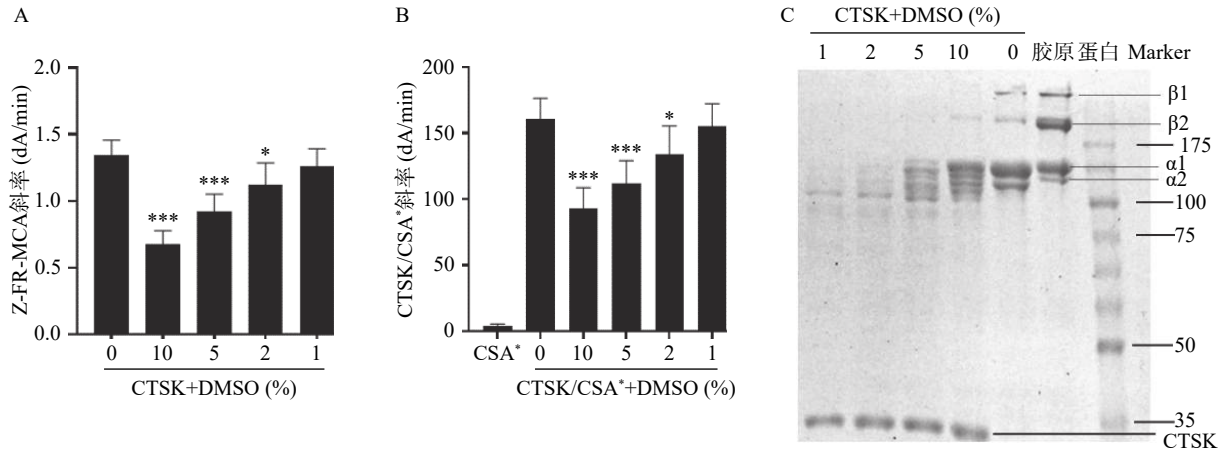


图 1 DMSO 浓度对 CTSK 抑制剂筛选方法的影响

A. Z-FR-MCA 活性; B. CTSK/CSA* 复合物; C. 胶原降解活性; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与不加 DMSO 组比较

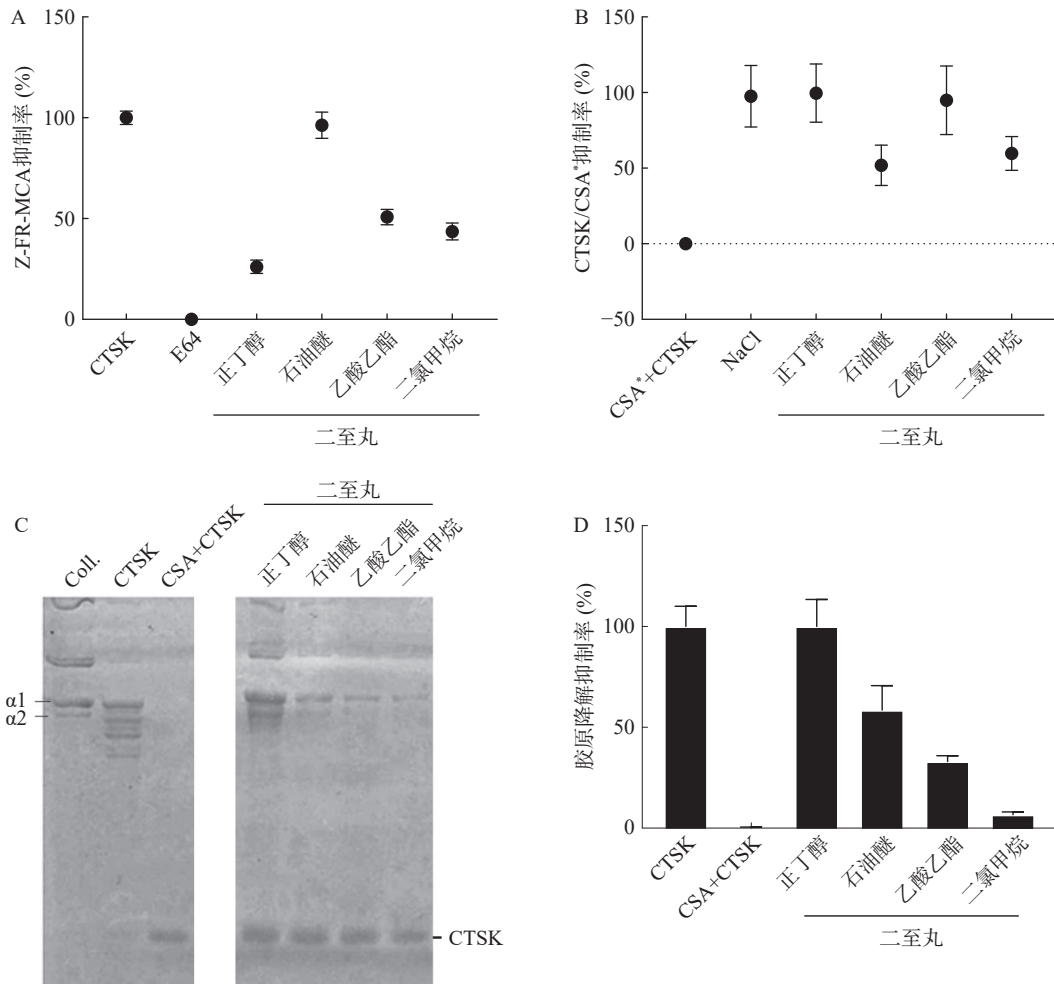


图 2 二至丸的不同部位提取物抑制 CTSK 活性作用

A. Z-FR-MCA 抑制率; B. CTSK/CSA* 抑制率; C. SDS-PAGE 胶原图; D. 胶原降解抑制率

羟基苯乙醇抑制 CTSK/CSA* 复合物形成的抑制率超过 50%, 表儿茶素没食子酸酯为 51.2%。而在 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 仅有齐墩果酸、3-O-乙酰基齐墩果酸、19 α -羟基熊果酸、3,4-二羟基苯乙醇、对羟基苯乙醇对 CTSK 与 Z-FR-MCA 结合活性有超过 50% 的

抑制率, 熊果酸为 47.1% 抑制率。采用 libdock 技术发现仅有 3,4-二羟基苯乙醇和对羟基苯乙醇与 CTSK 活性位点对接有得分。因此, 这些超过 50% 抑制率的二至丸活性成分被认为具有潜在抑制胶原降解活性。针对以上 12 种活性成分, 进行

胶原降解抑制实验,结果显示在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,墨早莲皂苷 IX,对胶原降解抑制率达 70.3%,女贞苷 53.2%,蟛蜞菊内酯达 50.1% 和表儿茶素没食子酸酯为 60.2%。异毛蕊花糖苷、木樨草素、槲皮素、松果菊苷、特女贞苷、熊果酸、齐墩果酸、3-O-乙酰基齐墩果酸、19 α -羟基熊果酸、3,4-二羟基苯乙醇、对羟基苯乙醇均显示无抑制胶原降解活性(表 1)。

3.4 二至丸潜在抑制剂与 CTSK 的结合作用

不溶性胶原、抑制剂和 CTSK 共培养 15 min,通过检测培养液中剩余 CTSK 的 Z-FR-MCA 活

性,来验证潜在 CTSK 抑制剂在体外抑制与 CTSK 的结合实验,结果显示 100 $\mu\text{mol/L}$ 的墨早莲皂苷 IX (ES-IX)、表儿茶素没食子酸酯(EGCG)、女贞苷 (NZG) 和蟛蜞菊内酯 (WED) 抑制率分别为 54.8%、64.1%、36.4% 和 51.4% (图 3)。

4 讨论

CTSK 抑制剂的高通量筛选方法,多采用合成底物 Z-FR-MCA 结合活性来筛选,其原理是 CTSK 可裂解底物端 FR-MCA 基团,释放游离的 MCA 发

表 1 二至丸中化学成分抑制组织蛋白酶 K 活性筛选

化合物成分	英文名称	CTSK/CSA* 抑制率(%)	ZFR-MCA 抑制率(%)	Libdock 得分	胶原降解 抑制率(%)	来源
墨早莲皂苷 V	eclalbasaponin V	0	0	/		M
墨早莲皂苷 I	eclalbasaponin I	0	0	/		M
墨早莲皂苷 II	eclalbasaponin II	0	0	/		M
墨早莲皂苷 VII	eclalbasaponin VII	11.3 $\pm$ 1.3	0	/		M
墨早莲皂苷 IX	eclalbasaponin IX	88.6 $\pm$ 9.2	0	/	70.3	M
红景天苷	Salidroside	27.8 $\pm$ 3.1	0	/		N
异毛蕊花糖苷	Isoacteoside	65.3 $\pm$ 4.7	0	/	/	N
橄榄苦苷	Oleuropein	35.9 $\pm$ 2.4	0	/		N
蟛蜞菊内酯	Wedelolactone	58.7 $\pm$ 5.8	2.81	/	50.1	M
熊果酸	Ursolic Acid	0	59.7	/		N
齐墩果酸	Oleanic acid	0	47.1	/		N
刺囊酸	Echinocystic acid	0	0	/		M
木樨草素	Luteolin	62.1 $\pm$ 8.6	0	/		M、N
蒙花苷	linarin	37.2 $\pm$ 3.1	0	/		M
槲皮素	quercitrin	68.5 $\pm$ 5.9	0	/		M、N
木樨草苷	galuteolin	33.2 $\pm$ 3.7	0	/		M、N
异去甲基蟛蜞菊内酯	Isowedelolactone	0	7.0	/		M
松果菊苷	Echinacoside	55.9 $\pm$ 6.5	9.7	/		N
女贞苷	Nuezhenoside	51.2 $\pm$ 4.7	0.10	/	53.2	N
特女贞苷	Specneuzhenide	58.6 $\pm$ 6.4	17.9	/	49.7	N
女贞苷 G13	Nuezhenoside G13	23.7 $\pm$ 2.4	0.16	/		N
3-O-乙酰基齐墩果酸	3-O-acetyl oleanolic acid	0	66.7	/		N
19 α -羟基熊果酸	19 α -OH Ursolic Acid	0	53.2	/		N
儿茶素	catechin	11.3	15.3	/		M
表儿茶素	L-Epicatechin	12.7	18.7	/		M
表儿茶素没食子酸酯	(-)-Epicatechin gallate	51.2 $\pm$ 5.4	10.5	/	60.2	M
大黄素甲醚	Emodin monomethyl ether	19.8 $\pm$ 1.7	0	/		N
β -谷甾醇	β -Sitosterol	0	0	/		N
3',4'-二羟基苯乙醇	3,4-dihydroxyphenethyl	70.3 $\pm$ 8.4	83.2	76.4848		N
对羟基苯乙醇	p-hydroxyphenethyl	62.4 $\pm$ 6.7	79.5	73.9225		N

注: M: 墨早莲; N: 女贞子。

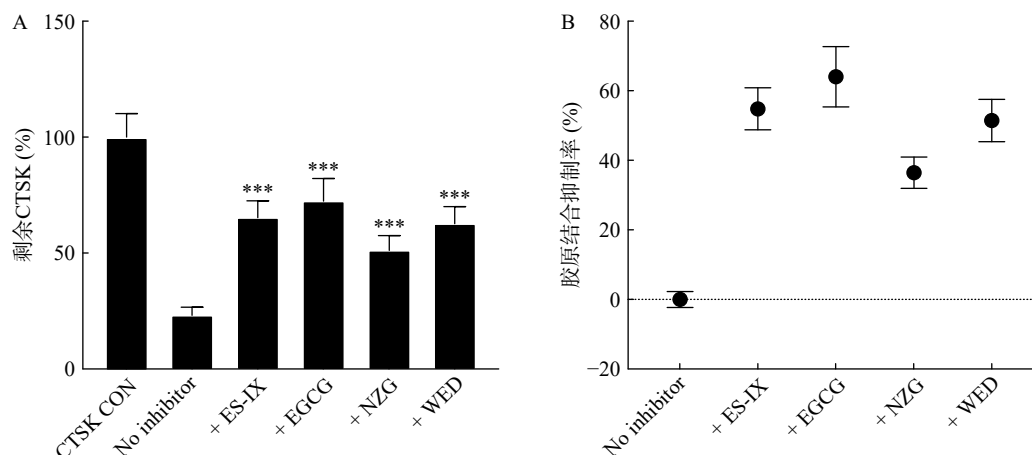


图3 4种潜在活性化合物抑制 CTSK 和胶原结合作用

A. 剩余 CTSK 的百分含量; B. 胶原与 CTSK 结合抑制率; *** $P < 0.001$, 与不加抑制剂组比较

色荧光基团,通过抑制剂引起荧光信号变化差异来检测评价抑制剂活性。基于骨胶原降解需要 CTSK 与 CSA 结合发挥作用,采用荧光标记 CSA*,形成 CTSK/CSA*复合物,其原理为抑制剂与 CTSK 酶结合形成 CTSK/抑制剂/CSA*复合物,导致荧光偏振信号差异,评价抑制剂与 CTSK 结合活性,可快速、灵敏和准确的判断化合物是否与 CTSK 存在相互作用。SDS-PAGE 凝胶电泳法是常用蛋白质分类技术,将胶原蛋白及其降解产物按照分子量大小迁移,考马斯染色溶液染色,对 α_1 胶原蛋白条带定量,计算胶原蛋白降解率。

二至丸的正丁醇提取部位抑制 CTSK/CSA*复合物形成和胶原降解活性最强,超过 95%,但对 CTSK 的 Z-FR-MCA 抑制率只有 26%。Z-FR-MCA 作为 CTSK 活性位点的合成底物,活性成分对 Z-FR-MCA 抑制率越高,证明对 CTSK 的活性位点抑制效率越高。基于 Bromme 教授提出的非活性位点抑制剂的概念^[13],活性成分具有显著的抑制胶原降解活性,但对活性位点 Z-FR-MCA 底物无抑制活性,可称为非活性位点 (exosite) 抑制剂。结果发现,二至丸的正丁醇提取部位可显著抑制胶原降解,而对 Z-FR-MCA 无显著影响,证明正丁醇提取部位可能存在抑制 CTSK 胶原降解活性的活性成分,而不影响 CTSK 活性位点的生理活性。二至丸的正丁醇提取部位的化学成分主要为墨旱莲皂苷类成分和女贞子三萜酸类成分,其中墨旱莲皂苷 IX (ES-IX)、表儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、女贞子 (NZS) 和蟾蜍菊内酯 (WED) 可能是潜在的 CTSK 非活性位点抑制剂。熊果酸和齐墩果酸具有较强的 Z-FR-MCA 活性,表明可作用 CTSK 活性位点,而女贞子乙醇提取物、熊果酸、齐墩果酸和墨旱莲

的蟾蜍菊内酯均报道显著抑制破骨细胞的骨吸收活性和 CTSK 的 mRNA 表达^[14-15],可能通过在细胞内直接作用 CTSK 酶,使其失去活性。

CTSK 是抗骨质疏松药物研发的关键靶标,有报道,中草药尤其是补肾中药含有丰富的治疗骨质疏松的活性物质,但不清楚这些化合物是否能够抑制 CTSK 活性,或者特异性抑制胶原酶的活性。除了胶原降解活性,CTSK 在甲状腺细胞中发挥降解甲状腺球蛋白,释放甲状腺激素^[16],在成纤维细胞中发挥降解纤维蛋白的功能^[17]。二至丸中有抑制 CTSK 活性的化合物,可进一步考察其对甲状腺球蛋白降解和纤维蛋白降解的作用活性,为中医药开发 CTSK 抑制剂提供新的思路。

【参考文献】

- [1] CALIÒ A N, BRUNELLI M, GOBBO S, et al. Cathepsin K: a novel diagnostic and predictive biomarker for renal tumors[J]. *Cancers*, 2021, 13(10): 2441.
- [2] DAI R C, WU Z T, CHU H Y, et al. Cathepsin K: the action in and beyond bone[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 433.
- [3] LI Z Q, HOU W S, ESCALANTE-TORRES C R, et al. Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 28669-28676.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部: 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [5] 梁文娜, 李西海, 胡柳, 等. 二至丸抑制绝经后骨质疏松大鼠骨代谢紊乱的作用机制研究[J]. *中医正骨*, 2017, 29(11): 1-7, 14.
- [6] 胡科. 二至丸对骨质疏松性股骨颈骨折术后愈合及髋关节功能的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(4): 384-386.
- [7] 俞益火, 陈久毅, 王建. 二至丸治疗绝经后骨质疏松症的疗效观察[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2011(4): 42-43.

(下转第 118 页)

- 所), 2005.
- [8] 杨超, 刘婧, 钟瑞, 等. 栀子有效部位的溃疡性结肠炎活性及其化学成分研究[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(2): 263-269.
- [9] 谢文利, 李宏捷, 晋玉章. 京尼平苷的降血糖作用研究[J]. *武警医学院学报*, 2008, 17(7): 580-581.
- [10] 颜静恩, 李晚忱, 吕秋军, 等. 栀子苷的降糖作用和对 PPAR γ 受体的激活[J]. *四川农业大学学报*, 2007, 25(4): 415-418.
- [11] 黄洪林, 杨怀瑾, 刘立超, 等. 栀子降血糖作用的实验研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17(1): 1-3.
- [12] 孙旭群, 赵新民, 杨旭. 栀子苷利胆作用实验研究[J]. *安徽中医学院学报*, 2004, 23(5): 33-36.
- [13] 朱江, 蔡德海, 芮菁. 栀子的抗炎镇痛作用研究[J]. *中草药*, 2000, 31(3): 198-200.
- [14] 赵维民, 季新泉, 叶庆华, 等. 栀子兰色素可能为栀子粉末外用抗炎消肿时的活性物质[J]. *天然产物研究与开发*, 2000, 12(4): 41-44.
- [15] 杨然, 陆远, 郝昊, 等. 金银花环烯醚萜苷类化学成分和药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11): 2746-2752.
- [16] 张冰冰, 欧则民, 严林, 等. 栀子总环烯醚萜和总西红花苷的提取纯化工艺考察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(11): 156-163.
- [17] 鲁艳梅, 马趣环, 石晓峰, 等. 糙叶败酱总环烯醚萜苷的纯化工艺及抗炎活性研究[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(21): 2675-2682.
- [18] 向雪滢, 杨建华, 胡君萍, 等. 新疆假龙胆的保肝活性部位环烯醚萜苷提取纯化工艺研究[J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(2): 151-158.
- [19] 周婷婷, 闻俊, 佟典承, 等. 栀子总环烯醚萜苷含量的紫外分光光度法测定[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2): 273-275.
- [收稿日期] 2022-10-08 [修回日期] 2022-11-16
[本文编辑] 崔俐俊

(上接第 96 页)

- [8] 蔡秀江, 黄美艳, 丁安伟, 等. 二至丸考源及药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23): 272-275.
- [9] 蒋益萍, 吴岩斌, 秦路平, 等. 墨旱莲组分中组织蛋白酶K非活性位点抑制剂研究[J]. *药学报*, 2017, 52(6): 936-942.
- [10] 钟询龙, 王若伦, 段炼, 等. 基于UPLC/Q-TOF-MS技术分析女贞子与墨旱莲配伍协同增效的物质基础[J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(19): 1887-1891.
- [11] 李雯, 庞旭, 韩立峰, 等. 中药墨旱莲化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(17): 3498-3505.
- [12] 刘美红, 邹峥嵘. 女贞子化学成分、药理作用及药动学研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2022(003): 030.446-460.
- [13] SHARMA V, PANWAR P, O'DONOGHUE A J, et al. Structural requirements for the collagenase and elastase activity of cathepsin K and its selective inhibition by an exosite inhibitor[J]. *Biochem J*, 2015, 465(1): 163-173.
- [14] XU D, LYU Y, CHEN X W, et al. Fructus Ligustri Lucidi ethanol extract inhibits osteoclastogenesis in RAW_{264.7} cells via the RANKL signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4767-4774.
- [15] LIU Y Q, HONG Z L, ZHAN L B, et al. Wedelolactone enhances osteoblastogenesis by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway but suppresses osteoclastogenesis by NF- κ B/c-fos/NFATc₁ pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32260.
- [16] TEPEL C, BRÖMME 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 Pt 24: 4487-4498.
- [17] VASSALLE C, IERVASI G. Cathepsin K: a classical bone biomarker in cardiovascular disease: the heart is not alone anymore[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(1): 36-37.
- [收稿日期] 2022-02-09 [修回日期] 2022-11-05
[本文编辑] 李春德