



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101947221 A

(43) 申请公布日 2011.01.19

(21) 申请号 201010294513.X

(22) 申请日 2010.09.28

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 袁增强 陈冬梅 肖磊 胡鹏

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称

甲磺酸伊马替尼的新用途

(57) 摘要

本发明公开了一种甲磺酸伊马替尼的新用途。本发明提供了甲磺酸伊马替尼在制备抑制神经元凋亡的产品中的应用,还提供了甲磺酸伊马替尼在制备治疗神经退行性疾病的产品中的应用。所述神经元为海马神经元。本发明的实验证明,STI571 作为 c-Ab1 特异性抑制剂,可以作为抗脑缺血及抗神经退行性疾病的候选新药,具有良好的应用前景,将极大程度拓展 STI571 的临床适应症。

1. 甲磺酸伊马替尼在制备抑制神经元凋亡的产品中的应用。
2. 甲磺酸伊马替尼在制备治疗神经退行性疾病和 / 或脑缺血疾病的产品中的应用。
3. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於:所述抑制神经元凋亡是通过抑制丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 -1 的磷酸化实现的。
4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在於:所述抑制丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 -1 的磷酸化是通过抑制非受体酪氨酸激酶的激酶活性实现的。
5. 根据权利要求 3 或 4 所述的应用,其特征在於:  
所述神经元凋亡为过氧化氢和 / 或鱼藤酮引起的神经元凋亡。
6. 根据权利要求 3-5 中任一所述的应用,其特征在於:所述神经元为海马神经元。
7. 根据权利要求 2-5 中任一所述的应用,其特征在於:所述产品为药物。
8. 根据权利要求 3-6 中任一所述的应用,其特征在於:所述抑制丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 -1 的磷酸化为抑制丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 -1 的第 433 位点的酪氨酸磷酸化。

## 甲磺酸伊马替尼的新用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种甲磺酸伊马替尼的新用途。

### 背景技术

[0002] STI571 又名 Glivec, 商品名为“甲磺酸伊马替尼”。目前国外主要用于慢性骨髓性白血病的治疗, STI571 能明显抑制白血病细胞增殖, 细胞阻滞于 G0/G1 期, 且具有明显的诱导凋亡作用。

[0003] 甲磺酸伊马替尼的化学名称为 4-(4-甲基-1-哌嗪) 甲基-N-4-甲基-3-4-(3-吡啶)-2-嘧啶氨基苯基-苯胺甲磺酸盐。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种甲磺酸伊马替尼的新用途。

[0005] 本发明提供了甲磺酸伊马替尼在制备抑制神经元凋亡的产品中的应用。

[0006] 本发明的另一个目的是提供一种甲磺酸伊马替尼在制备治疗神经退行性疾病和/或脑缺血疾病的产品中的应用。

[0007] 所述抑制神经元凋亡是通过抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-1 (MST1, serine/threonine-protein kinase) 的磷酸化实现的。

[0008] 所述抑制 MST1 的磷酸化是通过抑制非受体酪氨酸激酶 (c-Ab1) 的激酶活性实现的。

[0009] 所述神经元凋亡为过氧化氢和/或鱼藤酮引起的神经元凋亡。

[0010] 所述神经元为海马神经元, 优选为鼠海马神经元, 尤其优选为大鼠海马神经元。

[0011] 所述产品为药物。

[0012] 所述 MST1 的磷酸化为 MST1433 位点酪氨酸磷酸化。

[0013] 甲磺酸伊马替尼 (STI571) 的化学名称为 4-(4-甲基-1-哌嗪) 甲基-N-4-甲基-3-4-(3-吡啶)-2-嘧啶氨基苯基-苯胺甲磺酸盐, 分子式为  $C_{29}H_{31}N_7O \cdot CH_4SO_3$ 。

[0014] 本发明的实验证明, STI571 作为 c-Ab1 (非受体酪氨酸激酶) 特异性抑制剂, 还可有效对抗神经细胞的氧化应激反应, 抑制 c-Ab1 的激酶活性, 从而抑制神经细胞凋亡反应, 因而, 可能作为抗脑缺血及抗神经退行性疾病的候选新药, 具有良好的应用前景, 将极大程度拓展 STI571 的临床适应症。

### 附图说明

[0015] 图 1 为 STI571 抑制  $H_2O_2$  诱导的原代海马神经元的凋亡反应

[0016] 图 2 为 STI571 抑制 c-Ab1 的激酶活性

[0017] 图 3 为 c-Ab1 介导了  $H_2O_2$  激活 MST1 引起的细胞凋亡

[0018] 图 4 为 c-Ab1 的 RNAi 质粒都能很好的敲除内源的 c-Ab1

[0019] 图 5 为 c-Ab1 在体外磷酸化 MST1

- [0020] 图 6 为 c-Ab 在细胞内磷酸化 MST1
- [0021] 图 7 为 c-Ab1 在酪氨酸 433 位点磷酸化 MST1
- [0022] 图 8 为抗体能特异性识别 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化
- [0023] 图 9 为 c-Ab1 正向调节 MST1 的蛋白水平
- [0024] 图 10 为 c-Ab1 激活 MST1 的激酶活性
- [0025] 图 11 为 STI571 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MST1 表达
- [0026] 图 12 为 STI571 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化
- [0027] 图 13 为 STI571 可抑制鱼藤酮和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化
- [0028] 图 14 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可在胞浆中激活 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化

### 具体实施方式

- [0029] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0030] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0031] 以下实施例的细胞转染的方法均为 (1) 细胞培养:取 6 孔培养板,向每孔中加入 2mL 含 1-2×10<sup>5</sup> 个细胞培养液,37℃ CO<sub>2</sub> 培养至 40% -60% 汇合时 (汇合过分,转染后不利筛选细胞)。(2) 转染液制备:在聚苯乙烯管中制备以下两液 (为转染每一个孔细胞所用的量) A 液:用不含血清培养基 DMEM 稀释 2 μg DNA,终量 100 μL, B 液:用不含血清培养基稀释 2 μL lipofection2000,终量 100 μL,轻轻混合 A、B 液,室温中置 15-20 分钟。(3) 转染:把 A/B 复合物均匀加入培养液中,摇匀,37℃ 温箱置 6-8 小时,吸除培养基,换入新鲜培养液继续培养。
- [0032] 以下 GFP 荧光鉴定的均以 GFP 细胞为绿色作为阳性。
- [0033] 细胞培养基组成:DMEM(Gibco, C11995)+10%胎牛血清 FBS(Biochrom, S0115)。
- [0034] MST1 (丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-1) (mRNA:NM\_021420;protein:NP\_067395.1)。
- [0035] 甲磺酸伊马替尼 (STI571) (STI571 由诺华公司惠赠,Novartis(Basel, Switzerland). Gonzalo I. Cancinol, \*, Enrique M. Toledo2, \*, Nancy R. Leall, Diego E. Hernandez1, L. Fernanda Yévenes1, Nibaldo C. Inestrosa2 and Alejandra R. Alvarez1(2008)STI571 prevents apoptosis, tau phosphorylation and behavioural impairments induced by Alzheimer's β-amyloid deposits Brain131(9):2425-2442, 公众可从中国科学院生物物理研究所获得。)
- [0036] 实施例 1、甲磺酸伊马替尼 (STI571) 抑制神经元凋亡
- [0037] 1、STI571 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的原代海马神经元的凋亡反应
- [0038] 1)STI571 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的原代海马神经元的凋亡反应
- [0039] 以下培养大鼠海马神经元所用培养基的组成为 DMEM(Gibco, C11995)+10%胎牛血清 FBS(Biochrom, S0115)。
- [0040] 实验分为两大组:
- [0041] MST1-:原代培养大鼠海马神经元 (孕鼠购自维通利华,海马神经元从孕鼠胚胎上分离得到),3 天后用 EGFP (pCMS-EGFP, Clontech, #6101-1) 和 FLAG-VECTOR 表达质粒 (Sigma, E4401) 转染。
- [0042] MST1+:原代培养大鼠海马神经元,3 天后用 EGFP 和 FLAG-MST1 表达质粒 (MariaK.

Lehtinen. et. al, A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span, *cell*, 125, 987-1001, 2006 ; 公众可从中国科学院生物物理研究所获得。该质粒为将 MST1 克隆到 FLAG-VECTOR 上。) 转染 ;

[0043] 以上两大组在转染 24 小时后, 分别获得转染后的 MST1- 组细胞和转染后的 MST1+ 组细胞, 进行如下处理 :

[0044] 将转染后的 MST1- 组细胞分为三个小组 :

[0045] Control (MST1-) : 将转染后的 MST1- 组细胞继续培养 ;

[0046] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MST1-) : 将转染后的 MST1- 组细胞的培养基中添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在培养基中的浓度为 80 μ M ;

[0047] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/STI571 (MST1-) : 将转染后的 MST1- 组细胞的培养基中添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 STI571, 使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在培养基中的浓度为 80 μ M, STI571 在培养基中的浓度为 5 μ M ;

[0048] 将转染后的 MST1+ 组细胞分为三个小组 :

[0049] Control (MST1+) : 将转染后的 MST1+ 组细胞继续培养,

[0050] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MST1+) : 将转染后的 MST1+ 组细胞的培养基中, 添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在培养基中的浓度为 80 μ M ;

[0051] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/STI571 (MST1+) : 将转染后的 MST1+ 组细胞的培养基中, 添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 STI571, 使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在培养基中的浓度为 80 μ M, STI571 在培养基中的浓度为 5 μ M ;

[0052] 以上六个小组各培养 20 小时后, 分别用 4% 的多聚甲醛固定上述各组的细胞, 根据 GFP 荧光, 分别统计细胞的凋亡比率, 实验重复三次, 结果取平均值 :

[0053] Control (MST1-) 为 18.9 % , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MST1-) 为 45.3 % , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/STI571 (MST1-) 为 29.2% ;

[0054] Control (MST1+) 为 32.8 % , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MST1+) 为 61.1 % , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/STI571 (MST1+) 为 40.2% 。

[0055] 将上述结果作图分析, 为图 1 (ANOVA,  $p < 0.02$ ,  $n = 3$ ), 图中左边的一组柱状图为 MST1- 大组 (-), 图中右边的一组柱状图为 MST1+ 大组 (+)。

[0056] 从上述实验结果可以看出, 两组柱形图中, 无论是否 MST1 过量表达, 加入 STI571 的组细胞凋亡率均降低, 说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的神经细胞凋亡可被 STI571 阻断。

[0057] 2) STI571 可抑制 c-Abl (非受体酪氨酸激酶) 的激酶活性

[0058] 以下培养 293T 细胞所用培养基的组成为 DMEM (Gibco, C11995) + 10 % FBS (Biochrom, S0115)。

[0059] 实验分为两组 :

[0060] STI571+ : 将 Myc-c-Abl 表达质粒 (Xuan Liu, Wei Huang, Chufang Li, Ping Li, Jing Yuan, Xiaorong Li, Xiao-Bo Qiu, Qingjun Ma and Cheng Cao, Interaction between c-Abl and arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation, *Molecular Cell* 22, 317-327, 2006, 公众可从中国科学院生物物理研究所获得。含有 c-Abl 的编码基因。) 转染 293T 细胞 (Bi, W. Xiao, L. Jia, Y. Wu, J. Xie, Q. Ren, J. Ji, G. Yuan, Z. (2010) c-Jun N-terminal kinase enhances MST1-mediated pro-apoptotic signaling through phosphorylation at serine 82. *285(9)6259-64*; 公众可从中国科学院生物物理研究所获得。) 36 小时后, 向培养基中添加 STI571, 使 STI571 在培养基中的浓

度为  $10 \mu\text{M}$ , 1 小时后, 收集细胞裂解液;

[0061] STI571- : 将 Myc-c-Ab1 表达质粒转染 293T 细胞 36 小时后, 继续培养, 1 小时后, 收集细胞裂解液;

[0062] 上述两组的细胞裂解液分别用 Myc 的抗体 (Santa Cruza, L1108) 做免疫共沉淀, 再进行 western blot, 用 c-Ab1p-Y412 的抗体 (cell signal, 2865S) 去检测 p-Y412c-Ab1 (磷酸化形式的 c-Ab1, 细胞受  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激刺激后的磷酸化产物。) 的量, 用 c-Ab1 的抗体 (Santa Cruza, L1108) 检测 c-Ab1 总蛋白的量。

[0063] 结果如图 2 所示, 可以看出, STI571+ 组 (+) 中没有 p-Y412c-Ab1, 说明 STI571 可有效抑制 c-Ab1 的激酶活性, c-Ab1 总蛋白的量在 STI571+ 组 (+) 中比在 STI571-(-) 组高, 进一步说明了 STI571 可有效抑制 c-Ab1 的激酶活性。

[0064] 3) c-Ab1 介导了  $\text{H}_2\text{O}_2$  激活 MST1 引起的细胞凋亡

[0065] - 组 : 原代培养海马神经元在体外培养第 3 天后, 转染 EGFP 和 FLAG-MST1 ;

[0066] + 组 : 原代培养海马神经元在体外培养第 3 天后, 转染 EGFP、FLAG-MST1 和 c-Ab1RNAi1 (c-Ab1 RNAi1 为将序列为 GACCAACCTGTTTCAGCGCT 的片段插入 pBase-U6-vector 的 Xho I 和 BamH I 识别位点间得到的载体 ; pBase-U6-vector 记载在 JASONR. ROSE, LILIA M. BABE, Defining the level of human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) protease activity required for HIV-1 particle maturation and infectivity, JOURNAL OF VIROLOGY, p. 2751-3758, 1995, 公众可从中国科学院生物物理研究所获得。) ;

[0067] 以上两组均在转染 72 小时后, 得到转染后 + 组细胞和转染后 - 组细胞, 进行如下处理 :

[0068] 将转染后 + 组细胞分为两个小组 :

[0069] control (+ 组) : 将转染后 + 组细胞继续培养 ;

[0070]  $\text{H}_2\text{O}_2$  (+ 组) : 将转染后 + 组细胞的培养基中添加  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 使  $\text{H}_2\text{O}_2$  在培养基中的浓度为  $80 \mu\text{M}$  ;

[0071] 将转染后 - 组细胞分为两个小组 :

[0072] control (- 组) : 将转染后 - 组细胞继续培养 ;

[0073]  $\text{H}_2\text{O}_2$  (- 组) : 将转染后 - 组细胞的细胞培养基中添加  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 使  $\text{H}_2\text{O}_2$  在培养基中的浓度为  $80 \mu\text{M}$  ;

[0074] 将以上四组均处理 20 小时后, 固定细胞, 统计 GFP 阳性细胞的凋亡比率, 实验重复三次, 结果取平均值 :

[0075] control (- 组) 细胞的凋亡比率为 14.2% ,

[0076]  $\text{H}_2\text{O}_2$  (- 组) 细胞的凋亡比率为 41.6% ;

[0077] control (+ 组) 细胞的凋亡比率为 19% ,

[0078]  $\text{H}_2\text{O}_2$  (+ 组) 细胞的凋亡比率为 22.7% ;

[0079] 将结果作图, 结果如图 3 所示, 图中左边的一组柱状图为 - 组, 图中右边的一组柱状图为 + 组, 可以看出与 - 组相比, c-Ab1 基因敲除的细胞 (+ 组) 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后细胞凋亡率显著降低, 说明 c-Ab1 介导了  $\text{H}_2\text{O}_2$  激活 MST1 引起的细胞凋亡 (ANOVA,  $p < 0.02$ ,  $n = 3$ )。

[0080] 2、c-Ab1 在体外和体内均可磷酸化 MST1

[0081] 1) c-Ab1 的 RNAi 质粒能敲除内源的 c-Ab1

[0082] 以下培养 Neuro-2A 细胞所用培养基的组成为 DMEM(Gibco, C11995)+10 % FBS(Biochrom, S0115)

[0083] 实验分三组 :

[0084] Vector :Neuro-2A ( 购自 ATCC, Cat. No. CCL-B1) 细胞转染 pBase-U6-vector 质粒 ;

[0085] RNAi1 :Neuro-2A 细胞转染 c-Abl RNAi1 ;

[0086] RNAi2 :Neuro-2A 细胞转染 c-Abl RNAi2 (c-Abl RNAi2 为将序列为 AAGCAGCTCGATGGACCTCCA 的片段插入 pBase-U6-vector 的 Xho I 和 BamHI 识别位点间得到的载体) ;

[0087] 以上三组转染 72 小时后,收集细胞溶液,再分别用抗体 c-Abl (Santa cruza, L1108)、MST1 (cell signal, #3682)、FOXO3 (cell signal, #2497)、Action (sigma, A5441), 通过 western blot 检测 c-Abl 蛋白量、MST1 蛋白量、FOXO3 蛋白量、ACTIN 蛋白量。

[0088] 结果如图 4 所示,可以看出,相比于 Vector 组来说,经过 c-Abl 沉默的 RNAi1 组和 RNAi2 组中的 c-Abl 的表达量减少,MST1 的表达量与 c-Abl 的表达量成正比,其他蛋白无明显变化,证明 2 个 c-Abl 的 RNAi 质粒都能很好的敲除内源的 c-Abl,使内源性 MST1 表达量降低。

[0089] 2) c-Abl 可在体外磷酸化 MST1

[0090] 实验分为两组 :

[0091] - 组 :293T 细胞转染 pCMV-myc (Clontech, #631604) ;

[0092] + 组 :293T 细胞转染 Myc-c-Abl 表达质粒 ;

[0093] 以上两组转染 36 小时后,收集细胞裂解液,分别用 Myc 的抗体 (Santa Sruza, L1108) 做免疫共沉淀,再用 GST-MST1 (Bi W, Xiao L, Jia Y, Wu J, Xie Q, Ren J, Ji G, Yuan Z. c-Jun N-terminal kinase enhances MST1-mediated pro-apoptotic signaling through phosphorylation at serine 82. J Biol Chem. 2010Feb 26 ;285(9) :6259-64. 公众可从中国科学院生物物理研究所获得。) 为底物做激酶实验。

[0094] 结果如图 5 所示,可以看出,在 - 组和 + 组中均有 MST1,在 + 组中过表达 c-Abl 的情况下,+ 组中有 p-Y-MST1 (磷酸化的 MST1),- 组没有表达 c-Abl,也就没有产生 p-Y-MST1,表明 c-Abl 可在体外磷酸化 MST1。

[0095] 3) c-Abl 可在细胞内磷酸化 MST1

[0096] 实验分为三组 :

[0097] - 组 :在 293T 细胞单转 FLAG-MST1 ;

[0098] WT 组 :在 293T 细胞共转 FLAG-MST1 和 Myc-c-Abl ;

[0099] KD 组 :在 293T 细胞共转 FLAG-MST1 和 Myc-c-Abl KD ((Xuan Liu, Wei Huang, Chufang Li, Ping Li, Jing Yuan, Xiaorong Li, Xiao-Bo Qiu, Qingjun Ma and Cheng Cao, Interaction between c-Abl and arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation, Molecular Cell 122, 317-327, 2006, 公众可从中国科学院生物物理研究所获得。) ;

[0100] 上述三组转染 36 小时后,收集细胞裂解液,细胞裂解液分别用 FLAG 的抗体 (购自 Sigma, Cat. No. F3165。) 做免疫共沉淀后,通过 western blot,以酪氨酸磷酸化特异性抗体 (cell signal, 2865S) 去检测。

[0101] 结果如图 6 所示,可以看出,c-Ab1 可在细胞内磷酸化 MST1 得到 p-Y-MST1 ;而失活的 c-Ab1 (KD 组) 不能使 MST1 磷酸化,无 p-Y-MST1,同时 c-Ab1 (WT 组) 可以是 MST1 总蛋白含量提高,c-Ab1 (KD 组) 使 MST1 总蛋白含量降低。

[0102] 3、c-Ab1 可在酪氨酸 433 位点磷酸化 MST1

[0103] 1) c-Ab1 在酪氨酸 433 位点磷酸化 MST1

[0104] 实验分三组:

[0105] FLAG-MST1- 组:在 293T 细胞单转 Myc-c-Ab1 ;

[0106] FLAG-MST1WT 组:在 293T 细胞共转 FLAG-MST1 表达质粒和 Myc-c-Ab1 ;

[0107] FLAG-MST1Y433F 组:在 293T 细胞共转 FLAG-MST1Y433F (将 FLAG-MST1 上的 MST1 的第 433 位的酪氨酸变成苯丙氨酸。)和 Myc-c-Ab1 ;

[0108] 以上三组转染 36 小时后,收集细胞裂解液,细胞裂解液均用 FLAG 的抗体做免疫共沉淀后,通过 western blot,以 p-Y433-MST1 抗体 (将抗原多肽免疫兔,收集兔血清,纯化得到多克隆抗体 p-Y433-MST1,所述抗原的序列为 N 'CKIPQGDY-pEFLKSW) 去检测。

[0109] 结果如图 7 所示,c-Ab1 总蛋白在三组中均有表达,MST1 蛋白在 FLAG-MST1WT 组和 FLAG-MST1Y433F 组中有表达,c-Ab1 和 p-Y-MST1 只在 FLAG-MST1WT 组中有,其他两组都没有,说明 c-Ab1 在酪氨酸 433 位点磷酸化 MST1,而在 FLAG-MST1Y433F 组,c-Ab1 不能使 Y433F 磷酸化。

[0110] 2) 抗体能特异性识别 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化

[0111] 实验分为 4 组:

[0112] Myc-c-Ab1-/FLAG-MST1 WT 组:293T 细胞单转 FLAG-MST1 表达质粒;

[0113] Myc-c-Ab1 KD/FLAG-MST1 WT 组:293T 细胞共转 Myc-c-Ab1 KD 和 FLAG-MST1 表达质粒;

[0114] Myc-c-Ab1 WT/FLAG-MST1 WT 组:在 293T 细胞共转 Myc-c-Ab1 和 FLAG-MST1 表达质粒;

[0115] Myc-c-Ab1 WT/FLAG-MST1 Y433F 组:在 293T 细胞共转 Myc-c-Ab1 和 FLAG-MST1Y433F ;

[0116] 以上四组共转染 36 小时后,收集细胞裂解液,细胞裂解液用 FLAG 为抗体,进行免疫共沉淀,再用酪氨酸 433 位点磷酸化特异性抗体 (p-Y433-MST1) 去检测激酶活性。

[0117] 结果如图 8 所示,四组均有特征蛋白 ERK1/2 的表达,只有 Myc-c-Ab1 WT/FLAG-MST1WT 组使 MST1 在酪氨酸 433 位点磷酸化。

[0118] 4、c-Ab1 可正向调节 MST1 蛋白水平,并依赖于 c-Ab1 的激酶活性

[0119] 1) c-Ab1 正向调节 MST1 的蛋白水平

[0120] 实验分为 12 组:

[0121] c-Ab1-WT (0)/MST1-WT 组:293T 细胞共转 0  $\mu$ g Myc-c-Ab1 表达质粒 (c-Ab1-WT) 和 1  $\mu$ g FLAG-MST1 表达质粒 (MST1-WT) ;

[0122] c-Ab1-WT (1)/MST1-WT 组:在 293T 细胞共转 0.2  $\mu$ g Myc-c-Ab1 表达质粒和 1  $\mu$ g FLAG-MST1 表达质粒;

[0123] c-Ab1-WT (2)/MST1-WT 组:在 293T 细胞共转 0.8  $\mu$ g Myc-c-Ab1 表达质粒和 1  $\mu$ g FLAG-MST1 表达质粒;



[0124] c-Ab1-WT(3)/MST1-WT 组:在 293T 细胞共转 1.6  $\mu$ g Myc-c-Ab1 表达质粒和 1  $\mu$ g FLAG-MST1 表达质粒;

[0125] MST1-WT/c-Ab1-KD(0) 组:在 293T 细胞共转 0  $\mu$ g FLAG-MST1(c-Ab1-WT) 和 1  $\mu$ g c-Ab1-KD;

[0126] MST1-WT/c-Ab1-KD(1) 组:在 293T 细胞共转 0.2  $\mu$ g FLAG-MST1 和 1  $\mu$ g c-Ab1-KD;

[0127] MST1-WT/c-Ab1-KD(2) 组:在 293T 细胞共转 0.8  $\mu$ g FLAG-MST1 和 1  $\mu$ g c-Ab1-KD;

[0128] MST1-WT/c-Ab1-KD(3) 组:在 293T 细胞共转 1.6  $\mu$ g FLAG-MST1 和 1  $\mu$ g c-Ab1-KD;

[0129] c-Ab1-WT(0)/MST1-Y433F 组:在 293T 细胞共转 0  $\mu$ g Myc-c-Ab1(c-Ab1-WT) 和 1  $\mu$ g FLAG-MST1Y433F(MST1-Y433F);

[0130] c-Ab1-WT(1)/MST1-Y433F 组:在 293T 细胞共转 0.2  $\mu$ g Myc-c-Ab1 和 1  $\mu$ g FLAG-MST1 Y433F;

[0131] c-Ab1-WT(2)/MST1-Y433F 组:在 293T 细胞共转 0.8  $\mu$ g Myc-c-Ab1 和 1  $\mu$ g FLAG-MST1Y433F;

[0132] c-Ab1-WT(3)/MST1-Y433F 组:在 293T 细胞共转 1.6  $\mu$ g Myc-c-Ab1 和 1  $\mu$ g FLAG-MST1 Y433F;

[0133] 以上 12 组共转染 4 小时后,收集细胞裂解液,通过 western blot 以 FLAG 抗体检测 MST1 的蛋白水平。

[0134] 结果如图 9A 和 9B 所示,说明无论是否有激酶活性的 c-Ab1 均可正向调节 MST1 的蛋白水平,并且无论是否为 433F 突变的 MST1 均正向依赖于 c-Ab1 的激酶活性。

[0135] 2)c-Ab1 激活 MST1 的激酶活性

[0136] 实验分为两组:

[0137] Myc-c-Ab1-/FLAG-MST1 组:293T 细胞单转 FLAG-MST1;

[0138] Myc-c-Ab1+/FLAG-MST1 组:293T 细胞共转 FLAG-MST1 和 Myc-c-Ab1;

[0139] 上述两组转染 36 小时后,收集细胞裂解液,细胞裂解液用 FLAG 的抗体做免疫共沉淀后用 Histon H2B(abcam, ab13212) 为底物做激酶实验。

[0140] 结果如图 10 所示,MST1 和 ER51/2 在两组中均有表达,Myc-c-Ab1+/FLAG-MST1 组有  $^{32}$ P-H<sub>2</sub>B(c-Ab1 激活 MST1 的活性,MST1 使 Histon H2B 产生  $^{32}$ P-H<sub>2</sub>B) 的表达;表明 c-Ab1 可激活 MST1 的激酶活性。

[0141] 5、STI571 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化

[0142] 以下培养 SH-SY5Y 细胞所用培养基的组成为 DMEM(Gibco, C11995)+10% FBS(Biochrom, S0115)。

[0143] 1)STI571 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 MST1 表达

[0144] 实验分为四组:

[0145] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- 和 STI571- 组:培养 SH-SY5Y 细胞 (Fernanda Martins Lopesa, b, Fabio Klamta, b(2010)Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies.Brain Research 1337 85-94;

公众可从中国科学院生物物理研究所获得。)；

[0146]  $H_2O_2$ + 和 STI571- 组 : 培养 SH-SY5Y 细胞, 向细胞培养基中加入  $H_2O_2$ , 使  $H_2O_2$  在细胞培养基中的浓度为  $200 \mu M$  ;

[0147]  $H_2O_2$ - 和 STI571+ 组 : 培养 SH-SY5Y 细胞, 向细胞培养基中加入 STI571, 使 STI571 在细胞培养基中的浓度为  $10 \mu M$  ;

[0148]  $H_2O_2$ + 和 STI571+ 组 : 培养 SH-SY5Y 细胞, 向细胞培养基中加入  $H_2O_2$  和 STI571, 使  $H_2O_2$  和 STI571 分别在细胞培养基中的浓度为  $200 \mu M$  和  $10 \mu M$ ,

[0149] 以上四组分别处理 1 小时后, 收集细胞裂解液, 再分别以 p-Y433-MST1 抗体做免疫共沉淀后, 通过 western blot, 以 MST1 抗体检测。

[0150] 结果如图 11 所示,  $H_2O_2$ + 和 STI571- 组有酪氨酸 433 位点磷酸化 MST1,  $H_2O_2$ + 和 STI571+ 组没有酪氨酸 433 位点磷酸化 MST1, 说明 STI571 可以抑制  $H_2O_2$  诱导的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化。

[0151] 2)  $H_2O_2$  可诱导 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化引起的细胞凋亡

[0152] 实验分为三组 :

[0153] Vector 组 : 原代海马神经元体外培养 3 天后, 共转染 EGFP 和 FLAG-VECTOR ;

[0154] MST1-WT 组 : 原代海马神经元体外培养 3 天后, 共转染 EGFP 和 FLAG-MST1 ;

[0155] MST1-Y433F 组 : 原代海马神经元体外培养 3 天后, 共转染 EGFP 和 FLAG-MST1Y433F ;

[0156] 以上三组转染 24 小时, 得到转染后的 Vector 组细胞、转染后的 MST1-WT 组细胞和转染后的 MST1-Y433F 组细胞, 将上述三组细胞分为 6 个小组进行如下处理 :

[0157] Vector ( $H_2O_2$ ) 组 : 转染后的 Vector 组细胞的培养基中添加  $H_2O_2$ , 使  $H_2O_2$  在细胞培养基中的浓度为  $80 \mu M$  ;

[0158] MST1-WT ( $H_2O_2$ ) 组 : 转染后的 MST1-WT 组细胞的培养基中添加  $H_2O_2$ , 使  $H_2O_2$  在细胞培养基中的浓度为  $80 \mu M$  ;

[0159] MST1-Y433F ( $H_2O_2$ ) 组 : 转染后的 MST1-Y433F 组细胞的培养基中添加  $H_2O_2$ , 使  $H_2O_2$  在细胞培养基中的浓度为  $80 \mu M$  ;

[0160] Vector (control) 组 : 转染后的 Vector 组细胞继续培养 ;

[0161] MST1-WT (control) 组 : 转染后的 MST1-WT 组细胞继续培养 ;

[0162] MST1-Y433F (control) 组 : 转染后的 MST1-Y433F 组细胞继续培养 ;

[0163] 以上 6 个小组处理 20 小时后, 分别固定细胞, 分别统计 GFP 阳性细胞的凋亡比率。

[0164] 实验重复三次, 结果取平均值。

[0165] Vector ( $H_2O_2$ ) 组 GFP 阳性细胞的凋亡比率为 45.3% ,

[0166] MST1-WT ( $H_2O_2$ ) 组 GFP 阳性细胞的凋亡比率为 61.1% ;

[0167] MST1-Y433F ( $H_2O_2$ ) 组 GFP 阳性细胞的凋亡比率为 35.9% ;

[0168] Vector (control) 组 GFP 阳性细胞的凋亡比率为 18.9% ,

[0169] MST1-WT (control) 组 GFP 阳性细胞的凋亡比率为 32.8% ;

[0170] MST1-Y433F (control) 组 GFP 阳性细胞的凋亡比率为 31.9% ;

[0171] 将结果作图分析, 结果如图 12 所示 (ANOVA,  $p < 0.02$ ,  $n = 3$ ), 可以看出,  $H_2O_2$  可激活 MST1 野生型磷酸化进而诱导细胞凋亡, 而不能激活 MST1 Y433F 突变型诱导神经细胞

凋亡。

[0172] 6、STI571 可抑制鱼藤酮和  $H_2O_2$  诱导的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化,从而抑制细胞凋亡

[0173] 鱼藤酮 (Rotenone) 化学名称为:[2R-(2a $\alpha$ ,6a $\alpha$ ,12a $\alpha$ )-1,2,12a-四氢-8,9-二甲氧基-2-(1-甲基乙基)[1]苯并吡喃[3,4-b]糠酰[2,3-h][1]苯并吡喃-6(6aH)-酮,分子式为  $C_{23}H_{22}O_6$ ,购自 sigma,产品目录号 R8875。

[0174] 以下培养 COS7 细胞所用培养基的组成为 DMEM(Gibco, C11995)+10 % FBS(Biochrom, S0115)。

[0175] 1)STI571 可抑制鱼藤酮和  $H_2O_2$  诱导的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化

[0176] 实验分为 5 个组:

[0177] Rotenone-/STI571-组(不加入鱼藤酮和 STI571 组):培养 COS7 细胞 (Bi, W. Xiao, L. Jia, Y. Wu, J. Xie, Q. Ren, J. Ji, G. Yuan, Z. (2010)c-Jun N-terminal kinase enhances MST1-mediated pro-apoptotic signaling through phosphorylation at serine 82. 285(9)6259-64;公众可从中国科学院生物物理研究所获得)。

[0178] Rotenone+/STI571-/3h 组(单独加入鱼藤酮组处理 3 小时):培养 COS7 细胞,向培养基中加入鱼藤酮,使鱼藤酮在培养基中的浓度为  $25 \mu M$ ;处理 3 小时;

[0179] Rotenone+/STI571-/16h 组(单独加入鱼藤酮组处理 16 小时):培养 COS7 细胞,向培养基加入鱼藤酮,使鱼藤酮在培养基中的浓度为  $25 \mu M$ ;处理 16 小时;

[0180] Rotenone+/STI571+/3h 组(加入鱼藤酮和 STI571 组 1):培养 COS7 细胞,向培养基中加入鱼藤酮和 STI571,使鱼藤酮和 STI571 在培养基中的浓度分别为  $25 \mu M$  和  $10 \mu M$ ;处理 3 小时;

[0181] Rotenone+/STI571+/16h 组(加入鱼藤酮和 STI571 组 2):培养 COS7 细胞,向培养基中加入鱼藤酮和 STI571,使鱼藤酮和 STI571 在培养基中的浓度分别为  $25 \mu M$  和  $10 \mu M$ ;处理 16 小时;

[0182] 分别收集上述经过处理的 5 组细胞裂解液,通过 western blot 分别以 p-Y433MST1 抗体, MST1 抗体, c-Abl 抗体、cleavage caspase3 抗体 (cell signal, #9664)、ERK1/2 抗体 (cell signal, #9102) 进行检测。

[0183] 结果如图 13 所示, p-Y433MST1、MST1、c-Abl、ERK1/2 在 5 组中均有表达,而 cleavage caspase3 (MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化水平提高,可以引起 cleavage caspase3 的增加。)仅在 Rotenone+/STI571+/16h 组、Rotenone+/STI571-/16h 组和 Rotenone+/STI571-/3h 组中有表达。而加入 Rotenone+/STI571+/16h 组比 Rotenone+/STI571-/16h 组中的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化产物 (p-Y433MST1) 的量少,说明 STI571 可抑制 Rotenone 诱导的 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化,进而抑制 Rotenone 诱导的细胞凋亡。

[0184] 2) $H_2O_2$  可在胞浆中激活 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化

[0185] 实验分为 4 组:

[0186] 空白对照组 (control):培养原代培养海马神经元;

[0187] 单独加入 STI571 组 (STI571):培养原代培养海马神经元,向培养基中加入 STI571, STI571 在细胞培养基中的浓度为  $10 \mu M$ ;

[0188] 单独加入  $H_2O_2$  组 ( $H_2O_2$ ):培养原代培养海马神经元,向培养基中加入  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  在

细胞培养基中的浓度为  $400 \mu\text{M}$ ；

[0189] 加入 STI571 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ STI571)：培养原代培养海马神经元细胞，向培养基中分别加入 STI571 和  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，使 STI571 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  在细胞培养基中的浓度分别为  $10 \mu\text{M}$  和  $400 \mu\text{M}$ ；

[0190] 以上 4 组均处理 1 小时后，采用免疫荧光检测方法，将各组细胞用 4% 多聚甲醛固定十分钟，PBS 漂洗  $3\text{min} \times 3$ ，0.2% Triton 打孔 10min，PBS 漂洗  $3\text{min} \times 3$ ，羊血清室温封闭 1 小时，加入一抗 (p-Y433-MST1 抗体)，4 度过夜，PBS 漂洗  $3\text{min} \times 3$ ，加入荧光二抗 (ALexa Fluor 488, 购自 Invitrogen A11008。) 37 度一小时，PBS 漂洗  $3\text{min} \times 3$ ，Hoechest 染核 3min，PBS 漂洗  $3\text{min} \times 3$ ，凉干封片，拍照。

[0191] 用 p-Y433MST1 抗体检测神经元内源性 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化。结果见图 14 所示表明， $\text{H}_2\text{O}_2$  可在胞浆中激活 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化，而 STI571 可抑制该磷酸化。

[0192] 因此，STI571 通过抑制鱼藤酮和  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 c-Ab1 激酶活性，抑制 c-Ab1 对 MST1 的体内外磷酸化，抑制 c-Ab1 对 MST1 酪氨酸 433 位点磷酸化等途径而抑制鱼藤酮和  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的神经细胞凋亡反应。该发现首次阐明 STI571 抗神经细胞氧化应激反应及其分子机制，为 STI571 未来作为抗脑缺血及神经退行性疾病的候选新药奠定了理论和实验基础，具有良好的发展前景。

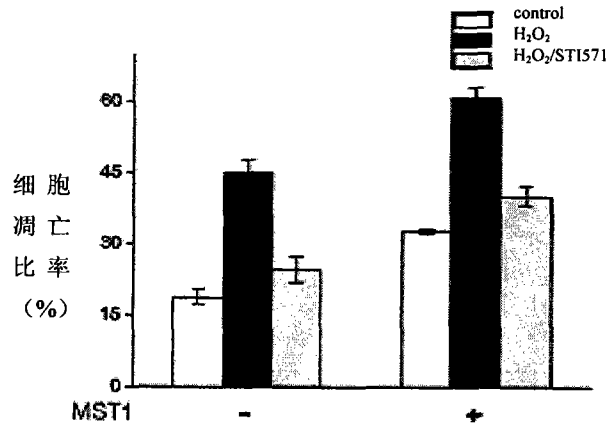


图 1

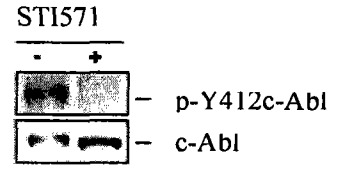


图 2

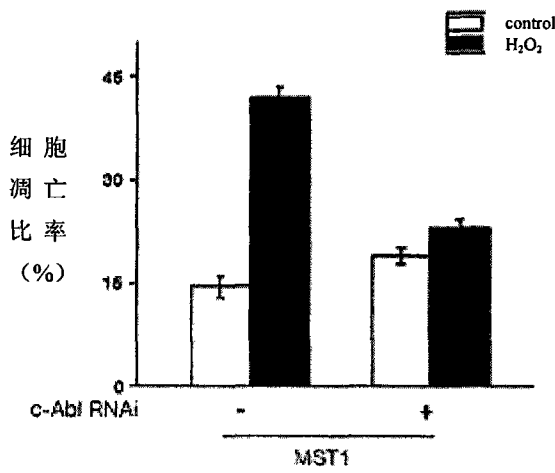


图 3

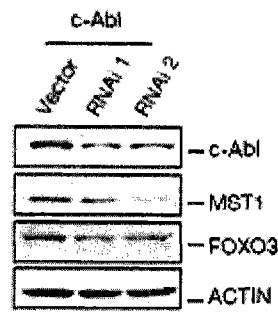


图 4

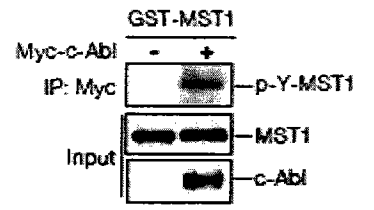


图 5

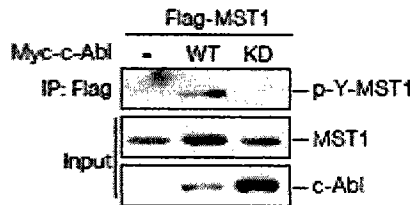


图 6

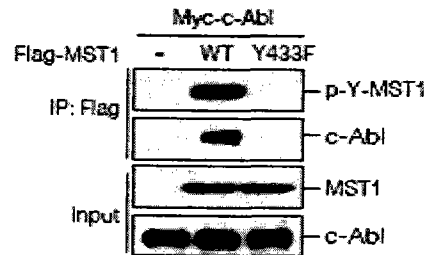


图 7

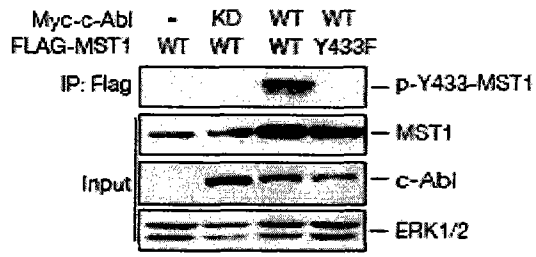


图 8



图 9

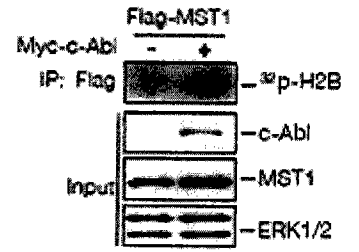
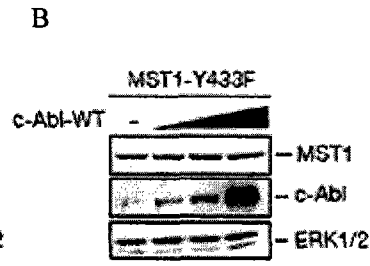


图 10

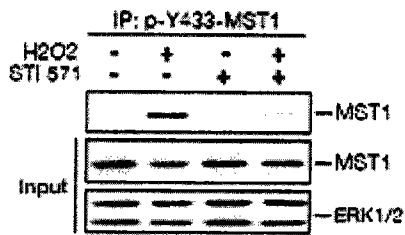


图 11

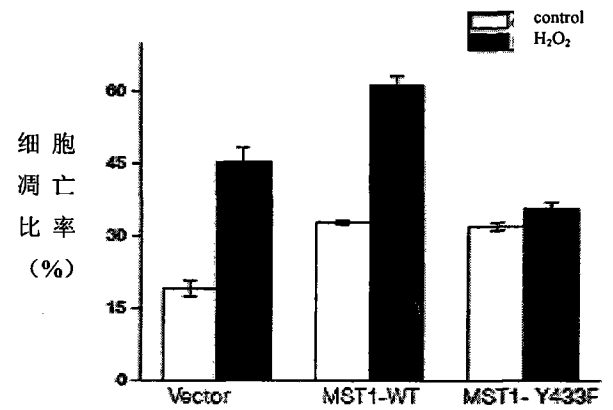


图 12

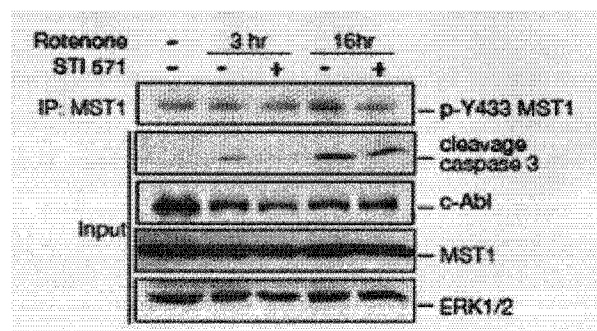


图 13

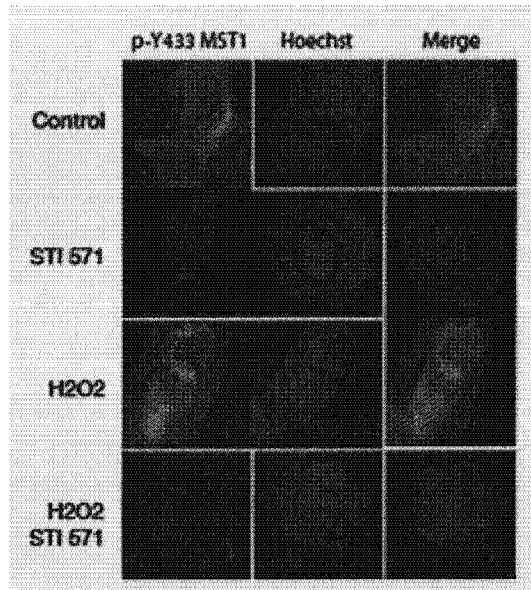


图 14