

一种羊肚菌源多肽 MIP-16 的分离纯化及其神经保护活性

熊川¹, 黄文丽¹, 金鑫¹, 罗强², 李萍¹, 张璐¹, 李强³, 朱宇^{1*}¹四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610061;²重庆医科大学附属第二医院 感染病分子重点实验室肝炎研究所, 重庆 400010;³成都大学药学与生物工程学院, 成都 610106

摘要:分离纯化人工栽培的梯棱羊肚菌子实体多肽(MIP-16),对其结构和神经保护活性进行研究。采用磷酸盐缓冲液提取,分子排阻色谱分离,反相高效液相色谱纯化获得梯棱羊肚菌子实体多肽,通过液相色谱-质谱连用技术完成氨基酸序列鉴定。构建6-羟多巴胺处理后引起凋亡的PC12细胞模型,验证MIP-16对PC12细胞的保护作用。结果显示:MIP-16由16个氨基酸组成,相对分子质量为1762 Da,氨基酸组成序列为Thr-Ile-Thr-Leu-Glu-Val-Glu-Ser-Ser-Asn-Ile-Thr-Asn-Asp-Val-Lys。细胞实验发现,MIP-16能够抑制PC12细胞丙二醛(MDA)产生,降低活性氧(ROS)水平,调节Bcl-2和Bax的比例,并降低Caspase蛋白的表达。MIP-16通过细胞线粒体途径抑制PC12细胞凋亡,具有神经保护活性,可作为一种辅助治疗帕金森综合症的药物开发。

关键词:梯棱羊肚菌;多肽;凋亡;神经保护活性

中图分类号:Q938.2;Q936

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)9-1519-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.9.010

Isolation and purification of a novel peptide from the fruiting bodies of *Morchella importuna* and its neuroprotective effect

XIONG Chuan¹, HUANG Wen-li¹, JIN Xin¹, LUO Qiang², LI Ping¹, ZHANG Lu¹, LI Qiang³, ZHU Yu^{1*}¹Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China;²Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases (Ministry of Education), Institute for Viral Hepatitis, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;³College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: In this research, we isolated and purified a novel peptide (MIP-16) from the fruiting bodies of *Morchella importuna* M. Kuo. MIP-16 was extracted with phosphate buffer, and purified by molecular exclusion chromatography followed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The amino acid sequence of MIP-16 was determined by LC-MS-MS as Thr-Ile-Thr-Leu-Glu-Val-Glu-Ser-Ser-Asn-Ile-Thr-Asn-Asp-Val-Lys with molecular mass of 1762 Da. 6-hydroxydopamine-induced apoptotic PC12 cell model was used to verify the protective effect of MIP-16 on PC12 cells from apoptosis. The results showed that treatment with MIP-16 significantly inhibits the production of malondialdehyde (MDA), reduces the level of reactive oxygen species (ROS), regulates the ratio of Bcl-2 and Bax, and reduces the activity of Caspase in PC12 cells; indicating its neuroprotective activity through a mitochondrial pathway. These results suggest a potential application of MIP-16 as an adjuvant therapy for the treatment of Parkinson's syndrome.

Key words: *Morchella importuna*; peptide; apoptosis; neuroprotective activity

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是人类第二大神经退行性疾病^[1],65岁以上人群中患病率为

2%~3%^[2]。PD的病理特征可概括为黑质致密区大量多巴胺能神经元丢失,进而导致黑质和纹状体多巴胺生物合成减少^[3]。PD的致病机理还不明确,研究证实,环境因素、遗传因素、氧化应激等均可能参与PD多巴胺能神经元的变性死亡过程^[4]。其中,氧化应激是导致神经元退化变性的一个重要原

收稿日期:2021-02-02 接受日期:2021-04-26

基金项目:四川省农业科学院高新领域扩展工程(2018GXTZ-01);四川省科学技术协会创新和服务能力提升项目(2018QNRC-007)

*通信作者 Tel:86-28-84504908; E-mail:zy200458@126.com

因,一方面,大脑是人类正常的生理活动中耗氧量最大的器官,但脑内的抗氧化酶相对缺乏,使大脑非常容易受到氧化应激损伤^[5];另一方面,早期研究表明,黑质致密区多巴胺能神经元线粒体氧化应激的增加可触发多巴胺依赖性毒性级联反应,导致溶酶体功能障碍和 α -突触核蛋白的积累^[6],这是PD的两个主要病理特征。目前,医学上大多采用经典的多巴胺替代疗法来治疗PD,如L-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)的补充。但越来越多的研究发现,这一经典的疗法存在较大的副作用,临床观察发现,长周期的L-DOPA治疗,有一定概率导致PD患者的运动障碍^[7]。因此,从减少氧化压力入手,寻找新的神经保护剂,是预防治疗PD的潜在途径之一。

近年来,从天然产物中提取纯化具有抗氧化活性的神经保护剂受到广泛关注并取得了显著的进展。从景天科植物红景天(*Rhodiola rosea* L.)根部提取到的红景天苷能够抑制氧化应激和炎症来保护凋亡的PC12细胞^[8]。芍药苷则通过抑制NF- κ B的活化来缓解6-羟基多巴胺诱导的PC12细胞凋亡^[9]。然而,与植物相比,真菌神经保护剂的研究相对较少。某些真菌多糖能够表现出较好的自由基清除活性,发挥神经保护作用^[10]。然而真菌多糖分子量大,结构复杂,难以穿透血脑屏障,其作为神经保护剂的应用受到限制。某些真菌的乙醇提取物或水提取物含有神经保护因子^[11],但提取物的成分尚不清楚,功能物质的结构有待鉴定。

羊肚菌(*Morchella* spp.)是一种名贵的食药两用真菌,《本草纲目》记载其“甘寒无毒,化痰理气,益肠胃”。梯棱羊肚菌(*Morchella importuna* M. Kuo.)是我国大面积人工栽培的品种,在本课题组前期的研究中确认,梯棱羊肚菌水提物中具有拟神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的物质,能够促进PC12细胞分化,形成神经网络^[12]。基于此,本研究进一步纯化鉴定梯棱羊肚菌子实体中的功效成分,构建6-OHDA损伤的PC12细胞模型,验证梯棱羊肚菌子实体中功效成分的神经保护活性,为人工栽培的羊肚菌保健功效的开发提供数据,为真菌源神经保护剂的筛选提供备选资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

梯棱羊肚菌子实体采集自四川省农业科学院食用菌栽培基地,37℃烘箱中烘干待用。大鼠嗜铬瘤

细胞株(PC12)购买自美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC)菌种保藏中心,ATCC编号为CRL-1 721。

1.1.2 试剂

C₁₈色谱柱(PerkinElmer,美国);Sephadex 30 increase分子排阻色谱柱(GE Healthcare,瑞典);胎牛血清、DMEM培养液(Thermo Scientific,美国);青霉素、链霉素、3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑噻唑蓝(MTT)(Sigma,美国);超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒、Caspase-3检测试剂盒(碧云天,中国);活性氧(ROS)检测试剂盒(Abcam,英国);其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.3 仪器

紫外分光光度计(Molecular Devices,美国);旋转蒸发器(EyelaOSB 2000,日本);冷冻干燥机(CHRIST Beta 2-8 LSCplus,德国);高效液相色谱仪(Perkinelmer CT 06484,美国);CO₂细胞培养箱(Thermo,美国);倒置显微镜(Olympus,日本)。

1.2 方法

1.2.1 梯棱羊肚菌子实体多肽(MIP-16)的提取纯化

称取梯棱羊肚菌子实体干品50g,置于中药材粉碎机粉碎后过100目筛网,获得梯棱羊肚菌子实体干品粉末。梯棱羊肚菌子实体干品粉末中蛋白质的含量根据GB/T5009.5-2010凯氏定氮法测定。梯棱羊肚菌子实体干品粉末中多肽的提取按照如下步骤进行:按照粉末/PBS缓冲液的料液比1:30加样,充分搅拌后置于磁力搅拌器120转搅拌过夜,静置后取上清。上清液通过截留分子量为3500Da的透析袋透析24h,收集透析液,旋转蒸发器浓缩,获得的浓缩液采用真空冷冻干燥机冷冻干燥,可获得梯棱羊肚菌子实体多肽提取物干粉。

取梯棱羊肚菌子实体多肽提取物干粉10g,无菌水溶解,配制成浓度为100mg/mL的溶液,上样于Superdex 30 Increase凝胶过滤柱,无菌水洗脱,通过自动收集器收集洗脱液,后于215nm下测定洗脱液的吸光值,收集并冻干单一峰,得到梯棱羊肚菌子实体多肽复合物。

取梯棱羊肚菌子实体多肽复合物干粉1g并溶解于无菌水,配制成浓度为10mg/mL的溶液,通过反向高效液相色谱纯化,收集单一峰,获得梯棱羊肚

菌子实体多肽(MIP-16)。色谱条件设置如下:色谱柱选用PE C₁₈柱(150 mm×4.6 mm),A相:纯净水,B相:含0.1%三氟乙酸的乙腈;进样量设定为30 μL;柱温设置为25±5℃;流速选择1.0 mL/min;检测波长设定为215 nm。洗脱条件:A相:0~8 min,99%→97%;8~12 min,97%→96%;12~16 min,96%→80%;16~20 min,80%→99%。

通过液相色谱-质谱(LC-MS-MS)解析 MIP-16 的氨基酸组成。液相 A 液为含 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈溶液。色谱柱以 A 液平衡。样品由自动进样器上样,再经色谱柱梯度分离,流速为 0.3 mL/min,柱温 70℃。质谱条件:样品用 TripleT-OF 5 600 + 质谱仪进行质谱分析。分析时长:18 min,检测方式:正离子,一级质谱扫描范围:600~3 500 *m/z*。

1.2.2 MIP-16 形态观察

取 2 mg MIP-16 置于附有铜胶带的样品台,通过离子溅射仪(Quorum,英国)给样品镀上一层导电金粉,置于扫描电镜下观察(Quanta FEG 250,美国)。样品在 20.0 kV 加速电压下进行检查^[13]。选择清晰的视野拍照。

1.2.3 细胞培养及处理

PC12 细胞用含 5% 胎牛血清和 10% 马血清的 1640 培养基培养。取对数期细胞按照 3×10^4 个/mL 浓度接种于 96 孔板,每孔 100 μL。随后,PC12 细胞与不同浓度的 MIP-16 共同孵育 6 h,移除培养基,加入不同浓度的 6-OHDA 处理。之后通过 MTT 法测定 PC12 细胞的活力。

$$\text{活力抑制率} = \frac{1 - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

式中, $A_{\text{样品}}$ 代表不同浓度 MIP-16 处理后的细胞吸光值; $A_{\text{对照}}$ 代表正常培养的细胞的吸光值。

1.2.4 PC12 细胞中 ROS 测定

取对数期生长的 PC12 细胞以 3×10^4 个/mL 浓度接种于 96 孔板,每孔 100 μL。待细胞贴壁后用不同浓度的 MIP-16 处理 6 h,移除培养基,加入不同浓度的 6-OHDA 处理。移除培养基,用预冷的 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 遍,用 DCFDA-细胞活性氧(ROS)检测试剂盒测定 PC12 细胞中的 ROS 含量。

1.2.5 PC12 细胞中 MDA 和 内源性抗氧化酶活力测定

PC12 细胞的处理如“1.2.4”,收集细胞,预冷的 PBS 溶液清洗并重悬 PC12 细胞。6 000 rpm 离

心收集细胞,加入 100 μL 细胞裂解液,漩涡振荡仪处理 1 min,6 000 rpm 离心 10 min,取 100 μL 上清加入到 96 孔板中,随后用酶标仪测定吸光度,计算 MDA,SOD,CAT 和 GSH-Px 的含量,其中 MDA 测定 532 nm 吸光值,SOD 测定 450 nm 吸光值,CAT 测定 520 nm 吸光值,GSH-Px 测定 340 nm 吸光值。

1.2.6 MIP-16 神经保护作用机制探索

PC12 细胞的处理如“1.2.4”,收集细胞,预冷的 PBS 溶液清洗并重悬 PC12 细胞。采用 QPCR 法测定细胞内 Bcl-2 和 Bax 的表达情况。通过 Trizol 试剂(Sigma,美国)完成 PC12 细胞 RNA 提取。

表 1 QPCR 引物的核酸序列

Table 1 Nucleotide sequences of the QPCR primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
Bax	Forward:5'-CTGCAGAGGATGATTGCTGA-3' Reverse:5'-GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC-3'
Bcl-2	Forward:5'-ATCTTCTCCTTCCAGCCTGA-3' Reverse:5'-TGCAGCTGACTGGACATCTC-3'
GAPDH	Forward:5'-CACTCACGGCAAATTCAACGGCA-3' Reverse:5'-GACTCCAGCACATACTCAGCAC-3'

应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(Selleckchem,美国),完成 30 次循环。

进一步测定 Caspase-9 和-3 的活性。采用碧云天公司的 Caspase-9 和-3 活性检测试剂盒(c1158 和 c1115)完成细胞 Caspase-9 和-3 活性的测定。取对数生长期 PC12 细胞以总量 1×10^6 个/孔完成 6 孔板接种,MIP-16 处理 6 h,构建 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞损伤模型,PBS 清洗并收集细胞,加入裂解液并于冰上裂解 5 min,4℃下 10 000 rpm 离心 10 min,反应缓冲液处理,405 nm 下测定吸光值。

1.3 数据分析

采用 Excel 2010,SPSS19.0 软件处理数据,并用 Origin 9.0 作图,各组实验数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 视为显著性差异。

2 结果

2.1 MIP-16 分离纯化及结构鉴定

依据 GB/T5009.5-2010 凯氏定氮法,测定梯棱羊肚菌子实体粉末中蛋白质的含量为 26.62%±1.17%。50 g 梯棱羊肚菌子实体粉碎后通过磷酸盐缓冲液提取,3 500 Da 透析袋透析并将所得透析液冻干后共得到多肽提取物干粉 9.85 g,得率为

19.7%。10 g 多肽提取物经过分子排阻色谱 Superdex 30 Increase 凝胶过滤后(见图 1A),依据分子量的大小,获得了4个洗脱峰,分子量由大到小以此标记为 A1 ~ A4,分别收集洗脱峰。通过 DPPH 自由基清除实验测定了各组分的 DPPH 自由基清除活性,结果表明组分 A2 自由基清除活性最强,因此选择

A2 组分作为梯棱羊肚菌多肽复合物进行下一步纯化。最终获得的多肽复合物(A2)冻干粉 0.48 g,得率为 4.8%。组分 A2 通过 RP-HPLC 进行分离纯化后,获得 3 个组分,即 B1 ~ B3。测定自由基清除活性后,选择 B2 作为梯棱羊肚菌多肽,即 MIP-16。最终获得 MIP-16 冻干粉 0.14 g,得率为 14%。

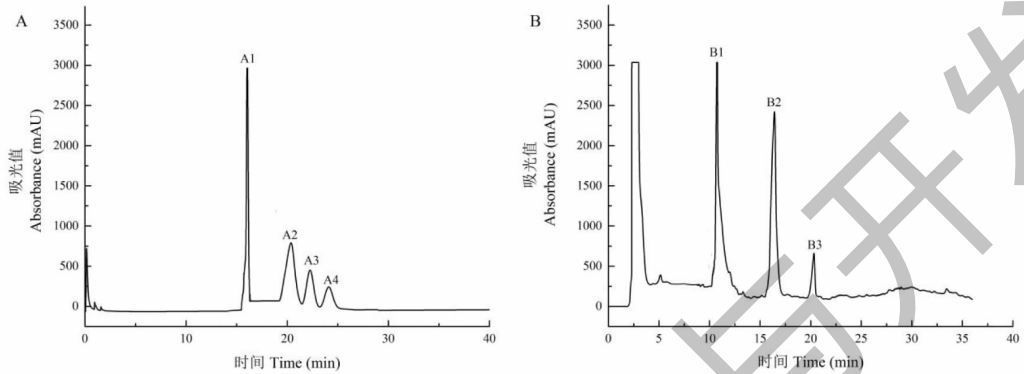


图 1 MIP-16 的分离纯化

Fig. 1 Isolation and purification of MIP-16

注:A:分子排阻色谱图;B:RP-HPLC 色谱图。Note:A:Gel chromatographic;B:RP-HPLC chromatographic.

多次重复实验以收集足够量的 MIP-16 进行 LC-MS-MS 分析。通过 LC-MS-MS 分析,解析出 MIP-16 由 16 个氨基酸组成,相对分子质量为 1 762

Da,氨基酸组成序列为 Thr-Ile-Thr-Leu-Glu-Val-Glu-Ser-Ser-Asn-Ile-Thr-Asn-Asp-Val-Lys(见图 2)。

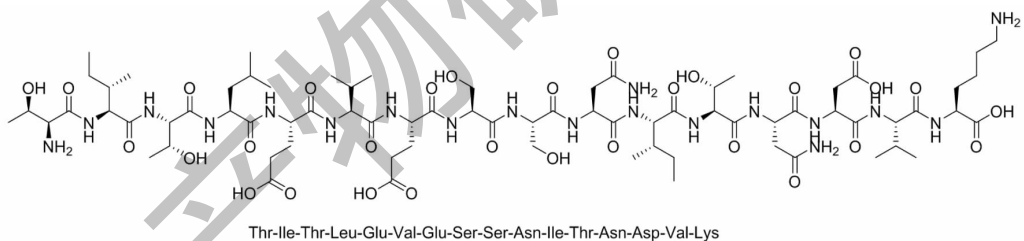


图 2 MIP-16 的氨基酸序列

Fig. 2 Amino acid sequence of MIP-16

在扫描电镜下,MIP-16 呈现不规则的片状结构,片状结构的边缘出现不规则的卷曲(见图 3)。

2.2 MIP-16 的神经保护作用

选择大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株(PC12),并建立 6-OHDA 诱导损伤的细胞模型,用不同浓度的 MIP-16 对细胞进行处理。结果表明,作用浓度介于 0 ~ 160 μM 的 MIP-16 对 PC12 细胞活性没有抑制作用。然而,6-OHDA 对 PC12 具有显著的抑制作用(见图 4A)。25 μM 的 6-OHDA 处理 24 h 后,细胞活力显著下降,为对照组的 85.83% \pm 3.25%,随着 6-OHDA 的浓度增大,PC12 细胞活力持续下降,100 μM 的 6-OHDA 处理 24 h,PC12 细胞活力降至对照组的一半,继续增大 6-OHDA 的浓度,PC12 细胞活力未见显著性下降,因此,后续实验中,

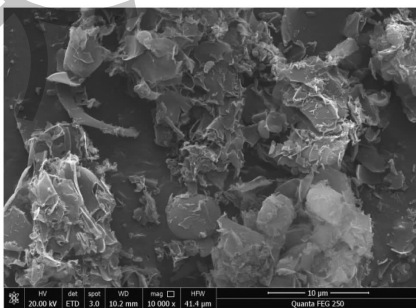


图 3 MIP-16 的扫描电镜图

Fig. 3 Scanning electron micrograph image of MIP-16

6-OHDA 浓度设定为 100 μM 。6-OHDA 作用时间对 PC12 细胞活力的影响如图 4B 所示,随着作用时间的增加,PC12 细胞的细胞活力逐渐降低,6-OHDA 处理 24 h,细胞活力降低至对照组的 52.42% \pm 3.19%,作用时间继续增长,细胞活力不再出现显著性下降。基于此,后续实验中 6-OHDA 的作用时间

设置为 24 h。通过 MIP-16 的预先孵育,6-OHDA 对 PC12 细胞的损伤作用显著减少(见图 4C)。20 μM 的 MIP-16 预处理,使得细胞活力恢复为 62.86% \pm 2.89%,与未经 MIP-16 预处理的 PC12 细胞呈现显著性差异。40 μM 的 MIP-16 则可使 PC12 细胞活力保持在 69.98% \pm 2.54%。

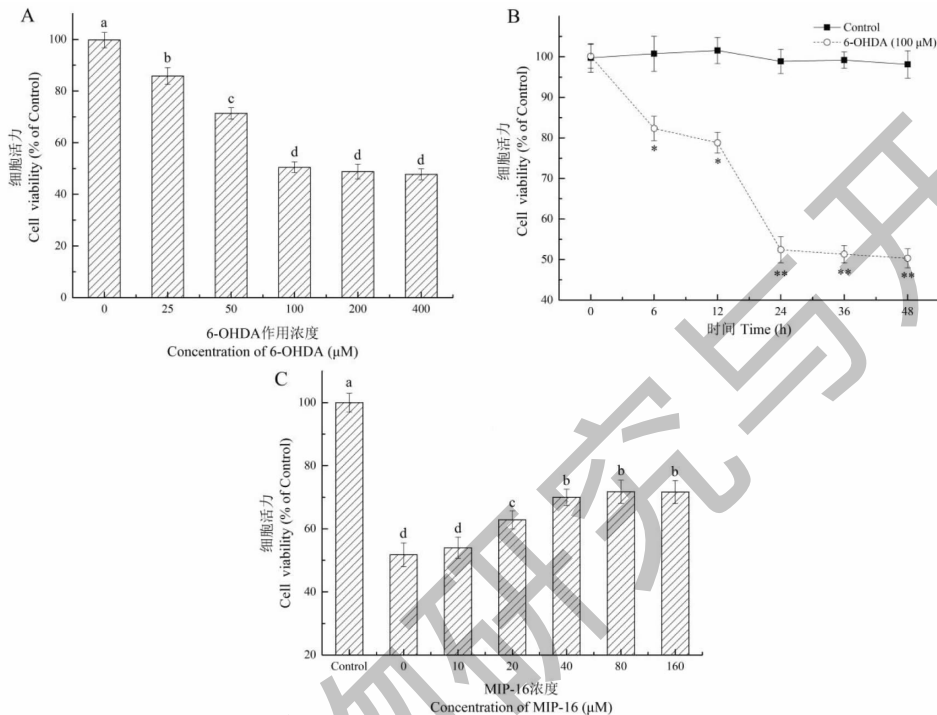


图 4 MIP-16 对 6-OHDA 引起细胞损伤的保护作用

Fig. 4 MIP-16 increased the cell viability of PC12 cells exposed to 6-OHDA

注:A:6-OHDA 处理 24 h 后的细胞活力;B:不同作用时间的 6-OHDA 对细胞活力的影响;C:MIP-16 对细胞的保护作用。A、C 中,不同小写字母代表 5% 水平的差异,即 $P < 0.05$ 。B 中,与未经 6-OHDA 处理的细胞相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note:A:Cell viability determination of PC12 cells co-cultured with different concentrations of 6-OHDA for 24 h;B:Cell viability of PC12 cells co-cultured with 6-OHDA at a concentration of 100 μM for different time;C: Protective effect of MIP-16 on cells. In A and C, Different lowercase letters represent significant differences at the 5% level. In B, compared with PC12 cells not exposed to 6-OHDA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 MIP-16 神经保护作用的机制

2.3.1 MIP-16 对细胞内 ROS 和 MDA 含量的影响

6-OHDA 的处理会使得 PC12 细胞内的 ROS 水平显著上升,如图 5A 所示,浓度为 100 μM 的 6-OHDA 处理 24 h 后,PC12 细胞内的 ROS 水平达到对照组的 2.3 倍。20 μM 的 MIP-16 预处理能够显著降低 ROS 的水平,为对照组的 1.8 倍,40 μM 的 MIP-16 具有更好的抑制效果,ROS 仅为 1.6 倍,即 162.19% \pm 4.14%。PC12 细胞 MDA 的含量与 ROS 具有相同的趋势(见图 5B),6-OHDA 的处理会使得 MDA 的含量上升为对照组的 280.87% \pm 6.89%,10

μM 的 MIP-16 预处理能够显著降低 MDA 的含量,为对照组的 2.2 倍,MIP-16 浓度的增加,抑制效果进一步增强。

2.3.2 MIP-16 对细胞内源性抗氧化酶活的影响

6-OHDA 的处理会使 PC12 细胞内源性抗氧化酶系的活力显著下降,如图 6 所示,SOD 活性为对照组的 52.21% \pm 4.11%,CAT 为 40.31% \pm 3.86%,GSH-Px 则为 39.62% \pm 2.91%。不同浓度的 MIP-16 处理后,内源性抗氧化酶系活力明显升高。40 μM 的 MIP-16 处理,能够使 CAT 和 GSH-Px 的活力与 6-OHDA 处理组呈现极显著差异。

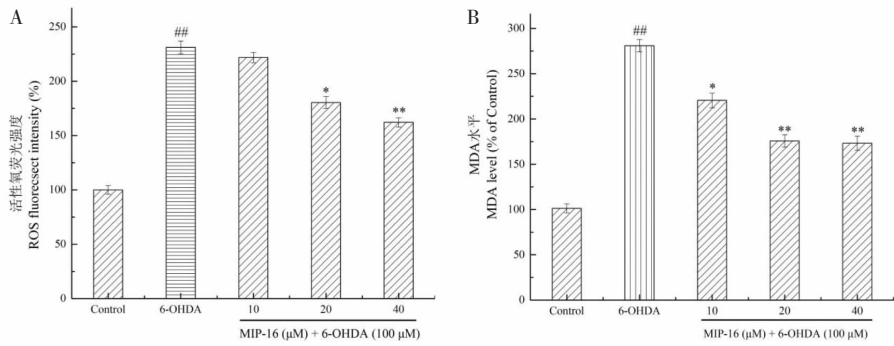


图5 MIP-16对PC12细胞ROS和MDA含量的影响

Fig. 5 Effect of MIP-16 on the content of ROS and MDA in PC12 cells

注:与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与6-OHDA处理的细胞相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,下同。Note:A:ROS content;B:MDA content. Compared with the control group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;Compared with the 6-OHDA group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,the same below.

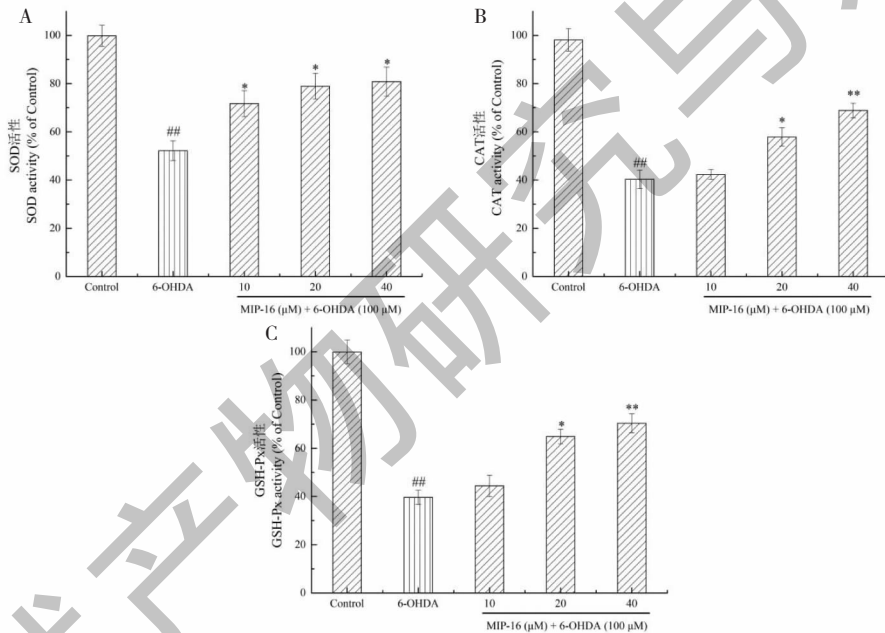


图6 MIP-16对PC12细胞内源性抗氧化酶活的影响

Fig. 6 Effect of MIP-16 on the activity of endogenous antioxidant enzymes in PC12 cells

2.3.3 MIP-16对凋亡相关蛋白表达的影响

6-OHDA的处理会改变Bax和Bcl-2的表达量,100 μM的6-OHDA处理24 h后,Bax的相对表达量增加为 $192.82\% \pm 5.72\%$,Bcl-2的相对表达量下降至 $40.48\% \pm 1.74\%$ 。MIP-16的预处理则能够下调Bax的表达,上调Bcl-2的表达,调整Bax/Bcl-2的比例。图7B展示了PC12细胞中Caspase的活性,6-OHDA处理后,PC12细胞中Caspase-9和-3的活性都显著升高,其中,Caspase-3达到对照组的 $205.41\% \pm 7.74\%$,Caspase-9则为 $242.76\% \pm 6.01\%$ 。通过不同浓度的MIP-16预处理后,

Caspase-9和-3的活性都显著下降。

3 讨论与结论

3.1 真菌多肽的提取

某些大型真菌具有极高的食药价值,同时含有丰富的蛋白质,是获得天然多肽的理想原料。Cordymin是提取自冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)中的一种多肽,该多肽能够抑制炎症发生,对大鼠由于缺血缺氧引起的脑损伤具有缓解作用^[14]。从杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)菌丝体中分离的多肽PEMP具有抗氧化、抗肿瘤和免疫强化功能^[15]。目前,真菌的功效成分多集中在多糖的研究上,相较于真菌多

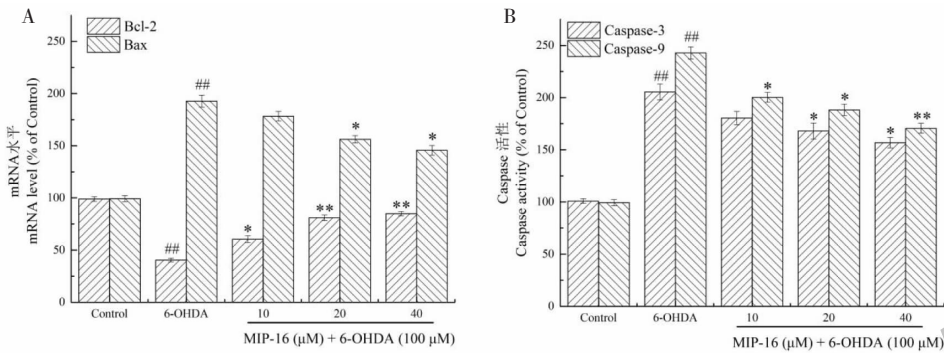


图7 MIP-16对6-OHDA诱导的PC12细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effect of MIP-16 on apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells

糖,多肽结构简单,免疫原性低,且易于人工合成,是现代药物开发的极具发展潜力的部分。目前从蛋白质水解物中分离纯化多肽多采用色谱柱法,包括离子交换色谱法和/或凝胶过滤色谱法,前者可以根据离子和极性分子的电荷进行分离,后者可以根据分子大小进行分离。然后,目前尚未见对真菌多肽提取的标准方法的报道,提取缓冲液的pH值、提取过程中是否需要蛋白酶酶解等尚未探索。此外,从不同种类的真菌中提取多肽往往对应着不同的提取方法,这不利于真菌多肽的推广应用。相较于真菌多糖成熟标准的提取方法,真菌多肽的提取方法需要进一步的探索。本研究中采用分子排阻色谱和反向高效液相色谱连用的方法纯化获得MIP-16,该方法首先通过分子大小进行粗分,再依据其极性进行细分,实验证明该方法的区分度较好,但是试验所需时间较长,还需要进一步改进完善。

3.2 帕金森综合症(PD)的药物治疗

黑质纹状体多巴胺能神经元的变性和细胞死亡导致多巴胺缺乏,是PD的主要病因。因此,多巴胺替代疗法(如补充L-DOPA等)是目前治疗特发性帕金森病的最佳方法之一,通过外源多巴胺的补充,来缓解症状。然而,在最初的最佳治疗反应期后,长周期的L-DOPA治疗往往伴随着运动功能丧失等副作用。此外,已有学者在长期服用L-DOPA的帕金森病患者的尿液中检测到6-OHDA^[16],因此,本研究中,我们通过6-OHDA处理PC12细胞,模拟PD的初期发生,寻找新的神经保护剂。在本研究中,我们发现6-OHDA的处理会使得PC12细胞中ROS的含量升高,进而会引发细胞凋亡。由此我们推测,长期L-DOPA治疗会产生较多的6-OHDA,可能对PD的治疗起到负反馈调节作用。基于以上分析,从降低氧化压力,减少氧化损伤入手,有望筛选到高效安

全的神经保护剂。而高等真菌中含有的多糖、多肽、三萜等成分具有较好的抗氧化活性,因此,我们从真菌中寻找神经保护剂,为PD的药物筛选提供资源。

3.3 氧化应激与PD的发生

氧化反应可以为人体生命活动提供能量,但是反应过程中产生的超氧阴离子自由基和羟基自由基能引起氧化损伤。内源性抗氧化酶等抗氧化剂的存在使ROS的产生和消耗趋于平衡,在正常状态下,维持一种稳态。但是有研究发现,随着年龄的增长,抗氧化系统的效率逐渐降低,在老年人群中,活性氧的增加超过了抗氧化系统的清除能力,继而会产生氧化压力,可能导致PD等神经退行性疾病的发生^[17]。内源性抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等,是机体天然的抗氧化应激防御系统^[18]。6-OHDA处理后,细胞内抗氧化酶活性显著降低。由此可以推测,此时细胞内的抗氧化酶系统明显超过正常负荷。MIP-16预处理6h可显著提高PC12细胞内源性抗氧化酶活性,SOD水平反映了细胞内抗氧化酶系统的负荷,可间接反映细胞内自由基的水平。这一结果可能表明,经过MIP-16预处理后,阴离子超氧物的生成量有所减少。此外,GSH-Px是细胞抗氧化防御的核心成分,也是ROS的电子供体,提示MIP-16作为另一种解毒系统,可能影响GSH的代谢,避免6-OHDA诱导的细胞死亡。

当内源性抗氧化酶系统不能及时清除ROS时,ROS容易损伤生物大分子,最终导致细胞凋亡。Bcl-2和Bax分别是Bcl-2蛋白家族中最具代表性的凋亡抑制基因和凋亡促进基因^[19]。Bax基因编码的Bax蛋白能与Bcl-2形成异二聚体,抑制Bcl-2的表达。研究发现Bax/Bcl-2蛋白的比值是决定细胞凋亡抑制作用强度的关键因素,Bax/Bcl-2也可认为

是凋亡发生的分子开关。Bax 诱导细胞凋亡的机制是 Bax 在 tBid 的作用下进入线粒体,增加线粒体膜的通透性,然后释放细胞色素 C,细胞色素 C 的释放是细胞凋亡内源性途径中的关键步骤,通过靶向和激活 Caspase-9 而发生,导致效应物半胱天冬酶(如 Caspase-3)的激活^[20]。因此,本研究通过检测 Bcl-2 和 Bax 的表达水平以及 Caspase (Caspase-3 和 Caspase-9)的活性来探讨 MIP-16 对 6-OHDA 诱导的细胞凋亡的保护作用。本研究中我们观察到,用 MIP-16 预处理 6-OHDA 可以显著提高 Bcl-2 的水平和降低 Bax 的水平,抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性,以上结果提示 MIP-16 可能通过调节 Bcl-2/Bax 比例,抑制 Caspase-3/9 的活性发挥抗凋亡作用。

研究表明,MIP-16 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡有明显的抑制作用:(1)重塑内源性抗氧化酶活性,包括 SOD、CAT 和 GSH-Px,作为一种内源性抗氧化促进剂。(2)降低 ROS 水平和 MDA 生成,从而降低细胞氧化水平,抑制凋亡的启动。(3)调节 Bax/Bcl-2 比值,抑制 Caspase-9 和 3 的表达,从而阻断细胞线粒体凋亡途径。MIP-16 结构简单,易于人工合成,有望作为一种缓解和辅助治疗 PD 的药物进行开发利用。

参考文献

- 1 Darvas M, Henschen CW, Palmiter RD. Contributions of signaling by dopamine neurons in dorsal striatum to cognitive behaviors corresponding to those observed in Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 65:112-123.
- 2 Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3:17013.
- 3 Tysnes OBR, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. *J Neural Transm*, 2017, 124:901-905.
- 4 Burbulla LF, Song P, Mazzulli JR, et al. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Science*, 2017, 357:1255-1261.
- 5 Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it[J]. *Ann Neurol*, 1992, 32:804-812.
- 6 Lau FC, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Nutritional intervention in brain aging: reducing the effects of inflammation and oxidative stress[J]. *Subcell Biochem*, 2007, 42:299-318.
- 7 Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2015, 386:896-912.
- 8 Zhou F, Ju J, Fang Y, et al. Salidroside protected against MPP⁺-induced Parkinson's disease in PC12 cells by inhibi-

ting inflammation, oxidative stress and cell apoptosis [J]. *Biotech Appl Biochem*, 2019, 66:247-253.

- 9 Cao BY, Yang YP, Luo WF, et al. Paeoniflorin, a potent natural compound, protects PC12 cells from MPP⁺ and acidic damage via autophagic pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1):122-129.
- 10 Giavasis I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 26(7):162-173.
- 11 Xiong C, Chen C, Chen ZQ, et al. Potentiation of neurotogenic activity of *Ganoderma leucocontextum* on rat pheochromocytoma cells [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2016, 28:1135-1138.
- 12 Xiong C, Luo Q, Huang WL, et al. The potential neurotogenic activity of aqueous extracts from *Morchella importuna* in rat pheochromocytoma cells [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26:1685-1692.
- 13 Tai LH, Cao JB, Yi WS. A new method for scanning electron microscope samples of polysaccharides distilled from green tea and the observation of ultrafine structure of them with atomic force microscope [J]. *J Chin Electr Microsc Soc (电子显微学报)*, 2009, 28:162-167.
- 14 Wang J, Liu YM, Cao W, et al. Anti-inflammation and antioxidant effect of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*, in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2012, 27:159-165.
- 15 Sun Y, Hu X, Li W. Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 97:323.
- 16 Park HJ, Zhao TT, Lee KS, et al. Effects of (-)-sesamin on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells and dopaminergic neuronal cells of Parkinson's disease rat models [J]. *Neurochem Int*, 2015, 83-84:19-27.
- 17 Zhang MX, Xia JH. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Life Sci Res (生命科学研究)*, 2000, 4:295-301.
- 18 Li YL, Guo JZ, Zhong LM, et al. Resveratrol regulates endogenous thiol antioxidants of cortex in status epilepticus rat model [J]. *Chin J Neuroanat (神经解剖学杂志)*, 2011, 27:383-388.
- 19 Mohan S, Hobani YH, Shaheen E, et al. Ameliorative effect of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (Fingerroot) on oxidative stress and inflammation in ethanol-induced gastric ulcer *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261:113104.
- 20 John CR. Mechanisms of apoptosis [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157:1415-1430.