

## 鹿茸多肽对鱼藤酮致SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及其机制

张旭帆<sup>1</sup>, 曹俊岭<sup>2</sup>, 胡金涛<sup>1</sup>, 刘蔚<sup>2</sup>, 王添全<sup>4</sup>, 欧阳竞锋<sup>3\*</sup>

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;  
3. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 4. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

**[摘要]** 目的:探讨鹿茸多肽对鱼藤酮诱导的神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞损伤的干预作用及相关机制。方法:用 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的鱼藤酮作用于SH-SY5Y细胞建立帕金森病(PD)体外模型,设置空白组、模型组、鹿茸多肽高、中、低剂量( $150, 100, 50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )组及雷帕霉素组。通过苏木精-伊红(HE)染色,罗丹明123(Rh123)染色,2',7'-二氯荧光黄二乙酸酯(DCFH-DA)染色及免疫组织化学染色观察各组细胞中路易小体的数量、线粒体膜电位的变化、活性氧簇(ROS)含量及 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -syn),蛋白激酶B(Akt),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的表达情况。结果:HE染色结果显示,与空白组比较,模型组中细胞数目减少、触角结构变钝,形态变圆,胞质内可见嗜酸性路易小体。与模型组比较,雷帕霉素组及鹿茸多肽高、中、低剂量组中细胞形态并无明显差异,但是胞质中路易小体较少;罗丹明123染色结果显示,与空白组比较,模型组中细胞线粒体膜电位明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,雷帕霉素组及鹿茸多肽高、中、低剂量组中细胞线粒体膜电位均有所下降( $P<0.05$ );DCFH-DA染色结果显示,与空白组比较,模型组细胞中活性氧(ROS)含量明显增多( $P<0.05$ );与模型组比较,雷帕霉素组及鹿茸多肽高、中、低剂量组的活性氧(ROS)含量均下降( $P<0.05$ )。免疫组织化学结果显示,与空白组比较,模型组 $\alpha$ -syn, Akt, mTOR蛋白表达明显增多( $P<0.05$ );与模型组比较,雷帕霉素组及鹿茸多肽高、中剂量组 $\alpha$ -syn, mTOR蛋白表达均明显减少( $P<0.05$ ),雷帕霉素组及鹿茸多肽高剂量组中Akt表达明显减少( $P<0.05$ )。结论:鹿茸多肽可能是通过抑制Akt/mTOR信号通路促进 $\alpha$ -syn的降解,从而发挥神经保护作用。

**[关键词]** 帕金森病; 鱼藤酮; 鹿茸多肽; 蛋白激酶B(Akt); 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR蛋白)

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0082-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201974

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200725.1615.010.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-27 08:53

### Protective Effect and Mechanism of Velvet Antler Peptide on Rotenone-induced SH-SY5Y Cell Damage

ZHANG Xu-fan<sup>1</sup>, CAO Jun-ling<sup>2</sup>, HU Jin-tao<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, WANG Tian-quan<sup>4</sup>, OUYANG Jing-feng<sup>3\*</sup>

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

3. Medical Experimental Center, Chinese Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China;

4. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the intervening effect of velvet antler peptide (VAP) on rotenone-induced neuroblastoma (SH-SY5Y) cell damage and explore its related mechanism. **Method:**  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  rotenone was used to SH-SY5Y cells to establish an *in vitro* model of Parkinson's disease (PD). A blank control

**[收稿日期]** 20200224(003)

**[基金项目]** 中国中医科学院自选课题项目(ZZ2019002);国家中医药管理局“全国中医药创新骨干人才”培训项目

**[第一作者]** 张旭帆,在读硕士,从事中药防治神经退行性疾病研究,E-mail:570913694@qq.com

**[通信作者]** \* 欧阳竞锋,博士,副研究员,从事中药调节干细胞定向分化及中药防治神经退行性疾病研究,E-mail:springeltics@hotmail.com

group, a model group, high, medium and low dose VAP groups ( $150, 100, 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively) and a rapamycin group were established. The number of lewy bodies, changes in mitochondrial membrane potential, content of reactive oxygen species (ROS) and  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn), protein kinase B (Akt), and mammalian target of rapamycin (mTOR) were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, rhodamine 123 staining, DCFH-DA staining and immunohistochemical staining expression respectively. **Result:** The results of HE staining showed that as compared with the blank group, the number of cells in model group was reduced, the tentacle structure became dull, the shape became round, and eosinophilic Lewy bodies were visible in cytoplasm. As compared with model group, there was no significant difference in cell morphology from rapamycin group and VAP high, medium and low dose groups, but there were fewer Lewy bodies in cytoplasm in these four groups. Rhodamine 123 staining showed that as compared with blank group, the mitochondrial membrane potential was increased significantly in model group ( $P<0.05$ ). As compared with the model group, the mitochondrial membrane potential was decreased in rapamycin group and VAP high, medium and low dose groups ( $P<0.05$ ). DCFH-DA staining results showed that as compared with blank group, the content of ROS was increased significantly in cells of model group ( $P<0.05$ ). As compared with model group, the content of ROS was decreased in rapamycin group and VAP high, medium and low dose groups ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical staining showed that as compared with blank group, the protein expression levels of  $\alpha$ -syn, Akt, and mTOR were increased significantly in model group ( $P<0.05$ ). As compared with model group, the protein expression levels of  $\alpha$ -syn and mTOR were significantly reduced in rapamycin group and VAP high and medium dose groups ( $P<0.05$ ), and the expression levels of Akt were significantly reduced in rapamycin group and VAP high-dose group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Velvet antler peptides may play a neuroprotective role by regulating the Akt/mTOR signaling pathway and promoting the degradation of  $\alpha$ -syn in SH-SY5Y cells.

**[Key words]** Parkinson's disease; rotenone; velvet antler polypeptide; protein kinase B (Akt); mammalian target of rapamycin (mTOR)

帕金森病(PD)是以中脑黑质致密部多巴胺(DA)能神经元异常变性、缺失,体内DA水平显著降低为特征的进行性神经退行性疾病。目前研究认为PD的发病是由于多个神经系统通路的功能障碍,影响多种神经递质的释放而出现各种运动、非运动症状及体征的<sup>[1-2]</sup>。PD核心的病理表现是中枢神经系统DA能神经元退化导致的纹状体中DA减少,所以目前药物治疗多数是通过增加黑质纹状体中的DA水平来缓解症状<sup>[3]</sup>。然而通过服用药物补充DA会导致脑内DA水平在空间和时间上分布不受调节,容易引发多种副作用。例如,长期服用左旋多巴会出现异动症,“剂末效应”及“开-关现象”<sup>[4]</sup>。鹿茸是雄性梅花鹿(马鹿)尚未骨化带有茸毛的幼角,具有补肾阳,益精血,强筋骨等功效,其主要活性成分为多肽和蛋白质<sup>[5]</sup>。研究发现鹿茸多肽可以有效抑制6-羟基多巴胺(6-OHDA)对大鼠造成神经损伤作用<sup>[6]</sup>。黑质和纹状体DA神经元变性缺失,纹状体内神经递质DA含量显著减少是PD发病的直接原因,而 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -syn)在DA细胞内的累积是PD发病机制中的关键因素,细胞中

$\alpha$ -syn的降解与自噬溶酶体途径密切相关<sup>[7]</sup>。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)在自噬诱导中发挥着重要的作用,mTOR激酶活化后可抑制自噬,相反抑制mTOR活化则能够激活自噬进程,而Akt则扮演促进mTOR活化的角色<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究发现,鹿茸多肽具有保护帕金森病体外模型神经元变性的作用,但是对其保护机制尚不明确。本研究使用鱼藤酮诱导SH-SY5Y细胞损伤模拟环境毒素引起的DA能神经元损伤,应用鹿茸多肽进行干预,观察鹿茸多肽体外实验中的神经保护作用及相关机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** SH-SY5Y神经细胞购自中国科学院上海生命科学研究院中国科学院细胞库,目录号SCSP-5014,已传至第10代。

**1.2 药品和试剂** DMEM培养基,胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为10313021,1091148);噻唑蓝(MTT),2',7'-二氯荧光黄二乙酸酯(DCFH-DA),罗丹明123(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为M8180,D6470,R8030); $\alpha$ -syn抗体(上海碧云天生物科技有限公司,批号AF8019);兔二步法检测试剂

盒(北京中杉金桥生物科技有限公司,批号PV-9001);蛋白激酶B(Akt),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体,鱼藤酮(英国Abcam公司,批号分别为ab179463,ab2731,ab143145);鲜梅花鹿茸片购自吉林省长春市鹏达牧业有限公司,由北京中医药大学东直门医院药学部主任曹俊岭教授鉴定为正品。

**1.3 仪器** R-210型旋转蒸发仪(瑞士步琦公司);JJ-CJ-1FD型超净工作台(苏州净化设备有限公司);HWS-150型恒温恒湿箱(上海森信);CKX41型倒置显微镜,VS120-S6-W型数字切片扫描系统,FV-1000型激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯株式会社);synergyH1型全自动酶标仪(德国Biotec公司)。

## 2 方法

**2.1 鹿茸多肽提取** 参照相关文献[9],自-80℃冰箱中取出鲜梅花鹿茸片,称取200 g置于烧杯中,用预冷过的双蒸水(4℃)反复冲洗至无血色;将洗净后的鹿茸放于破壁机中加入预冷的冰乙酸溶液(pH3.5)至800 mL,粉碎。所得混悬液于4℃,4 725 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清,加入无水乙醇使终体积分数达到55%,将溶液放置于4℃冰箱搅拌12 h,继续在4℃,4 725 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清。上清液在旋转蒸发仪(55℃)浓缩至50 mL。浓缩液置于真空冷冻干燥仪中48 h,得到梅花鹿茸多肽提取物23.96 g(得率为11.98%)。

**2.2 细胞培养** 细胞培养在含10%FBS,1% L-谷氨酰胺,1%(青霉素100 U·mL<sup>-1</sup>,链霉素100 g·L<sup>-1</sup>)的DMEM培养基中。培养条件37℃,5% CO<sub>2</sub>。每2 d传代1次。

**2.3 MTT比色法检测鱼藤酮对SH-SY5Y细胞的毒性作用** ①取对数生长期的SH-SY5Y细胞,以2×10<sup>4</sup>个/mL接种于96孔板中,每孔100 μL,置于恒温恒湿培养箱(5% CO<sub>2</sub> 37℃)中培养;②培养24 h,镜下观察细胞状态,细胞贴壁,形态正常,汇合度达到70%~80%;③分组与加药干预:空白组,加入完全培养基进行培养;模型组,分别加入用培养基稀释的终浓度为0.25,0.5,1,5,10,20,40,100 μmol·L<sup>-1</sup>的鱼藤酮溶液。每孔100 μL,每个浓度的鱼藤酮设5个复孔,置于恒温恒湿培养箱(5% CO<sub>2</sub> 37℃)培养;④20 h后用倒置相差显微镜观察细胞形态,并进行拍照,随后每孔加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT溶液10 μL,避光孵育4 h;⑤弃上清液,加入DMSO 150 μL,震荡10 min,酶标仪于490 nm处检测吸光度A,并根据其结果确定造模所使用的终浓度。

**2.4 MTT比色法检测鹿茸多肽对PD体外模型形**

态学的影响 ①取对数生长期的SH-SY5Y细胞,以2×10<sup>4</sup>个/mL接种于12孔板,每孔1 mL,置于的培养箱(5% CO<sub>2</sub> 37℃)中进行培养;②培养24 h,镜下观察细胞状态,细胞贴壁,形态正常,汇合度达到70%~80%;③分组与加药干预,空白组及模型组,加入完全培养基进行培养;鹿茸高、中、低剂量组,加入鹿茸多肽使终质量浓度分别为150,100,50 mg·L<sup>-1</sup>;雷帕霉素组,加入雷帕霉素使终质量浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>;④培养2 h,空白组加入磷酸盐缓冲液(PBS),其余各组均加入鱼藤酮使终浓度为0.5 μmol·L<sup>-1</sup>;⑤培养24 h,弃上清液,用PBS清洗3次,然后每孔加入10%甲醛1 mL,固定过夜。⑥进行HE染色,封片后显微镜下观察各组细胞内路易小体的变化并使用数字切片扫描系统扫描摄像。

**2.5 检测鹿茸多肽对体外模型线粒体膜电位ΔΨ的影响** ①取对数生长期的SH-SY5Y细胞,以2×10<sup>4</sup>个/mL接种于12孔板,每孔1 mL,置于恒温恒湿培养箱5% CO<sub>2</sub> 37℃中培养;②培养24 h,镜下观察细胞状态,细胞贴壁,形态正常,汇合度达到70%~80%;③分组与加药干预,空白组及模型组,加入完全培养基;鹿茸高、中、低剂量组,加入鹿茸多肽使终质量浓度分别为150,100,50 mg·L<sup>-1</sup>;雷帕霉素组,加入雷帕霉素使终质量浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>;④培养2 h,空白组加入PBS,其余各组均加入鱼藤酮使终浓度为0.5 μmol·L<sup>-1</sup>;⑤培养24 h,弃上清液,加入罗丹明123使终质量浓度为0.1 mg·L<sup>-1</sup>避光孵育15 min,随后激光共聚焦观察各组细胞荧光强度并摄像。

**2.6 检测鹿茸多肽对PD体外模型中活性氧簇(ROS)的影响** ①取对数生长期的SH-SY5Y细胞,以2×10<sup>4</sup>个/mL接种于12孔板,每孔1 mL,置于恒温恒湿培养箱(5% CO<sub>2</sub> 37℃)中培养;②培养24 h,镜下观察细胞状态,细胞贴壁,形态正常,汇合度达到70%~80%;③分组与加药干预:空白组及模型组,加入完全培养基进行培养;鹿茸高剂量组、中剂量组、低剂量组加入鹿茸多肽使终质量浓度分别为150,100,50 mg·L<sup>-1</sup>;雷帕霉素组加入雷帕霉素使终浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>;④培养2 h,空白组加入PBS,其余各组均加入鱼藤酮使终浓度为0.5 μmol·L<sup>-1</sup>;⑤培养24 h,弃上清液,加入H2DCFDA使终浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>,避光孵育15 min,随后用激光共聚焦在激发波长为485 nm处观察各组细胞荧光强度并摄像。

**2.7 检测鹿茸多肽对PD体外模型中 $\alpha$ -syn, Akt, mTOR蛋白表达** ①取对数生长期的SH-SY5Y细胞,以 $2 \times 10^4$ 个/mL接种于12孔板,每孔1 mL,置于恒温恒湿培养箱(5% CO<sub>2</sub> 37 °C)中培养;②培养24 h,镜下观察细胞状态,细胞贴壁,形态正常,汇合度达到70%~80%;③分组与加药干预:空白组及模型组,加入完全培养基进行培养;鹿茸高、中、低剂量组加入鹿茸多肽使终质量浓度分别为150, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup>;雷帕霉素组加入雷帕霉素使终质量浓度为10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>;④培养2 h,空白组加入PBS,其余各组均加入鱼藤酮使终浓度为0.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>;⑤培养24 h,弃上清液,PBS清洗3次,每孔加入10%甲醛1 mL固定过夜。⑥进行免疫组织化学染色, $\alpha$ -syn, Akt, mTOR一抗抗体稀释浓度分别为1:200, 1:300, 1:300,使用数字切片扫描系统观察各组细

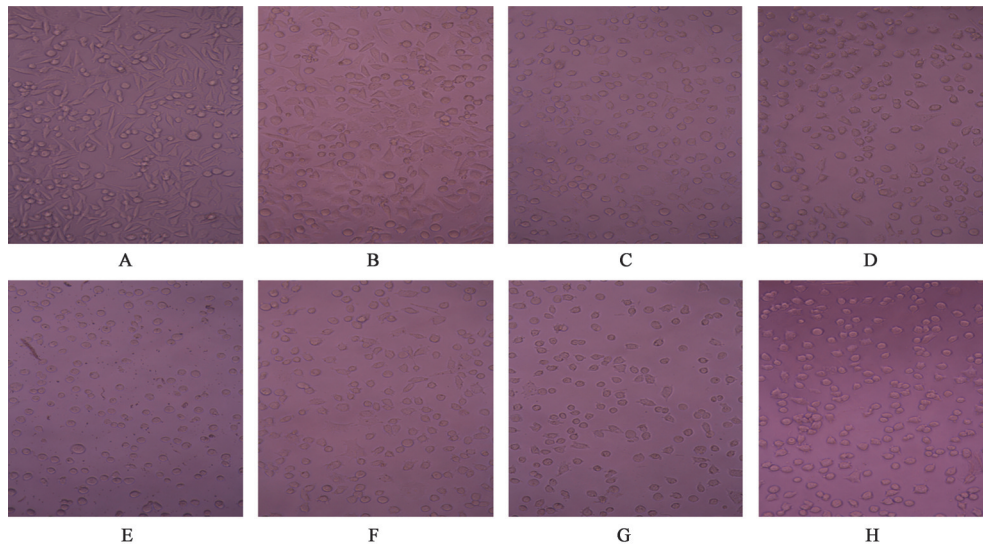
胞着色情况并摄像。

**2.8 统计学分析** 所有实验数据采用SPSS 20.0统计软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两个样品比较使用T检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 鱼藤酮对SH-SY5Y细胞形态及活性的影响

正常培养条件下的SH-SY5Y细胞呈梭形或多角形,贴壁生长,边缘清晰。与空白组比较,经不同浓度鱼藤酮处理后的细胞数目减少,突起减少或消失,形态多为圆形。MTT比色法检测显示,与空白组比较,经鱼藤酮处理后的细胞活性随鱼藤酮浓度的升高而降低( $P < 0.01$ )。其中鱼藤酮浓度0.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>组的细胞活性在50%左右,可作为后续模型用药剂量。见图1,表1。



A空白组;B-H.鱼藤酮0.25,0.5,1,5,20,40,100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>组

图1 鱼藤酮对SH-SY5Y细胞形态的影响(倒置相差显微镜,×200)

Fig. 1 Effect of rotenone on SH-SY5Y cells morphology(inverted microscope, ×200)

表1 鱼藤酮对SH-SY5Y细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of rotenone on activity of SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	细胞活性/%
空白	-	100
模型	0.25	89.51±1.33 <sup>1)</sup>
	0.5	53.54±2.26 <sup>1)</sup>
	1	49.14±1.43 <sup>1)</sup>
	5	40.02±1.17 <sup>1)</sup>
	10	33.34±1.74 <sup>1)</sup>
	20	25.27±1.21 <sup>1)</sup>
	40	21.23±0.67 <sup>1)</sup>
	100	17.42±0.72 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 3.2 鹿茸多肽对PD体外模型中路易小体的影响

空白组中SH-SY5Y细胞呈梭形或多角形贴壁生长,与空白组比较,模型组中细胞数目减少、触角结构变钝,形态变圆,胞质内可见嗜酸性路易小体。与模型组比较,雷帕霉素组及鹿茸多肽高、中、低剂量组的细胞形态并无明显差异,但是雷帕霉素组及鹿茸多肽高剂量组细胞中的lewy小体较少。见图2。

#### 3.3 鹿茸多肽对PD体外模型中线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的影响

与空白组比较,模型组中细胞线粒体膜电位明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,雷帕霉素组、鹿茸多肽高、中、低剂量组中细胞的线粒体膜电位明显降低( $P < 0.05$ ),表明鹿茸多肽能够减轻鱼藤酮对线粒体的损伤。见图3,表2。

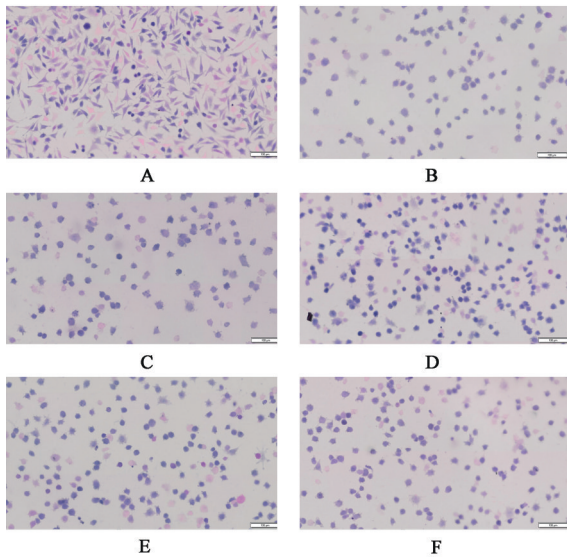


图2 鹿茸多肽对PD体外模型中lewy小体的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of velvet antler polypeptide on lewy bodies in PD model *in vitro* (HE, ×200)

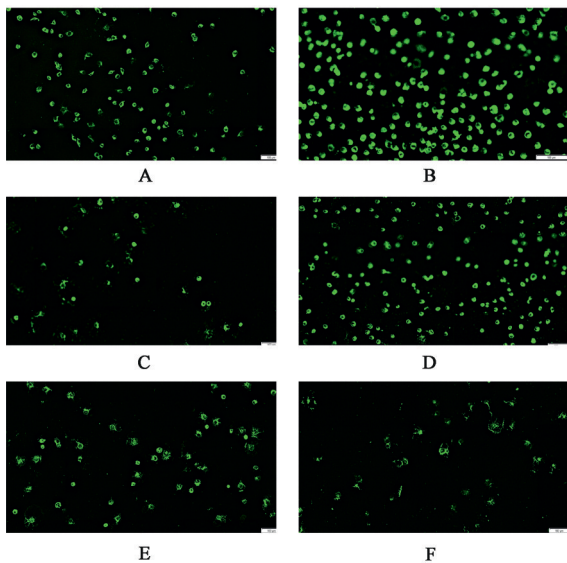


图3 鹿茸多肽对PD体外模型线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的影响(罗丹明123染色, ×100)

Fig. 3 Effect of velvet antler polypeptide on mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$  of PD model *in vitro* (Rhodamine 123 staining, ×100)

**3.4 鹿茸多肽对PD体外模型中ROS的影响** 与空白组比较,模型组中细胞ROS水平明显增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,雷帕霉素组及鹿茸多肽高、中、低剂量组中细胞ROS水平明显降低( $P < 0.05$ )。见图4,表3。

**3.5 鹿茸多肽对PD体外模型中 $\alpha$ -syn, Akt, mTOR蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组细胞中

表2 鹿茸多肽对鱼藤酮诱导的SH-SY5Y细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of velvet antler polypeptide on rotenone-induced SH-SY5Y cell mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	线粒体膜电位
空白	-	0.16±0.02
模型	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.23±0.03 <sup>1)</sup>
雷帕霉素	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.16±0.01 <sup>2)</sup>
鹿茸多肽	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.17±0.02 <sup>2)</sup>
	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.16±0.01 <sup>2)</sup>
	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.16±0.02 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表3~7同)。

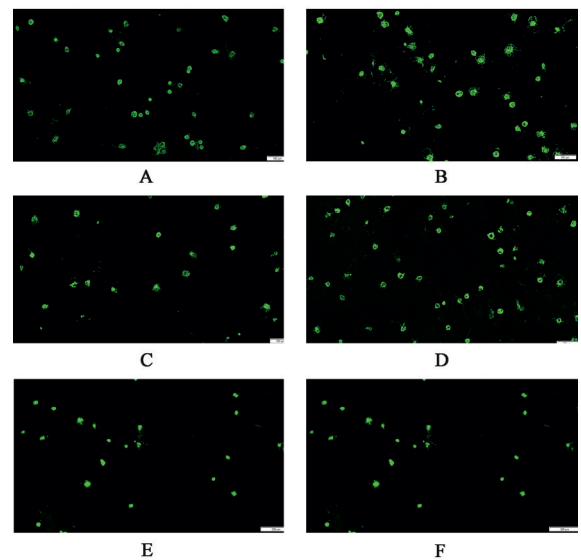


图4 鹿茸多肽对PD体外模型中ROS含量的影响(DCFH-DA, ×100)

Fig. 4 Effect of velvet antler polypeptide on ROS content in PD model *in vitro* (DCFH-DA, ×100)

表3 鹿茸多肽对PD体外模型中ROS含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of velvet antler polypeptide on ROS content in PD model *in vitro* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	ROS含量
空白	-	0.13±0.02
模型	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.24±0.02 <sup>1)</sup>
雷帕霉素	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.18±0.01 <sup>2)</sup>
鹿茸多肽	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.18±0.02 <sup>2)</sup>
	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.17±0.01 <sup>2)</sup>
	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.15±0.03 <sup>2)</sup>

$\alpha$ -syn, Akt, mTOR蛋白表达明显增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,雷帕霉素组及鹿茸多肽高、中剂量组中 $\alpha$ -syn, mTOR蛋白表达均明显减少( $P < 0.05$ );雷帕霉素组及鹿茸多肽高剂量组中Akt表达明显减少( $P < 0.05$ )。见图5~7,表4。

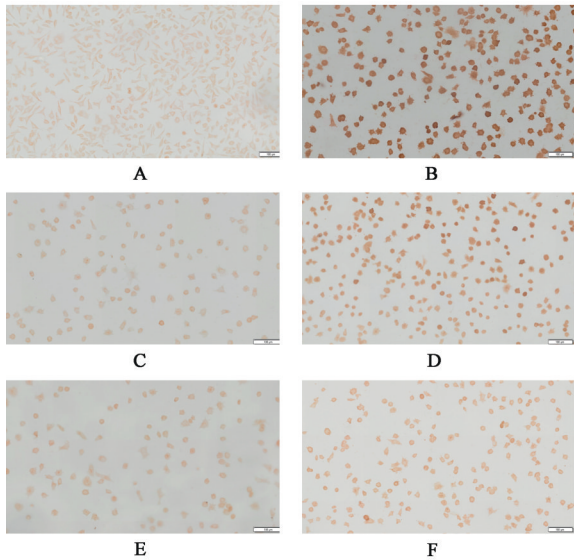


图5 鹿茸多肽对PD体外模型中 $\alpha$ -syn表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 5 Effect of velvet antler polypeptide on  $\alpha$ -syn expression in PD model *in vitro* (IHC,  $\times 200$ )

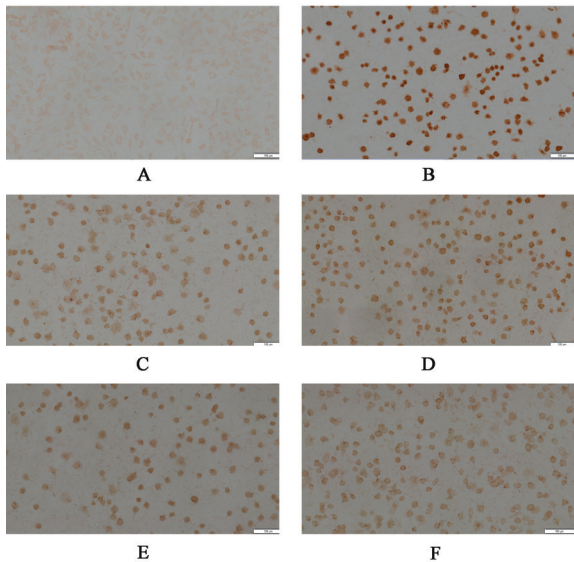


图6 鹿茸多肽对PD体外模型中Akt表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 6 Effect of velvet antler polypeptide on Akt expression in PD model *in vitro* (IHC,  $\times 200$ )

#### 4 讨论

PD是一种进行性神经系统退行性疾病,其病理表现为黑质致密部DA神经元内 $\alpha$ -syn在胞质内聚集及路易小体的形成。研究认为PD可能是遗传因素及环境毒素之间复杂的相互作用造成的<sup>[3]</sup>,其发病过程涉及到 $\alpha$ -syn的聚集、氧化应激、线粒体功能障碍、线粒体自噬等<sup>[10]</sup>。鹿茸已被报道具有多种特性如抗炎、抗氧化应激、抗衰老<sup>[11]</sup>,诱导神经干细胞分化为神经元等作用<sup>[12]</sup>。

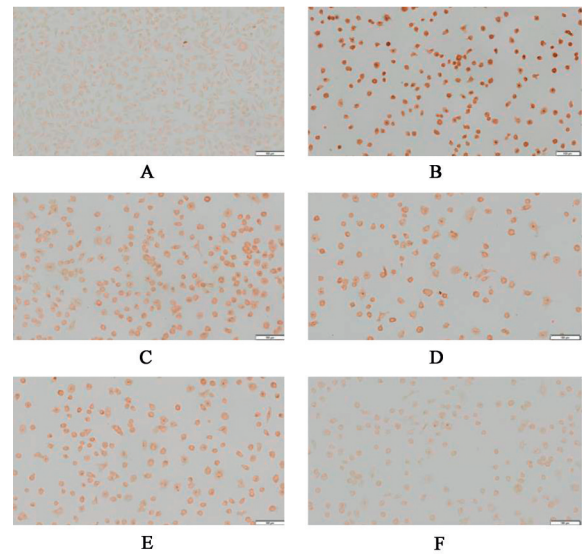


图7 鹿茸多肽对PD体外模型中mTOR表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 7 Effect of velvet antler polypeptide on mTOR expression in PD model *in vitro* (IHC,  $\times 200$ )

鱼藤酮是一种广泛存在于自然界的环境毒素,进入人体后能够选择性地在DA神经元中聚集,抑制线粒体复合物I的活性,引起线粒体功能障碍,蛋白降解异常, $\alpha$ -syn蛋白堆积,最终导致DA神经元变性缺失,出现PD相关的症状<sup>[13]</sup>。 $\alpha$ -syn在DA神经元内的累积及胞质内路易小体的形成是PD的主要病理表现<sup>[14]</sup>,而自噬是 $\alpha$ -syn蛋白降解的途径之一。自噬能够降解和回收利用细胞内的长寿蛋白、蛋白质聚集体及某些细胞器,短期内的自噬可以清除细胞内的异常蛋白及细胞器,维持细胞的正常功能,但是过度的自噬也会引起细胞凋亡<sup>[15]</sup>。Akt/mTOR信号通路是调节自噬水平的关键通路,Akt的活化可以激活mTOR,mTOR能够与自噬过程中的关键复合物ULK复合体结合并令其失活,从而发挥抑制自噬的作用<sup>[16]</sup>。本实验使用浓度为 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的鱼藤酮作用于SH-SY5Y细胞株建立帕金森病PD体外模型,研究鹿茸多肽对PD体外模型的保护作用。结果显示,模型组细胞质中出现大量路易小体,而空白组、鹿茸多肽高、中、低剂量组中没有或仅有少量路易小体;PD体外模型中,细胞形态发生明显变化,呈现圆形且附着力弱,容易掉落,细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi$ 很高,ROS含量明显高于正常组,鹿茸多肽作用后,各组形态学和空白组稍有差异,高、中剂量组细胞活力正常;细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi$ 降低明显,ROS含量也趋于正常,这说明鹿茸多肽对PD体外模型具有明显的保护作用。不仅

表4 鹿茸多肽对PD体外模型中 $\alpha$ -syn, Akt, mTOR蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of velvet antler polypeptide on  $\alpha$ -syn, Akt, and mTOR expression in PD model *in vitro* ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度	$\alpha$ -syn	Akt	mTOR
空白	-	0.17±0.04	0.30±0.03	0.17±0.02
模型	0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.26±0.02 <sup>1)</sup>	0.38±0.02 <sup>1)</sup>	0.26±0.03 <sup>1)</sup>
雷帕霉素	0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.13±0.03 <sup>2)</sup>	0.31±0.03 <sup>2)</sup>	0.17±0.03 <sup>2)</sup>
鹿茸多肽	0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.23±0.03	0.37±0.03	0.22±0.02
	0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.21±0.02 <sup>2)</sup>	0.36±0.04	0.20±0.01 <sup>2)</sup>
	0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.17±0.03 <sup>2)</sup>	0.31±0.03 <sup>2)</sup>	0.19±0.02 <sup>2)</sup>

如此,本研究还发现,PD体外模型组中 $\alpha$ -syn, Akt, mTOR的表达均高于空白组,而鹿茸多肽高、中剂量组能明显降低该分子的表达,这说明, Akt/mTOR信号通路参与鹿茸多肽对PD体外模型的保护作用,提高细胞自噬水平,促进 $\alpha$ -syn的降解,降低细胞线粒体膜电位和活性氧簇,从而发挥神经元保护作用。

综上所述,鹿茸多肽能够减少 $\alpha$ -syn的累积,减轻鱼藤酮诱导的SH-SY5Y细胞损伤,缓解线粒体损伤及氧化应激,减少胞质中路易小体的形成。其潜在的作用机制可能是鹿茸多肽能够调节Akt/mTOR信号通路影响自噬水平,促进 $\alpha$ -syn的降解,从而发挥神经保护作用。

[参考文献]

[ 1 ] BOHNEN N I, KANEL P, MÜLLER M. Molecular imaging of the cholinergic system in Parkinson's disease [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2018, 141 (4) : 211-250.

[ 2 ] PAGANO G, POITIS M. Molecular imaging of the serotonergic system in Parkinson's disease[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2018, 141(5): 173-210.

[ 3 ] PARMAR M, GREALISH S, HENCHCLIFFE C. The future of stem cell therapies for Parkinson disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21(2): 103-115.

[ 4 ] PICCONI B, HERNÁNDEZ L F, OBESO J A, et al. Motor complications in Parkinson's disease: striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias[J]. *Mov Disord*, 2018, 33(6): 867-876.

[ 5 ] SUI Z G, ZHANG L H, HUO Y S, et al. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87: 229-240.

[ 6 ] 李超华. 鹿茸蛋白提取方法的建立和神经保护作用

研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2016.

[ 7 ] XILOURI M, BREKK O R, STEFANIS L. Autophagy and alpha-synuclein: relevance to Parkinson's disease and related synucleopathies[J]. *Mov Disord*, 2016, 31 (2): 178-192.

[ 8 ] KA M, SMITH A L, KIM W Y. MTOR controls genesis and autophagy of gabaergic interneurons during brain development [J]. *Autophagy*, 2017, 13 (8): 1348-1363.

[ 9 ] 张郑瑶, 段冷昕, 周秋丽, 等. 梅花鹿茸多肽的化学结构及生物活性[J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(9): 2000-2004.

[ 10 ] 梁建庆. 帕金森病的发病机制、诊断标准及治疗策略 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(8): 631-635.

[ 11 ] CHUNHUI Y, WENJUN C, HUI W, et al. Pilose antler peptide protects osteoblasts from inflammatory and oxidative injury through EGF/EGFR signaling[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 99(7): 15-20.

[ 12 ] LI H Z, ZHI J Z, YA N S, et al. Velvet antler polypeptide is able to induce differentiation of neural stem cells towards neurons *in vitro* [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(3): 308-313.

[ 13 ] 陈春暖, 陈祥荣, 蔡若蔚, 等. 鱼藤酮建立帕金森病细胞模型的方法研究[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2015, 22(6): 402-407.

[ 14 ] JELLINGER K A. Neuropathology of Parkinson's disease [J]. *J Neuropath Exp Neur*, 2014, 55 (3) : 259-272.

[ 15 ] 王越. 鱼藤酮诱导 SH-SY5Y 帕金森模型中对 FOXO3a 在自噬凋亡中作用的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.

[ 16 ] ZENG Y C, HUO G, MO Y B, et al. MIR137 regulates starvation-induced autophagy by targeting ATG7 [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 569(4): 815-821.

[责任编辑 张丰丰]