

蛇足石杉内生真菌 g5 的乙酰胆碱酯酶抑制活性初步研究

承曦¹ 陈钧^{1*} 朱大元²

(1. 江苏大学药学院 镇江 212013)

(2. 中国科学院上海生命科学研究院上海药物研究所新药研究国家重点实验室 上海 201023)

摘要: 为了初步研究蛇足石杉内生真菌g5 发酵产物的乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制动力学以及对该株真菌做初步形态学鉴定,采用DTNB显色法检测g5 发酵液醇提物抑制AChE活性的效果,并采用玻片培养法进行真菌鉴定。结果发现g5 菌株属于半知菌目丛梗孢科青霉属;其发酵液醇提物对AChE的抑制作用表现为混合竞争型可逆抑制,其对游离酶的抑制常数 K_I 与对酶底物络合物的抑制常数 K_{IS} 分别为 0.0789 mL和 1.1352 mL,因此g5 菌株代谢产物可作为开发AChE抑制剂类药物的潜在资源。

关键词: 乙酰胆碱酯酶, 蛇足石杉, 内生真菌

Initially Research in Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Endophytic Fungi g5 Isolated from *Huperzia serrata*

CHENG Xi¹ CHEN Jun^{1*} ZHU Da-Yuan²

(1. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

(2. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Medicines, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201023)

Abstract: It was about the initially research in the kinetics of inhibiting acetylcholinesterase(AChE) of endophytic fungi g5 which Isolated from *Huperzia serrata*. In addition, morphologic determination was done with this fungus. The effect of EtOH extraction from g5 fermentative product on the inhibiting AChE was detected by coloration of DTNB method, and this fungus was determinated by slide culture. The result is that g5 belongs to *Penicillium rugulosum*. According to Initially analysis of enzyme kinetics, it was showed that g5 was admixed competitive reversible inhibitory type, and the inhibit-constant K_I against free E and K_{IS} against comoles compound of E_S is 0.0789 mL and 1.1352 mL, respectively. The metabolic product of g5 can be developed as potential drugs which is not only conspicuous but also reversible inhibiting AChE *in vitro*.

Keywords: Acetylcholinesterase, *Huperzia serrata*, Endophytic fungi

老年痴呆症(Alzheimer disease, AD)是一种严重危害人类健康的疾病。它的发病机理之一是在神经冲动传输过程中缺乏乙酰胆碱。乙酰胆碱酯酶(acetylcholine esterase, AChE)能分解乙酰胆碱,因此治疗AD的一个策略就是用AChE抑制剂来减少ACh的消耗,从而提高胆碱能神经元的兴奋性,达到治疗的效果^[1]。蛇足石杉(*Huperzia serrata*(Thunb.) Trev.)为珍贵药用植物,从中提到的石杉碱甲^[2](huperzine A, HupA)是我国发现的高选择性可逆AChE抑制剂。

按照内共生与协同进化观点,植物内生真菌已被证明能够产生与宿主相同或相似的生理活性成分^[3]。本研究组从蛇足石杉植株内分离得到g5菌株,其发酵产物具有显著的AChE抑制活性。早在80年代,国外学者已从大量微生物发酵产物中筛选出拮抗AChE的化合物^[4],但由于其不可逆抑制AChE酶催化中心,使酶彻底失活,具有强烈的神经毒性^[5],无法用于治疗AD症,只能作为灭害虫的农药。因此本文对g5菌株抑制AChE的效果进行抑制类型甄别,并做动力学分析,最后对该菌株做初步的形态学鉴定。

1 材料和方法

1.1 供试内生真菌

供试用g5内生真菌由本实验室李娜博士从安徽宣城地区野生蛇足石杉植株根中分离得到,经纯化后现保藏于江苏大学生药理学实验室。

1.2 试剂及仪器

碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCh)(D-8130)、5,5-二硫代-2-硝基苯甲酸(dithio-bis-nitrobenzoic acid, DTNB)(A-5751)和HupA纯品购自Sigma公司;高氯酸,国药集团化学试剂有限公司AR级;医用95%乙醇,山东广源医药酒精有限公司;spectra MAX190多功能酶标仪,美国Molecular Devices产品;R200/V旋转蒸发仪,德国BUCHI公司产品;奥林巴斯BX41系统显微镜,日本奥林巴斯TDL-5-A飞鸽离心机,上海安亭科学仪器制造厂产品;SPX-250B生化培养箱,上海跃进集团产品;QYC-211摇床,上海福玛试验设备有限公司;SW-CJ-2FD超净工作台,苏净集团产品;U-410超低温冰箱,英国New Brunswick Scientific公司。

鉴定用培养基^[15]:PDA培养基;Czapek's培养基;

Sabouroud's培养基;McClary培养基;酵母浸膏琼脂培养基;以上培养基用单蒸水按比例配制,1×10⁵ Pa高压灭菌20 min,倾入无菌皿中冷却待用。

发酵液制备:采用马铃薯葡萄糖液体培养基培养蛇足石杉内生真菌,28°C、120 r/min发酵10 d,做为供试发酵液,供试发酵液共计500 mL。

蛇足石杉内生真菌发酵产物的粗制:供试发酵液反复冻融破碎菌丝体细胞,再经95%乙醇醇沉除杂蛋白、多糖,浓缩成醇浸膏。用5 mL热水温浸,充分混匀制成醇提物样品。取10 μL稀释100倍用于对AChE抑制动力学研究。

AChE粗提物的制备:取小鼠大脑组织制成1%组织匀浆,即为AChE粗提物。

AChE抑制活性检测的基本操作过程:采用DTNB显色法^[6]并做适当改进,在EP管中加入发酵醇提物样品或HupA标准品、AChE粗提物50 μL、ATCh30 μL,磷酸缓冲液补平体系至终体积为390 μL,混和恒温37°C孵育30 min,加10 μL 6%高氯酸,振荡混匀,室温下终止反应20 min,9184×g离心1 min,取上清液,移入96孔板上,每孔100 μL,计3孔,加DTNB 100 μL反应显色(整个反应体系为200 μL)5 min,410 nm^[7]处酶标仪检测OD值。

1.3 体外AChE粗酶检测方法的评价

本文采用的体外AChE粗酶检测方法原理是:酶水解乙酰胆碱,生成有色的产物。有报道称不同来源的酶活性各不相同,因此本文通过检测HupA的IC₅₀,作为此方法的评价基础。

1.4 g5菌株发酵醇提物的AChE抑制动力学研究

1.4.1 g5菌株发酵醇提物的AChE抑制可逆性判别^[8]:发酵液醇提物样品稀释100倍后,取300 μL移入EP管中。再移入磷酸缓冲液340 μL,AChE粗酶液100 μL,37°C孵育5 min。再加入ATCh 60 μL,立即把混合液按不同体积加入96孔板中,并用PBS补平反应体系至140 μL,37°C孵育30 min,再加10 μL 6%高氯酸终止反应,最后每孔加100 μL的DTNB反应显色。410 nm处检测OD值。对照组不加菌株发酵醇提物样品,其他条件都与样品组一致。每组试验重复3次,取平均值。用OD值代替反应初速度v₀,对粗酶用量作图。

1.4.2 g5菌株发酵醇提物的AChE可逆抑制动力学分析:设300 μL和150 μL用量的g5发酵液样品为高、低剂量抑制剂组;设不加抑制剂为阴性对照组;

AChE粗提物用量一定; ATCh用量分为6个梯度: 60 μL 、50 μL 、40 μL 、30 μL 、20 μL 和10 μL ; 磷酸缓冲液补平体系。96孔板上用DTNB显色, 用OD值替代酶反应初速度 v_0 。3次重复, 取平均值。运用SoftMax Pro v5软件, 通过绘制米氏方程的衍生式Lineweaver-Burk方程计算 V_{\max} 、 K_m , 判断g5发酵液样品对AChE抑制作用的机理^[9]。运用SPSS EnzymeKinetics 1.10酶动力学分析软件, 结合SigmaPlot2001作图软件绘制米氏方程的衍生式L-B双倒数方程, 计算抑制常数。

1.5 g5菌株的形态学鉴定

用玻片培养法进行真菌鉴定^[10]。将菌落接种至不同鉴定培养基上, 以接种点为顶点放置20 mm \times 20 mm的消毒盖玻片, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养。当菌丝沿着盖玻片的两边生长时将玻片取出, 正面贴在载玻片上, 观察其菌丝、孢子梗、分生孢子的形态、着生方式及大小。综合菌落及显微产孢形态, 按丝状真菌分类鉴定方法, 以魏景超系统为参照, 确定g5菌株的种属地位。

采用SPSS13.0统计软件对所得结果进行一元方差分析(One-way ANOVA)

2 结果与分析

2.1 石杉碱甲 IC_{50} 的计算

如图1所示, HupA抑制AChE粗酶的 IC_{50} 为0.213 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$), 与文献报道结果^[11]接近, 且在此检测方法中, HupA对AChE粗酶抑制呈剂量依赖性关系。说明采用小鼠脑提取的AChE粗酶能够用于AChE抑制活性研究, 方法合理可靠。

2.2 g5菌株发酵醇提物AChE抑制动力学研究

2.2.1 对g5菌株发酵醇提物的AChE抑制可逆性的判别: 如图2所示, 随着酶用量的增大, g5菌株发酵液醇提物样品对AChE抑制程度逐渐变低, 呈向下弯曲的曲线。表明g5发酵液样品和酶的结合导致酶活力受抑制, 并不导致酶催化活性中心分子构象的永久变化而失活, 表现为可逆抑制作用。抑制类型是一个很重要的指标, 如果是不可逆抑制, AChE将永久损害, 进而引起神经系统紊乱, 譬如许多含磷化合物, 对AChE为不可逆抑制剂, 对神经有很强的毒性^[5,12]。而筛选得到的g5发酵液样品为可逆抑制型, 在体内将不会对神经系统造成不可逆

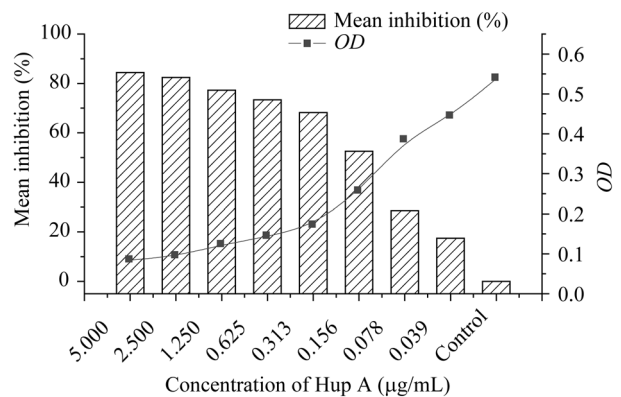


图1 不同浓度HupA对AChE粗酶的抑制效果

Fig. 1 The effects of different concentration of HupA inhibiting AChE

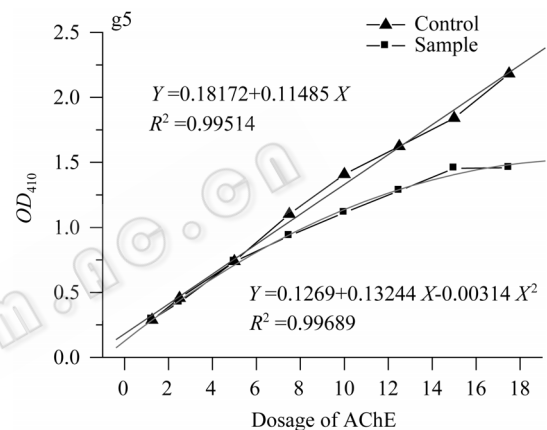


图2 g5发酵醇提物对AChE抑制类型判别

Fig. 2 Diagnosis the inhibitory type of g5 fermentative product

损害。

2.2.2 g5菌株发酵醇提物的AChE可逆抑制动力学分析(表1): 通过两个米氏方程的转换式计算 K_m 、 V_{\max} , 确定g5菌株发酵醇提物的可逆抑制类型。由 $K_m[300] > K_m[150] > K_m[\text{control}]$ 、 $V_{\max}[300] < V_{\max}[150] < V_{\max}[\text{control}]$, K_m 随着g5发酵液样品用量的增大而增大, 而 V_{\max} 则相反。因此其抑制机理表现为混合竞争抑制。表明g5菌株发酵物既能作用于AChE的游离酶, 又可作用于AChE与底物的络合物。

根据袁勤生的两次作图法^[13], 以Lineweaver-Burk双倒数图的各条直线斜率以及纵轴截距分别对g5发酵液样品作图(图3a、图3b), 如图3所示, 均为一直线, 求得g5发酵液样品对游离酶的抑制常数 K_I 与对酶底物络合物的抑制常数 K_{IS} 分别为0.0789 mL

表 1 g5 菌株可逆抑制类型的判别
Table 1 The discrimination of the g5's reversible inhibitory type

g5 发酵液用量(μL) Fermentative product of g5	$R^2 \pm s$	$K_m \pm s$	$V_{\max} \pm s$	可逆抑制类型 Reversible inhibitory type
300	0.956 ± 0.018	8.3 ± 0.87	1.4 ± 0.10	混合竞争型
150	0.966 ± 0.016	6.7 ± 1.81	1.6 ± 0.21	
0	0.938 ± 0.038	2.1 ± 0.61	1.8 ± 0.21	

Note: $n=3, \bar{x} \pm s$

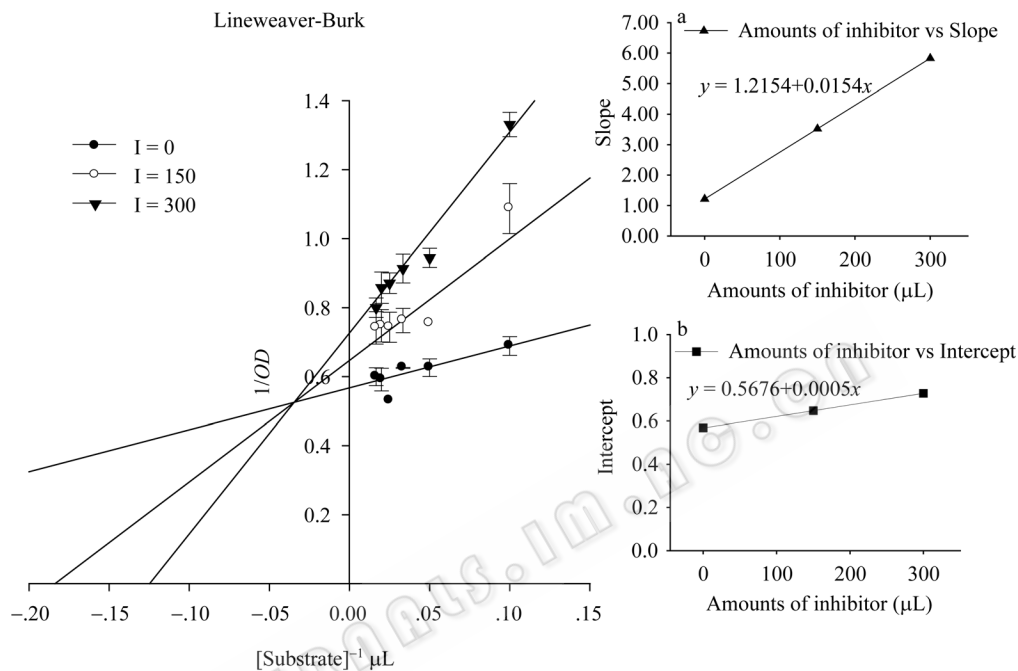


图 3 以 Lineweaver-Burk 双倒数图的各条直线斜率及纵轴、截距分别对 g5 发酵液样品作图
Fig. 3 The Lineweaver-Burk figure of g5 fermentative product inhibiting AchE

和 $1.1352 \text{ mL}^{[14]}$ 。

2.3 g5 菌株的形态学鉴定

如图 4 所示, g5 个体形态特征显示, 分生孢子梗近乎光滑, 分生孢子梗顶端成对称帚状间枝, 顶

层为小梗, 切离法生成分生孢子; 分生孢子串呈不分枝链状, 分生孢子多为椭圆形。据此判断 g5 为半知菌目丛梗孢科青霉属^[15], 进一步的分子生物学鉴定正在进行中。

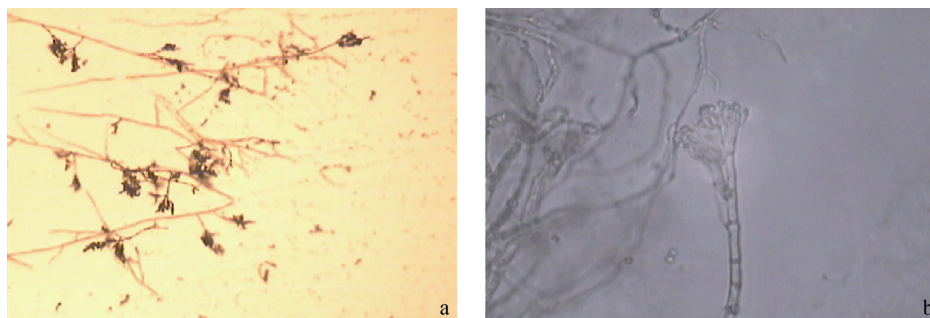


图 4 g5 菌株显微形态
Fig. 4 The micromorph of g5

注: a: 酵母浸膏琼脂培养基上($\times 40$); b: PDA 培养基上($\times 100$)

Note: a: Growth on yeast extract agar medium ($\times 40$); b: Growth on PDA medium ($\times 100$)

3 结论

1) 蛇足石杉内生真菌g5 发酵物对小鼠脑AChE粗酶具有混合竞争性可逆抑制作用, K_i 和 K_{IS} 分别为0.0789 mL和1.1352 mL。g5 发酵液样品对游离酶的抑制作用强度是对酶底物络合物抑制作用强度的14倍。表明g5 发酵液样品与游离酶的结合作用比与酶-底物络合物的结合强, 且这一结果与文献报道的HupA抑制类型相一致^[16]。

2) 初步形态学鉴定g5 菌株是半知菌目丛梗孢科青霉属(*Penicillium rugulosum*)。青霉属真菌种类多、分布广, 且其次生代谢产物具有各种活性。日本学者Kazuhiko等就从一株青霉属真菌(*Penicillium* sp. FO-4259)中发现了高效选择性可逆抑制AChE的化合物Arisugacin A, 目前正应用开发成治疗AD症药物^[17]。

参 考 文 献

- [1] 韩大雄, 杨 频. 老年痴呆症的分子病理机制. 化学通报, 2003, **12**(2): 100-103.
- [2] Xiaoqiang Ma, Changheng Tan, Dayuan Zhu, *et al.* Huperzine A from *Huperzia* species-An ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, **113**: 15-34.
- [3] Strobel GA. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9**(3): 240-244.
- [4] Kurokawa T, Suzuki K, Hayaoka T. Cyclophostin, acetylcholinesterase inhibitor from *Streptomyces laendulae*. *J Antibiot*, 1993, **46**: 1315-1318.
- [5] Saskia Eckert, Peter Eyer, Harald Mückter, *et al.* Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. *Biochemical Pharmacology*, 2006, **72**: 344-357.
- [6] Ellman GL, Courtney KD, Andre V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961, **7**: 88-95.
- [7] B Vinutha, D Prashanth, K Salma, *et al.* Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of ethnopharmacology*, 2007, **109**: 359-363.
- [8] 郭 勇, 郑穗平. 酶学. 广州: 华南理工大学出版社, 2000, pp.95-97.
- [9] 龚仁敏. 酶可逆抑制作用中线性混合型抑制的动力学. 安徽师大学报, 1998, **21**(1): 46-49.
- [10] 周德庆. 微生物学实验方法. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, p.245.
- [11] 杜晓华. 观赏植物马尾杉内生菌及其次生代谢产物对AChE 的抑制活性. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003, pp.43-45.
- [12] Rosenfeld C, Kousba A, Sultatos LG. Interactions of rat brain acetylcholinesterase with the detergent Triton X-100 and the organophosphate paraoxon. *Toxicol Sci*, 2001, **63**: 208-213.
- [13] 袁勤生. 现代酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 2001, pp.31-36.
- [14] 林 敏, 何 群, 陈清西. 没食子酸衍生物对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理. 厦门大学学报, 2006, **45**(4): 567-569.
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979, pp.501-512.
- [16] Xiaoqiang Ma, Changheng Tan, Dayuan Zhu, *et al.* Huperzine A from *Huperzia* species-An ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, **113**: 15-34.
- [17] Kazuhiko Otoguro, Fumiyoshi Kuno, Satoshi Omura. Arisugacins, selective acetylcholinesterase inhibitors of microbial origin. *Pharmacology & Therapeutics*, 1997, **76**: 45-54.