



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113876929 A

(43) 申请公布日 2022.01.04

(21) 申请号 202111389409.3

(22) 申请日 2021.11.22

(71) 申请人 中国人民解放军陆军军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30号

(72) 发明人 赛燕 肖靖淞 叶枫 程晋

张启夫 单耀辉 但国蓉 张玺

赵远鹏 邹仲敏

(74) 专利代理机构 重庆志合专利事务所(普通

合伙) 50210

代理人 胡荣琿

(51) Int. Cl.

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

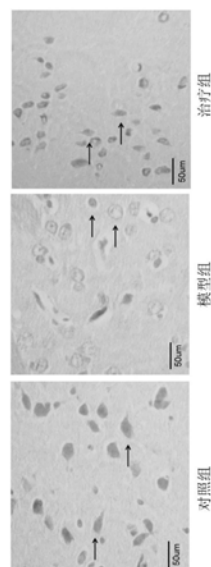
序列表1页 附图7页

(54) 发明名称

肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用,本发明所述肽MOTS-c能够降低鱼藤酮诱导的帕金森大鼠动物模型中脑氧化应激损伤水平,保护大鼠中脑黑质纹状体多巴胺能神经元,并减少多巴胺能神经元的丢失,显著提高纹状体的多巴胺水平,有效改善帕金森大鼠神经行为学症状。因此,肽MOTS-c在制备抗帕金森药物中具有重要的应用意义。



1. 肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述帕金森为由鱼藤酮诱导的。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述肽MOTS-c的氨基酸序列如SEQ.ID.NO.1所示。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述药物为多巴胺能神经元的保护剂。
5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述药物可增加纹状体多巴胺的含量。
6. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述药物采用腹腔注射的方式给药。
7. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述药物的用量为3-5mg/kg/日。

肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,特别涉及一种肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用。

背景技术

[0002] 帕金森病(Parkinson's disease,PD)是全球第二大常见的神经退行性疾病,其发病率随着年龄增长而增高,严重影响中老年人的身体健康及生活质量。PD的主要病理特征是中脑黑质多巴胺神经元的缺失和路易小体(Lewy body)形成,随着纹状体多巴胺的减少,出现静止性震颤、肌肉强直、运动迟缓、姿态步态异常等常见的临床表现,症状呈进行性发展,严重时患者生活不能自理。目前其病因尚未完全清楚,主要认为是遗传,环境和衰老等多种因素共同相互作用的结果,尤其是环境因素在散发性PD发病机制中具有重要作用。大量的流行病和小动物实验研究发现农药鱼藤酮与PD发病相关,鱼藤酮染毒大鼠可成功构建拟PD的动物模型。在已经公认的PD发病机制中,氧化应激是导致黑质纹状体多巴胺能神经元损伤的重要因素,在PD发病进程中发挥重要的作用。

[0003] 目前PD主要以药物治疗为主,常用的多巴胺前体左旋多巴可以通过血脑屏障进入脑内,代谢为多巴胺后补充内源性多巴胺缺乏,以缓解PD的症状。但是,大多数患者在长期用药后,其疗效逐渐减退,且出现各种运动并发症(包括开关现象,易动症等),反而进一步增加了治疗难度。尽管目前临床上开始采用多种联合用药的方法以延长药物使用时间,但是仍然未能取得良好的临床治疗效果。因此寻找治疗PD的新药是神经科学方向重要的研究方向。随着对PD发病机制认识的深入,从多环节入手,着重保护多巴胺能神经元也成为了新的治疗PD药物的研发思路之一。

[0004] 线粒体衍生肽(mitochondrial derived peptides,MDPs)是线粒体DNA(Mitochondrial DNA,mtDNA)开放阅读框编码的具有生物活性的短肽,参与机体代谢稳态的调节,在人体内发挥广泛的生理作用。已有的研究指出,MOTS-c作为目前已知的三种内源性MDPs之一,其可参与调节线粒体生物学功能,影响线粒体介导的代谢过程,是研究线粒体相关疾病重要的靶点。此外,肽MOTS-c可在代谢应激条件下保护细胞,还参与糖脂代谢等过程,并发挥调节胰岛素抵抗,改善脂质沉积,调节骨代谢等多种作用。不仅如此,由于多肽类药物具有高效能、高选择性、作用靶点广泛及潜在毒性低等优点,使得肽MOTS-c具有巨大的研究价值和应用前景。

[0005] 然而,肽MOTS-c发挥作用的机制还未完全阐明,目前也没有相关肽MOTS-c可用于治疗帕金森病的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用,所述肽MOTS-c治疗由鱼藤酮诱导的帕金森效果显著,其可以降低大鼠中脑的氧化损伤水平,保护多巴胺神经元,显著减少纹状体多巴胺神经元的丢失,并提高纹状体多巴胺的含量,进一步改善大鼠

神经行为学症状,为帕金森病的治疗药物提供了新的选择。

[0007] 本发明的技术方案是:

[0008] 肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用。

[0009] 所述帕金森为由鱼藤酮诱导的。

[0010] 所述肽MOTS-c的氨基酸序列如SEQ.ID.NO.1所示。

[0011] 所述药物为多巴胺能神经元的保护剂。

[0012] 所述药物增加纹状体多巴胺的含量。

[0013] 所述药物采用腹腔注射方式给药。

[0014] 所述药物的用量为3-5mg/kg/日。

[0015] 本发明用鱼藤酮诱导帕金森大鼠模型,鱼藤酮使用梯度给药,第一阶段注射剂量为2mg/kg,共给药3天。第二阶段注射剂量为1mg/kg,共给药7天。第三阶段注射剂量为0.5mg/kg,共给药20天。合计给药30天,建立鱼藤酮诱导大鼠帕金森动物模型。治疗组给予模型组腹腔注射MOTS-c,持续30天,剂量为3-5mg/kg。

[0016] 申请人的动物实验证明,肽MOTS-c能显著改善鱼藤酮诱导的帕金森大鼠的神经行为症状。肽MOTS-c能降低帕金森大鼠中脑内的氧化损伤水平,进一步保护大鼠多巴胺神经元,减少纹状体多巴胺神经元的丢失,并显著提高纹状体内的多巴胺的含量。在行为学方面,大鼠在新环境下的自主探索行为和运动协调情况均得到了显著的改善。提示肽MOTS-c为治疗PD提供了一种新的思路。

附图说明

[0017] 图1为大鼠中脑氧化损伤水平的检测结果,其中,

[0018] A为MDA(丙二醛)含量检测结果;图B为GSH(谷胱甘肽)含量的检测结果;图C为SOD(超氧化物歧化酶)活性的检测结果(注:* $P<0.05$,模型组与对照组比较;** $P<0.01$,模型组与对照组比较;# $P<0.05$,治疗组与模型组比较)

[0019] 图2为大鼠纹状体HE染色结果,其中,箭头所指位置为细胞核。

[0020] 图3为大鼠纹状体免疫组化的结果,其中,A为各组纹状体免疫组化染色(TH)结果;B为各组TH阳性面积的统计结果(注:* $P<0.05$,模型组与对照组比较;** $P<0.01$,模型组与对照组比较;# $P<0.05$,治疗组与模型组比较)。

[0021] 图4大鼠纹状体蛋白免疫印迹的检测结果,其中,TH是多巴胺合成限速酶酪氨酸羟化酶,PSD95是突触后膜的标志物,SYP是突触前膜标志物。

[0022] 图5为旷场实验结果,其中,A为大鼠运动总距离;B为大鼠运动轨迹的热图;C为大鼠后肢站立次数;D为静止不动时间(注:* $P<0.05$,模型组与对照组比较;** $P<0.01$,模型组与对照组比较;# $P<0.05$,治疗组与模型组比较)。

[0023] 图6为转棒实验结果,图中,注:* $P<0.05$,模型组与对照组比较;** $P<0.01$,模型组与对照组比较;# $P<0.05$,治疗组与模型组比较。

具体实施方式

[0024] 一、材料和试剂

[0025] 1.动物

[0026] 健康的SD雄性大鼠 (5-7周龄), 体重220~270g之间, 购于中国人民解放军陆军军医大学动物中心。

[0027] 2. 试剂

[0028]	鱼藤酮	美国西格玛公司
	多聚甲醛	武汉赛维尔生物科技有限公司
	苏木素	上海碧云天生物科技有限公司
	免疫组化试剂盒	北京博奥森生物科技有限公司
	HE 染色试剂盒	北京博奥森生物科技有限公司
	DAB 显色液	上海碧云天生物科技有限公司
	多巴胺标准品	北京索莱宝生物科技有限公司
	TH 抗体	Abclonal
	SYP 抗体	Abclonal
	PSD95 抗体	Abclonal
	β -actin 抗体	Abclonal

[0029] 其他试剂均采用市售的分析纯产品。

[0030] 3. 主要仪器设备

[0031]	Milli-Q Elix 纯水器	美国 Millipore
	低温高速离心机	德国 beckman 公司
	-80℃低温冰箱	美国 Thermo 公司
	光学显微镜	日本 Nikon 公司
	酶标仪	美国 Molecular Devices 公司
	Bio-rad 成像仪	美国 Bio-Rad 公司
	小动物疲劳仪	美国 Unibiolab 公司

[0032] 二. 实施例

[0033] 实施例1动物处理

[0034] 肽MOTS-c委托武汉百意欣生物科技有限公司合成,纯度为>95%,氨基酸序列如SEQ.ID.NO.1所示:

[0035] Met Arg Trp Gln Glu Met Gly Tyr Ile Phe Tyr Pro Arg Lys Leu Arg。

[0036] SD雄性大鼠44只,体重220~270g之间,饲养在室内温度为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的动物房,期间给大鼠提供自由饮水和进食。大鼠随机分为3组:对照组,模型组和治疗组。模型组(梯度剂量皮下注射):第一阶段注射剂量为2mg/kg,共给药3天。第二阶段注射剂量为1mg/kg,共给药7天。第三阶段注射剂量为0.5mg/kg,共给药20天。合计给药30天,建立鱼藤酮诱导大鼠帕金森动物模型。治疗组:在模型组给药的同时,腹腔注射MOTS-c (3-5mg/kg)持续30天。处理结束后先检测大鼠行为学指标,包括旷场实验和转棒实验。行为学检测结束后麻醉处死大鼠,置于冰上迅速分离纹状体(一部分用多聚甲醛固定,一部分用液氮速冻)并收集其余脑组织。

[0037] 实施例2实施各组大鼠神经行为学实验检测

[0038] 1) 旷场实验:旷场实验是评价实验动物在新环境中自主行为,探究行为以及紧张度的一种方法,以评价动物的活动度是否正常且均一。调整软件和系统参数后,将大鼠至于旷场反应箱内,让其自由活动10分钟,系统将记录大鼠的所有活动记录。实验结束后软件将记录分析其活动距离,活动轨迹和后肢站立次数等参数(每次实验前需要用酒精擦拭反应箱,以消除气味对动物的影响)。

[0039] 2) 转棒式疲劳仪实验:通过测量动物在滚轮上所停留的时间,用于评价动物平衡力,运动协调和中枢抑制等情况。实验开始前半小时将大鼠放到实验室适应环境。设置仪器转动参数,使得其以12rpm的速度匀速转动。实验动物依次放置于滚轮上,记录每只大鼠在转棒上保持平衡所能持续的时间,最长持续时间不超过3分钟。

[0040] 实施例3大鼠纹状体多巴胺的含量(高分辨液质联用法)

[0041] 将大鼠的纹状体称重并记录重量,精密加入1mL的甲醇(含0.1%甲酸),漩涡震荡1min,匀浆3min。高速离心14000rpm,10min,取上清进样分析。色谱Waters T3(150×2.1mm, 3 μm)。流速0.3mL/min,水相0.1%甲酸水溶液,有机相0.1%甲酸乙腈,洗针液甲醇,柱温箱温度35 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0042] 实施例4免疫组织化学染色

[0043] 纹状体组织用4%多聚甲醛固定后,常规脱水,石蜡包埋,切片,片厚5 μm 。组织切片经脱蜡水化,抗原修复,封闭内源性过氧化氢酶,抗体杂交(TH抗体),DAB显色,复染,脱水,透明和封片后镜检。进一步用组织切片数字扫描仪扫描图像,应用赛维尔图像分析软件自动读取组织测量区域,首先进行阳性等级划分:阴性无着色,计为0分;弱阳淡黄色,计为1分,中阳性棕黄色,记为2分;强阳性棕褐色,计为3分,最终分析计算测量区域内阳性面积比,反应阳性面积的多少。

[0044] 实施例5HE染色

[0045] 纹状体组织用4%多聚甲醛固定后,常规脱水,石蜡包埋,切片,片厚5 μm 。切片经过脱蜡水化后按照HE试剂盒说明书进行苏木素-伊红染色,苏木素染核,盐酸乙醇分化,伊红染细胞质,透明化后封片。在光学显微镜下观察纹状体结构及损伤改变,并进行拍照。

[0046] 实施例6免疫印迹法

[0047] 纹状体组织提取总蛋白;BCA法进行蛋白浓度测定;然后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,一抗孵育过夜(4度),对应种属二抗孵育(室温),化学发光液进行显影。拍照后用Image J软件进行灰度值分析。

[0048] 实施例7大鼠脑组织内GSH,MDA和SOD的含量测定

[0049] GSH,MDA和SOD检测试剂盒均购自上海碧云天生物科技有限公司,操作步骤均按照试剂盒说明书进行。

[0050] 三.结果

[0051] 1、肽MOTS-c可缓解鱼藤酮帕金森大鼠中脑氧化应激损伤

[0052] 结果显示,治疗组大鼠大脑内MDA含量有所下降,同时GSH含量和SOD活性也有所提升,表明肽MOTS-c对鱼藤酮帕金森大鼠中脑内的氧化应激损伤水平有明显缓解作用(见图1)。

[0053] 2、肽MOTS-c减轻鱼藤酮帕金森大鼠纹状体多巴胺神经元损伤

[0054] HE染色结果显示(见图2),治疗组纹状体组织形态基本规则,细胞形态虽有回缩但接近于正常,核固缩现象明显好转。表明肽MOTS-c对鱼藤酮大鼠纹状体神经元有显著保护作用。

[0055] 3、肽MOTS-c可减少帕金森大鼠纹状体多巴胺神经元丢失

[0056] 如图所示(图3,图4),模型组大鼠纹状体TH阳性着色减少明显,同时纹状体TH蛋白表达水平下降,提示帕金森大鼠纹状体多巴胺能神经元有显著丢失,这也是PD的重要标志。而治疗组大鼠纹状体的TH阳性细胞数量和TH蛋白表达水平明显提高。此外,治疗组纹状体神经元突触标志物PSD95和SYP的表达水平相较模型组显著增高,上述结果提示MOTS-c对纹状体多巴胺神经元有明显的保护作用。

[0057] 4、肽MOTS-c可增加帕金森大鼠纹状体多巴胺含量

[0058] 表1结果显示,模型组纹状体DA含量显著降低,进一步说明模型复制成功;肽MOTS-c能显著提高纹状体多巴胺水平的作用。

[0059] 表1:3组大鼠纹状体DA含量的测定结果($\bar{x} \pm SD$)

[0060]	对照组	模型组	治疗组
	(ng/mg)	(ng/mg)	(ng/mg)
DA 含量	7.85±1.22	6.02±1.147*	12.8±1.693*#

[0061] (注:*P<0.05,模型组与对照组比较;**P<0.01,模型组与对照组比较;#P<0.05,治疗组与模型组比较)

[0062] 5、肽MOTS-c可改善鱼藤酮帕金森大鼠探究能力

[0063] 旷场实验结果如图5所示,模型组大鼠后肢站立次数减少,运动距离缩短,休息时间增加,表明模型组动物在新环境中的自主探究行为能力显著下降,也提示帕金森模型复制成功。而治疗组的上述指标都得到了一定程度的好转,提示肽MOTS-c给药可以改善鱼藤酮致帕金森大鼠新环境下自主探究行为的能力。

[0064] 6、肽MOTS-c可改善鱼藤酮帕金森大鼠运动协调能力

[0065] 模型组大鼠运动协调障碍明显,且四肢活动欠佳,其在转棒上活动的时间显著缩短,甚至个别大鼠活动极度不协调,很难在转棒上持续活动。而治疗组大鼠运动协调能力显著改善,在转棒上活动的时间明显延长。提示肽MOTS-c对缓解帕金森大鼠运动协调能力有积极的作用(见图6)。

[0066] 综上,本发明建立鱼藤酮诱导帕金森大鼠模型,同时给予肽MOTS-c进行干预。实验结果显示肽MOTS-c能够缓解帕金森大鼠大脑的氧化应激损伤水平,保护多巴胺神经元,减少多巴胺神经元的丢失,且提高纹状体多巴胺的含量,改善帕金森大鼠的神经行为学症状。因此,肽MOTS-c对帕金森大鼠有明显的保护作用。肽MOTS-c能够应用于制备治疗帕金森病的药物。

序列表

<110> 中国人民解放军陆军军医大学

<120> 肽MOTS-c在制备治疗帕金森药物中的应用

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial synthesis)

<400> 1

Met Arg Trp Gln Glu Met Gly Tyr Ile Phe Tyr Pro Arg Lys Leu Arg

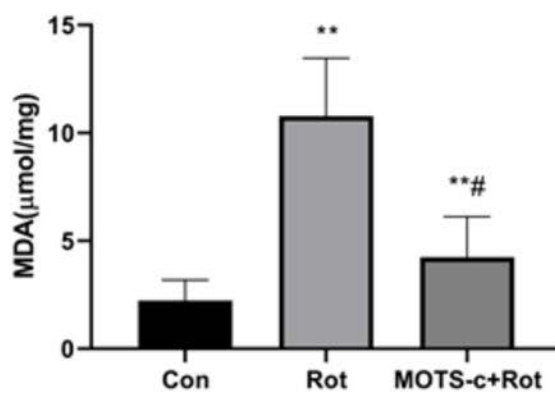
1

5

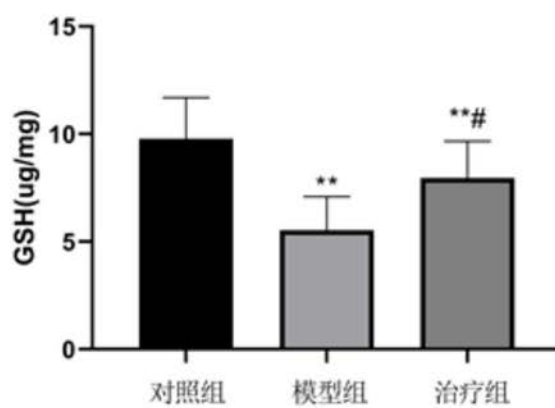
10

15

A:



B:



C:

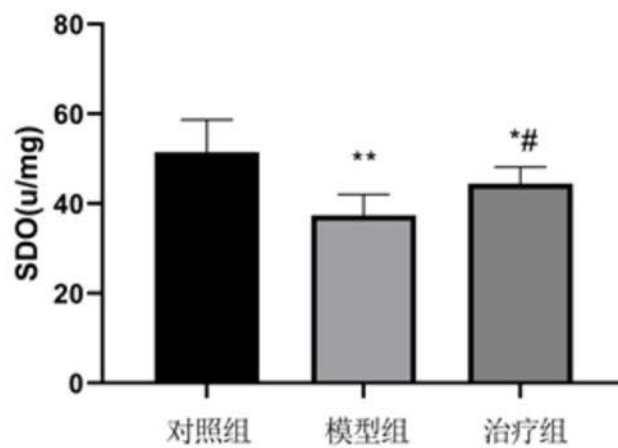


图1

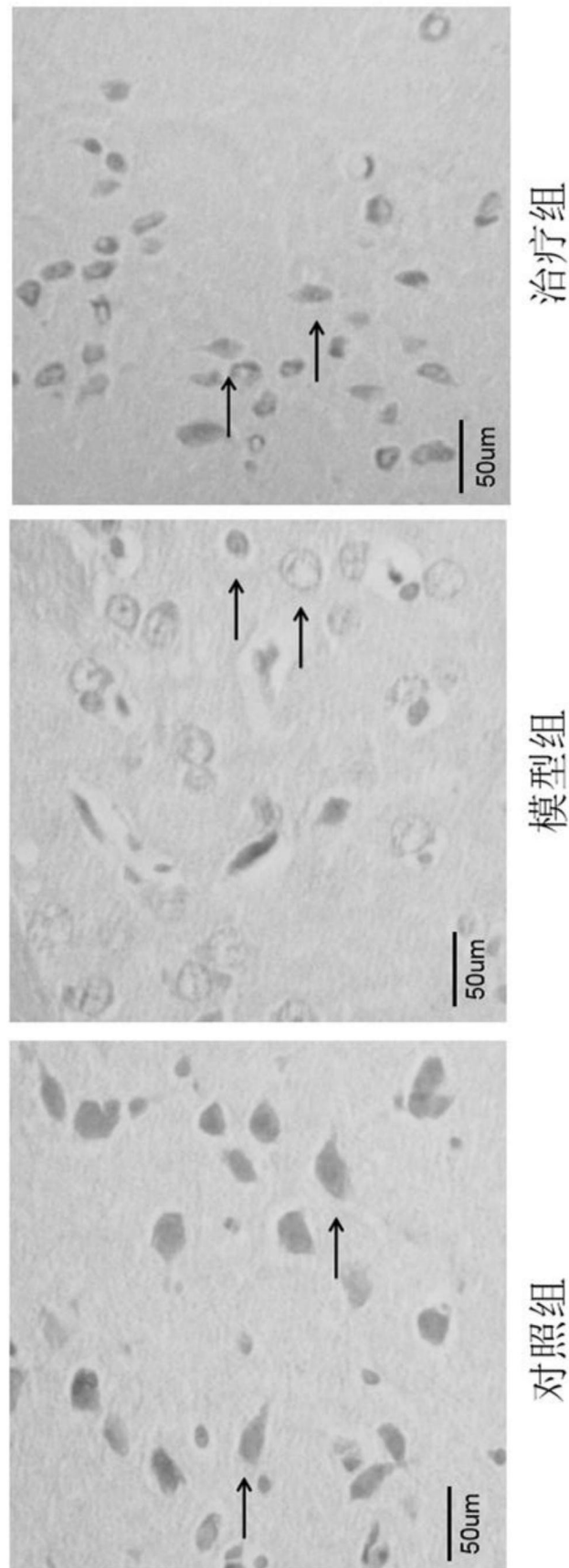
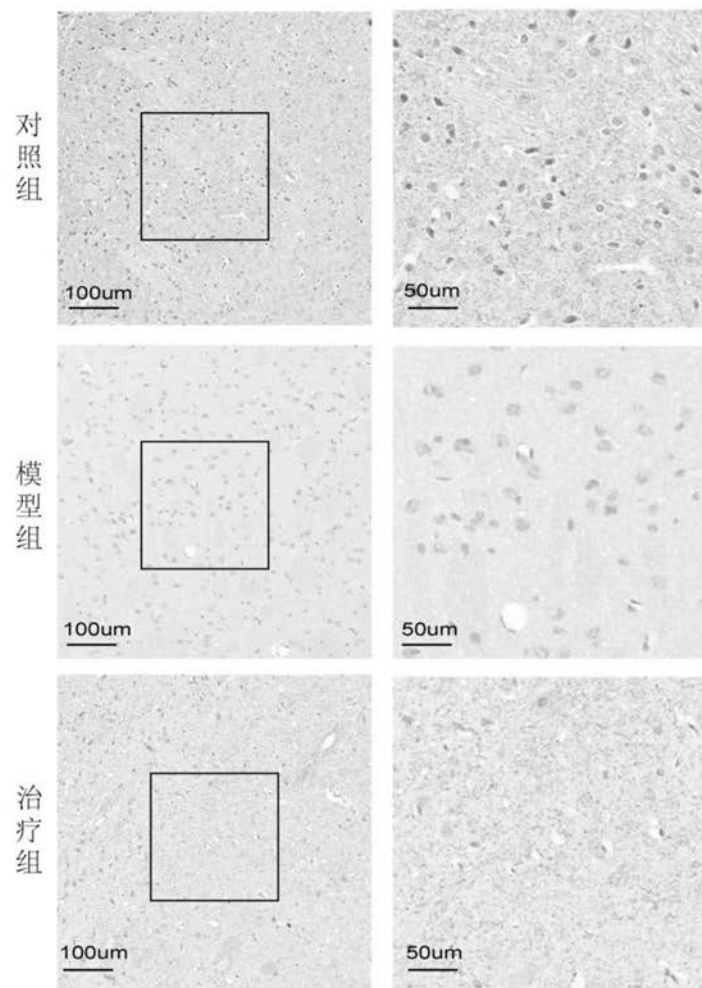


图2

A:



B:

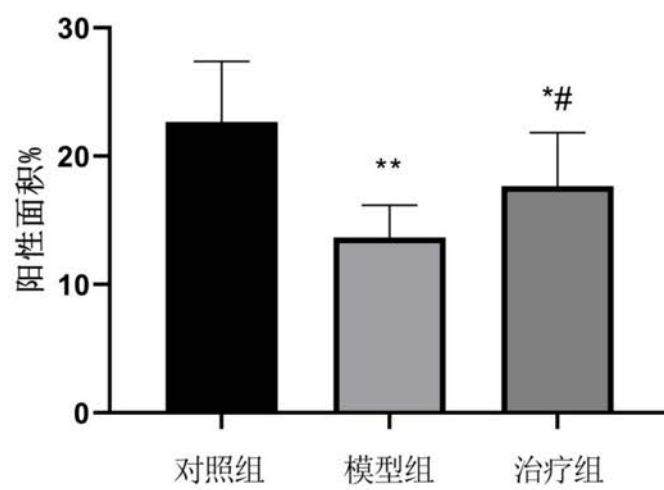


图3

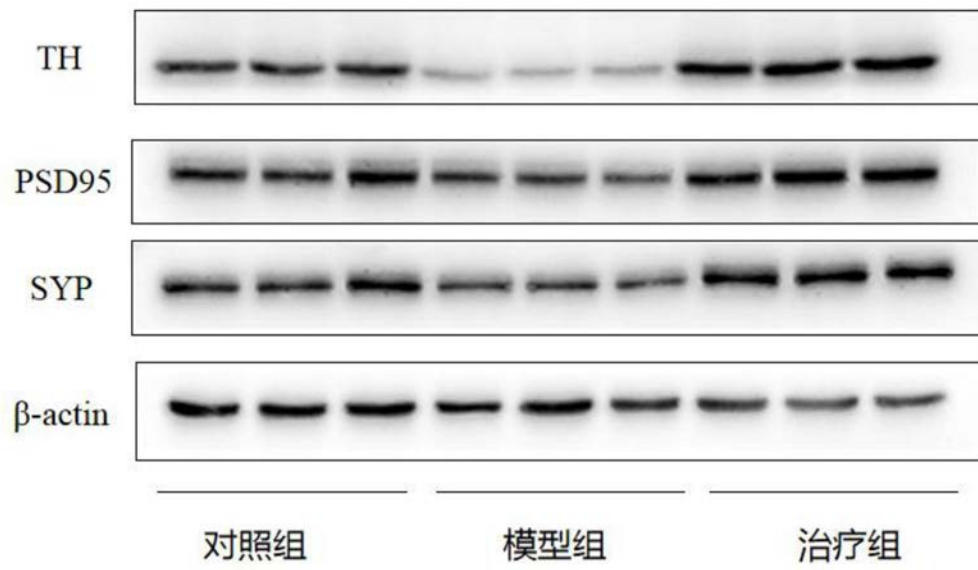
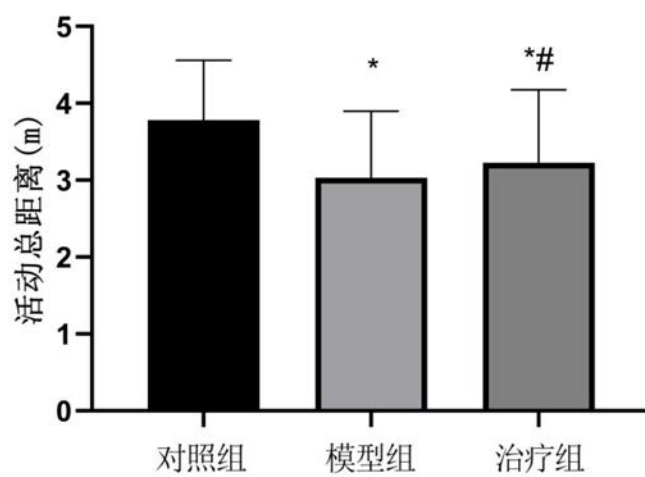


图4

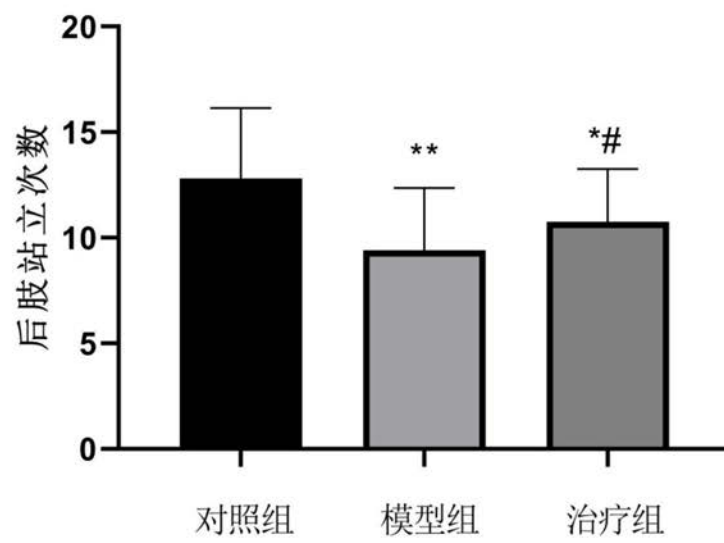
A:



B:



C :



D :

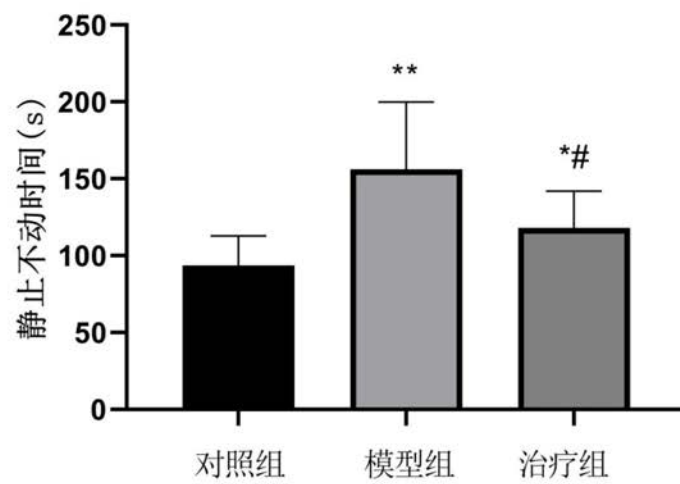


图5

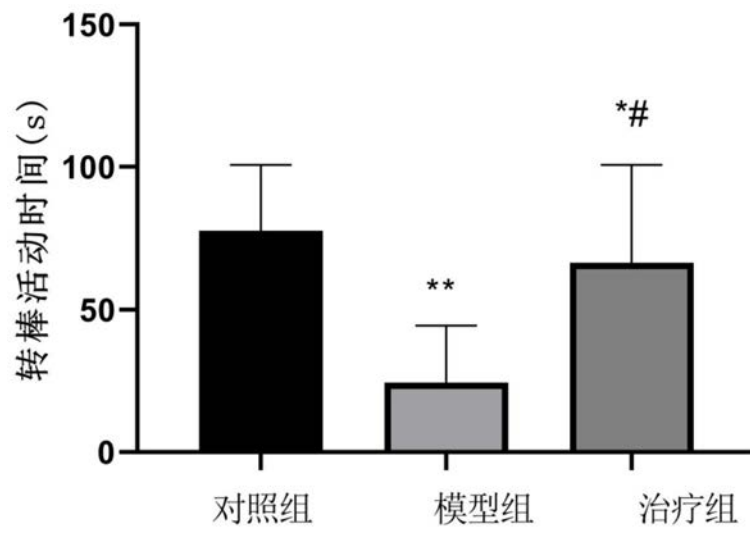


图6