

4种 α -芋螺毒素来源多肽合成及功能鉴定

吴 贇¹, 曹 锐¹, 张广献² (1. 广东医科大学广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 2. 广州中医药大学基础医学院, 广东广州 510006)

摘 要: 目的 探讨4种来源于 α -芋螺毒素的合成多肽对肌肉收缩抑制作用。方法 化学合成多肽, HPLC纯化, 质谱鉴定。通过肌细胞收缩和骨骼肌收缩试验, 检测4种多肽对肌肉收缩抑制作用。通过细胞毒性和家兔皮肤刺激性/腐蚀性试验, 检测多肽安全性。结果 芋螺毒素Reg1d抑制肌细胞和骨骼肌收缩, 不影响细胞存活, 对家兔皮肤无刺激性。结论 Reg1d有望开发成为一种新原料, 用于抗皱纹类化妆品。

关键词: 多肽; 芋螺毒素; 化学合成; 抗皱

中图分类号: R996.3

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)03-0253-06

Synthesis and functional identification of four α -conotoxin- derived oligopeptides

WU Yun¹, CAO Kun¹, ZHANG Guang-xian² (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. School of Fundamental Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of four α -conotoxin- derived oligopeptides on muscle contraction. Methods The oligopeptides were synthesized by chemical method, purified by HPLC, and identified by mass spectrometry. The inhibitory effects of four oligopeptides on muscle contraction were detected by myocyte contraction and skeletal muscle contraction tests, and their safety was evaluated by cytotoxicity test and skin irritation/corrosion test in rabbits. Results The conotoxin Reg1d inhibited the contraction of myocytes and skeletal muscles, but had no significant effect on cell viability or no irritation to rabbit skin. Conclusion Reg1d can be used as a new raw material for development of anti-wrinkle cosmetics.

Key words: oligopeptide; conotoxin; chemical synthesis; anti-wrinkle

芋螺毒素是海洋软体动物芋螺的毒管组织分泌的由10~50个氨基酸残基组成的小肽^[1]。芋螺毒素通过选择性靶向不同类型的神经递质受体或电压门控离子通道, 通常被用作神经科学研究和药物开发的分子工具^[2-3]。根据芋螺毒素保守的信号肽序列, 可以将数目繁多的芋螺毒素分成29个超家族^[4]。其中A-超家族芋螺毒素又可根据药理学作用靶点进一步分为 α -、 κ A-、 α A-家族。 α -家族芋螺毒素具有典型的CC-C半胱氨酸框架, 通常由12~19个氨基酸残基组成, 主要作用靶点为烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)^[5]。烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)分为肌肉型和神经型两种, 其中肌肉型nAChR普遍存在于脊椎动物骨骼肌细胞以及某些鱼的放电器官细胞的质膜上。受体与

乙酰胆碱结合, 引起Na⁺通道的开放, Na⁺流入靶细胞, 使得质膜去极化并引起细胞的收缩。 α -芋螺毒素能与神经肌肉接头处突触后膜上nAChR的 α 亚基结合, 从而竞争性地抑制乙酰胆碱与受体结合, 阻断神经-肌肉兴奋信号的传递^[6]。目前在具有抗皱功能的化妆品中广泛应用的蛇毒SYN-AKE是1种来源蛇毒的三肽^[7], 它主要作用于肌肉型nAChR的突触后膜, 从而抑制神经肌肉收缩。本研究从 α -芋螺毒素中筛选并合成了4种多肽, 探讨这些多肽对肌肉收缩的抑制作用及其应用前景, 旨在为开发新型抗皮肤皱纹产品提供参考。

1 材料和方法

1.1 多肽合成

合成的多肽序列见表1。采用Fmoc法^[8], 通过全自动多肽合成仪(海南建邦制药科技有限公司, 型号JB2014001)进行多肽的合成。从仪器上裂解下来的多肽, 用乙醚沉淀后, 在1 500×g下离心10 min。收集

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金联合基金项目
(No.2020A1515111040)

收稿日期: 2020-11-03; 修订日期: 2021-03-03

作者简介: 吴 贇(1987-), 男, 博士研究生, 助理研究员

表1 所合成的4个多肽序列

多肽	物种来源	氨基酸序列
SI	线纹芋螺	ICCNACGPKYSC
Reg1d	王冠芋螺	GCCSDPRCKHEC
SDPR	王冠芋螺	SDPR
ELDGNG	线纹芋螺	ELDGNG

沉淀,进行冷冻干燥。取少量冻干后的粗肽溶解,经10 000×g离心2 min去除杂质后,上C18反相柱进行高效液相色谱(HPLC)检测及纯化。线性梯度洗脱,215 nm和280 nm处双波长检测。将HPLC收集的目标峰取1 μL,进行质谱检测分析。确定多肽分子量正确后,用于后续实验。根据质谱结果,收集HPLC纯化后的目的峰,再次冻干。再经HPLC纯化,经检测达到95%以上纯度后,第3次冻干成粉末,-20℃保存备用。

1.2 肌细胞收缩检测

使用Cell Biolabs公司的细胞收缩检测试剂盒(Collagen-based Contraction Assay Kit, CBA-201)评估肌肉细胞的收缩性。将人骨骼肌细胞(HSMC,美国ATCC)在骨骼肌细胞培养基(skeletal muscle cell medium, SkMCM, ScienCell公司, 3501-b)中,37℃,5% CO₂条件下培养。将采集的细胞进行重悬,使细胞终浓度为(2~5)×10⁶个细胞/mL培养基。将2倍体积的细胞悬液和8倍体积的预冷的胶原凝胶溶液混合制成胶原晶格。在24孔板的每个孔中加入0.5 mL的细胞-胶原混合液,在37℃孵育1 h。当胶原聚合后,向凝胶晶格中添加1.0 mL培养基。培养48 h,期间观察胶原的收缩变化。在释放收缩基质之前,用浓度为100 μmol/L的多肽溶液处理细胞1 h。24 h后用直尺测量胶原凝胶大小的变化。使用细胞培养基作为阴性对照,蛇毒三肽SYN-AKE作为阳性对照。收缩率(mm)=释放前胶原凝胶的直径-释放24 h后胶原凝胶的直径。

1.3 骨骼肌收缩检测

实验所用SD大鼠购买自广州中医药大学实验动物中心[许可证号SYXK(粤)2018-0182]。30只大鼠(150~200 g)分为6组,每组5只。1组为阴性对照组,用台氏液代替多肽处理组织;1组为阳性对照组(SYN-AKE);剩余4组分别检测不同的样品多肽。大鼠腹腔注射1 mL 10%的水合氯醛进行麻醉后,剃去大鼠后肢及躯干后背部的毛,剪开皮肤,小心剥离,暴露肌层。分离腓肠肌内外侧头至踝关节,游离腓肠肌内侧头肌腱,并用手术线结扎,剪断。于腓肠肌根

部肌腱处结线接张力换能器,坐骨神经置于刺激电极上,接入BL-420E生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)。以连续单刺激的方式给予坐骨神经电刺激,刺激参数为:延时100 ms,波宽0.5 ms,频率0.5 Hz,强度5 V,扫描速度为4.00 s/div,待模型稳定后,记录腓肠肌收缩的张力大小作为多肽作用前的对照。用无菌脱脂棉给药,待测药品工作浓度为100 μmol/L。每隔5 min给予坐骨神经电刺激,记录腓肠肌收缩曲线,至腓肠肌收缩作用至25 min。

1.4 细胞毒性检测

使用96孔板培养和MTT染色法检测多肽对人骨骼肌细胞的细胞毒性^[9]。人骨骼肌细胞在骨骼肌细胞培养基中,37℃,5% CO₂条件下培养。将细胞以约10⁵个/mL接种于96孔板,每孔接种90 μL,置CO₂培养箱中培养至对数生长期。按预设的浓度梯度分别加入10 μL的多肽,使每孔中的多肽终浓度为1、2、5、10、20、50、100 μmol/L,每1个梯度设置3个重复。空白组加入100 μL骨骼肌细胞培养基。继续培养48 h后,每孔加入20 μL的MTT(5 g/L),然后置于37℃温育4 h。小心除去上清后,每孔加入100 μL DMSO,振荡约10 min溶解沉淀,随后用酶标仪检测OD值,波长490 nm。

1.5 皮肤刺激性/腐蚀性检测

根据《化妆品安全技术规范》2015年版中毒理学试验方法中的皮肤刺激性/腐蚀性试验方法检测多肽对家兔皮肤的刺激性/腐蚀性。新西兰白色家兔4只(质量合格证号:44007600002312),身体质量2.3~2.4 kg,购自广州花都区花东信华实验动物养殖场[许可证号为SCXK(粤)2019-0023]。试验前24 h,将家兔背部脊柱两侧被毛剪掉,剪毛中不损伤皮肤表面,去毛范围为3 cm×3 cm,涂抹面积为2.5 cm×2.5 cm。取0.5 mL浓度为1 mmol/L的多肽溶液涂抹在一侧皮肤上,另一侧涂0.5 mL纯化水作为对照,每天涂抹一次,连续涂抹14 d。涂抹1 h后观察结果,按《化妆品安全技术规范》2015年版的皮肤刺激性/腐蚀性试验表1标准进行评分。

1.6 统计学处理

各实验组数据分别与对照组比较,采用t检验。P<0.05为差异有统计学意义。各图中的所有误差线表示至少3次重复计算的平均值的标准误差。

2 结果

2.1 多肽的合成与纯化

所合成的4个多肽(芋螺毒素SI^[10]、Reg1d^[11]和多

肽片段SDPR、ELDGNG^[12])均选自A超家族芋螺毒素(序列见表1)。采用全自动合成了上述多肽,并用RP-HPLC对其进行了纯化,通过质谱鉴定了多肽的分子量(图1)。

2.2 多肽对肌细胞收缩的抑制作用

通过比较胶原凝胶在多肽处理前后的直径变化,发现多肽Reg1d、SDPR和ELDGNG对人骨骼肌细胞的收缩有一定的抑制作用。而多肽SI对骨骼肌细胞的收缩没有明显抑制作用(图2)。以上结果均至少重复3次。

2.3 多肽对骨骼肌收缩的抑制作用

使用芋螺毒素Reg1d处理腓肠肌后,对肌肉收缩的抑制作用明显,25 min时的抑制作用与阳性对照SYN-AKE的抑制作用相当;芋螺毒素SI对骨骼肌收缩只有微量的抑制作用;而多肽SDPR和ELDGNG则对腓肠肌的收缩没有明显作用(图3)。

2.4 芋螺毒素Reg1d的细胞安全性检测

根据以上肌细胞收缩和骨骼肌收缩实验的结果,选择了芋螺毒素Reg1d进行接下来的细胞安全性和皮肤安全性检测。实验结果显示,在7个检测浓度下,Reg1d对骨骼肌细胞的存活均没有明显毒性作用(图4)。

2.5 芋螺毒素Reg1d的皮肤安全性检测

根据《化妆品安全技术规范》2015年版中的皮肤刺激性/腐蚀性试验方法检测芋螺毒素Reg1d对家兔皮肤的刺激性/腐蚀性。在试验观察期内家兔均没有出现红斑和水肿;每天每只动物平均积分为0,未见其他毒性反应特征,表明1 mmol/L的Reg1d对皮肤多次给药,无刺激性。结果见表2。

3 讨论

芋螺毒素对不同的离子通道、G蛋白偶联受体和神经递质转运体具有高度的特异性和亲和力^[13]。目前已经有一些芋螺毒素正在处于临床试验阶段,其中的 μ -芋螺毒素MVIIA,已被美国FDA批准用于治疗难以控制的严重慢性疼痛^[14]。 α -芋螺毒素是nAChRs抑制剂,其在芋螺物种中的丰富表达,为寻找nAChRs的靶向药物,提供了一个具有可变初级序列、结构、药理特性和作用方式的天然多肽库^[15]。某些 α -芋螺毒素的高亚型选择性是鉴定天然nAChR亚型参与神经递质释放调控的关键^[16]。 α -芋螺毒素的结构/功能特性也促进了具有更高效价和/或亚型选择性的毒素多肽类似物的开发。在本研究中,主要考察4个来源于 α -芋螺毒素的多肽对于肌肉收缩的抑制作用,其中芋螺毒素Reg1d对肌细胞和骨骼肌的收缩表现出了明

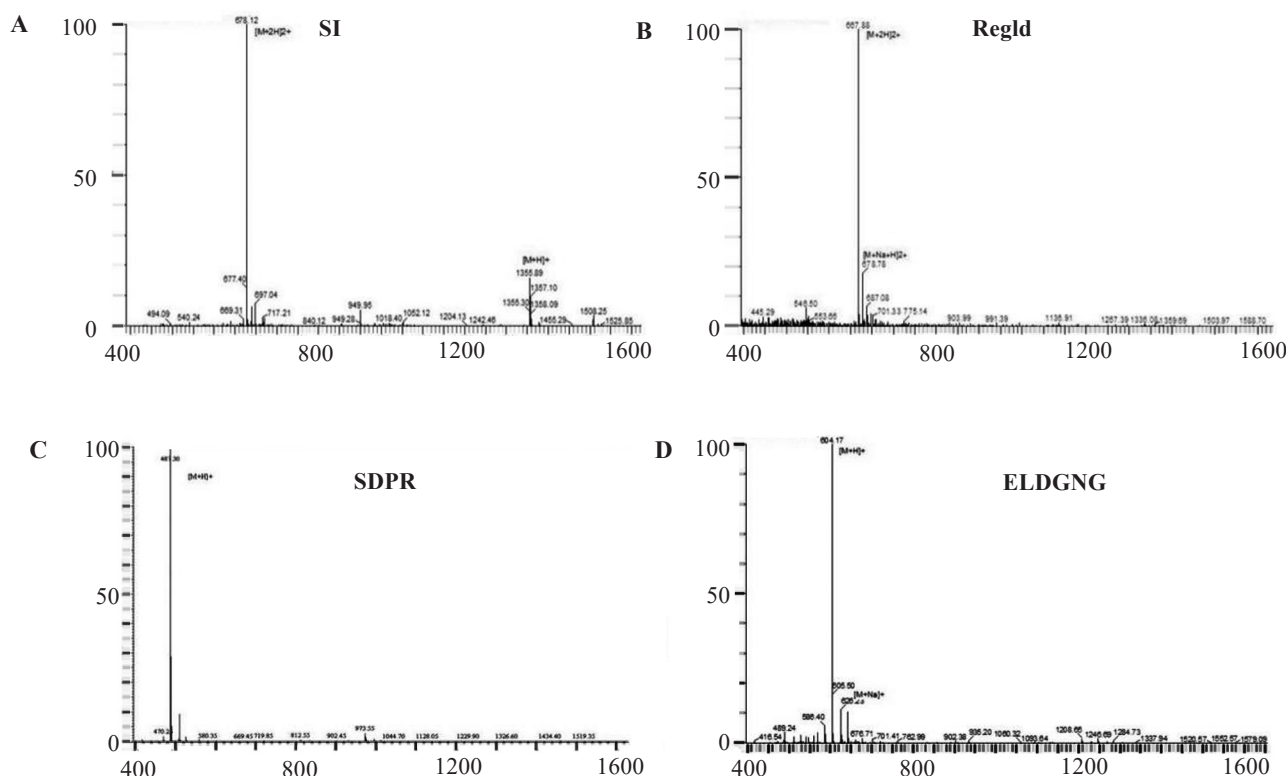
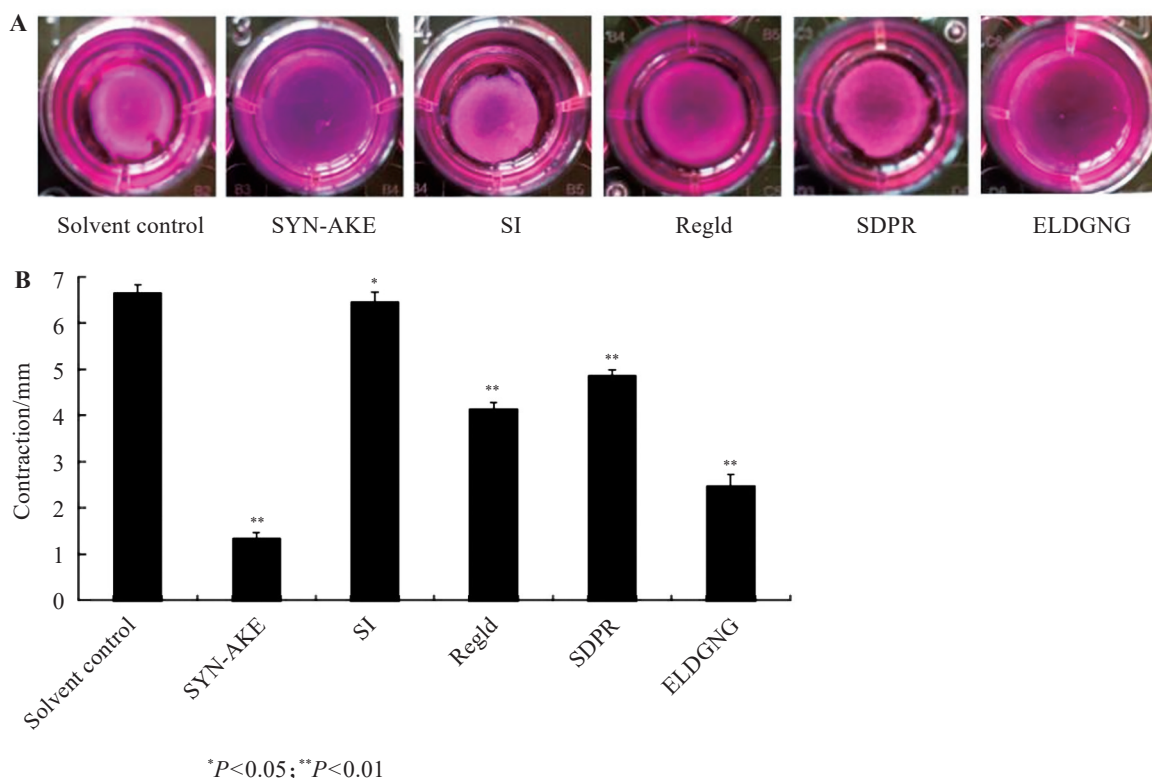


图1 经HPLC纯化后的4个多肽的质谱鉴定结果



A. 多肽处理后的胶原凝胶收缩图; B. 多肽处理后胶原凝胶直径大小的改变

图2 4个多肽对肌细胞收缩的抑制作用

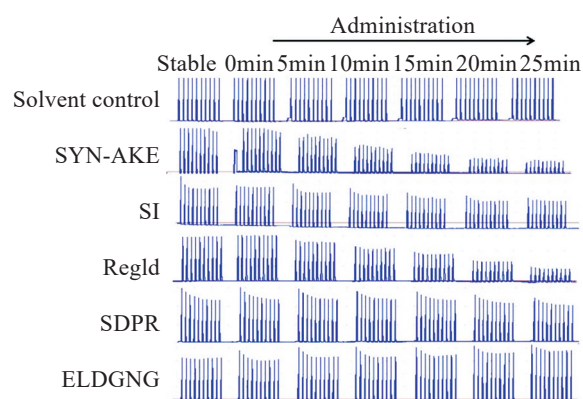


图3 4个多肽对不同时间点的大鼠骨骼肌收缩的抑制作用

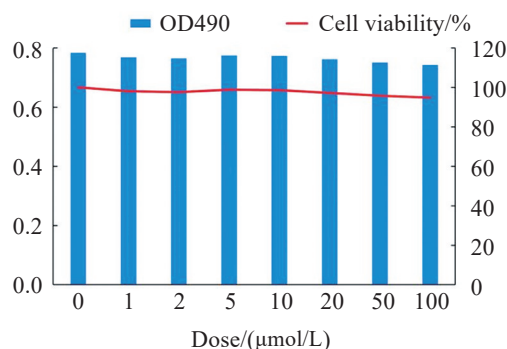


图4 芋螺毒素 Regld 对人骨骼肌细胞存活率的影响

显的抑制作用,同时也具有的良好安全性。

为减小芋螺毒素的分子量,使其更适合于药物应用,此前已经文献报道了一些方法,例如将芋螺毒素 MII 或 MrIA 的 N 到 C 端环化以及用二硫键取代二硫键^[17-18],用化学柔性间隔物替换芋螺毒素 SIHA 序列中的部分氨基酸等^[19]。然而,这些方法并不能完全去除芋螺毒素中的二硫键。芋螺毒素的分子量仍然较大。在本研究中,我们从 α -芋螺毒素中选择并设计了 4 个多肽。其中包括 2 个全长的芋螺毒素 SI 和 Regld,以及 2 个来自于芋螺毒素的多肽片段 SDPR 和 ELDGNG。我们期望通过相关的功能实验,了解多肽片段是否具有与完整毒素类似的活性。然而实验结果显示,2 个多肽片段并未表现出优于或接近完整毒素的活性,这可能与多肽片段的选择有关。在芋螺毒素的氨基酸序列中,除了保持基本空间结构的半胱氨酸外,剩余的氨基酸中有些与毒素的功能密切相关,有些与毒素的特异性相关,还有一些与毒素的结构稳定相关。在接下来的研究中,我们将从更多的芋螺毒素中选择更多的多肽片段来进行功能检测。

本研究选择了来源于蛇毒的三肽化合物 SYN-AKE 作为阳性对照。SYN-AKE 是一种基于合成蛋白质片段的化学物质,该片段源自庙蛙蛇毒中的

表2 芋螺毒素Reg1d对家兔多次皮肤刺激性试验结果

涂抹天数	动物数/只	皮肤刺激性反应积分					
		纯化水			Reg1d		
		红斑	水肿	总分	红斑	水肿	总分
1	4	0	0	0	0	0	0
2	4	0	0	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0	0	0
4	4	0	0	0	0	0	0
5	4	0	0	0	0	0	0
6	4	0	0	0	0	0	0
7	4	0	0	0	0	0	0
8	4	0	0	0	0	0	0
9	4	0	0	0	0	0	0
10	4	0	0	0	0	0	0
11	4	0	0	0	0	0	0
12	4	0	0	0	0	0	0
13	4	0	0	0	0	0	0
14	4	0	0	0	0	0	0
14 d 每只动物积分均值	—	—	0	—	—	0	—
每天每只动物积分均值	—	—	0	—	—	0	—

Waglerin-1 肽,可以减少肌肉细胞的收缩。因此, SYN-AKE 被广泛地应用到了抗皱类的化妆品中^[20]。与 SYN-AKE 相比,芋螺毒素 Reg1d 表现出了相似的生物活性。虽然 Reg1d 的分子量较大,但是它具有良好的生物安全性。在后续试验中,可以通过特定氨基酸的去除和替换,进一步降低 Reg1d 的分子量,Reg1d 依然有望开发成为一种新的原料,应用于抗皱纹类化妆品中。

参考文献:

- [1] HIMAYA S W A, LEWIS R J. Venomics-accelerated cone snail venom peptide discovery[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 788.
- [2] PENNINGTON M W, CZERWINSKI A, NORTON R S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential[J]. *Bioorgan Med Chem*, 2018, 26(10):2738-2758.
- [3] PRASHANTH J R, DUTERTREB S, LEWIS R J. Pharmacology of predatory and defensive venom peptides in cone snails [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(12): 2453-2465.
- [4] QUENTIN K, RILEY Y, AI-HUA J, et al. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database[J]. *Nucl Acids Research*, 2011, 40(D1):D325-D330.
- [5] JULIEN G, SÉBASTIEN D. α -Conotoxins to explore the molecular, physiological and pathophysiological functions of neuronal nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 679:24-34.
- [6] LIN B, XIANG S, LI M. Residues responsible for the selectivity of α -conotoxins for Ac-AChBP or nAChRs[J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(10):173.
- [7] HUSEIN E L, HADMED H, CASTILLO R F. Cosmeceuticals: peptides, proteins, and growth factors[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2016, 15(4):514-519.
- [8] WU Y, ZHANG G, ZHOU M. Inhibitory and anti-inflammatory effects of two antimicrobial peptides moronecidin and temporin-1Dra against *Propionibacterium acnes* in vitro and in vivo[J]. *J Pept Sci*, 2020, 26(7):e3255.
- [9] WU Y, QIANG Y Y, CAO K, et al. Inhibitory effect of the antimicrobial peptide BLP-7 against *Propionibacterium acnes* and its anti-inflammatory effect on *acne vulgaris*[J]. *Toxicon*, 2020, 184:109-115.
- [10] GROEBE D R, GRAY W R, ABRAMSON S N. Determinants involved in the affinity of alpha-conotoxins GI and SI for the muscle subtype of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(21):6469-6474.
- [11] FRANCO A, PISAREWICZ K, MOLLER C, et al. Hyperhydroxylation: a new strategy for neuronal targeting by venomous marine molluscs[J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 2006, 43: 83-103.
- [12] QIANG Y Y, NIU J G, WU Y, et al. Discovery of a novel cysteine framework XXIV conotoxin from *Conus striatus*, S24a, with potential analgesic activity[J]. *Int J Pept Res Ther*, 2021, 27:615-625.

- [13] GAO B, PENG C, YANG J, et al. Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery[J]. *Toxins*, 2017, 9(12):397.
- [14] OLIVEIRA K M, BINDA N S, MÁRIO S L, et al. Conotoxin MVIIA improves cell viability and antioxidant system after spinal cord injury in rats[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(10): e0204948.
- [15] NIKITA A, RICHARD L. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulators from cone snails[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(6):208.
- [16] TURNER M W, MARQUART L A, PHILLIPS P D, et al. Mutagenesis of α -conotoxins for enhancing activity and selectivity for nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Toxins*, 2019, 11(2):113.
- [17] CLARK R, FISCHER H, DEMPSTER L, et al. Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the α -conotoxin MII[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(39):13767-13772.
- [18] LOVELACE E S, ARMISHAW C J, COLGRAVE M L, et al. Cyclic MrIA: a stable and potent cyclic conotoxin with a novel topological fold that targets the norepinephrine transporter[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(22):6561-6568.
- [19] GREEN B R, CATLIN P, ZHANG M M, et al. Conotoxins containing nonnatural backbone spacers: cladistic-based design, chemical synthesis, and improved analgesic activity[J]. *Chem Biol*, 2007, 14(4):399-407.
- [20] LIM S H, SUN Y, MADANAGOPAL T, et al. Enhanced skin permeation of anti-wrinkle peptides via molecular modification[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):1596.

~~~~~  
(上接第252页)

- an embedded SINEB2 repeat[J]. *Nature*, 2012, 491(7424): 454-457.
- [13] WU Y, WEI B, LIU H, et al. MiRPara: a SVM-based software tool for prediction of most probable microRNA coding regions in genome scale sequences[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1):107.
- [14] 彭丽娇, 李欣晓, 江丹贤. 等. 长链非编码RNA在鼻咽癌组织中的差异表达[J]. *广东医科大学学报*, 2019, 37(3): 240-245.
- [15] XIONG Y, CHEN S, LIU L, et al. Increased serum micro RNA-155 level associated with nonresponsiveness to hepatitis B vaccine[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(7):1089-1091.
- [16] CAI X, HAGEDORN C H, CULLEN B R. Human micro RNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs[J]. *RNA*, 2004, 10(12):1957-1966.
- [17] 夏天飞, 汤纳平, 邱云良, 等. 长链非编码RNA在药物性肝损伤大鼠肝脏中表达谱的变化[J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(7):897-901.
- [18] CARPENTER S, AIELLO D, ATIANAND M K, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. *Science*, 2013, 341(6147):789-792.
- [19] ZHANG Q, CHEN C Y, YEDAVALLI V S, et al. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression[J]. *MBio*, 2013, 4(1): e00596-12.
- [20] CAI X, CULLEN B R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor[J]. *RNA*, 2007, 13(3): 313-316.