

# 桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒复制的抑制作用

杨微<sup>1</sup>, 陈志宝<sup>1,2,3</sup>, 陈操<sup>4</sup>, 魏艳梅<sup>5</sup>, 夏影<sup>1</sup>, 戴好富<sup>5</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学, 生命科学技术学院, 黑龙江大庆 163000) (2. 广东海洋大学滨海农业学院, 广东湛江 524088) (3. 广东海洋大学深圳研究院, 广东深圳 518108) (4. 中国疾病预防控制中心, 病毒病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206) (5. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

**摘要:** 优化桦褐孔菌乙醇粗提物提取工艺并初步探究其对朊病毒复制的影响。采用醇提方法, 利用正交试验方法, 确定最佳提取工艺。使用 CCK-8 试剂盒对桦褐孔菌乙醇粗提物处理细胞的安全性进行评价, 确定其安全质量浓度; 根据安全性评价结果, 使用蛋白免疫印记 (Western blot) 方法检测桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒复制的影响; 通过测定过氧化氢及抗氧化因子等对桦褐孔菌乙醇粗提物的抗氧化活性进行研究。桦褐孔菌乙醇粗提物的最佳提取工艺为: 料液比 (桦褐孔菌生粉:乙醇) 1:10 (g/mL), 乙醇体积分数 75%, 提取时间 2 h, 提取温度 80 °C, 在此条件下, 得率为 6.32%。桦褐孔菌乙醇粗提物的最大安全质量浓度为  $6.25 \times 10^{-4}$  mg/mL; 在此浓度下, 处理细胞 24 h 后, 桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒的复制有抑制作用 ( $p < 0.01$ ), 可减少  $H_2O_2$  的含量, 增加 SOD 和抗氧化因子 GCLM、GCLC 的含量, 且具有统计学意义。本试验表明桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒的复制具有抑制作用, 且这种作用可能与其抗氧化活性有关。

**关键词:** 桦褐孔菌; 乙醇粗提物; 抗氧化; 朊病毒复制

文章编号: 1673-9078(2021)07-8-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.1126

## Inhibition on Prion Replication by Ethanol Crude Extracts from *Inonotus obliquus*

YANG Wei<sup>1</sup>, CHEN Zhi-bao<sup>1,2,3</sup>, CHEN Cao<sup>4</sup>, WEI Yan-mei<sup>5</sup>, XIA Ying<sup>1</sup>, DAI Hao-fu<sup>5</sup>

(1.College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China)

(2.College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

(3.Shenzhen Research Institute, Guangdong Ocean University, Shenzhen 518108, China)

(4.National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China) (5.Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract:** To optimize the extraction process of the ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* and preliminarily study its effect on prion replication. The optimum extraction condition of ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* were employed by alcohol extraction and orthogonal test. To evaluate the cell safety of the ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus*, CCK-8 kit was used to determine the safe concentration. According to the results of safety evaluation, Western blot was used to detect the effect of the ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* on prion replication. The antioxidant activity of ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* was studied by measuring hydrogen peroxide and antioxidant factors. The optimal extraction conditions were as follow: the ratio of solid to liquid was (*Inonotus obliquus* power: alcohol) 1:10 (g/mL), the volume fraction of ethanol was 75%, the extraction time was 2 h, the extraction temperature was 80 °C. At this

引文格式:

杨微,陈志宝,陈操,等.桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒复制的抑制作用[J].现代食品科技,2021,37(7):8-13,+7

YANG Wei, CHEN Zhi-bao, CHEN Cao, et al. Inhibition on prion replication by ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 8-13, +7

收稿日期: 2020-12-04

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (C2018044); 热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室开放课题 (1630052019001)

作者简介: 杨微 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子药理学

通讯作者: 陈志宝 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 分子药理学; 陈操 (1983-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 朊病毒致病机制

condition, the yield of ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* was 6.32%. The maximum safe concentration range of ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* was  $6.25 \times 10^{-4}$  mg/mL. Under this condition, after 24 h treatment, prion replication were inhibited by the ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* ( $p < 0.01$ ), which could reduce the content of  $H_2O_2$  and increase the content of SOD and antioxidant factor GCLM, GCLC, and it was statistically significant. The results showed that ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* had an inhibitory effect on prion replication, which may be related to its antioxidant activity.

**Key words:** *Inonotus obliquus*; ethanol crude extracts; antioxidant; prion replication

桦褐孔菌 (*Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat) 又被称为桦树茸, 隶属于担子菌门、蘑菇纲、锈革菌目、锈革菌科、褐卧孔菌属<sup>[1]</sup>, 大多生长在白桦、银桦等桦树的树皮上, 同时在其破损处形成肉瘤状的菌核, 作为一种珍稀药用真菌, 主要分布地区有北纬 45~50 °C 芬兰、北美、俄罗斯的西伯利亚, 以及中国黑龙江和吉林等地<sup>[2]</sup>。它具有许多药理活性, 包括抵抗氧化应激<sup>[3,4]</sup>、阻止病原体入侵<sup>[5]</sup>、抑制肿瘤细胞生长<sup>[6]</sup>、产生抗炎因子<sup>[7]</sup>以及调节免疫功能<sup>[8]</sup>等作用, 同时对多种疾病具有抑制作用, 包括糖尿病、癌症、心血管疾病等<sup>[9]</sup>。此外, 桦褐孔菌也被当作辅助品添加到中药材、调味品、饮料、加工类肉品以及作为天然食用色素加入到食品中<sup>[10]</sup>。由于其功效和广泛的应用, 近年来对它的研究力度也在不断加大。

朊病毒病 (Prion Diseases) 亦称传染性海绵状脑病 (Transmissible Spongiform Encephalopathies, TSEs), 是一类由朊病毒导致的可感染人和动物中枢神经系统的退行性疾病<sup>[11]</sup>。朊病毒可表现出与常规病毒不同的典型特征, 对多种灭活作用显示出超强的抵抗能力。该病的潜伏期较长, 病死率为 100%, 发病机制尚不明确<sup>[12,13]</sup>。迄今为止, 没有有效的治疗性药物和预防性疫苗。研究表明桦褐孔菌可通过抑制氧化应激反应, 起到保护神经细胞的作用<sup>[14,15]</sup>。在朊病毒病发生、发展过程中, 同样存在氧化应激反应<sup>[16]</sup>, 但尚未有文献报道桦褐孔菌或其提取物对朊病毒病具有抑制作用。本文旨在使用桦褐孔菌乙醇粗提取物处理朊病毒感染的细胞, 对其进行安全性评价, 同时分析是否对朊病毒的复制具有抑制作用及其初步的作用机制, 为朊病毒病的治疗提供新的方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

桦褐孔菌 (*Inonotus obliquus*) 生药样品, 俄罗斯贝加尔湖地区; 感染朊病毒毒株 Chandler 且能稳定传代的细胞系 SMB-S15, 英国 Roslin 研究所。

CCK-8 试剂盒, 北京智杰方远科技有限公司; 过氧化氢检测试剂盒、CuZn Mn-SOD 活性检测试剂盒,

碧云天生物技术有限公司; 蛋白酶 K、硝酸纤维素 (NC) 膜, 美国 Merck 公司; ECL 显影试剂盒, 美国 Perkin-Elmer 公司; PrP 抗体, 美国 Santa Cruz 公司; GCLC 抗体、GCLM 抗体, 美国 Proteintech 公司;  $\beta$ -actin 抗体, 北京华兴博创生物技术有限公司; 过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 美国 Jackson ImmunoResearch 公司。

### 1.2 仪器与设备

细胞培养箱, 德国 Eppendorf 公司; 化学发光成像仪器, 中国上海勤翔科学仪器有限公司生产的; 恒温水浴锅, 中国北京市精科华瑞仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 桦褐孔菌乙醇粗提取物的提取

选取质地均匀的桦褐孔菌干燥子实体, 将其碎成适当的小块后使用粉碎机粉碎。称量干燥的桦褐孔菌粉末 5 g, 采用醇提法对其进行提取, 过滤, 取上清液, 滤渣反复提取几次, 合并滤液。采用旋转蒸发器浓缩滤液, 冷冻干燥机对其进行冷冻干燥, 最终得到黄色浸膏状固体为桦褐孔菌乙醇粗提取物。计算桦褐孔菌乙醇粗提取物的得率。

桦褐孔菌乙醇粗提取物得率公式按下列公式计算:

$$\text{乙醇粗提取物得率}/\% = \frac{\text{乙醇提取物的重量}/\text{g}}{\text{桦褐孔菌生药粉重量}/\text{g}} \times 100\%$$

#### 1.3.2 桦褐孔菌乙醇粗提取物的正交试验

为了得到桦褐孔菌乙醇粗提取物的最佳工艺条件, 选择恰当的料液比、乙醇体积分数、提取时间、提取温度进行 4 因素 3 水平正交试验, 最终确定桦褐孔菌乙醇粗提取物的最优提取工艺。L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A 料液比 (g/mL)	B 乙醇体积 分数/%	C 提取 时间/h	D 提取 温度/°C
1	1:6	85	1.5	60
2	1:8	80	2.0	70
3	1:10	75	2.5	80

### 1.3.3 桦褐孔菌乙醇粗提物抑制朊病毒复制作用及其抗氧化活性试验

#### 1.3.3.1 制备桦褐孔菌乙醇粗提物样品

称量干燥的桦褐孔菌粉末样品,按照 1.3.2 确定的最优提取工艺获取乙醇粗提物。将其配置成质量浓度为 5 mg/mL 的母液,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,分装后置于暗处保存备用。

#### 1.3.3.2 SMB-S15 细胞培养

使用 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 SMB-S15 细胞,并置于 33  $^{\circ}\text{C}$ 、5%的  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中,当细胞密度达到 80%~90%左右时,按照 1:2~1:5 的比例传代。空白对照组不添加任何物质,试验组添加不同浓度的乙醇粗提物。

#### 1.3.3.3 Western blot 试验

细胞裂解后变性处理,使用 12% SDS PAGE 电泳跑胶,半干式电转仪转至 NC 膜,5%脱脂乳室温封闭孵育 2 h, TBST 润洗 3 次 $\times$ 10 min;再分别孵育 PrP (6D11)、 $\beta$ -actin (1:5000 稀释)抗体于 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 润洗 3 次 $\times$ 10 min;室温孵育辣根过氧化物 (HRP) 标记羊抗鼠二抗 (1:5000 稀释) 2 h, TBST 润洗 3 次 $\times$ 10 min; ECL 显色后,在化学发光成像仪中采集图像。

#### 1.3.3.4 CCK-8 试验

采用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。细胞处理不同浓度乙醇粗提物后,在 96 孔培养板中每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h,于 450 nm 处酶标仪测吸光度值,计算细胞存活率。

#### 1.3.3.5 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、SOD 及抗氧化因子检测

细胞处理后收集细胞沉淀块,按照每 100 万细胞加入 100~200  $\mu\text{L}$  过氧化氢检测裂解液的比例加入裂解液,随后充分匀浆以破碎并裂解细胞。4  $^{\circ}\text{C}$ , 12000 g 离心 5 min,取上清,按照  $\text{H}_2\text{O}_2$  检测试剂盒方法测定过氧化氢含量。

收集细胞,用 4  $^{\circ}\text{C}$  或冰浴预冷的 PBS 或生理盐水洗涤 1~2 遍。沉淀用预冷的 PBS 在 4  $^{\circ}\text{C}$  或冰浴进行匀浆(可以使用玻璃匀浆器或各类常见电动匀浆器)。随后匀浆液 4  $^{\circ}\text{C}$  离心,取上清,按照 SOD 检测试剂盒方法测定 SOD 抑制率。

抗氧化因子 GCLM、GCLC 的检测参照 1.3.3.3 实验方法

### 1.3.4 统计分析

本试验中绘图软件为 GraphPad Prism。免疫印迹图像定量分析软件为 Image J。采用  $t$  检验进行统计分析。 $p < 0.05$  代表具有统计学意义,\*\*\*代表  $p < 0.001$ ,\*\*代表  $p < 0.01$ ,\*代表  $p < 0.05$ ,ns (no significance)

代表无统计学意义。所有数值表示均为平均值 $\pm$ 相对标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 优化桦褐孔菌乙醇粗提物提取工艺

#### 2.1.1 正交试验结果

利用正交试验对桦褐孔菌乙醇粗提物提取工艺进行优化,选择料液比 (A) 为 1:6 ( $A_1$ )、1:8 ( $A_2$ )、1:10 ( $A_3$ ),乙醇体积分数 (B) 为 85% ( $B_1$ )、80% ( $B_2$ )、75% ( $B_3$ ),提取时间 (C) 为 1.5 h ( $C_1$ )、2.0 h ( $C_2$ )、2.5 h ( $C_3$ ),提取温度 (D) 为 60  $^{\circ}\text{C}$  ( $D_1$ )、70  $^{\circ}\text{C}$  ( $D_2$ )、80  $^{\circ}\text{C}$  ( $D_3$ ) 作为正交试验的优化条件。

正交试验结果如表 2 所示,以乙醇粗提物的得率为考察依据,通过测定所得的数据分析表明,乙醇粗提物得率的主要影响因素顺序为  $A > C > D > B$ ,对乙醇粗提物的得率影响最大的是 (A) 料液比,得率最高时的料液比为 1:10;对乙醇粗提物的得率影响最小的是 (B) 乙醇体积分数,得率最高时乙醇体积分数为 75%。基于正交试验结果,确定乙醇粗提物的最优提取条件为  $A_3B_3C_2D_3$ (料液比 1:10,乙醇体积分数 75%,提取时间 2 h,提取温度 80  $^{\circ}\text{C}$ )。

表 2 正交试验结果

Table 2 The experimental results of orthogonal test

试验编号	A	B	C	D	乙醇粗提物得率/%
1	$A_1$	$B_1$	$C_1$	$D_1$	4.64
2	$A_1$	$B_2$	$C_2$	$D_2$	5.18
3	$A_1$	$B_3$	$C_3$	$D_3$	5.30
4	$A_2$	$B_1$	$C_2$	$D_3$	6.30
5	$A_2$	$B_2$	$C_3$	$D_1$	6.04
6	$A_2$	$B_3$	$C_1$	$D_2$	5.96
7	$A_3$	$B_1$	$C_3$	$D_2$	6.24
8	$A_3$	$B_2$	$C_1$	$D_3$	6.18
9	$A_3$	$B_3$	$C_2$	$D_1$	6.40
$K_1$	15.12	17.18	16.78	17.08	
$K_2$	18.30	17.40	17.88	17.38	
$K_3$	18.82	17.66	17.58	17.78	
R	3.70	0.48	1.10	0.7	
最优水平	$A_3$	$B_3$	$C_2$	$D_3$	

### 2.2 桦褐孔菌乙醇粗提物抑制朊病毒复制作用及其抗氧化活性研究

#### 2.2.1 SMB-S15 细胞中 PrP 蛋白的检测

朊病毒病的致病因子为朊病毒 (PrP<sup>Sc</sup>),它具有

感染性，不溶性及部分抗蛋白酶 K (protein K, PK) 消化的能力<sup>[17]</sup>。根据 PrP<sup>Sc</sup> 这一特性，利用 Western blot 检测蛋白酶 K 处理后 SMB-S15 细胞裂解液的朊蛋白 (PrP) 特异性条带，便可观察到 PrP<sup>Sc</sup> 含量的变化。为了验证 SMB-S15 细胞中的 PrP<sup>Sc</sup>，利用 20 ng/mL 的蛋白酶 K 处理细胞，随后对其进行 PrP 蛋白检测。结果如图 1 所示，经蛋白酶 K 处理后，SMB-S15 细胞仍能检测到 PrP 特异性条带。该结果表明，SMB-S15 细胞含有朊病毒 PrP<sup>Sc</sup>。

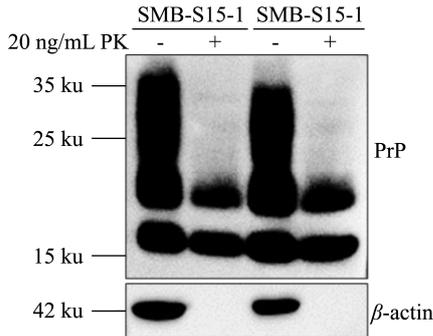


图 1 SMB-S15 细胞蛋白酶 K 处理前后 PrP 蛋白变化情况

Fig.1 Evaluation of PrP protein in SMB-S15 cells before and after treatment with proteinase K

### 2.2.2 桦褐孔菌乙醇粗提物的细胞安全性评价

药物本身以及高浓度可能会对细胞产生毒性作用。为了避免这种情况，本试验通过 CCK-8 方法检测乙醇粗提物对细胞存活率的影响，选择对细胞无毒副作用或毒副作用较小的安全质量浓度范围作为给药质量浓度。乙醇粗提物的细胞安全性评价结果如图 2 所示，采用 CCK-8 试验检测 24 h 的细胞存活率，结果显示当药物质量浓度为  $6.25 \times 10^{-4}$  mg/mL 时，SMB-S15 细胞的存活率为 89.33%；而当药物质量浓度为  $1.25 \times 10^{-3}$  mg/mL，细胞存活率下降至 87.33%，故最终得到乙醇粗提物的最大安全质量浓度范围为  $6.25 \times 10^{-4}$  mg/mL。

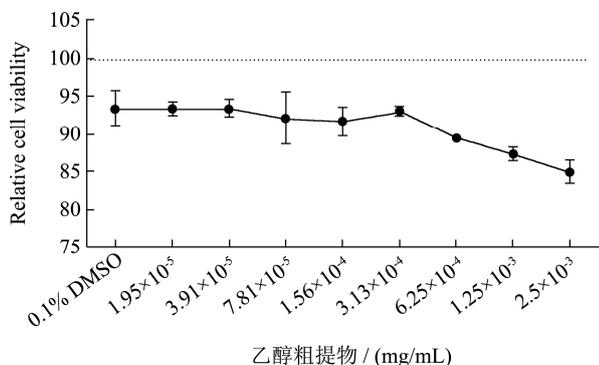


图 2 桦褐孔菌乙醇粗提物细胞安全性评价

Fig.2 Evaluation of cellular safety of ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus*

### 2.2.3 桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒复制的影响

据报道，桦褐孔菌生粉及提取物会对一些神经退行性疾病具有保护作用，包括阿尔兹海默症<sup>[18]</sup>、帕金森综合征<sup>[19]</sup>、血管性痴呆<sup>[20,21]</sup>等，但桦褐孔菌对朊病毒病是否具有作用尚未有文献报道。本试验基于细胞安全性评价结果，使用 Western blot 试验方法进一步检测乙醇粗提物对朊病毒复制的影响。结果如图 3 所示，不同质量浓度乙醇粗提物处理 SMB-S15 细胞 24 h，结果显示乙醇粗提物对 PrP<sup>Sc</sup> 的复制具有抑制作用，且呈现剂量依赖性，药物质量浓度为  $6.25 \times 10^{-4}$  ~  $3.91 \times 10^{-5}$  mg/mL 时，与对照组相比具有统计学差异。综上，在安全质量浓度范围内乙醇粗提物对朊病毒感染细胞 SMB-S15 处理 24 h 后，对朊病毒的复制具有抑制作用。本试验初步探究了乙醇粗提物对朊病毒复制的抑制或清除作用，这种作用可能是由于乙醇粗提物具有较强的抗氧化活性，直接或间接影响朊病毒的复制，但其具体作用机理目前尚不明确。

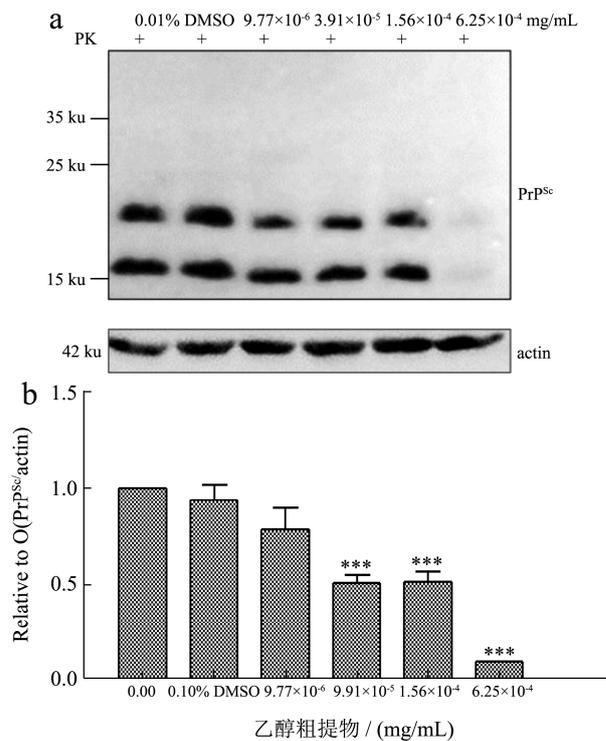


图 3 桦褐孔菌乙醇粗提物抑制复制朊病毒作用

Fig.3 Inhibition of prion replication by ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus*

### 2.2.4 桦褐孔菌乙醇粗提物的抗氧化活性

先前有文献证明，桦褐孔菌生粉及其提取物均具有较强的抗氧化活性<sup>[22,23]</sup>。为了进一步探究桦褐孔菌乙醇粗提物是否通过其抗氧化作用从而抑制朊病毒的复制，本试验检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SOD、GCLC、GCLM 的水平。先前有研究证明，朊病毒感染的细胞中 ROS 的水平会明显升高<sup>[16]</sup>，当机体遭受各种有害刺激时，体内的高活性物质如活性氧 (ROS) 会大量产生，导致机

体发生损伤。过氧化氢为 ROS 中的一类主要物质，首先利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 检测试剂盒对细胞内的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平进行检测，结果发现随着乙醇粗提物质量浓度的增加，其含量也逐渐减少，药物质量浓度为 6.25×10<sup>-4</sup>~1.56×10<sup>-4</sup> mg/mL 时，与对照组相比具有统计学差异（图 4）。该结果表明，乙醇粗提物能够降低 SMB-S15 细胞中的超氧化物，抵抗氧化应激产生的有害刺激。

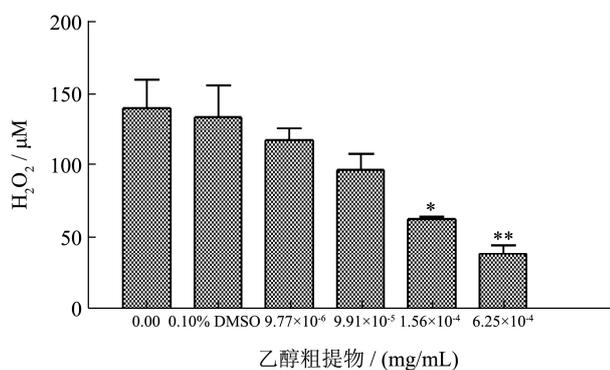


图 4 桦褐孔菌乙醇粗提物处理 SMB-S15 细胞后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平分析  
Fig.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels analysis of SMB-S15 cells treated with ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus*

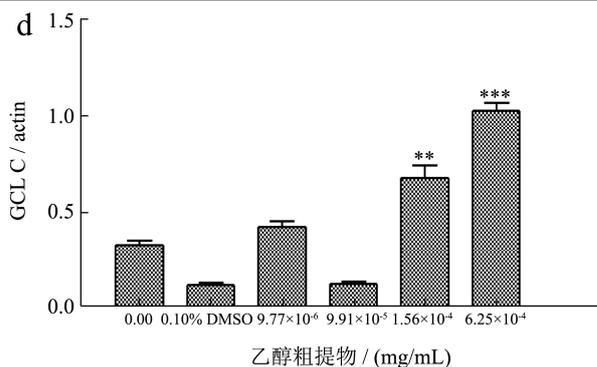
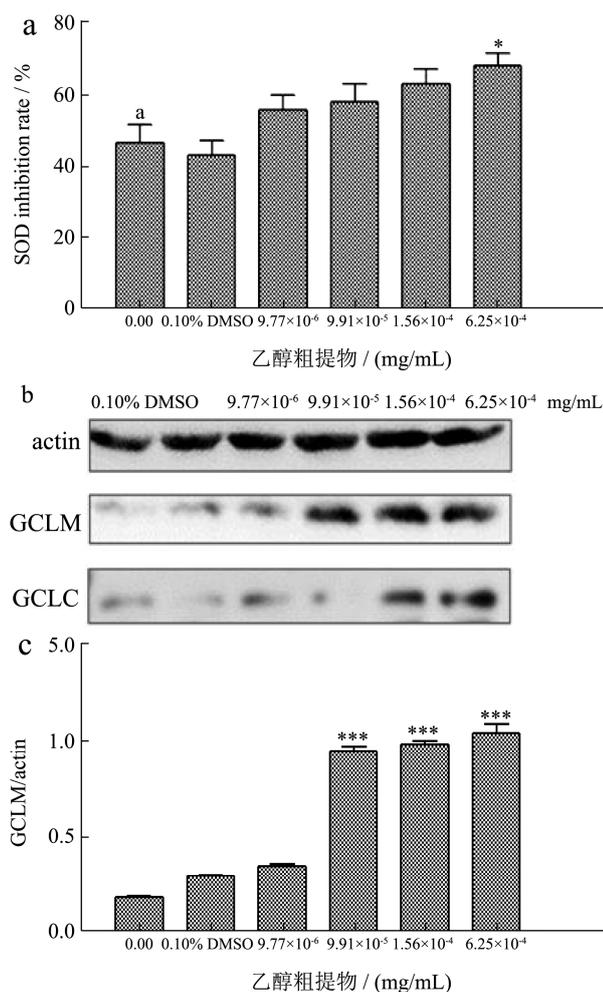


图 5 桦褐孔菌乙醇粗提物处理细胞后抗氧化因子水平分析  
Fig.5 Antioxidant factor levels analysis of SMB-S15 cells treated with ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus*

注：(a) SOD 抑制率变化；(b) GCLC、GCLM 蛋白含量变化；(c) GCLM 蛋白统计分析结果；(d) GCLC 蛋白统计分析结果。

为了进一步确定乙醇粗提物是通过抗氧化作用抑制朊病毒的复制，本试验检测了几种抗氧化因子。超氧化物歧化酶（SOD）是生物体内重要的酶之一，是机体内氧自由基的主要清除者，近年来成为许多氧化应激引起的疾病的研究靶点。谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚基（GCLC）及谷氨酰半胱氨酸合成酶调节亚基（GCLM）是体内还原性谷胱甘肽合成的限速酶，可以促进谷胱甘肽的合成，增强细胞的抗氧化能力<sup>[24]</sup>。结果显示，随着乙醇粗提物质量浓度的增加，SOD 的抑制率也逐渐增加，且在 6.25×10<sup>-4</sup> mg/mL 时具有统计学意义（图 5a）；GCLC 及 GCLM 的蛋白含量也逐渐增加（图 5b）。以上结果表明，在抑制朊病毒复制作用的过程中，桦褐孔菌乙醇粗提物的抗氧化活性发挥了作用。

### 3 结论

3.1 本研究以桦褐孔菌生粉为原料，利用醇提法提取桦褐孔菌乙醇粗提物，正交试验确定最佳提取条件。此外，采用 CCK-8 试验，对桦褐孔菌乙醇粗提物进行细胞安全性评价，得到其最大安全质量浓度为 6.25×10<sup>-4</sup> mg/mL；在此安全质量浓度下，使用 Western blot 试验，发现处理 24 h 后对朊病毒的复制具有抑制作用；通过检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和几种抗氧化因子，初步探究了这种抑制作用可能是通过其抗氧化活性产生的。

3.2 本试验初步探究了桦褐孔菌对朊病毒病的影响及其潜在的作用机制，证明了桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒病的致病因子 PrP<sup>Sc</sup> 的复制具有抑制作用，且这种抑制作用是通过抗氧化活性产生的，但对于抗氧

化作用机制的具体信号通路尚未清楚,还有待进一步研究。桦褐孔菌作为一种天然产物,既能当做食品添加剂,也可作为保健品,且毒副作用较小,这对未来的食品开发及疾病治疗方面都有很大的潜力。本试验为朊病毒病的治疗提供了理论依据,同时也为后续桦褐孔菌对神经保护方面的研究奠定了科学基础。

### 参考文献

- [1] Hokputsa S, Harding S E, Inngjerdingen K, et al. Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features [J]. Carbohydrate Research, 2003, 339(4): 753-762
- [2] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌-桦褐孔菌[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 7-8  
HUANG Nian-lai. The mysterious Russian folk medicinal fungus - *Inonotus obliquus* [J]. Edible Fungi of China, 2002, 21(4): 7-8
- [3] 饶平凡, 陈琦, 周河美, 等. 桦褐孔菌水提粉的抗氧化性及对人体经络电压的作用初探[J]. 中国食品学报, 2020, 20(6): 88-94  
RAO Ping-fan, CHEN Qi, ZHOU Mei-he, et al. Preliminary study on the antioxidant capacity of water extracts derived from *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat and its effect on human meridian voltage [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(6): 88-94
- [4] Eid J I, Das B. Molecular insights and cell cycle assessment upon exposure to chaga (*Inonotus obliquus*) mushroom polysaccharides in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Scientific Reports, 2020, 10: 7406
- [5] Tian J, Hu X L, Liu D, et al. Identification of *Inonotus obliquus* polysaccharide with broad-spectrum antiviral activity against multi-feline viruses [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 160-167
- [6] Jiang S P, Shi F, Lin H, et al. *Inonotus obliquus* polysaccharides induces apoptosis of lung cancer cells and alters energy metabolism via the LKB1/AMPK axis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 1277-1286
- [7] Javed S, Mitchell K, Sidsworth D, et al. *Inonotus obliquus* attenuates histamine-induced microvascular inflammation [J]. Plos One, 2019, 14: e0220776
- [8] Zhang L, Lin D, Li H, et al. Immunopotentiating effect of *Inonotus obliquus* fermentation products administered at vaccination in chickens [J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, 41: 43-51
- [9] 崔杰, 于新, 王立勋, 等. 桦褐孔菌化学成分和药理作用研究进展[J]. 河北中医药学报, 2017, 32(3): 48-53  
CUI Jie, YU Xin, WANG Li-xun, et al. Advances in the study of chemical constituents and pharmacological effects of *Inonotus obliquus* [J]. Journal of Hebei Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, 2017, 32(3): 48-53
- [10] 萧小. 桦树“肿瘤”成人类抗癌最佳药物[J]. 中国林业产业, 2016, Z1: 134-135  
XIAO Xiao. Birch “tumors” become the best anti-cancer drug for humans [J]. China Forestry Industry, 2016, Z1: 134-135
- [11] Greenlee J J, West G M H. The transmissible spongiform encephalopathies of livestock [J]. Ilar Journal, 2015, 56(1): 7-25
- [12] Walker L C, Jucker M. Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept [J]. Annual Review of Neuroscience, 2015, 38(1): 87-103
- [13] Ironside J W, Ritchie D L, Head M W. Prion diseases [J]. Handbook of Clinical Neurology, 2017, 145: 393-403
- [14] Nakajima Y, Nishida H, Nakamura Y, et al. Prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells by 3,4-dihydroxybenzalacetone isolated from chaga (*Inonotus obliquus* (persoon) Pilat) [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2009, 47(8): 1154-1161
- [15] Li Y, Zhang W, Chen C, et al. Inotodiol protects PC12 cells against injury induced by oxygen and glucose deprivation/restoration through inhibiting oxidative stress and apoptosis [J]. Journal of Applied Biomedicine, 2018, 16(2): 126-132
- [16] 阿达莱提·买买提明, 武月章, 谢姆斯耶·吾拉音, 等. 线粒体靶向抗氧化剂 Mitoquinone 和积雪草酸对朊病毒感染的神经细胞的治疗作用研究[J]. 病毒学报, 2019, 35(2): 247-254  
MAIMAITIMING Adalaiti, WU Yue-zhang, WULAYIN Xiemusiye, et al. The therapeutic role of mitochondria-targeted antioxidants mitoquinone and Asiatic acid in scrapie infected cell line SMB-S15 [J]. Chinese Journal of Virology, 2019, 35(2): 247-254
- [17] Bolton D C, McKinley M P, Prusiner S B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion [J]. Science, 1982, 218(4579): 1309-1311
- [18] Giridharan V V, Thandavarayan R A, Konishi T. Amelioration of scopolamine induced cognitive dysfunction and oxidative stress by *Inonotus obliquus* - a medicinal mushroom [J]. Food & Function, 2011, 2(6): 320-327

(下转第7页)