

白鲢骨骼肌丝氨酸蛋白酶抑制剂的提取、纯化及其特性

胡新颖, 刘欢, 张楠, 马长伟

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:从白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)骨骼肌中分离纯化到一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 该抑制剂的分子量大约 50 kD, 用 PAGE-明胶电泳证明, 该抑制剂对胰蛋白酶具有抑制作用; 当温度超过 60 ℃ 时, 抑制剂的活性下降 70% 左右, 但在 pH 3~11 的范围内均有活性。用 MTT 法分析白鲢骨骼肌丝氨酸蛋白酶抑制剂对急性 T 细胞白血病细胞 Jurkat、人骨髓瘤细胞 Sp20 和人骨髓瘤细胞 MG63 生长的影响, 结果发现该抑制剂对以上 3 种肿瘤细胞的增殖都有抑制作用, 而且抑制作用呈剂量依赖性。本研究旨在为进一步研究白鲢骨骼肌丝氨酸蛋白酶抑制剂的纯化及其抗肿瘤作用提供科学依据。[中国水产科学, 2006, 13(2): 316~321]

关键词:丝氨酸蛋白酶抑制剂; 白鲢; 纯化

中图分类号:S986 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)02-0316-06

天然蛋白酶抑制剂(proteinase inhibitor, PI)是对蛋白水解酶有抑制活性的蛋白质, 广泛存在于植物、动物和微生物^[1]中, 是自然界中含量最为丰富的蛋白种类之一^[2~4]。PI 具有防止体内不必要的蛋白降解的作用, 能调节蛋白代谢及调节各种蛋白酶的生理活性。迄今为止, 自然界共发现四大类蛋白酶抑制剂: 抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶的丝氨酸蛋白酶抑制剂; 抑制木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶的巯基蛋白酶抑制剂; 抑制胶原酶、氨肽酶的金属蛋白酶抑制剂和抑制胃蛋白酶、组织蛋白酶 D 的羧基蛋白酶抑制剂^[5]。蛋白酶抑制剂在医学上可用作恶性肿瘤治疗、抗血栓以及艾滋病防治的药物; 在植物对害虫和病原体的侵染防御系统中可作为防御植食性害虫的有效武器。

到目前为止, 已从多种动植物体中提取到蛋白酶抑制剂。鱼体中也存在天然蛋白酶抑制剂, 国外的研究人员已经从不同种类鱼的肌肉^[6]、血清^[7]、卵巢^[8]和皮^[9]中分离纯化出多种蛋白酶抑制剂, 其主要种类是丝氨酸蛋白酶抑制剂和半胱氨酸蛋白酶抑制剂。

中国是淡水渔业大国, 对于鱼体有价值的成分尚未充分提取和利用。关于淡水鱼体内蛋白酶抑制剂的研究在国内还是空白。本研究从白鲢骨骼肌中

分离出一种丝氨酸蛋白酶抑制剂并进行纯化, 同时测定其基本理化性质, 旨在探讨其潜在的抗肿瘤作用, 并为淡水鱼的高效加工利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器设备

白鲢购于市场, 体长 28~30 cm, 体质量 1000 g 左右; DEAE-Sephacel、SP-Sepharose、Blue-Sepharose、Con-Sepharose 均为 Amersham-Pharmacia 公司产品; 牛胰蛋白酶、Boc-Val-Leu-Lys-MCA、分子量标准蛋白、DMEM、RPMI1640、HEPES、MTT 均为 Sigma 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器和设备: pH 计、组织破碎匀浆器、荧光分光光度计、高速冷冻离心机、低压液相层析系统、电泳仪(Bio-Rad)、连续波长酶标仪。

1.2 蛋白酶抑制剂的提取和纯化

白鲢宰杀后迅速获取骨骼肌, 经低温预冷后, 绞碎并溶于 3~5 倍体积经预冷的 2% (W/V) KCl 溶液中, 用组织破碎匀浆器磨碎(低温进行), 离心 10 000 g 20 min, 上清液在 pH 8.0 含 50 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L 硼酸盐缓冲液中, 透析, 浓缩。加样至 DEAE-Sephacel (3.5 cm × 20 cm) 柱中, 用上述硼酸盐缓冲液洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 结合蛋

收稿日期: 2005-06-06; 修订日期: 2005-09-26。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371122)。

作者简介: 胡新颖(1972-), 女, 博士研究生; 研究方向: 水产品加工。

通讯作者: 马长伟, 中国农业大学食品科学与营养工程学院 303 信箱 100083, E-mail: chwmw@cau.edu.cn

白用含 1 mol/L NaCl 的硼酸盐缓冲液洗脱,测定活性并收集活性组分;将此蛋白溶液用 pH 6.0、20 mmol/L 的硼酸盐缓冲液透析,加样至 SP-Sepharose (2.6 cm × 20 cm) 柱中,同时用该缓冲溶液洗脱,结合蛋白用含 1 mol/L NaCl 硼酸盐缓冲液洗脱,收集活性组分;再用 pH 7.5、20 mmol/L 硼酸盐缓冲液透析,浓缩后加样至 Blue-Sepharose (1.0 cm × 8 cm) 柱,结合蛋白用 2 mol/L NaCl 硼酸盐缓冲液洗脱,收集活性组分,最后用含 3 mmol/L MnCl₂、5 mmol/L CaCl₂ 和 300 mmol/L NaCl (pH 7.5) 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液透析,浓缩后加样至 Con-Sepharose (1.0 cm × 8 cm) 柱中,用上述缓冲溶液洗脱,流速为 0.3 mL/min,结合蛋白用含 1 mol/L α-甲基吡喃甘露糖苷的缓冲溶液洗脱,测定活性并收集活性组分。

1.3 蛋白酶抑制剂的活性测定

蛋白酶抑制剂的活性由牛胰蛋白酶的剩余活性来表示^[7]。牛胰蛋白酶的活性测定方法如下:用 Boc-Val-Leu-Lys-MCA 作底物,取 780 μL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 8.0), 100 μL 牛胰蛋白酶 (1.0 μg Pr), 20 μL 抑制剂溶液, 室温下反应 5~10 min, 加入 100 μL 20 μmol/L 底物, 于 37℃ 反应 10 min, 加入终止试剂 (甲醇、正-丁醇、蒸馏水混合液, 体积比 35:30:35) 1.5 mL 终止反应。蛋白酶的剩余活性用荧光分光光度计在激发波长 352 nm、发射波长 438 nm 测得的 7-氨基-4-甲基香豆素的释放量来表示。对照组在同等条件下抑制剂溶液用硼酸盐缓冲液代替组成。1 单位的酶活由每分钟释放的 MCA 的量来表示, 1 单位的抑制作用指对每分钟释放 1 nmol 的 MCA 胰蛋白酶活性的抑制。活性测定至少重复 2 次。

反向酶谱测定^[10]: 纯化后的蛋白样品经过 PAGE-明胶电泳后, 将凝胶置于含胰蛋白酶的溶液分别保温 0.5 h、1 h 和 2 h, 含胰蛋白酶抑制剂部位的明胶不被胰蛋白酶水解而呈现蛋白染色带。

1.4 蛋白酶抑制剂的分子量测定^[11]

采用不连续的 SDS-PAGE 垂直电泳检测蛋白酶抑制剂的纯度和分子量。分离胶的浓度为 12.5%, 浓缩胶的浓度为 5%, 样品置于沸水浴中加热变性 2 min, 冷却, 稍作离心后加样, 所用的标准分子量为 14.2 kD、20 kD、24 kD、29 kD、36 kD、45 kD、66 kD, 电泳完成后, 凝胶用考马斯亮蓝进行染色, 待脱色至背景清晰后进行扫描。

1.5 蛋白酶抑制剂的 pH 及热稳定性

将纯化后的样品在温度梯度为 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃ 时各保温 10 min, 测定其剩余活性; 同时将样品置于 pH 值梯度为 2、4、6、8、10 条件下反应 10 min, 测定其剩余活性。

1.6 对肿瘤细胞的抑制作用

1.6.1 肿瘤细胞的培养 急性 T 细胞白血病细胞 Jarkat 接种在含有 10% 的胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 kU/L 青霉素, 100 mg/L 硫酸链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

人骨髓瘤细胞 MG63 接种在含有 10% 的胎牛血清, 低糖 DMEM 培养液中。

人骨髓瘤细胞 Sp20 接种在含有 10% 的胎牛血清, 高糖 DMEM 培养液中, 分别置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。

1.6.2 细胞生长抑制实验 3 种肿瘤细胞分别均以 5×10^7 /L 密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 培养 24 h 后, 加入经纯化的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 终浓度质量度分别为 0 g/L、0.1 g/L、0.2 g/L、0.5 g/L、1.0 g/L, 分别培养 24 h 后, 用 MTT 法^[12] 测 570 nm 处的吸光值。

1.6.3 MTT 检测 在 96 孔板中每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 37℃ 条件下继续孵育 4 h, 终止培养。小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 20 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 选择 570 nm 的波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值 (A_{570}), 求出细胞增殖的抑制率。重复 3 次。

$I(\text{抑制率}) = (\text{对照组吸光值平均值} - \text{实验组吸光值平均值}) / \text{对照组吸光值平均值} \times 100\%$

2 结果

2.1 白鲢丝氨酸蛋白酶抑制剂的分离纯化

由于通过离子交换可以使目的蛋白与肌肉中的其他大量杂蛋白及一些酶类的结合状态打开, 达到快速、有效的分离目的, 因此在分离白鲢蛋白酶抑制剂的实验中采用了离子交换方法。结果显示, 蛋白酶抑制剂的活性部分出现在高盐洗脱部分, 如图 1 和图 2 所示, 除去了大量杂蛋白。

经过离子交换分离后, 再采用染料亲和树脂进行分离。在这步纯化中, 大部分的杂蛋白被染料亲

和,而活性蛋白却不被吸附(图3),电泳分析显示(图5A),可知经过此步分离后只有两条蛋白带;最后把活性蛋白通过 ConA-Sepharose 亲和树脂分离(图4),活性蛋白出现在洗脱的最前端,不被树脂吸附,属于非糖蛋白。

2.2 白鲢丝氨酸蛋白酶抑制剂的纯度检测及蛋白活性电泳分析

电泳分析可知(图5A),经过各个步骤的分离纯化,杂蛋白被逐步去除,经过 ConA-Sepharose 亲和层析后,获得电泳纯的单一蛋白带,分子量大约为 50 kD。已研究发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂分子量

为 55~62 kD^[6,9]不等,有些由轻重两条链构成,有些由单一肽链构成。通过蛋白活性电泳实验,经过不同的反应时间(图5B),可以清晰地看到抑制剂存在的暗带。

2.3 白鲢丝氨酸蛋白酶抑制剂的 pH 及热稳定性

对纯化的蛋白酶抑制剂进行的基本性质研究表明,该抑制剂的热稳定性在温度超过 60℃ 时,开始迅速降低(图6),70℃ 时其活性仅为初始活性的 30%左右,90~100℃ 时已完全失去活性。该蛋白酶抑制剂有比较好的 pH 稳定性(图7),在 pH 3~11 均有活性。

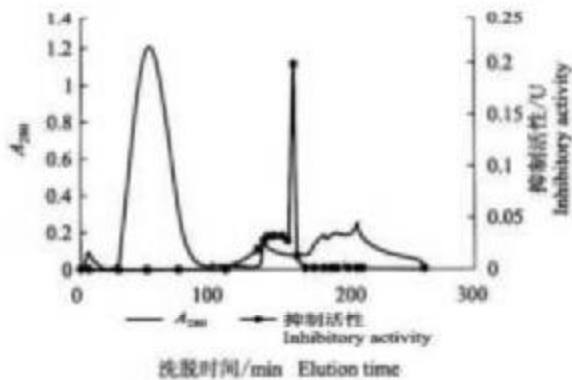


图1 白鲢骨骼肌蛋白酶抑制剂经 DEAE-Sepharose 分离洗脱及活性曲线

Fig.1 DEAE-Sepharose chromatography of proteinase inhibitor from silver carp skeletal muscle and its inhibitory activity

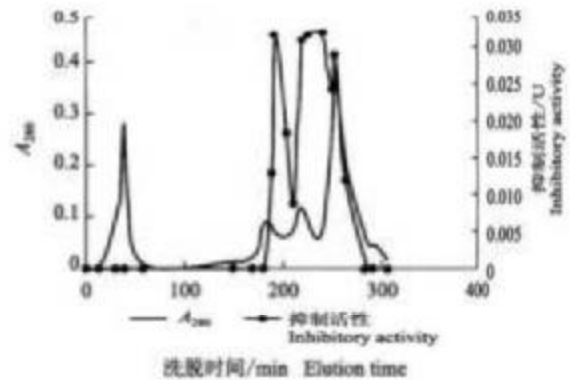


图2 SP-Sepharose 分离洗脱及活性曲线

Fig.2 SP-Sepharose chromatography of proteinase inhibitor from the DEAE-Sepharose pool and its inhibitory activity

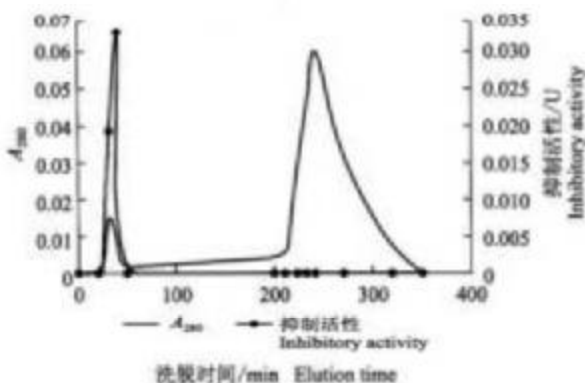


图3 Blue-Sepharose 分离洗脱及活性曲线

Fig.3 Blue-Sepharose chromatography of proteinase inhibitor from the SP-Sepharose pool and its inhibitory activity

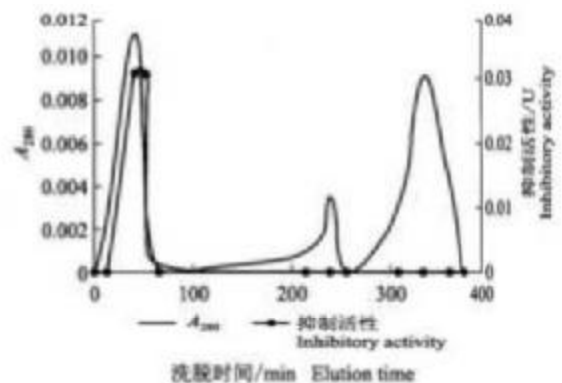


图4 ConA-Sepharose 分离洗脱及活性曲线

Fig.4 ConA-Sepharose chromatography of proteinase inhibitor from the concentrated Blue-Sepharose and its inhibitory activity

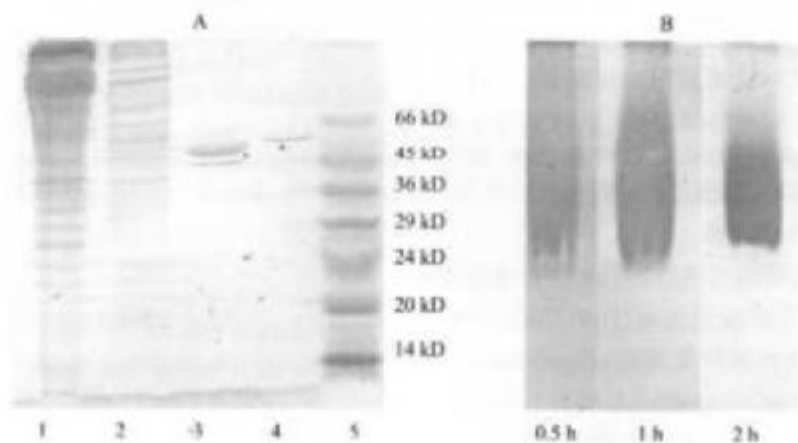


图5 蛋白酶抑制剂各纯化步骤的电泳图谱及抑制剂的反向酶谱图

(A) SDS-PAGE 电泳: 1. DEAE-Sepharose; 2. SP-Sepharose; 3. Blue-Sepharose; 4. ConA-Sepharose; 5. 标准蛋白。
(B) 反向酶谱: 不同反应时间的明胶-PAGE 活性电泳。

Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis of trypsin inhibitor and Gelatin reverse zymography

(A) SDS-PAGE of samples containing trypsin inhibitory activity at different purification stages. Lanes 1, DEAE Sepharose; 2, SP-Sepharose; 3, Blue-Sepharose 6 Fast Flow; 4, Con A-Sepharose; and 5, standard proteins.

(B) Gelatin reverse zymography. Polyacrylamide gels under nondenaturing conditions at different times.

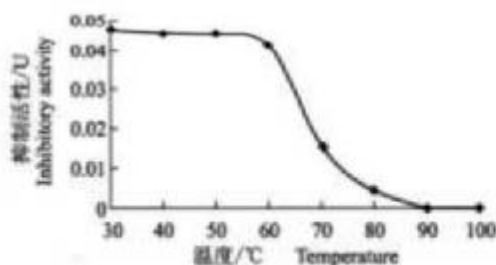


图6 蛋白酶抑制剂的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of the purified trypsin inhibitor

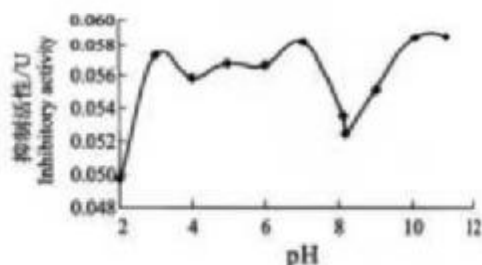


图7 蛋白酶抑制剂 pH 稳定性

Fig. 7 pH stability of the purified trypsin inhibitor

2.4 白鲢丝氨酸蛋白酶抑制剂对3种肿瘤细胞24 h增殖的抑制作用

3种肿瘤细胞培养液中加入蛋白酶抑制剂培养24 h后,用MTT法检测活细胞密度,计算抑制率如图8所示,3种细胞增殖受到不同程度的抑制,并且抑制作用随着抑制剂用量的增加而增强。

3 讨论

3.1 电泳分析的最佳时间

在蛋白酶的研究中,活性电泳的应用较广泛,酶可以水解胶中的蛋白,染色后呈亮带;而在以明胶为底物分析蛋白酶抑制剂活性的方法中,凝胶在酶液

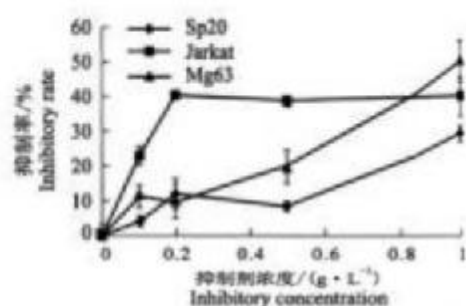


图8 丝氨酸蛋白酶抑制剂对3种肿瘤细胞24 h增殖的抑制作用

Fig. 8 Effects of serine proteinase inhibitor on the proliferation of the three cells in 24 h

中反应,明胶蛋白及其他蛋白水解,蛋白酶抑制剂存在的地方蛋白不被水解,经过染色后呈暗带,应用明胶活性电泳可以有效地检测蛋白酶抑制剂的活性。本实验经过不同的反应时间(图5B),发现如果水解时间过长,明胶被过度水解,会导致背景过淡,蛋白染色不清晰,比较结果认为经过1 h反应比较适合。

3.2 最适 pH 值及热稳定性

对纯化的蛋白酶抑制剂进行的基本性质研究表明,该抑制剂的热稳定性在温度超过60℃时,开始迅速降低(图6),从其他鱼种如鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[13]、白鲢鱼(*Micropogon opercularis*)^[14]分离的蛋白酶抑制剂也有相似的热稳定性;然而,该蛋白酶抑制剂有比较好的pH稳定性(图7),只在pH 2和pH 8时相对于其他pH条件下的活性较低。

3.3 对肿瘤细胞的抑制作用

丝氨酸蛋白酶抑制剂对肿瘤细胞增殖的抑制作用研究的较少,目前发现的从植物中提取到的一些胰蛋白酶抑制剂有的已经证明有抑制肿瘤细胞生长的作用,如苦荞胰蛋白酶抑制剂对HL-60细胞增殖有抑制作用^[15]。由于丝氨酸蛋白酶抑制剂主要是对蛋白酶的活性有抑制作用,因此推断,丝氨酸蛋白酶抑制剂可能会抑制细胞中某些蛋白水解酶的活性,如泛素-蛋白水解酶复合物,其中的丝氨酸蛋白酶及细胞周期中其他蛋白酶中的丝氨酸蛋白酶的活性,可能会导致细胞内丝氨酸蛋白酶家族中某些成员不能正常发挥作用,或者诱导它们过度表达,从而使细胞的生长周期不能正常地向下一个时期及周期推进,影响了增殖的正常进行,达到了抑制生长的作用。

参考文献:

- [1] 文方德,傅家瑞. 植物种子的蛋白酶抑制剂及其生理功能[J]. 植物生理学通讯,1997,33(1):1-9.
- [2] 朱新生,朱玉贵. 抗虫植物基因工程研究进展[J]. 植物学报,1997(39):282-288.
- [3] Knight P J K, Crickmore N, Ellar D J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brushborder membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is a minipeptase[J]. N Mol Microbiol,1994(11):429-436.
- [4] Sungchala S, Walters F S, English L H, et al. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and ⁸⁶Rb⁺-K⁺ efflux in vitro[J]. J Biol Chem,1994,269:10 088-10 092.
- [5] Barrett A. Nomenclature and classification of the protein homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin[J]. Biochem J,1982,236:311-312.
- [6] Cao M J, Oatomi K, Hara K, et al. Purification of a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*) [J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,272:485-489.
- [7] Aranishi F. Purification and characterization of serum serpin from carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Mar Biotech,1999(1):81-88.
- [8] Jang Y, Geon T, Chang D, et al. Purification and molecular cloning of carp ovarian cystatin [J]. Comp Biochem Physiol,1996,113B(3):573-580.
- [9] Symmes M. Purification and characterization of two cysteine proteinase inhibitors from the skin of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L.) [J]. Comp Biochem Physiol,1998,121(B):257-264.
- [10] 桑玉英. 常规聚丙烯酰胺凝胶电泳快速检测胰蛋白酶抑制剂的方法[J]. 云南植物研究,2001,23(2):236-238.
- [11] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000.8.
- [12] Garnet-Peyrauste L, Li P, Larnosa S, et al. Sulfonaphthyl, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells [J]. Gene Res,2000,60:1 426-1 433.
- [13] Aranishi F. Purification and characterization of α₁-proteinase inhibitor from carp (*Cyprinus carpio*) serum[J]. Mar Biotech,1999(1):33-43.
- [14] Sengorrin M P, Folco E J, Martone C M, et al. Purification and characterization of a proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*) [J]. Inter J Biochem Cell Bio,2001(33):691-699.
- [15] 王宏伟,乔振华,任文英,等. 苦荞胰蛋白酶抑制剂对HL-60细胞增殖的抑制作用[J]. 山西医科大学学报,2002,33(1):3-5.

Extraction, purification and properties of a serine proteinase inhibitor from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skeletal muscle

HU Xin-ying, LIU Huan, ZHANG Nan, MA Chang-wei

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: A serine proteinase inhibitor was purified from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skeletal muscle by chromatographies on DEAE-Sephacel, SP-Sephacrose, Blue-Sephacrose and Con A-Sephacrose. The purified inhibitor is a monomeric protein with the molecular mass of 50 kD as estimated by SDS-PAGE. Gelatin reverse zymography showed it had inhibitory activity on trypsin. The thermal stability of the inhibitor sharply decreased at temperatures over 60 °C, but showed a wide range of pH stability (pH 3–11). The antiproliferative effect of the purified serine proteinase inhibitor was determined by MTT on Sp20 cells, Jarkat cells and MG63 cells. It showed the inhibition on the proliferation of the three cells in a dose-dependent manner. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 316–321]

Key words: serine proteinase inhibitor; silver carp; purification

Corresponding author: MA Chang-wei. E-mail: chwm@cau.edu.cn

《中国水产生物种质资源与利用》征订启事

《中国水产生物种质资源与利用》是一部关于中国水产养殖生物种质资源研究成果的学术专著,由海洋出版社出版。该书共收集了 58 种中国重要水产养殖生物种质资源学术研究成果,其中包括鱼类 47 种,节肢动物 4 种,软体动物 6 种,爬行类 1 种。书中详细介绍了各物种的生物学状态、生理、生化、遗传学特征,以及它们的养殖技术和目前的种质保存状况等。书中收集了大量的基础研究数据资料,对科学保护和合理开发利用这些生物种质资源具有重要的参考价值。该书可供从事水产生物养殖、遗传育种、生物学研究、野生动物保护等学科领域的科技人员、研究生及大专院校师生参考,欢迎订购。

订价:160.00 元 邮费 6.00 元 共计 166.00 元

联系地址:北京市丰台区青塔村 150 号

联系人:中国水产科学研究院渔业综合信息研究中心 黄希玲

邮编:100039

电话:010-68673906

传真:010-68673934