

河蚬中活性蛋白 CFp-a 的分离纯化及其活性

祝雯, 林志铿, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉

(福建农林大学 植物病毒研究所, 农药与生物化学教育部重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要:采用硫酸铵分级沉淀, Blue Sepharose 6 Fast Flow、SP Sepharose Fast Flow 和 HPLC 柱层析, 从河蚬 (*Corbicula fluminea*) 中分离纯化蛋白 CFp-a。经 SDS-PAGE 测定, 其分子量为 24.0 kD; 经苯酚硫酸法测定, 其含糖量为 2.3%。10~160 $\mu\text{g/mL}$ CFp-a 分别处理肝癌细胞 BEL7404 72 h 后, 采用四氮唑还原法 (MTT) 检测癌细胞的生长活性, 结果显示, CFp-a 对 BEL7404 癌细胞生长的抑制率在 24.6%~79.2%。采用质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 和 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 CFp-a 分别处理 BEL7404 48 h 后, 用流式细胞仪 (FCM) 检测细胞凋亡, 可以在 DNA 直方图上观察到典型的亚 G_1 峰, 凋亡率分别为 10.99% 和 15.51%。

关键词:河蚬; 蛋白纯化; 癌细胞; 诱导凋亡

中图分类号: Q959.215; S986.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)04-0349-05

河蚬 (*Corbicula fluminea*) 又称黄蚬、金蚬、扁螺等, 广泛分布在湖泊、江河中。河蚬具有治疗肝病、麻疹和退热等功效^[1]。目前河蚬资源的利用仅局限在鲜食, 或者制成蚬干、咸蚬、罐头等粗加工方面。有关河蚬的化学成分及药理活性的深入研究尚少见报道。因此, 进行河蚬活性成分的分离纯化和活性成分的研究, 开展富含其活性物质制品研发, 将有利于提高河蚬资源的利用效益, 同时对于促进河蚬养殖业的发展具有重要作用。

本研究采用生化分离技术, 从河蚬水溶性蛋白中分离纯化了一种命名为 CFp-a 的蛋白, 并研究了该蛋白分离纯化的方法及其性质, 通过 MTT 法和 FCM 对其体外抑制肝癌细胞 BEL7404 增殖和诱导凋亡作用做了初步研究。旨在河蚬有效活性成分的提取及其生物制品的研制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

新鲜河蚬采集于福州闽江。肝癌细胞 BEL7404 由福建省医科大学附属医院肝胆外科研究所保存惠赠。

1.2 试剂及仪器

亲和层析介质 Blue-Sepharose 6 Fast Flow 购自 Amersham Biosciences 公司。SP Sepharose Fast

Flow 和 Sephadex G-50 均购自 Pharmacia Biotech 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、十二烷基硫酸钠 (SDS)、考马斯亮蓝 R-250 等均购自上海生物工程有限公司。蛋白质层析系统购自上海沪西仪器厂。HPLC 采用 Waters 650E, 色谱柱为 protein-pak 125 (0.79 cm $\times$ 30 cm), 检测器 Waters 486 分光光度计, 数据处理机 waters 746。PBS 缓冲液均为 0.02 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.8), Tris-HCl 缓冲液为 0.02 mol/L, pH 7.5。

1.3 实验方法

1.3.1 CFp-a 的分离纯化

(1) 样品处理。取鲜活河蚬 (壳长 2~3 cm) 样品 1 kg, 去壳后匀浆, 加入 3 倍体积的 PBS, 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸提 30 min, 然后离心 (8 000 r/min, 20 min), 取上清液。

(2) 硫酸铵盐析。将上述上清液进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀, 取 50%~80% 组分, 离心 (10 000 r/min, 20 min), 收集沉淀, 溶于 Tris-HCl, 并用蒸馏水透析除盐, 然后再用 Tris-HCl 平衡。

(3) Blue Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析。将透析液加入用 Tris-HCl 平衡的 Blue Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析柱 (2 cm $\times$ 5 cm), 用 Tris-HCl 洗脱至 $A_{280} < 0.02$ 后, 用含 0.5 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 洗脱 100 mL, 流速为 1 mL/min。将该洗脱液收集浓

收稿日期: 2003-10-16; 修订日期: 2004-02-27。

基金项目: 福建省科技厅重大资助项目 (2000H004)。

作者简介: 祝雯 (1971-), 女, 博士研究生, 从事天然活性物质研究。

通讯作者: 谢联辉。E-mail: XieLH@fjau.edu.cn

缩后用 PBS 平衡。

(4) SP Sepharose Fast Flow 层析。将收集的上述蛋白溶液加入用 PBS 平衡的 SP Sepharose Fast Flow 柱 (1.7 cm × 15 cm), 用 PBS 洗脱至 $A_{280} < 0.02$, 以含 0~0.5 mol/L NaCl 的 PBS 梯度洗脱, 流速 40 mL/h, 4 mL/管。测定 OD_{280} , 收集洗脱峰, 浓缩并用 PBS 平衡。

(5) HPLC 分离。用 PBS 配制 2 mg/mL 上述蛋白溶液, 取 0.5 mL 经色谱柱 protein-pak125 (0.79 cm × 30 cm), 流速为 0.8 mL/min。流动相为 PBS 缓冲液, 检测器为 Water 486 分光光度计于 280 nm 检测。

1.3.2 纯度鉴定 采用 protein-pak125 (0.79 cm × 30 cm) 高压液相色谱柱对提纯蛋白进行纯度鉴定, 流动相为 PBS (0.02 mol/L, pH 6.8)。

1.3.3 SDS/PAGE 电泳测定分子量^[2] 采用不连续凝胶电泳, 浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 15%, 浓缩胶缓冲液 pH 6.8, 分离胶缓冲液 pH 8.8。在凝胶成像仪 (IS-1000) 上进行拍照、保存和分析。

1.3.4 糖含量测定 苯酚—硫酸法^[3] 测蛋白质中糖含量。

1.3.5 氨基酸组成分析 氨基酸组成分析由国家药物管理局福建省微生物所完成, 将样品用 6 mol/L HCl 在 110 °C 水解 18 h 后, 在氨基酸自动分析仪上分析。

1.3.6 MTT 法测定 CFP-a 对 BEL7404 肝癌细胞增殖生长的抑制作用 对 BEL7404 肝癌细胞增殖生长的抑制作用采用 MTT 法 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay, 四氮唑还原法]^[4], 细胞按 3.0×10^4 cells/mL 接种于 96 孔板, 每孔板 100 μ L, 培养 24 h 使之贴壁后进行 CFP-a 处理, CFP-a 终质量浓度为 10、20、40、80、160 μ g/mL, 阳性对照为 100 μ g/mL 的 5-氟尿嘧啶 (5-Fluorouracil), 空白对照为相同体积 RPMI 1640 培养液。37 °C, 5% CO₂ 培养 72 h 后, 每孔加 MTT (5 mg/mL) 10 μ L, 培养 4 h 后, 弃除上清液, 每孔加入 100 μ L 二甲亚砜, 振荡 10 min, 置 Multiskan MK3 (Thermo Labsystems) 酶标仪上在 570 nm 波长处测定各孔的吸光度值。按下列公式计算抑制率: 抑制率 = $(1 - OD_{\text{用药组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.3.7 FCM 检测细胞凋亡率 BEL7404 细胞以 5×10^5 个接种培养瓶, 贴壁培养 24 h 后, 加入 20 μ g/mL 和 40 μ g/mL 的提纯蛋白, 37 °C, 5% 的 CO₂ 分别

培养, 培养 48 h 后进行常规的 FCM^[5] 检测。

2 结果

2.1 CFP-a 纯化和鉴定

河鲢的浸提液经 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀得 50%~80% 组分, 经亲和层析 Blue Sepharose 6 Fast Flow 和 SP Sepharose Fast Flow 的梯度洗脱得到 1 个洗脱峰 (图 1)。该洗脱峰经 HPLC 分离得到 3 个洗脱峰 (图 2)。保留时间为 18 min 的第 3 个洗脱峰为主要活性蛋白 CFP-a。收集该洗脱峰浓缩冻干。取冻干蛋白溶解后再经 protein-pak 125 (0.79 cm × 30 cm) 高压液相色谱柱进行纯度鉴定, 其洗脱峰为单一主峰 (图 3), 表明该蛋白已经纯化。各纯化步骤所得蛋白的 SDS/PAGE 电泳 (图 4), 通过 Blue Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析去除大量杂蛋白, 再通过 SP Sepharose Fast Flow 和 HPLC 分离得到的 CFP-a 的分子量约为 24.0 kD。

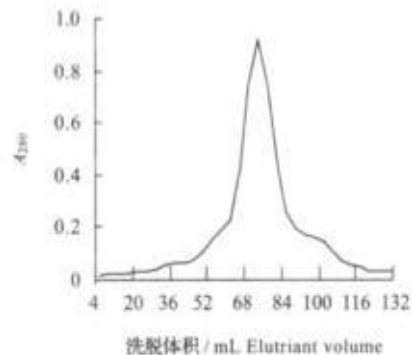


图 1 SP Sepharose Fast Flow 层析
Fig. 1 Ion-exchange column chromatography with a SP Sepharose Fast Flow for the collection from Blue Sepharose 6B Fast Flow

2.2 氨基酸组成分析

CFP-a 的氨基酸组成见表 1。用 6 mol/L HCl 在 110 °C 水解 18 h 后, 色氨酸 (Trp) 全部被破坏, 无法计算。谷氨酰胺 (Gln) 和天冬酰胺 (Asn) 转化为谷氨酸 (Glu) 和天冬氨酸 (Asp), 进行合并计算。从表 1 可看出 CFP-a 中苯丙氨酸 (Phe) 含量最高, 半胱氨酸 (Cys) 和酪氨酸 (Tyr) 次之。不含脯氨酸 (Pro)。

2.3 糖含量测定

将提纯蛋白 CFP-a 的质量浓度稀释到 2 mg/mL, 经苯酚—硫酸法测定, 测得糖含量为 2.3%, 表

明所提纯蛋白 CFp-a 为糖蛋白。

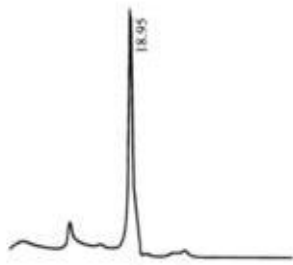


图2 HPLC 层析图谱

Fig.2 Separation and preparation of CFp-a HPLC



图3 纯化的 CFp-a 的 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC of purified CFp-a

2.4 CFp-a 对肝癌 BEL7404 细胞增殖生长的抑制作用

采用 MTT 法测定 CFp-a 对肝癌 BEL7404 细胞增殖生长的抑制作用。10 ~ 160 $\mu\text{g/mL}$ 河蚬蛋白 CFp-a 作用于 BEL7404 细胞 72 h 后,与对照组相比各用药组的细胞生长抑制率在 24.6% ~ 79.2%,不同浓度之间具有显著差异($P < 0.01$),如图 5 所示。阳性对照 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-氟尿嘧啶的抑制率为 71.8%。说明河蚬蛋白在较低剂量下对 BEL7404 具有明显的体外抑制作用,并具有剂量依赖性。

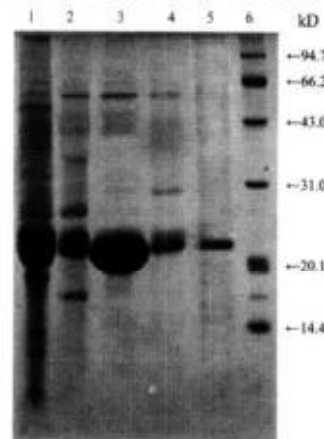


图4 蛋白纯化各步样品的 SDS-PAGE

1. 50% ~ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 总蛋白; 2. Blue Sepharose 6 Fast Flow 亲和柱; 3~4. Sp Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱收集的蛋白; 5. 经 HPLC 纯化的 CFp-a; 6. 标准蛋白

Fig.4 SDS-PAGE of purified and crude extracts

1, Total protein of 50% ~ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2, Protein purified by Blue-Sepharose 6 Fast Flow; 3~4, Protein purified by Sp Sepharose Fast Flow; 5, Purified CFp-a by HPLC; 6, Protein standard molecular markers

表1 GFp-a 的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of GFp-a

氨基酸 Amino acid	含量/% Content	氨基酸 Amino acid	含量/% Content	氨基酸 Amino acid	含量/% Content
天冬氨酸 Asp	5.70	半胱氨酸 Cys	13.340	苯丙氨酸 Phe	21.830
苏氨酸 Thr	2.06	缬氨酸 Val	6.960	赖氨酸 Lys	6.190
丝氨酸 Ser	1.87	甲硫氨酸 Met	1.162	组氨酸 His	1.261
谷氨酸 Glu	5.49	异亮氨酸 Ile	3.666	色氨酸 Trp	/
甘氨酸 Gly	1.52	亮氨酸 Leu	3.973	精氨酸 Arg	0.990
丙氨酸 Ala	1.76	酪氨酸 Tyr	11.690	脯氨酸 Pro	0

2.5 FCM 检测 BEL7404 细胞凋亡率

20 $\mu\text{g/mL}$ 和 40 $\mu\text{g/mL}$ CFp-a 作用于 BEL7404 细胞 48 h 后,FCM 结果显示在 DNA 直方图上出现明显的亚“ G_1 ”凋亡峰,凋亡率分别为 10.99% 和 15.51%,对照无凋亡现象,如图 6 所示,所提取的河

蚬蛋白 CFp-a 对 BEL7404 细胞具有诱导凋亡作用。

3 讨论

贝类中具有药用价值的种类众多,部分贝类蛋白的抗肿瘤活性已被证实^[6-8],而有关河蚬的化学

成分及药理活性的深入研究尚少见报道。本研究纯化河鲈蛋白是采用以 Blue Sepharose 6 Fast Flow 为主,结合硫酸铵分级沉淀,SP Sepharose Fast Flow 和 HPLC 柱层析方法。其中 Blue Sepharose 6 Fast Flow 是一种结构类似于 NAD⁺ 的磺化多芳香环化合物的 Cibacron Blue F3GA 与 Sepharose 6 Fast Flow 偶联的一种亲和层析方法。Cibacron Blue 3GA 可作为配基与蛋白质中的双核苷酸结合域发生特异互作^[9]。Cibacron Blue 3G 作为配基在亲和层析介质中广泛应用于各种蛋白的快速分离纯化,如干扰素的分离和植物核糖体失活蛋白等的分离^[10-12]。

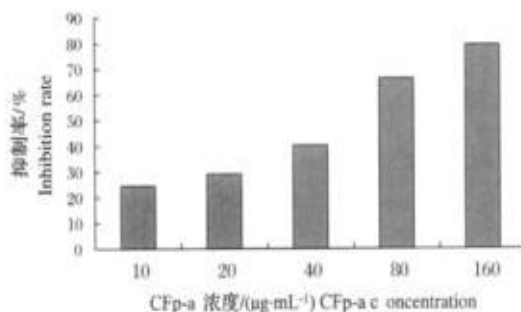


图5 CFp-a 对 BEL7404 细胞的增殖抑制作用

Fig. 5 Inhibition of proliferation of BEL7404 by CFp-a

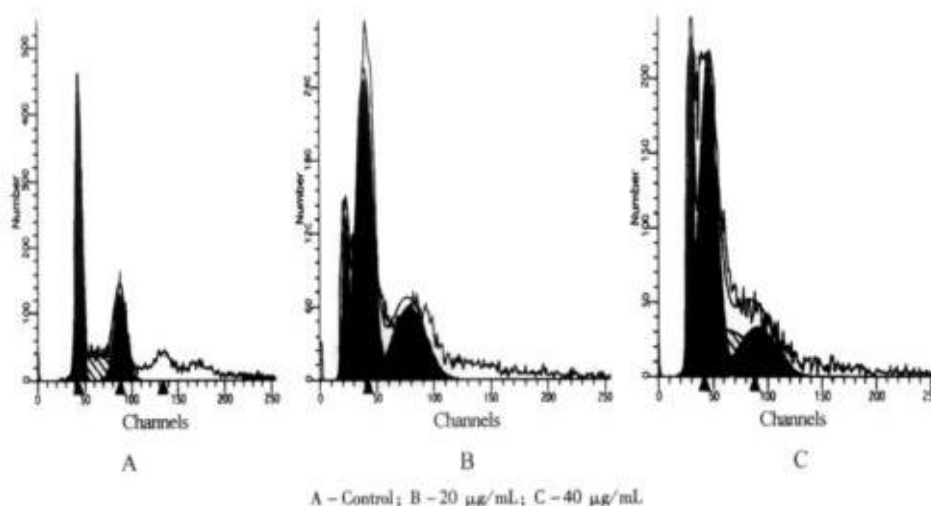


图6 CFp-a 诱导 BEL7404 发生细胞凋亡的 FCM 检测结果

Fig. 6 Detection of apoptosis of BEL7404 with CFp-a by FCM

本研究提取的河鲈蛋白 CFp-a 是一种分子量为 24.0 kD,含糖量 2.3% 的糖蛋白,以 10 ~ 160 μg/mL 质量浓度分别处理肝癌细胞 BEL7404 72 h,采用 MTT 法检测癌细胞的生长活性,结果显示该糖蛋白对肝癌细胞 BEL7404 具有明显的抑制作用,各浓度蛋白对癌细胞生长的抑制率在 24.6% ~ 79.2%。20 μg/mL 和 40 μg/mL 该蛋白分别处理 BEL7404 48 h 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡,可观察到典型的亚“G₁”峰,凋亡率分别为 10.99% 和 15.51%。由此可见,该蛋白对肝癌细胞 BEL7404 具有明显的抑制癌细胞增殖作用,其作用机理可能与诱导癌细胞凋亡作用相关。

参考文献:

[1] 万德光,吴家荣. 药用动物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993.

[2] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1993.

[3] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.

[4] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Meth, 1983, 65: 55-63.

[5] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry [J]. Cytometry, 1992, 13: 795-808.

[6] 董朝阳,林福生,张守兰. *Cristia plicata* 肝脏、肌肉组织提取物的生化性质与抗肿瘤活性比较[J]. 生命科学研究, 2002, 6(3): 255-260.

[7] 胡水根,朱国平,吴萍萍,等. 圆角角无齿蚌抗肿瘤有效成分的研究 I HB 糖蛋白的分析鉴定 [J]. 中国海洋药物, 1997(1): 23-25.

[8] 顾谦群,方玉春,辛现良,等. 柞孔扇贝糖蛋白的肿瘤抑制活性和对免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2001, 23(3): 200-202.

- [9] Thompson S H, Stellwagen E. Binding of cibacron blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73:361-365.
- [10] Knight E Jr, Fahey D. Human fibroblast interferon. An improved purification[J]. J Biol Chem, 1981, 256(8):3 609-3 611.
- [11] 袁惠东, 夏其昌, 张祖传. 用 Blue-Sephrose CL-6B 快速纯化天花粉蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(4): 369-373.
- [12] Parkash A, Ng T B, Tso W W. Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome-inactivating peptide from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds[J]. J Pept Res, 2002, 59(5):197-202.

Isolation, purification and property study of active protein CFp-a in *Corbicula fluminea*

ZHU Wen, LIN Zhi-keng, WU Zu-jian, Lin Qi-ying, XIE Lian-hui

(Key Laboratory of Pesticide and Biochemistry, Ministry of Education, Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Marine organisms have attracted much attention as potential sources for drugs over recent years. Mollusks, with a number of phylogenetic diverse, hold potential sources for anti-cancer drugs. A few kinds of proteins and glycoprotein isolated from mollusks showed high *in vitro* or *in vivo* anti-tumor activity. *Corbicula fluminea*, a kind of freshwater bivalve mollusks, is assisted in the treatment of some diseases such as hepatitis, measles and fever in Chinese traditional medicine. However, few studies on the components and biologically functional effects of *C. fluminea* were carried out. That provides a major interest to study the active components of *C. fluminea* for better utilization. In this study, an active protein, named CFp-a, was isolated and purified from the fresh *C. fluminea* with the methods of ammonium sulfate precipitation, Blue Sepharose 6 Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow column chromatography and HPLC. Among them, Blue Sepharose 6 Fast Flow is a kind of affinity chromatography with Cibacron Blue F3GA as a ligand. The blue dye binds many proteins, such as albumin, interferon and lipoproteins. It is also ideal for separation of broad range of nucleotide-requiring enzymes, nucleic acid binding proteins. With the affinity chromatography, CFp-a was isolated and concentrated. HPLC analysis proved the purity of the protein. The purified CFp-a was a monomeric protein with 24.0 kD in relative molecular mass, estimated by SDS-PAGE. It was a glycoprotein in containing 2.3% sugar by phenol-sulfuric acid reaction. In its amino acid composition, Phe had the highest content, followed by Cys and Tyr, but there is a lack of Pro.

The *in vitro* antitumor activity of CFp-a was determined by using BEL7404 human hepatoma cell line. BEL7404 cancer cells were treated with 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$ CFp-a for 72 h respectively. The growth inhibition rates of cancer cells were measured by MTT method. BEL7404 cancer cells were treated with 20 $\mu\text{g/mL}$ and 40 $\mu\text{g/mL}$ CFp-a for 48 h and Cell apoptosis was observed by flow cytometry (FCM). The results showed that the growth inhibition rates of cancer cells treated with CFp-a ranged from 24.6% to 79.2%. However, when treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ 5-Fluorouracil, it was 71.8%. So CFp-a showed high activity at low concentration. A typical subdiploid peak sub G_1 appeared on DNA histogram in FCM. The apoptotic rate was detected in 10.99% and 15.51%. The effects of CFp-a on the growth inhibition and the induction of apoptosis of BEL7404 cancer cells were dependent on CFp-a's concentration. Above results revealed that the CFp-a inhibited the proliferation and induced the apoptosis of BEL7404 cells *in vitro*.

Key words: *Corbicula fluminea*; purification of protein; cancer cell; apoptosis

Corresponding author: XIE Lian-hui. E-mail: XieLH@fjau.edu.cn