

一种凋亡相关蚯蚓丝氨酸蛋白酶的 纯化、活性鉴定及部分性质研究

谢江碧 郭振泉 翁 宁 王洪涛¹⁾ 江冠群 茹炳根*

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 通过多级柱层析, 从赤子爱胜蚓抽提物 (一组抗肿瘤活性蛋白成分) 中纯化得到凋亡相关丝氨酸蛋白酶 1 (apoptosis related serine protease 1, ARSP1), SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测得其表观分子质量为 28 ku. ARSP1 非变性 PAGE 图谱为相连的多条带, 质谱图为多头峰, MALDI-TOF-MS 测得各主峰相对分子质量为 24 645, 25 052 和 25 281, 等电聚焦电泳测得等电点 $pI < 3.8$. 测得 ARSP1 N 端 25 个氨基酸序列为: I(V) IGGT(S) N(D) ASPGEFPWQLSQTRGGSHS, N 端序列比较结果显示其与丝氨酸蛋白酶类高度同源. 体外实验中, 不仅通过凋亡细胞的相差显微观察验证了 ARSP1 的细胞杀伤活性, 而且进一步通过荧光抗体技术对其直接杀伤细胞活性进行了定位研究. Schiff's 试剂糖蛋白染色法鉴定 ARSP1 为糖蛋白 (或糖肽), 纤维蛋白平板法测得 ARSP1 同时具有纤溶酶和纤溶酶原激活酶活性, 进一步通过苯甲磺酰氟 (PMSF) 对其纤溶酶活性的抑制实验, 证明属于丝氨酸蛋白酶类.

关键词 凋亡相关丝氨酸蛋白酶 1, 细胞凋亡, 丝氨酸蛋白酶, 纯化, 糖蛋白, 纤溶酶, 纤溶酶原激活酶

学科分类号 Q55

药用蚯蚓即地龙, 是祖国医学抗癌方剂常用 240 味中药之一^[1]. 有关蚯蚓提取物的抗肿瘤作用及其机制探讨的报道多见于 20 世纪 80~90 年代. 研究发现, 蚯蚓提取物不仅能在体外直接杀伤癌细胞^[2], 在体内能抑制肿瘤的发生和发展^[3,4], 临床上还能对放疗和化疗起到明显增效作用^[5,6]. 作为混和物, 蚯蚓提取物成分复杂, 具有多种活性, 难以探讨具体作用机制. 但是, 鲜见有人对蚯蚓提取物, 尤其是抗肿瘤蛋白活性成分, 作较系统的纯化研究.

赤子爱胜蚓在分类学上属正蚓科爱胜属. 正蚓科蚯蚓常栖息于污泥、垃圾、粪堆等场所, 个体相对较细小, 体表呈暗红色. 赤子爱胜蚓体腔液中含有 40 多种不同生物活性的蛋白质, 分别体现溶细胞、溶蛋白、溶血、凝血、抑瘤、促有丝分裂和抑菌等活性^[7~14]. 我们从该种蚯蚓中分离得到一组活性蛋白成分 (简称蚯蚓抽提物), 对其体外及体内抗肿瘤活性进行了鉴定, 并对其体外细胞杀伤机制进行了初步探讨 (待发表). 本文对蚯蚓抽提物进行了纯化, 得到一种单一蛋白质成分, 暂命名为凋亡相关丝氨酸蛋白酶 1 (apoptosis-related serine protease 1, ARSP1), 并对其体外细胞杀伤活性及相关生化特性进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料

赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*) 购自北京东郊长营牛场, BALB/C 小白鼠购自北京大学医学部实验动物中心, 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 和人结肠细胞株 HCT-116 由北京大学生命科学中心单抗实验室提供. HiPrepTM 26/10 脱盐预装柱、HiPrep 16/10 phenyl (high sub) 疏水层析预装柱及 HiPrepTM 16/10 Q XL 离子交换预装柱随同 ÄKTAprime 自动层析仪均购于 Pharmacia 公司. RPMI1640 培养基购于 Gibco 公司, 测活用无菌塑料平皿 ($d = 5.0$ cm)、细胞培养瓶及多孔细胞培养板购于 Nunc 公司, 聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜购于 Gelman 公司, 牛血清白蛋白 (BSA, 纯度 $> 99.9\%$)、3-环己氨基-1-丙磺酸 (CAPS) 和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 购于 Sigma 公司, 苯甲磺酰氟 (PMSF) 和等电聚焦 (IEF) 电泳标准蛋白购于 Boehringer 公司, 蛋白质浓度测定试剂盒 (Bio-

* 通讯联系人.

¹⁾ 河南大学生命科学学院, 开封 475001.

Tel: 010-62751842, Fax: 010-62751842

E-mail: Rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2002-12-15, 接受日期: 2002-12-30

Rad DC Protein Assay) 购于 Bio-Rad 公司. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗小鼠抗体和异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记羊抗小鼠抗体购自北京欣经科生物技术有限公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 购自北京化学试剂公司, 纤维蛋白原、纤维蛋白溶酶原和凝血酶购自中国药品生物制品检定所. 其他化学试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 柱层析纯化: 称取蚯蚓抽提物冻干粉并溶于缓冲液 A (含 1.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (PB), pH 6.5), 吸取上清泵入 HiPrep 16/10 Phenyl (high sub) 疏水层析预装柱, 充分平衡. 然后采用组合梯度将目的峰洗脱, 即先用 40%~70% 缓冲液 B (0.02 mol/L PB, pH 7.4) 直线梯度, 洗脱体积约 100 ml, 再用 70%~100% 缓冲液 B 直线梯度, 洗脱体积约 100 ml. 收集活性峰 B, 脱盐冻干或直接上柱进一步纯化. 将疏水层析后峰 B (在缓冲液 B 中) 泵入 HiPrepTM 16/10 Q XL 离子交换层析预装柱, 然后充分平衡. 采用直线梯度洗脱, 即从 0%~100% 缓冲液 C (含 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液 B), 洗脱体积为 400 ml. 收集活性峰, 脱盐冻干以待进一步分析. 以上流速均为 4 ml/min, 每管收集 8 ml.

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE): 采用 5% 浓缩胶和 15% 分离胶不连续系统进行电泳. 与 SDS-PAGE 不同的是, 非变性 PAGE 样品溶于不含 SDS 和 β -巯基乙醇的样品缓冲液中直接上样, 然后在不含 SDS 的电极缓冲液中电泳. 恒流 20 mA. 考马斯亮蓝 R-250 染色或银染.

1.2.3 质谱法测定分子质量: 取彻底脱盐后冻干粉作为待测样品, 用基质辅助的激光解吸飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF-MS, Biflex-3, Bruker) 进行测定.

1.2.4 N 端序列分析: 待测样品先进行 SDS-PAGE, 然后在 CAPS 缓冲系统 (10 mmol/L CAPS, 10% 甲醇, pH 11.0) 中, 冷却条件下 100 V 恒压 30~60 min 或 200 mA 恒流 1~2 h, 电转移至 PVDF 膜上. 用蛋白质序列自动分析仪 (Procise, Applied Biosystems) 测定样品 N 端. 蛋白质部分序列的比较应用 NCBI 中 BLASTP 工具来完成.

1.2.5 相差显微镜观察: 以 HCT-116 为受试人癌细胞. 待测各样品溶于 RPMI1640 不完全培养基中, 微滤除菌 ($d = 0.22 \mu\text{m}$), 再用上述不完全培养基

稀释至一定浓度后加入样品测试孔 (100 μl /孔). 同时做空白对照孔 (100 μl 不完全培养基). 在倒置相差显微镜 (Olympus IM) 下观察细胞形态变化并拍照.

1.2.6 多克隆抗体的制备和效价测定: 纯化得到 ARSP1 (溶于生理盐水) 作为免疫抗原. 选用 BALB/C 小鼠为免疫动物, 先腹腔注射液体石蜡 (0.4 ml/只) 刺激产生腹水, 再腹腔接种 SP2/0 骨髓瘤细胞 (10^4 /只) 并进行动物免疫 ($\leq 50 \mu\text{g}$ /只). 收集抗血清和腹水, 离心取上清, 用硫酸铵沉淀法分离 IgG 抗体, 用 Sephadex G-25 柱脱盐, 最终将多克隆抗体溶于 PBS (pH 7.4) 中. 间接酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定抗体效价. 采用蚯蚓抽提物作为未纯化抗原 (1 g/L, 10 μl /孔), HRP 标记羊抗小鼠抗体为二抗, TMB 为酶反应底物, 在酶标仪 (Spectra Rainbow, Tecan Austria) 上测定各孔吸光值 (A_{450}).

1.2.7 蛋白质印迹及免疫检测: 蛋白质印迹时, 蚯蚓抽提物样品不经煮沸处理直接进行 SDS-PAGE, 然后冷却条件下 100 V 恒压 30~60 min 或冷室中 14 V 恒压过夜, 电转移至 PVDF 膜上 (Tris-甘氨酸缓冲系统, 含 15% 甲醇). 免疫检测时, 采用 TTBS 缓冲系统 (含 0.1% Tween 20 和 9 g/L NaCl 的 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 一抗和二抗工作液分别为自制 ARSP1 多克隆抗体 (1:50) 和 HRP 标记羊抗小鼠抗体 (1:350). 蛋白质转印膜用 TTBS 封闭后, 依次用 TTBS 稀释的一抗和二抗工作液孵育处理 (室温下持续振摇 1 h), 不同抗体处理步骤间用 TTBS 充分洗涤. 显迹时, 用 TBS (含 9 g/L NaCl 的 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 洗去残余 Tween 20, 然后将转印膜浸入发色底物显迹液 (DAB/ NiCl_2), 2~3 min 内即出现黑棕色条带, 蒸馏水洗膜终止反应, 晾干拍照.

1.2.8 荧光抗体定位抗原: 细胞爬片分别用蚯蚓抽提物 (终浓度为 30 mg/L) 作用 2 h, 4 h, 9 h, 12 h, 16 h 和 24 h 后丙酮固定, 然后免疫染色并荧光显微观察. 同时制作两种阴性对照, 即正常细胞对照和正常血清对照. 细胞爬片的制作: 取培养的对数生长期细胞 (HCT-116) 一瓶, 用 2.5 g/L 胰酶消化液处理, 用 RPMI1640 完全培养基 (含 5% 胎牛血清) 稀释至一定密度 (10^5 /ml). 预先将高压消毒的洁净盖玻片 (2 cm $\times$ 2 cm) 置入 6 孔细胞培养板, 吸取 100 μl 上述细胞悬液涂于盖玻片, 待细胞沉降后小心加入 1 ml 完全培养基, 然后在含

5% CO₂ 及 100% 湿度的 37℃ 恒温箱中培养 24 h. 蚯蚓抽提物溶于 RPMI1640 不完全培养基中, 加入测试孔后作用不同时间. 正常细胞对照则用不完全培养基代替蚯蚓抽提物. 细胞标本的固定: 小心取出盖玻片, 空气中挥发至干或吹干. 然后用冷丙酮 (4℃) 固定 10 min, PBS (pH 7.4) 中漂洗两次 (5 min/次), 吹干, 最后用蒸馏水洗去盐结晶, 自然干燥后密封保存 (-20℃ 以下). 免疫染色和观察: 先将上述已固定细胞标本浸入封闭液 (含 10 g/L BSA 的 PBS, pH 7.4) 中, 37℃ 孵育 10 min. 用 PBS (pH 7.4) 洗两次 (5 min/次), 蒸馏水中漂洗, 晾干, 然后转入湿盒内滴加一抗 (自制 ARSP1 多抗, 1:25 稀释, 含 10 g/L BSA), 正常血清对照则用正常小鼠血清代替一抗, 37℃ 孵育 30 min 或 4℃ 过夜. 同上用 PBS 和蒸馏水充分洗涤, 晾干, 置于湿盒内滴加二抗 (FITC 标记羊抗小鼠多抗, 1:10 稀释, 含 10 g/L BSA), 37℃ 孵育 30 min, 同上洗涤, 稍晾干后用缓冲甘油 (含 90% 甘油的 PBS, pH 7.4) 封固, 立即在荧光显微镜 (Olympus) 下观察并拍照.

1.2.9 等电点测定: 测定方法参见文献 [15].

1.2.10 糖蛋白鉴定: 样品经非变性 PAGE 分离后, 用过碘酸-Schiff 试剂对凝胶进行染色^[16], 染出的糖蛋白条带为紫红色, 非糖蛋白不着色.

1.2.11 纤溶活性的测定及抑制实验

蛋白质浓度的测定: 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准, 用 Bio-Rad DC 蛋白质分析试剂盒测定.

纤溶活性的测定: 纤溶酶活性的测定需制做阴

性板, 称取一定量琼脂糖, 加入缓冲液 B (含 0.15 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L Tris-HCl, pH 8.0), 加热溶解并 58℃ 水浴保温 (30 min 以上), 纤维蛋白原和凝血酶分别溶于缓冲液 A (0.02 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 后一起加入琼脂糖溶液, 混匀并迅速倒入三块无菌平皿 ($d = 5.0$ cm), 最后 80℃ 保温灭活 (15~20 min). 纤溶酶激酶活性的测定还需制做阳性板, 与阴性板不同的是, 除了纤维蛋白原和凝血酶, 还要加入纤维蛋白溶酶原 (溶于缓冲液 A), 混匀倒入三块无菌平皿, 凝固后直接使用. 测活时, 在平板上打孔, 加入待测样品, 倒置保温 (37℃) 直至溶圈清晰可辨. 纤溶酶激酶活性以阳性板溶圈面积扣除阴性板溶圈面积后的大小来表示.

PMSF 抑制 ARSP1 纤溶活性的测定: 取 PMSF 浓贮液 (100 mmol/L 溶于异丙醇, -20℃ 冻存), 稀释后与 ARSP1 溶液混匀, 4℃ 反应 30 min 后在阴性板上测活.

2 结 果

2.1 ARSP1 的柱层析纯化

图 1a 是蚯蚓抽提物疏水层析梯度洗脱图谱. 在用缓冲液 A 平衡时, 即出一无活性的大峰 A, 采用组合梯度洗脱后共得 3 个大峰, 测活时发现, 仅峰 B 成分作用下的受试细胞发生明显凋亡变化. 图 1b 为疏水层析后峰 B 进一步离子交换层析图谱, 采用直线梯度, ARSP1 活性峰在 0.2~0.3 mol/L NaCl 时被洗脱下来.

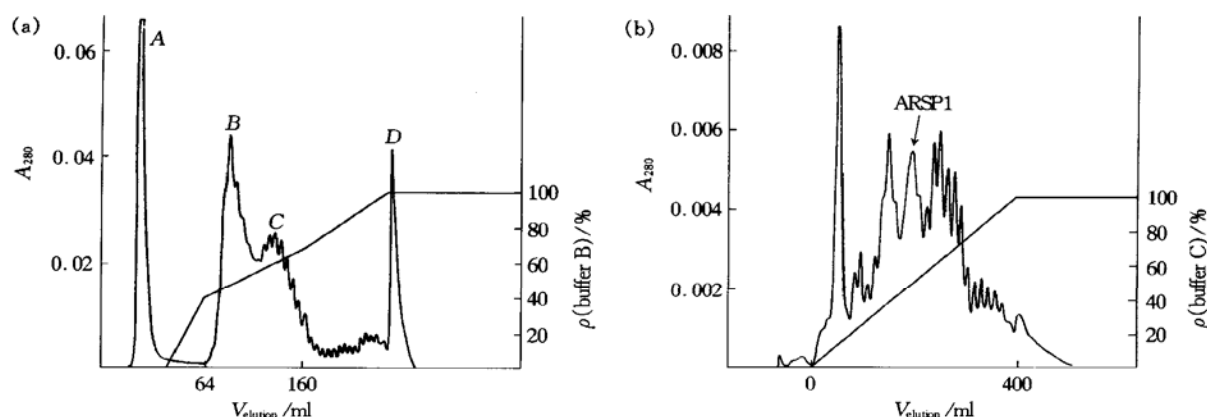


Fig 1 Hydrophobic chromatography of *Eisenia fetida* extract (a) and purification of ARSP1 from Peak B by ion exchange chromatography (b)

2.2 ARSP1 的质谱测定及电泳分析

图2中, ARSP1 的质谱图表现为多头峰包, 测得三个主峰的相对分子质量分别为 24 645,

25 052 和 25 281; 其非变性 PAGE 图谱表现为相连的多条带, SDS-PAGE 后为一条带, 测得表观分子质量 28 ku.

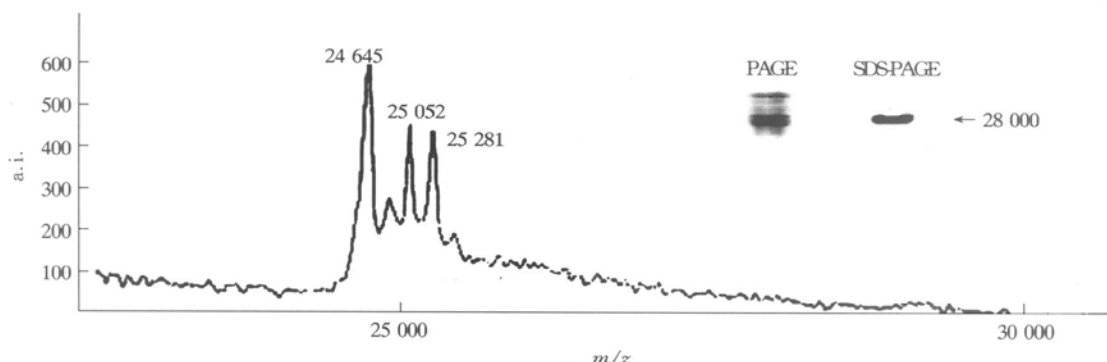


Fig. 2 Identification of the purity of ARSP1 by mass spectrometer (MALDI-TOF) assay and the result can be compared with PAGE and SDS PAGE analyses at the same time

2.3 N 端序列测定结果

测得 ARSP1 的 N 端 25 个氨基酸序列为: Ile (Val)-Ile-Gly-Gly-Thr(Ser)-Asn(Asp)-Ala-Ser-Pro-Gly-Glu-Phe-Pro-Trp-Glu-Leu-Ser-Glu-Thr-Arg-Gly-Gly-Ser-His-Ser. 其中, 前 6 个氨基酸的组成变化体现了 ARSP1 基因型的复杂性, 而第 7~18 氨基

酸序列 (ASPGGEFPWQLSQ) 是多种丝氨酸蛋白酶所共有的一段序列. N 端序列比较结果 (图 3) 显示, ARSP1 与丝氨酸蛋白酶类高度同源, 尤其是与 Nakajima 等^[17]报道的两种纤溶酶 F-I-1 和 F-I-2 相比.

1 ARSP1(<i>Eisenia fetida</i>)	1 I(V)IGGT(S)N(D)ASPGGEFPWQLSQTRGGSH S 25
2 Fibrinolytic enzyme F-I-1-earthworm (<i>Lumbricus rubellus</i>)	1 IIGGSNASPGGEFPWQLSQTRGGSH 24
3 Fibrinolytic enzyme F-I-2-earthworm (<i>Lumbricus rubellus</i>)	1 IIGGSNASPGGEFPWQLSQTRGGSH 24
4 Alkaline trypsin-like serine proteinase F-II-earthworm (<i>Lumbricus rubellus</i>)	1 VIGGTNASPGGEFPWQLSQQR 20
5 Fibrinolytic enzyme component A (<i>Eisenia fetida</i>)	1 VIGGTNASPGGEFPWQLSQQR 20
6 Trypsin-like protease (<i>Arenicola marina</i>)	49 IVGGVEARPNEFPWQVSLTNTGGSH 73
7 Suppression of tumorigenicity 14 (<i>Homo sapiens</i>)	615 VVGGTDADEGEWPWQVS 631
8 Transmembrane protease, serine 2 (<i>Epitheliasin</i>)	254 IVGGLNASPGDWPWQVSLHVQGVH 277
9 Plasminogen activator sPA (<i>Scolopendra subspinipes</i>)	34 IVGGEEAEPGEFPWQIS 50
10 Complement C1r/sB (<i>Cyprinus carpio</i>)	445 VFSGMQARPGQIPWQLLHKMHTRGGA 470

Fig. 3 Alignment of ARSP1 N-terminal sequence

2.4 相差显微镜观察

ARSP1 的作用浓度为 200 mg/L 时, 能观察到

受试细胞 (HCT-116) 外形明显的凋亡变化 (图 4b), 表现为贴壁细胞变圆皱缩, 最终胞膜内缢裂

为多个小体。同时,当蚯蚓抽提物的作用浓度仅为 60 mg/L 时,能观察到部分受试细胞的坏死现象,即胞膜膨胀破裂以致胞质外泄,显微镜下可见圆的空细胞或胞膜碎片(图 4c)。由此我们认为,原蚯

蚓抽提物混和组分构成复杂,可能存在不止一种细胞杀伤机制,而纯化后的 ARSP1 主要通过诱导细胞凋亡来体现细胞杀伤活性。

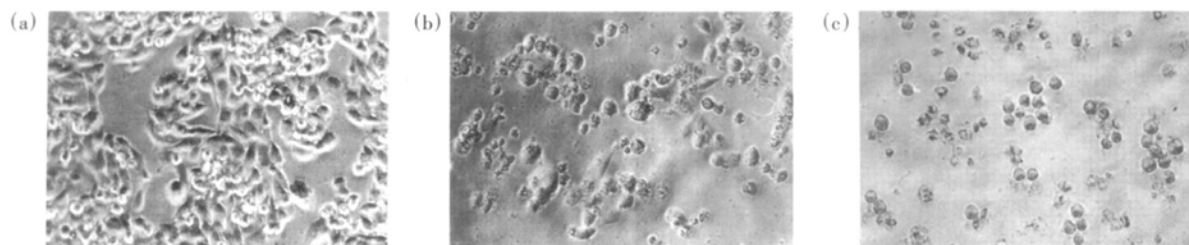


Fig 4 Morphology of cultured human tumor cells, HCT 116, photographed by phase contrast microscopy, in 48 h experiment tested for cytotoxicity of ARSP1 (200 mg/L) and 24 h experiment tested for cytotoxicity of *Eisenia fetida* extract (EE) (60 mg/L)

(a) control cells without any treatment in 48 h experiment; (b) cells treated with ARSP1; (c) cells treated with EE. Compared with the flattened lineament of normal control cells, (b) shows that the treatment with 200 mg/L of ARSP1 induced apoptosis with the typical morphology symptoms, such as round contour, restricting and wrinkled cell membrane and apoptotic bodies; however, some necrotic cells were also observed in (c), with swollen cell membrane or even membrane fragments.

2.5 荧光抗体定位抗原

测得 ARSP1 多克隆抗体的效价为 1: 100 000.

图 5a 中可以看到所得 ARSP1 多克隆抗体的免疫印

迹结果为一带,位于 28 ku 处.这说明纯化所得 ARSP1 的免疫原性较一致,而且其多克隆抗体特异性较高.图 5b 中利用免疫荧光技术定位不同时

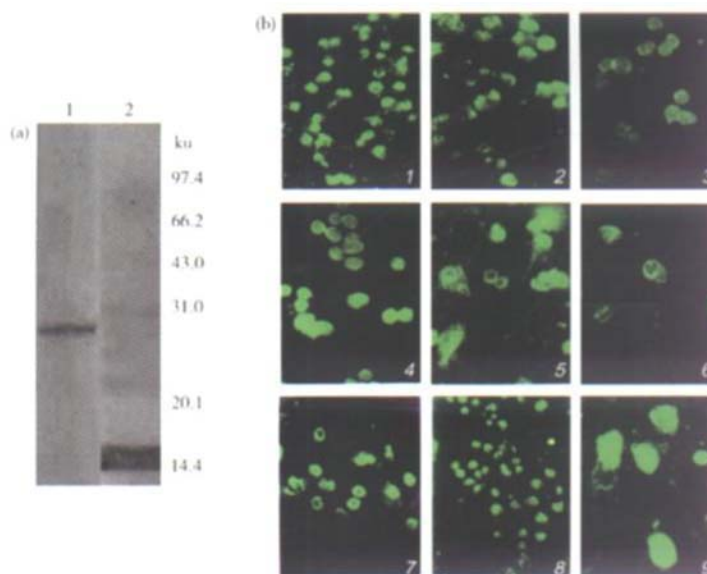


Fig. 5 Assay of the purity of polyclonal antibodies of ARSP1 (a) and location of ARSP1 (b)

(a) 1: *Eisenia fetida* extract after immunoblotting; 2: molecular protein marker stained directly by Coomassie Blue R-250. (b) ARSP1 was purified from *Eisenia fetida* extract (EE), in human tumor cells HCT-116 by immunofluorescence techniques. HCT-116 cells were cultured on glass slices and fixed by acetone after different effect time. The first antibody, polyclonal antibodies of ARSP1, was obtained from BALB/C mice. The second antibody, FITC-labelled anti-mouse antibodies from goat, was commercial product. 1: normal cell control, had been incubated with RPMI 1640 incomplete medium instead of EE for 24 h and later with the first antibody; 2: normal serum control, had been incubated with EE (30 mg/L) for 24 h and later with normal serum instead of the first antibody. Those cells of experiment groups (3~9) had been effected by EE (30 mg/L) for different time (3: 2 h; 4: 4 h; 5: 9 h; 6: 12 h; 7: 16 h; 8, 9: 24 h) and incubated with the first antibody. Then all of those cells were immuno-stained by the second antibody and photographed under fluorescence microscope (Olympus). Compared with that of two negative controls, the distribution of fluorescence in those cells of experiment groups tend to focus on specific areas and differentiate directionally among themselves by the different effect time of EE, that is, the fluorescence distributes specially on the outer of cell membrane (3), under the inner of cell membrane (4), in the cell plasm (5), on the outer of karyotheca (6), under the inner of karyotheca (7) and at last focuses in the complete nuclei or apoptotic bodies (8, 9). Note that the possibility of being stained of some cells in (8), which already falling apart, is decreased dramatically. (1~8) 150×; 9: 300×.

间点 ARSP1 在靶细胞内的分布情况, 得以进一步证明 ARSP1 的细胞杀伤活性. 相对阴性对照 (1, 2), 我们可以看到, 实验组细胞 (3~9) 荧光分布很有规律, 即区域性集中分布, 且随着作用时间的延长, 定向地由胞外向胞内、由核外向核内扩散, 最后浓缩于胞核或凋亡小体 (包裹着部分核物质) 中. 由此认为, 本实验通过两对抗原抗体相互作用系统, 间接地反映了蚯蚓抽提物中 ARSP1 在细胞内的分布规律或作用路线, 结合前述实验结果也证明 ARSP1 直接参与了对细胞的杀伤作用.

2.6 等电点测定

疏水层析后峰 B 和 ARSP1 的等电聚焦电泳结果见图 6. 由图 6 可见, 峰 B 成分复杂, 等电点分布范围广, 但总的来说都偏酸性 ($pI < 7.2$); 相对而言, 纯化后 ARSP1 的等电点较一致, 但呈强酸性 ($pI < 3.8$).

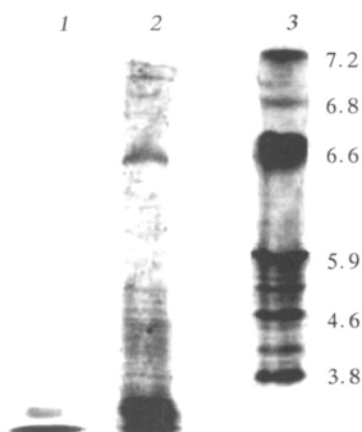


Fig. 6 Isoelectric focusing electrophoresis (IEF) of Peak B and ARSP1

1: ARSP1; 2: Peak B; 3: standard pI protein marker.

2.7 糖蛋白鉴定

图 7a 和 b 为同样样品非变性 PAGE 后, 分别进行糖蛋白染色和考马斯亮蓝染色的结果. 从图 7 可以看到, 具有细胞杀伤活性的两种混和物样品, 蚯蚓抽提物和峰 B, 含有相当比例的糖蛋白和糖肽, 且 Schiff's 试剂染出的紫红色条带泳动位置靠前. 但纯化后糖肽成分 ARSP1 在两种染色图谱上均表现为多条带. 对此, 分析认为, 由于多肽链糖基化的微观不均一性, 使得糖肽的分子质量不均一, 且纯化及分析测定过程会对以某些糖肽键 (如通过半胱氨酸) 连接的糖链造成不同程度的损伤, 再加上 ARSP1 基因型的复杂性 (N 端测序结果) 等原因, 这些都使得 ARSP1 的柱纯化 (图 1b) 和

质谱测定 (图 2) 峰形较钝或表现为多头峰, 而非变性 PAGE 图谱更可以直观地反映其分子质量和所带电荷的不均一性. 以上结论可通过 ARSP1 SDS-PAGE 后只有一条带的结果 (图 2) 进一步加以证明, 在 SDS-PAGE 样品的 β -巯基乙醇还原和沸水浴预处理过程中, ARSP1 的糖基脱落, 剩余部分表观分子质量约 28 ku.

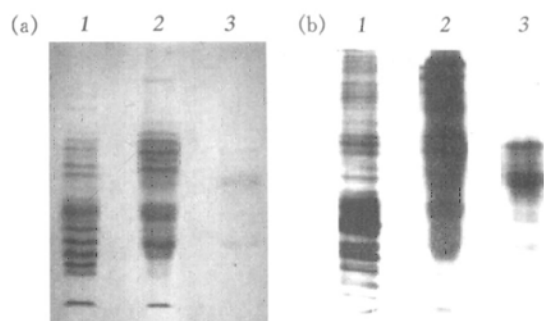


Fig. 7 Schiff's staining of glycoproteins after PAGE (a) and Coomassie Blue R-250 staining of the same protein samples (b)

1: *Eisenia fetida* extract; 2: Peak B; 3: ARSP1.

2.8 纤溶活性的测定及抑制实验

图 8a 和 b 分别为峰 B 离子交换层析后各部分纤溶活性的阴性板和阳性板测定结果, 其中 44, 45, 46 为 ARSP1 洗脱峰不同部位样品, 可以得知 ARSP1 同时具有纤溶酶和纤溶酶激酶活性. 图 8c 为 PMSF 对 ARSP1 纤溶酶活性的抑制结果. PMSF 是丝氨酸酯酶的不可逆抑制剂, 能抑制丝氨酸蛋白酶和木瓜蛋白酶. 图 8c 表明 ARSP1 的纤溶活性受到明显抑制, 结合其 N 端序列比较结果, 分析认为 ARSP1 属于丝氨酸蛋白酶类. 同时可以看到, ARSP1 在阴性板上表现为里透外晕的溶圈.

3 讨 论

综合以上实验结果可知, 细胞杀伤活性成分 ARSP1 在体外可以直接诱导癌细胞 (HCT-116) 凋亡, 而且发现其兼具纤溶酶和纤溶酶激酶活性, 属于丝氨酸蛋白酶类, 并被证实属于糖肽. 有关赤子爱胜蚓中含糖纤溶酶单一组分已有报道^[18], 该研究发现中性糖在糖含量中占了相当比例. 糖蛋白在动植物体内广泛存在, 包括许多酶、血浆蛋白、全部抗体、补体因子、粘液组分以及许多膜蛋白等, 其多肽链常携带许多短的杂糖链, 一般含 2~10 个单体, 分子质量约 540~3 200, 糖链数目变

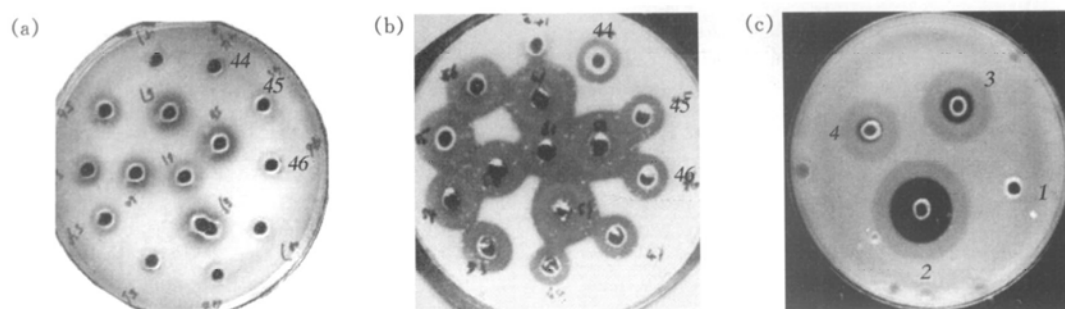


Fig 8 Fibrin plate assay of ARSP1

In negative plate without plasminogen (a) and positive plate with plasminogen (b), samples were tested under the same conditions (0.1 μ g, 37 $^{\circ}$ C, 4 h). Those samples tested are eluted at different time by linear gradient in ion exchange chromatography of Peak B, and 44, 45, 46 are different parts of ARSP1. In (c), the inhibition on fibrinolytic activity of ARSP1 (3 μ g, 37 $^{\circ}$ C, 1 h) by PMSF was tested. Those samples in different wells are 1 the solvent (0.02 mol/L Tris-HCl, pH 7.0~7.4) tested as control; 2 ARSP1 without PMSF; 3 ARSP1 with PMSF (0.5 mmol/L); 4 ARSP1 with PMSF (1.0 mmol/L).

化也很大。很显然，糖链的存在与糖蛋白的生理功能密切相关。

哺乳动物免疫杀伤细胞或细胞毒性淋巴细胞 (CTL)，可起到介导对侵入病毒的免疫和监视肿瘤转化的作用。它们通过多种机制杀伤靶细胞，但主要通过胞吐作用释放穿孔素 (perforin) 和一组丝氨酸蛋白酶作为介导细胞死亡的主要手段。这组丝氨酸蛋白酶被称作粒酶 (granzyme)^[19]。细胞凋亡是由多种蛋白酶控制不同凋亡阶段的凋亡事件组成的，蛋白酶的作用是细胞凋亡机制的核心部分，抑制蛋白酶活性的因素也抑制细胞凋亡的发生。调控凋亡的蛋白酶有多种，如粒酶、 Ca^{2+} 依赖中性蛋白酶 (calpain) 以及胱冬肽酶 (caspases)。细胞凋亡机制及其关键作用成分存在着一个长期衍变进化的过程^[20]。作为无脊椎动物的模式生物，蚯蚓体内的生理生化活性成分及相关机制得到了广泛深入的研究，尤其是免疫活性成分。蚯蚓的免疫系统是天然的 (innate)、非特异的 (non-specific)、非预期的 (non-anticipatory) 和非克隆的 (non-clonal)。除了多种丝氨酸蛋白酶^[21]，类似哺乳动物穿孔素的溶胞素 (cytolysin)^[22]，以及哺乳动物肿瘤坏死因子 (TNF) 的功能类似成分 CCF (coelomic cytolytic factor)^[23] 已分别从赤子爱胜蚓中得以纯化，有的已克隆、测序。通过对丝氨酸蛋白酶的水解底物^[14]及晶体蛋白空间结构模拟^[24]的研究，至少证明了赤子爱胜蚓中某些丝氨酸蛋白酶具有多种底物特异性，从而预示着其可能参与生理生化反应的多样性。此外，对丝氨酸蛋白酶通过肠道上皮细胞被有效吸收的研究^[25]，表明了蚯蚓中相关酶类的可能医用前景。

综述各研究表明，蚯蚓中丝氨酸蛋白酶类有溶

蛋白活性、无溶细胞活性，而提纯的溶胞素 (蚯蚓毒素) 有溶胞活性而无溶蛋白活性，TNF 的功能类似成分 CCF 与蚯蚓体腔液的调理、溶血及溶胞活性有关，并参与抑菌免疫反应。分析认为，蚯蚓中的溶胞素、丝氨酸蛋白酶类以及 CCFs 等活性成分单独和 (或) 协同作用，可能是蚯蚓蛋白抽提物体外杀伤细胞的本质所在。对单一成分 ARSP1 的活性鉴定证明，蚯蚓抽提物诱导的细胞凋亡过程可能是由丝氨酸蛋白酶类主导的级联降解过程，而且，ARSP1 的纯化及相关后续研究将为以后可能的抗肿瘤分子药物的研制提供一个新的选择点。

参 考 文 献

- 1 季宇彬主编. 抗癌中药药理与应用. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 1999. 522~ 527
Ji Y B. Pharmacological Action and Application of Anticancer Traditional Chinese Medicine. Heilongjiang: Heilongjiang Science and Technology Press, 1999. 522~ 527
- 2 曾小澜, 章碧玉, 麦羨霞, 等. 蚯蚓提取物对多种瘤细胞的作用. 山西医学院学报, 1995, 26 (2): 81~ 83
Zeng X L, Zhang B Y, Mai X X, et al. J Shanxi Med Col, 1995, 26 (2): 81~ 83
- 3 王克为, 张绍章, 李予蓉. 912 (蚯蚓提取物) 对小鼠移植瘤的抑制作用. 第四军医大学学报, 1986, 7 (2): 85~ 88
Wang K W, Zhang S Z, Li Y R. J 4th Mili Med Uni, 1986, 7 (2): 85~ 88
- 4 Hrzénjak T, Hrzénjak M, Kasuba V, et al. A new source of biologically active compounds earthworm tissue (*Eisenia foetida*, *Lumbricus rubellus*). Comp Biochem Physiol Comp Physiol, 1992, 102 (3): 441~ 447
- 5 张万岭, 李丽庆, 毛慧生. 912 合并化疗治疗恶性淋巴瘤和肺癌的临床观察. 中国肿瘤临床, 1991, 18 (3): 181~ 182
Zhang W L, Li L Q, Mao H S. Chin J Clin Onco, 1991, 18 (3): 181~ 182
- 6 张绍章, 田 琼, 王克为, 等. 中药地龙胶囊对食管癌和肺癌的辐射增效作用. 第四军医大学学报, 1992, 13 (3): 165~ 168
Zhang S Z, Tian Q, Wang K W, et al. J 4th Mili Med Uni, 1992, 13 (3): 165~ 168
- 7 Roch P, Valembos P, Davant N, et al. Protein analysis of

- earthworm coelomic fluid, II. Isolation and biochemical characterization of the *Eisenia foetida* Andrei factor (EFAF). *Comp Biochem Physiol*, 1981, **69B**: 829~ 836
- 8 周元聪, 朱洪, 陈瑞红, 等. 赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 血小板聚集剂的分离纯化及生化特性. *生物化学与生物物理学报*, 1990, **22** (5): 469~ 475
Zhou Y C, Zhu H, Chen R H, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 1990, **22** (5): 469~ 475
 - 9 Hrzenjak M, Kobrehl D, Levanat S, *et al.* Mitogenicity of the earthworm's (*Eisenia foetida*) insulin-like proteins. *Comp Biochem Physiol B*, 1993, **104** (4): 723~ 729
 - 10 Bilej M, Brys L, Beschin A, *et al.* Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. *Immunol Lett*, 1995, **45** (1~ 2): 123~ 128
 - 11 Cossarizza A, Cooper E L, Suzuki M M, *et al.* Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Experimental Cell Research*, 1996, **224**: 174~ 182
 - 12 Eue I, Kauschke E, Mohrig W, *et al.* Isolation and characterization of earthworm hemolysins and agglutinins. *Developmental and Comparative Immunology*, 1998, **22** (1): 13~ 25
 - 13 张希春, 孙振钧, 嵇如朋, 等. 蚯蚓两种抗菌肽的分离纯化及部分性质. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (6): 955~ 960
Zhang X C, Sun Z J, Zhuo R P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (6): 955~ 960
 - 14 Wu X Q, Wu C, He R Q. Immobilized earthworm fibrinolytic enzyme III-1 with carbonyldiimidazole activated agarose. *Prot Pept Lett*, 2002, **9** (1): 75~ 80
 - 15 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. *生化实验方法和技术* (第二版), 北京: 高等教育出版社, 1997. 111~ 115
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Experimental Methods and Techniques of Biochemistry*. 2nd. Beijing: Higher Education Press, 1997. 111~ 115
 - 16 Glossmann H, Neville D M Jr. Glycoproteins of cell surfaces. *J Biol Chem*, 1971, **246** (20): 6339~ 6346
 - 17 Nakajima N, Mihara H, Sumi H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, **57** (10): 1726~ 1730
 - 18 赵晓瑜, 静天玉. 蚯蚓纤溶酶组分的分离纯化和分析. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (2): 218~ 221
Zhao X Y, Jing T Y. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (2): 218~ 221
 - 19 Smyth M J, Trapani J A. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunology Today*, 1995, **16** (4): 202~ 206
 - 20 Vaux D L, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 1994, **76**: 777~ 779
 - 21 Roch Ph, Stabili L, Pagliara P. Purification of three serine proteases from the coelomic cells of earthworms (*Eisenia fetida*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1991, **98B** (4): 597~ 602
 - 22 Lange S, Kauschke E, Mohrig W, *et al.* Biochemical characteristics of eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluid of earthworms. *Euro J Biochem*, 1999, **262**: 547~ 556
 - 23 Beschin A, Bilej M, Brys L, *et al.* Convergent evolution of cytokines. *Nature*, 1999, **400** (12): 627~ 628
 - 24 Tang Y, Liang D C, Jiang T, *et al.* Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component a: revealing the structural determinants of its dual fibrinolytic activity. *J Mol Biol*, 2002, **321** (1): 57~ 68
 - 25 Fan Q, Wu C, Li L, *et al.* Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1526** (3): 286~ 292

Purification, Identification and Partial Characterization of an Apoptosis-related Serine Protease From Earthworm

XIE Jiang-Bi, GUO Zhen-Quan, WENG Ning, WANG Hong-Tao¹⁾, JIANG Guan-Qun, RU Bing-Gen^{*}
(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract An apoptosis-related serine protease (ARSP1) was purified from *Eisenia fetida* extract (mainly a group of anti-tumor protein components) by hydrophobic interaction chromatography and ion exchange chromatography. The molecular mass assayed by SDS-PAGE and isoelectric point of ARSP1 were 28 ku and less than 3.8, separately. However, several coterminous bands could be observed by PAGE of natural ARSP1 and several coterminous peaks of ARSP1 were also detected with MALDI-TOF-MS when the relative molecular mass of three main peaks are 24 645, 25 052 and 25 281, separately. The N-term amino acid sequence of ARSP1 was assayed as following: I(V)IGGT(S)N(D)ASPGFEPWQLSQTRGGSHS. And, a result that ARSP1 is highly homologous with serine proteases was concluded by the comparison of N-term amino acid sequences. *In vitro*, the cytotoxicity of ARSP1 was not only identified by phase-contrast microscopy observation of apoptotic cells, but also studied further by the localization of fluorescent antibodies. By Schiff's staining, ARSP1 was identified to be glycoprotein or glycopeptide. By fibrin plate assay, ARSP1 was identified to be a plasmin and also a plasminogen activator, and the fibrinolytic activity was inhibited by PMSF (an inhibitor of serine proteases).

Key words ARSP1, apoptosis, serine protease, purification, glycoprotein, plasmin, plasminogen activator

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, Fax: 86-10-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

¹⁾ College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475001, China.

Received: December 15, 2002 Accepted: December 30, 2002