

野生型和突变型荞麦蛋白酶抑制剂的活性比较 及抗肿瘤功能分析*

田欣 李晨 李玉英 王转花**

(山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要 运用定点突变技术研究重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(rBTI)的作用位点, 先后构建了 R45A-aBTI 和 R45F-fBTI 两个突变体. 抑制活性测定显示, aBTI 和 fBTI 均丧失了胰蛋白酶抑制活性, 却分别增加了对弹性蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的抑制活性, 确定 Arg⁴⁵ 为野生型 rBTI 的作用位点. 稳定性分析表明, rBTI、aBTI 和 fBTI 均具有很高的热稳定性及酸碱稳定性. 采用 MTT 比色法分别检测野生型和突变型抑制剂对肿瘤细胞生长的抑制作用. 结果表明, 突变前后的 3 种抑制剂对 HL-60 和 EC9706 细胞的生长均显示出很强的抑制作用, 并且具有明显的浓度依赖性和时间依赖性. 通过研究不仅确定了 rBTI 的作用位点, 而且获得了两种新型蛋白酶抑制剂, 且作用位点的改变并不影响其对肿瘤细胞的生长抑制作用. 为进一步研究胰蛋白酶抑制剂的结构与功能的关系以及抗肿瘤药物的研制提供了新的思路.

关键词 荞麦, 蛋白酶抑制剂, 作用位点, 突变体, 细胞增殖

学科分类号 Q71, Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00731

蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PI)在酶学功能与新药设计的研究中具有重要的意义. PI 作为一种潜在的癌症预防药剂在医学领域已得到普遍认可. PI 广泛存在于植物体内, 与植物抗虫抗病密切相关^[1]. 大多数食物, 如豆类、谷类、坚果、水果、蔬菜、番茄以及其他一些乳制品中均含有含量不等的抗营养因子 - 蛋白酶抑制剂, 它们可保护蛋白质免受相应酶的降解作用^[2-3].

荞麦属于药食同源的植物, 在亚洲、北美洲、大洋洲及欧洲东部许多国家均有广泛种植. 荞麦蛋白氨基酸组成较为独特, 荞麦食品具有降低胆固醇、降血压、改善糖尿病等作用. 在中国、日本和韩国等国家和地区, 荞麦已经被作为原料来生产很多功能性食品, 包括荞麦挂面、荞麦茶、荞麦醋等. 中国是世界荞麦的起源地, 国际荞麦专家称中国荞麦是“世界上最好、最干净的荞麦”. 食物中的 PI 可以在对人类健康没有副作用的前提下预防人体许多不同类型及不同部位癌症的增殖^[4-5]. 迄今为止, 荞麦中的多种蛋白酶抑制剂已经得到分离、纯化^[6-7]. 其中, 来自荞麦种子的两种胰蛋白酶抑制剂 BWI-1 和 BWI-2 可以有效抑制 T 细胞急

性淋巴细胞白血病^[8].

我们之前的研究借助分子生物学的方法, 通过克隆、表达获得一种重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(rBTI)^[9-10]. 体外研究发现, rBTI 能够显著抑制 HL-60 细胞(人急性髓细胞性白血病细胞株)、HepG2 细胞(人肝癌细胞株)及 IM-9 细胞(人多发性骨髓瘤细胞株)等肿瘤细胞的增殖, 对正常细胞无副作用^[10-12]. 此外, rBTI 诱导人类实体瘤细胞凋亡的作用机理也进行了初步的研究^[13]. 作为新型的抗癌、抑癌药物, rBTI 在疾病的诊断、治疗和预防等方面显示出很好的应用前景.

本实验依据预测的抑制剂作用位点, 根据已经获得的荞麦胰蛋白酶抑制剂的基因序列推测出相应的氨基酸序列, 利用定点突变技术对 rBTI 的基因进行分子改造, 通过原核表达系统获得 R45A-aBTI

* 国家自然科学基金(30671084, 30870525)和山西省自然科学基金(2007011077)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0351-7019371, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn

收稿日期: 2009-12-09, 接受日期: 2010-01-21

和 R45F-fBTI 两种突变体，对突变体的抑制活性鉴定确定了 rBTI 的作用位点。之后对野生型和突变型抑制剂的稳定性等理化性质进行了比较，并初步研究了 aBTI, fBTI 体外抑制肿瘤细胞增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株及主要试剂

RPMI 1640 培养液为美国 Hyclone 产品；人食管鳞状细胞癌细胞株 EC9706 由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠；人急性髓细胞性白血病细胞株 HL-60 由中国辐射防护研究院二所惠赠；胎牛血清为杭州四季青公司产品；四甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Sigma 公司产品；二甲基亚砜(DMSO)购自北京夏新生物公司；HEPES 钠盐购自 Sigma 公司；胰蛋白酶 (Trypsin)，胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)，BAPNA 和 BTEE 购买自 Solarbio 公司；弹性蛋白酶 (Elastase)和地衣红弹性蛋白(Elastin-orcein)为 Sigma 公司产品；HisTrap™ HP 亲和层析柱购买自 Amersham Pharmacia 公司；其他试剂均为国产分

析纯。

1.2 突变体 aBTI 和 fBTI 的构建

将 rBTI 全长氨基酸序列在 BLASTP 的 nr (Non-redundant GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF)数据库中与 9 种植物来源的抑制剂氨基酸序列进行同源性比对(图 1)。比对结果显示，rBTI 分子中具有典型的蛋白酶抑制剂的保守序列 EWPELVG 和 CDRVW，与丝氨酸类蛋白酶抑制剂马铃薯 - I 家族在氨基酸组成上极为相似^[4]。根据与马铃薯 - I 家族蛋白酶抑制剂家族的序列同源性，推测 Arg⁴⁵~ Asp⁴⁶ 氨基酸残基为 rBTI 的抑制作用位点^[6]。将 rBTI 分子中第 45 位 Arg 分别突变为 Ala 和 Phe，以本实验室先前构建的含有 BTI 基因全序列的克隆载体 pQE-31-BTI 为模板，利用合成的引物，通过两步法 PCR 扩增出带有突变位点的目的基因。表 1 为 PCR 所需的引物及待突变的位点。PCR 产物以 BamH I 和 Hind III 酶切位点克隆于 pQE-31 原核表达载体中，分别构建 pQE-31-aBTI 和 pQE-31-fBTI，并将构建好的质粒转化入 E. coli M15 [pREP4] 菌株。

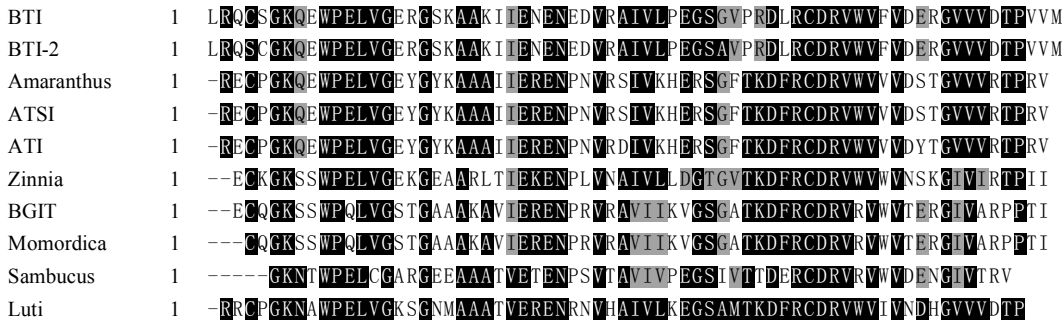


Fig. 1 Sequence alignment of amino acid deduced from nucleotide sequences of rBTI and other plant proteinase inhibitor reported in existing gene databases on internet alignment

BTI-2: Trypsin inhibitor of buckwheat; Amaranthus: Amaranthus hypochondriacus; ATSI: Trypsin/subtilisin inhibitor(ATSI); ATI: Trypsin inhibitor [Amaranthus hypochondriacus]; Luti: Chain A, solution structure of Linum Usitatissimum trypsin inhibitor; BGIT: Trypsin inhibitor BGIT-balsam pear; Momordica: Trypsin inhibitor [Momordica charantia]; Zinnia: Protease inhibitor 2 [Zinnia elegans]; Sambucus: Pathogenesis-related protein PR-6 type [Sambucus nigra].

Table 1 Oligonucleotides used for PCR and site-directed mutagenesis

Sequence of oligonucleotides (primers) 5'~3' (the mutated codons are in italics)	Template genes	Amino acid residue location	Mutations
ATGGATCCTCTGCGTCAGTGCTC (the <i>Bam</i> H I site is bold)		MRGSHH 1~6	
CCAAGCTTTATCACATAACAACAGG (the <i>Hind</i> III site is bold)		DTPVVM 64~69	
GTGCCTTTTGACCTCCGATGTGAC	Wild-type BTI	AVPRDLR 42~48	R45F
GTGCCTGCAGTCCTCCGATGTGAC	Wild-type BTI	AVPRDLR 42~48	R45A

1.3 突变体 aBTI 和 fBTI 的表达和纯化

将包含不同突变体的 *E. coli* M15 细胞在含有抗生素(100 mg/L Amp; 25 mg/L Kan)的 LB 培养基中 37℃ 分别培养, 180 r/min 震荡培养至 $A_{600} = 0.6$, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L 以诱导融合蛋白表达, 继续培养 4 h. 收集菌体, 超声破碎. 将上清液上样于平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.5)充分平衡过的 Ni²⁺ 亲和层析柱. 利用咪唑浓度梯度缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L 咪唑, pH 7.5)阶段清洗, 除去杂蛋白, 最后使用洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, pH 7.5)洗脱. 所得蛋白质样品通过福林 - 酚试剂法测定浓度. 15% SDS-PAGE 检测.

1.4 抑制活性分析

抑制剂对胰蛋白酶的抑制活性通过底物 BApNA(N-Benzoyl-L-Arginine P-Nitroanilide)的水解速率测定. 在 3.5 ml 活性测定体系中(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0, 含 10 mmol/L CaCl₂), 抑制剂样品和 100 mmol/L 胰蛋白酶于 37℃ 温育 10 min. 加入 20 μ l 150 mmol/L BApNA, 继续保温 10 min, 用 200 μ l 33% 的醋酸溶液终止反应, 410 nm 的波长下测定反应体系中底物的水解产物 p-Nitroanilide(PNA)所产生的吸收值. 对照反应体系以相同体积的测活缓冲液代替抑制剂样品溶液.

抑制剂对胰凝乳蛋白酶的活性测定以 0.5 mmol/L BTEE (N-Benzoyl-L-Tyrosine ethylester) 为底物, 测定方法同胰蛋白酶.

弹性蛋白酶作用于地衣红弹性蛋白(Elastin-orcein), 底物降解释放出的地衣红在 590 nm 处有光吸收值. 将 100 μ l 弹性蛋白酶和一定量的抑制剂加入 3.5 ml 活性测定体系(200 mmol/L 硼酸缓冲液, pH 7.4), 37℃ 温育 10 min. 再加入 10 mg Elastin-orcein, 37℃ 震荡反应 4 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清于 590 nm 下测定. 以不加抑制剂的溶液作为对照.

1.5 抑制剂的动力学分析

按照 1.4 抑制剂活性分析方法, 在底物浓度固定的情况下, 加入不同浓度的抑制剂, 以 BApNA, BTEE 和 Elastin-orcein 分别作为胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶活性测定的底物, 检测在不同抑制剂浓度体系内蛋白酶的剩余活性, 进而求得相应的反应初速度. 采用 Dixon plot 作图法, 计算出

rBTI, aBTI 和 fBTI 的抑制常数 K_i ^[15].

1.6 抑制剂稳定性研究

为了了解野生型和突变体蛋白在高温和酸碱环境的稳定性, 我们分别测定了 rBTI、aBTI 和 fBTI 在加热及不同 pH 条件下对相应蛋白酶的抑制活性变化.

抑制剂的热稳定性实验: 将纯化的 rBTI, fBTI 分别加入 pH 8.0, 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, aBTI 加入 pH 7.4, 200 mmol/L 硼酸缓冲液中, 100℃ 加热 0~80 min. 加热处理后的样品迅速在冰上冷却 15 min, 短暂离心. 吸取上层清液测定各抑制剂的剩余抑制活性.

抑制剂的酸碱稳定性分析: 将纯化的 rBTI, aBTI 和 fBTI 分别加入不同 pH 的缓冲液中(pH 2.0~12.0. Gly-HCl 缓冲溶液 pH 2~3, 醋酸缓冲溶液 pH 4~5, 苹果酸 -NaOH 缓冲溶液 pH 6~7, Tris-HCl 缓冲溶液 pH 8~9 以及 Gly-NaOH 缓冲溶液 pH 10~12), 37℃ 温育 30 min. 在最适反应条件下测定抑制剂的剩余抑制活性.

1.7 细胞培养

HL-60 细胞在含有体积分数 10%~15% 热灭活的胎牛血清, 15 mmol/L HEPES, 8 U/ml 庆大霉素的 RPMI 1640 完全培养液中, 于 37℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度孵育箱中培养, 细胞呈半悬浮状态生长, 2~3 天传代 1 次. EC9706 细胞在相同培养基和环境中培养, 细胞呈贴壁状态生长. 取对数生长期的细胞进行实验.

1.8 抑制剂对 HL-60 及 EC9706 细胞增殖的 MTT 检测

取处于对数生长期的 HL-60 细胞及 EC9706 细胞, 经过胰酶消化后, 调整细胞浓度至 1×10^6 ml, 按照每孔 100 μ l 细胞液接种于 96 孔板. 37℃, 5% CO₂ 过夜培养至细胞完全贴壁后, 更换新鲜的 RPMI 1640 完全培养基. 将 rBTI、aBTI 和 fBTI 分别加入培养板中, 至终浓度为 0.55, 1.1, 2.2 和 4.4 μ mol/L. 每组各设置 5 个复孔, 以不加抑制剂的实验组作为对照. 37℃, 5% CO₂ 条件下分别培养 6, 12 和 24 h 后, 每孔加入 20 μ l MTT(5 g/L), 继续培养 4 h. 离心后弃去板中培养液及 MTT, 每孔加入 150 μ l DMSO, 室温低速震荡 5 min. 待结晶物完全溶解后, 于酶标免疫测定仪(BIO-RAD MODEL 550)测定 490 nm 处的吸光度值. 通过 MTT 测定肿瘤细胞生长抑制率的计算公式如下:

肿瘤细胞的生长抑制率 = (1 - 实验组平均吸光值 / 对照组平均吸光值) $\times$ 100%.

1.9 统计学处理

所有数据用 3 次独立实验的平均值表示, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 组内采用方差分析, 组间采用 t 检验.

2 结 果

2.1 突变体的基因表达及纯化

按照方法 1.3, 将构建的两个突变型工程菌分别在 *E. coli* M15 [pREP4] 中表达, 表达产物经亲和和纯化后, 在 SDS-PAGE 图谱中显示(图 2), rBTI, aBTI 和 fBTI 均以可溶性方式表达, 表达产物的纯度均达到 95% 以上. 与突变前的野生型 rBTI (泳道 4)相比, 虽然 rBTI 中的 Arg⁴⁵ 残基分别被 Ala 和 Phe 取代, 但由于分子大小变化不大, 故 aBTI 和 fBTI (泳道 5, 6)在 SDA-PAGE 中的表观分子质量(约 9.3 ku)与先前的文献报道一致^[10].

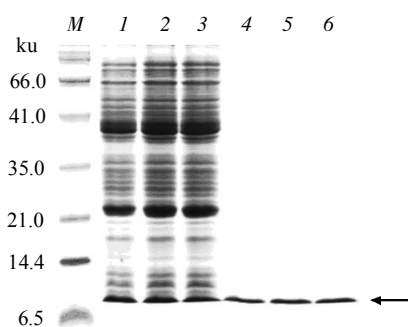


Fig. 2 Electrophoretic analysis(15% SDS-PAGE) of rBTI, aBTI and fBTI

The gel was stained with Coomassie blue dye. Three micrograms of protein was loaded in lane 1~3, and one microgram of protein was loaded in lane 4~6. 1~3: Cell lysate of *E. coli* M15/ pQE31-rBTI, aBTI and fBTI; 4~6: Affinity purified rBTI, aBTI and fBTI.

2.2 抑制活性分析

为了确定 rBTI 的抑制专一性, 了解其突变体 aBTI 和 fBTI 是否仍具有胰蛋白酶抑制活性, 按照 1.4 抑制剂活性分析方法, 我们测定了抑制剂对多种蛋白酶的抑制作用. 图 3 为 3 种抑制剂对胰蛋白酶的抑制作用. 结果显示, aBTI 和 fBTI 分别与胰蛋白酶作用后, 均不能形成稳定的酶-抑制剂复合物, 未发挥抑制剂对酶的抑制作用. 若以 rBTI 对酶的抑制率为 100% 计算, 则 fBTI 和 aBTI 均失去 90% 以上的胰蛋白酶抑制作用. 在对胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶的抑制实验中, fBTI 显示出很高的胰凝乳蛋白酶抑制作用, 而 aBTI 则显示出对弹性蛋白酶有抑制作用, rBTI 未显示出对以上两种蛋白酶的抑制作用. 图 4 表明, 野生型 rBTI 对胰

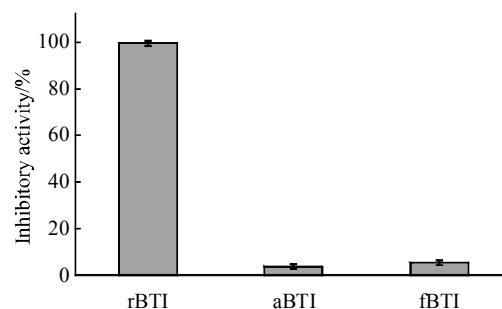


Fig. 3 Inhibition of trypsin by rBTI, fBTI and aBTI

Inhibitors were added to a fixed concentration of trypsin (9.3 nmol/L). Residual enzyme activity is expressed as percentage of the control ($v\%$) and was determined by using 150 $\mu\text{mol/L}$ BApNA as substrate. Three replicates performed for each measurement.

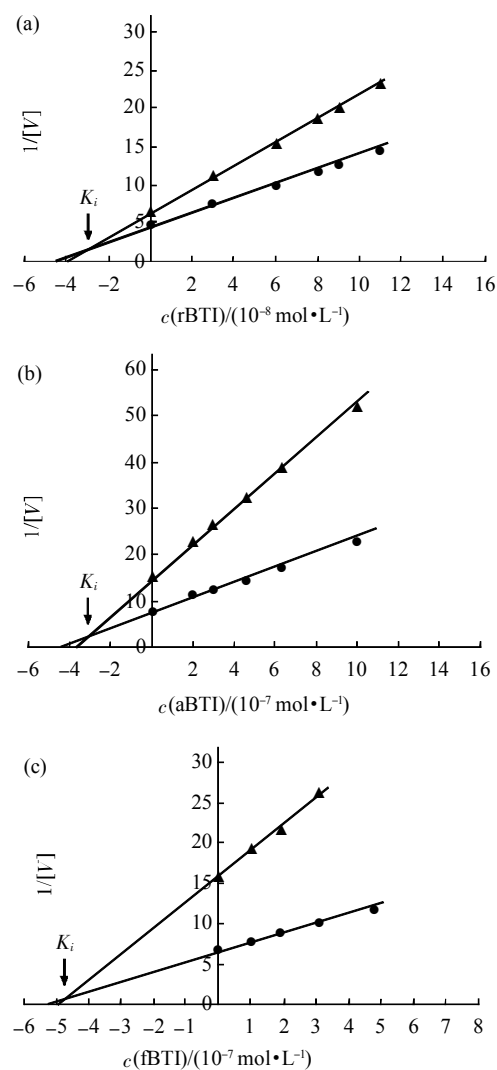


Fig. 4 Kinetic analysis of trypsin, elastase and chymotrypsin inhibition by rBTI, aBTI and fBTI

Dixon plot for the determination of the inhibition constant (K_i) of rBTI, aBTI and fBTI against trypsin (a), elastase (b) and chymotrypsin (c). The reciprocals of velocity were plotted against the inhibitor concentration, and the K_i value was obtained from the intercepts of two lines at two concentrations of substrate.

蛋白酶的抑制常数 K_i 为 3.20×10^{-8} mol/L (图 4a), 突变型 aBTI 对弹性蛋白酶的 K_i 为 3.34×10^{-7} mol/L (图 4b); fBTI 对胰凝乳蛋白酶的 K_i 为 4.97×10^{-7} mol/L (图 4c). 测定结果表明, 野生型和突变型抑制剂对相应的蛋白酶均有较高的亲和力, 在一定的浓度下可特异性地与酶活性中心结合, 导致活性酶失去它们对底物的催化功能, 从而起到抑制酶活性的作用.

2.3 抑制剂的稳定性

将 3 个样品 rBTI, aBTI 和 fBTI 在沸水浴中分别煮沸不同时间(0~80 min), 迅速冷却. 测定处理前后 3 种抑制剂对相应蛋白酶抑制作用的变化. 结果显示(图 5a), 在高温下, 样品抑制作用均没有发生显著变化. 100℃ 热处理 60 min 后, 3 种抑制剂的抑制作用仍可保留 80% 以上, 具有很高的耐热性.

将突变前后的样品在 pH 2.0~10.0 的范围内, 37℃ 分别作用 30 min 后, rBTI, aBTI 和 fBTI 均显示出很好的稳定性, 对相应蛋白酶的抑制作用始终保持在 80% 以上. rBTI 和 fBTI 在 pH 8.0 时抑

制活性最高, aBTI 在 pH 7.0 时表现出最高的抑制作用. 当 pH > 10.0 后, 各抑制剂的抑制作用迅速降低, 在 pH 12.0 时, aBTI 和 fBTI 的抑制作用均丧失 40% 左右, rBTI 的抑制作用则丧失 60% 以上. 该结果表明, rBTI, aBTI 和 fBTI 属于酸碱相对稳定的抑制剂, 在 pH > 10.0 时, 野生型 rBTI 的酸碱稳定性显著低于突变型 aBTI 和 fBTI 的酸碱稳定性(图 5b).

2.4 野生型和突变型抑制剂对肿瘤细胞生长的影响

先前的研究表明 rBTI 具有抑制不同肿瘤细胞生长, 并诱导其发生凋亡的作用^[10-13]. 为了了解 rBTI 在作用位点 Arg⁴⁵ 突变后是否仍具有抗肿瘤活性, 分别取不同浓度的 rBTI, aBTI 和 fBTI 作用于 HL-60 和 EC9706 细胞, 采用 MTT 法检测不同剂量和作用时间下, 抑制剂在体外对两株细胞增殖的抑制率. 图 6 为不同浓度的 3 种抑制剂分别对

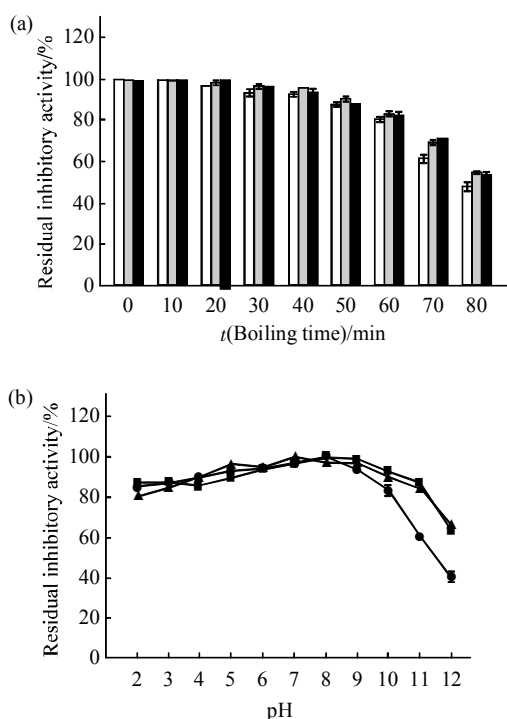


Fig. 5 Stability studies of rBTI, aBTI and fBTI

(a) Temperature stability of the inhibitory activity of inhibitors after incubation for 0~80 min at 100℃. □: rBTI; ▤: aBTI; ■: fBTI. (b) pH stability of inhibitory activity of inhibitors in pH range 2~12 after incubation for 30 min at 37℃. ●—●: rBTI; ▲—▲: aBTI; ■—■: fBTI. Values were given as $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments.

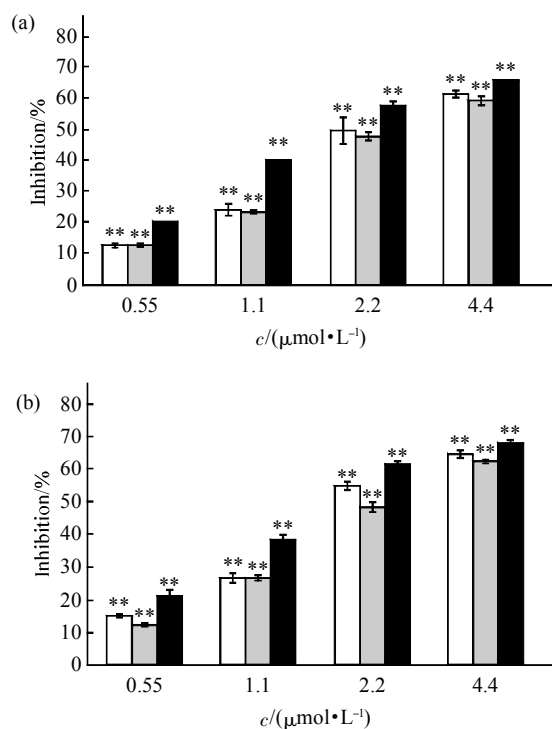


Fig. 6 Effects of rBTI, aBTI and fBTI treatment on the growth of HL-60(a) and EC9706(b) cells with different concentrations

Cells were incubated with various concentrations of inhibitors (0.55 ~ 4.4 μmol/L) for 20 h. The color intensity was measured using a microtiter plate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm. rBTI, aBTI and fBTI inhibited the survival of HL-60 and EC9706 cells in a dose-depended manner. Values were given as $\bar{x} \pm s$ of five independent experiments. ** $P < 0.01$, compared with untreated cells. □: rBTI; ▤: aBTI; ■: fBTI.

HL-60(图 6a)和 EC9706(图 6b)细胞的作用, 样品浓度为 0.55, 1.1, 2.2 和 4.4 $\mu\text{mol/L}$. 结果显示, 抑制剂与两株细胞分别作用 20 h 后, 在设定的浓度范围内各抑制剂均能够抑制 HL-60 和 EC9706 细胞的增殖, 抑制效率具有显著的剂量依赖性. 当样品浓度达到 4.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 3 种抑制剂对两株肿瘤细胞的抑制率均可达到 60%. rBTI, fBTI 和 aBTI 在 20 h 作用时间下, 抑制 HL-60 细胞增殖 50% 的药物浓度(IC_{50})分别为 3.28, 3.40 及 2.78 $\mu\text{mol/L}$; 抑制 EC9706 细胞增殖的 IC_{50} 分别为 3.03, 3.23 及 2.69 $\mu\text{mol/L}$.

图 7 为不同诱导时间(6, 12 和 24 h), 浓度为 2.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 3 种抑制剂分别对 HL-60(图 7a)和 EC9706(图 7b)细胞的作用结果. 结果显示, rBTI, aBTI 和 fBTI 对 HL-60 和 EC9706 细胞的抑制效率具有时间依赖性. 在 6~24 h 的范围内, 药物均能够明显抑制两株细胞的增殖, 随着时间的延长, 抑

制作用逐渐增强. 当诱导时间为 24 h, 2.2 $\mu\text{mol/L}$ 的药品浓度对 HL-60 和 EC9706 细胞的抑制率在 50% 以上.

在浓度梯度及时间梯度的实验组中, rBTI 和 aBTI 对 HL-60 和 EC9706 细胞的抑制率相近, 而 fBTI 对 HL-60 和 EC9706 细胞的抑制作用要显著高于 rBTI 和 aBTI 的抑制作用, 体外诱导 HL-60 和 EC9706 细胞 20 h 后, 抑制率分别达到 66.5% 及 68.2%. 此外, 在相同浓度及作用时间下, 药物对 EC9706 细胞增殖的抑制作用要高于对 HL60 细胞增殖的抑制作用, 3 种抑制剂对 EC9706 细胞均有更强的毒性作用.

3 讨 论

体外定点突变技术是研究蛋白质结构与功能之间复杂关系的有力工具, 也是实验中改造 / 优化基因的常用手段^[6]. 对某个已知基因的特定碱基进行定点改变、缺失或者插入, 可以改变相应的氨基酸序列和蛋白质结构, 对突变基因的表达产物进行研究有助于了解蛋白质结构与功能的关系, 探讨蛋白质相互作用的可能位点, 研究不同酶的活性或动力学特性等^[7].

本研究根据同源性比较和理论预测确定 Arg⁴⁵ 可能为 rBTI 的作用位点, 采用定点突变技术对该氨基酸残基进行替换, 分别得到 aBTI 和 fBTI 两种突变体. 抑制作用实验表明, aBTI 和 fBTI 均丧失了对胰蛋白酶的抑制作用. 在对其他蛋白酶的抑制实验中, fBTI 显示出很高的胰凝乳蛋白酶抑制作用, 而 aBTI 则显示出对弹性蛋白酶的抑制作用. 该结果不仅证明了 Arg⁴⁵ 残基为 rBTI 的作用位点, 在 rBTI 发挥胰蛋白酶抑制作用时起到关键作用, 同时表明 Arg⁴⁵ 残基若被其他氨基酸替代可能会引起 rBTI 抑制活性的改变, 并产生新的蛋白酶抑制作用. 这一结果对 rBTI 及其他来源的胰蛋白酶抑制剂结构与功能的研究具有很好的指导作用. 稳定性实验中, 野生型和突变型抑制剂均显示出很高的热稳定性及酸碱稳定性. 由于突变前后蛋白质分子的带电性发生了变化, 带正电荷的 Arg 被非极性氨基酸 Ala 和 Phe 替代, 这对抑制剂的等电点以及空间位阻产生了一定影响, 出现了在高温和强碱性的环境下突变体的稳定性略高于野生型的现象. 高耐热性及高酸碱稳定性的特点不仅有利于抑制剂的提取纯化, 作为潜在的抗肿瘤药物, 在药物口服及药物稳定性研究方面也有非常显著的意义, 是抗肿瘤

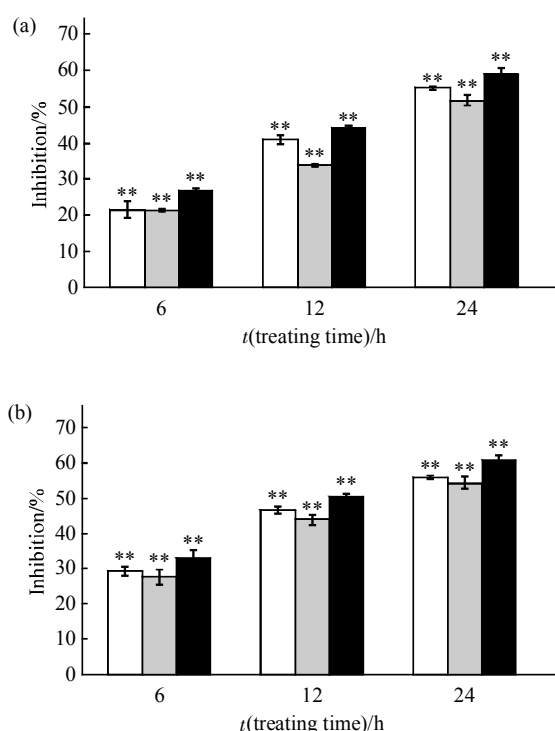


Fig. 7 Effects of rBTI, aBTI and fBTI treatment on the growth of HL-60(a) and EC9706(b) cells for different time

Cells were incubated for different time periods (6~24 h). Concentration of inhibitors is 2.2 $\mu\text{mol/L}$. The color intensity was measured using a microtiter plate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm. rBTI, aBTI and fBTI inhibited the survival of HL-60 and EC9706 cells in a time-dependent manner. Values were given as $\bar{x} \pm s$ of five independent experiments. ** $P < 0.01$, compared with untreated cells. □ : rBTI; ▒ : aBTI; ■ : fBTI.

药物设计的一个重要方面。

恶性肿瘤是机体正常细胞在多原因、多阶段与多次突变的情况下引起的一类疾病。目前在人体不同器官中已经鉴定出 100 多种恶性肿瘤^[18]。在肿瘤细胞生长和侵染过程中的一个关键步骤是细胞外基质屏障(ECM)的降解。除了对细胞和组织提供结构性支撑外,细胞外基质屏障也起着细胞黏着,信号传导等作用。丝氨酸蛋白酶是一类非常保守且与肿瘤细胞生长、侵染和转移有关的蛋白水解酶^[19],在肿瘤细胞中的主要作用是通过降解细胞外基质屏障促进肿瘤细胞与组织分离,使其迁移和侵染不受限制。在丝氨酸蛋白酶活性缺乏的小鼠体内,肿瘤细胞的蔓延比酶活性正常的小鼠慢很多。本研究初步证明,通过基因重组获得的荞麦丝氨酸蛋白酶抑制剂 rBTI 以及它的突变体 aBTI 和 fBTI 能够在体外抑制 HL-60 及 EC9706 肿瘤细胞的增殖,说明突变前后的不同蛋白酶抑制剂与肿瘤细胞膜外侧的胰蛋白酶、弹性蛋白酶和胰凝乳蛋白酶或特异性受体通过不同的途径相结合,从而使蛋白酶丧失水解细胞外基质屏障的作用,影响肿瘤细胞的侵染和扩散过程,起到对肿瘤细胞生长的抑制作用。

另有研究表明^[20],一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂能通过抑制细胞内 26S 蛋白酶中的 $\beta 1$ 亚基(具有半胱氨酸蛋白酶活性),使蛋白酶的作用受到抑制,从而诱导并促进肿瘤细胞凋亡。目前具体作用机制虽尚不清楚,但这一现象可以解释 rBTI 和 fBTI 在细胞内促进肿瘤细胞凋亡时有可能与酶分子中的相应亚基或基团(具有类胰蛋白酶活性或具有类胰凝乳蛋白酶活性)相互结合或识别有关。我们先前的研究已证明 rBTI 对血液病和实体瘤细胞均有一定的抑制生长和诱导其发生凋亡的作用^[13],本研究发现,突变后的两种突变体 aBTI 和 fBTI 仍然保留了对肿瘤细胞的生长抑制作用,但 fBTI 对 HL-60 和 EC9706 两株肿瘤细胞的抑制作用略高于 aBTI 和野生型 rBTI。此结果可能与 fBTI 作用的靶标胰凝乳蛋白酶的结构与活性以及酶分子中的特异性亚基等有关。由于肿瘤的发生和发展是一个非常复杂的过程,其作用机理主要有线粒体途径和死亡受体途径,且对于每一种药物促进肿瘤细胞凋亡的方式和事件各不相同,因此,这一结果有待进一步探讨。

本研究不仅确定了荞麦蛋白酶抑制剂 rBTI 的作用位点,而且收获了两款新的荞麦蛋白酶抑制剂——弹性蛋白酶抑制剂 aBTI 和胰凝乳蛋白酶抑制剂 fBTI。rBTI 作用位点的研究及 aBTI 和 fBTI

突变体的功能分析在国内外均属首次开展,而有关弹性蛋白酶抑制剂的研究也主要集中在治疗急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征等方面,对于抗肿瘤方面的研究国内尚无报道。我们获得的 3 种重组荞麦蛋白酶抑制剂均具有特异和高效的蛋白酶抑制作用,这为蛋白酶抑制剂的理论与应用研究提供了有用的参考价值。

致谢 我们感谢中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所的戚正武院士和包睿博士对论文完成提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] 卢晓风,夏玉先.植物蛋白酶抑制剂在植物抗虫与抗病中的作用.生物化学与生物物理进展,1998,25(4): 328-333
Lu X F, Xia Y X. Prog Biochem Biophys, 1998, 25(4): 328-333
- [2] Scarafoni A, Consonni A, Galbusera V, et al. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. Phytochemistry, 2008, 69(9): 1820-1825
- [3] Armstrong W B, Kennedy A R, Wan X S, et al. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase II a chemoprevention trial. Clin Cancer Res, 2000, 6(12): 4684-4691
- [4] Kennedy A R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. Pharmacol Ther, 1998, 78(3): 167-209
- [5] 王广斌,解晓悦.山西小杂粮竞争优势与产业发展研究.中国农学通报,2006,22(5): 485-488
Wang G B, Xie X R. Chin Agric Sci Bull, 2006, 22(5): 485-488
- [6] Belozersky M A, Dunaevsky Y E, Musolyamov A X, et al. Complete amino acid sequence of the protease inhibitor from buckwheat seeds. FEBS Lett, 1995, 371(3): 264-266
- [7] 王转花,赵卓惠,张政,等.一种苦荞种子蛋白酶抑制剂的纯化、特征及其抗虫活性.中国生物化学与分子生物学学报,2006,22(12): 960-965
Wang Z H, Zhao Z H, Zhang Z, et al. Chin J Biochem Mol Biol, 2006, 22(12): 960-965
- [8] Park S S, Ohba H. Suppressive activity of protease inhibitors from buckwheat seeds against human T-acute lymphoblastic leukemia cell lines. Appl Biochem Biotechnol, 2004, 117(2): 65-74
- [9] Li Y Y, Zhang Z, Liang A H, et al. Cloning and characterization of a novel trypsin inhibitor (BTIw1) gene from *Fagopyrum esculentum*. DNA Seq, 2006, 17(3): 203-207
- [10] Zhang Z, Li Y Y, Li C, et al. Functional expression of a buckwheat trypsin inhibitor in *Escherichia coli* and its effect on proliferation of multiple myeloma IM-9 cell. Acta Biochim Biophys Sin, 2007, 39(9): 701-707
- [11] 高丽,李玉英,张政,等.重组荞麦胰蛋白酶抑制剂对 HL-60 细胞的促凋亡作用.中国实验血液学杂志,2007,15(1): 59-62
Gao L, Li Y Y, Zhang Z, et al. J Exp Hematol, 2007, 15(1): 59-62

- [12] 李 芳, 李玉英, 白崇智, 等. 重组荞麦胰蛋白酶抑制剂对人肝癌细胞的凋亡及半胱氨酸天冬酶活性的影响. 中国生化与分子生物学学报, 2009, **25**(2): 92–97
- Li F, Li Y Y, Bai C Z, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2009, **25**(2): 92–97
- [13] Li Y Y, Zhang Z, Wang Z H, *et al.* rBTI induces apoptosis in human solid tumor cell lines by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation. Toxicol Lett, 2009, **189**(2): 166–175
- [14] Pandya M J, Smith D A, Yarwood A, *et al.* Complete amino acid sequences of two trypsin inhibitors from buckwheat seed. Phytochemistry, 1996, **43**(2): 327–331
- [15] Arindam B, Suman M, Sudeshna M L, *et al.* A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. Phytochemistry, 2006, **67**(3): 232–241
- [16] Xie Z W, Luo M J, Xu W F, *et al.* Two reactive site locations and structure and function study of the arrowhead proteinase inhibitors, A and B, using mutagenesis. Biochemistry, 1997, **36**(19): 5846–5852
- [17] Qi R F, Song Z W, Chi C W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. Acta Biochim Biophys Sin, 2005, **37**(5): 283–292
- [18] Fear G, Komamytsky S, Raskin I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. Pharmacol Therapeut, 2007, **113**(2): 354–368
- [19] Netzel-Arnett S, Hooper J D, Szabo R, *et al.* Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. Cancer Metastasis Rev, 2003, **22**(2–3): 237–258
- [20] Swieten P F, Samuel E, Hernández R O, *et al.* A cell-permeable inhibitor and activity-based probe for the caspase-like activity of the proteasome. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, **17**(12): 3402–3405

Analysis of Inhibitory Activity and Antineoplastic Effect of Wild Type rBTI and Its Mutants*

TIAN Xin, LI Chen, LI Yu-Ying, WANG Zhuan-Hua**

(Key Laboratory for Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract To examine the active site of recombinant buckwheat trypsin inhibitor (rBTI), two mutants (R45A-aBTI, R45F-fBTI) were generated through site-directed mutagenesis. Activity analysis found that the aBTI and fBTI had lost trypsin inhibitory activity. However, aBTI and fBTI showed new inhibitory activities against elastase and chymotrypsin, respectively. This result suggested that Arg⁴⁵ is the active site of rBTI. These inhibitors showed remarkable stability to heat and pH. The possible effects of aBTI and fBTI on the proliferation of human HL-60 and EC9706 cell lines were investigated by MTT assays. It indicated that aBTI and fBTI could specifically inhibit the growth of HL-60 and EC9706 cells in a dose- and time-dependent manner. The active site of rBTI was determined and two new inhibitors were obtained in this research. Knowledge about the active site is useful for further clarifying the physiological mechanism of rBTI and other protease inhibitors. New inhibitory activities of aBTI and fBTI are potentially useful in the fields of health and medicine.

Key words buckwheat, protease inhibitor, active site, mutant, cell proliferation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00731

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30671084, 30870525) and The Nature Sciences Foundation of Shanxi Province (2007011077).

**Corresponding author.

Tel: 86-351-7019371, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn

Received: December 9, 2009 Accepted: January 21, 2010