

虾蛄活性肽的分离与纯化及其对肿瘤细胞凋亡的影响

李云涛, 卜天, 曹玉昊, 马剑茵* (浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江舟山 316004)

摘要 [目的] 为海洋抗肿瘤新药的开发提供候选药物。[方法] 以海洋生物虾蛄为原料, 采用胰蛋白酶水解提取虾蛄软体组织中的活性多肽, 采用超滤、凝胶层析、高效液相色谱等技术对其进行分离与纯化, 并选择高表达肿瘤细胞株进行体外抗肿瘤活性评价。[结果] 获得纯度较高的活性肽 FHOS, 此肽的氨基酸序列为 Phe Tyr Met Asn His。采用 MTT 法测得 FHOS 对 PC-3 细胞和 A549 细胞的最高增殖抑制率达到 70.1% 和 90.0%, 呈现良好的量效和时效关系。[结论] FHOS 具有一定的抑制肿瘤细胞凋亡的活性。

关键词 虾蛄; 活性肽; 抗肿瘤活性

中图分类号 S986.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)34-219-03

Separation and Purification of Squillid Active Peptides and Its Effect on Apoptosis of Tumor Cells

LI Yun-tao, BU Tian, CAO Yu-hao, MA Jian-yin* (School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316004)

Abstract [Objective] The research aimed to provide candidate drugs for developing new marine anti-tumor drugs. [Method] Taking marine organism squillid as materials, active peptide was extracted from soft tissue of squillid with trypsin by enzymatic hydrolysis technique. And the hydrolysate was isolated and purified by such technologies as ultrafiltration and Sephadex G-25 gel and RP-HPLC. And its antitumor activities of every fraction obtained were detected by MTT method. [Result] A peptide (FOHS) with high purity was finally obtained. The amino acid sequence of FOHS was identified as Phe Tyr Met Asn His. The maximum proliferation inhibition rate of FHOS on PC-3 and A549 cells determined by MTT method were 70.1% and 90.0% respectively, showing good dose and time relationships. [Conclusion] FOHS had some activities for inhibiting the apoptosis of tumor cells.

Key words Squillid; Active peptides; Antitumor activity

虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*), 属于节肢动物门、软甲纲、口足目, 在我国南北沿海地区均有分布, 是浙江省重要的水产品之一。虾蛄体内的蛋白质含量较高, 占总体的 16%~20% 左右, 而生物活性肽就常以非活性形式存在于构成蛋白质的氨基酸长链中。近年来研究表明, 口虾蛄乙醇提取物能抑制 CNE-2Z 细胞裸鼠移植瘤的生长^[1], 降低 CNE-2Z 细胞的体外侵袭能力^[2]。酶解法水解提取海洋生物蛋白条件温和, 水解度相对较高, 营养成分保留得相对较好, 而且从酶解蛋白质产物中分离纯化^[3], 经常会得到一些具有生物活性的肽类化合物。笔者以海洋生物虾蛄为原料, 运用酶解方法和现代分离技术(膜分离技术、色谱分离技术)提取纯化虾蛄多肽, 选择高表达肿瘤细胞株进行体外抗肿瘤活性评价, 旨在为海洋抗肿瘤新药开发提供候选药物。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 胎牛血清, 购自杭州四季青生物工程有限公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 购自美国 SIGMA 公司; F12 粉末培养基, 购自美国 SIGMA 公司; RPMI1640 培养基, 购自 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 购自美国 SIGMA 公司。

1.2 试验仪器 BSZ-40-LCD 自动部分收集器, 为上海琪特分析仪器有限公司产品; 岛津 PPSQ-31A 蛋白质测序仪, 为日本岛津公司产品; 高效液相色谱仪 Agilent 1200, 为美国 Agilent 公司产品; 超滤杯、超滤膜, 购自上海摩速科学器材有限公司; G-25 凝胶分子筛, 购自北京亚太恒信生物科技有限公司; FD-1000 冷冻干燥机, 为上海爱朗仪器有限公司产品; CF16RXII 高速冷冻离心机, 为日本 HITACHI 公司产品;

UV1100 紫外分光光度计为上海美谱达公司产品; ZHJH-C1209C 型超净工作台, 为上海智诚分析仪器制造有限公司产品; 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司产品; Forma 3111 型 CO₂ 培养箱, 为美国 Thermo 公司产品; 倒置显微镜, 为日本 OLYMPUS 公司产品。

1.3 细胞株 人前列腺癌细胞 PC-3、DU-145 和肺癌细胞 A-549, 由中国科学院上海细胞生物学细胞库提供。

1.4 试验方法

1.4.1 酶解法制备虾蛄多肽粗提物。 取虾蛄并粉碎, 调节 pH, 在水浴保温条件下加入一定量的胰蛋白酶酶解, 酶解条件为: pH8.36, 加酶量 0.92%, 酶解温度 55 °C, 酶解 4 h 后将酶解液在 100 °C 水浴中灭活 15 min, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液浓缩, 备用。

1.4.2 MTT 法测定抗肿瘤活性^[4-5]。 将人前列腺癌细胞 DU-145、PC-3 和人肺癌细胞 A-549 分别接种到含有 10% 胎牛血清和双抗的 F12 营养液和 RPMI1640 营养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。分别取对数期生长的 PC-3、DU-145、A-549 细胞, 用胰酶消化, 制成悬液后接种于 96 孔板内, 5% CO₂、37 °C 培养 24 h, 贴壁生长至 80% 左右, 然后弃掉营养液, 加入供试虾蛄多肽样本, 每个组设置 3 个平行孔, 同时设置不加酶解物的对照组, 在 5% CO₂、37 °C 恒温箱中培养一定时间后, 每孔分别加入 20 μl MTT 和 180 μl PBS 温育 4 h, 弃去培养基, 加入 150 μl 的 DMSO, 在平板摇床上振荡 10 min, 在酶标仪 490 nm 处测定吸光度, 按照以下公式计算细胞增殖抑制率: 抑制率 = (1 - 药物组吸光度值/对照组吸光度值) × 100%

1.4.3 虾蛄酶解多肽的分离与纯化。 首先选用超滤法分离, 将酶解的粗提物分别用 10、5、3 kD 超滤膜超滤, 分别截留 5~10 kD、3~5 kD 以及小于 3 kD 等 3 个组分, 冷冻干燥

作者简介 李云涛 (1988 -), 女, 山东临沂人, 硕士, 从事海洋药物药理活性研究。* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事海洋生物活性成分的药效学研究。

收稿日期 2015-11-11

后分别配成 15 mg/ml 的浓度,采用 MTT 法测定各个组分对肿瘤细胞的抑制率。筛选出活性最高的一个组分,选用 Sephadex G-25 凝胶层析,装柱后用去离子水平衡,组分浓度为 100 mg/ml,每次上样 4 ml,洗脱速度为 3 ml/min,流动相为去离子水,于 280 nm 波长处进行紫外检测。收集洗脱峰,浓缩后冷冻干燥,采用 MTT 法检测对 PC-3 细胞、DU-145 细胞、A549 细胞的增殖抑制率,将活性最高的组分大量收集冷冻干燥进行高效液相色谱分离。高效液相条件为:Zorbax SB-C18(4.6×250,5 μm);柱温为 20℃;流动相为水和乙腈;梯度洗脱:0~40 min,乙腈浓度由 0% 变化到 70%;流速:0.8 ml/min;紫外检测波长分别为 220 和 280 nm。

1.4.4 多肽的氨基酸序列测定。目标多肽的氨基酸序列分析采用 N 末端氨基酸降解检测方法测定。

1.4.5 数据处理。所有试验数据均使用 SPSS18.0 统计软件进行单因素方差分析,结果均以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 虾蛄酶解多肽的膜分离 将浓缩的酶解液经 10、5、3 kD 的超滤膜粗分离后,得到 5~10 kD、3~5 kD 以及小于 3 kD 等 3 个组分,将各个组分冷冻干燥,配制成 15 mg/ml 的浓度,反应 24 h,各组分对 PC-3 细胞的抑制率分别为 25.82%、46.75% 和 67.80%,对 DU-145 细胞的增殖抑制率为 39.72%、45.02% 和 75.54%,其中组分 O3 对 PC-3 和 DU-145 细胞的抑制作用效果最好(图 1)。

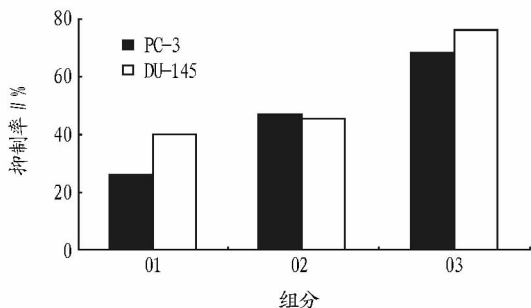


图 1 各组分对 PC-3 和 DU-145 细胞的增殖抑制率

2.2 虾蛄酶解多肽的凝胶层析分离 经过超滤后得到抗肿瘤活性较好的 O3 组分大量收集,冷冻干燥后选用 Sephadex G-25 凝胶层析洗脱,得到 3 个组分 OS1、OS2、OS3(图 2)。

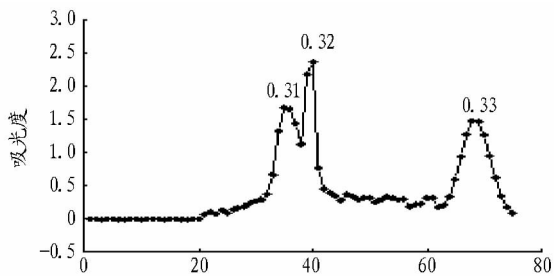


图 2 O3 组分葡聚糖凝胶 G-25 柱层析曲线

2.3 凝胶层析组分的抗肿瘤活性研究 将各组分分别配成 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 mg/ml 的浓度,采用 MTT 法检测其对 PC3、DU-145、A549 肿瘤细胞的增殖抑制率。培养 24 h

后由于试验中各组 4.0 mg/ml 对抗肿瘤细胞的抑制作用较小,所以选为对照组,使用独立样本 t 检验分析其他浓度组和该组有无显著差异。从图 3~5 可以看出,3 个组分 OS1、OS2、OS3 对 PC3、DU-145 和 A549 肿瘤细胞均有一定的抑制性,并且对 3 种肿瘤细胞的增殖抑制率均呈现出量效关系,其中 OS2 的抗肿瘤活性最高。对 DU-145 细胞的抑制率要强于 PC3 细胞和肺癌 A549 细胞。当 DU-145 浓度为 8.0 mg/ml 时,对 DU-145 的抑制率达到 83.68%,对 PC3 细胞的增殖抑制率为 70.84%,对肺癌 A549 细胞的增殖抑制率为 67.08%。

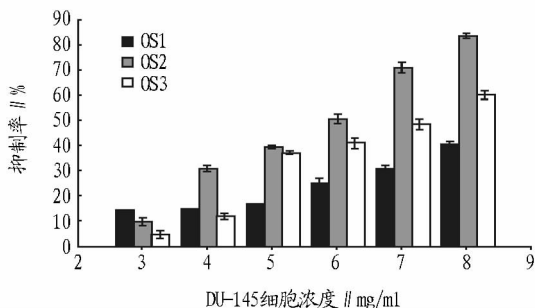


图 3 各组分对 DU-145 细胞增殖抑制率的影响

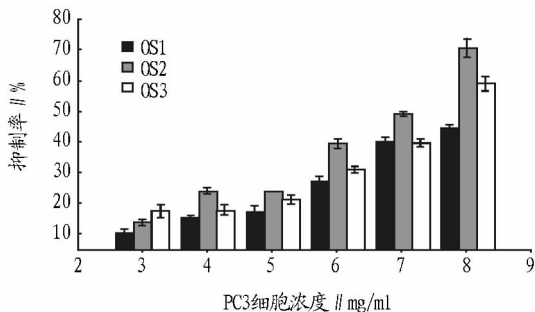


图 4 各组分对 PC3 细胞增殖抑制率的影响

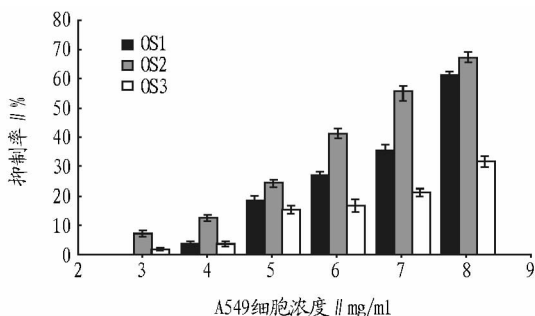


图 5 各组分对 A549 细胞增殖抑制率的影响

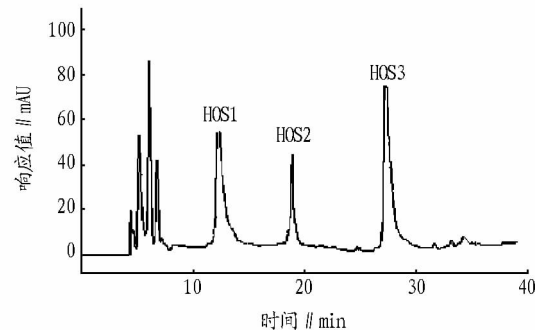


图 6 OS2 的 Zorbax C18 反相高效液相图谱

2.4 高效液相分离组分的抗肿瘤作用 将上述得到的 OS2 组分进一步经高效液相色谱分离得到 3 个峰组分,即 HOS1、HOS2 和 HOS3。从图 6 可以看出,当浓度为 0.4 mg/ml 时,培养 24 h 后,对 PC-3 细胞和 DU-145 细胞的增殖抑制率分别为 15.52%、17.96%、16.85% 和 18.54%、21.02%、20.58% (图 7)。

2.5 FHOS 的结构鉴定 从图 8 可以看出,组分 HOS2 对 2 种肿瘤细胞的增殖抑制作用略强于其他 2 个组分,将 HOS2 组分收集并用 BEH130 C₁₈ 色谱柱检测其纯度,在 9.81 min 出现单一峰,命名为 FHOS。经检测该肽的氨基酸序列为 Phe Tyr Met Asn His,其分子量为 711.80。

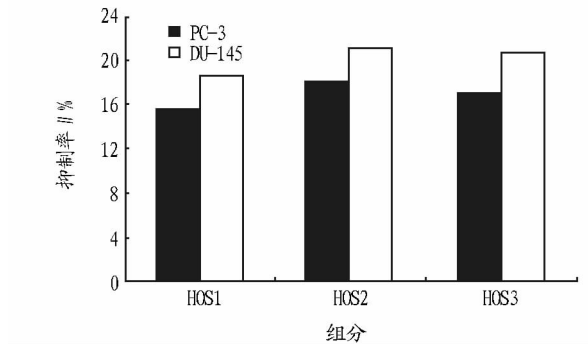
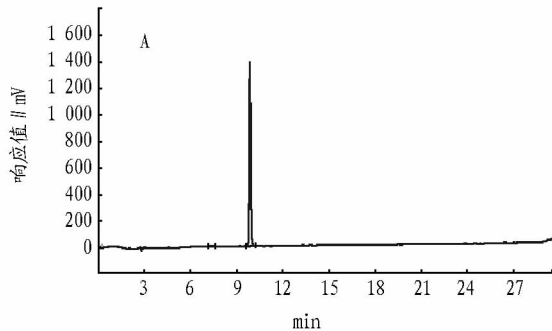


图 7 各组分对 PC-3 和 DU-145 细胞增殖抑制率的影响

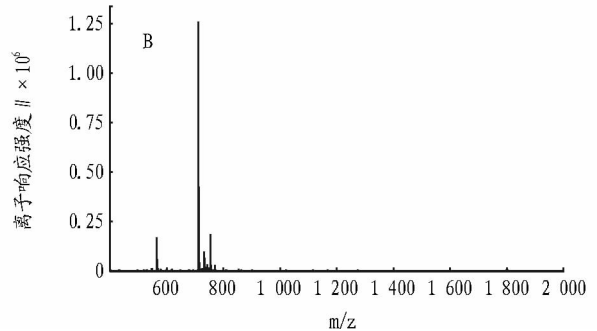


图 8 FHOS 的高效液相色谱图和质谱图

2.6 FHOS 对 PC-3 细胞和 A549 细胞的增殖抑制作用 FHOS 设置 5 个浓度组,分别为 3、6、9、12 和 15.0 mg/ml。分别作用 24、48、72 h 后,采用 MTT 法测定对 PC-3 细胞和 A549 细胞的增殖抑制率。从图 9~10 可以看出,作用 72 h 后 FHOS 对 A549 和 PC-3 细胞的增殖抑制率达到 70.1% 和 90.0%。

3 小结

笔者采用胰蛋白酶水解提取海洋生物虾蛄软体组织中的活性多肽,将酶解得到的粗提物进一步采用超滤、凝胶层析、高效液相色谱等技术进行分离纯化,凝胶层析得到 3 个组分 OS1、OS2 和 OS3,分别将 3 个组分对 PC-3 细胞、DU-145 细胞和肺癌 A549 细胞进行了抗肿瘤活性的研究,表明 3 个组分对肿瘤细胞均有很好的增殖抑制活性,并且呈现很好的剂量依赖性,对 DU-145 细胞的增殖抑制率最好。然后,再经过高效液相色谱分离,最终得到一个活性相对较高的虾蛄酶解多肽 HOS2。在浓度 0.4 mg/ml 时,对前列腺癌 DU-145 细胞的增殖抑制率为 21.02%。将 HOS2 通过高效液相检测为单一峰,经质谱分析和 N 末端氨基酸降解测序,该组分的氨基酸序列为 Phe Tyr Met Asn His,其分子量为 711.80,命名为 FHOS。采用 MTT 法测定 FHOS 对 PC-3 细胞和 A549 细胞的增殖抑制率,呈现很好的量效和时效关系。综上所述,FHOS 具有一定的抑制肿瘤细胞凋亡的活性,其体内的抗肿瘤作用及其作用机制还有待于深入研究。

参考文献

- [1] 顾涪水,黄培春,孔震,等. 口虾蛄提取物对人鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2005,14(14):1825-1826,1828.
- [2] 顾涪水,孔震,黄培春. 口虾蛄提取物对人鼻咽癌细胞基质金属蛋白酶-9 的抑制作用[J]. 现代中西医结合杂志,2004,13(21):2816-2818.
- [3] 龚钢明,顾慧,蔡宝国. 鱼类加工下脚料的资源化与利用途径[J]. 中国资源综合利用,2003(7):23-24.
- [4] WU B,ZHU J S,ZHANG Y, et al. Predictive value of MTT assay as an in vitro chemosensitivity testing for gastric cancer: One institution's experience[J]. World J Gastroenterol,2008,14(19):3064-3068.
- [5] BURTON J D. The MTT assay to evaluate chemosensitivity[J]. Method Mol Med,2005,110(1):69-78.

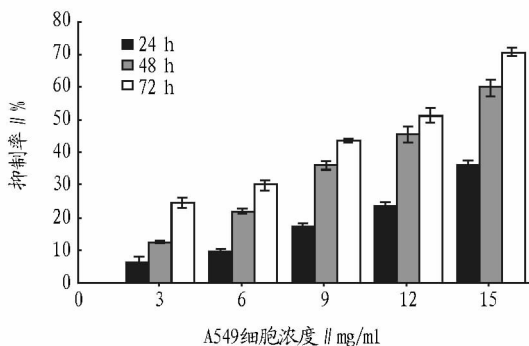


图 9 FHOS 对 A549 细胞增殖抑制率的影响

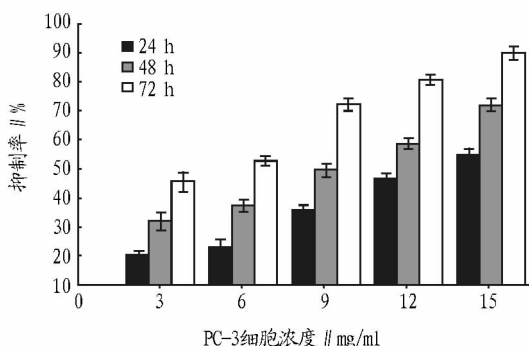


图 10 FHOS 对 PC-3 细胞增殖抑制率的影响