

缢蛏蛋白组分 Y₃ 的提取及抑癌活性研究

赵艳景 王 晨

(淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 连云港 222005)

摘 要 以新鲜缢蛏 *Sinonovacula constrzcta* 为材料, 经 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5, 含 0.14 mol/L NaCl) 缓冲液提取缢蛏粗蛋白、透析、DEAE 离子交换层析、Sephacrose CL-6B 凝胶层析, 得到 1 种具有抑癌生物活性的缢蛏蛋白组分 Y₃。SDS-PAGE 电泳测得该蛋白组分的分子量约为 64 kD。采用 MTT 比色法检测 Y₃ 对 4 种肿瘤细胞增殖的影响。结果显示, Y₃ 对 HeLa 和 BGC803 细胞有明显的抑制作用, 而对 SKOV3 和 HepG2 抑制作用不明显。此外, 探讨了 Y₃ 对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力。结果显示, 该蛋白组分清除自由基的能力很强, 在浓度为 100 μg/ml 时, Y₃ 对羟基自由基清除率达到 92.71%。在 3 μg/ml 下, 对超氧阴离子自由基的清除率达到 59.73%。

关键词 缢蛏 分离纯化 抗氧化活性 抑癌

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)06-0076-04

Preliminary studies on extraction and anticancer activity of a protein from *Sinonovacula constrzcta*

ZHAO Yan-jing WANG Chen

(Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

ABSTRACT A protein named as Y3 was purified from *Sinonovacula constrzcta* (Lamarck) by the method of buffer extraction (pH 7.5, 25 mmol/L Tris-HCl with 0.14 mol/L NaCl), DEAE ion-exchange chromatography and Sepharose CL-6B chromatography. The molecular weight was determined as 64kD by SDS-PAGE electrophoresis. This protein showed significant inhibitory effect on the growth of HeLa and BGC-823. This protein also showed strong scavenging activity on superoxide anion radical and hydroxyl free radical. The scavenging ratio of hydroxyl free radical was up to 92.71% at 100 μg/ml, and that of superoxide anion radical was 59.73% at 3 μg/ml.

KEY WORDS *Sinonovacula constrzcta* Separation and purification
Antioxidant activity Anticancer

随着双壳纲贝类的化学成分及其次级代谢产物研究的深入, 发现了多种具有生理活性的物质(杨若林等 2003; 刘晓丹等 2004; 肖湘等 2002), 有些具有药用开发价值。目前海洋双壳贝类的药用活性成分的研究

江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(BK2009641)、江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放基金项目(HS07014)和淮海工学院引进人才科研启动基金(KQ07018)共同资助

收稿日期: 2011-06-07; 接受日期: 2011-07-22

作者简介: 赵艳景(1976-), 女, 博士, 讲师, 主要从事海洋生物活性物质研究。E-mail: zhaoyanjing1976@163.com

就其化学成分而言主要是贝类毒素、多肽、多糖、糖蛋白、不饱和脂肪酸,它们的药理作用表现在抗肿瘤、消炎、抗病毒、提高人体免疫力等多方面,它们的抗肿瘤性能正在受到广泛的关注。

缢蛏 *Sinonovacula constrzcta* Lamarck, 俗名蛏子,江苏称其为海蛏,浙江称蛏,隶属软体动物门、双壳纲、异齿亚纲、帘蛤目、竹蛏科,广泛分布于中国、日本和朝鲜等国的沿海地区,在我国北自辽宁、山东,南至广东、福建都有分布,为海洋常见贝类。本研究对缢蛏活性蛋白组分进行分离纯化,并研究了其在体外的条件下,对几种肿瘤细胞增殖的影响和对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除效应,为将其开发成为新的抗肿瘤药物先导化合物提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

鲜活成体缢蛏购自连云港农贸市场(2011年3月5日购买),壳长 5.03~5.35 cm。

1.1.2 细胞株

本实验中采用的细胞株包括:人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 HepG2、人卵巢腺瘤细胞 SKOV3、胃癌细胞 BGC803 均由中国药科大学惠赠。

1.1.3 试剂

2-脱氧-D-核糖,美国 INALCO 公司;硫代巴比妥酸(TBA),国药集团化学试剂有限公司;Tris-Base,北京夏斯生物技术有限公司;丙烯酰胺、考马斯亮蓝 G-250、溴酚兰、考马斯亮蓝 R-250,加拿大 BBI 公司。RPMI-1640 培养基、新生小牛血清购自 GIBCO 公司,MTT、胰蛋白酶购自 BBI 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 缢蛏抑癌活性蛋白组分的分离纯化及分子量测定

将鲜活缢蛏去壳取肉匀浆破碎,经 50 mmol/L, pH 7.5 Tris-HCl(含 0.14 mol/L NaCl)缓冲液浸提、冻干浓缩、DEAE 纤维素离子交换层析、Sephacrose CL-6B 凝胶层析,收集具有抑癌活性的蛋白峰。应用 SDS-PAGE 电泳的方法检测蛋白组分的纯度及分子量。

1.2.2 缢蛏蛋白组分抑癌活性的测定

分别取处于指数生长期的人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 HepG2、人卵巢腺瘤细胞 SKOV3、胃癌细胞 BGC803,采用 MTT 法(汪琢等 2010;栾辉等 2010)测定缢蛏蛋白组分体外对这 4 种肿瘤细胞增殖活性的影响。

1.2.3 缢蛏蛋白组分对羟基自由基清除活性的测定

参照赵艳景等(2010)的方法,测定缢蛏蛋白组分对羟基自由基清除作用。在测活体系中加入不同浓度的缢蛏蛋白组分,测定清除率与效应物浓度的关系,分析缢蛏活性蛋白组分对羟基自由基清除作用的影响。

1.2.4 缢蛏蛋白组分对超氧阴离子清除能力的测定

采用邻苯三酚自氧化体系(赵艳景等 2010)测定缢蛏活性蛋白组分对超氧阴离子清除作用的影响。

2 结果

2.1 缢蛏抑癌活性蛋白组分的分离纯化

缢蛏经缓冲液浸提后,通过 DEAE 纤维素离子交换层析,得到不同蛋白质组分(图 1),收集具有抑癌活性较强的峰 3。峰 3 经 Sepharose CL-6B 凝胶层析纯化(图 2),收集具有抑癌活性较强的峰 3,简称 Y_3 。

将缢蛏粗提物及 Y_3 进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 3。以标准蛋白与目标蛋白的相对迁移率(m_R)为横坐标,各标准蛋白相对分子质量对数($\lg Mr$)为纵坐标作标准曲线,其回归方程为 $y = -1.1054x + 5.2616$, $R^2 =$

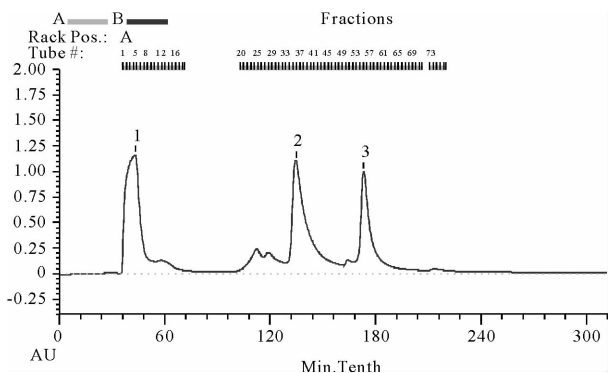


图1 DEAE 离子交换色谱图

Fig. 1 The analysis of DEAE-cellulose column chromatography

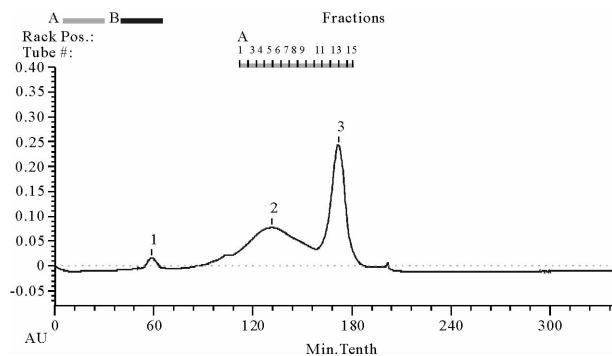


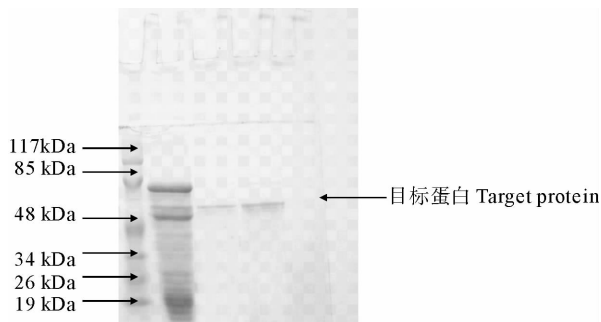
图2 Sepharose CL-6B 凝胶层析图谱

Fig. 2 The analysis of Sepharose CL-6B chromatography

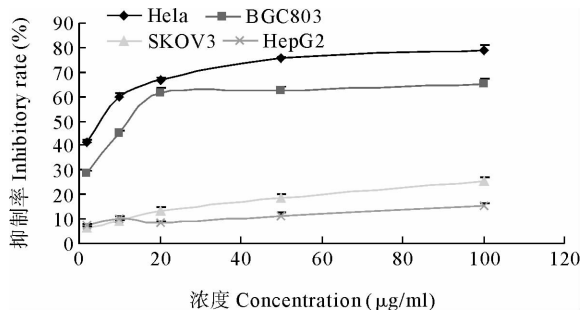
0.999 6。目标蛋白的 $m_R=0.414 6$ ，代入方程得 $\lg Mr=4.803 3$ ，则 Y_3 的分子量为 64 kD。

2.2 缢蛭蛋白组分 Y_3 对 4 种肿瘤细胞增殖的影响

MTT 检测结果表明，缢蛭蛋白组分 Y_3 对 HeLa 和 BGC803 细胞有明显的抑制作用，随着 Y_3 浓度的增大，肿瘤抑制率也升高，呈明显的剂量依赖性，当浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 时，抑制率分别达到了 60.05% 和 45.08%，而对 SKOV3 和 HepG2 则抑制作用不明显(图 4)。

图3 缢蛭蛋白组分 Y_3 的 SDS-PAGE 电泳Fig. 3 The SDS-PAGE analysis of the Y_3

by Sepharose CL-6B

图4 缢蛭蛋白组分 Y_3 对 4 种肿瘤细胞增殖的影响Fig. 4 Inhibitory effects of Y_3 on the multiplication of different tumor cells

2.3 缢蛭蛋白组分对羟基自由基的清除效应

取 Sepharose CL-6B 凝胶层析纯化得到的分子量不同的蛋白组分峰 1、峰 2、 Y_3 ，按 1.2.3 所示方法加样，依次对应表 8 中 As_1 、 As_2 、 As_3 ；测各峰在 532nm 处的吸光度值，并按公式 $SA\% = (Ac - As) / (Ac - A_0) \times 100\%$ 计算 $SA\%$ 。结果见表 1。

由表 1 可见， Y_3 抗氧化活性最强，在浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$ 时，清除率达到 92.71%。

2.4 缢蛭蛋白组分对超氧阴离子自由基的清除效应

由图 5 可知，缢蛭蛋白组分 Y_3 对超氧阴离子自由基具有很强的清除能力。在质量浓度很低的情况下就已表现出良好的清除能力；在 $3 \mu\text{g/ml}$ 下，对超氧阴离子自由基的清除率为 59.73%，随质量浓度的增加， Y_3 清除超氧阴离子自由基的能力不断增加，并表现出较好的线性关系。

表1 羟基自由基清除能力的测定($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 The scavenging of hydroxyl free radical by Y₃ at different concentrations

管号 Tube number	A ₀	A _c	A _{s1}	A _{s2}	A _{Y₃}
OD _{532 nm}	0.320	1.047	0.453±0.011	0.391±0.018	0.373±0.009
SA%	/	/	52.16	64.36	92.71

3 讨论

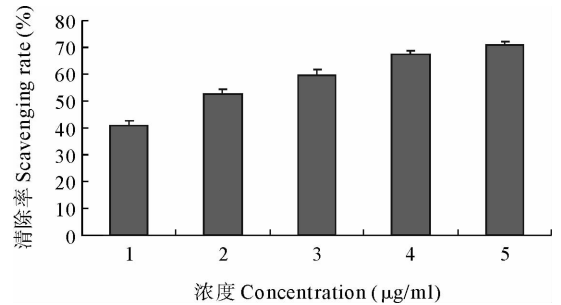
根据众多文献报道,自由基与肿瘤的发生与发展密切相关,自由基可以直接作用于DNA,造成染色体损伤和基因突变(刘立明等 2002;韩鹤龙等 2001;范晓岚等 2003)。此外,还造成蛋白质结构、功能改变,肽键发生断裂、聚合、交链以及脂质过氧化,从而造成肿瘤的发生(Prasad 2005;Benvenuti *et al.* 等 2004;Patel *et al.* 2006)。毛文君等(1999)研究表明,贻贝提取物可清除小鼠体内超氧阴离子,可以减少SOD与超氧阴离子大量接触,提高肝脏和血液中SOD和GSH-Px的活性,使移植性肿瘤生长受到抑制,小鼠的存活时间延长。

本研究以缢蛏为实验材料,经层析纯化得到一种具有抑癌生物活性的缢蛏蛋白组分Y₃。SDS-PAGE电泳测得该蛋白组分的分子量约为64kD。采用MTT比色法检测该蛋白组分对4种肿瘤细胞增殖的影响。结果表明,Y₃对Hela和BGC803细胞有明显的抑制作用,随着Y₃浓度的增大肿瘤抑制率也升高,呈明显的剂量依赖性,当浓度为10 μg/ml时,抑制率分别达到了60.05%和45.08%,而对SKOV3和HepG2则抑制作用不明显。但其抑癌作用是否具有特异性和选择性,即对正常组织是否有毒性,还需要进一步研究。

此外,探讨了该蛋白组分Y₃对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力。结果显示,该蛋白组分清除自由基的能力很强,在浓度为100 μg/ml时,Y₃对羟基自由基清除率达到92.71%。在3 μg/ml下,对超氧阴离子自由基的清除率达到59.73%。本实验结果预示缢蛏蛋白组分Y₃抑制癌细胞的生长有可能是通过对自由基的清除效应,来提高细胞内抗氧化水平,抑制癌细胞的生长。

参 考 文 献

- 毛文君,李 翊,李八方,毛文光. 1999. 贻贝提取物对荷瘤小鼠抗氧化功能的影响研究. 海洋科学, 15(6): 7~9
- 刘晓丹,邱 凌,吴 乔,陈清西. 2004. 文蛤抗癌活性多肽的生理活性研究. 厦门大学学报(自然科学版), 43(4): 432~435
- 刘立明,刘丽虹,宋功武,方光荣. 2002. 分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟自由基. 湖北大学学报, 24(4): 326~328
- 邱春江,姚兴存,赵培培,薛长湖. 2010. 酶解文蛤小分子肽分离纯化及生化特性. 食品研究与开发, 31(5): 4~6
- 汪 琢,姜守刚,祖元刚,付玉杰,张 宇. 2010. 刺五加中紫丁香苷的提取分离及抗肿瘤作用研究. 时珍国医国药, 21(3): 752~753
- 肖 湘,方明英,张尔贤,俞丽君. 2002. 缢蛏、织锦巴非蛤、二色裂江珧清除氧自由基作用研究. 中国海洋药物, 21(3): 5~7
- 范晓岚,杨 军,糜漫天,杨 慧. 2003. β-胡萝卜素的抗氧化作用与疾病预防. 中国公共卫生, 19(4): 479~480
- 赵艳景,胡 虹,王 颖. 2008. 3种蛏类水提液的抗氧化作用研究. 安徽农业科学, 36(31): 13 660~13 661, 13 667
- 赵艳景,胡 虹,王 颖. 2010. 缢蛏多糖的提取及抗氧化作用研究. 水产科学, 29(2): 91~94
- 栾 辉,牟海津,罗 兵,江晓路. 2010. κ-卡拉胶寡糖硫酸基含量与其抗疱疹病毒活性的关系. 渔业科学进展, 26(1): 110~116
- 韩鹤龙,何治柯,曾云鹏. 2001. 羟自由基的分析研究进展. 分析科学学报, 17(1): 83~ 87
- Benvenuti, S., Pellati, E., and Melegari, M. 2004. Polyphenols, Anthocyanins, ascorbic acid, and natural scavenging activity of rubus, ribes, and aronia. Journal of Food Science, 69(3): 164~169
- Prasad, K. 2005. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flaxlignan complex isolated from flaxseed. Atherosclerosis, 179(2): 69~75
- Patel, A., Mishra, S., and Ghosh, P. K. 2006. Antioxidant potential of C-phycoerythrin isolated from cyanobacterial species Lyngbya, Phormidium and Spirulina spp. Indian J. Biochem. Biophys. 43(1): 25~31

图5 Y₃对超氧阴离子的清除作用Fig. 5 The scavenging of superoxide anion radical by Y₃ at different concentrations