

荞麦rBTI-2的表达及其对肿瘤细胞的生长抑制作用

李玉英* 郭 慧 崔晓东 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 设计一种适合基因工程开发的无标签重组荞麦胰蛋白酶抑制剂rBTI-2, 并研究其对肿瘤细胞的生长抑制作用。构建原核表达载体pExSecI-BTI-2, 诱导表达获得可溶性目的蛋白, 经Resource™ Q纯化后作用于HL-7702、HepG2、EC9706和QBC-939细胞, MTT检测rBTI-2对其生长的影响, 并与前期获得的几种融合蛋白酶抑制剂进行功能比对。结果表明: 质粒pExSecI-BTI-2构建成功, SDS-PAGE分析表明分子量约为7.8 kDa。MTT检测表明rBTI-2对几种肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用, 而对正常细胞HL-7702作用很小。几种蛋白酶抑制剂对肿瘤细胞的生长均有不同程度的影响, 其中rBTI-2对肿瘤细胞的生长抑制作用要大于融合蛋白酶抑制剂rBTI, 这为深入研究BTI诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制及其应用开发提供了重要基础和研究依据。

关键词 胰蛋白酶抑制剂; MTT检测; 细胞增殖

蛋白酶抑制剂普遍存在于植物、动物及微生物体内, 在生命活动过程中起着重要的调控作用。现研发的蛋白酶抑制剂药物多数来源于人和动物, 如人尿胰蛋白酶抑制剂(UTI)、抑肽酶等^[1], 然而由于它们分子量大、结构复杂、分离提取难度大等特点, 在治疗作用方面存在诸多不足之处。相比之下植物来源的胰蛋白酶抑制剂分子量小、来源丰富、活性位点和作用机制类似, 对胰蛋白酶、血浆激肽释放酶、凝血酶、纤溶酶、凝血因子Xa和凝血因子XIIa等都具有较强的抑制作用, 并且在人体内的很多生理系统中起关键性的调控作用^[2]。研究发现生物体内的蛋白酶抑制剂还具有潜在的抗肿瘤作用^[3], 可能是一种新的抗肿瘤药物, 近年来备受关注。目前的研究主要集中在各种豆类、甘薯、南瓜以及荞麦等, 其中对大豆的研究较为深入, 研究表明低浓度的大豆Bowman-Birk型胰蛋白酶抑制剂(BBI)在动物体内对直肠癌、肝癌、口腔上皮癌和肺癌等多种癌症都有明显的抑制作用^[4], 而它的Kunitz型胰蛋白酶抑制剂(KTI)还能抑制直肠癌细胞的迁移^[5], 豇豆中的BBI能够使乳腺癌细胞的溶酶体膜的通透性发生改变, 进而诱导其凋亡^[6]。这些研究为开发新型抗肿瘤药物提供了新的方向。

荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)作为一种药食同源的植物, 目前在食品和医药方面有着广泛的应用。研究表明, 荞麦中的生物类黄酮和胰蛋白酶抑制剂有抑制癌细胞生长的作用。本实验室此前通

过基因克隆获得荞麦胰蛋白酶抑制剂基因序列, 构建了重组融合蛋白rBTI (N-端含有标签序列MRGSH-HHHHHTDP)^[7-8], 并通过定点突变将预测的活性位点氨基酸残基R₄₅进行替换, 获得具有弹性蛋白酶抑制剂活性的aBTI (R₄₅突变为A₄₅), 具有胰凝乳蛋白酶抑制剂活性的fBTI (R₄₅突变为F₄₅), 以及完全失去胰蛋白酶抑制剂活性的R,D-rBTI (R₄₅D₄₆突变为L₄₅V₄₆)。前期研究表明, rBTI对K562、HL-60等几种肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用并诱导其凋亡^[9-15]。为进一步探讨其诱导肿瘤细胞凋亡的机理及作用靶点, 本文选用没有6×His标签及其它序列的表达载体pEx-SecI^[16], 构建适合基因工程开发的无标签原核表达质粒pExSecI-BTI-2, 表达纯化后获得高纯度的rBTI-2, 作用于肿瘤细胞, 研究其对肿瘤细胞生长的影响, 并比较rBTI-2与rBTI、aBTI、fBTI和R,D-rBTI几种融合蛋白酶抑制剂对肿瘤细胞生长的影响, 为将其开发为新型抗肿瘤药物提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 pGEM-T-Easy Vector购自Promega公司产品; Taq DNA聚合酶购自Sangon公司产

收稿日期: 2010-12-14 接受日期: 2011-03-28

国家自然科学基金(No.30671084, No.30870525)和山西省自然科学基金(No.2007011077)资助项目

*通讯作者。Tel: 0351-7019371, E-mail: lyy9030@sxu.edu.cn

品; *Bam*H I、*Nde* I购自Ferments公司产品; LB培养基、B型小量质粒抽提纯化试剂盒购自博泰公司; 小量胶回收试剂盒购自博大公司; DMEM培养液购自美国HyClone公司; 胎牛血清为杭州四季青公司产品; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺盐酸盐(BApNA)购自Sigma公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自北京夏新生物公司; 胰蛋白酶抑制剂多克隆抗体为本实验室制备; 辣根过氧化物酶HRP标记的山羊抗大鼠IgG为Amersham公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 细胞株和菌株 人肝癌细胞HepG2和人正常肝细胞HL-7702分别由第四军医大学和中国辐射防护研究院惠赠; 食管癌细胞EC9706和胆管癌细胞QBC-939分别由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所和山西医科大学惠赠; QIA express pQE-31 vector、大肠杆菌菌株*E.coli* BL21(DE3)为本实验室保存, 表达载体pExSecI由德国明斯特大学Klaus Heckmann教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 pExSecI-BTI-2原核表达载体的构建 以质粒(pQE31-BTI)为模板扩增胰蛋白酶抑制剂的编码区域, 上游引物为: 5'-ATC ATA TGC TGC GTC AGT GCT CCG GT-3', 含有一个*Nde* I酶切位点, 下游引物为: 5'-ATG GAT CCT TAT CAC ATA ACA ACA GGA GTA TC-3', 含有一个*Bam*H I酶切位点。扩增条件为: 94 °C变性4 min, 94 °C 1 min, 60 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 30个循环, 最后72 °C延伸10 min。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, *BTI*基因大小约为250 bp。然后将*BTI*基因片段与pGEM-T Easy载体连接并转化到*E.coli* DH5 α 中。筛选重组质粒pGEM-T-BTI-2, 鉴定正确后, 将*BTI*基因和pExSecI原核表达载体连接, 构建pExSecI-BTI-2表达载体, 并将质粒转化入*E.coli* BL21(DE3)中。

1.2.2 rBTI-2蛋白的表达与纯化 含有质粒pExSecI-BTI-2的*E.coli* BL21(DE3)在0.1 mg/mL Kan的LB培养液中, 37 °C, 180 r/min恒温震荡培养, 当 D_{600} 达到0.5~0.6时, 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, 超声破碎后4 °C, 12 000 r/min离心30 min, 收集上清, 沉淀用4 mol/L尿素溶解, 同时以未诱导的菌作为空白对照, SDS-PAGE分析。

将收集的上清上样于Resource™ Q在AKTA™ Explore进行分离。平衡缓冲液为20 mmol/L, pH7.5的Tris-HCl, 洗脱液为20 mmol/L Tris-HCl, 内含0.5 mol/L NaCl, 控制流速2.0 mL/min, 进行梯度洗脱, 收集各洗脱峰, 进行电泳分析。

1.2.3 rBTI-2蛋白的Western blot鉴定 将纯化后的rBTI-2蛋白经SDS-PAGE电泳后, 用电转仪将蛋白转至NC膜上, 以大鼠抗BTI的抗血清作一抗, 用辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗大鼠IgG为二抗, 进行蛋白印记杂交, DAB显色, 拍照记录结果。

1.2.4 rBTI-2蛋白表达条件的优化 方法同实验1.2.2, 当 D_{600} 达到0.5~0.6时, 加入IPTG至终浓度0.5 mmol/L, 分别在诱导2.5 h、3.0 h、3.5 h、4 h和4.5 h时收集菌体, 超声破碎, 采用SDS-PAGE分析目的蛋白的表达量。另外, 加入不同浓度的IPTG, 终浓度分别为0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L、0.6 mmol/L和0.7 mmol/L, 诱导3.5 h后收集菌体, 超声破碎, 采用SDS-PAGE分析目的蛋白的表达量。

1.2.5 rBTI-2抑制活性的测定 参照Smith等^[17]的方法, 以BApNA为底物, 在4.4 mL的测活体系(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含10 mmol/L CaCl₂)中加入20 μ L胰蛋白酶(1 mg/mL)和30 μ L rBTI-2, 37 °C保温10 min, 迅速加入底BApNA(150 mmol/L, 溶剂为二甲基亚砜), 继续保温10 min, 加入0.5 mL 33%乙酸终止反应, 利用紫外分光光度计在410 nm波长下测定吸收值。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。抑制活性定义为每分钟内使每毫升反应液的 D_{410} 降低0.01为一个抑制活力单位(U)。抑制比活力(U/mg)为每毫克蛋白所具有的抑制活力。

1.2.6 细胞培养 人正常肝细胞HL-7702、人肝癌细胞HepG2、人食管癌细胞EC9706和人胆管癌细胞QBC-939分别在含有体积分数为10%胎牛血清, 8 U/mL庆大霉素的DMEM完全培养基, 37 °C, 5% CO₂孵育箱中培养, 细胞呈贴壁生长, 2~3天传代一次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.7 倒置显微镜观察细胞生长的变化 人肝癌细胞HepG2在6孔板中过夜生长, 加入终浓度为10 μ mol/L的rBTI-2和PBS处理48 h, 置于倒置相差显微镜下(100 $\times$)观察细胞的形态学变化。

1.2.8 rBTI-2抑制肿瘤细胞生长的MTT检测 取对数生长期的HL-7702、HepG2、EC9706和QBC-939细胞, 胰酶消化后, 细胞计数板计数, 按每孔100 μ L

接种于96孔板中, 每孔细胞数量控制在5 000~10 000个之间, 37 °C, 5% CO₂过夜培养, 加入不同浓度的rBTI-2纯品, 在最大作用浓度时, 以相同浓度的牛血清白蛋白BSA作为对照, 作用48 h后每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL), 继续培养4 h, 弃上清每孔加入150 μL DMSO, 振荡10 min, 待完全溶解后, 与酶标免疫测定仪(BIO-RAD MODEL 550)测定490 nm处的吸光度值。

细胞存活率=处理组 D 值/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

1.2.9 几种蛋白酶抑制剂抑制HepG2细胞生长的MTT检测 方法同1.2.8。供试样品浓度为5 μmol/L的重组荞麦胰蛋白酶抑制剂rBTI、具有胰凝乳蛋白酶抑制剂活性的fBTI、具有弹性蛋白酶抑制剂活性的aBTI、无胰蛋白酶抑制剂活性的R,D-rBTI以及无标签的胰蛋白酶抑制剂rBTI-2。

细胞生长的抑制率=(1-处理组 D 值/对照组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.2.10 统计学处理 所有数据用3次独立实验的平均值表示, 数据用均值加减标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。组内采用方差分析, 组间采用 t 检验。

2 结果

2.1 pExSecI-BTI-2原核表达质粒的构建

以C1、C2为引物, 以质粒(pQE31-BTI)为模板, 进行PCR扩增, 得到大小为250 bp左右的目地基因BTI(图1A)。将BTI连到pExSecI中, 构建重组质粒pExSecI-BTI-2, 通过BamH I和Nde I双酶切及PCR鉴

定(图1B), 测序结果显示BTI基因已正确连入pEx-SecI载体中。

2.2 rBTI-2蛋白的表达与纯化

按照实验1.2.2方法, 构建重组表达质粒pExSecI-BTI-2, 转化入*E.coli* BL21(DE3)菌株中进行表达。表达产物经Resource™ Q纯化后, 15% SDS-PAGE分析, 同时用未诱导空质粒表达作阴性对照, 结果如图2A显示, 表达的重组蛋白以可溶的形式存在, rBTI-2纯度达95%以上, 分子量约为7.8 kDa。

2.3 rBTI-2蛋白的Western blot鉴定

按照实验1.2.3方法, 对纯化的rBTI-2蛋白进行Western blot鉴定, 结果见图2B, 表明rBTI-2蛋白确实为胰蛋白酶抑制剂。

2.4 rBTI-2蛋白表达条件的优化

按照实验1.2.4对rBTI-2蛋白表达进行优化, 表达产物经15% SDS-PAGE分析, 结果如图3显示, 当诱导剂IPTG浓度相同时, 诱导3.5 h时, 蛋白表达量最大, 同时在诱导时间相同的情况下, IPTG终浓度至0.5 mmol/L蛋白表达量最大, 所以rBTI-2蛋白最佳表达条件是: IPTG终浓度为0.5 mmol/L, 诱导时间为3.5 h。

2.5 rBTI-2抑制胰蛋白酶活性的测定

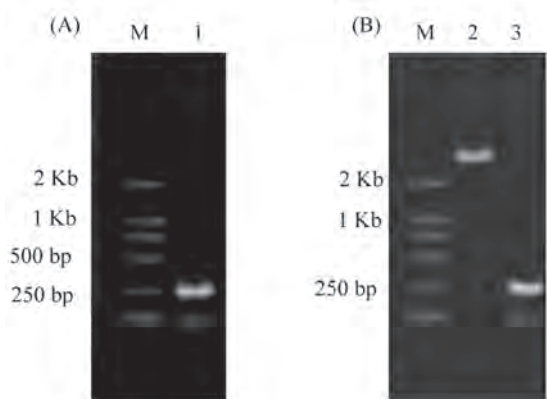
以BAPNA为底物测定rBTI-2的抑制胰蛋白酶活性, 结果显示, rBTI-2具有抑制胰蛋白酶活性, 其抑制活性为67 U/mg rBTI-2蛋白, 此结果与我们之前报道的重组融合荞麦胰蛋白酶抑制剂rBTI的抑制活性相近, 由此可见, rBTI-2蛋白能够明显地抑制胰蛋白酶的活性, 是一种胰蛋白酶抑制剂。

2.6 倒置显微镜观察细胞生长状态

在倒置显微镜下观察细胞形态, 对照组(图4A)细胞呈贴壁状态, 单层生长, 为不规则多边形, 核大且圆, 核仁明显, 经10 μmol/L的rBTI-2处理48 h后(图4B), 可见部分细胞皱缩变圆, 细胞间间隙变大, 部分细胞脱落。

2.7 rBTI-2对肿瘤细胞生长的MTT检测

利用MTT比色法检测rBTI-2对几种肿瘤细胞和人正常肝细胞HL-7702生长的影响, 结果(图5-图7)表明, rBTI-2对HepG2、EC9706和QBC-939细胞的增殖抑制效率具有剂量依赖性。在1.25~10 μmol/L的浓度范围内, rBTI-2能够显著抑制几种肿瘤细胞的生长, 随着药物浓度的增加, 抑制作用逐渐增强, 而对正常肝细胞HL-7702的增殖影响很小。当用

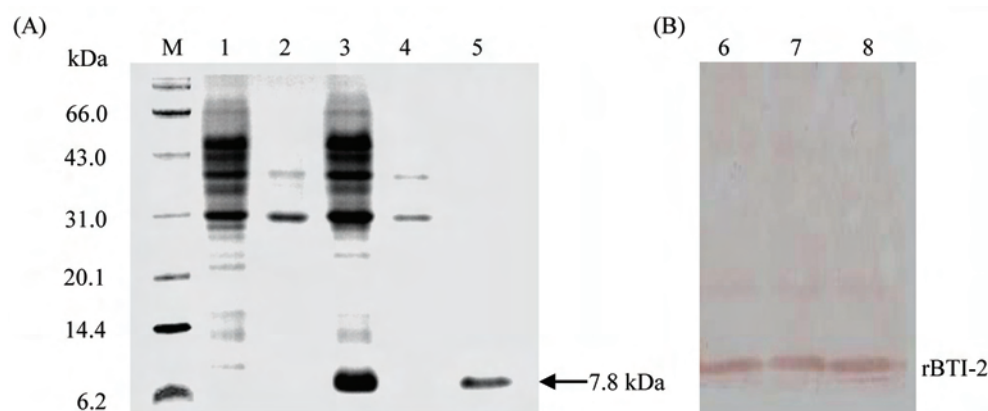


M: DL2 000 DNA Marker; 1: BTI 基因; 2: BamH I和Nde I双酶切pEx-SecI-BTI-2; 3: BTI的PCR产物。

M: DL2 000 DNA Marker; lane 1: BTI gene; lane 2: pExSecI-BTI-2 digested by BamH I and Nde I; lane 3: PCR products of BTI.

图1 PCR产物和重组质粒pExSecI-BTI-2的琼脂糖凝胶电泳分析

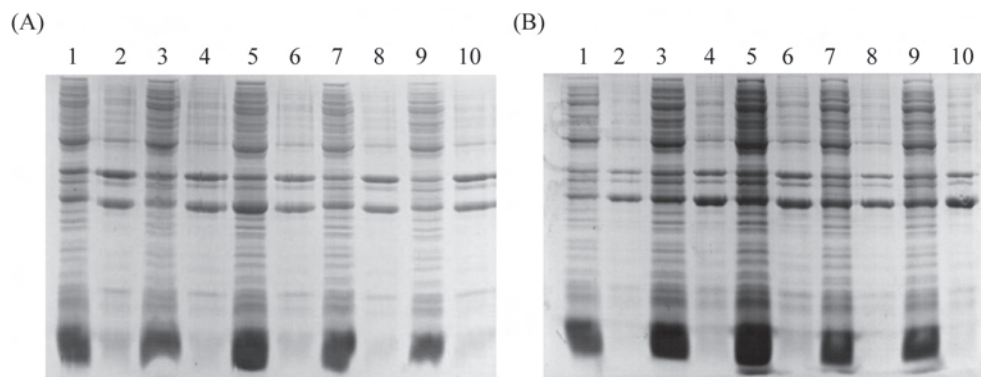
Fig.1 Analysis of the PCR products and the recombinant plasmid pExSecI-BTI-2 by agarose gel



M: 低分子质量标准蛋白; 1,2: 未诱导pExSecI-BTI-2上清与沉淀; 3,4: 诱导的pExSecI-BTI-2上清与沉淀; 5: 纯化的rBTI-2; 6-8: rBTI-2的Western blot分析。

M: protein molecular weight marker; lane 1 and 2: supernatant and sediment of pExSecI-BTI-2 none induced; lane 3 and 4: supernatant of and sediment pExSecI-BTI-2 induced; lane 5: purified rBTI-2; lane 6-8: Western blot analysis of rBTI-2.

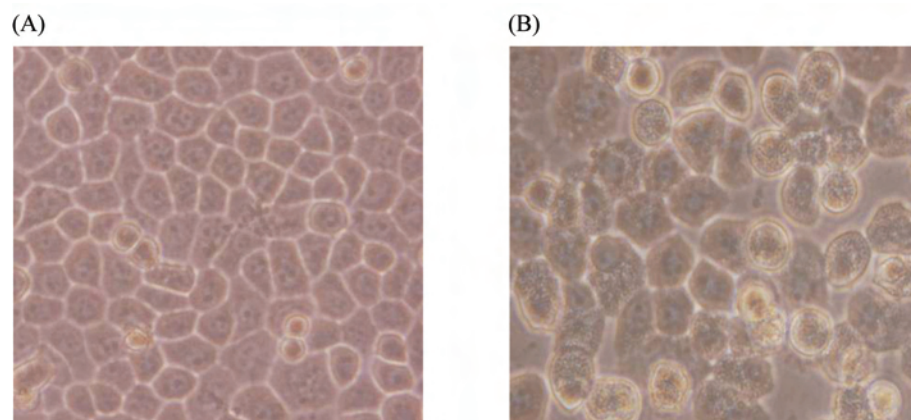
图2 rBTI-2的电泳分析(15% SDS-PAGE)和Western blot分析
Fig.2 Electrophoretic (15% SDS-PAGE) and Western blot analysis of rBTI-2



A: 1-10: 诱导pExSecI-BTI-2 2.5 h、3 h、3.5 h、4 h和4.5 h的上清与沉淀; B: 1-10: 诱导剂浓度分别为 0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L、0.6 mmol/L和0.7 mmol/L时, 诱导pExSecI-BTI-2的上清与沉淀。

A: lane 1-10: supernatant and sediment of pExSecI-BTI-2 to induce 2.5 h, 3 h, 3.5 h, 4 h and 4.5 h, respectively; B: lane 1-10: supernatant and sediment of pExSecI-BTI-2 in 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 mmol/L inducer, respectively.

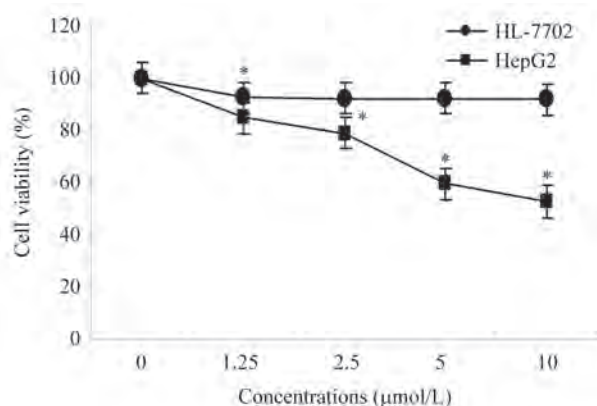
图3 不同诱导时间和不同诱导剂浓度的SDS-PAGE电泳分析
Fig.3 SDS-PAGE electrophoretic analysis of different induction time and inducer concentrations



HepG2细胞分别用PBS(A)和10 μmol/L的rBTI-2(B)作用48 h。

HepG2 cells in control group induced with PBS(A) or in treated group induced with 10 μmol/L rBTI-2(B) for 48 h.

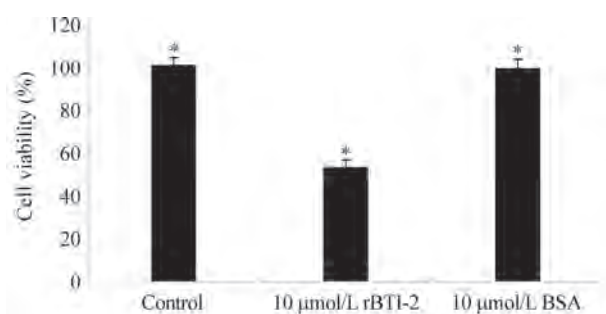
图4 rBTI-2作用于HepG2细胞倒置显微镜的观察(100×)
Fig.4 Inverted phase contrast micrographs of HepG2 treated with rBTI-2 (100×)



不同浓度的rBTI-2作用细胞48 h, 酶标免疫测定仪(Bio-Rad model 550)测定490 nm处吸光度值, rBTI-2以剂量依赖的方式抑制HepG2细胞的生长, $*P<0.05$ 。

Cells were incubated with various concentrations of rBTI-2 for 48 h. The color intensity was measured using a microtiter plate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm, rBTI-2 inhibited the survival of HepG2 cells in a dose-dependent manner, $*P<0.05$.

图5 rBTI-2对HepG2和HL-7702细胞生长的作用
Fig.5 Effects of rBTI-2 treatment on the growth of HepG2 and HL-7702 cells

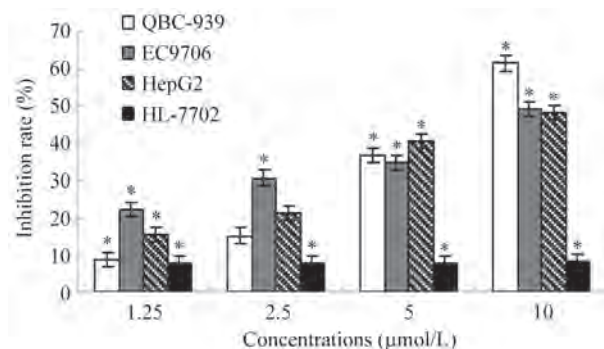


细胞经10 μmol/L rBTI-2和BSA作用48 h。酶标免疫测定仪(Bio-Rad model 550)测定490 nm处吸光度值, rBTI-2能明显抑制HepG2细胞的生长, 而BSA对HepG2的增值没有抑制作用, $*P<0.05$ 。

Cells were incubated with 10 μmol/L rBTI-2 and BSA for 48 h. The color intensity was measured using a microtiter plate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm, rBTI-2 specifically inhibited the survival of HepG2 cells, while the BSA hardly had any inhibition on proliferation of HepG2, $*P<0.05$.

图6 rBTI-2和BSA对HepG2细胞生长的作用
Fig.6 Effects of rBTI-2 and BSA treatment on the growth of HepG2 cells

10 μmol/L rBTI-2作用细胞48 h后, 对HL-7702细胞的增殖抑制率仅为(8.2±0.62)%, 而对HepG2、EC9706和QBC-939细胞增殖抑制率分别为(48.4±2.11)%、(49.2±1.42)%和(61.6±1.84)%, 可见, 在相同作用浓度和时间下, rBTI-2对QBC-939肿瘤细胞的生长抑制效果较强。同时, 用牛血清白蛋白作为对照, 可以看出, rBTI-2对HepG2细胞的生长确实有明显抑制作用,



不同浓度的rBTI-2作用不同细胞48 h。酶标免疫测定仪(Bio-Rad model 550)测定490 nm处吸光度值, rBTI-2能明显抑制QBC-939、EC9706和HepG2细胞的生长, 而对人正常肝细胞HL-7702的毒副作用较小, $*P<0.05$ 。

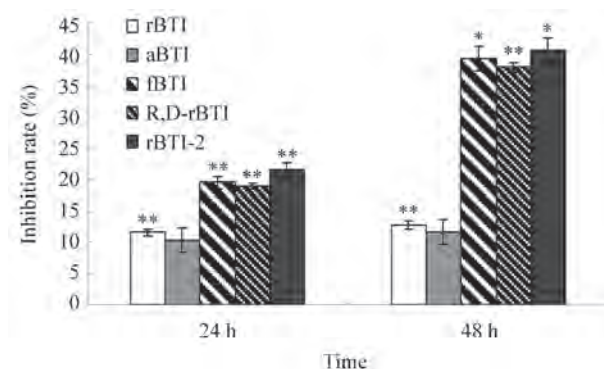
Different cells were incubated with various concentrations of rBTI-2 for 48 h. The color intensity was measured using a microtiter plate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm, rBTI-2 specifically inhibited the survival of QBC-939, EC9706 and HepG2 cells, while it has showed less toxicity against HL-7702 cell, $*P<0.05$.

图7 rBTI-2对QBC-939、EC9706、HepG2和HL-7702生长的作用
Fig.7 Effects of rBTI-2 treatment on the growth of QBC-939, EC9706, HepG2 and HL-7702

作用48 h后, 抑制率约为50%。

2.8 几种不同蛋白酶抑制剂对HepG2细胞生长的MTT检测

图8为几种不同的蛋白酶抑制剂对HepG2细胞生长的作用, 样品浓度为5 μmol/L, 作用时间分别为



5 μmol/L的rBTI、aBTI、fBTI、R,D-BTI和rBTI-2作用HepG2细胞24 h和48 h, 酶标免疫测定仪(Bio-Rad model 550)测定490 nm处吸光度值, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

HepG2 cells were incubated with rBTI, aBTI, fBTI, R,D-BTI and rBTI-2 for 24 h and 48 h. Concentration of inhibitors is 5 μmol/L. The color intensity was measured using a microtiter plate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm, $*P<0.05$, $**P<0.01$.

图8 不同蛋白酶抑制剂对HepG2细胞生长的作用
Fig.8 Effects of different protease inhibitors on treatment on the growth of HepG2 cells

24 h和48 h。结果显示, rBTI-2、rBTI、aBTI、fBTI和R,D-rBTI几种蛋白酶抑制剂对HepG2的增殖都有不同程度的影响, 作用48 h后的抑制率明显高于作用24 h, 呈现一定的时间依赖效应。其中作用24 h后, fBTI、R,D-rBTI和rBTI-2抑制率要高于rBTI和aBTI, 48 h后的作用效果一致, 并且rBTI-2的抑制率要高于重组胰蛋白酶抑制剂rBTI, 可见在相同的摩尔浓度下, 同为胰蛋白酶抑制剂的rBTI-2的作用较为明显。

3 讨论

胰蛋白酶抑制剂在人体内的很多生理系统中起关键性的调控作用, 是维持体内环境稳定的重要因素近年来, 作为潜在的新型抗癌药物, 受到越来越多研究者的青睐。Kennedy等^[18-19]研究证实低浓度的Bowman-Birk型抑制剂在动物体内对直肠癌、肝癌、口腔上皮癌和肺癌等多种癌症都有明显的抑制作用。大豆KTI能极大的减少肿瘤负担, 减少卵巢癌腹膜弥散型转移模型中腹水的形成^[20-21]。我们前期获得的带6个His标签的重组融合荞麦胰蛋白酶抑制剂rBTI, 体外研究发现, 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)等肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡, 对正常细胞无副作用^[12-15]。为此, 本研究选用表达载体pExSecI, 它的基因型是: kan^r, MCS, T7启动子, M13复制区, 含有BamH I、Nde I酶切位点, 无任何标签序列, 构建了适合基因工程开发的无标签重组表达质粒pExSecI-BTI-2, 并在 *E.coli* BL21(DE3)中稳定表达, 表达产物以可溶形式存在。纯化后得到高纯度的rBTI-2, 这为它的大规模生产提供了理论和实践基础。

在抑制肿瘤细胞生长实验中, 我们证实了rBTI-2对HepG2、EC9706和QBC-939细胞的生长有明显的抑制作用, 并且呈现剂量依赖关系, 但对正常肝细胞HL-7702影响很小, 10 $\mu\text{mol/L}$ rBTI-2作用48 h后, 对这几种肿瘤细胞的抑制率分别为(48.4 $\pm$ 2.11)%、(49.2 $\pm$ 1.42)%和(61.6 $\pm$ 1.84)%, 表明rBTI-2具有广谱的抗肿瘤效果, 并且对QBC-939细胞作用较强。另外, rBTI-2作用HepG2细胞48 h后, 倒置相差显微镜可以观察到细胞的形态发生了明显的变化, 细胞皱缩、变圆, 部分细胞脱落。这些事件中, rBTI-2可能直接或间接参与修改细胞周期调节蛋白的表达, 或者直接对表达产物进行修改, 从而导致细胞生长抑制。它是如

何进入细胞, 直接的作用靶点是什么, 这些还需要从分子机理上进行深入的研究。

实验还发现, 与先前获得的几种蛋白酶抑制剂相比, 无标签的rBTI-2确实具有抑制肿瘤细胞生长的作用, 并且作用效果比rBTI要强。相同摩尔浓度时, 由于rBTI-2不含融合蛋白, 作用时或许更容易和相应的受体结合, 发挥其作用, 所以rBTI-2抑制率也相应较大。几种蛋白酶抑制剂都能抑制肿瘤细胞的生长, 说明它们的抗肿瘤作用与其活性位点可能没有关系, 也可能是它们的作用受体不同, 导致对肿瘤细胞生长的影响不同, 或许与它们的某些片段有关系, 或许是几个关键氨基酸发挥着重要作用, 这需要在结构和功能上进一步去证实。

总之, 本研究表明rBTI-2可以作为一种潜在的抗肿瘤药物, 用于多种癌症的预防和治疗, 这为新型抗肿瘤药物的开发提供了新的方向。

参考文献(References)

- 1 杜惠芬, 李克生, 郭红云, 李雪萍. 胰蛋白酶抑制剂体外抑制肿瘤细胞降解细胞外基质的研究. 中国预防医学杂志 2004; 5(2): 138-9.
- 2 Otlewski J, Jaskólski M, Buczek O, Cierpicki T, Czapińska H, Krowarsch D, *et al.* Structure-function relationship of serine protease-protein inhibitor interaction. Acta Biochim Pol 2001; 48(2): 419-28.
- 3 Foehr MW, Tomei LD, Goddard JG, Pemberton PA, Bathurst IC. Antiapoptotic activity of the Bowman-Birk inhibitor can be attributed to copurified phospholipids. Nutr Cancer 1999; 34(2): 199-205.
- 4 Inoue K, Takano H, Yanagisawa R. Protective role of urinary trypsin inhibitor in acute lung injury induced by lipopoly saccharide. Exp Biol Med (Maywood) 2005; 230(4): 281-7.
- 5 Hiroshi K, Mika S, Yoshiko T, Naohiro K, Toshihiko T. A Kunitz-type protease inhibitor bikunin inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium-dependent transforming growth factor- β 1 signaling cascade. J Biol Chem 2003; 278(10): 7790-9.
- 6 Joanitti JA, Azevedo RB, Freitas SM. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. Cancer Letters 2010; 293(1): 73-81.
- 7 Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. Protease inhibitors of the sulfonamide type: Anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. Med Res Rev 2003; 23(5): 535-8.
- 8 Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. Cancer Res 1983; 43(5 suppl): 2454s-9s.
- 9 Guan-Jhong H, Ming-Jyh S, Hsine-Jung C, Yuan-Shiun C, Yaw-

- Huei L. Growth inhibition and induction of apoptosis in NB4 promyelocytic leukemia cells by trypsin inhibitor from sweet potato storage roots. *J Agric Food Chem* 2007; 55(7): 2548-53.
- 10 Li YY, Zhang Z, Wang ZH, Wang HW, Zhang L, Zhu L. rBTI induces apoptosis in human solid tumor cell lines by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation. *Toxicol Lett* 2009; 189(2): 166-70.
- 11 Wang ZH, Zhao ZH, Zhang Z, Yuan JM, Noback D, Wieslander G, *et al.* Purification and characterization of a protease inhibitor from fagopyrum artaricum gaertn seeds and its effectiveness against insects. *Chin J Biochem Mol Biol* 2006; 22(12): 960-5.
- 12 Li YY, Zheng Z, Liang AH, Wang ZH. Cloning and characterization of a novel trypsin inhibitor (BTIw1) gene from *Fagopyrum esculentum*. *DNA Sequence* 2006; 17(3): 203-7.
- 13 Zhang Z, Li YY, Li C, Yuan JM, Wang WH. 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): 701-7.
- 14 高 丽, 李玉英, 张 政, 王转花, 王宏伟, 张 丽, 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.
- 15 白崇智, 李玉英, 李 芳, 张 政, 王转花. 重组荞麦胰蛋白酶抑制剂诱导肝癌细胞H22凋亡的作用及其机制. *细胞生物学杂志* 2009; 31(1): 79-83.
- 16 刘晓辉, 梁述文, 王 伟, 申 泉, 郭 焱. 截短型人胰岛素样生长因子-I在大肠杆菌中的表达、纯化和鉴定. *中国生物化学与分子生物学报* 1999; 15(5): 738-41.
- 17 Smith C, Van Megen W, Twaalfhoven L, Hitchcock C. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuff. *Sci Food Agric* 1980; 31(4): 341-50.
- 18 Kennedy AR, Barclay BY, Kinzler KW, Newberne PM. Suppression of carcinogenesis in the intestines of min mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. *Cancer research* 1996; 56(4): 679-82.
- 19 Kennedy AR, Billings PC, Wan XS, Newberne PM. Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer* 2002; 3(2): 174-86.
- 20 Kobayashi H, Yagyu T, Inagaki K, Kondo T, Inagaki K. Therapeutic efficacy of once-daily oral administration of a Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, in a mouse model and in human cancer. *Cancer* 2004; 100(4): 869-77.
- 21 Kobayashi H, Fukuda Y, Yoshida R, Kanada Y, Nishiyama S, Mika Suzuki, *et al.* Suppressing effects of dietary supplementation of soybean trypsin inhibitor on spontaneous, experimental and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *Int J Cancer* 2004; 112(3): 519-24.

Expression of rBTI-2 of Buckwheat and Its Inhibit Proliferation Activity on Tumor Cells

Li Yuying*, Guo Hui, Cui Xiaodong, Wang Zhuanhua

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

Abstract To design a recombinant buckwheat trypsin inhibitor(rBTI-2) without label that suitable for developing genetic engineering and examine the effects of its inhibit proliferation activity on tumor cells, the pExSecI-BTI-2 was constructed. Soluble protein could acquired through inducing by IPTG. After purified through Resource™ Q column, the possible effects of rBTI-2 on the proliferation of HL-7702, HepG2, EC9706 and QBC-939 cell lines were investigated by MTT assays and compared the effect of several protease inhibitors on tumor cells. The results indicated that pExSecI-BTI-2 had been constructed. After purified and analyzed by SDS-PAGE, the approximate molecular weight was 7.8 kDa. MTT assays indicated that rBTI-2 could specifically inhibit the growth of HepG2, EC9706 and QBC-939, while it had showed less toxicity against HL-7702 cells. Several protease inhibitors could inhibit the proliferation of tumor cells on different level. Comparing with fusion protease inhibitors (rBTI), the inhibit proliferation activity on tumor cells of rBTI-2 was slightly strong. It provides important foundation and evidence for the molecule mechanism of apoptosis and application of rBTI-2.

Key words protease inhibitor; cell proliferation; MTT assay

Received: December 14, 2010 Accepted: March 28, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671084, No.30870525) and the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No.2007011077)

*Corresponding author. Tel: 86-351-7019371, E-mail: lyy9030@sxu.edu.cn