

重组荞麦蛋白酶抑制剂 aBTI 的表达及其对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

田欣 李玉英 王转花*

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

摘要 为了深入研究不同类型荞麦蛋白酶抑制剂在抑制肿瘤细胞生长及诱导其发生凋亡方面的作用, 本实验在先前得到的重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(rBTI)的基础上, 运用定点突变技术将rBTI的活性位点进行替换, 构建一种新型蛋白酶抑制剂 aBTI。通过在大肠杆菌 M15 [pREP4] 中表达, 获得以可溶形式存在的 aBTI 目的蛋白。经 Ni²⁺-NTA 亲和层析及 superdex 75 分子筛层析纯化, 目的蛋白的纯度达到 95% 以上。抑制活性测定表明, aBTI 具有专一性的弹性蛋白酶抑制活性, 抑制常数 K_i 为 $3.34 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。MTT 比色法检测及细胞核形态学观察显示, aBTI 在体外能够显著抑制 HepG2 肿瘤细胞的增殖 ($IC_{50}: 1.88 \mu\text{mol/L}$), 并诱导其凋亡, 具有较好的抗肿瘤效应。

关键词 荞麦; 蛋白酶抑制剂; 定点突变; 表达; 抗肿瘤

近年来, 各种恶性肿瘤和血液病的发病率逐年增高, 由于不同类型的肿瘤在其发生、发展过程中的机制不尽相同, 所以能够有效预防和治疗的药物极其有限。有研究表明^[1], 体内多种蛋白酶在肿瘤细胞增殖中起关键性作用, 而蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PI)可通过不同的途径与相应的蛋白酶或受体结合起到抑制肿瘤细胞生长和扩散的作用。植物蛋白酶抑制剂是普遍存在于植物体内的一类低分子量的多肽或蛋白质^[2]。在高等植物中, 许多基因家族的 PI 已经得到分离和鉴定, 它们在保护生物体不受侵害的同时, 还参与生物体内蛋白酶活性调节、信号受体的相互作用以及逆境情况下的应答等生理活动^[3]。植物中 PI 含量丰富, 种类繁多, 并且具有多种生物学功能, 使得不同植物来源的 PI 的结构及其在体内外的生物学活性受到相关研究者的关注。体外研究发现, 来自大豆和其他豆类中的 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂能够诱导结肠癌细胞的凋亡, 该抑制剂已经获得美国食品及药物管理局(FDA)的新药研究许可, 并被评定为一种非常适合人群使用的抗癌制剂^[4]。

荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)属蓼科, 荞麦属, 一年生草本植物。荞麦具有很高的营养和药用价值, 富含诸如芦丁、微量元素等多种生物活性物质, 是中国传统的药食同源植物, 由于其化学和生物学成份独特, 目前在食品和医药方面有着广泛的应用。Belozersky^[5]和 Dunaevsky 等^[6]先后报道了一种来自荞麦种子中的蛋白酶抑制剂 BWI-1 并对其理化性质进行了较深入的研究。但对这种分子量较小

(约 8.0 kDa)的蛋白酶抑制剂的功能研究较少。我们先前的研究采用基因重组技术, 获得了一种重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(recombinant buckwheat trypsin inhibitor, rBTI)^[7], 抗肿瘤实验显示, rBTI 在体外能够抑制 HeLa、H₂₂ 和 EC9706 等肿瘤细胞的增殖, 并诱导肿瘤细胞凋亡^[8,9]。

rBTI 全长由 79 个氨基酸残基组成, 包含一对二硫键, 我们通过同源性比对预测 rBTI 的活性位点位于第 45 位的 Arg 残基。根据氨基酸的极性性质差异, 本研究利用定点突变技术将 rBTI 活性中心的 Arg 残基替换为 Ala, 经过原核表达系统获得突变型抑制剂 R45A-aBTI, 并对 aBTI 进行了理化性质分析。通过 MTT 比色法检测和细胞核形态学观察, 初步确定突变体 aBTI 具有和野生型 rBTI 相同的抑制肿瘤细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡的作用。这为探讨同一家族蛋白酶与相应抑制剂的生物学活性及其实际应用提供了新内容。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人肝癌细胞 HepG2 由中科院北京动物所惠赠;

收稿日期: 2010-01-05 接受日期: 2010-07-09

国家自然科学基金(No.30671084, No.30870525, No.30970611)和山西省自然科学基金(No.2007011077) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0351-7019371, Fax: 0351-6658332, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn

胎牛血清为杭州四季青公司产品; RPMI 1640 培养液为美国 Hyclone 产品; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、HEPES 钠盐及 Elastase、Elastin-orcein 均为 Sigma 公司产品; 二甲基亚砜(DMSO)购自北京夏新生物公司; HisTrap™ HP 亲和层析柱和 superdex 75 10/30 HR 分子筛层析柱购自 Amersham Pharmacia 公司; pQE-31-BTI 及 *E. coli* M15 [pREP4] 菌株为本室保存; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 原核表达载体的构建

使用 NCBI 网站中的 BLAST 程序将野生型荞麦胰蛋白酶抑制剂 rBTI 与几种植物来源的蛋白酶抑制剂的氨基酸序列进行同源性比对^[7], 比对结果显示, rBTI 与丝氨酸蛋白酶抑制剂马铃薯 -I 家族有很高的同源性。通过对已报道的马铃薯 -I 家族蛋白酶抑制剂家族成员进行分析, 我们推测 rBTI 的抑制活性中心包括 Arg⁴⁵-Asp⁴⁶ 氨基酸残基。将 rBTI 氨基酸序列中第 45 位 Arg 残基进行替换, 突变为 Ala, 构建突变型抑制剂 aBTI。

设计两对引物(A₁, A₂ 和 L₁, L₂), 以含有 BTI 基因全序列克隆载体 pQE-31-BTI 为模板, 进行 PCR 扩增。以 A₁ 和 A₂ 作为引物扩增出约 150 bp 的片段 a, L₁ 和 L₂ 作为引物扩增出约 100 bp 的片段 b, 再以片段 a 和片段 b 互为模板, A₁ 和 L₂ 为引物, 进行第 3 轮扩增, 得到带有突变位点的 aBTI 全长基因。表 1 为扩增过程中所需引物。PCR 产物通过 BamHI 和 HindIII 双酶切后克隆至 pQE-31 表达载体中, 构建 pQE-31-aBTI 重组质粒, 并将构建好的质粒进行序列测定。

1.3 重组蛋白 aBTI 的表达及纯化

将测序正确的 pQE-31-aBTI 重组质粒转化入 *E. coli* M15 [pREP4] 菌株, 挑取阳性克隆接种于含有抗生素(100 μg/ml Amp、25 μg/ml Kan)的 LB 培养基中 37℃, 180 r/min 恒温震荡培养至 A₆₀₀=0.6, 加入

IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 以诱导融合蛋白表达, 继续培养 4 h。4℃, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。用适当体积超声破碎液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)重悬, 冰浴条件下超声破碎。4℃, 12 000 r/min 离心 30 min, 分离上清液。

重组蛋白 aBTI 的纯化使用 GE 公司中低压液相层析系统 ÄKTA Purifier 进行。将离心后收集的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⁺-NTA 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, 收集洗脱峰。将分离得到的蛋白溶液上样于 Superdex 75 10/30 HR 分子筛层析柱中进一步纯化。层析在 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0 的缓冲液中进行。收集蛋白洗脱峰, 鉴定纯化蛋白的抑制活性。所得蛋白样品通过福林 - 酚试剂法测定浓度, 15% SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 重组蛋白 aBTI 的抑制活性鉴定

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^[10]。抑制活性定义为: 每分钟内使每毫升反应液的 A₄₁₀ 降低 0.1 为一个抑制活力单位(U)。

弹性蛋白酶作用于地衣红弹性蛋白(Elastin-orcein)^[11], 当底物被降解释放出地衣红染料后, 在 590 nm 处有特征光吸收。抑制活性定义为: 每分钟内使每毫升反应液的 A₅₉₀ 降低 0.01 为一个抑制活力单位(U)。

1.5 细胞培养

HepG2 细胞在含有体积分数为 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, 细胞呈贴壁状态生长, 2~3 天传代 1 次。

1.6 抑制 HepG2 细胞生长的 MTT 检测

取处于对数生长期的 HepG2 细胞和人胚肾上皮正常细胞 HEK293, 经过胰酶消化后, 调整细胞浓度至 1×10⁶/ml, 按照每孔 100 μl 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。将纯化的 aBTI 蛋白加入培养板中, 至终浓度分别为 1.1 μmol/L、2.2 μmol/L 和 4.4 μmol/L。每组各设置 5 个复孔。37℃, 5% CO₂

Table 1 Oligonucleotides used for PCR and site-directed mutagenesis

Primer name	Sequence of the primers (5'-3')
A ₁	ATG GAT CCT CTG CGT CAG TGC TC (the BamHI site is in bold)
A ₂	AGG TCT GCA GGC ACC GCG CT
L ₁	GTG CCT GCA GAC CTC CGA TGT GAC
L ₂	CCA AGC TTT TAT CAC ATA ACA ACA GG (the HindIII site is in bold)

The mutate codons are in italics.

条件下培养 24 h 后, 每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml), 继续培养 4 h。离心后弃去板中培养液及 MTT, 每孔加入 150 μl 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 处的吸光值。MTT 测定肿瘤细胞增殖抑制率的计算公式如下: 肿瘤细胞的增殖抑制率(IR%)=(1-实验组平均吸光值/对照组平均吸光值) \times 100%。

1.7 HepG2 细胞核的形态学观察

HepG2 细胞在 96 孔板中经过 2.2 $\mu\text{mol/L}$ aBTI 处理 24 h 后, 收集细胞, 用预冷的磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2)洗涤后重悬于固定液(4% 多聚甲醛)中。将细胞固定 10 min 后, 悬液在 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 再次使用磷酸缓冲液洗涤 2 次。之后将细胞悬液滴到载玻片上, 每 100 μl 细胞悬液($1\times 10^6/\text{ml}$)中加入 5 μl DAPI 染液(2 $\mu\text{g/ml}$)。染色 10 min 后, 在荧光显微镜(Olympus BX51)下观察细胞核的形态学变化^[12]。

1.8 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($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示。组内采用方差分析, 组间采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 表达载体的构建及鉴定

以 pQE-31-BTI 为模板, 利用表 1 中的引物, PCR 扩增出约 250 bp 的基因片段, 图 1 结果显示扩增产物与预期大小相符。将 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上进行测序, 测序结果表明, 通过 3 轮 PCR 成功将 rBTI 基因中第 45 位 Arg 残基突变为 Ala, 得到了含有突变位点的 aBTI 全长基因。

2.2 重组蛋白 aBTI 的表达与纯化

按照 1.3 方法, 构建重组表达载体 pQE-31-aBTI 并转化入 *E. coli* M15 [pREP4] 菌株中进行表达。表达产物经过亲和层析和分子筛层析纯化后显示单一峰(图 2A)。SDS-PAGE 结果显示, 与未连接目的片段的 pQE-31 质粒阴性对照(图 2B, 泳道 1)相比有明显的蛋白表达条带(图 2B, 泳道 2、泳道 3), 且分子质量与预期大小一致, 约为 9.3 kDa。目的蛋白以可溶形式存在, 纯度达到 95% 以上。

2.3 抑制活性分析

为了确定表达产物 aBTI 是否具有蛋白酶抑制活性, 按照 1.4 抑制活性分析方法, 分别测定了 aBTI 对

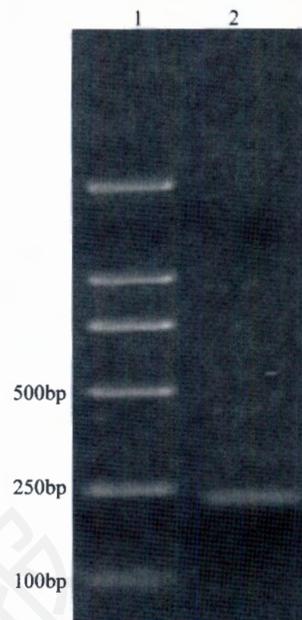


Fig.1 Analysis of the PCR product
Lane 1: DNA marker DL2 000; Lane 2: aBTI gene.

胰蛋白酶和弹性蛋白酶的抑制作用。结果显示, 与野生型荞麦胰蛋白酶抑制剂 rBTI 相比, 经过基因突变得到的 aBTI 对胰蛋白酶的抑制活性基本丧失, 而在弹性蛋白酶的抑制活性实验中, aBTI 却显示出很高的弹性蛋白酶抑制活性。图 3 为 aBTI 对弹性蛋白酶的抑制作用曲线。采用 Dixon plot 作图法, 计算出 aBTI 对弹性蛋白酶的抑制常数 K_i 为 $3.34\times 10^{-7}\text{mol/L}$ (图 4)。

2.4 重组蛋白 aBTI 抑制 HepG2 细胞生长的 MTT 检测

利用 MTT 比色法检测 aBTI 在体外对 HepG2 肿瘤细胞增殖的抑制作用。结果表明(图 5), aBTI 对 HepG2 细胞的抑制效率具有剂量依赖性。在 1.1~4.4 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, aBTI 能够显著抑制 HepG2 细胞的生长, 随着药物浓度的增加, 抑制作用逐渐增强, 而对正常细胞 HEK293 的增殖影响很小。当 aBTI 的浓度为 4.4 $\mu\text{mol/L}$, 体外诱导 HepG2 细胞 24 h 后, 抑制率达到 81.1%。经过计算, 在 24 h 作用时间下, aBTI 抑制 HepG2 细胞增殖 50% 的药物浓度(IC_{50})为 1.88 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 6 为不同浓度的突变型抑制剂 aBTI 和野生型抑制剂 rBTI 对 HepG2 细胞的作用, 样品浓度分别为 1.1 $\mu\text{mol/L}$ 、2.2 $\mu\text{mol/L}$ 和 4.4 $\mu\text{mol/L}$, 作用时间 24 h。结果显示, 各样品浓度下 aBTI 和 rBTI 对 HepG2 细胞的增殖都有明显的抑制作用。在样品浓度较低时, rBTI 的抑制作用略高于 aBTI, 而当样品浓度为 4.4

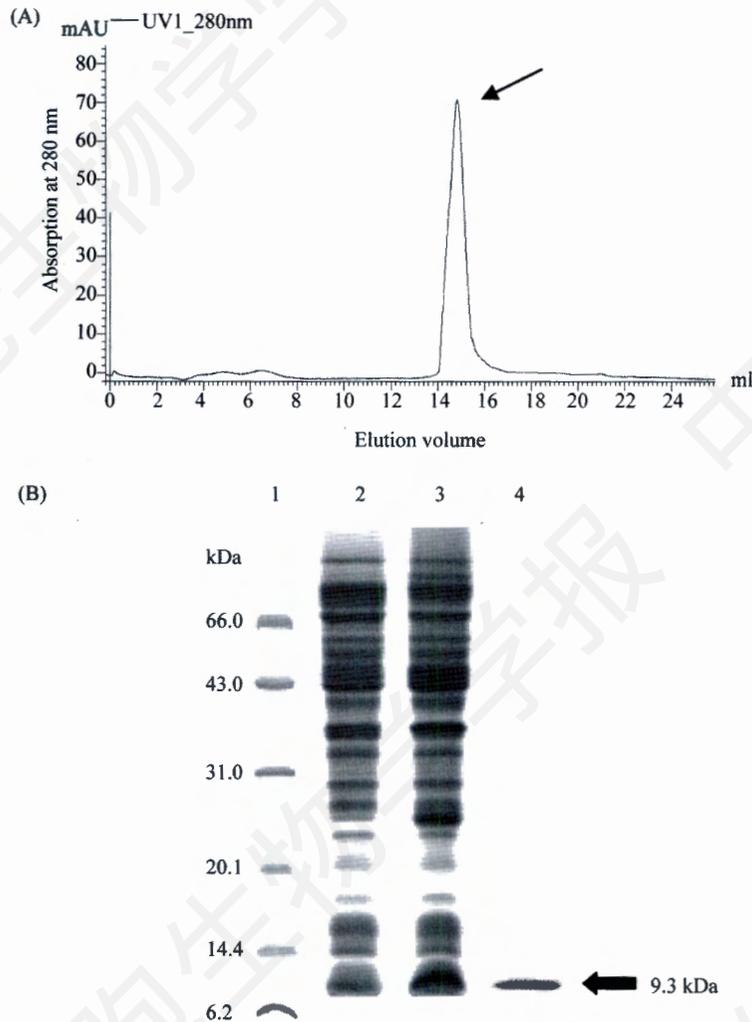


Fig.2 Purification and SDS-PAGE analysis of aBTI

A: aBTI was purified by Superdex 75 10/30 HR column chromatography. The column was eluted at a flow rate of 0.5 ml/min with 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) contained 150 mmol/L NaCl. The protein concentration was estimated from the absorbance at 280 nm. The inhibitory activity was determined as described in Materials and Methods; B: electrophoretic analysis (15% SDS-PAGE) of aBTI. The gel was stained with Coomassie blue dye. Three micrograms of protein were loaded in each lane. Lane 1, molecular markers; Lane 2, cell lysate of *E. coli* M15/pQE-31; Lane 3, cell lysate of *E. coli* M15/pQE-31-aBTI; Lane 4, purified aBTI after Superdex 75 column chromatography.

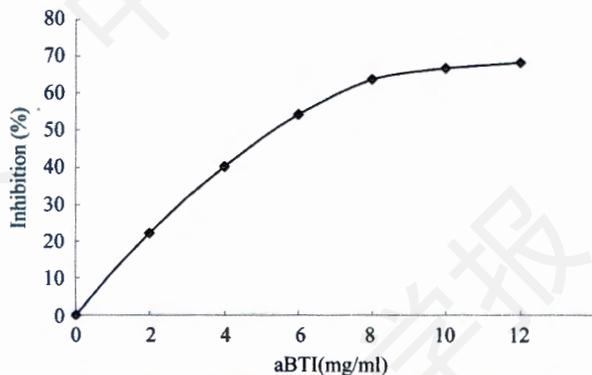


Fig.3 The inhibitory activities of aBTI on elastase

Elastase (50 mmol/L) was incubated with various amounts of aBTI at 37 °C for 4 h. The residual amidolytic activity of elastase was determined.

$\mu\text{mol/L}$ 时, 两种抑制剂对 HepG2 细胞的抑制率均达到 80% 以上。

2.5 HepG2 细胞核的形态学观察

HepG2 细胞经 2.2 $\mu\text{mol/L}$ aBTI 处理 24 h 后, 使用 DAPI 染液染色, 荧光显微镜下观察。从图 7 中可见细胞核的形态发生了明显变化, 出现了凋亡信号, 与对照组(图 7A)相比, 细胞核的染色质高度凝聚、边缘化(图 7B-a), 部分细胞核出现碎裂, 形状变得不规则, 伴有凋亡小体(图 7B-b)。该结果表明, 在设定的浓度和作用时间下, aBTI 能明显诱导 HepG2 肿瘤细胞发生凋亡。

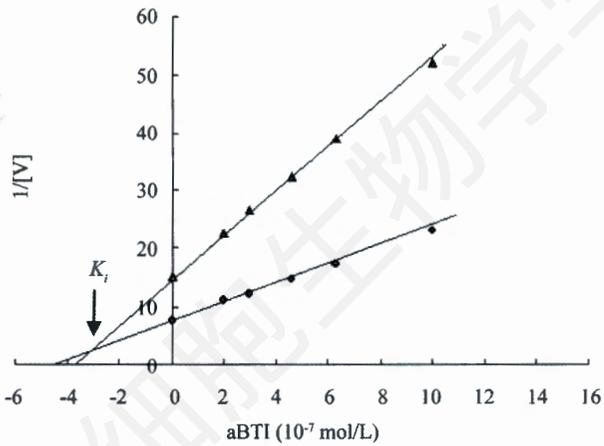


Fig.4 Kinetic analysis of elastase inhibition by aBTI

Dixon plot for the determination of the inhibition constant (K_i) of aBTI against elastase. 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.

3 讨论

本研究运用定点突变技术成功构建了 pQE-31-*aBTI* 原核表达载体,并在 *E. coli* M15 [pREP4]中实现融合表达,表达产物以可溶形式存在。通过亲和层析和分子筛层析纯化, aBTI 的纯度达到 95% 以上。抑制活性实验显示,经过对 rBTI 活性中心氨基酸突变得到的 aBTI 具有了新的蛋白酶抑制活性,即弹性蛋白酶抑制活性,与胰蛋白酶抑制剂相同,弹性蛋白酶抑制剂亦属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族。胰蛋白酶与弹性蛋白酶有着进化上同源的催化中心,都存在相同的催化三联体,因而催化机理非常相似。尽管

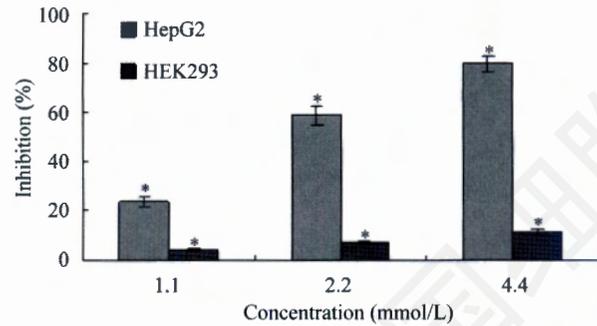


Fig.5 Effects of aBTI treatment on the growth of HepG2 and HEK293 cells

Cells were incubated with various concentrations of aBTI for 24 h. The color intensity was measured using a microtiter plate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm. Values are presented as means \pm SD of five determinations. * P <0.05.

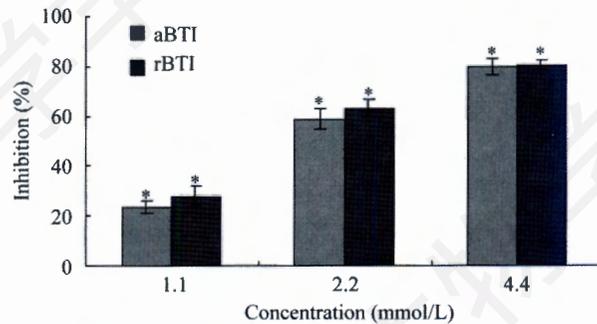


Fig.6 Effects of aBTI and rBTI treatment on the growth of HepG2 cells with different concentrations

Cells were incubated with various concentrations of inhibitors for 24 h. Values are presented as means \pm SD of five determinations. * P <0.05.

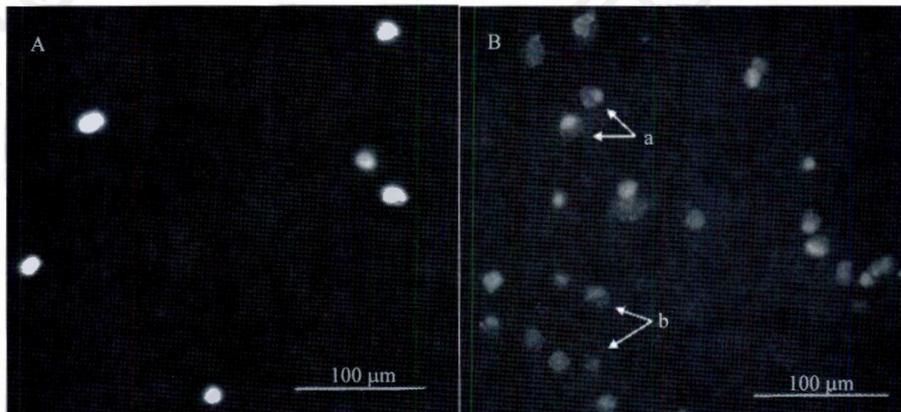


Fig.7 The morphological features of nucleolus of HepG2 cells

HepG2 cells were centrifuged and washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with DAPI for 10 min, detected apoptosis by fluorescence microscopy. By contrast, dense and thin crown of nuclear coloration, typical of chromatin condensation, could be observed in the aBTI-treated cells at 24 h. A: control group (20 mmol/L PBS, pH 7.2, 24 h); B: treatment group (2.2 μ mol/L aBTI, 24 h).

如此, 它们的底物专一性完全不同, 胰蛋白酶专一水解 Lys 和 Arg 的羧基参与形成的肽键; 弹性蛋白酶对小分子的氨基酸是专一的。rBTI 第 45 位 Arg 残基突变为 Ala 残基后, 由于 Ala 的侧链 R 基很小, 易于与弹性蛋白酶的催化中心结合, 从而达到对弹性蛋白酶的抑制作用。

在抑制肿瘤细胞生长实验中, 我们证实了所获得的重组蛋白质 aBTI 对人肝癌 HepG2 细胞具有显著的增殖抑制效应, 并且存在剂量依赖性, 而对正常细胞基本无影响。当 aBTI 的浓度为 4.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 体外作用 HepG2 细胞 24 h 后, 抑制率达到 81.1%, 与野生型蛋白酶抑制剂 rBTI 的抑制作用相近。考察和鉴定细胞凋亡诱导处理前后细胞形态与超微结构特征的变化, 是判断细胞是否凋亡的一个重要指标^[12]。本文细胞核形态学观察结果显示, 经过 aBTI 处理后, 大多数 HepG2 细胞处于细胞凋亡的中后期, 核膜裂解, 染色质分割, 并伴随有凋亡小体出现。该结果初步证明了 aBTI 具有体外诱导 HepG2 肿瘤细胞凋亡的生物学效应。蛋白酶抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡的机理研究已在本实验室开展, 初步研究表明^[13], 荞麦胰蛋白酶抑制剂诱导细胞凋亡的机制与 caspase-3 依赖性凋亡调节信号通路有关, 而并未涉及 Fas/Fas 配体途径。更为深入的实验正在进展之中。

目前, 国内外有关弹性蛋白酶抑制剂的报道主要集中在对肺部疾病的治疗^[14], 关于它在肿瘤发生发展中的作用研究尚少。本研究对我们先前获得的重组荞麦胰蛋白酶抑制剂进行了分子改造, 构建了重组突变蛋白 aBTI, 并初步研究了其对肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用, 发现来自荞麦中的重组弹性蛋白酶抑制剂 aBTI 具有较明显的抑制肿瘤细胞生长作用。aBTI 对其它实体瘤细胞的作用及敏感性等内容有待深入研究。

参考文献(References)

- 1 Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, Bugge TH, *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: 237-58.

- 2 Chaudhary NS, Shee C, Islam A, Ahmad F, Yernool D, Kumar P, *et al.* Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. *Phytochemistry* 2008; 69: 2120-6.
- 3 Mello GC, Oliva MLV, Sumikawa JT, Machado OLT, Marangoni S, Novello JC, *et al.* Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *J Protein Chem* 2001; 20: 625-32.
- 4 Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Taylor TH, Nguyen QA, Jensen J, *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: 4684-91.
- 5 Belozersky MA, Dunaevsky YE, Musolyamov AX, Egorov TA. Complete amino acid sequence of the protease inhibitor from buckwheat seeds. *FEBS Lett* 1995; 371: 264-6.
- 6 Dunaevsky YE, Pavlukova EB, Belozersky MA. Isolation and properties of anionic protease inhibitors from buckwheat seeds. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 40: 199-208.
- 7 Li YY, Zhang Z, Liang AH, Wang ZH. Cloning and characterization of a novel trypsin inhibitor (BTIw1) gene from *Fagopyrum esculentum*. *DNA Seq* 2006; 17: 203-7.
- 8 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.
- 9 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: 166-75.
- 10 Li J, Ruan KC, Chi CW. The assignment of the reactive sites of double-headed arrowhead proteinase inhibitor A and B. *Acta Biochim Biophys Sin* 2002; 34: 494-7.
- 11 贺稚非, 陈宗道, 李洪军, 刘鹭, 高兆建, 宫春波. 胞外弹性蛋白酶的理化特性及其影响因素. *食品与发酵工业* 2005; 31(4): 10-3.
- 12 郑燕彬, 杨海波, 陈兰英, 李祺福, 赵振利, 刘用金. 姜黄素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的诱导作用. *细胞生物学杂志* 2009; 30(1): 84-8.
- 13 李芳, 李玉英, 白崇智, 田欣, 张政, 王转花. 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. *中国生物化学与分子生物学报* 2009; 25(2): 92-7.
- 14 马国尔, 郑金旭. 中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂研究现状. *国际呼吸杂志* 2006; 26(4): 257-9.

Expression of Buckwheat Protease Inhibitor (aBTI) and Its Antitumor Efficacy against Human Hepatoma (HepG2) Cells

Xin Tian, Yu-Ying Li, Zhuan-Hua Wang*

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

Abstract Previous studies have shown that recombinant buckwheat trypsin inhibitor (rBTI) possesses potent antitumor activity in *in vitro* models. In this study, a mutant (R45A-aBTI) of rBTI was generated through site-directed mutagenesis. aBTI was expressed in a soluble state in *E.coli*. M15 [pREP4] and purified by affinity chromatography and gel filtration chromatography. The purity of the aBTI reached above 95%. Activity analysis indicated that aBTI had a specific inhibitory activity toward elastase, its inhibition constant (K_i) value was 3.34×10^{-7} mol/L. MTT assay demonstrated that rBTI could inhibit the growth of HepG2 tumor cells in a dose-dependent manner (IC_{50} : 1.88 μ mol/L). Additionally, nuclear staining showed that aBTI could induce the apoptosis of HepG2 cells. Our results suggested that aBTI displayed more marked antitumor efficacy in *in vitro* and might be a novel candidate for cancer treatment.

Key words buckwheat; protease inhibitor; site-directed mutagenesis; expression; antitumor

Received: January 5, 2010 Accepted: July 9, 2010

This work was supported by the National Nature Sciences Foundation of China(No.30671084, No.30870525, No.30970611) and the Nature Sciences Foundation of Shanxi Province(No.2007011077)

*Corresponding author. Tel: 86-351-7019371, Fax: 86-351-6658332, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn