

僵蚕溶茧酶抑制剂的纯化与抗肿瘤活性研究

王厚伟¹, 徐凌川¹, 王家超³, 曾英姿⁴, 田景振¹, 窦彦玲^{2*}, 王 飞⁵

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355
2. 山东中医药大学智能与信息工程学院, 山东 济南 250355
3. 河北医科大学基础医学院, 河北 石家庄 050017
4. 山东沃华医药科技有限公司, 山东 潍坊 261061
5. 御华景宸(山东)康养发展集团有限公司, 山东 济南 250000

摘要: 目的 分离纯化僵蚕溶茧酶抑制剂(Jiangcan cocoonase inhibitor, JCCI), 研究其体内外对人肝癌 SMCC-7721 细胞增殖的抑制活性。方法 依次应用以家蚕溶茧酶为配体的亲和色谱、Sephadex G-50 凝胶过滤色谱、Superdex 75 快速蛋白液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC), 从僵蚕粗蛋白提取物的 85% 硫酸铵沉淀物中分离纯化 JCCI。以 Edman 降解法测其 N 端氨基酸序列。应用 MTT 法与荷瘤裸鼠模型, 检测其体内外抑制 SMCC-7721 细胞增殖与生长活性。结果 JCCI 相对分子质量为 13 973.63, 其 N 端前 10 个氨基酸序列为 VRNKRQSNDD。抑制剂动力学分析结果表明, JCCI 是溶茧酶的非竞争性抑制剂, 米氏常数(K_m)平均值为 76.50, 二者物质的量之比为 1:1。JCCI 可显著抑制 SMCC-7721 肝癌细胞体外增殖与体内荷瘤裸鼠的肿瘤生长, 体外给药 36 h 的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50})为 260.52 $\mu\text{g/mL}$, JCCI 抑制率与剂量线性相关。结论 JCCI 是一种首次从僵蚕中分离纯化的具有抗肿瘤活性的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

关键词: 僵蚕; 溶茧酶; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 抗肿瘤活性; 肝癌; 亲和色谱; 荷瘤裸鼠; MTT 法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)07-2022-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.011

Research on purification of cocoonase inhibitor of *Bombyx Batryticatus* and its anti-tumor activity

WANG Hou-wei¹, XU Ling-chuan¹, WANG Jia-chao³, ZENG Ying-zi⁴, TIAN Jing-zhen¹, DOU Yan-ling², WANG Fei⁵

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
2. School of Intelligence and Information Engineering, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
3. School of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China
4. Shandong Wohua Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Weifang 261061, China
5. Yuhua Jingchen (Shandong) Health Development Group Co., Ltd., Jinan 250000, China

Abstract: **Objective** To isolate and purify the cocoonase inhibitor of *Bombyx Batryticatus* (Jiangcan, JCCI), and study its anti-tumor activity of SMCC-7721 liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods** JCCI was purified from the 85% ammonium sulfate precipitate of the crude protein extract of *Bombyx Batryticatus* by affinity chromatography with silkworm cocoonase as ligand, Sephadex G-50 gel filtration chromatography, and Superdex 75 FPLC. The JCCI N-terminal amino acid sequence was determined by Edman degradation method. MTT method and tumor-bearing nude mouse model were used to detect the inhibiting effect of JCCI on the proliferation and growth of SMCC-7721 *in vivo* and *in vitro*. **Results** The molecular weight of JCCI was 13 973.63 Daltons, and the first 10 amino acid sequence of its N-terminal was VRNKRQSNDD. JCCI was a non-competitive cocoonase inhibitor, with an average K_m of 76.50 and a molar inhibition ratio of 1:1. JCCI could significantly inhibit the proliferation of SMCC-7721 *in vitro* and the tumor growth of tumor-bearing nude mice *in vivo*. The IC_{50} was 260.52 $\mu\text{g/mL}$ after 24 h administration *in vitro*, and the inhibition rate was linearly related to the dose of JCCI. **Conclusion** JCCI was a serine protease inhibitor with anti-tumor activity purified from *Bombyx Batryticatus* for the first time.

收稿日期: 2021-10-28

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2013HM035); 山东省重点产业关键技术资助项目(2016CYJS08A01-8); 济南科技发展计划资助项目(201102021); 山东省高校科技计划资助项目(J11LF29)

作者简介: 王厚伟, 硕士生导师, 副教授, 从事基于药性理论的中药生物技术新药研发。Tel/Fax: 13791138419 E-mail: houweiw@163.com

*通信作者: 窦彦玲, 副教授, 从事计算机科学与技术研究。Tel/Fax: 15864533191 E-mail: yanlingdou@163.com

Key words: *Bombyx Batryticatus*; cocoonase; serine protease inhibitor; anti-tumor activity; liver cancer; affinity chromatography; tumor-bearing nude mice; MTT method

僵蚕是蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体,被列入《中国药典》2020 年版,具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结等功效^[1]。僵蚕单独或与其他中药配伍用于治疗多种肿瘤疾病^[2]。在我国的一些地区僵蚕作为一种民间药用于治疗癌症^[3]。关于僵蚕的抗肿瘤作用已有一些文献报道。僵蚕水煎煮提取物对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 细胞^[4]、小鼠艾氏腹水瘤细胞以及人肝癌细胞体外增殖有抑制作用^[5]; ig 僵蚕水煎剂,制备大鼠含药血清,该血清能抑制肝癌 Hepa1-6 细胞体外增殖与侵袭^[6];僵蚕乙醇提物对体外培养的 HeLa 细胞增殖具显著抑制作用^[7];僵蚕中麦角甾醇、 β -谷甾醇、棕榈酸 3 种成分具有抑制小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞和人黑色素瘤 A375 细胞增殖活性^[8]。

丝氨酸蛋白酶抑制剂广泛存在于动植物体内,在医学领域作为一类有前景的癌症治疗候选药物已得到普遍认可^[9-10]。肿瘤细胞外基质中丝氨酸蛋白酶活性与肿瘤浸润和转移密切相关^[11]。一些文献报道了丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制肿瘤细胞的浸润和转移作用^[12-16]。人肝癌细胞膜上存在丝氨酸蛋白酶抑制剂受体,抑制剂与之结合能够调节基质丝氨酸蛋白酶的活性,抑制蛋白酶对基质蛋白的分解作用,修复细胞屏障,阻断肿瘤细胞的浸润和转移^[17-18]。

家蚕溶茧酶是家蚕蛹羽化成蛾后由蚕蛾的下颚分泌的一种丝氨酸蛋白酶,用于溶解茧丝,在封闭的茧壳上形成羽化孔,以帮助蚕蛾脱茧而出。本课题组前期已完成了家蚕蛾溶茧酶(GenBank: BAJ46146.1)的分离纯化及其基因的克隆与表达^[19]。本研究拟应用以家蚕蛾溶茧酶为配体的亲和色谱技术作为主要分离手段,从僵蚕水提取物中分离纯化小相对分子质量丝氨酸蛋白酶抑制剂,研究抑制剂的理化性质、酶学特性及其体内、外抑制人肝癌 SMCC-7721 细胞增殖活性,分析它的丝氨酸蛋白酶抑制活性与抗肿瘤活性的关系与机制。迄今为止,僵蚕小相对分子质量蛋白组分的抗肿瘤活性未见报道,本研究为白僵蚕在中医临床上用于肿瘤性疾病的治疗,以及应用僵蚕溶茧酶抑制剂(Jiangcan cocoonase inhibitor, JCCI)治疗肝癌提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

H1850R 高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),FD-1D-80 冷冻干燥机(上海比朗仪器制造有限公司),快速蛋白质液相色谱仪(ÄKTA Pure, GE 医疗生命科学),4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer、ABI 491A 氨基酸测序仪(应用生物系统公司,美国),3550 酶标仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,美国]。

1.2 实验动物

无特定病原体的 BALB/c 裸鼠由山东中医药大学实验动物中心(济南,中国)提供,质量合格证编号:SYXK(鲁)2017-0022。本研究严格按照国家卫生研究院实验动物护理和使用指南(2015 年,第 9 版)中的建议进行。《动物使用方案》经山东中医药大学(济南)动物管理与使用委员会审定(批准号 SDUTCM20200303002)。

白僵蚕是根据《中国药典》2020 年版一部的炮制规范由本实验室专门制备。应用纯种白僵菌株 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant(山东中医药大学徐凌川教授鉴定)感染第 4 龄第 2 天的家蚕,家蚕品种为“菁松”×“皓月”的一代杂交种,常规桑叶育,收集病死的尸体,于烘箱中 40℃干燥制得。

1.3 材料

SMCC-7721 细胞(中国科学院生物化学与细胞生物研究所),DMEM 培养基、胎牛血清、氨苄青霉素、链霉素(Gibco-BRL),牛血清白蛋白(默克西格玛公司,美国),CNBr-active Sepharose CL-4B、Sephadex G-50、Superdex 75 Increase 10/300 GL(法玛西亚公司,瑞典), α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA,默克西格玛公司,美国),*N*-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯酰胺盐酸盐(BApNA,默克西格玛公司),Ultra-46K(默克密理博公司),MTT(默克西格玛公司),SPSS13.0 软件(SPSS, Inc., 美国)。

2 方法

2.1 JCCI 的提取与分离

2.1.1 JCCI 的提取 取适量新制备的白僵蚕粉加入 10 倍体积的提取缓冲液(50.00 mmol/L, pH 8.0, Tris-HCl 缓冲液),匀浆提取,离心(10 000 r/min, 10 min),收集上清液。沉淀物重复提取 2 次,合并

3 次上清液, 冷冻干燥, 得白僵蚕粗蛋白冻干粉, 称定质量, 备用。

2.1.2 JCCI 的硫酸铵分步盐析法分离 取适量上述白僵蚕冻干粉溶于适量的提取缓冲溶液中, 离心 (10 000 r/min、10 min), 收集上清液, 缓慢加入硫酸铵调节饱和度至 25%, 25 °C 下温和搅拌 30 min, 离心 (10 000 r/min、10 min), 收集沉淀物, 得 25% 饱和度的硫酸铵沉淀。上清液重复以上操作, 得 55%、85% 饱和度的硫酸铵沉淀。各沉淀物于 4 °C 下透析 36 h, 离心 (10 000 r/min、10 min), 上清液冷冻干燥, 测溶茧酶抑制活性。具有最高溶茧酶抑制活性的硫酸铵沉淀物冻干粉即为 JCCI。

2.2 蛋白质含量测定

使用 Lowry 蛋白质测定方法^[20], 用牛血清白蛋白作为标准品测定蛋白质含量。

2.3 JCCI 的抑制活性分析

参照文献方法^[21], 溶茧酶属类胰蛋白酶, 以 N-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯酰胺盐酸盐 (BAPNA) 为底物, 检测 JCCI 对溶茧酶的抑制活性。应用反应缓冲液 (50.00 mmol/L、pH 8.0、Tris HCl, 10.00 mmol/L CaCl₂) 配制 14.00、28.00、42.00、56.00、70.00、84.00、98.00 μg/mL 系列质量浓度 JCCI 溶液 (相当于 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00 nmol/mL)。取 1.00 mL 各浓度 JCCI 溶液, 分别与 2.00 mL 溶茧酶溶液 (2.50 nmol/mL) 混合, 37 °C 保温 10 min 后加入 100 μL BAPNA 溶液 (10.00 mmol/L), 继续 37 °C 保温 5 min 后, 用 0.40 mL 33% 乙酸溶液终止反应, 测 410 nm 吸光度 (A₄₁₀) 值。对照组以相同体积的反应缓冲液代替抑制剂样品溶液。1 个溶茧酶的酶活力单位定义为使 A₄₁₀ 值增加 0.01 所需酶的物质, 1 个 JCCI 抑制活力单位则为使 A₄₁₀ 值降低 0.01 所需抑制剂的物质。

2.4 亲和色谱

2.4.1 亲和配体的制备 选择家蚕溶茧酶作为亲和色谱的配体。溶茧酶是家蚕蛾在羽化的过程中分泌的一种丝氨酸蛋白水解酶, 用于水解蚕茧先端形成羽化孔, 使蚕蛾脱茧而出, 参照文献方法^[19]纯化制备溶茧酶配体。

2.4.2 亲和载体的制备 根据制造商说明书 (2018 版), 将 CNBr 活化的 Sepharose CL-4B 与适量的溶茧酶偶联, 制成亲和载体。

2.4.3 亲和色谱 适量粗 JCCI 溶于适量平衡缓冲溶液 (50.00 mmol/L、pH 8.0、Tris HCl) 中, 4 °C

离心 (10 000 r/min、10 min), 上清液加样于亲和色谱柱 (20.00 cm×1.60 cm, 柱体积约 35.00 mL, 柱床高 17.00 cm), 37 °C 保温 1 h, 依次用含 1.00 mol/L NaCl 的平衡缓冲液、蒸馏水、氯化氢溶液 (pH 2.4) 洗柱, 收集洗脱液, 用 Tris 碱 (2.00 mol/L) 中和, 重复加样, 合并 Tris 碱中和液, 透析, 冻干。

2.5 凝胶过滤色谱

亲和色谱冻干粉以适量洗脱液 (50.00 mmol/L Tris HCl 缓冲液, pH 8.0) 溶解, 加样于 Sephadex G-50 凝胶过滤色谱柱 (60.00 cm×1.60 cm, 柱体积约 114.00 mL, 柱床高 56.00 cm), 洗脱液体积流量 1.00 mL/min, 检测各洗脱峰的溶茧酶抑制活性。

2.6 快速蛋白质液相色谱 (FPLC) 分析

以上 JCCI 活性蛋白峰进一步做 Superdex 75 Increase 10/300 G L FPLC 分析, 用 2 倍体积的 50 mmol/L pH 8.0 Tris HCl 缓冲液平衡色谱柱, 上样后收集 1.2 倍柱体积的洗脱液, 每管 1 mL, 体积流量 0.50 mL/min, 检测 280 nm 的紫外吸光度值, 蛋白峰用 Ultra-46K 浓缩。检测各洗脱峰溶茧酶抑制活性。活性蛋白峰用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度, 纯化的样品-80 °C 保存。

2.7 SDS-PAGE 分析

参照文献方法^[22]进行 SDS-PAGE 分析, 凝胶浓度为 12%, 用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2.8 飞行时间质谱分析

吸取 10 μL 1.00 mg/mL 的 JCCI 样品与 10 μL 5.00 mg/mL 的 α-氰基-4-羟基肉桂酸 (HCCA) 混匀。取 1 μL 混合液滴于进样深头, 抽真空除去溶剂, 用 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer 进行质谱分析, 激光光源为 355 nm Nd: YAG 激光器, 加速电压 2 kV, 正离子反射检测模式。

2.9 JCCI 的 N 端氨基酸序列分析

参照文献方法^[21], 应用 ABI 491A 氨基酸测序仪, 以 Edman 降解法测定 JCCI 的 N 端 10 个氨基酸序列。

2.10 JCCI 的动力学分析

配制 2.00 nmol/mL (28.00 μg/mL) 和 3.00 nmol/mL (42.00 μg/mL) 的 JCCI 溶液, 各取 1.00 mL 分别与 2.00 mL 60.00 μg/mL 的溶茧酶溶液 (相当于 2.50 nmol/mL) 混合, 分别加入 2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、14.00、16.00、18.00 μL 的底物 BAPNA 溶液 (10.00 mmol/L), 保温 5 min 后用 0.50 mL 33% 的乙酸溶液终止反应, 测定 A₄₁₀ 值,

应用 Origin 2018 64bit 软件中抑制剂动力学分析子程序, 直接以 MichaelisMenten 模型作图, 计算米氏常数 (K_m)、最大反应速度 (V_{max})、抑制常数 (K_i)。

2.11 细胞培养

SMCC-7721 细胞用含 10%胎牛血清, 100 U/mL 氨苄青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。当 SMCC-7721 细胞贴壁并长满培养瓶侧壁时, 用胰蛋白酶消化处理后作传代培养。

2.12 MTT 检测

取对数生长期 SMCC-7721 细胞接种到 96 孔细胞培养板, 接种密度为 1×10^5 个/mL, 每孔 100.00 μ L, 培养 24 h 后给药, JCCI 质量浓度分别为 500.00、250.00、100.00 μ g/mL, 每个剂量设置 6 个复孔, 给药 36 h 后, 加入 10.00 μ L 5.00 g/L 的 MTT, 继续培养 4 h, 吸除各培养孔上清后, 加入 150.00 μ L DMSO 充分溶解, 用酶标仪测定各培养孔 490 nm 处 A 值。按公式计算细胞生长抑制率, 并应用 SPSS 13.0 软件计算 JCCI 的 IC₅₀。

细胞生长抑制率 = $1 - \text{给药组平均 A 值} / \text{对照组平均 A 值}$

2.13 体内抗肿瘤活性检测

用 DMEM 调配对数生长期的 SMCC-7721 的细胞密度为 5.00×10^6 /mL。取 0.10 mL 的细胞悬液于背部 sc 于 6 只 BALB/C 裸鼠, 根据肿瘤生长状况饲养约 20 d 后处死小鼠, 选择生长良好的肿瘤组织, 切成小块 (质量约 40.00 mg), 加入 0.20 mL 生理盐水, 用穿刺针移植于裸鼠左侧腋窝, 约 1 周后将肿瘤生长良好的荷瘤裸鼠随机分为 5 组, 每组 6 只。阴性对照组于瘤周 sc 0.20 mL 生理盐水 (10.00 mL/kg), 每天 1 次; 阳性对照组于瘤周 sc 16.00 μ L 的 5-氟嘧啶 (5-Fu) 注射液原液 (25.00 mg/mL), 隔天 1 次, 注射剂量为 20.00 mg/kg; 给药组分低、中、高 3 个 JCCI 剂量组, 分别于瘤周 sc 0.20 mL 用生理盐水溶解的 JCCI 药液, 每天 1 次, 注射剂量分别为 50.00、25.00、12.50 mg/kg。连续给药 14

d 后, 比较各组肿瘤质量, 计算肿瘤抑制率。各组裸鼠处死前称定质量, 处死后无菌采集各组裸鼠脾脏称定质量, 计算脾脏指数。

脾脏指数 = $10 \times \text{脾脏质量} / \text{体质量}$

2.14 统计分析

JCCI 处理组间差异比较应用 SPSS 软件做均匀方差分析与 t 检验, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示有统计学显著差异。

3 结果

3.1 JCCI 的提取与分离

按照“2.1”项方法, 取 2.00 g 冻干粉应用分步盐析法分离得到不同饱和度的硫酸铵沉淀物, 按照“2.2”项方法检测各沉淀物的蛋白质含量, 按照“2.3”项方法检测溶菌酶抑制活性。结果显示 (表 1), JCCI 溶菌酶抑制活性主要存在于 55%和 85%的硫酸铵沉淀物中, 但后者的比抑制活力是前者的 1.43 倍, 而且 55%硫酸铵沉淀物的比抑制活力 (1.45 U/mg) 与总硫酸铵沉淀物比抑制活力 (1.40 U/mg) 相近, 纯化倍数仅为 1.04。因此, 本研究将僵蚕总水溶性蛋白的 85%硫酸铵沉淀物指定为 JCCI 粗蛋白。以此为基础进行纯化处理。

3.2 JCCI 的纯化

按照“2.4”项方法, 取 300 mg JCCI 粗蛋白做亲和色谱纯化。图 1-A 上图显示 2 个蛋白峰, 第 1 个峰在 8~15 号收集管, 为盐洗脱峰, 该峰经检测无溶菌酶抑制活性; 第 2 个峰在 25~30 号管, 为具有显著 JCCI 活性的亲和吸附峰。

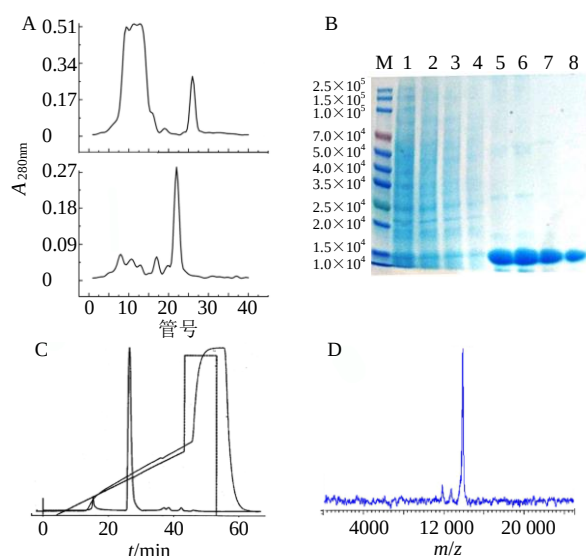
按照“2.5”项方法, 应用 Sephadex G-50 对亲和色谱的 25~30 号管收集液做进一步的凝胶过滤色谱纯化。图 1-A 下图显示主蛋白峰在 21~25 号收集管, 具有显著的溶菌酶抑制活性, 在主蛋白峰前面的 5~20 号收集管存在 4 个很小的杂蛋白峰, 均无 JCCI 活性。主蛋白峰的 22~24 号管经 12% SDS-PAGE 纯度分析, 显示单一蛋白条带, 纯度大于 90%。

合并 22~24 号收集管组分, 按照“2.6”项方

表 1 JCCI 粗蛋白盐析分离及其溶菌酶抑制活性检测

Table 1 Isolation of JCCI crude protein by salt fractionation with (NH₄)₂SO₄ and determination of its inhibitory activity

组分	蛋白含量/mg	抑制活力/U	比抑制活力/(U·mg ⁻¹)	蛋白回收率/%
25%硫酸铵沉淀物	275.68	57.83	0.21	13.78
55%硫酸铵沉淀物	491.45	713.43	1.45	24.57
85%硫酸铵沉淀物	442.79	917.39	2.07	22.14
总硫酸铵沉淀物	1 209.92	1 688.65	1.40	60.50



A-上图为亲和色谱图, 下图为凝胶过滤色谱图 B-SDS-PAGE (泳道 M 为蛋白质相对分子质量标记; 泳道 1~4 为 JCCI 粗蛋白, 上样量分别为 25、20、15、10 μ L; 5、6 为亲和色谱样品; 7 为凝胶过滤色谱样品; 8 为 FPLC 样品) C-快速蛋白质液相色谱图 D-飞行时间质谱图

A-figure above, Sepharose 4B cocoonase-affinity chromatography; Figure below, Sephadex G-50 gel filtration chromatography B-SDS-PAGE (Lane M, molecular weight markers; Lane 1-4, JCCI crude protein; Lanes 5, 6: affinity chromatography; Lane 7: gel filtration chromatography; Lane 8: FPLC) C-FPLC D-Time-of-flight mass spectrometry

图 1 JCCI 的分离、纯化、电泳鉴定与质谱分析

Fig 1 Separation, purification, electrophoresis and mass spectrometry of JCCI

表 2 JCCI 的纯化步骤

Table 2 Purification steps of JCCI

纯化步骤	蛋白含量/mg	抑制活力/IU	抑制活力回收率/%	比抑制活力/(U·mg ⁻¹)
85%硫酸铵沉淀	300.00	621.59	100.00	2.07
亲和色谱	29.29	563.58	90.67	19.24
Sephadex G-50 凝胶过滤色谱	21.38	541.33	87.09	25.32
FPLC	19.91	536.18	86.26	26.93

建立系统发育树, JCCI 与一种家蚕蛾蛋白酶抑制剂 (NP_001040294.1)、一种野桑蚕未表征蛋白 (XP_028028609.1)、一种黄杆菌 BFFFF2 蛋白高度同源, 但 4 者相对分子质量不同, 不是同种蛋白。本研究从中药僵蚕中分离纯化出 JCCI 属首次报道, 根据 NP_001040294.1 推测的 JCCI 的全长氨基酸序列与 cDNA 编码序列汇总见图 2。

3.4 JCCI 对溶茧酶活性的抑制作用与动力学分析

如图 3-A 所示, 在含 5 nmol/L 溶茧酶的反应体系中, JCCI 在 0~5.00 nmol/L 对溶茧酶抑制活性线性相关, 二者物质的量抑制比约为 1:1, 质量抑制

法进行 FPLC 分析。图 1-C 显示在洗脱时间 25~30 min 出现蛋白主峰, 合并收集主峰组分, 获得纯化的 JCCI。12% SDS-PAGE 分析结果 (图 1-B) 显示在相对相对分子质量 $1.0 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ 存在单一蛋白主带。飞行时间质谱分析结果 (图 1-D) 表明, JCCI 相对分子质量为 13 973.63。

由表 2 可见, JCCI 粗蛋白经亲和色谱分离后比抑制活力增加了 9.30 倍, 是 JCCI 纯化的关键步骤。Sephadex G-50 凝胶过滤色谱分离使比抑制活力进一步提升了 1.32 倍, 获得基本纯化的 JCCI 单一成分。尽管 FPLC 步骤的纯化倍数提升不显著, 但使 JCCI 纯度进一步提高, 满足 N 端氨基酸测序分析要求。JCCI 粗蛋白经 3 步色谱分离, 获得能够满足 N 端氨基酸测序分析要求的 JCCI 单体, 总纯化倍数提升了 13.01, 总抑制活力回收率为 86.26%, 蛋白回收率为 6.64%。

3.3 JCCI 的 N 端氨基酸序列与同源性

按照“2.9”项方法, JCCI 样品经 PAGE 电泳后转膜, 剪下主带, 应用 Edman 降解法测序, 获得 JCCI 的 N 端 10 个氨基酸序列: VRNKRQSNDD (缬氨酸·精氨酸·天冬酰胺·赖氨酸·精氨酸·谷氨酰胺·丝氨酸·天冬酰胺·天冬氨酸·天冬氨酸)。应用 BLASTp 程序检索 NR 数据库, 设定 E 值范围为 0~100, 共检索到 6 个 100% 相似度蛋白 (表 3)。以 Grishin (protein) 为距离采用 Fast Minimum Evolution 方法

比约为 1:1.71。

如图 3-B 所示, 3 种 JCCI 浓度 (0、2.00、3.00 nmol/L) 反应体系的 K_m 值相近, 分别为 76.76、76.40、76.35, 而 V_{max} 值则随 JCCI 含量增加而下降, 分别为 46.50、27.76、18.53 单位。因此, JCCI 为溶茧酶的非竞争性抑制剂。

3.5 JCCI 对 SMCC-7721 细胞体外增殖抑制作用

SMCC-7721 细胞贴壁生长 24 h 后给药, 给药 36 h 后 MTT 法测各培养孔 A_{490} 。表 4 显示, JCCI 对 SMCC-7721 增殖具有显著抑制作用, 抑制活性呈现浓度相关效应。应用逻辑回归求得 JCCI 在给

表 3 JCCI 的 N 端氨基酸序列 BLASTp 相似度检索结果汇总 (E 值 0~100)

Table 3 BLASTp similarity of the JCCI N-terminal amino acid sequence (E value 0—100)

登录号	科学名称	总得分	E 值	相似度/%	序列
Query	<i>Bombyx Batryticatus</i>	100.0	0	100.00	1 VRNKRQSNDD 10
XP_028028609.1	<i>Bombyx mandarina</i>	35.4	0.53	100.00	21 VRNKRQSNDD 30
NP_001040294.1	<i>Bombyx mori</i>	35.4	0.55	100.00	21 VRNKRQSNDD 30
OYU82547.1	<i>Flavobacterium</i> sp. BFFFF2	32.0	8.90	100.00	114 VRNKRQSNDD 122
XP_017783957.1	<i>Nicrophorus vespilloides</i>	29.9	50.00	88.89	23 IRNKRQSNDD 31
KAF2887618.1	<i>Ignelater luminosus</i>	29.9	51.00	88.89	96 RNKRQANDD 104
XP_028400913.1	<i>Dendronephthya gigantea</i>	29.1	98.00	100.00	636 NKRQSNDD 643

gta agg aac aag cgt cag tcg aat gat gat gat gac gtt ctc gat gac
V R N K R Q S N D D D D V L D D
cgc tat ggc tgg gag ctt acc acc cgg cct cca agg cag ttc cct ggg
R Y G W E L T T R P P R Q F P G
caa gga ttt ttc ccc ggt cta ttc ccc ggc cag ggt cag ttc cca gga
Q G F F P G L F P G Q G Q F P G
caa cag caa cgt tta act acg act cgg gct ccc aac aat ctg ggc acc
Q Q Q R L T T T R A P N N L G T
acc aca atg tgc cct gca att caa caa tgc att cgt agc tgc cca gta
T T M S P A I Q Q C I R S C P V
acc gct gag tac aat cca gtt tgt ggc act gat aat ata act tac aat
T A E Y N P V C G T D N I T Y N
aac cct gga agg ttg acg tgt gct cag gcg tgt gga atc aat gtc agc
N P G R L T C A Q A C G I N V S
gtt ctc cga tcc ctg cct tgc ccc act gct aca caa gct cct acc agc
V L R S L P C P T A T Q A P T S

图 2 JCCI 的氨基酸序列及其 cDNA 编码序列

Fig. 2 JCCI amino acid sequence and its cDNA coding sequence

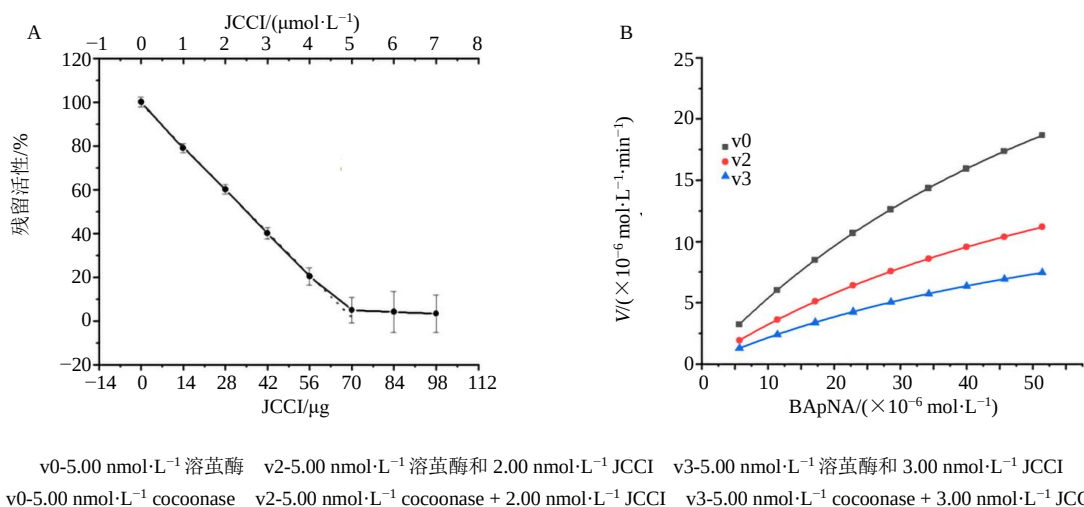


图 3 JCCI 对家蚕溶茧酶的抑制活性检测 (A) 与动力学分析 (B)

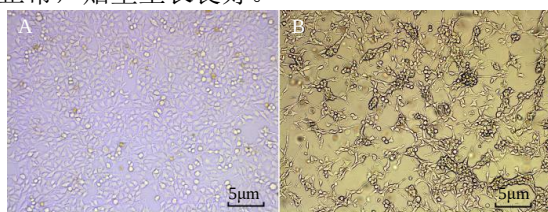
Fig. 3 Detection and kinetic analysis of the inhibitory activity of JCCI on silkworm cocoonase (A) and kinetic analysis (B)

表 4 JCCI 对 SMCC-7721 细胞体外增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Inhibitory effect of JCCI on the *in vitro* proliferation of SMCC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{490}	抑制率/%
对照	0	0.697 ± 0.017	
JCCI	100	$0.531 \pm 0.034^{**}$	24
	250	$0.389 \pm 0.029^{**}$	44
	500	$0.195 \pm 0.025^{**}$	72

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$ $^{**}P < 0.01$ vs control group药 36 h 后的 IC_{50} 为 $260.52 \mu\text{g/mL}$ 。

图 4 为 $500 \mu\text{g/mL}$ JCCI 给药 36 h 的细胞形态。JCCI 给药组细胞贴壁面积收缩减少, 细胞核固缩, 细胞质粗糙, 核分裂较少, 细胞数量与对照相比显著减少, 大量细胞悬浮死亡。而对照组细胞外部形态正常, 贴壁生长良好。

A-对照 B-JCCI 处理
A-control B-JCCI treatment图 4 JCCI 对 SMCC-7721 细胞增殖与外部形态的影响 ($\times 100$)Fig 4 Influence of JCCI on SMCC-7721 cell shape ($\times 100$)

3.6 JCCI 对 SMCC-7721 细胞体内增殖抑制作用

以 5-Fu 为阳性对照药物, 以瘤周 sc 方式给药, JCCI 对 SMCC-7721 移植瘤生长影响结果见表 5。JCCI 能够明显抑制 SMCC-7721 移植瘤细胞生长, 抑制活性呈现剂量依赖性。与对照组相比, JCCI 低剂量组的抑瘤率有所降低, 但无差异显著性, JCCI 中、高剂量组和阳性药物组的抑瘤率显著高于对照组。JCCI 中剂量组与 5-Fu 组相比抑瘤率无显著差异, 但 JCCI 高剂量组的抑瘤率显著高于 5-Fu 组。JCCI 各剂量组对裸鼠脾脏指数影响差异不显著。

4 讨论

僵蚕在中医临床上具有熄风、祛风之功效^[1]。中医理论认为“内风”善行数变是引起肝癌转移的关键病机之一, 并有相关“风药”抗肿瘤作用的报道^[23-25]。尽管僵蚕抗肿瘤物质基础与作用机制已有诸多研究^[2-10], 但有关僵蚕抗肿瘤活性蛋白的研究

表 5 JCCI 对 SMCC-7721 荷瘤裸鼠肿瘤质量和脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Tumor inhibition rate of JCCI on SMCC-7721 cells in tumor-bearing mice and the spleen coefficient ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%	脾脏指数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照	0	0.38 ± 0.19	0	5.27
5-Fu	20.0	$0.29 \pm 0.16^*$	23.68	5.18
JCCI	12.5	0.35 ± 0.14	9.68	5.36
	25.0	$0.27 \pm 0.11^*$	31.43	5.63
	50.0	$0.23 \pm 0.09^{* \#}$	55.56 [#]	5.44

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与阳性药物组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^*P < 0.05$ vs control group $^{\#}P < 0.05$ vs positive drug group

未见报道。本课题组在前期研究中分离得到一种具有家蚕溶茧酶抑制活性的僵蚕蛋白组分, 推测该组分与僵蚕的抗肿瘤活性密切相关。为此, 本研究进一步应用以溶茧酶为配体的亲和色谱、Sephadex G-50 凝胶过滤色谱, 以及 FPLC 技术, 从僵蚕粗蛋白的 85% 硫酸氨沉淀物中纯化出 JCCI, 纯化的 JCCI 经 SDS-PAGE 检测显示单一条带, FPLC 呈单一对称的色谱主峰, 进一步对 JCCI 做了抑制活性动力学分析, 观测了 JCCI 对 SMCC-7721 细胞的体内、外增殖的影响, 旨在为中药僵蚕抗肿瘤临床应用与抗肝癌新药研发奠定基础。

以溶茧酶为配体的亲和色谱是 JCCI 分离纯化的技术核心, 亲和配体源自家蚕蛾在羽化过程中合成分泌的一种丝氨酸蛋白酶—溶茧酶, 纯化的 JCCI 属于一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。在亲和色谱过程中, 需先将上样后的色谱柱在 37°C 条件下保温处理 1~1.5 h, 以水解去除与亲和配体非特异性结合的底物蛋白, 然后再用 1 mol/L NaCl 溶液洗柱, 以洗掉绝大部分与凝胶介质非特异性结合的杂蛋白, 最后用 pH 2~3 的盐酸溶液洗柱, 获得含少量杂质的 JCCI。在 Sephadex G-50 凝胶过滤色谱过程中, JCCI 的活性主峰位于 20~25 号收集管, 但在主峰前面有一小的杂蛋白峰与主峰未完全分开, 为保证 JCCI 的纯度可在收集过程中仅将 23~25 号管的收集液合并, 用于下一步的 FPLC 分析。应用 ABI-491A 氨基酸测序仪以 Edman 降解法测序对样品蛋白纯度要求很高, 为确保测序成功, 将 FPLC 主峰收集液经 PAGE 电泳后进一步电转膜, 剪下 PVDF 膜上的主带用于测序分析, 测得 JCCI 的 N 端前 10 个氨基酸序列为“VRNKRQSNDD”。

蛋白质 N 端 5~10 个氨基酸序列通常是其特征性标签序列。根据应用 BLASTp 程序检索 nr 数据库的同源性比较结果和系统发育树, JCCI 与一种家蚕蛾蛋白酶抑制剂前体 (NP_001040294.1) 高度同源, NP_001040294.1 的 21~30 位氨基酸序列与 JCCI 的 1~10 位序列完全相同。根据 Suetsugu 等^[26]对家蚕大规模全长 cDNA 测序结果, NP_001040294.1 全长含 148 个氨基酸残基, 但从第 21 位氨基酸残基开始计算的相对分子质量与 JCCI 的飞行时间质谱测定的相对分子质量完全相同, 均为 13 973.63。由此判断 JCCI 是家蚕 NP_001040294.1 蛋白缺失了 N 端 20 个氨基酸残基的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 该抑制剂含 128 个氨基酸残基, 等电点为 8.01。本研究从中药僵蚕中分离纯化出 JCCI 属首次报道。

JCCI 对 SMCC-7721 细胞体外增殖与荷瘤裸鼠的肿瘤生长具有显著抑制作用, 抑制率呈线性剂量效应。因此, JCCI 是僵蚕中一种具有抗肿瘤活性的丝氨酸蛋白酶抑制剂。肿瘤细胞外基质屏障的降解是肿瘤细胞生长和浸润过程中的关键环节, 它与基质中丝氨酸蛋白酶活性密切相关^[15], 而人肝癌细胞存在丝氨酸蛋白酶抑制剂受体, 能够调节基质丝氨酸蛋白酶的活性, 抑制蛋白酶对基质蛋白的分解作用^[15]。由此推测, JCCI 可能与 SMCC-7721 胞膜外侧的丝氨酸蛋白酶抑制剂受体结合, 抑制基质蛋白酶活性, 通过阻断细胞外基质屏障的降解, 影响肿瘤细胞的浸润扩散过程, 从而发挥对 SMCC-7721 细胞体内外生长的抑制作用。

JCCI 在体内外对 SMCC-7721 细胞增殖抑制作用显示了良好的抗肿瘤药物研发前景。但 JCCI 能否直接抑制与阻断 SMCC-7721 的转移与侵袭及其作用靶点与机制尚需进一步明确。本研究下一步将设计合成兼并引物以完成 JCCI 的 cDNA 序列克隆与表达, 研究 JCCI 对肿瘤相关信号通路的影响, 以深入探讨其抗肿瘤作用机制, 为论证 JCCI 抗肿瘤相关临床应用研发的可行性奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 375
- [2] 王居祥, 朱超林, 戴虹. 僵蚕及僵蛹的药理研究与临床应用 [J]. 时珍国医国药, 1999, 10(8): 637-639.
- [3] 李军德, 姜凤梧. 我国抗癌动物药概述 [J]. 中成药, 1992, 14(2): 40-42.
- [4] Jiang X, Zhang Z F, Chen Y J, et al. Structural elucidation

and *in vitro* antitumor activity of a novel oligosaccharide from *Bombyx batryticatus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 103: 434-441.

- [5] Cho H D, Min H J, Won Y S, et al. Solid state fermentation process with *Aspergillus kawachii* enhances the cancer-suppressive potential of silkworm larva in hepatocellular carcinoma cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 241.
- [6] Yuan L Y, Bing Z T, Han J N, et al. Study on the anti-tumor mechanism related to immune microenvironment of *Bombyx Batryticatus* on viral and non-viral infections of hepatocellular carcinoma [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2020, 124: 109838.
- [7] Wu W P, Cao J, Wu J Y, et al. Anticancer activity of *Bombyx batryticatus* ethanol extract against the human tumor cell line HeLa [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(1): 79-88.
- [8] 程杏安, 蒋旭红, 刘展眉, 等. 僵蚕七种化学成分抗肿瘤活性的初步研究 [J]. 仲恺农业工程学院学报, 2015, 28(4): 35-39.
- [9] Jiang L, Wang Y J, Zhao J, et al. Direct tumor killing and immunotherapy through anti-SerpinB9 therapy [J]. *Cell*, 2020, 183(5): 1219-1233.e18.
- [10] Wang L, Cao X Y, Li B M, et al. Function of serine protease inhibitor in tumor cell migration [J]. *Chin J Immunology*, 2019, 6(12): 1518-1523.
- [11] Peng S, Du T, Wu W, et al. Decreased expression of serine protease inhibitor family G1 (SERPING1) in prostate cancer can help distinguish high-risk prostate cancer and predicts malignant progression [J]. *Urol Oncol*, 2018, 36(8): 366.e1-366.e9.
- [12] Mehner C, Oberg A L, Kalli K R, et al. Serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) drives proliferation and anoikis resistance in a subset of ovarian cancers [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35737-35754.
- [13] Takahashi H, Funahashi H, Sawai H, et al. Synthetic serine protease inhibitor, gabexate mesilate, prevents nuclear factor-kappaB activation and increases TNF-alpha-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(10): 2646-2652.
- [14] Maass N, Hojo T, Zhang M, et al. Maspin: a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer [J]. *Acta Oncol*, 2000, 39(8): 931-934.
- [15] 李夏, 曾名勇, 董士远, 等. 胰蛋白酶抑制剂及其抗肿瘤活性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(4): 163-166.
- [16] 田启航, 李杰. 基于细胞焦亡探讨中医药干预肿瘤炎性微环境的新机制 [J]. 世界中医药, 2020, 15(12): 1814-1818.

- [17] Ying H Y, Gong C J, Feng Y, *et al.* Serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) downregulates E-cadherin and induces EMT of hepatoma cells to promote hepatocellular carcinoma metastasis via the MEK/ERK signaling pathway [J]. *J Dig Dis*, 2017, 18(6): 349-358.
- [18] Ge K K, Huang J J, Wang W, *et al.* Serine protease inhibitor kazal-type 6 inhibits tumorigenesis of human hepatocellular carcinoma cells via its extracellular action [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5965-5975.
- [19] 王厚伟. 家蚕蛾溶茧酶的分离纯化及其基因克隆与表达 [D]. 成都: 四川农业大学, 2005.
- [20] Loewenberg J R. Cyanide and the determination of protein with the Folin phenol reagent [J]. *Anal Biochem*, 1967, 19(1): 95-97.
- [21] Al-Tubuly A A. SDS-PAGE and western blotting [J]. *Methods Mol Med*, 2000, 40: 391-405.
- [22] Edman P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides [J]. *Arch Biochem*, 1949, 22(3): 475.
- [23] 赵海燕, 李静益. 连建伟运用风药治疗消化系统肿瘤经验 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2019, 29(5): 349-351.
- [24] Xia M J, Yang F M, Zhao C, *et al.* Discussion on wind-drugs in the treatment of tumor [J]. *J Traditional Chin Medicine*, 2017, 58(2): 115-118.
- [25] Li Y Y, Xiao B Y, He Y H. Research progress on anti-tumor effect of wind medicine [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2011, 36(23): 3375-3379.
- [26] Suetsugu Y, Futahashi R, Kanamori H, *et al.* Large scale full-length cDNA sequencing reveals a unique genomic landscape in a lepidopteran model insect, *Bombyx mori* [J]. *G3 Genes genomes genetics*, 2013, 3(9): 1481-1492.

[责任编辑 王文倩]