

苦石莲蛋白分离纯化及抗肿瘤作用探讨

李 涛¹, 余旭亚¹, 陈云俐²

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224; 2. 昆明理工大学 实验室管理处, 云南 昆明 650093)

摘要: 运用硫酸铵分级沉淀、阳离子交换和凝胶层析等方法, 分离、纯化得到了一种苦石莲蛋白, 其分子量约为 29.64kD. 采用 MTT 法考察了其抗肿瘤作用. 结果表明, 苦石莲蛋白对小鼠黑色素瘤细胞 (B16) 的体外增殖有明显抑制作用, 呈现出明显的量 - 效关系和时 - 效关系. 作用 48 h, 该蛋白对 B16 细胞的半抑制浓度 (IC₅₀) 约为 136 μg/mL.

关键词: 苦石莲; 分离纯化; 肿瘤细胞; 生长抑制

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1007 - 855X(2008)06 - 0091 - 03

Primary Study on Proteins Isolation and Purification from *Caesalpinia M inax* Hance and Its Anti-Tumor Effect

LI Tao¹, YU Xu-ya¹, CHEN Yun-li²

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China;

2. Laboratory Management Office, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China)

Abstract: The *Caesalpinia m inax* Hance protein (molecular weight being 29.64 kD) is obtained by isolating and purifying steps of protein precipitation with ammonium sulfate, cationic exchanging chromatography and gel filtration. MTT is adopted to inspect its anti-tumor effect. It is shown through the results that the protein of *Caesalpinia m inax* Hance has a perfect inhibition effect on the proliferation of mouse melanoma cells (B16 cells), which presents an obvious quantity-effect relationship and time-effect relationship. Within 48 hours, the protein has an IC₅₀ about 136 μg/mL on B16 cells.

Key words: *Caesalpinia m inax* Hance; isolation and purification; tumor cell; inhibition of growth

0 引言

近年来,天然抗肿瘤活性成分的研究方兴未艾,许多从植物中提取的活性蛋白相继报道.苦石莲,拉丁文:*Caesalpinia m inax* Hance,别名南蛇勒,喙果云实,老鸦枕头,打鬼棒;生长于山坡林中或灌木中,主要分布在西双版纳、德宏州一带,当地居民用其根、嫩叶、籽入药,具有解热祛风、消肿散结的功效^[1].其粗提物被用于治疗皮肤病,但对其药理作用机制研究甚少.

目前,对该植物的研究主要集中在生物小分子部分, Ren Wang - Jiang 等人从中分离了二萜类化合物、呋喃二萜内酯、三萜酮,并对其抗病毒活性及其结构进行了研究^[2-5].除此之外,对苦石莲抗肿瘤活性蛋白的研究国内外少见报道.

本研究利用从苦石莲籽中分离纯化出的一个蛋白质,通过体外实验,以小鼠黑色素瘤细胞 (B16) 为研究对象,考察该蛋白对肿瘤细胞的增殖抑制作用.

1 材料

苦石莲籽购自云南德宏州; CM - Sephadex C - 25, Sephadex G - 75 凝胶和蛋白质相对分子量标准,

收稿日期: 2008 - 04 - 06 基金项目: 昆明理工大学青年基金资助项目 (项目编号: 校青 2006 - 76).

第一作者简介: 李涛 (1970 -), 男, 硕士, 高级实验师. 主要研究方向: 生物资源开发. E - mail: litao0316@sina.com

Pharmacia 公司; RPM II640 培养基, 小牛血清 (FCS), 购自 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 胰蛋白酶, 购自 BB I 公司; 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

快速蛋白分离系统 (AKTA FPLC), 瑞典 Amersham Pharmacia 公司; 二氧化碳培养箱 (Thermo Forma 3110 型), 美国; 倒置显微镜 (Nikon TE2000 型), 日本; 紫外分光光度计 (UV - 1700); 酶标仪 (Power Wave X); 离心机 (Beckman), 美国; 96 孔培养板, Costar 公司, 美国。

2 方法

2.1 苦石莲蛋白的分离纯化

将苦石莲籽去壳取仁, 研细, 加 0.02 M 磷酸盐缓冲液 (含 0.1 mM EDTA 和 0.2 M NaCl, pH 7.0) [1 10 (w/v)], 4 ℃ 浸泡过夜。次日匀浆后, 用磁力搅拌器搅拌, 4 ℃ 浸提 24 h 离心, 小心刮去上层油脂, 过滤弃残渣, 收集上清液加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 60% 饱和度, 静置 4 h 后, 离心收集沉淀。在离心后的上清液中再加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 90% 饱和度, 4 ℃ 静置过夜。离心, 收集沉淀。将沉淀溶于尽可能少的磷酸盐缓冲液中, 装入透析袋 (能截留蛋白质分子量 10 kD 以上) 中, 用同一缓冲液进行透析除盐 (磁力搅拌, 4 ℃), 每隔 3 ~ 4 小时更换缓冲液, 透析 48 h, 用 10% 氯化钡检测透析液, 无白色沉淀产生即可。取出透析过的溶液, 离心弃去沉淀, 上清即为蛋白质粗提液。浓缩后置冰箱冷冻备用。将粗蛋白经离子交换 CM - Sephadex C - 25 去除部分杂蛋白, 收集洗脱峰, 过葡聚糖凝胶 Sephadex G - 75 柱进一步纯化, 采用活性跟踪法, 确定活性峰, 收集冻干, 即得苦石莲蛋白。

2.2 SDS - PAGE 凝胶电泳

用 15% 的 SDS - PAGE 凝胶电泳检测得到的苦石莲蛋白的纯度。当分子量在 15 kD 到 200 kD 之间时, 蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系, 以标准蛋白的迁移率对分子量对数作图得一标准曲线, 据此可测出苦石莲蛋白的相对分子量 M_r 。

2.3 蛋白质浓度测定

苦石莲蛋白的浓度测定采用考马斯亮蓝染色法^[6], 以牛血清白蛋白作标准。

2.4 细胞培养

培养基为 RPM II640, 其中含 10% 小牛血清 (FCS), 细胞系置于 37 ℃, 5% CO_2 , 饱和湿度环境的培养箱中培养。

2.5 苦石莲蛋白对体外培养小鼠黑色素瘤细胞 (B16) 增殖的抑制作用

按照改进过的文献 [7] 的方法进行。将处于对数生长期的细胞按 5×10^4 个 / mL 接入 96 孔板, 培养 24 h, 加入不同浓度的苦石莲蛋白 (终浓度为 2.4, 4.75, 9.5, 19, 37.5, 75, 150, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。对照组加入同浓度 PBS, 培养 48 h 后, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL , 继续培养 4 h, 弃除孔中培养液, 加 170 μL 二甲亚砜 (DMSO) 充分溶解蓝色结晶, 在 490 nm 波长下检测各孔的光吸收值, 实验重复 6 次。

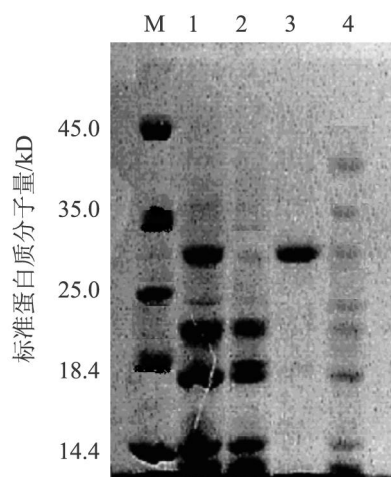
2.6 实验数据处理

所有结果以平均值 \pm 标准差表示, n 为实验次数, 用 student - t 检验两组数据之间的显著性差异, 当 $P < 0.05$ 时, 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 苦石莲蛋白的分离和纯化

结果如图 1 所示, SDS - PAGE 电泳图谱显示为单一条



M—标准蛋白Mark;
1—苦石莲蛋白粗提物(硫酸铵饱和度60%~90%);
2—苦石莲蛋白粗提物(硫酸铵饱和度30%~60%);
3—G-75纯化后的苦石莲蛋白;
4—苦石莲初提蛋白。

图1 SDS-PAGE凝胶电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis diagram

带,达到电泳纯.经计算其相对分子量约为 29.64 kD.

3.2 苦石莲蛋白对 B16细胞的量效作用

为了研究苦石莲蛋白对肿瘤细胞的量效作用,测定了不同蛋白浓度对 B16 细胞作用 48 h 的生长抑制曲线,如图 2 所示.结果显示,该蛋白能明显抑制小鼠黑色素瘤细胞 B16 细胞系的体外增殖,且随着浓度的增加,其对细胞的生长抑制作用越强烈,具有明显的量效关系.作用 48 h,其半抑制浓度 IC_{50} 约为 136 $\mu\text{g/mL}$.

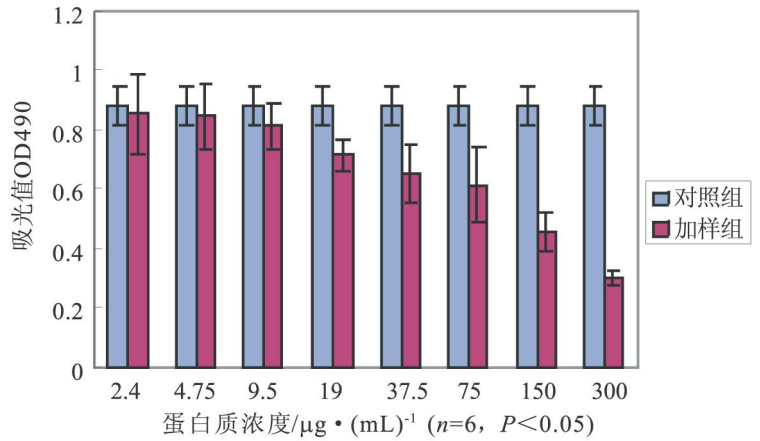


图2 不同蛋白浓度对B16细胞生长抑制的影响(48h)

Fig.2 Different effects on the proliferation inhibition of B16 cells brought by different protein concentration (48h)

3.3 苦石莲蛋白对 B16细胞的时效作用

为了研究苦石莲蛋白的时效作用,测定了蛋白浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 对 B16 细胞作用 72 h 的生长抑制曲线,如图 3 所示.从图中可以看到该蛋白抑制 B16 细胞的体外增殖的作用明显,在 150 $\mu\text{g/mL}$ 浓度作用情况下,B16细胞的增殖几乎处于停顿,72 h的抑制率为 88.91%.

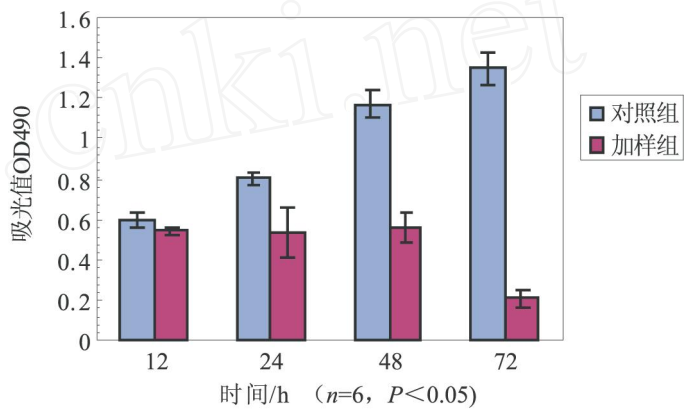


图3 苦石莲蛋白对B16细胞生长抑制的时效作用

Fig.3 Time-effect protein in *Caesalpinia minax* Hance on the proliferation inhibition of B16 cells

4 结 论

1)利用 CM - Sephadex C25和 Sephadex G - 75层析柱,通过浸提、盐析、离子交换、凝胶过滤层析等实验手段从苏木科植物苦石莲籽中分离纯化得到一个较高纯度的苦石莲蛋白,该蛋白经 SDS - PAGE电泳检测呈单一条带,其分子量约为 29.64 kD.

2)苦石莲蛋白在一定浓度下可以显著抑制小鼠黑色素瘤细胞 (B16细胞)的增殖活性,且呈现出明显的量 - 效关系和时 - 效关系.随蛋白质浓度的增加,对细胞的增殖抑制作用明显加强.作用 48 h,对 B16细胞的半抑制浓度 IC_{50} 约为 136 $\mu\text{g/mL}$.

3)苦石莲蛋白抑制细胞增殖的能力随着时间的延长而增强,在 150 $\mu\text{g/mL}$ 浓度作用 72 h情况下,细胞的增殖几乎处于停顿,对 B16细胞的抑制率约为 88.91%.

苦石莲蛋白对小鼠黑色素瘤细胞具有明显增殖抑制作用的结果表明,苦石莲可作为一种抗肿瘤药物资源进行开发,该蛋白对其它肿瘤细胞的增殖抑制作用及机制有待于进一步研究.

参考文献:

[1] 余旭亚,李涛,汪帅,等.南蛇勒提取物抑菌作用研究[J].昆明理工大学学报(理工版),2006,31(3):69-71.

[2] Ren Wang - Jiang, Paul Pui - Hay But, Shuang - Cheng Ma, et al Structure and antiviral properties of macrocaesalmin, a novel cassane furanoditepenoid lactone from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance[J]. Tetrahedron Letters, 2002, 43: 2415 - 2418.

(下转第 97页)

道的用昂贵的 ABTS 及 2,5 - 二甲苯胺作为诱导剂^[7],蔗渣的诱导效果更具有工业化应用的优势。

食用菌 XG8 菌株自身的产漆酶能力不及目前报道的朱红密孔菌 (*Pycnoporus cinnabarinus*)、毛栓菌 (*Trametes trogii*)^[8]等,但其添加蔗渣、乙醇及硫酸铜后,漆酶诱导效果显著,本研究结果可为新型漆酶诱导物的开发提供一个新的思路。利用蔗渣诱导漆酶的产生将有利于漆酶降解蔗渣中所含的大量木素分子,从而将被木素分子粘连的蔗渣纤维相互分离,实现了蔗渣的脱木素处理,对蔗渣造纸工业有重要的应用价值。

4 结 论

本试验选用木素、蔗渣、乙醇及不同铜离子浓度对食用菌 XG8 菌株的产漆酶能力进行诱导研究,结果表明蔗渣的诱导效果最明显,当利用蔗渣、乙醇及硫酸铜同时进行诱导时,漆酶活性与对照相比,酶活性提高了 10 倍。

参考文献:

- [1] 李丹,段舜山,侯红漫,等. 白腐菌对木质素降解能力的测定 [J]. 生态科学, 2002, 21 (4): 346 - 347.
- [2] 魏建华,宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展 [J]. 植物学报, 2001, 43 (8): 771 - 779.
- [3] Juan CM, Anne L, Laurence C, et al. Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar - cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (10): 3365 - 3371.
- [4] 赵敏,钱程. 白腐菌木素氧化酶系的检测及其漆酶诱导产生的研究 [J]. 中国造纸学报, 2005, 20 (2): 101 - 105.
- [5] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [6] Hublik G, Schinner F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants [J]. *Enzyme and Microbiol Technol*, 2000, 27 (3 - 5): 330 - 336.
- [7] Madhavi S, Revankar S. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR - 1 [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41 (3): 581 - 588.
- [8] 王宜磊. 毛栓菌漆酶诱导及其部分特性研究 [J]. 生物技术, 2003, 13 (3): 14 - 16.

(上接第 93 页)

- [3] Ren Wang - Jiang, Shuang - Cheng Ma, Zhen - Dan He, et al. Molecular structures and antiviral activities of naturally occurring and modified cassane furanoditerpenoids and friedelane triterpenoids from *Caesalpinia minax* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, (10): 2161 - 2170.
- [4] Ren Wang - Jiang, Paul P H But, Shuang - Cheng Ma, et al. Furanoditerpenoid lactones from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57: 517 - 521.
- [5] Ren Wang - Jiang, Shuang - Cheng Ma, Paul P H But, et al. Isolation and characterization of spirocaesamin, novel rearranged vouacapane diterpenoid from *Caesalpinia minax* Hance [J]. *Chem. Soc., Perkin Trans*, 2001, (1): 2920 - 2923.
- [6] 李建武,余瑞元,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1997.
- [7] Saszi T, Kudoh K, Uda Y, et al. Effect of isothiocyanates on growth and metastaticity of B16 - F10 melanoma cells [J]. *Nutr Cancer*, 1999, 33: 76 - 81.