

螺旋藻水解肽的制备及其抗肿瘤活性研究

王竹君, 张学武

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以螺旋藻为原料, 在反复冻融、均质和超声联用的基础上, 比较了盐提和水提两种不同方式的蛋白提取率, 并以水提螺旋藻蛋白为原料, 利用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶分别进行单酶解、双酶解以及体外模拟胃肠道消化的三酶解, 得到6种酶解肽。水解度及脱色前后的抗肿瘤活性鉴定结果表明, 水解度与抗肿瘤活性无直接相关性, 而脱色会降低酶解组分的抗肿瘤活性。对5种活性显著的酶解肽进行超滤, 得到9个对乳腺癌和肝癌细胞株的体外生长均有显著抑制作用的组分, 并对其中的碱性蛋白酶0~3 K组分进行Sephadex G-15分离纯化, 得到对MCF-7和HepG-2均有较强抑制作用的组分A3, 其 IC_{50} 值分别为64.59 $\mu\text{g/mL}$ 和61.65 $\mu\text{g/mL}$; 得到对HepG-2具有较强选择性抑制作用的组分A1, A4和A5, 其 IC_{50} 值分别为47.67 $\mu\text{g/mL}$ 、79.44 $\mu\text{g/mL}$ 和69.54 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究成果对以螺旋藻为原料的药品和保健食品的开发提供了理论基础。

关键词: 钝顶螺旋藻; 肽; 抗肿瘤活性; 酶解; 分离纯化

文章编号: 1673-9078(2015)11-25-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.005

Preparation of Bioactive Peptides Derived from *Spirulina platensis* and Their Anti-tumor Activities

WANG Zhu-jun, ZHANG Xue-wu

(South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Based on the combination of repeated freeze-thaw cycles, homogenization, and ultrasonic-extraction, the extraction rate between salt-extraction and water-extraction of *Spirulina* proteins was compared. Taking water-extracted *Spirulina* proteins as the raw material, six types of *Spirulina* proteolytic peptides were obtained through enzymolysis of *Spirulina* proteins using trypsin, chymotrypsin, pepsin, alkaline protease, and papain individually, using alkaline protease and papain together, and using trypsin, pepsin, and chymotrypsin to simulate the digestive processes of the gastrointestinal tract *in vitro*. Results of the degree of hydrolysis and anti-proliferation effects before and after decolorization suggested that there was no direct correlation between the degree of hydrolysis and the anti-proliferation effects. In addition, decolorization was found to lower the anti-tumor activity of hydrolytic components. Therefore, five types of proteolytic peptides with good anti-proliferation effects were used for ultrafiltration, providing nine components that could significantly inhibit the growth of both MCF-7 and HepG-2 *in vitro*. Then, the 0~3 K component of alkaline protease was isolated and purified using a Sephadex G-15 column to obtain the A3 component, which had a strong anti-proliferation effect on MCF-7 and HepG-2 cells, showing IC_{50} values of 64.59 $\mu\text{g/mL}$ and 61.65 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Additionally, another three components, A1, A4, and A5, were obtained, which had strong selective anti-proliferation effects on HepG-2 cells, with IC_{50} values of 47.67 $\mu\text{g/mL}$, 79.44 $\mu\text{g/mL}$, and 69.54 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These results provide a theoretical basis for the development of new drugs and health foods using *Spirulina platensis* as raw materials.

Key words: *Spirulina platensis*; peptide; anti-proliferation activity; enzymatic hydrolysis; isolation and purification

生物活性肽是对机体的功能或状态具有积极作用并最终影响机体健康的特殊蛋白质片段, 通常由3~20个氨基酸组成。相较于蛋白质而言, 小分子肽片段的优越性主要体现在: 更易被人体吸收利用; 活性

收稿日期: 2015-01-09

基金项目: 国家863项目子课题(2014AA022004)

作者简介: 王竹君(1989-), 女, 硕士, 主要从事抗肿瘤功能食品研究

通讯作者: 张学武(1963-), 男, 博士, 博导, 主要从事抗肿瘤功能食品研究

究

高, 在较小浓度下即可发挥其特有的生理作用; 分子量小, 易于修饰和改造, 能够通过人工化学合成等。而相较于单一的氨基酸而言, 小分子肽的优越性则体现在以下三个方面: 1.具有特殊的生理活性; 2.吸收通道: 人体摄入的蛋白质经过多种消化酶的水解, 主要以2~7个氨基酸组成的寡肽形式被吸收, 而人体小肠中存在专门的低聚肽吸收通道; 3.吸收速度: 已有研究表明, 人体中二肽和三肽的吸收速度比同组成的氨基酸更快^[1~5]。

海洋环境复杂多变,其高盐、高压、低温、寡营养等独特条件赋予了海洋生物某些优良的特性。许多研究表明,生物活性肽,尤其是海洋来源的生物活性肽具有抗氧化、抗肿瘤、抑菌、降压、降血糖等多种作用。而近年来,海洋来源的天然生物抗肿瘤肽也取得一定的进展,成为抗肿瘤药物和保健品开发的重要来源^[6,7]。

螺旋藻(*Spirulina*)被世界卫生组织认定为是世界上最优质的超级食品之一,其蛋白质含量高达60~70%,由18种氨基酸组成,包含人体全部8种必需氨基酸,且配比合理^[5,8]。其丰富的蛋白质为开发螺旋藻生物活性肽提供了良好的物质基础。利用酶解手段将螺旋藻蛋白进行非变性水解,不仅能提高螺旋藻蛋白的溶解性和体内吸收利用率,还能获取具有特殊生理功能的生物活性肽。目前已有报道从螺旋藻蛋白酶解物中成功提取到抗氧化肽、ACE抑制肽、抑菌肽等,但抗肿瘤肽的研究尚处于初级阶段^[9]。本文以MTT实验作为抗肿瘤活性的评价指标,通过酶解、超滤、凝胶色谱分离技术,筛选得到多个抗肿瘤活性肽组分,为进一步开发螺旋藻的食用和药用价值提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

螺旋藻粉(钝顶螺旋藻),由鄂尔多斯市绿肽源螺旋藻业有限公司提供;乳腺癌细胞MCF-7和肝癌细胞HepG-2,购于中山大学动物细胞实验室;碱性蛋白酶Alcalase 2.4L, Bio-Rad Assay试剂盒, MTT, 美国Sigma公司;胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶,广州齐云生物科技有限公司; Sephadex G-15, 美国GE公司;高糖DMEM完全培养基,胎牛血清,青霉素,链霉素, PBS, 美国Gibco公司;胰蛋白酶-EDTA消化酶, DMSO, 美国Bio Basic Unit公司;5-氟尿嘧啶,上海汉博生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

KDY-9820 凯氏定氮仪,德国Gerhardt公司; MBL50 均质仪,美国Morgec公司; Scientz-IIID型超声波破碎机,宁波新芝; 5415R 高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司; Sunrise 酶联免疫检测仪,奥地利TECAN公司; MCO-17AC型CO₂培养箱, MDF-382E型超低温冰箱,日本Sanyo公司;生物安全柜,上海金鹏分析仪器有限公司; UV 2300 紫外-可见分光光度

计,日本岛津公司;倒置显微镜, Olympus公司;超纯水仪, Millipore公司;自动部分收集器,上海嘉鹏科技有限公司;恒流泵,层析柱,广州精科科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

为筛选得到具有抗肿瘤活性的螺旋藻多肽,本实验主要分为螺旋藻多肽的分离制备和体外抗肿瘤活性的筛选两大主线。其中,体外抗肿瘤活性的筛选以MTT实验作为评价指标,贯穿螺旋藻多肽分离制备的全程。具体实验技术路线如下所示:



1.3.1 蛋白提取

盐提盐析:准确称取50g螺旋藻粉,液氮充分研磨后,按1:20的料液比将其溶于pH 6.8的PBS溶液中,常温下磁力搅拌30min。待其全部溶解后置于-20℃冰箱中冷冻4h,再置于37℃水浴中解冻,如此反复冻融三次。采用均质机均质2min(转速为5000 r/min 30s→10000 r/min 1min→5000 r/min 30s)后,以570W的功率超声20min(每超声6s,间隔9s),使蛋白质进一步游离出来。均质和超声全程,样品均置于冰浴中,以避免操作过程中产生的热量使蛋白质变性。将获得的溶液于4℃,8000 r/min条件下离心30min,取上清液,并用pH 6.8的PBS溶液洗沉淀后合并上清液备用。取全部上清液缓慢添加(NH₄)₂SO₄至终浓度20%,4℃下过夜,然后4℃,8000 r/min离心30min,取上清液。继续将上清液缓慢添加(NH₄)₂SO₄至终浓度80%,4℃下过夜后以相同条件离心取沉淀。用10mmol/L, pH 6.8的PBS溶液复溶,即为所得蛋白液。取部分蛋白液用Bio-Rad Protein Assay法测定蛋白质含量,其他上清液迅速真空冷冻干燥,并于-20℃冰箱中保存备用。整个实验过程采用避光保护。

水提:准确称取50g螺旋藻粉,用液氮充分研磨后,按1:20的料液比将其溶于1L Milli-Q水中,常温下磁力搅拌30min。然后采用与盐提完全相同的条件进行反复冻融、均质和超声。将获得的溶液于4℃,8000 r/min条件下离心30min,去除沉淀获得蛋白上清液。取部分上清液采用Bio-Rad Protein Assay法测定蛋白质含量,其他上清液迅速真空冷冻干燥,并于-20℃冰箱中保存备用。整个实验过程采用避光保护。

蛋白质含量和蛋白质提取率计算公式如下所示:

$$\text{蛋白质含量 (\%)} = \frac{\text{蛋白质提取液的体积} \times \text{标准曲线上查得的浓度}}{\text{粗蛋白样品重量}} \times 100\%$$

$$\text{蛋白质提取率 (\%)} = \frac{\text{提取液中蛋白质的含量}}{\text{螺旋藻粉末中蛋白质的含量}} \times 100\%$$

1.3.2 酶解研究

每次酶解均取 3 g 蛋白, 用超纯水配置成浓度为 2% 的螺旋藻蛋白溶液, 参考文献^[10,11], 将其调节到相应蛋白酶所需的最适温度和 pH 值, 并分别加入碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶进行单一水解, 依次加入碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行双水解, 依次加入胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶进行体外胃肠道消化模拟三酶解。具体酶解条件见表 1。酶解过程中以标定的 0.05 mol/L NaOH 实时控制体系 pH 值, 使其在酶的最适 pH \pm 0.05 之内。水解 8 h 后, 95 °C 水浴灭酶 10 min, 室温冷却后将水解液在 8000 r/min 下离心 30 min, 取上清液。取部分上清液, 采用改进的 pH-state 法测定水解度, 其他部分迅速冷冻干燥, 保存备用。

表 1 酶解条件

Table 1 Enzymolysis conditions

酶	温度/°C	pH	酶底比/%	时间/h
胰蛋白酶	42	8.0	3	8
胃蛋白酶	37	2.0	6	8
碱性蛋白酶 Alcalase2.4L	50	8.5	5	8
木瓜蛋白酶	55	6.5	4	8

双酶解: 1.碱性蛋白酶	55	8.5	5	5
Alcalase2.4L; 2.木瓜蛋白酶	55	6.5	4	3

三酶解: 1.胃蛋白酶;	37	2.0	6	2
2.胰蛋白酶; 3.胰凝乳蛋白酶	37	8.0	3	3
	37	8.0	5	3

注: 双酶解和三酶解实验中, 任意两种酶的水解程序之间需经过 85 °C 灭酶操作, 调节条件至后一种酶的酶解条件后再添加后续酶种进行酶解。

1.3.3 脱色研究

取 60 mL 酶解液, 添加 1% 粉状活性炭, 在 pH 6.8, 55 °C 条件下水浴摇床震荡 20 min。脱色后于 4 °C, 8000 r/min 条件下离心 30 min, 并用滤纸和砂芯漏斗

$$\text{癌细胞生长抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) - (\text{OD}_{\text{给药}} - \text{OD}_{\text{空白}})}{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}})} \times 100$$

采用 Origin9.0, 计算各分离组分对两种癌细胞的半数抑制浓度 IC₅₀ 值。

1.3.6 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行分析统计, 数据采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行 t 检验分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

双重过滤, 以除去活性炭。滤液迅速冷冻干燥, 保存备用。

1.3.4 分离纯化

1.3.4.1 超滤

综合酶解和脱色研究的结果, 选取其中具有较强抗肿瘤活性的组分, 加超纯水复溶后, 分别用 10 k, 5 k 和 3 k 的超滤膜组件 (超滤压强为 0.22 MPa) 截留超滤, 使酶解液按分子量分为 0~3 kD、3 kD~5 kD、5 kD~10 kD 和大于 10 kD 的组分。各组分迅速冷冻干燥, 保存备用。

1.3.4.2 凝胶柱层析

填料为 Sephadex G-15 凝胶, 柱体积 185 mL, 上样量 150 mg (3 mL), 流动相为超纯水, 流速 0.4 mL/min, 每 8 min 收集一管, 共收集 160 管, 检测波长为 215 nm 和 280 nm。收集各组分并迅速冷冻干燥, 保存备用。

1.3.5 体外抗肿瘤活性实验

通过 MTT 比色法分析各多肽组分对肝癌细胞株 HepG-2 和乳腺癌细胞株 MCF-7 的生长抑制作用。具体操作步骤如下: 取对数生长期的细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 加入完全培养基制成单细胞悬液, 并通过血球平板计数将细胞悬液的浓度调整至 5×10^4 个/mL, 接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 于 37 °C 恒温 CO₂ 培养箱中培养; 24 h 后弃去旧培养液, 加入 200 μ L 含有不同浓度的提取物、分离产物和阳性对照 (5-氟尿嘧啶) 的新鲜培养基, 以 PBS (0.5% DMSO) 为阴性对照, 重复 5 次; 48 h 后吸出药液, 用 PBS 洗板 2 次, 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L 和新鲜培养基 180 μ L; 继续培养 4 h, 弃去含有 MTT 的培养液, 加入 150 μ L DMSO 后振荡 15 min, 490 nm 波长处测定光密度值并计算抑制率 (公式如下)。实验过程中, 所有样品、阳性对照、阴性对照以及空白均设置 5 个复孔。

2 结果与讨论

2.1 螺旋藻蛋白的提取

2.1.1 总氮含量的测定

通过凯式定氮法测定出原螺旋藻粉末中蛋白质含

量为 60.04%。

2.1.2 蛋白提取率

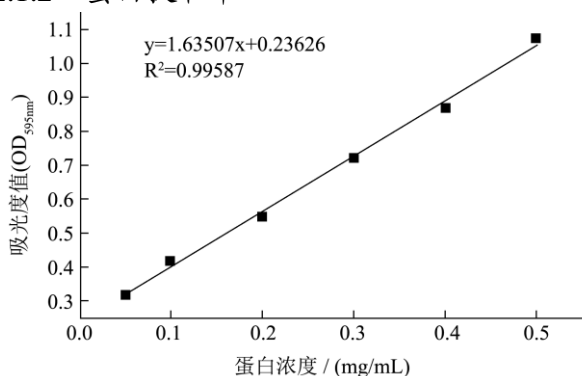


图 1 蛋白质标准曲线

Fig.1 Standard curve of the protein

表 2 水解度与抗肿瘤活性的差异显著性分析 (±s, n=5) (%)

Table 2 Results of the significance test of difference

酶解程序	水解度	抑制率		P (A, B, C)
		MCF-7	HepG-2	
胰蛋白酶	18.26±0.02	84.47±0.02	82.25±0.021	A**B**C
胃蛋白酶	6.07±0.01	69.89±0.01	68.73±0.02	A**B**C
碱性蛋白酶 Alcalase2.4L	24.39±0.01	92.50±0.01	91.07±0.01	A**B**C
木瓜蛋白酶	11.12±0.01	96.11±0.01	94.73±0.01	A**B**C
双酶解: 1.碱性蛋白酶 Alcalase2.4L; 2.木瓜蛋白酶	44.36±0.03	96.36±0.02	89.98±0.02	A**B**C
三酶解: 1.胃蛋白酶; 2.胰蛋 白酶; 3.胰凝乳蛋白酶	31.49±0.03	93.43±0.01	91.13±0.01	A**B**C

注: *表示P<0.05, 差异显著; **表示P<0.01, 差异极显著, 上标无*表示P>0.05, 无显著性差异。A表示水解度与对MCF-7的抑制作用相比; B表示水解度与对HepG-2的抑制作用相比; C表示对MCF-7和HepG-2两种细胞抑制作用之间的差异性分析。

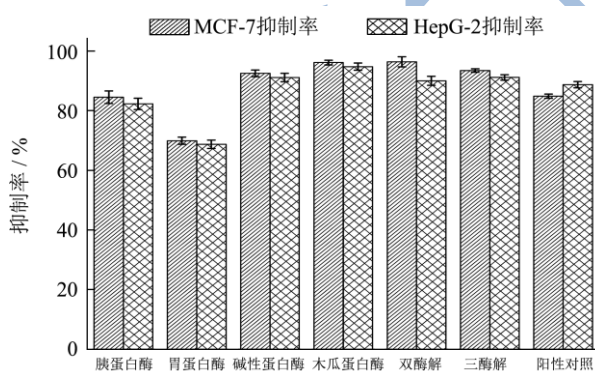


图 2 酶解组分对 MCF-7 和 HepG-2 细胞的体外抑制作用

Fig.2 Anti-proliferation effects of hydrolysis components on MCF-7 and HepG-2 in vitro

综合表 2 和图 2 数据可知, 在 500 μg/mL 浓度时, 各酶解组分对两种肿瘤细胞的体外生长均表现出了一定的抑制作用, 其中, 碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、双酶解和三酶解这 4 个酶解组分, 在 500 μg/mL 时, 对 MCF-7 和 HepG-2 的体外抑制作用均优于阳性对照 5-氟尿嘧啶, 即抑制率分别大于 84.87% 和 88.69%;; 胰

通过 Bio-Rad Protein Assay 方法测定提取的螺旋藻蛋白质含量的标准曲线如图 1 所示。

经计算, 盐提蛋白提取率为 80.37%, 水提的蛋白质提取率为 84.80%。但考虑到盐提过程中, 舍弃了 20% 盐析的杂蛋白, 而水提过程中则保留了螺旋藻的全蛋白, 故提取率水平相差不大。且由于水提的蛋白其复溶性优于盐提蛋白, 故选择水提蛋白作后续研究。

2.2 酶解物的水解度及其抗肿瘤活性测定

各酶解组分的水解度与其抗肿瘤活性的差异性分析结果见表 2, 各酶解组分与阳性药物 (浓度为 500 μg/mL 时) 对乳腺癌细胞株 MCF-7 和肝癌细胞株 HepG-2 两种肿瘤细胞的抑制效果见图 2。

蛋白酶的酶解组分与阳性对照的抗肿瘤活性相当但稍低于阳性对照; 而胃蛋白酶的酶解组分对上述两种肿瘤细胞的体外抑制作用较弱, 均显著低于阳性对照。

上述结果中, 利用胰蛋白酶、胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶联合酶解的三酶解, 较好地模拟了人体胃肠道消化系统, 其酶解产物对 MCF-7 和 HepG-2 的抑制率分别达到 94.43% 和 91.13%, 这提示了, 口服螺旋藻蛋白后, 经人体胃肠道消化, 可得到具有较强抗肿瘤活性的多肽, 表明螺旋藻作为抗肿瘤的保健食品具有广阔的开发前景和应用价值。

造成各酶解物抗肿瘤活性不同的原因可能归为以下三点: 1.酶切位点不同。不同的酶切位点暴露出不同的氨基酸序列, 端头处某些特定的氨基酸序列可能是影响抗肿瘤活性的主要因素。2.不同酶切位点的酶解产物对肿瘤细胞的体外抑制作用可能存在协同或竞争作用, 如: 单一的碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶的酶解物, 对 HepG-2 的抑制率分别为 91.07% 和 94.73%, 而当用两种酶联合酶解时, 该抑制率则下降到 89.98%。

3.酶解条件不同。如：用单一胃蛋白酶酶解时，长达 8 h 的强酸性环境可能会导致蛋白变性，而在三酶解中，该条件则仅持续 2 h。

由表 2 的差异性分析结果可知，同种酶解组分对两种不同的肿瘤细胞的体外抑制作用无显著性差异 ($P>0.05$)，但从数值结果来看，各酶解组分对 MCF-7 的抑制效果均略优于 HepG-2。各组分对 MCF-7 的抗肿瘤活性大小依次为：双酶解~木瓜蛋白酶>三酶解~碱性蛋白酶>胰蛋白酶>胃蛋白酶；对 HepG-2 的抗肿瘤活性大小依次为：木瓜蛋白酶>三酶解~碱性蛋白酶>双酶解>胰蛋白酶>胃蛋白酶。

目前已知的研究中，大多以酶解终点的水解度高低作为后续分离纯化的筛选条件，即选择水解度高的组分进行后续研究。但本文在测定水解度的基础上，又通过 MTT 实验进一步检测了其抗肿瘤活性，由表 2 的水解度与抗肿瘤活性的显著性差异分析可知，制备酶解肽时，水解度大小与抗肿瘤活性的高低无直接关系，差异极显著 ($P<0.01$)。因此，本文以 MTT 测定的抗肿瘤活性作为抗肿瘤活性肽制备和筛选的唯一条件。并根据各酶解物抗肿瘤活性的高低，舍弃活性相对较差的胃蛋白酶酶解物，对其余 5 种酶解组分进行后续的研究和筛选。

2.3 酶解物的脱色及其抗肿瘤活性测定

藻胆蛋白的多肽链是由脱辅基蛋白和开环四吡咯结构的色素通过硫醚键共价相连的，而酶解过程并不能确保将该硫醚键全部打开，故而可能会导致色素的部分残留。因此，为探究酶解后残存的色素对酶解肽抗肿瘤活性的影响，本文以胰蛋白酶酶解物为研究对象，通过 MTT 实验测定粉状活性炭脱色前后，酶解组分（浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时）对 MCF-7 和 HepG-2 的抑制效果，结果如图 3 所示。

由图可知，脱色后，胰蛋白酶酶解组分对两种肿瘤细胞的抑制效果明显下降，其中对 MCF-7 的抑制率降低了 20.34%，对 HepG-2 的抑制率降低了 18.98%，说明酶解肽中色素的有无或色素结构的完整性对肽组分的抗肿瘤活性有一定的影响。但脱色后的酶解肽在 500 $\mu\text{g/mL}$ 时对 MCF-7 和 HepG-2 的抑制率依然可达到 64.13% 和 63.27%，说明起主要抗肿瘤作用的是肽本身的结构和序列，而单独的色素是否同样具有一定的抗肿瘤活性还有待进一步的研究。这与 Bhat, Madyastha 以及唐学玺等人研究的结果相似：带有色基的别藻蓝蛋白与不带色素的重组脱辅基别藻蓝蛋白均具有一定的抗氧化活性，但带有色基的别藻蓝蛋白的抗氧化活性更强^[12,13]。因此，本文选取未脱色的酶

解组分，进行后续的分选纯化。

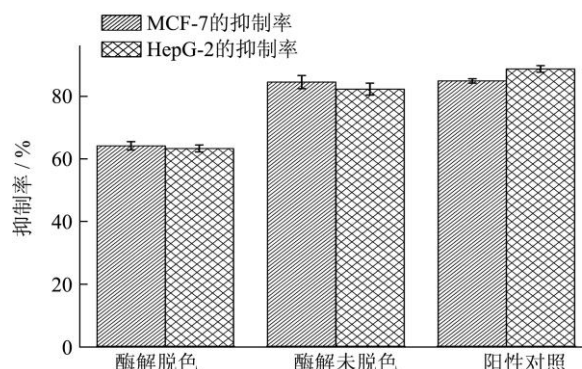


图 3 胰蛋白酶酶解组分脱色前后的体外抑制作用

Fig. 3 Anti-proliferation effects before and after decolorization of trypsin hydrolysis components on MCF-7 and HepG-2 *in vitro*

2.4 超滤组分及其抗肿瘤活性的测定

胰蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、双酶解以及三酶解的 5 种酶解组分分别过 10 k、5 k 和 3 k 的超滤膜截留，得到大于 10 k、5~10 k、3~5 k 和 0~3 k 的超滤组分共计 20 个，各组分（浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时）对 MCF-7 和 HepG-2 的体外抑制作用如图 4 和 5 所示。

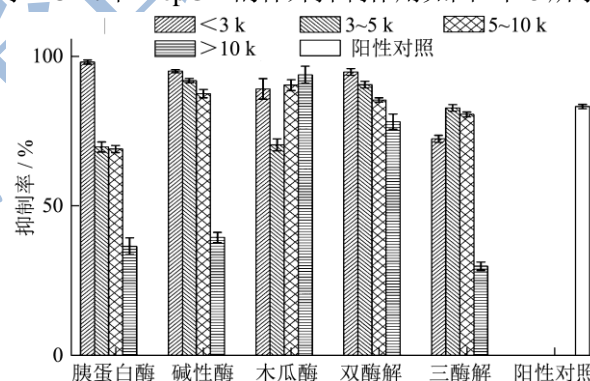


图 4 酶解物超滤组分对乳腺癌细胞的体外抑制作用

Fig.4 Anti-proliferation effects of ultrafiltration components on MCF-7 *in vitro*

由图 4 可知，在样品浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时，胰蛋白酶、碱性蛋白酶和三酶解酶解组分中大于 10 K 的组分对乳腺癌细胞株 MCF-7 的体外抑制作用较弱，细胞杀伤率不足 50%，除此之外的其他 17 个超滤组分均对 MCF-7 具有较强的体外抑制作用。特别地，0~3 k 的胰蛋白酶组分，0~3 k、3~5 k 和 5~10 k 的碱性蛋白酶组分，0~3 k、5~10 k 和大于 10 k 的木瓜蛋白酶组分，0~3 k、3~5 k 和 5~10 k 的双酶解组分以及 3~5 k 的三酶解组分对 MCF-7 的体外抑制作用优于阳性对照，细胞杀伤率均大于 83.08%，有显著的抗肿瘤活性。而从分子量角度分析，除木瓜蛋白酶外，其他酶解物的各超滤组分整体呈现出分子量越小，活性越强的趋

势规律,尤其是 0~3 K 的超滤组分,表现出较强的细胞抑制作用。这与目前大多数抗肿瘤水解肽的研究结果较为相似,即小分子肽的活性整体优于大分子量的肽组分。此外,短肽本身也具有分子量小、空间结构简单、易于人工合成、在提高肿瘤病灶用药浓度的同时能够降低用药剂量等优点,因而该结果提示了螺旋藻抗肿瘤肽在医药领域的研究价值。

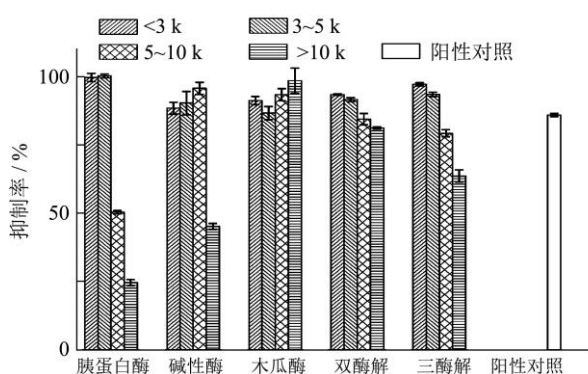


图 5 酶解物超滤组分对肝癌细胞的体外抑制作用

Fig.5 Anti-proliferation effects of ultrafiltration components on HepG-2 *in vitro*

由图 5 可知,在样品浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,各酶解超滤组分对 HepG-2 的体外抑制作用与对 MCF-7 的抑制作用趋势基本一致,但三酶解的 0~3 k、3~5 k 和 >10 k 的超滤组分对 HepG-2 的抑制作用有较好的选择性,其抑制率显著大于对 MCF-7 的体外抑制率,尤其是 0~3 K 组分,在 500 $\mu\text{g/mL}$ 时对 HepG-2 的体外抑制率为 97.31%,而对 MCF-7 的抑制率仅为 72.25%。对比阳性对照,除胰蛋白酶的 5~10 k 和大于 10 k 的组分以及碱性蛋白酶大于 10 k 的组分外,其余各酶解超滤组分对 HepG-2 的体外抑制效果均好于阳性对照。

综合分析图 4 和 5 的数据,由于各酶解物的 0~3 k 超滤组分对 MCF-7 和 HepG-2 两种肿瘤细胞株均有显著的抑制作用,且考虑到分子量小的寡肽易于人体吸收,易于进一步研究时通过质谱的方式鉴定序列并人工合成,故优先选取各酶解物超滤组分中 0~3 k 部分进行后续分离纯化。本文以碱性蛋白酶 0~3 k 组分为例,用凝胶色谱层析进一步分离。

2.5 碱性蛋白酶酶解物 0~3 k 的凝胶色谱分离组分及其抗肿瘤活性的测定

一级质谱初步鉴定碱性蛋白酶酶解物 0~3 k 超滤组分发现,该组分的多肽分子量主要分布于 800~1700,故而选择 Sephadex G-15 为填料,进行凝胶柱层析,洗脱曲线如图 6 所示。按 280 nm 检测结果收集分离产物为 5 部分,分别命名为 A1-A5,冷冻干燥

后,鉴定各组分(浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时)对肿瘤细胞 MCF-7 和 HepG-2 以及人正常肝细胞 LO2 的体外抑制作用,结果如图 7 所示。

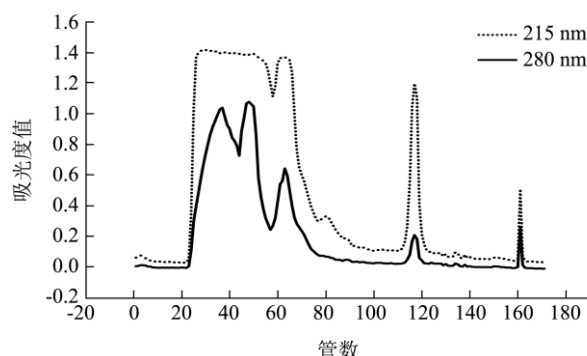


图 6 碱性蛋白酶酶解物 3 K 超滤组分的洗脱曲线

Fig.6 Hydrolysis elution curve of Alcalase 2.4 was lower than

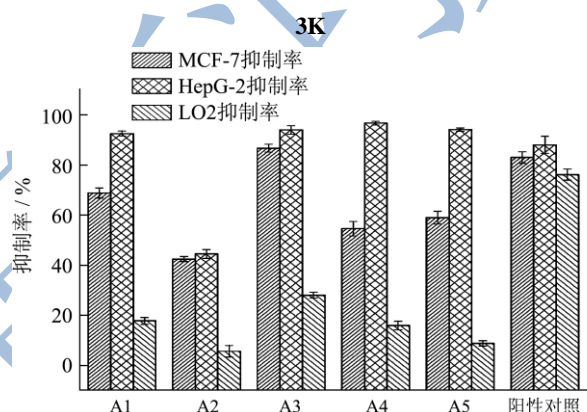


图 7 碱性蛋白酶酶解物不同组分对 MCF-7、HepG-2 和 LO2 细胞的体外抑制作用

Fig.7 Anti-proliferation effects of different Alcalase 2.4 hydrolysis components on MCF-7, HepG-2, and LO2 *in vitro*

由图 7 可知,在 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,纯化的 5 个组分中,只有 A3 对 MCF-7 的体外抑制效果较为显著,其抑制率为 86.71%,优于阳性药物 5-氟尿嘧啶的抑制率 82.98%。故选取 A3 对 MCF-7 做浓度梯度实验,数据见表 3。由表 3 可知,A3 对 MCF-7 的体外抑制作用在 31.25~500 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内有一定的剂量反应关系,即随浓度的增大,抑制作用增强,其 IC_{50} 值为 64.59 $\mu\text{g/mL}$ 。而从图 6 可知,A3 在 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,对正常肝细胞 L-O2 的抑制率为 28.03%,明显低于阳性药物的 76.18%,再对比 A3 对乳腺癌细胞的 IC_{50} 值可知,该组分对肿瘤细胞和正常肝细胞的半抑制浓度至少相差 1 个数量级,故 A3 的安全性可得到有效的保障。此外,A3 的抗肿瘤活性虽低于阳性药物 5-氟尿嘧啶,但与其他非小分子类物质如动植物多肽等相比,仍表现出较为优良的活性,如: You LJ 等分离得到的泥鳅多肽对 MCF-7 的 IC_{50} 值为 15.91 mg/mL ^[14]。因此,组分 A3 在乳腺癌相关的抗肿瘤药

物和保健品领域尚有广阔的开发空间。

由图7可知,除组分A2外,其他组分均对HepG-2细胞株的体外生长有较好的选择抑制作用,且A1, A3, A4和A5组分对HepG-2的抑制效果均优于阳性

对照(88.06%),有显著的抑制作用。对这四个组分的HepG-2细胞株做MTT浓度梯度实验,数据如表4所示。

表3 A3对乳腺癌细胞的体外抑制效果(±s, n=5)(%)

Table 3 Anti-proliferation effects of A3 on MCF-7 *in vitro*

浓度/($\mu\text{g/mL}$)	31.25	62.5	125	250	500	IC ₅₀ 值
A3	39.98±0.018	48.00±0.039	65.49±0.003	75.75±0.016	86.71±0.016	64.59
阳性对照	71.87±0.018	73.34±0.019	79.67±0.020	81.79±0.019	83.77±0.024	<31.25

表4 各组分对肝癌细胞的抑制效果(±s, n=5)(%)

Table 4 Anti-proliferation effects of different components on HepG-2 *in vitro*

浓度/($\mu\text{g/mL}$)	31.25	62.5	125	250	500	IC ₅₀ 值
A1	37.88±0.011	56.72±0.009	73.19±0.012	83.37±0.014	92.54±0.010	47.67
A3	30.18±0.006	50.24±0.008	77.20±0.011	88.38±0.013	93.97±0.017	61.65
A4	21.07±0.005	43.28±0.012	64.31±0.011	77.10±0.015	96.70±0.008	79.44
A5	33.64±0.012	44.87±0.013	78.35±0.011	81.11±0.009	94.12±0.014	69.54
阳性对照	33.77±0.008	61.05±0.028	73.60±0.027	84.54±0.023	88.06±0.034	45.55

由表4可知,组分A1, A3, A4和A5对HepG-2的体外抑制作用在31.25~500 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内有一定的剂量反应关系,即随浓度的增大,抑制作用增强,其IC₅₀值分别为47.67 $\mu\text{g/mL}$, 61.65 $\mu\text{g/mL}$, 79.44 $\mu\text{g/mL}$ 和69.54 $\mu\text{g/mL}$,有显著的细胞生长抑制作用。上述4个组分的IC₅₀值略低于阳性对照,但与阳性药物的抗肿瘤活性水平基本相当,尤其是组分A1,其与5-氟尿嘧啶的IC₅₀值仅相差2.12 $\mu\text{g/mL}$,药效几乎相同。此外,上述四组分在500 $\mu\text{g/mL}$ 时,对正常肝细胞的抑制率分别为17.74%、28.03%、15.85%和8.7%,显著低于阳性药物的抑制率76.18%,由此可推测,各组分对肿瘤细胞与正常细胞的IC₅₀值也至少相差1个数量级,表明上述四组分的安全性较好。因此,该结果对进一步筛选和鉴定具有较强抗肿瘤活性的螺旋藻水解肽提供了数据支持,同时也为开发来源于螺旋藻的口服抗肿瘤保健品和注射用的抗肿瘤药剂提供了理论依据。

3 结论

在相同前处理条件下,水提螺旋藻蛋白的提取率略高于盐提,且水提蛋白的复溶性显著优于盐提蛋白。以水提螺旋藻全蛋白为原料,通过单酶解、双酶解和三酶解得到的酶解混合肽组分中,除胃蛋白酶酶解物外,其他5种酶解组分在500 $\mu\text{g/mL}$ 时,对MCF-7和HepG-2的体外生长具有显著的抑制作用。该5种组分经过超滤后,按照分子量分为20个组分,MTT实验结果表明,其中9个组分MCF-7和HepG-2均有显著的抑制作用。碱性蛋白酶0~3K组分经葡聚糖凝

胶柱Sephadex G-15分离纯化后,得到5个纯化组分,其中A3对MCF-7和HepG-2均具有较强的体外抑制作用,而A1、A4和A5组分对HepG-2有较好的选择性抑制作用。故本文分离纯化得到的抗肿瘤肽组分,可为抗肿瘤药物和保健食品的开发利用提供理论基础。

参考文献

- [1] Thanh-Sang Voa, BoMi Ryub, Se-Kwon Kima. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal spirulina maxima [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(3): 1336-1346
- [2] Subhadeep Chakrabarti, Forough Jahandideh, Jianping Wu. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress [J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 608979
- [3] D D Kitts, K Weiler. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery [J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9 (16): 1309-1323
- [4] G T D Sousa, F S Lira, J C Rosa, et al. Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review [J]. Lipids in Health and Disease, 2012, 11: 67
- [5] 鲁军.螺旋藻活性肽的纯化、鉴定及降压、护肝机制研究[D].北京:北京林业大学,2010
LU Jun. Purification, characterization and antihypertensive and hepatoprotective effects of bioactive peptides derived from spirulina platensis [D]. Beijing: Beijing Forestry

- University, 2010
- [6] Guadalupe-Miroslava Suarez-Jimenez, Armando Burgos-Hernandez, Josafat-Marina Ezquerra-Brauer. Bioactive peptides and decapeptides with anticancer potential: sources from marine animals [J]. *Mar. Drugs*, 2012, 10 (5): 963-986
- [7] 张玉艳.文蛤抗肿瘤多肽的分离纯化及其作用机理的研究 [D].青岛:中国科学院海洋研究所,2009
ZHANG Yu-yan. Purification of a novel anti-tumor peptide from meretrix and its pharmaco-mechanism of action [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Hinese Academy Of Sciences, 2009
- [8] Archana Kulshreshtha, Anish Zacharia J, Urmila jarouliya, et al. spirulina in health care management [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2008, 9, 400-405
- [9] P D Karkos, S C Leong, C D Karkos, et al. Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 2011: 531053
- [10] Bochao Zhang, Xuewu Zhang. Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from spirulina platensis [J]. *Biotechnology Progress*, 2013, 29(5): 1230-1238
- [11] Eun-Kyung Kim, Yon-Suk Kimb, Jin-Woo Hwang et al. Purification and characterization of a novel anticancer peptide derived from ruditapes philippinarum [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(7): 1086-1090
- [12] Bhat VB, Madyastha KM. C-Phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275: 20-25
- [13] 关翔宇.藻蓝蛋白组合生物合成及蓝藻连接多肽生物进化研究[D].青岛:中国海洋大学
GUAN Xiang-yu. Research on combinational biosynthesis of fluorescent phycocyanin and evolution of cyanobacterial phycobilisomes linker polypeptides [D]. Qingdao: Ocean University of China
- [14] You LJ, Zhao MM, Liu RH, et al, JM. Antioxidant and antiproliferative activities of loach peptides prepared by papain digestion [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(14): 7948-7953