文章编号: 1673-1689(2011)03-0435-05

马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂与 DNA 的相互作用及抗氧化作用

孙 莹, 田亚平*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 从马铃薯中纯化一种天冬氨酸蛋白酶抑制剂(PPI)并对其与 DNA 的相互作用及抗氧化作用进行研究。以溴化乙啶作为探针, 利用荧光法在初步筛选抗癌药物上的应用, 首次对 PPI 与 DNA 的相互作用进行了研究; 利用二苯代苦味酰基自由基体系、H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟基自由基体系、超氧阴离子自由基体系对 PPI 的体外清除自由基的能力进行研究, 结果表明 PPI 具有一定体外抗氧化活性且从与 DNA 作用的角度分析可能具有抗癌效果。

关键词: 马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂; 荧光谱; 抗癌活性; 抗氧化活性

中图分类号: Q 51 文献标识码: A

Study on the Interaction with DNA and Antioxidant Activity of the Aspartic Protease Inhibitors from Potato

SUN Ying, TIAN Ya-ping*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The purpose of this study was to purify a kind of aspartic protease inhibitor from potato and investigate its interaction with DNA and antioxidant activity. With ethidium bromide as a probe, Fluorescence method for screening anticancer drugs in the application, the first time the interaction between PPI and DNA has been studied; Use scavenging of free radicals of flavonoids, DPPH, H_2O_2/Fe^{2+} for hydroxyl radical system and superoxide anion radical system of the PPI in vitro antioxidant activity study, The results show that PPI has some antioxidant activity in vitro and from the point of view with the DNA may have anticancer effects.

Key words: Aspartic protease inhibitor, fluorescence spectrum, anticancer activity, antioxidant activity

多项研究表明, 肿瘤发生、辐射致癌、心脑血管疾病、药物中毒、人体衰老等过程都涉及到自由基和活性氧, 自由基和活性氧是细胞癌变的原始引发机制[1-2]。目前对恶性肿瘤的药物治疗以化学药品为主, 但化学药品的毒副作用大, 多有不同程度的致突变毒性, 且价格昂贵, 因此人们把目光转向中药, 试图从天然成分中寻找毒副作用小、作用独特的抗肿瘤药物, 用天然蛋白质作为抗氧剂也已引起

收稿日期: 2010-05-21

基金项目: 国家"十一五"科技支撑计划项目(2008BAI63B06)。

* 通信作者: 田亚平(1964-), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 主要从事生物活性物质的研究与开发。

Email: yapingtian@hotmail.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

人们的兴趣[3]。

蛋白酶抑制剂泛指对蛋白酶有抑制作用的一类物质, 参与生物体内蛋白酶解活动的控制, 对维持正常的生命活动具有重要意义[4]。天冬氨酸蛋白酶的活性中心一般是由两个天冬氨酸残基所组成, 目前主要包括胃蛋白酶、血管紧张肽原酶、蛋白酶 A、组织蛋白酶 D、天冬氨酸膜内裂解蛋白酶等[5-6]。天冬氨酸蛋白酶抑制剂在食品保健及医药行业中应用非常广泛, 如增强免疫力和降血压等, 对胃溃疡、艾滋病、中风、老年痴呆症等的治疗具有明显的疗效[7]。

从马铃薯中提取的天冬氨酸蛋白酶抑制剂具有较高的安全性、杂质相对较少且易于规模化大量生产, 应用广泛, 有良好的应用前景[8]。文章利用荧光法对马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂与 DNA 的相互作用进行了研究, 并对其进行超氧阴离子自由基、羟自由基的清除作用和螯合能力进行了测定和初步研究, 以期进一步为马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂的医疗保健作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂 小牛胸腺 DNA、1, 1-二苯基-2-苦基苯基(DPPH)、溴化乙啶、胃酶抑素、抑肽酶, 均购自 Sigma 公司, 双氧水(H_2O_2)、水杨酸、邻苯三酚、硫酸亚铁等分析纯试剂由上海国药集团化学试剂有限公司提供。

1.1.2 仪器 台式冷冻离心机: 德国 Heraeus 产品; F-7000 型荧光分光光度计: 日本日立产品; 电子分析天平: 德国 Mettler 公司产品等。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂的分离纯化 马铃薯→去皮, 切块, 匀浆→离心, 取上清夜→超滤→醇沉→DEAE-52 离子交换→透析, 浓缩→Mono Q→马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂。

1.2.2 荧光法研究不同蛋白酶抑制剂与 DNA 的相互作用 实验条件: 整个反应液体积 3 000 μL, 介质为 10 mmol/L KNO_3, 将 75 μL DNA(1μg/μL) 溶液与一定浓度蛋白酶抑制剂混匀, 加入 25 μL EB (1μg/μl) 溶液, 最后用介质 10 mmol/L KNO_3 补足至 3000 μL, 避光条件下, (37±1) ℃反应 24 h, 后用日立 F-7000 型荧光分光光度计测定荧光光谱。

测量时以氙灯为光源, 激发波长 516 nm, 混合液所发射的荧光(EB 的荧光) 为宽荧光(540~740 nm)。激发和发射单色器狭缝均为 10 nm, 发射单色器扫描速度为 12 000 nm/min。

表 1 不同蛋白酶抑制剂测试混合液

Tab.1 Mixture of different protease inhibitors

各组液	KNO_3/μL	EB/μL	小牛胸腺 DNA/μL	抑制剂/μL
A	2 975	25		
B	2 900	25	75	
1	2 870	25	75	33
2	2 850	25	75	66
3	2 830	25	75	98
4	2 830	25	75	98
5	2 830	25	75	98

表 1 中各组混合液分别表示: *A* 为 EB 混合液, *B* 为 EB-DNA 混合液, 1~3 对应于所加入的 PPI 质量浓度为 1.52 mg/mL, 质量分别约为 0.05、0.1、0.15 mg, 4、5 分别为购买的胃酶抑素和抑肽酶, 质量均为 0.15 mg。

1.2.3 PPI 的抗氧化活性试验

1) DPPH 自由基清除能力的测定 取 2 mL 待测样品, 加入 2 mL 质量浓度为 0.04 g/L 的 DPPH·无水乙醇溶液, 混合均匀后反应 20 min, 在转速 3 500 r/min 下, 离心 10 min, 取上清液, 在波长 517 nm 处测其吸光度为 A_i; 另取 2 mL 待测样品于试管中, 分别加入无水乙醇 2 mL, 反应 20 min, 在转速 3 500 r/min 下离心 10 min, 取上清液, 在波长 517 nm 处测其吸光度为 A_j; 以 2 mL 质量浓度 0.04 g/L 的 DPPH·无水乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇反应作为参比, 其吸光度记为 A_0, 按照下列式子计算样品对 DPPH 自由基的清除率[9]:

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A_i 为 DPPH·加待测样品的吸光度; A_j 为无水乙醇加待测样品的吸光度; A_0 为 DPPH·加无水乙醇的吸光度。

2) 清除超氧阴离子的测定 采用邻苯酚自氧化法, 邻苯三酚在碱性条件下会发生自氧化, 生成有色中间产物和超氧阴离子自由基, 超氧阴离子自由基对自氧化有催化作用。具体操作: 取浓度为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl, pH 值为 8.2 的缓冲液 4.5 mL, 置于 25℃水浴中预热 20 min, 加入 0.1 mL 样品, 浓度为 2.5 mmol/L 的邻苯三酚 0.4 mL, 混匀后在 25 ℃水浴中反应 4 min, 立即用 V_C 溶液终止反应, 测吸光度 *A* 值。以蒸馏水代替样品作空白组, 按下式计算清除率[9]。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$清除率 = \frac{A_{空白} - A_{样}}{A_{空白}} \times 100\%$$

式中: $A_{空白}$ 为空白样的吸光度; $A_{样}$ 为样品的吸光度。

3) 清除羟自由基能力(· OH) 的测定　在 2 mL 待测样品中, 分别加入 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 $FeSO_4$, 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 H_2O_2, 混合后静置 10 min, 然后加入 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的水杨酸, 混合均匀, 静置 30 min 后, 在波长 510 nm 处测量其吸光度, 记录为 A_i, 用双蒸水代替水杨酸再次测量其吸光度, 记录为 A_j, 空白对照组以双蒸水代替蛋白质, 测量吸光度, 记录为 A_0[9]。清除羟自由基计算公式为:

$$清除率 = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$$

式中: A_i 为样品吸光度; A_j 为无水杨酸参加时的吸光度; A_0 为空白组的吸光度。

2　结果与讨论

2.1　马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂的分离纯化

利用醇沉、超滤、DEAE-52 和 Mono Q 离子交换层析法从马铃薯中纯化得到一种主要成分是蛋白质的天冬氨酸蛋白酶抑制剂。经 UltroGel ACA-54 凝胶过滤和 SDS-PAGE 鉴定为单亚基, 相对分子质量为 16 070。该抑制剂热稳定性良好, 对胃蛋白酶有很强的抑制作用, 半抑制浓度 IC_{50} 值为 26.67 μg/mL, 抑制类型属于非竞争和竞争混合型抑制模式。

2.2　不同蛋白酶抑制剂与 DNA 的相互作用

荧光探针技术较早以前就被用于研究药物与 DNA 的相互作用, 溴化乙啶(EB) 常作为荧光探针"嵌入"双链 DNA 并通过加入药物后 EB-DNA 体系荧光强度变化, 来探明 DNA 与药物的相互作用, 如其荧光的峰位不受影响, 仅使荧光强度降低, 则此药物可能具有抗癌性。此法是一种灵敏度高、选择性好且快速、简便初步筛选抗癌药物的方法。

EB 溶液的吸收光谱与 EB-DNA 溶液的吸收光谱波形类似, EB 本身的荧光很弱, 常温下 DNA 的荧光强度更弱, 在 540~ 740 nm 扫描范围内几近于无, 但 EB 与 DNA 两者结合后荧光强度骤增。EB-DNA 溶液中, EB 以两种不同形式存在: 一种是游离的, 一种是结合的(即生成 EB-DNA 结合物), 见图 1。在激发光波长 516 nm, 扫描范围 540~ 740 nm 内, 蛋白酶抑制剂无荧光现象, 而 EB 有一定的弱荧光光谱, 若将抑制剂与 EB 混合在一起, 对 EB 荧光光谱无影响。

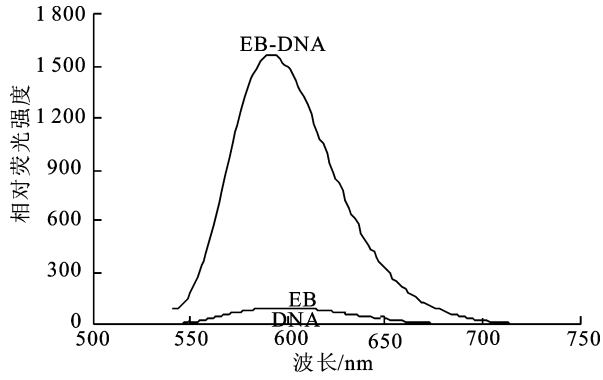

图 1　EB, DNA 及 EB-DNA 的荧光光谱

Fig. 1　The flourescence spectrum of EB, DNA and EB-DNA

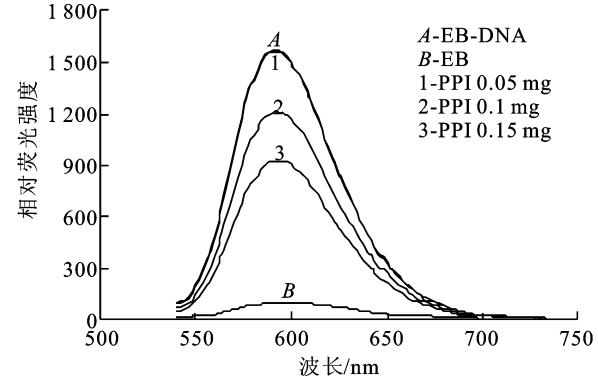

图 2　不同浓度 PPI 对 EB-DNA 荧光光谱的影响

Fig. 2　Effect of PPI concentration on EB-DNA's fluorescence spectrum

图 2 中 1~ 3 分别是不同浓度的 PPI 与 EB-DNA 的混合物, 发现 PPI 对 EB-DNA 的荧光光谱形状和峰位(592 nm) 没有影响, 但降低了 EB-DNA 的荧光强度, 且随着 PPI 浓度的上升, EB-DNA 的荧光强度降低幅度愈大。

分析表明, 在本实验条件下 PPI 压低荧光强度的效率 D 与浓度成正相关, D 为 DNA^+ 探针中加入药物后探针的荧光强度相对于 DNA^+ 探针荧光强度减去纯探针荧光强度的下降百分数。

设[PPI] = 0 时的 I_{max} 为 I_A, 对照的 I_{max} 为 I_B, 不同浓度 PPI 的 I_{max} 为 I_{PPI}, 则荧光强度压低率 D 按下式计算:

$$D(\%) = (I_A - I_{PPI})/(I_A - I_B) \times 100\%$$

从以上结果可知, EB-DNA 体系荧光强度的压低效率随加入 PPI 质量的增加而愈趋明显, 当 PPI 质量为 0.2 mg 时其对 EB-DNA 体系的荧光强度压低率约为 43.6%。可能是 PPI 加入 DNA 溶液之后, 影响了 DNA 向 EB 的能量传递, 从而使 EB-DNA 系统的荧光强度减弱。

图 3 中 A 为 EB-DNA 混合液, B 为 EB 混合

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

液,3~ 5 分别是不同蛋白酶抑制剂与 EB-DNA 的混合物,发现 3 种抑制剂对 EB-DNA 的荧光光谱形状和峰位均没有影响, 但降低了 EB-DNA 的荧光强度,且降低幅度胃酶抑素> PPI> 抑肽酶,说明蛋白酶抑制剂可能具有一定的抗癌广谱性,但胃酶抑素的作用效果更明显。

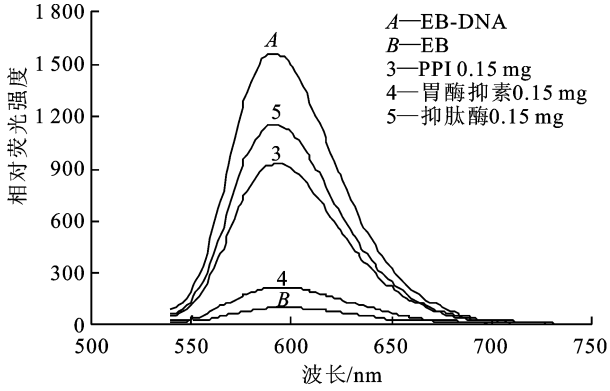

图 3 不同蛋白酶抑制剂对 EB-DNA 荧光光谱的影响

Fig. 3 Effects of different protease inhibitors on EB-DNA's fluorescence spectrum

2.3 PPI 抗氧化活性的研究

2.3.1 PPI 对 DPPH 自由基清除的影响 DPPH·是一种有机自由基,大多数自由基反应活性较强而寿命短暂,DPPH· 是为数不多的即使在室温条件下也能保持稳定的自由基,目前清除 DPPH·被作为评价物质是否具有抗氧化能力的指标之一[10]。PPI 对 DPPH·的清除作用见图 4。

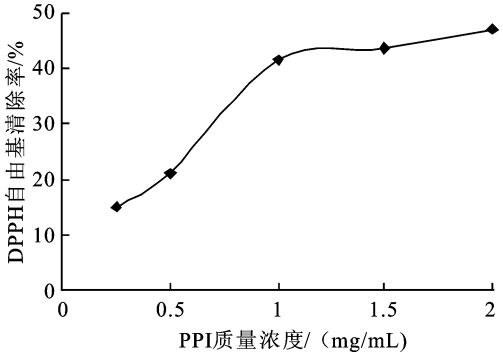

图 4 PPI 对 DPPH 的清除作用

Fig. 4 Scavenging effect of PPI on DPPH radical

由图 4 可以看出,PPI 对 DPPH·的清除呈现较好的量效关系,随着 PPI 质量浓度的增加,其清除 DPPH·的能力逐渐增强。在质量浓度为 2 mg/mL 时,PPI 对 DPPH·的清除率达到 47%,维生素 C 在质量浓度 0.1 mg/mL 时对 DPPH·的清除率达到 90% 以上,说明 PPI 相对于维生素 C 表现出较小的清除 DPPH·的能力。

2.3.2 PPI 对超氧阴离子的清除作用 在活性氧自由基中,超氧阴离子自由基产生最早,虽然它的氧化性相对较弱,但它可以歧化生成活性较强的活性氧自由基如单线态氧自由基,羟自由基和过氧化氢,并且还能引发脂质过氧化[11-12]。

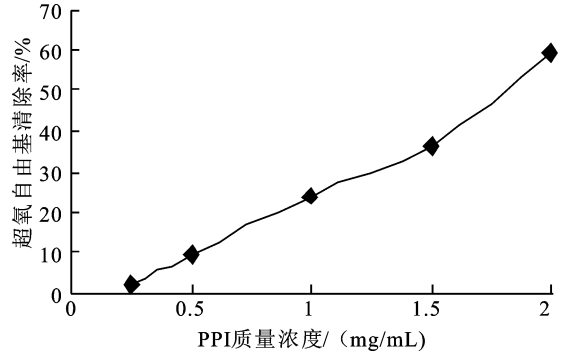

图 5 PPI 对超氧阴离子的清除作用

Fig. 5 Scavenging effect of PPI on superoxide anion radical

图 5 表明,PPI 对超氧阴离子的清除能力随质量浓度的增加而增大,EC_{50} 约为 1.8 mg/mL,而 BHA、BHT、维生素 E 的 EC_{50} 分别为 31、61、88 μg/mL[13]。可见 PPI 对超氧阴离子的清除作用较弱。

2.2.3 PPI 对羟自由基的清除作用 PPI 对羟自由基的清除作用见图 6。

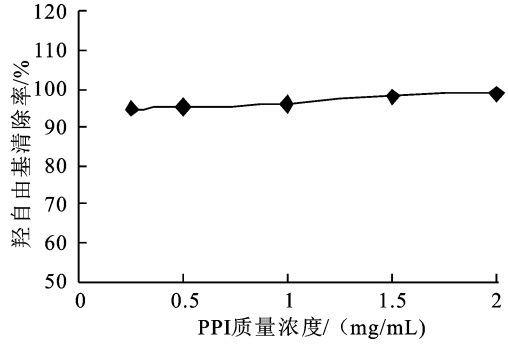

图 6 PPI 对羟自由基的清除作用

Fig. 6 Scavenging effect of PPI on hydroxyl radical

PPI 对羟自由基的清除能力较强,PPI 在质量浓度 0.25 mg/mL 时,对羟自由基清除率均已达到 90% 以上,而常用的抗氧化剂维生素 C 和甘露醇的 EC_{50} 分别为 1 907、4 536 μg/mL[14]。在活性氧自由基中,羟自由基最活泼,它能损伤所接触到的所有生物分子,如某些蛋白质、核酸、不饱和脂肪酸等,这些损伤能引起衰老、癌症和其它疾病[15]。PPI 具有很强的清除羟自由基的作用,可作为潜在的抗氧化剂来减缓羟自由基对人体的伤害。

3 结 语

荧光探针 EB 为一扁平分子,有很弱的荧光,当其插入到 DNA 的平面碱基对之间后,DNA + EB ⇔ DNA-EB 两者间发生能量传递,EB 吸收能量后,荧

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

光强度大大增强,在 580 nm 附近有最大发射,如果在 DNA-EB 体系中加入某些与 DNA 作用的药物(X),则有下列反应存在:DNA+ X ⇌DNA-X,药物 X 加入后则干扰 DNA-EB 体系的平衡,由图 2 和图 3 可知,药物加入后,体系的荧光强度减小,表示 EB 在药物加入后从 DNA 分子上解离下来,造成 EB-DNA 的荧光强度下降,这样通过荧光检测,可知添加的药物与 DNA 发生了相互作用,则可推测此药物可能具有抗癌活性。据此,可为研究某些物质的生理活性或为药物应用和开发提供必要信息。

抗氧化剂的抗氧化机理分为多种,如阻止链引发,与作为催化剂的二价金属离子反应,降解过氧化物和清除自由基等。对 PPI 的还原能力和螯合能力测定表明,该蛋白具有一定的清除自由基能力。所以可以初步推测 PPI 的抗氧化机理主要是清除已经产生的自由基。

如前所述,肿瘤发生、辐射致癌、人体衰老等过程都涉及到自由基和活性氧,直接影响人体的健康,本文研究结果表明 PPI 能与 DNA 发生较强的作用,从与 DNA 作用的角度分析其可能具有防癌抗癌效果,另外 PPI 的抗氧化活性可抑制或减少这些疾病的发生,起到医疗保健作用。PPI 纯化自马铃薯无任何毒副作用且易于规模化大量生产、资源价廉易得,因此将马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂应用于食品及医疗保健药品中,将具有广阔的开发前景。

参考文献(References):

[1] Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A P, et al. Antioxidanttherapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury[J]. **Pharmacol Rev,** 2001, 53:135-139.

[2] Pang Z J, Chen Y, Zhou M. The effect of polysaccharide krestin on GPx gene expression in macrophages[J]. **Acta Biochimica et Biothysica Sinica,** 1999, 31(3):284-288.

[3] 邹夏慧, 张焜和. 中药抗肿瘤作用的分子机制研究进展[J]. 国外医学中医中药, 2004, 26(6):330-334.
ZOU Xia-hui, ZHANG Kun-he. Research advance of anti-tumor effect of chinese medicine molecular mechanisms[J]. **International Journal of Chinese Medicine,** 2004, 26(6):330-334. (in chinese)

[4] Coates L, Erskine P T, Crump M P, et al. Five atomic resolution structures of endothiapepsin inhibitor complexes: implications for the aspartic proteinase mechanism[J]. **Mol Bio,** 2002, 318(5):1405-1415.

[5] Kumar A, Rao M. Biochemical characterization of a low molecular weight aspartic protease inhibitor from thermotolerant Bacillus licheniformis: Kinetic interactions with Pepsin[J]. **Biochimica et Biophysica Acta,** 2006, 1760(12):1845-1856.

[6] Milisavljevic M D, Timotijevic G S, Radovic S R, et al. Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed - Gene structure and expression analysis[J]. **Plant Physiol,** 2008, 165(9):983-990.

[7] Xue Q G, Waldrop G L, Schey K L, et al. A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (Crassostrea virginica) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite Perkinsus marinus[J]. **Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol,** 2006, 145(1):16-26.

[8] Kim M H, Park S C, Kim J Y, et al. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** 2006, 346: 681-686.

[9] 吴亚楠, 鲁晓翔, 连喜军, 等. 玉米须黄酮清除自由基活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 5-8.
WU Ya-nan, LU Xiao-xiang, LIAN Xi-jun, et al. Study on free radical scavenging activity of flavonoids Corn[J]. **Food Research and Development,** 2009, 30(2): 5-8. (in Chinese)

[10] 谢正军, 金征宇, 徐学明, 等. 苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较[J].食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 627-632.
XIE Zheng-jun, JIN Zheng-yu, XU Xue-ming, et al. Comparison of alfalfa leaf protein and enzymatic antioxidant activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(5): 627-632. (in Chinese)

[11] Dahl M K, Richardson T. Photogeneration of superoxide anion in serum of bovine milk and in model systems containing riboflavin and amino acid[J]. **J DairySci,** 1978, 61:400-407.

[12] Meyer A S, Isaksen A. Application of enzymes asfood antioxidants[J]. **Trends Food Sci Technol,** 1995, 6(9):300-304.

[13] Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu O I. Determination of in vit ro antioxidant activity of fennel (Foenicurlum vulgare) seed extracts[J]. **Technol,** 2003, 36:263-271.

[14] Yu H H, Liu X G, Xing R E, et al. In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish Rhopilema esculentum[J]. **Food Chem,** 2006, 95:123-130.

[15] Aruoma O I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease[J]. **J Am OilChem Soc,** 1998, 75:199-212.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net