

绿侧花海葵(*Anthopleura anjuna*)寡肽制备的关键技术与抗前列腺癌作用研究*

吴宗泽^{1,2} 丁国芳^{1,2} 杨最素¹ 余方苗¹ 唐云平¹
贾盈露¹ 郑媛媛¹ 陈锐¹

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心 舟山 316022;

2. 浙江省海洋水产研究所 舟山 316021)

摘要 本文探讨绿侧花海葵(*Anthopleura anjuna*)抗前列腺癌酶解寡肽制备与工艺优化。以绿侧花海葵肉为原料进行酶解,筛选最佳蛋白酶,通过正交实验优化酶解条件,并通过超滤、阴离子交换层析、G-25 凝胶过滤和反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化,通过 LC-MS 和氨基酸序列测定鉴定寡肽的氨基酸序列,并以 MTT 法检测产物对前列腺癌细胞系 DU-145 增殖抑制率,以确定活性最强组分,最后通过倒置显微镜观察纯化肽的抗前列腺癌活性。结果表明,碱性蛋白酶为最佳酶种;工艺条件为:最适料液比 1:5、最适 pH=11、最适加酶量 2000U/g、最适温度 35°C、最适酶解时间 6h;经高效液相纯化得到由五个氨基酸组成的绿侧花海葵抗前列腺癌寡肽,其氨基酸序列为: Tyr-Val-Pro-Gly-Pro (AAP-H);倒置显微镜结果显示经 AAP-H 作用 24h 后的 DU-145 细胞具有明显的凋亡形态学特征。结论:采用碱性蛋白酶酶解并通过超滤和色谱分离技术能从绿侧花海葵肉中制备抗肿瘤活性肽;且 AAP-H 对 DU-145 细胞的增殖抑制作用呈时间与剂量依赖关系,作用后细胞出现了凋亡的形态学特征。因此, AAP-H 能明显抑制前列腺癌细胞 DU-145 增殖,可以诱导其发生凋亡而发挥抗肿瘤作用。

关键词 绿侧花海葵;酶解;抗肿瘤;寡肽;工艺

中图分类号 Q816 doi: 10.11693/hyhz20161200268

前列腺癌(Prostate, PCa)一种早期难被发现、却高危险性的疾病,相比欧美国家,我国前列腺癌发病率要低得多,但是近年来由于人们饮食不均衡和环境污染,发病率也呈现明显的上升趋势(景奕文等, 2014),并成为威胁我国男性健康的重要因素。前列腺癌的发生发展与宿主免疫系统对肿瘤失去调控有关,如果得不到及时有效的治疗将发展为雄性激素非依赖性前列腺癌,加上晚期骨转移,给治疗带来极大的难度(Michalaki *et al.*, 2004)。因此,寻找既能提高人体免疫能力又能有效诱导癌细胞凋亡的活性物就显得尤其

重要。

海葵(sea anemone)属于原始海洋生物,六放珊瑚亚纲的一目,有 6 科、37 种,分布广泛,常见于热带和温带海底岩石和泥沙中(胡波, 2011)。目前,各国科学家对海葵毒素(张均顺等, 1998)钾离子通道和钠离子通道活性进行了大量的研究(Rodríguez *et al.*, 2014);另外,其降血压(Shkrob *et al.*, 2005)、抗真菌、免疫调节(Chi *et al.*, 2011)和抗肿瘤(Soletti *et al.*, 2008)的研究也有大量报道。但是由于海葵毒素含量极少、提取困难,严重制约生理学和病理学方面的研究(Monroy-

* 国家自然科学基金项目, 81001393 号, 2015GA700044 号; 国家海洋重大计划项目, 201586-2 号; 浙江省科技厅重大专项, 2013C03036 号; 浙江省自然科学基金项目, 21136001115 号。吴宗泽, 硕士研究生, E-mail: zongze461@sina.com

通讯作者: 丁国芳, 教授, 硕士生导师, E-mail: dinggf2007@163.com

收稿日期: 2016-12-02, 收修改稿日期: 2017-02-16

Estrada *et al.*, 2007)。参考海洋生物活性肽的研究进展发现用酶解法制备生物活性肽已经成为新的研究热点, 提取得到的活性肽既能补充机体营养成分, 又具有抗氧化、抗凝血、降血压、抗肿瘤等活性(张岩等, 2012)。

据窦光宇(2003)报道, 在众多海葵中, 数量最多的为绿侧花海葵(*Anthopleura anjunae*)。在我国东海部分海域, 每平方米绿侧花海葵的数量可达数百个。实验前期调查发现在舟山海域, 绿侧花海葵数量庞大, 在部分海水养殖区, 绿侧花海葵与其它水产品(如贻贝等)形成竞争共生, 对水产养殖造成一定的危害。虽然绿侧花海葵资源丰富, 但到目前为止, 对绿侧花海葵的研究却鲜有报道, 而利用酶法开发海葵活性肽尚未见有报道。本实验以绿侧花海葵肉为原料, 采用酶解法制备具有抗前列腺癌的活性肽, 通过正交实验优化酶解条件, 并通过超滤、阴离子交换层析、G-25 凝胶过滤层析和高效液相分离纯化, 以 MTT 法检测产物对前列腺癌细胞系 DU-145 增殖抑制率为指标筛选活性肽; 最后通过倒置显微镜观察细胞形态, 检验纯化肽的抗前列腺癌活性, 旨在为绿侧花海葵抗肿瘤药物和保健品的开发提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

绿侧花海葵: 采集舟山海域野生海葵, 经浙江海洋大学赵盛龙教授鉴定为绿侧花海葵(*Anthopleura anjunae*)。碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶和胃蛋白酶: 亚太恒信生物科技有限公司; 甲醇、乙腈: 色谱纯, 德国默克公司; 聚凝胺: 上海博普生物技术有限公司; F12 培养基: 美国 Gibco 公司; 无支原体胎牛血清(FBS): 杭州四季青生物制品有限公司。

CF16RN 型高速冷冻离心机、L8900 氨基酸自动分析仪: 日立仪器有限公司; Agilent-1260 型高效液相色谱仪: 美国安捷伦公司; ALPHA1-4/LDplus 超滤系统: 德国默克密理博公司; Forma 3111 型 CO₂ 培养箱: 美国 Thermo 公司; 倒置显微镜: 日本 OLYMPUS 公司; 酶标仪: 美国 BioRad 科技公司。

1.2 材料预处理

实验参考海葵解剖(李霞等, 2004)及营养成分分析(朱春晓等, 2011)并稍作修改, 取新鲜野生绿侧花海葵置于室温干净海水中养一天, 清洗除去杂质。用剪刀从中间剖开后, 在大烧杯中加水覆盖, 置于 -20℃ 下冷冻 12h, 室温自然解冻后, 反复操作三次。

挤出触手毒液, 冲洗至得到白色海葵肉。然后高速匀浆(10000r/min, 5min), 将匀浆液浸泡于异丙醇中去脂, 每 4h 更换一次, 连续换 3 次, 再用纯水将异丙醇冲洗干净, 置于通风橱中沥干, 最后分装标记, 置于 -20℃ 保存备用。冻融液参考(Anderluh *et al.*, 2002)海葵毒素的提取方法处理, 收集海葵毒素。

1.3 绿侧花海葵相关指标测定

1.3.1 基础成分测定 参考 GB 5009.3-2016 测定水分; 参考 GB5009.4-2016 测灰分; 参考 GB50095-2016 测粗蛋白含量; 参考 GB5009.6-2016 测定海葵肉的粗脂肪含量。

1.3.2 海葵氨基酸组成及含量分析 参考 GB5009.124-2016, 称取海葵肉匀浆样品经 6mol/L 盐酸水解后, 用日立 L8900 氨基酸自动分析仪测定氨基酸的组成及含量。

1.4 酶种的筛选

分别取 10g 预处理后的海葵肉匀浆加 50mL 纯水, 加酶量为 1000U/g, 根据酶试剂盒上的说明调节最佳 pH 和温度(表 1), 置于恒温水浴锅中进行酶解。期间匀速缓慢搅拌, 结束后煮沸灭活 15min, 然后用三层纱布过滤除去粗杂质, 滤液在 4℃、12000r/min 离心 10min, 连续离心两次。收集上清液用 0.45μm 针式滤膜过滤, 调节 pH=7 并对产物进行旋蒸浓缩和冷冻干燥。产物分装置于 -20℃ 冰箱保存备用。

表 1 酶解条件
Tab.1 The conditions for enzymolysis reaction

序号	酶种	pH	温度(°C)
1	胃蛋白酶	4	37
2	胰蛋白酶	8	37
3	中性蛋白酶	7.5	40
4	碱性蛋白酶	9	45

1.5 MTT 法检测产物对 DU-145 细胞增殖抑制活性及倒置显微镜观察细胞形态

前列腺癌细胞系 DU-145 用含 10%胎牛血清的 F12 培养液于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 待细胞贴壁生长至 70%—80%汇合度时进行传代或实验。

MTT 法参考张国梅等(2015)并稍作修改, 将 DU-145 细胞接种于 96 孔板中, 设置空白对照组及药物组, 药物组加入含不同剂量酶解产物的培养液, 每组设 3 个复孔, 培养 24h 后加入 200μL 含有 10% MTT 的 PBS 缓冲液, 并孵育 4h。弃 MTT 培养液, 加入 DMSO 震荡反应, 酶标仪检测吸光度 *A* 值, 计算抑制

率(IR), 计算公式为: $IR = (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{药物组 } A \text{ 值}) / \text{对照组 } A \text{ 值} \times 100\%$

在六孔板中培养细胞, 并按照产物的 IC_{50} 加药处理 24h, 倒置显微镜观察细胞形态, 分析产物对细胞增殖抑制的原因。

1.6 正交实验优化绿侧花海葵抗肿瘤酶解寡肽的制备工艺

通过方法 1.4 确定最佳的蛋白酶后, 以 $L_{16}(4^5)$ 正交实验优化绿侧花海葵抗肿瘤酶解寡肽的制备工艺, 以确定最佳的温度、时间、pH、加酶量和料液比, 产物经浓缩冷冻干燥并采用 MTT 法检测对 DU-145 增殖抑制活性, 正交实验的因素和水平如表 2 所示。

表 2 正交实验中各酶解反应的条件
Tab.2 The conditions of enzymolysis reaction in orthogonal experiments

水平	因素				
	A 料液比 (W/V)	B pH	C 加酶量 (U/g)	D 温度 (°C)	D 时间 (h)
1	1:2	8	1000	35	2
2	1:3	9	1500	45	4
3	1:4	10	2000	55	6
4	1:5	11	2500	65	8

1.7 最优酶解产物分离与纯化

1.7.1 海葵酶解液超滤 按照 1.6 确定的最佳酶解条件进行酶解, 制备绿侧花海葵抗肿瘤寡肽 (*Anthopleura anjunae* Anti-tumor Peptide, AAP), 用 ALPHA1-4/LDplus 超滤系统 8kDa 和 20kDa 的滤膜分级, 并按分子量由小到大命名为 AAP-I (MW<8kDa)、AAP-II (8kDa MW < 20kDa)、AAP-III (MW 20kDa)。MTT 法筛选活性最好组分。

1.7.2 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换层析提前活化、平衡交换柱(2cm×35cm), 上样浓度为 30mg/mL 溶液, 超声 5min, 0.45 μ m 针式滤膜过滤, 每次上样 3mL, 分别以纯水、0.1、0.3、0.5、0.8mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱, 各梯度分别洗脱 30min, 流速为 1mL/min, 用 DBS-100-LCD 电脑全自动部分收集器每 4min 收集一管, 于 280nm 检测吸光度, 并根据吸光度曲线合并洗脱峰。产物浓缩冷冻干燥, 分装保存于-20°C 冰箱中备用。MTT 法筛选活性最好组分。

1.7.3 SephadexG25 凝胶层析法分离纯化 将对

DU-145 增殖抑制率最高的 AAP-I-1 采用 G-25 凝胶层析继续分离纯化, 将样品配制成 30mg/mL 溶液, 超声 5min, 然后用 0.45 μ m 针式滤膜过滤, 每次加 3mL 到处理好的 Sephadex G-25 层析柱(2cm×50cm), 用超纯水洗脱, 流速为 1.0mL/min, 用 DBS-100-LCD 电脑全自动部分收集器每 4min 收集一管, 于 280 nm 检测吸光度, 并根据吸光度曲线合并洗脱峰, 产物浓缩冷冻干燥。MTT 法筛选活性最好组分。

1.7.4 反相高效液相色谱分离纯化 将 AAP-I-1-2 配制成 0.5mg/mL 溶液经 0.22 μ m 针式滤膜过滤后用反相高效液相色谱分离纯化。进样前平衡 Agilent 1260 ZORBAX SB-C18 (9.4mm×250mm)柱, 柱温 30°C; 洗脱液用乙腈超纯水混合液按 1mL/min 洗脱, 0—15min 乙腈(20%—50%), 15—30min: 乙腈(50%); 检测波长为 280 nm。纯品采用 PPSQ-31A 蛋白质测序仪测定肽链氨基酸序列。

1.8 AAP-H 活性检测

采用倒置显微镜观察 AAP-H 抗前列腺癌活性。DU-145 细胞接种在六孔板中培养至 80%—90%的汇合度后加药(1、5 和 10mg/mL), 24h 后终止培养, 于倒置显微镜下观察并拍照分析。

1.9 统计分析

实验结果采用 SPASS19.0 统计软件分析, 并采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *表示 $P < 0.05$, 具有显著性。

2 结果与分析

2.1 绿侧花海葵基础成份检测结果

绿侧花海葵肉的基础成分检测结果见表 3, 含有丰富的粗蛋白占(19.76%)和较低的粗脂肪(仅为 0.89%), 表明绿侧花海葵是一种高蛋白, 低脂肪的海产品。

绿侧花海葵肉的氨基酸组成及含量见表 4, 发现其包含常见的 17 种氨基酸, 种类比较齐全, 其中七种必需氨基酸含量占 24.31%, 低于太平洋侧花海葵的 37.37% (朱春晓等, 2011); 鲜味氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸)高达 50.58%, 高于太平洋侧花海葵(45.45%), 这可能也是绿侧花海葵味道鲜美的原因之一。

表 3 绿侧花海葵肉基础成分分析(g/100g, 湿重)
Tab.3 Basic components of *A. anjunae* flesh (g/100g, wet weight)

成分	水分	灰分	粗蛋白	粗脂肪
含量	76.67±1.31	0.42±0.13	19.76±1.37	0.89±0.12

表 4 绿侧花海葵肉的氨基酸组成及含量(g/100g, 干重)
Tab.4 Composition and content of amino acids of *A. anjuna* flesh (g/100g, dry weight)

氨基酸	含量	氨基酸	含量
天门冬氨酸 Asp*	7.067	酪氨酸 Tyr	1.004
苏氨酸 Thr [#]	2.700	苯丙氨酸 Phe [#]	1.643
丝氨酸 Ser	3.198	赖氨酸 Lys [#]	3.099
谷氨酸 Glu*	8.988	组氨酸 His	0.675
甘氨酸 Gly*	13.084	精氨酸 Arg	6.693
丙氨酸 Ala*	4.111	脯氨酸 Pro	4.649
胱氨酸 Cys	0.263	总氨基酸 TAA	65.74
缬氨酸 Val [#]	2.572	鲜味氨基酸 FTAA	33.25
蛋氨酸 Met [#]	1.176	必需氨基酸 EAA	16.01
异亮氨酸 Ile [#]	1.868	F/T(%)	50.58%
亮氨酸 Leu [#]	2.951	E/T(%)	24.35%

注: “*”表示鲜味氨基酸; “#”表示必需氨基酸; 色氨酸(Trp)因条件限制不检测

根据 FAO/WHO 对氨基酸评价标准, 绿侧花海葵必需氨基酸之间比值与理想的人体氨基酸比值有一定的差异(结果见表 5), 但研究表明, 亲水性多肽(含有 Asp、Thr、Ser、Glu、Arg、Lys、His 和 Gln 等亲

水性氨基酸)可通过静电吸引方式, 特异性作用于肿瘤细胞, 导致其细胞膜迅速破裂, 细胞内容物渗漏, 最终引起肿瘤细胞死亡(谢书越等, 2015)。然而绿侧花海葵肉酶解产物的亲水性氨基酸占总氨基酸含量的 49.3%, 亲水性氨基酸的高比例可为今后开发抗癌药物或者功能食品提供依据。

2.2 MTT 活性测试结果

将不同提取方法所得产物与前列腺癌细胞系 DU-145 共同培养 24h 后, 进行 MTT 活性测试, 结果如图 1 所示。结果发现所有产物的抑制率都表现出剂量依赖性, 中剂量(5mg/mL)的胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶的酶解产物以及毒素对 DU-145 细胞增殖抑制率分别是 (24.98±6.04)%、(28.55±5.29)%、(31.66±4.04)%、(73.7±4.31)% 和 (99.12±3.96)%。对 DU-145 细胞增殖抑制活性顺序由大到小分别是: 毒素>碱性蛋白酶>中性蛋白酶>胰蛋白酶>胃蛋白酶, 所以确定碱性蛋白酶为最优酶种。胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶的酶解产物和毒素的 IC₅₀ 分别是: 12.57、12.40、10.66、3.87 和 0.76mg/mL。

表 5 绿侧花海葵蛋白质营养评价

Tab.5 Nutrition evaluation on protein of *A. anjuna*

必需氨基酸	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Val
绿侧花海葵	2.8	4.5	4.7	2.2	4.0	4.1	4.0
FAO/WHO 模式谱	4.0	7.0	5.5	3.5	6.0	4.0	5.0

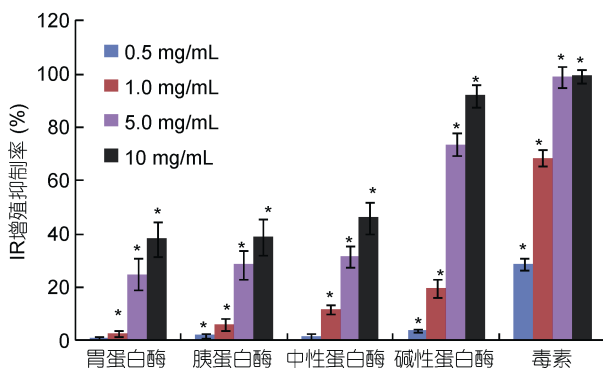


图 1 不同产物作用 24h 后对 DU145 细胞增殖抑制效果
Fig.1 Effects on proliferative inhibition to DU-145 cells after 24h with different enzymatic hydrolysates
注: “*”表示有显著性差异($P < 0.05$)

2.3 对前列腺癌 DU-145 细胞形态的影响

图 2 显示不同酶解产物作用 24h 对前列腺癌 DU-145 细胞形态的影响, 空白对照组细胞生长良好, 细胞间排列紧密, 细胞形态饱满; 经酶解产物作用后, B 组到 E 组细胞之间的间隙增大, 细胞膜收缩变圆,

并有较多细胞脱离培养瓶壁, 即细胞死亡, 同时相对空白组细胞数目明显减少; 经毒素作用后的 F 组细胞出现破碎, 被裂解成碎片。

虽然无论是毒素还是酶解产物都能促进 DU-145 细胞死亡, 但是从细胞形态变化初步判断其作用机制不同。海葵毒素能在细胞上形成特异穿孔, 使细胞破碎造成溶解(Marino *et al*, 2004)。而细胞凋亡的形态特征主要是细胞染色质固缩, 凝聚与核边缘, 呈块状、环状或者新月状(马岚, 2006)。因此初步推断, 酶解法制备的活性肽很可能是通过诱导细胞凋亡而抑制细胞增殖。

2.4 Alcalase 正交实验结果

采用正交实验设计以料液比、温度、pH 值、加酶量和时间 5 个因素, 以 IR 值作为指标, 检测碱性蛋白酶产物抑制前列腺癌细胞 DU-145 增殖活性的最优条件, 结果见表 6。采用极差法进行分析, 从 R_j 值大小可以看出, A(料液比)>E(时间)>D(温度)>C(加酶量)>B(pH 值)。而 IR 值最大时的水解条件为

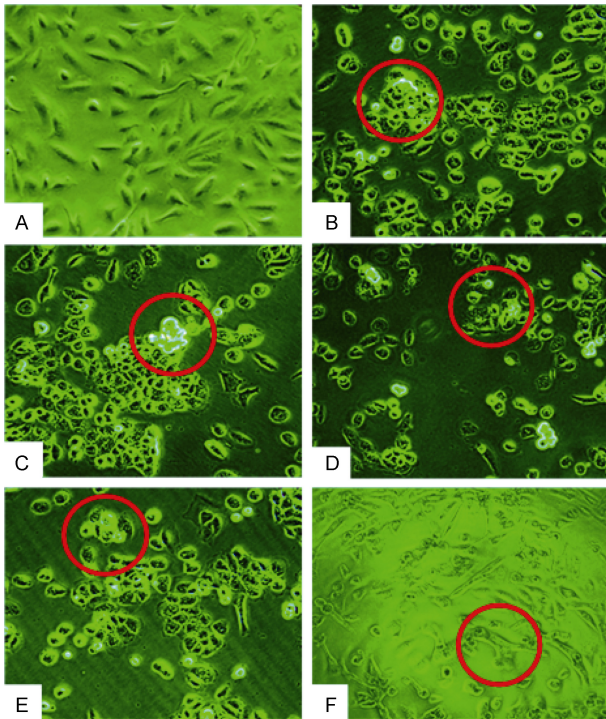


图2 不同产物对 DU-145 细胞形态的影响, 24h, 倒置显微镜($\times 200$)

Fig.2 Morphologic changes in DU-145 cells affected by different enzymatic hydrolysates in 24h, inverted microscope ($\times 200$)

注: A: 空白对照组细胞形态规则, 生长良好; B: 12.6mg/mL (IC_{50})的胃蛋白酶解产物作用于 DU-145 细胞 24h 后, 细胞收缩, 细胞间隙增大(圆圈所示); C: 12.4mg/mL (IC_{50})的胰蛋白酶解产物作用于 DU-145 细胞 24h 后, 细胞间隙增大, 部分细胞死亡、脱离培养瓶壁(圆圈所示); D: 10.7mg/mL (IC_{50})的中性蛋白酶解产物作用于 DU-145 细胞 24h 后, 视野中细胞数目明显减少, 细胞收缩, 细胞间隙增大(圆圈所示); E: 3.9mg/mL (IC_{50})的碱性蛋白酶解产物作用于 DU-145 细胞 24h 后, 细胞数目明显减少, 出现较多漂浮的死亡细胞(圆圈所示); F: 0.8mg/mL (IC_{50})的毒素作用于 DU-145 细胞 24h 后, 相对比空白组, 细胞形态发生明显的变化, 但并没有出现酶解产物所引起的收缩状态, 而是出现较明显的破碎(圆圈所示)

A4B4C3D1E3, 即料液比为 1 : 5、pH 为 11、加酶量为 2000U/g、温度为 35°C 和时间为 6h。并且按该条件酶解产物得率为 10.32%±0.69%。

2.5 初步分离结果

将碱性蛋白酶酶解液超滤后, 初步分离得到三种组分, 并命名为 AAP-I、AAP-II 和 AAP-III, 经 MTT 法活性筛选(图 3)后, 发现三种组分皆可对 DU-145 增殖产生抑制作用, 并表现剂量依赖效应, 当剂量为 10mg/mL 时, 三个组分几乎可以完全抑制细胞增殖。当剂量为 5mg/mL 时, 抑制率分别是 87.18±1.41%、74.36±2.30%和 83.05±2.03%, 综合三个剂量的抑制率, 以及到作为药品和保健品开发原材料分子量的适用

表 6 碱性蛋白酶酶解法正交实验结果

Tab.6 The results of $L_{16}(4^5)$ orthogonal test using Alcalase

序号	A 料液比	B pH 值	C 加酶量	D 温度	E 时间	抑制率 IR(%)
1	1(1 : 2)	1(8)	1(1000)	1(35)	1(2)	25.22
2	1	2(9)	2(1500)	2(45)	2(4)	24.58
3	1	3(10)	3(2000)	3(55)	3(6)	22.58
4	1	4(11)	4(2500)	4(65)	4(8)	22.05
5	2(1 : 3)	1	2	3	4	23.21
6	2	2	1	4	3	20.68
7	2	3	4	1	2	23.95
8	2	4	3	2	1	30.08
9	3(1 : 4)	1	3	4	2	35.57
10	3	2	4	3	1	33.56
11	3	3	1	2	4	55.53
12	3	4	2	1	3	73.81
13	4(1 : 5)	1	4	2	3	75.60
14	4	2	3	1	4	73.81
15	4	3	2	4	1	30.92
16	4	4	1	3	2	24.48
Ij	23.61	39.9	25.36	49.20	22.43	
IIj	24.48	38.16	38.13	46.45	27.15	
IIIj	49.62	33.25	40.51	26.71	47.42	
IVj	51.20	40.32	38.79	27.31	43.65	
Rj	27.59	7.07	15.15	22.49	24.99	

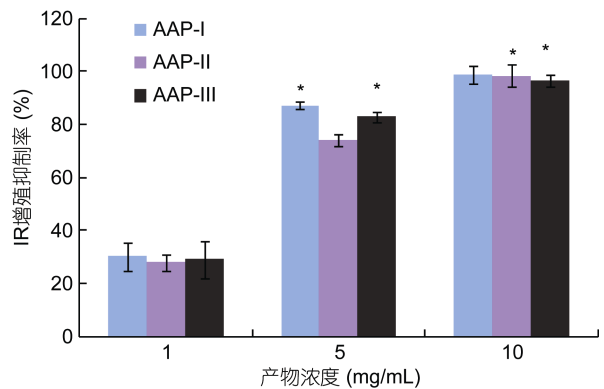


图 3 超滤后不同分子量产物对 DU-145 细胞增殖抑制 Fig.3 Effects on proliferative inhibition in different molecular weights to DU-145 cells

注: “*”表示有显著性差异($P < 0.05$)

性问题, AAP-I 是最好的选择, 所以采用阴离子交换层析对 AAP-I 进一步分离。

2.6 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析结果

将超滤得到的 AAP-I 用 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析得到三个峰产物(图 4), 分别命

名为 AAP-I-1、AAP-I-2 和 AAP-I-3。将每个峰产物浓缩冷冻干燥, 同样采用 MTT 法检测产物对 DU-145 的增殖抑制活性。结果(图 5)显示三种组分都能抑制 DU-145 细胞增殖, 都呈现剂量依赖效应, 并且在每一剂量下, 三种组分的抑制率皆表现为 AAP-I-1 > AAP-I-2 > AAP-I-3。对于中剂量组(5mg/mL), 抑制率分别是 $37.12 \pm 1.70\%$ 、 $34.78 \pm 2.20\%$ 和 $24.21 \pm 1.61\%$, 因此选取细胞增殖抑制率最高的 AAP-I-1 进一步分离纯化。

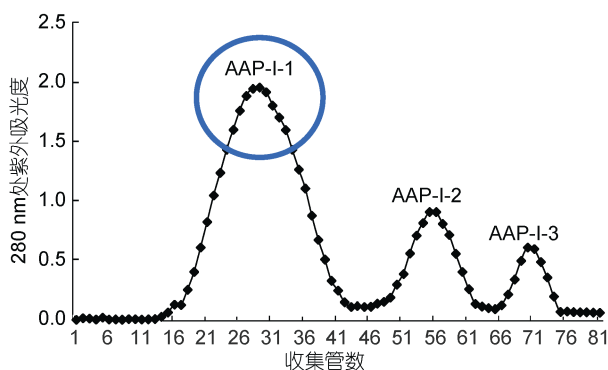


图 4 AAP-I 的 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析曲线图

Fig.4 The elution curve of AAP-I in anion exchange chromatography

注: 圆圈所示 AAP-I-1 为目标产物

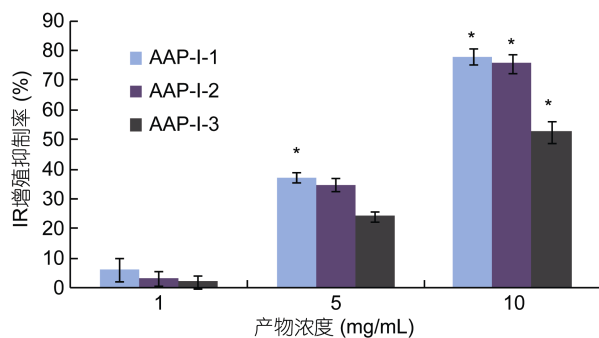


图 5 阴离子交换柱洗脱后三个峰产物对 DU-145 细胞增殖抑制

Fig.5 Effects on proliferative inhibition with three products after elution to DU-145 cells

注: “*”表示有显著性差异($P < 0.05$)

2.7 Sephadex G-25 凝胶层析分离结果

将 AAP-I-1 采用 Sephadex G-25 凝胶层析分离, 结果得到三个峰(图 6), 分别命名为 AAP-I-1-1、AAP-I-1-2 和 AAP-I-1-3, 收集后冷冻干燥, 分装于 -20°C 冰箱保存。采用 MTT 法检测抑制活性, 结果(图 7)显示三种组分都能抑制 DU-145 细胞增殖, 都呈现剂量依赖关系, 浓度越高抑制率越高。在较低浓度(1

和 5mg/mL)时, 三种组分的抑制率 AAP-I-1-2 > AAP-I-1-3 > AAP-I-1-1, 但是在高浓度组(10mg/mL), 抑制率为 AAP-I-1-2 > AAP-I-1-1 > AAP-I-1-3。对于中剂量(5mg/mL)时, 三个组分的抑制率分别是 $30.01 \pm 2.16\%$ 、 $46.14 \pm 2.29\%$ 和 $40.53 \pm 1.76\%$, 结果表明, 三个组分的产物对于剂量增加的敏感性有所不同, 但是对于各个浓度, AAP-I-1-2 对 DU-145 增殖的抑制率最好。

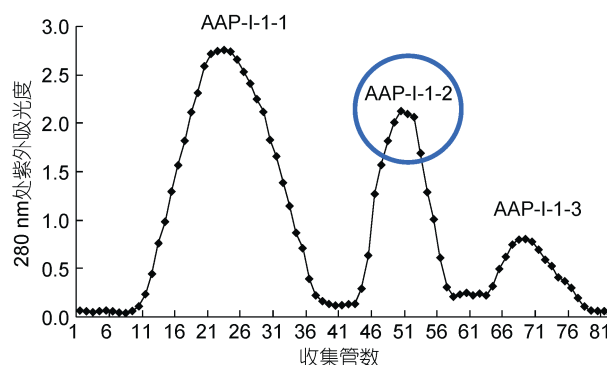


图 6 AAP-I-1 G-25 凝胶过滤洗脱曲线

Fig.6 Elution curve of AAP-I-1 in gel filtration chromatography

注: 圆圈所示 AAP-I-1-2 为目标产物

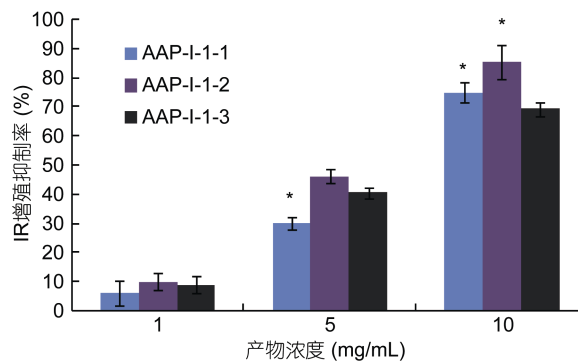


图 7 G-25 各洗脱峰产物 DU-145 细胞增殖活性示意图

Fig.7 Effects on the proliferative inhibition with different elution from gel filtration to DU-145 cells

注: “*”表示有显著性差异($P < 0.05$)

2.8 AAP-I-1-2 经高效液相分离结果、产物质谱及肽链序列

将 AAP-I-1-2 经 HPLC 纯化后结果如图 8 所示, 收集主峰产物浓缩冷冻干燥, 并命名为 AAP-H, 进行 MTT 活性测试, 24h 、 5mg/mL 对 DU-145 增殖抑制率为 $49.14\% \pm 2.29\%$, 比同等时间和剂量的 AAP-I-1-2 ($46.14\% \pm 2.29\%$) 略微偏高, 因此推断主峰 AAP-H 是 AAP-I-1-2 的主要活性物, AAP-H 经高效液相检测基本单一样品, 纯度大于 95% , 符合氨基酸序列测定要求, AAP-H 高效液相检测如图 9 所示。

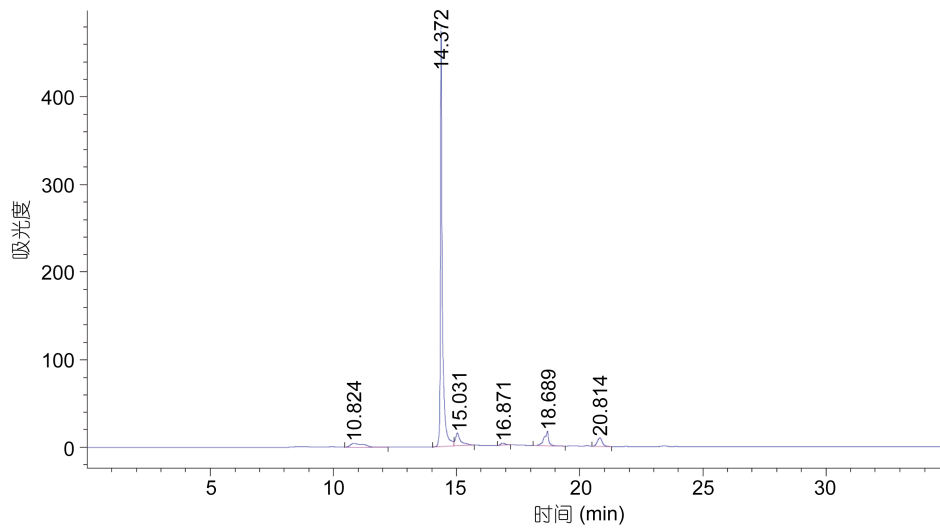


图 8 AAP-I-1-2 的 C18- HPLC 图
Fig.8 C18 HPLC chromatogram of AAP-I-1-2

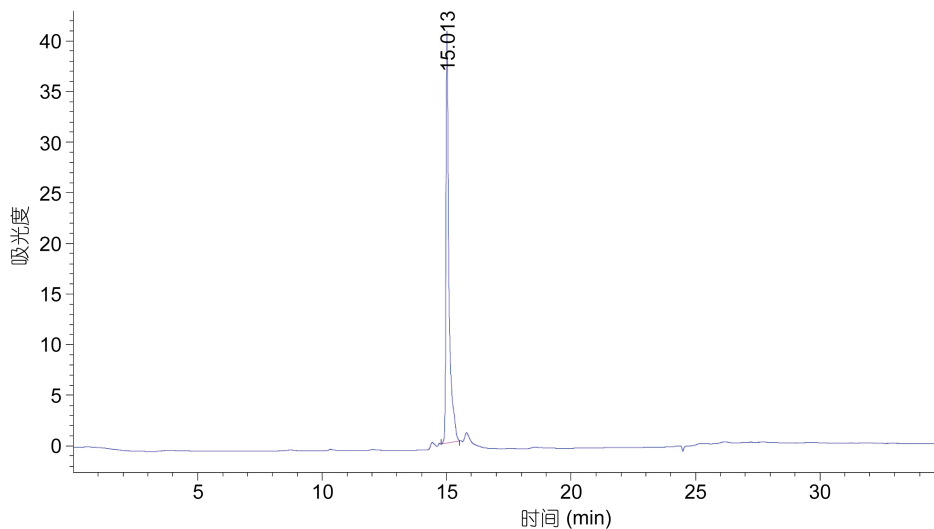


图 9 AAP-H 的 C18- HPLC 图
Fig.9 C18 HPLC chromatogram of AAP-H

将 AAP-H 进行氨基酸测序, 见图 10。结果为: Tyr-Val-Pro-Gly-Pro, 分子式为: $C_{26}H_{37}N_5O_7$, 分子量为 531.68Da, 与质谱的 532.27Da 基本吻合。因此推断, AAP-H 是比较纯的单一组分, 且是测序检测到的 Tyr-Val-Pro-Gly-Pro 寡肽。

2.9 倒置显微镜观察细胞形态

倒置显微镜观察结果如图 11 所示, 经 AAP-H 作用 24h 后, 空白对照组(A)的细胞生长良好, 细胞间排列紧密, 形态饱满。随着 AAP-H 浓度增加, 细胞形态发生变化, 如 1mg/mL 组(B)细胞出现细胞间隙增大, 轮廓模糊, 相对比空白组死细胞明显增多;

5mg/mL 组(C)细胞出现细胞收缩, 间隙增大, 胞膜出现空泡(C); 10mg/mL 组(D)的高剂量组, 细胞收缩变圆, 胞间间距增大, 细胞数量明显减少。表明 AAP-H 改变细胞形态同时抑制细胞增殖。

3 讨论

我国海域幅员辽阔, 海葵资源丰富, 常见的种类有: 中华仙影海葵(*Cereus sinensis* Verrill)、太平洋侧花海葵(*A. pacifica*)、黄侧花海葵(*A. xanthogrammica*)、纵条矾海葵(*Haliplanella luciae* Hand)和绿侧花海葵(*A. anjunae*)等。目前对海葵的研究主要是海葵毒素,

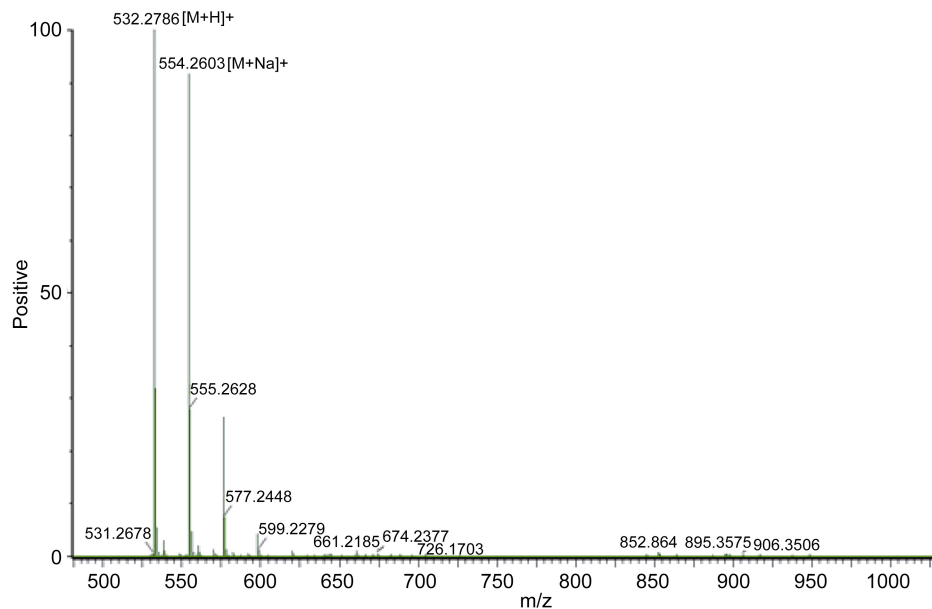


图 10 AAP-H 质谱图

Fig.10 Mass spectrogram of AAP-H

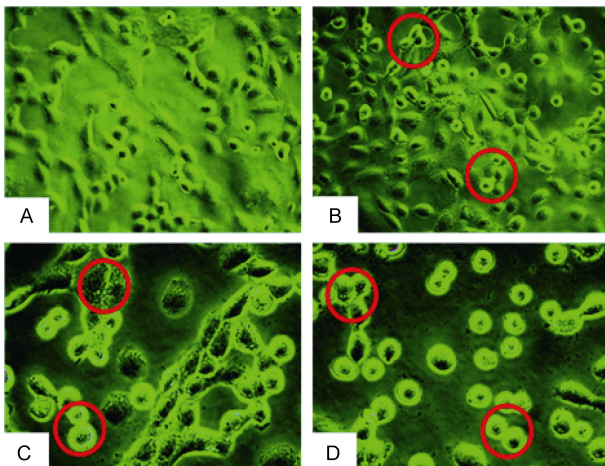
图 11 AAP-H 作用 DU-145 细胞 24h 后倒置显微镜观察细胞形态($\times 400$)

Fig.11 Cellular morphology of DU-145 under inverted microscope after treated with APP-H for 24h ($\times 400$)

注: A: 空白对照组细胞形态饱满, 生长情况良好; B: 1mg/mL 的 APP-H 作用 DU-145 细胞后, 细胞开始收缩变圆(圆圈所示); C: 5mg/mL 的 AAP-H 作用于 DU-145 细胞后, 细胞出现收缩变圆现象更明显, 同时出现空泡(圆圈所示); D: 10mg/mL 的 AAP-H 作用于 DU-145 细胞后, 视野中细胞数目明显减少, 细胞间间隙增大, 部分细胞脱离培养瓶壁(圆圈所示)

从海葵触手毒素中分离出多种具有细胞毒、神经毒作用的多肽和蛋白质; 另外, 也有研究表明, 海葵中还有丰富的甘油酯、神经酰胺、嘧啶、甾醇和生物碱等活性物(张均顺等, 1998)。这些毒素具有多种生物活性, 如抗菌、降血压、中枢神经抑制和镇痛等, 另外

海葵抗肿瘤活性物的研究也取得一定的进展, 如 Tejuca 等(2009)研究的三种海葵毒素通过使细胞膜成孔而抑制细胞增殖。但是到目前为止对海葵的研究基本都还停留在实验研究阶段, 并不能转化成产品, 其中重要的原因一方面是因为海葵毒素含量少, 提取困难; 另一方面由于海葵毒素毒性强, 在应用中副作用大, 这些因素都严重制约了海葵的研究进展。因此寻找新的途径开发海葵资源就显得尤为重要。

目前制备海洋生物活性肽比较常用的方法有三种: 一是化学合成方法制备生物活性肽; 二是以生物体或者组织为原料通过各种分离手段直接分离提取; 三是采用酶解法降解生物组织或者大分子产物制备生物活性肽(黄芳芳, 2011)。由于蛋白酶解法生产生物活性肽具有安全性高、反应条件温和、产率相对较高的优点, 因此该方法已经成为近年来制备活性肽的研究热点。海洋生物生长环境独特于陆生生物, 有的甚至生长在极高压或极低温等环境中, 造成海洋生物在生长过程中形成结构独特, 功能新颖的活性肽。这种活性肽部分以天然状态存在, 部分作为蛋白质大分子的结构域, 蛋白酶通过对特定的点位剪切, 可以得到活性比蛋白质更好的肽链, 这些生物活性肽在调节免疫系统、抗菌、抗血栓、抗高血压、调节胃肠道运动、清除自由基、抗病毒、促进矿物元素吸收和抗癌方面发挥重要的作用(黎观红等, 2004)。根据 Samaranayaka 等(2011)的研究表明: 肽链的生物活

性主要受氨基酸组分和肽链分子量大小影响, 活性肽比蛋白质、多聚肽和单纯的氨基酸具有更强的生物活性。另外肽链中的 Trp、Tyr、Met、Gly、Lys、His 和 Pro 等芳香族氨基酸或者疏水性氨基酸能很好地增强肽链的生物活性(Saito *et al*, 2003; Guo *et al*, 2009)。本实验结合舟山实际情况, 以绿侧花海葵肉为原料, 通过酶解法制备海葵抗肿瘤肽, 旨在为海葵资源的开发提供参考依据。

4 结论

通过实验确定碱性蛋白酶为最佳酶种, 采用正交实验进一步优化酶解法提取海葵抗肿瘤肽的最佳工艺条件为: 料液比为 1 : 5 (*W/V*)、pH=11、加酶量为 2000U/g、酶解温度为 35°C 和最佳酶解时间为 6h。通过超滤、阴离子交换层析、G-25 凝胶层析和反向高效液相等方法分离纯化, 以产物对 DU-145 增殖抑制率为指标, 最终纯化获得寡肽且氨基酸序列为: Tyr-Val-Pro-Gly-Pro, 并且 Tyr、Pro 和 Gly 结构可能是产物具有抗肿瘤活性的重要原因之一。综上所述, 绿侧花海葵肉是一种蛋白含量很高脂肪含量很低的天然食品, 通过酶解法制备的寡肽, 具有抗前列腺癌活性。

参 考 文 献

- 马 岚, 2006. 槐定碱对人肝癌 HepG-2 细胞诱导凋亡作用及其基因调控机制的实验研究. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 16—31
- 朱春晓, 王远红, 吕志华, 2011. 太平洋侧花海葵的营养成分分析. 中国海洋大学学报, 41(S1): 365—368
- 李 霞, 贾玉妹, 李雅娟, 2004. 黄海葵解剖学和主要器官组织学的研究. 大连水产学院学报, 19(3): 171—175
- 张 岩, 吴燕燕, 李来好等, 2012. 酶法制备海洋活性肽及其功能活性研究进展. 生物技术通报, 28(3): 42—48
- 张国梅, 杨最素, 丁国芳等, 2015. 沙蚕活性蛋白酶诱导人肺癌 SPC-A-1 细胞凋亡的机制研究. 现代食品科技, 31(3): 6—11
- 张均顺, 张培军, 1998. 海葵多肽神经毒素结构与功能研究新进展. 海洋与湖沼, 29(2): 212—218
- 胡 波, 2011. 海葵溶细胞素 Gigantoxin-4 的分离、鉴定和功能研究. 上海: 第二军医大学硕士论文, 8—30
- 黄芳芳, 2011. 乌贼墨寡肽酶解工艺及抗前列腺癌机制研究. 舟山: 浙江海洋学院硕士学位论文, 20—33
- 景奕文, 杨最素, 黄芳芳等, 2014. 乌贼墨多肽诱导人前列腺癌 DU-145 细胞凋亡的机制研究. 现代食品科技, 30(9): 1—6
- 谢书越, 穆利霞, 廖森泰等, 2015. 抗肿瘤活性肽的研究进展. 食品工业科技, 36(2): 368—372
- 窦光宇, 2003. 胜似鲜花的海洋动物——海葵. 森林与人类, (8): 38—38
- 黎观红, 乐国伟, 施用晖, 2004. 动物蛋白质营养中小肽的吸收及其生理作用. 生物学通报, 39(1): 20—22
- Anderluh G, Maček P, 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, 40(2): 111—124
- Chi V, Pennington M W, Norton R S *et al*, 2011. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*, 59(4): 529—546
- Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M, 2009. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*, 113(1): 238—245
- Gutiérrez-Aguirre I, Barlič A, Podlesek Z *et al*, 2004. Membrane insertion of the N-terminal α -helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin. *Biochemical Journal*, 384(2): 421—428
- Marino A, Valveri V, Muià C *et al*, 2004. Cytotoxicity of the nematocyst venom from the sea anemone *Aiptasia mutabilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4): 295—301
- Michalaki V, Syrigos K, Charles P *et al*, 2004. Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *British Journal of Cancer Immunology Letters*, 90(12): 2312—2316
- Monroy-Estrada H I, Segura-Puertas L, Galván-Arzate S *et al*, 2007. The crude venom from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* induces haemolysis and slight peroxidative damage in rat and human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 21(3): 398—402
- Rodríguez A A, Salceda E, Garateix A G *et al*, 2014. A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides*, 53: 3—12
- Saito K, Jin D H, Ogawa T *et al*, 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12): 3668—3674
- Samaranayaka A G P, Li-Chan E C Y, 2011. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4): 229—254
- Shkrob M A, Yanushevich Y G, Chudakov D M *et al*, 2005. Far-red fluorescent proteins evolved from a blue chromoprotein from *Actinia equina*. *Biochemical Journal*, 392(3): 649—654
- Soletti R C, de Faria G P, Vernal J *et al*, 2008. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-cancer drugs*, 19(5): 517—525
- Tejuca M, Anderluh G, Serra M D, 2009. Sea anemone cytotoxins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*, 54(8): 1206—1214

ENZYMATIC PREPARATION OF OLIGOPEPTIDE FROM *ANTHOPLEURA ANJUNAE* AND ITS ANTI-CANCER ACTIVITY OF PROSTATE CANCER CELLS

WU Zong-Ze^{1,2}, DING Guo-Fang^{1,2}, YANG Zui-Su¹, YU Fang-Miao¹, TANG Yun-Ping¹,
JIA Ying-Lu¹, ZHENG Yuan-Yuan¹, CHEN Rui¹

(1. School of Food Science and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Biomedical Products, Zhoushan 316022, China; 2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China)

Abstract The enzymatic preparation of anti-prostate cancer oligopeptide from *Anthopleura anjunae* and its process optimization was investigated. Taking the flesh of *A. anjunae* as the material, the best protease for enzymatic hydrolysis was screened and the reactions were optimized in orthogonal experiments. The active oligopeptide was purified by using ultrafiltration, anion exchange chromatography, G-25 gel chromatography and high performance liquid chromatography. All the active components were detected in methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay on prostate cancer DU-145 cells. Morphologic changes of the cells were observed in inverted microscopy. The optimum alkaline enzymatic hydrolysis conditions were determined as: temperature 35°C, pH 11, solid to liquid ratio 1 : 5, amount of enzyme 2000U/g, and hydrolysis time 6h. The anti-prostate cancer oligopeptide was obtained and identified as Tyr-Val-Pro-Gly-Pro (AAP-H) by N-terminal amino-acid sequencing. The results demonstrate that AAP-H suppressed the proliferation of DU-145 cells in a time- and dose-dependent manner and the apoptosis morphological features of cells occurred. The anti-prostate cancer oligopeptide was obtained from the enzymatic hydrolysates of green sea anemone using ultrafiltration and chromatographic separation techniques. Our findings suggest that AAP-H can inhibit the proliferation of prostate cancer DU-145 cells and induces apoptosis.

Key words *Anthopleura anjunae*; enzymatic hydrolysis; anti-tumor efficacy; oligopeptide; technology