

文蛤抗癌多肽对 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

康劲翮, 冷波, 贺量, 范成成, 王勤, 石艳, 陈清西

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室、厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 从文蛤体中分离纯化得到了抗癌多肽, 研究该多肽对 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 活力的影响, 结果显示文蛤抗癌多肽对该酶有明显的抑制作用. 在本文中, 我们将深入地研究其抑制作用机理和抑制效应类型, 结果表明: 随着文蛤多肽加入量的增大, 该酶活力呈指数下降, 测得导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为 $112.9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, 该多肽对酶的抑制作用是一种可逆过程, 抑制机理表现为混合型抑制类型, 对游离酶 (E) 的抑制常数 (K_1) 和酶-底物络合物的抑制常数 (K_{15}) 分别为 77.03 和 $697.44 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, 说明文蛤抗癌多肽与游离酶的结合导致酶活力的丧失, 明显的强于对酶-底物络合物的抑制效应, 底物的存在对该酶被文蛤抗癌多肽抑制作用起了保护作用.

关键词: 文蛤抗癌多肽; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q356.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2008)01-0033-04

病菌、病毒的侵染, 癌细胞的增殖及转移, 自身免疫疾病等都与细胞表面的糖密切相关^[1]. N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase, EC 3.2.1.52) 是一种位于溶酶体内的酸性水解酶, 存在所有组织中, 以前列腺和肾脏球肾小管溶酶体含量最高, 在体内主要参与糖蛋白、氨基多糖分子内葡萄糖苷键的水解. NAGase 中有多种同工酶, 大多数组织中有 A 型和 B 型同工酶. NAGase 在正常血液中只有少量存在. 近年来的研究表明, 在肝细胞受损时, 血清中该酶活性会升高^[2]. 有资料表明^[3], 多数肿瘤细胞中的溶酶体活性较高, 而肿瘤细胞中溶酶体活性的增强, 似有利于溶解其周围的胶原基质, 使肿瘤细胞易于向邻近组织侵犯或扩散转移. NAGase 作为溶酶体内水解酶之一, 能提示溶酶体的总体功能. 本文在获得锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) NAGase 酶抑制剂的基础上, 探讨文蛤抗癌多肽对该酶的生物学效应. 我们实验发现文蛤抗癌多肽对该酶具有较强的抑制作用. 本文首次报道了文蛤抗癌多肽在体外条件下对 NAGase 的抑制作用机理, 该研究为阐明文蛤抗癌多肽的抑癌作用机理, 以及对文蛤的药用价值的进一步开发提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

锯缘青蟹 NAGase 酶液为本实验室从青蟹内脏分离纯化得到; 文蛤抗癌多肽为本实验室从新鲜文蛤 (*Meretrix meretrix*) 中分离纯化得到; 对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNP-NAG) 为上海医药工业研究院生化室产品; 其余试剂均为国产 AR 试剂, 所有溶液均以去离子重蒸水配制.

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定 参考文献 [4] 并略作改变, 以 pNP-NAG 为底物, 在 2.0 cm^3 反应体系中, 含 $0.05 \text{ mol}/\text{dm}^3$ NaAc-HAc 缓冲液 (pH 5.8), $0.25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ pNP-NAG, 加入 10 mm^3 酶液, 混匀, 在 37°C 恒温水浴中准确反应 10 min, 然后加入 2.0 cm^3 $0.5 \text{ mol}/\text{dm}^3$ 的 NaOH 终止反应, 在 752 型 Spectrum 紫外可见分光光度计上测定波长为 405 nm 的光密度值 ($OD_{405 \text{ nm}}$), 光径为 1 cm , 测得在本体系下该产物的消光系数为 $8.80 \times 10^3 \text{ dm}^3 / (\text{mol} \cdot \text{cm})$.

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20063021); 厦门大学科技创新工程基金 (XDKJX20043001) 资助

作者简介: 康劲翮 (1982~), 女, 硕士研究生.

通讯作者: 陈清西, 男, 教授 (博导), E-mail: dqx@xmu.edu.cn

1.2.2 文蛤抗癌多肽对酶活力的影响 在上述测活体系中加入不同浓度的提纯的文蛤抗癌多肽溶液,测定酶的剩余活力,以酶的相对活力对文蛤多肽含量作图,绘制文蛤多肽对酶的抑制曲线图,测定导致酶活力下降 50%的抑制剂浓度, IC_{50} 值。

1.2.3 文蛤抗癌多肽对该酶抑制机理的判断 在含不同浓度的文蛤抗癌多肽作为效应物的测活体系中,加入不同量的纯化 NAGase 酶液,测得酶催化 pNP-NAG 水解的活力,以酶活力对相应酶量作图,根据文献 [5]作图结果判断此多肽对酶抑制作用是否是可逆反应。

1.2.4 文蛤抗癌多肽对 NAGase 抑制类型及抑制常数的测定 在含不同浓度的文蛤抗癌多肽作为效应物的测活体系中,改变底物 pNP-NAG 的浓度,加入等量的 NAGase 酶液,测得酶催化反应当初速度,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,通过比较酶催化的动力学参数,包括表观米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (v_m) 的变化来判断,并通过文献 [6]方法,分别以双倒数的斜率和纵轴截距对效应物浓度作图,求得效应物对游离酶 (E) 的抑制常数 (K_i) 和酶-底物络合物的抑制常数 (K_{is})。

2 实验结果

2.1 文蛤多肽对 NAGase 活力的影响

以文蛤抗癌多肽为效应物,在测活体系中加入不同浓度的效应物,测得文蛤多肽对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响。结果见图 1,随着多肽浓度的升高,酶的相对活力呈指数的下降,说明从文蛤提取的抗癌多肽对该酶有明显的抑制作用,当多肽浓度达到 $325 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 时,酶的剩余活力仅为 28.5%。测定导致酶活力丧失一半所需的文蛤抗癌多肽浓度为 $112.9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 。

2.2 文蛤多肽对 NAGase 的抑制机理

在固定底物 (pNP-NAG) 浓度为 $0.25 \text{mmol}/\text{cm}^3$ 的测活体系中,加入不同浓度的文蛤多肽,改变加入 NAGase 的量,测定酶催化 pNP-NAG 水解的活力。以酶的剩余活力对加入的酶量作图,结果见图 2 从图 2 可以看出,酶活力与加入的酶量关系图为一组通过原点的直线,随着效应物浓度的增大,直线的斜率降低,说明此多肽对酶的抑制作用属于可逆过程,该多肽是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低,而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降,如果是不可逆的反应,应该是得到一组横轴截距往右移动的平行线。

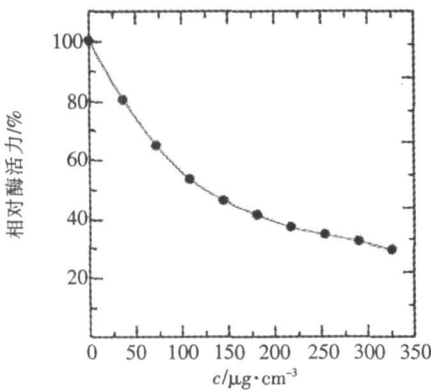


图 1 文蛤多肽对 NAGase 活力的影响

Fig.1 Effect of *Meretrix meretrix* peptide on the activity of NAGase

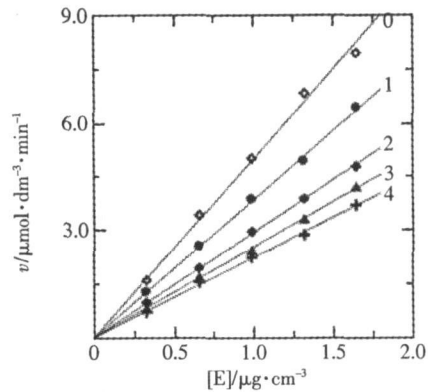


图 2 文蛤多肽对酪氨酸酶抑制机理的判断

Fig.2 Determination of the inhibitory mechanism of *Meretrix meretrix* peptide on NAGase

2.3 文蛤多肽对 NAGase 的抑制类型及抑制常数的测定

以文蛤多肽为效应物,在测活体系中固定酶的浓度,改变底物 pNP-NAG 的浓度,测定不同浓度效应物对酶活力的影响,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图 (图 3),得到相交于一点在第 2 象限的 1 组直线,横轴截距和纵轴截距都因多肽浓度的变化而改变,米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (v_m) 都随着多肽浓度增大而变化, K_m 值增大而 v_m 值下降,其抑制机理表现为混合型效应。二次作图,以斜率和纵轴截距对多肽浓度作图为直线,

分别可以求出该多肽对游离酶的抑制常数 (K_i) 为 $77.03 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 和对酶-底物络合物的抑制常数 (K_{is}) 为 $697.44 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

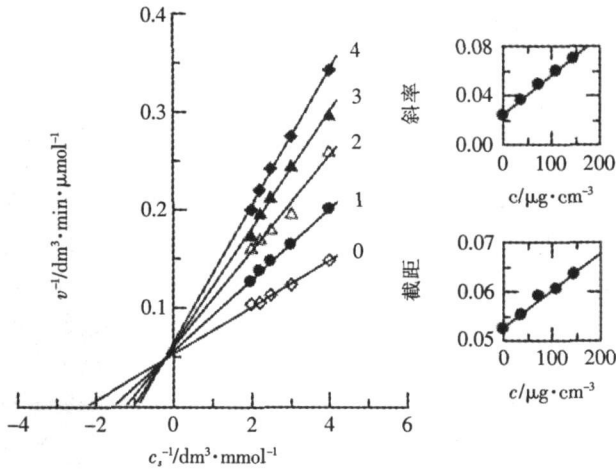
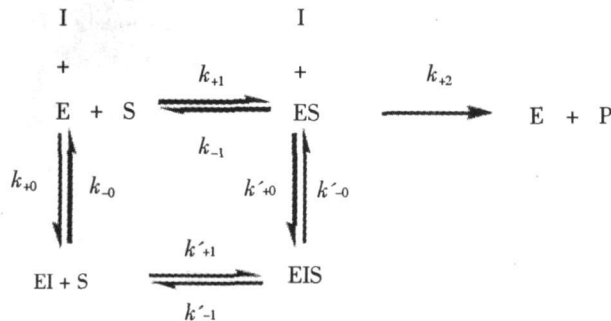


图3 文蛤抗癌多肽对 NAGase 抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图

Fig.3 Determination of the inhibitory type and inhibition constant of *Meretrix meretrix* peptide on NAGase

3 讨论

我们探讨了文蛤抗癌多肽对 NAGase 的体外实验, 结果表明 $1/v - 1/(S)$ 关系为一组相交于第二象限的直线, 酶催化 pNP-NAG 水解的动力学参数 K_m 和 v_m 均受影响. 表明该多肽可使酶对底物 pNP-NAG 的亲合力下降 (K_m 增大), 也可使酶催化活力下降 (v_m 下降), 说明该多肽对 NAGase 表现为混合型抑制效应. 混合型抑制效应分为竞争性抑制与非竞争性抑制之间的混合型抑制以及少量存在的非竞争性抑制与反竞争性抑制之间的混合型抑制两种中间类型. 该多肽既可以与游离酶 (E) 结合, 也可以与酶-底物的络合物 (ES) 结合, 也就是说, 底物 (S) 和该多肽对酶 (E) 的结合互不排斥, 该多肽对 E 与 S 的亲合力, S 对 E 与该多肽的亲合力是有影响的. 因此, 兼有部分竞争性抑制作用属于非竞争性抑制与竞争性抑制之间的类型. 但底物 (S) 与酶 (E) 的亲合力大于多肽与酶的亲合力. 而所形成的酶-底物-多肽络合物为无活性的, 不能分解出产物. 说明底物对酶有保护作用, 但即使底物浓度极高, 也必有部分的酶与多肽结合. 该多肽对酶作用的动力学模型可以表示为:



近些年来, 已有研究报道^[7], 原发性肝癌病人血清中 NAGase 活性值明显升高, 但原发性肝癌病人经过相应治疗, 包括手术、局部酒精或化学药物栓塞、全身化疗、射频治疗后, 整体血清 NAGase 值明显下降, 提示血清 NAGase 值可随着病情得到控制而下降, 血清 NAGase 值测定对原发性肝癌疗效观察有积极的检测意义. 另有报道^[8], 在其它癌症病人, 如胃、肾脏、乳腺癌和结肠的恶性肿瘤患者的 NAGase 活性也明显增高, 乳腺癌患者血清 NAGase 活性与肿瘤的分期无相关性, 但和 CEA 等肿瘤标志物具有相关性. 癌症患者 NAGase

活性病理性增高可能使肿瘤细胞新陈代谢的加快而导致细胞外排加强所致,或是枯否氏细胞摄粒作用的加强导致 NAGase 从外循环清除减少。

本实验的结果预示该多肽有可能通过参与抑制 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活力,从而起到抑制癌细胞生长的作用。通过研究,我们从理论上阐明了文蛤抗癌多肽对 NAGase 的抑制效应,为寻找文蛤抗癌多肽的抑癌机理提供了一些理论依据,但文蛤抗癌多肽的抑癌机理还有待于进一步更深入地研究。

参考文献:

- [1] 杨清香,曹军卫,黄国锦.糖基转移酶和去糖基化酶[J].氨基酸和生物资源,1997,19(2):38~43
- [2] 贾莉,乔文涛.血清 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶在肝病诊断中的应用[J].中日友好医院学报,1999,13(3):167~170
- [3] 江希明,郑树,丁仁瑞.肿瘤生物学[M].杭州:浙江科学技术出版社,1990:46~49.
- [4] 石艳,刘炜风,陈清西.菜青虫 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活性必需基团的研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2006,45(6):851~854
- [5] Zhang J P, Chen Q X, Wang Q, *et al* Purification and some properties of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*) [J]. Biochemistry (Moscow), 2006, 71: 55~59.
- [6] 杨学敏,张继平,陈清西,等.产物及其类似物对锯缘青蟹 NAGase 酶活力的影响[J].台湾海峡,2006,25(2):229~233.
- [7] 赵惠柳,朱波,劳明.血清 NAG 活性测定对 PLC 诊断及疗效观察的临床价值[J].广西医科大学学报,2003,20(2):212~213.
- [8] 罗鹭,冯钢,李红卫,等.乳腺癌病人血清 N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶活性的检测[J].湖南医学高等专科学校学报,2002,4(3):28~30.

Effects of anticancer peptide from Asiatic hard clam (*Meretrix meretrix*) on the activity of β -N-acetyl-D-glucosaminidase

KANG Jin-he, LENG Bo, HE Liang, FAN Cheng-cheng, WANG Qin, SHI Yan, CHEN Qing-xi

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract An anticancer peptide from Asiatic hard clam (*Meretrix meretrix*) has been purified. In this paper, the effect of this peptide on N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) from mud crab (*Scylla serrata*) was investigated. The results showed that the peptide inhibited the enzyme activity obviously. The inhibitory kinetics of the peptide on the enzyme was further studied. The results showed that the residual enzyme activity rapidly decreased with increasing concentrations of the peptide. The value of IC_{50} , the inhibitor's concentration leading to loss of 50% activity, was estimated to be $112.9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. The inhibition reaction of the peptide with the enzyme was determined to be reversible and the inhibition type was determined to be mixed-type by Lineweaver-Burk plots. The inhibition constants K_I and K_S were determined to be $77.03 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ and $697.44 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectively. The results show that the loss of the activity of enzyme caused by the combination of peptide with free enzyme is obviously stronger than with the enzyme-substrate complex. The presence of substrate offers a protection for the enzyme against the peptide inhibition.

Key words Asiatic hard clam (*Meretrix meretrix*); anticancer peptide; N-acetyl-D-glucosaminidase; inhibition; kinetics

(责任编辑:霍湘娟)