

- ods for the classification of LDL pattern type[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(1/2): 251-257.
- [17] PATHAK M, CHAUDHARY N, RATHORE A S. Development of a low-cost, high-throughput native polyacrylamide gel electrophoresis (N-PAGE) protocol for lipoprotein sub-fractionation using Quality by Design approach[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 92: 119-126.
- [18] MORENO-GORDALIZA E, VAN DER LEE S J, DEMIRKAN A, et al. A novel method for serum lipoprotein profiling using high performance capillary isotachopheresis[J]. Anal Chim Acta, 2016, 944: 57-69.
- [19] MATYUS S P, BRAUN P J, WOLAK-DINSMORE J A, et al. NMR measurement of LDL particle number using the Vantera (R) Clinical Analyzer[J]. Clin Biochem, 2014, 47(16/17): 203-210.
- [20] AKYOL S, LU J, AKYOL O, et al. The role of electro-negative low-density lipoprotein in cardiovascular diseases and its therapeutic implications[J]. Trends Cardiovasc Med, 2017, 27(4): 239-246.

(收稿日期: 2018-01-20 修回日期: 2018-03-28)

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.048

胰蛋白酶抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展*

郑文骏¹, 毛智翔¹, 黄琳娟¹综述, 姚 军², 钱翠娟^{3△}审校

(台州学院医学院: 1. 临床医学系; 2. 医学检验教研室; 3. 临床医学教研室, 浙江台州 318000)

关键词: 胰蛋白酶抑制剂; 肿瘤治疗; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图法分类号: R730.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)16-2508-04

胰蛋白酶是胰腺分泌后活化的一种酶, 可以选择性地水解蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链, 进而分解为氨基酸。科学家们在豆类、谷类、油料作物等植物中发现了多种胰蛋白酶抑制剂。其中, 植物来源的胰蛋白酶抑制剂具有相对分子质量较小、免疫反应较弱、原料来源广及价格低廉等优点, 受到研究者的关注。目前, 临床上胰蛋白酶抑制剂已用于治疗急性胰腺炎、防治脑缺血和脑水肿、抑制宫缩及预防早产等, 并且取得了很好的效果^[1]。已有的体外研究结果表明, 存在于豆类植物中的 Bowman-Birk 型(BBI)和 Kunitz 型(KTI)胰蛋白酶抑制剂能够通过抑制癌细胞增殖、黏附、迁移与侵袭, 或促进癌细胞凋亡等方式抑制肿瘤细胞的生长, 最终抑制肿瘤的发生和发展。此外, 胰蛋白酶抑制剂可以与多西他塞、多西紫杉醇、环磷酰胺等多种抗癌药物联合使用, 通过增强化疗药物的疗效或者减少化疗药物的耐药, 取得更优的抗肿瘤效果^[2]。但是, 胰蛋白酶抑制剂仍尚未应用于临床肿瘤的治疗。因此, 在肿瘤的分子靶向治疗的研究中, 胰蛋白酶抑制剂一直是目前研究的热点。

1 胰蛋白酶抑制剂的基本特征

胰蛋白酶抑制剂是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 在人体、动物和植物中都有分布, 主要功能是抑制胰蛋白酶的分泌^[1-2]。多数已开发的胰蛋白酶抑制剂来源于人和动物, 如从人尿中提取的人尿胰蛋白酶抑制

剂、从牛肺或牛胰中提取的抑肽酶等。但是, 这类胰蛋白酶抑制剂易受到病原微生物(如病毒等)的污染, 且相对分子质量较大, 可引起过敏反应等。另一些植物来源的胰蛋白酶抑制剂在自然界的含量丰富, 活性明确, 且相对分子质量较小, 所以受到越来越多科研工作者的青睐, 如从黄豆中提取的大豆胰蛋白酶抑制剂、从南瓜籽中提取的南瓜胰蛋白酶抑制剂等^[1-2]。根据结构和性质的不同, 通常将来源于豆类中的胰蛋白酶抑制剂分为两大类, 即 KTI 和 BBI^[3]。

1.1 KTI KTI 是在 1945 年首次从大豆中分离结晶出来而命名的^[3], 它是一种单体蛋白质, 相对分子质量在 20 kDa 左右, 由 181 个氨基酸和 2 对二硫键组成, 同时具有由几个半胱氨酸残基形成的 1 对或 2 对分子内二硫键所保持的高度保守的 N-末端区域和结构, 呈易变的非螺旋形, 对热不稳定^[4]。分子内只有 1 个活性中心, 其活性中心位于第 63 号的精氨酸和第 64 号的异亮氨酸上, 主要对胰蛋白酶直接地、专一地起作用^[5]。KTI 属单头抑制剂, 即一个抑制剂分子只结合一分子胰蛋白酶。

1.2 BBI BBI 是由 Bowman 在 1944 年作为丙酮不溶因子从大豆中分离出来的, Birk 又于 1961 年成功纯化并定义 BBI; BBI 也是一种单体蛋白质, 相对分子质量在 8 kDa 左右, 是由 71 个氨基酸组成的单肽链, 含有 7 个二硫键和大量的半胱氨酸, 具有热稳定性^[6]。2 个 BBI 结构域由保守的二硫键保持, 每个结

* 基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(No. LY16H160033); 浙江省公益技术应用研究项目(No. 2016C33189); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710350008)。

△ 通信作者, E-mail: qiancuijuan2007@163.com。

构域携带一个活性位点,在 2 个不同活性位点上具有 2 个独立的结合中心,即胰蛋白酶结合中心(第 16 号的赖氨酸,第 17 号的丝氨酸)和胰凝乳蛋白酶结合中心(第 44 号的亮氨酸,第 45 号的丝氨酸),分别用于抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶^[7]。

2 胰蛋白酶抑制剂的抗肿瘤作用

胰蛋白酶抑制剂在肿瘤中的研究仍集中在体外研究中,尚未见到胰蛋白酶抑制剂应用于人体内肿瘤的治疗的报道。目前的体外研究表明,胰蛋白酶抑制剂的抗肿瘤作用主要通过调控细胞周期、抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、或抑制肿瘤细胞侵袭等实现的^[6]。

2.1 胰蛋白酶抑制剂的抗细胞增殖作用 现有的研究结果表明,胰蛋白酶抑制剂能够抑制多种肿瘤细胞如人结肠癌细胞、人白血病细胞、人乳腺癌细胞、人卵巢癌细胞、舌癌细胞的生长和增殖^[8-13]。

有研究者最早在番薯根中发现并提取出胰蛋白酶抑制剂^[14]。研究发现,胰蛋白酶抑制剂能诱导人早幼粒白血病细胞 NB4 出现细胞周期阻滞,从而抑制细胞的增殖^[9]。其中一种在番薯根中提取的主要储存蛋白被命名为 Sporamin, Sporamin 占番薯根中总蛋白的 80%,属于 KTI^[15]。有研究表明, Sporamin 能够通过抑制 Akt/GSK-3 信号通路的转导从而抑制体外培养的人舌癌细胞的生长和增殖,并且这种作用具有一定的浓度依赖和时间依赖性^[16]。而且, Sporamin 也能够抑制体外培养的胰腺癌细胞的生长和增殖,这种作用可能与 Notch4 蛋白的表达下调有关^[16]。

另一种类型的胰蛋白酶抑制剂 BBI 能够通过上调肿瘤抑制因子-连接蛋白 43(Cx43)的表达而抑制骨肉瘤细胞的增殖^[17]。此外, BBI 通过下调细胞周期蛋白 D1、E1 和 ERK1/2 的磷酸化及上调细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的表达诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 在 G1/S 期出现细胞周期停滞,且这可能与 BBI 对泛素-蛋白酶体机制的抑制有关^[11]。另一种从豇豆种子里纯化而来的黑眼豌豆胰蛋白酶/糜蛋白酶抑制剂(BTCI)则是通过抑制 VEGF 分泌来抑制胃癌 AGS 细胞及结肠癌 HT-29 细胞增殖^[18]。

2.2 胰蛋白酶抑制剂的促凋亡作用 胰蛋白酶抑制剂在细胞凋亡方面也发挥了显著的作用,目前已发现,不同的胰蛋白酶抑制剂分别对肝癌细胞、人白血病细胞、乳腺癌细胞、人结肠癌细胞、人肺癌细胞等发挥促凋亡作用,其中诱导细胞凋亡最主要的途径就是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)家族的级联反应^[19-23]。

一种来源于荞麦并经过重组的胰蛋白酶抑制剂 rBTI 能够通过促进线粒体中细胞色素 C 的释放诱导肝癌细胞 H22 的凋亡,同时对正常的 7702 细胞仅有很小的作用^[19]。紫花芸豆胰蛋白酶抑制剂通过 Fas 与

其配体结合反应激活 Caspase-8,产生一系列级联反应导致细胞的凋亡^[9]。BTCI 能引起线粒体膜透化、溶酶体膜透化和 DNA 断裂导致乳腺癌细胞的凋亡^[11]。

胰蛋白酶抑制剂还能通过影响转录因子来促进癌细胞的凋亡。在结肠癌细胞中存在一种过表达的高度保守的核蛋白高迁移率族蛋白 1(HMGB1),经研究发现这种蛋白与结肠癌的进展关系密切^[24]。尿胰蛋白酶抑制剂乌司他丁能抑制 HMGB1 的表达,同时增加 NF- κ B 活性导致其靶基因产物 c-IAP2 的过表达来达到促进细胞凋亡的作用^[22],同时还能抑制 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性^[25]。另外一种新型经苦瓜提取的生物活性肽 BG-4 表现出显著的胰蛋白酶抑制作用,研究发现, BG-4 能通过上调 Bax 蛋白的表达并下调 X 连锁凋亡抑制蛋白的表达,从而促进结肠癌细胞的凋亡^[26]。

2.3 胰蛋白酶抑制剂的抗侵袭作用 肿瘤的侵袭能力主要体现在细胞外基质的降解、血管淋巴管的生成、上皮细胞-间充质转化等方面,而胰蛋白酶抑制剂能够通过影响这些过程来达到抗侵袭的作用。

Bikunin 也是一种 KTI。一方面, Bikunin 能够通过抑制胞外钙离子内流,来抑制转化生长因子(TGF)- β 1 介导的 ERK 信号转导及 Src 酪氨酸激酶的活化,从而导致 HRA 细胞中 PA 系统的抑制^[27]。另一方面,妊娠相关血浆蛋白-A 基因与 MT-SP1 基因可能分别作为 Bikunin 处理后的早期反应基因与晚期反应基因,而二者都与癌细胞的侵袭相关^[28]。此外, BBI 能够通过抑制基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 的分泌和活性,来阻碍癌细胞的侵袭和转移,同时可以明显地降低 VEGF 的产生和分泌,从而抑制肿瘤的血管生成^[18]。

胰蛋白酶抑制剂 EcTI 则是通过抑制胃癌细胞整合素- β 1 的表达,造成了 Src-FAK 通路受阻,进而阻止 Cortactin 上主要的 Src 磷酸化位点发生酪氨酸磷酸化,使细胞伪足无法形成,抑制细胞的黏和侵袭作用^[29]。此外, EcTI 可通过抑制 MMP-9、MMP-12、金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)等抑制肿瘤细胞侵袭作用^[30]。

3 胰蛋白酶抑制剂的应用

乌司他丁现与多种抗癌药合用,来增强其药效。乌司他丁与多西他塞通过抑制血管生成和上皮间质转化(EMT),从而抑制乳腺癌的侵袭和转移,二者具有协同作用^[31]。此外,有研究表明,乌司他丁和环磷酸胺处理小鼠异种移植乳腺癌细胞 MCF-7,两者都能有效抑制癌细胞中 CXCR4 和 MMP-9 的表达,且二者具有协同作用^[16]。同时乌司他丁也能增强多西紫杉醇的抗癌作用^[5],不过乌司他丁增强多西紫杉醇的抗癌作用的机制还不清楚。

除了与其他抗癌药物合用之外,还可以通过胰蛋白酶抑制剂与功能型多肽重组来进行抗肿瘤治疗。葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)是一种在癌细胞的细胞膜上表达,且在正常细胞不表达的蛋白质^[32]。因此,通过 GRP78 来行抗肿瘤治疗是可行的。而绿豆胰蛋白酶抑制剂(mTI)是一种经绿豆提取的胰蛋白酶抑制剂,研究表明,通过 GRP78 的结合肽 WIFPWQL 与 mTI 的融合形成重组蛋白 GBP-TI,GBP-TI 能通过 GBP 与 GRP78 的结合显著提高其入胞的能力,再通过 mTI 的抗癌作用对结肠癌细胞产生特异且强大的生长抑制和凋亡诱导作用,该重组过程不影响二者酶活性,且能显著增强其抗癌作用^[33]。

4 小 结

在不同的肿瘤中胰蛋白酶抑制剂具有不同的表达趋势,目前胰蛋白酶抑制剂在肿瘤细胞中的效应还未完全明确,其在肿瘤中发挥的作用机制还需要更深入的研究。同时,对胰蛋白酶抑制剂的研究还只停留在细胞、动物试验的层面,胰蛋白酶抑制剂在早期癌症临床治疗、联合用药及预后等方面的作用也需要更深入的研究。

参考文献

- [1] LIANG G, BOWEN J P. Development of Trypsin-Like Serine Protease Inhibitors as Therapeutic Agents: Opportunities, Challenges, and their Unique Structure-Based Rationales[J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(13): 1506-1529.
- [2] VOORHEES P M, ORLOWSKI R Z. The proteasome inhibitors in cancer therapy[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015, 5(2): 1443-1450.
- [3] PRICE S J, PANGLOLI P, KRISHNAN H B, et al. Kunitz trypsin inhibitor in addition to Bowman-Birk inhibitor influence stability of lunasin against pepsin-pancreatin hydrolysis[J]. *Food Res Int*, 2016, 90: 205-215.
- [4] SHAMSI T N, PARVEEN R, AMIR M, et al. Allium sativum Protease Inhibitor: A Novel Kunitz Trypsin Inhibitor from Garlic Is a New Comrade of the Serpin Family [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165572.
- [5] CHAN Y S, ZHANG Y, SZE S C, et al. A thermostable trypsin inhibitor with antiproliferative activity from small pinto beans[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2014, 29(4): 485-490.
- [6] MA T C, LE G, ZHOU R H, et al. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) blocks HIV entry into macrophages[J]. *Virology*, 2018, 513: 91-97.
- [7] LI X, HUA Y, CHEN Y, et al. An advance for removing antinutritional protease inhibitors: Soybean whey purification of Bowman-Birk chymotrypsin inhibitor by combination of two oppositely charged polysaccharides[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 164: 349-357.
- [8] CLEMENTE A, ARQUES MDEL C. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(30): 10305-10315.
- [9] LI M, LIU Q, CUI Y, et al. Isolation and characterization of a phaseolus vulgaris trypsin inhibitor with antiproliferative activity on leukemia and lymphoma cells[J]. *Molecules*, 2017, 22(1): E187.
- [10] AL-AWADHI F H, SALVADOR L A, LAW B K, et al. Kempopeptin C, a Novel Marine-Derived Serine Protease Inhibitor Targeting Invasive Breast Cancer [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(9): E290.
- [11] MEHDAD A, BRUMANA G, SOUZA A A, et al. A Bowman-Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition[J]. *Cell Death Discov*, 2016, 2: 15067.
- [12] ZHAO L P, XU T M, KAN M J, et al. A novel uPAg-KPI fusion protein inhibits the growth and invasion of human ovarian cancer cells in vitro[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(5): 1310-1316.
- [13] YAO J, QIAN C. Sporamin induce apoptosis in human tongue carcinoma cells by down-regulating Akt/GSK-3 signaling[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2011, 25(2): 229-236.
- [14] CHEN H J, LIANG S H, HUANG G J, et al. Sweet potato cysteine proteases SPAE and SPCP2 participate in sporamin degradation during storage root sprouting [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 172(186/187): 39-49.
- [15] SENTHILKUMAR R, YE H K W. Multiple biological functions of sporamin related to stress tolerance in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1309-1317.
- [16] 陈依依, 曾菊萍, 陈晓英, 等. Sporamin 对人胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭以及 Notch4 蛋白表达的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(6): 779-782.
- [17] FEREIDUNIAN A, SADEGHALVAD M, OSOIE M O, et al. Soybean Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI): Identification of the Mechanisms of BBI Suppressive Effect on Growth of Two Adenocarcinoma Cell Lines: AGS and HT29[J]. *Arch Med Res*, 2014, 45(6): 455-461.
- [18] BAI C Z, FENG M L, HAO X L, et al. Anti-tumoral effects of a trypsin inhibitor derived from buckwheat in vitro and in vivo[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 1777-1782.
- [19] NAKAHATA A M, MAYER B, RIES C, et al. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines [J]. *Biol Chem*, 2011, 392(4): 327-336.
- [20] ISMAIL A, NOOLU B, GOGULOTHU R, et al. Cytotoxicity and Proteasome Inhibition by Alkaloid Extract from *Murraya koenigii* Leaves in Breast Cancer Cells-Molecular Docking Studies [J]. *J Med Food*, 2016, 19(12): 1155-1165.

- [21] WANG Y, TAO T, DONG Y, et al. Effect of ulinastatin on the expression and distribution of high mobility group box 1 in human colon carcinoma cells in vitro[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3):2041-2047.
- [22] SHAMSI T N, PARVEEN R, FATIMA S. Trypsin inhibitors demonstrate antioxidant activities, inhibit A549 cell proliferation, and increase activities of reactive oxygen species scavenging enzymes[J]. Indian J Pharmacol, 2017, 49(2):155-160.
- [23] SATOH M, KOTANI K, YAMADA S, et al. Postoperative changes in high mobility group box 1 levels after colorectal cancer surgery[J]. J Int Med Res, 2017, 45(6):1651-1657.
- [24] SUN N, WANG H, WANG L. Protective effects of ghrelin against oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammation in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the HMGB1 and TLR4/NF- κ B pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3):2764-2770.
- [25] DIA V P, KRISHNAN H B. BG-4, a novel anticancer peptide from bitter melon (*Momordica charantia*), promotes apoptosis in human colon cancer cells[J]. Sci Rep, 2016, 6:33532.
- [26] KOBAYASHI H, SUZUKI M, TANAKA Y, et al. A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium-dependent transforming growth factor- β 1 signaling cascade[J]. J Biol Chem, 2003, 278(10):7790-7799.
- [27] SUZUKI M, KOBAYASHI H, TANAKA Y, et al. Bikunin Target Genes in Ovarian Cancer Cells Identified by Microarray Analysis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(17):14640-14646.
- [28] DE PAULA C A, COULSON-THOMAS V J, Ferreira J G, et al. Enterolobium contortisiliquum trypsin inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2012, 287(1):170-182.
- [29] THEODORO-JUNIOR O A, RIGHETTI R F, ALMEIDA-REIS R, et al. A Plant Proteinase Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* Attenuates Pulmonary Mechanics, Inflammation and Remodeling Induced by Elastase in Mice[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2):E403.
- [30] SHEN F, CAI W S, LI J L, et al. Synergism from the combination of ulinastatin and curcumin offers greater inhibition against colorectal cancer liver metastases via modulating matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression[J]. Onco Targets Ther, 2014, 7:305-314.
- [31] GAO F, SUN Z, SUN X, et al. Ulinastatin exerts synergistic effects with taxotere and inhibits invasion and metastasis of breast cancer by blocking angiogenesis and the epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2013, 28(3):218-225.
- [32] STEINER N, BORJAN B, HAJEK R, et al. Expression and release of glucose-regulated protein-78 (GRP78) in multiple myeloma[J]. Oncotarget, 2017, 8(34):56243-56254.
- [33] LI Z, ZHAO C, LI Z, et al. Reconstructed mung bean trypsin inhibitor targeting cell surface GRP78 induces apoptosis and inhibits tumor growth in colorectal cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 47:68-75.

(收稿日期:2018-01-22 修回日期:2018-04-02)

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.049

热休克蛋白 90 α 与胃癌的研究进展^{*}

王 鹏 综述,张铁军,刘瑞刚 审校

(内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院检验科,内蒙古包头 014010)

关键词:热休克蛋白; 胃癌; 抑制剂; 客户蛋白

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)16-2511-04

热休克蛋白(HSP)是广泛存在于细菌、动物和人体中的热应激蛋白质大家族,主要由热休克或其他一些应激源诱导而发生表达。在生物体内主要能发挥协助蛋白质的折叠、转运、跨膜、稳定构象及细胞的信号传导、损伤保护等“分子伴侣”的功能^[1-2]。按相对分子质量分为 HSP27、HSP60、HSP40、HSP70、HSP90、HSP110 等^[3-4]。HSP90 是 HSPs 家族中重要的成员之一,据研究显示, HSP90 常用于在肿瘤中调控突变或高表达的“客户蛋白”,如蛋白激酶 B

(AKT)、肝细胞生长因子受体 C-Met、人类表皮生长因子受体 2 (HER2)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4)、表皮生长因子受体 (EGFR)、雄激素受体 (AR),同时,其在肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、凋亡等分子通路中发挥重要作用^[5]。HSP90 α 是 HSP90 的两种异构体形式之一,在细胞内外非常稳定并且发挥主要的“伴侣蛋白”作用。胃癌是全球常见的恶性肿瘤之一,胃癌的早期诊断是提高诊断效率和治愈率的关键。HSP90 α 的底物蛋白涉及几乎所有的细胞过

^{*} 基金项目:内蒙古科技大学包头医学院科学研究基金项目(BYJJ-QM 2016106)。