

原核表达 Lunasin 的抗炎生物学活性鉴定及其对 J774A.1 细胞组织因子表达的影响

陈玉华, 付常振, 李明英, 李敬达, 迟彦

(大连大学生命科学与技术学院糖脂代谢重点实验室, 辽宁省大连市 116622)

[关键词] Lunasin; 核因子 κ B; 炎症因子; 组织因子; 脂多糖

[摘要] **目的** 检测原核表达 Lunasin(露那辛)的抗炎生物学活性,为 Lunasin 今后在生物医药领域的开发奠定基础。**方法** 利用基因工程技术将 PCR 扩增得到的 Lunasin DNA 片段定向克隆至表达载体 pET28,酶切及测序鉴定后对其诱导表达,利用镍离子亲和层析法对其进行纯化;Griess 法和 ELISA 法检测小鼠 J774A.1 细胞培养液中 Lunasin 对一氧化氮和肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 等炎症因子含量的影响;Western blot 检测 Lunasin 对核因子 κ B(NF- κ B)p65 磷酸化以及组织因子(TF)表达的影响。**结果** 成功构建了 Lunasin 的原核表达载体,获得纯度达 90%的 Lunasin 多肽。Lunasin 能通过抑制脂多糖(LPS)诱导小鼠 J774A.1 细胞 NF- κ B 的活化而抑制一氧化氮合成以及下游基因肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 的表达。Lunasin 对 LPS 诱导的 J774A.1 细胞 TF 的表达也具有显著抑制作用。**结论** 原核表达的 Lunasin 表现出显著的抗炎生物学活性,明显抑制 LPS 诱导的 J774A.1 细胞 TF 表达,其机制可能是通过抑制 NF- κ B 的活化而实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Identification of anti-inflammatory biological activity of prokaryotic expressed lunasin and its effect on the expression of tissue factor in J774A.1 cells

CHEN Yu-Hua, FU Chang-Zhen, LI Ming-Ying, LI Jing-Da, CHI Yan

(Key Laboratory of Carbohydrate and Lipid Metabolism Research, College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

[KEY WORDS] Lunasin; Nuclear factor- κ B; Inflammatory cytokine; Tissue factor; Lipopolysaccharide

[ABSTRACT] **Aim** To test the anti-inflammatory biological activity of prokaryotic expressed lunasin, and to lay the foundation for future lunasin development in biomedical field. **Methods** The lunasin DNA fragment amplified by PCR was cloned into the expression vector pET28 by means of genetic engineering technology. After the identification by restriction enzyme digestion and sequencing, lunasin expression was induced. The purification of lunasin was performed by nickel ion affinity chromatography. Griess method and ELISA were used to test the effects of lunasin on the contents of nitric oxide, tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the culture medium of mouse J774A.1 cells. The effects of lunasin on the phosphorylation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and the expression of tissue factor (TF) were detected by Western blot.

Results Prokaryotic expression vector of lunasin was successfully constructed and the recombinant lunasin peptide with about 90% purification was obtained. Lunasin could inhibit activation of NF- κ B induced by lipopolysaccharide (LPS) in mouse J774A.1 cells and then subsequently suppressed the synthesis of nitric oxide and the expression of downstream genes like tumor necrosis factor- α and interleukin-6. Lunasin also significantly inhibited the expression of TF induced by LPS in J774A.1 cells. **Conclusion** Prokaryotic expressed lunasin shows significant anti-inflammatory biological activity, and significantly inhibits the TF expression induced by LPS in J774A.1 cells, and its mechanism may be achieved by inhibiting the activation of NF- κ B.

[收稿日期] 2017-03-24

[修回日期] 2017-05-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81202536);大连市科学计划项目(2015E21SF012)

[作者简介] 陈玉华,硕士研究生,研究方向为生物活性肽抗炎机理,E-mail 为 1522584070@qq.com。通讯作者迟彦,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为生物活性肽抗炎机理及其开发,E-mail 为 chi_yan@126.com。

Lunasin(露那辛)是来源于大豆的含有 43 个氨基酸的生物活性肽,由 2S 白蛋白(GM2S-1)基因编码,分子量为 5.5 kDa^[1],最早由日本新潟大学医学部小组成员于 1987 年从大豆种子中分离鉴定而来^[2]。近年来研究表明该活性肽具有抑制炎症的发生^[3]、抑制细胞增殖^[4]、抗氧化^[5]、抗癌^[6]、调节体内胆固醇生物合成^[7]等作用而广受研究者关注。研究认为 Lunasin 的抗炎反应是通过抑制核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 的活性而实现的^[8]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是促炎细胞因子,它可通过活化 NF- κ B 而上调表达白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 以及一氧化氮(nitric oxide, NO)等多种细胞炎症因子,在炎症疾病中起到促炎作用。因此 LPS 也是目前公认的体外制备炎症细胞模型的刺激物^[9]。动脉粥样硬化血栓形成的主要危险因素包括了慢性炎症反应。组织因子(tissue factor, TF)是凝血过程的启动子,是决定斑块形成血栓的重要因素之一^[10]。当动脉粥样硬化发生时,斑块内部的炎症反应、炎症介质(如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6)会导致 TF 的表达上调,而表达上调的 TF 又正反馈调节炎症反应,进而削弱了动脉斑块的稳定性,从而加快了斑块破裂和血栓形成的进程^[11]。抑制炎症介质诱导的巨噬细胞 TF 的表达,对于最终抑制 TF 的促凝活性以及今后临床动脉血栓治疗具有重要意义。Cam 等^[12]研究发现, Lunasin 与动脉粥样硬化相关, Lunasin 抑制炎症相关通路。

本研究拟利用基因工程手段构建 Lunasin 的原核表达载体并对其诱导表达和亲和层析纯化,以 LPS 诱导巨噬细胞产生 NO、IL-6、TNF- α , 鉴定原核表达的 Lunasin 抗炎生物学活性,在此基础上,进一步探讨原核表达的 Lunasin 对 LPS 诱导巨噬细胞 TF 表达的抑制作用,为动脉血栓的预防和治疗、今后 Lunasin 在食品、生物医药领域的开发应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

J774A.1 细胞株购自 ATCC 库;大肠埃希菌 BL21(DE3)、原核表达载体 pET-28a(+), pMD19-Lunasin 质粒均为本室保存; Opti-DMEM I Reduced Serum Medium(无血清)培养基、脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司;限制性内切酶 NcoI、XhoI、Pvu II 及 T 载体(pMD19-T simple vec-

tor)均购自 TaKaRa 公司; Trans2K Plus II、Trans8K DNA Marker 购于全式金生物公司; NF- κ B p65-siRNA 由吉玛基因公司合成;胎牛血清购自 Hyclone 公司;引物由上海生工公司合成;质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、卡那霉素、氨苄青霉素购自上海生工公司; BCA 蛋白检测试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; NO 检测试剂盒、青霉素/链霉素双抗、二抗购于碧云天公司; ELISA 检测试剂盒购自 Cloud-Clone 公司; TF、p-p65 抗体购自 Santa Cruz 公司; p65 抗体购自 ABClone 公司;增强型化学发光 ECL 液购自 Pierce 公司。

1.2 pET-28a(+)-Lunasin 表达载体构建及鉴定

以实验室保存的 pMD19-Lunasin 载体上 Lunasin 核酸序列为模板,应用 Primer 5.0 设计扩增引物,信息如下: Lunasin-F: 5'-CATGCCATGGCATCTAAATGGCAGCACCAGCA-3'; Lunasin-R: 5'-CCGCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCATCGTCATCGTCA TCGTCATCG-3'。其中 Lunasin-F 引物中 5'端含有保护碱基、Nco I 酶切位点(下划线)以及 Lunasin 5'端部分氨基酸编码基因序列; Lunasin-R 中 5'端含有保护碱基、Xho I 酶切位点(下划线)、His 标签(斜体)以及 Lunasin 3'端部分氨基酸编码基因的互补序列以及终止密码子。用 Lunasin-F、Lunasin-R 引物,以 pMD19-Lunasin 质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并胶回收目的片段,与 pMD19-T simple vector 连接,将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,氨苄青霉素(50 mg/L)抗性筛选后进行 PCR 鉴定,并挑选阳性克隆扩大培养后提取质粒,送至上海生工公司测序。测序结果与实验室保存的 pMD19-Lunasin 序列进行比对,结果正确后提取质粒并命名为 Lunasin-T。

将 Lunasin-T 重组质粒和原核表达质粒载体 pET-28a(+)分别用 Nco I、Xho I 进行双酶切。回收酶切产物 Lunasin 片段和 pET-28a(+)载体片段,用 DNA 连接试剂盒 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂布到卡那霉素(50 g/L)抗性固体培养板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑选菌落进行 PCR 鉴定,选取鉴定正确的菌落扩大培养并提取质粒,然后将重组质粒 Pvu II 酶进行单酶切鉴定,将鉴定正确的质粒送公司测序再次鉴定,从而获得 Lunasin 重组表达载体 pET-28a(+)-Lunasin。

1.3 Lunasin 原核表达及纯化

将重组质粒 pET-28a(+)-Lunasin 转化 E Coli BL21(DE3) 感受态细胞,挑取单菌落接种于 LB 培养基中(含 100 mg/L 卡那霉素),过夜培养后以 1:100 扩大培养,待 OD_{600 nm} 值为 0.6 时加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.5 mmol/L,37℃ 继续培养 4 h,诱导 Lunasin 蛋白表达。4℃ 离心收集细菌,重悬于 Tris-HCl 缓冲液,冰浴超声裂菌,于 4℃ 条件下 6000 r/min 离心 30 min,收集上清液和沉淀,分别用 Tricine/SDS-PAGE 检测 Lunasin 蛋白的分布。在证实 Lunasin 蛋白主要分布在上清液后,用镍离子亲和层析柱纯化 Lunasin 蛋白,上清液用 0.45 μm 滤器过滤后,过镍离子亲和层析柱,分别用含有不同咪唑浓度的洗脱液(20、50、200、500 mmol/L)冲液洗脱。收集洗脱液,利用 Tricine/SDS-PAGE 检测蛋白纯化情况,用 Western blot 对纯化产物进行检测,并用 1 kDa 超滤管对纯化后的 Lunasin 蛋白进行浓缩和脱盐以及 BCA 法测定 Lunasin 蛋白的浓度。

1.4 细胞培养及药物处理

小鼠巨噬细胞 J774A.1 细胞在 5%CO₂、37℃ 条件下培养,于含 10%胎牛血清、0.5%双抗的 DMEM 高糖培养基中,待细胞长至 80%~90%的密度时,以 0.25%胰蛋白酶和 0.2%EDTA 混合液消化约 5 min 后传代,第 3~5 代细胞进行实验。实验分为 5 组:(1)空白对照组:单纯完全培养基孵育;(2)LPS 对照组:LPS 终浓度为 1 g/L 的完全培养基孵育;(3)LPS+10 μmol/L Lunasin 组:LPS 对照组基础上加 Lunasin(终浓度为 10 μmol/L)孵育;(4)LPS+25 μmol/L Lunasin 组:LPS 对照组基础上加 Lunasin(终浓度为 25 μmol/L)孵育;(5)LPS+50 μmol/L Lunasin 组:LPS 对照组基础上加 Lunasin(终浓度为 50 μmol/L)孵育。

1.5 细胞因子 NO、IL-6 以及 TNF-α 的检测

取对数生长期细胞,以 2×10⁵ 个/孔接种于 24 孔板,稳定培养 24 h 后分别更换同时含有 LPS(1 g/L)和 Lunasin 蛋白(0、10、25、50 μmol/L)的完全培养基,以不含有 LPS 和 Lunasin 蛋白组为对照,连续培养 24 h,收集细胞培养液。用一氧化氮检测试剂盒(Griess 分析法)测定细胞培养液中 NO 含量,按照 IL-6、TNF-α 的 ELISA 检测试剂盒使用说明,测定细胞培养液中 IL-6、TNF-α 的含量。

1.6 Western blot 检测 p65 磷酸化程度及 TF

用细胞刮板收获细胞,加入适量含有复合蛋白

酶抑制剂与复合磷酸酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液,冰浴孵育 30 min,加以间断性漩涡震荡,4℃ 离心后,吸取上清为细胞总蛋白提取物。BCA 法定量蛋白,每个样品取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE。电泳结束后,经电转,蛋白从凝胶转印到 PVDF 膜上,并用 5%脱脂奶粉(TBS-T 稀释)在室温封闭膜 1 h。然后分别加入磷酸化 p65(1:1000)、TF(1:500)、p65(1:2000)、GAPDH(1:2000)一抗,4℃ 孵育过夜,洗膜,并将膜与 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温孵育 1 h。用 ECL 试剂和化学发光凝胶成像系统显影,然后经 Gel-pro 软件进行灰度测定及分析。

1.7 靶向 NF-κB p65 的 siRNA 沉默

特异性靶向 p65 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列^[13]和阴性对照(插入打乱基因序列 Scramble)由苏州吉玛基因股份有限公司合成,p65-siRNA 序列为:正义链:5'-GGAGUAC-CUGAAGCUAUATT-3',反义链:5'-UAUAGCUU-CAGGGUACUCCTT-3'。选取第 3~15 代细胞,用不含双抗的 DMEM 培养基接种于 60 mm 培养皿中,细胞增殖至 70%左右时用 Lipofectamine 2000 转染 p65-siRNA 或 Scramble-control,转染 24 h 后,Western blot 检测 p65、TF 沉默情况。

1.8 统计分析

所有实验均重复 3 次,采用 SPSS 19.0 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's t-test 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lunasin 表达载体的构建及鉴定

以 pMD19-Lunasin 质粒为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经过 2%琼脂糖凝胶电泳,PCR 产物为 175 bp 左右,大小与预期一致。将 PCR 产物克隆至 T 载体,测序正确后亚克隆至表达载体,对构建好的重组表达质粒 pET-28a(+)-Lunasin 利用 Pvu II 进行单酶切鉴定,由于目的片段和质粒本身含有 Pvu II 的酶切位点,因此重组质粒可以切出 3 条片段,而空质粒可以切出 2 条片段,酶切产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳,显示酶切片段数与大小预期一致,说明 pET-28a(+)-Lunasin 表达载体构建成功。将酶切鉴定正确的质粒送上海生工公司测序,测序结果显示与目的片段序列完全吻合(图 1)。

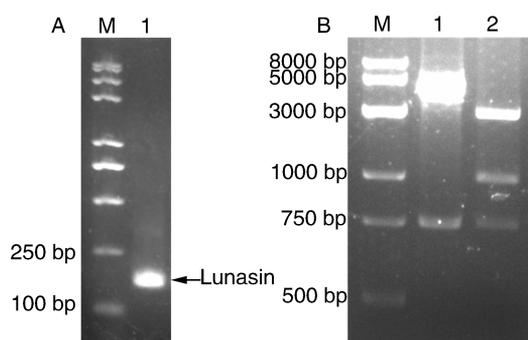


图 1. 重组质粒的构建及鉴定 A 为 Lunasin PCR 琼脂糖电泳结果(其中 M 为 Trans2K Plus II DNA Marker, 1 为 Lunasin 基因的 PCR 产物)。B 为转化后质粒酶切鉴定(其中 M 为 Trans8K DNA Marker, 1 为 Pvu II 酶切后的空质粒, 2 为 Pvu II 酶切后的重组质粒)。

Figure 1. Construction and identification of recombinant plasmid

2.2 蛋白表达及纯化产物的鉴定

对重组质粒转化菌用 IPTG 进行诱导, 37°C 诱导表达 4 h, 利用 Tricine/SDS-PAGE 检测诱导表达情况, 重组质粒在 5.5 kDa 处出现目的条带, 表明诱导表达成功(图 2A); 收集诱导表达菌体, 对其进行超声破碎, 离心后将上清过镍离子亲和层析柱, 用含有不同浓度的咪唑洗脱缓冲液洗脱, 收集各洗脱液进行 Tricine/SDS-PAGE 电泳, 在 200 mmol/L 咪唑洗脱液中可见较单一的 5.5 kDa Lunasin 蛋白出现, 其纯度在 90% 左右(图 2B); 以 Anti-HisAntibody 对 Lunasin 重组蛋白进行 Western blot 分析, 在 5.5 kDa 处出现杂交条带, 表明成功获得 Lunasin 重组蛋白(r-Lunasin)(图 2C)。

2.3 重组 Lunasin 对 LPS 诱导小鼠 J774A.1 细胞炎症因子分泌及 NF- κ B 活化的影响

为检测 Lunasin 是否具有抗炎的生物学活性, 我们利用 Griess 分析法以及 ELISA 方法检测其对 LPS 诱导小鼠 J774A.1 细胞炎症因子分泌的影响。与空白对照组比较, LPS 能提高小鼠 J774A.1 巨噬细胞炎症因子 NO、IL-6、TNF- α 的分泌, Lunasin 呈浓度依赖性降低小鼠巨噬细胞上清液中 NO、TNF- α 、IL-6 的含量, 其中当 Lunasin 浓度为 50 μ mol/L 时抑制作用最强 ($P < 0.01$; 图 3A、B、C)。由于上述细胞炎症因子均由 NF- κ B 所调控, 推测 Lunasin 对其的抑制作用是通过抑制 NF- κ B 的活化而实现, 于是我们用 Western blot 检测 Lunasin 对 p65 磷酸化的影响。与空白对照组比, LPS 处理 2 h 后, p-p65 的表达量明显增加, 而总蛋白 p65 的表达基本保持不变(图 3D); 与 LPS 对照组相比, Lunasin 呈时间依赖性抑制 LPS 诱导的小鼠 J774A.1 巨噬细胞 p-p65

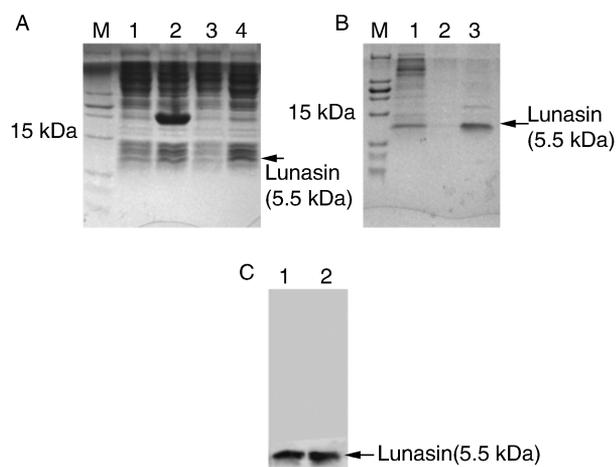


图 2. Lunasin 重组蛋白的表达、纯化和鉴定 A 为 Tricine/SDS-PAGE 检测重组质粒的表达[其中 M 为蛋白分子量标准, 1 为 pET-28a(+) 空质粒诱导前, 2 为 pET28a(+) 空质粒诱导后, 3 为重组质粒诱导前, 4 为重组质粒诱导后]。B 为 Tricine/SDS-PAGE 检测纯化后蛋白(其中 M 为蛋白分子量标准, 1 为 20 mmol/L 咪唑洗脱液, 2 为 50 mmol/L 洗脱液, 3 为 200 mmol/L 洗脱液)。C 为纯化产物的 Western blot 分析(1、2 为经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化的重组蛋白)。

Figure 2. Expression, purification and identification of recombinant lunasin protein

的表达, 当 Lunasin 处理时间为 2 h 时, 抑制 p65 磷酸化的作用最强(图 3E)。上述结果表明 Lunasin 抑制了 NF- κ B 的活化, 其对细胞因子的抑制作用是通过抑制 NF- κ B 的活化而实现的。

2.4 重组 Lunasin 对 LPS 诱导 J774A.1 细胞 TF 表达的影响

为证明 LPS 能够经由 NF- κ B 上调 J774A.1 细胞 TF 的表达, 我们首先利用 LPS 处理 J774A.1 细胞不同时间, Western blot 检测 LPS 对 TF 表达的影响, 随着 LPS 处理时间的增加, TF 的表达量也在增加(图 4A)。利用 siRNA 沉默 p-65, 与 Scramble 对照组相比, p65-siRNA 沉默率达到 90% 左右 ($P < 0.01$; 图 4B); 沉默 p-65 后, LPS 再刺激细胞, TF 表达量显著降低达 57% ($P < 0.01$; 图 4C)。表明 LPS 经由 NF- κ B 上调 J774A.1 细胞 TF 的表达。

前述研究证明了 Lunasin 具有抑制 LPS 诱导的 J774A.1 细胞 NF- κ B 活化, 进而抑制其下游炎症因子表达的抗炎生物学活性, 既然 LPS 诱导的 TF 表达同样经由 NF- κ B, 我们进一步检测 Lunasin 对 LPS 诱导 TF 表达的影响。与 LPS 对照组相比, Lunasin 呈浓度依赖性下调 LPS 诱导的 J774A.1 细胞 TF 的表达, 且当 Lunasin 浓度为 50 μ mol/L 时, 其抑制率

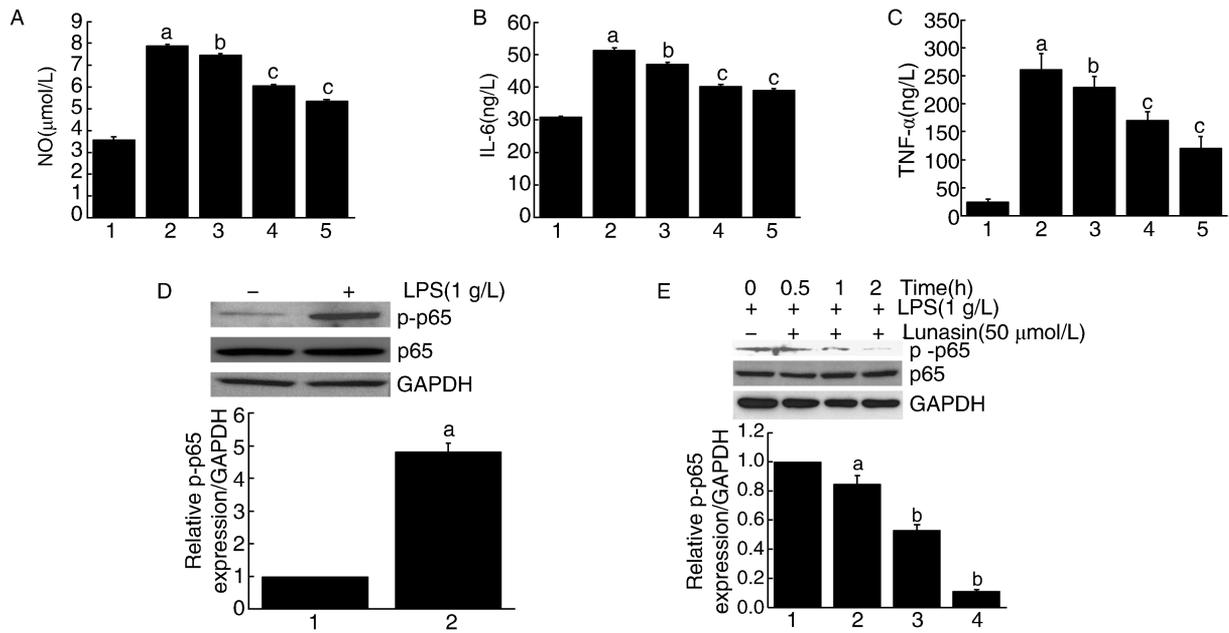


图 3. Lunasin 对 LPS 诱导 J774A.1 细胞 NO、IL-6、TNF-α 分泌及 NF-κB 活化的影响 (n=3) A、B、C 分别为 Lunasin 对 J774A.1 细胞上清液中 NO、IL-6、TNF-α 含量的影响(其中 1 为空白对照组,2 为 LPS 对照组,3 为 LPS+10 μmol/L Lunasin 组,4 为 LPS+25 μmol/L Lunasin 组,5 为 LPS+50 μmol/L Lunasin 组。a 为 P<0.01,与空白对照组比较;b 为 P<0.05,c 为 P<0.01,与 LPS 对照组比较)。D 为 LPS 对 J774A.1 细胞 NF-κB 活化的影响(其中 1 为空白对照组,2 为 LPS 对照组。a 为 P<0.01,与空白对照组比较)。E 为 Lunasin 处理不同时间对 LPS 诱导 J774A.1 细胞 p65 磷酸化的影响(其中 1 为 LPS 对照组,2、3、4 分别为 Lunasin 处理 0.5、1、2 h 组。a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与 LPS 对照组比较)。

Figure 3. Effects of lunasin on secretion of NO, IL-6, TNF-α and activation of NF-κB induced by LPS in J774A.1 cells (n=3)

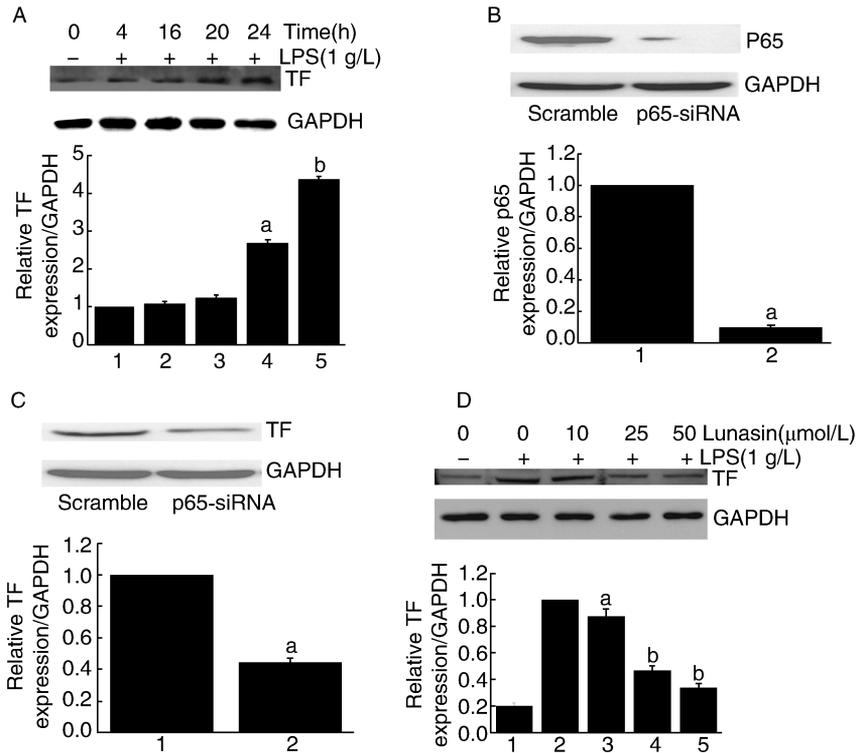


图 4. Lunasin 对 LPS 诱导 J774A.1 细胞 TF 蛋白表达的影响 (n=3) A 为 LPS 对 J774A.1 细胞不同时间点 TF 表达的影响(其中 1 为空白对照组,2、3、4、5 分别为 LPS 处理 4、16、20、24 h 组。a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与空白对照组比较)。B、C 为 Western blot 检测 p65-siRNA 沉默 p65 情况及 p65 沉默后 TF 蛋白表达(其中 1 为 Scramble 对照组,2 为 p65-siRNA 处理组。a 为 P<0.01,与 Scramble 对照组比较)。D 为 Lunasin 对 LPS 诱导 J774A.1 细胞 TF 表达的影响(其中 1 为空白对照组,2 为 LPS 对照组,3 为 LPS+10 μmol/L Lunasin 组,4 为 LPS+25 μmol/L Lunasin 组,5 为 LPS+50 μmol/L Lunasin 组。a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与 LPS 对照组比较)。

Figure 4. Effect of lunasin on expression of TF protein induced by LPS in J774A.1 cells (n=3)

最大,达到 66% ($P < 0.01$; 图 4D)。证实了 Lunasin 能够抑制 LPS 诱导的 J774A.1 细胞 TF 的表达,其作用机理可能同样是通过抑制 NF- κ B 活化而实现的。

3 讨论

本研究利用基因工程手段成功构建了 Lunasin 的原核表达载体,并利用亲和层析获得纯度达 90% 的 Lunasin 多肽。生物学活性检测结果显示,其能够通过抑制 NF- κ B 的活化而抑制下游基因 IL-6、TNF- α 以及 NO 的表达。在证明原核表达的 Lunasin 具有抗炎生物学活性基础上,检测其对 LPS 诱导巨噬细胞 TF 表达的影响,实验结果首次证明了其对 LPS 诱导巨噬细胞 TF 表达的抑制作用。该项研究为动脉血栓的治疗和预防提供了实验依据,也为今后在食品和生物医药领域开发 Lunasin 奠定了基础。

作为食源性的大豆生物活性肽 Lunasin,不仅可为机体提供生长发育所需的蛋白质营养,而且由于具备特殊的生物学功能将来可在功能食品、保健品、生物医药等领域具有很好的开发前景。然而目前 Lunasin 的获取通常利用分离手段从大豆中获得,这种方法操作繁琐,纯度不高^[14]。另外一种方法为化学合成,化学合成手段虽然增加了产物的纯度,但成本昂贵^[15]。探索一种简易快捷且成本较低的方法获取 Lunasin 对于其开发利用具有重要意义。利用基因工程手段,采用原核表达体系获得的重组蛋白,如干扰素、胰岛素等,由于其制备工艺纯熟、成本低廉等原因,现已广泛应用于生物医药领域。因此本研究尝试用基因工程手段原核表达 Lunasin。Lunasin 分子量较小,仅有 5.5 kDa,我们知道小分子量蛋白在表达体系中很容易被降解,但是如果添加大的标签可增加产物的稳定性。由于 Lunasin 本身分子量并不大,我们又担心会影响 Lunasin 本身的生物学活性,因此决定利用带有小分子量标签 His 的 pET28 构建 Lunasin 表达载体,为在尽量不影响活性前提下,通过抑制蛋白降解而获得重组 Lunasin。实验结果表明,通过添加蛋白酶抑制剂,Lunasin 在原核表达系统中的产率达到 90%,后期的细胞生物学实验表明,His 标签并没有影响其抗炎的生物学活性。

有文献表明,Lunasin 抑制炎症反应是通过抑制 NF- κ B 活性来实现的^[3]。在炎症相关疾病致病过程中,均可发现 NF- κ B 呈过度激活,大量胞浆内的 NF- κ B 复合物易位进入细胞核内,诱导前炎症介质、炎症介质和免疫相关因子等至少 27 种基因的转录

与表达^[16-18]。本研究证明了原核表达的 Lunasin 能够通过抑制 NF- κ B 的活化进而抑制下游基因如 IL-6、TNF- α 表达以及 NO 的合成,初步显示了其抗炎症的生物学活性。

查询文献获悉,LPS 可以通过 NF- κ B 而上调 TF 的表达^[19]。由于 TF 的表达也是由 NF- κ B 所调控,因此我们推测 Lunasin 也可以抑制 TF 的表达,但关于 Lunasin 对 LPS 上调巨噬细胞 TF 表达的抑制作用未有报道。为证明我们的推测,我们在证明原核表达的 Lunasin 具有抗炎生物学活性基础上,检测其对 TF 表达的影响,实验结果与预期一致,即 Lunasin 同样也可以通过抑制 NF- κ B 活化而抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 TF 的表达。

我们关于原核表达 Lunasin 的抗炎生物学活性及抑制 TF 表达的研究均为体外实验,今后还需进一步开展其在体内的抗炎活性及对 TF 表达抑制作用的研究,为动脉血栓的预防和治疗及 Lunasin 在生物医药领域的开发利用提供依据。

[参考文献]

- [1] Lule VK, Garg S, Pophaly SD, et al. Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide[J]. *J Food Sci*, 2015, 80(3): R485-R494.
- [2] Odani S, Koide T, Ono T. Amino acid sequence of a soybean (*Glycine max*) seed polypeptide having a poly (L-aspartic acid) structure[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(22): 10 502-505.
- [3] Cam A, de Mejia EG. RGD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF- κ B activation in human macrophages through interaction with the α V β 3 integrin[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(10): 1 569-581.
- [4] Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, Lumen BOD. Lunasin-aspirin combination against NIH/3T3 cells transformation induced by chemical carcinogens [J]. *Plant Food Hum Nutr*, 2011, 66(2): 107-113.
- [5] Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Lastra DC. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(9): 1 040-061.
- [6] Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention [J]. *Peptides*, 2009, 30(2): 426-430.
- [7] Adams MR, Golden DL, Franke AA, et al. Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice[J]. *J Nutr*, 2004, 134(3): 511-516.
- [8] Mejia EGD, Dia VP. Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- κ B pathway in the macrophage[J]. *Peptides*, 2009, 30(12): 2 388-398.

(下转第 1106 页)

- [20] Spencer-Segal JL, Waters EM, Bath KG, et al. Distribution of phosphorylated TrkB receptor in the mouse hippocampal formation depends on sex and estrous cycle stage [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(18): 6780-790.
- [21] Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, et al. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37585-593.
- [22] Takei N, Sasaoka K, Inoue K, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats [J]. *J Neurochem*, 1997, 68(1): 370-375.
- [23] Ishrat T, Pillai B, Soliman S, et al. Low-dose candesartan enhances molecular mediators of neuroplasticity and subsequent functional recovery after ischemic stroke in rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 1542-553.
- [24] 李红玲, 王马魁, 任力, 等. 运动训练对大鼠出血性脑损伤 BDNF 基因及其蛋白表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(9): 782-785.
- [25] Zhao J, Xu H, Tian Y, et al. Effect of electroacupuncture on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(2): 253-257.
- [26] Hwang IK, Chung JY, Yoo DY, et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli and Baihui on brain-derived neurotrophic factor and cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal dentate gyrus [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(11): 1431-436.
- [27] 张义, 任玉兰, 王兴丽, 等. 现代针灸治疗中风偏瘫选穴处方规律研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 15(9): 61-64.
- (此文编辑 曾学清)

(上接第 1098 页)

- [9] Jiang L, Xu F, He W, et al. CD200Fc reduces TLR4-mediated inflammatory responses in LPS-induced rat primary microglial cells via inhibition of the NF- κ B pathway [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(7): 521-532.
- [10] Holy EW, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular disease pathophysiology and pharmacological intervention [J]. *Adv Pharmacol*, 2010, 59(10): 259-292.
- [11] Iii APO, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here [J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(3): 432-439.
- [12] Cam A, Sivaguru M, Mejjia EGD. Endocytic mechanism of internalization of dietary peptide lunasin into macrophages in inflammatory condition associated with cardiovascular disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72115.
- [13] Saha RN, Pahan K. Differential regulation of Mn-superoxide dismutase in neurons and astroglia by HIV-1 gp120: Implications for HIV-associated dementia [J]. *Free Radical Bio Med*, 2007, 42(12): 1866-878.
- [14] Mitchell RAC, Lovegrove A, Shewry PR. Lunasin in cereal seeds: What is the origin? [J]. *J Cereal Sci*, 2013, 57(3): 267-269.
- [15] Gonzalez DME, Vázquez M, de Lumen BO, et al. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products [J]. *J Agr Food Chem*, 2004, 52(19): 5882-887.
- [16] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, Inflammation, and metabolic disease [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(1): 11-22.
- [17] Lawrence T. The nuclear factor- κ B pathway in inflammation [J]. *CSH Perspect Biol*, 2009, 1(6): a1651.
- [18] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappa B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells [J]. *Blood*, 2001, 97(1): 46-55.
- [19] Gao MY, Chen L, Yang L, et al. Berberine inhibits LPS-induced TF procoagulant activity and expression through NF-kappa B/p65, Akt and MAPK pathway in THP-1 cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(3): 480-484.
- (此文编辑 曾学清)