

藜麦活性蛋白的制备及抗结肠癌效应评价

加英¹, 张雪琛¹, 史江颖², 单树花², 李卓玉^{1,2*}

(¹山西大学生命科学学院 太原 030006

²山西大学生物技术研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要 本研究以藜麦全谷为原料,采用丙酮-硫酸铵沉淀法经 Q 柱进一步分离纯化,结合 MTT 法确定了具有抗结肠癌活性的藜麦蛋白(WQP),并在细胞水平上探究 WQP 的抗结肠癌活性。采用 MTT 试验表明 WQP 能够显著抑制结肠癌 DLD1 和 HCT-8 细胞的增殖,并具有质量浓度梯度依赖性,而对人正常结肠上皮细胞 FHC 无影响;细胞克隆形成试验及细胞形态学试验进一步证明了 WQP 具有显著的抗结肠癌作用;流式细胞技术检测结果表明 WQP 能够诱导结肠癌细胞凋亡。此外,细胞划痕试验表明 WQP 通过抑制 DLD1、HCT-8 细胞的增殖,阻滞了结肠癌细胞迁移。本研究为将 WQP 进一步开发成为天然抗结肠癌特医功能食品及保健品提供了理论依据,同时为藜麦蛋白的深度利用奠定了基础。

关键词 藜麦; 活性蛋白; 抗结肠癌; 凋亡; 抗迁移

文章编号 1009-7848(2022)11-0057-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.11.007

结肠癌(Colorectal cancer, CRC)是一种消化道恶性肿瘤,是世界范围内最常见的癌症,严重危害人类健康和安全^[1-2]。据 2018 年全球癌症数据统计,结肠癌的发病率和死亡率分别居于第 3 位和第 2 位^[3],其发病率预计在未来的几十年内持续增加^[4]。目前临床上对于结肠癌采用以手术为主、药物化疗为辅的综合治疗方式,这种治疗方式具有一定的局限性,可能会引起肿瘤细胞转移,还会产生极大的耐药性及毒副作用,损坏正常脏器,给患者带来二次伤害。寻找绿色、高效和低毒的预防结肠癌的功能食品是目前研究者的关注点。

藜麦(*Chenopodium quinoa willd.*)又称金谷子,是一种一年生草本开花植物,属藜科藜属^[5]。近年来,藜麦在山西省大规模种植,主要分布在忻州市、朔州市等地区。在营养学领域,藜麦有“全营养食品”的美称,富含人体所需的全部营养物质,与日常食用的大多数粮食谷物,如小麦、玉米、稻米、高粱等相比营养和食用价值更高,被誉为“超级谷物”,是世界范围内极具发展潜力和保健功效的农作物之一^[6]。数千年来,人们一直在日常饮食中摄入藜麦,旨在预防多种疾病并降低各种疾病的发病风险^[7]。藜麦能产生具有多种生物活性的次生代

谢产物,在过去 40 年里,从藜麦中鉴定出至少 193 种次级代谢产物,主要包括皂苷、酚酸类、黄酮类、萜类、甾醇类和含氮化合物^[8]。这些代谢产物中富含多种生物活性物质,可有效预防和改善炎症、心血管疾病、高血糖、高血压、骨质疏松症等多种慢性疾病^[9],对人们的健康有极大的益处。藜麦中的一些功能分子还有抗菌^[10]、抗癌^[11]、抗氧化^[12]、细胞毒性^[13]、抗糖尿病^[14]和抗炎^[15]等营养功效。此外,藜麦中蛋白质含量高,氨基酸比例合理,特别是含有普通谷物中最容易稀缺的赖氨酸(4.6%~6.6%)及蛋氨酸(0.4%~1.0%),具有较高的保健功效。目前提取藜麦蛋白多采用碱提酸沉的方法^[16],即先在碱性溶液中浸提,后在酸性条件下沉淀蛋白,并通过生物化学手段获得藜麦活性肽,如:蛋白酶解法^[17]、微生物发酵法^[18]及模拟消化法^[19]等,若酸、碱操作不慎会引起蛋白的变性,进而影响蛋白的生物活性,然而,目前通过无机盐沉淀来获取高生物活性的藜麦蛋白鲜见报道。

基于此,本研究以山西特色藜麦资源为原料,利用丙酮-硫酸铵沉淀法提取藜麦蛋白,结合 Q 柱分离纯化出具有抗结肠癌活性的藜麦蛋白,将其命名为 WQP。在细胞水平探讨 WQP 的抗结肠癌活性,分别从细胞增殖、细胞凋亡及细胞迁移 3 个方面评价 WQP 的抗结肠癌活性。本研究揭示了藜麦活性蛋白抗结肠癌的分子机制,为开发藜麦源活性蛋白抗结肠癌候选药物及其营养干预相关

收稿日期: 2021-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(81803238, 32072220)

第一作者: 加英,女,硕士生

通信作者: 李卓玉 E-mail: lzy@sxu.edu.cn

产品的研发提供科学依据和物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藜麦购自山西省忻州市静乐县农贸市场。

人结肠癌细胞株 DLD1、HCT-8 及正常结肠上皮细胞 FHC 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

RPMI-1640 培养基、胎牛血清, 购买于 GIBCO 公司; 噻唑蓝 (MTT)、EDTA、青霉素-链霉素-庆大霉素混合溶液 (100×三抗)、二甲基亚砜 (DMSO)、SDS, 购买于索莱宝科技有限公司; 结晶紫、G-250、胰蛋白酶, 购买于碧云天生物技术有限公司; 丙酮、甲醇 (分析纯级)、冰醋酸、异丙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (分析纯级), 购自天津市风船化学试剂科技有限公司; Q-柱材料, 购自 GE 公司。

1.2 仪器与设备

电子天平, 美国 Ohaus 公司; 破壁料理机, 九阳股份有限公司; CO_2 细胞培养箱、冷冻高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; 医用冷藏箱, 长虹美菱股份有限公司; pH 计, 上海三信仪表厂; 超净工作台, 北京亚泰科隆仪器技术有限公司; 倒置显微镜, 日本尼康株式会社; 紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司。

1.3 方法

1.3.1 藜麦蛋白的制备 采用 MTT 法检测抗结肠癌活性。将有抗结肠癌活性的组分洗脱液蛋白命名为 WQP, 最后经冷冻干燥得到藜麦蛋白粉末。将藜麦全谷粉碎并过 60 网目筛, 取上述粉末 30 g, 按料液比 1:10 的比例溶于预冷的 20 mmol/L Tris-NaCl (0.85%) 蛋白提取液中, 4 °C 搅拌过夜。在 4 °C、11 000 r/min 条件下离心 25 min, 取上清, 加入二倍体积预冷丙酮, 充分搅拌均匀后于 -40 °C 冰箱沉淀 2 h, 11 000 r/min 离心 25 min, 留沉淀。将沉淀置于 -40 °C 条件下挥发丙酮, 加入预冷的 20 mmol/L Tris-HCl 溶解, 离心取上清。根据硫酸铵饱和度表加入饱和度为 90% 的硫酸铵, 于 4 °C 静置 30 min 后于 4 °C、11 000 r/min 条件下离心 25 min, 留沉淀。沉淀用预冷的 20 mmol/L Tris-HCl 溶解, 置于 4 °C 透析除盐, 冷冻干燥后得到藜麦蛋白。

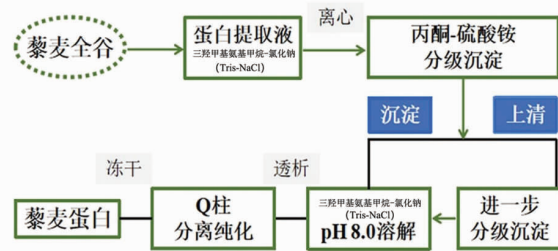


图 1 藜麦蛋白制备流程图

Fig.1 Flow chart of quinoa protein preparation

1.3.2 藜麦蛋白的分离纯化 采用 Q-强阴离子交换层析分离纯化藜麦蛋白。用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 平衡 Q 柱, 将藜麦蛋白溶解上样, 与柱材料结合 2~3 h, 依次用 100, 150, 200, 300 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-氯化钠 (Tris-NaCl) (pH 8.0) 洗脱层析柱, 分别收集洗脱液并分别浓缩洗脱液, 用紫外分光光度计在波长 595 nm 处检测, 计算蛋白浓度, 进一步在细胞水平检测 Tris-NaCl 各梯度洗脱蛋白液的抗结肠癌活性, 将具有抗结肠癌活性的组分命名为 WQP。

1.3.3 藜麦蛋白的抗肿瘤活性检测 取对数生长长期的结肠癌细胞 DLD1、HCT-8 及人正常结肠上皮细胞 FHC, 按细胞密度为 6 000~8 000 个/孔接种于 96 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后, 加入终质量浓度为 0, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WQP, 每个梯度设置 5 个复孔。处理 24 h 后吸弃旧培养基, PBS 洗 1~2 次, 换新鲜培养基, 每孔加入 20 μL MTT 处理 4 h。将上述培养液吸弃, 加入 150 μL DMSO 在振荡摇床上振荡 10 min, 用酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光度值, 并计算细胞存活率。

1.3.4 细胞克隆形成试验 取对数生长期结肠癌细胞 DLD1、HCT-8 按 5×10^3 个/孔接种于 24 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后, 用终质量浓度为 0, 60, 90, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WQP 处理细胞 5 d, 吸弃旧培养基, 用预冷的甲醇室温固定细胞 30 min。弃掉固定液, 0.1% 结晶紫染液染色 15 min, 37 °C 烘箱烘干后在显微镜下进行拍照。每孔加入 100 μL 1% 的 SDS 振荡溶解, 用酶标仪在波长 570 nm 处测定吸光度值进行量化分析。

1.3.5 细胞形态学试验 取生长状态较好的结肠癌细胞 DLD1、HCT-8 用胰酶消化, 调整细胞密

度,按 5×10^3 个/孔接种到 24 孔细胞培养板,待细胞贴壁后,加入终质量浓度为 0,60,80,100,120 $\mu\text{g/mL}$ 的 WQP 处理 24 h,用尼康显微镜拍照并记录细胞数量及形态。

1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 选取对数期 HCT-8 细胞,以 10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板,待细胞贴壁后加入终质量浓度为 0,90 $\mu\text{g/mL}$ 的 WQP 处理细胞 24 h,加 0.25% 胰酶(不含 EDTA)消化并离心收集细胞,PBS 洗 2 次,加入 1 \times 结合缓冲液 100 μL 重新吹散悬浮细胞,加入 5 μL 磷脂结合蛋白带绿色荧光(Annexin V-FITC)和 5 μL 碘化丙啶(PI)结合溶液,轻轻吹打使完全混匀,在室温下避光孵育 15 min。向上述体系中加入 400 μL 1 \times 结合缓冲液轻微摇匀,用流式细胞仪检测。

1.3.7 细胞划痕试验 选取对数期 DLD1、HCT-8 细胞,按 90%左右的单层细胞密度接种于 24 孔细胞培养板中的无菌牛津杯内。待细胞贴壁后,标记细胞所在的位置,用无菌镊子夹取出牛津杯,用 200 μL 的无菌枪头在标记的圈内均匀划痕,划痕结束后每孔补加 500 μL PBS,在显微镜下拍照记录 0 h 的划痕距离。吸掉 PBS,每孔加 500 μL 新鲜培养基,同时加入终质量浓度为 0,10,20 $\mu\text{g/mL}$ 的 WQP 处理细胞 24 h,每个质量浓度设置 3 个复孔。显微镜拍照并记录 24 h 的划痕距离,计算细胞迁移率。

迁移率(%)=(0 h 划痕距离-24 h 划痕距离)/0 h 划痕距离 \times 100

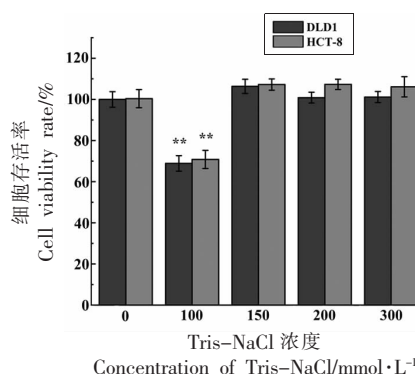
1.4 数据处理与分析

所有数据均用 3 次独立重复试验的平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计图中标准偏差用误差棒表示;采用 SPSS 25.0 软件中的单因素 ANOVA 检验分析各组间的显著性差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著;运用 Origin 2018 64Bit 软件进行数据的统计分析。

2 结果与分析

2.1 藜麦蛋白的活性检测

采用 MTT 法检测抗结肠癌活性,结果如图 2 所示,使用 1.3.2 节中所得的不同蛋白洗脱组分分别处理 DLD1 和 HCT-8 结肠癌细胞时,仅 100



注:**表示有显著性差异, $P < 0.01$;不同浓度洗脱组分蛋白含量均为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

图2 藜麦蛋白的活性检测

Fig.2 Activity detection of quinoa protein

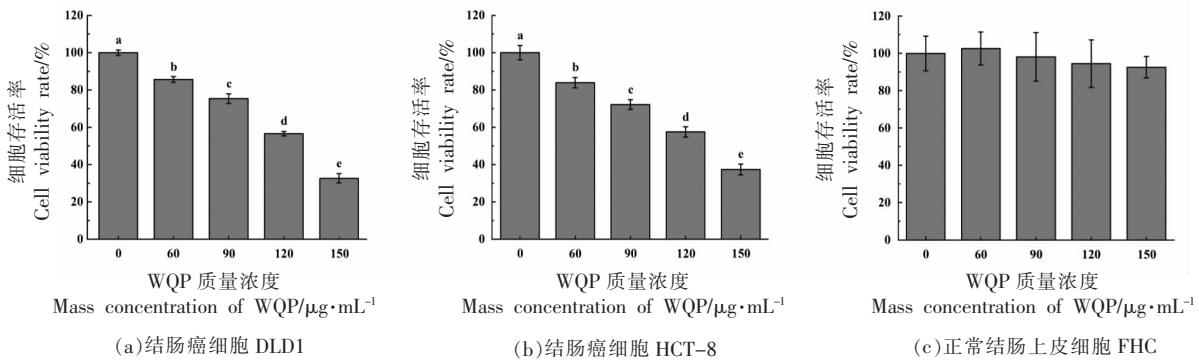
mmol/L Tris-NaCl 洗脱组分具有显著抑制结肠癌细胞增殖的活性,其对 DLD1 和 HCT-8 细胞的抑制率分别为 $(69.3 \pm 8.3)\%$ 和 $(72.2 \pm 6.1)\%$,其它组分的藜麦蛋白洗脱在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时均没有明显的抗结肠癌活性。综上,选用 100 mmol/L Tris-NaCl 洗脱组分,作为藜麦蛋白发挥抗结肠癌细胞活性的主要组分(命名为 WQP),进一步评价其抗结肠癌的效应。

2.2 WQP 抑制人结肠癌细胞 DLD1、HCT-8 的增殖

为了进一步确定藜麦活性蛋白 WQP 的抗结肠癌细胞增殖活性,用不同质量浓度的 WQP(0,60,90,120,150 $\mu\text{g/mL}$) 处理结肠癌细胞 DLD1、HCT-8 和正常结肠上皮细胞 FHC 24 h 后,采用 MTT 法检测细胞存活率。图 3a 和 3b 显示,藜麦蛋白 WQP 可以明显抑制两种结肠癌细胞的增殖,并呈现出质量浓度梯度依赖性;图 3c 则显示 WQP 对正常结肠上皮细胞 FHC 的细胞增殖并不影响。表 1 数据展示了不同质量浓度 WQP 处理结肠癌细胞 DLD1、HCT-8 及正常结肠上皮细胞 FHC 后,经 SPSS 回归概率分析计算出 WQP 对 DLD1 和 HCT-8 的 IC_{50} 值分别为 122 $\mu\text{g/mL}$ 和 128 $\mu\text{g/mL}$ 。以上结果揭示了 WQP 可以显著抑制结肠癌细胞的增殖。

2.3 WQP 抑制人结肠癌细胞 DLD1、HCT-8 细胞克隆形成能力

为了进一步确定 WQP 的抗增殖效应,采用平板克隆试验检测 WQP 对 DLD1 和 HCT-8 细胞克



注:不同字母表示有显著性差异, $P<0.05$ 。

图3 藜麦活性蛋白WQP对不同结肠细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of WQP on cell proliferation of different colon cells

表1 WQP对不同结肠细胞的半抑制浓度

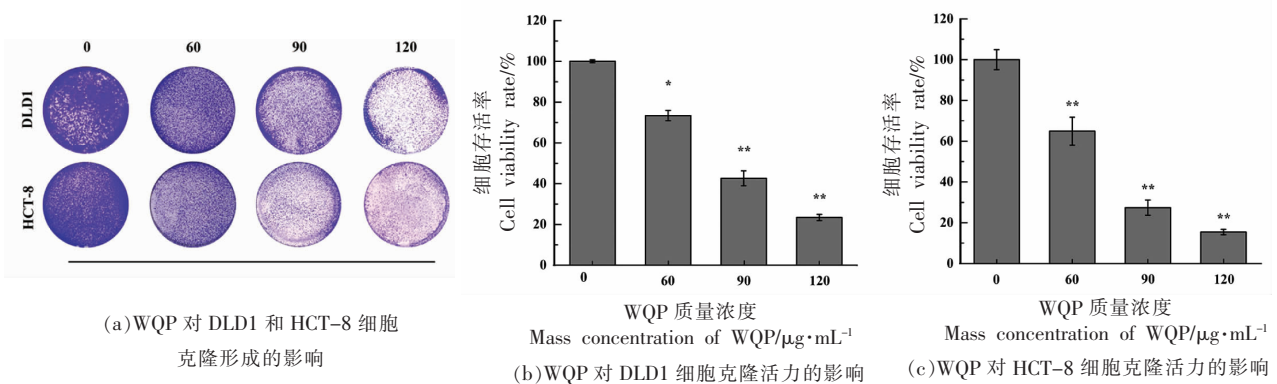
Table 1 The half maximal inhibitory concentration of WQP on different colon cells

细胞系	DLD1	HCT-8	FHC
IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	122.349 ± 0.367	127.736 ± 0.231	-

注:“-”表示。

隆形成能力的影响。图4a显示,WQP处理5d后,对结肠癌细胞集落的形成有明显的抑制作用,与

对照组相比,两种结肠癌细胞的克隆能力均被WQP显著抑制。图4b和4c分别定量分析了DLD1和HCT-8细胞克隆形成能力,结果显示当WQP的营养干预质量浓度为90 μg/mL时,DLD1的细胞存活率为42.6%,HCT-8的存活率仅为27.4%,且均具有质量浓度梯度依赖性。以上结果表明WQP能够显著抑制结肠癌细胞的克隆形成能力。



注:*表示有显著性差异($P<0.05$);**表示有显著性差异($P<0.01$)。

图4 WQP对DLD1、HCT-8细胞活力的影响

Fig.4 The effect of WQP on the activity of DLD1 and HCT-8 cells

2.4 WQP对人结肠癌细胞DLD1、HCT-8细胞形态的影响

为了验证WQP对结肠癌细胞的抗增殖效应,用不同质量浓度WQP(0,60,80,100,120 μg/mL)营养干预DLD1和HCT-8细胞24h,在倒置显微镜下观察细胞的生长状态。图5显示,在60 μg/mL处理条件下,与对照相比,随着WQP质量浓度的

升高,大量细胞在形态上发生了明显的变化,细胞逐渐皱缩变圆,且数量显著减少。以上结果表明WQP能够通过改变结肠癌细胞形态和抑制结肠癌细胞数量来发挥抗增殖效应。

2.5 WQP对人结肠癌细胞凋亡的影响

为了探讨WQP对结肠癌细胞增殖的抑制作用与细胞凋亡的关系,选取对WQP抑制较敏感的

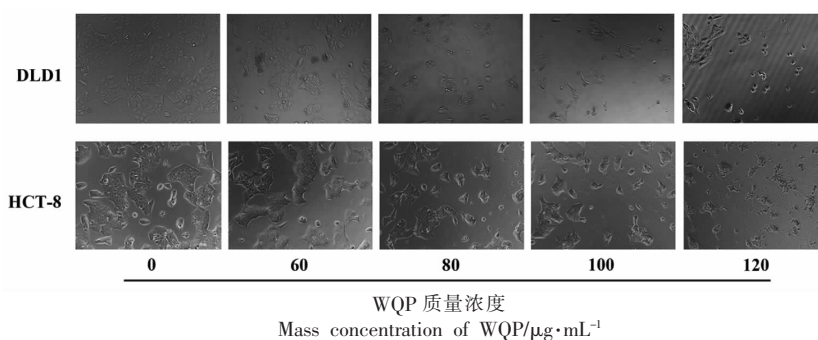
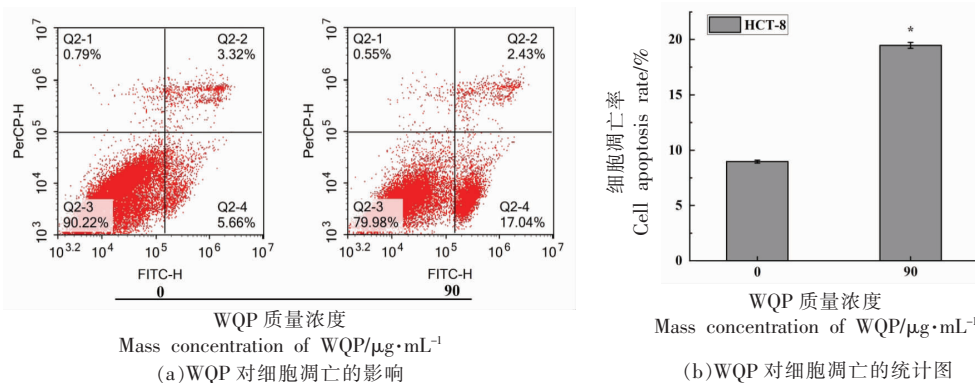


图 5 WQP 处理对细胞形态的影响

Fig.5 Effects of WQP treatment on cell morphology

结肠癌 HCT-8 细胞,采用流式细胞仪检测不同质量浓度 WQP 处理 24 h 对 HCT-8 细胞凋亡的影响。图 6a 显示,用 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WQP 处理 HCT-8 细胞后,凋亡率显著增加,其凋亡率为 19.47%;如

图 6b 细胞凋亡率统计图所示,与对照组相比凋亡率增加了近 2 倍。该结果表明 WQP 能够诱导 HCT-8 细胞凋亡,从而减缓结肠癌细胞的增殖。



(a) WQP 对细胞凋亡的影响

(b) WQP 对细胞凋亡的统计图

注:*表示有显著性差异, $P<0.05$ 。

图 6 WQP 处理对 HCT-8 细胞凋亡的影响

Fig.6 Effects of WQP treatment on apoptosis of HCT-8 cells

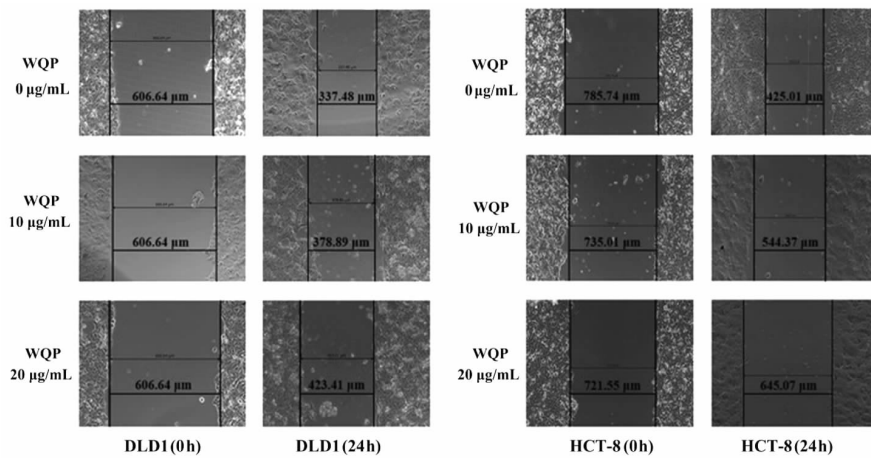
2.6 WQP 对人结肠癌细胞迁移的影响

从细胞迁移的角度进一步探究 WQP 的抗结肠癌效应,采用细胞划痕法检测不同质量浓度 WQP (0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 2 种结肠癌细胞 DLD1 及 HCT-8 迁移的影响。图 7a 显示,WQP 处理细胞 24 h 后能够显著抑制 DLD1 和 HCT-8 细胞的迁移,且在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 WQP 处理后抑制作用更加明显,图 7b 统计迁移率分别为 33%和 37%。采用 MTT 法检测与划痕试验相同质量浓度的 WQP 对两种结肠癌细胞的增殖情况,发现 WQP 对 DLD1 和 HCT-8 两种细胞的增殖效应均没有明显的抑制作用(图 7c),最高抑制率均为 5%以内,排除了细胞增殖效应对细胞迁移所产生的影响。以上结果揭示 WQP 具有抑制结肠癌细胞迁移的效应。

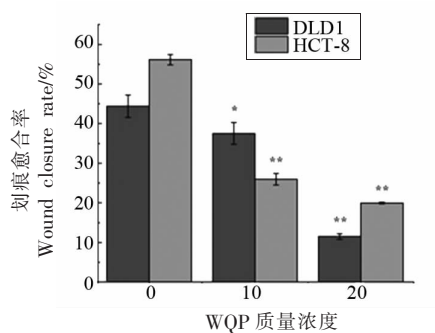
3 讨论

近年来从植物中提取的天然活性物质在预防人类疾病发生方面得到了越来越多的关注。目前已有研究者从多种植物中提取获得具有抗肿瘤活性的蛋白,如植物来源的凝集素^[20-22]、过氧化物酶(POD)^[23]、核糖体失活蛋白(RIPs)^[24]等,这些蛋白可通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡来抑制癌细胞增殖,提示谷物来源的活性蛋白有望开发成为预防肿瘤的特医食品。

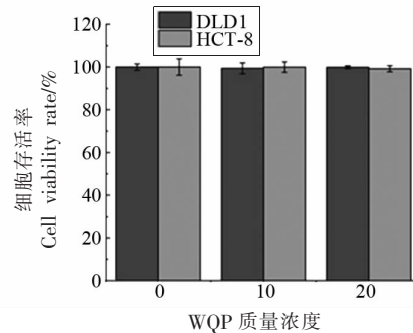
已有研究表明,藜麦蛋白及肽不仅具有抗氧化、降血压、降血糖等免疫调节活性^[25-27],在消化处理后还具有抗肿瘤的活性。Vilcacundo^[28]等于 2018 年研究发现,藜麦蛋白的体外模拟消化产物中 >5 ku 的肽具有抗结肠癌的生物活性;Ayyash 等^[29]研



(a) WQP 处理对 DLD1 及 HCT-8 细胞迁移的影响



(b) WQP 处理对 DLD1 及 HCT-8 细胞划痕愈合率的影响



(c) WQP 处理对 DLD1 及 HCT-8 细胞存活率的影响

注: * 表示有显著性差异, $P < 0.05$; ** 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 。

图 7 WQP 处理对 DLD1 及 HCT-8 细胞迁移的影响

Fig.7 Effects of WQP treatment on migration of DLD1 and HCT-8 cells

究发现全谷物羽扇豆、藜麦和小麦发酵后产物对结肠癌细胞 Caco-2 和乳腺癌细胞 MCF-7 肿瘤细胞具有显著的抗增殖活性,且随着发酵时间的增加,对肿瘤细胞的抑制率也逐渐增加,此外,还兼具抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶、抗高血压、抗氧化和蛋白水解的活性。上述研究均将藜麦蛋白进行消化或发酵后产物进行抗肿瘤活性分析,本研究与上述研究的不同在于,采用丙酮-硫酸铵沉淀法从山西特色资源藜麦全谷中获得了未经消化且具有抗结肠癌活性的蛋白组分,将其命名为 WQP,通过 MTT 试验初步揭示了其具有显著的抗结肠癌活性(图 2)。进一步在细胞水平采用细胞增殖试验、细胞平板克隆形成试验、细胞凋亡及细胞迁移试验对 WQP 的抗结肠癌效应进行了一系

列评价。研究结果表明:WQP 对结肠癌细胞的增殖及克隆形成能力有明显的抑制作用(图 3~4),且能够通过诱导 HCT-8 细胞凋亡进而抑制细胞增殖(图 6);同时,WQP 能够显著抑制结肠癌细胞的迁移(图 7),揭示 WQP 能够从抑制结肠癌细胞增殖、促进结肠癌细胞凋亡、阻滞结肠癌细胞迁移 3 个方面来发挥抗结肠癌效应。

以上结果完善了藜麦蛋白在抗结肠癌方面的研究,下一步将进一步纯化藜麦蛋白 WQP,以确定 WQP 中单一活性蛋白的抗结肠癌作用靶点,从细胞增殖、凋亡和迁移的角度阐明 WQP 及其单一活性蛋白的抗结肠癌分子机制,为藜麦营养物质在结肠癌防控方面的应用提供可靠的理论数据,进一步拓展了藜麦资源的综合利用和有效开发。

4 结论

本研究以山西特色藜麦资源为原料,利用丙酮-硫酸铵沉淀法提取藜麦蛋白,结合 Q 柱分离纯化出具有抗结肠癌活性的藜麦蛋白 WQP。进一步在细胞水平探讨 WQP 的抗结肠癌活性,分别从细胞增殖、细胞凋亡及细胞迁移 3 个方面进行评价,研究结果表明:WQP 能够诱导结肠癌细胞凋亡,从而抑制细胞增殖;另外,WQP 能够显著阻滞结肠癌细胞的迁移效应,表明 WQP 具有显著的抗结肠癌活性。本文为深入阐明 WQP 抗结肠癌的分子机制提供了试验基础,并为藜麦营养物质在结肠癌防控方面的应用提供基础数据,对藜麦资源的开发利用具有深远意义。

参 考 文 献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
- [2] JING N, YIN L, SUN J, et al. Expression levels of miR-205 and miR-506 in colon cancer tissues and their relationships with clinicopathological features[J]. Oncol Lett, 2018, 16(4): 4331-4336.
- [3] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [4] ARAN V, VICTORINO A P, THULER L C, et al. Colorectal cancer: Epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality[J]. Clin Colorectal Cancer, 2016, 15(3): 195-203.
- [5] DAKHILI S, ABDOLALIZADEH L, HOSSEINI S M, et al. Quinoa protein: Composition, structure and functional properties[J]. Food Chemistry, 2019, 299: 125161-125171.
- [6] SEMRA N V, NEVIN S. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. Journal of Cereal Science, 2016, 69: 371-376.
- [7] VEGA GÁLVEZ A, MIRANDA M, VERGARA J, et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review [J]. J Sci Food Agric, 2010, 90(15): 2541-2547.
- [8] LIN M, HAN P, LI Y, et al. Quinoa secondary metabolites and their biological activities or functions [J]. Molecules, 2019, 24(13): 2512-2559.
- [9] VALCÁRCEL YAMANI B, LANNES S. Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and amaranth (*Amaranthus* spp.) and their influence in the nutritional value of cereal based foods[J]. Food and Public Health, 2012, 2: 265-275.
- [10] MIRANDA M, DELATORRE-HERRERA J, VEGA-GÁLVEZ A, et al. Antimicrobial potential and phytochemical content of six diverse sources of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. Agric Sci, 2014, 5: 1015-1024.
- [11] HU Y, ZHANG J M, ZOU L, et al. Chemical characterization, antioxidant, immune-regulating and anticancer activities of a novel bioactive polysaccharide from *Chenopodium quinoa* seeds[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 99: 622-629.
- [12] TANG Y, TSAO R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: A review[J]. Molecular Nutrition Food Research, 2017, 61(7): 1600767-1600783.
- [13] KULJANABHAGAVAD T, THONGPHASUK P, CHAMULITRAT W, et al. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd[J]. Phytochemistry, 2008, 69(9): 1919-1926.
- [14] GRAF B L, POULEV A, KUHN P, et al. Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties [J]. Food Chemistry, 2014, 163: 178-185.
- [15] YAO Y, YANG X S, SHI Z X, et al. Anti-inflammatory activity of saponins from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages cells[J]. J Food Sci, 2014, 79(5): 1018-1023.
- [16] 李赫, 周浩纯, 张健, 等. 藜麦蛋白及肽的研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(3): 43-48.
LI H, ZHOU H C, ZHANG J, et al. Development prospect and research progress of *Chenopodium quinoa*[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(3): 43-48.
- [17] 和继刚, 杨庆华, 李文道, 等. 藜麦抗氧化肽制备工艺研究[J]. 现代农业科技, 2019, 1: 230-232.
HE J G, YANG Q H, LI W D, et al. Study on preparation method of antioxidant peptides from

- quinoa[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019, 1: 230–232.
- [18] RIZZELLO C G, LORUSSO A, RUSSO V, et al. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 41: 252–261.
- [19] VILCACUNDO R, BARRIO D, CARPIO C, et al. Digestibility of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein concentrate and its potential to inhibit lipid peroxidation in the zebrafish larvae model[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2017, 72(3): 294–300.
- [20] AJAY K G, DIVAKAR S, JUHI S, et al. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 142: 474–483.
- [21] BHUTIA S K, PANDA P K, SINHA N, et al. Plant lectins in cancer therapeutics; Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 144: 8–18.
- [22] ELVIRA G M, TRALIECE BRADFORD B S, CLARE H, et al. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lu-nasin[J]. *Nutr Rev*, 2003, 61(7): 239–246.
- [23] ZHANG X L, SHAN S H, LI H Q, et al. Cloning, expression of the truncation of recombinant peroxidase derived from millet bran and its reversal effects on 5-Fu resistance in colorectal cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132(1): 871–879.
- [24] ZENG M Q, ZHENG M Y, LU D S, et al. Anti-tumor activities and apoptotic mechanism of ribosome-inactivating proteins[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2015, 34(8): 325–334.
- [25] REN G, ZHU Y, SHI Z, et al. Detection of lutein in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and the *in vitro* evaluation of its antioxidant and anti-inflammatory activities[J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 97(12): 4110–4116.
- [26] ALUKO R E, MONU E. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 68(4): 1254–1258.
- [27] ALICE B N, SOLENE L M, CECILE D, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with *in vitro* dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties[J]. *Journal of Cereal Science*, 2015, 65: 112–118.
- [28] VILCACUNDO R, MIRALLES B, CARRILLO W, et al. *In vitro* chemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Research International*, 2018, 105: 403–411.
- [29] AYYASH M, JOHNSON S K, LIU S Q, et al. *In vitro* investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* spp.[J]. *Food Chem*, 2019, 275: 50–58.

Preparation of Quinoa Active Protein and Effect Evaluation of Its Anti-colon Cancer

Jia Ying¹, Zhang Xuechen¹, Shi Jiangying², Shan Shuhua², Li Zhuoyu^{1,2*}

(¹School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006

²Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract In this study, quinoa was used as raw material, and the protein component with anti-colon cancer activity was screened by MTT method after further separation and purification by acetone-ammonium sulfate precipitation method through Q column. The anti-colon cancer activity of WQP was further investigated by cell model. The results of cell proliferation assay showed that WQP significantly inhibited the proliferation of colon cancer DLD1 and HCT-8 cells in a concentration gradient dependence, but had no effect on human normal colon epithelial cells FHC. Cell clone formation assay and cell morphology assay further proved that WQP had significant anti-colon cancer effect. Flow cytometry showed that WQP could induce apoptosis of colon cancer cells. In addition, cell scratch assay showed that WQP significantly restrained the migration of DLD1 and HCT-8 cells. Therefore, this study provides a theoretical basis for the development of WQP as a natural anti-colon cancer drug ingredient, and at the same time greatly improves the utilization rate of quinoa protein.

Keywords quinoa; active protein; anti-colon cancer; apoptosis; anti-migration