

黄鱼鱼鳔肽分离及其诱导前列腺癌 DU-145 细胞凋亡的机制

彭东¹, 赖玉健¹, 田东昕^{2,3}, 钟碧奎^{2,3}, 安苗青¹, 黎攀^{1,3}, 杜冰^{1,3*}

¹ 华南农业大学食品学院 广州 510642

² 广东参之源健康科技有限公司 广州 510000

³ 华南农业大学与官栈鱼胶营养安全研究中心 广州 510642)

摘要 为探讨黄鱼鱼鳔肽诱导前列腺癌 DU-145 细胞凋亡的作用机制,从黄鱼鱼鳔酶解产物中分离纯化得到鱼鳔肽,鉴定其氨基酸序列。采用 CCK-8 法检测鱼鳔肽作用后 DU-145 细胞抑制率的变化;AO/EB 法检测 DU-145 细胞凋亡情况;流式细胞术检测 DU-145 细胞凋亡率和周期;免疫印记法检测 DU-145 细胞凋亡蛋白表达。结果表明,分离得到的鱼鳔肽 YCSB-1c 中包含 Ser-Pro-Ser-Pro 和 Gly-Pro-Ala-Arg 两条寡肽。与空白组相比,YCSB-1c 组中凋亡细胞明显增多,且呈质量浓度依赖性;流式细胞仪检测得出 YCSB-1c 组中存活细胞明显减少,晚期凋亡细胞明显增多。YCSB-1c 将 DU-145 细胞的细胞周期阻滞在 G0/G1 期,上调 Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达,诱导 DU-145 细胞凋亡。YCSB-1c 能有效诱导 DU-145 细胞凋亡,其作用机制与细胞周期停滞和线粒体介导的凋亡途径有关。

关键词 黄鱼鱼鳔; 抗前列腺癌肽; DU-145 细胞; 凋亡机制

文章编号 1009-7848(2023)02-0072-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.007

鱼鳔位于硬骨鱼体腔内的背部,是鱼维持平衡的重要器官。在鱼类加工过程中,鱼鳔经常被作为废弃物处理,造成资源的浪费,鱼鳔的高值化利用引起人们的关注^[1]。鱼鳔在我国有着悠久的食用和药用历史,最早的食用文字记录可追溯到北魏时期的《齐民要术》,药用文字记录可追溯到唐朝的《本草拾遗》。鱼鳔的主要成分为胶原蛋白,鱼鳔多肽是胶原蛋白的酶解产物,具有抗氧化、抗衰老、抗疲劳和抗癌等多种功效^[2-4]。

前列腺癌是全球男性最常见的恶性肿瘤之一^[5]。在我国,前列腺癌的发病率和死亡率呈逐年增高的趋势,前列腺癌的防治是我国公共卫生当前面临的重大挑战^[6]。抗癌肽具有易获得性、生物相容性、高效性和低毒性等多种优点,在癌症治疗中表现出巨大的潜力^[7]。研究表明抗癌肽的作用机制主要包括:参与诱导癌细胞周期停滞、诱导癌细胞凋亡、抗癌细胞血管新生、抑制肿瘤干细胞和激

活机体免疫应答^[8-10]。课题组前期测得黄鱼鱼鳔中蛋白质含量高达 75%以上,是生产胶原蛋白肽的优质原料来源^[11]。本试验从黄鱼鱼鳔酶解产物中分离纯化抗前列腺癌肽,探究其对前列腺癌细胞 DU-145 细胞的作用效果,并推测诱导细胞凋亡的机制,以期明确黄鱼鱼鳔肽抗前列腺癌的作用机制,同时也为黄鱼鱼鳔的高值化利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

干制黄鱼鱼鳔,购买于当地海鲜市场;前列腺癌细胞 DU-145 细胞、DU-145 细胞专用培养基,武汉普诺赛生命科技有限公司;胰蛋白酶消化液、二甲基亚砜,美国 Amresco 公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA),美国 Sigma 公司;AO/EB 染色试剂盒、Annexin V-FITC 试剂盒、PI 试剂盒、BCA 蛋白质定量检测试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;CCK-8 试剂,广州松鼠生物科技有限公司;Bax、Caspase-3、Caspase-9 和 β -actin 抗体,美国 Cell Signaling Technology 公司;中性蛋白酶、碱性蛋白酶,广州柏棠贸易有限公司;Sephadex G-25 凝胶填料、DEAE-52 凝胶填料,北京瑞达恒辉科技发展有限公司;其余试剂为分析纯级。

收稿日期: 2022-02-21

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2020A151501268);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21)

第一作者: 彭东,男,博士生

通信作者: 杜冰 E-mail: dubing@scau.edu.cn

1.2 仪器与设备

LC-20AT 高效凝胶渗透色谱仪、1260 高效液相色谱仪、1290-6470 超高压液质联用色谱仪, 美国 Agilent 公司; CytoFLEX 流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 有限公司; Varioskan™ LUX 多功能酶标仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; TCS SP8 激光共聚焦荧光显微镜, 德国 Leica 公司; Alpha 2-4 LD plus 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司。

1.3 方法

1.3.1 黄鱼鱼鳔酶解液的制备^[12] 黄鱼鱼鳔清洗去除杂质 → 料液比 1:20 浸泡 4 h → NaOH 调 pH 值至 8.5 → 加 0.75% 碱性蛋白酶、0.25% 中性蛋白酶 → 55 °C 恒温酶解 4 h → 升温至 90 °C 保持 10 min 灭酶 → 冷却至室温 → 4 000 r/min 离心 15 min → 取上清 → 鱼鳔酶解液 → 真空浓缩、冷冻干燥得到鱼鳔多肽冻干粉。将多肽冻干粉送至广东省测试分析研究所进行多肽分子质量测定。

1.3.2 鱼鳔多肽的纯化 取鱼鳔多肽冻干粉溶于蒸馏水中, 配置成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液, 使用中空纤维超滤膜(1 ku) 过滤, 收集 <1 ku 的组分, 冻干备用。将收集到的组分经 Sephadex G-25 凝胶色谱柱进一步纯化。蒸馏水作为洗脱液, 每管流速为 0.7 mL/min, 用自动收集器收集洗脱液。采用微量紫外分光光度计测定洗脱液吸光值, 收集单峰组分, 真空浓缩、冷冻干燥。测定组分对 DU-145 细胞的抑制率。

Sephadex G-25 凝胶交换柱纯化后的组分经 DEAE-52 阴离子交换柱进一步纯化。分别采用纯水、0.1 mol/L、0.2 mol/L NaCl 溶液为洗脱液, 每管流速为 2 mL/min, 每管收集体积为 5 mL。测定每管收集的洗脱液的吸光值, 收集后冻干单峰组分。测定组分对 DU-145 细胞的抑制率。

DEAE-52 阴离子交换柱纯化后的组分经反相高效液相色谱 (Reversed-phase high performance liquid chromatography, RT-HPLC) 进一步纯化。色谱条件设置如下: Pursuit XR_s C-18 色谱柱 (250 mm×21.2 mm, 10 μm), A 相——含 0.1% 三氟乙酸的水, B 相——含 0.1% 三氟乙酸的乙腈; 流速为 1 mL/min, 色谱柱温度为 35 °C, 紫外检测器的波长为 280 nm。梯度洗脱条件如下: A 相: 0~12

min, 95% → 80%; 12~24 min, 80% → 5%。按顺序收集单峰组分, 浓缩后真空冻干。测定各组分对 DU-145 细胞的抑制率, 对抑制率最高的组分进行序列鉴定。

1.3.3 鱼鳔多肽序列鉴定 在待鉴定组分中加入 DTT 溶液使其终浓度为 10 mmol/L, 56 °C 水浴中还原 1 h, 加入 IAA 溶液使其终浓度为 50 mmol/L, 避光反应 40 min 后, 脱盐, 并于 45 °C 条件下在真空离心浓缩仪中使溶剂挥干。在使用 LC-MS/MS 检测前用 10 mL 0.1% 甲酸中重悬。色谱条件如下: ReproSil-Pur C18-AQ resin (1.9 μm, 100 Å) 填充色谱柱 (150 μm×15 cm), 进样体积 5 μL, A 相——含 0.1% 甲酸的水, B 相——含 0.1% 甲酸的乙腈, 流速为 600 nL/min。梯度洗脱条件如下: A 相: 0~2 min, 96% → 92%; 2~45 min, 92% → 72%; 45~55 min, 72% → 60%; 55~66 min, 60% → 5%。质谱条件: 样品用 Q Exactive™ UHMR 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱仪分析, 电压为 2.2 kV, 温度为 270 °C, CID 检测器, 母离子扫描范围 *m/z* 100~1 500。

1.3.4 鱼鳔多肽对 DU-145 细胞的抑制率测定 DU-145 细胞用 DU-145 专用培养基培养, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养细胞单层生长至铺满瓶底 80% 左右时进行传代或用于试验。取 100 μL 对数生长期 DU-145 细胞以 2×10⁵ 个/mL 浓度接种于 96 孔板, 培养 24 h 后加入 10 μL 鱼鳔多肽样品, 孵育 24 h 后加入 10 μL CCK-8 溶液, 反应 2 h, 用酶标仪在波长 450 nm 处测定吸光度。抑制率计算公式如式(1)。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_2 - A_0}{A_1 - A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, A_0 ——培养基+CCK-8 溶液的吸光值; A_1 ——细胞+CCK-8 溶液的吸光值; A_2 ——细胞+样品+CCK-8 溶液的吸光值。

1.3.5 AO/EB 法测定 DU-145 细胞凋亡 取对数生长期 DU-145 细胞以 2×10⁵ 个/mL 浓度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后更换培养液, 分别加入含有 50, 250 μg/mL 和 750 μg/mL 鱼鳔多肽的培养液, 空白组加入原始培养液, 继续培养 24 h。取出 6 孔板, 吸去上清液, PBS 洗涤 2 次, 弃去洗涤液。加入 10 μL AO/EB 混合液 ($V_{AO}:V_{EB}=1:1$), 室温下避光孵育 5 min, 激光共聚焦荧光显微

镜下观察并拍照。

1.3.6 流式细胞仪测定细胞凋亡 取对数生长期 DU-145 细胞以 2×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔板中,分别加入含 50,250 $\mu\text{g/mL}$ 和 750 $\mu\text{g/mL}$ 鱼鳔多肽的培养液,空白组加入原始培养液,培养 48 h。2 500 r/min 条件下离心 5 min 收集沉淀,加入 4 $^\circ\text{C}$ 预冷 PBS 溶液,于 2 500 r/min 下离心 5 min,收集沉淀,重复两次。加入 500 μL 结合缓冲溶液重悬细胞后,加入 5 μL Annexin V-FITC 溶液,避光反应 5 min 后,加入 5 mL PI 溶液,避光静置 5 min。用 300 目筛网过滤,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.7 流式细胞仪测定细胞周期 取对数生长期 DU-145 细胞以 2×10^6 个/mL 浓度接种于 6 孔板中,分别加入含 50,250 $\mu\text{g/mL}$ 和 750 $\mu\text{g/mL}$ 鱼鳔多肽的培养液,空白组加入原始培养液,培养 48 h。2 500 r/min 条件下离心 5 min,收集细胞,用 4 $^\circ\text{C}$ 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次后,加入 1 mL 20 $^\circ\text{C}$ 的 70%乙醇,吹打均匀后静置过夜。2 500 r/min 条件下离心 5 min,弃掉上清液,用 4 $^\circ\text{C}$ 预冷 PBS 洗涤细胞后,每管细胞加入 0.5 mL PI 染色液,37 $^\circ\text{C}$ 避光放置 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.8 细胞凋亡蛋白表达 利用试剂盒提取细胞总蛋白,并利用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒进行定量。利用免疫印迹法测定 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白在 DU-145 细胞中的表达量。

1.4 数据分析

测定值以平均值 \pm 标准差表示,试验重复 3 次。使用 SPSS 22 软件进行单因素方差分析,通过 LSD 法对数据进行多重字母比较分析。采用 OriginPro 9.0 软件进行图形可视化处理,ChemDraw

表 1 鱼鳔酶解产物分子质量

Table 1 Molecular weight of enzymatic hydrolysate of yellow croaker swim bladder

保留时间/ min	数均分子 质量/u	重均分子 质量/u	分布系数	百分含量/ %
25.34	1 567	1 509	1.038	36.73
27.42	642	618	1.039	63.27

8.0 软件绘制多肽结构。

2 结果与分析

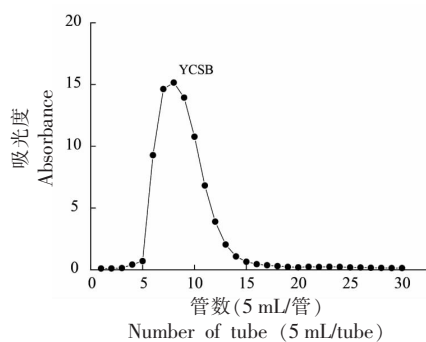
2.1 鱼鳔酶解液分子质量

采用 HPGPC 检测鱼鳔酶解液分子质量,结果如表 1 所示。酶解后的鱼鳔多肽中分子质量大于 1 000 u 的多肽占比 36.73%, 分子质量小于 1 000 u 的多肽占比 63.27%, 其中小分子多肽占比率较高,表明鱼鳔蛋白酶解程度较好。

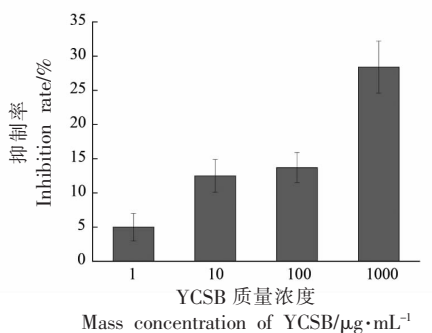
2.2 鱼鳔多肽的分离纯化

鱼鳔酶解产物经 Sephadex G-25 凝胶层析柱纯化的洗脱曲线如图 1a 所示。在图 1a 中,只出现一个峰,表明仅有一种分子质量大小相近的多肽被洗脱下来,命名为 YCSB。考察 YCSB 对前列腺癌细胞 DU-145 的抑制效果,结果如图 1b 所示。随着 YCSB 质量浓度变大,抑制率也随之增强,呈现一定的质量浓度依赖性。当 YCSB 质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,抑制率为 28.4%,对 DU-145 细胞表现出一定的抑制作用,可推断出 YCSB 中存在抗前列腺癌肽。

选用 DEAE-52 阴离子交换层析柱来对 YCSB 进行纯化,得到的洗脱曲线如图 1c~1e。纯水洗脱曲线中仅有一个峰,收集并命名为 YCSB-1;0.1 mol/L NaCl 洗脱曲线中有一高一低 2 个峰,



(a)Sephadex G-25 凝胶柱洗脱曲线



(b)YCSB 对 DU-145 细胞抑制率

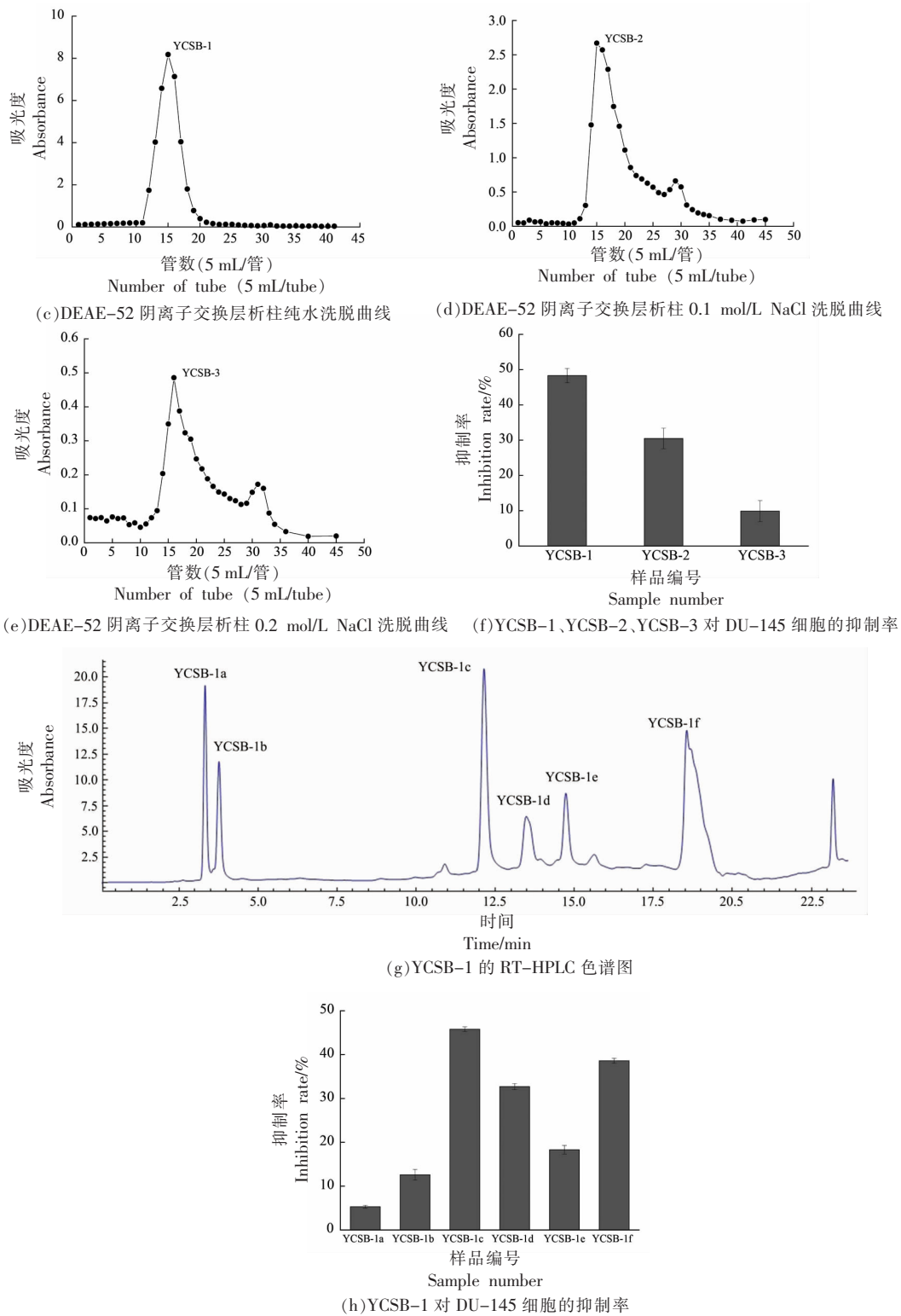


图 1 鱼鳔多肽的分离纯化

Fig.1 Separation and purification of peptide from yellow croaker swim bladder

收集高峰组分命名为 YCSB-2;0.2 mol/L NaCl 洗脱曲线中也出现了 2 个峰, 收集高峰组分命名为

YCSB-3。图 1f 为 YCSB-1、YCSB-2 和 YCSB-3 对 DU-145 细胞的抑制率, 在 1 000 μg/mL 时,

YCSB-1 抑制率最高,为 48.3%。因此,对 YCSB-1 进行进一步纯化。

图 1g 为 YCSB-1 的 RT-HPLC 色谱图,峰型较好,分离效果较佳。图谱中出现 6 个不同的色谱峰组分,收集并分别命名为 YCSB-1a、YCSB-1b、YCSB-1c、YCSB-1d、YCSB-1e 和 YCSB-1f。这 6 个组分对 DU-145 细胞的抑制率如图 1h 所示,在 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,YCSB-1c 表现出最高的抑制率 (45.8%),表明 YCSB-1c 是 YCSB-1 中一种重要

的抗前列腺癌肽。

2.3 多肽氨基酸序列鉴定

将 YCSB-1c 通过 LC-MS/MS 分析,对采集到的高分辨质谱数据进行 De novo 测序,共检测出 2 条四肽(表 2)。图 2 为 2 条四肽的二级质谱图,SPSP 的氨基酸序列为丝氨酸-脯氨酸-丝氨酸-脯氨酸(Ser-Pro-Ser-Pro),GPAR 的氨基酸序列为甘氨酸-脯氨酸-丙氨酸-精氨酸(Gly-Pro-Ala-Arg)。

表 2 YCSB-1c 的氨基酸序列鉴定

Table 2 Amino acid sequence identification of YCSB-1c

序列	保留时间/min	扫描离子	氨基酸数量	质荷比	质量/u	得分	偏差/u
SPSP	10.13	5 528	4	387.18	386.18	51	-19.2
GPAR	11.74	6 588	4	400.23	399.22	53	-2.7

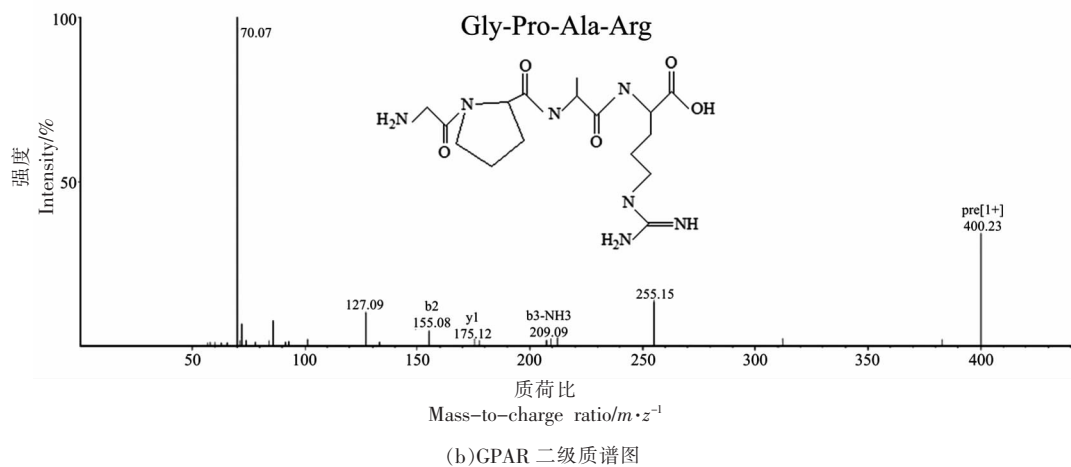
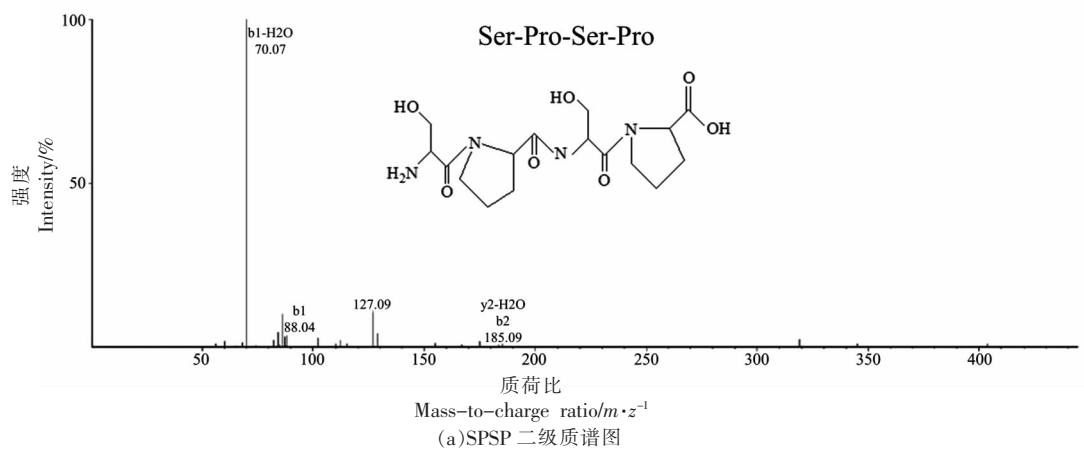


图 2 多肽的二级质谱图

Fig.2 The secondary mass spectrum of peptide

2.4 AO/EB 染色

吖啶橙(AO)能透过细胞膜完整的细胞,将细胞核染成均匀的绿色荧光;而溴化乙锭(EB)只能透过细胞膜受损的细胞,嵌入核 DNA,使其发出橘红色荧光^[13]。因此,可以利用 AO/EB 染色法来辨别正常细胞和凋亡细胞,YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞的 AO/EB 染色结果如图 3 所示。图 3a 为空白组,细胞呈现均匀的绿色荧光,表明空白组中存在大量活细胞。图 3b、3c 和 3d 分别对应 YCSB-1c 的低(50 μg/mL)、中(250 μg/mL)和高质量浓度(750 μg/mL)组,随着 YCSB-1c 质量浓度增加,活细胞数量不断减少,凋亡细胞数量不断增加,表明 YCSB-1c 能诱导 DU-145 细胞凋亡,且作用效果呈现质量浓度依赖性。

2.5 细胞凋亡分析

细胞经 Annexin V-FITC/PI 双染后,使用流式细胞仪能够准确地区分细胞的凋亡状态分布^[14]。YCSB-1c 作用 DU-145 细胞 24 h 后,细胞的线粒体膜电位图如图 4 所示,图中 4 个象限表示细胞的不同状态:左上,坏死细胞;左下,正常细胞;右上,晚期凋亡细胞;右下,早期凋亡细胞。相较于空

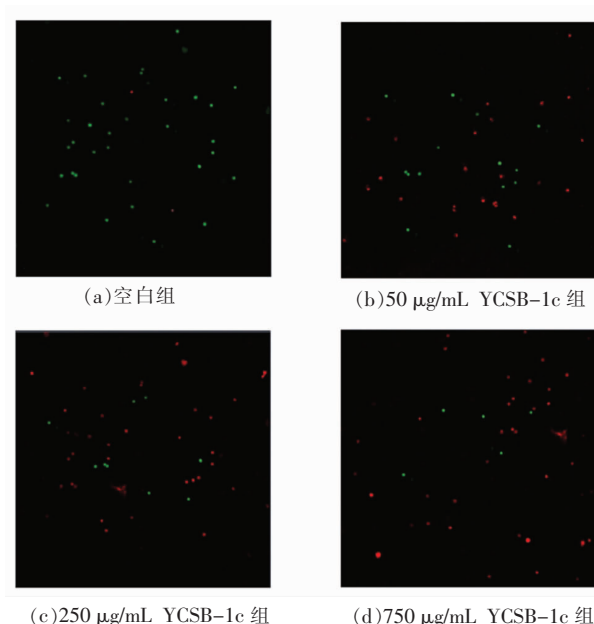


图 3 YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞的 AO/EB 染色图
Fig.3 AO-EB staining of DU-145 cells after treatment with YCSB-1c

白组,YCSB-1c 组中凋亡细胞明显增多,其中早期凋亡细胞在 50 μg/mL 和 250 μg/mL YCSB-1c 组中有微小的增加,而在 750 μg/mL YCSB-1c 组中

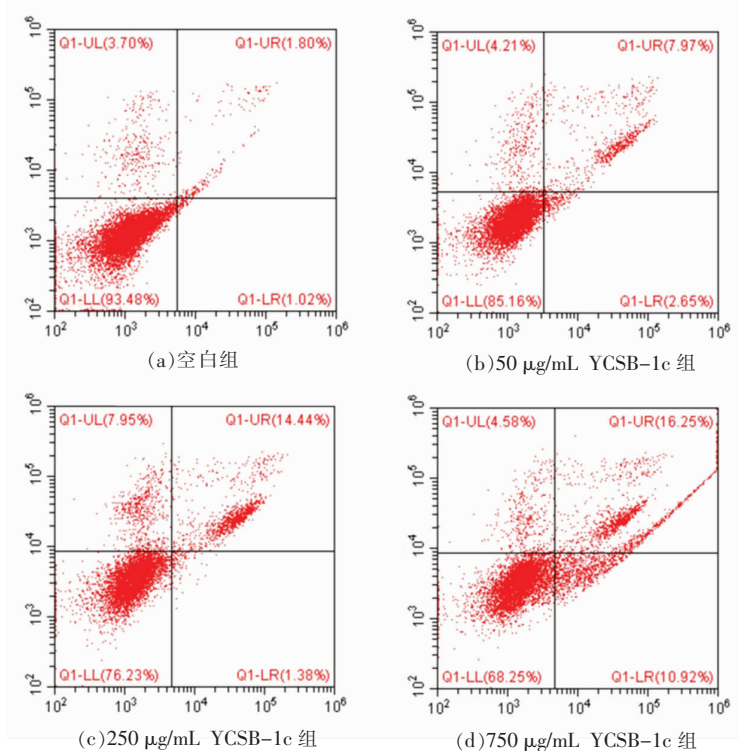


图 4 YCSB-1c 对 DU-145 细胞凋亡的影响

Fig.4 The effect of YCSB-1c on the apoptosis of DU-145 cells

早期凋亡细胞明显增加,达到 10.92%。50,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ YCSB-1c 组中的晚期凋亡细胞占比分别为 7.97%,14.44%和 16.25%,较空白组(1.80%)分别提升了 342.78%,702.22%和 802.78%。YCSB-1c 促使 DU-145 细胞进入凋亡状态,且作用效果与质量浓度呈正相关,这与细胞的 AO/EB 染色结果一致。

2.6 细胞周期分析

细胞周期可分为 4 个阶段:G1 期 (DNA 合成

前期)、S 期 (DNA 合成期)、G2 期 (DNA 合成后期)、M 期 (细胞分裂期)。YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞的细胞周期情况如图 5 和表 3 所示。由表 3 可知,与空白组相比,YCSB-1c 组中 G0/G1 期细胞显著增多($P<0.05$),且呈现质量浓度依赖性;S 期和 G2/M 期细胞显著降低($P<0.05$),这表明 YCSB-1c 将 DU-145 细胞的细胞周期阻滞在 G0/G1 期,阻止细胞进入 S 期合成 DNA,进而诱导 DU-145 细胞凋亡。

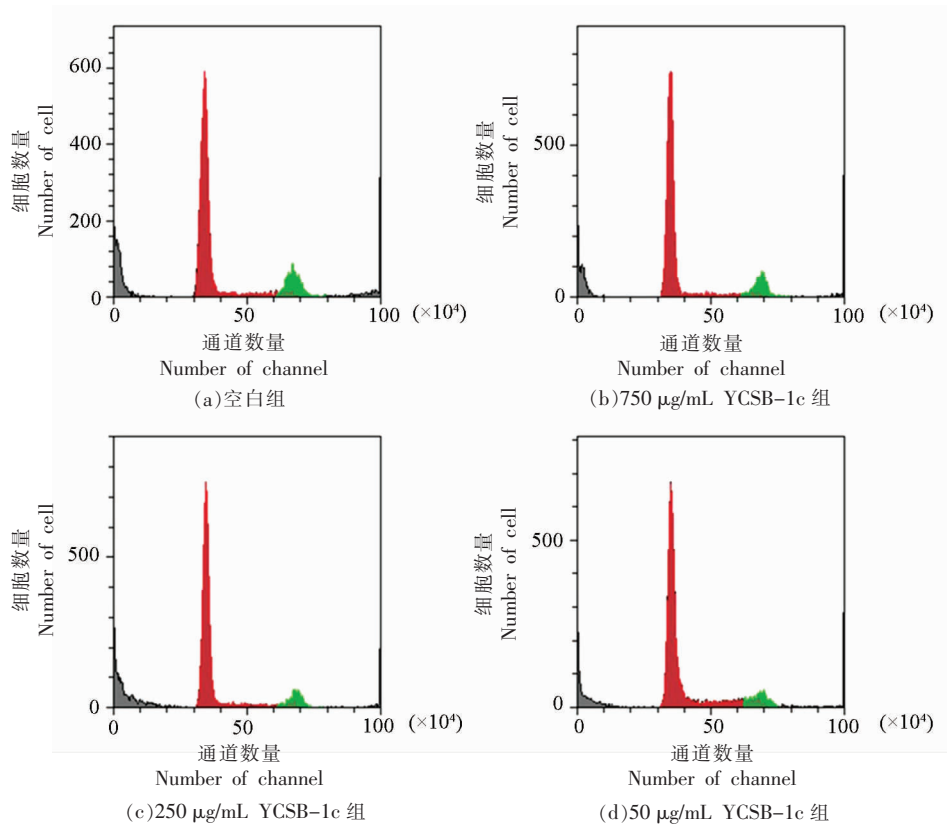


图 5 YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞的细胞周期分布图

Fig.5 Cell cycle distribution profiles of DU-145 cells after treatment with YCSB-1c

表 3 YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞的细胞周期分布结果

Table 3 Cell cycle distribution results of DU-145 cells after treatment with YCSB-1c

组别	细胞数量占比/%		
	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
空白组	80.12 ± 3.24 ^c	7.96 ± 1.05 ^a	11.92 ± 0.15 ^a
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ YCSB-1c	83.59 ± 2.65 ^b	5.73 ± 1.11 ^b	10.68 ± 0.21 ^b
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ YCSB-1c	86.25 ± 2.01 ^{ab}	5.32 ± 0.97 ^b	8.43 ± 0.31 ^c
750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ YCSB-1c	88.38 ± 2.25 ^a	4.28 ± 0.39 ^c	7.34 ± 0.25 ^d

注:同列数据右上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.7 免疫印记检测蛋白表达

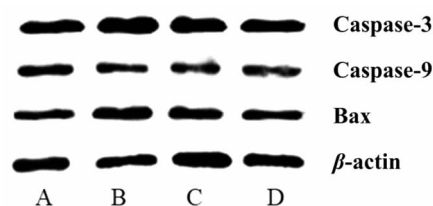
Bax 是一种促凋亡基因,能激活细胞线粒体凋亡途径,而 Caspase-3 和 Caspase-9 是执行凋亡的两种关键蛋白酶^[15]。如图 6 所示,3 种凋亡蛋白条带清晰,无明显拖尾。与空白组相比,不同质量浓度 YCSB-1c 组中 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达量增加,且呈质量浓度依赖性(表 4)。这表明 YCSB-1c 能上调 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达,进而促使 DU-145 细胞凋亡。

3 讨论

生物活性肽的功能与其特定氨基酸组成有密切关系,本研究分离纯化得到的鱼鳔多肽 YCSB-1c 中含有 2 条四肽,分别为 SPSP (Ser-Pro-Ser-Pro)、GPAR (Gly-Pro-Ala-Arg),其组成氨基酸均是黄鱼鱼鳔蛋白中的优势氨基酸^[11]。Pro 是 2 条四肽中共有的氨基酸,在 SPSP 中占比高达 50%,其是构成抗癌肽的重要氨基酸成分,如 Huang 等^[16]从蛭子中分离出两条多肽 Leu-Pro-Gly-Pro 和 Asp-Tyr-Val-Pro,并证实它们具备较好的抗前列腺癌活性;Shamova 等^[17]从山羊白细胞中分离一条富含 Pro 的多肽 ChBac3.4,其能选择性地作用 K562 红血病细胞和 U937 囊性淋巴瘤细胞而不损伤人体正常细胞。此外,GPAR 中的 Gly、Arg 也被公认为是抗癌肽的主要氨基酸组成^[18-19]。

细胞周期与细胞凋亡有着紧密的关联,细胞凋亡导致活细胞数量下降,引起细胞周期发生改变^[20]。流式细胞仪检测 YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞的细胞周期发现,与空白组相比,YCSB-1c 组中 G0/G1 期细胞显著增多 ($P<0.05$),S 期和 G2/M 期细胞显著降低 ($P<0.05$)。YCSB-1c 将 DU-145 细胞周期阻滞在 G0/G1 期,这可能与细胞合成 DNA、核糖体和蛋白质受阻有关^[21]。Huang 等^[16]研究发现,抗前列腺癌肽 SCH-P10 作用后 DU-145 细胞中 G0/G1 期细胞数量增加,S 期和 G2/M 期细胞数量减少,与本研究的结果一致。

诱导癌细胞凋亡被认为是治疗癌症的有效手段。细胞凋亡主要包括线粒体凋亡、内质网应激和死亡受体凋亡 3 种途径^[22],其中线粒体凋亡途径主要由非 Caspase 依赖细胞凋亡诱导因子和细胞色素 C 介导^[23]。细胞凋亡诱导因子介导的凋亡途



注:A. 空白组;B. 750 $\mu\text{g/mL}$ YCSB-1c 组;C. 250 $\mu\text{g/mL}$ YCSB-1c 组;D. 50 $\mu\text{g/mL}$ YCSB-1c 组。

图 6 YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞中蛋白表达

Fig.6 Protein expression in DU-145 cells after treatment with YCSB-1c

表 4 YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞中蛋白表达量

Table 4 Protein expression content in DU-145 cells after treatment with YCSB-1c

组别	Caspase-3	Caspase-9	Bax
空白组	1.94 \pm 0.06 ^c	1.29 \pm 0.04 ^c	1.36 \pm 0.12 ^c
50 $\mu\text{g/mL}$ YCSB-1c	1.92 \pm 0.05 ^c	1.35 \pm 0.05 ^b	1.43 \pm 0.07 ^c
250 $\mu\text{g/mL}$ YCSB-1c	2.02 \pm 0.11 ^b	1.34 \pm 0.08 ^b	1.57 \pm 0.03 ^b
750 $\mu\text{g/mL}$ YCSB-1c	2.38 \pm 0.09 ^a	1.42 \pm 0.09 ^a	1.87 \pm 0.11 ^a

注:同列数据右上标字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

径为:药物引起线粒体内的细胞凋亡诱导因子释放,并转移到细胞核内,破坏细胞 DNA 进而导致细胞凋亡^[24]。细胞色素 C 介导的凋亡途径为:当细胞中促凋亡蛋白 Bax 被激活时,会引起线粒体膜通透性增加,线粒体内的细胞色素 C 被释放到细胞质中,激活细胞中凋亡蛋白酶激活因子 (Apaf-1),Apaf-1 能激活 Caspase-9^[25]。细胞色素 C、Apaf-1 和 caspase-9 通过形成凋亡小体激活 Caspase-3,使核酸内切酶活化,引起 DNA 断裂最终导致细胞凋亡^[26]。本研究中发现,YCSB-1c 作用后 DU-145 细胞中促凋亡蛋白 Bax、执行凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达上调,推测 YCSB-1c 诱导 DU-145 细胞凋亡的作用机制如图 7 所示。

综上所述,YCSB-1c 能将 DU-145 细胞的细胞周期阻滞在 G0/G1 期,促使 DU-145 细胞中 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达上调,最终诱导 DU-145 细胞凋亡,实现抗前列腺癌的功效。试验结果表明黄鱼鱼鳔肽具有成为抗前列腺癌药

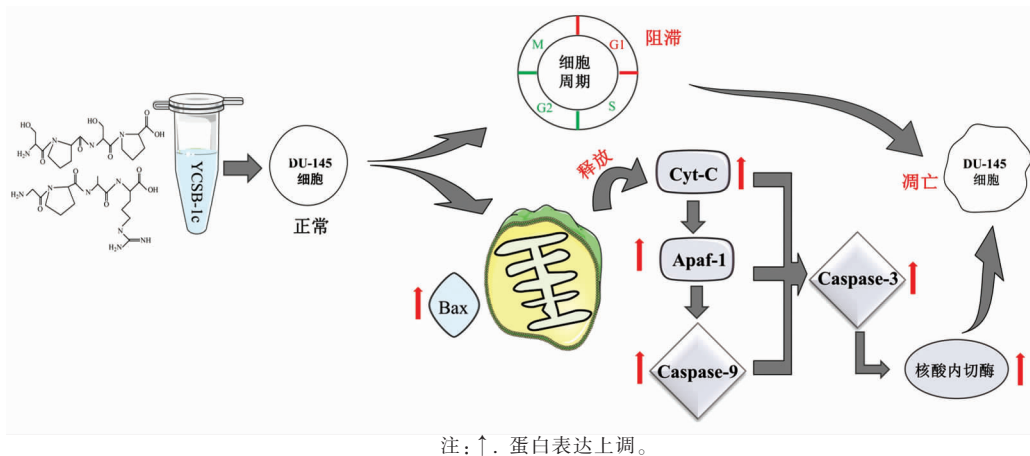


图7 YCSB-1c 诱导 DU-145 细胞凋亡的作用机制

Fig.7 The mechanism of YCSB-1c inducing apoptosis of DU-145 cells

物的潜力。后续将人工合成黄鱼鱼鳔中的两条寡肽，研究它们对前列腺癌细胞的抑制效果和作用机制。

4 结论

本文从黄鱼鱼鳔酶解产物分离得到鱼鳔肽 YCSB-1c，其包含 Ser-Pro-Ser-Pro 和 Gly-Pro-Ala-Arg 两条寡肽。YCSB-1c 对前列腺癌细胞 DU-145 有较好的抑制效果，其机制为：将 DU-145 细胞的细胞周期阻滞在 G0/G1 期，抑制细胞增殖；上调促凋亡蛋白 Bax、执行凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达量，诱导细胞凋亡。本研究为黄鱼鱼鳔的抗前列腺癌保健品开发提供数据支持，并有效提高黄鱼鱼鳔的附加值。

参 考 文 献

- [1] 董旭, 赵峡, 刘楚怡. 鱼鳔胶原肽的制备工艺及功能活性研究进展[J/OL]. 食品工业科技, (2021-07-20) [2021-08-30]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030285>.
DONG X, ZHAO X, LIU C Y. Progress in preparation and functional activity of fish swimming bladder collagen peptide[J/OL]. Science and Technology of Food Industry, (2021-07-20) [2021-08-30]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030285>.
- [2] 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 160-166.
TU Z C, TANG P P, ZHENG T T, et al. Optimization of swimming bladder collagen peptide preparation using response surface methodology and its antioxidant activity research[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(5): 160-166.
- [3] 葛恩会, 刘涛. 鱼鳔功效溯源及其现代研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2403-2406.
GE E H, LIU T. Traceability of the efficacy of fish bladder and its modern research progress[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(9): 2403-2406.
- [4] ZHAO W H, LUO Q B, PAN X, et al. Preparation, identification, and activity evaluation of ten antioxidant peptides from protein hydrolysate of swim bladders of miiuy croaker (*Müchthys müuy*) [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47: 503-511.
- [5] REBECCA L S, KIMBERLY D M, AHMEDIN J, et al. Cancer statistics, 2020 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020, 70(1): 7-30.
- [6] 刘灿, 李想, 王雷, 等. 2005-2014 年中国前列腺癌流行特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2021, 25(7): 806-811.
LIU C, LI X, WANG L, et al. Chinese prostate cancer epidemiological characteristics from 2005 to 2014[J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2021, 25(7): 806-811.
- [7] WANG L H, DONG C, LI X, et al. Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources (Review)[J]. Oncology Reports, 2017, 38(2): 637-

- 651.
- [8] MANSOURIAN M, BADIEE A, JALALI S A, et al. Effective induction of anti-tumor immunity using p5 HER-2/neu derived peptide encapsulated in fusogenic DOTAP cationic liposomes co-administrated with CpG-ODN[J]. Immunology Letters, 2014, 162(1): 87-93.
- [9] RUSSO L C, ARAUJO C B, IWAI L K, et al. A Cyclin D2-derived peptide acts on specific cell cycle phases by activating ERK1/2 to cause the death of breast cancer cells[J]. Journal of Proteomics, 2017, 151(SI): 24-32.
- [10] 李宁, 石爱民, 刘红芝, 等. 生物活性肽抗癌活性及其作用机制研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(11): 261-269.
- LI N, SHI A M, LIU H Z, et al. Research progress of bioactive peptides' anticancer function and its mechanism of action[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(11): 261-269.
- [11] 赵敏豪, 黎攀, 张豫粤, 等. 不同来源鱼鳔的营养成分比较分析[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(24): 12-17.
- ZHAO M H, LI P, ZHANG Y Y, et al. Comparison of nutritional quality in fish maw products from different sources [J]. Food Research and Development, 2020, 41(24): 12-17.
- [12] 梁钻好, 林凤英, 黎攀, 等. 结合预处理方法的酶法制备美藤果肽工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 147-153.
- LIANG Z H, LIN F Y, LI P, et al. Optimization of *Sacha inchi* peptide preparation by enzymolysis combined with pretreatment methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 147-153.
- [13] SAJID A, PRABHU A. Anti-angiogenic, apoptotic and matrix metalloproteinase inhibitory activity of *Withania somnifera* (ashwagandha) on lung adenocarcinoma cells[J]. Phytomedicine, 2021, 90: 153639.
- [14] SONG N, MA J Y, HU W, et al. Lappaconitine hydrochloride inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells via mitochondrial and MAPK pathway [J]. Acta Histochemica, 2021, 123(5): 151736.
- [15] ANVARIFAR H, AMIRKOLAIE A K, JALALI A M, et al. Environmental pollution and toxic substances: Cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish[J]. Aquatic Toxicology, 2018, 204: 144-159.
- [16] HUANG F F, DING G F, YANG Z S, et al. Two novel peptides derived from *Sinonovacula constricta* inhibit the proliferation and induce apoptosis of human prostate cancer cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(5): 6697-6707.
- [17] SHAMOVA O, ORLOV D, STEGEMANN C, et al. ChBac3.4: A novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2009, 15(2): 108-119.
- [18] SHOOMBATONG W, SCHADUANGRAT N, NANTASENAMAT C. Unraveling the bioactivity of anticancer peptides as deduced from machine learning [J]. Excli Journal, 2018, 17: 734-752.
- [19] CHIANGJONG W, CHUTIPONGTANATE S, HONGENG S. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review)[J]. International Journal of Oncology, 2020, 57(3): 678-696.
- [20] 郝帅, 闫燕, 李爽, 等. 食用色素藻蓝蛋白对非小细胞肺癌 A549 细胞体外增殖和凋亡的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 158-164.
- HAO S, YAN Y, LI S, et al. Effect of C-phyco-cyanin as a food pigment on proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Food Science, 2019, 40(3): 158-164.
- [21] 金晶玉, 朱成杰, 权英实, 等. 罗哌卡因通过线粒体通路诱导人结直肠癌 SW620 细胞株凋亡的实验研究[J/OL]. 中国比较医学杂志, (2021-07-21)[2021-08-30]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4822.R.20210721.1359.002.html>.
- JIN J Y, ZHU C J, QUAN Y S, et al. Ropivacaine induces apoptosis in a human colorectal cancer SW620 cell line via the mitochondrial pathway[J/OL]. Chinese Journal of Comparative Medicine, (2021-07-21)[2021-08-30]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4822.R.20210721.1359.002.html>.
- [22] SIEGMUND D, LANG I, WAJANT H. Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2 [J]. Febs Journal, 2017, 284(8): 1131-1159.
- [23] 叶汉林, 乔滢, 王琳琳, 等. 原阿片碱通过线粒体凋亡途径抑制肝细胞癌生长[J/OL]. 药学报, (2021-

- 04-01)[2021-08-30]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2021-0319>.
- YE H L, QIAO G, WANG L L, et al. Protopine inhibits the growth of hepatocellular carcinoma through a mitochondrially mediated apoptosis pathway[J/OL]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, (2021-04-01) [2021-08-30]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2021-0319>.
- [24] WIRASWATI H L, HANGEN E, SANZ A B, et al. Apoptosis inducing factor (AIF) mediates lethal redox stress induced by menadione [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 76496-76507.
- [25] 孙瑜, 李连军, 杨最素, 等. 菲律宾蛤仔寡肽抗前列腺癌 DU-145 细胞的机制研究[J]. *水产学报*, 2017, 41(3): 465-472.
- SUN Y, LI L J, YANG Z S, et al. Effect of oligopeptides from *Ruditapes philippinarum* on proliferation and apoptosis of human prostate cancer DU-145 cells [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 465-472.
- [26] REUBOLD T F, ESCHENBURG S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome [J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24(7): 1420-1425.

Isolation of Peptide from Yellow Croaker Swim Bladder and Its Mechanism of Inducing Apoptosis of Prostate Cancer DU-145 Cells

Peng Dong¹, Lai Yujian¹, Tian Jianxin^{2,3}, Zhong Biluan^{2,3}, An Miaoling¹, Li Pan^{1,3}, Du Bing^{1,3*}

¹College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

²Guangdong Shenzhiyuan Health Technology Co. Ltd., Guangzhou 510000

³SCAU and Guanzhan Fish Maw Nutrition and Security Research Center, Guangzhou 510642)

Abstract The study aimed to investigate the mechanism of the peptide from yellow croaker swim bladder inducing apoptosis in prostate cancer DU-145 cells. Isolation and purification of the peptides from the enzymatic hydrolysate of yellow croaker swim bladder and identification of its amino acid sequences. The CCK-8 method was used to measure the inhibition rate of swim bladder peptide after treatment with YCSB-1c. AO/EB method was used to determine apoptosis in DU-145 cells. Flow cytometry was used to determine apoptosis rate and cell cycle in DU-145 cells, and western blot was used to determine the expression levels of apoptosis-related proteins. The results showed that the YCSB-1c contains two oligopeptides, Ser-Pro-Ser-Pro and Gly-Pro-Ala-Arg. Compared with the control group, the apoptotic cells in the YCSB-1c groups were significantly increased in a dose-dependent manner. Flow cytometry results showed that live cells in YCSB-1c groups were significantly decreased, while the late apoptotic cells were significantly increased. YCSB-1c blocked the cell cycle of DU-145 cells in G0/G1 phase, up-regulated the protein expression of Bax, Caspase-3 and Caspase-9, and induced DU-145 cells apoptosis. YCSB-1c could effectively induce apoptosis in DU-145 cells, and the underlying mechanism is related to cell cycle block and mitochondria-mediated apoptotic pathway.

Keywords yellow croaker swim bladder; anti-prostate cancer peptide; DU-145 cells; apoptosis mechanism