

# 豆类植物蛋白酶抑制剂研究进展<sup>\*</sup>

张莉 汪东风 张宾 孙丽平

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

**摘要** 对国内外豆类丝氨酸蛋白酶抑制剂和半胱氨酸蛋白酶抑制剂的结构、理化性质和生理功能进行了阐述, 探讨了在抗虫植物基因工程和临床上的应用。

**关键词** 豆类植物; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)03-0314-06

蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PI)广泛存在于动植物和微生物体内, 与机体内相应的蛋白水解酶形成动态平衡, 调节许多重要的生命活动。PI 是一类分子量较小的多肽或蛋白质, 它们能与蛋白酶活性部位或变构部位结合抑制酶的催化活性或阻止酶原转化为有活性的酶, 在调节蛋白酶活性和蛋白质代谢等方面起着重要的作用。根据其作用的酶活性部位的不同, PI 分为丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂(巯基蛋白酶抑制剂)、金属羧肽酶蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂。目前已发现的植物来源的 PI 主要属于前3种类型。

在植物的贮藏器官, 特别在种子和球茎中, 其含量常常高达总蛋白的1%~10%。植物叶片受到机械损伤或经化学处理, 也会积累大量 PI。迄今为止, 已发现含有 PI 的植物有90多种且在豆科、茄科、葫芦科、禾本科及十字花科等草本植物中存在较多, 而在木本植物中较少, 仅在苹果等蔷薇科植物和欧洲白杨等杨柳科植物中发现<sup>[1]</sup>。

豆类植物属于被子植物双子叶植物纲(Dicotyledoneae)豆目(Fabales)蝶形花科(Fabaceae), 约12000种, 分布于全世界。豆类在我国居民膳食中占有十分重要的地位, 因此针对豆类植物蛋白酶抑制剂的研究在营养学和医学等领域都有着深远的意义。目前, 有关植物 PI 的报道很多, 但是关于各种豆类植物 PI 的研究综述还未见报道。本文主要就豆类植物丝氨酸蛋白酶抑制剂和半胱氨酸蛋白酶抑制剂的种类、分布、及其在生产和生活中的应用进行论述。

## 1 豆类植物中的丝氨酸蛋白酶抑制剂

### 1.1 大豆

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.], 原产我国, 主产东北, 是重要的油料作物。大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, SBTI)属于丝氨酸蛋白酶抑制剂, 是一种多肽, 组成氨基酸残基在72~197个左右。SBTI约有7~10种<sup>[2]</sup>, 据氨基酸组成、分子量、等电点、与不同蛋白酶的结合力以及免疫学的反应性等特点, 可将其分为两大类: ①Kunitz 胰蛋白酶抑制剂(Kunitz trypsin inhibitor, KTI), 分子量20~25kDa, 呈易变的非螺旋形, 对热不稳定, 含有二对二硫键, 特异抑制胰蛋白酶。一个抑制剂分子可以结合一分子的胰蛋白酶, 属单头抑制剂。大豆中含量约为1.4%; ②Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制剂(Bowman-Birk trypsin inhibitor, BBTI), 分子量6~10kDa, 含有较多二硫键, 具有热稳定性, BBTI对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶及弹性蛋白酶三种蛋白酶发生特异抑制。一个抑制剂分子可以结合二个分子的胰蛋白酶, 是一个双头抑制剂, 大豆中仅含0.6%<sup>[3]</sup>。

Kunitz 于1945年首先从大豆种子中分离 KTI (SBTI-A2, 并得到纯化结晶, 其分子量大约为20.1 kDa<sup>[4]</sup>。该种抑制剂结构为直径3~5 nm 球体, 由12个反平行 $\beta$ 带十字交叉构成, 其疏水性侧链起到主要稳定作用, 具有特殊热稳定性和化学稳定性。Roychaudhuri 等测定 KTI 热变性和复性, 发现热变性后一旦冷却很容易恢复到天然状态, 这为进一步研究无序 $\beta$ -折叠蛋白的展开提供有用的理论依

\* 收稿日期: 2006-03-22

基金项目: 山东省自然科学基金重点项目(Z2004D05)

作者简介: 张莉(1979-), 女, 博士, 研究方向生物化学。E-mail: qdzhangli@ouc.edu.cn

通讯作者: 汪东风, E-mail: wangdf@ouc.edu.cn

据<sup>[5]</sup>。SBTi—A2 具有电泳变异类型, 电泳后出现 Rf 值分别为 0.79、0.75、0.83 的三个互为显性的等位基因  $Ti^a$ 、 $Ti^b$ 、 $Ti^c$ 。由这 3 个显性等位基因编码的相应蛋白为  $Ti^a$ 、 $Ti^b$ 、 $Ti^c$ , 聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移率相对大小为  $Ti^c > Ti^a > Ti^b$ , 抑制剂的活力为  $Ti^a \approx Ti^c > Ti^b$ , 其中  $Ti^a$  在自然界中普遍存在, 而  $Ti^b$  和  $Ti^c$  较少见到。忻骅于 1991 年从国内 15000 余份大豆资源中发现了  $Ti^d$ , 与  $Ti^a$  仅有一个氨基酸的差别<sup>[9]</sup>。李严等从我国 2 种多年生野生大豆多毛豆 (*G. tomentella*) 和脮豆 (*G. tabacina*) 种子蛋白中发现 SBTi 蛋白酶的同工抑制剂现象<sup>[7]</sup>。这些 SBTi—A2 蛋白的一级结构也已被先后阐明。它们均含 181 个氨基酸残基, 都在相同位置含有两个二硫键 (Cys39—Cys86, Cys138—Cys145), 活性位点为 Arg63—Ile64, 在组成上稍有差异, 一个抑制剂分子能钝化一分子胰蛋白酶<sup>[8]</sup>。

Birk 在继 Bowman1944 年发现 BBTI 后于 1961 年纯化了 BBTI<sup>[9]</sup>。Odani 和 Ikenaka 于 1973 年测定出 BBTI 的全部氨基酸序列, BBTI 是由 71 个氨基酸组成的单肽链, 含有 7 个二硫键, 分子量大约是 8kDa。它具有两个反应中心, 一个在 Lys16—Ser17, 可以和胰蛋白酶结合; 另一个在 Leu43—Ser44, 可与胰凝乳蛋白酶结合, 所以 BBTI 可形成与胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶 1:1 结合或与两种酶同时结合的复合物<sup>[10]</sup>。研究表明, BBTI 不含  $\alpha$ —螺旋构型, 具有 61% $\beta$ —折叠, 38%无序构型和 1% $\beta$ —转角<sup>[11]</sup>。

BBTI 家族的抑制区是由二硫键连接 9 个残基的环形结构区, 这是许多丝氨酸蛋白酶所具有的特征性规则结构域。但 BBTI 环形结构的独特之处在于其抑制环边缘存在一个顺式肽键。BBTI 的抑制环最常见的基因序列是在 P3—P4' 处带有顺—反式立体结构的脯氨酸—脯氨酸元件。通过分析合成片段的抑制活性和结构发现, 只有脯氨酸存在于 P3' 时, BBTI 才显示出有效的胰蛋白酶抑制作用, 此处的顺式肽键是生物活性所必需的, 而 P4' 处的脯氨酸则可抑制 P3' 处反式构象的形成<sup>[12]</sup>。

Ware 等通过使用 BBTI 滴定人类皮肤组织中肥大细胞里糜蛋白酶抑制剂活性位点, 发现 BBTI 是人类糜蛋白酶的高效抑制剂, 化学计量法显示在 10 nM 糜蛋白酶条件下即可检测到其对糜蛋白酶的抑制作用, 糜蛋白酶/BBTI 复合物经过 SDS—PAGE 分析后并未发生解离, 说明二者之间形成了紧密结合的复合物<sup>[13]</sup>。Struthers 等比较了来自

蛇、猴等的胰蛋白酶均可被 BBTI 抑制, 抑制率达 90%~100%<sup>[14]</sup>。从未加热的大豆蛋白纯品或生大豆粉中提取的 BBTI 对人类胰蛋白酶的抑制程度比加热后要稍强一些<sup>[15]</sup>。Sessa 和 Wolf 发现大豆种皮可作为 BBTI 的一种新的廉价原料, 从而可用来作为具有较大开发前景的抗癌药物<sup>[16]</sup>。

## 1.2 菜豆

菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 是全世界普遍栽培的豆类作物之一。Pusztai 在 1966 年就报道了从菜豆 (*P. vulgaris*, var. haricot) 中得到一种胰蛋白酶抑制剂, 随后人们又从另一种菜豆 (var. red bean) 中得到一种完全不同的胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶抑制剂<sup>[17, 18]</sup>。Wu 等人从红色菜豆 (*Phaseolus vulgaris* var. Linden) 中分离纯化了四种胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶抑制剂<sup>[19]</sup>。氨基酸分析表明均含有丰富的 Cys, Ser, Asp 和 Pro, 但 Gly, Ala 及芳香氨基酸含量却很低。四种抑制剂的分子量相同, 并且基本以二聚体的形式存在, 等电点介于 4.46~5.09。抑制剂 R(A), R(B2) 和 R(C) 可以结合一分子胰蛋白酶和一分子胰凝乳蛋白酶, R(B1) 只结合一分子胰蛋白酶。Gibbs 从白色菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 中得到四种抑制  $\alpha$ —淀粉酶活性的成分<sup>[20]</sup>。进一步研究抑制活性最高的成分, 发现是 N—末端糖基化的糖蛋白, 去糖基化后的分子量大约是 55kDa, 且不改变与酶的结合常数, 说明糖基不参与结合。C—末端残基是 Ser—Ala—Tyr。血浆蛋白酶, 嗜热菌蛋白酶或链霉蛋白酶可以水解该抑制剂, 胃蛋白酶对其没有作用。抑制剂的活性离不开  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$  可以使结合的最初速率加快。Mg<sup>2+</sup> 和  $SO_4^{2-}$  对其抑制活性没有影响, 在 pH 6.9 时达到最大抑制效果。Osman 等比较了宽叶菜豆 (*Phaseolus acutifolius*) 蛋白酶抑制剂 (TBPI) 与大豆胰蛋白酶抑制剂 (KTI)、大豆胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶抑制剂 (BBTI) 以及利马豆胰蛋白酶抑制剂 (LBTI) 在不同条件下的热稳定性<sup>[21]</sup>。TBPI, BBTI 和 LBTI 在中性和酸性条件下加热到 100℃或在中性条件下高压处理仍具有热稳定性, 在中性条件下, 宽叶菜豆粗提物和 KTI 对加热和高压敏感。在碱性条件下, 所有纯化的 PI 对热敏感, 加热到 100℃时迅速失去对胰蛋白酶的抑制活性。实验表明, TBPI 与 Bowman—Birk 家族相似, 具有热稳定性, 在碱性条件下加热迅速失活。

Campos 等通过 HPLC 阴离子交换柱从宽叶菜豆 (*Phaseolus acutifolius* G.) 中分离得到两种 PI

(TBPI-A 和 TBPI-B), 抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶<sup>[22]</sup>。TBPI-B 含有 80 个氨基酸残基, 分子量大约是 9kDa, 氨基酸序列和 Bowman-Birk 家族类似。电泳和质谱表明该抑制剂存在二聚体和三聚体, 另外一个不寻常的特征是可以结合金属。N 一端四个连续的组氨酸可能与金属结合有关。质谱和原子吸收光谱也表明在天然状态下抑制剂与钙结合。

## 2 豆类植物中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂

半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatins)是一类小肽, 可以保护细胞免受不合适的内源或外部的蛋白质水解, 参与细胞内外正常及病理情况下的蛋白质降解的调控。通常认为种子中的胱蛋白可能参与调节发芽过程中的贮藏蛋白质的水解, 并且作为一种防御机制, 协同丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制昆虫体内的蛋白酶<sup>[23]</sup>。

cystatins 家族可以与半胱氨酸蛋白酶紧密且可逆地结合, 根据氨基酸序列的同源性, 分子量大小及其在机体内的分布状况, 分为 stefins、cystatins 和 kininogens 三个家族。Barrett 等认为 stefins 家族为不含二硫键和糖的单链蛋白, 分子量约为 11 kDa, 包括 stefinA 和 stefinB<sup>[24]</sup>。stefins 家族具有热稳定性, 在中性和碱性 pH 下稳定。cystatins 家族是含有两个链内二硫键的分泌性蛋白, 大约含有 115 个氨基酸残基, 分子量约为 12—13 kDa, 主要包括 cystatin C, D, E, F, S 等, 成员众多, 分布广泛。除了鼠 cystatin C 外, 该家族的其他成员都没有糖基化<sup>[25]</sup>。kininogens 家族也是含有链内二硫键的单链蛋白, 分子量较大, 约 68—120 kDa, 主要包括 H-kininogen, L-kininogen 和 T-kininogen。kininogens 在中性和碱性 pH 下是稳定的, 在 90 °C 短时间内具有热稳定性<sup>[26]</sup>。最近将来源于植物的 cystatins 胱蛋白 "phyto-cystatin" 列为第四家族的观点已被人们广泛接受, 分离并鉴定了许多新成员。植物胱蛋白分布在许多植物组织中, 主要存在于蛋白质贮藏器官。除了共同的结构特征 Gln-Val-Val-Ala-Gly<sup>[27]</sup>, 植物胱蛋白通常还有长的 C-末端和 N-末端以及二硫键, 这表明这个家族也是可以再分的<sup>[28]</sup>。

### 2.1 大豆

Learmonth 早在 1958 年就发现大豆粉有抑制木瓜蛋白酶的活性<sup>[29]</sup>, Brzin 在 1990 年从大豆种子中分离得到分子量为 12 和 13 kDa 的木瓜蛋白酶抑

制剂<sup>[30]</sup>。继 Misaka 等人之后, Hines 等从大豆种子中分离得到分子量为 12 kDa 的 cystatins, 其 N-端氨基酸序列与水稻 oryzacystatin 及鸡蛋 cystatin 有同源性, 可以抑制木瓜蛋白酶, 无花果蛋白酶, 但对菠萝蛋白酶, 牛胰蛋白酶, 牛  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶和猪胃蛋白酶的活性没有影响<sup>[28, 31]</sup>。这种抑制剂可以在不同程度上抑制几种以半胱氨酸蛋白酶为消化酶的昆虫幼虫中肠粗提物的分解蛋白的能力。大豆 cystatins 的等电点是 pH 5.3, 糖蛋白染色为阴性, 在 100 °C 加热 30 min 后失活。

### 2.2 菜豆

Brzin 等通过亲和层析和凝胶过滤层析从菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 的种子中分离得到一种 cystatins FSCPI 5.5<sup>[32]</sup>。SDS-PAGE 电泳显示在 14 kDa 附近有一条主带, 等电聚焦测得其等电点是 5.5。反相 HPLC 测得其 N-末端序列, 可知 FSCPI 5.5 为植物胱蛋白, 其 N-末端序列与胡萝卜 cystatin 的氨基酸顺序有 48% 类似, 与豆科植物的有 18%~23% 相似。FSCPI 5.5 对来源于 *P. vulgaris* 叶子的两种半胱氨酸蛋白酶 FLCP-1 和 FLCP-3 有强烈的抑制作用, 并且也是木瓜蛋白酶和人组织蛋白酶 B, H 和 L 的潜在抑制剂, 其  $K_i$  值分别是 0.08、3.6、2.8 和 0.02 nM。采用相似的方法首次从菜豆叶子中分离得到另一种 cystatins FLCPI。其 N-端氨基酸序列与 FSCPI 5.5 的相似但不完全相同, 免疫抗原性与 FSCPI 5.5 有关, 并且分子量相同。FLCPI 可以有效地抑制菜豆叶子中的两种半胱氨酸蛋白酶说明在正常和病理条件下该抑制剂在叶子蛋白质水解过程中发挥主要作用。

## 3 豆类植物蛋白酶抑制剂的应用

### 3.1 在抗虫植物基因工程中的应用

Mickel 和 Standish 最早于 1947 年观察到一些昆虫的幼虫在豆类产物中不能发育<sup>[33]</sup>。随后 Lipke 等发现大豆中的丝氨酸蛋白酶抑制剂对杂拟谷盗 (*Tribolium confusum*) 表现出毒性<sup>[34]</sup>。此后, 许多蛋白酶抑制剂的抗虫研究被陆续报道。谢可方等报道棉铃虫的幼虫喂食含有大豆胰蛋白酶抑制剂的人工饲料后, 表现出生长延缓、体重减轻、羽化率降低、死亡率增加<sup>[35]</sup>。丝氨酸蛋白酶抑制剂主要具有抑制鳞翅目昆虫消化蛋白酶的能力, 而巯基蛋白酶抑制剂则主要是通过抑制鞘翅目和半翅目昆虫消化道内的巯基蛋白水解酶而达到杀虫目的<sup>[36]</sup>。因此豆

类植物蛋白酶抑制剂在生物农药及利用转基因方法使作物提高抗虫性方面有着广阔的应用前景。

目前, 在转基因中使用较为成熟的是豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(cowpea trypsin inhibitor, CPTI)。CPTI 基因的作用靶位是昆虫的酶的活性位点, 具有杀虫范围广, 效果稳定等特点, 应用价值巨大。1987 年, 首次获得表达 CPTI 基因的烟草植株, 其体内的 CPTI 占总可溶性蛋白质的 0.9%, 抗虫效果明显, 烟草芽蛾的死亡率为 50%~62.5%。随后, 相继获得转 CPTI 基因的水稻、油菜、白薯、苹果、杨树和棉花等植物, 对玉米螟和水稻三化螟都有一定的抗性<sup>[37, 38]</sup>。

高越峰等构建了大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的一系列植物表达载体, 用于烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)等作物的转化<sup>[39]</sup>。利用棉铃虫(*Heliothis armigera* Hubner)对转基因烟草进行了抗虫测试, 结果表明, 转基因烟草和对照烟草相比, 具有明显的抗虫能力。Confalonieri 等将大豆 Kunitz 蛋白酶抑制剂基因转化到欧洲黑杨(*Populus nigra*), 但对试虫的毒杀效果不好<sup>[40]</sup>。此外, 在油菜、白杨和马铃薯等作物中也分别进行了大豆丝氨酸蛋白酶抑制剂的转基因研究<sup>[41]</sup>。虽然蛋白酶抑制剂基因是抗虫基因工程中经常使用的目的基因之一, 但是仍存在表达水平较低, 昆虫的适应性及植物本身代谢产物的影响等问题。

### 3.2 在临床治疗上的应用

蛋白酶抑制剂在临床治疗上有许多重要应用, 如在治疗胰腺炎和多功能衰竭、抗休克、减少心脏外科手术中失血、防治脑水肿和脑缺血、预防早产、预防单侧肺缺血再灌注引起的损伤等方面都有相关的研究报道。其中, 最令人瞩目的是在 HIV 和肿瘤治疗中的应用。

目前艾滋病的化学治疗主要是从 HIV 病毒的复制周期入手, 通过阻断病毒复制周期的三个关键酶(逆转录酶, 整合酶和蛋白酶)来达到抑制 HIV 复制的目的。将不同的酶抑制剂联合使用, 采用多药协同作用和从 HIV 复制周期的多个环节同时阻断, 在临床上取得了很好的效果<sup>[42]</sup>。继 1995 年第 1 个 HIV 蛋白酶抑制剂沙奎那韦研制成功后, 如今已有 5 种 HIV 蛋白酶抑制剂陆续研制出来。豆类植物蛋白酶抑制剂来源广泛, 方便易得, 相信随着研究的深入, 会在抗病毒方面发挥独特的作用。

Ye 等从蚕豆(*Vicia faba*)中分离得到一种分子

量大约为 7.5 kD 的胰蛋白酶—胰凝乳蛋白酶抑制剂, 该抑制剂对 *Mycosphaerella arachidicola*, *Fusarium oxysporum* 和 *Botrytis cinerea* 具有抗真菌活性<sup>[43]</sup>。和其他抗真菌蛋白一样, 抑制剂也抑制 HIV-1 逆转录酶的活性。可以增强鼠脾细胞的有丝分裂能力。这是首次关于豆类蛋白酶抑制剂抗真菌活性的报道。该抑制剂对 *Fusarium oxysporum* 的抑制活性比豆类其他的抗真菌蛋白的活性都要好, 对 *Mycosphaerella arachidicola* 的抑制活性和 ginkbilobin 相当, 但对 *Botrytis cinerea* 的抑制能力比豆类其他的抗真菌蛋白弱。

研究发现, 大豆 BBTI 型蛋白酶抑制剂具有明显的抗癌作用, 它不同于其它一些抗癌药物, 能以不可逆方式影响致癌过程且在低含量时也能发挥其抗癌作用。在已经发生癌症的模型中大豆 BBTI 型蛋白酶抑制剂体内外均可长期表现出抑癌作用<sup>[44]</sup>。大豆 BBTI 型蛋白酶抑制剂可抑制或阻止诱导结肠癌的发生, 其抑制肿瘤的效果主要来自于抑制胰凝乳蛋白酶的活性<sup>[45]</sup>。蛋白酶抑制剂虽然对癌细胞没有直接的杀伤效果, 但它在离体条件下可阻止正常细胞向恶性转化, 甚至在癌症晚期亦如此<sup>[46]</sup>。Augustine 等通过给 C3H/Jax 小鼠长期饲喂富含蛋白酶抑制剂(24%)的野生大豆研究鼠腺癌病毒(MMTV)诱导的乳腺癌发生过程。野生大豆在剂量为 2%、4%和 8%时的肿瘤抑制率分别为 68%、75%和 81%<sup>[47]</sup>。蛋白酶抑制剂被加热破坏的野生大豆组在 2%时对肿瘤发生无抑制作用, 说明是大豆中的 PI 对肿瘤的发生有抑制作用。纯化的野生大豆 PI 还可以明显降低 7, 12-二甲苯基蒽诱导的 Swiss albino 小鼠皮肤癌的发生和转移<sup>[48]</sup>。

Ashutosh 等研究了野生大豆对乙烷基亚硝基脲(ENU)诱导 Sprague-Dawley 小鼠神经系统肿瘤的作用<sup>[49]</sup>。ENU 组小鼠平均在表现神经系统病症 282 天后全部发生神经系统肿瘤, 明显比野生大豆组小鼠的时间短。野生大豆组的肿瘤抑制率为 41%, 并且小鼠个体的肿瘤个数要少的多。加热破坏蛋白酶抑制剂的野生大豆组的肿瘤发生率为 100%, 表明肿瘤抑制与蛋白酶抑制剂有关。野生大豆 BDF1 胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶抑制剂可以呈剂量依赖性有效阻断 B16F10 黑色素瘤细胞向肺部的转移, 推测与抑制血纤维蛋白溶酶有关<sup>[50]</sup>。

García-Gasca 等采用硫酸铵沉淀和凝胶过滤从宽叶菜豆(*Phaseolus acutifolius*)中分离出一种分子量为 7.1 kDa 蛋白酶抑制剂(TPIF), 并在体外比

较了对正常 3T3 成纤维细胞, HeLa 细胞和 3T3/v-mos 转化细胞生长的影响<sup>[51]</sup>。TPIF 呈剂量依赖性抑制 3T3/v-mos 转化细胞的生长, 在最高剂量时表现出对 3T3 成纤维细胞的细胞毒性, 对 HeLa 的生长没有影响。次致死剂量的 TPIF 还可以增强 3T3/v-mos 转化细胞的黏附能力, 促使其表型向正常细胞转化。其原因可能是细胞黏附蛋白或细胞外基质蛋白表达的变化, 也可能是参与细胞外基质蛋白水解的蛋白酶活性发生了变化。

随着植物蛋白酶抑制剂的分离和鉴定方法的逐渐改进, 不同来源、不同类型、不同特性的豆类蛋白酶抑制剂将会得到新的发现和应用, 豆类蛋白酶抑制剂将会在人们的生产生活中发挥巨大的作用。

## 参 考 文 献

- 1 刘会香, 张星耀. 植物蛋白酶抑制剂及其在林木抗虫基因工程中的应用[J]. 林业科学, 2005, 41(3): 150—157.
- 2 Wolfram B., Robert H. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteases[J]. Eur J Biochem, 1992, 204: 433—451.
- 3 庄炳昌. 中国野生大豆生物学研究[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 144—146.
- 4 Kunitz M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean[J]. Science, 1945, 101(2635): 668—669.
- 5 Roychaudhuri R., Sarath G., Zeece M., et al. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 412: 20—26.
- 6 忻骅, 曹凯鸣, 谢可方, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂新类型 Tld 的全序列分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(4): 671—673.
- 7 李严, 宗晖, 黄小莺, 等. 中国野生大豆胰蛋白酶抑制剂的初步研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 1999, 38(5): 529—532.
- 8 Koide T., Tsunawasa S., Ikenaka T. Studies on soybean trypsin inhibitors and amino acid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz)[J]. Eur. J. Biochem, 1993, 32: 408—416.
- 9 Birk Y. The Bowman-birk inhibitor, trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans[J]. Int J Pept Protein Res, 1985, 25(2): 113—131.
- 10 Odani S., Ikenaka T. Studies on soybean trypsin-inhibitors 8 disulfide bridges in soybean bowman-birk proteinase inhibitor[J]. J Biochem, 1973, 74(4): 697—715.
- 11 Wu Y. V., Sassa D. J. Conformation of bowman-birk inhibitor [J]. Agric Biol Chem, 1994, 45: 2863—2868.
- 12 Brauer A. B., Domingo G. J., Cooke R. M., et al. A conserved cis peptide bond is necessary for the activity of Bowman-birk inhibitor protein[J]. Biochemistry, 2002, 41(34): 10608—10615.
- 13 Ware J. H., Wan X. S., Rubin H., et al. Soybean Bowman-birk

protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase[J]. Arch Biochem Biophys, 1997, 344(1): 133—138.

- 14 Struthers B. J., MacDonald J. R. Comparative inhibition of trypsin from several species by soybean trypsin inhibitors[J]. J Nutr, 1983, 113(4): 800—804.
- 15 Brandon D. L., Bates A. H., Friedman M. ELISA analysis of soybean trypsin inhibitors in processed foods[J]. Adv Exp Med Biol, 1991, 289: 321—337.
- 16 Sessa J. D., Wolf J. W. Bowman-birk inhibitors in soybean seed coats[J]. Ind Crops Prod, 2001, 14: 73—83.
- 17 Pusztai A. The isolation of two proteins glycoprotein I and a trypsin inhibitor from the seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)[J]. Biochem J, 1966, 101: 379—384.
- 18 Jacob R. T., Pattabiraman T. N. Natural plant enzyme inhibitors: Isolation and properties of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)[J]. Indian J Biochem Biophys, 1986, 23: 105—109.
- 19 Wu C., Whitaker R. J. Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Linden)[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38: 1523—1529.
- 20 Gibbs B. F., Alli I. Characterization of a purified  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*)[J]. Food Res Int, 1998, 31(3): 217—225.
- 21 Osman M. A., Reid P. M., Weber C. W. Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH[J]. Food Chem, 2002, 78: 419—423.
- 22 Campos J. E., Whitaker R. J., Yip T. T., et al. Unusual structural characteristics and complete amino acid sequence of a protease inhibitor from *Phaseolus acutifolius* seeds[J]. Plant Physiol Biochem, 2004, 42: 209—214.
- 23 Abe K., Kondo H., Watanabe H., et al. Oryzacystatins as the first well-defined cystatins of plant origin and their target proteinases in rice seeds[J]. Biomed Biochim Acta, 1991, 50: 4—6.
- 24 Barrett A. J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors [J]. Trends Biochem Sci, 1987, 12: 193—196.
- 25 Esnard F., Esnard A., Faucher D., et al. Rat cystatin C: the complete amino acid sequence reveals a site for N-glycosylation [J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1990, 371(Suppl): 161—166.
- 26 Abrahamson M., Alvarez Fernandez M., Nathanson C. M. Cystatins[J]. Biochem Soc Symp, 2003, 70: 179—199.
- 27 Abe M., Abe K., Komoda M. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of a plant origin [J]. Eur J Biochem, 1992, 209: 933—937.
- 28 Misaka T., Kuroda M., Iwabuchi K., et al. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin[J]. Eur J Biochem, 1996, 240: 609—614.
- 29 Learmonth E. M. The influence of soy flour on bread doughs. III. The distribution of the papain-inhibiting factor in soybeans[J]. J

- Sci Food Agric, 1958, 9; 269—273.
- 30 Brzin J., Ritonja A., Popovic T., et al. Low molecular mass protein inhibitor of cysteine proteinases from soybean[ J ]. Biol Chem Hoppe-Seyler Suppl, 1990, 371; 167—170.
- 31 Hines M. E., Osuala C. I., Nielsen S. S. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity[ J ]. J Agric Food Chem, 1991, 39; 1515—1520.
- 32 Brzin J., Popovč T., Ritonja A., et al. Related cystatin inhibitors from leaf and from seed *Phaseolus vulgaris* L[ J ]. Plant Sci, 1998, 138; 17—26.
- 33 Mickel C. E., Standiah J., Mich J. Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*[ J ]. Agric Exp tech Bull, 1947, 178.
- 34 Lipke H., Fraenkel G. S., Liener I. E. Effect of soybean inhibitor on the growth of *Tribolium confusum*[ J ]. J Agr Food Chem, 1954, 2; 410—414.
- 35 谢可方, 董爱武, 忻骅, 等. 大豆 KUNITZ 型胰蛋白酶抑制剂的稳定性及抗虫性研究[ J ]. 复旦学报(自然科学版), 2002, 41(6); 631—634.
- 36 Ryan C. A. Protease inhibitors in plant: genes for improving defenses against insects and pathogens[ J ]. Annu Rev Phytopathol, 1990, 28; 425—449.
- 37 郝贵霞, 朱祯, 朱之梯. 豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究[ J ]. 植物学报, 1999, 41(12); 1276—1282.
- 38 师校欣, 王斌, 杜国强, 等. 根癌农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转化苹果主栽品种[ J ]. 园艺学报, 2000, 27(4); 282—284.
- 39 高越峰, 朱祯, 肖桂芳, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的分离及其在抗虫植物基因工程中的应用[ J ]. 植物学报, 1998, 40(5); 405—411.
- 40 Confalonieri M., Allegro G., Balestrazzi A., et al. Regeneration of populus nigra transgenic plants expressing a Kunitz proteins inhibitor (Kti3) gene[ J ]. Mol Breed, 1998, 4; 137—145.
- 41 Schuler T. H., Poppy G. M., Kerry B. R., et al. Insect-resistant transgenic plants[ J ]. TIBTECH, 1998, 16(4); 168—175.
- 42 蔡步林, 李卓荣. 人类免疫缺陷病毒蛋白酶抑制剂的研 究开发与展望[ J ]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(3); 179—182.
- 43 Ye X. Y., Wang H. X., Ng T. B. Structurally dissimilar proteins with antiviral and antifungal potency from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds[ J ]. Life Sci, 2000, 67; 3199—3207.
- 44 Kennedy A. R. Chemopreventive Agents: Protease inhibitors[ J ]. Pharmacol Ther, 1998, 78(3); 167—209.
- 45 Yavelow J., Collinst M., Birko Y., et al. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82; 5395—5399.
- 46 Kennedy, A. R. The conditions for the modification of radiation transformation in vitro by a tumor promoter and protease inhibitors[ J ]. Carcinogenesis, 1985, 6; 1441—1445.
- 47 Augustine O. F., Ashutosh P. B. Long-term feeding of field bean protein containing protease inhibitors suppresses virus-induced mammary tumors in mice[ J ]. Cancer Lett, 1997, 116; 1—7.
- 48 Augustine O. F., Ashutosh P. B. The field bean protease inhibitor can effectively suppress 7, 12-dimethylbenz[ $\alpha$ ] anthracene-induced skin tumorigenesis in mice[ J ]. Cancer Lett, 1996, 104; 219—224.
- 49 Ashutosh B., Augustine F., Sanjay B. Treatment with field bean protease inhibitor can effectively repress ethylnitrosourea (ENU)-induced neoplasms of the nervous system in Sprague-dawley rats[ J ]. Cancer Lett, 1998, 130; 161—167.
- 50 Ashutosh B., Augustine F., Sanjay B., et al. The field bean protease inhibitor has the potential to suppress B16F10 melanoma cell lung metastasis in mice[ J ]. Cancer Lett, 1998, 129; 15—20.
- 51 GarcíaGasca T., Salazar Olivo L. A., Mendiola Olaya E., et al. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells[ J ]. Toxicol in Vitro, 2002, 16; 229—233.

## ADVANCES IN THE STUDY OF PROTEASE INHIBITORS FROM LEGUMINOUS PLANTS

Zhang Li Wang Dongfeng Zhang Bin Sun Liping

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** Protease inhibitors are important in the proteolysis process of plant. It can mediate the degradation of storage proteins for the assimilation of nitrogen into biosynthetic pathways. And it plays an important role in the plant defense response to insect or pathogen predation. Protease inhibitor (PI) is generally categorized into four types. The intent of the present review is to focus on the structural, physicochemical characteristics and physiological functions of leguminous serine protease inhibitor and cysteine protease inhibitor. The clinical application and application in resisting pest genetic engineering were also discussed.

**Key words** Leguminous plants; Serine proteinase inhibitor; Cysteine proteinase inhibitor