

Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂研究进展

王长良¹, 张永忠¹, 孙志刚²

(1. 东北农业大学理学院应用化学系, 哈尔滨 150030; 2. 哈尔滨市金合兽药器械经销部, 哈尔滨 150030)

摘要 阐述 Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂 (BBI) 的分子结构、作用机制, 并对其在医药领域、饲料工业及植物抗虫害等方面的研究进展进行了综述和展望。

关键词 大豆胰蛋白酶抑制剂; 分子结构; 作用机制

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)05-0757-05

PROGRESS ON THE RESEARCH OF BOWMAN-BIRK SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR

WANG Chang-liang¹, ZHANG Yong-zhong¹, SUN Zhi-gang²

(1. Applied Department of Science College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

2. Sale Department of Harbin Jinhe Veterinary Medicine Instrument, Harbin 150030)

Abstract The paper reviewed the molecular structure and function mechanism of BBI, and summarised the application and research development of BBI in the field of medicine, feed industry, and plant disease resistance.

Key words Soybean trypsin inhibitor; Molecular structure; Function mechanism

胰蛋白酶抑制剂 (Trypsin Inhibitor, TI) 是指具有抑制胰蛋白酶活性作用的多肽或蛋白质, 是一种重要的生化药物和生化试剂。胰蛋白酶抑制剂广泛存在于动物、植物和微生物中。其来源广泛, 种类也颇多。例如从牛肺或牛胰中提取的抑肽酶 (aprotinin)、从人尿中提取的人尿胰蛋白酶抑制剂 (urinary trypsin inhibitor, UTI)、从大豆中提取的大豆胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor, SBTI) 等等。目前, 已从大豆中分离出两种类型蛋白酶抑制剂: Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (KSTI) 和 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂 (BBI)。Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制剂主要对胰蛋白酶直接地、专一地起作用。1945 年 Kunitz 首次从大豆中分离出 Kunitz 型胰蛋白酶

抑制剂。其分子量约为 20 000 ~ 25 000, 在大豆中的含量为 1.4%。BBI 是由 Bowman 于 1944 年首次以丙酮为不溶因子从大豆中分离出来。分子量 6 000 ~ 10 000, 含有大量的半胱氨酸, 在大豆中的含量约为 0.6%^[1]。本文主要综述 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂 (BBI) 研究进展。

1 BBI 的分子结构和活性中心

BBI 是由 71 个氨基酸所组成的单肽链, 包含 7 个二硫键。在二硫键与分子内氢键的作用下形成两个对称的三轮列区 (tricyclic domain), 每个区中都有相当规范的结合环。每个结合环中都有一个独立

收稿日期: 2007-05-10

基金项目: 黑龙江省“十一五”重大科技攻关项目 (GA06B402-4); 大豆生物学教育部重点实验室主任基金项目 (SB05A04)

作者简介: 王长良 (1975-), 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物的提取与纯化。

通讯作者: 张永忠, 教授。

的与丝氨酸蛋白酶(胰蛋白酶、糜蛋白酶)相互作用的活性位点。因此 BBI 也被称为双头抑制剂。结合环由 9 个氨基酸残基构成,其中位于环口处的两个半胱氨酸残基侧向形成二硫键。BBI 的两个活性中心:一个是赖氨酸 16-丝氨酸 17;另一个是亮氨酸 44-丝氨酸 45^[2],见图 1。

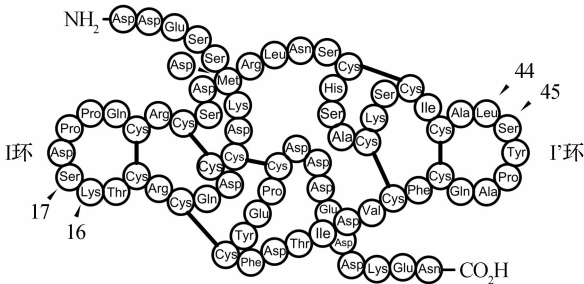


图 1 BBI 分子结构

Fig. 1 The molecule structure of BBI

研究发现 BBI 中的两个结合环存在差异。I 环可抑制胰蛋白酶,I'可抑制胰凝乳蛋白酶。故 BBI 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。大豆 BBI 经胃蛋白酶处理后可得到两个肽段,其中较长的肽段含有赖氨酸-丝氨酸肽键,保留了 84% 的胰蛋白酶的抑制活力,较短的肽段含有亮氨酸-丝氨酸肽键,保留有 16% 抗胰凝乳酶的活力。Mcbride 等根据 BBI 的氨基酸序列,人工合成了由 11 个氨基酸残基构成的环状多肽,该环状多肽与天然的 BBI 活性位点中的环有极相似的构象与生物学活性。该环状多肽的构象受到共价键、分子内氢键及顺、反式脯氨酸的共同影响,通过相邻的 β -折叠片层形成 β -发夹结构而变得十分稳定^[3](图 2)。

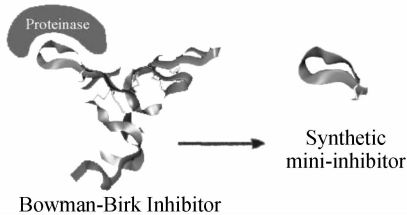


图 2 Bowman-birk 蛋白酶抑制剂的结构

Fig. 2 The structure of BBI

2 BBI 的作用机制

大豆中的胰蛋白酶抑制剂属于丝氨酸蛋白酶抑制剂,它可以和胰腺分泌的丝氨酸蛋白酶系发生反

应。胰蛋白酶抑制剂与靶酶相互作用,通常如酶与底物之间的相互作用一样,属于互补型作用机理。两者反应时,抑制剂暴露在外的活动中心与靶酶的活动中心通过氢键相连接,形成稳定的共价型复合物,从而导致酶活动中心的闭锁,使靶酶的活性丧失。与通常的酶催化反应相比,蛋白酶与抑制剂之间反应的米氏常数很低,故蛋白酶与抑制剂的亲和力大,二者可以迅速结合形成复合物。与一般酶的底物不同,抑制剂与酶结合后其活动中心肽链并不裂解或裂解速度极慢。因此,该复合物虽然可以分解成游离的酶和变性或未变性的抑制剂,但解离速度非常缓慢,BBI 与靶蛋白酶结合作用机制如下^[4]:

$$E + I \xrightleftharpoons[\text{Koff}]{\text{Kon}} C \xrightleftharpoons[\text{Kon}^*]{\text{Koff}^*} E + I^*$$

其中 E 为靶蛋白酶,I 为 BBI,C 为蛋白酶 - 抑制剂复合物,I* 为水解后被修饰的抑制剂。

3 BBI 在医药领域的应用

3.1 BBI 的抗癌活性

Yavelow 等^[5]对 BBI 进行研究,发现其显示抑癌活性。虽然 BBI 作为抗癌因子的作用机制还不清楚,但现已证实蛋白酶抑制能够在肿瘤形成的初始阶段逆转其发展过程,这可能是通过阻断了因接触致癌因素而启动的某个过程来实现的。BBI 的抑癌作用具有如下特点^[6]:①可抑制由多种物理或化学致癌因素引发的肿瘤;②可作用于不同的组织器官(结肠、肝脏、肺、食道以及口腔上皮);③通过不同途径(包括腹腔下注射、静脉注射、局部给药以及膳食摄入)给药均有效;④可抑制多种类型的肿瘤(鳞状细胞癌、腺癌、血管肉瘤等),范围远大于其他抗癌制剂;⑤对肿瘤形成的抑制作用是不可逆的,即停止使用后,受试系统中也会有新的恶性细胞或肿瘤出现;⑥即使在 0.125 nmol L⁻¹ 极低浓度下仍可有效抑制细胞转化。另外 BBI 还能影响某些癌基因的表达(如 c-myc 和 c-fos 等)、某些蛋白水解反应的活性(在暴露于诱癌的组织中这种反应的活性有所提高)及降低诱癌因素引起的基因表达扩增。

目前,对 BBI 作为抗癌制剂的研究已进入临床试验阶段。在所有接受 BBI 浓缩制剂(Bowman-Birk inhibitor concentrate, BBIC)治疗的患者中,血浆前列腺特异性抗原的水平都有明显下降,一些患者的下

降幅度甚至达到 43%。此外,血清甘油三酯的水平和前列腺容量都有明显下降,患者的尿道功能也有所改进^[7]。

Armstrong 等^[8]在另一临床 I 期试验中,给予 24 名口腔白斑患者 25 ~ 800 糜蛋白酶抑制单位 (chymotrypsin inhibitor unit, CIU) 的 BBIC 后,发现 24 ~ 48 h 内即可检测到其在尿中的代谢产物,说明 BBI 能够被人体快速吸收。当口服剂量达到 800 CIU 时,机体仍能很好地耐受,且无毒性反应。Wan 等^[9]将人类前列腺癌转移病灶细胞植入无胸腺的 NCRNU-M 裸鼠前列腺体内,造出人类前列腺癌异体移植的模型,再喂饲实验动物空白膳食和含 BBI 或 BBIC 的膳食,结果显示 BBI 或 BBIC 可减少肿瘤的最终着床率,延长肿瘤细胞的复制时间,且降低前列腺癌荷瘤裸鼠体内的 PSA 浓度,表明 BBI/BBIC 可用于前列腺癌的治疗。

3.2 BBI 对辐射的保护作用

人类正常纤维母细胞在辐射下可引起祖代纤维母细胞有丝分裂过程中发生的不成熟的终末分化^[10]。但经过 10 nmol L⁻¹ BBI 处理 2 h 后再进行辐射处理,可以明显遏制其不成熟的终末分化。另外经过 BBI 处理可引起其生存曲线及培养基中细胞型构成的显著变化。此外,在正常纤维母细胞中, BBI 可以减少辐射引起的蛋白质固化。所以 BBI 可以作为人类正常母细胞的选择性辐射保护剂^[11]。

4 饲料工业中的大豆胰蛋白酶抑制剂

4.1 大豆胰蛋白酶抑制剂毒理作用

脱脂豆粕是制备饲料的原料,其中含有大豆胰蛋白酶抑制剂。大豆中胰蛋白酶抑制剂的存在,是豆类植物在进化过程中获得自我保护的一种特性。作为蛋白酶抑制剂,它能抑制昆虫中肠道蛋白酶的活性,使昆虫生长发育不良而死亡,从而提高大豆的抗虫能力^[12,13]。另外,大豆胰蛋白酶抑制剂抑制了病原菌蛋白酶对寄主细胞的降解,使病原菌营养不足,生长繁殖受限,浸染与扩展受阻,从而达到抗病的目的^[14]。大豆胰蛋白酶抑制剂能抑制动物肠内蛋白酶的活性,妨碍食物蛋白的消化、吸收和利用,并引起胰腺肿大,导致生长延缓或停滞。一般认为有两方面的原因,一是胰蛋白酶能和小肠中的胰蛋白酶及糜蛋白酶结合,形成稳定的复合物,使酶失活,导致食物蛋白质的消化率降低,引起外源性氮的

损失;另外胰蛋白酶抑制剂可引起胰腺分泌活动增强,导致胰蛋白酶和糜蛋白酶的过度分泌。由于这些蛋白酶含有非常丰富的含硫氨基酸,所以使用于合成组织蛋白的这些氨基酸转而用于合成蛋白酶,并与抑制剂形成复合物而最终通过粪便排出体外,从而导致内源性氮和机体含硫氨基酸的大量损失。大豆蛋白质本来就缺乏含硫氨基酸,加上抑制剂所引起的含硫氨基酸的额外损失,导致体内氨基酸代谢不平衡,因而阻碍了动物的生长^[15]。

4.2 饲料中大豆胰蛋白酶抑制剂的失活研究

正因为胰蛋白酶抑制剂存在如上所述的毒性,因此在饲料工业生产和畜禽饲养实践中,尤其是在用豆粕-玉米型日粮饲养畜禽的条件下,如何防止胰蛋白酶抑制剂对畜禽的危害成为普遍关注的问题。美国已研制出不含胰蛋白酶抑制剂的大豆作饲料,在家畜、禽饲养上取得了很好的效果。国内的研究主要集中在对大豆中胰蛋白酶抑制剂的失活方面,在失活方法和技术上也取得很大成就。其中主要的失活方法有:物理失活法;化学失活法;酶失活法等。

4.2.1 物理失活法

4.2.1.1 热失活法 大豆胰蛋白酶抑制剂热失活是最早发现、研究,也是最常用的方法。通常采用常压蒸汽加热 30 min 或 98 kPa 压力的蒸汽处理 15 ~ 20 min,可使胰蛋白酶抑制剂失活。

4.2.1.2 超声波失活法 胰蛋白酶抑制剂的超声波失活是近几年发展的新技术。超声波是频率大于 20 kHz 的声波。超声波在液体中会产生空化气泡的膨胀现象,在溶液的传递过程中,液体中微小气泡随超声波声压变化而产生剧烈膨大、振荡和崩溃等过程。该过程所产生的极短暂的强压力脉冲及高温作用对于溶液中悬浮的微粒(如蛋白质)产生生化效果,从而引起某些具有生理活性的蛋白质的失活,如酶的失活及胰蛋白酶抑制剂的钝化。杨汝德等^[16]用超声波处理大豆制品,钝化了其中的胰蛋白酶抑制剂。结果表明,用 20 kHz 的超声波分别对生豆奶中的大豆胰蛋白酶抑制剂和纯化的大豆胰蛋白酶抑制剂进行 5 min, 80℃ 处理,前者的活力残留率为 29.3%,而后者则降为 38.8%。这可能是豆奶中大分子的 11S 和 7S 蛋白质的存在,有助于大豆胰蛋白酶抑制剂的失活。

4.2.1.3 其它物理失活法 Hafez^[17]发现用 10Gy 的 γ-射线照射大豆种子时,其中的大豆胰蛋白酶抑制剂活力降为原来的 25%。Cinkov^[18]实验发现用

13.56 ~ 27.12 MHz 的射频 (RP) 加热处理大豆种子至温度 120℃, 能使大豆胰蛋白酶抑制剂活力降至 10 μg mg⁻¹。利用浸泡和焙烤大豆种粒的方法, 分别能使大豆胰蛋白酶抑制剂活力降至原来的 42.9% 和 32.9%^[19]。

4.2.2 化学失活法 用无机化学试剂破坏 BBI 分子结构中的二硫键, 可达到破坏其活性的目的而氨基酸的组成不发生明显变化。Wedizcha 等^[20]研究了用偏重亚硫酸钠 (Na₂S₂O₃) 和亚硫酸钠 (Na₂SO₃) 钝化 BBI 作用机理: Na₂S₂O₃ 和 Na₂SO₃ 与氧气和豆粉中的水作用, 生成亚硫酸根离子 (SO₃²⁻) 和磺酸根基衍生物 (R-S-SO₃²⁻), 它们又进一步相互作用, 生成新的二硫复合物, 此复合物以亚硫酸根离子作催化剂, 使 BBI 的二硫键重组成为不可逆的失活分子基团。其它已报导过的化学试剂有: 硫酸铜、硫酸亚铁、硫代硫酸钠、戊二醛以及一些硫醇基的化合物等^[21]。

4.2.3 其它失活法 大豆中胰蛋白酶抑制剂的失活方法还有生物化学还原失活法^[22]、酶解失活法^[23]、羰氨反应失活法^[24]、发酵失活法^[25]等, 这里不再赘述。

5 BBI 在植物抗虫害方面的应用

早在半个多世纪以前, 人们就观察到了植物蛋白酶抑制剂的抗虫作用。在离体情况下, 低浓度的大豆胰蛋白酶抑制剂 BBI 能抑制甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼虫肠道的绝大部分胰蛋白酶的活性。活体试验表明, 当饲喂含有这两种抑制剂的人工饲料时, 幼虫的取食量明显下降, 表现出营养不良、虫体变轻、幼虫生长期增长等现象^[26]。王琛柱等研究了大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化和生长发育的影响, 表明蛋白酶抑制剂对昆虫抗营养效应在其于它对蛋白酶的激活和抑制作用, 从而导致各种蛋白酶间的协调性破坏, 昆虫消化过程受阻。大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚或丹宁混用对棉铃虫中肠蛋白酶和生长率的影响, 表明大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚或丹宁的协同作用比三者的单独作用更能有效的抑制幼虫的生长发育和中肠蛋白酶活性, 进一步阐明了蛋白酶抑制剂与一些抗虫次生性物质之间存在的增效作用。此结果提示在利用转基因改良植物抗虫性时, 应重视外与内源抗虫物质的协调性。如果

将外源蛋白酶抑制剂基因转入具有内源性抗虫次生物质的植物, 可能会获得高抗虫性的新品种。

6 对 BBI 研究的展望

基于 BBI 具有抗癌等多种生理活性作用, 研究从大豆中提取纯化大豆胰蛋白酶抑制剂, 制备高浓度的 BBI 具有重要意义。在医药领域, 目前对于 BBI 的抗癌机制仍不十分清楚, 因此, 探讨 BBI 的作用机制, 并研制安全有效的作用剂型已成为该领域的研究热点。新近研制出的软脂酰—BBI (PDL-ss-BBI), 精胺—BBI 等结合型 BBI, 提高了其在血中的保留时间及亲脂性, 增加了肺部和肝脏的蓄积量, 都为 BBI 的临床应用开拓了更加广阔的前景^[27]。从大豆中分离出大豆胰蛋白酶抑制剂后, 可以脱除大豆胰蛋白酶抑制剂对动物的毒性作用, 对于研制出不含胰蛋白酶抑制剂的大豆作饲料具有重要意义。当然在饲料工业中还要继续研究 BBI 的失活方法。最常用的热处理方法常常导致饲料中必需的氨基酸 (尤其是赖氨酸) 的损失及饲料的理化性质的改变, 影响其营养价值和加工性能, 且需浪费大量能源, 增加生产成本。化学法存在试剂的残留问题。酶解方法局限于酶的专一性以及酶的来源和酶容易失活导致其成本的加大。其它方法也都存有一定的问题。因此开拓新的、低成本、更高效的 BBI 失活方法有重要的意义。在抗虫害方面, 研究主要集中在转基因植物上^[28], 将 BBI 转入不同的植物, 不仅可使受体植物获得抗性, 转入的 BBI 还通过抑制蛋白酶的水解, 保护其他的蛋白不被降解, 有效提高植物防御能力。转基因技术已逐渐成为控制虫害的重要工具。

参 考 文 献

[1] Brik Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans[J]. Int J Pept Protein Res, 1985, 25 (2) : 113 - 131.

[2] Keopke J, Ermler U, Warkentin E, et al. Crystal structure of cancer chemopreventive bowman-birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 angstrom resolution. structural basis of janus-faced serine protease inhibitor specificity[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 298, 477 - 491.

[3] McBride J D, Waston E M, Brauer A B, et al. Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop[J]. biopolymers, 2001, 66 (2) : 79 - 92.

- [4] Laskowski, Qasim M A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes[J]. *Biochem biophys Acta*, 2000, 1477: 324 – 337.
- [5] 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.
- [6] 于颖慧, 吴坤. 大豆 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂 (BBI) 研究进展[J]. *疾病控制*, 2005, 9(2): 150 – 153.
- [7] Malkiewicz S B, McKenna W G, Vaughn D J, et al. Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia [J]. *Prostate*, 2001, 48(1): 16 – 28.
- [8] Armstrong W B, Kennedy A R, Wan X S, et al. Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia [J]. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 2000, 9(1): 43–47.
- [9] Wan X S, Ware J H, Zhang L, et al. Treatment with soybean derived Bowman-Birk inhibitor increase serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice [J]. *Nutr cancer*, 1999, 33(2): 174 – 177.
- [10] Dittmann K, Löffler H, Bamberg M, et al. Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radio sensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture[J]. *Radiother Oncol*, 1995, 34(2): 137–143.
- [11] Dittmann K H, Gueven N, Mayer C. The presence of wild-type TP53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in normal fibroblasts [J]. *Radiat Res*, 1998, 150(6): 648 – 655.
- [12] Ryam C A. Protease inhibitor in plant: gene for improving defenses against insects and pathogens [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1990, 28: 425 – 449.
- [13] McManus M T, Burgess E P J. Effects of the soybean trypsin inhibitor on growth and proteases of larvae of *Spodoptera litura* [J]. *Insect Physiol*, 1995, 41(9): 721 – 738.
- [14] Baral A, Fox P F, O'Connor T P. Isolation and characterization of an extra-cellular proteinase from *Pseudomona tolaasii* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(4): 757 – 762.
- [15] 周春晖, 黄惠华. 大豆胰蛋白酶抑制剂失活方法研究进展 [J]. *粮食与饮料工业*, 2001, 4: 19 – 22.
- [16] 杨汝德, 梁汉华. 超声波钝化大豆胰蛋白酶抑制剂的研究 [J]. *华南理工大学学报*, 1998, 26(4): 66 – 71.
- [17] Joseph A D. Effect of irradiation on the proteinase inhibitor activity [J]. *Journal of the American-Oil-Chem-Society*, 1993, 70(9): 935 – 937.
- [18] Czulor B, Markus Z, Petres J, et al. Dielectric heat treatment of soybean by 27 Hz radio frequencies. proceedings of the world conference on oilseed [J]. *Technology and Utilization*. New York: Press Riverlode, 1993, 466 – 469.
- [19] Kim K L, Qin W H, Tsang J C. Heat inactivation of trypsin inhibitor in soy milk at ultra-high temperatures [J]. *Journal of Food Science*, 1993, 58(4): 859 – 862.
- [20] Wed B L. *Chemistry of Sulfur Dioxide in Foods* [M]. Elsevier Applied Science Publishers. London and New York, 1984, 69.
- [21] Fader, Gary M. Reduction of Bowman-Birk protease inhibitor levels in plants [P]. United States Patent, 2003, 6, 548, 744.
- [22] Biohon C, Jin-an J, Roberbel K, et al. Stability of thioredoxin-linked reduction on the activity and stability of the Kunitz and Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor [J]. *American Chem Soc*, 1992, 40: 2333 – 2336.
- [23] Iosif A, Yattara, Vaintraub, et al. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor influence on its activity [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(4): 862 – 866.
- [24] Oste R E, Brandon D L, Bates A H. Effect of Maillard browning reactions in the Kunitz soybean trypsin inhibitor on its interaction with monoclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(1): 258 – 261.
- [25] Ranekar P, Joshi N, Sarnaik S, Kelkar A. Effect of fermentation acid bacteria from soybean seeds on trypsin inhibitor activity [J]. *Food Microbiology*, 1992, 9(3): 235 – 240.
- [26] Broadway R M, Duffey S S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua* [J]. *Insect Physiol*, 1986, 32(10): 827 – 833.
- [27] Wang J, Shen W C. Gastric retention and stability of lipidized Bowman-Birk protease inhibitor in mice [J]. *Int J Pharm*, 2000, 204(1–2): 111 – 116.
- [28] 张宁, 王凤山. 胰蛋白酶抑制剂研究概况 [J]. *中国生化药物杂志*, 2004, 25(2): 115 – 117.