

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.08.009

鸭胆子球蛋白酶解物对黑色素瘤细胞毒性研究*

刘 露¹ 张月圆¹ 李 开¹ 王惠芸¹ 王 冬² 王灵芝^{1Δ}

(1 北京中医药大学 生命科学学院 北京 100102; 2 北京中医药大学 中医学院 北京 100102)

摘要 目的:优化鸭胆子球蛋白提取工艺,采用酶解法获得多肽组分,并对其细胞毒性进行研究。**方法:**运用 $L_9(3^3)$ 表设计正交试验,筛选球蛋白提取最佳工艺参数,等电点法浓缩蛋白;采用不同蛋白酶水解球蛋白,经超滤(MWCO = 3 kDa)后收集滤过液,MTT 法考察小分子量酶解物对鼠源黑色素瘤 B16 的细胞毒性。**结果:**球蛋白最佳工艺参数为:NaCl 浓度 5%、提取时间 1.5 h、固液比 1:12;胃蛋白酶为最优蛋白酶源,其水解产物(≤ 3 kDa)对 B16 细胞具有显著的细胞毒性,72 h 时,IC₅₀ 为 $1.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论:**鸭胆子球蛋白源多肽组分具有明确的体外细胞毒性,有望进一步从中获得高活性抗肿瘤肽。

关键词:鸭胆子;球蛋白;提取工艺;抗肿瘤多肽

中图分类号:R-33; R284; R739.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)08-1447-06

The Cytotoxicity of Brucea Javanica Seeds Globulin Hydrolysates on Melanoma Cell*

LIU Lu¹, ZHANG Yue-yuan¹, LI Kai¹, WANG Hui-yun¹, WANG Dong², WANG Ling-zhi^{1Δ}

(1 School of Life science, Beijing University of Chinese medicine; 2 School of traditional Chinese medicine, Beijing University of Chinese medicine, Beijing, 100102, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the extraction process parameter of globulin Brucea javanica seeds, obtain the polypeptide components by enzymatic hydrolysis, and evaluate its cytotoxicity. **Methods:** The orthogonal experiment of $L_9(3^3)$ was firstly applied to obtain the optimal parameter for globulin extraction. The protein was then primarily purified by isoelectric precipitation. Different kinds of proteases were applied to hydrolyze *B. javanica* globulin followed by ultrafiltration with the molecular weight cut-off of 3 kDa to collect the permeate. MTT assay was then conducted to evaluate the cytotoxicity of low molecular weight hydrolysates (≤ 3 kDa) on B16 cell line. **Results:** The optimal process parameters of the globulins extraction were as follows: 5 % of NaCl concentration, 1.5 h of extraction time and solid liquid ratio of 1:12; The hydrolysates (≤ 3 kDa) of *B. javanica* globulin produced by pepsin showed significantly high growth inhibitory activity on B16 cells, with the IC₅₀ value of $1.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 72 h incubation. **Conclusion:** The peptides of *B. javanica* globulin demonstrated specific cytotoxicity on melanoma cell line *in vitro*, suggesting antitumor peptides could be further obtained from *B. javanica* seeds.

Key words: Brucea javanica; Globulin; Extraction process; Antitumor peptides

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R284; R739.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2018)08-1447-06

前言

恶性黑色素瘤是一种恶性程度最高的皮肤肿瘤,具有发病年龄早、易转移,对放化疗不敏感等特点,且发病率逐年增长。据统计,1982 年至 2011 年,欧美国家黑色素瘤以大于 3 % 的速度增长;2007 年至 2011 年,美国白种人新增病例为 70000,预计 2026 年至 2031 年新增病例为 116000^[1,2]。黑色素瘤在我国发病率相对较低,但近年来呈明显增加趋势,年增长率约为 3 % — 5 %,每年约有 2 万新发病例^[3]。因此,寻找有效治疗恶性黑色素瘤的新型药物备受关注。

鸭胆子是苦木科鸭胆子属鸭胆子 *Brucea javanica* (L.) Merr. 的成熟果实,味苦、性寒,有小毒,归大肠、肝经^[4],具有清

热、解毒、治疟、治瘰等功效。鸭胆子最显著的药理作用为抗肿瘤,鸭胆子油及苦木素等具有良好的抑瘤作用^[5,6],其中鸭胆子油已广泛用于临床治疗。蛋白质是生命结构和功能的重要单位,鸭胆子中的蛋白质含量为 17.47 %,其中球蛋白占蛋白总量的 8.11 %^[7]。蛋白质经水解后释放出生物肽,肽类药物具有安全可靠,作用多途径、多靶点等特点^[8]。本文拟对鸭胆子球蛋白提取工艺进行优化,并对其多肽组分的细胞毒性进行评价。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鸭胆子(广西,批号 20100242),购买于北京同仁堂,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为苦木科鸭胆子属的鸭胆子

* 基金项目:北京中医药大学青年教师项目(2018-JYB-JS005)

作者简介:刘露(1994-),硕士研究生, E-mail: 18810944972@163.com

Δ 通讯作者:王灵芝,博士,副研究员,研究方向:中药活性蛋白及多肽的功能研究, E-mail: wanglz@bucm.edu.cn

(收稿日期:2017-12-08 接受日期:2017-12-30)

Brucea javanica (L.) Merr.的干燥成熟果实。

鼠源黑色素瘤细胞 B16, 获赠于北京中医药大学孙震晓教授。

生物试剂:胃蛋白酶(批号 101644990, Sigma 公司);胰蛋白酶(批号 1002203482, Sigma 公司); α -糜蛋白酶(批号 10011750575, Sigma 公司);RPMI1640 培养基(批号 1493423, Gibco 公司);胎牛血清(批号 20161214, 四季青);双抗(批号 30002283, CORNING);蛋白质标准品(批号 20160422, 北京拜尔迪生物技术有限公司);蛋白质上样缓冲液(批号 20160422, 北京拜尔迪生物技术有限公司);其它试剂均为分析纯。

仪器:FW-100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);BP221S 型电子分析天平(Sartorius 公司);TGL-20M 型台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);佑科 PHS-3C 实验室 pH 计(上海佑科仪器仪表有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);FLC-3 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);

MCO-18AIC(UV)CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);Epoch 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);TE2000-S 倒置显微镜(日本 NIKON 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡胆子球蛋白提取工艺优化 (1)鸡胆子球蛋白提取:鸡胆子球蛋白提取方法参考冀会方等^[7],鸡胆子粉碎后过 40 目筛,石油醚脱脂,真空干燥。采用双蒸水提取清蛋白后,再加 5% NaCl 溶液于 4℃振荡 1 h 后,10000 r·min⁻¹、20 min 离心获取鸡胆子球蛋白提取液;转移蛋白提取液至透析袋(MWCO:3.5 kDa)中,放置 4℃低温环境中透析 24 h,期间每 4 h 换水。蛋白溶液冷冻干燥,以备用。

(2)蛋白含量测定:采用 BCA 法测定蛋白及多肽含量^[8]。将标准蛋白(BSA)稀释成适宜浓度(0.05 mg·mL⁻¹、0.1 mg·mL⁻¹、0.2 mg·mL⁻¹、0.3 mg·mL⁻¹、0.4 mg·mL⁻¹ 和 0.5 mg·mL⁻¹),37℃保温 30 min,冷却至室温后,562 nm 测定样品的 OD 值,绘制标准曲线,计算样品含量。

表 1 BCA 标准溶液
Table 1 BCA standard solution

Number	1	2	3	4	5	6	7
0.5 mg·mL ⁻¹ Standard protein (μL)	-	2	4	8	12	16	20
Protein concentration (mg·mL ⁻¹)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
DIW (μL)	20	18	16	12	8	4	-
BCA working liquid (μL)	200	200	200	200	200	200	200

Note: "-": Do not add sample, DIW-Deionized water.

(3)正交试验方案设计:前期试验表明 NaCl 浓度、提取时间、固液比对球蛋白提取效率有影响。故本研究设计 3 因素 3

水平正交试验(表 2)。考察上述因素对球蛋白提取效率的影响,以获得最优提取参数。

表 2 L₉(3³) 试验因素水平表
Table 2 L₉(3³) Test factor level table

Level	Factors		
	A, concentration of NaCl(%)	B, the time of extraction(h)	C, the ratio of solid-liquid(m/v)
1	3	0.5	1:10
2	4	1	1:12
3	5	1.5	1:14

1.2.2 鸡胆子球蛋白沉淀 (1)球蛋白等电点测定:采用沉淀法^[10]测定球蛋白的等电点:精确量取鸡胆子球蛋白溶液,用 10%的 HCl 溶液以 0.2 的梯度在 pH 2.0-4.0 调节蛋白溶液的 pH,蛋白溶液于 4℃,5000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液并测定其蛋白质含量,根据蛋白质在等电点处溶解度最小的原理,等电点处上清液蛋白含量最低。

(2)SDS-PAGE 电泳 采用垂直不连续体系^[11]:分别配制浓度为 15%分离胶和浓度为 5%浓缩胶。蛋白样品溶液加入上样缓冲液混合后,100℃处理 5 min 使其变性,上样量为 20 μg,室温恒压电泳。当溴酚蓝指示剂距胶底 5 mm 时立即停止电泳。考马斯亮蓝 R-250 染色,甲醇冰醋酸混合液脱色使蛋白条带清晰,背景干净。

1.2.3 鸡胆子蛋白酶解物的细胞毒性研究 (1)最优蛋白酶的筛选:选用胃蛋白酶、胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶三种酶水解鸡胆子球蛋白。反应条件为:1%的底物浓度,酶与底物浓度比为 1:10,温度 37℃;各种酶最适反应缓冲液分别为:胃蛋白酶(0.01 mol·L⁻¹ HCl, pH = 2.0),胰蛋白酶(50 mmol·L⁻¹ Tris 缓冲液, pH = 8.0), α -糜蛋白酶(50 mmol·L⁻¹ Tris 缓冲液, pH = 8.0)。酶解液水浴 48 h 后,100℃、5 min 变性以终止反应,立即冰浴冷却,再 4℃、10000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液,进而超滤离心(MWCO = 3 kDa),收集滤过液,冷冻干燥后,用 PBS 配制受试样品母液,0.22 μm 过滤除菌,备用。

(2)鸡胆子蛋白酶解物(≤ 3 kDa)对黑色素瘤 B16 的细胞毒性研究:细胞培养参考文献^[12],取对数生长期的细胞台盼

蓝染色,确保活细胞占细胞总数的 90 %以上,将细胞密度调整为 2×10^4 个 /mL,按照 100 μ L/ 孔的密度接种于 96 孔培养板,待细胞贴壁后,吸去旧培养基,空白组及阴性对照组每孔加入新鲜培养基。其余各组每孔加入等体积不同浓度的酶解产物,分别继续培养 24 h、48 h 和 72 h 后弃旧培养基,MTT 法于 570 nm 处测定 OD 值,计算细胞增殖抑制率。其中,胃蛋白酶酶解物设 0.25 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、0.5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、1 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、2 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、4 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 五个浓度,作用 B16 细胞 72 h 后,计算其 IC₅₀ 值。

抑制率(%) = [1-(加药组 OD 值 - 空白组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] $\times$ 100%

(3)B16 细胞形态学变化:细胞培养方法同上,添加不同浓度胃蛋白酶水解产物 (1 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 、2 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 和 4 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$),于 24 h、48 h 和 72 h 于倒置相差显微镜下观察其形态。

1.3 统计学分析

试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差学分析,P<0.05 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 鸦胆子球蛋白提取工艺参数的优化

2.1.1 蛋白标准曲线 蛋白标准曲线如图 1 所示,线性回归方程为: $y = 0.7919x + 0.0095$, $R^2 = 0.9993$,具有较好的线性关系。

2.1.2 鸦胆子球蛋白提取正交试验结果 按照正交表的试验方案,提取鸦胆子球蛋白并采用 BCA 法进行蛋白含量测定,结果如表 3 所示,由极差 R 可知,影响球蛋白提取效率的因素主次顺序为 C>A>B,即固液比对鸦胆子球蛋白提取效率影响最大,NaCl 浓度次之,提取时间对其影响最小。鸦胆子球蛋白最佳提取工艺参数组合为 A3B3C2;NaCl 浓度 5 %,提取时间 1.5 h,固液比 1:12。

2.1.3 鸦胆子球蛋白等电点测定结果 在 pH 2.2~4.0 之间调

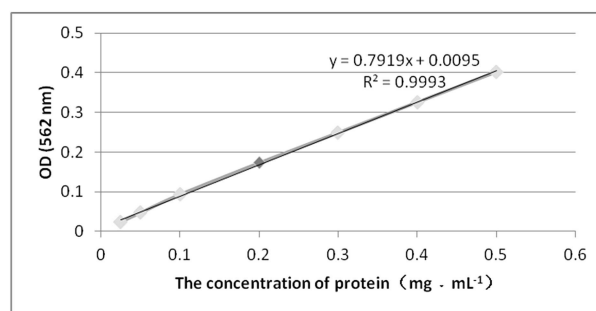


图 1 BCA 法蛋白定量曲线图

Fig.1 The standard curve of protein assay

节鸦胆子球蛋白提取液 pH,离心后,测定上清液蛋白含量,以 pH 值为横坐标表,OD562 值为纵坐标绘制曲线图,如图 2 所示,结果表明在 pH 2.8 处,上清液蛋白最低,即鸦胆子球蛋白等电点为 2.8。

2.1.4 SDS-PAGE 结果 将经过等电点沉淀与否的鸦胆子球蛋白均进行聚丙烯酰胺电泳,结果如图 3 所示,等电点沉淀前后鸦胆球蛋白条带均主要分布在 33 kDa、31 kDa、28 kDa 和 19 kDa 附近。相比之下,蛋白原液 21 kDa 条带表达量相对低一些,可能是等电点沉淀过程中,该条带蛋白沉淀效率较高。说明,沉淀法并未造成蛋白条带的损失,该方法浓缩蛋白可靠。

2.2 球蛋白酶解物的细胞毒性研究结果

2.2.1 最优蛋白酶筛选 采用 MTT 试验考察鸦胆子球蛋白不同酶解产物(≤ 3 kDa)对鼠源黑色素瘤细胞株 B16 的细胞毒性,结果如图 4 所示。给药后 24 h 时,胃蛋白酶、糜蛋白酶以及 α - 糜蛋白酶三种蛋白酶水解产物对黑色素瘤 B16 细胞增殖抑制作用不明显,且均无显著性差异($P>0.05$)。给药后 48 h,给药低剂量(1 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)和中剂量(2 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)时,胃蛋白酶水解产物的细胞增殖抑制率分别为 63.68 %和 75.14 %,显著高于其他

表 3 正交实验结果($M \pm s$, $n = 3$)

Table 3 The results of orthogonal experiment ($M \pm s$, $n = 3$)

Number	A	B	C	Levels of globulin($\text{mg} \cdot 2\text{g}^{-1}$)
1	1	1	1	66.86 $\pm$ 0.97
2	2	1	2	65.46 $\pm$ 0.85
3	3	1	3	66.22 $\pm$ 1.29
4	1	2	2	66.48 $\pm$ 0.98
5	2	2	3	71.37 $\pm$ 1.09
6	3	2	1	62.77 $\pm$ 1.12
7	1	3	3	65.94 $\pm$ 0.95
8	2	3	1	58.41 $\pm$ 0.86
9	3	3	2	77.67 $\pm$ 1.16
k1	66.43	66.18	62.68	
k2	65.08	66.87	69.87	
k3	68.89	67.34	67.84	
R	3.81	1.16	7.19	

Note: K stands for the average levels of globulin and R stands for the extreme difference. A, concentration of NaCl; B, the time of extraction; C, the ratio of solid-liquid.

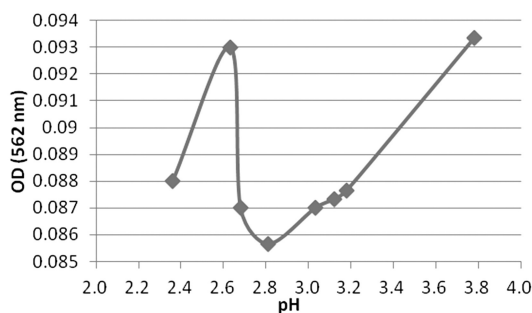


图2 鸦胆子球蛋白等电点曲线

Fig.2 Isoelectric point curve of *B. javanica* globulin

酶解物($P < 0.05$);在高剂量 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下,胃蛋白酶水解产物的细胞抑制率达到 75.76 %,与其他二者无显著性差异($P > 0.05$)。给药后 72 h, 胃蛋白酶水解产物中剂量的细胞抑制率达到 87.68 %,显著高于其他二者($P < 0.05$);而高剂量组,三者的细胞抑制率分别为 92.81 %、87.20 %和 79.51 %($P > 0.05$)。因此,胃蛋白酶的水解产物细胞毒活性最好,故选其为最优蛋白酶。经计算,72 h 时, IC_{50} 值为 $1.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 胃蛋白酶水解产物对 B16 的细胞形态学影响 胃蛋白酶小分子水解物对 B16 细胞形态学影响如图 5 所示,阴性对照组细胞数呈正常增长的趋势,细胞增殖速度快,细胞呈梭型且透光性良好,48 h 大量细胞处于分裂状态。胃蛋白酶水解产物对 B16 细胞增殖存在明显的抑制作用,随着浓度的增加,细胞数量明显减少,细胞变圆,细胞增殖抑制明显,呈剂量依赖性。

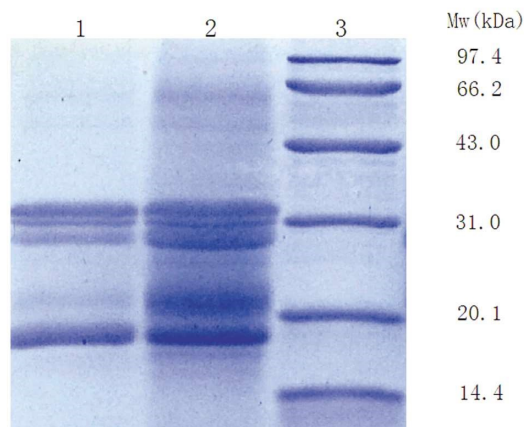


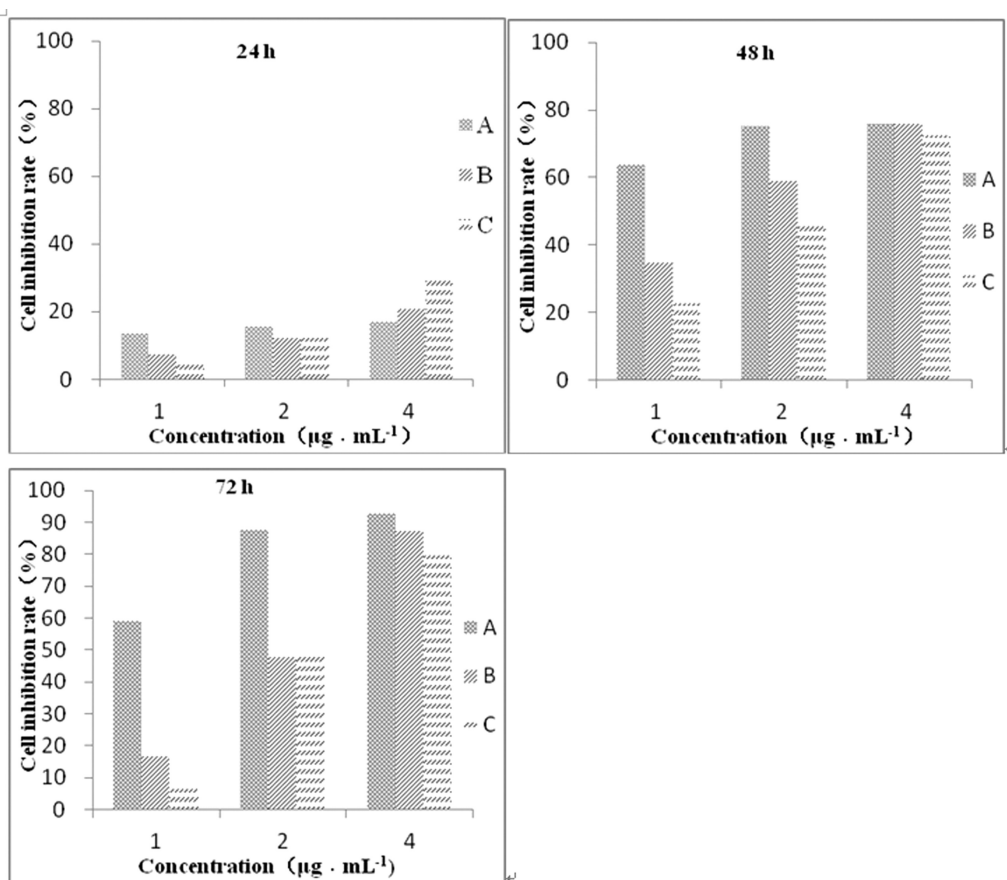
图3 鸦胆子球蛋白电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE profile of globulin of *B. javanica* seeds

1, the protein of unprocessed; 2, the protein of precipitated; 3, marker.

3 讨论

黑色素瘤是一种恶性程度极高的皮肤类肿瘤,在临床上较为常见且发病率近年来增长较快。黑色素瘤的侵袭和转移特性是影响黑色素瘤患者生存的首要因素也是治疗的最大障碍^[13]。肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的过程,开始水平生长,接着径向生长。在垂直生长期,肿瘤细胞浸入真皮或皮下组织,最终穿透毛细血管内皮细胞进入血液转移到远处^[14]。临床上黑色素瘤的化疗药物主要包括烷化剂、铂类和植物来源类等。随着对

图4 鸦胆子球蛋白酶解物($\leq 3 \text{ kDa}$)作用于 B16 细胞的增殖抑制率Fig.4 Inhibitory activity of globulin hydrolyzates ($\leq 3 \text{ kDa}$) on B16 cell proliferation

A, the product of pepsin hydrolysis; B, the product of trypsin hydrolysis; C, the product of α -Chymotrypsin hydrolysis

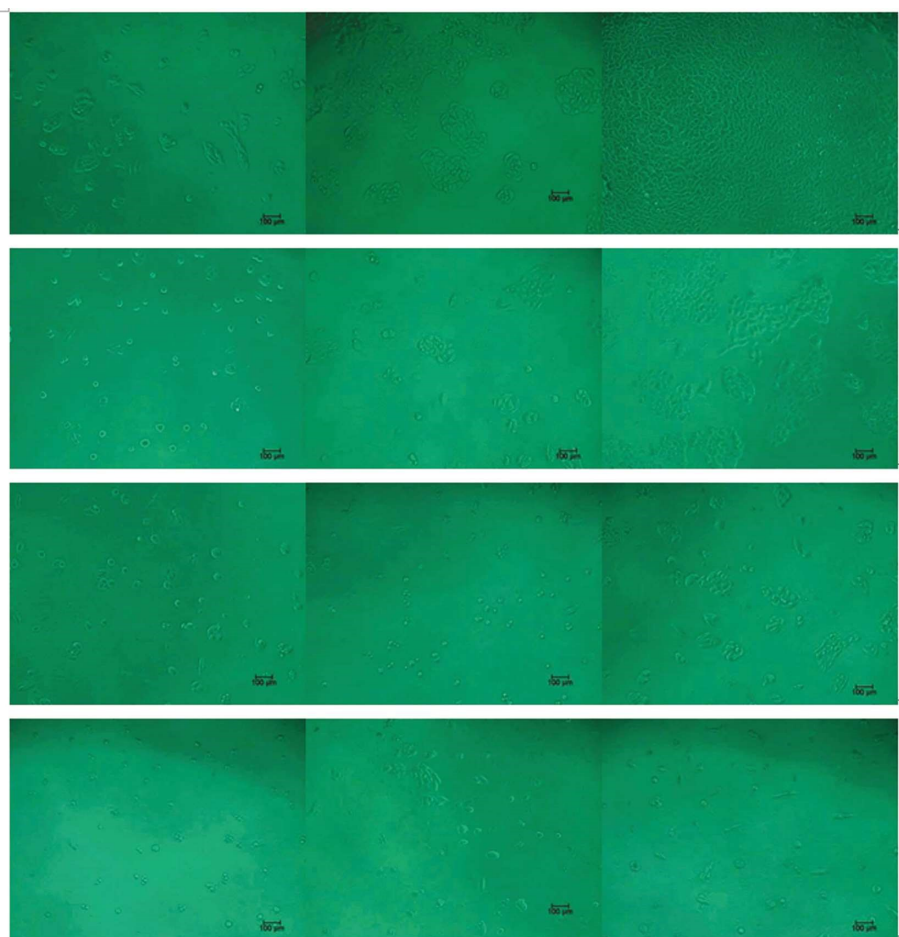


图 5 B16 细胞形态学观察(标尺 100 μm)

Fig.5 Cytological observation of B16 treated by the globulin hydrolysates ($\leq 3 \text{ kDa}$) enzymed by pepsin (Bar: 100 μm)

A, B, C stand for the B16 cells treated with the product of pepsin hydrolysis for 24 h, 48 h and 72 h. 1-4 stand for the concentration of the product of pepsin hydrolysis on 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively.

细胞信号传导的研究,更多关于调控细胞生长的信号传导途径被发现,这从分子水平上提供干预这些信号传导通路的可能。随着分子生物学研究的深入,发现黑色素瘤细胞存在 BRAF、NRA 和 CKIT 等基因变异,针对其表达产物的药物开始用于临床。靶向药物分为三类:第一类为特异性靶向药物,是专门针对特异基因突变患者,如 BRAF(V600E/K)抑制剂(Vemurafenib)、KIT 抑制剂(Imatinib)以及 NRAS 抑制剂,其特点为治疗靶点比较专一、有效率高,但后续耐药问题比较棘手。第二类是非特异靶向药物,其特点是靶点较广泛、单药效率低,如 IgG1 抗体(贝伐单抗)、多激酶抑制剂(Sorafenib)、酪氨酸激酶抑制剂(Dasatinib)、血管内皮抑制素(Endostar)等。第三类是靶向免疫药物,它不直接作用于肿瘤细胞,而是通过调动免疫系统来杀伤肿瘤细胞,如抗 CTLA-4 单抗(Ipilimumab)、抗 PD-L1 单抗及抗 PD-1 单抗(Pembrolizumab / lambrolizumab)。在目前的研究结果中,抗 PD-L1 单抗及抗 PD-1 单抗获得客观疗效的患者多可获得较为持久的疗效。但依旧存在严重的免疫相关的毒性反应,或者由于较短的缓解时间限制了这些靶向药物的实用^[15-17]。

生物肽是一种对生物体的生命活动有益或具有一定生理作用的肽类化合物,但多数生物肽是以非活性状态存在于蛋白质的长链中,经适当的水解后被释放,才显示出广泛的生物活性,往往是原蛋白质或组成氨基酸所不具备的独特生理机能

^[18],如抗血糖、降低胆固醇、抗高血压、抗癌等^[19]。其中抗肿瘤生物肽因具有对目标肿瘤的高亲和力、高特异性、低毒性等特点,还可以提高其他治疗方法对肿瘤治疗的敏感度;同时与抗体大分子药物相比,其具有低分子量、小体积等特点而倍受关注。目前已分离获得多种抗肿瘤肽,如从 *Dolabella auricularia* 中分离的海兔毒素、从 *Elysia rufescens* 中获得的 Kahalalides,以及从 *Lyngbya majuscula* 的次生代谢产物中分离的 Apratoxin A 等^[20]。牡蛎中获得的 LANAK 可抑制结肠癌 HT-29 细胞增殖^[21]。Lunasin 是从植物蛋白中分离获得的含有 43 个氨基酸的多肽,对癌变的纤维原细胞 C3H10T1/2 及小鼠皮肤癌模型均具有显著的抑制作用^[22]。从乌贼墨中分离纯化获得三肽 Gln-Pro-Lys 可抑制人前列腺癌 DU-145 细胞的增殖^[23]。RQSHFANAQP 可抑制乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的增殖作用^[24]。

酶解法制备生物肽,具有生产条件温和、可扩展性、可预测性以及易得等优点^[19]。蛋白酶水解物通过膜超滤、跨流膜过滤^[25]、柱层析或液相^[26]等分离方法可获得高活性多肽组分或单体。

鸦胆子是我国的传统中药,科研工作者们从中已分离获得多种结构明确的抗肿瘤成分,如油脂类的油酸和亚油酸、鸦胆子苦素、鸦胆子苷等。课题组前期工作表明鸦胆子球蛋白源多肽能显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖($\text{IC}_{50} = 6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[7],说明鸦胆子是优良的抗肿瘤药物开发的原材料。而鸦胆子球

蛋白的含量占鸭胆子总蛋白的 8.11 %^[7], 为了尽可能提取出球蛋白, 设计正交试验, 试验结果表明在最优提取条件下即 NaCl 浓度 5 %、提取时间 1.5 h、固液比 1:12, 鸭胆子球蛋白的提取率最高, 但同时增大了球蛋白提取液的体积, 因此采用等电点沉淀法浓缩球蛋白, 提高后续冻干效率。本研究结果表明鸭胆子球蛋白源多肽组分对黑色素瘤细胞 B16 具有明确的生长抑制作用 ($IC_{50} = 1.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 有望进一步从中获得有效的抗肿瘤肽。

参考文献(References)

- [1] Gonzalez D, Fearfield L, Nathan P, et al. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib, treatment in melanoma: recommendations from an expert panel[J]. *British Journal of Dermatology*, 2013, 168(4): 700-707
- [2] Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(6): 1161-1171
- [3] 徐靖雯, 蒋惠慈, 陈汐敏, 等. 抗体药物治疗黑色素瘤的现状与进展[J]. *中国药科大学学报*, 2014, 45(03): 259-266
Xu Jing-wen, Jiang Hui-ci, Chen Xi-min, et al. Advances in antibody drugs for treatment of melanoma [J]. *Journal of China pharmaceutical University*, 2014, 45(3): 259-266
- [4] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 131
Zhao Xue-min. A Supplement to Compendium of Materia Medica [M]. Peking: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 131
- [5] 朱丹丹, 揭晶, 张勇钢, 等. 鸭胆子油临床应用及剂型研究进展[J]. *中南药学*, 2014(10): 997-1000
Zhu Dan-dan, Jie Jing, Zhang Yong-gang, et al. Advances in clinical application and dosage form of jays[J]. *Central South Pharmacy*, 2014 (10): 997-1000
- [6] Gao H, Lamusta J, Zhang WF, et al. Tumor Cell Selective Cytotoxicity and Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from *Brucea javanica* [J]. *North American Journal of Medicine & Science*, 2011, 4 (2): 62-66
- [7] 冀会方, 刘露, 李开, 等. 鸭胆子蛋白质组成分析及其酶解物细胞毒性研究. *中国中药杂志*, 2016, 41(22): 4210-4215
Ji Hui-fang, Liu Lu, Li Kai, et al. Protein composition analysis and the cytotoxicity of gulbulin hydrolysates of *Brucea javanica* seeds[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(22): 4210-4215
- [8] 余志红, 鲁憬莉, 向明. 生物肽的临床应用及现状分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(23): 2034-2036
Yu Zhi-hong, Lu Zhi-li, Xiang Ming. Clinical application and status analysis of biological peptides [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2009, 29(23): 2034-2036
- [9] 吕媛, 马钰, 冯志明, 等. 二喹啉甲酸法在牛奶蛋白质定量中的应用[J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 151-154
Lu Yuan, Ma Yu, Feng Zhi-ming, et al. The application of the method in the quantitative determination of milk protein [J]. *Food Science*, 2010, 31(6): 151-154
- [10] Ju ZY, Hettiarachchy NS, Rath N. Extraction, denaturation and hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(2): 229-232
- [11] Krizkova S, Dostalova S, Michalek P, et al. SDS-PAGE as a Tool for Hydrodynamic Diameter-Dependent Separation of Quantum Dots[J]. *Chromatographia*, 2015, 78(11-12): 785-793
- [12] 张瑞晨, 张超, 孙震晓, 等. 何首乌不同分离部位对人正常肝 L02 细胞和肝癌 HepG2 细胞的杀伤作用 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37 (12): 1830-1835
Zhang Rui-chen, Zhang Chao, Sun Zhen-xiao, et al. The effects of different separation sites on normal liver LO2 cells and liver cancer HepG2 cells [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37 (12): 1830-1835
- [13] CSCO 黑色素瘤专家委员会, 中国黑色素瘤诊治指南[M]. 2015 版. 2015: 人民卫生出版社
CSCO expert committee on melanoma, China's diagnosis and treatment of melanoma: 2015 edition [M]. 2015: People's Medical Publishing House
- [14] Liu J, Fukunaga-Kalabis M, Li L, et al. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2014, 563: 13-21
- [15] Menzies AM, Long GV. Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond [J]. *European Journal of Cancer*, 2013, 49(15): 3229-3324
- [16] Ma C, Armstrong AW. Severe adverse events from the treatment of advanced melanoma: a systematic review of severe side effects associated with ipilimumab, vemurafenib, interferon alfa-2b, dacarbazine and interleukin-2 [J]. *Journal of Dermatological Treatment*, 2014, 25(5): 401-408
- [17] Farid M. Latest Approved Therapies for Metastatic Melanoma: What Comes Next?[J]. *Journal of Skin Cancer*, 2013, 2013(6): 735282
- [18] Sharma S, Singh R, Rana S. Bioactive Peptides: A Review [J]. *International Journal Bioautomation*, 2011, 15(4): 223-250
- [19] Daliri EB, Oh DH, Lee BH. Bioactive Peptides[J]. *Foods*, 2017, 6(5): 1-21
- [20] Xing H, Tong M, Jiang N, et al. Antitumor bioactive peptides isolated from marine organisms[J]. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*, 2017, 44(11): 1077-1082
- [21] Umayaparthi S, Meenakshi S, Vimalraj V, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*) [J]. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2014, 4(3): 343-353
- [22] Galvez AF, Chen N, Macasieb J, et al. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation[J]. *Cancer research*, 2001, 61(20): 7473-7478
- [23] Ding GF, Huang FF, Yang ZS, et al. Anticancer Activity of an Oligopeptide Isolated from Hydrolysates of Sepia Ink [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2011, 9(2): 151-155
- [24] Xue Z, Wen H, Zhai L, et al. Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Food Research International*, 2015, 77: 75-81
- [25] Ferri M, Graenhefeld J, Bretz K, et al. Peptide Fractions Obtained from Rice By-Products by Means of an Environment-Friendly Process Show In Vitro Health-Related Bioactivities [J]. *Plos One*, 2017, 12(1): e0170954
- [26] Li B, Qiao L, Li L, et al. A Novel Antihypertensive Derived from Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) Glutelin [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 123