

· 研究报告 ·

## 牡蛎天然活性肽对人胃腺癌 BGC-823 细胞周期与基因表达的调控

李鹏, 李祺福\*, 石松林, 梁盈

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:**目的 比较研究牡蛎天然活性肽(BPO)对人胃腺癌 BGC-823 细胞凋亡的生物学效应,并进一步探索其对胃癌细胞的作用机制。方法 采用酸抽提、凝胶柱层析等方法,从牡蛎体内分离提取到牡蛎天然活性多肽组分 BPO-1,以姜黄素和 HMBA 处理组为平行对照,流式细胞仪检测细胞周期变化及以免疫细胞化学方法检测相关癌基因、抑癌基因表达变化。结果 BPO-1 能有效抑制 BGC-823 细胞增殖活动,出现亚 G<sub>1</sub> 期细胞,细胞进入凋亡现象。BPO-1,姜黄素及其组合均能不同程度地上调 BGC-823 细胞 p16, c-myc, Fas, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达,下调突变型 p53, bcl-2 蛋白表达。结论 BPO-1 对胃癌细胞具有显著的诱导凋亡作用。其诱导癌细胞凋亡机制与其调节和干预 bcl-2, c-myc 等癌基因和 p53, p16, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 等抑癌基因的表达有关。

**关键词:**胃癌细胞 BGC-823; 牡蛎天然活性肽; 细胞周期; 癌基因与抑癌基因

**中图分类号:** R931.74, R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2007)03-0001-08

## Regulation of bioactive peptides of oyster (BPO) on the cell cycle and gene expression of human gastric adenocarcinoma cell-line BGC-823

LI Peng, LI Qi-fu\*, SHI Song-lin, LIANG Ying

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects and mechanism of bioactive peptides of oyster (BPO) on the apoptosis of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823. **Methods** BPO-1, isolated from *Ostrea cucullata* by acid extraction and gel chromatography, was used to treat the BGC-823 cells. Curcumin and HMBA were used as control. Cell-cycle was detected by flow cytometer, some oncogene and tumor repressive gene were detected by Immunocytochemistry analysis. **Results** BPO-1 could effectively inhibit the proliferation of BGC-823 cells, induce cells into sub-G<sub>1</sub> phase. BPO-1, curcumin and their combination could up-regulate the expression of gene p16, c-myc, Fas, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, and down-regulate gene p53, bcl-2. **Conclusion** BPO-1 could effectively induce BGC-823 cells into apoptosis, and the apoptosis effect involved to the changes of oncogene and tumor repressive gene.

**Key words:** gastric adenocarcinoma BGC-823; bioactive peptides of oyster; cell-cycle; oncogene and tumor repressive gene

\* 基金项目:福建省科技计划重点资助项目(2003N0052)

作者简介:李鹏,男,博士 \*通讯作者: E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

海洋天然活性物质抗肿瘤研究是抗肿瘤药物研究的一个重要领域<sup>[1,2]</sup>,但有关海洋动物活性肽抗肿瘤作用研究则仍未得到足够重视。我们的研究已表明,从进化地位低、具有原始性特征的动物中,寻找能干预细胞信号传导、调控细胞增殖分化的低分子活性肽是一条可行途径<sup>[3,4]</sup>。牡蛎是一种具有药用价值的海洋经济贝类动物,国内外的相关研究曾报道对牡蛎抗菌肽、特异蛋白和酶类的分离纯化研究。我们则从牡蛎中分离出天然活性肽 BPO-1 组分<sup>[5]</sup>,并鉴定了这一组分对肿瘤细胞的生物学效应<sup>[6]</sup>。为此,本文在这一基础上进一步研究牡蛎天然活性肽对人胃癌 BGC-823 细胞增殖分化、细胞周期及相关基因表达的影响,以探索牡蛎天然活性肽的抗肿瘤作用机制,为牡蛎天然活性肽在抗肿瘤研究中的应用和海洋动物低分子活性肽抗肿瘤的研究提供进一步的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 牡蛎天然活性肽 BPO-1 的分离提取

将鲜活的僧帽牡蛎 *Ostrea cucullata* Born, (2~3 月采自厦门海域),加入 pH8.0 的 Tris-HCl 溶液匀浆后离心 (Avantic TM J-25 Centrifuge, Beckman),取沉淀进行酸抽提,所得粗提液过交联葡聚糖柱 Sephadex G50 进行分级分离 (HD-97-I 型核酸蛋白检测仪,上海康华),收集第一个洗脱峰,冷冻干燥 (Stoppering tray dryer, Labconco) 后得冻干粉末,命名为 BPO-1 (bioactive peptides of oyster in peak I),经测定含 95% 多肽成分。

### 1.2 细胞培养与诱导处理

BGC-823 细胞培养于 RPMI1640 (Gibco) 培养液中 (内含 15% 热灭活小牛血清,  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素,  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素,  $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素, pH7.2),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养 24h 后进行药物处理。将分离纯化冻干的 BPO-1 溶解于 D-Hank's 液中配制成  $800\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的母液,并以培养液配制成不同浓

度的作用液 ( $30, 35, 40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。实验组细胞弃旧培养液换上含有 BPO-1 的培养液,对照组细胞同时换上不含 BPO-1 的新鲜培养液,连续培养备用。分别以含有  $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  姜黄素和  $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HMBA (六亚甲基双乙酰胺) 的培养液处理 BGC-823 细胞,以作为平行对照组。并设立  $3\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HMBA +  $30\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BPO-1 组合及  $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  姜黄素 +  $30\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BPO-1 组合处理组,观察其对细胞的生物学效应。

### 1.3 细胞生长曲线测定

取对数期细胞,制成  $5\times 10^4$  个  $\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的细胞悬液,以每瓶 2mL 的接种量接种于一批 25mL 培养瓶中,每组 21 瓶。培养 24h 后加药 (BPO-1) 处理,隔日换上新鲜培养液,其中对照组细胞换上不含诱导物的新鲜培养液,处理组换上含有不同浓度的新鲜培养液。加药处理后逐日 (1~7d) 取对照组和处理组细胞各 3 瓶,用台盼蓝排除法进行活细胞计数,取平均值,绘制细胞生长曲线。

### 1.4 细胞周期测定

参照文献<sup>[7]</sup>并加以修改,取对数期细胞,以  $10\times 10^4$  个  $\cdot\text{mL}^{-1}$  的浓度接种于一批培养瓶内,24 h 后加药处理进行培养,培养一定时间后,消化收集细胞于离心管中,  $1,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5min 弃上清,用 D-Hanks 洗涤 3 次,细胞沉淀重新悬浮于 0.5mL D-Hanks 中并充分打散,迅速加入 5mL 预冷的 75% 乙醇,置 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱暂存待检。细胞周期检测时,先离心去乙醇,  $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 洗 3 次,加入不含 DNAase 的  $1.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  RNAase (PBS 配制) 重悬细胞,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 20min 以消化 RNA,离心后加入  $0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的碘化吡啶 (PI) 4 染色 3min。流式细胞仪对细胞中的 DNA 含量作单参数测定,据所测得的 DNA 分布直方图,用细胞周期分析软件 Coulter System 进行细胞周期统计分析。

### 1.5 癌基因、抑癌基因、免疫细胞化学检测

取分别长有对照组细胞和经不同诱导物处

理( $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1,  $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  姜黄素和  $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 +  $5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  姜黄素)的细胞的盖玻片条,温 D-Hank's 液漂洗 2~3 次,每次 2~3min,室温稍晾干,冷丙酮 4 固定 10min (可-2 暂存), $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 洗涤 3 次,每次 5min; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 漂洗 3 次,每次 5min; 滴加适量 10% 正常山羊血清 (PBS 配制), 室温孵育封闭 10min; 倾去羊血清,滴加一抗(鼠抗人 mt p53, bcl-2, c-myc, p16 等) (1:100) 37 孵育 60min 或 4 孵育过夜, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 漂洗 3 次,每次 5min; 滴加 50 $\mu\text{L}$  生物素标记的二抗(IgG/Bio) (1:100), 37 孵育 10~15min;  $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 漂洗 3 次,每次 5min; 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(1:100), 37 孵育 10~15min; PBS 漂洗 3 次,每次 5min; DAB 显色剂室温显色 5~10min; 入自来水中断显色并在自来水充分冲洗,蒸馏水洗 1~2min,乙醇系列脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照。实验过程中以 PBS 代替一抗(其它步骤相同)进行免疫细胞化学染色作为阴性对照。

## 2 实验结果

### 2.1 细胞生长曲线测定

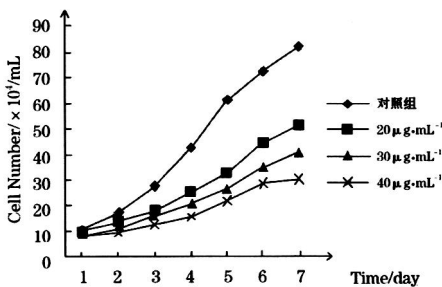


图 1 牡蛎天然活性肽 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of BPO-1 on the growth of human gastric carcinoma BGC-823 cells

细胞生长曲线测定结果显示人胃腺癌 BGC-823 细胞增殖速度较快,当接种细胞数为

$5 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  时,连续计数至第 7d,细胞数为  $82.29 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,为原来的 16.46 倍。经不同浓度的 BPO-1 处理后,BGC-823 细胞状态分别受到不同程度的抑制,其中  $20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 处理 7d,细胞计数结果为  $51.46 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,细胞数为原来的 10.29 倍,细胞生长抑制率达 37.46%。 $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 连续处理 7d,细胞减至  $41.04 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,仅为原来的 10.21 倍,细胞生长抑制率为 50.13%,与对照组细胞相比较,具有非常显著性差异。而经  $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 处理 7d 后,细胞计数结果为  $29.91 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,细胞数仅为原来的 5.98 倍,细胞生长抑制率高达 63.65% (图 1)。由于  $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 对细胞生长的抑制率相对较低,而  $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 处理时细胞铺展已较为明显,细胞生长受到明显抑制,因此本研究选择  $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 作为处理 BGC-823 细胞的适宜浓度。

### 2.2 细胞周期检测

应用流式细胞仪检测 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 周期分布的影响。结果显示,BPO-1 抑制 BGC-823 细胞增殖过程分为两阶段:先使细胞停留在  $G_0/G_1$  期;诱导  $G_0$  期细胞产生凋亡。即细胞周期出现标志 DNA 降解的亚  $G_1$  期细胞,且随着 BPO-1 浓度的增加,亚  $G_1$  期细胞比例增多。

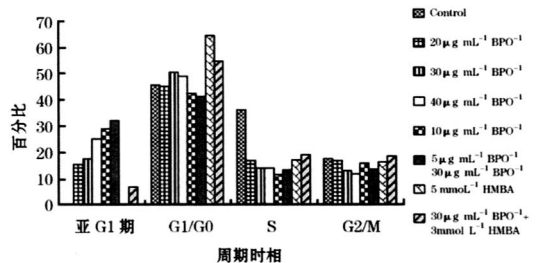


图 2 流式细胞仪检测不同浓度 BPO-1 处理的人胃腺癌 BGC-823 细胞周期分布

Fig. 2 Using the flow cytometer to analyse the effect of different concentrations of BPO-1 on cell-cycle distribution of human gastric adenocarcinoma BGC-823 cells

表 1 牡蛎天然活性肽 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 细胞周期分布的影响

Table 1 Effect of BPO-1 on cell-cycle distribution of human gastric carcinoma BGC-823 cells

实验组	细胞周期 (%)			
	亚 G <sub>1</sub> 期	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control	0	45.7	36.1	17.7
BPO-1 20 $\mu$ g · mL <sup>-1</sup>	15.4	45.2	16.8	17.0
BPO-1 30 $\mu$ g · mL <sup>-1</sup>	17.6	50.5	14.1	13.1
BPO-1 40 $\mu$ g · mL <sup>-1</sup>	25.1	49.1	14.0	11.8
姜黄素	29.0	42.6	11.5	15.9
姜黄素 + BPO-1	32.1	41.2	13.3	13.4
HMBA	0	64.4	17.1	16.5
HMBA + BPO-1	6.7	54.7	19.0	18.6

以 20 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> BPO-1 处理细胞,细胞周期即发生明显的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻抑,亚 G<sub>1</sub> 期细胞比例上升为 15.4%,而 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例则无明显变化,细胞出现凋亡;30 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> BPO-1 处理的细胞周期各时相的分布与其处理 20 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 的相类似,亚 G<sub>1</sub> 期细胞比例达 17.6%,而 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例也无明显变化,细胞仍被阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期;40 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 处理的细胞周期各时相的分布也与 20 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>, 30 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 处理的相类似,亚 G<sub>1</sub> 期细胞比例高达 25.1%,但与对照组细胞相比 G<sub>2</sub>/M 期无明显区别,细胞很少,未发生明显变化。结果显示 BPO-1 对 BGC-823 细胞的生长抑制作用与细胞凋亡有关。经不同浓度 BPO-1 处理后,BGC-823 细胞周期均出现明显的亚 G<sub>1</sub> 期(凋亡峰),并且随 BPO-1 浓度增加逐渐比例增大,而 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例则无明显变化。而经 10 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 的姜黄素处理的 BGC-823 细胞,也出现了代表凋亡发生的亚 G<sub>1</sub> 峰,且峰较宽,达到了 29.0%,但 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>,G<sub>2</sub>/M 期变化不大。经 5 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 姜黄素 + 30 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> BPO-1 处理的 BGC-823 细胞也出现了亚 G<sub>1</sub> 峰,为 32.1%,G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>,G<sub>2</sub>/M 期与对照组相比,变化不明显。

5mmol · L<sup>-1</sup> HMBA 处理 BGC-823 细胞,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例高达 54.1%,而 S 期细胞比例进一步降低至 17.1%,G<sub>2</sub>/M 期细胞则有一定程度的增加,但占细胞总数的比例不大,仅为 18.5%,细胞也明显被阻滞于

G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,但基本没有出现亚 G<sub>1</sub> 期细胞。30 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> BPO-1 + 3mmol · L<sup>-1</sup> HMBA 联合处理 BGC-823 细胞,细胞也出现 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻抑,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例高达 54.7%,并有不明显的亚 G<sub>1</sub> 期,为 6.7%,S 期细胞少,为 14.0%,G<sub>2</sub>/M 期细胞比例也有所减少,与 BPO-1 单独处理相比其效应要弱些(表 1)。

### 2.3 天然活性肽对相关癌基因表达的影响

#### 2.3.1 BPO-1 对 BGC-823 细胞 bcl-2 蛋白表达的影响

BGC-823 细胞 bcl-2 蛋白含量较高,免疫显色反应呈强阳性,反应产物为深棕黄色颗粒,大量分布于细胞质和细胞核内,分布较为致密,尤其是球形细胞内 bcl-2 蛋白遍布整个细胞。

经 40 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> BPO-1 处理,细胞内 bcl-2 蛋白仍呈阳性表达,与对照组相比其细胞内尤其是核周边细胞质内有一定程度的降低。10 $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 姜黄素处理与 BPO-1 处理相类似,显色反应呈弱阳性,主要分布于细胞核内,与对照组相比,细胞质内分布减少明显。经 BPO-1 与姜黄素联合诱导的细胞免疫反应也呈阳性,黄色反应产物主要分布于细胞核内,细胞质内也有少量分布,与对照组相比,其细胞核内分布有所减少,细胞质内分布减少更为明显。三者相比较,BPO-1 处理反应变化最为明显,联合诱导处理与姜黄素单独处理效果相当(见图 3:1,7,13,19)。

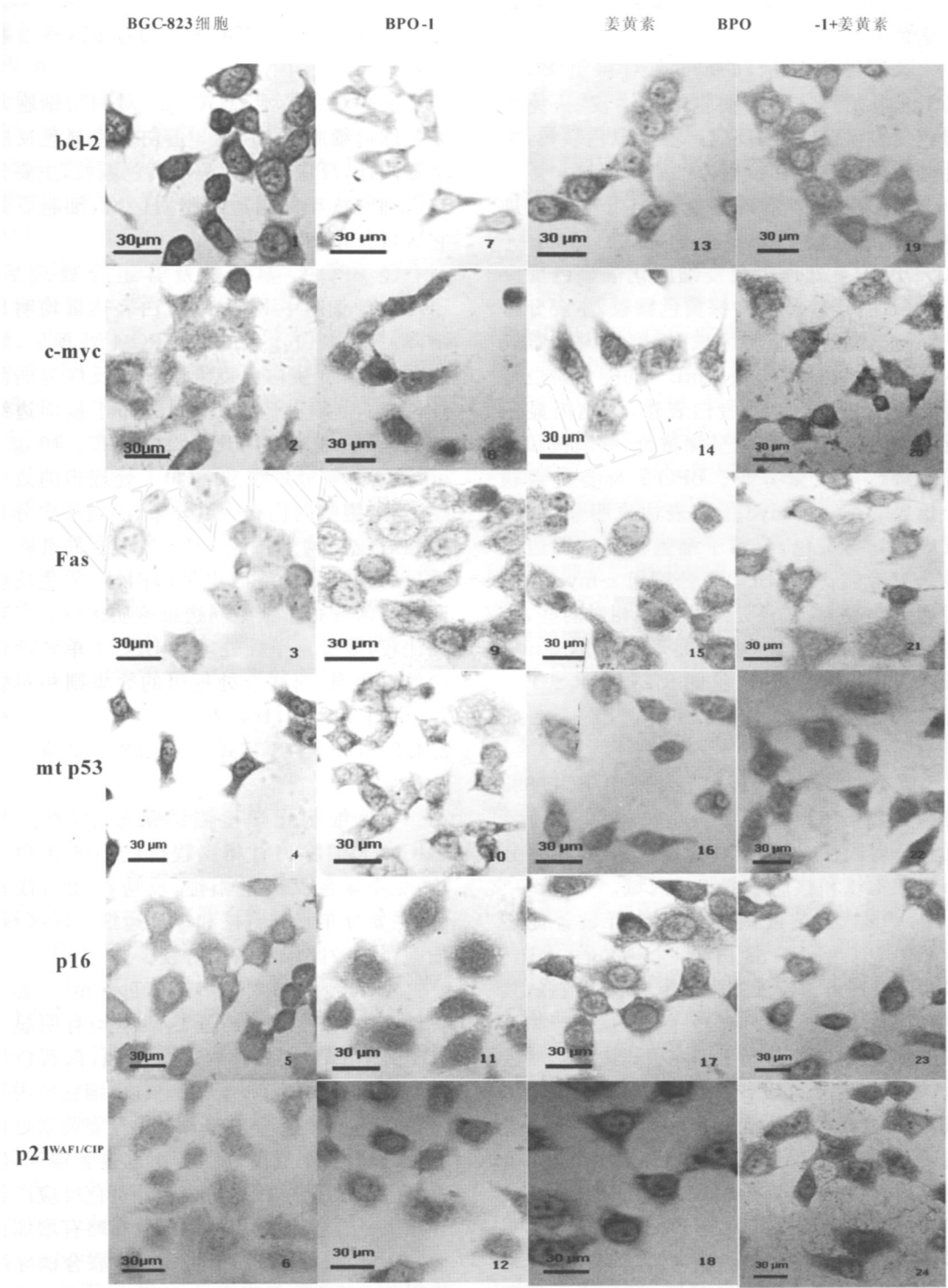


图 3 天然活性肽 BPO-1 对相关癌基因和抑癌基因表达的影响

### 2.3.2 BPO-1 对 BGC-823 细胞 $c-myc$ 蛋白表达的影响

检测结果显示,  $c-myc$  在对照组 BGC-823 细胞尤其是球形细胞中表达较弱, 免疫显色反应呈弱阳性, 反应产物为黄色颗粒, 主要分布于细胞核和核周边细胞质区域。

BPO-1、姜黄素诱导处理均可显著促进 BGC-823 细胞  $c-myc$  蛋白表达。40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 处理组免疫细胞化学显色反应为强阳性, 反应产物为棕黄色颗粒, 主要分布于细胞核周边细胞质区域, 细胞质内分布较少。与此相类似, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的姜黄素也可显著增强细胞  $c-myc$  蛋白表达, 细胞内显色反应也较强, 反应产物呈深黄色, 细胞核和核周边细胞质大量分布。BPO-1 与姜黄素联合诱导的细胞  $c-myc$  蛋白表达也明显增强, 反应产物为黄色, 分布于细胞核和核周边区域。三者相比较, BPO-1 处理组  $c-myc$  蛋白表达变化最大, 联合处理的变化相对弱些, 但与对照组细胞相比, 联合处理组细胞  $c-myc$  蛋白表达仍明显上升(见图 3:2, 8, 14, 20)。

### 2.3.3 BPO-1 对 BGC-823 细胞 Fas 蛋白表达的影响

实验结果表明, Fas 在对照组 BGC-823 细胞尤其是球形细胞中表达较弱, 免疫显色反应呈弱阳性, 反应产物为黄色颗粒, 主要分布于细胞核和核周边细胞质区域。

BPO-1、姜黄素诱导处理均可显著促进 BGC-823 细胞 Fas 蛋白表达。40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 处理可诱导细胞 Fas 蛋白表达增强, 其免疫细胞化学显色反应为强阳性, 反应产物为深黄色颗粒, 主要分布于细胞核周边细胞质区域, 细胞质内分布较少。与此相类似, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的姜黄素也可显著降低细胞 Fas 蛋白表达, 细胞内显色反应也较强, 反应产物呈深黄色, 细胞核和核周边细胞质大量分布。BPO-1 和姜黄素联合诱导的细胞 Fas 蛋白表达也明显增强, 分布于细胞核和核周边区域。三者相比较, 联合处理的变化最明显, 而 BPO-1 处理组和姜黄素处理组细胞内的 Fas 蛋白含量变化相当(见图 3:3, 9, 15, 21)。

### 2.4 天然活性肽对相关抑癌基因表达的影响

响

### 2.4.1 BPO-1 对 BGC-823 细胞 p53 蛋白表达的影响

实验观察显示, BGC-823 对照组细胞尤其是球形细胞中 M<sub>Tp53</sub> 蛋白免疫显色反应呈强阳性, 反应产物为深棕黄色颗粒, 主要分布于细胞核和核周边细胞质区域, 细胞质其它区域分布相对较少。

经 BPO-1、姜黄素及其组合处理后, BGC-823 细胞中 M<sub>Tp53</sub> 蛋白表达量均明显下降。其中 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1 处理后, 细胞内 M<sub>Tp53</sub> 蛋白免疫细胞化学反应为弱阳性, 浅黄色反应产物仅少量分布于核周边细胞质区域, 细胞核内几乎没有分布。10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  姜黄素处理组和 BPO-1 处理组的效果相当, 细胞核内仍有少量分布, 细胞质内分布则相对较为均匀。经 BPO-1 与姜黄素联合诱导的细胞免疫反应也呈弱阳性, 黄色反应产物均匀分布于细胞周边细胞质区域。三者相比较, 姜黄素单独处理与 BPO-1 单独处理的效果相当, 而联合处理组的效果则相对弱些(见图 3:4, 10, 16, 22)。

### 2.4.2 BPO-1 对 BGC-823 细胞 p16 蛋白表达的影响

免疫细胞化学检测结果显示, 对照组 BGC-823 细胞仍有相当程度的 p16 蛋白表达, 免疫显色反应呈阳性, 反应产物为浅黄色, 主要分布于细胞核和核周边细胞质区域, 细胞质边缘区域分布相对较少。

经 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BPO-1、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  姜黄素处理后, 细胞内 p16 蛋白表达均有明显上升。其中 BPO-1 处理组明显增强, 深黄色反应产物大量致密分布于细胞核内, 细胞质内的分布也有所增多, 呈散在分布。经姜黄素处理后, 细胞内 p16 蛋白表达产物也显著增加, 显色反应为强阳性, 细胞核内深棕黄色反应产物分布也显著增加, 细胞质内的分布略有增加也呈散在分布。经 BPO-1 与姜黄素联合诱导的细胞免疫反应也呈强阳性, 深黄色反应产物主要分布于细胞核内和核周边区域, 细胞质内也有分布。三者相比较, 姜黄素处理反应变化最为明显, 联合诱导处理与 BPO-1 单独处理效

果相当(见图 3:5,11,17,23)。

### 2.4.3 BPO-1 对 BGC-823 细胞 p21WAF1/CIP1 蛋白表达的影响

结果显示, BGC-823 对照组细胞中 p21WAF1/CIP1 蛋白免疫显色反应呈弱阳性,反应产物为黄色颗粒,主要分布于细胞核和核周边细胞质区域,细胞质其它区域分布相对较少。

经 BPO-1、姜黄素及其组合处理后, BGC-823 细胞中 p21WAF1/CIP1 蛋白表达量均明显上升。其中  $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BPO-1 处理后细胞内 p21WAF1/CIP1 蛋白免疫细胞化学反应为阳性,深黄色反应产物分布于核周边细胞质区域,细胞核内少量分布。 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  姜黄素处理后 p21WAF1/CIP1 蛋白表达也明显上升,细胞核内有少量分布,细胞质内分布则相对较为均匀。经 BPO-1 和姜黄素联合诱导的细胞免疫反应也呈强阳性,棕黄色反应产物主要分布于细胞核内和核周边区域,与对照组相比,其细胞核内分布有所增多。三者相比较,联合诱导处理反应变化最为明显,姜黄素处理与 BPO-1 处理效果次之(见图 3:6,12,18,24)。

## 3 讨论

### 3.1 牡蛎天然活性肽 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 细胞增殖的抑制作用

对肿瘤细胞增殖活动的抑制是鉴定外源性物质诱导肿瘤细胞凋亡作用的一项重要指标。肿瘤细胞生长曲线、细胞周期以及相关基因表达明显不同于正常细胞和凋亡细胞,尤其凋亡细胞会出现凋亡峰和凋亡相关基因的表达,这些指标成为鉴定外源性物质对肿瘤细胞作用效应的重要判断依据<sup>[8]</sup>。

本实验中细胞生长曲线显示, BPO-1 处理使原本快速增殖的 BGC-823 细胞的生长受到明显抑制;细胞周期检测也显示经不同浓度 BPO-1 处理和姜黄素处理的 BGC-823 细胞均出现明显的亚 G<sub>1</sub> 期(凋亡峰),并且两者都呈剂量-效应关系。姜黄素与 BPO-1 联合处理的 BGC-823 细胞也出现了亚 G<sub>1</sub> 峰。而 HMBA 单独处理组和 BPO-1 与 HMBA 联合处理组的 BGC-823 细胞则无明

显的凋亡期细胞。对相关凋亡基因表达的检测结果显示,经 BPO-1、姜黄素及其组合处理后, BGC-823 细胞中 P16, P21, C-myc, Fos 蛋白表达量均明显上升, MTP53 及 Bcl-2 表达则明显下降。

细胞周期中凋亡峰的出现及相关基因表达的变化是细胞凋亡的有力证据与常用鉴定指标<sup>[8]</sup>。姜黄素是一种已知的凋亡诱导物<sup>[9]</sup>,被广泛用于对胃癌等多种肿瘤细胞的凋亡诱导研究。本研究结果显示, BPO-1 处理的 BGC-823 细胞的周期与相关基因表达的改变类似于姜黄素等凋亡诱导物而不同于分化诱导物 HMBA,都出现了标志着细胞凋亡的亚 G<sub>1</sub> 期凋亡峰及有利于细胞凋亡的基因表达变化。国内外的相关研究报导姜黄素<sup>[10,11]</sup>,生长因子 -1<sup>[12]</sup>,三氧化二砷<sup>[13]</sup>,5-氟尿嘧啶<sup>[14]</sup>等凋亡诱导物诱导多种肿瘤细胞增殖抑制时都发生了 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞、上调 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>、野生型 p53 等基因表达、调控细胞周期进入亚 G<sub>1</sub> 期的现象,这些都与 BPO-1 对 BGC-823 细胞的生物学效应相一致。

由此表明,牡蛎天然活性肽 BPO-1 具有与姜黄素等细胞凋亡诱导物和其它海洋活性物质相同的抑制胃癌等肿瘤细胞增殖、诱导胃癌细胞凋亡的显著作用。

### 3.2 BPO-1 对 BGC-823 细胞相关癌基因、抑癌基因表达的影响

细胞癌基因和抑癌基因对细胞增殖与凋亡起正、负调控作用<sup>[15]</sup>,某些癌基因与抑癌基因产物作为细胞周期调控的关键蛋白,其表达异常常常引起细胞增殖与凋亡异常,进而导致肿瘤的发生<sup>[16]</sup>。因而相关癌基因、抑癌基因表达的变化成为鉴定外源物质抗肿瘤作用的一个重要依据<sup>[17]</sup>。

本研究结果显示, BPO-1 处理后 BGC-823 细胞中,癌基因 c-myc 产物、p16、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 抑癌基因产物表达明显增强,细胞凋亡相关基因 Fas 表达上升,抗凋亡基因 bcl-2 以及突变的 mt p53 癌基因蛋白表达水平显著减弱。这一结果与姜黄素和姜黄素与 BPO-1 联合处理组的观察结果是一致的。在已有的肿瘤细胞凋亡诱导的研究报道中,

也发现了相关基因表达的类似变化。如人参皂苷诱导白血病 6T-CEM 细胞凋亡<sup>[18]</sup>出现了 bcl-2 的下调;苦参碱诱导人肝癌细胞系 Hep G 凋亡<sup>[19]</sup>的研究发现有 Fas, p16, p21 的上调与 bcl-2 的下降;顺铂可降低人肝癌 SMMC-7721 细胞 mt p53 基因表达<sup>[1]</sup>, 三氧化二砷可增强人胃腺癌 SGC-7901 细胞 c-myc 基因的转录<sup>[20]</sup>。这些凋亡诱导物对人肿瘤细胞基因产物表达变化的影响, 与本研究中的 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 细胞基因表达的影响相类似。这表明 BPO-1 与姜黄素等凋亡诱导物对肿瘤细胞的作用机制相类似, 可有效抑制人胃腺癌细胞恶性增殖活动, 改变相关癌基因、抑癌基因表达, 从而对人胃腺癌细胞具有显著的诱导凋亡作用。

结合以上分析, 我们认为牡蛎天然活性肽 BPO-1 对肿瘤细胞的生物学效应主要是通过凋亡的诱导而表现为对细胞增殖的抑制作用。BPO-1 使细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 进而诱导 G<sub>0</sub> 期细胞产生凋亡, 这一过程涉及细胞周期调控与细胞凋亡信号传导等多个复杂的过程。BPO-1 可能通过膜受体产生特定的细胞信号, 对靶基因的表达进行调控: 下调 bcl-2, mt p53, 上调 c-myc, Fas, p16, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 等基因表达, 通过 Fas/ FasL 途径以及其它途径, 抑制 BGC-823 细胞增殖, 干预细胞周期等相关基因的表达, 使胃腺癌细胞发生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞; 进而促进 DNA 水解酶表达, 水解 DNA, 引发凋亡。从而对人胃腺癌细胞增殖产生明显的抑制与诱导凋亡作用。

#### 参考文献:

[1] 林文翰. 我国海洋生物的药学研究思考[J]. 中国天然药物, 2006, 4(1): 10-14.  
 [2] Peter van T, Michael E, Jelka M, et al. Mariculture trials with Mediterranean sponge species The exploitation of an old natural resource with sustainable and novel methods[J]. *Aquaculture*, 2003, 218: 439-455.  
 [3] Shi SL, Wang YY, Li QF, et al. Effects of tachyplesin and n - sodium butyrate on proliferation and gene expression of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(11): 1694-1698.  
 [4] Li QF, Ouyang GL, Peng XX, et al. Effect of tachyplesin on the regulation of cell cycle in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells[J]. *World J Gas-*

*troenterol*, 2003, 9(3): 454-458.  
 [5] 李祺福. 牡蛎天然活性多肽和制备方法及其在制备抗癌药物中的应用[P]. 中国. 专利号: ZL02141716. 4, 2006-08-30.  
 [6] 李鹏, 李祺福, 黄大川, 等. 僧帽牡蛎天然活性多肽 BPO-1 抗人胃腺癌 BGC-823 细胞活性研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(5): 618-622.  
 [7] DONG Weihong, XIE Yanhua, WANG Zehua. Apoptosis rate and objective diagnosis of drug resistance of ovarian cancer Cell Lines[J]. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2005, 4(5): 304-308.  
 [8] Deding Tao, Jianhong Wu, Yongdong Feng, et al. New method for the analysis of cell cycle-specific apoptosis[J]. *Cytometry*, 2004, 57A(2): 70-74  
 [9] 苏文忠, 韩福才. 肺癌相关肿瘤标志物的研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2006; 18(6): 428-430.  
 [10] Lev-Ari S, Maimon Y, Strier L, et al. Down-regulation of prostaglandin E2 by curcumin is correlated with inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human colon carcinoma cell lines[J]. *J Soc Integr Oncol*, 2006, 4: 21-26.  
 [11] Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, et al. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Cancer*, 2006, 106: 2503-2513.  
 [12] WANG Chun-lei, HUANG Zhi-qiang, WAN Yuanlian, et al. Study on TGF- $\beta$ 1-mediated apoptosis of human hepatoma cell lines[J]. *Modern Oncology*, 2006; 14(2): 176-178.  
 [13] 狄春红, 杨磊, 顾少华. 三氧化二砷诱导白血病细胞凋亡作用机制研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2005; 32(12): 945-948.  
 [14] 刘琳, 赵伟, 秦叔逵, 等. 三氧化二砷联合 5-氟尿嘧啶抗人大肠癌细胞的实验研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2006; 18(7): 437-441.  
 [15] Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis[J]. *Oncogene*, 2002, 21(16): 2593-2604.  
 [16] Evan GI, Vouaden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer[J]. *Nature*, 2001, 411: 342-348.  
 [17] Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle deregulations and anticancer therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(3): 139-145.  
 [18] 凌昌全, 俞超芹, 潘瑞萍, 等. 人参皂甙对人 T 淋巴细胞白血病细胞株凋亡基因的影响[J]. 中医杂志, 2000, 41(3): 176-179.  
 [19] 司维柯, 陈安, 刘斌, 等. 苦参碱诱导肝癌细胞凋亡研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 816-820.  
 [20] 马向东, 陈必良, 叶永清, 等. 顺铂诱导人卵巢癌细胞系 HO-8910 细胞凋亡[J]. 癌症, 1997, 16(3): 180-183.  
 [21] 邓友平, 林晨, 张雪艳, 等. 三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 诱导人胃腺癌 SGC7901 细胞程序化死亡并降低 c-myc 基因的表达[J]. 药学学报, 1999, 34(5): 4333-337.

(收稿日期: 2006-12-18)