

牡蛎天然活性肽 BPO-1 诱导人胃腺癌 BGC-823 细胞凋亡的形态与超微结构观察

石松林,李鹏,李祺福*,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 观察 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 细胞形态与超微结构的影响,以探索 BPO-1 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,以细胞凋亡诱导物姜黄素和癌细胞分化诱导物 HMBA 为平行对照,用光镜、透射电镜观察 BPO-1 处理细胞的形态和超微结构变化。结果 经处理后的 BGC-823 细胞体积缩小、染色质凝聚、线粒体空泡化、内质网腔扩大和出现凋亡小体等多种典型的细胞凋亡形态和超微结构特征。结论 牡蛎天然活性肽 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 细胞凋亡的诱导具有显著作用。

关键词:胃癌细胞;牡蛎天然活性肽;细胞凋亡;细胞形态与超微结构

中图分类号: R931.711;R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2007)05-0006-07

Effects of oyster bioactive peptides BPO-1 on the morphology and ultrastructure of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823

SHI Song-lin, LI Peng, LI Qi-fu*, 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 study the effects of bioactive peptides from oyster on the morphology and ultrastructure changes of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 and its mechanism. **Methods** BPO-1 was isolated from *Ostrea cucullata* by acid extraction and gel chromatography, and was used to treat the BGC-823 cells. Curcumin and HMBA were used as control. The morphology and ultrastructure of the cells were examined by light microscopy and transmission electron microscopy. **Results** After treatment with BPO-1, typical apoptosis characteristics of the morphology and ultrastructure could be observed on BGC-823 cells. **Conclusion** BPO-1 could effectively inhibit the proliferation of BGC-823 cells and induce BGC-823 cells to apoptosis.

Key words: gastric adenocarcinoma cells; oyster bioactive peptides; apoptosis; morphology and ultrastructure

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^[1,2],但有关海洋

动物肽抗肿瘤活性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

* 基金项目:福建省科技计划重点资助项目(2003N0052)

作者简介:石松林,男,博士研究生 *通讯作者: E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

原始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新的可行途径^[3,4]。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,但目前对牡蛎抗肿瘤活性物质的分离提取与抗肿瘤机理研究报道较少。我们则已从牡蛎中分离出天然活性肽 BPO-1 组分^[5],并观察到这一组分对肿瘤细胞的生物学效应^[6]。本研究则进一步研究牡蛎天然活性肽对人胃癌 BGC-823 细胞形态与超微结构的影响,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开发和应用提供进一步的实验依据。

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, 采自 2~3 月的厦门海域,由厦门大学海洋与环境学院周时强教授鉴定) 加入 PH8.0 的 Tris-HCl 溶液匀浆后离心,取沉淀进行酸抽提,所得粗提液过葡聚糖柱进行分级分离,收集第一个洗脱峰 (Bioactive Peptides of Oyster in Peak, BPO-1), 冷冻干燥后备用。

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°C , 5% CO_2 培养, 24h 后进行药物处理。经分离纯化冻干的 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, 并以培养液配制成合适浓度的作用液 ($40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。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 的培养液处理 BGC-823 细胞作为平行对照

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 光学显微镜样品制备与观察

将对照组细胞和经不同诱导物处理的处理组细胞分别以 $10\times 10^4\text{mL}^{-1}$ 的细胞浓度接种于放有盖玻片条的小青霉素瓶中, 培养处理后取出长有细胞的盖玻片条, 温 D-Hank's 洗涤 2~3 次, Bouin-Hollande 液固定过夜, 70% 乙醇洗涤, 常规苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照。

1.4 透射电镜样品制备与观察

取对数生长期细胞, 以 10×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞浓度接种于 50mL 培养瓶中, 接种 24h 后进行加药处理。对照组细胞和处理组细胞分别经温 D-Hank's 液洗涤 2~3 次, 用橡皮刮刀推下细胞移入离心管中, $1,500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min, 弃上清液; 细胞沉淀用 2.5% 戊二醛 4 预固定 2h, PBS 漂洗 3 次, 1% 四氧化锇 4 后固定 2h, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 812 包埋, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 于 JEM100-CX 型透射电镜下观察拍照。

2 实验结果

2.1 光学显微镜观察

光镜下, BGC-823 细胞具有人胃癌细胞典型的形态特征, 呈上皮样、圆形、梭形、肾形等不规则形态, 同时较常见癌巨细胞、多核细胞以及多极分裂相等。细胞体积较小, 细胞核大, 核形不规则, 常见畸形核, 核内常见多个核仁; 细胞质较少, HE 染色不均匀, 着色深浅不一 (图版 I-1)。

经 $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BPO-1 处理的 BGC-823 细胞, 群体细胞形态较一致, 排列规则, 固缩细胞较多, HE 染色较深, 细胞多见胞质突起, 细胞核变小, 核仁减少, 有些细胞发现有

明显的核凝聚现象(图版 I-2)。

经 $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素处理的 BGC-823 细胞形态变化类似于 BPO-1 处理细胞,群体细胞形态呈一致,细胞皱缩,染色很深,常见的处于分裂期的癌细胞减少,多见胞质突起和圆形的固缩细胞,核仁数目减少,染色质凝聚(图版 I-3)。

经 HMBA 处理后, BGC-823 细胞出现了细胞体积增大,细胞形态较为一致等明显变化。细胞趋于铺展, HE 染色较为均匀,细胞核较小,形状较为规则,核仁数量减少(图版 I-5)。

$5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素 + $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPO-1 组合处理的 BGC-823 细胞形态变化(图版 I-4)类似于 BPO-1 处理细胞;而经 HMBA + BPO-1 组合处理的 BGC-823 细胞形态(图版 I-6)变化与对照组细胞较为相似。

2.2 透射电镜观察

透射电子显微镜观察结果显示,对照组 BGC-823 细胞体积较小,形状不规则,核质比例大。细胞核较大,形态不规则,核膜向核内有不同程度的凹陷,核内有大小不一多个核仁,还可见核仁内大小不一的核仁小泡。细胞核内异染色质多,除核膜内缘较多外,还有一些呈团块地散在分布。在细胞质内,线粒体体积小,形状不规则,常可见呈深色负染,有些还呈空泡化,线粒体嵴数量较少,基质的电子密度也不均匀。高尔基体少见,体积较小,高尔基囊数目少排列不规则,极性不明显,高尔基囊腔有明显的膨胀现象,甚至呈泡状化。粗糙内质网不发达,数量少,长度相对较短,呈散在分布。细胞质多聚核糖体较多,游离核糖体较少。有些细胞还有少量的分泌颗粒,溶酶体少见,细胞表面还有较多的微绒毛突起(图版 II-1、2)。

经过 $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPO-1 处理后的 BGC-823 细胞的超微结构均产生了明显的变化。主要表现为细胞体积变小,细胞形态

较为一致;细胞核内的异染色质块增多,一些较大的团块边聚,使核内出现了透明区域,有些细胞可见明显的致密核和核残体;细胞质变得较为致密,细胞膜皱缩但完整,有小泡形成,基质的电子密度增高,细胞质体积缩小,细胞器数目减少,线粒体空泡化明显,内质网网腔扩大,但都可辨认;透射电镜下可见体积小、数目多的凋亡小体(图版 II-3、4)。

经 $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素处理的 BGC-823 细胞超微结构变化类似于 BPO-1 处理细胞。主要表现为体积变小,形态一致;核内的异染色质增多,异染色质团块边聚,使核内出现了透明区域,可见明显的致密核;细胞质缩小而电子密度增高,细胞膜皱缩但完整,有小泡形成,细胞器数目减少,线粒体肿胀明显,内质网网腔扩大;可见凋亡小体(图版 II-5、6)。

经 HMBA 处理后, BGC-823 细胞体积变大,核质比例减小。细胞核形状较为规则,核内异染色质团块减少而常染色质增多,核仁数目减少,核仁体积变小;细胞质内线粒体结构较为典型,嵴丰富,粗糙内质网较为丰富,多聚核糖体较少,游离核糖体较多(图版 II-9、10)。

经姜黄素 + BPO-1 组合处理的 BGC-823 细胞形态超微结构变化(图版 II-7、8)类似于 BPO-1 处理细胞;而经 HMBA + BPO-1 组合处理的 BGC-823 细胞形态超微结构(图版 II-9、10)则与对照组细胞较为相似。

3 讨论

细胞凋亡具有不同于其它细胞的典型形态与超微结构特征,因而观察细胞形态与超微结构变化是鉴定细胞凋亡最重要的依据之一^[7]。凋亡细胞主要表现为细胞体积变小;细胞核内的染色质块增多,异染色质团块边聚;细胞质变得较为致密,细胞膜皱缩但完整,有小泡形成,基质的电子密度增高,线粒体空泡化明显,内质网网腔扩大;出现凋亡小

体等形态与超微结构特征。前人^[8-10]在胃癌等不同肿瘤细胞凋亡的研究中,均以这一系列形态与超微结构变化作为鉴定细胞凋亡的依据。

本研究的光镜与透射电镜观察结果显示,BGC-823 细胞形态不规则,核质比较大;核内常见多个核仁,异染色质多;细胞质内细胞器体积小而数量少,线粒体嵴较少而基质的电子密度不均匀;高尔基体囊数目少而排列不规则,囊腔膨胀甚至呈泡状化;粗糙内质网不发达;溶酶体少见,细胞表面还有较多的微绒毛突起。这些形态与超微结构具有典型的肿瘤细胞恶性表型特征。而经 BPO-1 处理的 BGC-823 细胞则细胞体积变小、细胞核内异染色质增多,异染色质团块边聚;细胞质变得较为致密,胞膜皱缩但完整并有小泡形成,基质的电子密度增高,线粒体空泡化,内质网网腔扩大;并可见体积小、数目多的凋亡小体等凋亡细胞的形态与超微结构典型特征。

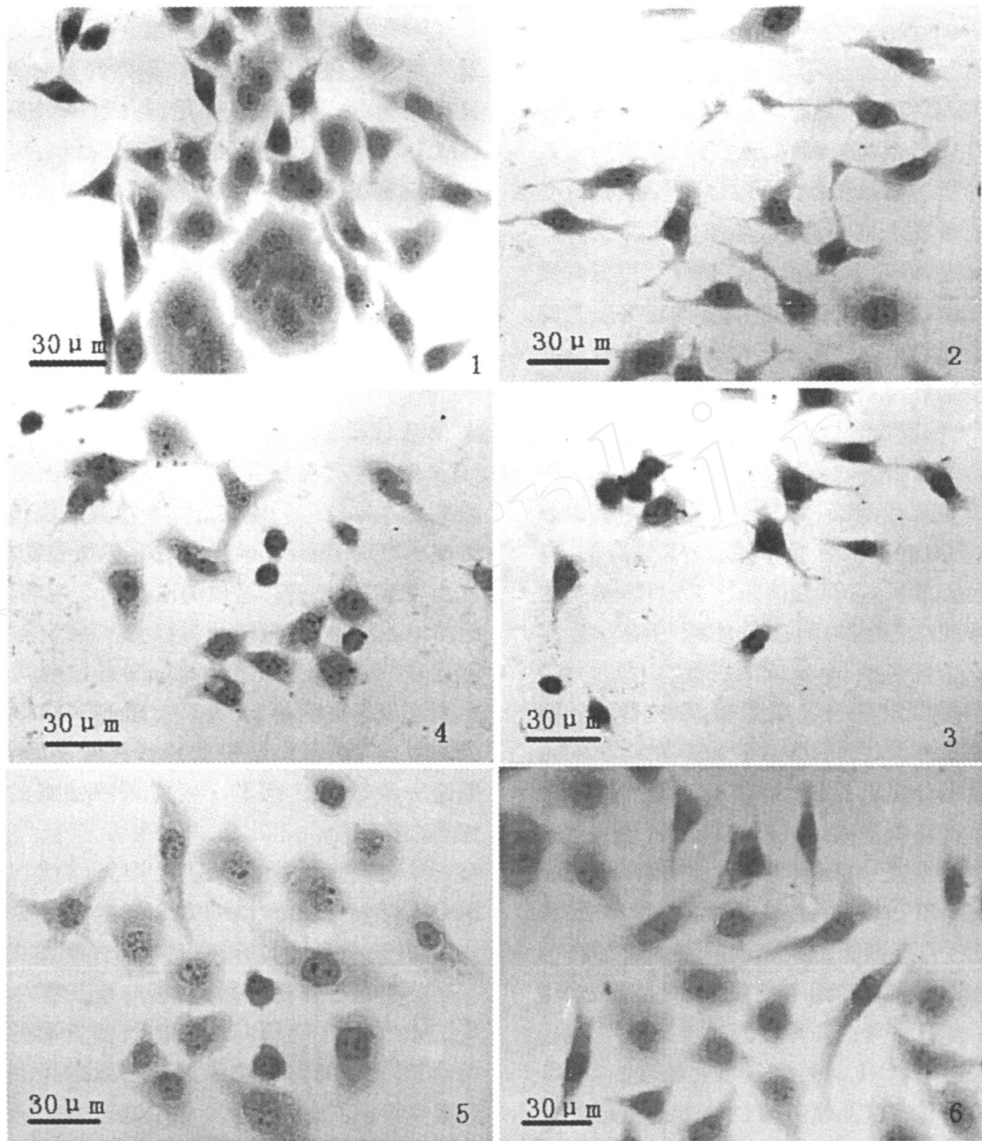
经凋亡诱导物姜黄素处理的 BGC-823 细胞形态学特征变化与 BPO-1 处理细胞相似。而经分化诱导物 HMBA 处理后细胞出现了细胞体积变大,常染色质增多,细胞质内线粒体嵴丰富,游离核糖体较多等特征,明显不同于 BPO-1 单独处理组。由此显示 BPO-1 对胃癌细胞的效应不同于肿瘤细胞诱导分化物 HMBA,而与姜黄素相似,即 BPO-1 对胃癌细胞凋亡具有显著的诱导作用。

经过 BPO-1 与姜黄素组合处理的 BGC-823 细胞也出现了趋向凋亡的形态与超微结

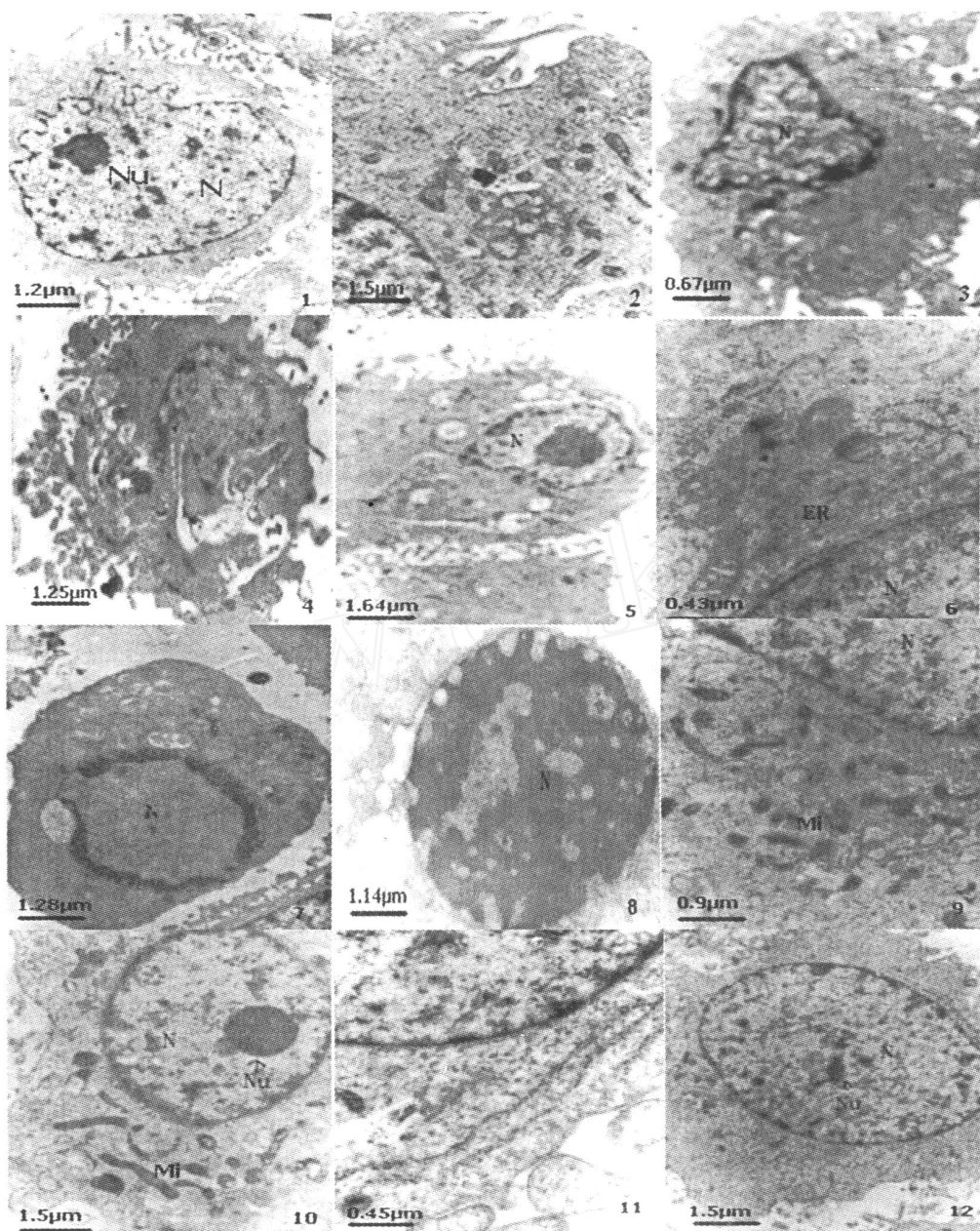
构改变,且作用效果更为明显。HMBA 与 BPO-1 组合处理的 BGC-823 细胞的形态特征类似于对照组 BGC-823 细胞而不同于分化诱导物 HMBA 单独处理组。BPO-1 与姜黄素联合处理使胃癌细胞向凋亡的方向发展且作用效果具有加成作用,以及 BPO-1 与 HMBA 组合不能促使细胞分化的现象更进一步证实了 BPO-1 对胃癌细胞的生物学效应是一种细胞凋亡作用。

姜黄素是一种已知典型的凋亡诱导物^[11,12],在肿瘤细胞凋亡研究中得到广泛应用。前人有关应用姜黄素、三氧化二砷^[13]、顺铂^[14]、5-氟尿嘧啶^[15]等凋亡诱导物对人胃癌 BGC-823、MGC-80-3、SGC-7901、白血病 HL-60 等肿瘤细胞凋亡的研究中,均报道细胞发生了异染色质增多,异染色质团块边聚使核内出现了透明区域,可见明显的致密核;细胞膜皱缩但完整,基质的电子密度增高,细胞质体积缩小,细胞器数目减少,线粒体肿胀明显,内质网网腔扩大;可见凋亡小体等变化。这与本文应用 BPO-1 处理 BGC-823 细胞的形态与超微结构变化特征完全一致,这更进一步印证了 BPO-1 对人胃癌细胞的细胞凋亡作用。

本文观察结果提示了牡蛎天然活性肽 BPO-1 对人胃腺癌 BGC-823 细胞的生物学效应,并进一步证实 BPO-1 对人胃癌凋亡具有显著的诱导作用。因此,进一步的深入研究工作不仅对于 BPO-1 在抗肿瘤方面的应用,同时对于海洋动物天然活性肽的研究均具有重要意义。



图版 :1. BGC-823;2. $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPO-1 处理的 BGC-823;3. $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素单独处理组细胞;
4. $5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素 + $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPO-1 组合处理的 BGC-823 细胞 5. HMBA 处理后 BGC-823;
6. $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HMBA + $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPO-1 处理的 BGC-823 细胞



图版 : (N:核;Nu:核仁;Mi:线粒体;ER:内质网;)

1~2: BGC-823 细胞;3~4: $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理的 BGC-823 细胞;5~6: $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素单独处理组细胞;
7~8: $5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素 + $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPO-1 组合处理的 BGC-823 细胞;
9~10: HMBA 处理后 BGC-823 细胞;11~12: $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HMBA + $30\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BPO-1 处理的 BGC-823 细胞

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 T, Michael E, Jelka M, et al. Helmut Schuhmacher. 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 tachyplestin 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 tachyplestin on the regulation of cell cycle in human hepatocellular carcinoma SMMC - 7721 cells[J]. *World J Gastroenterol*, 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] 彭远英, 彭正松, 喻可芳. 凋亡细胞的超微结构变化[J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(5): 280-283.
- [8] 李其云, 牛凤霞, 李文雁, 等. 胃癌细胞凋亡与增殖的观察[J]. 临床与实验病理学杂志, 2001, 17(3): 205-208.
- [9] 路小光, 冯秉安, 战丽彬, 等. 右旋柠檬烯诱导人胃癌细胞凋亡[J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(4): 325-327.
- [10] 芦志红, 张圣明, 李香群, 等. 中药露蜂房醇提取物对人红白血病 K562 细胞的生长抑制及凋亡诱导作用[J]. 解剖学杂志, 2004, 27(1): 18-22.
- [11] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review[J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2081-2087.
- [12] Singh S, Khar A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy[J]. *Anti-cancer Agents Med Chem*, 2006, 6: 259-270.
- [13] 陈亮, 刘晶, 黄煌. 不同浓度三氧化二砷对人胃癌 MGC-803 细胞的作用[J]. 实用预防医学, 2006, 13(4): 853-855.
- [14] 葛少华, 刘宝瑞, 钱晓萍. 顺铂与热疗联合对胃癌细胞系体外增殖抑制作用的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(3): 4-7.
- [15] 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.

(收稿日期: 2006-12-31)

《中国天然药物》是由中国药科大学与中国药学会共同主办的国家级药学学术期刊, 2003 年 5 月创刊。本刊以报道来自天然产物的活性化合物的发现与改造, 以及其药效与药理作用机制为重点, 是具有我国独特优势的中药、草药、海洋药物、生化药物、微生物药物、民族药物、民间药物进行国内外学术交流的重要窗口。本刊主要报道天然药物创新性研究成果, 辟有思路与方法、综述、论文、简报、技术交流、快报、药事法规等栏目; 登载中药学、天然药物化学、药剂学、药物分析学、药物物理学、毒理学、生物化学、微生物学、分子生物学及其相关学科的研究原著, 刊物体现了前沿性、创新性、科学性、可读性的特点。由本刊重点打造的“思路与方法”栏目由于其权威性、前沿性、启迪性而深受药学工作者喜爱。本刊是我国药学领域高水平学术期刊, 在高等院校、科研机构、制药企业、药检部门、医疗单位拥有众多读者群。

《中国天然药物》以学术质量为生命线, 国内外学术影响不断扩大。据最新《2007 版中国期刊引证报告》(中国科技信息所“万方数据库”)统计, 本刊 2006 年影响因子高达 0.957; 与 2004 年版《中文核心期刊要目总览》中收录的 15 个药学类核心期刊相比, 排名第 4 位, 基金论文比为 60%, 排名第 2 位。2007 年获全国中医药优秀期刊奖。

本刊为双月刊, A4 开本, 80 页, 铜版纸精美印刷, 逢单月 20 日出版, 国内外公开发行。国内定价每期 15 元, 全年 90 元。国际连续出版物号 ISSN: 1672-3651; 国内统一刊号: CN 32-1708/R。

地址: 南京市童家巷 24 号《中国天然药物》编辑部(邮编: 210009)

电话: 025-83271565/8; 传真: 025-83271229

电子信箱: zgtryw@sohu.com http: zgtr.chinajournal.net.cn