

# 文蛤多肽粉对人肝癌细胞 SMMC-7721的抑制作用及免疫调节作用

郑国兴, 范成成, 康劲翮, 冷波, 张剑, 王勤, 陈清西\*

(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:** 将文蛤肉以复合胰蛋白酶酶解, 经喷雾干燥工艺得到了文蛤多肽粉, 研究文蛤多肽粉对肝癌细胞的抑制作用和对昆明种小鼠的急性毒理作用和免疫调节作用, 结果显示文蛤多肽粉对体外培养的肝癌细胞 SMMC-7721具有明显的杀伤作用, 使细胞变形以至破裂从而抑制癌细胞的生长, 抗肿瘤作用明显; 文蛤多肽粉给药组的胸腺指数和脾脏指数较空白对照组明显升高, 提示文蛤多肽粉能促进小鼠胸腺和脾脏的生长发育, 增强免疫力。

**关键词:** 文蛤多肽; 抗肿瘤; 急性毒性试验; 胸腺指数和脾脏指数

中图分类号: Q 356 1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0135-03

文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 属软体动物门、双壳纲、真瓣鳃目、帘蛤科、文蛤属, 是我国滩涂传统养殖的主要贝类之一。文蛤肉营养丰富, 主要成分为: 水分 80.3% ~ 83.0%, 粗蛋白 10.5% ~ 12.6%, 粗脂肪 0.3% ~ 3.9%, 灰分 2.0% ~ 2.5%, 牛磺酸 395 ~ 652 mg/100g 文蛤核酸 3.74 ~ 4.57  $\mu\text{mol/g}$  肝糖 1.103 ~ 1.432 mg/100 g 此外, 还富含 EPA 和 DHA 等多烯不饱和脂肪酸, 以及人体易吸收的各种氨基酸和维生素等<sup>[1]</sup>。文蛤还具有很高的药用价值, 近代研究表明: 文蛤有清热利湿、化痰、散结的功效, 对肝癌、肺癌、胃癌等有明显的抑制作用。同时, 文蛤提取物对小鼠的体液免疫和细胞免疫具有明显的增强作用, 而且使用剂量较大时能够促进小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能<sup>[2]</sup>。天然存在的多肽含量小、提取困难, 而酶法降解制备的多肽具有保持和提高营养、不产生有毒物质、产品质量容易控制等优势, 它已成为制备多肽类保健品的最佳方法。在本文中, 我们采用酶解法得到文蛤多肽粉, 测定了其其对癌细胞的抑制作用和对昆明种小鼠的作用, 以为文蛤保健品的开发及应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

文蛤购于厦门市同安新店水产养殖场。肝癌细胞株 (SMMC-7721) 购自上海细胞所细胞库, 由厦门大学

生命科学学院细胞生物学实验室培养传代。RPMI-1640培养基为 Gibco 公司产品, 小牛血清为 Hycorne 公司产品。

### 1.2 文蛤细胞效应物的制备

文蛤多肽粉经 Sephadex G-15 柱脱盐后冷冻干燥, 所得产物溶于 PBS 配成浓度 10 mg/mL 的溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的微孔滤膜除菌备用。

### 1.3 细胞培养和样品对细胞效应的观察

SMMC-7721 细胞体外培养于含 10% 小牛血清和适量青霉素、链霉素 RPMI-1640 培养液中, 实验中取对数生长期细胞以  $4 \times 10^4$  细胞/mL 的浓度接种于 96 孔培养板。24 h 后换含有不同浓度文蛤多肽的培养液, 对照组细胞则换上不含样品的培养液, 37°C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养。2 d 后观察细胞形态变化并拍照。

### 1.4 胸腺指数和脾脏指数的测定

(1) 动物分组: 清洁级 KM 雄性小鼠 50 只 [由厦门大学抗癌研究中心实验动物室提供, 许可证号: SCXK(闽) 2004-0001], 每只体质量 18 ~ 22 g 随机分成 5 组即空白对照组, 环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CTX) 正对照组和文蛤多肽保健品高、中、低剂量组, 每组 10 只, 标记、编号并称重; 按移植性肿瘤研究法<sup>[3]</sup>接种 H22 实体瘤, 清洁级动物实验室饲养 [许可证号: SYXK(闽) 2004-0004]。

(2) 给药方法: 接种实体瘤后第 3 天开始给药, 连续给药 14 d。空白对照组: 小鼠灌胃 0.9% NaCl 0.3 mL/只, 每天一次; 环磷酰胺 (CTX) 正对照组: 小鼠灌胃 20 mg/mL CTX 0.1 mL/只, 4 天一次; 文蛤多肽保

收稿日期: 2008-09-22

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20063021), 厦门大学科技创新工程基金 (XDKJX20043001) 和国家基础科学人才基金项目 (J0630649) 资助

\* 通讯作者: [chengq@xmu.edu.cn](mailto:chengq@xmu.edu.cn)

健品高、中、低剂量组:小鼠分别灌胃 0.12 0.6和 0.25 g/mL文蛤多肽保健品 0.3 mL/只, 每天一次.

(3)指数的计算: 停药 24 h后处死小鼠, 取胸腺、脾, 分别称量, 计算胸腺指数 [胸腺指数 = 胸腺质量 (mg) / 体质量 (g)]和脾指数 [脾指数 = 脾质量 (mg) / 体质量 (g)].

## 2 实验结果

### 2.1 文蛤多肽粉的细胞学效应

正常的肝癌细胞 SMMC-7721呈卵圆形, 细胞之间排列紧密, 细胞通过生长连成一片, 癌细胞生长铺满时呈马赛克状排列, 轮廓较清晰, 边缘光滑, 常因相互拥挤而呈多边形扁细胞, 细胞间无接触抑制, 细胞密集生长, 多见分裂相细胞, 细胞核大且不规则, 核内常见多个核仁; 经酶解产物处理的细胞, 形态不规则出现拉丝状或呈梭形, 细胞排列没有规律, 可以看到细胞破裂后形成的细胞碎片和内含物, 结果见图 1 说明文蛤多肽粉对肝癌细胞 SMMC-7721具有明显的毒性作用, 可以在体外杀伤肝癌细胞.

### 2.2 文蛤多肽粉的免疫应答效应

胸腺指数和脾脏指数是衡量机体免疫功能的重要指标. 高剂量文蛤多肽粉给药组的胸腺指数较空白对

照组明显升高, 且剂量越大对应的胸腺越大, 具有明显的剂量效应; 高剂量文蛤多肽粉给药组的脾脏指数明显高于空白对照组, 且其脾脏指数具有剂量效应, 结果见表 1 ( $p < 0.05$ ).

## 3 讨论

癌症对生命的威胁很大, 是疾病导致死亡的头号杀手. 目前, 中国每年死于癌症的人为 140万到 150万, 而 70年代是 70万. 其中肝癌是我国常见恶性肿瘤之一, 是我国位居第二的癌症“杀手”, 因其恶性度高、病情进展快, 人称“癌中之王”. 我国每年死于肝癌约 11万人, 占全世界肝癌死亡人数的 45%. 通过 Sephadex G-25和 FPLC 层析, 本实验室已从文蛤中纯化出一种具有很强抗癌活性的多肽<sup>[4]</sup>, MALDI-TOF 质谱鉴定其分子量为 3 100 u左右. 在极低的浓度 4 μg/mL时, 该多肽对人胃癌细胞 BGC-823的抑制率就可达 60%, 且这种抑制作用呈明显的剂量效应. 观察发现, 经该多肽作用后, 胃癌细胞 BGC-823的贴壁率下降, 细胞变大变不规则, 染色发现细胞内颜色变深核模糊不清, 表明该多肽对 BGC-823细胞骨架明显的破坏作用. 同时该多肽对 SOD 酶和碱性磷酸酶有不同程度的激活作用. 进一步研究发现, 该多肽对肝癌细胞

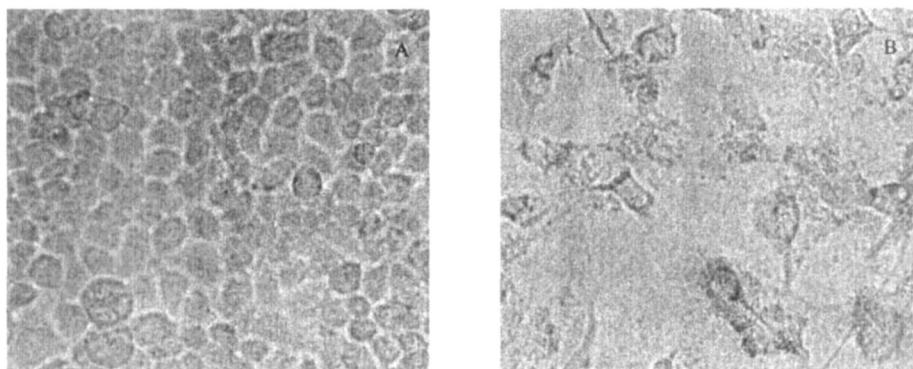


图 1 文蛤多肽粉对肝癌细胞 SMMC-7721的毒性作用  
A. 对照组; B. 1.5 mg/mL

Fig. 1 Toxicity of polypeptide health product on SMMC-7721 cell

表 1 文蛤多肽粉对 H22肝癌小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响  
Tab 1 Effect of health product on thymus index and spleen index of H22 mice

组别	剂量 / (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	动物数	胸腺指数 / (mg 10 <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	脾脏指数 / (mg 10 <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )
空白组	0.9% NaCl	10	34.7	93.2
CTX	100	10	32.5	130.9
文蛤多肽粉	1800	10	38.4	104.4
	900	10	35.2	93.9
	375	10	35	86.8

SMMC-7721 也有很强的抑制作用<sup>[5]</sup>。本文所得的文蛤多肽粉很可能含有类似该多肽的抗癌多肽,因此文中研究了文蛤多肽粉在体外对肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制,以寻求文蛤多肽粉在抑制肿瘤、预防癌症中的作用。结果表明,文蛤多肽粉对肝癌细胞 SMMC-7721 具有明显的毒性作用,可以在体外杀伤肝癌细胞,使肝癌细胞破裂分解。因此,文蛤多肽粉具有潜在的抑制肿瘤、防止肿瘤的保健功能。

胸腺作为中枢免疫器官,在人体免疫系统中居于中枢地位,有着至关重要的作用。胸腺介导 T 淋巴细胞的成熟,使机体获得了细胞免疫的重要功能。T 细胞被誉为人体健康的卫士,它在细胞免疫反应中具有重要作用,能够直接杀伤进入体内的病原微生物、肿瘤细胞和来自体内外的异物。胸腺还能产生 NK 细胞等其它具有免疫功能的物质。脾脏是机体最大的免疫器官,占全身淋巴组织总量的 25%,含有大量的淋巴细胞和巨嗜细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心。血液中抗原在脾中可引起有力的细胞免疫和体液免疫反应。脾的边缘区是免疫反应启动的重要部位。细胞免疫反应引起围动脉淋巴鞘明显的增大和免疫活性细胞输出的增多。体液免疫反应引起白髓淋巴小结和脾索中浆

细胞的增多,同时在脾脏输出血液中抗体的浓度增加。与淋巴结比较,脾中 B 淋巴细胞的比例更大,还存在有许多抗体依赖细胞毒性淋巴细胞,在特异抗体存在下可实现对靶细胞的直接杀伤作用。脾还能产生对免疫反应有调节作用的活性物质。研究发现,喂养文蛤多肽粉达到一定剂量后使 H22 肝癌小鼠的胸腺和脾脏明显增大,提示文蛤多肽粉能促进胸腺和脾脏的生长发育,提高机体的免疫功能。

### 参考文献:

- [1] 黄筱萍,刘兰,刘尧服.酶法水解文蛤肉的研究[J].食品科学,1996,17(9):21-24.
- [2] 何雅军,吴谦,朱瑞斐.文蛤多糖抗癌免疫药理作用的研究[J].中国海洋药物,1995,3:21-21.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002.
- [4] Leng B, Liu X D, Chen Q X. Inhibitory effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the BGC-823 cells and several enzymes[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1187-1190.
- [5] 冷波,康劲翮,贺量,等.文蛤多肽对体外培养人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用[J].厦门大学学报:自然科学版,2007,46(5):593-597.

## Inhibition Effect of Polypeptide from *Meretrix meretrix* on Liver Cancer Cells SMMC-7721 and Its Physiological Studies on Mice

ZHENG Guo-xing FAN Cheng-cheng KANG Jin-he LENG Bo  
ZHANG Jian WANG Q in CHEN Qing-xi\*

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

**Abstract** In this paper we got *Meretrix meretrix* peptide product using composite trypsin. By studying the inhibition of the health product on liver cancer cell, the effects on tumor in mice tumor and immune regulation were tested and the results showed that in vitro the health product could kill cancer cell SMMC-7721 obviously and make cell distortion and breaking. So it had very high biological activities of tumor inhibition. The thymus index and splenic index were obviously increased, which indicated that *Meretrix meretrix* Linnaeus polypeptide health product could promote the growth of mice thymus and spleen, and improve mice immunity.

**Key words** *Meretrix meretrix* peptide; antitumor; thymus index and splenic index