

· 快 讯 ·

文蛤多肽对体外培养人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用

冷 波, 康劲翮, 贺 量, 范成成, 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: 研究了文蛤多肽对体外培养的人肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用, 结果表明, 经 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 文蛤多肽处理的体外培养的人肝癌细胞(SMMC-7721)生长缓慢, 倍增时间延长, 细胞生长抑制率达 89.4%; 处理后的癌细胞形态发生明显改变, 处于 G_0/G_1 期的细胞明显增多, 而 S 期和 M 期细胞减少, 出现明显的凋亡峰, 凋亡率为 22.3%。实验结果表明, 文蛤多肽能有效地抑制体外培养肝癌细胞的增殖活动, 可通过改变肝癌细胞的形态及细胞周期而明显抑制细胞的增殖。

关键词: 文蛤; 多肽; 肝癌细胞; 增殖抑制

中图分类号: Q 247; Q 28

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)05-0593-05

从海洋生物中寻找和研究具有抗肿瘤活性的天然物质是目前海洋生物活性物质开发的一个重要领域, 也是抗癌药物研究的重要热点。寻找能选择性地诱导癌细胞凋亡、干预癌细胞信号传导、调控细胞增殖和分化活动的低分子肿瘤抑制物是其中的重要方向^[1-2]。海洋软体动物文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)肉质鲜美, 营养丰富, 具有极高的药用价值^[3]。不仅我国的众多医学专著中都记载有文蛤抗癌的功能, 现代生物学和医学的许多研究也表明文蛤中存在具有抗癌活性的低分子物质^[4-5]。20 世纪 60 年代, Schmeer 等人从文蛤抽提物中初步分离到一种对黑色素瘤小鼠和 HeLa 细胞均有较强抑制作用的物质, 他将这一活性物质称为“蛤素”, 并指出该物质可能是分子量小于 10 000 的多肽类物质——糖肽或小分子的核蛋白^[6]。前人的报道主要集中在对文蛤初提物的研究上, 对其中的活性成分及其作用机制缺乏进一步的探讨。我们从文蛤体内分离提取了分子量为 3 147 u 的质谱单一纯小分子多肽, 并发现它对体外培养的人胃癌细胞 BGC-823 有较强的抑制作用^[7]。本文研究了该多肽对体外培养的人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用, 以期初步探讨文蛤多肽抗癌的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材 料

文蛤于 7、8 月份在厦门大学白城市场购得。人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自上海细胞所, 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 Invitrogen 公司产品, 新生牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品。

1.2 文蛤多肽的分离提取

提取方法参照文献^[8], 应用有机溶剂抽提、Sephadex G-25、HPLC 等方法, 从文蛤体内分离提取文蛤多肽。

1.3 细胞培养和文蛤多肽的处理

SMMC-7721 细胞培养在含 10% 小牛血清和适量青霉素、链霉素以及卡那霉素 RPMI-1640 培养液中。实验中收集对数生长期细胞以 1.5×10^4 细胞/mL 的浓度接种于培养瓶, 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养 24 h 后用文蛤多肽处理。经分离纯化冻干的文蛤多肽溶解于 PBS 液中配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液, 并以培养液配制成不同浓度的作用液。实验组细胞弃旧培养液后换上含有文蛤多肽的培养液, 对照组细胞同时换上不含文蛤多肽的新鲜培养液, 连续培养后备用。

1.4 文蛤多肽抑制肝癌细胞的浓度效应测定

采用 Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT 法) 测定了文蛤多肽对体外培养的人肝癌 SMMC-7721 的细胞毒性。把培养好的肝癌 SMMC-7721 细胞用完全培养基制成单细胞悬浮液, 血球计数板计数, 按 1×10^4 个/mL 接种 200 μL 于 96 孔平底细胞培养板, 置 CO_2 培

收稿日期: 2007-03-05

基金项目: 福建省重点科技项目(2003N0052), 厦门市科技计划项目(3502Z20063021) 和厦门大学科技创新工程基金(XDKJCX20043001) 资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

养箱中, 37℃培养 1 d 后加入经完全培养基稀释的样品液, 继续培养 2 d 后取出, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液(溶于 PBS) 10 μL, 37℃反应 4 h, 加入 200 μL DMSO 溶液, 37℃充分溶解后, 用酶标仪(M 3550 型)测量吸光度, 测量波长为 570 nm. 按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

抑制强度以抑制率为 50% 时的样品浓度(IC_{50}) 表示. 以上实验重复 3 次, 取平均值绘制浓度效应图.

1.5 肝癌细胞生长曲线测定

将传代培养 3 d 的 SMMG-7721 细胞以 1.5×10^4 细胞/mL 接种于一批 10 mL 培养瓶中, 培养 24 h 后分别以 5.0 μg/mL 的文蛤多肽作用液处理. 实验处理 1~7 d, 每隔 1 d 从实验组和对照组各取 3 瓶细胞, 用苔盼蓝拒染法进行活细胞计数取平均值. 以上实验重复 3 次, 取平均值绘制生长曲线.

1.6 肝癌细胞形态及显微结构观察

同上法接种细胞于带洁净载玻片的培养皿中, 24 h 后以 5.0 μg/mL 的文蛤多肽作用液处理, 48 h 后光学显微镜下观察拍照. 将载玻片用 PBS 洗涤 2 次, 经 2.5% 戊二醛固定及系列乙醇脱水后, 在扫描电镜(Hitiach S-520)下观察细胞显微结构的改变.

1.7 细胞周期检测

同上法接种细胞于一批 10 mL 培养瓶中, 24 h 后分别以 5.0 μg/mL 的文蛤多肽作用液处理, 48 h 后按常规消化制备单细胞悬液, 1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗 2 次后加入 -20℃ 预冷的 70% 乙醇固定, 4℃ 过夜. 次日再次以 PBS 洗涤 2~3 次, 加入 0.5 mL 100 μg/mL RNase A 重悬细胞, 37℃ 温育 20 min, 之后加入 PI 染液(10 mg/mL) 4℃ 染色 30 min, 350 目绢筛过滤除去成团细胞, 在 Coulter EPICS XL 流式细胞仪上测定细胞周期, 根据所测得的 DNA 分布直方图用 Cell FIT 软件进行细胞周期统计分析.

2 实验结果

2.1 文蛤多肽抑制肝癌细胞的浓度效应

实验选用了 4 个浓度梯度来研究文蛤多肽抑制肝癌细胞的量效关系, 结果如图 1 所示. 当浓度为 0.625、1.25、2.5、5.0、10 μg/mL 时, 文蛤多肽对 SMMG-7721 的抑制率分别达到 4.9%、11.8%、22.3%、51.2% 和 66.1%. 该实验结果表明, 文蛤多肽对 SMMG-7721 的抑制作用存在显著的剂量效应关系, 其抑制率随浓度的升高而升高. 在极低浓度多肽的作

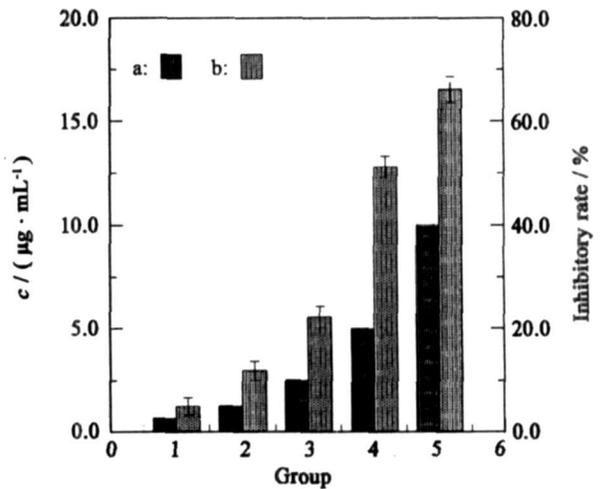


图 1 文蛤多肽对肝癌 SMMG-7721 细胞生长的影响
a: 文蛤多肽浓度(mg/mL); b: 抑制率(%)

Fig. 1 The influence of the polypeptides from *M. meretricis* on the growth of SMMG-7721 cells

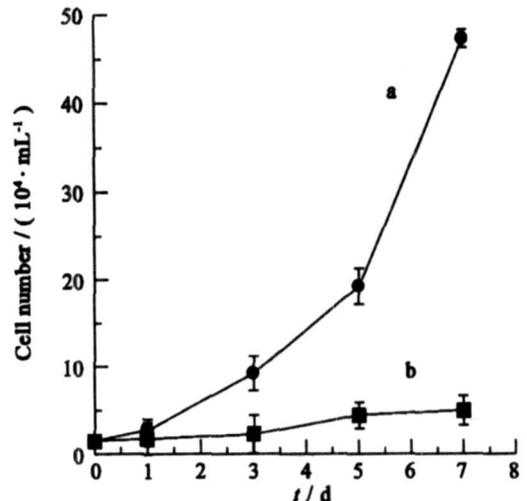


图 2 文蛤多肽对肝癌 SMMG-7721 细胞生长的影响
a: 对照组; b: 文蛤多肽处理组

Fig. 2 The influence of the polypeptides from *M. meretricis* on the growth of SMMG-7721 cells

用下, 癌细胞生长所受到的影响不大, 但当文蛤多肽浓度大于 5 μg/mL 时, 对癌细胞的抑制率便超过了 50%. 说明文蛤多肽对体外培养的人肝癌细胞 SMMG-7721 的生长具有显著的抑制作用.

2.2 文蛤多肽对肝癌 SMMG-7721 细胞生长的影响

以 1.5×10^4 细胞/mL 的密度接种癌细胞, 加入文蛤多肽后连续处理 7 d, 苔盼蓝拒染法隔天计数检测肝癌细胞 SMMG-7721 经文蛤多肽处理前后生长曲线的变化, 结果如图 2 所示. 对照组癌细胞增殖速度快, 呈现典型的指数增长模式, 培养至第 7 天, 细胞数由原来的 1.5×10^4 细胞/mL 上升至 47.25×10^4 细胞/

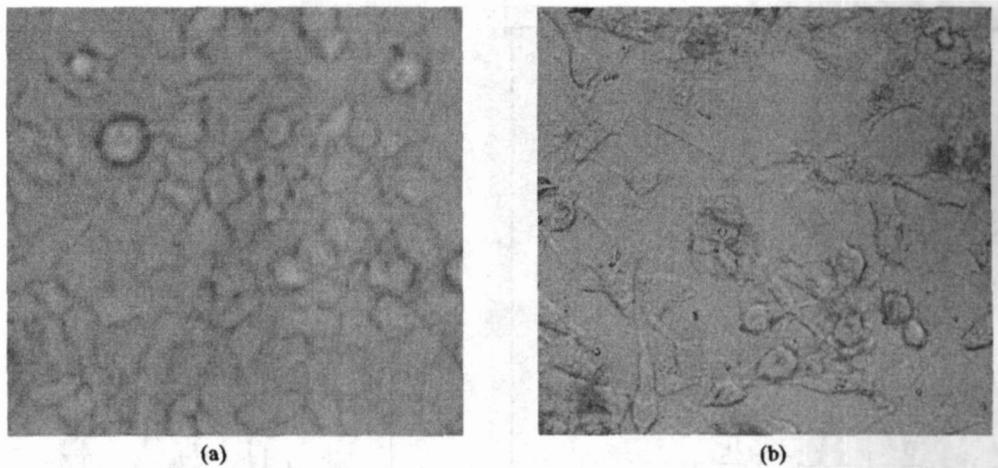


图 3 文蛤多肽对人肝癌细胞 SMMG-7721 的形态的影响

a: 肝癌细胞 SMMG-7721; b: 经文蛤多肽处理后的肝癌细胞 SMMG-7721

Fig. 3 The influence of the polypeptides from *M. meretrix* on the morphology of SMMG-7721 cells

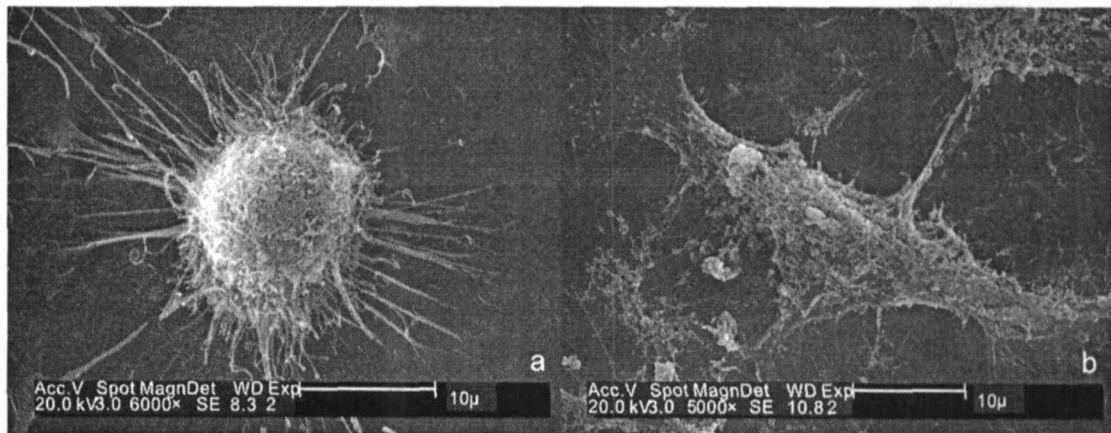


图 4 文蛤多肽处理前后人肝癌细胞 SMMG-7721 的显微结构变化

a: 肝癌细胞 SMMG-7721; b: 经文蛤多肽处理后的 SMMG-7721

Fig. 4 The influence of the polypeptides from *M. meretrix* on the microstructure of SMMG-7721 cells

mL, 为原来的 31.5 倍, 倍增时间为 32.4 h. 而经 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 文蛤多肽处理 7 d 后, 癌细胞数仅为 5×10^4 细胞/mL, 为原来 4.2 倍, 倍增时间延长至 76.8 h, 为对照组的 2.37 倍. 和对照组相比, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 文蛤多肽对 SMMG-7721 的生长抑制率高达 89.4%.

2.3 细胞形态和显微结构的变化

倒置光学显微镜下观察到的 SMMG-7721 细胞具有人肝癌细胞典型的形态特征, 生长铺满时呈马赛克状排列, 密集区常为多边形扁细胞, 而稀疏区细胞则呈圆形、卵圆形或星形, 同时较常见圆形和不规则形癌巨细胞, 细胞间无接触抑制, 多见分裂相细胞, 细胞核大且不规则, 核内常见多个核仁; 而经 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 文蛤多肽处理后的细胞外形变化明显, 呈梭形、三角形或不规则形等, 细胞体积变小, 趋于扁平铺展状态, 细胞群体数量显著稀疏, 少见分裂相细胞, 出现接触抑制现象 (如图 3 所示). 显示文蛤多肽能有效改变人肝癌

SMMG-7721 细胞形态学特征.

扫描电镜结果如图 4 所示, SMMG-7721 细胞具有球形、梭形等多种形态, 各类型细胞表面微绒毛丰富, 细胞边缘丝状伪足较多, 片状伪足较少, 其中球形细胞表面微绒毛相对更为丰富, 边缘丝状伪足较长; 而经 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 文蛤多肽处理后的细胞大多处于扁平铺展状态, 细胞体积减小, 呈棒状或颗粒状, 表面微绒毛减少, 边缘丝状伪足减少, 片状伪足增多. 表明肝癌细胞经文蛤多肽作用后表现出了一定的凋亡特征.

2.4 细胞周期的变化

利用流式细胞术检测文蛤多肽处理前后人肝癌细胞 SMMG-7721 的细胞周期变化, 结果如图 5 所示. 由图可知, SMMG-7721 细胞经 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 文蛤多肽处理 48 h 后, G_0/G_1 期细胞比例显著增加, 由原来的 49.9% 上升为 64.1%. 出现明显的凋亡峰, 凋亡率为 22.3%. 而 S 期细胞和 M 期细胞的比例则分别由原来

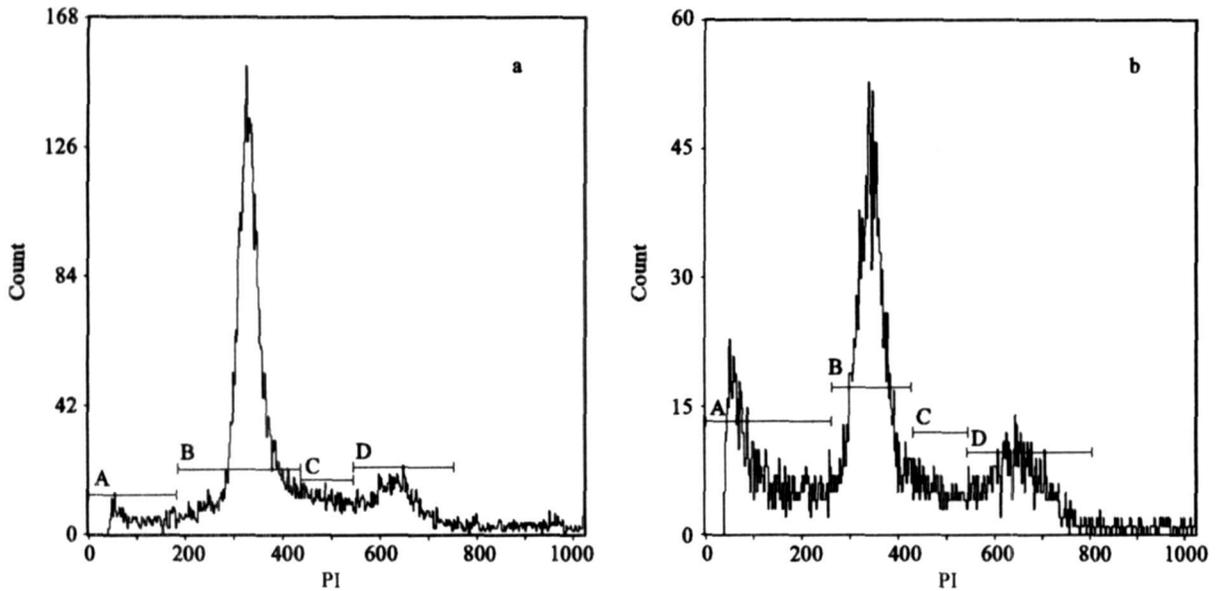


图 5 文蛤多肽 3147 对人肝癌 SMMG-7721 细胞周期分布的影响
a: 肝癌细胞 SMMG-7721; b: 经文蛤抗癌活性多肽处理后的 SMMG-7721
A: 凋亡细胞; B: G₀/G₁ 期细胞; C: S 期细胞; D: M 期细胞

Fig. 5 Effect of the polypeptides from *M. meretrix* on the cell cycle distribution of human hepatocarcinoma SMMG-7721 cells

的 12.6% 和 22.2% 降为 7.74% 和 18.6%; 表明肝癌细胞经文蛤多肽作用后细胞周期被明显阻滞于 G₀/G₁ 期, 部分细胞发生凋亡。

3 讨论

细胞凋亡现象与肿瘤的发生、发展及退化密切相关, 几乎所有的抗肿瘤药物都能诱导敏感肿瘤细胞的凋亡, 应用促进细胞凋亡的方法将是肿瘤治疗的主要途径之一。因此, 寻找能有效诱导凋亡或损伤癌细胞且对正常细胞没有损害的药物成为现今研究的热点。另一方面, 细胞持续分裂和不断增殖是癌细胞的重要特征, 考察对癌细胞增殖活动的抑制作用是鉴定外源性物质抗肿瘤作用的一项主要指标。有关文蛤的抗癌特性, 早在中国古代的众多医学宝典如《神农本草经》、《本草纲目》、《卫济宝书》、《伤寒论》、《方脉正宗》等中就有记载, 许多现代医学生物学的研究也表明文蛤能对延缓肿瘤发展和延长癌症患者生命起到一定的作用^[5], 此外, 许多研究报道还指出, 文蛤还有提高双向免疫调节能力^[10]、降糖、降血脂^[11] 等方面的作用。甚至有研究发现, 从文蛤中提取的一种新型的硫酸化 β-半乳糖具有抗 HIV 的活性^[4]。虽然 Schmeer 早就报道过文蛤提取物具有抗肿瘤活性, 但迄今未见引起国际相关学者的重视而有后续工作和系统研究报导。国内大多数的研究还停留在对文蛤初提物的研究上, 对其中的有效成分尤其是多肽及其作用机理尚缺乏深入探

讨。

本文研究结果表明, 文蛤多肽在低浓度下就能对肝癌细胞 SMMG-7721 的生长产生显著的抑制作用, 当其浓度为 5 μg/mL 时, 对癌细胞的抑制率便达到了 50%。其 IC₅₀ (1.6 μmol/L) 虽比目前广泛使用的典型抗癌药物紫杉醇的 IC₅₀ (21.6 nmol/L) 高^[12], 但却远低于其他的多肽类物质抑制癌细胞的 IC₅₀, 例如, 多数抗菌肽在浓度低于 50 μg/mL 时, 对癌细胞几乎没有作用, 以目前已知的典型代表——生物毒素蝎毒抗癌多肽为例, 其 IC₅₀ 也达到 26 μg/mL^[9]。生长曲线测定结果显示, 文蛤多肽能明显减缓体外培养的 SMMG-7721 细胞的生长, 延长其倍增时间。同时急性毒性实验结果显示, 该多肽在最大耐受剂量法的小鼠实验中表现无毒。这些结果充分表明, 文蛤多肽对体外培养的 SMMG-7721 细胞具有显著的增殖抑制作用而对正常机体无毒性反应, 从而为文蛤多肽抗肿瘤作用及其机理的深入研究提供了重要依据, 也为文蛤多肽的开发应用奠定了坚实基础。

采用光学显微镜、扫描电镜法及流式细胞技术等方法, 我们初步研究了文蛤多肽对体外培养的肝癌细胞 SMMG-7721 细胞的细胞形态、显微结构及其细胞周期的影响, 以期初步探讨文蛤多肽抗癌的分子机理。结果发现, 经文蛤多肽作用后的 SMMG-7721 不仅在形态学出现了一些凋亡特征的改变, 而且其细胞周期的正常移行也受到影响, 部分细胞发生了凋亡。结果显

示,文蛤多肽可能通过引起细胞的凋亡,进而实现了其对癌细胞的增殖抑制作用。

参考文献:

- [1] 戴秋云,黄培堂,黄翠芬.海洋生物抗癌肽研究进展[J].中国药物化学杂志,1997,7(3):223-228.
- [2] 吴久鸿,李国雄.抗癌及抗爱滋病天然药物在美国的研发现状[J].中草药,2002,33(11):1045-1049.
- [3] 丁源,丁伟,张吉德.我国药用海产贝类名录及其应用[J].海洋药物,1984,3:34-35.
- [4] Amornrut C, Toida T, Imanari T, et al. A new sulfated β -galactan from clams with anti-HIV activity[J]. Carbohydrate Research, 1999, 321: 121-127.
- [5] 陈汉源,丛笑倩,张昂,等.文蛤抽提物的抗癌研究[J].肿瘤防治研究,1980,4:3-7.
- [6] Schmeer M R. Growth-inhibiting agents from mercenaria extracts: chemical and biological properties[J]. Science, 1964, 144: 413-414.
- [7] Leng B, Liu X D, Chen Q X. Inhibitory effect of anticancer peptide from *Mercenaria* on the BG-G823 cells and several enzymes[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1187-1190.
- [8] 刘晓丹,邱陵,吴乔,等.文蛤抗癌活性多肽的生理活性研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2004,43(4):432-435.
- [9] 董伟华,孔天翰,韩飞雪,等.蝎毒抗癌多肽对4种人肿瘤细胞系的作用[J].河南医科大学学报,1999,34(1):52-55.
- [10] 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,1995,3:20-21.
- [11] 徐秀兰,李泰明,张传儒.文蛤水解液降糖及降脂作用的实验研究[J].中国生化药物杂志,1999,6:298-299.
- [12] 赵世义,马力,王祥.紫杉醇诱导肝癌细胞 SMMG-7721 凋亡的实验研究[J].肿瘤防治杂志,2002,9(3):257-259.

Effect of the Polypeptides from *Meretrix meretrix* Linnaeus on Proliferation of Human Hepatocarcinoma SMMG-7721 Cells

LENG Bo, KANG Jin-he, HE Liang, FAN Cheng-cheng, WANG qin, CHEN Qing-xi*

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

Abstract: A peptide (named as Mercenene) was isolated from *Meretrix meretrix* Linnaeus and used to treat the human hepatocarcinoma SMMG-7721 cells to investigate its effects on their proliferation, microstructure, and cell cycle. The cell proliferation and the inhibition rates were determined by cell counting methods and MTT methods, respectively. The microstructures of the cells were observed by scan electron microscope. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. It was found that the SMMG-7721 cells, after it was treated by 5.0 μ g/mL of Mercenene, grew slower than the control, their doubling time were postponed and the inhibitory rate on the cell growth was determined to be 89.4%. In the mean time, flow cytometry analysis showed that the cell proportions in G_0/G_1 phases were significantly increased and those in the S and M phase were decreased markedly. The apoptosis rate was up to 22.3%. These results indicate that Mercenene can effectively inhibit the proliferation of the human hepatocarcinoma cell line SMMG-7721 in vitro and may act as an apoptosis inducer in its antitumor effects via inducing morphological changes and cell cycle arrest.

Key words: *Meretrix meretrix* Linnaeus; polypeptides; hepatocarcinoma SMMG-7721 cells; proliferation inhibition