

文蛤多肽对体外培养宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用

张 剑, 康劲翮, 刘凤娇, 范成成,
李华亮, 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: 采用蒸馏水抽提, 有机溶剂沉淀大分子蛋白, Sephadex G-25 分子筛柱层析等技术从文蛤肉分离纯化, 得到一种低分子量的蛋白多肽, 命名为 Mer2. 实验结果表明, Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞有明显的抑制效应, Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用呈量效与时效关系. 经 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ Mer2 处理, 体外培养宫颈癌 HeLa 细胞生长缓慢, 细胞形态发生明显改变, 细胞生长抑制率达 78.1%, 并出现明显的凋亡峰, 凋亡率为 25.5%.

关键词: 文蛤多肽; 宫颈癌 HeLa 细胞; 抗癌; MTT 比色法; 凋亡

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)05-0729-04

海洋覆盖着地球表面积的 71%, 是生命的发源地. 从海洋生物及其代谢产物中筛选和提取具有特异化学结构的天然抗肿瘤活性物质成为海洋生物活性物质开发的一个重要领域. 美国 NCI 每年所筛选的约 30 000 个抗肿瘤化合物中, 约 5% 来自海洋生物, 其中发现有抗肿瘤活性的约 1%^[1]. 文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 又名花蛤, 属软体动物门、双壳纲, 是我国滩涂传统养殖的主要贝类之一. 其作为一种深受人们喜爱的海洋软体动物, 具有丰富的营养价值, 主要成分有: 粗蛋白、粗脂肪、灰分、牛磺酸、核酸、肝糖等, 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^[2]. 文蛤还有着极高的药用价值, 我国的众多医学专著中都记载其不仅具有清热利湿、化痰、散结的功效, 对肝癌、肺癌、胃癌、甲状腺肿等有明显的抑制作用, 而且还能够发挥降血糖、降血脂, 抗突变、抗衰老等多种生理功能^[3-4].

20 世纪 60 年代, Schmeer 等从文蛤抽提物中初步分离获得一种对黑色素瘤小鼠细胞有较强抑制作用的物质, 他们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^[5]. 文蛤多肽 (Mer2) 是我们实验室提取出来的一种低分子量多肽, 实验已经证明其对肝癌和胃癌有明显的抑制作用, 并对与癌细胞生长发育有关的 SOD 酶, 碱性磷酸酶有激活作用, 对酪氨酸酶

和 N-乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶有明显的抑制作用^[6-8]. 我们实验中发现该多肽对体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞有较强的抑制作用, 本文将深入研究探讨 Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用机理.

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. 宫颈癌细胞株 (HeLa) 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 Hyclone 公司产品.

1.2 Mer2 的分离提取

提取方法参照文献[9], 经过蒸馏水抽提, 有机溶剂沉淀大分子蛋白, Sephadex G-25 分子筛柱层析冷冻干燥等步骤, 从文蛤肉中分离提取 Mer2, 并将其溶解于 PBS 缓冲液中配制成浓度为 $1.0 \text{ mg}/\text{mL}$ 的母液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 并以培养液配制成不同浓度的作用液.

1.3 细胞培养

复苏的宫颈癌 HeLa 细胞培养在 10% 小牛血清和适量青霉素、链霉素 RPMI-1640 培养液中, 收集对数生长期细胞以 1.5×10^4 个细胞的浓度接种于 100 mL 细胞培养瓶, 5% CO_2 、37 °C 条件下培养.

1.4 Mer2 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的时间及浓度效应的测定

采用 Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT 法)^[10],

收稿日期: 2009-01-15

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 (XDKJXC20043001) 资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

取对数生长期的宫颈癌 HeLa 细胞, 配制成 2.0×10^4 个/mL 单细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔接种细胞 200 μ L, 培养约 24 h 后, 弃去培养液, 然后对照组每孔加入 200 μ L 新鲜的完全培养液, 实验组每孔分别加入含不同浓度 Mer2 的培养液, Mer2 终浓度分别为 5, 10, 20, 40 和 80 μ g/mL, 每个浓度重复 3 次, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 分别培养 24, 48 和 72 h 后, 弃去细胞培养液, 每孔加 180 μ L 细胞培养液和 5 mg/mL MTT 液 20 μ L, 继续培养 4 h, 弃细胞培养液, 加 DMSO 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 充分溶解后, 用酶标仪(M3550 型) 测量吸光度, 测量波长为 492 nm. 按下式计算抑制率:

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

1.5 宫颈癌 HeLa 细胞形态的观察

同上法接种细胞于 100 mL 细胞培养皿中, 培养 24 h 后, 用含 40 μ g/mL Mer2 细胞培养液处理, 继续培养 48 h 后光学显微镜下观察其形态并拍照.

1.6 细胞周期的检测

同上法接种细胞于 100 mL 培养瓶中, 培养 24 h 后, 分别用含 10, 20, 40 μ g/mL Mer2 培养液处理, 继续培养 48 h 后, 按常规消化制备单细胞悬液, 1 500 r/min 离心 5 min 收集细胞, PBS 洗 3 次后加入 70% 乙醇固定过夜, 加入 980 μ L RnaseA (100 μ g/mL) 重悬细胞, 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min, 之后加入 20 μ L PI 染液 (5 mg/mL) 4 $^{\circ}$ C 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 Mer2 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的时间及浓度效应

实验选用 5 个浓度梯度 (5, 10, 20, 40 和 80 μ g/mL) 研究 Mer2 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的时间及浓度效应关系, 结果(图 1) 表明, Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制有明显的时效和量效关系, 即随着 Mer2 作用癌细胞时间和剂量的增加, 其抑制率也在明显的增加.

2.2 细胞形态的变化

倒置光学显微镜下观察到对照组细胞平铺贴壁生长, 细胞轮廓清晰, 细胞之间排列密集, 呈不规则多角形, 细胞间无接触抑制, 多见分裂相细胞; 而经 40 μ g/mL Mer2 处理 48 h 后的细胞数量明显减少, 形态轮廓

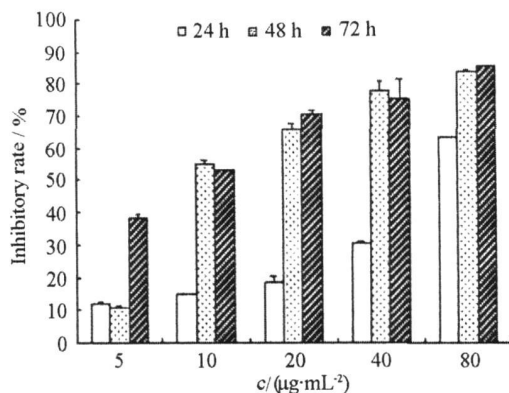


图 1 Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制效应

Fig. 1 Inhibitory effects of the polypeptides from *M. meretrix* on the proliferation of HeLa cells

变得不清晰, 细胞明显变圆, 且皱缩变形, 细胞间连接减少, 细胞脱壁而至悬浮状态. 核内染色质向核膜聚集并呈凝块状, 核处于溶解状态, 并可见到发泡的凋亡小体, 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(图 2). 光镜结果说明, Mer2 能改变宫颈癌 HeLa 细胞形态学特征, 并有效抑制细胞的生长.

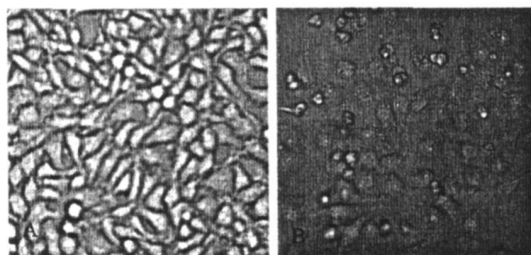


图 2 Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞的形态的影响
A. 对照; B. 经 40 μ g/mL Mer2 处理 48 h

Fig. 2 The influence of the polypeptides from *M. meretrix* on the morphology of HeLa cells

2.3 细胞周期的变化

利用流式细胞仪检测 Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞周期分布的影响, 检测结果见图 3. 与对照组相比, 经 Mer2 处理 48 h 后的宫颈癌 HeLa 细胞, 随着 Mer2 浓度增加, 亚 G_1 峰增高、增宽, 呈现出明显的凋亡峰, 凋亡率从 4.39% 分别上升为 1.44%, 17.6%, 25.5%. 表明随着 Mer2 作用浓度的增加, 细胞凋亡率也随之增大, 但细胞周期未出现明显阻滞现象, 可见 Mer2 是通过诱导细胞凋亡来抑制细胞的生长.

3 讨论

恶性肿瘤是一种发病率高、严重威胁人类健康的

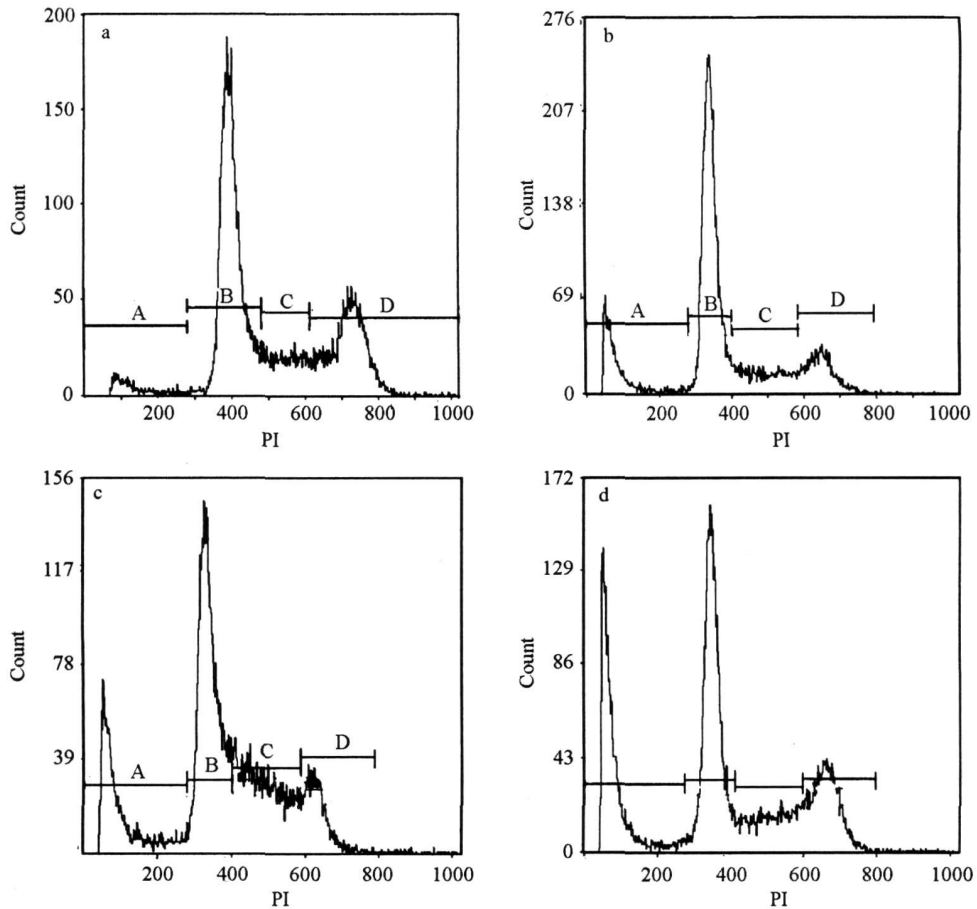


图 3 Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞周期分布的影响

a. 空白对照; b, c, d. Mer2 浓度分别为 10, 20 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 48 h

Fig. 3 Effect of the polypeptides from *M. meretrix* on the cell cycle distribution of HeLa cells

疾病. 随着肿瘤分子生物学研究的不断深入, 人们认识到肿瘤的发生、发展是一个长期的过程, 而细胞周期调控及细胞凋亡与肿瘤的发生、发展及退化密切相关. 从海洋生物中寻找诱导细胞凋亡的抗癌药物已成抗癌药物研究的发展趋势. 另一方面, 肿瘤细胞具有持续分裂增殖能力, 因此外源性物质对癌细胞增殖能力的抑制作用可以作为其抗肿瘤作用筛选指标. 利用文蛤治疗肿瘤在我国具有悠久的历史, 我国的《神农本草经》、《本草纲目》、《卫济宝书》、《伤寒论》、《方脉正宗》等著作中均有对文蛤抗肿瘤功效的相关记载. Rosarii Schmeer 于 1964 年在 Science 上报导了文蛤提取物具有抗肿瘤活性^[5]. 张铂等从文蛤中分离得到一种具有选择性杀伤肿瘤细胞功效的糖蛋白 MGP0501^[11]. 台湾学者以文蛤的肝脏为原料经有机溶剂提取, 从乙酸乙酯部分得 2 个甾醇类化合物, 具有能诱导 HL-60 细胞凋亡^[12]. 此外, 许多研究报道还指出, 文蛤具有提高双向免疫调节能力^[13]、降糖、降血脂等方面的作用^[14]. 但是国内外大多数的研究都是停留在文蛤粗提物上, 对其中的主要成份以及机理没有进一步深入的研究.

我们实验室经蒸馏水抽提, 有机溶剂沉淀大分子蛋白, Sephadex G-25 分子筛柱层析等步骤, 从文蛤体内分离提取得到一种低分子量蛋白多肽 Mer2.

细胞生物学效应的实验表明, Mer2 对宫颈癌 HeLa 细胞的生长具有明显的抑制作用, 延长其倍增时间. 并且随着 Mer2 浓度的升高、作用时间的延长, 其抑制作用也随之增强, 呈现药效和时效关系. 我们采用光学显微镜和流式细胞技术等方法, 初步研究了 Mer2 对体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞的细胞形态及其细胞周期的影响. 结果发现, 经 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mer2 作用 48 h 后宫颈癌 HeLa 细胞的体积明显变小, 变圆, 呈现皱缩变形, 细胞间连接减少, 贴壁率降低, 部份细胞脱壁而至悬浮状态, 核内染色质向核膜聚集并呈凝块状, 核处于溶解状态, 并可见到发泡的凋亡小体, 经流式细胞技术检测出明显的凋亡峰, 并且凋亡的比率随着 Mer2 浓度的增加而增加. 但是未出现明显的细胞周期阻滞现象, 表明 Mer2 可能是通过诱导细胞凋亡, 实现对癌细胞增殖的抑制作用. 为 Mer2 抗肿瘤作用及其机理的深入研究提供了重要依据, 也为 Mer2 的开发应用奠

定了坚实基础.

参考文献:

[1] 欧阳高亮,李祺福,田长海.海洋生物抗肿瘤活性物质及其作用机理研究进展[J].海洋科学,2003,27(7):21-23.

[2] 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.

[3] 魏宁,林秀坤,牛荣丽.文蛤中抗肿瘤活性物质研究概况[J].食品与药品,2007,9(11):63-65.

[4] 陈汉源,丛笑倩,张昂.文蛤抽提物的抗癌研究[J].肿瘤防治研究,1980,4:3-7.

[5] Schmeer M R. Growth-inhibiting agents from mercenaria extracts:chemical and biological properties [J]. Science, 1964,144:413-414.

[6] Leng B, Liu X D, Chen Q X. Inhibitory effects of anticancer peptide from Mercenaria on BGG-823 cells and several enzymes[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1187- 1190.

[7] 康劲翮,冷波,贺量,等.文蛤抗癌多肽对 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J].厦门大学学报:自然科学

版,2008,47(1):33-36.

[8] 冷波,康劲翮,贺量,等.文蛤多肽对体外培养人肝癌细胞 SMMC7721 的抑制作用[J].厦门大学学报:自然科学版,2007,46(5):593-597.

[9] 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.

[10] 李红艳,夏启胜,徐梅. MTT、MTS、WST-1 在细胞增殖检测中最佳实验条件的研究[J].中国康复医学杂志,2005,20(11):824-826.

[11] 张铂,吴梧桐,吴杰连.文蛤糖肽(MGP0405)的抗肿瘤活性及稳定性研究[J].药物生物技术,2006,13(1):24-27.

[12] Pan M H, Huang Y T, Chang C I, et al. Apoptotic-inducing epidioxyterols identified in hard clam (*Meretrix lusoria*)[J]. Food Chemistry, 2007, 102: 788- 795.

[13] 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.

[14] 徐秀兰,李泰明,张传儒.文蛤水解液降糖及降脂作用实验研究[J].中国生化药物杂志,1999,6:298-299.

Effect of the Polypeptides from *Meretrix meretrix* Linnaeus on Proliferation of Cervical Cancer Hela Cells

ZHANG Jian, KANG Jing-he, LIU Feng-jiao, FAN Cheng-cheng,
LI Hua-liang, 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: An anticancer peptide was purified from *Mercenaria*(*Meretrix meretrix* Linnaeus) by method of fragmentation with distilled water, organic precipitation and column chromatogram (Sephadex G-25). The anticancer peptide was obtained and named as Mer2. The antitumor activity of Mer2 was preliminarily determined with the MTT method *in vitro*. Mer2 had strong inhibitory effect on growth of Human cervical cancer cell strains Hela, in a dose-dependent manner. It was found that the Hela cells, after it was treated by 40 μg/mL of Mer2, grew slower than that of the control, and the shapes had been changed distinctly. The inhibitory rate of the cell growth was determined to be 78.1%. In the mean time, low cytometry analysis showed that the apoptosis rate of the cells was up to 25.5%.

Key words: *Meretrix meretrix* peptide; cervical cancer Hela cell; antitumor; MTT colorimetry; poptotsis