

# 文蛤多肽体外对人肺癌 A549 细胞的抑制作用

康劲翻<sup>1</sup>,任跃明<sup>2</sup>,李华亮<sup>1</sup>,范成成<sup>1</sup>,张 剑<sup>1</sup>,邱乒乓<sup>1</sup>,陈清西<sup>1</sup>

(1. 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室、厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2 中国药典委员会, 北京 100061)

**摘要:** 我们已从文蛤肉中提取得到 1 种具有抗癌活性的多肽, 命名为 Mer2 本文报道 Mer2 对体外培养的肺癌 A549 细胞的生物学效应. 采用溴化二苯偶氮盐 (MTT) 法检测 Mer2 对肺癌 A549 细胞的抑制效果, 并应用细胞形态观察法、Hoechst 荧光染色和流式细胞术等方法, 探讨了 Mer2 对细胞形态、细胞周期的影响. 结果表明, Mer2 对体外培养的肺癌 A549 细胞的生长有较强的抑制作用, 对作用含量和时间均具有一定的依赖性. Mer2 使细胞形态发生明显变化, 明显地出现凋亡峰, 但并没有出现明显细胞周期阻滞现象. 这表明文蛤多肽可能通过诱导细胞凋亡从而抑制癌细胞的生长.

**关键词:** 海洋生物学; 文蛤多肽; 抗癌; 肺癌细胞; 凋亡

DOI 10. 3969/J. ISSN. 1000-8160. 2009. 04. 006

中图分类号: Q 247; Q 28

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160 (2009) 04-0477-05

目前, 我国城市和农村肺癌的发病率一直持续上升, 肺癌以其高发病率、高转移率、高致死率, 已成为危害人们身体健康最主要的疾病之一. 肺癌的常规治疗包括: 手术治疗、放射治疗、药物化疗、免疫治疗等, 但其治疗效果没有显著地提高. 其中主要原因是肺癌生物学特性十分复杂且恶性程度高, 80% 的肺癌患者在确诊时已属晚期. 此外, 越来越多的证据表明, 肿瘤生长的主要原因不是肿瘤细胞大量增殖, 而是凋亡抑制蛋白或肿瘤促进蛋白 (例如 Bcl-2 蛋白) 等延长了已转化细胞生存期限的结果<sup>[1]</sup>. 因此, 利用药物有效诱导细胞凋亡是治疗肺癌的必选措施之一. 目前临床常用肺癌化疗药物具有毒副作用较大等缺点, 因此, 开发毒副作用小且能够有效启动肺癌细胞凋亡信号传导途径的药物是目前应解决的问题. 本实验室已从文蛤中提取得到了 1 种具有抗癌活性的多肽, 发现它在体外对人胃癌 BGC-823 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞均有显著的抑制作用, 并能激活与癌细胞生长发育有关的 SOD 酶、碱性磷酸酶, 能明显地抑制酪氨酸酶和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶的活力<sup>[2-4]</sup>. 目前, 尚未见有关文蛤多肽对人肺癌效应的研究报道. 本文研究了文蛤 (*Meretrix meretrix*) 多肽对体外培养的人肺癌 A549 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, 为其在抗肺癌药物中的应用提供理论依据.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

文蛤 (*Meretrix meretrix*) 购于厦门大学白城市场, 肺癌 A549 细胞株购自上海细胞研究所细胞库. RPMI-1640 细胞培养基购自 Gibco 公司, 小牛血清购自 Hyclone 公司.

### 1.2 文蛤多肽的制备

文蛤多肽的提取方法参照文献 [5], 从文蛤体内分离提取得到文蛤多肽 Mer2

### 1.3 细胞培养

细胞培养方法参照文献 [3].

### 1.4 MTT 法检测 Mer2 对肺癌 A549 细胞的抑制作用

参照文献 [3] 的方法, 将对数生长期的 A549 细胞以  $1 \times 10^4$  个 /  $\text{cm}^3$  的密度分别接种于 96 孔板中, 每孔

收稿日期: 2009-03-25

基金项目: 厦门市科技计划资助项目 (3502Z20063021); 厦门大学科技创新工程基金资助项目 (XDKJCX20043001)

作者简介: 康劲翻 (1982 ~), 女, 博士研究生.

通讯作者: 陈清西, 男, 教授 (博导); E-mail: chenqx@xnu.edu.cn

200mm<sup>3</sup>,在 37 条件下培养 24h 加入不同含量的 Mer2 溶液,继续培养至一定时间后,每孔加入 20mm<sup>3</sup> 含量为 5mg/cm<sup>3</sup> 的 MTT 溶液,在 37 条件下放置 4h 然后,加入 150mm<sup>3</sup> DMSO 溶液,在 37 下充分溶解后测定 OD<sub>570nm</sub> 值.实验重复 3 次,取平均值.按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = [(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{实验}}) / OD_{\text{对照}}] \times 100$$

### 1.5 肺癌 A549 细胞形态观察

以  $1.5 \times 10^4$  个/cm<sup>3</sup> 的细胞密度,接种对数生长期的 A549 细胞于培养皿中.培养 24h 后,以不同含量的 Mer2 溶液处理.对照组则以相应体积的 PBS 溶液处理,48h 后在光学显微镜下观察细胞.

### 1.6 Hoechst 染色

接种对数生长期的 A549 细胞于带洁净盖玻片的六孔板内.培养 24h 后,分别加入含量为 10、20、30 μg/cm<sup>3</sup> 的 Mer2 溶液.处理至预定时间后,用 PBS 溶液洗涤.加入少量固定液(甲醇 冰乙酸 = 3 1),固定 15min 经 PBS 溶液洗涤后,滴加 10μg/cm<sup>3</sup> Hoechst 33258 液,在室温孵育 10min,滴加少量甘油,于荧光显微镜下观察并拍照.实验重复 3 次.

### 1.7 测定细胞生长曲线

以  $5 \times 10^4$  个/cm<sup>3</sup> 的细胞密度接种细胞于培养瓶中,24h 后加入 Mer2 溶液.隔日换上新鲜培养液,其中处理组中的新鲜培养液含有相应含量的 Mer2 溶液.加药处理后 7d 内每天分别取 3 瓶对照组和处理组细胞,应用苔盼蓝染色法进行细胞计数,取平均值.

### 1.8 细胞周期检测

以  $1 \times 10^5$  个/cm<sup>3</sup> 的细胞密度将对数生长期细胞接种于一批培养瓶中.24h 后分别加入 10、30μg/cm<sup>3</sup> 的 Mer2 溶液,同时以加入同体积的 PBS 溶液作为对照.培养一定时间后获取细胞,用 PBS 溶液洗涤.加入 70% (V/V) 冷乙醇固定后重新收集细胞,用 PBS 溶液洗去固定液.加入含量为 100μg/cm<sup>3</sup> 的 RNase A 溶液 1cm<sup>3</sup>,在 37 下放置 30min 然后,加入 P 染液,使其终含量为 50μg/cm<sup>3</sup>,在 4 下放置 30min,经 300 目绢筛过滤.用流式细胞仪测定细胞周期,采用 Cell FIT 软件统计分析.

## 2 实验结果

### 2.1 Mer2 对肺癌 A549 细胞的抑制作用

当 Mer2 的含量分别为 10、20、30、40、50、60μg/cm<sup>3</sup> 时,不同含量的 Mer2 对肺癌 A549 细胞不同时间后的增殖抑制率(%)见图 1.结果表明作用时间为 48h 时,当 Mer2 的含量为 40μg/cm<sup>3</sup>,其对肺癌 A549 细胞的抑制率便超过了 50%;而当 Mer2 的含量为 60μg/cm<sup>3</sup>,抑制率达到 79.73%;当 Mer2 的含量为 60μg/cm<sup>3</sup>,分别作用 24、48、72h 后,对细胞的抑制率分别为 44.61%、79.73%、91.98%.可以看出 Mer2 对肺癌 A549 细胞

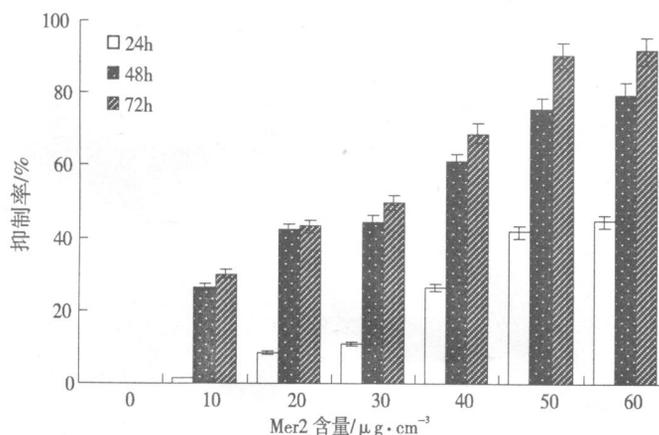


图1 Mer2对肺癌A549细胞的抑制效应

Fig. 1 Inhibitory effect of Mer2 on the lung adenocarcinoma A549 cells

的抑制作用具有一定的时间依赖性,其抑制强度对 Mer2 的含量也存在着一一定的依赖性.当 Mer2 含量升高和作用时间延长时,A549 细胞的存活率显著下降 ( $p < 0.05$ ).

## 2.2 细胞形态的变化

我们通过倒置光学显微镜对肺癌 A549 细胞形态进行了观察,实验结果表明 Mer2 对 A549 细胞有一定的杀伤作用(图 2).在未给药组,细胞形态完整,大小均匀,轮廓清晰,生长旺盛,均为贴壁生长,细胞之间没有接触抑制现象,说明细胞状态很健康.而经含量为  $30\mu\text{g}/\text{cm}^3$  的 Mer2 溶液处理 48h 后,可以发现 A549 细胞形态明显发生改变,细胞体积减小,出现变圆、皱缩等现象,细胞数量急剧减少,视野中几乎没有活细胞存在.光镜结果表明肺癌 A549 细胞能被 Mer2 有效地抑制生长,并且形态发生明显变化.

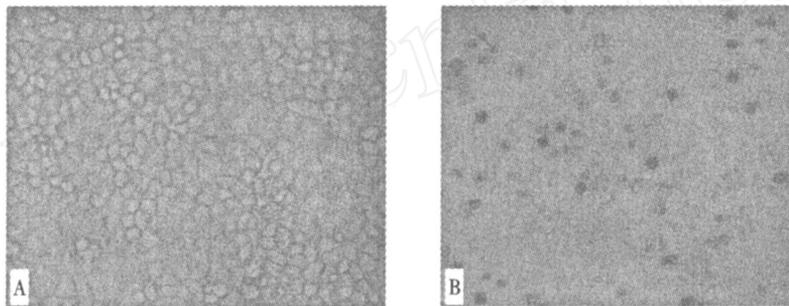


图 2 Mer2 对肺癌 A549 细胞形态的影响 (48h,  $\times 100$ )

Fig 2 Morphology change of lung adenocarcinoma A549 cells treated with Mer2

A: 对照组, B: Mer2 含量为  $30\mu\text{g}/\text{cm}^3$

## 2.3 Hoechst 染色细胞形态的观察

我们采用 DNA 特异结合染料 Hoechst 33258,在荧光显微镜下观察了肺癌 A549 细胞经含量为  $30\mu\text{g}/\text{cm}^3$  的 Mer2 溶液处理 48h 后细胞核的变化,用于鉴定细胞是否发生凋亡,结果如图 3 所示.经 Hoechst 33258 染色后,未经 Mer2 处理的对照组细胞呈弥散均匀的蓝色荧光,没有观察到染色质凝聚的现象.而经 Mer2 处理的细胞核染色质浓缩、凝聚,密度升高,细胞核被致密浓染,出现发白的颜色,提示细胞死亡经历了凋亡的过程.

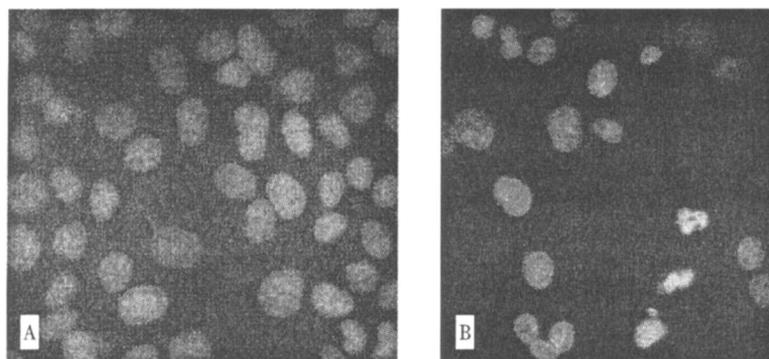


图 3 Mer2 对肺癌 A549 细胞核染色质形态变化的影响 (48h,  $\times 400$ )

Fig 3 Morphology change of lung adenocarcinoma A549 cells treated with Mer2

A: 对照组, B: Mer2 含量为  $30\mu\text{g}/\text{cm}^3$

## 2.4 肺癌 A549 细胞生长曲线的测定

细胞生长曲线检测结果如图 4 所示.未经 Mer2 处理的对照组细胞呈现指数增长,以较快速度生长,当接种细胞数为  $5 \times 10^4$  个  $/\text{cm}^3$  时,到第 7 天,细胞数目扩大了 25.55 倍,增长至  $127.75 \times 10^4$  个  $/\text{cm}^3$ .当 Mer2 的含量为  $30\mu\text{g}/\text{cm}^3$  时,肺癌 A549 细胞生长状态受到明显的抑制 ( $p < 0.05$ ),实验组的细胞数明显低于同一时

要点的对照组细胞数,到第7天时,细胞数增长至  $40.50 \times 10^4$  个 /  $\text{cm}^3$ . 这一结果说明 Mer2对肺癌 A549细胞生长有显著的抑制作用.

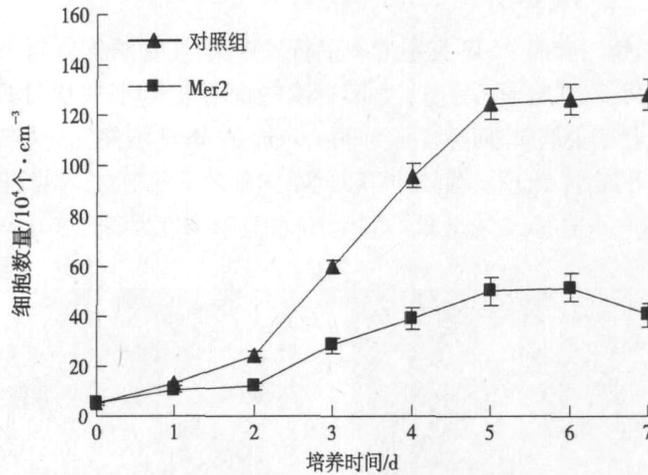


图4 Mer2对肺癌A549细胞生长的影响

Fig. 4 Effect of Mer2 on growth of lung adenocarcinoma A549 cells

### 2.5 细胞周期的检测结果

肺癌 A549细胞经 Mer2作用后,  $G_1$  期前出现亚二倍体峰即凋亡峰,且明显高于对照组(表 1). 与对照组相比,当 Mer2含量为  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  和作用时间分别为 24、48、72h时,随着处理时间的延长,  $G_0/G_1$  期细胞减少,其占比从原来的 68.2%分别降至 59.4%、45.8%、37.0% ( $p < 0.05$ );亚  $G_1$  峰的峰面积逐渐增加,凋亡率从 7.76%分别上升至 18.0%、25.5%、28.5% ( $p < 0.05$ ). 当 Mer2含量为  $30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  和作用时间分别为 24、48、72h时,  $G_0/G_1$  期细胞占比也随着处理时间的延长而降低,由对照组的 68.2%分别降至 45.9%、21.9%、14.0%;凋亡率也不断提高,由对照组的 7.76%分别上升至 21.7%、62.5%、75.0% ( $p < 0.05$ ). 这表明肺癌 A549细胞经 Mer2作用后,周期发生了明显变化,当 Mer2的含量增高和作用时间延长时,细胞凋亡率也不断增高,但并没有出现明显的细胞周期阻滞现象. 这表明 Mer2可能通过诱导细胞凋亡从而抑制癌细胞的生长.

表 1 Mer2对肺癌 A549细胞周期的影响

Tab 1 Effect of Mer2 on the cell cycle of lung adenocarcinoma A549 cells

Mer2含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	作用时间 / h	细胞周期 / %			
		亚 $G_1$ 期	$G_1/G_0$	S	$G_2/M$
0(对照组)	48	7.76 ± 1.5	68.2 ± 1.3	12.0 ± 1.5	10.8 ± 1.8
10	24	18.0 ± 2.3	59.4 ± 2.3	10.3 ± 2.6	11.2 ± 3.5
	48	25.5 ± 1.5	45.8 ± 3.6	17.7 ± 3.4	10.1 ± 3.6
	72	28.5 ± 5.3	37.0 ± 4.8	11.2 ± 3.5	13.8 ± 2.6
30	24	21.7 ± 1.5	45.9 ± 1.8	10.3 ± 1.9	21.6 ± 2.5
	48	62.5 ± 3.6	21.9 ± 4.5	4.94 ± 4.2	9.48 ± 4.5
	72	75.0 ± 5.2	14.0 ± 5.1	5.63 ± 4.5	5.06 ± 4.9

### 3 讨论

细胞凋亡能够维持组织恒定性,在细胞生理调控上起着很重要的作用. 细胞凋亡在正常细胞分裂情况下能除去损伤、分裂不完全及老化的细胞,免疫过程中能清除活化参与免疫反应的淋巴细胞. 同时,细胞凋亡也会清除不正常增生细胞及突变的细胞,以对抗肿瘤的形成<sup>[6]</sup>. 细胞凋亡现象与肿瘤的发生、发展与消退关系密切,诱导癌细胞走向凋亡对于癌症的预防及治疗具有非常重要的意义. 诱导肿瘤细胞凋亡已成为寻找抗肿瘤

瘤药物的新靶点和评价疗效的一项新指标.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当今研究的热点之一.

我们实验室已有的实验结果表明,经含量为  $10\mu\text{g}/\text{cm}^3$  的文蛤活性肽(Mer2)作用 48h后,BGC-823细胞数量减少,细胞生长抑制率达 50%. SMMC-7721细胞经含量为  $5\mu\text{g}/\text{cm}^3$  的文蛤活性肽处理后,细胞生长缓慢,倍增时间延长,细胞生长抑制率达 89.4%,细胞生长周期也发生变化,出现凋亡峰,凋亡率为 22.3%;且这 2种细胞的形态和结构均出现明显改变.本文研究结果表明,Mer2对肺癌 A549细胞具有较好的抑制作用,并且该抑制作用具有一定的时间依赖性,对 Mer2的含量也存在着一定的依赖性. Mer2对 A549细胞抑制作用随着含量的增加和作用时间的延长而不断地增强.生长曲线测定结果显示,Mer2能明显地减缓体外培养的 A549细胞的生长.光学显微镜、Hoechst荧光染色和流式细胞术等的研究结果也表明,经 Mer2处理后的肺癌 A549细胞的体积变小,出现变圆、皱缩等现象,细胞数量急剧减少,视野中几乎没有活细胞存在,经 Hoechst染色时其核染色质浓缩、凝聚,密度升高,细胞核被致密浓染,呈现发白的颜色,出现凋亡特征.流式细胞术的检测发现了凋亡峰,说明部分 A549细胞已发生了凋亡,但是未出现明显的细胞周期阻滞现象.这说明 Mer2对癌细胞的抑制作用具有一定的广谱性,能诱导细胞凋亡.推测 Mer2可能是通过诱导细胞的凋亡,从而对癌细胞的增殖产生抑制作用.这些结果为进一步研究文蛤活性多肽抗肿瘤的作用机理奠定了基础,也为文蛤活性多肽的开发应用提供了重要依据.

#### 参考文献:

- [1] Reed J C. Dysregulation of apoptosis in cancer[J]. J Clin Oncol, 1999, 17: 2 941-2 953.
- [2] Leng B, Liu X D, Chen Q X. Inhibitory effect of anticancer peptide from *Meretrix meretrix* on the BGC-823 cells[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1 187-1 190.
- [3] 冷波,康劲翻,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.
- [4] 康劲翻,冷波,贺亮,等.文蛤抗癌多肽对 N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J].台湾海峡, 2008, 27(1): 33-36.
- [5] 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.
- [6] Vaux D L, Haeccker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis[J]. Cell, 1994, 76: 777-779.

## Effect of peptide from *Meretrix meretrix* on the human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro

KANG Jin-he<sup>1</sup>, REN Yue-ming<sup>2</sup>, LI Hua-liang<sup>1</sup>, FAN Cheng-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, QIU Ping-ping<sup>1</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Pharmacopoeia Committee, Beijing 100061, China)

**Abstract:** An anticancer peptide named as mer2 was purified from *Meretrix meretrix*. In this paper, we investigated its biological effect on the lung adenocarcinoma A549 cells. The effect of Mer2 on the growth of A549 cells was detected by MTT assay, and the morphology and the cell-cycle of cells were detected by optical microscope, Hoechst staining and flow cytometry. The results showed that Mer2 inhibited the growth of A549 cells in a dose- and time-dependent manner and cell morphology changed distinctly, showing an obvious apoptosis properties. It indicated that the inhibitory effect of the peptide on cells had a relationship with the cell apoptosis.

**Key words:** marine biology; *Meretrix meretrix* peptide; anticancer; lung adenocarcinoma cells; apoptosis

DOI 10. 3969/J. ISSN. 1000-8160. 2009. 04. 006

(责任编辑:郭水伙)