

河蚬提取物对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用

邱乒乓¹, 戴燕燕¹, 李华亮¹,
康劲翮¹, 李文岗^{2*}, 陈清西^{1*}

(1. 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;

2. 福建医科大学附属厦门第一医院, 福建 厦门 361004)

摘要: 以河蚬 (*Corbicula fluminea*) 为材料, 经过甲醇抽提、乙酸乙酯萃取等方法得到河蚬提取物 (CFE)。用 MTT 法检测其对肝癌细胞株的抑制作用, 借助光学倒置显微镜以及流式细胞术考察 CFE 对细胞的形态及细胞周期的影响。实验结果表明: CFE 对肝癌细胞 SMMC-7721 有增殖抑制作用, 处理 72 h 细胞形态发生了明显变化, 其 IC_{50} 值为 $70 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。FMC 的结果显示, 经 CFE 处理后的肝癌 SMMC-7721 细胞出现明显的凋亡峰。这说明 CFE 有效抑制了体外培养的肝癌细胞增殖, 并且能够改变癌细胞的形态及细胞周期的分布, 诱导癌细胞出现凋亡。

关键词: 河蚬; 肝癌细胞; 增殖抑制; 凋亡

中图分类号: Q 247; Q 28

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)03-0406-04

海洋及江河、湖泊中蕴藏的生物资源为人类提供了众多功能独特和生理活性很强的活性物质。目前人们已从海绵、海鞘、海兔、海藻、珊瑚等生物中分离获得大量具有抗肿瘤活性的物质, 包括肽类、多糖及其衍生物、大环内酯类、生物碱类、萜类、多聚乙酰类、多烯醚类等多种化合物。河蚬 (*Corbicula fluminea*) 又称黄蚬、金蚬、扁螺等, 广泛分布于世界各地水域, 自然资源丰富。作为中药的药材, 河蚬具有去湿毒、治疗肝病、麻疹、退热、止咳化痰、解酒等功效^[1]。Huang 等^[2]发现河蚬的乙酸乙酯抽提物对 HL-60、U937 和 Hep G2 细胞有抑制作用, 并能引起 HL-60 的细胞凋亡。祝雯等^[3]从河蚬中分离纯化了一种糖蛋白, 命名为 CFp-a, 其具有诱导人肝癌细胞 BEL 7404 凋亡的作用。但目前有关河蚬活性成分的研究尚未深入。福建省河蚬养殖的历史悠久, 资源丰富。对河蚬活性成分的提取和研究将有利于提高河蚬养殖的经济效益, 促进养殖业的发展。作者采用生化分离技术得到河蚬提取物 (CFE), 运用倒置显微镜观察法、MTT 法和流式细胞术初步研究了其体外抑制肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖和诱导凋亡的作用, 为河蚬保健和药用价值的深度开发提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

河蚬购于厦门大学菜市场; 人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自上海细胞所, 由本实验室培养传代; RPMI-1640 培养基为 Invitrogen 公司产品; 新生牛血清为 Hyclone 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 河蚬活性物质的提取

参照文献[2], 取蚬肉, 用 4 倍体积的 50% 甲醇抽提 3 次, $6\ 800 \times \text{g}$ 离心 20 min, 得上清, 经过减压旋转蒸发后, 用乙酸乙酯萃取。再将得到的乙酸乙酯相 (CFE) 在 55℃ 下减压旋转蒸发, 然后通过冷冻干燥制成干粉。

1.2.2 细胞培养

参考文献[4-6]方法, 人肝癌 SMMC-7721 细胞培养基为 RPMI-1640 全培液 (含 10% 小牛血清、1% 青霉素和链霉素)。细胞接入 100 mL 培养瓶中, 在 37℃、5% CO_2 饱和湿度环境下培养、传代, 以备实验使用。

1.2.3 MTT 法测定河蚬提取物 CFE 对肝癌细胞生长的影响

将培养好的肝癌 SMMC-7721 细胞按 1×10^4 个/mL 分别接种于 96 孔平底细胞培养板, 每孔 200 μL , 置 CO_2 培养箱中, 37℃ 培养 1 d 后分别加入经完全培养基稀释的 CFE, 空白对照为相同体积 RPMI-1640 培养液, 继续培养 24、48、72 h 后每孔加入 5 mg/mL 的

收稿日期: 2008-08-25

基金项目: 国家基础科学人才培养基金 (J0630649), 厦门市科技计划项目 (3502Z20063021), 厦门市卫生局资助项目 (WSK0602) 资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn; lwg1186@163.com

MTT 溶液(溶于 PBS)20 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h,弃上清液,每孔加入 200 μL DMSO,37 $^{\circ}\text{C}$ 充分溶解后,用酶标仪测量吸光度,测量波长为 490 nm.按下式计算抑制率

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

1.2.4 流式细胞术测定河蚬提取物 CFE 对肝癌细胞周期的影响

将培养 3 d 的 SMMC-7721 细胞按约 1×10^5 个/mL 接种于一批 100 mL 培养瓶中,24 h 实验组分别用 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CFE 处理,对照组以相应体积的 PBS 处理.培养 24 h 后收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 次后加入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70%乙醇固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜.次日再以 PBS 洗涤 2~3 次,加入 1 mL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A 重悬细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,之后加入 PI 染液(10 mg/mL)4 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min,300 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 实验结果与分析

2.1 河蚬提取物 CFE 对肝癌细胞形态的影响

倒置光学显微镜下观察到对照组肝癌 SMMC-7721 细胞具有人肝癌细胞典型的形态特征(图 1A).细胞生长较密集区的癌细胞常因相互拥挤而呈多边形,而在生长稀疏部位则多见圆形、卵圆形、星形和不规则形癌细胞,细胞间无接触抑制.而经 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CFE 处理 48 h 后,肝癌细胞数量减少,体积变小,细胞变圆、皱缩,贴壁性变差(图 1B).

2.2 MTT 法测定河蚬提取物 CFE 对肝癌细胞的作用

将肝癌 SMMC-7721 细胞按 1×10^4 个/mL 分别接种于 96 孔平底细胞培养板,每孔 200 μL ,置 CO_2 培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d 后,分别加入不同浓度的 CFE,空白对照为相同体积 RPMI1640 培养液,观察分别培养 24、48 和 72 h 后癌细胞的剩余活细胞的相对数量,结果如图 2 所示.表明 CFE 对肝癌 SMMC-7721 细胞有明显的抑制作用,并显示出对剂量和时间的依赖效应,其抑制率随浓度的升高而升高,抑制作用随时间的延长而增强.不同浓度的 CFE(25、50、75、100、125、150、175、200、225 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用于 SMMC-7721 细胞 24、48 和 72 h 后,各用药组的细胞生长抑制率分别为 3%~73%、7%~79%和 29%~80%.当用 CFE 处理 48 h 后,对肝癌 SMMC-7721 细胞的 IC_{50} 为 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$.72 h 后,CFE 对肝癌 SMMC-7721 细胞的 IC_{50} 为

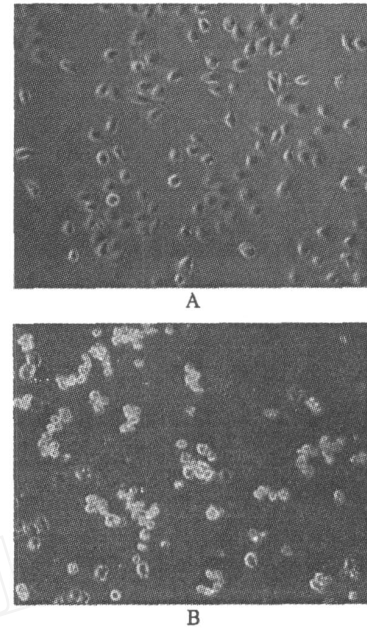


图 1 CFE 对肝癌 SMMC-7721 细胞形态的影响
A. 对照组;B. 处理组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48 h)

Fig. 1 The influence of CFE on the morphology of SMMC-7721 cells

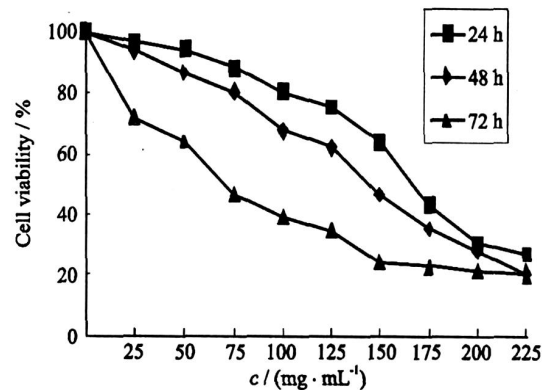


图 2 CFE 对肝癌 SMMC-7721 细胞生长的影响

Fig. 2 The effect of CFE on the growth of SMMC-7721 cells

70 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3 河蚬提取物 CFE 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期的影响

利用流式细胞术检测 CFE 对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期分布的影响.根据谱图检测结果,计算细胞周期的分布情况,结果总结于表 1.与对照组相比,经不同浓度 CFE(50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 24 h 后,FCM 结果显示了明显的亚“ G_1 ”凋亡峰,亚“ G_1 ”期细胞百分率分别增加了 42.68%和 75.48%,而 S 期细胞的比例分别下降了 4.34%和 8.54%,M 期细胞的比例则分别下降了 18.41%和 18.91%.以上结果说明

CFE 能够将细胞阻止于 G₀/G₁ 期,并能够诱导 G₀ 期细胞产生凋亡,且不同浓度的 CFE 作用于 SMMC-7721 细胞时,细胞凋亡率呈一定的剂量关系。

表 1 河蚬提取物 CFE 对人肝癌 SMMC-7721 细胞周期分布的影响

Tab. 1 Effect of CFE on cell cycle distribution of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells

时间/ h	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞周期/ %			
		亚 G ₁ 期	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	0	2.32	65.5	10.3	19.8
24	50	45.5	46.7	5.96	1.39
24	100	77.8	19.7	1.46	0.89

3 讨论

水生贝类不但营养丰富,味道鲜美,还具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、增强机体免疫功能等作用^[7]。从硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria* Linnaeus) 中分离出的“鲍灵”(paolin);从文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 中提取的蛤素 (mercenene) 对肿瘤和白血病有预防和抑制作用;从虾夷盘扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 分离的多肽、糖蛋白都有抗癌作用。从蓝贻贝 (*Mytilus edulis*) 和地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 中分离到了抗菌肽系列 defensin, mytilin, myticin 和 mytimycin 等^[8-10]。

祝雯^[3]等以 Blue Spherose 6 fast flow 亲和层析为主,结合硫酸铵分级沉淀,阳离子交换层析和 HPLC 分离纯化体系从河蚬中分离纯化了糖蛋白 CFP-a,采用 MTT 法检测其对 BEL 7404 细胞生长抑制作用,作用 72 h 后,IC₅₀ 为 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Huang 等^[2]用乙酸乙酯抽提得到混合物,通过 MTT 法检测,作用 6 h 后,该混合物对 Hep-J2 和 MCF-7 细胞没有明显作用;而对 HL-60、U937 和 Hep G2 细胞有抑制作用,IC₅₀ 分别为 250、350、850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

通过 50% 甲醇抽提,及乙酸乙酯萃取的方法从河蚬中得到的提取物 CFE 具有抗癌活性。利用 MTT 染色、倒置光学显微镜和流式细胞术,体外研究 CFE 的细胞生物学效应。结果表明,CFE 对肝癌 SMMC-7721 细胞具有抑制作用,并且抑制效应存在显著的剂量效应关系和时效关系,处理 48 h,IC₅₀ 值为 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理 72 h,IC₅₀ 值为 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。经 CFE 处理后的肝癌 SMMC-7721 细胞形态发生显著变化,细胞体积变小,

发生严重皱缩现象。处理后的肝癌 SMMC-7721 细胞的周期发生变化,出现明显的凋亡峰。说明河蚬乙酸乙酯萃取物 CFE 对体外培养的肝癌细胞具有较显著的抑制作用。Pan Min-Hsiung 等^[11]通过乙酸乙酯萃取,硅胶柱层析和 HPLC 分离纯化体系从丽文蛤中分离出了环二氧甾醇类物质,其具有诱导 HL-60 细胞凋亡的作用,因此河蚬提取物 (CFE) 中的抗肿瘤有效成分也可能为甾醇类物质。河蚬提取物 CFE 的活性成分鉴定及其诱导癌细胞凋亡的分子机制还需在今后的工作中进一步探讨。

感谢韩鹏和练惠辉参加部分实验。

参考文献:

- [1] 万德光,吴家荣. 药用动物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993:45-47.
- [2] Huang Y T, Huang Y, Hour T C, et al. Apoptosis-inducing active components from *Corbicula fluminea* through activation of caspase-2 and production of reactive oxygen species in human leukemia HL-60 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44:1261-1272.
- [3] 祝雯,林志铿,吴祖建,等. 河蚬糖蛋白对人肝癌细胞凋亡的影响[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(6):674-675.
- [4] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及应用[M]. 北京:科学出版社,1990:1-268.
- [5] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:10-40.
- [6] Monsmann F. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. J Immunol Methods, 1983, 65:55-63.
- [7] Ireland C M. Biomedical potential of marine natural products[M]// Marine Biotechnology. New York and London: Plenum Press, 1993.
- [8] Li C P. Antiviral activity of paolins from clams[J]. Ann N Y Acad Sci, 1965, 130(1):374-381.
- [9] 杜卫,刘晓萍,梁惠,等. 扇贝多肽对淋巴细胞的保护作用 and 反相液相色谱分析[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(5):27-29.
- [10] Takuma S, Hiroyuki U, Noriko A. Antitumor activity and immunomodulatory effect of glycoprotein fraction from scallop patinopecten yessoensis[J]. Nippon Susan Gakkaishi, 1987, 53(2):267-272.
- [11] Pan M H, Huang Y T, Chang C I, et al. Apoptotic-inducing epidioxysterols identified in hard clam (*Meretrix lusoria*) [J]. Food Chem, 2007, 102:788-799.

Inhibition Effect of *Corbicula fluminea* Extract on Human Hepatocarcinoma SMMC-7721 Cells

QIU Ping-ping¹, DAI Yan-yan¹, LI Hua-liang¹,
KANG Jing-he¹, LI Wen-gang^{2*}, CHEN Qing-xi^{1*}

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

2. Xiamen First Hospital Attached to Fujian Medical University, Xiamen 361004, China)

Abstract : We obtained ethyl acetate extract (CFE) of *Corbicula fluminea*, and then investigated the antitumor activity of CFE. The inhibition rate of cancer cell was measured by MTT method. The morphological change of SMMC-7721 cells was detected by inverted microscopy. The effects of CFE on cell cycles of SMMC-7721 were observed by FCM. The results showed that CFE displayed strong growth inhibitory effect in a dose and time dependant manner against hepatocarcinoma SMMC-7721 cells with estimated IC_{50} values of 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 72 h of treatment with CFE. The morphological change of SMMC-7721 was significant. In the mean time, flow cytometry analysis showed that CFE could induce the emergence of the peak of apoptosis. These results revealed that CFE inhibited the proliferation and induced the apoptosis of the human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro.

Key words : *Corbicula fluminea*; hepatocarcinoma SMMC-7721 cells; proliferation inhibition; apoptosis

· 简 讯 ·

2008 年度我校获部、省、市级科技奖项目情况

序号	项目名称	获奖类别	获奖等级
1	电催化表面结构效应和反应机理研究	高等学校优秀成果奖	1 等
2	杂色鲍的遗传改良及中试示范	福建省科学技术奖	2 等
3	基于聚苯胺膜修饰电极电化学传感器的研制	福建省科学技术奖	2 等
4	九龙江流域农业非点源污染机理与控制研究	福建省科学技术奖	2 等
5	水生低等动物及其病原菌的蛋白质组学研究	福建省科学技术奖	2 等
6	聚乙烯吡咯烷酮	福建省科学技术奖	3 等
7	颌骨放疗后牙种植术的实验研究	福建省科学技术奖	3 等
8	酞菁和花菁类化合物的合成及其在分析科学中的应用	福建省科学技术奖	3 等
9	数字化虚拟肝脏及治疗计划系统	厦门市科技进步奖	2 等
10	西氏鲍引种及杂交育种技术	厦门市科技进步奖	2 等
11	局部内放疗预防肝癌切除术后复发的研究	厦门市科技进步奖	2 等
12	大肠癌 APC 基因和 K-ras 基因高通量筛检技术方法研究	厦门市科技进步奖	3 等
13	基于聚苯胺膜修饰电极电化学传感器的研制	厦门市科技进步奖	3 等
14	肝肠联合移植动物模型的建立及肝移植诱导同源肠移植免疫耐受的实验研究	厦门市科技进步奖	3 等
15	厦门城市形态发展的空间句法分析	厦门市科技进步奖	3 等

厦门大学科技处