

文蛤多肽的体外抗癌活性研究

范成成¹, 张 剑¹, 康劲翮¹, 邱乒乓¹, 韩 鹏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:采用硫酸铵沉淀、有机溶剂分离、Sephadex G-25 分子筛层析等实验方法, 从文蛤肉中提取了一种低分子量的多肽, 命名为 Mer2。本文以溴化二苯偶氮盐 (MTT) 法检测 Mer2 对体外培养的癌细胞的抑制作用。结果表明 Mer2 对体外培养的人肝癌细胞株 (HepG₂)、宫颈癌细胞株 (Hela)、胆管癌细胞株 (QBC939)、肺癌细胞株 (SPC-A-1 和 LTEP-a-2) 的生长均有很强的抑制作用, 且抑制效果随着 Mer2 含量的增高和处理时间的延长而增强, 证明 Mer2 具有广谱的抗癌活性。其中 Mer2 对人肝癌 HepG₂ 细胞株抑制作用最为显著, 光学显微镜观察经 Mer2 细胞培养液处理后的细胞形态发生明显的改变, 流式细胞仪实验的结果表明处理后的细胞周期发生明显的改变, 并在 G₀/G₁ 期前出现凋亡峰。

关键词:海洋生物学; 细胞; 文蛤多肽; 抗癌; MTT 比色法; 凋亡

DOI 10.3969/j.issn.1000-8160.2009.04.005

中图分类号: Q 247; Q 28

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2009)04-0472-05

癌症又称恶性肿瘤, 是严重危害人类健康的一类疾病, 现有的抗肿瘤药物对多数肿瘤的治疗具有一定疗效, 但都不可避免地伴随着效率低、选择性差、毒副作用大等诸多弊端。因此, 从自然界中筛选出高效、低毒副作用的抗癌天然活性成分, 已成为抗癌新药物研究的热点。由于海洋物种资源丰富, 各国学者已从多种海洋生物中分离和鉴定出了多种具有抗肿瘤活性的天然物质^[1]。从海洋生物及其代谢产物中筛选和提取具有抗癌活性的天然物质成为抗肿瘤新药物的重要来源。本实验选取的海洋生物文蛤 (*Meretrix meretrix*) 是一种营养丰富的海洋软体动物, 它具有清热利湿、化痰、散结的功效, 对肿瘤细胞有明显的抑制作用, 还具有降血糖、降血脂、抗衰老、抗突变和抗艾滋等多种生理功能^[2-8]。其药用价值已受到越来越广泛地关注。文蛤肽是我们实验室提取出来的一种低分子量的多肽, 实验已经证明其对肝癌和胃癌细胞有明显的抑制作用, 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-D-氨基葡萄糖苷酶有明显的抑制作用^[9-10]。本文在此基础上对文蛤多肽的抗癌机理进行了更深一步的研究, 为阐明文蛤多肽抗癌作用机理, 以及对文蛤药用价值的进一步开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

文蛤 (*Meretrix meretrix*) 购于厦门同安养殖场。人肝癌细胞株 (HepG₂)、宫颈癌细胞株 (Hela) 和肺癌细胞株 (SPC-A-1 和 LTEP-a-2) 均购自上海细胞研究所细胞库, 由厦门大学生命科学学院细胞生物学实验室培养传代。胆管癌细胞株 (QBC939) 是第三军医大学王曙光教授赠送, 由本实验室培养传代。RPMI-1640 培养基和 DMEM 培养基为 Gibco 公司产品, 小牛血清为 Hyclone 公司产品。

1.2 文蛤多肽的分离提取

文蛤多肽的分离纯化方法参照文献 [9], 经过硫酸铵沉淀、有机溶剂抽提、Sephadex G-25 分离等步骤, 从

收稿日期: 2008-11-14

基金项目: 厦门市科技计划资助项目 (3502Z20063021); 厦门市卫生局资助项目 (WSK0602); 厦门大学科技创新工程基金资助项目 (XDKJCX20043001)

作者简介: 范成成 (1985~), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 陈清西, 教授, 博导, E-mail: chenqx@xmu.edu.cn; 李文岗, 副教授, 硕导, E-mail: wgl1861@163.com

文蛤肉中分离提取文蛤多肽命名为 Mer2

1.3 细胞培养

QBC939、SPC-A-1、LTEP-a-2细胞培养在 RPM F1640培养液中 [含 10% (V/V)小牛血清和 100U/cm³链霉素、青霉素], HepG₂、Hela细胞培养在 DMEM培养液中 [含 10% (V/V)小牛血清和 100U/cm³链霉素、青霉素]。实验中收集对数生长期细胞以 1.0 × 10⁵ 个/cm³的含量接种于细胞培养瓶中,在 37 和 5% (V/V) CO₂条件下培养过夜后用 Mer2细胞培养液处理。

1.4 文蛤多肽 Mer2抑癌作用的时效和量效测定

对 MTT法^[7]加以改进,取对数生长期的 HepG₂癌细胞株,配制成 1.0 × 10⁵ 个/cm³单细胞悬液,接种于 96孔培养板,每孔接种细胞 100mm³,培养约 24h后,弃去培养液,然后设阴性对照、Mer2组,每孔加入新鲜的培养液 100mm³。阴性对照组补加培养液 100mm³。Mer2组每孔加入不同含量的 Mer2培养液 100mm³。以 200mm³培养液作为空白调零组;Mer2用培养液逐步稀释至终含量分别为 80、40、20、10、5μg/cm³,每个含量设 3个平行孔。在 37 和 5% (V/V) CO₂条件下分别培养 24、48、72h后,弃去细胞培养液,每孔加 180mm³新鲜细胞培养液和 5mg/cm³ MTT液 20mm³,继续培养 4h弃细胞培养液,加 DMSO溶液 200mm³/孔,在 37 下充分溶解紫色结晶后,用 M3550型酶标仪测量 490nm的光密度值。按下式计算抑制率:

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

1.5 Mer2的抗癌谱筛选

按照“1.4节”的方法测定 Mer2对人源性癌细胞株 HepG₂、Hela、QBC939、SPC-A-1、LTEP-a-2生长的抑制作用。本实验采用 5个含量(80、40、20、10、5μg/cm³),培养时间均为 48h,实验重复 3次。

1.6 肝癌细胞 HepG₂形态观察

同上法接种细胞于带洁净载玻片的培养皿中,培养 24h后,用含 20μg/cm³的文蛤多肽 Mer2细胞培养液处理 48h,在光学显微镜下观察其形态并拍照。

1.7 细胞周期检测

同上法接种细胞于培养瓶中,培养 24h后,分别更换含量为 10、20、40μg/cm³的 Mer2培养液,培养 24、48、72h后用 0.25% (m/V)的胰酶消化制备单细胞悬液,以 1200r/min离心 5min, PBS液洗 1次后加入 70% (V/V)乙醇固定,4 保存备用(可保存 1周)。待细胞全部固定后再以 PBS液洗涤 2~3次,加入 980mm³ 100μg/cm³的 RNaseA液重悬细胞,37 孵育 20min;之后加入 20mm³ PI染液(5mg/cm³) 在 4 染色 30min, 200目绢筛过滤除去成团细胞,用流式细胞仪(Coulter EPICS XL)测定细胞周期,用 Cell FII软件对所测得的 DNA分布直方图进行细胞周期统计分析。

统计学处理:所有数据用平均值 ±标准偏差 ($\bar{X} \pm SD$)表示,采用方差分析进行组间比较分析。

2 实验结果

2.1 文蛤多肽抑制肝癌细胞的时效和量效

实验选用 5个含量梯度(80、40、20、10、5μg/cm³)来研究文蛤多肽抑制肝癌细胞 HepG₂的量效关系,结果如图 1所示。可以看出其 24、48、72h的 IC₅₀值分别是 50.5、18.2、6.8μg/cm³。该实验结果表明,文蛤多肽 Mer2对 HepG₂有明显的时间和剂量效关系,即随着 Mer2作用时间和剂量的增加,其抑制作用也明显地增强。

2.2 Mer2的抗癌谱筛选

抗癌谱实验表明 Mer2对 5种人源性癌细胞株均有不同程度的抑制作用。实验发现 Mer2对肝癌细胞株 HepG₂、宫颈癌细胞株 Hela和胆管癌细胞株 QBC939生长的抑制较强,加药含量为终含量(20μg/cm³)时,生长抑制率均已达 51%以上,对 2种肺癌细胞株(SPC-A-1和 LTEP-a-2)相对较弱一些。对 5种人源性瘤株体外生长抑制作用结果见图 2。高含量(80μg/cm³)Mer2对人源性癌细胞 HepG₂、Hela、QBC939、SPC-A-1均有很强的抑制作用,高含量抑制率分别达到了 78.3%、72.9%、67.6%、53.2%。对 LTEP-a-2细胞株影响最

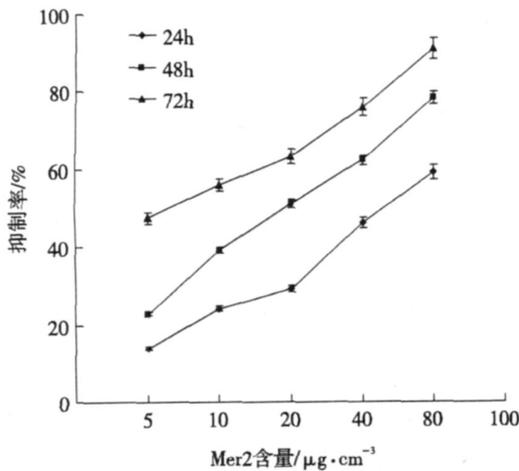


图1 Mer2对肝癌HepG₂细胞抑制的时效和量效关系

Fig. 1 Relation between time and effect of Mer2 on inhibiting HepG₂ cell

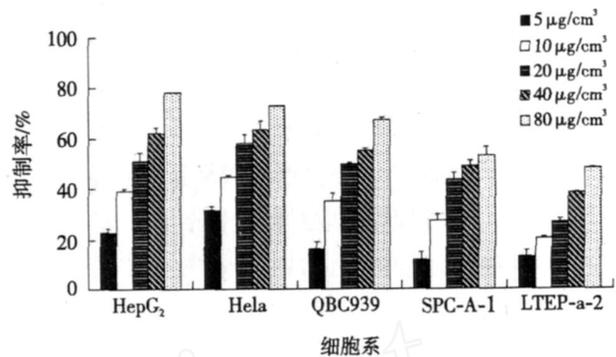


图2 Mer2对体外培养的癌细胞增殖的抑制效应

Fig.2 Dose-dependent inhibitory effect of Mer2 on the proliferation of cancer cells cultured *in vitro*

弱,高含量的抑制率仅为 48.2%. 故我们选择 HepG₂ 进行了光学显微镜的形态观察和流式细胞术的细胞周期实验.

2.3 细胞形态的变化

在倒置光学显微镜下观察到未经 Mer2液处理的肝癌 HepG₂ 细胞生长旺盛,为上皮样细胞,密集成片生长,铺满整个细胞瓶瓶底,轮廓较清晰,细胞形状因相互拥挤而呈不规则的多边形,细胞并未因相互接触而停止生长.而经 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 文蛤抗癌多肽 Mer2液处理 48h后的细胞外形变化明显,细胞变小变圆,贴壁细胞数量减少,出现了单个细胞的悬浮生长,细胞的集落化程度降低,细胞群体数量显著降低,且可出现台盼蓝拒染的圆形的凋亡小体(图 3)^[11]. 光镜结果表明,Mer2能有效地抑制癌细胞的生长,并能改变人肝癌 HepG₂ 细胞形态学特征.

2.4 细胞周期的变化

利用流式细胞仪检测文蛤活性多肽 Mer2对人肝癌 HepG₂ 细胞周期分布的影响. 与对照组相比,经不同含量的 Mer2细胞培养溶液分别处理不同时间后,人肝癌 HepG₂ 细胞周期分布的变化结果汇总于表 1. 结果显示, HepG₂ 细胞经含 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ Mer2细胞培养溶液分别处理 24、48、72h后,随着作用时间的延长,亚 G₁ 峰增高、增宽,出现了明显的凋亡峰,凋亡率从 2.83%分别上升为 5.

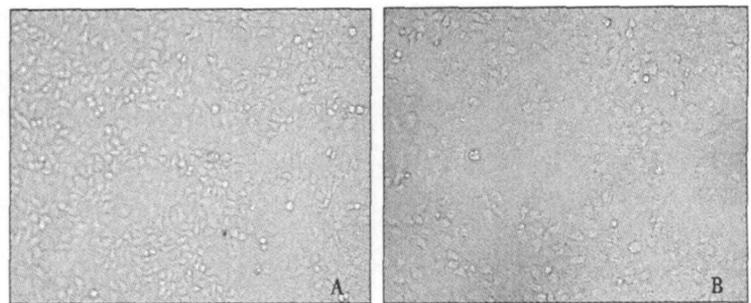


图3 Mer2对肝癌HepG₂形态的影响(48 h, $\times 100$)

Fig.3 Morphology change of liver cancer HepG₂ cells treated by Mer2

49%、11.9%、12.1%;经含 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ Mer2细胞培养溶液分别处理 24、48、72h后,随着作用时间的延长, G₀/G₁ 期细胞比例明显减少,由原来的 71.7%分别下降为 66.2%、55.5%、44.0%,亚 G₁ 峰增高、增宽,出现明显的凋亡峰,凋亡率从 2.83%分别上升为 6.36%、13.4%、21.4%;经含 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ Mer2细胞培养溶液分别处理 24、48、72h后,随着作用时间的延长,亚 G₁ 峰增高、增宽,出现明显的凋亡峰,凋亡率从 2.83%分别上升为 9.15%、18.2%、38.5%. 这表明随着 Mer2溶液作用含量的增高和作用时间的延长,人肝癌 HepG₂ 细胞周期发生明显变化,细胞凋亡率也随着增大,但细胞周期未出现明显阻滞现象,可见 Mer2对癌细胞生长的抑制可能是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的.

表 1 Mer2对肝癌细胞 HepG₂ 细胞周期的影响Tab 1 Effect of Mer2 on cell cycle of liver cancer HepG₂ 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)	48	2.8 ± 1.5	71.7 ± 1.7	7.5 ± 1.1	18.1 ± 1.2
10	24	5.5 ± 1.1	64.0 ± 1.5	17.3 ± 1.7	13.6 ± 1.4
	48	11.9 ± 1.9	62.2 ± 2.3	15.3 ± 4.5	11.0 ± 2.5
	72	12.1 ± 1.2	66.5 ± 3.5	8.8 ± 3.7	12.7 ± 5.0
20	24	6.4 ± 1.7	66.2 ± 3.3	14.9 ± 4.2	12.5 ± 2.2
	48	13.4 ± 1.3	55.5 ± 4.3	20.7 ± 2.3	10.7 ± 3.1
	72	21.4 ± 2.5	44.0 ± 3.7	19.2 ± 3.5	15.7 ± 4.5
40	24	9.2 ± 1.6	49.7 ± 5.0	12.8 ± 2.4	28.8 ± 2.9
	48	18.2 ± 1.5	57.8 ± 3.2	14.2 ± 3.6	10.1 ± 3.1
	72	38.5 ± 2.4	36.0 ± 4.1	16.8 ± 2.2	9.43 ± 4.2

3 讨论

文蛤主要产于沿海一带,其经济价值高、营养丰富、肉质鲜美,是滩涂养殖的主要贝类之一。文蛤提取物能提高机体免疫,抑制肿瘤细胞的生长^[12]。对哮喘、慢性气管炎、甲状腺肿大、淋巴结核等病也有明显疗效。文蛤多肽 Mer2为本实验室提取的具有抗癌活性的多肽物质。本文系统地报道了文蛤多肽 Mer2对多种肿瘤细胞增殖的抑制效果。实验结果表明,文蛤多肽 Mer2能对肝癌 HepG₂、子宫颈癌 HeLa细胞、胆管癌 QBC939细胞和肺癌细胞(SPC-A-1、LTP-a-2)等多种癌细胞产生抑制作用,抑制效应存在着显著的剂量依赖关系和时间依赖关系,其抑制作用随 Mer2含量的升高及时间的延长而增强。光学显微镜观察结果显示,经不同含量的 Mer2溶液作用后的肝癌 HepG₂细胞均出现体积变小、细胞贴壁能力下降,许多细胞脱落呈悬浮状态(存活或死亡),细胞集落生长特性明显降低,呈单个生长,并出现台盼蓝拒染的圆形小体——凋亡小体。这与用牡蛎和姜黄素等处理肿瘤细胞后的形态学改变一致^[13-14]。流式细胞测定结果表明,细胞周期出现凋亡峰,部分细胞发生了凋亡,由此推测 Mer2可能是通过引起细胞的凋亡,进而实现其对癌细胞增殖的抑制作用。这些结果充分表明,文蛤多肽 Mer2能有效地抑制体外培养的癌细胞的增殖,具有较好的抗癌效果和广谱性。为此,更深入地研究文蛤多肽 Mer2抗肿瘤作用机理,对于文蛤低分子活性肽在癌症防治中的应用及海洋天然抗癌活性物质的研究均具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 蒋庆锋,周有骏,王金政. 海洋抗肿瘤药物研究进展 [J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 23(6): 58-61.
- [2] 魏宁,林秀坤,牛荣丽,等. 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.
- [3] 张建新,邢银萍. 文蛤核酸抗癌活性的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1990, 21(1): 88-91.
- [4] 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.
- [5] Zhang L, Li H, Wu W T, et al Purification and characterization of cytotoxins from *Agkistrodon acutus* venom and their anticancer activity [J]. J Chin Pharm Sci, 2004, 13(2): 97.
- [6] Amomrut C, Toida T, Inanari T, et al A new sulfated β -galactan from clams with anti-HIV activity [J]. Carbohydrate Research, 1999, 321: 121-127.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Leng B, Liu X D, Chen Q X Inhibitory effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on BGC-823 cells and several enzymes [J].

FEBS Letters, 2005, 579: 1 187-1 190.

- [10] 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
- [11] Kerr J E R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics [J]. Br J Cancer, 1998, 26(1): 329-341.
- [12] 郑国兴,范成成,康劲翻,等.文蛤多肽对人肝癌细胞 SMMC-7721的抑制作用及免疫调节作用 [J].厦门大学学报:自然科学版,2008,47(增刊 2):135-137.
- [13] 石松林,李鹏,李祺福,等.牡蛎天然活性肽 BPO-1诱导人胃腺癌 BGC-823细胞凋亡的形态与超微结构观察 [J].中国海洋药物杂志,2007,26(5):6-12.
- [14] 高蔚,张德平,陈碧.姜黄素诱导人肺成纤维细胞凋亡的相关分子机制的初步研究 [J].中国呼吸与危重监护杂志,2009,8(2):186-189.

Antitumor activity of peptide from *Meretrix meretrix* in vitro

FAN Cheng-cheng¹, ZHANG Jian¹, KANG Jing-he¹, QIU Ping-ping¹, HAN Peng¹,
LIN Wen-gang², CHEN Qing-xi¹

(1. Key lab of ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

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

Abstract: An anti-cancer peptide was purified from *Meretrix meretrix* by methods of fragmentation, organic precipitation and column chromatogram (Sephadex G-25). Finally, the anticancer peptide was obtained and named as Mer2. The antitumor activity and stability of Mer2 were preliminarily determined by MTT method *in vitro*. It shows that Mer2 inhibited significantly the growth of human cancer cells including HepG₂, HeLa, QBC939, SPC-A-1 and LTP-a-2 in a dose-dependent manner *in vitro*, and had a more remarkable inhibitory effect on liver cancer cell strain HepG₂. The cell morphology of HepG₂ treated by the peptide Mer2 was changed distinctly under the LM and the proliferation of HepG₂ cells through induced-apoptosis was changed clearly showed by flow cytometry.

Key words: marine biology; cell; *Meretrix meretrix* peptide; antitumor; MTT colorimetry; apoptosis

DOI 10.3969/J. ISSN. 1000-8160. 2009. 04. 005

(责任编辑:郭水伙)