

# 二色桌片参酶解液对转化细胞的效应<sup>\*</sup>

陈正明 陈玉强\*\* 曹顺达\*\*\* 吴乔 苏文金

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门, 361005)

\*\* (中国人民解放军第174医院, 厦门, 361003)

**摘要** 用二色桌片参(*Mensamaria intercedens*)酶解液处理转化的人胚肺成纤维细胞(HLF)后, 细胞生长受到显著抑制, 抑制率达64.84%, 光镜下细胞透光性加强, 铺展较好, 细胞核形更为规则, 核畸形现象减少; 线粒体结构趋于正常; 软琼脂集落实验表明, 细胞集落形成率由 $23 \times 10^{-5}$ 下降至 $12.5 \times 10^{-5}$ , 裸小鼠致瘤实验显示抑瘤率为82.39%, 差异显著( $p < 5\%$ )。结果提示, 二色桌片参酶解液可能逆转转化的HLF细胞的恶性表型, 对其有一定的诱导分化作用。

**关键词** 二色桌片参 转化细胞 成纤维细胞 抗癌效应

**中国图书分类号** Q556

海参不仅营养丰富, 还含有一些生理活性物质, 即所谓的功能物质。自60年代以来, 各国对海参的药学价值所做的研究表明, 海参的药理活性包括抗凝血、抗辐射、抗病毒、降血脂、抗肿瘤、抗真菌等<sup>[1]</sup>, 尤其在抗肿瘤方面, 可使荷瘤小鼠的瘤体缩小、体质改善, 并可抑制癌细胞的转移<sup>[2,3]</sup>。

二色桌片参[*Mensamaria intercedens* (Lampart)]是一种大量存在于福建沿岸的低值海参, 其可能存在的药理活性未见文献报道。本文工作是利用复合蛋白酶对二色桌片参进行水解, 以酶解液处理转化细胞, 观察了其生物学效应, 并探讨二色桌片参的可能作用机理, 试图为这种海参的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 细胞系 人胚肺成纤维细胞(HLF): 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库, 经本实验鉴定为转化细胞。

1.1.2 海参酶解液 500g 海参干粉加入 9 100cm<sup>3</sup> 蒸馏水中, 加复合蛋白酶水解, 经脱腥脱臭处理, 并经过高温高压( $7 \times 10^4$  Pa, 110 C, 30min)灭菌, 在这种条件下蛋白酶已经完全失活。每 100cm<sup>3</sup> 酶解液合海参干粉 5.5g。

### 1.2 方 法

1.2.1 试样处理 以海参酶解液为试样, 为确定较适宜的试样浓度, 先以 0.1%~5%(V/V)

\* 厦门市 1994 年海洋科技项目资助课题。 陈正明, 男, 1969 年 2 月出生, 硕士。

\*\*\* 厦门市中药厂。

本文于 1996 年 10 月 28 日收到。

的 5 种浓度处理细胞,选定细胞能够生长的 1%和 2%浓度处理 HLF 细胞。

试样再以 0.22μm 孔径的微孔滤膜过滤除菌后加入培养液中,配成所需浓度,以此培养液对细胞作连续培养,对照组细胞培养液加 2%(V/V)D-Hank's 液。

1.2.2 生长曲线的测定 按文献[4],稍做改进。

HLF 培养 2d 后消化收集细胞,制成单细胞悬液,用 2×10<sup>-4</sup>终浓度(V/V)的苔盘蓝(Trypan Blue,进口分装)染色计算活细胞数后,接种于 24 孔板,每组 14 孔,每孔(约 3.14cm<sup>2</sup>)含 HLF 细胞 2×10<sup>3</sup> 个,体积 1cm<sup>3</sup>/孔,3d 后换液,每天每组取 2 孔消化后用苔盘蓝染色计活细胞数,取其均值绘制生长曲线。

1.2.3 形态观察 1)光镜观察:取生长成单层的细胞于倒置相差显微镜(DIAPHOT-300, NIKON, JAPAN)下观察并拍照。2)透射电镜观察:按常规方法。

1.2.4 软琼脂中集落形成率的测定 参考文献[5,6]方法

1.2.5 裸小鼠异种移植 按文献[7]方法。

取 HLF 对照组和 2%处理组细胞,苔盘蓝染色计数活细胞数后以全培养液制成 10<sup>7</sup> 个/cm<sup>3</sup> 的细胞悬液,分别接种于 8 只 4~5 周龄的 SPF 级 BALB/c 裸小鼠(厦门大学抗癌中心实验动物室提供)左右后肢皮下,每部位接种 5×10<sup>6</sup> 个细胞,饲养 6 周后观察结果。

将肿瘤解剖下来并称重,取瘤组织及周围肌肉组织与培养细胞一起做乳酸脱氢酶同工酶电泳,以证实肿瘤与培养细胞同源。按下式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{处理组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

1.2.6 乳酸脱氢酶同工酶(LDH)的检测 按文献[8]方法。

1.2.7 数据的统计学处理 各组数据以 t 值检验差异的显著性,其中裸鼠瘤重做配对资料的 t 值检验。

## 2 结果

### 2.1 细胞的生长状况

从生长曲线(图 1)可以看出,细胞经处理后,生长受到不同程度的抑制。其中,2%处理组的抑制作用更为明显。

### 2.2 细胞的形态观察

2.2.1 光镜观察 光镜观察表明,对照组 HLF 细胞排列紊乱,铺展性和透光性差,而经海参酶解液处理后,细胞铺展较好,排列较有方向性,透光性也明显加强(图版 1-1),这些特征都提示 HLF 细胞经处理后恶性程度有所下降。

2.2.2 电镜观察 在电镜下可见,HLF 细胞核膜凹陷,有多个核仁,有的核内有假包涵体;细胞质中线粒体结构不完整;经处理后,细胞核形较规则,核膜凹陷减少,核膜清晰、连续,线粒体有的较完整(图版 1-2),说明该海参酶解液对诱导这种转化细胞的逆转有一定作用。

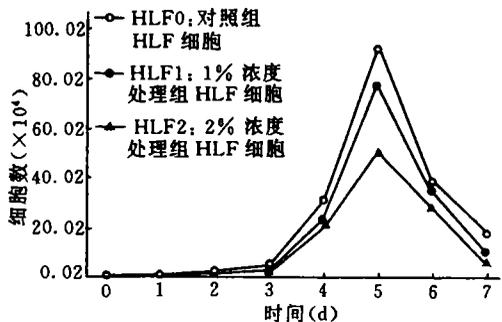


图 1 HLF 细胞的生长曲线

Fig.1 Growth curve of HLF cell

2.2.3 在半固体琼脂中的集落形成效率 从表 2 可看出,HLF 细胞都可在软琼脂中形成集落(图版 1-3),其中 1%处理组的集落形成率与对照组无显著差异,而 2%处理组则比对照组小,差异极显著( $p < 1\%$ )。表明这种细胞经海参酶解液处理后在软琼脂中形成集落的能力有所下降,即停泊依赖性有增强,提示其恶性程度有所下降。

表 1 HLF 细胞在软琼脂中形成的集落数及集落形成效率

Tab.1 Colony number and efficiency of HLF cell formed in soft agar

组别*	重 复 样 本 号						X±SD	集落形成效率(%)
	1	2	3	4	5	6		
HLF0	21	23	26	29	19	20	23.0±3.9	0.023
HLF1	20	21	25	29	20	21	22.7±3.6	0.0227
HLF2	12	14	13	10	11	15	12.5±1.6**	0.0125

注: \* 同图 1, \*\*  $p < 1\%$

2.2.4 裸小鼠异种移植 取 8 只裸小鼠,分别将对照组和 2%浓度处理组细胞注入每只裸小鼠左右后肢皮下,饲养 6 周后观察结果,除死亡一只,一只没有生瘤外,其余小鼠均可生瘤,LDH 同工酶电泳证实与培养细胞同源。它们各自的处理组与对照组的生瘤率没有差异(图版 1-4)。但细胞经处理后生瘤的瘤重比对照组有明显下降,抑瘤率为 82.39%,平均瘤重差异显著( $p < 5\%$ )(表 2)。

表 2 HLF 细胞致瘤的瘤重\*

Tab.2 Weight of tumor caused by HLF cell

组别	重 复 样 本 号							X±SD	抑瘤率(%)
	1	2	3	4	5	6	7		
对照组	0	281	331	3 873	861	1 587	2 700	1 376±1 442	
处理组	0	22	112	915	238	315	94	242.3±317**	82.39

注: \* 瘤重单位:mg, \*\*  $p < 5\%$

### 3 讨论

以上结果表明,HLF 细胞经本海参酶解液处理后,尤其是在 2%浓度处理组中,细胞生长受到显著抑制,抑制率达 64.84%,表明此海参酶解液具有抑制 HLF 细胞生长的作用。

海参除含有丰富的一般营养成分外,还存在多种抗肿瘤活性物质,已分离鉴定的有海参皂甙(海参毒素、海参素)和酸性粘多糖。据报道,从刺参 *Stichopus japonicus* Selenka 体壁经酶解提取的刺参酸性粘多糖在小鼠中对 MA-737 乳腺癌的疗效可达 88%,对肉瘤 S-180 抑制率达 55%~61%,对淋巴肉瘤 Lio-1 和小鼠肉瘤 S-37 的抑制率分别为 51%和 49%,若在接种癌株前给药,还可使转移灶明显减少,瘤体缩小。从阿氏辐肛参 *Actinopyga agassizi* 得到的海参素(Holothurin)也可抑制小鼠肉瘤 S-180 和 Krebs-2 腹水瘤的生长,并可显著延长小鼠的存活时间<sup>[1]</sup>。在 70 年代末,美国肿瘤研究所选用 P-388 鼠淋巴性白血病与 9-KB 细胞培养系统以及 P-388 与 L1210 细胞培养系统,筛选出了三种具有较强的细胞毒和抗肿瘤作用的海参皂甙,它们对细胞的  $ED_{50}$  从  $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^3$  到  $2.9\mu\text{g}/\text{cm}^3$  不等<sup>[9]</sup>。我们的实验结果也显示,二色桌片参中的某种成分对转化细胞 HLF 的生长有明显的抑制作用,软琼脂集落实验和裸鼠致瘤实验进一

步证实它对 HLF 细胞的恶性表型有逆转作用。

关于海参活性物质对体内外癌细胞的作用机制,还没有见到很深入报道。由于海参皂甙的毒性很高,尤其是海参素 A 具有高度阻止蛋白质合成的能力,所以推测它们主要是通过细胞毒作用来抑制细胞生长,而酸性粘多糖则毒性较低,它们对体内肿瘤转移和生长的抑制作用可能是基于其抗凝血机能和对机体免疫能力的增强作用<sup>[10]</sup>。

从本实验结果来看,我们选定的 1%和 2%浓度二色桌片参酶解液对体外培养的转化 HLF 细胞可能有一定的诱导分化作用,这一点尚未见有文献报道。从光镜下看,经二色桌片参酶解液处理的细胞生长缓慢,但未见细胞固缩、脱落死亡等现象,细胞呈铺展状态,由此表明二色桌片参酶解液对转化细胞的可能作用机制是通过诱导细胞分化的途径来进行的。许多细胞毒药物如亚硒酸钠、抗癌抗生素<sup>[11]</sup>、苔藓虫素 1(Bryosatin 1)<sup>[12]</sup>等在高浓度下对细胞有毒,而在低浓度时则可作为外源性的诱导分化剂而起作用。可见,细胞毒药物也可能有诱导细胞分化的作用,是否海参中的活性物质确有此功能,还有待于将来更深入的工作来阐明。

二色桌片参酶解液中是否含有以上所述的几种活性物质,这种海参酶解液中是否对其他培养细胞系有效,是哪一种或哪几种物质起作用,在进一步的动物模型中的结果又会如何,这都是将来值得探究的课题,其中关键之处是对海参酶解液的活性物质的测定及分离。总之,这种海参的药学价值是值得进一步研究的。

## 参考文献

- 1 马同江,周清凯,蔡云见. 海参的药理作用及应用. 海洋药物,1982,(2):9~14
- 2 马克韶,郝晓阁,王莉. 刺参酸性粘多糖抗肿瘤转移的实验研究. 海洋药物,1982,(1):21~25
- 3 李春艳,孙广生. 玉足海参提取物对小鼠 S-180 的抑瘤作用. 海洋药物,1983,(1):27~31
- 4 谢作煊,徐洁,邹巧仙等. 人工基膜对鼻咽癌上皮细胞株(CNE-2)生长的影响. 细胞生物学杂志,1995,12(2):27~30
- 5 瓦希利耶夫 JM,捷尔范德 JM 著(何申等译). 培养中的肿瘤与正常细胞. 北京:人民卫生出版社,1985,158~159
- 6 Buick R N, Stanicic T H & Fry S E et al. Development of an agar-methyl cellulose clonogenic assay for cells in transitional cell carcinoma of the human bladder. *Cancer Res.*, 1979,39:5 051~5 056
- 7 杨善民. DMSO 对人胃腺癌 MGc80-3 细胞的诱导分化作用. 实验生物学报,1994,27(3):281~285
- 8 王子淑编. 人体及动物细胞遗传学实验技术. 成都:四川大学出版社,1987,359~364
- 9 周清凯,蔡云见. 海参皂甙. 海洋药物,1982,(3):25~26
- 10 王强基,李春艳. 玉足海参粘多糖对小鼠免疫功能的影响. 海洋药物,1984,(1):12~15
- 11 陈惠黎. 肿瘤逆转. 见:汤钊猷主编. 现代肿瘤学. 上海:上海医科大学出版社,1993,157~167
- 12 Zhang X S,Zhang R W & Zhao H et al. Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent bryostatin 1,an activator of protein Kinase C,*Cancer Res.*,1996,56:802~808

## Effects of enzyme-digested *Mensamaria intercedens* solution on transformed Human Lung Fibroblast cell

Chen Zhengming, Chen Yuqiang\*, Cao Shunda, Wu Qiao and Su Wenjin

(The State Lab. for Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Xiamen, 361005)

\* (The 174th Hospital of PLA, Xiamen, 361003)

### Abstract

The transformed Human Lung Fibroblast (HLF) cell line was used to study the anti-tumor effects of *Mensamaria intercedens* (Lampart). The results indicate that this sea cucumber enzyme-digested solution has effects on this cell line.

The growth inhibition percentage of the treated HLF cell was 64.84%. The cell became more transparent and better spread. The nucleus was oval with clear and continuous nuclear membrane. The colony efficiency in soft agar decreased from  $23 \times 10^{-5}$  to  $12.5 \times 10^{-5}$ . The tumor weight caused in the nude mice decreased by 82.39%, with a significant difference ( $p < 5\%$ ). All these suggest that the enzyme-digested *Mensamaria intercedens* solution has the inhibiting effect on the cancerous phenotype and can somewhat induce the differentiation of the cell line. However, whether it affects other cancer cell lines and its mechanism should be further studied.

**KEYWORDS** *Mensamaria intercedens*, Transformed cell, Human Lung Fibroblast, Anti-cancer effects