

新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖和相关基因表达的影响*

刘用金 李祺福[△] 黄晓明 石松林 宋建晔 梁盈 武福云

(厦门大学生命科学院 细胞生物学研究室 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 目的:应用新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 处理人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞,观察 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖和相关基因表达的影响。方法:通过细胞计数、流式细胞仪、光学显微镜、免疫细胞化学方法检测细胞的变化。结果:经 60 μg/mL NBBP-1 处理后,SK-N-SH 细胞生长抑制率高达 90.09%,细胞周期被阻滞在 G0/G1,细胞核裂解成多个,免疫细胞化学染色结果显示,经处理后 bcl-2 抗凋亡基因蛋白表达减弱,而 p53、fas、bax 等促凋亡基因蛋白表达增强。结论:新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞凋亡具有显著的诱导作用,其诱导癌细胞凋亡的机理与其调节和干预癌基因 bcl-2 和 p53、fas、bax 等抑癌基因的表达有关。

关键词 新生牛牛脑活性肽 SK-N-SH 细胞 细胞凋亡

中图分类号:Q279;R730.264 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2009)02-208-04

The Effects of Neonatal Bovine Brain Bioactive Peptide NBBP-1 on Proliferation and Associated Gene Expression of Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells*

LIU Yong-jin, LI Qi-fu[△], HUANG Xiao-ming, SHI Song-lin, SONG Jian-ye, LIANG Ying, WU Fu-yun

(Laboratory of Cell Biology, Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology & Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of neonatal bovine bioactive brain peptides in peak (NBBP-1), with which we treated SK-N-SH cells, on the proliferation and gene expression of human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Methods:** The changes of SK-N-SH cells induced by NBBP-1 were detected by means of cell count, flow cytometry analysis, light microscope and immunocytochemistry. **Results:** Treated with 60 μg/mL NBBP-1, the proliferation of SK-N-SH cells was inhibited effectively, and the rate was up to 90.09%. Cell cycle was arrested in G1/S phase. Nucleus broke into several parts. The results of immunocytochemistry showed that expression of anti-apoptotic gene bcl-2 was down-regulated and expression of apoptotic genes p53, fas, bax were up-regulated. **Conclusions:** This study suggested that NBBP-1 could regulate the proliferation of human neuroblastoma SK-N-SH cells effectively, and the effect was related with the changes of oncogene and tumor-suppressor gene.

Key words: Neonatal bovine brain bioactive peptides; SK-N-SH cells; Apoptosis

Chinese Library Classification: Q279; R730.264 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2009)02-208-04

前言

细胞凋亡及其机理研究不仅是当前生命科学基础研究的重要领域,更是抗癌研究中的一个重要方向。近几十年来,国内外学者虽然在肿瘤细胞凋亡诱导方面开展过许多研究,并发现了一系列细胞凋亡诱导物,如紫杉醇、姜黄素等^[1-4],但这些凋亡诱导物均存在毒副作用大的问题而没有其临床研究。如何寻找毒副作用小的更具临床应用价值的细胞凋亡诱导物是肿瘤细胞凋亡研究中亟待解决的重要问题。本实验室此前研究证实了牡蛎天然活性肽 BPO-1 对人胃腺癌细胞凋亡的诱导作用^[5]。这表明从动物低分子活性肽中寻找这类高效低毒的肿瘤细胞凋

亡诱导物是一条可行的新途径。由于从哺乳动物组织分离的活性肽更具潜在应用意义,因此,我们从新生牛牛脑中分离提取了新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 (Neonatal bovine brain bioactive peptides in peak, NBBP-1),并以人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞为对象,研究 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖和相关基因表达的影响,进一步研究动物低分子活性肽对细胞凋亡的诱导作用,并为 NBBP-1 在抗肿瘤作用中的研究和应用提供相关科学依据。

1 材料与方法

1.1 新生牛牛脑活性肽的分离纯化

* 基金项目 福建省科技计划重点项目(2003N0052)资助

作者简介:刘用金(1984),男,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤细胞生物学

电话:0592-2185363 E-mail: yjliu1127@163.com

[△]通讯作者:李祺福 E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

(投稿日期:2008-07-10 接受日期:2008-07-31)

将新生牛牛脑匀浆离心后,取上清液进行酸抽提,所得粗提物过阳离子交换柱,再经脱盐柱除盐后,收集第一个峰,冷冻干燥后备用。

1.2 细胞培养及新生牛牛脑活性肽处理

SK-N-SH 细胞培养于 RPMI1640 培养液 (内含 13% 新生牛血清、2 mM 丙酮酸钠、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) pH7.2, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。24 h 后药物处理,经分离纯化的 NBBP-1 溶解于 PBS 中,配成 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的干液,并以培养液配成不同浓度的作用液。实验组细胞弃旧培养液换上含有 NBBP-1 的工作液。对照组细胞则换新鲜培养液,连续培养备用。

1.3 细胞生长曲线的测定

取对数期细胞,制成 7.5×10^4 cells/mL 浓度的细胞悬液,以每瓶 2 mL 的接种量接种于一批 25 mL 培养瓶中,每组 10 瓶。培养 24 h 后进行加药处理,换上新鲜培养液,其中对照组细胞换上不含诱导物的新鲜培养液,处理组换上含有不同浓度的新鲜培养液。加药处理后隔日(1-7 d)取对照组和处理组细胞各 2 瓶,苔盼蓝排除法隔日计数,以上实验重复三次,结果基本一致,以其中一次实验值为准,绘制生长曲线。

1.4 细胞周期的测定

取处于对数生长期的对照组和处理组细胞,用 PBS 清洗,消化收集细胞,1000 rpm 离心 5 min,细胞沉淀重悬于 1.5 mL PBS 中,缓慢注入 3.5 mL 冰预冷的无水乙醇中固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存待测。细胞上机检测前离心去乙醇,再用 PBS 洗涤,加入不含 DNase 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNaseA(PBS 配制)重悬细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20-30 min 以消化 RNA,离心后加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶(PI)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min,200 目筛绢过滤,然后用 Beckman 公司的 Coulter EPICS XL 型流式细胞仪进行细胞周期时相动力学检测,实验重复三次,根据所测得的 DNA 分布直方图进行细胞周期统计分析。

1.5 光学显微镜样品制备与观察

将对照组细胞和经不同诱导物处理的处理组细胞分别以 10×10^4 cells/mL 的细胞浓度接种于放有盖玻片条的 75 mL 细胞培养瓶中,培养处理后取出长有细胞的盖玻片条,于温育至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 洗涤 2-3 次, Bouin-Hollande 液固定过夜,70%乙醇洗涤,常规苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照。

1.6 癌基因、抑癌基因免疫细胞化学检测

1.6.1 人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞相关癌基因 bcl-2 产物表达观察样品制备 取分别长有对照组和处理组细胞的盖玻片,于预温至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 中漂洗,冷丙酮 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 20 min, PBS 洗涤,3% H_2O_2 室温避光孵育 10 min,蒸馏水漂洗,滴加适量的 2% BSA 室温孵育 25 min,滴加 Bcl-2 一抗(Bcl-2 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h, PBS 漂洗。滴加生物素标记的二抗(IgG/Bio)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20-30 min, PBS 漂洗,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 SABC,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20-30 min, PBS 漂洗, DAB 显色剂室温显色 5-20 min,自来水充分冲洗,蒸馏水漂洗,乙醇系列脱水,二甲苯透明,中性树脂封片, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照,记录结果。实验过程中以 PBS 代替一抗(其它步骤相同)进行免疫细胞化学

染色作为阴性对照。

1.6.2 人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞相关抑癌基因 bax、fas、wtp53 产物表达观察样品制备 样品的制备方法与癌基因 bcl-2 产物表达观察样品一致(Bax、Fas、Wtp53 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司)。实验过程中以 PBS 代替一抗(其它步骤相同)进行免疫细胞化学染色作为阴性对照。

2 结果

2.1 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞生长的影响

细胞生长曲线测定结果显示人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖速度较快,当接种细胞数为 7.5×10^4 cells/mL 时,连续计数至第 7 d,细胞数为 51.15×10^4 cells/mL,为原来的 6.82 倍,其倍增时间为 66.47 h。但经不同浓度的 NBBP-1 处理后,SK-N-SH 细胞生长状态分别受到不同程度的抑制,其中 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 处理 7 d,细胞计数结果为 26.70×10^4 cells/mL,为原来的 3.56 倍,和对照组细胞相比,生长抑制率为 47.80%。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 连续处理 7 d,细胞减少至 12.04×10^4 cells/mL,为原来的 1.61 倍,细胞生长抑制率为 76.46%,与对照组细胞相比较,具有极显著性差异($P < 0.01$)。而经 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 处理 7 d 后,细胞计数结果为 5.07×10^4 cells/mL,细胞数较原来少,细胞生长抑制率高达 90.09%。

表 1 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对 SK-N-SH 生长的抑制作用 ($\times 10^4$ cells/mL)

Group/date	1	3	5	7	Inhibition rate (%)
Control	12.36	30.00	39.33	51.15	-
40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9.75	25.54	30.17	26.71	47.80
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9.33	20.75	17.86	12.04	76.46
60 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.54	16.00	10.67	5.07	90.09

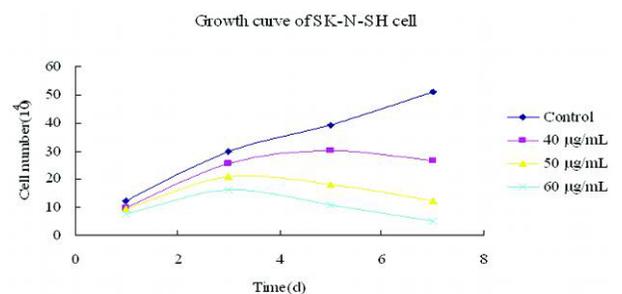


图 1 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对 SK-N-SH 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of NBBP-1 on the proliferation of SK-N-SH cell

2.2 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞周期的影响

应用流式细胞仪检测 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞周期分布的影响。检测结果显示, NBBP-1 抑制人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖过程分为两阶段:先使细胞停留在 G_0/G_1 期,诱导 G_0 期细胞产生凋亡。即 DNA 组方图出现 DNA 降解的亚 G_1 峰。随着 NBBP-1 浓度的增加,亚 G_1 峰增宽、增高。

表 2 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对 SK-N-SH 细胞周期的影响

Tab. 2 Effect of NBBP-1 on cell cycle distribution of SK-N-SH cell

Group	sub-G ₁ (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
Control	1.75	49.40	21.33	27.52
40 μg/mL	3.31	48.29	20.71	27.69
50 μg/mL	6.18	50.27	16.00	27.55
60 μg/mL	19.20	59.92	11.98	11.90

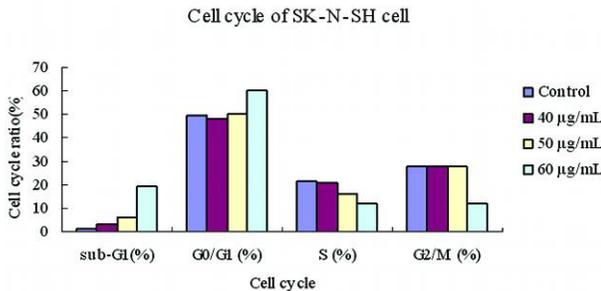


图 2 NBBP-1 处理 SK-N-SH 细胞周期分布图

Fig. 2 Effect of NBBP-1 on cell cycle distribution of SK-N-SH cells

其中以 40 μg/mL NBBP-1 处理细胞，细胞周期无发生明显的 G₀/G₁ 期阻抑，亚 G₁ 期细胞比例上升为 3.31%，而 G₂/M 期细胞比例也无明显变化，细胞出现少量凋亡。50 μg/mL NBBP-1 处理的细胞周期各时相的分布与其处理 40 μg/mL 的相类似，亚 G₁ 期细胞比例达 6.18%，而 G₂/M 期细胞比例也无明显变化。60 μg/mL NBBP-1 处理的细胞周期各时相的分布与 40 μg/mL、50 μg/mL 处理组相比发生较大变化，亚 G₁ 期细胞比例高达 19.20%，G₀/G₁ 期占细胞周期比例增加至 59.92%，出现明显阻抑，G₂/M 期占细胞周期比例下降至 11.98%，S 期降至 11.90%。结果显示 NBBP-1 对 SK-N-SH 细胞的生长抑制作用与细胞凋亡有关。经不同浓度 NBBP-1 处理后，SK-N-SH 细胞周期发生了变化，这种变化有明显的浓度依赖性，特别是当处理浓度达到 60 μg/mL 时，变化最为明显，亚 G₁ 期细胞比例迅速增加，G₀/G₁ 期细胞比例很大程度上增加，G₂/M 期、S 期细胞比例明显下降。

2.3 光学显微镜观察

光镜下，对照组人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞具有人神经母细胞瘤典型的形态特征，细胞群体排列不规则，个体细胞形状不规则，呈圆形、梭形、多边形等不规则形态，细胞常成簇生长，有些细胞同时较常见癌巨细胞、多核细胞以及多极分裂相等。细胞体积较小，细胞核大，核形不规则，常见畸形核，核内常见多个核仁，多达 3~5 个，大且深染。细胞质较少，HE 染色不均匀，着色深浅不一，胞质突起较多(图 3)。

经 40 μg/mL NBBP-1 处理的人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞，细胞形态发生变化，细胞群体排列较为规则，个体细胞形状较规则，多为梭形，癌巨细胞、多核细胞及多极分裂相减少。细胞体积变小，形态较一致，核仁数目减少，少数细胞出现核固缩，核质比例减少，细胞质增加，着色深浅较均一。50 μg/mL NBBP-1 处理的人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞，细胞群体较为规则，个体细胞形状较规则，多为梭形，癌巨细胞、多核细胞及多极分裂相减少。细胞体积变小，形态较一致，核仁数目减少，

细胞出现核固缩现象增加，少数细胞出现核凝聚现象，核变小，核质比例减少，细胞质增加，着色深浅较均一；经 60 μg/mL NBBP-1 处理的人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞，细胞群体较为规则，个体细胞形状较规则，多为梭形，癌巨细胞、多核细胞及多极分裂相少见。细胞体积变小，形态较一致，核仁数目减少，细胞出现核固缩现象增加，较多细胞出现核凝聚现象，核变小，核质比例减少，细胞质增加，着色深浅较均一(图 4)。

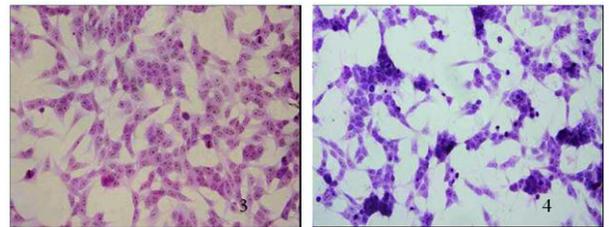


图 3、4 HE 染色光镜观察示 60 μg/mL NBBP-1 处理前后 SK-N-SH 细胞

Fig. 3, 4 HE. staining of SK-N-SH cells before and after 60 μg/mL NBBP-1 treatment

2.4 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞相关基因表达的影响

2.4.1 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞 p53 蛋白表达的影响 应用 SABC 免疫细胞化学方法检测人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞在 NBBP-1 处理后野生型 p53 蛋白(Wtp53)表达的变化。检测结果显示，对照组 SK-N-SH 细胞 Wtp53 蛋白免疫显色反应呈弱阳性，反应产物为浅黄色颗粒，主要分布于整个细胞中，其中细胞胞质中相对较多些，在胞质中分布较为均匀(图 5)。

经 NBBP-1 处理后细胞内 Wtp53 蛋白免疫细胞化学反应为强阳性，深棕黄色反应产物在细胞质区域大量表达，尤其是核周边细胞质中，细胞核内也有表达。可以看出随着处理浓度的升高，其细胞内 Wtp53 蛋白表达量也随之增高(图 6)。

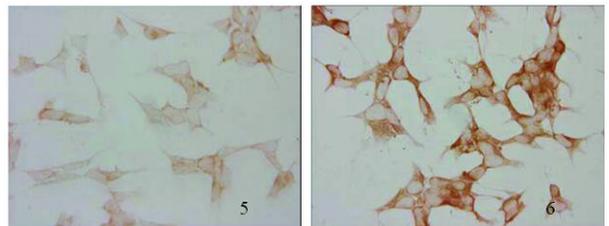


图 5、6 SABC 法免疫细胞化学染色光镜观察示 60 μg/mL NBBP-1 处理前后 SK-N-SH 细胞内 Wtp53 蛋白表达

Fig. 5, 6 Immunocytochemistry staining of the expression of Wtp53 in SK-N-SH cells before and after 60 μg/mL NBBP-1 treatment

2.4.2 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 应用 SABC 免疫细胞化学方法检测人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞在 NBBP-1 处理后 Bcl-2 蛋白表达的变化。免疫细胞化学检测显示，对照组 SK-N-SH 细胞 Bcl-2 蛋白含量较高，免疫显色反应呈强阳性，反应产物为深棕黄色颗粒，大量分布于细胞质内，分布较为致密(图 7)。

经 NBBP-1 处理后，细胞内 Bcl-2 蛋白免疫显色反应有明

显下降,反应呈弱阳性,黄色反应产物主要分布于细胞质内,与对照组相比,核内分布变化不大,但细胞质内分布减少明显。可以看出,随着处理浓度的增加,胞内 Bcl-2 蛋白表达量也逐渐降低(图 8)。

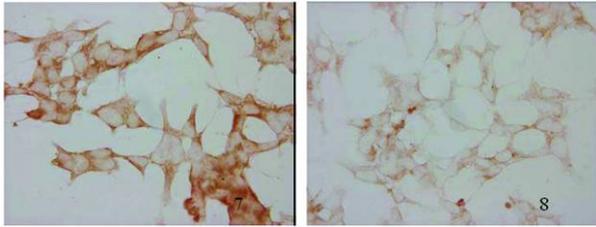


图 7、8 SABC 法免疫细胞化学染色光镜观察示 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 处理前后 SK-N-SH 细胞内 Bcl-2 蛋白表达

Fig.7, 8 Immunocytochemistry staining of the expression of Bcl-2 in SK-N-SH cells before and after 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 treatment

2.4.3 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞 Bax 蛋白表达的影响 应用 SABC 免疫细胞化学方法检测人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞在 NBBP-1 处理后 Bax 蛋白表达的变化。免疫细胞化学检测显示,对照组 SK-N-SH 细胞 Bax 蛋白含量较低,免疫显色反应呈弱阳性,反应产物为黄色颗粒,主要分布于核周边细胞质区域(图 9)。

经 NBBP-1 处理后,细胞内 Bax 蛋白免疫显色反应明显增加,反应呈强阳性,反应物为深棕黄色颗粒,主要分布于细胞核周边细胞质区域。可以看出,随着处理浓度的增加,胞内 Bax 蛋白表达量也逐渐提高(图 10)。

2.4.4 新生牛牛脑活性肽 NBBP-1 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞 Fas 蛋白表达的影响 应用 SABC 免疫细胞化学方法检测人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞在 NBBP-1 处理后 Fas 蛋白表

达的变化。免疫细胞化学检测显示,对照组 SK-N-SH 细胞 Fas 蛋白含量较低,免疫显色反应呈弱阳性,反应产物为黄色颗粒,主要分布于核周边细胞质区域(图 11)。

经 NBBP-1 处理后,细胞内 Fas 蛋白免疫显色反应明显增加,反应呈强阳性,反应物为深棕黄色颗粒,主要分布于细胞核周边细胞质区域。可以看出,随着处理浓度的增加,胞内 Fas 蛋白表达量也逐渐提高(图 12)。

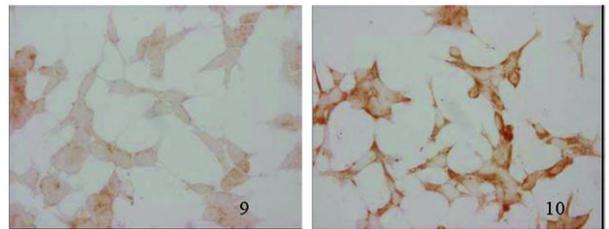


图 9、10 SABC 法免疫细胞化学染色光镜观察示 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 处理前后 SK-N-SH 细胞内 Bax 蛋白表达

Fig.9, 10 Immunocytochemistry staining of expression of Bax in SK-N-SH cells before and after 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 treatment

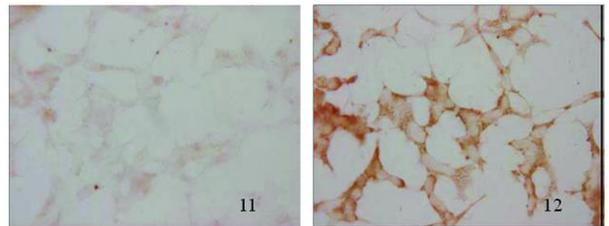


图 11、12 SABC 法免疫细胞化学染色光镜观察示 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 处理前后 SK-N-SH 细胞内 Fas 蛋白表达

Fig. 11, 12 Immunocytochemistry staining of the expression of Fas in SK-N-SH cells before and after 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 treatment

3 讨论

肿瘤细胞增殖活动的抑制和周期调控是鉴定外源性物质诱导肿瘤细胞凋亡的一项重要指标。本文实验结果显示:人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞是一株分裂增殖旺盛的细胞,细胞生长至第 7 d 时,细胞数为原来的 6.82 倍,其倍增时间为 66.47 h。但是,经 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 诱导处理 7 d 后,细胞数较原来少,细胞生长抑制率达到 90.09%。细胞周期各时相的细胞比例发生了显著变化,对照组 SK-N-SH 细胞 G₁ 期细胞比例为 1.75%, G₀/G₁ 期的细胞比例为 49.4%, S 期细胞为 21.33%, 而 G₂/M 期细胞为 27.52%; 经 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NBBP-1 诱导处理后,细胞周期出现明显的凋亡峰, G₁ 期细胞比例高达 19.20%, G₀/G₁ 期细胞比例增加为 59.92%, S 期细胞比例下降为 11.98%, G₂/M 期细胞比例降低为 11.90%。结果表明, NBBP-1 能显著抑制 SK-N-SH 细胞的增殖,使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。这一结果不仅与本实验室应用僧帽牡蛎天然活性肽 BPO-1 以及姜黄素处理人胃腺癌 BGC-823 细胞,同时与前人用格罗霉素、姜黄素、2,3- 吡啶酮、紫杉醇、僧帽牡蛎天然活性多肽 BPO-1 处理神经母细胞瘤、人肾癌 786-O 细胞、人神经母细胞瘤 SH-SY5Y、肺腺癌 A549 以及人胃腺癌 BGC-823 细胞时观察到的细胞增殖抑制和细胞周期阻滞结果相一致^[6-9]。由此表明,

NBBP-1 能显著地抑制 SK-N-SH 细胞的增殖,阻滞细胞周期的运转,诱导细胞凋亡。

细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程,细胞凋亡过程中,均伴有 bcl-2、p53、bax 等凋亡相关基因表达的变化。本文免疫细胞化学方法实验表明,对照组 SK-N-SH 细胞 Wtp53 蛋白、Bax 蛋白、Fas 蛋白免疫显色反应呈弱阳性, Bcl-2 蛋白免疫显色反应呈强阳性。而经 NBBP-1 处理后的 SK-N-SH 细胞, Wtp53 蛋白、Bax 蛋白、Fas 蛋白免疫显色反应呈强阳性, Bcl-2 蛋白免疫显色反应呈弱阳性。因此, NBBP-1 通过上调 wtp53、bax、fas 等促凋亡基因的表达,下调 bcl-2 抗凋亡基因的表达来调控细胞周期进程,促使细胞发生凋亡。这一实验结果不仅与前人应用 2,3- 吡啶酮处理人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y^[8]后, bax 基因表达上调, bcl-2 基因表达下调,而且与本实验室应用牡蛎天然活性肽 BPO-1 处理人胃腺癌 BGC-823 细胞^[5]后, fas 表达上调, bcl-2 表达下调的结果相一致。这表明 NBBP-1 是一种有效的抗肿瘤活性肽,能干预和调节相关癌基因与抑癌基因的表达。

本文研究结果充分表明 NBBP-1 能有效抑制人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖活动,调节和干预凋亡相关基因 fas、bax、p53、bcl-2 的表达,诱导人神经母细胞瘤细胞走向凋亡,从而为 NBBP-1 的抗肿瘤作用及其机理的进一步研究提供了科学依据。

(下转第 222 页)

d 的乳鼠,采取其下颌突,常规固定包埋,行连续切片及 HE 染色,制作成组织切片,在显微镜下对小鼠下颌切牙胚进行动态组织学观察,了解掌握了小鼠切牙胚在下颌突中所处的位置。结果表明小鼠下颌切牙胚位于下颌突内,牙胚由远中向近中斜向上前方行走,牙胚前端表面被一层矿化的硬组织覆盖;E13 d 胎鼠切牙胚发育进入蕾状期,E16 d 的胎鼠切牙胚处于帽状期,E18 d 的胎鼠切牙胚处于钟状早期,新生 2 d 的乳鼠切牙胚处于钟状晚期。本实验的研究结果表明:小鼠切牙胚的空间位置与磨牙胚相比有较大差别,磨牙胚位于下颌突后方牙槽陷窝内,剥除上方覆盖软组织后清晰可见,切牙位于磨牙胚前方下颌突内部,沿下颌突的方向由后向前上方行走;小鼠切牙胚各个时期的发育时间略晚于磨牙胚,如 E18 d 胎鼠的磨牙胚已发育至钟状晚期,而切牙胚在同期则处于钟状早期;牙乳头形成于蕾状期向帽状期牙胚过渡的阶段,此时成釉器下方被覆的外胚间充质细胞即为牙乳头。本实验对小鼠切牙胚进行了动态组织学观察,明确了小鼠切牙胚的空间位置,了解掌握了小鼠切牙胚发育的时空变化规律。

4 结论

本实验通过对小鼠切牙胚进行动态组织学观察,明确了小鼠切牙胚位于下颌突内,牙胚由远中向近中斜向上前方行走,牙胚前端表面被一层矿化的硬组织覆盖;发现 E13 d 胎鼠切牙胚发育进入蕾状期,E16 d 的胎鼠切牙胚处于帽状期,E18 d 的胎鼠切牙胚处于钟状早期,新生 1 d 的乳鼠切牙胚处于钟状晚期。本实验明确了小鼠切牙胚发育的时空变化规律,为进一步建立小鼠切牙胚牙乳头细胞培养模型进而阐明小鼠切牙胚发育机制奠定了重要的实验基础。

参考文献(References)

- [1] Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 9): 1647-1648
- [2] Thomas BL, Liu JK, Rubenstein JLR, et al. Independent regulation of DLX2 expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch [J]. *Development*, 2000, 127(1): 217

- [3] Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1997, 8(1): 4-39
- [4] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development [J]. *Mech Dev*, 1997, 67 (2):111-123
- [5] Neubuser A, Peter H, Bailing R, et al. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation [J]. *Cell*, 1997, 90: 247-255
- [6] Tucker AS, Sharpe PT. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place [J]. *J Dent Res*, 1999, 78 (4): 826
- [7] Bei M, Kratochwil K, Maas RL. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development [J]. *Development*, 2000, 127 (22): 4711-4718
- [8] Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition BMP signaling [J]. *Science*, 1998, 282 (6): 1136-1138
- [9] Hardcastle Z, Mo R, Sharp PT. The Shh signaling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants [J]. *Development*, 1998, 25: 2803- 2811
- [10] Gritli - Linde A, Bei M, Maas R, et al. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization [J]. *Development*, 2002, 129(23): 5323- 5337
- [11] Koyama E, Wu C, Shimo T, et al. Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2001, 222(2): 178- 191
- [12] Hardcastle Z, Mo R, Sharp PT. The Shh signaling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants [J]. *Development*, 1998, 25: 2803- 2811
- [13] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development [J]. *Mech Dev*, 1997, 67(2): 111-123
- [14] Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development [J]. *Mech. Dev*, 1999, 85: 197- 200
- [15] A Nadir i, S Kuchler - Bopp, Y Haikel, et al. Immunolocalization of BMP- 2/ - 4, and Wnt10b in the Developing Mouse First Lower Molar [J]. *J. Histochem. Cytochem*, 2004, 52(1): 103- 112

(图 2-图 5 见封 2)

(上接第 211 页)

参考文献(References)

- [1] Gan Quan, Xin Xiao-yan, Liu Yu, et al. Induction by taxol to apoptosis of HEC-1-B cells [J]. *J Fourth MilMed Univ*, 2007, 28(16):1474-1477
- [2] Zhou Yan-hong, XU Rui-cheng, HU Wen-liang, et al. 9-cis-RA induced apoptosis and inhibited proliferation in human gastric cancer cell line MGC80-3 [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2006, 13 (5): 339-343
- [3] Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, et al. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor [J]. *Nature*, 1997, 386 (6624): 499-502
- [4] Fu Qiang. Advances in research of endomorphin [J]. *Foreign Medicine*, 2001, 22(1):24-26
- [5] Li Peng, Li Qi-fu, Huang Da-chuan, et al. The research of isolation bioactive peptides from *saccostrea cucullata* and biological effects on

the human gastric adenocarcinoma bgc-823 cells [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2002, 41(5):618-623

- [6] Liu Yan, Zhang Chun-yang, Jiang Hua-mao, et al. Study on the effects of curcumin on proliferation inhibiting and cell cycle of human renal cancer 786-o cells [J]. *J Liaoning Med University*, 2007, 28(2):4-6
- [7] Hu Wan-qin, Hu Ming-dao, Dai H Chung, et al. On decreasing raf-1 and akt levels by geldamycin to induce apoptosis in neuroblastomas [J]. *Academic Journal of Kunming Medical College*, 2004, 2:44-47
- [8] Wang Na, Hou Lin, Zhu Zhao-yi, et al. Effect of 2, 3-dioxo indoline on apoptosis and human telomerase reverse transcriptase mRNA in SH-SY5Y cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2007, 23(5): 680-684
- [9] Gao Bao-an, Du Chun-ling, Chen Shi-xiong, et al. Effects of Paclitaxel on Cell Proliferation and Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells [J]. *Tianjin Med J*, 2008, 36(2):133-136