

中国鲎素对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用[△]

李祺福, 欧阳高亮, 鲍仕登, 洪水根

(厦门大学 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:应用从中国鲎血细胞中提取的鲎素处理人肝癌 SMMC-7721 细胞, 研究海洋生物活性物质的抗肿瘤作用。实验结果显示, 经 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲎素处理的 SMMC-7721 细胞生长缓慢, 细胞生长抑制率为 55.57%, 细胞分裂指数抑制率达 43.68%; 处理后的细胞碱性磷酸酶活性降低 36.26%, γ -GT 活性下降, TAT 活性增强。结果表明, 鲎素能有效地抑制肝癌细胞的增殖活动, 具有与癌细胞诱导分化物相似的抗肿瘤效果。

关键词:中国鲎素; 海洋生物活性物质; 肝癌细胞; 诱导分化

中图分类号:R931.74 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-3461(2002)02-0022-04

Inhibitory effects of tachyplesin on the proliferation of human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721

LI Qi-fu, OUYANG Gao-liang, BAO Shi-deng, HONG Shui-gen

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

Abstract: Tachyplesin, a marine bioactive substance which was isolated from acid extracts of horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes, was used to investigate the effects of tachyplesin on the proliferation of human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721. The trypan exclusion and Hematoxylin-Eosin dyeing were applied to examine the growth curve and mitotic index respectively. Biochemistry was used to assay the activities of alkaline phosphatase, γ -GT and TAT. The results showed that the proliferation of SMMC-7721 cells was inhibited obviously after treating with $3.0 \mu\text{g/ml}$ tachyplesin, the growth inhibitory rate amounted to 55.57%, and the cell mitotic index decreased by 43.68%. In the meantime, tachyplesin could decrease the activities of alkaline phosphatase and γ -GT, while increase the activity of TAT. It was demonstrated that tachyplesin could effectively inhibit the proliferation of the human hepatocarcinoma SMMC-7721 cell and induce the cell differentiation.

Key words: tachyplesin; hepatocarcinoma cell; marine bioactive substance; induced differentiation

海洋生物活性物质抗肿瘤研究是海洋生物活性物质开发与抗癌药物研究的一个重要领域。当前, 如何寻找能选择性地干预癌细胞信号传导、调控细胞增殖和分化活动的低分子肿瘤抑制物是其中的重要方向^[1]。本文应

用从海洋动物中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)血细胞中分离提取的低分子活性物质——中国鲎素对人肝癌 SMMC-7721 细胞进行处理, 观察鲎素对肝癌细胞增殖的抑制作用, 为鲎素抗肿瘤作用及其机理的深入研

[△] 基金项目: 教育部高等学校骨干教师资助计划项目和教育部高等学校重点实验室访问学者基金项目资助

究和探索鲎素在肿瘤治疗应用方面的前景提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 SMMC-7721 细胞引自上海细胞所细胞库, RPMI-1640 培养基为 GIBCO 产品, 小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品, 碱性磷酸酶试剂盒购自北京中生生物工程高技术公司, γ -GT 试剂盒购自公司上海联阳生物技术实业有限公司。

中国鲎素为本实验室制备: 参照 Nakamura 等人的方法^[2], 应用 Sephadex G-50、CM-Sepharose CL-6B 凝胶柱层析等技术, 从中国鲎血细胞酸抽提液中分离提取鲎素, 并以培养液配制成不同浓度的鲎素作用液。

1.2 细胞培养与药物处理

SMMC-7721 细胞培养在含 20% 小牛血清, 100U/mL 青霉素、100mg $\cdot$ L⁻¹ 链霉素以及 50mg $\cdot$ L⁻¹ 卡那霉素的 RPMI-1640 培养液中。24h 后换含有不同浓度鲎素的培养液, 对照组细胞则换上不含鲎素的新鲜培养液, 连续培养后备用。

1.3 细胞生长曲线测定

24h 后对照组细胞换上新培养液, 处理组换上含不同浓度鲎素的作用液。实验处理 1~7d, 每天从处理组和对照组各取 3 瓶细胞, 用台盼蓝拒染法进行活细胞计数, 取平均值, 绘制细胞生长曲线。

1.4 细胞分裂指数观察

将细胞以 2×10^4 /mL 接种于一批放有盖玻片条的小青霉素瓶中, 接种 24h 后进行 3.0 mg $\cdot$ L⁻¹ 鲎素处理。实验过程 1~7d, 每天从处理组和对照组各取 3 瓶细胞, 经 Bouin-Hollande 面定液固定、HE 染色, 逐日观察计数各盖玻片条上每 1000 个细胞中的分裂细胞数, 取平均值, 绘制分裂指数曲线图。

1.5 碱性磷酸酶活性测定

参照碱性磷酸酶活性测定试剂盒说明书所提供的方法进行: 取对照组细胞和经 3.0mg $\cdot$ L⁻¹ 鲎素处理 7d 的处理组细胞, D-Hank's 液洗涤, Verson 消化液消化后收集细胞, 细胞计数后离心, 用 PBS 调细胞浓度至 500×10^4 /mL。将细胞悬液冰浴超声波破碎 2~3 次, 每次 10-20s。取样品 20 μ L 加到 24 孔板中, (空白孔加同样量的 PBS), 再加 0.4mL pH10.0 基质缓冲液, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 水浴温育 15min, 加碱性溶液 0.4mL, 4-氨基安替吡啉溶液 0.2mL, 及铁氰化钾溶液 0.2mL, 充分混匀后, 以空白孔液调零, 于 520nm 处比色测定光吸度值, 以 A 值/10 万细胞为单位表示碱性磷酸酶的相对活力。

1.6 γ -谷氨酸转氨酶(γ -GT)活性测定

按上述方法制备细胞悬液, 按文献报道的方法^[3], 参照试剂盒说明, 以重氮试剂比色法于 520nm 处测定光吸度值, 以 A 值/100 万细胞为单位表示 γ -谷氨酸转氨酶的相对活力。以重氮试剂比色法于 520nm 处测定光吸度值, 以 A 值/100 万细胞为单位表示 γ -谷氨酸转氨酶的相对活力。

1.7 酪氨酸-酮戊二酸转氨酶(TAT)活性测定

按上述方法制备细胞悬液, 参照文献报道的方法^[4], 依次在各试管中加入 0.7 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 L-酪氨酸 (溶于 0.125 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸缓冲液, pH7.6) 2.6mL, 4.05 mmol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸吡哆醛 0.04mL, 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA 0.03mL, 100mmol $\cdot$ L⁻¹ DTT 0.03mL, 细胞匀浆 0.2mL (空白管加入 0.2mL PBS), 37 $^{\circ}$ C 水浴预温 10min 后加入 3.24mmol $\cdot$ L⁻¹ α -酮戊二酸 0.1mL, 继续在 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10min, 加入 10mol $\cdot$ L⁻¹ KOH 0.2mL, 剧烈振荡, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。以空白管调零, 于 331nm 处测定光吸度值, 以 A 值/100 万细胞为单位表示酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶的相对活力。

1.8 数据分析

所有实验数据均采用 t 检验及相关性分析。

2 结果

2.1 鲨素对 SMMC-7721 细胞生长的影响

生长测定结果显示,经不同浓度的鲨素处理后,SMMC-7721 细胞生长状态分别受到不同程度的抑制。其中 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲨素连续处理 7d,细胞生长抑制率为 55.57%,与对照组细胞相比较,具有极显著性差异($P < 0.01$)(见图 1)。细胞分裂指数观察显示, $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲨素能有效抑制 SMMC-7721 细胞分裂,细胞分裂指数高峰值从 35.19% 下降为 19.81%,且分裂高峰较对照组前移一天(见图 2)。

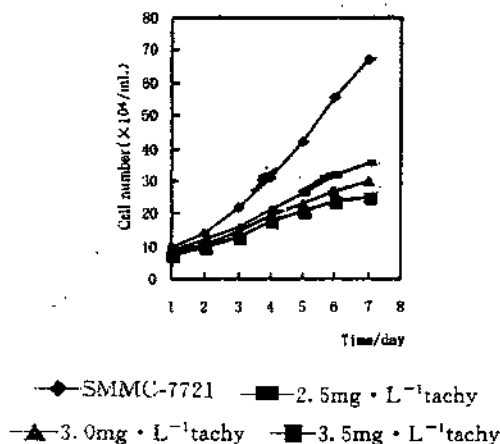


图 1 细胞生长曲线

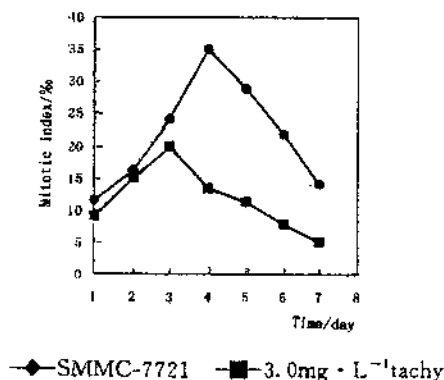


图 2 细胞分裂指数

2.2 鲨素对 SMMC-7721 细胞碱性磷酸酶活性的影响

碱性磷酸酶活性生化测定结果显示,SMMC-7721 细胞具有较高的碱性磷酸酶活性,其酶活性高达 0.51 单位。经 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲨素处理的细胞碱性磷酸酶活性下降至 0.33 单位,抑制率为 35.29% ($P < 0.01$)(见图 3)

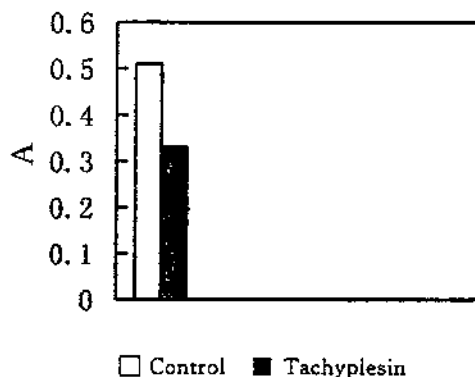


图 3 鲨素对 SMMC-7721 细胞碱性磷酸酶活性的影响

2.3 鲨素对 SMMC-7721 细胞 γ -GT 酶活性的影响

生化测定显示,SMMC-7721 细胞具有较高的 γ -GT 酶活性,高达 0.48 单位。经 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲨素处理后,细胞 γ -GT 酶活性降低,下降为 0.30 单位,抑制率达 37.50% ($P < 0.01$)(见图 4)。

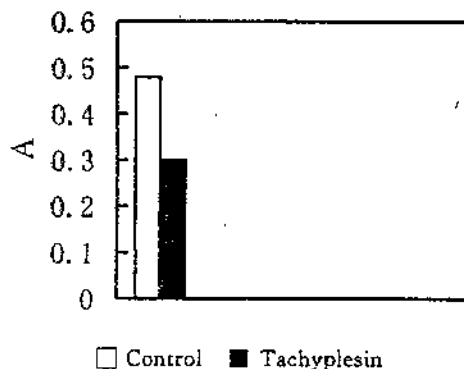


图 4 鲨素对 SMMC-7721 细胞 γ -GT 酶活性的影响

2.4 鲨素对 SMMC-7721 细胞 TAT 酶活性的影响

生化测定显示, SMMC-7721 细胞 TAT 酶活性较低。经 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲎素处理后, TAT 酶活性从 0.44 单位升高为 0.90 单位, 酶活力提高 104.55%, 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$) (见图 5)。

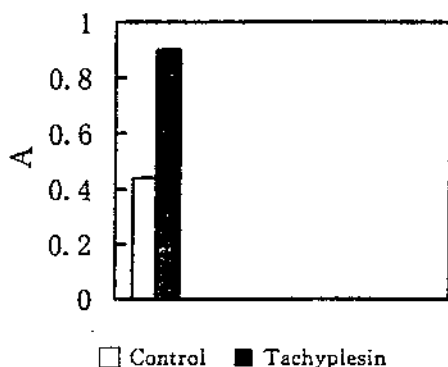


图 5 鲎素对 SMMC-7721 细胞 TAT 酶活性的影响

3 讨论

无限制的持续分裂和不断增殖是肿瘤细胞区别于正常细胞的一个重要特征。因此考察对癌细胞增殖活动的抑制作用是鉴定外源性物质抗肿瘤作用的一项重要指标^[5]。正常细胞一般分化程度较高或分化成熟, 不再进行增殖分裂或仅进行受到严格调控的增殖分裂, 只执行特定的功能。分化程度低则是肿瘤细胞又一重要特征。肿瘤细胞恶性增殖和分化程度较低是以与其相适应的代谢活动为基础, 主要表现在细胞物质代谢和能量代谢过程中标志酶的变化。碱性磷酸酶是消化道肿瘤的重要标志酶之一, 其活性与细胞增殖活动密切相关^[6,7], 高活性的碱性磷酸酶与肝癌患者的生存期预后有关^[8]。 γ -GT 是肝癌标志酶之一, 与肝癌的分化程度呈负相关。而 TAT 是肝癌细胞分化的标志酶之一, 其活性与肝癌分化程度呈正相关^[9]。

本文生长曲线测定和分裂指数观察结果显示, $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲎素对人肝癌 SMMC-7721 细胞的生长和分裂均具有明显的抑制

作用。生化测定结果显示, 经鲎素处理的 SMMC-7721 细胞碱性磷酸酶活性下降, γ -GT 活性降低, TAT 活性升高, 这与一些诱导分化物能有效改变细胞代谢酶活性的效应相类似^[10]。表明鲎素可有效抑制肝癌细胞的恶性增殖活动, 并对肝癌细胞具有一定的诱导分化作用, 从而为鲎素抗肿瘤作用及其机理的深入研究和探索鲎素在肿瘤治疗应用方面的前景提供了重要的依据。

参考文献

- [1] 杨根书, 刘增加. 低分子肿瘤抑制物研究概况[J]. 中国生化药物杂志, 1995, 16(5): 2346.
- [2] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*), isolation and chemical structure[J]. *J Bio Chem*, 1988, 263(32): 16709.
- [3] 上海市医学化验所编. 临床生化检验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984.
- [4] Diamodstone TL. Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde[J]. *Anal Biochem*, 1996, 16: 395.
- [5] Li QF, Wang DY. The differentiation of human gastric adenocarcinoma cell line MGC80-3 induced by dBcAMP in vitro[J]. *Chin J Cancer Res*, 1991, 3: 4.
- [6] Skinner JM, Whitehead R. Carcinoplacental alkaline phosphatase in malignant and premalignant conditions of the human digestive tract[J]. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1981, 394(1-2): 109.
- [7] Wasserman L, Nordenberg J, Beery E, et al. Differential effects of sodium butyrate and dimethyl sulfoxide on gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Experimental Cell Biology*, 1987, 55(4): 188.
- [8] Chevreton S, Trinchet JC, Mathieu D, et al. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 1999, 31(1): 133.
- [9] Kang JH, Shi YM, Zheng RL. Effects of ascorbic acid on human hepatoma cell proliferation and redifferentiation[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1999, 20(1): 1019.
- [10] 章雄文. 诱导肝癌分化药物的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 1999, 26(5): 389.

(收稿日期: 2001-08-21)