

牡蛎低分子活性肽对人肺腺癌 A549 细胞形态与超微结构变化的影响

梁 盈, 黄大川, 石松林, 李祺福*
(厦门大学生命科学学院 细胞生物化学研究室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以牡蛎 (*Saccostrea cucullata*) 体内分离提取出的牡蛎天然低分子活性多肽 (BPO-L, Bioactive Peptides of Oyster in Peak L) 为效应物, 观察研究 BPO-L 对人肺腺癌细胞形态和超微结构的影响. 光镜观察显示经 0.1 mg/mL BPO-L 处理后的 A549 细胞体积增大, 趋于扁平铺展状态, 细胞核质比例变小, 核仁数量减少. 透射电镜观察显示经 0.1 mg/mL BPO-L 处理后的 A549 细胞核形态较规则, 细胞核内异染色质减少, 常染色质增多; 细胞质内线粒体数量增多, 结构较为一致, 高尔基体呈较为典型发达状态, 并出现粗面内质网增多和多聚核糖体减少等变化. 结果表明, BPO-L 能有效改变人肺腺癌细胞的恶性形态与超微结构特征, 对肺癌细胞具有一定的诱导分化作用.

关键词: 牡蛎; 低分子活性肽; 肺癌细胞; 细胞形态; 超微结构
中图分类号: Q 247.2 Q 28 **文献标识码:** A **文章编号:** 0438-0479(2006)S-0177-04

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海洋药物研究的重要方面. 牡蛎不仅是一种高营养价值的海产品, 也是一种很有药用价值的海洋生物, 其药用价值和保健功能不仅在中医药领域中得到推崇^[1], 其研究也一直受到国内外学者的高度重视. 近几年来国内已有研究报道显示牡蛎粗提取物具有抗肿瘤作用, 如对癌细胞的放射增敏、清除氧自由基以及对动物机体的免疫调节作用等^[2-5]. 为了找寻具有干预细胞信号传导、调控细胞增殖分化功能的肿瘤低分子抑制物, 我们从鲜活牡蛎酸提物中分离提取低分子活性肽 (BPO-L, Bioactive Peptides of Oyster in Peak L), 以人肺腺癌 A549 细胞为实验模型, 研究了牡蛎低分子活性肽对肿瘤细胞的作用. 本文报道了 BPO-L 对人肺腺癌 A549 细胞形态和超微结构的影响.

1 材料与方法

1.1 细胞培养与牡蛎低分子活性肽处理

牡蛎低分子活性肽的提取及分子量测定 (见本实验室已发表的论文)^[6].

人肺腺癌 A549 细胞培养在 RPMI 1640 培养液中, 细胞接种 24 h 后进行 BPO-L 处理. 得到的纯化 BPO-L 溶解于 D-Hank's 液中配制成 7 mg/mL 浓度的

干液, 并以培养液配制成 0.1 mg/mL 作用液. 实验组细胞弃旧培养液换上含有 BPO-L 的作用液, 对照组细胞则换上不含 BPO-L 的新鲜培养液, 连续培养备用.

1.2 光学显微镜观察样品制备

将对照组和实验组细胞分别以 5×10^4 细胞/mL 浓度接种于放有盖玻片条的小青瓶中, 培养 72 h 后取出长有细胞的盖玻片条经 D-Hank's 洗涤, Bouin-Hollande 液固定过夜, 常规 HE 染色, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照.

1.3 透射电镜观察样品制备

取对数生长期细胞, 以 10×10^4 细胞/mL 的浓度接种于 50 mL 培养瓶中, 接种 24 h 后进行加药处理. 对数生长期的对照组细胞和连续培养 10 d 的处理组细胞分别经温 D-Hank's 液洗涤 2~3 次, 用橡皮刮收集细胞至离心管中, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清. 细胞沉淀用 2.5% 戊二醛 4℃ 预固定 2 h, PBS 漂洗 3 次, 1% 四氧化锇 4℃ 固定 2 h, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 823 包埋, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 于 JEM 100-CXII 型透射电镜下观察拍照.

2 实验结果

2.1 光学显微镜观察

光镜下可见 A549 细胞具有人肺腺癌细胞典型的形态特征. 细胞排列不规则, 多以大小不同的上皮样细胞为主, 同时呈现较常见癌巨细胞、多核细胞以及多极分裂相等. 细胞核大, 核形不规则, 常见畸形核, 核内常

收稿日期: 2006-01-09
基金项目: 福建省科技计划项目 (2003N0052) 资助
作者简介: 梁盈 (1981-), 女, 博士研究生.
* 通讯作者: chifulee@xmu.edu.cn

见多个核仁;细胞质较少,HE染色不均匀,着色深浅不一(图版 I-1).

而经 0.1 mg/mL 的 BPO-L 处理后, A549 细胞产生了一定的形态变化:细胞体积增大,趋于铺展状态,多核细胞和癌巨细胞少见.细胞核形状较为圆整,核仁数量减少,细胞质比较丰富,HE染色均匀,呈现出与正常上皮细胞相似的形态变化(图版 I-2).

2.2 透射电子显微镜观察

透射电子显微镜观察结果显示, A549 细胞体积比较大,核质比例较大,细胞核形状不规则,核膜向核内有不同程度的凹陷,核仁数量相对较多,大小不一.细胞核内异染色质多,除核内膜与核仁部位,还有一些呈团块的散在分布(图版 I-3).而经 0.1 mg/mL BPO-L 处理后的 A549 细胞超微结构发生了明显的变化,核质比减小,细胞核的形状趋向规则,呈圆形或卵圆形,细胞核内异染色质明显减少,而常染色质增多(图版 I-4).

透射电镜观察结果还显示 A549 细胞,其细胞质内线粒体体积小,形状不规则(图版 I-5).高尔基体较少见,体积小,高尔基体囊数目少,排列不规则,极性不明显,高尔基体囊腔有明显的膨胀现象,甚至呈泡状化,粗糙内质网不发达,呈散在分布,细胞质多聚核糖体较多,游离核糖体较少;另细胞质含大小、数量不一的分泌颗粒(图版 I-7).

而经 0.1 mg/mL BPO-L 处理后,在细胞质中线粒体数量明显增多,呈典型的短棒形或椭圆形,可明显看到嵴的数目略有增加(图版 I-6).高尔基体呈典型发达状态.粗糙型内质网数量明显增多,长度长,多聚核糖体减少而游离核糖体增多,使细胞质呈电子密度均匀分布;分泌颗粒明显增多(图版 I-8).

3 讨论

肿瘤细胞的形态和超微结构与其相应的正常亲本细胞存在着较大的差异,一般肿瘤细胞的大小不一致,具有球形、梭形、上皮样及大型癌巨细胞、多核细胞、多极分裂相等多种细胞形态;核质比例大,核畸形,核仁增多,细胞器不发达,细胞表面绒毛较多,边缘出现大量的丝状伪足等一系列恶性形态和超微结构表型特征^[7].因此,考察和鉴定肿瘤细胞形态与超微结构特征的变化,历来都是鉴定外源性物质对肿瘤细胞作用效应的重要判断依据^[8].同时细胞形态与超微结构的恢复性变化又是肿瘤细胞分化的一个重要特征.诱导分化后的肿瘤细胞丧失其形态与超微结构恶性特征,向其同组织来源的正常细胞形态与超微结构转变.由于细胞形态与超微结构是其行使细胞功能的基础和表现,细胞形态与超微结构的改变在一定程度上可反映

细胞相关功能活动状态也发生了变化.因此,诱导分化处理前后肿瘤细胞形态与超微结构特征的改变是判断肿瘤细胞是否逆转分化的一个重要指标^[8-10].

本研究光镜,透射电镜的观察结果分别显示: A549 细胞体积较大,多以大小不同的上皮样细胞为主,同时呈现较常见癌巨细胞、多核细胞以及多极分裂相等.细胞核大,畸形突出,核染色深,但不均匀.核内常见多个核仁,细胞核内异染色质多,除核内膜与核仁部位,还有一些呈团块的散在分布.核质比例较大,细胞核形状不规则,核膜向核内有不同程度的凹陷,核仁数量相对较多,大小不一.细胞质内线粒体体积小,形状不规则,常可见呈深色负染,嵴的结构不清晰.高尔基体不发达,体积小,极性不明显.粗糙内质网不发达,呈散在分布,细胞质多聚核糖体较多,游离核糖体较少.另细胞质含大小、数量不一的分泌颗粒.这些均显示 A549 细胞具有肿瘤细胞的形态与超微结构的典型恶性表型特征. BPO-L 能引起 A549 细胞的细胞形态和超微结构发生如下变化:细胞体积增大,趋于铺展状态,上皮样细胞增多.细胞核形状较为规则,核仁数量和异染色质减少,细胞质比较丰富,HE染色较为均匀.高尔基体呈典型发达状态.粗糙型内质网,游离核糖体和分泌颗粒数量明显增多.这些变化和 A549 细胞形态和超微结构特征有较大的差异而与相应的正常细胞较为相似. BPO-L 的这一作用与前人应用化学诱导分化物处理肺癌细胞的观察结果是一致的,如张绍仪、黄炜、鲍依稀和王虎等人分别应用环六亚甲基双乙酰胺(HMBA)、丁酸钠、9-顺维甲酸和榄香烯等处理人肺癌 A549 等细胞,均报道了诱导分化处理后的肺癌细胞出现细胞形态规则一致、细胞核形较为圆整、核质比例减小、核仁缩小、核内异染色质减少,以及细胞器比较发达等形态和超微结构的显著变化^[10-13].这些与本文应用 BPO-L 对肺癌细胞作用的变化是一致的.本课题组应用具有分化作用的低分子海洋生物活性肽——鲨素处理人胃癌 BGC-823 细胞,肝癌 SMMC-7721 和人肺腺癌 SPC-A-1 结果发现这些细胞都出现细胞核质比例减小,细胞核形状较为规则,细胞器较为典型等变化^[9,14,15].这些结果也与本文 BPO-L 处理肺癌细胞后引起的细胞形态结构与超微结构变化相类似,这表明 BPO-L 具有与上述一系列诱导分化物相同的功能,能有效的改变肺癌细胞的恶性形态和超微结构特征,使之出现与正常细胞相似的形态和结构变化,从而对人肺腺癌细胞具有显著的诱导分化作用.

为此,更深入地研究牡蛎低分子活性肽的抗肿瘤作用机理问题,显然对于牡蛎低分子活性肽在肿瘤防治中的应用和海洋天然活性物质抗肿瘤研究均有重要意义.

参考文献:

[1] 徐静, 于红霞. 牡蛎提取物的生物活性研究进展 [J]. 公共卫生, 2004 20(11): 1395– 1397

[2] 王颖, 马安伦, 张惠珍, 等. 牡蛎提取物抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中国海洋药物, 1997 16(1): 18– 22

[3] 胡国强, 颜艳, 田菲. 复方海洋药物对荷瘤小鼠生活状态的影响及其抑瘤增效作用 [J]. 中国临床康复, 2004 8 (32): 7228– 7230

[4] Escoubas JM. Oyster KK – like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues [J]. Febs Letters, 1999, 453(3): 293– 298

[5] Kumazawa Y. Purification and characterization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Journal of Agricultural and Food chemistry, 1997, 45(3): 604– 610

[6] 黄大川, 李祺福, 李鹏, 等. 牡蛎低分子活性物质对人肺腺癌 A549 细胞的生物学效应 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2002 41(5), 614– 617

[7] 李鹏, 李祺福, 黄大川, 等. 僧帽牡蛎天然活性多肽 BPO-1 抗人胃腺癌 BGC-823 细胞活性研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2002 41(5), 618– 622

[8] Cheson B D, Jasperse D M, Chun H G, et al Differentiation agent in the treatment of human malignancies [J]. Cancer Treatment Reviews, 1986, 13(3): 129– 135

[9] Li Q F, Ouyang G L, Li C Y, et al Effects of tachyplesin on the morphology and ultrastructure of human gastric carcinoma cell line BGC- 823 [J]. World Journal of Gastroenterology, 2000 6(5): 676– 680

[10] 张绍仪, 汤育瑛. 六亚甲基二乙酰胺诱导分化治疗肺癌小结 [J]. 肿瘤防治研究, 1994 21(5): 312– 314

[11] 黄炜, 黄济群, 廖兆全. 丁酸钠诱导高转移人肺癌细胞恶性表型逆转和抑制侵袭作用的研究 [J]. 肿瘤防治研究, 1998 26(6): 111– 114

[12] 鲍依稀, 罗春丽, 汤为学, 等. 榄香烯对人肺腺癌细胞 A549 作用机理的初步研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2002, 29(5): 338– 341.

[13] 王虎, 于雪艳, 张士国, 等. 9- 顺维甲酸对肺癌细胞生长特性的影响 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2004 4 (4): 228– 232

[14] 李祺福, 李长友, 欧阳高亮, 等. 中国鲨鲨素对人胃腺癌 BGC- 823 细胞形态和超微结构的影响 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000 39(6): 837– 843

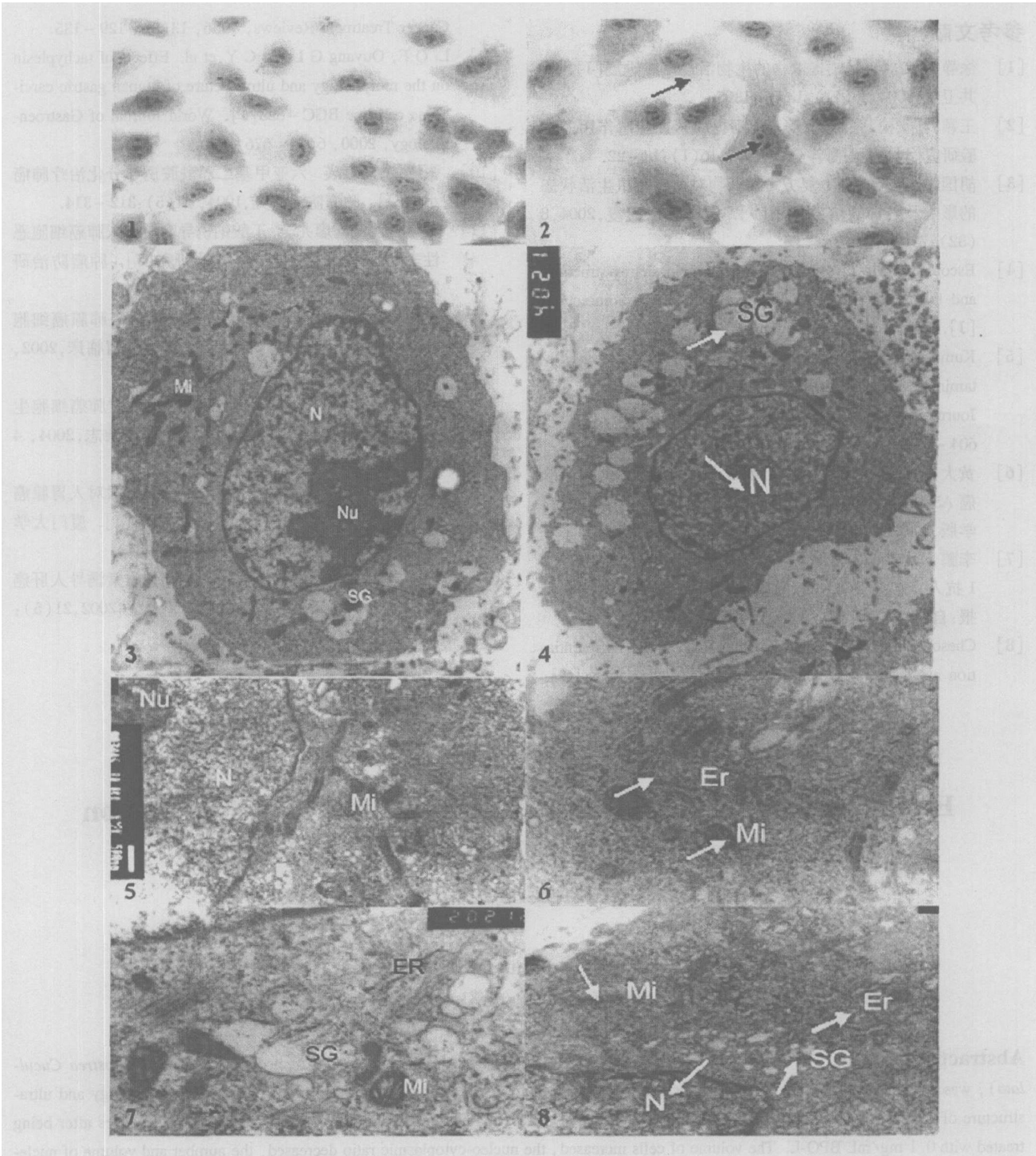
[15] 李祺福, 欧阳高亮, 刘庆榕, 等. 中国鲨鲨素诱导人肝癌 SMMC- 7721 细胞分化的观察 [J]. 癌症, 2002 21(5): 480– 483

Effects of Oyster Low Molecular Mass Bioactive Peptides on the Morphology and Ultrastructure of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells

LIANG Ying HUANG Da-chuan, SHI Song-lin, LI Qi-fu*
(Laboratory of Cell Biology, School of Life Sciences X ian en University, X ian en 361005, China)

Abstract In this study, The BPO-L (Bioactive Peptides of Oyster in Peak L), which was extracted from oyster (*Saccostrea Cuculata*), was used to treat the human lung adenocarcinoma A549 cells for investigating the effects of BPO-L on their morphology and ultrastructure of A549. Optical microscope observation showed that A549 cells had undergone restoration morphological changes after being treated with 0.1 mg/mL BPO-L. The volume of cells increased, the nucleo-cytoplasmic ratio decreased, the number and volume of nucleus decreased. Transmission electron microscope observation showed that in the A549 cells which treated with 0.1 mg/mL BPO-L, the shape of nuclear became regular, heterochromatin decreased while euchromatin increased, the number of mitochondrion increased and its structure appeared consistent, Golgi complex turned to be typical, endoplasmic reticulum increased and polyribosome decreased. These results showed that BPO-L could change their original malignant morphological and ultrastructure characteristics of the human lung adenocarcinoma cells effectively and had inducing differentiation effects on the human lung adenocarcinoma cells.

Key words Oyster low molecular mass bioactive peptides; lung adenocarcinoma cells; cell morphology; ultrastructure



图版 I BPO-L处理前后 A549细胞形态与超微结构特征的改变

Plate I Change of morphological and ultrastructure characteristics of A549 cell treated with BPO-L

1 光镜观察 A549细胞 HE染色 (×400); 2 光镜观察经 0.1 mg/mL 牡蛎低分子活性肽处理的 A549细胞 HE染色 (×536); 3 透射电镜观察 A549细胞 (×4 000); 4 透射电镜观察经 0.1 mg/mL BPO-L 处理后 A549细胞形态 (×4 000); 5 透射电镜观察 A549细胞线粒体 (Mi) (×80); 6 透射电镜观察 BPO-L 处理组细胞的线粒体 (Mi)、内质网 (Er) 结构 (×14 000); 7 透射电镜观察 A549 细胞内质网 (Er)、分泌颗粒 (SG) 结构以及多聚核糖体 (↑) 的分布 (×20 000); 8 透射电镜观察 BPO-L 处理组细胞线粒体 (Mi)、内质网 (Er)、分泌颗粒 (SG) 分布 (×14 000)
N (细胞核) Nu (核仁) Mi (线粒体) Er (内质网) G (高尔基体) SG (分泌颗粒) →示变化部位