

Anti-Tumor Activity of the Peptide from *Bullacta exarata*

Huanle Lin, Zhiyi Li, Bo Chen, Zhongda Yi, Zefeng Wang, Jianyin Ma*

School of Food and Pharmacy, Donghai Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan
Email: *chymjy@zjou.edu.cn

Received: May 30th, 2012; revised: Jun. 29th, 2012; accepted: Jul. 5th, 2012

Abstract: Objective: To isolate and purify the peptide from *Bullacta exarata*, and study its anti-tumor effect on prostate cancer. **Methods:** The antimicrobial peptides were hydrolyzed from soft tissues of *Bullacta exarata* by trypsin, and purified by sephadex chromatography. Measured by MTT assay in vitro anti-tumor activity and cell morphology was observed by fluorescence staining. **Results:** The components separated from membrane (molecular weight 5 - 10 KD) and isolated by the Sephadex G-75 could inhibit the PC-3 cells growth, and the latter stronger than the former. **Conclusion:** The *Bullacta* peptides could inhibit the PC-3 cells growth and have anti-tumor activities on prostate cancer.

Keywords: Peptides of *Bullacta Exarata*; Anti-Tumor; Enzymatic; Prostate Cancer

泥螺多肽抗肿瘤活性的初步研究

林焕乐, 励芝伊, 陈 博, 易忠达, 王泽峰, 马剑茵*

浙江海洋学院东海科学技术学院食品与药理学系, 舟山
Email: *chymjy@zjou.edu.cn

收稿日期: 2012 年 5 月 30 日; 修回日期: 2012 年 6 月 29 日; 录用日期: 2012 年 7 月 5 日

摘 要: 目的: 提取分离泥螺软体组织, 探索其体外抗肿瘤活性。**方法:** 采用胰蛋白酶酶解法获得泥螺多肽粗提物, 通过超滤膜滤过技术获得分子量在 5~10 kDa 的组分。用葡聚糖凝胶 G-75 分离、纯化, MTT 法测定其体外抗肿瘤活性并用荧光染色法观察细胞形态。**结果:** 经膜分离得到的组分(分子量 5~10 KD)和经葡聚糖凝胶 G-75 分离得到的泥螺多肽对前列腺 PC-3 肿瘤细胞均有一定的抑制作用, 且后者强于前者。**结论:** 泥螺多肽具有一定的抗前列腺 PC-3 肿瘤细胞的活性。

关键词: 泥螺多肽; 抗肿瘤; 酶解; 前列腺癌

1. 引言

泥螺(*Bullacta exarata*), 俗称“吐铁”、“黄泥螺”、“梅螺”等^[1], 隶属于腹足类后鳃亚纲软体动物, 由贝壳和软体两部分组成, 为西太平洋沿岸半咸水滩涂的习见种类, 广泛分布于我国南北沿海潮间带滩涂, 是典型潮间带底栖匍匐动物, 多栖息在中底潮带, 泥沙或沙泥的滩涂上, 在风浪小、潮流缓慢的海湾中尤其密集, 以东海和黄海产量最多。其生物体内蛋白含

量丰富, 多肽物质丰富。

一些生物活性多肽常以非活性状态存在于蛋白质中, 这些蛋白质经过蛋白酶的水解作用, 使隐藏于其中的活性肽释放出来, 有可能发挥出比蛋白更多的生物活性^[2-4]。当今社会, 人们受肿瘤的严重危害, 寻找低毒、高效的抗肿瘤药物迫在眉睫。而海洋物质丰富, 近年来有报道海洋天然活性成分具有一定的抗肿瘤活性^[5,6]。本文以新鲜的泥螺软体组织为对象, 提取分离了不同分子量的泥螺活性多肽, 并对分子量在 5~10 kDa 的组分进行体外抗肿瘤活性的初步研究, 为

*通讯作者。

抗肿瘤药物的研发提供参考。

2. 材料与仪器

2.1. 材料

泥螺, 购于舟山南珍菜场。胰蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司); 葡聚糖凝胶 G-75(Pharmacia); 其余试剂均为分析纯。

2.2. 主要仪器

BSA124S 型电子天平(德国, Sartorius AG 公司); DS-1 型高速组织捣碎机(上海标本模型厂); 高速冷冻离心机 CF16RXII(日立 HITACHI 公司); TG16-WS 台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司); SHB-III A 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 旋转蒸发器 RE-2000(上海亚荣生化仪器厂); U2800 型紫外可见分光光度计(日本, HITACHI 公司); 自动部分收集器(BSZ-40-LCD); HWS26 型微电脑电热恒温槽(上海一恒科技有限公司, 上海一恒科学仪器有限公司); Spectrum 752 p 紫外可见分光光度计(上海恒平科学仪器有限公司); MSC300 超滤杯(超滤膜: 5 kDa 和 10 kDa)(上海摩速科学器材有限公司); LGJ-18 冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司); QT-58A 智能紫外检测仪(上海琪特分析仪器有限公司); QT-199FC-LCD 智能自动部分收集器(上海琪特分析仪器有限公司)。

3. 方法

3.1. 酶解

泥螺去壳, 取其软体采用组织捣碎技术捣碎, 于 -20°C 冷藏备用。取上述经捣碎的泥螺软体组织用胰蛋白酶酶解, 选用最佳酶解条件^[5], 即酶解温度 45°C , pH 8.7, 料液比 1:4, 酶解时间 8 h, 加酶量 0.48%。经灭酶后, 在转速 8500 rpm 左右, 温度为 4°C 条件下离心 25 min, 弃去滤渣。

3.2. 酶解产物膜分离

取上述澄清液, 使用超滤杯及截取分子量分别为 5 kDa 和 10 kDa 的超滤膜, 截取后分别获得分子量为 5~10 kDa 的酶解液, 旋转蒸发, 冷冻干燥获得固体粉末。

3.3. 葡聚糖凝胶层析分离

Sephadex G-75 用 4°C 蒸馏水溶胀 12 h, 装入 $2.6\text{ cm} \times 100\text{ cm}$ 层析柱。取备用的冻干样品用 3 mL 去离子水溶解($0.1\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)后, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 上柱。用超纯水平衡、洗脱, 流速 $1.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 每 2 min 收集 1 管, 即每 1 收集管为 3 mL 的流出液, 分别将各收集管的流出液在波长 280 nm 处测定吸收值。收集洗脱峰, 浓缩冻干备用。

3.4. 细胞培养

选取人前列腺癌细胞 PC-3(原购自中科院上海细胞库, 由本实验室传代保存), 用含 10%胎牛血清的 F12 完全培养基于 37°C , 5% CO_2 的培养箱中培养, 细胞呈单层贴壁生长, 0.25%的胰蛋白酶消化, 每 2~3 天传代 1 次, 实验时选用对数生长期细胞。

3.5. 细胞增殖抑制率的测定

采用 MTT 法检测。取对数生长期的前列腺癌 PC-3 细胞制成悬液, 接种至 96 孔板, 每孔 200 μL , 置 5% CO_2 , 37°C 培养箱中分别培养 24 h, 然后分别加入不同浓度泥螺多肽溶液, 每个浓度设 3 个平行孔, 同时设不加药对照组, 置 5% CO_2 , 37°C 培养箱中孵育 24 h、48 h、72 h。培养结束后, 加 PBS 溶液(pH 7.2)清洗 3 次, 再加 MTT 继续培养 4 h, 吸弃 MTT, 加二甲基亚砷每孔 150 μL , 置酶联免疫检测仪在 490 nm 测吸光度, 计算细胞增殖抑制指数(IR)^[7]。计算公式如下:

$$\text{IR} = \frac{\text{阴性对照组OD值} - \text{实验组OD值}}{\text{阴性对照组OD值} - \text{调零孔OD值}} \times 100\%$$

3.6. 细胞凋亡的形态学分析

取处于指数生长期的 PC-3 细胞, 加入适量 0.25% 胰酶消化, 用含 10%进口小牛血清的 1640 培养液配成悬液, 用血球细胞板计数, 配成 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 取放有盖玻片的 6 孔细胞培养板, 每孔加细胞悬液 3 mL, 将细胞板放在 37°C , 含 5% CO_2 的培养箱中分别孵育 24 h 后取出。将每组药液分别加入各孔中, 再将细胞板放在 37°C , 含 5% CO_2 的培养箱中分别孵育 24 h 后取出细胞培养板。取出载玻片, 加 1 滴混合荧光染色液: 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 吖啶橙(AO)和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴乙

啉(EB)混匀，压上爬满细胞的盖玻片，荧光显微镜下观察凋亡细胞形态。

4. 结果与分析

4.1. 葡聚糖凝胶 G-75 分离峰图

酶解后的泥螺多肽混合物，经超滤膜分离，获得不同分子量的粗提物。选取分子量为 5~10 kDa 的酶解液，经葡聚糖凝胶 G-75 柱层析分离，在 280 nm 紫外分光光度计检测下，测定其吸收峰如图 1 所示。结果表明，第 15 管~19 管的流出液出现 1 个吸收峰，第 42 管~58 管的流出液又出现 1 个吸收峰，葡聚糖凝胶洗脱得到的两个峰分离较好，记为峰 1、峰 2。由于本实验室前期的研究中，已通过正交法得到了泥螺活性肽的最佳酶解条件，并且已对 3 kDa 组分进行了初步的抗癌活性研究^[8]。因此本实验在此基础上采用 G75 葡聚糖凝胶对 5~10 kDa 多肽产物进行分离、纯化，并测定其体外抗肿瘤活性。

4.2. 细胞增殖抑制率的测定

按照 2.5 方法所示观察对 PC-3 细胞株的增殖抑制

作用。实验结果表明，5~10 kDa 组分和峰 2 对前列腺 PC-3 癌细胞都有一定的抑制作用，并且随着浓度的增加和时间的推移其抑制作用逐渐加强。峰 2 浓度为 30 mg·mL⁻¹ 时，对前列腺 PC-3 癌细胞抑制效果较明显。然而当峰 2 浓度为 20 mg·mL⁻¹ 时，虽有抑制效果但其抑制效果明显低于 30 mg·mL⁻¹ 时的抑制作用，也比 5~10 kDa 组分的抑制效果差(表 1 和图 2)。

4.3. 细胞凋亡的形态学分析

图 3 正常 PC-3 细胞，核染色质呈均匀黄绿色，AO/EB 染色 × 400。

图 4 浓度为 20 mg·mL⁻¹ 的泥螺多肽作用于 PC-3 细胞 24 h，晚期凋亡细胞较多，核染色质固缩，呈桔红色。但有部分细胞属于早期凋亡，细胞膜完整，核染色质固缩，呈现黄绿色，AO/EB 染色 × 400。

图 5 浓度为 30 mg·mL⁻¹ 的泥螺多肽作用于 PC-3 细胞 24 h，随着浓度的增加，细胞死亡增多，且核染色质固缩，呈均匀一桔红色，AO/EB 染色 × 400。

泥螺多肽作用 PC-3 细胞 24 h 后，细胞经 AO、EB 双染色，在荧光显微镜下可见 4 种细胞。活细胞：

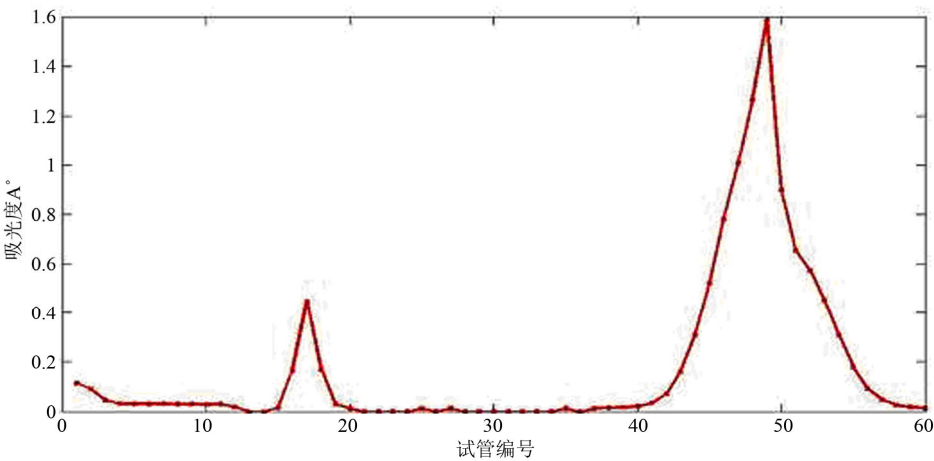


Figure 1. Sephadex G-75 gel chromatography of the *Bullacta* peptides (5~10 kDa)
图 1. 泥螺多肽 5~10 kDa 组分葡聚糖凝胶 G-75 峰图

Table 1. Inhibition rate of *Bullacta* peptides on PC-3 cells
表 1. 泥螺多肽 5-kDa 组分和峰 2 对前列腺 PC3 癌细胞的抑制率

时间	峰 2		5~10kDa	
	30 mg/mL	20 mg/mL	30 mg/mL	20 mg/mL
24	47.85%	8.47%	26.78%	20.12%
48	60.43%	15.16%	35.49%	26.41%
72	73.60%	19.64%	41.65%	33.35%

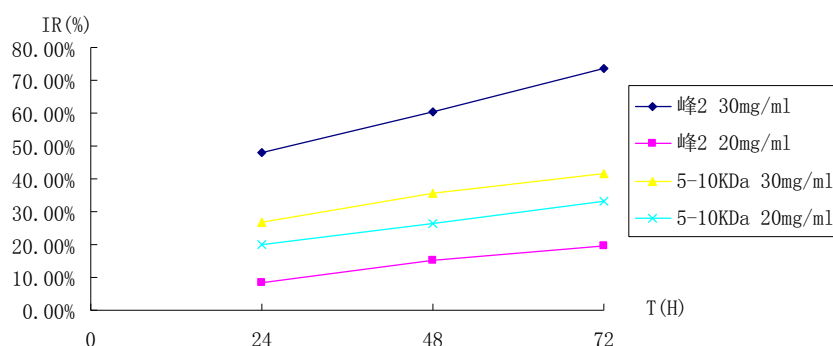


Figure 2. Effects of *Bullacta* peptides on the proliferation of PC-3 cells
图 2. 泥螺多肽 5~10 kDa 组分和峰 2 对前列腺 PC3 癌细胞的抑制率与时间关系

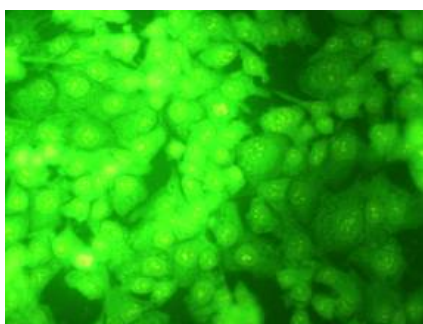


Figure 3. Normal cells with EB/OB staining
图 3. 正常细胞 AO/EB 双染荧光显微镜观察图

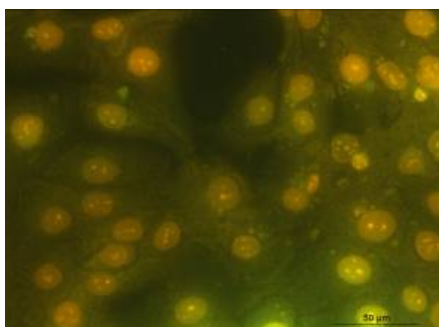


Figure 4. Low concentration of *Bullacta* peptides with EB/OB staining
图 4. 低浓度多肽作用下 AO/EB 双染荧光显微镜观察图

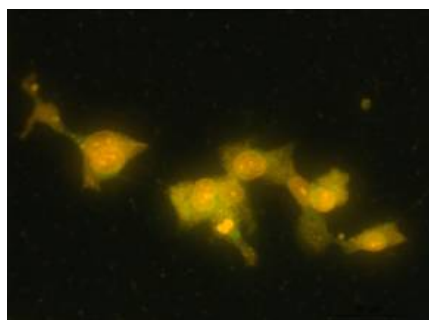


Figure 5. High concentration of *Bullacta* peptides with EB/OB staining
图 5. 高浓度多肽作用下 AO/EB 双染荧光显微镜观察图

核染色质呈均匀黄绿色；早期晚期凋亡细胞：细胞数较少，细胞膜完整，但核染色质固缩，呈黄绿色荧光；晚期凋亡细胞：核染色质固缩，呈桔红色；死亡细胞：细胞染成均一桔红色。并且随着泥螺多肽剂量的增加，晚期凋亡和死亡细胞逐渐增多，晚期凋亡细胞核浓聚，被染成桔红色，而死亡细胞被染成均一的桔红色。

5. 小结

本实验结果提示，采用胰蛋白酶酶解泥螺软体组织，并经超滤膜分离得到分子量为 5-10kDa 的粗提物，进一步通过 G75 葡聚糖凝胶柱层析分离，所得到的多肽产物对前列腺 PC-3 细胞具有一定的抗肿瘤活性。其抗肿瘤活性多肽的进一步分离纯化以及作用机制还有待于深入研究。

参考文献 (References)

- [1] 李晔, 苏秀榕, 李太武. 泥螺抗菌肽的初步研究[J]. 台湾海峡, 2005, 2(24): 145-149.
- [2] Y. Kohama, K. Suetsuna, Y. Wako, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitors in fish water-soluble protein hydrolysates prepared by bioreactor. Food Science and Technology Research, 1999, 5: 378-380.
- [3] K. Suetsuna, J. R. Chen. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. Marine Biotechnology, 2001, 3(4): 305-309.
- [4] F. Guerard, L. Dufosse, D. L. Broise, et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using *Alcalase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, 11(4-6): 1051-1059.
- [5] 顾琳娜, 顾昊. 抗菌肽的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(6): 1004-1006.
- [6] 李晔, 苏秀榕, 李太武等. 贝类等无脊椎动物抗菌肽的研究进展[J]. 水产科学, 2004, 23(9): 40-43.
- [7] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学(第 4 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1439-1442.
- [8] 胡俊锋, 胡志龙, 徐律, 叶俏, 尹伊, 马剑茵. 泥螺多肽酶解工艺的研究[J]. 健康必读杂志, 2011, 4(4): 337-339.