

# 菲律宾蛤仔酶解寡肽的制备 及抗前列腺癌 PC-3 细胞的实验研究

徐 律 杨最素\* 黄芳芳 李 荣 王 铨 孙 瑜

(浙江海洋学院食品与药学院 浙江省海洋生物医用制品重点工程技术研究中心 浙江 舟山 316004)

**摘要:**目的 研究菲律宾蛤仔酶解寡肽(RPO)的制备及体外抗前列腺癌 PC-3 细胞的活性。方法 选用胰蛋白酶对菲律宾蛤仔进行酶解,经截取分子量为 3KDa 的超滤膜、DEAE SepharoseFF 阴离子交换、反相高效液相色谱 C18 分离制备菲律宾蛤仔酶解寡肽,并应用 MTT 法、AO/EB 染色及 Annexin V - FITC/PI 双标记流式细胞术检测其体外抗 PC-3 细胞增殖活性。结果 菲律宾蛤仔酶解多肽 3KDa 以下的组分经阴离子交换,得到的峰 1 由液相色谱纯化后,获到分子量为 607.6 kDa 寡肽样品;MTT 法结果显示,该寡肽能抑制 PC-3 细胞增殖,呈剂量和时间依赖;AO/EB 染色 PC-3 出现凋亡的形态学改变;流式细胞仪检测 PC-3 细胞早期凋亡率、坏死率随寡肽浓度增加而增多,明显高于对照组。结论 胰蛋白酶酶解菲律宾蛤仔得到的寡肽能抑制 PC-3 细胞增殖,诱导凋亡。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; 寡肽; PC-3 细胞; 凋亡

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2013.06.027

中图分类号: R962 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2013)06-1351-03

## The Isolation and Purification of oligopeptides from Ruditapes Philippinarum and its Inhibition on the Growth of PC-3 Cells in Vitro

XU Lv ,YANG Zui-su\* ,HUANG Fang-fang ,LI Rong ,WANG Xian ,SUN Yu

(School of Food Science and Pharmacy of Zhejiang Ocean University Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products Zhoushan 316004 China)

**Abstract: Objective** To study methods to isolate and purify oligopeptides from Ruditapes philippinarum(RPO) and its antitumor activity against PC-3. **Methods** Trypsin proteases were applied to hydrolyze the R. philippinarum. Ultrafiltration and anion-exchange chromatography and RP-HPLC were performed to separate and purify the antitumor peptides. MTT assay was used to detect the inhibition effect of the RPO against PC-3 in vitro. AO/EB and Annexin V - FITC/PI was used to detect the apoptosis on PC-3. **Results** RPO's molecular weight is 607.6Da. MTT assay showed that the purified RPO inhibited proliferation of PC-3 cells in both concentration- and time-dependent manners. Flow cytometry studies showed exposing PC-3 cells to RPO for 24h increased the percentage of the early apoptotic cells and cellular necrosis in a dose-dependent manner. In addition, typical morphologic changes were observed in the cells with acridine orange /ethidium bromide staining. **Conclusion** RPO can inhibit the growth of PC-3 cells and induce apoptosis.

**Key words:** Ruditapes philippinarum; Oligopeptides; PC-3 cell line; Apoptosis

我国四大养殖贝类之一的菲律宾蛤仔(Ruditapes philippinarum)隶属于软体动物门、双壳纲、帘蛤科、缀锦亚科、蛤仔属,属于广温、广盐性品种,俗称花蛤。花蛤肉组织蛋白含量高,脂肪含量低,含有丰富的维生素和微量元素,具有良好的营养保健功能。据报导菲律宾蛤仔提取物具有提高免疫力、抗肿瘤等作用<sup>[1-3]</sup>。本实验室前期研究表明用水提醇沉方法提取菲律宾蛤仔的糖蛋白,在体外能抑制前列腺癌细胞 DU-145 的增殖<sup>[4]</sup>。但关于蛋白酶酶解菲律宾蛤仔获得多肽的制备方法报道不多,活性肽抗前列腺癌 PC-3 细胞的实验尚未见报道。本实验选用胰蛋白酶对菲律宾蛤仔进行酶解,经过超滤法、凝胶层析方法及反相高效液相色谱等技术分离纯化出菲律宾蛤仔酶解寡肽(Ruditapes philippinarum oligopeptides, RPO),并检测该肽体外抗前列腺癌 PC-3 细胞的活性。

收稿日期: 2012-09-25; 修订日期: 2013-03-12

基金项目: 浙江省自然科学基金(No. LY12C20008)

作者简介: 徐 律(1987-),男(汉族),江西高安人,现为浙江海洋学院食品与药学院硕士研究生,硕士学位,主要从事海洋功能食品研究工作。

\* 通讯作者简介: 杨最素(1967-),女(汉族),浙江定海人,现任浙江海洋学院食品与药学院副教授,硕士研究生导师,硕士学位,主要从事海洋功能食品研发工作。

### 1 材料与仪器

**1.1 药物与细胞株** 菲律宾蛤仔购自舟山农贸市场(经浙江海洋学院赵盛龙教授鉴定),RPO 课题组自制。人前列腺癌 PC-3 细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所,本室传代培养。

**1.2 试剂** 胰蛋白酶(SIGMA 公司);F12 培养基(Gibco 公司)加 10% 的胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),内含双抗;MTT(SIGMA 公司);DEAE SepharoseFF 阴离子交换柱购自于北京亚太恒信生物科技有限公司;反相高效液相色谱柱 C18 由 Kromasil 公司生产;AO/EB(杭州昊天生物技术有限公司);Annexin V - FITC/PI 双染试剂盒(晶美生物工程有限公司);其余试剂均为分析纯。

**1.3 仪器** CF16RXII 高速冷冻离心机(日立 HITACHI 公司)、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)和蛋白检测仪(HD-21-88)(上海琪特分析仪器有限公司);依利特 P1201 型高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司);MSC300 超滤杯(超滤膜: 3 Kda,上海摩速科学器材有限公司);PPSQ-31A 氨基酸测序仪(Shimadzu Corporation,日本)。Forma3111CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜(CXK41 OLYMPUS 公司);超净台(ZHJM-C12090,上海智城分析仪器制造有限公司);酶标仪(美国 BIO-

RAD); 显微镜 (CX31, OLYMPUS); 显微摄像 CCD (promicroscan 5898, USA); 荧光显微镜 (BX51, OLYMPUS); FACS Calbur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

**2.1 酶解寡肽的制备与纯化** 菲律宾蛤仔去壳取肉, 匀浆 将匀浆液加 3 倍体积蒸馏水, 选择胰蛋白酶 pH 为 7.8, 温度为 37℃, 加酶量为 1 200 u/g; 保温酶解 24 h 90℃灭酶 15 min 4℃下 8 500 r/min 离心 15min, 取上清液。用截取分子量为 3 KDa 的超滤膜, 在 20℃环境中超滤 11h 获得酶解液。用 DE-AE SepharoseFF 阴离子交换 柱型为 2.6 × 50 cm, 上样体积 3 ml, 分别用磷酸缓冲液、0.1 0.3 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaCl 溶液进行阶段洗脱, 洗脱速度为 1 ml · min<sup>-1</sup> 280 nm 下紫外监测, 自动部分收集器每管 4 ml 进行收集, 收集最高肽峰冷冻干燥后贮存备用。然后进行 RT-HPLC 纯化, 色谱条件为 C<sub>18</sub> 反相柱, 填料为 ODS; 柱型是 10 × 250 mm; 乙腈/水为流动相, 流速是 0.8 ml · min<sup>-1</sup>, 上样体积为 20 μl, 波长 220 nm。洗脱条件是乙腈浓度为 15%, 洗脱 20 min, 重复上样。

**2.2 氨基酸序列检测** 目标肽氨基酸序列分析采用 N 末端降解检测方法, 氨基酸测序仪进行测定。

**2.3 细胞增殖抑制实验** 采用 MTT 法进行检测。PC-3 细胞置于 F12 培养液、37℃、5% CO<sub>2</sub> 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的 PC-3 细胞悬液。以 1 × 10<sup>4</sup> 个/ml 接种至 96 孔板, 每孔 200 μl 培养 24 h 后吸弃上清。设对照组及 10, 15, 20, 25 mg · ml<sup>-1</sup> 和 30 mg · ml<sup>-1</sup> RPO 加药组, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h、48 h 和 72 h 后弃培养液, 加入 1 mg · ml<sup>-1</sup> MTT 200 μl 继续培养 4 h。吸弃 MTT, 加入 150 μl 的 DMSO 充分混合。置酶标仪在 490 nm 测吸光度, 计算细胞增殖抑制指数 (IR), IR = [(对照组 A 值 - 加药组 A 值) / (对照组 A 值 - 调零孔 A 值)] × 100%。重复实验 3 次。

**2.4 AO/EB 染色** 6 孔培养板内放入经处理过的盖玻片, 取 PC-3 单细胞悬液, 将细胞浓度调至 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml 接种于培养板, 每孔 2 ml, 24 h 后换液, 设对照组及 10, 20, 30 mg · ml<sup>-1</sup> RPO 加药组, 培养 24 h 后用 PBS 洗 3 次 95% 乙醇固定 30 min。取 AO 和 EB 各 1 mg 分别溶解于 10 ml pH7.2 的 PBS 中, 摇匀混合, 用前配制, 遮光保存。观察前滴加 40 μl PBS 和 10 μl AO/EB 混合液于载玻片上, 将有细胞一面朝下, 荧光显微镜观察, 拍照。

**2.5 流式细胞仪检测** PC-3 细胞以 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml 接种于 25 ml 培养瓶中, 24h 后换液。设对照组和 RPO 加药组, 药物浓度为 10, 20 mg · ml<sup>-1</sup> 和 30 mg · ml<sup>-1</sup>, 培养时间为 24 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 用 PBS 吹打成单细胞悬液, 室温下 1 200 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后弃上清, 重复 PBS 洗涤 1 次。加试剂盒专用缓冲液 400 μl, 吹打成细胞悬液。向细胞悬液中加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后再加入 5 μl 的 PI, 室温下放入暗室静置 5 min 后上机分析。

**2.6 数据处理** 各组数据之间采用单因素方差分析, 用 t 检验进行组间均数的比较, 使用 SPSS 13.0 进行数据分析。

3 结果

**3.1 酶解多肽分离结果** 取 3 KDa 以下的酶解液经 DEAE SepharoseFF 柱洗脱后, 出现两个峰, 即峰 1 (I1) 和峰 2 (I2) (图 1), 分别为缓冲液和 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaCl 溶液的洗脱组分 0.3 mol · L<sup>-1</sup> 和 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaCl 溶液没有明显的洗脱峰。收集 I1, 冷冻干燥后得到 1.3 g 干燥样品, 得率为 0.33%。

**3.2 RT-HPLC 洗脱结果** 峰 I1 经 RP-HPLC 色谱柱洗脱 (图 2), 在保留时间约为 4.5 min 时, 出现一主峰 (峰 4), 峰高为 1021.8, 峰面积为 5190.1, 收集该峰, 冷冻干燥后得到 0.37 g 样品 II, 得率为 0.1%, 该目标肽的分子量为 607.6 Da, 氨基酸序列为: Asp-Trp-Pro-His。

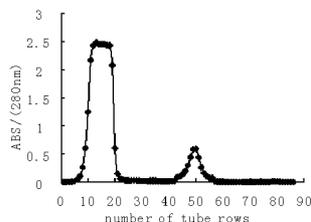


图 1 DEAE-sepharoseFF 洗脱峰

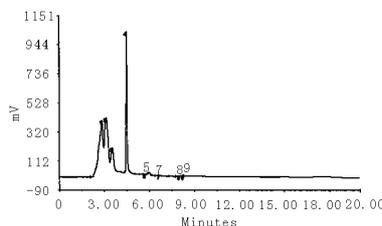


图 2 II 在 220 nm 处高效液相色谱图

**3.3 MTT 检测结果** RPO 作用于 PC-3 细胞后, 经 MTT 法检测细胞呈现出明显的增殖抑制作用, 且随着药物浓度的增加和作用时间的延长, 增殖抑制指数明显上升。结果见表 1。

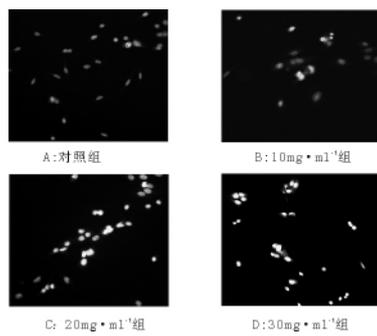
表 1 RPO 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用 (x ± s)

药物浓度	A 值			IR (%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
0 (对照)	0.24 ± 0.07	0.26 ± 0.06	0.31 ± 0.07	-	-	-
10	0.22 ± 0.02*	0.22 ± 0.03*	0.23 ± 0.04*	11.3 ± 0.12	16.2 ± 0.03	29.4 ± 0.14
15	0.20 ± 0.01*	0.19 ± 0.03*	0.20 ± 0.03*	21.6 ± 0.08	29.4 ± 0.12	42.9 ± 0.11
20	0.19 ± 0.01*	0.16 ± 0.04*	0.12 ± 0.01*	22.5 ± 0.06	48.5 ± 0.21	70.9 ± 0.04
25	0.17 ± 0.02*	0.09 ± 0.04*	0.09 ± 0.01*	39.7 ± 0.10	81.4 ± 0.18	85.7 ± 0.06
30	0.13 ± 0.03*	0.09 ± 0.03*	0.06 ± 0.01*	60.7 ± 0.14	81.8 ± 0.13	94.30 ± 0.03

与对照组之间比较, \*P < 0.05; n = 9

**3.4 AO/EB 染色结果** PC-3 细胞经 RPO 药物作用 24 h 经 AO/EB 染色, 在荧光显微镜下观察结果如图 3 所示。对照组正常的 PC-3 细胞呈上皮样生长, 伸展性好, 核染色质亮绿色并呈正常形态; 10 mg · ml<sup>-1</sup> RPO 作用后, 早期凋亡细胞较多, 染成绿色, 可见核染色质固缩, 形态上出现新月形等异常变化; 20 mg · ml<sup>-1</sup> RPO 作用后, 晚期凋亡细胞较多, 表现为细胞变圆, 核仁数目减少, 染色质固缩, 呈桔黄色; 30 mg · ml<sup>-1</sup> RPO 作用后, 晚期凋亡细胞增多, 细胞变圆, 核染色质固缩明显, 颜色加深呈桔红色, 并可见部分细胞核形成碎片, 或形成半月形, 或膜向外突出形成凋亡小体; 同时非凋亡的死亡细胞增多, 核染色质着桔红色但结构正常。

**3.5 流式细胞仪检测结果** Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术可以将实验样本中正常、坏死和凋亡细胞等分开。如图 4 所示, 细胞分为四个区: 左下象限 Annexin V-FITC-/PI-, 是正常细胞; 左上象限 Annexin V-FITC-/PI+, 是机械损伤细胞; 右下象限 Annexin V-FITC+/PI-, 代表早期凋亡细胞; 右上象限 Annexin V-FITC+/PI+ 为凋亡晚期或坏死细胞。从表 2 和图 4 中可以看出随着药物浓度的增加, 早期凋亡细胞明显增加, 而凋亡晚期或坏死的细胞增加更加明显, 经与对照组比较差异有统计学意义。

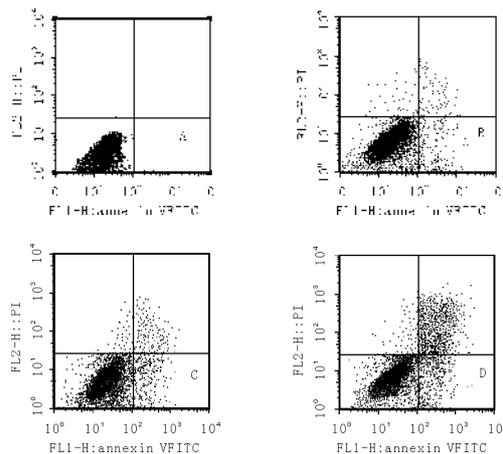


A - 对照组 B - 10 mg · ml<sup>-1</sup>组  
C - 20 mg · ml<sup>-1</sup>组 D - 30 mg · ml<sup>-1</sup>组  
图 3 PC-3 细胞 AO/EB 染色 (10 × 20)

表 2 RPO 对 PC-3 细胞凋亡率的影响 (x̄ ± s)

组别	ρ/mg · ml <sup>-1</sup>	早期凋亡率 (%)	晚期凋亡率 (%)
空白对照组	0	2.82 ± 0.71	2.64 ± 0.51
RPO	10	6.79 ± 0.99*	4.94 ± 0.52
RPO	20	9.25 ± 0.56*	10.98 ± 3.79
RPO	30	11.60 ± 0.68*	25.56 ± 2.80

与对照组之间比较, \* P < 0.01; 与对照组之间比较 P < 0.05; n = 3



A - 对照组 B - 10 mg · ml<sup>-1</sup>组  
C - 20 mg · ml<sup>-1</sup>组 D - 30 mg · ml<sup>-1</sup>组  
图 4 流式细胞术 Annexin V - FITC/PI 双标记

#### 4 讨论

近年来,随着我国人们生活方式的改变和平均寿命的延长,前列腺癌的发病率逐年增加。在确诊为前列腺癌的患者中,40%以上将发生转移,因肿瘤转移而致死的有70%以上。癌症患者长期化疗损害重要脏器,并产生肿瘤耐药性,影响化疗效果。因此,寻找低毒、高效的新型抗癌药物势在必行。海洋生物抗肿瘤活性物质的研究特别是寡肽类药物的发现为肿瘤治疗开辟了一条新的途径,展示出良好的开发前景。现已从多种海洋生物中发现一系列的抗肿瘤、抗微生物等活性寡肽,其中抗癌肽尤为引人注目<sup>[5]</sup>。应用现代分离技术从菲律宾蛤仔中提取活性物质引起了广大学者的兴趣,现已从菲律宾蛤仔中得到了糖胺聚糖、蛋白

聚糖、糖蛋白等活性物质,并具有抗肿瘤和增强免疫力等功能<sup>[1-3]</sup>。本实验应用胰蛋白酶酶解菲律宾蛤仔,获取的3Kda以下的酶解物经DEAE SepharoseFF阴离子交换、RP-HPLC C18分离得到了菲律宾蛤仔酶解寡肽(RPO),并进行了体外抗PC-3细胞实验。

通常抗肿瘤药物筛选分为体内实验和体外实验,MTT法以其简便、高效、重复性好而成为抗肿瘤药物体外筛选的常用方法<sup>[6]</sup>。本实验MTT结果显示PC-3细胞经RPO作用后,呈现出明显的增殖抑制现象,并随着药物浓度的增加和作用时间的延长,抑制指数明显上升,呈现出时间和剂量依赖。为了明确其抑制PC-3细胞生长的机制,实验中应用AO/EB荧光染料双染色,检测其是否能引起PC-3细胞形态学上的改变。从机理上看,AO能透过完整细胞膜,嵌入细胞核DNA中,使之发出亮绿色荧光;EB只能透过受损细胞的膜,嵌入核DNA,发桔红色荧光。实验结果表明正常PC-3细胞核染成均匀的绿色;RPO作用后早期凋亡细胞增多;随着RPO剂量的增加,晚期凋亡细胞增多,呈现细胞核形成碎片,形成凋亡小体等凋亡细胞形态学上的改变;同时非凋亡的死亡细胞增多,核染色质着桔红色但结构正常。由此推测RPO抑制PC-3细胞增殖的机制可能与诱导凋亡有关。

肿瘤的发生是多因素、多阶段的过程,细胞增殖的失控和细胞凋亡的抑制均为肿瘤发生的原因<sup>[7]</sup>。检测凋亡的方法很多,但流式细胞仪双参数Annexin V-FITC/PI法是目前检测细胞凋亡和区分坏死细胞较为理想的定量检测方法。本实验应用Annexin V-FITC/PI双标记流式细胞术检测药物作用后细胞的凋亡情况,发现正常培养的PC-3细胞也存在少量的早期凋亡细胞和坏死细胞。而经RPO作用24h后,PC-3细胞的凋亡细胞和坏死细胞便开始增多,且随着浓度的增加,凋亡细胞和坏死细胞逐渐增加。因此认为RPO能抑制PC-3细胞增殖,与诱导凋亡有关。至于RPO通过什么途径导致PC-3细胞凋亡,下一步我们将继续进行研究,探讨其相关的机制,为开发新的抗前列腺癌海洋药物提供实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 王娅楠,范秀萍,吴红棉. 菲律宾蛤仔糖胺聚糖抗肿瘤活性研究[J]. 广东海洋大学学报 2007 27(4):49.
- [2] 范秀萍,吴红棉,王娅楠,等. 菲律宾蛤仔糖胺聚糖的免疫活性研究[J]. 食品科学 2008 29(4):370.
- [3] 张莉,刘万顺,韩宝芹,等. 菲律宾蛤仔(Ruditapes philippinarum)蛋白聚糖的分离提取及其抗肿瘤活性的初步研究[J]. 海洋与湖沼 2007 38(1):62.
- [4] 郁迪,杨永芳,王加斌,等. 菲律宾蛤仔糖蛋白提取及体外抗肿瘤活性研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2011,30(4):336.
- [5] Jung-Chieh Hsua, Li-Ching Linb, Jason TC. et al. Characteristics of the antitumor activities in tumor cells and modulation of the inflammatory response in RAW264.7 cells of a novel antimicrobial peptide, chryso-sophin-1, from the red sea bream (Chrysophrys major) [J]. Peptides 2011 32(5):900.
- [6] 史大华,刘玮玮,刘永江,等. 低分子量海带岩藻多糖的制备及其抗肿瘤活性研究[J]. 时珍国医国药 2012 23(1):53.
- [7] 杨最素,冯播,徐昌芬. 4'-甲醚-黄芩素对绒毛膜癌JAR细胞c-myc表达的影响[J]. 中药新药与临床药理 2011 22(5):501.