

中国鲎素对人胃腺癌 BGC-823 细胞形态和超微结构的影响

李祺福, 李长友, 欧阳高亮, 洪水根

(厦门大学生命科学学院细胞生物学研究室, 福建 厦门 361005)

摘要: 应用从中国鲎血液中提取的鲎素处理人胃腺癌 BGC-823 细胞, 研究鲎素对胃癌细胞形态和超微结构的影响. 光镜观察显示经 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 鲎素处理的 BGC-823 细胞形态较为一致, 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、体积缩小. 扫描电镜与透射电镜观察可见经鲎素处理后 BGC-823 细胞表面微绒毛稀少, 细胞边缘丝状伪足减少, 片状伪足增多; 细胞核形态较规则, 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, 并出现粗糙型内质网增多和多聚核糖体减少等变化. 结果表明, 鲎素能有效改变胃癌细胞恶性形态结构特征, 从而对胃癌细胞具有一定的诱导分化作用.

关键词: 中国鲎; 鲎素; 胃癌细胞; 细胞形态; 超微结构

中图分类号: Q 247; Q 28

文献标识码: A

海洋动物鲎(horseshoe crab)是一种具有独特进化地位的“活化石”;其原始性使之具有许多功能特殊的生物活性物质. 近年来国外学者相继从鲎血液中分离提取出多种凝集素和抗菌、抗病毒的生物活性物质^[1]. 为找寻具有干预细胞信号传导、调控细胞增殖分化功能的低分子肿瘤抑制物^[2], 作者从中国鲎(*Tachyplesus tridentatus*)血液中分离提取了小分子多肽——鲎素(tachyplesin), 并鉴定其抗肿瘤活性^[3]. 进而在此基础上, 以人胃腺癌 BGC-823 细胞为实验模型, 系统研究鲎素对肿瘤细胞的生物学效应. 本文通过光镜、扫描电镜和透射电镜观察, 研究鲎素对胃癌细胞形态和超微结构的影响.

1 材料与方法

1.1 鲎素分离提取

参照 Nakamura 等的方法^[4], 将中国鲎血细胞酸抽提液进行 Sephadex G50、CM-Sephrose CL-6B 柱层析, 分离提取鲎素.

收稿日期: 1999-12-25

基金项目: 福建省自然科学基金(C97015)和高等学校重点实验室访问学者基金资助项目

作者简介: 李祺福(1950-)男, 副教授

1.2 细胞培养与鲎素处理

BGC-823 细胞培养在 RPMI-1640 培养液中(含 20% 小牛血清、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), 细胞接种 24 h 后进行鲎素处理. 经分离纯化冻干的鲎素溶解于 D-Hank's 液中配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的干液, 并以培养液配制成 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲎素作用液. 实验组细胞弃旧培养液换上含有鲎素的作用液, 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 光学显微镜样品制备

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 24 h, 常规 HE 染色, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照.

1.4 扫描电镜样品制备

分别将对照组和实验组细胞按上法接种, 经培养后取出长有细胞的盖玻片条, 用 D-Hank's 液洗涤, 经 2.5% 戊二醛固定 2 h, 1% 锇酸后固定 1 h, 乙醇系列脱水, 临界点干燥, 真空喷镀金膜后, 于日立 S-520 扫描电镜下观察拍照.

1.5 透射电镜样品制备

将传代培养 3 d 的 BGC-823 细胞以 10×10^4 细胞/mL 接种于 50 mL 培养瓶中, 培养 24 h 后实验组细胞用含 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲎素的培养液处理. 连续培养 10 d 后实验组和对照组细胞分别经 D-Hank's 液洗涤, 用橡皮刮刀推下细胞移入离心管中, 2 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 2.5% 戊二醛预固定 2 h, 1% 四氧化锇后固定 2 h, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 618 包埋, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 于 JEM 100-CX 型透射电镜下观察拍照.

2 结 果

2.1 光学显微镜观察

BGC-823 细胞排列不规则, 具有上皮样、圆形、梭形、肾形等不规则形态, 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, 细胞质较少, HE 染色不均匀, 着色深浅不一(图版 -1).

经 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲎素处理后, BGC-823 细胞产生了明显的形态变化. 细胞体积增大, 趋于铺展状态, 多核细胞和癌巨细胞少见, 细胞形状较为一致, 排列比较规则. 细胞核较小, 形状较为园整, 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 -2).

2.2 扫描电子显微镜观察

在扫描电镜下可见 BGC-823 细胞具有球形、梭形和扁平铺展细胞等形态. 在各类细胞表面均存在丰富的微绒毛, 其中微绒毛在球形细胞表面呈密集状态分布, 而在铺展细胞的中部区域微绒毛较为密集、边缘区域相对比较稀疏. 在细胞边缘出现了较多的丝状伪足, 在体积较大的球形细胞边缘丝状伪足较多, 呈放射状向四周伸出, 但在扁平细胞边缘丝状伪足较少而有少量片状伪足(图版 -3, 5).

经 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲎素处理的 BGC-823 细胞同样可见球形、梭形和扁平铺展细胞等几种形态, 但以扁平铺展细胞居多, 球形细胞较少. 各类型细胞表面微绒毛较少, 长度缩短, 并呈弯曲

萎缩状态, 细胞表面较为光滑并出现少量小泡状突起和皱痕结构. 在细胞边缘的丝状伪足减少, 而常见较多的片状伪足, 尤其在扁平铺展细胞边缘存在较多的大型片状伪足结构. 其表面特征与对照组细胞存在明显差异(图版 -4, 6).

2.3 透射电子显微镜观察

透射电镜观察显示, BGC-823 细胞核质比例较大, 细胞核的形状不规则, 核内异染色质团块较多, 核仁体积较大, 形状多样, 并且有较多的核仁小泡. 在细胞质内, 粗糙型内质网不发达, 数量少, 长度相对较短; 高尔基体体积较小, 高尔基囊数目少, 排列不规则, 极性不明显, 囊腔有明显的膨大扩充现象; 线粒体形态不规则, 嵴的数目少, 排列方式各异, 并多见空泡化现象; 细胞质中多聚核糖体较多, 游离核糖体较少(图版 -1, 2).

经 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 鲨素处理后, BGC-823 细胞超微结构产生了明显的变化. 细胞核质比例减小, 核形趋向规则, 多呈圆形或卵圆形, 细胞核内异染色质团块减少, 常染色质增多, 显得比较均匀, 核仁体积变小, 结构较为均一. 在细胞质内, 粗糙型内质网数量明显增多; 高尔基体中高尔基囊数目增多、排列较为规则, 高尔基液泡和高尔基小泡增多, 呈典型发达状态; 线粒体多呈棒状或椭圆形, 嵴数目增多, 排列较规则, 基质电子密度较均匀; 多聚核糖体减少, 游离核糖体增多(图版 -3~5). 结果显示经鲨素处理后的 BGC-823 细胞呈现出接近正常细胞的一些超微结构特征.

3 讨论

肿瘤细胞的形态和超微结构与其相应正常细胞存在较大差别. 肿瘤细胞一般均表现出细胞形态大小不一致, 核质比例较大, 核畸形, 核仁较大数目较多, 细胞器不发达和细胞表面微绒毛较多等一系列恶性形态结构表型特征^[5], 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尤其是诱导分化物对肿瘤细胞效应的重要判断指标^[6]. 而一系列化学诱导分化物诱导白血病、肝癌和肺癌等肿瘤细胞分化的结果均表明, 经诱导分化处理的癌细胞其形态结构产生与正常细胞相似的恢复性变化^[7-9].

BGC-823 细胞是一株增殖快、恶性程度高的低分化人胃腺癌细胞株. 本文光镜、扫描与透射电镜观察结果显示其群体细胞形态多样, 细胞大小不一, 排列不规则; 具有细胞核质比值大、细胞核畸形、核仁体积较大和核内异染色质较多的特征; 并存在线粒体形态不一致, 线粒体嵴少, 高尔基体结构不典型, 内质网数量较少等细胞器不发达现象; 以及细胞质内多聚核糖体较多、游离核糖体较少和细胞表面微绒毛丰富、细胞边缘丝状伪足较多等特点. 这些均显示其具有典型的肿瘤细胞形态与超微结构恶性表型特征^[5]. 但是, 经 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 鲨素处理的 BGC-823 细胞则呈现细胞大小较为一致、排列比较规则、细胞体积增大、趋于铺展状态和上皮样细胞增多的状况; 并产生细胞核质比值减小、细胞核形状较为圆整、核仁体积减小、核内异染色质减少和常染色质增多的变化; 同时在细胞质内出现了线粒体数量增加、形态较一致、线粒体嵴增多、高尔基体结构典型和内质网数量增多等细胞器较为发达的现象; 以及细胞质内多聚核糖体减少、游离核糖体增多和细胞表面微绒毛减少及细胞边缘丝状伪足减少、片状伪足增多等变化. 这一系列变化和 BGC-823 细胞的形态与超微结构特征有较大差异而与相应正常细胞较为相似. 充分表明了鲨素能有效改变胃腺癌细胞的形态与超微结构恶性表型特征, 并使之出现与正常细胞相似的形态与超微结构变化.

鲨素的这一作用与前人应用化学诱导分化物处理胃癌细胞的观察结果是一致的. 如吕桂

芝、许世稳、夏锋和陈宇等人分别应用丁酸钠、环六亚甲基双乙酰胺(HMBA)和全反式维甲酸等处理人胃癌 SGC-7901 细胞^[10-13], 均报导了诱导处理后的胃癌细胞出现细胞形态规则一致、细胞核形较为完整、核质比值减小、核仁缩小、核内异染色质减少, 以及细胞器比较发达和细胞表面微绒毛消退减少等显著变化. 这与本文应用鲎素对胃癌细胞作用的变化是一致的. 由此更进一步表明, 鲎素的作用与癌细胞分化诱导物相似, 对胃癌细胞具有一定的诱导分化作用. 为此, 更深入地研究鲎素的抗肿瘤作用机理问题, 显然对于鲎素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十分重要的意义.

参考文献:

- [1] Iwanaga S, Kawabata S, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: Their structure and functions[J]. J. Biochem., 1998, 123(1): 1- 15.
- [2] Johnson T C. Negative regulators of cell proliferation[J]. Pham. & Therap., 1994, 62(1~2): 247-265.
- [3] 洪水根, 陈菲, 李祺福, 等. 中国鲎鲎素 T-1 抗人早幼粒白血病 HL-60 细胞活性研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(3): 448- 451.
- [4] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) [J]. J. Bio. Chem., 1988, 263(32): 16709 - 16713.
- [5] Birbeck MSC, Symington T, Carter RL 主编(杨简等译). 肿瘤细胞的超微结构, 肿瘤的科学基础[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 11- 18.
- [6] 景永奎. 癌细胞分化诱导及分化诱导剂研究进展[J]. 药学进展, 1992, 16(1): 6- 13.
- [7] Ryves W J, Dimitrijevic S, Gordge P C, et al. HL-60 cell differentiation induced by phorbol-and 12-deoxyphorbol-esters[J]. Carcinogenesis, 1994, 15(11): 2501- 2506.
- [8] Vesey D A, Cunningham J M, Seiden A C, et al. Dimethyl sulphoxide induces a growth rate, altered cell morphology and increased epidermal-growth-factor binding in HepG2 cells[J]. Biochem. J., 1991, 277(pt3): 773- 777.
- [9] Khan M Z, Freshney R I, Mcnicol A M, et al. Induction of phenotypic changes in SCLC cell line in vitro by hexamethylene bisacetamide, sodium butyrate, and cyclic AMP[J]. Annals. Oncology, 1993, 4(6): 499- 507.
- [10] 吕桂芝, 高燕, 黄衍川, 等. 丁酸钠对人胃腺癌 SGC-7901 细胞的生物学效应[J]. 实验生物学报, 1989, 22(2): 169- 175.
- [11] 许世稳, 赵怀玉, 任礼勤, 等. 六亚甲基双乙酰胺对人胃腺癌细胞系(SGC-7901)诱导分化的电镜观察[J]. 肿瘤, 1989, 9(6): 260- 261.
- [12] 夏锋, 王代科, 刘宝华, 等. 联合细胞毒诱导分化对胃癌 SGC-7901 细胞株作用的研究[J]. 第二军医大学学报, 1998, 20(3): 220- 223.
- [13] 陈宇, 许才绂. 全反式维甲酸诱导人胃癌细胞株 SGC-7901 分化的研究[J]. 新消化病学杂志, 1997, 5(8): 491- 492.

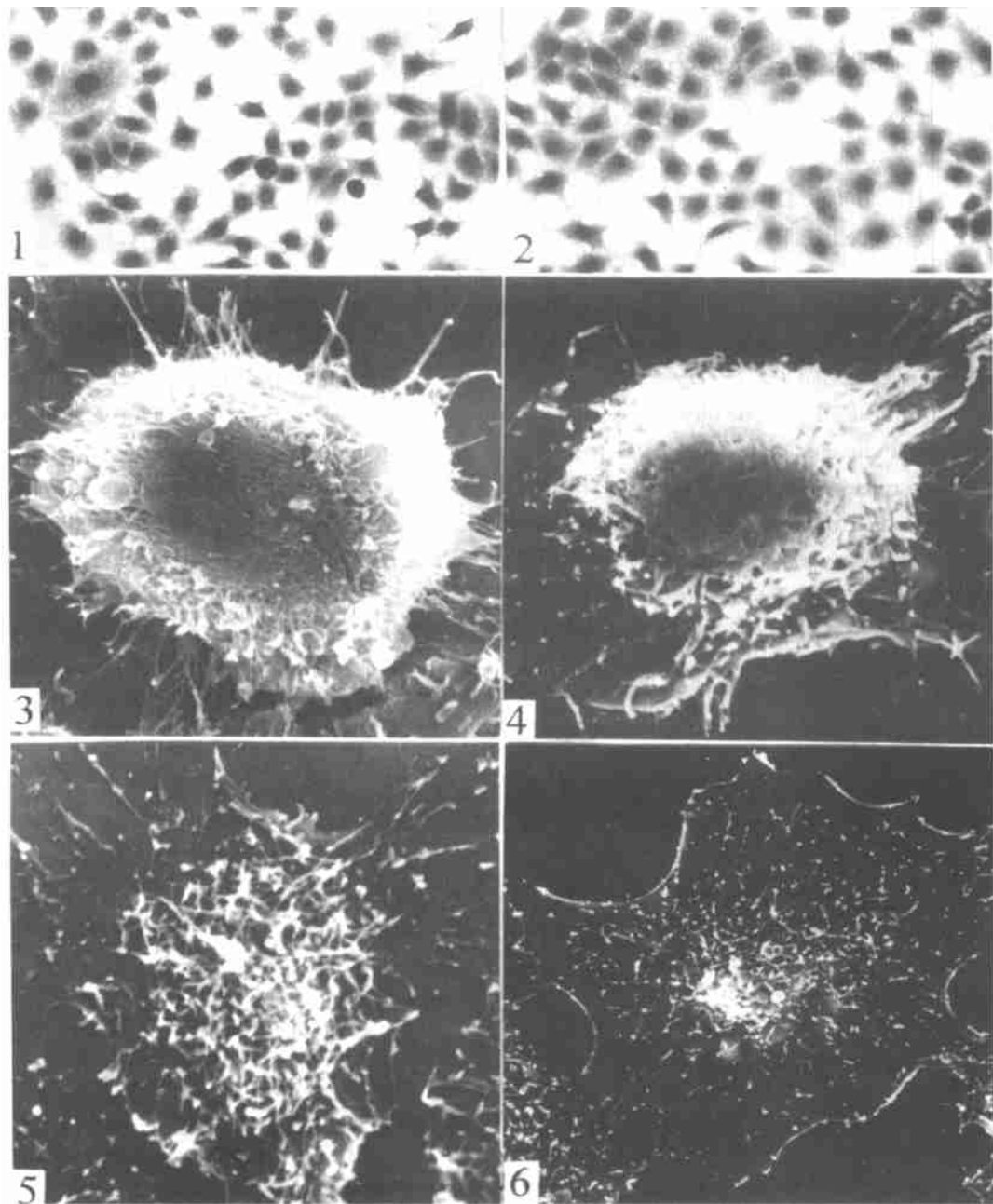
Effects of Tachyplesin on the Morphology and Ultrastructure of the Human Gastric Carcinoma Cell Line BGC-823

LI Qi-fu, LI Chang-you, OUYANG Gao-liang, HONG Shui-gen

(Lab. of Cell Biol. College of Life Science, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

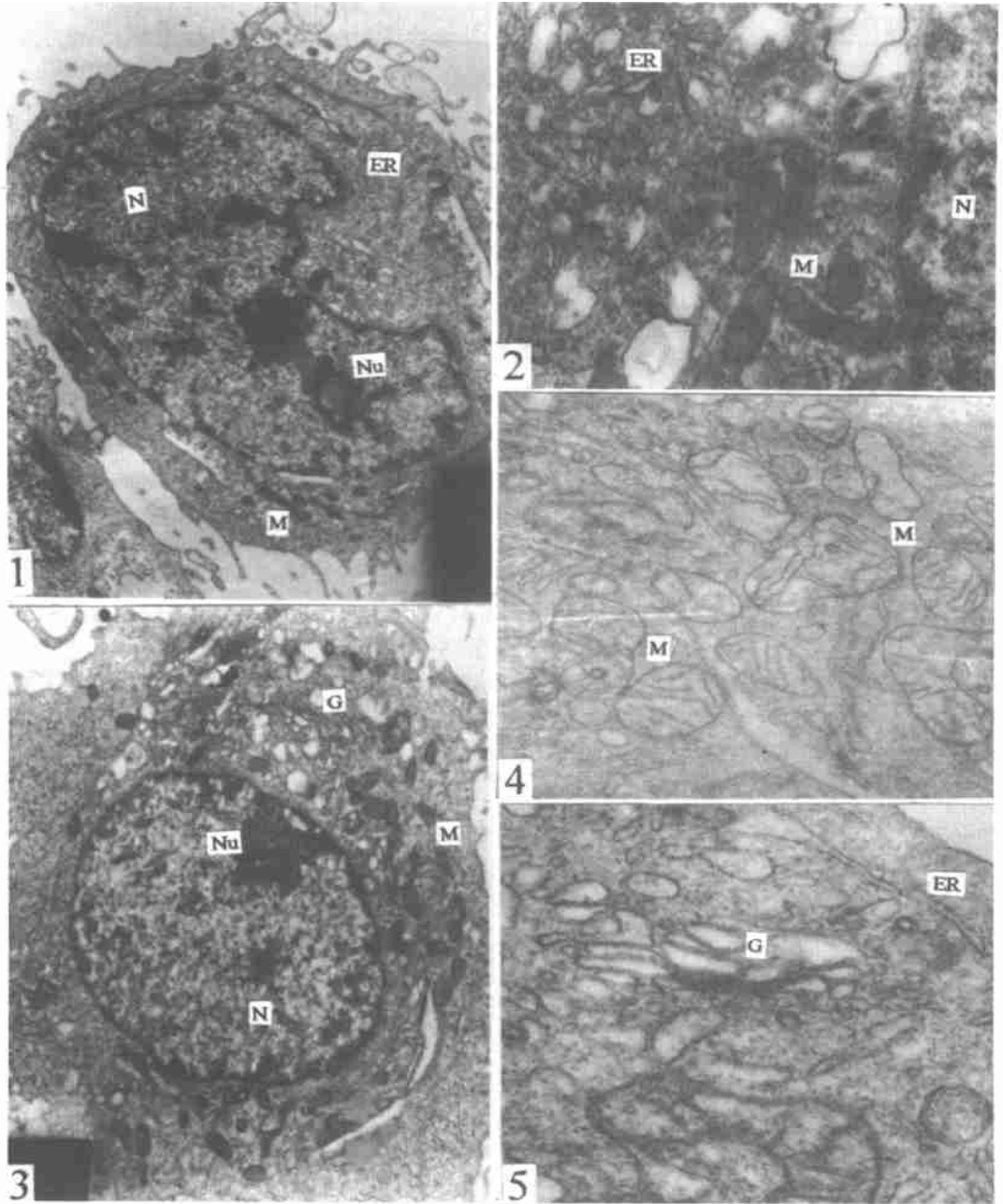
Abstract: In this study, we used tachyplesin which is isolated from acid extracts of horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) hemocytes, to treat the human gastric adenocarcinoma BGC-823 cells, and investigated the effects of tachyplesin on the morphology and ultrastructure of BGC-823 cells. Optical microscope observation showed that BGC-823 cells had undergone restorational morphological changes after being treated with 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tachyplesin. The volume of cells increased, the nucleo-cytoplasmic ratio decreased, the number and volume of nucleolus decreased. Scanning electron microscope and transmission electron microscope observation showed that, in the BGC-823 cells which were treated with 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tachyplesin, microvilli and filopodia reduced, sheed pseudopodia increased, 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 tachyplesin could change the malignant morphological and structural characteristics of the human gastric carcinoma cells effectively and had inducing differentiation effects on the human gastric carcinoma cells.

Key words: *Tachyplesus tridentatus*; tachyplesin; gastric carcinoma cells; cell morphology; ultrastructure



图版 说明

图1 BGC-823 细胞光镜照片. $\times 300$; 图2 鲨素处理组细胞光镜照片. $\times 300$; 图3 扫描电镜观察示 BGC-823 球形细胞表面微绒毛丰富, 细胞边缘有较多的丝状伪足. $\times 6000$; 图4 鲨素处理组细胞, 示球形细胞表面微绒毛基本消失. $\times 6000$; 图5 BGC-823 扁平铺展细胞表面有丰富的微绒毛, 细胞边缘有较多丝状伪足. $\times 4800$; 图6 鲨素处理组细胞表面微绒毛稀少, 并萎缩变短, 细胞边缘出现大型片状伪足. $\times 4200$



图版 说明

图 1 BGC-823 细胞透射电镜照片. 示细胞核质比值大, 细胞核(N)形不规则, 细胞质内细胞器少. $\times 9\ 600$, Nu 核仁 M 线粒体 ER 内质网; 图 2 BGC-823 细胞线粒体(M)形态结构不典型, 内质网(ER)减少. $\times 40\ 500$; 图 3 鲎素处理组细胞体积增大, 核质比值减小, 细胞核(N)形较规则, 细胞质内细胞器增多. $\times 10\ 720$; 图 4 鲎素处理组细胞线粒体(M)形态结构较一致, 线粒体嵴增多、排列较为规则. $\times 21\ 000$; 图 5 鲎素处理组细胞高尔基体(G)结构呈典型发达状态. $\times 48\ 000$