

# 牡蛎活性肽体外诱导HeLa细胞凋亡及其作用机制

余 杰, 杨振国, 陈美珍, 钟 炼, 李 伟  
(汕头大学生物学系, 广东 汕头 515063)

**摘 要:** 采用复合酶法水解制备牡蛎活性肽, 并运用Sephadex G-25柱层析法对酶解液中的肽类进行分离纯化与鉴定; 以磺基罗丹明B(SRB)比色法, 台盼蓝计数法, Hoechst/PI双荧光染色法和DNA Ladder等检测牡蛎活性肽诱导HeLa细胞凋亡的方式, 并采用流式细胞术和实时定量PCR分析牡蛎抗活性肽诱导HeLa细胞凋亡的作用机制。经分离纯化得到牡蛎活性肽(bioactive peptide of oyster, BPO), 并测得其分子质量为751D; BPO能有效抑制HeLa细胞增殖, 并阻止HeLa细胞G<sub>1</sub>期向S期的转换, 促使凋亡基因表达上调。BPO的作用机制与诱导凋亡基因表达上调和细胞周期阻滞有关。

**关键词:** HeLa细胞; 牡蛎活性肽; 细胞凋亡; 细胞周期阻滞

## Induction and Mechanism of HeLa Cell Apoptosis by Bioactive Peptide from Oyster

YU Jie, YANG Zhen-guo, CHEN Mei-zhen, ZHONG Lian, LI Wei  
(Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

**Abstract:** Flavourzyme and trypsin were used in combination for one-step hydrolysis of oyster homogenate. The resulting hydrolysate was separated by Sephadex G-25 column chromatography. As a result, a bioactive peptide was obtained. The apoptosis inducing effect of the bioactive peptide on HeLa cells was examined by sulforhodamine B colorimetric assay, trypan blue staining assay, Annexin V-FITC/PI double staining assay and DNA ladder assay. Meanwhile, the mechanism was analyzed by flow cytometry and real-time PCR. This peptide had a molecular weight of 751 D. It could effectively inhibit the proliferation of HeLa cells, arrest the cell cycle transition from G<sub>1</sub> to S phase and induce the up-regulation of apoptotic gene expression. Its mechanism of action was probably associated with up-regulating apoptotic gene expression and arresting the cell cycle.

**Key words:** HeLa cell; bioactive peptide from oyster; apoptosis; cell cycle arrest

中图分类号: Q254.4; Q28

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0290-05

生物活性肽由于其特殊的生理功能和极高的营养价值而备受关注, 成为国际上研发的重点。海洋活性物质抗肿瘤研究是抗肿瘤药物研发的一个重要领域, 其中海洋活性肽是海洋活性物质的重要组成部分。海洋生物活性肽具有高活性、高药效、高安全性的特点, 在肿瘤的临床应用中发挥重要的作用<sup>[1-3]</sup>。

牡蛎是一种高蛋白、药食兼用的珍贵海产品。随着对牡蛎药用及保健价值的认识日益深入, 其新的功能正不断地被挖掘出来, 远超出其传统使用价值。近年来, 欧美国家采用现代生物技术及高新技术对牡蛎中功能活性成分进行了研究开发, 研制出了各种功能食品与疗效品。美国Fox Chase癌中心、法国巴黎大学以及日本庆应大学等一直致力于牡蛎肉提取物的深入研究。据报道牡蛎的粗提液能增强巨噬细胞U-M和NBT的还原能力, 抑制乳腺癌MCF-7细胞增殖<sup>[4]</sup>, 牡蛎低分子活性物质对肺癌

细胞和白血病细胞有较明显的细胞增殖抑制作用<sup>[5-6]</sup>, 但目前仍缺乏对牡蛎抗肿瘤活性物质的分离提取与抗肿瘤机理的深入研究。宫颈癌是女性常见恶性肿瘤之一, 而有关牡蛎活性肽对宫颈癌抑制作用的研究尚未见报道。本研究以复合蛋白酶水解牡蛎蛋白, 从中分离出低分子活性肽组分, 并研究其体外诱导人宫颈癌HeLa细胞凋亡的生物学效应以及对细胞周期和相关基因表达的影响, 以探索牡蛎活性肽(bioactive peptide of oyster, BPO)的抗肿瘤作用机制, 以期为其在抗肿瘤研究中的开发和应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜太平洋牡蛎, 由汕头大学南澳海洋试验站提

收稿日期: 2012-07-04

基金项目: 广东省教育部部产学研合作专项(2010B090400461); 广东省科技计划项目(2010B020201015);

广东省自然科学基金研究团队项目(S2011030005257)

作者简介: 余杰(1955—), 男, 副教授, 学士, 主要从事天然活性物质研究与开发。E-mail: jyu@stu.edu.cn

供; 宫颈癌细胞HeLa, 由汕头大学医学院提供; 血管内皮细胞VEC, 由中国医学科学院肿瘤研究所提供。

胰蛋白酶( $\geq 20000\text{U/g}$ )、Sephadex G-25 美国Pharmacia公司; 风味蛋白酶( $\geq 20000\text{U/g}$ ) 上海源叶生物科技有限公司; 杆菌肽、抑肽酶 美国Sigma公司; 胎牛血清 杭州四季青工程有限公司; DMEM(高糖)培养液 赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; 磺基罗丹明B(SRB) 上海源叶生物科技有限公司; 二甲基亚砜(DMSO) 美国Amresco公司; Hoechst/PI双染试剂盒、DNA Ladder抽提试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

## 1.2 仪器与设备

TE2000-U倒置荧光显微镜 日本Nikon公司; BDFACS Aria流式细胞仪 美国Backman Coulter公司; DU530核酸蛋白检测仪 德国Eppendorf公司; Image station 2000R凝胶成像系统 英国Syngene公司; 7300 Real Time PCR System 美国ABI公司; HH.CP-T细胞培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; ZHJH-1106B超净工作台 上海智诚分析仪器制造有限公司; DBS-100电脑全自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂; Universal 320R台式冷冻离心机 德国Hettich公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 牡蛎活性肽的制备

参考汪秋宽等<sup>[7]</sup>研究方法并加以改进。取60g鲜活牡蛎匀浆, 在温度45℃, 复合酶2614U/g底物(风味蛋白酶与胰蛋白酶活力比为2.3:1), 底物质量浓度15.3g/L条件下酶解3h。95℃灭酶5min后, 于4℃、4500r/min离心30min, 取上清液, 过葡聚糖柱(填料: Sephadex G-25; 柱规格: 100cm×1.6cm; 流动相: pH7.0, 0.02mol/L磷酸缓冲液; 流速: 0.3mL/min)进行分级分离, 收集第2个洗脱峰, 命名为BPO; 标准样分别为L-酪氨酸、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、细胞色素C、杆菌肽和抑肽酶。用蓝葡聚糖2 000测定柱外水体积 $V_0$ , 然后由标准样测定各自的洗脱体积 $V_e$ , 根据L-酪氨酸、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、细胞色素C、杆菌肽和抑肽酶的相对分子质量对数lgM值和 $K_{av}$ 值(有效分配系数)制作标准曲线。根据BPO的洗脱体积和标准曲线求出其相对分子质量。

### 1.3.2 细胞培养与牡蛎活性肽的处理

HeLa细胞培养于DMEM完全培养液中(内含10%胎牛血清、100μg/mL青霉素、100μg/mL链霉素), 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养, 24h后加入不同质量浓度的牡蛎活性肽处理。

### 1.3.3 抗肿瘤活性的测定

取对数期HeLa细胞并配制成 $1.0 \times 10^5\text{cell/mL}$ 的细胞悬液。用SRB比色法<sup>[8-9]</sup>测定牡蛎活性肽的抗肿瘤活性, 每组设5个平行组。对HeLa细胞生长抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照组OD值} - \text{测试组OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100$$

### 1.3.4 细胞生长曲线的测定

参考李祺福等<sup>[10]</sup>的相关方法绘制。

### 1.3.5 Hoechst/PI荧光染色观察

采用上海碧云天生物技术有限公司生产的细胞凋亡Hoechst/PI检测试剂盒。实验步骤参照试剂盒说明书, 并于倒置荧光显微镜下观察、拍照。

### 1.3.6 DNA Ladder分析

采用上海碧云天生物技术有限公司生产的DNA Ladder抽提试剂盒。实验步骤参考试剂盒说明书, 并于凝胶成像系统紫外检测、拍照。

### 1.3.7 细胞周期的测定

参考文献[11-12]的方法并加以改进, 取对数生长期的HeLa细胞, 制成 $1 \times 10^5\text{cell/mL}$ 的细胞悬液接种于一批培养瓶中, 24h后实验组分别用不同质量浓度的BPO处理, 阳性对照组以5-氟尿嘧啶处理。培养至48h后用0.25%胰蛋白酶对HeLa细胞进行消化并收集细胞, 4℃、1000r/min离心5min, PBS洗2次, 细胞沉淀重新悬浮于0.5mL PBS中并充分打散, 迅速加入5mL冰预冷的75%乙醇, 置于4℃冰箱暂存待检。细胞周期检测时, 先离心除去乙醇, PBS洗3次, 测定时加入不含DNAase的1.0mg/mL RNase(PBS配制)重悬细胞, 37℃孵育30min, 离心后加入0.5mg/mL的碘化丙啶(propidium iodide, PI)4℃染色3min。用300目尼龙纱布过滤除去成团细胞, 于流式细胞仪上测定细胞周期。采用细胞周期分析软件FCS Express 3.0分析细胞周期。

### 1.3.8 RT-PCR测定凋亡基因的相对表达水平

不同质量浓度的牡蛎活性肽处理HeLa细胞48h。按照Trizol RNA提取试剂盒说明书提取细胞RNA。取1μg总RNA逆转录成cDNA。利用GenBank查得人Caspase3基因序列(NM\_032991.2), 人Caspase10基因序列(NM\_001206524.1), 人Caspase10基因序列(NM\_001101.3), 再利用Primer 5软件设计引物。PCR引物序列见表1。按照荧光定量PCR试剂盒说明书中两步法, 于7300 Real Time PCR System 中PCR扩增。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 List of the primers used for real time PCR

引物名称	引物序列
$\beta$ -actin	上游: 5'- GTTGCGTTACACCTTTTC-3' 下游: 5'- CTTGCCACTTCCACTGTS-3'
Caspase3	上游: 5'- GGTTCATCCAGTCGCTTTG-3' 下游: 5'- GCTTCCACCGTTGTCTC-3'
Caspase10	上游: 5'-GTATCAGGCTACCCAGTCC-3' 下游: 5'- AACCACTCGAAGTAGAC-3'

### 1.3.9 统计方法

实验数据采用Origin 8.0进行处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异显著,  $P > 0.05$ 为差异不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 牡蛎肽的分离与鉴定

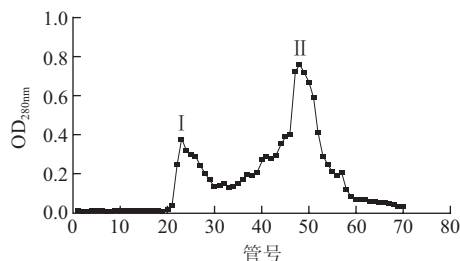


图1 Sephadex G-25柱层析分离牡蛎酶解液的洗脱曲线

Fig.1 Elution profile of oyster hydrolysate on Sephadex G-25 column

将牡蛎酶解液离心, 取上清过葡聚糖柱进行分级分离, 收集第2个洗脱峰(图1), 并根据其洗脱体积和凝胶过滤标准曲线, 计算出牡蛎低分子肽BPO的分子质量为751D。

### 2.2 BPO体外抗HeLa肿瘤细胞活性

将加入BPO处理的HeLa细胞和正常人微血管内皮细胞VEC培养基培养2d后, 用SRB比色法检测BPO对HeLa肿瘤细胞和VEC正常细胞的抑制作用。从表2可知, BPO对HeLa肿瘤细胞有不同程度的抑制作用, 且随着BPO质量浓度增大而提高, 呈现质量浓度依赖关系。当其质量浓度为40 $\mu$ g/mL时, 对HeLa细胞的抑制率高达(64.6 $\pm$ 3.2)%。与空白对照比较, 其抑制作用极其显著( $P < 0.01$ )。实验组的半数抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)为27.23 $\mu$ g/mL。此外, 在所选质量浓度下BPO对正常细胞VEC的抑制效果不显著, 表明BPO对HeLa肿瘤细胞能产生很强的抑制作用, 而对正常细胞基本无毒副作用, 提示牡蛎活性肽BPO是一种具有潜在应用价值、高效低毒的天然抗肿瘤物质, 值得进一步深入研究与开发应用。

### 2.3 细胞生长曲线测定

生长曲线测定结果(图2)显示, HeLa细胞接种培养24h后各瓶细胞数基本为1 $\times 10^5$  cell/mL。在BPO处理后, HeLa细胞的增殖活动均出现不同程度的抑制。以10 $\mu$ g/mL BPO处理HeLa细胞, 从第1~5天的生长抑制率分别为: 19.5%、23.9%、22.0%、18.9%和27.4%, 均表现出极显著性差异( $P < 0.01$ ); 当BPO的质量浓度达到30 $\mu$ g/mL时, HeLa细胞的生周期缩短, 第4天的生长抑制率为77.3%( $P < 0.01$ )。结果证实, 经10 $\mu$ g/mL以上质量浓度的BPO处理后,

HeLa细胞的增殖受到明显抑制( $P < 0.01$ ), BPO抑制HeLa细胞增殖的作用呈时间依赖性。

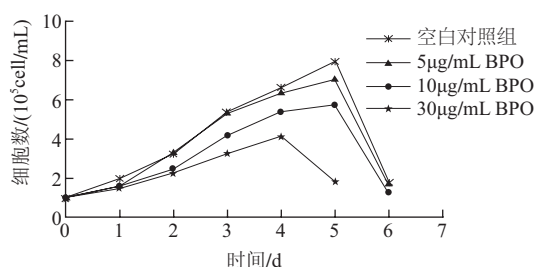
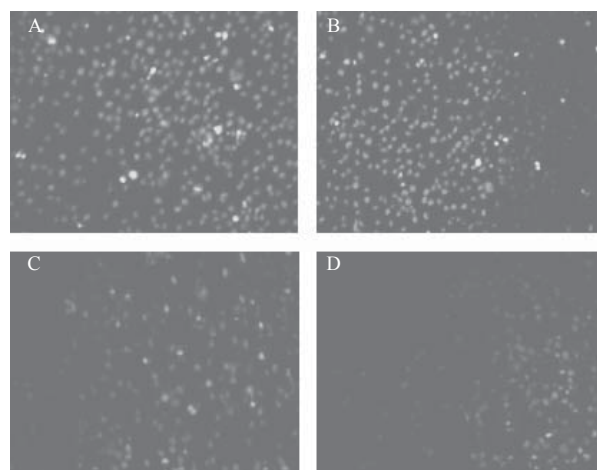


图2 BPO对HeLa细胞生长的影响

Fig.2 Growth curves of HeLa cells in the presence of the peptide at various concentrations

### 2.4 Hoechst/PI荧光染色观察结果



A. 空白对照组; B. 10 $\mu$ g/mL BPO; C. 20 $\mu$ g/mL BPO; D. 40 $\mu$ g/mL BPO。

图3 荧光显微镜下BPO处理后HeLa细胞的凋亡变化(Hoechst/PI,  $\times 200$ )

Fig.3 Fluorescence microscopic observation of HeLa cell apoptosis induced by the peptide (Hoechst/PI,  $\times 200$ )

采用Hoechst/PI两种荧光染料分别染色空白对照组和实验组HeLa细胞, 在荧光显微镜下进行观察, 并拍照、记录。由图3可知, 空白对照组HeLa细胞绝大多数为蓝光染色细胞, 细胞核大多呈现均匀、明亮的荧光, 表明其活力强; 低剂量(10 $\mu$ g/mL BPO)处理组与空白对照组比较, 细胞总量及红光染色细胞数量变化不大; 中剂量(20 $\mu$ g/mL BPO)处理组细胞总量开始减少, 红光染色细胞比例开始增多, 细胞核有边缘化, 有不规则的核裂解现

表2 BPO对HeLa细胞的抑制活性( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Table 2 Inhibitory effect of the peptide on HeLa cell proliferation( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

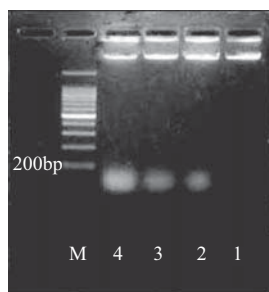
组别	抑制率/%						IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
	0	5 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL	20 $\mu$ g/mL	30 $\mu$ g/mL	40 $\mu$ g/mL	
给药组	—	15.3 $\pm$ 9.5**	22.7 $\pm$ 8.3**	44.1 $\pm$ 2.7**	57.5 $\pm$ 1.6**	64.6 $\pm$ 3.2**	27.23
阳性药物组(5-氟尿嘧啶)	—	21.2 $\pm$ 2.3**	28.6 $\pm$ 1.8**	45.9 $\pm$ 1.1**	64.0 $\pm$ 2.7**	77.67 $\pm$ 3.5**	22.53
正常细胞组(VEC)	—	3.9 $\pm$ 0.7	3.9 $\pm$ 1.6	5.8 $\pm$ 2.3	7.1 $\pm$ 2.3	7.8 $\pm$ 2.8	380.57

注: 以 BPO 添加量为 0 $\mu$ g/mL(下同)的组为空白对照组; 在测抑制率前先进行各组 OD 值的比较; \* 与空白对照组 OD 值比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); \*\* 与空白对照组 OD 值比较有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。— 无抑制率。



象,表明细胞已快速凋亡脱落;高剂量(40 $\mu\text{g/mL}$  BPO)处理组中红光染色细胞占据绝大多数,细胞总量进一步减少,细胞增殖进入到凋亡晚期。

## 2.5 DNA Ladder琼脂糖凝胶电泳图谱分析



1. 空白对照组; 2~4. 5、20、40  $\mu\text{g/mL}$  BPO处理组; M. DNA Marker。

图4 DNA Ladder电泳图谱

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation

在凋亡细胞中, DNA分子被特异性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖的内切核酸酶切断, 基因组DNA首先被降解为200~300kb和30~50kb的片段。随后, DNA进一步降解产生寡核苷酸片段, 其大小相当于核小体(180~200bp)的倍数。由图4可知, 泳道1的空白对照组未发生DNA断裂, 而在泳道2、3、4的BPO处理组均出现180~200bp的条带, 这表明BPO能明显诱导HeLa细胞凋亡, 抑制了肿瘤细胞的增殖。

## 2.6 细胞周期检测

表3 BPO对HeLa细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

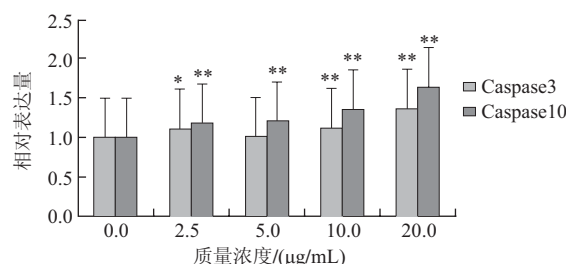
Table 3 Effect of the peptide on the cell cycle of HeLa cells( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

BPO质量浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	各周期细胞所占百分比/%			抑制率/%
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期	
0	52.45 $\pm$ 1.31	30.84 $\pm$ 1.68	16.30 $\pm$ 0.61	8.36 $\pm$ 0.58
7.5	55.41 $\pm$ 1.08*	27.31 $\pm$ 1.47	15.78 $\pm$ 1.00	21.83 $\pm$ 1.45**
15	66.55 $\pm$ 1.28**	18.43 $\pm$ 1.44**	11.95 $\pm$ 0.97**	43.50 $\pm$ 1.12**
30	73.25 $\pm$ 0.90**	14.71 $\pm$ 0.76**	9.95 $\pm$ 0.32**	54.14 $\pm$ 1.06**
20(5-氟尿嘧啶)	72.59 $\pm$ 1.72**	15.59 $\pm$ 1.20**	10.33 $\pm$ 0.95**	50.48 $\pm$ 1.20**

注: \*. 与空白对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); \*\*. 与空白对照组比较有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

表3为采用流式细胞仪检测BPO、5-氟尿嘧啶分别处理HeLa细胞后的细胞周期分布情况。从表3可看出, 不同剂量的BPO对HeLa细胞周期的分布均产生显著的作用 ( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。经30 $\mu\text{g/mL}$  BPO-L处理后的HeLa细胞的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例由原来的52.45%上升到73.25%, 而S期细胞比例则由30.84%下降到14.71%。BPO对细胞周期转换的阻抑作用呈现剂量依赖关系; 阳性对照组5-氟尿嘧啶对HeLa细胞也有相同的周期阻抑效应, 质量浓度为30 $\mu\text{g/mL}$ 的BPO阻抑效应73.25%与抗癌药物20 $\mu\text{g/mL}$  5-氟尿嘧啶的作用效果72.59%相当, 其差值仅为0.9%。由此可见, BPO使HeLa细胞发生G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>阻滞的生物学效应, 从而起到显著的抗肿瘤作用。它与抗癌药物5-氟尿嘧啶的作用效果是一致的。

## 2.7 BPO对HeLa细胞中Caspase3 mRNA和Caspase10 mRNA表达的影响



\*. 与空白对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ );

\*\*. 与空白对照组比较有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

图5 BPO对HeLa细胞中Caspase3与Caspase10 mRNA相对表达量的影响

Fig.5 Effect of the peptide on mRNA expression of caspase-3 and caspase-10 in HeLa cells

本实验采用Real-time PCR检测不同质量浓度BPO处理对HeLa细胞Caspase3 mRNA和Caspase10 mRNA的表达水平的影响。由图5可知, 在不同BPO处理质量浓度下, Caspase3 mRNA和Caspase10 mRNA的表达水平与对照组相比均有统计学意义。其中Caspase10 mRNA的表达与BPO质量浓度呈现剂量依赖性, 而Caspase3 mRNA的表达在一定范围也有剂量依赖关系。

## 3 讨论

肿瘤的发生与细胞周期调控紊乱密切相关<sup>[13-14]</sup>。同时, 在肿瘤细胞发生与发展中涉及到多个基因突变, 并受到复杂信号网络系统的调节<sup>[15-16]</sup>。本研究结果表明, BPO诱导HeLa细胞凋亡的效应主要通过对细胞周期阻滞和激活细胞凋亡信号通路来实现。

### 3.1 BPO阻滞HeLa细胞周期

当细胞周期转换点受阻时, 细胞就无法继续增殖下去, 最后分化死亡或进入G<sub>0</sub>期。李鹏等<sup>[5]</sup>发现牡蛎多肽可诱导人胃腺癌(BGC-823)细胞发生G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻抑。本研究结果证实, BPO能使宫颈癌HeLa细胞周期阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 从而发挥抗肿瘤作用。

### 3.2 BPO诱导Caspase凋亡基因表达上调

Caspases属半胱氨酸蛋白酶, 是引起细胞凋亡的关键酶, 被信号途径激活后, 能将细胞内DNA修复酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)降解, 使细胞不可逆走向死亡。Caspases按功能可以分为两类: 一类是起始者(initiators), 另一类是执行者(executioners)<sup>[17]</sup>。Initiators在外来蛋白信号的作用下被切割激活, 激活的Initiators对Executioners进行切割并使之激活, 达到级联放大的效果, 被激活的Executioners通过对Caspase靶蛋白进行水解, 导致细胞死亡<sup>[18-19]</sup>。

Caspase10是起始者,在凋亡信号传导过程中起重要作用。异常表达的Caspase10会破坏正常的与凋亡相关的信号转导通路,使正常细胞发生异常增殖与分化,最终导致肿瘤产生<sup>[20]</sup>。本研究发现,BPO能上调HeLa细胞中Caspase10 mRNA的表达水平,由此表明BPO能激活Caspase10受体蛋白(procaspase10),启动凋亡信号通路,诱导HeLa细胞凋亡。

在凋亡的信号传递中,Caspase3是细胞凋亡性死亡的最后执行者<sup>[21]</sup>。激活的Caspase3可以水解包括细胞调节、细胞信号转导、DNA修复等环节中重要的蛋白,从而使细胞表现为凋亡特有的形态学及生化特征。本研究结果显示,BPO能使HeLa细胞中Caspase3 mRNA的表达水平有显著的提高,证实BPO能激活HeLa细胞凋亡信号通路。推测BPO诱导HeLa细胞作用的通路可能是:BPO穿过细胞膜直接激活Fas相关死亡域蛋白(fas-associated death domain protein, FADD),FADD再将信号传递给Caspase10(initiators)后,通过级联放大作用Caspase10将“死亡信号”传递到下游中心效应因子Caspase3,再由Caspase3切割PARP,导致HeLa细胞凋亡。

目前国内外尚未见到牡蛎活性肽诱导Caspase凋亡基因表达上调的报道。本实验通过对牡蛎活性肽BPO体外诱导细胞凋亡过程中细胞周期和相关凋亡基因表达的研究,初步探讨了其对宫颈癌细胞HeLa的作用机制,为BPO抗肿瘤作用的进一步深入研究提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] 唐俊舫,徐丽艳,朱允中,等. 尿多肽联合NP与NP方案化疗在晚期非小细胞肺癌的随机对照临床研究[J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(6): 536-539.
- [2] 王彬,汪麟,张湘茹,等. 注射用紫杉醇治疗晚期恶性肿瘤 I 期临床耐受性研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 18(12): 1125-1129.
- [3] MAESHIMA Y, COLORADO P C, KALLURI R. Two RGD-independent alpha v beta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties[J]. J Biol Chem, 2000, 275(31): 23745-23750.
- [4] KONG Z L, CHIANG L C, FANG F. Immune bioactivity in shellfish toward serum-free cultured human cell lines[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(1): 24-28.
- [5] 李鹏,李祺福,黄大川,等. 僧帽牡蛎天然活性多肽峰 I 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.
- [6] 张辉. 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)中氨基酸和寡肽的提取[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.
- [7] 汪秋宽,刘红丹,徐坚,等. 牡蛎酶解液的抗氧化活性[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 295-300.
- [8] 许云禄,杨丽娟,刘广芬. 舟山眼镜蛇毒细胞毒素的分离纯化及其体外抗肿瘤活性[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(3): 127-130.
- [9] 黄银久,宋宝安,金林红,等. SRB法和MTT法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究[J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 13-16.
- [10] 李祺福,黄大川,石松林,等. 牡蛎低分子活性肽BPO-L对人肺腺癌 A549 细胞周期和相关癌基因、抑癌基因表达的调控作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(1): 104-109.
- [11] 张静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 209-211.
- [12] DONG Weihong, XIE Yanhua, WANG Zehua. Apoptosis rate and objective diagnosis of drug resistance of ovarian cancer cell lines [J]. The Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2005, 4(5): 304-308.
- [13] KUZNETSOV G, TENDYKE K, TOWLE M J, et al. Tubulin-based antimitotic mechanism of E7974, a novel analogue of the marine sponge natural product hemiasterlin[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(10): 2852-2860.
- [14] TARDY C, FACOMPRÉ M, LAINE W, et al. Topoisomerase I-mediated DNA cleavage as a guide to the development of antitumor agents derived from the marine alkaloid lamellarin D: triester derivatives incorporating amino acid residues[J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(7): 1697-1701.
- [15] ASSUNCAO G C, LINDEN R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative death pathways[J]. Eur J Biochem, 2004, 271(9): 1638-1650.
- [16] DEGRETEV A, BOYCE M, YUAN J. A decade of caspases[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8543-8567.
- [17] 张贵友,田瑞华,戴尧仁. 植物细胞凋亡的研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(6): 22-27.
- [18] THEODORE O G, MARIA F, PENELOPE J, et al. Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells[J]. Apoptosis, 2007, 12(7): 1299-1315.
- [19] KENT H, NINA E L, HELGE L, et al. A combination of functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2010, 71(2): 123-129.
- [20] WANG J, ZHENG L, LOBITO A, et al. Inherited human caspase-10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II[J]. Cell, 1999, 98: 47-58.
- [21] THOMAS A, FLEISHER M D, OLIVEIRA M D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome[J]. IMAJ, 2005, 7: 758-761.