

## 菲律宾蛤仔寡肽抗前列腺癌DU-145细胞的机制研究

孙瑜<sup>1,2</sup>, 李连军<sup>1,2</sup>, 杨最素<sup>1,2</sup>, 丁国芳<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江舟山 316022;

2. 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江舟山 316022)

**摘要:** 为研究人工合成的菲律宾蛤仔寡肽体外抗前列腺癌细胞DU-145的活性及作用机制, 实验采用流式细胞仪、激光共聚焦显微镜、Western blot等方法检测人工合成菲律宾蛤仔寡肽作用于DU-145细胞后细胞凋亡率、线粒体膜电位改变、细胞色素C表达、caspase3、caspase9的变化, 并用电子显微镜观察细胞超微结构的改变。结果显示, 随着药物浓度的增加和作用时间的延长, DU-145细胞的抑制率逐步增高, 当药物浓度为2.5 mg/mL时, 24 h抑制率为49.9%±4.1%, 72 h抑制率为97.2%±7.34%; Hoechst33258染色和电子显微镜下观察发现, 加药组细胞出现细胞核固缩、染色质凝集和细胞核碎片化等细胞凋亡的典型特征, 随着药物浓度的增加, 凋亡的细胞逐渐增多; 线粒体膜电位逐步下降; Western blot检测显示药物作用后细胞内Bax表达增加, Bcl-2表达减少, Bax/Bcl-2比值增加, Cyt-C、caspase-3、caspase-9表达增加, 且与药物浓度成正相关。研究表明, 人工合成菲律宾蛤仔寡肽能诱导人前列腺癌细胞DU-145凋亡, 可能机制为上调Bax表达、下调Bcl-2表达、增加Bax/Bcl-2比值, 诱导线粒体膜电位下降, 促使Cyt-C转移并激活caspase家族发生级联反应。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; 寡肽; 前列腺癌; 细胞凋亡; Bcl家族; caspase家族; Cyt-C

**中图分类号:** R 282.77

**文献标志码:** A

前列腺癌居目前全球男性癌症发病第2位和死亡率第6位<sup>[1-2]</sup>。据统计, 2008年全美新发前列腺癌病例186 320例, 其中死亡28 660例<sup>[3]</sup>; 欧洲每年新发病例约为382 000例, 大约有89 000例患者死于该病<sup>[4]</sup>。我国前列腺癌发病率低于欧美, 但从21世纪80年代起也呈逐年增高趋势, 在男性泌尿生殖系恶性肿瘤中居第3位<sup>[5-6]</sup>, 大约5%的前列腺癌患者在发现时已经出现了远处转移<sup>[7]</sup>。随着前列腺癌进展恶化到多个信号通路被激活, 针对单一靶标的药物治疗效果也随之减弱或者无效<sup>[8]</sup>。因此寻找疗效确切且副作用较小的药物, 成为一种必然的选择。近年来, 随着人们对海洋认识的不断深入, 从海洋生物中提取活性肽在抗肿瘤方面的研究也取得了很大进展,

并已逐渐成为抗肿瘤药物新的研究方向。

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*), 隶属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、帘蛤科(Veneridae), 俗名花蛤, 广泛分布在我国南北海区。双壳贝类营滤食性生活, 代谢率低, 对海洋环境中的污染物具有很强的生物富集作用, 常被作为海洋环境污染的指示生物<sup>[9]</sup>。王琳等<sup>[10]</sup>研究了Cd<sup>2+</sup>-B[α]P复合污染对菲律宾蛤仔的急性毒性和解毒代谢酶活性的影响, 探讨了双壳贝类在Cd<sup>2+</sup>-B[α]P复合胁迫下的毒性效应, 旨在筛选用于重金属-PAHs毒性评定的生物标志物。前期的实验研究表明, 菲律宾蛤仔提取物具有抑制肿瘤生长、改善症状、延长生命、提高免疫力、抗动脉粥样硬化等作用<sup>[11-15]</sup>。本实验

收稿日期: 2016-09-10 修回日期: 2016-12-01

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY12C20008)

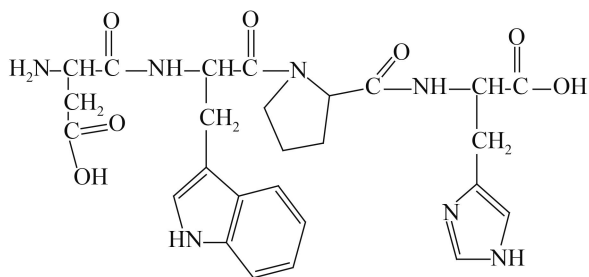
通信作者: 丁国芳, E-mail: dinggf2007@163.com

主要探讨了在前期研究基础上,人工合成的菲律宾蛤仔寡肽诱导人前列腺癌细胞凋亡的作用机制,以期寡肽类药物的发现与生产积累基础资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

菲律宾蛤仔寡肽(RPO)由菲律宾蛤仔经酶解纯化后获得。选用胰蛋白酶对菲律宾蛤仔进行酶解,经截取分子量为3 ku的超滤膜、DEAE Sepharose FF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<sup>[11]</sup>,该目标肽的分子量为607.6 u,氨基酸序列为Asp—Trp—Pro—His,分子结构式如下:



从菲律宾蛤仔提取的天然寡肽具有抑制前列腺癌细胞的增殖、并能诱导前列腺癌细胞凋亡。为避免残留的其他活性物质引起毒性反应,本实验尝试人工合成菲律宾蛤仔寡肽,并在体外检测其对前列腺癌细胞DU-145的作用。人工合成工作由上海丽昂化学有限公司完成。

人前列腺癌细胞DU-145细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所并由本实验室传代培养。胰蛋白酶(SIGMA公司);F12培养基(Gibco公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程公司);MTT(SIGMA公司);Annexin V-FITC/PI双染试剂盒(晶美生物工程有限公司)。

### 1.2 实验方法

**MTT法** 取对数生长期的人前列腺癌细胞株DU-145细胞制成约为 $5 \times 10^4$  /mL单细胞悬液,接种于96孔细胞培养板中,每孔加200  $\mu$ L细胞悬液,放置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,贴壁培养24 h后分别给予不同浓度的RPO(0.5, 1.0, 1.5, 2.5 mg/mL)处理(每组设5个复孔)。RPO分别作用于DU-145细胞24、48和72 h后,

MTT法测定加药后不同时间的吸光度A(490 nm),计算细胞的细胞抑制率,计算公式:细胞抑制率IR(%)=[(对照组A-药物组A)/对照组A]×100。

**Hoechst33258染色** 细胞接种于6孔培养板的盖玻片上,实验分成2组:①对照组中未加药物处理;②RPO组中分别加入浓度为1、2、3 mg/mL的RPO。各组培养48 h后,收集细胞。每孔给予4%多聚甲醛固定20 min,用PBS冲洗,Hoechst 33258荧光染料常温染色15 min,PBS冲洗,置于荧光显微镜下观察DU-145细胞的形态变化并拍照。

**透射电镜观察细胞形态** 各组细胞经消化移至10 mL的离心管中,离心,加2.5%的戊二醛前固定,加1%锇酸后固定;脱水,无水丙酮+环氧树脂618包埋剂2 h,用纯618包埋剂,切片机切成70~80 nm厚的超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色,透射电镜下观察并拍照。

**细胞线粒体膜电位的检测** 各组细胞经胰蛋白酶消化,转移到干净的离心管中,清洗、离心后在JC-1工作液中悬浮均匀,放置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育20 min;离心并收集细胞,用1×Incubation Buffer悬浮细胞,重复2次;最后用Incubation Buffer悬浮均匀细胞,用流式细胞仪检测。

**Western blot检测蛋白表达** 采用蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,并用BCA法定量。SDS-PAGE凝胶电泳。采用半干法将蛋白质从凝胶上转移到PVDF膜,经封闭、一抗、二抗孵育后洗膜显影。重复3次。采用Quantity One软件对目的蛋白条带进行灰度扫描,峰面积灰度分析,以 $\beta$ -actin为内参进行蛋白半定量分析。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件进行数据处理,实验数据均以平均值±标准差表示,组间差异显著性比较采用t检验,P<0.05表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 MTT法结果

未加药的对照组A均比加药组高,并且随着RPO药物浓度的增加,A值逐渐降低,DU-145细胞抑制率逐渐增加,当RPO浓度从0.5 mg/mL增加至2.5 mg/mL,24 h细胞抑制率从8.5%±1.1%增加至49.9%±4.1%;药物浓度不变而作用时间延

长, 同样发现 $A$ 值逐渐降低, DU-145细胞抑制率逐渐增加, RPO浓度为2.5 mg/mL时, 24 h细胞抑制率为 $49.9\% \pm 4.1\%$ , 72 h细胞抑制率为 $97.2\% \pm$

7.3%; 药物作用效果呈现明显的时效和量效关系(表1)。结果显示24 h  $IC_{50}$ 为2.1 mg/mL, 48 h  $IC_{50}$ 为1.7 mg/mL, 72 h  $IC_{50}$ 为1.3 mg/mL。

表 1 RPO对DU-145细胞的增殖抑制率

Tab. 1 Effect of RPO on proliferation of DU-145 cell lines

药物浓度/(mg/mL) drug concentration	$A$			IR/%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0(对照组 Control)	0.97±0.09	0.78±0.07	0.69±0.06			
0.5	0.69±0.03*	0.48±0.01*	0.37±0.02**	8.5±1.1	9.1±1.3	11.4±1.6
1.0	0.49±0.03*	0.44±0.03*	0.35±0.03**	13.3±1.2	17.5±1.7	37.6±2.2
1.5	0.42±0.04*	0.35±0.03*	0.31±0.02**	24.0±3.3	37.0±3.6	56.9±4.5
2.5	0.22±0.01**	0.17±0.03**	0.07±0.01**	49.9±4.1	75.6±6.2	97.2±7.3

注: \*与对照组比较( $P < 0.05$ ); \*\*与对照组比较( $P < 0.01$ )

Notes: \* means different significance with control ( $P < 0.05$ ); \*\* means more different significance with control ( $P < 0.01$ )

## 2.2 Hoechst33258染色结果

经Hoechst 33258染色后的正常DU-145细胞呈均匀的蓝色荧光, 细胞形态呈上皮样, 伸展性好(图1)。随着RPO药物浓度的增加, DU-145细胞数目逐渐减少, 细胞核蓝色荧光逐渐增强、变亮, 染色质聚集, 呈现凋亡的形态学改变。表明RPO可以诱导细胞凋亡, 作用效果与药物浓度呈正相关。

## 2.3 透射电镜下细胞形态改变

正常DU-145细胞周围有微绒毛, 胞质内有较多的滑面内质网与线粒体, 线粒体嵴清晰, 形态正常; 异染色质少, 核仁一个(图版)。RPO处理后, 细胞内出现空泡, 线粒体嵴消失, 内质网明显扩张, 细胞核体积明显缩小, 形态异常, 异染色质聚集于核膜边缘。

## 2.4 细胞线粒体膜电位检测

与对照组线粒体膜电位相比, 随药物浓度增加, 药物组线粒体膜电位逐渐下降(图2)。

## 2.5 Western blot检测蛋白表达

随着RPO浓度的增加, 细胞内Bcl-2蛋白的表达水平降低, Bax蛋白的表达量增加, Bax/Bcl-2的比值逐渐而增加, 呈现明显的剂量依赖性效应(图3)。Cyt-C、caspase-3和caspase-9蛋白随着RPO药物浓度的增加表达水平逐渐升高, PARP蛋白则随着RPO药物浓度增加而下降(图4)。

## 3 讨论

近年来, 海洋生物抗肿瘤活性物质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, 展示出良好的应用前景。有研究表明,

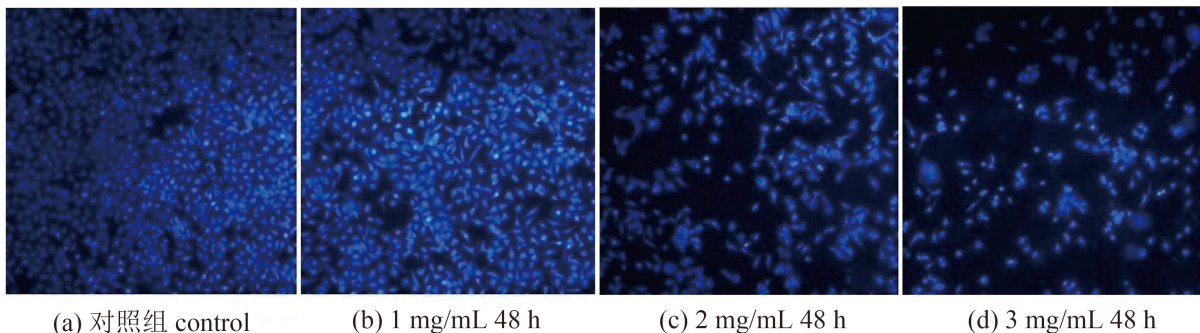


图 1 RPO对DU-145细胞形态变化的影响(Hoechst 33258染色×200)

Fig. 1 DU-145 cells morphological change after being incubated with RPO (Hoechst 33258 staining×200)

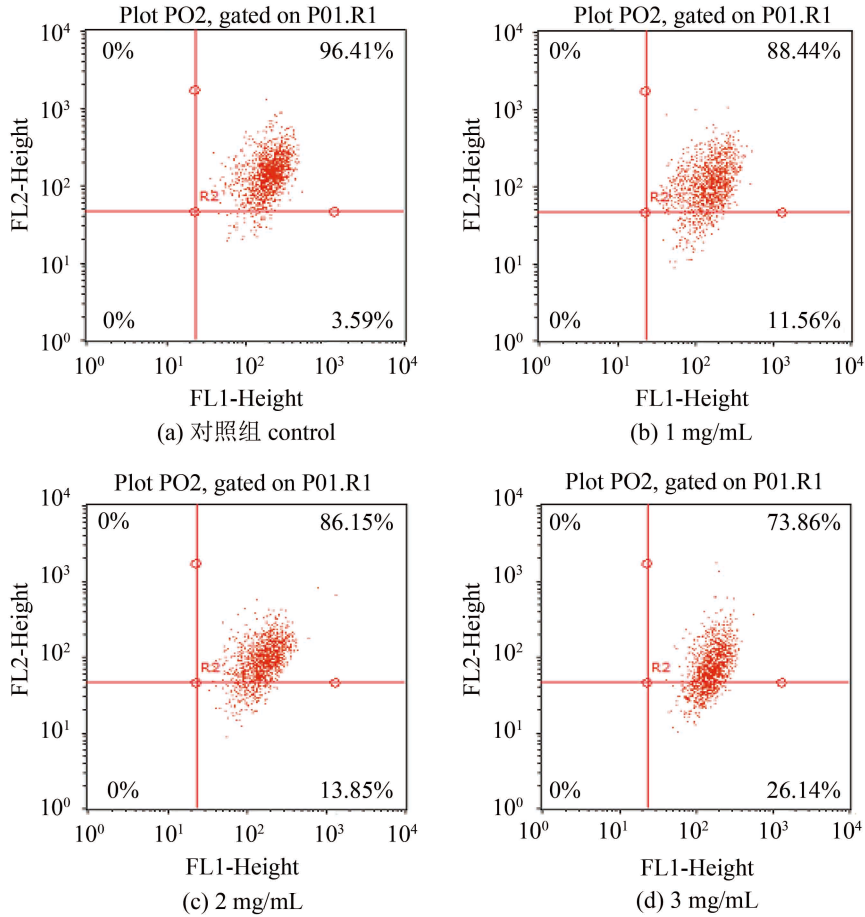


图 2 不同浓度PRO作用48 h后DU-145细胞线粒体膜电位变化

Fig. 2 DU-145 cells mitochondrial membrane potential changes after being incubated with different concentrations of RPO for 48 h

菲律宾蛤仔提取物具有抗肿瘤和增强机体免疫

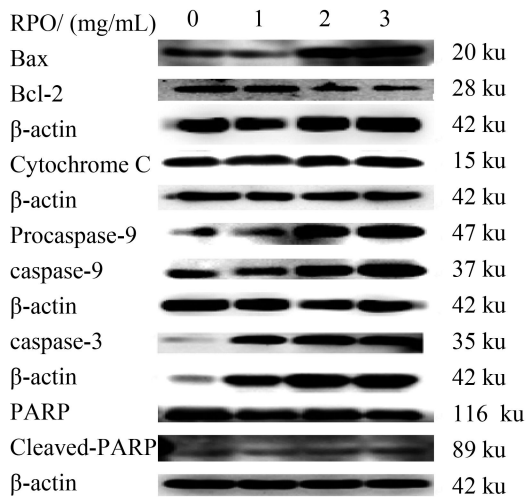


图 3 不同药物浓度作用后DU-145细胞中蛋白表达情况

Fig. 3 Protein expression in DU-145 cells after being incubated with different concentrations of RPO

力等作用<sup>[11-15]</sup>。本实验在前期实验的基础上，采用了人工合成的RPO，以避免RPO外其他物质可能产生的影响。MTT实验结果显示，RPO具有较好的抑制人前列腺癌DU-145细胞增殖的作用，且其作用效果随着浓度的增加和时间的延长而增强，具有良好的时效和量效关系。Hoechst 33258细胞核染色和透射电镜检查显示，给药组细胞数量减少，部分细胞出现核固缩、染色质边缘聚和核碎片化；细胞内出现空泡、线粒体嵴消失、内质网明显扩张、细胞核体积明显缩小等典型的细胞凋亡特征，发生凋亡的细胞数量随着菲律宾蛤仔寡肽浓度的增加而增加。

在多细胞生物中，细胞凋亡是维持自身稳定的重要机制，细胞增生和细胞凋亡间的平衡失调、细胞凋亡受抑制，可能导致肿瘤的发生<sup>[16]</sup>。在线粒体凋亡途径中，在细胞内凋亡刺激因子作用下，Bcl-2蛋白家族的Bax等受到激活在线粒体膜上形成PT孔(permeability transition pore)，使

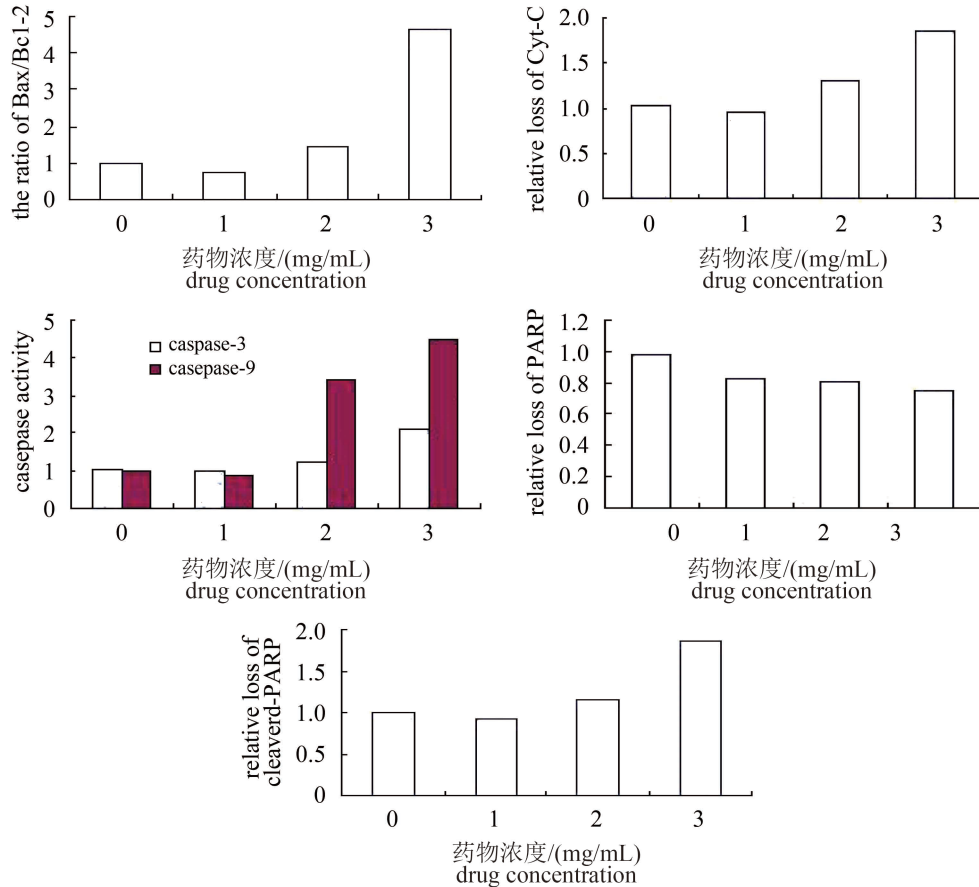


图 4 不同药物浓度作用后细胞中蛋白表达量情况

Fig. 4 Amount of protein expression in DU-145 cells after being incubated with different concentrations of RPO

线粒体膜通透性增高<sup>[17]</sup>, 致使线粒体内一些蛋白如Cyt-C、半胱氨酸、天冬氨酸蛋白水解酶激活剂(Smac/DIABLO)等得以通过线粒体膜进入细胞质<sup>[18]</sup>; 而Bcl-2能阻止Bax的激活从而阻止Cyt-C等的释放。Bcl-2和Bax通过形成同二聚体或异二聚体对Cyt-C的释放进行调节。在ATP或dATP作用下, Cyt-C分子与凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)羧基端WD重复序列形成复合体, 使Apaf-1发生别构效应而激活。Apaf-1能够以CRAD-CRAD方式聚集并活化caspase-9, 形成由caspase-9、Cyt-C、Apaf-1组成的凋亡小体。该凋亡小体具有裂解凋亡蛋白酶caspase-3的作用, 受裂解而激活的caspase-3可以降解ADP—核糖多聚合成酶(PARP), 激活核内核酸内切酶, 使核小体间DNA链断裂, 最终引起细胞凋亡并产生特有的DNA片段化<sup>[19]</sup>。本实验发现, 合成的RPO诱导DU-145细胞凋亡, 机制是通过下调抑凋亡基因Bcl-2的表达、上调促凋亡基因Bax的表达、提高Bax/Bcl-2比值, 进而诱导线粒体膜电位的下降,

促使Cyt-C转移并激发Caspase家族发生级联反应来实现。

本实验发现人工合成的菲律宾蛤仔寡肽具有显著的抑制前列腺癌DU-145细胞增殖、诱导DU-145细胞凋亡的作用, 其诱导DU-145细胞凋亡的作用机制可能与触发了线粒体途径细胞凋亡有关, 下一步将继续开展动物实验, 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] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Engel-Nitz N M, Alemayehu B, Parry D, *et al.* Differences in treatment patterns among patients with castration-resistant prostate cancer treated by oncologists versus urologists in a US managed care population[J]. Cancer Manag Res, 2011, 3: 233-45.

[3] Center M M, Jemal A, Lortet-Tieulent J, *et al.* International variation in prostate cancer incidence and mortality rates[J]. European Urology, 2012, 21(6): 1079-92.

- [4] Ferlay J, Parkin D M, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008[J]. *European Journal of Cancer*, 2010, 46(4): 765-781
- [5] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2004, 25(2): 77-80.
- Sun Y H. The research status of prostate cancer in China [J]. *Chinese Journal of Urology*, 2004, 25(2): 77-80(in Chinese)
- [6] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(4): 330-334.
- Han S J, Zhang S W, Chen W Q, *et al.* Analysis of the status and trends of prostate cancer incidence in China [J]. *Chinese Clinical Oncology*, 2013, 18(4): 330-334 (in Chinese)
- [7] Beltran H, Beer T M, Carducci M A, *et al.* New therapies for castrate-resistant prostate cancer: efficacy and safety[J]. *European Urology*, 2011, 60(2): 279-290.
- [8] Parray A, Siddique H R, Nanda S, *et al.* Castration-resistant prostate cancer: potential targets and therapies [J]. *Biologics*, 2012, 6: 267-276.
- [9] Livingstone D R. Persistent pollutants in marine invertebrates persistent pollutants in marine ecosystems[M]. UK: Pergamon, Oxford Press, 1992: 33-34.
- [10] 王琳, 潘鲁青, 许超群, 等. Cd<sup>2+</sup>-B[α]P 复合污染对菲律宾蛤仔急性毒性和解毒代谢酶活力的影响[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(1): 37-44.
- Wang L, Pan L Q, Xu C Q, *et al.* Combination effects of cadmium and benzo[a]pyrene on acute toxicity and metabolic enzymes activities of *Ruditapes philippinarum* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(1): 37-44 (in Chinese).
- [11] 徐律, 杨最素, 黄芳芳, 等. 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[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1351-1353.
- Xu L, Yang Z S, Huang F F, *et al.* The isolation and purification of oligopeptides from *Ruditapes philippinarum* and its inhibition on the growth of PC-3 cells *in vitro*[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2013, 24(6): 1351-1353(in Chinese).
- [12] 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): 49-54
- Wang Y N, Fan X P, Wu H M. Anti-tumor activity of glycosaminoglycan from *Ruditapes philippinarum*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2007, 27(4): 49-54(in Chinese).
- [13] 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): 370-372.
- Fan X P, Wu H M, Wang Y N, *et al.* Immune activity of glycosaminoglycan from *Ruditapes philippinarum*[J]. *Food Science*, 2008, 29(4): 370-372(in Chinese).
- [14] 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): 336-339.
- Yu D, Yang Y F, Wang J B, *et al.* Study of glycoprotein extracted and purified from *Ruditapes philippinarum* inhibits the growth of tumor cell *in vitro*[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 2011, 30(4): 336-339(in Chinese).
- [15] Takahashi K G, Kuroda T, Muroga K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2008, 150(1): 45-52.
- [16] Wajant H, Gerspach J, Pfizenmaier K. Engineering death receptor ligands for cancer therapy[J]. *Cancer Letters*, 2013, 332(2): 163-174.
- [17] van Delft M F, Huang D C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis[J]. *Cell Research*, 2006, 16(2): 203-213.
- [18] Lindsay J, Esposti M D, Gilmore A P. Bcl-2 protein and mitochondria-specificity in membrane targeting for death[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(4): 532-539.
- [19] Reubold T F, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome[J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24(7): 1420-1425.

## Effect of oligopeptides from *Ruditapes philippinarum* on proliferation and apoptosis of human prostate cancer DU-145 cells

SUN Yu<sup>1,2</sup>, LI Lianjun<sup>1,2</sup>, YANG Zuisu<sup>1,2</sup>, DING Guofang<sup>1,2\*</sup>

(1. Food Science and Pharmacy School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

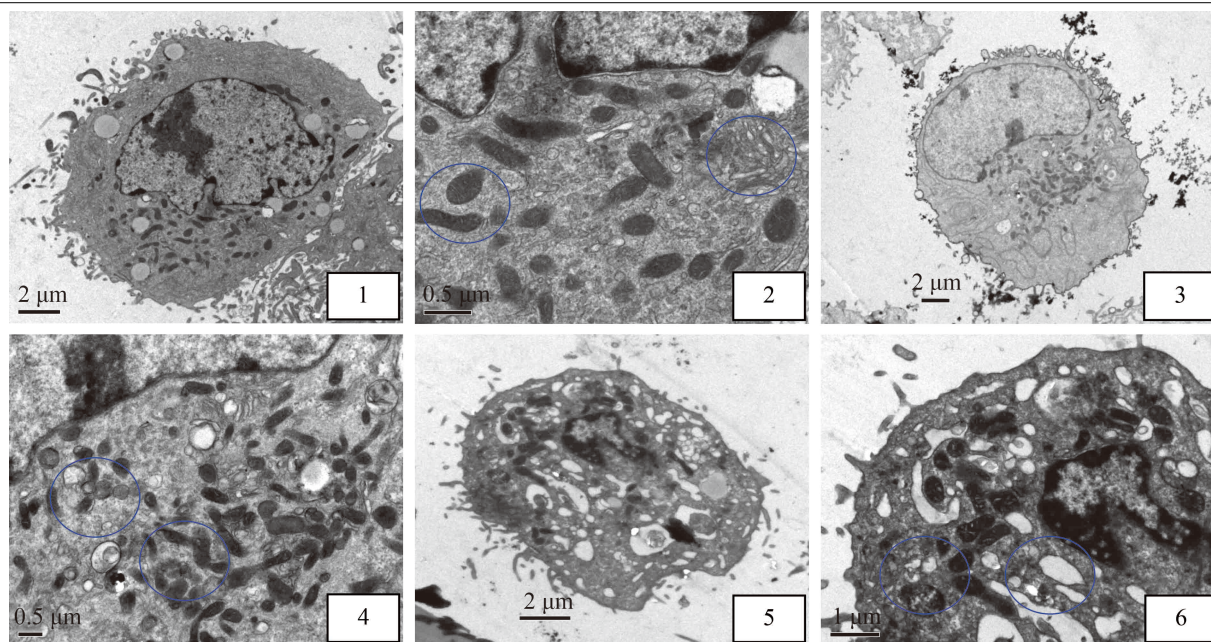
2. Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** This paper aims to study the activity and mechanism of synthetic *Ruditapes philippinarum* oligopeptides(RPO) against prostate cancer DU-145 cells. After being incubated with RPO, DU-145 cells' apoptosis rate, changes in mitochondrial membrane potential, cytochrome C expression, changes of caspase3 and caspase9, cell ultrastructure changes were observed with flow cytometry, laser confocal microscope, Western blotting and electron microscope. The results showed that the factor to induce apoptosis of DU-145 cells is concentration and time dependent, when the RPO concentration was 2.5 mg/mL, the DU-145 cells inhibition rate was 49.9%±4.1% for 24 hours, 97.2%±7.3% for 72 hours. Those DU-145cells incubated with RPO were found to exhibit typical characteristics of apoptosis, such as nucleus psychosis, condensed chromatin, and nucleus fragmentation. The apoptosis rate of DU-145 cells rose as the concentration of RPO increased. Western blotting demonstrated that RPO increased the protein levels of Bax, caspase-3, caspase-9, Cyt-C and reduced the protein expression of Bcl-2. RPO can inhibit the proliferation and induce apoptosis of DU-145 cells possibly by up-regulating expression of Bax, down-regulating the expression of Bcl-2, reducing the Bcl-2/Bax ratio, inducing decline of mitochondrial membrane potential, promoting Cyt-C transfer and stimulating the caspase family cascade reaction.

**Key words:** *Ruditapes philippinarum* ; oligopeptides; prostate cancer; apoptosis; Bcl family; caspase family; Cyt-C

**Corresponding author:** DING Guofang. E-mail: dinggf2007@163.com

**Funding projects:** Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY12C20008)



图版 DU-145细胞超微结构

1. ( $\times 3700$ ), 2. ( $\times 8900$ )为正常DU-145细胞, 细胞表面有较多微绒毛, 胞质中有较多的滑面内质网与线粒体, 线粒体嵴清楚; 3. ( $\times 3700$ ), 4. ( $\times 8900$ )为1 mg/mL PRO作用48 h后的DU-145细胞, 微绒毛脱落, 细胞内出现空泡, 线粒体嵴不明显, 滑面内质网扩大; 5. ( $\times 3700$ ), 6. ( $\times 8900$ )为3 mg/mL PRO作用48 h后的DU-145细胞, 微绒毛脱落, 细胞内出现较多空泡, 线粒体嵴消失, 滑面内质网明显扩大, 异染色质聚集于核膜周围

#### Plate Ultrastructure of DU-145 cells

1, 2. There were plenty of microvilli on the surface of normal DU-145 cell, many smooth endoplasmic reticulum and mitochondria in the cytoplasm. The mitochondrial ridge is clear [1. ( $\times 3700$ ), 2. ( $\times 8900$ )]. 3, 4. After incubated with 1mg/mL PRO for 48 hours, microvilli dropped, vacuoles appeared, mitochondrial ridge blurred and smooth endoplasmic reticulum enlarged [3. ( $\times 3700$ ) and 4. ( $\times 8900$ )]. 5, 6. After incubated with 3 mg/mL PRO for 48 hours, more vacuoles appeared, mitochondrial ridge disappeared, smooth endoplasmic reticulum enlarged obviously and heteromatin gathered in the nucleus [5. ( $\times 3700$ ) and 6. ( $\times 8900$ )]