

· 论 著 ·

家蝇抗菌肽 Cecropin 对人源性肿瘤细胞增殖与凋亡的影响

金小宝^{1,2} 龚水明³ 蒲俏虹^{1,2} 朱家勇^{1,2*} 褚夫江^{1,2} 梅寒芳^{1,2}

摘要：目的 分析家蝇抗菌肽 Cecropin 对人源性肿瘤细胞体外生长增殖与凋亡的影响。方法 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法测定家蝇抗菌肽 Cecropin 对人肺癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人宫颈癌细胞株 Hela、人肝癌细胞株 BEL-7402 和人正常肝细胞株 Chang's Liver 生长增殖情况的影响,采用流式细胞术检测家蝇抗菌肽 Cecropin 作用后 4 株肿瘤细胞凋亡的情况,对照组不加家蝇抗菌肽 Cecropin。结果 家蝇抗菌肽 Cecropin 对 4 株人源性肿瘤细胞的生长均有抑制作用,并能诱导肿瘤细胞发生凋亡,但对人肝癌细胞 BEL-7402 作用效果相对较强。结论 家蝇抗菌肽 Cecropin 能够影响人源性肿瘤细胞的生长与凋亡,作用机制需进一步研究。

关键词：家蝇 抗菌肽 肿瘤细胞 增殖 凋亡

中图分类号:R384 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)3-293-03

Effect of antimicrobial peptide cecropin of *Musca domestica* on proliferation and apoptosis of human tumor cell. JIN Xiao-bao^{1,2}, LI Xiao-bo^{1,2}, ZHU Jia-yong^{1,2*} et al. (1 School of Basic Acines, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, P. R. China; Corresponding author: ZHU Jia-yong, E-mail:zhujiy@gdpu.edu.cn)

Abstract: Objective To observe the effect of antimicrobial peptide cecropin of *Musca domestica* on proliferation and apoptosis of human tumor cells in vitro. Methods The effect of housefly antimicrobial peptide cecropin on human lung cancer cell line A549, human breast cancer cell line MCF-7, human cervical cancer cell line Hela, human hepatoma cell line BEL-7402 and human normal liver cell line Chang's Liver was investigated by MTT colorimetric assay. The apoptosis of tumor cell were investigated by flow cytometry, and control group without cecropin. Result The growth of human tumor cells was inhibited by cecropin, and cecropin could induce apoptosis of tumor cells, but the effect on human liver cancer BEL-7402 cells was the strongest. Conclusion Housefly antimicrobial peptide cecropin can affect growth and apoptosis of human tumor cell, but the mechanism needs further studying.

Key words: *Musca domestica*; Antimicrobial peptide; Tumor cell; Proliferation; Apoptosis

家蝇血淋巴的化学组成较复杂,主要包括抗菌肽、溶菌酶、凝集素和血素等抗菌蛋白和多糖类物质。近年来,有关家蝇血淋巴抑制肿瘤细胞生长的研究报道日益增多,很多学者认为抗菌肽可能是主要的效应分子,但没有明确的实验证据,多集中为抗菌蛋白复合物或者类似物水平^[1-4]。家蝇抗菌肽天蚕素(Cecropin)基因(Genbank 登录号为 EF175878)是我们实验室从家蝇三龄幼虫脂肪体克隆而来^[5]。本文以人肺癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人宫颈癌细胞株 Hela 和人肝癌细胞株 BEL-7402 等 4 株人源性肿瘤细胞为受试对象,观察家蝇抗菌肽 Cecropin 对人源性肿瘤细胞体外生长增殖和凋亡的影响,为研究抗菌肽抗肿瘤作用机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞

株 MCF-7、人宫颈癌细胞株 Hela、人肝癌细胞株 BEL-7402 和人正常肝细胞株 Chang's Liver 为本实验室保存。

1.1.2 家蝇抗菌肽 Cecropin 的来源 Cecropin 是本室通过 COS-7 细胞制备并经蛋白质印迹(Western blotting)分析鉴定,纯度≥95%^[6]。

1.1.3 主要试剂和仪器 RPMI 1640 细胞培养基、胰蛋白酶和胎牛血清为美国 GIBCO 公司产品,荧光染料 PI/Annexin-V 为美国 Sigma 生物公司产品,其余试剂为国产分析纯。酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品,倒置显微镜为日本奥林巴斯 OLYMPUS 公司产品,CO₂ 细胞培养箱为德国 HERAS 公司产品,Epics-XL 流式细胞仪为美国 Beckman-Coulter 公司产品,其余仪器为国产仪器。

1.2 方法

1.2.1 家蝇抗菌肽 Cecropin 对肿瘤细胞增殖的影响

基金项目:广东省社会发展项目(No.2010B031200011) 广州市社会发展攻关项目(No.2005Z3-E0211)

作者单位:1.广东药学院基础学院 广东 广州 510006; 2.广东省生物活性药物研究重点实验室 广东 广州 510006; 3.广东药学院附属门诊部 广东 广州 510224

作者简介:金小宝(1973~),医学博士,副教授,主要从事医学昆虫生物活性物质研究。E-mail:jinx2001@163.com

* 通讯作者 E-mail:zhujiy@gdpu.edu.cn

分别选取对数生长期的人肺癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人宫颈癌细胞株 Hela、人肝癌细胞株 BEL-7402 和人正常肝细胞株 Changs Liver 0.25% (w/v) 制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 $2.0 \times 10^4/\text{ml}$, 接种于 96 孔培养板, 每孔 $200 \mu\text{l}$ 。待细胞基本贴壁后, 加入含终浓度为 $50 \mu\text{M}$ 家蝇抗菌肽 Cecropin 的 RPMI 1640 完全培养液, 每个浓度设 8 个平行孔, 对照孔不加家蝇抗菌肽 Cecropin。分别培养 24h、48h、72h 后, 加入 $50 \mu\text{l}$ (5mg/mL) 的 MTT, 继续培养 4h, 弃各孔上清液, 每孔加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO, 充分振荡 10min, 在酶联免疫检测仪测定各孔 490nm 光吸收值。并计算各组平均值, 得出细胞生长抑制率。细胞生长抑制率计算公式为: 细胞生长抑制率 = (相应对照孔平均 OD 值 - 实验组各孔平均 OD 值) / 相应对照孔平均 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.2.2 家蝇抗菌肽 Cecropin 作用后肿瘤细胞的凋亡 肿瘤细胞凋亡率采用流式细胞术 AnnexinV/PI 双标法进行检测。分别选取对数期生长的人肺癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人宫颈癌细胞株 Hela 和人肝癌细胞株 BEL-7402, 调整浓度为 $3.0 \sim 5.0 \times 10^5/\text{ml}$, 分别接种于 6 孔组织培养板。培养 24h 后, 实验孔加入含终浓度为 $50 \mu\text{M}$ 家蝇抗菌肽 Cecropin 的

RPMI1640 完全培养基 2.0ml, 对照孔不加家蝇抗菌肽, 分别培养 24h、48h、72h 后, 0.25% 胰蛋白酶消化收集各孔细胞。用 PBS (pH7.4) 洗 2-3 次, 加入 $500 \mu\text{l}$ Binding Buffer 混匀制成单细胞悬液, 再加入 FITC 标记的 Annexin V (50ug/ml) $5 \mu\text{l}$ 、PI (50 $\mu\text{g/ml}$) $5 \mu\text{l}$ 。室温避光反应 30min 后, 振荡混匀, 经 500 目铜网过滤后立即进行流式细胞术定量检测各组细胞凋亡率 (Apoptosis%), 同时以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的管作为背景校正。各组平行进行三次实验。

1.3 统计学分析 实验数据以平均数与标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件分析处理, 对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响采用单因素方差检验 (one-way ANOVA) LSD 法进行数据分析。

2 结果

2.1 家蝇抗菌肽 Cecropin 对肿瘤细胞增殖的影响 MTT 结果显示, 与对照组相比, 4 株人源性肿瘤细胞经家蝇抗菌肽 Cecropin 作用 24h、48h、72h 后, 细胞生长增殖均受到抑制, 而正常人肝细胞株 Changs Liver 增殖的没有受到影响。其中对人肝癌细胞 BEL-7402 的影响最明显, 作用 24h、48h、72h 后抑制率分别为 $(24.31 \pm 0.22)\%$ 、 $(37.83 \pm 0.24)\%$ 、 $(52.3 \pm 0.33)\%$, 见表 1。

2.2 流式细胞仪 AnnexinV/PI 双标法检测细胞

表 1 家蝇抗菌肽 cecropin 对各组细胞生长增值的影响

Table 1 Inhibition ratio of Cecropin on tumor and Chang, liver cell (n=8 $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	24h 抑制率 (%) Inhibition rate (%)	48h 抑制率 (%) 48 h inhibition rate (%)	72h 抑制率 (%) 72h inhibition rate
对照组 Control	0	0	0
BEL-7402	$24.31 \pm 0.22^*$	$37.83 \pm 0.24^*$	$52.30 \pm 0.33^*$
MCF-7	$15.74 \pm 0.31^*$	$25.63 \pm 0.11^*$	$41.38 \pm 0.32^*$
Hela	$18.27 \pm 0.19^*$	$29.56 \pm 0.27^*$	$43.49 \pm 0.16^*$
A549	$16.32 \pm 0.15^*$	$26.84 \pm 0.49^*$	$39.88 \pm 0.32^*$
正常肝细胞 Liver cell	$-1.41 \pm 0.21^{**}$	$0.07 \pm 0.32^{**}$	$0.95 \pm 0.23^{**}$

注: * 各肿瘤细胞实验组 vs 对照组 $P < 0.05$, ** 正常肝细胞组 vs 对照组 $P > 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ each tumor cell group compared with control group ** $P > 0.05$ human normal liver cell line group compared with control group

BEL-7402 凋亡的情况 流式细胞仪 AnnexinV/PI 双标法检测结果表明, 家蝇抗菌肽 Cecropin 均能诱导 4 种人源性肿瘤细胞发生凋亡, 凋亡率随作用时间延长而增大, 但对正常人肝细胞株 Changs Liver 没有影响。其中, 对人肝癌细胞 BEL-7402 的效果最明显, 作用 24h、48h、72h 后细胞凋亡率分别为 $(3.3 \pm 0.11)\%$ 、 $(5.4 \pm 0.06)\%$ 、 $(8.0 \pm 0.13)\%$, 见表 2 和图 1。

3 讨论

已有一些学者对家蝇血淋巴提取物的抗肿瘤作用进行过研究, 丘晓燕等^[1]发现从舍(家)蝇幼虫中提取的抗菌物质, 能抑制人乳腺癌细胞 MCF-7、人胃癌细胞 BGC-823、MCC-803 和人肺癌细胞 SPC-A-1 等人体来源肿瘤细胞的体外增殖。文彩虹等^[2]在电子显微镜下发现家蝇血淋巴提取物作用人肝癌细胞株

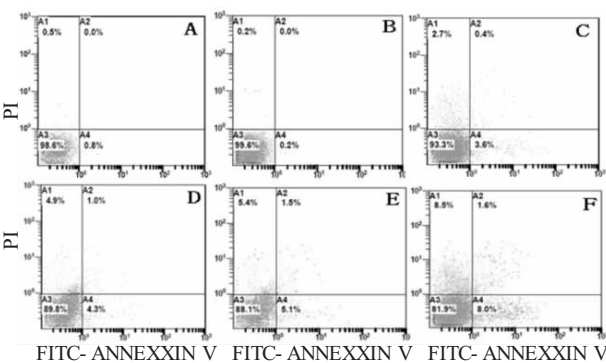
SMMC-7721 后, 细胞膜上出现小孔洞, 引起了细胞膜通透性增加, 细胞内容物外漏, 最终导致了细胞死亡, 并且能够影响肿瘤细胞的周期分布。万启惠等^[7]发现家蝇幼虫抗菌蛋白可通过诱导细胞凋亡来抑制子宫内膜腺癌 JEC 细胞的生长, 可通过细胞周期阻滞以及诱导细胞凋亡来抑制黑色素瘤细胞系 A375 肿瘤细胞的增殖。我们课题组^[8]采用扫描电子显微镜和激光共聚焦技术发现到人源性肝癌细胞 BEL-7402 经家蝇抗菌肽 Cecropins 作用后, 肿瘤细胞膜表面的微绒毛消失, 家蝇抗菌肽 Cecropin 主要与 BEL-7402 细胞膜结合, 部分 Cecropin 可穿过细胞膜进入细胞浆, 整个过程 Cecropin 会源源不断进入到细胞内部, 直至细胞死亡。

本文实验结果显示, 家蝇抗菌肽 Cecropin 能够抑

表 2 各组细胞经家蝇抗菌肽 cecropin 作用后的凋亡率
Table 2 The apoptosis ratio of Cecropin on tumor cell(n=3 $\bar{x}\pm s$)

组 别 Group	24h 凋亡率(%)24h apoptosis rate(%)	48h 凋亡率(%)48h apoptosis rate(%)	72h 凋亡率(%)72h apoptosis rate(%)
对照组 Control	0.20± 0.03	0.70± 0.02	0.80± 0.01
A549	2.10± 0.08*	2.80± 0.12*	3.60± 0.07*
MCF- 7	2.60± 0.09*	3.10± 0.04*	4.30± 0.04*
Hela	2.70± 0.07*	3.90± 0.11*	5.10± 0.06*
BEL- 7402	3.30± 0.11*	5.40± 0.06*	8.00± 0.13*
正常肝细胞 Liver cell	0.20± 0.06**	0.30± 0.03**	0.20± 0.05**

注：* 各肿瘤细胞实验组 vs 对照组 P 均 <0.05 ，** 正常肝细胞组 vs 对照组 $P>0.05$ 。
Note：* $P<0.05$ Each tumor cell group compared with control group ** $P>0.05$ human normal liver cell line group compared with control group



注：A 为空白对照组、B 为正常肝细胞组、C 为 A549 细胞组、D 为 MCF- 7 细胞组、E 为 Hela 细胞组、F 为 BEL- 7402 细胞组

Note：A showed control ,B showed human normal liver cell line Changs , Liver ,C showed human lung cancer cell line A549 ,D showed human breast cancer cell line MCF- 7 ,E showed human cervical cancer cell line Hela ,F showed human hepatoma cell line BEL- 7402

图 1 经家蝇抗菌肽 Cecropin 作用 72h 后各组细胞凋亡率测定
Figure 1 The cell apoptotic rate with flow cytometry analysis after 72h on concentration 50μ M

制 4 种人源性肿瘤细胞的生长增殖 ,并能诱导其发生凋亡 ,而正常人肝细胞株 Changs ,Liver 的增殖与凋亡没有影响 ,说明家蝇抗菌肽对肿瘤细胞的作用具有选择性。另外 ,从表 1 和表 2 中可看出家蝇抗菌肽 Cecropin 对 4 种人源肿瘤细胞的增殖抑制率与凋亡率的大小并不一致 ,说明家蝇抗菌肽 Cecropin 作用肿瘤细胞的方式非常复杂 ,诱导细胞发生凋亡只是其中一种作用方式 ,可能还伴发对细胞膜与细胞器等的破坏、阻滞细胞周期等多方面的作用所致。下一步我们将选择人源性肝癌细胞 BEL- 7402 为对象 ,进一步研究其作用机制。

参考文献：

[1] Qiu XY ,Liu Y ,Chen XL et al. Anticancer Activity of Antimicrobial Peptides Isolated from Musca Domestica Vicina[J] . Chinese Journal of Hygienic insecticides and Equipments , 2003 9 (1) :13-16.(In Chinese)
(丘晓燕 ,刘艳 ,陈晓麟 ,等 . 舍蝇抗菌肽的提取及其对肿瘤细胞生长的抑制作用[J] . 中国卫生杀虫药械 ,2003 9(1) :13-16.)
[2] Wen CH ,Qu CZ ,Li DY et al. Influence of Immuned Hemolymph of

Housefly on Ultra -structures and Cell Cycles of SMMC27721 Cells [J] . Henan Journal of Oncology 2004 ,17 (2) :100-102. (In Chinese)
(文彩虹 ,曲传智 ,李东英 ,等 . 家蝇免疫血淋巴对 SMMC-7721 肝癌细胞超微结构和增殖周期的影响 [J] . 河南肿瘤学杂志 , 2004 ,17(2) :100-102.)
[3] Li XH , Shi YH , Pei Z , et al. Antibacterial activity and in vitro anti-tumor activity of the extract of the larvae of the housefly [J] . Journal of Ethnopharmacology 2007 ,111 (2) :227-231.
[4] Jin XB ,Mei HF ,Zhu JY et al. Apoptosis inducing activity of the antimicrobial peptide cecropin of Musca domestica in human hepatocellular carcinoma cell line BEL -7402 and the possible mechanism [J] . Acta Biochimica et Biophysica Sin 2010 42(4) : 259-265.
[5] Jin XB ,Xu QY ,Zhu JY et al. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding Cecropin an antimicrobial peptide from Musca domestica Larvae [J] . Chin Trop Med 2004 4 (6) 903-906.(in Chinese)
(金小宝 ,许琴英 ,朱家勇 ,等 . 家蝇抗菌肽 cecropin 基因的克隆与序列分析[J] . 中国热带医学 2004 4(6) 903-906.)
[6] Jin XB ,Zhu JY ,Ma Y et al. The expression of anti-bacterial peptide cecropin gene in COS-7 cells and the preliminary study on the activities of its gene product [J] . Chin J Zoonoses 2007 23(6) : 566-568. (inChinese)
(金小宝 ,朱家勇 ,马艳 ,等 . 家蝇抗菌肽基因 cecropin 在 COS-7 细胞中的表达及产物活性初步研究 [J] . 中国人畜共患病学报 , 2007 23(6) 566-568.)
[7] Wan QH ,He LF ,Xu DG et al. Inhibition effects of antibacterial proteins from Musca domestica larvae on JEC and A375 tumour cells [J] . Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science) , 2008 28(8) 971-974.(In Chinese)
(万启惠 ,贺莉芳 ,徐大刚 ,等 . 家蝇幼虫抗菌蛋白对 JEC 和 A 肿瘤细胞的抑制作用 [J] . 上海交通大学学报 (医学版) ,2008 28 (8) 971-974.
[8] Jin XB ,Li XB ,Zhu JY et al. Interaction of Musca domestica Cecropin on Tumor Cell Membrane labeled with green fluorescent.[J] . Chin J Parasitol Parasit Dis Aug 2011 29 (4) 271-273. (In Chinese)
(金小宝 ,李小波 ,朱家勇 ,等 . 家蝇天蚕素对人肝癌 BEL-7402 细胞的作用靶点[J] . 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 2011 ,29(4) : 271-273.)

收稿日期 2011-09-22 编辑 符式刚