

文章编号:1674-2869(2010)12-0039-04

昆虫抗菌肽的诱导及其对荷瘤裸鼠抗瘤作用研究

包永芬^{1,2}, 孙剑刚², 袁玉林^{1*}

(1. 武汉大学基础医学院解剖学教研室, 湖北 武汉 430071;

2. 咸宁学院基础医学院医学微生物学教研室, 湖北 咸宁 437100)

摘 要:研究了脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导草地贪夜蛾卵细胞系 SF-9 产生抗菌肽的过程. 以三氯醋酸提取抗菌肽, 抑菌圈法测定抗菌活性, 结果显示形成了明显的抑菌圈; 体外实验证实, 提取的抗菌活性物质能显著抑制人宫颈癌细胞 SiHa 的生长; 体内实验利用已建立的荷人宫颈癌细胞 SiHa 裸鼠模型, 通过局部注射途径进行治疗干预实验, 结果显示治疗组与对照组比较肿瘤明显缩小, 有显著差异($P < 0.01$). 研究结果表明昆虫抗菌肽具有较明显的抗瘤作用.

关键词:昆虫抗菌肽; 裸小鼠; 宫颈癌; SiHa 细胞株

中图分类号: TQ465.6

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2010.12.010

抗菌肽是生物体内由特定基因编码产生的一类小分子多肽, 具有抗细菌、真菌、寄生虫、病毒, 杀害肿瘤细胞的功能, 不产生耐药性, 对正常人体细胞无伤害, 是新型抗菌药物的理想选择^[1]. 抗菌肽最初的研究集中于其抗菌活性, 但是近年来不断有抗菌肽抑癌作用的报道, 主要集中于体外即细胞学研究, 其抗瘤谱包括宫颈癌、髓样白血病、乳腺癌、肺癌、肝癌、直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、神经细胞瘤、纤维肉瘤、鼠的嗜铬细胞瘤等^[2-11]. 而且, 在相同剂量下, 抗菌肽只能杀死肿瘤细胞, 对正常细胞无毒副作用. 为了进一步研究抗菌肽对肿瘤细胞的作用, 本研究通过脂多糖诱导草地贪夜蛾卵细胞系 SF-9 产生抗菌肽, 并且首次将其通过体内实验作用于人宫颈癌细胞 SiHa, 观察其抗瘤效果, 为下一步临床试验做准备.

1 实验部分

1.1 细胞株

人宫颈癌细胞 SiHa, 由武汉大学提供. 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度培养.

草地贪夜蛾卵细胞系 SF-9, 由武汉大学提供. 在含 10% 胎牛血清的 Grace 培养液常规培养, 以备诱导.

1.2 实验动物

Balb/c 裸小鼠 30 只, 鼠龄 4~6 周, 实验分组

时体重(21.12 ± 1.03) g, 均为雌性. 均购自中国上海 SLAC 实验动物中心, SPF(无特定病原体)环境中饲养.

1.3 抗菌肽的诱导和提取

1.3.1 抗菌肽的诱导

将 LPS(Sigma 公司产品)加入处于对数生长的 SF-9 细胞, LPS 终浓度为 1 μg/mL, 28 °C 恒温培养. 分别收集诱导后 2、4、8、12、16、20、24、36、48 h 培养物上清液, 并观察培养细胞形态及生长增殖情况. 设未加 LPS 对照组培养细胞.

1.3.2 抗菌肽的提取

将收集的培养上清 500 r/min 离心 5 min, 上清经 0.22 μm 过滤器过滤, 加入三氯醋酸(最终质量分数 10%)冰浴 10 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀蛋白, 用 9:1 的丙酮和水洗涤, 14 000 r/min 离心 15 min, 沉淀物真空干燥备用.

1.4 抗菌活性物质的活性检测

a. 实验菌株大肠杆菌抗氨苄菌株 K12D31 由本室保存.

b. 比浊法 对 SF-9 细胞按照 LPS 终浓度为 1 μg/mL 诱导, 并在诱导后 2、4、8、12、16、20、24、36、48 h 收集培养上清液, 将提取的细胞上清沸水浴 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清以 0.45 μm 滤膜抽滤, 取 0.8 mL 滤液于 enpendof 管中, 加入对数生长期的 大肠杆菌抗氨苄菌株 K12D31 20 μL, 加氨苄青霉素至终浓度

收稿日期: 2010-08-29

作者简介: 包永芳(1981-), 女, 湖北黄石人, 助教, 硕士研究生. 研究方向: 微生物学.

指导老师: 袁玉林, 女, 副教授, 博士, 硕士研究生导师. 研究方向: 分子生物学和肿瘤学.

50 μg/mL,150 r/min,37℃恒温培养 3~4 h 至细菌生长至对数生长期,取出冰浴 10 min,用核酸蛋白仪测定 OD₆₀₀ 值. 将所测结果带入公式 $U=(A_0/A-1)^{-2}$,求得抗菌肽的活力单位. 以时间为横坐标,活力单位为纵坐标,绘制时间与活性关系曲线.

c. 抑菌圈法 灭菌双蒸水溶解提取的抗菌肽沉淀(10 μL/mg),滤纸片直径 5 mm,每张纸片吸取 5 μL 样品,所用菌种为大肠杆菌抗氨苄菌株 K12D31,作好的平板在培养箱中于 37℃培养 24 h,观察抑菌圈直径大小.

1.5 诱导动力学的测定

对 SF-9 细胞按照 LPS 终浓度为 1 μg/mL 诱导,并在诱导后 2、4、8、12、16、20、24、36、48 h 收集培养上清液,提取抗菌物质用液体培养抑制测定法测定抑菌活性. 以时间为横坐标,活力单位为纵坐标,绘制时间与活性关系曲线.

1.6 抗菌肽对 SiHa 细胞的体外杀伤作用

将生长状况良好的 SiHa 细胞用胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,用完全 RPMI-1640 培养液稀释细胞为 5×10⁵ 个/毫升,以每孔 150 μL 接种于 96 孔培养板上,置 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养,于细胞培养的第 2 d 将抗菌肽用 1 640 培养液分别配制成 10、1. 0、0. 1、0. 01、0. 001 μg/μL,各取 25 μL 分别加入癌细胞实验组孔中,每组设 6 个复孔,另设培养液空白组和 5-FU 阳性对照组,继续置 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养,分别于培养 24 h 和 48 h 每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL),继续培养 4 h,吸净上清,每孔加入 150 μL DMSO,在振荡器上避光振荡 10 min 使结晶完全溶解,于酶标仪 570 nm 处测定各孔 OD 值,并按下列公式计算细胞杀伤率.

细胞杀伤率(%)=(1-a/b)×100%
其中:a,对照组的光密度值;b,实验组的光密度值.

1.7 荷瘤裸鼠模型的建立

将处于对数生长期的人宫颈癌细胞 SiHa 用胰酶消化后,用 PBS 重悬,调整细胞密度为 2×10⁷ 个/毫升,取 0. 2 mL 注入到裸鼠左后肢背部皮下^[11]. 每 2~3 d 观察一次动物,用手触摸及卡尺测量确定肿瘤,以肿瘤平均直径来衡量瘤体大小,肿瘤平均直径>3 mm 为肿瘤呈阳性的标准;然后随机分组,组间体重差别不超过±1 g. 次日开始肿瘤局部给药,连续 4 天,每次注射剂量为:实验组注射上述制备的抗菌肽 0. 2 mL/20 g 小鼠

(24 mg/kg). 阳性对照组注射 5-氟脲嘧啶 20 mg/kg,阴性对照组注射 PBS 1 毫升/次. 第 10 d 颈椎脱臼处死小鼠,分离出肿瘤组织并称重,比较实验组和对照组的瘤重差异,按下列公式计算肿瘤的抑制率. 并且肿瘤组织做常规病理切片观察.

抑制率(%)=(对照组的平均瘤重-实验组的平均瘤重)÷对照组的平均瘤重

2 结果与分析

2.1 抗菌活性物质产生的动力学

在诱导后 2、4、8、12、16、20、24、36、48 h 收集培养上清液,提取抗菌物质用液体培养抑制测定法测定抑菌活性. 结果如图 1 所示,诱导后 4 h 开始产生抗菌物质,16 h 后达到最高峰,16~20 h 活力基本保持不变,再延长时间,活力明显下降.

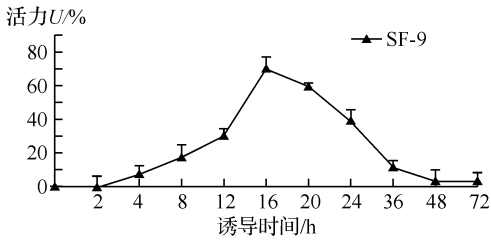


图 1 诱导时间与细胞产生的抗菌活性物质的活力关系
Fig.1 The relation between the time of induce and the activity of antibacterial peptide

2.2 不同诱导时间抗菌肽产生的抗菌活性

用大肠杆菌抗氨苄菌株 K12D31 作为指示菌来测定 LPS 诱导 SF-9 细胞产生的抗菌肽抑菌活性时,可观察到明显的抑菌圈(图 2).

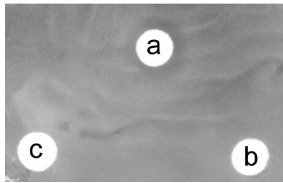


图 2 SF-9 细胞经 LPS 诱导后诱导产物的抗菌活性检测
Fig.2 The inhibitory activity of antibacterial substance from inducing SF-9 by LPS

注:a 为 SF-9 经 LPS 诱导样品;b 为 SF-9 细胞对照样品;c 为无菌水.

2.3 抗菌肽对 SiHa 细胞的体外杀伤作用

采用 MTT 法检测了不同浓度抗菌肽对 SiHa 细胞不同时间的杀伤效率,结果见表 1. 由表 1 可知,抗菌肽对癌细胞均具有一定的杀伤作用,随着药物浓度增加,作用时间延长,细胞增殖速度减慢,当抗菌肽浓度升为 0. 10 μg/μL 时其杀伤效应明显增强,并呈剂量-效应关系和时间-效应关系,具有浓度依赖性和时间依赖性.

表 1 抗菌肽对体外培养癌细胞杀伤作用(±s,%)

时间/h	浓度/(μg/μL)				
	0.001	0.01	0.1	1	10
24h	2.62 ± 0.88	13.23 ± 0.92	59.10 ± 1.28	62.84 ± 0.65	75.80 ± 0.78
48h	3.12 ± 0.34	14.75 ± 0.74	63.22 ± 0.73	72.45 ± 0.88	86.8 ± 1.30

2.4 昆虫抗菌肽对裸鼠移植瘤的治疗效果

局部组和 5-FU 抑瘤率分别为 80.00% 和 81.25%。瘤重比较抗菌肽实验组加上 5-FU 组和阴性对照组比较均有显著差异($P<0.01$),局部组和 5-FU 比较无明显差异($P>0.05$,见表 2)。

表 2 治疗组对荷宫颈癌 SiHa 小鼠的
第 10 天抑瘤作用($n=10$)

Table 2 Antitumor activity of insectival antibacterial peptides in nude mice bearing human cervical cancer cell line SiHa

组别	数量	瘤重(g)	抑瘤率(%)
阴性对照组	10	0.80 ± 0.15	
5-FU 阳性对照组	10	0.15 ± 0.05	81.25
抗菌肽局部组	10	0.16 ± 0.06	80.00

5-FU 处理组瘤组织内出现大片状出血坏死灶,少量淋巴细胞浸润。抗菌肽局部处理组瘤瘤大面积出血坏死,坏死区内及残存癌细胞周围较多炎细胞呈包围状,可见到单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞,以淋巴细胞为主(见图 3、4)。

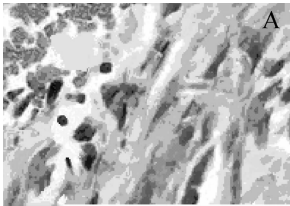


图 3 阴性对照组 H&E 染色结果

Fig. 3 The negative control group, H & E staining

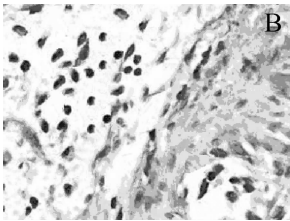


图 4 抗菌肽局部治疗组 H&E 染色结果(×400)

Fig. 4 The local treatment group peptide H & E staining(×400)

3 结 语

Samakovlis 等^[12]用 LPS、昆布多糖诱导黑毛果蝇的传代血细胞系产生天蚕肽(cecropin),说明 LPS 等是昆虫培养细胞产生抗菌肽很好的诱导源。本实验用 LPS 诱导离体培养的家蝇胚胎细胞产生了活性较高的抗菌物质,并且在诱导后 16 h

达高峰。本研究结果表明,抗菌肽对人宫颈癌细胞 SiHa 生长有显著的抑制作用,且随着抗菌肽浓度增加,作用时间延长,细胞增殖速度减慢,呈剂量一效应关系和时间一效应关系。体内试验结果表明,昆虫抗菌肽对荷人宫颈癌细胞 SiHa 裸鼠具有较明显的抑制肿瘤作用。显微镜下观察各治疗组的肿瘤组织,发现局部注射昆虫抗菌肽时,癌细胞周围较多炎细胞呈包围状,以淋巴细胞为主,并可见到单核细胞和中性粒细胞浸润,而腹腔注射昆虫抗菌肽、腹腔注射 5-FU 都没有类似的效果。作为完全抗原的物质,其分子量一般需在 10 kD 以上,分子量在 5 kD 以下的肽类一般无抗原性,不足以引起机体的免疫排斥反应。昆虫抗菌肽由 33~39 个氨基酸残基组成,分子量 4 kD~5 kD,可以基本排除外源性抗原引起的免疫反应。试验结果提示昆虫抗菌肽可能对裸鼠的免疫功能有较好的促进作用,而不象 5-FU 这类化疗药物对机体的免疫功能起着抑制作用。近年来国内外许多学者研究了抗菌肽杀伤肿瘤细胞的作用,结果表明,抗菌肽抑杀肿瘤细胞机制与杀菌机制不尽相同,它比杀菌机制更为复杂。一方面,它直接接触性抑杀肿瘤细胞,主要从细胞膜、线粒体、核膜、细胞核染色体和细胞骨架等方面来达到抑杀肿瘤细胞的效果;另一方面,抗菌肽还可以通过调动机体免疫机能,从体液免疫方面来抵抗癌细胞。有关抗菌肽作用于 Siha 细胞的机理有待于以后进一步深入研究。

参考文献:

[1] Zhang L, Falla T J. Antimicrobial peptides: therapeutic potential[J]. Expert Opin Pharmacother, 2006,7:653-663.

[2] Shin S Y, Kang J H, Jang S Y, et al. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1463: 209-218.

[3] Risso A, Braidot E, Sordano M C, et al. BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore[J]. Mol Cell Biol, 2002,

22:1926 – 35.

[4] Leuschner C, Hansel W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments[J]. Curr Pharm Des, 2004,10:2299 – 2310.

[5] Chen J, Xu X M, Underhill C B, et al. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells[J]. Cancer Res, 2005,65:4614 – 22.

[6] Mader J S, Hoskin D W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2006,15: 933 – 946.

[7] Wang Kai Rong, Zhang Bang Zhi, Wei Zhang, et al. Antitumor effects, cell selectivity and structure – activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI[J]. Peptides, 2008,29:963 – 968.

[8] Hoskin D W, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides [J]. Biochim Biophys Acta, 2008,1778:357 – 375.

[9] Chen Jyh Yih, Lin Wei Ju, Wu Jen Leih, et al. Epinecidin-1 peptide induces apoptosis which enhances antitumor effects in human leukemia U937 cells[J]. Peptides, 2009,30:2365 – 2373.

[10] Chen Jyh Yih, Lin Wei Ju, Lin Tai Lang. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells [J] Peptides, 2009, 30: 1636 – 1642.

[11] Lin Ming Ching, Lin Shih Bin, Chen Jian Chyi, et al. Shrimp antilipopolysacch-aride factor peptide enhances the antitumoractivity of cisplatin in vitro and inhibits HeLa cells growth in nude mice[J]. Peptides, 2010,31:1019 – 1025.

[12] Samakovlis C, Asling B, Boman H G, et al. In vitro induction of cecropin genes an immune response in a Drosophila blood cell line[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992,188(3):1169 – 1175.

**Insectival antibacterial peptides antitumor activity,
nude mice bearing, human cervical cancer cell line SiHa**

BAO Yong-fen^{1,2}, SUN Jian-gang², YUAN Yu-lin¹

(1. Department of Anatonly, Basic Medial College, Wuhan University, Wuhan 430071, China;

2. Department of Medical Microbiology, Xianning University Basic Medical School, Xianning 437100, China)

Abstract: *Spodoptera frugiperda* egg cell line (SF-9) were induced with LPS. The insectival antibacterial peptides were recovered by trichloroacetic acid precipitation method, and the antibacterial activity was determined using the zone inhibition assay. They generated obvious inhibition zone. In vitro, antibacterial peptides can inhibit the proliferation of human cervical cancer cell line SiHa. An in vivo analysis in nude mice with tumor xenografts was established to conduct interference treatment. Antibacterial peptides were injected intratumorally. The treatment groups showed marked difference from the control group ($P < 0.01$). Overall, these results indicated that the insectival antibacterial peptides were produced and possesses the potential to be a novel therapeutic agent for treating cervical cancer.

Key words: insectival antibacterial peptides; Nude mice; human cervical cancer; SiHa

本文编辑:张瑞