

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.009

家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对人髓样白血病细胞 K562 选择性杀伤作用的研究^{*}

张金花^{1,2}, 赵明才², 贺莉芳¹, 万启惠^{1△}

(1. 遵义医学院寄生虫学教研室, 贵州遵义 563003; 2. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000)

摘要:目的 利用脂多糖刺激家蝇胚胎细胞产生并提取抗菌蛋白, 对比研究家蝇胚胎细胞抗菌蛋白和高三尖杉酯碱(HHT)对人髓样白血病细胞 K562 和正常人体细胞的抑制杀伤作用。方法 采用含 20 mg/L 脂多糖的无血清 M3 培养基作用于处于对数生长期的家蝇胚胎细胞 16 h, 提取上清液中的抗菌蛋白, 将抗菌蛋白配制为 40、80、160、320 和 640 μg/mL 5 个浓度组, 采用 MTT 法测定各浓度抗菌蛋白对 K562 和人脐静脉血管内皮细胞的抑制作用。将处于对数生长期的 K562 细胞和人脐静脉血管内皮细胞配制成相同浓度的 HHT 组、家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组, 两种细胞均采用自身设置对照组。采用流式细胞术测定 K562 细胞和人脐静脉血管内皮细胞 3 组药物的有效杀伤率。结果 MTT 法检测显示, 5 种浓度抗菌蛋白对 K562 细胞均具有明显抑制作用, 各浓度抗菌蛋白对人脐静脉血管内皮细胞均无抑制作用。对照组、HHT 组及家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组对 K562 细胞的有效杀伤率分别为 (28.16±2.14)%、(81.41±1.95)% 和 (82.90±3.03)%; 对人脐静脉血管内皮细胞的有效杀伤率分别为 (41.13±2.51)%、(82.20±2.57)% 和 (36.68±1.86)%。结论 家蝇胚胎细胞抗菌肽与常用的白血病化疗药物相比, 优点在于能有效杀伤白血病细胞又不损伤正常人体细胞。

关键词:家蝇胚胎细胞; 抗菌肽; 人髓样白血病细胞; 抗癌活性; 高三尖杉酯碱
中图分类号:R392.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2014)33-4444-03

An comparative study of the selective killing action of antibacterial protein from the embryonic cells of the musca domestica on human myeloid leukemia cells K562^{*}

Zhang Jinhua^{1,2}, Zhao Mingcai¹, He Lifang¹, Wan Qihui^{1△}

(1. Department of Parasitology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Department of Inspection, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical University, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract:Objective To stimulate the embryonic cells of the musca domestica with lipopolysaccharide(LPS) for production of antibacterial protein and to extract antibacterial protein, then research the inhibitory action of the antibacterial protein and homoharringtonine on human myeloid leukemia cells K562 and normal human cells. **Methods** The logarithmic growth phase's embryonic cells of the musca domestica were stimulated using no serum M3 insect medium which contained 20 mg/L LPS for sixteen hours. The antibacterial protein was extracted from supernatant fluid. The antibacterial protein was prepared in 40, 80, 160, 320 and 640 μg/mL five density groups; the MTT experiments were used to test the inhibition of antibacterial protein on K562 cells and the human umbilical vein vascular endothelial cells. The K562 cells and human umbilical vein vascular endothelial cells were prepared HHT and antibacterial protein of the embryonic cells of the musca domestica groups, the normal control group was established by cells itself. Effective killing rate of K562 cells and the human umbilical vein vascular endothelial cells were measured. **Results** The effective inhibition ratio of homoharringtonine and the antibacterial protein on K562 cells and human umbilical vein vascular endothelial cells on three density groups were detected by flow cytometry. The MTT examination demonstrated that all density antibacterial peptides had inhibition activities on K562 cells, but no inhibition activities on human umbilical vein vascular endothelial cell. The effective killing and wound ratio of the control group, the homoharringtonine group and of the antibacterial protein group from the embryonic cells of the musca domestica on the K562 cells were (28.16±2.14)%, (81.41±1.95)% and (82.90±3.03)%, respectively; the effective killing rate on human umbilical vein vascular endothelial cells were (41.13±2.51)%, (82.20±2.57)% and (36.68±1.86)%, respectively. **Conclusion** Compared with the common chemotherapeutics medicine, the merit of the antibacterial protein from the embryonic cells of the musca domestica is that it can kill the tumor cells effectively, but would not damage the normal person cells.

Key words:embryonic cells of the musca domestica; antibacterial peptide; human myeloid leukemia cells; human umbilical vein vascular endothelial cell; anti tumour activity; homoharringtonine

高三尖杉酯碱(HHT)是临床急性白血病常用的化疗药物 之一, 是一种高效的抗肿瘤药物。其主要通过诱导白血病细胞

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972749)。 作者简介: 张金花(1978—), 硕士, 主管技师, 主要从事免疫学研究。 △ 通讯作者, Tel: 1359527048; E-mail: qhwan@sina.com。

的凋亡来抑制并杀伤白血癌细胞^[1]。临床证明其对急性粒细胞性白血病,急性单核细胞性白血病和慢性粒细胞性白血病等有良好的疗效^[2]。但同时 HHT 对正常人体细胞具有极强的毒性作用,可导致骨髓抑制,限制了化疗剂量的增加。在常规的剂量下 HHT 常见的不良反应有骨髓抑制、心脏毒性、低血压及消化系统常见的恶心、呕吐等症状^[3]。抗菌肽是一种小分子阳离子多肽,具有抗结核的作用^[4],更具有高效的杀菌能力以及广谱的抗病毒、抗肿瘤及抗菌活性。抗菌肽连续 48~72 h 对正常哺乳动物细胞及昆虫细胞进行体外培养,均无不良影响,对肿瘤细胞却有选择性杀伤作用。本研究检测家蝇胚胎细胞抗菌蛋白和 HHT 对 K562 和人脐静脉血管内皮细胞的有效杀伤率,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 家蝇胚胎细胞 MDEC-07114 由遵义医学院寄生虫学教研室自行建立^[5],人髓样白血病细胞 K562 和人脐静脉血管内皮细胞均由遵义医学院生化教研室惠赠。RPMI-1640 和 PI、脂多糖、M3 培养基购自 Sigma 公司。噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)购自 Amresco。HHT 由哈尔滨三联药业有限公司生产,国药准字 H20030936。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 参考贺莉芳等^[5]的方法,家蝇胚胎细胞采用 M3 培养基,28 ℃,5% CO₂ 条件培养;人髓样白血病细胞 K562 细胞、人脐静脉血管内皮细胞 1640 培养基,37 ℃、5% CO₂ 条件培养。

1.2.2 抗菌肽的诱导和提取 参考刘晖等^[6]的方法,用 20 mg/L 的脂多糖诱导处于对数生长期的家蝇胚胎细胞 16 h 收集上清液,0.45 μm 抽滤器抽滤,10%三氯醋酸冰浴 10 min,10 000 r/min 高速离心 10 min 沉淀蛋白,去上清液,丙酮:水洗涤(9:1),14 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,真空抽干,-20 ℃保存备用。

1.2.3 MTT 法测定抗菌蛋白对白血病细胞 K562 和人体正常细胞的抑制作用 将处于对数生长期的白血病细胞 K562 和人脐静脉血管内皮细胞配制成 2.5×10⁵ 个/mL 的细胞悬液,具体操作步骤参考文献^[7]。

1.2.4 流式细胞仪检测药物对 K562 和人脐静脉血管内皮细胞的有效杀伤率 将处于对数生长期的 K562 细胞和人脐静脉血管内皮细胞制成细胞悬液,浓度分别为 5×10⁵ 个/mL 和 2.5×10⁵ 个/mL,各 9 瓶,每瓶 4 mL,培养 24 h。K562 细胞和人脐静脉血管内皮细胞去上清液,3 瓶加入 500 μL 1 mg/mL 的 HHT,另 3 瓶加入 1 mL 用磷酸盐缓冲液(PBS)配制的 640 μg/mL 的家蝇胚胎细胞抗菌蛋白,使药物的最终浓度均为 125 μg/mL,剩余 3 瓶为对照组。继续培养 48 h 收集细胞,PBS 洗涤,去上清液,加入 20 μL Annexin V/PI,避光室温放置 20 min,加入少量 PBS,1 000 r/min,5 min,去上清液,加入 500 μL PBS 制成细胞悬液,1 h 内上机检测。细胞增殖指数(PI)阳性的细胞为被杀伤的靶细胞,除以靶细胞总数,即为杀伤率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,Duncan 复极差进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法测定不同浓度抗菌蛋白对 K562 细胞和人体正常细胞的抑制作用比较 白血病细胞 K562 各浓度组与对照

组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),最高浓度组(640 μg/mL 组)与其他浓度组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各浓度组家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对正常人体细胞抑制率极低,各浓度组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 HHT 和家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对 K562 细胞和人脐静脉血管内皮细胞的有效杀伤率比较 HHT 组和家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组对 K562 细胞的有效杀伤率与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);HHT 对人脐静脉血管内皮细胞的有效杀伤率与对照组及家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 1 各浓度家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对 K562 和人脐静脉血管内皮细胞的抑制作用($n=6$)

组别	K562 (OD 值)	人体正常 细胞(OD 值)	K562 抑制率(%)	人体正常细胞 抑制率(%)
对照组	0.604±0.042	0.414±0.030	—	—
40 μg/mL 组	0.416±0.040	0.413±0.025	28.596	0.255
80 μg/mL 组	0.437±0.031	0.409±0.021	21.968	1.103
160 μg/mL 组	0.465±0.090	0.419±0.025	21.347	1.158
320 μg/mL 组	0.437±0.070	0.406±0.022	26.514	0.895
640 μg/mL 组	0.315±0.040	0.415±0.011	42.173	1.011

—:表示此项无数据。

表 2 HHT 和家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对 K562 细胞和正常人体细胞的有效杀伤率($n=3$,%)

组别	K562 细胞	人脐静脉血管内皮细胞
对照组	28.16±2.14	41.13±2.51
HHT 组	81.41±1.95	82.20±2.57
家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组	82.90±3.03	36.68±1.86

3 讨论

HHT 是一种从三尖杉植物中提取的生物活性碱,是有效抗白血病的药物,其不但能抑制蛋白质合成的起始阶段,也直接干扰 DNA 聚合酶 α 的活性^[8]。其可诱导白血病细胞 K562 等发生编程性细胞死亡。抗菌肽是生物防御系统产生的一类对抗外源性病原体的肽类物质,能有效防范病原体的入侵。众多研究发现,抗菌肽广泛存在于昆虫、鱼类、两栖动物、被囊动物、鸟类、哺乳动物甚至人类^[9]。一方面,抗菌肽直接接触性抑制肿瘤细胞,主要从细胞膜、细胞核、染色体线粒体、核膜及细胞骨架等方面来抑杀肿瘤细胞;另一方面,它可以调动机体免疫机能,从体液免疫方面来抵抗癌细胞的入侵^[10]。

本研究采用治疗人类白血病的常用药物 HHT 和脂多糖诱导后产生的家蝇胚胎细胞抗菌蛋白来分析 2 种对髓样白血病细胞 K562 和人体正常细胞的杀伤作用,结果显示 HHT 对 K562 细胞的有效杀伤率为(81.41±1.95)%,家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对 K562 细胞的有效杀伤率为(82.90±3.03)%,对照组有效杀伤率仅为(28.16±2.14)%,HHT 组和家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 2 种药物对 K562 细胞均有良好的杀伤作用。在对人脐

静脉血管内皮细胞的作用中,对照组有效杀伤率为(41.13±2.51)%,HHT 组的有效杀伤率为(82.20±2.57)%,家蝇胚胎细胞抗菌肽组的有效杀伤率为(36.68±1.86)%。HHT 组分别与对照组及家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),家蝇胚胎细胞抗菌蛋白组与对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$),结果表明 HHT 对人脐静脉血管内皮细胞具有明显的杀伤作用而家蝇胚胎细胞抗菌蛋白不杀伤人脐静脉血管内皮细胞,而且家蝇胚胎细胞对白血病细胞的杀伤作用还略强于 HHT,对人脐静脉血管内皮细胞的作用略低于对照组,显示家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对人体正常细胞可能具有一定的保护作用,关于这点还有待更多的实验数据来证实。采用 MTT 法测定家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对 K562 细胞和正常人体细胞的抑制研究发现,低浓度即可抑制 K562 细胞生长,各浓度组对人体正常细胞无抑制。进一步验证家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对肿瘤细胞具有选择性杀伤作用。笔者的研究表明,家蝇胚胎细胞抗菌蛋白引起 K562 细胞 G_0/G_1 期百分比的上升,引起 PI 的下降,对 K562 细胞有抑制杀伤作用而对正常人体细胞无抑制作用^[7]。贺莉芳等^[11]利用家蝇幼虫抗菌肽作用于子宫内膜癌细胞 JEC 和黑色素瘤细胞 A375 以及健康人牙周膜细胞,结果显示家蝇幼虫抗菌肽对 JEC 细胞和 A375 细胞具有抑制作用而对牙周膜细胞无抑制作用。程璟侠等^[12]研究发现,家蝇幼虫抗菌肽需要一定的浓度和时间作用才能发挥抑制 K562 细胞生长的最佳活性,表明家蝇抗菌肽可能通过直接杀伤作用抑制 K562 细胞生长。众多研究结果表明,家蝇胚胎细胞抗菌蛋白能有效抑制人体肿瘤细胞的生长,而不损伤正常人体细胞^[13]。这与我们的实验结果相一致。

综上所述,本研究发现家蝇胚胎细胞抗菌蛋白在治疗白血病细胞方面优于传统的化疗药物,提取纯化家蝇胚胎细胞抗菌蛋白并制成相应药剂将有利于促进白血病的治疗,这些将有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Kantarjian HM, Talpaz M, Santini V, et al. Homoharringtonine: history, current research and future direction [J]. Cancer, 2001, 92(6): 1591-1605.

(上接第 4443 页)

correlation with the clinicopathological features and patient outcome[J]. Mod Pathol, 2009, 23(2): 213-224.

[7] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428.

[8] Hölsken A, Buchfelder M, Fahlbusch R, et al. Tumour cell migration in adamantinomatous craniopharyngiomas is promoted by activated Wnt-signalling [J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(5): 631-639.

[9] 周杰, 漆松涛, 潘军, 等. 颅咽管瘤组织炎性与临床预后相关性分析[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 41(6): 455-457.

[10] 周杰, 漆松涛, 潘军, 等. 不同组织炎性釉质上皮型颅咽管

[2] 李会波, 赛音其木格, 白院生. 高三尖杉酯碱在血液病治疗中的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 1(43): 63-65.

[3] Tangr, Faussat AM, Majdak P, et al. Sem-isynthetic homoharringtonine induces apoptosis via inhibition of protein synthesis and triggers rapid myeloid cell leukemia-1 down-regulation in myeloid leukemia cells[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5: 723-731.

[4] 岳俊伊, 张健. 抗菌肽抗结核作用的研究进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(19): 2673-2675.

[5] 贺莉芳, 万启惠, 刘晖, 等. 家蝇胚胎细胞系的建立及其生物学特性[J]. 昆虫知识, 2009, 789(5): 788-791.

[6] 刘晖, 贺莉芳, 万启惠, 等. 脂多糖诱导家蝇胚胎细胞的初步研究[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(1): 13-14.

[7] 张金花, 贺莉芳, 万启惠, 等. 家蝇胚胎细胞抗菌蛋白对人髓样白血病细胞 K562 抑制作用的研究[J]. 四川医学, 2012, 12(33): 2062-2064.

[8] Cohem JJ. Apoptosis [J]. Immunol Today, 1993, 14: 126-130.

[9] Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts [J]. J Inter Med, 2003, 54(3): 197-215.

[10] 韩玉萍, 翟朝阳. 抗菌肽的抗肿瘤作用[J]. 生命的化学, 2006, 26(2): 181-183.

[11] 贺莉芳, 万启惠, 刘晖, 等. 家蝇幼虫抗菌蛋白在体外诱导 JEC 凋亡的探讨[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(6): 923-925.

[12] 程璟侠, 樊宏英, 赵瑞君. 家蝇幼虫抗菌肽对 K562 细胞膜的质量浓度阈值作用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 1(23): 42-47.

[13] 万启惠, 贺莉芳, 刘晖, 等. 家蝇幼虫抗菌蛋白对 JEC 和 A375 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.

(收稿日期: 2014-06-20 修回日期: 2014-08-10)

瘤炎症细胞因子表达 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(31): 2499-2502.

[11] Mori M, Takeshima H, Kuratsu J. Expression of interleukin-6 in human craniopharyngiomas: a possible inducer of tumor-associated inflammation [J]. Int J Mol Med, 2004, 14(4): 505-509.

[12] Sullivan N, Sasser A, Axel AE, et al. Interleukin-6 induces an epithelial mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells [J]. Oncogene, 2009, 28(33): 2940-2947.

(收稿日期: 2014-06-25 修回日期: 2014-08-15)