



柞蚕抗菌肽对大鼠大肠癌的防治作用

自1980年Steiner等从惜古比天蚕分离出第一个抗菌肽-cecropins(杀菌肽)后,在几乎所有生物中均发现抗菌肽。对其生物活性的研究表明,抗菌肽对细菌、病毒、某些原虫、真菌及肿瘤细胞等具有选择性杀伤作用[1][2]。柞蚕是我国特有的昆虫品种,已证实柞蚕抗菌肽在体外对肿瘤细胞具有选择性杀伤作用[3]。本研究应用二甲基胍诱发的Wistar大鼠大肠癌模型,观察柞蚕抗菌肽对大肠肿瘤的影响,为抗菌肽应用于肿瘤防治提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料和试剂 正常胃粘膜上皮细胞株GES-1 购自北京市肿瘤防治研究所细胞遗传室。人结肠腺癌细胞株LS-174T为本室保存。柞蚕抗菌肽(3 000 Ua/ml, Ua: absolute units绝对单位[4])由华南农业大学黄自然教授提供。细胞培养基RPMI 1640、四氮唑盐(MTT)购自Sigama公司。二甲基亚砜(DMSO)、多聚甲醛等试剂为国产分析纯试剂。胎牛血清购自杭州四季清生物工程材料有限公司(批号:20011212)。细胞培养皿、培养平板为康宁(Coning)公司产品。酶标分析仪为Bio-Rad-550型。

1.1.2 动物及诱癌剂 Wistar大鼠,平均质量140 g,8周龄,雄性,SPF级,由本校实验动物中心提供(合格证号为2001A052)。诱癌剂为1,2二甲胍(1,2-dimethylhydrazine, DMH),购自Fluka公司。

1.2 方 法

1.2.1 抗菌肽对结肠癌和胃癌细胞株的杀伤作用 采用MTT法[5]。人正常胃粘膜上皮细胞株GES-1、人结肠腺癌细胞株LS-174T于37℃5%CO₂饱和湿度培养于RPMI 1640培养基(内含灭活胎牛血清及抗生素)。取对数生长期细胞(10⁵/ml)接种于96孔细胞培养板,每孔0.2 ml(2.0×10⁴/ml),培养18 h后更换培养基,加入3 000 Ua/ml柞蚕抗菌肽10 μl。阴性对照组加等量RPMI 1640培养基。培养48 h后倾去上清液加入MTT,继续培养4 h后吸去上清液加入DMSO,充分振荡,酶标仪570 nm测D(λ)值。设3个复孔,取平均值。抑瘤率=(对照孔D₅₇₀值-实验孔D₅₇₀值)/对照孔D₅₇₀值。

1.2.3 动物实验 Wistar大鼠随机分为模型对照组(20只)、柞蚕抗菌肽防治组(20只)、阴性对照组及空白对照组(各13只/组),每笼5~6只。在温度为(24±1)℃和相对湿度为(50±10)%的条件下以常备饲料饲养,适应1周后开始实验。DMH用前用1 mmol/L EDTA配制,并以1 mol/L NaOH调pH至7.0。模型对照组及柞蚕抗菌肽防治组按20 mg/kg·b.w.剂量于背侧颈部或大腿内侧皮下注射DMH以诱发大鼠大肠癌,阴性对照组在相同部位皮下注射相同体积EDTA,均每周1次。空白对照组及柞蚕抗菌肽防治组于诱癌同时开始灌胃给药,剂量为10 ml/kg·b.w.,均每周2次。18周末同时结束。动物在注射DMH前称重,调整给药剂量。第33周处死全部大鼠。取肛门以上结肠肠段,沿结肠系膜缘纵向剖开,PBS缓冲液漂洗,置于滤纸上观察肿瘤生长情况,记录有无肿瘤发生及发生数目并测量肿瘤大小。取肿瘤标本置于4%多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,切片,HE染色,行常规病理学检查。每一样品至少制作3张间断病理切片。肿瘤发生率为各组发生肿瘤的动物数

与各组动物总数之比；平均肿瘤个数为各组肿瘤总数与发生肿瘤的动物数之比(T/TBA, tumors/tumor-bearing animal)，肿瘤质量指数(TMI, tumor mass index) [6] [7]：每只动物肿瘤面积总和的常用对数， $TMI = \log_{10} \{Sn\pi[(D_1+D_2)/2]^2+C\}$ ， D_1 、 D_2 为肿瘤直径，C为常数(1.57，避免常用对数值<0)。

1.2.4 采用SPSS10.0统计软件分析 肿瘤发生率采用卡方检验，平均肿瘤个数及TMI采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 柞蚕抗菌肽对肿瘤细胞株的选择性杀伤作用

柞蚕抗菌肽的抗菌活性为3 000 Ua/ml。柞蚕抗菌肽对肿瘤细胞LS-174T具有生长抑制作用，实验组D(λ)值：0.92±0.11，对照组D(λ)值：1.71±0.18，抑瘤率为46%。柞蚕抗菌肽对胃粘膜上皮细胞株GES-1无生长抑制作用，实验组D(λ)值：1.27±0.14，对照组D(λ)值：1.22±0.13，抑瘤率为104%。

2.2 柞蚕抗菌肽AD对二甲胂诱导大鼠大肠癌的影响

实验第33周结束，4组动物体质量增加无显著性差异(资料未显示)。阴性对照组无肿瘤发生；空白对照组(单纯柞蚕抗菌肽灌胃组)无肿瘤发生，对大鼠无不良影响；模型对照组大鼠全部发生肿瘤(100%)，柞蚕抗菌肽组大肠癌发生率(65%)明显低于模型对照组($\chi^2=8.48$, $P=0.004$)。但大肠癌平均个数及TMI在两组间无显著性差异(P值分别为0.225 3及0.406 3)。见表1。组织病理检查显示，至实验结束时，大肠肿瘤均为大肠癌。

表 1 柞蚕抗菌肽对 DMH 诱发的大鼠大肠肿瘤发生的影响
Tab.1 DMH-induced colon carcinoma in rats gavaged with the cecropins from Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*

Group	<i>n</i>	Tumor incidence(%)	NT/TBA (Mean±SD)	TMI (Mean±SD)
Model control	20	20 (100)	1.4±0.68	0.47±0.15
Cecropins	20	13 (65)*	1.7±0.85	0.42±0.22

* $P<0.01$ vs model control

3 讨论

研究证实，抗菌肽由十余种氨基酸、15~60个氨基酸残基组成，相对分子质量2 000~8 000。PI较高，对热稳定，100 °C 30 min 仍保持杀菌活性，对蛋白酶及酸性环境较钝性，作用广谱，在一定浓度范围内对肿瘤细胞株具有选择性杀伤作用[2] [8] [9]。而柞蚕抗菌肽的主要成分为抗菌肽D和B(Cecropin B、D) [10]。本研究显示，柞蚕抗菌肽对“正常”胃粘膜上皮细胞株的生长无影响，对结肠腺癌细胞株的抑制率为46%，表明柞蚕抗菌肽对正常上皮细胞的影响小或无影响，而对肿瘤细胞株具有选择性杀伤作用。抗肿瘤动物实验表明柞蚕抗菌肽体外抗肿瘤作用确实，模型对照组大鼠全部发生肿瘤，柞蚕抗菌肽组大鼠大肠癌发生率为65%，明显低于模型对照组($P<0.01$)。但大肠癌平均个数及TMI在两组间无显著性差异(P值分别为0.225 3及0.406 3)。单纯柞蚕抗菌肽灌胃未见对大鼠的不良影响，与文献报导结果相同[11]。Hui 等[12]通过检测cecropin A对白血病细胞的 IC_{50} 显示，cecropin A可裂解白血病细胞而对淋巴细胞毒性低，而化学抗肿瘤药物5-氟尿嘧啶(5-FU)、阿糖胞苷(Ara-C)对肿瘤细胞及正常细胞无选择性；体外实验表明，cecropin A与5-FU、Ara-C联

合静脉用药具有协同增效作用。Papo等[13]采用合成的抗菌肽(15肽), 静脉注射于裸鼠肺转移瘤模型, 证实合成抗菌肽明显减少裸鼠肺湿重, 肺转移灶减少86%, 而实验动物无任何毒副反应。但本研究利用抗菌肽对蛋白酶及酸性环境不敏感的特点, 采用口服(灌胃)法给药, 简单方便。

DMH诱导的大鼠大肠肿瘤多在18至20周内开始出现肉眼可见的肿物, 即20周内为肿瘤的启动阶段[14][15]。本文柞蚕抗菌肽AD的使用期限仅18周, 与注射DMH诱发大肠肿瘤同时终止, 目的为观察柞蚕抗菌肽是否具有防止大肠肿瘤形成的作用。结果表明, 柞蚕抗菌肽可明显减少大鼠大肠肿瘤的发生率。18周后即肿瘤经过启动阶段后未再给予柞蚕抗菌肽AD, 因此发生肿瘤大鼠的平均肿瘤个数及TMI与模型对照组比较无明显差异, 这从另一侧面说明柞蚕抗菌肽对防止大肠癌形成作用确实。因DMH诱导的大鼠大肠癌多呈不规则形生长。国内的文献中多以统一的公式计算肿块体积, 计算结果并不准确。而以每只动物肿瘤总面积的自然对数作为肿块大小的参数似更客观[5][6]。

柞蚕是我国特有的蚕业品种, 在北方广泛分布和生长, 产量较高。我国人民很早就有食用柞蚕蛹的习惯并已入药(僵蚕)。柞蚕抗菌肽耐热, 在100 °C 30 min 仍保持杀菌活性。纯化工艺流程中除大分子蛋白工艺就是根据这一特性。柞蚕抗菌肽也耐酸碱, 在pH 2~14仍保持生物活性。因此, 长期食用柞蚕蛹可预防大肠癌发生。由于抗生素耐药性日益广泛, 目前国外在抗菌肽临床应用方面进展较快。抗菌肽应用于流行性脑脊髓膜炎、人幽门螺杆菌感染及抗真菌感染等已进入临床试验[16]。抗菌肽应用于肿瘤防治的文献及专利文献较多, 但仍处于实验室研究阶段。由于抗菌肽具有独特的选择性作用, 因此抗菌肽有可能成为新型抗肿瘤药物。

(责任编辑: 吴锦雅)

参考文献:

- [1] Moore AJ, Devine DA, Bibby MC. Preliminary experimental anti- cancer activity of cecropins[J]. Pept Res, 1994, 7(5): 265-9.
- [2] Boman HG. Innate immunity and the normal microflora[J]. Immunol Rev, 2000, 173: 5-16.
- [3] 张卫民, 彭朝晖, 黄自然. 经免疫的柞蚕蛹提取物对人直肠癌细胞的杀伤作用[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(1): 30-2.
Zhang WM, Peng ZH, Huang ZR. Cytocidal effect of immunized hemolymph from pupae of *Antheraea pernyi* on rectal cancer cells[J]. WCJD(World Chinese Journal of Digestion), 1998, 6(1): 30-2.
- [4] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae[J]. Eur J Biochem, 1982, 127(1): 207-17.
- [5] Robertson CN, Roberson KM, Pinero A, et al. Peptidyl membrane- interactive molecules are cytotoxic to prostatic cancer cells in vitro[J]. World J Urol, 1998, 16(6): 405-9.
- [6] McIntosh GH, le Leu RK, Royle PJ, et al. A comparative study of the influence of differing barley brans on DMH-induced intestinal tumours in male Sprague-Dawley rats[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1996, 11(2): 113-9.
- [7] McIntosh GH, Wang YH, Royle PJ. A diet containing chickpeas and wheat offers less protection against colon tumors than a casein and wheat diet in dimethylhydrazine-treated rats[J]. J Nutr, 1998, 128(5): 804-9.
- [8] van't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, et al. Antimicrobial peptides: properties and applicability[J]. Biol Chem, 2001, 382(4): 597-619.
- [9] Chen HM, Wang W, Smith D, et al. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1336(2): 171-9.
- [10] Qu Z, Steiner H, Engstrom A, et al. Insect immunity: isolation and structure of

cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Anthera pernyi*[J]. *Eur J Biochem*, 1982, 127(1): 219-24.

[11] Yang N, Stensen W, Svendsen JS, et al. Enhanced antitumor activity and selectivity of lactoferrin-derived peptides[J]. *J Pept Res*, 2002, 60(4): 187-97.

[12] Hui L, Leung K, Chen HM. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(5): 2811-6.

[13] Papo N, Shahar M, Eisenbach L, et al. A novel lytic peptide composed of D, L amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice[J]. *J Biol Chem*, 2003, Mar 19; [epub ahead of print].

[14] 张振书, 李建国, 赖卓胜, 等. 大肠癌发生过程中GSH-Px及脂质过氧化物水平的动态变化[J]. 第一军医大学学报(*J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*), 1994, 14(1): 32-3.

[15] Chang WW. Histogenesis of symmetrical 1, 2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon in the mouse[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1978, 60(6): 1405-18.

[16] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-95.

参考文献:

[1] Moore AJ, Devine DA, Bibby MC. Preliminary experimental anti-cancer activity of cecropins[J]. *Pept Res*, 1994, 7(5): 265-9.

[2] Boman HG. Innate immunity and the normal microflora[J]. *Immunol Rev*, 2000, 173: 5-16.

[3] 张卫民, 彭朝晖, 黄自然. 经免疫的柞蚕蛹提取物对人直肠癌细胞的杀伤作用[J]. *华人消化杂志*, 1998, 6(1): 30-2.

Zhang WM, Peng ZH, Huang ZR. Cytocidal effect of immunized hemolymph from pupae of *Antheraea pernyi* on rectal cancer cells[J]. *WCJD(World Chinese Journal of Digestion)*, 1998, 6(1): 30-2.

[4] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae[J]. *Eur J Biochem*, 1982, 127(1): 207-17.

[5] Robertson CN, Roberson KM, Pinero A, et al. Peptidyl membrane-interactive molecules are cytotoxic to prostatic cancer cells in vitro[J]. *World J Urol*, 1998, 16(6): 405-9.

[6] McIntosh GH, le Leu RK, Royle PJ, et al. A comparative study of the influence of differing barley brans on DMH-induced intestinal tumours in male Sprague-Dawley rats[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1996, 11(2): 113-9.

[7] McIntosh GH, Wang YH, Royle PJ. A diet containing chickpeas and wheat offers less protection against colon tumors than a casein and wheat diet in dimethylhydrazine-treated rats[J]. *J Nutr*, 1998, 128(5): 804-9.

[8] van't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, et al. Antimicrobial peptides: properties and applicability[J]. *Biol Chem*, 2001, 382(4): 597-619.

[9] Chen HM, Wang W, Smith D, et al. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1336(2): 171-9.

[10] Qu Z, Steiner H, Engstrom A, et al. Insect immunity: isolation and structure of

cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Anthera pernyi*[J]. *Eur J Biochem*, 1982, 127(1): 219-24.

[11] Yang N, Stensen W, Svendsen JS, et al. Enhanced antitumor activity and selectivity of lactoferrin-derived peptides[J]. *J Pept Res*, 2002, 60(4): 187-97.

[12] Hui L, Leung K, Chen HM. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(5): 2811-6.

[13] Papo N, Shahar M, Eisenbach L, et al. A novel lytic peptide composed of D, L amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice[J]. *J Biol Chem*, 2003, Mar 19; [epub ahead of print].

[14] 张振书, 李建国, 赖卓胜, 等. 大肠癌发生过程中GSH-Px及脂质过氧化物水平的动态变化[J]. *第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao)*, 1994, 14(1): 32-3.

[15] Chang WW. Histogenesis of symmetrical 1, 2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon in the mouse[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1978, 60(6): 1405-18.

[16] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-95.

[回结果列表](#)