

# 柞蚕抗菌肽对大鼠大肠癌的防治作用

张卫民 袁卓胜 袁可美 袁刚 袁文 袁周殿元 渊第一军医大学南方医院全军消化内科研究所 冤广东 广州 510515 冤

摘要 目的 观察柞蚕抗菌肽体外抗肿瘤作用及对大鼠大肠肿瘤发生的影响 遥方法 采用 MTT 法检测柞蚕抗菌肽对人结肠癌细胞株 LS-174T 尧胃粘膜上皮细胞株 GES-1 的杀伤作用 遥以二甲胂渊DMH冤诱发的 Wistar 大鼠大肠肿瘤为模型 观察柞蚕抗菌肽对大鼠大肠肿瘤的防治作用 遥DMH 诱发及柞蚕抗菌肽灌胃均 18 周 袁第 33 周结束实验 遥结果 柞蚕抗菌肽在体外对人结肠癌细胞株具有选择性杀伤作用 尧灌胃可明显降低大鼠大肠肿瘤发生率 渊5% 袁 <0.01 冤 且大肠癌平均个数及肿瘤质量指数无显著性差异 渊 >0.05 冤 遥结论 柞蚕抗菌肽对 DMH 诱导的大鼠大肠癌具有预防作用 遥

关键词 抗菌肽 大肠癌 二甲胂 大鼠

中图分类号 冤735 文献标识码 冤 文章编号 冤000-2588(2003)10-1066-03

## Effects of the antibacterial peptide cecropins from Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* on 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats

ZHANG Wei-min, LAI Zhou-shen, HE Mei-rong, XU Gang, HUANG Wen, ZHOU Dian-yuan

Institute of Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To gain insight into the putative anticancer effect of the antibacterial peptides, cecropins, from Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*, on the cancer cells and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in rats. Methods Growth inhibitory effect of the cecropins on normal human gastric epithelial cell line (GES-1) and human colon adenocarcinoma cell line (LS-174T) was observed using a microculture tetrazolium (MTT) colorimetric methods. Male Wistar rats were divided into 4 groups. Group 1 was given on a weekly basis cecropins from *Antheraea pernyi* (3 000 Ua/ml) by gavage at 2 doses of 10 ml/kg body weight and exposed to subcutaneous injection of DMH at the dose of 20 mg/kg body weight. Group 2 was received weekly DMH only. Group 3 was given the cecropins by gavage at the same dose as in group 1. Group 4 was weekly exposed to subcutaneous injection of EDTA (1 mmol/L). All treatments were completed in a course of 18 weeks and the experiment was finished at week 33. Results MTT assay showed selective cytotoxic activity of the cecropins against the human colon adenocarcinoma cells line. The viability of the cancer cells was about 54% and 100% for the normal cells. There was a significantly lower incidence of large intestinal tumors in rats gavaged with cecropins (65%,  $P < 0.01$ ), but the tumor burden (tumors/tumor-bearing animal) and tumor mass index were comparable between the groups ( $P > 0.05$ ). Conclusion The cecropins possess effective anti-tumor activity with no cytotoxicity against normal eukaryotic cells, and impede the neoplastic process in murine large intestines.

Key words: antibacterial peptides; colon tumor; 2-dimethylhydrazine (DMH); rats

自 1980 年 Steiner 等从惜古比天蚕分离出第一个抗菌肽 -cecropins 渊抗菌肽冤后 袁在几乎所有生物中均发现抗菌肽 遥对其生物活性的研究表明 袁抗菌肽对细菌 尧病毒 尧某些原虫 尧真菌及肿瘤细胞等具有选择性杀伤作用 遥柞蚕是我国特有的昆虫品种 袁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 遥本研究应用二甲基胂诱发的 Wistar 大鼠大肠癌模型 观察柞蚕抗菌肽对大肠肿瘤的影响 袁为抗菌肽应用于肿瘤防治提供实验依据 遥

### 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 遥人结肠腺癌细胞株 LS-174T 为本室保存 遥柞蚕抗菌肽 渊000 Ua/ml 袁绝对单位冤由华南农业大学黄自然教授提供 遥细胞培养基 RPMI 1640 尧四氮唑盐 渊ITT冤均自 Sigama 公司 遥二甲基亚砷 渊MSO冤尧多聚甲醛等试剂为国产分析纯试剂 遥胎牛血清购自杭州四季清生物工程材料有限公司 渊批号 冤0011212 冤 细胞培养皿 尧培养平板为康宁 渊Corning冤公司产品 遥酶标分析仪为 Bio-Rad-550 型 遥

1.1.2 动物及诱癌剂 Wistar 大鼠 袁平均质量 140 g 袁周龄 袁雄性 袁PF 级 袁由本校实验动物中心提供 渊合格

收稿日期 冤003-05-13

作者简介 张卫民 渊964- 冤男 袁汉族 袁湖北荆州人 袁986 年毕业于第四军医大学 袁博士 袁副主任医师 袁电话 冤20-88503351 袁E-mail:weigert@163.com

通讯作者 周殿元 袁电话 冤20-61641536

证号为 2001A052 诱癌剂为 1, 2 二甲胂 渊, 2-dimethylhydrazine, DMH 渊自 Fluka 公司遥

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 遥人正常胃粘膜上皮细胞株 GES-1 渊 结肠腺癌细胞株 LS-174T 于 37 益 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养于 RPMI 1640 培养基 渊含灭活胎牛血清及抗生素 渊取对数生长期细胞渊 0<sup>5</sup>/ml 渊接种于 96 孔细胞培养板 渊每孔 0.2 ml 渊.0 伊 0<sup>4</sup>/ml 渊培养 18 h 后更换培养基 渊加入 3 000 Ua/ml 柞蚕抗菌肽 10 滋 渊阴性对照组加等量 RPMI 1640 培养基 渊培养 48 h 后倾去上清液加入 MTT 渊继续培养 4 h 后吸去上清液加入 DMSO 渊充分振荡 渊酶标仪 570 nm 测 D<sub>570</sub> 渊遥设 3 个复孔 渊取平均值 渊抑瘤率 =渊时照孔 D<sub>570</sub> 值-实验孔 D<sub>570</sub> 值 渊对照孔 D<sub>570</sub> 值 渊

1.2.3 动物实验 Wistar 大鼠随机分为模型对照组 渊0 只 渊柞蚕抗菌肽防治组 渊0 只 渊阴性对照组及空白对照组 渊渊 13 只/组 渊每笼 5~6 只 渊在温度为 渊4 依 1 渊益和相对湿度为 渊0 依 0 渊%的条件下以常备饲料饲养 渊适应 1 周后开始实验 渊DMH 用前用 1 mmol/L EDTA 渊配制 渊并以 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 渊遥模型对照组及柞蚕抗菌肽防治组按 20 mg/kg 渊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 渊阴性对照组在相同部位皮下注射相同体积 EDTA 渊均每周 1 次 渊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 渊剂量为 10 ml/kg 渊b.w. 渊均每周 2 次 渊8 周末同时结束 渊动物在注射 DMH 前称重 渊调整给药剂量 渊第 33 周末处死全部大鼠 渊取肛门以上结肠肠段 渊沿结肠系膜缘纵向剖开 渊BS 缓冲液漂洗 渊置于滤纸上观察肿瘤生长情况 渊记录有无肿瘤发生及发生数目并测量肿瘤大小 渊取肿瘤标本置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 渊若规石蜡包埋 渊切片 渊HE 染色 渊行常规病理学检查 渊每一样品至少制作 3 张间断病理切片 渊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 渊平均肿瘤个数为各组肿瘤总数与发生肿瘤的动物数之比 渊NT/TBA, tumors/tumor-bearing animal 渊肿瘤质量指数 渊MI 渊tumor mass index 渊渊每只动物肿瘤面积总和的常用对数 渊MI=log<sub>10</sub> {S<sup>2</sup>渊(D<sub>1</sub>+D<sub>2</sub>)/2<sup>2</sup>+C} 渊渊D<sub>1</sub> 渊D<sub>2</sub> 为肿瘤直径 渊为常数 渊.57 渊避免常用对数值 <0 渊

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

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 遥柞蚕抗菌肽对肿瘤细胞 LS-174T 具有生长抑制作用 渊实验组 D<sub>570</sub> 渊值 渊.92 依 .11 渊对照组 D<sub>570</sub> 渊值 渊.71 依 .18 渊抑瘤率为 46% 遥柞蚕抗菌肽对胃粘膜上皮细胞株 GES-1 无生长抑制作用 渊实验组 D<sub>570</sub> 渊值 渊.27 依 .14 渊对照组 D<sub>570</sub> 渊值 渊.22 依 .13 渊抑瘤率为 104% 遥

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 渊组动物体质量增加无显著性差异 渊资料未显示 渊阴性对照组无肿瘤发生 渊空白对照组 渊单纯柞蚕抗菌肽灌胃组 渊无肿瘤发生 渊对大鼠无不良影响 渊模型对照组大鼠全部发生肿瘤 渊00% 渊柞蚕抗菌肽组大肠癌发生率 渊5% 渊明显低于模型对照组 渊渊=8.48, P=0.004 渊但大肠癌平均个数及 TMI 在两组间无显著性差异 渊渊值分别为 0.225 3 及 0.406 3 渊遥见表 1 渊组织病理检查显示 渊至实验结束时 渊大肠肿瘤均为大肠癌 渊

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	n	Tumor incidence(%)	NT/TBA 渊mean 渊依 D 渊	TMI 渊mean 渊依 D 渊
Model control	20	20 (100)	1.4 渊.68	0.47 渊.15
Cecropins	20	13 (65)*	1.7 渊.85	0.42 渊.22

\* P<0.01 vs model control

3 讨论

研究证实 渊抗菌肽由十余种氨基酸 渊5~60 个氨基酸残基组成 渊相对分子质量 2 000~8 000 渊PI 较高 渊对热稳定 渊渊 益 30 min 仍保持杀菌活性 渊对蛋白酶及酸性环境较钝性 渊作用广谱 渊在一定浓度范围内对肿瘤细胞株具有选择性杀伤作用 渊遥柞蚕抗菌肽的主要成分为抗菌肽 D 和 B 渊cecropin B 渊遥本研究显示 渊柞蚕抗菌肽对野正常 渊胃粘膜上皮细胞株的生长无影响 渊对结肠腺癌细胞株的抑制率为 46% 渊表明柞蚕抗菌肽对正常上皮细胞的影响小或无影响 渊而对肿瘤细胞株具有选择性杀伤作用 渊抗肿瘤动物实验表明柞蚕抗菌肽体外抗肿瘤作用确实 渊模型对照组大鼠全部发生肿瘤 渊柞蚕抗菌肽组大鼠大肠癌发生率为 65% 渊明显低于模型对照组 渊渊<0.01 渊但大肠癌平均个数及 TMI 在两组间无显著性差异 渊渊值分别为 0.225 3 及 0.406 3 渊遥单纯柞蚕抗菌肽灌胃未见对大鼠的不良影响 渊与文献报导结果相同 渊遥 Hui 等 渊通过检测 cecropin A 对白血病细胞的 IC<sub>50</sub> 显示 渊cecropin A 可裂解白血病细胞而对淋巴细胞毒性低 渊而化学抗肿瘤药物 5- 氟脲嘧啶 渊-FU 渊阿糖胞苷 渊ra-C 渊对肿瘤细胞及正常细胞无选择性 渊体外实验表明 渊cecropin

A 与 5-FU 尧 Ara-C 联合静脉用药具有协同增效作用遥  
Papo 等<sup>咱3</sup>采用合成的抗菌肽渊5 肽冤静脉注射于裸  
鼠肺转移瘤模型袁证实合成抗菌肽明显减少裸鼠肺湿  
重袁肺转移灶减少 86% 袁而实验动物无任何毒副反  
应遥本研究利用抗菌肽对蛋白酶及酸性环境不敏感  
的特点袁采用口服渊灌胃冤法给药袁简单方便遥

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袁即 20 周内为肿瘤的启动  
阶段<sup>咱4</sup>遥本文柞蚕抗菌肽 AD 的使用期限仅 18 周袁  
与注射 DMH 诱发大肠肿瘤同时终止袁目的为观察柞  
蚕抗菌肽是否具有防止大肠肿瘤形成的作用遥结果表  
明袁柞蚕抗菌肽可明显减少大鼠大肠肿瘤的发生率遥  
18 周后即肿瘤经过启动阶段后未再给予柞蚕抗菌肽  
AD 袁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袁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遥因 DMH 诱导的大  
鼠大肠癌多呈不规则形生长袁国内文献中多以统一  
的公式计算肿块体积袁计算结果并不准确遥而以每只  
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<sup>咱5</sup>遥

柞蚕是我国特有的蚕业品种袁在北方广泛分布和  
生长袁产量较高遥我国人民很早就有食用柞蚕蛹的习  
惯并已入药渊柞蚕冤遥柞蚕抗菌肽耐热袁在 100 益 30 min  
仍保持杀菌活性遥纯化工艺流程中除大分子蛋白工艺  
就是根据这一特性遥柞蚕抗菌肽也耐酸碱袁在 pH  
2~14 仍保持生物活性遥因此袁长期食用柞蚕蛹可预防  
大肠癌发生遥由于抗生素耐药性日益广泛袁目前国外  
在抗菌肽临床应用方面进展较快遥抗菌肽应用于流行  
性脑脊髓膜炎尧幽门螺杆菌感染及抗真菌感染等已  
进入临床试验<sup>咱6</sup>遥抗菌肽应用于肿瘤防治的文献及专  
利文献较多袁但仍处于实验室研究阶段遥由于抗菌肽  
具有独特的选择性作用袁因此抗菌肽有可能成为新型  
抗肿瘤药物遥

参考文献院

咱1 暂 Moore AJ, Devine DA, Bibby MC. Preliminary experimental anti-  
cancer activity of cecropins 咱暂 Pept Res, 1994, 7(5): 265-9.  
咱2 暂 Boman HG. Innate immunity and the normal microflora 咱暂 Immunol  
Rev, 2000, 173: 5-16.  
咱3 暂 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 咱暂 华人消化杂志, 1998, 6(1): 30-2.  
咱4 暂 Zhang WM, Peng ZH, Huang ZR. Cytocidal effect of immunized  
hemolymph from pupae of *Antheraea pernyi* on rectal cancer cells  
咱暂 WCJD(World Chinese Journal of Digestion), 1998, 6(1): 30-2.  
咱5 暂 Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al. Insect immunity: isolation  
and structure of cecropin D and four minor antibacterial components  
from *Cecropia* pupae 咱暂 Eur J Biochem, 1982, 127(1): 207-17.  
咱6 暂 Robertson CN, Roberson KM, Pinerio A, et al. Peptidyl membrane-  
interactive molecules are cytotoxic to prostatic cancer cells in vitro  
咱暂 World J Urol, 1998, 16(6): 405-9.  
咱7 暂 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 咱暂 J Gastroenterol Hepatol,  
1996, 11(2): 113-9.  
咱8 暂 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 咱暂 J Nutr, 1998, 128  
(5): 804-9.  
咱9 暂 van't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, et al. Antimicrobial  
peptides: properties and applicability 咱暂 Biol Chem, 2001, 382(4):  
597-619.  
咱10 暂 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 咱暂 Biochim Biophys Acta,  
1997, 1336(2): 171-9.  
咱11 暂 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* 咱暂 Eur J Biochem, 1982, 127(1): 219-24.  
咱12 暂 Yang N, Stensen W, Svendsen JS, et al. Enhanced antitumor activity  
and selectivity of lactoferrin-derived peptides 咱暂 J Pept Res, 2002,  
60(4): 187-97.  
咱13 暂 Hui L, Leung K, Chen HM. The combined effects of antibacterial  
peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells 咱暂  
Anticancer Res, 2002, 22(5): 2811-6.  
咱14 暂 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 咱暂 J Biol Chem, 2003, Mar 19; [epub ahead of print].  
咱15 暂 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 咱暂 第一军医大学学报 渊First Mil  
Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao冤 1994, 14(1): 32-3.  
咱16 暂 Chang WW. Histogenesis of symmetrical 1, 2-dimethylhydrazine-  
induced neoplasms of the colon in the mouse 咱暂 J Natl Cancer Inst,  
1978, 60(6): 1405-18.  
咱17 暂 Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms 咱暂  
Nature, 2002, 415(6870): 389-95.

责任编辑 隰锦雅冤