

文章编号:1003-4692(2009)06-0565-04

【论著】

黄粉虫幼虫抗肿瘤细胞K562抗菌肽的分离纯化

刘颜岗¹,程璟侠²,赵瑞君¹,樊宏英¹

【摘要】 目的 从黄粉虫幼虫体内分离纯化具有抗肿瘤细胞K562的抗菌肽。方法 通过超声诱导黄粉虫幼虫大量表达抗菌肽。然后经过研磨、离心、固相萃取、反相高效液相色谱分离纯化黄粉虫幼虫抗菌肽,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法和光镜观察法筛选对K562有杀伤作用的抗菌肽。**结果** 离心上清液上样固相萃取柱,经10%、30%、80%的乙腈水溶液洗脱,只有80%的乙腈水溶液分离组分有活性($P<0.01$)。该活性组分经反相高效液相色谱纯化后分离出5个具有抗肿瘤活性的峰物质,这5个峰活性都较强($P<0.01$),其中峰9、峰4能初步确定为抗菌肽,其他3种有待于进一步的实验证明。**结论** 黄粉虫幼虫体内存在抗肿瘤细胞K562的抗菌肽和抗菌物质,而且不止一种。

【关键词】 黄粉虫幼虫;抗菌肽;肿瘤细胞;K562;纯化

中图分类号:R384

文献标识码:A

Isolation and purification of antibacterial peptides with anti-K562 activity from the *Tenebrio molitor* Linnaeus larvae
LIU Yan-gang*, CHENG Jing-xia, ZHAO Rui-jun, FAN Hong-ying. *Institute of Parasitology, Department of Parasitology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: ZHAO Rui-jun, E-mail: 4935186aaa2272@sina.com

【Abstract】 Objective To isolate and purify the antimicrobial peptides with anti-tumor cell K562 activity from the *Tenebrio molitor* Linnaeus larvae. **Methods** Antimicrobial peptides of *Tenebrio molitor* L.larvae induced by ultrasonic waves were isolated and purified by trituration, centrifugalization, solid phase extraction (SPE) and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Then the antimicrobial peptides with anti-K562 activity were sieved by MTT colorimetric method and light microscope observation. **Results** Supernatant eluted with 10%, 30%, 80% acetonitrile (ACN) in aqueous solution by solid phase extraction, of which, only 80% was active ($P<0.01$). Five anti-tumor peaks appeared after purification by RP-HPLC, which all had strong activity ($P<0.01$). Only 9 and 4 peaks could initially identified as antimicrobial peptides, the others still need to be proved. **Conclusion** There are antimicrobial peptides and anti-bacterial substances which have anti-K562 activity in the *Tenebrio molitor* L.larvae, and more than one.

【Key words】 *Tenebrio molitor* Linnaeus larvae; Antimicrobial peptides; Tumor cells; K562; Purification

昆虫是自然界中种类和数量繁多、生长繁殖迅速的一类动物,各种昆虫在适应环境上各有其独特的方式,即都能产生抗菌肽类物质来保护自己^[1]。黄粉虫(*Tenebrio molitor* Linnaeus)别名黄粉甲,属于节肢动物门,昆虫纲,是一种大型的仓储害虫^[2]。由于黄粉虫蛋白质含量很高,其幼虫蛋白质含量占干重的54.25%^[2],因此有“蛋白质饲料宝库”之美誉^[3]。在这其中就有抗菌肽等抗菌物质。国外已经从黄粉虫体内分离出抗菌肽 tenecin 1,此抗菌肽对革兰阳性菌尤其是对耐甲氧

西林的金黄色葡萄球菌有杀伤作用^[4]。国内学者也对其抗菌肽有一些研究,但都主要集中在对细菌的作用方面,并未见有对肿瘤细胞K562作用的报道。因此,本实验旨在从黄粉虫中筛选出对K562有杀伤作用的抗菌肽。为该抗菌肽序列的测定和开发抗肿瘤细胞K562的特效药提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 黄粉虫幼虫 购自太原市花鸟市场。

1.1.2 肿瘤细胞 K562癌细胞,由中国医学科学院北京药物所引进。

1.1.3 主要试剂 苯甲基磺酰氟(PMSF)(美国Sigma公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国Sigma公司),溶于0.15 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,pH值7.4),配制成工作浓度5 mg/ml,过滤除菌,4℃避光保存;十二烷基磺酸钠

基金项目:山西省高校科技研究开发项目(200613011);山西省科技攻关项目(2006031087-04);太原市科学技术发展计划项目(081049)

作者单位:1 山西医科大学寄生虫学教研室(太原 030001);2 山西省疾病预防控制中心

作者简介:刘颜岗(1981-),男,河北邯郸人,硕士研究生,从事昆虫抗肿瘤细胞抗菌肽的筛选和纯化。E-mail: yangangliu123@163.com

通信作者:赵瑞君, E-mail: 4935186aaa2272@sina.com

(SDS)(美国 Amersco 公司), 10 g SDS 溶于 100 ml 双蒸水中配成 10% SDS, 加入 1 g KCl。生理盐水(高压灭菌)(大同星火药业有限公司);胎牛血清(杭州四季青公司);RPMI 1640 干粉(武汉博士德生物工程有限公司);三氟乙酸(TFA)分析纯(成都市科龙化工试剂厂);乙腈(ACN)色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司)。

1.1.4 主要设备 超声波仪(无锡市超声电子设备厂);净化工作台 SW-CJ-FD(苏州安泰空气技术有限公司);CO₂培养箱 311(美国 Thermo Forma 公司);自动板式酶标仪 ZS-2(北京新风机械厂);真空冷冻干燥机 FD-1-50(北京博医康实验仪器有限公司);倒置生物显微镜 XDS-1B(重庆光电仪器有限公司);固相萃取小柱(SPE)(Sep-Pak Cartridges C₁₈, 美国 Waters 公司);高效液相色谱仪 Agilent 1100(美国 Agilent 公司)。

1.2 方法

1.2.1 抗菌物质的诱导 将一定量的黄粉虫幼虫放入烧杯中,超声波裂解器探头靠近昆虫,在 80 W 的功率下处理 5 min。

1.2.2 收集黄粉虫幼虫组织匀浆上清液 将黄粉虫幼虫置于研钵中,按 1 g 幼虫加入 0.5 ml 生理盐水(内含 1 mmol/L PMSF)研磨,于 4 ℃、12 000 r/min (10 786 × g) 离心 30 min,重复 2 次,取上清^[5]。

1.2.3 Sep-Pak C₁₈ 柱固相萃取分离 以 5 ml 甲醇洗柱,然后以 5 ml 0.05% TFA 水溶液平衡柱体。将上清液上柱,每柱上样 3 ml,以 0.05% TFA 水溶液洗柱,记为流通液,依次以 5 ml 10%、30%、80% 浓度的 ACN 洗脱柱体,手动收集各洗脱组分,分别命名为 sp1、sp3、sp8,真空冻干机冻干,重溶于 PBS 中^[6]。

1.2.4 MTT 法、光镜观察法检测及观察 SPE 各组分和高效液相色谱(HPLC)各峰抗肿瘤细胞 K562 活性 细胞悬液制备:将培养瓶中的细胞悬液置于离心管中,1000 r/min (111 × g) 离心 5 min,弃上清液,吸取一定量的培养液加入到离心管中,充分混匀,细胞计数板计数调整细胞浓度使细胞悬液浓度在 2.5 × 10⁵ 个/ml 左右。MTT 法^[7]:将调整好的细胞悬液加入到 96 孔板中,对照组与实验组每孔 100 μl。将各组分在无菌间用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,加到实验组孔位中,每组分设 5 个复孔,每孔 50 μl。对照组设 5 个复孔,每孔 50 μl PBS。放到 37 ℃、5% 的 CO₂ 温箱中,24 h 后取出孔板在倒置显微镜 100 倍和 400 倍下观察细胞状态并拍照。之后每孔加入 MTT 20 μl,放到培养箱中,4 h 后每孔加入 SDS 100 μl,15 h 之后用酶标仪测 450 nm 下的吸光度(A)值,并按以下公式计算相对抑制率(IR)。

$$IR = 1 - \frac{\text{实验孔平均}A\text{值}}{\text{对照孔平均}A\text{值}} \times 100\%$$

1.2.5 Reversed-Phase HPLC (RP-HPLC) 纯化 经 MTT 法检测固相萃取活性组分,经 0.22 μm 滤膜过滤后取 20 μl 上样 ODS 柱(Sinochrom ODS-BP 250 mm × 4.6 mm 5 μm)(大连依利特公司)。色谱条件:流动相 A,0.1% TFA-水溶液;B,0.1% TFA-乙腈溶液;梯度洗脱:0~5 min B 的浓度为 5%,5~25 min B 的浓度 5%~60%,25~35 min B 的浓度 60%~80%,35~40 min B 的浓度 80%;流速 1 ml/min,柱温 20 ℃,紫外检测器检测波长 214 nm,延迟时间为 0.000 68 s,手动收集各峰。真空冻干机冻干,重溶于 PBS 中。

1.3 统计学处理 A 值用 SPSS 13.0 统计分析软件进行数据分析,结果均由 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析进行统计学处理,其中各组分与对照组比较均采用 Dunnett 法。

2 结果与分析

2.1 MTT 法及光镜观察法检测和观察 SPE 各组分抗肿瘤细胞 K562 结果 MTT 比色法,是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚(Formazan)并沉积在细胞中,由于死细胞中不含琥珀酸脱氢酶,因此加入 MTT 不会有反应。SDS 能溶解细胞中的甲瓚,用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定其 A 值,可间接反映甲瓚的含量和活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。

固相萃取各组分与对照组方差分析具有统计学意义($F=43.502, P<0.01$),其中用 Dunnett 法对各组分分别与对照组进行比较,只有 sp8 组与对照组差异有统计学意义($P<0.01$)(表 1),根据 MTT 原理说明固相萃取各组分中只有 sp8 组对 K562 有杀伤作用。IR 标准采用 1978 年全国抗癌药物会议制定的《抗肿瘤药物通用指标》:IR<30% 为不敏感,归阴性;IR≥30% 为敏感,归阳性。sp8 组的细胞相对抑制率为 65.64%,按照此标准,只有 sp8 组对 K562 敏感,对 K562 有杀伤力。在 100 倍镜下观察:sp8 组整个视野凌乱不堪,而对照组视野干净,两者形成鲜明的对比。400 倍镜下观察:sp8 组细胞有的已经完全分解破碎;有的只剩下半个或多半个细胞,另外半个或少半个已经分解成碎片;有的细胞膜不完整,形成缺口,细胞内容物正在通过缺口

表 1 MTT 法检测固相萃取各组分抗肿瘤细胞的作用

组别	A 值($\bar{x} \pm s$)	相对抑制率(%)
对照组	0.1173 ± 0.0035	
sp1 组	0.1130 ± 0.0070	3.67
sp3 组	0.1033 ± 0.0091	11.94
sp8 组	0.0403 ± 0.0146*	65.64

注:*表示差异有统计学意义($P<0.01$)。

向外释放;有的细胞发生变形,即将发生细胞分解。而对照组细胞几乎完整无缺。

2.2 RP-HPLC 纯化图谱 见图1。

2.3 MTT法及光镜观察法检测和观察 HPLC 各峰抗肿瘤细胞 K562 结果 高效液相色谱各峰与对照组方差分析差异有统计学意义($F=12.801, P<0.01$),其中用 Dunnett 法对各峰分别与对照组进行比较,峰1~4、9与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)(表2),说明这5个峰对 K562 有杀伤作用。且相对抑制率也说明只有这5个峰对 K562 敏感,对 K562 有杀伤力。在100倍和400倍光镜下观察高效液相色谱5个峰与固相萃取80%组分图像相似。其中这5个峰之间在镜下也无明显差别,而峰9的峰形较好,且响应值也较高,故将峰9的镜下图像列于图2。

表2 MTT法检测高效液相色谱各峰抗肿瘤细胞的作用

组别	A 值($\bar{x}\pm s$)	相对抑制率 (%)	组别	A 值($\bar{x}\pm s$)	相对抑制率 (%)
对照	0.1450±0.0038		峰13	0.1374±0.0360	5.24
峰1	0.0838±0.0045*	42.21	峰14	0.1350±0.0106	6.90
峰2	0.0714±0.0021*	50.76	峰15	0.1407±0.0061	2.97
峰3	0.0524±0.0059*	63.86	峰16	0.1187±0.0147	18.14
峰4	0.0856±0.0032*	40.97	峰17	0.1170±0.0171	21.59
峰5	0.1164±0.0140	19.72	峰18	0.1344±0.0119	7.31
峰6	0.1147±0.0098	20.90	峰19	0.1434±0.0060	1.10
峰7	0.1173±0.0075	19.10	峰20	0.1370±0.0125	5.52
峰8	0.1444±0.0021	0.41	峰21	0.1187±0.0213	18.14
峰9	0.0754±0.0065*	47.86	峰22	0.1187±0.0053	18.14
峰10	0.1264±0.0133	12.83	峰23	0.1190±0.0035	17.93
峰11	0.1377±0.0020	5.03	峰24	0.1294±0.0038	11.03
峰12	0.1300±0.0156	10.34			

注: *表示差异有统计学意义($P<0.01$)。

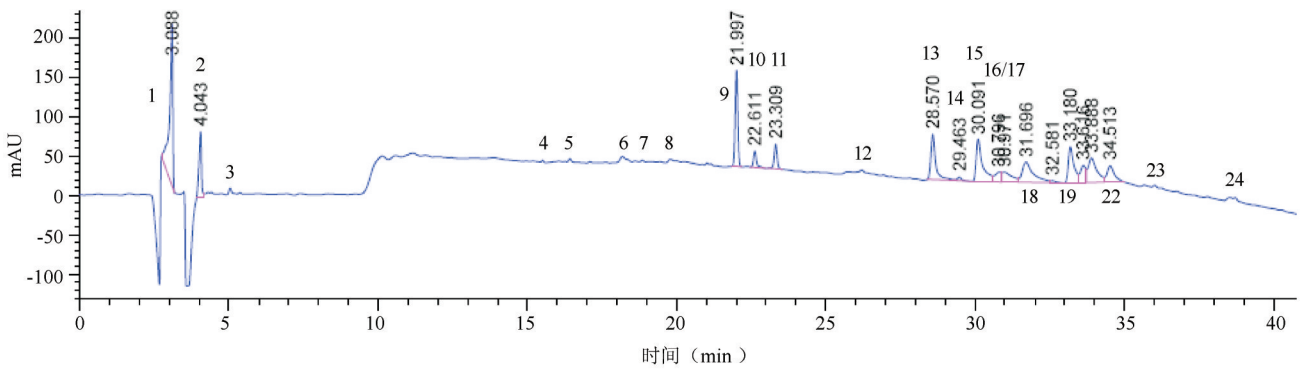
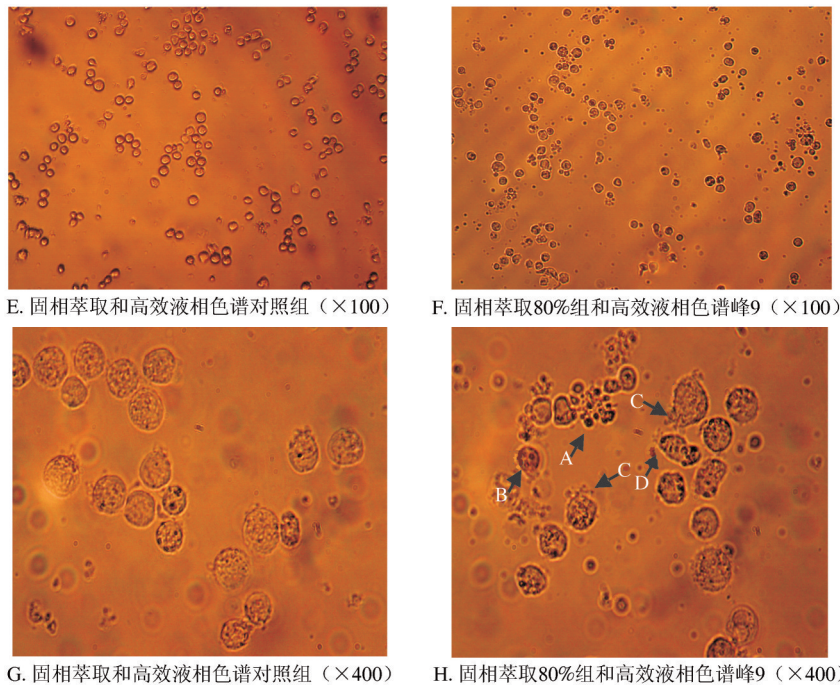


图1 RP-HPLC 纯化图谱



在100倍镜下观察:对照组视野干净(E), sp8组和高效液相色谱组峰9整个视野凌乱不堪(F),两者形成鲜明的对比。400倍镜下观察:对照组细胞几乎完整无缺(G), sp8组和高效液相色谱组峰9细胞有的已经完全分解破碎(H(A));有的只剩下半个或多半个细胞,另外半个或少半个已经分解成碎片(H(B));有的细胞膜不完整,形成缺口,细胞内容物正在通过缺口向外释放(H(C));有的细胞发生变形,即将发生细胞分解(H(D))。

图2 对照组、固相萃取80%组和高效液相色谱峰9的镜下图像

3 讨论

黄粉虫分布范围广泛、资源丰富、对环境适应性强、生活习性简单、食性广、喂养饲料成本低,而且虫体较家蝇(*Musca domestica*)幼虫大、易得,因此其幼虫相对于家蝇幼虫来说更易喂养和实验操作。家蝇成虫能自由飞行,黄粉虫成虫只能做短距离的飞行,相对容易形成规模喂养和繁殖。因此本次实验选取黄粉虫作为实验材料,仍然采用经典的蛋白筛选策略作为实验方法。

白血病是一种常见的恶性肿瘤,我国已将其列入重点防治的十大恶性肿瘤之一。发病以儿童和青年居多,在我国各年龄组恶性肿瘤的死亡率中占第6位(男性)和第8位(女性),在儿童及35岁以下的人群中则占第1位^[8]。近年研究证明,慢性粒细胞白血病(CML)细胞具有分化潜能,K562细胞正是来自CML患者的Ph染色体阳性CML细胞株,具有红细胞系的某些特点^[9]。它与其他恶性肿瘤细胞一样,主要表现细胞增殖过度,而细胞凋亡信号通路受阻所造成的异型细胞无限制地过度生长,从而引起相关的病理生理变化,产生相应的临床表现^[10]。临床上用来治疗白血病的药物有的虽然有效,但是不良反应和副作用太大;而抗菌肽在杀伤肿瘤细胞的同时对正常细胞的作用甚微,因此这成为研究抗菌肽的焦点。

本实验正是通过固相萃取和高效液相色谱从黄粉虫幼虫体内纯化出有抗K562的抗菌肽和抗菌物质。固相萃取是分离生物活性分子的一种快捷简单的方法^[11],通过萃取得到有活性的80%组分,高效液相色谱与萃取的原理相似,溶于流动相中的各组分经过固定相时,由于与固定相发生作用的大小、强弱不同,在固定相中滞留时间不同,从而先后从固定相中流出,结果使混合物得到分离,是一种重要的分析方法,广泛地应用于化学、生化分析中微量元素和小分子有机化合物的测定^[12,13]。在肽和蛋白质方面近年来也得到广泛的应用,例如国外学者^[14]和国内学者^[15]利用高效液相色谱已经分别从丽蝇和蚯蚓体内提取出抗菌肽。本实验将萃取的80%活性组分通过高效液相色谱纯化出5个有活性的峰物质,同时在280 nm的波长下检测发现保留时间为22.003 min和15.469 min处有较强的吸收峰,这与214 nm下的峰9保留时间21.997 min和峰4的出峰位置相符,而280 nm是含有芳香族氨基酸蛋白质的特征吸收峰,故初步认为峰9、峰4就是抗菌肽,其中

峰9的响应值最大,含量也最高;峰4的响应值最小,含量最低。峰4含量虽低,但是并不影响其抗肿瘤活性的发挥。王辉等^[16]指出,在抗菌肽作用于细胞壁的“桶板模型”机制中,从理论上讲只要有3个相同抗菌肽分子就可以在细胞膜上形成一个通道。因此,极少量的抗菌肽就会形成穿膜孔道,对靶细胞造成致命伤害^[17]。而其他3个峰在目前的实验条件下暂不能确定是否为抗菌肽,有待于进一步的实验证明。

参考文献

- [1] 韩润林,孙庆林,额尔敦夫,等. 黄粉虫幼虫中抗菌肽的诱导及其抗菌活性的初步研究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1998—1999, 19(3): 114—117.
- [2] 赵大军. 黄粉虫食品的开发利用[J]. 农牧产品开发, 2000, (3): 9—11.
- [3] 强承魁,杨兆芬,崔亚东. 黄粉虫的生理生化研究进展[J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2005, 18(3): 269—273.
- [4] Moon HJ, Lee SY, Kurata S, et al. Purification and molecular cloning of cDNA for inducible and tibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*[J]. J Biochem, 1994, 116(1): 53—58.
- [5] 赵瑞君,于娟,崔晓东,等. 家蝇幼虫抗弓形虫抗菌肽分离纯化[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(10): 1212—1213.
- [6] 张先文,张伟,赵小凡,等. 家蝇天然抗菌肽的分离纯化与活性分析[J]. 生物技术, 2007, 17(2): 51—54.
- [7] 程璟侠,于娟,赵瑞君,等. 家蝇蛹抗弓形虫抗菌肽的分离纯化[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2008, 19(4): 309—311.
- [8] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 600—601.
- [9] 孙逸武,戴传德,高雪芝,等. 氯高铁血红素诱导K562细胞分化[J]. 中国应用生理学杂志, 1991, 7(4): 357—358.
- [10] 熊术道,尹丽慧,李景荣,等. 苦瓜籽RIP的分离纯化及其对K562细胞作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(1): 81—84.
- [11] 国果,吴建伟,付萍,等. 家蝇幼虫分泌物抗菌肽的分离及部分特性[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(2): 87—91.
- [12] 张维昊,徐小清. 固相萃取-高效液相色谱法测定水中痕量微囊藻毒素[J]. 分析化学, 2001, 29(5): 522—525.
- [13] 施红林,王保兴,刘巍,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定烟草样品中植物色素的研究[J]. 中国烟草学报, 2003, 9(2): 1—5.
- [14] Chernysh S, Kim SI, Bekker G, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(20): 12628—12632.
- [15] Liu YQ, Sun ZJ, Wang C, et al. Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2004, 36(4): 297—302.
- [16] 王辉,杨桂文,吴敬涛,等. 抗菌肽作用机制的研究进展[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2007, 21(1): 48—52.
- [17] Freceer V, Ho B, Ding JL. De novo design of potent antimicrobial peptides[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3349—3357.

[收稿日期:2009-07-13]