

- [8] Jiang SF, Wei MX, Lin JJ, *et al.* Research of anti-protection of passive transferred *Schistosoma japonicum* from *Microtus fortis* serum[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2004, 17(5): 298-300. (in Chinese)
(蒋守富, 魏梅雄, 林矫矫, 等. 东方田鼠血清被动转移抗日本血吸虫的保护力研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(5): 298-300.)
- [9] Zhang XY, He YK, Li Y, *et al.* Preliminary observation of normal *Microtus fortis* serum and spleen cells kill schistosomula *in vitro*[J]. Chin J Schisto Control, 2001, 13(4): 206-208. (in Chinese)
(张新跃, 何永康, 李毅, 等. 正常东方田鼠血清及脾细胞体外杀血吸虫童虫作用的初步观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2001, 13(4): 206-208.)
- [10] Wang M, Yi XY, Zeng XF, *et al.* Preliminary Studies on the mechanisms of natural against infection of *Schistosoma japonicum* in SD rat[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2004, 17(1): 42-45. (in Chinese)
(王敏, 易新元, 曾宪芳, 等. SD 大鼠抗日本血吸虫感染机理的初步研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(1): 42-45.)
- [11] Ji F, Liu Z, Cao J, *et al.* B cell response is required for granuloma formation in the early infection of *Schistosoma japonicum*[J]. PLoS One, 2008, 3(3): e1724.
- [12] Jiang SF, Wei HX, Lin JJ, *et al.* Preliminary study on natural antibodies and IgG subclasses against *Schistosoma japonicum* in *Microtus fortis*[J]. Chin J Schisto Control, 2001, 13(1): 1-3. (蒋守富, 魏梅雄, 林矫矫, 等. 东方田鼠天然抗日本血吸虫抗体及 IgG 亚类的初步研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2001, 13(1): 1-3.)
- [13] He YX, Hu YQ, Yu QF, *et al.* Characteristics of different isolates of *Schistosoma japonicum* from China in the final hosts [J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 1991, 22(2): 240-244.
- [14] Khalife J, Cêtre C, Pierrot C, *et al.* Mechanisms of resistance to *Schistosoma mansoni* infection: the rat model[J]. Parasitol Int, 2000, 49(4): 339-345.
- [15] He YK, Luo XS, Zhang XY, *et al.* Immunological characteristics of natural resistance in *Microtus fortis* to infection with *Schistosoma japonicum* [J]. Chin Med J (Eng), 1999, 112(7): 649-654.
- [16] Sun J, Li H, Wang XL, *et al.* Comparison of *Schistosoma japonicum* serum NO changes, and liver and lung lesions after being infected of *Microtus fortis* and mice [J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(5): 433-439. (in Chinese)
(孙军, 李浩, 王喜乐, 等. 东方田鼠和小鼠感染日本血吸虫后血清 NO 的变化以及肝、肺病变的比较[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(5): 433-439.)
- [17] Zhu YC, Wu GL, Guan XH. Schistosomiasis Infection Immunology[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Literature Press, 2008; 89. (in Chinese)
(朱荫昌, 吴观陵, 管晓红. 血吸虫感染免疫学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2008; 89)
- [18] Jiang SF, Wei MX, Lin JJ, *et al.* Effect of IgG₃ antibody purified from sera of *Microtus fortis* against *Schistosoma japonicum* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(1): 34-36. (in Chinese)
(蒋守富, 魏梅雄, 林矫矫, 等. 东方田鼠 IgG₃ 抗体抗血吸虫病作用研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(1): 34-36.)
- [19] He HB, Zuo JZ, Liu BX, *et al.* Experimental infection of *Schistosoma japonicum* in wild and laboratory *Microtus fortis* [J]. J Practic Parasitic Dis, 1995, 3(2): 72-74.
(贺宏斌, 左家铮, 刘柏香, 等. 室内繁殖和野生东方田鼠感染日本血吸虫的比较 [J]. 实用寄生虫病杂志, 1995, 3(2): 72-74.)
- [20] Mckee AS, Pearce EJ. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development[J]. J Immunol, 2004, 173(2): 1224-1231.
(收稿日期: 2011-03-18 编辑: 张争艳)

文章编号: 1000-7423(2011)-04-0271-03

【研究简报】

家蝇天蚕素对人肝癌 BEL-7402 细胞的作用靶点

金小宝, 李小波, 朱家勇, 卢雪梅, 沈娟, 褚夫江, 梅寒芳

【提要】 将家蝇天蚕素(终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$)加入对数生长期的人肝癌 BEL-7402 细胞中作用 12 h, 扫描电镜观察天蚕素对人肝癌细胞细胞膜的影响。在此基础上, 采用绿色荧光素异硫氰酸(FITC)标记天蚕素, 运用激光共聚焦显微镜观察 FITC 标记的天蚕素与人肝癌细胞细胞膜的作用。肿瘤细胞经天蚕素作用 12 h 后, 扫描电镜显示细胞膜表面微绒毛大部分消失; 激光共聚焦显微镜显示大部分天蚕素与细胞膜结合, 细胞内也发现部分天蚕素进入。

【关键词】 扫描电镜; 激光共聚焦显微镜; 天蚕素; 肿瘤细胞; 细胞膜

中图分类号: R384.2 文献标识码: B

The Target of *Musca domestica* Cecropin on Human Hepatocellular Carcinoma BEL-7402 Cells

JIN Xiao-bao, LI Xiao-bo, ZHU Jia-yong, LU Xue-mei,
SHEN Juan, CHU Fu-jiang, MEI Han-fang

基金项目: 广东省科技厅社会发展项目 (No. 2010B031200011); 广州市社会发展攻关项目 (No. 2005Z3-E0211)

作者单位: 广东药学院基础学院, 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广州 510006

* 通讯作者, E-mail: zhujiy@gdpu.edu.cn

(School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ *Musca domestica* cecropin for 12 h, and observed under scanning electron microscope. The effect of *Musca domestica* cecropin labeled with FITC (FITC-cecropin) on BEL-7402 cells was detected by laser scanning confocal microscopy. The scanning electron microscopy showed that most microvilli on the surface of BEL-7402 cells disappeared at 12 h after cecropin treatment. The laser scanning confocal microscopy revealed that most FITC-cecropin combined with BEL-7402 cell membrane, and partly in the cytoplasm.

[Key words] Scanning electron microscope; Laser scanning confocal microscope; Cecropin; Tumor cell; Membrane

Supported by Social Development Project of Guangdong Provincial Department of Science and Technology (No. 2010B031200011) and Key Social Development Project of Guangzhou City (No. 2005Z3-E0211)

* Corresponding author, E-mail: zhuji@gdpu.edu.cn

家蝇天蚕素(cecropin)基因(Genbank 登录号为 EF175878)是本室自家蝇Ⅲ龄幼虫脂肪体克隆而来^[1], 研究发现一定浓度的家蝇天蚕素可抑制人肝癌细胞 BEL-7402 的生长, 并诱导其发生凋亡^[2]。有关天蚕素抗肿瘤细胞作用机制的研究起步较晚, 迄今仍未达成共识。有研究者认为^[3,4], 天蚕素可通过与细胞膜、线粒体、核膜、细胞核染色体和细胞骨架等直接接触从而抑杀肿瘤细胞, 还可通过调动机体免疫功能, 从体液免疫方面抵抗肿瘤细胞的入侵。

为阐明肿瘤细胞膜是否为家蝇天蚕素作用靶点, 本文以人肝癌细胞 BEL-7402 为研究对象, 采用扫描电子显微镜技术观察经天蚕素处理后肿瘤细胞细胞膜的结构变化。在此基础上, 将家蝇天蚕素进行绿色荧光素异硫氰酸(FITC)标记, 激光共聚焦扫描显微镜观察天蚕素在肿瘤细胞内的分布情况。

1 材料与方 法

1.1 天蚕素和细胞株的来源 天蚕素是本室通过 COS-7 细胞制备并经蛋白质印迹(Western blotting)分析鉴定, 纯度 $\geq 95\%$ ^[5]。人肝癌细胞 BEL-7402 购自中山大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI 1640 培养基、荧光染料 FITC 和胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清购自杭州四季清生物公司, 其余试剂均为国产分析纯。激光共聚焦扫描显微镜(LSM 510/ConfoCor2)为德国 Zeiss 公司产品, 电子显微镜(JEM-100CX)为美国 Beckman 公司产品。

1.3 电子显微镜观察 将对数生长期的人肝癌 BEL-7402 细胞铺在 6 孔板中, 孔内置洁净盖玻片, 待细胞长到 50%~80%时, PBS (pH 7.4)洗涤 3 次, 加入家蝇天蚕素(终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$)作用 12 h, 对照组不加天蚕素。取出玻片, PBS 冲洗, 2.5%戊二醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 次, 1%锇酸液重固定 30 min, PBS 冲洗 3 次, 用 50%、70%和 90%的无水乙醇依次浸泡脱水 20 min, 无水乙醇和醋酸异戊脂等量混合液浸泡 30 min, 重复 2 次后浸泡在醋酸异戊脂中, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。将玻片标本用导电膏固定在铜标本台上, 经临界点干燥后喷铂进行扫描电镜观察, 拍照。

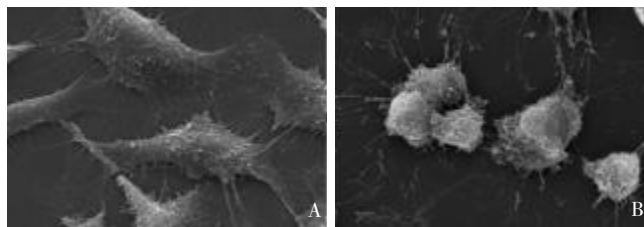
1.4 FITC 标记天蚕素 将天蚕素溶解于含 0.02 mol/L NaCl 的碳酸盐缓冲液 (0.02 mol/L, pH 9.1)中, 使其终浓度为 2.0 mg/ml, 加入 1.0% FITC (溶解于丙酮), 室温作用 5 h。用截留量相对分子质量 (M_r) 为 3 000 的滤器滤除未结合的 FITC, 收集标记蛋白, 用反相高效液相色谱进一步分离纯化, 参照文献 [6]的方法检测标记效率。将样品过滤除菌后, 进行蛋白定量测定, 冻干避光, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

1.5 激光共聚焦显微镜观察 将对数生长期的人肝癌 BEL-7402 细胞铺在 6 孔板中, 内置洁净盖玻片, 待盖玻片上细胞长到 50%~80%时, 加入含 50 $\mu\text{mol/L}$ FITC 标记的天蚕素的新配制的 RPMI 1640 (含 10%胎牛血清)培养液中, 常规培养 12 h。取出玻片, PBS 冲洗 3 次, 10%水甘油封片, 在激光共聚焦显微镜下观察。

2 结 果

2.1 电子显微镜观察 扫描电镜下, 对照组肿瘤细胞呈多边形, 细胞膜完整, 表面微绒毛丰富、卷曲成丛状、规则排列、长丝突起分布均匀, 细胞间镶嵌连接(图 1A)。天蚕素组胞体体积缩小, 细胞膜表面微绒毛卷曲、畸变、小球结构逐渐增多, 细胞间连接逐渐断裂, 细胞间隙增宽。部分细胞膜表面的微绒毛完全消失, 胞体固缩, 有部分细胞裂解(图 1B)。

2.2 激光共聚焦显微镜观察 激光共聚焦显微镜观察结果显示, FITC 标记的天蚕素与人肝癌 EL-7402 细胞共培养 12 h 后,

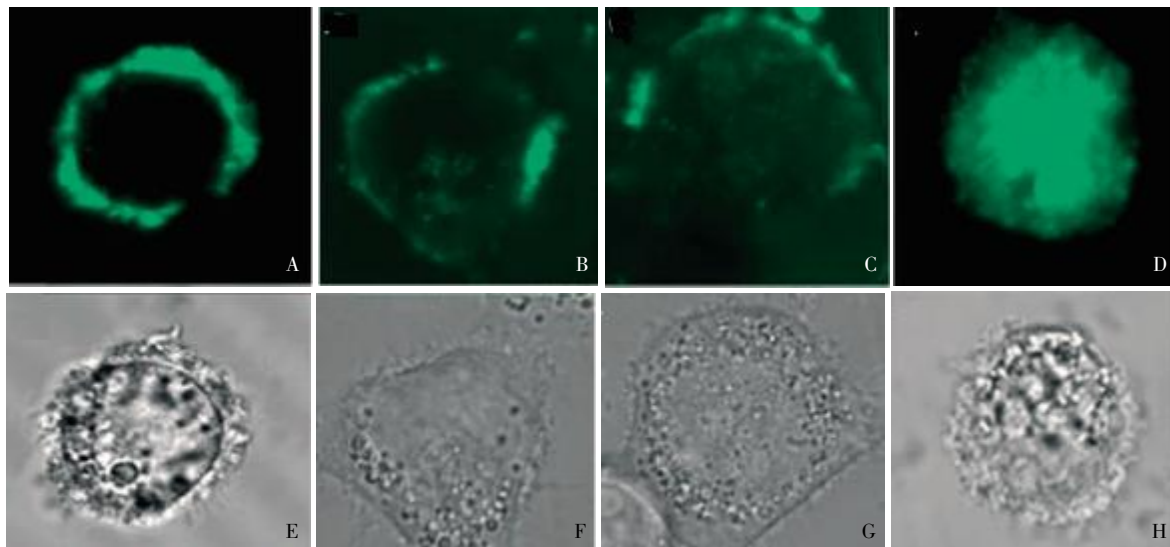


A: 对照组; B: 天蚕素组。

图 1 扫描电子显微镜下天蚕素处理后肿瘤细胞形态变化 ($\times 2000$)

大部分细胞外膜环绕大量强绿色荧光(图 2A), 部分 FITC-Cecropin 进入肿瘤细胞内(图 2B、2C), 死亡细胞内充满强绿色荧光

(图 2D)。E、F、G 和 H 分别为 A、B、C 和 D 白光下拍摄的对照图。



A、B、C、D: 荧光激发下; E、F、G、H: 白光下。

图 2 激光共聚焦显微镜下的天蚕素处理后肿瘤细胞 (×400)

3 讨论

天蚕素是人类发现最早的一类抗菌肽, 文献报道天蚕素作用肿瘤细胞的靶点主要在细胞膜, 通过其两亲 α 双螺旋上的正电荷与胞膜磷脂分子上负电荷之间的静电吸引而结合, 随后疏水端(酰胺基)插入到疏水的胞膜中央, 双亲的 α 双螺旋留在质膜表面, 打乱质膜上蛋白质和脂质的原有秩序, 使膜外正电荷增多, 导致膜去极化^[7,9]。由于其 α 双螺旋具有亲水、疏水两亲性, 天蚕素分子之间可相互聚集形成离子通道, 导致内容物外泄, 最后导致细胞渗透压丧失而死亡。Christensen 等^[9]采用平板脂质膜为模型, 也观察到了这种现象^[10]。

本文结果也支持天蚕素作用肿瘤细胞的靶点主要在细胞膜这一观点。扫描电镜显示, 经家蝇天蚕素作用 12 h 后, 人肝癌 BEL-7402 细胞膜表面的微绒毛消失; 激光共聚焦显微镜实验显示, 家蝇天蚕素主要与细胞膜结合, 部分天蚕素可穿过细胞膜进入细胞浆, 整个过程天蚕素会源源不断进入到细胞内部, 直至细胞死亡。

家蝇天蚕素破坏肿瘤细胞膜是否为抗肿瘤的重要作用方式, 这种细胞膜损伤是否能单独导致肿瘤细胞死亡, 是否需要其他机制共同作用, 尚不清楚。下一步本课题组将采用激光共聚焦显微镜进行亚细胞定位, 利用细胞核、细胞器(如线粒体等)特异性荧光染料与 FITC-cecropin 对比结果, 进一步阐明天蚕素抗肿瘤可能潜在的其它作用靶点。

参 考 文 献

[1] Jin XB, Xu QY, Zhu JY, *et al.* Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding cecropin: an antimicrobial peptide from *Musca domestica* larvae[J]. *Chin Trop Med*, 2004, 4(6): 903-906. (in Chinese)
(金小宝, 许琴英, 朱家勇, 等. 家蝇幼虫天蚕素基因的克隆与序列分析[J]. *中国热带医学*, 2004, 4(6): 903-906.)

[2] Jin XB, Mei HF, Zhu JY, *et al.* Apoptosis inducing activity of the antimicrobial peptide cecropin of *Musca domestica* in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 and the possible mechanism[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42(4): 259-265.
[3] Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(2): 357-375.
[4] Meyer JE, Harder J. Antimicrobial peptides in oral cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(30): 3119-3130.
[5] Jin XB, Zhu JY, Ma Y, *et al.* The expression of anti-bacterial peptide cecropin gene in COS-7 cells and the preliminary study on the activities of its gene product[J]. *Chin J Zoonoses*, 2007, 23(6): 566-568. (in Chinese)
(金小宝, 朱家勇, 马艳, 等. 家蝇抗菌肽基因 Cecropin 在 COS-7 细胞中的表达及产物活性初步研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(6): 566-568.)
[6] Liang CY, Xu WQ, Sun F, *et al.* Dynamic observation of cellular localization of fluorescein isothiocyanate labeled recombinant ganoderma lucidum immunoregulatory protein(rLz-8) in NB4 aPL cell[J]. *Chem J Chi Univ*, 2009, 30(3): 489-492. (in Chinese)
(梁重阳, 徐蔚青, 孙非, 等. FITC 标记重组灵芝免疫调节蛋白(rLz-8)在 NB4 细胞中的动态定位[J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(3): 489-492.)
[7] Wieprecht T, Apostolov O, Beyermann M, *et al.* Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa; thermodynamic and mechanistic aspects[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(2): 442-452.
[8] Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2006, 15(8): 933-946.
[9] Henrik S, Margitta R, Friedrich P. Antimicrobial peptides of the cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells[J]. *BMC Urology*, 2008, 8(5): 1-7.
[10] Christensen B, Fink J, Merrifield RB, *et al.* Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(14): 5072-5076.

(收稿日期: 2011-04-07 编辑: 衣凤芸)