

• 临床检验研究论著 •

家蝇胚胎细胞抗菌肽对人髓样白血病细胞 K562 生长抑制作用的研究

张金花^{1,2}, 贺莉芳¹, 杨霞霞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 研究家蝇胚胎细胞抗菌肽对人髓样白血病细胞 K562 的抑制作用。方法 利用脂多糖诱导家蝇胚胎细胞 MDEC-07114, 提取抗菌肽, 将家蝇胚胎细胞抗菌肽分为 40、80、160、320 和 640 μg/mL 5 个实验组, PBS 作为阴性对照组, 采用 MTT 法测定不同浓度抗菌肽对人髓样白血病细胞 K562 和人脐静脉血管内皮细胞的抑制作用并绘制 K562 细胞生长曲线。结果

家蝇胚胎细胞抗菌肽对肿瘤细胞 K562 具有明显抑制作用, 其浓度与抑制率具有显著相关性, 浓度越高, 作用时间越长, 对 K562 的抑制杀伤越强。各浓度组对人体正常细胞均无抑制作用。结论 家蝇胚胎细胞抗菌肽可抑制肿瘤细胞生长而不杀伤人体正常细胞。

关键词: 白血病, 髓样; 抗菌肽; 胚胎细胞系 MDEC-07114; 家蝇; 内皮细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.16.010

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)16-1941-02

The inhibitory action of antibacterial peptide from the embryonic cells of the musca domestica on human myeloid leukemia cells K562

Zhang Jinhua^{1,2}, He Lifang¹, Yang Xiaxia¹, Wan Qihui^{1△}

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

Abstract: Objective To research the inhibitory action of the antibacterial peptide from the theembryonic cells of the musca domestica on the human myeloid leukemia K562. **Methods** The logarithmic growth phase's embryonic cells of the musca domestica were induced by LPS. The antibacterial peptide was extracted from supernatant fluid. The antibacterial peptide was prepared 40, 80, 160, 320 and 640 μg/mL five density groups by PBS. The MTT experiments were made for human myeloid leukemia cells K562 and the human umbilical vein vascular endothelial cells. The growth curves of K562 cells in the above five density groups were made by MTT method and the tumour cells of isometric culture medium were been the control groups. **Results** The antibacterial peptide from the theembryonic cells of the musca domestica had remarkable inhibition activities on K562 cells. There was a correlation betwa the inhibition rates and antibacterial peptide concentrations. Along with time extension and medicine density increasing, K562 cell mortality rate rised. **Conclusion** The antibacterial peptide from the embryonic cells of the musca domestica has significance inhibitory activity on human myeloid leukemia cells K562, and has no inhibition activity on human umbilical vein vascular endothelial cells.

Key words: leukemia, myeloid; antibacterial peptide; embryonic cell line MDEC-07114; musca; endothelia cells

抗菌肽(antibacterial peptides)是生物体内经诱导产生的一种具有生物活性的小分子多肽, 相对分子质量在 2 000~7 000 左右, 由 20~60 个氨基酸残基组成。在不同动物组织中发现了很多具有抗菌作用的蛋白质和多肽, 90 多种抗菌肽的抗肿瘤活性已经被证实^[1]。大量的研究发现, 少量抗菌肽对肿瘤细胞即具有选择性的杀伤作用, 而对人体正常细胞无损伤。本实验利用脂多糖诱导家蝇胚胎细胞 MDEC-07114 产生抗菌肽, 观察其对人髓样白血病细胞 K562 和人体正常细胞的抑制作用, 为昆虫细胞系抗菌肽的抗肿瘤活性提供实验依据。

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^[2], 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。脂多糖、RPMI-1640、M3 培养基由 Sigma 公司生产。噻唑蓝(MTT)和二甲亚砜(DMSO)由 Amresco 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562 细胞、人脐静脉血管内皮细胞用 1640 培养基, 37 °C, 5% CO₂ 条件培养; 家蝇胚胎细胞用 M3

培养基, 28 °C, 5% CO₂ 条件培养。

1.2.2 抗菌肽的诱导和提取 参考刘晖等^[3]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 MDEC-07114, 16 h 后收集上清液, 0.45 μm 抽滤器抽滤, 配制成 10% 三氯醋酸的上清液冰浴 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min 沉淀蛋白, 弃上清液, 9:1 的丙酮:水洗涤, 14 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 真空抽干, -20 °C 保存备用。

1.2.3 实验组的设立 用 PBS 将提取的抗菌肽配制成 40、80、160、320 和 640 μg/mL 5 个浓度组, 0.22 μm 抽滤器抽滤除菌。用 PBS 和培养基设置相应的阴性对照组, 自身细胞作为阴性对照组。

1.2.4 MTT 法测定抗菌肽对 K562 细胞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 2×10⁵/mL 的细胞悬液, 具体操作方法参见文献[4]。

1.2.5 MTT 比色法测定不同浓度抗菌肽作用下细胞生长曲线 将处于对数生长期的 K562 细胞配制成 2×10⁵/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 37 °C, 5% CO₂ 培养 24

△ 通讯作者, E-mail: qhwan@sina.com

h。加不同浓度的抗菌肽培养液 100 μ L, 阴性对照组采用等量培养基, 继续培养 5 d。实验组每天各取 6 孔, 加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L, 培养 4 h。加入 200 μ L 的 DMSO, 震荡 5 min, 培养 30 min, 在 570 nm 处测定吸光度值。根据测定值绘制细胞生长曲线。

1.3 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据均用 SPSS 13.0 软件包处理, 进行单因素方差分析, Duncan 复极差进行两两比较, 不同字母表示差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 相

同字母表示差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 结 果

2.1 MTT 法测定不同浓度抗菌肽对肿瘤细胞和人体正常细胞的抑制作用 从表 1 可见, K562 细胞的各浓度组与阴性对照组相比, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$, 人脐静脉血管内皮细胞各浓度组抑制率与阴性对照组相比, 差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。各浓度组之间相比, 差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。

表 1 不同浓度抗菌肽对 K562 和正常人体细胞的抑制作用 ($n=6$) *

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(%)
阴性对照组	0.614 \pm 0.043 ^a	0.434 \pm 0.031 ^a	—	—
40 μ g/mL 组	0.446 \pm 0.041 ^b	0.423 \pm 0.026 ^a	29.596	0.285
80 μ g/mL 组	0.467 \pm 0.030 ^b	0.419 \pm 0.023 ^a	22.968	1.113
160 μ g/mL 组	0.475 \pm 0.091 ^b	0.429 \pm 0.028 ^a	22.347	1.258
320 μ g/mL 组	0.447 \pm 0.080 ^b	0.426 \pm 0.021 ^a	27.584	0.945
640 μ g/mL 组	0.335 \pm 0.041 ^c	0.425 \pm 0.014 ^a	45.173	1.027

* : 同列数据后不同字母表示 $P < 0.05$, 相同字母表示 $P > 0.05$ (邓肯新复级差检测); —: 无数据。

2.2 不同浓度抗菌肽作用下人髓样白血病细胞 K562 的生长曲线 从 K562 细胞的生长曲线上可以看出, 各浓度抗菌肽在初期对肿瘤细胞的生长就存在明显抑制作用, 高浓度组抗菌肽的抑制作用明显高于低浓度组, 随着抗菌肽浓度的增加和作用时间的延长, 被抑制杀伤的肿瘤细胞也越多。这种现象可能系家蝇胚胎细胞抗菌肽及 K562 细胞自身增殖的影响。关于家蝇胚胎细胞抗菌肽抗瘤应用前景有待进一步的开发, 其作用机制有待进一步的研究。

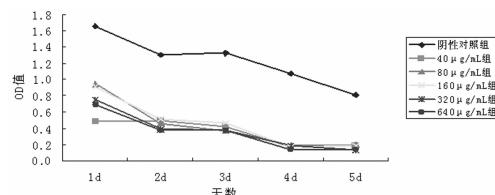


图 1 不同浓度抗菌肽作用下 K562 细胞的生长曲线

3 讨 论

抗菌肽的生物学活性与昆虫生活环境密切相关, 不同来源的昆虫抗菌肽生物学活性不相同, 昆虫个体内抗菌肽不同生物学活性也不尽相同^[5]。家蝇幼虫、家蝇成虫及家蝇蛹的抗肿瘤作用已得到肯定。赵瑞君等^[6]利用家蝇蛹抗菌肽作用于人髓样白血病细胞株 K562、人淋巴瘤细胞株 Daudi、人食管癌细胞株 Eca109 和人膀胱癌细胞株 T24 4 种肿瘤细胞, 结果显示 4 种肿瘤细胞生长均受到一定的抑制。贺莉芳等^[7-8]利用家蝇幼虫抗菌肽作用于黑色素瘤细胞 A375 及子宫内膜癌细胞和正常人牙周膜细胞, 结果显示抗菌肽对 A375 和子宫内膜癌细胞具有抑制作用而对牙周膜细胞无抑制作用。本实验采用 MTT 测定家蝇胚胎细胞抗菌肽对人髓样白血病细胞 K562 的抑制杀伤率, 结果显示各实验组对 K562 均有一定的抑制作用, 与阴性对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。家蝇胚胎细胞抗菌肽对人脐静脉血管内皮细胞无抑制作用, 各浓度组与阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这与家蝇蛹抗菌肽、家蝇幼虫抗菌肽的抗肿瘤特性相一致。

细胞生长曲线是测定细胞绝对生长数的常用方法, 也是判断细胞活力的重要指标, 是细胞生物学特性基本参数之一^[9]。MTT 比色法绘制的细胞生长曲线, 减少了取样和计数的人为误差, 排除了传统方法繁琐、费时的缺点, 重复性好且具有高度的特异性、灵敏度^[10-11]。本实验结果显示, K562 细胞以

- 参考文献**
- [1] <http://aps.unmc.edu/AP/database/antiC.php>.
 - [2] 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(5): 788-791.
 - [3] 刘晖, 贺莉芳, 万启惠, 等. 脂多糖诱导家蝇胚胎细胞抗菌肽的初步研究[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(1): 13-14.
 - [4] 张金花, 贺莉芳, 万启惠, 等. 家蝇胚胎细胞抗菌肽对黑色素瘤细胞 A375 抑制作用的实验研究[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(6): 89-91.
 - [5] 高琳, 李卫东. 昆虫抗菌肽及其应用研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(9): 710-713.
 - [6] 赵瑞君, 程景侠, 代培芳, 等. 家蝇蛹抗菌肽对肿瘤细胞膜破坏作用[J]. 中国公共卫生, 2007, 21(23): 1399-1400.
 - [7] 贺莉芳, 万启惠, 刘晖, 等. 家蝇幼虫抗菌蛋白对黑色素瘤细胞的影响[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(7): 808-809.
 - [8] 贺莉芳, 万启惠, 刘晖, 等. 家蝇幼虫抗菌蛋白对子宫内膜癌细胞生长影响[J]. 中国公共卫生, 2008, 22(5): 528-529.
 - [9] Zuo S, Tang C, Xu L, et al. Effects of recombinant DNMT1 eukaryotic expression plasmids on mRNA expression level of DNMT1 gene and growth curve of cells in human cholangiocarcinoma cell line[J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2006, 12(3): 191.
 - [10] 鄂征. 组织培养技术[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 154.
 - [11] 沈慧, 王万银, 秦海宏, 等. MTT 比色法绘制不同浓度下细胞生长曲线[J]. 广东微量元素科学, 2004, 11(1): 16-18.

(收稿日期: 2011-12-09)