

乳源抗菌-免疫调节融合肽对卵巢癌细胞增殖、凋亡的影响

唐宜桂 李小勤 刘琛 雷婷 秦宜德

摘要 目的 研究乳源抗菌-免疫调节融合肽(AIFP)对卵巢癌细胞增殖、凋亡的影响。方法 采用MTT法测定AIFP对卵巢癌细胞株SKOV3细胞和原代培养的卵巢癌细胞增殖的影响;流式细胞术测定AIFP对SKOV3细胞和原代卵巢癌细胞凋亡、周期的影响;并用RT-PCR检测AIFP对SKOV3细胞及原代癌细胞凋亡和周期相关基因表达水平的影响,以探讨其可能机制。结果 MTT法显示,AIFP对卵巢癌细胞的增殖具有抑制作用,且具有时间和剂量依赖性,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。流式细胞术检测结果显示,AIFP诱导卵巢癌细胞的凋亡,具有剂量和时间依赖性,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。RT-PCR结果表明,AIFP可以影响细胞凋亡和细胞周期相关基因(Akt、CDC25C和cyclinB1)的表达。结论 AIFP上调卵巢癌细胞凋亡和周期相关基因Akt、CDC25C和cyclinB1的表达,对卵巢癌细胞株SKOV3具有抑制增殖和促进凋亡的作用。

关键词 AIFP; SKOV3; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 392.11; R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0715-06

牛乳铁蛋白肽(bovine lactoferricin, LfcinB)来源于牛乳铁蛋白N端的25个氨基酸残基,是一种具有抗菌活性的生物活性肽^[1]。乳源免疫调节肽是源于牛乳β-酪蛋白第63~68氨基酸残基上的短肽,其氨基酸序列为PGPIP_N,具有抑制肿瘤生长等活性^[2-4]。乳源抗菌-免疫调节融合肽(antibacterial-immunomodulating fusion peptide, AIFP)是通过柔性连接臂将上述两种小分子肽连接形成的融合多肽。该实验室的前期研究^[3-4]显示,卵巢癌细胞株转染了该融合肽基因能明显抑制肿瘤细胞生长。该研究将探讨AIFP直接作用于卵巢癌细胞,分析其对卵巢癌细胞增殖的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、卵巢癌临床原代细胞 卵巢癌细胞株

2014-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30872992)

作者单位:安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:唐宜桂,女,硕士研究生;

秦宜德,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: qinyide@hotmail.com

SKOV3由本实验室保存。卵巢癌样本取自安徽医科大学第一附属医院妇产科手术室,由本实验室进行原代培养。

1.2 药物与试剂 AIFP(上海生工生物工程有限公司合成)纯度>99.8%;紫杉醇购自深圳万乐药业;胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、β-雌二醇(β-Estradiol)购自美国Peprotech公司;MTT、1640培养基和DMEM培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;I型、II型胶原蛋白酶购自美国Life公司;RT-PCR试剂盒购自美国Fermentas公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人卵巢癌细胞株SKOV3培养在含10%胎牛血清RPMI-1640培养基(含100 μg/ml青霉素和100 μg/ml链霉素)中,在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行试验。从无菌临床手术室取人卵巢癌组织块,放于预先准备的无菌的盛有PBS缓冲液的培养瓶中,在无菌环境中用PBS缓冲液冲洗癌组织块,然后用无菌眼科剪剪成1 mm³左右的小块,放入无菌15 ml离心管中,用0.05%的I型胶原酶在37℃消化20~30 min后,取上层细胞悬液,800 r/min离心10 min,收集细胞计数,配制成10⁵个/ml的细胞悬液,并用台盼蓝对细胞活力进行检测,将细胞培养在含有EGF、IGF和β-雌二醇的RPMI-1640+10%胎牛血清的培养基中,37℃、5%CO₂中培养,取对数生长期的细胞进行试验。

1.3.2 荧光免疫方法鉴定原代卵巢癌细胞 将无菌的细胞爬片放在6孔板孔底,培养的原代细胞用4%胰蛋白酶消化后,调整细胞浓度至10 000个,每孔加入1 ml细胞悬液,放于37℃、5%CO₂中培养培养过夜,第2天,吸尽细胞培养液,加入新鲜配制的2%多聚甲醛固定细胞10 min, PBS洗3次,每次5 min。用0.3%的Triton-100对细胞透化处理10 min, PBS洗3遍,每次5 min。用10%二抗同源血清封闭30 min, PBS洗3遍,每次5 min。加入一抗CK7(1:200)4℃孵育过夜(大于18 h), PBS洗3遍,每次5 min。加入荧光二抗(1:100)37℃孵育

1 h ,PBS 洗 3 遍 ,每次 5 min 。加入 Hoechst 33258 染色细胞 10 min ,PBS 洗 3 遍 ,每次 5 min ,去除多余的 Hoechst 33258 。取出细胞爬片 ,正面向下放在载玻片上封片 。在荧光显微镜下观察 。上述的试剂均用 PBS 配制 。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖 对数生长期细胞配制成细胞悬液 ,按每孔 5 000 个细胞种于 96 孔板中 ,待细胞贴壁后 ,以紫杉醇作为阳性药物 ,每孔加入不同浓度的 AIFP ,分别培养 24、48、72 h 后每孔加入 MTT(5 mg/ml) 20 μ l ,继续孵育 4 h 后 ,终止培养 吸取孔内液体 ,每孔加入 150 μ l DMSO ,振荡 10 min ,490 nm 波长下测定各孔吸光度(OD) ,每组 5 个复孔 ,计算每组均值 。细胞存活率(%) = $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{阴性对照组}} - OD_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

1.3.4 AnnexinV/PI 双染检测细胞凋亡 用不含 EDTA 的 0.4% 胰蛋白酶消化并收集对数生长期的细胞 ,调整细胞浓度 ,接种于 6 孔板中 ,每孔接种细胞 10^4 个 ,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中培养至细胞贴壁 ,每孔加入不同浓度的 AIFP ,分别培养 24、48、72 h 后收集细胞 。用冷的 PBS 洗涤 2 次 ,每管加入 500 μ l Binding Buffer 悬浮细胞 ,每管加入 5 μ l AnnexinV-FITC 混匀 ,然后加入 5 μ l PI 混匀 ,室温避光反应 15 min 后 在流式细胞仪上进行检测 ,并以未处理的细胞为阴性对照 ,紫杉醇处理的细胞为阳性对照 ,用 Modfit 软件进行分析 。

1.3.5 RT-PCR 检测凋亡相关基因的表达 设计基因 Akt、CDC25C、cyclinB1 及内参 β -actin 引物序列和片段长度见表 1 。PCR 目的基因引物及内参由上海生工生物工程有限公司合成 。TRIzol 法提取总 RNA ,然后分别逆转录合成 cDNA ,再进行 PCR 扩增 。PCR 条件: Akt 为 94 $^{\circ}$ C 4 min ,94 $^{\circ}$ C 30 s 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s ,72 $^{\circ}$ C 30 s 。CDC25C 为 94 $^{\circ}$ C 4 min ,94 $^{\circ}$ C 30 s 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s ,72 $^{\circ}$ C 30 s 。cyclinB1 为 94 $^{\circ}$ C 4 min ,94 $^{\circ}$ C 30 s 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s ,72 $^{\circ}$ C 30 s 。 β -actin 为 94 $^{\circ}$ C 4 min ,94 $^{\circ}$ C 30 s 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s ,72 $^{\circ}$ C 30 s 。目的基因与内参均扩增 35 个循环 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,用 *t* 检验进行差异分析 。

2 结果

2.1 免疫荧光法检测原代细胞的纯度 特异性抗体 CK7 作为一抗 ,用带有 FITC 免疫荧光的二抗 ,对癌细胞膜进行染色 ,用 Hoechst 33258 对细胞核进行

表 1 Akt、CDC25C、cyclinB1 及内参 β -actin 引物序列和片段长度

基因	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
Akt	F: CGGGGTAGGGAAGAAAATATC	185
	R: TGACAGAGTGAGGGGACACA	
CDC25C	F: GCTAACAAGTCACCAAAAGACA	230
	R: TCCCTGAACCAATACAAAATCTC	
cyclinB1	F: AGGTCCATCTCAGGTTCCACTT	296
	R: GACTAGGCGTTGTCCGTGAT	
β -actin	F: CGGGAAATCGTGCGTGAC	434
	R: TGGAGGTGGACAGCGAGG	

染色 。荧光显微镜下 癌细胞膜带有绿色荧光 ,癌细胞核带蓝色荧光 ,见图 1 。从图 1 可知 ,培养的细胞是卵巢癌细胞 ,其纯度为 84.61% ,可以进行下步实验 。

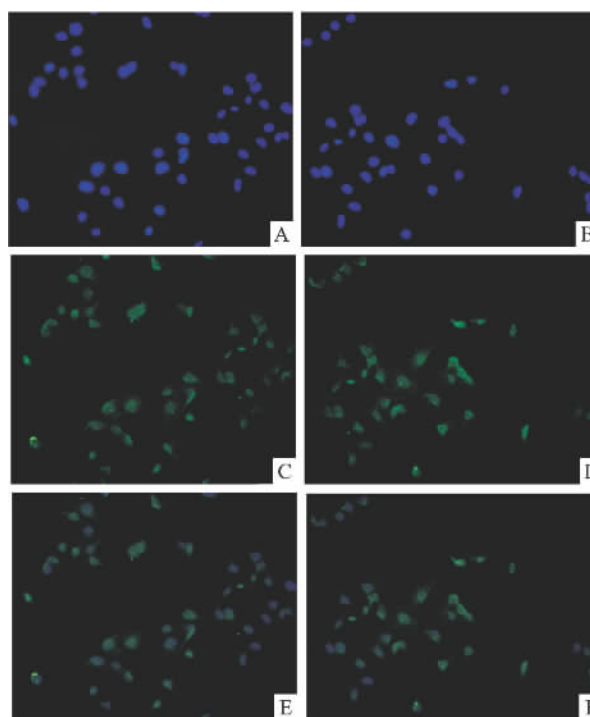


图 1 免疫荧光鉴定原代卵巢癌细胞的结果 $\times 200$

A、B: Hoechst 33258; C、D: FITC; E、F: 为 A、C 和 B、D 两张图片叠加的结果

2.2 AIFP 对 SKOV3 细胞增殖的影响 不同浓度的融合肽作用于 SKOV3 细胞不同时间 ,随着浓度的增加和作用时间的延长 ,细胞的存活率降低 。以不处理作为阴性对照 ,以 0.5 μ g/ml 紫杉醇处理作为阳性对照 ,AIFP 组对 SKOV3 细胞增殖的抑制率随 AIFP 浓度增加和作用时间的延长而增加 ,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$) 。根据数据作出生长抑制曲线 ,然后根据曲线求出 AIFP 作用于 SKOV3 细胞 24、48 和 72 h 的 ID₅₀ 分别

为 2.75×10^{-4} 、 3.96×10^{-5} 和 3.96×10^{-6} mg/ml。见图 2。

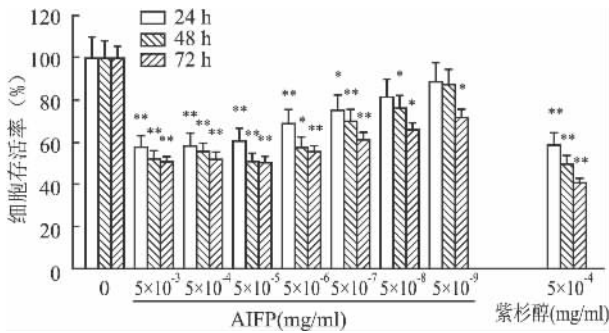


图2 AIFP 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

癌细胞 24、48、72 h 的 ID_{50} 分别为 1.74×10^{-4} 、 2.33×10^{-5} 和 3.12×10^{-6} mg/ml。与阴性对照组比较 AIFP 各浓度处理原代卵巢癌细胞存活率明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且有时间和剂量依赖性, 见图 3。

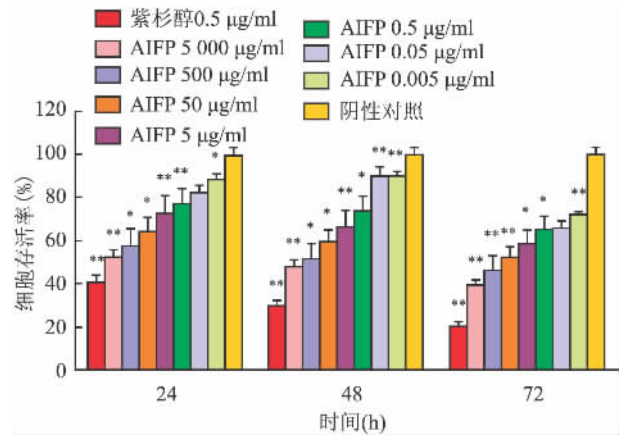


图3 AIFP 对原代卵巢癌细胞增殖的影响
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 AIFP 肽对原代卵巢癌细胞增殖的影响

不同浓度的 AIFP 作用于原代卵巢癌细胞 24、48、72 h 后的细胞存活率, 以 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 的紫杉醇做为阳性对照, 培养液作为阴性对照。根据数据作出生长抑制曲线, 然后根据曲线求出 AIFP 作用于原代卵巢

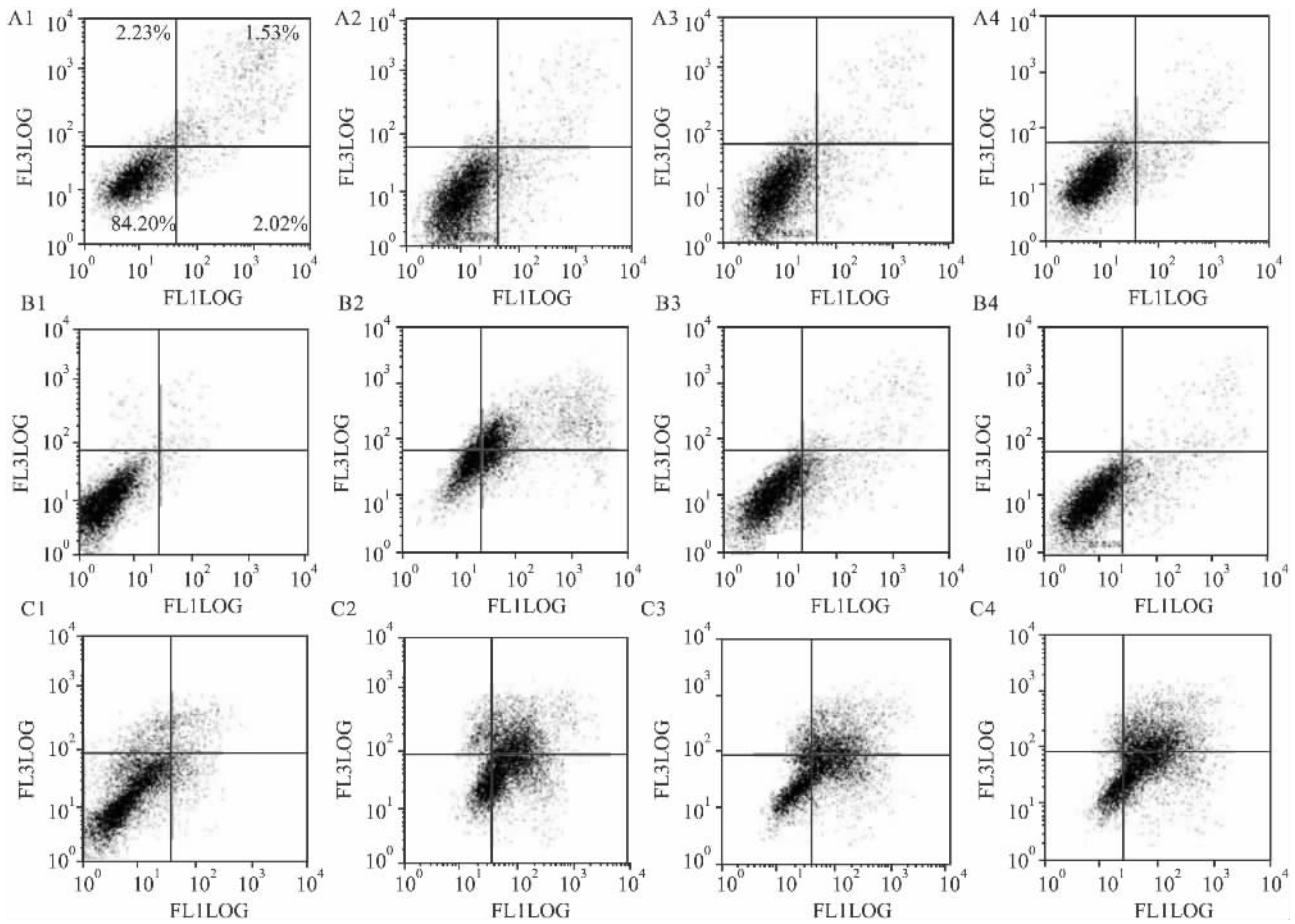


图4 AIFP 对原代卵巢癌细胞凋亡的影响

A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h; 1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组; 3: 高浓度 AIFP 组 (AIFP 的浓度为 5×10^{-3} mg/ml); 4: 低浓度 AIFP 组 (AIFP 的浓度为 5×10^{-6} mg/ml)

2.4 AIFP 对原代卵巢癌细胞和 SKOV3 细胞凋亡的影响 用不同浓度的 AIFP 作用于原代卵巢癌细胞和 SKOV3 细胞 24、48 和 72 h 后细胞凋亡的结果 培养液作为阴性对照 阳性对照用 0.5 μg/ml 紫

杉醇处理,与阴性对照组比较 AIFP 组对卵巢癌细胞凋亡的影响随 AIFP 浓度增加和作用时间的延长而增加,见图 4、5。

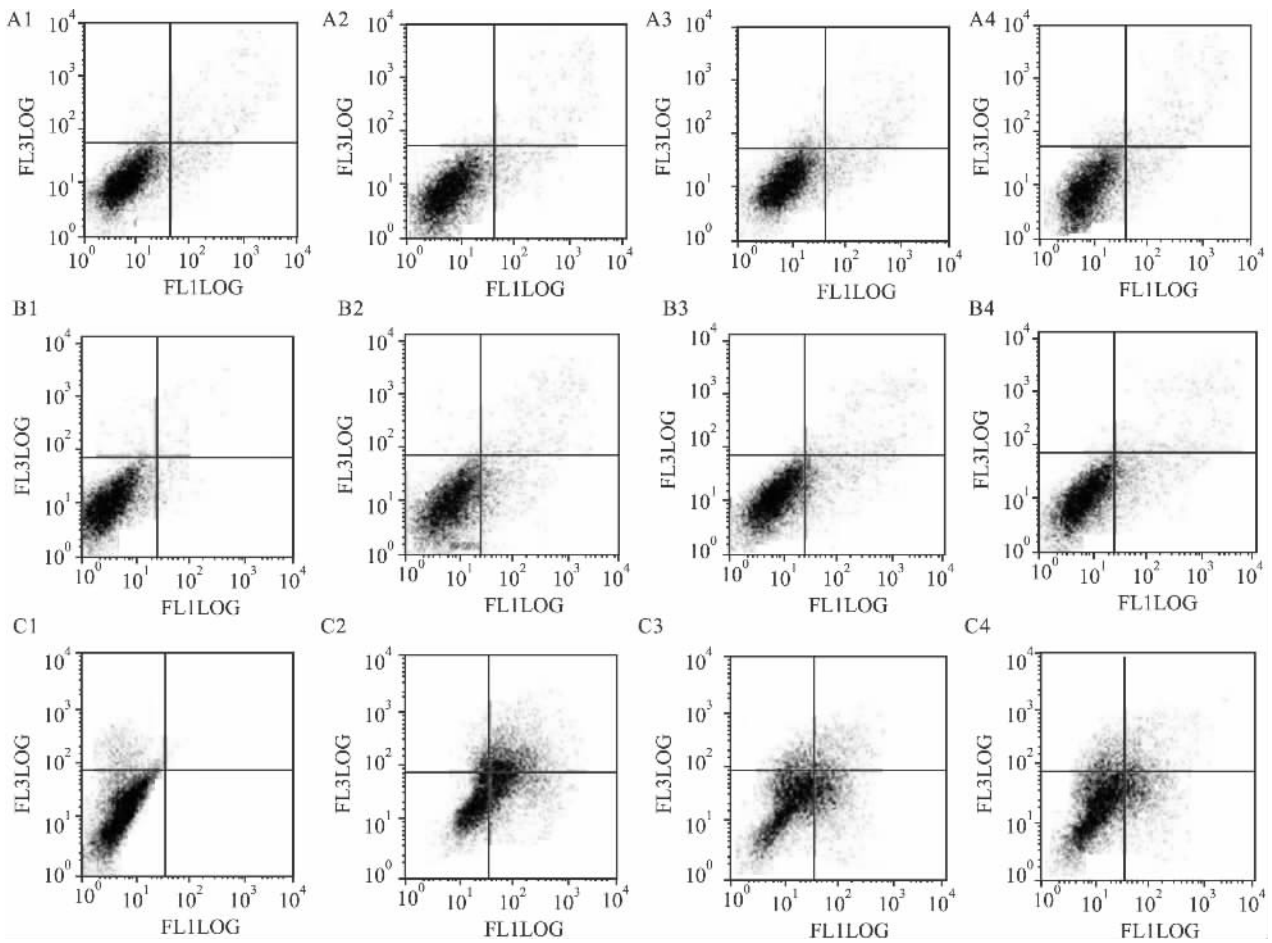


图 5 AIFP 对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响

A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h; 1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组; 3: 高浓度 AIFP 组(AIFP 的浓度为 5×10^{-3} mg/ml); 4: 低浓度 AIFP 组(AIFP 的浓度为 5×10^{-6} mg/ml)

2.5 RT-PCR 检测卵巢癌相关基因表达水平的变化 AIFP 下调 SKOV3 细胞中 Akt、CDC25C、cyclinB1 基因的表达水平,且随 AIFP 浓度的增加和作用时间的延长而更加明显,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ $P < 0.01$),见图 6、7。

3 讨论

LfcinB 是一类富含色氨酸的小分子抗菌肽,由牛乳铁蛋白在消化道内经胃蛋白酶水解而产生。LfcinB 具有抗菌、抑杀肿瘤细胞^[5-6]等多种生物学功能,可用于保健食品、化妆品、药品等。乳源免疫调节肽能促进机体的免疫、抗氧化、延缓机体衰老和抗疲劳等多种功能。本实验室前期研究^[7-8]显示,

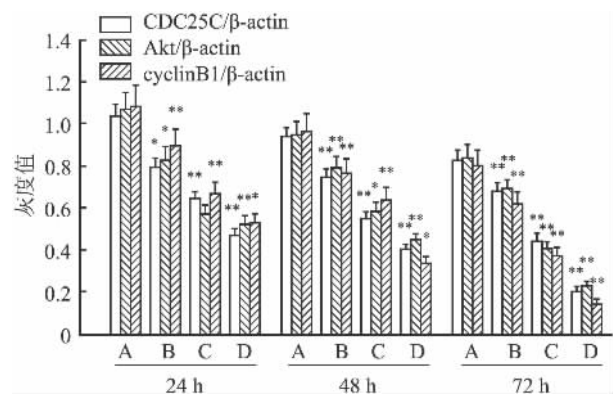


图 6 AIFP 对 SKOV3 细胞凋亡和周期相关基因表达的影响

A: 阴性对照组; B: AIFP 5×10^{-3} mg/ml; C: AIFP 5×10^{-6} mg/ml; D: AIFP 5×10^{-9} mg/ml; 与阴性对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

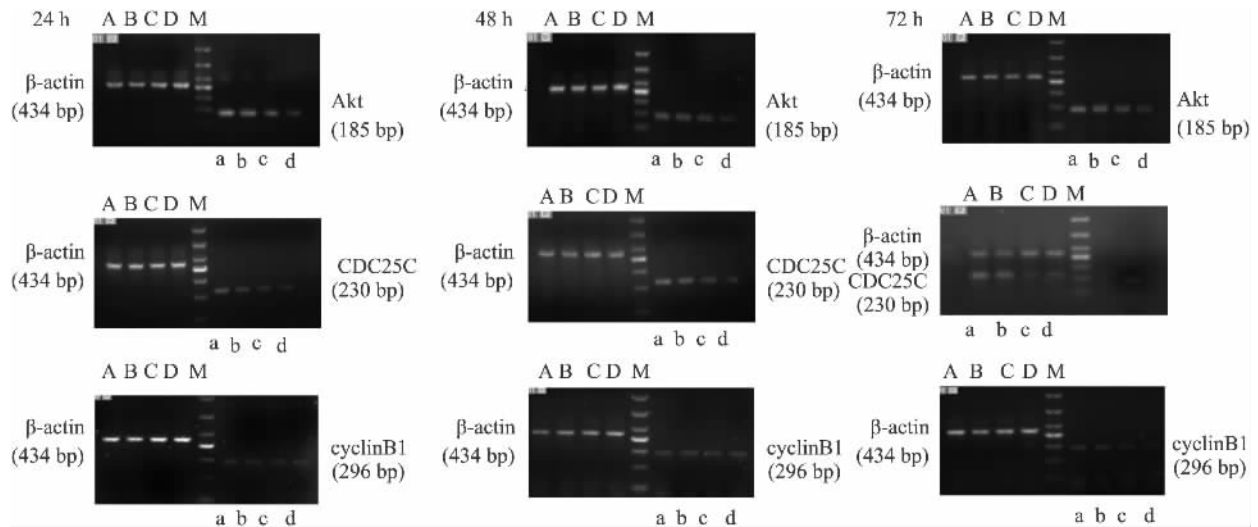


图7 AIFP对SKOV3细胞凋亡和周期相关基因表达的影响

A、a: 阴性对照组; B、b: AIFP的浓度为 5×10^{-9} mg/ml; C、c: AIFP的浓度为 5×10^{-6} mg/ml; D、d: AIFP的浓度为 5×10^{-3} mg/ml; M: DNA Marker DL1000

将LfcinB和免疫调节肽通过柔性连接臂^[9](GGGS)连接,形成融合肽,并在大肠杆菌表达系统中稳定表达。研究^[10]表明融合肽在抑制细胞增殖和抗菌方面有一定的效果,本实验将在前期研究结果中进一步研究融合肽对卵巢癌细胞株SKOV3细胞增殖和凋亡方面的影响。

Akt又称蛋白激酶B(protein kinases B,PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases,PI3K)下游的靶蛋白,是PI3K/Akt信号途径的中心环节,该信号途径参与调节细胞的存活、凋亡、扩增、恶性肿瘤的发生及化疗耐药等^[11]。PI3K/Akt在卵巢癌中高表达,与卵巢癌细胞的凋亡相关^[12]。

CDC25C即细胞分裂周期蛋白25同源蛋白,是一种细胞分裂周期蛋白,在真核细胞有丝分裂中期重要作用,是调控细胞周期进入M期的关键因子之一。CDC25C是CDC2/cyclinB的主要激活物,CDC2/cyclinB是一个主要的G₂/M期转变在G₂期检查点的总开关^[13]。当CDC25C磷酸酶活性受到抑制时,CDC2/cyclinB复合物的活性也将受到抑制,G₂期检查点的总开关处于“关闭”状态,发生G₂/M期阻滞。

cyclinB即细胞周期蛋白B,分为6中亚型,cyclinB1-6在S期开始表达,在G₂/M期达到峰值,到有丝分裂中后期消失^[14]。cyclinB的过表达能够促进G₂/M期转换,甚至导致细胞增生失控以及恶性转化。研究^[15]表明,用RNA干扰的方法抑制cy-

clinB表达,结果造成G₂/M期阻滞,细胞生长被抑制,并诱导细胞凋亡。

本实验用MTT法检测显示AIFP作用卵巢癌细胞株SKOV3细胞后,细胞的增殖减少,RT-PCR检测结果显示,AIFP作用后的SKOV3细胞的Akt、CDC25C和cyclinB1在一定范围内随时间和剂量的增加表达水平降低,说明AIFP对SKOV3细胞增殖和凋亡的影响可能是通过影响Akt、CDC25C和cyclinB1而发挥作用,为深入研究AIFP抗肿瘤的机制提供了可靠的依据。

参考文献

- [1] Ellman M B, Kim J, An H S, et al. Lactoferricin enhances BMP7-stimulated anabolic pathways in intervertebral disc cells[J]. Gene, 2013, 524(2): 282-91.
- [2] Wei W, Fang G, Cai W, et al. PGPIP, a therapeutic hexapeptide, suppressed human ovarian cancer growth by targeting BCL2[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60701.
- [3] 魏彩, 秦宜德, 郑欣, 等. 乳源免疫调节肽体外抑制人卵巢癌细胞侵袭和转移[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1): 42-8.
- [4] 郑欣, 何晓光, 张文晓, 等. 免疫调节肽对卵巢癌skov3细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(7): 758-62.
- [5] Fiat A M, Samour D, Jolles P, et al. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities[J]. Dairy Sci, 1993, 76(1): 301-10.
- [6] Mader J S, Richardson A, Salsman J, et al. Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabil-

- zation of the cell membrane and targeting of mitochondria [J]. *Exp Cell Res* 2007, 313(12): 2634–50.
- [7] 李素萍, 秦宜德, 董琼珠, 等. 饲喂乳源免疫调节肽对大鼠生长和免疫的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2005, 40(6): 499–501.
- [8] 顾芳, 秦宜德, 董华胜, 等. 乳源免疫调节肽对小鼠抗氧化和抗疲劳作用研究 [J]. *营养学报* 2006, 28(4): 326–8.
- [9] Ikeda M, Nozaki A, Sugiyama K, et al. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells [J]. *Virus Res* 2000, 66(1): 51–63.
- [10] 张文晓, 秦宜德, 何晓光, 等. 乳铁蛋白抗菌-乳源免疫调节肽的载体构建及在大肠杆菌中的表达和纯化 [J]. *安徽医科大学学报* 2012, 47(6): 641–4.
- [11] Levine D A, Bogomolny F, Yee C J, et al. Frequent mutation of the PI3KCA gene in ovarian and breast cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(8): 2875–8.
- [12] Arboleda M J, Lyons J F, Kabbinnar F F, et al. Overexpression of Akt2 protein kinase beta leads to up-regulation of beta1 integrins increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(2): 196–206.
- [13] Shibuya E K. G₂ cell cycle arrest—a direct link between PKA and Cdc25C [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(1): 39–41.
- [14] Jean C S, Se J J, Fadlo R K, et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(1): 4000–4.
- [15] Ho Y S, Duh J S, Jeng J H, et al. Griseofulvin potentiates antimetastatic effects of 5-fluorouracil through induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(3): 393–401.

Effect of antibacterial-immunomodulating fusion peptide on proliferation and apoptosis

Tang Yigui, Li Xiaoqin, Liu Chen, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of immunomodulating fusion peptide (AIFP) on human ovarian cancer cell proliferation and apoptosis. **Methods** The ovarian cancer cell proliferation of both the SKOV3 and primary treading with AIFP *in vitro* were assayed by MTT method. Apoptotic ratios of these cells were measured by flow cytometry (FCM) *in vitro*. The mRNAs of genes (Akt, CDC25C and cyclinB1) related to cell apoptosis and proliferation were assayed by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, AIFP had significant effect on inhibiting cell proliferation and promoted its apoptosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which were similar in primary ovarian cancer cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). By RT-PCR analysis, AIFP could significantly decrease the expressions of genes (Akt, CDC25C and cyclinB1) related to cell apoptosis and proliferation in SKOV3 cell line. **Conclusion** AIFP can decrease the proliferation of human ovarian cancer cell and induce their apoptosis. AIFP can down-regulate Akt, CDC25C and cyclinB1 genes expressions, which may affect ovarian cancer cell proliferation and apoptosis.

Key words AIFP; SKOV3; proliferation; apoptosis

(上接第 714 页)

(CTRL group). After 4 months, the body weight and serum lipid profiles were detected. Leydig cells were evaluated by 3 β -HSD immunohistochemical staining. Expressions of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cytochrome P450 Cholesterol side chain lyase (P450scc) were determined by RT-PCR and Western blot. **Results** The high-fat diet led to a significant increase in body weight, total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in HL group and SIMV group as compared to CTRL group ($P < 0.05$). A significant decrease in body weight and serum TC was noticed in SIMV group in comparison with HL group ($P < 0.05$). The decreased mRNA and protein expressions of testicular StAR and P450scc were observed in hyperlipidemic mice as compared to CTRL group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The StAR and P450scc expressions were significantly improved in SIMV group in comparison with the HL group ($P < 0.01$). There were no significant differences of Leydig cells number among these experimental groups. **Conclusion** SIMV may have a role in protecting Leydig cell function against metabolic damage caused by HL.

Key words testis; StAR; P450scc; hyperlipidemia; simvastatin