

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0385-03

· 短篇论著 ·

基因转染 LL-37/hCAP-18 对人乳腺癌细胞凋亡的影响

Effects of LL-37/hCAP-18 gene transfection on apoptosis of human breast cancer cells

韩艳非,袁红艳,常雅萍*(吉林大学 基础医学院 免疫学教研室, 长春 130021)

[摘要] 目的: 探讨基因转染人源抗菌肽 LL-37/hCAP-18 对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡的影响。方法: 将含人 LL-37/hCAP-18 的真核表达质粒瞬时转染人 MCF-7 细胞, 48 h 后, MTT 比色检测 MCF-7 细胞的增殖, 流式细胞术检测 MCF-7 细胞周期及凋亡, 细胞免疫组化染色检测 MCF-7 细胞中 Bax、Bcl-2 的表达。结果: 重组基因瞬时转染 MCF-7 细胞 48 h 后, 与各对照组相比, 肿瘤细胞的生长增殖受到显著抑制($P < 0.05$); 转染重组基因组肿瘤细胞凋亡率显著高于各对照组($P < 0.05$), 但细胞周期无明显变化; 与对照组相比, 转染重组基因 pEGFP-c1-LL-37 的 MCF-7 细胞中 Bcl-2 表达显著下降($P < 0.05$), Bax 由阴性表达转为表达明显升高。结论: LL-37/hCAP-18 可以通过上调促凋亡因子 Bax、下调抗凋亡因子 Bcl-2 诱导肿瘤细胞凋亡, 从而抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖。

[关键词] 抗菌肽; LL-37/hCAP-18; 转染; 细胞凋亡; 人乳腺癌细胞

[中图分类号] R730 **[文献标志码]** A

人源抗菌肽按照分子结构的不同, 主要分为两大类: 防御素家族和 Cathelicidins 家族。阳离子抗菌肽 LL-37/hCAP-18 (18KD human cationic antimicrobial peptide) 是目前所发现的唯一存在于人体内的 Cathelicidins 家族抗菌肽。真核细胞膜含有大量呈电中性的磷脂类物质和丰富的固醇类物质, 而肿瘤细胞膜中脂质的成分和排列已发生变化, 因此阳离子抗菌肽通过肽-膜脂作用抑制杀伤病变细胞, 而对正常人体细胞无影响。另外抗菌肽对肿瘤细胞线粒体、细胞骨架、染色体等多种细胞器均具有一定的破坏作用^[1-3]。目前大部分化疗药物往往同时抑杀癌细胞和正常细胞, 毒性作用较大。因此, 阳离子抗菌肽有望为抗癌药物的开发提供新的研究方向。另外, 抗菌肽基因序列短小, 易于转染, 可以将抗菌肽或其前体的基因导入肿瘤细胞, 实现对肿瘤的基因治疗, 而目前有关抗菌肽的肿瘤基因治疗的研究报道较少。本研究在已经构建人源抗菌肽 LL-37/hCAP-18 真核表达载体的基础上, 将其瞬时转染人乳腺癌细胞 MCF-7, 观察抗菌肽在乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡中的作用, 以期抗菌肽应用于肿瘤治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

pEGFP-c1-LL-37 重组质粒由本实验室构建; MCF-7 细胞由本实验室保存; PolyFect Kit 购自 QIAGEN 公司; MTT 购自北京鼎国生物技术有限公司; SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗人 Bax/Bcl-2 多克隆抗体购自北京博

奥森生物技术有限公司。

1.2 MTT 法检测细胞增殖活性

转染重组 pEGFP-c1-LL-37 基因组、转染 pEGFP-c1 空质粒组、不转染任何基因只加转染试剂组、正常对照细胞组在瞬时转染 48 h 后分别收集细胞, 采用 MTT 比色法描绘细胞生长曲线。

1.3 流式细胞术检测细胞周期及凋亡

根据 MTT 检测结果, 分别收集瞬时转染 48 h 后转染重组基因 pEGFP-c1-LL-37 组、转染 pEGFP-c1 空质粒组、正常对照组细胞, 利用流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡情况。

1.4 免疫组化检测细胞凋亡蛋白

以瞬时转染 48 h 后的空白对照组、转染 pEGFP-c1 空质粒组、转染重组基因 pEGFP-c1-LL-37 组细胞为实验对象, 采用 SP 试剂盒进行免疫组织化学染色, 检测凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 表达情况。结果判定标准: 胞质内出现棕黄色染色颗粒为阳性细胞。Olympus 显微镜观察并拍照, 采用图像分析系统进行蛋白的定性和定量分析。每张玻片随机选取 10 个不同的 200 倍视野, 每组蛋白反应的色彩强度 (IOD) 作为反应强度的参数, 取其平均值。

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(No. 200505142)。Supported by Science and Technology Research Development Program of Jilin Province(No. 200505142)

[作者简介] 韩艳非(1980 -), 女, 山东省德州市人, 硕士研究生, 主要从事细胞与分子免疫学方面的研究, E-mail: lvxiuyf1980@yahoo.com.cn

* Corresponding author. Tel(0431)85619476; E-mail: cyping@jlu.edu.cn

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad 分析软件对数据进行 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 判定为有统计学意义。

2 结果

2.1 重组基因瞬时转染对 MCF-7 增殖的抑制作用

将目的基因 LL-37/hCAP-18 转染 MCF-7 后,转染重组基因组的细胞的生长增殖明显减慢, D_{570} 值明显低于各对照组 ($P < 0.05$,图 1)。

2.2 基因转染对 MCF-7 细胞周期及凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,重组基因 pEGFP-c1-LL-37 瞬时转染对人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期没有显著影响,但出现相当比例的 DNA 含量小于二倍体的亚 G_1 凋亡峰,凋亡率可达(14.96 ± 1.86)%。而对照组凋亡率为(0.84 ± 0.15)% , 转

染 pEGFP-c1 组凋亡率为(6.09 ± 1.13)%(表 1)。

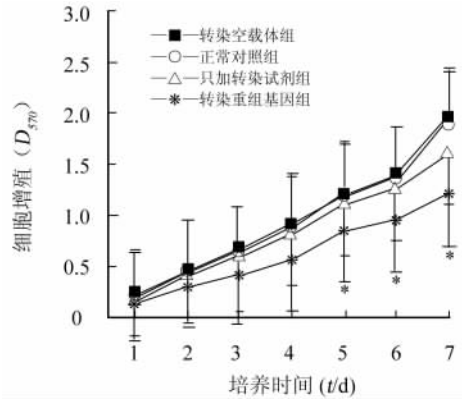


图 1 瞬时转染 48 h 后各组 MCF-7 细胞生长曲线 * $P < 0.05$ 与正常对照组或与转染空载体组或与只加转染试剂组比较

表 1 基因转染对 MCF-7 细胞周期及凋亡的影响($n = 3, \bar{x} \pm s, \%$)

组 别	凋亡率	细胞周期		
		$G_0 - G_1$	$G_2 - M$	S
对照组	0.84 ± 0.15	73.18 ± 6.92	9.59 ± 0.76	17.24 ± 1.92
转染 pEGFP-cl 组	6.09 ± 1.13	63.70 ± 6.9	1.12 ± 0.81	35.17 ± 3.07
转染 pEGFP-cl-LL-37 组	14.96 ± 1.86*	68.00 ± 5.19	8.04 ± 0.73	23.96 ± 2.16

* $P < 0.05$ 与对照组或与转染 pEGFP-c1 组比较

2.3 重组基因瞬时转染对 MCF-7 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响

结果显示,正常对照组 MCF-7 细胞中抗凋亡因子 Bcl-2 呈强阳性表达,IOD 值为 1.57×10^7 ; 促凋亡因子 Bax 表达阴性。转染 pEGFP-c1 空载体组细胞 Bcl-2 的 IOD 值为 1.42×10^7 ,Bax 表达阴性。转染重组基因 pEGFP-c1-LL-37 组细胞 Bcl-2 的 IOD 值为 6.50×10^6 ,Bax 的 IOD 值为 1.57×10^7 。与正常对照组及转染 pEGFP-c1 空载体组细胞相比,转染重组基因 pEGFP-c1-LL-37 组细胞中 Bcl-2 表达显著减少($P < 0.05, n = 10$),Bax 表达明显增加(图 2)。

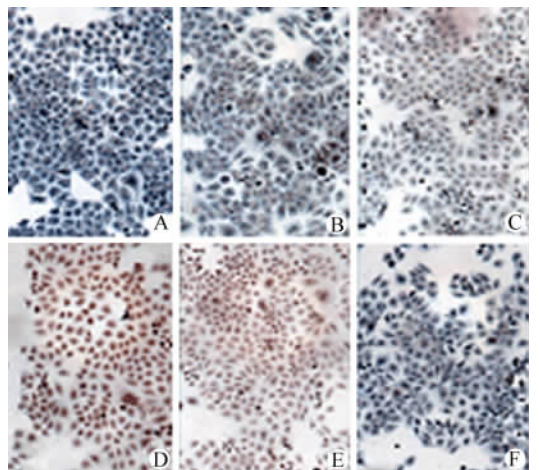


图 2 瞬时转染 48 h 后各组细胞中 Bcl-2、Bax 的表达(S-P 法, ×200)

A: 对照组 Bcl-2 的表达; B: 转染 pEGFP-c1 组 Bcl-2 的表达; C: 转染 pEGFP-c1-LL-37 组 Bcl-2 的表达; D: 对照组 Bax 的表达; E: 转染 pEGFP-c1 组 Bax 的表达; F: 转染 pEGFP-c1-LL-37 组 Bax 的表达

3 讨论

目前认为,在恶性肿瘤发生和发展过程中,细胞凋亡抑制比细胞过度增殖所起的作用更重要,而诱导肿瘤细胞分化、凋亡的相关研究也已成为近几年的抗肿瘤研究的热点之一。

在将 LL-37/hCAP-18 基因瞬时转染人乳腺癌细胞 MCF-7 后, 观察了细胞生长行为的变化。从其瞬时转染 48 h 后 7 d 的生长曲线上可以看到, 抗菌肽 LL-37/hCAP-18 进入肿瘤细胞 MCF-7 后, 细胞的增殖受到了一定程度的抑制, 转染重组基因 pEGFP-c1-LL-37 组与正常对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。采用流式细胞术检测瞬时转染 48 h 后细胞周期变化及凋亡情况, 结果显示, 重组基因瞬时转染对乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期没有阻滞作用, 但显示有相当比例的细胞有 DNA 的降解, 说明 LL-37/hCAP-18 可以诱导 MCF-7 发生凋亡。Bcl-2 家族是在细胞凋亡中起重要作用的一类蛋白质^[4-5], 其中 Bcl-2 和 Bax 分别是此家族中最有代表性的抑制凋亡基因和促进凋亡基因。文献报道^[6-7], Bcl-2 和 Bax 在肿瘤细胞凋亡中具有重要的调控作用。本实验采用细胞免疫组织化学染色检测发现在瞬时转染 48 h 后, 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达有显著下降, 而促凋亡蛋白 Bax 表达明显增加, Bax/Bcl-2 比值升高。MCF-7 细胞为 caspase 缺失型人乳腺癌细胞株, Bcl-2 和 Bax 虽然能够通过调节 caspase 活性来调控肿瘤细胞凋亡^[8], 但 Bcl-2 家族对 caspase 不依赖的肿瘤细胞凋亡如何调控目前尚不清楚。

综上所述, 人 Cathelicidins 家族抗菌肽 LL-37/hCAP-18 可以通过上调促凋亡因子 Bax、下调抗凋亡因子 Bcl-2 的表达诱导肿瘤细胞凋亡, 从而抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖。本研究为抗菌肽用于肿瘤基因治疗提供了一定的实验依据, 但对于抗菌

肽 LL-37/hCAP-18 抗肿瘤效应的机制还有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Bobek LA, Situ H. MUC7 202-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(2): 643-652.
- [2] Hariton-Gazal E, Feder R, Mor A, *et al.* Targeting of nonkaryophilic cell-permeable peptides into the nuclei of intact cells by covalently attached nuclear localization signals [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(29): 9208-9214.
- [3] Chen J, Xu XM, Underhill CB, *et al.* Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11): 4614-4622.
- [4] Rosse T, Olivier R, Monney L, *et al.* Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499.
- [5] Ivanovska I, Muhoro CN, Irusta PM. Anti-tumor therapeutic molecules that target the programmed cell death machinery [J]. *Mini Rev Med Chem*. 2006, 6(9): 1033-1042.
- [6] Guo B, Zhai D, Cabezas E, *et al.* Human peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6938): 456-461.
- [7] Papadopoulos K. Targeting the Bcl-2 family in cancer therapy [J]. *Semin Oncol*, 2006, 33(4): 449-456.
- [8] Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(1): 15-20.

[收稿日期] 2007-04-20

[修回日期] 2007-08-08

[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符, 它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法, 切不可混淆使用。现根据有关标准和规则, 把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

- (1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体, 例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。
- (2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体), 例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。
- (3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体, 例如 *Hind III*、*BamH I*、*Sal I* 等。
- (4) 各种统计学符号应斜体, 例如样本数 n 、均数 \bar{x} 、样本差 s 、 t 检验、 F 检验、概率 P 、相关系数 r 等。
- (5) 各种物理量的量符号应斜体(pH 用正体除外), 例如长度 L 、面积 A (或 S)、体积 V 、质量 m 、时间 t 、压力 p 、相对分子质量 M_r 、物质的量浓度 c_B 等。
- (6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体, 例如左旋 L -、右旋 D -、邻位 o -、对位 p -、反式 $trans$ -、顺式 cis -等。
- (7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。
- (8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体, 例如 *et al*、*vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)