

[ 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<sup>[1-3]</sup>。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 )。

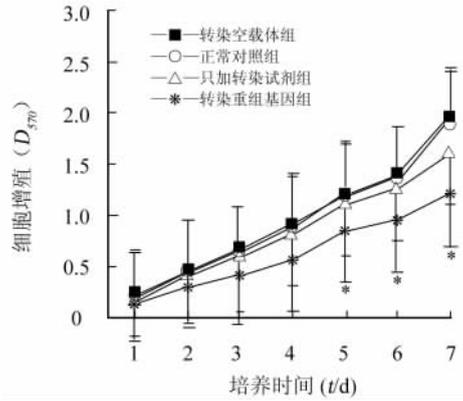


图 1 瞬时转染 48 h 后各组 MCF-7 细胞生长曲线 \*  $P < 0.05$  与正常对照组或与转染空载体组或与只加转染试剂组比较

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  $1.57 \times 10^7$ ;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  $1.42 \times 10^7$ ,Bax 表达阴性。转染重组基因 pEGFP-c1-LL-37 组细胞 Bcl-2 的 IOD 值为  $6.50 \times 10^6$ ,Bax 的 IOD 值为  $1.57 \times 10^7$ 。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)。

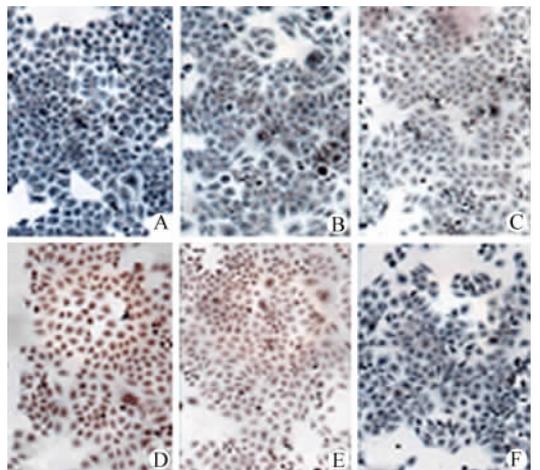


图 2 瞬时转染 48 h 后各组细胞中 Bcl-2、Bax 的表达( S-P 法, ×200 )

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<sup>[4-5]</sup>, 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<sup>[6-7]</sup>, 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<sup>[8]</sup>, 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 )