

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.003

· 基础研究 ·

新人工阳离子多肽 AIK 抗肿瘤活性的初步研究

范芳芳, 徐晖, 孙慧莹, 刘佳伟, 张海员, 李亦兰, 宁雪莲, 白静, 傅松滨, 周春水(哈尔滨医科大学基础医学院医学遗传学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

[摘要] **目的:** 研究新发现的人工阳离子多肽 AIK 在体内外对肿瘤细胞的抑制作用和杀伤机制。**方法:** MTS 方法检测 AIK 对急性早幼粒白血病细胞 HL-60 的抑制作用, 确定 AIK 最佳作用浓度及作用时间, 并以此条件测定其对 10 株人肿瘤细胞 (95C、95D、HL-60、HeLa、B95-8、HO-8910PM、HO-8910、SMMC-7721、U2OS 和 A549 细胞) 及人正常肝细胞 HL-7702 的抑制效应。流式细胞术检测 AIK 对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响, 并经 DAPI 染色后荧光显微镜下观察细胞的形态学变化。制备小鼠荷肝癌 H22 细胞皮下移植瘤模型, 将 36 只模型小鼠随机分为 PBS 阴性对照组、AIK 低剂量组 [8 mg/(kg·d)]、高剂量组 [15 mg/(kg·d)] 以及 MTX 阳性对照组 [1 mg/(kg·d)], 给予连续 10 d 瘤旁注射治疗, 记录小鼠体质量并观察其活动状态; 用药结束后, 脊脱臼法处死小鼠, 比较肿瘤质量及体积。**结果:** AIK 对 10 种肿瘤细胞均有不同程度的杀伤活性, 600 μg/ml AIK 作用 24 h 后对肺巨细胞癌 95C、白血病 HL-60 和宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制分别达 (90.33 ± 0.75)%、(89.06 ± 1.28)% 和 (76.09 ± 3.68)%。AIK 处理组 HeLa 凋亡细胞 [(4.88 ± 0.57)% vs (0.51 ± 0.19)% , $P < 0.05$] 及坏死细胞比例 [(2.96 ± 0.50)% vs (1.87 ± 0.27)% , $P < 0.05$] 均显著高于对照组, 400 μg/ml AIK 处理组 50% 以上的 H22 细胞出现胞膜破碎、细胞裂解等坏死表型。AIK 高剂量组、低剂量组和 MTX 阳性对照组的移植瘤体积和质量均显著低于 PBS 阴性对照组 ($P < 0.01$)。4 组小鼠体质量在治疗期间没有显著差异, 但 MTX 组小鼠体质量在治疗第 5 天开始出现下降, 其余 3 组在药物处理期间呈上升趋势。**结论:** AIK 能够抑制多种肿瘤细胞的生长, 诱导细胞凋亡和坏死; 显著抑制肝癌 H22 细胞小鼠皮下移植瘤的生长, 无明显不良反应。

[关键词] 阳离子多肽; AIK; 肿瘤; 细胞凋亡; 细胞坏死

[中图分类号] Q516; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)06-0617-07

Antitumor activity of a novel synthetic cationic peptide AIK: A preliminary observation

Fan Fangfang, Xu Hui, Sun Huiying, Liu Jiawei, Zhang Haiyuan, Li Yilan, Ning Xuelian, Bai Jing, Fu Songbin, Zhou Chunshui (Department of Medical Genetics, College of Basic Medicine, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the antitumor activity of a novel synthetic cationic peptide designated as AIK, and to elucidate the underlying mechanism(s) *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** In experiments *in vitro*, the optimal dosage and treatment duration for AIK to exert its maximal cell proliferation inhibitory activity were determined by MTS cell proliferation assays in human leukemia HL-60 cells. And then, the antitumor activity of AIK at the optimal dosage and for the optimal duration of treatment was assessed in ten tumor cell lines (i.e., 95C, 95D, HL-60, HeLa, B95-8, HO-8910PM, HO-8910, SMMC-7721, U2OS, A549) and one human normal liver cell line HL-7702. The effects of AIK on HeLa cell apoptosis and morphology were examined by flow cytometry and microscopy respectively. In experiments *in vivo*, mouse liver cancer H22 cells were transplanted into the armpits of male Kunming mice. Thirty-six mice that developed tumors of a similar size as confirmed 5 days after H22 cell transplantation were randomized to receive subcutaneously PBS (vehicle control), low dose AIK (8 mg/[kg·d]), high dose AIK (15 mg/[kg·d]) and methotrexate (1 mg/[kg·d]) of as

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81272582)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81272582)

[作者简介] 范芳芳 (1989 -), 女, 湖北省荆门市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: fanfang1118@163.com

[通信作者] 周春水 (Zhou Chunshui, corresponding author), E-mail: Zhoucs@ems.hrbmu.edu.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20141209.1503.003.html>

a positive control daily for 10 days, during which body weight was measured every day. Animals were sacrificed 24 h after the last treatment. Subcutaneous tumors were counted in each animal. Data on the weight and volume of the individual tumors were obtained and analyzed. **Results:** *In vitro*, AIK exhibited a potent cytotoxic activity against all types of cancer cells tested, in particular, the pulmonary giant cell carcinoma 95C cells, the leukemia HL-60 cells, and the cervical cancer HeLa cells. AIK treatment, as compared with vehicle control, resulted in significant increases in apoptosis ($[4.88 \pm 0.57] \% vs [0.51 \pm 0.19] \%$, $P < 0.05$) and necrosis ($[2.96 \pm 0.50] \% vs [1.87 \pm 0.27] \%$, $P < 0.05$) in HeLa cells. Microscopic assessment showed necrotic phenomena including dilated, fragmented cell membrane and cell lysis in more than 50% of AIK treated H22 cells. *In vivo*, tumor volume and weight were significantly smaller in both AIK-and methotrexate-treated animals than in PBS-treated animals ($P < 0.01$). Body weight declined in methotrexate-treated animals but tended to increase in other 3 groups of animals 5 days after treatment. Nevertheless, the overall differences in body weight changes between the 4 groups of animals failed to reach a statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** The novel cationic peptide AIK possesses a potent antitumor activity both *in vitro* and *in vivo*, thus having a great therapeutic potential for various types of cancer.

[**Key words**] cationic peptide; AIK; tumor; cell apoptosis; cell necrosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 617-623]

恶性肿瘤严重威胁人类健康和生命, 目前已有的抗肿瘤药物虽然对大多数肿瘤有一定疗效, 但仍存在着疗效低、选择性差、不良反应大、易产生瘤细胞耐药等问题。因此, 从不同途径寻找高效、低毒、特异性强的抗肿瘤药物乃是药物治疗的当务之急^[1-2]。抗肿瘤多肽药物分子量小, 活性高, 易穿透吸收, 免疫原性低, 结构简单易于改造, 可以多途径给药, 不易引起不良反应, 对多药抗性的肿瘤细胞系也具有较好的抑制活性^[3-5]。同时, 抗肿瘤多肽除了能够化学合成, 还能够以生物工程的方法大规模制备, 这些都预示着抗肿瘤多肽在临床上将有良好的应用前景。近年来, 国内外研究者^[3, 6-8]利用动植物等自然资源, 筛查噬菌体表面展示多肽库, 人工化学合成和改造, 得到了多种抗瘤多肽。这些多肽在体外细胞毒性实验和体内小鼠肿瘤移植模型上均显示不同程度的选择性抗瘤活性。如从海洋生物中分离的环状多肽 Didemnin B^[9-10], 对白血病细胞及黑色素瘤均有较好的抗肿瘤活性, 是第一个作为抗癌药进入临床使用的海洋生物化合物。来源于海兔的 Dolastin 10 衍生物 TZT-1027^[11-12] 对非小细胞肺癌细胞有较强的杀伤作用, 已进入临床 II 期研究。相对于传统的抗肿瘤药物来说, 药效较低是制约抗癌肽发展的最重要因素。因此, 改造已有的抗癌肽和筛选高活性新抗癌肽分子是解决抗癌肽缺陷的根本方法。

基于以上理念, 本课题组在筛选具有抗瘤活性的人工合成多肽过程中发现了一种能高效杀伤肿瘤细胞的小分子阳离子多肽 AIK。AIK 分子量小, 易于进行结构改造, 是研发新型靶向药物的优良候选药物。因此, 本研究对 AIK 体内外抗瘤活性以及杀

伤肿瘤细胞的机制做了深入探讨, 以期为进一步研发抗肿瘤多肽类新药和小型靶向性抗肿瘤新药提供实验依据和奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞株

实验动物采用雄性昆明小鼠 50 只, 4~5 周龄, 20~25 g, 由哈尔滨医科大学实验动物学部提供[实验动物合格证号: SCXK(黑)2013-001]。小鼠肝癌 H22 腹水细胞系由哈尔滨医科大学生物化学教研室刘兴汉教授馈赠, 由本实验室在昆明小鼠腹腔接种传代, 液氮长期保存。95C(肺巨细胞癌低转移株)、95D(肺巨细胞癌高转移株)、HL-60(急性早幼粒白血病细胞株)、HeLa(子宫颈癌细胞株)、B95-8(EB 病毒感染的白血病细胞株)、HO-8910PM(高转移卵巢癌细胞株)、HO-8910(低转移卵巢癌细胞株)、SMMC-7721(肝癌细胞株)、U2OS(骨髓瘤细胞株)、A549(肺腺癌细胞株)等 10 种肿瘤细胞株及 HL-7702 正常肝细胞株均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 新人工合成的阳离子多肽 AIK

本课题组在筛选具有抗瘤活性的人工合成多肽过程中发现的一种能高效杀伤肿瘤细胞的 25 肽, 命名为 AIK, 其氨基酸序列如图 1 所示。AIK 是一种小分子阳离子多肽, 它的等电点(pI)为 12.96, 理论相对分子质量为 3456.35。

1.3 主要试剂

AIK 及同样长度的无关对照多肽由北京赛百盛基因技术有限公司合成。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)购自辉瑞公司, MTS 检测试剂盒(CellTiter96®

Aqueous One Solution Reagent) 购自 Promega 公司, 细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC 流式检测试剂盒)购自北京四正柏生物科技有限公司, 含 DAPI 防荧光淬灭封片剂(Vectashield Mounting Medium with DAPI)购自 Vector Laboratories 公司, RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、F12K 培养基均购自 GIBCO BRL 公司, 胰蛋白酶购自 Promega 公司, 胎牛血清购自 PAA 公司。

Ser Met Met Lys Lys Lys Ala Leu Trp Arg	10
Arg Arg Arg Arg Met Gln Arg Arg Arg Arg	20
Arg Lys Lys Lys Lys	25

图 1 人工阳离子多肽 AIK 的氨基酸序列

Fig. 1 Amino acid sequence of synthetic cationic peptide AIK

1.4 MTS 法检测 AIK 的抗肿瘤活性及抑瘤细胞谱

采用 MTS 法测定 AIK 的抗肿瘤活性、具体实施方法参见试剂盒说明书。设空白对照组(只加培养基不加细胞)、细胞对照组(只加细胞和培养基,不加药物)以及 4 个实验组,其中 3 个实验组分别加入 AIK、经 10 $\mu\text{g/ml}$ 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 4 h 的 AIK 及无关对照多肽(终质量浓度为 600 $\mu\text{g/ml}$),另一组中加入相应量的胰酶,每组设 6 个平行孔。测定孔内光密度(D)值,肿瘤细胞杀伤率($\%$) = $(1 - \text{实验组平均 } D \text{ 值} / \text{对照组平均 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。

参照以上方法,测定不同浓度、不同作用时间 AIK 对 HL-60 细胞的杀伤活性,确定 AIK 最佳作用浓度及作用时间,并以此条件测定 AIK 对 10 株人肿瘤细胞(95C, 95D, HL-60, HeLa, B95-8, HO-8910PM, HO-8910, SMMC-7721, U2OS, A549)及人正常肝细胞(HL-7702)的杀伤率。同样测定不同浓度 AIK 对小鼠肝癌腹水细胞 H22 作用 24 h 时的杀伤率,光镜下观察并拍照。

1.5 流式细胞术检测 AIK 对 HeLa 细胞凋亡的影响

消化对数生长期 HeLa、H22 细胞,接种于 10 cm 培养皿中,常规培养 24 h 后换液。实验组含 100 $\mu\text{g/ml}$ 终质量浓度的 AIK,对照组加入等量培养基。培养 12 h 后,胰酶消化 5 min,完全培养基终止消化,离心后用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,用结合缓冲液重新悬浮细胞,调节其密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V/FITC 和 10 μl 20 $\mu\text{g/ml}$ 的碘化丙锭(PI)溶液,混匀后于室温避光孵育 15 min,在反应管中加入 400 μl PBS,流式细胞术检测细胞凋亡。

1.6 DAPI 染色观察 AIK 诱导的 HeLa 细胞凋亡表型

消化对数生长期 HeLa、H22 细胞,接种于灭菌后的盖玻片上,常规培养 24 h 后换液。实验组培养基含 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 AIK,对照组加入等量培养基。分别于 12 及 20 h 后取出盖玻片,PBS 洗 2 遍后用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min。PBS 洗 3 次,滴加含 DAPI 封片液,荧光显微镜下观察各组细胞核的形态并拍照记录。

1.7 AIK 对肝癌 H22 细胞小鼠皮下移植瘤的影响

将液氮冻存的小鼠肝癌细胞 H22 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中快速解冻,腹腔接种 3 只昆明小鼠,0.5 ml/只。取传代第 8 天 H22 腹水瘤模型小鼠一只,颈椎脱臼处死,于超净台内无菌操作吸取小鼠腹腔乳白色腹水 8 ml。1:10 稀释计数,PBS 调整瘤细胞悬液密度为 5×10^6 个/ml。取 0.2 ml 细胞悬液(相当于瘤细胞数 1×10^6 个),于小鼠左侧腋下进行无菌皮下接种,整个过程于 1 h 内完成。

接种肿瘤细胞 5 d 后,通过游标卡尺粗略测量,筛选出成瘤并且肿瘤大小基本一致的小鼠 36 只,随机分 4 组,每组 9 只。移植瘤局部给药,给药量为 AIK 高剂量组为 15 mg/(kg·d),AIK 低剂量组为 8 mg/(kg·d),阳性对照组氨甲蝶呤剂量为 1 mg/(kg·d),阴性对照组给予等量无菌 PBS。每次给药 0.1 ml,连续治疗 10 d。每天测量小鼠体质量。治疗结束 24 h 后,颈椎脱臼法处死小鼠,剥瘤,测量肿瘤的质量、肿瘤的长径和短径。移植瘤体积(V) = $1/2 AB^2$ (单位 mm^3 , A 为肿瘤长径, B 为肿瘤短径)。

1.8 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 IBM SPSS Statistics 19 统计软件。对于两组计量资料的比较采用 t 检验,对于 3 组以上计量资料的比较采用方差分析。具体为先通过 levene 检验证明各组之间的方差齐性,随后使用 One-Way ANOVA 方差分析检验总体上各组均数之间是否有显著差异,之后用 SNK 检验进行组间两两比较。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AIK 是一种广谱、高效抗瘤肽

用 600 $\mu\text{g/ml}$ 的 AIK 作用于人白血病 HL-60 细胞 24 h 后,对细胞的杀伤率超过 80%,而无关对照多肽对 HL-60 基本无杀伤活性(图 2A)。AIK 经胰蛋白酶消化 4 h 后,其杀伤细胞能力几乎消失(图 2A)。并且, AIK 抗瘤活性呈现剂量依赖性, AIK 作用于 HL-60 细胞 24 h 时,药物活性达到最高,延长作用时间并不能增强药效(图 2B)。

MTS 方法筛查 AIK 的抑瘤谱发现, AIK 对肺巨细胞癌细胞 95C、人白血病细胞 HL-60、宫颈癌细胞 Hela 等具有较高的杀伤率, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIK 作用 24 h 对上述细胞生长抑制率分别为 (90.33 \pm 0.75)%、(89.06 \pm 1.28)% 和 (76.09 \pm 3.68)%。而对肺腺

癌细胞 A549 等的杀伤率较弱(图 2C)。AIK 不仅对人源各种肿瘤细胞具有较高抑瘤活性, 而且对小鼠肝癌腹水瘤细胞 H22 也具有很强杀伤活性(图 2D), 进一步证实 AIK 是一种广谱抗肿瘤肽。

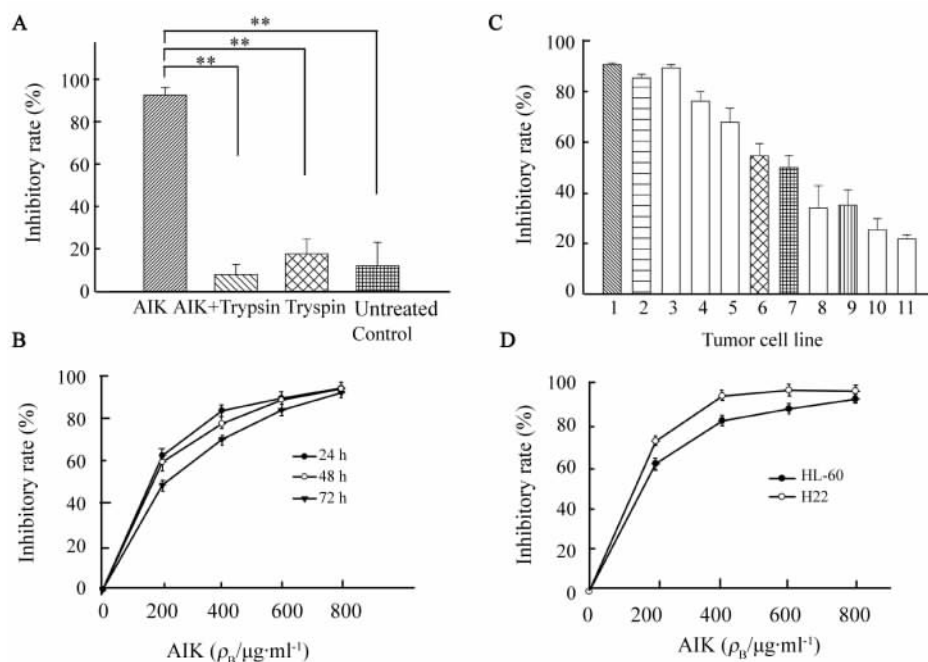


图 2 阳离子多肽 AIK 对各种肿瘤细胞生长的抑制活性

Fig. 2 Growth of various tumor cell lines was inhibited by AIK

A: AIK possessed antitumor activity against HL-60 cells; B: AIK inhibited HL-60 cells growth in a dose dependent manner; C: AIK has a broad antitumor activity; D: Growth of mouse liver tumor cell H22 was potently inhibited by AIK
1: 95C; 2: 95D; 3: HL-60; 4: Hela; 5: HL-7702; 6: B95-8; 7: HO-8910PM; 8: HO-8910; 9: SMMC-7721; 10: U2OS; 11: A549

2.2 AIK 促进肿瘤细胞的凋亡和坏死

AIK 处理 H22 细胞 24 h 后, 光镜下观察其形态学改变(图 3A)发现, 当 AIK 为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 约有 50% 以上细胞发生肿胀, 胞膜破裂, 细胞崩解产生大量细胞碎片, 而对照组细胞状态良好。

以 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AIK 处理 Hela 细胞 12 h 后, 流式细胞术检测结果(图 3B)显示, AIK 处理组凋亡 [(4.88 \pm 0.57)% vs (0.51 \pm 0.19)% , $P < 0.05$] 及坏死细胞比例 [(2.96 \pm 0.50)% vs (1.87 \pm 0.27)% , $P < 0.05$] 均显著高于对照组。AIK 处理 Hela 细胞经 DAPI 染色, 荧光显微镜下可以清楚地观察到细胞核固缩, 并有凋亡小体出现(图 3C)。

2.3 AIK 能够显著抑制小鼠皮下 H22 移植瘤的生长, 并对小鼠无明显毒副作用

AIK 高剂量治疗组、AIK 低剂量治疗组与 MTX

阳性对照组间的移植瘤体积和质量均没有显著差异, 但都显著低于 PBS 组 ($P < 0.01$, 图 4A-4C)。给药期间对小鼠体质量的测量发现(图 4D), PBS 组、AIK 低剂量组及高剂量组小鼠平均体质量均呈上升趋势, 而 MTX 组小鼠平均体质量只是在给药的前 5 d 呈缓慢上升, 之后的 5 d 略有下降。与 PBS 组相比, 在治疗第 10 天, MTX 组小鼠平均体质量下降最为明显。

3 讨论

阳离子多肽是抗肿瘤多肽家族中的重要一员。阳离子多肽含有带正电荷的氨基酸残基, 在正常生理条件下, 其表面带有不同程度的正电荷。而肿瘤细胞经常过度表达磷脂酰丝氨酸^[13-16], 硫酸乙酰肝素^[17-18]等阴离子, 导致肿瘤细胞膜带负电荷。因

此,阳离子多肽可与带有阴离子的肿瘤细胞通过静电相互作用结合,进而发挥抗癌作用。AIK 由 25 个氨基酸残基组成,其中含有 7 个赖氨酸、10 个精氨酸,而精氨酸残基和赖氨酸残基在生理 pH 下都是带正电荷的^[19]。因此,AIK 是一种典型的强阳离子多肽,可选择性结合含有较多阴离子的肿瘤细胞。

本研究发现,AIK 对人白血病细胞 HL-60 具有较高杀伤活性,而无关对照多肽对 HL-60 基本无杀伤活性。并且 AIK 经胰蛋白酶消化后,其杀伤细胞能力几乎消失。这些结果提示 AIK 杀伤细胞的活性来源于自身结构,而不是因为化学合成过程中污染了毒性化学物质。与多数阳离子抗肿瘤多肽相似,AIK 的抗癌活性在一定质量浓度范围内呈剂量依赖性。以 0 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不同质量浓度 AIK 处理 HL-60 及 H22 细胞时,随着剂量增加,AIK 对细胞的杀伤能力也逐渐增强。当 AIK 为 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,肿瘤细胞几乎全部被杀死。同样的,AIK 抗癌活性在一定时间范围内也是呈时间依赖性的。在相同剂量作用下,AIK 作用于 HL-60 细胞 24 h 时,药物活性达到最高,延长作用时间并不能增强药效。这些结果提示,AIK 在体外能够迅速与肿瘤细胞作用,进而发挥抗肿瘤活性。

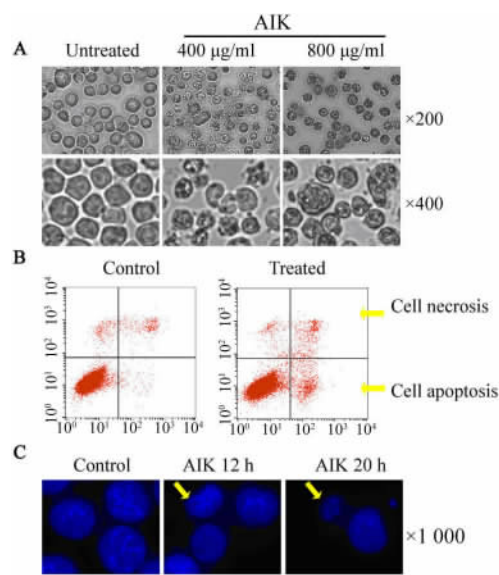


图 3 阳离子多肽 AIK 体外诱导肿瘤细胞凋亡和坏死

Fig. 3 Necrosis and apoptosis were induced in AIK treated cancer cells

A: Necrotic cells were observed in AIK treated H22 cells; B: Apoptotic and dead cells were detected in AIK treated HeLa cells; C: Apoptotic bodies were observed in AIK treated HeLa cells

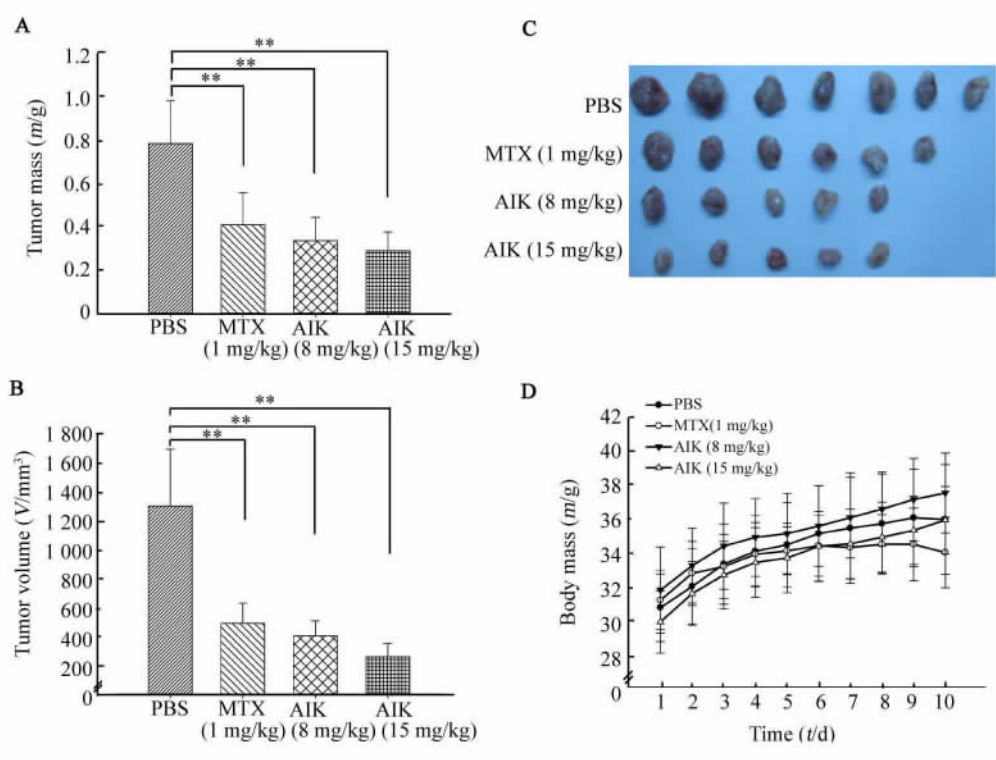


图 4 AIK 显著抑制荷瘤小鼠的皮下移植瘤生长

Fig. 4 Antitumor activity of AIK on a subcutaneous tumor-bearing mouse model

A, B: Average tumor mass and tumor volume of each group; C: Representative image of dissected tumors from each treated mouse; D: AIK exhibited a less severe side effect on the body mass of treated mice

以 MTS 方法体外筛查 AIK 对 11 株瘤细胞的作用发现, AIK 对肺巨细胞癌 95C、95D 细胞, 人白血病 HL-60 细胞, 宫颈癌 Hela 细胞等多数细胞均具有较高的杀伤率, 对骨髓瘤 U2OS 细胞, 肺腺癌细胞 A549 等也有一定的杀伤率。这一结果表明 AIK 是一种广谱高效抗肿瘤肽。AIK 不仅在体外高效杀伤肿瘤细胞, 也能显著抑制小鼠皮下移植瘤的生长, 并且无明显不良反应。在对小鼠荷鼠肝癌 H22 细胞皮下移植瘤模型给药治疗的过程中发现, PBS 组、AIK 低剂量组及高剂量组小鼠平均体质量均呈上升趋势, 而 MTX 组小鼠平均体质量只是在给药的前 5 d 呈缓慢上升, 之后的 5 d 略有下降。与 PBS 组相比, 在治疗第 10 天, MTX 组小鼠平均体质量下降最为明显。虽然它们之间的差异并无明显统计学意义, 但是根据体质量变化的趋势可以推断, 继续治疗一段时间后, 这一差异会逐渐增大。这一现象提示, MTX 治疗产生的不良反应较大, 而 AIK 治疗小鼠基本没有不良反应。

AIK 在体内外对肿瘤细胞均具有较高的杀伤活性, 然而它通过何种机制杀伤肿瘤细胞仍不清楚。目前, 广泛认为阳离子多肽能够通过桶板模型 (barrel-stave model)^[20-22]、地毯模型 (carpet model)^[23]、环孔模型 (toroidal pore model)^[24-25]、去污剂模型 (detergent-like model)^[26-27], 与细胞表面带负电荷的分子以静电相互作用而结合, 破坏细胞膜通透性, 诱导细胞发生坏死。

另一种可能的机制是, 阳离子多肽进入细胞质后渗透进入线粒体, 使其发生膨胀, 释放促凋亡因子, 进而诱导细胞发生凋亡^[28-29]。Buforin II b 是一种组蛋白 H2A 的衍生多肽, 对多种人肿瘤细胞有选择性毒性, 通过释放线粒体内的细胞色素 C 和激活 Caspase 9 而诱导细胞发生凋亡^[30]。本研究发现, 在低浓度时, AIK 可能是以类似 Buforin II b 的方式来诱导 HeLa 细胞凋亡的。但是, 当以 600 μg/ml 的 AIK 处理 H22 细胞 12 h 时, 光镜下可观察到大量的胞膜破裂、细胞崩解等细胞坏死表型。提示当高浓度 AIK 处理细胞时, 可能很快便达到上述假说中的临界浓度阈值, 以致于细胞膜结构发生明显改变, 导致细胞发生急剧的崩解。无论是 AIK 激活凋亡还是坏死, 其最终生物效应是大量杀伤肿瘤细胞, 这也解释了为什么 AIK 是一种高效的抗肿瘤肽。

目前通常使用的抗肿瘤药物, 如 DNA 损伤剂 (顺铂、多柔比星)、抗 DNA 代谢物 (甲氨蝶呤、吉西他滨) 和抑制有丝分裂的天然产物 (紫杉醇、多西他赛), 它们的作用靶标均是快速分裂的细胞, 对正常

细胞没有或只有很小的选择性, 从而导致严重的毒性作用^[31-32]。并且, 这些药物需要穿透细胞膜, 然后才能与细胞内靶标相互作用。许多药物进入胞液之后, 在与细胞内靶标相互作用之前就被细胞抗药机制运送到细胞外而失效^[33]。相比而言, AIK 等抗肿瘤多肽由于直接作用于肿瘤细胞膜而较少地在细胞内发挥活性, 因此可以避免常见的肿瘤耐药机制, 对耐受常规化疗药物的细胞仍有较好的治疗效果。有研究^[34]表明, 天蚕抗肿瘤多肽 Cecropin A 能显著地增强 5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷对急性成淋巴细胞性白血病细胞的杀伤作用。推测 AIK 与传统的抗肿瘤药物联合应用, 也有可能产生强化化疗效果、减轻化疗引起的毒性作用等效果, 这一推测将在进一步研究中得到验证。

抗肿瘤肽是靶向药物研发的重要对象。最近有研究^[35-39]将 iRGD 和 iNGR 等导向肽作为药物的载体, 可促进传统抗癌药物多柔比星在肿瘤组织中富集, 提高治疗作用, 降低毒性作用。由于 AIK 分子量小, 易于进行结构改造, 是研发新型靶向药物的优良候选药物。总之, AIK 的发现为进一步研发多肽类抗肿瘤新药和小型靶向性抗肿瘤新药奠定了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] 陆融, 王卓, 姚智. 小分子多肽抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(3): 499-502.
- [2] Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(2): 357-375.
- [3] 张冉, 劳兴珍, 郑珩. 抗肿瘤小分子多肽的研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(4): 42-46.
- [4] 赵锐, 孟庆义, 邓欣, 等. 多肽抗肿瘤化合物的研究进展 [J]. 海峡药学, 2012, 24(10): 4-8.
- [5] Oyston PC, Fox MA, Richards SJ, et al. Novel peptide therapeutics for treatment of infections [J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 8): 977-987.
- [6] 马丽, 蔡在龙, 毛积芳. 抗肿瘤小分子多肽的来源及抗肿瘤机制 [J]. 生命的化学, 2005, 25(2): 140-142.
- [7] 曾名嘉, 张冬梅, 陈钧辉. 抗肿瘤多肽研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 139-141.
- [8] Szczepanski C, Tenstad O, Baumann A, et al. Identification of a novel lytic peptide for the treatment of solid tumours [J]. *Genes cancer*, 2014, 5(5/6): 186-200.
- [9] Chun HG, Davies B, Hoth D, et al. The first marine compound entering clinical trials as an antineoplastic agent [J]. *Invest New Drugs*, 1986, 4(3): 279-284.
- [10] Tsukimoto M, Nagaoka M, Shishido Y, et al. Bacterial production of the tunicate-derived antitumor cyclic depsipeptide didemnin B [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(11): 2329-2331.

- [11] Horti J, Juhasz E, Monostori Z, et al. Phase I study of TZT-1027, a novel synthetic dolastatin 10 derivative, for the treatment of patients with non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(1): 173-180.
- [12] Yamamoto N, Andoh M, Kawahara M, et al. Phase I study of TZT-1027, a novel synthetic dolastatin 10 derivative and inhibitor of tubulin polymerization, given weekly to advanced solid tumor patients for 3 weeks [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(2): 316-321.
- [13] Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, et al. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(11): 3062-3066.
- [14] Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, et al. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 276(1/2): 113-119.
- [15] Al-Benna S, Shai Y, Jacobsen F, et al. Oncolytic activities of host defense peptides [J]. *Inter J Mol Sci*, 2011, 12(11): 8027-8051.
- [16] Wasaki T, Ishibashi J, Tanaka H, et al. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface [J]. *Peptides*, 2009, 30(4): 660-668.
- [17] Kleeff J, Ishiwata T, Kumbasar A, et al. The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(9): 1662-1673.
- [18] Suhovskih AV, Mostovich LA, Kunin IS, et al. Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer [J]. *ISRN Oncol*, 2013, 2013: 680136.
- [19] Zahid M, Lu X, Mi Z, et al. Cationic and tissue-specific protein transduction domains identification, characterization, and therapeutic application [J]. *Adv Genet*, 2010, 69, 83-95.
- [20] Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1/2): 55-70.
- [21] Hallock KJ, Lee DK, Omnaas J, et al. Membrane composition determines pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption [J]. *Biophys J*, 2002, 83(2): 1004-1013.
- [22] Cafiso DS. Alamethicin: A peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1994, 23, 141-165.
- [23] Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides [J]. *Biopolymers*, 1998, 47(6): 451-463.
- [24] Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, et al. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation [J]. *Biochemistry*, 1996, 35(35): 11361-11368.
- [25] Hallock KJ, Lee DK, Ramamoorthy A. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain [J]. *Biophys J*, 2003, 84(5): 3052-3060.
- [26] Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides [J]. *Biopolymers*, 2002, 66(4): 236-248.
- [27] Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(9): 1529-1539.
- [28] Mai JC, Mi Z, Kim SH, et al. A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(21): 7709-7712.
- [29] Li H, Kolluri SK, Gu J, et al. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3 [J]. *Science*, 2000, 289(5482): 1159-1164.
- [30] Lee HS, Park CB, Kim JM, et al. Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide [J]. *Cancer Lett*, 2008, 271(1): 47-55.
- [31] Cassidy J, Misset JL. Oxaliplatin-related side effects: Characteristics and management [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(5 Suppl 15): 11-20.
- [32] Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, et al. Doxorubicin-induced apoptosis: Implications in cardiotoxicity [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234-235(1/2): 119-124.
- [33] Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: Retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1859-1876.
- [34] Hui L, Leung K, Chen HM. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(5): 2811-2816.
- [35] Alberici L, Roth L, Sugahara KN, et al. De novo design of a tumor-penetrating peptide [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 804-812.
- [36] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors [J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(6): 510-520.
- [37] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs [J]. *Science*, 2010, 328(5981): 1031-1035.
- [38] De G, Ko JK, Tan T, et al. Amphipathic tail-anchoring peptide is a promising therapeutic agent for prostate cancer treatment [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(17): 7734-7747.
- [39] Zuo HD, Yao WW, Chen TW, et al. The effect of superparamagnetic iron oxide with iRGD peptide on the labeling of pancreatic cancer cells in vitro: A preliminary study [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 852352.

[收稿日期] 2014 - 07 - 23

[修回日期] 2014 - 10 - 27

[本文编辑] 黄静怡