论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0634-04

HP-10对结肠癌LoVo细胞体内外增殖的影响

卢 芳[1],徐 祥[2],梁华平[2],杨 雪[2],范 霞[2],魏 强[2],王 希[2],鲍依稀[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院检验科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 通过体内外实验检测六肽分子HP-10的细胞内转导能力和抗LoVo细胞增殖活性。**方法** MTT法观察75、37.5、18.75 μmol/L HP-10对人结肠癌LoVo细胞增殖的影响,运用激光共聚焦显微术和流式细胞仪分别检测HP-10的LoVo细胞内转导能力以及对LoVo细胞周期和凋亡的影响;建立LoVo细胞裸鼠皮下移植瘤模型,验证750、375、75 μmol/L HP-10在体内的抗结肠癌生长作用。**结果** 75、37.5、18.75 μmol/L HP-10对LoVo细胞体外增殖有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性抑制($P<0.05$);HP-10能直接跨膜进入LoVo细胞并促进LoVo细胞凋亡发生,但对其周期无明显影响;在结肠癌模型上HP-10能显著地抑制肿瘤生长($P<0.05$)。**结论** HP-10是一种无需穿膜肽引导可直接进入细胞的寡肽,在体内外对LoVo细胞具有明显的抑制生长作用,这种作用是通过诱导细胞凋亡产生的。

[关键词] 抗肿瘤;结肠癌;寡肽

[中图法分类号] R341.6; R73-36; R735.35 **[文献标志码]** A

Effects of HP-10 on proliferation of human colon adenocarcinoma LoVo cells *in vitro* and *in vivo*

Lu Fang[1], Xu Xiang[2], Liang Huaping[2], Yang Xue[2], Fan Xia[2], Wei Qiang[2], Wang Xi[2], Bao Yixi[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Depeartment 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the *in vitro* and *in vivo* effects of HP-10, a hexa-peptide β-Ala-Arg-Leu-Arg-Trp-Arg, on the proliferation of human colon adenocarcinoma LoVo cells and the penetration ability of HP-10 into the LoVo cells. **Methods** MTT assays were used to identify the effects of HP-10 on the LoVo cells at 75, 37.5 or 18.75 μmol/L. The membrane permeable effect of HP-10, the cell cycle and apoptosis were determined by confocal laser fluorescence microscopy and flow cytometry respectively. Then the model of colon cancer of nude mice was established with implantation of LoVo cells (3×10^6) and the therapeutic effect of HP-10 at concentrations of 750, 375 and 75 μmol/L respectively was observed. **Results** HP-10 markedly inhibited the proliferation of LoVo cells in a dose-dependent manner ($P<0.05$). HP-10 was able to transduce directly into LoVo cells and further induce cell apoptosis ($P<0.05$), but had no effect on cell cycle ($P>0.05$). Moreover, the growth of tumors was inhibited obviously by HP-10 in this adenocarcinoma model ($P<0.05$). **Conclusion** HP-10 is an oligopeptide able to directly transduce into cells without the coupling cell-penetrating peptide. It can inhibit the growth of LoVo cells *in vitro* and *in vivo* through inducing cell apoptosis.

[Key words] antitumor; colon adenocarcinoma; oligopeptide

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672414). Corresponding author: Bao Yixi, Tel: 86-23-63693729, E-mail: yixibao@163.com

近20年来,多肽在肿瘤治疗中的应用受到了广泛的关注。和传统治疗手段相比,多肽具有容易制备,抗原性弱,毒副作用小等优点[1]。许多多肽分子因为相对分子质量相对较大、疏水性低等种种原因不能直接穿膜进入细胞内发挥作用,需要依靠细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs)介导入胞。这样不仅增加了研究成本,同时也在一定程度上限制了此类多肽的开发和临床应用。本实验室通过化学合成出系列多肽,经过反复的筛选和改构,获得了六肽小分子,命名为HP-10。本实验发现,HP-10既具有显著的细胞毒性,还可以直接入胞发挥作用。本研究以LoVo细胞

[基金项目] 国家自然科学基金(30672414)

[通信作者] 鲍依稀,电话:(023)63693729,E-mail:yixibao@163.com

为例观察 HP-10 在体内外的抗肿瘤活性,为将其发展为有效的抗肿瘤药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

细胞和动物:人结肠癌 LoVo 细胞、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和人肺癌 A549 细胞均由重庆医科大学病理实验室赠予,常规培养在含 10% 小牛血清的 RPMI1640,添加 100 U/ml 的青霉素-链霉素;35 只 4~6 周龄雌性 BALB/c-nu/nu 裸小鼠,体质量 18~20 g,购自中国科学院上海实验动物中心,按 SPF 级标准饲养。

主要试剂:HP-10 的氨基酸序列为 β-Ala-Arg- Leu-Arg-Trp-Arg,相对分子质量 857.04。HP-10 和 FITC 标记 HP-10 均由上海辉瑞公司代为合成(纯度≥98%)。用 PBS 配制成 750 μmol/L 的浓度储存于 -70 ℃;RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司;小牛血清购自兰州民海生物工程有限公司;MTT,二甲亚枫(DMSO),SDS 均购自 Sigma 公司;Annexin Ⅴ-FITC/PI 凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 体外实验

1.2.1.1 MTT 法测细胞活性 对数生长期的 LoVo 细胞以 1×10^4/孔接种于 96 孔板,贴壁 4 h 后,加入同体积的药物和 PBS 培养 48 h。设置 5 个组:75、37.5、18.75 μmol/L 终浓度 HP-10 为实验组;15.4 μmol/L 5-Fu 为阳性对照组;相应体积 PBS 为阴性对照组($n=4$)。48 h 后加入 5 g/L MTT 20 μl/孔作用 4~6 h,然后加入 20% SDS,每孔 50 μl,37 ℃放置过夜,次日在酶标仪(Bio-Rad)570 nm 波长下比色,读取光密度值[$D(570)$],以光密度代表细胞活性大小,反映 HP-10 对细胞活性的抑制强弱。计算细胞增殖抑制率,每一实验条件至少重复 3 次。

细胞增殖抑制率 = [1 - 用药组 $D(570)$/对照组 $D(570)$] × 100%

1.2.1.2 激光共聚焦显微术 检测 HP-10 是否能进入细胞内发挥作用。将 2×10^3/孔 LoVo 细胞接种于 24 孔板,培养 4~8 h 完全贴壁后,加入 150、75、37.5 μmol/L 3 种浓度的 FITC 标记的 HP-10 共培养 2 h,弃上清,4% 多聚甲醛室温下避光固定 20 min,用 0.01 mol/L PBS 稍微摇晃洗涤 3 次,3 min/次;然后加入 10 μg/ml DAPI 染核,在 37 ℃下孵育 3 min,再次用 0.01 mol/L PBS 稍微摇晃洗涤 3 次,3 min/次,甘油封片,激光共聚焦显微镜(Zeiss Axioplan; Carl Zeiss)下检测被染细胞数。计算跨膜效率。

跨膜效率 = (FITC 染色细胞数/DAPI 染色细胞数) × 100%

1.2.1.3 细胞周期分析 将对数生长期 LoVo 细胞接种于 6 孔板中,贴壁 4 h 后,加入 75 μmol/L 药物处理 48 h,用 0.25% 胰酶消化细胞,0.01 mol/L PBS 清洗 2 遍,再用 4 ℃、70% 的冷乙醇固定细胞,4 ℃下过夜。离心弃固定液,PBS 重悬 5 min 后 300 目筛网过滤,加入 PI 染液,4 ℃,避光染色 30 min,流式细胞仪(Becton Dickinson)分析细胞周期。实验重复 3 次。

1.2.1.4 Annexin Ⅴ法检测细胞凋亡 对数生长期的结肠癌 LoVo 细胞分别用 75 μmol/L HP-10 及相应剂量的 PBS 处理 48 h 后,用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,4 ℃ 预冷的 PBS 洗 2 次,250 μl 结合缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度为 1×10^6/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 120 μg/ml 的 PI,混匀后于室温避光孵育 15 min,反应管中加 400 μl PBS,流式细胞仪检测。

1.2.2 体外实验 取对数生长期 LoVo 细胞,PBS 调整浓度为 3×10^7/ml,裸鼠左腋下靠背部皮下注射细胞悬液 100 μl。采用随机数字表法将裸鼠分成 5 组,HP-10 750、375 μmol/L 和 75 μmol/L 等 3 个浓度治疗组、PBS 阴性对照组和未注射空白对照组($n=7$)。接种后 10 d,治疗组和 PBS 组分别给予不同浓度药物和 PBS 瘤内注射 50 μl/次,隔日治疗,共治疗 7 次;每次注射前测小鼠体质量、饮食、排便情况,用游标卡尺测量肿瘤结节的最大直径(a)和最小直径(b),计算出肿瘤体积($V=ab^2/2$)。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS 13.0 统计软件,组间均数比较采用 t 检验,多组均数比较用方差检验。

2 结果

2.1 HP-10 对 LoVo 细胞体外增殖的抑制作用

结果显示 HP-10 对 LoVo 细胞有显著的抑制作用,且呈剂量依赖性抑制($P<0.05$)。终浓度 75、37.5、18.75 μmol/L HP-10 作用于 LoVo 细胞 48 h 后最大抑制率可分别达到(44.79±7.50)%、(37.84±5.42)%、(32.26±6.11)%。15.4 μmol/L 5-Fu 作用于 LoVo 细胞抑制率为(27.36±2.32)%,同较低浓度 HP-10 相比,二者抑制增殖作用相当。

2.2 HP-10 能直接穿膜进入 LoVo 细胞

3 种浓度的 FITC 标记 HP-10 与 LoVo 细胞共同培养 2 h 后行激光共聚焦检测,各视野下所见细胞内均检测到绿色荧光,绿色荧光除了主要定位于细胞质内,还定位于细胞核内。说明 2 h 后 HP-10 即可以进入到细胞内发挥作用。各浓度 FITC-HP-10 的 2 h 跨膜效率均为 100%。见图 1。

2.3 HP-10 对 LoVo 细胞增殖周期无影响

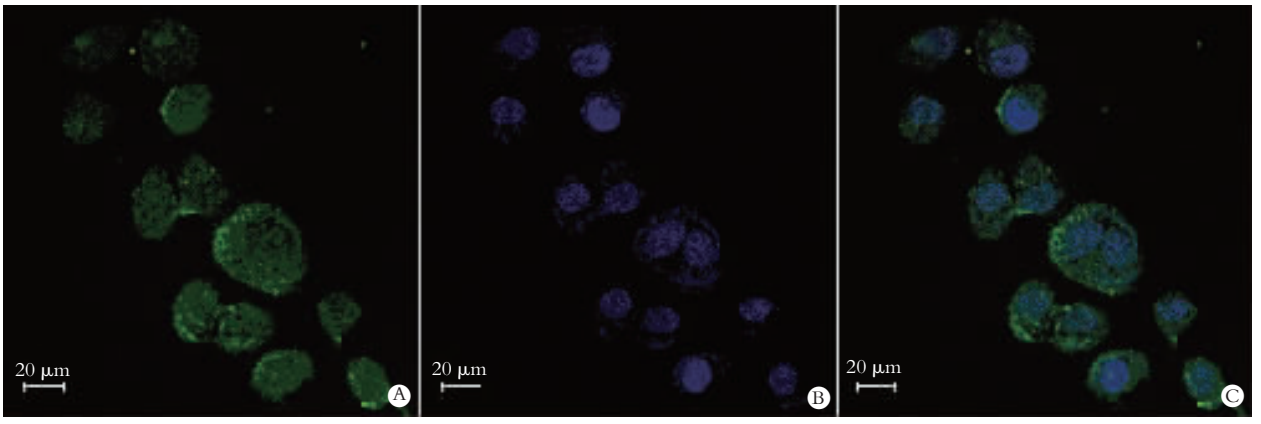
经 75 μmol/L HP-10、15.4 μmol/L 5-Fu 处理 LoVo 细胞后 48 h,测定细胞周期,结果发现,与 5-Fu 阳性对照组相比,阴性对照组细胞与处理组细胞 G_0/G_1 期、S 期、G_2/M 期均无显著性差异($P>0.05$)。见图 2。

2.4 HP-10 诱导 LoVo 细胞发生凋亡

经 HP-10 75 μmol/L 处理 48 h 后,LoVo 细胞凋亡率与阴性对照组 LoVo 细胞凋亡率相比有显著性差异[(12.96±1.51)% *vs* (5.17±0.85)%,$P<0.05$]。见图 3。

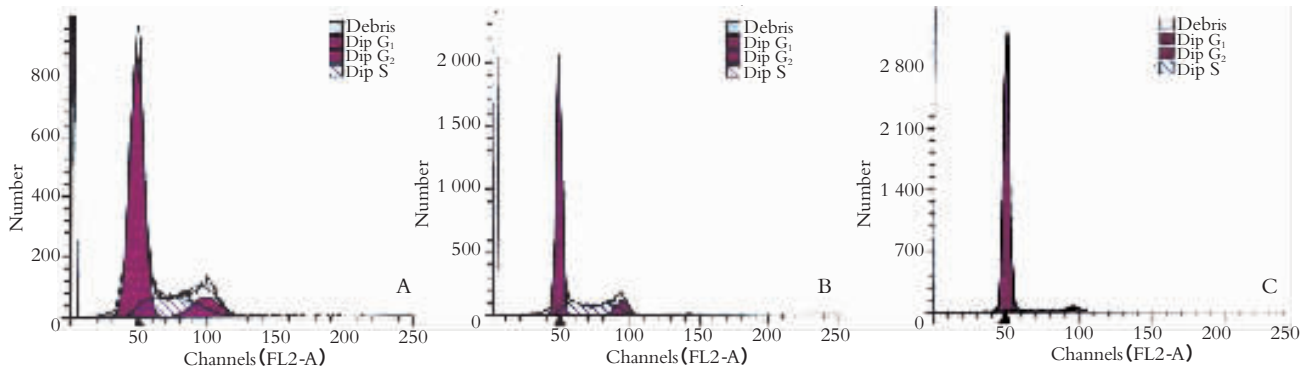
2.5 HP-10 对 LoVo 细胞异种移植瘤模型有抑制生长的作用

实验结果证明,瘤内注射 HP-10 能显著抑制肿瘤生长,和空白对照组和 PBS 阴性对照组相比具有显著性差异($P<0.05$),而 PBS 阴性对照组同空白对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。高、中、低浓度组间无显著性差异($P>0.05$),这说明 750、375 μmol/L 和 75 μmol/L 3 个浓度瘤内注射治疗效果相似,75 μmol/L 足以抑制肿瘤生长。见图 4。药物治疗期间无小鼠死亡,说明 HP-10 在 75~750 μmol/L 浓度范围对小鼠没有明显的毒副作用。



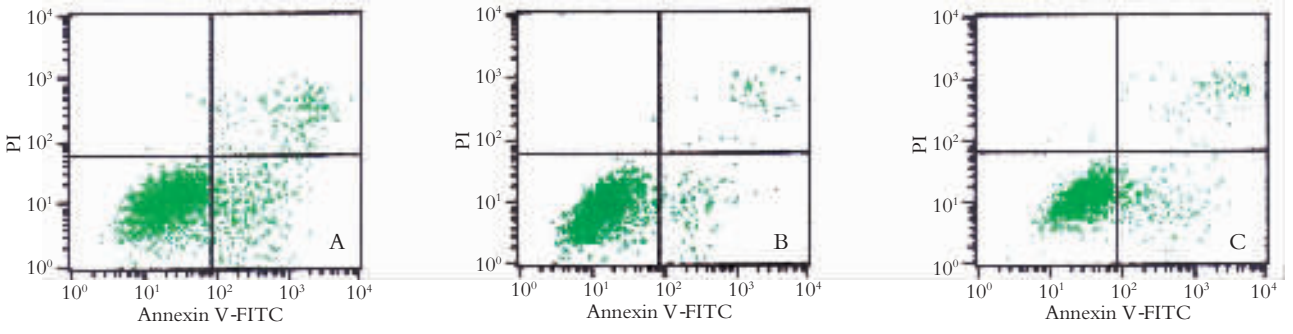
A：FITC；B：DAPI；C：FITC和DAPI双标记

图1 75 μmol/L FITC标记HP-10的LoVo内细胞跨膜能力 （激光共聚焦显微镜）



A:75 μmol/L HP-10 实验组;B:阴性对照组;C:5-Fu 阳性对照组

图2 流式细胞仪检测75 μmol/L HP-10对LoVo细胞周期的影响



A:75 μmol/L HP-10 实验组;B:阴性对照组;C:5-Fu 阳性对照组

图3 Annexin V法检测75 μmol/L HP-10对LoVo细胞凋亡的影响

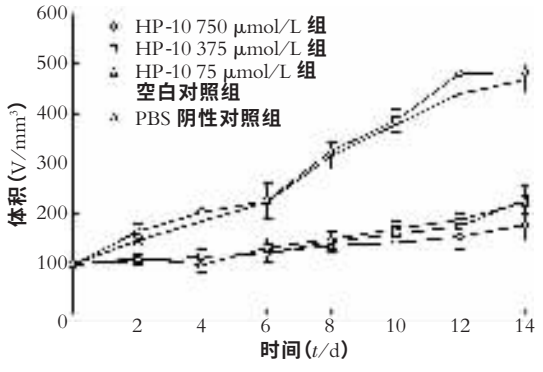


图4 不同浓度HP-10对LoVo细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=7$)

3 讨论

HP-10是从以NF-κB p50/p65异源二聚体中的p65亚基作为靶点，应用酵母双杂交技术筛选得到的与p65亚基同源结构域（RHD）相互作用的系列多肽[2]中挑选出来，并通过大量改构和筛选获得的小分子六肽。在对系列多肽进行改构的过程中发现，经改构后的部分多肽（包括HP-10）与p65的结合能力逐步降低，而抗肿瘤生长活性逐步增加。本研究发现，在MTT实验中，HP-10可以显著地抑制人结肠癌LoVo细胞且其作用和5-Fu相当，同时也可以抑制人乳腺癌

231细胞的增殖和活性,但对肺癌A549细胞抑制作用不明显(文中未列出)。而在前人的研究和报道中,多次提到A549细胞的生长和转移与NF-κB活化密切相关,抑制NF-κB活化也能显著的抑制A549细胞生长[3-5]。因此我们考虑HP-10可能是个多作用靶点物质。

激光共聚焦显微镜下,我们观察到HP-10可以穿透细胞膜进入到细胞内发挥作用。不仅可以进入到细胞浆内,还可以穿透核膜进入细胞核内发挥作用。从设计上来看,HP-10不含任何穿膜肽,说明HP-10在不需要穿膜肽的引导下可以直接穿透胞膜,进入胞内。细胞穿膜肽多肽药物[6,7]是现在国内外比较惯用的一种新技术,通过以无耗能、无受体介导的形式穿过真核细胞膜,广泛的应用于介导高活性的生物大分子物质入胞中。CPPs具有许多优点,在不改变原有物质的活性基础上可以介导比它大100倍的物质进入细胞,且普遍认为穿膜肽本身不具有任何细胞毒性。人肿瘤抑制基因 $p21^{WAF/CIP}$ 模拟物[8]、单链抗体可变区片段scFv[9]和多柔比星[10]等物质就成功地利用穿膜肽转导到细胞内。但最近,穿膜肽的无细胞毒性的观点却受到了质疑,研究发现直接注射到小鼠脑部会引起炎症反应和神经毒性[11]。显然,同依靠穿膜肽介导的物质相比,HP-10具有更高的效率和实用性。

细胞周期一共有4期,细胞依次经过G_1期、S期、G_2期、M期,完成其增殖过程。在哺乳动物细胞中,存在G_1/S、S和G_2/M等一系列细胞周期调控检验点。通过调控这些检测点,可以阻止肿瘤细胞周期,有效地控制肿瘤的发展、提高肿瘤的治疗效果。大多数的抗肿瘤药物都会引起细胞周期改变,特异性地杀伤某一期细胞,从而起到抗肿瘤作用。比如阿糖胞苷、甲氨蝶呤等代谢类药物主要作用于S期细胞,长春新碱、长春碱等植物药则作用于M期。本实验中,75 μmol/L的HP-10作用LoVo细胞后48 h,并不能引起细胞周期改变。提示HP-10可能是通过细胞周期非依赖途径发挥作用。因此为了进一步探讨可能的作用机制,我们分析了细胞凋亡情况。

Annexin Ⅴ细胞凋亡检测结果显示,HP-10可以诱导LoVo细胞凋亡发生。细胞凋亡与肿瘤的发生、发展有关,细胞凋亡的抑制可以促进肿瘤的形成和恶化[12]。相反,通过诱导肿瘤细胞发生凋亡可以抑制肿瘤的生长。细胞凋亡主要有3个通路:内源性(死亡受体途径)、外源性(线粒体途径)和穿孔素粒酶B途径[13]。3条途径最终以caspase 3为汇合点,导致凋亡的发生。实验的下一步目标是从下往上追溯,寻找HP-10诱导凋亡的途径和它的作用靶点。

载体实验结果显示,HP-10可以显著的抑制移植瘤瘤体生长,且750、375 μmol/L和75 μmol/L浓度组间没有显著性差异,这说明75 μmol/L以上浓度的HP-10没有量效差异,75 μmol/L浓度足以抑制肿瘤生长。同时,治疗期间未发现HP-10有明显的毒副作用。

综上,HP-10是一种无需穿膜肽辅助的可穿膜六肽分子,对LoVo细胞具有明显的抑制作用,诱导LoVo细胞凋亡,而不影响其周期变化。为了排除非特异性抗肿瘤作用,我们同时设计了突变阴性肽,其对照实验及靶点和作用机制研究仍在进行。

参考文献:

[1] 曾名嘉, 张冬梅, 陈均辉. 抗肿瘤多肽研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 139-141.
[2] 徐祥, 梁华平, 刘昕, 等. NF-κB p65亚基DNA结合域相互作用多肽的筛选及功能鉴定[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(2): 132-136.
[3] 张建, 徐永健, 熊维宁, 等. 转染IκBα基因抑制NF-κB活性对A549细胞侵袭行为的影响[J]. 癌症, 2008, 27(7): 710-715.
[4] Karin M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression[J]. Nature, 2006, 441(7092): 431-436.
[5] Hou Y, An J, Hu X R, *et al*. Ghrelin inhibits interleukin-8 production induced by hydrogen peroxide in A549 cells *via* NF-kappa B pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(1): 120-126.
[6] Deshayes S, Morris M C, Divita G, *et al*. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(16): 1839-1849.
[7] 吴强, 徐祥, 梁华平, 等. 穿膜肽的结构特点和穿膜机制[J]. 生命的化学, 2005, 25(4): 304-306.
[8] Tunnemann G, Martin R M, Haupt S, *et al*. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells[J]. FASEB J, 2006, 20(11): 1775-1784.
[9] Jain M, Chauhan S C, Singh A P, *et al*. Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors[J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7840-7846.
[10] Liang J F, Yang V C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(22): 5071-5075.
[11] Bolton S J, Jones D N, Darker J G, *et al*. Cellular uptake and spread of the cell-permeable peptide penetratin in adult rat brain[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(8): 2847-2855.
[12] Kerr J F, Winterford C M, Harmon B V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013-2026.
[13] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.

(**收稿**:2009-10-16;**修回**:2009-12-10)
(编辑 栾 嘉)