

The effects of SCP on endothelial cell migration and angiogenesis were measured by the cell migration experiment and the chicken embryo chorioallantoic membrane experiment, respectively. The results showed that the cytoskeleton of endothelial cell was wrinkled, and SCP inhibited the migration of endothelial cell, the inhibitory rate was concentration dependent. SCP also inhibited the angiogenesis in the

chorioallantoic membrane of chicken embryos significantly. These results suggest that SCP has the inhibitory effect on angiogenesis, and the mechanism may be that SCP inhibits the cytoskeleton of endothelial cell, so inhibits the cell's migration, and so inhibits angiogenesis.

Key words shark, cartilage, angiogenesis, cytoskeleton, chicken embryo chorioallantoic membrane, endothelial cell

抗菌肽 CM4 抗 K562 癌细胞的超微结构研究*

张双全 贾红武 戴祝英
(南京师范大学生物系, 南京 210097)

摘要 报道了家蚕抗菌肽 CM4 抗 K562 癌细胞的体外实验研究. 结果表明: 纯化后的家蚕抗菌肽 CM4 对培养的 K562 (人髓样白血病细胞) 有很强的杀伤作用. 用扫描和透射电镜观察超微结构以及用激光共聚焦显微断层图像分析, 表明微量纯化的抗菌肽 CM4 能使 K562 癌细胞产生一系列的病理变化, 可造成细胞高度肿胀, 膜与胞质分离, 细胞器和膜结构排列紊乱, 细胞表面微绒毛消失, 出现不规则的孔洞, 细胞骨架严重破坏, 膜局部结构破裂, 缺损, 胞浆内容物大量外泄, 最终细胞解体, 崩解成碎片.

关键词 抗菌肽, 癌细胞, 超微结构

自 Boman 教授^[1]发现并首先测定了惜古比天蚕 (*Hyalophora cecropin*) 抗菌肽一级结构和抗菌谱以来, 不少学者进而研究了其抗癌活性. 日本东京大学的名取俊二教授^[2]从棕尾别麻蝇幼虫中分离到两种抗菌肽, 能促进小鼠巨噬细胞及异型核白细胞对癌细胞的攻击作用, 又能使细胞产生干扰素, 并使肿瘤坏死因子活化. 1988 年美国路易斯安娜大学的 Jaynes 等^[3]从天蚕蛾中分离到一种全能性肽 (an all-purpose peptide), 对多种细菌、病毒、原虫及癌细胞均有很强的杀伤作用. 戴祝英等^[4]观察到家蚕抗菌肽及免疫血淋巴对 B4 转化细胞有明显的杀伤作用, 使之不能贴壁和正常生长. 黄自然等^[5]观察到柞蚕免疫血淋巴对鼻咽癌细胞株的细胞膜有破坏作用. 韩献萍

等发现柞蚕抗菌肽 D 对宫颈癌细胞有明显的杀伤作用. 郭玉梅等^[6]用透射电镜观察到家蚕抗菌肽对 K562 (人髓样白血病) 细胞有明显的杀伤作用. 我们从不同的蚕免疫血淋巴中分离纯化了一系列的抗菌肽^[7], 并测定了抗菌肽的 CM4 组分的一级结构^[8]. 用纯化的抗菌肽 CM4 组分^[9]研究了对体外培养的 K562 癌细胞的杀伤作用. 结果表明抗菌肽 CM4 对培养的 K562 (人髓样白血病) 细胞具有明显的杀伤作用. 用透射和扫描电子显微镜及激光共聚焦显微断层图像分析, 观察到抗菌肽首先作用于癌细胞的细胞膜, 使之肿胀, 细胞表面

* 国家自然科学基金资助项目, 国家教育委员会留学回国人员资助费支持项目.
收稿日期: 1996-04-02, 修回日期: 1996-07-29

的微绒毛消失, 外膜剥离形成不规则的孔洞, 细胞结构严重破坏. 胞浆内容物大量外泄, 细胞崩解成碎片.

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕滞育蛹: 苏 5× 苏 6, 丰 1× 54A, 中国农科院镇江蚕业研究所提供. 诱导源: 大肠杆菌 (*E. coli* k12D31), 中国科学院上海生物化学研究所屈贤铭赠送. 癌细胞: K562 (人髓样白血病细胞), 南京军区八一医院肿瘤实验室提供. 试剂: 细胞培养液为日本进口分装; 分离纯化试剂: CM-Sepharose CL-6B 为 Pharmacia 公司产品; Tryptone、Yeast Extract 为 OXOID 公司产品; 丙烯酰胺为 Sigma 公司产品, 甲叉双丙烯酰胺为 Aldrich 公司产品; 其他试剂除注明外均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 蚕蛹诱导: 基本上按戴祝英等^[9]介绍的方法进行.

1.2.2 免疫血淋巴的制备: 参照屈贤铭等^[8]的方法.

1.2.3 电泳及抗菌活力测定: 参照 Hultmark 等^[10]的方法.

1.2.4 抗菌肽的纯化: 抗菌肽 CM4 组分的纯化参照屈贤铭等^[7]的方法.

1.2.5 扫描电镜的制样及抗菌肽对 K562 细胞杀伤作用的观察: 常规培养 K562 肿瘤细胞至对数生长期, 用新鲜培养液配制成活细胞数为 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$ /ml, 接种到 96 孔培养板上, 每孔 100 μ l, 培养到细胞数为 10^6 /ml, 将抗菌肽用培养液配制成 1 g/L, 取 25 μ l 加入培养的细胞中, 阴性对照加 25 μ l 的培养液, 每组重复六个孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养 36 h, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入戊二醛固定, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液换洗三次, 1% 锇酸固定, 清洗, 常规梯度脱水, 置换, 临界点干燥, 镀膜 IB, 用日本明石 SX-40 型扫描电镜观察.

1.2.6 透射电镜制样及抗菌肽对 K562 癌细

胞杀伤作用的观察: 取对数生长期的 K562 细胞, 1 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 用新鲜的 1640 培养液稀释成 3.6×10^6 /ml (活细胞数为 94.4%) 的细胞悬液, 实验组加浓度为 2 g/L 的抗菌肽 10 μ l, 对照组加 10 μ l 新鲜的 1640 培养液. 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养 30 min, 室温低速离心, 弃上清液, 再用 1640 培养液洗两次, 加 4% 戊二醛固定 4 h, 再用 1% 琼脂进行预包埋, 然后用 1% 锇酸进行第二次固定 2 h. 按常规方法丙酮逐级脱水, Epon 812 环氧树脂原位包埋. LKB Reichert-Jung 超薄切片机切片, 醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染. 日立 H-600 型透射显微镜观察.

1.2.7 抗菌肽对 K562 癌细胞作用的激光共聚焦显微断层图像分析: 取 100 μ l 上述细胞悬液, 加浓度为 2 g/L 的抗菌肽 CM4 10 μ l, 另取 100 μ l 上述细胞悬液, 加 1640 新鲜细胞培养液 100 μ l 为对照组. 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 , 恒温条件, 分别培养 10、15 和 30 min, 用 Bio-Rad 激光共聚焦显微系统进行断层图像分析.

2 结 果

a. 抗菌肽作用于肿瘤细胞后的扫描电镜观察: 图 1 结果表明体外培养的 K562 肿瘤细胞经抗菌肽 CM4 组分作用 36 h, 细胞表面正常的微绒毛消失, 出现散在的不规则的孔洞, 外膜剥离, 细胞膜骨架严重破坏, 细胞内容物大量外泄, 至细胞彻底死亡. 而未经抗菌肽处理的对照组癌细胞结构完整无破损, 表面具有微绒毛.

b. 抗菌肽作用于肿瘤细胞后的透射电镜观察: 图 2 结果表明培养的 K562 肿瘤细胞经抗菌肽 CM4 组分作用 30 min, 细胞高度肿胀, 形成大的花样突起, 核膜有缺损, 膜与胞质分离, 核内出现不明颗粒, 色深, 细胞膜突起, 膜局部破裂, 细胞内容物大量外泄, 对照组细胞结构完整.

c. 抗菌肽作用于癌细胞后的激光共聚焦图像断层显微观察: 图 3 结果表明培养的 K562 癌细胞经抗菌肽 CM4 作用 10 min, 细胞

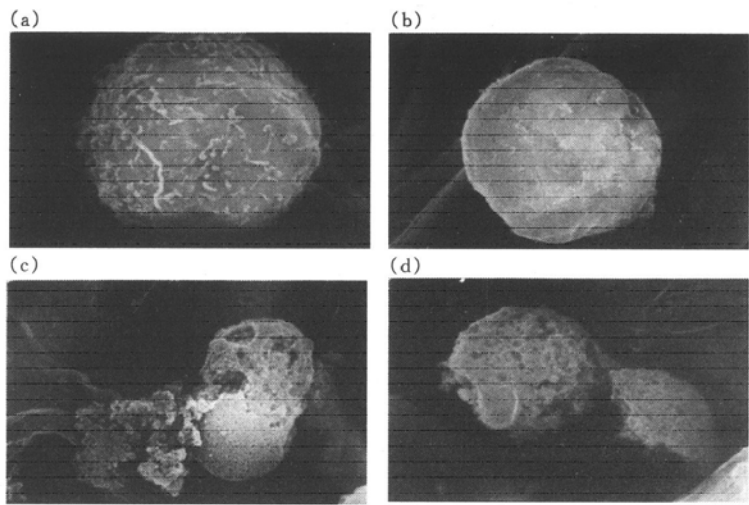


图 1 抗菌肽 CM4 对 K562 肿瘤细胞作用的扫描电镜观察

(a) 未经抗菌肽处理, $\times 7\,000$, 为正常肿瘤细胞的外形, 表面具有微绒毛, 结构完整, 无破损. (b) 经抗菌肽处理 24 h, $\times 5\,000$, 细胞表面的微绒毛消失, 外膜可见散乱的小孔. (c) 经抗菌肽处理 36 h, $\times 7\,000$, 细胞结构破坏严重, 胞膜大部分剥离, 部分区域形成大的不规则的孔洞, 细胞内容物大量外泄. (d) 经抗菌肽处理 36 h, $\times 5\,000$, 胞膜全部剥离, 细胞骨架严重破坏, 以致细胞完全崩解死亡.

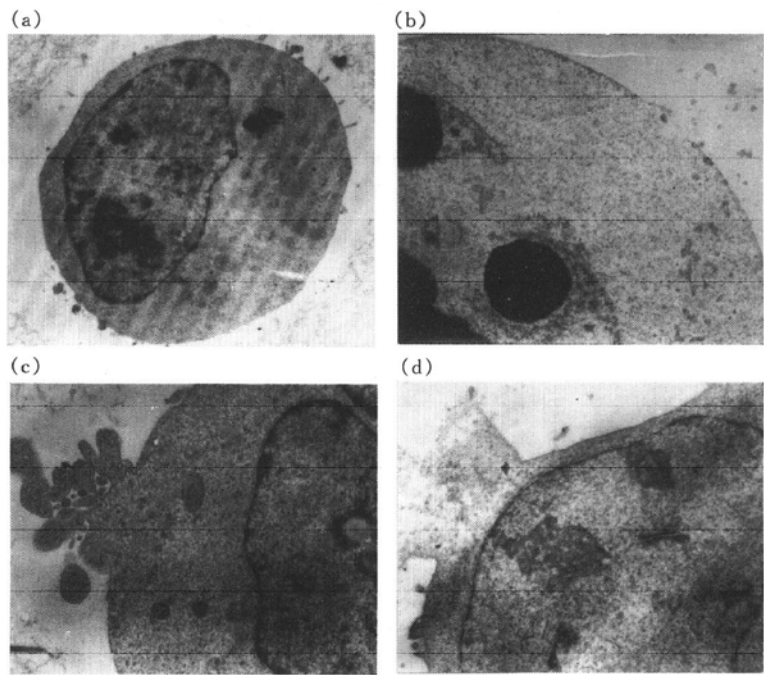


图 2 抗菌肽 CM4 组分对 K562 肿瘤细胞作用的透射电镜观察

(a) 未经抗菌肽处理, $\times 5\,000$, 细胞呈圆形, 可见细胞核, 线粒体, 细胞结构完整. (b) 经抗菌肽处理 30 min, $\times 10\,000$, 细胞高度肿胀, 核膜有缺损, 膜与胞质分离, 核内含不明颗粒, 色深, 局部细胞膜破裂, 内容物开始释放. (c) 经抗菌肽处理 30 min, $\times 12\,000$, 形成大的花样突起, 核内的圆形空泡, 为假包涵体. (d) 经抗菌肽处理 30 min, $\times 10\,000$, 细胞膜突起, 破裂, 胞内含物大量外泄.

膜局部出现缺损. 作用 15 min, 细胞器和膜结构严重破坏, 胞内容物大量外泄. 作用

30 min, 细胞解体, 崩解成碎片, 对照组细胞呈圆形, 结构完整.

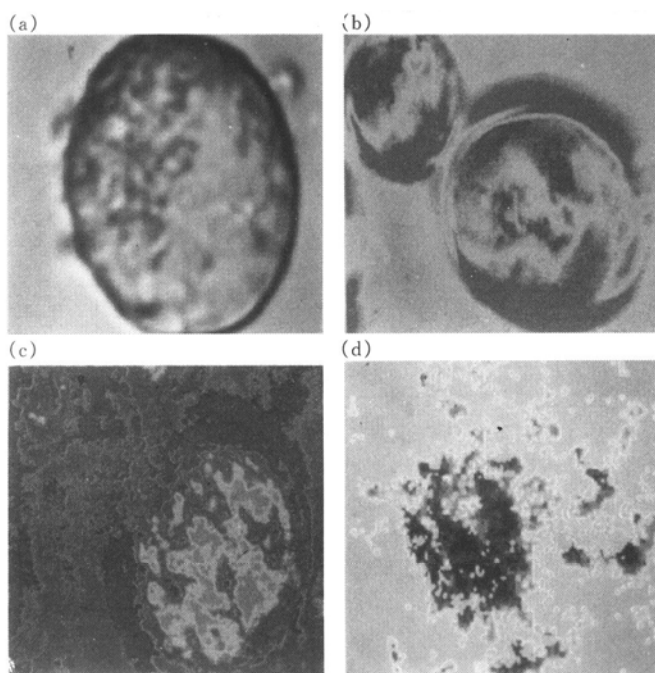


图3 抗菌肽 CM4 组分对 K562 肿瘤作用的激光共聚焦显微观察

(a) 未经抗菌肽处理, $\times 780$, 细胞呈圆形, 结构完整. (b) 经抗菌肽处理 10 min, $\times 600$, 细胞膜局部有缺损, 内容物外泄. (c) 经抗菌肽处理 15 min, $\times 780$, 细胞器和膜结构严重破坏, 缺损, 内容物大量外泄. (d) 经抗菌肽处理 30 min, $\times 780$, 细胞解体, 崩解成碎片.

3 讨 论

由于抗菌肽的结构都是一端疏水, 一端亲水, 疏水端很容易插入质膜内^[11]. 利用这一性质来研究抗菌肽的杀菌机制, 近几年来取得了突破性进展, 认为抗菌肽作用于细胞时, 首先抗菌肽分子 C 端疏水部分插入细菌质膜, 并与膜脂相互作用而形成一个离子通道, 使细胞内 K^+ 大量外渗, 胞内容物质外泄, 以致细胞死亡.

我们用纯化的家蚕抗菌肽 CM4 组分以及蚕免疫血淋巴在整体和离体水平上研究了这类肽对离体培养的癌细胞和不同种类的癌实体瘤的攻击杀伤作用. 结果发现抗菌肽不仅对体外培养的癌细胞有很强的杀伤作用, 而且对体内生长的不同种类的移植性肿瘤也有显著的抑制

作用.

对抗菌肽抗癌作用机制研究的结果表明, 抗菌肽杀死癌细胞机制与杀菌机制不尽相同. 它比杀菌机制更为复杂. 微量纯化的抗菌肽在作用癌细胞的初期, 首先使癌细胞致敏化, 我们观察到当抗菌肽加入癌细胞 10 s, 癌细胞表面有许多绒毛竖立起来, 然后这些微绒毛又消失, 细胞变得高度肿胀, 膜与胞质分离, 膜的表面出现许多不规则的孔洞, 亚细胞器和膜结构排列紊乱, 线粒体肿胀, 膨大, 呈空泡化变性, 膜局部结构破裂, 缺损, 细胞骨架严重破坏, 膜的通透性增加, 胞浆内容物大量外泄, 最终细胞解体, 崩解成碎片. 在这个过程中可能还伴随着一系列的物理与化学变化过程. 此外, 我们也注意到抗菌肽 CM4 组分的抗癌活性比 β 组分要强, 这和它们的抗菌活性相一

致. CM4 组分相当于天蚕 Cecropin B 组分, 是抗菌活性最强的组分, 它的等电点偏高, 碱性氨基酸含量多.

Steiner 等^[12]发现 Cecropin 和 Cecropin 结构类似物均能有效地结合到细菌膜表面上, 而哺乳动物的红细胞对 Cecropin 有抗性^[13]. 我们在过去的实验中也曾发现家蚕抗菌肽 β 组分和 CM4 组分能作用于 K562 癌细胞, 而不能作用于正常人红血球细胞.

柞蚕抗菌肽 D 也具有同样的性质. 这一有趣的现象表明, 抗菌肽可能具有识别“非己”的能力. 抗菌肽杀菌和抗菌机制中还可能存在一结合物与受体的关系. 这些未知的现象还有待于进一步深入研究.

抗菌肽抗癌作用机制的研究在国内外正日益受到重视, 因为这种小分子全能性肽具有水溶性好, 热稳定, 没有抗原性及生物学活性高等优点, 很有可能被开拓成一类多肽抗癌新药^[14].

致谢 本文是在华南农业大学黄自然教授的热情关心和指导下完成, 激光共聚焦显微断层分析照片由华南师范大学激光室谭石慈教授协助制作, 在此一并致谢.

参 考 文 献

1 Boman H G, Steiner H. Humoral immunity in *cecropia pupae*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1981, **94~ 95**: 75~ 89
2 名取俊二. 初期防御 I ニ关与ょう体液杀菌因子: II, ら机能シニッベテ. 生体防御, 1986, **3**: 331~ 338
3 Jaynes J. Lytic peptides: a magic bullet? *Biotechnology News*, 1990, **10** (1): 8
4 戴祝英, 张双全, 张锡然等. 一些理化因素诱导蚕产生抗菌物质及其作用的研究. 见: 江苏省科学技术协会编. 江苏省生物技术研讨会文集. 江苏: 江苏省科学技术协会, 1989. 224~ 227
5 黄自然, 郑庭辉, 梁怡章等. 柞蚕抗菌肽的抑菌效应. *科学通报*, 1985, **14**: 1107~ 1109
6 郭玉梅, 戴祝英, 胡云龙. 家蚕抗菌肽的一些性质及抗肿瘤活性. *南京师大学报 (自然科学版)*, 1985, **18** (1): 62~ 67
7 屈贤铭, 吴克佑, 邱雪贞等. 经聚肌胞核苷酸诱导家蚕蛹血淋巴六种抗菌肽的分离与鉴定. *生物化学与生物物理学报*, 1986, **18** (3): 284~ 292

8 Tu Y-Z, Qu X-M, Xu T-S. Purification characterization and structure of CM₂ph₁, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*. *Science in China (Series B)*, 1989, **32** (9): 1072~ 1081
9 戴祝英, 张双全. 大肠杆菌诱导家蚕蛹免疫血淋巴中抗菌物质的分离纯化与鉴定. *南京师大学报 (自然科学版)*, 1988, **2**: 88~ 93
10 Hultmark D, Engstrom Å, Bennich H *et al*. Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components for cecropia pupae. *Eur J Biochem*, 1982, **127**: 207~ 217
11 Boman H G, Faye I, Gudmundsson G H *et al*. Cell-free immunity in cecropia: a model sysytem for antibacterial proteins. *Eur J Biochem*, 1991, **201**: 23~ 31
12 Steiner H, Andreu D, Merrifield R B. Binding and action of cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **939**: 260~ 266
13 屈贤铭, 唐海伦. 柞蚕抗菌肽 B、D 对脂质体的作用. *生物化学与生物物理学报*, 1989, **21** (1): 35~ 41
14 张双全, 屈贤铭, 戚正武. 昆虫免疫及抗菌肽的应用前景. *生物化学杂志*, 1987, **3** (1): 11~ 18

Ultrastructure Observation of K562 Leukemia Cells Treated with Antibacterial Peptide CM4 Component. ZHANG Shuangquan, JIA Hongwu, DAI Zhuying (*Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*).

Abstract The effect of antibacterial peptide CM4 component act on the K562 cancer cells *in vitro* is reported. The tests showed that: the purified antibacterial peptide CM4 component can kill human myelogenous leukemia cancer (K562). The observation of ultrastructure of the cancer treated with the antibacterial peptides by using the scanning and transmission electron microscope and the microfault picture analyses of laser confocal microscope. The results showed that the pruiified antibacterial peptides brought about a series of pathological changes on cancer cells. As a result, the cells were high swelling, plasmolysis and disorders in subcellular and membrane structrue occurred, outer coat of cell dissolved, thus appearing irregular holes opening in a utensil and serious broken of skeleton structure of the cells. The membrane structure of some areas was broken and injured and intracel-lular substances leaked out. As a result, the cells disintegrated into small fragmants and died.
Key words antibacterial peptide, cancer cell, ultrastructure