



## 家蝇幼虫凝集素的分离纯化及其抑制 MCF-7 细胞活性的研究

曹小红, 霍 哲, 王春玲, 鲁梅芳

(天津市食品营养与安全重点实验室, 天津科技大学食品科学与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 家蝇幼虫血淋巴粗提液经过亲和层析, 分离出 3 种与 D-半乳糖特异性结合的蛋白, 经高效液相色谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离出分子质量为 38 ku 的家蝇幼虫凝集素 (MLL-2), 该组分具有明显的凝血活性. 圆二色谱结果表明, MLL-2 的二级结构主要是以  $\beta$  折叠 (80.3%) 和无规卷曲 (19.5%) 的构象存在. MTT 实验结果显示, MLL-2 对人乳腺癌 (MCF-7) 细胞的生长具有明显的抑制作用, 其抑制效果具有时间和浓度依赖性. 形态学观察表明, MLL-2 处理过的 MCF-7 细胞出现凋亡小体、染色质浓缩凋亡现象. 经流式细胞仪分析 MCF-7 细胞被阻遏在 G<sub>2</sub>/M 期, 并且凋亡率随作用时间的延长而增加. MLL-2 通过诱导 MCF-7 细胞发生凋亡, 从而起到抑制肿瘤细胞生长的作用.

**关键词:** 家蝇幼虫; 凝集素; 二级结构; MCF-7 细胞; 凋亡

中图分类号: Q279 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)02-0001-04

## Purification and Anti-Tumor Activity in MCF-7 Cells of Lectin from *Musca Domestica* Larvae

CAO Xiao-hong, HUO Zhe, WANG Chun-ling, LU Mei-fang

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Biotechnology,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Approximately three D-galactose specific lectins were isolated from the crude extract of *Musca domestica* larvae haemolymph. By HPLC procedure and SDS-PAGE, a new 38 ku *Musca domestica* larvae lectin (MLL-2) was purified ultimately. Circular dichroism detected the main backbone conformations of MLL-2 are  $\beta$ -sheet (80.3%) and random coil (19.5%). Anti-tumor activity of purified lectin was demonstrated by its inhibition on the proliferation of human breast cancer (MCF-7) cells in a time and dose dependent manner. The morphology of MCF-7 cells showed changes such as nuclear chromatin condensation and fragmentation. Flow cytometric analysis also demonstrated that MLL-2 caused apoptosis of MCF-7 cells through cell arrest at G<sub>2</sub>/M phase. MLL-2 induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro, it is a novel anti-breast cancer agent.

**Keywords:** *Musca domestica* larvae; lectin; protein secondary structure; MCF-7 cells; apoptosis

家蝇 (*Musca domestica*) 是一类重要的资源昆虫, 它对病原微生物有着较强的抵抗力. 这是由于蝇蛆体内有多种抗菌体, 如抗菌肽、凝集素、干扰素等物质, 能杀死各种细菌类微生物. 近几年, 凝集素抗肿瘤活性引起越来越多的关注, 有研究证实<sup>[1-2]</sup>, 其与肿瘤细胞表面的特定糖链结合以后会活化胞内核酸

酶, 引起 DNA 降解, 导致细胞死亡. 细胞凋亡 (apoptosis) 也是一种公认的用于肿瘤治疗的方法, 是细胞在一定的生理或病理条件下, 遵循自身的程序, 自己结束其生命的生理性死亡, 是组织发育形成和功能维持必需的生理现象. 有报道表明<sup>[3-4]</sup>, 家蝇幼虫抗菌蛋白具有明显的抗肿瘤效果. 因此, 本文分离纯化出一种

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2008-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20676103); 天津市应用基础研究计划项目 (07JCZDJC02900)

作者简介: 曹小红 (1961—), 女 (回族), 天津人, 教授, 博士生导师.

家蝇幼虫凝集素(MLL-2),对其凝集活力以及二级结构进行了研究,并将 MLL-2 作用于人乳腺癌(MCF-7)细胞,研究其对细胞增殖的影响,以及与细胞凋亡的关系,以期 MLL-2 药用价值的开发提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 家蝇幼虫凝集素的分离提纯

蝇种由天津市卫生防疫站提供,天津科技大学食品卫生与安全研究室饲养。取约 100 g 幼虫加入生物缓冲溶液(BIS)和少量的苯硫脲充分研磨,于 4 °C 以 8 000 r/min 离心 15 min,重复 3 次,除去上层漂浮的脂肪层,保留上清液。将上清液与 Sepharose 4B 于 4 °C 混合 3 h 后装柱,用 BIS 以 1 mL/min 的流量洗脱杂蛋白,至 280 nm 吸光度小于 0.01 时停止,用 0.2 mol/L 的 D-半乳糖解吸附,并控制流量为 1 mL/min,收集吸收峰,并将亲和层析后的溶液进行超滤,脱盐后冻干。

### 1.2 高效液相色谱的分离

将亲和层析后的冻干样品配制成 1 mg/mL 的溶液。选用 TOSOH 公司的 TSK GEL SuperSW3000 系列凝胶过滤液相色谱柱,平衡后,上样 10  $\mu$ L,流量 0.1 mL/min,磷酸盐缓冲液 PBS(pH 6.4)洗脱。

### 1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的检测

参照 Laemmli 方法<sup>[5]</sup>,应用包含 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)和 2.5%  $\beta$ -巯基乙醇的 12% 分离胶对亲和层析后蛋白组成进行分析。

### 1.4 家蝇幼虫凝集素凝血活性的检测

在 V 形血凝板上,采用倍比稀释方法,每孔加 25  $\mu$ L 的 BIS 和 25  $\mu$ L 的 HPLC 分离后的样品溶液(1 mg/mL),第一孔混匀后取 25  $\mu$ L 加入第二孔,混匀后也取出 25  $\mu$ L 加入第三孔,以此类推作倍比稀释。凝血板在微型混合仪上振动,同时每孔加入 25  $\mu$ L 体积分数为 2% 的兔红细胞悬液,继续振动 5 min,室温放置 1 h 后,显微镜观察凝血现象。

### 1.5 圆二色谱的检测

收集凝血活性较强的样品,将其制成 0.3 mg/mL 的溶液,进行二级结构构象单元分析。选用 Jasco J-715 圆二色光谱仪,参照 Yang 氏<sup>[6]</sup>CD 光谱估算样品二级结构中  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、 $\beta$  转角和无规卷曲所占的比率。

### 1.6 MTT 法测定细胞活性

分别取对数生长期的 MCF-7 细胞、正常组织的

人纤维 HLF 细胞  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup>,各加入样品使其最终质量浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100、150、200、250  $\mu$ g/mL,分别培养 24、36、48 h,每孔加入噻唑兰溶液(MTT 0.5  $\mu$ g/mL)20  $\mu$ L,继续培养 4 h 后吸去上清液,立即加入二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu$ L 显色,以仅添加培养液孔作空白对照。用酶标仪 570 nm 为测试波长,630 nm 为参考波长,在 20 min 之内读取各孔吸光度 A 值。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

### 1.7 凋亡细胞形态学观察

将细胞铺于 6 孔细胞培养板,培养过夜,用具有较高抑制率的样品溶液(100  $\mu$ g/mL)处理细胞 24、48、72 h,培养结束后在细胞培养液中加入吖啶橙(AO)染料 10 min,荧光显微镜下观察细胞线粒体内荧光点、细胞核染色体断裂及形态变化。

### 1.8 FCM 检测细胞凋亡

细胞单层接种在培养瓶中,培养 24 h 后加 100  $\mu$ g/mL 的 MLL-2,分别培养 24、48 h,收集贴壁的细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃去培养液,用预冷的 PBS 重悬细胞,1 500 r/min 离心 5 min,重复 2 次,70%冰乙醇 4 °C 固定 18 h,离心弃去固定液,PBS 洗脱 2 次,1.0 mg/mL 核糖核酸酶 A 溶液 37 °C 水浴处理 30 min,随后加入 0.25 mL 的 50 mg/L 碘化丙啶,4 °C 避光染色 30 min,采用流式细胞术(FCM)检测 MCF-7 细胞周期变化及细胞凋亡率,激发和发射波长分别为 488 nm 和 630 nm。

### 1.9 统计学处理

使用 SPSS10.5 软件统计分析所得结果,各组数据均以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。进行方差分析和 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 家蝇幼虫凝集素分离纯化的结果

亲和层析后的蛋白峰在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中出现 3 条带,见图 1,其分子质量为 59 ku、46 ku (MLL-1)和 38 ku (MLL-2)。亲和层析后的蛋白峰在高效液相色谱中同样被分离成 3 种组分,见图 2,依据图中蛋白峰的保留时间,其分子质量同样为 59 ku、46 ku 和 38 ku,这与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果相一致。

另外,显微镜观察凝集的结果也表明,MLL-2 的凝血活性较为明显,红细胞之间粘连在一起,呈簇拥状。因此,选择 MLL-2 作进一步研究。

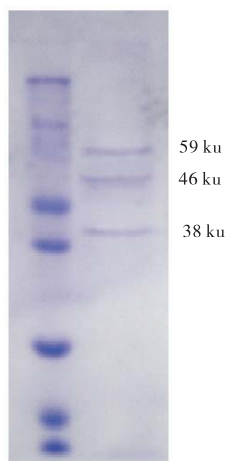


图1 亲和层析后的蛋白组分 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果  
Fig.1 SDS-PAGE of protein after affinity chromatograph

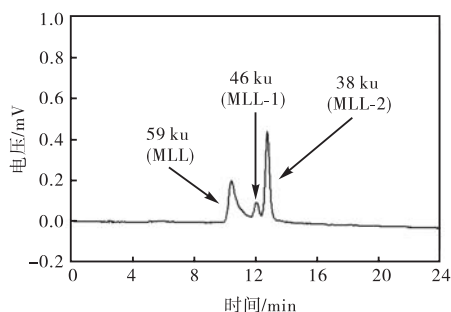


图2 亲和层析后的蛋白组分高效液相色谱分析  
Fig.2 Protein after affinity chromatography on HPLC

## 2.2 MLL-2 二级结构的检测结果

圆二色谱仪的检测结果(表1)表明,水溶液中 MLL-2 主要以  $\beta$  折叠和无规卷曲的构象存在,  $\alpha$  螺旋含量较少,基本上没有  $\beta$  转角。

表1 MLL-2 组分二级结构组成

Tab.1 Secondary structure conformation of MLL-2 in water %

$\alpha$ 螺旋	$\beta$ 折叠	无规卷曲
0.2	80.3	19.5

## 2.3 MLL-2 对乳腺癌细胞生长抑制作用

MLL-2 作用后对于 MCF-7 细胞活力的影响如图3所示. 以不同浓度的 MLL-2 作用 24、36、48 h 后, 细胞的抑制率随作用时间的延长、剂量的增大而显著升高, 呈明显的时间和剂量依赖性, MLL-2 的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 约为  $100 \mu\text{g/mL}$ . MLL-2 对来自正常组织的人成纤维 HLF 细胞没有明显的毒性作用(抑制率  $< 15\%$ ). 因为对细胞的杀伤作用为  $50\% \sim 60\%$  时, 比较容易观察检测凋亡细胞与正常细胞的状态, 所以选用 MLL-2 的质量浓度为  $100 \mu\text{g/mL}$ .

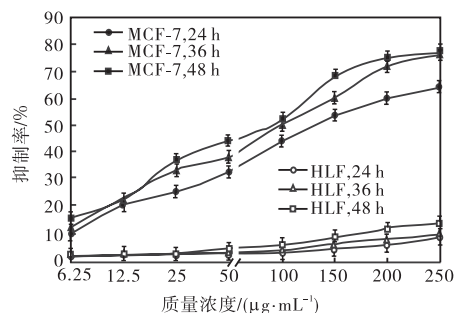


图3 MLL-2对MCF-7和HLF细胞的增殖抑制效果  
Fig.3 Inhibition of proliferation of MCF-7 and HLF cells by MLL-2

## 2.4 AO 染色结果

吖啶橙(AO)染色结果如图4所示,图4(a)中活细胞体积较大,形态完整,呈圆形;图4(b)所示样品处理 24 h 后的细胞形态,细胞膜完整,胞质出现芽状突起现象;图4(c)所示样品处理 48 h 后细胞核出现碎裂,主要因为细胞染色质浓缩或断裂;图4(d)所示样品处理 72 h 后的细胞形态,细胞核完全碎裂,并清晰可见凋亡小体的形成. 这些典型的细胞凋亡现象从形态学上证明了 MLL-2 具有诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用。

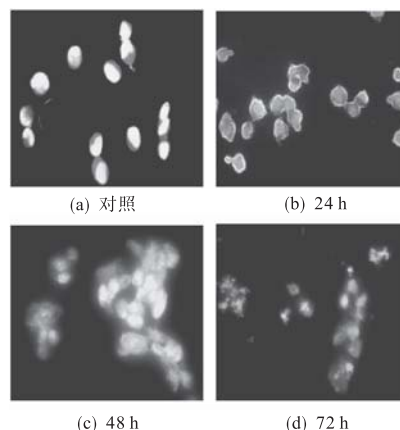


图4 MLL-2对MCF-7细胞形态学的影响  
Fig.4 Effect of MLL-2 on MCF-7 cells

## 2.5 FCM 检测细胞周期结果

细胞周期阻断是许多抗癌药物作用的靶点之一, 如阿霉素、顺铂、5-氟尿嘧啶及紫杉烷类化合物. 有研究表明, 能否使细胞周期阻断于  $G_2/M$  期或 S 期与细胞对药物的敏感性密切相关<sup>[7]</sup>. 以  $100 \mu\text{g/mL}$  的 MLL-2 对 MCF-7 细胞作用 24 h 和 48 h 后, 应用 FCM 进行细胞周期方面的检测, 检测结果见表2. MCF-7 细胞经  $100 \mu\text{g/mL}$  的样品处理后, 细胞被阻断在  $G_2/M$  期, 该时期细胞数比例从  $15.00\%$  提高至  $30.40\%$ , 同时凋亡细胞碎片也逐渐从  $5.38\%$  增加到  $17.70\%$ . 上述结果表明, MLL-2 可能通过阻断细胞生长周期诱导细胞发生

凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长.

表2 MLL-2对MCF-7细胞周期分布的影响( $n=3$ )

Tab.2 Time course analysis of the cell cycle distribution in MLL-2 treated MCF-7 cells ( $n=3$ )

时间/h	凋亡率/%	G <sub>1</sub> /%	S/%	(G <sub>2</sub> /M)/%
0	5.38 ± 0.04	62.50 ± 1.51	20.30 ± 1.35	15.00 ± 0.20
24	11.70 ± 0.92**	45.50 ± 2.26**	39.50 ± 1.91**	17.20 ± 0.28*
48	17.70 ± 2.24**	33.30 ± 2.39**	36.20 ± 2.29*	30.40 ± 0.25**

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3 讨论

家蝇幼虫凝集素(MLL-2)是一种对D-半乳糖特异性结合的凝集素,其分子质量为38 ku且对兔红细胞有较明显的凝集作用. MLL-2主要以 $\beta$ 折叠和无规卷曲的构象存在, $\alpha$ 螺旋含量较少, $\beta$ 转角基本上没有,这与陈结霞等人的报道<sup>[8]</sup>基本吻合.

随着化学治疗在肿瘤治疗中的地位逐步提高,化疗药物影响肿瘤细胞的机理日渐成为人们关注的焦点. 化疗药物作用于肿瘤细胞表现在两个方面:抑制肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的死亡,而后者又包括肿瘤细胞的坏死和肿瘤细胞的凋亡<sup>[9]</sup>. 但诱导凋亡时药物用量可能要偏大,所以要考虑对正常细胞的影响. 研究发现MLL-2对MCF-7细胞的生长抑制率有明显的作用,同时对来自正常组织的HLF细胞没有明显的毒性作用,比较符合临床药物的条件. 通过倒置显微镜观察,MLL-2可以引起MCF-7细胞出现一些典型的凋亡形态学变化. 阻断细胞增殖周期进程可引起细胞凋亡,而细胞凋亡也常伴随有生长阻滞,细胞周期和细胞凋亡密切相关<sup>[10]</sup>. 流式细胞仪分析结果显示,MLL-2可使MCF-7细胞阻滞在G<sub>2</sub>/M期,抑制细胞的DNA复制,阻碍细胞分裂,从而导致增殖减慢,趋向分化,进一步诱发凋亡. 综合MTT、荧光染色和细胞周期分析的实验结果可见,MLL-2作用于MCF-7细胞能显著抑制细胞增殖、诱发凋亡,并与药物作用浓度、作用时间密切相关,表明MLL-2主要通过诱导MCF-7细胞发生凋亡而抑制肿瘤细胞的生长. 家蝇凝集素在进一步研究的基础上,可望成为一种新型的抗肿瘤药物.

#### 参考文献:

[1] DE-Simone S G, Netto C C, Silva F P, et al. Simple

affinity chromatographic procedure to purify  $\beta$ -galactoside binding lectins[J]. Journal of Chromatography B, 2006, 838(2):135-138.

- [2] Richard G, Harry L S, Roberts, et al. Lectin-induced haemocyte inactivation in insects[J]. Journal of Insect Physiology, 2004, 50(10):955-963.
- [3] HOU Lixia, SHI Yonghui, ZHAI Pei, et al. Antibacterial activity and in vitro anti-tumor activity of the extract of the larvae of the housefly (*Musca domestica*) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 111(2):227-231.
- [4] 贺莉芳, 万启惠, 刘晖, 等. 家蝇幼虫抗菌蛋白诱导黑色素瘤 A375 细胞凋亡的探讨[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2006, 17(1):20-22.
- [5] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227:680-685.
- [6] Yang J T, Wu C S, Marinez H M. Calculation of protein conformation from circular dichroism[J]. Methods Enzymol, 1996, 130:208-269.
- [7] Dubrez L, Goldwasser F, Genne P, et al. The role of cell cycle regulation and apoptosis triggering in determining the sensitivity of leukemic cells to topoisomerase I and II inhibitors[J]. Leukemia, 1995, 9(6):1013-1024.
- [8] 陈结霞, 徐小龙, 王守业, 等. pH值和钙离子对尖尾蝮蛇抗血小板凝集素二级结构的影响[J]. 无机化学学报, 2007, 23(5):849-853.
- [9] Sugamura K, Makino M, Kaibara N. Apoptosis is a prognostic factor in colorectal carcinoma[J]. Surg Today, 1998, 28(2):145-150.
- [10] King K L, Cidlowski J A. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death[J]. Journal Cell Biochem, 1995, 58:175-180.