

## 重组蜂毒肽对 C6 胶质瘤细胞的抑制作用及对 VEGF, Flt-1, MMP-9 表达的影响

姚兴军\*, 王岳华, 侯文仲, 邓光策, 曾敏敏, 关北漩  
(清远市人民医院神经外科, 广东 清远 511518)

**[摘要]** **目的:**探讨重组蜂毒肽作用于大鼠 C6 胶质瘤细胞后,对细胞生长的抑制作用及对血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体(Flt-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。**方法:**对大鼠 C6 胶质瘤细胞进行体外培养后,分为对照组及重组蜂毒肽低、中、高剂量治疗组,治疗组分别给予相应浓度的重组蜂毒肽( $20, 50, 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),采用 MTT 法于 24, 48, 72 h 分别测定 C6 胶质瘤细胞的生长情况;并采用 Western blot 法测定不同浓度重组蜂毒肽作用 72 h 后 C6 胶质瘤细胞 VEGF, Flt-1, MMP-9 的表达情况。**结果:**与对照组比较,不同浓度的重组蜂毒肽作用于细胞 24 h 后,细胞生长情况无明显变化,但 48, 72 h 后,低、中、高浓度治疗组的细胞的增殖活性均有不同程度的降低、生长抑制率增高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );同时中、高浓度重组蜂毒肽作用 72 h 后,胶质瘤细胞的 VEGF, Flt-1, MMP-9 表达水平均有不同程度的降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。**结论:**重组蜂毒肽对 C6 胶质瘤细胞的生长和 VEGF, Flt-1, MMP-9 的表达均有明显的抑制作用,因此重组蜂毒肽可能通过抑制 VEGF, Flt-1, MMP-9 的表达来抑制胶质瘤的生长。

**[关键词]** 重组蜂毒肽; 神经胶质瘤; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0267-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013240267

## Effect of Recombinant Melittin on Inhibition of Glioma C6 Cell Growth and the Expression of VEGF, Flt-1, MMP-9

YAO Xing-jun\*, WANG Yue-hua, HOU Wen-zhong, DENG Guang-ce, ZENG Min-min, GUAN Bei-xuan  
(Department of Neurosurgery, Qingyuan City People's Hospital, Qingyuan 511518, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of recombinant melittin on the glioma C6 cells and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the cells. **Method:** Glioma C6 cells were separated into control group and 3 treatment groups, then  $20, 50, 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  recombinant melittin was given. MTT method was used to evaluate the inhibitory effects of recombinant melittin with different doses after 24, 48, 72 h on glioma C6 cell growth; the proteins expression of VEGF, Flt-1 and MMP-9 were determined by Western blot analysis. **Result:** Compared with control group, no significant change was found on glioma C6 cell growth after treated with recombinant melittin for 24 h in each treatment groups, but significantly inhibition of the glioma C6 cells proliferation was observed after treated with recombinant melittin for 48 h and 72 h in each groups ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The assay of Western blot showed that the proteins expression of VEGF, Flt-1 and MMP-9 in glioma C6 cells induced by recombinant melittin were significantly down-regulated when the cells were treated with  $50, 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  recombinant melittin for 72 h. **Conclusion:** Recombinant melittin can inhibit the glioma C6 cell growth and the expression of VEGF, Flt-1 and MMP-9 in the cells, so recombinant melittin maybe can inhibit the growth of glioma by affect expression of VEGF, Flt-1 and MMP-9.

**[Key words]** recombinant melittin; Glioma; VEGF

**[收稿日期]** 20130730(003)

**[通讯作者]** \*姚兴军, 博士, 从事神经外科肿瘤及外伤的诊断及治疗, Tel: 13500296234, E-mail: Yaixinjun 2000@163.com

蜂毒肽(melittin)又称蜂毒溶血肽,是由 26 个氨基酸组成的多肽分子,为蜂毒(Bee venom)的主要活性成分,具有消炎、抗菌、抗病毒、抗辐射等作用<sup>[1]</sup>。近年来有关蜂毒肽抗癌作用的报道增多,引起了广泛的关注<sup>[2-3]</sup>。但是天然蜂毒肽来源有限,成本极高,使其应用受到影响<sup>[1]</sup>,因此逐渐倾向于用人工重组的蜂毒肽代替天然提取的蜂毒肽使用。本实验研究了重组蜂毒肽(recombinant melittin)对大鼠 C6 胶质瘤细胞的抑制作用,初步探讨其作用机制。

### 1 材料

1.1 细胞 大鼠 C6 胶质瘤细胞来自中国医学科学院协和细胞库。

1.2 药物与试剂 重组蜂毒肽由本实验室制备(纯度为 91.2%),胰蛋白酶、DMEM 细胞培养基、胎牛血清(FBS)、多克隆(抗体购自美国 Gibco 公司),其他试剂及试剂盒(均由美国 Sigma 公司提供)。

1.3 仪器 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Heraeus 公司),酶标仪(Bio-Tek 公司),岛津紫外自动扫描分光光度计(日本),高速离心机(BECKMAN ZK401),超净工作台(Hfsafe-1200 公司),恒温循环水浴箱(Cole-Parmer 公司)。

### 2 方法

2.1 C6 胶质瘤细胞的培养 将 C6 胶质瘤细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,用 0.25% 胰酶消化传代,取传代 3 代后对数生长细胞用于实验。

2.2 重组蜂毒肽对 C6 胶质瘤细胞抑制作用的检测 取传代 3 代后对数生长的 C6 胶质瘤细胞,0.25% 胰酶消化,将细胞密度调整至 1 × 10<sup>6</sup>/mL,然后接种于 96 孔板中(每孔 100 μL),放入 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24h 后分别加入不同质量浓度的重组蜂毒肽(20, 50, 80 mg · L<sup>-1</sup>),每个浓度设 5 个复孔,放置细胞培养箱中继续培养,分别于重

组蜂毒肽加入后 24, 48, 72 h 后弃去上清液,各孔分别加入 20 μL 四甲基偶氮唑盐(MTT)溶液,继续培养 4 h 后,小心弃去培养液,每孔中分别加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO),震荡 10 min 后,置于酶标仪中于 490 nm 波长处测定各孔的吸光度(A),不加细胞的空白溶液调零。对照组除不加入重组蜂毒肽外,其他与实验组同法操作。同时,分别计算不同浓度的重组蜂毒肽作用 24, 48, 72 h 后对胶质瘤细胞生长的抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

2.3 测定细胞 VEGF, Flt-1 和 MMP-9 蛋白的表达<sup>[5]</sup> 取对数生长的 C6 胶质瘤细胞,经 0.25% 胰酶消化,将细胞密度调整至 1 × 10<sup>6</sup>/mL,然后接种于 96 孔板中(每孔 100 μL),放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24 h 后,分别加入不同质量浓度的重组蜂毒肽(20, 50, 80 mg · L<sup>-1</sup>),每个浓度设置 6 个复孔,同时设立不加入重组蜂毒肽的对照组。继续培养 72 h 后,停止培养,用 PBS 洗板 2 次,加入细胞裂解液,置于冰上裂解 20 min,于 4 °C, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 30 min,取上清液,进行蛋白定量,经 8% SDS-PAGE 凝胶电泳后,转膜,进行抗体标记、成像显影、漂洗(以 β-actin 蛋白为内参),采用图像分析软件测定记录各条带于 490 nm 处的 A,以不加入细胞的空白溶液调零。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析,所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析对所得数据进行处理,组间比较采用 SNK 检测法。以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对 C6 胶质瘤细胞的抑制作用 MTT 实验结果表明:重组蜂毒肽 20, 50, 80 mg · L<sup>-1</sup> 作用于大鼠 C6 胶质瘤细胞 48, 72 h 后,对细胞的增殖有不同程度的抑制作用(P < 0.05 或 P < 0.01),并且抑制率呈剂量依赖性。见表 1。

表 1 重组蜂毒肽对大鼠 C6 胶质瘤细胞的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

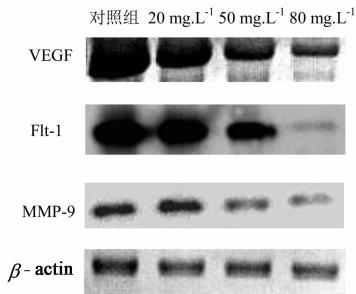
组别	质量浓度 /mg · L <sup>-1</sup>	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
对照	-	0.80 ± 0.03	-	1.52 ± 0.17	-	0.82 ± 0.06	-
重组蜂毒肽	20	0.79 ± 0.11	1.25 ± 0.21	1.38 ± 0.08 <sup>1)</sup>	9.21 ± 1.12	0.68 ± 0.07 <sup>1)</sup>	17.07 ± 2.57
	50	0.79 ± 0.07	1.25 ± 0.34	1.25 ± 0.11 <sup>2)</sup>	17.76 ± 2.33	0.56 ± 0.09 <sup>2)</sup>	31.71 ± 3.75
	80	0.78 ± 0.14	2.5 ± 0.15	1.03 ± 0.05 <sup>2)</sup>	32.24 ± 2.84	0.48 ± 0.03 <sup>2)</sup>	41.46 ± 3.61

注:与对照组相比<sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01。

3.2 对 C6 胶质瘤细胞 VEGF, Flt-1 及 MMP-9 蛋白表达的影响 Western blot 结果表明:不同浓度重组

蜂毒肽作用于大鼠 C6 胶质瘤细胞 72 h 后,低、中、高剂量组(20, 50, 80 mg · L<sup>-1</sup>)细胞内 VEGF, Flt-1 及

MMP-9 的表达均呈递减趋势,并具有剂量依赖性,中、高剂量组均显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 1,表 2。



A. 对照组; B~D. 重组蜂毒肽 20, 50, 80 mg·L<sup>-1</sup> 组

图 1 重组蜂毒肽对大鼠 C6 胶质瘤细胞 VEGF, Flt-1 及 MMP-9 表达的影响

表 2 重组蜂毒肽对大鼠 C6 胶质瘤细胞 VEGF, Flt-1 及 MMP-9 相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	VEGF /β-actin	Flt-1 /β-actin	MMP-9 /β-actin
对照	-	0.63 ± 0.12	0.58 ± 0.11	0.53 ± 0.16
重组蜂毒肽	20	0.60 ± 0.14	0.55 ± 0.15	0.51 ± 0.17
	50	0.53 ± 0.10 <sup>1)</sup>	0.46 ± 0.19 <sup>1)</sup>	0.42 ± 0.17 <sup>1)</sup>
	80	0.46 ± 0.12 <sup>2)</sup>	0.38 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.37 ± 0.13 <sup>2)</sup>

注:与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

脑神经胶质瘤为常见的颅内肿瘤疾病。目前临床常见的治疗方法有手术治疗、放射治疗、化学治疗等;其中手术治疗在恶性神经胶质瘤治疗中具有重要意义,但由于胶质瘤细胞边界不十分清晰,因此受医生临床水平及医疗条件等诸多因素的影响;放、化疗副作用较大,且应用受到具体病情等条件的局限,目前仅作为配合术后加强治疗或复发治疗使用<sup>[6-7]</sup>。因此对神经胶质瘤临床治疗药物及治疗机制的研究显得尤为重要。

据有关研究报告<sup>[8]</sup>在神经胶质瘤组织中,VEGF 蛋白的表达明显高于正常的神经上皮组织,且神经胶质瘤的恶性程度与肿瘤组织中 VEGF 的含量相关性极高。这提示我们,神经胶质瘤发病机制很可能与 VEGF 蛋白的表达相关。并且大量的文献报道也证实了 VEGF 蛋白表达与肿瘤疾病的相关性。于此同时在胶质瘤细胞中 VEGF 的表达往往与 Flt-1 正向相关,Flt-1, VEGF 通路的表达对胶质瘤细胞血管的生成具有重要影响<sup>[9]</sup>。MMP-9 为 MMPs 酶家族成员之一,它在肿瘤组织中的表达远高于正常组织,并且与肿瘤细胞血管的生长具有相关性。

本研究采用的重组蜂毒肽是基于分子生物学理论重组合成得到的人工蜂毒肽,性质稳定,纯度较高。本研究结果显示;20, 50, 80 mg·L<sup>-1</sup>的重组蜂毒肽在作用 48, 72 h 后,均可对 C6 胶质瘤细胞的生长具有显著抑制作用 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且抑制率呈剂量相关性;此外蜂 3 个剂量组的重组蜂毒肽作用 72 h 后,与对照组比较, C6 胶质瘤细胞中的 VEGF, Flt-1 及 MMP-9 的表达均有不同程度的降低,并且这种降低也同样呈现剂量相关性,以中、高剂量组的表达的降低尤为显著 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。因此重组蜂毒肽可能是通过影响胶质瘤细胞中的 VEGF, Flt-1 及 MMP-9 的表达来影响细胞血管生成,从而抑制胶质瘤细胞的生长。

综上所述,本研究初步探讨了重组蜂毒肽对大鼠 C6 胶质瘤细胞的生长的抑制作用,同时研究了其对 C6 胶质瘤细胞中的 VEGF, Flt-1 及 MMP-9 的表达的影响,这为重组蜂毒肽治疗神经胶质瘤疾病药物的开发提供了重要的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] 王关林,邢卓. 蜂毒肽的研究及展望[J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版,2005,28(1):87.
- [2] 高启龙,李玉梅,陈永强,等. 蜂毒素对骨肉瘤 UMR-106 细胞裸鼠移植瘤血管生成的影响[J]. 中华中医药学刊,2008,26(3):522.
- [3] 李爱剑,梁枫. 蜂毒素对人胃癌 BGC823 细胞生长抑制作用的实验研究[J]. 中国中医急症,2009,18(50):780.
- [4] 徐承熊. MTT 法测定药物对癌细胞杀伤作用的选择[C]. 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:284.
- [5] 肖丽君,赵恩宏,赵爽,等. 17-AAG 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用及对 STAT3 和 VEGF 表达的影响[J]. 中国医科大学学报,2013,42(1):65.
- [6] 柳秀芳,夏云飞,柳青,等. 164 例胶质瘤术后放射治疗疗效及预后[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2001,10(2):108.
- [7] 陈忠平,周旺宁. 我国胶质瘤诊断治疗现状和努力方向[J]. 中国肿瘤,2005,14(2):78.
- [8] 陈金绪,李建安,陈月新. 巢蛋白和血管内皮生长因子在脑胶质瘤中的表达[J]. 神经解剖学杂志,2011,27(6):685.
- [9] 刘兴吉,李玉林,鄯福忠,等. 光活化的金丝桃素对大鼠 C6 胶质瘤抑制作用及其对 VEGF, Flt-1 和 MVD 的影响[J]. 中国实验诊断学,2003,7(6):524.

[责任编辑 聂淑琴]