

苏云金芽孢杆菌 Bt9875 晶体蛋白诱导 HL-60 细胞凋亡

竺利红¹, 李翀², 吴吉安¹, 梁建根¹, 施跃峰^{1*}

(¹浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

(²北京大学医学部基础医学院, 北京 100083)

摘要:【目的】研究苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)Bt9875 菌株晶体蛋白对人急性髓细胞性白血病细胞 HL-60 的影响。【方法】采用 MTT 比色、荧光显微观察、DNA 凝胶电泳、流式细胞术等方法来检测不同浓度的 Bt9875 晶体蛋白处理后 HL-60 细胞的凋亡特征。【结果】Bt9875 晶体蛋白对 HL-60 细胞的生长具有明显的抑制作用,且随着蛋白质浓度的增加对 HL-60 细胞生长抑制愈加明显,而对正常人外周血单个核细胞(PBMC)无作用;荧光显微镜下观察发现经该蛋白作用后 HL-60 细胞核的形态呈现凋亡特征;流式细胞术分析表明,HL-60 细胞经 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 晶体蛋白作用后,凋亡率达到 52%;琼脂糖凝胶电泳显示细胞 DNA 呈梯状降解。【结论】初步证明了 Bt9875 晶体蛋白在体外能够明显抑制 HL-60 细胞的生长,并诱导其凋亡,这为苏云金芽孢杆菌晶体蛋白的应用开创了新的思路。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 晶体蛋白; HL-60 细胞; 凋亡

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0690-05

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种革兰氏阳性细菌,在形成芽孢的同时,菌体内的一端或两端合成各种形状的伴孢晶体蛋白,该蛋白通常具有特异的杀虫活性,称为杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Proteins ICPs)或 δ -内毒素(δ -endotoxin)。目前 Bt 已成为世界上产量最大的微生物杀虫剂^[1],广泛应用于控制农业、林业和医疗上的鳞翅目、双翅目、鞘翅目等害虫。Bt 菌株的伴孢晶体包含两种结构上无任何相关性对昆虫均有毒的蛋白家族—Cry 蛋白和 Cyt 蛋白。Cyt 蛋白具有体外溶血和溶细胞的特性,不仅具有抗双翅目昆虫的作用,而且对不同的脊椎动物和无脊椎动物细胞表现广谱细胞毒性^[2]。被广泛应用的 Cry 蛋白对昆虫有特异毒性,现已被划分为 22 个不同的主要基因型—Cry1 到 Cry22,主要作用于靶昆虫的中肠细胞,形成细胞膜通道,破坏渗透压,引起细胞溶解,最终导致细胞死亡。

长期以来,人们总是将 Bt 的晶体蛋白与杀虫功能联系在一起,而对于其在其它方面的生理活性功能研究很少,尤其是对于一些广泛分布的非杀虫 Bt 晶体蛋白,一直未受人们的重视^[3]。1997 年 Yudina 等首次报道一些非杀虫的 Bt 晶体蛋白具有抗菌活性^[4]。同年 Mizuki 等发现了 Bt 晶体蛋白的体外抗癌活性^[5],该研究是继发现 Bt 以色列变种之后又一个与医学联系的全新领域^[6]。本实验室一直从事杀虫苏云金芽孢杆菌的分离和筛选等研究工作,采用醋酸钠-抗生素分离法^[7]从不同环境中分离得到 1000 多株 Bt 菌株,发现其中一株编号为 Bt9875 的菌株,其晶体蛋白能诱导 HL-60 细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和细胞株: Bt9875 从杭州土壤中分

*通讯作者。Tel: +86-571-86404070; E-mail: shiyf2002@vip.sina.com

作者简介: 竺利红(1973-),女,浙江嵊州人,硕士研究生,研究方向为微生物农药。E-mail: karen2002@126.com

收稿日期: 2007-10-18; 修回日期: 2008-02-26

离获得,人急性髓细胞性白血病细胞 HL-60 来自北京大学医学部基础医学院。

1.1.2 培养基: LB 培养基(蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%, 氯化钠 1%, pH 7.0)。

1.1.3 主要试剂: RPMI-1640 培养液为 Gibco 产品,胎牛血清为 Hyclone 产品,荧光染料 Hoechst 33258 为 Invitrogen 公司产品,四甲基偶氮唑蓝(MTT)和苯甲基磺酰氟(PMSF)为 Sigma 公司产品,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒为北京宝赛生物技术有限公司产品,DNA ladder 检测试剂盒购自南京凯基生物公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株的初步鉴定

形态、培养特征及生化反应方法参照文献^[8]。细胞壁化学分析采用快速薄板层析法^[9]来进行全细胞水解液氨基酸及糖型分析。

1.3 晶体蛋白纯化

将 Bt9875 接种于 LB 液体培养基,28 ℃ 下 220 r/min 振荡培养 33 h,参考改良液体双相法提纯晶体蛋白^[10],真空冷冻干燥后-80 ℃ 保存备用。

1.4 晶体蛋白浓度的测定及其酶处理活化

将纯化晶体蛋白 37 ℃ 下在裂解液(50 mmol/L pH10.0 Na₂CO₃, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA)中溶解 60 min。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[11,12]检测其分子量,并用 Lowry 法测定蛋白含量^[13]。用蛋白酶 K 处理晶体蛋白^[14],30 μg/mL 蛋白酶 K 37 ℃ 作用 90 min,加入蛋白酶抑制剂 1 mmol/L PMSF 终止酶解反应,最终调节 pH 至 7.2,过滤除菌备用。

1.5 HL-60 细胞培养

将 HL-60 细胞和正常的人外周血单核细胞(PBMC)分别接种在含 10%的小牛血清的 RPMI-1640 的完全培养液中,于 37 ℃、5% CO₂ 孵育箱中培养,细胞呈半悬浮生长,2~3 d 传代 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

1.6 晶体蛋白抑制 HL-60 细胞生长的 MTT 检测

稀释 HL-60 细胞至 1×10⁶/mL,按 100 μL/孔接种于 96 孔培养板中,分别加入不同浓度经酶活化后的晶体蛋白溶液,使其终浓度分别为 12.5、25、50 和 100 μg/mL,每组设 3 个复孔,同时做正常细胞对照孔。37 ℃、5% CO₂ 培养 24 h,每孔加入 20 μL MTT (5.0 mg/mL),继续培养 4 h 后倒去板中的培养液,每孔加入 80 μL 的 DMSO 溶解结晶物,于 490 nm 处测定各孔光吸收值。

1.7 HL-60 细胞核的形态学观察

收集经终浓度为 100 μg/mL 晶体蛋白处理 24 h 后的 HL-60 细胞,用预冷的磷酸缓冲溶液(20 mmol/L pH 7.3)洗涤后重悬于固定液(4%多聚甲醛)中。10 min 后,悬液慢速离心,收集沉淀,用同样缓冲溶液洗涤 2 次。之后将细胞悬液滴到载玻片上,用 0.1 μg/mL 的 Hoechst 33258 染色 5 min。在荧光显微镜下观察细胞核的形态学变化。

1.8 细胞凋亡率的流式细胞术分析

收集不同浓度(12.5~100 μg/mL)晶体蛋白处理后的细胞(1×10⁶/mL)并重悬于结合缓冲液中,700×g 离心 10 min,用结合缓冲液再次悬起细胞,加荧光标记液 Annexin V 和 PI,室温闭光孵育 15 min,流式细胞仪检测。

1.9 DNA 的凝胶电泳检测

经不同浓度(12.5~100 μg/mL)的晶体蛋白处理后的细胞(1×10⁶/mL)用 PBS 洗涤,3400×g 离心 5 min,收集细胞,加入 100 μL 裂解液,冰上放置 5~10 min,离心,收集上清液,加入 10 μL 10%的 SDS、2 μL RNase A,混匀,于 37 ℃ 放置 1 h。加入 2 μL 蛋白酶 K,于 37 ℃ 放置 2 h,再依次加入 12 μL 3 mol/L 醋酸钠、250 μL 无水乙醇,混匀,-20 ℃ 孵育 30 min。9500×g 离心 10 min,弃上清,室温干燥沉淀。获得的 DNA 用双蒸水溶解后经 1%琼脂糖凝胶电泳并进行凝胶成像分析。

2 结果

2.1 菌株的初步鉴定结果

在 LB 固体培养基上,Bt9875 菌落呈乳白色、圆、边缘光滑。营养体直杆状,大小为(1.1~1.3) μm × (2.8~4.3) μm,革兰氏染色阳性。孢子囊一端为卵圆形芽孢,另一端为小方形伴孢晶体。细胞壁 型,形成菌膜,产生卵磷脂酶,V-P 反应、淀粉水解、脲酶反应等反应呈阳性,能水解七叶苷,能利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖。蔗糖发酵、甘露糖产酸等反应呈阴性。将菌株 Bt9875 归为苏云金芽孢杆菌类群。

2.2 晶体蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

晶体蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳见图 1,推断 Bt9875 含有 4 种晶体蛋白,分子量分别为 63、58、42、27 kDa。

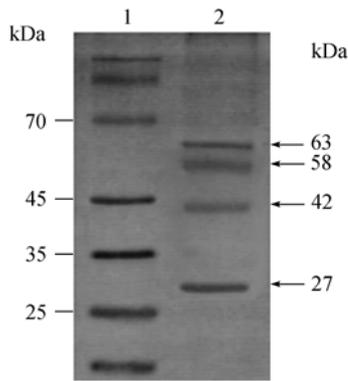


图1 Bt9875 晶体蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig. 1 SDS-PAGE of Bt9875 crystal protein. 1. Marker; 2. Bt9875 crystal protein.

2.3 晶体蛋白对 HL-060 细胞生长的抑制作用

用 MTT 比色法检测晶体蛋白对 HL-60 细胞增殖抑制发现, 抑制效率具有剂量依赖性。在 12.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 晶体蛋白能明显抑制 HL-60 细胞的生长, 随蛋白浓度的增加, 抑制作用逐渐增强(图 2)。但对正常的人 PBMC 的作用很小。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 晶体蛋白体外诱导 HL-60 细胞 24 h 后, 细胞被抑制率达到 52%, 而对 PBMC 的抑制率只有 12%。各实验组与正常对照组比较均有显著性差异或极显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

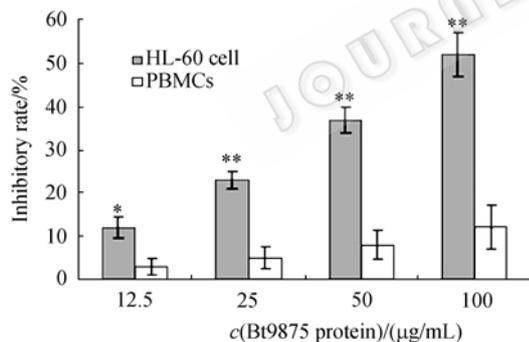


图2 Bt9875 晶体蛋白对 HL-60 细胞和 PBMCs 的抑制作用
Fig. 2 Effects of Bt9875 crystal protein on HL-60 cells and PBMCs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 HL-60 细胞核的形态学观察

HL-60 细胞经 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 晶体蛋白处理 24 h 后用 Hoechst 33258 染色, 与对照组(图 3-A)相比, 细胞核出现碎裂, 形状不规则, 少量伴有凋亡小体(图 3-B)。

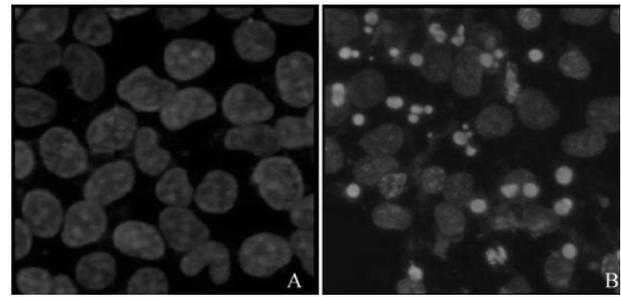


图3 HL-60 细胞凋亡的形态学检测

Fig. 3 Morphological features of nuclei of tested HL-60 cells. A: control group (PBS); B: group treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ba9875 crystal protein for 24 hours.

2.5 细胞凋亡率的流式细胞术分析

流式细胞术检测表明, 细胞凋亡早期细胞膜虽未破裂, 但出现了一些明显改变, 其中最明显的变化是细胞膜磷脂双分子层中的磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)从细胞膜内翻转到细胞膜外。Annexin V 与 PS 有很高的亲和力, Annexin V 被荧光素(FITC)标记, 可在流式仪上检测到早期凋亡的细胞。本实验结果表明, 经不同浓度 Bt9875 晶体蛋白处理的 HL-60 细胞出现了不同程度的凋亡。而且随着浓度的增加, 凋亡程度也越来越明显。由图 4 可以看出, 当晶体蛋白的浓度从 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞凋亡率分别为 13.6%、28.3%、40.2%和 50.7%, 即 IC_{50} 为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与 MTT 结果基本相吻合。

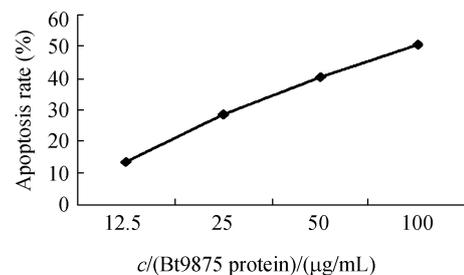


图4 流式细胞术检测 HL-60 细胞的凋亡率

Fig. 4 Apoptosis rate of HL-60 cells treated with various concentrations of Bt9875 crystal protein.

2.6 DNA 的凝胶电泳检测

细胞凋亡晚期时, DNA 会被核酸酶在核小体连接处切断, 产生 200 bp 或 200 bp 整倍数大小的 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳时呈现梯状条带。这是细胞凋亡的最典型特征。实验结果显示, 经晶体蛋白(浓度为 12.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理的 HL-60 细胞 DNA 呈现梯状

条带,而且随着蛋白浓度的增加,DNA 梯状条带越来越清晰。而对照组电泳条带依然在点样孔附近,并未出现“梯状”现象(图 5)。

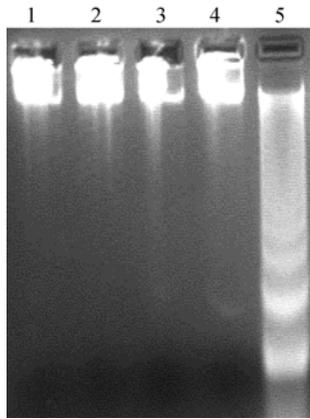


图 5 晶体蛋白诱导 HL-60 细胞凋亡后出现 DNA ladder.
Fig. 5 Internucleosomal DNA fragmentation in HL-60 cells treated with or without Bt9875 crystal protein. 1. no treatment; 2. 12.5 µg/mL crystal protein; 3. 25.0 µg/mL crystal protein; 4. 50.0 µg/mL crystal protein; 5. 100 µg/mL crystal protein.

3 讨论

苏云金芽孢杆菌是目前世界上应用最广泛的微生物杀虫剂。Mizuki 等首先发现某些不具有杀虫能力的 Bt 菌株合成的 81 kDa 伴胞晶体蛋白,经蛋白酶水解活化后对体外培养的人肿瘤细胞具有杀伤能力,所导致的细胞病变有明显的核凝聚和细胞肿胀过程^[5]。这一研究可能为抗癌研究的发展和生物制药开辟新的方向。

本研究发现了一株能诱导 HL-60 细胞凋亡的苏云金芽孢杆菌菌株 Bt9875,将其晶体蛋白经蛋白酶 K 处理后,能够有效的抑制 HL-60 肿瘤细胞的生长,并随蛋白浓度的逐渐增加,抑制作用也明显增强,呈剂量依赖性,但对正常外周血单个核细胞的生长没有影响,这说明 Bt9875 晶体蛋白对急性髓细胞性白血病细胞株 HL-60 有一定的抑制增长作用,在国内尚无报道。国外报道中具有抗肿瘤的晶体蛋白大都为无规则的近似球形^[2],而本研究所发现的晶体蛋白为小方形,分子量大小也不相同,为苏云金芽孢杆菌晶体蛋白在抗肿瘤方面的应用提供了新内容,也为 Bt 晶体蛋白药物的临床应用开创新的思路。

目前的抗肿瘤药物存在的最大缺陷在于不能特异地作用于肿瘤细胞,在杀死肿瘤细胞的同时伴随着正常体细胞的大量死亡。而最令人感兴趣的发现是:

Bt9875 晶体蛋白的水解产物能区别人急性髓细胞性白血病细胞 HL-60 和正常的人外周血单核细胞(PBMC),在一定的浓度范围内特异地杀死肿瘤细胞。Bt9875 晶体蛋白诱导 HL-60 细胞凋亡的机理及其理化特性有待更为深入的研究,使这类药物有望使其成为一种理想的抗肿瘤靶向治疗药物。

参 考 文 献

- [1] 蔡峻,任改新. 苏云金芽孢杆菌 Cyt 蛋白研究进展. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2002, 42 (4): 514-519.
- [2] Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 807-813.
- [3] Ohba M, Yu YM, Aizawa K. Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan. *Syst Appl Microbiol*, 1988, 11: 85-89.
- [4] Yudina TG, Burtseva LI. Activity of δ -endotoxin of four *Bacillus thuringiensis* subspecies against prokaryotes. *Microbiology*, 1997, 66: 25-31.
- [5] Mizuki E, Ohba M, Akao T *et al.* Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J Appl Microbiol*, 1999, 86: 477-486.
- [6] 李今煜, 陈小旋, 关雄. 苏云金芽孢杆菌抗癌剂的研究进展. 农业生物技术学报(*J Agric Biotech*), 2002, 10(3): 301-304.
- [7] 左雅慧, 徐宏英. 一株对小菜蛾高毒力的苏云金芽孢杆菌的选育及研究. 微生物学杂志(*J Microbiol*), 2002, 22(4): 40-41.
- [8] 戴莲韵, 王学聘. 苏云金芽孢杆菌研究进展. 北京: 科学出版社, 1997, 8-9.
- [9] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerophilic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, 29: 319-322.
- [10] 罗朝辉, 夏立秋, 丁学知, 等. 苏云金芽孢杆菌伴胞晶体蛋白提取方法比较研究. 湖南师范大学自然科学学报(*J Nat Sci Hunan Normal Univ*), 2007, 30(3): 94-98.
- [11] 柏锡, 张杰, 宋福平, 等. 国内 Bt 分离株 ICP 基因鉴定及表达产物研究. 武汉大学学报(*J Wuhan Univ*), 1998, 44: 56-58.
- [12] 张杰, 宋福平, 左慧雅, 等. 31 株苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因型鉴定及表达产物研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2000, 40(4): 372-378.
- [13] Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-275.
- [14] Yamashita S, Akao T, Mizuki E, *et al.* Characterization of the anti-cancer- cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46: 913-919.

Apoptosis of HL-60 cells induced by crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* Bt9875

Lihong Zhu¹, Chong Li², Ji'an Wu¹, Ji'angen Liang¹, Yuefeng Shi^{1*}

(¹ Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

(² Peking University Health Science Center, Beijing 10083, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of Bt9875 crystal protein treated with proteinase K on human cancer cells, HL-60. **[Methods]** We used the methods of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, fluorescence microscopy examination, agarose gel electrophores and flow cytometry to detect the growth inhibition rate and apoptosis characters of the HL-60 cells that were treated with different concentration of Bt9875 crystal protein. **[Results]** Bt9875 crystal protein inhibited the growth of HL-60 cells evidently in a dose-dependent manner, with minimal effects on normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The nuclei of HL-60 cells showed the characteristics of apoptosis. The analysis by flow cytometry indicated that the apoptosis rate of HL-60 cells was 52% after treatment with Bt9875 crystal protein (100 µg/mL). DNA analyzed by agarose gel electrophoresis showed "ladder" pattern. **[Conclusion]** Bt9875 crystal protein could inhibit the growth of HL-60 and induced its apoptosis, which provided a foundation for use of Bt9875 crystal protein to cure the acute myeloid leukemia.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; crystal proteins; HL-60 cell; apoptosis

*Corresponding author. Tel: +86-571-86404070; E-mail: shiyf2002@vip.sina.com

Received: 18 December 2007/ Revised: 26 February 2008

《微生物学报》投稿方式

2007年12月修定

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登录本刊网站【[http:// journals.im.ac.cn](http://journals.im.ac.cn)】进入《微生物学报》,点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先“注册”,注册成功后再进行投稿。如果您曾在本刊使用过网上投稿的,则可使用原来的“用户名”和“口令”直接投稿。如果忘了用户名和口令,请联系本刊编辑部,可以找回。
- (2) 邮寄纸样:在接到编辑发出的“稿件受理通知”的E-mail后,请作者邮寄1份纸稿、介绍信。
- (3) 稿件受理费:对于本刊受理的稿件,需交纳100元受理费,务必通过邮局汇款,切忌随信邮寄!【注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号(如果有)”】