

副溶血性弧菌产耐热直接溶血毒素对黑色素瘤的抑制作用研究

杨兰珠, 李诗怡, 郑雯静, 李 静, 包哲隈, 杨靖亚

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 为探讨耐热直接溶血毒素(Thermostabile direct hemolysin, TDH) 在体内和体外对小鼠黑色素瘤细胞 B16 的抑制作用, 本研究通过 MTT 法、克隆形成试验、凋亡试验、Caspase-8 和 Caspase-3 的活性试验、线粒体膜电位的检测以及体内 C57BL/6 小鼠(*Mus musculus*)荷瘤实验, 比较 TDH 作用于不同细胞的半抑制浓度(IC₅₀), 评价 TDH 对小鼠黑色素瘤细胞 B16 的体内外抑制作用。结果发现: 人结肠上皮细胞 NCM460、人正常肝细胞 LO2、人肝癌细胞 SMMC-7721 和小鼠黑色素瘤细胞 B16 在 TDH 处理 24 h 之后, 细胞的半抑制质量浓度 IC₅₀ 分别为 151、118、54 和 48 μg/mL, 正常细胞的 IC₅₀ 高出癌细胞近 2~3 倍。当质量浓度低于 20 μg/mL 时, TDH 以剂量依赖性的方式抑制 B16 细胞的克隆形成, 6 mg/kg TDH 在移植瘤模型中显著抑制体内肿瘤的生长($P < 0.001$)。流式细胞术和荧光试剂盒检测表明: 20 μg/mL 的 TDH 能诱导 19.4% 的 B16 细胞发生早期凋亡, 并激活 Caspase-8 和 Caspase-3, 但不影响线粒体膜电位。TDH 具有体内外的抗肿瘤活性, 可能通过细胞表面的死亡受体介导的凋亡信号通路引起凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 海洋毒素; 耐热直接溶血毒素; 抗肿瘤; 死亡受体; 凋亡

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)08-0121-09

DOI: 10.11759/hyxx20220328006

黑色素瘤是一种侵袭性生长的恶性肿瘤, 包括播散性黑色素瘤、结节状黑色素瘤、肢端黑色素瘤、黏膜黑色素瘤、眼部黑色素瘤等 9 种亚型, 与黑素细胞系的侵袭性生长和早期扩散有关^[1-2]。流行病学调查结果显示, 世界各地的黑色素瘤发病率和死亡率差异很大, 这主要与种族遗传表型的差异以及阳光照射的差异有关^[3]。临床上黑色素瘤的典型疗法是手术切除, 但对于转移性黑色素瘤患者, 单独的手术治疗不会完全治愈, 还需进一步结合药物治疗。氮烯唑胺(dacarbazine, DTIC), 又称达卡巴嗪, 是治疗转移性黑色素瘤的一线药物, 但它仍存在许多弊端, 如临床效率低、患者生存期无明显延长、大多数患者出现严重不良反应^[4-5]。因此, 寻找新型、高效的药物对治疗黑色素瘤有重要的临床意义。

细菌毒素是新型抗肿瘤药物开发的重要研究热点^[6], BRIGOTTI 等^[7]发现由致病大肠杆菌产生的 Stx1 毒素与表达神经酰胺三己糖苷的肿瘤细胞的细胞膜结合后, 增强了环磷酰胺对淋巴瘤细胞的细胞毒作用。KREITMAN 等^[8]构建了一种含有抗 CD22 抗体 Fv 段与截短的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 外毒素的融合毒素, 并进行了 I 期临床实验, 结果显示 3 个周期的治疗对白血病效果显著。耐热直接溶血

毒素(Thermostabile direct hemolysin, TDH)是由革兰氏阴性菌副溶血性弧菌(*Vibrio Parahemolyticus*)分泌的一种破坏细胞膜的海洋细菌毒素, 被认为是通过海鲜传播引起急性肠胃炎的主要病原体之一^[9]。通常情况下该毒素蛋白具有由两个相同亚基组成的二聚体结构, 其分子量为 42 kDa^[10]。研究报道 TDH 可显著降低小鼠肿瘤模型的肿瘤体积^[11], 抑制结直肠癌细胞系的增殖^[12]。因此, 它对治疗肿瘤开辟了新的可能性。本研究主要通过皮下注射 B16 细胞构建小鼠(*Mus musculus*)黑色素瘤模型, 通过瘤周给药的方式观察 TDH 对小鼠黑色素瘤生长的影响。此外, 本文还通过体外细胞实验研究了 TDH 对肿瘤细胞增殖、凋亡的影响, 并探讨其抗肿瘤活性的机理。以期为海洋生物毒素的抗肿瘤药物的开发提供理论依据, 同时为治疗黑色素瘤提供新思路。

收稿日期: 2022-03-28; 修回日期: 2022-06-14

基金项目: 上海市教委高原学科中青年人才培养项目(A1-3203-20-100617)

[Foundation: Young and Middle-aged Talents Cultivation Project of Top Disciplines of Shanghai Municipal Education Commission, No. A1-3203-20-100617]

作者简介: 杨兰珠(1995—), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤药理学研究, E-mail: yanglanzhuy@163.com; 杨靖亚(1978—), 通信作者, E-mail: jyyang@shou.edu.cn

1 材料

1.1 耐热直接溶血毒素 TDH

实验中使用的 TDH 毒素蛋白由本实验室分离纯化自致病性副溶血弧菌 ATCC33846, 制备过程参照马燕等^[10]的方法。

1.2 细胞

小鼠黑色素瘤细胞系 B16、人肝癌细胞(SMMC-7721)来自中国科学院细胞库, 人正常结肠上皮细胞(NCM460)和人正常肝细胞(LO2)由华东理工大学刘建文教授惠赠。

1.3 小鼠

从北京斯贝福生物技术有限公司购买 30 只 7 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠(质量 20 g±2 g), 饲养于上海海洋大学实验动物中心, 在室温条件下昼夜循环自由进食饮水。实验前适应性喂养 1 周。

1.4 试剂

Annexin V 凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位 JC-1 试剂盒(BD pharmingen 公司), Caspase-8 活性试剂盒、Caspase-3 荧光检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司), 喜树碱(上海四环生物技术有限公司), 氮烯唑胺(美国 APEX BIO 公司), BSA 牛血清蛋白(上海正极生物有限公司), DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清、小牛血清(上海普飞生物有限公司), 瑞氏-姬姆萨染色液、快速吉姆萨染色液(生物工程股份有限公司), MTT、胰酶、PBS、生理盐水(上海碧云天生物技术有限公司), 甲醇(国药集团化学试剂公司), 二甲基亚砜(北京索莱宝科技有限公司)等。

1.5 仪器

CO₂ 细胞培养箱、酶标仪(美国 Thermo 公司), 冷冻离心机(德国 Sigma 公司), 倒置显微镜(Olympus 公司), 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)等。

2 方法

2.1 细胞培养

B16 细胞和 SMMC-7721 细胞在含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中孵育, NCM460 细胞和 LO2 细胞在添加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。所有细胞置于 37℃、含有 5%CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中孵育。

2.2 细胞毒性实验

将对数生长期的细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于无菌的 96 孔细胞培养板, 培养液体积为 100 μ L/孔, 每组设 5 个复孔, 于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中孵育 24 h。待细胞贴壁后, 加入不同质量浓度的 TDH(0、15、30、60、120、240 μ g/mL)孵育 24 h, 然后向每孔中加入 10 μ L MTT(质量浓度为 5 mg/mL)继续孵育 4 h。随后弃去上清液并用 PBS 洗涤细胞, 每孔加 100 μ L 二甲基亚砜, 置摇床上振荡 10 min, 使沉淀充分溶解。用酶标仪在波长为 570 nm 处测定各孔吸光度, 采用改良寇氏法计算出每株细胞的半数抑制浓度 IC₅₀。

改良寇氏法: $\text{Log IC}_{50} = X_m - I \times (P - (3 - P_m - P_n) / 4)$

式中, X_m 为 Log 最大药物剂量, I 为 Log(最大药物剂量/相邻剂量), P 为阳性反应率之和, P_m 为最大阳性反应率, P_n 为最小阳性反应率

2.3 克隆形成试验

收集对数生长期的 B16 细胞, 吹打成均匀的细胞悬液并进行计数, 将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL。取一块无菌的 24 孔细胞培养板, 每孔加入 1 mL 上述细胞悬液, 培养过夜。第二天, 弃去培养液, 加入含不同质量浓度 TDH(0、2.5、5、10 μ g/mL)的新鲜培养液, 孵育 24 h 后, 弃去培养液, PBS 洗涤 1 次, 用胰蛋白酶消化并收集细胞, 显微镜下计数, 将细胞密度调整为 500 个/mL。取 6 cm 细胞培养皿, 每皿加 2 mL 细胞密度为 500 个/mL 的细胞悬液, 每个浓度梯度 3 个重复。小心将培养皿转移至 CO₂ 细胞培养箱, 在 37℃、5%CO₂ 恒定的环境中继续培养 3 周。

从细胞培养箱中取出 6 cm 细胞培养皿, PBS 小心清洗细胞 2 次, 尽可能除去残留的培养基和细胞碎片。每个培养皿中加 2 mL 甲醇溶液处理 15 min, 固定细胞, 弃去固定液, 加入 2 mL 快速吉姆萨染色液, 室温下作用 20 min, 倒去染色液, 采用浸洗的方式吸取剩余的染色液, 将细胞培养皿倒置在铺有吸水纸的超净工作台内自然晾干后。光学显微镜下, 每个细胞培养皿取 5 个随机视野拍照并统计大于 8 个细胞的克隆数, 最后计算细胞克隆形成率(细胞克隆形成率=平均每皿细胞克隆数/每皿中加入的细胞数×100%)。

2.4 体内实验

将 B16 细胞(100 μ L/只, 5×10^5 个细胞/100 μ L)

接种到 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠的左后肢皮下, 7 d 后当可触及的肿瘤形成后(50 mm³), 将小鼠随机分为 5 组, 每组 6 只。瘤周给药的方式给予不同剂量的 TDH(2、4、6 mg/(kg/d))、PBS(阴性对照)、氮烯唑胺(10 mg/(kg/d), 阳性对照), 连续 7 d 给药, 每日 1 次。同时每 2 d 用游标卡尺测量肿瘤垂直侧的最大直径(a)和长度(b), 肿瘤体积按照(a×b²/2) cm³ 计算。实验结束时, 从尾部取 20 μL 血液置于干净的载玻片上, 再取一张干净光滑的载玻片, 以 30°~45°的角度平滑地推开血液。干燥后, 用瑞氏-姬姆萨染色液染色。红细胞个数用 ImageJ 软件进行计数, 以各个视野中平均数量进行统计学分析, 白细胞计数(×10⁹/L)=高倍镜视野中白细胞平均个数×2×10⁹/L^[13]。

最后采用颈椎脱臼的方式处死所有小鼠, 取出肾脏、大脑、心脏、肝、脾脏和肺。所有器官用生理盐水洗涤, 然后称质量, 并计算脏器系数, 脏器系数=脏器质量/小鼠体质量×100%。

2.5 细胞凋亡实验

取对数生长期的 B16 细胞, 以 2×10⁵ 个/孔接种于无菌的 6 孔细胞培养板中, 37 °C 过夜培养。加入终质量浓度分别为 5、10、20 μg/mL TDH 的培养基, 阴性对照组加入等体积的 PBS, 处理 24 h 后用胰酶(不含 EDTA)消化并收集细胞。收集的细胞样品用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 遍, 加入凋亡试剂盒中提供的 1×Binding Buffer, 将 B16 细胞浓度调整为 1×10⁶ 个/mL。取出其中 100 μL 细胞液(1×10⁵ 个)至新的 EP 管中, 分别加入凋亡试剂盒中提供的 5 μL Annexin V-FITC 以及 5 μL 碘化丙啶试剂, 小心混匀, 室温下避光孵育 20 min。每个样品中再分别加入 400 μL 1×Binding Buffer 溶液, 用流式细胞仪检测细胞的凋亡率。细胞总凋亡率(%)=第二象限细胞凋亡率(晚期凋亡)+第四象限细胞凋亡率(早期凋亡)^[14]。

2.6 细胞内 Caspase-3 和 Caspase-8 的活性分析

B16 细胞在含 5%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中用 20 μg/mL TDH 处理。在第 0、3、6、9、12、15、18 和 24 h 时分别按照 Caspase-8 活性试剂盒和 Caspase-3 荧光检测试剂盒的要求处理 B16 细胞, 用酶标仪检测波长在 405 nm 处的吸光度以评价

Caspase-8 的活性, 另外 Caspase-3 活性检测的激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm。

2.7 线粒体膜电位

B16 细胞在 6 孔细胞板中培养, 在培养基中加入不同质量浓度的 TDH(0、5、10、20 μg/mL)、PBS(阴性对照)或 0.25 μg/mL 喜树碱(阳性对照), 37 °C 下孵育 24 h。然后收集细胞, 按照 JC-1 试剂盒的说明, 用亲脂性物质 JC-1 进行染色, 染色结束后用流式细胞仪分析 B16 细胞膜电位的变化趋势。

2.8 统计学分析

用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 通过非参数检验分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 TDH 的细胞毒性作用

所有细胞系经不同浓度的 TDH 处理后培养 24 h, 使用 MTT 法测定细胞活力。从表 1 可以看出, 不同细胞系的 IC₅₀ 值有所不同。B16 细胞对 TDH 最为敏感, IC₅₀ 值为 48 μg/mL。其次是人肝癌细胞(SMMC-7721), 而正常细胞(NCM460 和 LO2)对 TDH 不敏感。以上结果说明 TDH 对肿瘤细胞具有良好的选择性杀伤效应, 这对 TDH 用于肿瘤的治疗具有积极的意义。

表 1 TDH 对不同细胞系的 IC₅₀

Tab. 1 Half maximal inhibitory concentration of thermostable direct hemolysin against different cell lines

细胞系	B16	SMMC-7721	NCM460	LO2
IC ₅₀ (μg/mL)	48±1.5	54±6.1	151±9.2	118±7.3

3.2 TDH 对 B16 细胞克隆形成的影响

暴露于 TDH 后, 观察 B16 细胞集落形成的情况。如图 1 所示, 与对照组 TDH 质量浓度为 0 μg/mL 相比较, TDH 处理可显著抑制 B16 细胞的集落形成能力, 且呈浓度依赖性(P<0.001), 当 TDH 质量浓度为 10 μg/mL, B16 细胞克隆形成率降低至 45.07%。并且对照组的单个细胞克隆中的 B16 细胞数量多于实验组。由此可见, TDH 可在体外显著抑制 B16 细胞系的克隆形成。

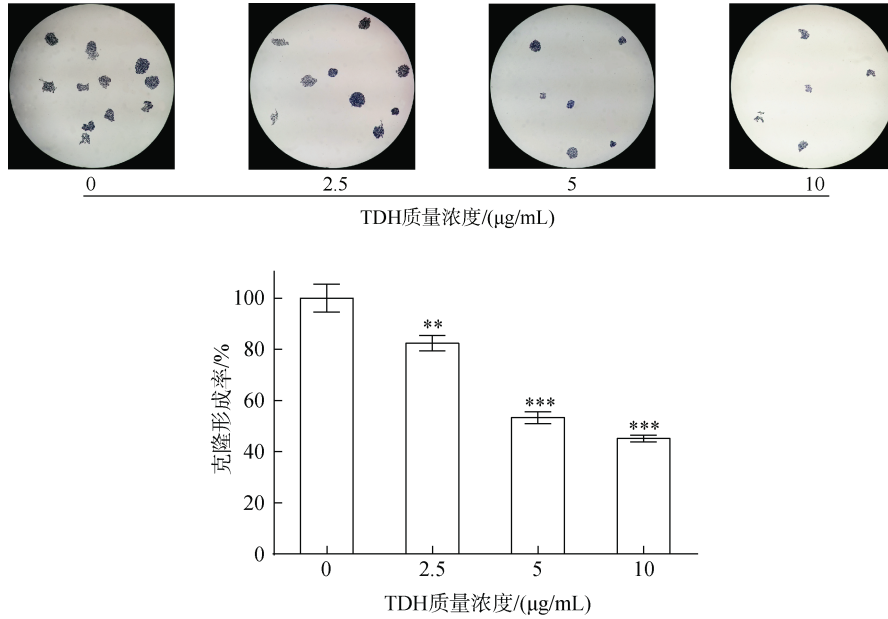


图1 TDH对B16细胞克隆形成的影响

Fig. 1 Effect of thermostable direct hemolysin on clone formation of B16 cells

与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.3 TDH对移植瘤模型体内肿瘤生长的影响

TDH对通过移植B16细胞引起小鼠体内黑色素瘤生长的影响如图2所示,6 mg/kg TDH实验组和阳性对照组(dacarbazine, 氮烯唑胺)小鼠的肿瘤体积均显著低于阴性对照组(PBS处理)小鼠的肿瘤体积($P < 0.001$),且6 mg/kg TDH实验组小鼠的肿瘤体积要小于阳性对照组。而2 mg/kg TDH实验组和4 mg/kg TDH实验组的小鼠肿瘤体积与阴性对照组均无显著差异。此外,TDH和氮烯唑胺处理对荷瘤小鼠血细胞数量的影响如表2所示,与阴性对照组相比,TDH处理不影响白细胞和红细胞的数量,而阳性对照氮烯唑胺可显著减少小鼠红细胞数量($P < 0.001$)。从表3可以看出,TDH和氮烯唑胺对荷瘤小鼠的各个脏器系数均无影响。这些结果表明,TDH在抑制黑色素瘤发展的有效剂量范围内对心、肝、脾、肺、肾、脑等器官和血液没有表现出明显的毒性,提示TDH是阻止黑色素瘤发展的潜在抑制剂。

3.4 TDH对B16细胞凋亡的影响

用0、5、10、20 µg/mL TDH处理B16细胞24 h后, FITC/PI双染流式细胞术结果表明(图3), TDH浓度为0 µg/mL时B16细胞凋亡率为3.2%,而TDH浓度为20 µg/mL时细胞凋亡率增加到19.4%($P < 0.001$)。这表明诱导细胞凋亡可能是TDH抑制黑色素瘤的重要机制之一。

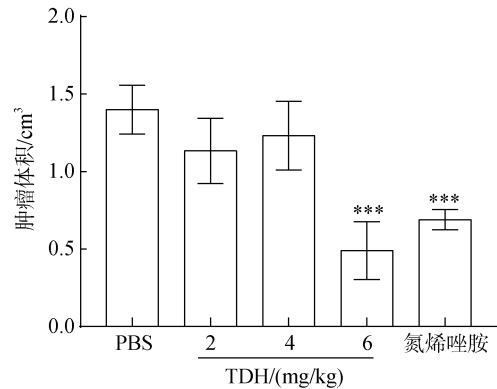


图2 TDH对小鼠体内黑色素瘤的影响

Fig. 2 Effect of thermostable direct hemolysin on melanoma in mice

与阴性对照组(PBS)比较, *** $P < 0.001$

Compared with negative control group(PBS), *** $P < 0.001$

表2 TDH和氮烯唑胺对荷瘤小鼠血细胞的影响

Tab. 2 Influence of thermostable direct hemolysin and dacarbazine on the blood cells of tumor-bearing mice

组别	RBC/($\times 10^7/L$)	WBC/($10^{11}/L$)
A(PBS)	842.12±102.62	69.33±57.71
B(2 mg/kg)	882.52±108.95	48.00±28.57
C(4 mg/kg)	801.64±95.20	56.00±35.38
D(6 mg/kg)	910.88±138.75	92.00±41.22
E(Dacarbazine)	706.80±74.88***	73.33±42.45

表 3 TDH 对荷瘤小鼠脏器系数的影响

Tab. 3 Influence of thermostable direct hemolysin on organ coefficients of tumor-bearing mice

组别	脏器系数/%					
	心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏	大脑
A(PBS)	0.45±0.06	5.06±0.28	0.86±0.26	0.62±0.04	1.10±0.16	1.63±0.21
B(2 mg/kg)	0.42±0.10	5.48±0.70	1.05±0.67	0.60±0.11	1.16±0.23	1.84±0.32
C(4 mg/kg)	0.40±0.07	5.33±1.07	0.71±0.32	0.63±0.12	1.02±0.33	1.61±0.30
D(6 mg/kg)	0.46±0.06	5.40±0.20	1.33±0.06	0.73±0.02	1.25±0.11	1.86±0.08
E(Dacarbazine)	0.39±0.09	5.00±1.00	0.58±0.29	0.57±0.16	1.12±0.27	1.47±0.41

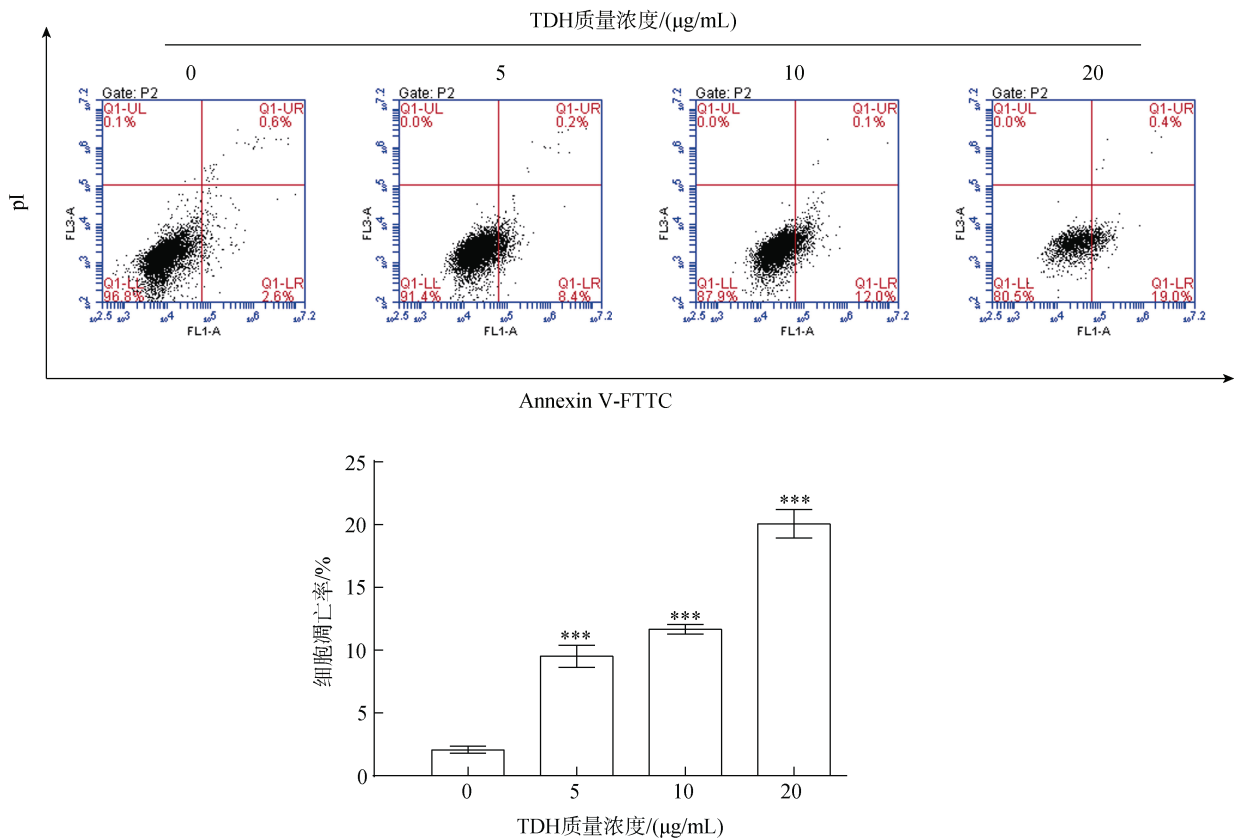


图 3 TDH 诱导 B16 细胞凋亡的作用

Fig. 3 Effect of thermostable direct hemolysin (TDH) on B16 cell apoptosis

与对照组比较, *** $P < 0.001$

compared with control group, *** $P < 0.001$

3.5 TDH 对 B16 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-8 激活的影响

半胱氨酸蛋白酶(Caspases)是一种蛋白水解酶,在控制细胞死亡中起着重要作用。在 TDH 处理后, Caspase-8 和 Caspase-3 分别在 6 和 8 h 被激活(图 4a 和 4b),说明 TDH 激活 Caspase-8 之后,引起了下游信号分子 Caspase-3 的活化,提示 TDH 可诱导 Caspase 级联反应,导致细胞凋亡。

3.6 TDH 对 B16 细胞线粒体膜电位的影响

在哺乳动物细胞中, Caspase-3 依赖的凋亡由两条途径启动: 细胞表面死亡受体的外源性途径或线粒体起始的内源性途径^[10, 15]。用 0、5、10、20 µg/mL TDH 刺激 B16 细胞 24 h 后,检测到线粒体膜电位的变化趋势。图 5 结果显示,不同浓度 TDH 刺激的 B16 细胞与阴性对照组细胞的线粒体膜电位无明显差异,提示 TDH 诱导的 B16 细胞凋亡与线粒体膜电位无关。结合

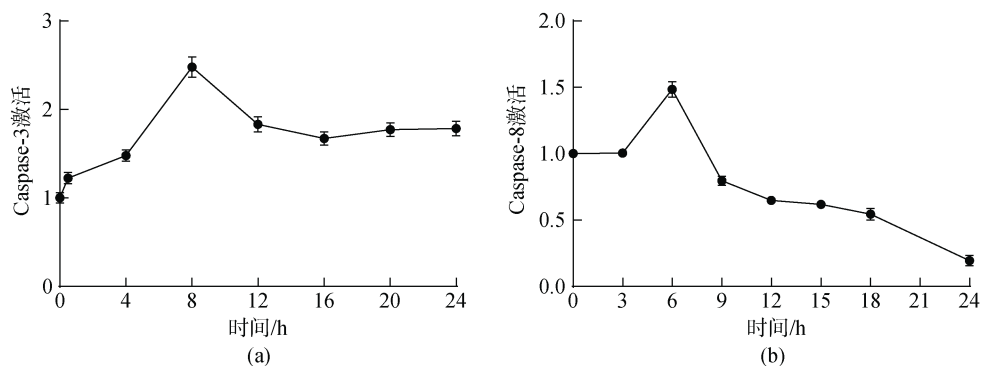


图4 TDH对B16细胞中Caspase-3(a)和Caspase-8(b)激活的影响

Fig. 4 Effect of thermostable direct hemolysin on the activation of Caspase-3 (a) and Caspase-8 (b) in B16 cells

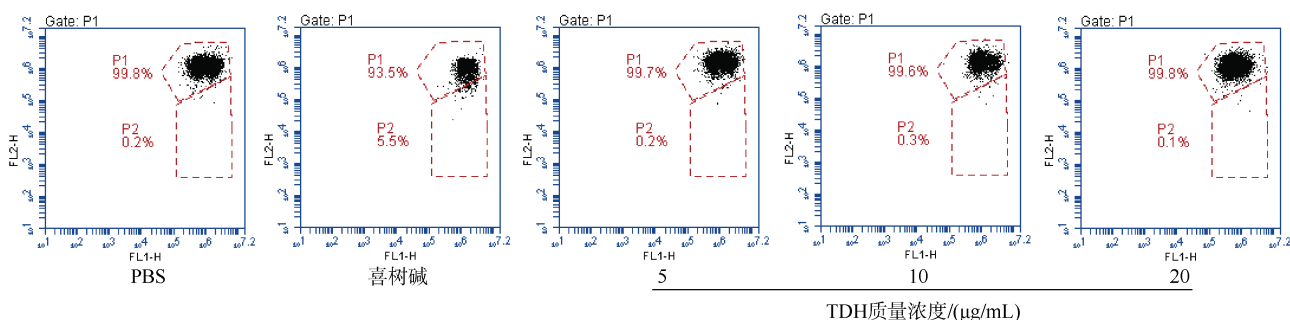


图5 TDH对B16细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 5 Effect of thermostable direct hemolysin on the mitochondrial membrane potential of B16 cells

图4, 说明TDH是通过细胞表面的死亡受体介导的外源性途径从而诱发Caspase-3级联反应最终导致细胞凋亡。

4 讨论

黑色素瘤是一种由黑色素细胞引起的恶性皮肤癌。由于黑色素细胞分布相对广泛, 如皮肤、葡萄膜、黏膜、直肠等, 所以黑色素瘤可能无处不在^[16-19]。对于早期患者, 黑色素瘤通过手术切除即可, 并且存活率很高, 但转移后存活率显著下降。对于转移性黑色素瘤的治疗而言, 过去10年开发的几种新药极大地改善了转移性黑色素瘤患者的预后^[20]。然而, 大多数患者对这些药物治疗没有表现出持久的反应。因此, 亟待开发更有效的黑色素瘤治疗药物。

近年来, 研究发现细菌和细菌毒素具有潜在的抗癌活性。链球菌(*Streptococcus*)和梭状芽孢杆菌(*Clostridium* spp.)是最早被用作抗癌剂的细菌^[21]。目前新式梭状芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) OK-432等是常见的细菌抗癌剂, 主要用于子宫肌瘤、淋巴瘤等实体瘤的治疗^[22-24]。细菌毒素是一种

有价值的癌细胞生长抑制因子, 具有抗肿瘤活性的细菌毒素分为两类: 与肿瘤表面抗原结合的毒素和与配体结合的毒素^[25]。如产气荚膜弧菌(*Clostridium perfringens*)产生的肠毒素与结直肠癌细胞表面大量存在的claudin-3和claudin-4结合在一起, 使细胞失去渗透平衡而导致癌细胞的溶解^[26]。近年来的研究表明, 副溶血性弧菌耐热直接溶血毒素(TDH)在直接杀伤肿瘤细胞或抑制肿瘤细胞增殖的过程中发挥重要作用, 最终导致实体瘤的抑制或消退^[10-12]。

本研究采用MTT法检测发现, 不同细胞系经TDH处理后, 两株人的正常细胞的IC₅₀比B16细胞高出2~3倍。由此可知, TDH对肿瘤细胞的毒性远大于正常细胞, 对肿瘤细胞具有一定的选择性。随后研究TDH对B16细胞克隆形成的影响, 结果表明TDH能显著抑制癌细胞的克隆形成。进一步的移植瘤模型体内实验结果说明: 6 mg/kg TDH处理小鼠的肿瘤体积小于PBS和氮烯唑胺对照组; 同时与对照组相比, TDH处理不影响白细胞和红细胞的数量, 对荷瘤小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑等器官的脏器系数没有显著影响, 表明TDH在抑制黑色素瘤发展的有效剂量范围内对小鼠的各种器官和血液没有表现

出明显毒性。体外和体内实验结果提示 TDH 可能是治疗黑色素瘤的潜在抑制剂。

进一步的凋亡实验、Caspase-8 和 Caspase-3 的活性分析以及线粒体膜电位检测发现, TDH 能有效诱导 B16 细胞凋亡, 并依次激活 Caspase-8 和 Caspase-3, 但不影响 B16 细胞的线粒体膜电位。由图 4、图 5 结果分析可知, TDH 诱导的凋亡可能属于细胞表面死亡受体起始的外源性途径。目前, 已知的死亡受体有 8 种: TNFR-1(又称 CD120a 或 p55)、FAS(CD95 或 Apo-1)、死亡受体 3(DR3)、死亡受体 4(DR4, TRAIL-R1)和死亡受体 5(DR5, TRAIL-R2)、死亡受体 6(DR6)、EDA-R(ectodermal dysplasia receptor)和 NGF-R^[27-28]。研究报道: DR3 主要分布于淋巴组织, 如脾脏、胸腺以及外周血淋巴细胞, 包括淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞等^[29]; FAS 和 NGF-R 在正常组织细胞中高表达, 在癌细胞中低表达^[30-31]; DR6 在正常组织细胞和癌细胞中均高表达^[32-33]。本研究发现 TDH 对正常细胞和小鼠黑色素瘤 B16 细胞的毒性相差约 2~3 倍, 这一现象说明与正常组织比较, TDH 结合的受体在 B16 细胞膜表面是高表达的, 可能是 TNFR-1、EDA-R、DR4 和 DR5 中的某一个或者一个目前尚未报道的新的受体。由此可推测 TDH 可能通过与肿瘤细胞膜表面高表达的死亡受体相互作用, 诱发了死亡受体起始的外源性途径, 进而激活了 Caspase-8, 并顺次激活 Caspase-3, 最终导致肿瘤细胞的凋亡(图 6)。

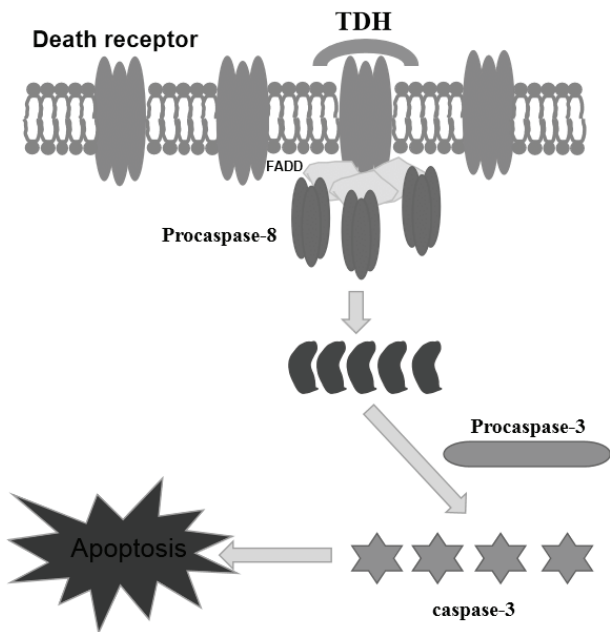


图 6 TDH 诱导肿瘤细胞凋亡的可能信号通路

Fig. 6 Signal pathway of TDH induced tumor cell apoptosis

5 结论

综上所述, 本实验研究了 TDH 对黑色素瘤的抗肿瘤作用, 发现 TDH 显著抑制了小鼠体内肿瘤的生长和体外 B16 细胞的增殖, 并促进 B16 细胞的凋亡。其作用机制可能是通过与肿瘤细胞膜表面高表达的死亡受体相互作用, 诱导细胞发生凋亡, 从而达到治疗黑色素瘤的目的, 但其具体的作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LODDE G, ZIMMER L, LIVINGSTONE E, et al. Malignant melanoma[J]. *Pathologie*, 2020, 41(3): 281-292.
- [2] EIDER D E, BASTIAN B C, CREE I A, et al. The 2018 world health organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: Detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(4): 500-522.
- [3] BOLICK N L, GELLER A C. Epidemiology of melanoma[J]. *Hematology Oncology Clinics of North America*, 2021, 35(1): 57-72.
- [4] 王丽. 达卡巴嗪长循环脂质体的制备及体内药代动力学、药效学初步研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2018. WANG Li. Preparation of dacarbazine long-circulating liposomes and its preliminary evaluation of pharmacokinetics and pharmacodynamics in vivo[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2018.
- [5] MISHRA H, MISHRA P K, EKIELSKI A, et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2018, 144(12): 2283-2302.
- [6] CUI C L, HAO Y, LING L Z, et al. Biotoxins for cancer therapy[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15: 4753-4756.
- [7] BRIGOTTI M, ARFILLI V, CARNICELLI D, et al. Shiga toxin 1, as DNA repair inhibitor, synergistically potentiates the activity of the anticancer drug, mafosfamide, on Raji cells[J]. *Toxins*, 2013, 5(2): 431-444.
- [8] KREITMAN R J, SQUIRES D R, STETLER S M, et al. Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(27): 6719-6729.
- [9] VERMA P, CHATTOPADHYAY K. Current perspective on the membrane-damaging action of thermostable direct hemolysin, an atypical bacterial pore-forming toxin[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 717147.
- [10] 马燕, 杨靖亚, 李诗怡, 等. 副溶血弧菌耐热直接溶血毒素抑制人肺腺癌细胞活性的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(1): 54-65.

- MA Yan, YANG Jingya, LI Shiyi, et al. Antitumor activity of *Vibrio parahaemolyticus thermostable* direct hemolysin on human lung cancer cell[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(1): 54-65.
- [11] HUANG S C, WANG Y K, HUANG W T, et al. Potential antitumor therapeutic application of *Grimontia holisae thermostable* direct hemolysin mutants[J]. Cancer Science, 2015, 106(4): 447-454.
- [12] CHOWDHURY P, PORE D, MAHATA N, et al. Thermostable direct hemolysin downregulates human colon carcinoma cell proliferation with the involvement of E-cadherin, and beta-catenin/Tcf-4 signaling[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20098.
- [13] 王霄霞. 外周血细胞形态学检查技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
WANG Xiaoxia. Morphological examination techniques of peripheral blood cells[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.
- [14] 丛丽, 谢小林, 刘素娟, 等. TIPE2 通过抑制 Akt 磷酸化促进 LPS 活化的巨噬细胞凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(2): 135-141.
CONG Li, XIE Xiaolin, LIU Sujuan, et al. TIPE2 promotes LPS-activated macrophages apoptosis by inhibiting Akt phosphorylation[J]. Chinese Journal of Immunology, 2022, 38(2): 135-141.
- [15] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. Annual Review of Immunology, 2018, 36: 489-517.
- [16] GUO W, WANG H, LI C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 424.
- [17] JAGER M J, SHIELDS C L, CEBULLA C M, et al. Uveal melanoma[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2020, 6(1): 24.
- [18] OLLA D, NEUMEISTER M W. Mucosal melanoma[J]. Clinics in Plastic Surgery, 2021, 48(4): 707-711.
- [19] DE MEIRA J D, SOBRADO L F, GUZELA V M, et al. Anorectal mucosal melanoma: A case report and literature review[J]. American Journal of Case Reports, 2021, 22: e933032.
- [20] SCHADENDORF D, AKKOOI A C J, BERKING C, et al. Melanoma[J]. Lancet, 2018, 392(10151): 971-984.
- [21] BAINBARA P, MANDAL S M. Bacteria and bacterial anticancer agents as a promising alternative for cancer therapeutics[J]. Biochimie, 2020, 177: 164-189.
- [22] STAEDTKE V, ROBERTS N J, BAI R Y, et al. Clostridium novyi-NT in cancer therapy[J]. Genes Diseases, 2016, 3(2): 144-152.
- [23] SCHMITZ-WINNENTHAL F H, HOHMANN N, SCHMIDT T, et al. A phase I trial extension to assess immunologic efficacy and safety of prime-boost vaccination with VX001, an oral T cell vaccine against VEGFR2, in patients with advanced pancreatic cancer[J]. Oncoimmunology, 2018, 7(4): e1303584.
- [24] OLIVIERI C, NANNI L D E, GAETANO A M, et al. Complete resolution of retroperitoneal lymphangioma with a single trial of OK-432 in an infant[J]. Pediatrics and Neonatology, 2016, 57(3): 240-243.
- [25] WEERAKKODY L R, WITHARANA C. The role of bacterial toxins and spores in cancer therapy[J]. Life Science, 2019, 235: 116839.
- [26] EBRAHIMZADEH S, AHANGARI H, SOLEIMANIAN A, et al. Colorectal cancer treatment using bacteria: focus on molecular mechanisms[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 218-230.
- [27] WULF S B, ULRIKE H, MARTIN E. Membrane trafficking of death receptors: Implications on signalling[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14: 14475-14503.
- [28] MORIWAKI K, CHAN F K M, MIYOSHI E. Sweet modification and regulation of death receptor signalling pathway[J]. Journal of Biochemistry, 2021, 169(6): 643-652.
- [29] YU Y, JIANG P, SUN P, et al. Analysis of therapeutic potential of preclinical models based on DR3/TL1A pathway modulation (Review)[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2021, 22(1): 693.
- [30] GUEGAN J P, GINESTIER C, CHARAFE-JAUFFRET E, et al. CD95/Fas and metastatic disease: What does not kill you makes you stronger[J]. Seminars in Cancer Biology, 2020, 60: 121-131.
- [31] 李昊. 神经生长因子受体 NGFR 在慢阻肺发病中的作用[D]. 济南: 山东大学, 2018.
LI Hao. The contribution of nerve growth factor receptor NGFR to the pathogenesis of COPD[D]. Jinan: Shandong University, 2018.
- [32] 李靖云, 胡瑞, 杜秋妹, 等. 死亡受体 6 的胞内结构域对其亚细胞定位的调节[J]. 生物物理学报, 2014, 30(2): 117-126.
LI Jingyun, HU Rui, DU Qiumei, et al. Death receptor 6 subcellular localization regulated by its intracellular domains[J]. Acta Biophysica Sinica, 2014, 30(2): 117-126.
- [33] STEGMANN S, WERNER J M, KUHLE S, et al. Death receptor 6 (DR6) is overexpressed in astrocytomas[J]. Anticancer Research, 2019, 39(5): 2299-2306.

Study on the inhibitory effect of thermostable direct hemolytic toxin from *Vibrio parahaemolyticus* on melanoma

YANG Lan-zhu, LI Shi-yi, ZHENG Wen-jing, LI Jing, BAO Zhe-wei, YANG Jing-ya
(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Mar. 28, 2022

Key words: Marine toxins; thermostable direct hemolytic toxin; antitumor; death receptor; apoptosis

Abstract: This paper aims to investigate the inhibitory effect of thermostable direct hemolysin (TDH) on B16 mouse melanoma cells *in vivo* and *in vitro*. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of TDH on different cells were compared, and the inhibitory effect of TDH on B16 mouse melanoma cells *in vivo* and *in vitro* was evaluated using MTT assay, clone formation test, apoptosis test, activity test of caspase-8 and caspase-3, detection of mitochondrial membrane potential, and tumor-bearing test of C57BL/6 mice *in vivo*. After 24 h of TDH treatment, the IC₅₀ of human colon epithelial cell NCM460, human liver fibroblast LO2, human liver cancer cell SMMC-7721, and mouse melanoma cell B16 were 151 µg/mL, 118 µg/mL, 54 µg/mL, and 42 µg/mL, respectively. The IC₅₀ of normal cells was 2–3 times higher than that of cancer cells. TDH could inhibit the clonal formation of B16 cells in a dose-dependent manner below a concentration of 20 µg/mL. TDH at 6 mg/kg significantly inhibited tumor growth *in vivo* in the transplanted tumor model ($P < 0.05$). Flow cytometry and fluorescent reagent detection revealed that 20 µg/mL TDH could induce early apoptosis in B16 cells by 19.4% and activate caspase-8 and caspase-3, but it had no effect on mitochondrial membrane potential. TDH has antitumor activity both *in vivo* and *in vitro*. It may induce apoptosis via the apoptosis signal pathway mediated by the death receptor on the cell surface, thereby acting as an antitumor agent.

(本文编辑: 谭雪静)