

抗菌肽 LL-37 通过激活 AMPK 介导的自噬对结肠癌 HT-29 细胞凋亡的研究

谢亚锋¹, 许志杰¹, 丁雅婷¹, 闫圣玉¹, 张 侨¹, 刘菀莹¹, 刘丽兵²

摘要 目的 探讨抗菌肽 LL-37 对结肠癌 HT-29 细胞凋亡的影响及其分子机制。方法 以结肠癌 HT-29 细胞作为研究对象,加入不同浓度(50、100、200 $\mu\text{g/ml}$)的抗菌肽 LL-37 或联合 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)抑制剂多索吗啡(10 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h 后,采用流式细胞术检测 HT-29 细胞凋亡率,Western blot 实验检测 HT-29 细胞凋亡相关蛋白(Bcl-2 和 Bax)、自噬相关蛋白(Beclin1、Atg5、LC3I 和 LC3II)和 AMPK 蛋白的表达。结果 高浓度抗菌肽 LL-37 能促进结肠癌 HT-29 细胞凋亡($P < 0.05$),并上调自噬相关蛋白 Beclin1、Atg5 表达水平以及提高 LC3II/LC3I 值($P < 0.05$),并且伴随着 AMPK 异常激活($P < 0.01$);AMPK 抑制剂联合干预能逆转抗菌肽 LL-37 对 HT-29 细胞的作用效果。结论 抗菌肽 LL-37 通过激活 AMPK 介导的自噬促进结肠癌 HT-29 细胞的凋亡。

关键词 结肠癌 HT-29 细胞; AMPK; 抗菌肽 LL-37; 细胞自噬; 细胞凋亡

中图分类号 R 735.5+5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)12-1845-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.006

结肠癌是最常见的消化道肿瘤之一,在全球癌症相关死亡率中排行第三^[1]。由于结肠癌具有局部复发、远处转移以及化疗耐药的特性,是一种高死亡率的疾病^[2]。寻找更多的潜在治疗性生物靶标是治疗结肠癌的理想思路。AMP 依赖的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是能量代谢调节关键因子,参与调控介导自噬的过程^[3]。自噬通过消化功能失调的蛋白质和细胞器,在致癌作用中起重要作用^[4]。抗菌肽 LL-37 是人体内发现的一种组织蛋白酶类抗菌肽,由前体肽 hCAP-18 水解释放^[5]。研究^[6-9]表明,LL-37 在胃癌、肺癌、黑色素

瘤及白血病中异常表达。作为肿瘤抑制因子,hCAP18/LL-37 在胃癌和淋巴细胞白血病中表达下调。然而,AMPK 和自噬是否参与了抗菌肽 LL-37 对结肠癌细胞凋亡的调控尚不明确。该研究探讨了抗菌肽 LL-37 对结肠癌 HT-29 细胞凋亡的作用机制,为明确相关作用机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂 人结肠癌细胞株 HT-29 购自北京北纳生物(BNCC)细胞库。McCoy's 5A 培养基购自美国 SIGMA 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司;AMPK 抑制剂购自德国 Merck 公司;抗菌肽 LL-37 购自上海锐东生物科技有限公司;Annexin-V FITC/PI 双染试剂盒购自上海贝博生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液均购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo 公司;兔抗 Bax(1:1 000)、兔抗 Bcl-2(1:2 000)、兔抗 p-AMPK(1:1 000)、兔抗 LC3A(1:50 000)、兔抗 LC3B(1:1 000)、兔抗 GAPDH(1:2 500)、兔抗 AMPK(1:1 000)、兔抗 Beclin1(1:2 000)、兔抗 Atg5(1:1 000)、二抗山羊抗兔 IgG(1:2 000)均购自英国 ABCAM 公司。

1.2 实验仪器 超净工作台购自苏州智净净化设备有限公司;CO₂ 恒温细胞培养箱购自美国 Thermo 公司;倒置荧光显微镜购自德国莱卡公司;流式细胞仪购自美国 Beckman 公司;电泳仪和全自动化学发光分析仪购自上海天能科技有限公司。

1.3 细胞培养及分组处理 使用含有 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养 HT-29 细胞。将细胞分为对照组、低浓度组(50 $\mu\text{g/ml}$)、中浓度组(100 $\mu\text{g/ml}$)和高浓度组(200 $\mu\text{g/ml}$)检测不同浓度抗菌肽 LL-37 处理 48 h 对 HT-29 细胞凋亡,AMPK 活性以及自噬的影响。此外,将细胞分为高浓度组(200 $\mu\text{g/ml}$)和高浓度 LL-37 联合 AMPK 抑制剂组,先采用 AMPK 抑制剂(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理 30 min 后,再采用高浓度 200

2020-07-20 接收

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(编号:16C1408);衡阳市科技局 2018 年指导性项目(编号:S2018F9031022235)

作者单位:¹ 南华大学附属第二医院肛肠科,衡阳 421001

² 南华大学附属南华医院肛肠科,衡阳 421001

作者简介:谢亚锋,男,硕士研究生;

闫圣玉,男,硕士研究生,责任作者,E-mail: xieyafeng5918@163.com

μg/ml 抗菌肽 LL-37 处理 48 h,检测 AMPK 被抑制后,抗菌肽 LL-37 对 HT-29 细胞凋亡和自噬的作用。

1.4 Annexin-V FITC/PI 双染法检测 HT-29 细胞凋亡 取对数期细胞,以 2×10^5 个/ml 细胞浓度接种于 6 孔板中,分组处理后在细胞培养箱中培养 48 h,收集细胞并将细胞浓度调整为 4×10^5 个/ml,用 PBS 洗涤细胞 2 次后,用 500 μl PBS 溶液将细胞重悬。每孔分别加入 5 μl Annexin-FITC 和 5 μl PI,充分混匀后室温避光 30 min。完成孵育后立刻上流式细胞仪进行细胞凋亡定量检测。

1.5 Western blot 检测 HT-29 细胞凋亡、AMPK 以及自噬相关蛋白表达 分组处理 48 h 后收集细胞,加入 RIPA 裂解液后,提取细胞总蛋白,用 BCA 法检测蛋白浓度后,用 10% 的 SDS-PAGE 胶分离蛋白,用湿转法转膜至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉封闭后,加入相应一抗 4 °C 孵育过夜。再将辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h 后,加入 ECL 显色,曝光后采集图片。以 GAPDH 为内参,用软件进行灰度值分析。

1.6 统计学处理 所有实验均独立重复 3 次。实验数据均采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素 ANOVA 方差法进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗菌肽 LL-37 促进结肠癌 HT-29 细胞凋亡

Annexin-V FITC/PI 双染法检测结果(图 1)显示 A 组细胞进行比较,组间凋亡率差异有统计学意义($F = 195.01, P < 0.001$)。与对照组比较,低浓度组细胞凋亡率没有改变,而中浓度和高浓度细胞凋亡率升高($t = 12.79, P < 0.001; t = 22.14, P < 0.01$)。Western blot 检测结果(图 2)显示 A 组细胞进行比较,凋亡率组间差异有统计学意义($F = 45.53, P < 0.001$);与对照组比较,低浓度组 Bcl-2/Bax 没有变化,而中浓度和高浓度细胞 Bcl-2/Bax 降低($t = 9.87, P < 0.05; t = 12.93, P < 0.01$)。结果表明一定浓度的抗菌肽 LL-37 能促进结肠癌 HT-29 细胞凋亡。

2.2 抗菌肽 LL-37 促进结肠癌 HT-29 细胞自噬

Western blot 实验结果(图 3)显示 A 组细胞进行比较,LC3II/LC3I ($F = 91.08, P < 0.001$)、Atg5 ($F = 54.11, P < 0.001$) 以及 Beclin1 ($F = 47.28, P < 0.001$) 表达水平组间差异有统计学意义。与对照

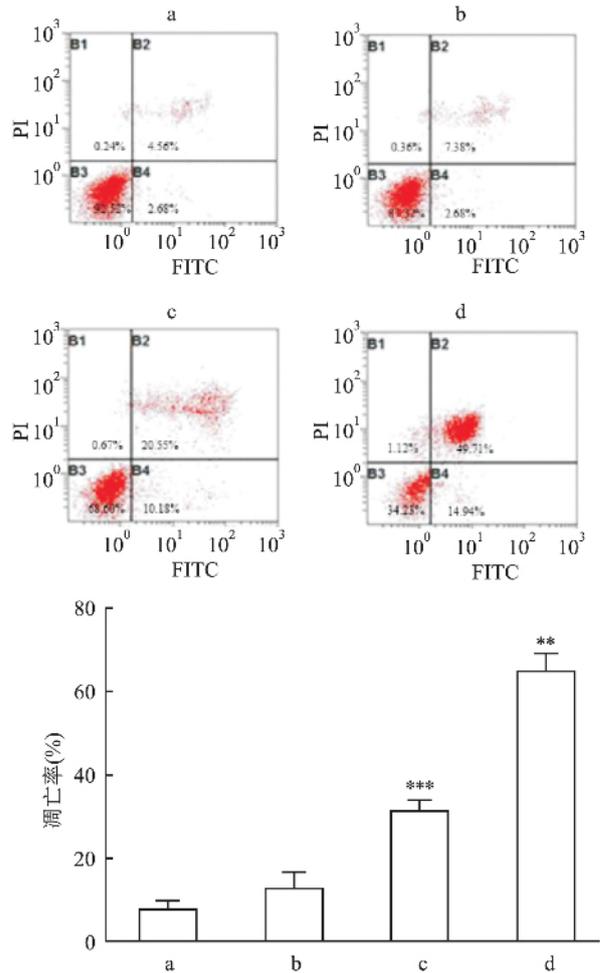


图 1 流式细胞术检测 HT-29 细胞凋亡

a: 对照组; b: 低浓度组; c: 中浓度组; d: 高浓度组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

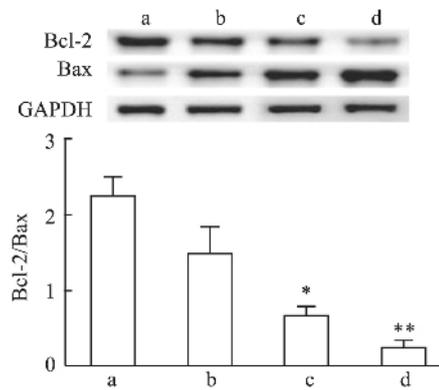


图 2 Western blot 法检测凋亡蛋白表达水平

a: 对照组; b: 低浓度组; c: 中浓度组; d: 高浓度组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

组比较,低浓度组细胞 Beclin1、Atg5 以及 LC3II/LC3I 没有变化,而中浓度和高浓度组细胞 Beclin1 ($t = 7.75, P < 0.05; t = 8.63, P < 0.01$)、Atg5 ($t =$

6.189, $P < 0.01$; $t = 13.12$, $P < 0.001$) 以及 LC3II/LC3I 提高 ($t = 12.94$, $P < 0.001$; $t = 13.13$, $P < 0.001$)。结果说明一定浓度的抗菌肽 LL-37 能促进结肠癌 HT-29 细胞发生自噬。

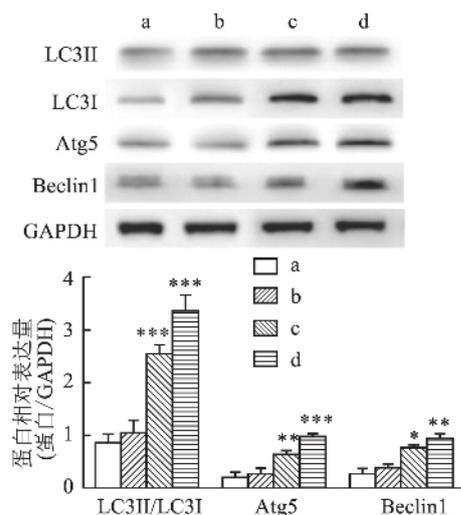


图3 抗菌肽 LL-37 在 HT-29 细胞中对自噬相关蛋白表达的影响
a: 对照组; b: 低浓度组; c: 中浓度组; d: 高浓度组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 抗菌肽 LL-37 促进 AMPK 信号异常激活

Western blot 实验结果(图4)显示 4 组细胞进行比较 p-AMPK/AMPK ($F = 112.70$, $P < 0.001$) 表达水平组间差异有统计学意义。与对照组比较,低浓度组细胞 p-AMPK/AMPK 无变化,而中浓度和高浓度组细胞 p-AMPK/AMPK 升高($t = 6.76$, $P < 0.01$; $t = 15.76$, $P < 0.01$)。结果表明一定浓度的抗菌肽 LL-37 能激活 AMPK 信号。

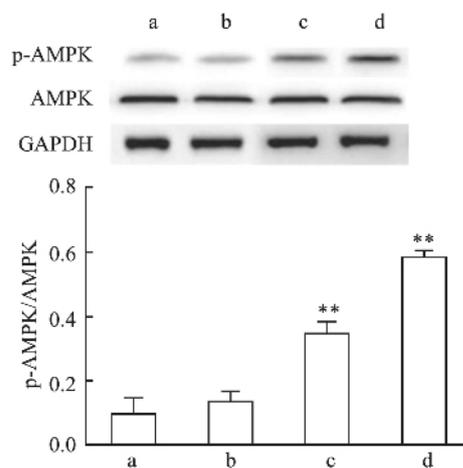


图4 抗菌肽 LL-37 在 HT-29 细胞中对 AMPK 活化的影响
a: 对照组; b: 低浓度组; c: 中浓度组; d: 高浓度组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 阻断 AMPK 信号抑制结肠癌 HT-29 细胞凋亡 Annexin-V FITC/PI 双染法检测结果(图5)显示,与高浓度组比较,高浓度 + AMPK 抑制剂组细胞凋亡率降低($t = 7.70$, $P < 0.01$)。Western blot 检测结果(图6)显示,与高浓度组比较,高浓度 + AMPK 抑制剂组 Bcl-2/Bax 升高($t = 7.74$, $P < 0.05$)。结果表明 AMPK 信号参与了抗菌肽 LL-37 促结肠癌 HT-29 细胞凋亡的作用。

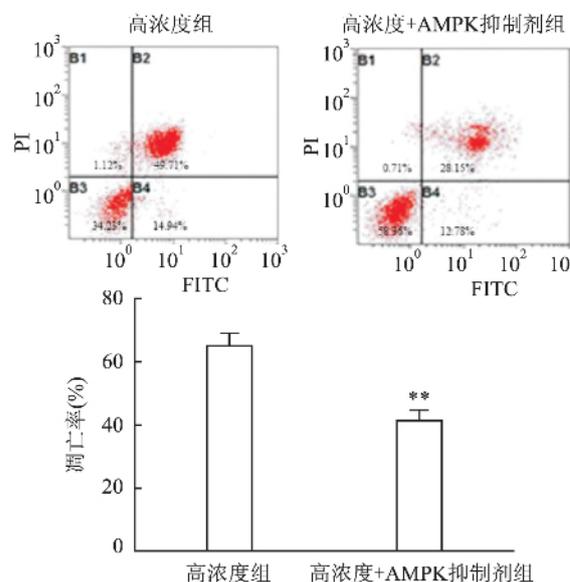


图5 流式细胞术检测细胞凋亡率
与高浓度组比较: ** $P < 0.01$

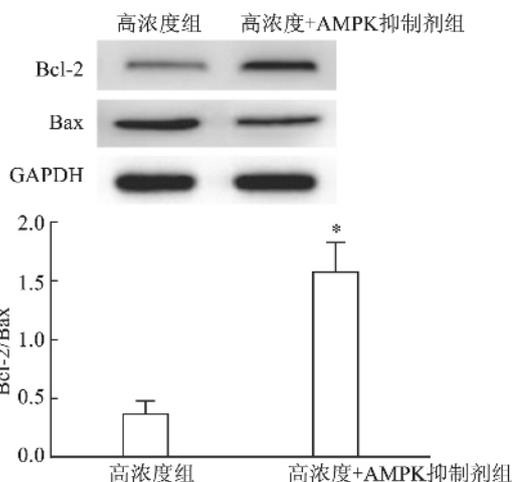


图6 Western blot 法检测凋亡蛋白表达水平
与高浓度组比较: * $P < 0.05$

2.5 阻断 AMPK 信号抑制结肠癌 HT-29 细胞自噬

Western blot 实验结果(图7)显示,与高浓度组比较,高浓度 + AMPK 抑制组细胞 Beclin1 ($t = 12.28$, $P < 0.01$)、Atg5 ($t = 7.00$, $P < 0.01$) 以及

LC3II/LC3I 降低 ($t = 6.03, P < 0.01$)。结果提示 AMPK 参与了抗菌肽 LL-37 促结肠癌 HT-29 细胞发生自噬的作用。

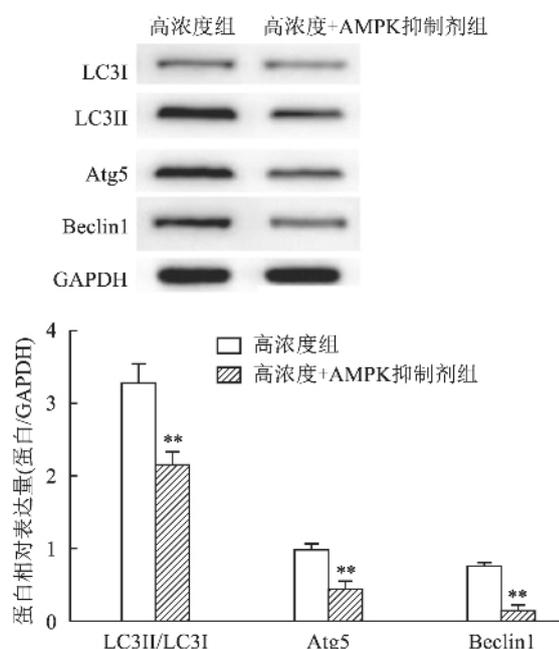


图7 阻断 AMPK 信号对抗菌肽 LL-37 处理的 HT-29 细胞自噬相关蛋白表达的影响 与高浓度组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

抗菌肽(antimicrobial peptides ,AMPs) 是一类具有抗菌活性的先天免疫效应分子活性肽,主要由上皮细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞合成和释放。当出现内外源刺激时,前体肽原 hCAP-48 便会水解释放 LL-37。由于 N 端前两个氨基酸残基为亮氨酸(L) 而总氨基酸残基总数为 37,因此命名为 LL-37^[10]。有研究^[11]提出,抗菌肽 LL-37 作为肿瘤抑制因子,在结肠癌中 LL-37 的表达下调,并且临床样本检测显示,LL-37 与肿瘤细胞的凋亡紧密相关。结合 LL-37 在结肠癌中的表达下调和 LL-37 与结肠癌细胞凋亡紧密相关,可以猜想 LL-37 在结肠癌发生中是否具有促/抗凋亡功能。有数据^[12]显示,在 p53 野生型结肠癌细胞中,LL-37 诱导磷脂酰丝氨酸外显和 DNA 片段化而不激活半胱天冬酶,说明 LL-37 能诱导半胱天冬酶依赖性凋亡的发生。小鼠源性抗菌肽(mouse cathelin-related antimicrobial peptide mCRAMP) 灌肠研究^[13]发现降低了氧化氮甲烷和硫酸葡聚糖诱导的结直肠癌小鼠的肿瘤大小和数量,但不诱导肿瘤和相邻正常结肠组织的细胞凋

亡。本研究显示,抗菌肽 LL-37 能促进结肠癌细胞 HT-29 的凋亡,异常激活 HT-29 细胞自噬,并且 LL-37 对结肠癌细胞 HT-29 的作用呈浓度梯度趋势。

AMPK 作为一种中枢代谢调节因子,是一种维持细胞能量平衡的代谢应激传感酶,已被广泛应用于能量消耗或补偿途径。葡萄糖/糖原代谢是一种主要的代谢途径,参与多种细胞活动,如增殖、生长和抗应激。葡萄糖饥饿是一种有效的生理性 AMPK 激活状态,在这种状态下,AMPK 会根据细胞或组织触发各种代谢事件。自噬是一种重要的降解途径,它不仅能维持细胞内平衡,去除蛋白质聚集物和功能失调的亚细胞器等潜在的危险成分,而且还能对营养缺乏等代谢应激作出适应性反应。证据^[14]表明,自噬与包括 AMPK 在内的营养信号模块密切相关,以根据许多不同的细胞信号对代谢途径进行微调,AMPK 和自噬对代谢紊乱也有一定的作用。本研究显示,抑制 AMPK 活性,能抑制结肠癌细胞 HT-29 的凋亡和自噬发生。有研究^[15]提出,抗菌肽 LL-37 参与了 4-苯基丁酸盐(PBA) 对人巨噬细胞结核分歧杆菌(MTB) 的自噬诱导,并且呈依赖性。沉默 LL-37,PBA 不能诱导 MTB 感染的人巨噬细胞发生自噬,当重新补充 LL-37 后,PBA 恢复诱导细胞内自噬功能^[15]。本研究显示,抗菌肽 LL-37 能异常激活 AMPK 的活性,且呈浓度趋势。在抗菌肽 LL-37 处理后的结肠癌细胞 HT-29 中添加 AMPK 抑制剂后,抑制 AMPK 能抑制 LL-37 处理后的结肠癌细胞 HT-29 的凋亡,降低 LL-37 处理后的 HT-29 细胞的自噬。

综上所述,抗菌肽 LL-37 能促进结肠癌细胞 HT-29 的凋亡,并且该过程与激活 AMPK 介导细胞发生自噬相关。该结果为深入了解抗菌肽 LL-37 促进结肠癌细胞凋亡的相关分子机制提供了一部分实验依据,为后续的潜在靶向治疗提供了思路。

参考文献

[1] Zeng M ,Zhu L ,Li L ,et al. miR-378 suppresses the proliferation , migration and invasion of colon cancer cells by inhibiting SDAD1 [J]. Cell Mol Biol Lett ,2017 , 22: 12.

[2] Shi Y ,Huang X X ,Chen G B ,et al. Dragon (RGMb) induces oxaliplatin resistance in colon cancer cells[J]. Oncotarget ,2016 , 7 (30) : 48027 - 37.

[3] Jang J E ,Eom J I ,Jeung H K ,et al. Targeting AMPK-ULK1-mediated autophagy for combating BET inhibitor resistance in acute myeloid leukemia stem cells[J]. Autophagy ,2017 , 13 (4) : 761 - 2.

[4] Liu L ,Jin X ,Hu C F ,et al. Exosomes derived from mesenchymal

- stem cells rescue myocardial ischaemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy *via* AMPK and Akt pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 52–68.
- [5] Sheehan G, Bergsson G, McElvaney N G, et al. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 promotes the growth of the pulmonary pathogen *aspergillus fumigatus* [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(7): e00097–18.
- [6] Hase K, Murakami M, Jimura M, et al. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori* [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1613–25.
- [7] Ji P, Zhou Y, Yang Y, et al. Myeloid cell-derived LL-37 promotes lung cancer growth by activating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Theranostics*, 2019, 9(8): 2209–23.
- [8] Jia J, Zheng Y, Wang W, et al. Antimicrobial peptide LL-37 promotes YB-1 expression, and the viability, migration and invasion of malignant melanoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 240–8.
- [9] Ye Y, Carlsson G, Karlsson-Sjoberg J M, et al. The antimicrobial propeptide hCAP-18 plasma levels in neutropenia of various aetiologies: a prospective study [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11685.
- [10] Kim J S, Jeong J H, Cho J H, et al. Antimicrobial activity of antimicrobial peptide LPein-YK3 derived from bovine lactophorin [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(8): 1299–309.
- [11] Wang J, Cheng M, Law I K M, et al. Cathelicidin suppresses colon cancer metastasis *via* a P2RX7-dependent mechanism [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, 12: 195–203.
- [12] Ren S X, Cheng A S, To K F, et al. Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6512–23.
- [13] Cheng M, Ho S, Yoo J H, et al. Cathelicidin suppresses colon cancer development by inhibition of cancer associated fibroblasts [J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2015, 8: 13–29.
- [14] Ha J, Guan K L, Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism [J]. *Mol Aspects Med*, 2015, 46: 46–62.
- [15] Rekha R S, Raomuvva S S, Wan M, et al. Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of mycobacterium tuberculosis in human macrophages [J]. *Autophagy*, 2015, 11(9): 1688–99.

Study of antimicrobial peptide LL-37 on apoptosis of colon carcinoma cell line HT-29 by activating AMPK-mediated autophagy

Xie Yafeng, Xu Zhijie, Ding Yating, et al

(Dept of Anorectal, The Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001)

Abstract Objective To investigate the effect of antimicrobial peptide LL-37 on apoptosis of colon carcinoma HT-29 cells and its molecular mechanism. **Methods** Colon cancer HT-29 cells were treated with antimicrobial peptide LL-37 at different concentrations of 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ and 200 $\mu\text{g/ml}$ or LL-37 combined with AMPK inhibitor dorsomorphin (10 $\mu\text{mol/L}$, pre-treated for 30 min) for 48 h. The apoptosis rate of HT-29 cells was assessed by flow cytometry. Apoptotic proteins (Bcl-2 and Bax), autophagy-related proteins (Beclin1, Atg5, LC3I and LC3II) and AMPK protein were detected by Western blot assay. **Results** High dose antimicrobial peptide LL-37 could promote apoptosis of HT-29 cells in colon carcinoma ($P < 0.05$), and increase the expression of autophagy related proteins Beclin1, Atg5 and LC3II/LC3I ($P < 0.05$), accompanied by abnormal activation of AMPK ($P < 0.01$). Intervention of AMPK inhibitor dorsomorphin combined with LL-37 could reverse the effect of antimicrobial peptide LL-37 on HT-29 cells in colon carcinoma. **Conclusion** Antimicrobial peptide LL-37 promotes apoptosis of colon cancer cell line HT-29 by activating AMPK-mediated autophagy.

Key words colon cancer HT-29 cell; AMPK; antimicrobial peptide LL-37; cell autophagy; cell apoptosis