

# 抗菌肽 WK-13-3D 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用及其机制

马飞, 宋瑾萱, 贺敏, 王秀青\*

宁夏医科大学检验学院, 宁夏银川 750004

[中图分类号] R737.9 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1720.2024.0925

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 马飞, 宋瑾萱, 贺敏, 等. 抗菌肽 WK-13-3D 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(6): 740-746.

[收稿日期] 2023-12-29 [录用日期] 2024-03-28 [上线日期] 2024-09-25

**[摘要]** 目的 探讨抗菌肽 WK-13-3D 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用及其可能机制。方法 采用 CCK-8 法检测 0、10、15、20、25、30、35、40  $\mu\text{mol/L}$  抗菌肽 WK-13-3D 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响; Pull down 实验确定抗菌肽 WK-13-3D 与 MDA-MB-231 细胞的互作蛋白。取 MDA-MB-231 细胞, 设置: (1) 对照组及 10、20  $\mu\text{mol/L}$  抗菌肽 WK-13-3D 处理组, 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况, Western blotting 检测细胞中重链结合蛋白(BiP)、蛋白激酶 R 样内网激酶(PERK)、真核翻译起始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )、磷酸化 eIF2 $\alpha$ (p-eIF2 $\alpha$ )、Bax 蛋白的表达变化; (2) 对照组(转染空载质粒)、si-BiP-592 组(转染 si-BiP-592 干扰质粒)与 si-BiP-592+WK-13-3D 组(转染 si-BiP-592 干扰质粒+10  $\mu\text{mol/L}$  抗菌肽 WK-13-3D), 采用 Western blotting 检测 BiP、PERK、eIF2 $\alpha$ 、p-eIF2 $\alpha$  及 Bax 蛋白的表达变化。12 只 BALB/c 小鼠随机分为 PBS 组( $n=4$ )、紫杉醇(TAX)组( $n=4$ )与 WK-13-3D 组( $n=4$ )。所有小鼠皮下注射 MDA-MB-231 细胞建立三阴性乳腺癌移植瘤模型。WK-13-3D 组瘤旁注射抗菌肽 WK-13-3D[200 mg/(kg·d)], TAX 组腹腔注射 TAX[200 mg/(kg·d)], PBS 组注射等体积的 PBS。注射后 2 周处死小鼠, 测量肿瘤重量和体积并拍照, 采用免疫组化染色检测肿瘤组织中 BiP 和 Ki-67 蛋白的表达情况。结果 CCK-8 法检测结果显示, 随着抗菌肽 WK-13-3D 浓度逐渐增加, MDA-MB-231 细胞存活率逐渐下降, 半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 19.82  $\mu\text{mol/L}$ 。Pull-down 实验匹配到抗菌肽与 MDA-MB-231 细胞的互作蛋白共 268 种, 主要包括 BiP、热休克蛋白 90 $\beta$ 1(HSP90B1)、含缬酪蛋白(VCP)、人类 71 kD 热休克同源蛋白(HSPA8)等。与对照组相比, 10、20  $\mu\text{mol/L}$  抗菌肽 WK-13-3D 处理组 MDA-MB-231 细胞凋亡率明显升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 细胞中 BiP 蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ), PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、Bax 蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), eIF2 $\alpha$  蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )。与对照组相比, si-BiP-592 组 MDA-MB-231 细胞中 BiP 蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ), PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、Bax 蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), eIF2 $\alpha$  蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ ); 与 si-BiP-592 组相比, si-BiP-592+WK-13-3D 组 MDA-MB-231 细胞 BiP 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、Bax 蛋白表达水平升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), eIF2 $\alpha$  蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )。经抗菌肽 WK-13-3D 和 TAX 治疗的小鼠肿瘤体积明显小于 PBS 组( $P<0.05$ ), 免疫组化染色结果显示经 WK-13-3D 治疗后小鼠肿瘤组织中 Ki-67 和 BiP 阳性细胞比例明显低于 PBS 组( $P<0.01$ )。结论 抗菌肽 WK-13-3D 可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 其机制可能是激活内质网应激、诱导细胞凋亡。

**[关键词]** 抗菌肽; 三阴性乳腺癌; 内质网应激; 细胞凋亡

## Inhibitory effect of antimicrobial peptide WK-13-3D on triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells and its possible mechanisms

Ma Fei, Song Jin-Xuan, He Min, Wang Xiu-Qing\*

School of Inspection, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

\*Corresponding author, E-mail: xiuqingwang1979@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81760661); 宁夏自然科学基金(2022AAC03185)

[作者简介] 马飞, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子诊断方面的研究

[通信作者] 王秀青, E-mail: xiuqingwang1979@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81760661), and the Natural Science Foundation of Ningxia (2022AAC03185)

**[Abstract] Objective** To investigate the inhibitory effect of antimicrobial peptide WK-13-3D on the proliferation of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells and its potential mechanism. **Methods** The effect of antimicrobial peptide WK-13-3D at concentrations of 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, and 40  $\mu\text{mol/L}$  on MDA-MB-231 cells proliferation was assessed using the CCK-8 assay. A pull-down assay was conducted to identify interacting proteins of antimicrobial peptide WK-13-3D with MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were obtained and divided into the following groups: (1) control group and treatment groups with 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  antimicrobial peptide WK-13-3D. Apoptosis was evaluated using flow cytometry and Western blotting was conducted to detect the expression change of heavy chain binding protein (BiP), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), phosphorylated eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ), and Bax proteins within the cells. (2) Control group (transfected with no-load plasmid), si-BiP-592 group (transfected with si-BiP-592 interference plasmid) and si-BiP-592+WK-13-3D group (co-treated with si-BiP-592 interference plasmid and 10  $\mu\text{mol/L}$  antimicrobial peptide WK-13-3D). Western blotting was used to detect the expression changes of BiP, PERK, eIF2 $\alpha$ , p-eIF2 $\alpha$  and Bax proteins. Twelve BALB/c mice were randomly divided into PBS group ( $n=4$ ), taxol (TAX) group ( $n=4$ ) and WK-13-3D group ( $n=4$ ). All mice were subcutaneously injected with MDA-MB-231 cells to establish a triple-negative breast cancer transplant tumor model. WK-13-3D group received local injections of antimicrobial peptide WK-13-3D [200 mg/(kg·d)], TAX group was administered TAX intraperitoneally at the same dose [200 mg/(kg·d)], and PBS group was injected with an equivalent volume of PBS. Two weeks post-injection, the mice were killed, and the tumor weight and volume were measured and photographed. Immunohistochemistry staining was performed to evaluate the expressions of BiP and Ki-67 proteins in the tumor tissues. **Results** CCK-8 assay showed a gradual decrease in MDA-MB-231 cell survival rates with increasing concentrations of WK-13-3D, with an inhibitory concentration 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) of 19.82  $\mu\text{mol/L}$ . The pull-down assay identified 268 interacting proteins of antimicrobial peptides and MDA-MB-231 cells, mainly including heavy-chain binding protein (BiP), heat shock protein 90 beta family member 1 (HSP90B1), valerin-containing protein (VCP), heat shock cognate 71 kD protein (HSPA8). Compared with control group, treatment with 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  antimicrobial peptide WK-13-3D significantly increased the apoptosis rate of MDA-MB-231 cells ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), decreased BiP protein expression ( $P<0.05$ ), and increased the expression levels of PERK, p-eIF2 $\alpha$ , and Bax ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), with no significant change in eIF2 $\alpha$  protein expression ( $P>0.05$ ). Compared with control group, si-BiP-592 group showed BiP protein expression significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the expression of PERK, p-eIF2 $\alpha$ , and Bax proteins was significantly increased ( $P<0.05$ ), with no significant change in eIF2 $\alpha$  protein expression ( $P>0.05$ ); Compared with si-BiP-592 group, si-BiP-592+WK-13-3D group showed a decrease in BiP protein expression ( $P<0.05$ ) and an increase in PERK, p-eIF2 $\alpha$ , and Bax protein expression ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), with no significant change in eIF2 $\alpha$  protein expression ( $P>0.05$ ). Tumor volumes in mice treated with antimicrobial peptide WK-13-3D and TAX were significantly smaller than those in PBS group ( $P<0.05$ ), and the immunohistochemical staining showed that the proportion of Ki-67 and BiP positive cells in tumor tissues of WK-13-3D treated mice was significantly lower than that in PBS group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Antimicrobial peptide WK-13-3D could inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells and its mechanism may involve the activation of endoplasmic reticulum stress and the induction of cell apoptosis.

**[Key words]** antimicrobial peptides; triple negative breast cancer; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

2023年全球癌症统计数据 displays, 女性乳腺癌发病率远高于其他类型的癌症, 是女性癌症死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌具有转移能力强、预后不良且缺乏靶向治疗药物的特点<sup>[2]</sup>, 常规治疗下更易发生远处复发, 预后差<sup>[3]</sup>, 故亟需寻求靶向性强、毒性低、不易产生耐药性且能有效抑制转移的药物。抗菌肽是生物免疫系统对抗多种病原微生物感染所产生的一类小分子多肽, 可通过多种机制抑制肿瘤发生<sup>[4]</sup>。其中抗菌肽 LL-37 是 Cathelicidin 家族的唯一成员<sup>[5]</sup>, 已被证实对多种人类癌症具有抑制作用<sup>[6-8]</sup>, 但由于其分子量大、合成成本高、出错概率高、易被蛋白酶水解, 所以对癌症的抑制存在两面性。本课题组在 LL-37 的基础上设计出了分子量小、活性集

中、抑癌效果强的抗菌肽 Mercidin<sup>[9]</sup>, 并已经证实其可有效抑制肺癌 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移, 促进肺癌细胞的凋亡<sup>[10]</sup>, 但存在半衰期短的缺陷。因此, 本课题组在 Mercidin 的结构基础上设计合成了半衰期长、疏水性高且生物活性强的抗菌肽 WK-13-3D, 本研究探讨其对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用及可能机制, 以期新型抗癌药物的研发提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料与试剂** 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 由宁夏医科大学检验学院分子诊断实验室提供; 抗菌肽 WK-13-3D 序列为 WKRIVRRIKRWLR-NH<sub>2</sub>, 由上

海吉尔生化有限公司合成。DMEM高糖培养基购自美国Hyclone实验室；CCK-8试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司；Annexin V-APC/7-ADD凋亡试剂盒购自中国贝博生物公司；BCA试剂盒购自江苏凯基生物公司；重链结合蛋白(heavy-chain binding protein, BiP)质粒购自苏州吉玛基因有限公司；兔抗BiP、蛋白激酶R样内网激酶(PKR-like ER kinase, PERK)、真核翻译起始因子2 $\alpha$ (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )、磷酸化eIF2 $\alpha$ (phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , p-eIF2 $\alpha$ )、Ki-67抗体, Bax多克隆抗体, 以及山羊抗兔HRP抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。NanoElute超高效液相系统购自美国赛默飞世尔科技公司；干扰质粒si-BiP-592序列为ACCATACATTCAAGTTGATAT, si-BiP-1178序列为ACCCTGACTCGGGCCAAATTT, si-BiP-1264序列为TGATTTGAAGAAGTCTGATAT, si-BiP-1569序列为TTTCTACAGCTTCTGATAATC, 购自苏州吉玛基因有限公司。

## 1.2 细胞实验

**1.2.1 CCK-8法检测细胞存活率** 收集MDA-MB-231细胞悬液, 接种于96孔板中, 培养过夜, 分别加入0、5、10、15、20、25、30、35、40  $\mu\text{mol/L}$  抗菌肽WK-13-3D, 空白组不加细胞, 每组设5个复孔, 培养24 h后加入CCK-8试剂, 继续培养1.5 h, 采用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(OD)值, 计算细胞存活率, 得出半数抑制浓度(median inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。

**1.2.2 Pull-down实验确定互作蛋白** 将50  $\mu\text{l}$ 链霉亲和素加入旋转柱内, 将生物素标记的抗菌肽WK-13-3D亦加入旋转柱内, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 用生物素封闭。向旋转柱内加入MDA-MB-231细胞提取的蛋白, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h, 收集猎物蛋白。将所有洗脱液进行SDS-PAGE凝胶电泳和染色。

**1.2.3 液相色谱-质谱联用分析** Pull-down实验结果肽段用液相色谱流动相A相溶解, 用NanoElute超高效液相系统进行分离后, 注入Capillary离子源中进行电离, 然后进入timsTOF Pro质谱进行数据采集, 肽段母离子及其二级碎片均采用TOF进行检测和分析。数据采集模式使用非依赖平行累积串行碎裂(dia-PASEF)模式。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 取对数生长期的MDA-MB-231细胞, 分别加入不同浓度( $1 \times \text{IC}_{50}$ 和 $1/2 \times \text{IC}_{50}$ )的抗菌肽WK-13-3D处理, 培养24 h, 以不加抗菌肽WK-13-3D处理作为对照组, 每组设3个复孔。加入Annexin V-APC和7-AAD室温避光染色, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

**1.2.5 Western blotting检测内质网应激和凋亡相关蛋**

白的表达 实验分组及处理如1.2.4, 提取各组细胞总蛋白, 上样行SDS-PAGE凝胶电泳并转膜, 5%脱脂奶粉封闭, 加入兔抗BiP、PERK、eIF2 $\alpha$ 、p-eIF2 $\alpha$ 及Bax多克隆抗体于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内孵育过夜; 加入山羊抗兔HRP抗体室温摇床孵育1 h, ECL显色, 曝光拍照, 最后用ImageJ软件对结果进行分析。

**1.2.6 构建BiP干扰质粒并转染MDA-MB-231细胞** 使用无血清培养基将待转染质粒和Lipofectamine 2000稀释至合适浓度, 静置5 min, 按1:1比例混合, 室温静置20 min。取对数生长期的MDA-MB-231细胞, 设置: (1)对照组(转染空载质粒)、si-BiP-1569组(转染si-BiP-1569)、si-BiP-592组(转染si-BiP-592)、si-BiP-1178组(转染si-BiP-1178)、si-BiP-1264组(转染si-BiP-1264), 采用Western blotting验证转染效率。(2)对照组(转染空载质粒)、si-BiP-592组(转染si-BiP-592干扰质粒)、si-BiP-592+WK-13-3D组(转染si-BiP-592干扰质粒+10  $\mu\text{mol/L}$  抗菌肽WK-13-3D), 培养6 h, 更换新鲜培养基, 继续培养24~48 h, 采用Western blotting检测BiP、PERK、eIF2 $\alpha$ 、p-eIF2 $\alpha$ 及Bax蛋白的表达情况。

## 1.3 动物实验

**1.3.1 体内抑瘤效果检测** 4周龄SPF级BALB/c小鼠12只, 体重( $16 \pm 2$ ) g, 购自北京HFK生物科技有限公司, 随机分为PBS组、紫杉醇(TAX)组与WK-13-3D组, 每组4只。将MDA-MB-231细胞( $1 \times 10^6$ )悬浮于PBS-Matrigel 100  $\mu\text{l}$  (1:1, V/V)中, 皮下注射到小鼠右侧乳房脂肪垫建立三阴性乳腺癌移植瘤模型。WK-13-3D组瘤旁注射抗菌肽WK-13-3D[200 mg/(kg·d)], TAX组腹腔注射TAX[200 mg/(kg·d)], PBS组注射等体积PBS。注射后2周处死小鼠, 测量肿瘤重量和体积并拍照。本研究获宁夏医科大学动物伦理委员会审批(IACUC-2023-005), 动物实验遵循动物福利伦理相关规定。

**1.3.2 免疫组化染色检测BiP、Ki-67蛋白的表达** 取小鼠移植瘤组织, 多聚甲醛固定后制作4  $\mu\text{m}$ 石蜡切片, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育10 min, 加入山羊血清室温下阻断20 min, 加入BiP、Ki-67抗体4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。加入山羊抗兔HRP抗体孵育1 h, DAB染色2 min, 苏木精染色3 min, 显微镜下观察细胞染色情况。

**1.4 统计学处理** 采用GraphPad 8.0软件进行统计分析。所有数据均为计量资料且符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 $t$ 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 抗菌肽WK-13-3D对MDA-MB-231细胞增殖的影**

响 CCK-8法检测结果显示,随着抗菌肽WK-13-3D浓度逐渐增高,细胞存活率逐渐下降,IC<sub>50</sub>为19.82 μmol/L,表明抗菌肽WK-13-3D可明显抑制MDA-MB-231的增殖(附图1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1720.2024.0925FJ>)。故选择1/2×IC<sub>50</sub>和1×IC<sub>50</sub>(分别为10、20 μmol/L)两个浓度进行后续实验。

**2.2 抗菌肽WK-13-3D与MDA-MB-231细胞的互作蛋白** Pull-down实验结果如附图2(<https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1720.2024.0925FJ>)所示,抗菌肽WK-13-3D与MDA-MB-231细胞的互作蛋白分子

量大多为70~100 kD。液相色谱-质谱联用分析结果显示,共匹配到268种蛋白,其中前10种蛋白见表1,经过分析,大多数蛋白包括BiP[又称葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78 kD, GRP78)]、热休克蛋白90β1(heat shock protein 90 beta family member 1, HSP90B1)、含缬酪肽蛋白(valosin containing protein, VCP)、人类71 kD热休克同源蛋白(heat shock cognate 71 kD protein, HSPA8)等均参与了内质网应激,其中BiP与内质网应激密切相关,且是互作蛋白中匹配度最高的,后续实验重点分析WK-13-3D抗菌肽对MDA-MB-231细胞中BiP蛋白的作用。

表1 通过肽指纹图谱在蛋白数据库中匹配到的抗菌肽WK-13-3D与MDA-MB-231细胞的主要互作蛋白信息

Tab. 1 Information of main interaction proteins between antimicrobial peptide WK-13-3D and MDA-MB-231 cells matched in the protein database by peptide fingerprint

蛋白中文名	蛋白英文名	基因名	蛋白评分值	序列覆盖率(%)	唯一肽段	多肽数	肽匹配图谱
重链结合蛋白	Heavy-chain binding protein	BiP	1551	47	24	26	30
热休克蛋白90α	Heat shock protein 90-alpha	HSP90AA1	1411	29	12	20	30
α肌动蛋白4	Alpha actinin 4	ACTN4	1183	27	12	22	25
热休克蛋白90αB类成员1	Heat shock protein 90 alpha family class B member 1	HSP90AB1	1030	20	5	13	19
α肌动蛋白1	Alpha actinin 1	ACTN1	899	23	9	19	22
白蛋白	Albumin	ALB	896	30	18	18	20
热休克蛋白90β1	Heat shock protein 90 beta family member 1	HSP90B1	868	29	20	20	20
延伸因子2	Eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	813	21	16	16	20
含缬酪肽的蛋白质	Valosin containing protein	VCP	695	18	13	13	15
人类71 kD热休克同源蛋白	Heat shock cognate 71 kD protein	HSPA8	629	18	7	9	12

**2.3 抗菌肽WK-13-3D对MDA-MB-231细胞凋亡的影响** 流式细胞术检测结果显示,与对照组相比,10、20 μmol/L抗菌肽WK-13-3D处理后MDA-MB-231细胞凋亡率明显增高,且呈浓度依赖性,差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ,图1A)。Western blotting检测结果显示,与对照组相比,10、20 μmol/L抗菌肽WK-13-3D处理后MDA-MB-231细胞中BiP蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ),PERK、p-eIF2α和Bax蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),eIF2α蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ ,图1B)。

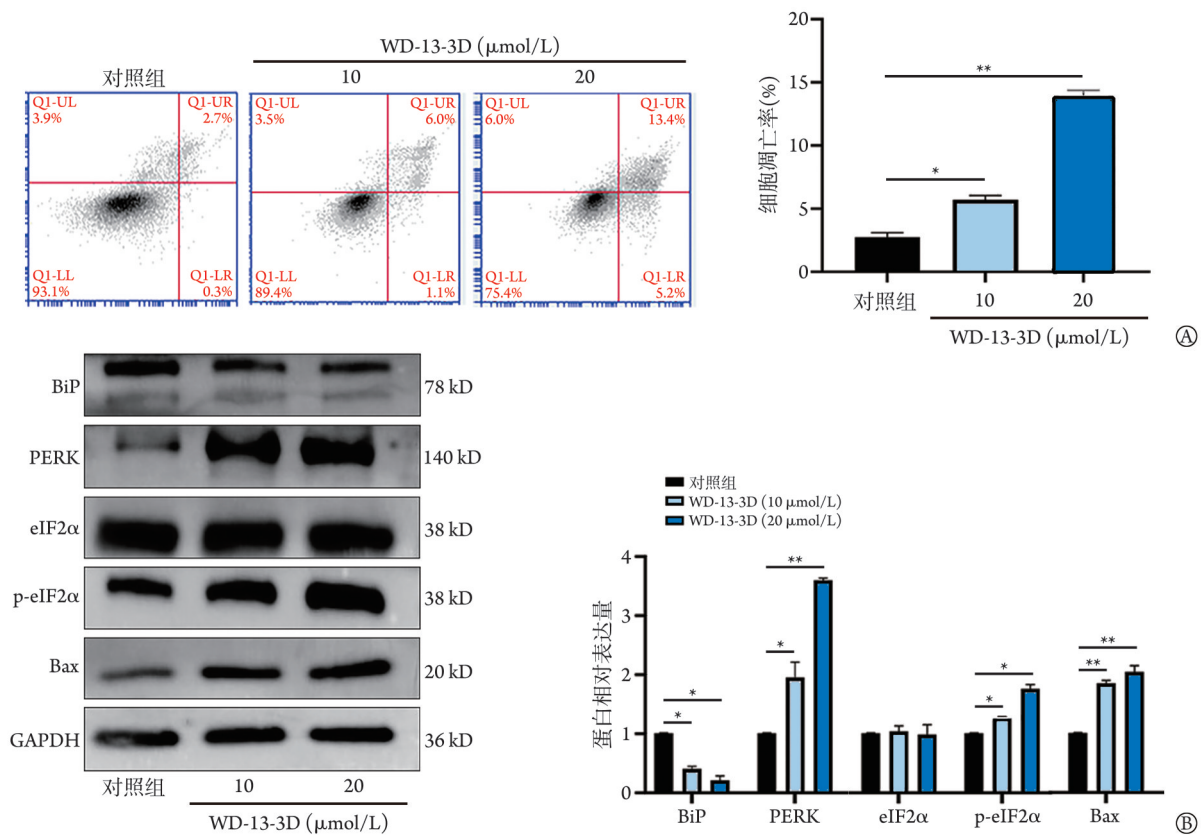
**2.4 干扰BiP后抗菌肽WK-13-3D对MDA-MB-231细胞中蛋白表达的影响** Western blotting验证转染效率,结果如图2A所示,与对照组比较,si-BiP-1569、si-BiP-592、si-BiP-1178、si-BiP-1264组BiP蛋白表达水平降低( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ ),以si-BiP-592组降低最为明显,因此采用si-BiP-592进行后续实验。与对照组比较,si-BiP-592组BiP蛋白表达水平明显降低,PERK、p-eIF2α、Bax蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与si-BiP-592组比较,si-BiP-592+WK-13-3D组BiP蛋白表达水平降低,PERK、Bax、p-eIF2α

蛋白表达水平升高( $P<0.01$ ),eIF2α蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ ,图2B)。

**2.5 抗菌肽WK-13-3D对体内肿瘤的影响** 用药2周后,小鼠移植瘤体积和重量如图3A所示。与PBS组比较,TAX组、WK-13-3D组移植瘤体积缩小( $P<0.05$ ),但WK-13-3D组与TAX组小鼠移植瘤体积差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图3B)。免疫组化染色结果显示,WK-13-3D组BiP、Ki-67阳性细胞比例均明显低于PBS组( $P<0.01$ ,图3C)。

### 3 讨论

三阴性乳腺癌较其他类型乳腺癌转移性强、缺乏靶向治疗药物且容易产生耐药性<sup>[11]</sup>,因此,亟需研发新型抗癌药物<sup>[12]</sup>。抗菌肽是一种从动物体内提取的小分子多肽,可用于治疗多种癌症。Hou等<sup>[13]</sup>的研究表明,抗菌肽NRC-03可通过线粒体氧化应激诱导口腔鳞状细胞凋亡;Ren等<sup>[14]</sup>发现,LL-37可通过激活凋亡诱导因子介导结肠癌细胞凋亡。本研究CCK-8法检测结果显示,抗菌肽WK-13-3D可明显抑制MDA-MB-231细胞的增殖,且呈浓度依赖性;



BiP, 重链结合蛋白; PERK, 蛋白激酶R样内网激酶; eIF2 $\alpha$ , 真核翻译起始因子2 $\alpha$ ; A. 抗菌肽 WK-13-3D 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响; B. 抗菌肽 WK-13-3D 对 MDA-MB-231 细胞中相关蛋白表达的影响; 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图1 抗菌肽 WK-13-3D 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响( $n=3$ )

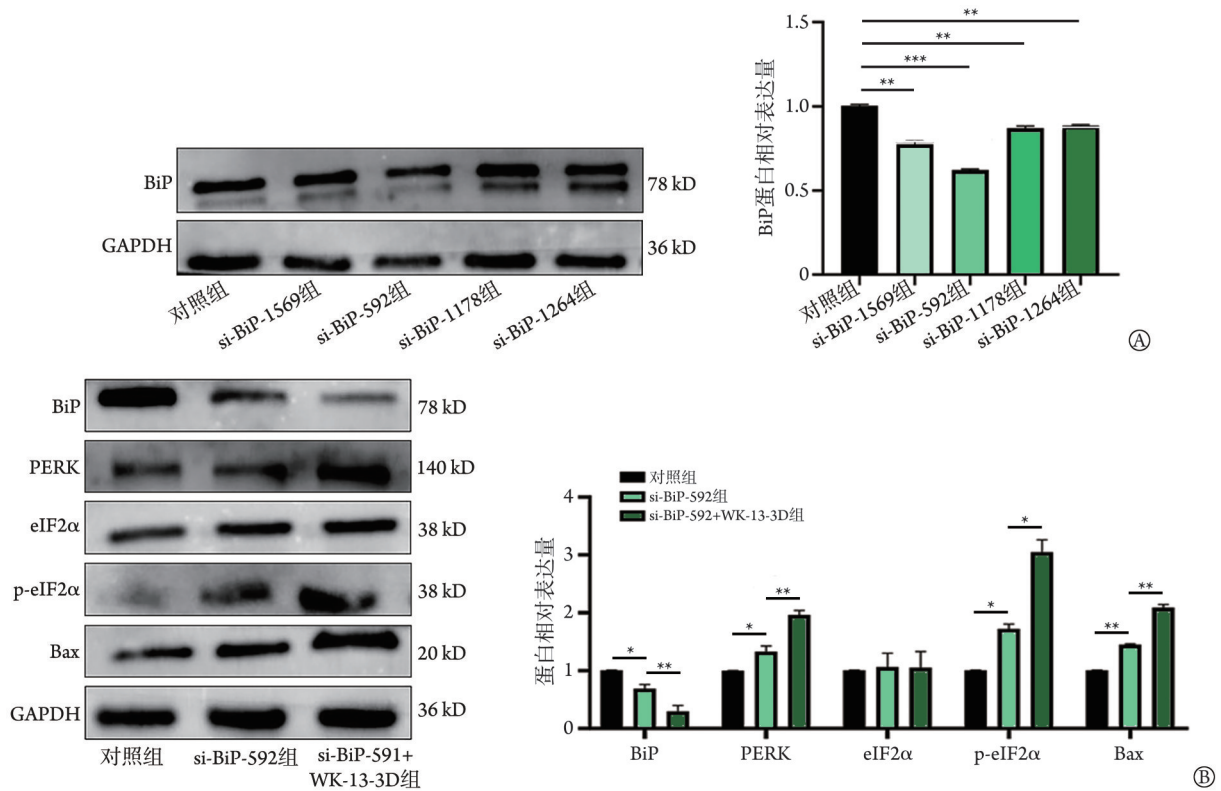
Fig.1 Effect of antimicrobial peptide WK-13-3D on apoptosis of MDA-MB-231 cells ( $n=3$ )

动物实验进一步证实抗菌肽 WK-13-3D 可抑制体内肿瘤的增长; 流式细胞术检测结果显示抗菌肽 WK-13-3D 可促进 MDA-MB-231 细胞凋亡; 经抗菌肽 WK-13-3D 处理后 MDA-MB-231 细胞中 Bax 蛋白表达水平明显升高; 在动物实验中, 经抗菌肽 WK-13-3D 处理后肿瘤组织中 Ki-67 阳性细胞比例降低。表明抗菌肽 WK-13-3D 可以诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡, 进而发挥抗肿瘤作用。

BiP 是内质网重要的分子伴侣, 也是内质网应激的关键分子<sup>[15]</sup>, 其主要作用是促进蛋白质的折叠和组装, 控制蛋白质的质量<sup>[16]</sup>。本研究中 Pull-down 实验结果显示抗菌肽 WK-13-3D 与 MDA-MB-231 细胞的互作蛋白中匹配度最高的是 BiP, 此外也有研究发现三阴性乳腺癌中 BiP 蛋白表达水平明显高于癌旁组织<sup>[17]</sup>。Ghosh 等<sup>[18]</sup>发现, 硝苯丙胺可激活细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 通路, 导致内质网应激介导的 BiP 下调, 进而诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡; Liu 等<sup>[19]</sup>发现, 吡拉比星可通过调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路下调 BiP 的表达, 进而抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,

且 BiP 表达越低, 患者预后越好。本研究中经抗菌肽 WK-13-3D 处理后, MDA-MB-231 细胞中 BiP 表达明显降低, 且动物实验也验证了该结果。

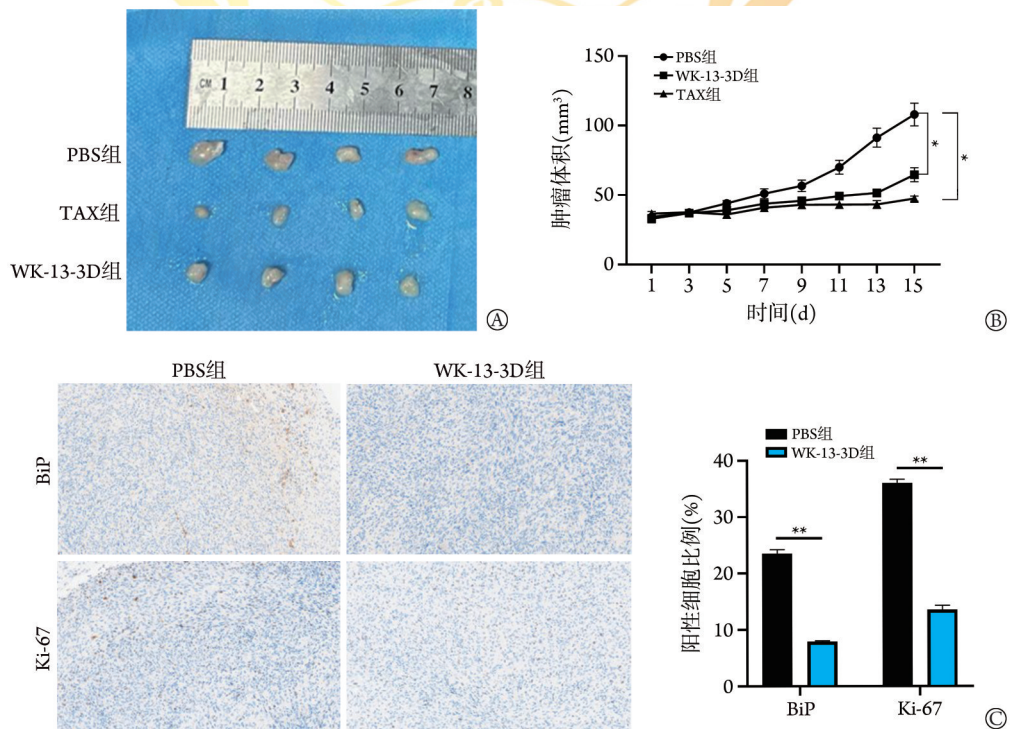
在各种有害损伤因素的作用下, 可发生蛋白折叠错误甚至不折叠, 这些异常蛋白会进入内质网腔, 导致内质网内出现钙离子紊乱等, 称为内质网应激<sup>[20]</sup>。内质网应激通过肌醇需求酶 1 (inositol requiring 1, IRE1)、PERK、活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 3 条信号通路维持细胞稳态, 激活未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)<sup>[21]</sup>。PERK 通路是 UPR 的主要通路之一, 在内质网应激被激活后, 磷酸化 eIF2 $\alpha$ , 进一步激活 ATF4, 导致转录因子 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 表达上调, 进而上调蛋白 Bax、下调蛋白 Bcl-2, 诱导细胞凋亡。袁烈等<sup>[22]</sup>发现, 雷公藤红素可通过激活内质网应激 PERK 信号通路诱导乳腺癌细胞凋亡; Li 等<sup>[23]</sup>发现, 夹竹桃苷可通过激活 PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP 通路诱导乳腺癌细胞死亡, 提高免疫治疗的疗效; Coker-Gurkan 等<sup>[24]</sup>发现, 阿提普利可通过激活 PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP 轴激活内质网应激, 介导三阴性乳腺癌细胞的凋亡; Liu 等<sup>[25]</sup>发现, 抗菌肽



BiP. 重链结合蛋白; PERK. 蛋白激酶R样内网激酶; eIF2α. 真核翻译起始因子2α; A. 在MDA-MB-231细胞中干扰BiP, 采用Western blotting验证转染效率; B. 干扰BiP对WK-13-3D相关蛋白表达的影响; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

图2 干扰BiP后抗菌肽WK-13-3D对MDA-MB-231细胞中相关蛋白表达的影响(n=3)

Fig.2 Effect of antimicrobial peptide WK-13-3D on related-protein expressions in MDA-MB-231 cells after interference with BiP (n=3)



BiP. 重链结合蛋白; TAX. 紫杉醇; A. 各组小鼠移植瘤大体所见; B. 各组小鼠移植瘤体积比较; C. 各组小鼠移植瘤组织中BiP和Ki-67的表达(免疫组化, ×200); \*P<0.05, \*\*P<0.01

图3 抗菌肽WK-13-3D对小鼠移植瘤的影响(n=4)

Fig.3 Effects of antimicrobial peptide WK-13-3D on tumor in mice (n=4)

PR-39可通过抑制内质网应激通路抑制缺氧/再灌注诱导的肾细胞凋亡；Yang等<sup>[26]</sup>发现，抗菌肽Scyreprocin可导致内质网应激和Ca<sup>2+</sup>释放，从而造成线粒体功能障碍，最终导致人肺癌细胞凋亡。以上研究表明，抗菌肽可通过内质网应激诱导肿瘤细胞凋亡。本研究中，经抗菌肽WK-13-3D处理后，MDA-MB-231细胞中PERK和p-eIF2 $\alpha$ 表达明显上调，而eIF2 $\alpha$ 表达无明显变化；在干扰BiP的表达后，PERK和Bax表达明显增加，同时再用抗菌肽WK-13-3D处理后PERK和Bax的表达进一步增加，表明抗菌肽WK-13-3D可能依赖激活内质网应激PERK-eIF2 $\alpha$ 信号通路促进乳腺癌细胞的凋亡。

综上所述，本研究结果表明，抗菌肽WK-13-3D可抑制三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖，其机制可能是下调BiP，激活PERK-eIF2 $\alpha$ 信号通路，激活PERK，磷酸化eIF2 $\alpha$ ，诱导内质网应激，上调Bax，进而诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡，这为进一步研究抗菌肽WK-13-3D的抗癌能力及新型抗乳腺癌药物的研发提供了实验依据。内质网应激后会对细胞自噬产生影响，但本研究未深入探讨抗菌肽WK-13-3D激活内质网应激后是否影响细胞自噬，且其中可能存在着更为复杂的协同调节机制，这也是今后继续研究的方向。

#### 【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, *et al.* Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Loibl S, Poortmans P, Morrow M, *et al.* Breast cancer[J]. *Lancet*, 2021, 397(10286): 1750-1769.
- [3] Luo C, Wang P, He S, *et al.* Progress and prospect of immunotherapy for triple-negative breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 919072.
- [4] Erdem Büyükkiraz M, Kesmen Z. Antimicrobial peptides (AMPs): a promising class of antimicrobial compounds[J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 132(3): 1573-1596.
- [5] Leite ML, Duque HM, Rodrigues GR, *et al.* The LL-37 domain: a clue to cathelicidin immunomodulatory response? [J]. *Peptides*, 2023, 165: 171011.
- [6] Lu F, Zhu Y, Zhang G, *et al.* Renovation as innovation: repurposing human antibacterial peptide LL-37 for cancer therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 944147.
- [7] Memariani M, Memariani H. Antifungal properties of cathelicidin LL-37: current knowledge and future research directions[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2023, 40(1): 34.
- [8] Lee HJ, Hong YJ, Kim M. Angiogenesis in chronic inflammatory skin disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 12035.
- [9] Wang G, Narayana JL, Mishra B, *et al.* Design of antimicrobial peptides: progress made with human cathelicidin LL-37[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1117: 215-240.
- [10] 张倩楠, 贾琴琴, 杨婷婷, 等. 抗菌肽Mericidin通过ERK/mTOR信号通路对肺癌A549细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. *现代预防医学*, 2022, 49(9): 1671-1675, 1683.
- [11] Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The landscape of targeted therapies in TNBC[J]. *Cancers*, 2020, 12(4): 916.
- [12] Sopik V. International variation in breast cancer incidence and mortality in young women[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 186(2): 497-507.
- [13] Hou D, Hu F, Mao Y, *et al.* Cationic antimicrobial peptide NRC-03 induces oral squamous cell carcinoma cell apoptosis via CypD-mPTP axis-mediated mitochondrial oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102355.
- [14] Ren SX, Cheng AS, To KF, *et al.* Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6512-6523.
- [15] Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(2): 71-88.
- [16] Xia S, Duan W, Liu W, *et al.* GRP78 in lung cancer[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 118.
- [17] Wang L, Li D, Su X, *et al.* AGO4 suppresses tumor growth by modulating autophagy and apoptosis via enhancing TRIM21-mediated ubiquitination of GRP78 in a p53-independent manner [J]. *Oncogene*, 2022, 42(1): 62-77.
- [18] Ghosh S, Adhikary A, Chakraborty S, *et al.* Cross-talk between endoplasmic reticulum (ER) stress and the MEK/ERK pathway potentiates apoptosis in human triple negative breast carcinoma cells: role of a dihydropyrimidone, nifetepimine[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(7): 3936-3949.
- [19] Liu M, Yang J, Lv W, *et al.* Down-regulating GRP78 reverses pirarubicin resistance of triple negative breast cancer by miR-495-3p mimics and involves the p-AKT/mTOR pathway[J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(1): BSR20210245.
- [20] Ajoolabady A, Kaplowitz N, Lebeauin C, *et al.* Endoplasmic reticulum stress in liver diseases[J]. *Hepatology*, 2023, 77(2): 619-639.
- [21] Salvagno C, Mandula JK, Rodriguez PC, *et al.* Decoding endoplasmic reticulum stress signals in cancer cells and antitumor immunity[J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(11): 930-943.
- [22] 袁烈, 周维英, 周端方, 等. 雷公藤红素通过激活内质网应激介导的细胞凋亡发挥抗ER<sup>+</sup>乳腺癌的作用[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(19): 2065-2073.
- [23] Li X, Zheng J, Chen S, *et al.* Oleandrin, a cardiac glycoside, induces immunogenic cell death via the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP pathway in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 314.
- [24] Coker-Gurkan A, Can E, Sahin S, *et al.* Atiprimod triggered apoptotic cell death via acting on PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP and STAT3/NF- $\kappa$ B axis in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 breast cancer cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(6): 5233-5247.
- [25] Liu J, Xue W, Xiang H, *et al.* Cathelicidin PR-39 peptide inhibits hypoxia/reperfusion-induced kidney cell apoptosis by suppression of the endoplasmic reticulum-stress pathway[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(8): 714-722.
- [26] Yang Y, Chen HY, Hao H, *et al.* The anticancer activity conferred by the mud crab antimicrobial peptide scyreprocin through apoptosis and membrane disruption[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5500.

(责任编辑: 纪方方)