

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0036-05

临床研究 · 论著

抗菌肽 LL-37 与膀胱尿路上皮癌关系的初步探讨*

朱波, 曾琪, 潘广瑞, 赵晖

(昆明医科大学第一附属医院 泌尿外科, 云南 昆明 650032)

摘要: 目的 检测抗菌肽 LL-37 在膀胱尿路上皮癌中的表达, 同时体外研究 LL-37 对膀胱肿瘤细胞株 T24、EJ 的作用。**方法** ELISA 检测 30 例膀胱尿路上皮癌患者和 30 例健康体检者新鲜晨尿中 LL-37 的表达, 同时检测 T24、EJ 细胞和尿路上皮 SV-HUC-1 细胞经不同浓度 LPS 刺激后培养液上清中 LL-37 水平。免疫组织化学和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 分别检测 30 例膀胱癌患者的肿瘤组织标本、肿瘤基底及周围组织标本中 LL-37 的表达。在体外将不同浓度的 LL-37 作用于 T24、EJ 和 SV-HUC-1 细胞, MTT 检测细胞的增殖。**结果** 健康体检者和膀胱癌患者尿液中 LL-37 的水平分别为 (2.02 ± 0.06) 和 (24.32 ± 0.02) ng/ml, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组织化学结果显示, LL-37 在癌组织中表达阴性, 而在癌组织周围的炎症细胞、血管壁及平滑肌内却呈阳性表达。RT-PCR 结果表明, 癌周围组织中 LL-37 的表达水平比癌组织高约 30 倍。T24、EJ 和 SV-HUC-1 细胞经 LPS 刺激后培养液上清中 LL-37 浓度均升高。在体外, LL-37 呈剂量依赖性地抑制 T24、EJ 细胞的增殖, 而其对 SV-HUC-1 细胞的抑制需更高的浓度。**结论** LL-37 与膀胱癌的发生可能有着一定的关联, 体外高浓度的 LL-37 可抑制膀胱癌 T24、EJ 细胞的生长。

关键词: 抗菌肽 LL-37; 膀胱癌; 表达; 抑制作用

中图分类号: R737.14

文献标识码: A

Relationship between antibacterial peptide LL-37 and bladder urothelial carcinoma*

Bo Zhu, Qi Zeng, Guang-rui Pan, Hui Zhao

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Kunming Medical University,
Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To detect the expression of antimicrobial peptide LL-37 in bladder urothelial carcinoma, and research the effect of LL-37 on bladder cancer cell lines T24 and EJ *in vitro*. **Methods** ELISA was used to detect the level of LL-37 expression in the fresh morning urine of 30 patients with bladder urothelial carcinoma and 30 healthy people, and LL-37 levels in cell culture supernatant secreted by the bladder cancer T24 and EJ cells and urothelial SV-HUC-1 cells after treatment with different concentrations of LPS. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect LL-37 expression levels of tumor tissues, tumor base and pericancerous tissues in 30 resected bladder cancer specimens. MTT was utilized to detect the proliferation of the T24, EJ and SV-HUC-1 cells treated with different concentrations of LL-37 *in vitro*. **Results** The levels of LL-37 in the urine of the healthy and bladder cancer patients were (2.02 ± 0.06) ng/ml and (24.32 ± 0.02) ng/ml respectively, the LL-37 level of the latter was significantly higher ($P < 0.05$). Immunohistochemistry displayed negative LL-37 expression in the cancer tissues, and positive expression in the inflammatory cells, vascular wall and smooth muscle cells surrounding the carcinoma tissues. RT-PCR results suggested that the LL-37 level in the pericancerous tissues was about 30 times higher than that in the cancerous tissues. The concentrations of LL-37 were elevated in the supernatant of T24, EJ and SV-HUC-1 cells after stimulation by LPS. *In vitro*, LL-37 inhibited the proliferation of T24 and EJ cells in a dose-dependent manner, however its inhibition to SV-HUC-1 cells needed higher concentrations. **Conclusions** There may be a

收稿日期: 2017-04-22

* 基金项目: 云南省科技厅 - 昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目 (No: 2014FB031)

[通信作者] 赵晖, E-mail: ydyzh@263.net; Tel: 13888492300

relevance between LL-37 and the occurrence of bladder cancer, and high concentration of LL-37 can inhibit the growth of EJ and T24 cells *in vitro*.

Keywords: antimicrobial peptide LL-37; bladder cancer; expression; inhibition

抗菌肽 LL-37 是人体内固有免疫成员。近来研究表明,其在抗感染、免疫调节、促血管生成、抑癌及促癌等方面均发挥生物学作用^[1]。且作为泌尿道重要的天然免疫因子,在从肾盂到膀胱黏膜的上皮中均有表达,并在细菌侵入时迅速合成和分泌,提示其与泌尿系感染密切相关^[2]。MICHAUD 等^[3]发现,慢性炎症可促进膀胱癌的发生。同时也有研究显示膀胱癌会被急性炎症抑制^[4]。SUTTMANN 等^[5]还报道合成抗菌肽天蚕素 A、B 可抑制膀胱癌的增殖,对良性的纤维母细胞则几乎没有影响。这些发现引导笔者联想到 LL-37 和膀胱癌间的联系,该实验旨在初步探讨两者的关系,为今后研究奠定基础,以期能为膀胱癌的治疗找到一条新的途径。

1 资料与方法

1.1 实验材料

T24、EJ 和 SV-HUC-1 细胞株均购于中国科学院昆明动物研究所细胞库,LL-37 ELISA 试剂盒购自荷兰 Hycult 公司,LL-37 由上海吉尔生化有限公司合成,PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, β -actin 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司,兔抗人 LL-37 多克隆抗体由美国 Abcam 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养方法 膀胱癌 T24、EJ 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,SV-HUC-1 细胞则仅将基础培养基更换为 DMEM 高糖,均置于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱,每 2、3 天更换培养液,当细胞汇合度达 80% ~ 90% 时传代。

1.2.2 ELISA 法检测尿液、细胞培养液上清中 LL-37 的水平 2014 年 1 月-2014 年 6 月昆明医科大学第一附属医院膀胱癌患者 30 例,并随机选取 30 例健康志愿者,收集他们的新鲜晨尿后照 LL-37 检测试剂盒说明书对样本进行检测。将 3 株细胞以 1×10^5 个/ml 的密度接种于 24 孔板,300 μ l/孔,待细胞汇合度达 60% 时更换无血清培养液,分别加入 1、5 和 10 μ g/ml LPS,各设 3 个副孔及空白对照组,继续培养后照 LL-37 检测试剂盒说明书对各孔进行测定。

1.2.3 免疫组织化学和 RT-PCR 检测膀胱癌组织及其周围组织 LL-37 的表达 2014 年 1 月-2014 年

9 月昆明医科大学第一附属医院膀胱癌患者 30 例,术中取癌组织标本及其周围 1 cm 以内的黏膜、肌层组织标本(外观上无明显炎症反应),作为肿瘤组、癌旁组。依据免疫组织化学试剂盒说明书操作,反应后呈棕黄色判定为 LL-37 阳性。参考文献[6]设计并合成 LL-37 引物,正向引物:5'-GATA ACAAGAGATTTGCCCTGCTG-3',反向引物:5'-TTTC TCAGAGCCCAGAAGCCTG-3',扩增片段大小为 173 bp,内参照 β -actin 正向引物:5'-CCCATCTATG AGGGTTACGC-3',反向引物:5'-TTTAATGTCACGC ACGATTC-3',扩增片段大小为 150 bp,均由上海华大基因公司合成。采用 Trizol 法提取组织总 RNA。PCR 反应体系:模板 DNA 1 μ l、10 $\times$ PCR buffer 5 μ l、dNTPs 4 μ l、LL-37 正反向引物各 0.5 μ l、ddH₂O 15 μ l、TaqDNA 聚合酶 0.25 μ l。PCR 反应条件:94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 3 min,共 30 个循环,72℃继续延伸 10 min。反应后对 PCR 反应液行琼脂糖凝胶电泳以确认 RT-PCR 扩增产物(约 173 bp)。若该位置有条带,则用琼脂糖凝胶回收并行克隆和测序。最后照 PCR 试剂盒说明书行 RT-PCR 反应,结束后确认 RT-PCR 的扩增和融解曲线及 PCR 定量时制作的标准曲线。

1.2.4 MTT 检测细胞经 LL-37 处理的增殖情况 将 3 株细胞以 1×10^5 个/ml 的密度接种于 96 孔板,100 μ l/孔。分别加入 22.5、45.0、90.0、180.0 和 270.0 μ g/ml LL-37,各设 5 个副孔及空白对照组。24 h 后加入 20 μ l/孔 MTT (5mg/ml),孵育 4 h 后吸弃孔内培养液,加入 150 μ l/孔 DMSO 混匀 10 min。酶标仪上测 490 nm 处吸光度 OD 值,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示,两独立样本比较用 *t* 检验,各组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿液、组织标本及细胞培养液上清中 LL-37 的表达

2.1.1 膀胱癌患者尿液中 LL-37 水平 膀胱癌组和

健康对照组的 LL-37 水平分别为 (24.32 ± 0.02) 和 (2.02 ± 0.06) ng/ml, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=1\,931.240$, $P=0.000$), 膀胱癌患者尿液中 LL-37 水平较健康对照组升高。

2.1.2 各组织中 LL-37 的表达 LL-37 在膀胱癌组织中表达阴性, 而在癌组织周围的炎症细胞、血管壁及平滑肌内却呈阳性表达。见图 1。

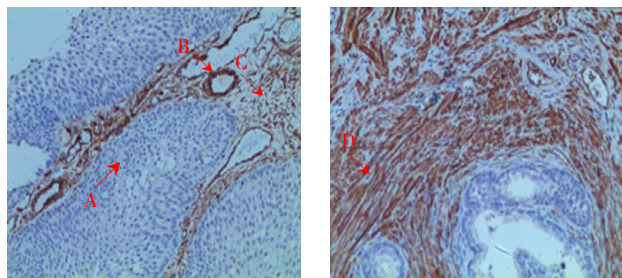
2.1.3 各组织中 LL-37 的表达 以 β -actin 的 PCR 产物条带亮度作为阳性对照, 亮度越高提示 LL-37 表达越高, 可见膀胱癌旁组织中 LL-37 的表达比癌组织相对较高。见图 2。

经过 RT-PCR 得出膀胱癌组织和膀胱癌旁组织中 LL-37 基因表达的 Ct 值 Ct 癌、Ct 癌旁, 分别与内参 β -actin 的 Ct 值 Ct 内参比较, 经过公式 $2^{\Delta Ct}=2^{Ct_{\text{癌}}-Ct_{\text{内参}}}$ 癌/癌旁 -Ct 内参计算后可见膀胱癌旁组织中 LL-37 的表达约是癌组织的 30 倍。见图 3。

2.1.4 细胞培养液上清中 LL-37 的表达 SV-HUC-1、T24、EJ 细胞经 LPS 刺激后细胞培养液上清中 LL-37 浓度均升高, 提示随着 LPS 浓度增加, 3 株细胞中 LL-37 表达升高。见表 1。

2.2 体外 LL-37 作用后细胞的增殖情况

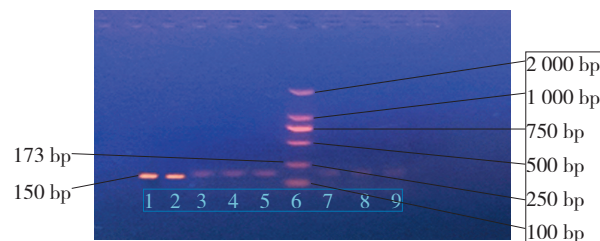
如表 2 所示, 各浓度 LL-37 的 T24、EJ、SV-HUC-1 细胞的吸光度值比较, 差异有统计学意义



A: 癌组织, B: 血管, C: 炎症细胞, D: 平滑肌

图 1 各组织中 LL-37 的表达 (免疫组织化学法 $\times 100$)

($P<0.05$), 对 T24、EJ 细胞的增殖有明显的抑制作用, 且呈一定剂量依赖性, 而 LL-37 在浓度达 $270\mu\text{g/ml}$ 时才表现出对 SV-HUC-1 细胞的抑制作用。



1、2: β -actin; 3~5: 癌旁组织; 6: DL-2000 Marker; 7~9: 癌组织

图 2 各组织中 LL-37 的表达

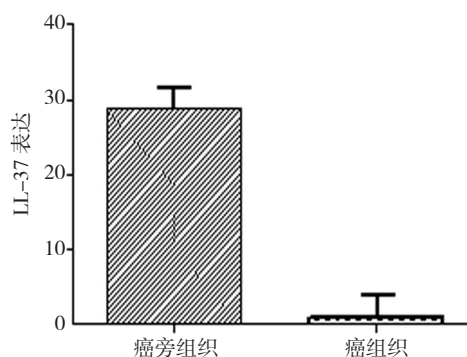


图 3 癌及癌旁组织 LL-37 的相对表达

表 1 细胞培养上清液中 LL-37 的表达

($n=4$, ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	SV-HUC-1	T24	EJ
0 $\mu\text{g/ml}$	8.09 ± 0.12	5.32 ± 1.84	7.53 ± 0.12
1 $\mu\text{g/ml}$	9.41 ± 0.67	$20.78 \pm 2.84^{\dagger}$	7.99 ± 0.55
5 $\mu\text{g/ml}$	$41.41 \pm 3.28^{\dagger}$	$50.15 \pm 4.07^{\dagger}$	$10.27 \pm 0.59^{\dagger}$
10 $\mu\text{g/ml}$	$54.00 \pm 2.89^{\dagger}$	$62.51 \pm 0.54^{\dagger}$	$13.33 \pm 0.34^{\dagger}$
F 值	435.308	389.821	144.225
P 值	0.000	0.000	0.000

注: $\dagger$ 与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较, $P<0.05$

表 2 MTT 检测细胞的吸光度值比较 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	T24	EJ	SV-HUC-1
0.0 $\mu\text{g/ml}$	0.703 ± 0.0461	0.922 ± 0.0592	0.342 ± 0.0056
22.5 $\mu\text{g/ml}$	$0.579 \pm 0.0469^{\dagger}$	$0.773 \pm 0.1096^{\dagger}$	0.339 ± 0.0096
45.0 $\mu\text{g/ml}$	$0.555 \pm 0.0229^{\dagger}$	$0.708 \pm 0.0939^{\dagger}$	0.336 ± 0.0077
90.0 $\mu\text{g/ml}$	$0.541 \pm 0.0331^{\dagger}$	$0.576 \pm 0.0485^{\dagger}$	0.329 ± 0.0104
180.0 $\mu\text{g/ml}$	$0.505 \pm 0.0236^{\dagger}$	$0.413 \pm 0.0311^{\dagger}$	0.330 ± 0.0061
270.0 $\mu\text{g/ml}$	$0.384 \pm 0.0239^{\dagger}$	$0.226 \pm 0.0664^{\dagger}$	$0.289 \pm 0.0074^{\dagger}$
F 值	54.720	83.360	35.830
P 值	0.000	0.000	0.000

注: $\dagger$ 与 0.0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较, $P<0.05$

3 讨论

近年来研究显示,LL-37 与肿瘤的关系很微妙,其可抑制胃癌、结肠癌细胞的增值,又能促进乳腺癌、卵巢癌、肺癌的生长^[7],更值得一提的是 LL-37 可在同一肿瘤中表现为抗癌和促癌作用。VON 等^[8]发现,20 ~ 30 ng/ml LL-37 可促进肺癌细胞的增值,而将其浓度调为 20 μ g/ml 后癌细胞的数量明显减少。LI 等^[9]发现,肿瘤微环境中的免疫细胞分泌的 Cathelicidin 类抗菌肽可促进结肠癌细胞生长;与 REN 等^[10]的研究结论不同之处也在于其所用的 LL-37 浓度为生理水平甚至更低,用于人、鼠结肠癌细胞的各为 1 μ g/ml、100 ng/ml,而文献中 LL-37 的浓度为 20 ~ 60 μ mol/L。由此可见 LL-37 浓度的差异对肿瘤的影响。

该实验中 LL-37 在膀胱癌患者尿液中的浓度较健康志愿者高,那么这一升高的 LL-37 来源于何处呢?结合免疫组织化学法结果来看,LL-37 主要表达在癌组织周围的平滑肌、炎症细胞及血管壁等处,而在癌组织中表达阴性,提示这一升高的 LL-37 很可能来自于这些癌旁组织或者说是肿瘤细胞生长微环境中的炎症细胞等分泌。且最近有研究表明,胰腺导管腺癌微环境中的 LL-37 在胰腺肿瘤干细胞介导的肿瘤发生中起着关键性的作用^[11]。也有研究发现,髓细胞表达的鼠同源 Cathelicidin 抗菌肽 CLAMP 可通过募集炎症细胞促进肺癌的生长,且肿瘤细胞会分泌可溶性因子诱导巨噬细胞中 LL-37 的表达,提示 LL-37、炎症和肿瘤有着密切的联系^[12]。朱小丹等^[13]在体外将巨噬细胞和卵巢癌细胞共同培养以构建简化的肿瘤微环境模型时,也发现巨噬细胞可通过增强抗菌肽 LL-37 的表达和分泌促进卵巢癌细胞的增殖。这些研究提示,肿瘤微环境中 LL-37 的存在及其对肿瘤的影响。该研究发现,膀胱癌组织的微环境中有明显的 LL-37 表达,且经 LPS 刺激后膀胱癌细胞培养液上清中也有其浓度的升高,提示这些浓度范围内的 LL-37 对膀胱尿路上皮癌是没有害处的。然而,当在体外使用 22.5 ~ 270 μ g/ml LL-37 时,其可抑制膀胱癌细胞的增殖,而对正常尿路上皮细胞的抑制作用则不明显,表明在一定的浓度范围内 LL-37 对肿瘤细胞的杀伤作用更大。同时研究表明,多西他赛搭载 LL-37 后的温敏凝胶颗粒可提高对大肠癌腹膜转移癌的抗癌效果,提示治疗肿瘤时可联合使用 LL-37^[14]。对于该研究中提示的体内外 LL-37 的不同作用,笔者认为和前述的 LL-37 在同一肿瘤中表现为抗癌和促癌一样,是由浓

度的差异所引起的。

另外,有学者在探讨 LL-37 对卵巢癌的作用时,采用基因芯片技术对 LL-37 在膀胱癌的表达也进行检测,结果显示,1 例膀胱癌组织中有明显的 LL-37 表达,这可能是由于其在采集肿瘤组织标本中的同时也包含了膀胱平滑肌、血管等组织,且只有 1 例,而与该实验结果有出入^[15]。而最新研究结果显示,膀胱癌细胞可通过分泌 LL-37 来抑制 BCG 的内化,在加入 LL-37 抗体后,BCG 的抗肿瘤效应又明显增强,提示一定浓度的 LL-37 可能更适应膀胱肿瘤的生长,这在某些方面上与该研究结论有着相似之处^[16]。然而,该研究中关于 LL-37 和膀胱尿路上皮癌的探讨还仅限于初级阶段,尚需后期进一步实验来阐释两者间复杂的关系。

该研究通过 LPS 刺激可诱发 T24、EJ 和 SV-HUC-1 细胞分泌 LL-37,表明除了正常尿路上皮细胞,膀胱尿路上皮癌细胞同样可以产生 LL-37。同时,笔者还发现膀胱肿瘤细胞微环境中存在着一定浓度的 LL-37,提示其可能在肿瘤的发病中起到一定作用,然而肿瘤细胞促进 LL-37 的产生,还是 LL-37 诱导肿瘤的发生,尚需进一步证实。且该研究中仅检测 30 例膀胱癌患者的肿瘤组织标本,样本数不是很大,但其还是在一定程度上提示 LL-37 与膀胱尿路上皮癌的相关性。另外,体外高浓度的 LL-37 可抑制膀胱癌 T24、EJ 细胞的增殖。

参考文献:

- [1] WONG J H, YE X J, NG T B. Cathelicidins: peptides with antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory, angiogenic, anticancer and procancer activities[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2013, 14(6): 504-514.
- [2] CHROMEK M, SLAMOVA Z, PETER BERGMAN P, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection[J]. *Nature Medicine*, 2006, 6(12): 636-641.
- [3] MICHAUD D S. Chronic inflammation and bladder cancer[J]. *Urol Oncol*, 2007, 25(3): 260-268.
- [4] OFFERSEN B V, KNAP M M, MARCUSSEN N, et al. Intense inflammation in bladder carcinoma is associated with angiogenesis and indicates good prognosis[J]. *British Journal of Cancer*, 2002, 87(12): 1422-1430.
- [5] SUTTMANN H, RETZ M, PAULSEN F, et al. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells[J]. *BMC Urology*, 2008, 8(1): 5.
- [6] GENNARO R, ZANETTI M. Structural features and biological

- activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides[J]. Biopolymers, 2000, 55(1): 31-49.
- [7] KURODA K, OKUMURA K, ISOGAI H, et al. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs[J]. Frontiers in Oncology, 2015, 5(144): 1-10.
- [8] VON H J, KOCZULLA R, SHAYKHIEV R, et al. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells[J]. Lung Cancer, 2008, 59(1): 12-23.
- [9] LI D, LIU W F, WANG X, et al. Cathelicidin, an antimicrobial peptide produced by macrophages, promotes colon cancer by activating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(5): 2939.
- [10] REN S X, CHENG A S, TO K F, et al. Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses coloncancer[J]. Cancer Research, 2012, 72(24): 6512-6523.
- [11] SAINZ B, ALCALA S, GARCIA E, et al. Microenvironmental hCAP-18/LL-37 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma by activating its cancer stem cell compartment[J]. Gut, 2015, 64(12): 1921-1935.
- [12] LI D, BEISSWENGER C, HERR C, et al. Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth[J]. Oncogene, 2014, 33(21): 2709.
- [13] 朱小丹, 许文娟, 严晓, 等. 巨噬细胞通过分泌抗菌肽 LL-37/hCAP-18 调控卵巢癌细胞的增殖 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(1): 120-125.
- [14] FAN R R, TONG A P, LI X L, et al. Enhanced antitumor effects by docetaxel/LL37-loaded thermosensitive hydrogel nanoparticles in peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer[J]. International Journal of Nanomedicine, 2015, 10: 7291.
- [15] COFFELT S B, WATERMAN R S, FLOREZ L, et al. Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion[J]. International Journal of Cancer, 2008, 122(5): 1030-1039.
- [16] CHOI S Y, KIM S J, CHI B H, et al. Modulating the internalization of bacille Calmette-Guérin by cathelicidin in bladder cancer-cells[J]. Urology, 2015, 85(4): 964.

(张西倩 编辑)