

# 斗米虫蛋白体外抗肿瘤活性及其对小鼠巨噬细胞免疫调节作用

孙嫫 侯沛颖 王毅 徐华潮\*

(浙江农林大学, 杭州 311300)

**摘要** 该文主要为了研究斗米虫蛋白的体外抗肿瘤活性及其免疫调节作用。提取斗米虫总蛋白, 逐级盐析分为3个部分, 透析除盐后得到不同蛋白部位, 并采用SDS-PAGE检测斗米虫不同蛋白部位的分子量; 利用MTT法、流式细胞术等方法研究斗米虫蛋白对人胃癌细胞MFC和小鼠乳腺癌细胞4T1增殖、迁移和凋亡的作用。MTT法研究斗米虫蛋白对小鼠单核巨噬细胞RAW264.7和人脐静脉内皮细胞HUEVC增殖的影响; 荧光微球吞噬实验检测斗米虫蛋白对RAW264.7细胞吞噬能力的影响; Griess法检测对RAW264.7细胞释放NO能力的影响; ELISA法检测对RAW264.7细胞的IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 分泌量; RT-PCR法检测不同浓度的斗米虫蛋白作用后RAW264.7细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-1、TLR4、MIR-7、IFN- $\gamma$ 、TRL-4、IL-6以及4T1细胞中MMP2、MMP9、STAT3、c-Myc和Sdfl mRNA水平变化。结果显示, 斗米虫蛋白主要分子量集中于63 kDa, 斗米虫蛋白对人胃癌细胞MFC及小鼠乳腺癌细胞4T1的增殖表现出较好抑制作用, 并呈现出一定剂量依赖关系( $P < 0.05$ ), 对HUEVC细胞没有细胞毒性, 对RAW264.7细胞表现出较好的促进增殖的作用( $P < 0.05$ )。斗米虫蛋白实验组与正常组细胞相比可以抑制4T1细胞的迁移( $P < 0.01$ ), 可诱导MFC和4T1细胞凋亡( $P < 0.05$ ); 斗米虫蛋白能够提高RAW264.7细胞的吞噬活性、NO释放量、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6分泌量及TNF- $\alpha$ 、IL-1、TLR4、MIR-7、IFN- $\gamma$ 和IL-6细胞因子的mRNA水平以及能显著下调4T1细胞中MMP2、MMP9、STAT3、c-Myc和Sdfl mRNA水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。由此推论, 斗米虫蛋白具有较好的体外抗肿瘤活性并且具有潜在的免疫调节作用。

**关键词** 斗米虫; 细胞凋亡; 小鼠巨噬细胞; 肿瘤细胞; 增殖抑制

## Anti-Tumor Activity of the Protein of *Apriona swainsoni* Larvae *In Vitro* and Its Immunoregulatory Effect on Mouse Macrophages

SUN Xu, HOU Peiying, WANG Yi, XU Huachao\*

(Zhengjiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

**Abstract** Here, we studied the anti-tumor activity and immunomodulatory effects of the protein of *Apriona swainsoni* larvae *in vitro*. The total protein of *Aprionas wainsoni* larvae was extracted and divided into three parts. The different protein sites were obtained after dialysis and salt removal. The molecular weights of different proteins of *Apriona swainsoni* larvae were detected by SDS-PAGE. The MTT method was used to study the human gastric cancer MFC, the mouse breast cancer 4T1 cells, macrophage RAW264.7 cells and the human umbilical endothelial

收稿日期: 2019-09-02 接受日期: 2019-12-11

浙江省与浙江农林大学林业与生物技术学院合作项目(四种特色食用昆虫开发利用研究)(批准号: L20180056)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13706710696, E-mail: xhcinsect@zafu.edu.cn

Received: September 2, 2019 Accepted: December 11, 2019

This work was supported by the Cooperation Project between Zhejiang Province and College of Forestry and Biotechnology of Zhejiang A&F University (the Development and Utilization of Four Special Edible Insects) (Grant No.L20180056)

\*Corresponding author. Tel: +86-13706710696, E-mail: xhcinsect@zafu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5179>

vein HUEVC cells proliferation. Migration assay was used to detect the effects of the protein of *Apriona swainsoni* larvae on the migration ability of 4T1 cells. Flow cytometry was used to study the effect of the protein of *Apriona swainsoni* larvae on apoptosis of MFC, 4T1 cells. Fluorescence microspheres assay for the effect of the protein of *Apriona swainsoni* larvae on phagocytic ability of RAW264.7 cells. The production of NO (nitric oxide) production was evaluated by Griess. The production of TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-6 (interleukin-6), and IL-1 (interleukin-1) were determined by ELISA (immunosorbent assay). The mRNA levels of TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 (interleukin-1), TLR4 (toll-like receptors 4), MIR-7 (mirn-7), IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), IL-6 (interleukin-6) associated with cell phagocytic ability in RAW264.7 cells were detected by RT-PCR. The mRNA levels of MMP2 (matrix metalloprotein 2), MMP9 (matrix metalloprotein 9), signal transducer and activators of transcription 3), c-Myc and Sdf1 (stromal cell-derived factor 1) associated with cell proliferation and migration in 4T1 cells were detected by RT-PCR. Compared with the normal group, the protein of *Apriona swainsoni* larvae showed a good inhibitory effect on the proliferation of MFC and 4T1 cells, and had no effect on the proliferation of RAW264.7 cells ( $P < 0.05$ ). The cell migration rates of test groups were reduced ( $P < 0.01$ ) when compared with the normal group, suggesting that the protein of *Apriona swainsoni* larvae inhibited the migration of 4T1 cells. The protein of *Apriona swainsoni* larvae could induce apoptosis in MFC and 4T1 cells ( $P < 0.05$ ), and have no cytotoxic effect on HUEVC cells. The protein of *Apriona swainsoni* larvae significantly increased phagocytic ability and production of NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ . The mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-1, TLR4, MIR-7, IFN- $\gamma$  and IL-6 in RAW264.7 cells of the test groups were significantly upregulated ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The mRNA levels of MMP2, MMP9, STAT3, c-Myc and Sdf1 in 4T1 cells of the test groups were significantly upregulated ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The protein of *Apriona swainsoni* larvae has good *in vitro* antitumor activity and potential immunomodulatory effects.

**Keywords** *Apriona swainsoni* larvae; apoptosis; mouse macrophages; tumor cells; proliferation inhibition

斗米虫为天牛科(Cerambycidae)锈色粒肩天牛(*Apriona swainsoni* Hope)、桑天牛(*Aprionagermari Hopehu*)或其他近缘昆虫的全虫幼虫,主要寄生在云实属的白乌不停树或五加科榉木等树心内,形如小蚕<sup>[1]</sup>。早在《中华本草》中就记载了斗米虫有治疗劳伤、透疹和增强筋骨的药用价值,明朝李时珍所著《本草纲目》一书内记载食用此虫可治疗小儿疳积、麻毒内陷、筋骨疼痛、肝硬化等疾病。江西上饶及浙江某些地区不少癌症病人长期食用斗米虫,病情都有显著好转。鉴于其临床应用前景及广阔的市场前景,课题组前期对人工养殖斗米虫开展了研究,在人工培育环境中用不同配方的匀实木屑饲料喂养该虫,测定虫体的蛋白质和微量元素的变化,观察其在人工饲养环境中生理状态,为人工大规模养殖该虫提供理论依据<sup>[2]</sup>。但目前为止,国内外还未有针对斗米虫蛋白抗肿瘤作用方面的研究报道。本实验以斗米虫蛋白为对象,从细胞水平上研究其体外抗肿瘤作用以及免疫调节作用,为斗米虫蛋白的活性研究提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及试剂

斗米虫(经浙江省农林大学徐华潮教授鉴定为锈色粒肩天牛幼虫)100条,体质量为5~10 g,虫龄在6~7龄,属于老熟幼虫,主要寄生于云实树干中,购自江西省上饶市斗米虫养殖场。凋亡试剂盒购自BD公司;DMEM培养基和胰蛋白酶购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;无支原体胎牛血清(未灭活)和噻唑蓝(methyl thiazolyltetrazolium, MTT)购自美国Gemini公司;二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、GM-CSF和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国Sigma公司;CytoFLEX每日质控荧光微球购自美国Beckman公司;石油醚、乙酸乙酯、乙酸购自杭州化学试剂有限公司;甲醛溶液购自上海凌峰化学试剂有限公司;一氧化氮检测试剂盒购自碧云天生物科技研究所;小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )酶联免疫检测试剂盒、小鼠白介素-6(interleukin-6, IL-6)酶联免疫检测试剂盒、小鼠IL-1 $\beta$ 酶联免疫检测试剂盒均购自上海联硕生物

科技有限公司; 实验用水为超纯水。

## 1.2 细胞株

人胃癌细胞株MFC、小鼠乳腺癌细胞株4T1、小鼠单核巨噬细胞RAW264.7均购自中国科学院上海细胞库(1:3~1:6传代。2~3天换液1次。用胰蛋白酶消化MFC、4T1进行传代; 胰酶对RAW264.7没有作用, 需要用细胞刮刀将细胞刮成单细胞后进行传代)。

## 1.3 方法

**1.3.1 斗米虫总蛋白的提取** 取100条新鲜斗米虫, 放入-80 °C冰箱冷冻处死, 随后置于冷冻干燥机中, 脱水干燥5天后, 取出斗米虫, 置于研钵中加入液氮磨成粉状, 虫体粉末称质量约100 g。将虫体粉末置于烧杯中, 加入500 mL预冷的PBS缓冲液, 冰浴超声提取30 min, 4 °C冰箱提取过夜。12 000 r/min、4 °C离心15 min, 取上清液, 弃沉淀, 合并上清液, 即为斗米虫总蛋白提取液。核酸蛋白仪检测蛋白浓度, 为41.62 mg/mL。

**1.3.2 斗米虫总蛋白的盐析及透析除盐** 取上述斗米虫总蛋白提取液200 mL加入60 g的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>固体, 30%盐析10 min后, 以8 000 r/min、4 °C离心5 min, 收集沉淀并称量; 取上清液再加入40 g的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>固体, 盐析10 min后, 以8 000 r/min、4 °C离心15 min, 收集沉淀并测量其质量; 再取上清液再加入40 g的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>固体, 盐析10 min后, 以8 000 r/min、4 °C离心15 min, 收集沉淀并测量其质量, 得到了分别为30%、50%、70%盐析的斗米虫蛋白盐析部位。4 °C下蒸馏水透析4 h, 透析除盐直至用氯化钡检测透析液, 未出现白色硫酸钡沉淀为止<sup>[3]</sup>, 除盐后的不同蛋白部位和总蛋白一起, 冷冻干燥直至得到干燥的斗米虫蛋白。计算不同盐析蛋白和总蛋白的得率。

$$\text{得率} = \frac{\text{提取蛋白质的质量}}{\text{样品的总质量}} \times 100\%$$

**1.3.3 斗米虫蛋白分子量的检测** 配制8%的聚丙烯酰胺分离胶, 样品上样, 120 V垂直电泳1 h; 经染色液(0.5%考马斯亮兰R250、30%甲醇、1%冰乙酸)染色, 放置4 °C过夜, 脱色液(30%甲醇、10%冰乙酸)脱色至无条带部位的胶体透明, 直到能看到清晰的蛋白条带。然后扫描并拍照。

**1.3.4 MTT法检测斗米虫蛋白对MFC、RAW264.7、4T1和HUEVC细胞增殖** 取对数生长期细胞, 以DMEM培养液稀释至浓度约为2×10<sup>3</sup>个/mL制备成单

细胞悬浮液, 均匀接种于96孔板, 待过夜后分别加入0.01、0.1、1、10、25、50、100 μg/mL浓度的斗米虫蛋白, 同时设置正常对照组(对于RAW264.7细胞取0.01、0.1、1、10 μg/mL浓度的斗米虫蛋白且设置模型组LPS(1 μg/mL)和GM-CSF(20 ng/mL), 每组3个复孔, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养箱中继续培养48 h后, 在避光的条件下, 每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL), 继续孵育4 h后取出吸弃培养基, 每孔加入150 μL DMSO, 摇床振荡15 min, 用酶标仪于570 nm波长处测其吸光度(D)值, 计算MFC和4T1细胞增殖抑制率以及RAW264.7和HUEVC细胞的存活率。实验重复3次。

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{\text{对照组吸光度值} - \text{实验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

**1.3.5 显微镜下观察细胞形态学变化** 取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化后, 调整细胞浓度为2×10<sup>4</sup>个/mL, 以每孔2 mL细胞悬液均匀接种于6孔板, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中。待细胞进入对数生长期后, 弃去原培养液, 各孔加入含0、1、10、100 μg/mL斗米虫总蛋白2 mL, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中, 于48 h后倒置显微镜下观察细胞形态变化。

**1.3.6 细胞划痕实验** 将4T1细胞按5×10<sup>4</sup>个/孔细胞均匀接种于24孔培养板内, 待24 h细胞贴壁后, 用100 μL规格的枪头在板底划“一”字形划痕。每孔分别加入0.1、1和10 μg/mL浓度的斗米虫蛋白, 培养24 h。弃培养液, 显微镜下随机选取6个视野拍照, 实验重复3次。计算细胞迁移距离率。

$$\text{细胞迁移距离} = \frac{0 \text{ h宽度} - 48 \text{ h宽度}}{0 \text{ h宽度}} \times 100\%$$

**1.3.7 细胞凋亡的检测** 将对数生长期的MFC和4T1细胞铺于6孔板中, 密度为3×10<sup>4</sup>个/mL。置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h。待细胞贴壁后, 加入低中高三种浓度(MFC浓度: 25、50、100 μg/mL; 4T1浓度: 1、10、100 μg/mL)的斗米虫蛋白以及等体积的DMEM培养液的正常对照组, 继续放入培养箱中培养48 h。收集各浓度的上清液, PBS洗涤2~3次, 用胰酶消化并收集细胞, 3 000 r/min离心3 min, 弃上清液。4 °C预冷PBS洗涤2次, 加入结合缓冲液(1× binding buffer)悬重细胞, 调整细胞浓度为2×10<sup>4</sup>个/mL; 将100 μL悬重液移至5 mL培养皿中, 加入4 μL Annexin-V; 加入



6  $\mu\text{L}$  PI, 重悬细胞后避光37  $^{\circ}\text{C}$  孵育15 min, 流式细胞仪检测细胞的凋亡率。实验重复3次。

**1.3.8 荧光微球吞噬实验** 将对数生长期的RAW264.7细胞铺于6孔板中, 密度为 $4 \times 10^4$ 个/mL。置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后, 加入低中高三种浓度(0.1、1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的斗米虫蛋白、设置对照组、LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )诱导组、GM-CSF(20  $\text{ng}/\text{mL}$ )诱导组, 继续放入培养箱中培养2 h。将荧光微球与1% BCA溶液以1:100体积比混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育30 min, 超声处理5 min。向培养2 h后的细胞中加入已经处理过的荧光小球( $1 \times 10^7$ /孔), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育3 h。孵育结束后弃上清液, 1 mL PBS缓冲溶液轻轻洗涤2~3次, 去上清, 加入冰PBS缓冲溶液0.3 mL, 用细胞刮下贴壁细胞, 轻轻吹打均匀。上流式细胞仪检测细胞吞噬。实验重复3次。

$$\text{吞噬率} = \frac{\text{吞噬荧光微球的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的荧光微球总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100\%$$

**1.3.9 Griess法检测对RAW264.7释放NO的含量** 取对数生长期的巨噬细胞RAW264.7, 按 $5 \times 10^5$ 个/孔浓度接种于6孔细胞培养板, 每孔加2 mL细胞悬液, 置于细胞培养箱, 细胞贴壁后, 加入浓度为0.1、1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的斗米虫蛋白、等体积的DMEM培养液的作为空白对照组, 以及LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作为阳性对照组, 继续放入培养箱中培养, 每组设3个复孔; 分别于24 h后收集上清液, 按照NO试剂盒说明书测定NO的含量。实验重复3次。

**1.3.10 ELISA法检测巨噬细胞RAW264.7的IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 分泌量** 取对数生长期的巨噬细胞RAW264.7, 按 $5 \times 10^5$ 个/孔浓度接种于6孔细胞培养板, 每孔加2 mL细胞悬液, 按“1.3.9”中方法分组给药, 24 h后无菌收集上清液, 参照IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的ELISA检测试剂盒说明书的方法, 检测培养上清中各细胞因子的含量。实验重复3次。

**1.3.11 RT-PCR检测RAW264.7和4T1细胞mRNA水平** RT-PCR检测RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ 、IL-1、TLR4(toll-like receptors 4)、MIR-7(mir-7)、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和IL-6 mRNA水平, 以及检测4T1细胞中基质金属蛋白酶2(matrix metalloprotein 2, MMP2)、MMP9、STAT3(signal transducer and activators of transcription 3)、c-Myc和基质细胞衍生因子

1(stromal cell-derived factor 1, Sdf1) mRNA水平。取对数生长期细胞给予不同浓度的斗米虫蛋白处理, 培养24 h后收集各组细胞, 根据说明书用Trizol试剂分离提取总RNA, 逆转录得到cDNA。按说明书(2 $\times$ SGFast PCR Master Mix)配制反应体系, 每个样本设置3个孔, PCR仪进行扩增, 扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 53  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  41 s, 共41个循环。基因相对表达用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算, 以GAPDH作为内参基因, 引物序列见表1。

#### 1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件中的t test分析处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ ( $n=3$ )表示, 以 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 斗米虫总蛋白及不同盐析蛋白的得率

斗米虫总蛋白及不同盐析蛋白的得率见表2。提取的斗米虫总蛋白含量为588.672 mg, 蛋白得率较高, 不同盐析得到的蛋白含量较少, 可能是因为斗米虫蛋白多数为复杂的膜蛋白结构。这为进一步分离提取提供了基础。

### 2.2 斗米虫蛋白的分子量分布

SDS-PAGE检测斗米虫不同蛋白的分子量(图1)。在斗米虫总蛋白中, 主要分子量位于63 kDa处, 并在20、25、32、40 kDa等多个位置有清晰条带。30%、50%和70%部分的蛋白分子量也集中在kDa处。

### 2.3 斗米虫蛋白对MFC、4T1和RAW264.7细胞增殖影响

不同浓度的斗米虫蛋白对MFC细胞及4T1细胞都具有生长抑制作用, 且浓度越高, 抑制作用越强, 呈现出一定浓度依赖关系( $r_{\text{MFC}}=0.9287$ ;  $r_{4\text{T1}}=0.7414$ ,  $P < 0.05$ )。斗米虫蛋白的浓度较低时, 细胞生长抑制率没有明显变化; 当斗米虫蛋白浓度逐渐增加时, 细胞生长抑制率呈现出上升趋势; 中高浓度的斗米虫蛋白实验组的细胞生长抑制率均大于低浓度的斗米虫蛋白实验组。斗米虫蛋白作用于人正常原代细胞HUVEC 48 h后, 高浓度组的细胞存活率可以达到77.90%左右, 几乎对正常细胞的无细胞毒作用, 该结果说明, 人正常细胞对该剂量下的斗米虫蛋白具有较好的耐药性<sup>[4]</sup>(表3)。

浓度为10、1、0.1、0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 斗米虫蛋白作用后的RAW264.7细胞存活率分别上升至(109.14 $\pm$ 6.71)%、

表1 RT-PCR引物序列  
Table 1 RT-PCR primers

基因 Genes	引物序列 Sequences
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GGC TGC CCA GAA CAT CAT-3' R: 5'-CGG ACA CAT TGG GGG TAG-3'
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F: 5'-TAC AGC GAC ACT TGA CAC CC-3' R: 5'-TGC GGA CCA TAG AGA GTG GA-3'
<i>IL-1</i>	F: 5'-GAG CAC CTT CTT TTC CTT CAT CTT-3' R: 5'-TCA CAC ACC AGC AGG TTA TCA TC-3'
<i>TLR4</i>	F: 5'-GAG CCG TTG GTG TAT CTT TGA-3' R: 5'-CTC CCA TTC CAG GTA GGT GTT-3'
<i>MIR-7</i>	F: 5'-CGG CGG TGG AAG ACT AGT GAT T-3' R: 5'-ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG-3'
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	F: 5'-TGC TAC AGC TCG AGA CTT CAA GCT C-3' R: 5'-CGG GAA GGC GTA CCA TGC TTT GAC A-3'
<i>IL-6</i>	F: 5'-TGA ACT CCT TCT CCA CAA GCG-3' R: 5'-GCC TCT TTG CTG CTT TCA CA-3'
<i>MMP2</i>	F: 5'-ACA ACA GCT GTA CCA CCG AG-3' R: 5'-TCA GTA TCA GCA TCG GGG GA-3'
<i>MMP9</i>	F: 5'-AGT CCG GCA GAC AAT CCT TG-3' R: 5'-AGT CGA ATC TCC AGA CAC GC-3'
<i>STAT3</i>	F: 5'-TAT CTT GGC CCT TTG GAA TG-3' R: 5'-GTC CTT TTC CAC CCA AGT GA-3'
<i>c-Myc</i>	F: 5'-ACG ACA AGA GGC GGA CAC-3' R: 5'-TAC CTT GGG GGC CTT TTC-3'
<i>Sdf1</i>	F: 5'-AGC CTG AGC TAC CGA TGC-3' R: 5'-TCT TCA GCC GTG CAA CAA-3'

表2 斗米虫总蛋白和不同盐析蛋白得率

Table 2 Yield of the protein of *Apriona swainsoni* larvae and different salting proteins

百分比 Percentage	体积/mL Volume /mL	蛋白含量/mg Total protein /mg	得率/mg·g <sup>-1</sup> Yield /mg·g <sup>-1</sup>
Total protein	657.000	588.672	4.296
30%	22.654	13.046	0.095
50%	14.453	10.447	0.076
70%	18.493	13.812	0.100

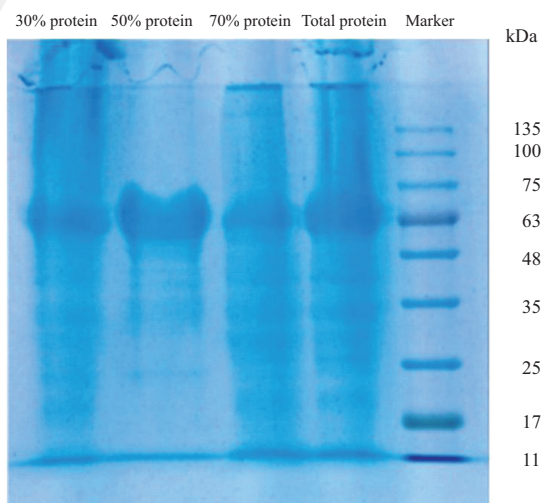


图1 不同盐析蛋白的SDS-PAGE图

Fig.1 SDS-PAGE map of different salting proteins

(128.86±9.99)%、(183.73±15.26)%和(212.36±7.26)% ( $P<0.01$ )。由此可见,该蛋白浓度越低越可以促进RAW264.7细胞增长。结果表明,RAW264.7细胞对低浓度的斗米虫蛋白非常敏感(表4)。

## 2.4 倒置显微镜下观察细胞形态学变化

正常对照组的4T1细胞培养48 h后,在显微镜下见其贴壁生长旺盛、邻近细胞生长融合成片、胞质饱满、细胞轮廓清晰、细胞外型呈梭形或多角形、铺展良好;加入斗米虫提取物后的4T1细胞,48 h后观察可见细胞扁圆突起、细胞间连接松弛、增殖速度变慢逐渐由贴壁脱落,且随浓度的增加而脱落更明显,脱落细胞悬浮于培养液中,细胞形态变圆或形态不规则。

正常对照组的MFC细胞贴壁生长良好,呈现出梭形或者多边形,可群集生长、核大、核质比高。而实验组经不同浓度下的斗米虫提取物的作用48 h后的MFC细胞悬浮增多,出现胞体缩小、变圆、核固缩、核裂变的现象。

从结果中可得出:从形态学上直接观察细胞生长状态,斗米虫蛋白可破坏4T1及MFC细胞的正常形态,部分可见细胞膜皱缩、细胞核固缩、细胞胞质内有空泡变性、核碎裂,即出现凋亡细胞;并且凋亡细胞随着斗米虫蛋白浓度升高而增多(图2)。

## 2.5 不同浓度的斗米虫蛋白对4T1细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,不同浓度的斗米虫蛋白作用

表3 MFC和4T1生长细胞抑制率  
Table 3 Inhibition rate of MFC and 4T1 cells

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	MFC		4T1		HUVEC	
	$D_{570}$	细胞生长抑制率/% Inhibition rate of cell proliferation /%	$D_{570}$	细胞生长抑制率/% Inhibition rate of cell proliferation /%	$D_{570}$	细胞存活率/% Cell viability /%
0	1.21±0.21	0	1.73±0.37	0	1.48±0.12	100
0.01	1.05±0.19	10.98±20.33	1.83±0.25	8.02±9.39*	1.74±0.13**	117.92±1.21**
0.1	1.04±0.14	13.29±11.84	1.48±0.30	14.31±2.40**	1.68±0.13*	114.02±1.89**
1	1.02±0.13*	15.33±8.37**	1.28±0.30*	26.89±5.63**	1.60±0.15	108.13±2.29**
10	0.85±0.11**	30.55±5.32**	1.13±0.23**	35.19±3.23**	1.52±0.14	102.64±1.41**
25	0.67±0.02**	44.61±10.31**	1.02±0.21**	42.30±2.01**	1.40±0.15	94.43±3.70**
50	0.30±0.03**	78.32±1.59**	0.88±0.09**	49.63±6.19**	1.32±0.18*	88.09±5.48**
100	0.24±0.01**	83.18±4.11**	0.81±0.07**	53.37±7.34**	1.18±0.21**	77.90±7.76**

用0(正常对照组)、0.01、0.1、1、10、25、50和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的斗米虫蛋白处理MFC、4T1和HUVEC细胞48 h,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ 。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与正常组比较。

MFC, 4T1 and HUVEC cells were treated with the protein of *Aprionaswainsoni* larvae 0 (normal group), 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 h.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs the normal group.

表4 RAW264.7细胞存活率  
Table 4 Survival rate of RAW264.7 cells

分组 Group	$D_{570}$	细胞存活率/% Cell viability /%
Normal	0.75±0.02	100
LSP	1.30±0.04**	187.45±4.23**
GM-CSF	1.13±0.05**	160.26±11.99**
0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.45±0.08**	212.36±7.26**
0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.29±0.08**	183.73±15.26**
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.93±0.04**	128.86±9.99**
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.80±0.06*	109.14±6.71**

正常对照组、模型组LSP、GM-CSF组、斗米虫蛋白浓度(0.01、0.1、1和10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )实验组处理RAW264.7细胞48 h,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ 。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与正常组比较。

RAW264.7 cells were treated with the protein of *Aprionaswainsoni* larvae (0.01, 0.1, 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), normal group, LSP group, GM-CSF group for 48 h.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs the normal group.

4T1细胞48 h后, 正常组细胞迁移率为(42.57±1.16)%, 0.1、1和10 μg/mL组细胞迁移率分别为(68.59±1.89)%、(65.98±0.85)%和(76.33±1.16)%( $P<0.05$ , 图3), 表明斗米虫蛋白明显抑制了4T1细胞的迁移。

## 2.6 不同浓度斗米虫蛋白对MFC和4T1细胞凋亡的影响

流式细胞检测结果(图4)显示, 与正常组比较, 细胞凋亡率随着斗米虫蛋白浓度的升高而升高, 斗

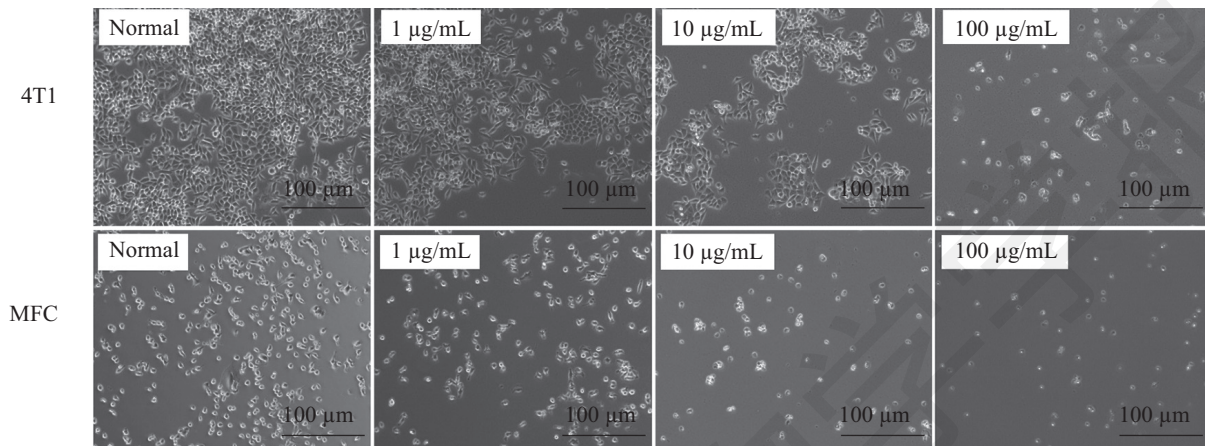
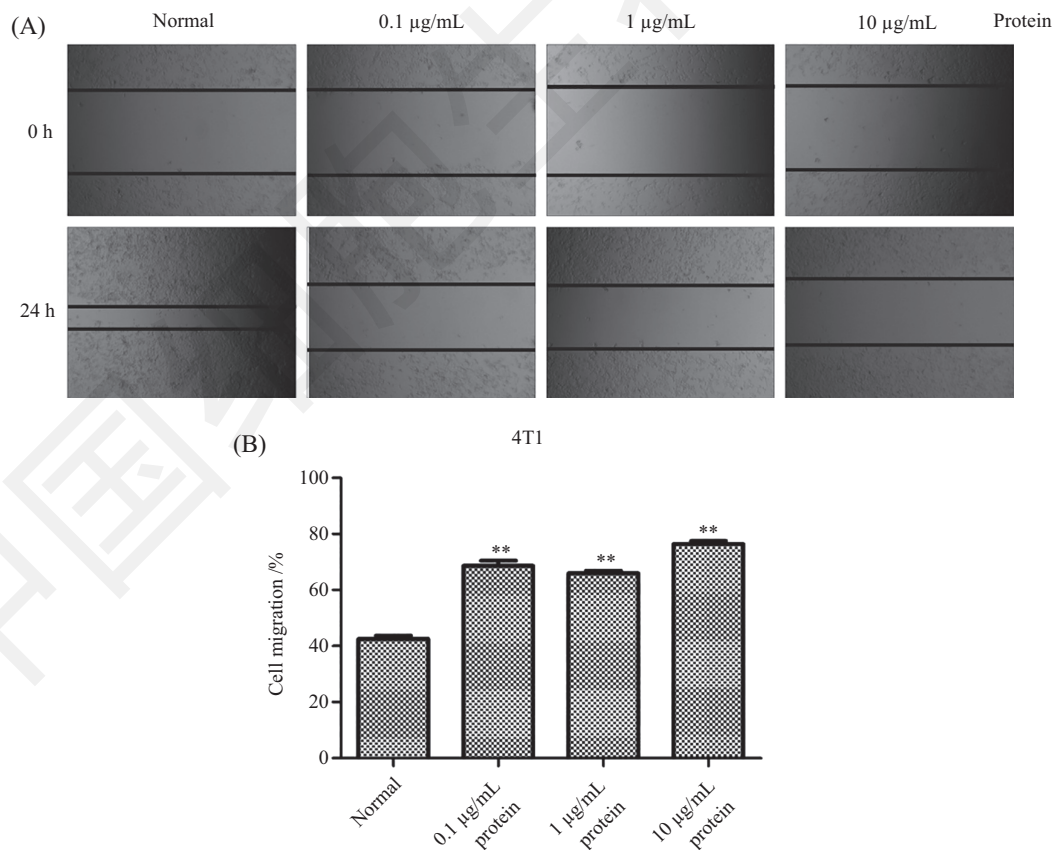


图2 不同浓度斗米虫蛋白处理4T1和MFC细胞形态的变化

Fig.2 Cell morphology changes of 4T1 and MFC treated with different concentrations of the protein of *Apriona swainsoni* larvae



A: 不同浓度的斗米虫蛋白对4T1细胞作用48 h的细胞迁移结果图; B: 4T1细胞在48 h的细胞迁移率。  $\bar{x}\pm s, n=3$ 。 \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与正常组比较。  
A: cell migration result graph of 4T1 treated by different concentrations of the protein of *Apriona swainsoni* larvae for 48 h; B: cell migration rate of 4T1 cells treated by different concentrations of the protein of *Apriona swainsoni* larvae for 48 h.  $\bar{x}\pm s, n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs the normal group.

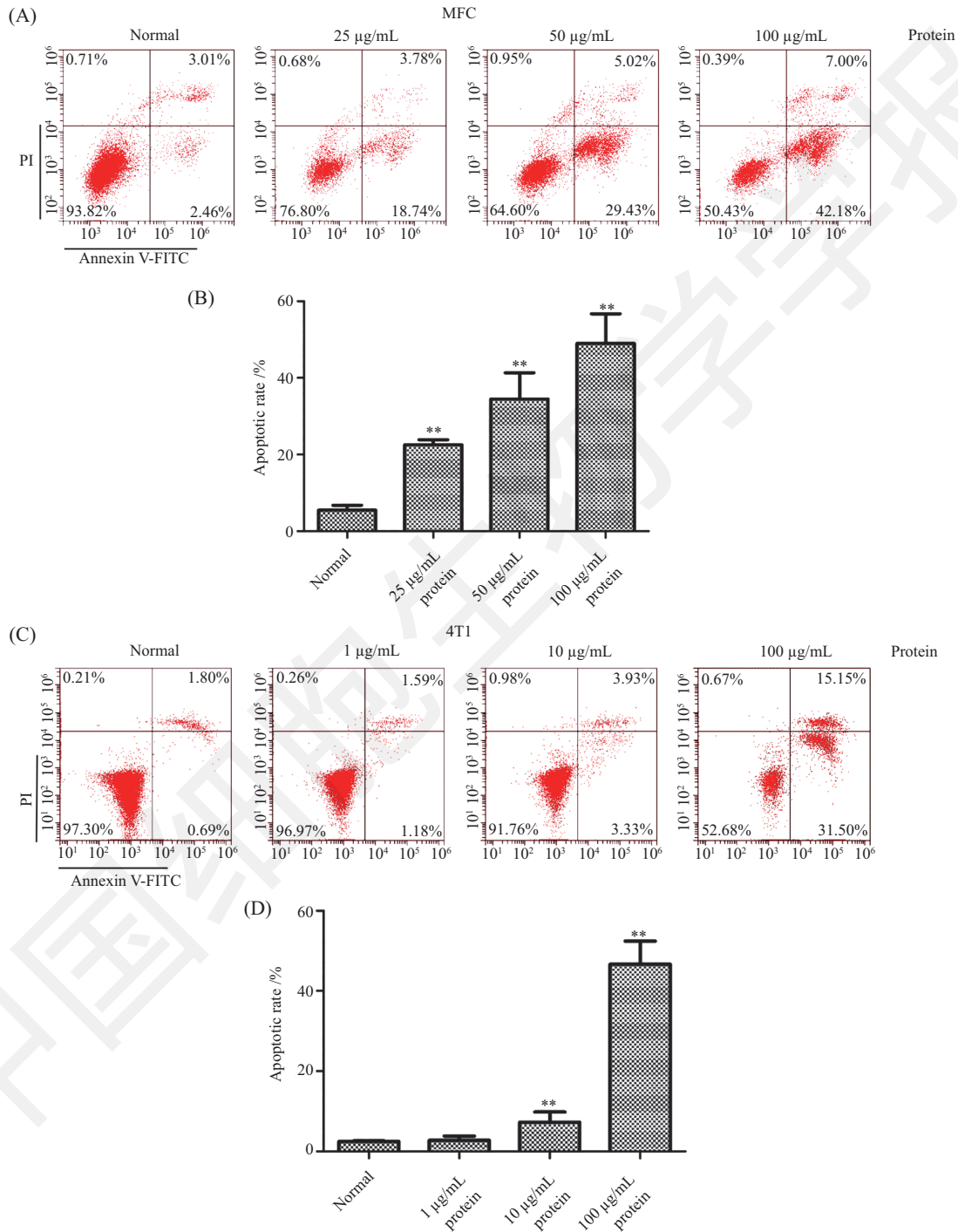
图3 不同浓度的斗米虫蛋白对4T1细胞迁移能力的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of the protein of *Apriona swainsoni* larvae on migration of 4T1 cells



米虫蛋白浓度为25、50和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组MFC细胞凋亡率分别升高为(22.52 $\pm$ 1.37)%、(34.45 $\pm$ 6.89)%和(48.98 $\pm$ 7.76)%，有明显的浓度依赖性( $r_{\text{MFC}}=0.991$ ， $P<0.01$ )；斗米虫蛋白浓度为1、10和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组4T1

细胞凋亡率分别升高为(2.77 $\pm$ 108.3)%、(7.26 $\pm$ 257.13)%和(46.65 $\pm$ 577.54)%，其中10和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组4T1细胞差异具有统计学意义( $P<0.01$ )，可见斗米虫蛋白可以诱导MFC和4T1细胞凋亡。



A、C：不同浓度的斗米虫蛋白对MFC和4T1细胞分别作用48 h的流式结果图；B、D：MFC细胞、4T1细胞在48 h的细胞凋亡率； $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ 。  
\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ，与正常对照组比较。

A,C: flow cytometry results of MFC and 4T1 treated by different concentrations of the protein of *Aprionaswainsoni* larvae for 48 h; B,D: the apoptotic rates of MFC and 4T1 cells treated by different concentrations of the protein of *Aprionaswainsoni* larvae for 48 h; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs the normal group.

图4 流式细胞仪检测MFC和4T1细胞的凋亡率

Fig.4 Flow cytometry detection of apoptosis rate of MFC and 4T1 cells



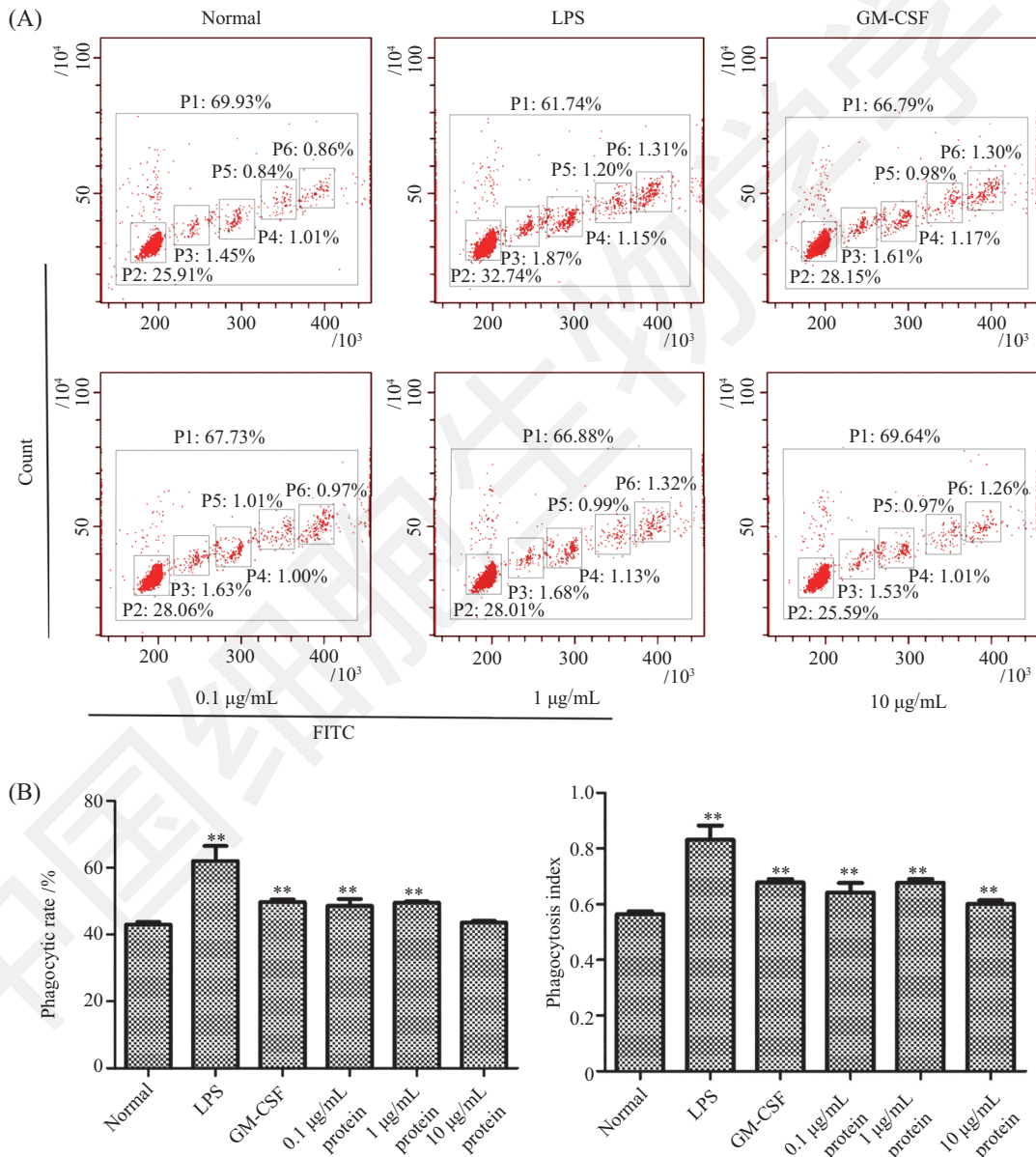
### 2.7 不同浓度的斗米虫蛋白对RAW264.7细胞吞噬活性的影响

流式细胞仪分析和数据获取结果(图5): 与正常组相比较, 锈色粒肩天牛幼虫蛋白3个剂量组对RAW264.7细胞在吞噬一个荧光微球无明显差异, 但其吞噬2及2个以上荧光微球能力有明显提高, 特别是1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组在吞噬5~6个荧光微球能力与阳性对照组相当, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。该蛋白在中低浓度的条件下吞噬能力要强于高浓度, 与之前结果一致, 中低浓

度反而更加刺激RAW264.7细胞的吞噬荧光微球。

### 2.8 不同浓度的斗米虫蛋白对RAW264.7细胞分泌NO量的影响

根据Griess法绘制标准曲线并计算NO的量, 结果显示: 各个浓度斗米虫蛋白对巨噬细胞分泌NO的量与正常对照组相比有明显差异( $P < 0.05$ , 图6)。由此可知, 斗米虫蛋白在不同浓度能够激活巨噬细胞RAW264.7中NO的释放量, 也能提高分泌NO的能力。



A: RAW264.7细胞吞噬荧光微球流式结果图; B: RAW264.7细胞吞噬荧光微球的吞噬率和吞噬指数。  $\bar{x} \pm s, n=3$ 。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

A: flow cytometry results of phagocytosing fluorescent microspheres in RAW264.7 cells; B: dot-plot of FSC-SSC and FL1-SSC of RAW264.7 treated with fluorescent microspheres.  $\bar{x} \pm s, n=3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

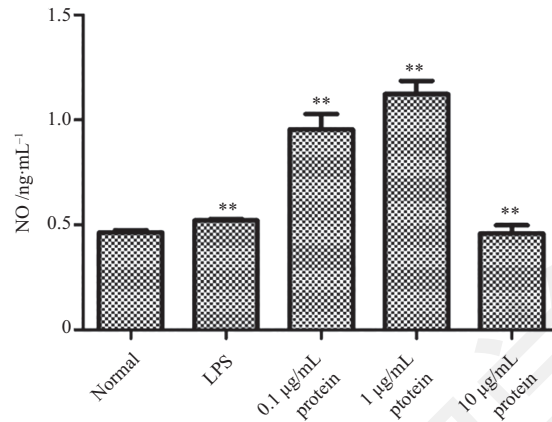
图5 RAW264.7细胞吞噬荧光微球的吞噬率和吞噬指数

Fig.5 Dot-plot of FSC-SSC and FL1-SSC of RAW264.7 treated with fluorescent microspheres

## 2.9 不同浓度斗米虫蛋白对RAW264.7细胞分泌IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的影响

斗米虫蛋白作用24 h后, 该蛋白浓度范围在0.01~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 能促进巨噬细胞分泌IL-6、TNF- $\alpha$

和IL-1 $\beta$ 的量, 与正常对照组和LPS相比, 具有极显著性差异( $P < 0.05$ , 图7)。由此可知, 斗米虫蛋白在不同浓度能够激活巨噬细胞RAW264.7分泌IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的量, 也能提高分泌IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的

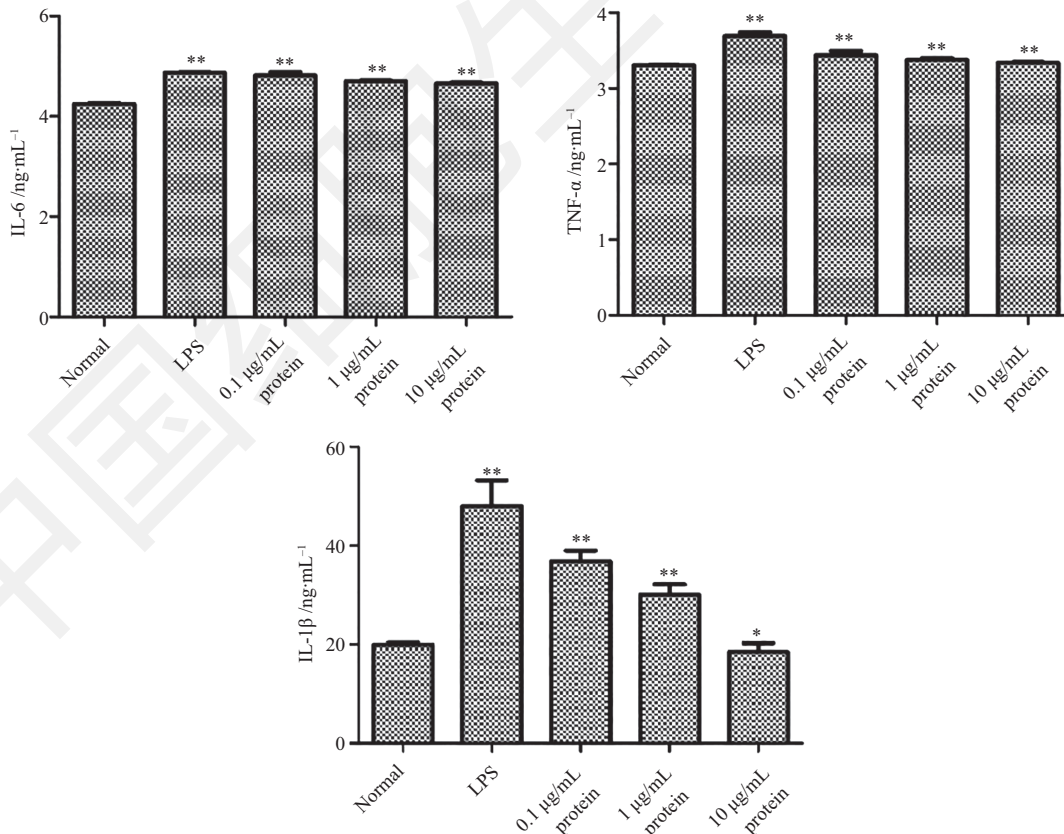


$\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*\* $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*\* $P < 0.01$  vs the normal group.

图6 不同浓度的斗米虫蛋白对RAW264.7细胞分泌NO量

Fig.6 The effect of on the production of the protein of *Aprionaswainsoni* larvae nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells

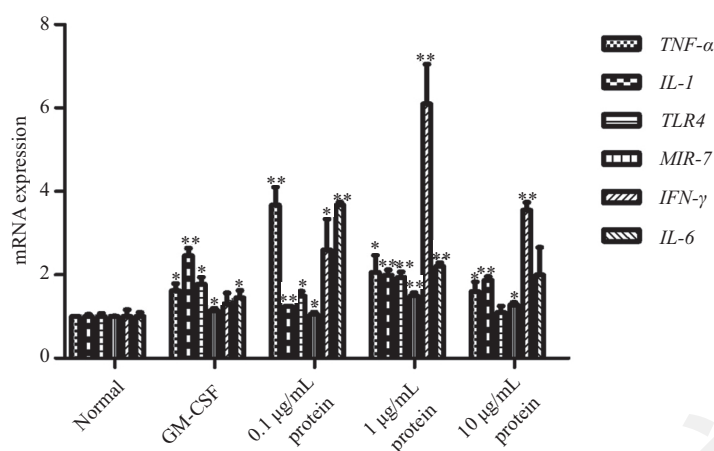


$\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs the normal group.

图7 不同浓度斗米虫蛋白对RAW264.7细胞分泌IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的影响

Fig.7 The effect of the protein of *Apriona swainsoni* larvae on secretion of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in RAW 264.7

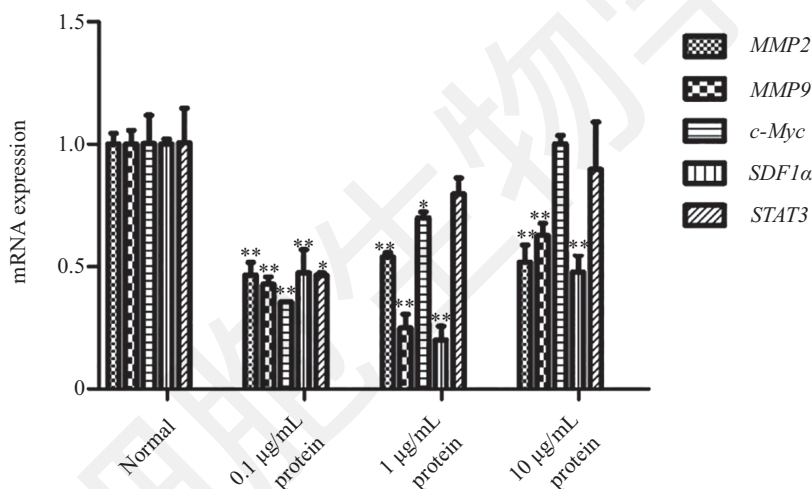


$\bar{x} \pm s, n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与正常对照组比较。

$\bar{x} \pm s, n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs the normal group.

图8 不同浓度斗米虫蛋白对RAW264.7细胞mRNA水平的影响

Fig.8 Effects of different concentrations of the protein of *Apriona swainsoni* larvae in RAW264.7 cells



$\bar{x} \pm s, n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与正常对照组比较。

$\bar{x} \pm s, n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs the normal group.

图9 不同浓度斗米虫蛋白对4T1细胞mRNA水平的影响

Fig.9 Effects of different concentrations of the protein of *Apriona swainsoni* larvae in 4T1 cells

能力。

### 2.10 不同浓度斗米虫蛋白对RAW264.7和4T1细胞mRNA水平的影响

RT-PCR结果(图8和图9)显示, 不同浓度斗米虫蛋白作用RAW264.7细胞24 h后, 与正常组相比, 阳性对照组(GM-CSF)和实验组RAW264.7细胞*TNF-α*、*IL-1*、*TLR4*、*MIR-7*、*IFN-γ*和*IL-6* mRNA水平显著上调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。不同浓度斗米虫蛋白作用4T1细胞24 h后, 与正常组相比, 实验组4T1细胞*MMP2*、*MMP9*、*STAT3*、*c-Myc*和*Sdf1* mRNA水平显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

## 3 讨论

当前治疗肿瘤的主要手段是化疗, 但经过化疗人体会产生许多毒副作用如损伤免疫功能、损害胃肠道、破坏肝功能和骨髓抑制, 这些毒副作用限制了化疗药物疗效的进一步提高和发展, 因此利用药用昆虫治疗肿瘤或者辅助治疗肿瘤达到增效减毒的目的具有极其重要的意义。目前药用昆虫在治疗肿瘤的研究中已发现有增效减毒作用, 而且能增加肿瘤对化疗药物的敏感性, 使用较低剂量的化疗药物也能产生同样的效果, 并且能使原对化疗不敏感的肿瘤在应用中药后有效, 从而进一步提高了化疗的



疗效。

从本研究实验结果发现,斗米虫蛋白能抑制MFC、4T1细胞的增殖,并能显著促进4T1细胞的迁移,诱导MFC、4T1细胞凋亡。尤其在斗米虫蛋白在高剂量100 mg/mL时,抑制的效率可以到70%~80%。由此推论,该蛋白能抑制癌细胞的可能机制是通过提高机体免疫能力而间接影响癌细胞,而不是直接作用于癌细胞将其杀死,只是抑制了细胞的增殖<sup>[4]</sup>。而后我们选择让斗米虫蛋白作用于巨噬细胞看其是否具有效果。巨噬细胞为机体免疫细胞中重要类型之一<sup>[5]</sup>。当机体受到病原体的侵害时,活化的巨噬细胞不仅能够吞噬病原体,还分泌调节免疫反应的细胞信使,如炎症介质NO、PEG2和细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ <sup>[6]</sup>。有研究报道,虫草可以诱导巨噬细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 等细胞因子的分泌<sup>[7]</sup>,增强巨噬细胞的吞噬活性<sup>[8]</sup>。实验结果表明,斗米虫蛋白可以提高RAW264.7细胞的存活率。该蛋白还能够增强细胞吞噬能力,巨噬细胞吞噬功能的提高有利于机体的非特异性免疫作用。该结果进一步说明了斗米虫蛋白激活了RAW264.7巨噬细胞,从而提高了NO的产生及免疫刺激因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的释放,从而发挥了免疫调节作用<sup>[9]</sup>。

TNF- $\alpha$ 是一个经典的炎症指标,能够诱导多种炎症因子产生,最终导致细胞凋亡,处于炎症反应的中心环节,其表达量的多少可以直接反应炎症的严重程度<sup>[10]</sup>。IL-1能刺激集落刺激因子、血小板生长因子等细胞因子的产生,在免疫应答和组织修复中起作用<sup>[11]</sup>。TLR4在识别病原体和激活先天免疫中起着重要的作用<sup>[12]</sup>,并且它可促进机体的抗感染、抗肿瘤活性<sup>[13]</sup>。TLR4一旦被激活,能够促进细胞内信号通路传导从而激活免疫相关蛋白作用<sup>[13]</sup>。MIR-7和IFN- $\gamma$ 是巨噬细胞活化因子,具有免疫调节的特性<sup>[14]</sup>。IL-6是一种重要的炎症因子,为肿瘤及间质炎性微环境的重要成员,在某些肿瘤中IL-6/STAT3通路是肿瘤细胞增殖、肿瘤耐药、血管生成及上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的关键因子之一,IL-6能增强淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer cell, LAK)、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和T淋巴细胞的活性,从而增强抗肿瘤活性<sup>[15]</sup>。实验结果显示,斗米虫蛋白能够上调RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ 、IL-1、TLR4、

MIR-7、IFN- $\gamma$ 和IL-6 mRNA的水平,从而激活了RAW264.7细胞的免疫调节作用。MMP2和MMP9是细胞外基质重塑和肿瘤转移过程中的明胶酶,与多种肿瘤的转移密切相关<sup>[16]</sup>。二者的高表达可促进乳腺癌细胞的转移<sup>[17]</sup>。本实验中发现,斗米虫蛋白高剂量组能够降低MMP-2和MMP-9的表达,提示斗米虫蛋白对4T1乳腺癌肺转移的抑制作用可能与抑制MMP-2和MMP-9的表达有关。STAT3可通过抑制肿瘤细胞产生的促炎症反应细胞因子从而促进肿瘤迁移<sup>[18]</sup>。Sdf1能够在细胞中过表达,敲除它可以抑制肿瘤细胞的生长和转移<sup>[19]</sup>。该实验中斗米虫蛋白能够显著下调4T1细胞STAT3、c-Myc和Sdf1 mRNA的水平,来抑制肿瘤细胞生长和转移。

有研究表明,食源性蛋白可增强机体吞噬细胞能力,增强自然杀伤细胞的活性,提高机体吞噬细胞的能力<sup>[20]</sup>,也可以抵御病原体侵入和抑制宿主细胞的促炎反应发挥免疫调节作用<sup>[21]</sup>,这与本文研究结果一致。食源性蛋白不会直接与病原体发生相互作用,但可以促进宿主细胞的防御能力,从而起到免疫调节能力来抵御肿瘤细胞<sup>[22]</sup>。斗米虫作为一种药用昆虫物质,具有广泛的药理活性,是良好的抗肿瘤和免疫调节活性物,具有潜在应用价值,值得进一步深入研究。

## 参考文献 (References)

- [1] 叶苓,林美熙,黄泰康,等. 虫类本草[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002, 10: 162-3.
- [2] 赵艺,徐华潮,马艳,等. 虫酰肼和灭幼脲对锈色粒肩天牛氧化酶和解毒酶活性的影响[J]. 浙江农林大学学报(ZHAO Y, XU H C, MA Y, et al. Oxidase and detoxifying enzyme activity of *Apriona swainsoni* (Hope) with diflubenzuron and flubenzuron [J]. Journal of Zhejiang A & F University), 2018, 35(1): 174-7.
- [3] 洗永权,谭竹钧,韩雅莉. 黑蚂蚁纤溶活性蛋白的分离纯化及其性质研究[J]. 基因组学和应用生物学(XIAN Y Q, TAN Z Y, HAN Y L. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic protein from black ants [J]. Genomics and Applied Biology), 2015, 34 (2): 284-9.
- [4] 党一凡. 罗格列酮增强胰岛素抵抗肝癌HepG2/IR细胞对化疗药物敏感性研究. 青岛: 山东大学[D], 2019.
- [5] ZHENGX, ZOU S, XU H. The linear structure of beta-glucan from baker's yeast and its activation of macrophage-like RAW264.7 cells [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 61-8.
- [6] ZONG AZ, CAO H, WANG F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1395-410.
- [7] APETOHL, GHIRINGHELLI F, TESNIERE A. Toll-like receptor4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy [J]. Nat Med, 2007, 13(9): 1050-



- 9.
- [8] HAN C, YANG J, SONG P. Effects of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced inflammatory factor-release in RAW264.7 cells [J]. *J Int Cytokine Res*, 2018, 38(1): 29-37.
- [9] MODESTO R, WENBO ZH, DEXTER LL. Role of IL-6 in angiotensin II-induced retinal vascular inflammation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(3): 54.
- [10] ZHANG M Z, TIAN X H, WANG Y. Immunomodulating activity of the polysaccharide TLH-3 from *Tricholomalobayense* in RAW264.7 macrophages [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 2679-85.
- [11] GIACOPPO S, RAJAN T S, IORI R. The  $\alpha$ -cyclodextrin complex of the Moringa isothiocyanate suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells through Akt and p38 inhibition [J]. *Inflam Res*, 2017, 66(6): 487-503.
- [12] CHEN X M, YU GQ, FAN S. Sargassum fusiforme polysaccharide activates nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) and induces cytokine production via Toll-like receptors [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 105: 113-20.
- [13] 许文, 李心群. 猪苓多糖通过Toll样受体4对小鼠腹腔巨噬细胞的活化作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*(XU W, LI X Q. Activation of polysaccharides from *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries on peritoneal macrophages from mice through Toll-like receptor 4 [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2010, 24(4): 266-74.
- [14] 于晓红, 李书丹, 阚洪敏, 等. 红树莓原液对免疫抑制小鼠脏器指数及血清IFN- $\gamma$ 、IL-4水平的影响[J]. *天津中医药*(YU X H, LI S D, KAN M H, et al. Influence of red raspberry on IFN- $\gamma$ , IL-4 levels and immunosuppressed mice organs index [J]. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2015, 32(3): 173-5.
- [15] 陈亮, 盛修贵. IL-6/STAT3信号通路与卵巢癌关系研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*(CHEN L, SHENG X G. Research advances in the relationship between IL-6/STAT3 [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*), 2015, 22(25): 1253-6.
- [16] ZHENG H, TAKAHASHI H, MURAI Y, et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(5A): 3579-83.
- [17] MIN K W, KIM DH, DO S I. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and 9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast [J]. *J Pathol Microbiol Immunol*, 2014, 122(12): 1196-206.
- [18] FOFARIA N M, SRIVASTAVA S K. Critical role of STAT3 in melanoma metastasis through anoikis resistance [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 7051-64.
- [19] BRULER S, CHARNUX N, SUTTON A, et al. The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL 12 and mediated by the matrix metal oproteinase-9 [J]. *Glycobiology*, 2006, 16(6): 488-501.
- [20] YANG R Y, ZHANG Z F, PEI X R. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(2): 464-70.
- [21] HOU H, FAN Y, LI B. Preparation of immunomodulatory hydrolysates from Alaska pollock frame [J]. *J Sci Food Agricul*, 2012, 92(15): 3029-38.
- [22] 程媛, 曹慧, 徐斐. 食源性蛋白中免疫活性肽的研究进展[J]. *食品科学*(CHENG Y, CAO H, XU F. Research progress in immune regulation of food-derived bioactive peptides [J]. *Food & Machinery*), 2015, 36(17): 296-9.