

蜂毒肽 Melittin 对小鼠红细胞溶血效应 及影响机制分析

石 伟,李彩云,陈玉清

(南京师范大学生命科学学院,江苏省分子医学生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 蜂毒肽 Melittin 是一种具有高效抗细菌、真菌、肿瘤细胞等多种生物学活性的抗菌肽,然而其溶血活性限制了其发展为高效抗菌抗癌药物的应用. 本文深入分析了 Melittin 对小鼠红细胞的作用机制,探讨影响 Melittin 溶血活性的细胞机制. 结果表明, Melittin 可以引起红细胞膜上形成空洞,抑制细胞内 ATPase 的活性. 红细胞膜中糖蛋白或糖脂糖链中的唾液酸参与 Melittin 的相互作用,介导 Melittin 的溶血活性. 质膜胆固醇也影响 Melittin 与红细胞膜相互作用,降低溶血活性. 研究还发现,外源添加 D-葡萄糖和 D-蔗糖能显著抑制 Melittin 的溶血活性. 研究结果为降低抗菌肽溶血性以及推动抗菌肽的药物应用提供了重要理论基础.

[关键词] 蜂毒肽,溶血性,唾液酸,碳水化合物,胆固醇

[中图分类号] Q26 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)02-0086-07

The Effect of Melittin on Rat Red Blood Cells and Its Mechanism

Shi Wei, Li Caiyun, Chen Yuqing

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key
Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Melittin is an antibacterial peptide with variety of biologically activities including highly effective against bacteria, fungi and tumor cells. However, its highly hemolysis activity limits the application as antibacterial and anticancer drugs. This paper deeply analyzed the mechanism of action of Melittin to rat red blood cells, especially for cellular mechanisms. The result showed that Melittin induced a pore-forming on erythrocyte membrane, inhibited the activity of intracellular ATPase. Sialic acid moieties of glycoproteins or glycolipids interact with Melittin mediated hemolytic activity of Melittin. Plasma membrane cholesterol may also interact with Melittin and influence hemolytic activity. The study also found that the addition of exogenous D-glucose and D-sucrose could significantly inhibit the hemolytic activity of Melittin. Our data provided an important theoretical basis for reducing the hemolytic activity of antimicrobial peptides and promoting their drug application.

Key words: Melittin, hemolysis, sialic acid, carbohydrates, cholesterol

抗菌肽(Antimicrobial peptide)是一类广泛存在于生物界的参与抗菌免疫的重要防御分子,作为先天性免疫抵御入侵病原体的第一道防线^[1]. 越来越多的研究表明,除具有抗细菌作用外,抗菌肽还有抗真菌、病毒、原虫以及恶性肿瘤细胞的作用,其多种生物学功能已引起广泛的关注^[2]. 根据对作用细胞的选择性,可以将抗菌肽分为 2 种类型:一、对微生物、肿瘤细胞有杀伤活性但对正常细胞低毒或无毒的抗菌肽;二、对微生物、肿瘤细胞以及正常细胞都有杀伤活性的抗菌肽^[3,4]. 具有选择性杀伤活性的抗菌肽成为抗菌抗癌新药的重要资源. 然而目前研究发现,具有选择性杀伤活性的抗菌肽通常抗癌活性不够理想,限制了直接作用抗癌药物的应用;而对微生物、肿瘤细胞以及正常细胞均无选择性的抗菌肽通常表现为高效的抗菌抗癌活性,为提高这类抗菌肽的选择性,一些研究通过氨基酸替换、偶联侧链等方式进行改造^[5-7].

抗菌肽 Melittin 是分离于欧洲蜂蜜(*Apis mellifera*)毒液中的由 26 个氨基酸残基(GIGAVLKVLTTGL-

收稿日期:2014-11-12.

基金项目:国家自然科学基金(30900743)、江苏省基础研究计划(自然科学基金)资助项目(BK2011368、BK20141446).

通讯联系人:陈玉清,博士,副教授,研究方向:抗菌肽抗肿瘤机制研究. E-mail:chenyuqing@njnu.edu.cn

PALISWIKRKRQQ)组成的阳离子抗菌肽,其抗菌活性、特别是高效的抗癌活性引起多年来广泛的研究.作为一种阳离子抗菌肽,Melittin 具有典型的双亲 α -螺旋结构,N 端约 20 个氨基酸残基组成双亲螺旋,C 端 6 个氨基酸残基组成疏水螺旋.双亲性使 Melittin 能溶于亲水环境,结合于生物膜,与生物膜相互作用而发挥生物学活性^[8,9].已有研究表明,Melittin 对白血病、肺癌、前列腺癌、乳腺癌、肾癌、肝癌等多种癌细胞具有明显的杀伤活性,可以通过诱导坏死、凋亡或抑制迁移等多种途径发挥抗癌活性^[10-12],成为一种非常有潜力的抗癌资源.然而,体内实验表明,高剂量的 Melittin 将引起严重的毒副作用,包括肝损伤以及高溶血活性,限制了 Melittin 直接作为抗菌抗癌药物的应用^[13].溶血性是评价药物毒副作用的重要指标,降低溶血性是发展 Melittin 为抗菌抗癌药物急需解决的问题.但是,目前 Melittin 的溶血机制仍然不清楚.本研究首先检测 Melittin 对红细胞结构与功能的影响,然后分析红细胞中胆固醇以及糖蛋白、糖脂糖链中的唾液酸、岩藻糖与 Melittin 的相互作用,最后评价外源碳水化合物对 Melittin 溶血的抑制作用.通过深入研究 Melittin 的溶血机制,推动 Melittin 在抗菌抗癌领域的应用.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

昆明小鼠,购自南京青龙山动物养殖场.

1.1.2 试剂

Melittin 由上海吉尔多肽有限公司合成,HPLC>95%;唾液酸酶(sialidase),岩藻糖苷酶(fucosidase),胆固醇(cholesterol),以及碳水化合物:D-乳糖(D-lactose),D-蔗糖(D-sucrose),D-葡萄糖(D-glucose)购自 Sigma 公司;腺苷(adenosine)购自 Aladdin 试剂公司;ATP 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方 法

1.2.1 溶血性实验

小鼠眼球取血 1 mL,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清.加入 0.9%的 NaCl 溶液,缓慢混匀,1 000 r/min 离心 5 min.生理盐水洗细胞 3 次,至上清液澄清.然后用生理盐水按照 4%的浓度稀释红细胞,每孔 200 μ L,加入到 96 孔板中.以生理盐水作为阴性对照,Triton X-100 作为阳性对照,其余加入不同浓度的 Melittin(0.5 μ mol/L、1.0 μ mol/L、2.0 μ mol/L 和 4.0 μ mol/L).37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,水平离心机 1 000 r/min 离心 5 min,吸取上清 100 μ L 至 96 孔酶标板中,测量 414 nm 下的吸光值.根据公式: $(A_{\text{peptide}} - A_{\text{NS}}) / (A_{\text{TritonX-100}} - A_{\text{NS}}) \times 100\%$ 计算溶血百分率.

1.2.2 扫描电镜观察

取等量的红细胞每管 200 μ L,分别加入 2HU(1HU 代表 50%的红细胞发生溶血时所需要的抗菌肽浓度)的 Melittin 处理 1 min、8 min 和 15 min,9 000 r/min 离心 5min,PBS 洗 3 次,用 4%的戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 3 h,9 000 r/min 离心 15 min,用 PBS 洗固定细胞 3 次,每次 15 min,对固定洗涤后的细胞依次用 50%、70%、80%、90%和 95%的乙醇脱水,每次 10 min,最后用 100%的乙醇脱水 2 次,每次 20 min,脱水的细胞在 CO₂ 培养箱中吹干过夜,离子溅射镀金后用 JEOL 公司的 JSM-7600F 扫描电子显微镜观察细胞溶血时的超微结构变化.

1.2.3 红细胞内 ATP 生成的测定

2 个实验检测 Melittin 对红细胞内 ATP 生成的影响:(1)红细胞内总 ATP 酶活性的检测.取抗凝全血,1 000 r/min 离心 10 min,弃上层血清,留下层压积红细胞,取一定量的压积红细胞,2 HU 的 Melittin 处理,NaCl 处理组作为阴性对照,H₂O₂(5 μ mol/L)处理组作为阳性对照.然后分别加重蒸水处理,对光观察溶液直至透亮,使用超微量总 ATP 酶测试盒检测,单位为 μ molPi/10⁷ RBC/h;(2)葡萄糖和腺苷对 Melittin 溶血性的影响.1.5 HU 的 Melittin 首先在含溶解于 NaCl 溶液中的 100 nmol/L 葡萄糖与 5 nmol/L 腺苷中处理 30 min,然后分别加入悬浮于 NaCl 溶液中 4%(体积分数)的红细胞 100 μ L,处理后的红细胞测定其溶血活性.

1.2.4 唾液酸酶和岩藻糖苷酶对 Melittin 溶血性的影响

取 3 份等量稀释的红细胞分别进行如下处理:(1) sialidase(0.1 U/mL) 于 37 °C 孵育 30 min;(2) fucosidase(0.1 U/mL) 于 37 °C 孵育 30 min;(3) PBS 对照. 处理后的红细胞分别测定其不同浓度的 Melittin(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$) 的溶血活性.

1.2.5 碳水化合物与胆固醇对 Melittin 溶血性的影响

D-乳糖、D-蔗糖、D-葡萄糖(终浓度为 20 mmol/L) 以及不同浓度的胆固醇(4 μg 、10 μg 和 40 μg), 分别加入 1.5 HU 的 Melittin, 终体积为 100 μL , 室温孵育 30 min. 加入 100 μL 4%(体积分数) 的小鼠红细胞悬液混匀, 37 °C 孵育 1 h, 测定溶血活性.

1.2.6 统计学处理

所有实验均重复 3~5 次, 采用 SPSS 18.0 统计软件分析处理, 采用 *t* 检验, 数据以(平均值 \pm 标准差)表示, $P < 0.05$ 为具有显著性差异(*), $P < 0.01$ 为具有极显著差异(**).

2 结果

2.1 蜂毒肽 Melittin 对小鼠红细胞的溶血活性

蜂毒肽 Melittin 的溶血活性测定结果如图 1 所示. 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下, Melittin 对小鼠红细胞溶血率约 60%, 50% 的红细胞发生溶血的 Melittin 浓度约 0.8 $\mu\text{mol/L}$ (即 HU = 0.8 $\mu\text{mol/L}$), 4 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度处理使得红细胞溶血率为 100%. 可见 Melittin 对小鼠红细胞表现出较高的溶血活性, 并且呈现浓度依赖性.

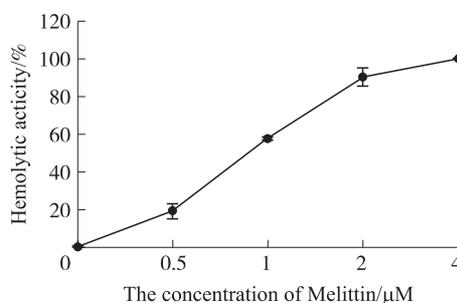


图 1 Melittin 的溶血曲线

Fig. 1 The hemolysis rates of Melittin on rat red blood cells

2.2 蜂毒肽 Melittin 对红细胞膜的影响

为探讨 Melittin 是否影响红细胞膜结构, 进行了扫描电镜分析. 对照组红细胞呈双凹形扁平状结构, 膜表面光滑, 经 Melittin 处理 1 min 后, 红细胞膜表面出现突起; 处理 8 min 后红细胞膜出现了皱缩和变形; 处理 15 min 后红细胞膜表面有裂纹并且有孔洞的出现, 表明红细胞膜的结构和完整性受到破坏(图 2).

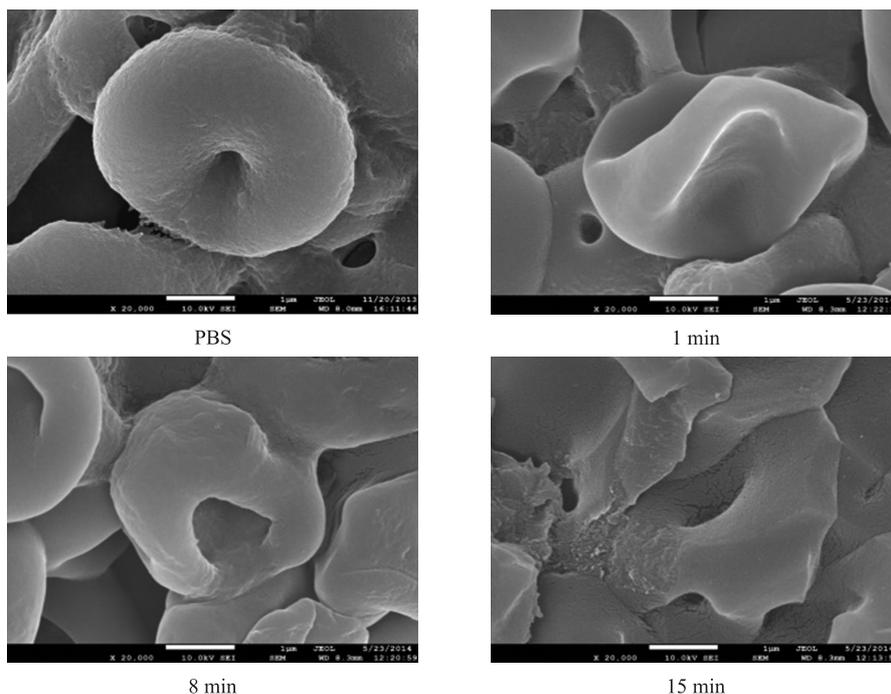


图 2 扫描电镜观察 Melittin 处理的红细胞膜表面形态学变化

Fig. 2 Scanning electron micrographs showing the effect of Melittin on rat red blood cells

2.3 蜂毒肽 Melittin 对红细胞膜 ATP 酶活性的影响

为了测定 Melittin 对细胞膜结构的损伤是否影响 ATP 酶活性,检测了 Melittin 处理前后红细胞内总 ATP 酶活性的变化情况. 对照组处理 H_2O_2 能显著抑制 ATPase 的活性,降低细胞内 ATP 水平. 与对照组相比,Melittin 也可以显著降低红细胞内 ATP 水平(图 3A). 葡萄糖和腺苷对 ATP 的生物合成很重要,将它们加入到红细胞悬液中,如果 Melittin 引起的溶血有代谢的消耗,那么葡萄糖和腺苷的添加将会抑制溶血. 结果发现,葡萄糖和腺苷的添加显著降低了 Melittin 的溶血活性,降低了约 12%(图 3B). 可见 Melittin 可以引起红细胞内 ATPase 活性降低,降低细胞内 ATP 的产生.

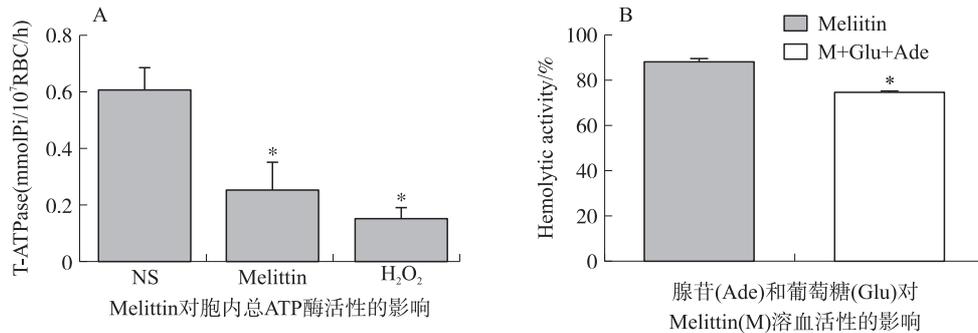


图 3 Melittin 对胞内 ATP 消耗的测定

Fig. 3 Effect of Melittin on the intracellular ATP consumption

A, Melittin 对胞内总 ATP 酶活性的影响; B, 腺苷(Ade)和葡萄糖(Glu)对 Melittin(M)溶血活性的影响

A, T-ATPase activity affected by Melittin; B, Effect of adenosine and glucose on the hemolytic activity of Melittin

2.4 唾液酸和岩藻糖对 Melittin 溶血性的影响

唾液酸和岩藻糖是细胞膜糖蛋白和糖脂寡糖链中的重要糖分子,将小鼠红细胞经过唾液酸酶和岩藻糖苷酶分别处理后,测定唾液酸和岩藻糖是否介导 Melittin 的溶血活性. 唾液酸酶水解去除红细胞膜糖蛋白或糖脂中的带负电荷的唾液酸分子后, Melittin 的溶血活性显著降低. Melittin 在 $1 \mu\text{mol/L}$ 时溶血性约 60%, 水解除去唾液酸后, 溶血性下降了 40%; Melittin 在 $4 \mu\text{mol/L}$ 时溶血性为 100%, 水解除去唾液酸后溶血性下降了 40%, 可见红细胞膜表面唾液酸分子显著影响了 Melittin 的溶血活性. 岩藻糖苷酶水解去除红细胞膜表面糖链中的岩藻糖后, Melittin 溶血性也有不同程度的降低. 在 Melittin 作用浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $4 \mu\text{mol/L}$ 时, 溶血活性均降低了约 18%, 达到显著水平 ($P < 0.05$); 然而, 在 Melittin 作用浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 时, 岩藻糖虽然影响了 Melittin 的溶血性, 但是影响不显著(图 4).

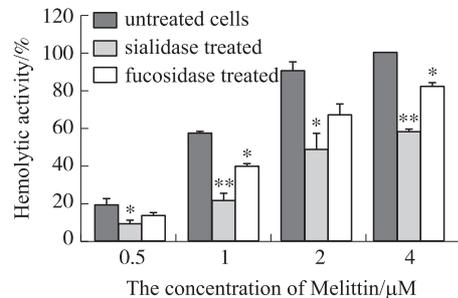


图 4 唾液酸和岩藻糖对 Melittin 溶血活性的影响

Fig. 4 Effect of sialidase and fucosidase on the hemolytic activity of Melittin

2.5 糖类化合物对 Melittin 溶血性的影响

进一步探讨外源糖分子以及环境中糖分子是否影响 Melittin 的溶血活性, 分别测定 D-乳糖、D-葡萄糖和 D-蔗糖 3 种糖分子对 Melittin 溶血性的影响. 除 D-乳糖对 Melittin 的溶血活性无显著影响外, D-蔗糖显著抑制 Melittin 的溶血活性 ($P < 0.05$). D-葡萄糖使 Melittin 的溶血活性降低了约 40%, 达到极显著水平 ($P < 0.01$)(图 5).

2.6 胆固醇对 Melittin 溶血性的影响

胆固醇是真核生物细胞膜的重要膜脂, 探讨了胆固醇对 Melittin 溶血性的影响. 加入 $4 \mu\text{g}$ 胆固醇后, 抑制了 Melittin 的溶血活性, 降低了 52%; 加入 $40 \mu\text{g}$ 胆固醇, 几乎完全抑制了 Melittin 的溶血活性. 可见外源胆固醇对 Melittin 的溶血性具有明显抑制作用, 并呈现出剂量依赖性(图 6).

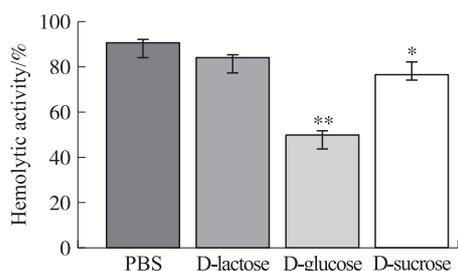


图 5 不同种类的碳水化合物对 Melittin 溶血性的影响
Fig. 5 Effect of various carbohydrates(20 mmol/L) on the hemolytic activity of Melittin

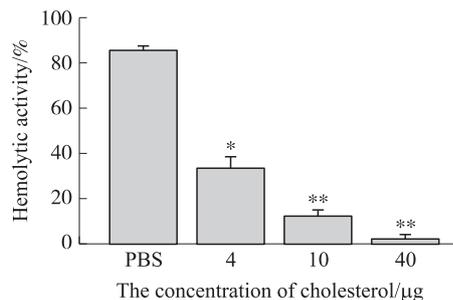


图 6 不同浓度的胆固醇对 Melittin 溶血性的影响
Fig. 6 Effect of different concentrations(0 mol/L~10⁻⁴ mol/L) of cholesterol on the hemolytic activity of Melittin

3 讨论

Melittin 是一种具有高效抗菌抗癌活性的抗菌肽,但是其溶血性限制了作为抗菌抗癌药物的直接应用. 本研究发现, Melittin 对小鼠红细胞具有很高的溶血活性,扫描电镜结果显示 Melittin 能导致膜表面形成裂纹和孔洞,直接裂解红细胞膜,导致溶血性. 作为一种膜活性肽,典型的双亲螺旋结构、疏水结构以及阳离子性是抗菌肽与生物膜发挥作用的基础^[14]. 已有研究表明,两亲 α -螺旋结构和较高疏水作用在 Melittin 作用于细菌以及真核细胞生物膜中发挥着至关重要的作用,其中亮氨酸拉链区对 Melittin 溶血活性起着至关重要的作用,如果缺失疏水残基 Leu 将改变 Melittin 的两亲性,减少疏水作用力,影响 Melittin 插入细胞膜的能力而降低其细胞毒性^[15-17].

本研究证实, Melittin 通过直接作用红细胞膜而使红细胞膜破裂,产生溶血. 红细胞作为一种特殊类型的细胞,没有线粒体、内质网等细胞器,因此细胞膜对于红细胞是非常重要的亚细胞结构. 红细胞膜参与着能量代谢、物质运输以及信号传递等多种生物学功能. ATP 酶活性主要反应了红细胞膜上的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性状况,它们主要维持红细胞内离子浓度的稳定,ATP 酶活性与细胞正常的新陈代谢以及保持正常形态紧密相关. 本研究发现, Melittin 作用于小鼠红细胞时可以显著降低 ATPase 活性,导致细胞内 ATP 水平显著降低. 研究也发现, Melittin 处理红细胞后将会导致膜上相关蛋白释放,与血红蛋白形成聚合物. 由此可见, Melittin 通过损伤红细胞膜结构而影响红细胞膜上的相关蛋白(酶),进一步影响相应的代谢途径而发挥溶血作用.

抗菌肽作为一种膜活性肽,与细胞膜结合是其发挥生物学活性的首要条件^[18]. Han 等研究了抗菌肽对乳腺癌细胞的选择性作用,发现细胞膜表面的糖脂和糖蛋白是抗菌肽结合的重要靶点. 进一步分析发现,糖脂和糖蛋白中寡糖链上的带负电荷的唾液酸是抗菌肽结合于恶性肿瘤细胞的靶糖分子^[4]. Melittin 发挥小鼠红细胞破坏作用的首要条件是需要与红细胞膜表面结合. 因此,本研究探讨了红细胞膜糖蛋白和糖脂中寡糖链中的唾液酸和岩藻糖是否也介导了 Melittin 对红细胞膜的结合. 结果显示,当水解去除唾液酸后,溶血活性平均降低 40%,表明红细胞膜表面唾液酸分子极显著影响了 Melittin 的溶血活性,介导了 Melittin 与红细胞膜的相互作用. Melittin 是一个带有 6 个正电荷的阳离子肽,唾液酸带有负电荷,电荷之间的相互作用可能促进了 Melittin 与红细胞的结合. 岩藻糖是细胞膜表面重要的中性单糖,本研究表明岩藻糖对 Melittin 溶血性也有影响,但是影响作用小于唾液酸的影响. 因此,红细胞膜表面糖链中的唾液酸和岩藻糖都可能与 Melittin 结合并作用于小鼠红细胞的靶糖分子. 带正电荷的 Melittin 与膜表面负电荷分子,如唾液酸间正负电荷的驱动,是 Melittin 溶血活性的关键. 因此,抑制 Melittin 与红细胞膜表面唾液酸的结合可能是降低 Melittin 与红细胞结合、降低溶血性的有效方法.

有研究指出,血液中的—些常见糖分子可以保护红细胞免受—些溶血分子的裂解作用^[19]. 本研究探讨了外源 D-乳糖、D-葡萄糖和 D-蔗糖 3 种糖分子对 Melittin 溶血活性的影响. 结果发现,除 D-乳糖对 Melittin 的溶血活性无显著影响外, D-葡萄糖和 D-蔗糖都能显著抑制 Melittin 的溶血活性. 这些糖分子对 Melittin 溶血活性的抑制对于发展 Melittin 的药剂学提供了重要的理论基础,其影响机理有待进一步深入研究.

胆固醇是真核细胞膜的重要脂类,红细胞膜上胆固醇含量约占 45%^[20],在细胞膜组分、细胞膜动力学、功能以及分类排序研究中具有重要作用,在调节抗菌肽与真核细胞作用中发挥着重要作用^[21,22]。有研究报道,降低质膜胆固醇含量后,Melittin 对肠道细胞的细胞毒性显著增强^[23]。在没有其他磷脂缺失的情况下,胆固醇减少 55%,Melittin 的溶血活性就增加 3 倍^[24],推测这是由于胆固醇的减少引起了红细胞膜上酰基链的混乱从而导致红细胞膜的不稳定,这将有利于 Melittin 在红细胞膜上的插入以及孔洞的形成^[25]。可见,红细胞膜中的胆固醇影响 Melittin 对真核细胞以及红细胞的作用。本研究发现,外源添加胆固醇可以降低 Melittin 的溶血活性,并且表现出剂量依赖性。一方面证实 Melittin 具有与胆固醇结合的能力,因此可能参与与红细胞膜的结合与作用;另一方面也表明,外源胆固醇对于降低 Melittin 的溶血活性作用显著。

综上所述,Melittin 可以通过与红细胞上糖蛋白或糖脂寡糖链中的唾液酸、岩藻糖以及胆固醇相互作用,结合于红细胞膜表面,损伤红细胞膜结构,影响红细胞膜上的参与能量代谢相关的 ATP 酶活性,导致细胞内 ATP 水平显著降低,最终引起红细胞溶血。D-葡萄糖和 D-蔗糖都能显著抑制 Melittin 的溶血活性,本研究结果为降低 Melittin 使用过程中的溶血活性提供了重要的理论参考,将推动 Melittin 作为抗菌抗癌药物的发展。

[参考文献]

- [1] Dathe M, Wierprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1/2): 71-87.
- [2] Cao L, Dai C, Li Z, et al. Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative in *vitro* and in *vivo*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40135.
- [3] Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1/2/3): 190-194.
- [4] Han Y Y, Liu H Y, Han D J, et al. Role of glycosylation in the anticancer activity of antibacterial peptides against breast cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(9): 1254-1262.
- [5] Dennison S R, Harris F, Phoenix D A. The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes[J]. *Biophys Chem*, 2007, 127(1/2): 78-83.
- [6] Lee H S, Park C B, Kim J M, et al. Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide[J]. *Cancer Lett*, 2008, 271(1): 47-55.
- [7] Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1/2): 55-70.
- [8] Raghuraman H, Chattopadhyay A. Organization and dynamics of melittin in environments of graded hydration: a fluorescence approach[J]. *Langmuir*, 2003, 19: 10332-10341.
- [9] Raghuraman H, Chattopadhyay A. Interaction of melittin with membrane cholesterol: a fluorescence approach[J]. *Biophys J*, 2004, 87(4): 2419-2432.
- [10] Heinen T E, da Veiga A B. Arthropod venoms and cancer[J]. *Toxicon*, 2011, 57(4): 497-511.
- [11] Moon D O, Park S Y, Choi Y H, et al. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells[J]. *Toxicon*, 2008, 51(1): 112-120.
- [12] Park J H, Jeong Y J, Park K K, et al. Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF- κ B and AP-1-dependent MMP-9 expression[J]. *Mol Cells*, 2010, 29(2): 209-215.
- [13] Liu S, Yu M, He Y, et al. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway[J]. *Hepatology*, 2008, 47(6): 1964-1973.
- [14] Dathe M, Wierprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1/2): 71-87.
- [15] Weaver A J, Kemple M D, Brauner J W, et al. Fluorescence, CD, attenuated total reflectance(ATR) FTIR, and ¹³C NMR characterization of the structure and dynamics of synthetic melittin and melittin analogues in lipid environments[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(5): 1301-1313.
- [16] Pérez-Payá E, Houghten R A, Blondelle S E. The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(3): 1048-1056.

- [17] Asthana N, Yadav S P, Ghosh J K. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin; a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(53): 55 042–55 050.
- [18] Chen Y Q, Min C, Sang M, et al. A cationic amphiphilic peptide ABP-CM4 exhibits selective cytotoxicity against leukemia cells[J]. *Peptides*, 2010, 31: 1 504–1 510.
- [19] Chung J J, Ratnapala L A, Cooke I M, et al. Partial purification and characterization of a hemolysin(CAH1) from Hawaiian box jellyfish(*Carybdea alata*) venom[J]. *Toxicon*, 2001, 39(7): 981–990.
- [20] Marcotte I, Wegener K L, Lam Y H, et al. Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes[J]. *Chem Phys Lipids*, 2003, 122(1/2): 107–120.
- [21] Yeagle P L. Cholesterol and the cell membrane[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 822(3/4): 267–287.
- [22] Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol[J]. *Science*, 2000, 290(5 497): 1 721–1 726.
- [23] Maher S, McClean S. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(5): 1 104–1 114.
- [24] Raghuraman H, Chattopadhyay A. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes[J]. *Chem Phys Lipids*, 2005, 134(2): 183–189.
- [25] Cassera M B, Silber A M, Gennaro A M. Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance(EPR) spin label study[J]. *Biophys Chem*, 2002, 99(2): 117–127.

[责任编辑:黄 敏]