

灵芝孢子油对人肝癌细胞株 HepG2的影响及其机制的初步研究

孙琳, 花春艳, 侯亚义*

(南京大学医学院, 国家生物医药技术重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要:目的 探讨灵芝孢子油对人肝癌细胞株 HepG2的影响及其机制。方法 CCK8法观察灵芝孢子油对 HepG2细胞的增殖抑制作用; 体外运动迁移实验观察细胞迁移能力的变化; 流式细胞术观察细胞凋亡; RT-PCR技术检测 VEGF 细胞凋亡相关因子 Bcl2、Bax及 P53和 Toll样受体 mRNA水平的表达情况; 免疫荧光观察细胞骨架的改变。结果 灵芝孢子油对体外培养的肝癌 HepG2细胞有抑制增殖作用, 且具有剂量、时间相关性; 灵芝孢子油能降低 HepG2细胞迁移速度; HepG2细胞凋亡率随灵芝孢子油浓度增加而增加; VEGF Bcl2和 Bax mRNA表达下调, P53的 mRNA无显著变化; 灵芝孢子油也能改变 Toll样受体 mRNA的表达情况; 灵芝孢子油处理后, HepG2细胞骨架改变, 伪足减少, 并且出现典型的凋亡细胞形态。结论 灵芝孢子油可抑制肝癌细胞株 HepG2的增殖 诱导肝癌 HepG2细胞凋亡, 抑制其迁移能力, 改变细胞表面 Toll样受体表达, 而这些可能与灵芝孢子油抗肿瘤的机制相关。

关键词:肝肿瘤 /病理学; 植物油类 /药理学; 孢子; 灵芝 /药理学; 肿瘤细胞, 培养的; 癌, 肝细胞 /病理生理学; Toll样受体; 细胞凋亡

中图分类号: R735.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-1692(2011)02-0128-06

肝癌是世界上死亡率第三的癌症。肝炎病毒的感染, 加上饮食上接触致癌原, 都增加了发病率^[1]。肿瘤的发生、发展, 与细胞凋亡与细胞增殖之间的失衡、细胞的迁移有着密切关系。与此同时, 肿瘤细胞表面 Toll样受体的表达也参与到肿瘤细胞逃逸免疫监视等过程中。

灵芝被称为“仙草”, 是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌赤芝和紫芝的总称。随着对灵芝研究的不断深入, 灵芝的生殖细胞——孢子的药用价值也引起了人们的关注。灵芝孢子油由灵芝孢子粉经 CO₂超临界萃取而来^[2], 是一种脂溶性物质, 主要成分为三萜类、甾醇类、脂肪及脂肪酸等^[3]。已有研究表明, 灵芝孢子油不仅能抑制肿瘤生长、杀伤肿瘤细胞^[4], 还对免疫功能有一定的调节作用^[5]。

本实验以 HepG2人肝癌细胞为靶细胞, 对灵芝孢子油对肝癌细胞的影响及其机制进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2人肝癌细胞引自中国科学院上海细胞

生物研究所细胞库; 灵芝孢子油由南京中科药业有限公司馈赠, 纯度 > 99%; RPMI1640培养基干粉、胰蛋白酶均购自 Gibco公司; 新生小牛血清购自 PAA公司; CCK-8试剂盒购自同仁化学研究所; Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒购自 SigmaAldrich; 鬼笔环肽 Phalloidin-PE购自 Sigma公司; 明胶干粉购于 Amresco公司; 引物由上海 Invitrogen合成; 顺铂注射液 (6 mL 30 mg)购自江苏豪森药业有限公司 (国药准字 H20040813)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌 HepG2细胞, 用完全 RPMI1640培养基 (含 10%灭活小牛血清、100 mg/L青霉素及 100 mg/L链霉素)培养, 置于 37℃、5% CO₂培养箱中, 传代培养至对数生长期备用。

1.2.2 CCK8法检测灵芝孢子油对 HepG2细胞的增殖抑制作用 取对数生长期 HepG2细胞制成 1×10^4 /mL单细胞悬液, 接种于 96孔板中, 每孔 100 μ L 37℃、5% CO₂条件下培养 24小时。经不同浓度的灵芝孢子油 (0.0 1.0 2.5 0.5 1 g/L)分别处理 24、48小时后, 加入 CCK8试剂 10 μ L继续孵育 4小时后, 用酶标仪 450 nm处测各孔的吸收度 (OD值)。每次每组测定 6个复孔。以培养液作为空白对照并调零, 测 3次, 取平均值。根据公式计算细胞增殖抑制率: 细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 实验组

收稿日期: 2010-09-30

作者简介: 孙琳 (1987-) 女, 辽宁铁岭人, 南京大学医学院硕士生, 从事免疫学研究。

*通讯作者 E-mail: yayihou@nju.edu.cn

OD值 /对照组 OD值)×100%。

1.2.3 体外运动迁移实验 6孔培养板内接种 1×10⁵个 HepG2细胞, 37℃、5% CO₂条件下培养至细胞覆盖率为 85%左右, 用灭菌双面剃须刀片在培养孔中刮制 2条整齐而平行的无细胞区。给予不同浓度的灵芝孢子油 (0.0, 1.0, 2.5, 5.0 g/L)和顺铂注射液 (10 mg/L)处理, 分别于 6、12和 24小时后在显微镜下观察比较不同实验组之间细胞迁移情况。

1.2.4 流式细胞仪 Annexin V2-FITC/PI双染法检测灵芝孢子油对 HepG2细胞凋亡的影响 取对数生长期 HepG2细胞制成 2×10⁵ /mL单细胞悬液, 接种于 24孔培养板中, 37℃、5% CO₂培养箱中培养 24小时后, 给予不同浓度的灵芝孢子油 (0.0, 1.0, 2.5, 5.1 g/L)处理, 另外设置空白对照组, 继续孵育。培养 24小时后用 0.25%胰酶收集各组细胞, 用冷的磷酸盐缓冲液 (PBS)洗涤两遍, 然后重悬于 100 μL binding buffer中, 根据 Annexin V-FITC染色试剂盒说明书, 对细胞进行染色。利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 RT-PCR技术检测细胞凋亡相关因子 VEGF、Bcl₂、Bax及 P53 mRNA表达 取对数生长期 HepG2细胞制成 4×10⁵ /mL单细胞悬液, 接种于 6孔培养板中, 37℃、5% CO₂培养箱中培养 24小时后, 给予不同浓度的灵芝孢子油 (0.0, 1.0, 2.5, 5.1 g/L)和顺铂 (10 mg/L)处理, 继续孵育。培养 6小时后收集各实验组细胞, 用 Trizol提取总 RNA, 用紫外分光光度计测定 RNA纯度 (A₂₆₀/A₂₈₀>1.6), 同时行 RNA定量。取 1 μg RNA进行

逆转录合成 cDNA进行 PCR检测细胞凋亡相关因子 VEGF、Bcl₂、Bax及 P53的表达。引物序列见表 1。PCR反应条件为: 94℃ 30秒, T_m退火 30秒, 72℃延伸 45秒, 30个循环, 最后 72℃ 5分钟; 目的基因和内参照进行同管扩增, 以减少误差。扩增产物进行 12 g/L的 TBE琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB)染色, 在凝胶成像分析系统紫外光下进行拍照和图像分析。以 β-actin为内参照, 目的基因的 PCR产物条带的灰度 Volume之比作为反映目的基因 mRNA水平的相对指标。

1.2.6 RT-PCR技术检测细胞 Toll样受体 mRNA表达 取对数生长期 HepG2细胞制成 4×10⁵ /mL单细胞悬液, 接种于 6孔培养板中, 37℃、5% CO₂培养箱中培养 24小时后, 给予不同浓度的灵芝孢子油 (0.0, 1.0, 2.5, 5.1 g/L)和顺铂 (10 mg/L)处理, 继续孵育。培养 6小时后收集各实验组细胞, 用 Trizol提取总 RNA, 用紫外分光光度计测定 RNA纯度 (A₂₆₀/A₂₈₀>1.6), 同时行 RNA定量。取 1 μg RNA进行逆转录合成 cDNA进行 PCR检测细胞 Toll样受体 mRNA的表达。引物序列见表 2。PCR反应条件为: 94℃ 30秒, T_m退火 30秒, 72℃延伸 45秒, 30个循环, 最后 72℃ 5分钟; 目的基因和内参照进行同管扩增, 以减少误差。扩增产物进行 12 g/L的 TBE琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB)染色, 在凝胶成像分析系统紫外光下进行拍照和图像分析。以 β-actin为内参照, 目的基因的 PCR产物条带的灰度 Volume之比作为反映目的基因 mRNA水平的相对指标。

表 1 HepG2细胞凋亡相关因子 RT-PCR引物序列

基因	扩增序列 (5'-3')	扩增序列 (5'-3')	扩增片段 (bp)	退火温度 (℃)
VEGF	ACTTCAAGCCGTCCTGTG	CCTTTCCTCGAATGATTTT	228	54
Bcl ₂	AGCTGCACCTGACGCCCTTACCGC	AGGAGAAATCAAACAGAG	288	55
Bax	AGCTTCAGGGTTTCATCCAGG	GCCTTGAGCACCAGTTTG	295	55
P53	GCCTGAGGTGGCTCTGAC	CCCCTTCTTGCGGAGATTC	215	58
actin	GCTACAGCTTACCACCACA	GGTCTTTACGGA TGTC AACGTC	288	60

表 2 HepG2细胞 Toll样受体 RT-PCR引物序列

基因	扩增序列 (5'-3')	扩增序列 (5'-3')	扩增片段 (bp)	退火温度 (℃)
TIR1	TCCAGGTTCCTAAAGACCTATCC	GGTTCACAGTAGGGTGGCAA	237	56
TIR2	ATCCTCCAATCAGGCTTCTCT	ACACCTCTGTAGGTCACGTGTG	163	56
TIR3	TACCAGCGGCAACTTCAC	AGTTCAGTCAAATTCGTGCAGAA	187	56
TIR4	GACCTGTCCCTGAACCCCTA	TCTCCAGAACCAAACGA	88	52
TIR6	CATGTTCCAAAAGACCTACCGC	ACTCACAATAGGATGGCAGGATA	234	56
TIR8	TGTTCTTCAGTCGTCAATGC	TGTCTGCACTCTGCAATAACT	142	56
TIR9	GCAGCGGAGATGTTT	TGAATGAGTGTCTGTGGT	81	52
TIR10	GCTAAGACATCGGTCTATGTCT	GGATCTGAAAGTGTTCACGTAT	106	55
actin	GCTACAGCTTACCACCACA	GGTCTTTACGGA TGTC AACGTC	288	60

1.2.7 细胞爬片及免疫荧光标志细胞骨架 将无菌盖玻片放到 6孔培养板里,加覆 500 μ L左右 1%的无菌明胶,37 $^{\circ}$ C孵育 2小时,吸去明胶,PBS洗涤 1次,将对数生长期细胞以适当密度接种于 6孔培养板过夜。待细胞贴壁后,加入不同浓度的灵芝孢子油(0.01、0.25、0.5、1 g/L)和顺铂注射液(10 mg/L)处理 24小时。将细胞爬片用 4%多聚甲醛固定 30分钟,用 PBS洗 3次,0.1% Triton 100室温处理 15分钟,PBS洗 3次,用 3% BSA室温封闭 1小时,PBS洗 3次,加 Phalloidin PE(1:50)室温孵育 1小时,PBS洗 3次,最后 DAPI(0.5 μ g/L)染核 10分钟,PBS洗 3次,加甘油封片,用激光共聚焦显微镜观察。

1.3 统计学分析

实验均重复 3次或 3次以上,实验数据用 GraphPad Prism 5软件进行分析,实验组与对照组比较采用单因素相关分析。

2 结果

2.1 灵芝孢子油对 HepG2细胞增殖的抑制作用

不同浓度的灵芝孢子油作用 HepG2细胞 24小时和 48小时后,HepG2细胞的增殖受到显著抑制,且呈剂量依赖性(见图 1、表 3)。

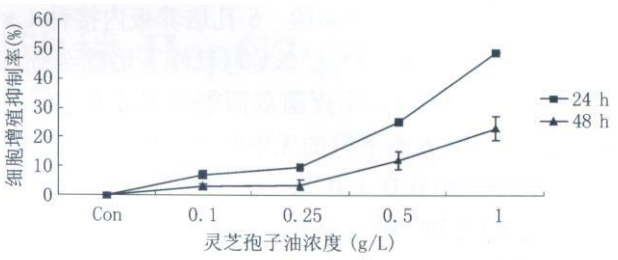


图 1 灵芝孢子油对 HepG2细胞增殖活力的影响

表 3 灵芝孢子油对 HepG2细胞增殖的影响

灵芝孢子油 (g/L)	细胞增殖抑制率(%)	
	24 h	48 h
0.1	3.91±1.28	3.30±0.61
0.25	6.07±0.54	3.73±1.56
0.5	12.09±0.48	12.09±3.09
1	25.60±0.17	23.06±3.99

2.2 灵芝孢子油对 HepG2细胞迁移能力的影响

体外运动迁移实验表明不同浓度的灵芝孢子油对细胞浸润迁移能力均有一定的抑制作用,且随着灵芝孢子油浓度的递增,对细胞迁移能力的抑制作用越显著,呈剂量依赖性(见图 2)。

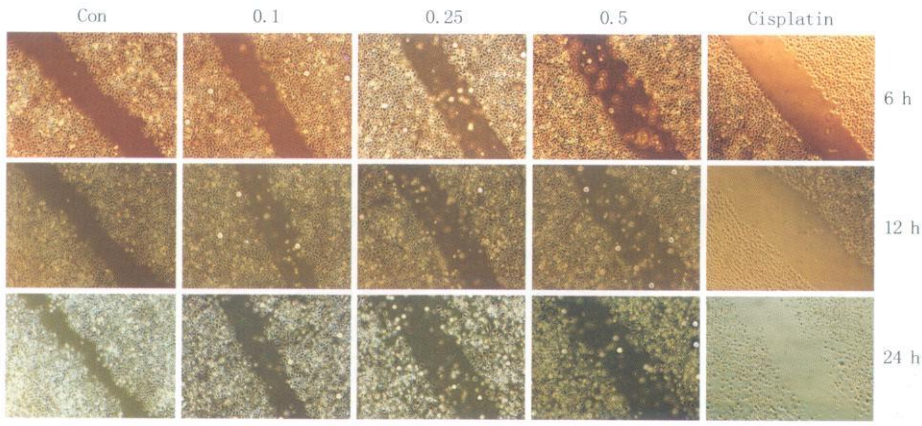


图 2 不同浓度的灵芝孢子油对 HepG2细胞迁移能力的影响

2.3 灵芝孢子油诱导 HepG2细胞凋亡的检测

用 Annexin V/PI双标志法流式细胞仪检测不同浓度的灵芝孢子油作用 HepG2细胞 24小时后,细胞凋亡率升高,说明灵芝孢子油能明显诱导了细胞凋亡(见表 4)。

2.4 灵芝孢子油对 HepG2细胞凋亡相关因子 VEGF Bcl2, Bax及 P53 mRNA表达水平的影响

在灵芝孢子油的作用下,特别是在其高浓度(0.5 g/L和 1 g/L)时,HepG2细胞中 VEGF Bax以及 Bcl2在 mRNA水平上表达下降,而实验组的 P53与对照组比较差异无统计学意义。其中,实验组的

Bcl2/Bax的比值<1,表明灵芝孢子油有促凋亡作用(见表 5、图 3)。

表 4 不同浓度灵芝孢子油诱导 HepG2细胞凋亡的影响

组别	浓度(g/L)	细胞凋亡率(%)
对照组	—	13.28±0.59
灵芝孢子油	0.1	17.07±2.00*
灵芝孢子油	0.25	19.81±1.23**
灵芝孢子油	0.5	25.24±2.13***
灵芝孢子油	1	31.71±6.64***
顺铂	2	24.93±2.43**

与对照组比较 * P<0.05 ** P<0.001 *** P<0.0001

表 5 不同浓度的灵芝孢子油对 HepG2细胞 VEGF、Bcl2、Bax及 p53 mRNA表达水平的影响

组别	浓度 (g/L)	VEGF/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl2/ β -actin	p53/ β -actin	Bcl2/Bax
对照组	—	0.34±0.01	0.66±0.02	0.65±0.01	1.35±0.02	1.19±0.02
灵芝孢子油	0.1	0.30±0.01*	0.42±0.01*	0.43±0.01*	1.43±0.03	0.82±0.01*
灵芝孢子油	0.25	0.34±0.02	0.50±0.02*	0.47±0.02*	1.39±0.04	0.88±0.03
灵芝孢子油	0.5	0.22±0.02*	0.38±0.03*	0.41±0.02*	1.41±0.03	0.87±0.03
灵芝孢子油	1	0.16±0.02*	0.44±0.03*	0.26±0.01*	1.35±0.02	0.57±0.02*
顺铂	2	0.25±0.01*	0.43±0.02*	0.59±0.03	1.44±0.02*	1.09±0.01*

* 与对照组比较, P<0.05

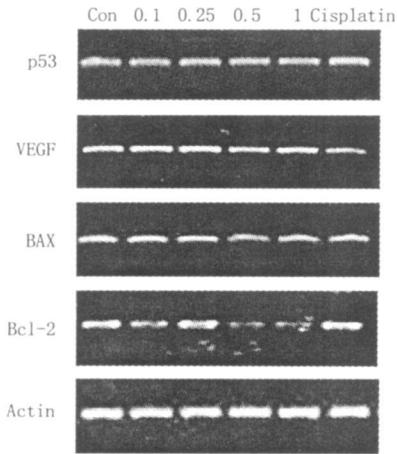


图 3 不同浓度的灵芝孢子油对 HepG2细胞 VEGF、Bcl2、Bax及 p53 mRNA表达水平的影响

表 6 不同浓度的灵芝孢子油对 HepG2细胞 TLRs mRNA表达水平的影响

组别	浓度 (g/L)	TLR1/ β -actin	TLR2/ β -actin	TLR3/ β -actin	TLR4/ β -actin	TLR6/ β -actin	TLR8/ β -actin	TLR9/ β -actin	TLR10/ β -actin
对照组	—	0.81±0.02	0.73±0.02	0.77±0.01	0.56±0.01	0.78±0.01	0.89±0.02	0.63±0.02	0.76±0.02
灵芝孢子油	0.1	0.76±0.03	0.71±0.03	0.69±0.02*	0.56±0.02	0.95±0.03*	0.81±0.03	0.64±0.03	0.73±0.03
灵芝孢子油	0.25	0.78±0.04	0.73±0.02	0.73±0.03	0.57±0.02	1.40±0.04*	1.37±0.03*	0.63±0.04	0.76±0.02
灵芝孢子油	0.5	0.75±0.02	0.73±0.01	0.70±0.01*	0.58±0.03	0.91±0.02	1.42±0.04*	0.62±0.03	0.77±0.01
灵芝孢子油	1	0.76±0.01*	0.81±0.03*	0.68±0.02*	0.55±0.01	1.27±0.03*	1.56±0.03*	0.64±0.02*	0.79±0.03
顺铂	2	0.77±0.03	0.70±0.03	0.74±0.03	0.57±0.02	0.92±0.04	1.39±0.03*	0.68±0.03	0.72±0.03

* 与对照组比较, P<0.05

核膜完整, 近似圆形, 边缘清晰, 染色均匀。灵芝孢子油作用后的细胞体积缩小、变圆, 胞核内颗粒增加, 其细胞核呈波纹状、折缝样, 染色质浓集。高浓度的灵芝孢子油还伴有细胞核固缩或断裂现象及出现凋亡小体, 为细胞凋亡的典型特征 (图 5)。

3 讨论

灵芝作为一种名贵中药, 其药用价值已被大量研究分析验证。而在防癌、抗肿瘤方面, 由灵芝孢子粉经 CO₂超临界萃取而来的脂溶性物质——灵芝孢子油的功效是灵芝子实体的 60~70倍。已有研究表明, 灵芝孢子油能增强小鼠淋巴细胞增殖能力及腹腔巨噬细胞吞噬能力, 提高 NK细胞杀伤作用等,

2.5 灵芝孢子油对 HepG2 细胞 Toll样受体 mRNA表达水平的影响

在较高浓度灵芝孢子油的作用下, HepG2细胞中 TLR1 和 TLR3 表达下降, 而 TLR2、TLR6 以及 TLR8 表达升高, 而 TLR4、TLR9 和 TLR10 表达无显著变化 (见表 6 图 4)。

2.6 免疫荧光染色观察灵芝孢子油诱导 HepG2 细胞凋亡

肌动蛋白 Phalloidin-PE 荧光染色为红色, 呈红色细丝状, 主要沿细胞长轴分布, 贯穿整个 HepG2 细胞, 相对于对照组、实验组的细胞变圆, 伪足减少, 降低了细胞的运动能力。同时可见, 细胞密度降低, 细胞骨架遭到破坏。而 DAPI 在荧光激发下发蓝光, 与细胞核 DNA 结合, 染核。对照组细胞的细胞

进而对增强免疫细胞的生理活性, 恢复受损机体的免疫功能, 达到抗肿瘤的目的^[49]。

肿瘤的发生与发展, 依赖于细胞凋亡和细胞增殖之间的平衡与失衡。现已知 Bcl2 家族基因和 p53 与细胞凋亡信号转导有着密切关系。Bcl2 家族蛋白功能上分为促凋亡 (如 Bax 和 Bad 等) 和抑凋亡 (如 Bcl2 和 Bcl-x 等) 两类。本研究结果表明, 高浓度的灵芝孢子油能够显著抑制 HepG2 细胞体外生长, 促进 HepG2 细胞的凋亡进程, 并使 HepG2 细胞出现核质浓集和凋亡小体等典型的凋亡形态学特征。同时, Bax 蛋白在基因水平上均有下调, 可能由于灵芝孢子油并不在基因水平上对其进行调控; 且据报道, Bax 与 Bcl2 的比值, 对药物

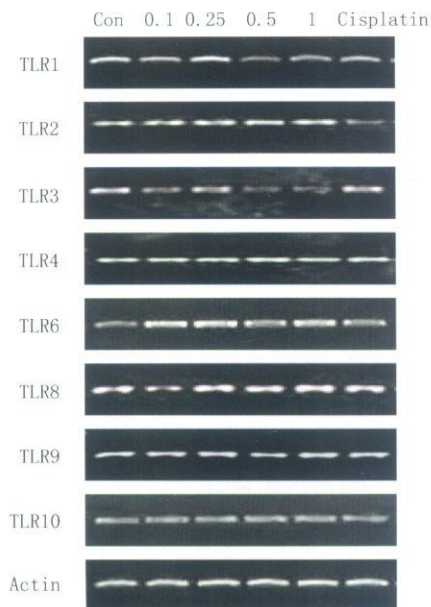
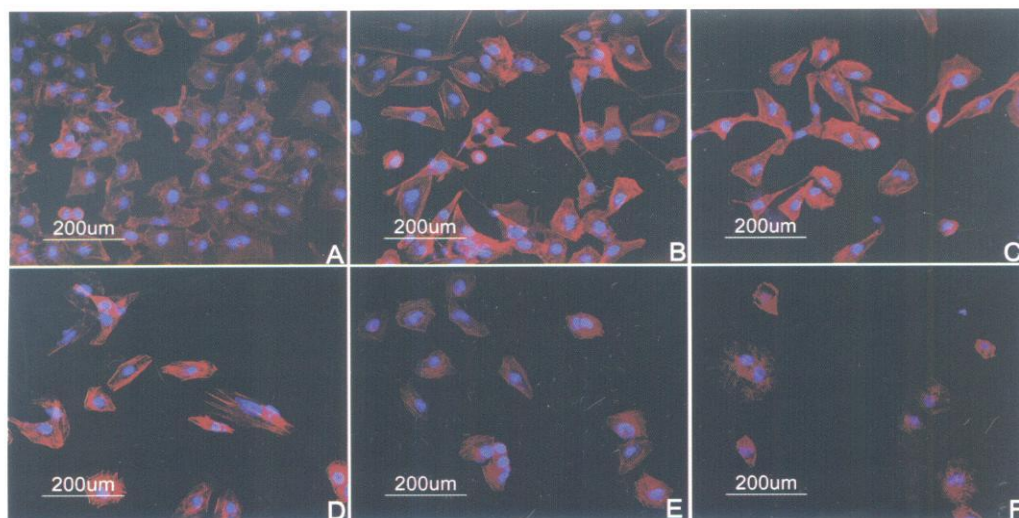


图 4 不同浓度的灵芝孢子油对 HepG2 细胞 TLRs mRNA 表达水平的影响



A 对照组 (Con); B 0.1 g/L; C 0.25 g/L; D 0.5 g/L; E 1 g/L; F Cisplatin (10 mg/L)

图 5 免疫荧光染色观察灵芝孢子油诱导 HepG2 细胞凋亡

天然免疫与获得性免疫的桥梁。在人体中已确定 13 种 TLRs 主要表达在免疫细胞和上皮细胞中。近来研究发现, 在一些肿瘤细胞系或者肿瘤, 特别是上皮衍生性肿瘤上, 也可以检测到 TLRs^[10]。TLRs 是可能促进增殖, 抑制凋亡, 并参与肿瘤细胞的迁移、浸润及血管生成^[11]。例如, 有研究表明肿瘤细胞 TLR3 的表达可诱导肿瘤细胞的凋亡^[12], 而肿瘤细胞 TLR8 的表达与其天然或合成配体结合可逆转调节性 T 细胞的免疫抑制作用。本实验从基因水平上验证了 TLRs 在 HepG2 细胞上的表达, 同时初步证明灵芝孢子油对 TLR 表达有一定影响, 而具

诱导的细胞凋亡的发生具有决定性作用^[7]。而灵芝孢子油作用后, Bcl2/Bax 的比值 < 1, 表现为促凋亡作用。

另一方面, 肿瘤的发生、发展、浸润及转移也与血管新生密切相关^[8]。VEGF 是血小板衍生生长因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF) 家族中的一个亚家族, 是参与血管新生和血管发生过程的重要信号蛋白。它是内皮细胞的特异有丝分裂原, 能增强内皮细胞的生存能力, 促进有丝分裂, 增强趋化性和血管渗透性, 在体外能促进内皮细胞的生长, 在体内可诱导血管发生, 是目前已知作用最强的促血管生成的生长因子之一, 已成为肿瘤治疗的靶点之一^[9]。体外运动迁移实验表明, 灵芝孢子油能显著抑制细胞迁移能力, 减少细胞伪足, 并在基因水平上下调 VEGF 的表达, 进而对肿瘤发展、迁移起到一定的限制作用。

Toll 样受体 (TLRs) 属于模式识别受体, 是连接

体作用机制已在进一步的研究中。

综上所述研究表明, 灵芝孢子油能够调控肝癌细胞凋亡相关基因表达, 进而抑制肝癌细胞的体外增殖, 促进细胞凋亡。此外, 灵芝孢子油还可以抑制细胞体外迁移, 影响肝癌细胞自身 TLRs 的表达。本研究揭示了灵芝孢子油抗肿瘤作用的部分机制, 为灵芝孢子油在肝癌治疗的应用上提供了新的方向。

参考文献:

- [1] Kensler TW, Qian GS, Chen JG, et al. Translational

- strategies for cancer prevention in liver [J]. Nat Rev Cancer 2003 3(5): 321—329
- [2] 王 彬, 周科勤, 范青生, 等. 超临界 CO₂ 萃取菌草灵芝孢子油中三萜类物质和脂肪酸的测定 [J]. 食品安全与检测, 2006 22 (1): 74—75
- [3] 林志彬, 王鹏云. 灵芝孢子及其活性成分的药理作用 [J]. 北京大学学报, 2006 38 (5): 541—547
- [4] Xie YZ, Li SZ, Albert Y, et al. Ganoderma lucidum inhibits tumour cell proliferation and induces tumour cell death [J]. Enzyme Microb Tech 2006 40(1): 177—185
- [5] 刘菊研, 刘少勇, 金 铃, 等. 口服灵芝孢子油对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2006 21(5): 300—301
- [6] 高 杨, 邓新国, 孙倩娜, 等. 灵芝孢子油对 N-甲基-N-亚硝酸脲诱导的大鼠视网膜损伤中 CasPase23 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2009 25(7): 871—875
- [7] Van Delft MF, Huang DC. How the Bcl2 family of proteins interact to regulate apoptosis [J]. Cell Res 2006 16(2): 203—213
- [8] Jain RK, Di Tomaso E, Duda DG, et al. Angiogenesis in brain tumours [J]. Nat Rev Neurosci 2007 8(8): 610—622
- [9] Harper SJ, Bates DJ. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics [J]. Nat Rev Cancer 2008 8 (11): 880—887
- [10] Yu L, Chen SW. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy [J]. Cancer Immunol Immun 2008 57(9): 1271—1278
- [11] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer [J]. Nat Rev Cancer 2009 9(1): 57—63
- [12] Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, et al. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy [J]. Clin Cancer Res 2007 13(15): 4565—4574

Effect of glossy ganoderma spore oil on human hepatoma cell line HepG2

SUN Lin, HUA Chun-yang, HOU Ya-yi

(Medical School and State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology Nanjing University Nanjing 210093 China)

Abstract Objective To investigate the effect of glossy ganoderma spore oil on human hepatoma cell line HepG2 and its mechanism. Methods Cell proliferation was measured by cell count kit (CKK-8). The mobility was evaluated by migration assay. Cell apoptotic rate was examined by flow cytometry (FCM). RT-PCR analysis was used to detect mRNA expression of apoptosis related factors Bcl2, Bax, P53 and Toll like receptors; the cytoskeleton was observed by the immunofluorescent staining. Results Glossy ganoderma spore oil inhibited the proliferation of HepG2 cells in a dose and time dependent manner. The migrating speed of HepG2 cells was reduced. The apoptotic rate of HepG2 cells increased with the elevated concentrations of glossy ganoderma spore oil. The mRNA expressions of VEGF, Bcl2 and Bax were down-regulated while P53 expression up-regulated. The mRNA expression of Toll like receptors was also changed by glossy ganoderma spore oil. The cytoskeleton of HepG2 cells was changed and the pseudopod was decreased, representing the typical apoptosis appearance. Conclusion Glossy ganoderma spore oil can inhibit the proliferation and the mobility, induce apoptosis of human hepatoma cell line HepG2, change the expression of Toll like receptors, which may be related to its anti-tumor effects.

Key words: liver neoplasms/pathology; plant oils/pharmacology; spores; GANODERMA LUCIDUM/pharmacology; tumor cells cultured; carcinoma; hepatocellular physiology/pathology; Toll-like receptors; apoptosis