

灵芝孢子油对人肺腺癌细胞 LTP-a-2 的抑制作用

刘贤钦¹, 窦 环¹, 宋玉仙¹, 公 伟¹, 侯亚义^{1,2}

(1. 南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室, 2. 江苏省医学分子技术重点实验室, 江苏 南京 210093)

Studies on the inhibitory effect of Glossy ganoderma spore oil (GGSO) on human lung adenocarcinoma LTP-a-2 cell

LIU Xian-qin¹, DOU Huan¹, SONG Yu-xian¹, GONG Wei¹, HOU Ya-yi^{1,2}

(1. Immunology and Reproductive Biology Lab; 2. Jiangsu Key Laboratory of Molecular Medicine, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

中国图书分类号: R282.71; R329.24; R329.25; R734.202.2

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2011)01-0146-02

关键词: 灵芝孢子油; LTP-a-2 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞迁移; CCK-8; 流式细胞术

Key words: Glossy ganoderma spore oil; LTP-a-2 cell; cell proliferation; apoptosis; cell migration; CCK-8; Flow cytometry

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是中药宝库中的珍品。近年来对其化学成分及作用机制进行了大量的研究,发现它具有调节和增强人体免疫力及对肿瘤有良好的协同治疗作用^[1-3]。灵芝孢子油是灵芝孢子粉中的脂溶性物质,主要包含三萜类、多糖类及核苷类等有效成分。虽然普遍认为灵芝孢子油(GGSO)具有抑制肿瘤生长的作用^[4],但其确切的机制尚不十分清楚。本文分析了 GGSO 对人肺腺癌 LTP-a-2 细胞体外凋亡及迁移的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 药材 灵芝孢子油(GGSO)由南京中科药业有限公司提供,溶于二甲基亚砜(DMSO),储存液浓度比为 0.833,使用时稀释,室温保存。

1.2 试剂 0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清(购于杭州四季青生物公司),RPMI 1640、CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),顺铂(DDP),凋亡试剂盒(Sigma-Aldrich)。

1.3 仪器 倒置相差显微镜(OLYMPUS),离心机(SIGMA),流式细胞仪(BD FACS Calibur),酶标仪(BIO-TEK),PCR 仪(TaKaLa)。

2 方法

2.1 细胞增殖实验 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性。

按如下公式计算细胞活性:细胞增殖活力/% = (GGSO 处理组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (平行对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) × 100%。

2.2 细胞凋亡及凋亡相关分子 mRNA 表达检测 采用 Annexin V 联合 PI 法及流式细胞术检测细胞凋亡率。RT-PCR 法检测凋亡相关分子 p53, Bcl-2, Bax mRNA 表达。

2.3 细胞迁移及迁移相关分子 mRNA 表达检测 采用细胞划痕法,计算迁移距离(μm) = 0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度。RT-PCR 法检测迁移相关分子 VEGF、MMP2 及 MMP9 mRNA 表达。

2.4 统计学处理 统计方法采用 Graphpad Prism 5 软件进行处理,两组数据采用 *t* 检验,多组数据用单因素方差分析。

3 结果

3.1 细胞增殖 不同浓度 GGSO 作用细胞 24 h 后细胞活性分别为 89.71%、86.64%、61.27%、8.92%、5.75%。与对照组相比: $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

3.2 细胞凋亡 GGSO 作用细胞 24 h 后, LTP-a-2 细胞凋亡率分别为 10.9%、12.11%、20.47%、87%、98.71%。阴性对照组的凋亡率为 13.15%, 阳性对照组的凋亡率为 30.74%, 与对照组相比: $P < 0.01$ 。

与对照组相比, p53、Bax mRNA 表达量增多并且 Bax mRNA 表达量随 GGSO 浓度增加而增加, Bcl-2 在 GGSO 高浓度时 mRNA 表达量降低。

3.3 细胞迁移 不同浓度 GGSO 作用 LTP-a-2 细胞 24 h 后, 随着 GGSO 浓度的增加 LTP-a-2 细胞迁移距离逐渐减小, 实验组与对照组之间差异有显著性。与对照组相比, VEGF、MMP2 在 GGSO 高浓度时 mRNA 表达降低, MMP9 mRNA 表达量随 GGSO 浓度增加而降低。

4 讨论

GGSO 对 LTP-a-2 细胞活性呈剂量依赖性抑制, 同时诱导细胞凋亡及抑制细胞迁移, 这与许多文献报道结果相一致^[5-7]。RT-PCR 检测结果显示 GGSO 可引起促凋亡基因 Bax、p53^[5-7] mRNA 表达量增加而使抗凋亡基因 Bcl-2^[8] mRNA 表达量下降。同时 GGSO 也抑制迁移相关基因 VEGF、MMP2 及 MMP9^[9] mRNA 表达。

综上所述, GGSO 可明显抑制 LTP-a-2 细胞增殖、迁移, 并促进其凋亡, 但其详细的凋亡及迁移机制还有待研究。

参考文献:

- [1] Zhang W Y, Wang Y, Hou Y Y. Effects of Chinese medicinal fungus water extract (FWE) on tumor metastasis and some parameters of immune function [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(3): 461-8.

收稿日期: 2010-09-19, 修回日期: 2010-11-9

基金项目: 南京大学研究生科研创新基金 (No 2010CL04)

作者简介: 刘贤钦 (1984-), 男, 硕士生, 研究方向: 细胞与分子免疫学, Tel: 025-83686341, E-mail: jx-lxq@163.com;
侯亚义 (1960-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 自身免疫性疾病及肿瘤分子免疫机制与治疗, Tel: 025-83686441, E-mail: yayihou@nju.edu.cn.

琐琐葡萄多糖体外抗乙型肝炎病毒作用的实验研究

刘涛¹, 赵军², 李海波³, 马龙¹

(1. 新疆医科大学公共卫生学院毒理学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所新疆维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830002; 3. 江苏省南通市疾病预防控制中心, 江苏 南通 226006)

Inhibitory effects of polysaccharides from *Vitis vinifera* L on hepatitis B virus *in vitro*LIU Tao¹, ZHAO Jun², LI Hai-bo³, MA Long¹

(1. Dept of Toxicology, College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Key Laboratory for Research and Development of Uighur Drugs, Institute of Materia Medica of Xinjiang, Urumqi 830002, China; 3. Nantong Center for Disease Control and Prevention, Nantong Jiangsu 226006, China)

中国图书分类号: R 282.71; R 284.1; R 373.21; R 978.7

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2011)01-0147-02

关键词: 琐琐葡萄; 多糖; 乙型肝炎病毒; HepG 2.2.15 细胞株; 细胞培养; 体外

Key words: *Vitis vinifera* L; polysaccharides; HBV; HepG 2.2.15 cells; cell culture; *in vitro*

琐琐葡萄 (*Vitis vinifera* L) 为葡萄科小无核红葡萄, 药用果实, 主产于我国新疆吐鲁番、和田、鄯善等地^[1], 具有健脾胃、理肺、生津、养血等功效; 在维吾尔医临床主要应用于脾胃不和、神志不安以及小儿麻疹和肝炎等病症的治疗^[2],

收载于《神农本草经》、《本草纲目》和《维吾尔药志》等历代医药文献中。多糖 (polysaccharides) 是存在于有机体内的一种重要的结构成分, 也是一种重要的信号或信息分子的受体, 具有调节免疫^[3]、抗肿瘤^[4]、抗病毒^[5]等多种生物活性。文献报道^[6] 多糖是琐琐葡萄的主要特征性成分之一, 且在体内内外对免疫性肝损伤具有保护作用^[7-8], 对肝癌细胞 HepG2 的增殖具有抑制作用^[9]。为探讨琐琐葡萄多糖抗乙肝病毒作用, 本文用 HepG 2.2.15 细胞株为模型, 考察了用药后细胞培养上清液中乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、E 抗原 (HBeAg) 的改变, 并采用荧光定量 PCR 法考察了其对 HBV DNA 的抑制效果, 评价其抗 HBV 活性。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要材料 HepG 2.2.15 细胞株购自武汉大学物种保藏中心; DMEM 培养基、G418、青霉素-链霉素 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物制品公司); HBsAg 和 HBeAg 检测试剂盒 (上海华美生物公司); HBV DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒 (上海申友生物技术公司); MTT (AMRESCO, 上海生工生物工程技术有限公司分装); 二甲基亚砜 (DMSO) 和 0.025% 胰蛋白酶-EDTA (Sigma 公司); 拉米夫定 (3-TC, 批号: 06120028, 葛兰素史克制药苏州有限公司); 琐琐葡萄多糖由作者提取。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG 2.2.15 细胞株传代于高糖 DMEM 培养基 (每 1 000 ml 含 100 万单位青霉素、1.0 g 链霉素、100 mg G418 和 10% 灭活胎牛血清) 中, 置 5% CO₂ 37℃ 培养箱培养。

1.2.2 细胞毒性试验 细胞接种 48 h 后, 倾去培养基, 分别加入不同浓度样品培养, d 4 换样, d 8 后加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液, 每孔 10 μl, 37℃ 孵育 4 h 后, 加入 DMSO, 每孔 150

收稿日期: 2010-09-17, 修回日期: 2010-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No 30660157)

作者简介: 刘涛 (1974-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 食品毒理学, Tel: 0991-4365317, E-mail: xjmuilt@163.com

马龙 (1957-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品毒理学, 通讯作者, Tel: 0991-8567261; E-mail: xjmmul@163.com

[1] 梁军, 侯亚义. 破壁灵芝孢子粉诱导 MCF-7 细胞凋亡的机理研究 [J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(2): 49-52.

[2] Liang J, Hou Y Y. Studies on the mechanism of Ganoderma lucidum induces apoptosis of MCF-7 cell [J]. Chin Wild Plant Res, 2006, 25(2): 49-52.

[3] 李颖博, 李宇华, 王瑞, 等. 灵芝多糖对肿瘤细胞与内皮细胞相互作用的影响 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 250-3.

[4] Li Y B, Li Y H, Wang R, et al. Effect of Ganoderma lucidum polysaccharides (GLPS) on tumor-endothelium interactions [J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24(2): 250-3.

[5] 夏明星, 张莲芬, 王一君, 等. 王不留行提取物对内皮细胞增殖、迁移及其黏附的作用评价 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(6): 817-9.

[6] Xia M X, Zhang L F, Wang Y J, et al. Evaluation of the effect of cowherb seed extracts on endothelial cell proliferation, migration and adhesion [J]. Chin Pharmacol Bull, 2009, 25(6): 817-9.

[7] Speide D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death [J]. Cell, 2010, 20(1): 14-24.

[8] Chen W, He Z H. Relationship of Bcl-2 family members, apoptosis with pulmonary fibrosis [J]. Intern J Resp, 2008, 28(24): 1500-4.

[9] Lin S S, Lai K C, Hsu S C. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. Cancer Lett, 2009, 285(2): 127-33.