

灵芝孢子油对肺腺癌癌性胸水中原代肿瘤细胞的抗肿瘤作用

吕明明¹, 王婷婷¹, 钱倩², 万晓¹, 王婷¹, 于力克², 侯亚义¹

Anticancer effect of Ganoderma spores oil on Primary cancer cells isolated from pleural effusion

LV Ming-ming, WANG Ting-ting, QIAN Qian, WAN Xiao, WANG Ting, YU Li-ke, HOU Ya-yi

¹ Immunology and Reproductive Biology Laboratory of Medical School Nanjing University Nanjing 210093 China; ² Chest Hospital of Nanjing Nanjing 210029 China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Ganoderma spores oil on primary cancer cells isolated from the pleural effusion of patients with lung adenocarcinoma. Methods Primary cancer cells were isolated from the pleural effusion (n=12) of patients. The response of these cancer cells to Ganoderma spores oil and chemotherapeutic agents commonly used in clinic were determined by CCK-8 assay and compared with culture cell line A549. Flow cytometer was used to examine the apoptotic-induced effect of Ganoderma spores oil on primary cancer cells. RT-PCR was used to examine the role of Ganoderma spores oil in the expression of apoptotic-related genes including bax and bcl-2. Results The primary cancer cells isolated from effusions showed sensitivity to Ganoderma spores oil with IC_{50} values of $0.28 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$, similar to the IC_{50} values of $0.46 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$ in culture cell line A549 ($P > 0.05$). The inhibition ratios of ganoderma spores oil, docetaxel, cisplatin and gemzar to primary cancer cells were $48.7\% \pm 3.3\%$, $31.6\% \pm 14.1\%$, $30.2\% \pm 11.6\%$ and $51.4\% \pm 5.6\%$. There was no significant difference between Ganoderma spores oil and chemotherapeutic agents commonly used clinically ($P > 0.05$). Ganoderma spores oil had an important apoptotic-induced role in primary cancer cells. We also observed that Ganoderma spores oil could up-regulate bax mRNA and down-regulate bcl-2 mRNA in primary cancer cells. Conclusion Based on the response of cancer cells isolated from pleural effusion in this study, we believed that Ganoderma spores oil might have a potential anticancer effect.

【Key words】 Ganoderma spores oil; Primary cancer cells; malignant pleural effusion; bax; bcl-2

Modem Oncology 2011, 19(07): 1289-1292

【摘要】 目的: 研究灵芝孢子油对肺腺癌的癌性胸水中原代肿瘤细胞的抗癌作用。方法: 体外培养肺腺癌细胞系 A549 用 CCK-8 法检测灵芝孢子油对 A549 细胞的体外抗肿瘤作用。收集 12 例经病理确诊的肺腺癌患者的癌性胸水分离原代肿瘤细胞, 用 CCK-8 法检测灵芝孢子油及临床常用化疗药物对原代肿瘤细胞的药物敏感性; 流式细胞仪检测灵芝孢子油对原代肿瘤细胞的凋亡诱导作用, RT-PCR 检测灵芝孢子油对凋亡相关蛋白基因 bax 及 bcl-2 mRNA 表达的影响。结果: 灵芝孢子油对 5 例癌性胸水中原代肿瘤细胞的 IC_{50} 平均值为 $0.28 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ 与对 A549 细胞的 IC_{50} $0.46 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$ 无显著差异 ($P > 0.05$)。在各测试药物浓度 (TDC) 下, 灵芝孢子油、多西紫杉醇、顺铂和健择对原代肿瘤细胞的抑制率分别为 $48.7\% \pm 3.3\%$, $31.6\% \pm 14.1\%$, $30.2\% \pm 11.6\%$, $51.4\% \pm 5.6\%$, 灵芝孢子油与这些化疗药物的抗肿瘤作用无显著差异 ($P > 0.05$)。灵芝孢子油显著促进原代肿瘤细胞凋亡, 对原代肿瘤细胞中凋亡相关蛋白 bax mRNA 有明显上调作用, 对 bcl-2 mRNA 有明显下调作用。结论: 灵芝孢子油对肺腺癌的癌性胸水原代肿瘤细胞有较好的抗癌作用。

【关键词】 灵芝孢子油; 原代肿瘤细胞; 癌性胸水; bax; bcl-2

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2011.07.10

【文章编号】 1672-4992-(2011)07-1289-04

【收稿日期】 2010-09-16

【修回日期】 2011-01-06

【作者单位】 ¹ 南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室, 江苏 南京 210093

² 南京市胸科医院, 江苏 南京 210029

【作者简介】 吕明明 (1986-), 女, 山东菏泽人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫学工作。E-mail: jinnamingsn@126.com

【通讯作者】 侯亚义 (1960-), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫学研究。E-mail: yavhou@njuedu.cn

癌性胸水是恶性肿瘤晚期并发症之一,目前尚缺乏满意的治疗方法。灵芝孢子油是由超临界 CO_2 流体萃取后超声从破壁灵芝孢子粉中强化提取,经进一步浓缩富集而得的油状脂质物,主要含有三萜、甾醇类、脂肪及脂肪酸等成分^[1-2]。有文献^[3-4]报道其具有增强细胞免疫及增强 NK 细胞活性、免疫调节功能,并具有护肝及直接抑杀肿瘤干细胞的作用。在本实验中检测了孢子油对原代肿瘤细胞的凋亡诱导作用,从基因水平初步探讨了灵芝孢子油抗肿瘤作用的相关机制,为临床应用研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株与细胞培养

人肺腺癌细胞系 A549 购自中国科学院上海细胞生物研究所,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2 药物

灵芝孢子油由南京中科药业有限公司馈赠,多西紫杉醇(Doc)、顺铂(DDP)、健择(Gemzar)购自江苏恒瑞医药公司。

1.3 标本收集与原代肿瘤细胞的分离

2010年3月至2010年8月于江苏省南京市胸科医院收集经病理科确诊为肺腺癌所致的癌性胸水12例,≥70岁5例,<70岁7例;男7例,女5例;左侧肺部7例,右侧肺部5例;胸水量为 550±150 ml,用脱落细胞学检查方法确诊。组织病理诊断均是肺腺癌,TNM 分期为 IV 期,胸水中均查到脱落的癌细胞。无菌条件下行胸腔穿刺术,抽取癌性胸水,200 ml 由病理科行脱落细胞学检查。抽取 200~500 ml 胸水至无菌容器中并分装至 50 ml 离心管中,1500 r/min 离心 15 分钟,弃上清;在 15 ml 离心管中将 7 ml 细胞悬液小心加至 7 ml Ficoll 之上,2200 r/min 离心 25 分钟;吸取中间层至新管;加入 40 ml D-Hank's 液洗涤细胞;如沉淀中含有较多的红细胞,加入红细胞裂解液 40 ml 裂解红细胞;用含抗生素的 RPMI 1640 再次洗涤细胞,台盼兰染色计算细胞活力。所分离的原代细胞经病理科确诊肿瘤细胞含量>50%。

1.4 CCK8 法药物敏感性测定

将对数生长期的 A549 以 2×10^4 /ml 接种于 96 孔板,培养 24 h 后弃去培养液,加入含灵芝孢子油的培养液,药物浓度分别为 1.25 μl/ml、0.63 μl/ml、0.31 μl/ml、0.16 μl/ml、0.08 μl/ml、0.04 μl/ml 每个药物浓度设 6 个复孔,同时设不加药的细胞为阳性对照孔和不加细胞的空白对照孔。从胸腔积液中分离的原代细胞取 1.0×10^5 /ml 接种于 96 孔 U 型悬浮培养板中,分别加入含灵芝孢子油、顺铂、多西紫杉醇、健择的培养液。灵芝孢子油的药物浓度分别是 0.63 μl/ml、0.31 μl/ml、0.16 μl/ml、0.08 μl/ml 临床药物所用 100% 测试药物浓度(TDC)分别为^[5]: Doc 10 μg/ml、DDP 4.0 μg/ml、GEM 25 μg/ml (100% TDC 参考药物在人体内的血浆峰浓度),每个浓度设立 3 个复孔,并设立阳性对照孔和空白对照孔。药物敏感性判定:100% TDC 浓度下抑制率>50% 为高度敏感,抑制率 30%~50% 为中度敏感,抑制率<30% 为不敏感^[5]。将上述细胞置于 37℃、5% 二氧化碳饱和湿度的培养箱孵育 72 小时后取出,每孔加入 20 μl 的 CCK8 显色剂(上海同仁化学研究所),继续孵育 4 小时后,自动酶标仪以 460 nm 波长测定各孔的吸光度(A)值,用复孔吸光度平均值进行比较。肿瘤细胞抑制率=(阳性对照孔测定 A 值-实验孔测定 A 值)/(阳性对照孔测定 A 值-空白孔测定 A 值)×

100%,肿瘤细胞存活率=(1-肿瘤细胞抑制率)×100%。以药物浓度为横坐标,肿瘤细胞存活率为纵坐标绘制浓度效应曲线,求出回归方程,得出抑制 50% 细胞生长的药物浓度(IC_{50}) (见表 1)。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

将原代肿瘤细胞以 3×10^5 孔接种于六孔板,用含抗生素的 RPMI 1640 培养细胞两天,第三天换含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基培养。待细胞数目达到每孔的 80% 时,换上含灵芝孢子油的培养基,24 小时后,用不含 EDTA 的 0.25% 的胰酶消化细胞,D-Hank's 液洗细胞 2 次,按照试剂盒说明书作标记 Annexin V 试剂和 PI 后,流式细胞检测。计算分析 Annexin V+/PI- 早期凋亡细胞和 Annexin V+/PI+ 晚期凋亡细胞所占的比例。

1.6 RNA 提取及 RT-PCR

取药物作用前后的原代肿瘤细胞,用 D-Hank's 液洗细胞 1 次去除培养液后,加入 1 ml 总 RNA 提取试剂 Trizol 充分混匀后用 0.2 ml 氯仿抽提,等体积异丙醇沉淀,75% 乙醇洗涤 RNA 空气干燥,加 20 μl 溶解液溶解 RNA 沉淀。按照逆转录试剂盒(Takara)说明书步骤将 RNA 逆转录为 cDNA。普通 PCR 的反应体系总体积为 25 μl,含 mix 12.5 μl, ddH₂O 8 μl, DMSO 1 μl, 引物 1 μl, cDNA 1.5 μl, 引物序列为: β-actin sense TCTGGCACCACCTTCTA β-actin antisense AGGCATACAGGGACAGCA; bcl-2 sense AGCTGCACCTCAGCCCTTACCGC bcl-2 antisense AGGAGAAATCAACAGAG; bax sense TGCTTCAGGGTTCATCCAGG bax antisense GCCTTGAGCACCAGTTTG。PCR 扩增条件为: β-actin 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 72℃ 5 min, 26 cycles; bax 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 72℃ 5 min, 31 cycles; bcl-2 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 72℃ 5 min, 35 cycles。

1.7 数据分析与统计

组间差异用 Student-t 检验和方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。统计软件为 SPSS 11.5。

2 结果

2.1 灵芝孢子油对肿瘤细胞系及原代肿瘤细胞的作用

在 0~1.25 μl/ml 浓度梯度下,灵芝孢子油对肺腺癌 A549 细胞的抗肿瘤作用呈浓度依赖性, IC_{50} 值为 0.46±0.08 μl/ml (图 1)。灵芝孢子油对肺腺癌性胸水中的原代肿瘤细胞的抗癌作用也呈浓度依赖性,其 IC_{50} 平均值为 0.28±0.04 μl/ml 与细胞系的 IC_{50} 值无统计学差异 ($P > 0.05$)。后续试验中选取 0.16 μl/ml 和 0.31 μl/ml 两个浓度(图 2)。在 0.16 μl/ml 和 0.31 μl/ml 两个浓度的灵芝孢子油作用细胞 24 小时后,细胞形态发生明显的变化,对照组细胞形态呈多边形,贴壁状态较好,伸展性较好,灵芝孢子油处理组细胞变圆,贴壁性稍差,且细胞的伸展性稍差(图 3)。该形态变化在高浓度处理组中尤为明显。

2.2 灵芝孢子油对原代肿瘤细胞的凋亡诱导作用

浓度为 0.16 μl/ml 的灵芝孢子油处理 24 小时后,原代肿瘤细胞中 Annexin V+/PI- 早期凋亡细胞比例由对照组的 0.71% 增加到 38.48% ($P < 0.01$), Annexin V+/PI+ 晚期凋亡细胞比例由对照组的 0.08% 增加到 0.74% ($P < 0.01$) (图 4)。提示灵芝孢子油可显著地促进原代肿瘤细胞凋亡。

2.3 灵芝孢子油对凋亡相关蛋白基因的作用

灵芝孢子油可以明显上调肺腺癌胸腔积液中原代肿瘤细胞的 bax mRNA 表达水平, 可见相同的浓度下, 48 h 处理组与 24 h 处理组相比上调作用明显。灵芝孢子油对肺腺癌性

胸水原代肿瘤细胞的 bcl-2 mRNA 表达有明显下调作用, 所有处理组与对照组相比明显下调, 且该下调作用有时间依赖性和浓度依赖性。高浓度 (0.31 μl/ml) 灵芝孢子油作用 48 h 对 bcl-2 mRNA 的下调幅度最大 (图 5)。

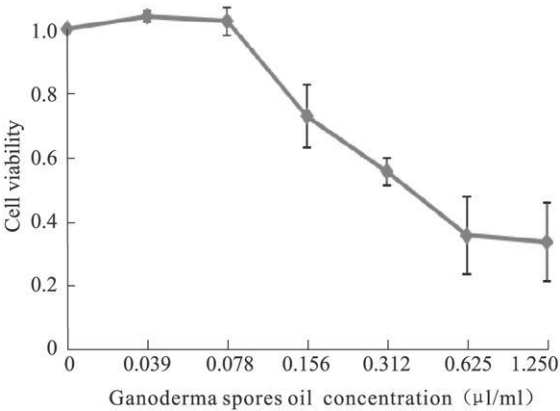


图 1 灵芝孢子油对 A549 细胞的生长抑制曲线
Fig 1 The inhibition curve of ganoderma spores oil on cell line A549

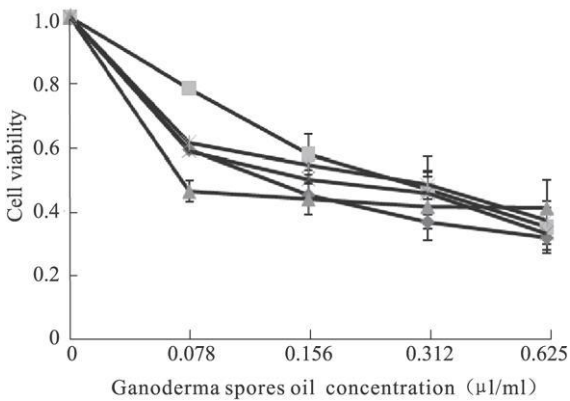


图 2 灵芝孢子油对 5 例肺腺癌性胸水中原代肿瘤细胞的生长抑制曲线
Fig 2 The inhibition curves of ganoderma spores oil on primary cancer cells isolated from pleural effusion

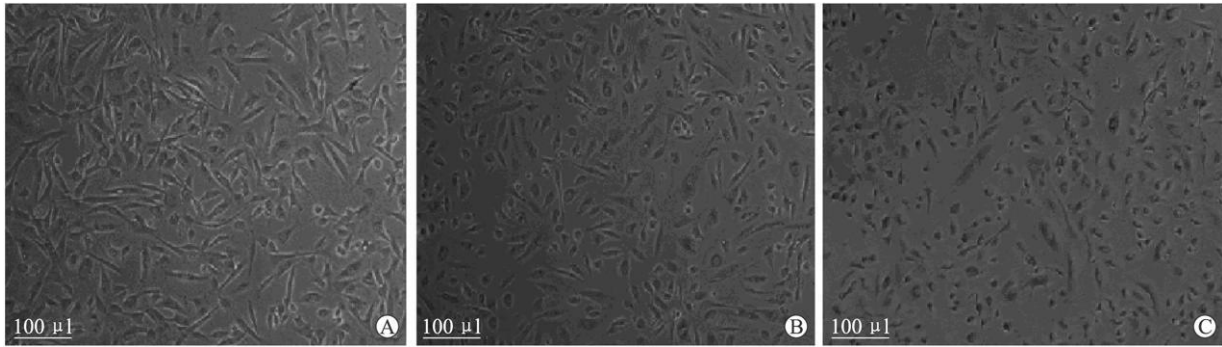


图 3 灵芝孢子油处理后细胞形态的变化
A 对照组 (药物未处理组); B 低浓度灵芝孢子油处理组 (0.16 μl/ml); C 高浓度灵芝孢子油处理组 (0.31 μl/ml)
Fig 3 Effect of ganoderma spores oil on primary cancer cells isolated from pleural effusion
A Control (undisposed with drugs); B ganoderma spores oil 0.16 μl/ml; C ganoderma spores oil 0.31 μl/ml

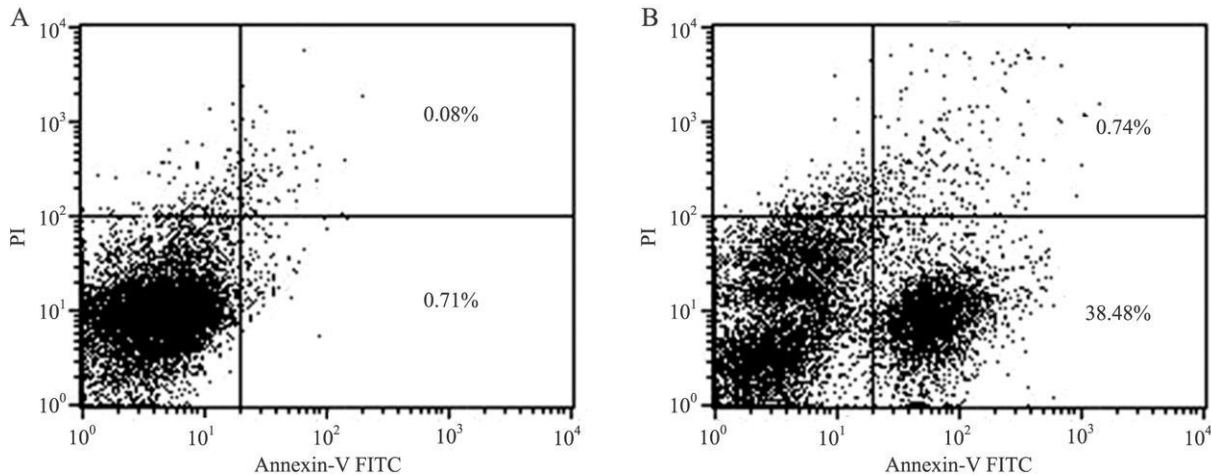


图 4 灵芝孢子油对癌性胸水中原代肿瘤细胞的凋亡诱导作用
A 对照组; B 0.16 μl/ml 灵芝孢子油药物处理组
Fig 4 The apoptotic induced effect of ganoderma spores oil on primary cancer cells
A control; B ganoderma spores oil 0.16 μl/ml

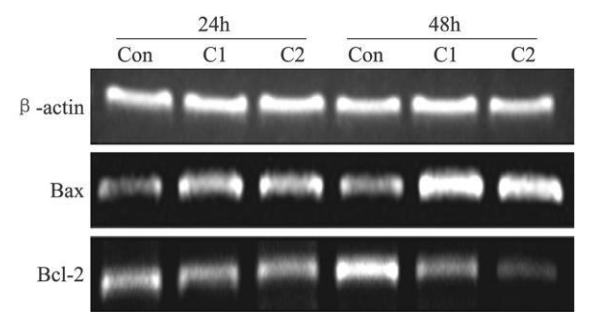


图 5 灵芝孢子油对原代肿瘤细胞中凋亡相关蛋白 bax 和 bcl-2 mRNA 水平的影响

(Con 对照组, C1=0.16 μl/ml 灵芝孢子油、C2=0.31 μl/ml 灵芝孢子油)

Fig 5 The role of ganoderma spores oil in the expression of apoptosis-related genes including bax and bcl-2

(con= control C1= ganoderma spores oil 0.16 μl/ml C2= ganoderma spores oil 0.31 μl/ml)

表 1 药物对癌性胸水中原代肿瘤细胞的抗肿瘤作用 (以抑制率表示%)

Tab 1 Anticancer effect of chemotherapeutic agents and ganoderma spores oil on primary cancer cells isolated from pleural effusion (inhibition ratio%)

Chemotherapeutic agents	Docetaxel	Cisplatin	Gemzar	Ganoderma spores oil
Inhibition ratio				
1	18.5±1.1	32.7±3.9	52.2±3.8	46.4±4.9
2	20.0±0.7	38.0±8.1	57.0±3.1	50.1±4.3
3	21.2±4.8	48.9±1.2	39.1±2.1	49.3±2.5
4	42.3±1.1	23.5±7.6	49.7±15.5	42.5±10.4
5	56.0±5.7	8.0±7.7	58.9±4.1	55.1±2.3
Mean of inhibition ratio	31.6±14.1	30.2±11.6	51.4±5.6*	48.7±3.3

* P<0.05 健择的抗肿瘤作用与多西紫杉醇和顺铂相比有显著性差异

* P<0.05 anticancer effect of gemzar was obviously increased compared to docetaxel and cisplatin

3 讨论

灵芝孢子 (Ganoderma lucidium spore) 是灵芝生长成熟期从菌盖弹射出来极其细小的孢子, 为灵芝的生殖细胞, 具有灵芝的全部遗传活性物质, 其化学成分包括: 蛋白质和氨基酸类、糖肽类、维生素类、胡萝卜素、甾醇类、三萜类、生物碱类、脂肪酸类、内酯和无机离子类等^[6]。其中三萜类物质是重要的生物活性物质, 灵芝孢子中微量元素钴 (Co)、硒 (Se) 和铬 (Cr) 与人类的健康和疾病的防治有密切关系^[7]。灵芝孢子具有抗肿瘤、调节免疫、血脂以及改善神经、心血管和呼吸系统的作用。临床观察, 灵芝孢子粉胶囊配合化疗对胃癌、食管癌、肝癌和大肠癌等具有良好的治疗作用, 是一种有效的化疗增效和减毒剂。然而, 既往研究均局限于灵芝孢子油对肿瘤细胞株的抗肿瘤作用, 对于癌性胸水中原代肿瘤细胞的作用尚无报道。本研究, 发现其 IC₅₀ 平均值为 0.28±0.04 μl/ml 与细胞系的 IC₅₀ 值无明显差异, 表明灵芝孢子油对癌性胸水中的原代肿瘤细胞与细胞系 A549 具有类似的抗肿瘤作用。灵芝孢子油对癌性胸水中原代肿瘤细

胞的作用与化疗药物多西紫杉醇、顺铂、健择相比较, 灵芝孢子油的抗肿瘤作用明显。统计结果显示, 健择优于多西紫杉醇和顺铂, 而孢子油与以上三种化疗药物无明显差异性。

bcl-2 家族成员包括抑制细胞凋亡的 bcl-1、bcl-2、bcl-XL、bcl-X 和促进凋亡的 bax、bcl-2、bcl-2、bcl-2 主要通过抑制线粒体途径从而抑制细胞凋亡, 细胞凋亡的发生都伴有 Cyt C 从线粒体释放, 继而激活 caspases 最终导致凋亡^[8], bcl-2 可抑制线粒体释放 Cyt C 即使 Cyt C 已经释放至胞浆中, bcl-2 也具有延缓细胞凋亡的作用^[9-10], bax 是 bcl-2 家族成员之一, 有对抗 bcl-2 促进凋亡的功能^[11]。本实验中我们研究了灵芝孢子油对原代肿瘤细胞作用后对 bax 和 bcl-2 mRNA 表达水平的影响, 结果提示灵芝孢子油作用 48h 后可以使 bax 上调, 使 bcl-2 基因因明显下调, 同样结果也可见于其他所取原代肿瘤细胞中, 但在不同病例的原代细胞中基因下调的程度不同。

本文研究了灵芝孢子油对肺腺癌性胸水中原代肿瘤细胞的作用, 并与化疗药比较, 为进一步的临床研究提供了参考。

【参考文献】

[1] 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

[2] 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.

[3] 李森柱, 谢意珍, 周静文, 等. 灵芝孢子油主要活性成分及降血脂功能的研究 [J]. 中国食用菌, 2006 25(5): 40-42

[4] Xie Yi-Zhen, Li Sen-Zhu, Allen Yee, et al. Ganoderma lucidum inhibits tumor cell proliferation and induces tumor cell death [J]. Enzyme and Microbial Technol 2006 4: 177-185.

[5] MH Neale, AL Lamont, AH Indley, et al. Creep: The ex vivo effect of high concentrations of doxorubicin on recurrent ovarian carcinoma [J]. Anticancer Drugs 2000 11: 865-871

[6] 陈体强, 李开本, 徐洁, 等. 灵芝孢子粉氨基酸、脂肪酸及元素组成的研究 [J]. 菌物系统, 1997 16(1): 52-56

[7] 罗志明. 灵芝孢子的微量元素含量和药理应用分析 [J]. 广东微量元素科学, 2003 10(8): 42-48

[8] Marudpurkar A, Lazebnik Y. Requirement of cytochrome c for apoptosis in human cells [J]. Cell Death Differ 2006 13(12): 2062-2067.

[9] Bomer C. The Bcl-2 protein family: sensors and check points for life-or-death decisions [J]. Mol Immunol 2003 39(11): 615-647.

[10] Rosse T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. Nature 1998 391(6666): 496-499.

[11] Warren DT, Tajsic T, Mellad JA, et al. Novel nuclear nesprin-2 variants tether active extracellular signal regulated MAPK1 and MAPK2 at promyeocyte leukemia protein nuclear bodies and act to regulate smooth muscle cell proliferation [J]. J Biol Chem 2010 285(2): 1311-1320

(编校: 何妹)