

# 灵芝孢子油对人肺腺癌 LTP-2 细胞凋亡的影响

王亚平, 赵光锋, 刘柳, 李鹏飞, 侯亚义

(南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室, 210093)

**[摘要]** 目的 观察灵芝孢子油对人肺腺癌细胞 LTP-2 增殖、凋亡与 mR-16 及其靶基因表达的影响, 从 mRNA 角度揭示灵芝孢子油的抗肿瘤机制。方法 灵芝孢子油处理人肺腺癌细胞 LTP-2 24 和 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测其对细胞增殖的影响, 倒置相差显微镜观察细胞形态学变化, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, real time PCR 检测 mR-16 及其靶基因 bcl2 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。结果 灵芝孢子油呈剂量、时间性地抑制人肺腺癌 LTP-2 细胞的增殖; 当灵芝孢子油浓度达到  $2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 细胞形态发生明显变化, Annexin V/PI 双染检测提示, 灵芝孢子油在低浓度下就可促进细胞凋亡; 灵芝孢子油可显著上调 LTP-2 细胞中 mR-16 的表达并相应下调 bcl2 和 VEGF 基因的表达。结论 灵芝孢子油能显著抑制人肺腺癌细胞 LTP-2 细胞增殖, 引起细胞形态学改变。其作用机制之一是上调 mR-16 的表达、下调 bcl2 和 VEGF 的表达, 从而促进肺癌细胞凋亡, 达到抗肿瘤的效果。

**[关键词]** LTP-2 灵芝孢子油; 细胞凋亡; mR-16

**[中图分类号]** R285 R965

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2011)05-0570-04

## Glossy Ganoderma Spore Oil Induced Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma LTP-2 Cells through UP-regulating mR-16 Expression

WANG Ya-ping ZHAO Guang-feng LU Liu LI Peng-fei HOU Ya-yi (Immunology and Reproductive Biology Laboratory Medical School of Nanjing University Nanjing 210093 China)

**ABSTRACT** Objective To investigate the effects of glossy ganoderma spore oil on the proliferation apoptosis mR-16 expression of human lung adenocarcinoma LTP-2 cell line and explore its anticancer mechanism. Methods The LTP-2 cells were treated with glossy ganoderma spore oil for 24 and 48 hours. The inhibition on cell growth was determined by using cell counting kit (CCK-8). Cell morphological changes were observed by light microscopy. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry and the expression of mR-16 bcl2 and PDCD4 were determined by real time PCR. Results Glossy ganoderma spore oil time and dose dependently inhibited the LTP-2 cells proliferation, changed the cell morphology obviously after the glossy ganoderma spore oil reached to  $2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Glossy ganoderma spore oil induced the LTP-2 cells apoptosis even at a low concentration by Annexin V/PI double stained detection and it up-regulated the expression of mR-16 and down-regulated the bcl2 and VEGF expression significantly. Conclusion Glossy ganoderma spore oil could inhibit the cell proliferation obviously and change the cell morphology. The mechanisms of which should be associated with up-regulating the mR-16 expression and down-regulating the bcl2 and VEGF expression.

**KEY WORDS** LTP-2 Glossy ganoderma spore oil Apoptosis mR-16

肺癌是全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤, 常规药物的毒副作用及肿瘤耐药性难以克服。从中草药开发抗肿瘤药物已成为近来研究的热点之一<sup>[1]</sup>。灵芝及其提取物可通过提高免疫力实现抑制肿瘤, 也可直接抗肿瘤<sup>[2]</sup>。但其免疫调节及抗肿瘤机制尚未十分明确<sup>[3]</sup>。mR-16 被认为是肿瘤抑制因子, 可能通过靶向调控促癌基因, 如 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, bcl2)、髓样细胞白血病 1 基因 (myeloid cell leukemia-1, mcl1)、细胞周期蛋白 D1 (cell

cyclin D1, CCND1) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等来发挥功能<sup>[4]</sup>。笔者在本实验中研究灵芝孢子油对肺癌 LTP-2 细胞株中 mR-16 及靶基因 bcl2 和 VEGF 表达的影响及其凋亡诱导作用, 从 mR-16 基因表达和调控角度探讨灵芝孢子油抗肿瘤机制。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 肺癌 LTP-2 细胞 (中国科学院上海细胞所), 灵芝孢子油 (江苏省南京中科药业有限公司, 纯度 > 99%), RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶 (Gibco 公司) 反转录试剂盒 (Takara 公司), SYBR green mix (Roche 公司), CCK-8 试剂盒 (同仁化学研究所), Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (Sigma Aldrich), 引物合成 (Invitrogen 上海)。

**[收稿日期]** 2010-08-12 **[修回日期]** 2010-10-06

**[作者简介]** 王亚平 (1985-) 女, 山东日照人, 硕士, 研究方向: 医学免疫学。电话: 025-83686341 (0)15951974900 E-mail: yaping9966@126.com

**[通讯作者]** 侯亚义 (1960-) 男, 教授, 博士生导师。电话: 025-83686441 E-mail: yayihou@nju.edu.cn

**1.2 细胞准备及实验分组** 肺癌 L1EP-2细胞培养于含 10% FBS的 RPMI1640培养基中,置于 37℃,5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)潮湿空气的培养箱内培养,2~3 d传代 1次,以维持细胞处于对数生长期。实验分 4组:对照组,灵芝孢子油 0.5,1,2 μL·mL<sup>-1</sup>组,分别处理 24,48 h进行相应检测,倒置显微镜下观察各组细胞形态变化情况。

**1.3 CCK8法检测细胞增殖抑制率** 在 96孔培养板上接种 4组细胞,每组 24复孔,每孔加 1×10<sup>4</sup>个细胞进行接种,接种 24,48 h待测孔加入 CCK8试剂 10 μL培养箱孵育 4 h后用酶标仪测定 450 nm处的吸光度值(A值),每次每组测定 6复孔。以培养液做空白对照并调零,测 3次,取平均值。细胞增殖抑制率(%)=(1-细胞存活率)×100%;即细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组 A值/对照组 A值)]×100%。

**1.4 流式细胞仪检测灵芝孢子油对 L1EP-2细胞凋亡率的影响** 收集处于对数生长期的 L1EP-2细胞,接种于 24孔板,每孔细胞数 2×10<sup>5</sup>个,细胞贴壁后,弃去上清液。加入不同浓度灵芝孢子油,使其终浓度分别为 0.05,1,2 μL·mL<sup>-1</sup>,24 h以及 48 h后用 0.25%胰酶收集所有细胞,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered solution PBS)洗 2次(1 000 r·min<sup>-1</sup>),弃去上清液,用染色缓冲液(binding buffer)100 μL重悬。加 Annexin V-PI各 5 μL室温避光孵育 10 min后流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

**1.5 实时定量 PCR检测细胞内 mR-16水平** 收集处于对数生长期的 L1EP-2细胞,接种于 12孔板,每孔细胞 5×10<sup>5</sup>个,37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,次日加入灵芝孢子油,终浓度为 1 μL·mL<sup>-1</sup>,同时设立空白对照组,于 12 h收集细胞,总 RNA抽提按 Trizol试剂(Invitrogen公司)说明书进行,提取的总 RNA用紫外分光光度计(BioRad USA)测 A<sub>260</sub>。以 U6 snRNA作为内参照,进行实时定量 PCR反应条件参照 FastStartUniversal SYBR Green Master Reagent-Time

PCR Quantitation Kit提供的说明书操作,mR-16的相对表达水平用ΔC和 2<sup>-ΔΔC</sup>计算。

**1.6 实时定量 PCR检测 Bcl2和 VEGF mRNA表达水平** 利用 SYBR Green 染料检测 L1EP-2细胞中 PTEN和 Pdc4的 mRNA实验分组同前。各组细胞以 5×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>的密度接种于 12孔板,次日加入灵芝孢子油,终浓度为 1 μL·mL<sup>-1</sup>,同时设立空白对照组,于 12 h收集细胞。总 RNA抽提按 Trizol试剂(Invitrogen公司)说明书进行,提取的总 RNA用紫外分光光度计(BioRad USA)测 A<sub>260</sub>。总反应体积为 25 μL,上、下游引物以及 1 μL DNA在 95℃、2 min变性后,共进行 40个循环扩增,每个循环包括 95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s。bcl2和 VEGF的 mRNA的相对表达水平用ΔC和 2<sup>-ΔΔC</sup>计算。GAPDH mRNA作为内参照。

**1.7 统计学方法** 统计学方法采用 GraphPad Prism 5软件进行处理,两组数据采用 t检验,数据采用单因素方差分析。P<0.05表示差异有统计学意义。

2 实验结果

**2.1 灵芝孢子油呈浓度依赖性抑制 L1EP-2细胞增殖** 见表 1。灵芝孢子油分别作用 L1EP-2细胞 24和 48 h后,随着浓度的增加,L1EP-2细胞活力显著下降,细胞增殖抑制率显著升高,当灵芝孢子油浓度达到 2 μL·mL<sup>-1</sup>时,在 48 h的细胞增殖抑制率达到约 78%。

2.2 灵芝孢子油诱导 L1EP-2细胞凋亡

**2.2.1 灵芝孢子油对细胞形态的影响** 不同浓度灵芝孢子油(0.05,1,2 μL·mL<sup>-1</sup>)作用 L1EP-2细胞 24 h随着灵芝孢子油浓度的增加,细胞形态发生明显变化,在高浓度时细胞呈现整体萎缩,细胞膜边缘出现小气泡等典型细胞凋亡性状(图 1)。

**2.2.2 灵芝孢子油诱导 L1EP-2细胞凋亡** 灵芝孢子油处理 L1EP-2细胞 24和 48 h随着灵芝孢子油浓度的增加,L1EP-2细胞早期凋亡率逐渐增大,呈现明显的剂量依赖性。而且 48 h的细胞早期凋亡率明显高于 24 h(表 1,图 2)。

表 1 4组 L1EP-2细胞 24和 48 h后 A值和凋亡比例测定结果

Tab 1 The absorbance and apoptosis of L1EP-2 cells after treatment for 24 or 48 hours in the 4 groups

x±s

| 组别                        | A值                        |                           | L1EP-2细胞凋亡/%             |                          |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                           | 24 h                      | 48 h                      | 24 h                     | 48 h                     |
| 灵芝孢子油                     |                           |                           |                          |                          |
| 0.5 μL·mL <sup>-1</sup> 组 | 0.248±0.003 <sup>*1</sup> | 0.268±0.004 <sup>*1</sup> | 8.20±0.50                | 17.60±0.75 <sup>*2</sup> |
| 1.0 μL·mL <sup>-1</sup> 组 | 0.236±0.002 <sup>*1</sup> | 0.250±0.005 <sup>*1</sup> | 13.30±0.66 <sup>*2</sup> | 24.50±0.78 <sup>*1</sup> |
| 2.0 μL·mL <sup>-1</sup> 组 | 0.230±0.003 <sup>*1</sup> | 0.232±0.002 <sup>*1</sup> | 16.80±0.57 <sup>*1</sup> | 28.70±0.93 <sup>*1</sup> |
| 对照组                       | 0.327±0.005               | 1.123±0.004               | 6.50±0.05                | 4.50±0.06                |

与对照组比较,\*<sup>1</sup>P<0.01,\*<sup>2</sup>P<0.05

Compared with control group,\*<sup>1</sup>P<0.01,\*<sup>2</sup>P<0.05

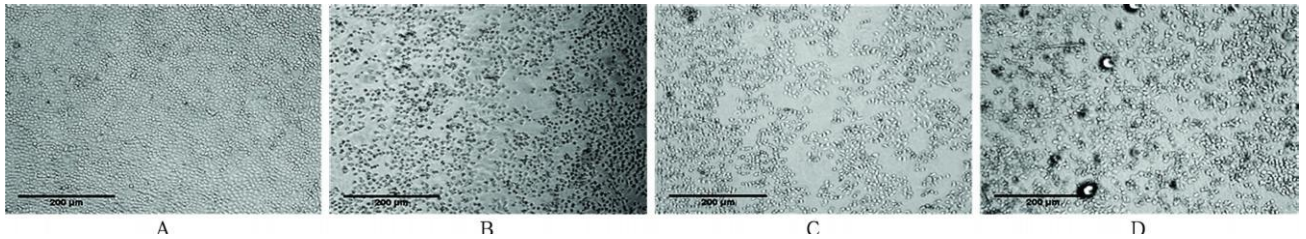


图 1 不同浓度灵芝孢子油处理 LTP-2 细胞 24 h 后细胞形态

A 对照组; B  $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  灵芝孢子油组; C  $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  灵芝孢子油组; D  $2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  灵芝孢子油组

Fig 1 The morphology of LTP-2 cells after treatment with glossy ganoderma spore oil at different concentration for 24 hours

A control group B  $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  glossy ganoderma spore oil group C  $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  glossy ganoderma spore oil group D  $2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  glossy ganoderma spore oil group

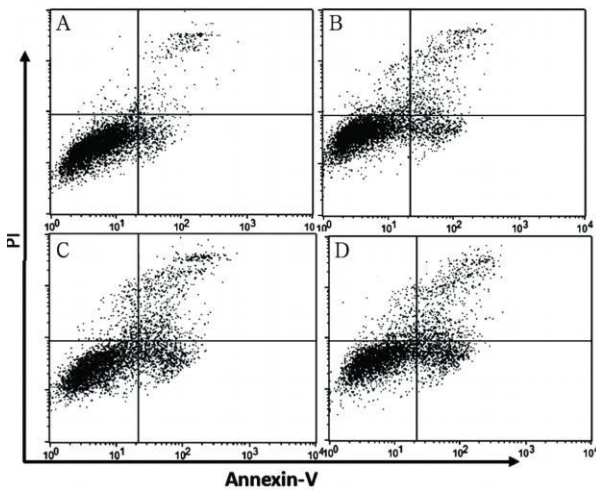


图 2 不同浓度灵芝孢子油处理 LTP-2 细胞 24 h 后流式细胞仪检测结果

A 对照组; B  $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  灵芝孢子油组; C  $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  灵芝孢子油组; D  $2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  灵芝孢子油组

Fig 2 The result of LTP-2 cell after treatment with glossy ganoderma spore oil at different concentrations for 24 hours by flow cytometry

A control group B  $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  glossy ganoderma spore oil group C  $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  glossy ganoderma spore oil group D  $2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  glossy ganoderma spore oil group

**2.3 灵芝孢子油上调 mR-16 的表达**  $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  灵芝孢子油处理 LTP-2 细胞 12 h 后, 实时定量 PCR 实验测得 mR-16 的表达上调约 2 倍。

**2.4 灵芝孢子油下调 bcl2 与 VEGF 基因的表达** 灵芝孢子油可以显著下调抑癌基因 bcl2 和 VEGF mRNA 的表达。其中 bcl2 下调表达约 50%, VEGF 下调约 50%。

### 3 讨论

灵芝是担子菌纲多孔菌科灵芝属的真菌, 是一种历史悠久的中药材。灵芝孢子中含有三萜类、多糖类、核苷类、生物碱类、呋喃衍生物类、多种酶类、及有机

锗、脂肪酸等十几类近千种化合物(复合物)。具有生理活性的成分主要有三萜类、多糖类、核苷酸类、氨基酸、微量元素及有机锗、生物碱类<sup>[3]</sup>。文献报道灵芝具有降血糖、降血脂、抗肿瘤等功效<sup>[4]</sup>。

研究表明, 灵芝孢子油的抗肿瘤机制包括: 通过调节免疫功能间接抑制肿瘤细胞生长, 甚至杀伤肿瘤细胞<sup>[2]</sup>; 激活 caspase3 从而引起细胞凋亡<sup>[7]</sup>; 抑制拓扑异构酶导致异常 DNA 结构的出现、染色体单体分离异常、复制又受阻等, 从而抑制细胞的增殖等<sup>[2]</sup>。

microRNA (miRNA) 是真核细胞中一种 21 ~ 25 个核苷酸大小, 参与转录后基因调控的非编码单链小分子 RNA 可特异性识别靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR) 并与之结合, 引起靶 mRNA 的降解或翻译抑制, 从而对基因进行转录后表达调控, 调节许多重要的细胞活动<sup>[8]</sup>。笔者在本实验中首次从 mRNA 调控细胞凋亡角度来探讨灵芝孢子油的抗肿瘤机制。

mR-16 被认为是肿瘤抑制因子, 在多种肿瘤中过低表达, 包括前列腺癌<sup>[9]</sup>、白血病<sup>[10]</sup>和肺癌<sup>[11]</sup>等。这个小分子 RNA 很可能通过靶向调控促癌基因来发挥功能, 笔者在本实验中主要关注其靶基因 bcl2 和 VEGF。

Bcl2 蛋白能广泛抑制细胞凋亡, 尤其是抑制 DNA 损伤引起的细胞凋亡, 延长细胞的存活期<sup>[12]</sup>。在血管生成与肿瘤的研究中, VEGF 是目前了解最为深入的血管生成家族, VEGF 是刺激肿瘤血管生成的主要因素。现有研究表明: VEGF 是作用最强、特异性最高的血管生成调控因子, 其有利于新生血管生长及延伸, 为内皮细胞的迁移和肿瘤细胞的转移提供形态学基础<sup>[13]</sup>。

本实验结果显示, 灵芝孢子油具有明显的抑制肿瘤细胞活力、促进肿瘤细胞凋亡的作用, 这与以往研究结果类似。同时, 抑癌微小 mRNA 分子 mR-16 被显著上调, 这表明灵芝孢子油抗肿瘤的作用机制之一与 mR-16 有一定的关联。笔者进一步检测其靶基因 bcl2

以及 VEGF 的表达, 因为 bcl2 与 VEGF 在肿瘤的生长、血管形成以及细胞迁移中发挥重要功能<sup>[14-15]</sup>。

综上所述表明, 灵芝孢子油具有抑制肿瘤的作用, 其机制之一与促进 mR-16 表达进而抑制 bcl2 与 VEGF 表达有关。该研究为灵芝孢子油治疗肺癌提供了一定的实验依据。

[DOI] 10.3870/ydyb.2011.05.005

[参考文献]

- [1] WARGOVICH M J, WOODS C, HOLLIS D M, et al. Herbal cancer prevention and health [J]. J Nutr 2001 131 (11): S034-S036
- [2] 陈纯, 王恒邦, 吴盈莹, 等. 灵芝及灵芝孢子提取物的抗肿瘤及对 DNA 拓扑异构酶作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 2008 24(2): 45-49
- [3] 刘媛, 耿越. 灵芝多糖抗肿瘤的细胞机制及作用通路研究 [J]. 食品与药品, 2008 10(7): 48-51
- [4] AQEILAN R, I CALN G A, CROCE C M. mR-15a and mR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives [J]. Cell Death Differ 2010 17(2): 215-220
- [5] 柯永建, 乐仁昌, 江小昱. 灵芝活性成分及药用价值 [J]. 中国科技博览, 2009 33(4): 255
- [6] 幸而, 吴松青. 两种灵芝孢子粉抗肿瘤及免疫功能研究 [J]. 今日药学, 2008 18(4): 57-59
- [7] 张娟, 高文信, 王翔, 等. 灵芝三萜防治口腔黏膜癌及其对细胞的作用 [J]. 口腔医学研究, 2008 10(24): 487-489
- [8] 赵健, 闫康, 高杰, 等. mR-21 真核表达载体的构建及其活性鉴定 [J]. 分子免疫学杂志, 2009 25(11): 1047-

1052

- [9] BONC D, COPROLA V, MUSUMECIM, et al. The mR-15 and mR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities [J]. Nat Med 2008 14(11): 1271-1277
- [10] GAO W, YU Y, CAO H L, et al. Deregulated expression of mR-21, mR-143 and mR-181a in non-small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis [J]. Biomed Pharmacother 2010 64: 399-408
- [11] ORTHOLAN C, PUISSEGUR M P, LLE M, et al. MicroRNAs and lung cancer: new oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets [J]. Curr Med Chem 2009 16(9): 1047-1061
- [12] 时衍同, 刘伟, 潘丽. 非小细胞肺癌 bcl2 蛋白表达及其与细胞凋亡和增殖的关系 [J]. 山东医药, 2005 45(16): 31-32
- [13] 马路. 血清 VEGF 与 EGF 检测在肺癌中的临床意义 [J]. 慢性病学杂志, 2010 12(1): 9-10
- [14] ZHU W, SHAN X, WANG T S, et al. mR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines [J]. Int J Cancer 2010 127(1): 2520-2529
- [15] TAKAHAMA M, TSUTSUMI M, TSUJUCHI I, et al. Frequent expression of the vascular endothelial growth factor in human non-small cell lung cancers [J]. Tpn J Clin Oncol 2004 28(3): 176-181

# 透皮促渗剂对醋酸地塞米松壳聚糖凝胶透皮特性的影响

西娜<sup>1</sup>, 段同华<sup>2</sup>, 西传坡<sup>2</sup>, 俞发<sup>1</sup>, 何彬<sup>2</sup>

(1. 解放军第 458 医院药剂科, 广州 510602 2. 解放军炮兵学院门诊部, 合肥 230031)

[摘要] 目的 观察透皮促渗剂对醋酸地塞米松壳聚糖凝胶透皮特性的影响。方法 实验分为无促渗剂组 and 促渗剂组。无促渗剂组为 0.75% 药物 5% 壳聚糖凝胶剂; 促渗剂组根据含促渗剂不同又分为月桂氮革酮+丙二醇、月桂氮革酮、丙二醇+二甲亚砜、二甲亚砜+月桂氮革酮组。以无毛大鼠皮肤为渗透屏障, 进行体外渗透实验, 分析该凝胶稳态透皮速率 ( $J_s$ ) 和  $J_s$  提高率。结果 无促渗剂组①  $J_s$  为  $(3.75 \pm 0.56) \mu g \cdot (cm^2)^{-1} \cdot h^{-1}$ 。促渗剂组效果明显, 其中二甲亚砜+月桂氮革酮组②  $J_s$  为  $(8.12 \pm 0.58) \mu g \cdot (cm^2)^{-1} \cdot h^{-1}$ , 月桂氮革酮+丙二醇组③  $J_s$  为  $(5.41 \pm 0.74) \mu g \cdot (cm^2)^{-1} \cdot h^{-1}$ , 丙二醇+二甲亚砜组④  $J_s$  为  $(4.31 \pm 0.42) \mu g \cdot (cm^2)^{-1} \cdot h^{-1}$ , 月桂氮革酮组⑤  $J_s$  为  $(4.35 \pm 0.36) \mu g \cdot (cm^2)^{-1} \cdot h^{-1}$ 。与①比较, ②的  $J_s$  提高率为 2.17% ( $P < 0.01$ ), 与③④⑤比较, ②的  $J_s$  分别为 1.51, 1.89, 1.87 倍 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 混合促渗剂具有比单一促渗剂更好的促渗效果。

[关键词] 透皮促渗剂; 地塞米松, 醋酸; 壳聚糖凝胶; 经皮渗透

[中图分类号] R945

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)05-0573-05

## Effects of Transdermal Penetration Enhancers on the Permeation Properties of Dexamethasone Acetate Chitosan Gel

XINA, DUAN Tonghua, XI Chuanpo, YU Fa, HE Bin (1. Department of Pharmacy, the 458 Hospital of