

DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2011.07.008

灵芝孢子油对人胃腺癌细胞 BGC823 的抑制作用

何伶芳¹, 高倩颖¹, 侯亚义^{1,2}

Inhibition of Glossy Ganoderma Spore Oil to Human Gastric Adenocarcinoma BGC823 Cell

He Ling-fang¹, GAO Qian-ying¹, HOU Ya-yi^{1,2}

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

Corresponding Author: HOU Ya-yi, E-mail: yayihou@nju.edu.cn

Abstract Objective To investigate the effects of Glossy ganoderma spore oil (GSSO) on the proliferation, apoptosis and migration of human gastric adenocarcinoma cell BGC823. **Methods** After BGC823 cells were treated with GSSO, the inhibition growth efficacy was determined using cell count kit (CCK-8), and cell apoptosis was analyzed by flow cytometry, cell migrating ability was determined by cell migration assay. **Results** Compared with control (DMSO solvent), GSSO concentration-dependently inhibited the BGC823 cell proliferation ($P < 0.05$); from the result of flow cytometry, GSSO could induce the apoptosis of BGC823 cell when its concentration was in excess of 0.005 % ($P < 0.001$). GSSO inhibited the BGC823 cell migration significantly when the GSSO's concentration attained to 0.005 % ($P < 0.001$). **Conclusion** GSSO could inhibit the proliferation and cell migration obviously and induced apoptosis of BGC823 cell.

Key words: Glossy ganoderma spore oil; BGC823 cell; Cell proliferation; Apoptosis; Cell migration
摘 要: 目的 观察灵芝孢子油(GSSO)对BGC823细胞增殖、凋亡、迁移的影响,探讨其对胃腺癌细胞的影响。方法 GSSO干预BGC823后,CCK-8检测细胞增殖的变化,流式检测细胞凋亡的变化,Transwell实验检测细胞迁移的变化。结果 与对照组(溶剂DMSO)相比,GSSO剂量依赖性地抑制BGC823细胞的增殖($P < 0.05$);体积分数 $> 0.005\%$ 时,即可促进细胞凋亡($P < 0.001$)。与对照组相比较,灵芝孢子油体积分数达到 0.005% ,即可显著性抑制BGC823细胞迁移($P < 0.001$)。结论 孢子油能显著抑制BGC823细胞增殖和迁移,促进BGC823细胞凋亡。

关键词: 灵芝孢子油; BGC823; 细胞增殖; 凋亡; 细胞迁移

中图分类号: R735.2; R730.52 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2011)07-0761-03

0 引言

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一。从中草药以及天然植物中开发抗肿瘤药物或通过膳食预防肿瘤,近年来已经成为研究的热点之一^[1]。灵芝孢子油是从灵芝孢子中提取的脂质活性物,它的化学成分主要包括灵芝三萜类灵芝酸、不饱和脂肪酸、有机锗、灵芝多糖和蛋白质等^[2-3]。其中总三萜的含量和抗肿瘤作用呈现正相关关系^[4]。

灵芝及其提取物不仅可通过提高免疫力抑制肿瘤,还具有直接抗肿瘤作用^[3]。灵芝孢子油有良好的抑瘤作用,其抑瘤作用呈量效关系^[5]。但灵芝的

抗肿瘤作用机制尚未十分明确。本实验研究灵芝孢子油对胃癌BGC823细胞体外增殖、凋亡及迁移的影响,探讨灵芝孢子油抗肿瘤机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

灵芝孢子油(GSSO)由南京中科药业有限公司馈赠,纯度大于99%,人胃腺癌细胞系(BGC823)引自中科院上海细胞所,小牛血清和RPMI1640培养液(Gibco公司),反转录试剂盒(TaKaRa公司),CCK-8试剂盒(同仁化学研究所),Annexin-V-FITC/PI凋亡试剂盒购自Sigma公司,引物由Invitrogen公司合成,Matrigel Based Membrane Matrix购自于BD science公司,Transwell小室购自于Millipore公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞准备及实验分组

胃癌BGC823细胞

收稿日期: 2011-01-05; 修回日期: 2011-04-28
作者单位: 1. 210093 南京, 南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室, 2. 江苏省医学分子重点实验室
通信作者: 侯亚义, E-mail: yayihou@nju.edu.cn
作者简介: 何伶芳(1985-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤免疫与基因治疗的研究

培养于含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液中,置于 37℃,5%CO₂ 的培养箱内培养,2~3 天传代一次。实验共分四组:GSSO 体积分数为对照组(溶剂 DMSO)、0.0025%、0.005%、0.01%、0.05%组。DMSO 对细胞状态没有影响。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 在 96 孔培养板上接种四组细胞,每组 6 复孔,以 1×10⁴/孔细胞浓度进行接种,接种 24、48 h 后加入 CCK-8 试剂 10 μl,培养箱培养 4 h 后用酶标仪测定处吸光度值(450 nm)。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 用 0.25% 胰酶收集所有细胞,PBS 洗两次(1 000 rcf/min),弃上清液,用 100 μl 结合缓冲液重悬。加 5 μl Annexin V、5 μl PI,室温避光培养 10 min 后流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞迁移实验 在 PV PF(聚碳酸酯膜,孔径为 8 μm)膜的上表面铺 Matrigel 40 μl/室。置于 24 孔板中,37℃培养 30 min。收集 BGC823 细胞接种于上室中,每室 300 μl(即 3×10⁴细胞/室)。在小室的下室加入不同浓度的 GSSO 的培养液每室 500 μl,培养 24 h。将膜轻轻取出,擦去膜上表面未侵袭的细胞及基质胶,然后在 10%的甲醛中固定 30 min,1%结晶紫染色 20 min,水洗,于 400 倍显微镜下统计穿膜细胞数,每张膜计数 10 个视野,取其平

均值,进行统计学分析。

1.3 统计学方法

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

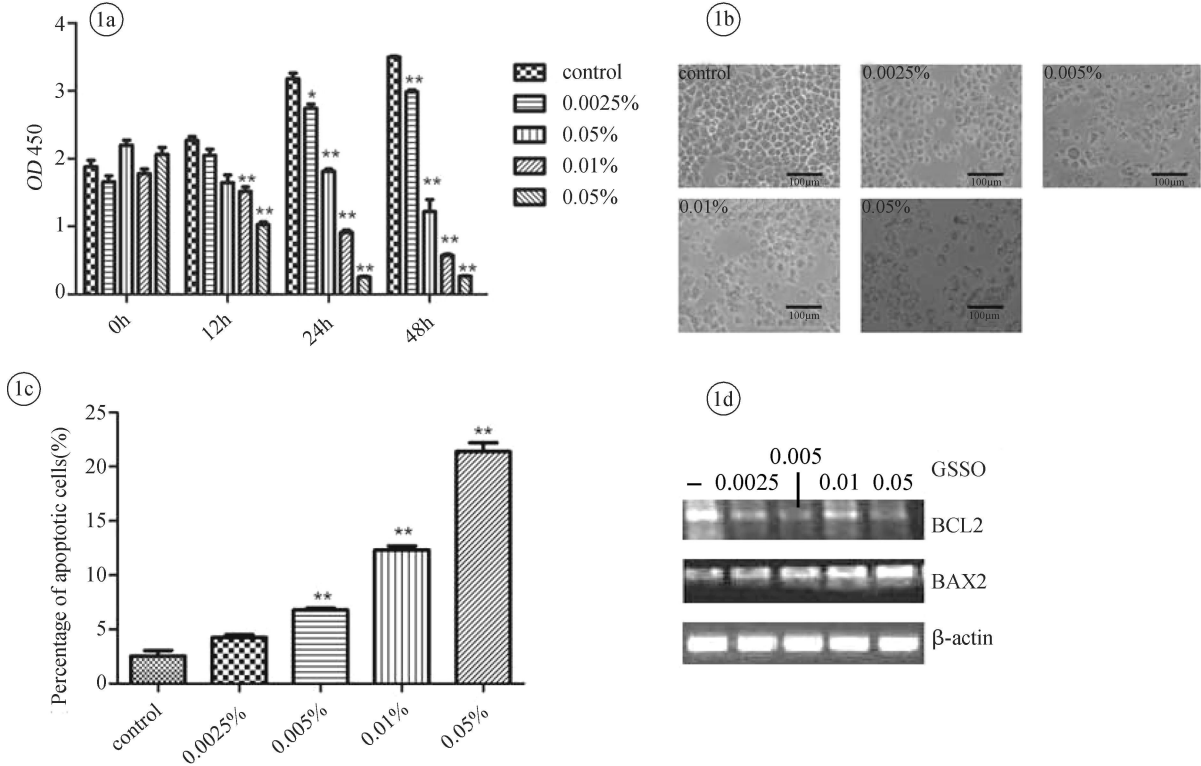
2 结果

2.1 GSSO 对 BGC823 细胞的影响

2.1.1 GSSO 对 BGC823 细胞增殖的影响 与对照组溶剂 DMSO 相比较,随着 GSSO 浓度以及时间的增加,BGC823 细胞活力显著下降,当 GSSO 体积分数为 0.05%时,24 h 后可显著抑制细胞的增殖(*P*<0.05),见图 1a。

2.1.2 GSSO 对 BGC823 细胞凋亡的影响 不同体积分数的 GSSO 作用 BGC823 细胞 24 h。随着 GSSO 浓度的增加细胞形态发生明显变化,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,见图 1b。BGC823 细胞凋亡率随 GSSO 浓度增大而逐渐升高。与对照组相比,当 GSSO 的浓度达到 0.005%时,细胞的凋亡差异具有统计学意义(*P*<0.001),见图 1c。

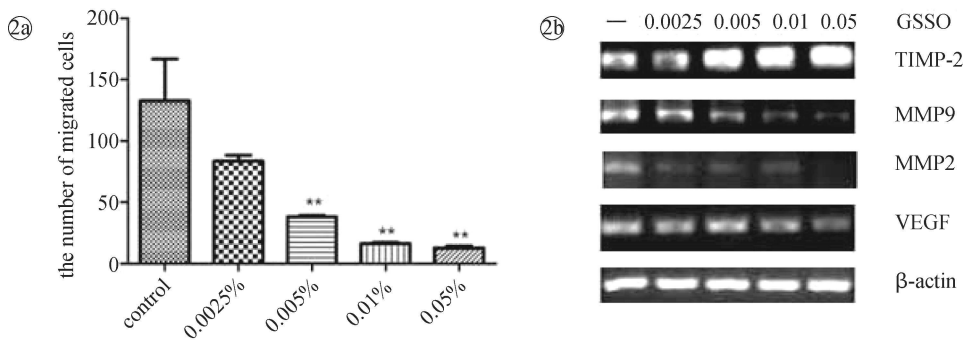
2.1.3 GSSO 促进 Bax-2 mRNA 表达而抑制 Bcl-2 mRNA 表达 RT-PCR 结果显示:与对照组相比,



1a: the changes of absorbance after different concentration of GSSO treated BGC823 for 12~48h; 1b: the effect of different concentration of GSSO on the cell morphology of BGC823 after 48h; 1c: the percentage of apoptotic BGC823 cell treated different concentration of GSSO for 24 h was detected using flow cytometry; 1d: effect of GSSO on the expression of molecules related to apoptosis (*, **: vs. control, **P*<0.05, ***P*<0.001)

图 1 灵芝孢子油对 BGC823 细胞增殖和凋亡的影响

Figure 1 Effects of GSSO on the cell proliferation and cell apoptosis in BGC823



2a: the statistical results of the number of cell migration; 2b: effect of GSSO on the mRNA expression of molecules related to migration of BGC823; *: $P < 0.01$, vs. control

图 2 灵芝孢子油对 BGC823 细胞迁移影响
Figure 2 Effect of GSSO on the migration of BGC823 cell

GSSO 处理的 BGC823 细胞中, Bax-2 mRNA 表达量增多, 并随 GSSO 浓度增加而增加, Bcl-2 在 GSSO 处理后 mRNA 表达量降低, 见图 1d。

2.2 GSSO 对 BGC823 细胞迁移的影响

2.2.1 GSSO 显著性抑制 BGC823 细胞迁移 GSSO 作用 BGC823 细胞 24 h, 随着 GSSO 浓度的增加, BGC823 细胞迁移数量逐渐减小, 表明 GSSO 可剂量依耐性地抑制细胞迁移。实验组与对照组相比, 当 GSSO 浓度达到 0.005% 时, 细胞迁移数量差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 见图 2a。

2.2.2 GSSO 抑制 VEGF、MMP2 及 MMP9 mRNA 表达而促进 TIMP-2 表达 RT-PCR 结果显示: 与对照组相比, VEGF、MMP2、MMP9 mRNA 表达量随 GSSO 浓度增加而降低, 而 TIMP-2 的表达随着 GSSO 的浓度的增加而升高, 见图 2b, 这提示, GSSO 可以抑制肿瘤细胞 BGC823 的迁移。

3 讨论

本课题的前期研究证明了灵芝孢子油具有抗肿瘤的功能^[6-8]。本研究发现灵芝孢子油可剂量依赖性抑制 BGC823 细胞增殖, 同时可显著性诱导细胞凋亡。诱导细胞凋亡的机制很多, 目前普遍认为与细胞凋亡相关分子主要有: Cys-Asp 蛋白水解酶家族、Bcl-2 基因家族、凋亡诱导因子、凋亡抑制分子等^[9-11]。Bcl-2 蛋白家族按功能分为两类, 一类具有抑制凋亡作用(如 Bcl-2), 而另一类具有促进凋亡作用(如 Bax-2)^[12]。细胞受到凋亡信号诱导时可引起 Bax-2 表达增加, Bcl-2 表达降低, 从而促进细胞凋亡。本研究发

现 BGC823 细胞经 GSSO 处理后 Bax-2 mRNA 表达量增加而 Bcl-2 mRNA 表达量下降。

MMPs 具有很强的细胞外基质降解作用, 而 TIMPs(基质金属蛋白酶抑制剂)则是 MMPs 的抑制剂, TIMPs 能特异性的与 MMPs 催化活性中心的锌离子结合, 封闭其活性^[13]。在肿瘤的迁移中

VEGF 是关键因素, 其可促进肿瘤细胞迁移浸润^[14]。通过迁移实验我们观察到灵芝孢子油可显著抑制 BGC823 细胞迁移。VEGF、MMP2 及 MMP9 mRNA 表达量下降, TIMP-2 表达上调。

综上所述, 灵芝孢子油可明显抑制 BGC823 细胞增殖、迁移, 并促进其凋亡, 能够杀伤肿瘤, 但其详细的凋亡及迁移机制还有待研究。

参考文献:

- [1] Wargovich MJ, Woods C, Hollis DM, et al. Herbs, cancer prevention and health[J]. J Nutr, 2001, 131(11 Suppl): s3034-s3036.
- [2] 冯翠萍, 程红艳, 唐兵, 等. 灵芝孢子粉中孢子油提取及生物活性的研究[J]. 食用菌学报, 2008(4), 15: 63-66.
- [3] 胡瞬, 易有金, 熊兴耀, 等. 灵芝孢子油的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 9214-9215.
- [4] 李向敏, 谢意珍, 潘鸿辉, 等. 灵芝孢子油检测标准与其抗肿瘤活性的关系[J]. 中国食用菌, 2010, 29(2): 45-47.
- [5] 袁玉芬. 灵芝孢子油抗移植性肝癌实验研究[J]. 安徽医药, 2005, 9(3): 173-174.
- [6] 林志彬, 王鹏云. 灵芝孢子及其活性成分的药理研究[J]. 北京大学学报, 2006, 38(5): 541-547.
- [7] 王筱婧, 孙莉莎, 徐江平. 灵芝孢子粉抑制人肝癌细胞生长的实验研究[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31(1): 30-33.
- [8] 李建军, 雷林生, 余传林, 等. 灵芝多糖抗肿瘤作用的免疫学相关性研究[J]. 中药学, 2007, 30(1): 71-73.
- [9] Fan TJ, Han LH, Cong RS, et al. Caspase family proteases and apoptosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2005, 37(11): 719-727.
- [10] Zou H, Li Y, Liu X, et al. An APAF-1, cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11549-11556.
- [11] Dutton A, Young LS, Murray PG. The role of cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) in the pathogenesis and treatment of cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2006, 10(1): 27-35.
- [12] 唐宇宏, 沈群. 中药有效成分诱导恶性血液肿瘤细胞凋亡的分子机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(7): 778-782.
- [13] 张智, 金艳, 元琦, 等. 肾康灵对慢性肾衰竭大鼠肾组织 MMP-2、9 及 TIMP-1、2 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(8): 714-716.
- [14] Wang FQ, So J, Reierstad S, et al. Vascular endothelial growth factor - regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and of matrix metalloproteinases[J]. Int J cancer, 2006, 118(4): 879-888.

[编辑: 黄国玲; 校对: 周永红]